

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 9월 12일 (12.09.2019)



(10) 국제공개번호

WO 2019/172666 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 7/08 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A23K 20/147 (2016.01) A61P 31/04 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01) A61Q 17/00 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/002633

(22) 국제출원일: 2019년 3월 7일 (07.03.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0026778 2018년 3월 7일 (07.03.2018) 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 장성읍 매화7길 4, Jeollanam-do (KR). 박은지 (PARK, Eunji); 62029 광주시 서구 엄화로45번길 17, 103동 1301호, Gwangju (KR).

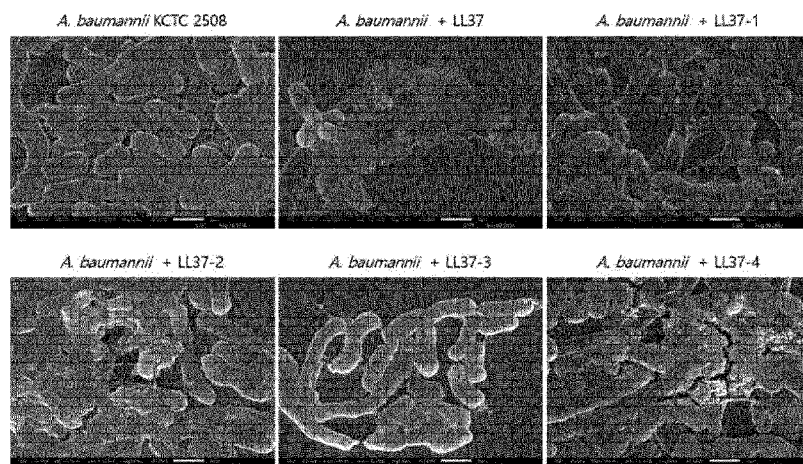
(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(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).

(54) Title: NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVED FROM LL37 PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: LL37 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel antimicrobial peptide derived from an LL37 peptide and a use thereof. The antimicrobial peptide of the present invention shows excellent antimicrobial activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and antibiotic-resistant bacteria and exhibits low cytotoxicity against cells from mice and humans, and therefore, the antimicrobial peptide may be utilized as an active ingredient of antibiotics, cosmetic compositions, food additives, feed additives, and biological pesticides for antimicrobial use.

(57) 요약서: 본 발명은 LL37 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 우수한 항균활성을 보이며, 쥐 및 인간 유래 세포에 대해 낮은 세포독성을 나타내어, 항균용 항생제, 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/172666 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: LL37 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 LL37 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하여 세균의 항생제 저항성(resistance)이 야기되었다. 실제로, 세균이 새로운 항생제에 저항성을 나타내는 속도는 새로운 항생제가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다.
- [3] 항생제 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus* sp.)에서 최초로 발견되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다. 항생제에 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 사멸하지 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.
- [4] 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다. 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 항생제에 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.
- [5] 항생제 내성은 작용 기작의 측면에서 크게 두가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며, 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인

내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은 오토라이신 활성화의 하향조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하향조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다.

- [6] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성화과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.
- [7] 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신(bacteriocin)들은 구조적으로 세 부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며, 두 번째는 비란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고, 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다. 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데, 상기의 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -시트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -나선형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다. 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 가지며, 이들 구조 중 사람에서 발견된 항균 펩타이드인 LL37(cathelicidin antimicrobial peptide)은 양친화성 알파 나선형 구조를 형성한다.
- [8] 한편, 한국공개특허 제2018-0000531호에는 항생 펩타이드인 파필리오신(Papiliocin)의 N 말단 잔기 및 마가이닌(Magainin)의 N 말단 잔기를 연결하여 제조된 '그람음성 다제내성균에 대해 항생제와 상승적 항균효과를 가지는 항생 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1420849호에는 '다제내성균에 높은 항균 효과를 보이는 프로테티아마이신 항균펩타이드 유도체 및 그 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 LL37 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 항균활성을 가지는 것으로 기존에 보고된 양친화성을 갖는 LL37 항균 펩타이드를 주형으로 하여, 서열번호 2 내지 서열번호 5로 기재되는 신규한

4종의 항균 펩타이드(LL37-1 내지 LL37-4)를 합성하였고, 상기 합성된 항균 펩타이드의 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 활성 및 세포 독성을 분석한 결과, LL37-2 및 LL37-4 펩타이드가 LL37 항균 펩타이드와 유사하거나 보다 우수한 수준의 항균활성을 보이며, 쥐 적혈구 및 인간 정상 세포주에 대하여 낮은 세포독성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 결실되고, ii) 16번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되거나, iii) 16번째 및 26번째 아미노산이 리신으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장품 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 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 개체 내 항균 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명의 신규한 항균 펩타이드(LL37-2 및 LL37-4)는 우수한 항균 활성과 동시에 낮은 세포 독성을 가지고 있으므로, 항생제, 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약외품 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 모체 항균 펩타이드인 LL37(대조군) 및 LL37 유사체 신규 펩타이드인 LL37-2 또는 LL37-4가 단백질 분해효소인 트립신의 존재하에서 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균주에 대하여 안정하게 항균활성을 나타내는지 확인한 결과이다.
- [20] 도 2는 모체 항균 펩타이드인 LL37(대조군) 및 LL37 유사체 신규 펩타이드인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4의 다양한 용매 상에서 2차 구조 형성 여부를

확인한 결과이다.

