

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 7월 3일 (03.07.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/104582 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/46 (2006.01) *A23K 1/17* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/010583
- (22) 국제출원일: 2013년 11월 20일 (20.11.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0158201 2012년 12월 31일 (31.12.2012) KR
- (71) 출원인: 부경대학교 산학협력단 (PUKYOUNG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 608-739 부산시 남구 신선로 365 부경대학교, Busan (KR).
- (72) 발명자: 박남규 (PARK, Nam Gyu); 613-010 부산시 수영구 남천동 삼익비치 아파트 212-606, Busan (KR). 서정길 (SEO, Jung Kil); 608-020 부산시 남구 대연동 599-1 번지 부경대학교, Busan (KR). 이민정 (LEE, Min Jeong); 608-020 부산시 남구 대연동 599-1 부경대학교, Busan (KR). 정현교 (JUNG, Hyun Gyo); 608-020 부산시 남구 대연동 599-1 부경대학교, Busan (KR).
- (74) 대리인: 김태선 (KIM, Tae Sun); 135-915 서울시 강남구 테헤란로 37길 15 영남빌딩 402호, Seoul (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVED FROM LIVER OF *KATSUWONUS PELAMIS* AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 가다랑어 간 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to an antimicrobial peptide and provides a peptide exhibiting antimicrobial activity and having an amino acid sequence represented by SEQ. No. 1, and a use thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 그의 용도를 제공한다.



WO 2014/104582 A1

명세서

발명의 명칭: 가다랑어 간 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 더 상세하게는 가다랑어 간 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 항미생물성 펩타이드는 생물체의 선천성 면역체계(innate immune system)의 최전방 생체 방어인자이다. 항미생물성 펩타이드는 특정 미생물이나 항원에 반응하는 후천면역과는 달리 미생물의 종류에 크게 상관없이 작용하며 반응시간도 바로 혹은 몇 시간 내로 매우 빠르다. 내성균의 문제를 항상 내포하고 있는 기존의 항생제와 구분되어 내성의 문제 또는 면역문제나 거부반응의 문제없이 광범위한 생물계에서 미생물로부터 숙주를 보호하기 위해 자연적으로 생성되었기에 이들 항미생물성 펩타이드들은 천연 항생제라고 불린다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 가다랑어(Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*)의 간(liver)으로부터 면역기작을 담당하는 신규 항미생물 활성 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[6]

과제 해결 수단

- [7] 본 발명의 일 관점에 따르면, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 제공된다.
- [8] 상기 펩타이드는 가다랑어(Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*)의 간(liver)으로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [9] 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)

- 일 수 있으며, 및 상기 효모는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.
- [10] 상기 펩타이드는 적혈구 세포를 파괴하지 않을 수 있다.
- [11] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물이 제공된다.
- [12] 상기 항균 조성물에 있어서, 상기 펩타이드는 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [13] 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)일 수 있으며, 및 상기 효모는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.
- [14] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.
- [15] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드의 유효 투여량은 0.001 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.
- [16] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 상술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제가 제공된다.
- [18] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균, 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [19] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.

[20] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 어류가 양식되고 있는 수조의 물에 직접 살포하는 것도 가능하다.

[21]

발명의 효과

[22] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 가다랑어의 간으로부터 유래된 신규한 항미생물 활성을 갖는 펩타이드를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물의 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021과 그람 음성균인 대장균(*E. coli* D31)에 대한 항미생물 활성을 확인한 사진(도 1a), 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021에 대하여 CAU-PAGE를 한 후 항미생물 활성을 확인한 그래프(도 1b), 및 상기 CAU-PAGE 분리된 간 추출물의 활성 분획물을 Acid-urea-PAGE를 한 후, 쿠마시 용액(Coomassie blue)으로 염색을 한 사진(도 1c)이다.

[25] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물을 역상 HPLC를 이용하여 분리한 결과 그래프(도 2a), 및 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물을 양이온 교환 컬럼을 수행한 후, 한번 더 역상 HPLC를 수행한 결과 및 이의 항미생물 활성을 나타낸 결과(도 2b)이다.

[26] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 분획된 펩타이드를 MALDI time-of-flight(TOF)/TOF 질량분석기를 이용하여 분자량을 분석한 결과(도 3a)이며, 정제된 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과(도 3b)이다.

