



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0060208
(43) 공개일자 2022년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A01N 63/14 (2020.01)
A61K 35/64 (2015.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43563 (2013.01)
A01N 63/14 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0145925
(22) 출원일자 2020년11월04일
심사청구일자 2020년11월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 24, 의과대학(회기동)
주기백
서울특별시 동대문구 제기로 131, 106동 1408호(청량리동, 한신아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

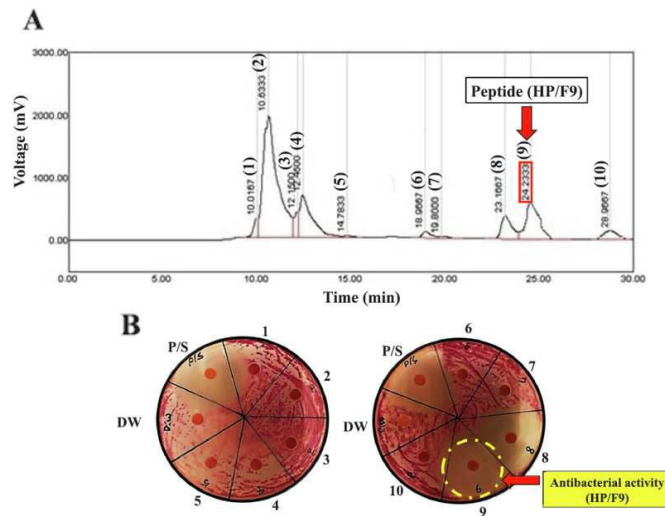
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 동애등에 유충 추출물에서 분리된 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물

(57) 요약

본 발명은 동애등에 유충 추출물에서 분리된 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 페렴간균 증식 억제 효능을 가지는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 35/64 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315657
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 동애등애(*Hermetia illucens*) 유충으로부터 분리된 것인, 항균용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 동애등애 유충의 혈림프로부터 분리된 것인, 항균용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)에 대한 항균활성을 가지는 것인, 항균용 조성물.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 폐렴간균으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 펩타이드는 동애등애(*Hermetia illucens*) 유충으로부터 분리된 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 폐렴간균으로 유발되는 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌막염, 사구체신염, 내안구염, 안내염, 간농양, 폐혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증 및 이하선염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동애등애 유충 추출물에서 분리된 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 폐렴간균 증식 억제 효능을 가지는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 병원성 미생물에 의한 직접 혹은 간접적인 피해는 경제, 환경, 의학적으로 많은 문제를 부각시키고 있다. 식품 산업에서의 식품 유통 과정 중의 부패로 인한 손실, 농산업에서의 농작물에 대한 과량의 화학 살충제의 사용으로 인한 인체의 유해성 및 환경오염, 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성 균주의 출현 등 사회 전반에서 많은 문제들을 야기시키고 있다. 특히, 최근 항생제에 고도의 내성을 보이는 미생물들이 발견되고 항생제에 대한

내성 문제가 심각해지면서, 새로운 항생제의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0003] 또한, 일반적으로 항생제는 인간뿐 아니라 축, 수산업에 있어서도 매우 중요한 역할을 한다. 과거 축, 수산의 발전에 따라서 단위 면적당 사육두수가 증가되고 생산성을 향상시키기 위하여 질병의 예방 및 치료는 성공적인 축, 수산의 중요한 요인으로 작용하였다. 이에 다양한 항생제와 성장촉진제들이 개발되었고, 현장에서 사용되어 왔다. 이러한 항생제 사용량의 증가는 축, 수산물에 대한 오염을 초래하였고, 더 나아가 생물농축현상을 통하여 축, 수산물을 소비하는 인간의 생명을 위협하는 상황까지도 초래하였다.

[0004] 현재 사용되고 있는 대부분의 항생제는 화학적인 합성을 통해 제조된 것으로서 고비용이 소요되며, 상기와 같은 오염 및 부작용을 유발하는 등의 많은 한계를 가지고 있다. 따라서, 최근에는 천연물로부터 새로운 항균물질을 분리하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 항생제의 기능을 대체할 수 있는 환경친화적인 물질의 개발이 중요한 과제이다. 천연물로부터 새로운 항균물질을 분리하기 위해서는 항균 스펙트럼이 광범위하고 장기간 투여하여도 부작용이 없이 안전하여야 한다는 점 등을 고려해야 한다.

[0005] 한편, 동애등애(*Hermetia illucens*, black soldier fly)는 아메리카 동애등애라고 알려진 파리목 동애등애과의 대표적인 환경정화 곤충이다. 동애등애는 한국, 일본, 중국, 대만 등 동남아시아와 미국 등지에 널리 분포되어 있고, 주로 축사, 퇴비사, 생활쓰레기장, 음식물쓰레기장 주변에 서식하며, 알에서 성충까지 크는 기간은 약 37~41일이다. 알에서 유충, 번데기, 성충의 생활사를 가지며, 그 중에서 유충은 유기성 폐기물을 친환경적으로 분해할 수 있다고 알려져 있는데, 약 14일 정도의 유충 기간에만 먹이활동을 하기때문에 유충 기간에 축사나 생활쓰레기 및 음식물쓰레기와 같은 유기성폐기물이 야적되어 있는 곳에서 생활사를 이어 가게 된다. 상기 동애등애에 관하여 유기성폐기물의 분해역할에 대해서는 알려져 있으나, 동애등애로부터 유래한 추출물 및 이의 분획물의 폐렴간균과 관련된 항균활성에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1726951호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 HP/F9 펩타이드를 포함하는 항균 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 HP/F9 펩타이드를 포함하는 폐렴간균으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 HP/F9 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴간균으로 유발되는 질환의 치료방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 “항균”은 균에 저항하는 능력을 의미하며, 세균이나 곰팡이와 같은 미생물의 작용으로부터 방어하기 위해 이루어지는 모든 기작을 의미한다.

