(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0061935
(43) 공개일자 2015년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0146323
(22) 출원일자 2013년11월28일
심사청구일자 2013년11월28일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
에스 더블유 에이 히마야
부산광역시 남구 용소로 45,해양바이오프로세스연구단(대연동, 부경대학교)
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직동, 쌍용예가)
(74) 대리인
위병갑

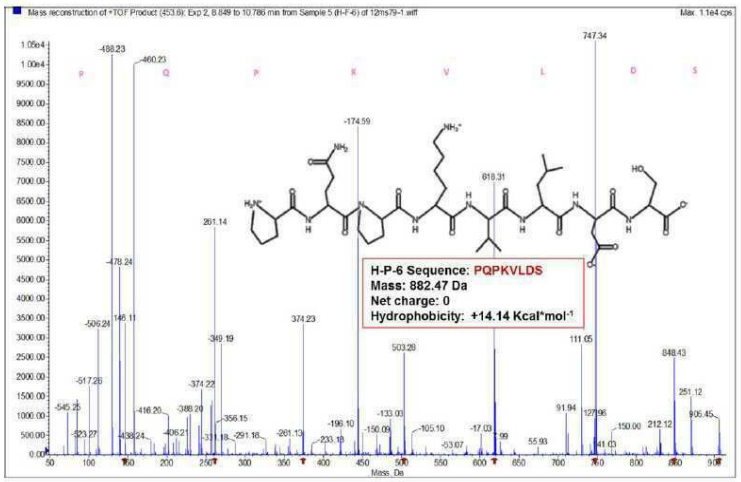
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 클라미도모나스를 미생물로 가수분해하여 수득한 활성 펩타이드를 이용하여 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 상피 세포의 증식 및 이동을 억제하는 위장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 활성 펩타이드는 헬리코박터 파이로리균에 감염되어 활성화된 EGFR에 결합하여 EGFR의 티로신 키나아제 활성을 저해함으로써 위암 상피 세포의 증식 및 이동을 효과적으로 억제할 수 있는바, 위장 질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 이용할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 CD20130113
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 해양과학기술진흥원
연구사업명 해양생명공학사업
연구과제명 해양생물 유래 생리활성물질의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2012.01.01 ~ 2013.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 클라미도모나스(*Chlamydomonas* sp.) 유래인 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 클라미도모나스를 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*) 및/또는 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 분획하여 정제한 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 펩타이드는 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 펩타이드는 C-Myc, Cyclin-D, MMP-7 및 MMP2 유전자의 발현을 억제하여 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 위 상피세포의 EGFR 활성을 억제 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 펩타이드는 EGFR과 결합하여 EGFR의 활성을 억제 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 결합은 수소 결합, 극성 결합 또는 소수성 결합인 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학

적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 EGFR의 활성은 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 활성인 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 β-카테닌(β-catenin)의 핵내 전위를 억제하는 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 위장 질환은 위암 또는 위염인 것을 특징으로 하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 13

서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 기능 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 클라미도모나스를 미생물로 가수분해하여 수득한 활성 펩타이드를 이용하여 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 상피 세포의 증식 및 이동을 억제하는 위장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 위염, 위궤양, 십이지장궤양은 스트레스, 유전적 소인, 생활습관 등의 인자가 복잡하게 얽혀서 발병하는 질병이다. 최근, 그 주요한 원인의 하나로서 헬리코박터 파이로리균(H. pylori)이 주목받고 있다. 1983년에 Warren과 Marshall이 위 생검 표본으로부터 나선상 균의 분리배양에 성공한 이래, 위염, 위궤양, 십이지장궤양 및 위암과 본 균과의 관계에 대해서 정력적으로 연구가 이루어져 왔다. 그 결과, 헬리코박터 파이로리균(H. pylori)의 감염 율은 건강한 위에서는 양성율이 약 4%인 것에 반해서, 만성 위염에서는 약 83%, 위궤양에서는 약 69%, 십이지장 궤양에서는 약 92%, 비궤양 소화불량 증후군에서는 약 51%로 고율이었다고 보고되고 있다. 또한 헬리코박터 파이로리균의 감염은 위암의 발생율에 강한 관련성이 있고, WHO의 국제암연구기관에서는 1994년에 헬리코박터 파이로리균을 인과관계가 강한 발암인자로 하고 있다.

[0003] 헬리코박터 파이로리균은 매우 다양한 변종을 나타내고 있으며, 지역, 인종, 개인에 따라서도 그 감염된 균에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 헬리코박터 파이로리균은 숙주 세포의 신호 전달 체계에 영향을 주어 병리학적으로 중요한 역할을 하는 정교한 독성 전략으로 진화되어 왔으며, 질병과 연관성이 높은 헬리코박터 파이로리균은 cag 병원성 섬(cag PAI)를 가지고 있고, cag PAI의 최종 산물인 CagA가 병원균 막을 통과하여 숙주의 위장 상피 세포로 전달하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. CagA는 휴지기의 병원균 세포막 내부에 위치하는 유형 IV 분비 기관을 통해 숙주 세포로 이동하는데, CagA는 유형 IV 분비기관에 결합하여 병원균 세포막에 있는 포스파티딜세린과 결합하고, 숙주 상피세포로 침입할 수 있게 되는 것이다. cag PAI를 포함하는 헬리코박터 파이로리균이 심한 위염, 위축성 위염, 원위부 위암의 발병과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 보고되고 있는데, CagA을 숙주 상피 세포로 주입하면, glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) 모티프의 티로신이 인산화되고, 이는 숙주 세포의 형태학적 변화를 유도하며, 이는 벌새 표현형이라고 이름지어져 있다. 이러한 변화는 세포의 이동과 관련되어 있으며, 위장 장벽의 무결성(integrity)을 손상시킬 수 있다. 또한, 인산화되지 않은 CagA도 이에 국한되지는 않으나 β-catenin 활성화, 부착 결합 복합체(adherence junction complex)의 파

괴, 세포 극성의 손실 등 위장 상피세포에 영향을 주어 병리학적으로 기여할 수 있다.

[0004] 부착 결합(Adherens junctions)은 세포와 세포 간 접촉의 유지, 세포 극성 및 전사를 조절하기 위한 핵에서의 신호 전달을 위해 요구된다. 이는 동적 구조로 구성되어 있으며, 인접한 상피 세포의 표면에 위치하고 있다. 부착 결합의 주요 구성요소로 E-cadherin, 아마딜로 단백질 패밀리 멤버인 p120-catenin (p120)과 β-catenin 및 액틴 결합 단백질인 α-catenin이 있는데, E-cadherin은 장형의 세포외 및 세포질 도메인을 가지고 있고, 이중 세포외 도메인은 동종친화적 결합을 형성하고, 세포질 도메인은 p120와 β-catenin을 포함하는 세포내 단백질들과 직접 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 수많은 연구에서 헬리코박터 파이로리균의 감염은 E-cadherin 유전자의 프로모터의 메틸화를 유도하고, 이로써 E-cadherin의 발현을 감소시킨다고 보고되고 있다. E-cadherin 기능의 상실은 위암과 관련이 있으며, E-cadherin 유전자의 프로모터의 메틸화는 헬리코박터 파이로리균을 박멸하여 되돌릴 수 있다. E-cadherin 발현을 변화시켜 부착 결합의 안정성을 줄이는 것은 헬리코박터 파이로리균이 위장 장벽 기능을 파괴하고 병의 진행을 촉진시키는 하나의 기전일 것으로 예상된다. 비인산화된 CagA는 헬리코박터 파이로리균 감염으로 부착 결합이 파괴되는 과정에서 분비되고, 균의 막으로부터 상피 세포의 세포질로 β-catenin과 p120의 이동을 개시한다. 이후 β-catenin이 세포질과 핵에 축적되면, β-catenin 의존적 유전자들이 활성화되고, 암이 발병하게 된다.

[0006] 정상적인 생리 조건하에서 β-catenin은 세포질 β-catenin glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β)에 의해 조절된다. 그러나, 위암 등의 암이 발생하면 β-catenin의 발현이 증가하고, 대장 용종증 대장균(adenomatous polyposis coli, APC)의 돌연변이, GSK-3β의 억제가 관찰되는데, 이들은 모두 세포질 내에서 β-catenin의 안정화와 관련이 있다. 헬리코박터 파이로리균이 β-catenin의 세포질 수준을 증가시키는 또 다른 기전은 EGFR/PI3K 의존적 GSK-3β의 불활성화와 CasA를 통한 막 연합 β-catenin의 직접 결합이 있다. 헬리코박터 파이로리균의 독성과 관련된 감염은 EGFR/PI3K 신호전달 경로를 활성화시키고, β-catenin의 EGFR/PI3k 의존적 핵내 전위를 촉진시킨다. EGFR 티로신 키나아제 활성과 β-catenin 의 핵내 전위는 c-Myc, cyclin D, survivn, matrix-metallo-proteinases와 같은 발암에 영향을 주는 유전자의 전사를 유도한다.