[27] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물에서 정제된 항미생물성 단백질의 아미노산 서열과 그 외 알려진 헤모글로빈 β 사슬(hemoglobin β chain)의 C-말단 아미노산 서열과 비교하여 나타낸 그림이다.

[28] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드의 인간 적혈구 세포에 대한 용혈활성을 피시딘 1(Piscidin 1)과 비교한 그래프이다.

[29]

발명의 실시를 위한 형태

[30] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[31]

[32] 실시예 1: 가다랑어 조직 추출물의 제조

[33] 냉동 가다랑어를 동원 F&B (창원, 대한민국)으로 제공받아 간을 적출한 후

상기 간 조직에 미리 가열된 1% 아세트산(HAc)을 1:4(v/v)의 비율로 혼합하고, 단백질 분해효소의 활성을 막기 위해 5분 동안 가열하였다. 가열된 조직은 5분 동안 얼음 속에서 냉각시킨 후 균질화하였다(speed#6, T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, USA). 균질화 한 후, 4°C, 15,000 x g에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 수득하고 하기 실험에 이용하기 직전까지 -70°C에 보관하였다.

[34]

[35] 실시예 2: 가다랑어 추출물의 항미생물 활성[36] 가다랑어 추출물의 항미생물 활성은 *B. subtilis* KCTC1021와 그람 음성균인 대장균(*E. coli* D31)을 이용하였으며, 간 추출물의 각각의 항미생물 활성을 고감도 방사확산 분석(ultrasensitive radial diffusion assay, URDA) 방법을 이용하여 측정하였다.

[37] 구체적으로 상술한 미생물들은 25°C 또는 37°C에서 18시간 동안 TSB(Trypticase soy broth) 또는 SDB(Sabouraud's dextrose broth)에서 배양한 후, 상기 배양액을 McFarland 표준혼탁도 0.5(Vitek Colorimeter #52-1210; Hach, Loveland, CO, USA)가 되도록 각각 희석하였다. 상기 희석액은 약 $\sim 10^8$ CFU/ml (세균) 또는 $\sim 10^6$ CFU/ml (*C. albicans*)에 해당하는 양이다. 상기 희석액은 각각 0.5 ml을 9.5 ml의 깔개 겔(underlay gel)[10 mM 인산 완충액(pH 6.6), 0.03% TSB(tryptic soy broth) 또는 0.03% SDB(Sabouraud's dextrose broth), 및 1% I형 한천(low EEO)]에 혼합하여 5×10^6 CFU/ml(세균) 또는 5×10^4 CFU/ml(*C. albicans*)로 조정한 후 직경 10 cm, 높이 1.5 cm 평판 접시에 도포하였으며, 그 결과 1 mm 높이의 겔이 형성되었다. 그 후, 상기 평판 접시 내에 형성된 겔에 직경 2.5 mm 크기로 구멍을 뚫어 웰(well)을 만들었다. 그 후, 상기 웰에 간 추출물을 각각 5 μ l HAc(0.01% HAc)에 2배 순차희석한 후, 각각의 희석액을 1 mm 두께의 깔개 겔 내에 형성된 직경 2.5 mm의 웰에 첨가한 후, 25°C 또는 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 배양된 현탁액 위에 10 mM 인산완충용액(pH 6.6)에 6% TSB 또는 6% SDB, 및 1% 한천을 포함하는 강도 두 배의 덮개 겔 10 ml을 덮은 후, 25°C 또는 37°C에서 16 내지 18시간 동안 배양하였다. 다음 날 웰 주위에 형성된 투명지역(clear zone)의 직경을 측정함으로써 활성을 확인하였다. 웰의 투명지역(clear zone)의 직경에서 웰의 직경을 제한 값을 유니트(U)로 표현하였는데 0.1 mm을 1U로 환산하였고 합성 펩타이드의 최소 효과 농도(Minimal effective concentration, MEC, μ g/ml)는 펩타이드 농도의 로그값에 대한 유니트의 곡선의 X-intercept로 계산하였다(Seo JK *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 338:1998-2004, 2005).

[38] 그 결과, 도 1a 왼쪽 패널에 나타난 바와 같이 가다랑어 간 추출물은 그람 양성 균인 *B. subtilis* KCTC1021 및 그람 음성 균인 *E. coli* D31에 대하여 강력한 항미생물 활성을 나타냈다.

