(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0088403
(43) 공개일자 2014년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2006.01) *A61K 36/03* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0000238
(22) 출원일자 2013년01월02일
심사청구일자 2013년01월02일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도
전체 청구항 수 : 총 8 항

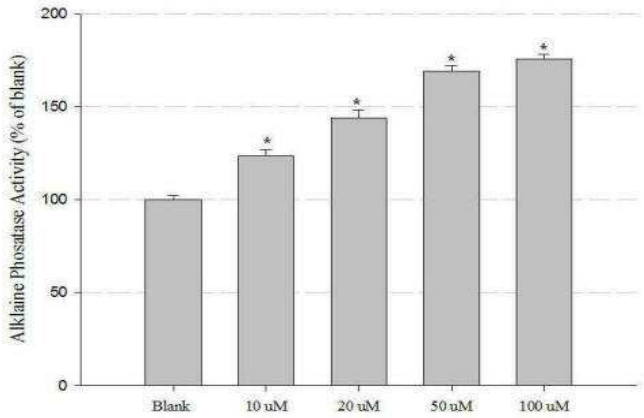
(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
정원교
광주광역시 서구 풍암1로 53, 104동 302호(풍암동, 현대삼환아파트)
천충길
전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220 (조선대학교 해양생물연구교육센터)
정상화
광주광역시 남구 제석로 72, 102동 604호(봉선동, 더실아파트)
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **해양 미세조류의 발효물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 해양 미세조류의 발효물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 조골세포의 분화를 촉진시키는 작용을 함으로써 골다공증과 같은 골질환의 예방 또는 치료에 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0003111
부처명	교육과학기술부
연구사업명	교육과학기술부 일반연구자지원사업
연구과제명	해양생물 유래 조골세포 분화 및 미네랄 형성 촉진 선도물질 탐색과 그 작용기전 연구
기 여 율	1/2
주관기관	조선대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20103020090020
부처명	지식경제부
연구사업명	지식경제부 한국에너지기술평가원 신재생에너지기술개발사업
연구과제명	바이오리파이너리 기반 고효율 평판형 광생물반응기
기 여 율	1/2
주관기관	조선대학교
연구기간	2010.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 해양 미세조류로부터 유래된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 미세조류는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 발효된 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 펩티드는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 분말과 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 용액의 혼합물에 락토바실러스 브레비스 BJ20(*Lactobacillus brevis* BJ20) 배양액을 첨가한 후 발효시켜 분리한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 골질환은 골다공증인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 조골세포의 분화를 유도하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양 미세조류의 발효물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조골세포의 분화 과정은 상호 연결되어 있으며, 신체에서 골흡수 및 골형성 동안 조절된다. 주요 전사인자들은 조골세포 분화를 조절하고, 중요한 신호전달 분자들은 골형성에서 중요한 단계들을 조정한다. 골다공증은 골흡

수와 골형성 사이의 불균형으로 인한 골격량의 감소인 반면, 골 항상성에는 조골세포와 파골세포 사이의 균형적인 상호작용이 필요하다.

[0003] 생체 외 연구에서, MG-63(사람의 조골세포를 닮은 세포주) 세포는 조골세포 발생의 모형 역할을 한다. MG-63 세포는 알칼리성 인산가수분해효소, 무기물화 등 조골세포 분화의 표현형과 같은 조골세포의 특성을 보이는 조골세포 분화의 원형으로서의 역할을 하고, 종양세포주는 다양한 물질의 생체적합성을 검사할 수 있는 모형으로서 잘 특징지어지는 것으로 확인되었다. 새로운 골형성은 주로 조골세포의 기능이므로, 골형성을 조절하는 물질은 조골세포 계통의 세포 증식을 증가시키거나 조골세포의 분화를 유도함으로써 작용한다. 또한, 연골세포와 조골세포에서 연골을 분해하는 효소는 프로테오글리칸 합성의 억제로 이어지고 콜라겐 분해를 자극하며 연골의 정상적인 유지를 저해한다. 이 과정은 미토겐활성단백질키나아제(MAPKs) 경로와 같은 일련의 세포외 자극-의존적 신호전달 연쇄반응을 활성화한다.

[0004] 발효는 식품을 생산하고 보존하는 가장 오래되고 가장 경제적인 방법 중 하나이며, 식품의 영양가와 풍미를 향상시키고, 식품을 병원성 미생물로부터 안전하게 유지해 준다. 식품 가공에서는 일반적으로 혐기성 조건하에서, 효모, 박테리아, 또는 그들의 조합을 사용하여 탄수화물, 단백질 및 이산화탄소를 전환한다. 단백질분해는 발효 과정 동안 주요한 생화학적 과정 중 하나이며, 저분자량 성분, 주로 폴리펩티드, 더 작은 펩티드, 아미노산의 형성으로 인한 것이다. 주로 내생적 효소들의 결과인 이러한 반응들은 미생물의 유형에 의해 영향을 받는다.

