(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 3 월 23 일 (23.03.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/048029 A1

(51) 국제특허분류:
A23L 1/305 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010292

(22) 국제출원일: 2016 년 9 월 12 일 (12.09.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0130341 2015 년 9 월 15 일 (15.09.2015) KR

(71) 출원인: **조선대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **박윤경 (PARK, Yoonkyung)**; 61452 광주시 동구 필문대로 309 조선대학교 생명공학관 205 호, Gwangju (KR). **이종국 (LEE, Jong-Kook)**; 57915 전라남도 순천시 외서면 신덕리 296, Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12 층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, 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, RW, 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, 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).

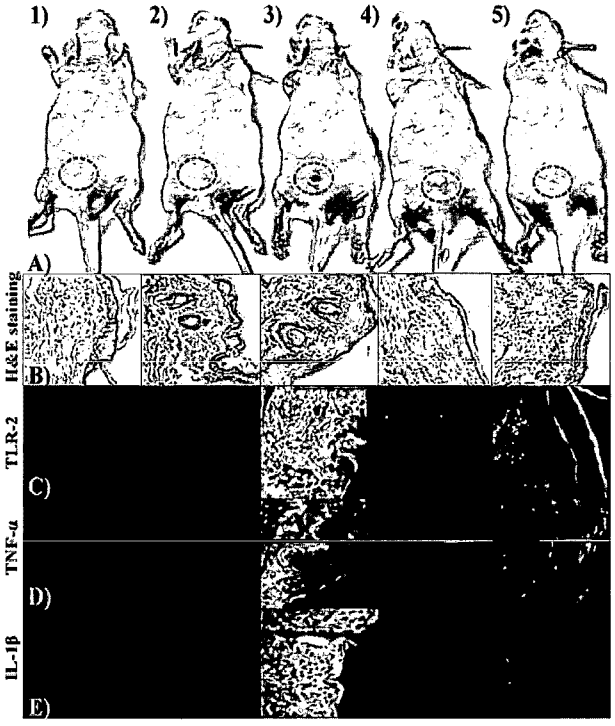
공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY COMPOSITION CONTAINING CLAVASPIRIN PEPTIDE ANALOG AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 클라바스피린 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물

[도 3]



(57) **Abstract**: The present invention relates to an anti-inflammatory composition containing a clavaspirin peptide analog as an active ingredient. CSP-4 peptide, in the present invention, which is a synthetic peptide prepared by substituting the 9 and 12 positions of *Styela clava*-derived clavaspirin peptide with positively charged lysine (K) amino acid, has an excellent antimicrobial effect on an animal model exhibiting an inflammatory response caused by antibiotic resistant bacteria and shows little cytotoxicity,and thus CSP-4, of the present invention, which is a clavaspirin peptide analog, can be useful as an active ingredient of a pharmaceutical composition for prevention or treatment of inflammatory diseases, a cosmetic composition, a food additive and the like.

(57) **요약서**: 본 발명은 클라바스피린 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서 미더덕 유래 클라바스피린(Clavaspirin) 펩타이드 중 9 번과 12 번에 양이온을 띠는 라이신(Lysine, K) 아미노산으로 치환시켜 제조한 합성 펩타이드인 CSP-4 펩타이드가 항생제 내성균에 의해 유발된 염증 반응 동물 모델에 대한 항균 효과가 우수하고, 세포독성을 거의 나타내지 않으므로, 본 발명의 클라바스피린 펩타이드 유사체인 CSP-4 는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장료 조성물, 식품 첨가제 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2017/048029 A1

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 클라바스피린 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 클라바스피린 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 경제성장에 의한 신체활동의 감소는 면역력의 저하를 초래해 박테리아, 곰팜이, 기생충 등과 같은 미생물 감염으로부터 각종 질병의 위험에 노출되어 있으며, 현재 전 세계적으로 질병 예방과 치료를 위해 다양한 약물을 사용하고 있지만 약물의 오·남용은 병원균의 저항성을 증가시켰다. 특히 수퍼버그(superbugs)로 불리우는 VRE(vancomycin-resistant enterococci), MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)와 MDRP(multidrug-resistant pathogens)의 증가는 현재 전 세계적인 관심의 대상이다.

[3] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하여 세균의 항생제 저항성(resistance)이 야기되었다. 실제로, 세균이 새로운 항생제에 저항성을 나타내는 속도는 새로운 항생제의 유사체가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 MRSA, 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus* faecalis), 마이코박테리움 투버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas* aeruginosa) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다.

[4] 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, MRSA에서 발견되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다. 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

[5] 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다. 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에

저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

[6] 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며, 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은 오토라이신 활성의 하부조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하부조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다.

[7] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.

[8] 한편, 염증반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개 물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타난다. 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부 물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상(과민성질환, 만성 염증)이 되며, 수혈, 약물투여, 장기이식 등 치료과정에서도 장해요인이 된다.

[9] 현재까지 염증 반응의 물리적 불편함을 감소시키는 제약학적 제제를 투여하여 치료하고 있으나 일반적인 항염증성 약제는 광범위한 질병의 치료에 사용되고, 동일한 약제가 종종 상이한 질병의 치료에 이용되기 때문에 치료 작용 및 부작용을 공유하게 된다. 그러나 부작용 때문에 장기적으로 사용하기가 곤란하며, 결과적으로 현재까지의 치료법에 부작용의 심각성이 너무 크기 때문에 새롭거나 개선된 치료제 개발은 필수적이고 시급한 실정이며, 부작용에 대한 우려가 없는 인체에 안전한 항염제의 필요성이 대두되고 있다.

[10] 한국등록특허 제1158368호에는 '은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 항염증 활성용 조성물 및 추출방법'이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2015-0085935호에는 'CM-MA 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드 CMA3 및 이의 용도'이 개시되어 있으나, 본 발명의 클라바스피린 펩타이드 유사체를

유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 23개 아미노산으로 구성된 클라바스피린(Clavaspirin) 펩타이드 중 9번과 12번에 양이온을 띠는 라이신(Lysine, K) 아미노산으로 치환시켜 제조한 합성 펩타이드가 항생제 내성균에 의해 일으켜진 염증 반응 동물 모델에 대한 항염 효과가 우수하고, 세포독성을 거의 나타내지 않음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[12] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 및 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에 대한 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[17] 본 발명의 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체는 항생제 내성균에 의해 일으켜진 염증 반응 동물 모델에 대한 항염 효과가 우수하고, 세포독성을 거의 나타내지 않으므로, 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 화장료 조성물, 식품 첨가제 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 본 발명의 CSP-4 펩타이드의 적혈구 용혈작용 결과를 나타낸다. 대조군 멜리틴(melittin, ○), CSP-4(●).

[19] 도 2는 대식세포인 Raw 264.7에서 TNF-α(A) 및 IL-1β (B)발현 여부를 확인한 결과를 나타낸다. 3회 개별실험 평균값 ± 표준편차 값으로 나타내었다.

