



- (51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/000043
- (22) 국제출원일: 2014년 1월 3일 (03.01.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0001074 2013년 1월 4일 (04.01.2013) KR
- (71) 출원인: 조선대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 501-759 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박윤경 (PARK, Yoon Kyung); 515-891 전라남도 장성군 장성읍 남면 마흥길 45, Jeollanam-do (KR).
이중국 (LEE, Jong Kuk); 540-922 전라남도 순천시 외서면 덕치길 53, Jeollanam-do (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won-Hee); 135-080 서울특별시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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.

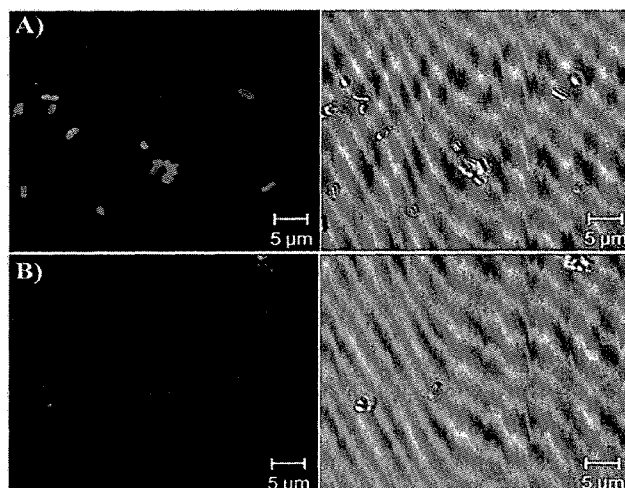
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ANTIBIOTIC PEPTIDE DERIVED FROM RIBOSOMAL PROTEIN L1 OF HELICOBACTER PYLORI BACTERIA, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 헬리코박터 파일로리균의 리보솜 단백질 L1 으로부터 유래된 신규한 항생 펩타이드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel antibiotic peptide derived from ribosomal protein L1 of helicobacter pylori bacteria, and a use thereof, particularly, to a novel peptide represented by sequence number 4 and prepared by substituting proline for phenylalanine, which is a twelfth amino acid of a peptide, wherein the peptide comprises an amino acid sequence represented by sequence number 3. It was ascertained that the novel peptide shows significant antibiotic activities, does not have cell toxicity, and has in vivo anti-inflammatory effects by the peptide of the present invention, thus the novel peptide can be used as an active ingredient of a natural antibiotic.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 헬리코박터 파일로리균의 리보솜 단백질 L1 으로부터 유래된 신규한 항생 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, 서열번호 3 으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드의 12 번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환하여 서열번호 4 로 기재되는 신규한 펩타이드를 합성하였으며, 상기 신규한 펩타이드가 유의적인 항균활성을 나타내고, 세포독성이 없음을 확인하였으며, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 상기 신규한 펩타이드는 천연 항균제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

헬리코박터 파일로리균의 리보솜 단백질 L1으로부터 유래된 신규한 항생 펩타이드 및 그의 용도

5

【기술분야】

본 발명은 헬리코박터 파일로리균의 리보솜 단백질 L1으로부터 유래된 신규한 항생 펩타이드 및 그의 용도에 관한 것이다.

10 【배경기술】

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 항생제의 유사체가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빠르다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다(Stuart B. Levy, Scientific American, 46-53, 1998).

20

항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus sp.*)에서 최초로 발견이 되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., Nature, 227, 138-140, 25 1970). 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin)과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 페니실린의 경우에 있어서 내인성

가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzymes)를 활성화함으로써 세균을 죽이지만, 또한 세균이 이 효소의 활성을 억제하여 항생제 치료 시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

세균이 항생제에 대한 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다(Handwerger and Tomasz, Rev. Infect. Dis., 7, 368-386, 1985). 아울러, 내성은 항생제에 대한 세균의 저항성이 발생할 선행조건이라고 간주하는데, 이것은 항생제 치료에도 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 항생제에 대한 저항성을 보이는 모든 세균들은 그 항생제에 대한 내성도 있는 것으로 알려져 있으므로(Liu and Tomasz, J. Infect. Dis., 152, 365-372, 1985), 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두 가지로 구분되는데, 첫번째는 모든 세균에 있어서 성장 속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며 (Tuomanen E., Revs. Infect. Dis., 3, S279-S291, 1986), 두번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은, 오토라이신 효소의 활성을 감소시키는 조절(down regulation)이 일어나는 것인데, 이러한 조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이지만, 세포 용해를 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 명백하게, 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소의 결손으로 생긴 경우인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로, 이러한 자가분해 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상에서 발견되는 내성은 오토라이신 효소의 활성을 외형적으로 조절하는 과정으로 이루어진다(Tuomanen et al., J. infect. Dis., 158, 36-43, 1988).

상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 대한 저항성을 나타내는 세균을

제거하기 위하여 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 오토라이신 효소의 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.

한편, 세균은 박테리오신(bacteriocin)이라는 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신들은 구조적 특징에 따라 세 가지로 구분된다. 첫번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며 두번째는 비(非)란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고, 세번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다 (Cintas et al., J. Bact., 180, 1988-1994, 1998). 곤충을 포함하여, 동물 역시 펩타이드 항생제를 자체적으로 생산할 수 있는데(Bevins et al., Ann. Rev. Biochem., 59, 395-414, 1990), 구조에 따라 세 개의 그룹으로 나눌 수 있다. 첫번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -시트(sheet) 펩타이드이고, 두번째는 α -회전형(helical)의 양친화성 펩타이드 분자이며, 세번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki et al., Int. J. Antimicrob. Agents, 9, 269-280, 1998). 이들 항균 펩타이드들은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., Cell, 65:205, 1991; Boman, H. G., Annu. Rev. Microbiol., 13:61, 1995). 또한, 상기 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 흔한 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다.

소화성 궤양이 스트레스와 위산 과다생성에 의해 발생한다는 가설이 있어왔으나, 최근에 이러한 소화성 궤양이 헬리코박터 파일로리균에 의한 것이라고 밝혀지면서(Blaser, MJ., Trends Microbiol., 1, 255-260, 1991) 헬리코박터 파일로리 균에 대한 관심이 집중되고 있다. 헬리코박터 파일로리균은 그람 음성균에 속하는데 성장 속도가 매우 느리고 나선형 몸체와 편모를 가지는 혐기성 미생물이다. 헬리코박터 파일로리균이 생산하는 많은

단백질 중 RPL1이라는 단백질은 230개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 상기 단백질의 아미노말단 부위가 세크로핀과 유사한 구조를 갖는 것이 밝혀졌는데, 특히 8개의 아미노산이 세크로핀과 같은 것으로 알려져 있다. 헬리코박터 파일로리균의 RPL1 아미노말단 부위는 완벽한 양친화성 나선모양 구조를 가지는데(Putsep, K. et al., Nature, 398, 671-672, 1999), 이러한 양친화성 펩타이드는 세포막의 지질 성분과 유사한 구조를 지니므로 미생물의 세포막 지질과 결합하여 미생물의 세포막을 파괴하거나, 세포막의 전위를 변화시켜 미생물을 파괴한다는 작용 기작이 보고되어 있다. 이 외에도 헬리코박터 파일로리균의 RPL1 단백질의 아미노말단 부위는 역시 항균활성을 가진다는 5
10 보고가 있다(Putsep K. et al., Nature, 398, 671-672, 1999).

따라서 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되었다. 지금까지 보고된 양친화성 펩타이드로는 서열번호 1로 기재되는 HP(2-20) 펩타이드, 멜리틴(melittin, ME) 펩타이드 등이 있다.

15 헬리코박터 파일로리 유래 RPL1 단백질의 아미노말단 부위 중 양친화성 활성을 갖고 항생 활성을 나타내는 펩타이드인 서열번호 1로 기재되는 HP(2-20) 펩타이드는 세포 독성은 없으면서 항균활성과 함께 항진균 효과가 있다고 보고되었다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 291, 1006-1013, Biochim. Biophys. Acta. 2002, 1598, 185-194).

20 또한, 멜리틴 펩타이드는 벌독의 성분 중 고형분의 50% 이상을 차지하는 펩타이드로서 카르복시 말단이 아미노화(amidation) 되어 있고, 진핵세포에 대하여 세포독성이 매우 높아 고등동물세포를 낮은 농도에서도 잘 파괴하고, 미생물인 그람 음성균 및 그람양성균에 대해서도 항균활성이 높다고 보고되었다(Habermann, E., Science, 177: 314, 1972; Steiner, H., et al., Nature, 25
292: 246, 1981; Tosteson, M. T., et al., Biochemistry, 228: 337, 1987).

그 이외 HP (2-20)과 유사한 아미노산 서열이 있는 세크로핀 계열의 양친화성 펩타이드는 초파리에게서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은창자에서도 발견되었는데, 이 중 세크로핀 A(cecropin A, CA)는

항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었다(Boman, H. G. and Hultmark, D., *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 103, 1987).