- [21] 도 3은 모체 항균 펩타이드인 LL37(대조군) 및 LL37 유사체 신규 펩타이드인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4를 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균주에 처리한 후, PI 염색을 통해 박테리아 막에 미치는 영향을 유세포분석기로 분석한 결과이다.
- [22] 도 4는 저진공 전자주사현미경을 통해 대조군 항균 펩타이드인 LL37 및 실험군 항균 펩타이드인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4의 아시네토박터 바우마니 막에 대한 파괴능을 확인한 사진이다.
- [23] 도 5는 웨스턴 블롯과 실시간 역전사 중합효소반응을 통해 아시네토박터 바우마니 감염 후, 모체 항균 펩타이드인 LL37(대조군) 및 LL37 유사체 신규 펩타이드인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 투여에 따른 염증성 사이토카인의 발현 수준을 확인한 결과이다. lysate: 펠렛, Sup: 상층액.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [25] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
- [26] i) 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 결실되고,
- [27] ii) 16번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되거나,
- [28] iii) 16번째 및 26번째 아미노산이 리신으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [29] 기존에 알려진 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 모체 펩타이드인 LL37은 인간 유래 카텔리시딘(cathelicidin) 펩타이드로, 항균 펩타이드로 알려져 있다. 상기 LL37 펩타이드는 당업계에서 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 상기 합성을 위한 방법으로 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법으로 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 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [30] 본 발명의 항균 펩타이드는 상기 i) 및 ii), 또는 i) 및 iii) 조건을 만족해야 하는데, 구체적으로 i) 조건은 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 모두 결실되어야 하는 것이며, ii) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 16번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid, E)이 양전하를 갖는 염기성의 아미노산인 리신(lysine, K)으로 치환되어야 하는 것이며, iii) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 16번째 아미노산인 글루탐산 및 26번째 아미노산인 아스파르트산(aspartic acid, D)인 양전하를 갖는 염기성의 아미노산인 리신(lysine, K)으로 치환되어야 하는 것이다.
- [31] 본 발명의 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의

아미노산 서열을 가질 수 있는데, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 LL37로부터 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 결실되고, 16번째 아미노산인 글루탐산(E)이 리신(K)으로 치환된 항균 펩타이드로 LL37-2로 명명하였고, 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 LL37로부터 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 결실되고, 16번째 아미노산인 글루탐산(E) 및 26번째 아미노산인 아스파르트산(D)이 리신(K)으로 치환된 항균 펩타이드로 LL37-4로 명명하였다.

- [32] 상기 항균 펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 치환은 전극의 증/감을 이용하여 세포독성을 낮추며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대하여 항균활성을 증가 또는 유지하기 위해 수행될 수 있다.
- [33] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [34] 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*) 또는 리스테리아 속(*Listeria*) 인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 상기 그람 음성균은 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 대장균 속(*Escherichia*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렘토스피라 속(*Leptospira*), 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 대장균 속(*Escherichia*) 또는 살모넬라 속(*Salmonella*)일 수 있고, 더욱 구체적으로는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 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.

[38] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 쥐 및 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가진 것일 수 있다.

[39] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다. 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로, 각 펩타이드에 관한 것은 전술한 바와 같다.

[40] 본 발명의 LL37 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 항균 펩타이드인 LL37-2(서열번호 3) 및 LL37-4(서열번호 5) 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[41] 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.

[42] 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.

[43] 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.

[44] 본 발명의 항균 펩타이드의 유효용량은 0.1 내지 2mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지는 1mg/kg이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.

[45] 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 유효투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[46] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.

[47] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 화장료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[48] 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.

[49] 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.

[50] 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, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[51] 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.

[52] 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.

[53] 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.

[54] 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.

- [55] 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [56] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [57] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로, 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 식품 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [61] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 사료 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [62] 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.

- [63] 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, 사일레지는 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.
- [64] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물, 항균용 생물 농약, 및 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [65] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 생물 농약, 방부 조성물 및 의약외품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [66] 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.
- [67] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [68] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [69] 본 발명은 또한, 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.
- [70]
- [71] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을

예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[72]

[73] 실시예 1. 펩타이드의 합성 및 분리정제

[74] 본 발명자들은 메리필드(Merrifield)의 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149, 196)에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 모체 펩타이드인 LL37의 아미노산 서열에서 15번째부터 30번째 아미노산을 절단하였다. 절단된 16개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드를 LL37-1로 명명하고(서열번호 2), 상기 LL37-1의 아미노산 서열 중 2번째 아미노산을 리신(Lysine, K)으로 치환하여 LL37-2로 명명하였고(서열번호 3), 상기 LL37-1의 아미노산 서열 중 12번째 아미노산을 리신(K)으로 치환하여 LL37-3으로 명명하였고(서열번호 4), 상기 LL37-1의 아미노산 서열 중 2번째 및 12번째 아미노산을 모두 리신(K)으로 순차적으로 치환하여 이를 LL37-4로 명명하였고, 각 펩타이드를 합성하였다.

[75] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH_2 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다.

[76] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo trizole(HOBT)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 DCM(dichloromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid), 페놀, 싸이오아니졸(thioanisole), H_2O 및 트리이소프로필실레인(triisopropylsilane)을 각각 85 : 5 : 5 : 2.5 : 2.5(v/v)의 비율로 혼합한 용액을 가하고 2~3시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전하여 이를 수득하였다. 상기 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C18300Å, 15, 19.0mm×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N 염산으로 110°C에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N 염산에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정 후, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 5: 395, 1991)을 수행하였다.

[77] 그 결과, 하기 표 1에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 서열번호 5의 아미노산 서열로 기재되는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다.

[78] [표1]

본 발명에서 합성한 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유시간

펩타이드명칭	아미노산 서열	서열번호	보유시간	분자량(Da)
LL37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIV QRIKDFLRNLPVPTES-NH ₂	1	38.433	4493.3
LL37-1	KEFKRIVQRIKDFLRN-NH ₂	2	23.688	2089.7
LL37-2	KKFKRIVQRIKDFLRN-NH ₂	3	21.554	2089.0
LL37-3	KEFKRIVQRIKKFLRN-NH ₂	4	21.163	2101.8
LL37-4	KKFKRIVQRIKKFLRN-NH ₂	5	19.436	2100.9

[79]

[80] 실시예 2. 항균 활성 측정

[81] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

[82] 구체적으로, 하기 표 2에 기재된 균주를 구입하여, MHB(Mueller Hinton Broth) 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^5 세포/ $50 \mu\text{l}$ 의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트리트 플레이트(Nunc, USA)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드를 각각 96 웰에 1/2배씩 계열 희석(serial dilution)하여 $50 \mu\text{l}$ 씩 플레이트에 첨가한 후 37°C 에서 18시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트리트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 대조군으로는, 모체 펩타이드인 LL37을 상기와 동일한 방법을 수행하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

[83]

[표2]