[0007] 헬리코박터 파이로리균에 감염되면 다양한 독성 요소들이 분비되고, 이들 요소는 단핵구, 대식세포, 호중구, B 세포 및 T 세포와 같은 다양한 면역 세포를 활성화시키며 침투를 자극하게 된다. 감염의 복잡성에 따라 후천성 및 선천성 면역 반응이 활성화되는데, 헬리코박터 파이로리균은 체액성 및 세포성 면역반응을 모두 유도한다. 비록, 헬리코박터 파이로리균은 비침투성 세균으로 알려져왔지만, 최근 연구에서는 생체 및 시험관 내 실험을 통하여 헬리코박터 파이로리균이 위자아 상피 세포에 침투하는 능력이 있음이 알려졌다. 또한, 위염과 위암의 발병에 있어서, 헬리코박터 파이로리균은 면역 세포와 직접적인 접촉이 있는 것으로 보고되었다.

[0008] 따라서 본 발명자들은 본 발명을 통하여 헬리코박터 파이로리균에 의해 유도되는 생체 내 분자적 기전에 대해 연구하고 이를 조절할 수 있는 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 이용하여 다양한 상기 균주 관련 질환의 치료에 활용해 보고자 시도하던 끝에 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국특허 제10-2011-0125576호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 이용하여 위장 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 클라미도모나스(*Chlamydomonas* sp.) 유래일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 클라미도모나스를 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*) 및/또는 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 분획하여 정제한 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 C-Myc, Cyclin-D, MMP-7 및 MMP2 유전자의 발현을 억제하여 위 상피세포의 증식 및 이동을 억제하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 위 상피세포의 EGFR 활성을 억제 또는 감소시키는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 EGFR과 결합하여 EGFR의 활성을 억제 또는 감소시키는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 결합은 수소 결합, 극성 결합 또는 소수성 결합일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 EGFR의 활성은 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 활성일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 β-카테닌(β-catenin)의 핵내 전위를 억제하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 위장 질환은 위암 또는 위염일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 기능 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 헬리코박터 파이로리균에 감염되어 증가되는 위 상피세포의 증식과 이동을 억제하는 효과를 가지고 있어 위장 질환 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 클라미도모나스를 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 이를 분획한 분획물의 아미노산 서열을 분석한 결과이다.

도 2는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 증식을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.

도 3은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 이동을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.

도 4는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 EGFR 인산화를 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.

도 5는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 PI3K 인산화를 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.

도 6은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 β-catenin활성화에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 7은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 세포주의 증식과 이동에 관여하는 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 8은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드와 EGFR의 티로신 키나아제 도메인의 도킹 이미지를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0028] 클라미도모나스(Chlamydomonas)는 단세포 녹조류(Chlorophyta)로서 민물, 해양, 눈, 극지 등 다양한 환경에 분포하는 진핵생물이며, 클라미도모나스는 6-8 시간의 doubling time을 가지는 미세조류로서 3-5일의 doubling time을 가지는 50% 이상의 지질 고함유 미세조류보다 증식속도가 10배 이상 빠르다. 클라미도모나스는 생리, 생화학, 분자생물학, 유전체 연구(genome project 완성되었음)가 가장 앞서 있어서 유전자 재조합이 쉽게 가능한 미세조류로서 녹색효모(Green yeast)라 불린다.

[0029] 본 발명자들은 클라미도모나스를 가수분해하여 수득한 펩타이드의 효과를 연구하였으며, 서열번호 1의 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 감염되어 증식 및 이동이 증가된 위암 상피세포의 증식 및 이동을 억제함을 알 수 있었다. 또한, 본 발명자들은 이러한 효과를 나타내는 기전에 대해 더욱 심도있게 연구한 결과, EGFR의 활성화가 헬리코박터 파이로리균에 의한 위암 상피세포의 과도한 증식과 이동을 유도하고, 서열번호 1의 펩타이드는 헬리코박터 파이로리균에 감염된 위암 상피세포의 EGFR이 활성화되는 것을 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

[0030] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 위장 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하며, 상기 펩타이드의 약제학적으로 허용가능한 염이 제공된다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약제학적으로 허용가능한 염은 염화물 염이다.

[0031] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 펩타이드 혹은 상기 펩타이드의 전구체는, 예를 들어, 박테리아(예컨대, 대장균(E.coli) 또는 고초균(Bacillus subtilis)), 곤충 세포 시스템(예컨대, 초파리(Drosophila) Sf9 세포 시스템), 효모 세포 시스템(예컨대, 사카로마이세스 세레비지에(S. cerevisiae), 에스. 사카로마이세스(S. saccharomyces)) 또는 섬유상 진균 발현 시스템, 또는 동물 세포 발현 시스템(예컨대, 포유동물 세포 발현 시스템)을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 임의의 공지된 단백질 발현 시스템에서 재조합방식으로 생산될 수 있다. 상기 펩타이드 혹은 상기 펩타이드의 전구체는 또한 화학적으로 합성될 수도 있다. 당업자에게 충분히 공지되고 또한 박테리아 이외의 단백질 발현 시스템에서의 본 명세서에 기재된 펩타이드의 미숙 및 성숙 형태 그리고 변종의 생산에 적합한 일반적인 유전적 작제물 및 방법이 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는데 이용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 화학적으로 생산될 수 있다. 펩타이드는 전통적인 BOC 혹은 FMOC 보호를 이용해서 용액 및 고상 합성을 포함하는 다수의 상이한 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 연속적인 아미노산 커플링을 이용하여 2-클로로트리틸 혹은 왕 수지(Wang resin) 상에 합성될 수 있다. 이하의 보호기가 이용될 수 있다: 플루오레닐메틸옥시카보닐 혹은 tert-뷰틸옥시카보닐(알파-아미노기, N-말단); 트리틸 혹은 tert-뷰틸(Cys의 티올기); tert-뷰틸(존재한다면, 글루탐산의 γ-카복실 및 트레오닌의 하이드록실기); 및 트리틸(존재할 경우 아스파라긴 측쇄의 β-아미드 기능 및 티로신의 페놀기). 커플링은 3차 아민의 존재 하에 DIC 및 HOBt와 함께 작용할 수 있고, 펩타이드는 칵테일(트라이플루오로아세트산 81%, 페놀 5%, 티오아니솔 5%, 1,2-에탄다이티올 25%, 물 3%, 다이메틸설파이드 2%, 요오드화 암모늄 1.5% w/w)을 이용해서 고형 담체로부터 탈보호되어 분리될 수 있다. 트라이플루오로아세트산 및 기타 휘발물의 제거 후, 유기 용매를 이용해서 펩타이드를 석출시킬 수 있다. Cys 잔기들 간의 다이설파이드 결합은 다이메틸 설폭사이드를 이용해서(Tam et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:6657-62) 또는 공기 산화 전략을 이용해서 형성될 수 있다. 얻어진 펩타이드는 역상 크로마토그래피에 의해 정제되고 동결 건조될 수 있다.

