



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0111039
(43) 공개일자 2022년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/315 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)
A23K 20/195 (2016.01) A23L 3/3571 (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/3156 (2013.01)
A01N 63/50 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0014180

(22) 출원일자 2021년02월01일

심사청구일자 2021년02월01일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

박윤경
전라남도 장성군 장성읍 매화7길 4
강희경
광주광역시 광산구 상무대로 137-2, 105동 803호
(송정동, 송정 라인2차 아파트)

(74) 대리인

특허법인리채

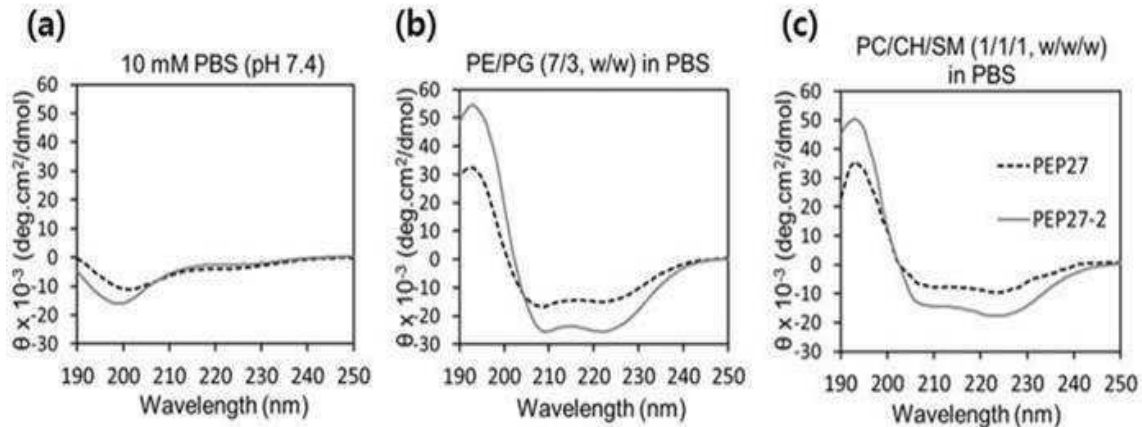
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 PEP27 펩타이드로부터 유래한 신규 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 2번째 및 4번째 아미노산이 트립토판(tryptophane, W)으로 치환되거나; ii) 2번째, 4번째, 11번째 및 13번째 아미노산이 트립토판으로 치환되거나; iii) 2번째, 4번째, 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째 및 27번째 아미노산이 트립토판으로 치환된 펩타이드는 우수한 항균 활성 및 낮은 세포 독성을 나타내며, 궁극적으로 항생제, 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약품 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 20/195 (2016.05)
A23L 3/3571 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109584
과제번호	2019R1A2B5B03070330
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성 세균에 작
용하는 항균펩타이드 개발 및 제제화 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711102939
과제번호	2017-0-01714-004
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	정보통신기획평가원
연구사업명	ICT융합산업원천기술개발(R&D)
연구과제명	딥러닝 기술을 이용한 동물항생제 대체 펩타이드 서열 탐색 및 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서

- i) 2번째 및 4번째 아미노산이 트립토판(tryptophane, W)으로 치환되거나;
- ii) 2번째, 4번째, 11번째 및 13번째 아미노산이 트립토판으로 치환되거나;
- iii) 2번째, 4번째, 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째 및 27번째 아미노산이 트립토판으로 치환된 펩타이드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나에 대해 항균 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 그람 음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*), 에스케리키아 콜라이(*E. coli*), 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 항균용 조성물은 약학 조성물인, 항균용 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 항균용 조성물은 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약, 방부용 조성물 및 의약품 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 항균용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PEP27 펩타이드로부터 유래한 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세균 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하여 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 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다.

[0004] 항생제 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus* sp.)에서 최초로 발견되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다. 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화 시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다. 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다. 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다. 작용 기작의 측면에서 항생제 내성은 크게 두가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며, 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두 기본적인 현상은 오토라이신 활성의 하부조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하부조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다. 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 박테리오킨(bacteriocin)은 여러 종류의 미생물이 생산하는 천연항균성 단백질로 생산균과 유사한 균종에 대하여 살균 작용을 갖는다. 박테리오킨은 구조적으로 세 부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며, 두 번째는 비란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고, 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다. 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데, 상기 펩타이드 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나뉘어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-시트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α-나선형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는

프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다. 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 가진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2158036호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 신규 펩타이드 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 2번째 및 4번째 아미노산이 트립토판(tryptophane, W)으로 치환되거나; ii) 2번째, 4번째, 11번째 및 13번째 아미노산이 트립토판으로 치환되거나; iii) 2번째, 4번째, 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째 및 27번째 아미노산이 트립토판으로 치환된 펩타이드.
- [0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드.
- [0012] 3. 위 1에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나에 대해 항균 활성을 갖는 펩타이드.
- [0013] 4. 위 3에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.
- [0014] 5. 위 3에 있어서, 상기 그람 음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.
- [0015] 6. 위 3에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 스태필로코커스 아우레우스(*S. aureus*), 에스케리키아 콜라이(*E. coli*), 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 펩타이드.
- [0016] 7. 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.
- [0017] 8. 위 7에 있어서, 상기 항균용 조성물은 약학 조성물인, 항균용 조성물.
- [0018] 9. 위 7에 있어서, 상기 항균용 조성물은 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약, 방부용 조성물 및 의약품 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 항균용 조성물.

발명의 효과

[0020] 본 발명 펩타이드는 우수한 항균 활성 및 낮은 세포 독성을 나타내며, 이에 항생제, 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약품 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 항균 펩타이드인 PEP27(대조군) 및 아미노산 잔기가 치환된 PEP27 유사체 신규 펩타이드인 PEP27-2(실험군)의 막 유사환경에서 2차 구조를 확인한 결과로, 도 1a는 수용액 상태(10 mM PBS 용액), 도 1b는 PE/PG(7/3)로 구성된 박테리아 막 모방 인공막 및 도 1c는 PC/CH/SM(1/1/1)로 구성된 진핵세포 막 모방 인공막을 의미한다.
- 도 2는 대조군인 PEP27 펩타이드 및 신규 펩타이드 PEP27-2의 대장균(*Escherichia coli*) 막에 대한 작용 여부를 유세포분석기(FACS)로 확인한 결과이다.
- 도 3은 대조군인 PEP27 펩타이드 및 신규 펩타이드 PEP27-2의 박테리아 내부 물질인 DNA에 대한 결합능을 확인한 결과로, 펩타이드:DNA 비율은 각각 DNA 단독(0), 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1 이다.
- 도 4는 대조군인 PEP27 펩타이드 및 신규 펩타이드 PEP27-2의 대장균 및 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 막에 대한 작용을 주사전자현미경(SEM)으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 사람의 각질 형성 세포주 (HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)에 FITC로 표지된 PEP27-2 펩타이드 (FITC-PEP27-2)의 내재화를 형광현미경으로 확인한 결과이다.
- 도 6는 다제 내성 균주인 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) MW2에 감염된 후 형성된 농양에 대한 PEP27 펩타이드와 항생제인 세프트리악손 (ceftriaxone)의 단독처리 또는 병용처리시 치유 효과를 확인한 결과이다.
- 도 7은 다제 내성 균주인 스탕필로코커스 아우레우스 MW2에 감염된 후 형성된 농양 부분을 회수하여 회복되는 총 균수(CFU/g)를 확인한 결과이다.
- 도 8는 다제 내성 균주인 스탕필로코커스 아우레우스 MW2에 GFP(green fluorescent protein) 유전자가 삽입된 균주 (스탕필로코커스 아우레우스 MW2-GFP) 감염된 후 형성된 농양에 대한 PEP27 펩타이드와 항생제인 세프트리악손 (ceftriaxone)의 단독처리 또는 병용처리시 균주의 분포도와 치유 효과를 확인한 결과이다.
- 도 9은 다제 내성 균주인 스탕필로코커스 아우레우스 MW2에 감염된 후 형성된 농양에 대한 PEP27 펩타이드와 항생제인 세프트리악손 (ceftriaxone)의 단독처리 또는 병용처리시 농양 조직의 변화를 확인한 결과이다.
- 도 10은 다제 내성 균주인 스탕필로코커스 아우레우스 MW2에 감염된 후 형성된 농양 조직에서 염증반응에 관련된 유전자의 상대적인 발현율을 확인한 결과이다 (TNF- α : 종양괴사인자-알파, IL-1 β : 인터루킨-1 베타, IL-6: 인터루킨-6, iNOS: 산화질소 합성효소, COX-2: 시클로옥시게나제-2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 2번째 및 4번째 아미노산이 트립토판(tryptophane, W)으로 치환되거나; ii) 2번째, 4번째, 11번째 및 13번째 아미노산이 트립토판으로 치환되거나; iii) 2번째, 4번째, 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째 및 27번째 아미노산이 트립토판으로 치환된 펩타이드를 제공한다.
- [0026] 기존에 알려진 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 모체 펩타이드인 PEP27은 트립토판(*Streptococcus pneumoniae*)에서 분비되며, PEP27은 Vex123-Pep27-VncRS 유전자좌에 존재하는 "죽음 신호 펩타이드"로 알려져 있다.
- [0027] [서열번호 1]
- [0028] MRKEFHNLSSGQLLADKRPARDYNRK-NH₂
- [0029] PEP27 펩타이드는 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, PEP27 펩타이드의 합성을 위한 방법으로 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법을 이용할 수 있으며, 구체적으로 액상 펩타이드 합성법(solution-phase peptide synthesis), 고상 펩타이드 합성법(solid-phase peptide synthesis), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법을 이용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 2 내지 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드일 수 있다.
- [0031] [서열번호 2]

