

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2011/159071 A2

(43) 국제공개일

2011년 12월 22일 (22.12.2011)

PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/004300

(22) 국제출원일: 2011년 6월 13일 (13.06.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2010-0057000 2010년 6월 16일 (16.06.2010) KR  
10-2010-0118187 2010년 11월 25일 (25.11.2010) KR  
10-2010-0118186 2010년 11월 25일 (25.11.2010) KR  
10-2010-0118185 2010년 11월 25일 (25.11.2010) KR  
10-2010-0118184 2010년 11월 25일 (25.11.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 나이백 (NANO INTELLIGENT BIOMEDICAL ENGINEERING CORPORATION. CO. LTD.) [KR/KR]; 서울특별시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학, 110-749 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정중평 (CHUNG, Chong-Pyoung) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 송파동 58-1 잠실대우레이크월드 아파트 2701 호, 138-170

Seoul (KR). 박윤정 (PARK, Yoon-Jeong) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 구로 5동 롯데아파트 110동 402호, 152-770 Seoul (KR). 이주연 (LEE, Jue-Yeon) [KR/KR]; 경기도 과천시 부림동 주공아파트 914동 304호, 427-736 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

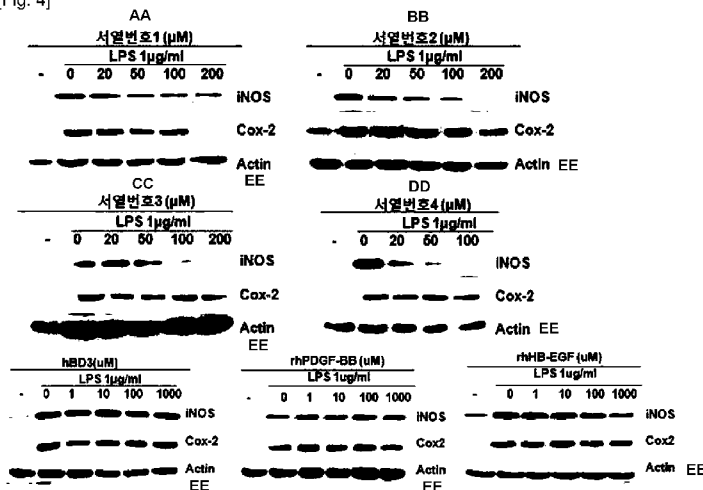
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PEPTIDE HAVING ANTIMICROBIAL OR ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME AS AN ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물

[Fig. 4]



AA ... Sequence No. 1  
BB ... Sequence No. 2  
CC ... Sequence No. 3  
DD ... Sequence No. 4  
EE ... Actin

(57) Abstract: The present invention relates to a peptide having antimicrobial or anti-inflammatory activity and to a pharmaceutical composition containing the same as an active ingredient. More particularly, the present invention relates to a peptide having antimicrobial or anti-inflammatory activity against dental infection bacteria including periodontal pathogens and bacteria which cause atopic dermatitis, and to a pharmaceutical composition containing the peptide as an active ingredient. The peptide according to the present invention, which has antimicrobial or anti-inflammatory activity, can be used for treating dental infections such as periodontitis and peri-implantitis, and for treating inflammations such as atopic dermatitis, psoriasis and arthritis.

(57) 요약서: 본 발명은 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 치주원인균을 포함하는 치과감염세균 및 아토피성 피부염을 일으키는 세균에 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로

로 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드는 치주염, 임플란트 주위염 등 치과감염의 치료 및 아토피, 건선, 관절염 등의 염증치료 목적으로 사용할 수 있다.

