

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0086053
(43) 공개일자 2022년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)
A23K 20/147 (2016.01) A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)
A01N 63/50 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2020-0176164

(22) 출원일자 2020년12월16일

심사청구일자 2020년12월16일

(71) 출원인

동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단
경상북도 경주시 동대로 123 (석장동)

(72) 발명자

구태원
경상북도 경주시 충효2길 40-13, 삼보마을1차 20
4동 404호

윤은영

경기도 성남시 분당구 정자로 56,
상록마을라이프A 109동 1401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 퍼씨알

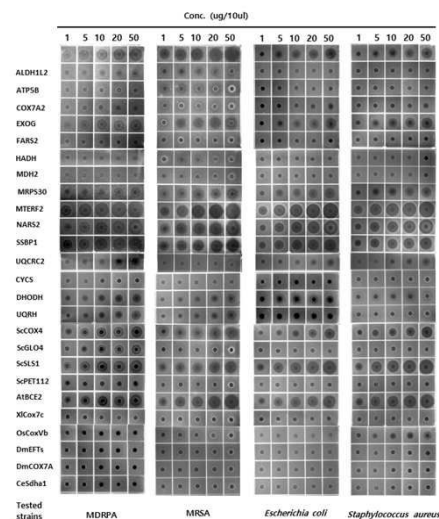
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 및 그 용도에 관한 것으로, 상기 펩타이드는 항균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸 활성이 우수할 뿐만 아니라, 세포독성이 낮고 트립신 등 프로테아제에 의해 쉽게 분해되지 않으므로, 다양한 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23K 20/147 (2016.05)

A61K 8/64 (2013.01)

A61Q 17/005 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

(72) 발명자

이규식

경상북도 경주시 충효중앙길 74, 3층 305호

조상현

경상북도 경주시 현곡면 안현로 68-7, 새한센시빌
110동 101호

정은정

경상북도 경주시 동성로 148

이민구

경상북도 칠곡군 지천면 지천로 492-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021604
과제번호	318018033HD020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명	곤충 생체 지질함량 향상 및 부산물 이용 천연방부제 생산 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	동국대학교 산학협력단(경주)
연구기간	2018.04.26 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711118700
과제번호	2020R1F1A1075607
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	항균 및 항암 활성을 가지는 미토콘드리아 표적서열에 관한 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	동국대학교(경주캠퍼스)
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.05.28

명세서

청구범위

청구항 1

미토콘드리아 전구서열(presequence)로부터 유래한 알파-나선(alpha-helix) 구조를 갖는 양친성 펩타이드(amphiphilic peptide)로서,

알파-나선구조의 중심축과 상기 알파-나선구조를 형성하는 아미노산 중 어느 하나의 아미노산을 포함하는 가상의 직각 평면을 기준으로, 일측은 3 이상의 비극성 아미노산을 포함하고, 타측은 3 이상의 염기성 아미노산을 포함하며,

상기 펩타이드의 N-말단은 메티오닌이고,

항균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성을 나타내는 것인 양친성 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 9 내지 103개의 아미노산으로 구성된 것인 양친성 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 아르기닌(Arginine)을 하나 이상 포함하는 것인 양친성 펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 류신(Leucine)을 하나 이상 포함하는 것인 양친성 펩타이드.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 N-말단의 메티오닌을 기준으로,

$4n-2$ 내지 $4n+1$ 번째 아미노산 중 적어도 하나는 비극성 아미노산이고,

$4n-2$ 내지 $4n+1$ 번째 아미노산 중 적어도 하나는 염기성 아미노산인 것인 양친성 펩타이드(n 은 1 이상의 정수).

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드에 포함된 산성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 0 : 1 내지 0.8 : 1 인 것인 양친성 펩타이드.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 1.2 : 1 내지 6.5 : 1 인 것인 양친성 펩타이드.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산 및 극성 아미노산의 개수비가 0.4 : 1 내지 4.0 : 1 인 것인 양친성 펩타이드.

청구항 9

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 사료첨가제.

청구항 10

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 화장료 조성물.

청구항 11

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 위생용 향균제품.

청구항 12

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 의료용 향균제품.

청구항 13

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 14

제 1항의 양친성 펩타이드를 포함하는 천연방부제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나이다. 페니실린(penicillin) 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 왔으나, 최근 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 등장하고 있다. 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 페니실린, 세팔로스포린(Cephalosporin) 등과 같은 종래의 화학 항생제는 미생물의 세포벽 또는 단백질의 합성저해에 의하여 항생작용을 나타낸다. 그러나, 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가 분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 발생한다. 따라서, 새로운 작용 메커니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이며, 종래의 화학 항생제와 상이한 항생기전을 나타내는 항균 펩타이드들이 새로운 개념의 차세대 항생제로서 주목을 받고 있다.

[0004] 신규 항균 펩타이드를 개발함에 있어서, 나비목, 벌목, 파리목 및 딱정벌레목 등 다양한 곤충이 불량환경에서 오랜 화의 역사를 통해 병원균 침입에 대해 강력한 항균 펩타이드를 발현하는 선천성 면역기전(innate immune system)을 보유하고 있음에 주목하여, 이들 곤충으로부터 항균펩타이드의 개발이 진행중에 있다. 다만, 이러한 항균 펩타이드는 다른 종으로부터 유래한 것이라는 점에서, 인체독성 및 단백질가수분해효소에 대한 감수성이 문제되며, 활성을 나타내는 펩타이드를 동정하는데 많은 시간이 소요된다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 세포질에서 생산된 전구체 단백질을 미토콘드리아에 선택적으로 전달하는데 필요한 아미노산 서열인 미토콘드리아 전구서열을 사용하여 항균 등 다양한 활성을 나타내는 펩타이드를 발굴하기 위한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2017-0013842호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성을 나타내는 양친성(amphiphilicity) 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 사료첨가제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 위생용 항균제품을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 의료용 항균제품을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 양친성 펩타이드를 포함하는 천연방부제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양상은 미토콘드리아 전구서열(presequence)로부터 유래한 알파-나선(alpha-helix) 구조를 갖는 양친성 펩타이드(amphiphilic peptide)로서, 알파-나선구조의 중심축과 상기 알파-나선구조를 형성하는 아미노산 중 어느 하나의 아미노산을 포함하는 가상의 직각 평면을 기준으로, 일측은 3 이상의 비극성 아미노산을 포함하고, 타측은 3 이상의 염기성 아미노산을 포함하며, 상기 펩타이드의 N-말단은 메티오닌이고, 항균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성을 나타내는 것인 양친성 펩타이드를 제공한다.

[0017] 본 발명의 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드는 알파-나선 구조를 이루며, 알파-나선구조의 일측은 3 이상의 비극성 아미노산을 포함하여 소수성 성질을, 타측은 3 이상의 염기성 아미노산을 포함하여 양이온성 성질을 갖는 양쪽성 성질을 나타내기 때문에, 기존에 알려진 항균 펩타이드와 유사한 메커니즘으로 세포벽을 파괴할 수 있다. 반면, 구성 비율 및 순전하(net charge) 등에서 기존의 항균 펩타이드와는 차이가 있으며, 대표적인 항균 펩타이드인 멜리틴(melittin)보다도 세포독성이 낮고 트립신 등 프로테아제에 의해 쉽게 분해되지 않으므로, 사료첨가제, 화장품 조성물, 약학적 조성물, 항균제품 및 천연방부제 등의 광범위한 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어, "미토콘드리아 전구서열(presequence)"은 미토콘드리아 표적 서열(targeting sequence)과 같은 의미로 사용되며, 세포질에서 합성된 전구체 단백질의 아미노산의 N-말단에 위치하여, 전구체

단백질을 미토콘드리아에 선택적으로 전달하는데 필요한 아미노산 서열을 말한다.

