



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0080172
(43) 공개일자 2013년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0000952
(22) 출원일자 2012년01월04일
심사청구일자 2012년01월04일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
박윤경
전라남도 장성군 남면 마흥길 45
(74) 대리인
이원희

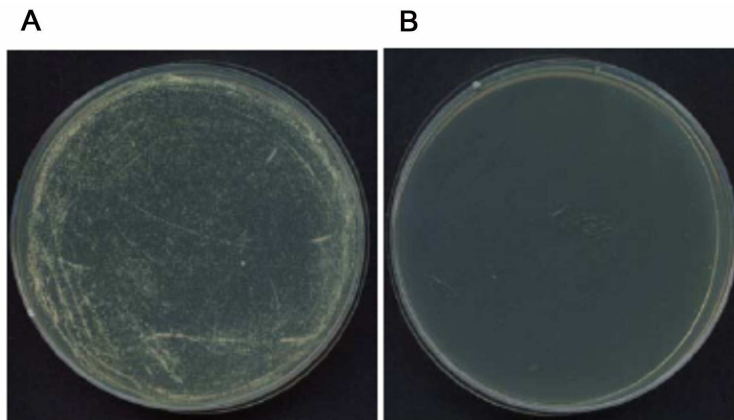
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 감자로부터 분리한 신규한 항진균 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이(Potide-J)는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성이 뛰어나며, 세포 독성을 나타내지 않으므로 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 화장품 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027603

부처명 교육과학기술부

연구사업명 지역인력양성사업

연구과제명 천연자연으로부터 여드름유발 세균에 작용하는 천연 항생펩타이드 개발 및 산업화

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항진균 펩타이드는 분자량이 1.0831 kDa인 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항진균 펩타이드는 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermedia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항진균 펩타이드.

청구항 5

1) 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)의 구근을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;
2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;
3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및
4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 제 1항에 기재된 펩타이드의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 단계 2)의 완충용액은 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 0.1% β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제 1항에 기재된 펩타이드의 제조방법.

청구항 7

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균

용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermedia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장품 조성물.

청구항 11

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약.

청구항 12

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 신규한 항진균 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 농약, 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 등의 기능성 향생제란 넓은 의미에 있어서 농작물에서 농약으로써의 기능, 식품이나 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 포함되며 좁은 의미로는 세균, 곰팡이, 효모등 미생물의 증식을 억제하여 농약, 식품 및 의약품에서 부패 미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 것이다. 이러한 농약, 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 등의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

[0003] 식물이나 동물들은 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산한다(Bevins *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 59, 395-414, 1990). 상기 펩타이드 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어지는데, 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -시트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -회전형(helical) 양친화성 분자이며, 세 번째는 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). 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많이 존재하는 것은 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이며, 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)이 이러한 구조를 갖는다.

[0004] 천연항균제란 천연 자원이나 미생물 자원으로부터 선택성이나 생화학적, 생리학적인 차이를 극대화하여 바이러스, 세균, 효모, 곰팡이 등을 선택적으로 제어하나 인체에는 무해하게 또는 독성을 최소화한 항균제를 말한다. 현재 보고된 천연항균제로는 편백나무에서 회노키티올, 목련에서 메그노놀, 자몽종자 추출물인 DF-100등이 개발되어 있으나 현재 그 사용되는 규모는 매우 미미하다. 현재 천연허브추출물은 세포 증식 기작을 억제하여 미생물

