

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092350

(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) A01N 37/46 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)

A23L 33/18 (2016.01) A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A01N 37/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0181862

(22) 출원일자 2023년12월14일

심사청구일자 2023년12월14일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

아스미타

대전광역시 중구 계룡로918번길 30-6, 101호(문화동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 12 항

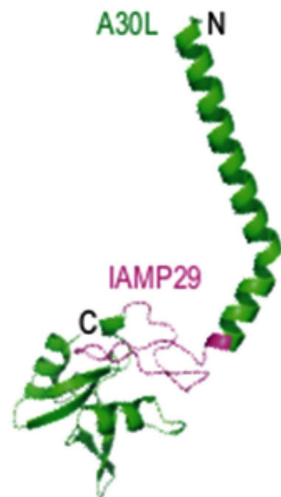
(54) 발명의 명칭 항균 펩타이드 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 천연 유래로서 정상 세포에 대한 독성이 매우 낮고 항균활성이 우수한 신규 펩타이드 및 그 응용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 펩타이드(이하, "IAMP29"라 칭함) 및 그 응용에 관한 것이다.

서열번호 1: HAAFEYSKISGGTALDRRVQDVNDTISD (29 aa)

대표도 - 도1



MNSLSIFFIVVATAAAVCLLFIQSYSIY
 ENYGNIFEFNATHAAFEYSKISGGT
 PALDRRVQDVNDTISDVKQKWRCV
 VYPGNGFVSASIFGFQAEVGPNNNT
 RSIRKFNTMRQCIDFTFSDVINIDIYN
 PCIAPNINNTECQFLKSVL (146aa)

(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)
A23K 20/147 (2016.05)
A23L 33/18 (2016.08)
A61P 31/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
C12N 2710/24122 (2013.01)

박은진

대전광역시 중구 과례로 48-12, 202호(문화동)

(72) 발명자

노테일러

대전광역시 유성구 계룡로88번길 41, 402호 (봉명동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197670
과제번호	00255021
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	자가포식-면역대사 연결고리 해석을 통한 감염 제어 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.06.01 ~ 2032.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 펩타이드.

청구항 2

청구항 1의 펩타이드를 암호화하는 유전자.

청구항 3

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 펩타이드는 상기 펩타이드를 암호화하는 유전자의 형태로 제공되는 항균 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 유전자가 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

청구항 6

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

약학 조성물인 항균 조성물.

청구항 7

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

건강기능식품 조성물인 항균 조성물.

청구항 8

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

사료첨가제 조성물인 항균 조성물.

청구항 9

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

생물 농약 조성물인 항균 조성물.

청구항 10

청구항 3 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

방부제 조성물인 항균 조성물.

청구항 11

청구항 2의 유전자를 발현하도록 형질전환된 재조합 균주.

청구항 12

청구항 11의 재조합 균주를 이용한 청구항 1의 펩타이드의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연 유래로서 정상 세포에 대한 독성이 매우 낮고 항균활성이 우수한 신규 펩타이드 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1928년 영국 과학자인 프레밍이 페니실린(penicillin)을 발견한 이래, 많은 항생물질이 개발되었으며, 그 화학 구조를 수식 또는 변경하는 것에 의해 치료 효과를 증가시켜왔다. 그러나 항생제의 오남용으로 인해 모든 항생제에 강력한 내성을 지닌 슈퍼박테리아의 등장으로 새로운 위험에 직면하게 되었다. 전 세계적으로 2019년 한 해 동안 항생제 내성균 감염이 직접적 사인이 된 경우가 127만건이며, 이로 인해 간접적으로 건강이 악화해 사망한 사례는 495만건에 달한다. 보건복지부에 따르면 2019년 인체에 대한 국내 항생제 사용량은 OECD(경제협력 개발기구) 29개국 중 3번째로 높다. 2010년에는 국내에서도 슈퍼박테리아라 일컬어지는 NDM-1 유전자를 함유한 카바페넴 내성 장내균(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)이 발견되는 등 내성균에 의한 위험성이 증가하고 있다. 이 같은 상황에도 불구하고 최근 포도상구균, 결핵균 등의 내성 문제를 극복할 수 있는 항생제 개발은 전 세계적으로 정체된 실정이다. 특히, 최근 수년 동안 전 세계가 코로나 팬데믹의 영향으로, 코로나 변이에 대응하기 위한 의약품 개발에 집중하면서 사망률이 매우 높은 패혈증 등을 일으키는 그람양성균인 메티실린 내성 포도상구균(MRSA)이나 세균학상 그람음성균이 아닌 다제내성 결핵균(MDR TB)에 대한 신규 항생제 개발이 시급한 실정이다.

