(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0078561
(43) 공개일자 2013년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0147577
(22) 출원일자 2011년12월30일
심사청구일자 2011년12월30일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
박윤경
전라남도 장성군 남면 마흥길 45
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복된 신규한 항균 및 항진균 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드가 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통하여 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성이 뛰어나며 병원성 진균 및 항생제 내성 곰팡이에 대하여 탁월한 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포독성이 거의 나타나지 않으므로 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

Peptides	Amino acid sequence
서열번호 1: $(KW)_2$	KWKW-NH_2
서열번호 2: $(KW)_3$	KWKWKW-NH_2
서열번호 3: $(KW)_4$	KWKWKWKW-NH_2
서열번호 4: $(KW)_5$	KWKWKWKWKW-NH_2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017532

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 담석증 환자에게 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성 세균에 작용하는 항균 펩타이드 개발 및 제제화 연구

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 양성균에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 음성균에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루기노사(*Psedomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항생제 내성 균주는 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238), 살모넬라류(*S. typhimurium* CCARM 8007, 8009, 8013) 및 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3089, 3090, 3108, 3114, 3126)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermidia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 항생제 내성 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 항생제 내성 곰팡이는 캔디다 알비칸스(*C. albicans* CCARM 14001, 14007, 14020)인 것을 특징으로 하는 항균 및 항진균 펩타이드.

청구항 13

제 1항의 항균 및 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 약학적 조성물.

청구항 14

제 1항의 항균 및 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 화장료 조성물.

청구항 15

제 1항의 항균 및 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약.

청구항 16

제 1항의 항균 및 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복된 신규한 항생 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하

여 세균의 항생제 저항성(resistance)이 야기되었다. 실제로, 세균이 새로운 항생제에 저항성을 나타내는 속도는 새로운 항생제의 유사체가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다(Stuart B. Levy, *Scientific American*, 46-53, 1998).

[0003] 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus sp.*)에서 최초로 발견이 되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., *Nature*, 227, 138-140, 1970). 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재 하에서 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin)과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 페니실린의 경우에 있어서 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이지만, 또한 세균이 이 효소의 활성을 억제하여 항생제 치료 시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

[0004] 세균이 항생제에 대한 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다(Handwerger and Tomasz, *Rev. Infec. Dis.*, 7, 368-386, 1985). 아울러, 내성은 항생제에 대한 세균의 저항성이 발생할 선행조건이라고 간주하는데, 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제적으로 항생제에 대한 저항성을 보이는 모든 세균들은 그 항생제에 대한 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로(Liu and Tomasz, *J. Infect. Dis.*, 152, 365-372, 1985), 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

[0005] 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두 가지로 구분되는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장 속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며(Tuomanen E., *Revs. Infect. Dis.*, 3, S279-S291, 1986), 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은, 오토라이신 효소의 활성을 감소시키는 조절(down regulation)이 일어나는 것인데, 이러한 조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이지만, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 명백하게, 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소의 결손으로 생긴 경우인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로, 이러한 자가분해 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상에서 발견되는 내성은 오토라이신 효소의 활성을 외형적으로 조절하는 과정으로 이루어진다(Tuomanen *et al., J. infect. Dis.*, 158, 36-43, 1988).

[0006] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 대한 저항성을 나타내는 세균을 제거하기 위하여 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 오토라이신 효소의 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.

[0007] 한편, 세균은 박테리오신(bacteriocin)이라는 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신들은 구조적 특징에 따라 세 가지로 구분된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며 두 번째는 비(非)란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다(Cintas *et al., J. Bad.*, 180, 1988-1994, 1998). 곤충을 포함하여, 동물 역시 펩타이드 항생제를 자체적으로 생산할 수 있는데(Bevins *et al., Ann. Rev. Biochem.*, 59, 395-414, 1990), 구조에 따라 세 개의 그룹으로 나눌 수 있다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-쉬트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α-회전형(helical)의 양친화성 펩타이드 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki *et al., Int. J. Antimicrob. Agents*, 9, 269-280, 1998). 이들 항균 펩타이드들은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., *Cell*, 65:205, 1991; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 13:61, 1995). 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 흔한 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다.

[0008] 따라서 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되었다. 멜리틴(melittin)은 벌독의 성분 중 고형분의 50% 이상을 차지하는 펩타이드로서 카르복시 말단이 아미노화(amidation) 되어 있고 진핵세포에 대하여 세포독성이 매우 커 고등동물세포를 낮은 농도에서도 잘 파괴하고, 미생물인 그람 음성균 및 그람양성균에 대해서도 항균 활성이 높다고 보고

되었다(Habermann, E., *Science*, 177: 314, 1972; Steiner, H., *et al., Nature*, 292: 246, 1981; Tosteson, M. T., *et al., Biochemistry*, 228: 337, 1987). 그 이외 HP(2-20)와 유사한 아미노산 서열을 가지고 있는 세크로핀 계열의 양친화성 펩타이드는 초파리에서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은 창자에서도 발견되었는데, 이 중 세크로핀 A(cecropin A, CA)는 항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었다 (Boman, H. G. and Hultmark, D., *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 103, 1987).

[0009] 또한 상기한 양친화성 펩타이드의 활성에 관한 연구와 더불어, 그들이 갖는 아미노산 서열 및 단백질 구조 등의 특성을 살펴보면, 그 서열상의 특성이 항균 활성과 매우 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어 아르기닌을 라이신으로 대체하면 활성은 남아있지만 진핵세포 독성은 감소한다는 보고가 있다(Epand RF, Lehrer RI, Waring A, WangW, Maget-Dana R, Lelievre D, Epand RM., *Bioploymers* 2003; 71: 2-16.; Park Y, Lee DG, Jang SH, Woo ER, Jeong HG, Choi CH, Hahm KS., *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1645: 172-182.). 게다가, 라이신 잔기로만 구성된 강한 합성 항균 펩타이드는 양친화적 구조의 극성 표면에 놓이고 음이온성 지질 상단부와 작용하게 된다. 이는 미생물에 대한 특이성의 원인이 된다(DatheM, SchumannM, WieprechtT, WinklerA, BeyermannM, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M., *Biochemistry* 1996; 35: 12612-12622.; Song YM, Park Y, Lim SS, Yang ST, Woo ER, Park IS, Lee JS, Kim JI, Hahm KS, Kim Y, Shin SY., *Biochemistry* 2005; 44: 12094-12106.; GopalR, ParkSC, HaKJ, ChoSJ, KimSW, SongPI, NahJW, ParkY, Hahm KS., *J. Pept. Sci.* 2009; 15: 589-594.).

[0010] 이에, 본 발명자들은 라이신 및 트립토판 잔기가 2 내지 5번 반복적으로 존재하여 다양한 길이를 갖는 펩타이드를 합성하였으며, 그들 중 서열번호 3의 $(KW)_4$는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 우수한 항균 활성이 가지며 병원성 진균 및 항생제 내성 곰팡이에 대하여 탁월한 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포독성이 거의 나타나지 않으므로, 인체에 안전한 항균제 및 항진균제로서의 기능을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명자들은 라이신 및 트립토판 잔기가 3번 반복된 $(KW)_3$에 대하여 항균활성을 알아보았으나(Gopal R, Kim YJ, Seo CH, Hahm KS, Park Y., *J Pept Sci*. 2011; 17: 329-334), 본 발명의 $(KW)_4$는 $(KW)_3$보다 일반균주에서는 최대 16배, 항생제 내성 균주에서는 최대 8배 이상의 매우 높은 항균 활성을 나타내었고, 항진균 활성 또한 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서, $(KW)_4$는 $(KW)_3$보다 항균 및 항진균 활성이 매우 뛰어난 펩타이드임을 밝혔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 및 항진균 펩타이드를 이용한 항균 및 항진균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 라이신 및 트립토판 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해, 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 우수한 항균 활성을 가지며 병원성 진균 및 항생제 내성 곰팡이에 대하여 탁월한 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포독성이 거의 나타나지 않음을 확인함으로써, 이를 이용한 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 사용된 펩타이드 및 서열을 나타낸 도이다.

