(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0092795
(43) 공개일자 2018년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/07* (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) *C07K 5/10* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/07 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0098287
(22) 출원일자 2017년08월02일
심사청구일자 2017년08월02일
(30) 우선권주장
1020170017326 2017년02월08일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
제재영
부산광역시 남구 신선로 566 304동 401호 (G5하이츠 자이) (용호동)
형준호
부산광역시 부산진구 당감로 17,9동 1102호(당감동, 삼익아파트)
오윤옥
부산광역시 남구 용호로 38-17, 209동 1402호(용호동, 일신님2차아파트)
(74) 대리인
위병갑

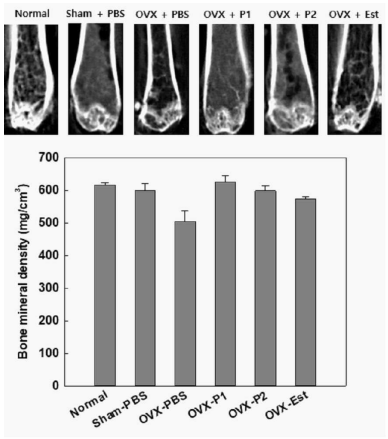
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **꼬막단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드 및 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 효과가 있어 골질환, 특히 골다공증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
A61K 38/08 (2013.01)
C07K 5/1002 (2013.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B4016004
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 수산물로부터 골다공증 치료 및 완화 펩타이드 개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 꼬막(*Scapharca subcrenata*) 단백질 유래인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 및 대사성 골질환으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 꼬막단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008).

[0003] 기존에 알려진 골다공증 치료제로는 비스포스포네이트(bisphosphonate)계열의 약물이 있는데, 비스포스포네이트는 골의 무기질 성분에 침착되며, 비스포스포네이트가 침착된 골을 파골세포가 탐식할 경우 가수분해되지 않는 ATP 유사체(analogue)를 형성하여 세포에 독성을 나타내거나 파골세포 내에서 다양한 방식으로 파골세포의 활성 감소 및 세포사멸(apoptosis)을 초래해 골 흡수를 줄이고 이를 통해 골밀도를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

이러한 약물들은 비교적 안전한 것으로 알려져 있으나, 최근 장기간 사용시 정상적인 골 흡수 및 골 형성에 의한 골의 재형성(remodeling)이나 골절 이후 골 재생(healing)과정에 영향을 주어 골의 탄성이 떨어져 오히려 골강도에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 우려들이 제기되고 있으며, 실제로 이로 인해 많은 환자에서 피로 골절을 일으킨다는 보고가 있다. 따라서, 골다공증 발병과 관련된 새로운 골대사 기전의 발견 및 골다공증 예방 또는 치료제 개발의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-1486074호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 꼬막단백질 유래인 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 및 대사성 골질환으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0014] 또한, 상기 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 펩타이드는 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 효과가 있어 골질환 특히 골다공증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 분획된 꼬막단백질 유래 펩타이드를 SP-Sephadex C-25 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 분리한 후, 이들 획분에 대한 ALP 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다($^{a-f}p<0.05$).

도 2는 양이온 교환 크로마토그래피에서 분리된 획분을 HPLC 상에서 분리한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 Hypersil Gold C18 column(20×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 분리된 결과이고, (B) 내지 (D)는 Hypersil Gold C18 column(4.6×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 분리된 결과를 나타낸 것이다($^{a-f}p<0.05$).

도 3은 De-novo sequencing (Q-TOF LC-MS/MS)에 의한 펩타이드 서열을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드를 처리한 후, ALP 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드를 처리한 후, 조골세포 분화에 관여하는 단백질 발현 여부를 웨스턴 블럿팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드를 처리한 후, 조골세포 분화에 관여하는 MAPKs 발현 여부를 웨스턴 블럿팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드를 처리한 후, 조골세포의 미네랄 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다($^{a-c}p<0.05$).

도 8은 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드와 BMP 길항제의 처리 유무에 따른 BMP 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드와 BMP 길항제의 처리 유무에 따른 MAPKs 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드와 MAPKs 저해제를 처리한 후, BMP 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL) 펩타이드와 MAPKs 저해제를 처리한 후, ALP 활성 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 서열번호 1(AWLNH), 서열번호 2(PHDL) 펩타이드 또는 에스트로겐(17β-estradiol, Est)을 골다공증 모델에 투여 시 전체적인 골밀도 변화를 micro CT로 촬영하고, 골밀도를 micro CT 측정로 측정하여 이를 그래프로 정량화하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 서열번호 1(AWLNH) 또는 서열번호 2(PHDL)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드를 제공한다.

[0019] 본 발명의 용어, "골 형성"은 골조직의 바탕에 석회염이 침착하여 골조직을 이루는 일을 말한다.

[0020] 상기 펩타이드는 꼬막(*Scapharca subcrenata*) 단백질 유래이고, 조골세포의 분화를 촉진시키나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 용어, "조골세포(osteoblast)"는 골기질을 합성, 분비하고, 기질에 칼슘, 마그네슘 이온 등의 무기염을 침착시킴으로서 골조직을 석회화시키는 능력을 갖고 있는 세포로서, 골 형성 등에 의해 뼈의 신생이 이루어지는 부위에서 볼 수 있다. 또한, 골 형성이 진행된 상태에서는 스스로 형성된 골조직 속에 묻혀 골세포가 되는 세포이다.