또한 상기 양친화성 펩타이드의 활성화에 관한 연구와 더불어, 그들이 갖는 아미노산 서열 및 단백질 구조 등의 특성을 살펴보면, 그 서열상의 특성이 항균활성과 매우 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있다. 따라서 상기 양친화성 펩타이드의 아미노산 서열을 이용하여 그 서열의 특정부위에서 유사한 아미노산으로 치환하거나, 일부 서열들을 재조합하여 접합 펩타이드(conjugation peptide)를 제조하고, 펩타이드 서열의 일부 기능 부위를 서로 도치시킴으로써 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드를 제조할 수 있다(Chan, H. C., et al., *FEBS Lett.*, 259: 103, 1989; Wade, D., et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 40: 429, 1992).

실제로 상기의 양친화성 펩타이드를 응용하여 항암효과가 있는 합성 펩타이드 mag A 및 mag G 등이 제조되었고, 그 효능이 보고된 바 있다(Ohsaki, et al., *Cancer Res.*, 52: 3534, 1992). 그 외에도, 마가이닌 2 및 멜리틴 펩타이드들의 양친화성 부위, 유연성 부위 및 소수성 부위 등의 아미노산을 상호 결합시켜 항진균 활성을 나타내는 합성 펩타이드들이 개발되었으며, 이들은 특히 박테리아 및 곰팡이 속 균주에 작용함이 특허 등록된 바 있다(대한민국 특허등록 제0204501호).

또한, 본 발명자들은 기존의 HP(2-20) 펩타이드의 특정 아미노산을 트립토판으로 치환하여 소수성을 증가시킴으로써 항생효과가 증진됨을 확인하여 항생 펩타이드(서열번호 2)로써 특허 등록된 바 있고(대한민국 특허등록 제0459808호), HPA3 펩타이드(서열번호 2)의 글루타민산을 프롤린으로 치환시킴으로써 접힘구조를 갖는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 갖는 항생 펩타이드를 특허 등록된 바 있다(대한민국 특허등록 제0935029호).

25

항생 펩타이드 구조의 대부분은 일직선상의 나선 구조로 구성되어 있음으로써 세포의 막을 공격하는 특징을 갖는데, 이때 일직선상의 나선구조의 적절한 부위에 접힘 구조를 줌으로써 세포의 막에 더욱더 잘 결합하도록

조절하는 것이 가능해진다. 즉 세균이나 곰팡이의 막 표면의 소수성 또는 전하를 이용하여 이들의 막에서 결합을 더욱 잘하도록 유도하는 것이다.

이에 본 발명자들은 새로운 천연 항균제를 개발하기 위해 노력한 결과,
 5 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드의 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환하여 서열번호 4로 기재되는 신규한 펩타이드를 합성하였으며, 상기 신규한 펩타이드가 유의적인 항균활성을 나타내었고, 세포독성이 없음을 확인하였으며, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 상기 신규한 펩타이드를 천연
 10 항균제의 유효성분으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 신규한 항균용 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물을
 15 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 제공한다.

20 또한, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 항균 펩타이드 또는
 25 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체내 항균 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 항균 펩타이드 또는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방

또는 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 항균제로 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩타이드를 제공한다.

또한, 본 발명은 항균용 건강식품으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩타이드를 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 항균제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 항균용 건강식품의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

10

【유리한 효과】

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항생 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물은 탁월한 항균활성을 나타내고 용혈작용 및 세포독성이 없으며, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 인체에 안전한 항생제로 유용하게 사용될 수 있다.

15

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 HPA3P에 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환하므로서 모체인 펩타이드에 비해 접힘 구조와 유연성이 높은 항생 펩타이드를 2차 구조 분석기(CD: Circular Dichroism)를 이용하여 확인한 도이다:

20

A: HPA3P(서열번호 3) 처리군; 및

B: HPA3P2(서열번호 4) 처리군.

도 2는 대장균의 세포 내부 막에 미치는 영향을 사이토스-그린 형광물질을 이용해 형광 광도의 증가정도를 확인한 도이다:

25

A: HPA3P(서열번호 3) 처리군,

B: HPA3P2(서열번호 4) 처리군; 및

C: 버포린-2(Buporin-2) 펩타이드.

도 3은 본 발명의 펩타이드와 모체펩타이드에 로다민(rhodamine) 형광 다이(dye)를 부착 후 펩타이드가 대장균에 작용여부를 형광 현미경을 통해 확인한 도이다:

A: HPA3P(서열번호 3) 처리군; 및

5 B: HPA3P2(서열번호 4) 처리군.

도 4는 ICR 마우스에 *Pseudomonas aeruginosa* 균을 감염 시켜 염증을 유발한 후 서열번호 4 펩타이드를 처리하여 면역 반응 억제 측정을 나타낸 도이다:

10 A: 염증이 유도된 ICR 마우스에 서열번호 4 펩타이드를 한번 및 여러 번 처리하여 10일 동안 염증 억제를 확인한 도이다;

B: 염증이 유도된 ICR 마우스에 서열번호 4 펩타이드를 농도별로 처리하여 염증 억제를 확인한 도이다:

1) 음성 대조군;

2) *P. aeruginosa* 균으로 감염된 양성 대조군;

15 3) 서열번호 4 펩타이드 0.25 mg/kg 농도를 처리한 군; 및

4) 서열번호 4 펩타이드 0.5 mg/kg 농도를 처리한 군.

도 5는 ICR 마우스에 대장균을 처리하여 각 조직의 변화를 확인한 도이다.

20 도 6은 ICR 마우스에 *Pseudomonas aeruginosa* 균을 감염 시켜 염증을 유발한 후 서열번호 4 펩타이드를 처리하여 항 염증 관련 단백질 증가여부를 확인한 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

25

본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 제공한다.

상기 펩타이드는 대한민국 특허등록 제0935029호에서 제조된 서열번호

3으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 HPA3P의 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환된 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균활성을 갖는 것이 바람직하고, 보다 구체적으로 상기 그람

- 5 양성균은 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 스트렙토미세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 구성된 균으로부터
- 10 선택되는 어느 하나, 상기 그람 음성균은 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*shigella*), 타이포이드 바실러스(*typhoid bacillus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 예르시니아 페스티스(*yersinia pestis*), 나이세리아 고노로에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 스피로헤타, 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스
- 15 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 으로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 균주는 스타필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3090, 3108, 3114, 3126), 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* 1034, 3904, 4007, 4891)로 구성된
- 20 균으로부터 선택되는 어느 하나에 대하여 항균활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명자들은 세포막에 대한 결합력 향상을 위한 항생 펩타이드를 제조하기 위하여, 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법에 따라,

25 Fmoc(9-fluorenylmethoxy carbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하여, 서열번호 3으로 기재되는 HPA3P 펩타이드의 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환시킨 서열번호 4으로 기재되는 HPA3P2 펩타이드를 합성하였다(표 1 및 도 1 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드 항균활성을 측정하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하여 관찰하였다. 이 때 사용한 그람 양성균은 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)이고, 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)이며 항생제 내성 균주는 스태필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3090, 3108, 3114, 3126), 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* 1034, 3904, 4007, 4891)이다. 그 결과, 일반 균주에서 본 발명의 펩타이드(HPA3P2)는 모체 펩타이드에 비해 약간의 항균활성이 낮음을 확인하였고(표 1 참조), 내성 균주에서는 모체 펩타이드와 유사한 항균활성을 확인하였다(표 2 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여, 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사한 결과, 본 발명의 서열번호 3으로 기재된 HPA3P 및 서열번호 4로 기재된 HPA3P2 펩타이드의 용혈작용은 800 μM 에서도 일어나지 않음을 확인하였다(표 1 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 정상세포주에서 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여, 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line)을 이용하여 세포독성을 측정한 결과, 서열번호 4로 기재된 HPA3P2 펩타이드는 세포독성 억제 10%(EC₁₀)가 180.5 μM 로 모체 펩타이드인 HPA3P보다 좋은 것을 확인하였으며, 세포독성 억제 50%(EC₅₀)에서는 400 μM 에서 독성이 일어나지 않는 것을 확인하였다(표 1 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드 구조 변화를 분석하기 위하여 원편광 이색성 분광 측정법(circular dichroism, CD)를 이용하여 분석한 결과, 서열번호 4로 기재된 펩타이드(HPA3P2)는 세포막 지질과 유사한 SDS에서 약간의 알파-나선형 구조를 형성하지만 기타 다른 조성에서는 구조를 형성하지 않는 것을 확인하였다(도 1 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 세포막을 투과하여 핵산과

작용하는지를 확인하여 위하여 사이토스-그린(SYTOX-Green) 형광 및 광도를 시간단위로 측정한 결과, 본 발명의 서열번호 4로 기재된 펩타이드(HPA3P2)(도 2B)는 서열번호 3으로 기재된 펩타이드(HPA3P)(도 2A)에 비해 농도가 증가함에도 형광 강도의 변화는 일어나지 않는 것을 확인하였다. 반면에,
5 서열번호 3으로 기재된 펩타이드(HPA3P)는 버포린-2(buforin-2)(도 2C)와 동일한 반응을 나타내는 것을 확인하였다(도 2 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 대장균의 어느 부분에 작용하는지 그 위치를 확인하기 위하여 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy)을 이용하여 확인한 결과, 서열번호 3으로 기재된
10 HPA3P(도 3A)는 대장균의 막 내부에 투과하여 대장균이 붉은빛을 강하게 발산하는 것을 확인하였으며, 서열번호 4로 기재된 HPA3P2(도 3B)는 대장균이 거의 없으며, 또한 형광을 거의 발산하지 않은 것으로 빠른시간에 대장균을 파괴시켜서 세척과정 중 작은 입자로 분리된 대장균이 세척되어버린다는 것을 확인하였다(도 3 참조).