- [0032] MWKWFHNVLSGQLLADKRPARDYNRK-NH₂
- [0033] [서열번호 3]
- [0034] MWKWFHNVLSWGWLADKRPARDYNRK-NH₂
- [0035] [서열번호 4]
- [0036] MWKWFHNVLSGQLLADKWWAWYNNWW-NH₂
- [0037] 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 PEP27로부터 2번째 및 4번째 아미노산이 트립토판(W)으로 치환된 펩타이드로, PEP27-1로 명명하였다.
- [0038] 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 PEP27로부터 2번째, 4번째, 11번째 및 13번째 아미노산이 트립토판(W)으로 치환된 펩타이드로, PEP27-2로 명명하였다.
- [0039] 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 PEP27로부터 2번째, 4번째, 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째 및 27번째 아미노산이 트립토판(W)으로 치환된 펩타이드로, PEP27-5로 명명하였다.
- [0040] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열의 “-NH₂”는 C 말단의 카르복시기이 아미드화되어 있는 것을 나타낸다.
- [0041] 구체적으로, 본 발명 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드일 수 있다.
- [0042] 전술한 아미노산의 치환에 의해 펩타이드의 전극의 증/감이 일어날 수 있고 세포독성을 감소시킬 수 있다. 또한, 전술한 아미노산의 치환에 의해 펩타이드의 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 나타낼 수 있다.
- [0043] 본 발명의 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 나타낼 수 있다.
- [0044] 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 펩타이드는 스태필로코커스 속, 바실러스 속 또는 리스테리아 속으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나에 대해 우수한 항균 활성을 나타낸다.
- [0045] 그람 음성균은 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 에스케리키아 속(*Escherichia*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*) 및 리케치아 속(*Rickettsia*)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본 발명의 펩타이드는 슈도모나스 속, 에스케리키아 속 또는 살모넬라 속으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나에 대해 우수한 항균 활성을 나타낸다.
- [0046] 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항생제는 아미노글리코사이드 계열(아미노글리코사이드, 겐타마이신, 네오마이신 등), 페니실린 계열(엠포실린 등), 술폰아미드 계열, 베타-락탐 계열(베타-락탐, 아목시실린/클라불란산 등), 클로람페니콜 계열, 에리트로마이신 계열, 플로르페니콜 계열, 포스포마이신 계열, 카나마이신 계열, 린코마이신 계열, 메티실린 계열, 퀴놀론 계열, 스트렙토마이신 계열, 테트라사이클린 계열, 트리메소프림 계열 및 반코마이신 계열의 항생제로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 우수한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여는 항균 농도 내에서 낮은 세포 독성을 나타낼 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 항균용 조성물은 약학 조성물일 수 있다. 즉, 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 약학 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 PEP27 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드인 서열번호 2 내지 4는 강한 항균 활성을 나타내면서 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 펩타이드는 항균용 약학 조성물의 유효

성분으로 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 항생제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 다른 항생제와 병용될 수 있으며, 다른 항생제와 병용시 단독으로 사용하는 경우에 비해 상승적 항균 활성을 나타낼 수 있다.

- [0052] 약학 조성물은 유효성분인 펩타이드 이외에도 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0054] 약학 조성물은 임상투여시 경구 또는 비경구로 투여가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다.
- [0055] 약학 조성물은 유효성분인 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.
- [0056] 예를 들어, 본 발명 약학 조성물은 공지된 항생제를 더 포함할 수 있다.
- [0057] 공지된 항생제는 아미노글리코사이드 계열(아미노글리코사이드, 겐타마이신, 네오마이신 등), 페니실린 계열(엠포실린 등), 숄폰아미드 계열, 베타-락탐 계열(베타-락탐, 아목시실린/클라불란산 등), 클로람페니콜 계열, 에리트로마이신 계열, 플로르페니콜 계열, 포스포마이신 계열, 카나마이신 계열, 린코마이신 계열, 메티실린 계열, 퀴놀론 계열, 스트렙토마이신 계열, 테트라사이클린 계열, 트리메소프림 계열 및 반코마이신 계열의 항생제로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다. 구체적으로 항생제는 메로페넴, 세프트리지딤, 세프트리악손, 도리페넴, 에르타페넴, 이미페넴 및 실라스타틴, 세파드록실, 세파졸린, 세팔렉신, 세파클로르, 세포테탐, 세폭시틴, 세프프로질, 세푸록심, 세프디니르, 세프디토렌, 세픽심, 세포탁심, 세프포독신, 세프티부텐, 세페픽 및 세프트롤린으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다. 보다 구체적으로 항생제는 메로페넴, 세프트리지딤 및 세프트리악손으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 펩타이드의 유효용량은 0.1 내지 2 mg/kg일 수 있고, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(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 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 펩타이드의 항생제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0060] 상기 항균용 조성물은 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약, 방부용 조성물 및 의약외품 조성물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0061] 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 PEP27 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드인 서열번호 2 내지 4는 강한 항균 활성을 나타내면서 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 펩타이드는 항균용 화장료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0063] 화장료 조성물은 유효성분인 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함할 수 있다. 예컨대 화장료 조성물은 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체 중 적어도 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0064] 화장료 조성물은 유효성분인 펩타이드를 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 포함할 수 있다.
- [0065] 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0066] 화장료 조성물의 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.
- [0067] 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0068] 화장료 조성물의 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.
- [0069] 화장료 조성물의 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.
- [0070] 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0071] 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 향균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [0072] 본 발명의 PEP27 향균 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드인 서열번호 2 내지 4는 강한 향균 활성을 나타내면서 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 펩타이드는 향균용 식품 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 펩타이드를 식품 첨가물로 사용하는 경우 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 식품 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 펩타이드를 첨가할 수 있는 식품은 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 또는 비타민 복합제일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0075] 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 향균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0076] 본 발명의 PEP27 향균 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드인 서열번호 2 내지 4는 강한 향균 활성을 나타내면서 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 펩타이드는 향균용 사료 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 펩타이드를 사료 첨가제로 사용하는 경우 기존의 향생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 펩타이드를 사료 첨가제로 사용하는 경우 사료는 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0078] 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

- [0079] 본 발명은 전술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 방부 조성물, 항균용 생물 농약, 및 항균용 의약품의 유효성분으로 제공한다.
- [0080] 본 발명의 PEP27 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드인 서열번호 2 내지 4는 강한 항균 활성을 나타내면서 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 펩타이드는 항균용 방부 조성물, 항균용 생물 농약, 및 항균용 의약품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0081] 방부 조성물에는 식품의 방부제, 화장품 보존제 또는 의약품 보존제가 포함될 수 있다. 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 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 포함될 수 있다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.
- [0082] 본 발명의 조성물을 의약품 조성물로 사용할 경우, 유효성분인 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있다.
- [0083] 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0085] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항균 방법을 제공한다.
- [0086] 개체는 인간을 제외한 포유류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0090] **실시예**
- [0091] **1. 펩타이드의 합성 및 분리 정제**
- [0092] 메리필드(Merrifield)의 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 모체 펩타이드인 PEP27의 아미노산 서열에서 2번째와 4번째 잔기를 트립토판 (tryptophan, W)으로 치환하여 펩타이드를 합성(서열번호 2)하였다. 서열번호 2의 아미노산 서열에서 11번째, 13번째 또는 19번째, 20번째, 22번째, 23번째, 26번째, 27번째 잔기를 트립토판으로 치환하여 펩타이드를 합성하였다 (표 1).
- [0093] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH₂ 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. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzotriazole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methylpyrrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고, NMP 및 DCM(dichloromethane)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. 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C18300 Å, 15, 19.0mm×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N 염산으로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압농축하고, 0.02N 염산에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하고, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill, et al., Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5: 395,

1991)을 수행하였다.

[0094] 그 결과, 표 1의 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 기재되는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다.

표 1

펩타이드 명칭	아미노산 서열	서열번호	분자량
PEP27	MRKEFHNLSSGQLLADKRPARDYNRK-NH ₂	1	3228.7
PEP27-1	MWKWFHNLSSGQLLADKRPARDYNRK-NH ₂	2	3316.9
PEP27-2	MWKWFHNLSSGQLLADKRPARDYNRK-NH ₂	3	3474.1
PEP27-5	MWKWFHNLSSGQLLADKWWAWWYNWW-NH ₂	4	3625.2

[0097] PEP27의 서열(서열번호 1)을 기준으로 신규 펩타이드(서열번호 2 내지 4)의 치환된 아미노산의 종류 및 치환된 위치를 표 2에 나타내었다.

표 2

아미노산 번호	PEP27	PEP27-1	PEP27-2	PEP27-5
1	M			
2	R	W	W	W
3	K			
4	E	W	W	W
5	F			
6	H			
7	N			
8	V			
9	L			
10	S			
11	S		W	
12	G			
13	Q		W	
14	L			
15	L			
16	A			
17	D			
18	K			
19	R			W
20	P			W
21	A			
22	R			W
23	D			W
24	Y			
25	N			
26	R			W
27	K			W

[0099] [공백: 아미노산 치환 없음]

[0101] 2. 항균 활성 측정

[0102] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 평가하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농

도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

[0103] 구체적으로, 하기 표 3에 기재된 균주를 구입하여, 각 균주에 적합한 조성의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^4 세포/ $100 \mu\text{l}$ 의 농도로 희석하여 마이크로 적정 플레이트(Nunc, USA)에 준비하였다. 그런 다음 위 1에서 합성한 PEP27, PEP27-1, PEP27-2 또는 PEP27-5 펩타이드를 각 웰에 1/2배씩 계열 희석(serial dilution)하여 첨가한 후 37°C 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 PEP27를 대조군으로 사용하였고, 부포린 2 (butorin 2)와 멜리틴 (melittin)은 비교 펩타이드로 사용하였다.

