(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0085935
(43) 공개일자 2015년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0005936
(22) 출원일자 2014년01월17일
심사청구일자 2014년02월05일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
박윤경
전라남도 장성군 남면 마흥길 45
이종국
전라남도 순천시 외서면 덕치길 53길
(74) 대리인
이원희

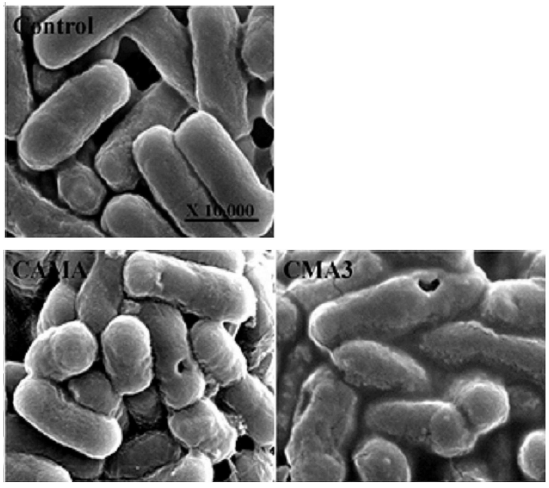
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **CM-MA 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드 CMA3 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 CM-MA 펩타이드로부터 유래된 신규한 유사체 항생 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드를 주형으로 하여, 서열번호 2 내지 서열번호 7로 기재되는 신규한 항생 펩타이드를 합성하였고(CMA 1 내지 CMA 6), 상기 합성된 항생 펩타이드는 그람양성균 및 그람음성균에 대한 항균활성을 나타내면서 인간 적혈구세포 및 인간 정상 세포주(HaCaT)에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 항균용 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017532

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성세균에 작용하는 항균펩타이드 개발 및 제제화 연구

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서 하기 i) 내지 v) 중 어느 하나의 변이를 갖는 아미노산 서열로 구성된 항생 펩타이드:

i) 4 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환;

ii) 5 번째 아미노산이 라이신 또는 루이신으로 치환;

iii) 7 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환

iv) 13 번째 내지 17 번째 아미노산의 순서를 변경할 후, 이들 아미노산 중 하나의 아미노산이 히스티딘으로 치환; 및

v) 15 번째 아미노산이 글루타민으로 치환.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는 서열번호 2 내지 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 7

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.

청구항 8

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 9

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제.

청구항 10

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제.

청구항 11

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약.

청구항 12

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CM-MA 펩타이드로부터 유래된 신규한 유사체 항생 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버큘로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다(Stuart B. Levy, *Scientific American*, 1998, 46-53).

[0003] 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*, 1970, 227, 138-140). 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

[0004] 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다(Handwerger and Tomasz, *Rev. Infec. Dis.*, 1985, 7, 368-386). 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는

항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로(Liu and Tomasz, *J. Infect. Dis.*, 1985, 152, 365-372), 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

[0005] 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며(Tuomanen E., *Revs. Infect. Dis.*, 1986, 3, S279-S291), 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은 오토라이신 활성의 하부조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하부조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다(Tuomanen et al., *J. infect. Dis.*, 1988, 158, 36-43).

[0006] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다. 또한, 그러한 새로운 항생제를 세균의 감염과 염증치료에 효과적으로 치료하기 위한 항생제을 제공하는 것이 필요하다.

[0007] 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신(bacteriocin)들은 구조적으로 세 부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며 두 번째는 비란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다(Cintas et al., *J. Bad.*, 1998, 180, 1988-1994). 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데(Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 395-414), 상기의 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-쉬트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α-회전형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, 9, 269-280). 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., *Cell*, 1991, 65, 205; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, 13, 61). 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많은 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다.

[0008] 이러한 펩타이드 중에서도 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되었다. 지금까지 보고된 양친화성 펩타이드로는 마가이닌 2(magainin 2, MA), 세크로핀 A(cecropin A, CA) 및 멜리틴(melittin, ME) 펩타이드 등이 있다.

