



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0142700
(43) 공개일자 2014년12월12일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 4/00 (2006.01) A61K 38/02 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7025281</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년03월07일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년09월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/054599</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/132005
국제공개일자 2013년09월12일</p> <p>(30) 우선권주장
10 2012 203 547.8 2012년03월07일 독일(DE)</p> | <p>(71) 출원인
로베르트 보쉬 게젤샤프트 뢰어 메디치니셰 포르
숨 엠베하
독일 70376 슈투트가르트 아우어바흐슈트라쎄 112</p> <p>(72) 발명자
베캄프 안
독일 70372 슈투트가르트 쾨니히칼슈트라쎄 40
슈뢰더 브른
독일 70376 슈투트가르트 잇착-라빈-슈트라쎄 7
슈탕에 에두아르트
독일 70469 슈투트가르트 합폴트슈트라쎄 71아</p> <p>(74) 대리인
양영준, 안국찬</p> |
|---|--|

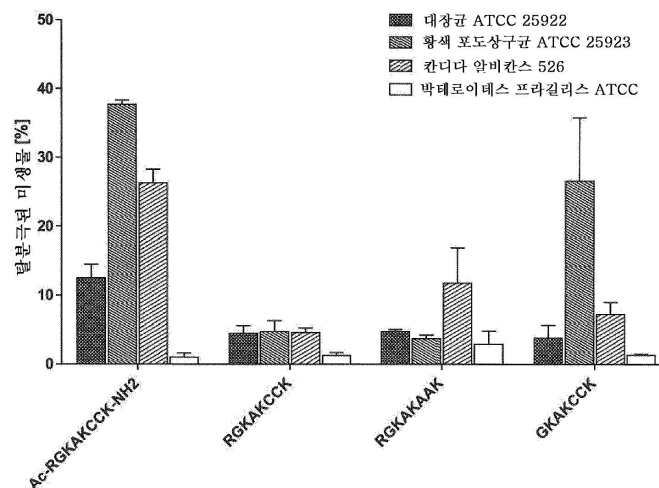
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **항균성 펩티드**

(57) 요약

본 발명은, 8개 이상의 측차 아미노산을 함유하는 신규 항균성 펩티드에 관한 것으로, 이 펩티드는 다음과 같은 화학식의 서열을 갖는다: $\text{Ter}_1\text{-X}_1\text{-B}_1\text{-X}_2\text{-B}_2\text{-X}_3\text{-Z}_1\text{-Z}_2\text{-X}_4\text{-Ter}_2$. 또한, 상기 펩티드는 변형된 말단을 가질 수도 있다. 상기 펩티드는 박테리아 또는 균류와 같은 미생물에 의해 유발되는 염증성 및 전염성 질병을 치료 또는 예방하는 데 효과적이다.

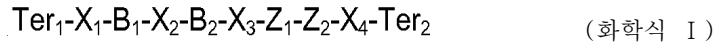
대표도



특허청구의 범위

청구항 1

C-말단 및 N-말단을 가지며, 8개 이상의, 최대 12개의 측차 아미노산으로 이루어진 항균 활성 펩티드 또는 그의 유도체이며, 상기 펩티드는 하기의 화학식 I의 서열,



을 가지며,

상기 화학식에서 Ter_1 은 N-말단 아미노산(X_1)의 유리 N-말단 아미노기이거나 변형된 N-말단 아미노기이며;

X_1 , X_2 및 X_3 은 각각 동일하거나 상이하고, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산으로부터 각각 상호 독립적으로 선택되며, 바람직하게는 다음 물질들, 즉 아르기닌, 리신, 6-하이드록시라이신, 호모아르기닌, 2,4-디아미노부티르산, [베타]-호모아르기닌, D-아르기닌, 아르기날, 2-아미노-3-구아니디노프로피온산, 니트로아르기닌, N-메틸-아르기닌, [엡실론]-N-메틸리신, 알로-하이드록시라이신, 2,3-디아미노프로피온산, 2,2'-디아미노피멜린산, 오르니틴, 대칭-디메틸아르기닌, 비대칭-디메틸아르기닌 중 하나에서 선택되며,

B_1 및 B_2 는 동일하거나 상이하고, 각각 지방족 또는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산이며, 바람직하게는 알라닌 또는 글리신으로부터 선택되며,

Z_1 및 Z_2 는 각각 시스테인이거나, 시스테인과 알라닌이며,

Ter_2 는 C-말단 아미노산(X_4)의 유리 C-말단 카르복실기이거나, 변형된 C-말단 카르복실기인, 펩티드 또는 그의 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 8개의 측차 아미노산으로 이루어지며, 화학식 I의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 펩티드 또는 그의 유도체에 있어서, SEQ ID No. 1 내지 6 또는 그의 유도체 중 하나로부터 선택되며, 상기 유도체는 하나 이상의 아미노산을 이 아미노산의 유도체로 교체함으로써 형성되는 것을 특징으로 하는, 펩티드 또는 그의 유도체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, D-아미노산 또는 L-아미노산 또는 이들의 혼합물로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단 및/또는 N-말단에 있는 펩티드가 아세틸화, 아미드화, 포르밀화, 포스포릴화에 의해 변형되는 것을 특징으로 하는, 펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드를 항균 물질로서 사용하고, 그리고/또는 소독제나 세척제에 사용하는, 펩티드의 용도.

청구항 7

제6항에 있어서, 미생물에 의해 유발되는 염증성 또는 전염성 질병을 치료하기 위해, 그리고/또는 예방하기 위해 사용하는, 펩티드의 용도.

청구항 8

제7항에 있어서, 염증성 또는 전염성 질병은 박테리아, 바이러스 또는 균류인 미생물에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는, 펩티드의 용도.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 또는 전염성 질병은 *비피도박테리움* 종, *락토바실루스* 종, *대장균*, *스트렙토코쿠스* 종, *포도상구균* 종, *박테로이데스* 종, *칸디다* 종, *슈도모나스* 종, *프로피오니박테륨* 종, *트레포네마* 종으로부터 선택된 미생물에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는, 펩티드의 용도.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 또는 전염성 질병은 만성적인 염증성 장 질병, 구강/인두강의 염증성 질병, 폐 질병, 비뇨 생식로 질병, 궤장 질병, 여성 생식기 질병, 피부의 질병이나 상처 또는 화상 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 펩티드의 용도.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 펩티드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 제약 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 펩티드를 위해 코딩된 폴리뉴클레오타이드.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 항균성 펩티드와, 의료분야에서의 상기 항균성 펩티드의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 축약해서 "AMP"로도 명명되는 항균성 펩티드는 자연적인 면역 체계의 부분이며, 미생물의 전염에 대한 상피 방어를 위해 대단히 중요하다.

[0003] 건강한 사람의 경우에는 피부 및 점막이 미생물에 의한 전염에 대하여 물리적인 장벽을 형성한다. 이 물리적인 장벽은 건강한 피부 내에서는 각질층으로 이루어지고, 점막 내에서는 점액층으로 이루어지며, 이 점액층 내에서는 낙설 및 점액질 분비가 표면의 영구적인 재생을 유도하는 동시에 표면에 달라붙는 미생물의 연속적인 제거를 유도한다. 피부 내부에 또한 존재하는 지질과의 상호 작용 하에서 상기 물리적인 장벽은 미생물이 살아 있는 표피 내부로 침투하는 것을 방지해준다.

