



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0122110  
(43) 공개일자 2013년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/74 (2006.01) A61K 31/40 (2006.01)  
A61K 31/409 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0045179  
(22) 출원일자 2012년04월30일  
심사청구일자 2012년04월30일

(71) 출원인  
건국대학교 산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
한국해양과학기술원  
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)

(72) 발명자  
신희재  
경기도 수원시 권선구 금곡동 삼익1차 아파트 103동 1101호  
이광호  
충청북도 충주시 교현동 남산2길 21  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
이상문, 박천도

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토클로린을 포함하는 항 알러지 조성물

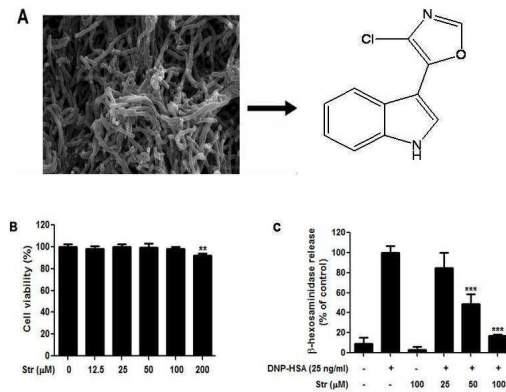
(57) 요약

본 발명에 따르면 스트렙토클로린은 in vitro에서 비만세포(mast cell)의 탈과립과 TNF, IL-4의 생산을 억제하였으며, 또한 in vivo에서는 DNFB로 유도한 마우스의 알러르기 피부염을 억제하였다.

따라서, 본 발명에 따른 스트렙토클로린을 활성성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 조성물은 그 효과가 뛰어나며 더더욱 해양미생물로부터 유래한 천연 물질인 스트렙토클로린을 활성성분으로 포함하기 때문에 부작용으로부터 자유로울 수 있다.

대표도 - 도1

Fig. 1



(72) 발명자

**이희승**

서울특별시 광진구 광장동 218-1 극동아파트 7동  
1105호

**이종석**

경기도 안양시 동안구 평안동 초원대원아파트 304  
동 306호

**이연주**

경기도 과천시 원문동 래미안슈르 319동 1602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 - (PE98816)

부처명 교육과학기술부

연구사업명 한국해양연구원 연구운영비 지원

연구과제명 해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구

기 여 율 7/10

주관기관 한국해양연구원

연구기간 2012.03.01 ~ 2012.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 - (PM56641)

부처명 국토해양부

연구사업명 해양생명공학기술개발

연구과제명 해외 해양생물자원 개발 및 활용기반 구축 사업

기 여 율 3/10

주관기관 한국해양연구원

연구기간 2011.08.01 ~ 2012.07.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

스트렙토클로린을 활성 성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 약학적 조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 알러지 질환이 천식, 알러지성 피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 비염 또는 아토피인 것을 특징으로 하는 알러지 질환 치료용 약학적 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 알러지 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)로부터 분리된 스트렙토클로린(streptochlorin)을 활성성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 습진, 두드러기, 아토피와 같은 알러지 피부염, 비염, 천식 등을 포함한 알러지 질환은 모든 연령층에 여러 요인으로 유발된다. 이러한 질환의 대부분은 유전적 소인, 환경적 유발자(알러젠)에 대한 피부의 과민반응, 면역 조절장애 등과 연관된 만성적 재발 염증성 질환이다.

[0003] 비만 세포(Mast cell)는 피부, 호흡기 점막, 위장관, 혈관 외막, 심근과 같은 알러젠의 표적 기관과 조직에서 알러지 반응을 일으키는데 중심적 역할을 한다. 비만 세포에서 알러젠, IgE와 고친화성 IgE 수용체 (FcεRI)의 결합은 탈과립을 통한 알러지 반응과 지질 매개물질의 합성을 통해 알러지 초기 반응을 유도할 수 있다. 따라서, 비만 세포를 불활성화하는 것은 알러지 질환을 예방하는 데 중요한 접근방법이다.

[0004] 알러지 질환을 치료하는데 많은 방법이 있지만 주로 치료보다 예방이 많으며, 또한 소화기 염증, 위궤양과 같은 부작용을 초래한다.