[0022] 본 발명의 신규한 펩타이드는 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질(펩타이드)을 의미한다. 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 펩타이드를 포함한다. 바람직하게는 펩타이드의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알카리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다. 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0023] 본 발명의 신규한 펩타이드는 꼬막의 단백질로부터 직접 분리하여 제조할 수 있으며, 이의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0024] 또한 본 발명의 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 펩타이드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 펩타이드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. 본 발명의 신규한 펩타이드는 보호된 아미노산간의 응축반

응(condensation reaction)에 의한 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 펩타이드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 골 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 골 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 및 대사성 골질환으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나이고, 바람직하게는 골다공증이나 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물에는 상기 펩타이드 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0032] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 펩타이드의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 식품 조성물은 골기능의 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 포함할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0039] 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100㎖를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

[0040] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 펩타이드를 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린; 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0041] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용 할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 본 발명의 기능성 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로서 상기 펩타이드 또는 약학적으로 허용되는 이의 염을 포함하는 신경계 질환에 효과를 갖는 조성물 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품보조첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는 바 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품보조첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함한다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0043] 상기 외에 본 발명의 기능성 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1. 실험재료 및 방법**

[0048] **1.1. 재료**

[0049] 실험에 사용된 꼬막(ark shell, *Scapharca subcrenata*)은 순천에 위치한 재래시장에서 구입하였다. 그 외 세포 배양에 사용된 재료는 Gibro-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위한 항체(p-Smad1/5, Smad1/5/8, Dlx5, Runx2, osterix, p-ERK, p-JNK, p-p38 및 β-actin)는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 그 외 시약은 Sigma-Aldrich 社에서 구입하였다.

[0051] **1.2. 꼬막단백질 유래 저분자 가수분해물 제조**

[0052] 조골세포 분화 촉진 펩타이드를 제조하기 위해서 꼬막을 동결건조한 후 펩신을 이용하여 분해하였다. 효소와 기

질비는 1:500으로 하였고, 반응시간은 2시간으로 하였다. 분해물은 막분리 방법을 이용하여 분자량이 1 kDa 이하의 분획물을 제조하였다.

[0054] **1.3. 조골세포 분화 펩타이드의 분리, 정제 및 구조 동정**

[0055] 조골세포 분화 촉진 펩타이드를 분리하기 위해서 먼저 SP-Sephadex C-25 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 1L 비이커에 미리 양이온 교환 수지를 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)으로 평형화시킨 다음 꼬막 단백질 유래 저분자 펩타이드를 첨가하여 양이온 교환 수지와 반응시켰다. 1시간 후에 비흡착된 펩타이드는 필터과정을 통해 모으고 나머지 흡착부분은 NaCl을 이용하여 순차적 방법으로 용출 시켰다. 즉, NaCl 농도를 0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6 및 0.6-1.0 M로 처리하여 흡착된 펩타이드를 얻었다. 회수한 펩타이드는 투석(dialysis)을 통하여 NaCl을 제거하고 동결건조하였다. 이온교환 크로마토그래피에서 분리한 분획물을 다시 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 상에서 Hypersil Gold C18 column(20×250mm, Thermo Scientific, PA, USA)을 이용하여 분리하였고 조골세포 분화 촉진 활성을 측정한 후에 Hypersil Gold C18 column(4.6×250mm)으로 최종 분리하였다. 분리한 펩타이드는 Q-TOF LC-MS/MS mass spectrometer에서 *de-novo* sequencing방법으로 펩타이드의 서열을 동정하였다.

[0057] **1.4. 세포배양 및 시약 처리**

[0058] 실험에 사용된 마우스 유래 중간엽 줄기세포는 ATCC (D1 cell, CRL-12424)에서 구입하였고, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 5% CO_2 및 37℃ 조건에서 배양하였다. 조골세포 분화를 위해서 분화용 배지(DMEM + 50 μg/mL ascorbic acid, 10 mM β-glycerolphosphate 및 10^{-7}M dexamethasone)는 이틀에 한번 씩 교환하였다.

[0059] BMP antagonist(noggin, 100 ng/mL) 또는 MAPKs 저해제(10 μM SB203580, 20 μM PD98059 및 10 μM SP600125)는 2시간 동안 세포에 처리한 후 펩타이드가 포함된 분화용 배지를 처리하여 지정된 시간동안 배양하였다.

[0061] **1.5. 세포독성 측정**

[0062] 펩타이드의 세포독성 측정은 MTT(3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide)를 이용하였다. 24-well plate에 세포가 70-80% confluent한 상태가 되었을 때 펩타이드를 농도별로 처리한 후 24 또는 48시간 후에 1 mg/mL MTT 용액을 첨가하였다. 4시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후, 배지를 제거하여 생성된 formazan은 DMSO에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] **1.6. ALP(alkaline phosphatase) 활성 및 염색**

[0065] ALP 활성 측정을 위해서 96-well plate에 세포를 배양 및 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 배지를 제거하였다. 세포를 PBS에 세척한 다음 0.1% Triton X-100가 포함된 25 mM sodium carbonate buffer (pH 10)를 이용하여 세포를 분해시키고, 상층액 100 μL를 효소반응액(1.5 mM $MgCl_2$, 3.8 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 25 mM sodium carbonate buffer) 100 μL를 혼합하여 37℃에서 90분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 아래와 같이 계산하였다.