표 3

균주명	구분	출처	기탁번호
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	그람양성균	미국 세포주은행	ATCC25923
		미국 세포주은행	ATCC29213
	항생제내성 그람양성균	분리주 USA 300	
		분리주 MW2 (USA 400)	
		항생제내성균주은행	CCARM3089
		항생제내성균주은행	CCARM3090
		항생제내성균주은행	CCARM3518
	형질전환균주	MW2-GFP	
슈도모나스 에루지노사 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	그람음성균	미국 세포주은행	ATCC15692
		미국 세포주은행	ATCC27853
	항생제내성 그람음성균	분리주 4007	
		분리주 4891	
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	그람음성균	미국 세포주은행	ATCC25922
		미국 세포주은행	ATCC27853
	항생제내성 그람음성균	항생제내성균주은행	CCARM1229
		항생제내성균주은행	CCARM1238
살모넬라 티피뮤리움 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	그람음성균	한국 세포주은행	KCTC1926
	항생제내성 그람음성균	항생제내성균주은행	CCARM8007
		항생제내성균주은행	CCARM8008
바실러스 쉐틸리스 (<i>Bacillus subtilis</i>)	그람양성균	한국 세포주은행	KCTC1998
리스테리아 모노사이토젠스 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	그람양성균	한국 세포주은행	KCTC3710

[0104]

[0105] 그 결과, 하기 표 4에서 나타난 바와 같이 PEP27-2 펩타이드는 대조군인 모체 펩타이드 PEP27 및 다른 신규 펩타이드들에 비해 그람 양성균, 그람음성균 및 항생제 내성균에 대해 현저히 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 4

균주	펩타이드	최소적해농도 (μM)					
		PEP27	PEP27-1	PEP27-2	PEP27-5	Buforin 2	Melittin
그람 양성균							
<i>S. 아우레우스</i> ATCC25923		32	32	2	>64	16	2
<i>S. 아우레우스</i> ATCC29213		32	32	2	>64	16	2
<i>B. 셀렐리스</i> KCTC1998		64	32	4	>64	32	4
<i>L. 모노사이토젠스</i> KCTC3710		32	64	8	>64	64	4
그람 음성균							
<i>대장균</i> ATCC25922		64	64	4	>64	64	2
<i>대장균</i> ATCC27325		64	32	4	>64	64	2
<i>P. 에루지노사</i> ATCC15692		64	32	4	>64	32	2
<i>P. 에루지노사</i> ATCC27853		64	32	4	>64	32	2
<i>Sa. 티피리움</i> KCTC1926		64	32	8	>64	32	4
항생제내성 그람양성균							
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3089		32	32	4	>64	32	2
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3090		32	16	4	>64	32	4
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3518		32	32	4	>64	32	2
<i>S. 아우레우스</i> USA300		32	32	2	>64	32	2
<i>S. 아우레우스</i> MW2		32	32	4	>64	64	4
항생제내성 그람음성균							
<i>대장균</i> CCARM1229		64	64	4	>64	64	2
<i>대장균</i> CCARM1238		64	32	4	>64	64	4
<i>P. 에루지노사</i> 4007		64	32	4	>64	32	2
<i>P. 에루지노사</i> 4891		64	32	4	>64	64	2
<i>Sa. 티피리움</i> CCARM8007		64	32	2	>64	32	4
<i>Sa. 티피리움</i> CCARM8009		64	32	4	>64	32	4

3. 용혈 활성 측정

위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드들의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

구체적으로, 쥐(Balb/c, 6주령, 수컷) 적혈구를 8%의 농도가 되도록 PBS(pH 7.0)로 희석하고, PEP27, PEP27-1, PEP27-2 또는 PEP27-5 펩타이드를 각각 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 및 100.0 μM/웰의 농도로 처리하여, 37℃에서 1시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000 x g로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 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 용혈 활성 100%로 하여, 하기 수학적 1을 사용하여 각 펩타이드의 용혈 활성(hemolysis)을 계산하였다.

[수학적 1]

적혈구 파괴능(%) = (흡광도 A-흡광도 B)/(흡광도 C-흡광도 B) × 100

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

그 결과, 하기 표 5와 같이 모체 펩타이드인 PEP27 펩타이드는 100 μM 농도를 처리하였을 때 쥐 적혈구에 대하여 3.58%의 용혈 작용만 나타나는 것을 확인한 것에 비해, PEP27-2 펩타이드는 100 μM 농도에서도 적혈구에 대

한 75.8% 용혈 작용이 유발되는 것으로 확인하여 독성이 증가됨을 확인하였다. 그러나, 이는 활성 증가에 따른 독성도 증가 된 것이며, 항균 활성의 범위 내에서는 독성이 없음을 확인하였다.

표 5

	적혈구 파괴능 (%)					
	펩타이드 농도 100 μ M	펩타이드 농도 50 μ M	펩타이드 농도 25 μ M	펩타이드 농도 12.5 μ M	펩타이드 농도 6.25 μ M	펩타이드 농도 3.13 μ M
PEP27 (서열번호 1)	3.58	3.64	2.76	1.79	1.26	0
PEP27-1(서열 번호 2)	50.65	44.51	25.75	1.97	1.05	0
PEP27-2(서열 번호 3)	75.84	62.47	40.51	14.96	2.30	0
PEP27-5(서열 번호 4)	3.25	2.34	0	0	0	0
Buforin 2	5.77	3.10	2.05	0.92	0.29	0
Melittin	99.17	97.76	83.99	69.75	49.41	27.33

4. 정상 세포주에서 세포 독성 확인

위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 정상 세포주에서의 세포 독성을 확인하기 위해, 사람의 각질 형성 세포주 (HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)을 이용하여 독성을 측정하였다.

구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HaCaT 세포를 2×10^5 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, PEP27, PEP27-1, PEP27-2 또는 PEP27-5 펩타이드를 펩타이드를 각각 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 또는 100.0 μ M/웰의 농도로 처리하여, 24시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응시켰다. 24시간 후, 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 0.5 mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 100 μ l를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹인 후, 560 nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

그 결과, 하기 표 6과 같이 100 μ M의 모체 PEP27 펩타이드를 처리했을 때, HaCaT 세포는 100%의 세포 생존력을 나타내어 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이에 반해, PEP27-2는 펩타이드는 100 μ M 농도에서도 세포 생존력이 각각 69.3%로 확인하였다. 이는 용혈 현상보다 세포 독성이 낮게 나옴을 확인하여, 본 발명의 항균 펩타이드가 모체 펩타이드에 비해 항균 활성이 증가되었고, 항균 활성 범위 내에서는 세포 독성이 없음을 확인하였다.

표 6

	세포 생존력 (%)					
	펩타이드 농도 100 μ M	펩타이드 농도 50 μ M	펩타이드 농도 25 μ M	펩타이드 농도 12.5 μ M	펩타이드 농도 6.25 μ M	펩타이드 농도 3.13 μ M
PEP27 (서열번호 1)	100	100	100	100	100	100
PEP27-1(서열 번호 2)	42.38	66.45	83.21	100	100	100
PEP27-2(서열 번호 3)	30.67	42.24	66.75	99.01	100	100
PEP27-5(서열 번호 4)	100	100	100	100	100	100
Buforin 2	100	100	100	100	100	100
Melittin	6.54	11.25	28.21	44.25	78.25	98.21

[0123] **5. 원이색법 스펙트럼 측정**

[0124] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α -나선형 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

[0125] 구체적으로, 10mM PBS(pH 7.4), PE/PG (L- α -Phosphatidylethanolamine/L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol; 7/3, w/w) 또는 PC/CH/SM (L- α -phosphatidylcholine/cholesterol/sphingomyelin); 1/1/1, w/w/w)로 구성된 1 mM의 큰 단일 라멜라 소포(Large unilamellar vesicles, LUV)의 현탁액에 PEP27, PEP27-1, PEP27-2 또는 PEP27-5 펩타이드를 40 μ M로 0.1 cm 길이(path-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25℃로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다. 원이색법 스펙트럼을 위한 α -나선형 구조 계산식은 하기 수학적 식 2를 사용하였다.

[0126] [수학적 식 2]

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

(상기 식에 있어서, θ_{obs} 는 신호의 밀리도(milidegrees)를 나타내며;

l은 셀 크기(cm)의 광학 길이(optical path-length)를 나타내고; 및

c는 첨가한 펩타이드의 농도(mol/L)를 나타낸다.)

[0127]

[0128] (위 수학적 식 2의 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)

[0129] 결과, 10 mM PBS 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 구조를 형성하지 않은 반면, PE/PG(7/3) 또는 PC/CH/SM(1/1/1)로 구성된 LUV 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 모든 펩타이드에서 2차 구조인 α -나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 이의 결과를 통해, 본 발명의 항균 펩타이드는 미생물인 박테리아 막과 유사한 PE/PG(7/3)와 진핵세포의 막과 유사한 PC/CH/SM(1/1/1)용액 상에서 α -나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다 (도 1).