[0009] 세크로핀 계열의 양친화성 펩타이드는 초파리에서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은 창자에서도 발견되었는데, 세크로핀 A는 항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었으며(Boman, H. G. and Hultmark, D., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1987, 41, 103), 또한 마가이닌 2 펩타이드는 세포독성이 없으면서 항균활성과 함께 항진균, 항암 및 항-원생생물 효과가 있다고 알려져 있다(Zasloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 5449). 아울러, 이러한 두 펩타이드의 일부 서열들을 재조합시킨 접합 펩타이드(conjugation peptide)를 제조하여 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드를 제조할 수 있음이 알려져 있다(Chan, H. C., et al., *FEBS Lett.*, 1989, 259, 103; Wade, D., et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*,1992, 40, 429).

[0010] 이에, 본 발명자들은 항균활성을 가지는 것으로 기존에 보고된 펩타이드로부터 항균활성이 증진된 신규한 합성 펩타이드를 제조하기 위하여 노력한 결과, 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드를 주형으로 하여, 서열번호 2 내지 서열번호 7로 기재되는 신규한 항생 펩타이드를 합성하였고(CMA 1 내지 CMA 6), 상기 합성된 항생 펩타이드는 그람양성균 및 그람음성균에 대한 항균활성을 나타내면서 인간 적혈구 및 인간 정상 세포주(HaCaT)에 대하여 낮은 세포독성을 나타내므로, 상기 합성된 항생 펩타이드는 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약외품의 유효성분으로 유

용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드로부터 합성된, 우수한 항균활성 및 낮은 세포독성을 나타내는 신규한 항생 펩타이드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하기 i) 내지 v) 중 어느 하나의 변이를 갖는 아미노산 서열로 구성된 항생 펩타이드를 제공한다:

[0013] i) 4 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환;

[0014] ii) 5 번째 아미노산이 라이신 또는 루이신으로 치환;

[0015] iii) 7 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환

[0016] iv) 13 번째 내지 17 번째 아미노산의 순서를 변경할 후, 이들 아미노산 중 하나의 아미노산이 히스티딘으로 치환; 및

[0017] v) 15 번째 아미노산이 글루타민으로 치환.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.

[0023] 아울러, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드로부터 합성된 서열번호 2 내지 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 항생 펩타이드는 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 우수항 항균활성을 나타내고, 인간 적혈구 및 인간 정상세포주에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 대조군 항생 펩타이드인 CA-MA 및 실험군 항생 펩타이드인 CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 및 CMA6의 2차 구조 형성 여부를 확인한 도이다;

■은 CMA1, □은 CMA2, ▲은 CMA3, △은 CMA4, ●은 CMA5, 및 ○은 CMA6임;

도 1A는 10 mM 인산 나트륨 용액에서 상기 펩타이드의 2차 구조 형성 여부를 확인함; 및

도 1B는 30 mM 황산 도데실 나트륨 용액에서 상기 펩타이드의 2차 구조 형성 여부를 확인함.

도 2는 대조군 항생 펩타이드인 CA-MA 및 실험군 항생 펩타이드인 CMA3의 C-말단에 TAMRA를 부착한 후 대장균에

처리하여 미치는 영향을 확인한 도이다.

도 3은 대조군 항생 펩타이드인 CA-MA 및 실험군 항생 펩타이드인 CMA3의 대장균 막에 대한 파괴능을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 하기 i) 내지 v) 중 어느 하나의 변이를 갖는 아미노산 서열로 구성된 항생 펩타이드를 제공한다.

[0028] i) 4 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환;

[0029] ii) 5 번째 아미노산이 라이신 또는 루이신으로 치환;

[0030] iii) 7 번째 아미노산이 히스티딘으로 치환

[0031] iv) 13 번째 내지 17 번째 아미노산의 순서를 변경할 후, 이들 아미노산 중 하나의 아미노산이 히스티딘으로 치환; 및

[0032] v) 15 번째 아미노산이 글루타민으로 치환.

[0033] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드이다.

[0034] 상기 항생 펩타이드는 서열번호 2 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 치환은 전극의 증/감을 이용하여 세포독성을 낮추며, 그람 음성균 및 그람 양성균에 대하여 항균활성을 증가 또는 유지하기 위해 수행될 수 있다.