[0005] 증가하는 과학적 증거는 최근에 많은 펩티드들이, 확립되어 있는 단백질의 공급원으로서의 역할뿐 아니라 항산화, 항암, 항고혈압, 항균, 항염증, 면역조절 및 콜레스테롤 저하 효과 등의 특정 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 생활성 펩티드는 모 단백질 내에서 비활성임에도 불구하고, 신체 기능 또는 상태에 긍정적인 영향을 주고 건강에 영향을 줄 것이다. 이러한 펩티드들은 보통 3-20개의 아미노산 잔기들을 포함하며, 펩티드의 활성은 아미노산 조성과 배열에 따라 달라진다. 펩티드의 구조와 활성 수준 간의 관계는 펩티드가 장관상피를 통해 흡수되고 표적에 도달하기 전에 장관상피의 대사 활동에 영향을 줄 것임을 나타낸다.

[0006] 해양 미세조류는 단백질, 지질, 비타민 및 다른 영양 성분이 풍부하여 주로 건강 식품으로 생산되어 판매되고 있다. 최근에, 해양 미세조류가 약물학적 재료의 유용하고 새로운 활성 공급원이라는 많은 보고들이 나오고 있다. 미세조류 중에서, 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)는 명백하게 많은 먹이 그물에서 주요한 구성 요소이며, 미세조류의 계절적인 풍부함, 변동 및 성장 속도의 평가는 해양과학 연구에서 중요한 요소가 되어 왔으며, 앞으로도 그럴 것이다. 피키아 앙구스타(*Pichia angusta*)로도 불리는 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)는 제한된 수의 메탄올자화효모 종에 속한다. 메탄올자화효모의 범위는 칸디다 보이디니(*Candida boidinii*), 피치아 메타놀리카(*Pichia methanolica*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)를 포함한다. 한세눌라 폴리모르파(*H. polymorpha*)는 분류학상으로 사카로미세스과(saccharomycetaceae)의 한 종이며, 독특한 특성은 특히 의약품 분야에서 유전자기술적인 단백질 생산을 위한 우수한 기반을 제공한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1990-7000504 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 발효된 미세조류 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를

유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 펩티드는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 유래된다.

[0011] 상기 펩티드는 발효된 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 분리된다.

[0012] 상기 펩티드는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 분말과 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 용액의 혼합물에 락토바실러스 브레비스 BJ20(*Lactobacillus brevis* BJ20) 배양액을 첨가하여 발효시킨 후 분리된다.

[0013] 상기 골질환은 골다공증이다.

[0014] 상기 펩티드는 조골세포의 분화를 유도하는 방법으로 작용한다.

[0015] 또한, 본 발명은 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 조골세포의 분화를 촉진시키는 작용을 함으로써 골다공증과 같은 골질환의 예방 또는 치료에 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a 내지 도 1c는 본 발명의 발효된 미세조류의 세포 생존율 및 ALP 활성을 보여주는 결과이다.

도 2a 내지 도 2d는 본 발명의 발효된 미세조류로부터 펩티드의 분리 과정을 보여주는 결과이다.

도 3a 및 도 3b는 MG-63 세포에서 본 발명의 펩티드의 분화 효과를 보여주는 결과이다.

도 4a 및 도 4b는 MG-63 세포에서 본 발명의 펩티드의 ALP 및 BMP-2 단백질 발현을 조사한 결과이다.

도 5는 본 발명의 펩티드가 MAPK 신호경로에 관여함을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명의 발명자들은 발효한 해양 미세조류인 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)와 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)로부터 새로운 펩티드를 정제하였고, 상기 펩티드의 인간 조골세포 (MG-63)에서의 효과를 확인함으로써 상기 펩티드가 조골세포 분화를 조절할 수 있고, 골항상성과 골질환의 관리에 기여할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0020] 따라서, 본 발명은 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 펩티드는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 유래된다.

[0022] 상기 펩티드는 발효된 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 분리된다.

[0023] 상기 펩티드는 파브로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 분말과 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 용액의 혼합물에 락토바실러스 브레비스 BJ20(*Lactobacillus brevis* BJ20) 배양액을 첨가하여 발효시킨 후 분리된다.

[0024] 상기 골질환은 골다공증인 것이 바람직하다.

[0025] 상기 펩티드는 조골세포의 분화를 유도하는 방식으로 작용한다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0027] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스,

메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0028] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0029] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0030] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 5,000 mg, 바람직하게는 100 내지 3,000 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1 일 1 내지 3 회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0035] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0036] 또한, 본 발명은 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Le의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0037] 본 발명의 건강 기능 식품은 골질환의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 펩티드를 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 펩티드는 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0039] 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허

용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0040] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.