[0012] 본 발명에서 “항균용 조성물”이란 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균제, 살균제, 방부제, 보존제 또는 제균제와 같은 의미일 수 있으며, 바람직하게는 세균의 발육과 생활 기능을 저지 또는 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[0013] 본 발명에서는 동애등애 유충으로부터 분리한 펩타이드가 세포 및 동물 모델에서 폐렴간균에 대한 강한 항균 활성을 가지고 있어, 이를 이용하여 폐렴간균에 대한 항균용 조성물 또는 폐렴간균에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

- [0014] 본 발명에서, “서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드”는 본 발명에서 HP/F9 펩타이드와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0015] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열 뿐만 아니라, 상기 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더더욱 바람직하게는 95% 이상, 더욱 더 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서, 실질적으로 서열번호 1의 펩타이드와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.
- [0016] 상기 HP/F9 펩타이드는 동애등애(*Hermetia illucens*) 유충으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 “동애등애(*Hermetia illucens*)”는 체장이 12-20 mm인 가늘고 긴 형태를 갖고, 제2복절에 백색 또는 황갈색의 크고 반투명한 무늬가 특징인 곤충을 의미한다. 더 자세한 명칭으로는 '아메리카 동애등애'라고도 하며, 영어로 '*Hermertia illucens*' 학명 외에도 'black soldier fly'라고도 불린다. 상기 동애등애는 음식물 쓰레기, 가축분뇨 등의 각종 유기물들을 먹기 때문에, 유기물로 인한 환경오염을 개선하는데 유용하다고 보고되고 있다.
- [0018] 상기 펩타이드는 동애등애 유충의 혈림프로부터 분리된 것일 수 있다. 상기 분리, 정제 방법은 당업계에서 펩타이드 분리, 정제시 사용되는 방법을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0019] 상기 조성물은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)에 대한 항균활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 “폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)”은 그람 음성의 단간균을 의미하며, 편모, 포자는 없고, 협막을 가지고 있는 미생물이다. 보통 한천에 잘 발달하는 통성염기성균으로 사람의 장관내, 구강 등에 상재하고 있으며, 급성 폐렴의 원인균이 되고, 기관지 폐염, 요로감염증 등에서 분리되는 미생물이다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서는 동애등애 유충의 혈림프로부터 분리한 HP/F9 펩타이드가 기존 상업용 항생제에 비해 폐렴간균에 대한 항균 활성이 우수하며, 마우스에 적용한 결과에서도 체중 감소량이 현저히 감소되어 감염으로부터 보호 효과가 현저히 향상됨을 확인하였다(도 3 및 도 4).
- [0022] 또한 본 발명의 일 실시예에서 폐렴간균에 감염된 마우스 폐에 HP/F9 펩타이드 처리 결과 세균 성장 억제 효과가 현저히 증가함을 통해 폐렴간균으로부터 감염 억제 효과가 우수함을 확인하였다(도 5).
- [0023] 상기 결과를 통해, 본 발명의 펩타이드는 폐렴간균에 대한 항균 효과가 기존 항생제와 비교하여 우수함을 입증한 바, 항균용도로서 활용 가능함을 보여준다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 폐렴간균으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 구체적으로, 상기 펩타이드는 동애등애(*Hermetia illucens*) 유충으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0026] 상기 폐렴간균으로 유발되는 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌막염, 사구체신염, 내안구염, 안내염, 간농양, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증 및 이하선염으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서 “폐렴(pneumonia)”은 세균, 바이러스 및 곰팡이 등의 미생물로 인한 감염으로 발생하는 폐의 염증을 의미하며, 기침, 염증 물질의 배출에 의한 가래, 숨쉬는 기능의 장애에 의한 호흡곤란 등의 폐의 정상적인 기능에 장애가 생기는 폐 증상, 구역, 구토, 설사 등의 소화기 증상 및 두통, 피로감, 근육통, 관절통 등의 신체 전반에 걸친 전신 질환이 발생하는 질환이다. 본 발명의 약학적 조성물로 예방 또는 치료가 가능한 폐렴은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 세균성 폐렴일 수 있으며, 보다 바람직하게는 폐렴간균에 의하여 발생하는 폐렴일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 “요로감염(Urinary tract infection, UTI)”은 여성에서 일생 동안 어느 시기에나 발병하고 남성에서는 유아기나 노령에서 자주 발생하며, 요로 감염증에는 방광염, 신우신염, 무증상 세균뇨, 그리고 신장결석과 도뇨관과 관련된 합병증으로서의 감염과 재발성 요로 감염증이 포함된다. 소아 요로감염의 원인균은 대장균(*E. coli*)이 80% 이상을 차지하며, 폐렴간균, 녹농균, 황색포도상구균 등도 요로감염을 일으키는 원인균 중 하나로 알려져 있다.
- [0029] 본 발명에서 “사구체신염”은 사구체에서 발생하는 염증을 의미하며, 막성 사구체신염, 소상(focal) 분절성

사구체 경화, 사구체간질 확산 증식성 사구체신염, 모세혈관내 또는 모세혈관외 증식성 사구체신염과 같은 하위 그룹으로 분류될 수 있다. 주로 연쇄구균, 폐렴간구균 등의 감염이 진행되면 감염에 따른 독소에 대한 알레르기 현상으로 발증하여, 염증이 일어나는 질환 중 하나이다.

