(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0131076
(43) 공개일자 2014년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0049942
(22) 출원일자 2013년05월03일
심사청구일자 2013년05월03일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직동, 쌍용예가)
보 탄 상
부산광역시 남구 용소로 45, C-13호관 304호(대연동, 부경대 대연캠퍼스)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 13 항

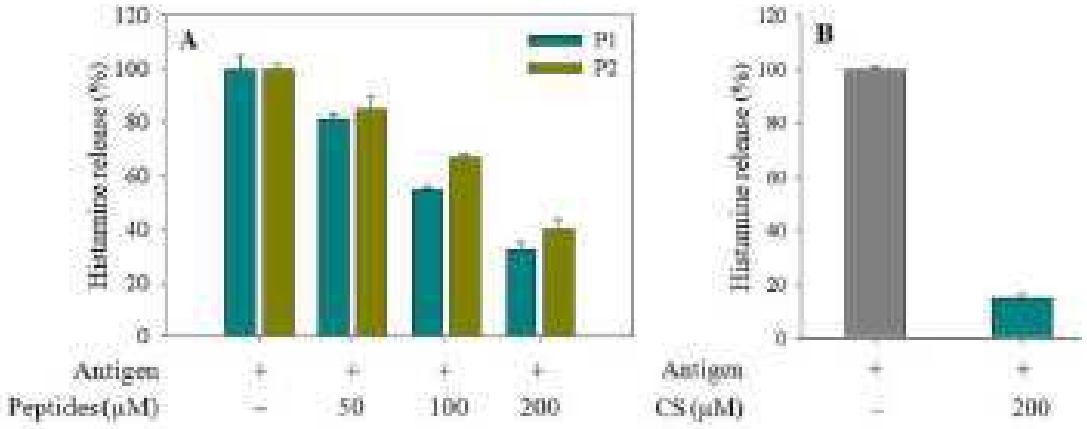
(54) 발명의 명칭 **스피룰리나 맥시마 유래의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 스피룰리나 맥시마를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군에서 하나 이상의 효소를 선택하여 가수분해한 가수분해물 또는 이를 정제한 펩타이드의 항알러지 활성에 관한 것이다.

본 발명에 따른 스피룰리나 맥시마 유래의 가수분해물 또는 이를 분리 정제한 펩타이드는 비만세포의 탈과립 활성을 억제하고 FcεRI의 비만세포 표면 발현을 억제함으로써 효과적인 항알러지 활성을 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 극대화시킬 수 있을 것이다. 또한, 스피룰리나 맥시마 유래의 가수분해물 또는 이로부터 분리 정제된 펩타이드는 천연 유래 물질로서, 독성 및 부작용이 없어 장기간 안심하고 사용할 수 있으므로 건강기능식품으로도 사용 가능할 것이다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1615005033
부처명 국토해양부
연구관리전문기관 한국해양수산기술진흥원
연구사업명 해양생명공학사업
연구과제명 해양생물 유래 생리활성물질의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)에서 유래하는 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 가수분해한 가수분해물로부터 분리 및 정제한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 효소를 사용하되, 효소 대 기질인 스피룰리나 맥시마를 1:100(w:w)의 양으로 반응시켜 수득한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 비만세포의 탈과립 억제활성을 통해 항알러지 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 펩타이드는 IgE와 그 수용체인 FcεRI의 결합의 저해 활성; 또는 ROS 소거 활성에 의해 비만세포의 탈과립 억제활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 FcεRI의 α 사슬의 발현 억제; 또는 FcεRI 의 비만 세포 표면 발현 억제를 통해 항알러지 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 8

스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 효소로 가수분해하여 수득한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 스피룰리나 맥시마 가수분해물.

청구항 9

스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 프로나아제 E(Pronase E)로 가수분해하여 수득한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 스피룰리나 맥시마 가수분해물.

청구항 10

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 알러지 관련 질환은 알레르기 비염, 천식, 두드러기, 아토피피부염, 음식 알러지, 금속 알러지 또는 약제 알러지인 것을 특징으로 하는 알러지 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 12

서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항알러지 활성을 갖는 스피룰리나 맥시마 가수분해물 유래의 펩타이드에 관한 것으로, 더 상세하게는 스피룰리나 맥시마를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군에서 하나 이상의 효소를 선택하여 가수분해한 가수분해물 또는 이를 정제한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 들어 해양 자원으로부터 유래된 신규한 생활성 물질을 다양한 건강 기능식품이나 약학적 조성물로 활용하는 예가 많다. 해양 생물들은 카로티노이드, 테르페노이드, 크산토필, 클로로필, 비타민, 포화 지방산, 아미노산, 단백질, 아세토게닌, 폴리페놀, 알칼로이드, 폴리사카라이드 등의 물질을 생합성하는 것으로 알려져 있으며, 해양 환경은 1차 또는 2차 대사물질을 생산할 수 있는 자원의 보고라 할 수 있다. 지난 수십년 간 수많은 신규한 조성물들이 해양 생물로부터 분리되었으며 이들의 뛰어난 생물학적 활성에 대해 연구되어 왔다. 특히, 해양 조류의 경우 가장 훌륭한 바이오매스(biomass) 생산자로 알려져 있는데, 해양 조류로부터 생산된 다양한 천연의 생활성 물질은 항응집, 항바이러스, 항산화, 항알러지, 항암, 항염, 항비만 효과 등을 나타낸다고 보고되고 있다.

[0003] 이 중에서도 해양 펩타이드의 구조, 조성, 서열 특성에 대한 정보가 알려지기 시작하면서 이들을 생활성 물질로 활용하려는 시도가 집중되고 있다. 해양 펩타이드는 크게 용매 추출, 효소 가수분해, 미생물 발효 등의 방법으로 생산이 가능하고, 대개 3 내지 20개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 펩타이드를 구성하는 아미노산의 조성 및 서열에 따라 이들의 생활성 기능이 정해지는 것으로 알려져 있다. 현재까지 해양 펩타이드를 추출하기 위해 사용된 해양 생물로는 오징어, 홍합, 굴, 참치, 대구, 고등어, 명태, 장어, 조류 등이 있으며, 추출된 해양 펩타드는 항고혈압 또는 항미생물 활성 등을 나타내고 심혈관 질환의 발생 가능성을 낮추어준다고 보고되고 있다. 따라서, 해양 펩타이드는 건강 기능 식품 및 약학적 조성물로 연구되어야 하는 소중한 자원이라 할 수 있다.

[0004] 한편, 알러지는 선진국에서 발병하는 매우 흔한 질병 중 하나로, 전 세계 인구의 1/3, 서양인의 1/5이 알러지 질환을 앓고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 알러지성 비염, 천식, 아토피성 습진 등은 가장 흔한 만성 알러지 질환들로, 이에 대한 수많은 연구가 진행중에 있으며, 알러지는 주로 동물 비듬, 집먼지 진드기, 식품, 꽃가루, 곤충, 화학물질과 같이 무해한 환경 물질에 대한 과도한 면역 반응에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다. 알러지 반응은 알러지 유발 물질(allergen)이 체내에 들어오면 $CD4^+$ Th2 세포가 생성되고, 이들 세포가 IL-4, IL-5,

IL-9, IL-13 등을 분비하여 B 세포로 하여금 면역유발물질 특이적인 IgE를 생산하도록 하며, 알러지 유발물질이 결합된 IgE가 비만 세포나 호염기성 세포의 표면에 있는 Ig E 수용체에 쉽게 결합될 수 있도록 친화력을 높이고, 이에 따라 세포 내 Ca2+ 양의 증가, 히스타민이나 베타-헥소나미니다아제와 같이 미리 형성된 염증 조절물질의 분비, 또는 루코트리엔, 프로스타글란딘, 사이토카인과 같은 물질의 합성 및 분비와 같은 세포 내 캐스캐이드가 진행되고, 그 결과 기도 수축, 점액질 생산, 염증 세포 모집과 같은 일련의 알러지성 염증 반응이 유도된다. 종래에는 이러한 알러지 반응을 차단하기 위하여 항히스타민제, 코르티코스테로이드 등을 사용하여 왔으나, 이들 물질을 만성적으로 복용하였을 때 다양한 부작용이 나타나는 문제점이 있었다.

[0005] 이에 본 발명자들은 항알러지 활성을 가지는 천연물질을 연구하던 중, 스피룰리나 맥시마의 가수분해물이 알러지 반응을 효과적으로 억제할 수 있으며, 항알러지 활성을 나타내는 기전을 이해함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국등록특허 제10-0734720호

(특허문헌 0002) 2. 대한민국등록특허 제10-1045601호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 항알러지 활성을 갖는 신규한 가수분해물 또는 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 가수분해물 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 가수분해물 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 이를 위하여 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항알러지 활성을 갖는 펩타이드를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)에서 유래하는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 가수분해한 가수분해물로부터 분리 및 정제한 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 효소를 사용하되, 효소 대 기질인 스피룰리나 맥시마를 1:100(w:w)의 양으로 반응시켜 수득한 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 비만세포의 탈과립 억제활성을 통해 항알러지 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 IgE와 그 수용체인 FcεRI의 결합의 저해 활성; 또는 ROS 소거 활성에 의해 비만세포의 탈과립 억제활성을 나타내는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 FcεRI의 α 사슬의 발현 억제; 또는 FcεRI 의 비만 세포 표면 발현 억제를 통해 항알러지 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 트립신, α-키모트립신, 펩신으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 효소로 가수분해하여 수득한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 스피룰리나 맥시

마 가수분해물을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)를 프로나아제 E(Pronase E)로 가수분해하여 수득한 것을 특징으로 하는 항알러지 활성을 갖는 스피룰리나 맥시마 가수분해물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 알러지 관련 질환은 알레르기 비염, 천식, 두드러기, 아토피피부염, 음식 알러지, 금속 알러지 또는 약제 알러지인 것일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 스피룰리나 맥시마 유래의 가수분해물 또는 이를 분리 정제한 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드는 비만세포의 탈과립 활성을 억제하고 FcεRI의 발현을 억제함으로써 효과적인 항알러지 활성을 나타내므로 이를 적절히 활용한다면 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 극대화시킬 수 있을 것이다. 또한, 스피룰리나 맥시마 유래의 가수분해물 또는 이로부터 분리 정제된 펩타이드는 천연 유래 물질로서, 독성 및 부작용이 없어 장기간 안심하고 사용할 수 있어 건강기능식품으로도 사용 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 스피룰리나 맥시마를 프로나아제 E(SM1) 또는 위의 소화효소들(SM2)로 가수분해한 가수분해물의 히스타민 분비 억제 활성(A) 및 세포 독성(B)을 비교한 결과이다.

도 2는 스피룰리나 맥시마를 프로나아제 E(SM1) 또는 위의 소화효소들(SM2)로 가수분해한 가수분해물의 IL-8 생산 억제 활성(A) 및 세포 독성(B)을 비교한 결과이다.

도 3은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 항알러지 활성을 갖는 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과이다.

도 4는 스피롤리나 맥시마로부터 유래된 항알러지 활성을 갖는 또 다른 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과이다.

도 5는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드(A) 및 양성대조군인 크로몰린 나트륨(B)의 히스타민 분비 억제 활성을 보여주는 그래프이다.

도 6은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드(A) 및 양성대조군인 크로몰린 나트륨(B)의 베타-헥소스아미니다아제 분비 억제 활성을 보여주는 그래프이다.

도 7은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드 및 양성대조군인 노코다졸의 미세소관 중합반응 억제 활성을 보여주는 그래프이다.

도 8은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 Fyn/Gab2의 발현량 변화에 미치는 영향을 알아보기 위한 웨스턴 블라팅 결과이다.

도 9는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드에 의한 세포 내 칼슘 증가 억제 효과를 나타내는 그래프(A) 및 형광 현미경 사진(B)이다.

도 10은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 Lyn, Syk, PLC, PKC, IP3R의 발현양에 미치는 영향을 알아보기 위한 웨스턴 블라팅 결과이다.