[0041] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시르히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 눈개승마 추출물 100중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0042] 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 하나의 구체예일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예의 범위로 한정되는 것은 아니다.

[0043] **[실시예]**

[0044] **재료 및 방법**

[0045] **<1-1> 재료 및 시약**

[0046] 본 실시예에서 사용된 *Pavlova lutheri*(KMCC H-006)는 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC)에서 제공받았다. *Hansenula polymorpha*(KCTC 7538)는 한국생물자원센터(Korea Biological Resource Center)에서 제공받았고, 표준 F/2(Guillard's) 배지에서 배양하였다. 세포벽은 37℃에서 8시간 동안 (pH 6.0) 기질/효소 비율이 100:1(w/w)로 조절된 셀룰로오스에서 용해되었다. 발효된 미세조류를 준비하기 위해서, 배양된 미세조류를 동결건조하여 준비한 분말을 1:15(w/v) 비율의 완충액 (pH 7) 용액에 추가하였고, 발효를 돕기 위해서 효모 *H. polymorpha* 용액을 추가로 첨가하였다. 이후 121℃에서 30분 동안 고압살균한 후, 미세조류 용액을 얻었고, 1×10^4 CFU/mL의 *Lactobacillus brevis* BJ20(Accession No. KCTC 11377BP) 배양액을 1%(v/v) 농도로 용액에 추가하였고, 잘 섞은 후 37℃에서 12일 동안 배양하면서 발효시켰다. 발효된 미세조류는 모두 동결건조시킨 후, 사용할 때까지 80℃에서 보관하였다.

[0047] 인간 조골세포(MG-63)는 미국균주보존협회(American Type Culture Collection)(Manassas, VA, USA)에서 구하였다. 둘베코변형이글배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), 트립신-EDTA, 페니실린/스트렙토마이신, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 다른 세포배양 재료들은 Gibco BRL, Life Technologies(USA)로부터 구매하였다. MTT(3-(4,5-디메칠-2-yl)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드), 12-O-테트라데카노일포볼-13-아세테이트(TPA), 및 모노브로모비마인은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 항-ALP는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. 항-BMP-2, 항-p-EPK, 항-p-JNK, 항-P-p38 및 항-베타-액틴은 Cell Signaling(Beverly, MA)에서 구매하였다. 다른 모든 화학물질 및 용매는 분석용 품위이다.

[0048] **<1-2> 세포 배양 및 생존능력 결정**

[0049] 세포들은 5% CO_2 습한 배양기에서 37℃에서 5% FBS를 포함한 둘베코변형이글배지(DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 다른 농도의 표본의 존재 하에 5×10^3 세포/웰의 밀도에서 96-웰 플레이트에서 배양되었다. 세포 생존능력은 MTT 분석을 사용하여 결정하였다. MTT는 포르마잔에 대한 미토콘드리아-의존적 감소에 의해 결정되는 세포 생존능력의 표지자로서 사용되었다. 요약하자면, 세포들을 놓은 후, 표시된 시간 동안 다양한 시약으로 처리하였다. 다양한 처리 이후에, 배지를 제거하고 세포들은 0.5mg/mL MTT 용액에서 배양하였다. 37℃ 및 5% CO_2에서 3시간 동안 배양한 후, 상층액을 제거하고, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 540nm에서 신호를 검사함으로써

포르마잔의 형성을 관찰하였다.

[0050] **<1-3> 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP) 활성**

[0051] 세포들을 5 × 10^3 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 놓고 24시간 동안 배양하였다. 검사할 약제를 웰에 추가하고, 2일 동안 계속 배양하였다. 그리고 나서 세포를 생리식염수로 3회 씻은 후, 37℃에서 1시간 동안 0.1% 트리톤 X-100을 포함하는 B(비신코니닉 액시드) 단백질 분석 시약에서 배양함으로써 세포의 단백질 농도를 결정하였다. 1M NaOH를 추가함으로써 반응을 중지하고, 560nm에서 흡광도를 측정하였다. 생리식염수로 세포를 3회 씻음으로써 적절한 처리 시간 이후에 세포 내에서의 알칼리성 인산가수분해효소 활성을 평가하였고, 0.1% 트리톤 X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 및 15mM p-니트로페닐 포스페이트(p-NPP)를 포함하는 pH 10, 0.1M $NaHCO_3$-Na_2CO_3 완충액에서 37℃에서 1시간 동안 배양함으로써 세포 활성을 측정하였다. ALP가 존재할 때, p-NPP는 파라-니트로페놀과 무기인으로 변환된다. 표본의 ALP 활성은 분광광도계를 사용하여 405nm에서 흡광도로부터 측정하였다. ALP 활성은 다음 식으로 계산하였으며, 이 식에서 상대 분광도 A 및 A_0는 각각 표본이 있을 때와 없을 때의 상대 분광도이다.

