



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0118518
(43) 공개일자 2013년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0041448

(22) 출원일자 2012년04월20일

심사청구일자 2012년04월20일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

조주현

경상남도 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 115동 2003호

김현

경상남도 사천시 정동면 한보3차아파트 101동 903호

장주혜

경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 호계리 308-1 장미파크맨션 702호

(74) 대리인

김순웅

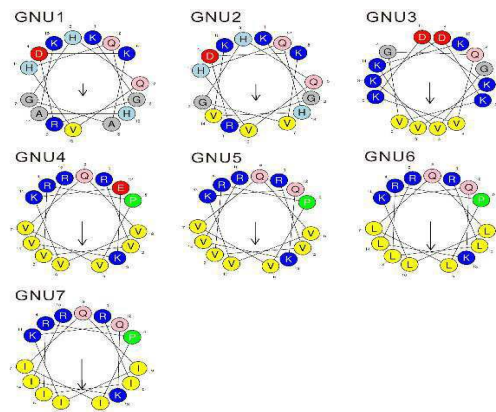
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 생체내 이용효율이 증진되고 세포독성이 감소된 항균펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항균펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항균펩타이드는 단백질 분해효소에 저항성을 보이고, 높은 항균력을 갖는 아미노산 서열을 가지며, 생체내 이용효율이 증가되고 세포독성이 감소될 뿐만 아니라 단백질 분해효소에도 높은 저항성을 나타내는 효과가 우수함으로, 항균용 의약품, 식품 방부제 또는 화장품 첨가제에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0008044
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-일반연구자지원사업-기본연구지원사업
연구과제명	웍티도글리칸 인식 단백질에 의한 어류의 생체방어 기작 연구
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0015180
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업
연구과제명	생체방어웍타이드의 신규 감염치료제로의 개발 연구
주관기관	경상대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 5, 6 및 7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 갖는 항균펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항균펩타이드는 그람양성균, 그람음성균, 진균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균에 대한 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 항균펩타이드.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 그람양성균은 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 항균펩타이드.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 그람음성균은 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 항균펩타이드.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 진균은 칸디다 아르비칸스(*Candida albicans*), 크립토코커스 네오포만스(*Cryptococcus neoformans*) 및 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 항균펩타이드.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)인 GNUHCCP1227, GNUHCCP1235, GNUHCCP1257과 반코마이신-내성 엔테로코커스(Vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)인 GNUHCCP1620, GNUHCCP2106, GNUHCCP1887로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 항균펩타이드.

청구항 7

제 1항의 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항의 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 식품방부제.

청구항 9

제 1항의 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 화장품 첨가제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생체내 이용효율이 증진되고 세포독성이 감소된 항균펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항균펩타이드(antimicrobial peptides)는 숙주 방어 시스템에 중요한 인자들 중 하나이다. 항균펩타이드는 미생물에 대한 폭넓은 스펙트럼 활성을 가지며 진핵세포에서 숙주 방어에 중요한 기능을 수행한다. 항균펩타이드는 모든 클래스의 생명체(예컨대, 포유동물, 양서류, 곤충, 등)에서 발견되었는데, 이는 항균펩타이드가 진화적으로 선천성 면역 반응의 보존성 구성성분일 수 있다는 것을 의미한다.
- [0003] 항균펩타이드는 다수의 아르기닌, 라이신 또는 히스티딘을 포함하고 있어 전체적으로 양전하(+2 ~ +9)를 띠며 30% 정도의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고 있다. 이러한 특징으로 인해 항균펩타이드는 음전하를 띤 세균 세포막과 접촉하게 되면 양친매성 α -나선구조(amphipathic α -helix) 혹은 β -병풍구조(β -sheet)를 형성하여 세포막 속으로 끼어 들어가 세포막의 전위를 변화시키거나 세포막 자체에 구멍을 내어 세포막을 파괴함으로써 세균을 죽인다. 또한 일부 항균펩타이드는 세포내로 들어간 다음 세포내 표적을 공격하여 세포 기능을 마비 시킴으로써 항균 활성을 나타낸다. 그러므로 항균펩타이드는 특정 수용체를 표적으로 하는 기존의 항생제에 비해 내성 유발가능성이 현저히 낮은 특징이 있다. 항균펩타이드는 생체내에 직접 존재하는 물질로, 그 구조가 단순하며 오랜 진화 과정에서도 내성 문제를 일으키지 않았다. 또한 항균펩타이드는 신속한 작용 기전, 기존 항생제 내성균에 작용, 광범위한 항균 스펙트럼, 항 내독성(anti-endotoxicity) 등의 특징을 가지고 있어 신규 감염 치료제로서 개발이 적합하다.
- [0004] 하지만 기존에 알려진 대부분의 항균펩타이드들은 체내에 투입시 생리적 염농도에서 불활성화되고 혈청내에 존재하거나 병원균이 분비하는 단백질 분해효소에 의해 빠르게 분해되어 실제 생체내 이용효율이 극히 낮으며, 특정 수용체가 아닌 세포막에 직접적으로 작용하는 특성 때문에 미생물 뿐만 아니라 인간세포에 대해서도 독성을 가지는 문제점이 제기되어 왔다. 최근에, 항균펩타이드에 대한 많은 연구들은 증가된 항균활성 및 포유동물 세포에 대한 낮은 세포독성을 가지는 천연의(naturally occurring) 항균펩타이드에 대한 짧은 유사체 개발에 집중되어 왔다. 일부 연구는 선택성을 조절하기 위해 펩타이드의 물리화학적 변수들, 예를 들어 순전하(net charge), 나선성(helicity), 잔기 당 소수성(H), 소수성 모멘트(μ) 및 양성 전하를 띠는 극성 나선 면에 의해 정해지는 각을 변형시켜 최적화하고자 시도하였다. 또한 D-form 아미노산 또는 펩토이드(peptoid)를 이용하여 항균펩타이드를 구성하거나 이황화 결합을 이용한 펩타이드의 dimerization 또는 cyclization, 그리고 펩타이드 양 말단의 modification(N-terminal acetylation, C-terminal amidation) 등을 통해 단백질 분해 효소에 대한 저항성을 증진 시키고자 하였다. 즉 기존의 연구들은 종래기술의 문제점을 펩타이드에 일반적이지 않은 아미노산 잔기를 첨가하거나 구조에 이차 변형을 가하여 해결하고자 하였는데 이 경우 펩타이드의 생산 단가가 높아져 경제성이 낮아진다는 치명적인 단점이 또 다른 문제점으로 지적되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 이에 본 발명자들은 경제적으로 대량생산이 가능하고 생체 내에서 이용 효율이 높으며 세포독성이 감소된 신규 항균펩타이드에 대한 연구를 계속하던 중, 일반적인 아미노산 잔기 15개만을 사용하여 경제적인 대량 생산이 가능하면서도 생체내 이용효율이 높고 인간세포에 대해서는 독성이 없는 항균펩타이드(GNU5, GNU6, GNU7)를 개발하였으며, 특히 GNU6와 GNU7은 체내에 존재하거나 병원균이 분비하는 단백질 분해효소에 대해 저항성을 가지고 높은 염농도나 혈청 존재 하에서도 활성을 잃지 않으며 10종의 테스트용 미생물 뿐만 아니라 환자에게 직접 분리한 항생제 내성균(MRSA 3종, VRE 3종)에 대해서도 강력한 항균력을 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 본 발명의 목적은 생체내 이용효율이 증진되고 세포독성이 감소된 신규한 항균펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품 방부제, 화장품 첨가제, 가축 사료 첨가제 및 감염 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 항균펩타이드 및

