(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월10일
(11) 등록번호 10-1796766
(24) 등록일자 2017년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/305 (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A61K 35/64 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2016-0084908
(22) 출원일자 2016년07월05일
심사청구일자 2016년07월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150000157 A*
KR1020130111854 A*
Developmental and Comparative Immunology 52 (2015), pp98-106.*
KR1020140046193 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전복실
서울특별시 동대문구 경희대로 26-6 경희대학교 의과대학 의동물학교실
최원형
경기도 고양시 일산동구 중앙로 1055, 610호 (백석동, 성우레이크하임)
(74) 대리인
특허법인 하나

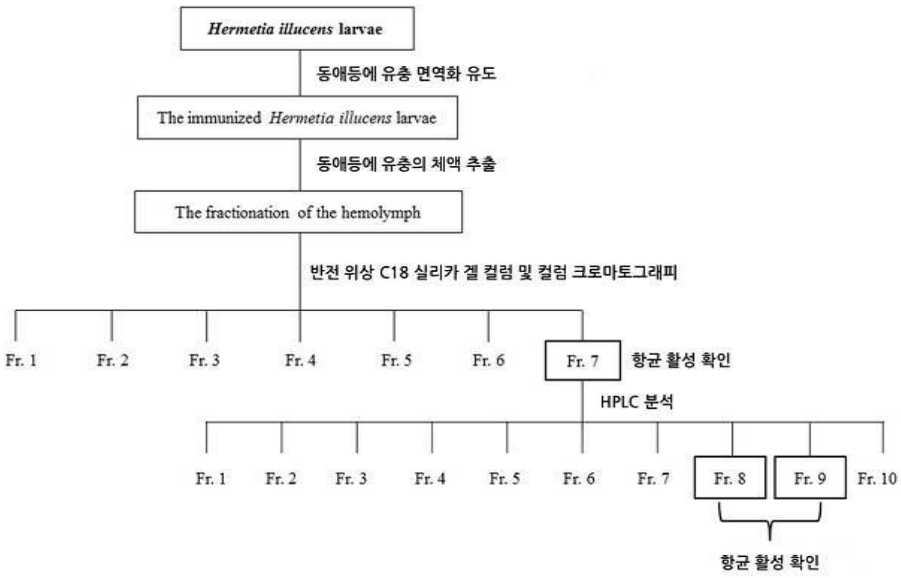
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **면역화된 동애등에 유충에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함하는 항균성 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 면역화된 동애등에 유충에서 분리된 친환경적이고 항균 활성이 우수한 펩타이드 분획물 및 이를 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/204 (2013.01)
A23V 2250/55 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)의 도입에 의해 면역화된(immunized) 동애등에 유충에서 분리된 20kDa 또는 22kDa의 펩타이드 분획물을 포함하는 항균 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 또는 이질균(Shigella dysenteriae)에 대한 항균 활성을 가지는 항균 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제4항의 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제4항의 항균 조성물을 포함하는 폐렴 또는 세균성 이질의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제4항의 항균 조성물을 포함하는 사료 조성물.

청구항 8

동애등에 유충에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 도입하는 단계;

상기 동애등에 유충의 체액을 추출하는 단계; 및

상기 체액에서 20kDa 또는 22kDa의 펩타이드 분획물을 수득하는 단계;를 포함하는 항균 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동애등에 유충에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함하는 항균성 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 병원성 미생물에 의한 직접 혹은 간접적인 피해는 경제, 환경, 의학적으로 많은 문제를 야기하고 있다. 식품 유통 과정에서 부패로 인한 손실, 농작물에 대한 과량의 화학 살충제의 사용으로 인한 환경오염 또는 인체에 미치는 악영향, 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성 균주의 출현 등 사회 전반에서 많은 문제가 대두되고 있다. 특히, 최근 항생제에 고도의 내성을 보이는 미생물들이 발견되고 항생제에 대한 내성 문제가 심각해지면서, 새로운 항생제의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0003] 항생제는 세균 감염에 의한 감염성 질환의 치료에 있어 주된 수단이다. 그러나 1980년대 이후 과도한 항생제의 사용으로 더욱 많은 항생제 내성 균주가 발생하고 있으며, 1986년 최후의 항생제로 불리는 반코마이신

(Vancomycin)에 내성을 지닌 황색포도상구균 및 다재 내성을 가진 균주가 다수 발견되어 의학계에 충격을 주었다.

[0004] 일반적으로 항생제는 인간뿐 아니라 축, 수산업에 있어서도 매우 중요한 역할을 한다. 과거 축산, 수산업의 발전에 따라서 단위 면적당 사육두수가 증가되고 생산성을 향상시키기 위하여 질병의 예방 및 치료는 매우 중요한 요인으로 작용하였다. 다양한 항생제와 성장촉진제들이 개발되었고 현장에서 사용되어 왔다. 항생제 사용량의 증가는 축산, 수산물에 대한 오염을 초래하였고, 더 나아가 생물농축현상을 통하여 인간의 생명을 위협하는 상황을 초래하였다.

[0005] 최근 항생제 사용에 대한 정부 차원의 규제가 전 세계적으로 강화됨에 따라 항생제를 대체할 수 있는 수단에 대한 관심이 증대하고 있다. 현재 사용되고 있는 대부분의 항생제는 화학적인 합성을 통해 제조된 것으로서 고비용이 소요되며, 환경 오염 및 생체 부작용을 유발하는 등 많은 한계를 가지고 있다.