[0052] ALP 활성(%) = (A - A_{0-}) / A_0 × 100

[0053] **<1-4> 고속액체크로마토그래피 (HPLC)에 의한 ALP 활성 펩티드의 정제**

[0054] 동결건조한 발효된 미세조류를 증류수에서 용해하였고 일회용 sep-pak vac 20cc(5.0g) C_{18} 카트리지를 통과시켰다. 우선 이 카트리지를 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)에서 100% 메탄올로 활성화한 후, 0.1% TFA를 포함하는 증류수로 씻었다. 결합하지 않은 화합물들은 0.1% TFA가 있는 카트리지에 의해 수집되었다. 이어서 카트리지에 수집된 물질들을 0.1% TFA에서 10% 메탄올로 용출하였다. 분획을 동결건조한 후 아래와 같이 추가적으로 정제하였다.

[0055] 분획은 역상 고속액체크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함하는 acetonitrile의 경사자계(30분 동안 0-30%)가 있는 Primesphere 10 C_{18}(20 × 250 mm) 칼럼에서 1.0 mL/min의 속도로 추가 정제하였다. 용리 최고점은 215nm에서 발견되었고, 최고점은 회전증발기를 사용하여 농축하였다. 각각의 최고점을 수집하고, 그들의 ALP 활성을 평가한 다음, 표본들을 동결건조하였다. 활성 분획들은 0.1% TFA를 포함하는 15% acetonitrile(15분 동안 20% v/v)이 있는 Acclaim 120 C_{18} 분석용 칼럼에 1ml/min의 속도로 적용되었다. 순수 펩티드는 아미노산 배열을 분석하였다.

[0056] **<1-5> 아미노산 배열 결정법**

[0057] 정제된 펩티드의 정확한 분자량과 아미노산 배열은 전자분무이온화(ESI) 이온발생원과 결합된 Q-TOF 질량분석계(Micromass, Altrincham, UK)를 사용하여 결정되었다. 정제된 펩티드는 메탄올/물(1:1, vol/vol)에서 용해된 후 전자분무 이온발생원으로 주입되었고, 펩티드의 분자량은 질량스펙트럼에서 2가 전하를 띤 $(M+2H)^{+2}$ 상태에 의해 결정되었다. 분자량을 결정한 후, 펩티드는 조각화를 위해 자동적으로 선택되었고, 배열 정보는 탠덤 질량분석법(MS) 분석에 의해 구하였다.

[0058] **<1-6> 무기물화**

[0059] 7일 동안 처리한 후, 알리자린 레드(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 염색법을 사용하여 24-웰 플레이트에서 무기물화의 정도를 결정하였다. 요약하자면, 세포들을 70% (v/v) 에탄올에서 1시간 동안 고정한 후, 실온

에서 15분 동안 탈이온수(pH = 4.2)에서 40mM 알리자린 레드-에스로 염색하였다. 흡인으로 알리자린 레드-에스 용액을 제거한 후, 오비탈회전기 상에서 실온에서 15분 동안 PBS에서 세포들을 배양하였다. 그리고 나서, 세포들을 신선한 PBS로 1회 씻어내고, 이어서 10mM 인산나트륨(pH = 7.0)에서 10% (w/v) 세틸피리디늄클로라이드로 15분 동안 염색을 제거하였다. 다음으로 추출된 염색물을 96-웰 플레이트로 옮겨서, 마이크로플레이트 리더를 사용해서 562nm에서 흡광도를 측정하였다(Tecan Austria GmbH, Austria). 활성은 다음 식으로 계산하였으며, 이 식에서 상대 분광도 A 및 A_0는 각각 표본이 있을 때와 없을 때의 상대 분광도이다. 펩티드로 처리한 그룹의 무기물화 활성을 블랭크 그룹 (표본 처리하지 않고, 비타민 C (50㎍/mL)/β-글리세로포스페이트(10 mM)로 처리)의 무기물화 활성과 비교하였다.

[0060] 무기물화 수준(%) = $(A - A_0) / A_0 \times 100$

[0061] **<1-7> 웨스턴 블롯 분석**

[0062] 표준 절차에 따라 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 요약하자면, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 2 mM 페닐메칠술포닐 불화물, 류펩틴 80㎍/ml, 3 mM NaF 및 1 mM DTT를 포함하는 RIPA 완충액에서 4℃에서 30분 동안 세포들을 용해하였다. 세포 용해물(25㎍)을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법에 의해 분리하고, 폴리비닐리덴 불화물막(Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮기고, 5% 탈지유로 차단한 후, 1차 항체 (1:1000으로 희석한)로 잡종을 만든다. 실온에서 홀스래디쉬-페록시다제-결합된 2차 항체(1:5000 희석)로 배양한 후, 제조자의 지침에 따라 화학발광 ECL 분석 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 사용해서 면역-반응 단백질을 검출하였다. LAS3000 발광 영상 분석기를 사용하여 웨스턴 블롯을 시각화하였고 단백질 발현은 MULTI GAUGE V3.0 소프트웨어에 의해 정량화하였다(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan).