도 11은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IgE와 FcεRI의 결합에 미치는 영향을 유세포 분석기로 분석한 결과이다.

도 12는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비마만 세포에서 ROS 생성에 미치는 영향을 분석한 분광형광계 분석(A), 과산화물 음이온 생성에 미치는 영향을 분석한 형광 현미경 사진(B), 과산

화수소 생성에 미치는 영향을 분석한 형광현미경 사진(C)이다.

도 13은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이가 항원에 의해 자극된 비만세포에서 IL-4 및 IL-13의 단백질(A) 또는 mRNA(B)의 발현양에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 14는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비만세포에서 HDC의 단백질(A) 또는 mRNA(B)의 발현양에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 15는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비만세포에서 PI3K, Akt의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 16은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비만세포에서 p50, 065의 핵으로의 이동 또는 IκB-α 분해에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 17은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비만세포에서 ERK, p38, JNK의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 18은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 FcεRI α chain의 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 19는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 FcεRI의 표면발현에 미치는 영향을 유세포분석기를 통해 분석한 결과이다.

도 20는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 FcεRI의 표면발현에 미치는 영향을 형광이미지로 관찰한 결과이다.

도 21은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 히스타민 분비에 미치는 영향을 형광이미지로 관찰한 결과이다.

도 22는 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 TNF-α 분비에 미치는 영향을 형광이미지로 관찰한 결과이다.

도 23은 스피룰리나 맥시마로부터 유래된 펩타이드가 IL-4 및 IgE에 의해 자극된 비만세포에서 GATA-1의 단백질(A) 및 mRNA(B) 발현양에 미치는 영향을 형광이미지로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)에서 정제된 펩티드의 항알러지 용도에 관한 것으로, 상기 정제된 펩티드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0026] 본 발명에서 사용한 스피룰리나 맥시마는 광합성을 하고 필라멘트를 갖는 나선형의 다세포 미세조류로, 단백질, 비타민, 미네랄이 풍부히 함유되어 있고, 면역력 증진, 항산화 특성, 항바이러스 특성, 항암 효과가 있음이 보고되고 있다.

[0027] 본 발명자들은 이러한 효능을 갖는 스피룰리나 맥시마를 가수분해한 후 그 가수분해물 및 상기 가수분해물로부터 정제된 펩타이드의 항알러지 활성을 확인하고 이러한 활성을 기초로 알러지 관련 질병 등을 예방 또는 치료할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0028] 그러므로 상기 스피룰리나 맥시마 가수분해물 및 상기 가수분해물로부터 정제된 펩타이드는 알러지 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있을 것이다.

[0029] 이러한 알러지 관련 질환으로는 알레르기 비염, 천식, 두드러기, 아토피피부염, 음식 알러지, 금속 알러지 또는 약제 알러지가 있을 수 있다.

[0030] 본 발명에서 "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 "치료하는"이란 용어는 "치료"가 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[0031] 따라서 포유동물에 있어서 알러지 관련 질환의 "치료" 또는 "치료요법"은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0032] (1) 알러지 관련 질환의 발달을 저지시킴,

[0033] (2) 알러지 관련 질환의 확산을 예방함,

[0034] (3) 알러지 관련 질환을 경감시킴,

[0035] (4) 알러지 관련 질환의 재발을 예방함 및

[0036] (5) 알러지 관련 질환의 증상을 완화함(palliating)

[0037] 본 발명에 따른 스피룰리나 맥시마에서 정제된 펩티드는 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 추출이란 적절한 용매를 이용하여 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 그러나, 스피룰리나 맥시마에서 추출하지 않은 합성된 펩티드도 항산화 효과를 가지는 기능성 물질로 활용할 수 있고 별도의 용매를 사용하지 않고 분리 정제한 펩티드도 본 발명의 기능성 물질로 활용할 수 있을 것이다.

[0038] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물일 수 있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0040] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0041] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 이루어진 기능성 펩타이드는 조성물에 10 내지 200㎛M 농도로 포함될 수 있으며, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95 중량%로 포함될 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩티드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0044] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0046] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어

진 기능성 펩티드 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명의 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 이로부터 정제된 펩타이드는 천연물질로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 항산화 관련 질환의 예방 또는 치료 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명은 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0049] 본 발명의 건강기능식품은 알러지 관련 질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 건강기능식품이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0051] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0052] 상기 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0053] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩타이드를 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0054] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분인 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩티드를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 백운풀 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0055] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩티드와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0056] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 스피룰리나 맥시마 가수분해, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 기능성 펩타이드와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0057] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 이를 정제한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 정제 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0059] 또한 본 발명은 포유동물에게 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 펩타이드를 투여하는 것을 포함하는 알러지 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0060] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0061] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 펩타이드를 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0062] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 스피룰리나 맥시마에서 정제된 기능성 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] **<실시예 1>**

[0065] **1-1. 재료 준비**

[0066] 스피룰리나 맥시마(Spirulina maxima)는 한국 안산에 소재하는 해양 연구소(Marine Instute)로부터 수득하였다. 프로나아제 E(Pronase E), 트립신(trypsin), 알파-키모트립신(alpha=chymotrypsin), 펩신(pepsine)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 분자량에 기초한 가수분해물의 분획을 위한 초미세여과막(ultrafiltration membrane)은 밀리포어 사(Millipore Co., Bedford, USA)에서 구입하였다. DMEM 배지, 소혈청(FBS), 항생제는 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 사이토카인 분석을 위한 효소 면역분석용 시약은 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 디메틸 설폭사이드(Dimethyl sulfoxide), o-프타알데하이드(o-phthalaldehyde), 디니트로페닐-소 혈청알부민(DNP-BSA), 디니트로페닐-특이적 이뮤노글로블린 E(DNP-specific IgE), 3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT) 등 그 밖에 본 발명에서 이용된 시약들은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0067] FITC 항-마우스 IgE 항체는 BioLegned Inc.(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Annexin V는 BD Pharmingen™(San Diego, CA,USA)에서 구입하였다. Oligo (dT) 15 primer, M-MLV 역전사 효소, GoTaq DNA 중합효소는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블랏을 위한 단백질 특이적 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 칼슘-특이적 형광 프로브(Fura-3/AM)는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용된 모든 프라이머는Bioneer (Daedeak-gu, Daejeon, South Korea)에서 합성하였으며, 모든 다른 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0068] 트랜스펙션을 위한 시약인 Lipofectamin™ 2000은 Invitrogen™(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, 사이클로헥사마이드와 랫 IL-4는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0069] **1-2. 통계분석**

[0070] 각 그룹간의 통계적 차이는 던칸의 다범위 검증을 이용하여 ANOVA 분석하였고, 차이는 $p<0.05$인 경우 유의성 있는 것으로 고려하였다. 통계용 소프트웨어로는 SAS v9.1(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였다.

[0071] **<실시예 2>**

[0072] **스피롤리나 맥시마(Spirulina maxima) 가수분해물의 제조**

[0073] **2-1. 효소 가수분해물의 제조**

[0074] 건조된 스피롤리나 맥시나(S. maxima)는 0.1M 인산 나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer)에 녹여 -20℃에서 12시간 동안 보관하였다. -20℃ 동결 및 37℃ 해동을 4번 반복한 후, 혼합액을 1시간 동안 초음파로 분해하고 70℃에서 1시간 동안 열처리하였다. 그 후, 혼합액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 푸른색의 상청액을 회수하여 동결건조하였다. 단백질 추출물(SM)은 프로나아제 E(pronase E) 또는 위의 소화효소인 트립신, 알파-키모트립신, 펩신을 이용하여 가수분해 하였다. 프로나아제 E의 가수분해물(SM1)은 프로나아제 E를 이용하여 0.1M 인산 나트륨 버퍼에서 교반하며 50℃, pH 8의 조건에서 8시간 동안 가수분해하여 수득하였고, 위 소화효소에 의한 가수분해물(SM2)은 트립신 및 알파-키모트립신을 이용하여 0.1M 인산 나트륨 버퍼에서 교반하며 37℃, pH 8의 조건에서 4시간 동안 가수분해한 후, 37℃, pH 2의 조건에서 펩신을 이용하여 4시간 동안 교반하며 추가 가수분해하여 수득하였다. 반응은 끓는 온열 수조에서 혼합액을 10분간 열처리하여 종결시켰으며, 감압 동결건조된 가수분해물은 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.

[0075] 상기 가수분해물을 이용하여 히스타민 분비 억제 및 IL-8의 생산 억제 효과를 비교해 본 결과(실험 방법은 하기 실시예 3-3 참조), 상기 가수분해물의 농도 의존적으로 히스타민 분비 및 IL-8 생산량이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며(도 1, 도 2) 따라서 본 발명자들은 상기 가수분해물이 항알러지 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0076] **2-2. 효소 가수분해물의 분자량에 따른 분획**

[0077] 동결건조된 효소 가수분해물은 증류수에 희석하여 한외여과막 Hollow Fiber Catridge(GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Westborough, MA, USA)를 이용하여 10, 5, 3 kDa을 컷오프로 하여 분자량에 따라 분획하였다. 분획은 10kDa 막을 통과하여 못한 10kDa 이상의 가수분해물, 10kDa 막을 통과하였으나 5kDa 막을 통과하지 못한 5-10kDa의 가수분해물, 5kDa 막을 통과하였으나 3kDa 막을 통과하지 못한 3-5kDa의 가수분해물, 3kDa의 막을 통과한 3kDa 이하의 가수분해물로 분류되었다.

[0078] 상기 효소 가수분해물의 분자량에 따른 분획 결과, 3kDa 이하의 가수분해물이 가장 효과적으로 히스타민 분비 및 IL-8의 생산을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었으며(데이타 미도시), 각 분획은 감압동결건조한 후 -20℃에서 보관하고 추가 실험을 진행하였다.

[0079] **2-3. 생리활성 펩타이드의 정제**

[0080] **2-3-1. 이온교환 크로마토그래피**

[0081] 효소 가수분해물로부터 펩타이드들의 정제는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC, AKTA, Amersham Biosciences Co., Uppsala, Sweden)을 이용하여 HiPrep 16/10 디에틸아미노에틸 고속 유량(DEAE FF) 음이온-교환 컬럼(16×100mm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 상에서 이루어졌다. 가수분해물(40mg/ml)은 20mM 초산 나투륨 버퍼(pH4.0)로 평형이 유지된 HiPrep 16/10 DEAE 음이온 교환 컬럼에 로딩(2ml)하고, 동일 버퍼에 용해된 염화나트륨(0-2M)의 선형 구배를 이용하여 유속 2ml/min로 하여 용리하였다. 각 분획은 280 nm에서 모니터링하고, 4ml 부피로 수집한 후 회전증발기를 이용하여 농축하였다.

[0082] 상기와 같은 이온교환 크로마토그래피 결과 2번째 분획에서 가장 효과적인 히스타민 분비 억제 및 IL-8 생산 억제 효과를 나타내는 것으로 나타났으며(데이타 미도시), 따라서 상기 분획을 감압동결건조한 후 추가 실험을 진행하였다.

[0083] **2-3-2. 젤 여과 크로마토그래피**

[0084] 상기 감압동결건조된 분획은 GE Healthcare Superdex™ Peptide 10/300 GL 젤여과 컬럼(10×300mm)을 이용하여 정제하였다. 상기 컬럼은 인산 나트륨 버퍼(50mM, pH 7)을 이용하여 용리하였고, 분획 1ml을 유량 1ml/min 상에

서 수집하였다. 분획은 280nm에서 모니터링한 후, 생리활성 분획을 동결 건조하여 추가 실험을 진행하였다.

[0085] 상기 이온교환크로마토그래피에 의해 분획한 2번째 분획을 다시 10개로 분획하여 히스타민 분비 억제 및 IL-8 생산 억제 효과를 관찰한 결과, 8번째 분획에서 가장 뛰어난 히스타민 분비 억제 및 IL-8 생산 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(데이타 미도시).

