



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2009년06월11일  
 (11) 등록번호 10-0902209  
 (24) 등록일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.  
**C07K 14/435** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2003-7014458  
 (22) 출원일자 2003년11월06일  
 심사청구일자 2007년05월07일  
 번역문제출일자 2003년11월06일  
 (65) 공개번호 10-2003-0094388  
 (43) 공개일자 2003년12월11일  
 (86) 국제출원번호 PCT/CN2002/000317  
 국제출원일자 2002년05월08일  
 (87) 국제공개번호 WO 2003/016339  
 국제공개일자 2003년02월27일  
 (30) 우선권주장  
 01112855.0 2001년05월10일 중국(CN)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US05589364 A1\*  
 WO0104156 A1\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**상하이 후아이 바이오 랩**  
 중국, 상하이 200235, 카오바오 로드, 36  
 (72) 발명자  
**선, 유쿤**  
 중국, 상하이200233, 카오바오로드36  
**우, 텡시**  
 중국, 상하이200233, 카오바오로드36  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**김 순 영, 김영철, 이준서**

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 신원혜

**(54) 마가이닌 유도체**

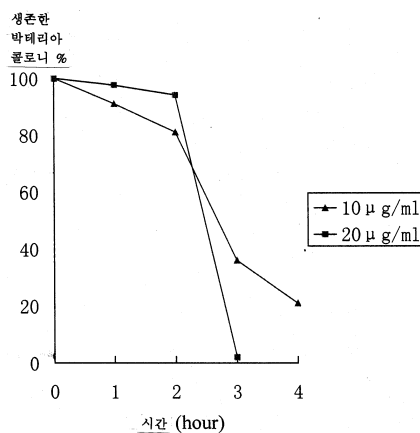
**(57) 요약**

본 발명은 마가이닌 유도체 및 약제학적으로 허용되는 그 염에 관한 것으로서, 상기 유도체는 하기와 같은 서열을 갖는다:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH.

상기에서 X는 Met, Ile 및 Leu으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며, Y는 Ser, Lys, Ile, Arg 및 Leu으로 구성된 군으로부터 선택된 두개의 아미노산 잔기의 조합이다. 본 발명의 유도체는 자연 발생적 마가이닌과 동등하거나 더 높은 항-미생물 활성을 갖는다. 그것들은 고상 합성에 의해 쉽게, 더 용이하게는 바이오엔지니어링 테크닉에 의해 제조될 수 있다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자  
**주,지용**  
중국, 상하이200233, 카오바오로드36  
**유,강**  
중국, 상하이200233, 카오바오로드36  
**셴,춘주안**  
중국, 상하이200233, 카오바오로드36

**자오,샤오링**  
중국, 상하이200233, 카오바오로드36  
**조우,지약시양**  
중국, 상하이200233, 카오바오로드36

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 아미노산 서열을 갖는 마가이닌 펩티드 유도체 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH

상기에서, X는 Met, Ile 또는 Leu이고; Y는 Ser-Arg, Lys-Arg, Ile-Arg 및 Leu-Arg으로 구성된 군으로부터 선택된 두개의 아미노산 잔기이다.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서, Y가 Ser-Arg인 마가이닌 펩티드 유도체 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

**청구항 6**

제1항에 있어서, X가 Leu이고, Y가 Ser-Arg인 마가이닌 펩티드 유도체 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

**청구항 7**

제1항에 있어서, X가 Met이고, Y가 Ile-Arg인 마가이닌 펩티드 유도체 또는 약제학적으로 허용되는 그 염.