에 대한 살균 효과가 크다고 알려져 있으며 식물성 천연 살균 소독제로서 독성이 없고, 부식성이 없으며 인체에 전혀 무해한 안전한 천연 항균제로 보고되어 있다. 하지만 현재 천연 항균제로 이용되고 있는 식물체들은 그 재배 규모가 작거나, 국내에서 많이 재배되고 있지 않으며, 재배방법이 어려운 것들이어서 원료 수급이 원활하지 못하기 때문에 쉽게 이용되지 못하고 있다. 하지만 감자는 재배지역이 넓으며, 그 수량 또한 많기 때문에 재료 확보가 용이하며 원료 단가를 낮출 수 있다. 감자껍질을 말려서 가루로 만든 뒤 화장실이나 습기가 많은 곳에 뿌려 두면 벌레가 생기지 않으며, 더운물에 데었을 때 감자를 갈거나 얇게 썰어 환부에 붙여주면 흉터가 생기지 않고 잘 낫는 등 민간요법으로 이미 감자는 천연 항균제로써의 역할을 수행하고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 단백질을 추출하고 펩타이드를 분리 및 정제하여 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성이 있는 포타이드-제이(Potide-J)를 수득하였고, 상기 포타이드-제이에 대하여 사람의 적혈구에서 용혈 활성을 측정한 결과 세포 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하여 천연 항진균제로서의 기능을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항진균 펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항진균 펩타이드를 이용한 항진균 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은

[0011] 1) 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)의 구근을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;

[0012] 2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;

[0013] 3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및

[0014] 4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 상기 항진균 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 항진균 펩타이드를 유효성분으로 하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 상기 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이(Potide-J)는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성이 뛰어나며, 세포 독성을 나타내지 않음을 확인함으로써, 이를 이용한 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품

방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 항생제 기능성 펩타이드인 포타이드-제이(Potide-J)를 분리 및 정제하는 일련의 단계 과정을 도식화해 보여주는 도이다.
- 도 2는 에이에프피-제이(AFP-J)의 단백질을 전기영동한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 포타이드-제이(Potide-J)를 얻기 위해 추출해낸 단백질을 HCl에 녹여 이황화결합이 풀어진 펩타이드를 분리해 얻는 것을 보여주는 도이다.
- 도 4a는 HCl에 의해 소화된 정제 펩타이드의 항생활성을 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 세포를 이용하여 측정한 것을 나타낸 도이다.
- 도 4b는 포타이드-제이(Potide-J)의 항생활성을 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 세포를 이용하여 측정한 것을 나타낸 도이다.
- 도 5는 합성된 포타이드-제이(Potide-J)의 항생활성을 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 세포를 이용하여 측정해 보여주는 도이다.
- A: 포타이드-제이(Potide-J)가 처리되지 않은 캔디다 알비칸스; 및
- B: 포타이드-제이(Potide-J)를 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 캔디다 알비칸스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 제공한다.
- [0023] 상기 감자는 구체적으로 재배한 것, 시판되는 것 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 항진균 펩타이드는 구체적으로 분자량이 1.0831 kDa이고, 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 가지며, 보다 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테누레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermedia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, 가장 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)이나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 상기 항진균 펩타이드는 구체적으로 세포독성을 나타내지 않으며 10-머(mer)의 아미노산 크기로 구성되어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명자들은 항생 활성을 가지는 펩타이드를 제조하기 위하여, 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 단백질을 추출하여 고속단백질액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)를 이용하여 에이에프피-제이(AFP-J)를 수득하였고(도 1 참조), 이를 SDS-PAGE를 이용하여 분리하여 15 kDa의 특정 단백질을 포함하는 것을 확인하였다(도 2 참조). 또한, 상기 에이에프피-제이를 C18 역상(Reverse Phase, RP)-고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 펩타이드를 분리 및 정제하여(도 3 참조), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성이 있는 포타이드-제이(Potide-J)를 수득하였다(도 4a 및 도 4b 참조).
- [0027] 또한, 본 발명자들은 포타이드-제이의 아미노산 서열 및 분자량을 확인하기 위하여, 아미노산 분석기 및 MALDI-MS(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry)를 이용하여 확인한 결과, 상기 포타이드-제이는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되어 있으며 분자량은 1.0831 kDa임을 확인하였다.
- [0028] 또한, 본 발명자들은 포타이드-제이가 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여, 상기 포타이드-제이의 적혈구 파괴능을 조사한 결과 상기 포타이드-제이는 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(표 1 참조).

