(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0144066
(43) 공개일자 2020년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A01N 33/08* (2006.01)
A23K 20/147 (2016.01) *A23K 20/195* (2016.01)
A23L 3/3463 (2017.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61Q 17/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A01N 33/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0072112
(22) 출원일자 2020년06월15일
심사청구일자 2020년06월15일
(30) 우선권주장
1020190071635 2019년06월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
유영도
서울특별시 강남구 삼성로 212 (대치동, 은마아파트 6-1401)
이혜라
경기도 용인시 기흥구 중부대로55번길 11, 영통빌리지 130동 203호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

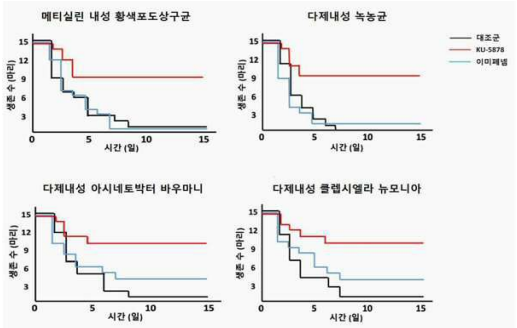
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **라이신 치환을 포함하는 Romo1 유래 항균 펩타이드 및 그 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 Romo1 단백질 유래의 항균 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로 Romo1 단백질의 두 번째 알파 헬릭스(α-helix 2) 영역의 아미노산 서열을 갖는 다양한 펩타이드에서 그람 양성, 그람 음성, 및 다제내성 박테리아에 대한 항균 활성을 확인하여 상기 각 펩타이드와 각 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물 등을 제공하는 것이다. 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체는 기존의 항생물질 및 항생 펩타이드보다 다양한 종류의 세균과 다제내성 박테리아에 대해 보다 우수한 항생능력을 가지고, 특히 혈관 내에서 다양한 박테리아에 대한 항균 활성을 가짐으로써, 새로운 항생제로 광범위한 세균 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 물질로 제공될 수 있다. 이에, 본 발명의 항균 펩타이드를 포함하는 조성물은 감염성 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 의약용, 의약부외용, 식품 및 사료 첨가용, 농약 및 화장품 첨가용 등 다양한 방면으로 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도4



균주	생존율(%)		
	대조군	이미페넴 (4 회 투여)	KU-5878 (1 회 투여)
메티실린 내성 황색포도상구균	7	7	60
다제내성 녹농균	0	7	60
다제내성 아시네토박터 바우마니	7	27	67
다제내성 클렙시엘라 뉴모니아	7	27	67

(52) CPC특허분류
A23K 20/147 (2016.05)
A23K 20/195 (2016.05)
A23L 3/34635 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 24의 아미노산 서열;

서열번호 24의 아미노산 서열에서 1번째 K가 T로 치환되거나, 또는 12번째 아미노산 T가 G로 치환된 아미노산 서열; 또는

서열번호 24의 아미노산 서열에서 2번째 아미노산이 T로 치환된 아미노산 서열로 이루어지는 항균 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항균 펩타이드는 적어도 하나의 메티오닌이 노루루신 또는 이소루신으로 치환된,

항균 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

하기 (a) 내지 (s) 중 어느 하나의 변이를 더 포함하는 항균 펩타이드:

(a) 1 내지 12, 14 내지 15, 17 내지 21번째 아미노산 중 어느 하나의 아미노산이 결손

(b) 14번째 아미노산 결손; 및 1 내지 8, 12, 15, 또는 18번째 아미노산이 결손

(c) 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손 ; 및 1 내지 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손

(d) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 및 1, 2, 또는 12번째 아미노산 결손

(e) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 및 18번째 아미노산 결손

(f) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손

(g) 3 또는 4번째 아미노산 결손; 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 5, 6, 7, 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손

(h) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3, 4, 7, 또는 8번째 아미노산 결손

(i) 1, 2, 5, 또는 6 번째 아미노산 결손; 7, 8, 또는 11번째 아미노산 결손; 14 또는 15번째 아미노산 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손

(j) 5 또는 6번째 아미노산 결손; 11번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 3 또는 4, 7 또는 8, 12, 및 14번째 중 어느 하나의 아미노산 결손