- [0019] 미토콘드리아 전구서열은 양친성을 나타내어 전구체 단백질이 미토콘드리아의 세포막을 효율적으로 투과할 수 있도록 한다. 본 발명은 이와 같은 성질을 나타내는 미토콘드리아 전구서열로부터 유래한 펩타이드를 세균, 진균, 바이러스 및 암세포의 억제에 선택적으로 적용할 수 있음을 확인함으로써, 항균, 항진균 및 암세포 사멸 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어, "가상의 직각 평면"은 알파-나선구조의 중심축에 직각이 되도록, 알파-나선구조를 형성하는 아미노산 중 어느 하나의 아미노산과 중심축을 연결한 직선, 및 중심축을 포함하는 가상의 평면을 말한다.
- [0021] 본 발명의 펩타이드는 전술한 가상의 직각 평면을 기준으로 일측은 비극성 아미노산이 주로 배향되고, 타측은 양이온성을 나타내는 아미노산이 주로 배향되기 때문에, 전체적으로 양친성 성질을 갖는다. 따라서, 본 발명의 펩타이드는 양이온성을 나타내는 염기성 아미노산 부분이 세포막의 표면에 결합한 후, 소수성을 나타내는 비극성 아미노산 부분에 의해 기공이 형성되는 등의 메커니즘을 통하여 세포막을 파괴하거나 세포막의 기능을 방해할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 펩타이드는 대부분 인간 유래 미토콘드리아 전구서열로부터 유래한 것이라는 점에서, 체내 독성이 낮으면서도, 미토콘드리아를 포함하지 않는 원핵생물에 대한 억제 효과가 우수하다. 한편, 본 발명의 펩타이드는 암세포의 사멸 활성이 우수하다. 이는 정상세포와 암세포의 세포막 성질의 차이 때문으로, 암세포의 경우, 세포막의 외부에 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol) 등 음전하를 나타내는 성분이 풍부하다. 따라서, 본 발명 펩타이드의 양이온성을 나타내는 부분과 암세포의 결합이 정상세포 대비 더욱 용이하므로, 결과적으로, 본 발명의 펩타이드에 의한 세포막의 파괴 및 기능 방해는 암세포에서 선택적으로 발생한다. 또한, 본 발명의 펩타이드의 경우, 항진균 활성은 우수하면서도 인간 세포에 대한 독성은 낮음을 확인하였다. 즉, 본 발명의 펩타이드는 부작용 없이 항균, 항진균 및 암세포 사멸을 위하여 유용하게 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드는 9 내지 103개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드는 아르기닌(Arginine)을 하나 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드는 류신(Leucine)을 하나 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 펩타이드는 9개 이상 및 103개 이하의 아미노산으로 구성되며, 이에는 아르기닌 및 류신이 하나 이상 포함될 수 있다. 일반적인 항균 펩타이드와는 달리, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산은 아르기닌 및 류신의 비율이 높다. 류신은 비극성 아미노산이고, 아르기닌은 염기성 아미노산으로 중성 pH에서 양전하를 갖는 아미노산이다. 한편, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산은 중성 pH에서 음전하를 갖는 아미노산인 아스파르트산 및 글루탐산의 비율이 낮다. 즉, 본 발명의 펩타이드는 알파-나선구조의 일측의 양이온성 성질 및 타측의 소수성 성질의 양친성 성질이 일반적인 항균 펩타이드보다 크기 때문에, 세균 등의 세포막의 파괴 및 기능 방해 활성이 더욱 우수하다.
- [0027] 본 발명의 펩타이드는 일측에 비극성 아미노산이 3개 이상 배향되어, 펩타이드 전체적으로 세포막의 파괴 및 기능 방해 활성에 충분한 소수성 성질을 나타낼 수 있다.
- [0028] 본 발명의 펩타이드는 타측에 염기성 아미노산이 3개 이상 배향되어, 펩타이드 전체적으로 세포막의 파괴 및 기능 방해 활성에 충분한 양이온성 성질을 나타낼 수 있다.
- [0029] 즉, 본 발명의 펩타이드는 일측에 배향되는 비극성 아미노산 및 타측에 배향되는 염기성 아미노산이 각각 3개 이상일 경우, 알파-나선구조 펩타이드의 세포막의 파괴 및 기능 방해 활성에 충분한 양친성 성질이 나타날 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드는 N-말단의 메티오닌을 기준으로, $4n-2$ 내지 $4n+1$ 번째 아미노산 중 적어도 하나는 비극성 아미노산이고, $4n-2$ 내지 $4n+1$ 번째 아미노산 중 적어도 하나는 염기성 아미노산인 것일 수 있다(n 은 1 이상의 정수).
- [0031] 즉, N-말단의 메티오닌을 기준으로, 2 내지 5번째 아미노산, 6 내지 9번째 아미노산, 10 내지 13번째 아미노산 등 $4n-2$ 내지 $4n+1$ 번째(n 은 1 이상의 정수) 아미노산 중 적어도 하나는 비극성 아미노산이고, 적어도 하나는 염기성 아미노산 일 수 있다. 이와 같이 구성된 아미노산 서열의 경우, 아미노산 서열에 의하여 형성된 알파-나선

구조를 갖는 본 발명의 펩타이드에서 양친성 성질이 나타날 수 있다.

- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드에 포함된 산성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 0 : 1 내지 0.8 : 1 인 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산 중, 산성 아미노산은 염기성 아미노산보다 적으며, 구체적으로, 산성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 0 : 1 내지 0.8 : 1 인 것일 수 있다. 따라서, 본 발명 펩타이드는 염기성 아미노산에 의하여 양이온성 성질이 나타난다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 1.2 : 1 내지 6.5 : 1 인 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산 및 극성 아미노산의 개수비가 0.4 : 1 내지 4.0 : 1 인 것일 수 있다.
- [0036] 비극성 아미노산 및 염기성 아미노산의 개수비가 1.2 : 1 내지 6.5 : 1 일 경우 및 비극성 아미노산 및 극성 아미노산의 개수비가 0.4 : 1 내지 4.0 : 1 인 경우, 세포막의 파괴 및 기능 방해 활성화에 가장 적합한 양친성 성질을 나타낼 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 사료첨가제를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "사료첨가제"는 대상생물의 생산성 향상이나 건강을 증진 및/또는 유지시키기 위해서 사료에 첨가되는 물질을 의미한다. 본 발명의 사료첨가제는 전술한 양친성 펩타이드를 포함한다.
- [0040] 사료에 포함되는 상기 사료첨가제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 0.01 내지 10.0%(w/w)일 수 있고, 바람직하게는 0.05 내지 5.0%(w/w)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 2.0%(w/w)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.2 내지 1.0%(w/w)일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 사료첨가제는 이에 한정되는 것은 아니나, 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우계류), 닭, 오리, 거위, 꿩 등 조류, 장어, 광어 등 어류 개, 고양이 등 애완동물 중 어느 하나 이상의 사료에 첨가될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 사료첨가제는 부형제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 부형제는 약제에 적당한 굳기나 형상을 주기 위해서, 또는 주제(主劑)의 양이 적은 경우에 일정 용량, 중량을 주어 취급하기 쉬운 크기로 할 목적으로 첨가되는 성분을 의미한다. 상기 부형제는 사료첨가제의 제조에 있어서 통상적으로 사용되는 것을 포함할 수 있고, 이에 한정되지는 않으나, 밀기울, 옥수수 분말, 곡류 전분, 실리카분말, 규조토 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 사료 등 기준 및 규격(농림축산식품부 고시 제2014-106호)에서 인정하고 있는 부형제 등을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 사료첨가제는 당업계의 통상적인 제형으로 제조될 수 있으며, 분말 또는 소정의 형태를 가진 펠릿 형상으로 구현될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 사료첨가제는 체내 흡수를 증진시키기 위해 나노화되거나, 소장에서의 항균 활성을 강화하기 위해 지방코팅 제형으로 제조될 수 있다.
- [0044] 상기 부형제는 전체 사료 첨가제 100 중량부에 대해 50 내지 99 중량부로 포함될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 화장료 조성물은 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속 이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 및/또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 화장료 조성물은 화장수, 젤, 로션, 연고, 크림, 팩, 에멀전, 에센스, 패치 또는 분무제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 화장료 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기재 및/또는 첨가물을 포함할 수

있으며, 그 효과를 떨어트리지 않는 범위 내에서 비이온 계면활성제, 실리콘 폴리머, 체질안료, 향료, 방부제, 살균제, 산화 안정화제, 유기 용매, 이온성 또는 비이온성 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트(emollient), 실리콘, α -히드록시산, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 향료, 보존제, 계면활성제, 소염제, 물질 P 길항제, 충진제, 중합제, 추진제, 염기성화 또는 산성화제 및/또는 착색제 등 공지의 화합물을 더 포함하여 제조될 수 있다.

[0050] 본 발명의 화장품 조성물은 예를 들어, 용액, 젤, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구, 이온형(리포솜) 또는 비이온형의 소나 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱 등의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 포함한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 위생용 향균제품을 제공한다.

[0053] 본 발명의 위생용 향균제품은 구강위생용품, 여성위생용품, 유아/아동위생용품, 애견위생용품, 생활위생용품 등 일반적으로 시중에서 판매되는 위생용품일 수 있다.

[0054] 구강위생용품으로는 예를 들어, 구강 세정제, 칫솔, 치실, 치약 등일 수 있고, 여성위생용품으로는 예를 들어, 생리대, 화장솜, 여성청결제 등일 수 있으며, 유아/아동위생용품으로는 예를 들어, 기저귀, 유아전용세제, 턱받이, 수건, 목욕용품 등일 수 있고, 애견위생용품으로는 기저귀, 배변패드, 구강청결제, 귀 세정제, 눈물 얼룩 지우개, 안구 세정제, 샴푸, 린스, 치약 등일 수 있으며, 생활위생용품으로는 마스크, 면봉, 물티슈, 비누, 샴푸, 린스, 세정제, 입욕제, 좌욕제, 탈취제, 향수, 휴지, 주방세제, 세탁세제 등일 수 있다.

[0055] 상기 위생용품의 제조시 본 발명의 양친성 펩타이드를 함유하도록 제조할 수 있으며, 각 위생용품의 제조 공정에 따라 상기 추출물의 추출방법, 추출물의 형태, 추출물의 처리 방식 및 농도 등을 당업계의 통상적인 방법으로 다양하게 변형하거나 목적에 맞도록 적절하게 조절할 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 의료용 향균제품을 제공한다.