[0004] 하지만, 상기와 같은 물리적인 장벽 이외에 건강한 피부 및 점막의 성공적인 감염 방어를 위해서는 추가의 인자들도 반드시 필요한데, 이와 같은 추가 인자들에는 다른 무엇보다도 내생적인 항균성 펩티드가 속한다. 따라서, 예컨대 리소자임은 코 분비물 내에 존재하여 특히 그람 양성적인 박테리아를 사멸시킬 수 있는 항균성 펩티드이다. 또한, 장점막 내에서는 디펜신이 항균성 펩티드로서 공지되어 있으며, 상기 디펜신의 존재는 특히 장 표피가 매우 많은 양의 박테리아에 노출되었다는 전제하에서 필수적으로 나타난다. 미생물이 침투하기 어려운 점액층 외에, 장점막 내에서는 파네트 세포가 발견될 수 있는데, 이 파네트 세포는 사람의 디펜신-5를 분비하고, 다른 무엇보다도 장점막의 영구적인 재생을 위해서 중요한 줄기 세포를 보호해준다.

[0005] 추가의 공지된 AMP는 서라이어신으로서 공지된 펩티드, 그리고 효과적이고 내생적이며 광범위하게 사용되는 사람의 항균 물질인 RNase-7이다.

[0006] 공지된 내생적인 항균성 펩티드 외에도 선행 기술에 수많은 항균 물질이 공지되어 있는데, 이들 항균 물질은 생물학적 근원의 물질뿐만 아니라 합성적으로 제조된 물질도 해당하며, 따라서 이들 물질은 - 원래의 의미에서와 같이 - 자연적으로 형성된, 균류 또는 박테리아의 저분자 대사 산물이거나 화학적으로 합성된 치료제이다.

[0007] 특히 천연 및 합성 항균 물질에 대한 내성의 발생이 미생물로 인한 전염병의 치료를 점점 더 어렵게 만든다는

점에 근거하여, 부작용이 적고 제조 및 처리가 간단한 것을 특징으로 하는 새로운 항균 활성 제제에 대한 요구도 주기적으로 대두된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 근거하여 본 발명의 과제는, 미생물로 인한 전염성 질병을 치료하는 데 사용될 수 있는 새로운 항균성 물질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제는 본 발명에 따라, C-말단 및 N-말단을 가지며, 8개 이상의, 그리고 최대 12개의 측차 아미노산으로 이루어진 항균 활성 펩티드에 의해 해결되며, 상기 펩티드는 하기의 화학식 I의 서열을 갖는다.

[0010] $\text{Ter}_1\text{-X}_1\text{-B}_1\text{-X}_2\text{-B}_2\text{-X}_3\text{-Z}_1\text{-Z}_2\text{-X}_4\text{-Ter}_2$ (화학식 I)

[0011] 상기 화학식에서,

[0012] Ter_1 은 N-말단 아미노산(X_1)의 유리 N-말단 아미노기이거나 변형된 N-말단 아미노기이며,

[0013] X_1 , X_2 및 X_3 은 각각 동일하거나 상이하고, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산으로부터 각각 상호 독립적으로 선택되며, 바람직하게는 다음 물질들, 즉 아르기닌, 리신, 6-하이드록시라이신, 호모아르기닌, 2,4-디아미노부티르산, [베타]-호모아르기닌, D-아르기닌, 아르기닌, 2-아미노-3-구아니디노프로피온산, 니트로아르기닌, N-메틸-아르기닌, [엡실론]-N-메틸리신, 알로-하이드록시라이신, 2,3-디아미노프로피온산, 2,2'-디아미노피렐린산, 오르니틴, 대칭-디메틸아르기닌, 비대칭-디메틸아르기닌 중 하나에서 선택되며,

[0014] B_1 및 B_2 는 동일하거나 상이하고, 각각 지방족 또는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산이며, 바람직하게는 알라닌 또는 글리신으로부터 선택되며,

[0015] Z_1 및 Z_2 는 각각 시스테인이거나, 시스테인과 알라닌이며,

[0016] Ter_2 는 C-말단 아미노산(X_4)의 유리 C-말단 카르복실기이거나, 변형된 C-말단 카르복실기이다.

[0017] 여기서, 펩티드는 8개의 아미노산으로 이루어지고 화학식 I의 서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0018] Z_1 및 Z_2 는 앞에서 이미 언급된 바와 같이 각각 시스테인이거나, 시스테인과 알라닌, 다시 말해 Z_1 이 시스테인이면 Z_2 는 알라닌이고, Z_1 이 알라닌이면 Z_2 는 시스테인이다.

[0019] 본원에서 펩티드는 바람직하게 합성적으로 제조되고, 제조합형으로 제조되며, 효소 분열에 의해 획득 및/또는 분리된다. 본 발명에 따른 펩티드로서는 상대적으로 짧은 펩티드가 사용되기 때문에, 본 발명에 따른 펩티드가 합성적으로 제조되는 경우가 바람직하다; 합성적인 제조 방법은 선행 기술에 충분히 공지되어 있으며, 특히 액체상 및 고체상 화학적인 합성 방법을 포함한다. 종설(review article)/표준 작업인 S. Kent 저, "Chemical Synthesis of Peptides and Proteins", Annual Review of Biochemistry 57: 957-989(1988)가 예로서 참조된다. 현재 관련 분야에서는 합성 펩티드를 상업적으로 제조하는 수많은 회사가 활동하고 있기도 하다.

[0020] 화학식 I의 8개의 아미노산 이외에 본 발명에 따른 펩티드는 N-말단뿐만 아니라 C-말단에도 본 발명에 따른 펩티드의 효과 및 안정성에 악영향을 전혀 미치지 않거나 약간만 미치는 추가의 아미노산을 더 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 펩티드의 구조에서 출발할 때, 8개의 아미노산으로 이루어진 펩티드에서와 동일하거나 매우 유사한 항균 효과에 도달할 수 있기 위해 어떤 아미노산 혹은 아미노산 잔기를 C-말단 또는 N-말단에 추가로 부가할 수 있는지는 당업자가 용이하게 알 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 펩티드는 발명자의 자체 실험에서 일련의 박테리아 균주 및 균류 균주에 대하여 매우 효과적이라고 입증되었다.

[0022] 여기서 "펩티드"라는 용어는 각각 펩티드 결합을 통해 상호 결합된 아미노산의 서열을 의미하며, 이때 아미노산은 바람직하게 자연적으로 발생하는 20개의 아미노산으로부터 선택되고, 그 안에서 아미노산은 L-배열 형태(configuration) 또는 D-배열 형태로 존재할 수 있다. 그렇기 때문에 상기 펩티드에 대하여 대안적으로 그리고

상기 펩티드의 작용 방식 및 구조로부터 출발할 때에는, 본 발명에 따라 본 발명에 의해서도 포함되는 펩티도미메틱(peptidomimetic; 펩티드 유사 물질)도 제조될 수 있다. 본 경우에 펩티도미메틱은 규정에 따라 저분자 화합물이며, 이 화합물의 필수적인 구조 요소들은 본 발명에 따른 펩티드를 기본으로 한다. 이때 본 발명에 따른 펩티드는 예를 들어 분리, 합성 또는 제조함된 상태로 존재할 수 있거나 상응하는 형태로 제공될 수 있다.

[0023] 여기서 "항균성"이라는 용어는 미생물의 번식 능력 또는 전염력을 감소시킬 수 있는 특성, 또는 미생물을 사멸시키거나 비활성화하는 특성을 의미한다. 이때 "미생물"이란 육안으로는 대부분 확인할 수 없는 현미경적으로 작은 유기체 혹은 단위체(unit)로 이해되며, 본 경우에 미생물은 특히 다른 유기체, 특히 사람 또는 다른 포유동물 내부에서 건강에 유해한 과정(질병)을 야기하는 박테리아, 바이러스 및 균류로 이해된다.

[0024] 바람직한 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 펩티드는 SEQ ID No. 1 내지 6 또는 이들의 유도체로부터 선택되며, 이 경우 유도체는 하나 이상의 아미노산을 상기 아미노산의 유도체로 교체함으로써 형성된다. 본 실시예에서는 특히 다음과 같은 펩티드가 선호된다: 서열 RGKAKCKK(SEQ ID No. 1)를 갖는 펩티드, 서열 RGKAKCAK(SEQ ID No. 2)를 갖는 펩티드 및 RGKAKACK(SEQ ID No. 3)를 갖는 펩티드가 선호되며, 특히 변형되지 않은 형태의, 다시 말해 변형되지 않은 말단을 갖는 펩티드 또는 변형된 형태의, 다시 말해 하나 이상의 변형된 (C- 또는 N-)말단을 갖는 펩티드 또는 변형된 N-말단 및 변형된 C-말단을 갖는 변형된 형태의 펩티드가 선호된다(SEQ ID NOs. 4, 5 및 6 참조).

