



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092379
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 31/198 (2024.01) A61K 35/742 (2015.01)
A61K 8/99 (2017.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61Q 19/00 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0182205

(22) 출원일자 2023년12월14일

심사청구일자 2023년12월14일

(71) 출원인

주식회사 엠바이옴제라퓨틱스

경기도 성남시 분당구 판교로289번길 20, 2동 5층
공동보육실(삼평동, 판교테크노밸리 스타트업 캠퍼스)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

강세찬

서울특별시 동작구 남부순환로269길 8, 2층 (사당동, 덕창빌딩)

권정은

경기도 화성시 영통로27번길 20, 405동 1702호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차준용

전체 청구항 수 : 총 13 항

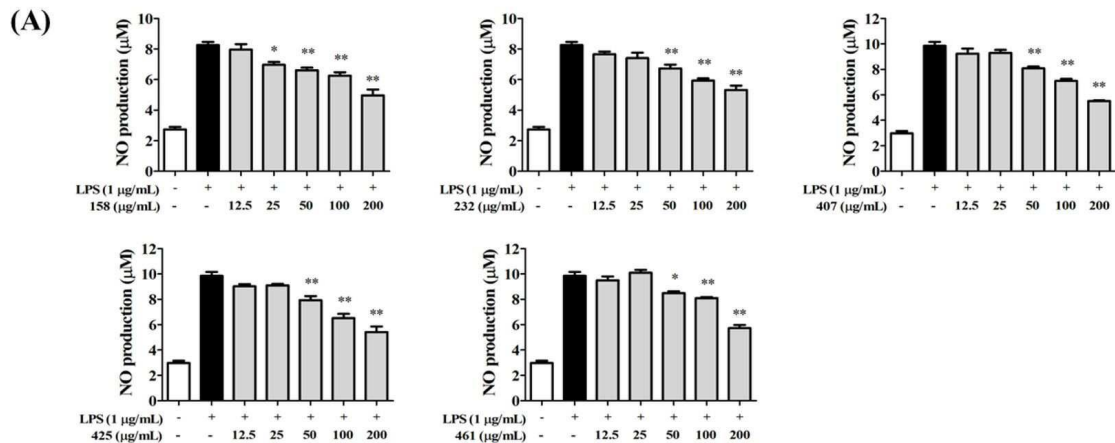
(54) 발명의 명칭 페리바실러스 프리고리토레란스 JS2 균주 및 상기 균주를 포함하는 염증성 피부질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명자는 산화질소(NO)의 발현을 측정하여 미생물을 선별하고 미생물 *Peribacillus frigoritolerans* JS2를 선택했다. 본 발명자는 *P. frigoritolerans* JS2의 상등액에서 활성 화합물 L-페닐알라닌을 분리하고 RAW 264.7 및 RBL-2H3 세포의 염증을 완화하는 능력을 확인했다. NC/Nga 마우스 모델을 사용하여 *P. frigoritolerans* JS2

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



상등액이 아토피 피부염에 미치는 치료 효과를 조사했다. *P. frigorigerans* JS2를 적용하면 DNCB로 유발된 마우스에서 아토피 피부염이 임상적으로 회복되었다. IFN- γ 를 증가시키면서 혈청 내 IgE, TARC, IL-10 및 IL-1 β 를 억제했다. 이는 *P. frigorigerans* JS2가 아토피 피부염에서 발견되는 Th 세포의 불균형을 회복한다는 것을 의미한다. 궁극적으로 *P. frigorigerans* JS2는 Th 세포의 불균형을 회복함으로써 아토피 피부염의 근본적인 염증 메커니즘을 완화할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 따라서 이 연구의 결과는 *P. frigorigerans* JS2가 인간의 아토피 피부염 치료제로서 잠재력을 가지고 있음을 제안한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2024.01)

A61K 35/742 (2013.01)

A61K 8/99 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2250/206 (2013.01)

(72) 발명자

전혜린

서울특별시 용산구 독서당로34길 22, 2동 402호

박주하

부산광역시 강서구 명지오션시티12로 92, 514동 601호

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 16S rDNA가 서열번호 1로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 TNF α , IL-6 및 IL-1 β 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 균주는 COX-2 및 iNOS의 발현을 감소시켜, COX-2/iNOS 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 균주는 p38 및 JNK의 인산화를 감소시켜, MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 균주는 포유 동물의 혈청내 아토피 관련 사이토카인 및 케모카인 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 균주는 로리크린(Loricrin) 또는 인볼루크린(involucrin)의 발현을 증가시켜 피부 장벽 강화 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 염증성 피부질환은 접촉피부염, 자극 접촉피부염, 알레르기 접촉피부염, 접촉 두드러기 증후군, 자가 감각 피부염, 아토피 피부염, 알레르기성 피부염, 지루성 피부염, 구진상 두드러기, 습진 및 건선으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 13

L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페리바실러스 프리고리토레란스 JS2 균주 및 상기 균주를 포함하는 염증성 피부질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 염증성 피부 질환으로 알려진 아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 전 세계 인구의 약 20%에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 아토피 피부염은 어린이에게 흔히 발생하지만, 나이가 많은 그룹에서 더 심한 것으로 나타났다. 아토피는 천식, 알레르기성 비염으로 이어질 수 있다. 이러한 증상은 환자의 생활을 불편하게 만든다. 현재 아토피 피부염의 원인은 유전적, 환경적, 면역학적 요인의 복잡한 상호작용이다. 일반적인 견해는 아토피 피부염의 증상이 Th1과 Th2 세포 사이의 면역 불균형의 결과라는 것이다. 인볼루크린, 로리크린과 같은 단백질을 포함하는 피부 장벽이 외부 요인으로 인해 손상되면 항원 침투가 증가한다. 다양한 자극으로 인한 표피 손상은 Th2 면역 반응을 유발할 수 있다. Th2 세포는 B 세포에서 IgE 생산을 자극하는 IL-4와 같은 사이토카인을 생

산한다.

[0003] 대식세포 RAW 264.7 세포는 염증 반응을 적극적으로 시작하고 증폭시킨다. LPS는 대식세포를 활성화하여 염증성 사이토카인을 생성할 수 있는 염증 유도제로 알려져 있다. LPS 유발 세포 염증 모델은 아토피 피부염에 대한 시험관 내 연구에서 널리 활용되었다. 더욱이, NO 생성은 염증 반응 및 면역 조절과 관련이 있다. 염증 반응에 역할을 하는 NO는 유해한 물질을 생성할 수 있다. 또한 염증을 유발하고, 세포막을 파괴하고, DNA 손상을 일으키고, 지질 산화를 촉진하는데, 이 모두는 염증성 질환, 자가면역 질환, 암을 비롯한 다양한 질병의 원인이 된다. 따라서 NO 생성을 줄이는 것은 염증 반응을 조절할 가능성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2023-0061274호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 만성 염증성 피부 질환으로 알려진 아토피 피부염은 인구의 약 20%에 영향을 미치는 것으로 추정되며 가려움증, 습진, 염증, 건조함 및 피부 병변이 특징이다. 아토피 피부염의 정확한 근본 원인은 여전히 불확실하다. 그러나 이는 유전적, 환경적, 면역학적 요인의 관여로 인해 발생하여 Th1/Th2 세포의 불균형을 초래하는 것으로 여겨진다. 이러한 불균형은 사이토카인에 의해 매개되는 비정상적인 면역 반응을 일으키고, 그 결과 사이토카인의 분비가 증가하여 B 세포가 더 많은 IgE를 생성하도록 유도한다. 비만 세포 활성화는 IgE의 방출에 의해 촉발되고, 결과적으로 히스타민과 같은 물질이 방출된다. 이 방출은 혈관과 피부를 자극하여 알레르기 증상을 유발한다. 따라서 본 발명자는 Th 세포의 불균형을 완화하면 아토피 피부염 증상이 개선될 것이라는 가설을 세웠다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주를 제공한다.

[0007] 상기 균주는 16S rDNA가 서열번호 1로 기재되는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0008] 상기 균주는 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하고, 상기 염증성 사이토카인은 TNF α , IL-6 및 IL-1 β 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0009] 상기 균주는 COX-2 및 iNOS의 발현을 감소시켜, COX-2/iNOS 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 상기 균주는 p38 및 JNK의 인산화를 감소시켜, MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 상기 균주는 포유 동물의 혈청내 아토피 관련 사이토카인 및 케모카인 수치를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 균주는 로리크린(Loricrin) 또는 인볼루크린(involucrin)의 발현을 증가시켜 피부 장벽 강화 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 염증성 피부질환은 접촉피부염, 자극 접촉피부염, 알레르기 접촉피부염, 접촉 두드러기 증후군, 자가 감작 피부염, 아토피 피부염, 알레르기성 피부염, 지루성 피부염, 구진상 두드러기, 습진 및 건선으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물을 제공하며, 상기 식품

조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명자는 산화질소(NO)의 발현을 측정하여 미생물을 선별하고 미생물 *Peribacillus frigoritolerans* JS2를 선택했다. 본 발명자는 *P. frigoritolerans* JS2의 상등액에서 활성 화합물 L-페닐알라닌을 분리하고 RAW 264.7 및 RBL-2H3 세포의 염증을 완화하는 능력을 확인했다. NC/Nga 마우스 모델을 사용하여 *P. frigoritolerans* JS2 상등액이 아토피 피부염에 미치는 치료 효과를 조사했다. *P. frigoritolerans* JS2를 적용하면 DNCB로 유발된 마우스에서 아토피 피부염이 임상적으로 회복되었다. IFN- γ 를 증가시키면서 혈청 내 IgE, TARC, IL-10 및 IL-1 β 를 억제했다. 이는 *P. frigoritolerans* JS2가 아토피 피부염에서 발견되는 Th 세포의 불균형을 회복한다는 것을 의미한다. 궁극적으로 *P. frigoritolerans* JS2는 Th 세포의 불균형을 회복함으로써 아토피 피부염의 근본적인 염증 메커니즘을 완화할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 따라서 이 연구의 결과는 *P. frigoritolerans* JS2가 인간의 아토피 피부염 치료제로서 잠재력을 가지고 있음을 제안한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 RAW 264.7 세포에서 세포독성 및 NO 억제 활성을 갖는 5종의 미생물에 대한 2차 스크리닝 결과를 나타낸다; 도 1A에서는 NO 억제가 관찰되었으며 도 1B에서는 RAW 264.7 세포에서 세포독성이 나타났다.

도 2는 *Peribacillus frigoritolerans* JS2 균주의 16S rRNA 염기 서열을 나타낸다.

도 3은 JS2 상등액이 RAW 264.7 세포에서 사이토카인 발현에 미치는 영향을 나타낸다; 세포를 LPS(1 μ g/mL)로 24시간 동안 자극한 후 25, 50 및 100 μ g/mL의 JS2 상등액으로 처리했다. β -액틴과 비교하여 등물량의 mRNA를 정량화했다: (A) TNF α , (B) IL-6, (C) IL-1 β , (D) COX-2, (E) iNOS.

도 4는 RAW 264.7 세포에서 COX-2 및 iNOS 신호 전달 분자의 발현에 대한 JS2 상등액의 효과를 나타낸다; 세포는 LPS(1 μ g/mL)로 자극한 후 24시간 동안 25, 50 및 100 μ g/mL의 농도로 JS2로 처리되었다(도 4A). 도 4B는 COX-2 및 iNOS 신호 전달 경로의 개략도를 보여준다.

도 5는 RBL-2H3 세포에서 세포독성 효과 및 β -소사미니다제 방출에 대한 JS2 상등액의 효과를 나타낸다; RBL-2H3 세포에 대한 JS2 상등액(A) 및 β -hexosaminidase 방출(B)의 세포 독성 효과. 양성대조군으로 사용된 Ketotifen은 25 μ g/mL로 처리하였다.

도 6은 RBL-2H3 세포에서 사이토카인 발현에 대한 JS2 상등액의 효과를 나타낸다; 세포를 25, 50 및 100 μ g/mL의 JS2 상등액, 0.2 μ g/mL 항-DNP-BSA 및 0.2 μ g/mL DNP-BSA로 처리했다. 케토티펜 25 μ g/mL를 양성 대조군으로 사용했다. β -틴과 비교하여 등물량의 mRNA를 정량화했다; (A) TNF α , (B) IL-4, (C) IL-1 β .

도 7은 RBL-2H3 세포에서 MAPK 신호 분자의 발현에 대한 JS2 상등액의 효과를 나타낸다. 세포를 25, 50 및 100 μ g/mL의 JS2 상등액, 0.2 μ g/mL 항-DNP-BSA 및 0.2 μ g/mL DNP-BSA로 처리했다(도 7A). 25 μ g/mL 농도의 Ketotifen의 양성 대조군을 사용했다.

도 8은 실험 마지막 날의 등 피부 이미지를 나타낸다.

도 9는 피부염 점수를 나타내는 그래프이다.

도 10은 JS2 상등액을 뿌린 후 NC/Nga 마우스에서 아토피 피부염 유사 피부 병변의 긁기 행동 프로파일을 나타내는 그래프이다.

도 11은 NC/Nga 마우스의 사이토카인 및 케모카인의 혈청 수준에 대한 JS2 상등액의 효과를 나타낸다; (A) IgE, (B) IL-10, (C) IL-1 β , (D) TARC 및 (E) IFN- γ 의 수준. 데이터는 평균 $\pm$ SD(n=5)로 표시된다.