- [0030] 상기 약학적 조성물은 본 발명의 HP/F9 펩타이드로 이루어진 약학적 조성물 뿐만 아니라, 폐렴간균에 대한 항균 활성 또는 폐렴간균으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 HP/F9 펩타이드 외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 제형으로는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등일 수 있다. 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이형일 수 있다.
- [0033] 상기 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 HP/F9 펩타이드에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘, 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0034] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순 희석제인 물, 리퀴드, 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 측면은 HP/F9 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴간균으로 유발되는 질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [0037] 상기 '폐렴간균으로 유발되는 질환'에 관한 설명은 전술한 바와 동일하다.
- [0038] 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 폐렴간균으로 유발되는 질환을 가진 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 폐렴간균으로 유발되는 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 조성물을 포함하는 의약품 항균제에 관한 것이다.

- [0044] 본 발명의 의료용 항균제품으로는 예를 들어, 소독솜, 붕대, 면 거즈, 면봉솜 또는 붕합사 등을 포함한다. 상기 붕합사는 생분해성 성분, 비흡수성 성분, 또는 이들의 혼합물로 이루어질 수 있다.
- [0045] 상기 의료용 제품 중 붕대 및 면 거즈는 제품의 제조 후 함침할 수 있고, 상기 그 원사를 함침하고 건조한 후, 이를 완제품으로 제조할 수 있으며, 시중에 판매되고 있는 의료용 제품을 구입하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 의료용 항균제품의 제조방법은 의료용 제품을 제조하고, 이를 동에등에 유층으로부터 분리한 HP/F9 펩타이드를 포함하는 조성물에 함침시키는 단계와, 상기 함침된 의료용 제품을 시험하여 항균성 및 생물학적 안정성을 평가하는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명의 동에등에 유층에서 분리한 HP/F9 펩타이드는 폐렴간균에 대한 항균활성이 우수하므로, 폐렴간균에 의해 유발되는 다양한 질환에 대해 유용하게 활용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 동에등에 유층에서 분리된 혈림프(Hemolymph)의 HPLC 분획과정 및 분획된 추출물에서의 항생물질 유무 및 폐렴간균에 대한 증식 억제효능 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 동에등에 유층에서 분리된 혈림프의 분획물 7(Fr. 7)을 추가 분획하여 HP/F9 펩타이드를 확보한 결과 및 추가 분획물을 사용하여 폐렴간균에 대한 증식 억제효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 시험관 내(*in vitro*) HP/F9의 항균 효과를 페니실린과 스트렙토마이신 함유한 시험 항생제(P/S)와 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 폐렴간균을 감염시킨 마우스에 HP/F9 투여 결과 나타나는 체중 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 폐렴간균을 감염시킨 마우스에 HP/F9을 투여한 결과 폐에서의 폐렴간균 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 폐렴간균을 감염시킨 마우스에 HP/F9을 투여한 결과 36시간 후 나타나는 병리학적 증상을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 폐렴간균을 감염시킨 마우스에 HP/F9을 투여한 결과 10일 후 나타나는 병리학적 증상을 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 폐렴간균을 감염시킨 마우스 신장의 병리학적 변화를 조사한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0051] **실시예 1. 실험 동물 준비**
- [0052] 7 주령 암컷 BALB/c 마우스 (그룹당 n=10)는 KOATECH (경기도 평택)에서 구입하였다. 모든 동물은 낮과 밤의 주기가 12 시간인 시설에서 유지되었으며, 음식과 물은 원하는대로 섭취하였다. 동물과 관련된 모든 실험 절차는 경희대학교 IACUC (허가 번호: KHUASP(SE)-18-105)에서 정한 지침에 따라 승인 및 수행되었다. 이소플루레인 (Isoflurane) 마취 (BSL 2)는 수술 중 고통을 최소화하기 위해 사용되었다.
- [0053] **실시예 2. 박테라이 균주 준비 및 배양**
- [0054] 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 13883)는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 박테리아는 Luria-Bertani (LB) broth에서 37℃에서 24시간 동안 배양한 다음 MacConkey (Becton, Dickinson Co., USA) 한천 플레이트에 플레이트하였다. 세균 배양물을 연속적으로 희석하고 각 희석액을 50 Ml을 삼중 배양액에 플레이트하였다. 각 희석 플레이트의 콜로니 형성 단위 (CFU)를 평균화하였다.

[0055] **실시예 3. 동애등애(*H. illucens*) 유충의 면역화(immunization) 및 혈림프(hemolymph) 정제**

[0056] 동애등애 유충 (600g)은 처음에 모든 불순물을 제거하기 위해 증류수로 세 번 행구었다. 유충은 바늘을 사용하여 프로바이오틱스 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)로 면역화하였다 (도 1A). 작은 가위를 사용하여 유충의 뒷부분을 하나씩 열은 후, 각 유충에서 10 μ l의 혈림프를 수집하고 다음 단계에서 사용하기 위해 200의 유충에서 총 2 ml을 수집하였다. 상기 혈림프를 C18 카트리지(Waters Co., USA)를 사용하여 7개의 분획물을 분류한 다음 표시된대로 50℃에서 회전 증발기를 사용하여 감압하에 증발시켰다 (Chu et al., 2014; Choi et al., 2018).