[39] 이어, 본 발명자는 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 가다랑어 간 추출물에

포함된 활성물질이 가수분해 작용에 영향을 받는지의 여부를 단백질 분해 효소를 처리하여 확인하였다. 단백질 분해 효소로 250 $\mu\text{g/ml}$ 크리스탈 트립신(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA)을 이용하였으며, 상기 실시예 1의 가다랑어 간 추출물에 첨가하여 37°C에서 60분 동안 처리하였다. 그리고 상술한 바와 동일한 URDA 방법을 이용하여 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021 및 그람 음성균인 *E. coli* D31에 대한 항미생물 활성을 확인하였다.

- [40] 그 결과, 도 1a의 오른쪽 패널에 나타난 바와 같이, 상기 균에 대한 항미생물 활성이 현저하게 감소되었으며, 이러한 결과는 가다랑어 간 추출물이 단백질 항생물질을 포함하고 있다는 것을 의미한다.

[41]

[42] 실시예 3: 가다랑어 간 추출물로부터 항미생물 펩타이드의 정제

- [43] 본 발명의 일 실시예에 따른 항미생물 활성을 나타내는 가다랑어 간 추출물을 연속 산-요소-폴리아크릴아마이드 겔(continuous acid-urea-polyacrylamide gel, CAU-PAGE)과 역상 HPLC를 통하여 정제하였다.

- [44] 먼저, CAU-PAGE는 이미 알려진 방법(Seo *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 338:1998-2004, 2005) Bio-Rad Prep Cell 491(Bio-Rad, US)를 사용하여 가다랑어 간 추출물을 초기에 정제하였다. 12% 아크릴아마이드 겔을 사용 하였으며 5% HAc와 4.8 M Urea를 포함하고 0.48% (v/v) TEMED(tetramethylethylenediamine)와 0.22% (w/v) APS(ammonium persulphate)를 넣어 직경 28 mm 튜브를 이용하여 겔을 제작하였고, 겔은 4°C에서 90분 동안 pre-run을 수행하였다. 위와 아래 챔버 모두는 5% HAc를 넣어 주고, pre-run을 수행한 후, 위 챔버에 5% HAc를 다시 넣어주었다. 산성화된 간 추출물 10 ml 에 5 ml 샘플 용액(3.0 M urea in 5% HAc)을 혼합한 뒤, 겔에 로딩한 후 30 mA로 전류를 일정하게 4°C 하에 전기영동을 수행하였다. 시료는 0.8 ml/분 속도로 용출되었고 12 ml씩 분획물을 6시간 동안 수집하였다. 이 분획물은 -70°C에서 밤새 보관한 후 동결건조 하였다. 동결건조 후, 각 분획물은 0.01% HAc의 200 μl 로 용해하였고 각 분획물의 5 μl 로 항미생물 활성을 상술한 URDA 방법으로 확인하였다.

- [45] AU-PAGE는 continuous AU-PAGE로부터 얻은 분획물의 순도를 확인하기 위하여 수행하였다. 4.8 M urea, 5% HAc, 0.48%(v/v) TEMED와 0.22%(w/v) APS를 넣어, 12% 아크릴 아마이드 겔(100 mm wide $\times$ 75 mm long $\times$ 1.0 mm thick)을 준비하였다. 150 V로 일정하게 유지하여 5% HAc에 두어 Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, US)를 이용하여 역-극성으로 60분 동안 pre-run하여 APS와 TEMED를 제거하였다. 시료는 샘플 용액(3.0 M urea in 5% HAc containing methyl green)과 1:1 비율로 섞은 후 실내 온도에서 150 V로 일정하게 50분 동안 5% HAc 하에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 겔은 쿠마시 염색용액(Coomassie brilliant blue R-250 dye)로 염색 한 후 MeOH:HAc:H₂O(4:1:5) 용액으로 염색을 다시 제거하였다. 그 결과 CAU-PAGE 전개 이후에 항미생물 활성은 13-34 분획물 사이에서 흩어져 나타났으며(도 1b),

항미생물 활성 분획물의 AU-PAGE는 크기 의존적으로 분리되어 나타났다(도 1c).