(k) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 및 15번째 아미노산 결손

(l) 1, 2, 5, 또는 6번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 14, 및 18 번째 아미노산 결손

(m) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12번째, 및 15번째 중 어느 하나의 아미노산 결손

(n) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손

(o) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 2개의 아미노산 결손

(p) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및

18번째 아미노산이 결손

(q) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 3개의 아미노산 결손

(r) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손

(s) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항균 펩타이드는 10 및 14번째 아미노산쌍, 또는 14 및 18번째 아미노산쌍이 스테이플화된,

항균 펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 스테이플화는 아미노산쌍이 펜테닐알라닌 또는 옥테닐알라닌으로 치환되고 상호 가교결합한 것인,

항균 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항균 펩타이드는 C말단에 연결된 아미노산 서열을 더 포함하고,

상기 C말단에 연결된 아미노산 서열은 R 또는 K가 1 내지 3개 반복하는 서열로 이루어진 것인,

항균 펩타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Romo1 단백질 유래의 항균 펩타이드에 관한 것으로서, 구체적으로 Romo1 단백질의 두 번째 알파 헬릭스(α-helix 2) 영역의 아미노산 서열을 갖는 다양한 펩타이드에서 그람 양성, 그람 음성, 및 다제내성 박테리아에 대한 항균 활성을 확인하여 상기 각 펩타이드와 각 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물 등을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 박테리아 감염에 대한 치료 수단으로 사용되고 있는 항생제의 가장 큰 문제점은 박테리아의 항생제 내성 획득이다. 영국정부의 웰컴트러스트 보고서에 의하면 2050년에는 기존 항생제로 치료할 수 없는 슈퍼박테리아에 의해 세계적으로 사망자 수가 1,000만 명을 초과하여, 사망 원인에 있어서 슈퍼박테리아 감염이 암을 추월하는 위협이 될 것으로 전망된다.

[0003] 또한, 세계보건기구(WHO)는 수많은 다제내성균에서 위급 단계(critical priority)에는 있는 박테리아로는 카바페넴 내성 아시네토박터균(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*), 카바페넴 내성 녹농균(carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*), 및 카바페넴 내성 장내세균 속(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae sp.*) 균종을 선정하고, 최후의 항생제로 알려진 카바페넴계 항생제에 내성을 보이는 그람 음성 슈퍼박테리아를 최우선으로 해결해야 한다고 발표하였다.

[0004] 한편, 균혈증은 혈액 중에 세균이 살아 있는 경우를 말하며, 감염의 직접적 또는 간접적인 영향에 의하여 발생하는 것이 패혈증이다. 즉, 패혈증은 인체에 침입한 세균이 혈액에 감염됨으로써 나타나는 전신성 염증반응 증

후군으로서 감염 후 6시간 경과 후에는 생존률이 30%가 안되는 질병이다. 패혈증 원인균은 연쇄상구균, 황색포도상구균, 대장균, 폐렴균, 녹농균, 진균을 비롯하여 매우 다양하며, 이러한 패혈증 유발 원인균의 다양성에 의해 그 치료에 어려움이 있다.

