

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 3월 28일 (28.03.2019) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2019/059572 A2

(51) 국제특허분류:

C07K 7/08 (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A23K 20/147 (2016.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A23K 20/195 (2016.01) *A01N 33/08* (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010459

(22) 국제출원일: 2018년 9월 7일 (07.09.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0122499 2017년 9월 22일 (22.09.2017) KR

(71) 출원인: 조선대학교산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY**) [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 박윤경 (**PARK, Yoonkyung**); 57219 전라남도 장성군 장성을 매화7길 4, Jeollanam-do (KR). 이종국 (**LEE, Jong-Kook**); 58125 전라남도 화순군 화순읍 광덕로 155, 201동 401호, Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (**CHOI, Kyu Whan**); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

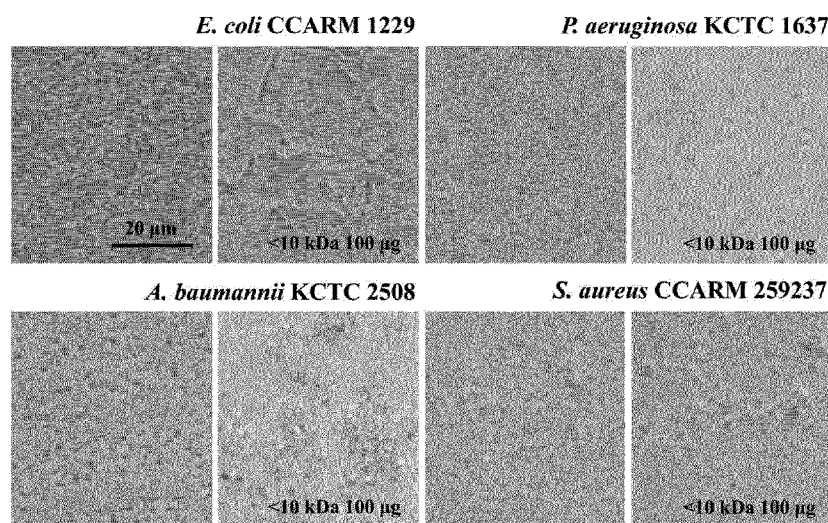
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVED FROM SKATE SKIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 홍어 껍질 유래의 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel antimicrobial peptide derived from skate skin and a use thereof. The antimicrobial peptide, of the present invention, composed of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 has an excellent antimicrobial effect against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria and exhibits low cytotoxicity against human erythrocyte cells, and thus can be used for various purposes.

(57) 요약서: 본 발명은 홍어 껍질로부터 유래한 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드는 그람 양성균 및 그람 음성균에 대한 항균 효과가 우수하며 인간 적혈구 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 다양한 용도로 사용될 수 있을 것이다.