도 2의 A 및 B는 물과 인산완충수용액에서 본 발명의 펩타이드의 농도에 따른 응집현상 분석을 위하여 펩타이드 내 트립토판 잔기의 최대 형광 방출 파장을 측정한 그래프이고, C 및 D는 인산완충수용액에서 펩타이드의 2차 구조 분석을 위하여 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용해 이를 확인한 그래프이다.

A : 물에서 $(KW)_4$ 및 $(KW)_5$의 형광 방출 파장 최대 값

B : 인산완충수용액에서 $(KW)_4$ 및 $(KW)_5$의 형광 방출 파장 최대 값

* $(KW)_4$(●), $(KW)_5$(▲)

C : 인산완충수용액에서 $(KW)_4$ 구조

D : 인산완충수용액에서 $(KW)_5$ 구조

* 25 μM(●), 50 μM(■), 100 μM(▲), 150 μM(◆)

도 3은 본 발명의 펩타이드를 형광 물질로 표지한 뒤 세균에 처리하여 펩타이드의 작용 위치를 확인한 도이다.

A : 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229)

B : 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090)

도 4는 본 발명의 펩타이드가 세균의 막에 미치는 영향과 농도에 따른 살균작용 시간을 분석한 그래프이다.

A : 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 막의 탈분극정도 분석

B : 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090) 막의 탈분극정도 분석

C : 대장균(*E. coli*) 세포내막 작용분석

D : 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*) 세포내막 작용분석

E : 항생제-내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 살균력 분석

F : 항생제-내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090) 살균력 분석

* A 내지 D: $(KW)_2$(◆), $(KW)_3$(■), $(KW)_4$(●), $(KW)_5$(▲), Melittin(○)

E 및 F: $(KW)_4$의 MIC(□), $(KW)_4$의 2MIC(△), $(KW)_5$의 MIC(■), $(KW)_5$의 2MIC(▲)

도 5는 본 발명의 펩타이드가 박테리아-유사 이중 막에 작용하는지 확인하기 위하여 형광물질 방출정도와 응집력을 확인한 그래프이다.

A : PE:PG(7:3, w/w)

B : PC:CH(10:1, w/w)

C : PE:PG(7:3, w/w)

* $(KW)_2$(◆), $(KW)_3$(■), $(KW)_4$(●), $(KW)_5$(▲)

도 6은 본 발명의 펩타이드가 박테리아-유사 이중막이 존재하는 상태에서 펩타이드의 2차 구조 분석을 위하여 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용해 이를 확인한 그래프이다.

A : PE:PG(7:3, w/w)

B : PC:CH(10:1, w/w)

* $(KW)_2$(◆), $(KW)_3$(■), $(KW)_4$(●), $(KW)_5$(▲)

도 7은 본 발명의 펩타이드를 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229)에 처리하여 활성을 확인한 전자현미경 사진이다.

A : 음성 대조군(처리하지 않았음)

B : $(KW)_4$

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 라이신(Lys) 및 트립토판(Tryptophan) 잔기가 4번 반복되는 항균 및 항진균 펩타이드를 제공한다.

[0023] 상기 펩타이드는 구체적으로 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되고 세포독성을 거의 나타내지 않으며 8-머(mer)의 최소 아미노산 크기로 구성되어 길이가 짧아 합성이 용이하며, 소수성 영역이 증가하여 양친화성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 또한, 상기 펩타이드는 구체적으로 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루기노사(*Psedomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 균주는 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238), 살모넬라류(*S. typhimurium* CCARM 8007, 8009, 8013) 및 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3089, 3090, 3108, 3114, 3126)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 대하여 항균 활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 상기 펩타이드는 구체적으로 병원성 진균 및 항생제 내성 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermidia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 곰팡이는 캔디다 알비칸스(*C. albicans* CCARM 14001, 14007, 14020)에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 아울러, 상기 펩타이드는 구체적으로 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090)의 외부에 결합하여 작용하고 상기 균들의 내막에까지 영향을 미치며 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229)에 처리하였을 때 상기 균의 표면을 거칠게 하고 손상을 입히며, 응집현상을 유발하는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명자들은 신규한 항균 및 항진균 펩타이드를 제조하기 위하여, 라이신 및 트립토판 두 종류의 아미노산으로만 구성된, 서열이 단순하고 짧은 길이의 펩타이드를 합성하였다. 그 결과, 라이신 및 트립토판 잔기가 두 번 반복된 $(KW)_2$(서열번호 1), 세 번 반복된 $(KW)_3$(서열번호 2), 네 번 반복된 $(KW)_4$(서열번호 3) 및 다섯 번 반복된 $(KW)_5$(서열번호 4)을 합성하였다(도 1 참조).

[0028] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드의 항균 활성을 측정하기 위하여, 대조군으로 본 발명의 펩타이드와는

다른 길이의 $(KW)_{n\ (n=2,3\ 또는\ 5)}$ 및 멜리틴(melittin) 펩타이드를 사용하여 각 균주의 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, 이하 "MIC"라 약칭함)를 측정하여 관찰하였다. 이 때 사용한 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)이고, 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루기노사(*Psedomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)이며, 항생제 내성 균주는 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238), 살모넬라류(*S. typhimurium* CCARM 8007, 8009, 8013) 및 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3089, 3090, 3108, 3114, 3126)이다. 그 결과, 일반균주에서 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 대조군의 서열번호 1 펩타이드에 비해 최대 64배, 서열번호 2에 비해 16배, 서열번호 4에 비해 8배 이상의 높은 항균 활성을 나타냈으며, 내성 균주에서는 차례로 최대 32배, 8배, 8배 이상의 높은 항균 활성을 나타냈다(표 1 참조). 따라서, 본 발명의 펩타이드는 그람 양성균/음성균 및 항생제 내성 균주 모두에서 우수한 항균활성을 나타내었다는 것을 확인하였다.

[0029] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드의 항진균 활성을 측정하기 위하여, 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermidia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*) 및 항생제 내성 곰팡이인 항생제-내성 캔디다 알비칸스(*C. albicans* CCARM 14001, 14007, 14020)를 사용하여 MIC값을 측정하였다. 그 결과, 병원성 진균에 대하여 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 실험에 사용한 용액의 종류에 상관없이 활성이 좋음을 확인할 수 있었고, 서열번호 4 펩타이드의 경우 인산완충수용액 조건에서 보다 활성이 좋음을 확인할 수 있었으며(표 2 참조), 항생제 내성 곰팡이에 대하여 서열번호 3 및 서열번호 4의 펩타이드가 활성이 좋음을 확인하였다(표 3 참조).

[0030] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사한 결과, 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않음을 알 수 있었다(표 4 참조).

[0031] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드의 응집현상 및 구조를 분석하기 위하여 분광 형광계(spectrofluorometer) 및 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용하여 분석한 결과, 서열번호 3 펩타이드는 물 및 인산완충수용액에서 응집현상이 나타나지 않았으나, 서열번호 4 펩타이드는 인산완충수용액에서 응집현상이 일어남을 확인하였다(도 2 참조).

