(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0049577
(43) 공개일자 2016년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A23L 1/00* (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0146058
(22) 출원일자 2014년10월27일
심사청구일자 2014년10월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김정희
서울특별시 강남구 학동로 68길 20 중앙하이츠 102동 701호
조경주
서울 동작구 상도로38길 93, A동 102호 (상도동, 도영타운4차)
(74) 대리인
이원희

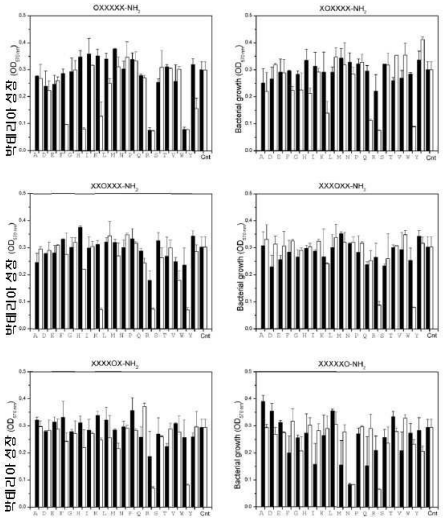
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **항균 펩타이드 헥사머를 포함하는 구강 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 구강 병원성을 포함하는 구강질환에 대한 신규 합성 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, PS-SCL을 이용하여 스크리닝하여 헥사펩타이드(hexapeptide)를 발굴하였고 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)에 대한 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9C6049936
부처명 미래부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 신경줄기세포의 성장/분화/사멸 조절과정에서 세포 에너지 대사/성장 신호전달계 및 autophagy 역할규명
기 여 율 1/1
주관기관 미래부
연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 항균용 펩타이드:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$-NH_2

상기 X_1은 아르기닌(arginine) 또는 트립토판(tryptophan)이고;

X_2 내지 X_5는 시스테인(cysteine)을 제외한 아미노산 중 어느 하나이며;

X_6는 아르기닌 또는 아스파라긴(asparagine)이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 X_1이 아르기닌이면

X_3 및 X_4는 비극성(non-polar) 아미노산이고

X_5는 리신(lysine) 또는 히스티딘(histidine)이며

X_6는 아르기닌이고,

X_1이 트립토판이면

X_2 및 X_3는 극성(polar) 또는 양전하된(positively charged) 아미노산이고

X_4 및 X_5는 비극성 아미노산이며

X_6는 아르기닌인 것을 특징으로 하는 항균용 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 8로 기재되는 것을 특징으로 하는 항균용 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항균용 펩타이드는 C-말단의 카르복실기를 -NH_2로 치환한 것을 특징으로 하는 항균용 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항균용 펩타이드는 양친매성(amphiphilic) α-헬리컬(α-helical) 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는 항균용 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)에 대해 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균용 펩타이드.

청구항 7

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 펩타이드는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)에 대해 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 건강기능식품.

청구항 10

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 구강질환은 충치(dental caries) 및 치주염(periodontal disease)인 것을 특징으로 하는 구강질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 13

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 개선용 의약외품조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 충치(Dental caries) 및 치주염(periodontal disease)을 포함하는 구강 질환에 대한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 충치(dental caries) 및 치주염(periodontal disease)은 일반 감염 구강 질환으로서, 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)과 같은 충치원인균(Hamada S *et al.*, Microbiol Rev. 1980;44:331-384; Loesche WJ Microbiol Rev. 1986;50:353-380) 및/또는 포르피로모나스긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*)와 같은 치주원인균(periodontopathogenic)을 포함하는 치태(dental plaque)와 관련이 있다(Griffen AL *et al.*, J Clin

Microbiol. 1998;36:3239-3242; Slots J *et al.*, Periodontol 2000 1999;20:82-121).

[0003] 치태균을 조절하는 것이 구강 질환의 예방 및 치료에 중요하기 때문에, 클로헥시딘(chlorhexidine)과 같은 넓은 범위의 항치태 화학제제(antiplaque chemical agent)(Rolla G *et al.*, J Dent Res. 1975;54:B57-62) 또는 반코마이신(vancomycin)과 같은 항생물질(De Paola PF *et al.*, J Dent Res. 1974;53:108-114)등이 치료에 이용되고 있다. 그러나, 클로헥시딘의 불쾌한 쓴맛과 치아를 염색시키므로 이 약물의 임상적용이 제한된다. 또한 항생물질에 대한 내성의 증가로, 항생물질의 효능이 감소하고 있다(Davies J. Science 1994;264:375-382). 따라서, 임상적으로 유용한 부작용 없는 항치태 제제를 개발하는 것이 필요한 실정이다.

[0004] 최근에, 항생물질 대용물로 사용 가능성 때문에 천연 항균성의 펩타이드 및 이들의 합성 효소가 주목을 받고 있다. 이러한 항균성 펩타이드는 약물-내성 균주를 포함하는 넓은 범위의 박테리아 종에 대하여 효과가 있다. 이러한 펩타이드 내의 양전하를 띤 아미노산 잔기는 자체의 2 차 구조 헬릭스(helix), 룹(loop) 및 다른 구조와 함께 음전하인 지질 막에 기공을 형성하고, 세포막의 정상적인 상태를 파괴한다. 또한, 항균성 펩타이드는 면역반응 유도, 사이토카인 방출, 및 화학주성(chemotaxis)과 같은 선천 면역 및 염증 반응에 역할을 하는 것으로 나타났다. 그러나, 펩타이드는 생체 내에서 단백질 분해에 영향받기 쉽고 생리적 pH 값에서 높은 살균 활성 수준을 얻기 어려운 점 등 이들의 생물 활성이 인체 내에서 변형되기 때문에 임상적용이 제한되어 왔다(Jenssen H *et al.*, Clin Microbiol Rev. 2006 ;19:491-511).

[0005] 그럼에도 불구하고, 항균성 펩타이드는 구강 충치 내의 병원성 박테리아에 직접적으로 적용할 수 있기 때문에 구강 감염(oral infection) 치료에 효과적이고 안전하다.