[0033] 상기 펩타이드는, 염기의 형태로 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 제조, 분리 혹은 이용될 수 있다. 염의 예로는 펩타이드의 아세트산염, 염화물염, 황산염 및 인산염을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0034] 다른 양상에 있어서, 펩타이드가, 단독으로 혹은 배합되어, 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체 혹은 매체와 조합될 수 있는 조성물이 제공된다. 펩타이드는 환자에게 투여될 경우 부작용, 알레르기 혹은 바람직하지 않은 기타 상황을 일으키지 않는 재료와 조합될 수 있다. 이용되는 담체 혹은 매체는 용매, 분산제, 코팅, 흡수 촉진제, 제어된 방출제(즉, 서방제), 및 1종 이상의 불활성 부형제(전분, 폴리올, 과립제, 극미세 셀룰로스(microfine cellulose), 미세결정형 셀룰로스(예컨대, 셀피어, 셀피어 비즈(Celphere beads)(등록상표)), 희석제, 윤활제, 결착제(binder), 붕해제 등을 포함함) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제

제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수도 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체로서 이용하기 위한 부형제 그리고 상기 추가의 성분의 예로는, 결착제, 충전제, 붕해제, 윤활제, 항미생물제 및 코팅제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "결착제"란 용어는 본 발명의 실시에 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 결착제라면 어느 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 결착제의 예로는, 전분(예컨대, 옥수수 전분, 감자 전분 및 호화 전분(pre-gelatinized starch)(예컨대, 칼라콘사(Colorcon, Ltd)에서 판매되고 있는 스타치(STARCH) 1500(등록상표) 및 스타치 1500 LM(등록상표)) 및 기타 전분), 말토덱스트린, 젤라틴, 천연 및 합성 검, 예, 아카시아, 분말화 트래거캔스, 구아검, 셀룰로스 및 그의 유도체(예컨대, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(하이프로멜로스), 에틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 카복시메틸 셀룰로스 칼슘, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 분말화 셀룰로스, 극미세 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 미국 펜실베니아주의 마르쿠스 훅시에 소재한 에프엠시 코포레이션(FMC Corporation)에서 판매되고 있는 아비셀(AVICEL)(상표명), 예컨대, 아비셀 EL-PH-101(상표명), -103(상표명) 및 -105(상표명)), 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈(예컨대, 폴리비닐 피롤리돈 K30), 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0036] 약제학적 조성물에 특히 이용될 수 있는 결착제의 예로는 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 전분, 말토덱스트린 혹은 셀룰로스 에터(예컨대, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스)를 들 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "충전제"란 용어는 본 발명의 실시에 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 충전제라면 어느 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 충전제의 예로는, 탤크, 탄산칼슘(예컨대, 과립 혹은 분말), 제2인산칼슘, 제3인산칼슘(tribasic calcium phosphate), 황산칼슘(예컨대, 과립 혹은 분말), 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 아비셀(Avicel) PH101 혹은 셀피어(Celphere) CP-305), 극미세 셀룰로스, 분말화된 셀룰로스, 덱스트레이트, 카올린, 만니톨, 규산, 솔비톨, 전분(예컨대, 스타치 1500), 호화 전분, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 아이소말트, 라피노스, 말티톨, 멜레지토스, 스타키오스, 락티톨, 팔라티니트, 자일리톨, 마이오이노시톨, 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 펩타이드를 코팅하는데 특히 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 충전제의 예로는, 탤크, 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 아비셀 PH101 혹은 셀피어 CP-305), 분말화 셀룰로스, 덱스트레이트류, 카올린, 만니톨, 규산, 솔비톨, 전분, 호화 전분, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 아이소말트, 제2인산칼슘, 라피노스, 말티톨, 멜레지노스, 스타키로스, 락티톨, 팔라티나이트, 자일리톨, 만니톨, 마이오이노시톨(myoinositol) 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "첨가제"란 용어는 약제학적으로 허용가능한 첨가제이면 어떠한 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는, 붕해제, 분산 첨가제, 윤활제, 활택제, 항산화제, 코팅 첨가제, 희석제, 계면활성제, 향미 첨가제, 보습제, 흡수 촉진 첨가제, 제어된 방출 첨가제, 응결 방지 첨가제, 항미생물제(예컨대, 방부제), 착색제, 건조제, 가소화제 및 염료를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "부형제"는 약제학적으로 허용가능한 첨가제, 충전제, 결착제 혹은 제제이면 어느 것이라도 가능하다.

[0041] 본 발명의 조성은 기타 치료제 성분, 응결방지제(anti-caking agent), 방부제, 감미제, 착색제, 향미료, 건조제, 가소제, 염료, 활택제, 부착방지제, 대전방지제, 계면활성제(습윤제), 항산화제, 필름 코팅제 등을 임의선택적으로 포함할 수도 있다. 임의의 이러한 임의선택적 성분은 제형의 안정성을 보증하기 위하여 본 명세서에 기재된 화합물과 상용성이어야만 한다. 상기 조성물은 필요에 따라 기타 첨가제, 예를 들어, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 라피노스, 말티톨, 멜레지토스, 스타키오스, 락티톨, 팔라티니트, 전분, 자일리톨, 만니톨, 마이오이노시톨 등, 및 이들의 수화물, 그리고 아미노산류, 예를 들어, 알라닌, 글라이신 및 베타인, 및 펩타이드류 및 단백질류, 예를 들어, 알부민을 함유할 수 있다.

[0042] 상기 조성물은, 예를 들어, 추가의 용매, 분산제, 코팅제, 흡수 촉진 첨가제, 제어된 방출 첨가제 및 1종 이상의 불활성 첨가제(예를 들어, 전분, 폴리올, 과립화 첨가제, 미세결정성 셀룰로스, 희석제, 윤활제, 결착제, 붕

해 첨가제 등) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수 있다. 조성물은, 또한 예를 들어, 응결 방지 첨가제, 방부제, 감미 첨가제, 착색제, 향미료, 건조제, 가소제, 염료 등을 포함할 수 있다.

[0043] 적절한 붕해제로는, 예를 들어, 한천(agar-agar), 탄산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 크로스카멜로스 나트륨, 크로스포비돈, 포비돈, 폴라크릴린 칼륨, 전분 글라이콜산 나트륨, 감자 혹은 타피오카 전분, 기타 전분, 호화 전분, 점토, 기타 알긴류, 기타 셀룰로스, 검 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0044] 적절한 윤활제로는, 예를 들어, 스테아르산 칼슘, 스테아르산 마그네슘, 광유, 경광유(light mineral oil), 글라이세린, 솔비톨, 만니톨, 폴리에틸렌 글라이콜, 기타 글라이콜류, 스테아르산, 라우릴황산나트륨, 탤크, 식물성 경화유(hydrogenated vegetable oil)(예컨대, 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 대두유), 스테아르산 아연, 올레산 에틸, 라우르산 에틸, 한천, 실로이드(syloid) 실리카겔(AEROSIL 200, W.R.Grace Co., 미국 매릴랜드주의 볼티모어시에 소재), 합성 실리카의 응고 에어로졸(Evonik Degussa Co., 미국 텍사스주의 피아노시에 소재), 발열성 이산화규소(CAB-O-SIL, Cabot Co., 미국 매사추세츠주의 보스톤시에 소재), 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0045] 적절한 활택제로는, 예를 들어, 류신, 콜로이드성 이산화규소, 삼규산마그네슘(magnesium Trisilicate), 분말화 셀룰로스, 전분, 탤크 및 제3인산칼슘을 들 수 있다.

[0046] 적절한 응결방지 첨가제로는, 예를 들어, 규산 칼슘, 규산 마그네슘, 이산화규소, 콜로이드성 이산화규소, 탤크, 및 이들의 혼합물을 들 수 있다

[0047] 예컨대, 퀩타이드 조성물용의 방부제로서 이용될 수 있는 적절한 항미생물 첨가제로는, 예를 들어, 염화벤즈알코늄, 염화벤즈에토늄, 벤조산, 벤질알코올, 뷰틸파라벤, 염화세틸피리디늄, 크레졸, 클로로뷰탄올, 데하이드로아세트산, 에틸파라벤, 메틸파라벤, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페녹시에탄올, 아세트산 페닐수은산(phenylmercuric acetate), 질산 페닐수은산(phenylmercuric nitrate), 소르브산 칼륨, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨, 데하이드로아세트산 나트륨, 프로피온산 나트륨, 소르브산, 티메졸, 티모(thymo) 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0048] 적절한 항산화제로는, 예를 들어, BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), 비타민 E, 프로필 갈레이트, 아스코르브산 및 그의 염 혹은 에스터, 토코페롤 및 그의 에스터, 알파-리포산 및 베타-리포산을 들 수 있다.

[0049] 적절한 코팅 첨가제로는, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 약제학적 글레이즈, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스 프탈레이트, 메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 셸락(shellac), 수크로스, 이산화티탄, 카르나우바 왁스, 미세결정성 왁스 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 적절한 보호 코팅으로는 아쿠아코트(Aquacoat)(예컨대, 아쿠아코트 에틸셀룰로스 수성 분산제, 15% w/w, FMC 바이오폴리머, ECD-30), 유드라지트(Eudragit)(예컨대, 유드라지트 E PO PE-EL, 로엠 파마 폴리머스(Roehm PharmaPolymers)) 및 오파드리(Opadry)(예컨대, 오파드리 AMB 분산제, 20% w/w, 칼라콘사 제품)를 들 수 있다.

[0050] 소정의 실시형태에서, 퀩타이드 조성물용의 적절한 첨가제로는 수크로스, 탤크, 스테아르산 마그네슘, 크로스포비돈 혹은 BHA의 1종 이상을 들 수 있다.