[0006] 따라서, 최근에는 천연물로부터 새로운 항균물질을 발굴하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항생제의 기능을 대체할 수 있는 환경친화적인 물질의 개발이 중요한 과제로 떠오르고 있다. 특히, 천연물로부터 새로운 항균물질을 분리하기 위해서는 항균 스펙트럼의 범위 및 생체 안전성 등을 고려해야 한다.

[0007] 한편, 동애등에(*Hermetiaillucens*, black sodier fly)는 아메리카 동애등에라고 알려진 파리목 동애등에과의 대표적인 환경정화 곤충이다.

[0008] 동애등에는 한국, 일본, 중국, 대만 등 동남아시아와 미국 등지에 널리 분포되어 있고, 주로 축사, 퇴비사, 생활쓰레기장, 음식물쓰레기장 주변에 서식하며, 알에서 성충까지 크는 기간은 약 37 내지 41일이다.

[0009] 동애등에는 알에서 유충, 번데기, 성충을 거쳐 성장하며, 상기 유충은 유기성 폐기물을 친환경적으로 분해할 수 있다고 알려져 있다. 동애등에는 약 14일 정도의 유충 기간에만 먹이활동을 하기 때문에 유충 기간에 축사나 생활쓰레기 및 음식물 쓰레기와 같은 유기성 폐기물이 야적되어 있는 곳에서 생장한다. 동애등에의 유기성 폐기물에 대한 분해능은 이미 알려져 있으나, 동애등에로부터 유래한 추출물 및 이의 분획물의 항균 활성에 대해서는 연구가 부족한 실정이다.

[0010] 본 발명자들은 천연물로부터 새로운 항균물질을 분리하기 위하여 예의 노력한 결과, 면역화된 동애등에 유충으로부터 분리된 펩타이드 분획물이 우수한 항균 활성을 가짐을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 종래의 화학적 항생제를 대체할 수 있는 천연 소재 기반의 항생 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, 면역화된(immunized) 동애등에 유충에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함하는 항균 조성물이 제공된다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 항균 조성물은 20kDa 또는 22kDa의 펩타이드 분획물을 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 동애등에 유충은 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp.*)의 균주의 도입에 의해 면역화될 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 항균 조성물은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 또는 이질균(Shigella dysenteriae)에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물이 제공된다.

[0017] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 사료 조성물이 제공된다.

[0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 동애등에 유충에 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp.*)의 균주를 도입하는 단계; 상기 동애등에 유충의 체액을 추출하는 단계; 및 상기 체액에서 펩타이드 분획물을 수득하는 단계;를 포

함하는 항균 조성물의 제조 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면, 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물은 친환경적이고 체내 안전성이 우수할 뿐만 아니라, 우수한 항균 활성을 보유하므로 의학적 용도뿐만 아니라 식품 및 사료 첨가제 등 다양한 산업적 활용이 가능하다.

[0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물을 분리 정제하는 방법을 도식화한 것이다.

도 2는 전기영동을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물을 정제하고 분자량을 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물의 아미노산 서열을 분석한 것이다.

도 4는 MTT assay 측정법을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물의 세포 독성을 측정한 결과이다.

도 5는 TB assay를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물의 농도별 항균 활성을 측정한 결과이다.

도 6은 Resazurin microtiter assay를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물의 농도별 항균 활성을 측정한 결과이다.

도 7은 고체배지 측정법을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 분획물의 농도별 항균 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0024] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0025] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0026] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0027] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명의 일 측면에 따르면, 면역화된(immunized) 동애등에 유충에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함하는 항균 조성물이 제공된다.

[0030] 상기 항균 조성물은 동애등에 유충에 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp.*)의 균주를 도입하는 단계; 상기 동애등에 유충의 체액을 추출하는 단계; 및 상기 체액에서 펩타이드 분획물을 수득하는 단계;에 의해 제조될 수 있다.

[0031] 상기 "동애등에(*Hermetia illucens*)"는 black soldier fly 로 호칭되는 파리목 동애등에과의 곤충을 지칭하며, 대표적인 환경정화곤충으로 알려져 있다. 상기 동애등에는 알, 유충, 번데기, 성충의 생활사를 가지며, 상기 항균 조성물은 유충에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함할 수 있다.

[0032] 상기 항균 조성물은 상기 면역화된 동애등에에서 분리된 펩타이드 분획물을 포함하므로 특정 미생물에 대한 우

수한 항균 활성을 보유할 수 있다.

[0033] 상기 "항균" 또는 "항균 활성"은 세균이나 곰팡이와 같은 미생물에 대해 저항하는 성질을 의미하고, 보다 상세하게는 항생물질 등이 세균의 성장 또는 증식을 억제하는 특성을 의미한다. 상기 항균은 미생물의 성장 및 대사를 저해하는 정균과 세균을 사멸하는 살균을 포함할 수 있다. 상기 항균은 미생물의 번식 능력 또는 전염력을 감소시킬 수 있는 특성, 또는 미생물을 사멸시키거나 비활성화하는 특성을 포괄할 수 있다. 상기 미생물은 육안으로는 용이하게 식별되지 않은 현미경적으로 작은 유기체 혹은 단위체(unit)를 의미하고, 사람 또는 포유 동물 등 특히 다른 유기체 내부에서 건강에 유해한 현상 또는 질환을 야기하는 박테리아, 바이러스 및 균류를 포함할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 미생물은 음식물 또는 피복류를 변패시키는 부패성 박테리아 및 사람이나 동식물에 기생하거나 독소를 생산하여 질병을 일으킬 수 있는 병원성 박테리아를 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 부패성 박테리아는 바실러스, 클로스트로디움, 슈도모나스, 또는 장내세균군일 수 있고, 상기 병원성 박테리아는 폐렴간균, 콜레라균, 대장균, 이질균, 포도상구균, 살모넬라, 디프테리아균, 또는 파상풍균일 수 있다.