[0009] 상기 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 항균펩타이드는 단백질 분해효소에 저항성을 보이고, 높은 항균력을 갖는 아미노산 서열을 가지며, 생체내 이용효율이 증가되고 세포독성이 감소될 뿐만 아니라 단백질 분해효소에도 높은 저항성을 나타내는 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 펩타이드 유도체의 나선형 모형(helical wheel diagram)을 나타낸 도이다.

도 2는 생리적 염농도에서 펩타이드 유도체의 항균 활성을 나타낸 도이다.

도 3은 혈청 존재하에서의 펩타이드 유도체의 항균 활성을 나타낸 도이다 [(-)는 혈청과 반응시키지 않은 펩타이드, (+)는 혈청과 전배양(pre-incubation)시킨 펩타이드].

도 4는 펩타이드 유도체의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 나타낸 도이다.

도 5는 펩타이드 유도체의 용혈 활성(A) 및 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT cell)에 대한 세포독성(B)을 측정한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 서열번호 5, 6 및 7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 갖는 항균펩타이드를 제공한다.

[0013] 상기 항균펩타이드는 그람양성균, 그람음성균, 진균 및 항생제 내성균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균에 대한 항균활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 그람양성균은 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 포함하는 그람양성균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 균주에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 그람음성균은 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*)을 포함하는 그람음성균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 균주에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 진균은 칸디다 아르비칸스(*Candida albicans*), 크립토코커스 네오포만스(*Cryptococcus neoformans*), 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 포함하는 진균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 균주에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 항생제 내성균은 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)인 GNUHCCP1227, GNUHCCP1235, GNUHCCP1257과 반코마이신-내성 엔테로코커스(*Vancomycin-resistant Enterococcus*, VRE)인 GNUHCCP1620, GNUHCCP2106, GNUHCCP1887을 포함하는 항생제 내성균으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 균에 대하여 항균활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 항균용 조성물은 항균용 약학적 조성물, 식품방부제 또는 화장품첨가제를 포함한다.

[0020] 본 발명의 항균펩타이드는 NaCl 100 내지 150mM, KCl 2.0 내지 3.0mM, Na₂HPO₄ 5 내지 15mM, KH₂PO₄ 1 내지 5mM을 포함하는 생리적 염 농도에서도 항균활성을 잃지 않고, 혈청 존재하에서도 항균력을 유지한다. 또한 트립신, 키모트립신, 아우레오라이신을 포함하는 단백질 분해효소로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효소에 대하여 분해되지 않고 적혈구 용혈 활성이 낮으며 세포독성이 나타나지 않는다. 따라서, 본 발명의 항균펩타이드는 항균용 의약품, 식품 방부제 또는 화장품 첨가제에 유용하게 사용될 수 있다.

- [0021] 상기 약학적 조성물은 서열번호 5, 6 및 7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 서열을 갖는 항균펩타이드와 함께 항균효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 항균펩타이드의 일일 투여량은 2 ~ 10mg/kg, 바람직하게는 약 4 ~ 8mg/kg이나 임상결과에 따라 가감될 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 식품방부제는 공지의 식품 방부제 중 1종 이상 포함하여 제조될 수 있다. 식품방부제로는 테히드로 초산, 소르빈산칼륨, 소르빈산칼슘, 안식향산나트륨, 안식향산칼륨, 안식향산칼슘, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 프로피온산나트륨, 프로피온산칼슘 등이 사용되고 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 상기 식품방부제는 상기 항균펩타이드를 식품방부제 총 중량에 대해 0.01 ~ 1중량% 포함하는 것이 바람직하다.
- [0026] 상기 항균펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장품 첨가제는 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 화장품첨가제는 상기 항균펩타이드 외에 피부과학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다. 또한, 적합한 화장품의 제형으로는, 예를 들면 상기 항균펩타이드를 첨가한 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 또한 화장품 첨가제에 사용되는 부형제로서 알부틴(arbutin), 코직산(kojic acid), 루시놀(rucinol), 비타민C(vitamin C) 및 vitamin C 유도체 등을 추가로 함유할 수 있으며, 주름개선 효과를 목적으로 레티놀(retinol) 및 그 유도체, 인돌아세트산(indol acetic acid) 및 그 유도체, 아데노신(adenosin), 토코페롤(tocoperol) 및 그 유도체, 카이니틴 등을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기 부형제에는 화장품 첨가제에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.
- [0027] 상기 화장품 첨가제에는 상기 항균펩타이드를 화장품첨가제 총 중량에
- [0028] 0.01 ~ 1중량%를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0029] 이하, 본 발명의 내용을 실시예 및 제제예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **[실시예 1] : 펩타이드 유도체의 제조**
- [0031] 본 발명에서는 펩타이드 유도체를 제조하기 위하여 선행연구결과와 문헌 조사, APD(Antimicrobial Peptide Database) 데이터베이스 분석 및 분자 모델링 결과를 바탕으로 제작하였다. 대부분의 항균펩타이드들은 양친매성의 α -나선(amphipathic α -helix) 구조를 형성하고 다수의 아르기닌(Arg)/라이신(Lys) 잔기와 소수성 잔기를 가져 전체적으로 양전하를 띠고 높은 소수성(hydrophobicity)을 보인다. 이러한 구조적 요소들이 항균력에 중요하다고 알려져 있으므로 펩타이드 유도체 제작시 기본적으로 상기 요소들을 유지시켰으며 이와 더불어 추가적 사항들을 고려하였다.
- [0032] 기존 항균펩타이드들의 가장 큰 문제점 중 하나는 체내에 존재하거나 병원균으로부터 분비되는 단백질 분