[0006] 천연 항균성 펩타이드 및 이의 합성 변형체이외에도, 많은 연구자들은 펩타이드의 작용 기전을 이해하고 항균성 활성 개선을 위하여 펩타이드 라이브러리를 개발하기 위한 합성 콤비네토리얼(combinatorial) 기술을 사용해왔다. 그러나, 지금까지 몇몇 연구에서만 항균 펩타이드를 찾아내기 위해서 합성 라이브러리를 사용하였고 구강 병원성 박테리아에 작용하는 항균펩타이드 연구에는 거의 사용되지 않았다. 합성 라이브러리(combinatorial library)는 강력한 생물 활성을 갖는 펩타이드를 생성하고 식별하는데 매우 효과적인 방법이다(Ryge TS *et al.*, Bioorg Med Chem. 2006;14:4444-4451; Denholt CL *et al.*, Biopolymers 2009;91:201-206).

[0007] 이에, 본 발명자들은 구강 병원균에 대한 신규 합성 항균 펩타이드를 개발하기 위해 노력한 결과, PS-SCL(positioning scanning-synthetic combinatorial library)를 스크리닝하여 헥사펩타이드(hexapeptide)를 발굴하였고, 상기 신규 합성 항균 펩타이드가 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. actinomycetemcomitans)에 대한 항균 활성이 있음을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 항균용 펩타이드(C-terminal 이 X_1이고 N-terminal이 X_6 인 배열):

[0009] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$-NH_2

[0010] 상기 X_1은 아르기닌(Arginine) 또는 트립토판(tryptophan)이고;

[0011] X_2 내지 X_5는 시스테인(cysteine)을 제외한 아미노산 중 어느 하나이며;

[0012] X_6는 아르기닌 또는 아스파라긴(asparagine)을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을

제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 개선용 건강기능식품 및 의약외품조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 항균용 펩타이드를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 개선용 건강기능식품 및 의약외품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 구강질환에 대해 항균성을 나타내는 신규 합성 펩타이드는 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 포함하는 구강 병원성 대해 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 합성 펩타이드 라이브러리(synthetic peptide combinatorial library)에 의한 박테리아 성장 억제를 나타낸 도이다. S. 뮤탄스(*S. mutans*)을 0.6(검은색 바(bar)) 또는 1.5 mM(흰색 바(bar))의 펩타이드 존재하에서 밤사이 동안 배양하고 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 0는 정의된(defined) 위치를 나타내고 상기 위치의 아미노산은 x-축 상에 나타난다. 나머지 다섯 개의 위치(X)는 19 개의 아미노산(시스테인(cysteine)은 제외) 중의 하나를 포함한다. Cnt는 대조군(control)을 나타낸다.

도 2는 S. 뮤탄스(*S. mutans*), S. 고르도니(*S. gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)에 대한 펩-1(pep-1), 펩-2(pep-2), 및 펩-3(pep-3)의 항균활성을 나타낸 도이다. 모든 실험은 적어도 3회씩 수행되었고 모든 데이타는 평균±표준편차(mean ± standard deviation(SD))로 나타냈다.

도 3은 각각의 펩타이드를 위한 α-헬리컬 윌(α-helical wheel) 모델을 나타낸 도이다. 잔기(residue)는 C-말단부터 N-말단까지 단일 글자 코드(single letter code)로 지정되거나 또는 연속적으로 숫자화된다. 양전하된 아미노산은 그늘진 어두운 회색(shaded dark grey)이고, 폴라 아미노산(polar amino acid)은 그늘진 밝은 회색(shaded light grey)을 나타낸다.

도 4는 항균 펩타이드로 배양 후의 *S.* 뮤탄스의 TEM 이미지를 나타낸 도이다. 비히클 단독(vehicle only)(A), 0.6 mM 펩-1(pep-1)(B) 또는 0.4 mM 펩-2(pep-2)(C)과 함께 박테리아를 밤사이 배양한 후, 박테리아 멤브린을 관찰하여 나타낸 도이다(mag, × 30,000).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 하기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드(peptide)로 이루어진 군으로부터 선택된 항균용 펩타이드(C-terminal 이 X1이고 N-terminal이 X6 인 배열):

[0023] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$-NH_2

[0024] 상기 X_1은 아르기닌(Arginine) 또는 트립토판(tryptophan)이고;

[0025] X_2 내지 X_5는 시스테인(cysteine)을 제외한 아미노산 중 어느 하나이며;

[0026] X_6는 아르기닌 또는 아스파라긴(asparagine)을 제공한다.

[0027] 상기 X_2 및 X_3는 아르기닌, 트립토판 또는 리신(lysine)이고; X_4 및 X_5는 아르기닌 또는 트립토판인 것이 바람직하다.

[0028] 상기 항균용 펩타이드는 C-말단의 카르복실기를 $-NH_2$로 치환한 것이 바람직하고, 양친매성(amphiphilic) α-헬리컬(α-helical) 구조를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 상기 펩타이드는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)에 대해 항균활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0030] 상기 펩타이드는 RGAARN-NH_2, RGLLRN-NH_2, RSAARN-NH_2, RLGGKN-NH_2, WRRAAN-NH_2, WRRLLN-NH_2, WKKAGN-NH_2 및 WSKAAN-NH_2 서열로 구성되고, 유의적인 항균활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 펩타이드는 아미드화, 에스테르화, 아실화, 아세틸화, 페길화(PEGylation) 또는 알킬화에 의해 변형될수 있는데, 구체적으로 항미생물 펩타이드는 아실화, 아세틸화, 페길화(PEGylation), 알킬화 등에 의해 N-말단부에서 및 아미드화 또는 에스테르화에 의해 C-말단부에서 변형시킬 수 있다.