[0005] 해양미생물유래 생물활성물질은 일반적으로 세포독성이 없으며, 세포 특이성 활성이 있어 항생제, 항암제, 항염증제로서의 가능성이 알려지고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 천연 자원에서 유래된 신규 항-염증성 및 항-알러지성 제제를 개발하면 부작용이 없는 매우 유용한 제제가 될 수 있는 것에 착안하여 해양미생물 유래 천연 물질을 활성성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명은,

[0008] 스트렙토클로린을 활성 성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에 따른 알러지 질환 치료용 약학적 조성물에 있어서, 대상 알러지 질환은 천식, 알러지성 피부염, 알러지성 결막염, 알러지성 비염 또는 아토피일 수 있다.

**발명의 효과**

[0010] 본 발명에 따르면 스트렙토클로린은 in vitro에서 비만세포(mast cell)의 탈과립과 TNF, IL-4의 생산을 억제하

였으며, 또한 in vivo에서는 DNFB로 유도한 마우스의 알레르기 피부염을 억제하였다.

[0011] 따라서, 본 발명에 따른 스트렙토클로린을 활성성분으로 포함하는 알러지 질환 치료용 조성물은 그 효과가 뛰어나며 더더욱 해양미생물로부터 유래한 천연 물질인 스트렙토클로린을 활성성분으로 포함하기 때문에 부작용으로부터 자유로울 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0012] 도 1은 RBL-2H3 세포에서 스트렙토클로린의 세포 독성 및 탈과립에 대한 효능에 관한 것으로 A는 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.)로부터 얻어지는 스트렙토클로린의 분자구조, B는 RBL-2H3 세포에서 스트렙토클로린의 세포 독성 측정 결과, C는 RBL-2H3세포에서 DNP-HAS로 유도된 탈과립 반응에 대한 스트렙토클로린의 억제 효능 측정 결과이다.

도 2는 RBL-2H3 세포에서 스트렙토클로린 TNF- $\alpha$  및 IL-4의 분비 저해 효능에 관한 것으로서, A는 DNP-HAS로 유도된 TNF- $\alpha$ , B는 IL-4, 및 C는 mRNA의 발현 수준에 대한 결과이다.

도 3은 DNFB-유도 알러지성 피부염 마우스 모델에서 스트렙토클로린의 과민감 반응에 대한 효능에 관한 것으로, A는 마우스 모델의 확립 및 스트렙토클로린 처리, B는 귀뚜까 감소 효과, C는 MPO의 효소 활성 측정 결과, D는 헤마톡실린과 에오신 염색을 통한 조직학적 조사 결과이다.

도 4는 DNFB-유도 알러지성 피부염 마우스 모델에서 스트렙토클로린의 IgE와 염증성 cytokine의 생산과 분비 억제 효능에 관한 것으로, A는 IL-4, B는 INF- $\gamma$ , C는 TNF- $\alpha$  및 D는 IgE 생성에 관한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0013] 본 발명에서 사용된 스트렙토클로린 [C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>O]은 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)로부터분리된 노란색은 무정형 고형화합물(도 1A 참조)로서 이하 이 화합물의 항 알러지 효과에 대하여 상세하게 기술한다.

**1. 재료 및 방법**

**1.1. 세포 배양**

[0016] 본 실험은 RBL(Rat Basophile leukemia)-2H3 세포를 미국 세포은행 (American Type Culture Collection (ATCC); Manassas, VA, USA)으로부터 취득하여 이용하였다. 배지는 10% FBS(fetal bovine serum), 항생제(100 U/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 되었다.

**1.2. 시약**

[0018] 스트렙토클로린(*Streptochlorin*)은 동해안의 아야진에서 채집한 해양퇴적토로부터 분리한 해양 스트렙토마이세스(*Streptomyces* sp.)종인 04DH110을 발효배양액으로부터 분리하였다. 실험에 사용된 재료는 세포 배양액인 DMEM, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffer salin(PBS) 등의 세포배양 및 시약들은 모두 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다.

[0019] 또한 Dinitrophenyl-human serum albumin (DNP-HSA) 및 모든 시약은 sigma에서 TNF- $\alpha$ , IL-4 ELISA kit는 BD-OptEIA에서, 모든 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

**1.3. 세포 활성 검사 (MTT assay)**

[0021] 세포 독성을 확인하기 위해서 MTT(3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium Bromide) assay를 이용해서 측정하였다. RBL-2 H3 세포를cell을 96 well plate에 1 $\times$ 10<sup>4</sup> cell/50 $\mu$ l/well의 농도로 하룻밤 overnight해서 부착시킨 후, 시료를 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 7시간 동안 배양한다. 그리고 남은 배지를 모두 제거하고 MTT 용액을solution을 100ul를 처리해 주고 3시간 동안 배양incubation한다.