[0131] **6. 유세포분석기(Flow cytometry) 측정**

[0132] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드가 박테리아 막에 작용하는지 여부를 확인하기 위하여, 모체 펩타이드보다 항균활성이 우수한 PEP27-2 펩타이드를 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하였다.

[0133] 구체적으로, 모체 PEP27 펩타이드 또는 PEP27-2 펩타이드의 최소저해농도(MIC) 값을 대장균에 처리한 후 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 그 후, 원심분리기(10,000rpm)를 이용해 상층액을 제거한 다음 10 μ g/ml 농도의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)로 4℃에서 30분간 염색하였다. 그런 다음, 결합하지 않은 프로피디움 요오드화물을 원심분리기를 이용해 제거하고 생리식염수(PBS) 1 ml를 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거한 후, Bechman 유세포분석기를 이용하여 박테리아 막에 대한 펩타이드의 영향을 확인하였다.

[0134] 그 결과, 대장균 세포에서 PEP27 (19.9%) 보다 PEP27-2 (21.84%) 펩타이드가 막 파괴능이 조금 증가함을 확인하였다. 그러나, 상기 펩타이드들은 세포 투과성 펩타이드인 부포린 2와 같이 박테리아 막을 손상시키는 능력이 없음을 확인했다. 이는 PEP27과 PEP27-2가 대장균 막 파괴 없이 대장균을 사멸시킴을 확인했다. 대조 펩타이드 중 세균의 세포막을 파괴하는 멜리틴은 대장균(91.6%)에 대해서 세포막 파괴능을 확인하여 멜리틴과는 다른 기작을 가짐을 확인하였다.

[0136] **7. 항균 펩타이드와 DNA의 결합 유무 분석**

[0137] 위 1의 방법으로 제조된 합성 펩타이드가 항균활성을 나타내는 기작이 무엇인지 구체적으로 확인하기 위하여, PEP27, PEP27-1, PEP27-2 또는 PEP27-5 합성 펩타이드가 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합하는지 여부를 전기영동을 통해 확인하였다.

[0138] 구체적으로, 300 ng의 플라스미드 DNA(pRSETB)를 펩타이드와 비울별(펩타이드/DNA 비율은 각각 DNA 단독, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1로 실시)로 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 1% 아가로스 겔에 전기영동을 수행하여 브로민화 에티듐(Ethidium bromide, EtBr)으로 염색하고 UV로 확인하였다.

[0139] 그 결과, 도 3과 같이 비교 펩타이드인 멜리틴은 DNA와 어떠한 결합도 하지 않았으며 PEP27, PEP27-2 및 대조펩타이드인 부포린 2는 정도의 차이는 있지만 모두 DNA와 결합하는 결과를 보여주었다(도 3). 이때 PEP27보다 PEP27-2 펩타이드가 DNA 결합능이 더 높음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, PEP27-2 펩타이드가 일부 아미노산 잔기의 치환으로 인해, 모체 펩타이드인 PEP27에 비해 PEP27-2 펩타이드가 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합능이 높아 더 높은 항균활성을 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

[0141] **8. 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 분석**

[0142] 위 1의 방법으로 제조된 합성 펩타이드가 세균의 세포막에 손상을 주는지 확인하기 위해서 주사전자현미경을 통해 확인하였다.

[0143] 구체적으로, 대장균과 스태필로코커스 아우레우스 세포를 OD₆₀₀에서 0.2의 농도로 PBS에 현탁시킨 후, PEP27-2 펩타이드를 최소저해농도(MIC)로 처리하고 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 대조균은 펩타이드가 없는 균주를 사용하였다. 배양 후, 세포를 회수하고, 2.5% 글루타르알데하이드로 4℃에서 18시간 처리한 후 PBS 완충용액으로 2회 세척하였다. 고정된 세포를 100% 에탄올 및 희석된 에탄올(50%, 70%, 90% 및 100%)을 이용하여 순차적으로 10분 동안 탈수시킨 후 표본을 건조시키고 백금으로 코팅한 후 저진공 주사형 전자현미경을 사용하여 확인하였다.

[0144] 그 결과, 도 4와 같이 처리되지 않은 대조균 세포는 밝고 매끄러운 표면을 가지는 반면, 비교 대조균으로 사용한 막파괴 펩타이드인 멜리틴을 처리한 세포는 상당한 막 손상이 일어났음을 확인하였다. 펩타이드에 노출된 세포 표면은 구멍이 생기면서 물질 모양의 손상을 입은 모양이 관찰되었고, 일부 경우에는 세포질 내 내용물의 누출이 관찰되었다. 그러나, PEP27-2 펩타이드를 처리한 세포는 대조균과 거의 동일하게 세포 손상을 거의 확인할 수 없었다. 이는 세포막 파괴 없이 박테리아를 사멸시킴을 확인하였다.

[0146] **9. 펩타이드의 세포 흡수**

[0147] 위 1의 방법으로 제조된 합성 펩타이드가 세포에 침투하는 능력을 위상차 현미경을 통해 확인하였다. 구체적으로, 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT 세포)를 폴리아민 코팅 커버 슬립 (SPL Life Sciences, 경기도, 대한민국)이 포함된 6 웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 분주하고 24시간 배양한 후, 플로오레세인이소티오시아네이트 (FITC) 표지된 PEP27-2 (FITC-PEP27-2)를 5 μM의 농도로 처리하여 1 시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 1시간 반응 후 세포의 핵을 Hoechst 33342 핵산 염색액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 8 μM)을 처리하여 10 분 동안 염색하였다. PBS로 3 회 세척 한 후, 위상차 현미경 (EVOS™ FL Auto 2 Imaging System, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 세포 내 형광을 이미지화하였다.

[0148] 그 결과, 도 5와 같이 FITC-PEP27-2는 HaCaT 세포에 의해 명확하게 흡수되고 세포 내 녹색 형광으로 고르게 분포되어 세포질과 핵 모두에 나타났다. PEP27-2의 핵 국소화를 확인하기 위해 FITC 표지된 펩티드로 처리된 세포의 핵을 핵 염색 염료 Hoechst 33342로 대조 염색한 결과, PEP27-2는 HaCaT 세포의 세포질과 핵 모두에 분포하는 것을 확인했다. HaCaT 세포에서 FITC-PEP27-2는 세포질과 핵 내로 세포흡수한 것을 확인하였다. 대조 펩타이드인 TAT (GRKKRRQRRPQ)는 11개 아미노산 잔기를 가진 고도로 양전하를 띠는 세포 침투성 펩타이드로 PEP27-2 펩타이드와 같이 HaCaT 세포에서 세포질과 핵내로 흡수한 것으로 확인되었다.

[0150] **10. 항생물막 활성 측정**

- [0151] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들 중 항균활성이 가장 우수한 펩타이드인 PEP27-2의 생물막 억제 농도값을 측정하였다.
- [0152] 구체적으로, 상기 표 3에 기재된 균주 중 스태필로코커스 아우레우스, 대장균, 슈도모나스 에루지노사 균을 각 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 5×10^4 세포/100 μl 의 균체 농도로 희석하여 마이크로 플레이트(SPL)에 접종하였다. 그런 다음, Pse-T2 펩타이드를 각 웰에 1/10배씩 10 mM PBS 용액(pH 7.2)으로 희석하여 10 μl 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 플레이트 판독기를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 생물막 최소억제 농도값을 확인하였다.
- [0153] 그 결과, 하기 표 7에 개시된 바와 같이 모든 균주에서 PEP27-2 펩타이드가 대조 펩타이드인 멜리틴과 거의 유사한 강한 생물막 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 7

	생물막 최소억제농도 (μM)	
	PEP27-2	Melittin
그람 양성균		
<i>S. 아우레우스</i> ATCC 25923	4	4
<i>S. 아우레우스</i> ATCC 29213	4	4
그람 음성균		
대장균 ATCC 25922	8	4
대장균 ATCC 27325	8	4
<i>P. 에루지노사</i> ATCC 15692	8	4
<i>P. 에루지노사</i> ATCC 27853	8	4
항생제내성 그람양성균		
<i>S. 아우레우스</i> CCARM 3089	4	4
<i>S. 아우레우스</i> CCARM 3090	4	4
<i>S. 아우레우스</i> CCARM 3518	4	8
항생제내성 그람음성균		
대장균 CCARM 1229	8	4
대장균 CCARM 1238	8	4
<i>P. 에루지노사</i> 4007	8	4
<i>P. 에루지노사</i> 4891	8	8

[0154]

[0156] **11. 항균 펩타이드와 항생제의 항균 활성 확인**

- [0157] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들 중 항균 활성이 가장 우수한 펩타이드인 PEP27-2의 항균 활성을 기존 항생제와 비교하기 위해서, 동일한 그람 양성균 (스태필로코커스 아우레우스) 및 그람 음성균 (슈도모나스 에루지노사) 균주에 대하여 항생제가 나타내는 MIC 농도를 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 대상 균주를 준비하고, 항생제인 메로페넴 (Meropenem), 세프트라지딴 (Ceftazidime), 세프트리악스

(Ceftriaxone) 또는 반코마이신(Vancomycin)을 각각 처리하여 항생제의 MIC를 확인하였다.

그 결과, 하기 표 8과 같이 11 개 균주에 대한 PEP27-2의 MIC는 2 ~ 4 μ M 범위의 활성을 확인하였다. 메로페넴(Meropenem), 세프트리지딴(Ceftazidime), 세프트리악손(Ceftriaxone) 및 반코마이신(Vancomycin)의 MIC는 0.25 ~ 512 μ M 범위의 항균 활성을 나타냄을 확인하였다 (표 8).