[0035] 일 실시예에 있어서, 상기 항균 조성물은 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*) 또는 이질균(*Shigella dysenteriae*)에 대한 항균 활성을 가질 수 있으며, 폐렴 또는 세균성 이질의 치료 및 예방의 용도로 사용될 수 있다.

[0036] 상기 "폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)"은, 그람 음성의 단간균을 의미하며, 편모, 포자는 없고, 협막을 가지고 있는 미생물이다. 보통 한천에 잘 발달하는 통성염기성균으로 사람의 장관 내 또는 구강 등에 상재하고 있으며, 급성 폐렴의 원인균이 되며, 기관지 폐염, 요로감염증 등에서 분리되는 미생물이다.

[0037] 상기 "폐렴(pneumonia)"은, 세균, 바이러스 및 곰팡이 등의 미생물로 인한 감염으로 발생하는 폐의 염증을 의미하며, 기침, 염증 물질의 배출에 의한 가래, 숨쉬는 기능의 장애에 의한 호흡곤란 등의 폐의 정상적인 기능에 장애가 생기는 폐 증상, 구역, 구토, 설사 등의 소화기 증상 및 두통, 피로감, 근육통, 관절통 등의 신체 전반에 걸친 전신 질환을 유발할 수 있다.

[0038] 상기 "이질균(*Shigella dysenteriae*)"은, 장내세균과에 속하는 그람 음성, 비운동성, 내생포자 비형성의 간균을 의미하며, 한천배지에서 효과적으로 발육하는 미생물이다. O항원의 항원적 차이에 의하여 A 내지 D의 4군 4균종(A군: *S. dysenterise*, 1 내지 10형, B군: *S. flexneri*, 1 내지 6 및 X, Y의 8형. C군: *S. boydii*, 1 내지 15형, D군: *S. sonnei*, 형별 없음)으로 분류되며, 세균성 이질 및 세균성 위소장염의 원인균이다.

[0039] 상기 "세균성 이질(shigellosis)"은 이질균(Shigella)에 감염된 상태를 의미하며, 대장과 소장을 침범하는 급성 감염성 질환이다. 환자 또는 보균자가 배출한 대변을 통해 구강으로 감염되며, 발열, 구역, 복통 및 후증을 동반하는 소량의 점성, 혈성 설사의 증상을 야기할 수 있다.

[0040] 한편, 상기 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 중합체의 길이와 무관하게 모든 아미노산의 중합체를 의미하고, 단백질 단편, 올리고펩타이드, 및 단백질을 광범위하게 포괄할 수 있다.

[0041] 상기 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물에서 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 수득된 결과물을 의미한다.

[0042] 상기 펩타이드 분획물은 면역화된 동애등에 유충의 추출물 또는 체액을 n-헥산, 에틸아세테이트 등의 용매를 이용한 용매분획방법으로 분획한 결과물일 수 있다. 상기 분획물은 극성 용매 분획물 및 비극성 용매 분획물을 포함할 수 있고, 메탄올 분획물, 에틸아세테이트 분획물 등 용매의 종류는 한정되지 않는다.

[0043] 상기 항균 조성물은 20kDa 또는 22kDa의 펩타이드 분획물을 포함할 수 있다. 본 발명자들은 펩타이드 분획물을 분획하고 항균 활성이 우수한 단일 분자량의 펩타이드 분획물은 선별하였으며, 20kDa 또는 22kDa의 펩타이드 분획물의 현저한 항균 활성을 확인하였다.

[0044] 상기 "면역화(immunization)"는 표적 항원 또는 에피토프(epitope)에 대한 면역 반응(항체 또는 이펙터 CTL과 같은 세포성 면역을 포함)을 상승시키는 능력을 부여하는 과정을 의미할 수 있다. 상기 면역화는 능동 면역 반응을 제공함으로써 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0045] 상기 면역화는 완벽한 면역성을 의미하는 것은 아니며, 기준선보다 상대적으로 큰 정도의 면역 반응을 의미한다. 예컨대, 상기 면역화에 의해 표적 항원에 대한 세포성 또는 체액성 면역반응이 증가 또는 발생한다면

표적 항원에 대해 면역화된 것으로 평가될 수 있다.

[0046] 상기 면역화는 특정 대상체에 대해 항원을 투입하여 면역 반응을 야기시키는 방법이라면 특별히 제한되지 않으며, 예컨대, 표준 근육 내 또는 피부 내 주사, 경피 입자 전달, 흡입, 국소, 경구, 비강 내 또는 점막 모드의 투여에 의해 대상체에 직접적으로 도입될 수 있다.

[0047] 구체적으로, 상기 동애등에 유충은 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp.*)의 균주의 도입에 의해 면역화될 수 있고, 바람직하게는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 복강 내 주입하여 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0048] 상기 항균 조성물은 유해균 특히, 폐렴간균 및 이질균에 대한 특이적 억제 활성으로 인해 식품 조성물, 약학적 조성물, 사료 조성물, 첨가제, 청결제, 세정제 등 다양한 용도로 활용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 조성물이 제공된다.

[0050] 상기 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등 모든 형태의 식품 조성물을 포함할 수 있다. 상기 유형의 식품 조성물은 당해 기술 분야에 공지된 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 식품 조성물은 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물을 포함하므로 상기 폐렴간균 및 이질균의 증식이 효과적으로 억제되어 식품의 보존성이 현저히 개선될 수 있다.

[0051] 상기 식품 조성물은 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품안정처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.

[0052] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.