[20] 도 3은 *S.* aureus CCARM 0027 균으로부터 피부염을 유발한 헤어리스 마우스

피부에 CSP-4 펩타이드를 처리하여 7일 후(A) 각 조직을 적출하여 H&E 염색(B) 및 면역 조직 화학 방법을 통해 TLR-2(C), TNF-α(D), IL-1β(E) 항체를 부착하여 발현여부 확인한 결과를 나타낸다. 1) 대조군, 2) CSP-4 200㎍/ml, 3) *S.* aureus CCARM 0027, 4) *S.* aureus CCARM 0027 + CSP-4 100㎍/ml, 5) *S.* aureus CCARM 0027 + CSP-4 200㎍/ml.

[21] 도 4는 전자주사현미경(SEM)을 통해 헤어리스 마우스 피부의 표면 변화를 확인한 결과이다. A) 대조군, B) CSP-4 200㎍/ml, C) *S.* aureus CCARM 0027, D) *S. aureus* CCARM 0027 + CSP-4 100㎍/ml, E) *S. aureus* CCARM 0027 + CSP-4 200㎍/ml.

[22] 도 5는 본 발명의 펩타이드에 의한 염증이 유도된 헤어리스 마우스 피부 내 사이토카인과 염증 발현 단백질 발현 여부를 확인한 결과이다. A) 대조군, B) CSP-4 200㎍/ml, C) *S.* aureus CCARM 0027, D) *S.* aureus CCARM 0027 + CSP-4 100㎍/ml, E) *S. aureus* CCARM 0027 + CSP-4 200㎍/ml.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

[24] 기존의 알려진 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 모체 펩타이드인 클라바스피린(clavaspirin)은 미더덕(*Styela* clava)에서 유래한 항균 펩타이드로 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다.

[25] 본 발명의 유효성분인 클라바스피린 펩타이드 유사체는 CSP-4라고도 일컫으며, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는다.

[26] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법에 따라, 모체 펩타이드의 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열의 9번과 12번 두 개의 이소루신(Isoleusine, I)을 소수성이 낮은 라이신(Lysine, K)으로 치환하여 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 CSP-4 펩타이드를 제공한다.

[27] 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 CSP-4 펩타이드는 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 상기 치환되는 9번과 12번의 아미노산은 라이신(Lysine, K) 이외에도, 양전하 아미노산인 아르기닌(Arginine, R) 또는 히스티딘(histidine, H)으로 치환이 가능하며, 바람직하게는 라이신(Lysine, K)이다.

[28] "염증"이라 함은 인체 내 염증 반응을 제한 없이 포함하며, 급성 및/또는 만성 염증 질환; 및 염증을 수반하는 질환을 모두 포함한다.

[29] 상기 염증은 세균에 의해 유발되어질 수 있으며, 바람직하게는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 그람

음성균은 대장균(*Escherichia* coli) 또는 프로테우스 불가리스(*Proteus* vulgaris)이고, 그람 양성균은 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus* epidermidis), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus)이며, 상기 항생제 내성균은 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[30] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항생제 내성균인 *S.* aureus MRSA 0027 균으로 염증이 유발된 마우스에 본 발명의 CSP-4 펩타이드를 처리하여 염증 억제 효과를 확인하였다.

[31] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 사이토카인 또는 염증 관련 단백질 발현을 억제하며, 바람직하게는 TNF-α, IL-1β, NF-κB 또는 TLR-2(Toll-like receptor 2) 발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 상기 식품은 염증을 감소시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

[33] 본 발명의 일 구현 예에 따른 건강기능식품 조성물에서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 본 발명의 상기 CSP-4 펩타이드를 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 CSP-4 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 CSP-4 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[35] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 펩타이드를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[36] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드 및

덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[37] 상기 외에 본 발명의 CSP-4 펩타이드는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[38] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[39] 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 CSP-4 펩타이드는 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다.

[40] 상기 염증은 세균에 의해 유발되어질 수 있으며, 바람직하게는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia* coli) 또는 프로테우스 불가리스(*Proteus* vulgaris)이고, 그람 양성균은 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus* epidermidis), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus)이며, 상기 항생제 내성균은 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[41] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항생제 내성균인 *S.* aureus MRSA 0027 균으로 염증이 유발된 마우스에 본 발명의 CSP-4 펩타이드를 처리하여 염증 억제 효과를 확인하였다.

[42] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 사이토카인 또는 염증 관련 단백질 발현을 억제하며, 바람직하게는 TNF-α, IL-1β, NF-κB 또는 TLR-2 발현을 억제할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[43] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학 조성물에서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[44] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[45] 본 발명의 CSP-4 펩타이드의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과

결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 CSP-4 펩타이드를 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 미리세틴을 포함하는 약학조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 CSP-4 펩타이드에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 CSP-4 펩타이드의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 CSP-4 펩타이드는 1일 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[48] 본 발명의 CSP-4 펩타이드는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[49] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증

조성물을 제공한다.

[50] 본 발명의 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체는 염증 억제 효과가 우수하며 부작용도 발생하지 않아 상기 펩타이드가 우수한 항염증 조성물의 유효성분으로 작용할 수 있다.

[51] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[52] 본 발명의 일 구현예에서, CSP-4 펩타이드를 염증이 유발된 마우스 피부에 도포하였을 때 염증 억제 효과가 우수하였으며 부작용도 발생하지 않아 상기 펩타이드가 우수한 염증 개선용 화장료 조성물의 유효성분으로 작용할 수 있다.

[53] 본 발명의 화장료 조성물은 피부외용연고, 크림, 유연화장수, 영양화장수, 팩, 에센스, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어트리트먼트, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 영양에센스, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클린저 등의 제형을 가질 수 있다. 이들 각 제형의 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기제와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.

[54] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[55] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[56] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[57] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수있다.

[58] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서

지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[59] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 및 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에 대한 항균용 조성물을 제공한다.

[60] "항균(antimicrobial)"의 의미는 어떤 농도에서 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제, 또는 제거하는 능력을 의미하며, 바람직하게는 항세균(anti-bacterial)을 의미할 수 있으며, 상기 세균은 그람 음성균, 그람 양성균, 또는 항생제 내성균일 수 있으며, 바람직하게는 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia* coli) 또는 프로테우스 불가리스(*Proteus* vulgaris)이고, 그람 양성균은 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus* epidermidis), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus)이며, 상기 항생제 내성균은 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[61]

[62] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] **실시예 1: 펩타이드의 합성 및 분리정제**

[65] 본 발명자들은 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963)에 따라, 모체 펩타이드인 클라바스피린(대조군)으로 기재된 아미노산 서열(서열번호 1)을 가지는 펩타이드의 소수성(Hydrophobic) 부분인 9번과 12번 위치에 이소루이신(Isoleucine, I)을 라이신(Lysine, K)으로 치환하여 CSP-4 펩타이드(서열번호 2)(실험군 1)을 합성하였다(표 1).