도 12는 NC/Nga 마우스의 표피 두께를 나타낸다; 도 12A는 등 피부의 H&E 염색을 나타낸다. 검은색 화살표는 표피의 끝과 끝을 나타낸다. 도 12B는 표피 두께의 평균 두께를 나타낸다.

도 13은 NC/Nga 마우스에서 JS2 상등액이 로리크린 및 인볼루크린에 미치는 영향을 나타낸다.

도 14는 *P. frigorigerans* JS2 상등액의 분리 및 정제결과를 나타낸다. (A) *P. frigorigerans* JS2 상등액으로부터 화합물의 분리 계획을 도시한다. (B) *P. frigorigerans* JS2 추출물의 NO 억제 활성 및 세포 독성결과를 나타낸다; 이 실험을 수행하기 위해 Raw 264.7 세포주를 사용했다. (C) *P. frigorigerans* JS2 추출물이 β -hexosaminidase 방출 및 세포 독성에 미치는 영향을 나타낸다. 본 실험은 RBL-2H3 세포주를 사용하여 수행되었다. MC; 디클로로메탄, EA; 에틸 아세테이트, SiO₂; 실리카겔.

도 15는 NO 생성 및 β -hexosaminidase 방출에 대한 JS2 상등액의 EA 분획 효과를 나타낸다; 도 15A. RAW 264.7 세포에서 *P. frigorigerans* JS2 상등액의 EA 분획의 산화질소 억제 활성 및 세포독성의 효과. 그림 15B. *P. frigorigerans* JS2 상등액의 EA 분획이 RBL-2H3 세포에서 β -hexosaminidase 방출 및 세포 독성에 미치는 영향.

도 16은 RAW 264.7 및 RBL-2H3 세포에서 L-페닐알라닌의 세포독성을 나타낸다; RAW 264.7 세포(도 20A) 및 RBL-2H3 세포(도 20B)에 대한 L-페닐알라닌의 세포독성 효과.

도 17은 L-페닐알라닌이 NO 생성 및 β -hexosaminidase 방출에 미치는 영향을 나타낸다.

도 18은 RAW 264.7 세포에서 L-페닐알라닌이 사이토카인 발현에 미치는 영향을 나타낸다. 세포를 LPS(1 μ g/mL)로 24시간 동안 자극한 후 25, 50 및 100 μ g/mL의 L-페닐알라닌으로 처리했다. β -액틴과 비교하여 등물량의 mRNA를 정량화했다: (A) TNF α , (B) IL-6, (C) IL-1 β , (D) COX-2, (E) iNOS.

도 19는 RAW 264.7 세포에서 L-페닐알라닌이 COX-2 및 iNOS 신호 전달 분자의 발현에 미치는 영향을 나타낸다. 세포를 LPS(1 μ g/mL)로 24시간 동안 자극한 후 25, 50 및 100 μ g/mL의 L-페닐알라닌으로 처리했다.

도 20은 RBL-2H3 세포에서 MAPK 신호 분자의 발현에 대한 L-페닐알라닌의 효과를 나타낸다. 세포를 L-페닐알라닌 25, 50 및 100 μ g/mL, 0.2 μ g/mL 항-DNP-BSA 및 0.2 μ g/mL DNP-BSA로 처리했다. 케토티펜 25 μ g/mL를 양성 대조군으로 사용했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 우수한 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 균주를 발굴하기 위해 연구한 결과, 신규한 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigorigerans*) JS2 균주가 우수한 염증성 피부 질환 치료 효과를 갖는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0023] 이에 본 발명은, 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigorigerans*) JS2 균주를 제공한다.
- [0024] LPS로 자극된 염증성 사이토카인의 방출에 대한 JS2 상등액의 영향을 평가한 결과, 상기 균주, 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 더욱 바람직하게는 상기 균주 배양 상등액은 염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 여기서 상기 염증성 사이토카인은 TNF α , IL-6 및 IL-1 β 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 또한 상기 균주, 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 더욱 바람직하게는 상기 균주 배양 상등액은 COX-2 및 iNOS의 발현을 감소시켜, COX-2/iNOS 신호 전달 경로를 억제시켜 염증 유발 효과를 발휘하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0026] 또한, JS2 상등액의 항염증 역할을 탐색하기 위해 MAPK의 단백질 수준과 p38 및 JNK의 인산화 상태를 확인한 결과, 상기 균주, 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 더욱 바람직하게는 상기 균주 배양 상등액은 p38 및 JNK의 인산화를 감소시켜, MAPK 신호 전달 경로를 억제하여, 염증 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0027] 본 발명자는 아토피 피부염 마우스 모델에서 JS2 상등액의 효과를 평가하기 위해 혈청 내 사이토카인과 케모카

인을 추가로 측정한 결과, 상기 균주, 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 더욱 바람직하게는 상기 균주 배양 상등액은 포유 동물의 혈청내 아토피 관련 사이토카인 및 케모카인 수치를 감소시키는 것을 확인하였다. 구체적으로 IFN- γ 를 증가시키면서 혈청 내 IgE, TARC, IL-10 및 IL-1 β 를 억제하여 상기 균주가 아토피 피부염에서 발견되는 Th 세포의 불균형을 회복한다는 것을 의미한다.

- [0028] 본 발명자는 피부 장벽 보호 효과를 확인한 결과, 상기 균주, 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 더욱 바람직하게는 상기 균주 배양 상등액은 로리크린(Loricrin) 또는 인볼루크린(involucrin)의 발현을 증가시켜 피부 장벽 강화 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0029] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 염증성 피부질환은 접촉피부염, 자극 접촉피부염, 알레르기 접촉피부염, 접촉 두드러기 증후군, 자가 감각 피부염, 아토피 피부염, 알레르기성 피부염, 지루성 피부염, 구진상 두드러기, 습진 및 건선으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액, 상기 배양물의 건조물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 균주의 사균체로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공하며, 상기 화장료 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 “균주 배양액”은 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주를 TSB 배지에 37℃, 170rpm 환경에서 48h ~ 72h 동안 배양한 것을 원심분리기 (3,000 rpm, 20분, 상온)를 이용하여 균주를 분리한 상등액을 의미한다.
- [0034] 본 발명에서 “균주 분말”은 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주를 TSB 배지에 37℃, 170rpm 환경에서 48h ~ 72h 동안 배양한 것을 원심분리기 (3,000 rpm, 20분, 상온)를 이용하여 균주를 분리한 후 동결건조 한 것을 의미한다.
- [0035] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 향산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐 피롤리돈(PVP:polyvinyl pyrrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스피복론(cross-linkedpolyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulosesodium), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향산프로필(propylp-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 유효한 양'이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 염증성 질환의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 또한, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도,

환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는" 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성 성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물에는 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물 이외에, 본 발명의 효과를 방해하지 않는 것을 한도로 하여, 다른 배합 성분이 포함되어 있을 수 있다.

[0040] 본 발명의 식품 조성물에 배합 가능한 성분으로서, 예를 들면 설탕, 트레할로스, 아세솔팜 K, 자일리톨, 수크랄로스, 에리트리톨, 아스파탐, 물엿 등의 감미료; 카카오버터, 식물성 유지 등의 유지; 대두 레시틴 등의 유화제, 향료; 향료 제제; 밀크; 물 등을 들 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물의 형상에 대해서는 특별히 제한되지 않고, 분말상, 입상, 칩상, 플레이트상 등 중 어느 것이든 좋고, 사용되는 식품의 종류에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은, 필요에 따라 파쇄, 분쇄, 정립 등의 처리에 제공하여 원하는 형상으로 성형된다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 제조시에 압출 조립에 의해 성형할 수도 있다.

[0042] 상기 식품은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 포함하는 각종 형태의 식품일 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 구체적 식품 형태는 음료, 식이 보충제, 크립상 식품, 디저트, 과자, 조미료, 레토르트 식품, 식육가공 식품, 어묵 식품, 계란가공 식품, 통조림 또는 통포장 식품, 빵, 빙과, 대두가공 식품, 쌀밥식품, 및 스프 등이 있다.

[0043] 이하, 본 발명에서 사용되는 식품 형태에 대하여 상술한다.

[0044] 본 발명의 식품은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물 중 어느 것을 포함하는 것이든 상관없다.

[0045] 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물은 유방암의 예방 내지 개선 등의 용도에 유용하다. 따라서 각종 형태의 식품은 상기 용도를 목적으로 한 기능성 식품으로서도 제공할 수 있다. 즉, 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식품은 일반적인 식품 외에도, 특정 보건용 식품, 영양 보조 식품, 기능성 식품, 병자용 식품 등으로서 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식품은 유방암 환자를 위한 영양 보조 식품으로서 유용하다.

[0046] 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다. 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.

[0047] 이하, 본 발명에 의해 제공되는 구체적 식품 형태에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0048] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 음료를 제공한다. 본 발명의 음료의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 과즙 음료; 야채 주스; 스파클링 워터, 콜라, 과즙 함유 탄산음료, 진저에일, 사이다, 소다 등의 탄산음료; 스포츠 드링크 등의 청량 음료수; 커피, 커피 우유 등의 커피 음료; 홍차, 녹차, 우롱차 등의 차음료; 코코아; 유산균 음료; 우유, 과일 우유, 유산균 음료 등의 우유음료; 맥주, 소주, 위스키, 칵테일, 탄산음료를 탄 소주 등의 알코올 음료 등을 들 수 있다.

[0049] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식이 보충제를 제공한다. 본 발명의 식이 보충제의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 소프트젤, 정제, 분말제 등을 들 수 있다. 이들 중에서도, 바람직하게는 소프트젤을 들 수 있다. 소프트젤 및 분말제의 경우에는 그의 소정량을 캡슐에 수용된 상태로 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 소프트젤의 바람직한 하나의 실시양태로서는, 젤라틴,

물, 및 글리세린을 포함하는 소프트젤 중에, 에쿠올 함유 대두 배축 발효물 또는 그의 추출물을 첨가한 것이 예시된다. 또한, 소프트젤에는 상기 성분 외에 대두유, 밀랍, 레시틴, β -카로틴 등의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0050] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 크림상 식품을 제공한다. 본 발명의 크림상 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 휘프드 크림, 카스타드 크림, 버터 크림, 생크림, 커피 화이트너 등을 들 수 있다.

[0051] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 디저트를 제공한다. 본 발명의 디저트의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 요구르트, 젤리, 푸딩, 무스 등을 들 수 있다.

[0052] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 과자를 제공한다. 본 발명의 과자는 종별을 불문하며, 구운 과자나 쥘 과자를 포함한 모든 과자가 포함된다. 본 발명의 과자로서, 구체적으로는 캔디, 엿, 카라멜, 프레첼, 타블렛, 껌, 초코렛, 쿠키, 콩과자, 웨하스, 치즈 크래커, 구미, 전병, 스하마(일본 과자의 일종), 건과자, 양갱, 만두, 고사리떡, 파운드 케이크, 애플파이 필링, 스낵 과자, 말린 떡과자 등이 예시된다.

[0053] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 조미료를 제공한다. 본 발명의 조미료의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 불고기 소스, 장어구이 소스, 오징어 진미의 조미료, 토마토 케첩, 맑은 장국, 액체 드레싱, 분말 드레싱, 참깨 소스, 시즈닝, 간장 등을 들 수 있다.

[0054] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 레토르트 식품을 제공한다. 본 발명의 레토르트 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 카레, 하이라이스 소스, 스투, 미트 소스, 화이트 소스 등의 소스의 소; 중화풍 덮밥, 소고기 덮밥, 닭고기 계란 덮밥 등의 덮밥의 소; 마파두부의 소, 술밥의 소 등의 조미료 재료 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식육가공 식품을 제공한다. 본 발명의 식육가공 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 소시지(건조, 반건조, 볼로냐, 프랑크푸르트, 비엔나, 스모크), 리버 페이스트, 베이컨, 솔더 베이컨, 햄, 햄버거, 미트볼 등을 들 수 있다.

[0056] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 통조림 또는 통포장 식품을 제공한다. 본 발명의 통조림 또는 통포장 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 굴, 복숭아 등의 과일 통조림; 참치, 정어리 등의 해산물 통조림; 잼 등의 통조림; 스프 등의 통조림; 소스 등의 통조림 등이 예시된다.

[0057] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 빵을 제공한다. 본 발명의 빵의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 식빵, 프랑스빵, 조리빵, 멜론빵, 꺾빵, 크림빵, 잼빵, 롤빵, 크로와상 등을 들 수 있다.

[0058] 추가적으로 본 발명자는 *P. frigoritolerans* JS2 상등액으로부터 활성 물질을 정제 및 분리하기 위한 컬럼 크로마토그래피를 수행한 결과, EA 분획의 개방 컬럼 크로마토그래피는 NO 억제 및 β -헥소사미니다제 방출에서 상당한 효능을 입증하였다.

[0059] 따라서 본 발명은 수탁번호 KCCM13403P로 기탁된 페리바실러스 프리고리토레란스(*Peribacillus frigoritolerans*) JS2 균주의 EA 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0060] 또한 본 발명자는 상기 EA 분획물로부터 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 분리하였고, 상기 화합물이 TNF- α 및 IL-6의 발현을 실질적으로 약화시키고, COX-2와 iNOS를 억제시키고, JNK와 p38의 인산화를 감소시켜 염증을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 따라서, 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명은 L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 염증성 피부질환 또는 개선 용도로 사용될 수 있다.