본 발명에서 사용한 균주 및 이의 입수처

구분	균주명	출처	기탁번호
그람양 성균	스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25923
	리스테리아 모노사이토젠스(<i>Listeria monocytogenes</i>)	한국 세포주은행	KCTC 3710
그람음 성균	아시네토박터 바우마니(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	한국 세포주은행	KCTC 2508
	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25922
	슈도모나스 에루지노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	미국 세포주은행	ATCC 27853
	살모넬라 티피뮤리움(<i>Salmonella typhimurium</i>)	한국 세포주은행	KCTC 1925
항생제 내성균	아시네토박터 바우마니(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	울지대학교 감염내과	분리주 2
			분리주 3
			분리주 4
			분리주 5
			분리주 8
			분리주 9
			분리주 10
			분리주 11
			분리주 12
			분리주 13
			분리주 19

[84] 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이 실험균인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 특히 합성된 펩타이드 유사체 중 LL37-2 및 LL37-4 펩타이드는 항생제 내성균에 대한 항균활성에서는 모체 펩타이드인 LL37과 유사한 수준을 보이는 것으로 확인되었으나, 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해서는 모체 펩타이드보다 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[85]

[표3]

그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 펩타이드의 항균 활성

균주		펩타이드	최소 저해 농도 (μM)				
			LL37	LL37-1	LL37-2	LL37-3	LL37-4
그람 양성균		S. 아우레우스 ATCC 25923	16	32	2	4	2
		L. 모노사이토젠스 KCTC 3710	64	128	16	64	16
그람 음성균		A. 바우마니 KCTC 2508	2	16	4	16	4
		대장균 ATCC 25922	32	128	16	32	16
		P. 에루지노사 ATCC 27853	8	16	8	8	4
		S. 티피뮤리움 KCTC 1925	32	32	4	8	4
항생제 내성균		A. 바우마니 #2	2	4	2	4	2
		A. 바우마니 #3	2	8	2	4	2
		A. 바우마니 #4	2	8	2	4	2
		A. 바우마니 #5	2	4	2	4	2
		A. 바우마니 #8	2	4	2	2	2
		A. 바우마니 #9	2	4	2	2	2
		A. 바우마니 #10	2	4	2	2	2
		A. 바우마니 #11	2	4	2	2	2
		A. 바우마니 #12	2	8	2	4	2
		A. 바우마니 #13	2	4	2	2	2
		A. 바우마니 #19	2	8	2	4	4

[86]

[87] 실시예 3. 항생물막 활성 측정

[88] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 생물막 억제 농도값을 측정하였다.

[89] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 생물막이 가장 잘 형성되는 균을 적합한 조성의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 1×10^6 세포/ $50 \mu\text{l}$ 의 균체 농도로 희석하여 마이크로 플레이트에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 LL37, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4

펩타이드를 각각 96 웰에 1/10배씩 10mM 인산 완충 생리식염수(PBS)로 희석하여 웰에 50 μ l 씩 첨가한 후 37°C에서 24 시간 배양하였다. 상층액을 완벽히 제거한 후 100% 메탄올로 15분간 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색용액으로 1시간 염색시킨 후, 3번 세척한 뒤 95% 에탄올로 용해하여 마이크로 적정 플레이트 판독기를 이용하여 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 군주에 대한 생물막 최소억제 농도값을 확인하였다.

- [90] 그 결과 하기 표 4에 개시된 바와 같이 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4 펩타이드에서는 대조군인 모체 펩타이드 LL37에 비해 아시네토박터 바우마니에서 비슷하거나, 보다 강한 생물막 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다.

- [91] [표4]

그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 펩타이드의 생물막 저해 활성

		펩타이드 명칭	% 생물막 형성능				
		농도, μ M	32	16	8	4	2
그람 음성균	A. 바우마니 KCTC 2508	LL37	10	23	33	39	42
		LL37-1	27	29	33	34	42
		LL37-2	23	22	28	34	37
		LL37-3	23	25	29	41	52
		LL37-4	22	23	28	32	48
항생제 내성균	A. 바우마니 #5	LL37	15	36	40	74	97
		LL37-1	26	59	60	63	70
		LL37-2	18	19	67	69	95
		LL37-3	20	24	26	62	60
		LL37-4	20	22	49	59	74
	A. 바우마니 #10	LL37	13	53	54	58	62
		LL37-1	36	36	36	53	63
		LL37-2	28	29	29	33	39
		LL37-3	30	32	34	38	61
		LL37-4	30	33	33	37	49

- [92]

- [93] 실시예 4. 용혈 활성 측정

- [94] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드들의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

- [95] 구체적으로, 쥐(Balb/c, 6주령, 암컷) 적혈구를 8%의 농도가 되도록 PBS(pH 7.0)로 희석하고, LL37, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드를 각각 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 또는 100.0 μ M/웰의 농도로 처리하여, 37°C에서 1 시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000 x g로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈량을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포

파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100 (sigma, USA)을 처리하여 37°C에서 1 시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 상기 흡광도 값을 적혈구 용혈활성 100%로 하여, 하기 식을 사용하여 각 펩타이드의 용혈활성(hemolysis)을 계산하였다.

[96] 적혈구 파괴능(%) = (흡광도 A - 흡광도 B) / (흡광도 C - 흡광도 B) X 100

[97] (흡광도 A, 414nm 파장에서 측정한 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도; 흡광도 B, 414nm 파장에서 측정한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도; 흡광도 C, 414nm 파장에서 측정한 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도.)

[98] 그 결과, 하기 표 5에 나타난 바와 같이 모체 펩타이드인 LL37 펩타이드는 100 μ M 농도를 처리하였을 때 쥐 적혈구에 대하여 35%의 용혈작용이 유발되는 것을 확인한 것에 비해, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드는 100 μ M 농도에서도 적혈구에 대한 파괴능을 나타내지 않는 것을 확인하여, 본 발명의 항균 펩타이드는 모체 펩타이드에 비해 쥐 적혈구에 대한 세포독성이 약한 것을 확인하였다).

[99] [표5]

항균 펩타이드의 용혈 활성 측정

펩타이드 명칭	% 적혈구 파괴능						
농도 (μ M)	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
LL37	35	8	3	2	1	1	1
LL37-1	0	1	1	1	1	1	0
LL37-2	1	1	1	1	1	0	0
LL37-3	1	1	1	1	0	1	1
LL37-4	1	1	1	0	1	1	1

[100]

[101] 실시예 5. 정상 세포주에서 세포독성 확인

[102] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 정상 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해, 정상 사람 각질 배양 세포주(Normal Human Keratinocyte cell line, HaCaT)와 정상 사람 섬유아세포주(Normal Human Fibroblast cell line, Hs27)를 이용하여 세포독성을 측정하였다.