[66] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH_2 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-아미노산-왕 레진을 출발물질로 사용하였다.

[67] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo trizole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노산 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및

DCM(dichoromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid), 페놀(phenol), 싸이오아니졸(thioanisole), H2O 및 트리이소프로필실레인(triisopropylsilane)을 각각 85:5:5:2.5:2.5(v/v)의 비율로 혼합한 용액을 가하고 2~3시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기 방법으로 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C_{18}300Å, 15, 19.0 mm×30 m, Waters, 미국)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N HCl로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 상기의 방법으로 조성된 펩타이드의 순도를 확인한 결과 95% 이상의 순도를 나타내었으며, MALDI 질량 분석법(Hill 등, Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5:395, 1991)을 이용하여 분자량을 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 비교한 결과, 그 값이 일치하는 것을 확인하였다(표 1).

[68] [표1]

본 발명에서 합성한 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유 시간

펩타이드 명칭	아미노산 서열	서열번호	분자량	보유 시간
Clavaspirin	FLRFIGSVIHGIGHLVHHIGVA L-NH_2	1	2492.01	35.2
CSP-4	FLRFIGSVKHGKGHLVHHIGV AL-NH_2	2	2522.04	20.2

[69]

[70] **실시예 2: 항균 활성 측정**

[71] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(MIC) 값을 측정하였다.

[72] 구체적으로, 그람 음성균으로 대장균(*Escherichia* coli, ATCC 25922), *P.* 에루지노사(*Pseudomonas* aeruginosa, ATCC 15692), *S,* 타이피무리움(*Salmonella typhimurium,* KTCC 1926), *P.* 불가리스(*Proteus* vulgaris, KCTC 2433)를, 그람 양성균으로 *S.* 아우레우스(*Staphylococcus* aureus, ATCC 25923), *L.* 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes, ATCC 19115), *B.* 서브틸리스(*Bacillus* subtilis, KCTC 1918), *S.* 에피더미디스(*Staphylococcus* epidermidis, KCTC 3096)를 미국 세포주은행(ATCC)과 한국 세포주은행(KCTC)으로부터 분양받아 사용하였으며, 각 균주를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨; Sigma, 미국) pH 5.5와 pH 7.4에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음 1% 박토 펩톤 배지(Difco, 미국)로 5×10^5 세포/100㎕의 균체 농도로

희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, 미국)에 접종하였다. 상기 실시예 1에서 합성한 CSP-4 펩타이드와 모체 펩타이드를 각각 96 웰(well)로부터 1/2배씩 pH 5.5와 pH 7.4에서 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 12시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 620nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

[73] 그 결과, 하기 표 2에 개시된 바와 같이 본 발명된 CSP-4 펩타이드는 모든 균주에서 높은 항균 활성을 보임을 확인하였다(표 2).

[74] [표2]

그람 음성균 및 그람 양성균에 대한 항생 펩타이드의 항균 활성

펩타이드	생육 최소저해농도(μM)							
	그람 음성균				그람 양성균			
	대장균	P. 에루지노사	S. 타이피무리움	*P.* 불가리스	S. 아우레우스	L. 모노사이토젠스	*B.* 서브틸리스	*S.* 에피더미디스
Clavaspirin	2	32	32	8	16	16	16	4
CSP-4	2	32	64	4	8	4	4	4

[75]

[76] **실시예 3: 용혈 활성 측정**

[77] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

[78] 구체적으로, 인간 적혈구를 8%의 농도가 되도록 생리식염수 용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고, 상기 클라바스피린(Clavaspirin), CSP-4 및 멜리틴(Melittin) 펩타이드를 높은 농도부터 1/2의 농도로 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 1,000×g로 원심분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414㎚ 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100(Sigma, 미국)을 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 트리톤 X-100의 적혈구 용혈 활성을 100%로 하여, 하기 수학식 1을 사용하여 상기 펩타이드의 용혈 활성을 계산하였다.

[79] [수식1]

$$\text{적혈구 파괴능(hemolysis)(\%)} = \frac{\text{흡광도A} - \text{흡광도B}}{\text{흡광도C} - \text{흡광도B}} \times 100$$

[80] (상기 식에 있어서, 흡광도 A는 414 ㎚ 파장에서 측정한 각 펩타이드를 처리한

반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 B는 414 ㎚ 파장에서 측정한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 C는 414 ㎚ 파장에서 측정한 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타낸다.)

[81]

[82] 그 결과, 본 발명의 CSP-4 펩타이드는 200μM 농도 이하에서 용혈작용이 거의 일어나지 않았다(표 3). 따라서, 본 발명의 항생 펩타이드는 세포독성이 거의 일어나지 않는 것을 확인하였다.

[83] [표3]

펩타이드	% 적혈구 파괴능(각 펩타이드 농도, μM)				
	400	200	100	50	25
Clavaspirin	100	100	100	100	100
CSP-4	10	1	0	0	0

[84]

[85] **실시예 4: 정상 세포주에서의 세포독성 확인**

[86] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 정상 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해, 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT 세포주, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, 독일)를 이용하여 독성을 측정하였다.

[87] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HaCaT 세포주를 3×10^3씩 96웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, CSP-4 펩타이드를 각 농도별(25, 50, 100, 200 또는 400μM/웰)로 처리하여, 24시간 동안 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 배양 후, 생리식염수 용액(PBS)에 5mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 20㎕를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200㎕의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 560 nm에서 흡광도를 확인하여 세포 생존력을 확인하였다.

[88] 그 결과, 표 4 에서 보는 바와 같이 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT 세포주)에서 펩타이드(CSP-4)는 세포 독성을 거의 나타내지 않았다.

[89] [표4]

펩타이드	% 세포 생존력(각 펩타이드 농도, μM)				
	400	200	100	50	25
Clavaspirin	0	1	1	3	15
CSP-4	88	100	100	100	100

[90]

[91] **실시예 5: 항생제 내성균에 대한 항균 활성 확인**

[92] 합성된 펩타이드의 고병원성 세균에 대한 항균 활성 보유를 확인하기 위하여

전남대학교 병원 환자들로부터 분리한 각종 MRSA(methicillin resistant *Staphylococcus* aureus)의 세균을 분양받아 LB와 TSB에서 중간-로그 상까지 배양하였다. 96웰 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, 미국)에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 100㎕씩 넣고, 여기에 균주가 포함된 배지를 100㎕씩 가한 후, 37℃에서 24시간 방치하여 600nm에서 흡광도를 측정하고, 흡광도가 양성 대조군(균주가 없는 배지)과 같은 농도를 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)로 결정한다. 즉 95% 이상 성장억제를 보이는 농도가 MIC값이 된다.

