

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 10월 5일 (05.10.2023) WIPO | PCT



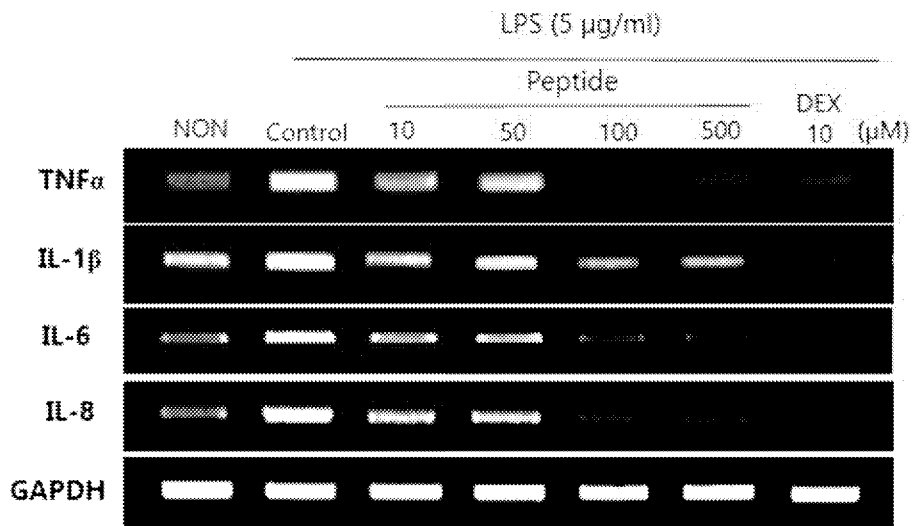
(10) 국제공개번호
WO 2023/191384 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/003862
- (22) 국제출원일: 2023년 3월 23일 (23.03.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0040544 2022년 3월 31일 (31.03.2022) KR
- (71) 출원인: (주)케어젠 (CAREGEN CO., LTD.) [KR/KR];
14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38,
Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 정용지 (CHUNG, Yong Ji); 14119 경기도 안양
시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). 김
은미 (KIM, Eun Mi); 14119 경기도 안양시 동안구 엘
에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). 김선수 (KIM,
Seon Soo); 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번
길 46-38, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP); 04521
서울특별시 중구 청계천로 30, 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: PEPTIDE HAVING ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-FIBROTIC ACTIVITIES AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 항염증 및 항섬유화 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도

RT-PCR



(57) Abstract: A peptide of the present invention has the activity of inhibiting the expression of inflammatory cytokine genes, inflammatory cytokine proteins, or proteins related to inflammatory cytokine signaling in lung cells where inflammatory responses are induced. In addition, the peptide can reduce the number of neutrophils in lung tissues where inflammatory responses are induced. Therefore, the peptide of the present invention can be used as an active substance useful for the treatment, prevention or amelioration of lung inflammatory diseases.

(57) 요약서: 본 발명의 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질의 발현을 억제하는 활성을 갖는다. 또한, 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 폐의 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선에 유용한 활성물질로 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2023/191384 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항염증 및 항섬유화 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] [관련출원과의 상호인용]
- [2] 본 출원은 2022년 03월 31일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0040544호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국특허출원 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [3] [기술분야]
- [4] 본 발명은 항염증 및 항섬유화 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 폐 염증성 질환 또는 폐섬유증의 치료, 예방, 또는 개선 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [5] 인간의 폐는 신체의 6% 부피를 차지하고, 다수의 작은 가스낭인 폐포로 구성되어 있다. 폐의 일차적 목적은 전신 순환계와 가스 상호 교환을 촉진하는 것이다. 폐가 어떠한 원인에 의해서든 자극이 되어 염증반응(inflammation response) 유발하게 되면 폐에서의 면역 세포인 호중구, 대식세포, 중성구, 비만세포 등의 세포와, 여러가지 폐 세포로부터 사이토카인(cytokine)이나 성장인자(growth factor)가 분비된다. 염증성 사이토카인은 염증성 폐질환의 중요한 매개물질로 알려져 있는데, 폐 상피세포는 염증세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 인터루킨(interleukin), 케모카인(chemokines), 콜로니 자극인자(colony stimulating factors)와 성장인자(growth factor)등을 생산하여 분비함으로써 국소 염증 부위에서 사이토카인 네트워크에 중요한 역할을 한다.
- [6] 폐에서의 염증성 질환으로서 대표적인 질환인 천식과 만성폐쇄성폐질환(COPD)은 모두 만성적인 기도 염증에 의해서 유발되는 질환이며, 전 세계적으로 매우 흔하고, 그 유병율도 급증하고 있다. 천식 환자에서는 기도의 점막(mucosa)과, 점막하(submucosa)층에 호산구, 비만세포와 CD4+T 세포의 침범이 발생되며, 이들 세포는 IL-4, IL-5, IL-13를 생산 분비하고 있다. 또한, 폐의 섬유증은 폐에서의 염증반응이 매우 중요한 발병 원인이라고 알려져 있다. 대부분의 장기는 조직 손상후에 염증과 치유 과정을 거치게 되는데, 만약 손상이 작은 경우는 정상 구조와 기능을 유지하지만, 계속적인 손상이 있으면 치유 과정에서 조직이 섬유화 되는 과정을 밟게 된다.
- [7] 현재 사용되고 있는 폐 염증성 질환의 치료제로는 염증을 줄여주기 위한 항염증제로서 코르티코 스테로이드 제제가 가장 많이 사용되고 있으며, 그 외에도 면역반응이나 사이토카인을 표적으로 하는 약물로 Th1 반응을 활성화시키거나, Th2 반응을 억제시키는 치료제, 사이토카인 억제제로서 항 IL-2, 항 IL-4, 항 IL-5,

항 IL-9, 항 IL-13, 항 PGD2, 항 TNF- α , 비만세포 억제제, PPAR- γ 촉진제, 항-IgE, 항 CD23 등의 치료제가 개발되고 있다. 그러나, 이러한 약물들은 실제 임상에서 부작용이 발생하거나 실제 치료 효과가 미약하여, 보다 안전하고 높은 효능을 보이면서, 비용면에서 경제적인 새로운 약물의 개발이 절실한 실정이다.

[8] [선행기술문헌]

[9] [특허문헌 1] WO 2011/029931

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 항염증 활성 특히 폐에서의 염증을 억제하고 폐 섬유화로의 진행을 억제할 수 있는 활성을 갖는 펩타이드를 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 본 발명의 펩타이드가 폐에서의 염증반응을 현저히 완화시켜 주고, 폐의 섬유화로의 진행도 효과적으로 억제한다는 것을 폐세포 및 동물실험을 통해 증명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[11] 따라서, 본 발명의 목적은 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것에 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 폐 염증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 폐의 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

과제 해결 수단

[14] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[15] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[17] 이하에서 본 발명을 상세하게 설명한다.

[18] 1. 펩타이드 및 이의 활성

[19] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

[20] 본 명세서의 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.

[21] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 변형 없이 사용될 수 있으나, 상기 펩타이드가 가지는 본래의 활성, 예컨대 항당뇨 및 항비만 활

성에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환, 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체 또는 단편을 사용할 수 있다.

- [22] 본 발명의 펩타이드는 그 활성을 변화시키지 않는 범위내에서 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 변형될 수 있다.
- [23] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열이란 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 각각 75% 이상, 예컨대 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 의미한다. 또한, 상기 펩타이드에는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열이 추가적으로 포함할 수 있다.
- [24] 본 발명의 펩타이드는 아미노산 서열의 일부 부위를 선정하고 그 활성을 증가시키기 위해 N-말단 및/또는 C-말단 변형이 유도된 것일 수 있다. 이러한 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 통해 본 발명의 펩타이드의 안정성을 현저하게 향상시킬 수 있으며, 예를 들어, 펩타이드의 생체 내 투여 시 반감기를 증가시킬 수 있다. 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 인 비보에서의 안정성 뿐만 아니라, 저장안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 포함하는 의미이다.
- [25] 상기 N-말단 변형은 펩타이드의 N-말단에 아세틸기(acetyl group), 플루오레닐 메톡시카르보닐기(fluorenylmethoxycarbonyl group), 포르밀기(formyl group), 팔미토일기(palmitoyl group), 미리스틸기(myristyl group), 스테아릴기(stearyl group) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG)로 이루어진 군으로부터 선택된 보호기가 결합한 것일 수 있다. 상기 C-말단 변형은 펩타이드의 C-말단에 히드록시기(hydroxyl group, -OH), 아미노기(amino group, -NH₂), 아자이드(azide, -NHNH₂) 등이 결합한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 펩타이드는 본 발명이 속하는 기술분야에서 널리 알려진 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성방법, 특히 고상 합성기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성기술(US 등록특허 제 5,516,891호)에 따라 제조될 수 있다.
- [27] 본 발명의 펩타이드는 염증반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질의 발현을 억제하는 활성을 갖는다.

- [28] 일 구현예에서, 발현이 억제되는 상기 염증성 사이토카인 유전자는 $\text{TNF } \alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 및 COX-2 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [29] 일 구현예에서, 상기 발현이 억제되는 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질은 $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , COX2 , IL-8 , p-JNK , p-ERK , p-PI3K , p-AKT , p-ERK , 및 Myeloperoxidase으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [30] 본 발명의 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 섬유화 유전자의 발현을 억제한다.
- [31] 일 구현예에서, 상기 발현이 억제되는 섬유화 유전자는 $\alpha\text{-SMA}$, Collagen1A1 , Fibronectin1 , 및 Tenascin C 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [32] 본 발명의 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시킬 수 있다.
- [33] 상술한 본 발명의 펩타이드가 상기와 같은 활성을 가짐으로써 폐의 염증성 질환을 치료, 예방 또는 개선하는데에 매우 우수한 효능을 발휘할 수 있다.
- [34] **2. 폐 염증성 질환 치료 또는 예방용 조성물**
- [35] **약학적 조성물**
- [36] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [37] 본 발명의 펩타이드는 상술한 바와 같이 염증 반응 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 단백질, 또는 신호전달 관련 단백질들의 발현을 억제하므로 우수한 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방 활성을 갖는다.
- [38] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 폐 염증성 질환은 천식, 알러지성 천식, 기관지염, 만성 기관지염, 급성 기관지염, 세기관지염, 미만성 범세기관지염, 기관지 확장증, 흉막염, 폐포염, 혈관염, 폐렴, 과민성 폐렴, 만성폐쇄성폐질환, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 연기 흡입 폐손상, 및 열에 의한 폐손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명의 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질의 발현을 억제할 수 있다.
- [40] 상기 염증성 사이토카인 유전자는 $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 및 COX-2 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [41] 상기 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질은 IL-1 β , IL-6, COX2, IL-8, p-JNK, p-ERK, p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 Myeloperoxidase으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [42] 본 발명의 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 섬유화 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [43] 상기 섬유화 유전자는 α -SMA, Collagen1A1, Fibronectin1, 및 Tenascin C 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [44] 본 발명의 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시킬 수 있다.
- [45] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상술한 펩타이드의 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것일 수 있다.
- [46] 상기 용어 "치료학적 유효량"은 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분인 펩타이드가 그 활성 또는 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미하고, 예컨대, 폐의 염증성 질환의 치료 또는 예방의 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [47] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [49] 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed., 1995, Williams & Wilkins)에 상세히 기재되어 있다.
- [50] 본 발명의 약학적 조성물은 폐의 염증성 질환을 치료하기 위한 적합한 모든 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육내 주입, 복강내 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [51] 상기 약학적 조성물의 투여량은 1일당 0.0001 μ g 내지 100 mg, 0.001 μ g 내지 100 mg, 0.01 μ g 내지 100 mg, 0.1 μ g 내지 100 mg, 또는 1.0 μ g 내지 1000 mg 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [52] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체

및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[53] 식품 조성물

[54] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[55] 상기 폐 염증은 천식, 알러지성 천식, 기관지염, 만성 기관지염, 급성 기관지염, 세기관지염, 미만성 범세기관지염, 기관지 확장증, 흉막염, 폐포염, 혈관염, 폐렴, 과민성 폐렴, 만성폐쇄성폐질환, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 연기 흡입 폐손상, 및 열에 의한 폐손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환에 의한 폐 염증일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[56] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[57] 본 발명의 폐 염증 또는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질의 발현을 억제할 수 있다.

[58] 상기 염증성 사이토카인 유전자는 TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[59] 상기 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질은 IL-1 β , IL-6, COX2, IL-8, p-JNK, p-ERK, p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 Myeloperoxidase으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[60] 본 발명의 폐 염증 또는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 섬유화 유전자의 발현을 억제할 수 있다.

[61] 상기 섬유화 유전자는 α -SMA, Collagen1A1, Fibronectin1, 및 Tenascin C 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[62] 본 발명의 폐 염증 또는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물에서, 상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시킬 수 있다.

[63] 본 발명의 기능성 식품 조성물에서 펩타이드는 전체 조성물 중량에 대해 0.0001 중량% 내지 10 중량%의 범위내에서 적절한 양을 선택하여 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [64] 일 구현예에서, 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상기 펩타이드의 식품학적 유효량 및 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것일 수 있다.
- [65] 본 발명의 식품 조성물은 상기 유효성분으로서 펩타이드 뿐만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로오스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제, 타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 상기 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [66] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상술한 성분 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 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 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 기능성 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 펩타이드 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함될 수 있다.
- [67] 본 발명의 다른 측면에서, 상술한 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 폐 염증성 질환의 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 폐 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선 방법을 제공한다.
- [68] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상술한 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 폐 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선하는 데 사용하는 용도(use)를 제공한다.
- [69] 본 발명의 또 다른 측면에서, 폐 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선하기 위한 의약(medicament) 또는 기능성 식품 조성물의 제조하기 위한 상술한 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 용도를 제공한다.
- [70] 상기 폐 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선 방법에는 상술한 본 발명의 펩타이드, 약학적 조성물에 관해 설명된 내용이 모두 동일하게 적용될 수 있으며, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 기재하지 않는다.

발명의 효과

- [71] 본 발명의 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된

단백질의 발현을 억제하는 활성을 갖는다. 또한, 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 폐의 염증성 질환의 치료, 예방, 또는 개선에 유용한 활성물질로 사용될 수 있다.

- [72] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [73] 도 1은 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 MRC-5 세포에서 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, 및 IL-8의 유전자 발현에 대한 제조예 1의 펩타이드로 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [74] 도 2는 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 A549 세포에서 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2 유전자 발현에 대한 제조예 1의 펩타이드로 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [75] 도 3은 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 MRC-5 세포에서 IL-1 β , IL-6, pJNK, pERK의 발현에 대한 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [76] 도 4a 및 도 4b는 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 A549 세포에서 Phospho-PI3K, Phospho-AKT, Phospho-ERK, IL-1 β , IL-6, COX2의 발현에 대한 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [77] 도 5a 및 도 5b는 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 MRC-5 세포에서 IL-6 및 IL-8의 발현에 대한 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [78] 도 6은 LPS 처리에 의해 염증반응 유도된 MRC-5 세포에서 섬유화 유전자 α -SMA 및 Collagen1A1 유전자의 발현 수준에 대한, 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [79] 도 7은 TGF- β 1 처리한 MRC-5 세포에서 섬유화 유전자 α -SMA, Fibronectin1, Collagen1A1, 및 Tenascin C의 유전자의 발현 수준에 대한, 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [80] 도 8은 IL-1 β 처리한 A549 세포에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2의 유전자 발현 수준에 대한, 제조예 1의 펩타이드 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [81] 도 9a, 도 9b 및 도 9c는 IL-1 β 처리한 A549 세포에서 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6, 및 IL-8의 발현 수준에 대한, 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [82] 도 10a 및 도 10b는 LPS에 의해 폐 염증 유도된 마우스의 기관지세척액에서 총 세포수, 호중구(neutrophil)수, 대식세포(macrophage)의 수에 대한 제조예 1의 펩타이드 처리의 영향을 측정한 결과이다.

- [83] 도 11a 내지 도 11d는 LPS에 의해 폐 염증 유도된 마우스의 기관지세척액에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, Myeloperoxidase(MPO)의 발현수준에 대한 제조예 1의 펩타이드의 처리의 영향을 측정한 결과이다.
- [84] 도 12a 및 도 12b는 LPS에 의해 폐 염증 유도된 마우스의 폐조직의 H&E 염색후 관찰한 결과와, 폐포벽의 두께를 측정한 결과와, 총 세포의 수를 측정한 결과와, 폐포의 수를 측정한 결과이다.
- [85] 도 13a는 BLM(Bleomycin)에 의해 폐 섬유증 유도된 마우스의 체중을 측정한 결과이고, 도 13b는 상기 마우스의 기관지세척액에서 대식세포(macrophage) 및 림프구(lymphocyte)의 수에 대한 제조예 1의 펩타이드를 처리한 영향을 측정한 결과이고, 도 13c 및 도 13d는 상기 마우스의 기관지세척액에서 세포들을 현미경으로 관찰한 결과 및 총 세포수를 측정한 결과이다.
- [86] 도 14a는 BLM(Bleomycin)에 의해 폐 섬유증 유도된 마우스의 폐조직의 H&E 염색을 관찰한 결과이고, 도 14b는 상기 H&E 염색한 폐 조직사진에서 각처리 군의 폐포의 수를 측정한 결과와, 총 세포의 수를 측정한 결과와, 폐포벽의 두께를 측정한 결과이다.
- [87] 도 15a는 BLM(Bleomycin)에 의해 폐 섬유증 유도된 마우스의 폐조직의 Trichrome 염색을 행하여 관찰한 결과이며, 도 15b는 정상군의 콜라겐의 양을 100%로 하여 나머지 처리군의 콜라겐의 양의 변화를 %로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [88] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [89] **제조예 1: 펩타이드의 제조**
- [90] 자동 펩타이드 합성기(Milligen 9050, Millipore, 미국)를 이용하여 하기의 [표 1]에 기재된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, C18 역상 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(Waters Associates, 미국)를 이용하여 이들 합성된 펩타이드를 순수 분리하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC BEH300 C18 (2.1 mm X 100 mm, 1.7 μ m, Waters Co, 미국)을 이용하였다.

