(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 7 월 25 일 (25.07.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/155017 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) ***A61Q 17/00*** (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01) ***A23L 33/18*** (2016.01)
A01P 1/00 (2006.01) ***A23K 20/147*** (2016.01)
A61P 31/04 (2006.01) ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/000514

(22) 국제출원일: 2024 년 1 월 11 일 (11.01.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0007581 2023 년 1 월 18 일 (18.01.2023) KR

(71) 출원인: 조선대학교산학협력단 **(INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 61452 광주광역시 동구 조선대길 126, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 박윤경 **(PARK, Yoon Kyung)**; 57219 전라남도 장성군 장성읍 매화7길 4, Jeollanam-do (KR). 김민경 **(KIM, Min Kyung)**; 58121 전라남도 화순군 화순읍 칠충로 61-28, Jeollanam-do (KR). 이사홍 **(LEE, Sa Hong)**; 05855 서울특별시 송파구 법원로4길 10, Seoul (KR).

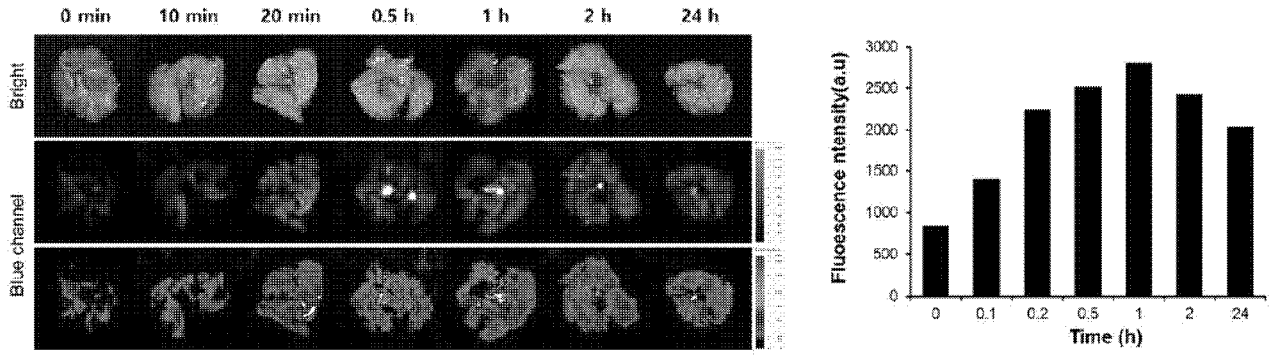
(74) 대리인: 특허법인(유)남아이피그룹 **(NAM IP GROUP)**; 04516 서울특별시 중구 서소문로 95, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

WO 2024/155017 A1

(54) Title: NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE DESIGNED FROM DUCK-DERIVED ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 오리 유래 항균 펩타이드로부터 설계된 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a new peptide and, more specifically, to a new peptide prepared by means of substitution or/and deletion of some amino acid sequences of a duck-derived antimicrobial peptide, and a use thereof. The novel peptide according to the present invention has excellent antimicrobial activity against gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobater baumannii*; gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus cereus*; and antibiotic-resistant bacteria, and therefore, as a material having antimicrobial activity, the novel peptide can be useful as a material for coating, packaging, preservatives (cosmetic preservatives, food preservatives, pharmaceutical preservatives), and additives (food additives, cosmetic additives, feed additives), as well as for antibiotics, pharmaceuticals, cosmetics, food, feed, and biopesticides. In particular, the novel peptide of the present invention has minimal cytotoxicity and has the advantage of being safe for the human body even for long-term use.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 오리 유래 항균 펩타이드의 일부 아미노산 서열을 치환 또는/및 결실을 통해 제조된 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 펩타이드는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*) 와 같은 그람 음성균; 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 와 같은 그람 양성균; 및 항생제 내성균에 대한 항균 활성이 우수하므로, 항균 활성을 갖는 소재로서 항생제, 의약품, 화장품, 식품, 사료 및 생물 농약은 물론 이 외에도 코팅제, 포장제, 보존제(화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 보존제), 첨가제(식품 첨가제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제) 소재로 유용하게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 신규 펩타이드는 세포독성이 미미하여 장기간 사용에도 인체에 안전한 이점을 가진다.

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 오리 유래 항균 펩타이드로부터 설계된 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 신규 펩타이드에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 오리 유래 항균 펩타이드의 일부 아미노산 서열을 치환 또는/및 결실을 통해 제조된 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 항균 또는 항진균 효과가 있는 항생제는 미생물은 죽이면서 인체 또는 동물에게는 독성이 낮고 체내의 효소 등에 의해 비활성화되지 않는 선택적 독성작용(selective toxicity)을 갖는 물질이다. 이는 주로 DNA의 복제, 유전정보의 전사 및 해독, 전사 에너지의 수송, 세포벽의 생합성 등을 저해함으로써 미생물의 증식을 억제하는 기전을 통해 효과를 나타낸다.

[3] 그러나 광범위하고 무분별한 항생제 사용으로 인해 항생제 내성을 가지는 균주들이 증가하고 있다. 미국 질병통제센터(CDC)의 AMR(antimicrobial resistance) 병원 항생제 보고서에 따르면, 항생제의 오남용으로 인해 2006년 한해 동안 약 10만명이 MRSA(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)에 감염되었고 그 중 사망자는 약 2만명이었다. 2010년에는 국내에서도 슈퍼박테리아라 일컬어지는 NDM-1(New Delhi metalo-beta-lactamase) 유전자를 함유한 카바페넴 내성 장내균(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)이 발견되는 등 내성균에 의한 위험성이 증가하고 있다. 현재 전 세계적으로 이루어지는 감염성 질환에 대한 연구의 대부분은 병원균의 대사나 생합성 경로를 선택적으로 억제 또는 제어하는 항생물질의 개발과 약독화 병원균의 배양에 의한 백신 개발에 초점이 맞추어져 있다. 기존의 항생 물질의 경우 숙주의 대사 및 생합성 경로를 조절하는 효소도 동시에 억제하여 부작용과 독성을 나타내는 경우가 많고 내성 문제로 사용이 제한되고 있으며, 백신 개발만으로는 신종 병원균에 신속하게 대처할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 감염성 질환을 초기에 효과적으로 제어할 수 있는 새로운 패러다임의 감염 치료제의 개발이 시급한 실정이며, 최근 들어 국내외 연구진들은 기존의 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)에 주목하고 있다.

[4] 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 감염 과정에서 거의 모든 종의 즉각적인 비특이적 방어 메커니즘의 구성요소이다. 이들은 주로 양전하(+2~+9)를 띠고 있으며, 30% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고 있다. 이러한 특징으로 인해 항균 펩타이드가 음전하를 띤 세균 세포막과 접촉하게 되면 양극성 α-헬릭스(amphipathic α-helix) 혹은 β-시트(β-sheet)를 형성하여 세포막 속으로 들어갈 수 있다. 항균 펩타이드가 표적 세균의 세포막에 들어가게 되면 양전하를 갖

는 항균 펩타이드가 음전하를 띠는 박테리아, 바이러스 또는 곰팡이의 지질막과 결합하여 지질막의 불안정화를 일으키고, 세포막의 전위를 소실시켜 세균을 죽이는 것으로 알려져 있다. 천연에 존재하는 항균성 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되었고, 이는 기존에 사용되고 있는 화학합성 항생제와 다른 작용기작을 통하여 항균 활성을 나타내기 때문에 항생제 내성 균주에 대한 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[5] 현재까지 연구된 결과들에 의하면, 동물 및 식물 등으로부터 약 2,000 종 이상의 많은 항균 펩타이드가 분리되었는데, 대표적인 항균 펩타이드로서 세크로핀(cecropin), 머게이닌(magainin), 봄비닌(bombinin), 디펜신(defensin), 타키플레신(tachyplesin) 및 부포린(buforin) 등이 알려져 있다. 이들 항균 펩타이드들은 공통적으로 17-24개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 그람 음성균 및 그람 양성균뿐만 아니라 원핵생물 또는 곰팡이 등에 대해서도 항균력을 가지며 일부는 암세포와 바이러스에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[6] 이에 본 발명자는 기존에 보고된 항균 펩타이드로부터 항균활성이 증진된 신규한 합성 펩타이드를 제조하기 위하여 양친화성을 갖는 오리 유래 항균 펩타이드(이하 간략하게 'dCATH'라 약칭함)를 주형으로 하여, 7종의 dCATH 유사체(서열번호 2 내지 서열번호 8)를 합성하였고, 상기 합성된 펩타이드 유사체가 모체 펩타이드인 dCATH 대비 증진된 항균 활성 및 두드러지게 감소된 세포독성(세포독성이 미미함)을 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 따라서 본 발명의 목적은 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 항균 펩타이드를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 항생제를 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 식품첨가제를 제공하는 것이다.

[11]

[12] *본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 사료첨가제를 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 화장품 보존제 또는 의약품 보존제를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 생물 농약을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인체에 안전하면서도 항균 활성이 우수한 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균 펩타이드를 이용한 인간을 제외한 개체에 내 항균 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[17] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[18] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서, i) 3번째 또는 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나; ii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나; iii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 또는 13번째 아미노산 1개 이상이 리신(Lysine, K)으로 치환되거나; 또는 iv) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 및 13번째 아미노산이 리신(Lysine, K)으로 치환되고, 19번째 및 20번째 아미노산이 결실된 항균 펩타이드를 제공한다.

[19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[20] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가질 수 있다.

[21] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[22] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 그람 양성균은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[23] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)일 수 있다.

[24] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation)될 수 있다.

[25] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항생제를 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 사료첨가제를 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장품 보존제 또는 의약품 보존제를 제공하는 것이다.

[30] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 생물 농약을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.

[32] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다.

발명의 효과

[33] 본 발명에 따른 신규 펩타이드는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)와 같은 그람 음성균; 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)와 같은 그람 양성균; 및 항생제 내성균에 대한 항균 활성이 우수하므로, 항균 활성을 갖는 소재로서 항생제, 의약품, 화장품, 식품, 사료 및 생물 농약은 물론 이 외에도 코팅제, 포장제, 보존제(화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 보존제), 첨가제(식품 첨가제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제) 소재로 유용하게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 신규 펩타이드는 세포독성이 미미하여 장기간 사용에도 인체에 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[34] 도 1은 항균 펩타이드인 dCATH(대조군) 및 dCATH 유사체 신규 펩타이드인 dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 및 dCATH-A7(실험군)의 다양한 용매 상에서 2차 구조 형성 여부를 확인한 결과이다.

[35] 도 2는 대조군인 dCATH 펩타이드 및 dCATH 유사체 신규 펩타이드인 dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 및 dCATH-A7(실험군)의 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 막에 대한 작용 여부를 유세포분석기를 이용하여 확인한 결과이다.

[36] 도 3은 대조군인 dCATH 펩타이드 및 신규 펩타이드인 dCATH-A6 및 dCATH-A7의 박테리아 내부 물질인 DNA에 대한 결합능을 전기영동을 통해 확인한 결과이다(lane 1번부터 6번까지 DNA/펩타이드 비율은 각각 DNA 단독, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4로 실시함).