[0032] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 대장균의 어느 부분에 작용하는지 그 위치를 확인하기 위하여 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy)을 이용하여 확인한 결과, 서열번호 3 펩타이드는 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090)의 외부에 결합하고 있음을 확인하였다(도 3 참조).

[0033] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 대장균 막에 실제로 작용하는지, 또한 펩타이드에 의한 박테리아의 사멸에 얼마나 빨리 작용하는지 확인하기 위하여, 탈분극정도 분석, 세포내막에의 작용확인, 시간에 따른 세포사멸측정을 하였다. 그 결과, 서열번호 1 펩타이드는 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090)에서 탈분극 시키지 못하였고, 서열번호 2 펩타이드는 50 μM에서 약 20% 정도의 탈분극 현상이 나타난 것에 비해 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드는 상기 두 세균 모두 25 μM에서 80% 정도의 탈분극 현상이 나타났음을 확인하였다(도 4의 A 및 B 참조). 그리고, 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드는 대장균(*E. coli*) 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*)의 내막에까지 영향을 미치는 것을 확인하였으며(도 4의 C 및 D 참조), 서열번호 3 펩타이드가 서열번호 4 펩타이드에 비해 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090)에서 그 활성을 빠르게 나타내었음을 확인하였다(도 4의 E 및 F 참조).

[0034] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀에 실제로 작용하는지, 박테리아-유사 리포좀을 응집시키는지 확인하기 위하여, 분광 형광계(spectrofluorometer)를 이용하여 알아본 결과, 서열번호 3 펩타이드 및 서열번호 4 펩타이드 모두 L-a-포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE) 및 L-a-포스파티딜글리세롤(L-a-phosphatidylglycerol, PG)이 7:3의 비율일 때는 박테리아-유사 리포좀에 작용였지만, 난황(egg yolk) L-a-포스파티딜콜린(L-a-phosphatidylcholine, PC) 및 콜레스테롤(cholesterol, CH)이 10:1의 비율일 때는 서열번호 3 펩타이드가 서열번호 4 펩타이드에 비해 동일한 농도에서 절반 이하의 방출정도를 나타냄을 확인하였다(도 5의 A 및 B 참조). 그리고, 서열번호 4 펩타이드는 서열번호 3 펩타이드에 비해 리포좀을 더 응집시키는 결과를 확인하였다(도 5의 C 참조).

[0035] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀 성분에서 그 구조가 어떻게 달라지는지 확인하기 위하여, 편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용하여 알아본 결과, 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀 성분에서 서열번호 1 및 서열번호 2 펩타이드는 어떤 구조를 형성하지 못한 반면, 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드는 접혀지는 방법으로 구조에 변화가 일어났음을 확인하였다(도 6 참조). 특히, 상기와 같은 현상은 박테리아의 막을 파괴할 때 중요한 인자가 된다.

[0036] 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229)에 작용하여 어떻게 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 주사형 전자 현미경(scanning electron micrograph)을 이용하여 알아본 결과, 서열번호 3 펩타이드를 처리하였을 때 매끄러운 상기 항생제 내성 대장균의 표면이 거칠어지고 손상을 입었으며, 응집현상이 나타남을 확인하였다(도 7 참조).

[0037] 그러므로, 본 발명의 라이신 및 트립토판이 4번 반복되는 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해 탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 거의 없으므로 인체에 안전한 항균제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 약학적 조성물은 구체적으로 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루기노사(*Psedomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 균주는 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238), 살모넬라류(*S. typhimurium* CCARM 8007, 8009, 8013) 및 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3089, 3090, 3108, 3114, 3126)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 대하여 항균 활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 또한, 상기 약학적 조성물은 구체적으로 병원성 진균 및 항생제 내성 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermidia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 곰팡이는 캔디다 알비칸스(*C. albicans* CCARM 14001, 14007, 14020)에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 라이신 및 트립토판이 4번 반복되는 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해 탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 거의 없으므로 항균 및 항진균용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 신규한 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0043] 즉, 본 발명의 신규한 펩타이드는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 신규한 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 신규한 펩타이드의 유효용량은 0.01 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 ㎎/㎏ 이며, 하

루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple does)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신규한 펩타이드의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0047] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 및 항진균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명의 라이신 및 트립토판이 4번 반복되는 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해 탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 거의 없으므로 항균 및 항진균용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0049]

[0050] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분으로 상기 신규한 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0051] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0052] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸타, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0055] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸타 등이 이용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.

[0058] 본 발명의 라이신 및 트립토판이 4번 반복되는 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해

탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 거의 없으므로 무독성 농약으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제를 제공한다.

[0060] 본 발명의 라이신 및 트립토판이 4번 반복되는 펩타이드는 유해 미생물의 내막에까지 영향을 미치는 것을 통해 탁월한 항균 및 항진균 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 거의 없으므로 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0061] 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 식품이나 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 보존제의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다. 농작물의 병충해를 박멸하기 위한 농약 역시 해로운 미생물의 증식을 억제하고 인체에 무해하여야 사람이 농약을 살포한 농작물을 안전하게 섭취할 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0063] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] **<실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제**

[0065] 본 발명자들은 라이신(Lys) 및 트립토판(Tryptophan) 반복구조를 갖는 펩타이드를 합성하기 위하여, Fmoc(9-플루오레닐-메톡시카르보닐)(9-fluorenylmethoxy carbonyl)을 아미노기 보호 용기로 이용한 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하였다(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, 1963). 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이 -OH 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-왕 레진(Wang Resin)을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-하이드록시벤조 트리아졸(HOBt)-디사이클로-헥시카르보이미드)(N-hydroxybenzo triazole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링(coupling) 시킨 후, NMP(20% 피페리딘/N-메틸 피롤리돈)(20% piperidine/N-methyl pyrolidone)용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 DCM(디클로로메탄)(dichoromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(트리플루오로아세트산)(trifluoroacetic acid)-페놀(phenol)-티오아니졸(thioanisole)-물(H_2O)-트리이소프로필실란(triisopropylsilane) (85: 5: 5: 2.5: 2.5, vol./vol.) 용액을 가하고 2 내지 3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸 에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기의 방법으로 얻은 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토 니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(column)(Delta Pak, C_{18} 300Å, 15, 19.0mm ×30 cm, Waters)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N HCl로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축 하고, 0.02N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다.

[0066] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 원하는 아미노산 서열을 가진 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다(도 1).

[0067] **<실시예 2> 펩타이드의 항생활성 측정**

[0068] **<2-1> 박테리아에서 생육 최소저해농도 측정**

[0069] 상기 <실시예 1>에서 제조된 펩타이드의 항균 활성을 측정하기 위하여, 먼저 본 발명자들은 균체가 분열되지 않

는 펩타이드의 최소 농도인 MIC 값을 측정하였다. 항균 활성 측정을 위하여 그람 양성균으로써 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)를, 그람 음성균으로써 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루기노사(*Psedomonas aeruginosa*)와 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 항생제 내성 균주로써 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238), 살모넬라류(*S. typhimurium* CCARM 8007, 8009, 8013), 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3089, 3090, 3108, 3114, 3126)를 사용하였으며 각각의 최적 배지에서 배양한 다음 2×10^5 세포/㎖의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종하였다. 상기 <실시예 1>에서 합성한 펩타이드 및 양성 대조군으로 사용한 멜리틴 펩타이드를 각각 200 μM/웰(well) 부터 1/2배씩 인산나트륨완충수용액(sodium phosphate buffer) 및 인산완충수용액(phosphate buffered saline, PBS)에 각각 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 18 내지 24시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였으며, 그 결과를 인산나트륨완충수용액 및 인산완충수용액을 구분하여 하기 표 1에 나타내었다(괄호 안의 수치는 인산완충수용액에 희석한 경우임).