- [0029] 아울러, 본 발명자들은 합성된 펩타이드의 항진균 활성을 알아보기 위하여, Fmoc(N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl)-protected 아미노산을 이용해 고체상 방법으로 펩타이드를 합성하였고, 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 알아본 결과, 선형 펩타이드인 포타이드-제이만이 항진균 활성을 갖는 것을 확인하였다(도 5 참조).
- [0030] 그러므로 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포 독성을 나타내지 않으므로 인체에 안전한 항균제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은
- [0032] 1) 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)의 구근을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;
- [0033] 2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;
- [0034] 3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및
- [0035] 4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 상기 항진균 펩타이드의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 감자는 구체적으로 재배한 것, 시판되는 것 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0037] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 완충용액은 구체적으로 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% 디메틸 술폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 0.1% β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol)로 이루어지는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 크로마토그래피는 구체적으로 고속단백질액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) 또는 역상(Reverse Phase, RP)-고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)이고, 보다 구체적으로 고속단백질액체 크로마토그래피에 의하여 분리하고, C18 역상-고성능 액체 크로마토그래피에 의하여 정제하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 방법에 있어서 단계 4)의 항진균 펩타이드는 구체적으로 분자량이 1.0831 kDa이고, 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 가지며, 보다 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermedia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, 가장 구체적으로 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)이나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 상기 항진균 펩타이드는 구체적으로 세포독성을 나타내지 않으며 10-머(mer)의 아미노산 크기로 구성되어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 본 발명은 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 약학적 조성물은 구체적으로 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이고, 보다 구체적으로 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 카테뉴레이트(*C. catenulate*), 캔디다 인터미디아(*C. intermedia*), 캔디다 루고사(*C. rugosa*), 캔디다 글라브라타(*C. glabrata*) 및 캔디다 멜리비오시카(*C. melibiosica*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이고, 가장 구체적으로 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 갖는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포 독성을 나타내지 않으므로 항진균용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 신규한 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

- [0045] 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, 동결건조제, 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 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 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [0047] 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.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규한 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.
- [0049] 또한, 본 발명은 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포 독성을 나타내지 않으므로 항진균용 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0051]
- [0052] 본 발명의 화장품 조성물은 유효성분으로 상기 신규한 펩타이드 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0053] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 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.
- [0054] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 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.
- [0055] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0056] 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, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

- [0057] 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.
- [0058] 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.
- [0059] 또한, 본 발명은 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포 독성을 나타내지 않으므로 무독성 농약으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명은 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제를 제공한다.
- [0062] 본 발명의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Jopung)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 항진균 펩타이드인 포타이드-제이는 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대하여 항진균 활성을 가질 뿐만 아니라 세포 독성을 나타내지 않으므로 의약품, 화장품, 식품 또는 사료 보존용 방부제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0063] 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 식품이나 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 식품의 방부제 및 화장품, 의약품 보존제의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다. 농작물의 병충해를 박멸하기 위한 농약 역시 해로운 미생물의 증식을 억제하고 인체에 무해하여야 사람이 농약을 살포한 농작물을 안전하게 섭취할 수 있다.
- [0064] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0065] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용을 한정하는 것은 아니다.
- [0066] <실시예 1> 감자로부터 단백질 추출
- [0067] 감자의 구근을 이용하여 단백질을 추출하기 위해 Ana Segura 등의 방법(Ana Segura et al, 1999) 및 Quang Khai Huynh 등의 방법(Quang Khai Huynh et al, 1992)을 변형하여 수행하였다. 감자의 구근을 액체질소(Liquid nitrogen)가 첨가된 상태에서 막자사발(Mortar) 및 절구공이(Pestle)를 이용하여 분말로 분쇄한 후, 단백질 추출 완충용액(protein extraction buffer)(50 mM Tris-HCl pH 7.5), 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% 디메틸 술폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 0.1% β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol)과 함께 단백질을 추출하였다.
- [0068] <실시예 2> 펩타이드의 분리
- [0069] 상기 <실시예 1>의 단백질 추출물을 6,000 × g에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액은 세파크릴(Sephacryl)

S-100 컬럼(column)(2.5 × 95 cm)을 이용한 크로마토그래피를 이용해 50 mM 탄산수소 암모늄 완충용액(ammonium bicarbonate buffer)(pH 8.0)에서 항진균 활성이 없는 비흡착 분획(fraction)(분획 I 및 분획 II) 및 활성이 있는 흡착 분획(분획 III)으로 분리하였으며, 항진균 활성을 보인 분획 III를 슈퍼덱스 200 프랩 그레이드(Superdex 200 prep grade) 컬럼을 이용한 고속단백질액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)로 분리하였다.