**청구항 8**

바이오엔지니어링 테크닉에 의해 제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 마가이닌 펩티드 유도체를 생산하는 방법으로서,

마가이닌 펩티드 유도체의 아미노산 서열에 따라 유전자 단편들을 합성하는 단계;

상기 유전자 단편들을 라이게이션시키는 단계;

제조합 플라스미드를 제조하는 단계;

상기 제조합 플라스미드를 숙주 세포에 형질전환하는 단계;

상기 숙주 세포를 배양하여 상기 마가이닌 펩티드 유도체를 발현하는 단계;

상기 마가이닌 펩티드 유도체를 숙주 세포로부터 추출하는 단계; 및

동결건조를 통해 상기 마가이닌 펩티드 유도체를 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 마가이닌 펩티드 유도체의 생산방법.

**청구항 9**

제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 마가이닌 펩티드 유도체 또는 약제학적으로 허용되는 그 염을 포함하는, 항-미생물제.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 개구리 피부 항박테리아성 펩티드 유도체(마가이닌(Magainin) 유도체)에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 항-미생물 활성의 특징을 갖는 마가이닌 유도체들에 관한 것이다.

**배경 기술**

<2> 자기들의 종족을 보호하는 항-박테리아성 펩티드 물질을 생산할 수 있는 많은 생명체가 있다. 예컨대, 곤충, 미생물, 양서류 및 인간을 들 수 있다. 이러한 항-박테리아성 펩티드는 박테리아의 세포막 상의 지질을 관통하여 불활성화시킬 수 있으며, 원생동물 중, 생식세포 및 심지어 바이러스에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로, 그러한 펩티드들을 수피-항생제로 부른다. 항-박테리아성 펩티드는 모두 다양한 량의 양전하를 운반하는데, 그 항-박테리아성 메커니즘은 그 펩티드에 의해 운반되는 양전하와 박테리아 세포벽에 존재하는 인지질에 의해 운반되는 음전하와의 결합에 의존한다. 그 결합을 통해 세포막에는 이온 통로가 형성되고 관통성이 증가되어 결국 박테리아를 용해시켜 죽이게 되는 것이다. 따라서 이러한 펩티드들의 항-미생물 활성은 어떤 특정 수용체와의 결합에 의존하는 것이 아니다.

<3> 항-박테리아성 펩티드는 넓은 범위의 항미생물 활성을 가지는데, 호기성 박테리아 및 혐기성 박테리아 뿐만 아니라 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 모두에 대해 항미생물 활성을 나타낸다. 항-박테리아 펩티드는 억제-내성 작용을 나타내지 않는다는 점에서 항생제와 다르며, 많은 유형의 항생제에 대해 내성을 갖는 박테리아조차도 항-박테리아성 펩티드에 의해 저해될 수 있다. 또한, 그러한 항-박테리아성 펩티드는 원생동물종 및 바이러스에 대해서도 저해효과가 있다. 항-박테리아성 펩티드의 대사산물은 아미노산이기 때문에, 이러한 펩티드들은 숙주 세포에 대해 낮은 독성을 갖는다. 요컨대, 항-미생물 펩티드는 항-미생물 약제로서 유용한 광범위한 전망을 갖는 화합물의 한 클래스이다.

<4> 마가이닌은 개구리 피부로부터 유래된, 항-박테리아성 작용을 갖는, 자연 발생적 항-박테리아성 펩티드의 한 카테고리이다. 마가이닌은 지금까지 극도로 연구되어 왔으며 그들은 합성하기가 쉽고 비용이 저렴하며 용혈현상 가능성이 낮은 특징이 있다.

<5> 미국 특허 USP 5589364호는 바이오엔지니어링 테크닉을 이용하여 마가이닌 II (23개 아미노산)를 제조하는 방법을 개시하였다. 마가이닌 II는 자연 발생적 개구리-피부 항-박테리아 펩티드의 일종으로서 하기와 같은 아미노산 서열을 갖는다:

<6> Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH.

<7> 상기에서 Gly은 글리신을, Ile은 이소루신을, Lys은 리신을, Phe은 페닐알라닌을, Leu은 루신을, His은 히스티딘을, Ser은 세린을, Ala는 알라닌을, Val은 발린을, Glu는 글루탐산을, Met은 메티오닐을, Asn은 아스파라지네이트를 나타낸다.