[37] 도 4는 신규 펩타이드인 dCATH-A7의 세포 내 위치를 확인한 형광염색 결과이다.

[38] 도 5는 마우스 폐 조직 내 신규 펩타이드 dCATH-A7 위치를 시간별로 확인한 결과이다.

[39] 도 6은 신규 펩타이드 dCATH-A7의 마우스 폐 조직 조직에서의 활성을 보여주는 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서, i) 3번째 또는 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나; ii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나; iii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 또는 13번째 아미노산 1개 이상이 리신(Lysine, K)으로 치환되거나; 또는 iv) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 및 13번째 아미노산이 리신(Lysine, K)으로 치환되고, 19번째 및 20번째 아미노산이 결실된 항균 펩타이드에 관한 것이다.

[41] 본 발명에 있어서, 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 항균 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성방법에 따라 제조될 수 있다.

[42] 기존의 알려진 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 모체 펩타이드인 dCATH는 오리(duck, Anas platyrhynchos)에서 분리된 항균 펩타이드로 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 상기 합성을 위한 방법으로 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., Proteins; structures and molecular principles, 1983)으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(solution-phase peptide synthesis), 고상 펩타이드 합성법(solid-phase peptide synthesis), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[44] 본 발명에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 dCATH로부터 3번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되어 'dCATH-A1'으로 명명하였고; 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 4번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되어 'dCATH-A2'로 명명하였으며; 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 3번째와 4번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되어 'dCATH-A3'로 명명하였고; 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 3번째와 4번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되었으며, 8번째 아미노산이 리신(K)으로 치환되어 'dCATH-A4'로 명명하였으며; 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 3번째와 4번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되었으며, 8번째와 9번째 아미노산이 리신(K)으로 치환되어 'dCATH-A5'로 명명하였고; 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 3번째와 4번째 아미노산이 알라닌(A)으로 치환되었으며, 8번째와 9번째 그리고 13번째 아미노산이 리신(K)으로 치환되어 'dCATH-A6'로 명명하였으며; 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 서열번호 7번의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에서 19번째와 20번째 아미노산이 결실된 항균 펩타이드로 'dCATH-A7'로 명명하였다.

[45] 상기 항균 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다.

[46] 또한 상기 항균 펩타이드는 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 본 발명의 신규 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환(도입)하여 본 발명의 신규 펩타이드가 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질(폴리펩티드)을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.

[47] 상기 항균 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation)된 것일 수 있다.

[48] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가질 수 있다.

[49] 상기 그람 음성균은 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 대장균 속(*Escherichia*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*), 리케치아속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 및 아시네토박터 속(*Acinetobacter*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[50] 상기 그람 양성균은 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[51] 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*), 아시네토박터 바우마니

(*Acinetobacter baumannii*) 및 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[52] 상기 항생제는 예를 들면, β-락탐계 항생제, 아미노글리코사이드계 항생제, 뉴퀴놀론계 항생제, 펩타이드계 항생제, 글리코펩타이드계 항생제, 테트라사이클린계 항생제, 리파마이신계 항생제, 린코마이신계 항생제 및 매크로라이드계 항생제를 들 수 있으나, 특별히 이를 한정하는 것은 아니다.

[53] β-락탐계 항생제로는 예를 들면, 페니실린계 항생제, β-락타마아제 저해제 배합 페니실린계 항생제, 세펨계 항생제, β-락타마아제 저해제 배합 세펨계 항생제, 카바페넴계 항생제, β-락타마아제 저해제 배합 카바페넴계 항생제, 모노박탐계 항생제 및 페넴계 항생제 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 페니실린계 항생제, β-락타마아제 저해제 배합 페니실린계 항생제, 세펨계 항생제, β-락타마아제 저해제 배합 세펨계 항생제 및 카바페넴계 항생제일 수 있다.

[54] 페니실린계 항생제로는 예를 들면, 벤질페니실린, 페니실린 O, 페니실린 V, 페니실린 G, 메티실린, 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 카베니실린, 바캄피실린, 티카실린, 아즐로실린, 메즐로실린, 아목시실린, 설타미실린, 탈람피실린, 레남피실린, 시클라실린, 피브메실리남, 아스폭시실린, 암피실린 및 피페라실린을 들 수 있으며, 바람직하게는 피페라실린일 수 있다.

[55] β-락타마아제 저해제 배합 페니실린계 항생제로는 예를 들면, 암피실린-설박탐 배합제, 티카실린-클라블라닉 산 배합제, 및 피페라실린-타조박탐 배합제를 들 수 있다.

[56] 세펨계 항생제로는 예를 들면, 세파졸린, 세팔로틴, 세파피린, 세파렉신, 세파드록실, 세팔로리딘, 세프테졸, 세프록사딘, 세파만돌, 세푸록심, 세포니시드, 세포라니드, 세파클러(cefaclor), 세프프로질, 세프포독심, 로라카베프, 세프트리악손, 세포탁심, 세프티족심, 세포페라존, 세프술로딘, 세포티부텐, 세픽심, 세페타메트, 세프디토렌피복실, 세프피롬, 세포시틴(cefoxitin), 세포테탄, 세프메타졸, 세프부페라존, 세프미녹스, 라타목세프, 플로목세프, 세포티암, 세프피라미드, 세프메녹심, 세포조프란, 세파트리진, 세프디니르, 세프테람피복실, 세프카펜피복실, 세프톨로잔, 세프타롤린, 세프라딘세프톨로잔, 세프타지딤 및 세페핌을 들 수 있으며, 바람직하게는 세포탁심, 세프타지딤 및 세페핌일 수 있다.

[57] β-락타마아제 저해제 배합 세펨계 항생제로는 예를 들면, 세포페라존-설박탐 배합제, 세프타지딤-아비박탐 배합제, 세프타롤린-아비박탐 배합제 및 세프톨로잔-타조박탐 배합제를 들 수 있다.

[58] 카바페넴계 항생제로는 예를 들면, 이미페넴, 파니페넴, 비아페넴, 도리페넴, 에르타페넴, 테비페넴(Tebipenem), 토모페넴, 사프트리넴(saftrinem), 레나페넴 및 메로페넴을 들 수 있으며, 바람직하게는 이미페넴 및 메로페넴일 수 있다.

[59] β-락타마아제 저해제 배합 카바페넴계 항생제로는 예를 들면, 이미페넴-MK-7655 배합제 및 비아페넴-RPX7009 배합제를 들 수 있다.

[60] 모노박탐계 항생제로는 예를 들면, 아즈트레오남(aztreonam) 및 카루모남(carumonam)을 들 수 있다.

[61] 페넴계 항생제로는 예를 들면, 파로페넴 및 술로페넴(sulopenem)을 들 수 있다.

[62] 아미노글리코사이드계 항생제로는 예를 들면, 스트렙토마이신, 네오마이신, 카나마이신, 파로마이신, 젠타마이신, 토브라마이신, 네틸마이신, 스펙티노마이신, 시소마이신, 디베칼린, 베카나마이신, 리보스타마이신, 아스트로마이신, 아베카신(arbekacin), 플라조마이신, 이세파마이신 및 아미카신을 들 수 있으며, 바람직하게는 아미카신 및 젠타마이신일 수 있다.

[63] 뉴퀴놀론계 항생제로는 예를 들면, 날리딕스산(nalidixic acid), 옥솔린산, 피로미드산, 피페미드산, 노플록사신, 페플록사신(pefloxacin), 에녹사신, 오플록사신, 테마플록사신, 로메플록사신, 플레록사신, 그레파플록사신, 스파르플록사신(sparfloxacin), 트로바플록사신, 클리나플록사신, 가티플록사신, 목시플록사신, 시타플록사신, 가네플록사신, 게미플록사신, 가레녹사신, 프룰리플록사신(prulifloxacin), 토스플록사신, 베시플록사신, 피나플록사신, 델라플록사신, 아바플록사신, 자보플록사신, 네모녹사신, 파주플록사신(pazufloxacin), 시프로플록사신 및 레보플록사신을 들 수 있으며, 바람직하게는 시프로플록사신일 수 있다.

[64] 펩타이드계 항생제로 예를 들면, 콜리스틴(colistin)일 수 있다.

[65] 글리코펩타이드계 항생제로는 예를 들면, 반코마이신, 텔라반신 및 테이코플라닌을 들 수 있다.

[66] 테트라사이클린계 항생제는 예를 들면, 미노사일클린(minocycline) 및 타이제사이클린(tigecycline)을 들 수 있다.

[67] 리파마이신계 항생제로는 예를 들면, 리팜피신을 들 수 있다.

[68] 린코마이신계 항생제로는 예를 들면, 클린다마이신을 들 수 있다.

[69]

[70] *매크로라이드계 항생제로는 예를 들면, 에리트로마이신 및 아지트로마이신을 들 수 있다.

[71] 본 발명의 일구체예에서, 상기 항생제 내성균은 암피실린/설박탐 배합제, 아미카신, 아즈트레오남, 시프로플록사신, 콜리스틴, 세페핌, 젠타마이신, 이미페넴, 메로페넴, 미노사일클린, 피페라실린, 트리메토프림/설파메톡사졸 배합제, 세포탁심, 세프타지딤, 티카실린-클라블라닉 산 배합제, 타이제사이클린 및 피페라실린/타조박탐 배합제로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주이다(결과 미도시).

[72] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

[73] 본 발명에 있어서, '항균용 조성물'이란 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균제, 항생제, 방부제, 보존제 또는 제균제와 같은 의미일 수 있으며, 일예로 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)와

같은 그람 음성균; 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 같은 그람 양성균; 또는 항생제 내성균을 포함하는, 병원성 미생물의 발육과 생활 기능을 저지 또는 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[74] '대장균(*Escherichia coli*)'은 그람 음성균으로 사람 및 동물의 대장에 서식하는 세균 중 하나이며, 분변에 의해 오염된 환경에서는 쉽게 발견할 수 있기 때문에 식품, 음료, 식당과 같은 청결을 필요로 하는 대상의 오염의 지표로 사용되는 세균이다.

[75] '슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)'는 그람음성의 소간균(小杆菌)으로 인간에 대한 병원성은 약하지만, 널리 자연환경에 분포하고 있기 때문에 혼합감염, 2차감염을 일으켜서 질병상태를 악화시킨다. 특히 수술・화상등 생체의 저항력이 저하되어 있는 경우, 감염으로 인해 패혈증을 일으킨다(균교대증, 일화견(日和見)감염). 만성중이염에 대부분 본균이 나타난다. 또한 소화기 점막을 침범해서 설사를 일으키기도 한다.

[76] '아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)'은 대표적인 병원성 균주로 그람 음성 세균이다. 1968년 처음으로 명명된 아시네토박터 바우마니는 약한 병원성과 토양, 물 등의 자연 환경과 병원 환경에 널리 분포되어 있는 세균이며, 3가지 계열 이상의 항생제에 내성을 갖는 다제내성(multiple drug resistance, MDR) 아시네토박터 바우마니균 감염증이 최근 15년 간 폭발적으로 증가하고, 특히 이라크 분쟁지역에서 악명 높은 'Iraqibacter'로 불리우며 큰 문제로 대두되었다.