[0025] 본 실시예에서 "상기/일 아미노산의 유도체"라는 용어는 개별 아미노산으로부터 유도되는 모든 아미노산 잔기로 이해될 수 있으며, 이들 아미노산 잔기는 개별 아미노산으로부터 예를 들어 일 작용기의 구조적인 변경에 의해서 얻어진다.

[0026] 본 실시예에서 "변형된 N-말단 아미노기" 및 "변형된 C-말단 카르복실기"라는 용어는 변형된 아미노기 또는 카르복실기로 이해된다. N-말단 변형에 대한 예들은 아세틸화, 포르밀화 또는 구아닐화 N-말단들이다. C-말단 변형에 대한 예들은 아미드화 C-말단들이다.

[0027] 본 실시예에서는 특히 펩티드가 각각 전체적으로 D-아미노산 또는 L-아미노산으로 이루어지거나 이들의 혼합물로 이루어지는 경우가 선호된다. 본 실시예에서 "D-아미노산" 또는 "L-아미노산"이란 사용될 천연 아미노산, 비천연 아미노산 또는 (이미노산과 같은) 아미노산 유도체가 L-배열 형태 또는 D-배열 형태로 존재할 수 있다는 것을 의미한다.

[0028] 또 다른 한 실시예에 따르면, C-말단 및/또는 N-말단에 있는 펩티드가 변형되는 경우, 특히 아세틸화, 아미드화, 포르밀화 또는 구아닐화에 의해서 변형되는 경우가 선호된다.

[0029] 본 발명에 따른 펩티드의 C-말단 및/또는 N-말단의 변형은, 이와 같은 변형에 의해서 이들 말단이 펩티다아제 및 프로테아제에 의한 분해에 대하여 더욱 안정적으로 된다는 장점을 갖는다; 이로써 본 발명에 따른 펩티드는 예를 들어 혈청 내에서 연장된 반감기(half-life time)를 갖게 된다. N-말단 및 C-말단의 변형은 또한 예컨대 다른 아미노산 서열 또는 다른 생체 분자와 같은 다른 기에 대한 펩티드의 결합도 허용한다.

[0030] 본 발명에 따른 펩티드의 또 다른 한 실시예에서, 펩티드는 환원되거나 산화된 상태로 존재한다.

[0031] 본 발명에 따르면, 펩티드는 미생물에 의해 유발되는 염증성 및/또는 전염성 질병의 치료 및/또는 예방을 위해 사용된다.

[0032] 그렇기 때문에 본 발명에 따라, 박테리아, 바이러스 또는 균류에 의해 유발되는 염증성 및/또는 전염성 질병에 사용된다.

[0033] 특히 본 발명에 따른 사용은 *비피도박테리움* 종(*Bifidobacterium* sp.), *락토바실러스* 종(*Lactobacillus* sp.), *대장균*(*Escherichia coli*), *스트렙토코커스* 종(*Streptococcus* sp.), *포도상구균*(*Staphylococcus* sp.), *박테로이데스* 종(*Bacteroides* sp.), *칸디다* 종(*Candida* sp.), *슈도모나스* 종(*Pseudomonas* sp.), *프로피오니박테리움* 종(*Propionibacterium* sp.), *트레포네마* 종(*Treponema* sp.), *엔테로박터* 종(*Enterobacter* sp.), *살모넬라* 종(*Salmonella* sp.), *레지오넬라* 종(*Legionella* sp.)으로부터 선택된 미생물에 의해 유발되는 염증성 또는 전염성 질병에서 실현되며, 이때 상기의 나열이 끝이 아니며, 여기에 언급되지 않은 박테리아 균주 및/또는 균류 균주에 대해서도, 특히 일반적으로 나이세리아과, 장내 세균과에 속하는 박테리아에 대해서도 펩티드가 효과적이라는 점은 자명하다.

[0034] 본원에서는 특히 만성적인 염증성 장 질병, 예를 들어 카리에스(caries) 및 잇몸 염증과 같은 구강/인두강의 염증성 질병, 폐 질병, 비뇨 생식로의 질병, 췌장의 질병, 여성 생식기 질병, 피부 질병 및/또는 피부 상처(피부

학적 질병)에서 본 발명에 따른 펩티드의 사용이 이루어지는 것이 바람직하다.

- [0035] 그에 상응하게, 본 발명은 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드를 구비하는 제약 조성물 그리고 경우에 따라서는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier) 및 선행 기술에서 통상적인 추가의 제형제 및 보조제, 그리고 미생물에 의해 유발되는 염증성 전염성 질병으로 고통받는 포유 동물을 치료하기 위한 방법과도 관련이 있으며, 이 방법에서는 본 발명에 따른 펩티드 또는 본 발명에 따른 제약 조성물이 치료상으로 효과적인 양만큼 투여된다. 본원에서 "치료상으로 효과적인" 또는 "치료상으로 효과적인 양"이라는 표현은 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드의 양, 또는 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드를 구비하고 박테리아 및/또는 균류의 증식 및 군체 형성(colony formation)을 감소시킬 수 있거나, 완전히 방지할 수 있거나 또는 측정 가능한 치료 차원의 혹은 예방 차원의 성공에 도달할 수 있는 제약 조성물의 양을 의미한다. 대상을 위한 정확한 효과적인 양은 그 대상의 크기 및 건강 상태, 질병의 유형 및 정도 그리고 하나 이상의 펩티드 혹은 제약 조성물 또는 전달된 복수의 조성물의 조합에 의존한다.
- [0036] 본 발명의 제형/약은 *생체 외에서(in vitro)* 또는 *생체 내에서(in vivo)* 적용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 제약 조성물은 선택된 투여 경로, 즉 비경구 투여 경로, 경구 투여 경로, 복강내 투여 경로, 경피성 투여 경로 등에 적용된 수많은 형태로 환자에게 투여될 수 있다. 이 경우 비경구 투여는 다음과 같은 경로로의 투여를 포함한다: 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 세포 조직 내 투여, 동맥 내 투여, 피하 투여, 활액 내 투여, 경피 내 투여를 포함하는 상피 내 투여, 흡입을 통한 폐 내부 투여, 안과식 투여, 혀 밑 및 볼 주변에 투여, 안구 내 투여를 포함하는 국소적 투여, 피부 내 투여, 안구 내 투여, 직장 내 투여 그리고 흡입제를 통한 비강 흡입.
- [0038] 본원에서 투여는 용액, 팅크제(tincture), 연고, 분말, 현탁액, 크림의 형태 및 추가의 고체 또는 액체 제형의 형태로 그리고 정제, 캡슐, 스프레이로서 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 펩티드로써 혹은 이와 같은 펩티드를 함유하는 약으로써 치료될 수 있는 피부 질병에는 예를 들어 여드름, 피부염, 화상 및 미생물에 의해 야기되거나 미생물 감염의 위험이 존재하는 피부 손상의 경우에 나타나는 다른 피부 질병이 속한다.
- [0040] 바람직한 일 실시예에 따르면, 의학 조성물은 피부를 통해서 또는 피부를 경유해서 투여되며, 이와 같은 투여 방식은 비침습적이고 환자 친화적인 투여 방식이고, 경구 투여 방식에 대하여 소화 기관 내에 있는 매질이 고려될 필요가 없다는 장점을 갖는다. 피부를 통한 수용은 예를 들어 코와 뺨 내에서, 혀 밑에서, 잇몸에서 또는 질 내에서 가능하다. 상응하는 투여제는 공지된 기술에 의해서 달성될 수 있다; 이 투여제는 점비약, 비강 분무액, 삽입물, 필름, 패치, 젤, 좌약, 연고 또는 정제로 가공될 수 있다. 바람직하게 피부를 통한 흡수를 위한 첨가제는 하나 또는 복수의 성분을 함유할 것이며, 이(들) 성분은 피부에 달라붙어서 흡수할 표면과 투여제의 접촉 시간을 연장시키고 이로 인해 흡수를 통한 수용을 증가시킨다. 따라서, 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드는 예를 들어 피부 속으로의 펩티드의 침투를 지원하는 리포솜으로 형성될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 펩티드는 또한 구강/인두강의 질병을 치료하기 위해서도 사용될 수 있으며, 이와 같은 사용 예에서는 치약, 구강 청결제, 젤 및/또는 예를 들어 치실의 형태로 존재할 수 있다.
- [0042] 앞에서 이미 언급된 바와 같은 제약 조성물은 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드 외에 2개 이상의 본 발명에 따른 펩티드를 함유할 수도 있다. 또한, 제약 조성물은 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드 외에 예를 들어 선행 기술에 공지된 항균 물질(예컨대 스트렙토마이신, 페니실린, 테트라실린)와 같은 하나 또는 복수의 추가 활성 물질 또는 살진균제, 예를 들어 마이코나졸과 같은 항미생물적으로 작용을 하는 다른 화합물, 또는 예를 들어 열 또는 피부 발진과 같이 감염에 의해 통상적으로 야기되는 증상들을 치료하는 다른 물질을 더 구비할 수도 있다.
- [0043] 그 외에, 약은 또한 약제학적으로 허용되는 담체, 결합제, 첨가제, 보조제도 구비할 수 있다. 의약적인 담체, 첨가제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준화된 의약적 실시와 관련해서 실행될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체로서는 무엇이 개별 복용량(dosage)에 가장 적합한지에 따라서 그리고 그와 동시에 펩티드와 화합할 수 있는지의 여부에 따라서 용제, 증량제 또는 분산 보조제 혹은 현탁 보조제와 같은 다른 액상 결합제, 표면 활성제, 등장성(isotonic) 활성제, 농후화제 또는 유화제, 방부제, 캡슐화제(encapsulating agent), 고체 결합 물질 또는 슬립제(slip agent)가 사용될 수 있다. 의약적인 조성물은 또한 완충제, 희석제 및/또는 첨가제를 더 포함할 수 있다. 적합한 완충제는 예를 들어 트리스-HCL, 글리신 및 인산염을 함께 포함하고, 적합한 희석제는 예를 들어 수성 NaCl-용액, 락토스 또는 만니톨을 함께 포함한다. 적합한 첨가제는 예를 들어