[93] [표5]

균주	MIC(μM)				
	Clavaspirin	CSP-4	Melittin	Erythromycin	Gentamycin
S. aureus	16	8	2	1	1
S. aureus MRSA 3126	16	8	2	128	32
S. aureus MRSA 0027	16	8	2	>256	64
S. aureus MRSA 5157	8	8	2	16	16
S. aureus MRSA 1635	16	8	2	>256	>256
S. aureus MRSA 4761	32	8	4	>256	32
S. aureus MRSA 5159	32	8	8	16	16
S. aureus MRSA 3-359	16	8	4	>256	64
S. aureus MRSA 2-122	8	8	4	>256	128
S. aureus MRSA 1630	8	8	4	>256	64
S. aureus MRSA 1870	8	8	4	>256	16
S. aureus MRSA 3511	8	8	4	>256	>256
S. aureus MRSA 5156	8	8	4	>256	>256
S. aureus MRSA 3518	8	8	4	>256	>256

[94]

[95] 그 결과, 표 5에서 보는 바와 같이 사람 유래의 항생제 내성균의 고병원성 세균들에 대한 항생 활성을 나타내었다.

[96] 특히, 실험의 비교군으로서 항생 펩타이드 기능이 우수하다고 알려진 멜리틴(Melittin)과 비교했을 때 활성이 같거나 한-두 단계 떨어지지만 멜리틴의 경우 세포독성이 강력하여 약물로서 개발이 제한되어 있다. 도 1에 개시된 바와 같이 본 발명의 항생 펩타이드(CSP-4)는 적혈구 용혈작용을 테스트한 결과

멜리틴(항균 펩타이드, ○)은 2㎍/ml에서 거의 100%의 용혈작용을 보이는 반면, CSP-4(●)은 500㎍/ml에서도 1% 미만의 용혈현상을 보였다. 이는 본 발명의 펩타이드가 세포 독성이 없음을 보였다(도 1).

[97] 또한 기존 환자에게 적용 중인 에리트로마이신(Erythromycin)과 젠타마이신(Gentamycin)의 경우 항생제 기능이 전혀 나타나지 않음을 확인함으로써 이들 환자에서 분리한 항생제 내성 황색포도상구균이 기존 항생제에는 전혀 작용하지 않음을 확인하였다(표 5).

[98]

[99] **실시예** 6: 세포 배양 및 단백질 추출

[100] 항생제 내성 황색포도상구균인 *S.* aureus MRSA 0027 균에 의한 대식세포(Raw 264.7 cell)에 사이토카인 발현 실험에 앞서 대식세포를 100U/μM 페니실린과 10% FCS(fetal calf serum)이 첨가되어있는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 보충제를 이용하여 5% CO_2 가습 배양기에서 37℃에서 배양하였다. 염증 전구체 사이토카인인 TNF-α(Tumor Necrosis factor-α)와 IL-1β(Interleukin-1β) 발현 억제 여부 실험을 위해 대식세포를 1×10^{6}세포/ml로 12-웰(well) 플레이트에 접종을 하여 1일간 5% CO_2 가습 배양기에서 배양을 한 후 사전에 배양해 놓은 *S.* aureus MRSA 0027 균을 1×10^{6}세포/ml로 음성 대조군(negative control)을 제외한 플레이트(well)에 접종을 하고, 양성 대조군(positive control)을 제외한 나머지 플레이트(well)는 PELPYK 펩타이드를 각각 다른 농도인 25, 50, 100 및 200 ㎍/ml으로 처리하여 12시간 동안 5% CO_2 가습 배양기(37℃)에서 반응시켰다. 12시간이 지난 12-웰 플레이트에 상등액을 제거한 후 트립신을 이용하여 부착되어있는 대식세포를 수거하였다. 순수 대식세포만을 얻기 위해 4,000 rpm에서 10분간 세포를 침전시킨 후 상등액을 제거한 후 단백질 추출 시약(PRO-PREP™ protein extraction solution, iNtRON biotechnology)을 이용하여 단백질을 추출하였다.

[101]

[102] **실시예 7: TNF-α 및 IL-1β 발현 억제 확인**

[103] 단백질 추출 시약을 이용하여 추출된 각각의 단백질을 단백질 정량법인 Bradford 방법을 이용하여 농도를 정량화하였다. 염증 전구체 사이토카인인 Tumor Necrosis factor-α 와 Interleukin-β Kit(KOMABIOTECH, 한국)를 사용하여 반응을 한 후 흡광도 450nm에서 ELISA 측정을 수행하였다. 배양된 대식세포(RAW 264.7)의 세포 개수를 카운터(5×10^{5}세포/ml)하여 5% CO_2 배양기에서 1일간 배양된 세포에 피부염을 유발한다고 알려진 미생물인 *S.* aureus MRSA 0027 균을 1×10^{6}세포/ml 농도로 접종한 곳에 해양 생물체로부터 분리된 항균 펩타이드를 25, 50, 100, 200㎍/ml의 농도로 처리하여 염증전구체 사이토카인으로 일반적으로 알려진 TNF-α, IL-1β를 확인한 결과, 항균 펩타이드만을 접종한 곳에서는 대조군과 대조한 결과 사이토카인이 거의 발현을 하지 않은 것을 알 수 있었다. 반면, 박테리아만을 처리한 곳에서는 과다

발현이 유발되었지만, 박테리아를 처리한 곳에 CSP-4 펩타이드를 이용해 각각의 농도별로 처리한 결과 농도가 증가함에 따라 염증 전구체 사이토카인인 TNF-α와 IL-1β의 발현이 줄어드는 것을 확인하였다(도 2).

[104]

[105] **실시예 8: H&E(Haematoxyline and Eosin) 조직 염색법과 조직 면역학 방법**

[106] 6주령의 헤어리스 마우스(Hairless mouse)의 피부에 *S.* aureus MRSA 0027(1×10^8 세포/ml) 균으로부터 염증 유도를 위해 100㎕ 처리하였다. 30분 경과 후 CSP-4 펩타이드를 100㎍/ml, 200㎍/ml로 각각 처리하였다. 염증이 유도된 부위에 펩타이드를 처리한 마우스, 펩타이드만을 처리한 마우스 및 염증이 유도된 마우스의 조직을 각각 적출하여 생리식염수(PBS)를 이용하여 세척하였고, 4% PFA(paraformaldehyde)를 사용하여 상온에서 24시간 동안 조직을 고정시켰다. 고정시킨 모든 조직을 에탄올의 농도를 높여가며 조직의 수분을 탈수시킨 다음(각각 2시간 동안 반응), 3번에 자일렌(xylene)을 치환하여 각각 1시간 동안 반응을 하고난 후 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록의 샘플은 마이크로톰(Microtome, Thermo-scientific, 미국)을 이용하여 4μm씩 섹션을 하고, 상온에서 수분을 완전히 제거시켰다. H&E 염색법과 면역조직화학 방법을 통해 조직의 변화와 항염증 사이토카인 또는 TLR2 수용체 작용여부를 확인하기 위한 것으로, 섹션 해놓은 각각의 조직을 자일렌에서 파라핀을 제거시켰다. 다음 단계로 조직의 수분을 완전히 제거하기 위해 에탄올의 농도를 높여가면서(반응시간 2분) 가수분해한다. 가수분해된 조직에 H&E을 이용하여 염색하였다. 또한, 각각의 조직에 5% BSA(bovine serum albumin)로 블록킹(blocking)하여 조직 사이의 빈 공간을 채워주며, 항염증 반응을 보이는 항체(anti-TLR-2 mouse (ABfrontier, AB24192), anti-TNF-α, mono, mouse (ABfrontier, AB1793), anti-IL-1β, poly, mouse (ABfrontier, AB1413))를 이용하여 조직에 부착하도록 상온에서 20분간 반응시킨다. 조직이 떨어지지 않도록 TBST 완충제를 이용하여 나머지 액들을 제거시켜주며, 녹색 형광이 부착되어 있는 2차 항체(Got anti-mouse IgG (HRP) LF-SA5001-conjugated)를 부착시켰다. 다음으로 각각의 조직을 형광현미경을 이용하여 확인하였다(Ix71, Olympus, 일본).