[77] '스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)'는 그람양성의 통성혐기성 세균으로 건강한 사람이나 가축의 피부와 비강표면에 일반적으로 존재하는 병원균이며, 내열성인 외독소를 생산하여 식중독을 일으킨다. 또 식세포를 죽이는 독소(류코시딘), 용혈소, 응고효소 등을 분비하여 감염숙주세포의 저항성에서 벗어나 화농성 감염증을 일으키는 것을 알려져 있다. 포도상구균은 50% 이상의 건강한 사람, 동물의 피부, 비강 등에 서 흔히 발견되며 여드름, 농가진 같은 경증의 피부감염증부터 폐렴, 수막염, 패혈증과 같은 생명을 위협하는 질환들에 이르기까지 다양한 질병을 초래할 수 있다. 또한, 원내감염의 가장 흔한 5가지의 원인 중 하나이며, 종종 수술 후 상처 감염증을 초래한다. 미국 병원에서 매년 약 50만 명의 환자들이 포도상구균 감염증에 걸리는 것으로 알려졌다. 황색포도상구균은 균주에 따라 여러 가지 독소를 분비할 수 있는데, 이는 발열성 독소 초항원(Pyrogenic toxin superantigens), 표피 박탈성 독소(Exfoliative toxins), 기타독소 등 3가지로 분류된다. 식중독의 원인이 되는 7가지의 장독소(enterotoxin)를 만들어 내는 균주는 발열성 독소 초항원에 속한다. 황색포도상구균이 생산한 장독소는 위장염의 원인이 되는데, 오심·구토·설사·복통 증상을 일으키며, 8-24 시간 내에 증세가 완화되어 자연 치유된다. 식중독 증상은 세균 자체에 의해서가 아니라 장독소에 의해 발생하는 것으로, 내열성이 강하여 식품을 가열·조리하여도 파괴되지 않으므로, 황색포도상구균에 오염된 식품은 섭취하지 않는 게 최선이다.

[78] '리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)'는 그람 양성 막대균인 리스테리아균 중 유일하게 사람에게 병원성이 있는 세균으로 오염된 식품으로 전염될 수 있는 식품매개 위장관 감염의 원인균에 해당한다. 상기 균은 세포매개성 면역력이 감소되어 있는 노인, 장기이식 환자, 후천성면역결핍증후군 (AIDS) 환자 등에서 중추신경계 감염, 패혈증 등 심각한 감염을 일으킬 수 있다.

[79] '바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)'는 내열성 아포를 생성하는 그람양성 간균이자 통성 혐기성균으로서, 식품의 제조, 가공, 조리 후에 적절한 조건이 갖추어지면 왕성하게 증식하여 부패 및 변패를 일으키며, 음식을 조리한 후 식히기 위해 실온에 장기간 방치한 경우 바실러스 세레우스균의 포자가 증식하거나 독소가 생성되는 것으로 알려져 있다. 바실러스 세레우스균에 오염된 식품을 섭취하면 이 균이 만들어내는 장독소에 의해 설사나 구토 같은 식중독 증상이 나타날 수 있다.

[80] 본 발명의 항균 펩타이드는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 및 항생제 내성균에 대한 우수한 항균 활성을 갖는바, 이를 유효성분을 포함하는 본 발명의 조성물은 항균 활성을 가진 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[81] 특히, 본 발명의 항균 펩타이드는 세포독성 및 용혈성을 분석한 결과, 모체 펩타이드(dCATH)에 비해 세포독성 및 용혈성이 미미한 것으로 나타나, 인체에 안전한 이점을 갖는다. 오리 유래 모체 펩타이드(dCATH)는 포유류 세포 독성 때문에 치료적 적용이 제한적인 문제점이 있으나, 본 발명의 항균 펩타이드는 이와 같은 문제점을 해결하였다.

[82] 따라서 본 발명의 상기와 같은 특징으로 갖는 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물은 항균 활성이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 항생제, 의약품, 화장품, 식품, 사료 및 생물 농약은 물론 이 외에도 코팅제, 포장제, 보존제(화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 보존제 등), 첨가제(의약품 첨가제, 식품 첨가제, 화장품 첨가제, 사료 첨가제 드) 소재로 사용될 수 있다. 예를 들어, 의약에 있어서는 항생제나 오염방지제와 같은 목적으로, 식품에 있어서는 방부나 항균 목적으로, 농업에 있어서는 항균, 살균, 소독의 목적으로 화장품이나 생활용품에 있어서는 비듬억제용, 무좀방지용, 겨드랑이 채취억제용, 항균이 필요한 물품에 코팅제의 용도를 위하여 사용될 수 있으며, 전술한 목적으로만 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 내지 50.0중량%로 포함될 수 있다. 또한, 상기 항균용 조성물 본 발명의 항균 펩타이드 이 외에, 항균활성 또는 방부활성을 가지는 다른 공지 항균 물질을 더 포함할 수 있다.

[83] 본 발명의 항균용 조성물은 구체적으로 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아

속(*Listeria*), 바실러스 속(*Bacillus*) 및 항생제 내성균에 대한 항균용 조성물일 수 있고, 보다 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는/및 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 항균용 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[84] 하기에서는 본 발명의 항균용 조성물을 더욱 구체적으로 세분화하여 살펴본다.

[85] 먼저, 본 발명의 항균용 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

[86] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 감염성 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 하며, 상기 감염성 질환은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는/및 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 의해 발병되는 질환일 수 있다.

[87] 구체적으로, 상기 감염성 질환은 식중독, 농가진(impetigo), 봉소염(Cellulitis), 열상피부증후군(scalded skin syndrome), 유방염(mastitis), 균혈증(bacteremia), 패혈증(sepsis), 포도상구균성폐염(Staphylococcal pneumonia), 심내막증(endocarditis), 골수염(osteomylitis), 포도상구균성패혈증(Staphylococci sepsis), 독소쇼크증후군(Toxic shock syndrome), 원내폐렴, 요로 감염증, 전신감염증 (균(세균)피증 및 패혈증), 피부 및 연부 조직 감염증, 외과감염증, 복강내 감염증, 폐감염증 (낭포성 섬유증 환자에 있어서의 것을 포함한다), 헬리코백터 필로리(Helicobacter pylori) (및 소화성 궤양질환, 위발암등이 관련되는 위의 합병증 경감), 당뇨병성 발감염증, 골수염 및 중추 신경계 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 감염증일 수 있으나, 특별히 이를 한정하는 것은 아니다.

[88] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명의 항균 펩타이드를 개체에 투여하여 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 의한 세균성 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[89] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명의 항균 펩타이드를 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 의한 세균성 질환의 발병이 의심되는 개체에 투여하여 상기 질병의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[90] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 의한 세균성 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[91] 본 발명의 항균용 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 본 발명에서 사용가능한 담체로는 리포좀, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산,중합체성아미노산, 및 아미노산 공중합체와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 예를 들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 설페이트와 같이 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체, 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체에 관해서는 문헌 [Remingtion's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1991]에 기재되어 있다.

[92] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 펩타이드 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 수막강내, 심실내, 폐, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 소화관내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[93] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 임상투여시에 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[94] 즉, 본 발명의 항균 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 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[95] 본 발명의 약제학적 조성물에서 유효성분인 항균 펩타이드의 유효 용량은 0.1 내지 20 ㎎/㎏이고, 바람직하기에는 0.5 내지 10 ㎎/㎏ 이며, 하루 1 내지 3회 투여될 수 있다.

[96] 본 발명의 약제학적 조성물에서 유효성분인 항균 펩타이드의 총 유효량은 거환(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 확산(infusion) 등에 의해 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. 상기 항균 펩타이드의 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

상기 펩타이드의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[97] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 항균용 약학적 조성물은 항생제일 수 있다.

[98] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 식품 조성물일 수 있다.

[99] 본 발명의 항균용 식품 조성물은 감염성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 하며, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 본 발명의 항균 펩타이드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[100] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[101] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[102] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 항균 펩타이드를 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[103] 한편, 본 발명의 유효성분인 항균 펩타이드는 세포독성이 미미하므로 항균 기능성 부여를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는바, 감염증의 예방 또는 개선을 위한 기능성 식품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[104] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.

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

[106] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 항균 펩타이드는 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 30 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[107] 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 파운데이

션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[108] 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.

[109] 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.

[110] 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, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[111] 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.

[112] 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.

[113] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물은 유효성분인 항균 펩타이드를 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 유효성분을 나노리포좀 내부에 함유시키면, 유효성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 유효성분으로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.

[114] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 식품첨가제일 수 있다.

[115] 본 발명의 항균 펩타이드를 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 장기간의 섭

취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[116] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[117] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 사료첨가제일 수 있다.

[118] 본 발명의 항균 펩타이드는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는/및 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 항균 활성을 가짐에 따라, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 사료첨가제는 사료에 첨가되는 항생제 대체물질로서 사용이 가능하다.

[119] 상기 사료첨가제는 닭, 오리, 거위, 꿩, 돼지, 소, 염소, 개 및 고양이 중 어느 하나 이상의 동물용 배합사료 내 첨가 혼합되는 사료첨가제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[120] 본 발명의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 상기 사료첨가제는 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다.

[121] 본 발명의 사료첨가제는 부형제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 약제에 적당한 굳기나 형상을 주기 위해서, 또는 주제(主劑)의 양이 적은 경우에 일정 용량, 중량을 주어 취급하기 쉬운 크기로 할 목적으로 첨가되는 성분이다. 이에 한정되는지는 않지만, 상기 부형제는 탈지강, 밀기울, 옥수수 분말, 곡류 전분, 실리카분말, 규조토 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있으며, 사료 등 기준 및 규격(농림축산식품부 고시 제2014-106호)에서 인정하고 있는 부형제 등을 포함할 수 있다.

[122] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 식품 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제일 수 있다.

[123] 상기 식품 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 식품이나 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함될 수 있고, 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 식품 방부제 및 화장품, 의약품 보존제의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

[124] 본 발명의 항균 펩타이드는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스

타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는/및 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 우수한 항균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 독성이 미미하므로 식품의 방부제, 화장품 또는 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

[125] 상기 식품 방부제는 본 발명의 항균 펩타이드를 식품 방부제 총 중량에 대해 0.01 내지 50중량% 포함할수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[126] 본 발명의 제제예에 식품 방부제는 본 발명의 항균 펩타이드 이외에 공지의 식품 방부제 중 1종 이상 포함하여 제조될 수 있다. 식품 방부제로는 데히드로초산, 소르빈산칼륨, 소르빈산칼슘, 안식향산나트륨, 안식향산칼륨, 안식향산칼슘, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 프로피온산나트륨, 프로피온산칼슘 등이 사용되고 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[127] 본 발명의 제제예에 따른 화장품 보존제는 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태에 포함하여 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다.

[128] 또한, 본 발명의 화장품 보존제는 본 발명의 항균 펩타이드 외에 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 포함함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다. 또한, 적합한 화장품의 제형으로는, 예를 들면 본 발명의 항균 펩타이드를 첨가한 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 포함한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[129] 본 발명의 제제예에 따른 화장품 보존제는 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태에 포함하여 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다.