[103] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 정상 사람 각질 배양 세포(HaCaT)와 정상 사람 섬유아세포(Hs27)를 1×10^4 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, LL37, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드를 각각 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 또는 32 μ M/웰의 농도로 처리하여, 24 시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응하였다. 배양 후, 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 5 mg/ml MTT(Thiazolyl

Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 10 μl 를 각 웰에 넣고 1 시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200 μl 의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 570 nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

- [104] 그 결과, 하기 표 6에 나타난 바와 같이 32 μM 의 모체 LL37 펩타이드를 처리했을 때, HaCaT 세포와 Hs27 세포는 각 17 및 19%의 세포 생존력을 나타내어 LL37 펩타이드가 매우 높은 세포 독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이에 반해, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드를 32 μM 의 농도로 처리했을 경우 HaCaT 세포는 각각 104%, 107%, 104% 및 101%의 세포 생존력을 나타냈으며, Hs27 세포는 각각 95%, 97%, 95% 및 93%의 세포 생존력을 나타내어, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드가 모체 펩타이드에 비해 세포 독성을 거의 보이지 않는 것을 확인하였다.

- [105] [표6]

항균 펩타이드의 세포독성 분석

	펩타이드 명칭	% 세포 생존력						
	농도(μM)	32	16	8	4	2	1	0.5
HaCaT	LL37	17	83	99	98	96	99	99
	LL37-1	104	101	103	99	98	103	97
	LL37-2	107	107	101	102	104	106	100
	LL37-3	104	104	98	98	101	100	96
	LL37-4	101	94	92	96	97	103	100
Hs27	LL37	19	82	90	89	90	90	95
	LL37-1	95	92	96	95	103	100	100
	LL37-2	97	93	89	91	94	92	92
	LL37-3	95	93	91	90	93	92	94
	LL37-4	93	96	93	90	97	94	94

- [106]

- [107] 실시예 6. 체내의 이온 농도에서 펩타이드의 항균활성 확인

- [108] 체내의 서로 다른 이온의 존재에서 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 항균 활성을 확인하기 위하여, 군체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소 저해 농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

- [109] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508을 MHB(Mueller Hinton Broth) 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 LL37-2 또는 LL37-4 펩타이드를 체내에

존재하는 서로 다른 이온(염화나트륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화철)의 각기 다른 농도의 용액에 희석하여 50 μl 씩 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음, 배양된 균을 2×10^5 세포/50 μl 의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, USA)에 접종한 뒤 37°C에서 18시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 군주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

대조군으로는, 상기 표 3에 나타난 각 펩타이드 LL37, LL37-2 및 LL37-4의 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508에 대한 MIC 값을 사용하였다.

- [110] 그 결과 하기 표 7에 개시된 바와 같이 LL37-2 및 LL37-4 펩타이드에서는 일가 이온인 염화나트륨을 제외하고 대조군인 MIC 값에 비해 아시네토박터 바우마니에서 비슷한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[111] [표7]

이온 종류 및 농도가 상이한 조건에서 항균 펩타이드의 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508에 대한 항균 활성

	항균 펩타이드의 최소 저해 농도 (μM)												
	대조군	염화나트륨(mM)			염화칼륨(mM)			염화마그네슘(mM)			염화철(mM)		
		50	100	150	1.25	2.5	5	0.5	1	2	2	4	8
LL37	2	4	4	8	2	2	2	4	4	4	2	4	4
LL37-2	4	8	16	32	4	4	8	4	4	4	4	4	4
LL37-4	4	8	16	32	4	4	8	4	4	4	4	4	4

[112]

[113] 실시예 7. 트립신에 대한 펩타이드의 안정성 확인

[114] 단백질 분해효소 중 하나인 트립신의 존재에서 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 활성을 확인하기 위하여, 방사상확산분석법(radial diffusion assay)을 통해 단백질 분해효소에 대한 펩타이드의 안정성을 확인하였다.

[115] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 군주 중 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508을 MHB 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^5 세포/10 ml의 균체 농도로 희석하여 최종 농도를 1%로 맞춘 아가로스와 혼합한 뒤 페트리 접시에 고르게 펴서 굳혀준다. 그런 다음, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 맞춘 펩타이드를 10.7 nM의 트립신과 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰고, 굳혀진 페트리 접시에 직경 6 mm로 이루어진 페이퍼 디스크를 올린 후 트립신과 반응시킨 펩타이드를 25 μl 씩 분주하였다. 이를 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 페이퍼 디스크 주변의 투명한 직경을 측정하여 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508에 대한 항균 활성 정도를 확인하였다.

[116] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 모체 펩타이드인 LL37은 트립신에 의해

완전히 분해되어 항균 활성이 나타나지 않은 반면, LL37-2 및 LL37-4 펩타이드에서는 단백질 분해효소인 트립신을 처리하였을 때 트립신 무처리제 비해 각각 1.75 mm씩 투명환이 감소하였지만 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508에 대한 항균 활성을 나타내고 있음을 보여주었다.

[117]

[118] 실시예 8. 원이색법 스펙트럼 측정

[119] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α -나선형 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

[120]

구체적으로, 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline), 50% 트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol, TFE) 또는 30 mM 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액에 LL37, LL37-1, LL37-2, LL37-3 또는 LL37-4 펩타이드를 40 μ M로 첨가하여 0.1 cm 길이(path-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25°C로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다. 상기 원이색법 스펙트럼을 이용한 α -나선형 구조 계산식은 하기 식을 사용하였다.

[121]

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{obs}}}{10 \cdot l \cdot c}$$

(상기 식에 있어서, θ_{obs} 는 신호의 밀리도(milidegrees)를 나타내며;

l은 셀 크기(cm)의 광학 길이(optical path-length)를 나타내고; 및

c는 첨가한 펩타이드의 농도(mol/l)를 나타낸다.)

[122]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 인산 완충 생리식염수에 각 펩타이드를 첨가하였을 때에는 2차 구조를 형성하지 않은 반면, 50% TFE 용액과 30 mM SDS 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 모든 펩타이드에서 2차 구조인 α -나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 이의 결과를 통해, 본 발명의 항균 펩타이드는 미생물인 박테리아 막과 유사한 SDS와 TFE 용액 상에서 α -나선형 구조를 형성하는 것을 알 수 있었다.