[0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 박테리아 균주인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)(ATCC 25175), 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)(KCTC 3286), 및 아그레가티박터 악티노마이세템코미탄(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) Y4 (KCTC 3698)를 배양한 후 구강 병원균에 대해 항균성을 갖는 펩타이드를 발굴하기 위하여, PS-SPCL 라이브러리를 사용하여 RXXXXX-NH_2 및 WXXXXX-NH_2가 있는 펩타이드 라이브러리를 선별하였고 0.6 mM 및 1.5 mM에서 박테리아 성장에 대한 강한 억제를 나타냄을 확인하였다(도 1A 참조). 또한, 위치 2의 Gln 및 Lys은 좋은 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 1B 참조). 따라서, 세 개의 헥사펩타이드, RXXXXN-NH_2(펩-1(pep-1)), WXXXXN-NH_2(펩-2(pep-2)), 및 RRRWRN-NH_2(펩-3(pep-3))를 합성하였다. 구강미생물에 대한 헥사펩타이드의 활성을 조사한 결과, 펩-1 및 펩-2 모두가 0.6 mM 및 1.5 mM에서 S. 뮤탄스(S. mutans)에 대해 현저한 항균성의 활성을 나타냄을 확인하였다(도 2A 참조). 펩-1, 펩-2, 및 펩-3의 α-헬리컬 휠을 모델링한 결과, 펩타이드들의 전체 전하는 펩-1 및 펩-2에 대하여 +1/0이고, 펩-3에 대하여 +4를 나타냄을 확인하였다(도 3 참조). 펩-1 및 펩-2의 항균성에 대한 기전을 조사한 결과, 펩-1 또는 펩-2가 처리된 박테리아는 특정 분할 단계에서 칸막이 역활을 하여 박테리아 멤브린의 기능저하를 나타냄으로써 살균 기전을 가질 수 있음을 확인하였다(도 4 참조).

[0033] 따라서, 본 발명의 신규 합성 펩타이드는 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 포함하는 구강 병원성 대해 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 펩타이드는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)에 대해 항균활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명은 상기 펩타이드를 함유하는 충치(dental caries) 및 치주염(periodontal disease)을 포함하는 구강질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 신규한 항균용 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약물들은 경피(transdermal), 국소(topical), 비경구(parenteral, 위장(gastrointestinal), 경기관지(transbronchial), 및 치조정(transalveolar)을 포함하여 어떠한 공지의 경로를 통해서든 제공될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] 상기 약학적 조성물의 제형은 당 분야에 일반적으로 알려져 있으며 편의상 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA 를 참조할 수 있다. 예컨대, 하루에 약 0.05 μg/Kg(체중) 내지 약 20 mg/Kg(체중)이 투여될 수 있다. 용량 체제는 최적의 치료적 반응을 제공하기 위해 조정

될 수 있다. 예컨대, 매일 몇몇의 분할량으로 투여되거나 또는 치료상태의 위급 조짐에 따라 비례하여 감소할 수 있다.

[0039] 상기 약학적 조성물은 구강(oral), 정맥 주사(intravenous)(수용성인), 근육 내(intramuscular), 피하(subcutaneous), 비강 내(intra nasal), 진피내(intradermal) 또는 좌약 경로(suppository routes) 또는 이식(implanting) (예컨대, 시험관 내(in vitro) 감작화되고 수용부(recipient)로 입양 전이되는 단핵구(monocytes) 또는 수상돌기 세포(dendrite cells)와 같은 세포를 이용하거나 복강 내 경로에 의하여 서방성 분자를 이용)과 같은 공지의 방법으로 투여될 수 있다. 투여 경로에 따라, 상기 펩타이드는 구성성분을 불활성화시킬 수 있는 효소, 산 및 다른 자연 상태의 작용으로부터 보호하기 위해 물질 내로 코팅될 수 있다.

[0040] 예컨대, 상기 펩타이드의 낮은 친유성(lipophilicity) 때문에 위장관 내에서는 펩타이드 결합을 분해할 수 있는 효소에 의해, 위 내에서는 산 가수분해에 의해 파괴될 수 있다. 펩타이드를 비경구 투여가 아닌 방법으로 투여하기 위해, 펩타이드들은 불활성화를 방지할 수 있는 물질로 코팅되거나 이와 함께 투여될 수 있다. 예컨대, 펩타이드는 첨가제와 함께 투여될 수 있고, 효소 억제제와 병용 투여하거나 리포좀 형태로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 첨가제는 레조르시놀(resorcinols), 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르(polyoxyethylene oleyl ether) 및 n-헥사데실 폴리에틸렌 에테르(n- hexadecyl polyethylene ether)와 같은 비이온성 계면활성제(non-ionic surfactants)를 포함한다. 효소 억제제는 판크레아틱 트립토판 억제제(pancreatic tryptophan inhibitor), 디이소프로필플루오로인산(diisopropylfluorophosphate, DEP) 및 트라실롤(trasylol)을 포함한다. 리포좀은 수중유중수(water-in-oil-in-water) CGF 에멀젼 뿐만 아니라 공지의 리포좀을 포함한다. 상기 약학적 조성물은 또한 비경구 또는 복강 내로 투여될 수 있다. 또한 분산이 글리세롤 액체 폴리에틸렌 글리콜(glycerol liquid polyethylene glycols), 및 이들의 혼합물 및 오일 내에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용상태 하에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위하여 보존제(preservative)를 포함할 수 있다.

[0041] 주입용으로 적합한 상기 약물형태는 멸균수용액(수용성) 또는 분산 및 멸균 주입 용액 또는 분산의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 있어서 상기 형태는 멸균된 것이어야 하며 또한 용이한 주사능을 갖는다는 점에서 유체이어야 한다. 상기 형태는 제조 및 보관 상태에서 안정하여야 하며, 박테리아 및 균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대항하여 보존되어야 한다. 상기 담체는 예컨대, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일과 같은 용제 또는 분산매(dispersion media)를 포함할 수 있다. 예컨대, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅의 사용에 따라, 분산에 관하여 요구되는 입자크기의 유지에 따라 및 계면활성제의 사용에 따라 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 예컨대, 클로로부타놀, 페놀, 소르브산, 티메로살(theomersal) 등 다양한 항균 및 항진균제에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에서, 예컨대, 당류 또는 소듐 클로라이드와 같은 등장화제(isotonic agents)를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주입가능한 조성물의 장기적인 흡수는 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수지연제의 조성물 내 사용에 의하여 이루어질 수 있다.