해효소에 의해 분해되는 것이다. 특히 항균력에 필수요소인 아르기닌(Arg)/라이신(Lys)과 같은 양전하를 띤 아미노산과 소수성 아미노산이 단백질 분해효소의 표적이 된다. 주된 단백질 분해효소인 트립신(trypsin)과 키모트립신(chymotrypsin)은 인간의 혈청과 피부에도 존재하는 것으로 알려져 있으며, 각각 양전하를 띤 잔기와 소수성 잔기를 인지하여 C-말단 쪽을 절단하고, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)가 분비하는 아우레오라이신(aureolysin) 역시 소수성 잔기를 인지하여 N-말단 쪽을 절단한다. P1과 P1'의 사이가 절단위치(cleavage site)이며 이 부분을 기준으로 해서 N-말단 쪽을 P1, P2, P3, P4 순으로 표기하고, C-말단 쪽을 P1', P2', P3', P4' 순으로 표시하여 상기 단백질 분해효소의 인지서열을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0033]

효소이름	인지서열							
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
트립신				K.R	not P			
			W	K	P			
			M	R	P			
키모트립신				F/Y/L	not P			
				W	not M/P			
아우레오라이신					L/F/I/V			

[0034]

양전하를 띤 아미노산과 소수성 아미노산은 항균력을 나타내는데 필수적인 요소로, 펩타이드 유도체 제작시 이들을 제외할 수 없으므로 대신 아미노산 배치를 적절히 하여 가급적 이들 단백질 분해효소들이 인지할 수 없도록 하였다. 단백질 분해효소인 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin), 아우레오라이신(aureolysin)의 인지서열을 최대한 피하고 펩타이드가 전체적으로 양친매성의 α -나선(α -helix) 구조를 이루도록 아미노산을 배치하였다. 또한 펩타이드의 길이가 길수록 단백질 분해효소에 의해 인지될 수 있는 자리가 많아지므로 항균활성을 유지하는데 필요한 최소 길이를 유지하면서 가능한 전체 서열의 길이를 짧게 하기 위해 펩타이드 유도체의 길이를 15aa로 고정하였다. 그리고 펩타이드 유도체 서열내의 양전하를 띤 잔기 사이에 음전하를 띤 잔기를 배치하거나 서열 내에 존재하는 양전하를 띤 잔기를 히스티딘(Histidine, His)으로 대체하여 트립신에 의해 분해되지 못하도록 하였다. 또한 트립신(trypsin)은 라이신(Lys)보다 아르기닌(Arg)을 더 잘 인지하지만, 라이신(Lys)보다 아르기닌(Arg)을 포함하는 항균펩타이드가 더 높은 활성을 나타낸다고 알려져 있음을 고려하였다. 따라서, 펩타이드 유도체 제작시 트립신(trypsin)에 의해 어느 정도 인지될 것이라고 예상되는 지점에는 라이신(Lys)을 배치하고, 트립신(trypsin)에 의한 분해 효율이 극히 낮거나 분해되지 않는 위치에는 아르기닌(Arg)을 배치하였다. 펩타이드 유도체가 높은 항균력을 가지기 위해서는 전체적인 소수성(hydrophobicity)이 높아야 하므로 펩타이드 유도체의 친수성 표면(hydrophilic face)에서 극성 잔기를 가지는 아미노산 중 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 글리신(Gly), 히스티딘(His)을 제외한 잔기의 길이가 가장 긴 글루타민(Gln)을 사용하여 전체적으로 소수성(hydrophobicity)을 높여주도록 제작하였다. 또한 펩타이드 유도체가 높은 항균력을 가지려면 소수성 표면(hydrophobic face)에 적어도 5개의 소수성 잔기가 연속적으로 배치되어야 하는 반면, 그 이상의 소수성 잔기가 연속적으로 배치되게 되면 항균력 뿐만 아니라 세포 독성도 함께 증가하는 경향이 있음을 고려하여 소수성 표면(hydrophobic face)을 이루는 소수성 잔기들 사이에 라이신(Lys)을 배치하여 전체적으로 소수성 잔기가 5개를 초과하여 연속적으로 배치되지 않게 제작하였다.

[0035]

유도체 펩타이드들은 자동화합성기(PeptrEx-R48, 펩트론사, 대전, 대한민국)를 이용하여 FMOC 고체상 방법으로 합성하였으며, 합성된 각 펩타이드는 C18 분석 RP 칼럼(Shiseido capcell pak)을 사용한 역상 HPLC(Prominence LC-20AB, Shimadzu사, 일본)로 정제하고, 질량분석기(HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard사, Roseville, 미국)를 이용하여 동정 및 확인하였다.

[0036]

상기 사항들을 고려하여 최종적으로 7개의 펩타이드 유도체를 제조하였고, 이를 표 2에 나타내었다. 또한 제조된 펩타이드 유도체의 구조들을 도 1에 나타내었다.

표 2

[0037]

펩타이드	서열	분자량	소수성잔기 (%)	소수성	순전하
GNU1	KGRDKAGHQVHQHAK(서열번호1)	1696	20%	-0.197	+3

GNU2	KGRDKVGHQVHQHVK(서열번호2)	1753	20%	-0.076	+3
GNU3	GVKDKVGQVKDKVKK(서열번호3)	1656	26.6%	-0.188	+4
GNU4	RVVRPVVQVVKVKVR(서열번호4)	1791	46.6%	0.226	+4
GNU5	RVVRPVVQVVKQKVR(서열번호5)	1790	46.6%	0.226	+5
GNU6	RLLRPLLQLLKQKLR(서열번호6)	1888	46.6%	0.478	+5
GNU7	RIIRPIIQIKQKIR(서열번호7)	1888	46.6%	0.525	+5

[0038]

[0039] [실시예 2] : 펩타이드 유도체의 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

[0040]