WO 2011/159071 A2

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

## 명세서

### 발명의 명칭: 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 치주원인균을 포함하는 치과감염세균 및 아토피성 피부염을 일으키는 세균에 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 치주질환은 치주원인균에 의해 치아 주위의 연조직 및 치조골이 만성염증으로 파괴되어 잇몸에서 출혈이 일어나고, 이가 흔들리며, 최후에는 치아를 상실하는 질환으로서 일반적으로 풍치라고 알려져 있다. 치주원인균으로는 *Prevotella intermedia*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* 등이 있다.
- [4] 이러한 치주병을 예방하기 위하여, 페니실린 등의 항생제를 이용하여 치면세균막을 형성하는 원인균을 퇴치하려는 노력이 계속되고 있으나, 장기간의 사용시 발생하는 항생제 내성균으로 인하여, 실질적인 임상에서는 사용되지 못하고 있는 실정이다. 이를 극복하기 위하여 불소 화합물을 이용하거나, 자동 치아세척기구를 이용하는 등 여러가지 방법이 개발되고 있으나, 그 효과면에서 큰 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 임상적으로는, 클로로헥시딘이 함유된 양치액을 사용하고, 미노싸이클린을 함유하고 있는 첩부제, 연고제 등을 사용하고 있다.
- [5] 한편, 아토피성 피부염은 전세계적으로 널리 분포하는 질환으로 5세 이하의 모든 어린이중 3-5%가 이 질환에 걸려 있다. 대개 유아기와 소아기에서 시작되고, 아토피성 피부염환자의 90% 이상이 5세 이전에 아토피성 피부염 증세를 보인다.
- [6] 종래에는 아토피성 피부염이 알러지의 일종으로만 생각되었으나, 비알러지 측면에서의 고찰이 확대되면서 습진 반응의 원인과 해결책으로 접근하고 있다. 이 질병의 환자가 각종 피부 생리 기능을 나타내는 것을 검토하는 과정에서 발한의 감소, 피지 분비의 저하, 피부 혈관 반응의 이상, 건조성 피부 등의 이상 기능을 나타내는데, 비알러지 측면에서 볼 때 건조성 피부가 아토피성 피부염의 병태로서 가장 중요한 의미를 가진다는 새로운 견해가 제시되고 있다.
- [7] 건조 피부가 형성되면 피부 표면의 방어 기능(barrier function)이 소실되고 외부로부터의 자극물이나 알러겐의 피부 침입이 용이할 뿐만 아니라, 이러한 침입물에 대하여 피부가 거부 반응을 일으킨다. 아토피성 피부염은 그 자체보다

가려워 긁다가 생기는 2차성 세균감염으로 증상이 심해진다. 아토피 환자의 피부는 장기간 긁고 건조해진 결과로 세균감염에 노출될 가능성이 매우 크다.

아토피성 피부염 환자의 주된 2차 감염 세균은

스트렙토코커스(*Streptococcus*)류이고, 이외에도 여러 종의 미생물들이 감염되어 염증 등의 반응을 일으키게 된다. 최근의 보고에 의하면 이 세균의 외독소가 우리 몸의 면역체계를 자극하여 알레르기를 일으키는 화학물질을 나오게 하여 아토피를 악화시킨다고 한다. 즉, 이 세균 자체가 알레르겐으로 작용한다는 것이다.

- [8] 아토피성 피부증상 발병 시 환자는 병·의원 및 약국에서 스테로이드의 연고 및 내복약(주사제 포함)으로 치료받고 있으나, 스테로이드를 내복약이나 주사제로 사용할 경우, 피부에서 피하출혈, 색소 침착, 탈모, 가려움증, 안면홍반 등의 부작용이 보고되어 있고, 내분비계 부작용으로, 속발성 부신피질 기능 부전, 당뇨병, 소화기계 부작용으로 소화성궤양, 위염, 정신신경계 부작용으로 우울상태, 두통, 근·골격계 부작용으로 골다공증, 단백질 대사부작용으로 야유건, 질소불평형, 전해질계 부작용으로 혈압상승, 눈에 안압항진, 녹내장 등을 유발한다고 알려져 있으며, 스테로이드계 연고를 사용할 경우 피부에 피부감염증, 스테로이드 좌창, 스테로이드 피부염, 그 밖에도 뇌하수체 부신피질계 기능 억제 등의 심각한 부작용을 가져오고 있음이 보고되어 있다.
- [9] 특히 유아기 환자가 스테로이드를 사용하였을 경우 그 부작용은 성인보다 매우 심각함은 자명한 사실이다. 이러한 부작용으로 인해 새로운 치료 방향을 모색하려는 움직임이 늘어나고 있다. 약을 복용하는 것 이외의 방법으로 아토피 전문 화장품을 사용하고 있으며, 그 제품의 개발도 진화하고 있다. 1세대 아토피 제품은 천연 오일과 미네랄 성분이 중심이었고, 2세대 제품은 주로 세라마이드와 천연보습인자를 함유하고 있다. 그러나 1·2세대 제품 모두 피부 보습 유지에 초점을 뒀 아토피 피부 개선에 한계가 있다. 따라서 아토피의 치료에는 적절한 항생물질의 사용이 필수적이다.
- [10] 이에, 본 발명자들은 치주원인균 및 피부기생세균에 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드를 개발하고자 예의 노력한 결과, 인간 베타 디펜신, 혈소판 유래 성장인자 및 헤파린 결합 표피성장 인자에서 유래된 펩타이드가 치주염 치료 및 아토피성 피부염 완화작용에 효과적이라는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11]
- [12] 발명의 요약
- [13] 본 발명의 목적은 항균작용 또는 항염작용이 있는 펩타이드를 제공하는데 있다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항균 또는 항염증 활성을 가지는 인간

베타 디펜신, 혈소판 유래 성장인자 및 헤파린 결합 표피성장 인자에서 유래된 펩타이드를 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 염증 치료용 조성물을 제공한다.