[0051] 본 발명의 조성물은 또한 이하의 것들을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌 기타 부형제, 제제 및 그의 카테고리를 포함할 수 있다: L-히스티딘, 플루로닌(Pluronic)(등록상표), 폴록사머(Poloxamer)(예컨대 루트롤(Lutrol)(등록상표) 및 폴록사머 188), 아스코르브산, 글루타티온, 침투성 증강제(예컨대, 지질, 콜산 나트륨, 아실카르니틴, 살리실레이트류, 혼합 담즙염, 지방산 마이셀류, 킬레이터, 지방산, 계면활성제, 중간쇄 글라이세라이드류), 프로테아제 억제제(예컨대, 대두 트립신 억제제, 유기산), pH-강하제 및 생활성을 촉진시키는데 유효한 흡수 증강제(미국 특허 제6,086,918호 및 제5,912,014호에 기재된 것들을 들 수 있지만 이들로 제한되는 것은 아님), 씹을 수 있는 정제용 재료(예컨대, 덱스트로스, 프럭토스, 락토스 1수화물, 락토스 및 아스파탐, 락토스 및 셀룰로스, 말토덱스트린, 말토스, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스 및 구아검, 솔비톨 결정체 등); 비경구제(예컨대, 만니톨 및 포비돈 등); 가소제(예컨대, 세바스산 다이뷰틸, 코팅용 가소제, 폴리비닐아세테이트 프탈레이트); 분말 윤활제(예컨대, 베헨산 글라이세릴 등); 연성 젤라틴 캡슐(예컨대, 솔비톨 특수 용액 등);코팅용 구형체(예컨대, 구형 당(sugar sphere)); 구형화제(spheronization agent)(예컨대, 베헨산 글라이세릴 및 미세결정성 셀룰로스); 현탁/겔화제(예컨대, 카라기난, 젤란검, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스, 포비돈, 전분 글

라이콜산 나트륨, 잔탄검); 감미료(예컨대, 아스파탐, 아스파탐과 락토스, 덱스트로스, 프럭토스, 꿀, 말토덱스트린, 말토스, 만니톨, 당밀(molasses), 솔비톨 결정체, 솔비톨 특수 용액, 수크로스); 습식 과립제(예컨대, 탄산칼슘, 무수 락토스, 락토스 1수화물, 말토덱스트린, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스, 포비돈, 전분), 카라멜, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 체리 크림향 및 체리향, 무수 구연산, 구연산, 가루 백당, D&C 적색 제33호, D&C 황색 제10호 알루미늄 레이크(Aluminum Lake), 에데트산 이나트륨, 에틸 알코올 15%, FD& C 황색 제6호 알루미늄 레이크, FD&C 청색 제1호 알루미늄 레이크, FD&C 청색 제1호, FD&C 청색 제2호 알루미늄 레이크, FD&C 녹색 제3호, FD&C 적색 제40호, FD&C 황색 제6호 알루미늄 레이크, FD&C 황색 제6호, FD&C 황색 제10호, 글라이세롤 팔미토스테아레이트, 글라이세릴 모노스테아레이트, 인디고 카민, 레시틴, 만니톨, 메틸 및 프로필 파라벤, 모노 암모늄 글라이시리지네이트, 천연 및 인공 오렌지향, 약제학적 글레이즈, 폴록사머 188, 폴리덱스트로스, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리비돈, 호화 옥수수 전분, 호화 전분, 적색 산화철, 사카린 나트륨, 나트륨 카복시메틸 에터, 염화나트륨, 구연산 나트륨, 인산나트륨, 딸기향, 합성 흑색 산화철, 합성 적색 산화철, 이산화티탄 및 백랍(white wax).

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 위장 질환은 만성 소화장애, 점막염, 속쓰림, 역류성 식도질환, 십이지장 또는 위 구양, 위염, 위암일 수 있다.

[0053] 본 명세서에 기재된 펩타이드 및 효능제는 위장 장애와 연관된 내장 통증 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 장애와 연관된 통증의 치료, 예방 혹은 저감을 위하여 단독으로 혹은 병용 요법으로 이용될 수 있다.

[0054] 상기 '치료하는'이란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 '치료'란 용어는 '치료하는' 이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 위장 질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0055] (1) 위장 질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,

[0056] (2) 위장 질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,

[0057] (3) 위장 질환을 경감시킴.

[0058] (4) 위장 질환의 재발을 예방함, 및

[0059] (5) 위장 질환의 증상을 완화함(palliating)

[0060] 본 발명에 따른 위장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 장 질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0061] 본 발명에 따른 펩타이드의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 장 질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0062] 또한, 상기에서 “약학적으로 허용되는”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0063] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에 따른 위장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 위장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 장 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0065] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품용 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물은 위장 질환 증상의 개선 또는 예방에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0066] 본원에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람

직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0067] 본원발명에 따른 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로,본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 캔디류,쵸코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0068] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 본원발명에서 상기음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 장 질환 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0070] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 위장 질환 증상의 개선 또는 예방을 위한 식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0071] 본원발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나,건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에 는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0073] **<실시예 1>**

[0074] **실험준비**

[0075] **1-1. 재료준비**

[0076] 해양 녹조류인 클라미도모나스(*Chlamydomonas sp.*(strain c-104))는 한국 해양 미생물 조류 은행(KMMCC)로부터 수득하였으며, 표준 F/2 Guillard's meduium을 이용하여 배양하였다. 한편, 가수분해용 미생물인 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*, KCTC 3014)와 캔디다 유틸러스(*Candida utilis*, KCCM 50045)는 각각 미생물자원센터 및 한국미생물보존센터에서 수득하였으며, 이들 미생물을 배양하기 위한 영양 한천 및 YM 한천은 BD Difco™(NJ, USA)로부터 구입하였다. 또한, 동물 세포주인 장의 신경교 세포(EGC/PK050399egrf), 소장 상피세포(IEC-6), 위의 상피 세포(AGS) 및 대식세포(RAW 264.7)는 ATCC로부터 수득하였고, 이들 세포 배양용 배지 및 FBS는 Lonza(Basel, Switzerland)에서 구입하였다.

[0077] 세포배양용 배지인 RPMI 1640, FBS, streptomycin, penicillin 및 0.5% 트립신/0.53mM EDTA는 Lonza(Basel,

Switzerland)로부터 구입하였다. Gentamycin, clarithromycin, MTT 시약[(3-(3,4-dimethyl-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide)], 소 알부민, Triton™ X-100, RIPA buffer, tri reagent®은 Sigma Chemical Co.(Saint Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 화학물질과 시약은 분석용 최상 등급의 제품을 구입하여 사용하였다.

[0078] **1-2. 클라미도모나스의 생장 조건 수립**

[0079] 클라미도모나스의 최적의 생장 조건을 알기 위하여 250ml 플라스크에 100ml의 F/2 배지를 담고 클라미도모나스를 접종한 후, 온도(15, 20, 25, 30, 35 ℃), 광도(50, 100, 150, 200, 250 μmol/m^2s), 배양 시간(0, 3.5, 7, 10.5, 14일)을 변수로 하여 3회 반복 실험을 통해 최적의 생장 조건을 수립하였다.

[0080] 그 결과, 하기 표 1에 도시된 조건이 클라미도모나스의 대량 생산에 가장 적합한 조건임을 확인할 수 있었다.

표 1

Variable	Optimal conditions
Temperature (X_1)	29.03 °C
Light intensity (X_2)	164.2 μmol$m^{-2}s^{-1}$
Time (X_3)	11.3 days

The pH and salinity was maintained at 8 and 33‰, respectively during the condition optimization

[0081]

[0082] **1-3. 클라미도모나스의 대량 생산 및 동결 건조**

[0083] 클라미도모나스의 대량 생산은 상기 실시예 2에서 결정된 최적 조건에서 실시하였다. 초기 배양은 5L 폴리카보네이트 병에서 시작하여 20L 배양으로 확대하고 10주 안에 최종 100L 배양으로 확대하였다. 이 때 염분 유지를 위하여 플라스크 내로 정기적으로 증류수를 첨가하였고 계속적으로 공기를 투과시켰다. 세포 밀도가 10^{10}cells/ml에 도달하였을 때 배양을 멈추고 클라미도모나스를 원심분리기를 이용하여 10000 rpm으로 원심분리하였다. 한편 침전된 클라미도모나스 주위의 염분을 제거하기 위하여 상기 침전물에 증류수를 넣고 다시 한번 원심분리하고 즉시 -70℃로 동결건조하였다. 이 후 동결건조된 클라미도모나스는 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0084] **1-4. 통계분석**

[0085] 본 발명에 있어서 모든 데이터는 별도의 언급이 없는 한 독립된 3번의 실험에서 얻어진 평균±표준편차로 나타내었으며, 다른 처리군간의 통계 비교는 SPSS 프로그램(version 12.0)과 함께 ANOVA 기법에 의해 분석하였다. 또한, $p<0.05$ 이하의 값에 대해서만 유의한 것으로 판단하였다.