[0070] 그 결과, 표 1에서 보는 바와 같이 일반균주에서 본 발명의 서열번호 3의 펩타이드는 대조군의 서열번호 1 펩타이드에 비해 최대 64배, 서열번호 2에 비해 16배, 서열번호 4에 비해 8배 이상의 높은 항균 활성을 나타냈으며, 항생제 내성 균주에서는 차례로 최대 32배, 8배, 8배 이상의 높은 항균 활성을 나타냈다는 것을 확인하였다(표 1).

표 1

박테리아 균에대한 펩타이드의 생육 최소저해농도

	생육 최소저해농도 (μM)						
미생물 종류	서열번호1	서열번호2	서열번호3	서열번호4	Melittin	Ampicillin	Oxacillin
그람 음성균							
대장균	>200 (>200)	50 (200)	6.25 (12.5)	50 (12.5)	1.56 (1.56)	-	-
S. 티피무리움	50 (200)	3.12 (6.25)	1.56 (1.56)	6.25 (3.12)	0.39 (0.39)	-	-
P. 에루기노사	>200 (>200)	12.5 (25)	3.12 (3.12)	25 (6.25)	3.12 (3.12)	-	-
그람 양성균							-
S. 아우레우스	>200 (>200)	50 (200)	6.25 (12.5)	25 (12.5)	1.56 (1.56)	-	-
B. 서브틸리스	>200 (>200)	100 (200)	6.25 (12.5)	12.5 (12.5)	1.56 (3.12)	-	-
L. 모노사이토젠스	200 (>200)	12.5 (25)	3.12 (3.12)	3.12 (3.12)	1.56 (1.56)	-	-
항생제-내성 균							
대장균 CCARM 1229[a]	>200 (>200)	25 (100)	6.25 (12.5)	50 (12.5)	3.12 (3.12)	>200 (>200)	
대장균 CCARM 1238[a]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	50 (12.5)	1.56 (1.56)	>200 (>200)	
S. 티피무리움 CCARM 8007[b]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	25 (12.5)	6.25 (12.5)	>200 (>200)	
S. 티피무리움 CCARM 8009[b]	>200 (>200)	50 (200)	6.25 (12.5)	25 (12.5)	6.25 (12.5)	>200 (>200)	
S. 티피무리움 CCARM 8013[b]	>200 (>200)	50 (200)	6.25 (12.5)	25 (12.5)	3.12 (6.25)	>200 (>200)	
S. 아우레우스 CCARM 3089[c]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	50 (12.5)	1.56 (1.56)	-	>200 (>200)
S. 아우레우스 CCARM 3090[c]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	25 (12.5)	3.12 (3.12)	-	>200 (>200)
S. 아우레우스 CCARM 3108[c]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	50 (12.5)	1.56 (1.56)	-	>200 (>200)
S. 아우레우스 CCARM 3114[c]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	25 (12.5)	3.12 (3.12)	-	>200 (>200)
S. 아우레우스 CCARM 3126[c]	>200 (>200)	50 (200)	12.5 (12.5)	25 (12.5)	1.56 (1.56)	-	>200 (>200)

[0071]

[0072] **<2-2> 곰팡이에서 생육 최소저해농도 측정**

[0073] 상기 <실시예 1>에서 제조된 펩타이드의 곰팡이에서 항진균 활성을 측정하기 위하여, 먼저 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 MIC 값을 측정하고, 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermidia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*), 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)를 각각의 최적 배지에서 배양한 다음 2×10^5 세포/㎖의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종하였다. 상기 <실시예 1>에서 합성한 펩타이드 및 양성 대조군으로 사용한 멜리틴 펩타이드를 용액1로 기재되는 10mM 인산 나트륨 용액(pH 7.2)과 용액2로 기재되는 인산완충수용액에 각각 128 μM/웰(well) 부터 1/2배씩 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 18 내지 24시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기를 이용하여 620 ㎚의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0074] 그 결과, 표 2에서 보는 바와 같이 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 실험에 사용한 용액의 종류에 상관없이 항진균 활성이 좋음을 확인할 수 있었고, 서열번호 4 펩타이드의 경우 용액2로 기재되는 인산완충수용액 조건에서 더 활성이 좋음을 확인할 수 있었다(표 2).

표 2

곰팡이에 대한 펩타이드의 생육 최소저해농도

미생물 종류	생육 최소저해농도 (μM)									
	서열번호1		서열번호2		서열번호3		서열번호4		멜리틴	
	용액1	용액2	용액1	용액2	용액1	용액2	용액1	용액2	용액1	용액2
C. 알비칸스	>128	>128	8	32	8	8	16	8	4	4
C. 카테뉴레이트	>128	>128	8	16	8	8	32	8	4	8
C. 인터미디아	>128	>128	8	32	8	8	32	4	4	4
C. 루고사	>128	>128	8	32	8	8	32	8	4	8
C. 글라브라타	>128	>128	16	32	8	8	16	4	4	4
C. 멜리비오시카	>128	>128	8	32	8	8	32	8	4	8

[0075]

[0076] 또한, 본 발명의 펩타이드의 항생제 내성 곰팡이 균에서의 항진균 활성을 측정하기 위하여, 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 RMPI 1640 용액 및 항생제 내성 캔디다 알비칸스(*C. albicans* CCARM 14001, 14007, 14020)를 사용하여 MIC를 확인하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0077] 그 결과, 표 3에서 보는 바와 같이 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드가 항진균 활성이 좋음을 확인하였다(표 3).

표 3

항생제-내성 곰팡이에 대한 펩타이드의 생육 최소저해농도

미생물 종류	생육 최소저해농도 (μM)					
	서열번호1	서열번호2	서열번호3	서열번호4	멜리틴	플루코나졸
C. 알비칸스 CCARM 14001	>128	>128	32	8	16	>128
C. 알비칸스 CCARM 14007	>128	>128	32	16	8	>128
C. 알비칸스 CCARM 14020	>128	>128	32	8	8	>128

[0078]

[0079] **<실시예 3> 펩타이드의 세포 독성 측정**

[0080] 본 발명의 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상기 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다. 사람의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산완충수용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.0)으로 희석하고 여기에 200 μM/웰 부터 1/2의 농도로 항균 접합 펩타이드를 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1,000 g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈의 양을, 414 ㎚ 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤 X-100을 사람의 적혈구 세포에 첨가하여 그 상등액의 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 각 항균 접합 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

수학식 1

[0081]
$$\%\ \text{적혈구 파괴능}(hemolysis) = \left(\frac{\text{흡광도 } A - \text{흡광도 } B}{\text{흡광도 } C - \text{흡광도 } B}\right) \times 100$$

[0082] 상기 식에서, 흡광도 A는 414 ㎚ 파장에서 펩타이드 용액의 흡광도, 흡광도 B는 414 ㎚ 파장에서 PBS의 흡광도 그리고 흡광도 C는 414 ㎚ 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

[0083] 상기 식에 의한 200㎛M 농도에서 적혈구 파괴능의 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[0084] 그 결과, 표 4에서 보는 바와 같이 본 발명의 서열번호 1, 2 및 3 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면에, 양성 대조군으로 사용한 서열번호 4 펩타이드는 세포독성이 매우 높게 나타남을 확인하였다(표 4).