- [46] 도 2a에 나타난 바와 같이, 얻어진 항미생물 활성 분획물 17을 CapCell-Pak C18 역상 컬럼(5 μ m, 300A, 4.6 X 250mm, Shiseido, Japan)에 로딩하였다. 그 후, 상기 샘플에 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액을 1 ml/분의 유속으로 60분 동안 5~65%까지 선형 농도구배를 처리하였으며 수득된 용출액의 흡광도는 220 nm 파장에서 관찰하였다. 그 결과 도 2a에 나타난 바와 같이, 강한 활성을 나타내는 단일 피크(도 2a의 화살표)가 관찰되었다.

- [47] 이에, 도 2b에 나타난 바와 같이, 본 발명자는 항미생물 펩타이드를 정제하기 위하여, 상기 도 2a의 단일 피크에 대하여 C18 역상 HPLC를 한번 더 수행하였다. 상기 샘플에 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액을 1 ml/분의 유속으로 60분 동안 5~65%까지 선형 농도구배를 처리하였으며 수득된 용출액의 흡광도는 220 nm 파장에서 관찰하였다. 가장 강한 활성 피크는 44% 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액에서 용출되었다.

[48]

[49] **실험예 1: 정제된 펩타이드의 항미생물 활성 측정**

- [50] 이어 본 발명자는 상기 실시예 3에서 정제된 펩타이드의 항미생물 활성을 상술한 URDA 방법을 이용하여 확인하였다. 상기 실시예 3에서 최종 정제된 펩타이드를 단백질 분해 효소인 크리스탈 트립신 처리 전, 후의 항미생물 활성을 비교하였다.

- [51] 250 μ g/ml 크리스탈 트립신(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA)을 상술한 정제과정으로 최종 정제된 펩타이드에 37°C에서 60분 동안 처리하였다. 그리고 상술한 바와 동일한 URDA 방법을 이용하여 그람 양성 균인 *B. subtilis* KCTC1021에 대한 항미생물 활성을 확인하였다.

- [52] 그 결과, 트립신 처리에 의해서 상기 펩타이드의 항미생물 활성은 완전히 사라졌다(도 2b 참조).

[53]

[54] **실험예 2: 정제된 펩타이드의 분자량 및 서열분석**

- [55] 상기 실험예 1에서 항미생물 활성을 확인한 정제된 펩타이드의 분자량 측정은 선형모드((Bruker Daltonics, Billerica, MA)에 plused SMARTBEAM II(355 nm Nd:YAG 레이저; 반복속도 1 kHz)를 갖춘 Ultraflex III MALDI time-of-flight (TOF)/TOF 질량분석기를 이용하여 분석하였다. 우선, 상기 펩타이드는 CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) 매트릭스 용액[10 mg/mL in 0.1% TFA/50% ACN, 1:1, v/v]과 0.1% TFA/50% ACN(1:1, v/v)의 혼합용액에 녹인 후, MALDI 플레이트에 바로 로딩하였다. 그후, 상기 스펙트라(spectra)는 Flex analysis software (version 3.3, Bruker Daltonics, DEU)를 이용하여 분석하였다. 또한, 정제된 펩타이드의 N 말단의 아미노산 서열은 펄스 리퀴드 자동 서열분석기(pulse liquid automatic sequencer, model 473A; Applied Biosystems Inc.,