[0065] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0067] <실험방법>

[0068] 1. 미생물 배양

[0069] 총 213종의 미생물을 스크리닝하였다. 모든 배양액은 121℃에서 15분 동안 고압멸균하였고, 모든 미생물은 동일한 호기성 조건인 37℃, 150rpm에서 72시간 동안 배양하였다. 본 실험에 사용된 상층액을 얻기 위해 배양물을 3,000rpm에서 20분 동안 원심분리했다.

[0071] 2. 세포 생존력 분석

[0072] MTT 분석을 사용하여 세포 세포 독성을 조사했다. RAW 264.7 세포와 RBL 2H3 세포를 96-웰 플레이트에 (1 x 104 세포/웰) 넣고 24시간 동안 배양하였다. JS2와 EA6를 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL로 처리하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로, 5 mg/mL MTT 스톡 용액 10 µL를 각 웰에 첨가하고 샘플을 37℃에서 2시간 동안 배양했다. 상층액을 버리고 DMSO(Dimethyl sulfoxy)를 사용하여 formazan을 현탁시켰다. 다중 판독기 Infinite 200(TECAN, 스위스 취리히)을 사용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 검출했다.

[0074] 3. 산화질소(NO) 분석

[0075] 산화질소(NO) 생성은 Griess 시약을 사용하여 측정되었다. RAW 264.7 세포를 96웰 플레이트에 (1 x 104개 세포/웰) 배치했다. 24시간 배양 후, 세포를 JS2 및 EA6과 함께 LPS(1µg/ml)로 24시간 동안 자극한 다음 세포 배양 배지를 수집하여 NO 생성에 대해 분석했다. 50 µl의 배지 분취량을 50 µl의 Griess 시약(2.5% 인산 중 1% 설과 니아미드 및 0.1% N-(-1-나프틸)-에틸렌디아민 이염산염)과 혼합한 후 실온에서 20분 동안 배양했다. 이어서, 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 540nm에서의 흡광도를 정량화하였다. 결과는 NaNO₂ 연속 회색 표준 곡선에 대해 계산되었다.

[0077] 4. qRT-PCR

[0078] RAW 264.7 세포를 6웰 플레이트에 2 x 105개 세포/웰로 시딩하여 37℃에서 24시간 배양했다. 세포를 테스트 샘플과 함께 LPS(1µg/mL)로 24시간 동안 처리했다. RAW 264.7 세포는 TRIzolTM 시약(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 수집되었다.

[0079] RBL-2H3 세포를 6웰 플레이트에 1.5 x 105개 세포/웰로 시딩했다. 24시간 후, 상층액을 제거하고 쥐 항-DNP-BSA IgE(최종 농도 0.2 µg/mL)를 함유한 EMEM 배지로 교체했다. 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 EMEM으로 교체했다. 그 후, 시험 시료 용액을 첨가하고 37℃에서 20분간 배양하였다. 반응을 자극하기 위해 DNP-BSA(최종 농도 0.2 µg/mL)를 각 웰에 주입하고 37℃에서 20분간 배양했습니다. 세포를 TRIzolTM 시약으로 용해시켰다.

[0080] TRIzolTM 시약을 사용하여 총 세포 RNA를 분리했습니다. cDNA 합성 키트(HKGenomics Inc., Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA 2 µg으로부터 cDNA를 생성하였다.

[0081] 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 위해 최종 반응 부피는 20 µL로 준비되었다. 반응 혼합물은 1 µL의 cDNA, 10 µL의 2X Real-Time PCR Kit 시약, 0.5 µL의 정방향 및 역방향 프라이머, 8 µL의 멸균 증류수로 구성되었다. 사용된 프라이머는 표 1과 2에 나와 있다.

표 1

[0082]

Mouse primer sequences used in real-time PCR

Gene name	Primer sequence
IL-1 β	5'-GAAGAGCCCATCCTCTGTGA-3' (Sense) 5'-TTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3' (Antisense)
IL-6	5'-ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG-3' (Sense) 5'-CATTGGAATTTGGGTAGGA-3' (Antisense)
TNF- α	5'-GTCTACTGAACCTCGGGGTGAT-3' (Sense) 5'-ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG-3' (Antisense)
iNOS	5'-CTATCAGGAAGAAATGCAGGAGAT-3' (Sense) 5'-GAGCACGCTGAGTACCTCATT-3' (Antisense)
COX-2	5'-GTAGCCAGCAAAGCCTAGGAGCAAC-3' (Sense) 5'-CTACTGAGTACCAGGCCAGCACAA-3' (Antisense)
β -actin	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3' (Sense) 5'-ACCCTCATAGATGGGCACA-3' (Antisense)

표 2

[0083]

Rat primer sequences used in real-time PCR

Gene name	Primer sequence
IL-1 β	5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAGCACCTC-3' (Sense) 5'-GGGTTCATGGTGAAGTCAAC-3' (Antisense)
IL-6	5'-AGAGACTTCCAGCCAGTTGC-3' (Sense) 5'-AGCCTCCGACTTGTGTAAGTG-3' (Antisense)
TNF- α	5'-TCGTCTACTCCTCAGAGCCC-3' (Sense) 5'-ACTTCAGCGTCTCGTGTGT-3' (Antisense)
β -actin	5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3' (Sense) 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3' (Antisense)

[0084]

PCR 조건은 95℃에서 15초 동안 변성, 60℃에서 40초 동안 어닐링, 72℃에서 1분 동안 신장을 40주기로 하였다. qRT-PCR은 Thermo Fisher Scientific의 QuantStudio[®] 3 Real-Time PCR 시스템을 사용하여 수행되었습니다. 상대 mRNA 수준은 동일한 주형의 β -액틴 수준에 대한 비율로 계산되었다.

[0086]

5. 미생물 식별을 위한 16S rRNA 시퀀싱

[0087]

미생물은 한국미생물문화센터(KCCM Co., SEOUL, Korea)에서 수행한 16S rRNA 염기서열분석을 이용하여 동정하였다.

[0089]

6. 동물

[0090]

5주령 수컷 NC/Nga 마우스(체중 20~25g, n=5)를 라온바이오(경기도 영인시)에서 구입하였다. 마우스를 12시간 명암 주기 하에 22±3℃에서 53% ± 5% 습도에 보관했다. 쥐에게 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet(ENVIGO, West Lafayette, IN, USA)를 자유롭게 먹였다. 이소플루란을 이용하여 마우스를 마취하였고, 안과 채혈을 통해 혈청을 채취하였다. 혈액 수집 후 안락사를 위해 경추를 탈구했다. 모든 실험 절차는 경희대학교 동물보호이용위원회(KACUC, 승인번호 KHGASP-23-081)에서 승인한 지침에 따라 수행되었다.

[0092]

7. 아토피 피부염 유사 피부 병변의 유도 및 JS2 치료

[0093]

8주령 수컷 NC/Nga 마우스를 무작위로 5개 그룹으로 나누었다(그룹당 n=5): 정상(차량 치료), 대조군(DNCB 치료), JS2 1%(DNCB + JS2 1%[w/v]), JS2 2%(DNCB + JS2 2%[w/v]), JS2 4%(DNCB + JS2 4%[w/v]). 등털을 제거한 후 4일마다 1% DNCB 용액(3:1 [v/v] 아세톤과 올리브 오일의 혼합물에 용해) 200 μ l를 적용하여 아토피 피부염 유사 피부 병변을 유발했다. 4일 후 매일 100 μ L의 JS2 용액으로 해당 부위를 치료하고 6주 동안 1% DNCB 용

액 200 μ l를 주 3회 도포했다.

[0095] **8. 피부염 점수**

[0096] 피부염 점수는 희생 전날 측정되었다. 점수는 중증도(0(증상 없음), 1(경증), 2(중등도), 3(심각))을 기준으로 홍반, 건조함, 부종, 딱지, 찰과상 및 태선화의 5가지 증상 각각에 대해 심각도를 기준으로 측정되었다.

[0098] **9. 긁는 행위**

[0099] NC/Nga 마우스의 긁는 행동은 20분 동안 뒷발을 사용하여 등 피부를 긁는 데 소요된 시간을 측정하여 평가되었다. 이 측정은 희생 전날에 수행되었다. 점수는 0부터 4까지 0(없음), 2(1.5초 미만 긁기), 4(1.5초 이상 긁기)로 평가되었다. 긁는 행동에 대한 총 점수는 모든 쥐의 긁는 시간에 대한 개별 측정값을 합산하여 결정되었다.

[0101] **10. 개방형 컬럼 크로마토그래피 및 화합물의 구조 분석**

[0102] *P. frigorigerans* JS2를 121°C에서 15분 동안 고압멸균된 Marine Broth 배지에서 배양하고, 22°C, 200rpm, pH 6.9-7.2에서 72시간 동안 배양하였다. JS2를 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고 여과했다. 상등액을 농축하고 3 L H₂O에 재용해시켰다. 이어서 디클로로메탄(MC, 1.5 L x 3), 에틸아세테이트(EA, 1.5 L x 3), n-부틸알코올(n-BuOH, 1.5 L x 3) 용매를 순차적으로 첨가하여 용매분획물을 얻고, 나머지 용액을 물 분획이라고 한다. EA 분획(10 g)을 클로로포름-메탄올(6:1)로 용리하는 SiO₂ 컬럼(Φ 5.5 x 27 cm) 크로마토그래피를 수행하여 7개 분획(JS2-E1 ~ JS2-E7)을 생성했다. n-BuOH 분획물을 EA 분획물과 동일한 조건으로 SiO₂ 컬럼크로마토그래피를 실시한 결과 8개의 분획물(JS2-B1~JS2-B8)을 얻었다. 생리활성이 있는 분획은 NO 분석과 β -hexosaminidase 분석을 통해 결정되었다. 분리된 화합물 구조는 ¹H NMR, ¹³C NMR, gHSQC, gCOSY 및 gHMBC 분광학으로 결정되었다. NMR 분석은 서울대학교(서울, 한국)에서 수행되었다.

[0104] **11. HPLC 분석**

[0105] Agilent 1260 Infinity HPLC 시리즈(Santa Clara, CA, USA)는 JS2의 L-페닐알라닌 함량 분석에 사용되었다. 분리하는 Agilent C18 컬럼(4 μ m, 4.6 mm x 150 mm i.d.)에서 40°C에서 수행되었다. 이동상은 물(A)과 아세트오닐트릴(B) 중 0.02% C2HF3O2로 구성되었다. 분리는 다음과 같은 바이너리 라이너 구배 조건 하에서 수행되었다: 0-20분, 90(A): 10(B) v/v%; 20-21분 0(A): 100(B) v/v%; 21-25분 0(A): 100(B) v/v%; 25-26분 100(A): 0(B) v/v%; 26-30분 100(A): 0(B) v/v %. 유속은 1.0mL/min, 주입량은 10 μ L, 모니터링 파장은 215nm였다. JS2와 L-페닐알라닌을 100% MeOH로 희석했다. 머무름 시간과 UV-vis 스펙트럼을 L-페닐알라닌과 비교하여 피크를 검출하고, 각각의 표준 곡선을 사용하여 정량화를 수행했다.

[0107] **<실험결과>**

[0108] **1. 체외에서 아토피 피부염 치료 효능 평가**

[0109] (1) RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 및 NO 억제 활성에 대한 미생물 스크리닝

[0110] LPS로 유도된 NO 분비가 있는 RAW 264.7 세포에서 세포 독성과 NO 억제 활성을 평가했다. 세포를 100 μ g/mL의 213종 미생물로 처리하고 세포 생존율을 MTT 분석으로 평가하였다. 320개의 미생물 시료 중 NO 저해 및 세포독성을 고려하여 5개의 시료를 선정한 후 2차 스크리닝을 실시하였다. 결과는 미생물 샘플 158, 232, 407, 425 및 461에서 NO 억제 효과(도 1A)와 세포 독성(도 1B)을 보여주었다.

[0111] 다양한 농도의 5종 미생물을 RAW 264.7 세포에 투여하였다. 5개 샘플(158, 232, 407, 425 및 461) 모두 용량 의존적 NO 억제를 나타냈다. 샘플 158은 상당한 NO 효과를 갖는 것으로 나타났으며 후속 분석을 위해 선택되었다.