표 4

[0085]

	적혈구 파괴능 (%)						
	서열번호1	서열번호2	서열번호3	서열번호4	Melittin	Ampicillin	Oxacillin
적혈구 파괴능	0	0	8	71	100	-	-

[0086] **<실시예 4> 펩타이드의 응집현상 및 구조 분석**

[0087] **<4-1> 분광 형광계(spectrofluorometer)를 통한 응집현상 확인**

[0088] 본 발명의 펩타이드가 수용액상태에서 응집현상을 나타내는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 먼저 두 수용액 상태에서 다양한 농도의 상기 펩타이드의 응집현상을 조사하였다. 펩타이드를 구성하는 아미노산 중 트립토판(Tryptophan)은 형광을 띠는 성질을 지니고 있는데, 이를 이용하여 응집현상을 확인할 수 있다. 다양한 농도(1 내지 18 ㎛M)의 상기 펩타이드를 물 및 인산완충수용액에 내에 존재하도록 준비하였다. 이후 분광 형광계(spectrofluorometer, Perkin-Elmer LS55)를 이용하여 형광 방출량의 변화를 기록하였다. 측정 시 사용한 여기 파장(excitation wavelength)은 280 ㎚, 방출파장(emission wavelength)은 300 내지 400 ㎚이다.

[0089] 그 결과, 도 2의 A에서 보는 바와 같이 물에서 본 발명의 서열번호 3 및 4 펩타이드는 농도의 증가와는 상관없이 그 최대형광방출 파장값이 변하지 않고 일정함을 확인하였다(도 2의 A). 반면에 도 2의 B에서 보는 바와 같이 인산완충수용액에서 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 최대형광방출 파장값이 변하지 않았지만, 서열번호 4 펩타이드는 농도가 증가할수록 파장값이 감소함을 확인하였다(도 2의 B). 따라서 서열번호 3 펩타이드는 두 수용액 상태에서 응집현상이 나타나지 않으나 서열번호 4 펩타이드는 인산완충용액에서 응집함을 확인할 수 있었다.

[0090] **<4-2> 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 통한 응집현상 확인**

[0091] 인산완충수용액에서 상기 펩타이드의 다양한 농도에 따른 응집현상을 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용하여 분석하였다. CD 큐벳에 다양한 농도의 상기 펩타이드를 주입한 뒤, 190 내지 250 ㎚의 파장영역에서 분석하였다.

[0092] 그 결과, 도 2의 C 및 D에서 보는 바와 같이 인산완충수용액에서 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 농도에 상관없이 그래프가 거의 일관되었으나, 서열번호 4 펩타이드는 농도에 따라 그래프에 변화가 생김을 확인하였다(도 2의 C 및 D). 따라서 도 2의 B에서의 결과와 마찬가지로 서열번호 3 펩타이드는 인산완충수용액에서 응집현상이 일어나지 않았지만, 서열번호 4 펩타이드는 응집현상이 일어남을 확인할 수 있었다.

[0093] **<실시예 5> 박테리아에서의 펩타이드 작용부위 확인**

[0094] 본 발명의 펩타이드가 대장균의 어느 부분에 작용하는지 그 위치를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy)을 이용하여 확인하였다. 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090) 각각을 최적 배지에서 배양한 다음, 2 × 10^5 세포/㎖의 균체 농도로 인산완충수용액을 사용하여 희석하였다. 5-카르복시테트라메틸로다민(5-carboxytetramethylrhodamine, TAMRA)로 표지된 상기 서열번호 3 펩타이드 12.5 ㎛M을 대장균과 스태필로코

쿠스 아우레우스에 처리하고 37℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이 후 5분간 3000g 로 원심 분리하여 두 박테리아를 회수하고 인산완충수용액으로 씻는 과정을 세 번 반복하였다. 이렇게 처리한 두 박테리아를 공초점 레이저 현미경을 통해 관찰하였다.

[0095] 그 결과, 도 3의 A 및 B에서 보는 바와 같이 본 발명의 서열번호 3 펩타이드는 항생제 내성 대장균과 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스의 외부에 결합하고 있음을 확인하였다(도 3의 A 및 B).

[0096] **<실시예 6> 대장균의 막에 미치는 펩타이드의 영향 분석**

[0097] **<6-1> 박테리아의 탈분극정도 분석**

[0098] 박테리아의 탈분극정도 분석을 위하여, 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090) 각각을 최적 배지에서 배양한 다음, 완충 수용액 1(20 mM 글루코오스(glucose), 5 mM HEPES 및 pH 7.3)을 사용하여 2번 씻어주었다. 각각의 박테리아가 600 ㎚에서 흡광도가 0.05가 되도록 완충 수용액 2(20 mM 글루코오스, 5 mM HEPES, 0.1 M KCl 및 pH 7.3)를 이용하여 희석하였다. 1 μM의 3,3'-디에틸티오디카보시아닌 요오드화물(3,3'-diethylthiodicarbocyanine iodide, DiSC3-5)을 첨가한 뒤 기준치 형광수치가 안정될 때까지 반응시켰다. 이 후 다양한 농도의 펩타이드를 처리하여 형광 방출량의 변화를 기록하였다. 측정 시 사용한 여기 파장(excitation wavelength)은 622 ㎚, 방출파장(emission wavelength)은 670 ㎚이다.

[0099] 그 결과, 도 4의 A 및 B에서 보는 바와 같이 서열번호 1 펩타이드는 두 세균에서 막을 탈분극 시키지 못하였고, 서열번호 2 펩타이드는 50 μM에서 약 20% 정도의 탈분극 현상이 나타났다. 그에 비해 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드는 두 세균 모두 25 μM에서 80% 정도의 탈분극 현상이 나타났음을 확인하였다(도 4의 A 및 B).

[0100] **<6-2> 세포막 내에서의 작용 확인**

[0101] 세포내막에의 작용을 확인하기 위하여, 대장균(*E. coli*) 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*) 각각을 최적 배지에서 배양하고 인산완충수용액에 2×10^7 세포/㎖의 균체 농도로 희석하였다. 1 μM의 SYTOX 그린(green)(분자 프로브(molecular probe))과 세포를 10분 동안 암반응 시키고, 12.5 μM의 상기 펩타이드들을 처리하여 한 시간 동안 발생되는 형광을 측정하였다. 측정 시 사용한 여기파장은 485 ㎚, 방출파장은 520 ㎚이다. 0.1% 트리톤 X-100을 처리하여 얻은 값을 100%로 간주하였고, 이에 따른 상대적인 형광발생정도를 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 4의 C 및 D에서 보는 바와 같이 서열번호 4 펩타이드는 대장균에서는 30분, 스태필로코쿠스 아우레우스에서는 20분경에 방출 형광 값이 가장 높았으며, 서열번호 3 펩타이드는 대장균에서 56분, 스태필로코쿠스 아우레우스에서는 30분경에 방출 형광 값이 가장 높으므로 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드는 대장균과 스태필로코쿠스 아우레우스의 내막에까지 영향을 미치는 것을 확인하였다(도 4의 C 및 D).

[0103] **<6-3> 시간에 따른 세포사멸 확인**

[0104] 시간에 따른 세포사멸을 측정하기 위하여, 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229) 및 항생제 내성 스태필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus* CCARM 3090) 각각을 최적 배지에서 배양하였다. 2×10^5 세포/㎖의 균체에 MIC 및 MIC의 두 배 농도의 상기 펩타이드를 처리하고, 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 및 60분 동안 반응시킨 후 일정량을 희석하여 한천배지에 도말하였다. 37℃에서 16시간 동안 배지를 배양한 뒤 생긴 콜로니의 수를 세어 그 결과를 확인하였다.