[0067] $\text{ALP activity (\%)} = (A - A_0)/A_0 \times 100$

[0068] A: 펩타이드 처리군, A_0: 무처리군

[0070] ALP 염색을 위해서 12-well plate에 세포를 배양한 후 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 배지를 제거하고 PBS에 2번 세척하였다. 10% formalin 용액을 처리하여 5분간 세포를 고정한 후 다시 PBS에 세척하고 BCIP/NBT 기질 용

액을 well plate에 첨가한 후 37℃에서 15분간 배양하여 현미경으로 관찰하였다.

[0072] **1.7. Alizarin red S 염색(미네랄화 측정)**

[0073] 조골세포 분화의 마지막 단계인 석회화를 측정하기 위해서 12-well plate에 세포를 배양한 후 21일 동안 펩타이드를 처리하였다. 배양이 끝난 후 세포를 PBS에 세척하고 70% 에탄올 용액을 4℃에서 1시간 처리하여 고정시켰다. 2% Alizarin red S(pH 4.2) 용액을 상온에서 15분간 처리하여 염색 후 증류수로 4번 세척하여 완전히 건조시켰다. 현미경으로 세포의 미네랄 형성을 관찰하고, 정량을 위해서 10% cetylpyridinium chloride 용액을 사용하여 염색된 Alizarin red S 용액을 탈색 시켜 반응한 양을 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 미네랄 형성 정도는 하기 수식을 이용하여 계산하였다.

[0075] $\text{Mineralization}\ (\%) = (A - A_0)/A_0 \times 100$

[0076] A: 펩타이드 처리군, A_0: 무처리군

[0078] **1.8. 웨스턴 블럿팅(Western blotting)**

[0079] 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 RIPA buffer(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 세포를 파괴한 후 단백질을 추출하여 정량하였다(Pierce BCA assay kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 5% 스킴밀크로 블러킹한 후, 1차 항체를 처리하여 4℃에서 오버나잇하였고, 이후 2차 항체를 처리하여 상온에서 2-3시간 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence) assay kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 이용하여 PVDF 멤브레인 상의 단백질을 검출하였다.

[0081] **1.9. 마우스 준비 및 약물처리 프로토콜**

[0082] 실험에 사용된 모든 마우스는 8주령의 C57BL/6N 암컷 마우스이며 Envigo社 (미국)로부터 구입하였고 1주일간 순화기간을 거쳤다.

[0083] 골다공증 모델을 만들기 위해 한 그룹 당 4-5마리 총 18마리의 마우스에게 난소적출 수술(OVX)을 실시하였고, 일주일 후, 서열번호 1(AWLNH) 및 2(PHDL) 펩타이드 (각각 5 μg/25 g 마우스), 양성대조군으로 17β-estradiol (Est, 0.5 μg/25 g 마우스) 및 PBS(Gibco) 100 μL를 하루에 한 번 2달간 복강 투여하였다. 대조군으로는 골다공증의 Sham 모델로 한 그룹당 4마리의 암컷 마우스를 피하절개만 실시하였고, 100 μL PBS를 복강 투여하였다.

[0084] 난소적출 수술 후 일주일 후에 골다공증의 효율적 유발을 위하여 칼슘결핍 식이(Envigo社, 미국)를 제공하였다. 정상 마우스는 수술 없이 정상 식이를 제공하였다.

[0086] **1.10. 마이크로 씨티(micro CT)**

[0087] 마우스로부터 대퇴골을 분리하여 근육을 제거하고 생리식염수로 세척한 후 24시간 동안 4% 포르말린에 고정시키고 골밀도를 측정하였다. 대퇴골의 미세 단층 촬영은 micro-CT scanner (Inveon preclinical CT, Siemens Healthcare, 미국)를 사용하여 샘플 길이 1.9 cm, 폭 2 cm, 80 keV의 광자 에너지, 500 μA의 전류를 흘려 측정하였다. 골밀도 측정을 위해서 그룹당 동일한 부위의 2 mm^3의 부피 부분을 Siemens Inveon Software를 이용하여 측정하였다.

[0089] **실시예 2. 꼬막단백질 유래 저분자 펩타이드의 ALP(alkaline phosphatase) 활성 결과**

[0090] 분획된 꼬막단백질 유래 저분자 펩타이드는 이온 교환 크로마토그래피에 의해서 분리되었고, 분리된 획분에 대

하여 조골세포에서 ALP 활성에 미치는 영향은 조사하였다. 그 결과, 0.6-1.0M NaCl 농도에서 용출된 획분에서 blank(무처리군)보다 210% 높은 ALP 활성을 보임을 확인하였다(도 1).