[0086] **<실시예 2>**

[0087] **클라미도모나스 가수분해 및 활성 펩타이드 분리**

[0088] **2-1. 가수분해용 미생물 배양**

[0089] 클라미도모나스의 가수분해에 사용할 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)는 각각 상기 미생물 특이적인 성장 배지 영양 한천(grwoth media nutrient agra) 및 효모와 곰팡이 한

천(yeast and mold agar)에서 배양하였다. 즉, 상기 배지는 멸균 후 플레이트에 넣어 굳히고, 굳혀진 한천 위에 상기 균주를 스트리킹하여 37℃에서 3일간 배양하였다. 성장 곡선의 로그기(log phase)에 있는 미생물을 레플리카(replica)한 후, $1cm^2$ 조각으로 잘라 각 미생물마다 총 5 조각을 준비하여, 클라미도모나스에 접종하였다.

[0090] **2-2. 클라미도모나스 세포벽 분해**

[0091] 상기 가수분해용 미생물을 이용한 가수분해에 앞서, 클라미노모나스의 세포 벽을 분해하였다. 우선 상기 동결건조된 클라미도모나스 50g을 절굿공이를 이용하여 분쇄하고 갈아 증류수와 혼합한 후, 증류수를 이용하여 고체비율이 5%가 되도록 1L 용액을 만들었다. 상기 용액의 pH를 6으로 맞추고, 55℃까지 가열한 후, 세포벽 분해 효소인 termamyl 120L(0.01% v/w)을 첨가하고 동일 온도에서 교반하며 2시간 동안 가수분해하였다. 이 후 혼합액을 121℃, 15 psi로 10분간 가압멸균처리한 후 냉각하고 미생물 접종에 앞서 1시간 동안 초음파를 처리하여 추가 분해하였다.

[0092] **2-3. 미생물을 이용한 가수분해 조건 설정**

[0093] 상기 실시예 2-2에서 일부 가수분해된 클라미도모나스를 추가 가수분해하기 위하여 상기 실시예 2-1에서 배양한 미생물을 접종하고, 교반 배양기(Dongwon scientific, Korea)을 이용하여 100rpm, 37℃에서 12~72시간 배양하였다. 가수분해물은 6000g에서 30분간 원심분리하고, 그 상청액을 동결건조하였다.

[0094] 각 조건에서 가수분해된 가수분해물의 단백질 함량을 비교한 결과, 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)을 혼합하여 36시간 동안 가수분해한 경우 가장 높은 단백질 함량을 나타내는 것으로 나타났으며, 따라서, 본 발명자들은 상기 조건을 클라미도모나스를 가수분해하는 최적 조건으로 설정하였다.

[0095] **2-4. 이온 교환 크로마토그래피를 이용한 분리**

[0096] 상기 가수분해물은 HiPrep 16/1- 디에틸아미노에틸 고속 유량(DEAE FF) 이온 교환 컬럼 상의 FPLC(AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)을 이용하여 정제하였다. 즉, 상기 가수분해물을 20mM sodium acetate buffer(pH 4.0)으로 평형화된 HiPrep™ 16/10 DEAE FF 이온 교환 컬럼 상에 로딩하고, 유속 2mL/min으로 동일 버퍼 상에서 NaCl(0-2M)의 선형 구배로 분리하였다. 각 분획(4mL)은 280nm에서 모니터링하고, 감압하에 동결건조한 후, 생활성을 조사하였다. 이후, 높은 생활성을 가지는 비독성 분획은 순수 펩타이드를 수득하기 위하여 추가로 HPLC 정제하였다.

[0097] 상기 이온 교환 크로마토그래피로 분리된 분획은 유속 1mL/min으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함하는 아세토니트릴(0~30% 또는 0~40% in 30 min)의 선형 구배로 YMC pack pro C18(4.6×250mmI.D., YMC Co., Ltd) 상의 역상 HPLC(RP-HPLC, Dionex ultimate 3000 Korea, Lts., Sunnyvale, CA)를 이용하여 추가 정제하였다. 분리된 피크는 280nm에서 관찰하였고, 수집된 분획물을 회전 농축기를 이용하여 농축하였다.

[0098] **2-5. 아미노산 서열 분석**

[0099] 정제 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열은 전기분무 이온화(ESI) 소스와 결합된 혼성 Q-TOF LC/MS/MS 질량 분석기(AB Sciex Instruments, Foster City, CA)를이용하여 분석하였다. 이를 위하여 정제된 펩타이드는 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해한 후 전자분무 소스에 넣고 이중 대전된 $(M+2H)^{2+}$ 상태에서 질량분석기로 분석하였다. 분자량을 결정한 후, 펩타이드를 단편화하고 이온 분무 전압(IS)은 5.5kV, 커튼 가스(CUR)는 30 units으로 설정하고 Denovo sequencing progrma(AB Sciex Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 서열분석하였다.

[0100] 그 결과, 여섯번째 분획물에서 의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 수득할 수 있었다(도 1 참조).

표 2

[0101]

NO.	아미노산 서열	
서열번호 1	PQPKVLDS	클라미도모나스 가수분해 6번째 분획물

[0102] **<실시예 3>**

[0103] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 위암 세포주 증식 억제 효과**

[0104] 헬리코박터 파이로리균은 위암 세포주의 증식율을 현저히 증가시킬 수 있다고 보고된바 있다. 일반적으로 헬리코박터 파이로리균에 의해 매개되는 위암 세포주의 증식은 위암 발병의 마커로 인식되고 있는데, 본 발명자들은 상기 펩타이드가 이러한 위암 세포주의 증식을 억제할 수 있는지 확인해 보았다.

[0105] 이를 위하여 AGS 위암 상피 세포주는 ATCC(MD, USA)로부터 구입하였고, 10% FBS로 보충된 RPMI1640 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 세포 증식은 MTT assay로 분석하였다. 우선, 24 웰 플레이트에 세포를 항생제를 함유하지 않는 배지를 이용하여 1×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후, 신선한 배지로 교체하면서 클라미도모나스 속 유래 펩타이드(25, 50, 100μM)를 처리하였다. 한 시간 배양 후 ATCC에서 구입한 cag+ 헬리코박터 파이로리균 43504를 20 MOI 감염시켰다. 감염 6시간 후 세포를 무혈청, 무항생제 배지를 이용하여 세척하였고, 신선한 배지로 교체하여 24시간 동안 추가적으로 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고, MTT 용액(1mg/ml)을 500㎕ 추가한 후 4시간 동안 반응시켰다. 각 웰에서 MTT 용액을 제거하고, 이 후, 형성된 formazan crystals을 용해하기 위하여 500 μl 의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하였다. 광학밀도는 ultraviolet (UV) microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)를 이용하여 540nm에서 측정하였다. 상대적인 위암 세포주의 증식율은 대조군과 비교하여 측정하였고, 3번 이상의 독립된 실험의 평균치로 결과를 도시하였다.

[0106] 그 결과, 본 발명에 의한 클라미도모나스 유래의 펩타이드에 의해 헬리코박터 파이로리균에 의해 유도되는 위암 세포주의 증식을 농도 의존적으로 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다(도 2 참조).

[0107] **<실시예 4>**

[0108] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 위암 세포주 이동 억제 효과**

[0109] 헬리코박터 파이로리 균은 발암 신호 전달 경로를 자극하고 세포 극성을 감소시켜 세포 이동을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 세포 극성이 감소한 세포는 온전한 위암 세포주에 비해 용이하게 세포 이동이 가능하다. 상피 세포 이동은 세포 증식률과 마찬가지로 발암 마커로 활용할 수 있는데, 이에 본 발명자들은 헬리코박터 파이로리균이 감염된 위암 상피 세포의 이동을 본 발명에 의한 펩타이드가 효과적으로 억제하는지 확인해 보았다.

[0110] 이를 위하여 위암 상피 세포주에 펩타이드(25, 50, 100μM)를 처리하여 한 시간 배양 후 cag+ 헬리코박터 파이로리균 43504를 20 MOI 감염시킨 후 6시간 동안 배양하고, 신선한 배지로 교체하여 24시간 동안 추가배양하였다. 세포 이동은 Radius™ 24-well cell migration kit(Catalog No. CBA-123, Cell bio labs, Inc)를 이용하여 제조자의 방식에 따라 분석해 보았다.