[0105] 그 결과, 도 4의 E 및 F에서 보는 바와 같이 서열번호 3 펩타이드는 MIC의 농도에서는 20분, MIC의 두 배 농도에서는 10분 내에 두 내성 박테리아에 작용하여 살균효과를 나타낸 반면, 서열번호 4 펩타이드는 MIC 농도에서 50분, MIC 두 배 농도에서 평균 35분에 작용하였으므로 서열번호 3 펩타이드가 서열번호 4 펩타이드에 비해 두 내성 박테리아 모두에서 그 활성을 빠르게 나타내었음을 확인하였다(도 4의 E 및 F).

[0106] **<실시예 7> 펩타이드의 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀과의 작용여부**

[0107] **<7-1> 펩타이드의 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀과의 작용 확인**

[0108] 본 발명의 펩타이드가 박테리아와 적혈구-유사 리포좀에 실제로 작용하는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 먼저 박테리아와 적혈구-유사 리포좀을 제작하였다. 대부분의 대장균(*E. coli*) 막은 L-a-포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE) 및 L-a-포스파티딜글리세롤(L-a-phosphatidylglycerol, PG)로, 적혈구(human red blood cells) 막은 난황(egg yolk) L-a-포스파티딜콜린(L-a-phosphatidylcholine, PC) 및 콜레스테롤(cholesterol, CH)로 주로 이루어져 있다. 클로로포름용액에 녹아있는 PE 및 PG는 7:3의 비율로, PC 및 CH는 10:1의 비율로 준비한 다음, 유리관에 담아 수분을 제거하고 동결건조시켰다. 칼세인(calcein) 형광시료가 든 완충액(70 mM 칼세인, 인산완충수용액(phosphate buffered saline), pH 7.4)을 해당 유리관에 담고 액체질소를 이용하여 얼리고 녹이는 과정을 아홉 차례 반복한 뒤, 리포좀 내로 들어가지 않은 형광시료를 분리하기 위하여 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography)를 통과시켰다. 2.5 μM의 지질이 함유된 형광시료내포 리포좀은 다양한 농도의 펩타이드(0.03 내지 1 μM)와 25분간 반응시켰다. 방출된 형광시료의 형광 값을 분광형광계(spectrofluorometer)로 측정하였으며, 측정 시 사용한 여기파장은 480 ㎚, 방출파장은 520 ㎚이다. 100% 방출값은 0.1% 트리톤 X-100을 이용하여 나타냈으며, 이를 기준으로 각 펩타이드의 방출 값을 비교하기 위하여 하기 수학식 2에 따라 계산하였다.

수학식 2

[0109]
$$\%\,\text{형광 방출량} = \frac{(F - F_0)}{(F_t - F_0)} \times 100$$

[0110] 상기 식에서, F는 펩타이드 처리 후 흡광도, F0는 완충액 처리 후 흡광도, Ft는 0.1% 트리톤 X-100 처리 후 흡광도를 나타낸다. 상기 식에 의한 다양한 비율에서 형광시료 방출 정도의 결과를 알아보았다.

[0111] 그 결과, 도 5의 A에서 보는 바와 같이 서열번호 3 및 서열번호 4 펩타이드 모두는 박테리아-유사 리포좀에 작용하여 형광시료가 많이 방출되었다. 하지만 도 5의 B에서 보는 바와 같이 서열번호 3은 서열번호 4 펩타이드에 비해 동일한 농도에서 절반 이하의 방출정도를 나타내었음을 확인하였다(도 5의 A 및 B).

[0112] **<7-2> 펩타이드의 적혈구-유사 리포좀 응집 여부 확인**

[0113] 본 발명의 펩타이드가 리포좀을 응집시키는지 확인하기 위하여 클로로포름용액에 녹아있는 PE 및 PG를 7:3의 비율로 준비한 다음, 유리관에 담아 수분을 제거하고 동결건조시켰다. 인산완충수용액을 해당 유리관에 담고 액체질소를 이용하여 얼리고 녹이는 과정을 아홉 차례 반복한 뒤, 0.2 ㎛의 여과막을 통과시킨 후 회수하였다. 400 μM의 리포좀에 5, 10, 20 및 40 μM의 펩타이드를 첨가하여 405 ㎚의 흡광도로 응집정도를 측정하였다.

[0114] 그 결과, 도 5의 C에서 보는 바와 같이 서열번호 4 펩타이드는 서열번호 3 펩타이드에 비해 리포좀을 더 응집시키는 결과를 확인하였다(도 5의 C).

[0115] **<실시예 8> 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀에서 펩타이드의 구조분석**

[0116] 본 발명의 펩타이드가 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀 성분에서 그 구조가 어떻게 달라지는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상기 실시예 <7-1>의 방법에 따라 박테리아 및 적혈구-유사 리포좀을 제작하였다. 이들 인공 막 성분의 리포좀이 존재할 때 펩타이드의 구조를 편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)을 이용하여 분석하였다. 1 mM의 리포좀과 50 μM의 펩타이드를 혼합한 뒤, CD 큐벳에 혼합물을 주입하고 190 내지 250 ㎚의 파장영역에서 분석하였다.

[0117] 그 결과, 도 6의 A 및 B에서 보는 바와 같이 PE:PG가 7:3의 비율인 박테리아-유사 리포좀 및 PC:CH가 10:1의 비

율인 적혈구-유사 리포좀에서 서열번호 1 펩타이드 및 서열번호 2 펩타이드는 어떤 구조를 형성하지 못한 반면, 서열번호 3 펩타이드 및 서열번호 4 펩타이드는 상기 두 가지 모두의 조건에서 접혀지는 방법으로 구조에 변화가 일어났음을 확인하였다(도 6의 A 및 B).

[0118] **<실시예 9> 항생제 내성 대장균에 작용하는 펩타이드**

[0119] 본 발명의 펩타이드가 항생제 내성 대장균(*E. coli* CCARM 1229)에 작용하여 어떻게 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 주사형 전자 현미경(scanning electron micrograph)을 이용하여 확인하였다. 항생제 내성 대장균을 최적 배지에서 배양하고 인산완충수용액에 2 × 10^7 세포/㎖의 균체 농도로 희석하였다. 12.5 μM의 서열번호 3 펩타이드 첨가한 다음 60분 뒤 3000g에서 5분간 침전시켰다. 침전물은 인산완충수용액을 통해 씻어주고, 다시 침전시키고 씻어주는 과정을 2회 반복하였다. 이 후 (0.2 M 나트륨카코딜산완충수용액(sodium-cacodylate buffer)(pH 7.4)을 이용한) 5% 글루타알데하이드(glutaraldehyde) 500 ㎕를 이용해 4℃에서 3시간 동안 박테리아를 고정하고, 0.1 M 나트륨카코딜산완충수용액으로 씻어주었다. 이 후 (0.1M 나트륨카코딜산완충수용액을 이용한)1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide)을 처리하고 4℃에서 1시간 반응시킨 뒤 5% 슈크로스가 포함된 동일완충수용액으로 두 번 씻어주었다. 이어 20, 40, 60, 80, 95 및 100% 에탄올을 이용해 탈수시킨 뒤 건조, 코팅시켜 주사형 전자 현미경을 통해 관찰하였다.