[0091] 이후, 양이온 교환 크로마토그래피에서 분리된 획분을 Hypersil Gold C18 column(20×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 분리하였다. 유속은 2.5 mL/min, 이동상은 0.1% TFA/H_2O와 0.1% TFA/acetonitrile하여 선형상 농도구배법(0-60% acetonitrile, 2-25min)으로 용출시킨 다음, 각 분획물을 분리하였다. 분리한 결과 16-18min 사이에서 용출된 획분에서 가장 우수한 ALP 활성을 보였다(도 2A). 이 획분을 Hypersil Gold C18 column(4.6×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 다시 분리하였다. 유속은 1.0 mL/min, 동일한 이동상에서 선형상 농도구배법(10-30% acetonitrile, 0-17min) 분리하였고, 그 결과 1번 획분에서 가장 우수한 ALP 활성을 나타내어(도 2B), 동일한 조건으로 다시 분리하였다. 도 2C에서 나타나듯이 1번 획분에서 가장 우수한 ALP 활성을 보여 이 획분을 유속 0.9 mL/min, 선형상 농도구배법(10-20%, 0-17min)으로 분리한 결과, 도 2D와 같이 최종 분리하였다.

[0092] 분리된 최종 획분을 Q-TOF LC-MS/MS를 이용하여 *de-novo* sequencing한 결과 두 개의 펩타이드를 확인할 수 있었고 이들의 펩타이드 서열은 Ala-Try-Leu-Asn-His(AWLNH, 640.3Da: 서열번호 1) 및 Pro-His-Asp-Leu(PHDL, 480.2Da: 서열번호 2)로 확인되었다(도 3).

[0093] 상기 두 개의 펩타이드는 조골세포 분화 촉진능을 확인하기 위해서 Fmoc SPSS(solid phase peptide synthesis) 방법으로 합성하였다(Peptron Inc. 서울). 합성된 두 개의 펩타이드는 조골세포 분화에서 ALP 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, 아주 강력한 ALP 활성 증가를 보였는데, 특히, 4 μM 농도에서 본 발명의 서열번호 1의 펩타이드(AWLNH)는 210%, 본 발명의 서열번호 2의 펩타이드(PHDL)은 187%의 ALP 활성을 보였다(도 4).

[0095] **실시예 3. 조골세포 분화에 관여하는 단백질 발현 결과**

[0096] ALP 활성 측정에서 본 발명의 두 종류의 펩타이드가 4 μM 농도에서 아주 우수하였기 때문에 4 μM 농도를 처리하여 다음 실험을 진행하였다. 세포주에 7일간 본 발명의 펩타이드를 처리한 후 단백질을 추출하여 웨스턴 블럿팅을 실시하였다. 그 결과, 두 종류의 펩타이드는 조골세포 분화에 관여하는 BMP-2/4(bone morphogenetic protein)의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다(도 5).

[0097] 또한, BMP-2/4는 다운스트림 신호체계에 있는 Smad1/5의 인산화를 촉진시켜 세포내 신호전달을 촉진시키고 인산화된 Smad1/5는 조골세포 분화 및 형성에 관여하는 특정 단백질을 생산하는데 중요한 역할을 하는 전사조절인자인 Dlx-5, Runx-2 및 osterix를 활성화 여부를 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 두 종류의 펩타이드는 BMP-2/4의 발현을 증가시켜 다운스트림에 있는 신호전달물질들인 Smad1/5 및 전사조절인자인 Dlx-5, Runx-2 및 Osterix가 모두 발현 또는 활성을 증가시킴으로써, 조골세포의 분화를 촉진시키는 것을 확인하였다(도 5). 또한, 조골세포 분화의 초기 바이오마커인 type I collagen의 발현을 강하게 증가시키는 것도 확인하였다(도 5).

[0098] 또한, MAPKs(mitogen-activated protein kinases)는 조골세포 분화에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 본 발명자들은 본 발명의 두 종류의 펩타이드가 MARKs에 활성시키는 효과가 있는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 그 결과, MARKs인 p-p38, p-ERK 및 p-JNK의 인산화를 증가시켜 조골세포 분화를 촉진시키는 것을 확인하였다(도 6).

[0099]

[0100] **실시예 4. 펩타이드에 의한 조골세포의 미네랄 형성 결과**

[0101] 본 발명의 두 종류의 펩타이드(AWLNH 및 PHDL)를 21일 동안 처리한 후 미네랄 형성을 Alizarin red S 염색으로 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 두 종류의 펩타이드는 조골세포의 미네랄 형성을 강하게 촉진하는 것으로 확인되었다. 구체적으로 서열번호 1의 펩타이드(AWLNH)은 대조군에 비해 289%, 서열번호 2의 펩타이드(PHDL)는 259%의 미네랄 형성이 증가되었음을 확인하였다(도 7).