WO 2019/059572 A2

명세서

발명의 명칭: 홍어 껍질 유래의 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도 기술분야

[1] 본 발명은 홍어 껍질 유래의 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 모든 생물체들은 항균제 기능의 펩타이드를 자연적으로 생산하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 펩타이드의 항균작용은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 항균 기능의 펩타이드들은 아미노산의 서열에 따라 시스테인이 풍부한 병풍형(β -sheet) 펩타이드, 나선형(α -helical) 양친화성 분자, 및 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드 등으로 분류된다. 또한, 생체 내에서 생산된 펩타이드 이외에 주변의 동종 또는 이종의 세균들과 경쟁하기 위해 분비된 박테리오신(bacteriocin)은 유해 세균을 죽이는 항생물질로서 잘 알려져 있다. 박테리오신은 구조에 따라, 란티바이오틱스(lantibiotics), 비란티바이오틱스(nonlantibiotics) 및 신호 펩타이드(signal peptide)의 세 가지로 분류된다. 이러한 생체 내에서 생성되어 항생 기능 작용을 하는 항생 펩타이드 또는 박테리오신은 항생제 내성, 항생제 쇼크 등의 문제점을 해소할 수 있다.
- [3] 따라서 기존의 항균제를 대처할 수 있는 천연 항균제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 천연 항균제라 함은 식물 또는 미생물로부터 생화학적 또는 생리학적 차이를 극대화하여 바이러스, 박테리아, 효모, 곰팡이 등을 선택적으로 성장을 억제/제어하고, 인체에 무해하거나 독성을 최소화한 낮은 항균제를 말한다.
- [4] 현재 보고된 천연 항균제들 중 하나인 프로폴리스는 천연 항산화 물질로 플라보노이드가 들어있는 나무만 골라 수지 성분을 뽑아내, 타액과 효소를 섞어 만들어 벌집 안에 꿀과 여왕벌 등을 보호하고자 방어 물질을 발라 놓는다. 일벌에 의한 세균 감염예방에 효과적인 프로폴리스에 들어 있는 각종 비타민과 아미노산, 플라보노이드 등은 세포대사를 촉진하는 역할을 하고 테르펜류 등은 항암 및 항균 작용을 하고, 체내에 염증과 통증을 일으키는 물질인 프로스타글란딘을 억제하여 면역력 강화에 도움을 준다. 그러나, 프로폴리스는 화분이 섞여 있으므로 꽃가루 알레르기를 가질 수 있으며, 임산부는 의사와의 상담 후 복용하는 것이 좋다.
- [5] 민간 요법중 하나로서, 삭힌 홍어는 강알카리성 식품으로 골다공증, 기미, 주근깨 등 피부미용에도 좋고, 삭힌 홍어탕은 위염을 억제하고 숙취해소에 좋으며, 뇌졸중과 신부전증 예방 효과도 크다고 알려져 있다. 그리고 홍어가 천연 항균제로서의 역할을 수행한다는 것이 전해지고 있다.
- [6] 한편, 한국등록특허 제1263452호에는 '키조개로부터 유래된 신규한 항균

펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1734331호에는 '한국산 해삼에서 분리한 신규한 항균활성 펩타이드 및 그 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 홍어 껍질 유래의 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 천연 생물소재인 홍어(*Okamejei kenojei*)의 껍질로부터 추출, 분리 및 정제하여 항균 활성이 있는 분획을 얻고, 그람 음성 및 그람 양성 세균에 대해 우수한 항균 활성을 보이며, 인간 적혈구 세포에 대해 낮은 세포 독성을 보이는 신규한 펩타이드를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 홍어(*Okamejei kenojei*) 껍질로부터 유래한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명의 신규한 항균 펩타이드는 우수한 항균 활성과 동시에 인간 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 펩타이드가 유래한 홍어 껍질은 잘 사용되지 않고 버려지는 것으로, 재료의 확보가 용이하고 단가가 낮은 장점이 있어, 천연 항균제로서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 홍어(*Okamejei kenojei*) 껍질로부터 본 발명의 펩타이드 분리과정을 나타내는 개요도이다.
- [19] 도 2는 홍어 껍질로부터 추출된 추출액(<10kDa)을 이용하여 박테리아에 대한 항균활성을 확인할 결과로, 각 박테리아별로 좌측은 추출액을 처리하지 않은 모습이고, 우측은 100 μ g의 추출액을 처리한 모습이다.
- [20] 도 3은 홍어 껍질로부터 분리된 10kDa 이하의 단백질을 RP-HPLC를 이용하여 각각의 피크의 분획을 모아 GFP+ 대장균에서 항균활성을 측정한 결과이다.
- [21] 도 4는 홍어 껍질로부터 유래된 펩타이드의 피크를 LC-HPLC를 이용하여 확인한 히스토그램과, 트리신(tricine) SDS-PAGE 전기영동 분석결과이다.
- [22] 도 5는 홍어 껍질로부터 유래된 펩타이드의 분자량 측정결과이다.
- [23] 도 6은 홍어 껍질로부터 유래된 펩타이드의 인간 적혈구 세포에 대한 용혈활성을 측정한 결과이다. SA1: 홍어 껍질 유래 항균 펩타이드, Melittin: 벌독 유래 항균 펩타이드.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍어(*Okamejei kenojei*) 껍질로부터 유래한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.
- [25] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 신규한 항균 펩타이드는, 홍어의 껍질로부터 분리한 것으로, 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 세포 독성이 낮은 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 알려진 통상의 단백질/펩타이드 추출방법에 의해 홍어 껍질로부터 추출 및 분리할 수 있다. 또한, 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조할 수도 있다. 상기 합성을 위한 방법으로는 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., *Proteins; structures and molecular principles*, 1983)으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(solution phase peptide synthesis), 고상 펩타이드 합성법(solid-phase peptide synthesis), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [26] 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [27] 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*), 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균일 수 있고, 바람직하게는 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 또는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*)의 그람 음성균일 수 있으며, 가장 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스