[0005] 현재까지 패혈증의 치료는 주로 면역 반응을 억제하거나 혈액 응고를 저해하는 등 증상의 완화를 목적으로 하는 치료가 최선이며, 근본적인 치료를 위해서는 초기에 환자가 감염된 균종 확인을 위한 세균 동정이 필요하나, 상술한 바와 같이 패혈증에 의한 즉각적인 전신 염증 반응에 의해 세균 동정에 소요되는 시간이 확보되지 못한다는 점에 문제가 있다. 또한, 가령 패혈증 원인균을 성공적으로 동정하였더라도, 그 원인균이 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성 박테리아인 경우 그 치료에 적절한 약물이 없다는 점에 문제가 있다. 이에, 패혈증 원인균에 대한 동정 없이 광범위한 세균에 대한 항균활성을 갖는 항생제의 개발이 필요하며, 특히 다제내성 박테리아에 대한 항균활성을 갖는 항생물질의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 상술한 바와 같이, 현재까지 인류가 사용하고 있는 항생제의 가장 큰 문제점은 박테리아의 내성 획득이고, 이를 해결하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 박테리아의 항생제 내성 획득을 극복하기 위해 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 동물 또는 인간의 방어 단백질(host defense protein) 유래의 다양한 항균 펩타이드가 개발되었으나, 인체 면역 체계 내에서 내성 획득의 가능성이 있고, 혈액 내에서 짧은 반감기와 인체에 나타내는 독성의 문제 및 기존 항생제와 비교하여 제한적인 약효를 나타내는 등의 문제가 있어 실용화되지 못하고 있는 실정이다. 일례로, 마개닌(magainin)은 1999년 미국에서 개발된 항균 펩타이드로 임상 3상 이후 FDA 승인을 요청하였으나 그 약효가 종래 항생제와 비교하여 우수하지 못해 승인이 거부되었다. 또한, 2003 년에 답토마이신(daptomycin), 2014 년에 오리타반신(oritavancin)이 미국 식약처에서 승인을 받았으나, 두개의 펩타이드 모두 그람 양성균에서만 항균 활성을 나타내었으며, 피부 감염 질환에만 적용될 수 있었다.

[0007] 상술한 바와 같이 현재까지 그 약효와 적용의 제한에 의해, 균혈증 및 패혈증 등의 세균 감염 질환의 치료에 적용가능한 항균 펩타이드는 개발되지 못하였으며, 본 발명자들은 미토콘드리아 내막에 위치하는 Romo1 단백질의 두 번째 알파 헬릭스 구조가 그람 양성, 그람 음성, 및 다제내성 박테리아에서 항균활성을 나타내어 광범위한 세균 감염질환 치료에 적용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: WHO, Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (2017. 2. 27)

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Lee et al., J. Cell Biol., 217, 2059-2071, 2018

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 라이신 치환을 포함하는 Romo1 단백질 유래의 항균 펩타이드 및 상기 펩타이드의 아미노산 일부를 치환(substitution) 또는 결손(deletion)시킨 변형된 항균 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항생제와 상기 항균 펩타이드를 포함하는 식품 및 사료 첨가제, 화장료 조성물, 생물농약, 및 항균용 의약외품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 Romo1 단백질 서열 중 52 내지 79 번째 아미노산 영역에서 선택되는 임의의 아미노산을 기준으로 카르복시(C-) 말단 방향으로 연속된 7 내지 28개 아미노산 서열을

포함하는 항균 펩타이드를 제공한다.

[0013] 일 구현예로서, 상기 항균 펩타이드를 구성하는 하나 이상의 아미노산 서열이 치환(substitution) 또는 결손(deletion)된 항균 펩타이드를 제공한다.

[0014] 다른 구현예로서, 상기 펩타이드는 서열번호 2 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0015] 또 다른 구현예로서, 상기 펩타이드는 서열번호 16, 30, 40, 및 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0016] 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 예를 들면 서열번호 17 내지 29로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0017] 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 30의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 예를 들면 서열번호 31 내지 39로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0018] 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 40의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 예를 들면 서열번호 41 내지 44으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0019] 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 예를 들면 서열번호 46 내지 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0020] 또 다른 구현예로서, 바람직하게는 서열번호 17 내지 25, 27, 34, 37, 39, 42, 및 44로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 상기 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있고, 더욱 바람직하게는 서열번호 22, 23, 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 상기 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0021] 또 다른 구현예로서, 상기 펩타이드는 서열번호 13의 아미노산 서열; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 하기 (a) 내지 (h) 중 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열로 이루어지는 항균 펩타이드일 수 있다. (a)는 1번째 아미노산 K를 R로 치환, (b)는 2번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, (c)는 5번째 아미노산 Q를 K 또는 R로 치환, (d)는 6번째 아미노산 S를 K, R, 또는 H로 치환, (e)는 9번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, (f)는 10번째 아미노산 F를 W로 치환, (g)는 16번째 아미노산 I를 L로 치환, (h)는 20번째 아미노산 I를 G 또는 L로 치환일 수 있다.

[0022] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 적어도 하나의 메티오닌이 노루루신 또는 이소루신으로 치환된 것일 수 있다.