[18]

### 도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 액체 희석법을 이용하여 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 항균효능을 측정한 결과를 나타낸 것이다. (A: *Prevotella intermedia*; B: *Actinomyces israelii*; C: *Fusobacterium nucleatum*; D: *Staphylococcus aureus.subsp.aureus*; E: *Streptococcus pyogenes*; 및 F: *Staphylococcus epidermidis*)

[20] 도 2는 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 의한 베타-헥소사미니데이즈( $\beta$ -hexosaminidase) 방출량의 변화를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

[21] 도 3은 NF- $\kappa$ B의 웨스턴블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 4는 iNOS 및 COX-2의 웨스턴블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

[23]

### 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[25] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[26] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드에 관한 것이다.

[27] 항균 펩타이드는 인간의 선천적인 면역 시스템에 존재하고 있으며, 세포막에 결합하고 구멍을 뚫으므로써, 박테리아, 곰팡이, 바이러스에 대해 넓은 범위의 항균력을 보인다(Brogden KA. *Nat Rev Microbiol*, 3:238, 2005; Sørensen OE. *et al., Contrib Microbiol*, 15:61, 2008).

[28] 그 중 어떤 항균 펩타이드는 또한 리포다당류(lipopolysaccharide, LPS)의 활성을 중화시키는 역할도 한다(Rosenfeld Y *et al., J Biol Chem*, 281:1636, 2006).

[29] 항균 펩타이드는 상피세포, 호중구, 침샘 등 감염에 관계하는 다양한 세포에서 생산된다. 그 중 인간 디펜신(human defensin)류, 카세리시딘(cathelicidin) LL-37, 히스타틴(Histatin)류 등이 있으며 양이온을 띠고 소수성인 항균 펩타이드이다. 양이온성 펩타이드는 그람음성, 그람양성균에 유발되는 폐혈증과 염증을 방지한다고 알려져 있다(Scott MG. *et al., Infect Immun*, 67:6445, 1999; Giacometti A. *et al., Antimicrob Agents Chemother*, 46:2132, 2002).

[30] 본 발명의 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드는 인간 베타 디펜신-2(human beta-defensin-2, hBD2), 인간 베타 디펜신-3(human beta-defensin-3, hBD3), 인간 혈소판 유래 성장인자(human platelet derived growth factor-B, PDGF-B) 및 헤파린 결합 표피 성장인자(heparin binding-epidermal growth factor, HB-EGF)에서 유래된 펩타이드 단편으로서, 인간 베타 디펜신-2 유래의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고, 인간 베타 디펜신-3 유래의 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지며, 인간 혈소판 유래 성장인자 유래의 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가진다. 또한, 헤파린 결합 표피 성장인자 유래의 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가진다.

[31]

[32] 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열은 하기와 같다.

[33]

[34] 서열번호 1 (BD2-2) : C-P-R-R-Y-K-Q-I-G-T-C-G-L-P-G-T-K-C-C-K-K-P

[35] 서열번호 2 (BD3-3) : G-K-C-S-T-R-G-R-K-C-C-R-R-K-K

[36] 서열번호 3 (PDGF) : R-K-I-E-I-V-R-K-K-P-I-F-K-K-A-T-V-T

[37] 서열번호 4 (HB-EGF) : C-K-R-K-K-K-G-K-G-L-G-K-K-R-D-P-C-L-R-K-Y-K

[38]

[39] 본 발명의 일 양태에서는, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 대표적 치주원인균인 *Prevotella intermedia*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, 아토피 피부염을 유발할 수 있는 피부기생세균인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*. subsp. *aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 화농성 연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*)에 대해 우수한 항균활성을 가지는 것을 확인하였으며, hBD3, rhPDGF-BB(recombinant human PDGF-BB) 및 rhHB-EGF(recombinant humanHB-EG)와 비교하였을 때, 항균효과가 우수한 것을 확인하였다.

[40] 본 발명의 다른 양태에서는, 아토피성 피부염의 증상인 소양증을 개선할 수 있는 항소양 효능을 평가하기 위해, 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 의한 탈과립 관련 효소인 베타-헥소사미니테이즈의 방출량 변화를 측정하였으며, 알레르기 질환 치료제로 사용되는 KF(ketotifen fumarate), hBD3, rhPDGF-BB(recombinant human PDGF-BB) 및 rhHB-EGF(recombinant humanHB-EG)의 베타-헥소사미니테이즈의 방출량 변화와 비교한 결과, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 베타-헥소사미니테이즈 방출 억제효과가 우수한 것을 확인하였다.