[0103] **실시예 5. BMP 길항제(noggin) 및 MAPKs 저해제 처리에 따른 BMP 신호전달경로 및 MAPKs 인산화에 미치는 영향**

[0104] 본 발명의 두 종류의 펩타이드가 BMP 신호전달경로 및 MAPKs 인산화 경로의 활성화에 따른 조골세포 분화 촉진을 규명하기 위해, 먼저 BMP의 길항제인 noggin을 처리한 후 관련 단백질 발현을 웨스턴 블럿팅으로 확인하였다. 그 결과, noggin과 펩타이드를 함께 처리한 군에서는 펩타이드만 처리한 군에 비해 BMP-2/4 및 다

운스트림 신호전달물질의 발현이 현저히 감소함을 확인하였다(도 8).

[0105] 일반적으로 BMPs의 활성화는 MAPKs의 인산화 증가와 관련이 있다고 알려져 있으나, 본 발명에서는 BMP 길항제를 처리한 경우 펩타이드에 의한 MAPKs(p-p38, p-ERK 및 p-JNK) 인산화에 거의 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(도 9).

[0106] 반면, MAPKs 저해제인 SB203585(p38 저해제), PD98059(ERK 저해제) 및 SP600125(JNK 저해제)를 처리한 결과, 본 발명의 펩타이드만 처리한 군에서는 BMP-2/4, 인산화 Smad1/5 및 전자조절인자인 Runx-2의 발현이 증가하였으나, MAPKs 저해제를 함께 처리한 군에서는 BMP-2/4, 인산화 Smad1/5 및 전자조절인자인 Runx-2의 발현이 억제됨을 확인하였다(도 10). 특히, PD98059(ERK 저해제) 및 SP600125(JNK 저해제) 처리에 의해서 BMP 신호가 강하게 저해됨을 확인하였다.

[0108] MAPKs 저해제가 조골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 조골세포 분화 초기 바이오마커인 ALP의 발현을 염색을 통하여 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 두 종류의 펩타이드를 각각 처리한 세포에서는 ALP의 발현이 증가하여 아주 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었으나, MAPKs 저해제 중 PD98059(ERK 저해제) 및 SP600125(JNK 저해제)에 의해서는 ALP의 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 11).

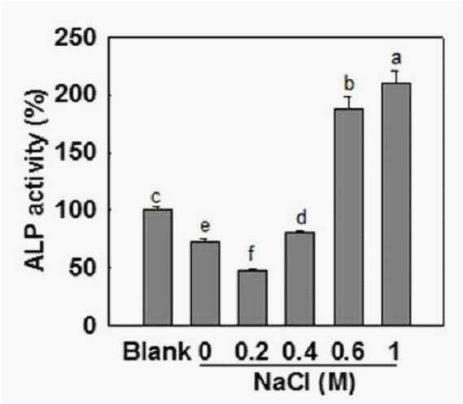
[0109] 따라서, 본 발명의 두 종류의 펩타이드는 ERK 및 JNK의 인산화에 영향을 주는 신호전달경로에 관여하고, BMPs 신호전달경로의 활성화를 시킴으로써, 조골세포 분화를 촉진시킬 수 있어 골질환, 특히 골다공증의 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0111] **실시예 6. 골다공증 모델에서 펩타이드가 골형성에 미치는 영향**