<8> 미국 특허 제6183992호에는 마가이닌 유도체인 MSI-78(22개 아미노산)을 생산하는 방법을 개시하고 있는데, 상기 유도체는 하기와 같은 아미노산 서열을 갖는다:

<9> Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>.

<10> ADIS NEW DRUG PROFILE에는 Harriet M. Lamb 등에 의해 마가이닌 유도체 MSI-78이 외상 감염 및 당뇨병에 의해 유발된 다리 궤양을 치료하는 데에 명백한 치료 효과를 나타낸다는 것이 보고된 바 있다.

**발명의 상세한 설명**

발명의 목적

<12> 본 발명의 목적은 몇몇 마가이닌 유도체를 제공하는 것으로서, 이는 마가이닌 유도체의 카테고리를 넓히게 될 것이다. 그러한 유도체들은 합성 화학 방법, 더 용이하게는 재조합 테크닉에 의해 제조될 수 있으며, 이를 통해 생산비용을 절감할 수 있다. 그러한 유도체들의 항-미생물 효과는 자연 발생적 마가이닌과 같거나 그 이상이다.

발명의 개요

<14> 본 발명은 하기와 같은 아미노산 서열을 갖는 몇몇 마가이닌 유도체 및 약제학적으로 허용되는 그 염에 관한 것

이다:

- <15> Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-X-Asn-Y-OH.
- <16> 상기에서 X는 Met, Ile 및 Leu으로 구성되는 군으로부터 선택되는 한 개의 아미노산 잔기이며, Y는 Ser, Lys, Ile, Arg 및 Leu으로 구성된 군으로부터 선택된 두 개의 아미노산 잔기의 조합이다.
- <17> 본 발명의 마가이닌 유도체는 서열목록의 서열번호1(<210>1)에 나타난 아미노산 서열을 갖는다.
- <18> 본 발명의 마가이닌 유도체들은 양성적 화합물로서, 충분히 산성이거나 충분히 염기성이어서 많은 무기염기, 무기산 및 유기산 중 어느 것과 반응하여 염을 형성할 수 있다. 산부가염을 형성하기 위하여 통상적으로 이용되는 산으로서는, 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 인산, p-톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 옥살산, p-브로모페닐-술폰산, 탄산, 숙신산, 시트르산, 벤조산, 아세트산 등이 있다. 그러한 염의 예로는 술페이트, 피로술페이트, 바이술페이트, 술페이트, 바이술페이트, 포스페이트, 모노하이드로젠포스페이트, 다이하이드로젠포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 테카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포르메이트, 이소부티레이트, 카프로에이트, 헵타노에이트, 프로피오레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베르에이트, 세바케이트, 푸마르에이트, 말레에이트, 부틴-1,4-다이오에이트, 핵신-1,6-다이오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 다이니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 술포네이트, 크실렌술포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 감마-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 타르타르에이트, 메탄술포네이트, 프로판술포네이트, 나프탈렌-1-술포네이트, 나프탈렌-2-술포네이트, 만델레이트 등을 포함한다. 바람직한 산부가염은 염산 및 브롬화수소산과 같은 무기산, 특히 염산과 형성된 염이다.
- <19> 알칼리 또한 이용되어 마가이닌 유도체와 반응하여 염을 형성할 수 있다. 그러한 알칼리의 대표적인 예로는 암모늄, 알칼리 금속, 알칼리 금속 수산화물, 카보네이트 및 바이카보네이트를 포함한다. 통상 그러한 알칼리는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄 및 탄산칼륨이 될 수 있다.
- <20> 본 발명의 마가이닌 유도체의 아미노산은 L-유형 또는 D-유형의 이성질체일 수 있다.
- <21> 본 발명은 또한 마가이닌 유도체의 생산방법을 제공한다.
- <22> 상기 방법은 재조합 테크닉에 의해 마가이닌 유도체를 생산하는 것인데, 마가이닌 유도체의 아미노산 서열에 따라 유전자 단편들을 합성하는 단계, 상기 유전자 단편들을 라이게이션시키는 단계, 재조합 플라스미드를 제조하고 클로닝하는 단계, 발효, 분리, 정제 및 동결건조 단계를 통해 산물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <23> 본 발명은 또한 마가이닌 유도체를 생산하는 방법을 제공한다.
- <24> 상기 방법은 고상 합성에 의해 마가이닌 유도체를 생산하는 것인데, 그것은 고상 캐리어로서 HMP 수지를 이용하고, 한 잔기의 알파-아민을 9-플루오르에닐 메톡시카르보닐(Fmoc)로 보호하고, 펩티드 합성기 상에서 펩티드를 합성하고, 분리, 정제 및 동결건조 단계를 통해 산물을 얻는 것을 포함한다.
- <25> 본 발명의 또 다른 관점은 항-미생물 작용을 갖는 의약/조제약의 제조에 있어서 마가이닌 유도체 및 약제학적으로 허용되는 그 염의 용도를 제공하는 것이다.
- <26> 본 발명은 다양한 마가이닌 유도체를 제공하며 이는 마가이닌 유도체의 카테고리를 넓힌다. 그러한 마가이닌 유도체들은 화학적 합성, 더 용이하게는 재조합 테크닉에 의해 제조될 수 있는데, 이를 통해 생산 비용을 낮출 수 있다. 그러한 유도체들은 자연 발생적 마가이닌에 비해 항-미생물 효과가 같거나 더 높다.
- <27> 항-미생물 효과 실험, 타임-킬(time-kill) 연구, 용혈 및 급성 독성 테스트로부터 본 발명의 마가이닌 유도체의 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)에 대한 항-미생물 효과가 자연 발생적 마가이닌과 비슷하며, 그러한 마가이닌 유도체들은 또한 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해서도 저해 효과가 있다는 것이 밝혀졌다. 항-미생물 실험은 50 $\mu$ l의 박테리아 용액(10<sup>6</sup> 박테리아/ml)에 대한 본 발명의 마가이닌 유도체의 영향을 테스트함으로써 수행되었는데, 90% 이상의 박테리아가 0.5 $\mu$ g의 용량으로 3시간 이내에 사멸한 반면, 1 $\mu$ g의 용량으로는 거의 모든 박테리아가 3시간 이내에 사멸하였다. 본 발명의 유도체의 용혈현상 연구를 통해 50% 박테리아의 용혈에 유효한 농도(HC<sub>50</sub>) 대 50% 박테리아의 저해에 유효한 농도(IC<sub>50</sub>)의 비율이 대략 50:1인 반면, 자연 발생적 마가이닌의 비율은 약 24:1인 것으로 나타났는데, 이는 본 발명의 산물의 안전성이 자연 발생적 마가이닌에 비해 우수함을 입증하는 것이다. 또한 급성 독성 연구를 통해 본 발명의 마가이닌 유도체가 낮은 독성

을 갖는다는 것이 밝혀졌다.

**실시예**

<30> 하기 실시예는 예시적인 것에 불과하며, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 의도는 아니다.

<31> 실시예1

<32> X가 Leu이고 Y가 Ser-Arg인 본 발명의 마가이닌 유도체의 바이오엔지니어링 테크닉에 의한 제조

<33> (1) 상기 마가이닌 유도체의 아미노산 서열에 따라 하기 유전자 단편들을 제조함:

**(a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA**

**(b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC CGT TAG A**

**(c) 5' AG CTT CTA ACG GCT GTT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT**

<34> **(d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG**

<35> (2) DNA 단편들의 라이게이션:

<36> 0.1로 동등한 260nm에서의 광학밀도(A<sub>260nm</sub>)를 갖는 단편 (a), (b), (c) 및 (d)를 취하고, 단편 (a) 및 (d) 뿐만 아니라, 단편 (b) 및 (c)를 각각 별도로 두개의 튜브에 넣었다. 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 버퍼, 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 및 ATP를 각각 상기 두개의 튜브에 첨가하였다. 반응 혼합물을 37°C에서 60분간 인큐베이션시키고, 워터 배스에서 10분간 95°C에서 인큐베이션시켰다. 그런 다음 자연적으로 실온까지 냉각시켰다. T4 라이게이즈 버퍼 및 ATP 용액을 첨가하고 T4 라이게이즈를 첨가한 다음 그 혼합물을 하룻밤 15°C에서 인큐베이션시켜 단편 라이게이션을 완료하였다.

<37> (3) 클로닝

<38> P<sub>L</sub> 프로모터(또는 Lac 또는 Tac)를 함유한 플라스미드를 제한효소 엔도뉴클레아제 EcoRI 및 HindIII으로 분해시키고 하이드록시벤젠:클로로포름 용매로 추출한 후 클로로포름으로 3회 세척하고 이소프로판올 용매로 침전시킨 다음 원심분리로 수거하였다.

<39> 상기 분해된 플라스미드를 상기 마가이닌 유래 단편들로 라이게이션시키고 마가이닌 유래 유전자 단편 함유 플라스미드를 얻었다. 그러한 플라스미드를 이 콜라이 JM103 또는 JM109 숙주세포 안으로 형질전환시켰다. 한천 플레이트에서 배양한 후 박테리아 콜로니를 스크리닝하였다.

<40> (4) 검사

<41> 마가이닌 유도체의 유전자 단편을 함유하는 플라스미드를 단일-클로닝된 박테리아로부터 추출하고 EcoRI 및 HindIII로 이중 분해시켰다. 1% 한천 젤 상에서 전기영동을 수행하고 에티디움 브로마이드로 염색하였다. 클로닝된 유전자 단편들은 마커와 비교함으로써 검사하였고, DNA 서열 분석으로 더욱 테스트하였다.

<42> (5) 발효

<43> 각각이 10g의 펩톤, 5g의 효모 추출물, 5g/L의 염화나트륨으로 구성된 LB 액체 배지 300ml를 함유하는 1L 용량의 교반 병(총 10개의 병) 내에서 상기 박테리아 균주를 인큐베이션시켰다. 단백질 발현을 유도하기 위해 0.2mM의 이소프로필 베타-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 37°C에서 첨가하였다. 상기 박테리아 세포를 하룻밤 인큐베이션시키고 원심분리로 수확하였다. 온도-조절된 프로모터 P<sub>L</sub>을 갖는 플라스미드를 사용할 때, 박테리아 세포

를 30℃에서 8시간동안 배양하였다. 그런 다음 배지의 온도를 42℃로 올리고, 박테리아 세포를 4시간 유지시켜 유전자 발현을 유도하였다.

<44> (6)상기 박테리아 세포 벽을 37℃에서 1시간동안 라이소자임의 작용 하에 둠으로써 파괴시켰다. 침전물은 6M의 구아니딘 하이드로클로라이드 처리를 하였다. 원심분리, 투석 및 그 이후의 원심분리를 한 후 단백질인 세포 내용물을 얻었다. 1% 염화나트륨, 0.1% Triton X-100 및 Tris-HCL 버퍼(20mM, pH8)을 함유하는 세척 용액으로 상기 세포 내용물을 3회 세척하였다. 용합 단백질은 12% 소듐 도데칸술포네이트(SDS)를 함유하는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(PAGE)를 통해 확인하였다.