[0023] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 17, 18, 및 19 번째 아미노산 중 어느 하나가 결손되거나; 또는 3 또는 4번째 아미노산, 및 7 또는 8번째 아미노산이 결손된 것일 수 있다.

[0024] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 C말단에 연결된 아미노산 서열을 더 포함하고, 상기 C말단에 연결된 아미노산 서열은 R 또는 K가 1 내지 3개 반복하는 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0025] 다른 양상은, 서열번호 24의 아미노산 서열; 또는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 1번째 K가 T로 치환되거나, 또는 12번째 아미노산 T가 G로 치환된 아미노산 서열; 또는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 2번째 아미노산이 T로 치환된 아미노산 서열로 이루어지는 항균 펩타이드를 제공한다.

[0026] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 적어도 하나의 메티오닌이 노루루신 또는 이소루신으로 치환된 것일 수 있다.

[0027] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 하기 (a) 내지 (s) 중 어느 하나의 변이를 더 포함할 수 있다.

[0028] (a) 1 내지 12, 14 내지 15, 17 내지 21번째 아미노산 중 어느 하나의 아미노산이 결손; (b) 14번째 아미노산 결손; 및 1 내지 8, 12, 15, 또는 18번째 아미노산이 결손; (c) 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손 ; 및 1 내지 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손; (d) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 및 1, 2, 또는 12번째 아미노산 결손; (e) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 및 18번째 아미노산 결손; (f) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; (g) 3 또는 4번째 아미노산 결손; 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 5, 6, 7, 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손; (h) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3, 4, 7, 또는 8번째 아미노산 결손; (i) 1, 2, 5, 또는 6 번째 아미노

산 결손; 7, 8, 또는 11번째 아미노산 결손; 14 또는 15번째 아미노산 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; (j) 5 또는 6번째 아미노산 결손; 11번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 3 또는 4, 7 또는 8, 12, 및 14번째 중 어느 하나의 아미노산 결손; (k) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 및 15번째 아미노산 결손; (l) 1, 2, 5, 또는 6번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 14, 및 18 번째 아미노산 결손; (m) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12번째, 및 15번째 중 어느 하나의 아미노산 결손; (n) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손; (o) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 2개의 아미노산 결손; (p) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산이 결손; (q) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 3개의 아미노산 결손; (r) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손; (s) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손.

[0029] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 10 및 14번째 아미노산쌍, 또는 14 및 18번째 아미노산쌍이 스테이플화된 것일 수 있다. 상기 스테이플화는 아미노산쌍이 펜테닐알라닌 또는 옥테닐알라닌으로 치환되고 상호 가교결합한 것일 수 있다.

[0030] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 C말단에 연결된 아미노산 서열을 더 포함할 수 있고, 상기 C말단에 연결된 아미노산 서열은 R 또는 K가 1 내지 3개 반복하는 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0032] 또 다른 구현예로서, 상기 펩타이드는 하나 이상의 아미노산 서열이 변형(modification)된 것일 수 있다.

[0033] 또 다른 구현예로서, 상기 변이는 페길레이션(PEGylation), 아세틸레이션(acetylation), 카르복실레이션(carboxylation), 리피데이션(lipidation), 또는 아미데이션(amidation)일 수 있다.

[0034] 또 다른 구현예로서, 상기 펩타이드를 구성하는 아미노산은 각각 독립적으로 L-형 또는 D-형의 아미노산일 수 있으며, 방사선 또는 형광 라벨된 아미노산 유사체일 수 있다.

[0035] 또 다른 구현예로서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세균에 대해 항균 활성을 가질 수 있다.

[0036] 또 다른 구현예로서, 상기 그람 양성균은 포도상구균 속(*Staphylococcus sp.*), 간균 속(*Bacillus sp.*), 엔테로코커스 속(*Enterococcus sp.*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces sp.*), 및 스트렙토코커스 속(*Streptococcus sp.*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 속(Genus)에 속하는 세균일 수 있으며, 바람직하게 상기 그람 양성균은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 스트렙토마이세스 신데넨시스(*Streptomyces sindenensis*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 및 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세균일 수 있다.