[0057] 상기 7개의 분획물을 이용하여 디스크 확산 분석 결과, 분획물 7(Fraction 7, Fr.7)이 *K.pneumoniae*에 대해 가장 높은 항균 효과를 나타내었다(도 1B). 이는 다른 분획물에 비해 Fr.7이 효과적으로 박테리아 억제 효과할 수 있는 분획물임을 보여준다.

[0058] 모든 추출물 및 7개의 컬럼 분획물은 0.20 mm 주사기 필터를 사용하여 여과하고 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0059] **실시예 4. HPLC 분석을 통한 HP/F9 펩타이드 확인**

[0060] 상기 실시예 3에서 분리한 Fr.7 분획물을 C18 역상 컬럼을 포함하는 YL9100 HPLC 시스템 (Young Lin Instrument Co., Ltd., Korea)을 이용하여 10 μ L의 주입 부피, 1.0 ml/min의 컬럼 유속 및 100% 메탄올과 100% 물의 이동상(50 : 50 의 비율)으로 60분 동안 분석하였다. 상기 분석은 40℃ 및 215 nm의 UV 파장에서 수행되었다. HPLC 분석 결과, 정제된 분획물 7(fraction 7, Fr 7) 내 여러 피크가 나타났으며, HP/F9를 포함한 10 개의 HPLC 분획으로 세분화되어 나타남을 확인하였다(도 2A).

[0061] 또한, 가장 효과적인 항균 효과를 구현하는 물질을 식별하기 위하여 24 시간 동안 10개의 HPLC 분획물에 세균을 처리한 결과, 다른 분획물에 비해 HP/F9(22,000 Da, k22)는 가장 강력한 박테리아 성장 억제제임을 확인하였다 (도 2B).

[0062] **실시예 5. HP/F9 펩타이드 서열 확인**

[0063] HP/F9 펩타이드에 대한 아미노산 서열은 Easy-nLC 1000(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)과 나노 전기 분무 소스가 장착된 LTQ Orbitrap Elite 질량 분석기 (Thermo Scientific)로 구성된 나노 LC-ESI-MS/MS 시스템을 사용하여 결정하였다. NCBI (National Center of Biological Information) BLAST 프로그램이 서열 분석에 사용되었다. 분석된 펩타이드 서열은 NCBI의 BLASTx 알고리즘을 사용하여 알려진 펩티드와 비교하여 서열을 결정하였다.

[0064] 그 결과, HP/F9는 하기 표 1의 22개의 아미노산으로 구성됨을 확인하였다.

표 1

타겟	시퀀스(5'-3')	서열번호
HP/F9	YQASGTPLVVIAGQEYGTGSSR	서열번호 1

[0066] **실험예 1. HP/F9의 시험관 내(*in vitro*) 항균 효능 확인**

[0067] HP/F9의 항균 활성을 평가하기 위해 *K. pneumoniae* (10 CFU/50 μ l)를 다양한 농도의 HP/F9 (1, 2, 6 및 12 μ g / 50 μ l)를 포함하는 용액에서 37℃에서 배양하였다. 2시간 배양 후 *K. pneumoniae*와 HP/F9 혼합물을 MacConkey 한천에 플레이팅하고 CFU를 계산하여 박테리아 성장을 평가하였다.

[0068] HP/F9의 항균 효과를 비교하기 위해 페니실린과 스트렙토마이신(P/S; WELGENE, Daegu, Republic of Korea)을 함유한 상업용 항생제가 대조군으로 사용되었다 (P/S; 대한민국 대구 웰진). HP/F9 혼합물과 유사하게, 1, 2, 4 및 8 유닛 (U)의 P/S로 처리된 *K. pneumoniae* 박테리아 배양물을 MacConkey 한천에 플레이팅하고 콜로니 성장을 평가하였다.

[0069] 그 결과, 50 μ l에서 6 또는 12 μ g의 HP/F9 처리는 *K. pneumoniae* 성장의 완전한 억제를 유도하였으며, 이는 4U의 항생제에 의해 유도된 항균 효과와 유사하였다(도 3A 및 3B). 이러한 결과는 HP/F9는 *K. pneumoniae* 성장을 효과적으로 억제 할 수 있음을 보여준다.

[0070] **실험예 2. *K. pneumoniae* 감염에 대한 생쥐의 HP/F9 효능 확인**

[0071] 마취 후 마우스(그룹당 n = 10)를 *K. pneumoniae* (10^7 CFU/50 μ l)로 비강 내 감염시켰다. 비강 내 경로를 통해 감염 2 시간 후 50 μ l PBS에 1.2 μ g, 6 μ g 및 15 μ g의 HP/F9를 투여하여 항균 활성을 결정하였다.

[0072] 대조군으로 *K. pneumoniae* 감염된 마우스에 상업용 항생제 P/S를 비강으로 주입하였다. 10 마리의 마우스 중, 각 그룹의 6 마리의 마우스를 감염 36 시간 후에 희생시키고 폐 세균 부하(lung bacterial loads)를 측정하였다. 이소플루란(isoflurane) 마취 후 자궁 경부 탈구를 시행하여 고통을 최소화하였다. 나머지 4 마리의 마우스를 매일 모니터링하여 체중 변화를 확인하였다.