- [91] [표1]

서열번호	펩타이드의 아미노산 서열
1	KYLLVHRPYYRR

- [92] 이어서, 상기 제조한 서열번호 1의 펩타이드에 대한 효능을 평가하였다.
- [93] **실험예 1: LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인 유전자 발현의 억제**
- [94] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 염증성 사이토카인 유전자의 발현을 억제하는지에 대해서 실험하였다.
- [95] **1. MRC-5 세포**

[96] MRC-5 세포 (lung fibroblast cell)를 12-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS(Sigma Aldrich) $5\mu\text{g/ml}$ 처리군(음성대조군), LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 제조예 1의 펩타이드(10, 50, 100, $500\mu\text{M}$) 처리군, LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 Dexamethasone (DEX) $10\mu\text{M}$ 처리군(양성대조군)에 대해, 활성물질 및 약물들을 처리하고 24시간 후에 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 MRC-5 세포에서 easy-BLUETMTotal RNA 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)로 cDNA 로 변환시켰다. PCR premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머(primer)로 반응 혼합물을 준비한 후, PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이어서, 아가로스 겔 전기영동에 의해 mRNA 발현 패턴을 결정하였다. 실험에 사용한 프라이머의 염기서열은 아래의 [표 2]에 기재하였다. 실험결과, 도 1에서 보여지는 바와 같이, 염증유도인자인 LPS 처리에 의해 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, 및 IL-8의 유전자 발현이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드로 처리할 경우 증가된 상기 유전자들의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[97] **2. A549 세포**

[98] A549 세포(Human alveolar basal epithelial cell)를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS(Sigma Aldrich) $5\mu\text{g/ml}$ 처리군(음성대조군), LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 제조예 1의 펩타이드(10, 50, 100, $500\mu\text{M}$) 처리군, LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 Dexamethasone (DEX) $10\mu\text{M}$ 처리군(양성대조군)에 대해, 활성 물질 및 약물들을 처리하고 3시간 후에 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 상기 처리군 A549 세포에서 easy-BLUETMTotal RNA 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)로 cDNA 로 변환시켰다. PCR premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머(primer)로 반응 혼합물을 준비한 후 PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이어서, 아가로스 겔 전기영동에 의해 mRNA 발현 패턴을 결정하였다. 실험에 사용한 프라이머의 염기서열은 아래의 [표 2]에 기재하였다. 실험결과, 도 2에서 보여지는 바와 같이, 염증유도인자인 LPS 처리에 의해 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2 유전자 발현이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드로 처리할 경우 증가된 상기 유전자들의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[99] [표2]

유전자	프라이머	서열(5' -> 3')	서열번호
TNF- α	F	AACATCCAACCTTCCCAAACG	2
	R	GACCCTAAGCCCCCAATTCTC	3
IL-1 β	F	TTCGACACATGGGATAACGA	4
	R	TCTTTCAACACGCAGGACAG	5
IL-6	F	AAA GAG GCA CTG CCA GAA AA	6
	R	ATC TGA GGT GCC CAT GCT AC	7
IL-8	F	GAAGGTGCAGTTTTGCCAAG	8
	R	ACCCTCTGCACCCAGTTTTC	9
COX-2	F	ATCATTCACCAGGCAAATTGC	10
	R	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG	11
GAPDH	F	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	12
	R	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	13

[100] 실험예 2 : LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인 단백질 발현의 억제

[101] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 염증성 사이토카인 단백질들의 발현을 억제하는지에 대해서 실험하였다.

[102] 1. 웨스턴 블로팅 분석 1: MRC-5 세포

[103] MRC-5 세포(lung fibroblast cell)를 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS (Sigma Aldrich) 5 μ g/ml 처리군(음성대조군), LPS 5 μ g/ml 및 제조예 1의 펩타이드 (10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, LPS 5 μ g/ml 및 Dexamethasone (DEX) 10 μ M 처리군(양성 대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 24시간 배양하였다. 배양한 각 처리군 및 대조군의 세포에 용해버퍼를 첨가하여 용해시킨 후 4°C 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 획득한 단백질을 BCA Protein Assay 키트 (Sigma)를 사용하여 정량하였다. 단백질은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 수행한 후, 멤브레인(membrane)에 전기이동(electrotransfer)하였다. 단백질이 부착된 멤브레인을 5% 탈지유(skim milk)로 처리하여 블로킹(blocking)한 후, 1차 항체를 4°C에서 하룻밤(overnight) 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 다시 PBS-T로 세척한 후 Gel Doc(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 Western 검출 시약(Elpis Biotech, Daejeon, Korea)을 통해 시각화하였다. 실험에 사용한 항체는

다음과 같다: 항-IL-1 β 항체(Cell signaling technology(CST), USA), 항-IL-6 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA), 항-pJNK 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA), 항-pERK 항체(Cell signaling technology(CST), USA), 항- β -Actin 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA). 실험결과, 도 3에서 보여지는 바와 같이, LPS를 처리한 경우 IL-1 β , IL-6, pJNK, pERK의 발현이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해, IL-1 β , IL-6, pJNK, pERK의 발현이 농도 의존적으로 다시 감소하였다.

[104] **2. 웨스턴 블로팅 분석 2 : A549 세포**

[105] A549 세포(Human alveolar basal epithelial cells)를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS (Sigma Aldrich) (5 μ g/ml) 처리군(음성대조군), LPS (5 μ g/ml) 및 제조예 1의 펩타이드 (10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, LPS (5 μ g/ml) 및 Dexamethasone (DEX) (10 μ M) 처리군(양성 대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 24시간 배양하였다. 배양한 각 처리군 및 대조군의 세포에 용해버퍼를 첨가하여 용해시킨 후 4°C 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 획득한 단백질을 BCA Protein Assay 키트(Sigma)를 사용하여 정량하였다. 단백질은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)한 다음 멤브레인(membrane)에 전기이동(electrotransfer)하였다. 단백질이 부착된 멤브레인을 5% 탈지유(skim milk)로 처리하여 블로킹(blocking)한 후, 1차 항체를 4°C에서 하룻밤(overnight) 반응시켰다. PBS-T로 세척한 다음 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 다시 PBS-T로 세척한 후 Gel Doc(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 Western 검출 시약(Elpis Biotech, Daejeon, Korea)을 통해 시각화하였다. 실험에 사용한 항체는 다음과 같다: 항-IL-1 β 항체: (Cell signaling technology(CST), USA), 항-IL-6 항체: (Santa Cruz Biotechnology, USA), 항-COX2 항체: (Santa Cruz Biotechnology, USA), 항-Phospho-PI3K 항체: (Cell signaling technology(CST), USA), 항-Phospho-AKT 항체: (Cell signaling technology(CST), USA), 항-Phospho-ERK 항체: (Cell signaling technology(CST), USA), 항- β -Actin 항체: (Santa Cruz Biotechnology, USA). 실험결과, 도 4a 및 도 4b에서 보여지는 바와 같이, LPS를 처리한 경우 Phospho-PI3K, Phospho-AKT, Phospho-ERK, IL-1 β , IL-6, COX2의 발현이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해 단백질들의 발현수준이 농도 의존적으로 감소하였다.

[106] **3. ELISA 분석**

[107] MRC-5 세포(lung fibroblast cell)를 12-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS (Sigma Aldrich) 5 μ g/ml

처리군(음성대조군), LPS 5 μ g/ml 및 제조예 1의 펩타이드 (10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, LPS 5 μ g/ml 및 Dexamethasone (DEX) 10 μ M 처리군(양성 대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 72시간 배양하였다. 세포 배양 후 배양액을 4°C 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 상등액에 대해 IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D systems) 및 IL-8 Quantikine ELISA kit (R&D systems)을 사용하여 키트 지시서의 사용방법에 따라 ELISA 분석을 수행한 뒤, Microplate reader를 이용하여 흡광도를 450nm 에서 측정하였다. 실험결과, 도 5a 및 도 5b에서 보여지는 바와 같이, LPS를 처리한 경우 IL-6 및 IL-8의 발현 수준이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해 IL-6 및 IL-8의 발현 수준이 농도 의존적으로 감소하였다.

[108] 실험예 3 : LPS에 의해 유도된 섬유화(fibrosis) 유전자 발현의 억제

[109] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 LPS에 의해 유도된 섬유화 유전자들의 발현을 억제하는지에 대해서 실험하였다. MRC-5 세포(lung fibroblast cell)를 12-웰 플레이트에 2 x 10⁵ 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, LPS (Sigma Aldrich) 5 μ g/ml 처리군(음성 대조군), LPS 5 μ g/ml 및 제조예 1의 펩타이드 (10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, LPS 5 μ g/ml 및 Dexamethasone (DEX) 10 μ M 처리군(양성 대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 3시간 후에 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 MRC-5 세포에서 easy-BLUETMTotal RNA 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 cDNA로 변환시켰다. PCR premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머로 반응 혼합물을 준비한 후 PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이어서, 아가로스 겔 전기영동에 의해 mRNA 발현 패턴을 결정하였다. 실험에 사용된 프라이머의 염기서열은 아래 표 3에 기재하였다.

[110] [표3]

유전자	프라이머	서열(5' -> 3')	서열번호
α -SMA	F	GGTGCTGTCTCTC TATGCCTCTGGA	14
	R	CCCATCAGGCAA CTCGTAACTCTTC	15
Collagen1A1	F	CATCACCTACCACTGCAAGAAC	16
	R	ACGTCGAAGCCGAATTCC	17
GAPDH	F	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	12

	R	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	13
--	---	----------------------------	----

[111] 실험결과, 도 6에서 보여지는 바와 같이, LPS를 처리한 경우 α -SMA 및 Collagen1A1 유전자의 발현 수준이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해 α -SMA 및 Collagen1A1 유전자의 발현 수준이 농도 의존적으로 다시 감소함을 확인하였다.

[112] 실험예 4 :TGF- β 1에 의해 유도된 섬유화 유전자 발현의 억제

[113] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 TGF- β 1에 의해 유도된 섬유화(fibrosis) 유전자들의 발현을 억제하는지에 대해서 실험하였다. MRC-5 세포(lung fibroblast cell)를 12-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후에, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, TGF- β 1 5ng/ml 처리군(음성대조군), TGF- β 1 5ng/ml 및 제조예 1의 펩타이드 (10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, TGF- β 1 5ng/ml 및 Dexamethasone (DEX) 10 μ M 처리군(양성 대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 3시간 후에 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 MRC-5 세포에서 easy-BLUETMTotal RNA 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하여 cDNA로 변환시켰다. PCR premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머로 반응 혼합물을 준비한 후 PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이어서, 아가로스 겔 전기영동에 의해 mRNA 발현 패턴을 결정하였다. 실험에 사용된 프라이머의 염기서열은 아래 표 4에 기재하였다.

[114] [표4]

유전자	프라이머	서열(5' -> 3')	서열번호
α -SMA	F	GGTGCTGTCTCTCTATGCCTCTGGA	14
	R	CCCATCAGGCAACTCGTAACTCTTC	15
Fibronectin1	F	GGATGCTCCTGCTGTCAC	18
	R	CTGTTTGATCTGGACCTGCAG	19
Collagen1A1	F	CATCACCTACCACTGCAAGAAC	16
	R	ACGTCGAAGCCGAATTCC	17
Tenascin C	F	CCAGCGACCATCAACGCAGC	20
	R	GGGGCTTGTTTCAGTGGATGCCT	21
GAPDH	F	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	12

	R	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	13
--	---	----------------------------	----

- [115] 실험결과, 도 7에서 보여지는 바와 같이, TGF- β 1을 세포에 처리한 경우, α -SMA, Fibronectin1, Collagen1A1, 및 Tenascin C의 유전자의 발현이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해, 유전자들의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다.
- [116] 실험예 5 :IL-1 β 에 의해 유도된 염증성 사이토카인 유전자 발현의 억제
- [117] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 염증성 사이토카인 유전자의 발현을 억제하는지에 대해서 실험하였다. A549 세포(Human alveolar basal epithelial cell)를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군, IL-1 β (2ng/ml) 처리군(음성대조군), IL-1 β (2ng/ml) 및 제조예 1의 펩타이드(10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, IL-1 β (2ng/ml) 및 Dexamethasone (DEX) 10 μ M 처리군(양성 대조군)에 대해, 활성 물질 및 약물들을 처리하고 3시간 후에 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 상기 각군의 A549 세포에서 easy-BLUETMTotal RNA 추출 키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)로 cDNA로 변환시켰다. PCR premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머로 반응 혼합물을 준비한 후 PCR machine(Eppendorf, Germany)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이어서, 아가로스 젤 전기영동에 의해 mRNA 발현 패턴을 결정하였다. 실험에 사용한 프라이머의 염기서열은 [표 2]와 같다. 실험결과, 도 8에서 보여지는 바와 같이, IL-1 β 처리에 의해 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2 유전자 발현 수준이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드로 처리할 경우 상기 유전자들의 발현 수준이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.
- [118] 실험예 6 :IL-1 β 에 의해 유도된 염증성 사이토카인 단백질 발현의 억제
- [119] 제조예 1에서 제조한 서열번호 1의 펩타이드가 폐세포에서 IL-1 β 에 의해 유도된 염증성 사이토카인 단백질의 발현을 억제하는지에 대해 실험하였다. A549 세포(Human alveolar basal epithelial cells)를 12-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰(well)로 시딩(seeding)하여 실험에 사용하였다. 10% FBS를 포함한 배지로 1일간 배양한 후, FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 4시간 동안 기아상태(starvation)를 유도하였다. 세포에 아무것도 처리하지 않은 정상군(NON), IL-1 β (2ng/ml) 처리군(음성대조군, NC), IL-1 β (2ng/ml) 및 제조예 1의 펩타이드(10, 50, 100, 500 μ M) 처리군, IL-1 β (2ng/ml) 및 Dexamethasone (DEX) (10 μ M) 처리군(양성대조군)들의 세포들을 상기한 활성물질 및 약물들을 처리하고 72시간 배양하였다. 세포 배양후 배양액을 4°C 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 상등액에 대해 IL-6 Quantikine ELISA Kit(R&D systems), IL-8 Quantikine ELISA Kit(R&D

systems), IL-1 β Quantikine ELISA Kit(R&D systems)을 사용하여 키트 지시서의 사용방법에 따라 ELISA 분석을 수행한 뒤, Microplate reader를 이용하여 흡광도를 450nm 에서 측정하였다. 실험결과, 도 9a, 도 9b 및 도 9c에서 보여지는 바와 같이, IL-1 β 를 처리한 경우, IL-1 β , IL-6, 및 IL-8의 발현 수준이 증가하였으나, 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해 IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 발현 수준이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

[120] 실험예 7 : LPS에 의해 유도된 급성 폐염증의 억제

[121] 1. 동물 실험

[122] 동물 실험에는 BALB/c 마우스 (Female/7W)를 이용하였으며, LPS를 주입하여 급성 폐 염증 모델(acute lung inflammation model)을 확립하였다. 7 주령 BALB/c 암컷 마우스를 5 마리씩 5 그룹으로 아래 [표 5]와 같이 나누어 실험을 수행하였다. 1일차에 G2-G5 그룹에 비강을 통해 LPS(10 μ g/50 μ l/mouse)를 투여하였고, LPS 투여 1시간 후에, G3 및 G4 그룹은 제조예 1의 펩타이드(0.5 mg, 1 mg)을 비강투여하였으며, G5 양성대조군은 Dexamethasone (100 μ g)을 복강투여하였다. 활성물질 및 약물을 투여하고 24 시간 경과 후 마우스를 희생하여 기관지 세척액(Bronchoalveolar Lavage Fluid) 및 폐조직을 얻고, 이를 다음 분석에 사용하였다.

[123] [표5]

그룹	성별	동물 수 및 번호	테스트 그룹	LPS	펩타이드 /약물	Dose (mg/head)	Dose amount (mL/head)
G1	Female	5(1-5)	정상군	-	-	-	-
G2	Female	5(6-10)	음성대조군	+	-	-	-
G3	Female	5(11-15)	실험군 1	+	펩타이드(IN)	0.5mg	0.05 mL
G4	Female	5(16-20)	실험군 2	+	펩타이드(IN)	1mg	0.05 mL
G5	Female	5(21-25)	양성대조군	+	DEX(IP)	100 μ g	0.05 mL

[124] [표 5]에서 펩타이드: 제조예1의 펩타이드, DEX: Dexamethasone, IN: 비강투여 (intranasal administration), IP: 복강투여 (intraperitoneal administration).