[107] 상기 H&E 염색 방법으로 피부 표변의 변화를 확인한 결과 박테리아를 처리한 조직의 두께가 두꺼워지면서 면역세포가 밀집되는 현상을 확인하였다(도 3B). 이와 대조로 펩타이드를 처리한 곳에서는 농도가 증가함에 따라 염증 반응은 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 상세히 확인하고자 염증 전구체 단백질인 TNF-α, IL-1β 및 염증 발현에 작용하는 수용체로 TLR-2 항체를 사용하였다. 적출된 조직에 각각의 1차 항체를 부착한 후 형광이 부착된 2차 항체를 부착시켜 형광 현미경으로 확인한 결과 박테리아만을 처리한 곳에서는 모든 단백질들이 과다 발현하였지만, 펩타이드를 농도별로 처리하여 확인한 결과 농도가 증가함에 따라 염증 관련 단백질은 발현이 거의 유발되지 않은 것을

확인하였다(도 3C,D, E). 이것으로 보아 미생물에 감염되어 피부염을 유발시 항균 펩타이드 작용에 의해 높은 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다(도 3).

[108]

[109] **실시예 9. 주사전자현미경 분석(Scanning Electron Microscopy, SEM)**

[110] 상기 실시예 8의 방법으로 처리한 마우스의 조직으로부터 파라핀 블록을 제작하여 각 샘플은 마이크로톰(Microtome, Thermo-scientific)을 이용하여 4 μm씩 섹션을 하고, 상온에서 수분을 완전히 제거시켰다. 자일렌으로 파라핀을 완전히 제거된 조직을 금가루를 이용하여 코팅을 수행한다. 다음으로 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 조직의 변화를 확인하였다.

[111] 피부염이 유도된 헤어리스 마우스에 조직의 변화를 확인한 결과(도 4), 높은 농도인 200㎍/ml의 항균 펩타이드만을 처리한 곳에서는 마우스의 피부의 변화가 유발되지 않았다. 이와 대조적으로 *S.* aureus CCARM 0027만을 처리한 곳에서는 마우스 피부조직인 콜라겐이 심하게 파괴됨으로써 독성을 보였다. *S.* aureus CCARM 0027를 이용하여 피부염이 유발된 마우스에 항균 펩타이드를 100㎍/ml과 200㎍/ml로 처리한 결과 농도가 높을수록 마우스 피부의 콜라겐의 파괴 여부는 현저하게 줄어드는 것을 확인함으로써 해양생물체로부터 유래된 항균 펩타이드는 조직에 감염된 미생물에 대하여 강한 항균활성을 보이므로 피부염 유발을 예방할 수 있음을 확인하였다(도 4).

[112]

[113] **실시예 10. 웨스턴 블롯 분석**

[114] 6주령의 헤어리스 마우스(Hairless mouse)의 피부에 *S.* aureus MRSA 0027(1×10^8 세포/ml) 균으로부터 염증 유도를 한 마우스와 펩타이드를 농도별로 처리한 조직을 적출하여 단백질 추출 시약을 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford 방법으로 농도를 정량화된 샘플을 15% 아크릴아마이드 겔에서 3시간 SDS-PAGE 전기영동하였다. 그리고, PVDF 멤브레인(Bio-Rad, 미국)에 전기영동된 단백질을 90V로 1시간동안 4℃에서 이동시킨 후 각각의 1차 항체(anti-GAPDH(Santa Cruz Biotechnology, LF-PA0018), anti-TLR2, mono, mouse(ABfrontier, AB24192), anti-NF-κB, poly, mouse(Santa Cruz Biotechnology, SC-71675), anti-TNF-α, mono, mouse(ABfrontier, AB1793), anti-IL-1β, poly, mouse (ABfrontier, AB1413) 및 anti-Cathelicidin, poly, mouse(ABfrontier, AB93357))를 5% 탈지유(skim milk) 블로킹 용액에 첨가하여 4℃에서 1일 동안 부착시켰다. 1차 항체가 부착된 멤브레인을 TBST 완충제를 이용하여 세척하였고, 다음으로 2차 항체(Goat anti-rabbit IgG (HRP) LF-SA5002 및 Goat anti-mouse IgG (HRP) LF-SA5001-conjugated)를 1차 항체가 부착되어있는 멤브레인에 상온에서 2시간 반응하여 부착을 하였다. 2차 항체까지 부착된 멤브레인을 TBST 완충제를 사용하여 부착되지 않은 이물질을 완전히 제거한 후 2차 항체에 부착되어있는 HRP 발색 작업(western blot detection kit, ABfrontier, LF-QC0103) 수행을 통해 염증 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

[115] 상기 웨스턴 블롯 방법을 통해 염증 발현에 관련된 단백질을 확인한 결과 피부염증이 유도된 조직에서는 신호전달 단백질(TLR-2, NF-kB), 사이토카인(TNF-α, IL-1β) 및 Cathelicidin 항균 펩타이드가 대조군과 비교하여 과다 발현하였지만 펩타이드를 처리한 곳에서는 농도가 증가함에 따라 이들 염증 관련 단백질이 감소함을 확인하였다(도 5). 이로서 해양 생명체로부터 분리/변형된 항균 펩타이드가 염증의 억제에 강한 작용을 한다는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 염증은 세균에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 세균은 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia* coli) 또는 프로테우스 불가리스(*Proteus* vulgaris)이고, 그람 양성균은 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus)이며, 상기 항생제 내성균은 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 TNF-α, IL-1β, NF-κB 또는 TLR-2 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[청구항 6] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 염증은 세균에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 세균은 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia* coli) 또는 프로테우스 불가리스(*Proteus* vulgaris)이고, 그람 양성균은 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria* monocytogenes), 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus* aureus)이며, 상기 항생제 내성균은 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 염증 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스,