[0063] **<1-8> 통계분석**

[0064] 모든 자료들은 평균±표준편차로 나타내었다. 평균값들은 새롭게 준비된 시약을 사용하여 다른 날에 수행된 최소한 3회의 독립적인 실험으로부터 구한 자료를 바탕으로 계산하였다. 통계분석은 스튜던트 t-검정을 사용하여 수행하였다.

[0065] **2. 실험결과**

[0066] **<2-1> MG-63 세포에서 발효된 미세조류의 세포독성 및 ALP 활성 효과**

[0067] 우선, MG-63 세포에서 다양한 농도의 발효 미세조류의 세포독성 효과를 MTT 평가법으로 결정하였다. 도 1a와 같이, 발효된 미세조류는 24시간 동안 MG-63 세포에 처리한 후 농도 (10-500㎍/mL)에서 세포 증식에 대해 유의한 효과를 보이지 않았다. 또한, 100㎍/mL의 발효 미세조류의 처리는 72시간 동안 세포 생존능력에 유의한 효과를 보이지 않았다(도 1b).

[0068] 조골세포의 성숙에 대한 발효 미세조류의 효과는 MG-63 세포에서 알칼리성 인산가수분해효소 활성을 결정함으로써 연구하였다. MG-63 세포에서 48시간 동안 처리한 후 용량-의존적으로 (10-100㎍/mL) 발효 미세조류가 알칼리성 인산가수분해효소 활성을 증가시키는 것으로 결과가 나타났다(도 1c). 분화된 조골세포는 효소 발현의 높은 수준과 관련 있는 ALP 활성의 증가를 보여주었다. 발효 미세조류는 가장 높은 ALP 활성을 보이기 때문에, 후속 연구에서 발효 미세조류를 사용하였다.

[0069] **<2-2> 발효 미세조류로부터 추출한 ALP 활성 펩티드의 정제 프로파일**

[0070] 동결건조한 발효 미세조류는 증류수에서 용해하였고, 일회용 sep-pak vac 20 cc (5.0 g) C_{18} 카트리지를 통해 통과시켰다. 동결건조한 분획은 RP-HPLC를 사용하여 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함하는 acetonitrile의 경사자계(30분 동안 0-30%)가 있는 Primesphere 10 C_{18} (20 × 250 mm) 칼럼에서 1.0ml/min의 속도로 추가 분리하였다. 용리 최고점은 215 nm에서 관찰되었고, 4부분으로 분리되었다 (도 2a). 각각의 분획을 모아서 동결건조한 후, MG-63 세포에서 ALP 활성을 측정하였다. 수집된 모든 분획 중에서, 분획 4는 MG-63 세포에서 48시간 동안 처리 (100 μg/mL)한 후 더 높은 ALP 활성 (164.2%)을 나타내었다 (도 2b). 활성 분획을 얻기 위해서, 0.1% TFA를 포함하는 15% acetonitrile (20% v/v, 15분 동안)가 있는 Acclaim 120 C_{18} 분석용 칼럼에서 1 mL/min의 속도로 재크로마토그래피를 시행하였다(도 2c). 마지막으로, 우리는 정제된 펩티드를 얻었다. 908.9 Da의 분자량을 가지는 정제 펩티드의 아미노산 배열은 Glu-Pro-Gln-Trp-Phe-Leu인 것으로 결정되었다(도 2d). ESI/MS 분광법으로 결정된 정제 펩티드(PFPL)의 분자량은 아미노산배열로부터 계산한 이론적인 질량과 잘 일치하였다.

[0071] **<2-3> 조골세포 MG-63 세포 분화에 대한 PFPL의 효과**

[0072] 충분한 양의 PFPL을 얻기 위해서, 크로마토그래피 분리법을 여러 번 수행하였고, PFPL의 ALP 활성을 조사하였다.

[0073] 조골세포 분화 과정은 ALP 활성의 발현과 같은 표현형 표지자를 검사함으로써 따를 수 있다. 도 3a와 같이, PFPL (10-100 μM)로 처리한 용해물 세포는, 처리하지 않은 세포로서 사용된 네거티브 그룹 (블랭크)과 비교하여 용량-의존적으로 ALP 수준을 유의하게 증가시켰다. 또한, 염색된 배양으로부터 추출한 알리자린 레드-에스의 흡광도 측정에 의한 무기물화의 정량화는 PFPL의 존재 하에서 14일 동안 배양한 조골세포의 무기물화의 유의한 증가를 나타내었다. 도 3b는 연구한 펩티드가 네거티브 (블랭크) 그룹과 비교했을 때 수산화인회석의 양을 증가시킴을 나타낸다. 세포외 칼슘 축적의 수준은 용량-의존적으로 (10, 20, 50, 및 100 μM) 높아진다. 무기물화 평가의 결과는 PFPL이 조골세포 분화를 잠재적으로 유도할 수 있음을 명확하게 보여준다.