[0003] 생물체 유래의 생리활성 물질들은 생물체의 항상성(homeostasis) 유지에 중요한 역할을 담당한다. 특히 항균 펩타이드는 생물체의 방어 시스템의 필수 구성요소로, 생명과학 및 의학 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다.

[0004] 항균 펩타이드는 서열 및 2차 구조가 매우 다양하지만, 공통적으로 15~40개의 아미노산으로 이루어져 있으며, +2~+9의 정전하를 갖는 양이온성이고, 소수성 영역과 친수성 영역을 갖는 양친매성 특징을 갖는다. 항균 펩타이드의 이러한 특징으로 인하여, 음이온을 갖는 세포막 또는 인지질막에 상호작용하기 쉬우며 더 나아가 막 안으로 들어가기 쉽다. 따라서 막의 완전성을 손상시키는 것에 의해 박테리아 및 진균에 대한 항균활성을 나타낸다. 이와 같이 하나의 정의된 독특한 에피토프와 같은 단순한 분자구조를 표적으로 하거나, 단백질 또는 RNA의 합성과정을 저해하는 기존 항생제들이 항생제 내성을 갖는 미생물을 유도하는 것과는 달리, 세포막에 작용하여 막의 투과성, 세포 용해 및 사멸을 유도하는 작동방식은 수분 내에 박테리아 및 진균을 사멸시킨다. 따라서 항균 펩타이드는 내성을 거의 유발하지 않을 뿐 아니라 빠르게 작용하고, 생분해성 특성으로 인하여 환경 또는 생체에서 축적되지 않기 때문에 잔류 항생제에 대한 우려를 완화할 수 있다.

[0005] 항균 펩타이드의 예로는 방선균(*Streptomyces roseosporus*) 유래의 뎀토마이신(daptomycin, 상표명 Cubicin),

바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 유래의 바시트라신(bacitracin), 인체의 호중구와 대식세포에서 발견되는 디펜신(defensin), 벌 독에서 분리한 멜리틴(mellitin) 등을 들 수 있다. 현재까지 많은 자연유래의 항균 펩타이드와 인위적으로 개량된 합성 항균 펩타이드가 보고되었으나, 항균 능력 및 항균 범위가 종래 항생제에 비해 훨씬 약한 문제가 있다. 또한 독성, 짧은 반감기, 고비용 등은 인체에 직접 사용하기에 걸림돌로 작용하고 있다.

[0006] 폭스 바이러스(pox virus)는 비교적 대형의 이중 가닥 DNA 게놈을 갖는 벽돌형 또는 타원형 바이러스로, 인간과 여러 유형의 동물에게 질병을 유발하는 병원성 바이러스이다. 폭스 바이러스의 감염에 의하면, 일반적으로 피부 병변, 결절 또는 파종성 발진을 형성한다. 폭스 바이러스는 NP 항원에 공통항원을 갖는 오르토폭스(Orthopox) 바이러스, 아비폭스(Avipox) 바이러스, 레포리폭스(Leporipox) 바이러스, 카프리폭스(Capripox) 바이러스, 파라폭스(Parapox) 바이러스, 엔토모폭스(Entomopox) 바이러스 등 6가지의 바이러스속으로 이루어진다. 지금은 더 이상 자연계에 존재하지 않는 천연두 바이러스, 원숭이두창 바이러스 등이 폭스 바이러스에 속한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1502773호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-2311729호
(특허문헌 0003) 일본 공개특허 제2017-48175호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 인체에 대한 독성이 낮아 안전하게 사용될 수 있으면서도, 우수한 항균활성을 나타내는 신규한 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 펩타이드를 이용한 항균 조성물과, 그 응용을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다. 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 펩타이드(이하, "IAMP29"라 칭함)에 관한 것이다.