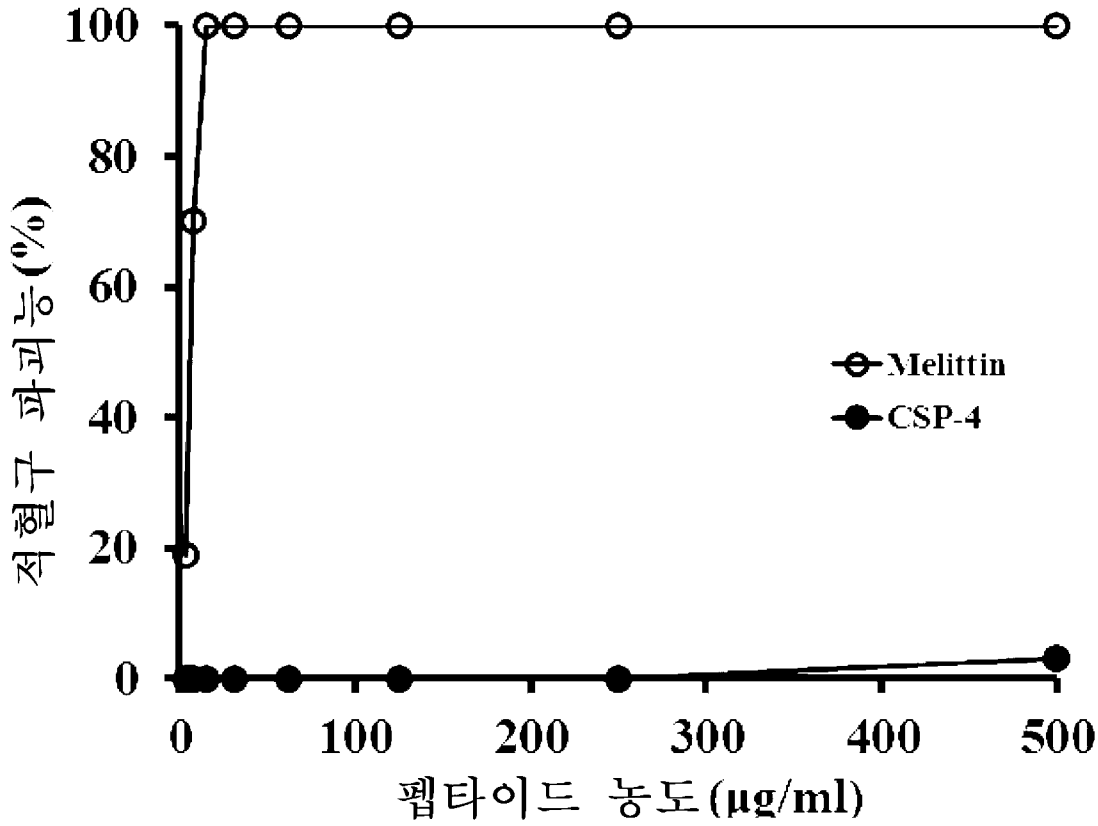
섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 11] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물.

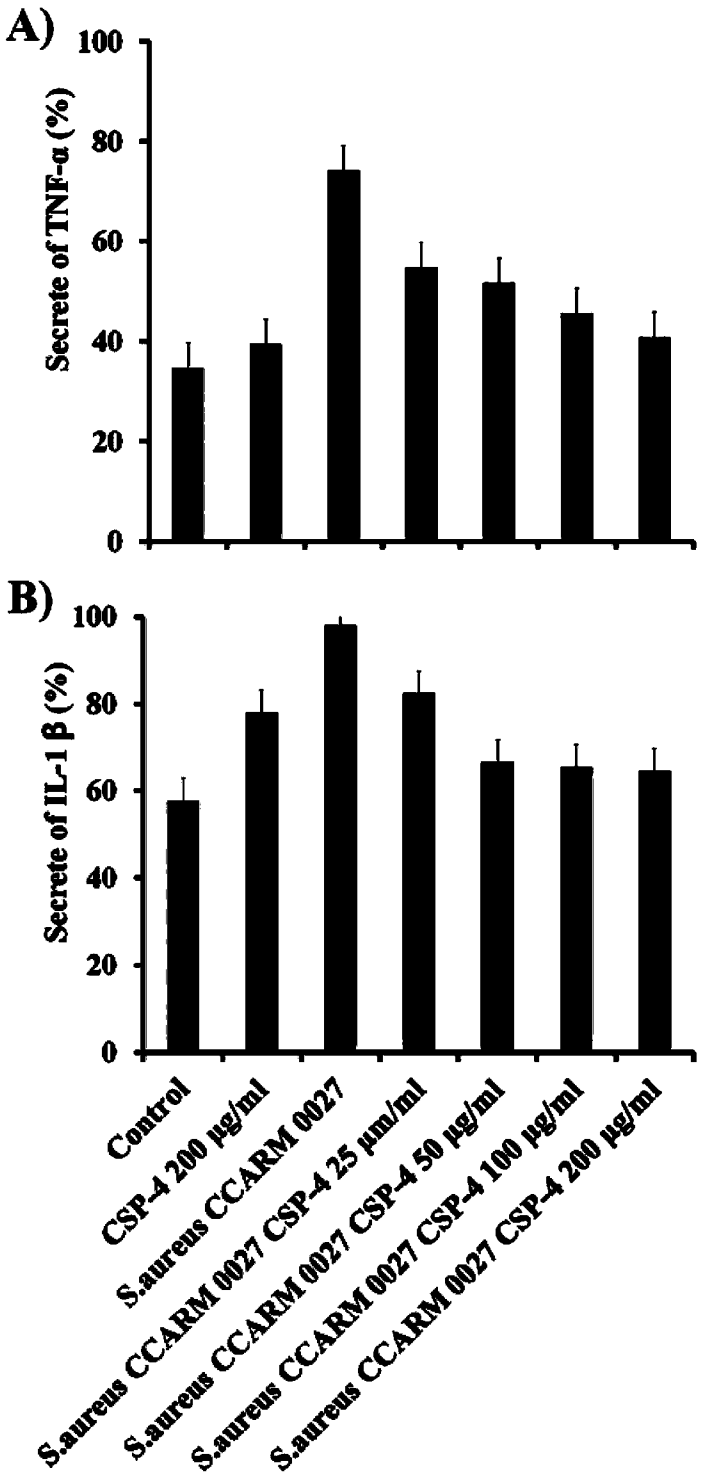
[청구항 12] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

[청구항 13] 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 클라바스피린(clavaspirin) 펩타이드 유사체를 유효성분으로 함유하는, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus* subtilis) 및 MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에 대한 항균용 조성물.