[0037] 또 다른 구현예로서, 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia sp.*), 클렙시엘라 속(*Klebsiella sp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter sp.*), 수도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 및 엔테로박터 속(*Enterobacter sp.*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 속(Genus)에 속하는 세균일 수 있으며, 바람직하게 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세균일 수 있다.

[0038] 또 다른 구현예로서, 상기 다제내성균은 페니실린계(penicillins), 카바페넴계(carbapenems), 세팔로스포린계(cephalosporins), 퀴놀론계(quinolones), 마크로라이드계(macrolides), 테트라사이클린계(tetracyclins), 또는 글리코펩티드계(glycopeptides)에 속하는 1종 이상의 항생물질에 대한 내성을 갖는 상기 그람 양성균 또는 그람 음성균으로서, 바람직하게 상기 다제내성균은 메티실린 내성 포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus sp.*), 다제내성 수도모나스 속(multidrug-resistant *Pseudomonas sp.*), 반코마이신 내성 엔테로코커스 속(vancomycin-resistant *Enterococcus sp.*), 다제내성 클렙시엘라 속(multidrug-resistant *Klebsiella sp.*), 다제내성 아시네토박터 속(multidrug-resistant *Acinetobacter sp.*), 및 반코마이신 내성 포

도상구균(vancomycin-resistant *Staphylococcus sp.*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 속(Genus)에 속하는 세균일 수 있다.

[0039] 또 다른 구현예로서, 상기 다제내성균은 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *S. aureus*), 다제내성 녹농균(multidrug-resistant *P. aeruginosa*), 다제내성 아시네토박터 바우마니(multidrug-resistant *A. baumannii*), 다제내성 클렙시엘라 뉴모니아(multidrug-resistant *K. pneumoniae*), 반코마이신 내성 엔테로코커스 패시움(vancomycin-resistant *E. faecium*), 및 반코마이신 내성 황색포도상구균(vancomycin-resistant *S. aureus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세균일 수 있다.

[0040] 또 다른 구현예로서, 상기 다제내성 녹농균은 피페라실린(piperacilin), 피페라실린타조박탐(piperacilin-tazobactam), 세프타지딤(ceftazidime), 이미페넴(imipenem), 메로페넴(meropenem), 젠타마이신(gentamicin), 아미카신(amikacin), 및 시프로플록사신(ciprofloxacin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 갖는 것일 수 있으며, 상기 다제내성 아시네토박터 바우마니는 피페라실린, 피페라실린타조박탐, 세프타지딤, 이미페넴, 메로페넴, 젠타마이신, 아미카신, 시프로플록사신, 및 세페핌(cefepime)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 갖는 것일 수 있고, 상기 다제내성 클렙시엘라 뉴모니아는 피페라실린타조박탐, 세프타지딤, 세페핌, 이미페넴, 젠타마이신, 및 시프로플록사신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 갖는 것일 수 있다.

[0041] 또 다른 구현예로서, 상기 반코마이신 내성 엔테로코커스 패시움은 반코마이신 외에도 리팜핀(rifampin), 테트라사이클린, 젠타마이신, 에리트로마이신(erythromycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 및 암피실린(ampicillin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 추가로 갖는 것일 수 있으며, 상기 반코마이신 내성 황색포도상구균은 반코마이신 외에도 옥사실린(oxacillin), 벤질페니실린(benzylpenicillin), 암피실린, 및 세파졸린(cefazolin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항생제에 대한 내성을 추가로 갖는 것일 수 있다.

[0042] 다른 양상은, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항생제를 제공한다.

[0043] 또 다른 양상은, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 세균성 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 또 다른 양상은, 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 세균성 감염 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0045] 또 다른 양상은, 세균성 감염 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 항균 펩타이드의 용도를 제공한다.

[0046] 일 구현예로서, 상기 세균성 감염 질환은 피부감염, 식중독, 중이염, 방광염, 복막염, 요로감염, 유방염, 폐렴, 심내막염, 결막염, 관절염, 자궁내막염, 선역, 균혈증, 패혈증, 및 여드름으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질병일 수 있고, 바람직하게는 폐렴 또는 패혈증일 수 있다.