[0013] 서열번호 1: HAAFEYSKSIIGGTPALDRRVQDVNDTISD (29 aa)

[0014] 상기 펩타이드는 원숭이두창 바이러스(Monkeypox virus)의 막단백질 A30L에서 유래하는 펩타이드이며, 서열 분석 결과 대부분의 폭스 바이러스(pox virus) 계열에서 공통적으로 발현되고 있는 것으로 확인된다.

[0015] 원숭이두창 바이러스(strain Zaire-96-I-16) 유래의 A30L 단백질의 면역 염증반응을 확인하고 알파폴드 2(AlphaFold2) 단백질 구조 예측 프로그램으로 코어 부분의 29개 아미노산으로 이루어진 서열을 확인한 후 이를 IAMP29로 명명하였다. 도 1은 상기 예측 결과의 3차원 구조와 A30L의 서열을 보여주는 이미지로, 이 중 IAMP29로 명명한 부분을 붉은 색으로 나타내었다. 해당 서열의 펩타이드는 단디큐어 주식회사에 의뢰하여 합성한 후, 건강한 인간 단핵구에 대한 세포독성 평가 시 매우 낮은 독성을 나타내었으며, 항균활성이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이제까지 해당 펩타이드에 대해 진행된 선행연구들은 아직 보고된 바 없다.

[0016] 본 발명에서 "항균활성"은 진균, 바이러스, 박테리아와 같은 미생물의 성장 또는 증식을 억제하는 활성을 의미하며, 더 나아가 미생물을 사멸시키는 것을 포함한다.

[0017] 본 발명에서 '서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드'라고 기재되어 있더라도, 일부 서열이 결실, 변

형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 변이체 역시 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 본 발명의 항균 펩타이드로 사용될 수 있음은 당연하다. 예를 들어, 상기 펩타이드 변이체는 펩타이드 서열의 N-말단 및/또는 C-말단의 수식화나 서열 추가에 의한 연장, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환에 의한 것으로, 펩타이드의 기능이 변경되지 않은 것일 수 있다. 본 발명에서 "보존적 치환(conservative substitution)"이라 함은 하나 이상의 아미노산을 구조적 및/또는 화학적 성질이 유사한 다른 천연 또는 비-천연 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 통상적으로, 보존적 치환은 펩타이드의 활성에 전혀 영향을 미치지 않거나 또는 거의 영향을 미치지 않는다.

[0018] 또한 상기 펩타이드는 염 또는 금속 착화합물의 형태로 존재할 수도 있다.

[0019] 또한 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 상기 유전자는 DNA, RNA, PNA 및 이들의 혼합물로 이루어질 수 있다. 상기 유전자는 전술한 펩타이드 변이체를 암호화하는 유전자일 수 있다.

[0020] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물에 관한 것이다. 항균 펩타이드는 작용 기작상 미생물의 막을 손상시켜 병원균에 직접적으로 영향을 미치는 것에 의해 항균 활성을 나타내기 때문에 기존 항생제에 대해 내성을 갖는 병원균을 비롯하여 넓은 범위의 미생물에 대한 항균 조성물로서 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 항균 조성물에서 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 IAMP29 자체로 함유될 수도 있으며, 혹은 상기 펩타이드를 암호화하는 유전자의 형태로서 상기 펩타이드를 발현하도록 제공될 수도 있다. 이 때 상기 유전자는 발현 벡터 내에 포함된 형태일 수 있다. "발현 벡터"는 적당한 숙주 세포에서 표적 펩타이드를 발현할 수 있도록 하는 재조합 벡터로, 상기 유전자의 발현에 필수적인 조절 요소를 포함함은 당연하다.

[0022] 상기 항균 조성물은 다양한 응용 분야에 사용될 수 있다. 대표적으로 본 발명의 항균 조성물은 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물은 병원균에 의한 각종 질병에서, 원인 병원균의 성장 및 증식을 직접적으로 저해할 수 있으므로 해당 질병의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 특히 상기 항균 조성물은 항생제에 내성을 나타내어 치료에 곤란을 겪고 있는 다제내성균에 의한 질병의 치료에 유용하다.