에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [28] 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균일 수 있고, 바람직하게는 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*)의 그람 양성균일 수 있으며, 가장 바람직하게는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [29] 상기 그람 음성균 및 그람 양성균 외, 본 발명의 항균 펩타이드는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가질 수 있다. 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [30] 상기 항생제는 이에 제한되지는 않으나, 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 항생제를 포함한다.
- [31] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [32] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 본 발명의 홍어 껍질로부터 유래한 항균 펩타이드는 그람 음성균 및 그람 양성균 그리고 항생제 내성균에 대해 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대해 낮은 세포 독성을 가지므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [33] 본 발명의 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 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. 본 발명의 항균 펩타이드를 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [34] 즉, 본 발명의 항균 펩타이드는 실제의 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [35] 또한, 본 발명의 항균 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [36] 본 발명의 항균 펩타이드의 유효용량은 0.1 내지 2mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지는 1mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.
- [37] 본 발명의 항생제에서 본 발명의 신규한 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 신규한 펩타이드의 항생제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물을 제공한다.
- [39] 본 발명의 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [40] 본 발명의 항균용 의약품은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다. 상기 개체는 인간을 제외한 포유류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [42] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [43] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 항균 펩타이드 이외에 화장료 조성물에

통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

- [44] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 펩타이드는 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.
- [45] 본 발명의 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 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [46] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 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.
- [47] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명의 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.
- [49] 본 발명의 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.
- [50] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [51] 또한, 본 발명은 상기 향균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 향균용 식품 첨가제를 제공한다.

- [52] 본 발명의 펩타이드를 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 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.
- [53] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [54] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [55] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [56] 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물군 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.
- [57] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.
- [58] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.
- [59] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서, 그람 음성균 및 그람 양성균 그리고 항생제 내성균에 대해 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대해 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 생물농약 또는 방부 조성물의 유효성분으로 유용하게 활용될 수 있다.

- [60] 상기 방부 조성물에는 화장품 보존제 또는 의약품 보존제 등이 있다. 상기 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.
- [61] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [62] 실시예 1. 홍어 껍질로부터 단백질 추출
- [63] 홍어(*Okamejei kenojei*) 껍질을 액체질소가 첨가된 상태의 막자사발과 절구 공이를 이용하여 분말로 분쇄한 후, 상기 분말을 4°C에서 3시간 동안 50% 메탄올에 첨가하여 잘 혼합한 후, 12,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 이때, 본 발명의 단백질 추출방법은 공지의 방법을 변형하여 수행하였다(Ana Segura et al., (1999) Mol Plant Microbe Interact., 12(1):16-23). 이후, 추출된 추출물을 6,000xg에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액 만을 취하여 스펙트라/포아 7(Spectra/Por 7: 3,500D MWCO) 멤브레인(Spectrum Laboratories, Inc., 미국)을 사용하여 3차 증류수로 4°C에서 투석(dialysis)하여 정제하였다.
- [64] 실시예 2. 항균활성 측정
- [65] 상기 실시예 1에서 추출한 홍어 껍질로부터 분리된 작은 크기의 단백질/펩타이드의 항균활성을 측정하기 위하여 아래와 같이 실시하였다.
- [66] 대장균(CCARM 1229), 슈도모나스 에루지노사(KCTC 1637), 아시네토박터 바우마니(KCTC 2508) 그리고 포도상구균(CCARM 259237)을 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)에 각 웰당 1×10^5 세포가 되도록 희석하여 각각의 균이 포함된 배지(LB, NB+0.5% NaCl, NB, TSB) 100 μ l를 플레이트에 분주한 후, 음성 대조군에는 각각의 균만을 분주하고 나머지 플레이트에는 각각의 균과 상기 실시예 1에서 정제한 샘플 100 μ g을 접종하여 37°C 배양기에서 4시간 배양하였다. 이후, 항균 활성여부를 가시화하기 위해 현미경을 이용하여 각각의 균만을 접종한 것과 균과 샘플을 접종한 플레이트를 확인하였다. 그 결과, 각각의 균만을 접종한 플레이트에 비해 균과 샘플을 함께 접종한 플레이트에서는 세균들의 성장이 정상적이지 않은 형태를 보이는 것으로 관찰되었다(도 2).
- [67] 도 2는 홍어 껍질로부터 추출된 10kDa 이하 샘플을 이용하여 항균활성을 측정한 결과로, 음성 대조군 및 실험군에서 균체의 생육 정도를 관찰한 결과, 홍어 껍질에서 분리한 10kDa 이하의 샘플의 강력한 항균활성이 확인되었다.
- [68] 실시예 3. 역상 HPLC 및 항균활성 측정
- [69] 실시예 1로부터 얻은 홍어 껍질의 <10kDa의 샘플을 C18 컬럼(4.6x250mm;