표 8

미생물	최소적해농도 (μ M)				
	PEP27-2	Meropenem	Ceftazidime	Ceftriaxone	Vancomycin
<i>S. 아우레우스</i> ATCC25923	2	2	16	8	0.25
<i>S. 아우레우스</i> ATCC29213	2	2	8	4	0.25
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3089	4	64	512	512	0.25
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3090	4	128	512	512	0.5
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3518	4	64	64	256	0.25
<i>S. 아우레우스</i> USA300	2	2	32	16	0.25
<i>S. 아우레우스</i> MW2	4	2	32	32	0.25
<i>P. 에로우지노사</i> ATCC15692	4	2	4	16	512
<i>P. 에로우지노사</i> ATCC27853	4	2	2	8	256
<i>P. 에로우지노사</i> 4007	4	4	16	16	512
<i>P. 에로우지노사</i> 4891	4	8	16	64	512

12. 항균 펩타이드 및 항생제 병용 처리시 상승 효과 확인

각 혼합액에 대하여 결정한 MIC 값을 이용하여, 균주에 대한 항균 활성에서 펩타이드와 항생제의 상승효과를 평가하였다. 평가를 위하여, 분할 저해 농도 (Fractional inhibitory concentration; FIC) 분석은 체커보드 분석법 (checkerboard assay)을 사용하였다.

구체적으로, 100 μ L의 박테리아 (5×10^5 CFU / mL)를 96 웰 플레이트의 각 웰에 접종한 후 MIC 값부터 희석한 펩타이드 용액 (2:1 단계적으로 희석된 용액)을 각 웰에 50 μ L씩 첨가하였다. 그 후 항생제 용액을 희석하여 각 웰에 50 μ L씩 첨가하고 상반된 조건으로도 동일하게 실시하여 각 혼합액의 MIC 값을 결정하였다. FIC 값은 다음과 같이 계산되었다: FIC 지수 = FIC (A) + FIC (B) = [A]/MIC (A) + [B]/MIC (B), 여기서 [A]는 PEP27-2 항생제가 있는 경우 MIC (A)는 PEP27-2 단독의 MIC이고 FIC (A)는 PEP27-2의 FIC 이다. [B], MIC (B) 및 FIC (B)는 항생제에 해당하는 값이다. 계산한 FIC 값에 따라 다음과 같이 평가하였다: <0.5, 상승 효과 (Synergy effect); 0.5~4, 무차별(Indifference); >4.0, 길항작용 (Antagonism).

그 결과, 펩타이드와 항생제의 어떤 조합도 길항작용은 없음을 확인하였다. 그 결과, 하기 표 9에서 나타난 바와 같이 스타필로코코스 아우레우스 CCARM 3089 및 CCARM 3090에서 PEP27-2의 0.25x MIC와 조합하여 메로페넴, 세프트리지딴 또는 세프트리악손에 대해 상승 효과를 확인하였다. 또한, 슈도모나스 에로우지노사 4891 및 스타필로코코스 아우레우스 MW2의 경우 PEP27-2의 0.25x MIC와 조합시 각각 메로페넴 또는 세프트리악손에서만 상승효과를 확인하였다 (표 9 및 표10). 하기 표 9과 표10에서 나타난 바와 같이 소수의 표준 균주와 비교하여 대부분의 항생제 내성 균주에서 상승 작용 활성을 확인하였다.

표 9

균주	처리펩타이드/항생제	부분억제농도 (FIC)	조합효과
<i>S. 아우레우스</i> ATCC25923	PEP27-2 / Meropemem	1	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.75	Indifferent
<i>S. 아우레우스</i> ATCC29213	PEP27-2 / Meropemem	1	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>S. 아우레우스</i> USA300	PEP27-2 / Meropemem	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.75	Indifferent
<i>S. 아우레우스</i> MW2	PEP27-2 / Meropemem	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3089	PEP27-2 / Meropemem	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3090	PEP27-2 / Meropemem	0.38	Synergy
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>S. 아우레우스</i> CCARM3518	PEP27-2 / Meropemem	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.75	Indifferent

[0165]

표 10

균주	처리펩타이드/항생제	부분억제농도 (FIC)	조합효과
<i>P. 에로우지노사</i> ATCC15692	PEP27-2 / Meropemem	0.63	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>P. 에로우지노사</i> ATCC27853	PEP27-2 / Meropemem	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	1	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.75	Indifferent
<i>P. 에로우지노사</i> 4007	PEP27-2 / Meropemem	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy
<i>P. 에로우지노사</i> 4891	PEP27-2 / Meropemem	0.5	Synergy
	PEP27-2 / Ceftazidime	0.75	Indifferent
	PEP27-2 / Ceftriaxone	0.5	Synergy

[0166]

[0168] **13. 다제 내성 스태필로코코스 아우레우스에 감염된 농양의 치유능 측정**

[0169] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들 중 항균활성이 가장 우수한 펩타이드인 Pse-T2의 효능을 마우스 모델을 사용하여 *in vivo*에서 평가했다.

[0170] 구체적으로, 6-7 주령의 BALB/c 마우스 뒷면(등쪽)의 표피에 GFP 유전자가 삽입된 스태필로코코스 아우레우스 MW2 (*S. aureus* MW2-GFP, 1×10^9 CFU/100 μ l PBS)를 감염시켰다. 감염 2시간 후 PEP27-2 (0.2 mg/kg, 50 μ l) 단독, 세프트리악손 (0.2 mg/kg, 50 μ l) 단독 또는 펩타이드와 항생제의 병용처리 (0.05 mg/kg PEP27-2 +0.1 mg/kg 세프트리악손, 50 μ l)를 주입하였다. 대조군 마우스에는 펩타이드가 없는 동량의 PBS(20 μ l)를 주입하였다. 처리 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 및 7일에 농양의 형태를 촬영하고 농양 및 주변 조직을 회수하였다. 농양 조직은 조직 분쇄기를 사용하여 멸균된 PBS 500 μ l에서 균질화 시켰다. 한천 플레이트에 상기 균질화물의 연속 희석액을 플레이팅하여 24시간 동안 배양하여 스태필로코코스 아우레우스 MW2 균주를 정량화하였다.

[0171] 그 결과, 스태필로코코스 아우레우스 MW2 균주의 감염이 없는 PBS만 주입한 실험군에서는 농양이 형성되지 않음을 확인할 수 있었다 (도 6). 반면 스태필로코코스 아우레우스 MW2를 감염시킨 후 PBS만 주입한 실험군에서는 농양이 1일 후부터 형성되면서 7일까지 농양의 크기가 감소하지 않았고, 농양에 심한 염증이 생겼음을 알 수 있었다. 그러나, 스태필로코코스 아우레우스 MW2를 감염시킨 후 PEP27-2만 주입한 실험군, 세프트리악손만 주입한 실험군 및 PEP27-2 + 세프트리악손만 주입한 실험군 모두 PBS를 주입한 실험군에 비해 농양의 크기가 적게 형성됨을 알 수 있었다. 반면, 스태필로코코스 아우레우스 MW2를 감염시킨 후 PEP27-2 단독으로 처리한 경우보다 병용처리시 농양 치유 효과가 유의하게 비슷하거나 약간 효과가 큼을 육안으로 확인하였다 (도 6). 농양 치유 효과를 더 명확하게 확인하기 위해, 농양 조직의 균질화물을 배양하여 박테리아 수를 확인한 결과에서도, 세균 감염 후 PEP27-2 또는 세프트리악손으로 처리한 후, 세균 수는 0 일에 비해 각각 3 일에 80.0 % 또는 46.0 %, 7 일에 89.3 % 또는 61.5 % 감소하였다. 병용처리 후의 콜로니 수는 7 일에 91.1 %로 단일처리 후 보다 스태필로코코스 아우레우스 MW2 균수가 낮게 확인되었다 (도 7). 이는 병용 치료가 PEP27-2 또는 세프트리악손을 사용한 단일 치료에 비해 감염 부위에서 박테리아의 제거를 개선하는 상승 효과를 가짐을 알 수 있었다. 또한 PEP27-2를 단독으로 처리시에도 농양 부위의 균주 제거에 효과적임을 확인하였다.

[0173] **14. 농양 마우스 모델의 라이브 형광 이미징**

[0174] 위 1의 방법으로 제조된 펩타이드들 중 항균활성이 가장 감염 진행 상황을 실시간으로 추적하기 위해 형광 (GFP) 표지된 스태필로코코스 아우레우스 MW2 (스타필로코코스 아우레우스 MW2-GFP)를 사용하였다. 형광 이미지는 FOBI 형광 이미징 시스템 (Neo Science, 수원, 대한민국)을 사용하여 감염 시작부터 6시간, 1일, 2일, 3일 동안 촬영하고 라이브 이미지 소프트웨어로 분석하였다.

[0175] 그 결과, 스태필로코코스 아우레우스 MW2-GFP를 높은 박테리아 용량 (1×10^9 CFU)으로 감염시킨 후 0 시간에 그룹간에 형광 신호에 차이가 없었다 (도 8). 스태필로코코스 아우레우스 MW2-GFP 만 처리한 농양 위의 피부 표면에서 형광 신호가 3 일 동안 지속적으로 증가하였다. PEP27-2 단독 처리 후 형광 신호는 병용 처리와 유사했지만, 세프트리악손 단독의 형광 신호는 감소하지 않았다 (도 8). 형광성 농양 부위를 기준으로 PEP27-2와 세프트리악손을 병용한 치료는 상승 효과를 나타남을 확인하였다.