[0070] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 큰 흡착 피크(peak)를 에이에프피-제이(AFP-J)라 명명하였다(도 1).

[0071] <실시예 3> 펩타이드의 분리 확인

[0072] 상기 <실시예 2>의 에이에프피-제이(AFP-J) 분리를 확인하기 위하여 도데실 황산 나트륨 폴리아크릴아마이드 전기영동(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)을 Laemmli(Laemmli et al. 1972)의 방법에 따라 평면 젤(slab gel)을 이용하여 수행하였으며, 시료 및 표준단백질을 15% 아크릴 아마이드 젤(acrylamide gel)에 로딩(loading)하였다. 전기영동 후, 젤(gel)을 쿠마시 브릴러언트 블루(coomassie brilliant blue) R-250으로 염색하고, 탈색 완충용액(destaining buffer)(MeOH: 빙초산(glacial acetic acid): 증류수(distilled water) = 30: 10: 60)으로 탈색하여 단백질의 밴드(band)를 확인하였다. 분자량 표준 단백질로는 저 분자량 범위(Low Molecular Weight Range)인 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin)(66 kDa), 달걀 난백알부민(Chicken Egg Ovalbumin)(45 kDa), 토끼 근육 GAPDH(Rabbit Muscle GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase))(36 kDa), 소 적혈구 탄산 탈수효소(Bovine Erythrocytes Carbonic Anhydrase)(29 kDa), 소 췌장 트립시노젠(Bovine Pancreas Trypsinogen)(24 kDa), 콩 트립신 저해제(Soybean Trypsin Inhibitor)(20 kDa), 소 젖 a-락트알부민(Bovine Milk a-Lactalbumin)(14.2 kDa), 소 폐 아프로티닌(Bovine Lung Aprotinin)(6.5 kDa)을 이용하여 단백질의 분자량을 확인하였다.

[0073] 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 에이에프피-제이(AFP-J)는 분자량 15kDa인 특정 단백질을 포함한다는 것을 확인하였다(도 2).

[0074] <실시예 4> 펩타이드의 정제

[0075] 상기 <실시예 2>의 에이에프피-제이(AFP-J)를 HCl에 녹이고 60℃에서 24시간 처리를 하였다. 그 후 반응을 종결시키기 위해 로딩 완충용액을 넣어주고 모든 샘플을 Shim-pack VP-ODS, C18 컬럼(4.6 × 250 mm; 4.6 ± 0.3 μm 입자(particle); 12.0 ± 1.0 nm 구멍(pore); Shimadzu) 역상(Reverse Phase, RP)-고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 정제하였다. 그리고 완충용액(0.1% TFA가 포함된 아세토니트릴(Acetonitrile)의 B)의 선형 구배(linear gradient)(40% 내지 80%, 1%/min) (Lee et al., 1999)에 의해 용출하였다.

[0076] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 세 개의 피크(peak)(①, ② 및 ③)로 나뉜 것을 확인하였다(도 3).

[0077] <실시예 5> 포타이드-제이(Potide-J)의 항진균 활성 측정

[0078] 상기 <실시예 4>의 피크(peak) 분획(fraction)을 모아 균주로는 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 사용하여 항진균 활성을 측정하였다. 진균수는 한천-홀(Agar-hole)에 각 웰당 2×10^3 세포가 되도록 희석하여 진균을 분주한 후, 음성대조군에는 캔디다 알비칸스만을 분주하고 실험군인 다른 홀에는 포타이드-제이를 같이 접종하여 28℃ 배양기에서 24시간 배양하였다.

[0079] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에서 보는 바와 같이 ① 및 ③ 피크는 항진균 활성을 보이지 않았으나, ② 피크는 4시간 뒤부터 곰팡이 세포의 응집을 막았으며, 24시간 뒤에는 곰팡이 세포의 응집이 매우 강하게 억제되는 것을 확인하였다(도 4a 및 도 4b). 따라서, 상기 ② 피크를 포타이드-제이(Potide-J)라 명명하였다.