[41] 본 발명의 또 다른 양태에서는, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 의한 NF- $\kappa$ B, iNOS 및 COX-2의 발현억제 효과를 웨스턴블롯을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 LPS에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시키는

것을 확인하였으며, 알레르기 질환 치료제로 사용되는 KF(ketotifen fumarate), hBD3, rhPDGF-BB(recombinant human PDGF-BB) 및 rhHB-EGF(recombinant humanHB-EG)에 의한 NF- $\kappa$ B, iNOS 및 COX-2의 발현 억제효과는 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 의한 억제효과에 비해 작은 것을 확인하였다.

- [42] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다.
- [43] 본 발명에서 상기 항균용 조성물은 치과감염 질환 치료용일 수 있으며, 상기 치과감염 질환은 치주염, 치은염 및 임플란트 주위염으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [44] 본 발명에서 상기 치과감염 질환 치료용 조성물 전체 100중량부에 대하여, 상기 펩타이드  $10^{-3}$ ~1중량부 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는  $10^{-2}$ ~ $10^{-1}$ 중량부를 함유할 수 있다. 이는 펩타이드가  $10^{-3}$  중량부 미만으로 함유되면 항균 또는 항염증 효과가 크지 않고, 1중량부를 초과하여 함유되면 효과가 비례적으로 증가하지 않아, 함유 증가에 따른 실익이 없기 때문이다.
- [45] 본 발명에서 상기 치과감염 질환 치료용 조성물은 프로폴리스, 자일리톨 및 단백질 분해효소로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 함유할 수 있는데, 프로폴리스 또는 자일리톨을 추가로 포함하여 관능특성을 향상시킬 수도 있고, 단백질 분해효소를 첨가하여 항균효과 및 리포다당류 제거 효과를 높일 수 있다.
- [46] 본 발명의 치과감염 질환 치료용 조성물의 약제학적으로 허용되는 담체는 녹말, 락토오스, 탄산칼슘, 인산칼슘 등과 같은 부형제, 녹말, 아라비아고무, 카르복시메틸셀룰로오즈, 히드록시메틸셀룰로오즈, 결정성셀룰로오즈 등과 같은 결합제, 마그네슘스테아레이트, 활석 등과 같은 윤활제, 카르복시메틸셀룰로오즈 칼슘, 활석 합성알루미늄 실리케이트 등과 같은 분해제, 물, 식물유 등과 같은 희석제 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [47] 본 발명의 치과감염 질환 치료용 조성물의 제형은 특별히 제한되지는 않으나, 분말, 미세과립, 액제, 산제, 분무제, 연고제 및 젤상제제로 제형화될 수 있으며, 젤상제제로 제형화되는 것이 가장 바람직하다.
- [48] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 염증 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [49] 본 발명에서 상기 염증은 아토피, 건선, 관절염, 피부염, 알레르기, 골관절염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 방광염 및 신장염으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [50] 본 발명에 있어서 상기 염증 치료용 조성물 전체 100중량부에 대하여, 상기

펩타이드 10<sup>-2</sup>~10중량부 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는 10<sup>-1</sup>~1중량부를 함유할 수 있다. 이는, 펩타이드가 10<sup>-2</sup>중량부 미만으로 함유되면 항균 또는 항염증 효과가 크지 않고, 10중량부를 초과하여 함유되면 효과가 비례적으로 증가하지 않아, 함유 증가에 따른 실익이 없기 때문이다.

[51] 또한, 본 발명의 펩타이드를 염증 치료용 조성물에 배합한 경우의 제형에 대해서는 통상적인 성분과 방법에 의해 배합되고, 예컨대, 화장수, 크림, 연고, 유액, 파운데이션, 오일, 팩, 약용비누를 포함한 비누, 보디비누, 입술연지, 손톱 화장품, 눈 화장품, 향수, 세안료, 치약 마우스 원시 등과 같은 구강용류, 방취제, 목욕 용제, 샴푸, 린스, 헤어 토익, 헤어 스프레이 및 염모료 등의 제형으로 할 수 있다. 아울러, 본 발명에 따른 성분을 배합한 각종 조성물의 형태는 임의적으로서, 용액형, 크림형, 페이스트형, 젤형, 젬형, 거품형, 고형상 및 분말형으로서 이용할 수 있다.