[125] 2. 기관지세척액(BALF) 수득 및 세포의 계수

[126] 마우스를 마취한 후, 70% 에탄올로 시술 부위를 소독하였다. 이어서, 마우스의 아랫입술에서부터 흉부까지 피부를 절개하였으며, 기도를 열어준 뒤 IV catheter (BD, USA)를 통해 PBS 1ml의 주입 및 회수를 2회 반복하여 기관지세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)를 채취하였다. 채취된 BALF를 3000rpm에

서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하고, 분리된 세포는 0.5 ml PBS에 재현탁한 뒤, 트립판 블루(trypsin blue) 용액과 1:1 비율로 희석하고, hemacytometer를 이용하여 총 세포를 계수하였다. 남은 세포 현탁액에서 10 μ l를 이용하여 슬라이드 글라스에 도말(smear) 하였고, different cell count를 위하여 Diff-Quik staining solution (Sysmex, Japan)으로 세포를 염색하였다. 염색이 끝난 후, 현미경을 통해 세포를 관찰 및 계수하였고, 총 세포수 대비 면역세포수를 환산하여 그래프로 나타내었다. 도 10a 및 도 10b에 나타난 실험결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 호중구(neutrophil)수는 LPS 처리에 의해 증가하였고, 증가된 호중구의 수는 제조예 1의 펩타이드 처리에 의해 농도 의존적 방식으로 유의하게 감소하였다. 대식세포(macrophage)는 LPS 처리에 의해 유의적 증가가 없었으며, 제조예 1의 펩타이드 처리에 의해서도 증가 또는 감소가 없었다.

[127] **3. 기관지세척액(BALF)에서 친염증성 단백질의 발현 분석**

[128] 상기 채취한 BALF에 대해 친염증성 단백질들에 대해 ELISA 분석을 수행하였다. 채취된 BALF를 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 대해 TNF- α Quantikine ELISA kit (R&D systems), IL-1 β Quantikine ELISA kit (R&D systems), IL-6 Quantikine ELISA kit (R&D systems), Myeloperoxidase(MPO) Quantikine ELISA Kit (R&D systems)를 사용하여 사용 지침서에 따라 분석을 수행한 뒤, Microplate reader를 이용하여 흡광도를 450nm에서 측정하였다. 실험결과, 도 11a 내지 도 11d에서 알 수 있는 바와 같이, LPS 투여에 의해, TNF- α , IL-1 β , IL-6, Myeloperoxidase(MPO)의 발현수준이 증가하였고, 증가한 상기 사이토카인의 발현수준이 제조예 1의 펩타이드의 처리에 의해 농도 의존적 방식으로 감소하였다.

[129] **4. 폐조직에서의 조직학적 변화 측정**

[130] 동물실험을 수행한 마우스에서 얻은 폐조직을 상온에서 PBS로 세척한 후에, 4% paraformaldehyde (PBS dilution)으로 고정(fixation)하였다. 고정이 완료된 조직을 PBS로 3회 세척하고, 70% 내지 100%의 농도구배 에탄올 연속물(series)을 사용하여 탈수시켰다. 이어서, 폐조직 샘플을 포매(embedding)하고, 4 μ m 두께의 박편으로 절단하였다. 슬라이드 글라스에 위치된 4 μ m 크기의 박편된 표본을 농도구배된 에탄올 연속물로 탈랍(dewaxing) 및 수화(hydration) 시키고, 차레로 hematoxlin 용액에서 1분, Eosin 용액에서 10초 동안 염색하였다. 염색이 끝나면 차레로 90%, 100% 에탄올에 조직 슬라이드를 담가주었으며, 마지막으로 자일렌(xylene)에 5분간, 2회 담근후에 조직 슬라이드의 마운팅(mounting)을 진행하였다.

[131] 폐조직의 H&E 염색을 관찰한 결과는 도 12a에 나타내었다.

[132] 도 12b의 그래프는 폐포벽의 두께를 측정한 결과(정상군의 폐포벽 두께를 100%로 하여 나머지 처리군의 두께의 증가정도를 %로 나타냄, 염색한 폐사진에서의 세포의 수를 측정한 결과(정상군의 세포의 수를 100%로 하여 나머지 처리군의 세포의 수의 증가정도를 %로 나타냄), 폐사진에서의 폐포의 수를 측정한 결

과(정상군의 폐포의 수를 100%로 하여 나머지 처리군의 폐포의 수의 증가 및 감소를 %로 나타냄)를 각각 나타낸다.

[133] 실험예 8 : BLM 유도된 폐섬유증의 억제

[134] **1. BLM 유도 폐섬유증 동물 모델**

[135] 8주령 BALB/c 수컷 마우스를 5 마리씩 4개의 그룹으로 아래 [표 6]와 같이 나누었다. 1 일차에 구강 인두를 통한 Bleomycin 용액(10ng/50 μ l/mouse)을 투여하여 BLM 유도를 1회 진행한 후, 7일차 부터, 주 3회 14 일간 제조예 1의 펩타이드(1 mg/mouse)을 비강투여하였으며, 양성대조군인 Pirfeninone (2mg/mouse)는 주 3회 14일간 경구 투여하였다. BLM 유도 21일차에 마우스를 희생하여 기관지 세척액 및 폐조직을 얻고, 이를 다음 분석에 사용하였다.

[136] [표6]

그룹	성별	동물의 수 및 번호	테스트 그룹	BLM	펩타이드 /약물	Dose (mg/head)	Dose amount (mL/head)
G1	Male	5 (1-5)	정상군	-	-	-	-
G2	Male	5 (6-10)	음성대조군	+	-	-	-
G3	Male	5 (11-15)	실험군	+	펩타이드(IN)	1 mg	0.05 mL
G4	Male	5 (16-20)	양성대조군	+	Pirfeninone (Oral)	2 mg	0.1 mL

[137] 상기 [표 6]에서 펩타이드: 제조예1의 펩타이드, IN: 비강투여(intranasal administration), Oral : 경구투여.

[138] **2. 체중 변화**

[139] 실험을 수행한 마우스의 체중을 측정한 결과를 도 13a에 나타내었다. BLM 유도 폐섬유화 마우스에서 체중이 감소하였으며, 제조예 1의 펩타이드를 투여한 경우 감소되었던 체중이 다시 회복되었다.

[140] **3. 기관지세척액(BALF) 획득 및 세포의 계수**

[141] 실험을 수행한 마우스를 마취한 후, 70% 에탄올로 시술 부위를 소독하였다. 이어서, 마우스의 아랫입술에서부터 흉부까지 피부를 절개하였으며, 기도를 열어준 뒤 IV catheter (BD, USA)를 통해 PBS 1ml의 주입 및 회수를 2회 반복하여 기관지세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)를 채취하였다. 채취된 BALF를 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하고, 분리된 세포는 0.5 ml PBS에 재현탁한 뒤, 트립판 블루(trypan blue) 용액과 1:1 비율로 희석하고, hemacytometer를 이용하여 총 세포를 계수하였다. 남은 세포 현탁액에서 10 μ l를 이용하여 슬라이드 글라스에 도말(smear)하였고, different cell count를 위하여 Diff-Quik staining solution (Sysmex, Japan)으로 세포를 염색하였다. 염색이 끝난

후, 현미경을 통해 세포를 관찰 및 계수하였고, 총 세포수 대비 면역세포수를 환산하여 그래프로 나타내었다. 도 13b에 나타낸 실험결과에서 알 수 있는 바와 같이, 대식세포(macrophage) 및 림프구(lymphocyte)의 수는 BLM 처리에 의해 증가하였고, 증가된 대식세포 및 림프구의 수는 제조예 1의 펩타이드 처리에 의해 감소하였다. 도 13c 및 도 13d에는 세포들을 현미경으로 관찰한 결과 및 총 세포수를 측정한 결과를 나타내었다.

[142] **4. 폐조직에서의 조직학적 변화 측정- H&E 염색**

[143] 동물실험을 수행한 마우스에서 얻은 폐조직을 상온에서 PBS로 세척한 후에, 4% paraformaldehyde (PBS dilution)으로 고정(fixation)하였다. 고정이 완료된 조직을 PBS로 3회 세척하고, 70% 내지 100%의 농도구배 에탄올 시리즈를 사용하여 탈수시켰다. 이어서, 폐조직 샘플을 포매(embedding)하고, 4 μ m 두께의 박편으로 절단하였다. 슬라이드 글라스에 위치된 4 μ m 크기의 박편된 표본을 농도 구배된 에탄올 시리즈로 탈랍(dewaxing) 및 수화(hydration)시키고, 차례로 hematoxlin 용액에서 1분 및 Eosin 용액에서 10초 동안 염색하였다. 염색이 끝나면 차례로 90%, 100% 에탄올에 조직 슬라이드를 담가주었으며, 마지막으로 자일렌(xylene)에 5분간, 2회 담근후에 조직 슬라이드의 마운팅(mounting)을 진행하였다.

[144] 도 14a에는 폐조직의 H&E 염색을 관찰한 결과를 나타내었다.

[145] 도 14b에는 염색한 폐 조직사진에서 각처리 군의 폐포의 수를 측정한 결과, 염색한 폐 조직 사진에서 총 세포의 수를 측정한 결과(정상군의 총 세포의 수를 100%로 하여 나머지 처리군의 총세포 수의 증가정도를 %로 나타냄), 염색한 폐 조직 사진에서 각 처리군의 폐포벽의 두께를 측정한 결과(정상군의 폐포벽 두께를 100%로 하여 나머지 처리군의 두께의 증가정도를 %로 나타냄)을 각각 보여준다.

[146] **5. 폐조직에서의 조직학적 변화 측정- Masson's Trichrome 염색**

[147] 동물실험을 수행한 마우스에서 얻은 폐조직을 상온에서 PBS로 세척한 후에, 4% paraformaldehyde (PBS dilution)으로 고정(fixation)하였다. 고정이 완료된 조직을 PBS로 3회 세척하고, 70% 내지 100%의 농도구배 에탄올 시리즈를 사용하여 탈수시켰다. 이어서, 폐조직 샘플을 포매(embedding)하고, 4 μ m 두께의 박편으로 절단하였다. 슬라이드 글라스에 위치된 4 μ m 크기의 박편된 표본을 농도 구배된 에탄올 시리즈로 탈랍(dewaxing) 및 수화(hydration) 시켰다. Weigert's iron hematoxlin, Biebrich scarlet-acid fuchsin solution, Phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution, 및 아닐린블루 용액(aniline blue solution)에서 각각 10분씩 염색을 수행하였다. 염색 완료후, 1% 아세트산 용액에 2분간 조직 슬라이드를 담근 후 D.W로 세척하였다. 차례로 95%, 100% 에탄올에 조직 슬라이드를 담가주었으며, 마지막으로 자일렌(xylene)에 5분간, 2회 담근 후 조직 슬라이드의 마운팅(mounting)을 진행하였다. 도 15a는 Trichrome 염색법을 이용하여 콜라겐을 염색한 결과이다. 도 15b는 정상군의 콜라겐의 양을 100%로 하여 나머지 처리군의 콜라겐의 양의 변화를 %로 나타내었다. BLM 처리에 의해 유도된 폐의 섬유화

정도를 콜라겐의 양의 변화를 통해서 확인한 결과, 제조예 1의 펩타이드 처리시 폐 조직내의 콜라겐 침착 정도가 뚜렷하게 감소하는 것을 확인하였다.

[148] **제조예 2: 약학적 조성물의 제조**

[149] **2-1. 산제의 제조**

[150] 본 발명의 펩타이드 2 g

[151] 유당 1 g

[152] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[153] **2-2. 정제의 제조**

[154] 본 발명의 펩타이드 100 mg

[155] 옥수수전분 100 mg

[156] 유당 100 mg

[157] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[158] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[159] **2-3. 캡슐제의 제조**

[160] 본 발명의 펩타이드 100 mg

[161] 옥수수전분 100 mg

[162] 유당 100 mg

[163] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[164] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[165] **2-4. 환의 제조**

[166] 본 발명의 펩타이드 1 g

[167] 유당 1.5 g

[168] 글리세린 1 g

[169] 자일리톨 0.5 g

[170] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4g이 되도록 제조하였다.

[171] **2-5. 과립의 제조**

[172] 본 발명의 펩타이드 150 mg

[173] 대두추출물 50 mg

[174] 포도당 200 mg

[175] 전분 600 mg

[176] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[177] **제조예 3: 기능성 식품 조성물의 제조**

[178] **3-1. 건강식품의 제조**

[179] 본 발명의 펩타이드 500 µg

[180] 비타민 혼합물 적량

- [181] 비타민 A 아세테이트 70 mg
- [182] 비타민 E 1.0mg
- [183] 비타민 D 0.13mg
- [184] 비타민 B2 0.15mg
- [185] 비타민 B6 0.5mg
- [186] 비타민 B12 0.2mg
- [187] 비타민 C 10mg
- [188] 비오틴 10mg
- [189] 니코틴산아미드 1.7mg
- [190] 엽산 50mg
- [191] 판토텐산 칼슘 0.5mg
- [192] 무기질 혼합물 적량
- [193] 황산제1철 1.75mg
- [194] 산화아연 0.82mg
- [195] 탄산마그네슘 25.3mg
- [196] 제1인산칼륨 15mg
- [197] 제2인산칼슘 55mg
- [198] 구연산칼륨 90mg
- [199] 탄산칼슘 100mg
- [200] 염화마그네슘 24.8mg
- [201] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분

을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

- [202] **3-2. 건강음료의 제조**
- [203] 본 발명의 펩타이드 500 μ g
- [204] 구연산 1000mg
- [205] 올리고당 100g
- [206] 매실농축액 2g
- [207] 타우린 1g
- [208] 정제수를 가하여 전체 900ml

- [209] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시할 수 있다.

- [210] 상기에서는 본 출원의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는 상기와 같은 특정 실시예만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 폐 염증성 질환은 천식, 알러지성 천식, 기관지염, 만성 기관지염, 급성 기관지염, 세기관지염, 미만성 범세기관지염, 기관지 확장증, 흉막염, 폐포염, 혈관염, 폐렴, 과민성 폐렴, 만성폐쇄성폐질환, 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 연기 흡입 폐손상, 및 열에 의한 폐손상으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 염증성 사이토카인 유전자, 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질의 발현을 억제하는 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 염증성 사이토카인 유전자는 TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 COX-2 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 청구항 3에 있어서,
상기 염증성 사이토카인 단백질 또는 염증성 사이토카인 신호전달에 관련된 단백질은 IL-1 β , IL-6, COX2, IL-8, p-JNK, p-ERK, p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 Myeloperoxidase으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 세포에서 섬유화 유전자의 발현을 억제하는 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 섬유화 유전자는 α -SMA, Collagen1A1, Fibronectin1, 및 Tenascin C 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 펩타이드는 염증 반응이 유도되는 폐 조직에서 호중구의 수를 감소시키는 것인, 폐 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 염증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물.

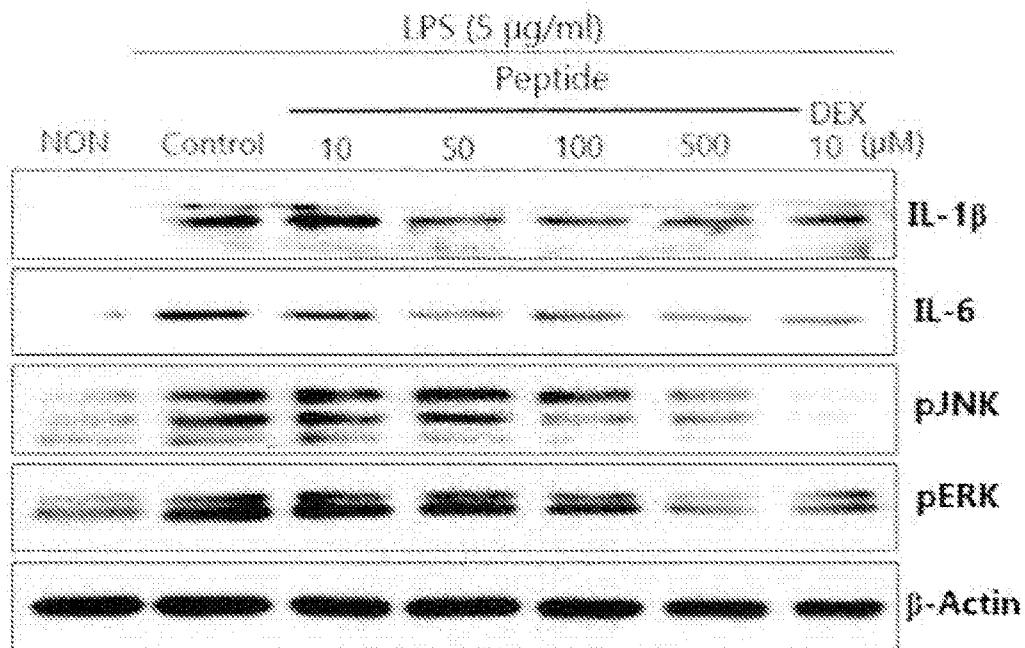
[청구항 10] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 폐 섬유증의 개선 또는 예방용 기능성 식품 조성물.