[0074] **<2-4> 조골세포 MG-63 세포에서 ALP, 및 BMP-2 발현에 대한 PFPL의 효과**

[0075] 뼈형성단백질 (BMPs)은 골형성과 재형성 과정에서 중요한 역할을 한다. 조골세포 분화의 자극은 주로 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP) 발현의 증가에 의해 특징지어짐이 잘 확립되어 왔다.

[0076] 조골세포 MG-63 세포에서 ALP 및 BMP-2 발현에 대한 정제 펩티드의 효과를 결정하기 위하여, 우리는 ALP 및 BMP-2의 발현 수준을 평가하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 사용하였다. PFPL은 용량-의존적으로 검사한 ALP 및 BMP-2의 수준을 유의하게 증가시켰다 (도 4).

[0077] **<2-5> 세포 신호전달 경로에 대한 PFPL의 효과**

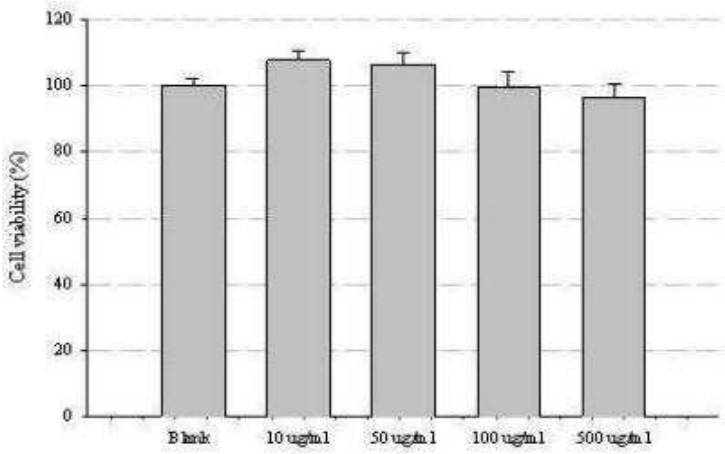
[0078] 자극 사이토카인은 MAPK 신호전달 경로 등 주요 경로를 통해 많은 종류의 단백질 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 펩티드 처리가 MAPKs의 3가지 다른 인산화 형태인 pERK, pJNK 및 p-p38의 발현에 영향을 주는지를 검사하고자 하였다. 흥미롭게도, PFPL은 양성대조군 (TPA) 및 블랭크 (적정하지 않은 표본)에 관하여 MG-63 세포에서 TPA-가 유도하는 p38 키나아제의 활성화를 억제하였다 (도 5).

[0079]

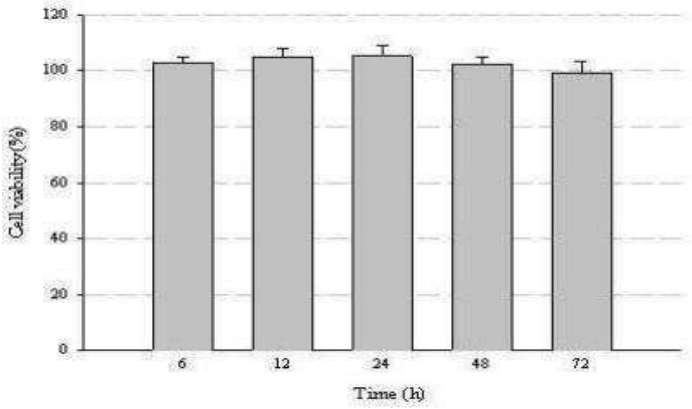
[0080] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