[0086] **2-3-3. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)**

[0087] 상기 젤 여과 크로마토그래피에 의해 수득한 감압동결건조된 분획은 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)를 포함하는 선행 구배 아세토니트릴(0-40%)를 가지고 유량 1ml/min으로 하여 Primesphere 10 C18(10×250mm, Phenomenex, Cheshire, England) 컬럼 상의 역상 HPLC(RP-HPLC, Dionex Korea Ltd., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 추가 정제하였다. 용리 피크는 215nm에서 측정하였고, 활성 피크는 회전증발기를 이용하여 농축한 후 감압 동결건조하였다. 최종 정제된 펩타이드는 아미노산 서열 분석에 사용되었다.

[0088] **2-4. 아미노산 서열 분석**

[0089] 정제된 펩타이드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열은 전자분무이온화(ESI) 소스와 결합된 Q-TOF 질량 분석기(Micromass, Altrincham, UK)를 이용하여 분석하였다. 정제된 펩타이드는 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해된 후 전자분무 소스에 주입하고 2가로 대전된 상태 $(M+2H)^{2+}$로 분자량을 측정하였다. 분자량 측정 후, 펩타이드는 분절하여 직렬질량분광법(tandom mass spectroscopy)에 의해 도 3과 같이 LDAVNR(서열번호 1)의 펩타이드 서열 또는 도 4와 같이 MMLDF(서열번호 2)와 같은 펩타이드 서열 정보를 얻을 수 있었다.

[0090] **<실시예 3>**

[0091] **스피롤리나 맥시마(Spirulina maxima) 유래 펩타이드의 항-알러지 활성**

[0092] **3-1. 세포 배양**

[0093] 본 발명을 위한 실험에 사용된 RBL-2H3 대식 세포는 Korean Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 인간 제대정맥혈관내피세포(EA. hy926)은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 상기 세포들은 10% 열-불활성화된 FBS, 2mM L-글루타민, 10 mM HEPES 버퍼, 100U/ml 페니실린 G, 100mg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 5% CO_2, 37℃ 습식 조건에서 배양하였다.

[0094] **3-2. 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 정제 펩타이드의 세포독성 실험**

[0095] 본 발명은 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 이로부터 정제된 펩타이드의 항알러지 활성을 이용하여 알러지 관련 질환을 치료하고자 하는바, 본 발명자들은 우선 스피룰리나 맥시마 가수분해물 또는 이로부터 정제된 펩타이드를 처리한 경우 세포 독성이 나타나는지 여부, 즉 세포 생존능을 실험해 보았다.

[0096] RBL-2H3 세포 및 EA. hy926 세포의 생존률은 MTT[3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드] 분석으로 측정하였다. 이를 위하여 세포는 96-웰 플레이트에 2×10^5/ml의 농도로 배양하고, 신선한 배지로 세척한 후, 스피룰리나 맥시나(S. maxima) 유래의 가수분해물 또는 정제 펩타이드를 처리하였다. 24시간 배양 후, 세포를 세척하고, MTT 용액(1mg/ml)을 4시간 처리하였다. 그 후 상청액을 제거하고, DMSO(100ul)를 첨가하여 형성된 포르마잔 염을 용해하였다. 포르마잔 염이 양은 540nm에서 마이크로플레이트 리더(GENios® Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 측정하였다. 세포 생존능은 블랭크와 비교한 퍼센트로 정량화하였다.

[0097] 그 결과, 본 발명에 의한 스피룰리나 맥시나 가수분해물 또는 이를 정제한 펩타이드를 처리해도 세포 생존능에는 전혀 영향이 없는 것으로 나타나(데이타 미도시), 상기 가수분해물 및 펩타이드는 세포에 비교적 안전한 물질인 것으로 판단할 수 있었다.

[0098] **3-3. 정제 펩타이드의 비만세포 탈과립 억제 효과**

[0099] 알러지 반응은 비만세포(mast cell)에서 일어나는 과잉면역반응으로 이해할 수 있다. 체내에 노폐물이 축적되면 혈액이 오염되고 이로 인해 세포도 오염되게 된다. 세포는 스스로 정화하기 위하여 외부 물질을 흡수하게 되고 그 결과 비만세포가 된다. 정상세포의 경우 세포 내의 모든 활동이 엄격히 통제되는데 반해 비만세포에서의 연락체계는 둔화되어 세포표면의 이물질에 과도한 면역기제를 발동하게 되는 것이다. 비만세포가 면역기제를 발동하면 세포막 표면에서 항원항체반응이 이루어지고, 이 때 세포막 표면에 있는 히스타민, 베타-헥소사미니다아제 등의 과립물질들이 터져 나오게 된다.

[0100] 본 발명자들은 정제된 펩타이드(서열번호 1, 서열번호 2)의 비만 세포 탈과립 억제 효과를 관찰하기 위하여, 상기 펩타이드를 처리한 경우 히스타민 또는 베타 헥소사미니다아제의 분비가 억제되는지 관찰해 보았다.

[0101] **3-3-1. 정제된 펩타이드에 의한 히스타민 분비 억제 실험**

[0102] 히스타민 분비는 분광형광계 분석을 이용하여 측정하였는데, 이를 위하여 RBL-2H3 세포는 24-웰 플레이트(2×10^5 cells/ml)에 분주하고 스피롤리나 맥시나(S. maxima) 유래의 펩타이드를 6시간 처리한 후 디니트로페닐-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체를 최종 농도가 1㎍/㎖이 되도록 하여 밤새 처리하였다. 그 후 타이로드 버퍼[Tyrode buffer, (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH_2PO_4, 1mM $MgCl_2$, 12mM $NaHCO_3$, 1.8mM $CaCl_2$]로 2번 세척하고 항원 디니트로페닐-소 혈청 알부민(DNP-BSA)을 최종 농도가 1㎍/㎖이 되도록 하여 60분간 처리하였다. 그 후, 0.5N NaOH(40㎕), 2.5mg/ml OPA(20㎕)를 상청액 100㎕에 첨가하고 30분간 반응시켰다 반응은 3N HCl 10㎕를 첨가하여 종결시켰다. 형광강도는 여기 파장 365nm, 방출 파장 465nm에서 측정하였고, 블랭크로는 아무것도 처리하지 않은 세포들의 상청액을 이용하였으며, 대조군으로는 항원 DNP-BSA 단독 처리한 세포의 상청액을 이용하였다. 히스타민 분비는 하기와 같은 식으로 계산하였다.

[0103] $$\text{히스타민분비율}(\%)=\frac{\text{테스트샘플형광강도}-\text{블랭크형광강도}}{\text{대조군형광강도}-\text{블랭크형광강도}}\times100$$

[0104] 그 결과 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이 펩타이드 처리 농도가 증가할수록 DNP-BSA 항원에 의해 유도되는 히스타민 분비가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 200μM의 펩타이드 (서열번호 1, 서열번호 2)를 각각 처리한 경우 히스타민 분비율은 각각 32%, 40%로 나타났다. 한편, 양성 대조군인 크로몰린 나트륨(cromolyn sodium)을 200μM 처리한 경우 15%의 히스타민 분비율을 나타내었다.

[0105] **3-3-2. 정제 펩타이드에 의한 베타-헥소아미다아제 분비 억제 실험(beta-hexoamidase release assay)**

[0106] RBL-2H3 세포는 다양한 농도의 생리활성 펩타이드(50, 100, 200μM) 또는 양성 대조군인 크로몰린 나트륨(cromolyn sodium)을 6시간 처리하고 DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1㎍/㎖)로 밤새도록 민감화하였다. 민감화된 세포들은 타이로드 버퍼(Tyrode buffer)로 세척하고 DNP-BSA(최종 농도 1㎍/㎖)로 1시간 동안 자극하였다. 그 상청액 50㎕를 0.1M 구연산 나트륨(pH 4.5)에 용해된 1mM p-니트로페닐-N-아세틸-베타-d-글루코스아미나이드(*p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-d-glucosaminide) 50㎕와 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 0.1 M Na2CO3와 0.1 M NaHCO3 (pH 10)를 포함하는 250 ㎕의 탄산염 버퍼를 첨가하고 410nm에서 p-니트로페놀(*p*-nitrophenol) 형성에 따른 흡광도를 측정하였다. 블랭크로는 아무것도 처리하지 않은 세포들의 상청액을 이용하였으며, 대조군으로는 항원 DNP-BSA 단독 처리한 세포의 상청액을 이용하였다. 베타-헥소스아미니다아제 분비율은 하기와 같은 식으로 계산하였다.

[0107] $$\text{베타-헥소스아미니다아제분비율}(\%)=\frac{\text{테스트샘플흡광도}-\text{블랭크흡광도}}{\text{대조군흡광도}-\text{블랭크흡광도}}\times100$$

[0108] 그 결과 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이 펩타이드 처리 농도가 증가할수록 대식세포의 탈과립을 억제하는 효과

를 확인할 수 있었다. 특히, 200μM의 펩타이드 (서열번호 1, 서열번호 2)를 각각 처리한 경우 베타-헥소스아미니다아제 분비율은 각각 40%, 42%로 나타났다. 한편, 양성 대조군인 크로몰린 나트륨(cromolyn sodium)을 200μM 처리한 경우 22%의 베타-헥소스아미니다아제 분비율을 나타내었다.

[0109] **3-3-3. 형광현미경을 이용한 정제 펩타이드에 의한 미세소관 중합반응 억제 효과 관찰**

[0110] 비만세포의 탈과립 반응은 미세소관의 중합반응에 의해 이루어지는바, 본 발명자들은 정제 펩타이드(서열번호 1, 서열번호 2)가 비만세포의 탈과립 반응을 억제하는 효과가 미세소관의 중합반응을 저해함으로써 이루어지는 것인지 관찰해 보고자 하였다.

[0111] 이를 위하여 RBL-2H3 세포를 생리활성 펩타이드(200 μM) 또는 노코다졸(1 μM)로 6시간 처리한 후, DNP-특이적 IgE 항체(최종농도 1 μg/ml)로 밤새 민감화하였다. 그 후 타이로드 버퍼로 세척하고 항원 DNP-BSA (최종 농도 1 μg/ml)로 30분간 세포를 자극하였다. 그 후 배지를 제거하고 3% 파라포름알데하이드를 10 분간 첨가한 후 세포를 0.1% 트라이톤 X-100으로 15초간 처리하여 투과화하고, FITC-표지된 항-알파-튜불린 항체(Sigma-Aldrich)를 1/100 희석하여 37℃에서 60분간 반응시키고, 형광 현미경(CTR 6000, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 형광 이미지를 관찰하였다.

[0112] 그 결과, 오직 서열번호 1의 펩타이드(P1)를 처리한 경우에만 미세소관 중합반응을 저해하는 것을 확인할 수 있었고, 서열번호 2의 펩타이드(P2)를 처리한 경우에는 미세소관 중합반응을 저해하지 않는 것으로 확인되었다. 이를 통해 본 발명자들은 서열번호 1의 펩타이드와 서열번호 2의 펩타이드가 비만세포의 탈과립 반응을 유도하는 기전이 서로 상이함을 확인할 수 있었다.

[0113] **3-3-4 정제 펩타이드에 의한 미세소관 중합반응 억제 효과 기전 관찰**

[0114] 본 발명자들은 상기 펩타이드들이 미세소관 중합반응을 저해하는 효과와 관련하여 그 기전에 대해 좀 더 명확히 알아보고자, 상기 펩타이드들이 Fyn/Gab2를 포함하는 항원에 의해 유도되는 미소세관-의존적 기전에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보고자 상기 DNP-BSA 항원으로 자극한 세포에 대해 웨스턴 블라팅을 실시하였다.