- Foster City, CA, USA)의 자동화된 Edman 분해 방법을 이용하여 분석하였다.
- [56] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 1개의 양성 이온 피크(2337.39)가 관찰되었다(도 3a 참고). 이러한 결과를 통해서 정제된 펩타이드가 Edman 분해 방법에 따라 분석한 결과 상기 펩타이드의 하기와 같은 21개의 아미노산 잔기를 포함한다는 것을 확인할 수 있었다(도 3b). MALDI-TOF-MS에 의해 얻은 2337.39 Da은 아미노산 서열을 바탕으로 계산된 2337.66 Da에 거의 근접한다는 것을 확인할 수 있었다. 정제된 펩타이드의 등전점(PI)은 9.7이다.
- [57] 정제된 펩타이드의 아미노산 잔기의 서열분석을 수행한 결과는 다음과 같다:
- [58] NH₂-TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH-OH(서열번호 1).
- [59] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 아미노산의 상동성을 분석하기 위하여, Genome Net([://www.ncbi.nlm.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST))에 있는 BLASTP 2.2.10과 TBLASTN 2.2.10 유사성 분석 프로그램을 이용하였다. 이론적인 등전점과 질량 분석은 ExPASy([://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html))로 추정하였다. 시퀀스 정렬은 ClustalX를 사용하여 수행하였다(Thomson *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 25: 4876-4882, 1997). 분석 결과 본 발명의 일 실시예를 통하여 정제된 펩타이드가 안타크틱피쉬(*Trematomus bernacchii*, 86 %, 서열번호 2), 대서양대구(*Gadus morhua*, 71%, 서열번호 3), 대서양연어(*Salmo salar*, 80%, 서열번호 4), 메기(*Ictalurus punctatus*, 75%, 서열번호 5), 모순드래곤피쉬(*Cygnodraco mawsoni*, 86%, 서열번호 6), 유럽넙치(*Platichthys flesus*, 70%, 서열번호 7), 해덕(*Melanogrammus aeglefinus*, 76%, 서열번호 8), 송사리(*Oryzias latipes*, 80%, 서열번호 9), 나일티라피아(*Oreochromis niloticus*, 85 %, 서열번호 10), 오렌지 점 그라우퍼(*Platichthys flesus*, 70%, 서열번호 11), 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*, 81 %, 서열번호 12) 및 레드시뱃(*Pagrus major*, 70%, 서열번호 13)을 포함한 다른 종의 헤모글로빈 β 체인의 C-말단과 매우 유사하였다(70-86%, 도 4참조).
- [60] 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예를 통하여 정제된 펩타이드가 신규한 항미생물 활성을 갖는 펩타이드이며, 본 발명자는 상기 펩타이드를 SH β AP(Skipjack hemoglobin β chain related antimicrobial peptide)라고 명명하였다.

[61]

[62] 실례 3: SH β AP 펩타이드의 항균 스펙트럼 분석[63] 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드의 항균 스펙트럼을 URDA 방법을 이용하여 확인하였다.[64] 항균 스펙트럼 측정에는 그람 양성균인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)를 이용하였으며, 그람 음성균인 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모라이터쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 효모인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 이용하였다.

항미생물 활성을 측정한 방법은 상기 실험에 1과 동일하며, 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*)와 비브리오 파라헤모리티커스(*Vibrio parahaemolyticus*)의 경우 TSB(Trypticase soy broth)에서 25°C 온도조건으로, 나머지 세균들은 TSB(Trypticase soy broth)에서 37°C 온도조건에서 배양하였으며, 효모인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 SDB(Sabouraud's dextrose broth)에서 37°C 온도조건에서 배양되었다는 면에서 차이가 있었다. 이때, 양성 대조군으로는 E.J. Noga (NCSU, NC, USA)교수로부터 제공받은 교잡종 줄무늬 베스(hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M. chrysops*)로부터 분리된 α -나선행의 항미생물성 펩타이드인 피시딘 1(Piscidin 1)을 사용하였다(Silphaduang and Noga, *Nature*, 414(6861): 268-269, 2001).

- [65] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드는 그람 양성균(*B. subtilis*, 및 *S. aureus*[MECs, 6.5-57.0 μ g/mL])과 그람 음성균(*E. coli* D31, *E. coli* ML35p, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, 및 *S. sonnei* [MECs, 2.0-19.0 μ g/mL])과 효모(*C. albicans*[MECs, 12.0 μ g/mL])에 대하여 모두 강한 항미생물 활성을 나타냈으며, 양성 대조군인 피시딘 1과도 유사한 항미생물 활성을 보였다. 또한 *S. iniae*와 *V. parahemolyticus*[MECs, 1.5-23.0 μ g/mL]에 대하여 강한 항미생물 활성을 보였다. 그러나 *A. hydrophila*에 대하여는 MEC 수치가 >125.0 μ g/mL을 나타내며 항미생물 활성이 거의 나타나지 않았다, 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드가 광범위한 항미생물 활성을 가지고 있음을 시사한다.