[0120] 그 결과, 도 7의 A에서 보는 바와 같이 펩타이드를 처리하지 않은 항생제 내성 대장균은 그 표면이 매끄러우나, 도 7의 B에서 보는 바와 같이 서열번호 3 펩타이드를 처리한 대장균은 표면이 거칠고 손상을 입었으며, 응집현상이 나타남을 확인하였다(도 7의 A 및 B).

[0121] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0122] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0123] **<1-1> 산제의 제조**

[0124] <실시예 1>의 펩타이드 2g

[0125] 유당 1g

[0126] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0127] **<1-2> 정제의 제조**

[0128] <실시예 1>의 펩타이드 100mg

[0129] 옥수수전분 100mg

[0130] 유 당 100mg

[0131] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0132] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0133] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0134] <실시예 1>의 펩타이드 100mg

[0135] 옥수수전분 100mg

[0136] 유 당 100mg

[0137] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0138] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0139] **<1-4> 환의 제조**

[0140] <실시예 1>의 펩타이드 1 g

[0141] 유당 1.5 g

[0142] 글리세린 1 g

[0143] 자일리톨 0.5 g

[0144] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0145] **<1-5> 과립의 제조**

[0146] <실시예 1>의 펩타이드 150 mg

[0147] 대두 추출물 50 mg

[0148] 포도당 200 mg

[0149] 전분 600 mg

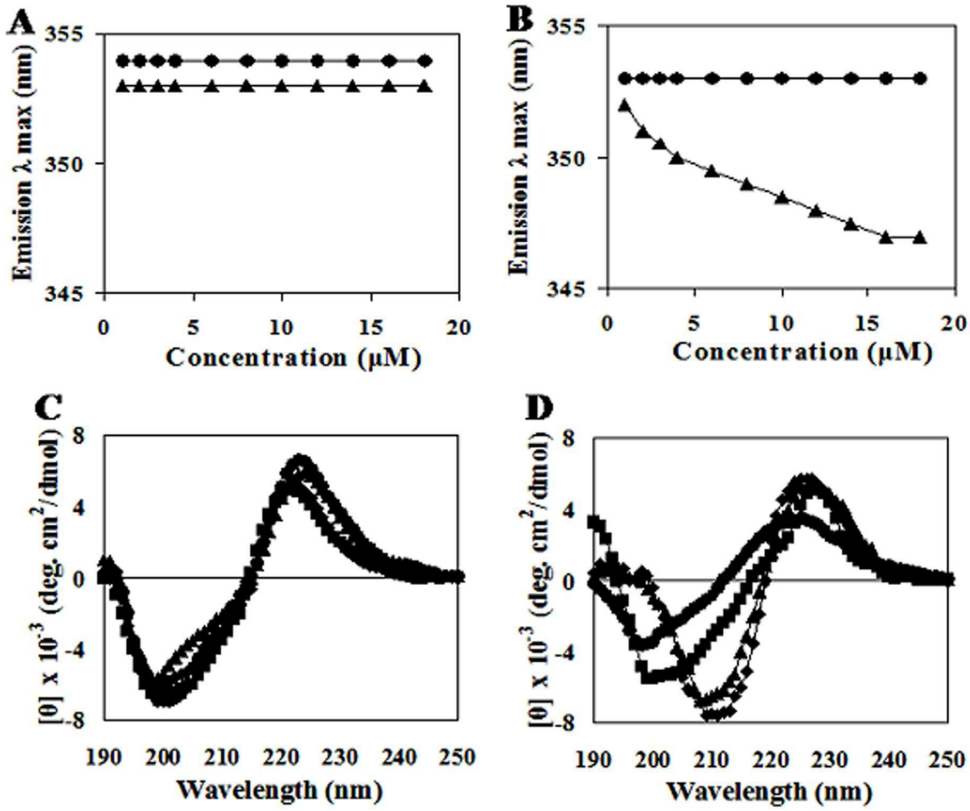
[0150] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

도면

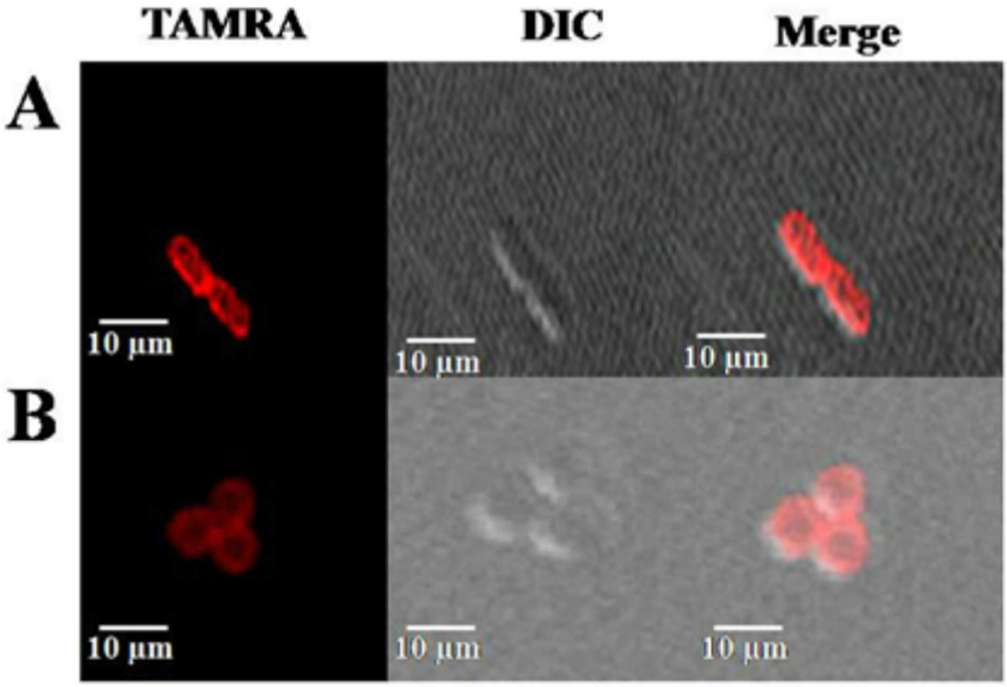
도면1

Peptides	Amino acid sequence
서열번호 1: $(KW)_2$	KWKW-NH_2
서열번호 2: $(KW)_3$	KWKWKW-NH_2
서열번호 3: $(KW)_4$	KWKWKWKW-NH_2
서열번호 4: $(KW)_5$	KWKWKWKWKW-NH_2