[0053] 또한, 상기 식품 조성물은 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 상기 약학적 조성물은 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물을 포함하므로 상기 폐렴간균 및 이질균에 대한 억제 활성이 우수하다.

[0056] 상기 약학적 조성물은 통상적인 약학적 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0057] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0059] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물 및 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0060] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0061] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0062] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다. 상기 “약학적으로 유효한 양”은 의

학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0063] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0064] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 사료 조성물이 제공된다.

[0065] 상기 사료 조성물은 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물을 포함하므로 상기 페렴간균 및 이질균의 증식이 효과적으로 억제될 수 있고 보존성이 현저히 개선될 수 있다.

[0066] 상기 사료는 가축의 생육에 필요한 유기 또는 무기 영양소를 공급하는 물질이다. 상기 동물은 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배성 및 호흡기관이 분화되어 있는 생물로서, 구체적으로는 극피동물, 갑각류, 연체동물, 어류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 상기 사료 조성물은 곡물, 식물성 단백질 사료, 동물성 단백질 사료, 당분 또는 유제품을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 곡물은 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀일 수 있고, 상기 식물성 단백질 사료는 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 할 수 있으며, 상기 동물성 단백질 사료는 혈분, 육분, 골분 및 생선분일 수 있고, 상기 당분 또는 유제품은 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분일 수 있다.

[0068] 상기 사료 조성물은 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성창 촉진제 또는 질병 예방제와 같은 성분을 더욱 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 상기 사료 조성물은 성분들의 분쇄 정도에 따라 경점성의 조립 또는 과립 물질로 제조될 수 있으며 메쉬로 공급되거나 추가 가공 및 포장을 위해 원하는 분리된 형상으로 형성될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 저장을 위해 펠렛화, 팽창화 또는 압출 공정을 거칠 수 있으며, 저장의 용이성을 위해 건조되어 유통될 수도 있다.

[0070] 한편, 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물은 식품, 사료 첨가제의 용도로 사용될 수도 있다. 상기 첨가제는 식품, 또는 사료에 보존성을 부여하며, 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물은 저렴하고 인체에 무해하므로 식품이나 사료에 안전하게 적용될 수 있다.

[0071] 상기 첨가제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 여타의 첨가물을 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 첨가물 등 다른 유효성분이나 색소, 계면활성제, 방부제 등의 첨가물과 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 첨가제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 분말화, 과립화, 정제화 또는 액상화하여 제조될 수 있으며, 통상의 방법에 따라 포장되어 유통될 수 있다.

[0072] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 세정제가 제공된다.

[0073] 예컨대, 상기 세정제는 의류용 세제, 식기 세척제, 식품 세정제, 가전제품 세척제일 수 있다. 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물은 특정 균주의 생장을 억제하고 인체에 무해하므로 각종 생활용품의 세척이나 항균성의 부여를 목적으로 사용할 수 있다.

[0074] 상기 세정제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택된 첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 세정제 등 다른 유효성분이나 색소, 계면활성제, 방부제 등의 첨가제와 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 세정제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 분말화, 과립화, 정제화 또는 액상화하여 제조될 수 있으며, 통상의 방법에 따라 포장되어 유통될 수 있다.

[0075] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 포함하는 분획물을 포함하는 청결제가 제공된다.

[0076] 상기 청결제는 일상 생활에서 흔히 감염되기 쉬운 병원성 미생물의 체내 감염을 예방하는 손, 구강 또는 여성용 청결제 등의 용도로 사용될 수 있다. 상기 면역화된 동애등에 유래의 펩타이드 분획물은 인체에 무해하므로 손, 구강, 여성용 청결제로서 안전하게 사용될 수 있다.

[0077] 상기 청결제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택된 추가적인 여타의 첨가물을 추가로 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 첨가물 등 다른 유효성분이나 색소, 계면활성제, 방부제 등의 첨가물과 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 청결제는 그 사용 목적 및 용도에 따라 분말화, 과립화, 정제화 또는 액상화하여 제조될 수

있다.

[0078] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0080] 제조예 : 동애등에 유충의 펩타이드 분획물 제조

[0082] **항균성 펩타이드의 발굴**

[0083] 동애등에 유충의 복강에 유산균인 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 주입하고 24시간 동안 사육하여 유충의 체내에서 면역 반응을 유도하였다.

[0084] 상기 동애애등에 유충으로부터 체액을 추출한 후 C_{18} 개방 원통 크로마토그래피(open-column chromatography)를 통해 분획하였다. 컬럼 용출 용액은 99.8% 메탄올 및 멸균 증류된 정제수를 비율별로 혼합하여 사용하였다.

[0085] 추출한 유충 체액 및 TFA(Trifluoroacetic acid)가 0.025% 함유된 멸균 증류된 동량의 정제수를 혼합하고 컬럼 상부에 충진하였다. 충진 후 용출용액을 순차적으로 용출하여 펩타이드가 함유된 컬럼 용출액을 수득하고, 용출된 컬럼 용액을 농축한 후 항균 활성을 측정하였다.

[0086] 컬럼 분획을 통해 수득한 7개 분획을 고체배지 측정법을 사용하여 항균 활성을 측정한 결과, 7개 분획 중 7번 분획이 항균 활성을 나타내었다(도 1).

[0088] **항균성 펩타이드의 분리 정제**

[0089] 컬럼 분획 및 항균 활성 측정법을 통해 확인된 항균성 분획을 HPLC 분석을 통해 분석 정제하였다. 항균 활성을 나타내는 상기 컬럼 7번 분획을 HPLC 분석기기의 샘플주입구에 투입하고 용출용매를 사용하여 순차적으로 분석하였다. HPLC 분석에서 항균 활성을 가지는 HPLC 정제 물질을 분리하였다.

