

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0099305
(43) 공개일자 2022년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/10 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)*A61P 29/00* (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)*A61P 11/00* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-0001391

(22) 출원일자 2021년01월06일

심사청구일자 2021년01월06일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

박윤경

전라남도 장성군 장성읍 매화7길 4

오준희

광주광역시 서구 화개중앙로87번길 15, 106동 90
3호(매월동, 매월동 아텔리움&로제비앙 아파트)

(74) 대리인

특허법인리체

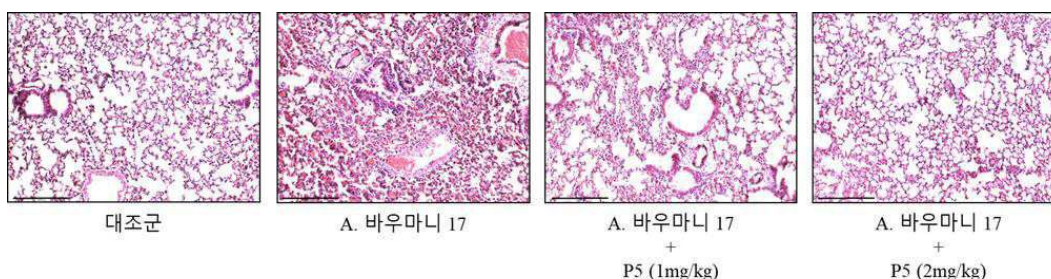
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 P5 펩타이드를 포함하는 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 P5 펩타이드를 포함함으로써 우수한 항균, 항염증 및 뮤신 억제 효과를 나타내고, 동시에 낮은 세포독성을 나타낸다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109584
과제번호	2019R1A2B5B03070330
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견후속연구(연평균연구비 2억원~4억원 이내)
연구과제명	담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성 세균에 작용하는 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	융합서비스
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 서열로 이루어진 P5 펩타이드를 포함하는 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 호흡기 질환은 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나에 의해 유발되는 것인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 항생제 내성균은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 크렙실라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 호흡기 질환은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 낭포성 섬유증, 급성 폐손상, 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침, 가래, 기관지염, 인후염, 편도염, 부비동염, 비염, 폐쇄성 세기관지염 및 후두염으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 P5 펩타이드를 포함하는 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 항생제 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상으로 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 생기는 현상이다. 이는 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이나 세균은 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 존재하에서도 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.

[0004] 항생제 내성을 나타내는 균 중에서도 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)는 주로 원내 기회 감염균주로 질병을 유발하는 것으로, 세계보건기구(WHO)는 인체에 가장 큰 위험을 초래하는 균주로 항생제 카바페넴

내성 아시네토박터 바우마니를 발표하였다. 그러나 카바페넴 내성뿐 아니라 다제내성 균주가 급증하고 있어 치료에 어려움이 있다. 특히 아시네토 바우마니는 여러 감염 경로 중에서도 호흡기를 통한 감염이 가장 많이 유발되고 있으며, 이로 인하여 기관지 및 호흡기 질환을 일으킨다. 병원내 감염을 통해서 항생제 내성 균주가 세균성 폐렴을 일으키게 되면 폐 상피 세포에서는 염증 과다 발현과 더불어 호흡곤란을 유발하는 객담을 생성하는 주요 성분인 뮤신(Mucin)이 과다 발현되어 호흡 장애가 일어나게 된다. 현재 항균 기능과 점액 조절제로서의 기능을 함께 갖는 항생제의 수가 적고, 항생제 내성을 유발하는 균주가 증가하고 있는 실정이다. 이에 항생제 내성 균주가 감염됨으로써 유발되는 염증, 객담 생성에 대한 치료제 개발이 이루어져야 한다.