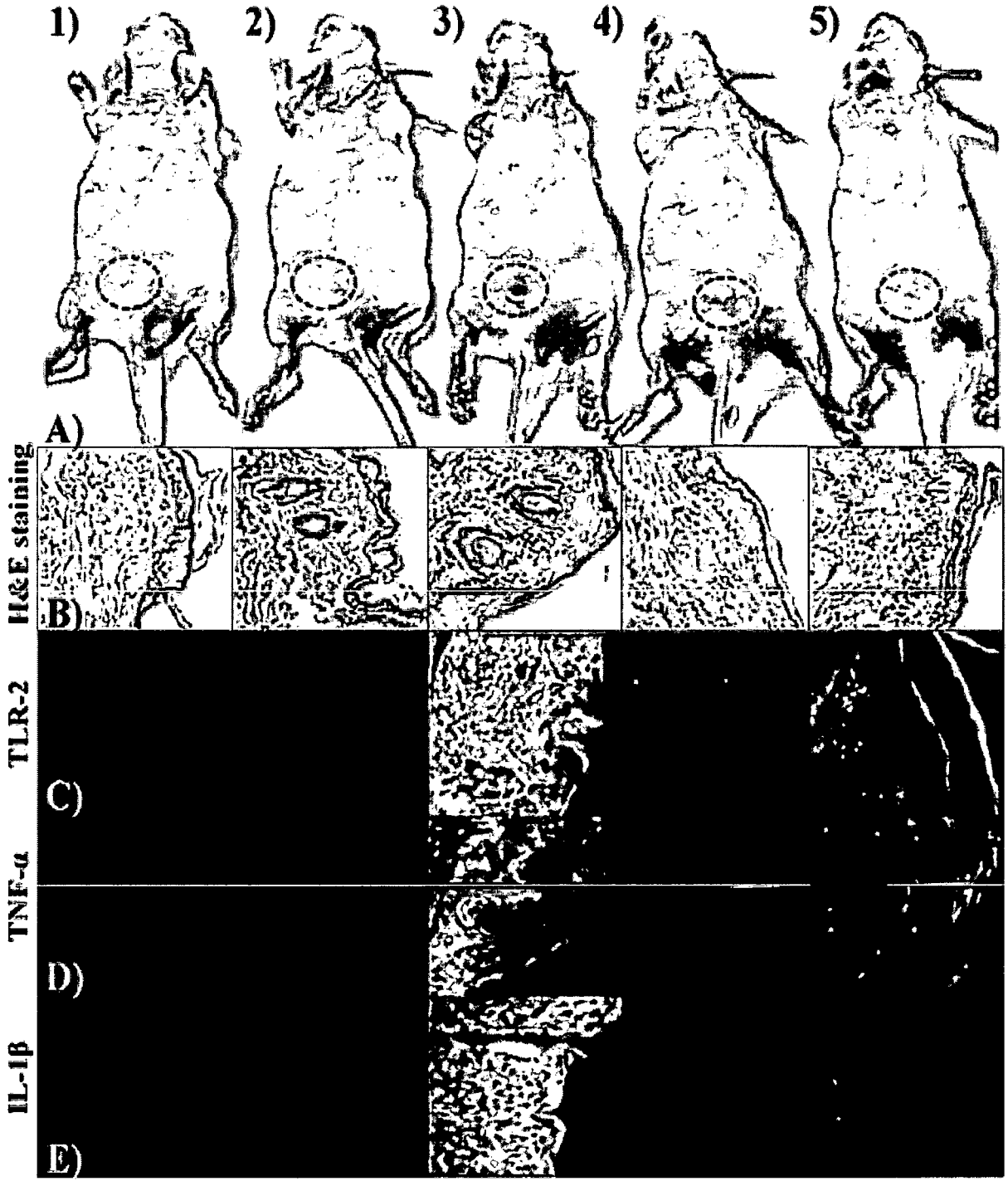
[도1]


100
80
60
40
20
0
적혈구 파괴능(%)
0
100
200
300
400
500
펩타이드 농도(μg/ml)
Melittin
CSP-4

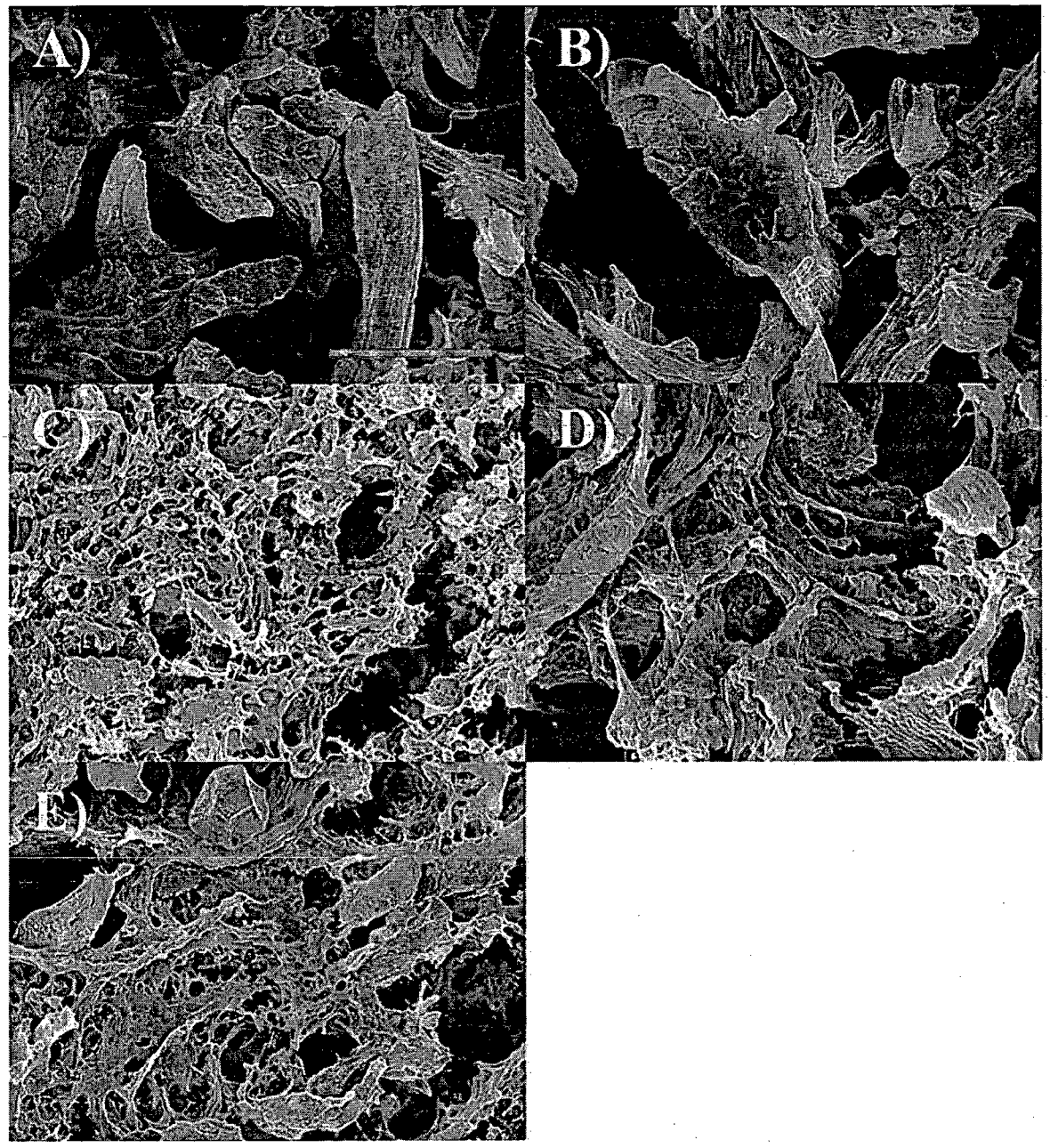
[도2]