15 또한, 본 발명자들은 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인하기 위하여, ICR 마우스((주) 샘타코 바이오 코리아)에 염증을 유도하기 위하여, *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug-resistant *P.aeruginosa* 4007 cells, MDRPA, 6×10^7 cfu/ml)균을 100ul 처리하여 염증이 유도된 마우스에서 본 발명의 펩타이드에 의한 면역 반응 억제를 측정한 결과,
20 박테리아를 처리한 부분에서 면역세포가 밀집 되는 현상을 확인하였다. 이와 대조로 펩타이드를 처리한 곳에서는 농도가 증가함에 따라 염증 반응은 줄어드는 것을 확인 하였다(도 4 참조).

또한, 본 발명자들은 ICR 마우스에 염증을 유도하기 위하여 GFP가 라벨링된 대장균(*E.Coli*)을 감염 시킨 후, 상기 염증이 유도된 마우스의
25 조직을 적출하여 각각의 조직을 형광 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 항균 펩타이드를 0.25 mg/kg 및 0.5 mg/kg의 농도로 처리한 마우스 군에서 염증이 억제되는 것을 확인하였으며, 항균 펩타이드를 높은 농도(0.5 mg/kg)로 처리한 마우스 군의 조직에서 염증이 현저하게 줄어드는 것을 확인함으로써, 서열번호

4 항균 펩타이드에 의해 조직에 감염된 미생물에 대한 강한 항균활성을 보이므로 피부염 유발을 예방할 수 있음을 확인하였다(도 5 참조).

아울러, 본 발명자들은 ICR 마우스에 *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug-resistant *P.aeruginosa* 4007 cells, MDRPA, 6×10^7 cfu/ml) 균을
5 이용하여 염증을 유도 시킨 후, 상기 마우스에 각기 다른 농도의 서열번호 4 항균 펩타이드를 처리하여 조직을 적출한 후, 웨스턴 블랏을 사용하여 항염증 단백질의 발현 정도를 확인한 결과, 염증이 유도된 마우스의 조직에서
10 신호전달 단백질(IL-6, TLR-4, NF- κ B) 및 사이토카인(TNF- α , IL-1 β)이 과발현하는 것을 확인하였고, 각각의 농도로 서열번호 4 항균 펩타이드를 처리한 마우스군의 조직에서 상기 펩타이드 처리 농도가 증가함에 따라 염증 관련 단백질이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 서열번호 4 항균 펩타이드가 항염증 억제에 강한 작용을 한다는 것을 확인하였다(도 6 참조).

따라서, 본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고,
15 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항염증 효과를 확인함으로써, 인체에 안전한 항생제로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

20 상기 펩타이드는 대한민국 특허등록 제0935029호에서 제조된 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드 HPA3P의 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환된 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 상기 그람 양성균은
25 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus Pneumonia*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 스트렙토미세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*),

스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나, 상기 그람 음성균은 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*shigella*), 타이포이드 바실러스(*typhoid bacillus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 예르시니아 페스티스(*yersinia pestis*), 나이세리아 고노로에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 스피로헤타, 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)

5 으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 및 상기 항생제 내성 균주는 스타필로코쿠스류(*S. aureus* CCARM 3090, 3108, 3114, 3126), 대장균류(*E. coli* CCARM 1229, 1238) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* 1034, 3904,

10 4007, 4891)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 대하여 항균활성을 갖는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 신규한 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며

15 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 신규한 펩타이드는 실제로 비경구의 여러 가지 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, 비수성용제, 현탁제, 유제,

20 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 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.

25 또한, 본 발명의 신규한 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온(glutathione)과 같은

항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

본 발명의 신규한 펩타이드의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

5

본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple does)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 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

15

또한, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 식품 보조제 또는 식품 첨가제를 제공한다.

20

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.

25

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

5 식품을 모두 포함한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 항균 펩타이드 또는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체내 항균 방법을 제공한다.

10 본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본 발명의 항균 펩타이드 또는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체내 항균 방법으로 사용될 수 있다.

15

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 항균 펩타이드 또는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

상기 병원성 세균은 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*),
 20 대장균(*Escherichia coli*), 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본
 25 발명의 항균 펩타이드 또는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방 또는 치료방법으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 항균제로 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩타이드를

제공한다.

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본 발명에 따른 펩타이드를 항균제로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 항균용 건강식품으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 펩타이드를 제공한다.

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본 발명에 따른 펩타이드를 항균용 건강식품으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 항균제의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본 발명에 따른 펩타이드를 항균제의 제조에 이용하는 용도로 사용될 수 있다.

아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 펩타이드를 항균용 건강식품의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

본 발명의 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 유의적인 항균활성을 나타내고 용혈 작용 및 세포독성이 없고, 생체 내(*in vivo*)에서 본 발명의 펩타이드에 의한 항 염증 효과를 확인함으로써, 본 발명에 따른 펩타이드를 항균용 건강식품의 제조에 이용하는 용도로 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

5 <실시예 1> 펩타이드들의 합성 및 분리정제

세포막에 대한 결합력 향상을 위한 항생 펩타이드를 합성하기 위해, 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법(Merrifield, RB., J. Am. Chem. Soc., 85, 2149, 1963)에 따라, Fmoc(9-fluorenylmethoxy carbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하여, 서열번호 3으로 기재되는 HPA3P 펩타이드의 12번째
10 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환시킨 서열번호 4로 기재되는 HPA3P2 펩타이드를 합성하였다(표 1 및 도 1). 그 외에도 대조군으로 버포린-2(buforin-2) 펩타이드를 합성하였다.

구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 Rink Amide MBHA-Resin 을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이
15 $-OH$ 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin 을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo triazole(HOBT)- dicyclo-hexycarbodiimide) 법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링(coupling) 시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고
20 NMP 및 DCM(dichloromethane)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA (trifluoroacetic acid)-phenol-thioanisole- H_2O -triisopropylsilane(85 : 5 : 5 : 2.5 : 2.5, v/v) 용액을 가하고 2 내지 3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기의 방법으로 얻은
25 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC column(Delta Pak, C_{18} 300Å, 15, 19.0mm × 30 cm, Waters, USA)을 이용하여

정제하였다. 합성 펩타이드를 6 N HCl로 110°C에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02 N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 상기의 방법으로 조성된 펩타이드들의 순도를 확인한 결과 95% 이상의 순도를 나타내었으며, MALDI 질량 분석법(Hill, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 5: 395, 1991)을 이용하여 분자량을 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 비교한 결과, 그 값이 일치하는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명의 접합 구조를 갖는 펩타이드는 MALDI 분석 결과, 분자량(HPA3P: 2417.2, HPA3P2: 2367.0)이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하므로 정확한 아미노산 서열을 가짐을 확인하였다(표 1).

【표 1】

펩타이드 아미노산 서열, 분자량, 용리시간 및 활성여부 확인

설계	서열	분자량	용리시간(분)	MIC (μM)				HC ₁₀ /HC ₅₀	EC ₁₀ /EC ₅₀
				Ec	Pa	Sa	Bs		
HPA3P (서열번호3)	AKKVFKRLPKLFSKIWNWK-NH ₂	2417.2	23.66	1	8	16	2	>800/>800	151.5/381.2
HPA3P2 (서열번호4)	AKKVFKRLPKLFPSKIWNWK-NH ₂	2367.0	19.82	16	16	>64	>64	>800/>800	180.5/>400

Ec: 대장균(*Escherichia coli*), Pa: 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), Sa: 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), Bs: 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), MIC: 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration)

<실시예 2> 항균활성 측정

상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 HPA3P2 펩타이드의 항균활성을 측정하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(MIC)값을 측정하였다.