[123]

[124] 실시예 9. 유세포분석기(Flow cytometry) 측정

[125]

상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드가 박테리아 막에 작용하는지 여부를 확인하기 위하여, 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하였다.

[126]

구체적으로, 모체 펩타이드 LL37 또는 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4의

최소농도 억제(MIC) 값을 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균주에 처리한 후 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 후, 원심분리기(10,000 rpm)를 이용해 상층액을 제거한 다음 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)로 4°C에서 30분간 염색하였다. 그런 다음, 결합하지 않은 프로피디움 요오드화물을 원심분리기를 이용해 제거하고 생리식염수(PBS) 1 ml을 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거하고, Bechman 유세포분석기를 이용하여 박테리아 막에 대한 각 펩타이드의 영향을 확인하였다.

[127] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 모체 펩타이드인 LL37을 비롯한 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4 펩타이드가 박테리아 막에 손상을 주어 형광시그널이 오른쪽으로 이동된 것을 확인할 수 있었다.

[128]

[129] 실시예 10. 항생 펩타이드가 아시네토박터 바우마니에 미치는 효과 탐침

[130] 본 발명의 합성 펩타이드가 항균활성을 나타내는 정도를 구체적으로 확인하기 위하여, 모체 펩타이드 LL37과 유도체 펩타이드 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4가 박테리아의 막에 대한 미치는 영향(파괴능)을 저진공 주사전자현미경(Low Vacuum scanning electron microscopy)을 통해 확인하였다.

[131] 구체적으로, 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균주를 MHB 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 10% MHB 배지를 포함한 생리식염수 용액에 2×10^7 세포/ml의 균체 농도로 희석하였다. 상기 희석한 균주에 LL37 또는 비교균인 LL37-1 내지 LL37-4 펩타이드를 각각 MIC 농도로 처리한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그런 다음, 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 상기 균주를 상온에서 30분, 4°C에서 12시간동안 고정하고, 완충제로 세척을 실시한 후 사산화오스뮴(OsO_4)으로 재고정해 준 후, 에탄올을 이용해 단계적으로 탈수시켰다. 탈수 후, 백금 코팅을 실시하여 저진공 주사전자현미경을 통해 관찰하였다.

[132] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 모체 펩타이드 LL37과 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4 펩타이드가 아시네토박터 바우마니의 세포막에 작용하여 박테리아 막을 파괴하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 항균 활성이 우수한 것으로 확인되었던 LL37-2 및 LL37-4에서 아시네토박터 바우마니의 세포막이 LL37-1 및 LL37-3에 비해 많이 파괴된 것을 확인할 수 있었다.

[133]

[134] 실시예 11. 펩타이드에 의한 염증성 사이토카인 발현 변화 확인

[135] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드가 대식 세포에서 염증성 사이토카인 발현을 변화시키는지 웨스턴 블롯과 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다.

[136] 구체적으로, 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균주를 MHB 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 인산 완충 식염수로 1×10^7 세포의 농도로 희석하여 인간 대식 세포(Human macrophage cells, U937)에 시간

의존적으로 감염시킨 샘플과, 대식 세포에 1×10^7 세포의 농도로 희석한 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508 균을 감염시킨 후 1시간 뒤 모체 펩타이드 LL37과 유사체 펩타이드를 투여하고 9시간 후 수거한 샘플을 회수하였다. 회수한 샘플을 세포 용해 버퍼를 이용하여 상층액(sup)과 펠렛(lysate)을 얻는다. 그런 다음, 웨스턴 블롯과 실시간 역전사 중합효소연쇄반응을 통해 염증성 사이토카인의 발현 정도와 변화를 확인하였다.

- [137] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 인간 대식 세포에 아시네토박터 바우마니 KCTC 2508를 감염시켰을 때, HMGB-1(High Mobility Group Box 1)과 late cytokine(IL-1b 및 TNF- α)이 9시간대에 증가되는 것이 확인되었으며, 유사체 펩타이드인 LL37-1, LL37-2, LL37-3 및 LL37-4를 각각 투여한 경우에는 증가된 HMGB-1 및 late cytokine의 발현 수준이 감소되었으나, 모체 펩타이드인 LL37의 경우 병증 상태에서 염증성 사이토카인들의 발현을 더욱 증대시키는 것을 확인할 수 있었다.

[138]

- [139] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

- [140] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

- [141] <1-1> 산제의 제조

- [142] 본 발명의 펩타이드 20mg

- [143] 유당 20mg

- [144] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- [145] <1-2> 정제의 제조

- [146] 본 발명의 펩타이드 10mg

- [147] 옥수수전분 100mg

- [148] 유당 100mg

- [149] 스테아린산 마그네슘 2mg

- [150] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

- [151] <1-3> 캡슐제의 제조

- [152] 본 발명의 펩타이드 10mg

- [153] 결정성 셀룰로오스 3mg

- [154] 락토오스 14.8mg

- [155] 스테아린산 마그네슘 0.2mg

- [156] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

- [157] <1-4> 액제의 제조

- [158] 본 발명의 펩타이드 20mg

- [159] 이성화당 10g

- [160] 만니톨 5g

[161] 정제수 적량

[162] 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 제조하였다.

[163] <1-5> 주사제의 제조

[164] 본 발명의 펩타이드 10 μ g/ml

[165] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지

[166] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1ml

[167] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 펩타이드를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120°C에서 15분 이상 고압증기멸균기로 살균하여 주사액을 제조하였다.

[168]

[169] <제조예 2> 화장품의 제조

[170] <2-1> 유연화장수(스킨)

[171] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 표 8에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

[172] [표8]

유연화장수 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 60	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	to 100

[173] <2-2> 영양화장수(로션)

[174] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 표 9에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

[175] [표9]
영양화장수 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
스쿠알란	10.0
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	2.0
유장목오일	0.1~30
1,3-부틸렌글리콜	8.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 60	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	to 100

[176] <2-3> 에센스

[177] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 에센스를 제조하기 위해 하기 표 10에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

[178]

[표10]

에센스 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
시토스테롤	1.7
폴리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.2
잔탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량
정제수	to 100

[179] <2-4> 세안제(클렌징폼)

[180] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 표 11에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[181]

[표11]

세안제 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
N-아실글루타민산나트륨	20.0
글리세린	10.0
PEG-400	15.0
프로필렌글리콜	10.0
POE(15) 올레일알코올에테르	3.0
라우린유도체	2.0
메틸파라벤	0.2
EDTA-4Na	0.03
향료	0.2
정제수	to 100

[182] <2-5> 영양크림

[183] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 표 12에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

[184]

[표12]

영양크림 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
바세린	7.0
유동파라핀	10.0
밀납	2.0
폴리솔베이트60	2.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
스쿠알란	3.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
잔탄검	0.5
토코페닐아세테이트	0.1
향료, 방부제	미량
정제수	to 100

[185] <2-6> 마사지크림

[186] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 표 13에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조한다.