[0058] 본 발명의 의료용 향균제품으로는 예를 들어, 소독솜, 봉대, 면 거즈, 면봉솜 또는 봉합사 등이 포함될 수 있다. 상기 봉합사는 생분해성 성분, 비흡수성 성분, 또는 이들의 혼합물로 이루어질 수 있으며, 상기 생분해성 봉합사는 PGA(polyglycolic acid), PLA(polylactic acid), PLLA(poly(lactide-co-L-lactide), PGLA(poly(glycolide-co-L-lactide), PG(polyglycolide), PL(polylactide) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 비흡수성 성분은 폴리에스터(polyester), 나일론(nylon), PAN(Polyacrylonitrile) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 봉합사는 복선사(multifilament) 형태를 가질 수 있으며, 상기 봉합사는 코팅제로서 스테아르산칼슘(Calcium Stearate) 성분을 더 포함할 수 있는데, 상기 코팅제의 사용으로 거친 표면을 마감하여 균이 기생할 수 있는 공간을 최소화할 수 있다.

[0059] 본 발명의 의료용 제품 중 소독솜, 봉대, 면 거즈 및 면봉솜은 복선사(multifilament) 형태를 가질 수 있으며, 상기 봉합사와 마찬가지로 코팅제로서 스테아르산칼슘(Calcium Stearate) 성분을 더 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 상기 의료용 제품 중 봉대 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.

[0062] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0063] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및/또는 미네랄 오일일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및/또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (22th ed.,

2013)에 상세히 기재되어 있다.

- [0064] 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 공지된 항균, 항진균, 항바이러스 및 또는 항암 활성을 나타내는 물질과 함께 투여될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물치료 및/또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 약학적 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기재 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 떨어트리지 않는 범위 내에서 비이온 계면활성제, 실리콘 폴리머, 체질안료, 향료, 방부제, 살균제, 산화 안정화제, 유기 용매, 이온성 또는 비이온성 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트(emollient), 실리콘, α -히드록시산, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 향료, 보존제, 계면활성제, 소염제, 물질 P 길항제, 충진제, 중합체, 추진제, 염기성화 또는 산성화제, 및/또는 착색제 등 공지된 화합물을 더 포함하여 제조될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001~1000mg/kg 범위 내이다.
- [0069] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 시 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 고형제제 형태로 투여될 수 있으며, 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물을 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태로 제제화 할 경우, 이의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여될 수 있으며, 예를 들어, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 등의 방법을 통하여 투여되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0071] 비경구 투여용 제형으로의 제제화는, 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조하는 것일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 멸균되고, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 제제화될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 양상은 본 발명의 양친성 펩타이드를 포함하는 천연방부제 조성물을 제공한다.
- [0074] 본 발명에서 사용되는 용어, "천연방부제"는 진균/세균 등 미생물의 증식을 억제하여 물질의 부패 방지 및/또는 식품의 신선도 유지를 위한 천연물질 유래의 성분을 의미하며, 일반적으로 식품, 화장품 또는 의약품 등의 변질을 막고 그것을 사용하거나 보존하는 동안에 그 순도를 유지시키기 위해서 첨가될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 천연방부제 조성물은 식품방부제, 화장품 방부제, 의약품 방부제 등으로 사용될 수 있다.
- [0076] 상기 천연방부제 조성물은 본 발명의 양친성 펩타이드 외에 당업계에서 통상적으로 사용되는 방부제 또는 보존제를 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 식품방부제로써 프로피온산 칼슘, 벤조산 나트륨, 아질산 나트륨 및/또는 소르브산 등을 더 포함할 수 있고, 화장품 방부제로써 메틸 파라벤(Metyl Paraben), 에틸 파라벤(Ethyle Paraben), 프로필 파라벤(Propyl Paraben), 부틸 파라벤(Butyl Paraben), 퀴터늄-15(Quaternium-15) 및/또는 이미다졸리딘릴 우레아(Imidazolidinyl Urea) 등을 더 포함할 수 있으며, 의약품 방부제로써 벤조산의 나트륨 염 등을 더 포함할 수 있다.
- 발명의 효과**
- [0078] 본 발명의 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드는 항균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸 활성이 우수할 뿐만 아니라, 세포독성이 낮고 트립신 등 프로테아제에 의해 쉽게 분해되지 않으므로, 다양한 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 실시예 2의 결과를 나타내는 것으로, 멜리틴(melittin) 및 본 발명의 펩타이드 중 ALDH2에 대한 대식세포(Raw 264.7) 및 각질세포(HaCaT)에서의 농도별 세포 생존율을 시간별(23, 48 및 72시간)로 나타낸 그래프 및 본 발명의 펩타이드 중 MTERF2 및 NARS2에 대한 각질세포(HaCaT)에서의 농도별 세포 생존율을 시간별(23, 48 및 72시간)로 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 실시예 3의 결과를 나타내는 것으로, MDRPA, MRSA, *Eschechia coli* 및 *Staphylococcus aureus*에 대한 본 발명 펩타이드의 항균 활성을 방사선 확산 분석법으로 확인한 사진이다.
- 도 3는 실시예 4의 결과를 나타내는 것으로, *Candida albicans*에 대한 본 발명 펩타이드의 항균 활성을 방사선 확산 분석법으로 확인한 사진이다.
- 도 4 내지 도 10은 실시예 5의 결과를 나타내는 것으로 본 발명의 펩타이드의 암세포 사멸 활성을 확인할 수 있다.
- 도 11 은 실시예 6의 결과를 나타내는 것으로 본 발명 펩타이드의 프로테아제 저항성을 방사선 확산 분석법으로 확인한 사진이다.
- 도 12 내지 도 14은 실시예 7의 결과를 나타내는 것으로, 본 발명 펩타이드를 나선 휠 투영도(helical wheel projection)로 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0081] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 실시예 1. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 선별
- [0084] 공지된 인간 유래 (1684종), 효모 유래 (294종), 초파리 유래 (73종), 애기장대 유래 (385종), 벼 유래 (224종), 개구리 유래 (127종), 예쁜 꼬마선충 유래(142종) 미토콘드리아 단백질의 아미노산 서열 및 각 종별 미토콘드리아 전구서열(presequence)을 확인하기 위하여, GenBank에서 미토콘드리아 서열을 검색한 결과, 총 2939종의 미토콘드리아 서열을 확인하였다. 확인된 2939 종의 미토콘드리아 서열 중, 확률적으로 50% 이상인 유전자를 후보군으로 선별하여, 총 547종의 미토콘드리아 전구서열을 선별하였다.
- [0085] 선별한 547종의 미토콘드리아 전구서열의 특성을 확인하기 위하여, 미토콘드리아 전구서열의 평균 길이, 평균 잔기의 개수 및 아미노산의 평균 구성 비율을 기존의 항균펩타이드 2966종(<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)과 비교하였다.

표 1

아미노산		평균 구성 비율(%)	
구분	아미노산	항균 펩타이드 (2966종)	미토콘드리아 전구서열 (547종)
Non-polar, aliphatic	이소류신	5.96	1.73
	발린	5.71	5.56
	류신	8.33	13.78
	페닐알라닌	4.03	3.02
	메티오닌	1.23	3.83
	알라닌	7.67	13.33
	트립토판	1.67	2.49
	글리신	11.6	9.42
	프롤린	4.67	6.66
Acidic, (-) charged	아스파르트산	2.59	0.61
	글루탐산	2.66	1.71

Polar, uncharged	트레오닌	4.50	3.83
	세린	6.06	7.38
	티로신	2.46	1.28
	글루타민	2.52	3.2
	아스파라긴	3.85	1.49
	시스테인	6.97	2.38
Basic, (+) charged	리신	9.60	2.38
	아르기닌	5.73	14.19
	히스티딘	2.11	1.73

[0089] 그 결과, 기존의 평균 펩타이드와 미토콘드리아 전구서열의 잔기의 개수는 각각 32.63개 및 34.12개로 유사함을 확인하였다. 반면, 기존의 평균펩타이드와는 달리, 미토콘드리아 전구서열은 알라닌, 류신 및 아르기닌의 구성 비율이 높은 반면, 이소류신, 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 시스테인 및 리신의 구성 비율이 낮음을 확인하였다(표 1). 또한, 기존의 평균 펩타이드의 순전하(net charge)는 3.29인 반면, 미토콘드리아 전구서열의 순전하는 5.05임을 확인하였다.

[0090] 한편, 547개의 미토콘드리아 전구서열로부터, 20개 이하의 아미노산 서열로 구성되면서 높은 amphipathic α helix 구조를 가져 양친성이 우수하여 세포막 분해 활성이 우수할 것으로 예상되는 서열번호 1 내지 27에 해당하는 펩타이드를 선별하였다(표 2). 이후 실험에서는, 이들 펩타이드의 평균, 항진균, 항바이러스 및 암세포 사멸 활성 등을 평가하였다.