[0023] 상기 약학 조성물은 예방 또는 치료용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로서, 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있으며, 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 항균 조성물에서 상기 펩타이드의 유효 용량은 0.01~10 mg/kg일 수 있다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 제제의 형태, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 병용 투여되는 경우에는 동시에 혹은 순차적으로 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0024] 본 발명의 항균 조성물은 또한 건강기능식품 조성물일 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 과자, 주류, 초콜릿, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 또는 본 발명의 건강기능식품은 그 자체로 혹은 다른 성분과 혼합하여 음식의 조리 시 사용할 수 있는 식품 첨가물의 형태로 사용될 수도 있다.

[0025] 구체적으로 본 발명의 항균 조성물은 병원성 세균 및 바이러스에 대한 질병의 예방 또는 증상 개선을 위한 사료 첨가제 조성물로 사용될 수 있다. 본 발명의 사료첨가제 조성물은 가금류, 가축, 어류, 반려동물의 사료에 대한 첨가제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 부형제나 담체 등 사료첨가제의 제조에 통상적으로 사용되는 첨가물과 함께 분말, 펠릿, 액제 등 당업계의 통상적인 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 사료첨가

제는 사료의 제조 시 첨가하여 통합된 사료의 형태로 제조할 수도 있으며, 혹은 별도의 제품으로서 제조하여 사료의 공급 시 단독으로 혹은 사료에 혼합하여 공급할 수 있다. 사료 제조 시 첨가하는 경우, 사료에 포함되는 사료첨가제의 함량은 특별히 제한되지는 않으며, 예를 들어 0.01~10 w%일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 가축이나 가금류, 어류의 병원성 세균 및 바이러스에 대한 질병의 예방 또는 증상 개선을 위해 사용하는 경우에는, 생분해성 특성으로 인하여 종래 항생제와는 달리 체내에 축적되지 않으므로 잔류 항생제에 대한 우려를 완화할 수 있다.

[0026] 본 발명의 항균 조성물은 농작물의 병충해를 방제하기 위한 생물 농약으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 농작물에 대한 영향 없이 유해 미생물에 직접적으로 영향을 미쳐 병충해를 예방 및 구제하며, 인체에 해가 없을 뿐 아니라 생분해성 특성을 나타내어 잔류 항생제에 대한 우려 없이 농작물을 안전하게 섭취할 수 있도록 한다.

[0027] 본 발명의 항균 조성물은 또한 각종 용도의 조성물에서 질병의 예방 또는 치료/증상개선을 위해 사용될 수 있을 뿐 아니라, 미생물 증식에 의한 부패를 방지하는 방부제 조성물로도 사용될 수 있다. 본 발명의 방부제 조성물은 식품, 의약품, 의약외품, 화장품, 멀티슈와 같은 생활용품 등에서 미생물의 발육을 억제하고 살균 작용을 하는 것에 의해 유통기간을 늘릴 수 있으며, 안전한 사용을 보장할 수 있다.

[0028] 본 발명에 의한 펩타이드 IAMP29는 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc), t-부톡시카보닐(Boc), 벤질옥시카보닐(Cbz)와 같은 보호기를 사용한 고상 합성방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 합성은 당 기술분야에서 널리 알려져 있는 자동 펩타이드 합성기를 이용할 수 있으며, 혹은 수동으로 직접 수행할 수도 있음은 당연하다. 또는 단백질 발현 시스템을 이용한 유전공학적 방법을 이용할 수 있다.