[0111] 그 결과, 헬리코박터 파이로리 균으로 감염된 세포에서는 세포 이동에 의해 내부 원형 공간이 완전히 채워졌으나, 본 발명에 의한 펩타이드를 처리한 경우에는 농도 의존적으로 세포이동이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0112] **<실시예 5>**

[0113] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 위암 세포주의 EGFR 발현에 미치는 효과**

[0114] 헬리코박터 파이로리균에 감염된 상피 세포가 과도하게 증식하고 암이 발병하는 주요 기전 중 하나가 EGRF 티로신 키나아제의 활성화라는 연구 결과가 보고된 바 있다. 이는 헬리코박터 파이로리균으로부터 분비된 CagA 단백질이 EGFR의 발현을 증가시키기 때문인데, 본 발명자들은 본 발명에 의한 펩타이드가 이러한 EGFR의 발현을 억

제할 수 있는지 조사해 보았다.

[0115] 이를 위하여, 위암 상피 세포주에 펩타이드(25, 50, 100㎛)를 처리하여 한 시간 배양 후 cag+ 헬리코박터 파이로리균 43504를 20 MOI 감염시킨 후 6시간 동안 배양하고, 신선한 배지로 교체하여 24시간 동안 추가배양하였다. 이후, 세포를 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% legepal CA-630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate를 포함하는 RIPA 버퍼(Sigma)를 이용하여 얼음에서 5분간 방치하여 용해하였다. 세포 잔해는 원심분리기를 이용하여 제거하고 상청액을 신속하게 동결하였다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific)를 이용하여 측정하였고, 세포 용해물(단백질 20 ㎍)을 SDS-PAG 겔 전기영동으로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인을 5% BSA로 2시간 동안 상온에서 블라킹하고 항체를 이용하여 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 이후, 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응시키고, chemiluminescent ECL assay kit (Amersham Pharmacia Biosciences) 로 an LAS3000 ® Luminescent image analyser 를 이용하여 밴드를 확인하고 단백질 발현은 Multi Gauge V3.0 software (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)로 정량화하였다.

[0116] 그 결과, 헬리코박터 파이로리균을 감염시킨 경우 위암 상피세포에서의 활성화된 EGFR 수치가 증가한 것으로 나타났다. 그러나, 클라미도모나스 유래의 펩타이드를 처리한 경우에는 처리 농도에 의존적으로 EGFR 수치가 감소하는 것으로 나타났으며, 이러한 수치는 EGFR 특이적 저해제인 AG1487에 유사한 수준으로 확인되었다(도 4 참조). 상기와 같은 결과를 통하여 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 위암 세포주의 증식을 억제하는 효과가 EGFR의 활성화를 저해함으로써 유도된다는 것을 알 수 있었다.

[0117] **<실시예 6>**

[0118] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 PI3K 및 Akt 활성화에 미치는 영향**

[0119] EGFR이 활성화되면 세포 증식과 관련된 유전자에 영향을 미치기 때문에, 본 발명자들은 본 발명에 의한 펩타이드가 EGFR 하위 단계 신호 전달 물질에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다.

[0120] 이를 위하여 위암 상피 세포주에 펩타이드(25, 50, 100㎛)를 처리하여 한 시간 배양 후 cag+ 헬리코박터 파이로리균 43504를 20 MOI 감염시킨 후 6시간 동안 배양하고, 신선한 배지로 교체하여 24시간 동안 추가배양하였다. 이후, 상기 실시예 5에 기재된 방식과 동일하게 웨스턴 블라팅을 통하여 p-PI3K, p-Akt, GSK3/β를 확인해 보았다.

[0121] 그 결과, 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 PI3K와 Akt의 인산화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0122] **<실시예 7>**

[0123] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 β-catenin 핵내 이동에 미치는 영향**

[0124] β-catenin의 핵내 이동에 본 발명에 의한 펩타이드가 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보기 위하여 상기 실시예 5에 기재된 방식에 따라 웨스턴 블라팅을 실시하였다. 핵내 단백질과 세포질의 단백질을 분리하기 위하여 Nuclear/Cytosol fractionation kit(Bio Vision)를 사용하였다.

[0125] 또한, 이를 보다 명확히 하기 위하여 면역세포화학법을 실시하였다. 이를 위하여 세포를 poly D-lysine 코팅된 커버 슬립에서 배양하고, 펩타이드 또는 저해제를 4시간 동안 처리한 후, 헬리코박터 파이로리 균을 6시간 동안 감염시켰다. 이후, 커버 슬립을 세척하고, 4 % paraformaldehyde으로 10분간 고정시켰으며, PBS로 다시 세척하였다. 세포는 0.1% tween 20으로 10분간 투과성을 높여주고, 1% cell culture grade bovine serum albumins으로 상온에서 1시간 동안 처리하여 블라킹하였다. 이후, 세포를 1차 항체(1:300 희석)으로 4℃에서 밤새 반응시키고, anti-goat secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 or 555 (1:1000 희석) (Santa cruz)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역-염색된 세포는 DAPI (4′,6-Diamindino-2-phenylindole)로 추가 염색하고, fluoro-shield mounting media (Sigma)로 마운팅하였으며, 현광현미경(CTR 6000 Leica, Germany)으로 관찰하였다.

[0126] 그 결과, 헬리코박터 파이로리 균에 의해 핵 내에서 증가된 β-catenin의 양이 본 발명에 의한 펩타이드를 처리하자 핵에서 감소하고 세포질에서 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 면역 형광 염색법에 의해서도 확인

할 수 있었는데, 녹색 형광으로 표지된 β-catenin이 대조군에서는 핵내에서 적게 확인되었으나, 헬리코박터 파이로리에 감염된 경우 현저하게 증가하여, 헬리코박터 파이로리균이 β-catenin의 핵내 이동을 촉진하는 것을 알 수 있었다. 그러나, 클라미도모나스 유래 펩타이드를 처리한 경우 핵내에서 증가했던 β-catenin이 다시 세포질에서 증가하는 양상을 나타내어, 본 발명에 의한 펩타이드가 헬리코박터 파이로리균에 의해 유도된 β-catenin의 핵내 이동을 저해하는 효과를 발휘함을 알 수 있었다(도 6 참조).

[0127] **<실시예 8>**

[0128] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 위암 세포주 증식 및 이동에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향**

[0129] 본 발명자들은 헬리코박터 파이로리 균에 의한 EGFR 활성화와 관련하여 위암 세포주의 증식 및 이동에 관련된 유전자 발현이 어떻게 변화하는지 및 본 발명에 의한 펩타이드가 상기 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다.

[0130] 이를 위하여 위암 상피세포를 10cm 배양 접시에서 배양한 후, 배양 접시의 70%를 차지할 때 각 샘플을 4시간 동나 처리하고, 이후 헬리코박터 파이로리균을 6시간 동안 감염시켰다. 총 RAN는 Trizol 시약으로 용해하고, 클로로포름을 5:1 비율로 첨가한 후 100 rcf로 15분간 4℃에서 원심분리하였다. 분리된 상청액을 이소프로판올을 1:1 비율로 첨가하여 9300 rcf로 10분 동안 원심분리하여 생성된 RNA 침전물은 75% 에탄올 세척하고, diethyl pyrocarbonate-treated RNAase free water로 용해하였다. RNA 양은 micro-plate reader (Tecan Austria GmbH)로 260nm에서 정량하였고, 추출된 총 RNA(2μg)는 Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI)를 이용하여 단일 가닥 cDNA를 합성하였다. cDNA는 하기 표 3에 기재된 프라이머로 증폭시켰다. 증폭 주기는 프라이 특이적 어닐링 온도에 따라 조절하였으며, PCR 산물은 1.5% 아가로오스 겔을 이용하여 TAE 버퍼로 100V에서 30분간 전기영동한 후 EtBr 염색하여 AlphaEase® gel image-analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)로 관찰하였다.

[0131] 그 결과, 세포 증식과 이동에 관여하는 c-Myc, cyclin D, MMP-7, MMP-2의 mRNA가 헬리코박터 파이로리균 처리에 의해 증가하였으며, 이에 대해 활성 펩타이드를 처리한 경우 상기 유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 활성 펩타이드 처리시 유전자 발현양은 EGFR 저해제를 처리한 것과 유사한 수준으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 7 참조).

[0132] **<실시예 9>**

[0133] **클라미도모나스 유래 활성 펩타이드와 EGFR의 결합 위치 분석**

[0134] 본 발명자들은 EGFR 키나아제에 본 발명에 의한 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 직접적으로 결합할 수 있는지 Docking calculation을 통하여 확인해 보았다.