[0047] 또 다른 양상은, 상기 항균 펩타이드를 포함하는 항균용 의약외품 조성물, 화장료조성물, 식품 첨가제, 및 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체는 기존의 항생물질 및 항생 펩타이드보다 다양한 종류의 세균에 대해 높은 항생능력을 가짐으로써, 세균 감염성 질환 환자의 혈액 내에서 다양한 원인균을 초기에 동시에 제거할 수 있다. 특히, 본 발명의 펩타이드는 항생제 내성을 갖는 박테리아에 대해 높은 항균 능력을 발휘하여 기존 항생제 적용의 한계를 넘어서 다제내성 박테리아에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료제로서 제공될 수 있다. 또한, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체는 내성 획득의 가능성이 낮고, 독성이 낮으며, 특히 혈액 내에서 기존의 항균 펩타이드보다 높은 항균 능력이 있다는 점에서 광범위한 세균성 감염질환의 예방 또는 치료를 목적으로 의약용, 의약부외용, 식품 및 사료 첨가용, 농약 및 화장품 첨가용 등 다양한 방면으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 KU-5878과 종래 항균 펩타이드(LL-37, 마개닌 2, 및 답토마이신)와의 그람 양성 및 그람 음성 박테리아

에 대한 항균 활성을 비교 확인한 도면이다.

도 2는 KU-5878과 종래 항균 펩타이드(LL-37, 마개닌 2, 및 답토마이신)와의 다제내성 박테리아에 대한 항균 활성을 비교 확인한 도면이다.

도 3는 KU-5878과 종래 항생물질(이미페넴)과의 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 대한 항균 활성을 비교 확인한 도면이다.

도 4는 KU-5878과 종래 항생물질(이미페넴)과의 다제내성 박테리아에 대한 항균 활성을 비교 확인한 도면이다.

도 5는 KU-5878과 종래 항균 펩타이드(마개닌 2 및 멜리틴)와의 인간 혈관 내피유래 세포주(HUVEC cell)에 대한 독성을 비교 확인한 도면이다.

도 6은 KU-5878 및 KU-5878 변이체(KU-5878-K4 및 KU-5878-K4-D)와 종래 항균 펩타이드(LL-37, 마개닌 2, 및 멜리틴)와의 생쥐의 적혈구 세포에 대한 독성을 적혈구 용혈 현상의 정도를 통해 비교확인한 도면이다.

도 7은 *in vivo*에서 KU-5878의 무독성을 생쥐 체중의 관찰 결과를 통해 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] Romo1(Reactive oxygen species modulator 1) 단백질은 미토콘드리아의 내막에 위치하는 막 단백질로서, 미토콘드리아의 활성산소 생성, TNF-α 신호전달, 세포 노화, 암의 진행 및 침윤, 및 미토콘드리아 내부 단백질 수송 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. Romo1 단백질의 구조는 2개의 알파 헬릭스를 포함하는 단백질로서, 첫 번째 알파 헬릭스(α-helix 1)는 주로 소수성 아미노산으로 구성되어 있고, 두 번째 알파 헬릭스(α-helix 2)는 친수성 및 소수성의 양면성을 갖는다.

[0051] 본 발명자들은 Romo1 단백질의 α-helix 1 영역은 물에 잘 녹지 않는 성질을 가져 연구에서 배제하고, α-helix 2 영역의 아미노산 서열(52-79 a.a.)을 갖는 다양한 길이의 펩타이드를 합성하여 그 항균활성을 확인하고, 상기 펩타이드의 변이체로부터 항균활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0052] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역에서 선택되는 하나의 아미노산을 기준으로, 연속되는 아미노산 서열을 포함하되 서로 길이가 다른 수 종의 펩타이드를 합성하고, 녹농균 및 황색포도상구균에 대한 상기 각 펩타이드의 항균 활성을 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Romo1 단백질의 52-62 아미노산 영역에서 임의의 아미노산을 기준으로 연속된 18개의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 모두에서 녹농균과 황색포도상구균에 대한 항균활성을 확인하였으나, 그 중에서도 특히 Romo1 단백질의 58-78 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 펩타이드에서 우수한 항균활성을 확인할 수 있었다(실시예 1 참조).

[0053] 이에, 본 발명자들은 Romo1 유래 항균 펩타이드를 제공한다.