[0073] 폐 세균 부하를 결정하기 위해 폐를 수집하고 주사기를 사용하여 1 ml PBS에 균질화하고 100 μ m 세포 스트레이너 (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)를 통해 여과하였다. 각 마우스의 연속 희석된 폐 균질물을 MacConkey 한천 플레이트에 3 회 플레이팅하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 개별 폐 균질물의 CFU를 평가하였다.

[0074] 그 결과, *K. pneumoniae* 감염에 대하여 상업적 항생제 처리된 마우스에 비하여 HP/F9 처리된 마우스에서 보호 수준이 우수하게 나타났으며, 특히 15 μ g HP/F9로 처리된 마우스에서 감염에 대한 보호 효과가 눈에 띄게 증가하였다. 또한, 감염 2 일 후 대조군에 비해 HP/F9로 처리한 마우스에서 체중 감소가 눈에 띄게 감소하였다(도 4). 이와 같은 결과는 HP/F9의 비강 내 접종이 *K. pneumoniae* 감염으로부터 마우스를 보호할 수 있음을 보여준다.

[0075] 또한, 폐에 HP/F9 펩타이드 처리한 다음 폐 세균 부하를 측정한 결과 HP/F9의 6 μ g 및 15 μ g 투여시 세균 성장 억제 효과가 나타남을 확인하였다. 이와 같은 결과를 HP/F9가 항균성을 가지며 비강내 투여는 마우스의 폐로부터 더 큰 박테리아 억제를 제공할 수 있음을 시사한다(도 5A 및 5B).

[0076] **실험예 3. 감염 후 폐 및 신장 병리 검사**

[0077] 감염 후 36 시간 및 10일 후에 마우스를 희생시키고 병리학적 검사를 위해 폐를 수집하였다. 수집한 폐 샘플을 10% 포르말린에 고정하기 전에 혈액 제거를 위해 PBS로 세척하였다. 그 후 조직을 절편하고 헤마톡실린과 에오신(H&E)로 염색하였다. 폐 샘플과 유사한 고정 및 염색 절차를 거친 10일째에 희생된 마우스로부터 신장 샘플을 수집하였다. H&E 염색된 조직 단면은 각각 신장과 폐의 사구체신염 및 기관지 주위 염증의 징후에 대해 현미경 (Olympus TE-200U, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0078] 그 결과, HP/F9를 처리한 마우스는 기관지 주위 염증을 나타내지 않고, 폐 실질 구조가 보존되었다. 반면 *K. pneumoniae*에 감염된 마우스의 폐 조직학은 36 시간 후 국소 간질 비후 및 염증이 나타났으며, 10일 후 경미한 기관지 주위 염증이 나타났다. 이와 같은 결과는 HP/F9가 *K. pneumoniae* 감염에 의해 유발된 폐 염증을 개선할 수 있음을 보여준다(도 6 및 도 7).

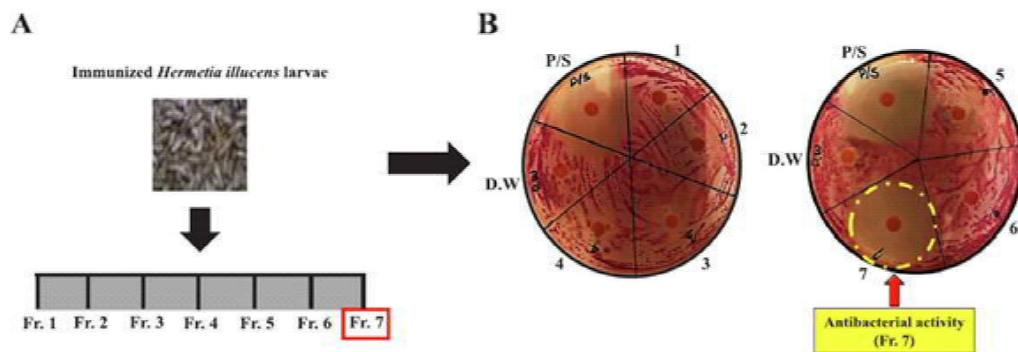
[0079] 또한, HP/F9 투여가 사구체신염의 중증도를 낮출 수 있는지 여부를 평가하기 위해 *K. pneumoniae* 감염 후 쥐의 신장에 병리학적 검사를 실시한 결과, *K. pneumoniae*에 감염된 마우스는 10일 후에 사구체신염이 나타난 반면, HP/F9를 투여한 마우스에서 신장은 손상되지 않았으며, 사구체신염 징후가 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 HP/F9가 마우스에서 *K. pneumoniae* 감염에 의해 유발된 신장 사구체신염을 개선할 수 있음을 나타낸다.