구체적으로, 항균활성 측정을 위하여 표준 균주인 그람 음성균으로써 대장균(KCTC 1682) 및 슈도모나스 에루기노사(KCTC 1637)를, 그람 양성균으로써 스타필로코쿠스 아우레우스(KCTC 1637) 및 바실리우스 서브틸리스 (KCTC

1918)를 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양받아, 그리고 각종 저항성 균주로 스테필로코쿠스 아우레우스(CCARM 3090, 3018, 3114, 3126) 및 대장균(CCARM 1229, 1238)은 이화여자대학 균주은행으로부터 분양받았으며, 슈도모나스 에루기노사(1034, 3904, 4007, 4891)은 전남대학교병원 중이염 환자로부터 입수하였다. 각 균주를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨; Sigma, USA)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음 1% 박토 펩톤 배지(Difco, USA)로 5×10^5 세포/100 μ l의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, USA)에 접종하였다. 상기 <실시예 1>에서 합성한 펩타이드 및 표 1의 펩타이드들을 각각 96웰부터 1/2배씩 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37°C에서 6 시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, Germany)를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였다.

그 결과, 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 <실시예 1>에서 합성한 본 발명의 펩타이드(HPA3P2)와 모체 펩타이드(HPA3P)의 항균활성 측정결과 표준 균주인 그람 음성균과 그람 양성균에서 본 발명의 펩타이드가 모체 펩타이드에 비해 약간의 항균활성이 낮음을 확인하였고(표 1), 각종 저항성 균주에서는 모체 펩타이드와 같거나 유사한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 2).

20

【표 2】

저항성 균주에 관한 항균활성 측정

균주	MIC (μ M)				
	HPA3P	HPA3P2	Ampicillin	Erythromycin	Piperacillin
<i>S. aureus</i> CCARM 3090	1	1	-	>800	-
<i>S. aureus</i> CCARM 3018	1	1	-	>800	-
<i>S. aureus</i> CCARM 3114	1	1	-	>800	-
<i>S. aureus</i> CCARM 3126	1	1	-	>800	-
<i>E. coli</i> CCARM 1229	0.5-1	0.5-1	>800	-	-
<i>E. coli</i> CCARM 1238	0.5-1	0.5-1	>800	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 1034	1	1	-	-	>400
<i>P. aeruginosa</i> 3904	1	1	-	-	>400
<i>P. aeruginosa</i> 4007	1	1	-	-	>400
<i>P. aeruginosa</i> 4891	1	1	-	-	>400

<실시예 3> 용혈 활성 측정

상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 접힘 구조를 갖는 HPA3P2 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 접힘 구조를 갖는 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다.

구체적으로, 인간 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고 여기에 12.5 μ M/웰부터 1/2의 농도로 표 1에 서열번호 3과 4로 기재된 펩타이드들을 각각 연속적으로 희석하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, 1,000 g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈량을, 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 세포 파괴 정도를 비교 조사하기 위하여 1% 트리톤 X-100(sigma, USA) 을 인간 적혈구 세포에 첨가하여 그 상등액의 흡광도를 측정하였다. 상기 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하고, 하기 수학적 1에 따라 본원 발명의 펩타이드 및

표 1의 펩타이드들의 적혈구 파괴능을 계산하였다.

[수학식 1]

$$\% \text{적혈구파괴능(hemolysis)} = \left(\frac{\text{흡광도A} - \text{흡광도B}}{\text{흡광도C} - \text{흡광도B}} \right) * 100$$

5 상기 수학식 1에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액의 흡광도, 흡광도 B는 414 nm 파장에서 PBS의 흡광도 그리고 흡광도 C는 414 nm 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 서열번호 3으로 기재된 HPA3P과 본 발명의 서열번호 4로 기재된 HPA3P2 펩타이드의 용혈작용은 800 μM 에서도
10 일어나지 않는 것을 확인하였다(표 1).

<실시예 4> 정상 세포주에서 세포독성 확인

 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드들의 정상 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해, 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)을 이용하여 독성을 측정하였다.
15

 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에서 배양된 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line)를 2×10^4 씩 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, 상기 <실시예 1>에서 제조한 펩타이드들을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 5% CO_2
20 인큐베이터에서 반응시켰다. 배양 후, 5 mg/ml 농도로 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 녹인 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 용액 20 μl 를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 상층액을 제거하고, 200 μl 의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 560 nm에서 결과를 확인하였다.

25 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line)에서 서열번호 3으로 기재된 HPA3P 펩타이드는 세포독성 억제 10%(EC₁₀)가

151.1 μM 이었으며, 본 발명의 서열번호 4로 기재된 HPA3P2 펩타이드는 세포독성 억제 10%(EC₁₀)가 180.5 μM 로 모체 펩타이드인 HPA3P보다 좋음을 알 수 있었으며, 세포독성 억제 50%(EC₅₀)에서는 400 μM 에서 독성은 일어나지 않음을 확인하였다(표 1).

5

<실시예 5> 원편광 2색성 스펙트라 (CD: Circular Dichroism Spectra) 분석

상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드를 원편광 이색성 측정법 이용한 구조의 변화를 측정하였다. 원편광 이색성 스펙트라(Jasco J-810 spectropolarimeter(Jasco, 미국)) 장비로 온도조절이 가능한 것으로 25°C로 온도를 고정시켰다. 구조결정을 확인하기 위해 사용된 cell의 경로길이(path-length quartz)는 0.1 cm자리를 이용하였다. 각 펩타이드의 농도는 30 μM 을 이용하였으며, 사용 완충제로는 10 mM 인산나트륨(sodium phosphate), 50% trifluoroethanol(TFE, v/v), 30 mM sodium dodecyl sulfate(SDS, v/v) 그리고 300 mM lipopolysaccharide(LPS)와 반응한 후 원편광 이색성 스펙트라의 250-190 nm 범위에서 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드들의 2차 구조를 분석하였다. 이들 타원형 구조([θ], $\text{degcm}^2\text{dmol}^{-1}$) 분석은 수학식 2와 같다.

[수학식 2]

$$[\theta] = \theta_{\text{obs}} / 10 / c$$

θ_{obs} 는 1/1000 (millidegree)에서 신호 (타원형)가 측정된 값, l 는 셀의 길이(cm)에 빛이 투과되는 길이(optical path-length), c 는 시료의 몰(molar)에 농도를 의미한다.

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 서열번호 3으로 기재된 펩타이드 (HPA3P)는 10 mM 인산 완충제에서는 구조를 형성하지 않지만 TFA, SDS그리고

LPS에서 전형적인 알파-나선형(helix) 구조를 갖는 것으로, 특히 세포막 지질과 유사한 SDS에서는 아주 강하게 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 이것과 비교로 서열번호 4로 기재된 펩타이드(HPA3P2)는 세포막 지질과 유사한 SDS에서 약간의 알파-나선형 구조를 형성하지만 기타 다른 조성에서는 구조

5 형성이 일어나지 않음을 확인하였다(도 1).

<실시예 6> 펩타이드의 사이토스-그린 (SYTOX-Green) 형광 빛 광도 측정

상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드를 사이토스-그린(SYTOX-Green) 형광 및 광도를 시간단위로 측정하였다.

10 구체적으로, 대장균(*E. coli*)을 LB 배지로 37°C에서 배양한 후 10 mM 인산 나트륨(sodium phosphate) 완충제에서 대장균 세포를 2×10^7 cells/ml로 맞추었다. 이들 대장균 세포에 사이토스-그린(SYTOX-Gree)을 1 μ M을 처리하여 15분에서 20분가량 빛이 들어오지 않은 배양기에서 반응을 시킨 후

15 비교군(HPA3P(A), Buporin-2(C))과 실험군(HPA3P2)(B) 펩타이드를 최소억제농도(MIC)로 처리하고 사이토스-그린(SYTOX-Green)으로부터 형광 광도 증가를 발광파장 485 nm와 방사파장 520 nm에서 측정하여 결정한 값으로 나타내었다.

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 서열번호 4로 기재되는 펩타이드(HPA3P2)(도 2B)는 서열번호 3으로 기재된 펩타이드(HPA3P)(도 2A)에

20 비해 농도가 증가함에도 형광 빛 강도의 변화는 일어나지 않았다. 반면 대조군(HPA3P)은 버포린-2(Buforin-2)(도 2C)와 동일한 반응을 나타내는 것을 확인하였다(도 2).

따라서, 기존에 알려진 버포린-2 펩타이드는 세포막을 투과하여 핵산과 작용하는 것으로 막을 투과시 순간의 구멍(tranzent pore)이 형성되어

25 형광물질이 핵산과 결합 후 형광 빛 강도의 변화가 일어나는 것으로 대조군인 HPA3P 펩타이드가 이러한 작용을 하지만 실험군인 HPA3P2 펩타이드는 형광 빛 강도의 변화가 펩타이드 농도가 증가함에도 불구하고 아무런 변화가 일어나지

않은 것으로 실험군과 대조군의 기작이 다름을 확인하였다.