[130] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 생물 농약일 수 있다.

[131] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 의약외품 조성물일 수 있다.

[132] 본 발명의 조성물을 의약외품 조성물로 사용할 경우, 상기 항균 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[133] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충진제일 수 있다.

[134] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 코팅제 조성물일 수 있다.

[135] 본 발명의 조성물은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는/및 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니 균주에 대한 항균 활성이 우수한 펩타이드를 유효성분으로 함유하므로, 항균이 필요한 물품에 코팅제의 용도를 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 항균 도마, 항균 치약 용기, 항균 칫솔갑, 항균 화장품 용기, 항균 쓰레기통, 항균 대야, 항균 컵, 항균 병, 항균 쌀통, 항균 김치통, 항균 바가지, 항균 포장지, 항균 식품저장용기, 항균 박스, 항균 양념통, 항균 물통, 항균 음료용 병, 항균 부직포, 항균 섬유, 항균 행주, 항균 걸레, 항균 수세미, 항균 이불 커버, 항균 침대 커버, 항균 식탁매트, 항균 변기 시트 커버, 항균 불고기판, 항균 기저귀, 항균 생리대, 항균 마스크, 항균 붕대, 항균 밴드, 항균 의료 물품, 항균 과일 포장지, 항균 꽃 포장지, 항균 벽지, 항균 장판 및 항균 타일 등과 같은 물품을 코팅할 수 있는 코팅용 항균 조성물의 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

[136] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내 항균 방법에 관한 것이다.

[137] 상기 개체란 인간, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

[138] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[139]

[140] **<실시예 1>**

[141] **<u>본 발명의 신규 펩타이드의 합성 및 분리 정제</u>**

[142] 메리필드(Merrifield)의 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 모체 펩타이드인 dCATH의 아미노산 서열에서 3번째와 4번째의 아미노산 잔기를 알라닌(Alanine, A)으로 치환하였고, 이후 8번째, 9번째, 13번 아미노산 잔기를 리신(Lysine, K)으로 순차적으로 치환하였다. 마지막으로 19번째와 20번째 아미노산 잔기를 결실시켜 합성하였다(하기 표 1 참조).

[143] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH_2 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다.

[144] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo trizole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고, NMP 및 DCM(dichoromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid), 페놀(phenol), 씨이오아니졸(thioanisole), H2O 및 트리이소프로필실레인(triisopropylsilane)을 각각 85:5:5:2.5:2.5(v/v)의 비율로 혼합한 용액을 가하고 2~3시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전하여 이를 수득하였다. 상기 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C18300Å,15,19.0mm×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N 염산으로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N 염산에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정한 후, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill, et al., Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5: 395, 1991)을 수행하였다.

[145] 그 결과, 하기 표 1에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 기재되는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다.

[146]

[147] [표1]

합성 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유시간

명칭	아미노산 서열	서열번호	보유시간	분자량
dCATH	KRFWQLVPLAIKIYRAWKRR	1	22.519	2628.8
dCATH-A1	KR**A**WQLVPLAIKIYRAWKRR	2	21.179	2551.1
dCATH-A2	KRF**A**QLVPLAIKIYRAWKRR	3	21.033	2513.1
dCATH-A3	KR**AA**QLVPLAIKIYRAWKRR	4	19.993	2437.9
dCATH-A4	KR**AA**QLV**K**LAIKIYRAWKRR	5	21.306	2467.4
dCATH-A5	KR**AA**QLV**KK**AIKIYRAWKRR	6	16.953	2482.8

dCATH-A6	KR**AA**QLV**KK**AIK**K**YRAWKRR	7	13.63	2497.4
dCATH-A7	KR**AA**QLV**KK**AIK**K**YRAWK	8	13.173	2186.2

[148] * 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation) 됨.

[149]

[150] **<실시예 2>**

[151] **본 발명 신규 펩타이드의 항균 활성**

[152] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다. 여기서, 생육 최소저해농도(MIC)란 세균의 가시적인 성장을 방지하는 물질의 최소 농도를 의미한다.

[153] 구체적으로, 하기 표 2에 기재된 균주를 구입하여, 각 균주에 적합한 조성의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^4 세포/100㎕의 농도로 희석하여 마이크로 적정 플레이트(Nunc, USA)에 준비하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드를 각 웰에 1/2배씩 계열 희석(serial dilution)하여 첨가한 후 37℃에서 18시간 동안 배양하였고, 마이크로 적정 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 모체 펩타이드인 dCATH를 대조군으로 사용하였다.

[154] 그 결과, 하기 표 3에서 나타난 바와 같이 dCATH-A1 내지 dCATH-A5 펩타이드는 그람양성균, 그람음성균 균주에 대해 대조군인 모체 펩타이드 dCATH 대비 대체적으로 우수한 항균활성을 가지는 것을 확인하였다.

[155] 특히, dCATH-A6 및 dCATH-A7 펩타이드는 대조군인 모체 펩타이드 dCATH에 비해 아시네토박터 바우마니 균주에 대해 우수한 항균활성을 나타내며, 스타필로코커스 아우레우스 균주에 대해 두드러지게 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[156] 뿐만 아니라, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A5 내지 dCATH-A7 펩타이드의 경우 아시네토박터 바우마니 내성 균주에 대해 대조군인 모체 펩타이드 dCATH 대비 두드러지게 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[157]

[158] [표2]

박테리아 균주 및 이의 입수처

구분	균주명	출처	기탁번호
그람 음성균	대장균 (*Escherichia coli*)	미국 세포주은행	ATCC 25922
	슈도모나스 에루지노사	미국 세포주은행	ATCC 27853

	(*Pseudomonas aeruginosa*)		
	아시네토박터 바우마니 (*Acinetobater baumannii*)	한국 세포주은행	KCTC 1017
그람 양성균	스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	미국 세포주은행	ATCC 25923
	리스테리아 모노사이토젠스 (*Listeria monocytogenes*)	한국 세포주은행	KCTC 3710
	바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)	한국 세포주은행	KCTC 2508
항생제 내성균	아시네토박터 바우마니 분리주 1 ~ 26	을지병원	-

[159]

[160] [표3]

신규 펩타이드의 항균 활성

항목		MIC(μM)							
		dCATH	dCATH-A1	dCATH-A2	dCATH-A3	dCATH-A4	dCATH-A5	dCATH-A6	dCATH-A7
그람 음성균	대장균	2	2	2	2	2	1	2	4
	슈도모나스 에루지노사	2	4	2	2	2	1	2	8
	아시네토박터 바우마니	2	2	1	1	2	1	1	1
그람 양성균	스타필로코커스 아우레우스	2	2	1	2	2	1	0.5	0.5
	리스테리아 모노사이토젠스	2	2	2	2	2	1	2	4
	바실러스 세레우스	1	2	1	2	2	1	2	1
항생제 내성균	아시네토박터 바우마니_분리주 1	2	2	2	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 2	2	2	1	1	2	1	2	1

아시네토박터 바우마니_분리주 3	2	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 4	2	2	2	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 5	2	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 6	4	2	2	2	1	1	2	1
아시네토박터 바우마니_분리주 7	4	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 8	2	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 9	2	2	2	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 10	2	2	2	2	4	1	2	1
아시네토박터 바우마니_분리주11	2	2	1	1	2	1	1	0.5
아시네토박터 바우마니_분리주 12	2	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 13	2	2	1	1	2	1	1	1
아시네토박터 바우마니_분리주 14	2	2	1	2	2	1	2	1
아시네토박터 바우마니_분리주15	2	2	1	2	2	1	1	1

	아시네토박터 바우마니_분리주16	2	2	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 17	2	1	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 18	2	2	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 19	2	1	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주20	2	1	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주21	2	2	1	4	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 22	2	2	1	1	2	2	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 23	2	1	1	1	2	1	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 24	4	2	1	1	2	2	1	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 25	2	2	1	1	2	1	2	1
	아시네토박터 바우마니_분리주 26	2	2	2	1	2	1	2	1

[161]

[162] **<실시예 3>**

[163] 본 발명 신규 펩타이드의 항생물막 활성

[164] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드의 항생물막 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 생물막 최소억제 농도(Minimal biofilm Inhibitory Concentration, MBIC) 값을 측정하였다. 여기서, 생물막 최소억제 농도(MBIC)란 생물막 생존 세포의 평균 수가 시간에 따라 증가하지 않는 항균 물질의 최저 농도를 의미한다.

[165] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 생물막이 잘 형성되는 균주(아시네토박터 바우마니 KCTC 2508, 아시네토박터 바우마니_분리주 10 & 분리주 14)를 각 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 5×10^4 세포/100㎕의 균체 농도로 희석하여 마이크로 플레이트(SPL)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드를 각 웰에 1/10배씩 10mM 인산 나트륨 용액(sodium phosphate, pH 7.2)으로 희석하여 10㎕ 첨가한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 상층액을 완벽히 제거한 후 100% 메탄올로 15분간 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색용액으로 1시간 염색시킨 후, 3번 세척한 뒤 95% 에탄올로 용해하여 마이크로 적정 플레이드 판독기를 이용하여 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 생물막 최소억제 농도값을 확인하였다.

[166] 그 결과, 하기 표 4에 개시된 바와 같이 dCATH-A1 내지 dCATH-A7 펩타이드에서는 대조군인 모체 펩타이드 dCATH에 비해 상대적으로 강한 생물막 저해활성을 나타냈으며, 특히, dCATH-A3, dCATH-A5 내지 dCATH-A7에서 더욱 우수한 생물막 저해 활성을 보여주었다.

[167]

[168] [표4]

신규 펩타이드의 항생물막 활성

항목	MBIC (μM)		
	아시네토박터 바우마니 KCTC 2508	아시네토박터 바우마니_분리주 10	아시네토박터 바우마니_분리주 14
dCATH	4	4	4
dCATH-A1	4	4	2
dCATH-A2	4	2	2
dCATH-A3	2	2	1
dCATH-A4	4	4	4
dCATH-A5	2	2	1
dCATH-A6	2	2	2
dCATH-A7	2	2	1

[169]

[170] **<실시예 4>**

[171] **본 발명 신규 펩타이드의 세포독성 평가**

[172]

[173] <4-1> 적혈구 용혈 활성

[174] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드의 세포독성을 평가하기 위하여 적혈구 용혈활성을 측정하였다. 용혈은 적혈구가 파괴되어 헤모글로빈이 외부로 유출되는 것을 말하며, 본 발명 신규 펩타이드의 세포독성은 적혈구 세포에 대한 용혈활성을 측정하여 확인하였다.

[175] 구체적으로, 양(Sheep) 적혈구를 8%의 농도가 되도록 PBS(pH 7.0)로 희석하고, dCATH, dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 또는 dCATH-A7 펩타이드를 각각 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 및 100.0μM/웰의 농도로 처리하여, 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 1,000xg로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 량을 414㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100(sigma, USA)을 처리하여 37℃에서 1시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 상기 흡광도 값을 적혈구 용혈활성 100%로 하여, 하기 수학식 1을 사용하여 각 펩타이드의 용혈활성(hemolysis)을 계산하였다.