세제, 용제, 산화 방지제 및 방부제 그리고 예를 들어 상동 알부민 또는 생체에 적합한 히드로젤과 같은 보호 콜로이드를 함께 포함한다. 이와 같은 추가 구성 요소에 대한 개관은 예를 들어 A. Kibbe: "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 제3판, 2000년, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press에서 발견된다.

- [0044] 또한, 본 발명에 따른 의약적인 조성물은 약제학적으로 허용되는 염, 예컨대 무기산의 염, 염화수소산염, 브롬화수소산염, 인산염, 황산염과 같은 무기산의 염 및 그와 등가의 염을 구비할 수도 있다; 그러나 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트와 같은 유기산의 염 및 그와 등가의 염도 구비할 수 있다.
- [0045] 일반적으로, 의약적으로 효과적인 매일 복용량은 추측하건대 치료를 받을 대상의 체중의 0.01 내지 50mg/kg의 범위 안에, 바람직하게는 0.1 내지 20mg/kg의 범위 안에 놓인다. 마찬가지로 앞에서 이미 언급한 바와 같이, 약은 개별적으로 투여될 수 있거나 그 중에 2개 이상이 동시에 투여될 수 있는 정제 또는 캡슐의 형태로 제공될 수 있다. 약은 또한 분리가 지연된 제형의 형태로 제공될 수도 있다.
- [0046] 통상적으로는, 의사가 특정 환자의 나이, 체중 및 일반적인 건강 상태를 고려해서 그 특정 환자에게 적합한 실 제 복용량을 결정하게 된다.
- [0047] 적용 예에 따라, 약은 흡입에 의해서, 좌약 또는 페서리(pessary)의 형태로, 국소적으로는 용액, 로션, 연고, 크림 또는 루스 파우더(loose powder)로서, 스킨 패치를 사용해서, 입을 통해서 정제의 형태 또는 경우에 따라 향미제 또는 착색제를 함유하는 캡슐, 엘릭서(elixir), 용액 또는 현탁액의 형태로 투여될 수 있다.
- [0048] 감염을 치료하기 위해서 사용되는 의약적인 용도 이외에, 하나 이상의 본 발명에 따른 펩티드는 또한 표면 또는 대상을 소독 또는 세척할 목적으로 사용될 수 있는 소독제 또는 세척제에도 사용될 수 있다. 다른 적용 분야는 포장 분야로서, 이와 같은 분야에서 펩티드는 포장 재료상에 결합될 수 있거나 그 내부에 결합될 수 있거나, 또는 미생물에 의해서 쉽게 분해될 수 있는 다른 재료들을 위한 방부제로서 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 펩티드를 사람의 치료에 사용하는 용도 이외에, 가축 의학에 사용하는 것도 가능하다.
- [0050] 본 발명은 또한 분리된 핵산 분자와도 관련이 있으며, 이 핵산 분자의 서열은 본 발명에 따른 펩티드를 위해서 그리고 특히 SEQ ID No. 1 내지 6을 갖는 펩티드를 위해서 코딩되며, 이때 본 발명에 따른 항균성의, 즉 항-박테리아성의 또는 항진균성의 펩티드 또는 코딩되는 핵산은 숙주 세포 내에서 제어되는 발현을 갖는 조절적인 서열과 기능적으로 결합되어 있다. 본 발명의 추가의 대상은 전술된 핵산 분자에 의해서 형질 주입되거나 형질 변환되는 숙주 세포이다.
- [0051] 추가의 장점들은 이하의 설명 부분 그리고 첨부된 도면에서 드러난다.
- [0052] 전술된 그리고 이하에서 더 설명될 특징들은 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 각각 지시된 조합 형태로뿐만 아니라 다른 조합 형태로 또는 단독으로도 사용될 수 있음을 자명하다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 본 발명의 실시예들은 각각의 도면에 도시되어 있고, 이하의 설명 부분에서 상세하게 설명될 것이다:

도 1은 *비피도박테리움 아돌레센티스*(*Bifidobacterium adolescentis*) 또는 *대장균*(*Escherichia coli*) 박테리아와 관련된 다양한 펩티드[헵타펩티드 (a); 옥타펩티드 (b) (c)]의 항균 작용에 대한 검사 결과를 보여준다. 문자는 단자모 코드 내에 있는 아미노산을 지시한다. 펩티드 ac-RGKAKCCK-NH₂(c)(SEQ ID No. 4)는 아세틸화 아미노-말단 및 아마이드화 카르복시-말단을 갖는다. 억제환(inhibition zone)의 직경은 항균 활성을 나타낸다; 이때 2.5mm의 직경은 한천 평판 내부에 천공된 빈 웰(well)의 직경이며, 상기 웰은 단지 분산매(carrier fluid)만을 함유한다(음성 대조군). 본 실험은 3회 이상 반복되었고, 평균값 + 표준 편차가 도시되어 있다;