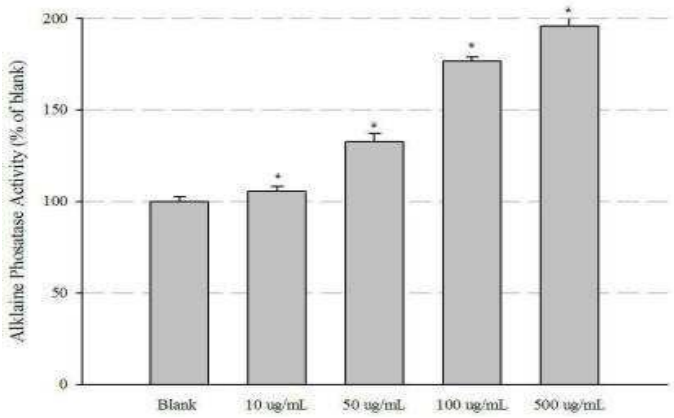
도면1a



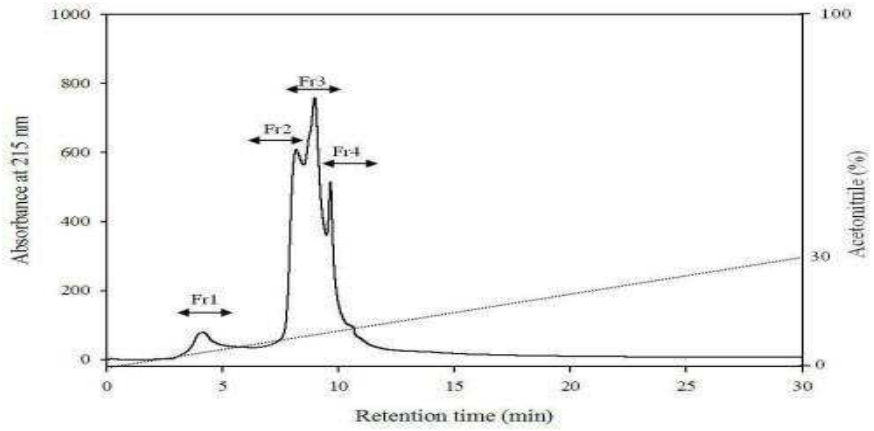
도면1b



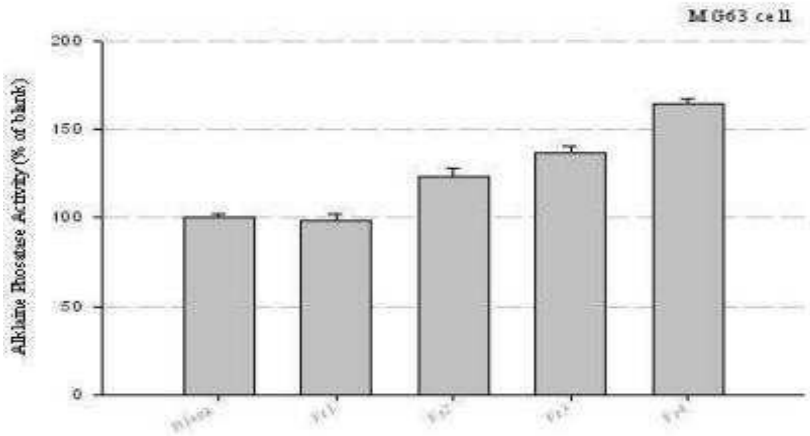
도면1c



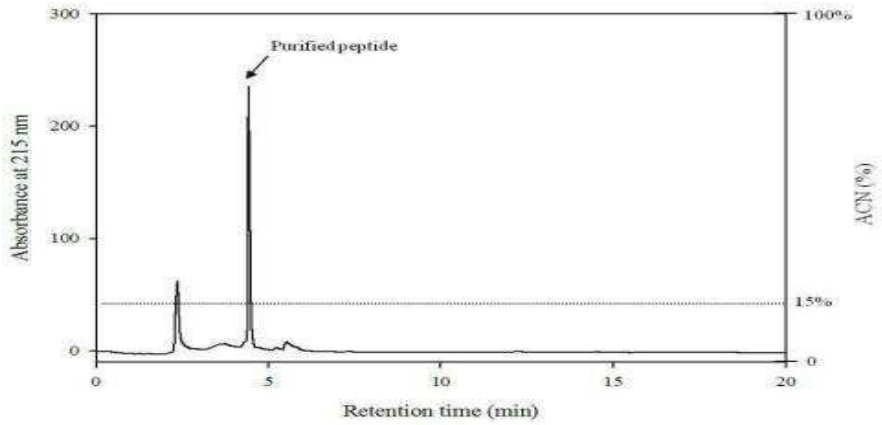
도면2a



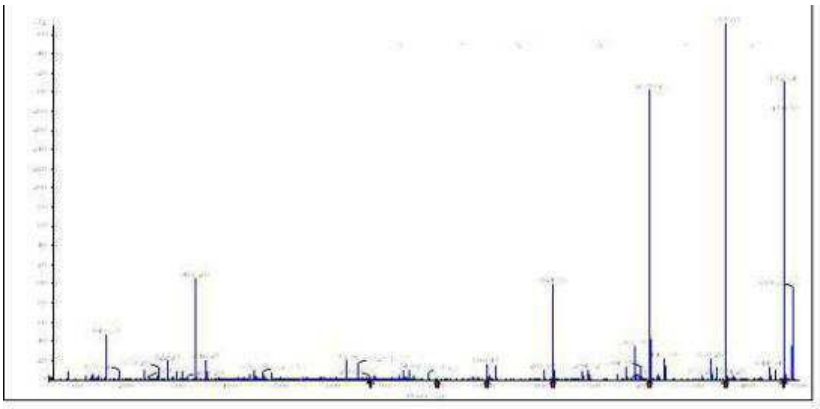