표 2

[0092]

No.	Organism	Name		UniProt acc. no.	MTS Sequence	서열번호
		Gene	Full			
1	Human (Homo sapiens)	ALDH2	HUMAN Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	MLRAARFGPRLGRRLL	서열번호 1
2		ALDH1L2	HUMAN Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Q3SY69	MLRRGSQALRRF	서열번호 2
3		ATP5B	HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	MLGFVGRVAAAPASGALRR	서열번호 3
4		COX7A2	HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	P14406	MLRNLLALRQIGQRT	서열번호 4
5		EXOG	Nuclease EXOG, mitochondrial	Q9Y2C4	MAIKSIASRLRGSRRFL	서열번호 5
6		FARS2	HUMAN Phenylalanine-tRNA ligase, mitochondrial	Q16836	MVGSALRRG	서열번호 6
7		HADH	HUMAN Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	Q16836	MAFVTRQFMRS	서열번호 7
8		MDH2	HUMAN Malate dehydrogenase,	P40926	MLSALARPASAALRRS	서열번호 8
9		MRPS30	HUMAN 39S ribosomal protein S30,	Q9NP92	MAAARCWRPLLRGPRLL	서열번호 9
10		MTERF2	HUMAN Transcription termination factor 2	Q49AM1	MLWKLLRSQSCRLCSFRK	서열번호 10
11		NARS2	HUMAN Probable asparagine--tRNA ligase	Q96159	MLGVRCLLRSVRF	서열번호 11
12		SSBP1	HUMAN Single-stranded DNA-binding protein	Q04837	MFRRPVLQVLQFVRH	서열번호 12
13		UQCRC2	HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 2	P22695	MKLLTRAGSFSRFY	서열번호 13
14		CYCS	HUMAN Cytochrome c	P99999	MGDVEKGKKIFIMK	서열번호 14
15		DHODH	HUMAN Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	Q02127	MAWRHLKKRA	서열번호 15
16		UQCRH	HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 6	P07919	MGLEDEQKMLTES	서열번호 16

17	Yeast (Saccharomyces cerevisiae)	ScCOX4	YEAST Cytochrome c oxidase subunit 4	P04037	MLSLRQSIIRFFKPATRT	서열번호 17
18		ScGL04	YEAST Hydroxyacylglutathione hydrolase	Q12320	MKFLQIIRN	서열번호 18
19		ScSLS1	YEAST Sigma-like sequence protein 1	P42900	MWKFNNKLARLTYYRL	서열번호 19
20		ScPET112	YEAST Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	P33893	MLRLARFY	서열번호 20
21	Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)	AtBCE2	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	Q9M7Z1	MIARRIWRSHRFLRPF	서열번호 21
22	Frog (Xenopus laevis)	XlCox7c	XENLA MGC85582 protein	Q66KN3	MFGQTVRRF	서열번호 22
23	Rice (Oryza sativa)	OsCoxVb	Probable L-ascorbate peroxidase 6,	POCOL1	MWRRLQTLAPALRR	서열번호 23
24	Drosophila (Drosophila melanogaster)	DmEFTs	DROME Elongation factor Ts	Q9VJC7	MLLQRFFTRA	서열번호 24
25		DmCOX7A	DROME Cytochrome c oxidase subunit 7A	Q9VHS2	MMNLSRAVVRS	서열번호 25
26	Nematode (Caenorhabditis elegans)	CeSdh1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	Q09508	MLRAASNGLRNTVAARS	서열번호 26

실시예 2. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 세포 독성 확인

미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드가 항균 용도 등의 펩타이드로 사용될 수 있는지 확인하기 위한 전단계로, 세포 독성을 평가하였다.

구체적으로, 96-웰 플레이트에 Raw 264.7 세포주 또는 HaCaT 세포주를 2.5×10^3 cells/well씩 분주하고, 하루 배양한 후, MTERF2, NARS2, ALDH2 또는 멜리틴(melittin)을 2, 4, 6, 8 또는 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 다음, 37°C 의 5% CO_2 의 조건에서 24, 48 또는 72시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 웰에 EZ-CyTox Enhanced Cell Viability Assay Kit(Daeil Lab Service, Korea)를 $10 \mu\text{l}$ 넣은 다음, 배양기에서 2 내지 4시간 동안 반응시키고, 마이크로 플레이트 판독기(microplate reader)(Molecular Device, Sunnyvale, Cam USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 ALDH2 또는 멜리틴을 처리하지 않은 무처리군의 흡광도값에 대한 백분율로 나타내었다.

그 결과, Raw 264.7 세포주 및 HaCaT 세포주에서 각각 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 멜리틴을 처리한 경우 대부분의 세포주가 사멸하였음을 확인하였다. 반면, MTERF2, NARS2, ALDH2 를 처리한 경우 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서도 Raw 264.7 세포주 및 HaCaT 세포주는 80% 이상의 생존율을 나타내었다(도 1).

상기 결과를 통하여, 기존의 항균펩타이드 대비 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 낮은 세포독성을 확인하였다.

실시예 3. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 항균 활성 확인

미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 항균 활성을 확인하기 위하여, 방사선 확산 분석법(RDA: radial diffusion assay)을 수행하였다.

구체적으로, 항균 활성을 확인하기 위한 균주로는 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* 및 그람음성균인

*Escherichia coli*과 항생제내성균인 MRSA(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)와 MDRPA(Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa)를 사용하였다. RDA 분석을 위하여 멸균된 RDA용 underlay gel(9mM 인산나트륨, 1mM 시트르산나트륨, pH7.4, 1%(w/v) 1형 아가로스(low electroendosmosis agarose), 0.03% TSB)에 배양된 균주(4×10^6 cfu/ml)를 각각 혼합하여 100mm 사각플레이트에 부어 굳혔다. Underlay gel에 지름 3.5mm의 구멍을 내어 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 또는 멜리틴을 1, 5, 10, 20 또는 $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 씩 구멍에 넣은 후, 펩타이드가 확산되도록 37°C에서 3시간 동안 배양한 다음, 그 위에 RDA용 overlay gel(6% TSB, 1%(w/v) 1형 아가로스)을 부어 굳히고, 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이후, clear zone의 크기를 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

[0103] 그 결과, 도 2 에서 확인되는 바와 같이 4종 균주에 대해 다소간의 활성 차이가 있으나, 실험에 사용된 모든 균주에 대하여 50% 이상의 MTS가 항균활성을 나타내었고, MTERF2는 E.coli, S. aureus, MDRPA, MRSA 모두에 대하여 처리농도(1, 5, 10, 20, $50 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) 의존적으로 항균활성이 증가하였다.

[0105] 실시예 4. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 항진균 활성 확인

[0106] 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 항진균 활성을 확인하기 위하여, 방사선 확산 분석법(RDA)을 수행하였다.

[0107] 구체적으로, 항균 활성을 확인하기 위한 균주로는 *Candida albicans*를 사용하였다. RDA 분석을 위하여 멸균된 RDA용 underlay gel(9mM 인산나트륨, 1mM 시트르산나트륨, pH7.4, 1%(w/v) 1형 아가로스(low electroendosmosis agarose), 0.03% TSB)에 배양된 각각의 균주(4×10^6 cfu/ml)를 혼합하여 100mm 사각플레이트에 부어 굳혔다. Underlay gel에 지름 3mm의 구멍을 내어 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 또는 멜리틴을 1, 5, 10, 20 또는 $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 씩 구멍에 넣은 후, 펩타이드가 확산되도록 37°C에서 3시간 동안 배양한 다음, 그 위에 RDA용 overlay gel(6% TSB, 1%(w/v) 1형 아가로스)을 부어 굳히고, 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이후, clear zone의 크기를 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

[0108] 그 결과, *Candida albicans*에 대한 항균활성은 ALDH2, ALDH1L2, EXOG, MRPS30, MTERF2, NARS2, SSBP1, DHODG, SsCOX4, SsSLS1, AtBCE2 및 OsCoxVb에서 매우 우수하며, COX7A2, UQCRC2, SsGLO4, SsPET112 및 DmEFTs에서 우수함을 확인하였다(도 3).

[0110] 실시예 5. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 암세포 사멸 활성 확인

[0111] 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 암세포 사멸 활성을 확인하기 위하여, 암세포 증식 억제 실험을 수행하였다.

[0112] 실험 세포 및 시약

[0113] 세포주는 Breast cancer cell line MDA-MB231, Human colon cancer cell HT-29, Human liver cancer cell HepG2, human pancreatic cancer cell PANC-1 and normal human epithelial cell line HaCaT cell을 Korean Cell Line Bank (KCLB)로 부터 구입해 사용하였다.