4.6±0.3μm particle; 12.0±1.0nm pore; Shimadzu, 일본) 역상-HPLC(reverse phase High-performance liquid chromatography)를 이용하여 각각의 피크를 분리하였다. 이때, 버퍼(0.5% TFA가 포함된 아세트나이트릴 B)의 기울기(linear gradient, 10~65%, 2%/min, 30min)에 의해 용출한 후, 피크의 분획을 모아 항균활성을 측정하였다.

- [70] 이때, 항균활성 측정을 위해, 대장균에 GFP(green fluorescence protein) 발현을 유도하여 사용하였다. 대장균 수는 96-웰 마이크로적정 플레이트에 각 웰당 5×10^4 , 1×10^5 세포가 되도록 희석하여 대장균을 포함한 LB 배지 100μl를 플레이트에 분주한 후, 음성 대조군에는 대장균 만을 분주하고 나머지 플레이트에는 대장균 및 상기 역상-HPLC로부터 얻은 각각의 피크 분획물을 접종하여 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 이후, 항균활성을 가시화하기 위해 형광현미경을 이용하여 대장균 만을 분주한 플레이트와 대장균과 각각의 용출 분획물을 접종한 플레이트를 확인하였다. 그 결과 대장균만을 분주한 곳에 대조하여 피크 번호 4, 5, 6 및 7번 모두 강한 항균활성을 보였으며, 군수가 증가하더라도 강한 항균활성을 갖는 것을 확인하였다(도 3). 특히, 피크 7번은 역상-HPLC에서 많은 양의 농도를 획득할 수 있었으며, 다른 피크의 항균활성과 대조한 결과 강한 항균활성을 갖는 것을 확인하였다.

[71] 실시예 4. HPLC 확인 및 Tricine SDS-PAGE

- [72] 상기 실시예 3으로부터 얻은 피크 7번 샘플을 C18 컬럼(4.6×250mm; 4.6±0.3μm particle; 12.0±1.0nm pore; Shimadzu) 역상-HPLC를 이용하여 정제하였다. 이때, 버퍼(0.5% TFA가 포함된 아세트나이트릴 B)의 기울기(linear gradient, 10~65%, 2%/min, 30min)에 의해 용출한 후, 각각의 피크 분획을 대상으로 Tricine SDS-PAGE을 수행하여 분자량을 확인하였다. 전기영동 후의 겔은 은 염색(silver staining) 방법으로 염색하여 밴드의 크기를 확인하였다. 그 결과, 강력한 항균활성을 가진 피크 7번 샘플은 크기 마커를 비교해서 추측할 때 2 kDa 이하에 존재하는 아주 작은 크기의 단백질/펩타이드임을 알 수 있었다(도 4).

[73] 실시예 5. 분자량 및 아미노산 서열 확인

- [74] 상기 실시예 4에서 정제한 펩타이드를 6N 염산에 녹인 후 110°C에서 22시간 동안 가수분해하여 건조시키고, 아미노산 분석기를 이용하여 아미노산 서열을 확인하였다. 또한, 질량분석기(Kratos, AXIMA-CFR; Shimadzu)를 이용하여 상기 서열이 확인된 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

- [75] 그 결과, 홍어 껍질에서 유래한 펩타이드는 분자량이 1,466Da의 작은 크기의 펩타이드임을 확인하였다(도 5). 또한, 홍어 껍질에서 유래한 펩타이드의 아미노산 서열분석은 에드만 분해법(Edman degradation)을 이용하였으며, 서열번호 1로 기재하였다.