[0042] 상기 펩타이드들이 적절하게 보호되었을 때, 상기 약학적 조성물은 예컨대, 불활성 희석제 또는 흡수가능한 식용 담체와 함께 구강으로 투여되거나, 또는 단단하거나 또는 부드러운 껍질의 젤라틴 캡슐에 봉입되거나, 또는 정제로 압축되거나, 또는 다이어트 식품과 함께 직접 혼합될 수 있다. 구강 치료적 투여에 있어서, 상기 활성 화합물은 첨가제와 혼합되고 삼킬 수 있는(ingestible) 정제, 구강(buccal) 정제, 알약(troches), 캡슐, 엘릭시르제(elixirs), 현탁액(suspensions), 시럽, 웨이퍼(wafers) 등의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 조성물 및 제제는 적어도 1중량의 활성 화합물을 포함한다. 상기 조성물 및 제제의 비율은 물론 달라질 수 있다. 이러한 치료적으로 유용한 조성물 내 활성 화합물의 양은 획득될 적합한 용량이다. 본 발명에 따른 바람직한 조성물 또는 제제는 활성 화합물을 약 0.1 μg 내지 2000 mg로 포함하는 구강 단위투여 형태로 제조된다.

[0043] 상기 정제, 알약, 캡슐 등은 또한 다음의 것들을 포함할 수 있다: 트래거캔스(tragacanth) 검, 아카시아 검, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 및 수크로스, 락토오스 또는 사카린과 같은 감미제가 추가되거나 페퍼민트, 살리실산(oil of wintergreen), 또는 체리향과 같은 향미제. 상기 단위투여 형태가 캡슐인 경우, 상술한 물질들에 추가로 액체 담체를 더 포함할 수 있다. 다양한 다른 물질들이 코팅으로서 또는 상기 단위투여 형태의 물리적 형태를 변경하기 위해 존재할 수 있다. 예컨대, 정제, 알약 또는 캡슐은 쉘락(shellac), 당류 또는 이들 모두로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)는 활성 화합물, 감미제로서 수크로스, 보존제로서2메틸 및 프로필파라벤, 색소 및 체리 또는 오렌지 향과 같은 향료를 포함할 수 있다. 물론, 모든 단위투여 형태 제조에 사용된 물질들은 사용되는 양에서 약학적으로 순수하고 대체로 무독성이어야 한

다. 또한, 상기 활성 화합물은 서방성 제제 및 제형 내로 혼합될 수 있다.

[0044] 본 명세서의 펩타이드 또는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제와 같이 사용될 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제는 모든 용제, 분산매, 코팅 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질로서 이러한 매체 및 물질의 사용은 당분야에 잘 알려져 있다. 어떠한 공지의 매체 또는 물질이 상기 활성 성분과 양립할 수 없는 경우가 아닌 한, 치료적 조성물 내에서 이들의 사용이 고려될 수 있다. 추가의 활성 성분 또한 상기 조성물 내에 포함될 수 있다. 예컨대, 리포좀 내 봉입, 미립자(microparticles), 미소캡슐(microcapsules), 수용체 매개 엔도시토시스(receptor-mediated endocytosis)와 같은 다양한 전달 체계가 알려져 있으며 본 발명의 화합물을 투여하는데 사용될 수 있다. 도입 방법은 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 주사, 피하, 비강내, 경막 외, 및 구강 경로를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 화합물 또는 조성물은 예컨대, 주입 또는 순간 주사에 의하여, 상피 또는 점막피부 내벽(예컨대, 구강 점막, 직장 및 장점막 등)을 통한 흡수에 의하여 투여되는 등, 어떠한 공지의 경로를 통해서든 투여될 수 있으며, 또한 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전체적 또는 국소적일 수 있다. 또한, 상기 본 발명의 약학적 화합물 또는 조성물을 심실내(intraventricular) 및 척추 강내 주사를 포함하여 어떠한 적절한 경로에 의해서든 중추신경계로 도입하는 것이 바람직할 수 있으며; 심실내 주사는 예컨대 옴마야 리저버(Ommaya reservoir)와 같이, 리저버에 부착된 심실내 카테터(catheter)에 의해 용이하게 이루어질 수 있다. 폐의 투여 또한 예컨대, 흡입기 또는 분무기의 사용에 의해, 및 연무제(aerosolizing agent)와 배합하여 적용될 수 있다.

[0045] 따라서, 신규 합성 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 포함하는 구강 병원성 대해 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 또는 구강질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0047] 상기 구강질환은 충치(dental caries) 및 치주염(periodontal disease)을 포함한다.

[0048] 본 발명의 펩타이드가 상기와 같은 항균용 또는 구강질환 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는, 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캅셀 형태이다.

[0049] 본 발명의 건강기능식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 항균용 또는 구강질환 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강기능식품을 섭취함으로써 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.

[0051] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0052] 상기 외에 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범

위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0053] 따라서, 신규 합성 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 포함하는 구강 병원성 대해 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 구강질환 예방 및 개선용 의약외품조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명의 항균 펩타이드를 의약외품 조성물의 첨가물로 사용할 경우, 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용하는 등의 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 항균 펩타이드의 함량은 의약외품의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 예를 들어, 의약외품 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량부, 바람직하게는 1 내지 30 중량부 및 보다 바람직하게는 1 내지 10 중량부의 함량으로 포함될 수 있다.

[0057] 구강 제품의 예는 치약, 구강 청결제, 양치액, 연고액 및 츄잉검으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 항균 펩타이드 의약외품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.

[0059] 본 발명의 항균 펩타이드 의약외품은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 그 상세한 내용은 약학 조성물에 관하여 전술한 바와 같다.

[0060] 본 발명의 항균 펩타이드 의약외품은 충치 및 치주염의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0061] 따라서, 신규 합성 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 의약외품조성물은 S. 뮤탄스(S. *mutans*), S. 고르도니(S. *gordonii*), 및 A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 포함하는 구강 병원성 대해 항균 활성을 나타냄을 확인함으로써 구강 질환의 예방 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] **<실시예 1> 박테리아 균주 및 성장 배지**

[0064] 본 발명에서 사용된 박테리아 균주는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)(ATCC 25175), 스트렙토코커스 고르도니(*Streptococcus gordonii*)(KCTC 3286), 및 아그레가티박터 악티노마이세템코미탄(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) Y4 (KCTC 3698)이었다.