[0080] <실시예 6> 포타이드-제이(Potide-J)의 아미노산 서열 및 분자량 확인

[0081] 감자의 구근으로부터 유래하는 항균활성을 갖는 포타이드-제이를 6N-HCl에 녹인 후 22시간 110℃에서 가수분해하여 건조시킨 후 아미노산 분석기(amino acid analyzer)로 아미노산 서열을 확인하고 MALDI-MS(Matrix

Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry)(Kratos Analytical Ins)로 분자량을 확인하였다.

[0082] 그 결과, 서열번호 1에서 보는 바와 같이 포타이드-제이의 N-아미노 말단 서열은 NH₂-Ala-Val-Cys-Glu-Asn-Asp-Leu-Asn-Cys-Cys이고, 분자량은 1.0831 kDa임을 확인하였다(서열번호 1).

[0083] <실시예 7> 포타이드-제이(Potide-J)의 세포 독성 측정

[0084] 포타이드-제이(Potide-J)가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 상기 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다. 사람의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고 여기에 200 μM/웰(well)로부터 1/2의 농도로 상기 펩타이드를 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1,000 g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈의 양을, 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤 X-100을 사람의 적혈구 세포에 첨가하여 그 상등액의 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 상기 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

수학적 식 1

$$\% \text{ 적혈구 파괴능(hemolysis)} = \left(\frac{\text{흡광도 A} - \text{흡광도 B}}{\text{흡광도 C} - \text{흡광도 B}} \right) \times 100$$

[0086] 상기 식에서, 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.

[0087] 그 결과, 표 1에서 보는 바와 같이 적혈구 세포들이 파괴되지 않았으므로 포타이드-제이(Potide-J)는 세포 독성을 나타내지 않았음을 확인하였다(표 1).

[0088]

표 1

[0089] 세포 독성 연구 결과

펩타이드 (Peptide)	% 적혈구 파괴능(Hemolysis)							
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31
포타이드-제이(Potide-J)	0	0	0	0	0	0	0	0
멜리틴(Melittin)	100	100	100	95	73	36	19	0

[0090] (멜리틴(Melittin)은 세포 독성이 강한 것으로 알려진 항생 펩타이드이며, 이를 대조군으로 실험하였음.)

[0091] <실시예 7> 포타이드-제이(Potide-J)의 합성 및 합성된 포타이드-제이의 항진균 활성 측정

[0092] Fmoc(N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl)-protected 아미노산을 이용해 고체상 방법으로 선형 펩타이드, 3번과 9번 Cys 사이 이황화결합을 가지는 펩타이드 및 3번과 10번 Cys 사이 이황화결합을 가지는 펩타이드, 이렇게 총 세 가지 합성 펩타이드를 만들었다. 생성된 펩타이드를 Waters 15-μm Deltapak C18 컬럼(19 × 300 mm)을 이용한 역상(Reverse Phase, RP)-고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 분리하였다. 완충용액(0.1% TFA가 포함된 아세토니트릴(Acetonitrile)의 B)의 선형 구배(linear gradient)(0% 내지 60%)에 의해 용출한 후 Vydac C18 컬럼(4.6 × 250 mm, 300 Å, 5 nm)을 이용한 역상-고성능 액체 크로마토그래피로 순도를 알아내고 MALDI-MS(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry)로 분자량을 확인하였다. 항생 활성은 평판배지에 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 및 포타이드-제이를 도말하여 측정하였다.

