

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 31일 (31.05.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2019/103203 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/013532

(22) 국제출원일: 2017년 11월 24일 (24.11.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 주식회사 겐백스앤카엘 (GENVAX & KAEL CO., LTD.) [KR/KR]; 34036 대전시 유성구 테크노1로 58, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 겐

(71) 출원인: 김상재 (KIM, Sang Jac) [KR/KR]; 06360 서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 03151 서울시 종로구 종로5길 58 석탄회관빌딩 10층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, 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 국내 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).

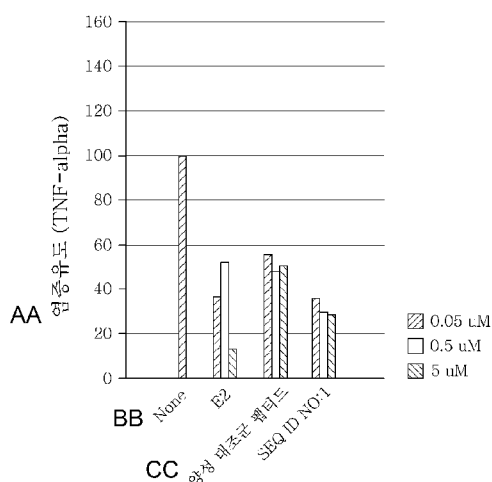
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL PEPTIDE AND COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규 펩티드 및 이를 포함한 조성물



AA ... Induction de l'inflammation (TNF-alpha)

BB ... Néant

CC ... Peptide témoin positif

(57) Abstract: The present specification relates to a novel peptide and a composition comprising the same and, more particularly, discloses a novel peptide showing the prophylactic and therapeutic efficacy of anti-inflammation, anti-fibrosis, wound healing, and anticancer, and a composition comprising the same. The novel peptide and the composition comprising the same, disclosed in the present specification, exhibit the effect of alleviating, preventing, and treating symptoms such as inflammation, fibrosis, wounds, and diseases such as cancer including the symptoms and thus can provide a prophylactic and therapeutic method for related diseases.

(57) 요약서: 본 명세서에는 신규 펩티드 및 이를 포함한 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 항염, 항섬유, 창상치유 및 항암의 예방 및 치료에 효능을 보이는 신규 펩티드 및 이를 포함한 조성물이 개시된다. 본 명세서에 개시된 신규 펩티드 및 이를 포함한 조성물은 염증, 섬유증 및 창상과 상기 증상들을 포함하는 암과 같은 질병의 증상을 개선, 예방 및 치료하는 효과를 나타내어 관련 질병의 예방 및 치료 방법을 제공할 수 있다.



WO 2019/103203 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 펩티드 및 이를 포함한 조성물

기술분야

- [1] 본 명세서는 신규 펩티드 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 신규 펩티드를 포함하며 항염, 항섬유화, 상처 치유, 피부 개선 및 항암 치료에 효과적인 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 종양 괴사 인자 (TNF), 특히 $\text{TNF-}\alpha$ 는 염증성 세포로부터 방출되어 다채로운 세포 상해 반응, 면역 반응 및 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. $\text{TNF-}\alpha$ 는 많은 염증 질환 및 자기 면역 질환의 발증이나 천연화 (遷延化) 에 관여하고, 또한 혈액 중에 방출되어 전신에 작용하면, 중증의 패혈증 및 패혈증성 쇼크를 일으키는 것이 알려져 있다. 이와 같이 $\text{TNF-}\alpha$ 는 생체의 면역계에 광범위하게 관련된 인자이기 때문에, $\text{TNF-}\alpha$ 를 저해하는 약제의 개발이 활발히 실시되고 있다. $\text{TNF-}\alpha$ 는 불활성형으로 생합성되고 프로테아제에 의해 절단되어 활성형이 되지만, 이 활성화에 관여하는 효소는 종양 괴사 인자 변환 효소 (TACE) 로 불리고 있다. 따라서 이 TACE 를 저해하는 물질은 $\text{TNF-}\alpha$ 에서 기인되는 질환, 병태, 이상 상태, 상태가 좋지 않음, 좋지 않은 자각 증상 등을 치료, 개선, 예방할 수 있다(KR2011-0060940A).
- [4] 섬유증은 섬유아세포에 의한 세포외 기질의 비정상적 생성, 축적 및 침착이 일어나는 질환으로, 다양한 조직의 구조 및 기능을 변화시키는 손상(injury) 또는 염증에 따른 콜라겐 매트릭스의 비정상적인 축적을 말한다. 섬유증의 발병 위치에 무관하게, 섬유증의 대부분의 병인학은 정상 조직을 대체하는 콜라겐 매트릭스의 과도한 축적을 포함한다. 특히 신장, 간, 폐, 심장, 뼈 또는 골수, 그리고 피부에서 유발된 섬유증은 장기의 기능부전을 유도하고 최악의 경우 사망에 이르게도 한다. 상기 섬유아세포는 정상적 상태에서는 세포 외 기질의 전구체를 생성하여 섬유 조직을 형성하는 기능을 한다. 결합 조직의 세포사이 물질인 세포외 기질은 피브로 넥틴, 라미닌, 콘드로넥틴, 콜라겐과 같은 단백질 형태로 존재한다.
- [5] 한편, $\text{TGF-}\beta$ 는 섬유아세포에 의한 세포외 기질의 비정상적 생성, 축적은 세포증식, 염증반응, 암세포 전이와 같이 매우 다양한 역할을 가지며, 많은 세포 신경전달 경로(Cellular Signaling Pathway)와 표적이 규명 되어 있다. 따라서, 많은 질병 모델에서 $\text{TGF-}\beta$ 에 관한 연구가 진행 되었으며 가장 활발한 연구 및 약물개발이 진행 되고 있는 분야는 섬유증 관련질환(Fibrotic diseases)과 암을 꼽을 수 있다. $\text{TGF-}\beta$ 는 세포증식 조절인자로서 세포증식을 유도 또는 제한하여 암, 심장질환, 당뇨를 비롯한 다양한 질병의 발병과정에서 중요한 역할을

수행하는 것으로 보고하고 있으며, 다양한 생리 활성 등이 보고되었다. 예를 들면, TGF- β 합성 억제 (세포증식 조절인자 생성 억제), TGF- β antagonist (TGF receptor를 교란, 신호전달방해), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) antagonist (혈관 생성 유도 인자 억제), p38 MAP kinase inhibitor (세포 증식 신호 전달 효소 억제), 항염 (TNF- α 및 MAPK의 생성억제) 등의 작용이 있다. 따라서 TGF- β 를 보다 직접적으로 억제하거나 TGF- β 가 관여하는 신호전달 과정을 차단할 수 있으며, 부작용도 없는 새로운 의약 조성물을 개발할 수 있다면, 섬유화로 유발되는 각종 질병 및 노화에 대한 예방 및 치료를 수행할 수 있을 것이다.

- [6] 창상 치유 과정은 크게 염증기(inflammation), 육아기 (granulation), 상피화기(epithelialization) 및 섬유증식기(fibroplasia) 의 4단계로 나뉜다. 염증기에서는 필요한 세포들(섬유모세포, 상피세포 등)을 활성화 시킨다. 이어 육아기에서는 섬유모세포가 콜라겐을 증착(deposit)시키며, 이에 콜라겐이 증가하게 되고 창상이 성숙(mature)하게 된다. 또한 창상 부위의 각질세포(keratinocyte) 변화가 일어나게 되고, 결손부위 표피(epidermis)가 두꺼워지고 표피 아래의 기저세포로부터 표피까지 상피세포(epithelial cells)가 이동하게 되는 상태로 점차 나아가게 되는데 이를 상피화기라고 하며, 상피화기를 거쳐 섬유 증식기로 나아가 콜라겐 섬유(collagen fibers)들이 콜라겐 기질(collageneous matrix)를 형성하여 창상 결손부위를 메우게 되고, 이것이 장기간 이루어지다 종료되면 치유가 되는 것이다. 따라서 상피세포의 증식과 콜라겐의 생성 또한 상처 치료 및 항노화 작용의 중요한 기전(mechanism) 중 하나라고 할 수 있을 것이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 이러한 배경하에서 본 발명자들은 신규 펩티드들을 개발하여 TNF- α 감소 및 TGF- β 억제를 통한 항염, 항섬유화, 창상 치유, 피부 개선 및 항암 등의 효능이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [9] 일 측면에서 본 발명의 목적은 항염, 항섬유화, 창상 치유 및 항암에 효능이 있는 신규 펩티드 및 이를 포함하는 질병 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 일 측면에서 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드, 또는 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 제공한다.
- [12] 일 측면에서 본 발명은 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을

포함하는 항염 조성물을 제공한다.