[0090] 용출용매는 멸균 증류된 증류수 및 99.9% 메탄올을 50:50 비율로 혼합하고 TFA(Trifluoroacetic acid)를 0.025% 첨가한 후 사용하였다.

[0091] HPLC 분석 결과, 컬럼 7번 분획은 10개의 HPLC 정제 물질로 분리되었으며, HPLC 분획을 고체배지 측정법 및 액체배지 측정법으로 항균성을 확인한 결과, HPLC 8번 및 9번 물질이 강한 항균성을 나타내었다(도 1).

[0092] 항균 활성이 확인된 상기 HPLC 8번 및 9번 분획에 대해 BCA assay 및 SDS-PAGE를 수행하였다.

[0093] BCA assay를 통하여 HPLC 8번과 9번 물질의 단백질량을 정량한 후 15% SDS Gel에 HPLC 8번과 9번 물질을 첨가하고 90V에서 3시간동안 전기영동한 결과, HPLC 분석을 통해 분리, 정제된 8번 및 9번 분획물의 단일 밴드와 분자량(20kDa, 22Kda)이 확인 되었다(도 2).

[0094] Nano-electrospray source, LTQ Orbitrap Elite mass spectrometer(Thermo Scientific, USA) 및 Easy-nLC 1000(Thermo Scientific, USA)를 포함하는 nano-LC-ESI-MS/MS system을 사용하여 정제된 단백질의 아미노산 서열을 분석을 하였다(도 3).

[0096] 실험예 1 : 세포독성 시험

[0097] MTT assay 측정법을 통해 동애등에 유충 유래 펩타이드 분획물(HPLC 8번 및 9번)의 세포독성을 평가하였다. 멸균된 증류수를 사용하여 단백질 용액을 제조한 후 마우스 배아 정상세포에 대한 시험물질을 독성을 측정하였다.

[0098] NIH 3T3 세포를 배양하고 96 웰-플레이트(96-well plate)에 세포를 분주(3×10^5 cells/well)한 후 37° C에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 펩타이드 분획물의 농도(7.5 내지 30 μM)를 달리하여 첨가하고 37° C에서 24시간, 48시간 동안 배양하였다.

[0099] 배지를 제거한 후 0.1% MTT 용액을 96 웰-플레이트의 각 웰에 30㎛씩 첨가하였으며, 호일로 보양하여 37° C에서 3시간 동안 재배양하였다.

[0100] DMSO 170 ㎛를 첨가하고 30분 동안 실온에서 shaking한 후 ELISA leader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성율(%)은 약물을 투여하지 않은 정상 배양 세포군의 흡광도를 대비하여 산출하였다.

[0101] 분석 결과 상기 펩타이드 분획물 첨가 배양에 따른 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다(도 4).

[0103] 실험예 2 : Turbidometric(TB) assay를 통한 항균 활성 시험

[0104] TB assay를 통해 상기 펩타이드 분획물(HPLC 8번 및 9번)의 항균 활성을 평가하였다. 멸균된 증류수를 사용하여

단백질 용액을 제조한 후 폐렴균 및 이질균에 대한 항균 활성을 측정하였다.

[0105] 멸균된 10mL 유리병에 LB 배지를 담은 후 시험균주를 접종하고 37° C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0106] 시험균주를 새로운 10mL 배지에 10㎕ 접종한 후 혼합된 균주 용액을 96 웰-플레이트(96-well plate)의 각 웰(well)에 200㎕씩 첨가하였다.

[0107] 상기 펩타이드 분획물을 농도(1.875 내지 15 ㎛M)를 달리하여 첨가한 후, 24시간 후에 595nm에서 흡광도를 측정하여 항균 활성을 측정하였다.

[0108] 항균 활성은 약물을 투여하지 않은 정상 배양 균주의 흡광도를 대비하여 산출하였다.

[0109] 분석 결과 상기 펩타이드 분획물은 폐렴균 및 이질균의 성장 및 분열증식을 현저하게 저해하였다(도 5).

[0111] 실험예 3 : Resazurin microtiter assay를 통한 항균 활성 시험

[0112] Resazurin microtiter assay를 통해 상기 펩타이드 분획물의 항균 활성을 평가하였다. 멸균된 증류수를 사용하여 단백질 용액을 제조한 후 폐렴균 및 이질균에 대한 항균 활성을 측정하였다.

[0113] 멸균된 10mL 유리병에 LB 배지를 담은 후 시험균주를 접종하고 37° C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0114] 시험균주를 새로운 10mL 배지에 10㎕ 접종한 후 혼합된 균주 용액을 96 웰-플레이트(96-well plate)의 웰(well)에 200㎕씩 첨가하였다. 상기 펩타이드 분획물을 농도(1.875 내지 15 ㎛M)를 달리하여 첨가한 후 상기 시험균주를 배양하였다.

[0115] 24시간 후 0.05% Resazurin 용액 30㎕를 각 웰(well)에 첨가하고 24시간 동안 재배양 하였다. 시험균주의 생존력을 의미하는 색변화(청색: 세균의 성장 및 분열증식 억제, 분홍색: 세균의 성장 및 분열증식)는 24시간 후에 관찰되었다.

[0116] 분석 결과 상기 펩타이드 분획물은 폐렴균 및 이질균의 성장과 증식을 현저히 억제하는 것으로 확인되었다(도 6).

[0118] 실험예 4 : 고체배지 측정법을 통한 항균 활성 시험

[0119] 고체배지 측정법을 통해 상기 펩타이드 분획물의 항균 활성을 평가하였다. 멸균된 증류수를 사용하여 단백질 용액을 제조한 후 폐렴균 및 이질균에 대한 항균 활성을 측정하였다.