GAPDH

2/22

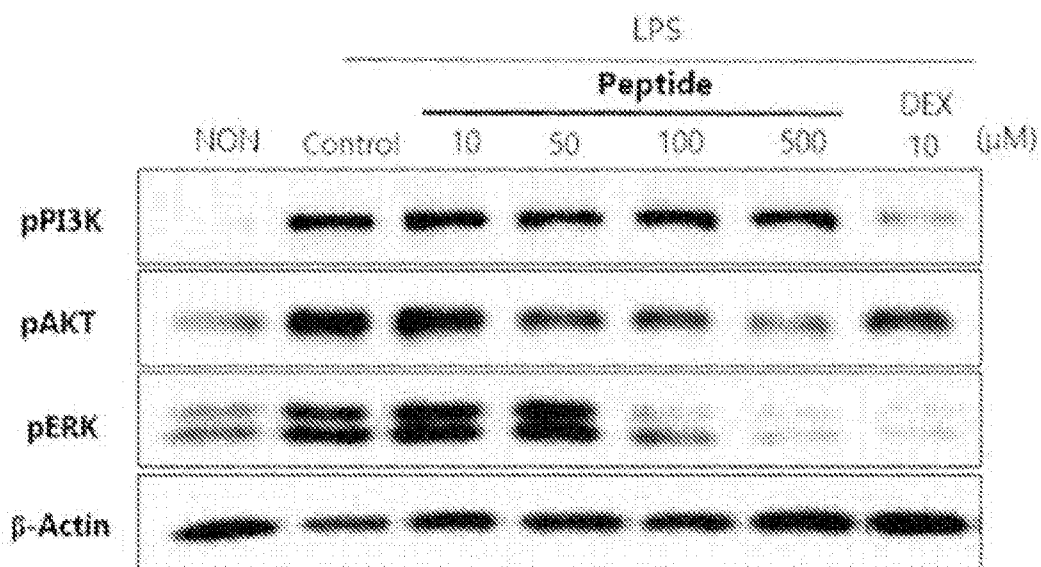
[도3]

웨스턴 블롯 분석에 의한 번역 수준
(Translational level by Western blot analysis)



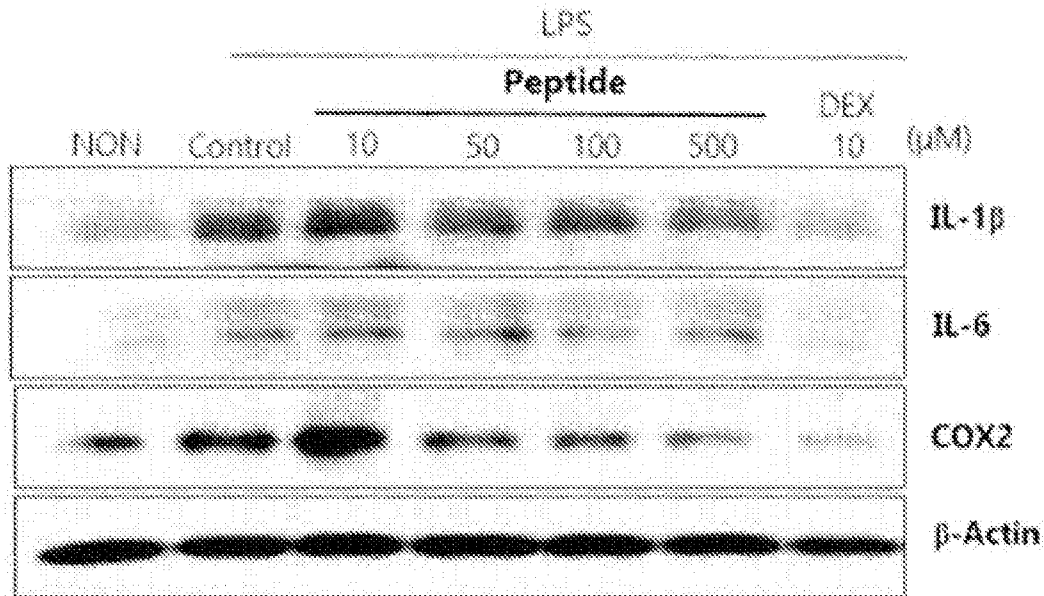
[도4a]

신호전달 분자 (Signaling Molecule)

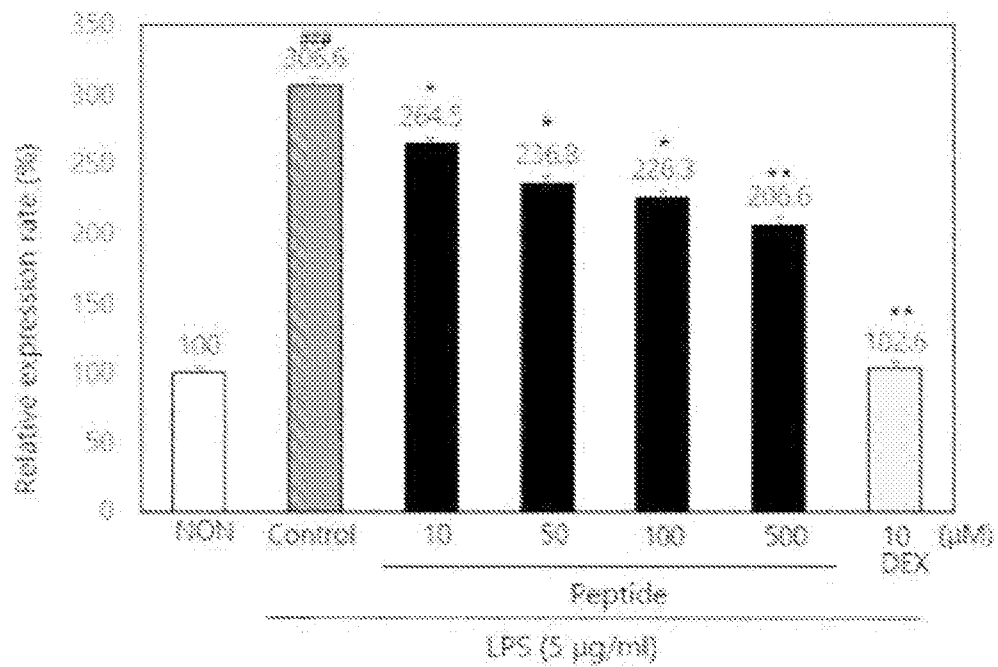


3/22

[도4b]

염증성 사이토카인 (Inflammatory cytokine)

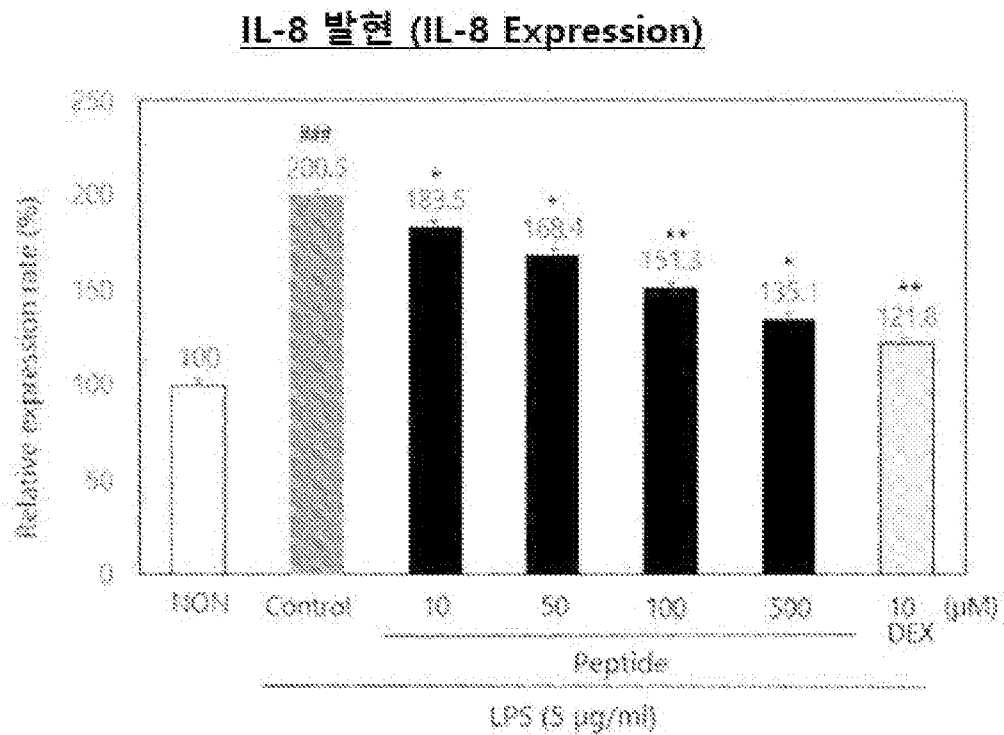
[도5a]

IL-6 발현 (IL-6 Expression)

NON vs NC, ### $p < 0.001$ / NC vs Peptide, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, by t-test

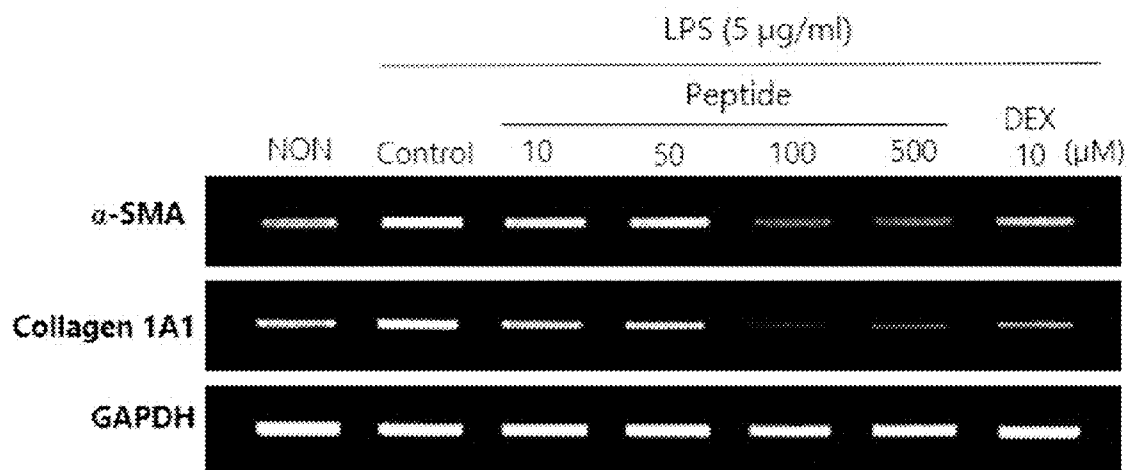
4/22

[도5b]

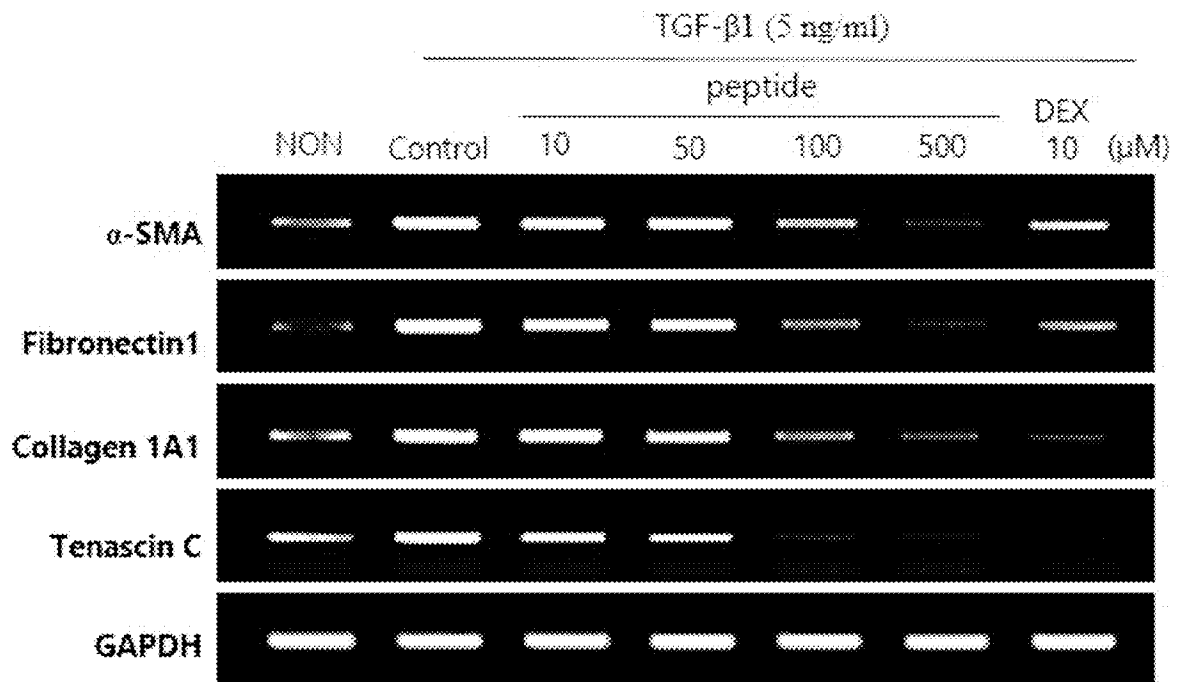


NON vs NC, ###p<0.001 / NC vs Peptide, **p<0.01, *p<0.05, by t-test

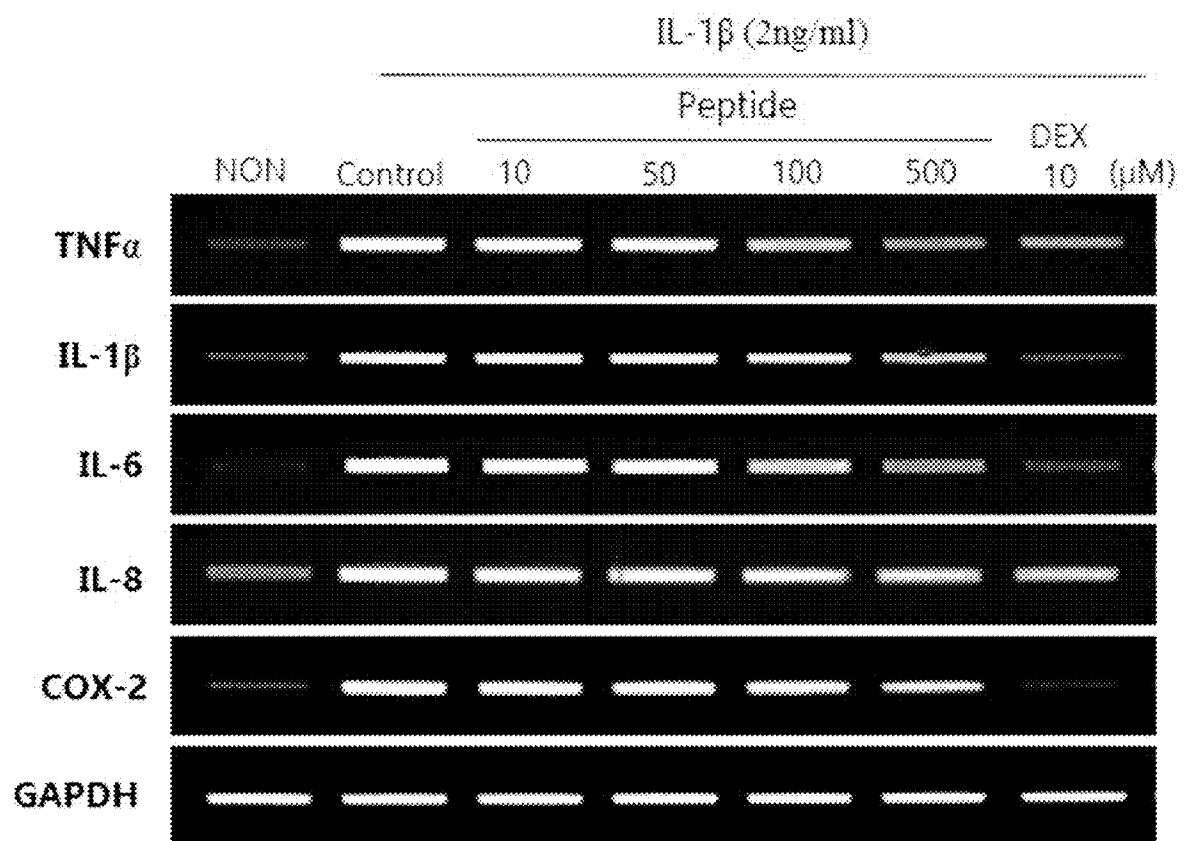
[도6]