[52]

[53] 실시예

[54] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[55]

[56] 실시예 1: 펩타이드의 항균효능 측정

[57]

[58] 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 항균효능을 평가하기 위해 액체 희석법에 따라 항균실험을 진행하였다. 치주원인균인 *Prevotella intermedia*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*을 Tryptic soy broth에서 배양하였다. *Staphylococcus aureus.subsp.aureus*와 *Streptococcus pyogenes*는 Trypticase soy 액체배지에서, *Staphylococcus epidermidis*는 Nutrient 액체배지에서 배양하였다. 위의 균주들은 620nm에서 흡광도가 1이 될 때까지 배양한 후 세포를 수거하여 실험에 사용하였다. PBS로 희석하여 ml당 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> 개의 박테리아를 TSA(tryptic soy agar) 플레이트에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

[59] 액체 희석법을 이용하여 펩타이드에 의한 항균력을 측정하기 위해 미세튜브에 1ml의 증류수를 넣은 후 10 $\mu$ l의 희석된 균액을 넣어 평판배지에 50 $\mu$ l를 도말하여 대조군(control)으로 사용하였다. 항균력을 갖는 펩타이드를 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml의 농도로 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 50 $\mu$ l를 도말하여 생성된 콜로니 수를 카운팅하였으며, 동일한 방법으로 Growth factor인 hBD3, rhPDGF-BB(recombinant human PDGF-BB), rhHB-EGF(recombinant humanHB-EG)의 항균력을 측정하여 비교하였다.

[60] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을

가지는 펩타이드는 처리농도가 100 $\mu$ g/ml일 경우 가장 항균력이 높았으며, growth factor(hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF)의 항균력은 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 비해 항균력이 떨어지는 것을 확인하였다.

[61]

[62] 실시예 2: 펩타이드의 세포수준의 항소양 효능평가

[63]

[64] 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 항소양 효과를 확인하기 위해 베타-헥소사미니테이즈 방출량의 변화를 측정하였다.

[65]

Basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 세포를 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, RBL-2H3 세포는 10% FBS(heat inactivated fetal bovine serum)와 100unit/ml

항생제(페니실린-스트렙토마이신)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% air가 공급되는 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 세포의 수는 5×10<sup>4</sup> cells/well로 96 well plate에서 배양한 후, 상등액을 제거한 다음 anti-DNP IgE 100ng/ml이 포함된 DMEM을 각 well에 100 $\mu$ l씩 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS로 1회 세척하고 Tyrode's buffer를 각 well당 100 $\mu$ l씩 첨가하여 15분간 배양하였다. 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 Tyrode's buffer로 농도별(1, 10, 100  $\mu$ g/ml)로 희석하여 100 $\mu$ l씩 첨가하고 37°C에서 1시간 반응하였다.

DNP-HSA(100ng/ml)를 100 $\mu$ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간 재차 반응시켰다. 배양 후 상등액 80 $\mu$ l를 취해서 다른 96 well plate에 넣고 동일한 부피의 기질 용액(0.2M citrate, 1mM p-nitrophenyl- $\beta$ -acetyl-glucosamide, pH 4.5)을 넣어주고 1시간 반응하였고, 1시간 반응하는 동안 세포는 분해 완충용액(lysis buffer: 1% Triton X-100)으로 처리하고, 4°C 12,000g 조건에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 새로운 96 well plate에 넣고 위와 동일한 방법으로 반응시켰다. 기질 반응을 중지시키기 위해 정지액(0.2M sodium bicarbonate, pH 10) 100 $\mu$ l를 첨가하고 5분간 반응시킨 후 흡광도를 405nm에서 측정하여 베타-헥소사미니테이즈 방출량의 변화를 측정하였다. 베타-헥소사미니테이즈 양 측정법의 경우, 히스타민 정량법보다 민감하고 정확하다고 알려져 있어 최근 탈과립 연구에 많이 사용되고 있다. 위와 같은 방법으로 비교군으로 알레르기 질환 치료제로 사용되는 KF, Growth factor인 hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF에 의한 베타-헥소사미니테이즈 방출량의 변화를 측정하여 비교하였다.

[66]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 100 $\mu$ M에서는 대조군(control)과 비슷한 수준으로 베타-헥소사미니테이즈의 방출량이 감소한 반면, hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF는 베타-헥소사미니테이즈의 방출량 감소에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[67]