[0080] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

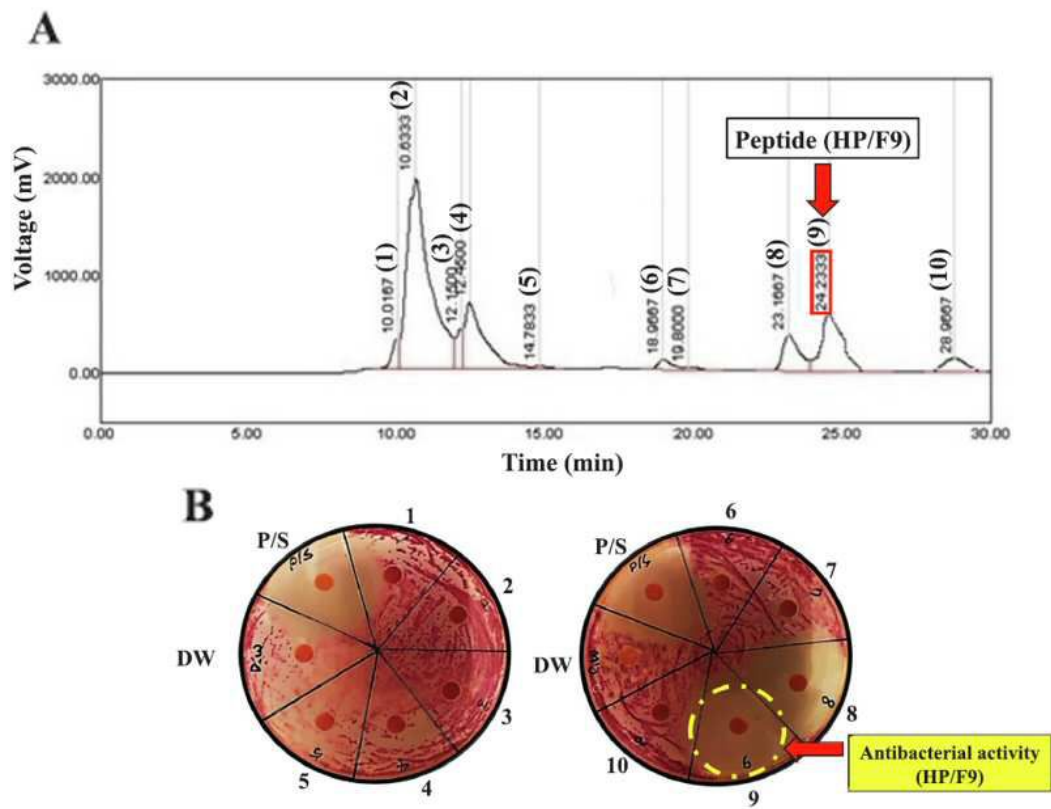
[0081] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