<실시예 7> 형광현미경(CLSM: Confocal Laser-Scanning Microscopy)에 의한 펩타이드가 대장균(*E. coli*)의 막에 작용여부 확인

- 5 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 HPA3P2 펩타이드에 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine; TAMRA)을 실험군과 대조군의 C말단의 아민(amine)기에 부착하여 대장균(*E. coli*)에 미치는 작용기작을 형광현미경(CLSM: Confocal Laser-Scanning Microscopy)을 이용하여 확인하였다.
- 10 구체적으로, 실험군인 서열번호 4로 기재된 HPA3P2와 대조군인 서열번호 3으로 기재된 HPA3P의 C말단에 TAMRA를 부착 후 37 °C에서 24시간동안 LB 배지에서 배양된 대장균(*E. coli*)에 실험군과 대조군의 최소 억제 농도(MIC : minimum inhibitory concentration) 값에서 처리하여 상온에서 5분간 반응 시간을 유지 후 원심분리기 4,000 rpm으로 침전시킨 대장균을
- 15 생리식염수(PBS)로 3번 세척하였다. 형광 다이(dye)가 부착된 실험군과 대조군이 대장균에 작용하는 현상을 LSM 510 형광현미경으로 헬륨 네온 레이저(helium neon laser) 543 nm 파장을 사용하였으며, 이것을 이미징으로 작성하였다.

- 20 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 서열번호 3으로 기재된 HPA3P(도 3A)는 대장균의 막내부에 투과하여 대장균이 붉은빛을 강하게 발산하는 것을 확인하였으며, 서열번호 4로 기재된 HPA3P2(도 3B)는 대장균이 거의 없으며, 또한 형광을 거의 발산하지 않은 것으로 빠른시간에 대장균을 파괴시켜 세척 과정 중 작은 입자로 분리된 대장균이 세척되버린다는 것을 확인하였고, 또한 대조군과 실험군이 대장균에 작용시 미치는 영향력/기작이 다르다는 것을
- 25 확인하였다(도 3).

<제조예> 약학적 제제의 제조

<1-1> 산제의 제조

<실시예 1>의 펩타이드 2 g

유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

5

<1-2> 정제의 제조

<실시예 1>의 펩타이드 100 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

10

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐제의 제조

15

<실시예 1>의 펩타이드 100 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

20

<1-4> 환의 제조

<실시예 1>의 펩타이드 1 g

유당 1.5 g

25

글리세린 1 g

자일리톨 0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<1-5> 과립의 제조

<실시에 1>의 펩타이드	150 mg
대두 추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

<실시에 8> 생체 내(*in vivo*)에서 펩타이드에 의한 항 염증 효과 확인**<8-1> 마우스 사육**

ICR 마우스를 주식회사 샘타코 바이오 코리아에서 분양을 받아 받았다. 분양 받은 모든 마우스를 각각의 케이지에 그룹별로 나누어서 5일 동안 안정화를 시킨 후 본 실험에 들어갔다. 본 실험에서 모든 마우스는 12:12h로 dark-light 사이클을 유지 시켰으며, 사육장의 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 습도를 40-50%로 유지한 상태에서 사육을 하였다.

<8-2> 염증이 유도된 마우스에서 펩타이드에 의한 면역 반응 억제 측정 확인

염증이 유도된 마우스에서 펩타이드에 의한 면역 반응 억제를 측정하기 위하여, 하기와 같은 방법을 수행하였다.

구체적으로, ICR 마우스((주) 샘타코 바이오 코리아)에 염증을 유도하기 위하여, *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug-resistant *P. aeruginosa* 4007 cells, MDRPA, $6 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$) 균을 100ul 처리하였다. 처리 30분 후, 균이 감염된 상기 마우스에 서열번호 4 펩타이드를 0.25 및 0.5 mg/kg로 각각 처리하였다. 염증이 유도된 부위에 펩타이드를 처리한 마우스와 펩타이드만을 처리한 마우스 그리고 염증이 유도된 마우스의 조직을 각각 적출하여 생리식염수인 PBS를

이용하여 세척을 하였고, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 사용하여 상온에서 24시간 동안 조직을 고정시켰다. 고정시킨 모든 조직을 에탄올의 농도를 높여가며 조직의 수분을 탈수 시킨 다음(각각 2시간동안 반응), 3번에 xylene을 치환하여 각각 1시간 동안 반응을 하고 난 후 파라핀 블록을 제작 하였다. 제작된 파라핀 블록의 샘플은 마이크로톰(Microtome, Thermo-scientific)을 이용하여 4 μ m씩 섹션을 하고, 상온에서 수분을 완전히 제거시켰다. 조직에 Heamatoxyline & Eosin 염색과 조직에 면역조직화학 방법을 통해 조직의 변화와 항 염증 사이토카인(Cytokine)또는 TLR4 수용체 작용여부를 확인하기 위한 것으로, 섹션 해놓은 각각의 조직을 xyline에서 파라핀(paraffin)을 제거시켰다. 다음 단계로 조직의 수분을 완전히 제거 하기 위해 에탄올의 농도를 높여가면서 (반응시간 2분) 가수분해하였다. 가수분해된 조직에 Heamatoxylin & Eosin을 이용하여 염색을 시켰다. 또한, 각각의 조직에 5% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)으로 블록킹(blocking)을 하여 조직 사이의 빈 공간을 채워주며, 항염증 반응을 보이는 항체인 anti-TLR-4 mouse (ABfrontier, AB24192), anti-TNF- α , mono, mouse (ABfrontier, AB1793), anti-IL-1 β , poly, mouse (ABfrontier, AB1413)를 이용하여 조직에 부착하도록 상온에서 20분간 반응시켰다. 그런 다음, 조직이 떨어지지 않도록 TBST 완충제를 이용하여 나머지 액들을 제거 시켜주며, 녹색 형광이 부착되어있는 2차 항체(Got anti-mouse IgG (HRP) LF-SA5001-conjugated)를 부착시켰다. 상기 각각의 조직을 형광현미경을 이용하여 관찰/확인 한다 (Ix71, Olympus, Tokyo, Japan).

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 박테리아를 처리한 부분에서 면역세포가 밀집 되는 현상을 확인하였다. 이와 대조로 펩타이드를 처리한 곳에서는 농도가 증가함에 따라 염증 반응은 줄어드는 것을 확인 하였다(도 4).

<8-3> 염증이 유도된 마우스의 각 기관별 조직의 변화 확인

염증이 유도된 마우스 조직의 변화를 확인하기 위하여, 하기와 같은

방법을 수행하였다.

구체적으로, ICR 마우스에 염증을 유도하기 위하여 GFP가 라벨링된 대장균(E.Coli)을 감염 시키고 한 시간이 지난 후, 상기 염증이 유도된 마우스의 조직을 적출하여 표면을 절단하였다. 적출된 각각의 조직을 형광
5 현미경을 이용하여 관찰하였다(Ix71, 올림푸스, 도쿄, 일본).

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 항균 펩타이드를 0.25 mg/kg 및 0.5 mg/kg의 농도로 처리한 마우스 군에서 염증이 억제되는 것을 확인하였으며, 항균 펩타이드를 높은 농도(0.5 mg/kg)로 처리한 마우스 군의 조직에서 염증이 현저하게 줄어드는 것을 확인함으로써, 서열번호 4 항균 펩타이드에 의해
10 조직에 감염된 미생물에 대한 강한 항균활성을 보이므로 피부염 유발을 예방할 수 있음을 확인하였다(도 5).

<8-4> 염증이 유도된 마우스에서 항 염증 관련 단백질 증가여부 확인

염증이 유도된 마우스에서 항 염증 관련 단백질 증가 여부를 확인하기
15 위하여, 하기와 같은 방법을 수행하였다.