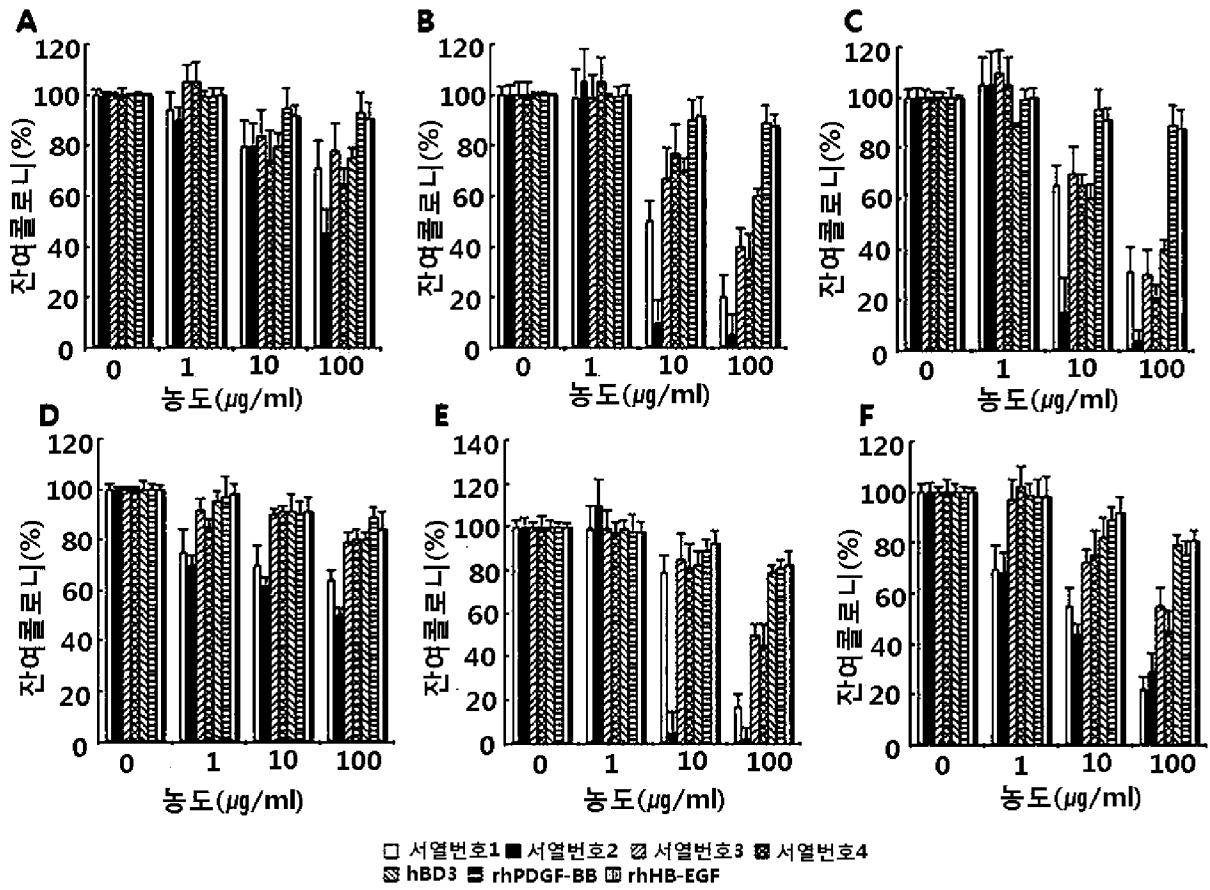
- [68] 실시예 3: 펩타이드의 세포수준의 항염증 효능 평가
- [69]
- [70] 1) NF- $\kappa$ B의 웨스턴블롯 분석
- [71] 시그널 관련성을 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B 시그널과 관련된 알레르기성 염증관련 효소 NF- $\kappa$ B의 발현량을 확인하였다.
- [72] RAW 264.7 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 100unit/ml 항생제(페니실린-스트렙토마이신)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% air가 공급되는 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.
- [73] RAW 264.7 세포를 배양하여 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 1시간 동안 처리한 뒤, LPS(10ng/ml)를 처리하여 8시간 뒤에 cytosol과 nucleus의 단백질을 각각 수득하여 hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF에 의한 NF- $\kappa$ B 발현 변화와 비교하였다. 수득한 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 전기이동분리한 후 블러팅 키트를 사용하여 나이트로셀룰로오즈 멤브레인으로 단백질을 이동시켰다. 1차 항체 NF- $\kappa$ B로 블러팅하고, HRP(horseradish peroxidase)와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음 ECL 웨스턴블롯 검출 시약을 사용하여 반응시킨 후 X-ray 필름에 노출시켜 시그널을 검출하여 염증관련 효소인 NF- $\kappa$ B 발현을 확인하였다.
- [74] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B의 발현을 억제하였으나, hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF는 NF- $\kappa$ B 발현 억제효과가 펩타이드에 비해 크지 않은 것을 확인하였다.
- [75]
- [76] 2) iNOS 및 COX-2의 웨스턴블롯 분석
- [77] RAW 264.7 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 100unit/ml 항생제(페니실린-스트렙토마이신)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% air가 공급되는 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.
- [78] RAW 264.7 세포를 배양하여 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 1시간 동안 처리한 뒤, LPS(10ng/ml)를 처리하여 8시간 뒤에 cytosol과 nucleus의 단백질을 각각 수득하여 hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF에 의한 iNOS 및 COX-2의 발현 변화와 비교하였다. 수득한 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 전기이동분리한 후 블러팅 키트를 사용하여 나이트로셀룰로오즈 멤브레인으로 단백질을 이동시켰다. 1차 항체 iNOS 및 COX-2로 각각 블러팅하고, HRP(horseradish peroxidase)와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음 ECL 웨스턴블롯 검출 시약을 사용하여 반응시킨 후 X-ray 필름에 노출시켜