[76] 실시예 6. 적혈구 용혈활성의 측정

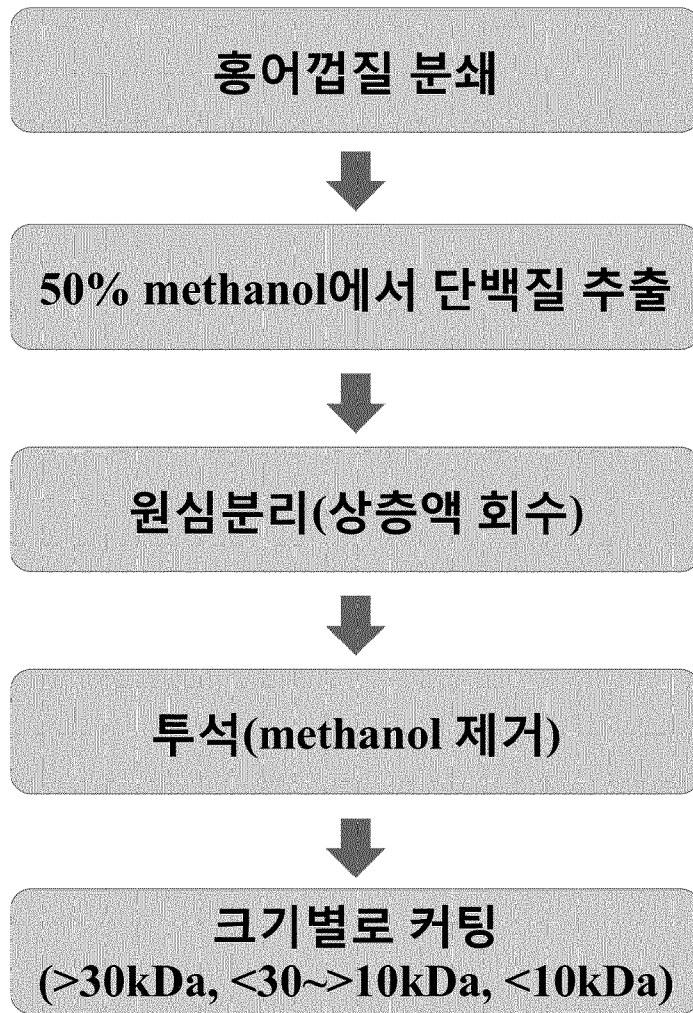
- [77] 상기 펩타이드의 세포독성 여부를 판별하기 위하여 적혈구 용혈 활성을 하기와 같이 측정하였다.

- [78] 인간 적혈구(erythrocytes)를 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.0) 완충액으로 3회 세척하고, PBS 완충액으로 희석한 8.0% 적혈구 용액을 96-웰 마이크로적정 플레이트에 100 μ l씩 로딩한 후, 본 발명의 펩타이드 용액을 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μ M/웰의 농도로 섞어준 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 414nm에서 흡광도 측정을 하였다. 또한, 대조군으로서 공지된 항균 펩타이드인 멜리틴(melittin)을 동일한 농도로 처리하였다. 이때, 적혈구 세포의 용혈 정도의 기준이 되는 대조군으로, 0.1% 트리톤 X-100을 처리하였을 경우의 흡광도 값을 100% 용혈도로 하여, 각 펩타이드의 용혈율, 즉 세포 파괴정도(hemolysis)는 하기 수학적 식 1에 의하여 산출하였다.
- [79] [수학적 식 1]
- [80] 적혈구 파괴능(%) = (흡광도 A - 흡광도 B) / (흡광도 C - 흡광도 B) X 100
- [81] (상기 식에 있어서, 흡광도 A는 414nm 파장에서 측정한 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.)
- [82] 그 결과, 본 발명의 홍어 껍질로부터 유래한 항균 펩타이드(SA1)는 인간 적혈구 세포에 대해 낮은 용혈 활성을 보여, 세포 독성이 낮음을 확인할 수 있었다. 반면, 벌독 유래 항균 펩타이드인 멜리틴은 3.125 μ M의 낮은 농도에서도 55% 이상의 높은 용혈 활성을 보여 세포 독성이 높은 펩타이드임을 알 수 있었다(도 6).