[0135] Docking calculation은 DockingServer(Bikadi and Hazai, 2009)를 이용하여 분석하였다. MMFF94 force field(Halgren, 1998)는 DockingServer를 이용한 리간드 분자의 에너지 최소화를 위하여 사용되었다. Gasteiger partial charges를 리간드 원자들에 추가하였고, 무극성 수소 원자를 융합하고, 회전 가능한 결합을 결정하였다. Docking calculation을 이용하여 EGFR의 2JIV 단백질 모델을 분석하였다. 필수적인 수소 원자, Kollman 융합 원자 유형 전하, 용매화 척도는 AutoDock tools(Morris et al, 1998)로 분서가였다. 20×20×20 Å 격자 포인트와 0.375Å 공간을 갖는 Affinity (grid) maps는 Autogrid program(Morris et al, 1998)을 이용하여 도출하였다. AutoDock parameter set-와 distance-dependent dielectric functions는 각각 Van der Waals 식과 정전기의 항으로 계산하였다. Docking 시뮬레이션은 Lamarckian genetic algorithm(LGA)와 Solis&Wets local search method(Solis and Wets, 1981)을 이용하여 수행하였다. 리간드 분자의 최초 위치, 방향, 비틀림은 임의로 세팅하였다 각 docking 실험은 10개의 다른 시도에서 최대 250000 에너지 평가 후 종결되도록 설정되었다. 군집의 크기는 150으로 설정되었다. 실험 동안, translational step은 0.2Å, quanternion과 torsion step은 각각 5로 적용하였다.

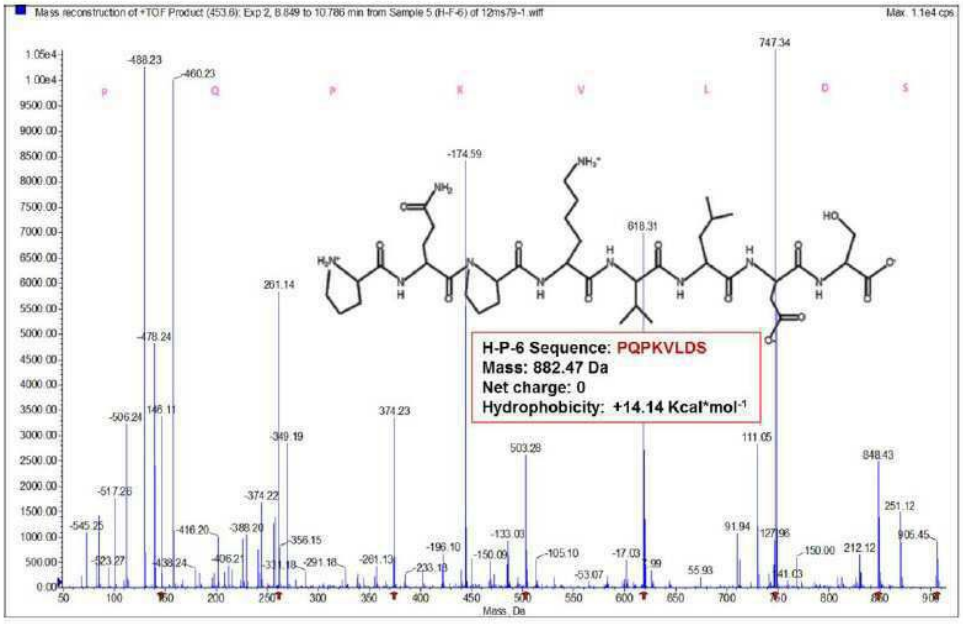
[0136] 그 결과, 본 발명의 펩타이드는 EGFR과 수소 결합, 극성 결합, 소수성 결합에 의해 EGFR의 키나아제 도메인과 결합하는 것으로 나타났으며, 결합에너지는 -4.91kcal/mol로 계산되었다. 본 발명에 의한 펩타이드는 EGFR 키나아제 도메인의 Hinge 부위, P-loop, C-helix와 활성화 루프와 결합하는 것으로 나타났다(도 8 참조). 상기와 같은 실험결과를 통하여 본 발명자들은 본 발명에 의한 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드가 EGFR 티로신 키나

아제 도메인에 결합하여 티로신 키나아제 활성을 저해함으로써 헬리코박터 파이로리 균에 의해 유도되는 위암 상피 세포의 증식 및 이동을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

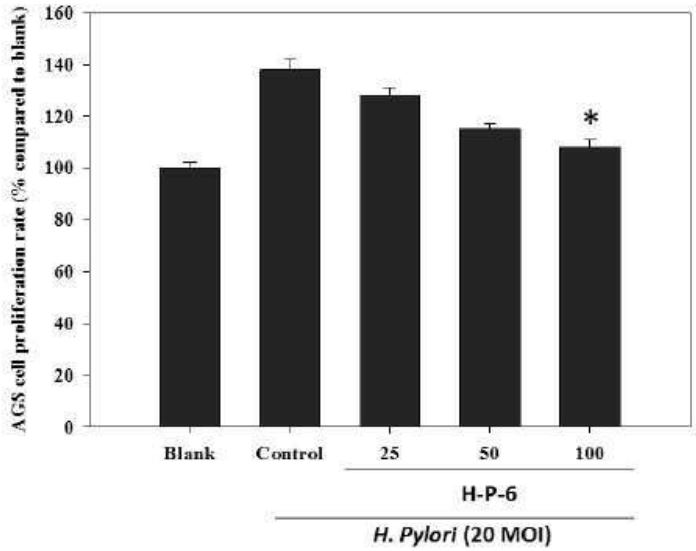
[0137] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

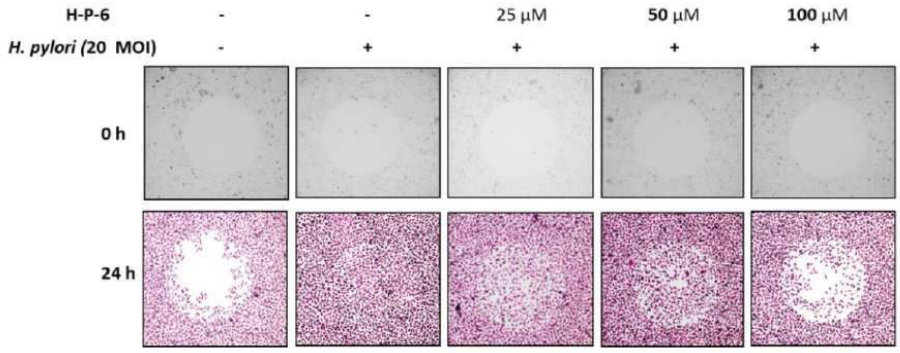
도면1



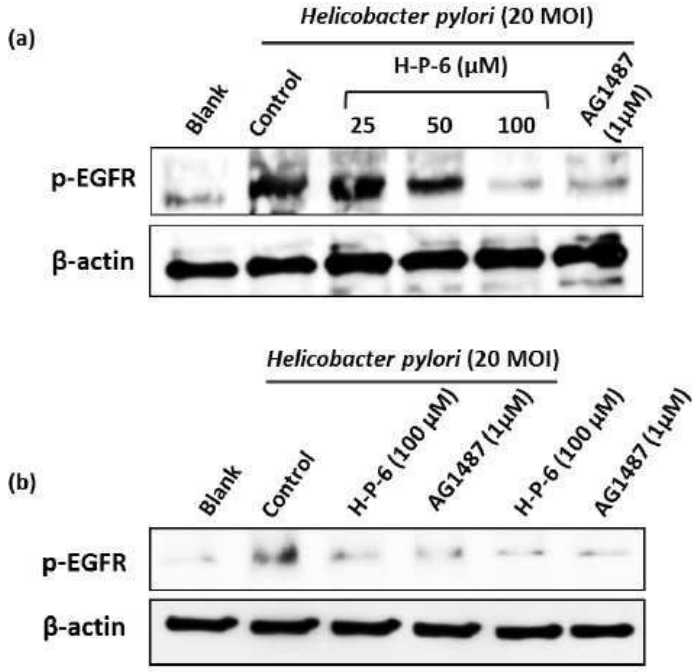
도면2


AGS cell proliferation rate (% compared to blank)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
Blank
Control
25
50
100
H-P-6
H. Pylori (20 MOI)