[0029] 이를 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 유전자를 발현하도록 형질전환된 재조합 균주를 제공한다. 형질전환은 특정 유전자를 발현하도록 해당 유전자를 수여 세포에 도입하는 것을 의미한다. 형질전환은 벡터를 사용하여 이루어질 수 있다. 벡터는 수여 세포에 이중 유전자를 도입할 수 있는 플라스미드, 박테리오파지 또는 동물 바이러스와 같은 구조물이다. 상기 유전자의 발현은 일시적이거나 혹은 재조합 균주의 다음 세대로 전달되어 지속적으로 발현될 수도 있다. 바람직하게는 상기 유전자의 발현은 유도성 발현에 의해 이루어지도록 할 수 있다. 유도성 발현을 달성하는 프로모터나 발현의 조절, 형질전환 등의 기술은 당업계에서 널리 공지된 기술로서 상세한 설명을 생략한다. 상기 재조합 균주를 상기 유전자의 발현을 허용하는 조건에서 배양하는 것에 의해 본 발명의 펩타이드를 제조할 수 있다. 유전자의 발현에 의해 생산된 펩타이드는 용도에 따라 균주의 배양액 그 자체로 사용하거나, 추가적인 분리, 정제 및/또는 처리 단계를 통해 수득되어 사용될 수 있다. 펩타이드의 정제의 정도 역시 용도에 따라 적절하게 조절될 수 있음은 당연하다.

발명의 효과

[0030] 이상과 같이 본 발명의 신규 펩타이드는 인체에 대한 독성 없이 우수한 항균활성을 나타내며, 내성균의 발현에 대한 우려 없이 안전하게 사용할 수 있으므로 항균 조성물로서 의약, 식품, 사료, 생물 농약 등 다양한 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 원숭이두창 바이러스 막단백질인 A30L의 3차원 예측 구조와, IAMP29의 위치를 보여주는 모식도.

도 2는 IAMP29의 세포독성을 평가한 그래프.

도 3은 IAMP29의 Mbo11 균주에 대한 항균활성을 보여주는 그래프.

도 4는 IAMP29의 Mabc-s 균주에 대한 항균활성을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0033] [실시예]

[0034] **실시예 1 : 세포독성 평가**

[0035] 건강인 공혈자로부터 정맥혈을 제공받아 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액세포(peripheral blood mononuclear cells)를 수집하였다. 수집한 말초혈액단핵세포는 배양액에 2×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24-well culture plate에 부착시켰다. 1시간 후에 부착되지 않은 상층액은 제거하고 새 배지로 채워 plate에 부착된 단핵구만 실험에 사용하였다. 분리된 단핵구의 순도는 항CD14 항체를 이용한 유세포 측정으로 95% 이상임을 확인하였다.

[0036] 단핵구에 IAMP29(단디큐어 주식회사에 의뢰하여 합성)를 0~25 µg/ml의 농도로 처리하였다. 72시간 처리 후 CCK-8(Cell Counting Kit-8)을 사용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 세포 생존율을 측정하고, 그 결과를 도 2에 도시하였다. 도 2에서 확인할 수 있는 것과 같이, 측정된 농도 범위에서 IAMP29는 건강인 유래 단핵구에 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0037] **실시예 2 : IAMP29의 항균활성 평가**

[0038] 1) Mbol1에 대한 항균활성 평가

[0039] 건강인 유래 대식세포에 Mbol1(myobacterium abscessus subsp. bolletii (smooth strain))를 감염시킨 후, IAMP29를 처리하여 항균활성을 평가하였다. 대식세포는 실시예 1에서 분리한 단핵구를 Cell Host Microbe 2009, 6, 231-243에 기재된 방법에 따라 4 ng/ml 인간 대식세포 집락인자(h-CSF, Sigma-Aldrich, M6518)의 존재 하에 4일간 분화시켜 사용하였다.

[0040] 구체적으로 대식세포에 Mbol1을 MOI=1로 2시간동안 감염시키고, 감염되지 않은 균은 PBS로 세척하여 제거하였다. 이후 IAMP를 0, 1, 또는 5 µg/ml의 농도로 처리하여 추가로 18시간동안 배양하였다. 18시간 후 세포 내 균주의 생존율을 분석하기 위하여, 감염된 세포를 증류수에 용해시켜 세포 내 세균을 방출시켰다. 연속 희석된 감염된 세포의 균질물을 n7H10 한천 플레이트에 도말하고 3-4일 배양 후 집락을 계수하였다.

[0041] 도 3은 그 결과를 보여주는 그래프로 IAMP29는 농도의존적으로 Mbol1의 생존을 크게 억제함을 보여준다.