[0035] 상기 합성을 위한 방법으로 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., Proteins; structures and molecular principles, 1983)으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상 고상법(Solution Phase Peptide synthesis), 고상 고상법(solid-phase peptide syntheses), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 고상법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 상기 항생 펩타이드는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*), 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 및 살모넬라 속(*Salmonella*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 상기 그람 양성균은 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*) 및 스타필로코커스 속(*Staphylococcus*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*) 및 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 상기 항생 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 CA-MA 항생펩타이드를 합성하였다. 또한, 이를 주형으로 하여 13 번째 내지 17 번째 아미노산을 무작위로 위치를 변화한 후 펜닐알라린을 히스티딘으로(CMA1), 알라닌을 히스티딘으로 치환하였으며(CMA2), 또한 5 번째의 페닐알라닌을 라이신과 7 번째 라이신을 히스티딘으로 치환하였으며, 13 번째 내지 17 번째에 아미노산 서열을 무작위로 위치를 변환 후 페닐알라닌을 히스티딘으로 치환하여 CMA3으로, 그리고 4번의 루이신을 히스티딘과 5번의 페닐알라닌을 루이신으로 치환하였고, 13번에서 17번의 아미노산 서열을 무작위로 위치를 변환 후 17번에 알라닌을 히스티딘으로 치환하여 CMA4로, 13번에 펜닐알라닌을 히스티딘으로 치환하여 CMA5로 설계하였다. 또한 대조군인 CA-MA 항생펩타이드의 15번 아미노산인 히스티딘을 글루타민으로 치환하여 CMA6을 설계함으로써, 서열번호 2 내지 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 CMA1 내지 CMA6 펩타이드를 합성하였다(표 1 참조).

[0041] 또한, 본 발명자들은 상기 합성한 CA-MA 항생 펩타이드 및 실험군인 CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 및 CMA6가 그람 음성균 및 그람 양성균에 대하여 나타내는 항균 활성을 확인한 결과, 실험군 펩타이드가 CA-MA 펩타이드와 거의 유사한 최소농도억제(MIC)값을 나타내는 것을 확인하였다(표 2 및 표 3 참조).

[0042] 또한, 본 발명자들은 대조군(CA-MA)과 실험군(CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5, CMA6)의 펩타이드를 인간 적혈구 세포(human red blood cell,hRBC)에서 용혈작용여부와 HaCaT세포에서 독성여부를 확인한 결과, hRBC 및 HaCaT 세포에 200 μM 농도의 펩타이드를 처리하였을 때, 대조군에 비해 실험군에서 용혈작용이 유발되지 않았을 뿐만 아니라, 세포 생존율이 현저하게 상승하는 효과를 나타내는 것을 확인하였고, 실험군 중에서 CMA3 펩타이드가 가장 우수한 것을 확인하였다(표 4 참조).

[0043] 또한, 본 발명자들은 상기 대조군 및 실험군 항생 펩타이드의 2차 구조를 확인하기 위하여 원이색법(circular dichroism)을 수행한 결과, 30 mM 황산 도데실 나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액에서 모든 펩타이드가 2차 구조인 α-나선형 구조를 나타내는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[0044] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 항생 펩타이드가 나타내는 항균 활성을 구체적으로 확인한 결과, 상기 대조군인 CM-MA 펩타이드 및 실험군인 CMA3 펩타이드는 모두 대장균의 세포막에 위치하여(도 2 참조), 대장균의 세포막에 큰 구멍을 형성하여 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0045] 따라서, 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 항균용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.

[0047] 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 양친화성을 갖는 세크로핀과 마가이닌을 접합한 CA-MA 항생 펩타이드이다.

[0048] 상기 항생 펩타이드는 서열번호 2 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 치환은 전극의 증/감을 이용하여 세포독성을 낮추며, 그람 음성균 및 그람 양성균에 대하여 항균활성을 증가 또는 유지하기 위해 수행될 수 있다.

[0049] 상기 항생 펩타이드는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 상기 그람 음성균은 대장균 속, 슈도모나스 속, 살모넬라 속, 렙토스피라 속, 리케치아 속을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 대장균 속, 슈도모나스 속 및 살모넬라 속으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 대장균, 슈도모나스 에루지노사 및 살모넬라 타이피뮤리움으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0051] 상기 그람 양성균은 스타필로코커스 속, 리스테리아 속, 스타필로코커스 속, 코리네박테리움 속, 락토바실러스 속 및 바실러스 속을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스타필로코커스 속, 리스테리아 속 및 스타필로코커스 속으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스타필로코커스 아우레우스, 리스테리아 모노사이토젠스 및 스타필로코커스 에피더미디스로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지

않는다.