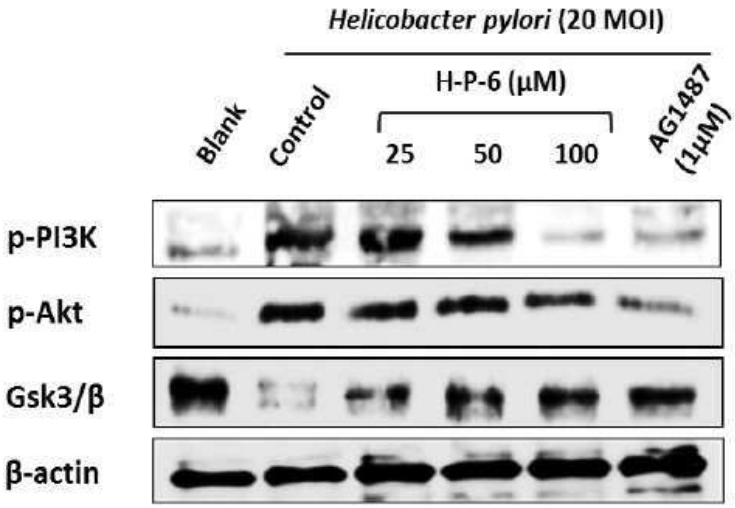
도면3


H-P-6
-
-
25 μM
50 μM
100 μM
H. pylori (20 MOI)
-
+
+
+
+
0 h
24 h

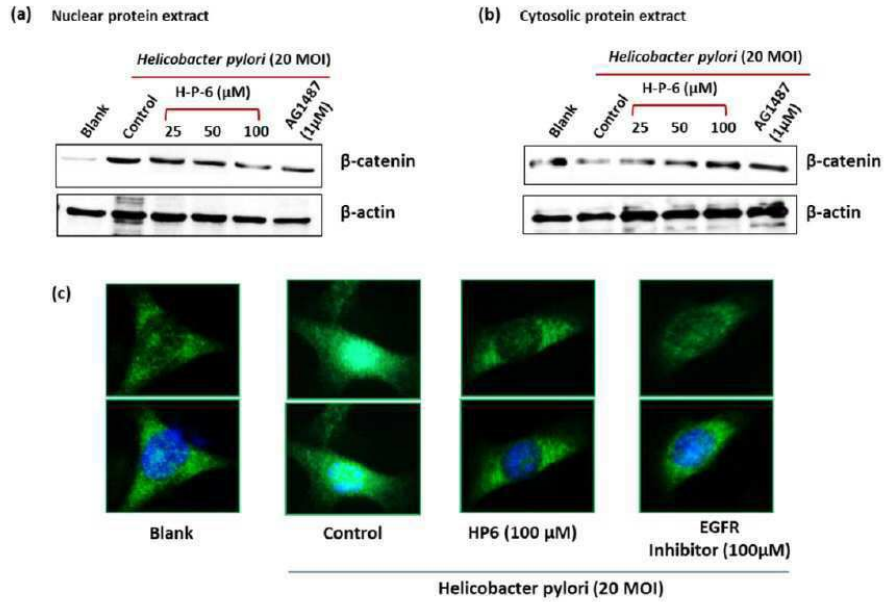
도면4


(a)
Helicobacter pylori (20 MOI)
H-P-6 (μM)
Blank
Control
25
50
100
AG1487 (1μM)
p-EGFR
β-actin
(b)
Helicobacter pylori (20 MOI)
Blank
Control
H-P-6 (100 μM)
AG1487 (1μM)
H-P-6 (100 μM)
AG1487 (1μM)
p-EGFR
β-actin

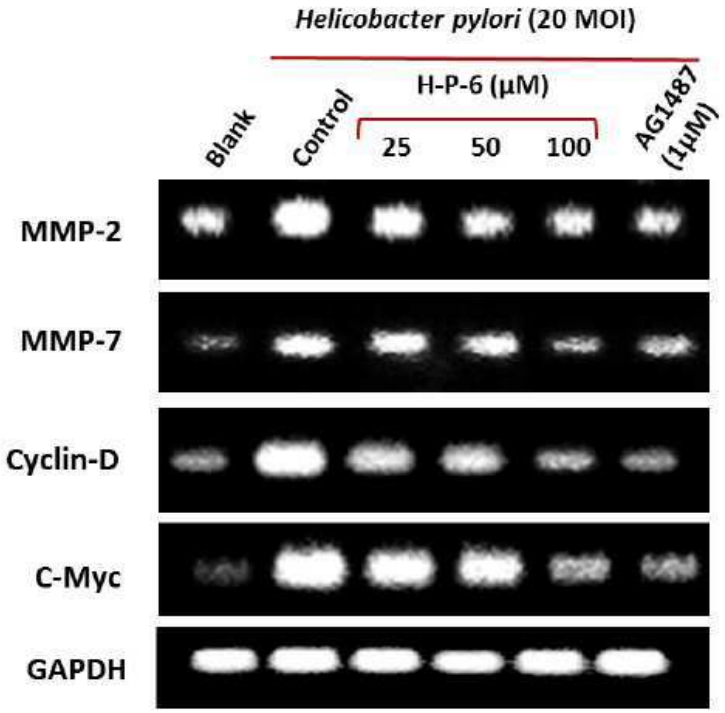
도면5


Helicobacter pylori (20 MOI)
H-P-6 (μM)
Blank
Control
25
50
100
AG1487 (1μM)
p-PI3K
p-Akt
Gsk3/β
β-actin

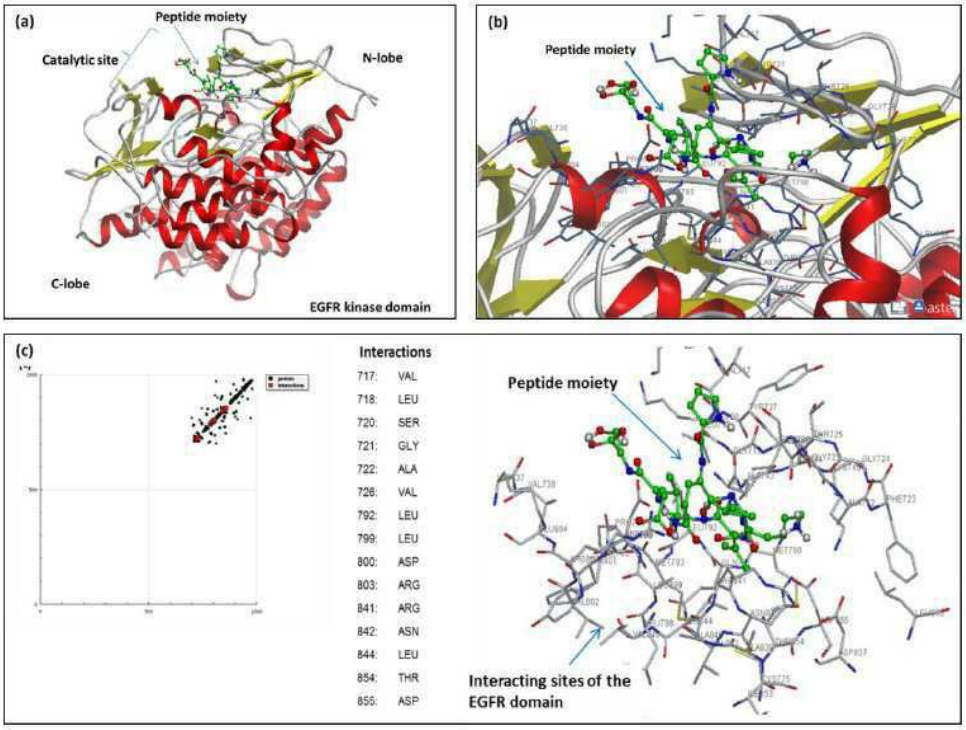
도면6


(a) Nuclear protein extract
Helicobacter pylori (20 MOI)
H-P-6 (μM)
Blank
Control
25
50
100
AG1487 (1μM)
β-catenin
β-actin
(b) Cytosolic protein extract
Helicobacter pylori (20 MOI)
H-P-6 (μM)
Blank
Control
25
50
100
AG1487 (1μM)
β-catenin
β-actin
(c)
Blank
Control
HP6 (100 μM)
EGFR Inhibitor (100μM)
Helicobacter pylori (20 MOI)

도면7


Helicobacter pylori (20 MOI)
H-P-6 (μM)
Blank
Control
25
50
100
AG1487 (1μM)
MMP-2
MMP-7
Cyclin-D
C-Myc
GAPDH

도면8



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Composition for treating or preventing gastrointestinal disorders comprsing peptide derived from chlamidomonas sp.

<130> PN1305-147

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Chlamidomonas sp.

<400> 1

Pro Gln Pro Lys Val Leu Asp Ser

1 5