<45> (7) 상기 세포 내용물을 8M의 카바마이드 용액에 용해시켰다. 상기 세포 내용물을 용균시키기 위해 50mM의 염산의 존재 하에서 시아노젠 브로마이드를 첨가하였다. 상기 용액은 빛이 차단되고 질소가 보호되는 조건 하에서 교반하였다. 용균 반응이 완료된 후, 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC, Amersham Pharmacia Biotech에 의해 제조된 AKTA™)를 갖는 Sephadex G-25를 통해 마가이닌 유도체 조 산물을 얻었고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, C<sub>18</sub> 컬럼)을 이용한 정제 및 CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA 버퍼를 이용한 구배 용출을 통해 최종 산물을 얻었다. 상기 얻어진 산물의 HPLC 분석 결과는 화학적 합성에 의해 제조된 것과 일치한다.

<46> 실시예2

<47> X가 Leu이고 Y가 Ser-Lys인 본 발명의 마가이닌 유도체의 바이오엔지니어링 테크닉에 의한 제조

<48> A. 상기 마가이닌 유도체의 아미노산 서열에 따라 하기 유전자 단편들을 합성함:

- (a) 5' AAT TCC ATG GGT ATC GGT AAA TTT CTG CAC AGC GCG AAA AAA
- (b) 5' TTT GGT AAA GCG TTT GTG GGT GAA ATC CTG AAC AGC AAG TAG A
- (c) 5' AG CTT CTA CTT GCT GIT CAG GAT TTC ACC CAC AAA CGC TTT
- (d) 5' ACC AAA TTT TTT CGC GCT GTG CAG AAA TTT ACC GAT ACC CAT GG

<49>

<50> 본 실시예의 단계들 (2) 내지 (7)은 상기 실시예1과 동일하며, 얻어진 마가이닌 유도체의 HPLC 분석 결과는 화학적 합성에 의해 제조된 것과 일치한다.

<51> 실시예3

<52> X가 Leu이고 Y가 Lys-Arg인 본 발명의 마가이닌 유도체의 고상 합성에 의한 제조

<53> (1) 아미노산 모노머:

**표 1**

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

<54>

<55> 상기에서, Fmoc는 9-플루오르에닐 페톡시카르보닐을,

<56> BOC는 터트(tert)-부틸옥시카르보닐을,

<57> Trt는 트리틸을,

<58> OtBu는 삼차 부틸 에스테르를,

<59> tBu는 터트-부틸을 나타낸다.

<60> (2) 장치 및 시약

<61> 장치: Model 433A 펩티드 합성기(Applied Biosystem, US)

<62> 시약: N-메틸 케토피롤리딘, 메틸렌 클로라이드, 헥사하이드로피리딘, 메탄올, 디메틸아미노피리딘/DMF, N,N-다이소프로필에틸아민/NMP, 100mmole HBTU / DMF 중의 0.5M HOBt, N,N-다이사이클로헥실카보다이이미드/NMP

<63> 상기에서,

<64> DMF는 N,N-디메틸포름아미드

<65> NMP는 N-메틸피롤리돈

<66> HOBt는 1-하이드록시벤조트리아졸, 및

<67> HBTU는 2-(1H-벤조트리아졸-일-1,1,3,3-테트라메틸-우로늄 헥사플루오로포스페이트)를 나타낸다.

<68> (3) 절차

<69> a. 합성

<70> 합성 스케일 0.25mmol을 취하여, 예컨대 그 합성 과정은 다음과 같았다. 0.25g의 HMP 수지를 측정하여 합성기의 반응기 용기에 넣었다. 각각이 보호기와 결합된 1mmol의 다양한 잔기들을 측정하여 카르복시 말단부터 아미노 말단까지 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 아미노산 서열에 따라 합성기에 배열하였다. 25°C의 실온에서 컴퓨터 프로그램의 제어 하에서 자동적으로 Fmoc 보호의 제거, 잔기의 활성화 및 활성화된 잔기의 HMP 수지에의 부착이 수행되었다. 그러한 반응은 전체 펩티드가 합성될 때까지 반복되었다. 합성 완료 후, 사이드 체인 보호기와 결합된 각 잔기를 갖는 잔기-부착 수지를 펩티드 합성기 상에서 공기 건조시킨 후 측정하였다.