[176] [수학식 1]

[177] 적혈구 파괴능(%) = (흡광도 A-흡광도 B)/(흡광도 C-흡광도 B) X 100

[178] 상기 식에 있어서, 흡광도 A는 414㎚ 파장에서 측정한 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며, 흡광도 B는 414㎚ 파장에서 측정한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며, 흡광도 C는 414㎚ 파장에서 측정한 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타낸다.

[179] 그 결과, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이 대조군인 모체 펩타이드 dCATH 펩타이드와 신규 펩타이드 dCATH-A1과 dCATH-A2 100μM 농도를 처리하였을 때 양 적혈구에 대하여 100%의 용혈작용이 유발되었고, dCATH-A3, dCATH-A4, 및 dCATH-A5 펩타이드는 50% 이상 용혈작용이 유발된 것에 비해, dCATH-A6 및 dCATH-A7 펩타이드는 100μM 농도에서 적혈구에 대한 파괴능이 50% 이하로 낮게 나타난것을 확인하였다. 또한 항균 활성농도에서는 적혈구 파괴능이 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[180] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 신규 펩타이드가 모체 펩타이드에 비해 세포독성이 감소한 것을 확인하였다.

[181]

[182] [표5]

신규 펩타이드의 적혈구 파괴능 (%)

항목	적혈구 파괴능 (%)					
	3.13μM	6.25μM	12.5μM	25μM	50μM	100μM

dCATH	8.71	19.68	41.39	73.92	99.93	100
dCAT H-A1	0.43	1.71	4.92	13.02	53.63	100
dCAT H-A2	0	0.32	1.52	8.16	39.65	100
dCAT H-A3	0.35	0.9	3.08	8.43	23.91	68.97
dCAT H-A4	6.81	12.32	22.08	41.5	74.85	98.04
dCAT H-A5	1.44	1.28	3.31	8.64	24.9	69.73
dCAT H-A6	0	0.07	0.84	3.31	13.28	49.43
dCAT H-A7	0	0	0.46	2.48	11.76	47.81

[183]

[184] <4-2> MTT 에세이

[185] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드의 세포독성을 평가하기 위하여 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)을 이용하여 독성을 측정하였다.

[186] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HaCaT 세포를 2×105 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, dCATH, dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 또는 dCATH-A7 펩타이드를 각각 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 및 100.0μM/웰의 농도로 처리하여, 24시간 동안 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 24시간 후, 인산 완충액 생리 식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 0.5mg/㎖ MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 100㎕를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200㎕의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹인 후, 570nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

[187] 그 결과, 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 100μM의 농도에서 대조군인 모체 펩타이드 dCATH와 신규 펩타이드인 dCATH-A1 내지 dCATH-A5을 처리했을 때, HaCaT 세포는 0%에 가까운 세포 생존력을 나타내어 펩타이드가 매우 높은 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 이에 반해, dCATH-A6 및 dCATH-A7 펩타이드는 100μM의 농도에서 각각 91.96% 및 98.40%의 세포 생존력을 나타내어 세포 독성이 매우 낮거나 거의 없는 것으로 나타났다.

[188]

[189] [표6]

신규 펩타이드의 인간 피부 각질세포 처리에 따른 세포생존율 (%)

항목	세포생존율 (%)					
	3.13μM	6.25μM	12.5μM	25μM	50μM	100μM
dCATH	100	100	75.3	11.61	2.51	2.45
dCAT H-A1	100	100	97.94	29.98	0.81	1.79
dCAT H-A2	100	100	88.97	30.66	2.99	2.16
dCAT H-A3	91.96	91.91	97.89	56.56	5.47	1.59
dCAT H-A4	90.92	90.21	58.04	5.59	2.49	1.36
dCAT H-A5	100.46	92.29	95.06	57.98	8.27	3.71
dCAT H-A6	98.86	100	94.73	98.05	97.85	91.96
dCAT H-A7	98.03	99.22	100	100	99.95	98.4

[190]

[191] **<실시예 5>**

[192] **본 발명 신규 펩타이드의 생체 내 염 농도에 대한 안정성**

[193] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드의 생체 내 존재하는 염 농도 하에 항균 활성을 가지는지 확인하기 위해, 다양한 염 농도에서 펩타이드의 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

[194] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508을 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^4 세포/100㎕의 농도로 희석하여 마이크로 적정 플레이트(Nunc, USA)에 준비하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드를 다양한 염농도 조건 하에 웰에 1/2배씩 계열 희석(serial dilution)하여 첨가한 후 37℃에서 18시간 동안 배양하였고, 마이크로 적정 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 모체 펩타이드인 dCATH를 대조군으로 사용하였다.

[195] 그 결과, 하기 표 7에 나타낸 바와 같이 dCATH-A1 내지 dCATH-A5 펩타이드는 모체 펩타이드인 dCATH와 유사한 활성을 보였지만, dCATH-A6 및 dCATH-A7 펩타이드는 대조군 대비 더욱 낮은 MIC 값을 보여 우수한 항균활성이 나타났다.

[196] 상기와 같은 결과를 통해, 신규 펩타이드 dCATH-A6 및 dCATH-A7는 다양한 염 조건 하에서도 강한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 특히, 대조군 모체 펩타이드 dCATH에 비해 항균 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

[197]

[198] [표7]

본 발명 신규 펩타이드의 다양한 염 조건에서의 항균 활성

항목		MIC (μM)							
		dCATH	dCATH-A1	dCATH-A2	dCATH-A3	dCATH-A4	dCATH-A5	dCATH-A6	dCATH-A7
SP buffer	10 mM	2	2	2	2	2	1	1	1
NaCl	10 mM	4	4	2	2	4	4	2	4
	50 mM	2	2	2	2	2	1	1	1
	100 mM	2	1	1	1	2	1	1	1
$MgCl_2$	150 mM	2	4	2	2	4	2	1	1
	0.5 mM	4	2	2	2	4	2	1	2
	1 mM	4	2	2	2	2	2	2	1
$FeCl_3$	2 mM	2	2	2	2	4	2	1	1
	3 mM	4	2	2	2	4	2	1	1
	4 mM	4	2	2	2	4	1	1	1

[199]

[200] **<실시예 6>**

[201] **원이색법 스펙트럼 측정**

[202] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α-나선형 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

[203] 구체적으로, 10mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7.4), 50% 트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol, TFE) 또는 30mM 소듐 도데실 설페이트(sodium

dodecyl sulfate, SDS) 용액에 dCATH, dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 또는 dCATH-A7 펩타이드를 40μM로 첨가하여 0.1cm 길이(path-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25℃로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다. 상기 원이색법 스펙트럼을 위한 α-나선형 구조 계산식은 하기 수학식 2를 사용하였다.

[204] [수학식 2]

[205] $$[\theta] = \frac{\theta_{obs}}{10 \cdot l \cdot c}$$

[206] 상기 식에 있어서, θ_{obs}는 신호의 밀리도(milidegrees)를 나타내며, l은 셀 크기(cm)의 광학 길이(optical path-length)를 나타내고, c는 첨가한 펩타이드의 농도(mol/ℓ)를 나타낸다.

[207] 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이, 10mM 인산나트륨 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 구조를 형성하지 않은 반면, 50% TFE 용액과 30mM SDS 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 모든 펩타이드에서 2차 구조인 α-나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다.

[208]

[209] **<실시예 7>**

[210] **유세포분석기(Flow cytometry) 측정**

[211] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드가 실제 박테리아 막에 작용하는지 여부를 확인하기 위하여, 모체 펩타이드와 신규 펩타이드 dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, dCATH-A5, dCATH-A6 및 dCATH-A7를 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하였다.

[212] 구체적으로, 펩타이드의 최소억제농도(MIC)의 2배 값을 아시네토박터 바우마니에 처리한 후 10분 동안 37℃에서 반응시켰다. 그 후, 원심분리기(10,000rpm)를 이용해 상층액을 제거한 다음 10㎍/㎖ 농도의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)로 4℃에서 30분간 염색하였다. 그런 다음, 결합하지 않은 프로피디움 요오드화물을 원심분리기를 이용해 제거하고 생리식염수(PBS) 1㎖를 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거한 후, Bechman 유세포분석기를 이용하여 박테리아 막에 대한 펩타이드의 영향을 확인하였다.

[213] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, dCATH 모체 펩타이드와 dCATH-A1, dCATH-A2, dCATH-A3, dCATH-A4, 및 dCATH-A5 신규 펩타이드는 박테리아 막에 손상을 주어 형광시그널이 오른쪽으로 이동된 반면, dCATH-A6 및 dCATH-A7는 형광시그널이 이동되지 않아 박테리아 막에 손상을 주지 않았음을 확인할 수 있었다.

[214] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 신규 펩타이드 dCATH-A6 및 dCATH-A7은 대조군인 모체 펩타이드와 박테리아 막에 작용하는 기작이 다름을 유추할 수 있었다.

[215]

[216] **<실시예 8>**

[217] **본 발명 신규 펩타이드와 박테리아 DNA의 결합 유무 분석**

[218] 상기 <실시예 7>에서 살펴본 바와 같이, 본 발명 신규 펩타이드 dCATH-A6 및 dCATH-A7은 박테리아 막에 작용하지 않음을 확인하였다. 이에, 본 발명 신규 펩타이드가 항균활성을 나타내는 기작이 무엇인지 구체적으로 확인하기 위하여, dCATH-A6 및 dCATH-A7 신규 펩타이드가 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합하는지 여부를 전기영동을 통해 확인하였다.

[219] 구체적으로, 260ng의 플라스미드 DNA(pRSETB)를 펩타이드와 비율별(lane 1번부터 6번까지 DNA/펩타이드 비율은 각각 DNA 단독, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4로 실시)로 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 1% 아가로스 겔에 전기영동을 수행하여 브로민화 에티듐(Ethidium bromide, EtBr)으로 염색하고 UV로 확인하였다. 박테리아의 DNA에 결합하여 항균활성을 나타내는 항균 펩타이드인 Buforin 2를 양성 대조군으로 사용하였다.

[220] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 모체 펩타이드인 dCATH는 DNA와 어떠한 결합도 하지 않은 것으로 나타난 반면, 본 발명 신규 펩타이드 dCATH-A6와 dCATH-A7은 DNA와 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[221] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명 신규 펩타이드 dCATH-A6와 dCATH-A7은 일부 아미노산 잔기의 치환 또는 결실로 인해, 박테리아 막에 작용하여 항균활성을 나타내는 모체 펩타이드인 dCATH와는 달리, 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합하여 항균활성을 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

[222]

[223] **<실시예 9>**

[224] **본 발명 신규 펩타이드의 세포 내 위치 확인**

[225] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드 중 독성이 없고 활성이 뛰어난 dCATH-A7을 이용하여 세포 내 위치를 확인하였다. 실험에 사용한 세포는 인간 폐 섬유아세포(human lung fibroblast cell)인 MRC-5로 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 RPMI 배지에서 배양하였다.