[0120] LB broth 액체 배지에 Solid agar powder를 첨가하여 멸균한 후 지름 87mm 원형 디스크에 Solid-agar liquid 용액을 첨가하여 실온에서 고체화 하였다.

[0121] 멸균된 10 mL 유리병에 LB(liquid broth) 배지를 담은 후 폐렴균 및 이질균을 접종하고 37° C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0122] 시험균주를 새로운 10 mL 배지에 10㎕ 접종한 후 혼합된 균주 용액을 고체 배지에 도말한 후 6mm 페이퍼 디스크를 고체 배지에 부착하였다.

[0123] 부착된 디스크에 상기 펩타이드 분획물을 50㎛M씩 투여하고 37° C 배양기에서 24시간 동안 배양하여 시험물질에 의한 심험균주의 성장억제 범위(Bacterial inhibition zone)를 측정하였다.

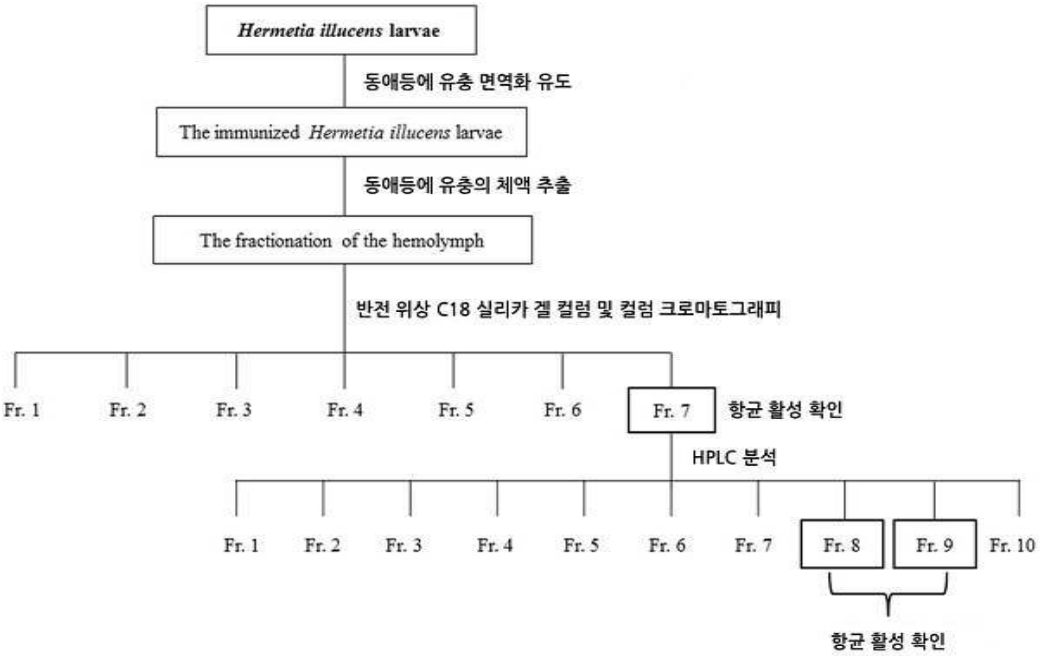
[0124] 분석결과 상기 펩타이드 분획물은 폐렴균 및 이질균의 성장과 증식을 현저히 억제하는 것으로 확인되었다(도 7).

[0125] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

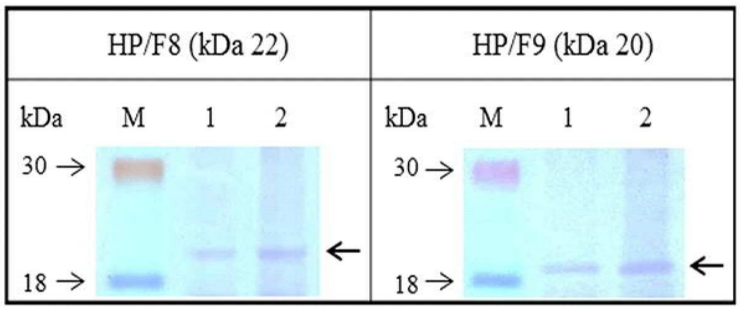
[0126] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