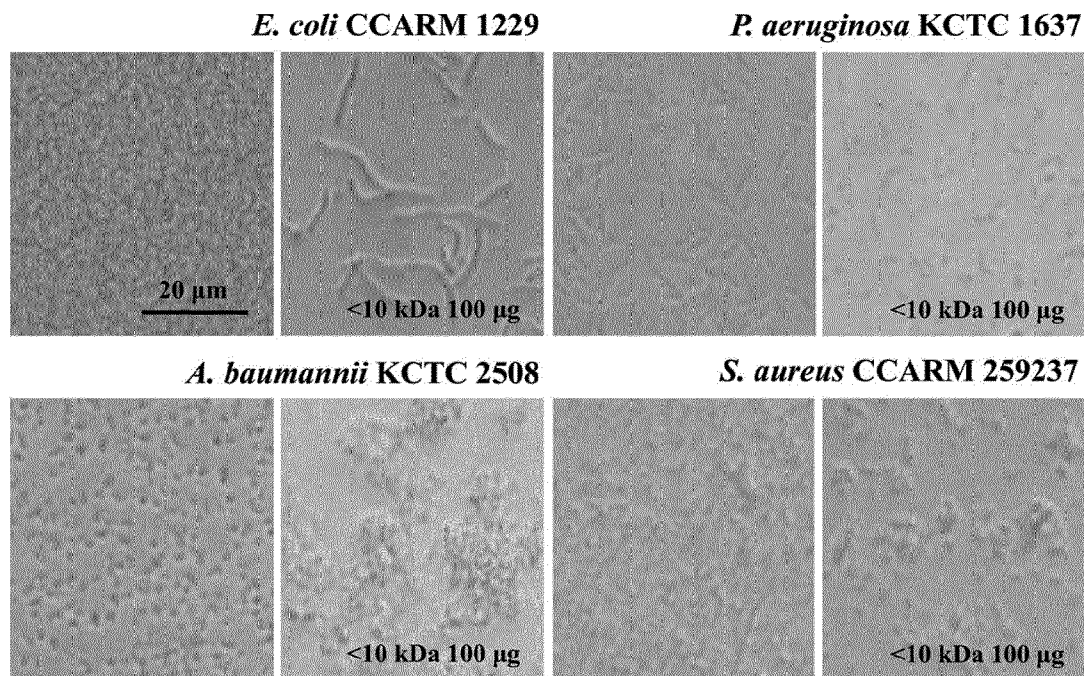
청구범위

- [청구항 1] 홍어(*Okamejei kenojei*) 껍질로부터 유래한 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 6] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.
- [청구항 7] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물.
- [청구항 8] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법.
- [청구항 9] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물.
- [청구항 10] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제.
- [청구항 11] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제.
- [청구항 12] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약.
- [청구항 13] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물.