도면2b



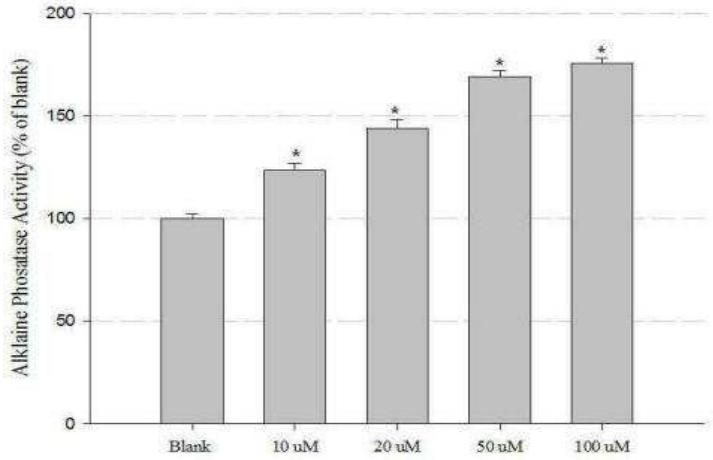
도면2c



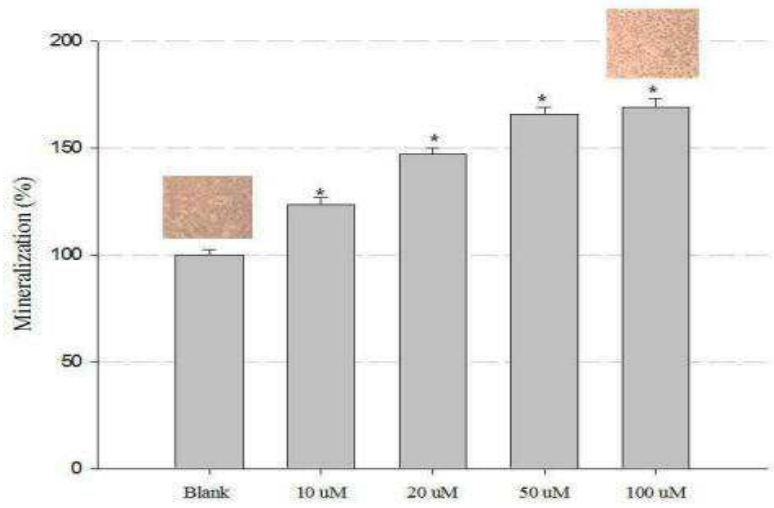
도면2d



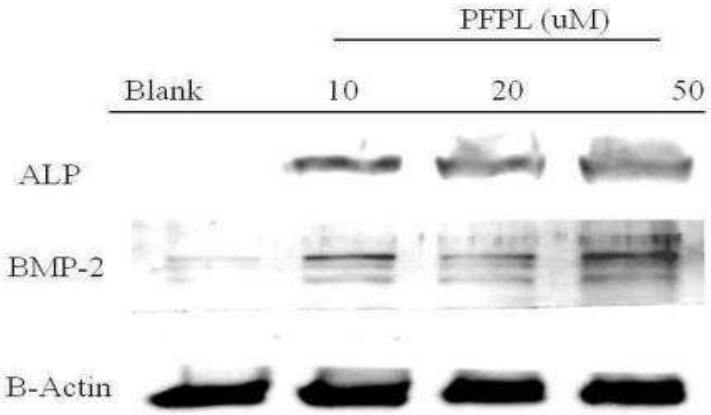
도면3a



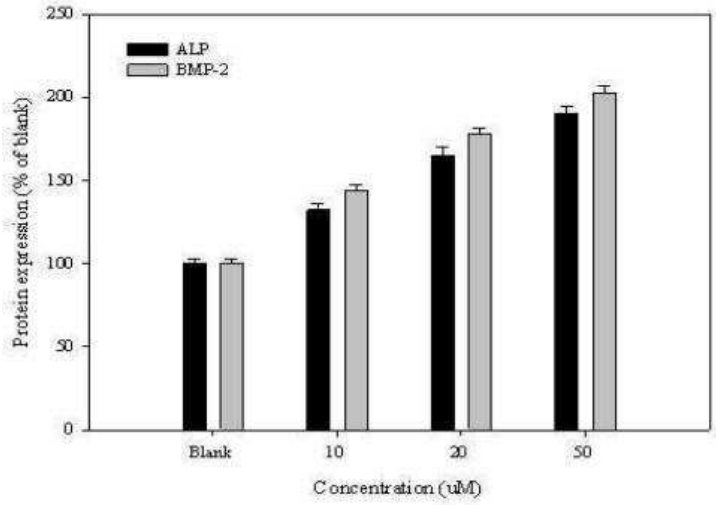
도면3b



도면4a



도면4b



도면5