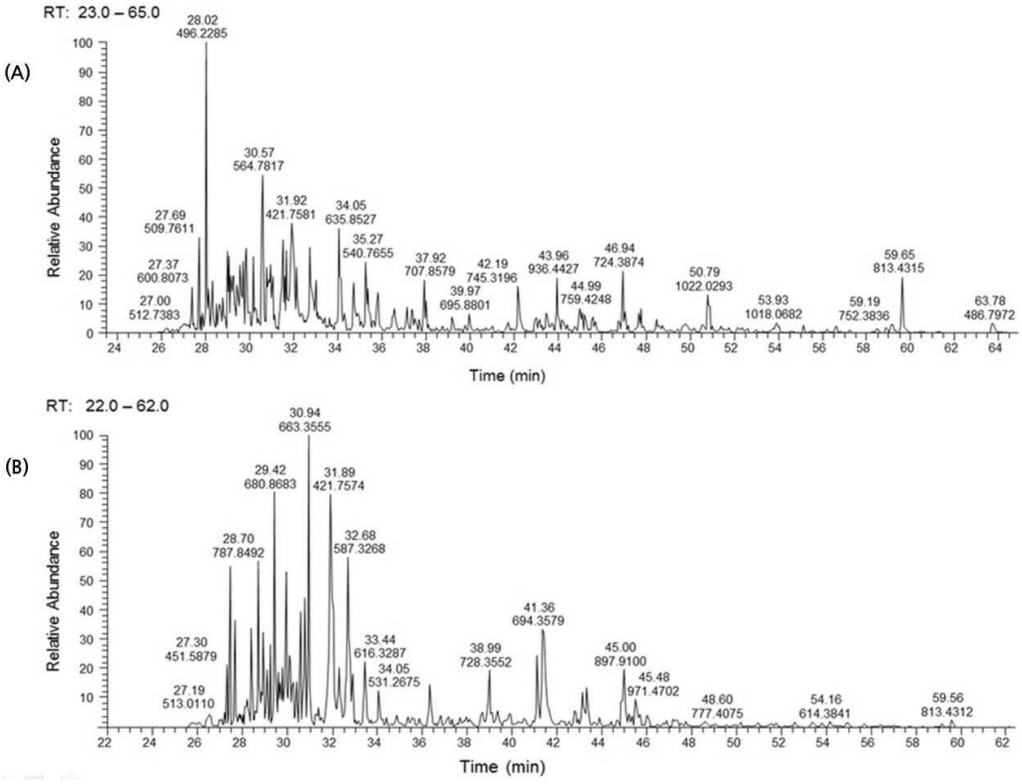
도면1


Hermetia illucens larvae
동애등에 유충 면역화 유도
The immunized Hermetia illucens larvae
동애등에 유충의 체액 추출
The fractionation of the hemolymph
반전 위상 C18 실리카 겔 컬럼 및 컬럼 크로마토그래피
Fr. 1
Fr. 2
Fr. 3
Fr. 4
Fr. 5
Fr. 6
Fr. 7
항균 활성 확인
HPLC 분석
Fr. 1
Fr. 2
Fr. 3
Fr. 4
Fr. 5
Fr. 6
Fr. 7
Fr. 8
Fr. 9
Fr. 10
항균 활성 확인