[0065] 모든 미생물은 표준 배양으로 37℃에서 뇌 심장 주입(brain heart infusion(BHI))을 포함하는 트립틱 소이 아가(TSA, Difco Laboratories, USA)에서 성장시켰다. S. 뮤탄스(S. *mutans*) 및 S. 고르도니(S. *gordonii*)를 산소 조건(aerobic conditions(5% CO_2))하에서 배양한 반면, A. 악티노마이세템코미탄(A. *actinomycetemcomitans*)을 혐기성상태(100% N_2)에서 배양하였다.

[0066] **<실시예 2> 펩타이드 라이브러리 스크리닝에 의한 항균 헥사펩타이드의 선별**

[0067] 구강 병원균에 대해 항균성을 갖는 펩타이드를 발굴하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0068] 구체적으로, 본 발명에서 사용된 헥사펩타이드(헥사머(hexamers))는 포스텍(POSTECH (Pohang, Korea))의 펩타이드 라이브러리 지원센터(Peptide Library Support Facility; PLSF)에서 제공받았으며, 사용된 라이브러리는 PS-SPCL이다. 상기 펩타이드 라이브러리는 원-비드-원 펩타이드(one-bead one-peptide) 라이브러리이고, 베이스(base)로서 폴리스티렌 매트릭스(polystyrene matrix)를 활용하였으며 링커로서 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol)를 활용하였다(Novabiochem TG-resin, 01-64-3). 상대 비율을 갖는, 19개의 다른 아미노산 (시스테인(cysteine)을 제외) 중에 하나를 포함하는 혼합된 (X) 포지션은 근접-같은 몰(equimolar) 비율을

산출하도록 맞추었다.

[0069] 각각의 아미노산은 C-말단 아미드화(amidation)에 의해 합성되었다. 단일 라이브러리는 114 튜브(6 위치 × 19 아미노산)을 포함하고 총 펩타이드 농도는 30 mM이었고 각각의 펩타이드는 12 nM이었다. 19개의 하위-라이브러리가 있고 각각은 2,476,099 펩타이드를 포함한다. 각각의 합성 펩타이드는 펩트론(Peptron (Daejeon, Korea))로부터 구입하였다. 각각의 펩타이드는 C18 컬럼(Waters 290 separation module, USA) 상의 고압력 액체 크로마토그래피로 정제되었고 HP1100 시리즈 LC/MSD (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)로 질량 분석법으로 확인되었다. 펩타이드 라이브러리 및 각각의 펩타이드 모두는 공급자가 제시한 대로 사용하였다. 펩타이드 라이브러리는 6개의 하위-라이브러리를 포함하고 헥사펩타이드는 $O(_{1-6})XXXXX-NH_2$로서 나타내어진다. 여기서, O는 특정 아미노산을 나타내고 X는 동일농도(equimolar) 혼합물인 19개의 아미노산 중의 하나이다.

[0070] 얻어진 라이브러리를 두 가지 다른 농도로 S. 뮤탄스에 대해 항균성의 활성에 대해 스크리닝 하였고, 각각 정의된 위치에서 유의적인 항균활성을 가지는 아미노산을 확인하였다. 구체적인 선별은 각각의 하위-라이브러리의 항균 활성을 측정하여 수행되었다. 충치에서 생긴 박테리아, S. 뮤탄스를 테스트 모델로서 사용하였다. S. 뮤탄스의 성장을 비처리된 대조군(테스트된 2 개 농도)의 항균활성의 30%보다 적게 감소시킨 하위-라이브러리는 추가 선별에 사용되었다.

[0071] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 아르기닌(arginine) (R) 및 트립토판(tryptophan) (W)이 첫 번째 위치에 있는, 예를 들면, 각각 $RXXXXX-NH_2$ 및 $WXXXXX-NH_2$가 있는 펩타이드 라이브러리를 선별하였다. 상기 두 개의 펩타이드는 0.6 mM 및 1.5 mM에서 강한 성장 억제를 나타냄을 확인하였다(도 1A). 위치 2 ($XOXXXX-NH_2$)를 조사하였을 때, R 및 W가 1.5 mM에서 높은 항균 활성을 나타내는 가장 효과적임을 나타냈다. 그러나, 0.6 mM에서는 항균활성이 낮았다(R에 대한 대조군 값의 73.7%, 및 W에 대한 대조군 값의 94.7%). 또한, 위치 2의 Gln 및 Lys은 좋은 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 1B). R 및 W는 위치 3 ($XXOXXX-NH_2$)에서 가장 효과적이었다. 리신(Lysine (K))는 1.5 mM에서 높은 성장 억제 활성을 나타냈으나, 0.6 mM에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 위치 4 및 5 ($XXXOXX-NH_2$ 및 $XXXXOX-NH_2$)에서 R과 W를 포함하는 펩타이드는 또한 매우 효과적인 반면, 아스파라긴(asparagine)(N)은 위치 6($Ac-XXXXXO-NH_2$)에서 가장 효과적이었고, 이어서 R이 효과적이었다. 상기 위치 스캐닝 결과는 위치 1의 R/W, 위치 2의 R/W/K, 위치 3의 R/W/K, 위치 4의 R/W, 위치 5의 R/W 및 위치 6의 R/N을 갖는 펩타이드가 가장 효과적이었다. 양전하된 아미노산(positinely chatged amino acid)(R) 또는 비전하된 폴라 아미노산(uncharged polar amino acid)(W)는 대부분의 위치에서 나타났다. 이는 R 또는 W가 S. 뮤탄스에 대한 항균 활성에 필수적임을 나타낸다. 상기 결과에 따라 선택된 펩타이드는 양친매성(amphiphilic)이기보다는 매우 친수성(hydrophilic)이고 용해성(soluble)일 수 있다. 따라서, 세 개의 펩타이드를 결정하였다. 두 가지는 1 내지 6의 아미노산 위치의 혼합물을 포함하고, 하나는 모든 6 위치의 특정 아미노산을 포함한다. 따라서, 세 개의 헥사펩타이드, $RXXXXN-NH_2$(펩-1(pep-1)), $WXXXXN-NH_2$(펩-2(pep-2)), 및 $RRRWRN-NH_2$(펩-3(pep-3))를 합성하였다.