[0115] 이를 위하여 RBL-2H3 세포에 다양한 농도의 생리활성 펩티드(50, 100, 200 μM)를 6시간 동안 처리하고 DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1 μg/ml)로 밤새 민감화하였다. 민감화된 세포는 세척한 후 항원 DNP-BSA (최종농도 1 μg/ml) 2 시간 또는 24 시간 자극하였다. 그 후, 세포를 RIPA lysis buffer (NP-40, Sigma-Aldrich, USA)로 용해하고 동일 양의 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동한 후 니트로셀루로오즈 멤브레인으로 이동시켰다. 상기 멤브레인을 5% (w/v) 소혈청 알부민을 포함하는 TBS-T 버퍼(20 mM Tris, pH 7.6, 0.1% Tween 20)로 블라킹 하고, 적당한 일차 항체(1:1000 희석)으로 1시간 이상 반응시킨 후, TBS-T 버퍼로 3번 세척하고 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG 이차 항체(1:5000 희석)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 TBS-T 버퍼를 이용하여 3번 세척하고 면역반응을 나타내는 밴드를 electrochemiluminescence (ECL)를 이용하여 확인하였다. 한편, 핵 단백질의 경우 제조자 방식에 따라 핵 추출 시약(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 추출한 단백질을 웨스턴 블랏에 활용하였다.

[0116] 그 결과, 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 항원에 의한 Fyn/Gab2의 발현 증가는 서열번호 1의 정제 펩타이드에 의해서 저해되지만, 서열번호 2의 정제 펩타이드에 의해서는 저해되지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 오직 서열번호 1의 정제 펩타이드만 Fyn/Gab2의 신호전달 경로를 차단하여 미세소관 중합반응을 저해함으로써 비만세포의 탈과립화를 억제함을 예상할 수 있었다.

[0117] **3-4. 정제 펩타이드가 항원에 의해 자극된 비만 세포내 칼슘 증가에 미치는 영향 관찰**

[0118] 비만세포의 탈과립 현상은 비만세포 내의 칼슘 농도 증가와 관련되어 있음은 이미 알려져 있다. 본 발명자들은 이와 관련하여 상기 정제된 펩타이드들이 비만 세포 내 칼슘 증가에 영향을 미치는지 확인해 보고자 하였다.

[0119] 세포 내 칼슘은 칼슘 반응성 형광 프로브인 Fura 3-AM을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 RBL-2H3 세포를 흑색 96-웰 플레이트에 2×10^5 cells/ml로 분주하고, 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 EDTA(1μM)을 6시간 처리한 후 DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1㎍/㎖)로 밤새 민감화시켰다. 그 후 세포를 Fura-3/AM(최종 농도 2μM)로 1시간 동안 배양하고, 타이로드 버퍼로 세척한 후 항원 DNP-BSA(최종 농도 1㎍/㎖)로 5분간 자극하였다. Fura-

2/AM 형광 강도는 자극을 준 후 2분이 지나 마이크로플레이트 리더(GENios® TecanAustria GmbH, Austria)를 이용하여 측정하였으며, 이 때 여기 파장은 360nm, 방출 파장은 528nm에서 측정하였다.

[0120] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, IgE로 민감화하고 항원 DNP-BSA로 자극한 RBL-2H3 세포(Control)의 세포내 칼슘 양은 아무런 처리도 하지 않은 RBL-2H3 세포(Blank)에 비해 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 한편, 정제된 펩타이드(RBL-2H3)를 함께 처리한 세포에서는 이러한 세포 내 칼슘 증가가 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

[0121] **3-5. 정제 펩타이드의 비만 세포내 칼슘 증가 저해 기전 관찰**

[0122] 세포 내 칼슘 증가는 Lyn/Syk/PLC/PKC/IP3R을 포함하는 신호전달 경로의 활성화에 기인하는 것으로 알려져 있는 바, 본 발명자들은 상기 정제된 펩타이드가 상기 신호전달 경로에 미치는 영향을 알아보고자 하였다

[0123] 이를 위하여 RBL-2H3 세포에 정제 펩타이드(P1 또는 P2, 50, 100, 200μM)를 처리하고 IgE로 민감화한 후, 항원 DNP-BSA로 자극하여 웨스턴 블라팅을 실시하였다.

[0124] 그 결과, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 서열번호 1의 정제 펩타이드(P1)는 신호전달 경로에 관여하는 Lyn, Syk, PLC, PKC, IP3R의 발현량을 모두 저해시키는 반면, 서열번호 2의 정제 펩타이드(P2)는 신호전달 경로에 관여하는 일부 단백질인 PLC, PKC, IP3R의 발현량만을 저해시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 P1은 신호전달 경로의 초기 단계, 즉 IgE 수용체인 FcεRI에 영향을 미칠 것으로 판단하였다.

[0125] **3-6. 정제 펩타이드가 FcεRI와 IgE의 결합에 미치는 영향 관찰**

[0126] 상기 실시예 3-5를 통해 서열번호 1의 펩타이드(P1)는 세포 내 칼슘 증가와 관련하여 세포전달 경로의 초기 단계에 영향을 미칠 것으로 판단되는바, 본 발명자들은 서열번호 1의 펩타이드(P1)가 IgE 수용체인 FcεRI와 IgE의 결합에 영향을 미치는지 여부를 유세포분석기를 이용해 관찰해 보았다.

[0127] 이를 위하여 RBL-2H3 세포에 다양한 농도의 생리활성 펩타이드(50, 100, 200 μM)를 6시간 동안 처리하고 DNP-특이적 IgE 항체(최종농도 1 μg/ml)로 민감화하였다. 그 후 세포를 세척하고, 항-IgE FITC-접합된 항체(최종농도 1 μg/ml)를 포함하는 cold binding buffer (BD Diagnostic Systems, Cockeysville, MD, USA)에서 풀어주고, 1시간 동안 얼음에 방치한 후, 원심분리로 세척하였으며, cold binding buffer로 다시 풀어주어 유세포분석기(BD Diagnostic Systems, Cockeysville, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. 히스토그램 상의 숫자는 IgE-양성 세포의 퍼센트를 의미한다.

[0128] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있듯이 항-IgE FITC-접합된 항체로 염색하지 않은 그룹(blank)와 비교하여, 정제 펩타이드를 처리하지 않은 그룹(Control)은 89%의 형광 강도를 나타내었으며, 서열번호 1의 펩타이드를 처리한 그룹에서는 각각 50, 100, 200 μM의 농도 처리군에서 각각 71, 45, 30%의 형광강도를 나타내었다. 따라서, P1은 IgE와 그 수용체인 FcεRI의 결합을 방해함으로써 FcεRI의 활성을 저해한다는 것을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 서열번호 2의 펩타이드(P2)는 FcεRI 저해활성을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

[0129] **3-7. 정제 펩타이드의 비만세포에서의 활성 산소종(ROS) 생산에 미치는 영향**

[0130] 본 발명자들은 정제된 펩타이드가 비만 세포 내 칼슘 증가 및 비만 세포의 탈과립화에 미치는 영향이 활성 산소종(ROS)과 관계되는지 확인해 보고자 실험을 진행하였다.

[0131] 세포내 ROS 생산을 측정하기 위하여 디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA) 형광 염색을 이용하였다. 이를 위하여 RBL-2H3 세포를 생리활성 펩타이드(200μM)로 6시간 처리하고 DNP-특이적 IgE 항체(최종농도 1㎍/㎖)로 밤새 민감화시켰다. 그 후 세포를 DCFH-DA를 5μM 처리하여 37℃에서 1시간 동안 배양하고, 타이로드 버퍼로 세척한 후 DNP-BSA(최종 농도 1㎍/㎖)로 자극하였다. ROS의 존재 하에서 DCFH의 산화에 의해 발생하는형광 디클로로플루오레세인(DCF)의 형성은 GENios® 형광 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Grodig/Salzburg, Austria)를 이용하여 여기 파장 486nm, 방출 파장 528nm에서 30분 동안 매 5분 간격으로 측정하였다.

[0132] 과산화물 음이온 및 과산화수소와 같은 세포 내 ROS 수치는 디하이드로에티듐(dihydroethidium, DHE) 및 2',7'-

디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 형광 염색 후 형광 현미경을 이용하여 분석하였다. 이를 위하여 RBL-2H3 세포는 생리활성 펩타이드(200 μM) 또는 디페닐렌아이오도늄 염화물(10 μM)을 6시간 처리하고 DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1 μg/ml)로 밤새 민감화시킨 후, 5 μM의 DHE 및 DCFH-DA로 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 세포를 타이로드 버퍼로 세척하고 항원 DNP-BSA(최종 농도 1 μg/ml)로 자극한 후 배지를 제거하고 3% 파라포름알데하이드를 30 분간 첨가하고 형광 현미경(CTR 6000, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 형광 이미지를 관찰하였다.

[0133] 그 결과, 도 12에서 볼 수 있듯이, 정제 펩타이드(P1, P2)는 모두 ROS 소거활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 특히, 본 발명자들은 형광 현미경을 이용하여 항원에 의해 유도된 과산화물음이온(superoxide anion)과 과산화수소(hydrogen peroxide)의 생산을 감소시키는 것으로 나타났으며, 정제 펩타이드 중에서도 서열번호 2의 펩타이드(P2)가 서열번호 1의 펩타이드(P1)에 비해 ROS 소거 활성이 더 뛰어난 것으로 나타났다.

[0134] **3-8. 항원 자극된 비만세포에서의 사이토카인 분비에 정제 펩타이드가 미치는 영향**

[0135] **3-8-1.정제 펩타이드가 HDC, IL-4, IL-13의 단백질 및 mRNA 발현에 미치는 영향 분석**

[0136] HDC, IL-4, IL-13의 단백질 양은 웨스턴 블라팅을 이용하여, mRNA 양은 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 RBL-2H3 세포는 다양한 농도의 펩타이드(50, 100, 200 μM)를 6시간 처리하고, DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1μg/ml)로 밤새 민감화 하였다. 민감화 된 세포를 세척하고 항원 DNP-BSA (최종 농도 1μg/ml)로 24시간 동안 자극한 후 단백질 양은 상기 실시예 3-3-4에 기재된 웨스턴 블라팅 방법과 동일하게 진행하였다. 한편, mRNA 정량 분석은 RT-PCR을 이용하였는데, 이를 위하여 세포 내 RNA를 제조자 방식에 따라 Trizol 시약으로 추출한 후 cDNA 합성을 위해 총 RNA 중 2㎍을 RNase-free water와 oligo (dT)에 첨가하고 70℃에서 5분간 변성하고, 즉시 냉각하였다. RNA는 1× RT 버퍼, 1mM dNTPs, 500 ng oligo (dT), 140 U M-MLV 역전사 효소, and 40 U RNase 저해제를 포함하는 마스터 믹스를 이용하여 42℃에서 1시간 동안 역전사하였다. 합성된 cDNA를 PCR 분석에 사용하였으며, GAPDH를 대조군으로 사용하였다. 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0137] HDC sense 5'-GCA-GCA-AGG-AAG-AAC-AAA-ATC-C-3'

[0138] HDC antisense 5'-CAA-CAA-GAC-GAG-CGT-TCA-GAG-A-3'

[0139] IL-4 sense 5'-TGA-TGG-GTC-TCA-GCC-CCC-ACC-TTG-C-3'

[0140] IL-4 antisense 5'-CTT-TCA-GTG-TTG-TGA-GCG-TGG-ACT-C-3'

[0141] IL-13 sense 5'-GAC-CCA-GAG-GAT-ATT-GCA-TG-3'

[0142] IL-13 antisense 5'-CCA-GCA-AAG-TCT-GAT-GTG-AG-3'

[0143] GAPDH sense 5'-TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC-3'

[0144] GAPDH antisense 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA-3'

[0145] 증폭 조건은 95℃에서 45초(변성), 55℃에서 50초(어닐링), 72℃에서 60초 (연장) 조건에서 30 사이클 진행하였으며, 증폭된 산물은 1% 아가로오스 전기영동 하여 1mg/ml EtBr 염색하여 UV를 이용한 AlphaEase® gel image analysis software(Alpha Innotech. San Leandro, CA, USA)로 분석하였다.