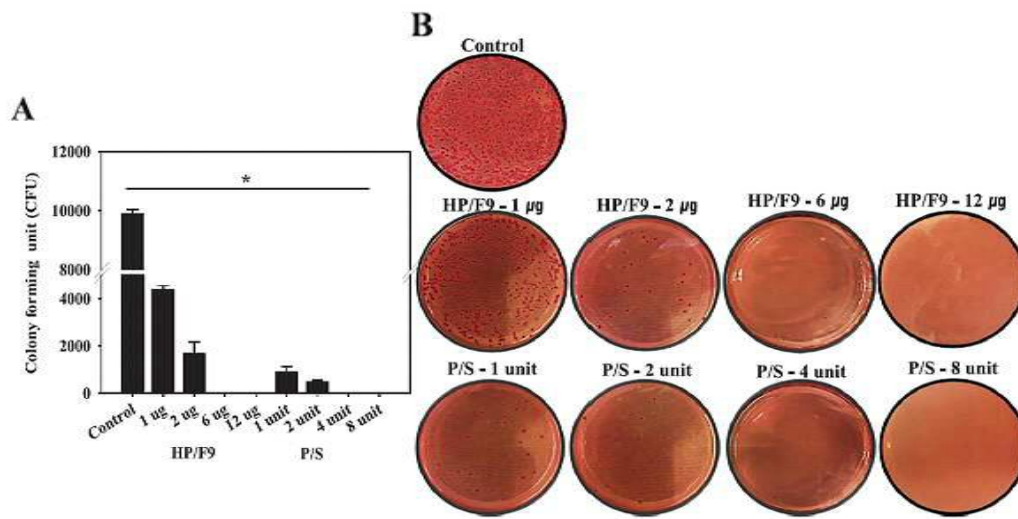
도면1



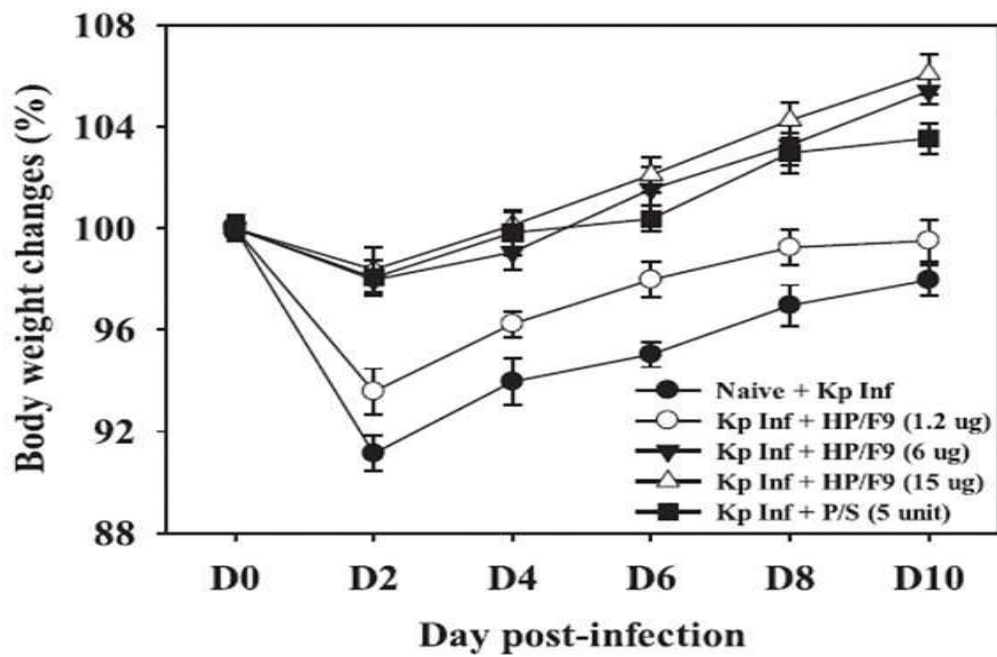
도면2



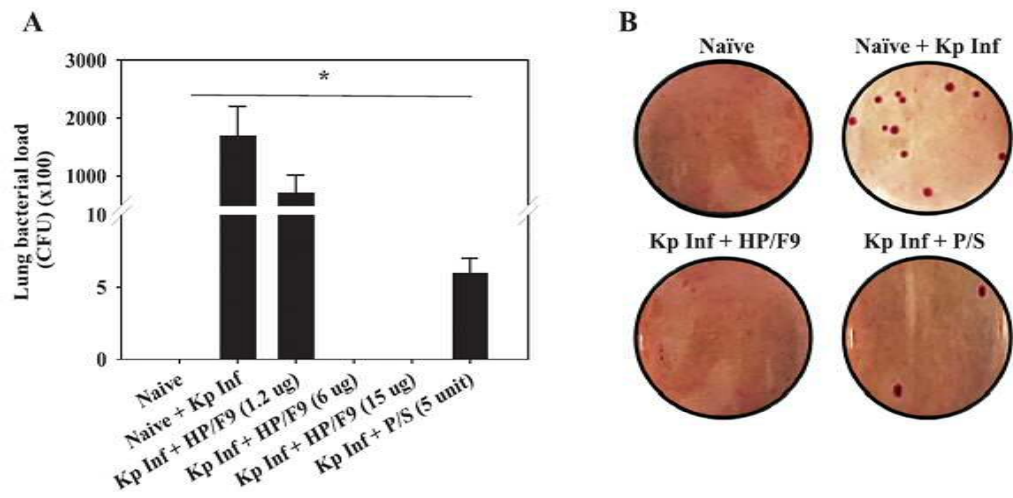
도면3



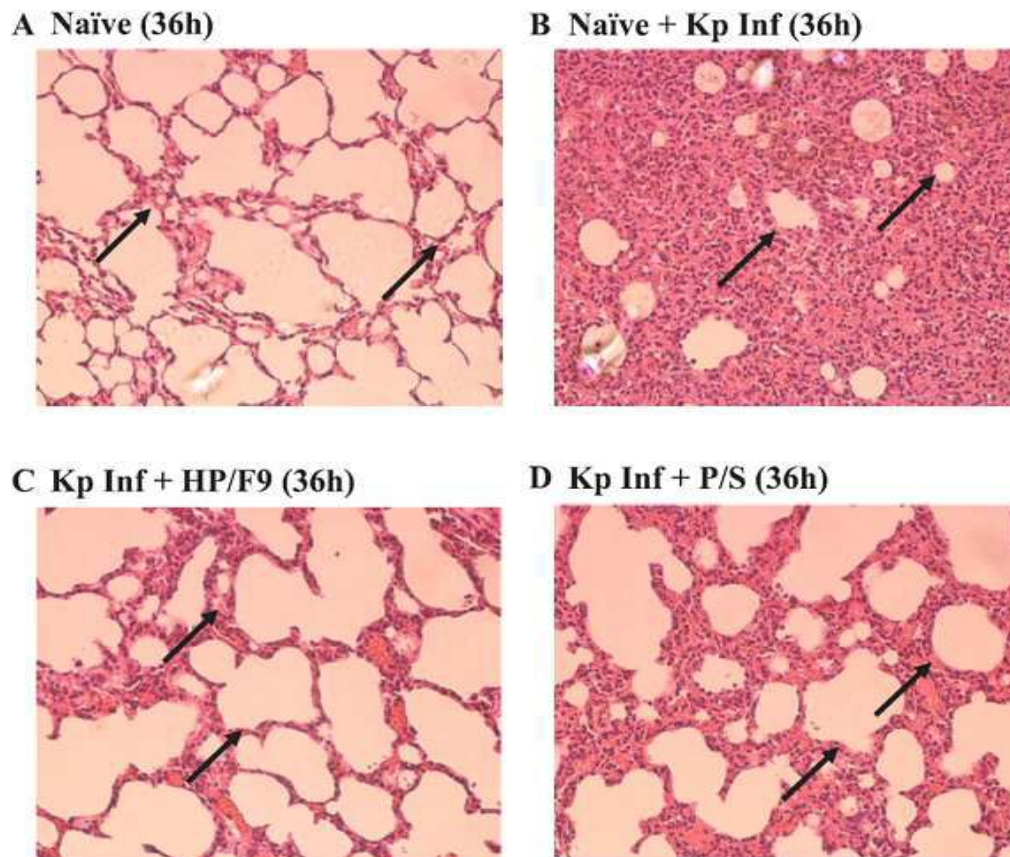
도면4



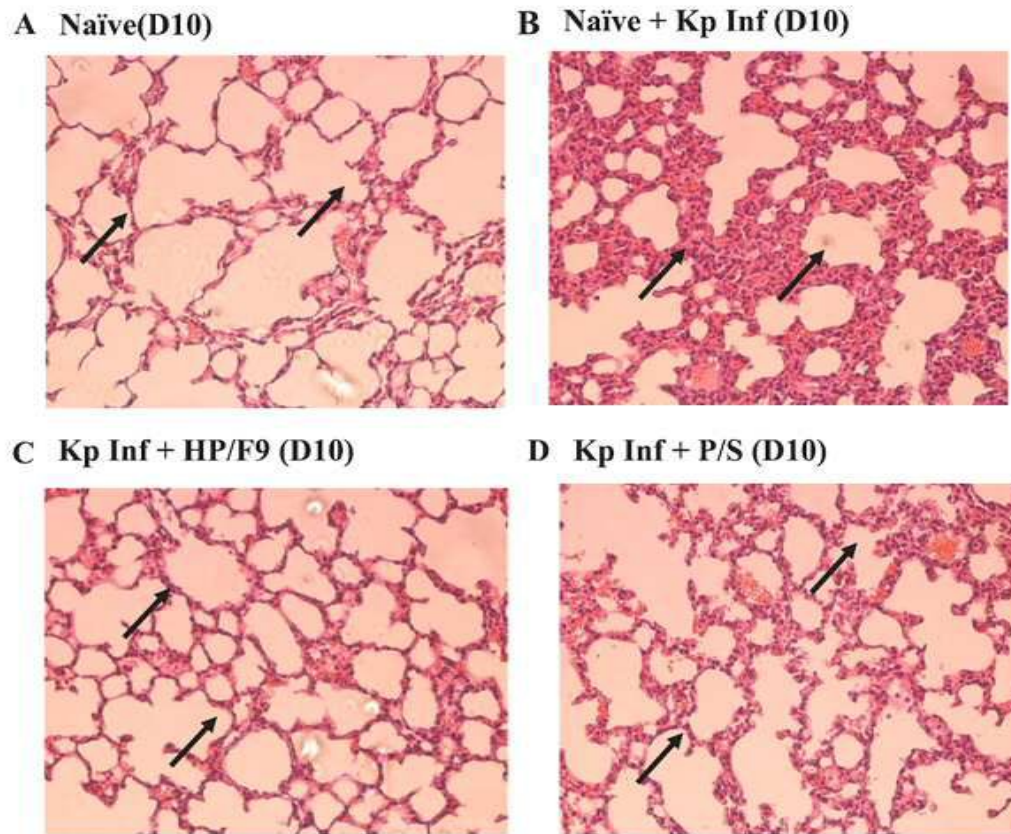
도면5



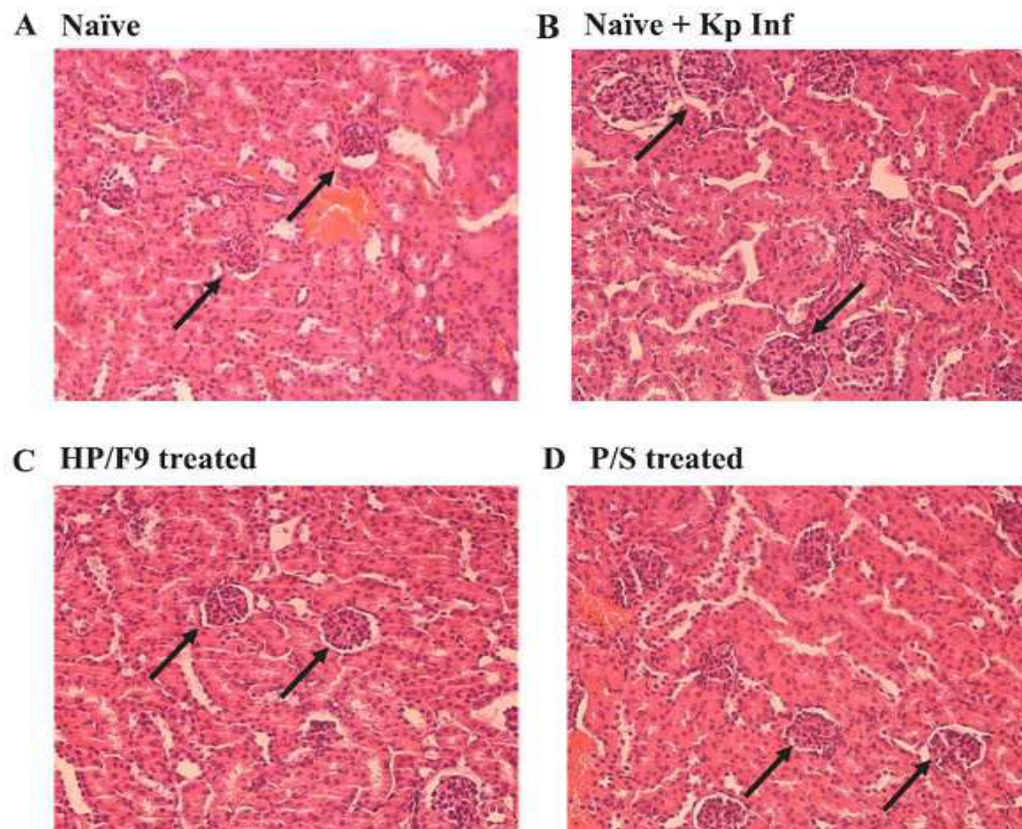
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> ANTIMICROBIAL COMPOSITION CONTAINING PEPTIDES ISOLATED FROM
HERMETIA ILLUCENS LARVA EXTRACT

<130> 20PP30663

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HP/F9

<400> 1

Tyr Gln Ala Ser Gly Thr Pro Leu Val Val Ile Ala Gly Gln Glu Tyr

1 5 10 15

Gly Thr Gly Ser Ser Arg

20