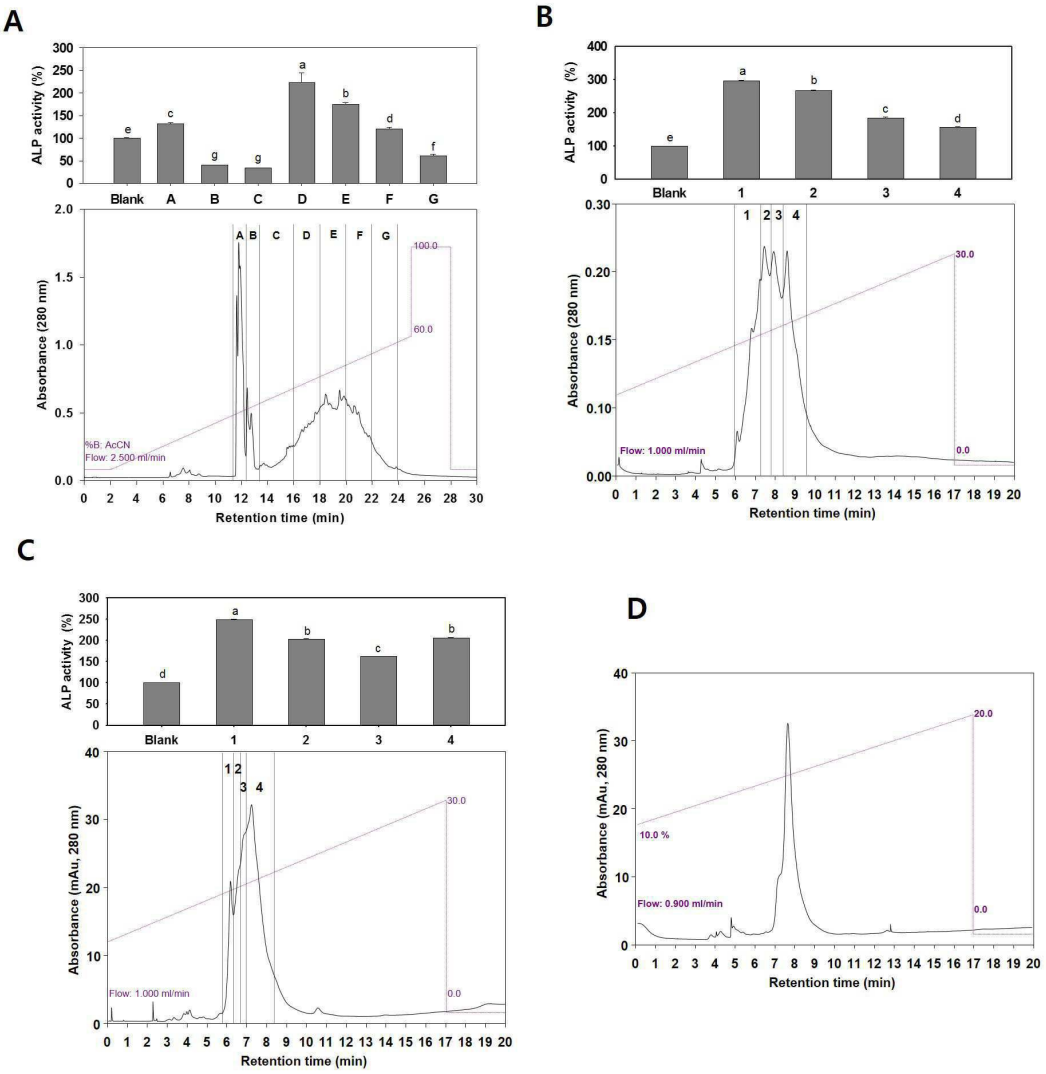
[0112] 본 발명의 서열번호 1(AWLNH (P1)) 및 서열번호 2(PHDL (P2)) 펩타이드가 난소적출 및 칼슘결핍식이로 유도한 골다공증 모델에서 골형성에 미치는 영향을 측정하였다. Micro CT 촬영 사진과 골밀도 변화 결과에 대한 그래프는 도 12에 나타내었다. 골다공증을 유발한 모델에 서열번호 1(AWLNH (P1)) 및 서열번호 2(PHDL (P2))의 펩타이드를 각각 투여한 결과 PBS만 주입한 마우스보다 골밀도가 유의적으로 증가한 것으로 확인되었고, 양성대조군으로 사용된 17β-estradiol(Est, 에스트로겐)과 유사한 골형성 정도를 나타냄을 확인하였다.

도면

도면1

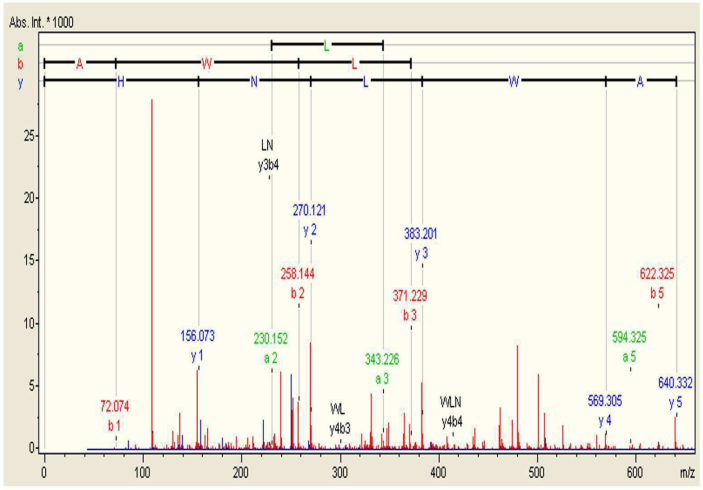


도면2

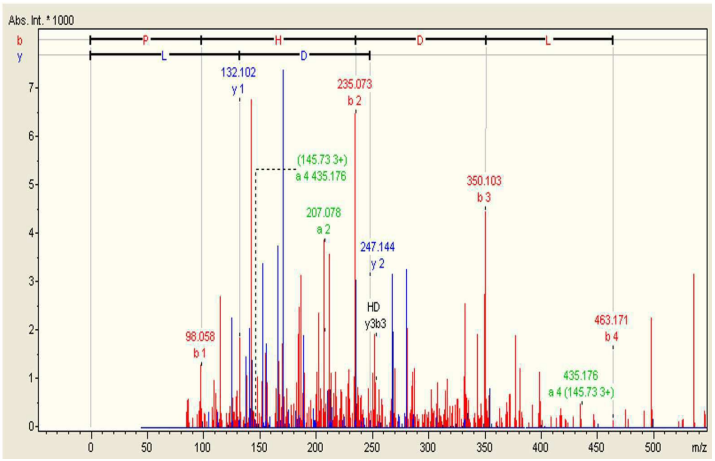

A
ALP activity (%)
Blank A B C D E F G
Absorbance (280 nm)
%B: AcCN
Flow: 2.500 ml/min
100.0
60.0
Retention time (min)
B
ALP activity (%)
Blank 1 2 3 4
Absorbance (280 nm)
Flow: 1.000 ml/min
30.0
0.0
Retention time (min)
C
ALP activity (%)
Blank 1 2 3 4
Absorbance (mAu, 280 nm)
Flow: 1.000 ml/min
30.0
0.0
Retention time (min)
D
Absorbance (mAu, 280 nm)
10.0 %
Flow: 0.900 ml/min
20.0
0.0
Retention time (min)