도 2는 본 발명에 따른 펩티드를 상이한 병원체에 대한 항균 물질로서 사용한 다양한 실시예들의 검사를 보여준다: 다음과 같은 펩티드가 검사되었다: 변형된 옥타펩티드(SEQ ID No. 4), 야생형 옥타펩티드(SEQ ID No. 1), 알라닌-돌연변이 옥타펩티드(SEQ ID No. 7) 및 헵타펩티드(SEQ ID No. 8)(각각 50μg/ml)가 *대장균*, *포도상구균*, *칸디다 알비칸스*(*Candida albicans*) 및 *박테로이데스 프라길리스*(*Bacteroides fragilis*)에 대한 유세포 항균 효과 분석법(flow cytometric antimicrobial effectiveness assay)으로 테스트 되었다. 문자는 재차 단자모 코드 내에 있는 개별 아미노산을 지시한다. 본 시험은 2중 배치(double batch) 내에서 2회 반복되었고, 평균값 + 표준 편차가 도시되어 있다;

도 3은 D-아미노산으로 이루어진 본 발명에 따른 옥타펩티드의 검사 결과를 *대장균 K12* (a) 혹은 *비피도박테리움 아돌레센티스* (b)에 대하여 L-아미노산으로 이루어진 옥타펩티드와 비교해서 보여준다;

도 4는 방사선 확산 분석법(Radial diffusion assay)에서 병원성 박테리아 및 균류에 대한 본 발명에 따른 다양한 옥타펩티드의 활성에 대한 추가의 검사 결과를 보여준다; 그리고

도 5는 장내 세포계인 CaCo-2에 대한 옥타펩티드의 세포 독성에 대한 검사 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 도입부에 언급된 바와 같이, 항균성 펩티드(AMP)는 거의 모든 유기체로부터 생성되고, 미생물 감염에 대한 제1장벽이 된다. 많은 AMP가 그람 양성적인 박테리아에 대해서뿐만 아니라 그람 음성적인 박테리아에 대해서도, 그리고 균류 및 외피를 갖는 몇몇 바이러스에 대해서 항균성의 활성을 갖는다. 사람은 상이한 부류의 AMP를 생성하며, 이 경우 그 중에 하나는 앞에서 이미 언급된 바와 같이 디펜신이다. 디펜신은 자체 크기가 작고(3 내지 5 kDa), 하나의 순 양전하 및 6개의 보존된 시스테인 잔기를 구비하는 것을 특징으로 하며, 이들 시스테인 잔기는 3개의 디설피드 브리지를 통해 상호 연결되어 있다. 상기 브리지의 연결성에 따라서 디펜신은 알파-디펜신 및 베타-디펜신으로 세분된다. 지금까지는 단지 4개의 베타-디펜신(hBD-1 내지 hBD-4)만 기능적으로 검사되었으며, 다른 무엇보다도 항생 작용을 하는 후보자로서도 검사되었다.

[0055] 하지만, 앞에서 이미 언급된 바와 같이, 3개의 천연 디설피드 브리지를 구비하는 베타-디펜신의 화학적인 합성은 하나의 큰 도전이며, 이와 같은 도전은 비용뿐만 아니라 제조 방법의 복잡성과도 연관되어 있다.

[0056] 본 발명에 의해서 최초로 제공된 펩티드는, 2개의 유리 시스테인유리 시스테인하에서 기술되는 검사 결과가 보여주는 바와 같이 항균 활성에 있어서 hBD-1에 비해 그리고 hBD-1의 C-말단으로부터 선택된 더 짧은 펩티드 서열에 비해 우수하다고 입증된 디펜신 hBD-1의 C-말단부의 옥타펩티드이다.

[0057] 박테리아 균주 및 균류 균주

[0058] 박테리아 균주 *비피도박테리움 아돌레센티스* Ni3, 29c(임상적 고립), *비피도박테리움 브레브* PZ1343, *비피도박테리움 룡검* DSM 20219T(임상적 고립), *락토바실루스 아시도필루스*(*Lactobacillus acidophilus*) PZ1138(임상적 고립), *락토바실루스 퍼멘툼*(*Lactobacillus fermentum*) PZ1162(임상적 고립) 및 *스트렙토코쿠스 살리바리우스* spp. *테르모필루스*(*Streptococcus salivarius* spp. *termophilus*) DSM20617은 Ardeypham(독일)에 의해 획득되었고, *박테로이데스 불가투스*(*Bacteroides vulgatus*) DSM1447은 DSMZ(Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen, 독일 미생물 보존 센터)에 의해서 제공되었다. *칸디다 알비칸스*(*Candida albicans*) 균주 526은 배설물로부터 분리되었고, 진단검사의학원인 클리닉 암 아이허르트(Klinik am Eichert) 병원(독일 괴핑엔 소재)에 의해서 제공되었다. 미국 미생물 보존 센터(American Type culture Collection, ATCC)의 표준균주인 *대장균* ATCC25922, *황색포도상구균*(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923, 및 *박테로이데스 프라길리스*(*Bacteroides fragilis*) ATCC25285는 독일 진단검사의학원인 클리닉 암 아이허르트 병원(독일 괴핑엔 소재)에 의해 제공되었다. 또한, 균주 *엔테로코쿠스 파에칼리스*(*Enterococcus faecalis*) ATCC29212, *칸디다 알비칸스* ATCC 10231 및 *녹농균*(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853이 테스트 되었으며, 이들은 지시된 ATCC-번호로 American Type Culture Collection에서 획득될 수 있다.

[0059] 펩티드

[0060] 사람의 베타-디펜신은 일본 오사카에 소재하는 Peptide Institute Inc.에 의해서 제공되었다; 카르복시-말단 헵타펩티드 및 옥타펩티드 그리고 환원된 hBD-1은 화학적으로 합성되었다(독일, EMC Micro Collections Tuebingen).

[0061] 항균 분석법

[0062] 혐기성 박테리아에 대한 항균 방사선 확산 분석은 앞에서 기술된 바와 같이 실시되었다[Schroeder 외: "Reduction of disulfide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1", *Nature*, 469: 419-423 (2011) 참조]. 간략하게 말하자면, 박테리아는 혐기성으로 배양되었고(Oxoid AnaeroGenTM, 영

국), 특히 37℃에서 24시간 동안 콜럼비아-한천 평판 상에 올려졌으며, 그 다음에 액체 TSB["액체 배지 (trypticase soy broth)"] 매질 내부에 접종되었고, 재차 24 시간 동안 배양되었다. 그 다음에 이어서 박테리아 배양균이 세척되었고, 광학 밀도(OD_{620nm}) = 0.1로 희석되었으며, 그 중에서 $150\mu l$ 는 효과 분석을 위해 사용되었다. 배양(incubation)은 0.3mg/ml의 TSB-분말을 함유하고 pH-값이 7.4인 10ml 10mM 인산나트륨 및 0 또는 2mM의 디티오프레이톨(DTT, Sigma Aldrich)을 함유하는 1%(w/V)의 낮은 EEO-아가로오스(매우 낮은 EEO-값을 갖는 아가로오스)(Appli-Chem) 내에서 이루어졌으며, 특히 혐기성 조건 하에서 $1\mu g$ 의 산화된 합성 hBD-1(Peptide Institute, 일본) 또는 합성 펩티드를 이용하여 3시간에 걸쳐서 이루어졌다. 플레이트 상에는 6%(w/v) TSB-분말, 1% 아가로오스 및 10mM 인산나트륨 완충제(pH-값 7.4 또는 5.7)를 함유하는 오버코팅 젤이 DTT가 있는 상태에서 또는 DTT가 없는 상태에서 제공되었다. 37℃에서 48시간 동안 배양한 후에 금지 구역의 직경이 측정되었다. 본 시험은 3회 이상 반복되었다.