<71> b. 보호기 제거 및 수지의 부착

<72> 보호기와 결합된 인슐린 친화성 펩티드 유도체의 각 잔기를 갖는 잔기-부착 수지를 플러그드 에틀렌마이어 플라스크에 넣고 하기 나타난 절단 시약들을 첨가하였다.

**표 2**

<73>

시약	용량
물	0.50ml
메틸 페네이트	0.50ml
페놀	0.75g
머캡토에탄올	0.20ml
트리플루오로아세트산	10.0ml

<74> 30°C의 일정한 온도에서 6시간동안 전자기 교반 반응을 수행하였다. 여과 단계 이후 수성 여과물을 수거하였다. 수지를 소량의 트리플루오로아세트산으로 세척하였다. 그 다음에 상기 수거된 수성 여과물 및 세척 용액을 함께 혼합하고 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 상기 혼합물을 여과하고 그 결과된 침전물을 소량의 에테르로 세척하였다. 제습기에서 증발시킨 후, 조 산물을 얻었다.

<75> c. HPLC에 의한 정제 및 동결건조

<76> 예비적 HPLC를 이용하여 조 산물의 분리 및 정제를 수행하였다. 동결 건조 단계 이후에 최종 산물을 얻었다. 그 산물의 분자량은 크로마토그램-질량 스펙트로그램 조인트 분석을 통해 그 이론치와 일치함을 알아내었다.

<77> 실시예4

<78> 약물동력학적 연구

<79> 상기 실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체의 항-미생물 실험을 하기 절차에 따라 자연 발생적 마가이닌과 비교하면서 수행하였다.

<80> 테스트 균주인 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*) JM103 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 각각 배양하고  $1 \times 10^6$  박테리아/ml로 희석하였다. 멸균된 Tris-HCl 버퍼(pH 6.5) 20mM를 첨가하였다. 그 다음에 다양한 농도의 마가이닌 유도체 및 자연 발생적 마가이닌 II를 각각 첨가하고 37°C에서 다른 시간 제한동안 인큐베이션시켰다. 배양물 50 $\mu$ l를 취하고 한천 플레이트에 스프레드하고 37°C에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 남겨진 박테리아 콜로니를 계수하고 사멸된 박테리아의 퍼센트를 계산하였다.

<81> (1) 항-미생물 효과를 나타내는 표

<82> 상기 실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체 및 자연 발생적 마가이닌 II의 항-미생물 효과의 비교

표 3

<83>

샘플	농도 $\mu$ g/ml	남은 박테리아 콜로니			사멸된 박테리아 %		
		0hr	3hr	4hr	3hr	4hr	
실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체	0	407	228				
		317					
	10		109	73	160	195	71.3
				91		177	
	20		9	5	2	5	97.8
				7		3	
자연 발생적 마가이닌 II	10		99	57	52	44	75.4
				78		48	
	20		12	4	6	4	97.5
				8		5	

<84> 상기 실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체의 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항-미생물 작용을 나타내는 표

표 4

<85>

농도 $\mu$ g/ml	남은 박테리아 콜로니			2시간 이내에 사멸된 박테리아 %
	0hr	1hr	2hr	
0	267			
	225			
50	158	18	2	99
	185	18	2	99
	172	18	2	99

<86> (2) 타임-킬 연구 결과를 나타내는 도면: 상기 실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체의 타임-킬 연구 결과는 도 1에 나타내었다.