[0114] 배양액은 MDA-MB231, HT-29, PANC-1, HaCaT cell은 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Cat No. S001-01, WELGENE, South korea) 와 1% Penicillin-Streptomycin (Cat No. 15140-122, gibco, USA)이 포함된 DMEM (Cat No. 11995-065, gibco, USA)를 사용하였으며, HePG2 cell은 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Cat No. S001-01, WELGENE, South korea), 1% Penicillin-Streptomycin (Cat No. 15140-122, gibco, USA)과 1mM Sodium Pyruvate (Cat No. LS013-01 WELGENE, South korea) 이 포함된 MEM (Cat No. LM007-07, WELGENE, South korea)을 사용하였으며, 6well plate (Cat No. 30006, SPL, South korea)에 세포 넣은 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 부착 세포를 떼어내기 위하여 0.25%-Trypsin EDTA (Cat No. 25200-072, gibco, Canada)를 사용하였다. 세포 세척 시 20x PBS (Cat No. P2007-7.4, Biosesang South korea)를 1xPBS로 희석 후 사용하였다. 각 처리군은 음성대조군(Control), 양성대조군(Melittin), 실험물질 처리군(MTERF2, NASR2)으로 구성하였다. 음성대조군은 10% FBS와 1% Penicillin-Streptomycin이 포함되지 않은 DMEM, MEM을, 양성대조군은 Melittin을 사용하였으며, 실험물질 처리군은 MTERF2, NASR2를 사용하였다. MTERF2, NASR2은Anyen (Anyen, South Korea)에서 합성을 하였으며, MTERF2 (20mg), NASR2 (20mg)을 20% DMSO (Cat No. D1022, Biosesang, South korea) 와80% DW

에 녹여서 10 µg/ml로 제조하여 사용하였다. Apoptosis와 Necrosis 판별하기 위하여 유세포분석기 CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences, United States)를 형광 염료 시약인 Annexin V - FITC Apoptosis Kit(Cat No. K101-100, Biovision, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0116] 유세포 분석기 측정 방법(Flow Cytometry Analysis)

[0117] 6well Plate에 음성대조군 (Unstain, Stain), 양성대조군 (Melittin), 실험물질 대조군 (MTERF2, NASR2)를 작성하고, PANC-1, MDA-MB231, HT-29, HaCaT, HepG2 세포를 6well Plate에 well 당 DMEM, MEM 배지 2ml 과 4x10⁵의 세포를 넣고 37℃ 5% CO₂ Incubator 24h 배양 한다. 다음날 배지를 제거하고, 1xPBS 500 µl 를 넣고 세척 후 음성대조군 (Unstain, Stain)에는 FBS가 없는 배지 2ml을 넣고, 나머지 양성 대조군 Melittin (3, 6, 12 µg/ml 과 12, 16, 24 µg/ml), 실험물질 대조군 MTERF2, NASR2 (50, 100, 150 µg/ml)에는 FBS없는 배지로 제조하여 well 마다 2ml씩 넣고 37℃ 5% CO₂ Incubator 시간별로 배양 한다. 죽어서 떠 있는 세포들도 필요함으로 배지를 15ml 튜브에 옮긴 후 1xPBS 500 µl 넣고 세척한다. Trypsin 500 µl 넣고 37℃ 5% CO₂ Incubator에 1분 배양 후 FBS있는 배지를 동일 양 500 µl 넣고 Trypsin 작용을 중화 시킨다. 그리고 15ml 튜브에 옮긴 뒤 4℃ 의 원심분리기 3,000rpm 2min 돌린다. 상층액 제거한 후 1xPBS 500 µl로 세포를 풀어주면서 세척한다. 다시 4℃ 의 원심분리기 3,000rpm 2min 돌린다 1xPBS를 제거한 후 Annexin V-FITC/Pi가 세포에 염색 확인을 위하여 음성대조군 (Unstain)에는 1x Binding Buffer 500 µl 만 넣고 음성대조군 (Stain), 양성대조군, 실험물질 대조군에는 1x Binding Buffer 500 µl 와 Annexin-v 5 µl 와 PI 5 µl를 넣은 후 형광이 날아가지 않게 어두운 곳에서 상온에 30분 배양 후 유세포분석기를 이용한다. 유동 세포 계측 데이터는 영역 및 Gating 을 구성하여 처리군당 최고 10,000개의 Gating 된 세포를 통해 데이터 수집, 분석이 된다.

[0118] 그 결과, 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드를 처리한 경우, MDA-MB-231 유방암 세포주가 효과적으로 사멸됨을 확인하였다 (도 4).

[0120] 한편, 본 발명의 미토콘드리아 전구서열 중 MTERF2-L19N5 및 NASR2을 이용하여 MDA-MB-231 유방암 세포주, PANC-1 췌장암 세포주, HT-29 대장암 세포주 및 HepG2 간암세포주에 대한 항암활성을 확인하였다.

[0121] 구체적으로 상기한 MDA-MB-231 유방암 세포주에 대한 실험과 동일한 방법으로 MDA-MB-231 유방암 세포주, PANC-1 췌장암 세포주, HT-29 대장암 세포주 및 HepG2 간암세포주를 배양, 사용하였고, 그 후 실시예 1-3의 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 중 MTERF2-L19N5 및 NASR2를 처리하고, 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 암세포주에 대한 시간 및 농도별로 flow cytometry (FACS analysis)를 수행하여 세포 생존율을 분석하였다.

[0122] 그 결과, 도 5 내지 도 8에서 확인되는 바와 같이 MTERF2는 실험에 사용한 4종의 암세포주에 대하여 매우 높은 항암활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이 결과는 MTERF2가 특정 단일암종에 대한 치료효과뿐만 아니라 다양한 암의 치료에도 활용이 가능한 후보 소재라는 것을 의미한다. 또한, 인간 유방암세포주(MDA-MB231)에 대해서는 처리 후 1시간부터 암세포를 사멸하기 시작하여 2 시간 이후부터는 대부분의 암세포가 사멸되는 것을 확인할 수 있어, MTERF2가 암종에 대한 매우 빠른 치료 효과를 가지는 후보 소재로써 개발이 가능할 것으로 판단된다.

[0123] 또한, 도 9 및 도 10에서 확인되는 바와 같이 NASR2도 MTERF2와 유사하게 유방암세포주(MDA-MB231)와 췌장암세포주(PANC-1)에 대하여 매우 높은 항암활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0125] 실시예 6. 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 프로테아제 저항성 확인

[0126] 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드가 단백질가수분해효소에 의해 분해되지 않고 활성을 유지할 수 있는지 확인하기 위하여, 단백질가수분해효소에 대한 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 저항성을 분석하였다.

[0127] 구체적으로, 단백질가수분해효소로는 트립신(trypsin) 및 키모트립신(chymotrypsin)을 사용하였으며, 대조 물질로는 멜리틴(Sigma)을 사용하였다. 멜리틴 및 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드는 멸균증류수에 녹여 사용하였다.

[0128] 시트르산 인산 버퍼(citrate phosphate buffer; 9mM 인산나트륨, 1mM 시트르산나트륨, pH 7.4)와 1%(w/v) 1형

아가로스(low electroendosmosis agarose) 아가로스, 0.03% TSB로 구성된 멸균된 underlay gel에, *Candida albicans*(4×10^6 cfu/ml)를 넣고 혼합한 뒤 배양접시에 굳혔다. 그 후, 지름 3mm의 구멍을 내어, 트립신(50, 100nM) 또는 키모트립신(50, 100nM)과 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 또는 펠리틴 20 μ g을 혼합하여 넣었다. 37℃에서 3시간 배양한 후, overlay gel(6% TSB, 1% agarose)을 붓고 37℃에서 1시간 배양하여, 총 4시간 동안 배양하였다. 이후, 90℃에서 10분 동안 처리하여 단백질을 가수분해효소를 불활성화시켰다. 대조군으로는 단백질을 가수분해효소를 처리하지 않은 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드 또는 펠리틴만을 지름 3mm의 구멍에 20 μ g 넣은 다음, 배양을 하지 않은 것 및 총 4시간 동안 배양한 것을 사용하였다. 그 후, 진균이 자라지 못해 생기는 clear zone의 크기를 대조군과 비교하여 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드가 단백질가수분해효소에 의해 분해되어 활성이 사라졌는지 여부를 확인하였다.

[0129] 그 결과, NARS2 및 UQCTC2의 경우, 트립신 처리시 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성이 감소하였다는 점에서, 트립신에 의해 펩타이드가 일부 분해되었음을 확인하였다. 반면, NARS2 및 UQCTC2 이외의 펩타이드의 경우, 대조군인 펠리틴 대비 항진균 활성이 우수한 것을 확인하였다(도 11).

[0130] 상기 결과를 통하여, 기존의 항균펩타이드 대비 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 프로테아제에 대한 저항성을 확인하였다.

[0132] 실시예 7. 효과가 우수한 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 구조적 유사성 확인

[0133] 실시예 2 내지 5 에서 항균, 항바이러스, 항진균 및 암세포 사멸 활성이 우수한 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 구조적 유사성을 확인하였다.

[0134] 구체적으로, 알파-나선구조를 갖는 ALDH1L2, ALDH2, DHODH, EXOG, MRPS30, MTERF2, NARS2, SSBP1 및 UQCRC2의 아미노산 서열을 나선 휠 투영도(helical wheel projection)로 나타내어 각 펩타이드의 구조 및 성질을 확인하였다.