펩타이드 유도체의 항균력을 그람양성균과 그람음성균, 곰팡이를 포함하는 10종의 테스트용 미생물을 이용하여 확인하였다. 세균의 경우 5ml의 TSB(tripticase soy broth)배지에, 곰팡이의 경우 5ml의 sabouraud 배지에서 각각 37℃와 30℃에서 하룻 밤 동안 배양한 후 다시 새로운 배지로 옮겨 2-3 시간 배양하여 대수 증식기에 있도록 하였으며, 대수 증식기의 미생물을 10mM 나트륨-인산 완충액, pH 7.4(NaPB)를 이용하여 5×10^4 CFU/ml 농도가 되도록 희석하였다. 폴리프로필렌 96-웰 플레이트의 각 웰에 미생물 희석액(90 μ l)과 2배수로 연속 희석된 펩타이드(10 μ l)를 섞어준 다음, 37℃(세균) 또는 30℃(곰팡이)에서 3시간 배양하고 여기에 다시 새로운 배지 100 μ l를 넣은 뒤 세균의 경우 37℃에서 16시간, 곰팡이의 경우 30℃에서 20시간 배양하였다. 그 후 Bio-Rad사의 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 각 웰의 흡광도(absorbance)를 595nm에서 측정하여 미생물의 성장을 완전히 억제하는 가장 낮은 펩타이드 농도를 최소저해농도 (MIC)로 결정하였다. MIC 값들은 한번에 3개씩, 3번의 독립적인 실험을 통해 얻은 수치의 평균값으로 결정하였다.

[0041]

상기 방법을 이용하여 측정한 펩타이드 유도체의 최소저해농도를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0042]

미생물	최소 저해 농도(MIC) (μ g/ml) ^a							
	GNU1	GNU2	GNU3	GNU4	GNU5	GNU6	GNU7	Buforin IIb
그람-양성균								
<i>E. faecalis</i>	>64	>64	>64	>64	8	2	2	0.5
<i>M. luteus</i>	>64	>64	>64	8	2	0.5	1	1
<i>B. subtilis</i>	>64	>64	>64	>64	16	4	2	2
<i>S. aureus</i>	>64	>64	>64	64	4	4	2	2
그람-음성균								
<i>E. coli</i>	>64	>64	>64	>64	32	2	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64	>64	>64	16	2	2	4
<i>S. typhimurium</i>	>64	>64	>64	>64	>64	2	4	2
곰팡이								
<i>C. albicans</i>	>64	>64	>64	64	2	2	2	2
<i>C. neoformans</i>	>64	>64	>64	>64	2	2	2	2
<i>S. cerevisiae</i>	>64	>64	>64	>64	2	4	4	2

[0043]

표 3에 나타난 바와 같이, 펩타이드 유도체의 소수성이 증가할수록 항균력이 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 그람음성균에 대한 항균력이 그람양성균이나 곰팡이에 대한 항균력보다 소수성에 영향을 크게 받음을 확인하였다.

[0044]

따라서 이후의 실험은 높은 항균력을 가지는 3종의 유도체 펩타이드(GNU5, GNU6, GNU7)를 대상으로 진행하였다.

[0045]

[실시예 3] : 생리적 조건에서의 항균 활성 측정을 통한 안정성과 효능이 증진된 펩타이드 유도체의 선별

[0046]

1. 생리적 염농도에서 펩타이드 유도체의 항균활성 측정

[0047] 펩타이드 유도체 항균력은 기본적으로 방사 확산(radial diffusion)방법을 이용하여 측정하였으며, 각각의 생리적 조건 하에서의 활성 검증을 위해 조금씩 변형하였다. 보다 상세하게는 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)(4×10^6 CFU)를 각각 10 mM NaPB와 PBS(NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 2mM)를 포함하는 하부 젤(underlay)에 트랩한 뒤 3mm 지름의 웰을 뚫고 여기에 각각의 펩타이드 유도체($32 \mu\text{g/ml}$)를 $5 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 그 후 37°C 에서 3시간 동안 배양하여 펩타이드 유도체가 충분히 확산되도록 실험하였다. 하부 젤 위에 1% 아가로오스와 6% TSB를 포함하는 상부 젤(overlay)을 붓고 37°C 에서 다시 16시간을 배양한 뒤 웰 주위에 미생물이 자라지 못한 투명한 영역(clear zone)을 측정하였다. 또한 이 실험에서 고염농도에서의 활성 측정을 위해서 10mM NaPB 대신 PBS를 포함하는 하부 젤을 사용하였고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0048] 도 2에 나타낸 바와 같이, GNU6와 GNU7은 하부 젤에 생리적 염농도를 가지는 PBS를 사용하였을 때도 항균력이 유지되는 것으로 확인되었다.

[0049] 2. 혈청 존재하에서 펩타이드 유도체의 항균활성 측정

[0050] 혈청(serum)에 의한 영향을 확인하기 위해서 채취한 인간 혈액(human blood)을 4°C 에서 3시간 동안 배양시킨 뒤 4°C 에서 300g로 10분간 원심분리하여 상층액만 회수하여 얻은 인간 혈청(human serum)을 PBS를 이용하여 25% (V/V)가 되도록 희석하고 여기에 각각의 펩타이드 유도체를 최종농도 $64 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가한 뒤 37°C 에서 5분간 반응시켰다. 그 후 만들어진 시료의 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균력을 방사 확산(radial diffusion)방법으로 측정하였다. 이 경우 대조군으로는 혈청과 반응하지 않은 펩타이드를 사용하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0051] 도 3에서 나타낸 바와 같이, GNU5의 경우 혈청에 의해 항균 활성을 상실하는 반면, GNU6와 GNU7은 혈청 존재하에서도 항균력을 유지하는 것으로 확인되었다.

[0052] 3. 단백질 분해효소가 펩타이드 유도체에 미치는 영향

[0053] 단백질 분해효소에 의한 영향을 확인하기 위해서는 펩타이드 유도체($2 \mu\text{g}$)를 단백질 분해효소 트립신(2500:1 molar ratio), 키모트립신(2500:1), 아우레오라이신(5000:1)과 각각 37°C 에서 0, 1분, 5분, 15분, 30분, 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 반응시킨 후 Tris-Tricine SDS-PAGE를 이용하여 펩타이드가 분해된 정도를 측정하였다.

[0054] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0055] 도 4에서 나타낸 바와 같이, buforin IIb가 트립신에 의해 반응 1분부터 급격히 분해되어 5분 만에 완전히 분해되어 없어지고, 키모트립신과 아우레오라이신에 의해 반응 5분 후부터 작은 단편으로 분해되어 활성을 상실하는 반면, 펩타이드 유도체 GNU5, GNU6, GNU7은 반응 12시간까지도 단백질 분해효소에 의해 완전히 분해되지 않고 남아있는 것을 확인하였다. 특히 GNU5와 GNU7은 트립신, 키모트립신, 아우레오라이신 모두에 대해 12시간까지 저항성을 가지고 있음을 확인하였다. 위의 실험들을 통해 GNU5, GNU6, GNU7이 생리적 조건에서 안정성과 효능이 증진된 항균펩타이드 유도체임을 확인할 수 있었다.