[66]

[67] 표 1

[Table 1]

본 발명의 펩타이드의 항균 스펙트럼

미생물	그람염색 여부	최소효과농도(g/mL) [M] ^a	
		SHAP	Piscidin 1
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	+	16.0	7.5
<i>B. subtilis</i> RM125	+	6.5	4.5
<i>S. aureus</i> KCTC162	+	57.0	4.5
<i>E. coli</i> D31	-	15.0	3.8
<i>E. coli</i> KCTC1116	-	2.6	7.0
<i>E. coli</i> ML35p	-	6.2	2.3
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2004	-	19.0	8.0
<i>S. enterica</i> KCTC2514	-	2.0	7.0
<i>S. sonnei</i> KCTC2009	-	6.0	13.0
Fish pathogen			
<i>A. hydrophila</i> KCTC2358	-	>125.0	10.0
<i>S. iniae</i> FP5229	+	23.0	6.5
<i>V. parahemolyticus</i> HUF91	-	1.9	2.3
<i>V. parahemolyticus</i> KCCM41664	-	1.5	3.1
Yeast			
<i>C. albicans</i> KCTC7965	Yeast	12.0	>62.5

[68]

[69] **실험예 4: SH β AP 펩타이드의 용혈활성**

[70]

본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드의 용혈활성을 확인하기 위하여, 인간 적혈구 세포를 이용하여 측정하였다(Park *et al.*, *Biochemistry*, 50, 3288-3299, 2011).

[71]

상기 적혈구 세포는 구연산을 처리된 혈액을 5분 동안 3000 x g에서 원심분리하여 수득한 후, 플라즈마와 버피코트(buffy coat)를 제거하기 위해 150 mM NaCl을 포함하는 10 mM 인산완충액(pH 7.4)으로 세척한 후, 완충액에 현탁하여 3%의 적혈구 용적율(hematocrit)로 조절하였다. 그 결과 상기 현탁액은 약 2 X 10⁸ cells/ml 비율로 적혈구를 포함한다. 상기 3% 적혈구 용적율을 갖는 현탁액에 SH β AP 또는 피시딘 1을 0 내지 100 μ g/ml의 농도로 첨가한 후, 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. 상기 상층액을 5분 동안 3,000 x g에서

원심분리해서 얻은 상층액을 마이크로타이터 플레이트에 넣은 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 용혈반응을 표현하였다. 100% 용혈반응은 0.1% Triton X-100을 처리한 후, 방출되는 헤모글로빈에 따라 결정되었다. SHβAP 또는 피시딘 1에 의한 적혈구 용혈반응은 하기 수학적 식 1에 의해 계산하였다.

[72]

[73] 수학적 식 1

$$\text{적혈구용혈반응(\%)} = \frac{(\text{펩타이드용액의 } 405\text{nm에서의 흡광도}) - (\text{완충액의 } 405\text{nm에서의 흡광도})}{(0.1\% \text{트리톤X-100의 } 405\text{nm에서의 흡광도} - \text{완충액의 } 405\text{nm에서의 흡광도})} * 100$$

[74]

[75] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 SHβAP 펩타이드는 인간 적혈구 세포에 대해서 용혈활성을 전혀 나타나지 않았으며, 이러한 용혈활성을 100 μg/ml의 농도로 처리하였을 때에도 관찰되지 않았다. 반면 양성대조군으로 이용한 피시딘 1은 12.5 μg/ml의 농도로 인간 적혈구 세포에 처리하였을 때에도 세포가 용혈되는 것을 관찰할 수 있었다(도 5 참조). 이 결과는 SHβAP는 세포독성이 낮으며, 이는 잠재적으로 질병 치료를 위한 기존의 항생제의 대안으로 사용할 수 있음을 시사한다.

[76]

본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[77]

산업상 이용가능성

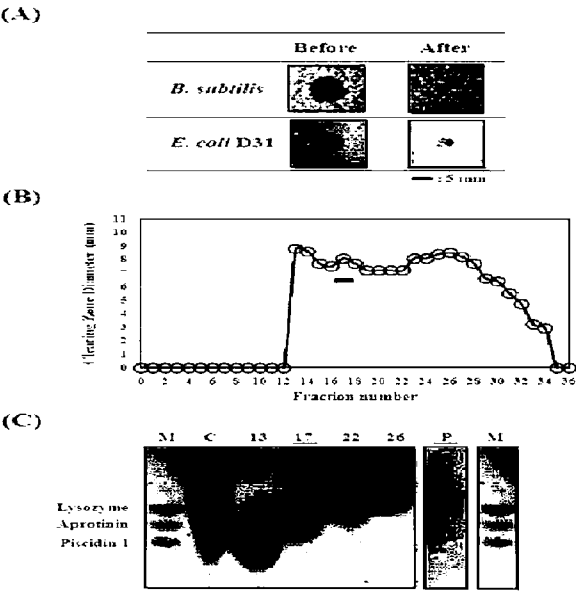
[78]

본 발명의 향미생물성 펩타이드는 가다랑어 간 유래의 새로운 향미생물성 펩타이드로서 천연 항생제로의 활용이 가능하다.