[0054] 본 명세서에서 "Romo1 유래 펩타이드"는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역에서 내의 연속되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이고, "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 Romo1 유래 펩타이드는 Romo1 단백질을 조각내어 획득할 수 있으며, 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술 또는 액상 합성 기술에 따라 제조될 수 있다.

[0055] 나아가, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 Romo1 단백질 서열 중 52 내지 79 번째 아미노산 영역에서 임의의 아미노산을 기준으로 연속된 아미노산 서열을 포함하는 것이라면 그 길이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 7 내지 28 mer, 더욱 바람직하게는 18 내지 28 mer일 수 있다.

[0056] 보다 구체적으로 상기 항균 펩타이드는 Romo1 단백질 서열 중 52-62 아미노산 영역에서 임의의 아미노산을 기준으로 연속된 18개 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2-15으로 이루어진 군, 더욱 바람직하게는 서열번호 5, 8, 9, 13, 및 14로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단의 순서로 나열되어 있으며, Romo1 단백질 서열 중 특정 영역에서 선택되는 아미노산을 기준으로 "연속되는 아미노산 서열"이란 상기 기준 아미노산의 C-말단 방향으로 연속되는 아미노산 서열을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 Romo1 단백질의 특정 영역에서 선택되는 임의의 아미노산을 기준으로 연속되는 7 내지 28 개 아미노산 서열이라 함은 상기 Romo1 단백질의 특정 영역에서 선택된 기준

아미노산을 포함하고 상기 기준 아미노산의 C-말단 방향으로 연속되는 아미노산 서열을 포함하여 총 7 내지 28개의 아미노산 서열을 의미한다.

[0058] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 상기 Romo1 유래 항균 펩타이드의 적용 범위를 확인하기 위하여, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 펩타이드를 대표로 선정하여 황색포도상구균, 고초균, 장내구균, 스트렙토미세스 신데넨시스, 엔테로코커스 패칼리스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 대장균, 클렙시엘라 뉴모니아, 아시네토박터 바우마니, 녹농균, 엔테로박터 에어로게네스, 메티실린 내성 황색포도상구균, 다제내성 녹농균, 다제내성 아시네토박터 바우마니, 다제내성 클렙시엘라 뉴모니아, 반코마이신 내성 엔테로코커스 패시움, 및 반코마이신 내성 황색포도상구균에 대한 상기 펩타이드의 항균 활성을 확인하였다. 그 결과 본 발명의 Romo1 유래 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성 박테리아 모두에게서 광범위한 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 2 참조).

[0059] 또한, 보다 우수한 항균활성을 갖는 펩타이드 탐색을 위하여 KU-5878을 구성하는 각 아미노산을 그 성질에 따라 $X_1X_1MMX_1X_1GGX_1FGX_1FMAIGMGIR$ (서열번호 16), $KTX_2X_2QSGGTFGTFX_2AX_2GX_2GX_2R$ (서열번호 30), $KTMMQSGGTX_3GTX_3MAIGMGIR$ (서열번호 40), 및 $KTMMQSX_4X_4TFX_4TFMX_4IX_4MX_4IR$ (서열번호 45)으로 구분하여 각 X_1 내지 X_4의 아미노산을 치환한 펩타이드를 합성하여 그 항균활성을 확인하였다.

[0060] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 KU-5878 펩타이드에서 친수성 잔기를 포함하는 아미노산을 양전하를 포함하는 아미노산으로 치환하는 경우에 항균활성의 변화를 확인하였다. KU-5878 펩타이드에서 친수성 잔기를 포함하는 아미노산의 위치는 서열번호 16에서 X_1으로 표시되어 있으며, X_1 위치의 아미노산을 각각 독립적으로 치환하였다. Romo1 단백질의 α-helix 2 영역에서 친수성 아미노산을 양 전하를 포함하고 있는 아미노산(R, H 또는 K) 또는 다른 친수성 아미노산(T, S, Q, 또는 N)으로 치환하는 경우에서 그 항균활성의 변화를 확인하였다. 그 결과 항균활성이 유지되거나 그보다 우수한 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 4-1 참조).