[0056] 이 후 실험은 선별된 유도체(GNU5, GNU6, GNU7)를 가지고 실험을 하였다.

[0057] [실시예 4] : 적혈구 용혈 활성 및 세포 독성 측정을 통한 인체에 무해한 펩타이드 유도체 선별

[0058] 1. 펩타이드 유도체의 용혈 활성 측정

[0059] 펩타이드 유도체를 감염치료제로 개발하기 위해서는 세포 독성이 없어야 하므로 펩타이드 유도체의 세포 독성을 먼저 적혈구에 대한 용혈 활성을 통해 확인하였다. 인간 혈액 3ml로부터 분리한 적혈구를 PBS로 세척한 다음 총 부피가 20ml가 되도록 희석하였다. 준비한 적혈구 용액 $190 \mu\text{l}$ 에 펩타이드 유도체 $10 \mu\text{l}$ (최종농도 $0.5 \sim 128 \mu\text{g/ml}$)를 처리하고 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 그 후 반응액을 원심 분리하여 얻은 상층액($100 \mu\text{l}$)을 PBS로 10배 희석한 다음, 567nm에서의 흡광도(A_{567})를 측정하여 적혈구 막 손상에 따른 헤모글로빈(hemoglobin)의 유출을 측정하였다. 이때 펩타이드 유도체를 처리하지 않은 시료의 흡광도를 0% 용혈반응, 0.2% triton X-100을 처리한 시료의 흡광도를 100% 용혈반응으로 정하고, 펩타이드의 용혈 활성 [Hemolysis (%)]은 다음과 같은 수학적 식 1로 결정하였다.

[0060] [수학적식1]

[0061] 펩타이드의 용혈 활성 (%) = $\{(A_s - A_0) / (A_{100} - A_0)\} \times 100\%$

[0062] ※ A_s , 펩타이드를 처리한 시료의 흡광도;

[0063] A_0 , 펩타이드를 처리하지 않은 시료의 흡광도;

[0064] A_{100} , 0.2% triton X-100을 처리한 시료의 흡광도.

[0065] 결과는 도 5A에 나타내었다.

[0066] 도 5A에서 나타난 바와 같이, buforin IIb가 128 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 14.5%의 용혈 활성을 나타내는데 반해, GNU5, GNU6, GNU7은 측정 농도 범위에서 전혀 용혈 활성을 나타내지 않았다.

[0067] 2. 펩타이드 유도체의 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT cell)에 대한 세포독성 측정

[0068] 선별된 펩타이드 유도체들의 인간 세포에 대한 독성 여부를 검증하기 위하여, 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT)에 펩타이드 유도체를 처리한 후 MTT 어세이를 수행하였다. HaCaT 세포주(8000 cells/well)를 96-웰 플레이트에서 10% FBS를 포함한 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)을 이용하여 5% CO_2 존재 하에서 16시간 동안 배양하고, 이들 세포에 펩타이드 유도체(1 ~ 64 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 24시간 추가 배양한 다음, 세포의 생존 정도를 CellTiter 96-cell proliferation assay kit (Promega)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 이때 세포생존율 [Viability (%)]은 다음과 같은 수학적 2로 결정하였다.

[0069] [수학적식2]

[0070] 세포 생존율 (%) = $\{(A_s - A_0) / (A_c - A_0)\} \times 100\%$

[0071] ※ A_s , 펩타이드를 처리한 시료의 흡광도;

[0072] A_c , 펩타이드를 처리하지 않은 대조군의 흡광도;

[0073] A_0 , 배지만의 background 흡광도.

[0074] 결과는 도 5B에 나타내었다.

[0075] 도 5B에 나타난 바와 같이, buforin IIb가 32 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 53%의 HaCaT 세포를 사멸시키는 세포독성을 나타낸 것과는 달리, GNU5, GNU6, GNU7은 64 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 HaCaT 세포에 대해 전혀 독성을 나타내지 않았다.

[0076] 따라서, 상기 결과로부터 GNU5, GNU6, GNU7은 안전한 감염 치료제로서 개발될 수 있음을 알 수 있다.

[0077] [실시예 5] : 선별된 펩타이드 유도체의 항생제 내성균(MRSA, VRE)에 대한 항균력 검증

[0078] 선별된 펩타이드 유도체의 감염치료제로서의 실용화 가능성을 검증하기 위하여, 경상대학교병원 병원체 자원은행(GNUHCCP)에서 분양받은 환자로부터 직접 분리된 항생제 내성균인 메티실린-내성 스타필로코커스 아우레우스(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 이하 MRSA)와 반코마이신-내성 엔테로코커스(vancomycin-resistant *Enterococcus*, 이하 VRE)에 대한 항균력을 상기 실시예 2에 기재된 방법과 동일하게 마이크로희석(microdilution)방법을 이용하여 측정하였다.

[0079] 사용된 항생제 내성균종은 표4에 나타내었고, 측정한 결과는 표 5에서 나타내었다.

표 4

균종 (KBN no.)	검체 채취일	검체명	성별	나이	질환	증상
-----------------	--------	-----	----	----	----	----

MRSA(1227)	2004.09.22	Spinal fluid	M	58	패혈증 말기신장질환	오한, 발열
MRSA(1235)	2004.10.18	Closed pus	M	75		급성설사
MRSA(1257)	2004.12.08	Open pus	M	52	요도암	복부팽만, 통증
<i>E. faecium</i> (1620)	2010.06.23	Rectal swab	F	74	위암, 폐렴	전신쇠약
<i>E. faecium</i> (2106)	2011.04.27	Ascitic fluid	M	59	간, 신장 열상	외상
<i>E. faecium</i> (1887)	2010.11.04	Rectal swab	M	48	말기신장질환, 봉와직염	다리부종, 열감

[0081]

표 5

[0082]

Drug resistant bacteria	최소 저해 농도(MIC) (μg/ml)					
	Peptide				Antibiotic	
	GNU5	GNU6	GNU7	Buforin IIb	Oxacillin	Vancomycin
MRSA						
MRSA (KBN no. 1227)	64	2	2	1	≥4	
MRSA (KBN no. 1235)	64	2	2	4	≥4	
MRSA (KBN no. 1257)	64	2	8	2	≥4	
VRE						
<i>E. faecium</i> (KBN no. 1620)	8	2	2	2		≥32
<i>E. faecium</i> (KBN no. 2106)	4	2	2	2		≥32
<i>E. casseliflavus</i> (KBN no. 1887)	2	2	2	2		≥32

[0083]

표 5에서 나타낸 바와 같이, GNU5는 반코마이신-내성 엔테로코커스(VRE) 3종에 대해 강한 항균력을 나타내었으며, GNU6와 GNU7은 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA) 3종과 반코마이신-내성 엔테로코커스(VRE) 3종 모두에 대해 강한 항균력을 나타냄으로써, 기존에 항생제 내성균에 강하게 작용하는 것으로 알려진 buforin IIb과 거의 유사한 항균력이 있음을 확인하였다.