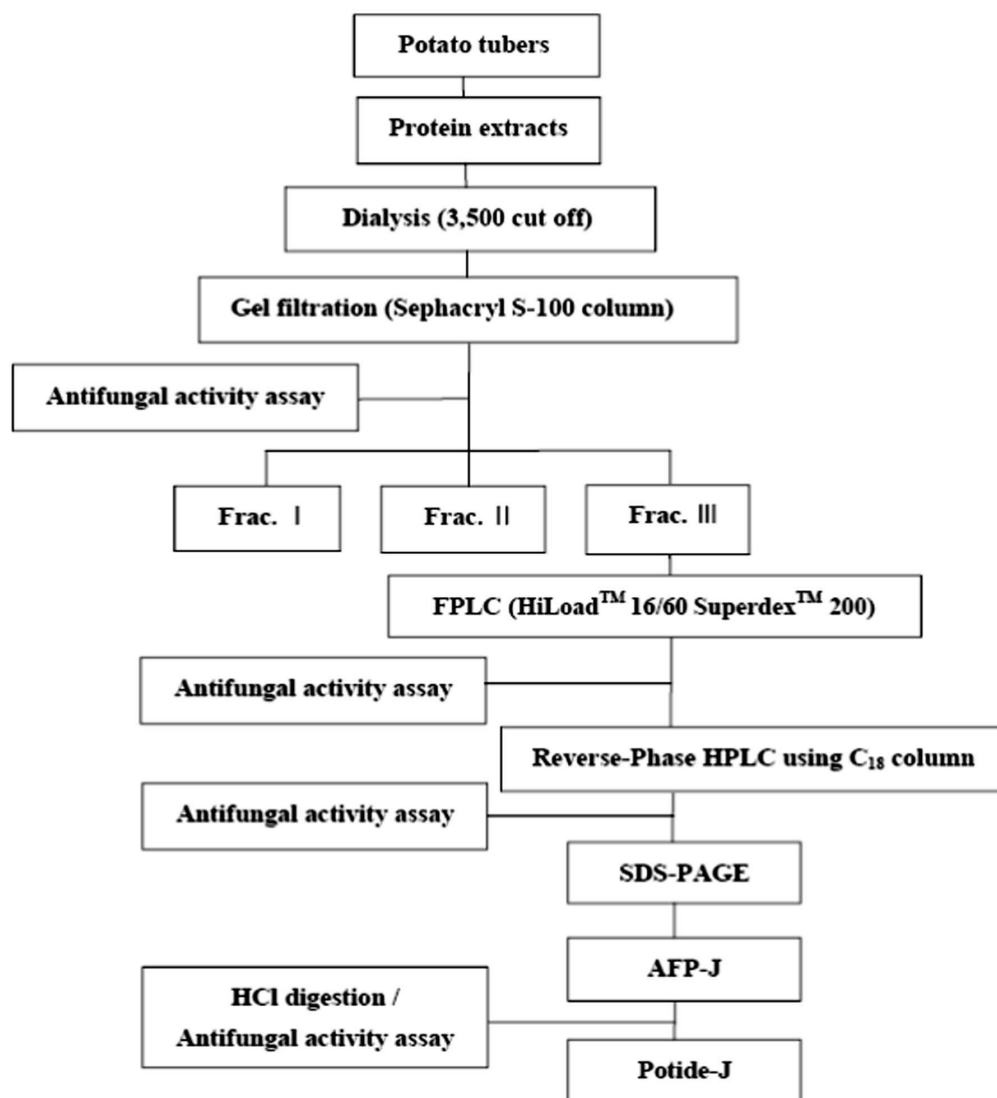
- [0093] 그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 선형 펩타이드인 포타이드-제이만이 캔디다 알비칸스의 성장을 억제하여 항진균 활성을 나타낸 것을 확인하였다(도 5)
- [0094] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.
- [0095] <제조예 1> 약학적 제제의 제조
- [0096] <1-1> 산제의 제조
- [0097] 본 발명의 펩타이드 2g
- [0098] 유당 1g
- [0099] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0100] <1-2> 정제의 제조
- [0101] 본 발명의 펩타이드 100mg
- [0102] 옥수수전분 100mg
- [0103] 유 당 100mg
- [0104] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0106] <1-3> 캡슐제의 제조
- [0107] 본 발명의 펩타이드 100mg
- [0108] 옥수수전분 100mg
- [0109] 유 당 100mg
- [0110] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0111] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0112] <1-4> 환의 제조
- [0113] 본 발명의 펩타이드 1 g
- [0114] 유당 1.5 g
- [0115] 글리세린 1 g
- [0116] 자일리톨 0.5 g
- [0117] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0118] <1-5> 과립의 제조
- [0119] 본 발명의 펩타이드 150 mg
- [0120] 대두 추출물 50 mg
- [0121] 포도당 200 mg