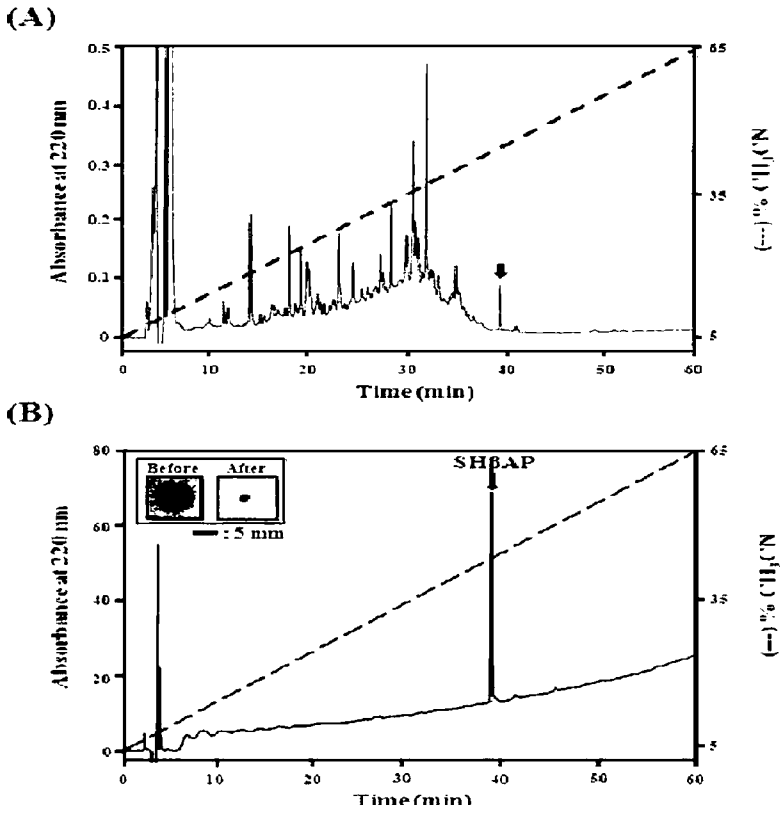
청구범위

- [청구항 1] 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
그램 음성균, 그람 양성균 및 효모에 대한 항균활성을 갖는, 항균 조성물.
- [청구항 4] 제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

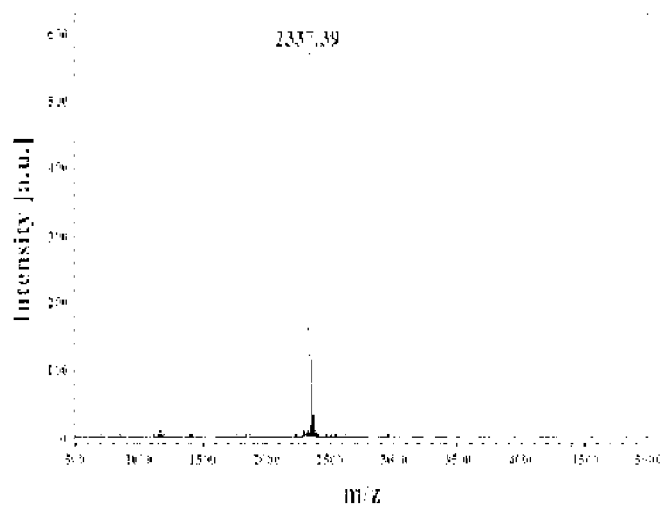
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]
(A)