[0042] 2) Mabcs에 대한 항균활성 평가

[0043] Mbol1 대신 Mabcs(myobacterium abscessus subsp. abscessus (smooth strain))균주를 MOI=3으로 감염시킨 것을 제외하고는, 1)과 동일한 방법에 의해 Mabcs에 대한 항균활성을 평가하였다. 도 4에서 IAMP29가 Mabcs에 대해 역시 농도 의존적으로 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

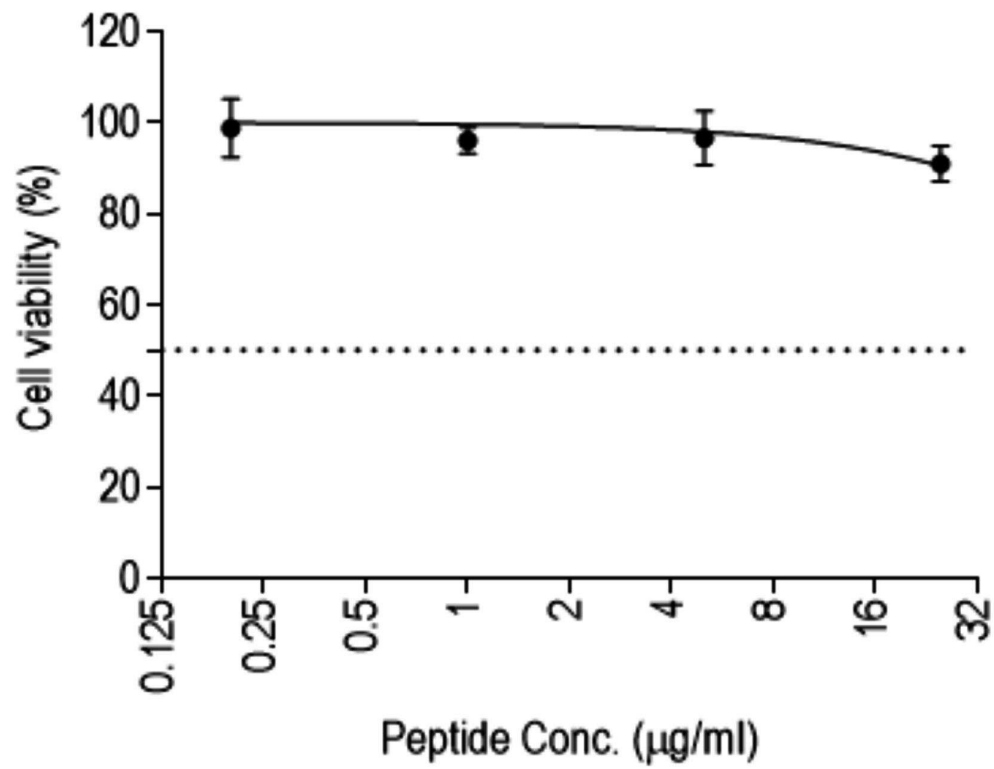
도면

도면1