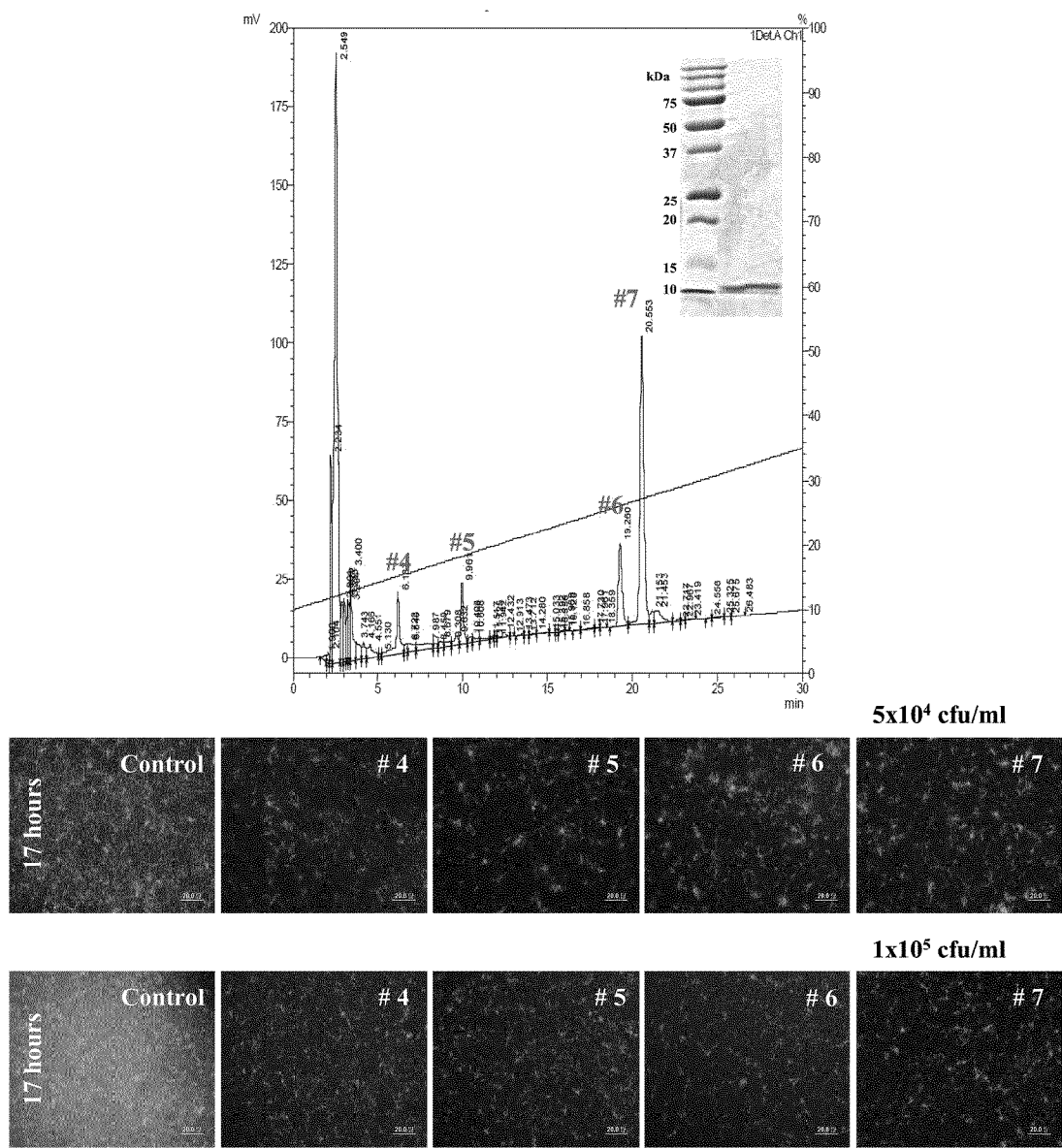
[도1]



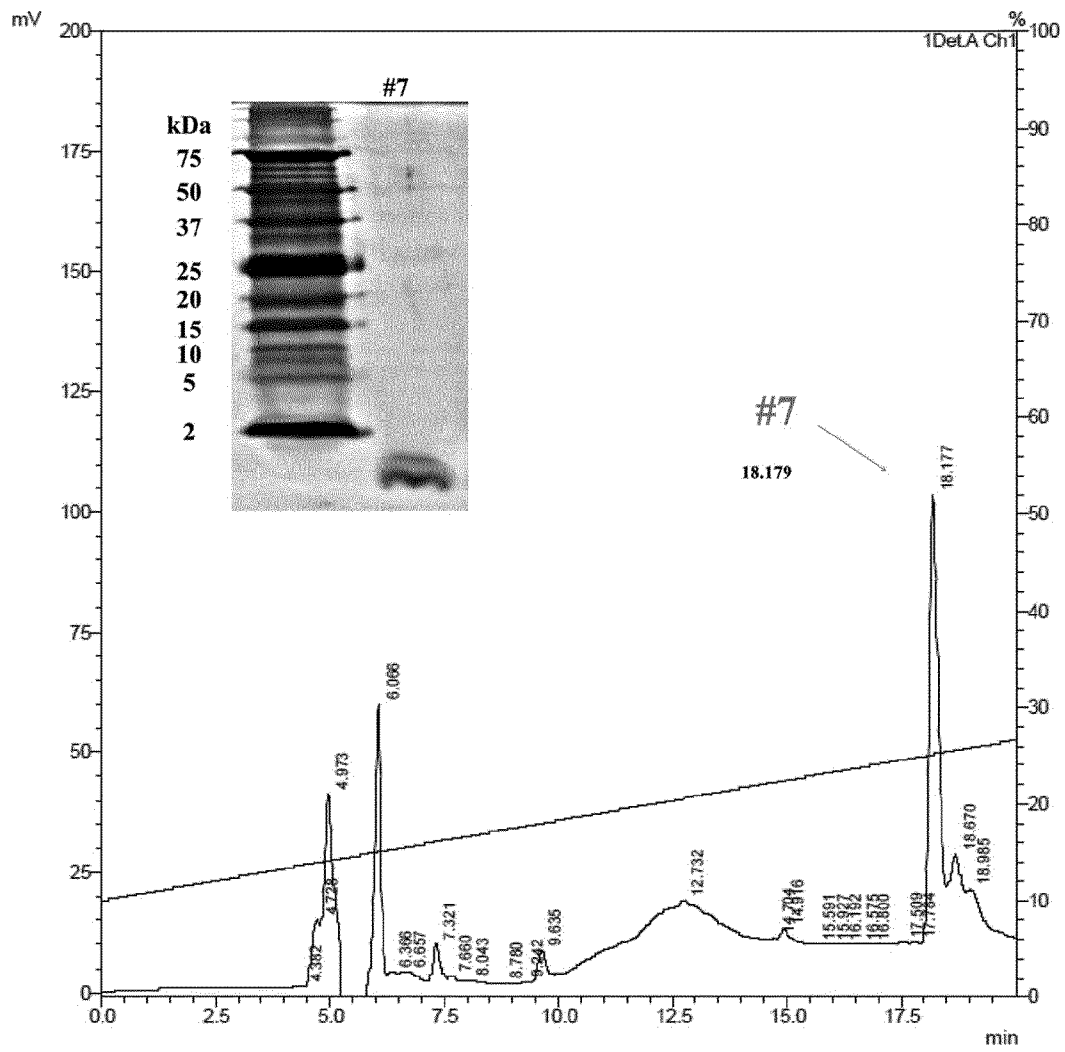
[도2]