- [13] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 항염 조성물은 $\text{TNF-}\alpha$ 억제에 의하여 항염 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항염 조성물일 수 있다.
- [14] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 항염 조성물은 류마티스 관절염, 건선, 건선 관절염, 아토피 피부염, 궤양성 대장염 및 크론병 등의 염증성 장질환, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 만성 폐색성 폐질환(COPD), 패혈증, 내독소 쇼크, 간염 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염증 관련 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [15] 일 측면에서 본 발명은 또한 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [16] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 티지에프-베타 신호전달 억제에 의하여 신체 기관 섬유증 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [17] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 암, 항암제 투여 및 방사선 노출로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것에 의해 유도되는 섬유증을 예방 및 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [18] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 췌장암, 대장암, 위암, 전립선암, 비소세포폐암, 유방암, 흑색종 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택되는 암세포 조직의 섬유증을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [19] 일 측면에서 본 발명은 또한 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 상처 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [20] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 상처 치료 또는 개선용 조성물은 콜라겐 합성 유도에 의하여 창상 치유 효능을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [21] 일 측면에서 본 발명에 따른 상기 상처 치료 또는 개선용 조성물은 피부 주름, 피부 마름, 흉터, 피부 패임, 표피 화상, 표피 열상, 표피 창상 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 피부 질환 또는 악화의 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.
- [22] 본 발명의 일실시예에서 조성물은, 상기 하나 이상의 펩티드, 또는 그의 염을 포함하는 피부상태 개선용 조성물일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 피부 상태는 피부 노화에 따른 피부 주름, 피부 마름, 탄력 저하 및 피부 패임 중 어느 하나 이상일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일실시예에서 조성물은, 상기 하나 이상의 펩티드, 또는 그의 염을 포함하는 항암 조성물일 수 있다.
- [24] 일 측면에서 본 발명은 또한 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 조성물; 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증

중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 항염, 항섬유화, 항암, 상처 치유 및 피부상태 개선 중 어느 하나 이상의 효능을 위하여 사용되는 키트를 제공한다.

- [25] 일 측면에서 본 발명은 또한 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 조성물을 항염, 항섬유화, 항암, 상처 치유 및 피부상태 개선 중 어느 하나 이상의 효과를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 염증, 섬유증, 암, 또는 상처의 개선, 예방 또는 치료 방법, 또는 피부상태 개선 방법을 제공한다.
- [26] 일 측면에서, 본 발명은 상기 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염의 신규한 용도를 제공한다. 일 실시예에서, 상기 용도는 염증, 섬유증, 암 또는 창상의 개선, 예방 및 치료일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 용도는 피부상태 개선용일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 피부 상태는 피부 노화에 따른 피부 주름, 피부 마름, 탄력 저하 및 피부 패임 중 어느 하나 이상일 수 있다. 예컨대, 화장품 조성물로서의 용도일 수 있다.
- [27] 일 측면에서, 본 발명은 염증, 섬유증, 암 또는 창상의 개선, 예방 또는 치료용 펩티드 또는 그 염일 수 있다.

[28]

발명의 효과

- [29] 일 측면에서 본 발명에 따른 서열번호 1의 서열을 포함하는 펩티드들 또는 그 단편인 펩티드들은 항염, 항섬유화, 창상 치유 및 항암 효능을 가져, 염증, 섬유화, 창상 및 암 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공할 것으로 예상된다.

[30]

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 LPS처리된 THP-1 세포주에 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 각 농도별(1, 5, 10 μ M)로 처리한 뒤 TNF- α 의 mRNA 발현량을 RT-qPCR을 통하여 측정한 뒤 이를 억제 비율로 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 2는 LPS로 염증이 유도된 THP-1 세포주에 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 각각 농도별(0.05, 0.5, 5 μ M)로 투여한 군과 아무것도 처리하지 않은 대조군 및 에스트라디올(E2)을 처리한 양성 대조군으로 나누어 처리한 뒤 TNF- α 의 양을 ELISA를 통하여 측정한 뒤 이를 나타낸 그래프이다.
- [33] 도 3은 HepG2 세포주에 아무것도 처리하지 않는 대조군, TGF- β 만 처리한 섬유증 대조군, TGF- β 및 SB43152를 처리한 양성대조군, 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 각각 농도별(1 및 10 μ M)로 처리한 군으로 나누어 처리한 뒤 섬유증 마커인 phosphor-Smad 2/3, Smad 2/3과 참조 유전자 GAPDH의 발현을 웨스턴블로팅 및 이미지 분석기를 통하여 측정한 뒤 이를 나타낸 사진(상단) 및 그래프(하단)이다.

- [34] 도 4는 SD 랫에 창상을 유도한 창상 유도 동물모델에 창상 직후 및 2일 간격으로 신규 펩티드를 100 μ g/ml 농도로 50 μ l씩 매회 처리하고 직후(0 day) 및 1, 3, 5, 7, 10, 11마다 창상의 면적을 아무 처리도 하지 않은 대조군과 함께 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 5는 SD 랫에 창상을 유도한 창상 유도 동물모델에 창상 직후 및 2일 간격으로 신규 펩티드를 100 μ g/ml 농도로 50 μ l씩 매회 처리한 실험군과 아무것도 처리하지 않은 대조군에서 3일차와 5일차에 각각 2마리씩 생검을 실시하여 조직을 매송-트릭롬(masson trichrome) 염색하여 콜라겐 생성 정도를 평균 형광 강도로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37]

- [38] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

- [39] 본 발명의 일 측면에서, 서열 번호 1의 서열 (ALTSKLRG)을 포함하거나 그 단편인 신규 펩티드를 개시한다. 일 구현예에서 서열 번호 1의 서열 (ALTSKLRG)로 구성되는 신규 펩티드를 개시한다. 서열번호 1 서열의 분자량은 844.51이다.

- [40] 본 명세서에 개시된 펩티드는, 서열번호 1을 포함하거나 그 단편인 펩티드들과 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산이 변화된 펩티드를 포함할 수 있다.

- [41] 본 발명의 일 측면에서, 아미노산 변화는 펩티드의 물리화학적 특성이 변경되도록 하는 성질에 속한다. 예를 들어, 펩티드의 열안정성을 향상시키고, 기질 특이성을 변경시키고, 최적의 pH를 변화시키는 등의 아미노산 변화가 수행될 수 있다.

- [42] 본 명세서에서 "아미노산"이라 함은 자연적으로 펩티드로 통합되는 22개의 표준 아미노산들 뿐만 아니라 D-아이소머 및 변형된 아미노산들을 포함한다. 이에 따라, 본 발명의 일 측면에서 펩티드는 D-아미노산을 포함하는 펩티드일 수 있다. 한편, 본 발명의 다른 측면에서 펩티드는 번역 후 변형(post-translational modification)된 비표준 아미노산 등을 포함할 수 있다. 번역 후 변형의 예는 인산화(phosphorylation), 당화(glycosylation), 아실화(acylation) (예컨대, 아세틸화(acetylation), 미리스토일화(myristoylation) 및

팔미토일화(palmitoylation)를 포함), 알킬화(alkylation), 카르복실화(carboxylation), 히드록실화(hydroxylation), 당화반응(glycation), 비오틴닐화 (biotinylation), 유비퀴티닐화 (ubiquitinylation), 화학적 성질의 변화(예컨대, 베타-제거 탈아미드화, 탈아미드화) 및 구조적 변화(예컨대, 이황화물 브릿지의 형성)를 포함한다. 또한, 펩티드 컨쥬게이트를 형성하기 위한 가교제(crosslinker)들과의 결합과정에서 일어나는 화학 반응들에 의해 생기는 아미노산의 변화, 예컨대 아미노기, 카르복시기 또는 사이드 체인에서의 변화와 같은 아미노산의 변화를 포함한다.