[0005] 한편, 박테리옌(bacteriocin)은 여러 종류의 미생물이 생산하는 천연항균성 단백질로 생산균과 유사한 균종에 대하여 살균 작용을 갖는다. 박테리옌은 구조적으로 세 부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이옌티스(lantibiotics)이며, 두 번째는 비란티바이옌티스(nonlantibiotics)이고, 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다. 뿐만 아니라 곤충을 포함하는 동물도 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산할 수 있으며, 이들로부터 생성되는 펩타이드 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나뉘어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -쉬트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -나선형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다. 이들 항균 펩타이드들은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 가진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2020-0033828호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 P5 펩타이드를 포함하는 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 염증성 호흡기 질환은 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나에 의해 유발되는 것인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0012] 3. 위 2에 있어서, 상기 항생제 내성균은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 크렙실라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0013] 4. 위 1에 있어서, 상기 염증성 호흡기 질환은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 낭포성 섬유증, 급성 폐손상, 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침, 가래, 기관지염, 인후염, 편도염, 부비동염, 비염, 폐쇄성 세기관지염 및 후두염으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 효과

[0015] 본 발명 P5 펩타이드는 우수한 항균, 항염증 및 뮤신 억제 효과를 나타내고, 동시에 낮은 세포독성을 나타낸다. 또한, 본 발명 P5 펩타이드는 생체 내 폐 조직의 용혈 작용을 회복시키는 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 P5 펩타이드의 생체 내 폐 조직 손상 완화 효과를 확인한 결과로 대조군은 마우스의 비강에 완충 용액, A. 바우마니 17은 내성 균주를, A. 바우마니 17 + P5 1mg/kg과 A. 바우마니 17 + P5 2mg/kg은 내성 균주와 항균 펩타이드를 주입한 뒤 폐의 단면을 염색하여 염증과 용혈 현상을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 P5 펩타이드를 포함하는 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] [서열번호 1]

[0020] KWKKLLKKPLKKLLKKL

[0021] P5 펩타이드는 세크로핀(Cecropin A, CA)과 마가이닌(Magainin 2, MA) 접합 펩타이드(CA-MA(Cecropin A - Magainin 2))를 모체로 하여 아미노산 잔기를 치환하고 제거하여 만들어진 펩타이드로서 양친화성 알파 나선형 구조를 형성한다.

[0022] P5 펩타이드는 세균과 진균에 대하여 우수한 항균 활성을 나타낸다. P5 펩타이드는 세균과 진균에 대하여 주형 펩타이드보다 현저히 우수한 항균 활성을 나타낸다.

[0023] 예를 들어, P5 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균, 항생제 내성균, 진균에 대해 항균 활성을 나타낼 수 있다. 구체적으로, P5 펩타이드는 그람 음성균, 항생제 내성균에 항균 활성을 나타낸다.

[0024] 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 균으로, 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 크렙실라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 균으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0025] 상기 항생제는 아미노글리코사이드 계열(아미노글리코사이드, 겐타마이신, 네오마이신 등), 페니실린 계열(앰피실린 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] P5 펩타이드는 낮은 세포독성을 나타낼 수 있고, 구체적으로 인간 유래 세포에 대해 낮은 세포 독성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 인간 유래 세포는 인간 피부 각질 세포주(HaCaT) 및 인간 폐 상피 세포주(A549)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0027] P5 펩타이드는 염증억제 효과를 나타내며 객담의 주요 성분인 뮤신의 생성을 억제시키는 효과를 나타낸다. 구체적으로, P5 펩타이드는 항생제 내성 균주로 인하여 인간 폐 상피 세포주(A549)에 과다 발현된 염증 및 객담 주요 성분 뮤신(Mucin)의 생성을 감소시키는 효과를 나타낸다.

[0028] P5 펩타이드는 폐 조직 손상을 회복시키는 효과를 나타낸다. 구체적으로, P5 펩타이드는 항생제 내성 균주로 인하여 손상된 폐 조직을 회복시키는 효과를 나타낸다.

[0029] P5 펩타이드는 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조방법은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, P5 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] 염증성 호흡기 질환은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 낭포성 섬유증, 급성 폐손상, 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침, 가래, 기관지염, 인후염, 편도염, 부비동염, 비염, 폐쇄성 세기관지염 및 후두염으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0031] 염증성 호흡기 질환은 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나에

의해 유발되는 것일 수 있다.

[0032] 항생제 내성균은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)일 수 있다.

[0033] 용어 “예방”은 조성물의 투여로 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다

[0034] 용어 “치료”는 조성물의 투여에 의해 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 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.