[0063] 박테리아 및 균류의 막 탈분극(membrane depolarization)을 측정한 유세포 항균 분석법은 앞에서 기술된 바와 같이 실시되었다[Nuding 외, "A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts," Journal of Microbiological Methods, 65: 335-380 (2006) 참조]. 간략하게 말하자면, ml당 1.5×10^6 개의 세포가 1:6으로 희석된 Schaedler 매질이 37℃에서 펩티드에 의해 $50\mu l$ 의 최종 부피로 배양되었다. 디펜신은 0.01%의 아세트산 내에서 용해되었고, 최종 농도가 지시된 박테리아-/균류 현탁액에 첨가되었다. 이때 용제(0.01%의 아세트산)로 배양된 박테리아- 또는 균류 현탁액은 생존 능력을 위한 제어 부로서 이용되었다. 90분 후에 상기 현탁액이 1mg/ml의 막 전위 민감성 염료인 DiBAC4 (3)([bis-(1,3-디부틸바비투레이트)트리메탄 옥소놀])(Invitrogen, 미국)를 이용해서 배양되었다. 현탁액이 원심 분리되었고, 침전물이 300ml 인산염 완충된 염분 내에서 재부유되었다. 현탁액 내에서 탈분극된 형광 박테리아 또는 균류의 백분율은 FACSCalibur-유세포 분석기(Becton-Dickinson, 미국)를 이용하여 Cell Quest Software(Becton-Dickinson)를 사용해서 결정되었다. 본 시험은 2회 이상 반복되었는데, 특히 각각 중복된 형태로 반복되었다.

[0064] HPLC-분석

[0065] HPLC("High Performance Liquid Chromatography")에 의한 분석을 위해 옥타펩티드가 0.1%(v/v) 트리플루오로아세트산(TFA)과 혼합되었고, Agilent 1200 시스템(Agilent) 및 "Synergi reversed phase"(RP) 칼럼(250 x 4.6mm, $4\mu m$, Phenomenex, 독일)에 의해서 분석되었다. 구배는 25℃ 및 0.8ml/분의 조건에서 24분 안에 0% B로부터 12% B로 상승되었다[용제 A, 물 + 0.18%(v/v) TFA; 용제 B, 아세토니트릴 + 0.15% (v/v) TFA].

[0066] 이온-억제 분석법

[0067] $0.25\mu g/ml$ 의 펩티드 또는 디펜신이 4.5mM의 NaCl, 염화마그네슘 $MgCl_2$, 염화철 $FeCl_2$, 염화아연 $ZnCl_2$ 또는 황산아연 $ZnSO_4$ 로써 45분 동안 실온에서 배양되었다. 그 다음에 이어서 상기 혼합물이 방사선 확산 분석법에 의해 *비피도박테리움 아돌레센티스* 또는 *대장균*에 대한 자체 항균 활성에 대하여 분석되었다. 본 시험은 3회 이상 반복되었다.

[0068] 결과

[0069] Schroeder 외["Reduction of disulfide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1", Nature, 469: 419-423 (2011)]는 최근에 사람의 베타-디펜신 1이 환원 조건하에서 증가된 항균 활성을 나타낸다는 것을 보여주었다.

[0070] 본 경우에 hBD-1 혹은 그의 항균 활성이 계속해서 검사되었다. 이 목적을 위하여 사람의 장내 식물균의 공생 박테리아에 대한 사람의 3개 베타-디펜신 hBD-1, 2 및 3의 항균 활성이 테스트 되었고, 특히 표준 조건(pH 7.4) 하에서 그리고 약산성의 조건(pH 5.7) 하에서 테스트 되었으며, 이 경우 두 가지 조건 하에서는 2mM의 화학적 환원제 디티오프레이톨이 증식 배지에 첨가되는 환원 조건도 테스트 되었다. 이때, 표준 조건 하에서는 이와 같은 조건 하에서 전반적으로 비활성이고 환원에 의해 활성화되는 hBD-1을 제외한 대부분의 박테리아에서 베타-디펜신의 활성이 최대였다. 하지만, 이와 같은 활성화는 5.7의 pH-값에서는 관찰될 수 없었다. 그와 달리, hBD-2는 환원에 의해서는 전혀 영향을 받을 수 없는 것으로 입증된 한편, pH-값의 변경은 상기 펩티드의 항균

활성에 매우 부정적인 영향을 미쳤다.

- [0071] hBD-3는 대부분의 경우에 두 가지 다른 디펜신에 비해 테스트 된 공생하는 박테리아에 대하여 매우 강한 활성을 가졌다.
- [0072] 요약해서 말하자면, 예를 들어 산화 환원 전위 및 pH-값과 같은 주변 매질의 인자들은 공생하는 장내 박테리아에 대한 베타-디펜신의 항균 활성을 변조할 수 있다. 하지만, 이와 같은 변조는 몇몇 디펜신-박테리아-관계에 대해서 명확하게 나타나며, 그람 상태 및 박테리아 속과는 상관 관계가 없다.
- [0073] *비피도박테리움 아돌레센티스*에 대하여 이미 항균 활성을 나타내는 hBD-1의 7개 말단 아미노산인 헵타펩티드에 대한 검사는, 야생형의 카르복시-말단 헵타펩티드가 *비피도박테리움 아돌레센티스*에 대하여 최대의 활성을 나타낸 한편 반대의 아미노산 서열을 갖는 펩티드는 덜 활성적이었다는 사실을 보여주었다. 알라닌과 시스테인 잔기를 교체함으로써, 활성이 완전히 중단되었다. hBD-1로부터 분리된 아미노-말단은 비활성적이었다.
- [0074] 본 경우에는 본 발명에 따른 펩티드, 즉 hBD-1의 카르복시-말단의 8개 말단 아미노산을 포함하는 옥타펩티드가 테스트 되었다: 상기 옥타펩티드는 이전에 테스트 된 헵타펩티드보다 강한 항균 활성을 나타냈다(도 1 참조). Cys₆ 또는 Cys₇이 교체되었다면, 활성은 *비피도박테리움 아돌레센티스*와 관련해서 특히 동일한 정도까지 대폭 줄어든 한편, 2개 시스테인의 교체는 활성을 완전히 중단시켰다. 이전에 테스트 된 헵타펩티드와 달리 옥타펩티드는 또한 *대장균*에 대해서도 항균 활성을 나타냈다(도 1b 참조). 놀랍게도 이 경우에 Cys₆ 또는 Cys₇을 알라닌으로 교체하는 것은 항균 활성을 증가시킨 한편, 2개 시스테인의 교체는 재차 항균 활성을 거의 완전히 중단시켰다.
- [0075] 옥타펩티드를 최적화하기 위하여 혹은 프로테아제에 대한 상기 옥타펩티드의 안정성을 개선하기 위하여, 다음 단계에서 옥타펩티드의 아미노-말단은 아세틸화에 의해서 그리고 카르복시 말단은 아미드화에 의해서 안정화되었다. *대장균*에 대한 활성은 야생형 펩티드에 비해 두드러지게 다르지 않은 한편, *비피도박테리움 아돌레센티스*에 대한 활성은 급격하게 증가되었다(도 1c 참조).
- [0076] 새로이 확인되고 제공된 옥타펩티드에 의해서는, 간단하고도 경제적으로 제조될 펩티드에 항생 효과가 제공되며, 상기 펩티드는 치료제로서 사용될 수 있다. 그렇기 때문에, 변형된 펩티드뿐만 아니라 변형되지 않은 펩티드도 (기회 전염성의) 병원성 미생물을 사멸시킬 수 있는 능력에 대하여 검사되었다. 이 목적을 위하여 유세포 분석법이 실시되었으며(도 2 참조), 이 분석법으로부터 드러난 사실은, 야생형-옥타펩티드의 효과 그리고 알라닌-돌연변이 펩티드의 효과 및 야생형 헵타펩티드의 효과는 대부분의 경우 미미한 정도에 불과하다는 것이다. 그와 달리 변형된 옥타펩티드는 병원성 미생물인 *포도상구균* 및 *칸디다 알비칸스*에 대해서는 두드러진 활성을 나타냈지만, *대장균* 및 *박테로이데스 프라길리스*에 대해서는 그렇지 않았다.
- [0077] 따라서, 말단의 안정화에 의해서는 공생하는 장내 박테리아인 *비피도박테리움 아돌레센티스*에 대해서뿐만 아니라 임상적인 관련이 있는 2개 이상의 병원성 미생물에 대해서도 항균 활성이 증가된다고 나타났다.
- [0078] 추가의 시험에서는, 테스트 된 펩티드의 소수성을 검사하기 위하여 역상 HPLC-분석이 실시되었다. (데이터는 나타나지 않았다). 변형된 옥타펩티드는 칼럼으로부터 마지막으로 용리되었으며, 이와 같은 상황은 최대의 소수성을 지시해준다; 그에 앞서서 야생형 펩티드, 개별 알라닌-아미노산-교체 변종 및 2중-알라닌-아미노산-교체 변종의 용리가 이루어졌다(데이터는 나타나지 않았음).
- [0079] 전하 및 이온 상호 작용의 역할을 더 검사하기 위하여, 산화된 및 환원된 hBD-1 그리고 야생형 및 변형된 옥타펩티드가 1가의 및 2가의 양이온에 의해서 배양되었다(데이터는 나타나지 않았음). *대장균*과 관련해서는, 완전한 디펜신의 활성이 염화마그네슘 또는 염화철을 이용한 예비 배양에 의해서 완전히 중단된 한편, 카르복시-말단 펩티드의 활성은 대폭 억제되었지만, 상기 금속 이온을 이용한 예비 배양 후에는 계속해서 검출 가능했다. 그와 달리 NaCl은 *대장균*에 대한 항균 활성에 전혀 영향을 미치지 않았다.
- [0080] *비피도박테리움 아돌레센티스*에 대한 검사에서 재차 드러난 사실은, 염화나트륨을 이용한 예비 배양은 활성에 대하여 강한 효과를 나타내지 않는 한편, 염화철, 염화아연 및 황산아연은 활성을 완전히 폐지시켰거나 심하게 감소시켰다는 것이다. *대장균*과 달리 염화마그네슘을 이용한 배양은 *비피도박테리움*에 대한 항생 활성에 전혀 영향을 미치지 않았다.
- [0081] 추가의 검사에서는, 글리신을 제외한 D-아미노산으로 이루어지고 서열 RGKAKCKK(SEQ ID No. 1)를 갖는 본 발명에 따른 옥타펩티드가 L-아미노산으로 이루어지고 서열 RGKAKCKK(SEQ ID No. 1)를 갖는 옥타펩티드와 비교해서 검사되었으며, 특히 변형되었거나 변형되지 않은 말단을 이용해서 검사가 이루어졌다(도 3). D-아미노산으로