- 시그널을 검출하여 염증관련 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현을 확인하였다.
- [79] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 서열번호 1~4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 반면, hBD3, rhPDGF-BB 및 rhHB-EGF는 iNOS와 COX-2의 발현 억제효과가 없는 것을 확인하였다.
- [80]
- [81] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [82]
- 산업상 이용가능성**
- [83] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드는 치주염, 임플란트 주위염 등 치과감염의 치료 및 아토피, 건선, 관절염 등의 염증치료 목적으로 사용할 수 있다.
- [84]
- 서열목록 Free Text**
- [85] 전자파일 첨부하였음.

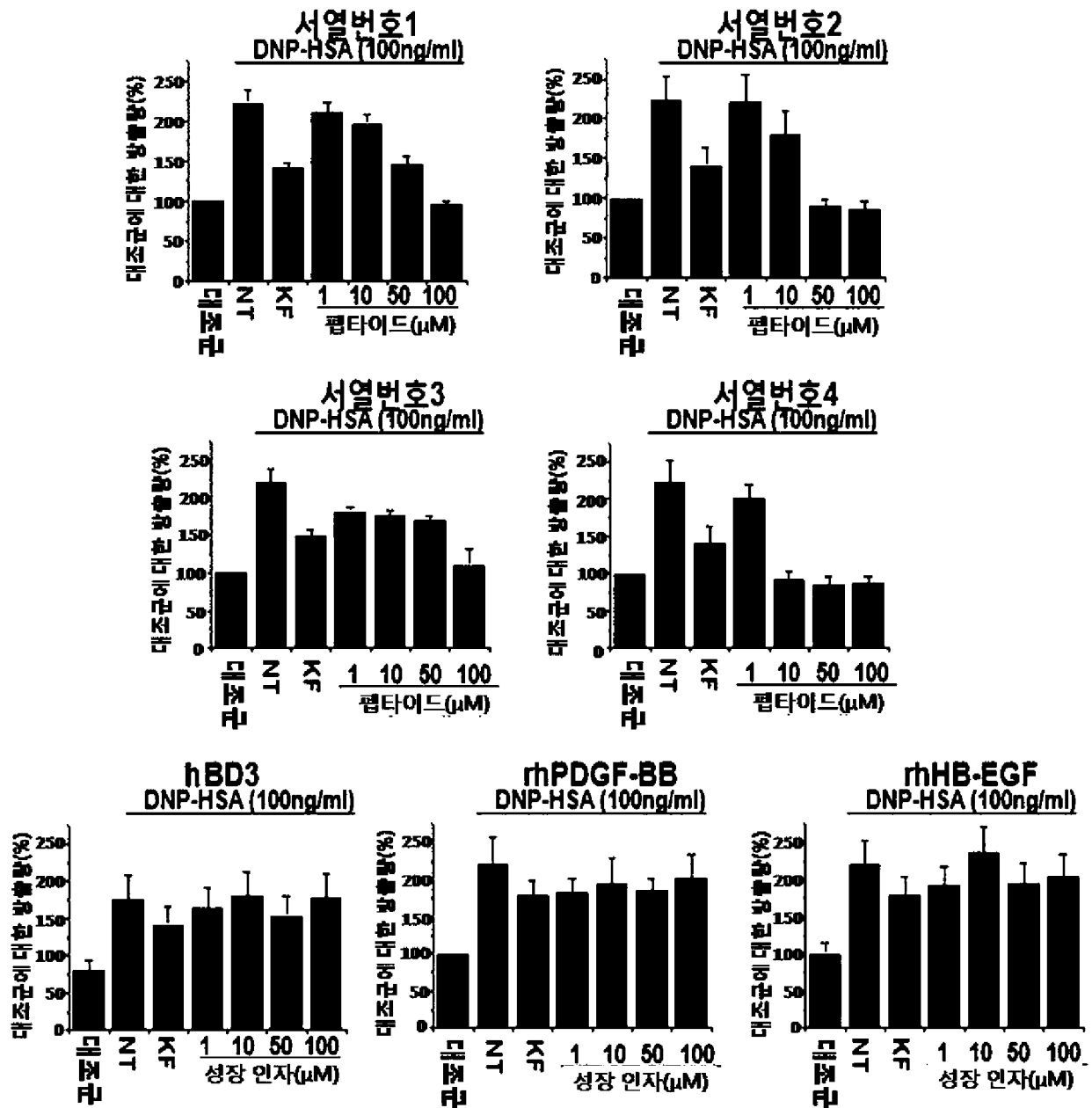
## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 인간 베타 디펜신-2 유래 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드.
- [청구항 2] 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 인간 베타 디펜신-3 유래 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드.
- [청구항 3] 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 인간 혈소판 유래 성장인자 유래 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드.
- [청구항 4] 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 헤파린 결합 표피 성장인자 유래 항균 또는 항염증 활성을 가지는 펩타이드.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 펩타이드를 하나 이상 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 치과감염 질환 치료용인 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 치과감염 질환은 치주염, 치은염 및 임플란트 주위염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.
- [청구항 8] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 펩타이드를 하나 이상 유효성분으로 함유하는 염증 치료용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 염증은 아토피, 건선, 관절염, 피부염, 알레르기, 골관절염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 방광염 및 신장염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 염증 치료용 조성물.