도면3

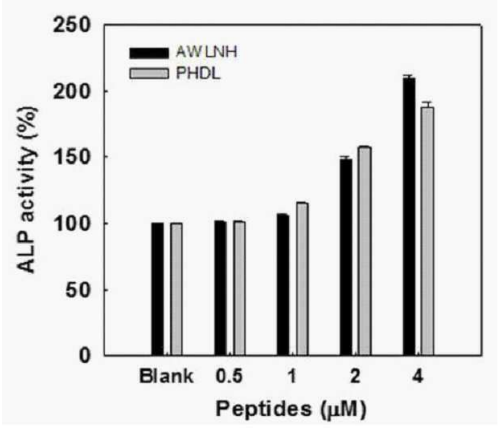
Peptide sequence: AWLNH



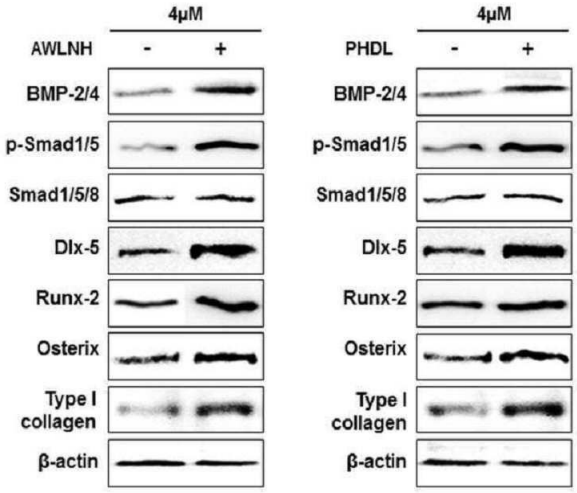
Peptide sequence: PHDL



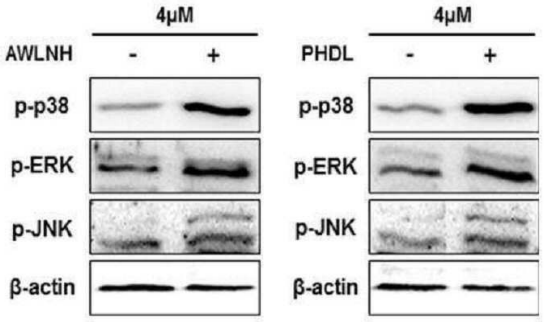
도면4



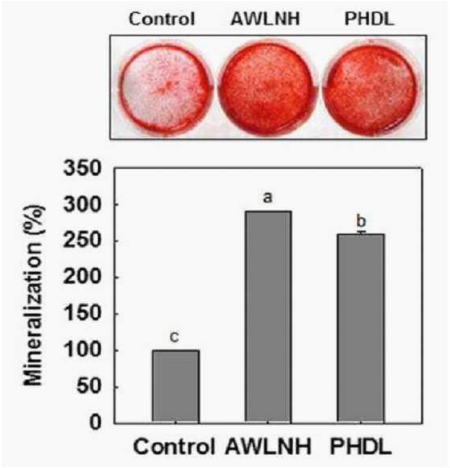
도면5


4μM
AWLNH
-
+
BMP-2/4
p-Smad1/5
Smad1/5/8
Dlx-5
Runx-2
Osterix
Type I collagen
β-actin
4μM
PHDL
-
+
BMP-2/4
p-Smad1/5
Smad1/5/8
Dlx-5
Runx-2
Osterix
Type I collagen
β-actin

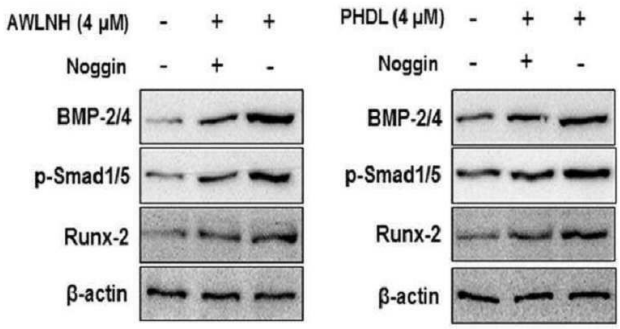
도면6


4μM
AWLNH
-
+
p-p38
p-ERK
p-JNK
β-actin
4μM
PHDL
-
+
p-p38
p-ERK
p-JNK
β-actin

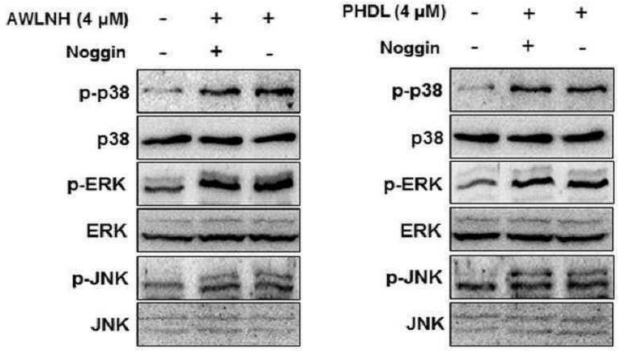
도면7


Control
AWLNH
PHDL
Mineralization (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
c
Control
AWLNH
PHDL