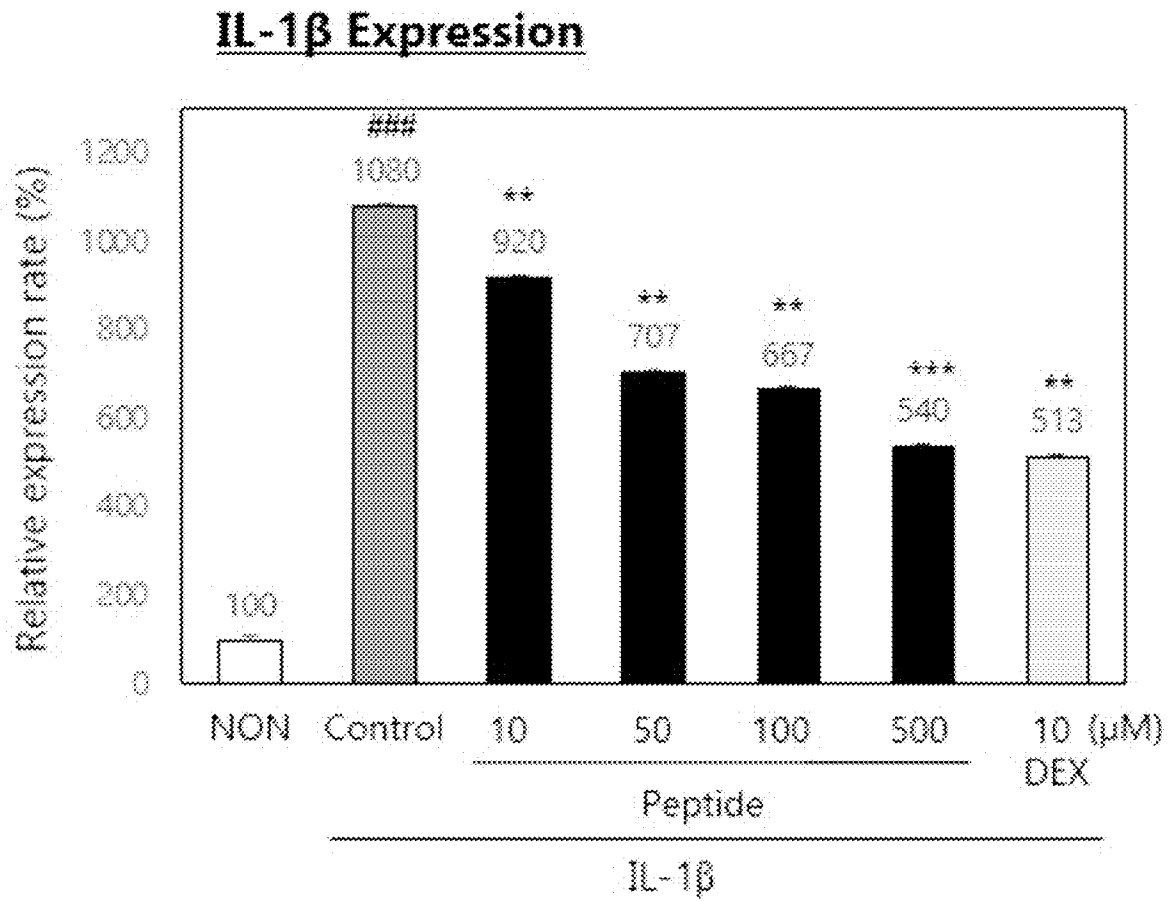
[도7]



[도8]



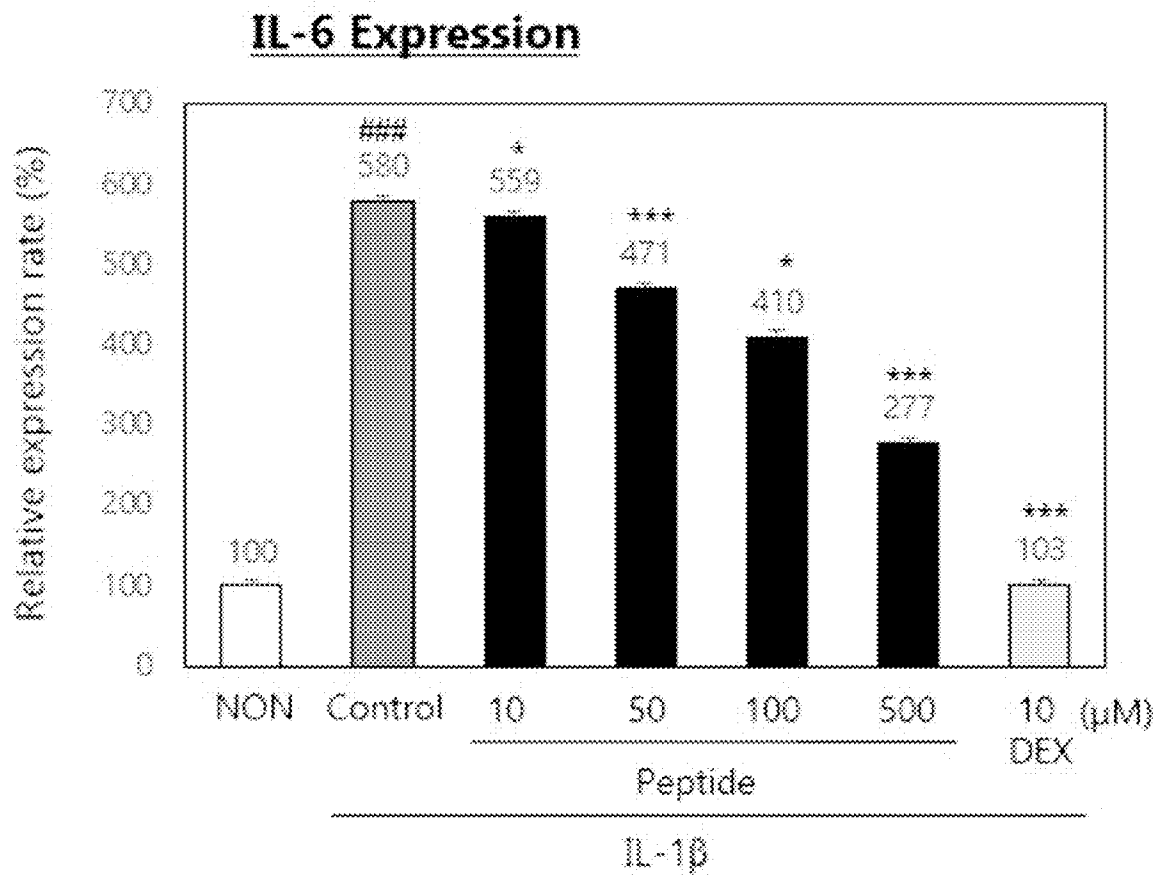
[도9a]



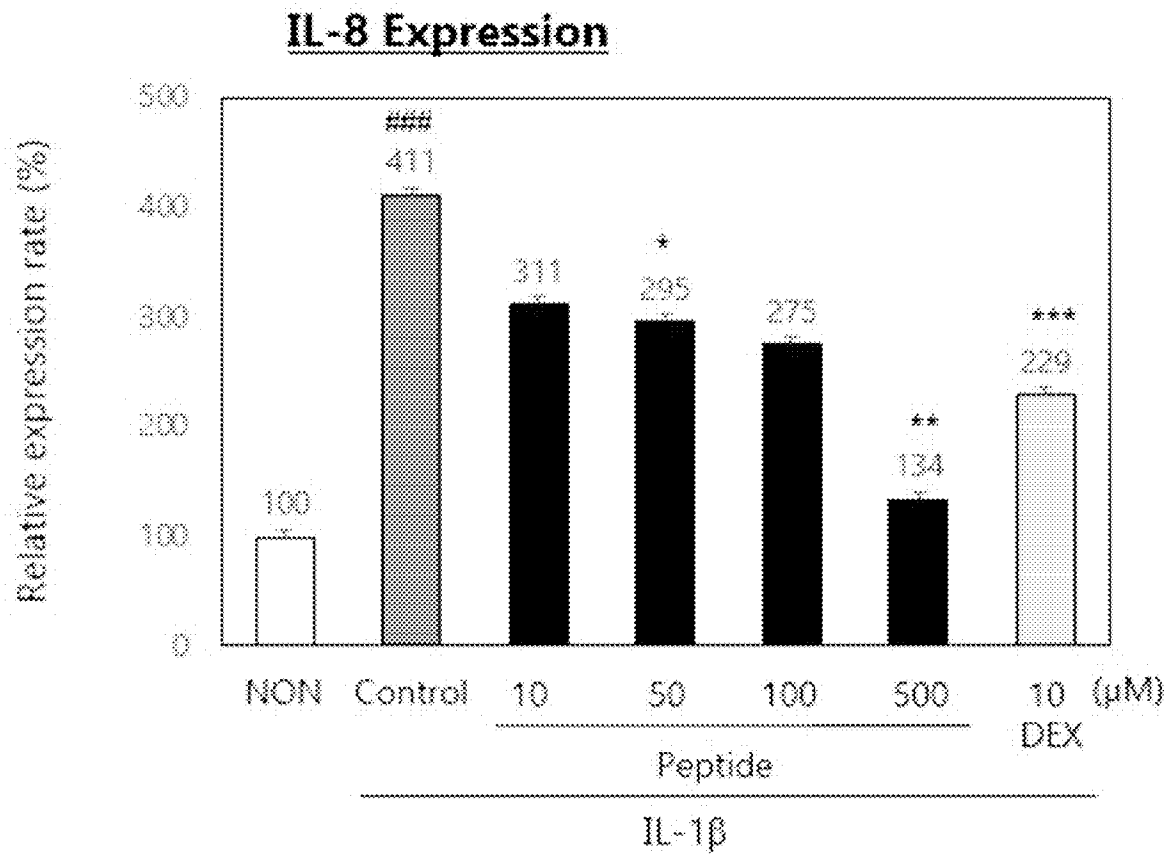
NON vs NC, ###p<0.001

NC vs Peptide, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, by t-test

[도9b]

NON vs NC, ### $p < 0.001$ NC vs Peptide, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, by t-test

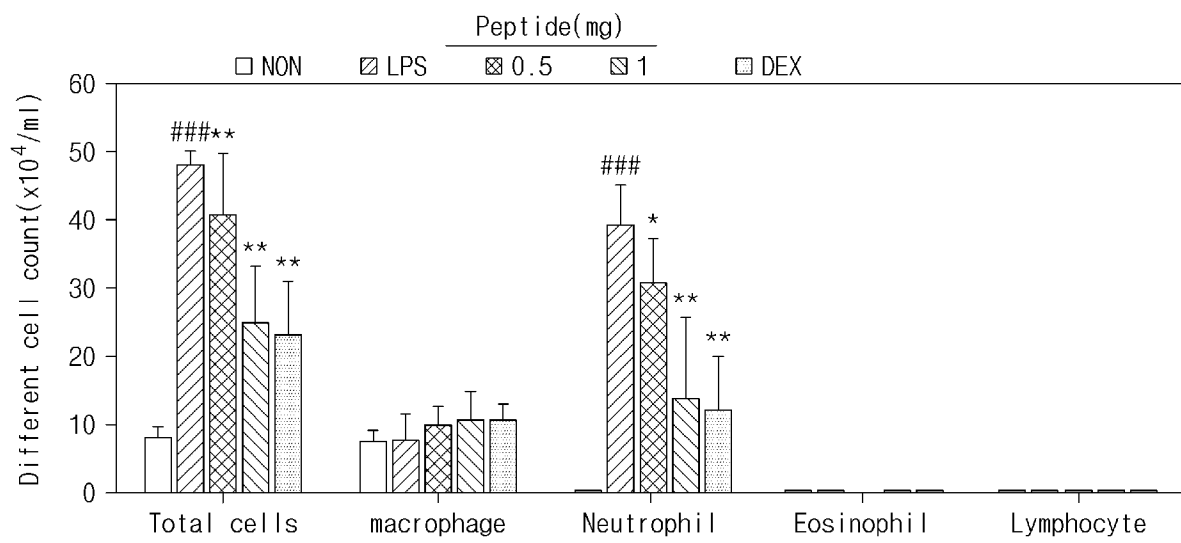
[도9c]



NON vs NC, ###p<0.001

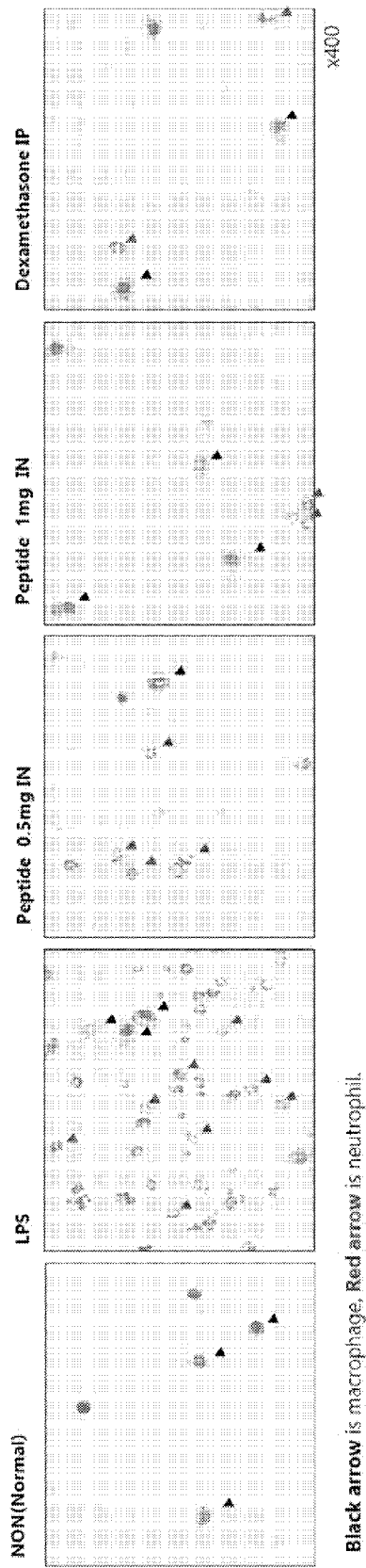
NC vs Peptide, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, by t-test

[도10a]

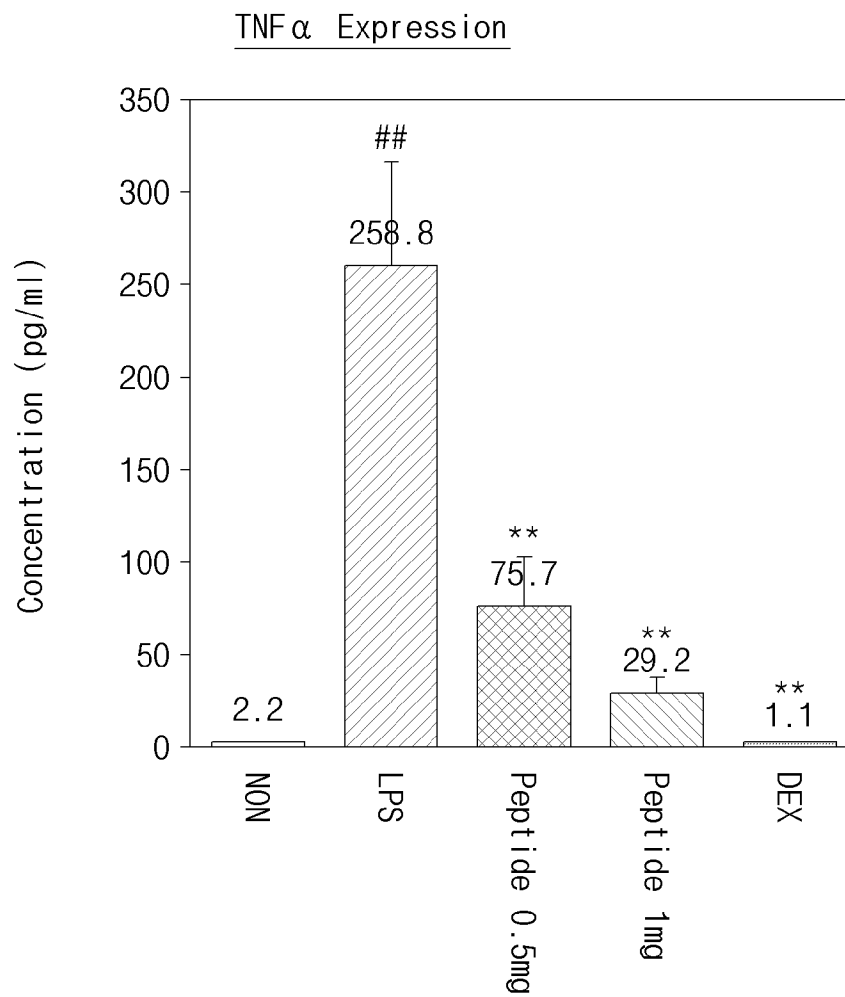


NON vs LPS, ###p<0.001 and LPS vs Peptide, **p<0.01, *p<0.05 by One-way ANOVA

[도 10b]