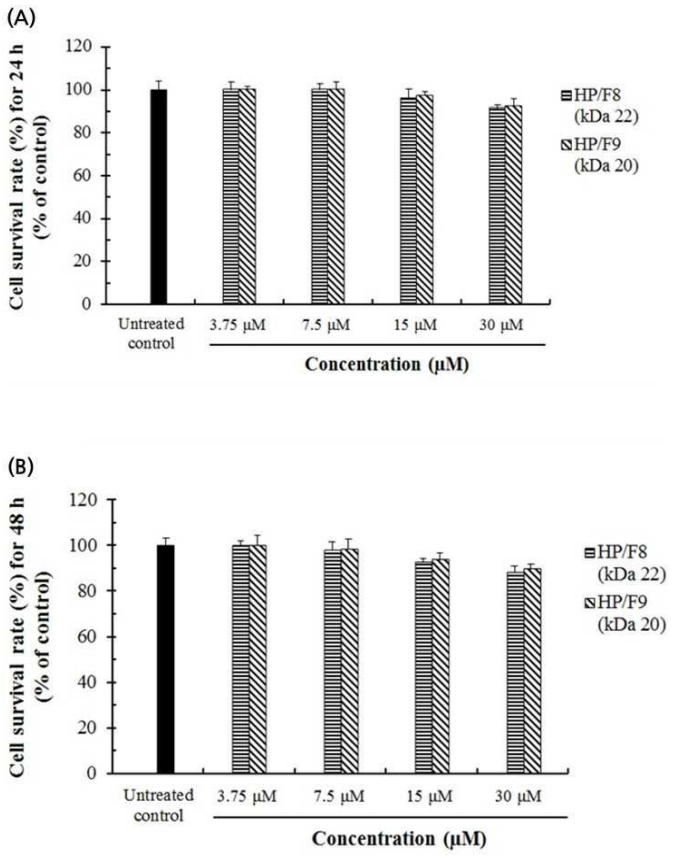
도면2


HP/F8 (kDa 22)
HP/F9 (kDa 20)
kDa
M
1
2
30
18
kDa
M
1
2
30
18

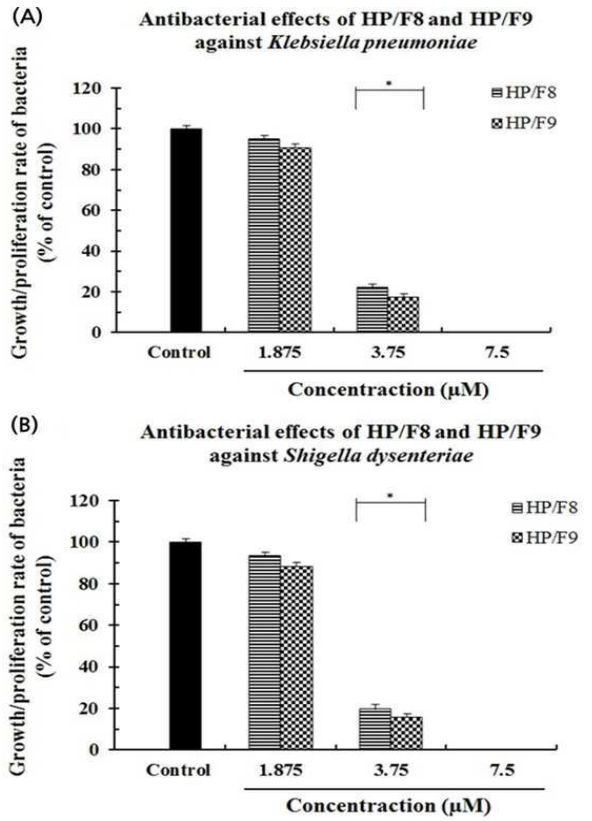
도면3


(A)
RT: 23.0 – 65.0
Relative Abundance
Time (min)
28.02 496.2285
30.57 564.7817
31.92 421.7581
34.05 635.8527
27.69 509.7611
35.27 540.7655
27.37 600.8073
37.92 707.8579
42.19 745.3196
43.96 936.4427
46.94 724.3874
27.00 512.7383
39.97 695.8801
44.99 759.4248
50.79 1022.0293
53.93 1018.0682
59.19 752.3836
59.65 813.4315
63.78 486.7972
(B)
RT: 22.0 – 62.0
Relative Abundance
Time (min)
30.94 663.3555
29.42 680.8683
31.89 421.7574
28.70 787.8492
32.68 587.3268
41.36 694.3579
27.30 451.5879
33.44 616.3287
38.99 728.3552
45.00 897.9100
34.05 531.2675
45.48 971.4702
27.19 513.0110
48.60 777.4075
54.16 614.3841
59.56 813.4312

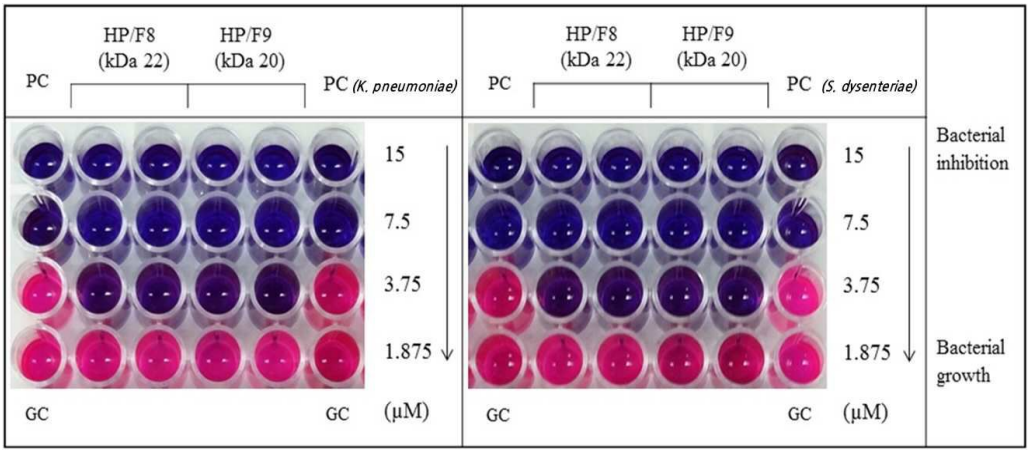
도면4


(A)
Cell survival rate (%) for 24 h (% of control)
HP/F8 (kDa 22)
HP/F9 (kDa 20)
Untreated control
3.75 μM
7.5 μM
15 μM
30 μM
Concentration (μM)
(B)
Cell survival rate (%) for 48 h (% of control)
HP/F8 (kDa 22)
HP/F9 (kDa 20)
Untreated control
3.75 μM
7.5 μM
15 μM
30 μM
Concentration (μM)

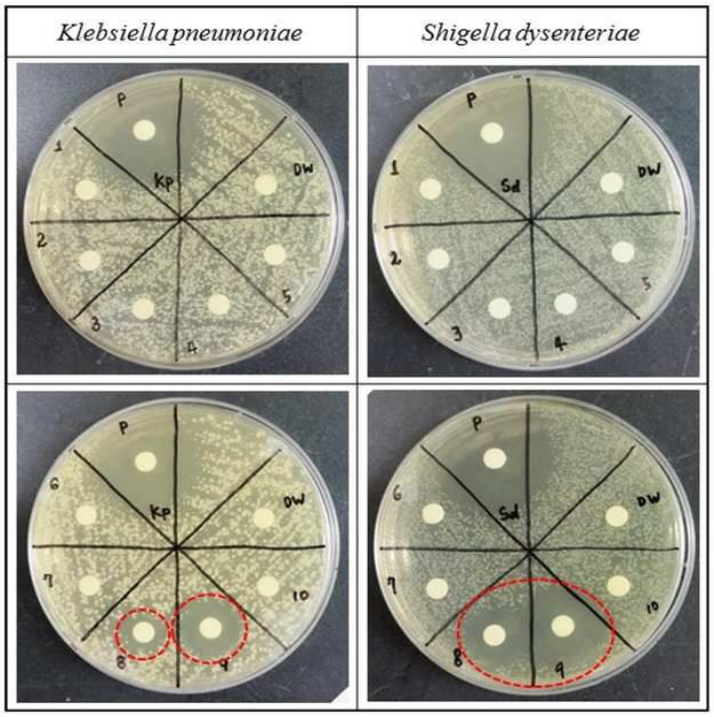
도면5


(A)
Antibacterial effects of HP/F8 and HP/F9 against Klebsiella pneumoniae
Growth/proliferation rate of bacteria (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
*
HP/F8
HP/F9
Control
1.875
3.75
7.5
Concentraction (μM)
(B)
Antibacterial effects of HP/F8 and HP/F9 against Shigella dysenteriae
Growth/proliferation rate of bacteria (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
*
HP/F8
HP/F9
Control
1.875
3.75
7.5
Concentraction (μM)

도면6


HP/F8 (kDa 22)
HP/F9 (kDa 20)
PC
PC (K. pneumoniae)
15
7.5
3.75
1.875
GC
GC
(μM)
PC
PC (S. dysenteriae)
Bacterial inhibition
Bacterial growth

도면7


Klebsiella pneumoniae
Shigella dysenteriae
P
KP
Sd
DW
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10