[0037] 본 발명의 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.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분인 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

[0040] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 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.

[0042] 1. 항균 펩타이드 서열

표 1

구분	펩타이드명	서열	분자량(Da)
실시예1	P5	KWKLLKKPLLKLLKKL-NH ₂ (서열번호1)	2246.0
비교예1	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂ (서열번호2)	2846.5

[0045] 2 항균 활성 측정

[0046] P5 펩타이드의 항균 활성을 확인하기 위해 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

[0047] 구체적으로, 하기 표 2에 기재된 균주를 구입하거나 환자로부터 분리하여 각 균주에 적합한 조성 배지 Mueller-Hinton broth (MHB)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^5 세포/100 μ l의 농도로 희석하여 마이크로 적정 플레이트(Nunc, USA)에 준비하였다. 그런 다음 항균 P5 펩타이드(실시예1)를 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. 항균 펩타이드 Melittin(비교예1)과 항생제 Meropenem을 대조군으로 사용하였다.

표 2

구분	균주명	출처	기탁번호
표준 균주	아시네토박터 바우마니 (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	한국 세포주은행	KCTC 2508

항생제 내성균	아시네토박터 바우마니 (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	분리주 1	
		분리주 2	
		분리주 3	
		분리주 4	
		분리주 5	
		분리주 6	
		분리주 7	
		분리주 8	
		분리주 9	
		분리주 10	
		분리주 11	
		분리주 12	
		분리주 13	
		분리주 14	
		분리주 15	
		분리주 16	
		분리주 17	
		분리주 18	
		분리주 19	
		분리주 20	
		분리주 21	
		분리주 22	
		분리주 23	
		분리주 24	
		분리주 25	
		분리주 26	

[0049] 그 결과, 하기 표 3처럼 P5 펩타이드는 아시네토박터 바우마니(A. 바우마니)에 대해 Melittin 펩타이드(비교예 1)와 유사하게 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 3

A. 바우마니 표준 균주 및 내성균에 대한 항균 펩타이드의 MIC

균주	펩타이드 및 항생제	최소 억제 농도 (μg/mL)		
		P5	Melittin	Meropenem
표준 균주	A. 바우마니	4	4	1
항생제 내성균	A. 바우마니 1	8	4	128
	A. 바우마니 2	8	4	256
	A. 바우마니 3	8	4	128
	A. 바우마니 4	8	4	256
	A. 바우마니 5	4	4	128
	A. 바우마니 6	8	4	128
	A. 바우마니 7	8	4	128
	A. 바우마니 8	8	4	128
	A. 바우마니 9	8	4	128
	A. 바우마니 10	4	4	128
	A. 바우마니 11	4	4	256
	A. 바우마니 12	4	4	64
	A. 바우마니 13	4	4	64
	A. 바우마니 14	4	4	256
	A. 바우마니 15	4	4	256
	A. 바우마니 16	4	4	128
	A. 바우마니 17	4	4	256
	A. 바우마니 18	4	4	64
	A. 바우마니 19	4	4	256
	A. 바우마니 20	4	4	128
	A. 바우마니 21	8	4	128
	A. 바우마니 22	8	4	128
	A. 바우마니 23	8	4	256
	A. 바우마니 24	8	4	128
	A. 바우마니 25	4	4	64
	A. 바우마니 26	8	4	128

[0050]

[0052]

3. 항생물막 활성 측정

[0053]

P5 펩타이드의 항균 활성을 확인하기 위해 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 생물막 억제 농도 값을 측정하였다.

[0054]

구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 생물막이 잘 형성되는 균을 각 균주에 적합한 조성 배지 Mueller-Hinton broth (MHB)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 1×10^6 세포/100μl의 균체 농도로 희석하여 마이크로 플레이트(SPL)에 접종하였다. 그런 다음 P5 펩타이드를 각 웰에 1/10배씩 10mM 인산 나트륨 용액(sodium phosphate, pH 7.2)으로 희석하여 10μl 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 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 생물막 최소억제 농도 값을 확인하였다. 그 결과, 하기 표 4처럼 P5 펩타이드는 Melittin 펩타이드와 유사하게 내성 균주에서 강한 생물막 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 4

펩타이드 및 항생제 균주	생물막 최소억제농도 (μg/mL)		
	P5	Melittin	Meropenem
A. 바우마니 (KCTC 2508)	8	4	2
A. 바우마니 17	8	8	>64

[0055]

[0056]

4. 내성 균주에서의 P5 펩타이드 내성 유발 확인

[0057]

P5 펩타이드가 내성을 유발하는지 확인하기 위해 내성 균주 A. 바우마니 17에 P5 펩타이드의 MIC 1/2 값을 처리하여 내성 유발을 확인하였다.