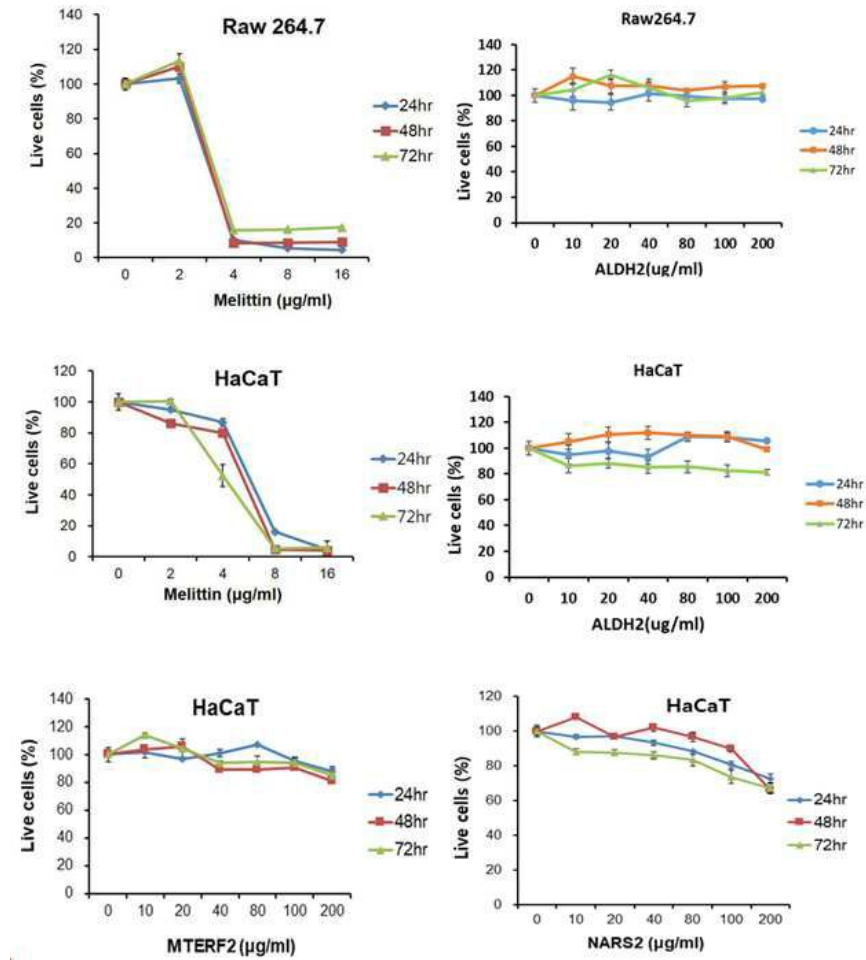
[0135] 그 결과, 도 12 내지 도 14에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각 펩타이드의 알파-나선구조의 일측은 대부분 소수성 성질을 갖는 비극성 아미노산으로, 타측은 대부분 양이온성 성질을 갖는 염기성 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였다.

[0136] 상기 결과를 통하여, 본 발명의 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 구조의 유사성을 확인하였다. 또한, 본 발명의 미토콘드리아 전구서열 유래 펩타이드의 구조는 알파-나선구조의 일측은 소수성 성질을, 타측은 양이온성 성질을 갖는 양쪽성 성질을 나타내며, 이러한 성질에 의하여 세포막을 파괴함으로써, 항균, 항진균 및/또는 암세포 사멸 활성을 나타냄을 확인하였다.

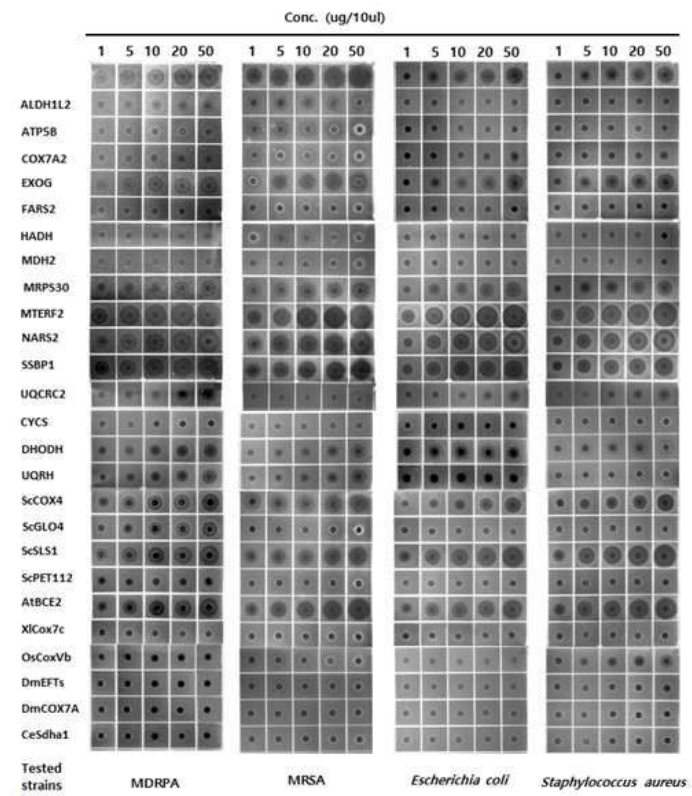
[0138] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