구체적으로, ICR 마우스에 *Pseudomonas aeruginosa* (multidrug-resistant *P.aeruginosa* 4007 cells, MDRPA, 6×10^7 cfu/ml)균을 이용하여 염증을 유도 시켰다. 염증이 유도된 상기 마우스에 각기 다른 농도의 서열번호 4 항균 펩타이드를 처리하여 조직을 적출한 후, 상기 조직의 단백질을 추출하였다.
20 그런 다음, 상기 추출된 단백질을 Bradford 방법으로 농도를 정량화 시키고, 전체 단백질을 SDS-PAGE 전기영동으로 15% 아크릴아마이드 겔에서 3시간 동안 수행하였다. 그런 다음, PVDF 멤브레인(Bio-Rad, USA)에서 전기영동 된 단백질을 90V로 1시간 동안 4℃에서 이동시킨 후 각각의 1차 항체를 5% 스킵 밀크(skim milk); 항- GAPDH(Santa Cruz Biotechnology, LF-PA0018), 항- TLR2,
25 모노(mono), 마우스(mouse)(ABfrontier, AB24192), 항--NF-κB, 폴리, 마우스(Santa Cruz Biotechnology, SC-71675), 항- TNF-α, 모노, 마우스(ABfrontier, AB1793), 항- IL-1β, 폴리, 마우스(ABfrontier, AB1413) 및 항- Cathelicidin, 폴리, 마우스(ABfrontier, AB93357), 4℃에서 1일 동안

부착을 시켰다. 1차 항체가 부착된 멤브레인(membrane)을 TBST 완충제를 이용하여 세척을 하였고, 다음으로 2차 항체(Goat anti-rabbit IgG (HRP) LF-SA5002 and Goat anti-mouse IgG (HRP) LF-SA5001-conjugated)를 1차 항체가 부착 되어있는 멤브레인에 상온에서 2시간 반응하여 부착을 하였다. 2차 항체까지 부착이 된 멤브레인을 TBST 완충제를 사용하여 부착되지 않은 이물질들을 완전히 제거 한 후 2차 항체에 부착되어있는 HRP 발색 작업(western blot detection kit, ABfrontier, LF-QC0103) 수행을 통해 항염증 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 염증이 유도된 마우스의 조직에서 신호전달 단백질(IL-6, TLR-4, NF-kB) 및 사이토카인(TNF- α , IL-1 β)이 과 발현하는 것을 확인하였고, 각각의 농도로 서열번호 4 항균 펩타이드를 처리한 마우스군의 조직에서 상기 펩타이드 처리 농도가 증가함에 따라 염증 관련 단백질이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 서열번호 4 항균 펩타이드가 항염증 억제에 강한 작용을 한다는 것을 확인하였다(도 6).

【산업상 이용가능성】

상술한 바와 같이, 본 발명은 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항생 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물은 탁월한 항균활성을 나타내고 용혈작용 및 세포독성이 없으므로 인체에 안전한 항생제로 유용하게 사용될 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드.

5. 【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열에서 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환된 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

10. 【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 4】

15 제 3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 5】

20 제 3항에 있어서, 상기 그람 음성균 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 6】

25 제 3항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 그람 양성균인 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 그람 음성균인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 7】

서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

5 **【청구항 8】**

제 7항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열에서 12번째 아미노산인 페닐알라닌을 프롤린으로 치환된 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

10

【청구항 9】

제 7항에 있어서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

15

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 바실리우스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용
20 약학적 조성물.

【청구항 11】

제 9항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는
25 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

【청구항 12】

제 9항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 그람 양성균인 스타필로코쿠스

아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 그람 음성균인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

5 **【청구항 13】**

서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 것을 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제.

【청구항 14】

10 약학적으로 유효한 양의 제 1항의 항균 펩타이드 또는 제 7항의 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체내 항균 방법.

【청구항 15】

15 약학적으로 유효한 양의 제 1항의 항균 펩타이드 또는 제 7항의 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방 또는 치료 방법.

【청구항 16】

20 제 15항에 있어서, 상기 병원성 세균은 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방 또는 치료 방법.

【청구항 17】

25 항균제로 사용하기 위한 제 1항의 펩타이드.

【청구항 18】

항균용 건강식품으로 사용하기 위한 제 1항의 펩타이드.

【청구항 19】

제 1항의 펩타이드를 항균제의 제조에 이용하는 용도.

【청구항 20】

5 제 1항의 펩타이드를 항균용 건강식품의 제조에 이용하는 용도.

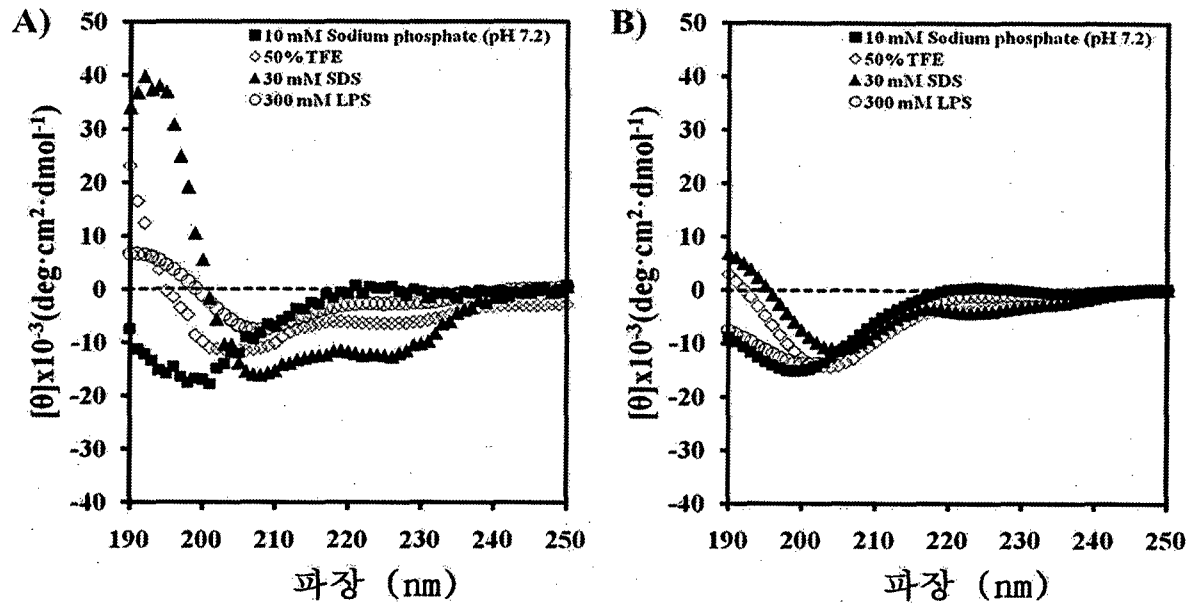
10

15

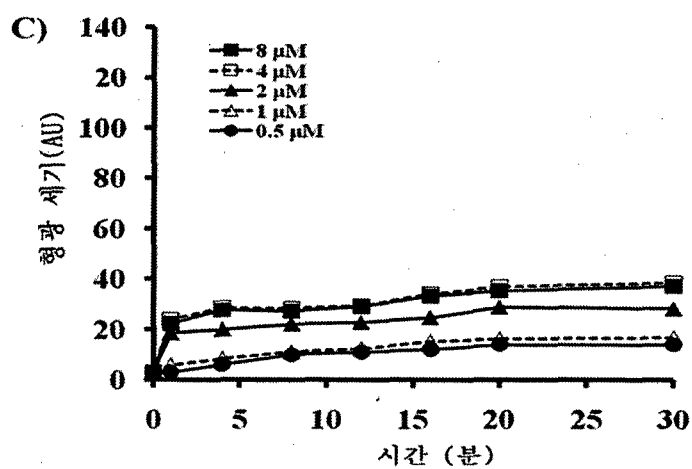
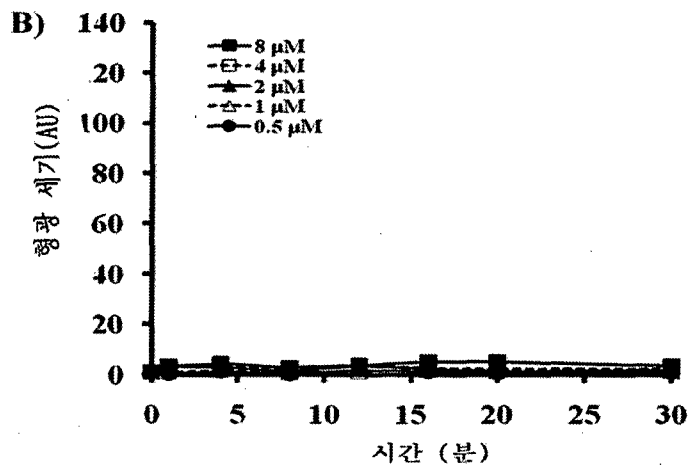
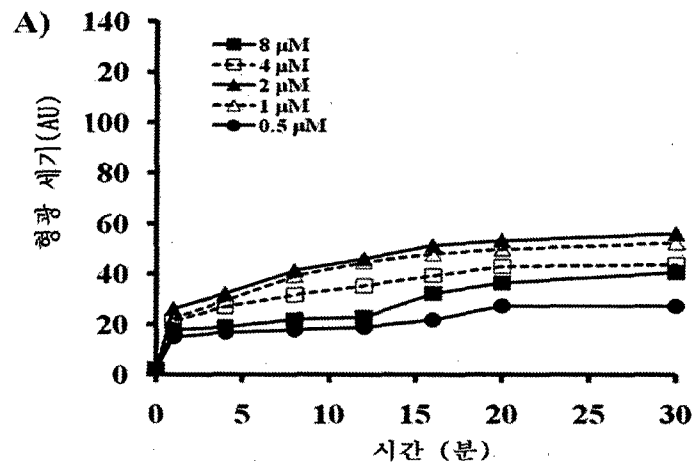
20