[226] MRC-5 세포를 24웰 플레이트에 5×105 세포/웰로 분주하고 24시간 배양한 후, FITC 형광이 라벨링 된 dCATH-A7을 2μM/웰의 농도로 처리하여 1시간 동안 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 반응 후, 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 200μL로 세척하고 Hochest 33342를 10분간 염색시킨다. 염색 후, 1% glutaraldehyde 용액으로 10분간 고정시킨 후 인산 완충액 생리식염수 200μL로 세척한 후 EVOS FL Auto 2 cell imaging system을 통해 확인하였다.

[227] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, MRC-5 세포에 FITC-dCATH-A7 펩타이드가 세포 내에 들어가 위치한다는 것을 확인할 수 있었다.

[228] 상기와 같은 결과를 통해, dCATH-A7 펩타이드의 작용 기전을 알 수 있었다.

[229]

[230] **<실시예 10>**

[231] **본 발명 신규 펩타이드의 비강(nasal) 흡입 후 위치 확인**

[232] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드 중 dCATH-A7을 이용하여 마우스 비강으로 흡입시켜 폐에 위치하는지 확인하였다.

[233] BALB/c 마우스(6주령)의 일주일 안정기를 가진 후 FITC-dCATH-A7 펩타이드를 비강으로 5mg/kg을 20μl 흡입시켰다. 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 그리고 24시간에 폐조직을 샘플링하여 FITC의 형광정도를 FOBI invivo imaging system을 이용하여 확인하였다.

[234] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, FITC 형광이 0분에 700 a.u로 낮게 나타났고 10분부터 1500정도의 형광 감도가 나타났으며 1시간에 3000정도의 형광감도가 나타나 폐 내부에 펩타이드가 존재함을 확인할 수 있었다. 이후 24시간까지도 형광신호가 감지 되는 것을 확인하였다.

[235] 상기와 같은 결과를 통해, dCATH-A7 펩타이드가 24시간까지 폐 조직 내에 위치하여 작용할 수 있음을 알 수 있다.

[236]

[237] **<실시예 11>**

[238] **본 발명 신규 펩타이드의 생체 내 활성 측정**

[239] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 펩타이드 중 dCATH-A7을 이용하여 생체 내 활성을 측정하였다.

[240] 항생제 내성균 중 아시네토박터 바우마니_분리주 10을 선택하여 실험하였고, PBS 버퍼를 이용하여 3번 세척하여 준비하였다. BALB/c 마우스(6주령)의 일주일 안정기를 가진 후 비강으로 1×10^9 CFU/ml을 20μl를 감염시켰다. 감염 후 펩타이드를 5 mg/ml의 농도로 준비한 후 비강에 주입하고 관찰하였다. 3일째 되는 날 조직을 샘플링하여 조직을 H&E 염색을 하여 손상을 확인하였다.

[241] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, 항생제 내성균에 감염시킨 마우스 폐 조직은 폐포가 망가지고 면역세포들의 침투가 확인되었으며, 폐 조직의 섬유화가 관찰되었다. 반면에, 항생제 내성균과 함께 신규 펩타이드 dCATH-A7을 처리한 마우스 폐 조직은 상대적으로 섬유화가 진행이 되지 않았으며 전체적으로 손상이 적은 것을 확인할 수 있었다.

[242] 상기와 같은 결과를 통해, dCATH-A7 펩타이드는 생체 내에서도 항균효과를 나타내어 작용함을 알 수 있었다.

[243]

[244] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[245]

[246] **<제조예 1>**

[247] 약학적 제제의 제조

[248]

[249] <1-1> 산제의 제조

[250] 본 발명의 신규 펩타이드 20㎎

[251] 유당 20㎎

[252] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[253]

[254] <1-2> 정제의 제조

[255] 본 발명의 신규 펩타이드 10㎎

[256] 옥수수전분 100㎎

[257] 유당 100㎎

[258] 스테아린산 마그네슘 2㎎

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

[260]

[261] <1-3> 캡슐제의 제조

[262] 본 발명의 신규 펩타이드 10㎎

[263] 결정성 셀룰로오스 3㎎

[264] 락토오스 14.8㎎

[265] 스테아린산 마그네슘 0.2㎎

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

[267]

[268] <1-4> 액제의 제조

[269] 본 발명의 신규 펩타이드 20㎎

[270] 이성화당 10g

[271] 만니톨 5g

[272] 정제수 적량

[273] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[274]

[275] <1-5> 주사제의 제조

[276] 본 발명의 신규 펩타이드 10㎍/㎖

[277] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지

[278] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1㎖

[279] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 신규 펩타이드를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5㎖ 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 고압증기멸균기로 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[280]

[281] **<제조예 2>**

[282] **화장품의 제조**

[283]

[284] <2-1> 유연화장수(스킨)

[285] 하기 표에 나타난 바와 같이 유연화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[286]

[287] [표8]

유연화장수 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	3
글리세린	5
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[288]

[289] <2-2> 영양화장수(로션)

[290] 하기 표에 나타난 바와 같이 영양화장수를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[291]

[292] [표9]

영양화장수 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30

스쿠알란	10
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	2
유창목오일	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	8
글리세린	5
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[293]

[294] <2-3> 에센스

[295] 하기 표에 나타난 바와 같이 에센스를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[296]

[297] [표10]

에센스 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
시토스테롤	1.7
플리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	5
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량

정제수	To 100

[298]

[299] <2-4> 세안제(클렌징폼)

[300] 하기 표에 나타난 바와 같이 세안제를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[301]

[302] [표11]

세안제 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
N-아실글루타민산나트륨	20
글리세린	10
PEG-400	15
프로필렌글리콜	10
POE(15) 올레일알코올에테르	3
라우린유도체	2
메틸파라벤	0.2
EDTA-4Na	0.03
향료	0.2
정제수	To 100

[303]

[304] <2-5> 영양크림

[305] 하기 표에 나타난 바와 같이 영양크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[306]

[307] [표12]

영양크림 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
바셀린	7
유동파라핀	10
밀납	2
폴리솔베이트60	2.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5

스쿠알란	3
프로필렌글리콜	6
글리세린	4
트리에탄올아민	0.5
산탄검	0.5
토코페닐아세테이트	0.1
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[308]

[309] <2-6> 마사지크림

[310] 하기 표에 나타난 바와 같이 마사지크림을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[311]

[312] [표13]

마사지크림 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	6
글리세린	4
트리에탄올아민	0.5
밀납	2
토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2
유동파라핀	30
산탄검	0.5
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[313]

[314] <2-7> 팩

[315] 하기 표에 나타난 바와 같이 팩을 통상의 방법에 따라 제조하였다.

[316]

[317] [표14]

팩 제형예

성분	함량(중량%)
본 발명의 신규 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	2
글리세린	4
폴리비닐알코올	10
에탄올	7
파이지-40 히드로게비이티드캐스터오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[318]

[319] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열에서,
i) 3번째 또는 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나;
ii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되거나;
iii) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 또는 13번째 아미노산 1개 이상이 리신(Lysine, K)으로 치환되거나;
또는
iv) 3번째 및 4번째 아미노산이 알라닌(Alanine, A)으로 치환되고, 8번째, 9번째 및 13번째 아미노산이 리신(Lysine, K)으로 치환되고, 19번째 및 20번째 아미노산이 결실된 항균 펩타이드.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 항균 펩타이드는 서열번호 2 내지 8의 아미노산 서열을 가지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 그람 양성균은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobater baumannii*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 항균 펩타이드는 C-말단이 아미드화(amidation)된 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[청구항 8] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항생제.

[청구항 9] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 화장료 조성물.

[청구항 10] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 식품첨가제.

[청구항 11] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 사료첨가제.

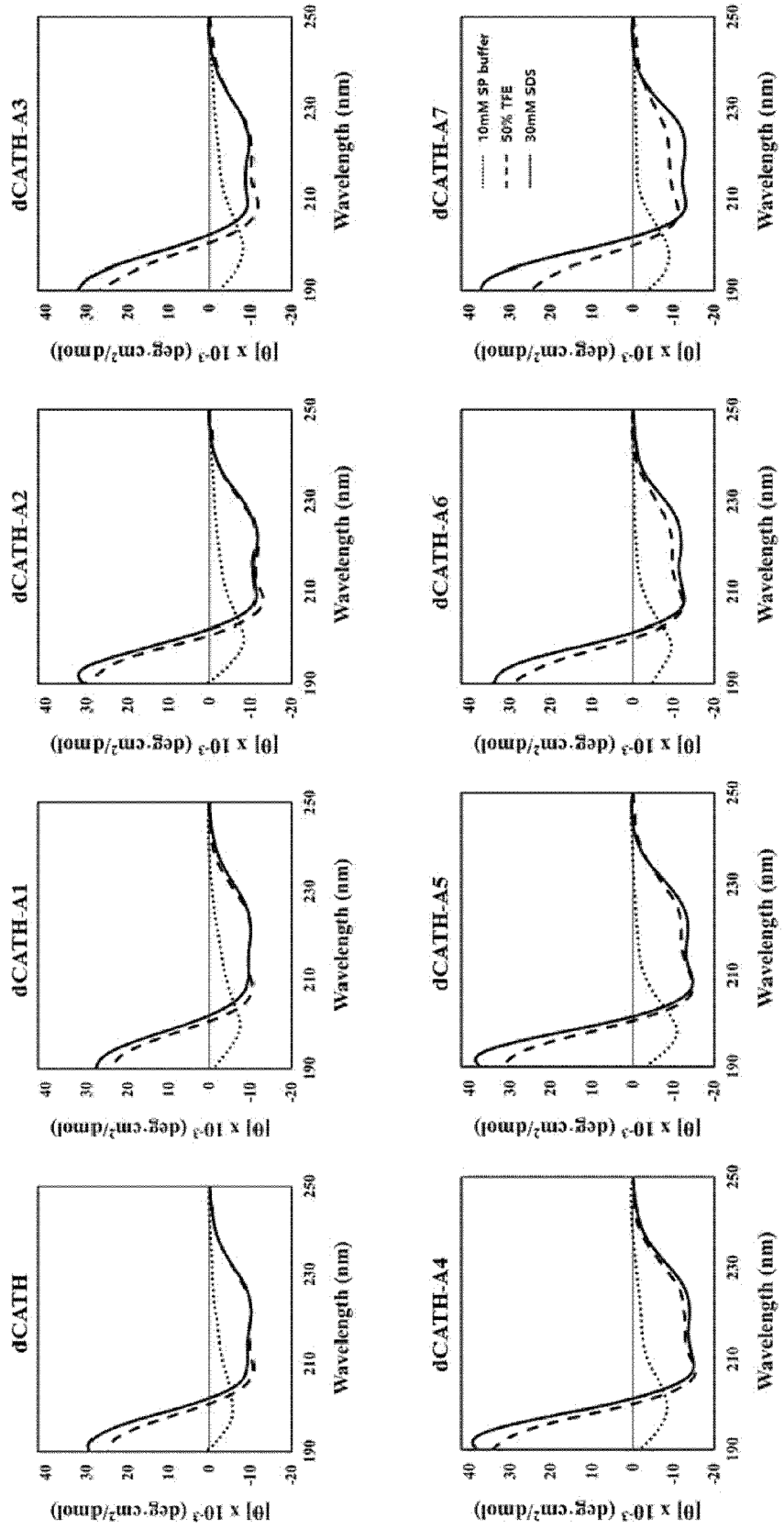
[청구항 12] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 화장품 또는 의약품 보존제.