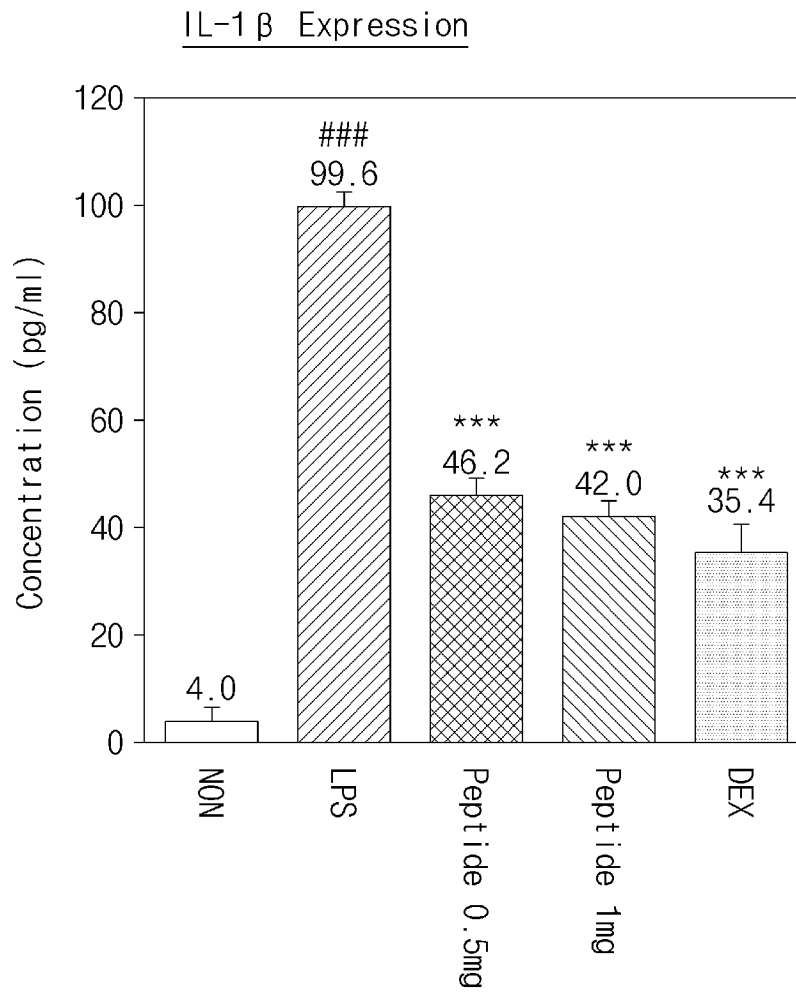


[도11a]



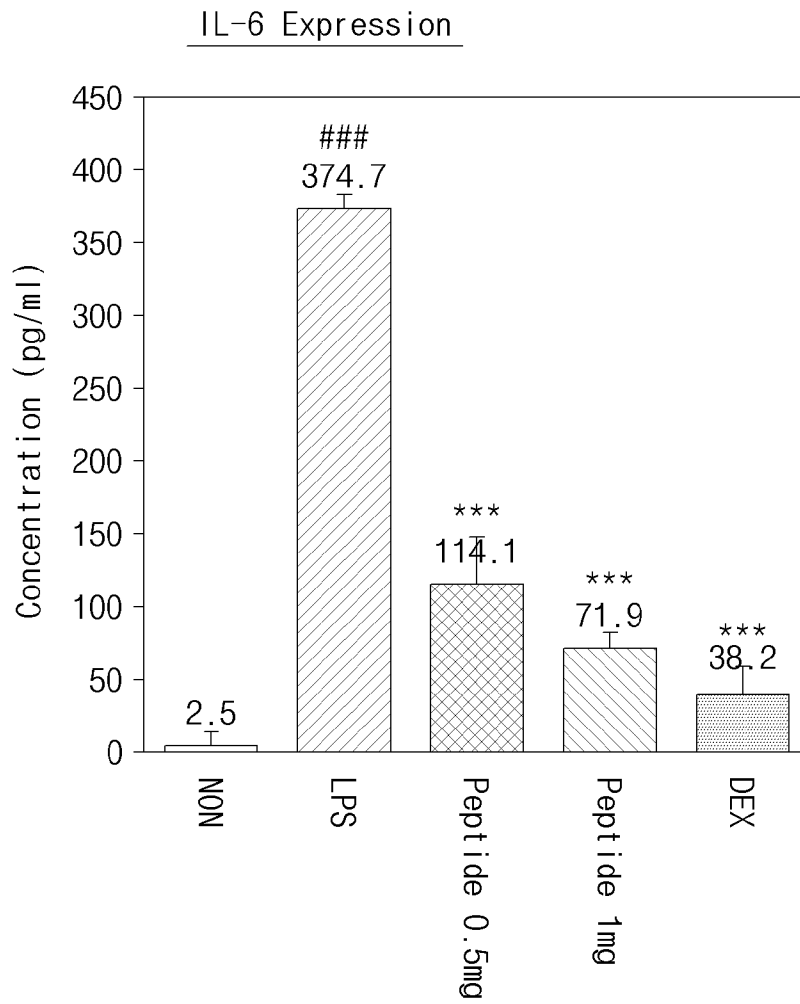
NON vs LPS, ###p<0.001 ##p<0.01, and LPS vs Peptide, ***p<0.001, **p<0.01, by One-way ANOVA

[도11b]



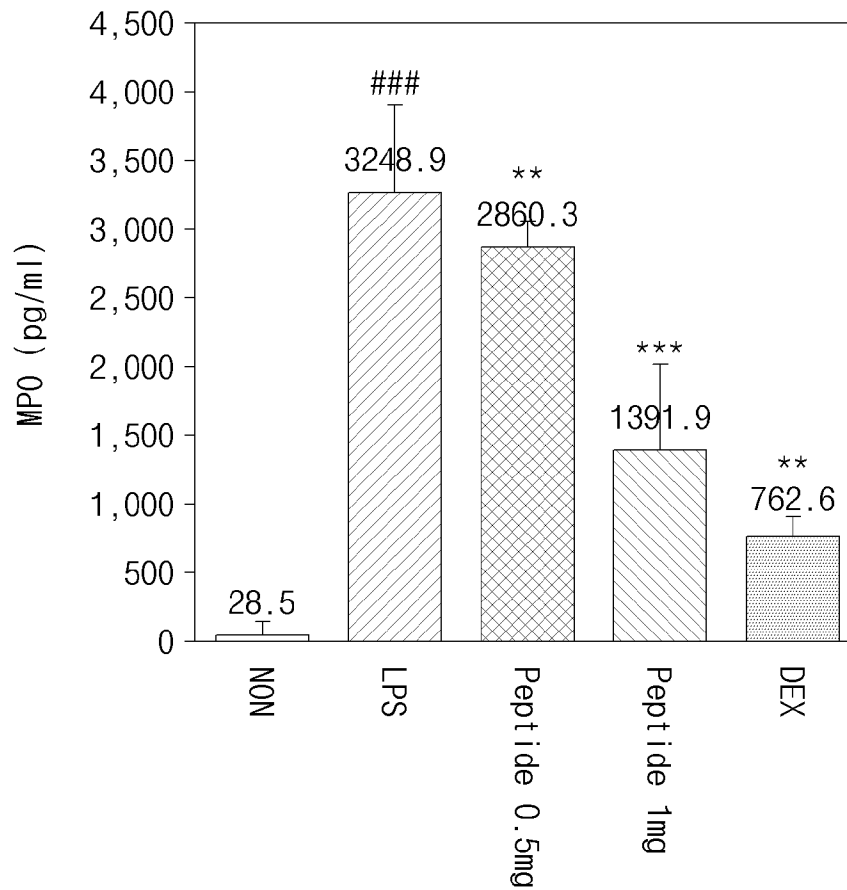
NON vs LPS, ###p<0.001 ##p<0.01, and LPS vs Peptide, ***p<0.001, **p<0.01, by One-way ANOVA

[도11c]



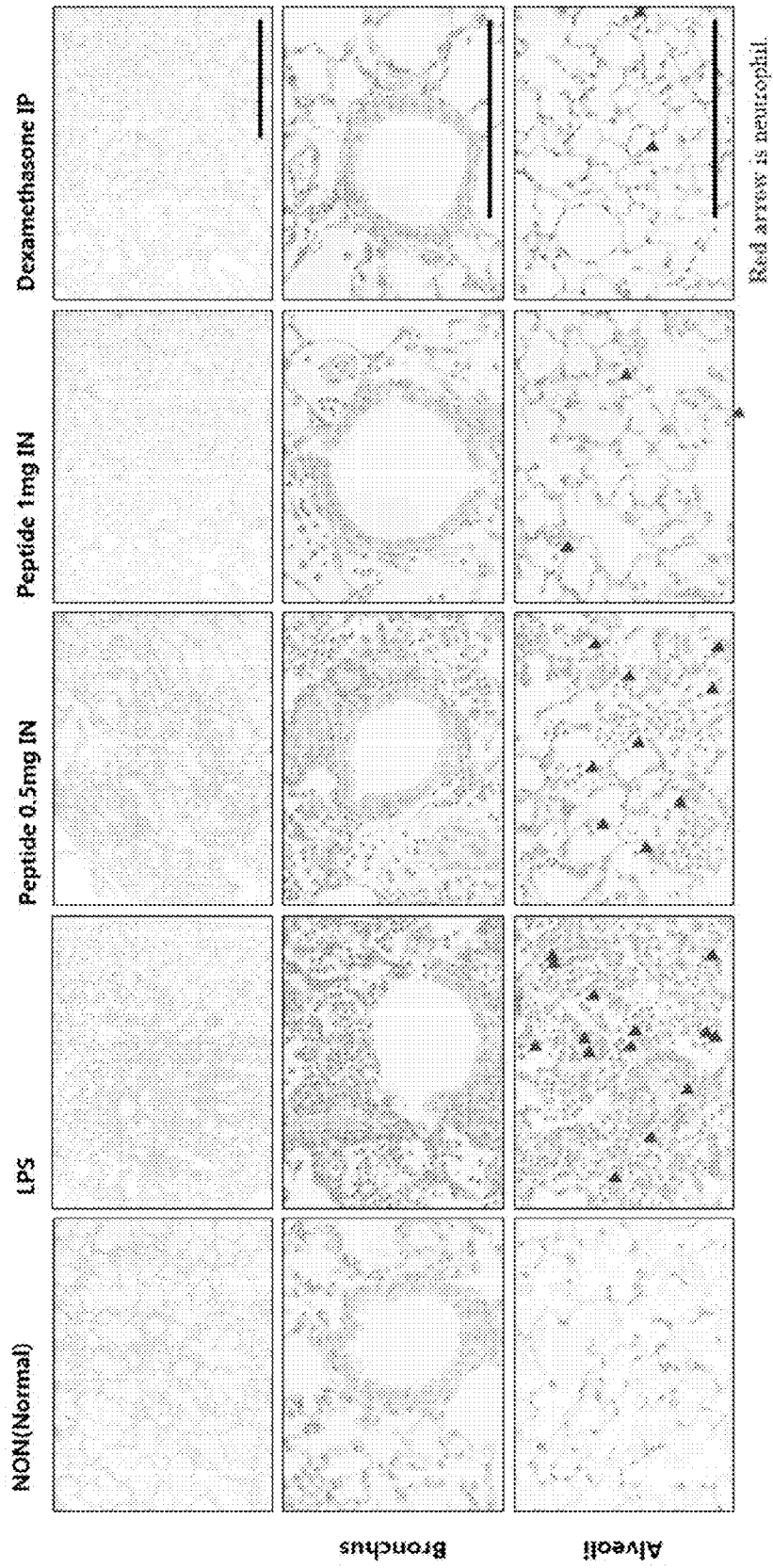
NON vs LPS, ### $p < 0.001$ ## $p < 0.01$, and LPS vs Peptide, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, by One-way ANOVA

[도11d]

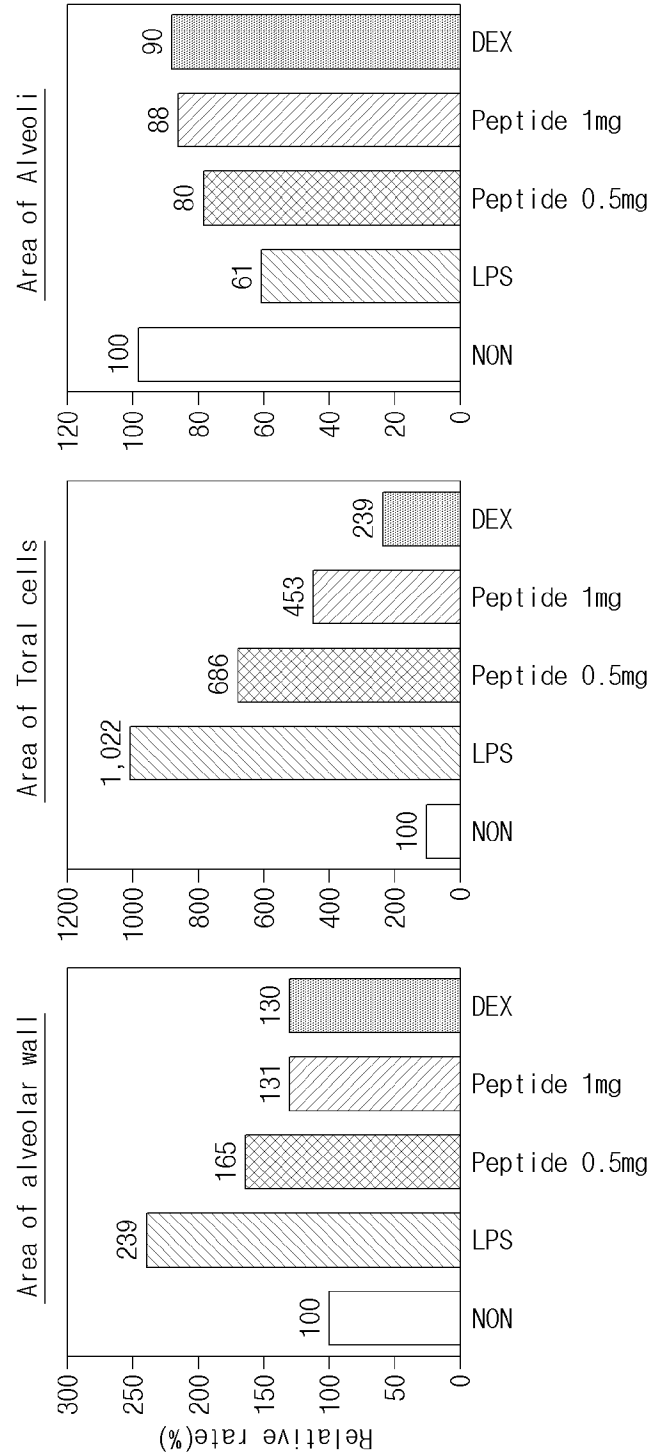
MP0 (Myeloperoxidase) Expression

NON vs LPS, ### $p < 0.001$ ## $p < 0.01$, and LPS vs Peptide, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, by One-way ANOVA

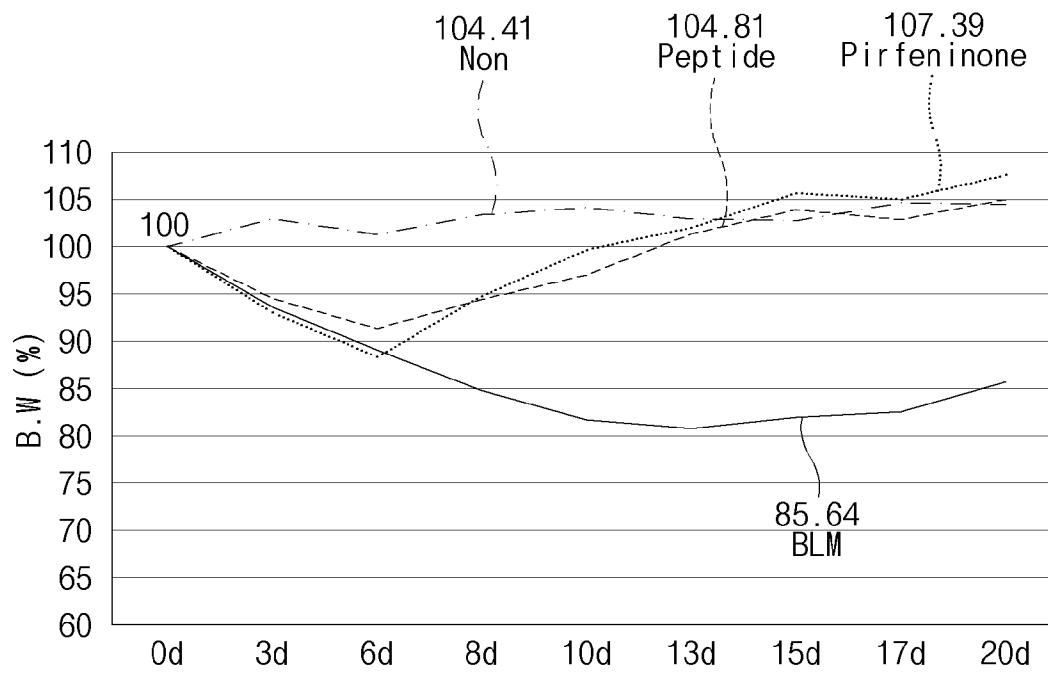
[도 12a]