- [0113] (2) 미생물 균주의 분리 및 동정
- [0114] 미생물의 계통발생을 확인하기 위해 16s rRNA 유전자 서열을 분석하였다. 16s rRNA 유전자 서열은 [서열 목록 1]과 같고(도 2), 16s rRNA 유전자 서열 분석 결과 샘플 158 균주는 기탁된 페리바실러스 프리고리톨레란스(*Peribacillus frigoritolerans*)로 확인되었고, 본 발명자는 이 미생물을 *Peribacillus frigoritolerans* JS2로 명명하고, 2023년 10월 10일자로 한국미생물보존센터에 기탁하였다(기탁번호 KCCM13403P).
- [0115] [서열 목록 1]
- [0116] TTAGGGCGGCTGGCTCCATGAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACGTAGAATGGCTTTATGGGATTCGCTTACCTTCGCAGGTTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGGACAGGAGTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAAGTACAGACAGAAAGTCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCAAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTTGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCACTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCAGCAGTTACTCTGGTACTGTCTCTCCCTAACACAGAACTTACGACCGAAGGCCTTCTTCGTTACGCGCGGTGTCTCCGTGAGCTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCACTAGCTAATGCGCGCGGCCCATCTATAAGTGACAGCGTAAACCGTCTTTCATCTTCTCTCATGCGAGAAAAGACGTATCCGTTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGACGGTTGCCACGTGTACTACCCGTCCGCGCTAATCTCAGGGAGCAAGCTCCCGTCGATTGCTCGACTGC.
- [0118] (3) RAW264.7 세포의 *P. frigoritolerans* JS2 상층액에서 과발현된 유전자의 억제
- [0119] 본 발명자는 LPS로 자극된 염증성 사이토카인의 방출에 대한 JS2 상층액의 영향을 평가했다(도 3A, B 및 C). 대조군과 비교하여 LPS에서 사이토카인 수준이 유의하게 상승했다. 또한, JS2 상층액 처리군의 사이토카인 수준을 LPS와 비교하였다. JS2 상층액 처리는 RAW 264.7 세포에서 TNF α , IL-6 및 IL-1 β 의 발현을 감소시켰다. 또한 염증 분자를 조절하는 COX-2와 iNOS의 발현도 측정되었다(Murakami & Ohigashi, 2007). JS2로 세포를 처리하면 용량 관련 방식으로 COX-2 및 iNOS의 발현이 감소했다(도 3D 및 E).
- [0121] (4) *P. frigoritolerans* JS2 상층액이 RAW 264.7 세포의 COX-2/iNOS 신호 전달 경로에 미치는 영향
- [0122] 사이토카인과 같은 염증성 자극은 COX-2 및 iNOS의 발현을 유도할 수 있다. 본 발명자는 Western blotting을 통해 COX-2와 iNOS에 대한 JS2 상층액의 억제 활성을 조사했다. 도 4A는 COX-2와 iNOS가 대조군과 비교하여 LPS 유발의 증가를 입증했음을 보여준다. JS2 상층액 처리에서는 COX-2와 iNOS가 농도 의존적으로 감소하였다. JS2 고용량군은 COX-2($p<0.05$)와 iNOS($p<0.01$)를 효과적으로 억제했다. 이 발견은 JS2 상층액이 RAW 264.7 세포에서 COX-2/iNOS 신호 전달 경로를 억제하여 잠재적으로 염증 유발 효과를 발휘한다는 것을 시사한다(도 4B).
- [0124] (5) β -핵소사미니다제 방출에 대한 JS2 상층액의 효과
- [0125] RBL-2H3 세포를 다양한 농도(6, 12, 25, 50, 100 및 200 μ g/mL)에서 항-DNP-BSA와 함께 밤새 사전 배양한 다음 DNP-BSA로 자극했다. RBL-2H3 세포의 항원에 의한 탈과립화는 JS2 상층액에 의해 유의하게 억제되었다(도 5B). 도 5A는 JS2 상층액에 세포 독성이 없음을 보여준다. 이러한 관찰은 JS2 상층액이 탈과립을 방해한다는 것을 나타낸다.
- [0127] (6) RBL-2H3 세포에서 JS2 상층액으로 과발현된 유전자의 억제
- [0128] RBL-2H3 세포주에서 염증성 사이토카인 TNF α , IL-4 및 IL-1 β 에 대한 JS2 상층액의 조절 효과를 조사하기

위해, 본 발명자는 DNP-BSA로 RBL-2H3 세포를 자극한 후 TNF α 와 IL-4의 상대적 발현 수준을 조사했다. JS2와 케토티펜 처리군은 염증성 사이토카인을 억제했다. 이러한 결과는 JS2 상등액 처리에 의한 TNF α , IL-4 및 IL-1 β 의 발현 감소가 염증 반응과 관련된 아토피 피부염 증상을 예방할 수 있음을 보여준다(도 6).

(7) RBL-2H3 세포의 MAPK 신호 전달 경로에 대한 *P. frigitolerans* JS2 상등액의 효과

본 발명자는 JS2 상등액의 항염증 역할을 탐색하기 위해 MAPK의 단백질 수준과 p38 및 JNK의 인산화 상태를 측정했다. p38 및 JNK는 DNP-BSA 처리에서 인산화된 반면, JS2 상등액 처리에서는 인산화가 크게 감소했다(도 7A). 이 발견은 JS2 상등액이 RBL-2H3 세포에서 MAPK 신호 전달 경로를 억제한다는 것을 시사한다. 따라서 JS2 상등액은 RBL-2H3 세포에서 염증 효과를 나타낼 수 있다(도 7B).

2. DNCB로 유도된 NC/Nga 마우스 모델에서 JS2 상등액의 아토피 피부염 완화 효과

(1) DNCB로 유도된 NC/Nga 생쥐의 임상 결과

DNCB 유발 대조군에서는 정상군에 비해 건조함, 홍반, 미란 등의 아토피 피부염 증상이 나타났다. 그러나 JS2 상등액을 적용하면 이러한 아토피 피부염 증상이 완화되었다. 도 8은 5개 그룹(Normal, Control, JS2 1%, JS2 2%, JS2 4%)으로 구분된 등 피부의 전형적인 이미지를 보여준다. JS2 상등액 처리는 마우스 털을 생성하고 죽은 피부를 감소시켰다. 피부염의 임상적 중증도는 SCORAD index를 이용하여 평가하였고, 해당 결과를 도 9에 나타내었다. 대조군(DNCB 유발) 그룹은 정상군에 비해 유의하게 높은 중증도(severity)를 보인 반면, JS2 상등액 처리 마우스에서는 대조군에 비해 중증도가 감소한 것으로 나타났다. 이러한 발견은 JS2 상등액을 사용한 치료가 아토피 피부염 중증도를 감소시킬 수 있음을 입증한다.

(2) JS2 상등액은 긁는 행동(Scratching behavior)을 완화한다.

긁는 행동은 30분당 3.2 ± 0.6 회, 대조군에서는 62.3 ± 22.7 회 관찰되어 아토피 피부염 유사 피부 병변군에서 긁는 행동이 눈에 띄게 증가한 것을 확인하였다(도 10). JS2 상등액 처리군의 긁는 행동은, 30분당, JS2 상등액 1% 처리군에 비해 22.9 ± 19.3 배, JS2 상등액 2% 처리군에 비해 25.7 ± 17.6 배, JS2 상등액 4% 처리군에 비해 14.7 ± 8.4 배 높은 것으로 관찰되었다. JS2 상등액 4% 그룹은 유의성을 보였다($p < 0.05$).

(3) NC/Nga 마우스의 JS2 상등액에 의한 신체 및 기관 중량 변화

JS2 상등액 독성을 확인하기 위해 마우스 체중과 장기 무게를 측정했다(표 3). DNCB로 유도된 생쥐에서는 정상에 비해 체중 감소가 나타났다. 간 조직의 무게는 정상에 비해 증가했다. 또한, DNCB로 유도된 생쥐에서는 비장 무게가 유의하게 증가했다($p < 0.01$). JS2 상등액 1% 및 JS2 상등액 4% 그룹은 일부 비장 중량을 회복했습니다($p < 0.05$). 신장과 흉선의 무게 변화는 정상인과 비교하여 눈에 띄는 차이가 없었다.

표 3

	Body weight(g)			Organ weight(% of body weight)		
	Initial	Final	liver	Spleen	kidney	thymus
Normal	24.39 ± 0.70	27.34 ± 0.86	4.30 ± 0.16	0.29 ± 0.02	1.41 ± 0.10	0.052 ± 0.002
Control	24.44 ± 2.33	24.40 ± 1.39	5.01 ± 0.49	0.47 ± 0.09	1.50 ± 0.06	0.049 ± 0.011
JS2 1%	25.10 ± 1.18	25.44 ± 1.43	4.38 ± 0.26	0.38 ± 0.05	1.50 ± 0.11	0.044 ± 0.007
JS2 2%	25.01 ± 1.64	24.62 ± 1.57	4.97 ± 0.65	0.40 ± 0.04	1.48 ± 0.12	0.048 ± 0.023
JS2 3%	25.17 ± 1.05	24.76 ± 1.17	4.72 ± 0.37	0.37 ± 0.04	1.48 ± 0.08	0.056 ± 0.008

(4) DNCB 유발 NC/Nga 마우스에서 IgE, IL-10, IL-1 β , TARC 및 IFN- γ 의 혈청 수준에 대한 JS2 상등액의 효과

상승된 혈청 IgE 수준은 아토피 피부염과 연관되어 있다. 본 발명자는 JS2로 처리된 마우스에서 IgE 수준의 변화를 조사했습니다(도 11A). 본 발명자는 JS2 상등액 처리군의 IgE 수준이 대조군에 비해 감소한 것을

발견했다.

[0146] 본 발명자는 아토피 피부염 마우스 모델에서 JS2 상등액의 효과를 평가하기 위해 혈청 내 사이토카인과 케모카인을 추가로 측정했다(도 11B, C, D 및 E). IL-10 및 IL-1 β 는 혈청 TARC 수준을 사용하여 IgE 매개 아토피 피부염과 비IgE 매개 아토피 피부염 모두에서 아토피 피부염의 중증도를 평가할 수 있다고 보고되었다. 대조군에서는 INF- γ , IL-10 및 TARC 혈청 수치가 유의하게 증가했다. 그러나 JS2 상등액으로 처리하면 IL-10, IL-1 β 및 TARC의 수준이 감소하였고 반면 INF- γ 의 수준은 증가하였다. 이러한 결과는 JS2 상등액이 아토피 피부염 관련 사이토카인 및 케모카인의 억제로 인해 아토피 피부염을 완화했음을 시사한다.

[0147] 즉, INF- γ 를 증가시키면서 혈청 내 IgE, TARC, IL-10 및 IL-1 β 를 억제하는효과는 *P. frigorigerans* JS2가 아토피 피부염에서 발견되는 Th 세포의 불균형을 회복한다는 것을 의미한다

[0149] (5) DNCB 유발 NC/Nga 마우스의 등 피부 표피 두께

[0150] 표피 두께에 대한 국소 JS2 상등액 적용의 효과를 DNCB 유발 아토피 피부염 마우스 모델에서 분석했다. 피부 조직 샘플을 H&E 염색하고 광학 현미경을 사용하여 400x 배율로 검사했다. 그 결과, DNCB 유도군의 표피 두께는 84.48 μ m로, 비DNCB 유도군 11.64 μ m에 비해 약 7배 증가하였다(도 12). 이에 반해, 1% JS2 상등액을 처리한 그룹은 표피 두께가 81.85 μ m, 2% JS2 상등액을 처리한 그룹은 72.94 μ m, 4% JS2 상등액을 처리한 그룹은 40.63 μ m의 두께를 나타냈다. 이러한 측정은 DNCB 유도군에 비해 상당한 감소를 나타냈으며, 이는 표피 두께의 유의한 감소를 나타냅니다.

[0152] (6) DNCB 유발 NC/Nga 마우스에서 JS2 상등액이 로리크린과 인볼루크린에 미치는 영향

[0153] 로리크린(Loricrin)과 인볼루크린(involucrin)은 피부 장벽 형성을 촉진하는 단백질이다. 본 발명자는 Western blotting을 통해 생쥐의 등쪽 친척에서 이러한 단백질을 측정하고 JS2 상등액의 피부 장벽 보호 효과를 확인했다. DNCB 유발 아토피 피부염 마우스 모델에서 표피 단백질에 대한 JS2 상등액 처리 효과가 도 13에 나와 있다. 로리크린(Loricrin)과 인볼루크린(involucrin)은 DNCB 유발 그룹에서 상당한 증가를 보였다. 또한, 해당 단백질을 JS2 상등액으로 처리할 때 농도 의존적 감소를 나타냈다.

[0155] 3. JS2로부터 항-아토피 피부염 화합물의 분리

[0156] (1) *P. frigorigerans* JS2 상등액으로부터 활성 물질을 정제 및 분리하기 위한 컬럼 크로마토그래피

[0157] *P. frigorigerans* JS2 배양액(12 L)의 상등액을 얻고 디클로로메탄, 에틸 아세테이트(EA) 및 n-BuOH를 사용하여 분획화했다. 4개의 분획 중에서 EA 분획은 가장 효과적인 NO 억제 활성(그림 14B)과 β -헥소사미니다제 방출(도 14C)을 생성했다. RAW 264.7 또는 RBL-2H3 세포에서는 뚜렷한 세포독성이 없었다. EA 분획의 개방 컬럼 크로마토그래피는 NO 억제 및 β -헥소사미니다제 방출에서 상당한 효능을 입증했다. 본 발명자는 7개의 분획(EA1-EA7)을 얻고 NO 억제 및 β -헥소사미니다제 방출을 연구했다. 대부분의 EA 분획에서 높은 농도에서 NO 억제가 나타나지 않았으며 EA6 분획은 모든 농도에서 상당한 효과를 나타냈다(도 15A). 모든 EA 분획은 β -헥소사미니다제 방출을 억제했다(도 15B). 하나의 EA 분획으로 인해 L-페닐알라닌(JS2-E6)이 분리되었다(도 14A). 분리된 두 화합물의 화학 구조 결정은 NMR 스펙트럼 데이터를 분석을 통해 이루어졌다.