[187]

[표13]

마사지크림 조성

성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0
토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
산탄검	0.5
향료, 방부제	미량
정제수	to 100

[188] <2-7> 팩

[189] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 팩을 제조하기 위해 하기 표 14에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

[190] [표14]

팩 조성

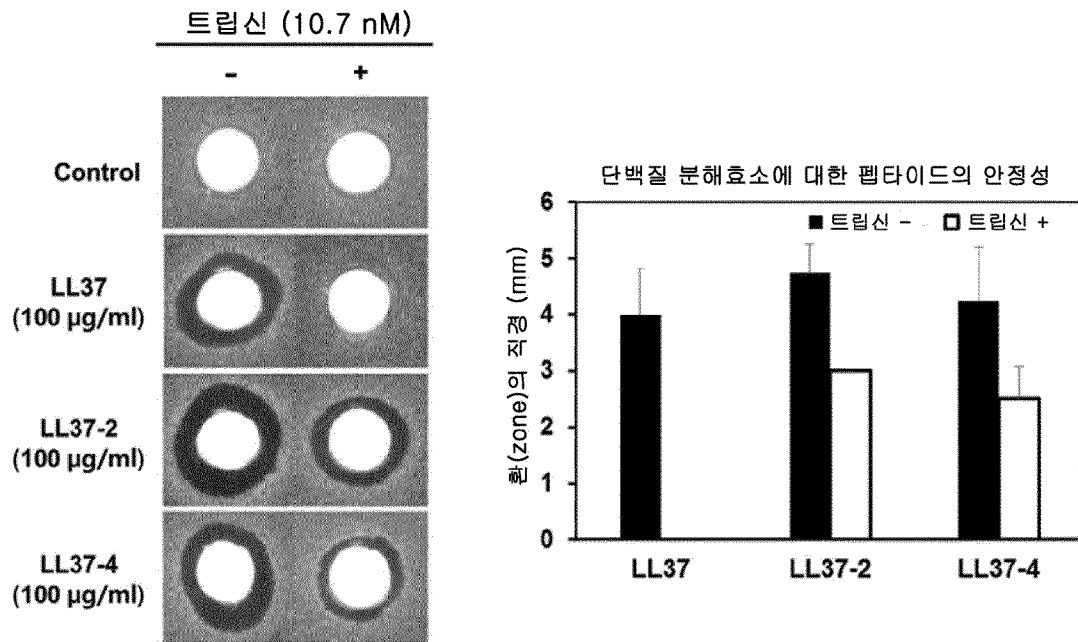
성분	함량 (중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	2.0
글리세린	4.0
폴리비닐알코올	10.0
에탄올	7.0
파이지-40 히드로게비이티드캐스터오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
향료, 방부제	미량
정제수	to 100

- [191] 이상의 본 발명은 상기에 기술된 실시예 및 제조예에 의해 한정되지 않고, 통상의 기술자들에 의해 다양한 변형 및 변경을 가져올 수 있으며, 그외의 색조 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얇게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있고, 이는 첨부된 청구항에서 정의되는 본 발명의 취지와 범위에 포함된다.

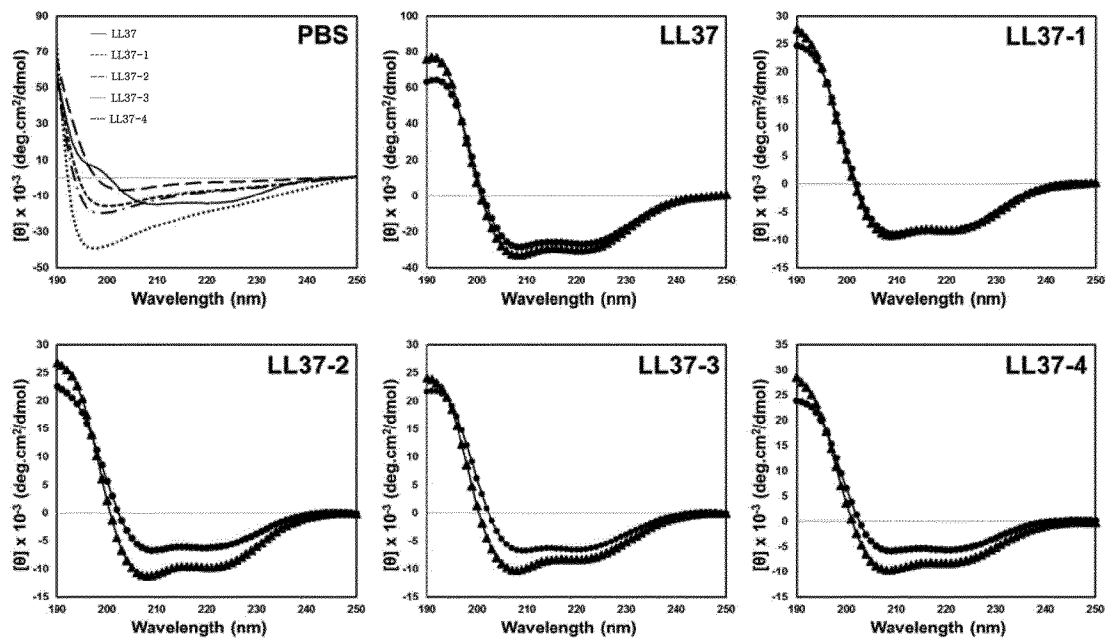
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
 i) 1번째부터 14번째 아미노산 및 31번째부터 37번째 아미노산이 결실되고,
 ii) 16번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되거나,
 iii) 16번째 및 26번째 아미노산이 리신으로 치환된 항균 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 그람 음성균은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 8] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.
- [청구항 9] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장품 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 항균용 의약외품 조성물.
- [청구항 14] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 항균 펩타이드를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 개체 내 항균 방법.