- [43] 본 명세서에 개시된 펩티드는 자연 그대로의 공급원으로부터 동정 및 분리된 야생형 펩티드일 수 있다. 한편, 본 명세서에 개시된 펩티드는 서열번호 1의 단편들인 펩티드와 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 및/또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는, 인공 변이체일 수 있다. 인공 변이체에서 뿐만 아니라 야생형 폴리펩티드에서의 아미노산 변화는 단백질의 폴딩(folding) 및/또는 활성에 유의한 영향을 미치지 않는 보존성 아미노산 치환을 포함한다. 보존성 치환의 예들은 염기성 아미노산(아르기닌, 리신 및 히스티딘), 산성 아미노산(글루탐산 및 아스파르트산), 극성 아미노산(글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산(루신, 이소로이신, 발린 및 메티오닌), 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 작은 아미노산(글리신, 알라닌, 세린 및 트레오닌)의 군의 범위 내에 있다. 일반적으로 특이적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환이 본 분야에 공지되어 있다. 가장 흔하게 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 및 Asp/Gly, 그리고 이들과 반대인 것들이다. 보존적 치환의 다른 예는 다음 표와 같다.

[44] [표1]

원래 아미노산	예시적인 잔기 치환	바람직한 잔기 치환
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; ile ; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe ; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

[45] 펩티드의 생물학적 특성에 있어서의 실제적인 변형은 (a) 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 시트 또는 나선 입체 구조를 유지하는데 있어서의 이들의 효과, (b) 표적 부위에서의 상기 분자의 전하 또는 소수성을 유지하는데 있어서의 이들의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 있어서의 이들의 효과가 상당히 상이한 치환부를 선택함으로써 수행된다. 천연 잔기는 통상의 측쇄 특성에 기준하여 다음 그룹으로 구분된다:

[46]

[47] (1) 소수성: 노르루이신, met, ala, val, leu, ile;

[48] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

- [49] (3) 산성: asp, glu;
- [50] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- [51] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및
- [52] (6) 방향족: trp, tyr, phe.
- [53] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또다른 부류로 교환함으로써 이루어질 것이다. 펩티드의 적당한 입체 구조를 유지하는 것과 관련이 없는 어떠한 시스테인 잔기도 일반적으로 세린으로 치환되어 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 이상한 가교결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합(들)을 상기 펩티드에 가하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다
- [54] 펩티드의 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변화된 것이다. 변화란 의미는 펩티드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실 및(또는) 펩티드 내에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 나타낸다.
- [55] 펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. N-연결된이란 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써, 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.
- [56] 펩티드로의 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기 언급된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변화시킴으로써 편리하게 수행된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 이러한 변화는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 최초 항체의 서열에 부가하거나 이들 잔기로 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [57] 또한 본 발명의 일 측면에 따른 서열 번호 1의 펩티드는 세포 내 독성이 낮고, 생체 내 안정성이 높다는 장점을 가진다. 본 발명의 일 측면에서는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 하나 이상 유효 성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [58] 본 발명의 일 측면에 따른 염증, 섬유화, 창상 및 암 관련 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 일 측면에서는 서열번호 1을 포함하는 펩티드 또는 그 단편인 펩티드를 0.01mg/mL 내지 0.1mg/mL, 1mg/mL, 10mg/mL, 및 100mg/mL의 함량으로 포함할 수 있으나 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 상기 범위 또는 그 이하의 범위로 포함하는 경우 본 발명의

의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다.

- [59] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물은 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.
- [61] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡슐제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 겔, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [62] 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [63] 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 100 g/kg/일 , 구체적으로는 10 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10 g/kg/일 , 더 구체적으로는 100 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 1 g/kg/일 , 보다 더 구체적으로는 500 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 100 mg/kg/일 이 될 수 있으나, 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [65] 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드를 포함하는 조성물은 류마티스 관절염, 건선, 건선 관절염, 아토피 피부염, 궤양성 대장염 및 크론병 등의 염증성 장질환, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 만성 폐색성 폐질환(COPD), 폐혈증, 내독소 쇼크, 간염 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염증 관련 질환을 예방 또는 치료하는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [66] 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드를 포함하는 조성물은 암, 항암제 투여 및 방사선 노출로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것에 의해 유도되는 섬유증을 예방 및 치료하는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

- [67] 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드를 포함하는 섬유증 예방 및 치료용 약학적 조성물은 췌장암, 대장암, 위암, 전립선암, 비소세포폐암, 유방암, 흑색종 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택되는 암세포 조직의 섬유증을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [68] 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드를 포함하는 조성물은 피부 주름, 피부 마름, 피부 패임, 표피 화상, 표피 열상, 표피 창상 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 피부 질환 또는 악화의 예방 또는 치료 및 개선을 위한 약학적 조성물로 효과를 나타내며 사용될 수 있다.
- [69] 본 발명의 일 측면은 상기 펩티드 또는 그 염을 포함하는 화장품 조성물을 제공한다. 상기 화장품 조성물은 화장품학 또는 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소 적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽, 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 멀티 에멀전, 현탁액, 마이크로 에멀전, 마이크로 캡슐, 미세 과립구, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제, 포말(foam), 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 또는 패치 형태로 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [70] 상기 화장품 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유하는 것도 무방하며, 본 발명의 유효 성분 이외에 다른 성분을 기타 화장품 조성물의 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 화장품 조성물은 상기 유효 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품 조성물에 배합되는 다른 성분을 포함할 수 있고, 이의 예로서 유지 성분, 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 안정화제, 증점제, 글리세린, pH 조절제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다. 상기 화장품 조성물에 포함될 수 있는 기타 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니고, 또한 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 가능하다.
- [71] 상기 화장품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 비누형 제제, 유연 화장수, 영양 화장수, 에센스, 영양 크림, 마사지 크림, 팩, 젤, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 립스틱, 패치, 분무제, 아이 크림, 아이 에센스, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌저, 모발 샴푸, 모발 컨디셔닝, 모발 트리트먼트, 모발 에센스, 모발 로션, 두피 헤어토닉, 두피 에센스, 헤어젤, 헤어 스프레이, 헤어팩, 바디 로션, 바디 크림, 바디 오일 및 바디 에센스로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [72] 본 명세서에 따른 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 드링크제와 같은 액제, 캐러멜, 젤, 바 등으로 제형화될 수

있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

- [73] 본 명세서에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [74] 본 명세서에 따른 식품 조성물은, 예를 들어, 츄잉껌, 캐러멜 제품, 캔디류, 빙과류, 과자류 등의 각종 식품류, 청량 음료, 미네랄 워터, 알코올 음료 등의 음료 제품, 비타민이나 미네랄 등을 포함한 건강기능성 식품류일 수 있다.
- [75] 상기 외에 본 발명의 일 측면인 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 기능성 식품 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 포함되는 것이 일반적이다.
- [76] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).
- [77] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.
- [78] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시예 필수적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술

분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

- [79] 본 발명의 바람직한 구체예들은 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하길 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명이 실시되기를 기대한다. 따라서, 본 발명은, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.

[80]

발명의 실시를 위한 형태

[81]

- [82] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[83]

- [84] 실시예 1: 신규 펩티드의 합성

[85]

- [86] 서열번호 1의 신규 펩티드를 종래에 알려진 고상 펩티드 합성법에 따라 제조하였다. 구체적으로, 펩티드들은 ASP48S(Pepton, Inc., 대한민국 대전)를 이용하여 Fmoc 고상 합성법(solid phase peptide synthesis, SPPS)을 통해 C-말단부터 아미노산 하나씩 커플링함으로써 합성하였다. 다음과 같이, 펩티드들의 C-말단의 첫번째 아미노산이 수지에 부착된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

- [87] $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$

- [88] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-chloro-Trityl Resin}$

- [89] $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-chloro-Trityl Resin}$

[90]

- [91] 펩티드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-term이 Fmoc으로 보호(Protection)되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, t-Bu (t-butylester), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl) 등으로 보호된 것을

사용하였다. 예컨대 다음과 같다:

- [92] Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Gln-OH, Trt-Mercaptoacetic acid.
- [93] 커플링 시약(Coupling reagent)으로는 HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] /NMM [4-Methylmorpholine] 를 사용하였다. Fmoc 제거는 20%의 DMF 중 피페리딘(piperidine in DMF)을 이용하였다. 합성된 펩티드를 Resin에서 분리 및 잔기의 보호기 제거에는 절단 콕테일(Cleavage Cocktail) [TFA (trifluoroacetic acid) /TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5] 를 사용하였다.
- [94] 아미노산 보호기가 결합된 출발 아미노산이 고상 지지체에 결합되어 있는 상태를 이용하여 여기에 해당 아미노산들을 각각 반응시키고 용매로 세척한 후 탈보호하는 과정을 반복함으로써 각 펩티드를 합성하였다. 합성된 펩티드를 수지로부터 끊어낸 후 HPLC로 정제하고, 합성 성공여부를 LC/MS로 확인하고 동결 건조하였다.
- [95] 본 실시예에 사용된 펩티드에 대해 고성능 액체 크로마토그래피 결과, 모든 펩티드의 순도는 95% 이상이였다.
- [96] 상기 방법과 동일한 방법으로 양성 대조군 펩티드로서 ALTSKLRA (서열번호 2)를 제조하였다.
- [97]
- [98]
- [99] 실시예 2: 신규 펩티드의 항염 활성
- [100]
- [101] 신규 펩티드의 항염 활성을 검증하기 위하여, LPS(Lipopolysaccharide)로 염증을 유도한 세포주에서 염증 활성을 나타내는 사이토카인으로 알려진 TNF- α 의 발현 정도를 RT-qPCR과 ELISA방법을 사용하여 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)에 대해 각각 측정하였다.
- [102]
- [103] 실험 시약 및 재료 준비
- [104] 인간 급성 단핵구성 백혈병 (Human acute monocytic leukemia) 세포주인 THP-1 세포(American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다. THP-1을 96 웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 셀이 되도록 RPMI 1640 배지에 부유시켜 24시간 동안 배양시켰다. 이 때 대식세포(macrophage)로의 분화를 위해 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma)를 처리하였다.

[105] 리포폴리사카라이드 (LPS, Sigma)는 PBS(Phosphate buffered saline)로 녹여 사용하였고, PMA는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였다.

[106] 펩티드는 실시예 1에서의 합성법에 따라 Peptron(대한민국 대전)에서 합성하여 사용하였다.

[107]

[108] 실험 방법

[109] RT-qPCR 시험방법은 다음을 따랐다. THP-1 세포들을 6-웰 플레이트에 2×10^6 /웰로 플레이트링 한 후에 100 ng/ml 농도 PMA를 24시간 처리하여 Macrophage로 분화시켰다. Media를 제거하고 분화한 THP-1 세포들을 SFM(serum-free media)으로 2번 세척한 후, 10 ng/ml LPS와 1, 5, 10 μ M 농도별로 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 각각 처리하여 6시간 배양하였다. RNeasy® Plus Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 RNA를 추출하고, 추출한 RNA를 정량한 후에 Reverse Transcription system(Promega)를 사용하여 cDNA 합성을 실시하였다. CFX96-Real-Time System(Bio-rad)를 이용하여 RT-qPCR를 실시하여, TNF- α 의 mRNA 발현을 분석하였으며, 참조 유전자(Reference gene)로 GAPDH를 사용하였다. PCR조건은 40 사이클 (95 에서 15초, 55 에서 30초, 72 에서 30초)이며 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 3과 같다

[110]

[111] [표3]

Gene	Forward Sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
TNF- α	CTATCTGGGAGGGGTCTTCC (서열번호 3)	ATGTTCGTCCTGCTCACAG (서열번호 4)
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT (서열번호 5)	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA (서열번호 6)

[112] ELISA 시험방법은 다음을 따랐다. ATCC에서 분양받은 단핵(monocyte) 세포주인 THP-1를 계대배양하여 P3 단계로 준비하고, 세포주를 well-plate에 분주하고 PMA를 처리하여 macrophage로 분화시킨다. 분화된 세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도(TNF-alpha 생성을 유도)하고, 위의 세포에 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 농도별(0.05, 0.5, 5 μ M)로 처리하여 TNF- α 의 양을 ELISA로 측정하였다. 무염증 군과 완전 염증군에 대한 상대값을 산정하였고, 에스트로젠(E2) 양성 대조군으로, 일반 대조군으로 신규펩티드를 처리하지 않은 무처리 세포주를 설정하여 비교하였다. E2는 THP-1에서 TNF- α 의 생성을 억제하는 스테로이드로 알려져 있다.

[113] 통계 처리

- [114] 모든 데이터는 평균±표준오차(mean±S.E.M.)로 나타내었으며, 통계처리는 ANOVA 검정에 의해 실시하였다. SigmaStat 통계 프로그램을 사용하였으며 통계학적 분석은 크루스칼 월리스 검정(Kruskal-Wallis test) 및 만-휘트니 U-검정(Mann-Whitney U-test)를 이용하여 분석하였다. 또한 각 군간의 비교는 사후 검정(Tukey test)법을 시행하여 p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.
- [115]
- [116] **실험 결과 및 분석**
- [117] 상기 실험 방법을 통하여 측정된 결과는 아래와 같다.
- [118] RT-qPCR을 통하여, LPS로 THP-1 세포에서 LPS유도 염증반응을 일으킨 것 대비 펩티드를 각각의 농도(1, 5, 10 μ M)별로 처리했을 때 TNF- α 의 mRNA 발현량을 통해 각 펩티드의 항염활성을 나타내주는 TNF- α 의 mRNA 억제율을 비교한 결과, 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG)은 모든 농도에서 우수한 TNF- α 유전자 발현 저해 효과를 보였으며, 그 중에서도 1 μ M 및 5 μ M에서는 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)에 비해 우수한 효과를 나타내었고, 특히 가장 낮은 농도인 1 μ M에서는 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)에 비해 월등히 우수한 항염활성을 나타내었다(도 1 참조).
- [119] ELISA를 통하여 신규펩티드들의 항염 활성을 THP-1 세포의 TNF- α 생성 억제능으로 확인한 결과, 서열번호 1의 펩티드는 모든 농도에서 TNF- α 생성 억제 효과를 나타내었다. 특히, 양성 대조군인 E2와 서열번호 2 (ALTSKLRA)에 비해 우수한 효과를 나타내었다(도 2 참조).
- [120] 상기 2개의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 신규 펩티드는 TNF- α 의 억제로 나타나는 항염 활성을 보이는 것을 알 수 있다. TNF- α 의 억제에 대한 실험은 전체 염증 억제 효과 입증에 가장 기초적인 실험으로 알려져 있으며, 이를 통하여 본 발명의 신규 펩티드는 전반적인 항염 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.
- [121]
- [122] **실시예 3: 신규 펩티드의 항섬유화 활성**
- [123]
- [124] 섬유화증의 주요원인으로 여겨지는 TGF- β 억제 효능을 확인하기 위하여, HepG2 세포주에서 TGF- β 신호전달(signaling) 억제작용을 확인하는 실험을 아래와 같이 실시하였다.
- [125]
- [126] **실험 시약 및 재료 준비**
- [127] 본 실험을 위하여 사용한 시약 및 재료는 다음과 같다. 파우더 상태의 신규 펩티드들은 0.2 μ m 필터에 여과된 증류수(0.2 μ m filtered sterile water)에 녹인 후 -70°C에 분주(aliquot)하여 보관하고, 사용시 이를 녹여 사용하였다. 세포주는 HepG2 (ATCC HB-8065; American Type Culture Collection)를 사용하였고, 제조합

human TGF- β 을 4mM HCl에 녹여 10 μ g/mL stock으로 제조하여 사용하였다. 실험군으로서 신규 펩티드인 서열번호 1 (ALTSKLRG) 및 양성 대조군 펩티드로서 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 상기 실시예 1에 따라 준비하였다. 또한, 양성 대조군으로 사용하는 SB431542 (Sigma)는 10 mM stock으로 제조하여 사용하였다.

[128]

[129] 세포주 준비

[130] 60mm 페트리디쉬(petri-dish)에 2x10⁶ 개의 HepG2 세포들 (ATCC HB-8065;)을 파종(seeding)한 후, 16시간 CO₂ 배양기에서 배양한다. 그 후, SFM (무혈청 배지)로 배지를 교환하고 추가로 24 시간을 배양한다. 그 후, 10 ng/ml 농도의 TGF- β 1으로 배지를 교환하고 추가로 펩티드들을 농도 별로(1, 10 μ M) 함께 처리하여 72시간 동안 배양한다. 각 펩티드 처리군들은 추가로 37°C에서 1시간 CO₂배양기에 배양한다.