[0159] (2) L-페닐알라닌의 세포독성

[0160] L-페닐알라닌($C_9H_{11}NO_2$)은 백반증과 티로신 생성에 역할을 하고 파킨슨병의 증상을 감소시키는 필수 단백질 생성 아미노산이다. 본 발명자는 RAW 264.7(도 16A) 및 RBL-2H3(도 16B)에서 MTT에 의한 L-페닐알라닌의 세포독성을 조사했다. 주목할만한 세포 독성은 없었다. 따라서 다음 실험에서는 JS2 상등액과 동일한 농도인 25, 50 및 100 μ g/mL의 L-페닐알라닌을 사용했다.

[0162] (3) NO 억제 및 β -헥소사미니다제 방출에 대한 L-페닐알라닌의 효과

- [0163] NO 및 염증성 사이토카인과 같은 염증성 분자는 대식세포에 의해 생성된다. 그러나 NO의 과잉 생산은 만성 염증을 유발한다. 본 발명자는 RAW 264.7 세포에서 NO 방출에 대한 L-페닐알라닌의 억제 효과를 조사했다. 도 17A는 L-페닐알라닌이 NO 생성을 유의하게 억제한다는 것을 보여준다. 호염기성 백혈병 세포에서 발견되는 효소인 β -헥소사미니다제는 탈과립 중에 방출되는 히스타민의 양과 관련이 있다. 그 수준은 항알레르기 치료의 효과를 평가하는 지표로 사용될 수 있다. 본원 발명에서, L-페닐알라닌으로의 전처리는 DNP-BSA-자극된 RBL-2H3 세포에서 탈과립화를 유의하게 억제하였다(도 17B).
- [0165] (4) RAW 264.7 세포에서 L-페닐알라닌으로 과발현된 유전자의 억제
- [0166] NO는 염증성 사이토카인과 함께 염증 반응에 참여한다. 도 18에 나타난 바와 같이, L-페닐알라닌은 TNF- α 및 IL-6의 발현을 실질적으로 약화시켰다. 또한, L-페닐알라닌은 COX-2와 iNOS 발현을 현저하게 억제했다. 따라서 본 발명자는 L-페닐알라닌이 RAW264.7 세포에서 염증성 사이토카인과 TNF- α , IL-6, COX-2 및 iNOS를 포함한 분자의 발현을 효과적으로 감소시키는 것을 제안합니다.
- [0168] (5) RAW 264.7 세포에서 L-페닐알라닌이 COX-2/iNOS 신호전달 경로에 미치는 영향
- [0169] COX-2/iNOS 신호 전달 경로에 대한 L-페닐알라닌의 효과를 확인하기 위해 웨스턴 블롯으로 분자를 측정했다(도 19). RAW 264.7 세포를 LPS에 노출시켰을 때 비처리군에 비해 COX-2와 iNOS가 유도되었다. 그러나 COX-2와 iNOS는 L-페닐알라닌에 의해 억제되었다.
- [0170] 또한, L-페닐알라닌은 항-DNP-BSA- 및 DNP-BSA-자극 RBL-2H3 세포에서 MAPK 단백질(JNK 및 p38)의 인산화를 억제한다(도 20). 결론적으로 L-페닐알라닌은 RAW264.7 세포에서 COX-2/iNOS를 감소시키고 RBL-2H3 세포에서 JNK와 p38의 인산화를 감소시켜 염증을 억제한다.
- [0172] <논의>
- [0173] 본 발명에서는 LPS에 의해 유발되는 과도한 NO 생성 수준과 COX-2 및 iNOS와 같은 염증 매개체의 발현 수준을 분석했다. 대식세포에서 LPS에 의해 염증이 발생한 경우, JS2 상등액의 사이토카인 억제 효과를 확인하였다. 또한, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 JS2 상등액을 처리한 경우 웨스턴 블롯을 통해 COX-2와 iNOS의 분자 발현 정도를 확인하였다. 염증성 사이토카인인 TNF α , IL-6 및 IL-1 β 는 JS2 상등액을 처리한 RAW 264.7 세포에서 억제되었으며, COX-2 및 iNOS도 단백질 수준에서 억제되었다. 상기 결과는 JS2 상등액이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 염증 매개체에 대한 억제 효과를 나타냄을 확인시켜준다. 따라서 JS2 상등액의 항염증 효과는 아토피 피부염과 같은 염증성 질환의 치료제로 활용될 수 있음을 나타낸다.
- [0174] RBL-2H3 세포주는 주로 아토피 피부염 연구에서 알레르기 반응과 관련된 염증을 조사하는 데 사용된다. RBL-2H3 세포에는 IgE와 결합할 수 있는 표면 수용체가 존재하는데, 항원-항체 반응을 통해 세포가 IgE와 결합하면 세포가 활성화되어 다양한 염증성 사이토카인이 분비된다. 따라서 RBL-2H3 세포는 알레르기 항원, 히스타민 분비 및 기타 염증 매개체 간의 상호 작용을 조사하는 데 사용될 수 있다. RBL-2H3에서 처리된 JS2 상등액으로 β -방출이 억제되었다. 또한, JS2 상등액이 염증과 관련된 사이토카인인 TNF α , IL-4, IL-1 β 를 억제하는지 조사하였다. 본 발명자는 JS2 상등액 처리가 p38과 염증 반응 조절에 관여하는 MAPK 단백질인 JNK의 인산화를 억제한다는 것을 웨스턴 블롯에서 확인했다. 이러한 시험관 내 결과를 바탕으로 본 발명자는 JS2 상등액이 아토피 성 염증 매커니즘에 관여한다는 가설을 세웠다. 본 결과는 JS2 상등액이 β -hexosaminidase의 배설과 사이토카인 생성을 유의하게 억제한다는 것을 보여준다. 따라서 JS2 상등액은 아토피 피부염을 해결하기 위한 실행 가능한 치료 후보가 될 수 있다.
- [0175] 본 발명에서는 RAW 264.7 세포에서 NO 저해를 보이는 미생물을 스크리닝했다. RAW 264.7 세포를 처리하기 위해 213종 중에서 선별된 5종의 미생물을 다양한 농도로 사용하였다. 하나의 미생물(158)이 선택되었다. 16S rRNA 시퀀싱 후 미생물은 *Peribacillus frigoritolerans* JS2로 확인되었다. 본 발명자는 그 효과를 확인하기 위해 JS2의 상등액을 사용했다.
- [0176] JS2가 Th1/Th2의 불균형을 억제하고 염증성 바이오마커의 발현을 감소시킨다는 사실을 바탕으로 생체 내 실험을 수행했다. 실험은 DNCB로 유도된 NC/Nga 모델에서 수행되었다. 희생 전 날 피부염 점수와 긁는 행동을 측정한 결

과, JS2 상등액 처리군에서 점수가 낮은 것으로 확인되었다. 해부 후 장기의 체중 변화는 DNCB 유발군이 정상군에 비해 체중 감소를 나타냈다. 또한 정상군에 비해 대조군의 간 및 비장의 무게가 증가하는 것을 관찰하였다. 이는 아토피 피부염 증상 증가로 인한 염증 반응 증가로 인한 조직 부종으로 인한 것으로 추정된다. 아토피 피부염의 증상은 Th1과 Th2 세포 사이의 면역 불균형의 결과라는 우리의 가설에 따라, Th2 세포 분화에 의해 발현된 IL-10 및 IL-1 β 의 혈청 수준은 정상에 비해 대조군에서 증가를 나타냈고 JS2 상등액 처리에서는 감소했다. 반면에, Th1 세포 분화에 의해 발현된 IFN- γ 의 혈청 수준은 정상에 비해 대조군에서 감소하였고, JS2 상등액 처리로 회복되었다. 또한 아토피 피부염에서는 비만 세포가 IgE에 의해 활성화되어 Th2 면역 반응을 유발하고 염증 반응을 일으킨다. 아토피 피부염 환자의 혈류 내 IgE 양이 증가하여 상태의 개선 또는 중증도를 나타내는 지표가 된다. DNCB로 유도된 NC/Nga 마우스에 JS2 상등액을 처리한 경우 IgE 수준이 감소하는 것을 관찰했다. 전반적으로, 집단적 생체내 발견은 JS2 상등액이 잠재적으로 Th1/Th2 분화를 조절함으로써 아토피 피부염 증상을 완화한다는 것을 나타낸다. 등 피부 박리 후 H&E 염색을 이용하여 표피 두께를 조직학적으로 분석한 결과, DNCB 유도군은 처리하지 않은 군에 비해 표피 두께가 약 7배 증가한 것으로 나타났다. 대조적으로, JS2 상등액을 처리한 경우, 농도 의존적으로 표피 두께가 감소하는 것이 관찰되었으며, 이는 피부 손상이 완화되었음을 나타낸다. 피부 장벽 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 단백질인 로리크린과 인볼루크린의 발현을 확인하기 위해 NC/Nga 마우스에서 추출한 등 피부 조직을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. DNCB 유발군에서 loricrin과 involucrin의 발현이 증가하였다. 그러나 JS2 상등액으로 처리하면 농도에 따라 로리크린 및 인볼루크린 발현 수준이 감소했다. 이러한 결과는 JS2 상등액이 아토피 피부염과 관련된 표피 세포의 과도한 분화 및 증식을 억제한다는 것을 나타낸다. 결과적으로, JS2 상등액은 표피 세포의 비정상적인 분화 및 증식을 완화하여 파괴된 피부 장벽을 회복함으로써 아토피 피부염에 대한 유망한 치료 가능성을 나타내는 것으로 추론할 수 있다.

[0177] JS2 상등액에 존재하는 활성 성분을 확인하기 위해 물질 분리 절차를 수행했다. 본 발명자는 *P. frigiditolerans* JS2에서 활성 물질인 L-페닐알라닌을 분리하고 확인했다. 본 연구를 통해 JS2의 대사산물로부터 분리된 페닐알라닌의 항-아토피 피부염 효과가 확인되었다. L-페닐알라닌의 항-아토피 피부염 효과는 RAW 264.7 및 RBL-2H3 세포를 대상으로 시험관 내에서 조사되었다. L-페닐알라닌은 RAW 264.7 세포에서 COX-2/iNOS 신호 전달 경로를 억제했다. 또한, L-페닐알라닌은 전염증성 사이토카인(TNF α , IL-6)을 효과적으로 억제했다. 또한, L-페닐알라닌은 항-DNP-BSA- 및 DNP-BSA-자극 RBL-2H3 세포에서 MAPK 단백질(JNK 및 p38)의 인산화를 억제한다. 결론적으로 L-페닐알라닌은 RAW264.7 세포에서 COX-2/iNOS를 감소시키고 RBL-2H3 세포에서 JNK와 p38의 인산화를 감소시켜 염증을 억제한다. 동일한 실험에서 동일한 농도의 JS2 상등액과 비교하여 페닐알라닌은 사이토카인 및 염증 관련 분자에 대한 더 큰 억제를 나타냈다. 이는 JS2의 대사산물인 페닐알라닌이 COX-2/iNOS 및 JNK/p38 경로를 조절하여 아토피 피부염 완화에 관여한다는 것을 나타낸다.

[0178] 이러한 발견을 바탕으로 본 발명자는 JS2의 대사산물이 항-아토피 피부염 효과를 가지고 있음을 확인했다. 앞으로는 페닐알라닌 외에 JS2 배양물에 존재하는 화합물을 발견하기 위한 추가 연구가 필요하며, 미생물 JS2의 2차 대사산물은 아토피 피부염 치료 후보로 간주된다.

[0180] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

수탁번호

[0182]

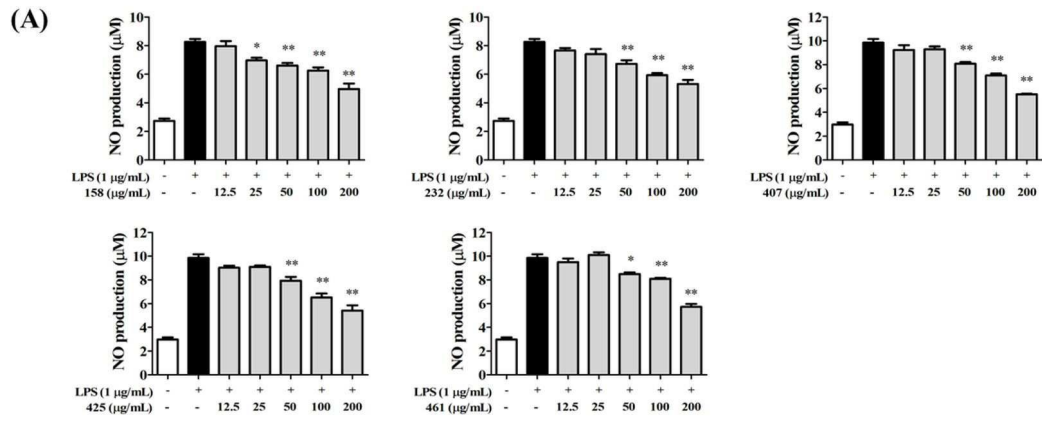
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13403P