[0052] 상기 항생 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 항생 펩타이드를 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0055] 즉, 본 발명의 항생 펩타이드는 실제의 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명의 항생 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 황산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 항생 펩타이드의 유효용량은 1 내지 2 mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지는 1 mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.

[0058] 본 발명의 항생제에서 본 발명의 신규한 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신규한 펩타이드의 항생제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0059] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 화장료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 항생 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 황산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0062] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 펩타이드는 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0063] 본 발명의 화장료 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 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0064] 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.

[0065] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0066] 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.

[0067] 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.

[0068] 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 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식품 첨가제를 제공한다.

[0070] 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 식품 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0071] 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 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량부이하, 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.

[0072] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0073] 또한, 본 발명은 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제를 제공한다.

[0074] 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 사료 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일레지 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0076] 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물군 또는 효소들을 첨가함으로서 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠

렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일레지는 청예사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%으로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

[0077] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제를 제공한다.

[0078] 또한, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.

[0079] 아울러, 본 발명은 상기 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0080] 본 발명의 CM-MA 항생 펩타이드로부터 유래된 유사체 항생 펩타이드인 CMA 1 내지 CMA6 펩타이드는 강한 항균활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 항균용 생물 농약, 방부 조성물 및 의약외품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0081] 상기 방부 조성물에는 화장품 보존제 또는 의약품 보존제 등이 있다. 상기 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.

[0082] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0083] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충진제일 수 있다.

[0084] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0085] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0086] **<실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제**

[0087] 본 발명자들은 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)에 따라, 모체 펩타이드인 CA-MA로 기재된 아미노산 서열을 가지는 펩타이드에 4번을 히스티딘으로, 5번을 라이신과 루이신 그리고 7번에 히스티딘으로 치환하였으며, 13번에서 17번에 아미노산을 무작위로 위치를 변환 후 히스티딘으로 치환하였다. 또한 CA-MA로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 항생 펩타이드에 15번을 그루타민으로 치환하여 합성을 하였다(표 1).

[0088] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH2 형태인 펩타이드는 Rink Amide MBHA-Resin을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다.

[0089] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo trizole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링(coupling) 시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 DCM(dichoromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid), 페놀(phenol), 싸이오아니졸(thioanisole), H2O 및 트리이소프로필실레인(triisopropylsilane)을 각각 85 : 5 : 5 : 2.5 : 2.5(v/v)의 비율로 혼합한 용액을 가하고 2 내지 3 시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전하여 이를 수득하였다. 상기 수

득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C18300Å,15,19.0mm×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6 N HCl로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02 N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정한 후, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill, et al ., Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5: 395, 1991)을 수행하였다.

[0090] 그 결과, 하기 [표 1]에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 서열번호 7로 기재되는 아미노산을 나타내는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다(표 1).

표 1

[0091] 본 발명에서 합성한 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유 시간

펩타이드 명칭	아미노산 서열	서열번호	분자량	보유 시간
CA-MA	KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF-NH_2	서열번호 1	2401.0	23.6
CMA1	KWKLFKKIGIGKHFLSAKKF-NH_2	서열번호 2	2402.2	20.9
CMA2	KWKLFKKIGIGKFLSAHKKF-NH_2	서열번호 3	2404.2	22.3
CMA3	KWKLKKHIGIGKHFLSAKKF-NH_2	서열번호 4	2393.2	17.8
CMA4	KWKHLKKIGIGKFLSAHKKF-NH_2	서열번호 5	2390.8	79.1
CMA5	KWKHLKKIGIGKHFLSAKKF-NH_2	서열번호 6	2392.6	17.6
CMA6	KWKLFKKIGIGKFLQSAKKF-NH_2	서열번호 7	2394.3	23.9

[0092] **<실시예 2> 항균 활성 측정**

[0093] 본 발명자들은 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(MIC) 값을 측정하였다.