이루어지고 변형된 말단(N-말단: 아세틸화; C-말단: 아미드화)을 갖는 펩티드는 *대장균* K12(도 3a 참조)에 대하여 상대적으로 약한 활성을 나타낸 한편, 상기 펩티드는 변형되지 않은 형태에서만 뿐만 아니라 변형된 형태에서도 *비피도박테리움 아돌레센티스*(도 3b 참조)에 대하여 L-아미노산으로 이루어진 펩티드에 비해 증가된 활성을 보였다.

[0082] 상기 데이터는 또한 전체적으로 펩티드와 양이온 간의 상호 작용이 양의 전하에 토대를 두고 있다는 사실뿐만 아니라 오히려 특정한 이온이 특정 박테리아에 대한 활성에 영향을 미칠 수 있다는 사실도 보여준다.

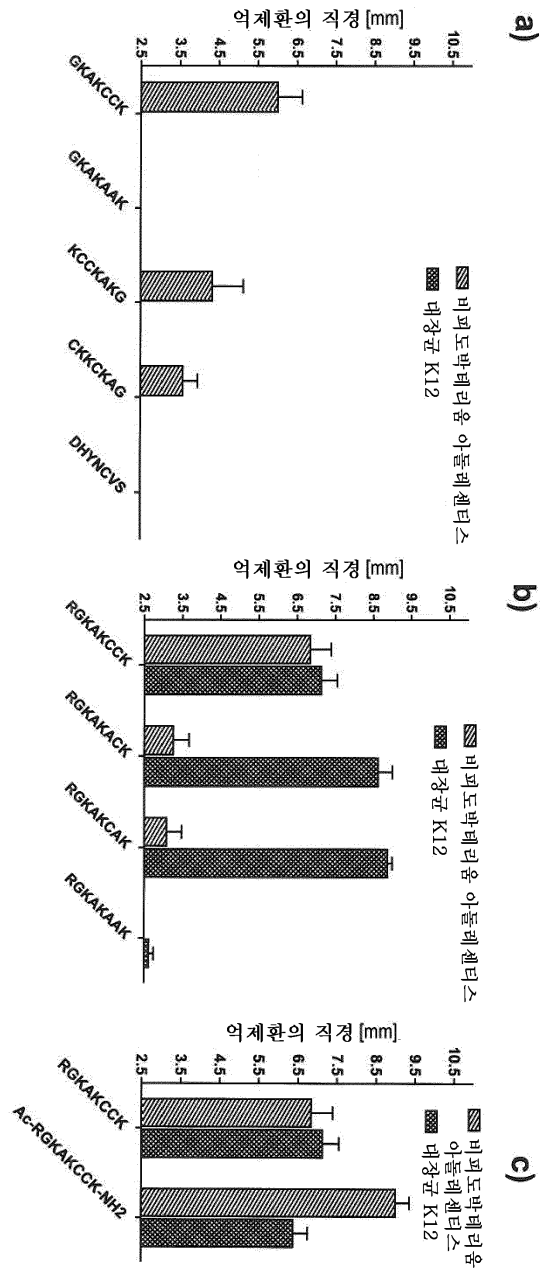
[0083] 병원성 박테리아 및 균류에 대한 본 발명에 따른 옥타펩티드의 활성은 추가의 방사선 확산 분석법에서도 확인되었다: *균주 대장균* 25922, *황색포도상구균* 25923, *엔테로코쿠스 파에칼리스* 29212, *칸디다 알비칸스* 10231 및 *녹농균* 27853에 대한 활성이 테스트 되었으며(도 4 참조), 이 경우에는 한 편으로 L-아미노산(도 4 참조, 다이어그램의 좌측에 5개의 칼럼)으로 이루어지거나 글리신을 제외한 D-아미노산(도 4 참조, 다이어그램의 우측에 5개의 칼럼)으로 이루어지고 서열 RGKAKCKK(SEQ ID No. 1)를 갖는 본 발명에 따른 옥타펩티드가 사용되었으며, 특히 각각 한 번은 변형된 말단이 그리고 한 번은 변형되지 않은 말단(N-말단: 아세틸화; C-말단: 아미드화)이 사용되었다. 여기에서는 *대장균* 및 *포도상구균*에 대한 두드러진 활성 외에 특히 테스트 된 옥타펩티드의 모든 변종의 *칸디다 알비칸스*에 대하여도 탁월한 활성이 나타났다.

[0084] 추가의 MTT-((3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드; 디아졸일 블루)시험에서는 말단이 안정화된 옥타펩티드의 세포 독성이 더 검사되었으며, 특히 사람 세포계인 CaCo-2(ATCC HTB-37)에 대하여 개별 옥타펩티드[변형된 말단: N-말단: 아세틸화 및 C-말단: 아미드화를 갖는 SEQ ID No. 1; L- 또는 D-아미노산(글리신 제외)]의 농도를 증가시켜서 0.01% 아세트산의 증가하는 농도와 비교하면서 검사가 이루어졌다. 그에 대한 결과는 도 5에 제시되어 있으며, 이 결과에서 드러난 사실은, 안정화된 옥타펩티드는 용제인 0.01% 아세트산의 세포 독성을 초과하는 세포 독성을 갖지 않는다는 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 옥타펩티드는 또한 치료적인 적용 예에 사용되기에 적당하다.