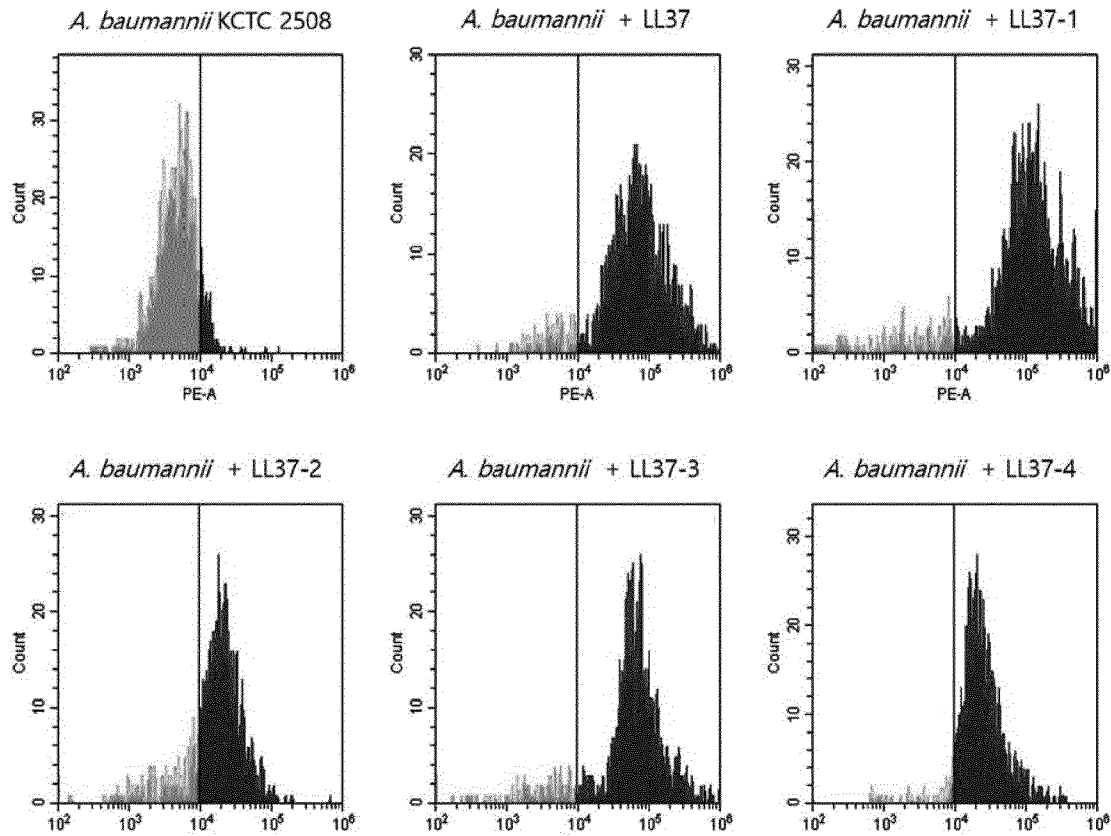
[도1]



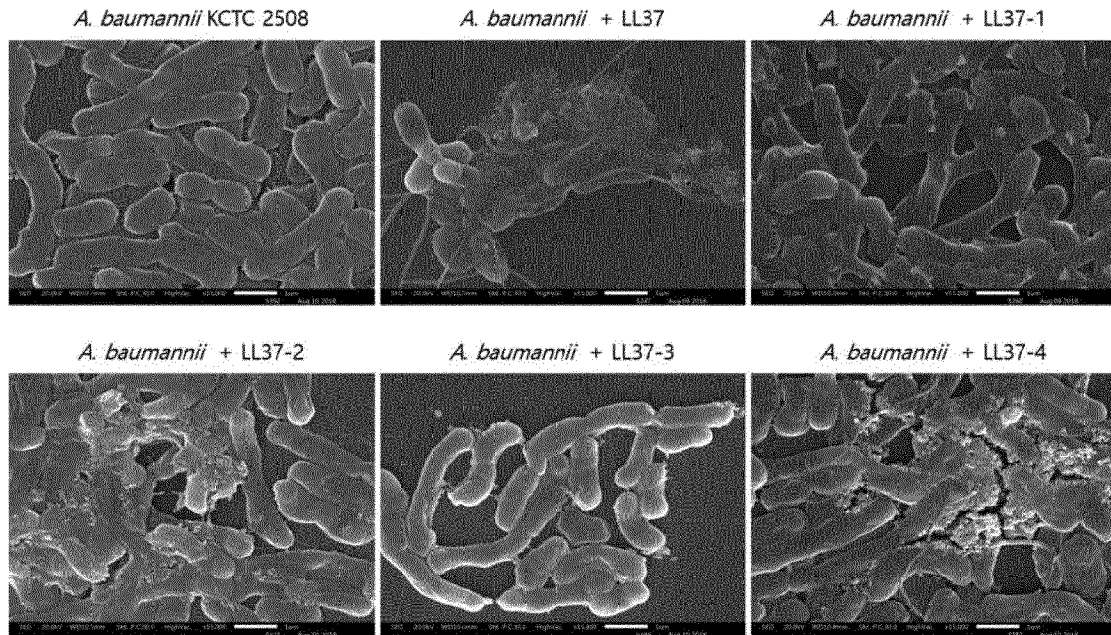
[도2]