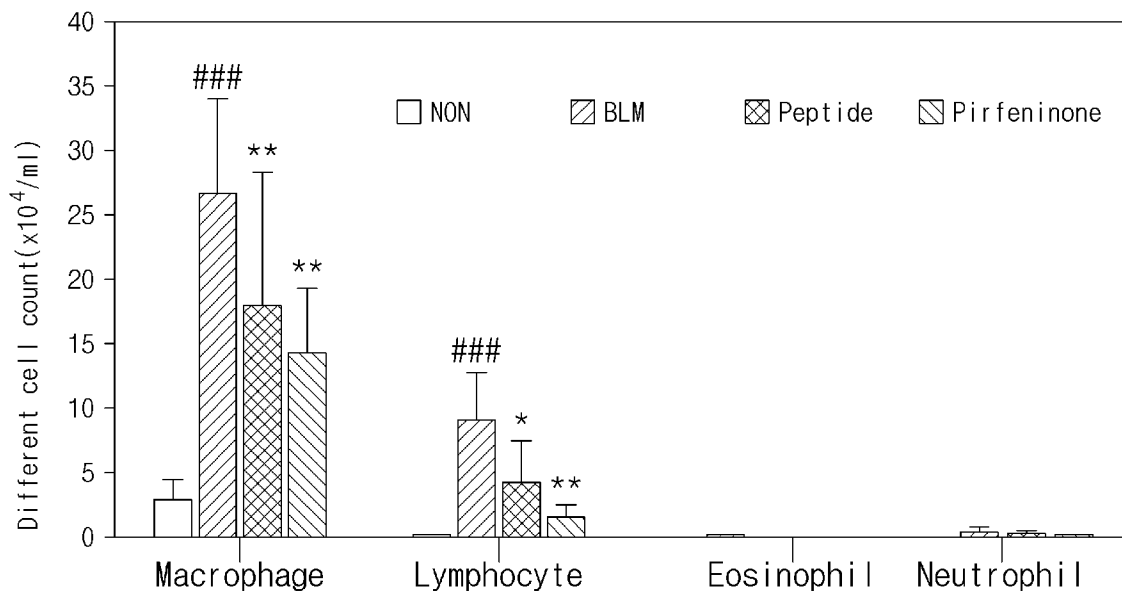
[도 12b]



[도13a]

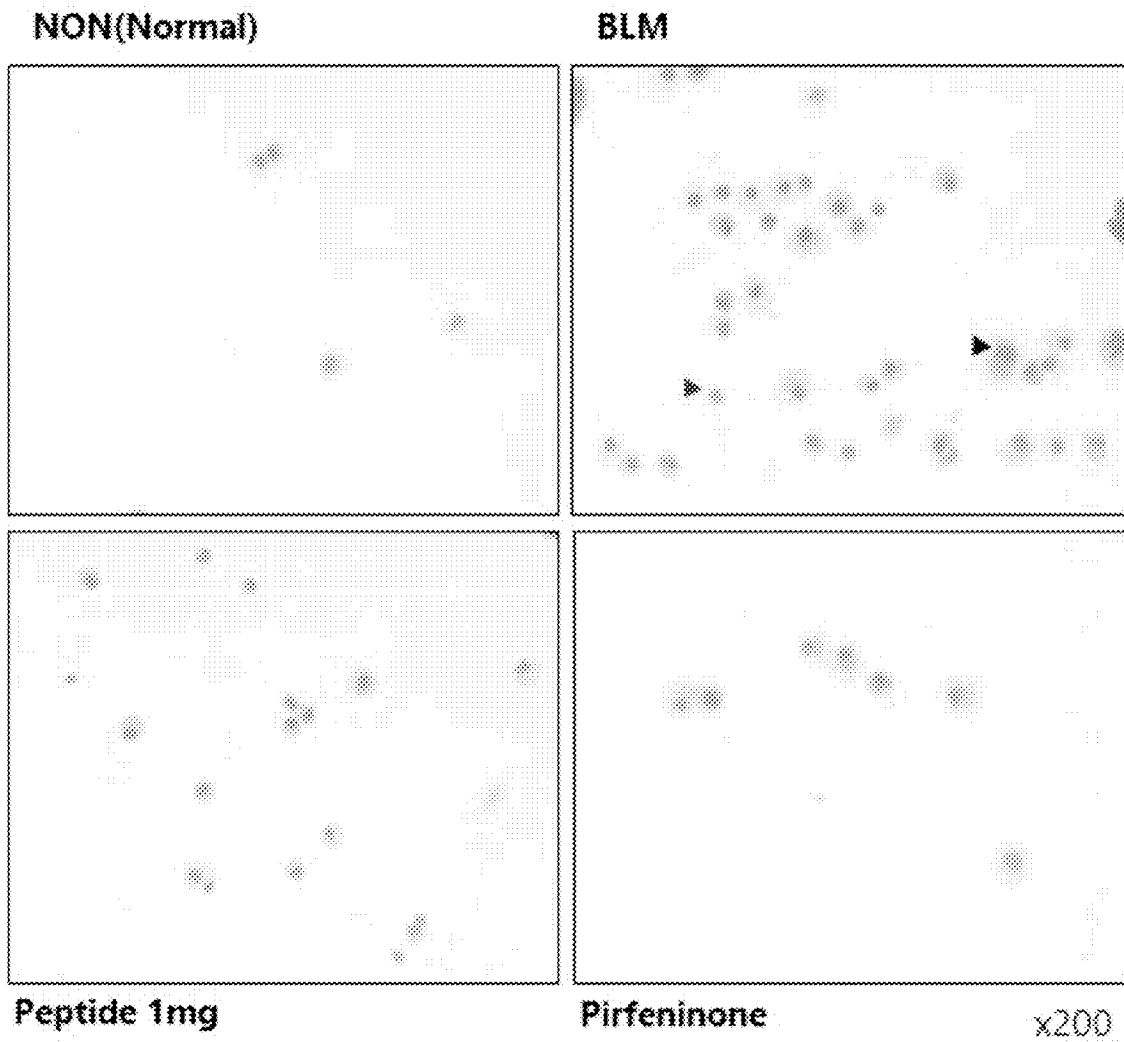


[도13b]



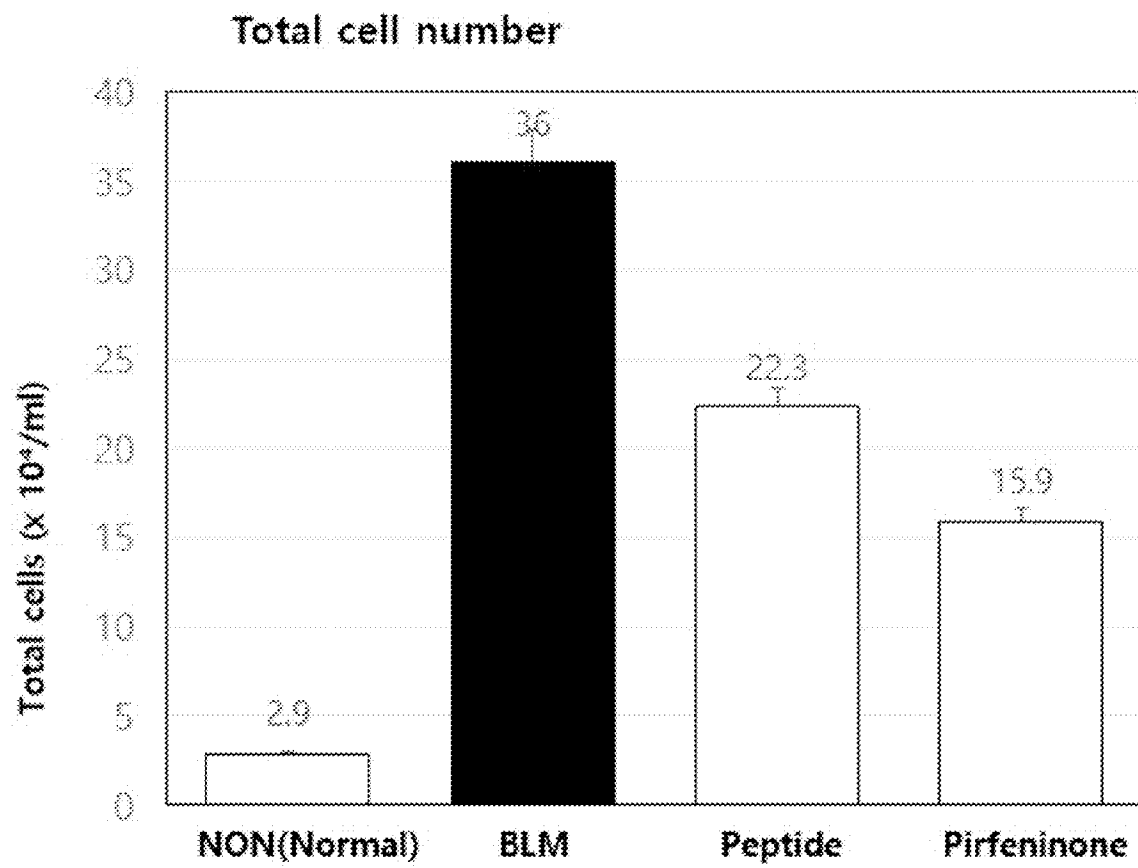
NON vs BLM, ^{###}p<0.001 and LPS vs Peptide, ^{**}p<0.01, ^{*}p<0.05 by One-way ANOVA

[도 13c]

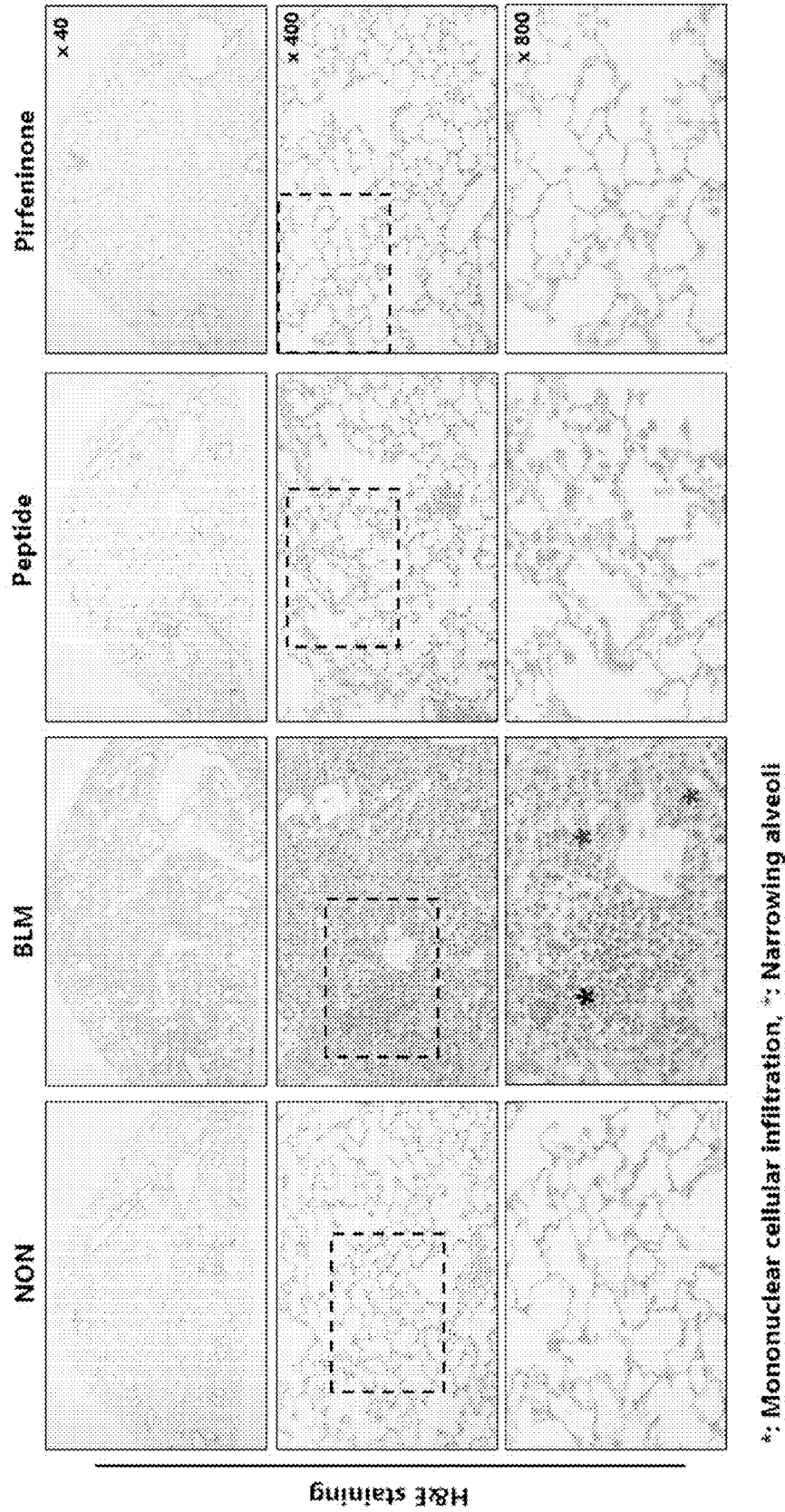


Black arrow is macrophage, **Red arrow** is neutrophil.

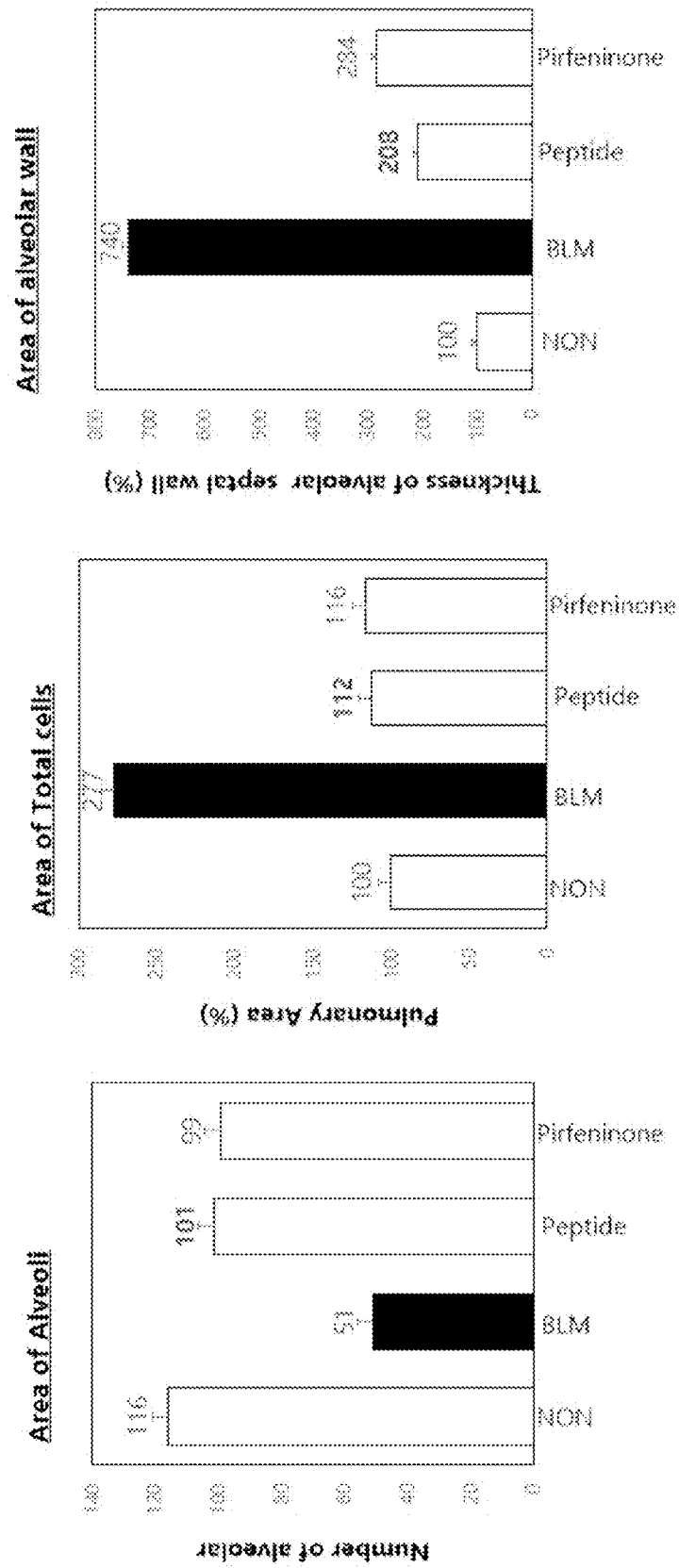
[도13d]