[0094] 구체적으로, 하기 [표 2]에 기재된 균주를 구입하여, 각각의 조성의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 5×10^5 세포/100 ㎕의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, USA)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 1>에서 합성한 CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 또는 CMA6 펩타이드를 각각 96웰(well)로부터 1/2배씩 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 12시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 대조군으로는, 모체 펩타이드인 CM-MA를 상기와 동일한 방법을 수행하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

표 2

[0095] 본 발명에서 사용한 균주 및 이의 입수처

구분	균주명	출처	기탁번호
그람 음성균	대장균 (*Escherichia coli*)	미국 세포주은행	ATCC 19115
	슈도모나스 에루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)	미국 세포주은행	ATCC 15692
	살모넬라 타이피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*)	한국 세포주은행	KTCC 1926
그람양성균	스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	미국 세포주은행	ATCC 25923
	리스테리아 모노사이토젠스 (*Listeria monocytogenes*)	미국 세포주은행	ATCC 19115
	스타필로코커스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*)	한국 세포주은행	KCTC 3096

[0096] 그 결과, 하기 [표 3]에서 나타난 바와 같이 CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 및 CMA6 펩타이드는 대조군인 CA-MA에 비해 그람 음성균 및 그람 양성균 모두에서 거의 유사한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 3).

표 3

[0097] 그람 음성균 및 그람 양성균에 대한 항생 펩타이드의 항균 활성

펩타이드	생육최소저해 농도(μM)					
	그람 음성균			그람 양성균		
	대장균	P.에루지노사	S.타이피뮤리움	S.아우레우스	L.모노사이토젠스	S.에피더미디스
CA-MA	2	1	1	8	0.5	8
CMA1	8	8	1	16	4	32
CMA2	2	4	1	32	1	16
CMA3	4	8	1	32	2	64
CMA4	4	16	1	32	2	32
CMA5	8	16	1	32	2	64
CMA6	4	4	1	16	1	8

[0098] **<실시예 3> 용혈 활성 측정**

[0099] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드들의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드들의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

[0100] 구체적으로, 인간 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고, 상기 <실시예 1<에서 합성한 CM-MA, CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 또는 CMA6 펩타이드를 각각 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 또는 200.0 μM/웰의 농도로 처리하여, 37℃에서 1 시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000 g로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 량을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100(sigma, USA)을 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 트리톤 X-100의 적혈구 용혈활성을 100%로 하여, 하기 [수학식 1]을 사용하여 상기 펩타이드의 용혈활성을 계산하였다.

수학식 1

[0101]
$$\text{적혈구 파괴능(hemolysis)(\%)} = \frac{\text{흡광도A} - \text{흡광도B}}{\text{흡광도C} - \text{흡광도B}} \times 100$$

[0102] (상기 식에 있어서,

[0103] 흡광도 A는 414 nm 파장에서 측정한 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며;

[0104] 흡광도 B는 414 nm 파장에서 측정한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 및

[0105] 흡광도 C는 414 nm 파장에서 측정한 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타낸다.)

[0106] 그 결과, 하기 [표 4]에서 나타난 바와 같이 모체 펩타이드인 CA-MA 펩타이드는 200 μM 농도를 처리하였을 때 인간 적혈구에 대하여 6%의 용혈작용이 유발되는 것을 확인한 것에 비해, CM-MA, CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 또는 CMA6 펩타이드는 200 μM 농도에서도 적혈구에 대한 파괴능을 나타내지 않는 것을 확인하여, 본 발명의 항생 펩타이드는 모체 펩타이드에 비해 적혈구에 대한 세포독성이 감소하는 것을 확인하였다(표 4).

표 4

[0107] 항생 펩타이드의 용혈 활성 측정

펩타이드 명칭	% 적혈구 파괴능(각 펩타이드 농도, μM)				
	200	100	50	25	12.5
CA-MA	6	2	1	0	0
CMA1	0	0	0	0	0
CMA2	0	0	0	0	0
CMA3	0	0	0	0	0
CMA4	0	0	0	0	0
CMA5	0	0	0	0	0
CMA6	0	0	0	0	0

[0108] **<실시예 4> 정상 세포주에서 세포독성 확인**

[0109] 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.