25

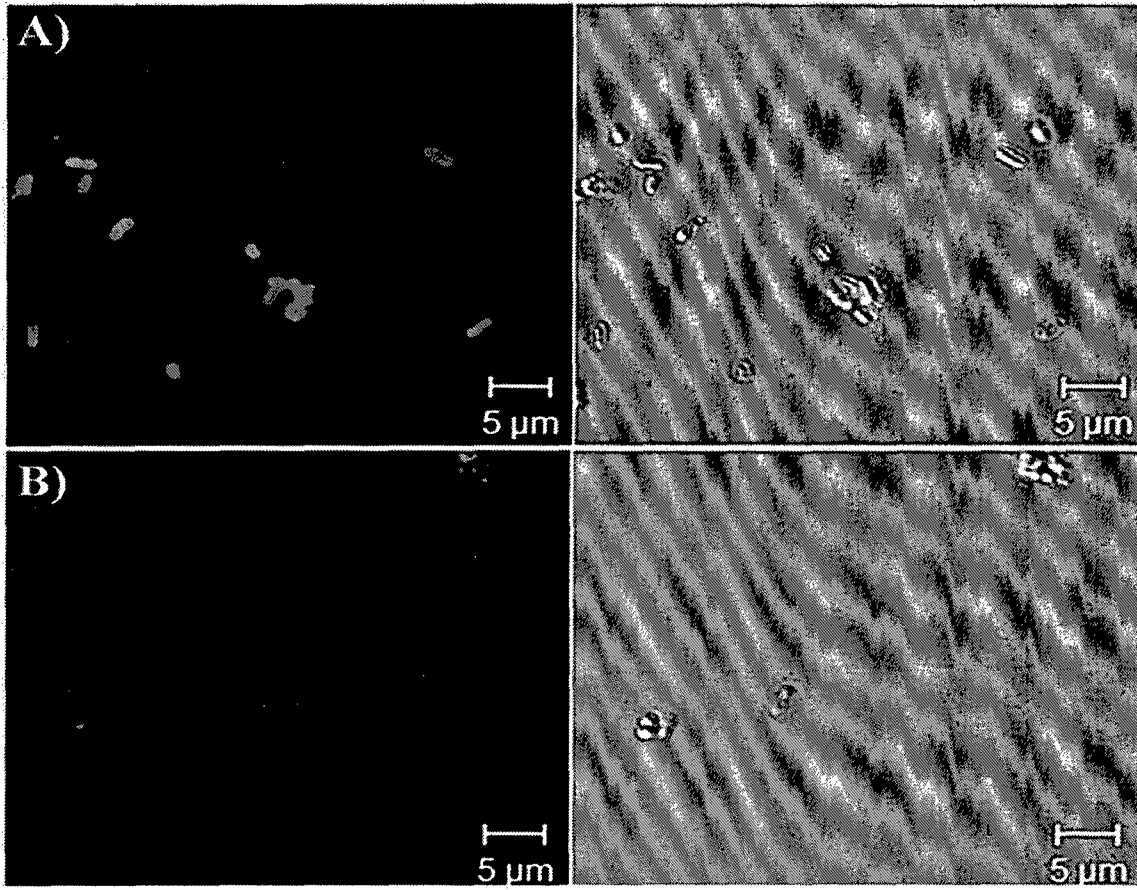
1/6
[도 1]



2/6
[도 2]

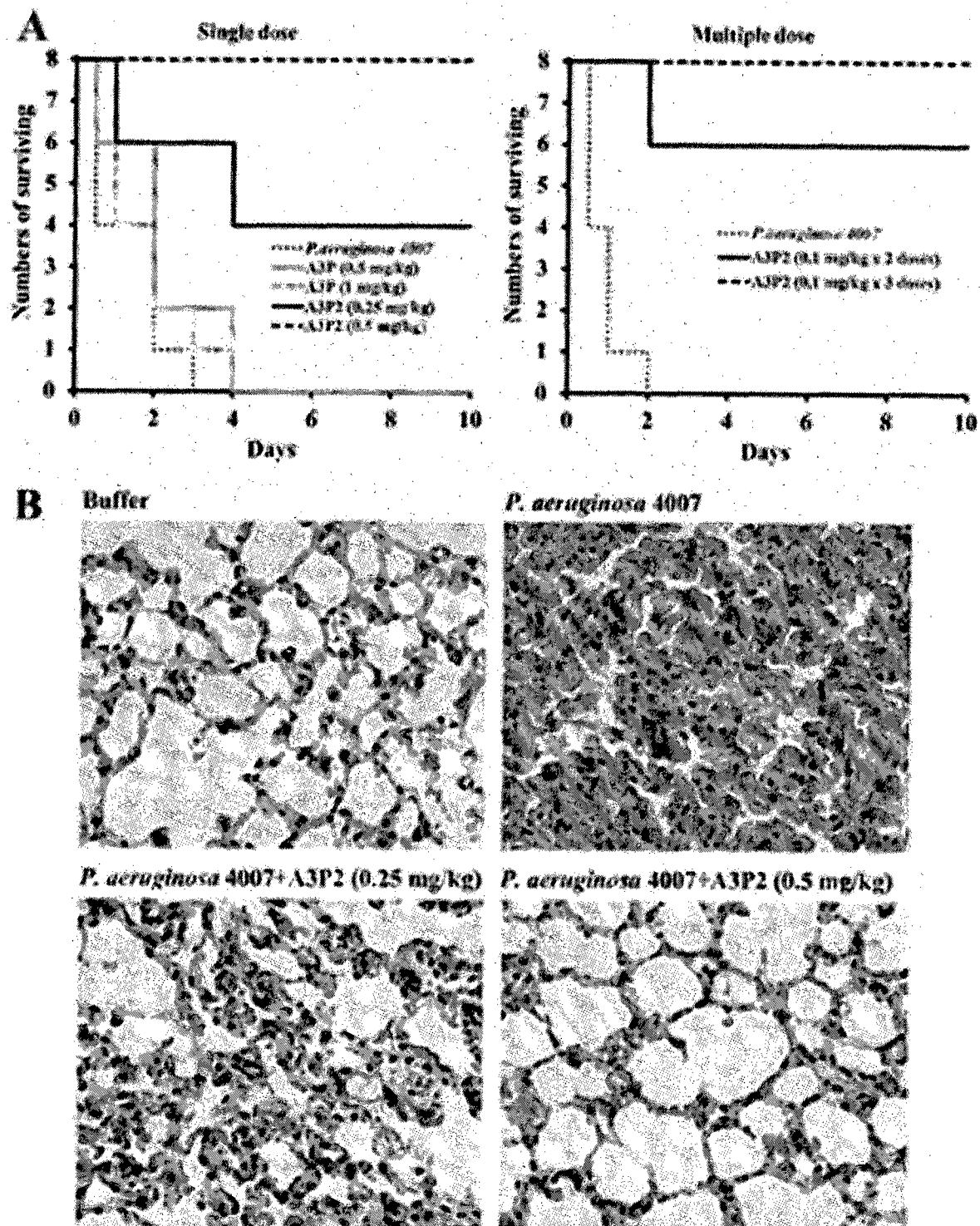


3/6
[도 3]