그리고 배지를 모두 제거하고 DMSO를 200 $\mu$ l를 넣어주고 10분간 반응시킨다. 10분 후에 microplate reader(molecular devices)로 550nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0022] **1.4.  $\beta$ -Hexosaminidase 측정**

[0023] RBL-2H3을 10%FBS를 포함한 MEM에 현탁시킨 후 IgE(100ng/ml 최종농도)를 넣고 24well plate에  $2.5 \times 10^5$  cell/well 농도로 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 7시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer(NaCl 119 mM, KCl 5 mM, Glucose 5.6 mM, MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) 0.4mM, PIPES 25 mM, NaOH 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.2) 로 2번 세척한 다음 각 well당 200ul Siraganian buffer와 sample을 농도별로 처리한 후 30분 동안 반응시켰다. 이후 DNP-HSA (25 ng/ml 최종농도) 사용하여 세포를 15분 동안 반응시키고 ice bath에서 10분간 incubation시켜 반응을 종결시켰다. 상층액 150 $\mu$ l를 튜브로 옮겨 3000rpm에서 3분 동안 원심분리한 후 30 $\mu$ l를 96 well plate로 옮기고 substrate buffer(4-*p*-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 1mM, 0.1M citrate buffer PH 4.5) 30 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응 시킨 다음 각 well 당 stop solution(0.1M NaHCO<sub>3</sub>) 250  $\mu$ l 를 첨가하여 반응을 정지시키고 microplate reader(molecular devices)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0024] 시료와 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 degranulation percent(%)를 계산하였다.

[0025] 
$$\text{degranulation percent}(\%) = (\text{sample 처리한 OD} - \text{blank OD}) / (\text{control OD} - \text{blank OD}) \times 100$$

[0026] **1.5. cytokine 및 IgE ELISA**

[0027] 세포배양액 내의 cytokine의 양을 알아보기 위해서 Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용해서 측정하였다. RBL-2H3 cell을 24well plate에  $1 \times 10^5$  cell/500ul의 농도로 overnight해서 세포를 부착시킨 후, IgE를 70ng/ml의 농도로 처리한 후 7시간 동안 배양하였다. Streptochlorin을 각 농도로 처리하고 1시간 동안 배양 후 DNP-HSA를 25ng/ml의 농도로 처리한 후 3시간 동안 배양한다. 이후 상층액 50ul를 capture 항체로 코팅된 96well plate에 50ul씩 옮기고 밤새 배양시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 100 $\mu$ l의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리해서 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 washing한 다음 100 $\mu$ l의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 washing 하였다. 그리고 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate(TMB) 기질을 100 $\mu$ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 $\mu$ l의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 처리하고 microplate reader(molecular devices)로 450nm에서 흡광도를 측정한다.

[0028] **1.6. RT-PCR**

[0029] RBL-2H3을 MEM배지에 현탁 시킨 후 anti-DNP-HSA IgE(70ng/ml 최종농도)를 넣고 cell culture dish(60  $\pi$ ) 에  $1 \times 10^6$  개의 세포를 분주한 다음 2시간 동안 배양하여 감작시켰다. 각 sample을 농도 별로 30분 동안 처리하고, DNP-HSA(25 ng/ml 최종농도) 첨가 후에 1시간 동안 같은 조건으로 배양하였다. 배지를 제거하고, PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후에 얼음으로 옮겨 반응을 종결시켰다. TRIzol 1ml로 세포를 용해시키고, chloroform 200  $\mu$ l를 첨가한 후 vortex로 잘 섞어주고 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액 300  $\mu$ l를 취하여 isopropanol 500  $\mu$ l를 첨가하고 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고, 75% 에탄올 1ml을 첨가하여 세척한 후 원심분리를 한 다음 건조시켰다. cDNA를 만들기 위해 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성시킨 각 그룹의 RNA 2  $\mu$ g과 oligo dT 1  $\mu$ l, 10mM의 dNTP mix 1  $\mu$ l, 10 $\times$ RT buffer 2.5  $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1M DTT 2  $\mu$ l, RNase OUT 1  $\mu$ l, SS III RT 1  $\mu$ l를 첨가한 다음 물로 20  $\mu$ l까지 채워주고 섞어준 후 역전사효소(reverse transcriptase) 반응을 시켰다. 생성된 각 그룹의 cDNA 2  $\mu$ l에  $\beta$ -actin primer(F/R) 1  $\mu$ l씩, 10 $\times$ EX Taq buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP mix 2  $\mu$ l, EX Taq HS 0.2  $\mu$ l를 넣고 물로 20  $\mu$ l까지 채워준다. 섞어준 후 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하고, agarose gel 전기영동으로 확인하였다. TNF- $\alpha$ , IL-4 primer(F/R)에 대해서도 동일한 방법으로 수행하였다.