[0110] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 사람의 각질 형성 세포주(HaCaT cell line)를 3×10^3씩 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, 상기 <실시예 1>에서 합성한 CM-MA, CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 또는 CMA6 펩타이드를 각각 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 또는 200.0 μM/웰의 농도로 처리하여, 24 시간 동안 5% CO2인큐베이터에서 반응하였다. 배양 후, 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 5 mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 20 ul를 각 웰에 넣고 4 시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200 ul의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 560 nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

[0111] 그 결과, 하기 [표 5]에서 나타난 바와 같이 200 μM 모체 CM-MA 펩타이드를 처리했을 때, HaCaT 세포는 1.4%의 세포 생존력을 나타내어 CM-MA 펩타이드가 매우 높은 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 이에 반해, CMA1, CMA4 및 CMA5 펩타이드는 각각 51.1%, 64.5% 및 78.9%의 세포 생존력을 나타내어 낮은 세포 독성을 가지는 것을 확인하였고, 특히 CMA3 펩타이드는 200 μM 농도에서 92.4%의 세포 생존력을 나타내므로, 대조군인 CA-MA 펩타이드에 비해 세포 독성을 거의 보이지 않는 것을 확인하였다(표 5).

[0112] **<실시예 5> 원이색법 스펙트럼 측정**

[0113] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α-나선형 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

[0114] 구체적으로, 10 mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7.4) 또는 30 mM 황산 도데실 나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액에 상기 <실시예 1>에서 합성한 CM-MA, CMA1, CMA2, CMA3, CMA4, CMA5 또는 CMA6 펩타이드를 30 μM로 첨가하여 0.1 cm 길이(paht-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25℃로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다. 상기 원이색법 스펙트럼을 위한 α-나선형 구조 계산식은 하기 [수학식 2]를 사용하였다.

수학식 2

[0115]
$$[\theta]=\frac{\theta_{obs}}{10\cdot l\cdot c}$$

[0116] (상기 식에 있어서,

[0117] Θ_{obs}는 신호의 밀리도(milidegrees)를 나타내며;

[0118] l은 셀 크기(cm)의 광학 길이(optical path-length)를 나타내고; 및

[0119] c는 첨가한 펩타이드의 농도(mol/ℓ)를 나타낸다.)

[0120] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 10 mM 인산나트륨 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 구조를 형성하지 않은 반면, 30 mM SDS 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 모든 펩타이드에서 2차 구조인 α-나선형 구조를 형성하는 것을 통해, 본 발명의 항생 펩타이드는 미생물인 박테리아 막과 유사한 황상도데실 나트륨 상에서 α-나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0121] **<실시예 6> 공초점(confocal) 현미경 측정**

[0122] 상기 <실시예 1>의 방법으로 제조된 펩타이드의 대장균 막에 작용 여부를 확인하기 위하여, 항균활성이 대조군과 유사하며 높은 농도에서도 독성을 나타내지 않는 것으로 선별된 펩타이드인 CMA3의 C-말단 부위의 NH에 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine, TAMRA)-를 부착하여 공초점(confocal) 현미경을 이용하여 확인하였다.

[0123] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 합성한 CA-MA 또는 CMA3의 C-말단 부위의 NH에 TAMRA를 부착하여 분리하고, 최소농도 억제(MIC)의 1/2 값을 대장균에 처리한 후 10 분간 37℃에서 반응을 하였다. 반응 후, 순수 대장균만을 원심분리기(4000 rpm)를 이용해 수득하고, 상층액을 제거하였다. 그런 다음, 생리식염수(PBS) 50 μl를 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거한 후 LSM510 공초점 현미경을 이용하여 대장균 막에서 펩타이드의 위치를 확인하였다.

[0124] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 TAMRA가 부착된 CMA3 및 CM-MA 펩타이드 모두 대장균 막에 위치하여 나타나는 것을 확인하였다(도 2).

[0125] **<실시예 7> 항생 펩타이드가 대장균에 미치는 효과 탐침**

[0126] 본 발명의 합성 펩타이드가 항균활성을 나타내는 정도를 구체적으로 확인하기 위하여, CMA3 합성 펩타이드가 대장균 막을 용해하는 것을 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)을 통해 확인하였다.

[0127] 구체적으로, 대장균을 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 100 mM 염화나트륨(NaCl)을 포함하는 10 mM 농도의 인산나트륨 완충용액(Na-phosphate buffer, pH 7.4)에 10^8 세포/mℓ 균체 농도로 희석하였다. 상기 희석한 균주에 상기 <실시예 1>에서 합성한 CMA3 또는 비교균인 CA-MA 펩타이드를 각각 1/2 MIC농도로 처리한 후 37℃에서 10 분간 반응을 유발하였다. 그런 다음, 5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 상기 균주에 첨가하여 4℃에서 2 시간동안 고정하고, 완충제로 세척을 실시한 후 에탄올을 이용해 단계적으로 탈수시켰다. 탈수 후, 인계점건조(critical point dry)를 하고 골든 코팅을 실시하여 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)에서 관찰하였다.