[0122] 전분 600 mg

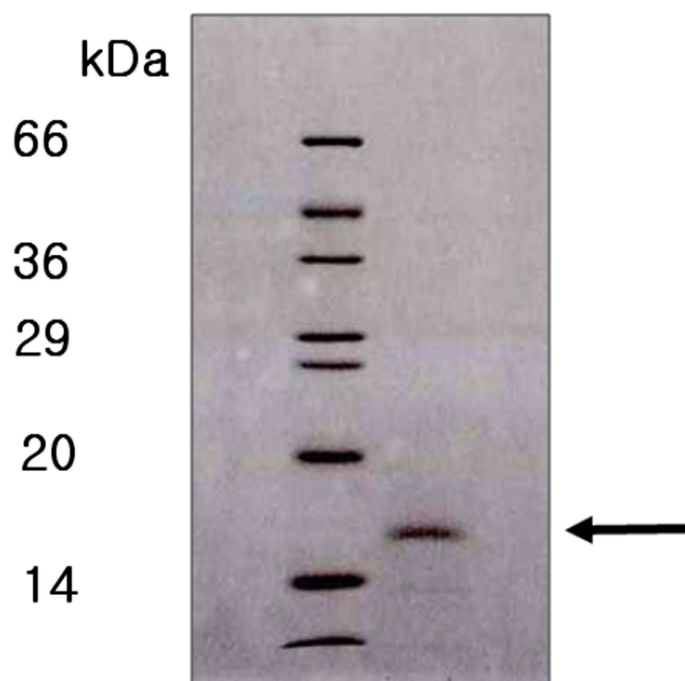
[0123] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