[0072] **<실시예 3> 구강미생물에 대한 헥사펩타이드의 활성**

[0073] S. 뮤탄스, S. 고르도니, 및 A. 악티노마이세템코미탄에 대한 세 개의 펩타이드의 활성을 테스트하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0074] 구체적으로, 각각의 박테리아의 테스트 균주를 5 ㎖의 풍부한 액체배지에 배양하고 570 nm에서 광학밀도 1.0로 밤사이 배양하였고, 1×10^8 콜로니 형성유닛(CFU)/㎖에 해당한다. 각각의 박테리아 균주는 멸균 96-웰 플레이트의 트립틱 소이 액체배지(TSB)로 접종하여 최종부피 100 ㎕ (1:100 희석)를 생산하였다. 적절한 펩타이드 저장용액(stock solution)의 부피는 플레이트(최종 농도: 1.5 mM)의 첫 번째 컬럼에 첨가한 후 플레이트(1.5 mM부터 0.15 mM까지)를 멸균적으로 희석하였다. 대조군은 단지 비히클(vehicle)을 첨가하였다. 플레이트를 진탕(shaking)하지 않고 18 시간 동안 산소성(aerobic) 또는 무산소성(anaerobic) 조건하에서 37℃에서 배양하였다. 흡광도를 570 nm에서 측정하여 박테리아 성장을 정량화하였다. 모든 실험은 3회씩 수행되었다. 펩타이드에 대한 억제 농도 50(IC_{50}) 값을 항균성의 활성 분석으로부터 유래된 그래프로부터 계산되었고 IC_{50} 값을 3회씩 결정되었다.

[0075] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 펩-1(pep-1) 및 펩-2(pep-2) 모두는 0.6 mM 및 1.5 mM에서 S. 뮤탄스(S.

mutans)에 대한 농도 의존적으로 현저한 항균성의 활성을 나타냄을 확인하였다(도 2A). 그러나, 펩-3(pep-3)는 테스트된 농도에서 S. 뮤탄스(S. mutans)에 대하여 활성을 나타내지 않았다. 또한, A. 악티노마이세템코미탄(A. actinomycetemcomitans)에 대하여 펩타이드의 항균 활성을 테스트하였을 때, 항균 활성을 나타내지 않았다.

[0076] **<실시예 4> 펩-1(pep-1), 펩-2(pep-2), 및 펩-3(pep-3)의 α-헬리컬 윌(a-helical wheels)의 모델링화**

[0077] 펩-1, 펩-2, 및 펩-3의 α-헬리컬 윌을 모델링화하였다.

[0078] 구체적으로, 펩타이드의 2차 구조는 -helix, -sheet 및 loop등의 구조를 가지는데 helix의 구조를 갖는 펩타이드는 양친매성 (amphiphilic)을 나타낸다. -helix는 전형적으로 나선형의 구조를 이루며 아미노산 사슬이 한바퀴를 도는데 아미노산 3.6개가 필요하고 피치 (pitch)는 5.4 이다. 이러한 펩타이드의 나선형 구조를 위에서 내려다 본 형태를 도식하면 헬리컬 윌(helical wheel) 형태가 된다. 헬리컬 윌에서 잔기(residue)는 C-말단부터 N-말단까지 단일 글자 코드(single letter code)로 지정되거나 또는 연속적으로 숫자화된다. 양전하된 아미노산은 그늘진 어두운 회색(shaded dark grey)이고, 폴라 아미노산(polar amino acid)은 그늘진 밝은 회색(shaded light grey)이다.

[0079] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 상기 펩타이드들의 전체 전하는 펩-1 및 펩-2에 대하여 +1/0이고, 펩-3에 대하여 +4이다. 예상한 바와 같이, 펩-1 및 펩-2는 위치 1 및 6의 고정된 양성(positive) 또는 폴라(polar) 아미노산을 정착화하였고, 이는 만약 양전하되거나 폴라 아미노산이 위치 X1 및/또는 위치 X4에 차지하고 논폴라(nonpolar) 아미노산은 X2 및 X3 위치에 있다면, 헬리컬 윌은 양친매성(amphiphilic)일 수 있음을 제시한다(도 3). 4 개의 양전하된 아미노산 (R)이 포함되어 있기 때문에, 펩-3의 전체 전하는 +4였다. Pep-3 내의 아르기닌(arginine) 잔기는 잘 분산되었으므로 펩타이드 헬릭스의 한쪽 면으로 이동되지 않았다. 추가적으로, 펩-3(W 및 N)의 다른 아미노산은 폴라(polar) 아미노산이었다. 따라서, 펩-3는 친수성 펩타이드였고 항 박테리아 펩타이드에서 빈번히 발견되는 양친매성(amphiphilic) α-헬리컬(helical) 구조를 형성할 수 없다. 양친매성의 부재는 펩-3의 낮은 항균성의 활성을 설명한다.

[0080] 펩-4(pep-4) RQWWRN-NH_2를 헬리컬 윌에 맵핑하였을 때, 양전하된 폴라 아미노산이 잘 분산되어 있었다. 펩-4는 세 개의 테스트 균주에 대하여 활성을 나타내지 않았다. 또한 다른 헥사펩타이드인, 펩-1(pep-1)의 위치 X4에 R 또는 W 을 포함하는 RXXXRN-NH_2 (펩-5(pep-5)) 및 RXXXWN-NH_2 (펩-6(pep-6))는 펩타이드 헬릭스의 양친매성(amphiphilic) 특성이 증가되었으며 항균활성을 나타내었다. 그 정도는 펩-1 또는 펩-2의 항균 활성만큼 크지 않았다.

[0081] **<실시예 5> 항균활성을 나타낸 펩타이드 서열 확인**

[0082] 상기 <실시예 4>에서 항균활성을 갖는 것으로 정의된 펩타이드를 이용하여 구체적인 서열의 펩타이드가 항균활성을 나타내는지를 조사하기 위하여 하기 <표 1>의 서열을 갖는 펩타이드를 이용하여 상기 <실시예 3>의 동일한 방법으로 항균실험을 수행하였다.