[0128] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 CA-MA를 대장균에 처리한 경우와 유사하게 CMA3 펩타이드가 대장균 막에 구멍을 형성하면서 파괴하여, 효과적인 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 3).

[0129] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0130] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0131] **<1-1> 산제의 제조**

[0132] 본 발명의 펩타이드 20 mg

[0133] 유당 20 mg

[0134] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0135] **<1-2> 정제의 제조**

[0136]	본 발명의 펩타이드	10 mg
[0137]	옥수수전분	100 mg
[0138]	유 당	100 mg
[0139]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0140] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0141] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0142]	본 발명의 펩타이드	10 mg
[0143]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0144]	락토오스	14.8 mg
[0145]	스테아린산 마그네슘	0.2 mg

[0146] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0147] **<1-4> 액제의 제조**

[0148]	본 발명의 펩타이드	20 mg
[0149]	이성화당	10 g
[0150]	만니톨	5 g
[0151]	정제수	적량

[0152] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0153] **<1-5> 주사제의 제조**

[0154]	본 발명의 펩타이드	10 ㎍/㎖
[0155]	묽은 염산 BP	pH 7.6로 될 때까지
[0156]	주이용 염화나트륨 BP	최대 1 ㎖

[0157] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 펩타이드를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ㎖ 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15 분 이상 오토클래이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0158] **<제조예 2> 화장품의 제조**

[0159] **<2-1> 유연화장수(스킨)**

[0160] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 [표 5]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 5

[0161]

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

[0162] **<2-2> 영양화장수(로션)**

[0163] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 [표 6]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 6

[0164]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
1,3-부틸렌글리콜	8.0
글리세린	5.0
스쿠알란	10.0
모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄	2.0
유창목오일	0.1 ~ 30 %
1,3-부틸렌글리콜	3.0
글리세린	5.0
폴리옥시에틸렌(60) 경화피마자유	0.2
에탄올	8.0
구연산	0.02
구연산나트륨	0.06
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[0165] **<2-3> 에센스**

[0166] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 에센스를 제조하기 위해 하기 [표 7]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 7

[0167]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
시토스테롤	1.7
플리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량

정제수	To 100

[0168] **<2-4> 세안제(클렌징폼)**

[0169] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 [표 8]에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

표 8

[0170]

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

[0171] **<2-5> 영양크림**

[0172] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 [표 9]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 9

[0173]

배합성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
바셀린	7.0
유동파라핀	10.0
밀납	2.0
폴리솔베이트60	2.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
스쿠알란	3.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
산탄검	0.5
토코페닐아세테이트	0.1
향, 방부제	미량
정제수	To 100

[0174] **<2-6> 마사지크림**

[0175] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 [표 10]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조한다.

표 10

[0176]

배합성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1 ~ 30 %
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0

토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
산탄검	0.5
향, 방부제	미량
정제수	To 100

[0177] **<2-7> 팩**

[0178] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 팩을 제조하기 위해 하기 [표 11]에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 11

[0179]

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

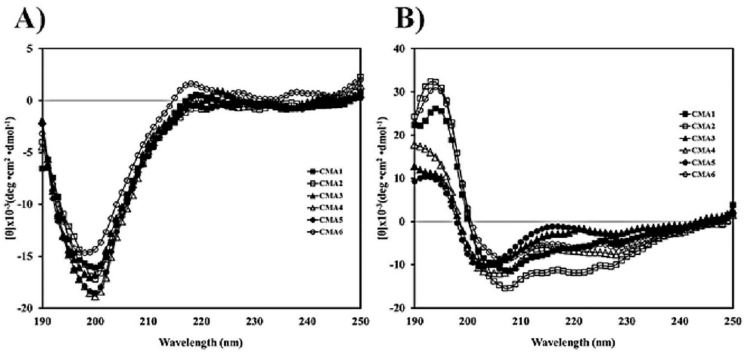
[0180] 이상의 본 발명은 상기에 기술된 실시예 및 제조예들에 의해 한정되지 않고, 통상의 기술자들에 의해 다양한 변형 및 변경을 가져올 수 있으며, 그외의 색채 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얇게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있고, 이는 첨부된 청구항에서 정의되는 본 발명의 취지와 범위에 포함된다.