<87> (3) 용혈 테스트 결과를 나타내는 표:

표 5

그룹		용량( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	용혈%
테스트 그룹	자연-발생적 마가이닌	100	0
		500	0
		1000	1.9
	실시예1로부터 제조된 마가이닌 유도체	100	0
		500	0
		1000	2
컨트롤 그룹	Tritonx-100	0.1%	100

<89> (4) 급성 독성 테스트: Kunming 종의 두 마우스에 대해 급성 독성 테스트를 수행하였다. 그 마우스에 상기 실시예로부터 얻어진 마가이닌 유도체를 복부 주사하고 한시간동안 주입을 받은 후 그 두 마우스의 생존율에 대해 관찰하였다.

표 6

복부 주입량	생존율
100 $\mu\text{g}$	100%
200 $\mu\text{g}$	100%
1000 $\mu\text{g}$	100%

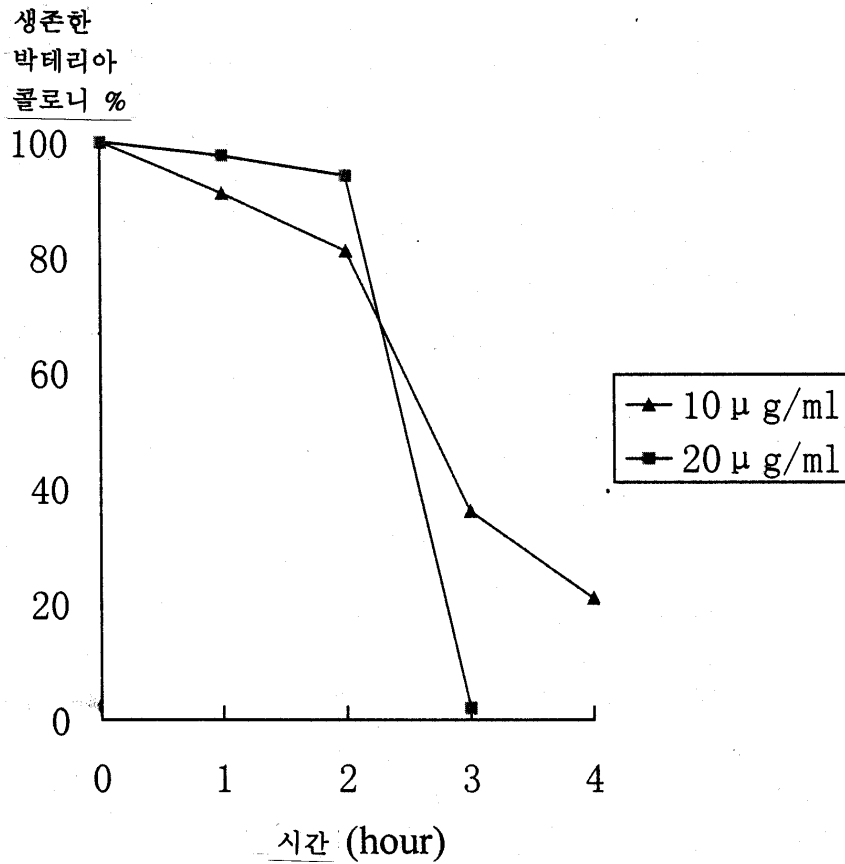
도면의 간단한 설명

<28> 본 발명은 하기 도면 및 실시예를 참고로 하여 더욱 상세히 설명될 것이다.

<29> 도 1은 실시예1로부터 얻어진 마가이닌 유도체의 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)에 대한 타임-킬 연구를 나타내는 다이어그램이다.

도면

도면1



서열 목록

<110> Shanghai Huayi Bio Lab  
 <120> A frog skin antibacterial peptide derivative  
 <130> IF03P065/CN  
 <150> CN 01112855.0  
 <151> 2001-05-10  
 <160> 1  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Magainin analogue  
 <220>

<221> VARIANT  
 <222> (21)  
 <223> Ile or Leu  
 <220>

<221> VARIANT  
 <222> (23)

<223> Lys or Ile or Arg or Leu  
<220>

<221> VARIANT

<222> (24)

<223> Lys or Ile or Arg or Leu

<400> 1

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Ser  
20