도면

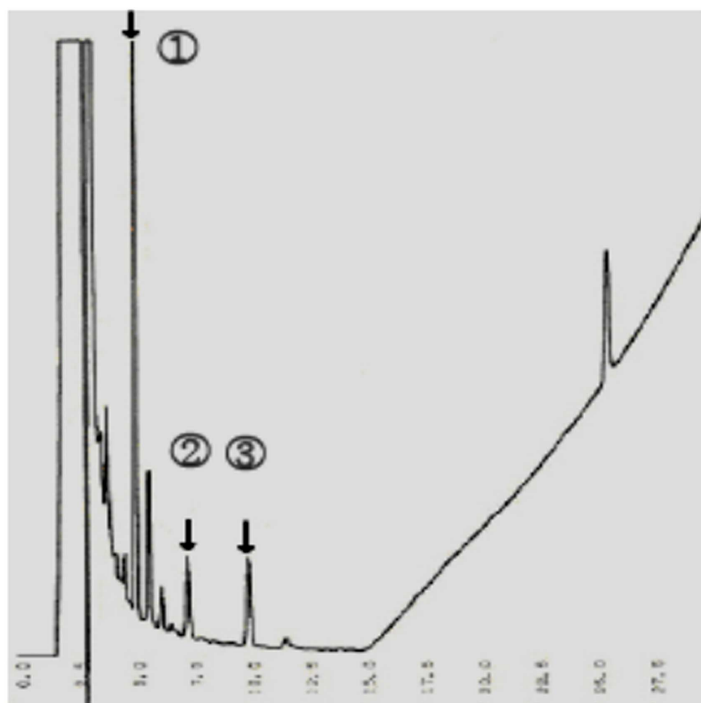
도면1



도면2



도면3

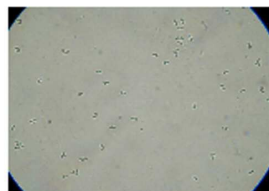


도면4a

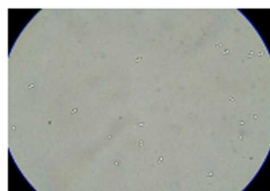
Control



Peak ①-2hr



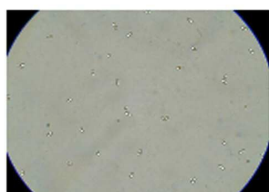
Peak ②-2hr



Peak ③-2hr



Peak ①-4hr



Peak ②-4hr



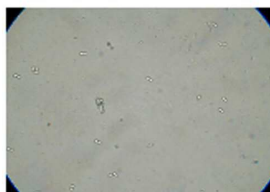
Peak ③-4hr



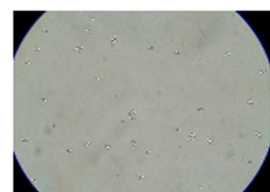
Peak ①-8hr



Peak ②-8hr



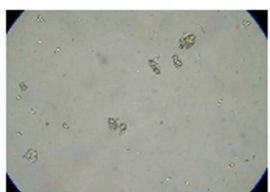
Peak ③-8hr



Peak ①-24hr



Peak ②-24hr

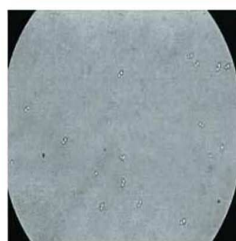


Peak ③-24hr

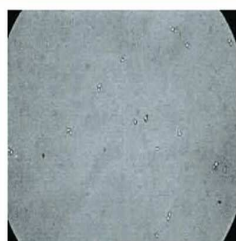


도면4b

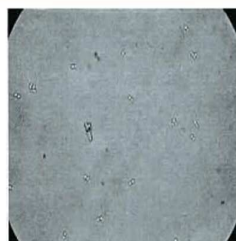
포타이드-제이(Potide-J)-2hr



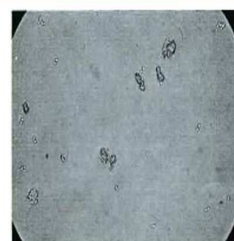
포타이드-제이(Potide-J)-4hr



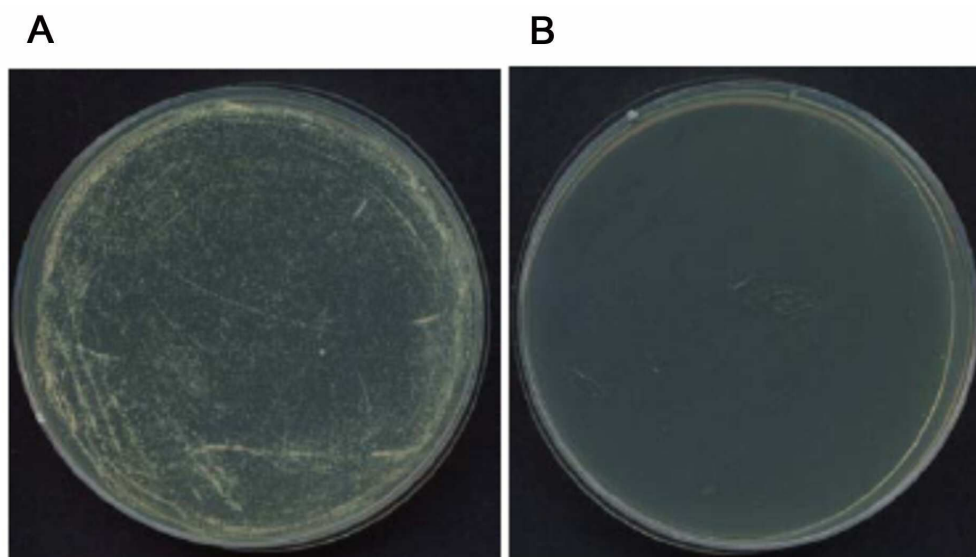
포타이드-제이(Potide-J)-8hr



포타이드-제이(Potide-J)-24hr



도면5



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
 <120> Novel antifungal peptide isolated from Solanum tuberosum L cv.
 Jopung and use thereof
 <130> 11p-11-36
 <160> 1
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Potide-J
 <400> 1
 Ala Val Cys Glu Asn Asp Leu Asn Cys Cys
 1 5 10