A)
Secrete of TNF-α (%)
100
80
60
40
20
0
B)
Secrete of IL-1 β (%)
100
80
60
40
20
0
Control
CSP-4 200 μg/ml
S.aureus CCARM 0027
S.aureus CCARM 0027 CSP-4 25 μm/ml
S.aureus CCARM 0027 CSP-4 50 μg/ml
S.aureus CCARM 0027 CSP-4 100 μg/ml
S.aureus CCARM 0027 CSP-4 200 μg/ml

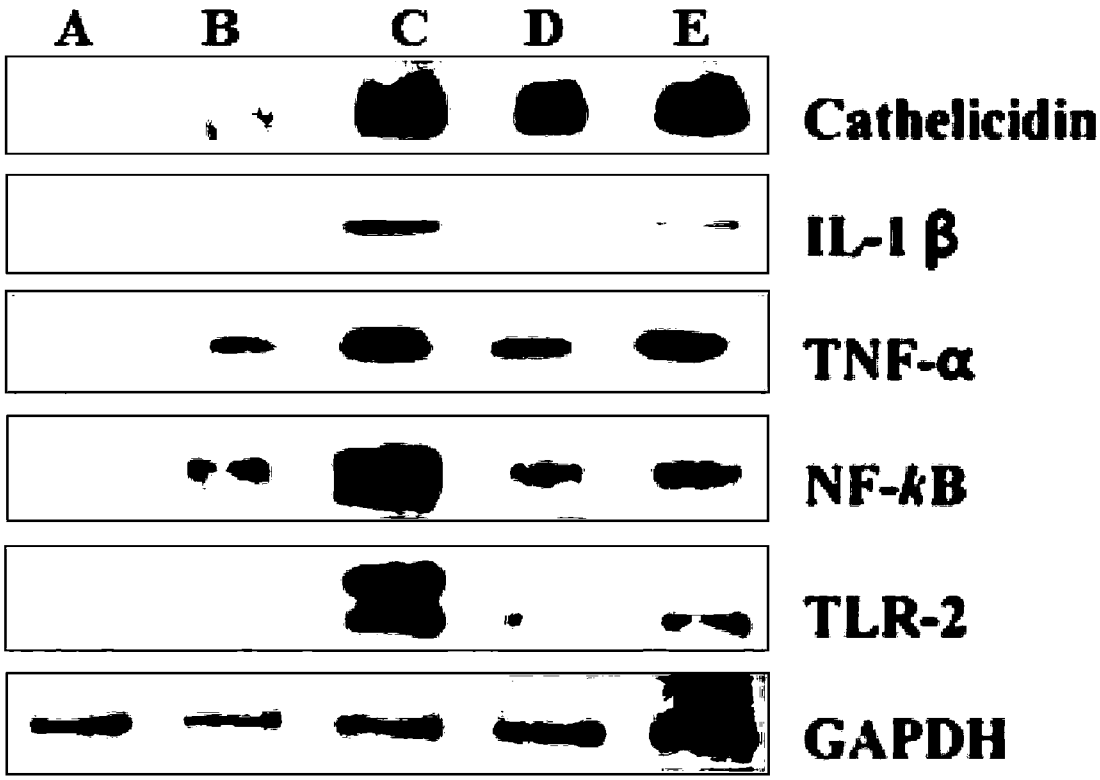
[도 3]



[도 4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/010292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 1/305(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, C07K 14/435(2006.01)i

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)

A23L 1/305; A61Q 19/00; A61K 8/49; A61K 8/30; C07K 14/435; A61K 38/17; A61K 38/16

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: clavaspirin, anti-inflammation, peptide analogue, anti-microbial

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5998374 A (LEHRER, Robert I. et al.) 07 December 1999 See claim 6.	1-13
A	LEE, I. -H. et al., "Clavaspirin, an Antibacterial and Haemolytic Peptide from Styela Clava", J. Pept. Res., December 2001, vol. 58, no. 6, pages 445-456 See abstract.	1-13
A	LEHRER, Robert I. et al., "Natural Peptide Antibiotics from Tunicates: Structures, Functions a Potential Uses", The Society for Integrative and Comparative Biology, April 2003, vol. 43, no. 2, pages 313-322 See abstract.	1-13
A	KR 10-2015-0083275 A (DAEJEON UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 17 July 2015 See abstract.	1-13
A	KR 10-2014-0055970 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 09 May 2014 See abstract.	1-13

☐ 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

"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	Date of mailing of the international search report
26 DECEMBER 2016 (26.12.2016)	**26 DECEMBER 2016 (26.12.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/010292

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5998374 A	07/12/1999	WO 98-38309 A1	03/09/1998
KR 10-2015-0083275 A	17/07/2015	NONE	
KR 10-2014-0055970 A	09/05/2014	KR 10-1550727 B1	07/09/2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/010292

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 1/305(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, C07K 14/435(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A23L 1/305; A61Q 19/00; A61K 8/49; A61K 8/30; C07K 14/435; A61K 38/17; A61K 38/16

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: 클라바스피린, 항염, 펩타이드 유사체, 항균

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 5998374 A (LEHRER, ROBERT I. 등) 1999.12.07 청구항 6 참조.	1-13
A	LEE, I.-H. 등, 'Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from Styela clava', J. Pept. Res., 2001.12, 58권, 6호, 페이지 445-456 초록 참조.	1-13
A	LEHRER, ROBERT I. 등, `Natural Peptide antibiotics from tunicates: structures, functions and potential uses', The Society for Integrative and Comparative Biology, 2003.04, 43권, 2호, 페이지 313-322 초록 참조.	1-13
A	KR 10-2015-0083275 A (대전대학교 산학협력단) 2015.07.17 요약 참조.	1-13
A	KR 10-2014-0055970 A (주식회사 엘지생활건강) 2014.05.09 요약 참조.	1-13

☐ 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

"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	국제조사보고서 발송일
2016년 12월 26일 (26.12.2016)	2016년 12월 26일 (26.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/010292

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5998374 A	1999/12/07	WO 98-38309 A1	1998/09/03
KR 10-2015-0083275 A	2015/07/17	없음	
KR 10-2014-0055970 A	2014/05/09	KR 10-1550727 B1	2015/09/07