[0058]

구체적으로, A. 바우마니 17 2×10^5 세포/2mL에 P5 펩타이드와 현재 Carbapenem 내성 균주의 치료제로 사용되는 항생제 Tigecycline과 Colistin 각각을 생육 최소저해농도 1/2 값을 처리하여 균주에 적합한 조성 배지 Mueller-Hinton broth (MHB)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양하였다. 배양 된 균주를 대상으로 펩타이드와 각 항생제를 처리하여 MIC 실험을 실시하였다. MIC를 실시하였던 균주를 가지고 2×10^5 세포/2mL에 P5 펩타이드의 MIC 1/2 값을 처리하여 반복해서 균주를 배양하였다. 다음 날 MIC를 동일하게 반복 수행하였다. 이를 30일간 반복해서 수행하였다. MIC 값은 마이크로 적정 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 그 결과, 표 5처럼 치료제로 사용되는 항생제의 경우 MIC 값이 약 256배(Tigecycline), 8192배(Colistin) 증가하여 내성을 유발하는 것을 확인하였다. 반면에 P5 펩타이드의 경우 30일 간 내성 유발 유도를 하였음에도 불구하고 MIC 값이 4 μg/mL로 유지되어 P5가 내성을 유발하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 5

펩타이드/항생제 내성 유발 기간	최소 억제 농도(μg/mL)	
	1일	30일
P5	4	4
Tigecycline	0.5	128
Colistin	0.5	4096

[0059]

[0061]

5. 인간 혈청 조건에서의 안정성 및 항균 활성 확인

[0062]

P5 펩타이드의 인간 혈청 존재 하에서 안정성을 확인하기 위해 인간 혈청을 이용하여 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)하에서 항균 활성 유지 시간을 측정하였다.

[0063]

구체적으로, P5 펩타이드(실시예1)와 Melittin(비교예1)의 MIC 값인 4 μg/mL에 인간 혈청이 최종 농도 25%가 되게 처리하여 37℃에서 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180분 동안 반응 시켰다. 이후 A. 바우마니 17 2×10^5 세포/mL를 펩타이드 및 인간 혈청의 혼합물과 동일한 양으로 처리하여 1시간 동안 37℃에서 함께 반응시켰다. 이후 Mueller-Hinton 한천 배지에 도말하여 37℃에서 16-18시간 반응한 뒤 콜로니를 계수하였다. 그 결과, 표 6처럼 Melittin(비교예 1)이 MIC 4 μg/mL에서 인간 혈청과 반응 했을 때에 0분부터 A. 바우마니 17에 대한 항균 활성이 저해된 반면, P5 펩타이드(실시예1)는 MIC 4 μg/mL에서 약 30분까지 항균 활성이 유지 되었으며 60, 90분 까지도 약 2-30%의 항균 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 이로써 P5 펩타이드가 인간 혈청에서 낮은 농도에서도 일정 시간 안정성을 유지한다는 것을 확인할 수 있었다.

표 6

반응 시간 펩타이드	A. 바우마니 17 생존력(%)							
	0분	10분	20분	30분	60분	90분	120분	180분
P5	0	0	0	0	약 20-100	약 30-100	약 70-100	100
Melittin	100	100	100	100	100	100	100	100

[0064]

[0066] 6. 정상 세포주에서의 세포독성 확인

[0067] P5 펩타이드의 인간 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해 인간 각질 형성 세포주(HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)와 인간 폐 상피 세포주(A549 cell line, Korean Cell Line Bank, Jongno-gu, Seoul, 03080, Korea)를 이용하여 독성을 측정하였다.