[0030] **1.7. 실험동물제작**

[0031] 6주령 암컷 balb/c mice는 나라바이오택에서 구매했고 건국대학교 SPF실에서 키웠다. acetone-olive oil (3:1)용액내 25  $\mu$ l의 0.15% 2, 4-dinitrofluorobenzene (DNFB)를 5주 동안 매일 mouse의 귀에 발라주었다. Streptochlorin 은 PBS에 희석하여 복강에 3일 동안 주사하였다. 귀두께는 digital caliper (Control Company, Friendswood,TX,USA)를 통하여 측정하였다

[0032] **1.8. Myeloperoxidase (MPO) assay**

[0033] Hydrochloric acid (3.7%) 34  $\mu$ l와 TMB 5 mg 을 DMSO 1 ml에 녹여 sodium acetate-citric acid buffer (0.1 mol/l, pH 6.0) 에 1:100로 섞어준다. TMB 용액 100  $\mu$ l, 조직 균일화 상층액 10  $\mu$ l , 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 첨가하고 30 분간 반응시킨다. 이후 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l로 반응을 종결하고 450nm에서 흡광도를 측정한다.

[0034] **1.9. 조직 H&E 염색**

[0035] 마우스 귀 조직을 파라핀에 담가 고정시켜 마이크로톰(Leica Microsystems, Jena,Germany) 을 이용해 6  $\mu$ m 두께로 자른다. 염색 전에 귀 조직 절편을 자일렌에 담가 파라핀을 제거하고 hematoxylin (Merck, WhitehouseStation, NY, USA) 와 0.5% eosin (Sigma-Aldrich)으로 염색해 형태학적 변화와 세포 침윤을 관찰하였다. Toluidine blue (pH 3.0) 는 비만세포 관찰에 사용하였다.

[0036] **1.10. 통계처리**

[0037] 실험은 mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M)를 통해 나타내었다. 각 그룹간의 통계적 차이는 one-way ANOVA를 통한 Dunnett test를 통해서 나타내었다. P값< 0.05를 통계적 유의차가 있다고 나타내었다.

[0038] **2. 결과**

[0039] **2.1. Streptochlorin 의 RBL-2H3세포에서 항원유도성 탈과립의 억제효능**

[0040] RBL-2H3 세포를 스트렙토클로린의 항알러지 효능을 평가하고 이의 매커니즘을 설명하는 in-vitro 모델로 사용하였다.

[0041] 첫 단계로서, 스트렙토클로린의 세포 독성을 MTT-기반 세포활성 분석으로 측정하였다. RBL-2H3 세포를 다양한 농도의 스트렙토클로린으로 24 시간 처리하였다.

[0042] 그 결과 RBL-2H3 세포에서 스트렙토클로린은 100  $\mu$ M까지 세포 독성이 없음을 알 수 있었다(도 1B 참조).

[0043] 또한 국부 알러지 반응에서 중요한 단계는 비만세포에서의 탈과립이며 이는  $\beta$ -hexosaminidase의 측정으로 알 수 있는데, 본 연구에서 스트렙토클로린은 RBL-2H3세포에서 DNP-HAS로 유도된 탈과립 반응에서 용량 의존적으로 저해하였다(도 1C 참조).

[0044] **2.2 스트렙토클로린의 알러지 및 염증성 cytokine의 발현 및 분비 억제효능**

[0045] TNF- $\alpha$  및 IL-4 등 cytokine은 지연성 과민반응과 염증반응에 중요하다.