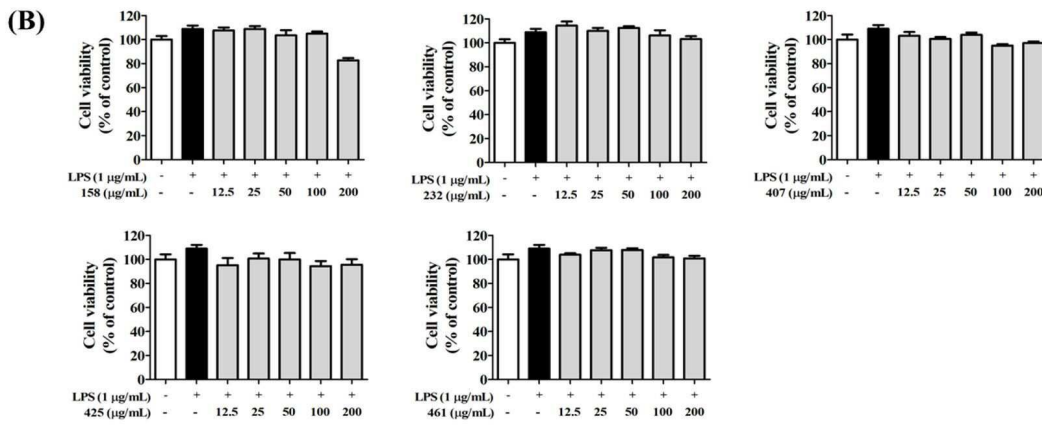
수탁일자 : 20231010

도면

도면1a



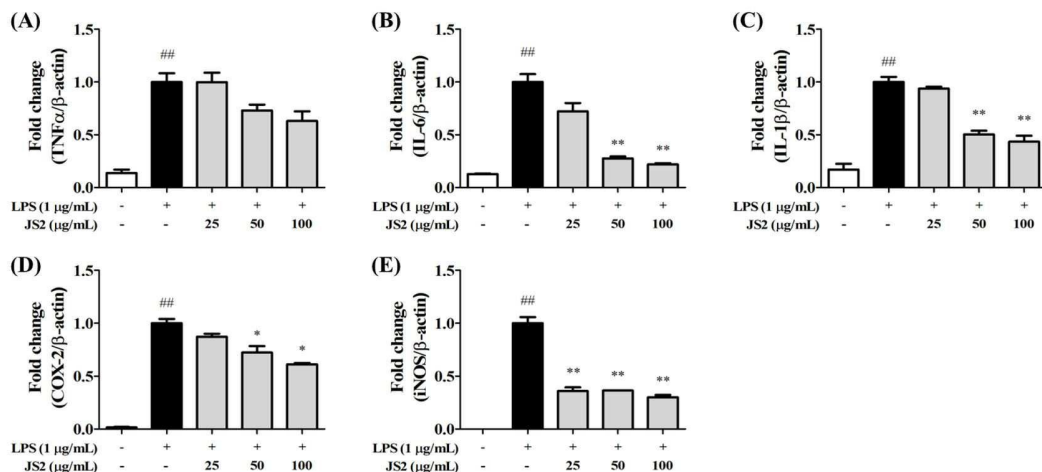
도면1b



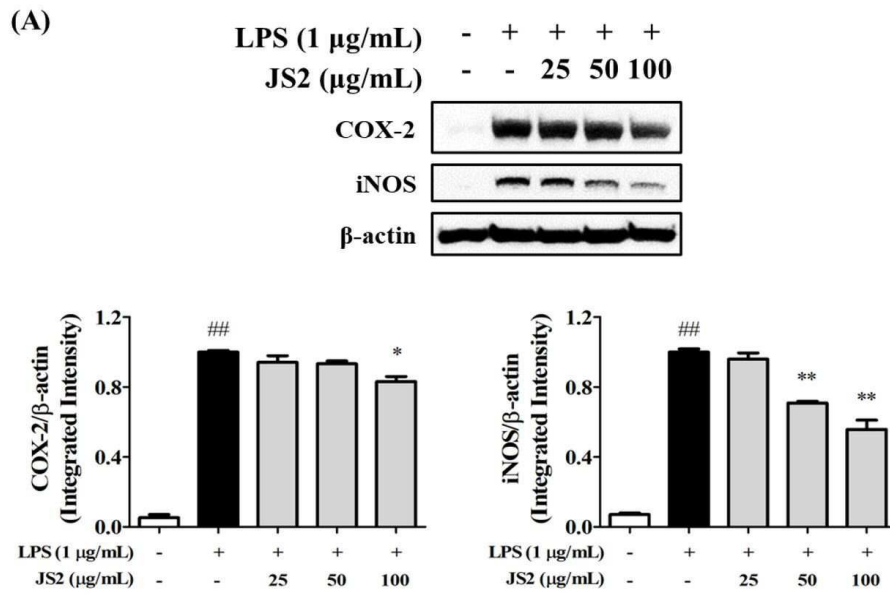
도면2

Strain	16S rRNA sequence
<i>Brevibacterium frigoris</i> JS2	TTAGGGCGGCTGGCTCCATGAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTT ACAAACTCTCGTGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAA CGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCATTACTAGCGATTCCGGC TTCATGACGGCGAGTTGACGCTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCT TTATGGGATTTCGCTTACCTTCGCGAGTTTGCAGCCCTTTGTACCAT CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCGAGGTGATAAGGGGCATGATGAT TTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCT TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGC TCGTTGCGGACTTAACCAACATCTACGACACGAGCTGACGAC AACCATGCACCACTGTCACTCTGCCCGAAGGGGAAAGCCCT ATCTCTAGGGTTGTGACAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTC GCGTTGCTTCGAATTAAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC CCGTCAATTCTTTGAGTTTACGCTTGGCGCGTACTCCCCAGGC GGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCT CTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACGAGGATC TAATCTGTTTGTCCCGACGCTTTCGCGCTCAAGTGTCAAGTTACA GACAGAAAGTGCCTTTCGCACTGGTGTCTCCAAATCTCTACG CATTTCACCGTACACTTGAATTCACCTTCTCTCTGCACTCA AGTTCCCGAGTTTCCAATGACCTCCACGTTGAGCGGTGGGCTT CACATCAGACTTAAGGAACCACTGCGCGCTTACGCCCAATA ATTCCGGACAACGCTTGCCACTACGTATTACCGCGCTGCTGGC ACGTAGTTAGCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCA GCAGTTACTCTGGTACTTGTCTTCCCTAACCAACAGAACTTACGA CCCGAAGGCCTTCTCGTTACGCGGCGTGTCTCCGTCAGACTTTC GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCGCTAGGAGTCTGG GCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCT ACGCATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATG CGCCGCGGCGCCATCTATAAGTGACAGCGTAAACCGTCTTTCCAT CTTCTCTATGCGAGAAAGAACGTATCCGGTATTAGCTCCGGTTT CCCGAAGTTATCCAGTCTTATAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTC ACCCGTCGCGCTAATCTCAGGGAGCAAGCTCCCGTCGATTTCGC TCGACTGC