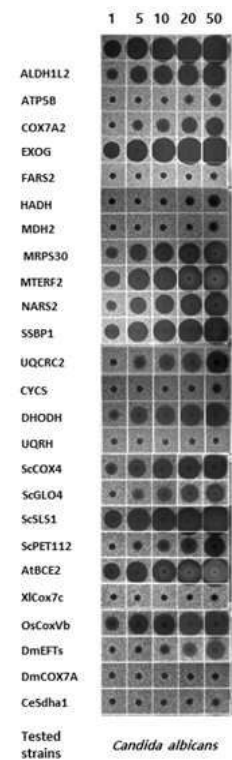
도면1



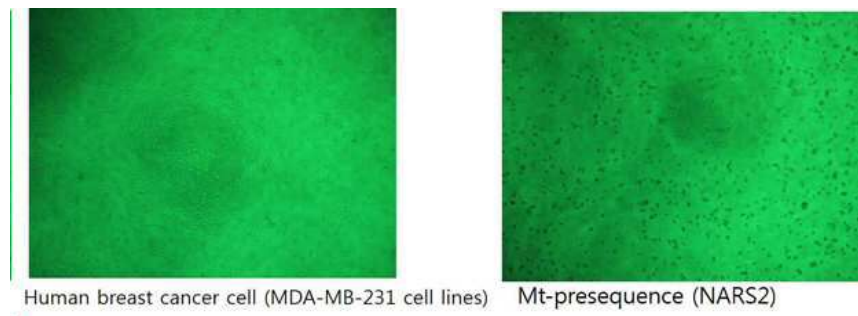
도면2



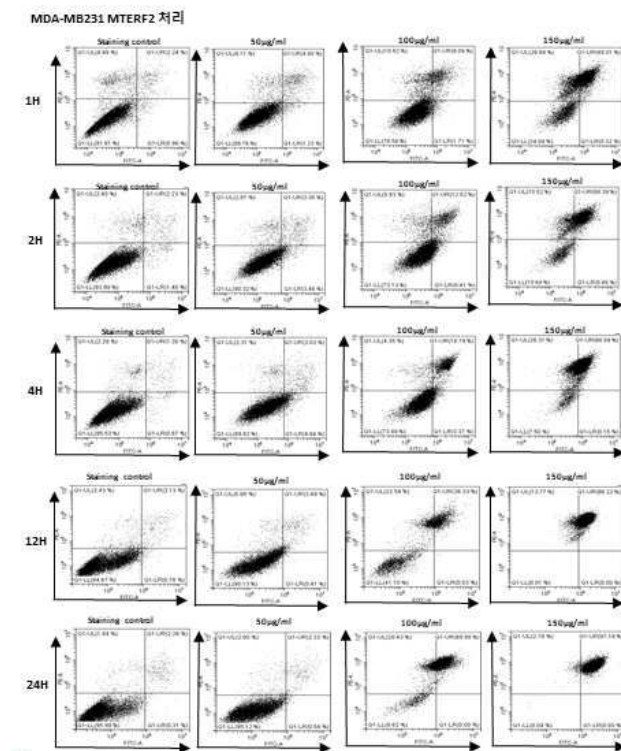
도면3



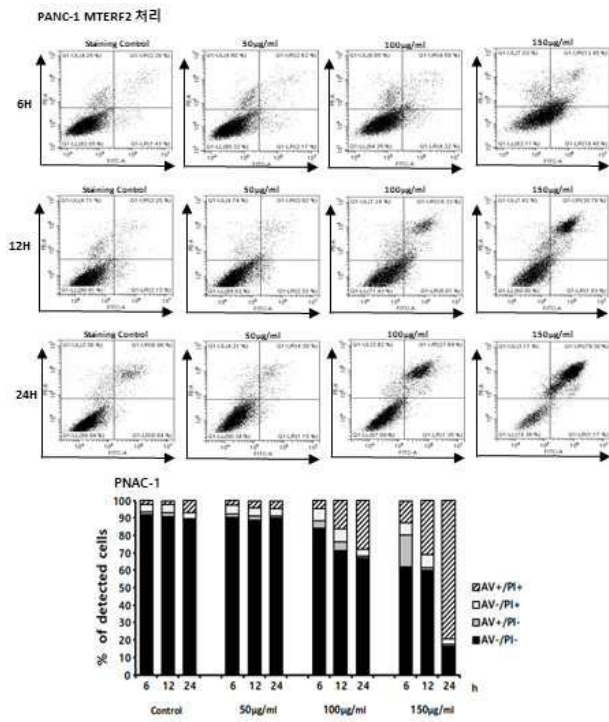
도면4



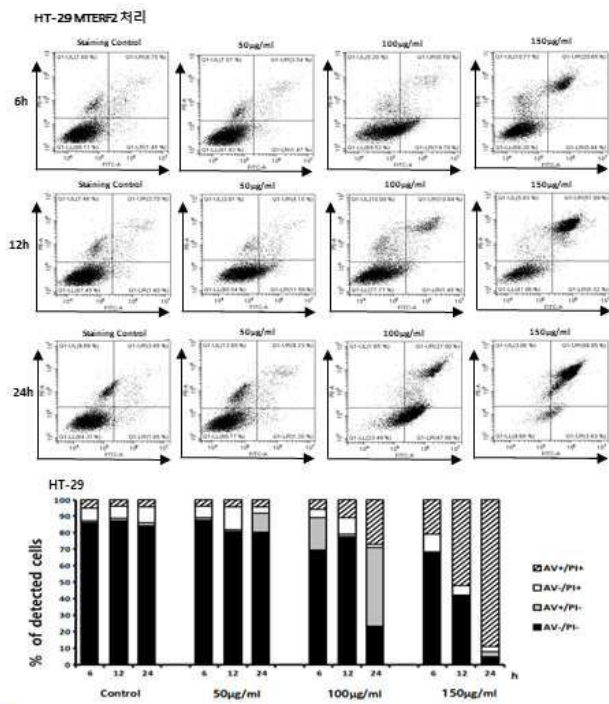
도면5



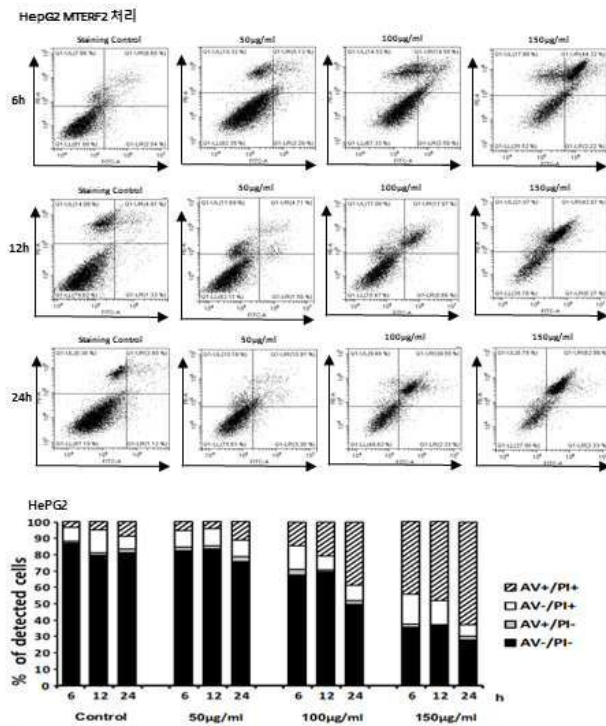
도면6



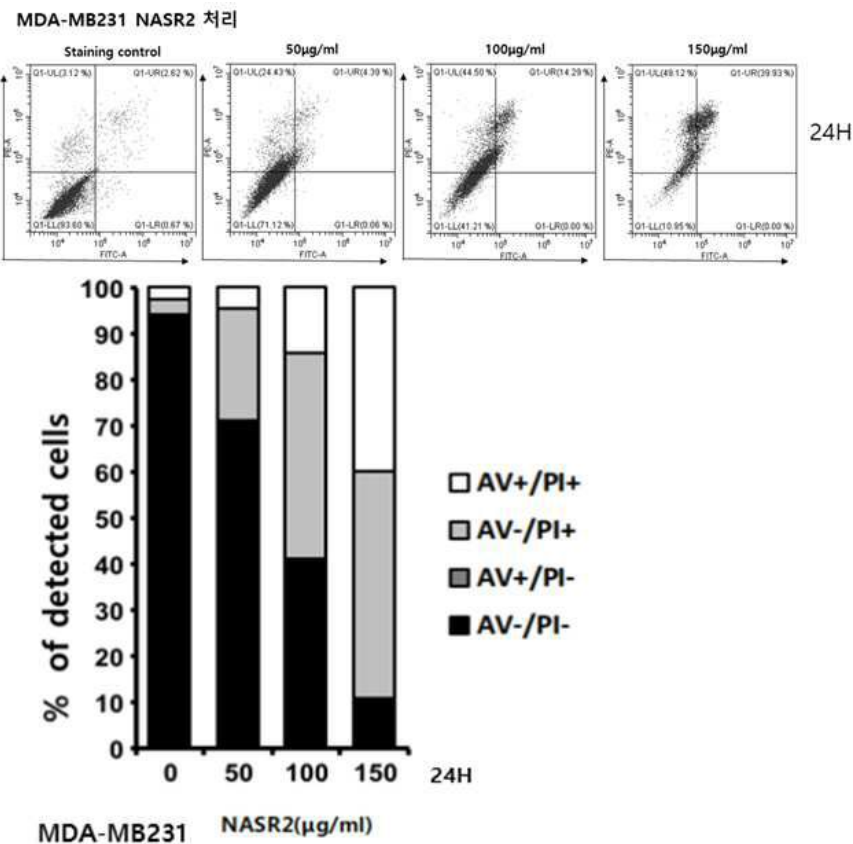
도면7



도면8

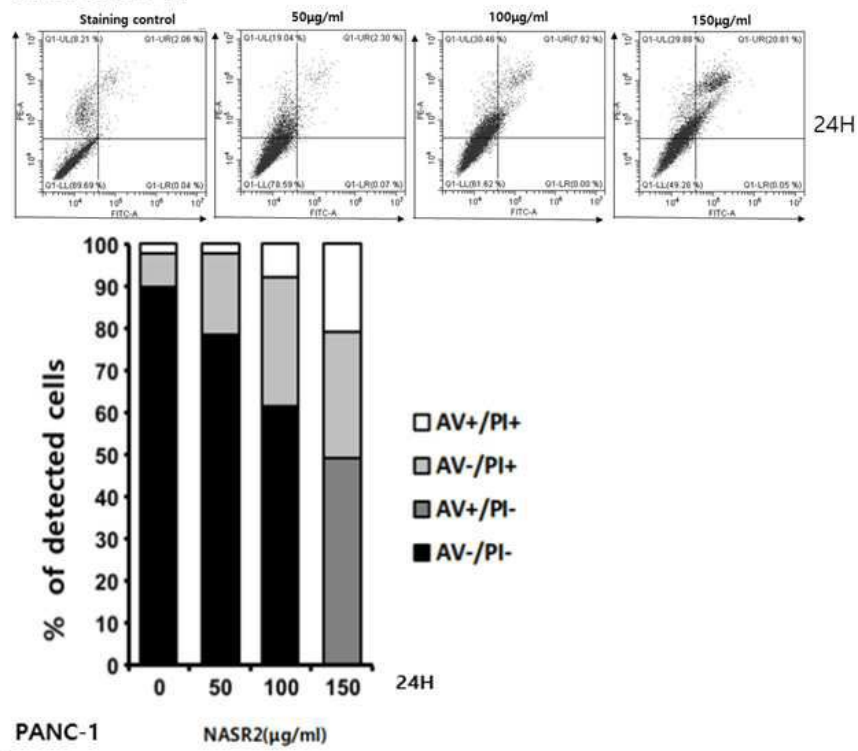


도면9

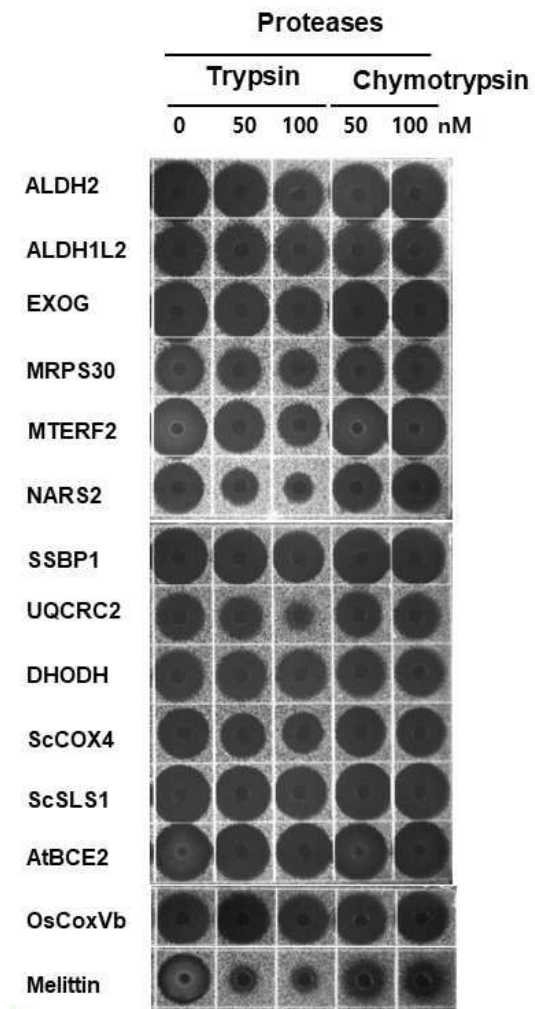


도면10

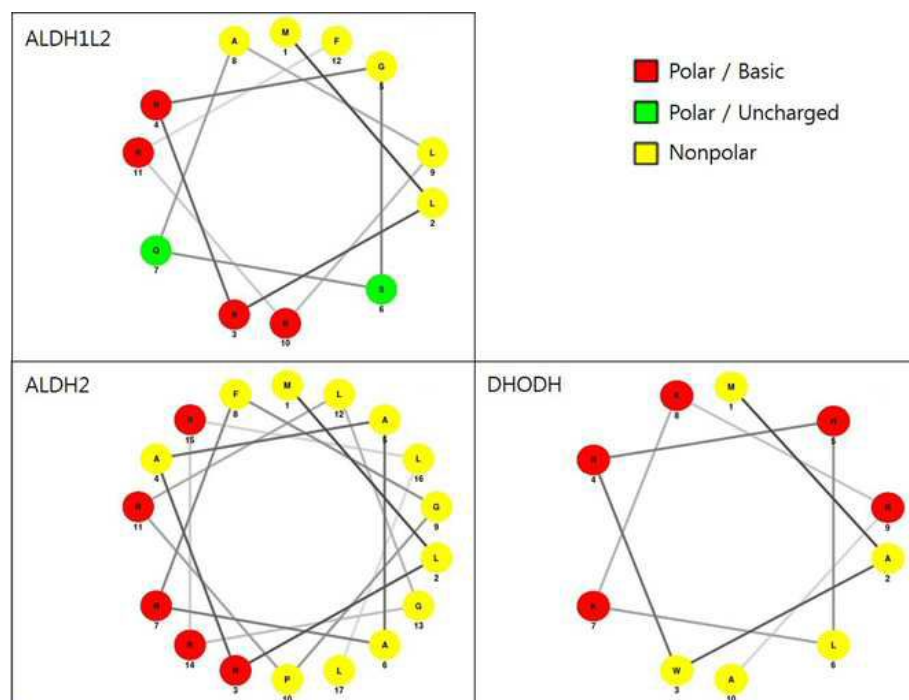
PANC-1 NASR2 처리



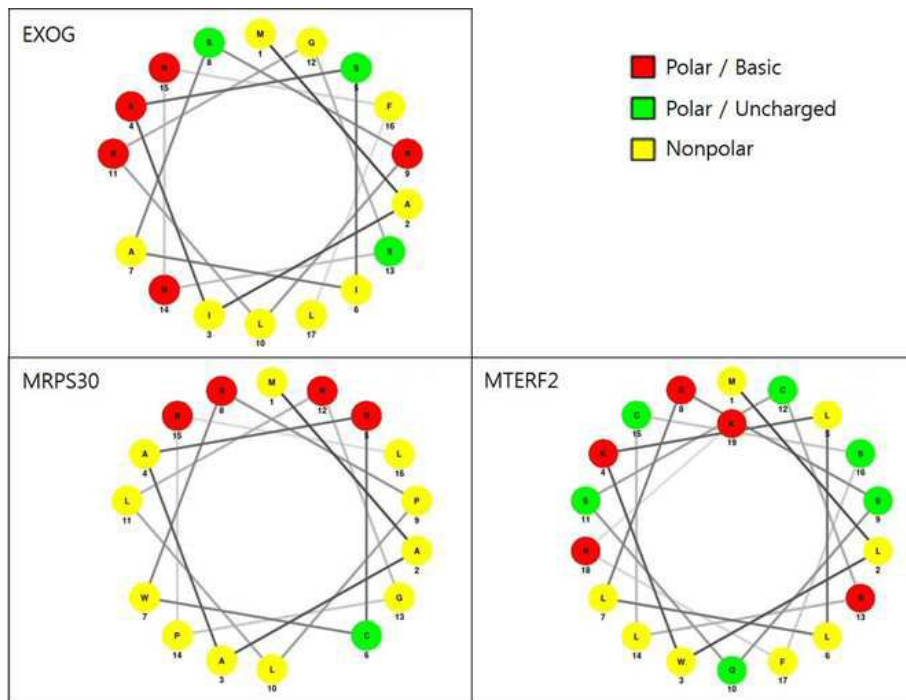
도면11



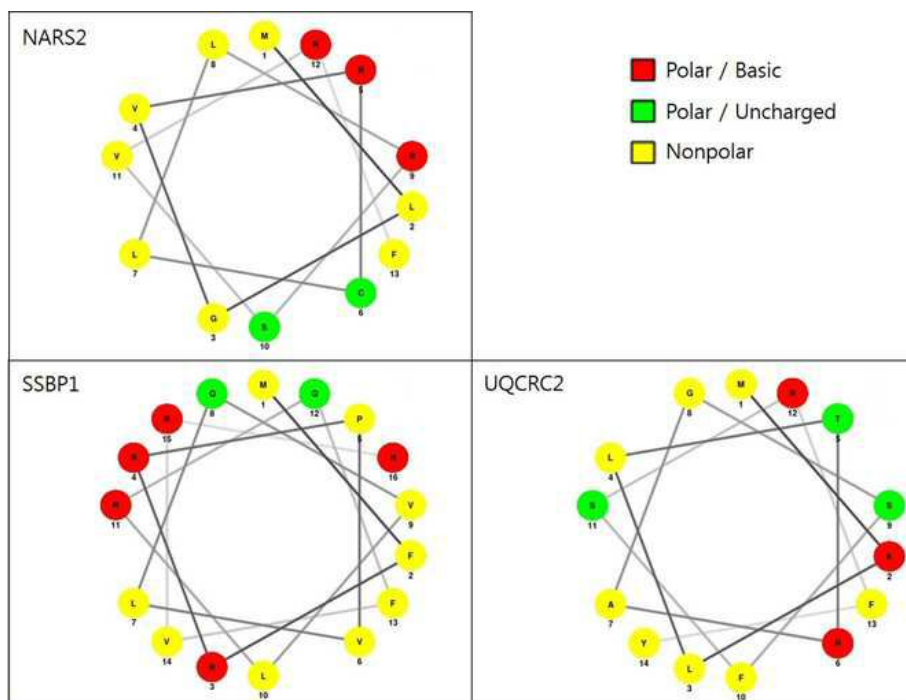
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> Dongguk University Gyeongju Campus Industry-Academy Cooperation Foundation
- <120> Peptides Derived from Mitochondrial Presequence and Uses thereof
- <130> PN200251
- <160> 26

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Ala Ala Ala Arg Phe Gly Pro Arg Leu Gly Arg Arg Leu

1 5 10 15

Leu

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Arg Arg Gly Ser Gln Ala Leu Arg Arg Phe

1 5 10

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Leu Gly Phe Val Gly Arg Val Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gly Ala

1 5 10 15

Leu Arg Arg

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Arg Asn Leu Leu Ala Leu Arg Gln Ile Gly Gln Arg Thr

1 5 10 15

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Ala Ile Lys Ser Ile Ala Ser Arg Leu Arg Gly Ser Arg Arg Phe
 1 5 10 15
 Leu

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Val Gly Ser Ala Leu Arg Arg Gly
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Met Ala Phe Val Thr Arg Gln Phe Met Arg Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Ala Ala Arg Cys Trp Arg Pro Leu Leu Arg Gly Pro Arg Leu

1 5 10 15

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Trp Lys Leu Leu Leu Arg Ser Gln Ser Cys Arg Leu Cys Ser