[0068] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM, RPMI1640 배지에서 배양된 HaCaT 세포와 A549 세포를 1×10^5 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, P5 펩타이드와 Melittin 펩타이드를 각각 웰 당 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 또는 $25.0 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여, 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 24시간 후 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 0.5mg/mL MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 $100\mu\text{L}$ 를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 상층액을 제거하고, $200\mu\text{L}$ 의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹인 후, 560nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다. 그 결과, 하기 표 7처럼 $25 \mu\text{g/mL}$ 의 P5 펩타이드를 처리했을 때 HaCaT 세포는 100%, A549 세포는 79.88%의 세포 생존력을 나타내었다. 이에 반해 Melittin 펩타이드는 $25 \mu\text{g/mL}$ 를 처리했을 때 HaCaT 세포는 22.72%, A549 세포는 6.47%의 세포 생존력을 나타내어 P5 펩타이드가 $25 \mu\text{g/mL}$ 의 높은 농도에서도 Melittin 펩타이드에 비해 세포 독성이 적다는 것을 확인하였다.

표 7

펩타이드 농도($\mu\text{g/mL}$) 세포주/펩타이드		세포 생존력(%)					
		25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
HaCaT	P5	100	100	100	100	100	100
	Melittin	22.72	37.51	65.20	100	100	100
A549	P5	75.88	92.29	100	100	100	100
	Melittin	6.47	9.66	30.36	51.80	69.24	71.30

[0069]

[0071] 7. 정량적 실시간 PCR을 이용한 전염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

[0072] P5 펩타이드의 인간 세포주에서의 항염증 활성을 확인하기 위해 항생제 내성 균주(A. 바우마니 17)가 감염된 인간 폐 상피 세포 (A549)를 이용하여 항염증 활성 측정하였다.

[0073] 구체적으로, 10% FBS(소태아혈청; Fetal Bovine Serum)가 함유된 동물 세포 배양 배지인 RPMI1640에서 배양된 A549 세포를 1×10^6 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, RPMI1640로 배지를 교체해 준 뒤 다시 24시간 배양하였다. 이 후 1×10^7 세포/웰의 A. 바우마니 17 균주를 감염시키고 30분 뒤 P5 펩타

이드를 0.5, 1 또는 2 µg/mL 농도로 처리하여 10시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응시켰다. 10시간 후 TRIzol 시약 (Life Technologies)을 사용하여 세포주에서 mRNA를 분리하고, Topscript™ cDNA synthesis kit (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이어서 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Foster City, CA, USA)을 이용하여 염증 유발 유전자인 사이토카인 중 IL-6, IL-8, IL-1β 및 TNF-α의 발현과 상피성장인자수용체 유전자 EGFR의 발현양을 확인하였다. 발현 수준은 항존유전자(housekeeping gene)인 GAPDH를 기준으로 정량화 하였고, PCR 수행 과정은 95℃에서 10분; 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초, 40 사이클로 진행하였다. 그 결과, 하기 표 8처럼 완충 용액 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)만을 처리한 인간 폐 상피 세포(A549)의 mRNA 수치(표 8의 대조군)와 비교하여 A549에 A. 바우마니 17 균주를 감염시킨 경우 사이토카인 수치가 증가하였다. A549에 A. 바우마니 17 균주 감염 후 P5 펩타이드를 0.5, 1 또는 2 µg/mL 농도로 처리했을 때, 사이토카인과 EGFR 수치가 적게는 약 1.5배(IL-1β)에서 많게는 5.9배(IL-8)까지 감소한 것을 측정하였고, 이를 통해 P5 펩타이드가 항염증 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

표 8

사이토카인	A549 (Relative mRNA level)				
	대조군	A. 바우마니 17	A. 바우마니 17 + P5(0.5µg/mL)	A. 바우마니 17 + P5(1µg/mL)	A. 바우마니 17 + P5(2µg/mL)
IL-6	1	22.45	13.73	9.98	5.74
IL-8	1	65.40	32.20	34.70	11.04
TNF-α	1	16.56	7.76	6.75	5.13
IL-1β	1	3.19	2.97	2.50	2.00
EGFR	1	4.61	1.44	1.11	1.06

8. 정량적 실시간 PCR을 이용한 뮤신 유전자 발현 분석

P5 펩타이드의 인간 세포주에서 뮤신 억제 활성을 확인하기 위해 내성 균주 A. 바우마니 17이 감염된 인간 폐 상피 세포 (A549)를 이용하여 뮤신 억제 활성을 측정하였다.