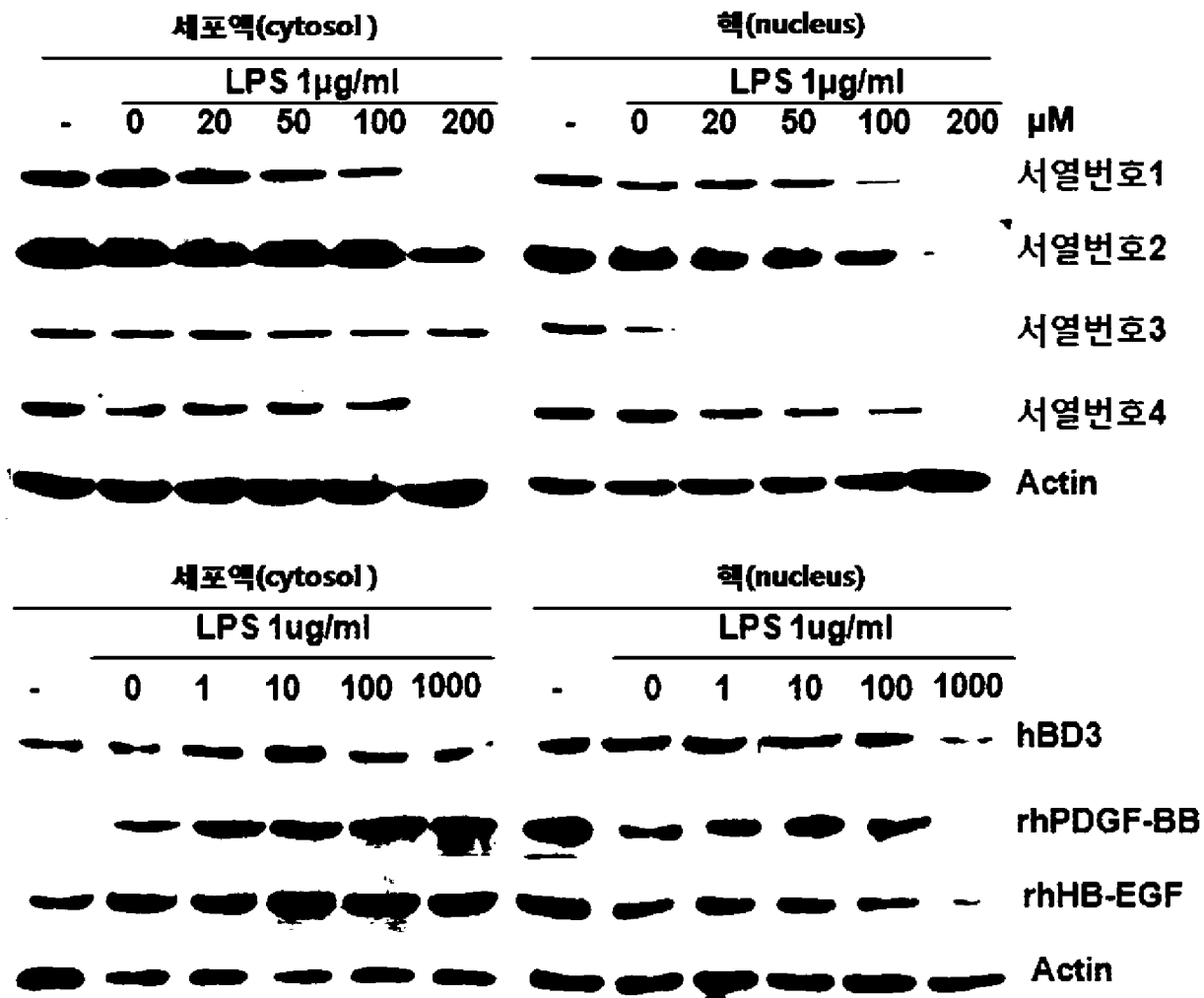
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