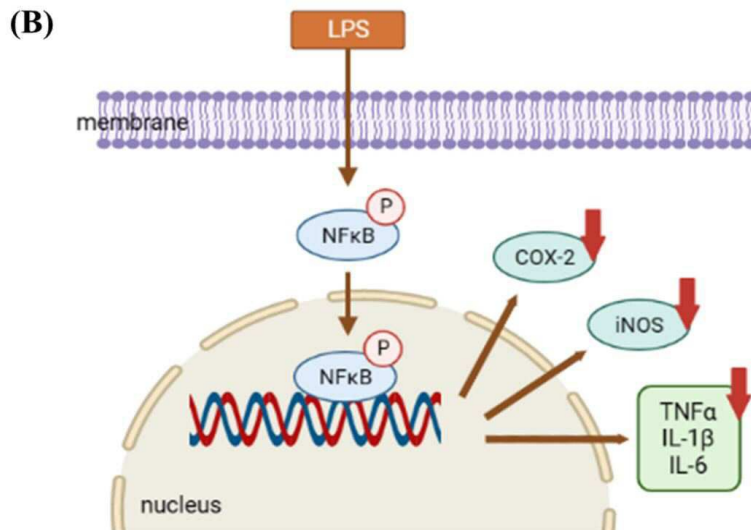
도면3



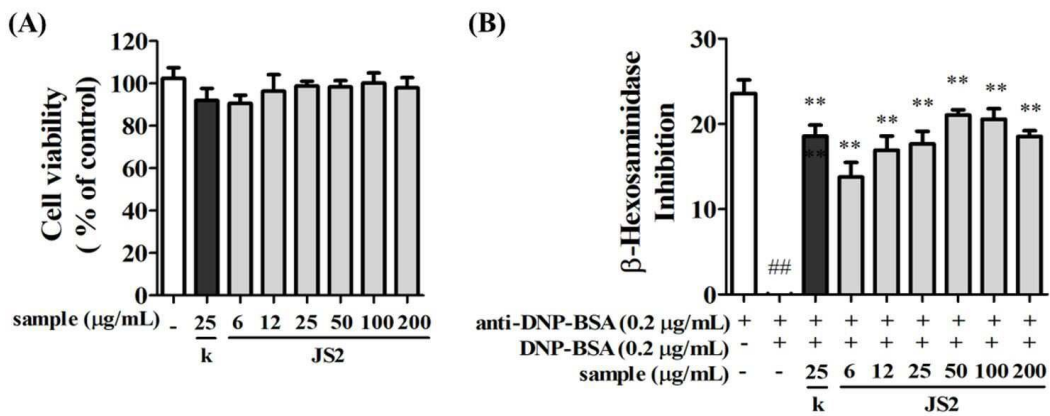
도면4a



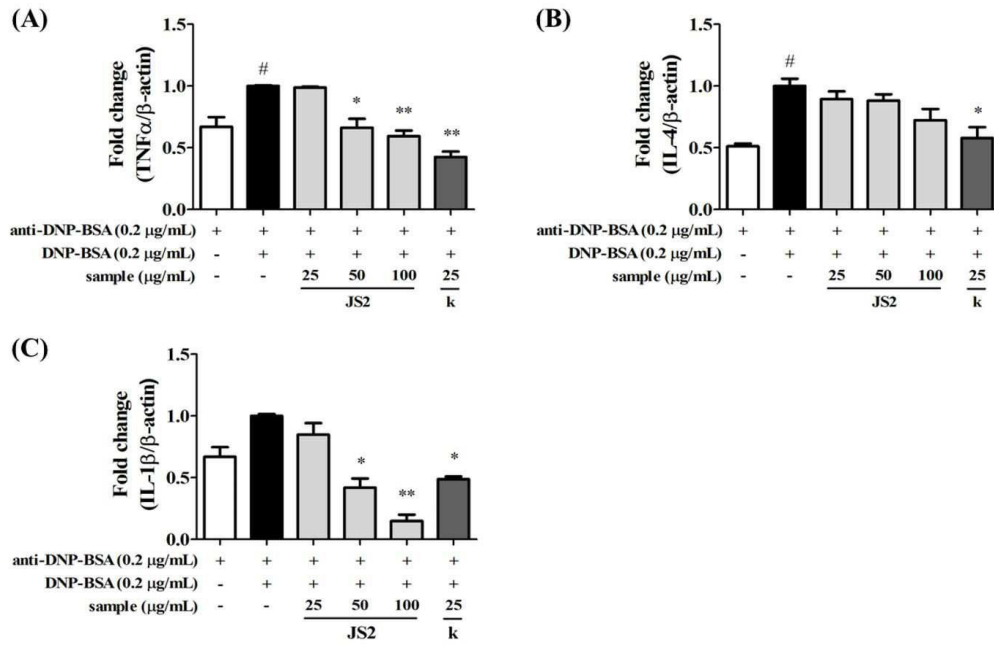
도면4b



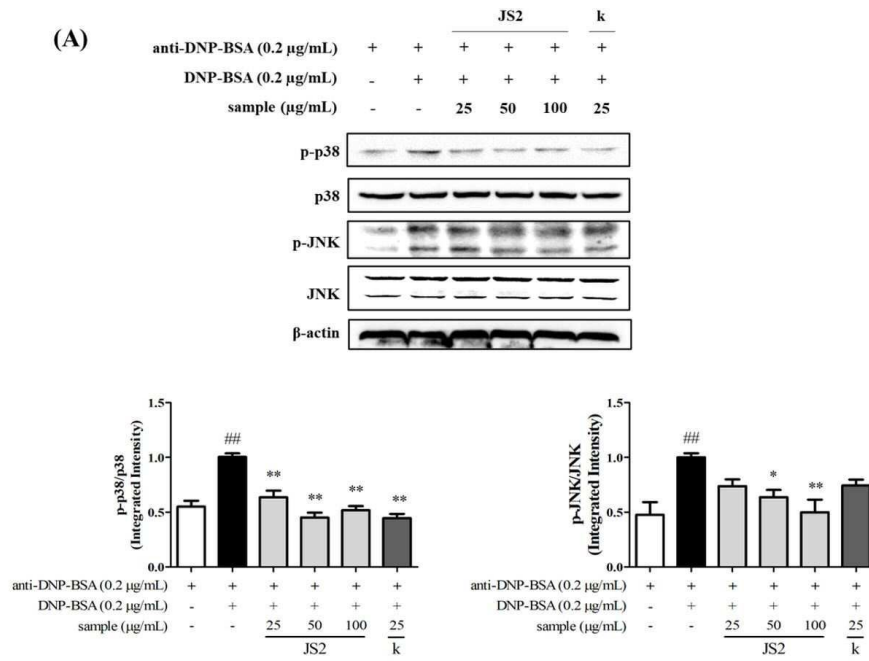
도면5



도면6

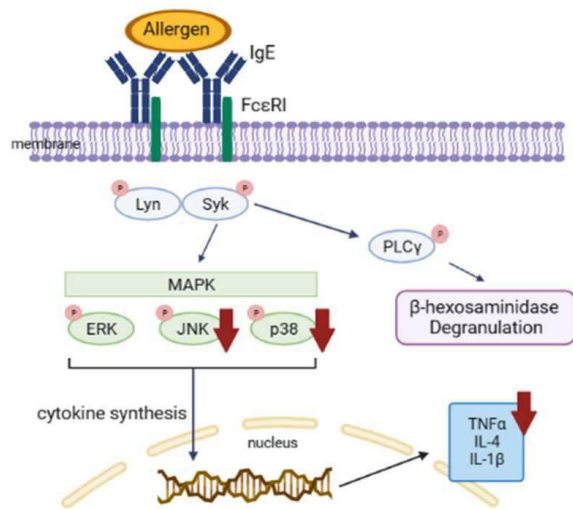


도면7a

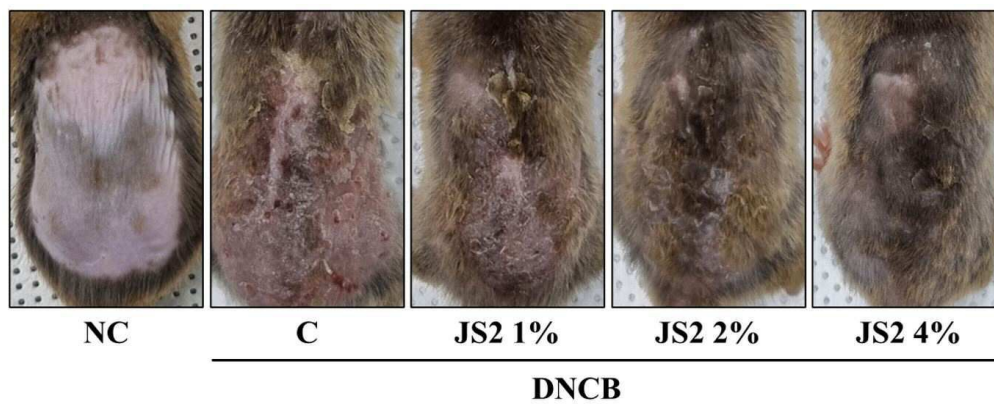


도면7b

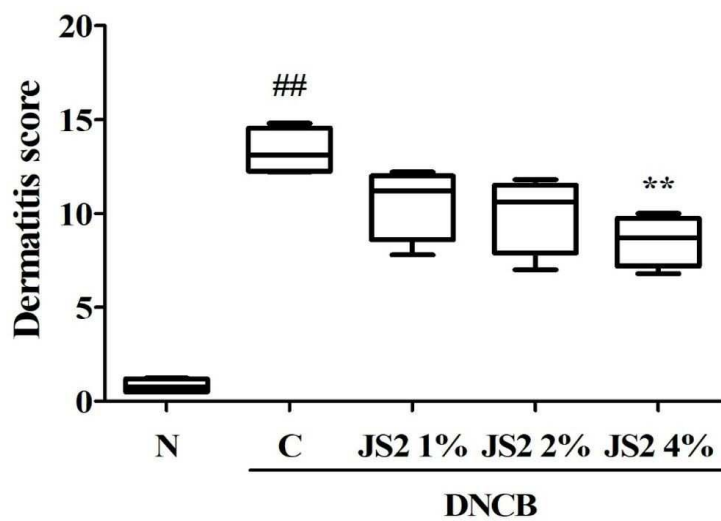
(B)



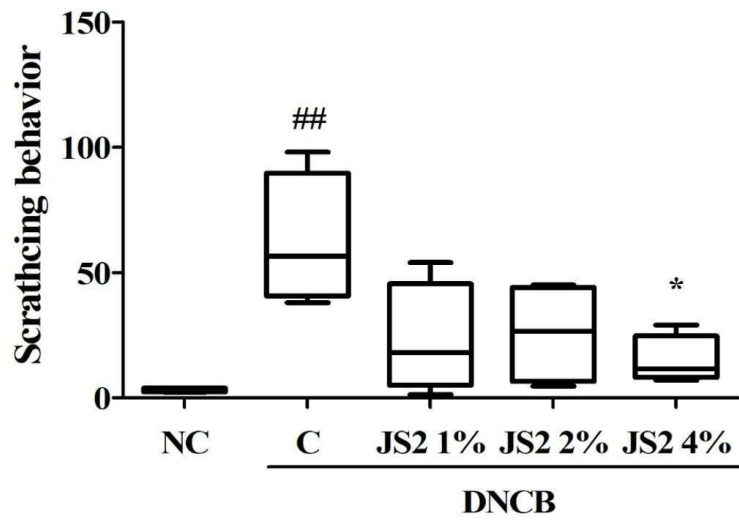
도면8



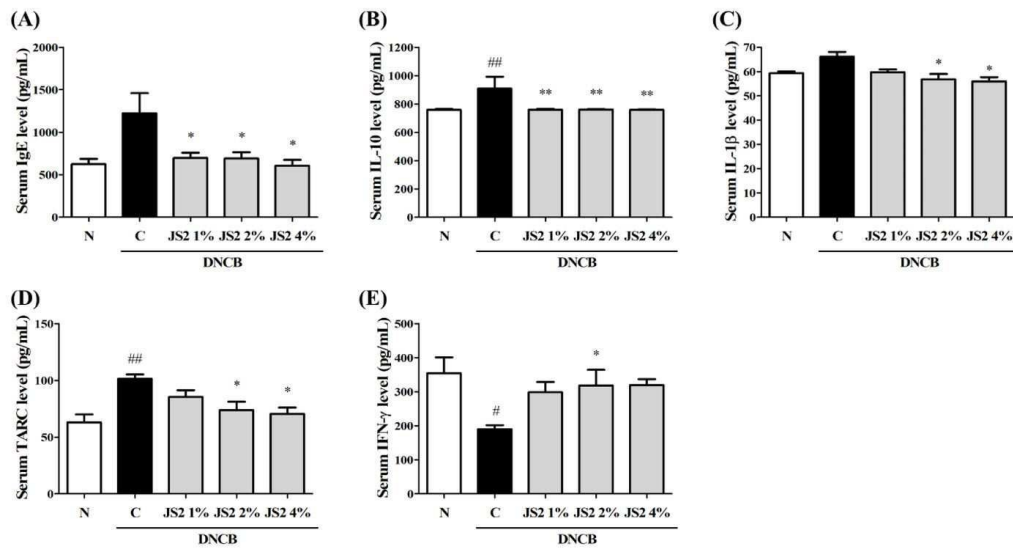
도면9



도면10

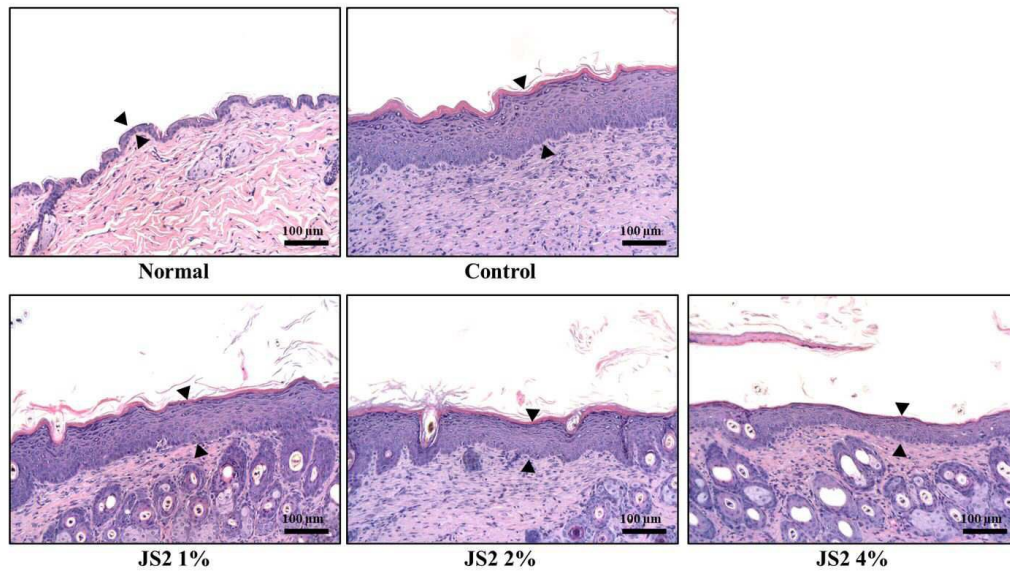


도면11



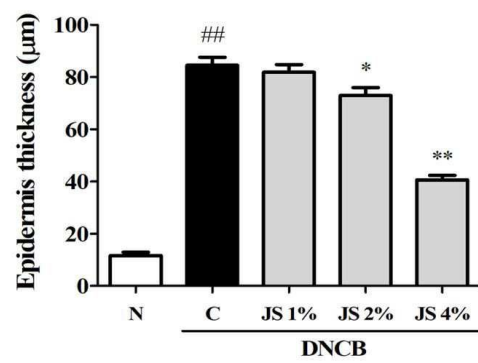
도면12a

(A)

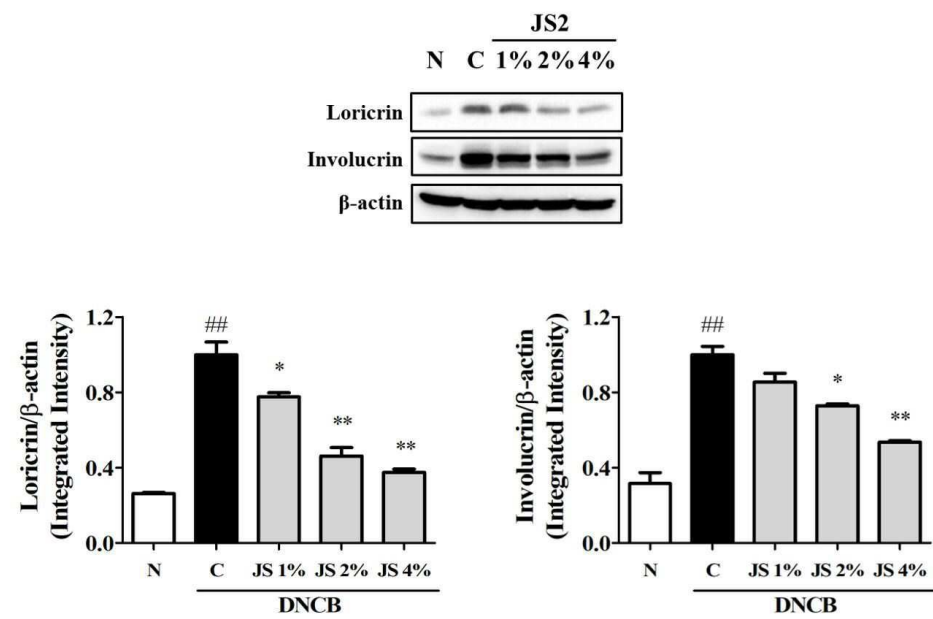


도면12b

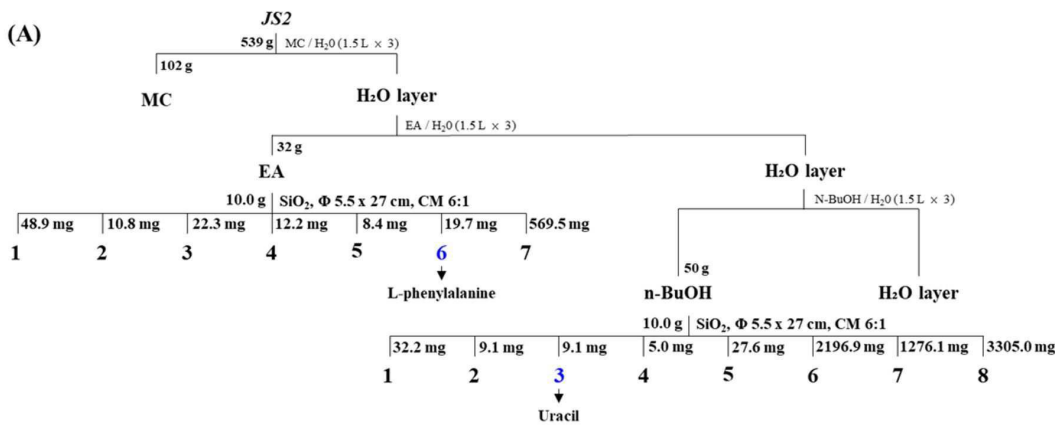
(B)