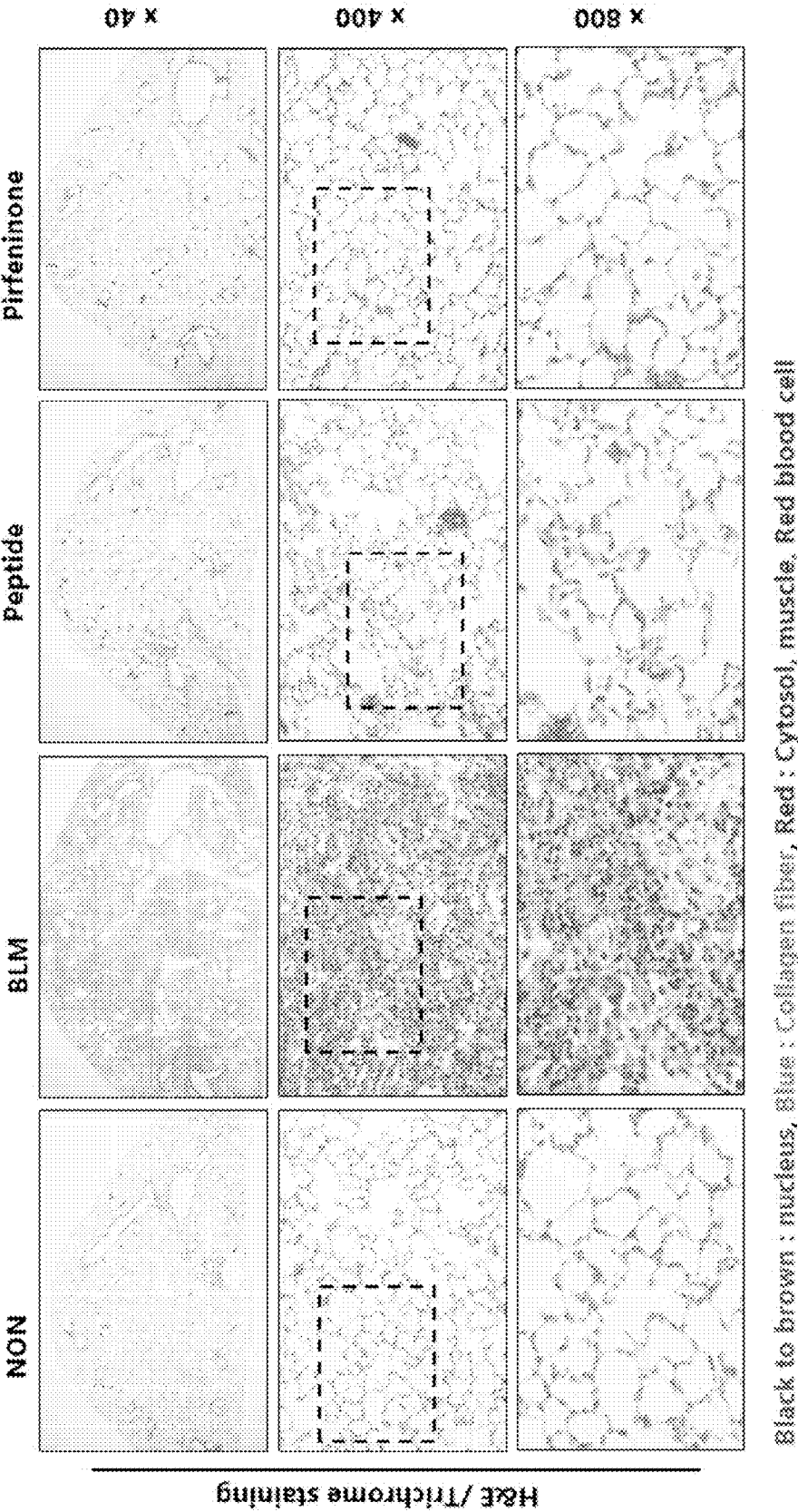
[도 14a]



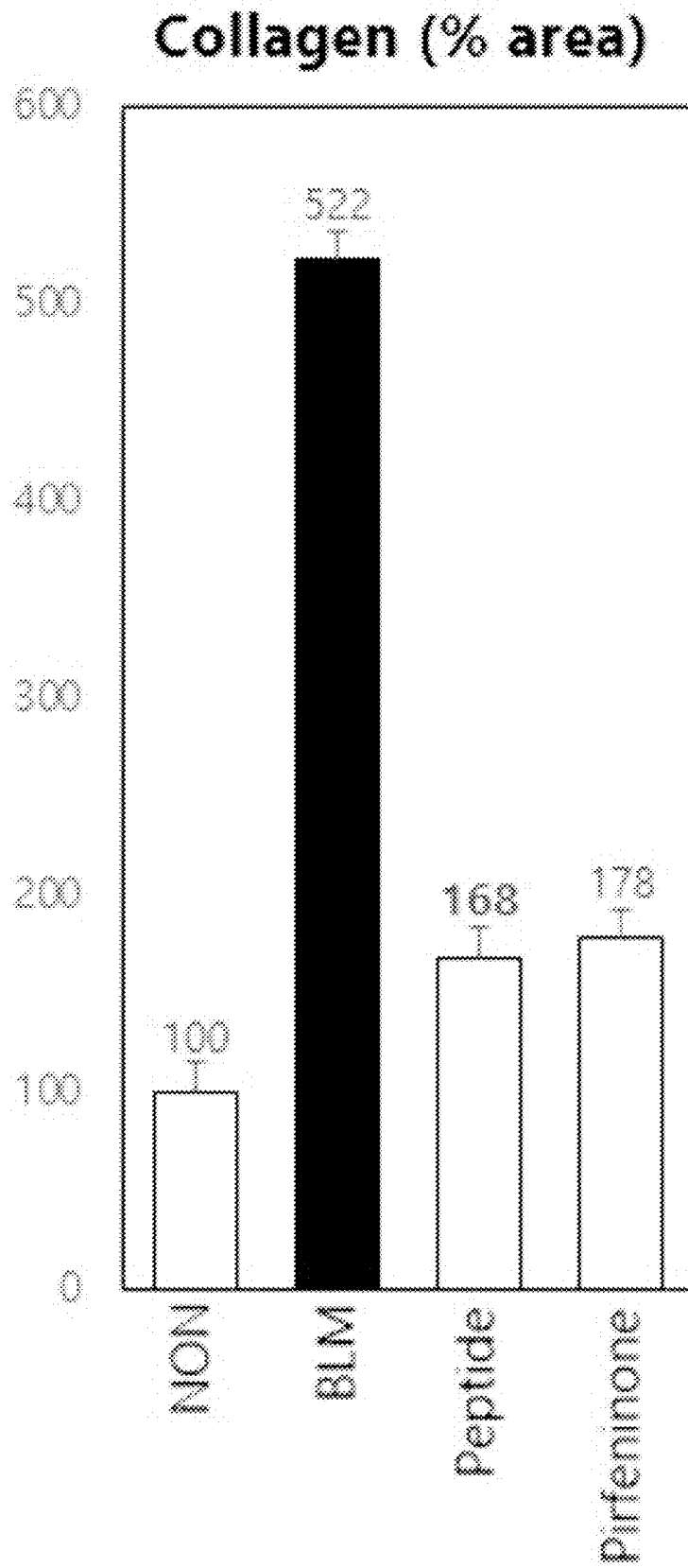
[도 14b]



[도 15a]



[도15b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/10(2006.01); A61P 11/00(2006.01); A61P 29/00(2006.01); A23L 33/18(2016.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/10(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/07(2006.01); C07K 5/107(2006.01); G01N 33/569(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 항염증(anti-inflammation), 항섬유화(anti-fibrosis), 펩타이드(peptide), KYLLVHRPYYRR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0009924 A (CAREGEN CO., LTD.) 25 January 2022 (2022-01-25) See abstract; claims 1-4; table 1; and SEQ ID NO: 3.	1-10
A	ASRANI, P. et al. SARS-CoV-2 mediated lung inflammatory responses in host: targeting the cytokine storm for therapeutic interventions. Molecular and Cellular Biochemistry. 2021, vol. 476, pp. 675-687. See entire document.	1-10
A	NCBI. GenBank accession no. QFO42108.1 (10 October 2019). See entire document.	1-10
A	KR 10-2001-0108002 A (HISTATEK, LLC) 07 December 2001 (2001-12-07) See entire document.	1-10
A	US 10793596 B2 (CARA THERAPEUTICS, INC.) 06 October 2020 (2020-10-06) See entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2023

Date of mailing of the international search report

26 June 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003862

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/003862

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2022-0009924	A	25 January 2022	BR	112023000503	A2	31 January 2023
				EP	4183793	A1	24 May 2023
				KR	10-2022-0009855	A	25 January 2022
				KR	10-2022-0009925	A	25 January 2022
				KR	10-2022-0009926	A	25 January 2022
				KR	10-2380735	B1	01 April 2022
				WO	2022-015069	A1	20 January 2022
KR	10-2001-0108002	A	07 December 2001	BR	9816097	A	22 January 2002
				CA	2353550	A1	08 June 2000
				CN	1341026	A	20 March 2002
				EP	1152770	A1	14 November 2001
				HK	1044468	A1	25 October 2002
				JP	2003-504304	A	04 February 2003
				KR	10-0596136	B1	05 July 2006
				MX	PA01005600	A	14 July 2003
				WO	00-32217	A1	08 June 2000
US	10793596	B2	06 October 2020	AU	2007-317817	A1	15 May 2008
				BR	PI0718651	A2	19 November 2013
				CA	2667155	A1	15 May 2008
				CN	101535336	A	16 September 2009
				CY	1116760	T1	15 March 2017
				DK	2064228	T3	10 December 2012
				EP	2064228	A2	03 June 2009
				EP	2064228	B1	29 August 2012
				EP	2079756	A2	22 July 2009
				EP	2079756	B1	17 October 2012
				ES	2394377	T3	31 January 2013
				HK	1130814	A1	08 January 2010
				IL	197923	A0	24 December 2009
				JP	2010-509343	A	25 March 2010
				JP	2010-510966	A	08 April 2010
				JP	2013-241447	A	05 December 2013
				JP	5244810	B2	24 July 2013
				JP	5364583	B2	11 December 2013
				JP	6220180	B2	25 October 2017
				KR	10-1513736	B1	20 April 2015
				KR	10-1513737	B1	28 April 2015
				KR	10-1513842	B1	20 April 2015
				KR	10-2009-0085096	A	06 August 2009
				KR	10-2009-0085097	A	06 August 2009
				KR	10-2014-0056396	A	09 May 2014
				MX	2009004999	A	12 October 2009
				MY	148144	A	15 March 2013
				NL	301199	I1	19 October 2022
				NZ	577107	A	12 January 2012
				PA	2022522	I1	10 November 2022
				PL	2064228	T3	31 January 2013
				PT	2064228	E	10 December 2012
				RU	2009-121297	A	20 December 2010
				S2	200045	I1	28 November 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/003862

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 10017536 B2	10 July 2018
		US 10138270 B2	27 November 2018
		US 10913769 B2	09 February 2021
		US 2009-0075907 A1	19 March 2009
		US 2009-0156508 A1	18 June 2009
		US 2009-0264373 A1	22 October 2009
		US 2010-0075910 A1	25 March 2010
		US 2011-0118186 A1	19 May 2011
		US 2011-0212882 A1	01 September 2011
		US 2011-0257105 A1	20 October 2011
		US 2013-0012448 A1	10 January 2013
		US 2014-0357579 A1	04 December 2014
		US 2015-0152138 A1	04 June 2015
		US 2015-0197545 A1	16 July 2015
		US 2016-0310558 A1	27 October 2016
		US 2016-0362450 A1	15 December 2016
		US 2016-0376308 A1	29 December 2016
		US 2017-0007574 A1	12 January 2017
		US 2018-0078605 A1	22 March 2018
		US 2019-0177365 A1	13 June 2019
		US 2019-0241610 A1	08 August 2019
		US 7402564 B1	22 July 2008
		US 7713937 B2	11 May 2010
		US 7727963 B2	01 June 2010
		US 7842662 B2	30 November 2010
		US 8217007 B1	10 July 2012
		US 8236766 B2	07 August 2012
		US 8486894 B2	16 July 2013
		US 8536131 B2	17 September 2013
		US 8906859 B2	09 December 2014
		US 8951970 B2	10 February 2015
		US 9321810 B2	26 April 2016
		US 9334305 B2	10 May 2016
		US 9359399 B2	07 June 2016
		WO 2008-057608 A2	15 May 2008
		WO 2008-057608 A3	24 September 2009
		WO 2008-060552 A2	22 May 2008
		WO 2008-060552 A3	31 December 2008
		ZA 200903053 B	24 February 2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/10(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A23L 33/18(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/10(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/07(2006.01); C07K 5/107(2006.01); G01N 33/569(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항염증(anti-inflammation), 항섬유화(anti-fibrosis), 펩타이드(peptide), KYLLVHRPYYRR		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2022-0009924 A ((주)케어젠) 2022.01.25 요약; 청구항 1-4; 표 1; 및 서열번호 3	1-10
A	ASRANI, P. 등, 'SARS-CoV-2 mediated lung inflammatory responses in host: targeting the cytokine storm for therapeutic interventions', Molecular and Cellular Biochemistry, 2021, 476권, 페이지 675-687 전체 문헌	1-10
A	NCBI, GenBank accession no. QFO42108.1 (2019.10.10) 전체 문헌	1-10
A	KR 10-2001-0108002 A (히스타테크, 엔엔씨) 2001.12.07 전체 문헌	1-10
A	US 10793596 B2 (CARA THERAPEUTICS, INC.) 2020.10.06 전체 문헌	1-10
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년06월22일(22.06.2023)	국제조사보고서 발송일 2023년06월26일(26.06.2023)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0009924 A	2022/01/25	BR 112023000503 A2	2023/01/31
		EP 4183793 A1	2023/05/24
		KR 10-2022-0009855 A	2022/01/25
		KR 10-2022-0009925 A	2022/01/25
		KR 10-2022-0009926 A	2022/01/25
		KR 10-2380735 B1	2022/04/01
		WO 2022-015069 A1	2022/01/20
KR 10-2001-0108002 A	2001/12/07	BR 9816097 A	2002/01/22
		CA 2353550 A1	2000/06/08
		CN 1341026 A	2002/03/20
		EP 1152770 A1	2001/11/14
		HK 1044468 A1	2002/10/25
		JP 2003-504304 A	2003/02/04
		KR 10-0596136 B1	2006/07/05
		MX PA01005600 A	2003/07/14
		WO 00-32217 A1	2000/06/08
US 10793596 B2	2020/10/06	AU 2007-317817 A1	2008/05/15
		BR PI0718651 A2	2013/11/19
		CA 2667155 A1	2008/05/15
		CN 101535336 A	2009/09/16
		CY 1116760 T1	2017/03/15
		DK 2064228 T3	2012/12/10
		EP 2064228 A2	2009/06/03
		EP 2064228 B1	2012/08/29
		EP 2079756 A2	2009/07/22
		EP 2079756 B1	2012/10/17
		ES 2394377 T3	2013/01/31
		HK 1130814 A1	2010/01/08
		IL 197923 A0	2009/12/24
		JP 2010-509343 A	2010/03/25
		JP 2010-510966 A	2010/04/08
		JP 2013-241447 A	2013/12/05
		JP 5244810 B2	2013/07/24
		JP 5364583 B2	2013/12/11
		JP 6220180 B2	2017/10/25
		KR 10-1513736 B1	2015/04/20
		KR 10-1513737 B1	2015/04/28
		KR 10-1513842 B1	2015/04/20
		KR 10-2009-0085096 A	2009/08/06
		KR 10-2009-0085097 A	2009/08/06
		KR 10-2014-0056396 A	2014/05/09
		MX 2009004999 A	2009/10/12
		MY 148144 A	2013/03/15
		NL 301199 I1	2022/10/19
		NZ 577107 A	2012/01/12
		PA 2022522 I1	2022/11/10
		PL 2064228 T3	2013/01/31
		PT 2064228 E	2012/12/10
		RU 2009-121297 A	2010/12/20
		S2 200045 I1	2022/11/28

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 10017536 B2	2018/07/10
		US 10138270 B2	2018/11/27
		US 10913769 B2	2021/02/09
		US 2009-0075907 A1	2009/03/19
		US 2009-0156508 A1	2009/06/18
		US 2009-0264373 A1	2009/10/22
		US 2010-0075910 A1	2010/03/25
		US 2011-0118186 A1	2011/05/19
		US 2011-0212882 A1	2011/09/01
		US 2011-0257105 A1	2011/10/20
		US 2013-0012448 A1	2013/01/10
		US 2014-0357579 A1	2014/12/04
		US 2015-0152138 A1	2015/06/04
		US 2015-0197545 A1	2015/07/16
		US 2016-0310558 A1	2016/10/27
		US 2016-0362450 A1	2016/12/15
		US 2016-0376308 A1	2016/12/29
		US 2017-0007574 A1	2017/01/12
		US 2018-0078605 A1	2018/03/22
		US 2019-0177365 A1	2019/06/13
		US 2019-0241610 A1	2019/08/08
		US 7402564 B1	2008/07/22
		US 7713937 B2	2010/05/11
		US 7727963 B2	2010/06/01
		US 7842662 B2	2010/11/30
		US 8217007 B1	2012/07/10
		US 8236766 B2	2012/08/07
		US 8486894 B2	2013/07/16
		US 8536131 B2	2013/09/17
		US 8906859 B2	2014/12/09
		US 8951970 B2	2015/02/10
		US 9321810 B2	2016/04/26
		US 9334305 B2	2016/05/10
		US 9359399 B2	2016/06/07
		WO 2008-057608 A2	2008/05/15
		WO 2008-057608 A3	2009/09/24
		WO 2008-060552 A2	2008/05/22
		WO 2008-060552 A3	2008/12/31
		ZA 200903053 B	2010/02/24