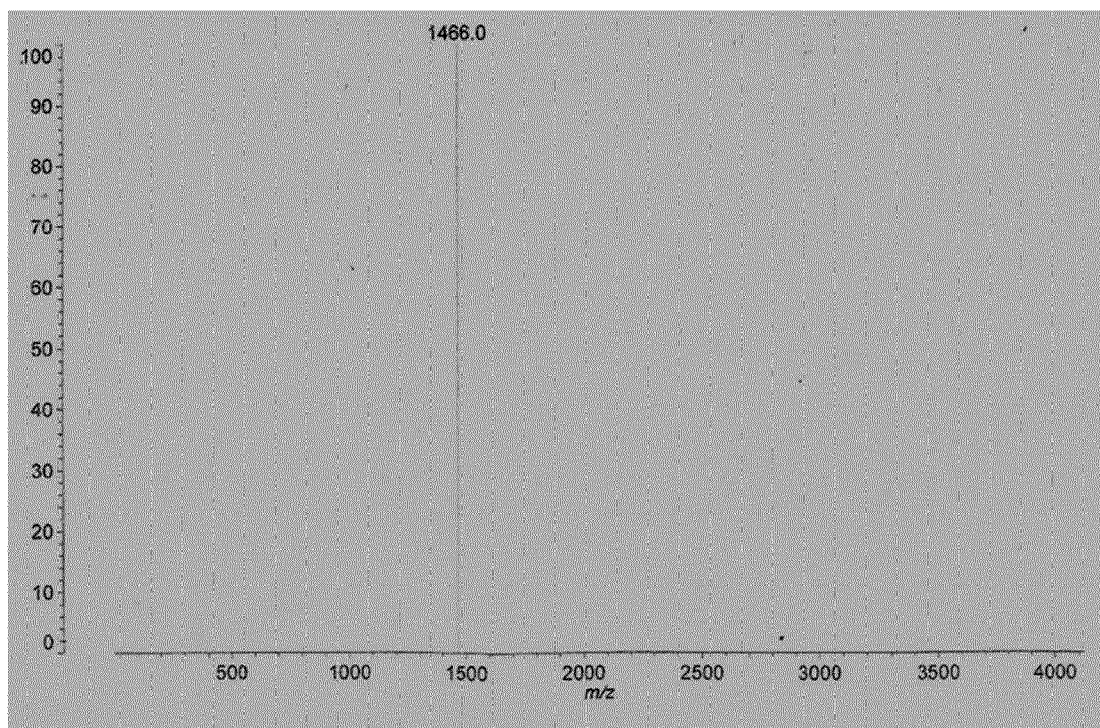
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