[131]

[132] 실험 방법

[133] 신규 펩티드의 항섬유화 활성을 측정하기 위하여, TGF- β 신호전달 억제 정도를 측정하기 위한 실험은 웨스턴 블로팅(Western Blotting)을 사용하였으며, 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[134]

펩티드 처리한 세포들을 PBS로 2번 세척한 후, 세포 수거기(cell scraper)로 1.5 mL EP 튜브에 모아, 원심분리기 (1,000rpm, 4°C, 2분)로 상층액 제거 후 RIPA 된 HepG2 세포에 100 μ L씩 가한다. 40분간 얼음에서 배양(incubation)한 후 10분마다 흔들어 섞고(vortex, micro-centrifuge를 미리 4°C냉각) 1ml 주사기를 사용해서 시료를 40-50번 섞는다. 마지막으로 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 사용한다.

[135]

30 μ g의 단백질을 8% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하여 PVDF 막 (polyvinylidene difluoride membranes, Millipore)으로 전이시킨다(transfer). PVDF막을 5% 탈지우유(skim milk)로 블로킹(blocking)하고 특정한 프라이머리 항체(primary antibodies)와 배양한다. 이 실험에 사용된 항체는 다음과 같다. Smad 2/3 (60, 52 kDa, 5% BSA 1:1000, #3102, Cell signaling), pSmad2/3 (cell signaling #3102), GAPDH (37 kDa, 5% BSA 1:1000, #2118, Cell signaling). 이어서 PVDF막을 TBST (Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20)로 세척 후, HRP-접합 항-토끼 항체(HRP-conjugated anti-rabbit antibody, Jackson Immuno Research Laboratories, INC.)와 반응시킨다. 그 후, ECL 검출(detection, Amersham Pharmacia Biotech)을 수행하고, 얻어진 이미지는 이미지 분석기(GE Healthcare, ImageQuant LAS 4000)로 분석하였다.

[136]

TGF- β 억제능을 측정하기 위하여 TGF- β 신호전달 활성 마커들로 pSmad2/3 Smad2/3 이 사용되었고, 전기영동시 참조군으로서 GAPDH가 사용되었다. 상기 TGF- β 신호전달 활성 마커들은 TGF- β 가 억제될수록 높은 농도로 발현이 되는

것들을 사용하였다.

[137]

[138] 통계 처리

[139] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ S.E.M.)로 나타내었으며, 통계처리는 ANOVA 검정에 의해 실시하였다. SigmaStat 통계 프로그램을 사용하였으며 통계학적 분석은 크루스칼 월리스 검정(Kruskal-Wallis test) 및 만-휘트니 U-검정(Mann-Whitney U-test)를 이용하여 분석하였다. 또한 각 군간의 비교는 사후 검정(Tukey test)법을 시행하여 p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

[140]

[141] 실험 결과 및 분석

[142] 상기 실험 방법을 통하여 측정된 결과는 아래와 같다.

[143] 웨스턴 블로팅 방법을 통하여, 신규 펩티드의 TGF- β 의 억제 정도를 측정 한 결과, 섬유화 유도 TGF- β 만 처리된 무처리군(Untreat)에 비하여 TGF- β 가 억제될수록 높게 나타나는 마커들의 발현이 높게 나타난 것을 볼 수 있었다(도 3 참조). 이는 신규 펩티드의 처리로 TGF- β 가 억제되었음을 나타내는 결과라 할 수 있다. 또한 양성 대조군인 SB431542 및 양성 대조군 펩티드인 서열번호 2 (ALTSKLRA)를 처리한 것과 비교하였을 때 pSmad2/3 발현량이 현저히 높았다. 이를 통해 서열번호 1의 펩티드가 더 높은 TGF- β 억제 활성을 보이는 것을 알 수 있었다.

[144]

[145] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 신규 펩티드는 TGF- β 의 억제로 나타나는 항섬유증 활성을 보이는 것을 알 수 있다. TGF- β 의 억제에 대한 실험은 항섬유증 활성 실험 중 널리 사용되는 실험으로 알려져 있으며, 이를 통하여 본 발명의 신규 펩티드들은 항섬유증 활성 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

[146]

[147] 실시예 4: 신규 펩티드의 창상 치유 활성

[148]

[149] 신규 펩티드의 상처치유 효능을 확인하기 위하여, 창상 유도 동물모델에 신규 펩티드들을 처리한 뒤 창상크기 감소 및 치유 과정에 필요한 콜라겐 생성 효능을 확인하는 실험을 아래와 같이 실시하였다.

[150]

[151] 실험 동물 준비

[152] 생쥐의 경우 피부가 얇고 일정하게 창상을 만들기 어려우므로 SD랫(Sprague-Dawley Rat)을 선택하였다. 호르몬의 변화에 의한 영향을 배제하기 위하여 수컷을 선택하였으며 6주령을 입고하여 약 1주일간 순응기간을 거쳤으나, 실험 결과를 좀더 세밀하게 도출하기 위하여 11주령까지

기다려 실험을 실시하였다. 실험동물이 후각에 예민하여 타 개체에 위해를 가할 수 있으므로 창상을 만든 후부터 각 개체를 분리하여 우리 당 1마리씩 사육하며 관찰하였다.

[153]

[154] 실험 방법

[155] 준비된 실험동물에 전층 창상(full-thickness excision)을 형성하기 위하여 하기와 같은 방법을 따랐다. 마취를 유도하기 위해 실험 동물 몸무게 kg 당 10 mg의 염산 자일라진(xylazine-HCl)과 kg당 100 mg의 염산 케타민(ketamine HCl)을 혼합하여 쥐의 복강 내에 주사하거나 호흡마취기를 사용하였다. 마취가 유도된 뒤 엎드린 자세에서 실험동물의 등에 난 털을 깨끗이 면도하고 베타딘(betadine)으로 소독한 후 16 mm 펀치를 이용하여 등의 가장 높은 부위에서 좌우측으로 각각 약 1 cm 떨어진 지점에 1개씩 원형의 전층 창상을 만들었다. 창상 부위에 별도의 드레싱은 시행하지 않았다.

[156] 전층 창상이 유도된 동물 모델을 하기와 같이 군을 나누고 약물을 창상 형성 직후 및 이틀 간격으로 도포처리 하였다. 도포 방법은 물질을 1 mg/ml의 농도로 만든 후 실험직전 100 µg/ml로 10배 희석하여 사용하였다. 도포는 창상마다 50 µl를 점적하였다.

[157] 1) 대조군: 창상 1개당 생리식염수 50µl를 점적

[158] 2) 실험군 1: 0.1 mg/ml 의 서열번호 1 펩티드를 창상 1개당 50µl씩 점적

[159]

[160] 창상 형성 직후 및 창상 후 2, 4, 7, 9, 11, 14일째에 관찰하고 촬영하였다. 상처가 완전히 아물었을 경우 아문 날짜를 기입하였다. 통상적으로 약 9일째에 최소 상처의 5% 수준까지 줄어드는 개체가 나오기 시작하였다. 상처 부위를 자와 함께 촬영한 후 촬영한 이미지를 Image J program (NIH, USA)로 분석하여 상처 면적을 산출하여 비교하였다.

[161]

[162] 콜라겐 형성을 위한 생검은 창상 후 3일째와 5일째 각각 대조군 중 2마리와 실험군 중 2마리를 희생시켜 등 양쪽의 창상부위를 채취하여 실행하였다. 콜라겐 합성여부를 비교하기 위하여 매송-트릭롬(masson trichrome)염색을 시행한 뒤 평균적인 형광 강도(intensity)를 측정된 값을 얻었다.

[163]

[164] 실험 결과 및 분석

[165] 실험군을 대조군과 비교하였을 때, 전층 창상 유도 후 1일째에 창상 크기가 대조군 보다 작게 나타났다(도 4 참조). 대조군과 실험군 모두 11일차까지 관찰하면 창상의 크기 차이가 크지 않고 치유되어 가지만, 창상 발생 후 초기에 실험군에서 창상이 대조군에 비해 줄어드는 것은 신규 펩티드가 창상 발생 초기에 효과를 나타냄을 나타내는 증거라 할 수 있다.

[166] 또한 창상 유도 후 콜라겐 형성을 관찰한 결과에서, 대조군 및 실험군의 콜라겐

발생 평균 형광 강도를 측정한 결과 모든 실험군이 대조군과 비교하였을 때 높게 나타났다(도 5 참조). 이는 신규 펩티드가 창상 부위의 치유가 이루어질 때 필수적인 콜라겐 형성을 촉진함을 나타내는 것이라 볼 수 있다.