[0083] 그 결과, <표 1>의 서열을 갖는 펩타이드는 S. 뮤탄스(S. mutans)에 대한 농도 의존적으로 현저한 항균성의 활성을 나타냄을 확인하였다

표 1

[0084]

RGAARN-NH_2	서열번호 1
RGLLRN-NH_2	서열번호 2
RSAARN-NH_2	서열번호 3
RLGGKN-NH_2	서열번호 4
WRRAAN-NH_2	서열번호 5
WRRLLN-NH_2	서열번호 6

WKKAGN-NH_2	서열번호 7
WSKAAN-NH_2	서열번호 8

[0085] **<실시예 6> 항균성의 활성 기전 확인**

[0086] 상기 결과에 기반하여 항균성의 제제로서 가장 큰 잠재성을 나타낸 펩-1 및 펩-2의 항균성에 대한 기전을 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

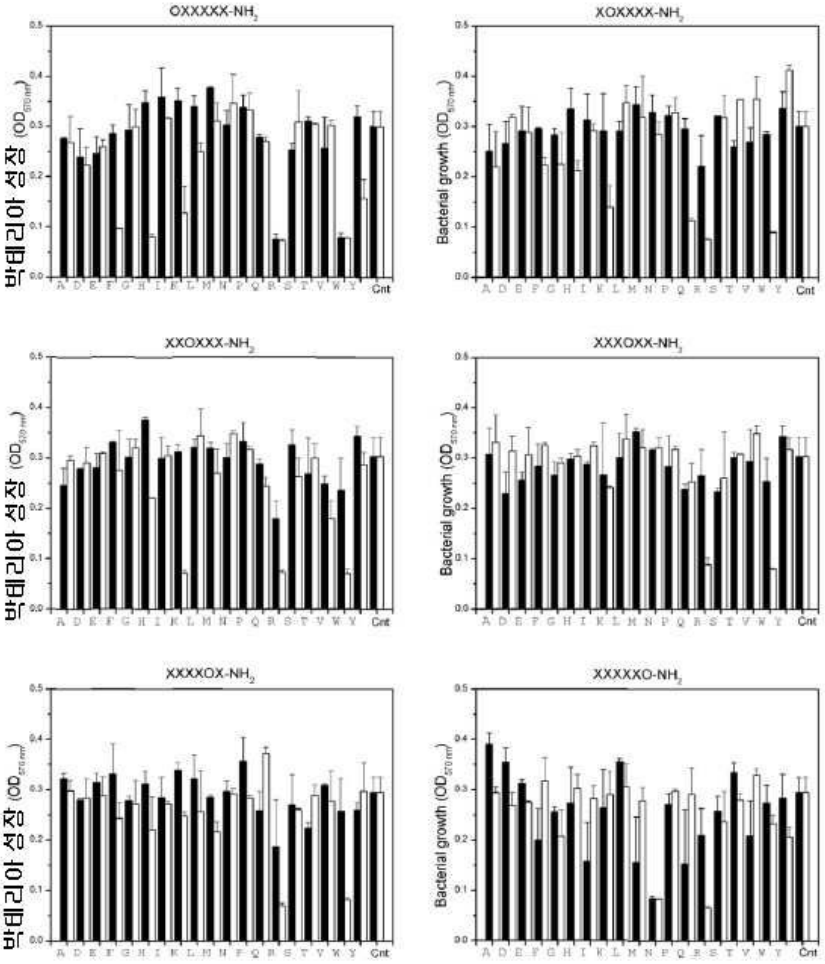
[0087] 구체적으로, 상기 항균 펩타이드의 박테리아 세포 멤브린의 온전함(integrity)에 대한 효과를 조사하였다. 첫째, 가장 영향받기 쉬운 박테리아인 S. 뮤탄스(S. mutans)에 대한 펩-1 및 펩-2의 IC_{50} 값을 결정하였다. 펩-1 및 펩-2의 IC_{50} 값은 각각 대략 0.6 및 0.4 mM이었다.

[0088] 투과전자 현미경(transmission electron microscopy(TEM)) 분석을 위해서, 하루밤 배양한 S. 뮤탄스를 신선한 배지(1:100 희석)으로 접종하였고 펩타이드의 존재하에서 하루밤 동안 성장시켰다. TEM 시료 표본을 준비하기 위하여, 박테리아 상층액을 2% 글루타알데하이드(glutaraldehyde) 및 4% 포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시켰다. 에탄올로 탈수화하고, 전자밀도(electronic density)를 증강시키기 위하여 오스뮴 테트록시드(osmium tetroxide)에서 시료를 후-고정(post-fixated)하였다. 준비된 시료를 포스페이트(phosphate) 또는 카코딜레이트(cacodylate) 버퍼로 세척하여 여분의 고정액을 제거한 후 탈수화하였다. 침윤 단계는 상온에서 수행되었다. 표본을 Epon 812에 충분히 끼워넣고 시료 수지의 점도(viscosity)를 증가시켰다. 초박편(Ultra-thin sections)는 울트라마이크로톰(ultramicrotome)으로 절단되었고(Sorvall instrument MT6000, Tucson, AZ, USA), 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 및 리드 시트레이트(lead citrate)로 전자적으로 염색하였다. 박테리아 형태(morphology)를 TEM(Hitachi H-600, Hitachi Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