[청구항 13] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 생물 농약.

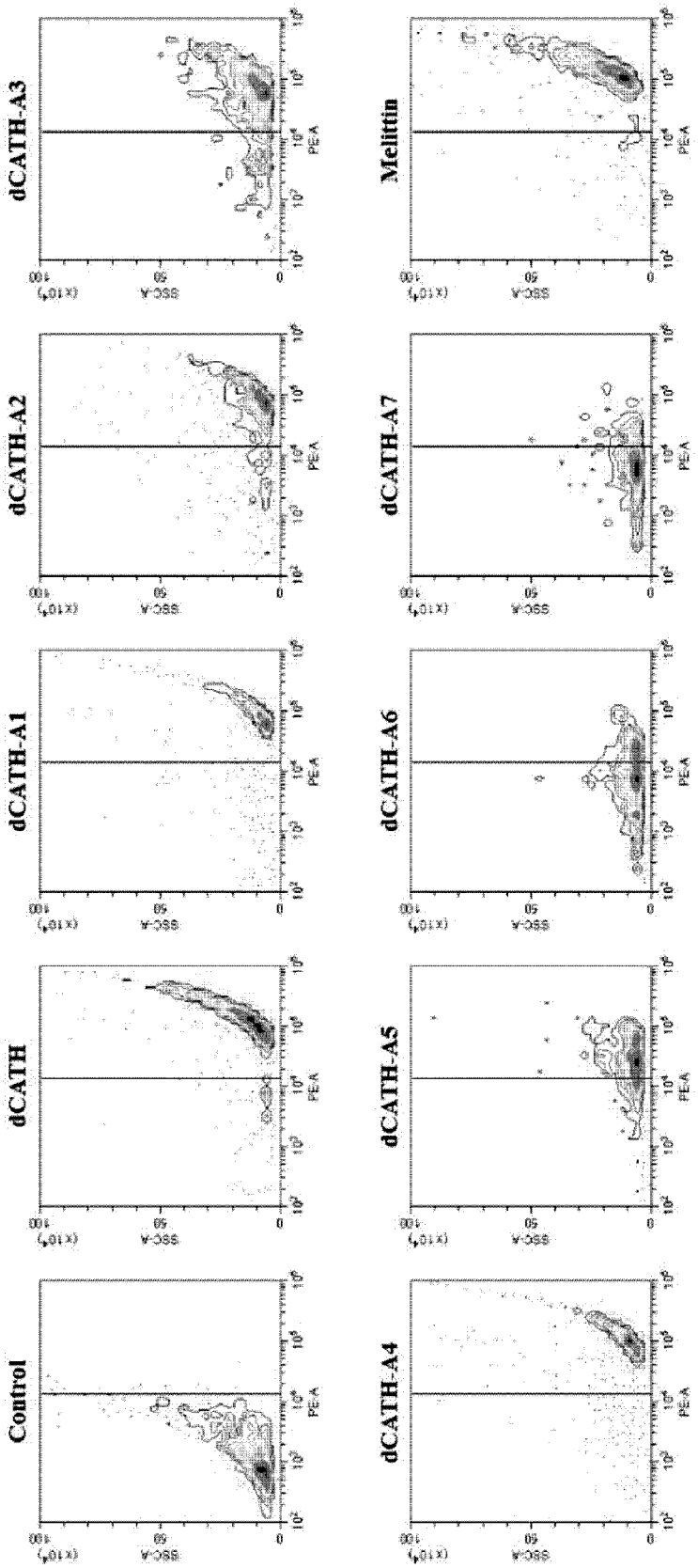
[청구항 14] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분을 포함하는 항균용 의약외품 조성물.

[청구항 15] 제1항의 항균 펩타이드를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법.

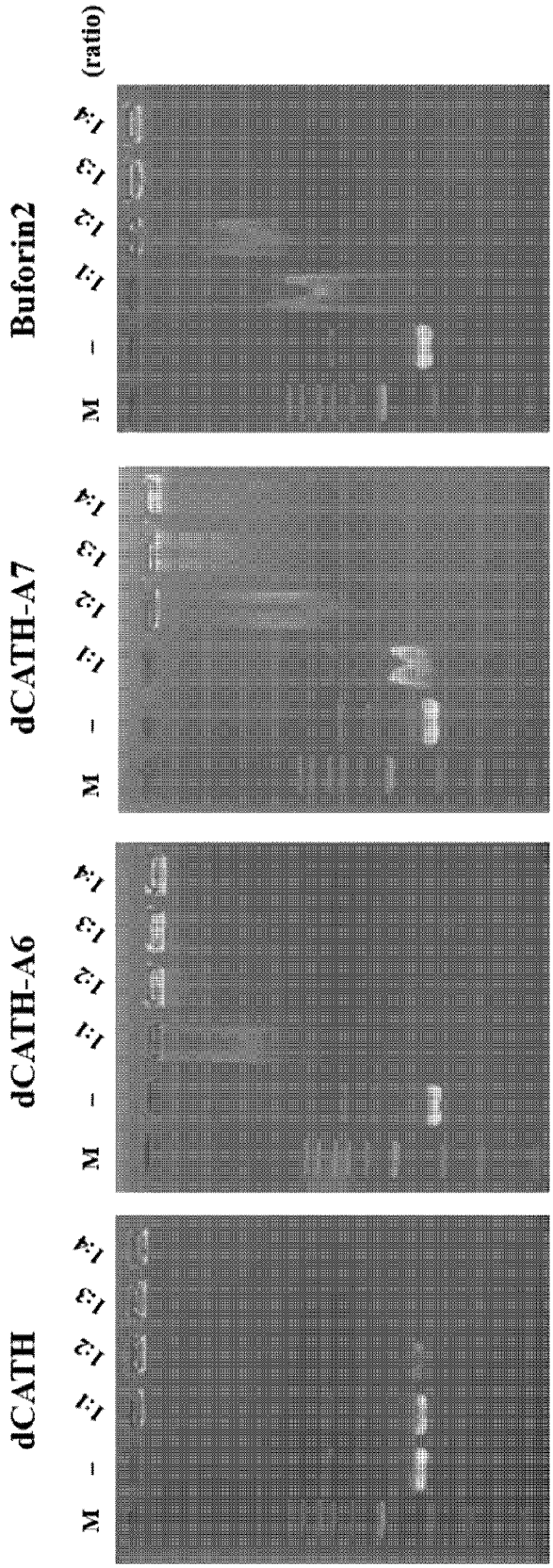
[도1]


dCATH
dCATH-A1
dCATH-A2
dCATH-A3
dCATH-A4
dCATH-A5
dCATH-A6
dCATH-A7
10mM SP buffer
50% TFE
30mM SDS
[θ] x 10-3 (deg.cm2/dmol)
Wavelength (nm)

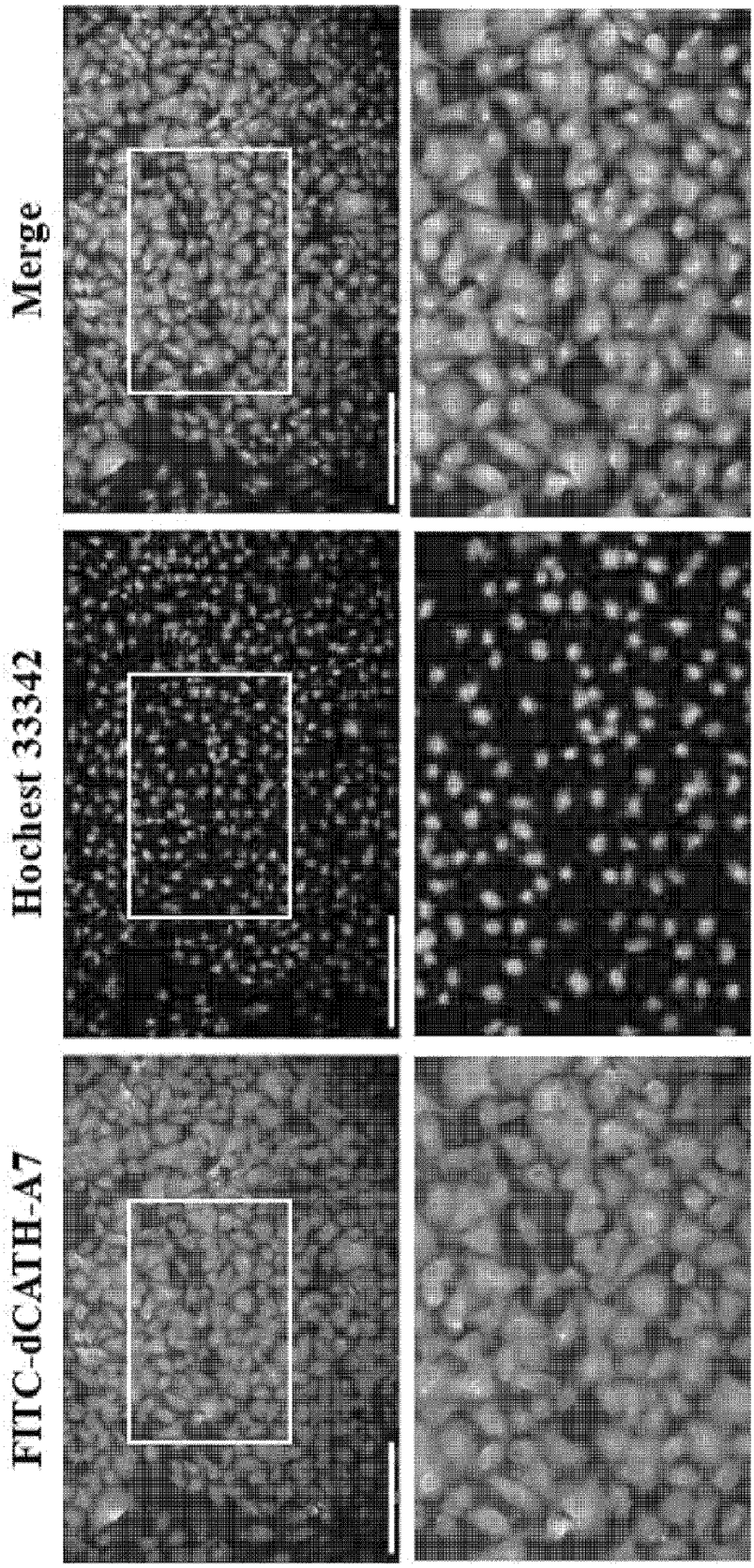
[도2]


dCATH-A3
Melittin
dCATH-A2
dCATH-A7
dCATH-A1
dCATH-A6
dCATH
dCATH-A5
Control
dCATH-A4
SSC-A
PE-A