[0146] 도 13 및 도 14는 그 결과를 나타낸 것으로, 항원에 의해 증가된 IL-4, 1L-13, HDC의 단백질 및 mRNA 발현량은 정제 펩타이드에 의해 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0147] **3-8-2. 정제 펩타이드가 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 영향 분석**

[0148] PI3K/Akt 신호전달 경로의 활성은 다양한 염증 반응과 관계된 유전자와 단백질 발현을 유도한다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명에 따른 정제 펩타이드(P1, P2)가 이들 신호전달 경로에 미치는 영향을 알아보고자, RBL-2H3 세포는 다양한 농도의 펩타이드(50, 100, 200 μM)를 6시간 처리하고, DNP-특이적 IgE 항체(최종 농도 1μg/m

l)로 밤새 민감화 하였다. 민감화 된 세포를 세척하고 항원 DNP-BSA (최종 농도 1μg/ml)로 24시간 동안 자극한 후 단백질 양은 상기 기재된 실시예 3-3-4에 기재된 웨스턴 블라팅 방법과 동일하게 진행하였다.

[0149] 그 결과 도 15에서 볼 수 있듯이, 항원에 의해 자극된 비만세포에서는 PI3K, Akt의 인산화가 증가되는 것으로 나타났으나, 정제 펩타이드를 함께 처리한 비만세포에서는 PI3K와 Akt의 인산화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0150] **3-8-3. 정제 펩타이드가 NF-κB 활성화에 미치는 영향 분석**

[0151] NF-κB는 MAPK의 하부 신호전달 분자로, 본 발명자들은 본 발명에 따른 정제 펩타이드가 NF-κB 활성화에 미치는 영향을 관찰해 보고자 그 서브유닛인 p50, p65의 핵으로의 위치 변화를 관찰해보았다 . 또한, 정제 펩타이드에 의한 IκB-α 의 분해 정도에 대해서도 웨스턴 블라팅을 통해 관찰해 보았다.

[0152] 그 결과, 도 16에서 볼 수 있듯이, 정제 펩타이드(P1, P2)는 비만세포에서 항원에 의해 자극된 p50, p65의 핵으로의 이동을 저해하고, IκB-α 의 분해를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0153] **3-8-4. 정제 펩타이드가 ERK, p38, JNK의 인산화에 미치는 영향**

[0154] 한편, 본 발명자들은 정제 펩타이드가 MAPK의 신호전달 경로를 차단하는지 확인하기 위하여 정제 펩타이드가 ERK, p38, JNK의 인산화에 미치는 영향을 추가적으로 관찰하였다.

[0155] 그 결과, 도 17에서 볼 수 있듯이, 정제 펩타이드(P1, P2)는 항원에 의해 자극된 비만세포에서 ERK, p38, JNK의 인산화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0156] **3-9. 정제 펩타이드가 FcεRI α chain 발현에 미치는 영향 관찰**

[0157] IgE와 IL-4는 비만 세포에서 FcεRI 의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 본 발명에 의한 정제 펩타이드(P1, P2)가 IgE 수용체인 FcεRI 의 발현량에 미치는 영향을 확인해 보고자 웨스턴 블라팅 및 RT-PCR을 실시하였다. 웨스턴 블라팅은 실시예 3-3-4에 제시된 방법과 동일하게 수행하였으며, RT-PCR은 실시예 3-8-1에 제시된 방법과 동일하게 수행하였다. PCR에 사용된 프라이머는 하기와 같다.

[0158] FcεRI α chain sense 5'-ATT-GCC-TGA-ATC-ACC-AGC-A-3'

[0159] FcεRI α chain antisense 5'-AGG-GCT-GGG-ATT-ACA-GGC-GTG-3'

[0160] GAPDH sense 5'-TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC-3'

[0161] GAPDH antisense 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA-3'.

[0162] 그 결과는 도 18에서 볼 수 있듯이 IgE 및 IL-4의 처리에 의해 FcεRI α chain의 발현양은 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였고, 특히 처리 3일째에 가장 높은 발현양을 나타내었다. 그러나, 정제 펩타이드를 함께 처리한 경우 FcεRI α chain의 발현양은 단백질 합성 저해제인 사이클로헤사마이드(cycloheimide)와 비슷한 정도로 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0163] **3-9. 정제 펩타이드가 FcεRI 세포 표면 발현에 미치는 영향 관찰**

[0164] 정제 펩타이드가 FcεRI 세포 표면 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 IL-4 및 IgE에 의해 비만세포를 자극하고 정제 펩타이드 처리 유무에 따른 FcεRI의 세포 표면 발현양을 유세포 분석기 및 형광 사진을 이용하여 관찰하여 보았다

[0165] 유세포 분석기를 이용한 분석을 위해 RBL-2H3 세포는 24-웰 플레이트(5×10^3 cells/ml)에 분주하고, 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM)를 6시간 처리한 후 DNP-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체(최종 농도 1㎍/㎖) 또는 랫 IL-4(10ng/ml)을 이용하여 24, 48, 72시간 동안 민감화하였다. 그 후 세포를 세척하고, 항-IgE FITC-접합된 항체(최종 농도 1 μg/ml)를 포함하는 cold binding buffer (BD Diagnostic Systems, Cockeysville, MD, USA)에서 풀어주고, 1시간 동안 얼음에 방치하고, 원심분리로 세척하였으며, cold

binding buffer로 다시 풀어주어 유세포분석기(BD Diagnostic Systems, Cockeysville, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. 히스토그램 상의 숫자는 IgE-양성 세포의 퍼센트를 의미한다.

[0166] 형광 이미지를 위해 RBL-2H3 세포는 24-웰 플레이트(5×10^3 cells/ml)에 분주하고, 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM)를 6시간 처리한 후 DNP-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체(최종 농도 1㎍/㎖) 또는 랫 IL-4(10ng/ml)을 이용하여 24, 48, 72시간 동안 민감화하였다. 세포를 세척하고 항-IgE FITC-접합된 항체(최종농도 1㎍/㎖)를 포함하는 차가운 PBS에 풀어준 후 버퍼를 제거하고, 3% 파라포름알데하이드를 30분간 첨가하였다. 형광 이미지는 형광 현미경(CTR 6000, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

[0167] 그 결과, 도 19 및 도 20에서 볼 수 있듯이 IgE와 IL-4에 의한 비만세포에서의 FcεRI 세포 표면 발현은 각각 1일, 2일, 3일째 41%, 50%, 61%로 타났으나, 서열번호 1의 펩타이드(200μM), 서열번호 2의 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM) 처리시 FcεRI 세포 표면 발현은 각각 31%, 49%, 43%인 것으로 나타나 본 발명에 의한 정제 펩타이드가 FcεRI의 비만세포 표면에서의 발현을 효과적으로 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0168] **3-10. 정제 펩타이드가 히스타민 분비에 미치는 영향 관찰**

[0169] IgE 및 IL-4에 의한 FcεRI의 세포 표면 발현량 증가는 히스타민 분비를 유도할 수 있다는 가정하에 본 발명자들은 정제 펩타이드가 히스타민 분비에 미치는 영향을 관찰해 보았다.

[0170] 히스타민 분비는 분광형광계 분석을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포는 24-웰 플레이트(5×10^3 cells/ml)에 분주하고 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM)를 6시간 처리한 후 디니트로페닐-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체(최종 농도 1㎍/㎖) 또는 랫 IL-4(10ng/ml)을 이용하여 24, 48, 72시간 동안 민감화하였다. 그 후 타이로드 버퍼[Tyrode buffer, (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH_2PO_4, 1mM $MgCl_2$, 12mM $NaHCO_3$, 1.8mM $CaCl_2$]로 2번 세척하고 항원 디니트로페닐-소 혈청 알부민(DNP-BSA)을 최종 농도가 1㎍/㎖이 되도록 하여 60분간 처리하였다. 그 후, 0.5N NaOH(40㎕), 2.5mg/ml OPA(20㎕)를 상청액 100㎕에 첨가하고 30분간 반응시켰다 반응은 3N HCl 10㎕를 첨가하여 종결시켰다. 형광강도는 여기 파장 365nm, 방출 파장 465nm에서 측정하였고, 블랭크로는 아무것도 처리하지 않은 세포들의 상청액을 이용하였으며, 대조군으로는 항원 DNP-BSA 단독 처리한 세포의 상청액을 이용하였다. 히스타민 분비는 하기와 같은 식으로 계산하였다.

[0171]
$$\text{히스타민분비율}(\%)=\frac{\text{테스트샘플형광강도-블랭크형광강도}}{\text{대조군형광강도-블랭크형광강도}}\times100$$

[0172] 그 결과, 도 21에 도시된 바와 같이 비만세포에서 IgE와 IL-4에 의해 시간 경과에 따라 히스타민 분비가 증가하였으며, 정제 펩타이드는 이러한 히스타민 분비를 억제하는 효과를 확인할 수 있었다. 특히 서열번호 1의 펩타이드가 서열번호 2의 펩타이드에 비해 히스타민 분비 억제 효과가 뛰어났으며, 사이클로헥사마이드의 경우 유의한 히스타민 분비 억제 효과를 관찰할 수 없었다.

[0173] **3-11. 정제 펩타이드가 TNF-α의 분비에 미치는 영향 관찰**

[0174] 정제 펩타이드가 TNF-α의 분비에 미치는 영향을 관찰하기 위해 RBL-2H3 세포는 24-웰 플레이트(5×10^3 cells/ml)에 분주하고, 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM)를 6시간 처리한 후 DNP-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체(최종 농도 1㎍/㎖) 또는 랫 IL-4(10ng/ml)을 이용하여 24, 48, 72시간 동안 민감화하였다. 그 후 세포를 세척하고 항원 DNP-BSA(최종 농도 1㎍/㎖)를 1시간 동안 처리하였다. 상청액을 수집하여 TNF-α의 분비량을 R&D 시스템의 프로토콜에 따라 샌드위치 면역분석법을 이용하여 정량화하였다.

[0175] 그 결과, 도 22에서 볼 수 있듯이 비만세포에서 TNF-α의 분비량은 IL-4 및 IgE 처리시 시간 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었으나, 정제 펩타이드를 처리한 경우 이러한 효과가 감소되는 것으로 확인되었다. 한편, 사이클로헥사마이드 처리시에는 이러한 분비 감소 효과가 관찰되지 않았다.

[0176] **3-12. RT-PCR을 이용한 GATA-1의 mRNA 정량 분석**

[0177] FcεRI의 발현은 비만세포에서 전사효소인 GATA-1의 조절을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 본 발명인 정제 펩타이드가 GATA-1의 발현에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다.

[0178] 이를 위하여 RBL-2H3 세포는 6-웰 플레이트(2×10^4 cells/ml)에 분주하고, 생리활성 펩타이드(200μM) 또는 사이클로헥사아마이드(1μM)를 6시간 처리한 후 DNP-특이적 IgE(DNP-specific IgE) 항체(최종 농도 1㎍/㎖) 또는 랫 IL-4(10ng/ml)을 이용하여 24시간 동안 민감화하였다.

[0179] 우선 웨스턴 블라팅을 위해서, 상기 세포를 RIPA lysis buffer (NP-40, Sigma-Aldrich, USA)로 용해하고 동일 양의 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동한 후 니트로셀루로오즈 멤브레인으로 이동시켰다. 상기 멤브레인을 5% (w/v) 소혈청 알부민을 포함하는 TBS-T 버퍼(20 mM Tris, pH 7.6, 0.1% Tween 20)로 블라킹 하고, 적당한 일차 항체(1:1000 희석)으로 1시간 이상 반응시킨 후, TBS-T 버퍼로 3번 세척하고 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG 이차 항체(1:5000 희석)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 TBS-T 버퍼를 이용하여 3번 세척하고 면역반응을 나타내는 밴드를 electrochemiluminescence (ECL)를 이용하여 확인하였다. 한편, 핵 단백질의 경우 제조자 방식에 따라 핵 추출 시약(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 추출한 단백질을 웨스턴 블랏에 활용하였다.