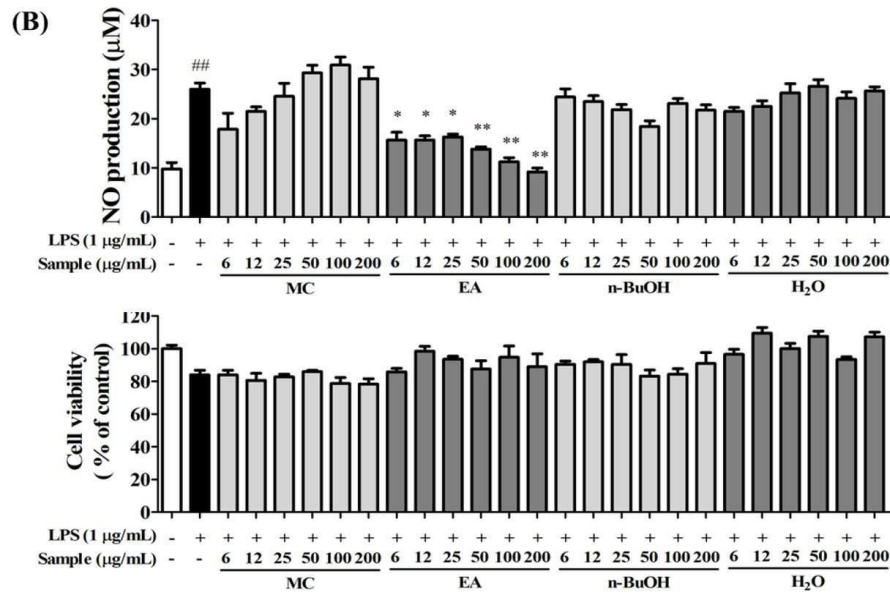
도면13



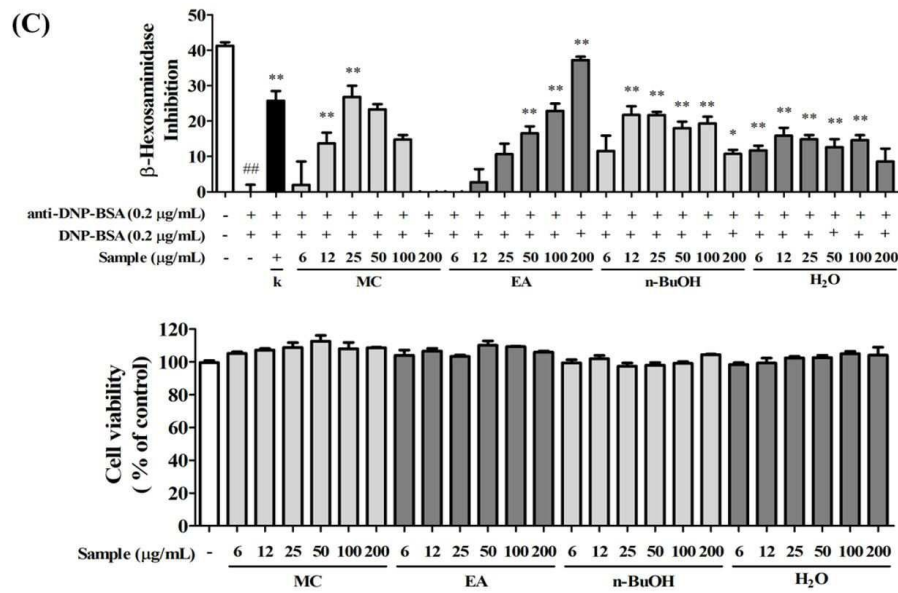
도면14a



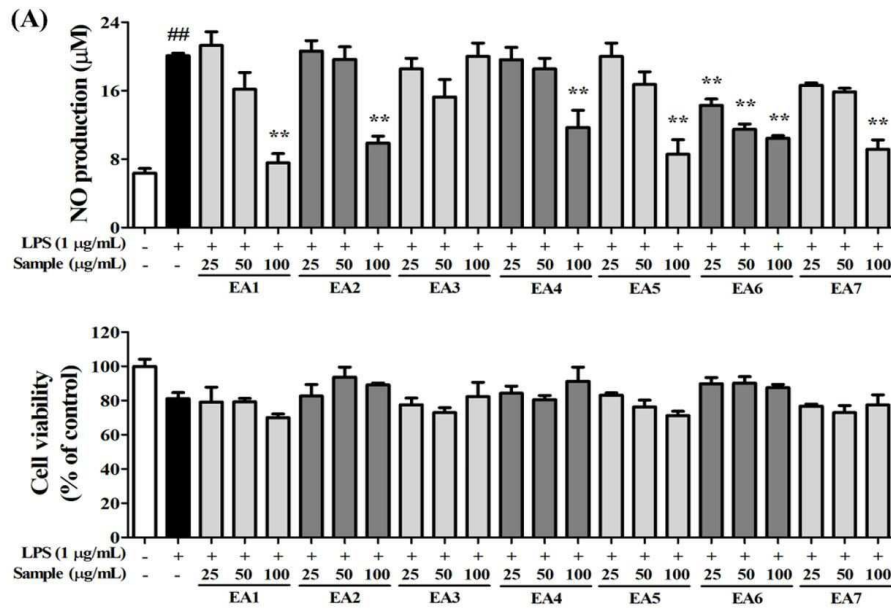
도면14b



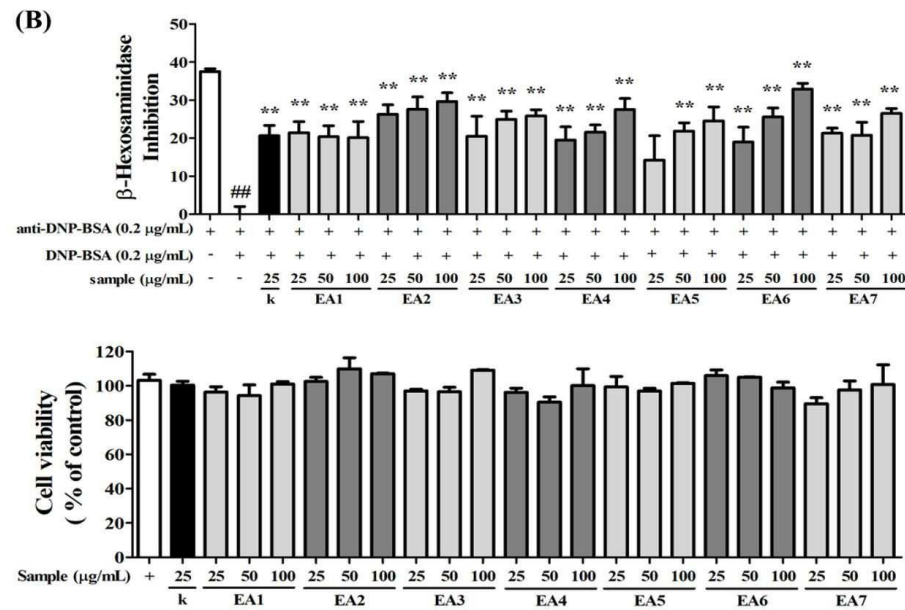
도면14c



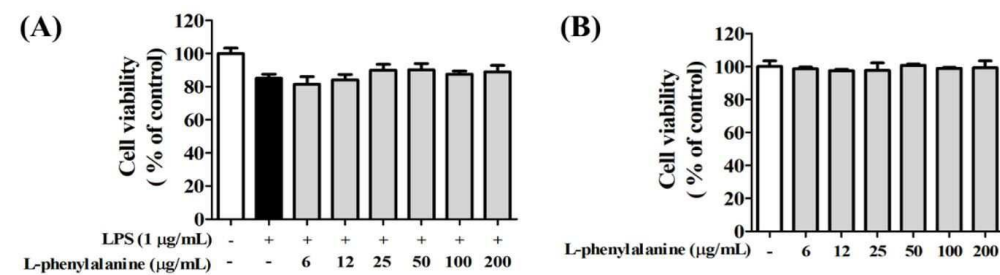
도면15a



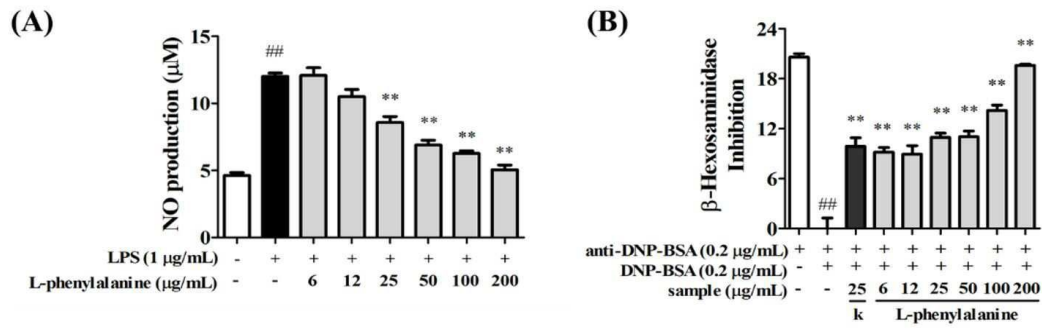
도면15b



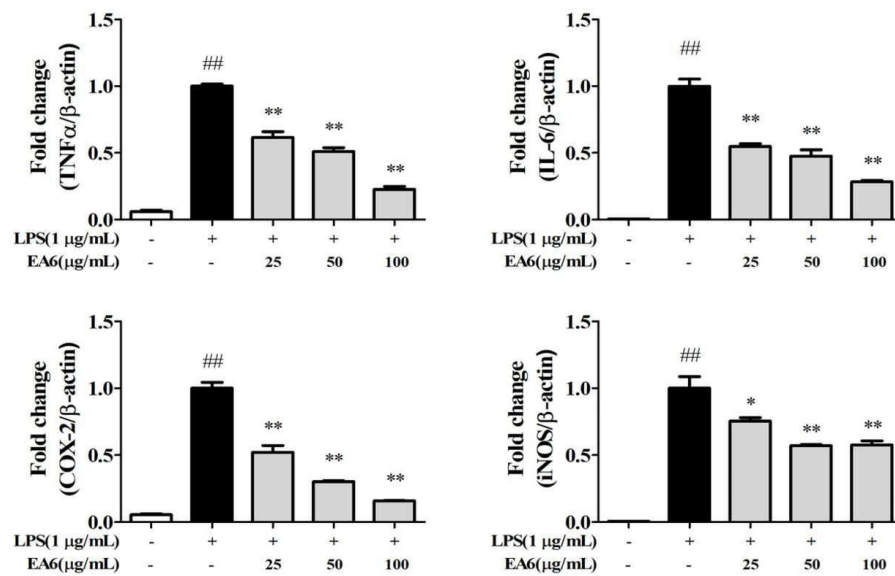
도면16



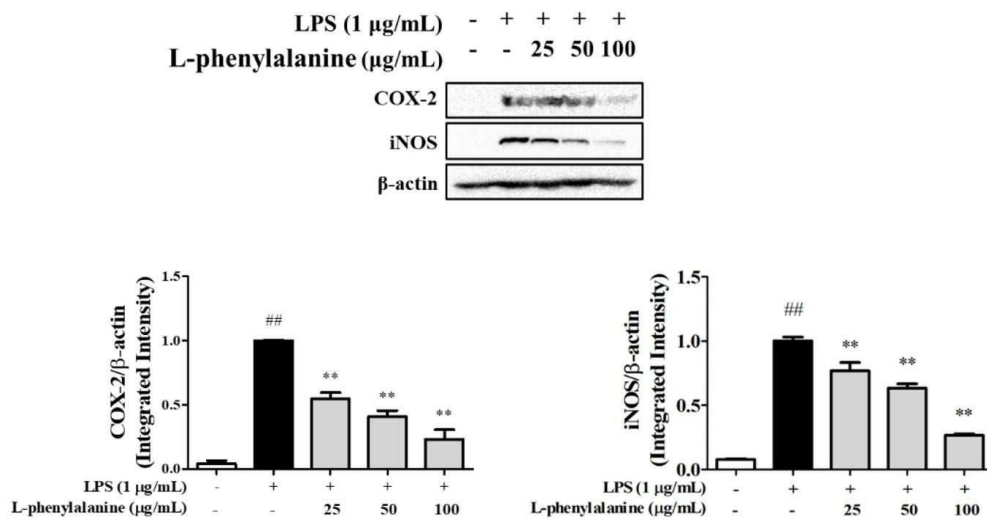
도면17



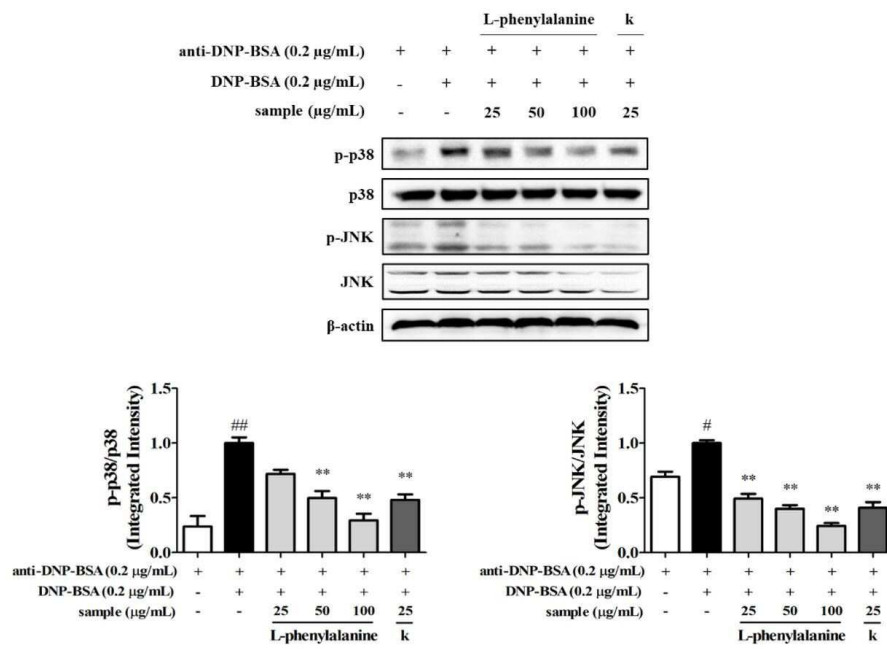
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.