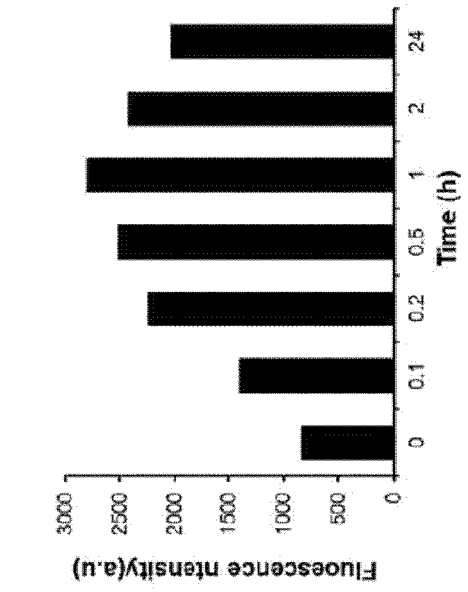
[도3]

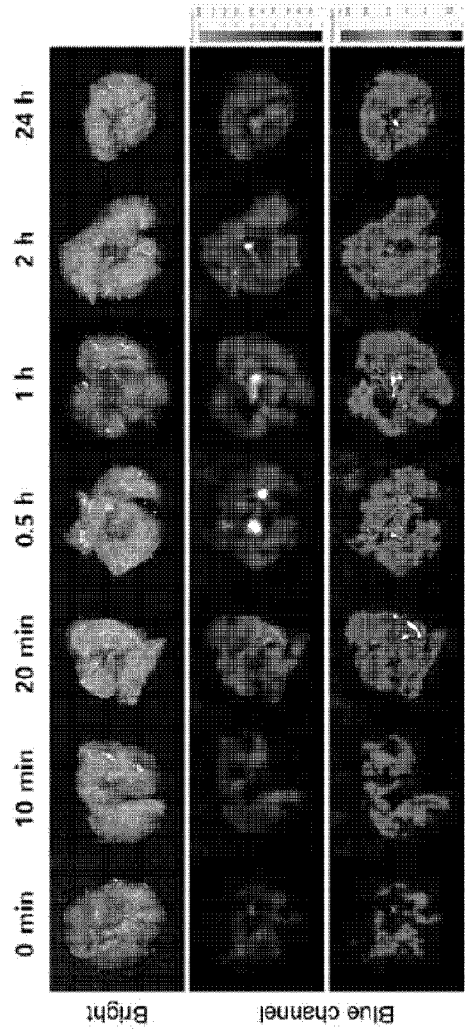


[도4]

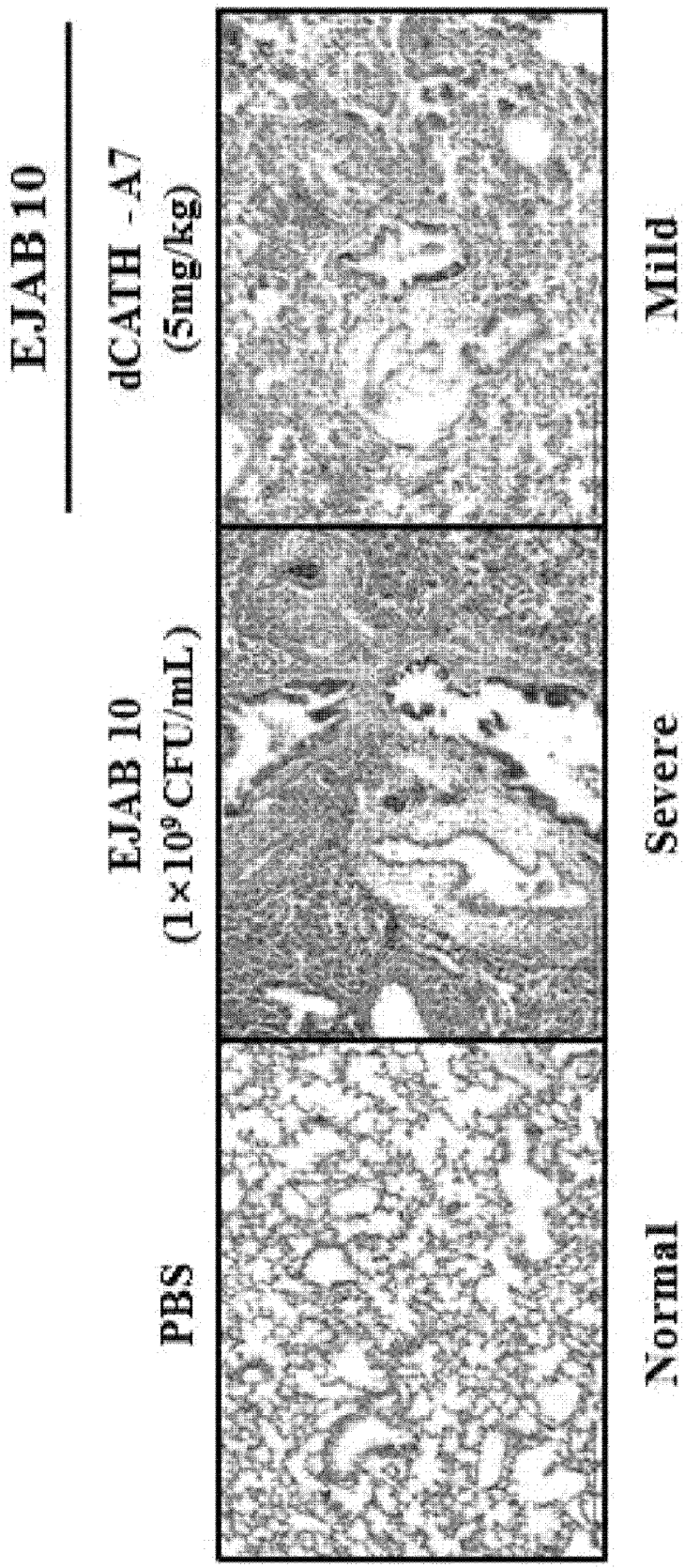


[도5]


Fluorescence ntensity(a.u)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
0.1
0.2
0.5
1
2
24
Time (h)


0 min
10 min
20 min
0.5 h
1 h
2 h
24 h
Bright
Blue channel

[도6]


EJAB 10
dCATH - A7
(5mg/kg)
EJAB 10
(1×10⁹ CFU/mL)
PBS
Mild
Severe
Normal

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/000514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i; **A01N 37/46**(2006.01)i; **A01P 1/00**(2006.01)i; **A61P 31/04**(2006.01)i; **A61K 8/64**(2006.01)i; **A61Q 17/00**(2006.01)i; **A23L 33/18**(2016.01)i; **A23K 20/147**(2016.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/08(2006.01); A61K 35/74(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/47(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 항균 펩타이드(antimicrobial peptide), 오리(duck), 서열(sequences), 알라닌(alanine), 라이신(lysine), 아시네토박터 바우마니(Acinetobacter baumannii), 그람 음성균(gram-negative bacteria), 아미드화(amidation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI. GenBank: ALD83753.1. cathelicidin [Anas platyrhynchos]. (22 December 2015). See the sequences; and pages 1-8.	1-15
A	GAO, W. et al. Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism. Scientific Reports. 2015, vol. 5, document no. 17260, pp. 1-12. See abstract; and pages 1-2.	1-15
A	HONG, Y. et al. Identification of duck liver-expressed antimicrobial peptide 2 and characterization of its bactericidal activity. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2019, vol. 32, no. 7, pp. 1052-1061. See abstract; and pages 1-2.	1-15
A	KR 10-2016-0018549 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 17 February 2016 (2016-02-17) See entire document.	1-15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 April 2024	**17 April 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/000514

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1521123 B1 (CIPLA MEDPRO RESEARCH AND DEVELOPMENT (PTY) LTD.) 19 May 2015 (2015-05-19) See entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/000514

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/000514

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2016-0018549 A	17 February 2016	CN 105555290 A	04 May 2016
		CN 105555290 B	09 November 2021
		EP 2994154 A1	16 March 2016
		EP 2994154 B1	26 February 2020
		JP 2016-526020 A	01 September 2016
		JP 6683601 B2	22 April 2020
		KR 10-2137941 B1	29 July 2020
		US 2016-0075749 A1	17 March 2016
		US 9562085 B2	07 February 2017
		WO 2014-182172 A1	13 November 2014
KR 10-1521123 B1	19 May 2015	CN 101454440 A	10 June 2009
		CN 101454440 B	29 May 2013
		EP 2021457 A2	11 February 2009
		EP 2021457 B1	11 February 2015
		JP 2009-538614 A	12 November 2009
		KR 10-2009-0023626 A	05 March 2009
		US 2009-0297482 A1	03 December 2009
		US 2011-0268703 A1	03 November 2011
		US 7951385 B2	31 May 2011
		US 8444998 B2	21 May 2013
		WO 2007-138538 A2	06 December 2007

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/000514

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i; **A01N 37/46**(2006.01)i; **A01P 1/00**(2006.01)i; **A61P 31/04**(2006.01)i; **A61K 8/64**(2006.01)i; **A61Q 17/00**(2006.01)i; **A23L 33/18**(2016.01)i; **A23K 20/147**(2016.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08(2006.01); A61K 35/74(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/47(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항균 펩타이드(antimicrobial peptide), 오리(duck), 서열(sequences), 알라닌(alanine), 라이신(lysine), 아시네토박터 바우마니(Acinetobacter baumannii), 그람 음성균(gram-negative bacteria), 아미드화(amidation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI GenBank: ALD83753.1 "cathelicidin [Anas platyrhynchos]" (2015.12.22) 서열;페이지 1-8	1-15
A	GAO, W. 등., "Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism", Scientific Reports, 2015, 5권, 문헌번호 17260, 페이지 1-12 초록; 페이지 1-2	1-15
A	HONG, Y. 등, "Identification of duck liver-expressed antimicrobial peptide 2 and characterization of its bactericidal activity", Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2019, 32권, 7호, 페이지 1052-1061 초록; 페이지 1-2	1-15
A	KR 10-2016-0018549 A (아카데미슈 지켄후이스 라이덴) 2016.02.17 전체 문헌	1-15
A	KR 10-1521123 B1 (시플라 메드프로 리서치 엔드 디벨롭먼트 (피티와이) 엘티디) 2015.05.19 전체 문헌	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년04월16일(16.04.2024)	**2024년04월17일(17.04.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/000514

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/000514

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0018549 A	2016/02/17	CN 105555290 A	2016/05/04
		CN 105555290 B	2021/11/09
		EP 2994154 A1	2016/03/16
		EP 2994154 B1	2020/02/26
		JP 2016-526020 A	2016/09/01
		JP 6683601 B2	2020/04/22
		KR 10-2137941 B1	2020/07/29
		US 2016-0075749 A1	2016/03/17
		US 9562085 B2	2017/02/07
		WO 2014-182172 A1	2014/11/13
KR 10-1521123 B1	2015/05/19	CN 101454440 A	2009/06/10
		CN 101454440 B	2013/05/29
		EP 2021457 A2	2009/02/11
		EP 2021457 B1	2015/02/11
		JP 2009-538614 A	2009/11/12
		KR 10-2009-0023626 A	2009/03/05
		US 2009-0297482 A1	2009/12/03
		US 2011-0268703 A1	2011/11/03
		US 7951385 B2	2011/05/31
		US 8444998 B2	2013/05/21
		WO 2007-138538 A2	2007/12/06