[0046] 따라서, 본 연구자들은 스트렙토클로린이 항원-유도된 RBL-2H3 세포에서 TNF- $\alpha$  및 IL-4의 분비를 저해할 것인가를 조사하였다. 스트렙토클로린은 RBL-2H3 세포에서 DNP-HAS로 유도된 TNF- $\alpha$  및 IL-4의 생산을 억제하였으며 (도 2A 및 2B 참조), 이에 상응하는 mRNA의 발현 수준도 유의하게 억제하였다(도 2C 참조).

[0047] 이러한 결과들로 스트렙토클로린이 Fc  $\epsilon$  RI-자극된 RBL-2H3 세포에서 그들의 전사를 차단함으로써 TNF- $\alpha$  및 IL-4의 생성을 저해하는 것을 알 수 있었다.

[0048] **2.3. DNFB로 유도된 알러지성 피부염모델에서 스트렙토클로린의 억제효능**

[0049] 스트렙토클로린의 생체내 항알러지 효능을 증명하기 위해, 본 연구들은 DNFB-유도 알러지성 피부염 마우스 모델을 확립하고 및 스트렙토클로린로 처리 후 과민감 반응의 감소를 관찰하였다(도 3A 참조).

[0050] 흥미롭게도 본 연구에서 DNFB만 처리한 대조구에 비해 스트렙토클로린 처리그룹에서 귀두개의 감소 효과가 나타났다(도 3B 참조).

[0051] 또한 과립세포에서 가장 많은 peroxidase 효소인 MPO의 효소 활성을 측정한, 스트렙토클로린을 투여하면 용량-의존적 방식으로 효소 활성을 억제하는 것을 알 수 있었다(도 3C 참조).

[0052] 더욱이, 항원으로 자극된 귀 조직을 헤마톡실린과 에오신 염색으로 조직학적 조사하였다. 스트렙토클로린을 투여하면 귀 조직의 팽창을 감소시키고 귀 조직으로 염증성 세포가 도입되는 것을 감소시켰다(도 3D 참조).

[0053] 이는 비만세포, 호산구 및 호중구를 위시한 과립구가 스트렙토클로린로 처리시 항원으로 자극된 귀 조직으로 덜 유입된다는 것을 나타내는 것이다.

[0054] **3.4. DNFB로 유도된 알러지성 피부염모델에서 스트렙토클로린의 IgE와 염증성 cytokine의 생산과 분비 억제 효능**

[0055] 접촉 과민성은 cytokine에 의해서도 야기되는데, 본 연구자들은 DNFB로 유도된 알러지성 피부염모델에서 IL-4, INF- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 모니터링함으로써 스트렙토클로린의 항알러지 활성을 조사하였다.

[0056] 그 결과, IL-4 (도 4A 참조), INF- $\gamma$  (도 4B 참조) 그리고 TNF- $\alpha$  (도 4C 참조)가 스트렙토클로린 투여에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

[0057] 또한, 본 연구자들은 알러지 반응에 중요한 역할을 하는 혈청 IgE의 수준을 조사하였다. IgE 생성 또한 스트렙토클로린 투여후 용량의존적으로 저해되었다 (도 4D 참조).

[0058] 이러한 결과는 스트렙토클로린이 in vivo에서의 알러지 반응을 억제한다는 것을 보여준다.

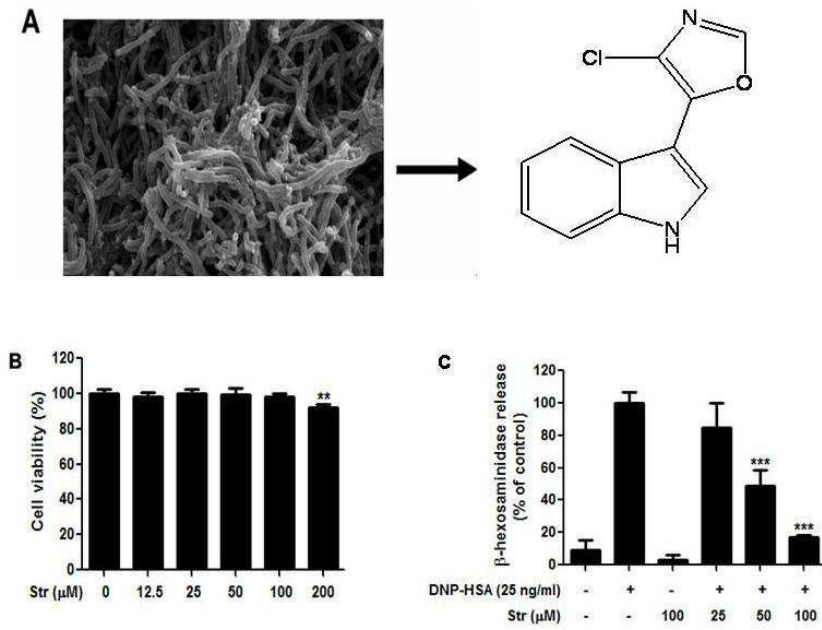
[0059] 결론적으로 본 연구 결과 스트렙토클로린은 비만세포에서 알러젠에 대한 알러지 반응을 약화시키며 따라서 다양한 알러지 질환을 치료하는 잠재적인 치료제로서 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.