[167]

[168] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 신규 펩티드가 창상 발생 면적을 감소시키고 콜라겐 합성을 증가시키는 활성을 보이는 것을 알 수 있다. 이를 통하여 본 발명의 신규 펩티드는 창상 치유 활성 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

[169]

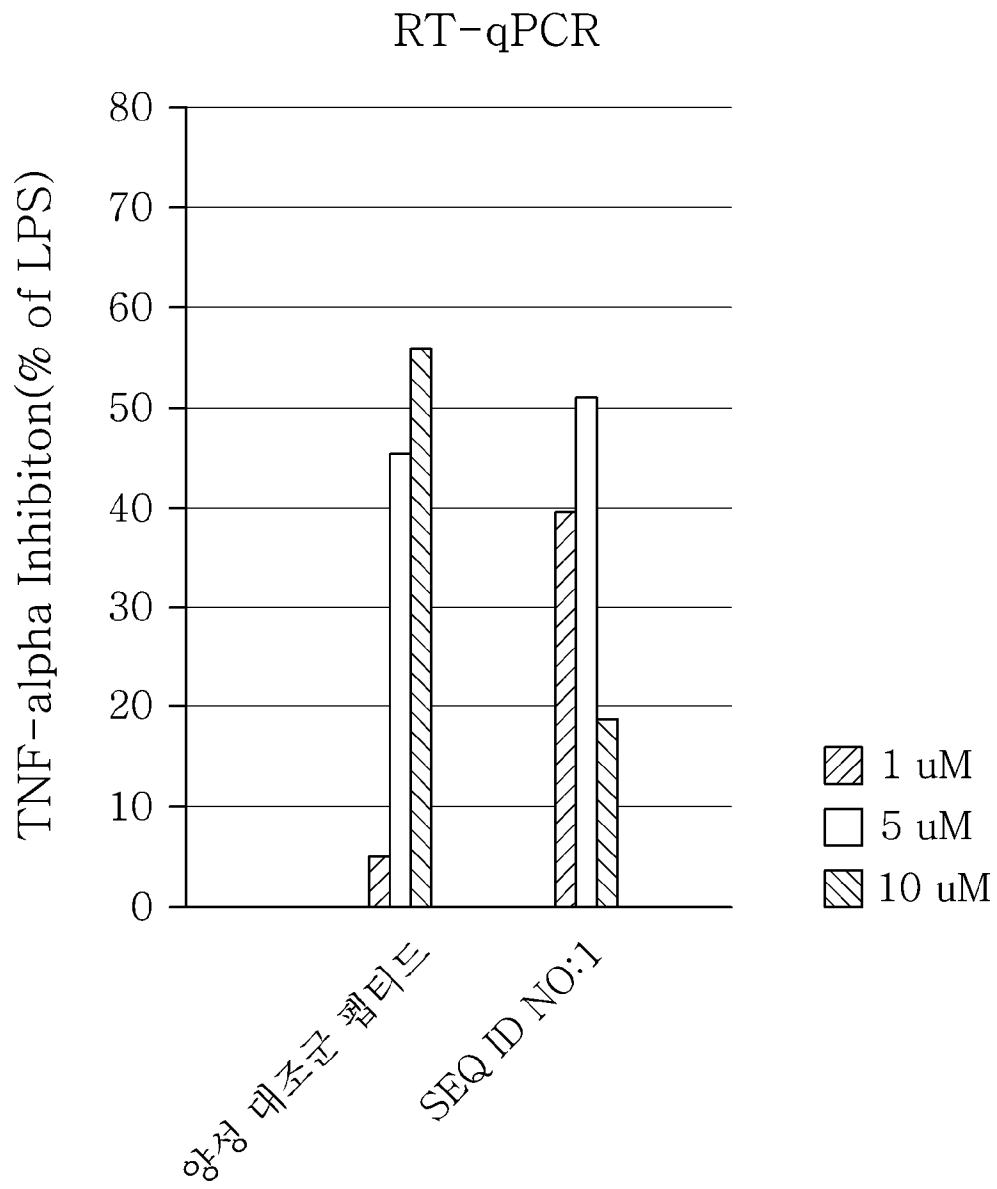
[170] 상기 실험 예들의 결과를 종합하여 보면, 본 발명에 따른 신규 펩티드들이 항염, 항섬유화 및 창상 치유의 효과가 있음을 알 수 있으며, 이를 이용하여 염증, 섬유화증 및 창상을 예방 및 치료하는 치료제의 개발에 더하여 염증, 섬유화증을 동반하는 암과 각종 질병의 예방 및 치료제, 증상 개선제의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

청구범위

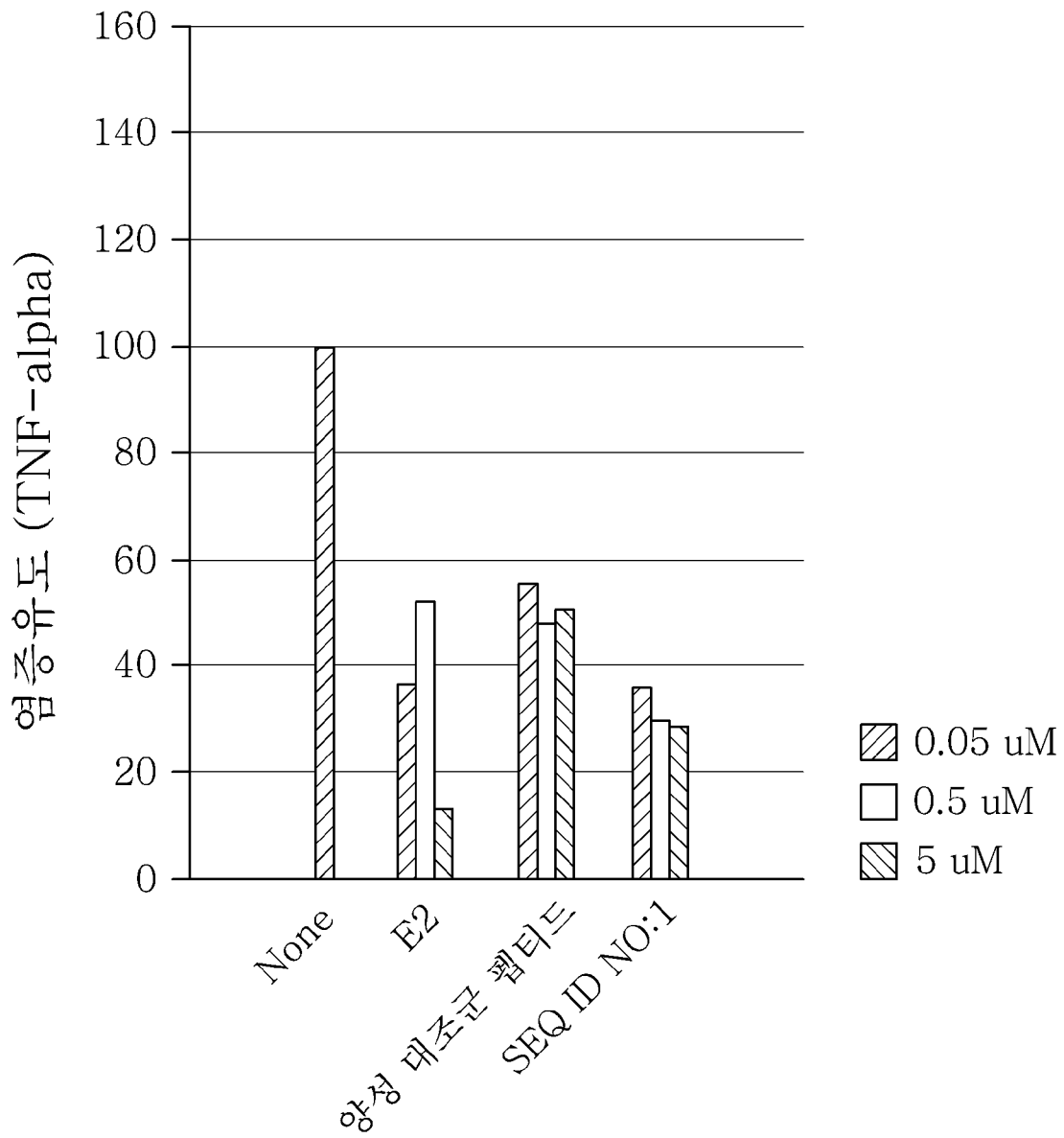
- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염.
- [청구항 2] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 항염 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 항염 활성을 가지는 조성물은 TNF- α 감소에 의하여 항염 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항염 조성물.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 항염 조성물은 류마티스 관절염, 건선, 건선 관절염, 아토피 피부염, 궤양성 대장염 및 크론병 등의 염증성 장질환, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 만성 폐색성 폐질환(COPD), 패혈증, 내독소 쇼크, 간염 및 제1형 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염증 관련 질환을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 항염 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 TGF- β 신호전달 억제에 의하여 신체 기관 섬유증 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 암, 항암제 투여 및 방사선 노출로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것에 의해 유도되는 섬유증을 예방 및 치료하는 것을 특징으로 하는 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 8] 제 5항에 있어서, 상기 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 췌장암, 대장암, 위암, 전립선암, 비소세포폐암, 유방암, 흑색종 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택되는 암세포 조직의 섬유증을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 신체 기관 섬유증 예방, 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 9] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 상처 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 상처 치료 또는 개선용 조성물은 콜라겐 합성 유도에 의하여 창상 치유 효능을 가지는 것을 특징으로 하는 상처 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 11] 제 9항에 있어서, 상기 상처 치료 또는 개선용 조성물은 표피 화상, 표피 열상, 표피 창상 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 상처를 치료 또는 개선하는 것을 특징으로 하는 상처 치료 또는 개선용 조성물.
- [청구항 12] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 피부상태 개선용 조성물.

- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 피부 상태는 피부 노화에 따른 피부 주름, 피부 마름, 흉터, 탄력 저하 및 피부 패임 중 어느 하나 이상인 피부 상태 개선용 조성물.
- [청구항 14] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 항암 조성물.
- [청구항 15] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 조성물, 또는 제 2항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 따른 조성물; 및 상기 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 횟수 및 적응증 중 하나 이상을 개시한 지시서를 포함하는 항염, 항섬유화, 항암, 상처 치유 및 피부상태 개선 중 어느 하나 이상의 효능을 위하여 사용되는 키트.
- [청구항 16] 제 1항에 따른 하나 이상의 펩티드, 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 조성물을 항염, 항섬유화, 항암, 상처 치유 및 피부 상태 개선 중 어느 하나 이상의 효과를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 염증, 섬유증 또는 암의 예방, 개선 또는 치료, 또는 상처의 치료 또는 개선, 또는 피부 상태 개선 방법.

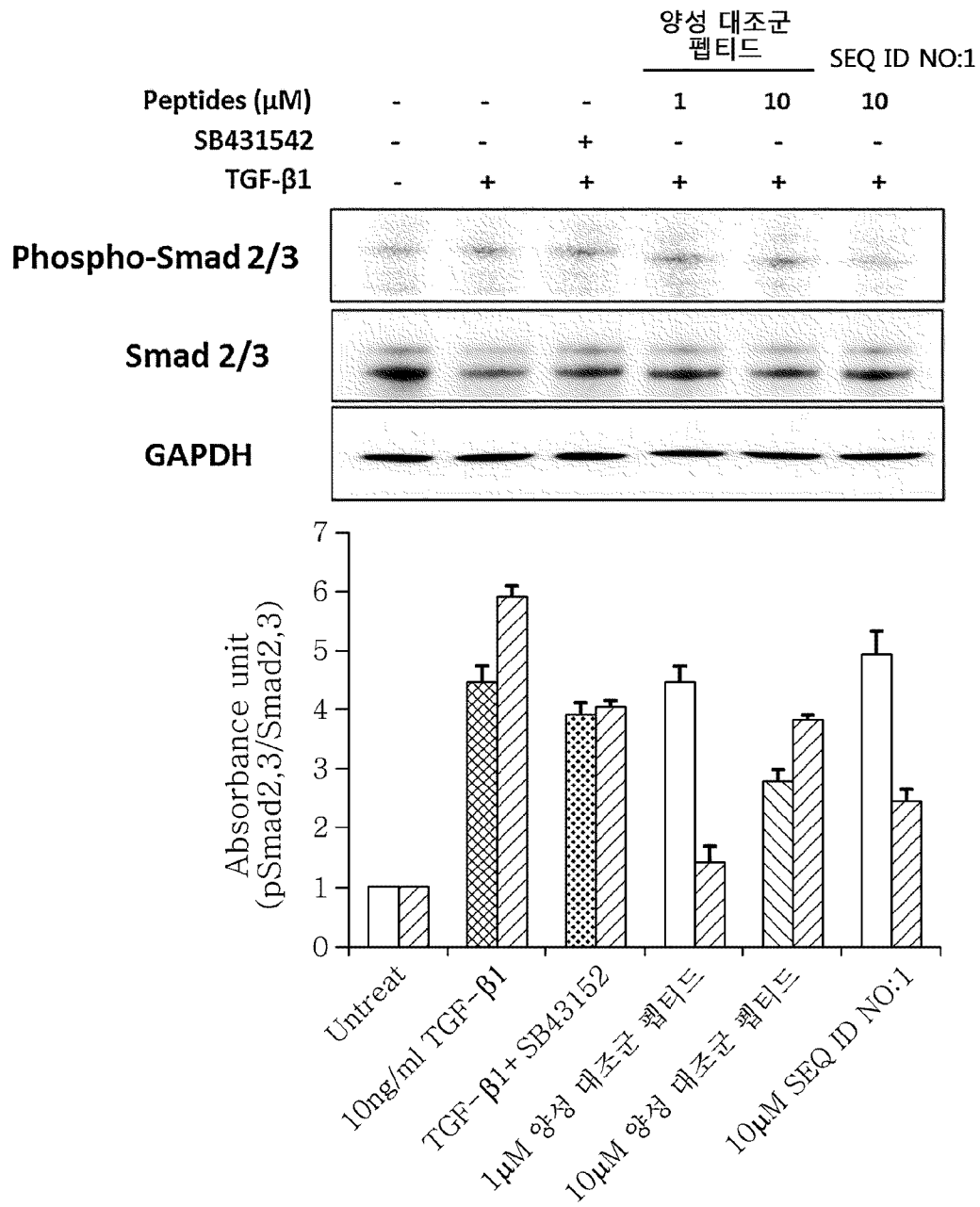
[도1]



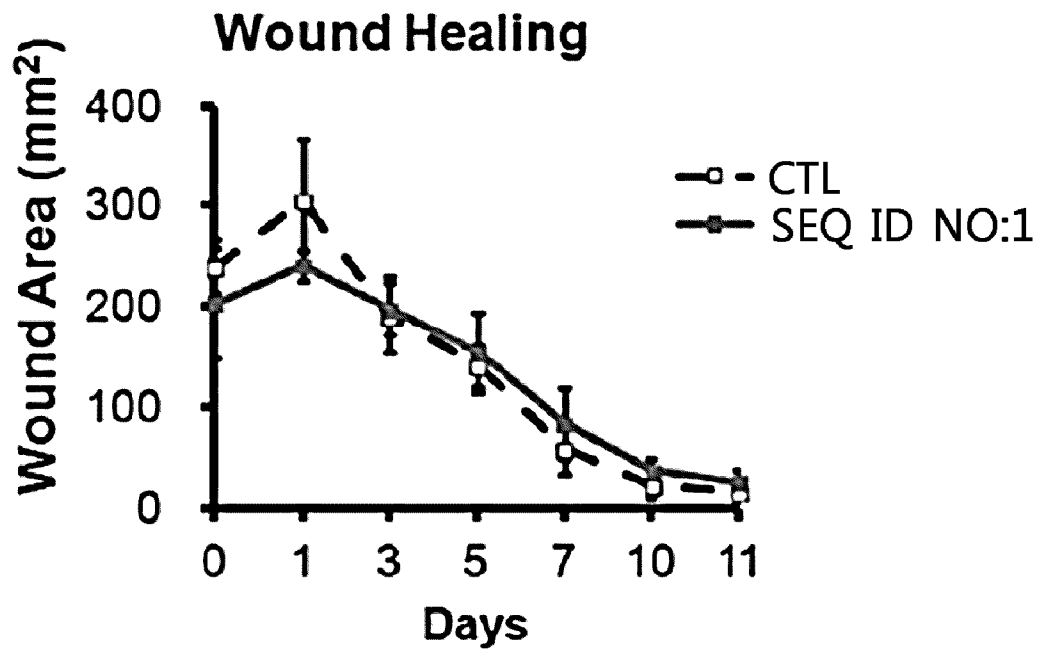
[도2]