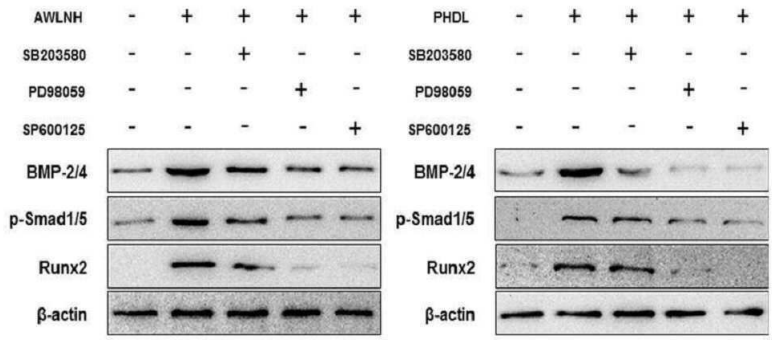
도면8


AWLNH (4 μM) - + +
Noggin - + -
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx-2
β-actin
PHDL (4 μM) - + +
Noggin - + -
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx-2
β-actin

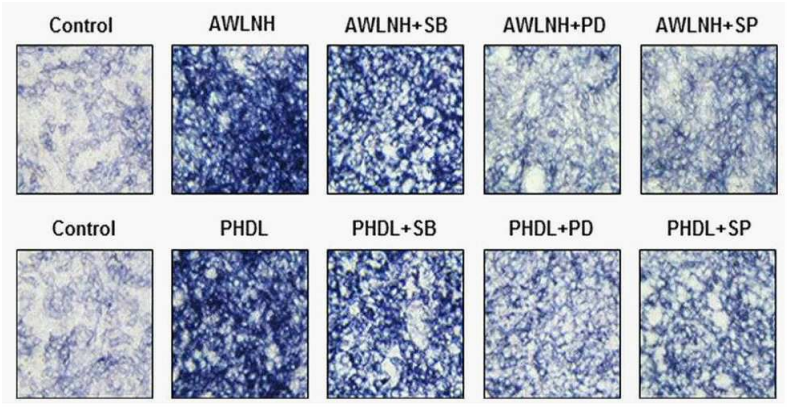
도면9


AWLNH (4 μM) - + +
Noggin - + -
p-p38
p38
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
PHDL (4 μM) - + +
Noggin - + -
p-p38
p38
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK

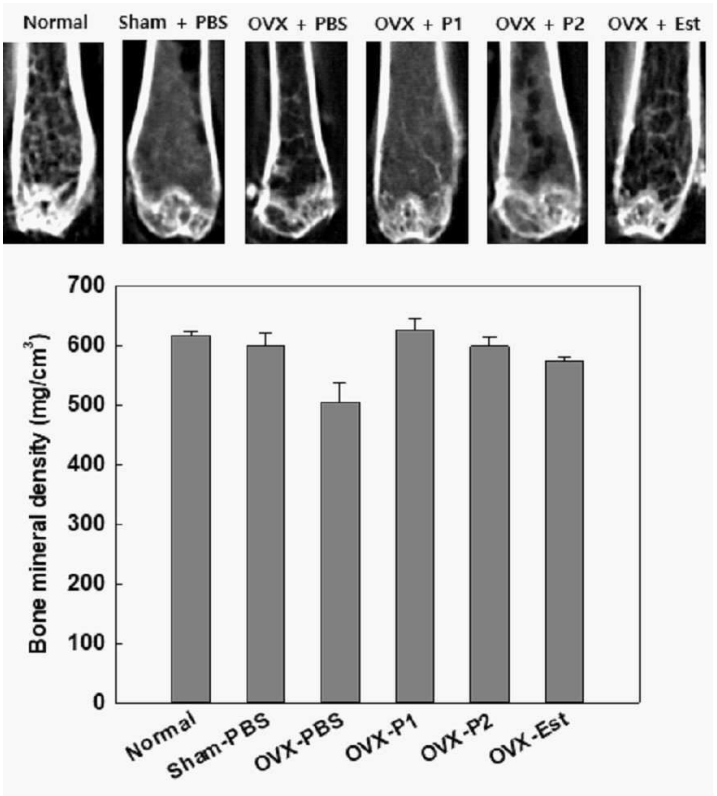
도면10


AWLNH - + + + +
SB203580 - - + - -
PD98059 - - - + -
SP600125 - - - - +
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx2
β-actin
PHDL - + + + +
SB203580 - - + - -
PD98059 - - - + -
SP600125 - - - - +
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx2
β-actin

도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Pukyong National University

<120> Composition for preventing and treating bone disease comprising

cockle protein-derived peptides as active ingredient

<130> PN1701-021

<150> KR 1020170017326

<151> 2017-02-08

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Ala Trp Leu Asn His

1 5

<210> 2

<211

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 2

Pro His Asp Leu

1