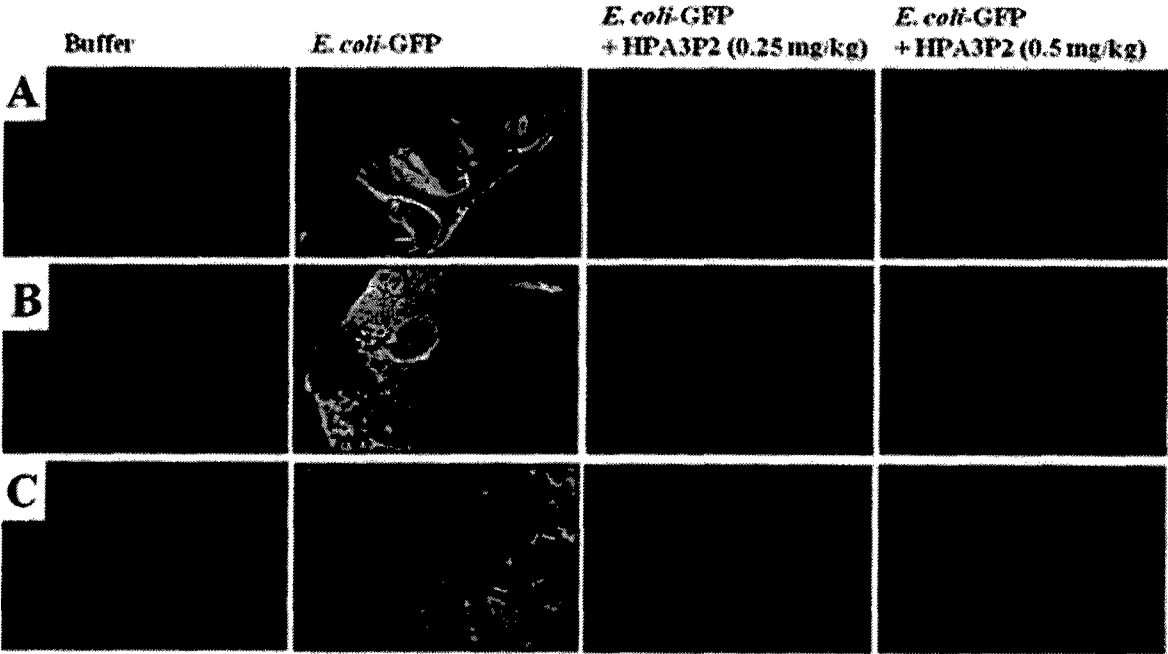


4/6

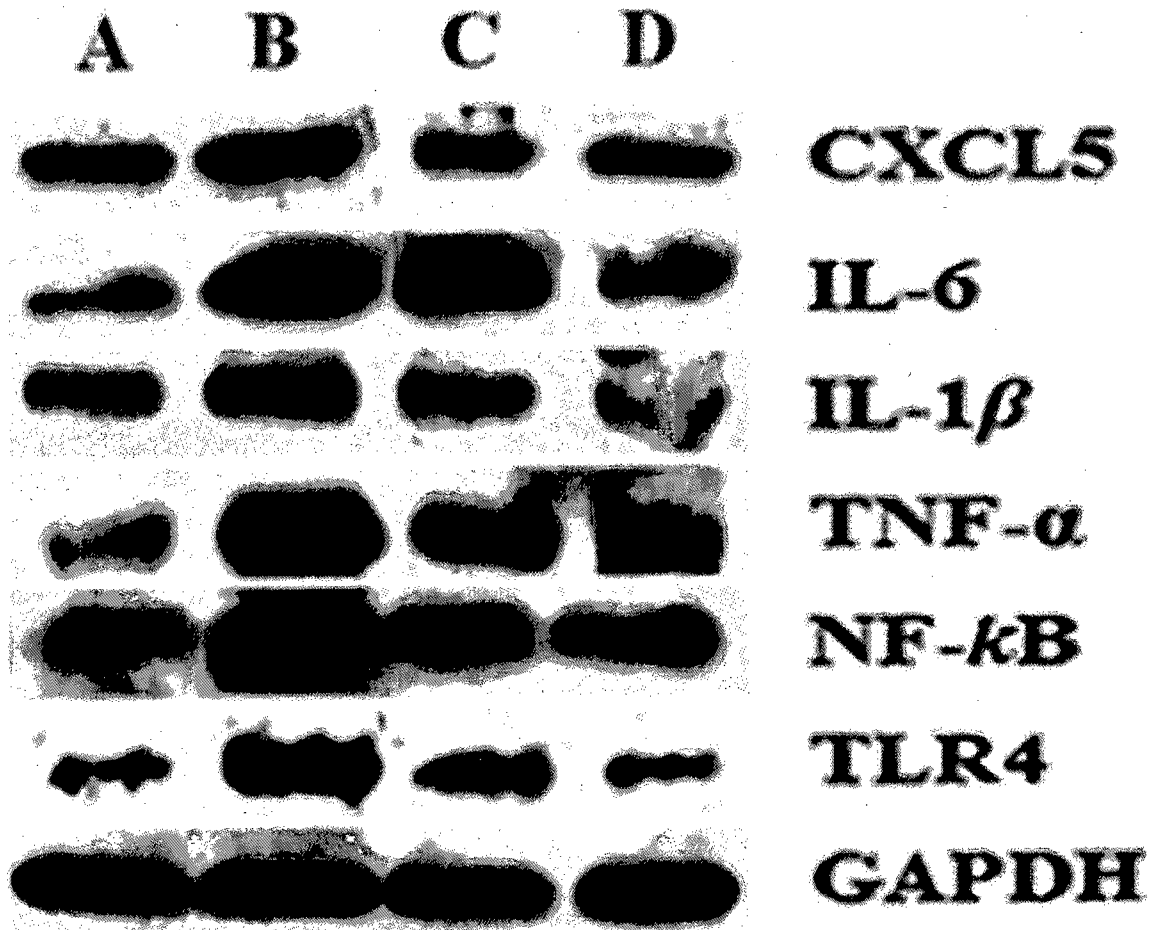
[도 4]



5/6
[도 5]



6/6
[도 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/000043**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 7/08(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, A61P 31/04(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; C07K 4/00; C07K 7/00; A61K 39/00; A61K 38/10; A61P 31/04

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: helicobacter pylori ribosomal protein L1, antibiotic peptides, HP(2-20), phenylalanine, proline, substitution

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2009-0002435 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) 09 January 2009 See abstract and claims 1-11; paragraphs [0034]-[0036], [0055]-[0059]; and tables 1-2.	1-13,17-20
X	LEE, TZONG-HSIEN et al., "The membrane insertion of helical antimicrobial peptides from the N-terminus of Helicobacter pylori ribosomal protein L1", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2010, vol. 1798, no. 3, pages 545-557 See abstract and table 1.	1-13,17-20
A	LEE, KWANG H. et al., "Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2-20) and its analogues derived from Helicobacter pylori", Biochemical Journal, 2006, vol. 394, pages 105-114 See abstract and tables 1-2.	1-13,17-20
A	NCBI, PDB accession no. 1P0O_A (10 October 2012) See the entire document.	1-13,17-20
A	US 7658928 B2 (FRITZ, JRG et al.) 09 February 2010 See the entire document.	1-13,17-20



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

25 APRIL 2014 (25.04.2014)

Date of mailing of the international search report

25 APRIL 2014 (25.04.2014)

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/KR2014/000043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LEE, JONG-KOOK et al., "A helix-PXXP-helix peptide with antibacterial activity without cytotoxicity against MDRPA-infected mice", Biomaterials, Epub. 28 October 2013, vol. 35, no. 3, pages 1025-1039 See abstract; pages 1027-1028; and tables 1-2.	1-13,17-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/000043

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14-16 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

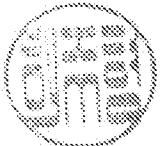
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/000043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0002435 A	09/01/2009	KR 10-0935029 B1	06/01/2010
US 7658928 B2	09/02/2010	AU 2001-89813 A1	25/02/2002
		CA 2418854 A1	21/02/2002
		EP 1309345 A2	14/05/2003
		JP 2004-506019 A	26/02/2004
		US 2004-0170642 A1	02/09/2004
		US 2008-0166368 A1	10/07/2008
		WO 02-13857 A2	21/02/2002
		WO 02-13857 A3	11/07/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 7/08(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 7/08; C07K 4/00; C07K 7/00; A61K 39/00; A61K 38/10; A61P 31/04 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: 헬리코박터 파일로리 리보솜 단백질 L1, 항생펩타이드, HP(2-20), 페닐알라닌, 프롤린, 치환		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2009-0002435 A (조선대학교산학협력단) 2009.01.09. 요약 및 청구항 제1항-제11항; 문단 [0034]-[0036], [0055]-[0059]; 및 표 1-2 참조.	1-13, 17-20
X	LEE, TZONG-HSIEN 외 7명, `The membrane insertion of helical antimicrobial peptides from the N-terminus of Helicobacter pylori ribosomal protein L1`, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2010, 1798권, 3호, 페이지 545-557 요약 및 테이블 1 참조.	1-13, 17-20
A	LEE, KWANG H. 외 6명, `Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2-20) and its analogues derived from Helicobacter pylori`, Biochemical Journal, 2006, 394권, 페이지 105-114 요약 및 테이블 1-2 참조.	1-13, 17-20
A	NCBI, PDB accession no. 1P00_A (2012.10.10.) 전체 문서 참조.	1-13, 17-20
A	US 7658928 B2 (FRITZ, JRG 외 4명) 2010.02.09. 전체 문서 참조.	1-13, 17-20
☒ 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 특허문헌 “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 04월 25일 (25.04.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 04월 25일 (25.04.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	LEE, JONG-KOOK 외 3명, `A helix-PXXP-helix peptide with antibacterial activity without cytotoxicity against MDRPA-infected mice`, Biomaterials, Epub. 2013.10.28., 35권, 3호, 페이지 1025-1039 요약; 페이지 1027-1028; 및 테이블 1-2 참조.	1-13, 17-20

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☐ 출원시 국제출원에 포함

☒ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 14-16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제14항 내지 제16항은 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대
상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0002435 A	2009/01/09	KR 10-0935029 B1	2010/01/06
US 7658928 B2	2010/02/09	AU 2001-89813 A1	2002/02/25
		CA 2418854 A1	2002/02/21
		EP 1309345 A2	2003/05/14
		JP 2004-506019 A	2004/02/26
		US 2004-0170642 A1	2004/09/02
		US 2008-0166368 A1	2008/07/10
		WO 02-13857 A2	2002/02/21
		WO 02-13857 A3	2002/07/11