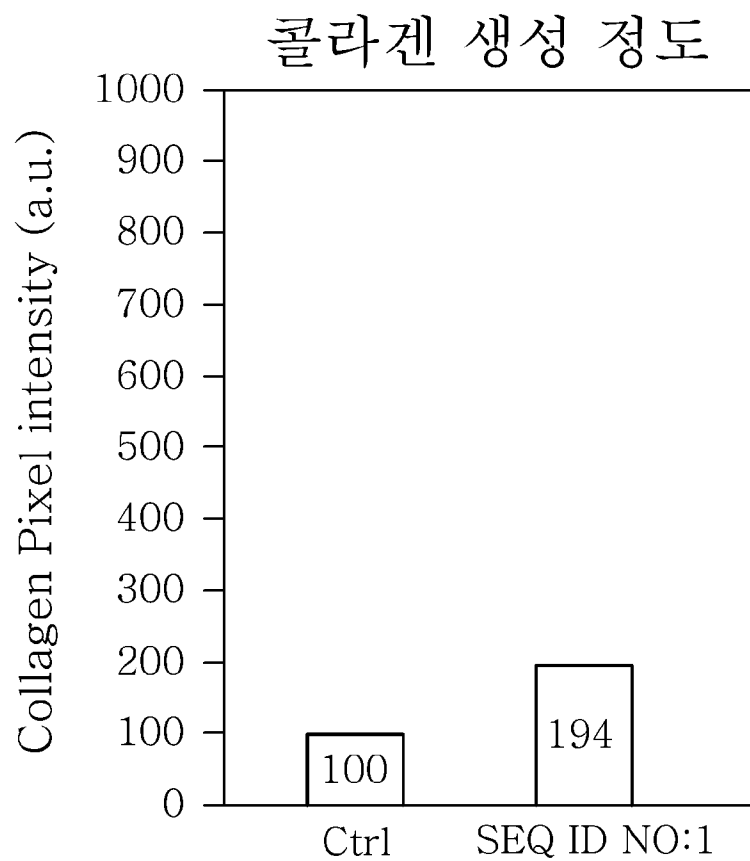
[도3]



[도4]



[도5]



Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-116138 A1	06/07/2017	KR 10-2018-0089440 A	08/08/2018
KR 10-2010-0061677 A	08/06/2010	AT 522225 T	15/09/2011
		AT 553772 T	15/05/2012
		AU 2008-297417 A1	19/03/2009
		AU 2008-297418 A1	19/03/2009
		AU 2008-297425 A1	19/03/2009
		AU 2008-297426 A1	19/03/2009
		AU 2008-297524 A1	19/03/2009
		AU 2008-297529 A1	19/03/2009
		AU 2008-297535 A1	19/03/2009
		AU 2008-297541 A1	19/03/2009
		AU 2008-297542 A1	19/03/2009
		AU 2008-297551 A1	19/03/2009
		AU 2008-297566 A1	19/03/2009
		AU 2008-297567 A1	19/03/2009
		AU 2008-297874 A1	19/03/2009
		AU 2008-297875 A1	19/03/2009
		AU 2008-297884 A1	19/03/2009
		AU 2008-297885 A1	19/03/2009
		AU 2008-297888 A1	19/03/2009
		AU 2008-297891 A1	19/03/2009
		AU 2008-297892 A1	19/03/2009
		AU 2008-297893 A1	19/03/2009
		AU 2008-297895 A1	19/03/2009
		AU 2008-297896 A1	19/03/2009
		EP 2187905 A2	26/05/2010
		EP 2187907 A2	26/05/2010
		EP 2187912 A2	26/05/2010
		EP 2187915 A2	26/05/2010
		EP 2187915 B1	31/08/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/013532**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 7/06(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)n**

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)

C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 38/07; A61K 38/17; A61K 38/00

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: peptide, inflammation, fibrosis, injury, cancer, skin, treatment, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017-116138 A1 (GEMVAX & Kael CO., LTD. et al.) 06 July 2017 See paragraphs [0014], [0027], [0028], [0047]; and table 1.	1,12,15
Y		2-11,13,14
Y	KR 10-2010-0061677 A (MONDOBIOTECH LABORATORIES AG.) 08 June 2010 See paragraphs [0007], [0027], [0046], [0048], [0055], [0068], [0069].	2-11,13,14
X	NCBI Reference Sequence: WP_058623598.1: MarR Family Transcriptional Regulator [Microbacterium testaceum] (02 November 2016) See the entire document.	1
X	GenBank: KTR94653.1: Transcriptional Regulator [Microbacterium testaceum] (22 December 2015) See the entire document.	1
A	TRAVIS, Taryn E. et al., "A Multimodal Assessment of Melanin and Melanocyte Activity in Abnormally Pigmented Hypertrophic Scar", Journal of Burn Care & Research, 2015, vol. 36, pages 77-86 See pages 77, 84, 85.	1-15



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

23 AUGUST 2018 (23.08.2018)

Date of mailing of the international search report

24 AUGUST 2018 (24.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/013532

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/06(2006.01)j, A61K 38/00(2006.01)n

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 38/07; A61K 38/17; A61K 38/00

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: 펩티드, 염증, 섬유증, 상처, 암, 피부, 치료, 키트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2017-116138 A1 (주식회사 잼팩스앤카엘 등) 2017.07.06 단락 [0014], [0027], [0028], [0047]; 및 표 1 참조.	1, 12, 15
Y		2-11, 13, 14
Y	KR 10-2010-0061677 A (몬도바이오테크 레보레토리즈 아게) 2010.06.08 단락 [0007], [0027], [0046], [0048], [0055], [0068], [0069] 참조.	2-11, 13, 14
X	NCBI Reference Sequence: WP_058623598.1: MarR family transcriptional regulator [Microbacterium testaceum] (2016.11.02) 전문 참조.	1
X	GenBank: KTR94653.1: transcriptional regulator [Microbacterium testaceum] (2015.12.22) 전문 참조.	1
A	TRAVIS, TARYN E. 등, 'A multimodal assessment of melanin and melanocyte activity in abnormally pigmented hypertrophic scar', Journal of Burn Care & Research, 2015, 36권, 페이지 77-86 페이지 77, 84, 85 참조.	1-15

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지
않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된
문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후
에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신
규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일
또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과
조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명
은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 08월 23일 (23.08.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 08월 24일 (24.08.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



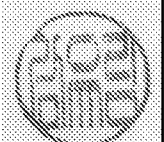
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2017-116138 A1	2017/07/06	KR 10-2018-0089440 A	2018/08/08
KR 10-2010-0061677 A	2010/06/08	AT 522225 T	2011/09/15
		AT 553772 T	2012/05/15
		AU 2008-297417 A1	2009/03/19
		AU 2008-297418 A1	2009/03/19
		AU 2008-297425 A1	2009/03/19
		AU 2008-297426 A1	2009/03/19
		AU 2008-297524 A1	2009/03/19
		AU 2008-297529 A1	2009/03/19
		AU 2008-297535 A1	2009/03/19
		AU 2008-297541 A1	2009/03/19
		AU 2008-297542 A1	2009/03/19
		AU 2008-297551 A1	2009/03/19
		AU 2008-297566 A1	2009/03/19
		AU 2008-297567 A1	2009/03/19
		AU 2008-297874 A1	2009/03/19
		AU 2008-297875 A1	2009/03/19
		AU 2008-297884 A1	2009/03/19
		AU 2008-297885 A1	2009/03/19
		AU 2008-297888 A1	2009/03/19
		AU 2008-297891 A1	2009/03/19
		AU 2008-297892 A1	2009/03/19
		AU 2008-297893 A1	2009/03/19
		AU 2008-297895 A1	2009/03/19
		AU 2008-297896 A1	2009/03/19
		EP 2187905 A2	2010/05/26
		EP 2187907 A2	2010/05/26
		EP 2187912 A2	2010/05/26
		EP 2187915 A2	2010/05/26
		EP 2187915 B1	2011/08/31