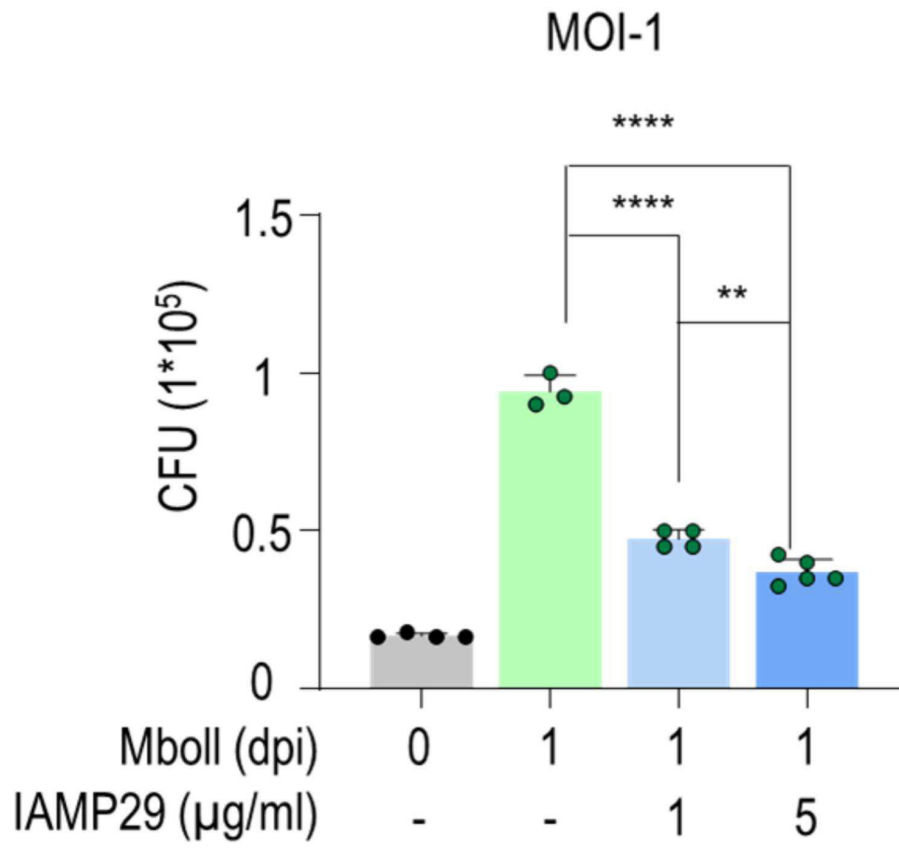


MNSLSIFFIVVATAAVCLLFIQSYSIY
ENYGNIKEFNATHAAFEYSKSIGGT
PALDRRVQDVNDTISDVKQKWRCV
VYPGNGFVSASIFGFQAEVGPNN
RSIRKFNTMRQCIDFTFSDVINIDIYN
PCIAPNINNTECQFLKSVL (146aa)

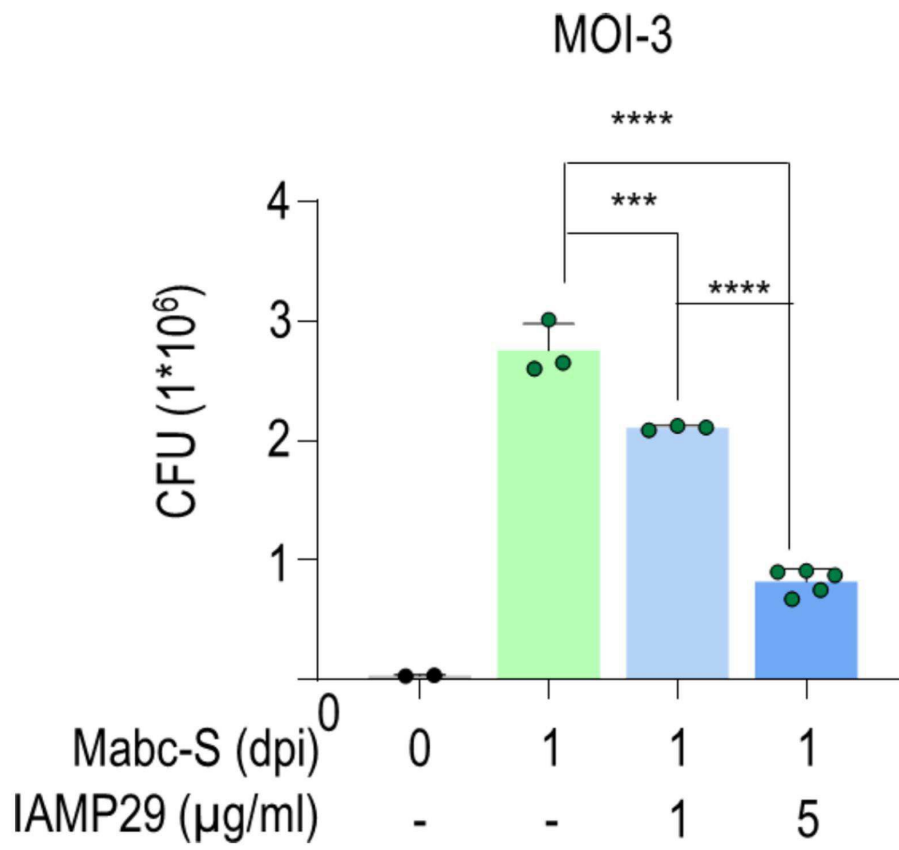
도면2



도면3



도면4



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.