산업상 이용가능성

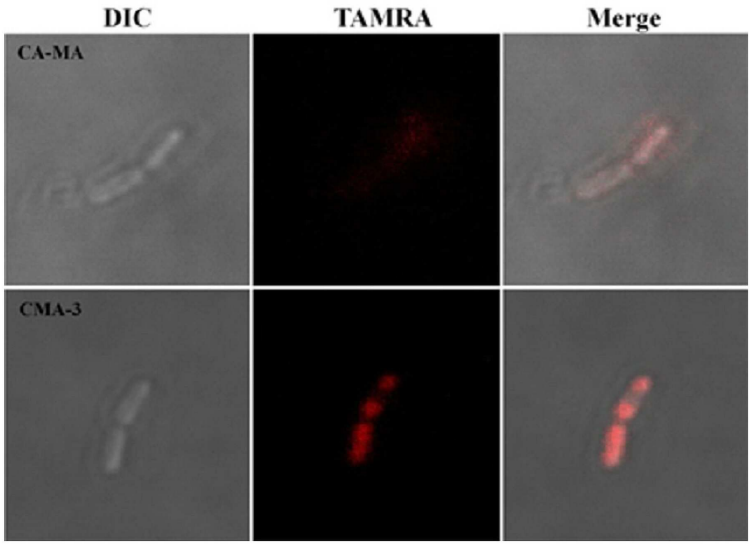
[0181] 본 발명의 항생 펩타이드는 우수한 항균활성과 동시에 인간 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면

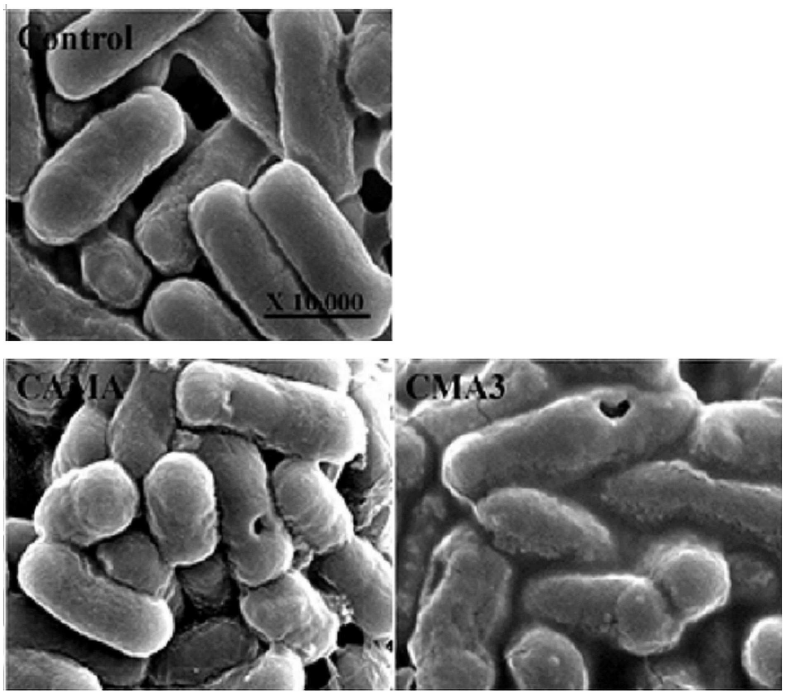
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY

<120> The effect of antimicrobial activity of CMA3 analogue peptide derived from CA-MA

<130> 13P-01-005

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CA-MA

<400> 1

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser

1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe

20

<210>

2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA1

<400> 2

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Leu Ser

1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA2

<400> 3

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu Ser Ala

1 5 10 15

His Lys Lys Phe

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA3

<400> 4

Lys Trp Lys Leu Lys Lys His Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Leu Ser

1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA4

<400> 5

Lys Trp Lys His Leu Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu Ser Ala

1 5 10 15

His Lys Lys Phe

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA5

<400> 6

Lys Trp Lys His Leu Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Leu Ser

1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMA6

<400> 7

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu Gln Ser
1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe
20