[0084]

[0085]

제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[0086]

1-1. 산제의 제조

[0087]

서열번호 5, 6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 20 mg

[0088]

유당 100 mg

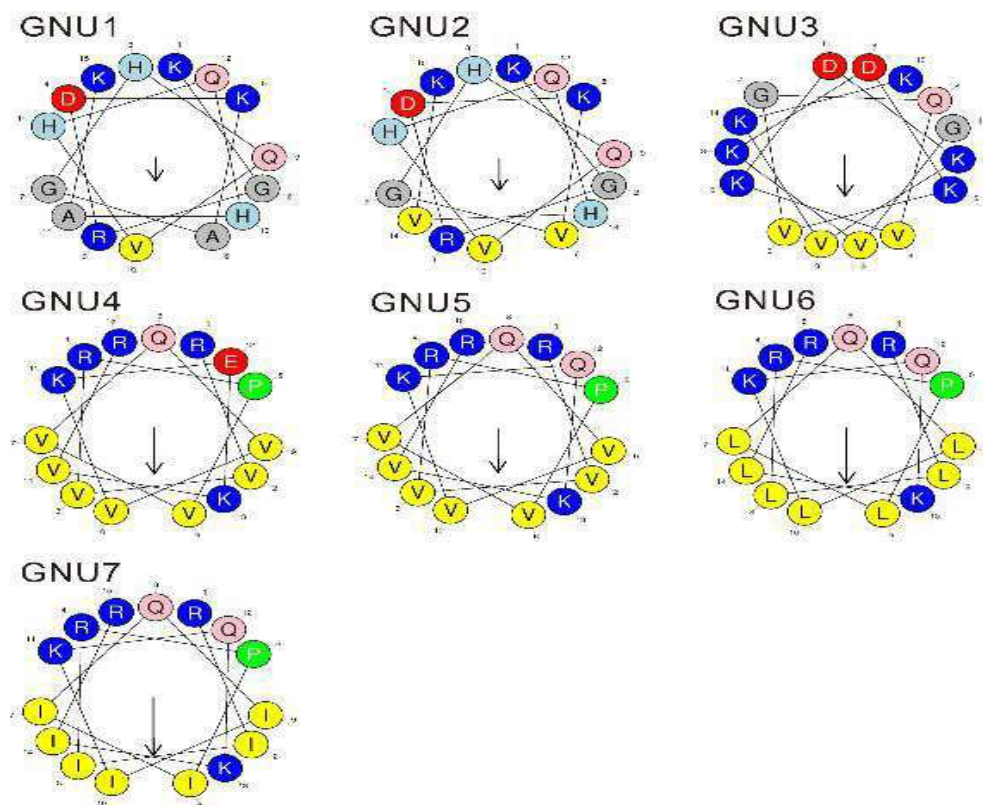
- [0089] 탈크 10 mg
- [0090] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0091] **1-2. 정제의 제조**
- [0092] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 10 mg
- [0093] 옥수수전분 100 mg
- [0094] 유당 100 mg
- [0095] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0096] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0097] **1-3. 캡슐제의 제조**
- [0098] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 10 mg
- [0099] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0100] 락토오스 14.8 mg
- [0101] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0102] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0103] **1-4. 주사제의 제조**
- [0104] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 10 mg
- [0105] 만니톨 180 mg
- [0106] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0107] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0108] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0109] **1-5. 액제의 제조**
- [0110] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 20 mg
- [0111] 이성화당 10 g
- [0112] 만니톨 5 g
- [0113] 정제수 적량
- [0114] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0115]
- [0116] **제제예 2. 식품방부제의 제조예**
- [0117] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드
- [0118] 0.5%

[0119]	데히드로초산 0.1%
[0120]	소르빈산칼륨 0.1%
[0121]	소르빈산칼슘 0.2%
[0122]	안식향산나트륨 0.5%
[0123]	안식향산칼륨 0.1%
[0124]	안식향산칼슘 0.5%
[0125]	파라옥시안식향산메틸 0.1%
[0126]	파라옥시안식향산프로필 0.1%
[0127]	프로피온산나트륨 0.1%
[0128]	프로피온산칼슘 0.1%
[0129]	통상의 방부제 제조방법에 따라 각각 포함시켜 제조한다.
[0130]	제제예 3. 화장품 첨가제 제제예
[0131]	<u>2-1. 유연화장수(스킨로션)의 제조</u>
[0132]	서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 향균펩타이드 0.5 %
[0133]	베타-1,3-글루칸 1.0 %
[0134]	부틸렌글리콜 2.0 %
[0135]	프로필렌글리콜 2.0 %
[0136]	카르복시비닐폴리머 0.1 %
[0137]	피이지-12 노닐페닐에테르 0.2 %
[0138]	폴리솔베이트 80 0.4 %
[0139]	에탄올 10.0 %
[0140]	트리에탄올아민 0.1 %
[0141]	방부제, 색소, 향료 적량
[0142]	정제수 to 100 %
[0143]	<u>2-2. 영양화장수(밀크로션)의 제조</u>
[0144]	서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 향균펩타이드 0.5 %
[0145]	베타-1,3-글루칸 1.0 %
[0146]	밀납 4.0 %
[0147]	폴리솔베이트 60 1.5 %
[0148]	솔비탄세스퀴올레이트 1.5 %
[0149]	유동파라핀 0.5 %
[0150]	카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
[0151]	글리세린 3.0 %
[0152]	부틸렌글리콜 3.0 %