구체적으로, 10% FBS가 함유된 RPMI1640에서 배양된 A549 세포를 1×10⁶ 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, RPMI1640로 배지를 교체해 준 뒤 다시 24시간 배양하였다. 이 후 24시간 동안 A. 바우마니 17를 RPMI1640 배지에서 배양한 상층액을 채취하여 이를 1/10로 희석하여 A549에 감염시키고 30분 뒤 P5 펩타이드를 0.5, 1 또는 2 µg/mL 농도로 처리하여 72시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응시켰다. 72시간 후 TRIzol 시약 (Life Technologies)을 사용하여 세포주에서 mRNA를 분리하고, Topscript™ cDNA synthesis kit (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이어서 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Foster City, CA, USA)을 이용하여 뮤신 발현 mRNA 수치를 확인하였다. 그 결과, 하기 표 9처럼 DPBS만을 처리한 인간 폐 상피 세포(A549)의 mRNA 수치(표 9의 대조군)와 비교하여 A549에 A. 바우마니 17 균주의 상층액을 처리한 경우 뮤신의 발현 수치가 증가하였다. A549에 A. 바우마니 17 균주 감염 후 P5 펩타이드를 0.5, 1 또는 2 µg/mL 농도로 처리했을 때, 뮤신 발현 수치가 약 9.5배(MUC5AC), 3.4배(MUC5B) 감소한 것을 측정하였고, 이를 통해 P5 펩타이드가 뮤신 억제 활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

표 9

뮤신	A549 (Relative mRNA level)				
	대조군	A. 바우마니 17 상충액	A. 바우마니 17 상충액 + P5(0.5μg/mL)	A. 바우마니 17 상충액 + P5(1μg/mL)	A. 바우마니 17 상충액 + P5(2μg/mL)
MUC5AC	1	24.94	6.00	5.43	2.62
MUC5B	1	3.76	1.62	1.83	1.11

[0079]

[0081] **9. 생체 내 폐 조직 치유능 측정**

[0082] P5 펩타이드의 생체 내 폐 조직 치유능을 마우스 모델을 사용하여 생체 내에서 평가했다.

[0083] 구체적으로, 6-7 주령의 BALB/c 마우스 비강을 통해 A. 바우마니 17 5×10^8 세포/20μl을 감염시켰다. 감염 6시간 후 P5 펩타이드 (1-2 mg/kg, 20μl)를 비강 주입하였다. 대조군 마우스에는 펩타이드가 없는 동량의 DPBS(20 μl)를 주입하였다. 이후 A. 바우마니 17 처리 24시간 후에 마우스의 폐 조직을 회수하였다. 폐 조직을 4% PFA 고정액에 3-7일 동안 넣어 고정한 뒤 탈수, 투명화, 파라핀 침투 과정을 수행하였다. 파라핀을 이용하여 조직 표본을 제작하고 10mm 두께로 절단하여 H&E(Hematoxylin&Eosin) 염색을 실시하였다. 그 결과, 대조군 마우스의 폐 단면에 비해 A. 바우마니 17을 감염 시킨 경우 헤마톡실린과 에오신의 염색이 더 진하게 또는 더 많은 부위에 염색 된 것을 확인할 수 있다. 이는 감염 부위에 많은 염증 유발과 용혈 작용이 일어났다는 것을 의미한다. 반면 A. 바우마니 17 감염 후 P5 펩타이드를 1mg/kg, 2mg/kg 처리 하였을 때 대조군 수준으로 염증과 용혈 작용이 회복되는 것을 확인할 수 있다(도 1 참조). 이를 통해 P5 펩타이드가 생체 내에서 내성 균주 감염시 유발되는 조직 손상을 회복시키는 효능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0085] **10. BALB/c 마우스에서 항염증 및 뮤신 억제 활성 확인**

[0086] P5 펩타이드의 BALB/c 마우스에서의 항염증 및 뮤신 억제 활성을 확인하기 위해 BALB/c 마우스에 항생제 내성 균주(A. 바우마니 17)를 비강 주입한 뒤 P5 펩타이드를 처리하여 마우스 폐에서의 항염증 및 뮤신 억제 활성을 측정하였다.