[0177] **15. 다제 내성 스태필로코코스 아우레우스에 감염된 농양 조직 절편 염색**

[0178] 위 13에서 회수한 농양 부위와 염증 부위 조직 중 7 일째 조직을 4 % 완충 포르말린에 고정시켰다. 포르말린으로 고정된 염증 부위 또는 농양은 파라핀에 묻히게 되고 단면의 절편은 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다.

[0179] 그 결과, 스태필로코코스 아우레우스 MW2 단독으로 감염된 마우스의 감염 부위는 피부 조직에서 심부 골격근 조직으로 확장되었으며 감염 부위 주변에서 호중구와 대식세포가 관찰되었다. 상부 진피의 깊은 염증, 골격근 손상 및 괴사로 인해 상부에 지각/딱지가 있는 큰 농양이 형성 되었다 (도 9). 세균 계수와 생 형광 이미징을 통

해 피부 표면에 보이는 딱지가 많은 스탕필로코코스 아우레우스 MW2를 함유하고 있음을 확인했습니다. 스탕필로코코스 아우레우스 MW2 감염 후 2 시간 후에 PEP27-2, 세프트리악손 또는 이들의 조합으로 처리된 마우스에서 농양 부위, 피부 표면에 형성된 눈에 보이는 딱지, 박테리아의 수가 현저하게 감소함을 확인하였다. 그러나, 염증 반응은 병용 처리시 가장 현저하게 일어남을 조직 절편에서 확인하였다 (도 9).

16. 정량적 실시간 PCR을 이용한 전염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

종양괴사인자-알파 (TNF- α), 인터루킨-1 베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 (IL-6), 산화질소 합성효소 (iNOS) 및 시클로옥시게나제-2 (COX-2)와 같은 염증 매개체의 mRNA 발현은 피부 감염 및 상처 치유시 변화가 일어난다. 세균이 감염되지 않은 마우스와 감염된 마우스, 감염 후 PEP27-2 단독 처리, 세프트리악손 단독 처리 또는 병용 처리한 마우스에서 염증 유전자의 발현을 측정하여 PEP27-2 단독 처리시와 항생제와의 병용 처리시의 효능을 검증하였다.

구체적으로, 트리졸 시약을 사용하여 상처 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. 준비된 총 RNA는 cDNA 합성 키트를 사용하여 cDNA를 합성하였다. qPCR은 qPCR 2x premix (SYBR Green)를 이용하여 수행하였고, 염증 유전자들 중 TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS 및 COX-2의 발현 양을 확인하였다. 발현 수준은 β -액틴을 기준으로 정량화 하였고, PCR 수행 과정은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분; 95℃에서 15초, 60℃에서 1분, 40 사이클; 95℃에서 15초, 60℃에서 1분 및 95℃에서 30초, 60℃에서 15초로 진행하였다. 유전자 발현은 $\Delta\Delta C_t$ 방법으로 β -액틴 수준으로 정규화한 후 계산하였다. 대조 세포의 전사는 1로 설정되었고 다른 실험 그룹은 이 값의 배수이다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS 및 COX-2 발현을 확인한 결과, 스탕필로코코스 아우레우스 MW2 균주가 감염된 피부의 농양부위에서 상기 각 염증성 사이토카인의 발현이 증가됨이 관찰되었고, 세균에 감염된 피부 상처에 PEP27-2 단독 처리, 세프트리악손 단독 처리 또는 병용 처리한 조건에서는 염증성 사이토카인의 발현이 억제되는 것이 확인되었다 (도 10). PEP27-2 및 세프트리악손과의 병용 치료는 두 약제 단독 치료보다 TNF- α 를 제외하고 염증성 사이토카인의 더 큰 억제를 나타냈다. TNF- α 발현의 경우, PEP27-2 단독 및 PEP27-2와 세프트리악손의 조합 치료는 유사하게 억제되었다. 이것은 조합 치료가 스탕필로코코스 아우레우스 MW2에 감염된 마우스에서 유도된 일부 염증 매개체의 발현을 억제하는 데 상승 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 PEP27-2와 세프트리악손 주사를 병용하면 생체 내에서 스탕필로코코스 아우레우스 MW2에 대한 항균 효과를 발휘하고 감염에 반응하여 발생하는 염증을 억제함을 확인하였다.

전술한 실험 결과들로부터 본 발명 3종의 PEP27 유사체(서열번호 2 내지 서열번호 4)는 정상 세포에 대한 세포 독성이 낮고, 모체 펩타이드인 PEP27 보다 우수하거나 유사한 수준으로 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, 합성된 펩타이드 유사체 중, PEP27-2 펩타이드(서열번호 3)는 모체 펩타이드인 PEP27에 비해 현저히 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 합성된 펩타이드 유사체와 항생제를 병용 처리시 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대하여 시너지 효과로 항균 활성을 나타냄을 확인하였다.

제조예 1: 약학적 제제의 제조

1-1. 산제의 제조

표 11

성분	중량(mg)
본 발명의 펩타이드	20 mg
유당	20 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

1-2. 정제의 제조

표 12

성분	중량(mg)
본 발명의 펩타이드	10 mg
옥수수 전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

1-3. 캡슐제의 제조

표 13

성분	중량(mg)
본 발명의 펩타이드	10 mg
결정성 셀룰로오스	3 mg
락토오스	14.8 mg
스테아린산 마그네슘	0.2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

1-4. 액제의 제조

표 14

성분	중량
본 발명의 펩타이드	20 mg
이성화당	10 g
만나톨	5 g
정제수	적량

통상의 액제의 제조 방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

1-5. 주사제의 제조

표 15

성분	첨가량
본 발명의 펩타이드	10 mg/ml
묾은 염산 BP	pH 7.6로 될 때까지
주이용 염화나트륨 BP	최대 1 ml

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

[0209] **제조예 2: 화장품의 제조**

[0210] **2-1. 유연화장수(스킨)**

[0211] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 표 16처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 16

[0212]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0214] **2-2. 영양화장수(로션)**

[0215] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 표 17처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 17

[0216]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
스쿠알란	10.0
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	2.0
유창목오일	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	8.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0218] **2-3. 에센스**

[0219] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 에센스를 제조하기 위해 하기 표 18처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 18

[0220]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
시토스테롤	1.7
폴리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7

세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스포이트	0.4
농글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

2-4. 세안제(클렌징폼)

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 표 19처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 19

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
N-아실글루타민산나트륨	20.0
글리세린	10.0
PEG-400	15.0
프로필렌글리콜	10.0
POE(15) 올레일알코올에테르	3.0
라우린유도체	2.0
메틸파라벤	0.2
EDTA-4Na	0.03
향료	0.2
정제수	To 100

2-5. 영양크림

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 표 20처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 20

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
바셀린	7.0
유동파라핀	10.0
밀납	2.0
폴리솔베이트60	2.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
스쿠알란	3.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
산탄검	0.5
토코페닐아세테이트	0.1
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[0230] **2-6. 마사지크림**

[0231] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 표 21처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 21

[0232]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0
토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
산탄검	0.5
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[0234] **2-7. 팩**

[0235] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 팩을 제조하기 위해 하기 표 22처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

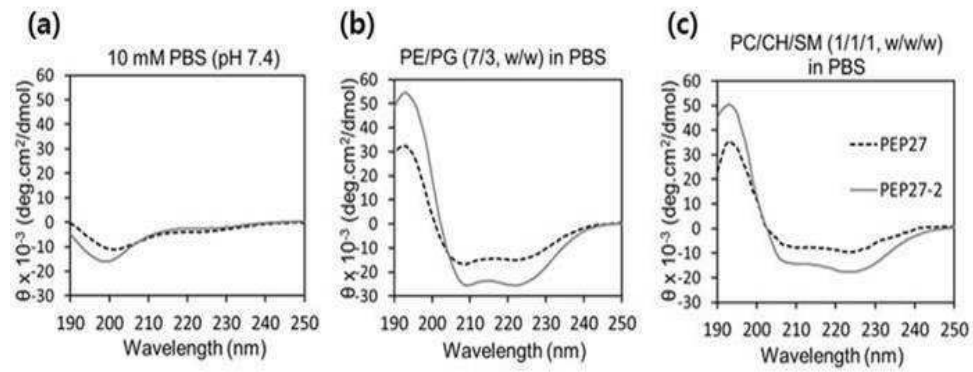
표 22

[0236]

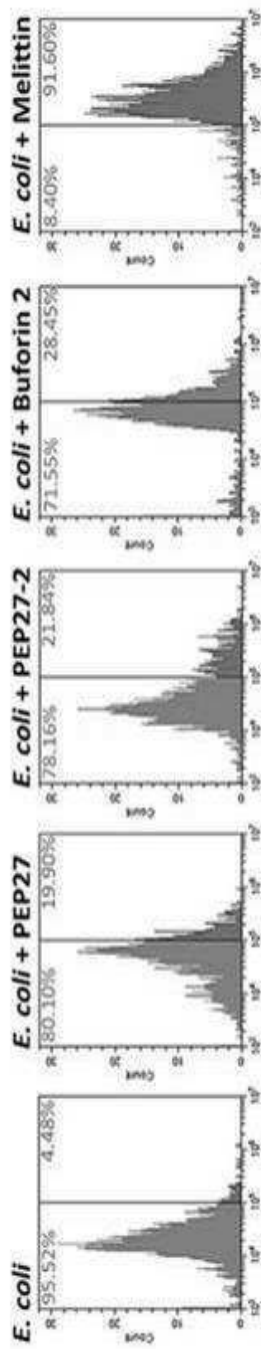
성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	2.0
글리세린	4.0
폴리비닐알코올	10.0
에탄올	7.0
파이지-40 히드로게비이트드캐스터오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