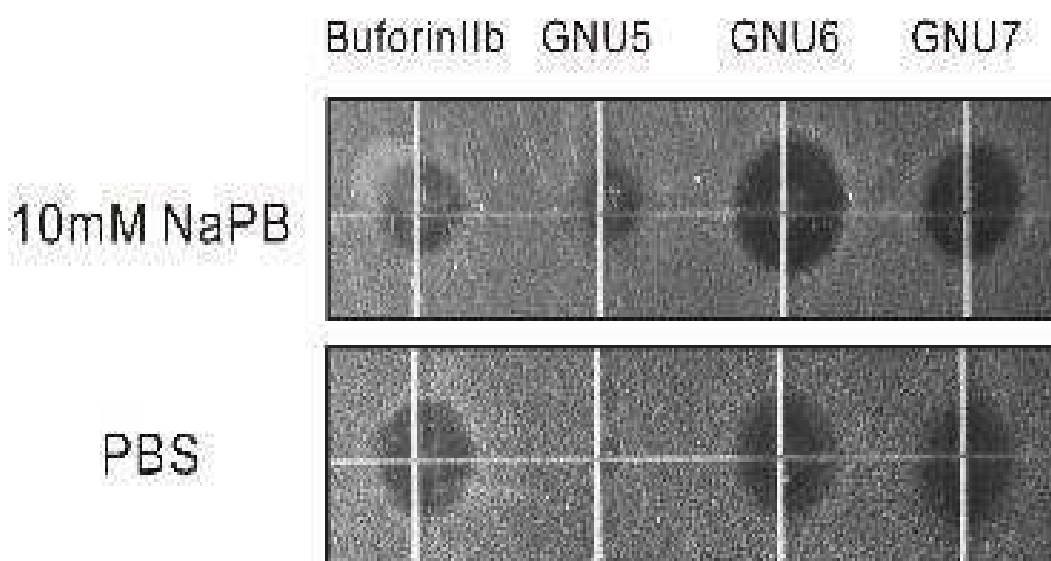
- ul style="list-style-type: none; padding-left: 0;">
- [0153] 프로필렌글리콜 3.0 %
- [0154] 카르복시비닐폴리머 0.1 %
- [0155] 트리에탄올아민 0.2 %
- [0156] 방부제, 색소, 향료 적량
- [0157] 정제수 to 100 %
- [0158] 2-3. 영양크림의 제조
- [0159] 서열번호 5,6 및 7로 기재되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 갖는 항균펩타이드 1.0 %
- [0160] 베타-1,3-글루칸 5.0 %
- [0161] 밀납 10.0 %
- [0162] 폴리솔베이트 60 1.5 %
- [0163] 피이지 60 경화피마자유 2.0 %
- [0164] 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 %
- [0165] 유동파라핀 10.0 %
- [0166] 스쿠알란 5.0 %
- [0167] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
- [0168] 글리세린 5.0 %
- [0169] 부틸렌글리콜 3.0 %
- [0170] 프로필렌글리콜 3.0 %
- [0171] 트리에탄올아민 0.2 %
- [0172] 방부제, 색소, 향료 적량
- [0173] 정제수 to 100 %