[0180] 한편 RT-PCR을 위해서는, 상기 세포 내 RNA를 제조자 방식에 따라 Trizol 시약으로 추출한 후 cDNA 합성을 위해 총 RNA 중 2㎍을 RNase-free water와 oligo (dT)에 첨가하고 70℃에서 5분간 변성하고, 즉시 냉각하였다. RNA는 1× RT 버퍼, 1mM dNTPs, 500 ng oligo (dT), 140 U M-MLV 역전사 효소, and 40 U RNase 저해제를 포함하는 마스터 믹스를 이용하여 42℃에서 1시간 동안 역전사하였다. 합성된 cDNA를 PCR 분석에 사용하였으며, GAPDH를 대조군으로 사용하였다. 본 발명에 사용된 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0181] GATA-1 sense 5'-ATG-GAT-TTT-CCT-GGT-CTA-GGG-GC-3'

[0182] GATA-1 antisense 5'-TCA-AGA-ACT-GAG-TGG-GGC-GAT-CAC-G-3'

[0183] GAPDH sense 5'-TTC-ACC-ACC-ATG-GAG-AAG-GC-3'

[0184] GAPDH antisense 5'-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA-3'.

[0185] 증폭 조건은 95℃에서 45초(변성), 55℃에서 50초(어닐링), 72℃에서 60초 (연장) 조건에서 30 사이클 진행하였으며, 증폭된 산물은 1% 아가로오스 전기영동 하여 1mg/ml EtBr 염색하여 UV를 이용한 AlphaEase® gel image analysis software(Alpha Innotech. San Leandro, CA, USA)로 분석하였다.

[0186] 그 결과, 도 23에서 볼 수 있듯이 비만세포를 IgE 및 IL-4로 처리한 경우 GATA-1의 단백질 및 mRNA 양은 증가하는 경향을 나타냈으나, 정제 펩타이드(P1, P2) 또는 사이클로헥사마이드를 처리한 경우 GATA-1의 단백질 및 mRNA 발현양은 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

[0187] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0188] P1: 서열번호 1의 펩타이드

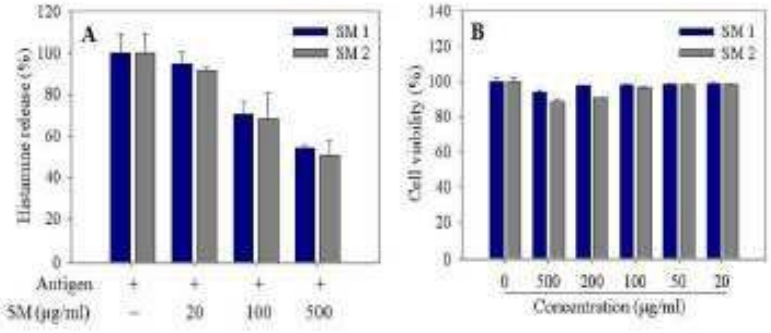
P2: 서열번호 2의 펩타이드

SM1: 스피룰리나 맥시마를 프로테아제 E로 가수분해한 가수분해물

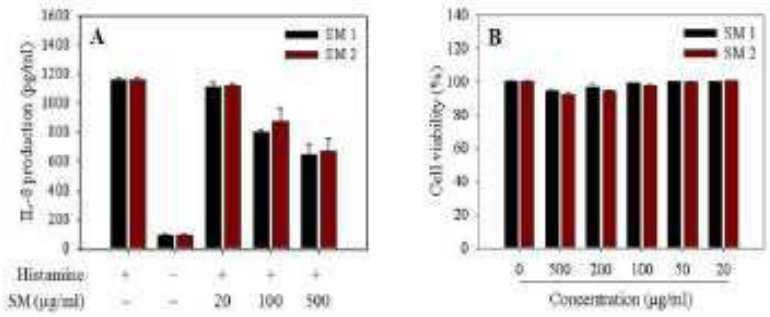
SM2: 스피룰리나 맥시마를 펩신, 트립신, α-키모트립신으로 가수분해한 가수분해물

도면

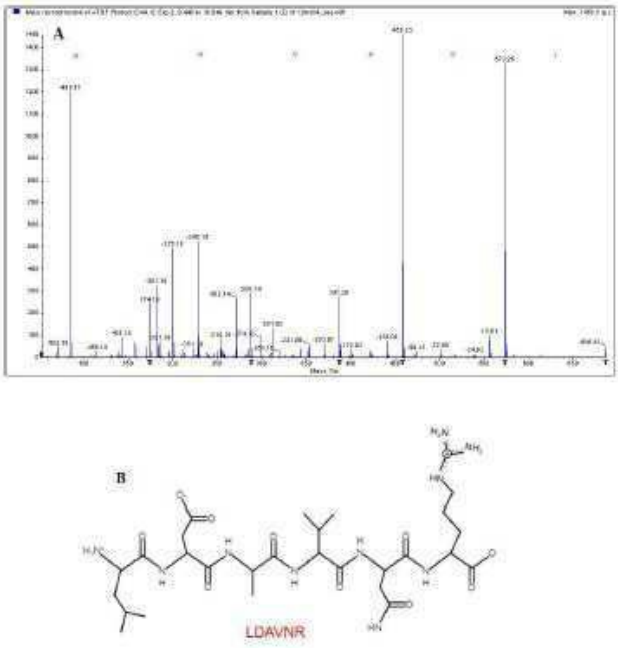
도면1



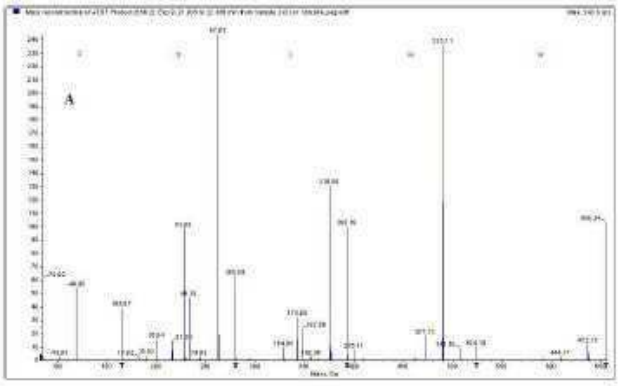
도면2



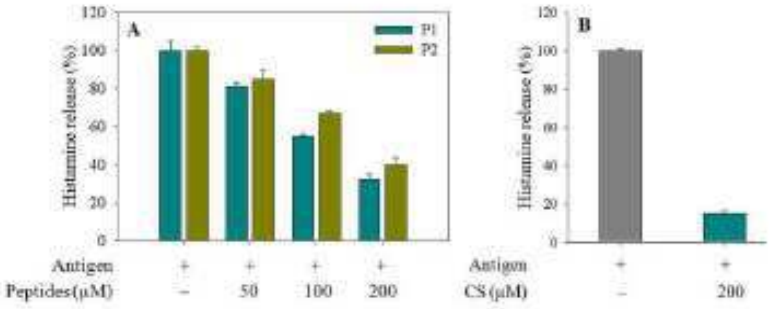
도면3



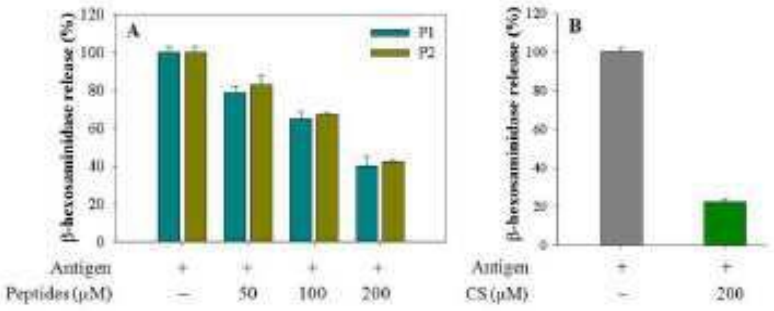
도면4


A
B
MMLDF

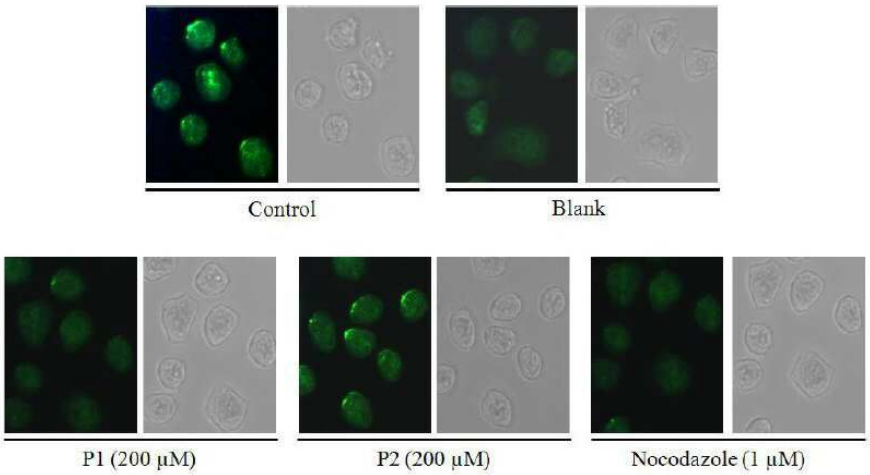
도면5


A
P1
P2
Histamine release (%)
Antigen
Peptides(μM)
B
Histamine release (%)
Antigen
CS (μM)

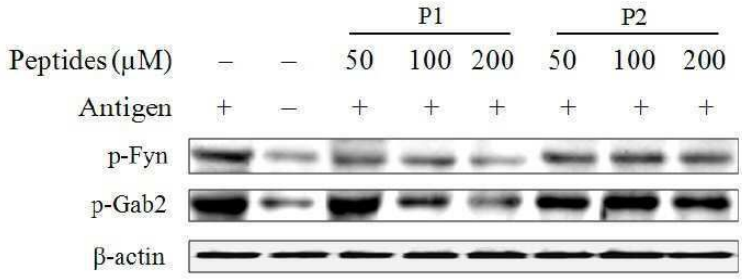
도면6


A
P1
P2
β-hexosaminidase release (%)
Antigen
Peptides (μM)
B
β-hexosaminidase release (%)
Antigen
CS (μM)

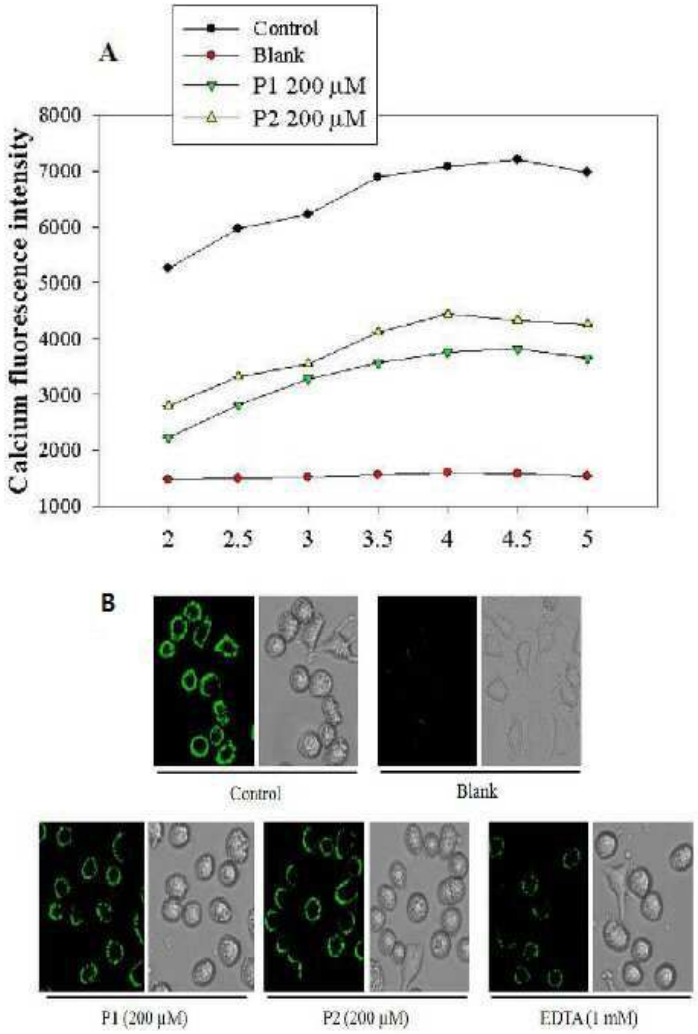
도면7


Control
Blank
P1 (200 μM)
P2 (200 μM)
Nocodazole (1 μM)