도면

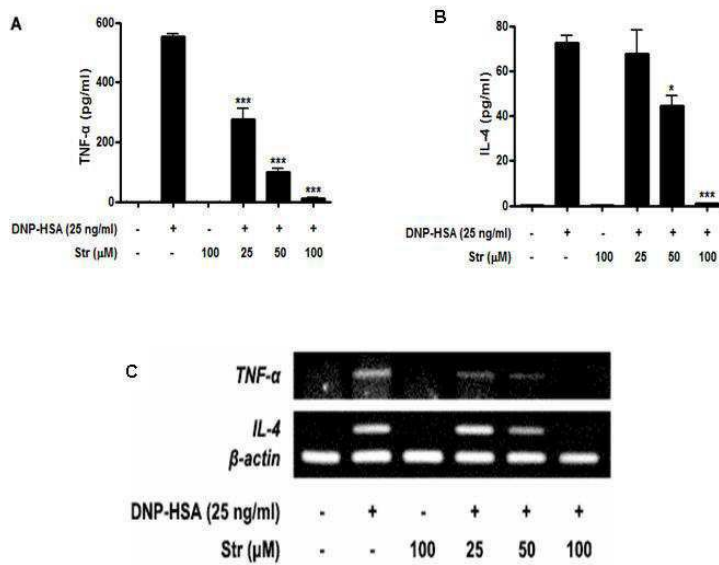
도면1

Fig. 1



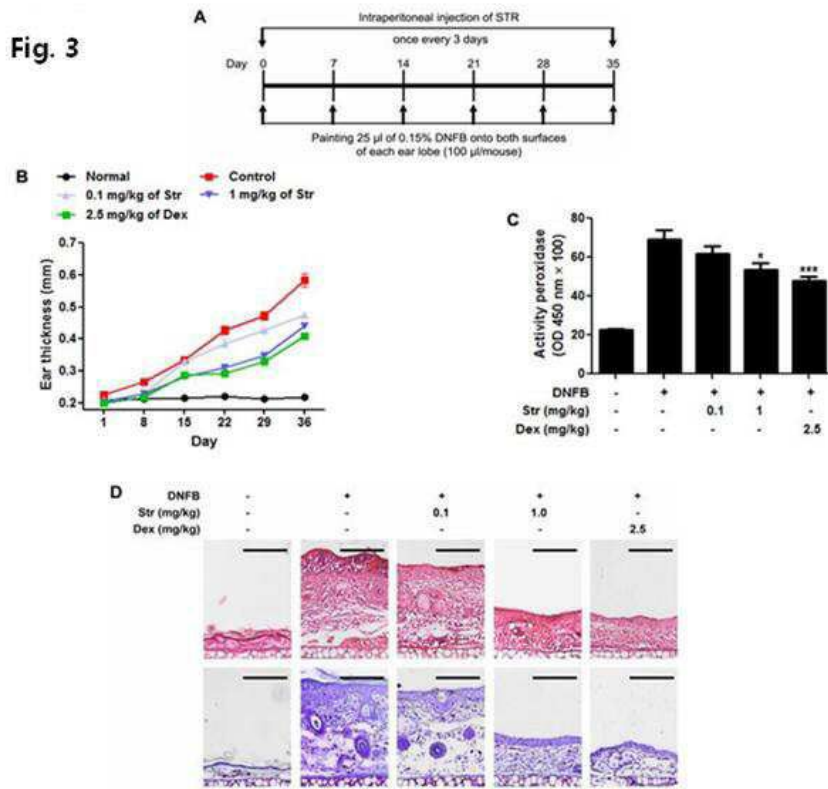
도면2

Fig. 2





도면3



도면4