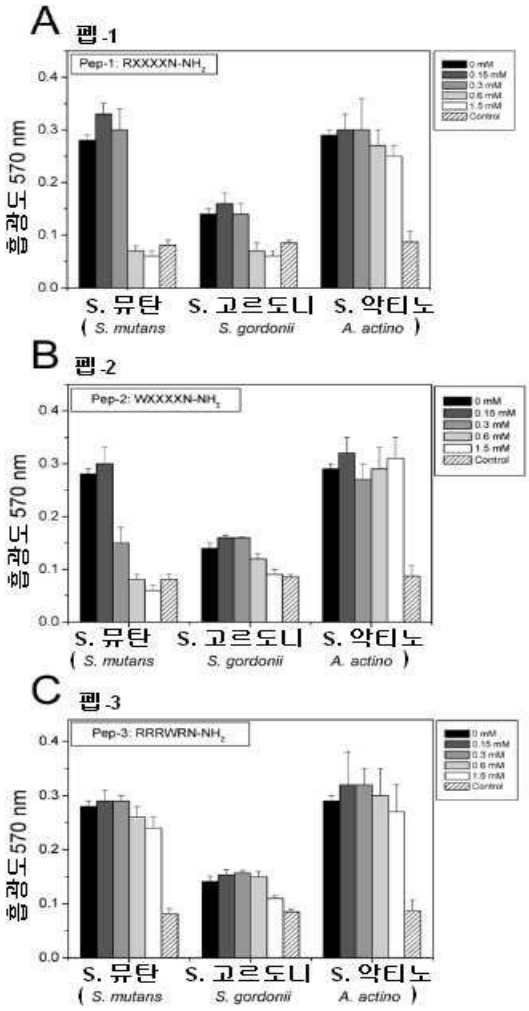
[0089] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 IC_{50}의 펩-1 및 펩-2으로 처리된 S. 뮤탄스(S. mutans)의 TEM 이미지를 나타내고 있다. 펩타이드 처리(도 4B 및 4C)는 비처리된 대조군(도 4A)과 비교하여 박테리아 세포 멤브린을 파괴함을 확인하였다. 펩-1 또는 펩-2가 처리된 박테리아는 특정 분할 단계에서 칸막이 역활을 하는 것으로 보이고 다른 박테리아로 융합되었다. 이는 멤브린의 기능저하를 나타낸다. 두 개의 펩타이드는 박테리아 멤브린 불안정화의 유사한 패턴을 나타냈으며, 두 개 모두 유사한 살균 기전을 가질 수 있음을 나타낸다.

도면

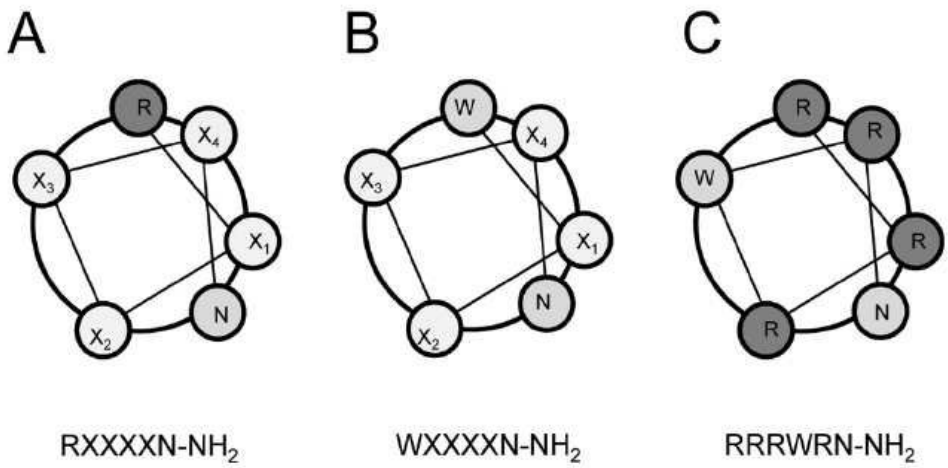
도면1


OXXXXX-NH2
XOXXXX-NH2
XXOXXX-NH2
XXXOXX-NH2
XXXXOX-NH2
XXXXXO-NH2
박테리아 성장 (OD670 nm)
Bacterial growth (OD670 nm)
박테리아 성장 (OD570 nm)
Bacterial growth (OD570 nm)
박테리아 성장 (OD270 nm)
Bacterial growth (OD270 nm)
A D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y Cnt

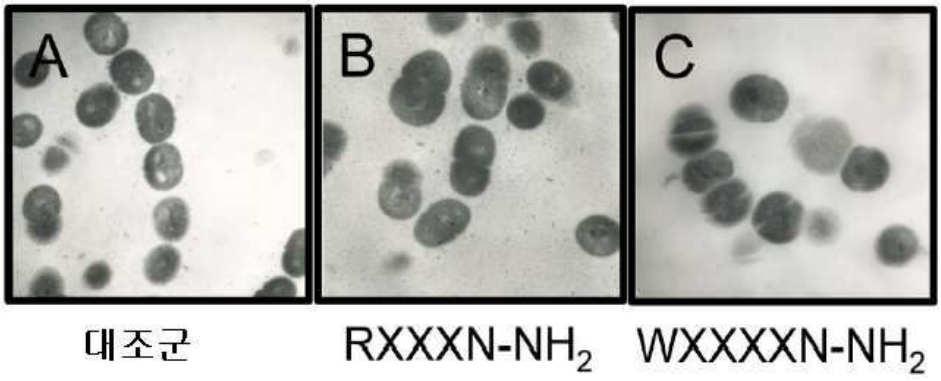
도면2


A 펩-1
Pep-1: RXXXXN-NH2
흡광도 570 nm
S. 뮤탄 (S. mutans)
S. 고르도니 S. gordonii
S. 악티노 A. actino)
B 펩-2
Pep-2: WXXXXN-NH2
C 펩-3
Pep-3: RRRWRN-NH2

도면3


A
B
C
RXXXXN-NH2
WXXXXN-NH2
RRRWRN-NH2

도면4



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Croup of Kyung Hee University

<120> Pharmaceutical composition for the prevention and treatment of oral disease containing antimicrobial petide hexamers, and use thereof

<130> 14P-09-026

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGAARN-NH2 peptide

<400> 1

Arg Gly Ala Ala Arg Asn
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGLLRN-NH2 peptide

<400> 2

Arg Gly Leu Leu Arg Asn
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSAARN-NH2 peptide

<400> 3

Arg Ser Ala Ala Arg Asn

1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RLGGKN-NH2 peptide

<400> 4

Arg Leu Gly Gly Lys Asn

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WRRAAN-NH2 peptide

<400> 5

Trp Arg Arg Ala Ala Asn

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WRRLLN-NH2 peptide

<400> 6

Trp Arg Arg Leu Leu Asn

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WKKAGN-NH2 peptide

<400> 7

Trp Lys Lys Ala Gly Asn

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WSKAAN-NH2 peptide

<400> 8

Trp Ser Lys Ala Ala Asn

1 5