1 5 10 15

Phe Arg Lys

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Leu Gly Val Arg Cys Leu Leu Arg Ser Val Arg Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Phe Arg Arg Pro Val Leu Gln Val Leu Arg Gln Phe Val Arg His

1 5 10 15

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Lys Leu Leu Thr Arg Ala Gly Ser Phe Ser Arg Phe Tyr

1 5 10

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Met Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Ile Met Lys
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Met Ala Trp Arg His Leu Lys Lys Arg Ala
 1 5 10

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Met Gly Leu Glu Asp Glu Gln Lys Met Leu Thr Glu Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 17

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
 1 5 10 15
 Thr

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 18

Met Lys Phe Leu Leu Gln Gln Ile Arg Asn

1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 19

Met Trp Lys Phe Asn Lys Lys Leu Ala Arg Leu Thr Tyr Arg Leu

1 5 10 15

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 20

Met Leu Arg Leu Ala Arg Phe Tyr

1 5

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 21

Met Ile Ala Arg Arg Ile Trp Arg Ser His Arg Phe Leu Arg Pro Phe

1 5 10 15

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 22

Met Phe Gly Gln Thr Val Arg Arg Phe

1 5

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 23

Met Trp Arg Arg Leu Gln Thr Leu Ala Pro Ala Leu Arg Arg

1 5 10

<210> 24

<211

> 10

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 24

Met Leu Leu Gln Arg Phe Phe Thr Arg Ala

1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 25

Met Met Asn Leu Ser Arg Ala Val Val Arg Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 26

Met Leu Arg Ala Ala Ser Asn Gly Leu Arg Asn Thr Val Ala Ala Arg

1 5 10 15

Ser