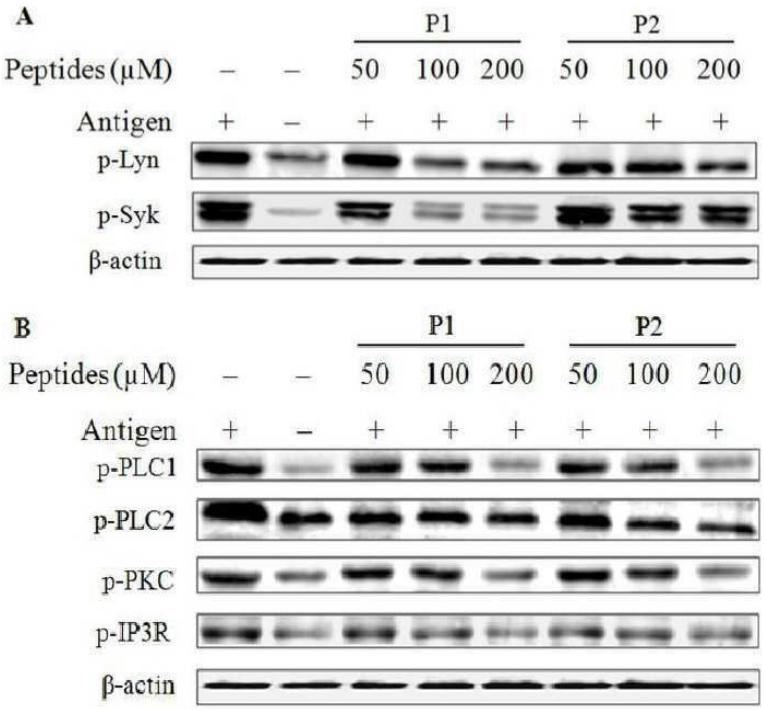
도면8


P1
P2
Peptides (μM) – – 50 100 200 50 100 200
Antigen + – + + + + + +
p-Fyn
p-Gab2
β-actin

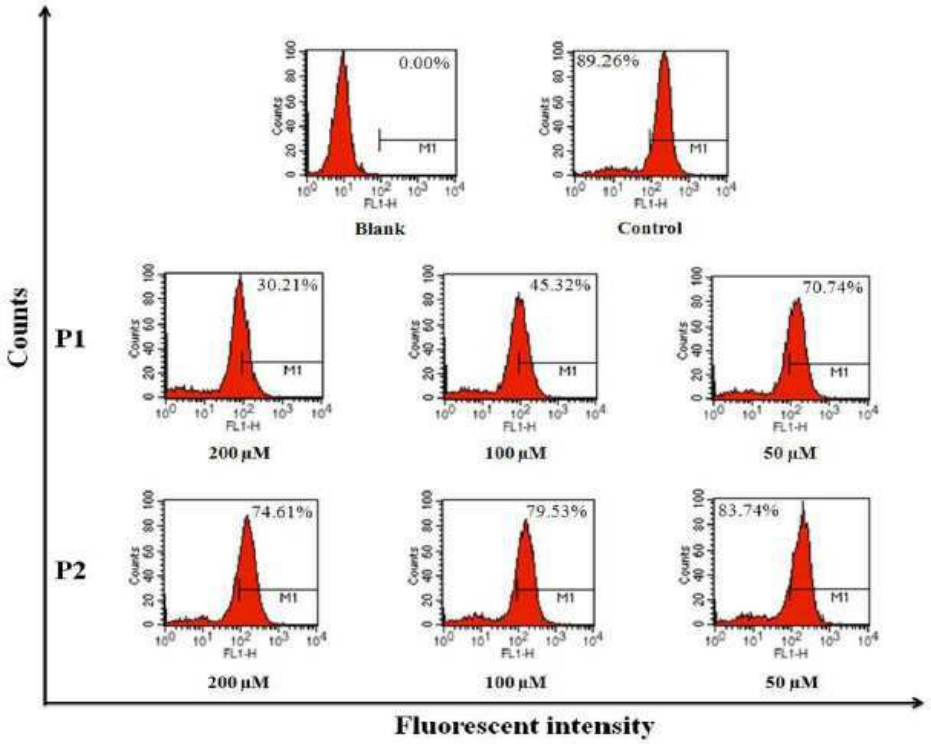
도면9


A
Control
Blank
P1 200 μM
P2 200 μM
Calcium fluorescence intensity
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
B
Control
Blank
P1 (200 μM)
P2 (200 μM)
EDTA (1 mM)

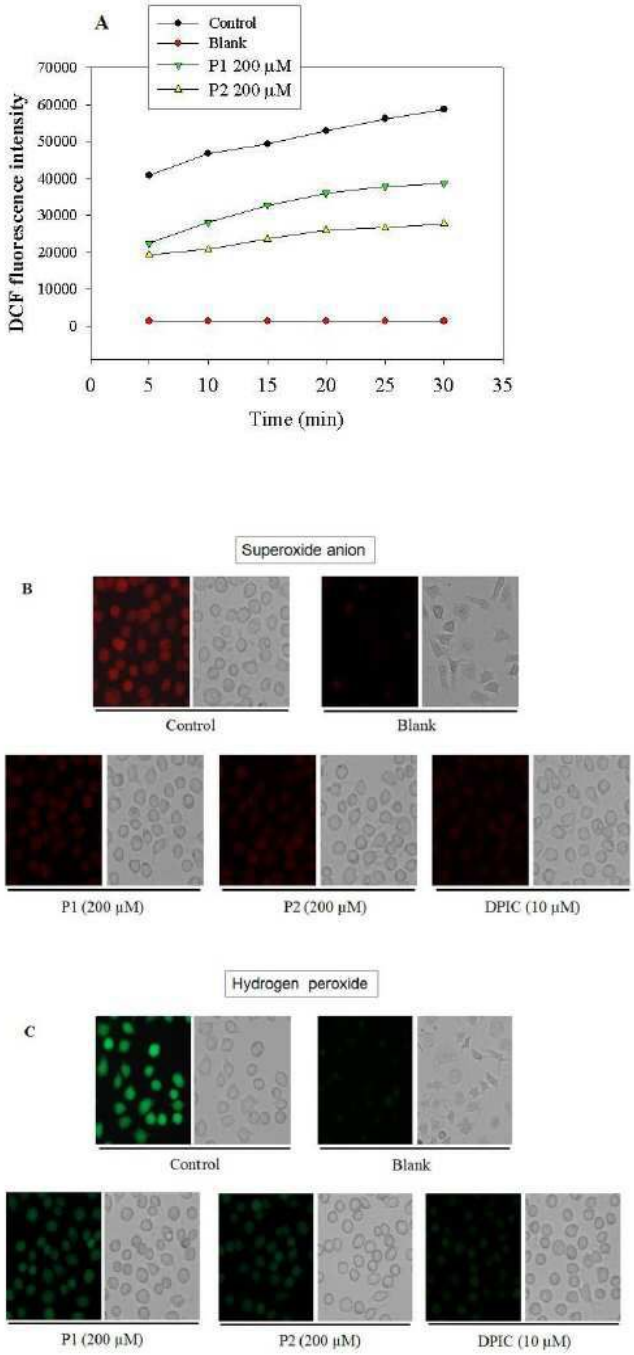
도면10


A
P1
P2
Peptides (μM)
–
–
50
100
200
50
100
200
Antigen
+
–
+
+
+
+
+
+
p-Lyn
p-Syk
β-actin
B
P1
P2
Peptides (μM)
–
–
50
100
200
50
100
200
Antigen
+
–
+
+
+
+
+
+
p-PLC1
p-PLC2
p-PKC
p-IP3R
β-actin

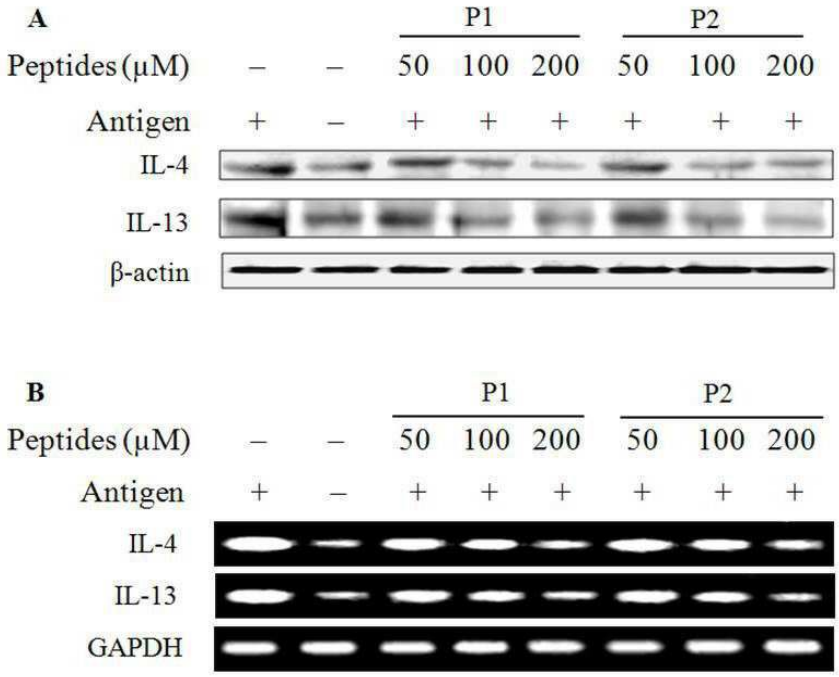
도면11


Counts
P1
P2
0.00%
Blank
89.26%
Control
30.21%
200 μM
45.32%
100 μM
70.74%
50 μM
74.61%
200 μM
79.53%
100 μM
83.74%
50 μM
M1
FL1-H
Fluorescent intensity

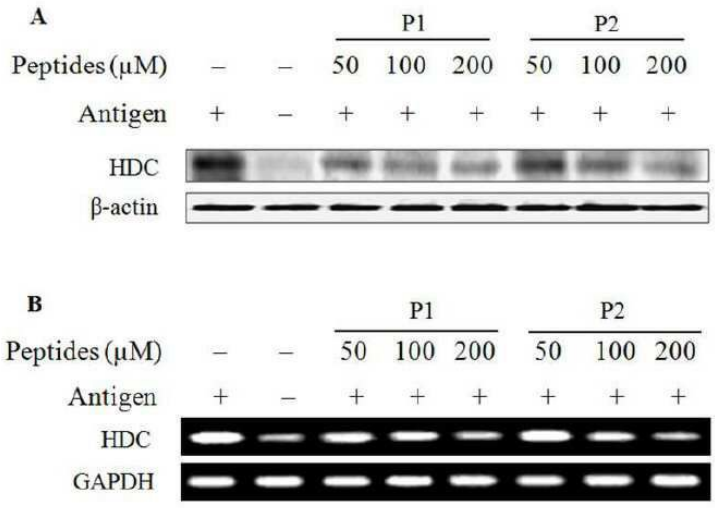
도면12


A
Control
Blank
P1 200 μM
P2 200 μM
DCF fluorescence intensity
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Time (min)
Superoxide anion
B
Control
Blank
P1 (200 μM)
P2 (200 μM)
DPIC (10 μM)
Hydrogen peroxide
C
Control
Blank
P1 (200 μM)
P2 (200 μM)
DPIC (10 μM)