도면

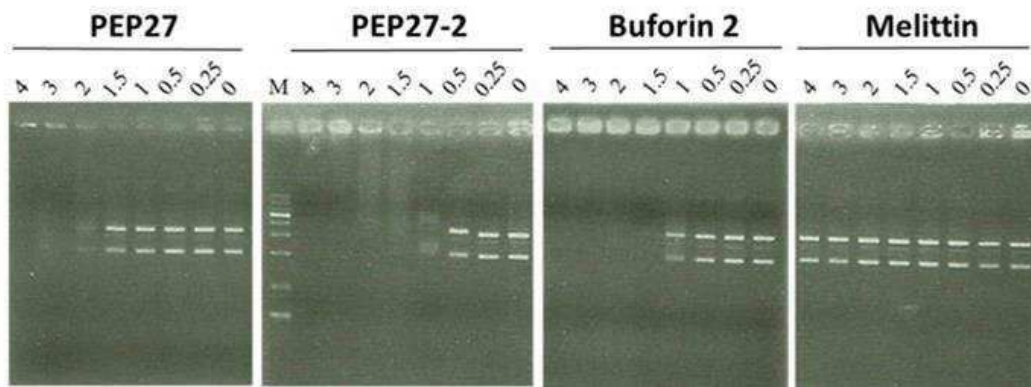
도면1



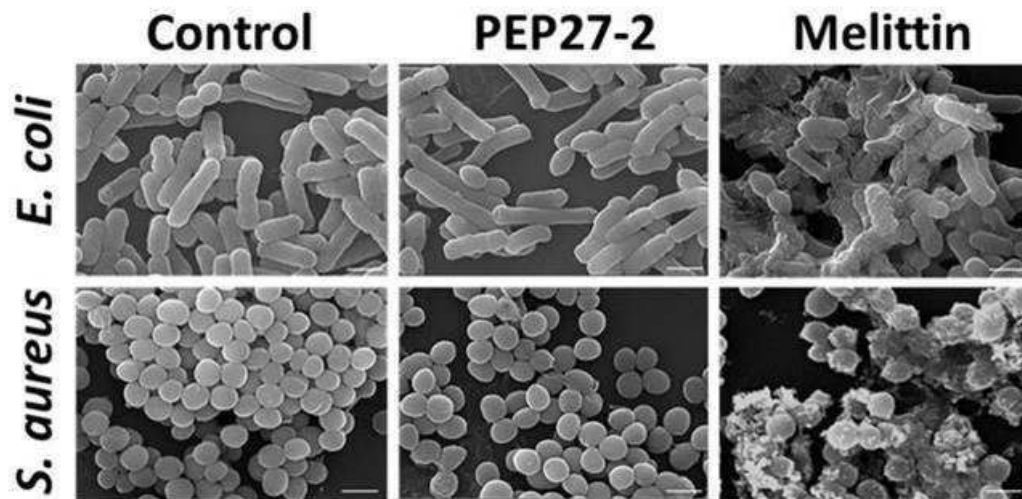
도면2



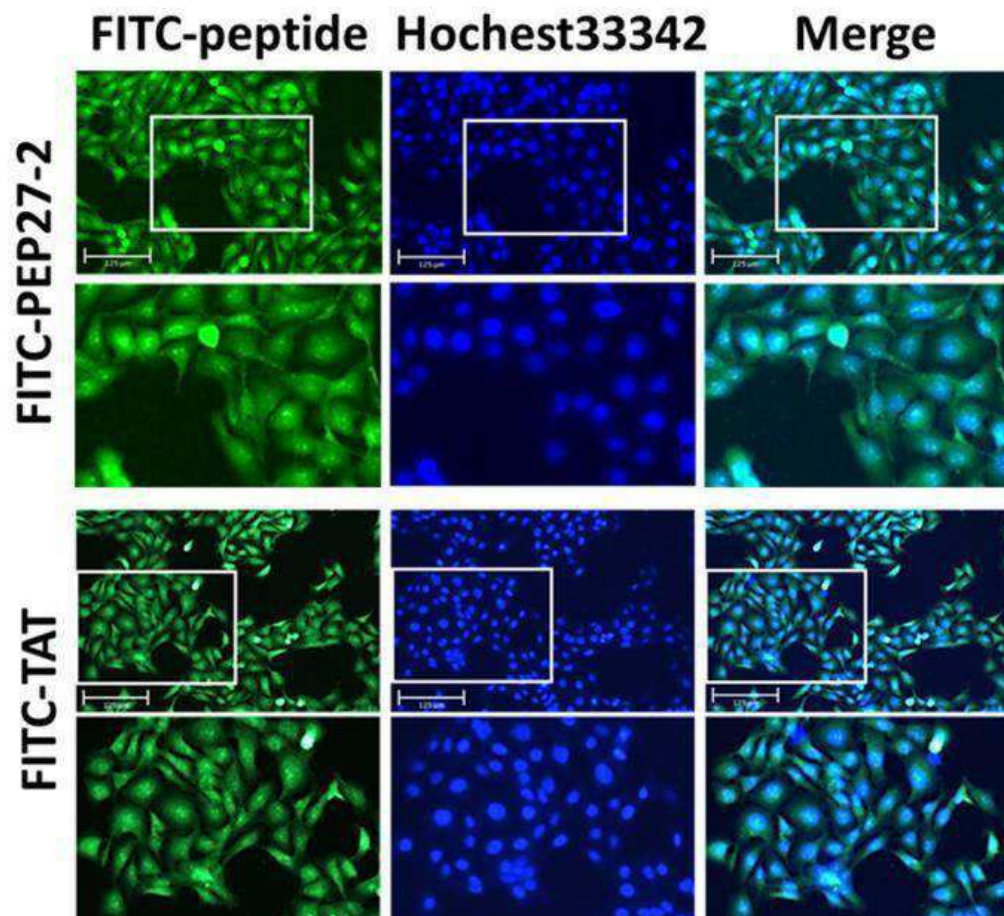
도면3



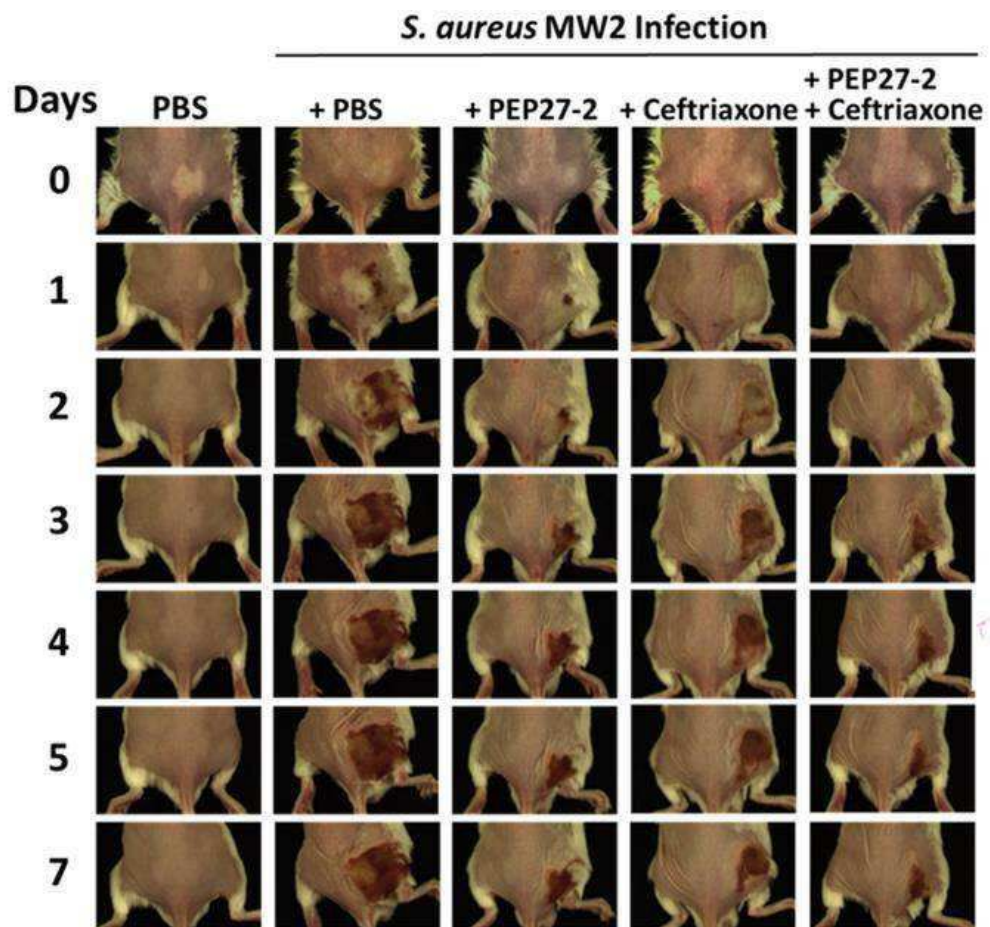
도면4



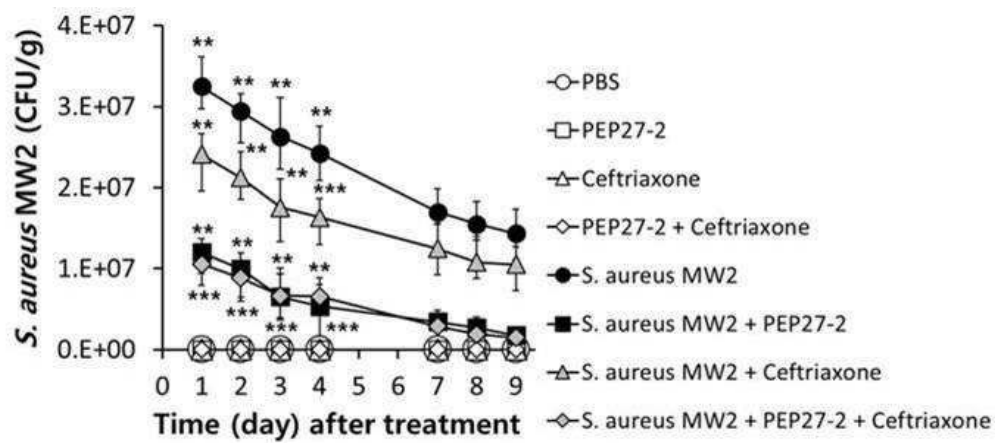
도면5



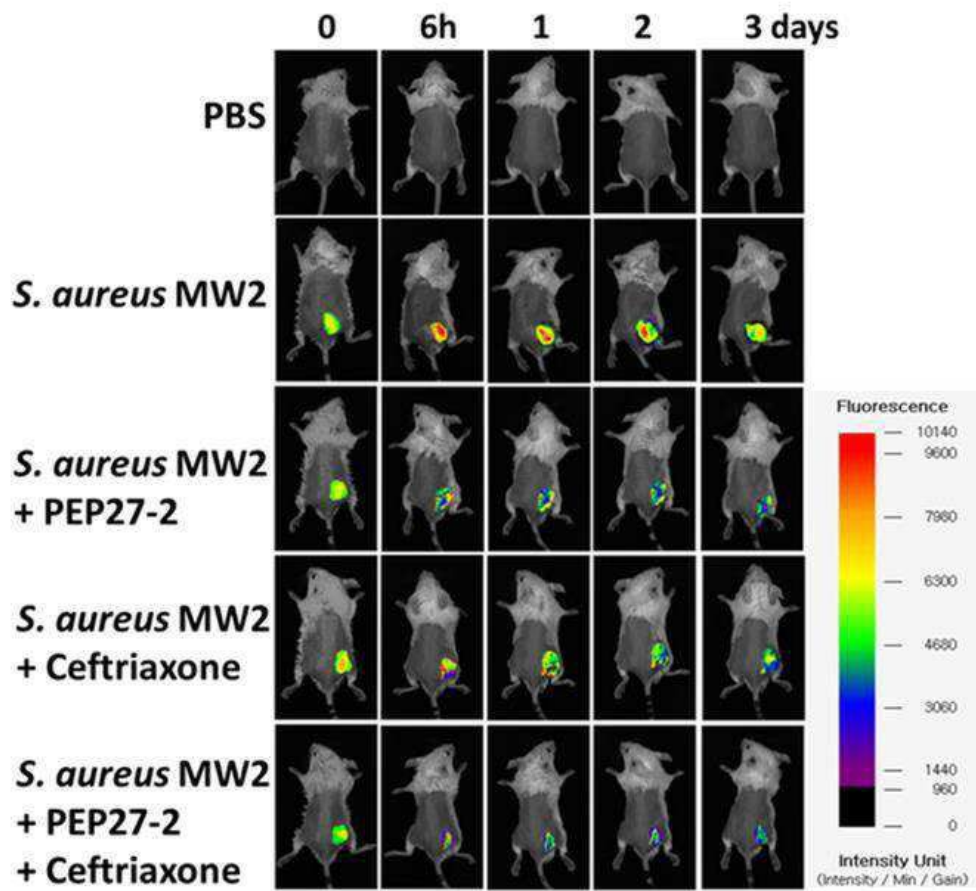
도면6



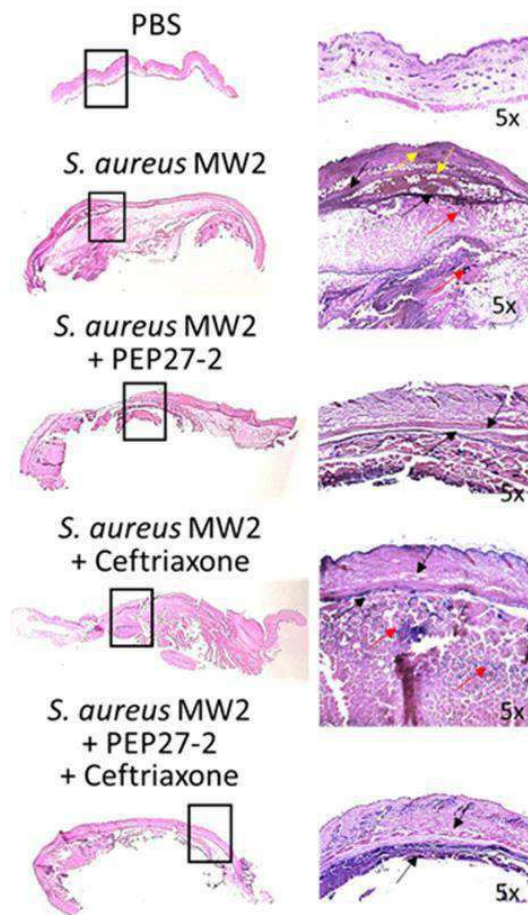
도면7



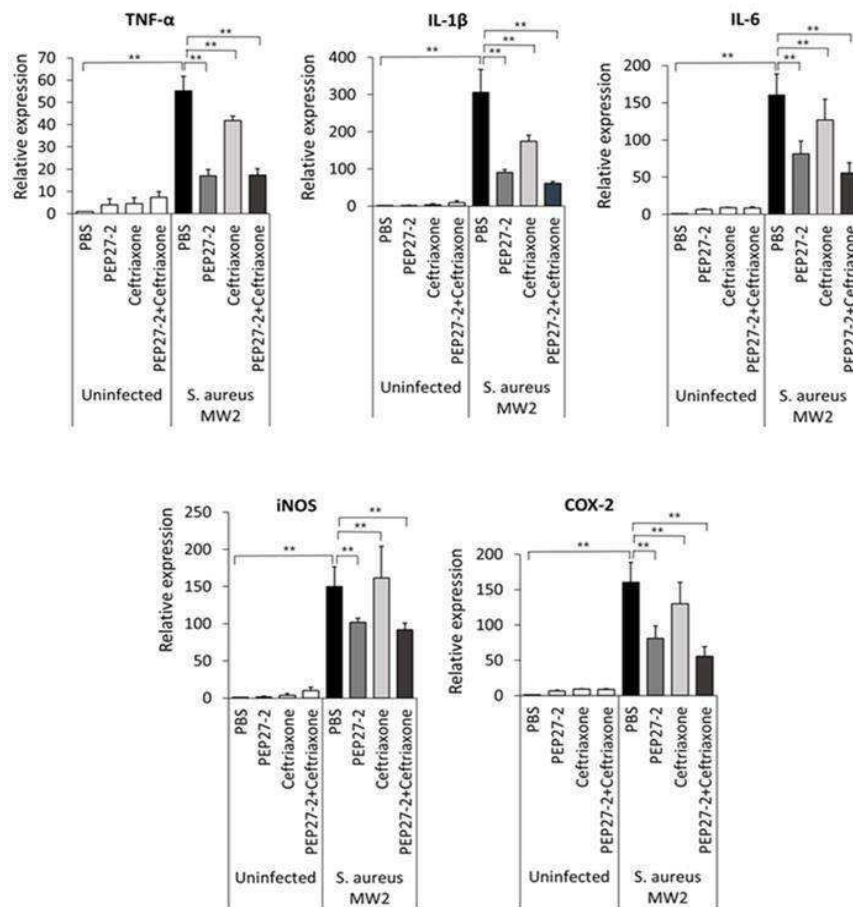
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> Novel peptide derived from PEP27 peptide and uses thereof

<130> 20P12021

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP27

<220><221> MOD_RES

<222> (27)

<223> AMIDATION,

<400> 1

Met Arg Lys Glu Phe His Asn Val Leu Ser Ser Gly Gln Leu Leu Ala

1 5 10 15
Asp Lys Arg Pro Ala Arg Asp Tyr Asn Arg Lys

20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP27-1

<220><221> MOD_RES

<222> (27)

<223> AMIDATION,

<400> 2

Met Trp Lys Trp Phe His Asn Val Leu Ser Ser Gly Gln Leu Leu Ala

1 5 10 15

Asp Lys Arg Pro Ala Arg Asp Tyr Asn Arg Lys

20 25

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> PEP27-2

<220><221> MOD_RES

<222> (27)

<223> AMIDATION,

<400> 3

Met Trp Lys Trp Phe His Asn Val Leu Ser Trp Gly Trp Leu Leu Ala

1 5 10 15

Asp Lys Arg Pro Ala Arg Asp Tyr Asn Arg Lys

20 25

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEP27-5

<220><221> MOD_RES

<222> (27)

<223> AMIDATION,

<400> 4

Met Trp Lys Trp Phe His Asn Val Leu Ser Ser Gly Gln Leu Leu Ala

1 5 10 15

Asp Lys Trp Trp Ala Trp Trp Tyr Asn Trp Trp

20 25