[0087] 구체적으로, 6-7 주령의 BALB/c 마우스 비강을 통해 A. 바우마니 17 (5×10^8 CFU/20μl PBS)을 감염시켰다. 감염 6시간 후 P5 펩타이드 (1-2 mg/kg, 20μl)를 비강 주입하였다. 대조군 마우스에는 P5 펩타이드가 없는 동량의 PBS(20μl)를 주입하였다. A. 바우마니 17 처리 24시간 후에 폐 조직을 회수하였다. 회수한 폐 조직을 TRIzol 시약 (Life Technologies)에 담가 균질기를 이용하여 분쇄하였다. 이후 mRNA를 분리하고, Topscript™ cDNA synthesis kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이어서 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Foster City, CA, USA)을 이용하여 염증 유발 사이토카인과 상피성장인자수용체 유전자 EGFR, 뮤신 발현 mRNA 수치를 확인하였다. 그 결과, 하기 표 10처럼 DPBS만을 처리한 마우스 폐의 mRNA 수치(표 10의 대조군)와 비교하여 마우스 비강에 A. 바우마니 17 감염시킨 경우 각 유전자의 mRNA 수치가 증가하였다. 마우스 비강에 A. 바우마니 17 감염시킨 후 P5 펩타이드를 1mg/kg 또는 2mg/kg 농도로 마우스 비강을 통해 처리했을 때 각 유전자의 mRNA 수치가 적게는 약 1.6배(TNF-α), 많게는 5.2배(IFN-γ) 감소한 것을 측정하였고, 이를 통해 P5 펩타이드가 각 유전자의 억제 활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

표 10

mRNA	BALB/c mouse lung (relative mRNA level)			
	대조군	A. 바우마니 17	A. 바우마니 17 + P5(1mg/kg)	A. 바우마니 17 + P5(2mg/kg)
EGFR	1	8.69	8.57	3.03
MUC5AC	1	8.55	12.98	2.96
MUC5B	1	4.55	5.30	1.66
TNF- α	1	24.34	20.13	15.40
IL-6	1	28.47	19.30	6.98
IFN- γ	1	5.16	2.64	1.12
IL-1 β	1	23.47	19.50	12.86

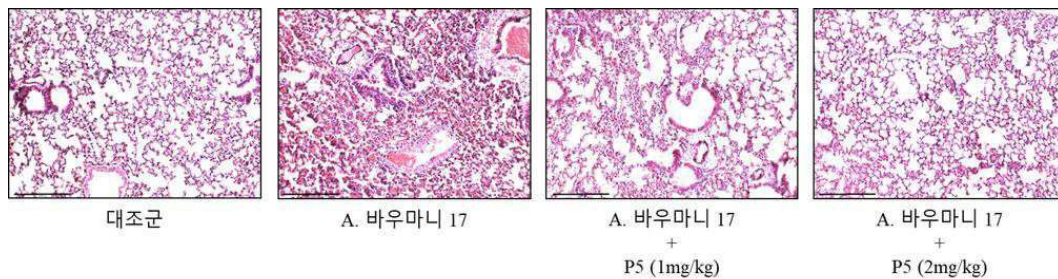
[0088]

[0090]

전술한 실험 결과처럼 P5 펩타이드는 항생제 내성균에 대한 항균 효과, 폐 염증 억제 효과, 객담을 생성시키는 주요 성분인 뮤신 발현 억제 효과 및 손상된 폐 조직의 치유 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 정상 세포에 대한 낮은 세포 독성 효과를 나타내는 바 호흡기 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

도면

도면1



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Pharmaceutical compositions for preventing and treating of inflammatory respiratory diseases comprising P5 peptide
- <130> 20P12020
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5

<400> 1

Lys Trp Lys Lys Leu Leu Lys Lys Pro Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys

1 5 10 15

Lys Leu

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Melittin

<400> 2

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu

1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

20 25