도면

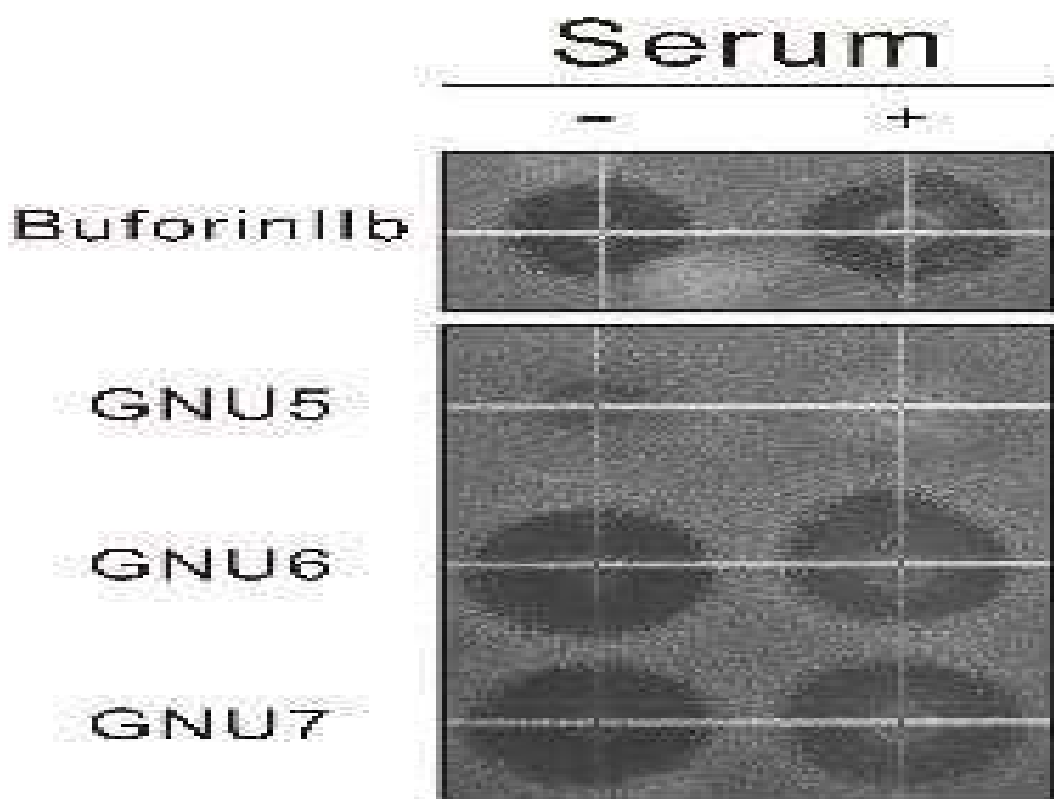
도면1



도면2

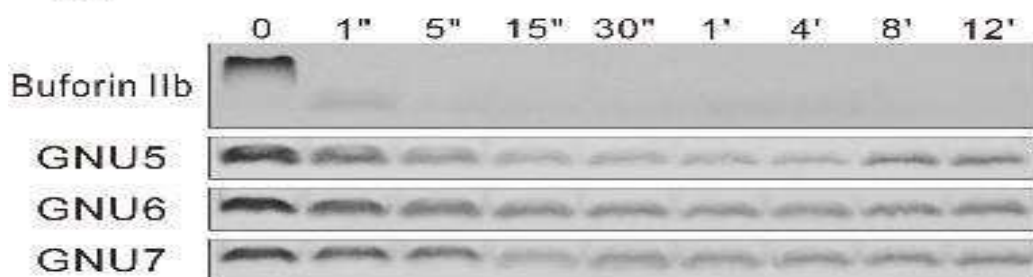


도면3

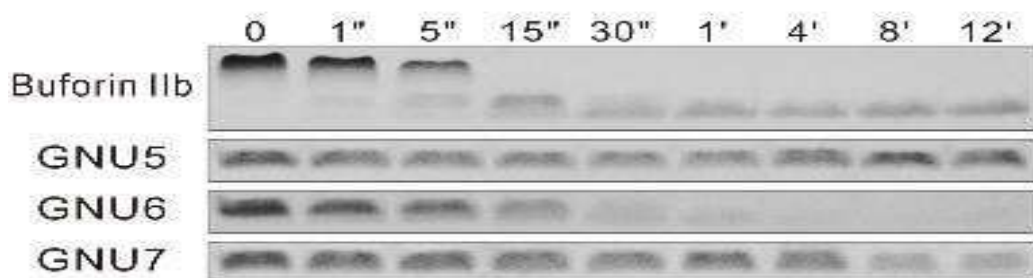


도면4

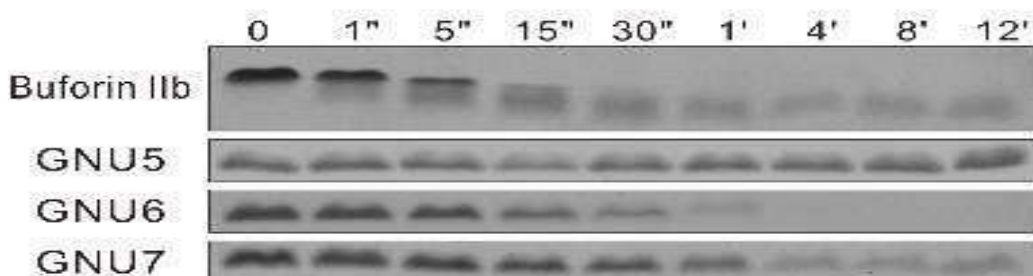
Trypsin



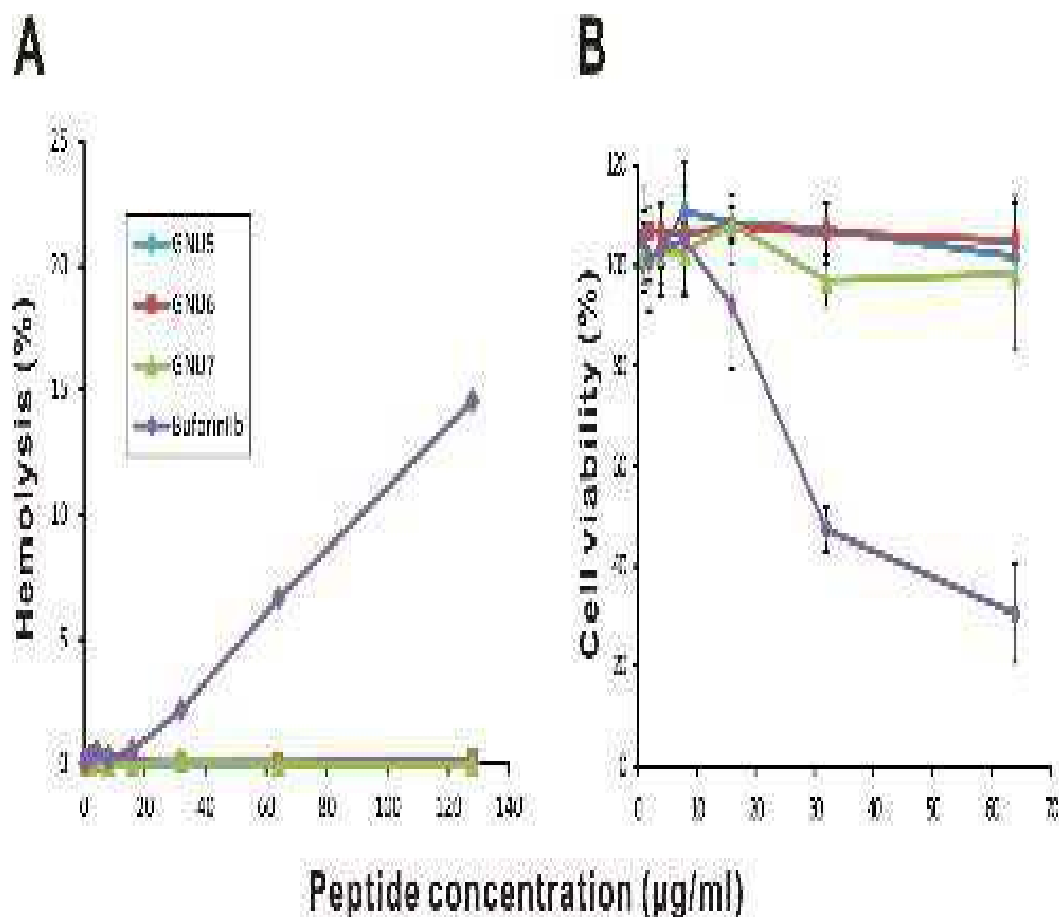
Chymotrypsin



Aureolysin



도면5



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Antimicrobial peptide with improved bioavailability and reduced cytotoxicity and antimicrobial composition comprising the same

<130> P-1.223

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GNU1 is antimicrobial peptide.

<400> 1

Lys Gly Arg Asp Lys Ala Gly His Gln Val His Gln His Ala Lys

1

5

10

15

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GNU2 is antimicrobial peptide.
 <400> 2
 Lys Gly Arg Asp Lys Val Gly His Gln Val His Gln His Val Lys
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GNU3 is antimicrobial peptide.
 <400> 3
 Gly Val Lys Asp Lys Val Gly Gln Val Lys Asp Lys Val Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GNU4 is antimicrobial peptide.
 <400> 4
 Arg Val Val Arg Pro Val Val Gln Val Val Lys Glu Lys Val Arg
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GNU5 is antimicrobial peptide.
 <400> 5
 Arg Val Val Arg Pro Val Val Gln Val Val Lys Gln Lys Val Arg
 1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GNU6 is antimicrobial peptide.

<400> 6

Arg Leu Leu Arg Pro Leu Leu Gln Leu Leu Lys Gln Lys Leu Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GNU7 is antimicrobial peptide.

<400> 7

Arg Ile Ile Arg Pro Ile Ile Gln Ile Ile Lys Gln Lys Ile Arg

1 5 10 15