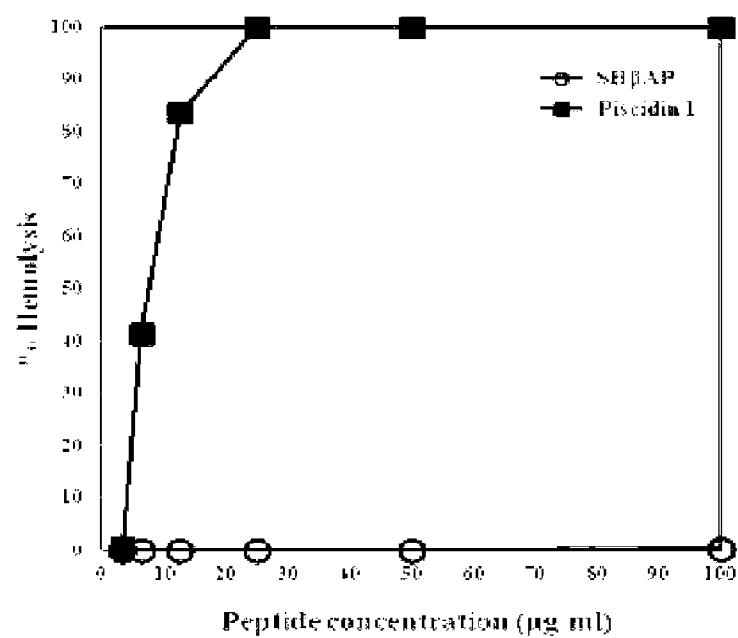
(B)

1 10 20
TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH

[Fig. 4]

	10 20
Skipjack tuna	TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH
Antarctic fish	TQGA FQKFLAVVVSALGKQYH
Atlantic cod	TQVAAQKFLSVVVSALGRQYH
Atlantic salmon	-QEAFQKFLAVVVSALGRQYH
Catfish	-QAALQKFLAVVVSALGKQYQ
Dragonfish	TQAA FQKFLAVVVSALGKQYH
European flounder	-QEAAQKFLSVVVSALGRQYH
Haddock	TQVAAQKFLAVVVSALGRQYH
Medaka	-QATFQKFLAVVVSALGRQYH
Nile Tilapia	-QEAAQKFLAVVVSALGRQYH
Orange-spotted grouper	-QAA FQKF IAVVVN ALGRQYH
Rainbow trout	TQEAFQKFLAVVVSALGRQYH
Red seabream	-QEAAQKFLAVVVN ALGRQYH

[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/010583**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/46(2006.01)i, A23K 1/17(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/46; C12N 15/12; A23K 1/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: antimicrobial peptide, katsuwonus pelamis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SONG, R. et al. Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (<i>Setipinna taty</i>). Molecules. 9 March 2012, vol. 17, no. 3, pages 2980-91. See table 1.	1-4
A	OTERO-GONZALEZ, A. J. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. FASEB Journal. May 2010, vol. 24, no. 5, pages 1320-34. See pages 1329-1330.	1-4
A	KR 10-2006-0063157 A (REPUBLIC OF KOREA(NATIONAL FISHERIES RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE)) 12 June 2006 See claims 1-4.	1-4
A	URAKOVA, I. N. et al. The Biological Activities of Fish Peptides and Methods of Their Isolation. Russian Journal of Marine Biology. November 2012, vol. 38, no. 6, pages 417-422. See pages 419-420.	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 FEBRUARY 2014 (26.02.2014)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2014 (28.02.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/010583

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAJAFIAN, L. et al. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. Peptides. January 2012, vol. 33, no. 1, pages 178-85. See pages 182-183.	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/010583

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0063157 A	12/06/2006	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/46(2006.01)i, A23K 1/17(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/46; C12N 15/12; A23K 1/17 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: antimicrobial peptide, katusuwonus pelamis		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SONG, R. et al. Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (Setipinna taty). Molecules. 9 March 2012, Vol. 17, No. 3, pages 2980-91. table 1 참조.	1-4
A	OTERO-GONZALEZ, A. J. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. FASEB Journal. May 2010, Vol.24, No. 5, pages 1320-34. 1329-1330쪽 참조.	1-4
A	KR 10-2006-0063157 A (대한민국(관리부서:국립수산물과학원)) 2006.06.12 청구항 1-4항 참조.	1-4
A	URAKOVA, I. N. et al. The Biological Activities of Fish Peptides and Methods of Their Isolation. Russian Journal of Marine Biology. November 2012, Vol. 38, No. 6, pages 417-422. 419-420쪽 참조.	1-4
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 02월 26일 (26.02.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 02월 28일 (28.02.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 이현지 전화번호 +82-42-481-8745 

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NAJAFIAN, L. et al. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. Peptides. January 2012, Vol. 33, No. 1, pgaes 178-85. 182-183쪽 참조.	1-4

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/010583

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2006-0063157 A	2006/06/12	없음	