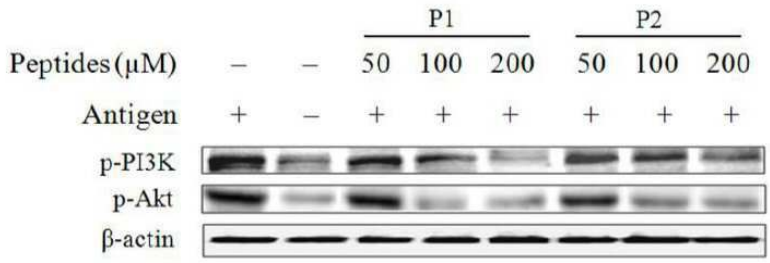
도면13



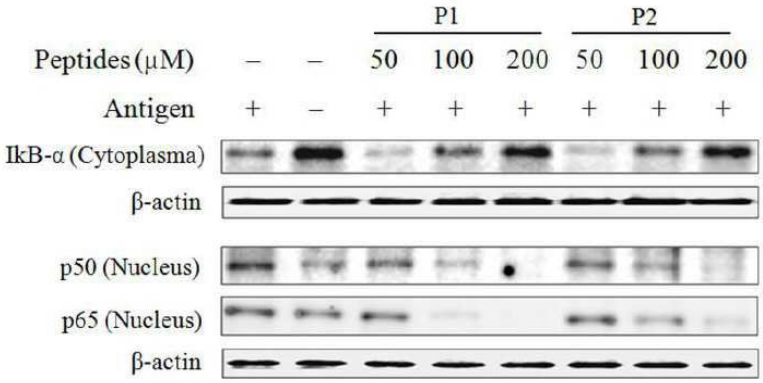
도면14



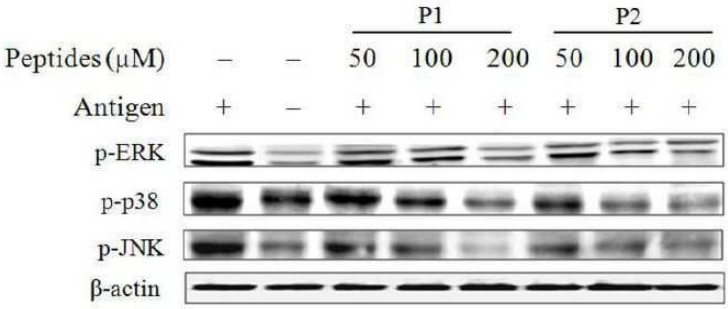
도면15



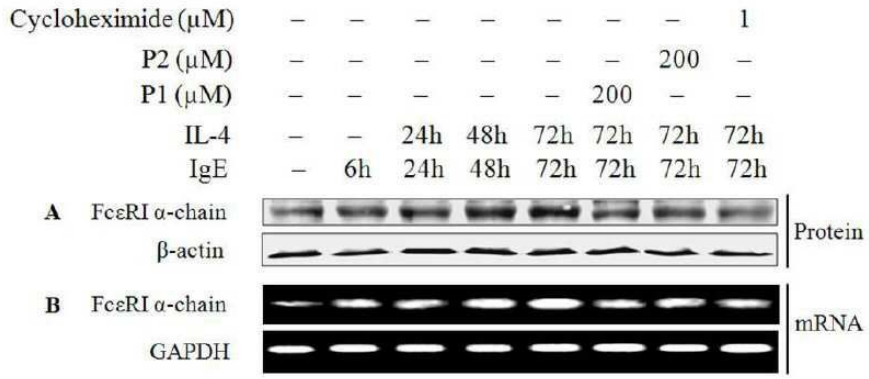
도면16



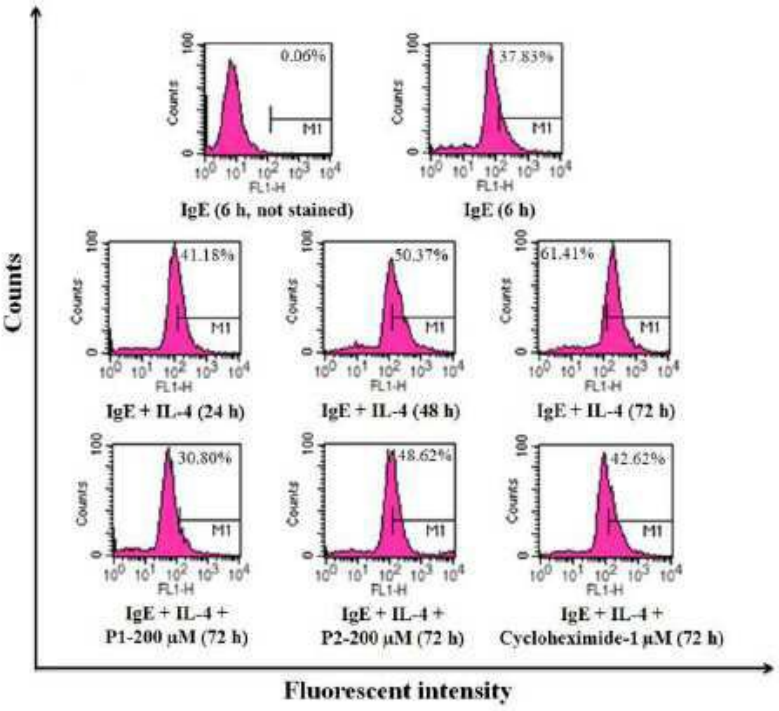
도면17



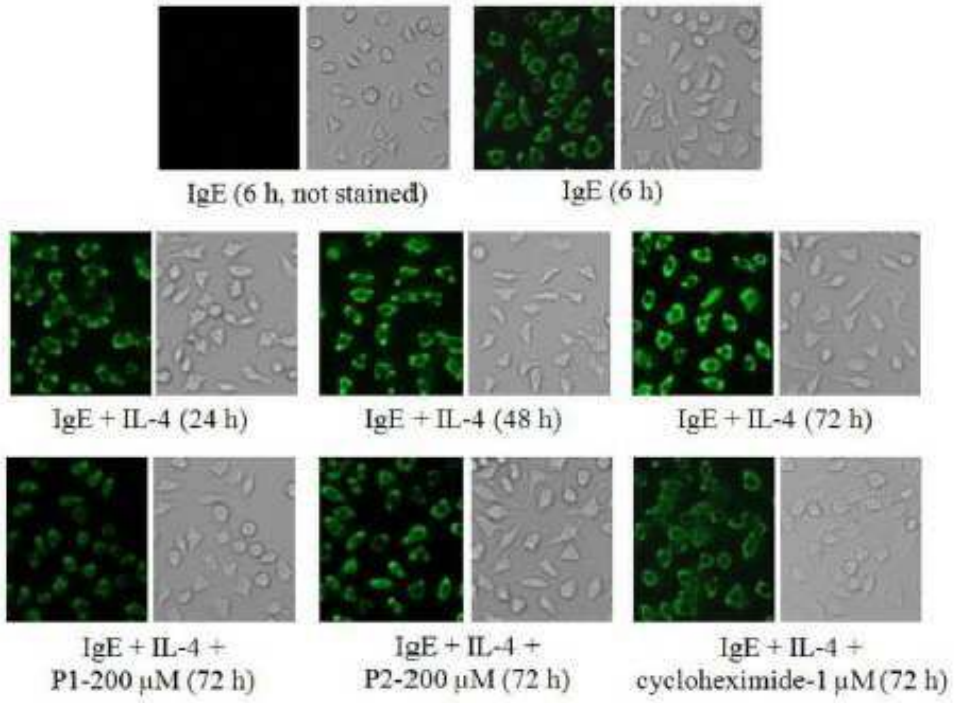
도면18



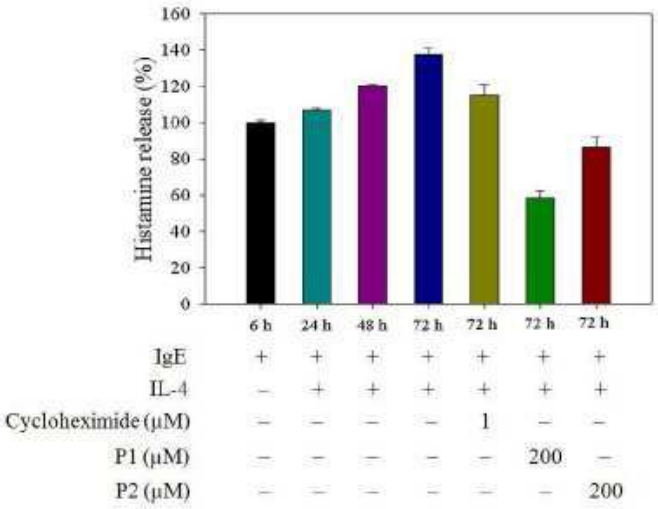
도면19


Counts
0.06%
M1
IgE (6 h, not stained)
37.83%
M1
IgE (6 h)
41.18%
M1
IgE + IL-4 (24 h)
50.37%
M1
IgE + IL-4 (48 h)
61.41%
M1
IgE + IL-4 (72 h)
30.80%
M1
IgE + IL-4 + P1-200 μM (72 h)
48.62%
M1
IgE + IL-4 + P2-200 μM (72 h)
42.62%
M1
IgE + IL-4 + Cycloheximide-1 μM (72 h)
Fluorescent intensity

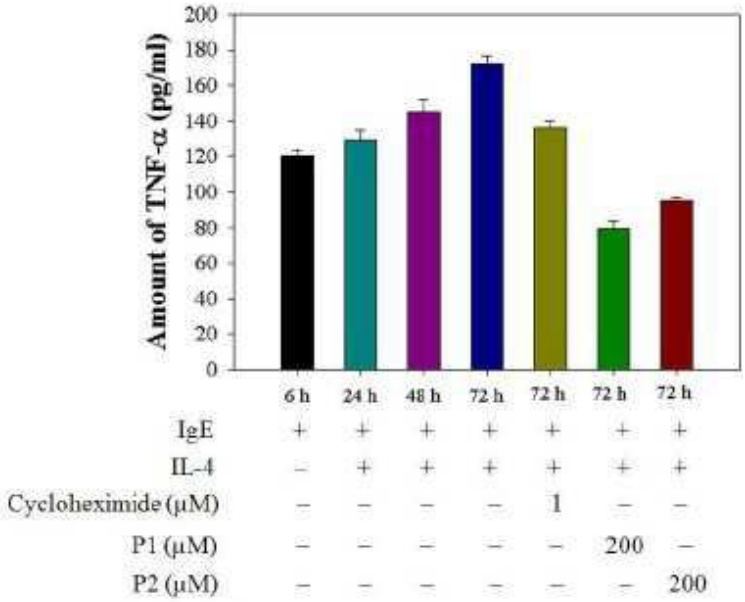
도면20


IgE (6 h, not stained)
IgE (6 h)
IgE + IL-4 (24 h)
IgE + IL-4 (48 h)
IgE + IL-4 (72 h)
IgE + IL-4 + P1-200 μM (72 h)
IgE + IL-4 + P2-200 μM (72 h)
IgE + IL-4 + cycloheximide-1 μM (72 h)

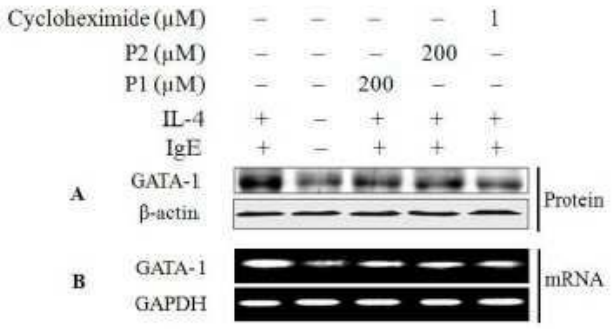
도면21



도면22



도면23



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Composition containing peptides from spirulina maxima for prevention or treatment of Allergic disease

<130> PN1301-026

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Spirulina maxima

<400> 1

Leu Asp Ala Val Asn Arg
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Spirulina maxima

<400> 2

Met Met Leu Asp Phe
1 5