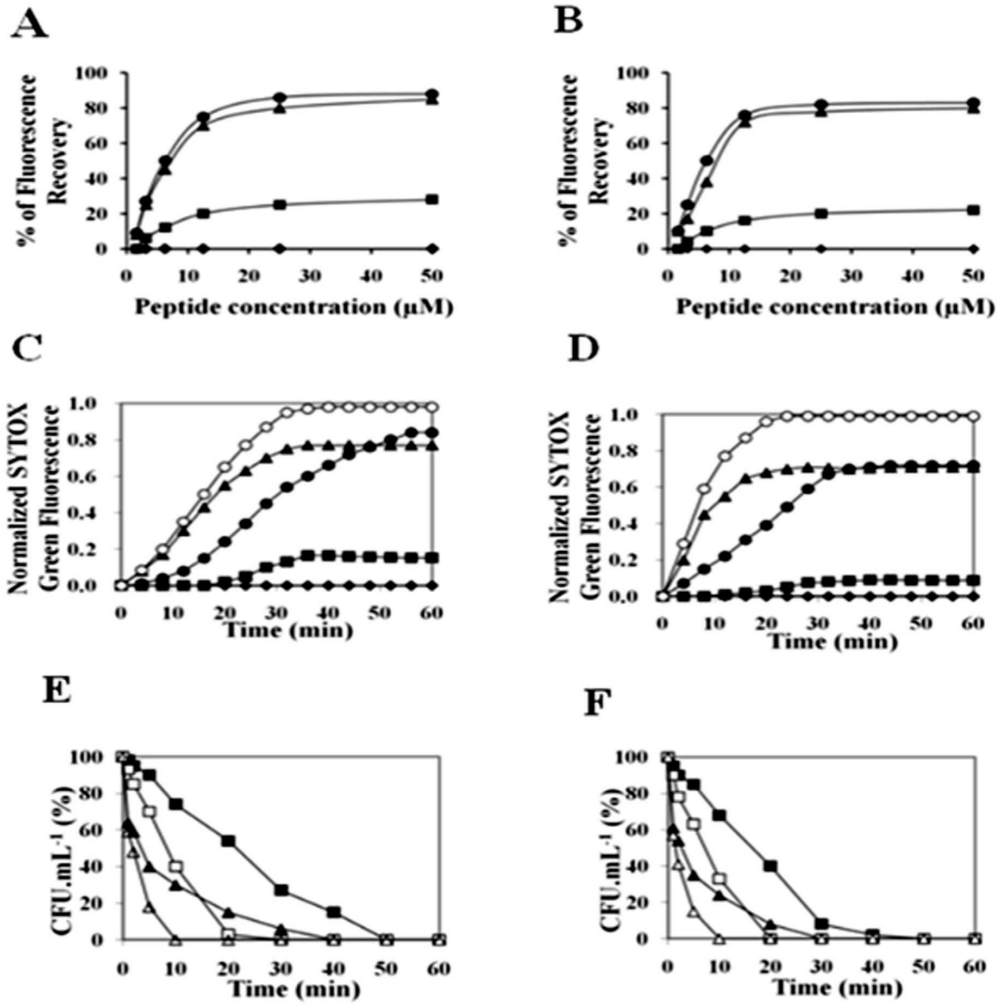
도면2


A
B
C
D
Emission λ max (nm)
Concentration (μM)
[θ] x 10^-3 (deg. cm^2/dmol)
Wavelength (nm)

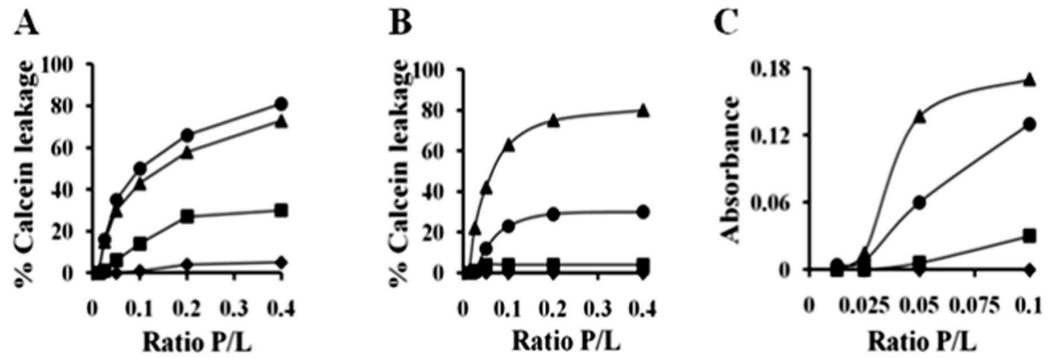
도면3


TAMRA
DIC
Merge
A
B
10 μm

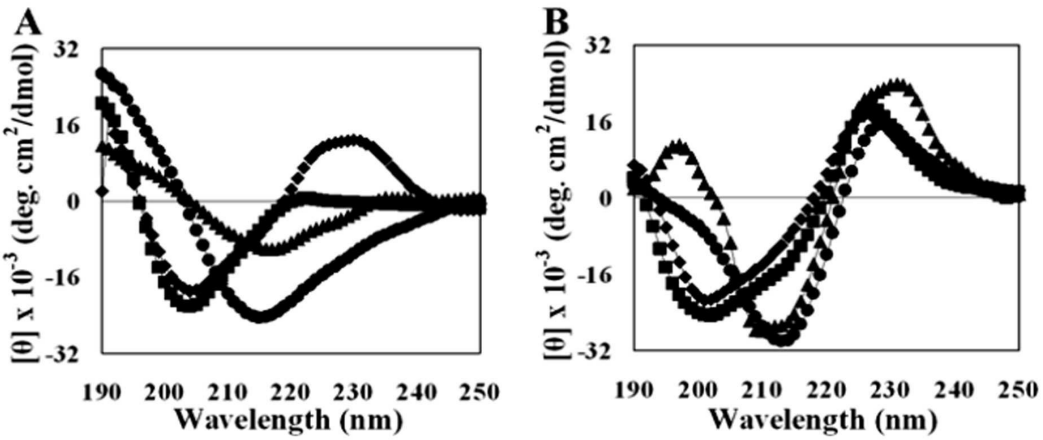
도면4


A
% of Fluorescence Recovery
Peptide concentration (μM)
B
% of Fluorescence Recovery
Peptide concentration (μM)
C
Normalized SYTOX Green Fluorescence
Time (min)
D
Normalized SYTOX Green Fluorescence
Time (min)
E
CFU.mL-1 (%)
Time (min)
F
CFU.mL-1 (%)
Time (min)

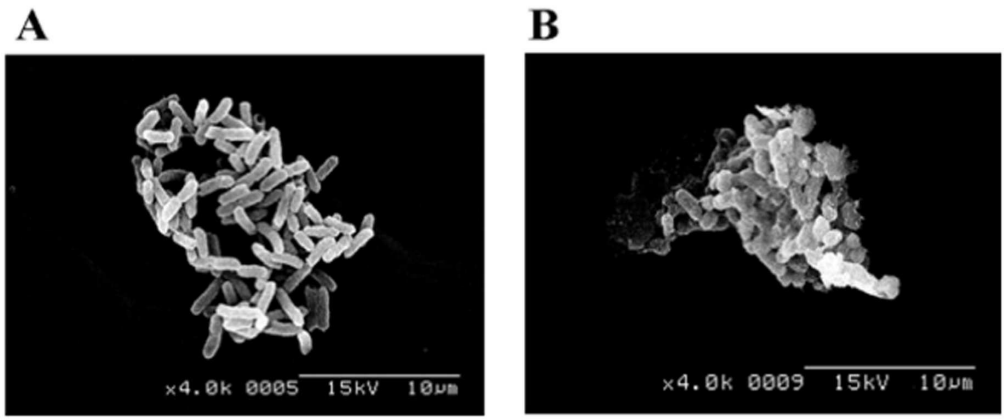
도면5


A
% Calcein leakage
Ratio P/L
B
% Calcein leakage
Ratio P/L
C
Absorbance
Ratio P/L

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> Novel antibiotic and antimycotic peptide with four times repeated Lys and Trp residues and use therof

<130> 11p-11-37

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence for (KW)2

<400> 1

Lys Trp Lys Trp

1

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence for (KW)3

<400> 2

Lys Trp Lys Trp Lys Trp

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence for (KW)4

<400> 3

Lys Trp Lys Trp Lys Trp Lys Trp

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence for (KW)5

<400> 4

Lys Trp Lys Trp Lys Trp Lys Trp Lys Trp

1 5 10