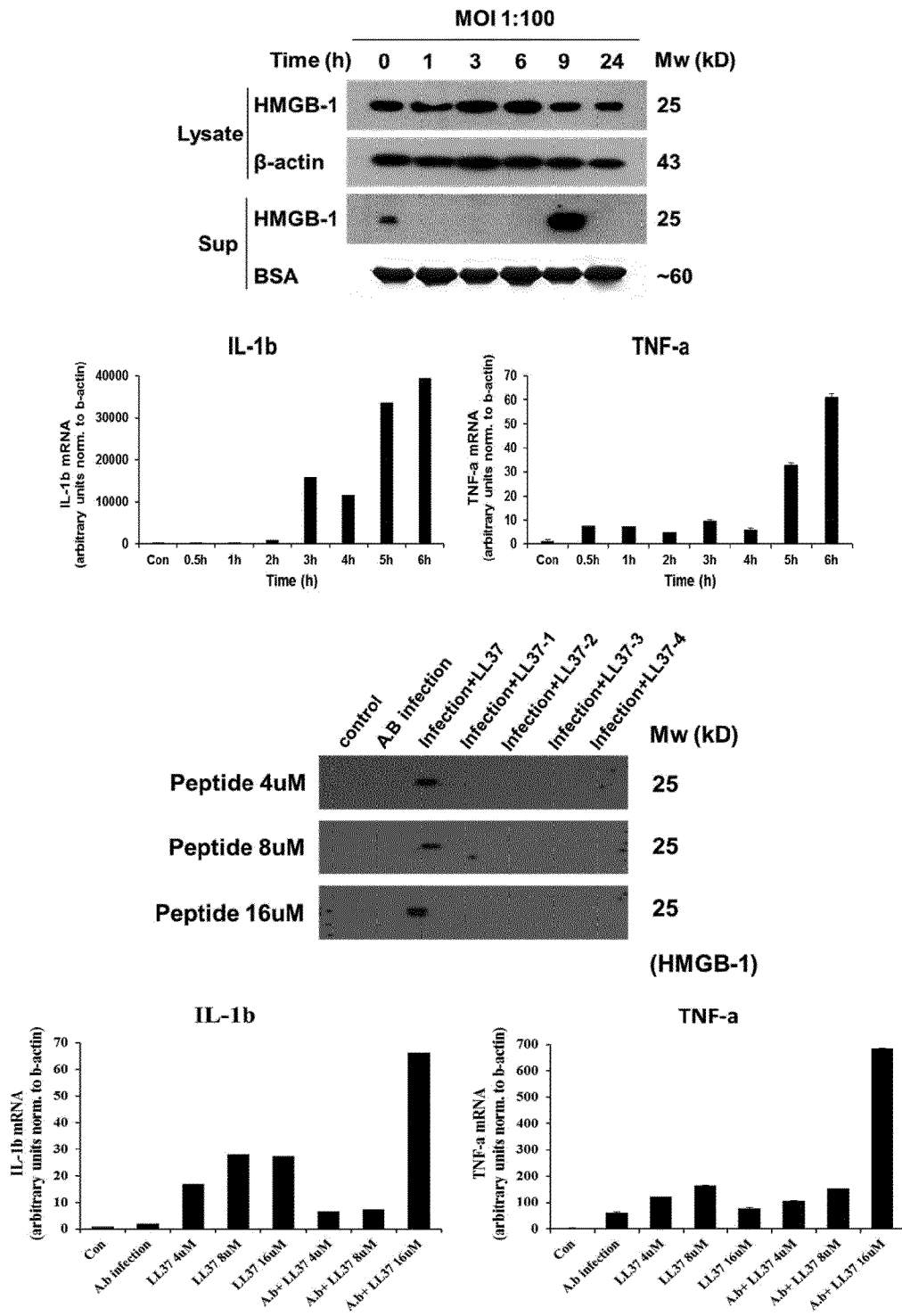
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i, A01N 63/00(2006.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A23L 3/3463(2006.01)i, A23L 3/3526(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i, A61Q 17/00(2006.01)i, A61Q 19/00(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 7/08; A61K 38/16; C07K 14/00; A01N 63/00; A23K 20/147; A23L 3/3463; A23L 3/3526; A61K 8/64; A61K 38/00; A61P 31/04; A61Q 17/00; A61Q 19/00

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: LL37, antimicrobial peptide, substitution, drug-resistant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NELL, Marja J. et al. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. Peptides. 2006, vol. 27, pages 649-660 See the entire document.	1-14
A	NAGAOKA, I. et al. Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAPI8/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002, vol. 9, no. 5, pages 972-982 See the entire document.	1-14
A	NAGAOKA, I. et al. Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAPI8/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. Inflammation Research. 2005, vol. 54, pages 66-73 See the entire document.	1-14
A	US 2010-0048480 A1 (BOMMARIUS, Bettina et al.) 25 February 2010 See the entire document.	1-14



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

19 JUNE 2019 (19.06.2019)

Date of mailing of the international search report

19 JUNE 2019 (19.06.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002633

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUO, Yijie et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Human Cationic Antibacterial Peptide (LL-37) and Its Analogs Against Pan-Drug-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> . Jundishapur Journal of Microbiology. 2017, vol. 10, no. 3, e35857, pages 1-17 See the entire document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002633

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0048480 A1	25/02/2010	CA 2670014 A1	20/11/2008
		WO 2008-140582 A2	20/11/2008
		WO 2008-140582 A3	08/01/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i, A01N 63/00(2006.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A23L 3/3463(2006.01)i, A23L 3/3526(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i, A61Q 17/00(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08; A61K 38/16; C07K 14/00; A01N 63/00; A23K 20/147; A23L 3/3463; A23L 3/3526; A61K 8/64; A61K 38/00; A61P 31/04; A61Q 17/00; A61Q 19/00

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: LL37, 항균 펩타이드(antimicrobial peptide), 치환(substitution), 항생제 내성(drug-resistant)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NELL, MARJA J. 등, 'Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application', Peptides, 2006, 27권, 페이지 649-660 전체 문헌 참조.	1-14
A	NAGAOKA, I. 등, 'Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues', Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, 9권, 5호, 페이지 972-982 전체 문헌 참조.	1-14
A	NAGAOKA, I. 등, 'Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions', Inflammation Research, 2005, 54권, 페이지 66-73 전체 문헌 참조.	1-14
A	US 2010-0048480 A1 (BOMMARIUS, BETTINA 등) 2010.02.25 전체 문헌 참조.	1-14

☒ 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

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 06월 19일 (19.06.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 06월 19일 (19.06.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



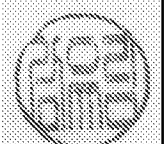
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GUO, YIJIE 등, ‘Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Human Cationic Antibacterial Peptide (LL-37) and Its Analogs Against Pan-Drug-Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>’, Jundishapur Journal of Microbiology, 2017, 10권, 3호, e35857, 페이지 1-7 전체 문헌 참조.	1-14

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2010-0048480 A1

2010/02/25

CA 2670014 A1

2008/11/20

WO 2008-140582 A2

2008/11/20

WO 2008-140582 A3

2009/01/08