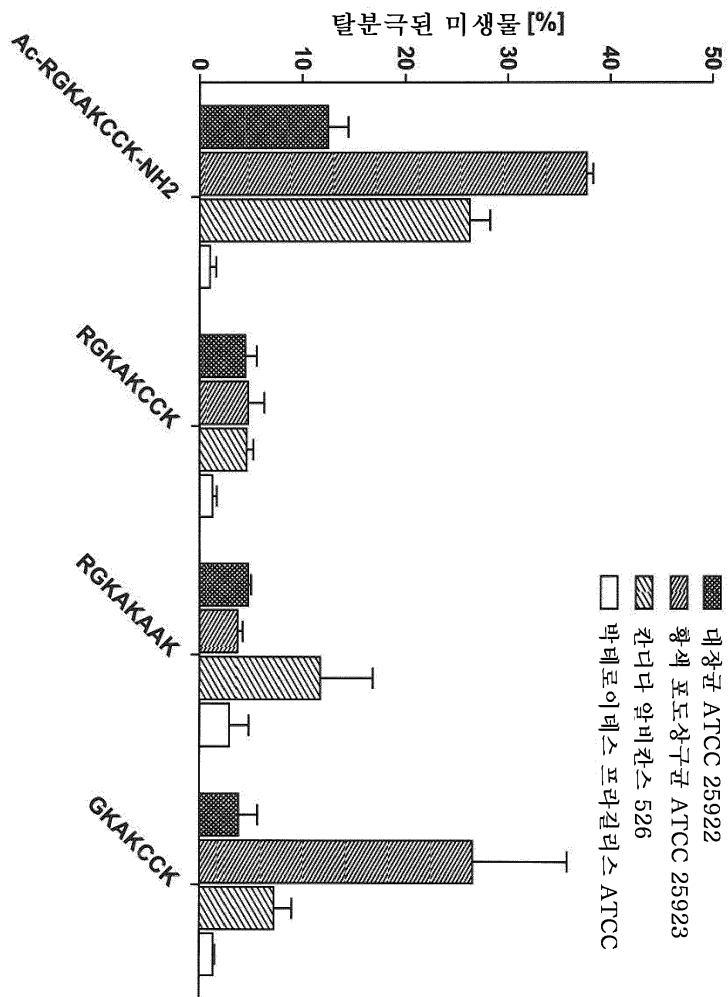
[0085] 하지만, 전술된 결과 및 데이터가 분명하게 보여주는 사실은, 본원에서 처음으로 제공된 옥타펩티드, 특히 아미노산이 교체된 야생 형태의 옥타펩티드 및/또는 안정화된 형태의 옥타펩티드는 항생 효과를 갖는 우수한 제제라는 것이다. 이와 같은 결과는 놀라운 것이며, 지금까지 이용 가능한 선행 기술을 토대로 해서는 전혀 예상할 수 없었던 결과이다.

도면

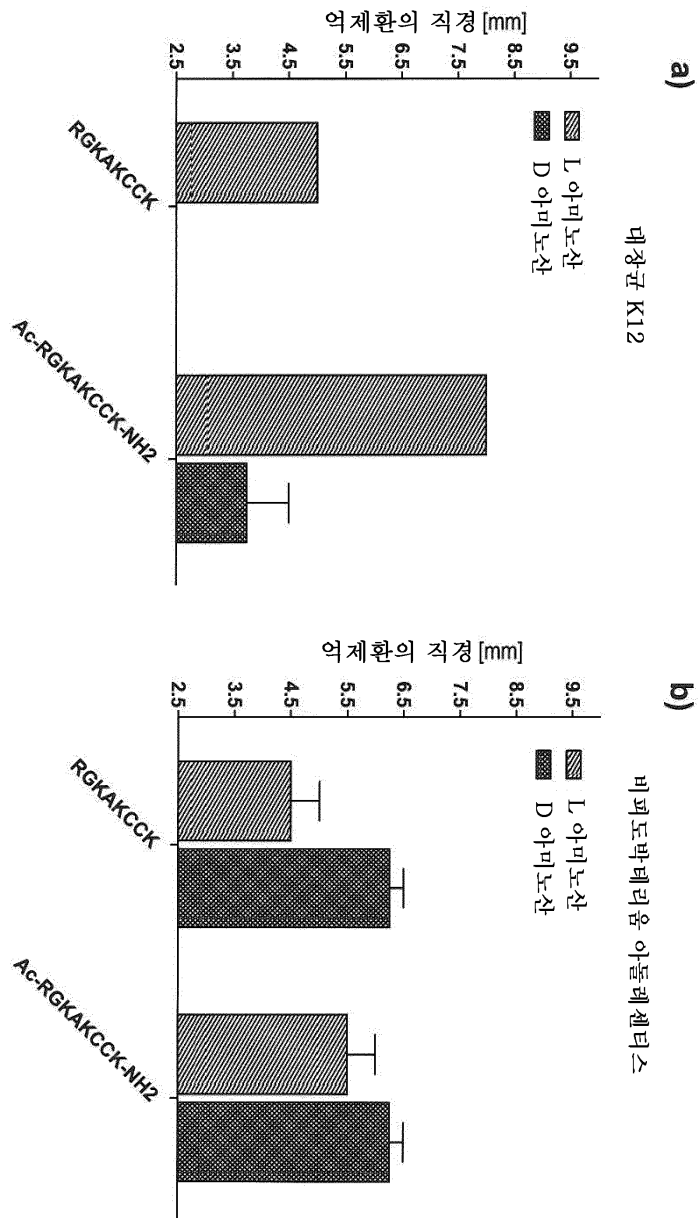
도면1



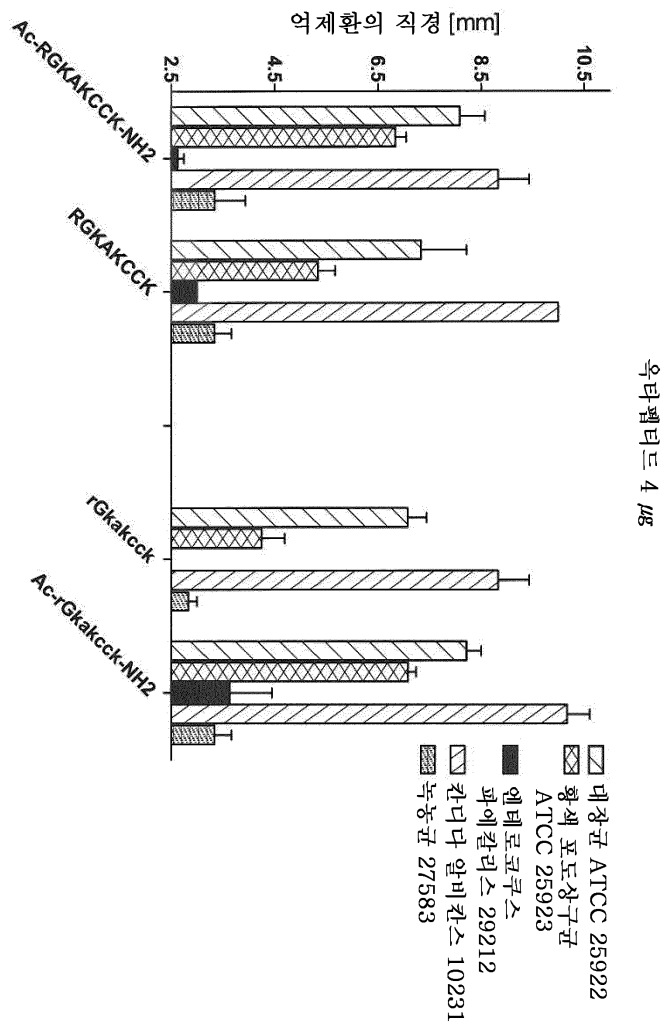
도면2



도면3



도면4



도면5