[0061] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 KU-5878 펩타이드에서 메티오닌(M) 또는 이소루신(I)을 소수성 잔기를 포함하고 그 구조가 유사한 아미노산(M, L, I, V, 또는 Nle)으로 치환하는 경우와 소수성 잔기를 포함하지만 그 구조가 다른 아미노산(F, Y, 또는 W)으로 치환하는 경우에서 그 항균활성의 변화를 확인하였다. KU-5878 펩타이드에서 메티오닌(M) 및 이소루신(I)은 서열번호 30에서 X_2으로 표시되어 있으며, X_2 위치의 아미노산은 각각 독립적으로 치환되었다. 그 결과, 메티오닌을 노루루신(Nle)으로 치환하는 경우 그 항균활성이 유지되었으며, 또한 이소루신을 트립토판(W)으로 치환하는 경우 항균활성이 감소되었다. 한편, 이소루신을 글리신으로 치환하는 경우 항균활성이 향상된 펩타이드를 얻을 수 있음을 확인하였다(실시예 4-3 참조).

[0062] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 KU-5878 펩타이드에서 소수성 잔기를 포함하는 페닐알라닌(F)을 친수성 아미노산 또는 그 구조가 유사한 소수성 아미노산(F, Y, 또는 W) 또는 그 구조가 다른 소수성 아미노산(M, L, I, V, 또는 Nle)으로 치환하는 경우에 그 항균활성의 변화를 확인하였다. KU-5878 펩타이드에서 페닐알라닌은 서열번호 40에서 X_3으로 표시되어 있으며, X_3 위치의 아미노산은 각각 독립적으로 치환되었다. 그 결과, 페닐알라닌을 트립토판(W)으로 치환하는 경우 항균활성이 향상된 펩타이드를 얻을 수 있음을 확인하였다(실시예 4-4 참조).

[0063] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 KU-5878에서 알라닌(A) 또는 글리신(G)을 각각 글리신 또는 알라닌으로 치환하는 경우에 항균활성의 변화를 확인하였다. KU-5878 펩타이드에서 알라닌과 글리신은 서열번호 45에서 X_4로 표시되어 있으며, X_4 위치의 아미노산을 각각 독립적으로 치환하였다. 그 결과, 알라닌을 글리신으로 치환하는 경우 및 글리신을 알라닌으로 치환하는 경우 항균활성을 나타내지만 KU-5878 펩타이드와 비교하여 감소된 항균활성을 나타냄을 확인하였다(실시예 4-5 참조).

[0064] 상기로부터, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드는 Romo1의 52-79 영역 내에서 임의의 아미노산을 기준으로 연속되는 7-28개 아미노산 서열을 포함하면서, 그 항균 활성을 나타내는 범위 내에서 하나 이상의 아미노산 치환(substitution)을 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 구체적인 실시예서, 본 발명자들은 KU-5878 변이체의 적용범위를 확인하기 위하여, KU-5878-K4를 대표로 선정하고 다양한 세균에 대한 항균활성을 확인하였다. 그 결과, KU-5878-K4도 KU-5878과 마찬가지로 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성 박테리아 모두에게서 광범위한 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 4-2 참조).

[0066] 또한, 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해서 KU-5878 및 KU-5878-K4를 구성하는 아미노산 일부 또는 전부를 D-형 아미노산으로 치환한 펩타이드의 경우에도 KU-5878과 유사한 항균활성을 나타내며, 특히 소 혈청의 존재 하에서 KU-5878 및 KU-5878-K4의 경우 항균활성이 크게 감소하나 D-형 아미노산으로 치환된 변이체의 경우 항균활성 감소 폭이 적음을 알 수 있었다(실시예 4-6 참조).

[0067] 상기로부터, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드를 구성하는 아미노산은 각각 독립적으로 L-형태 또는 D-형태일 수 있으며, 각 아미노산은 아미노산 유사체, 방사선 라벨링 아미노산, 또는 형광 태그 아미노산일 수 있다.

[0068] 한편, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드는 아미노산 서열의 일부 부위를 선정하고 그 활성을 증가시키기 위해 아미노(N-) 말단 또는 카르복시(C-) 말단의 변형을 유도할 수 있다. 이러한 변형을 통해 본 발명의 펩타이드는 생체 내 투여 시의 증가된 반감기를 가질 수 있다.

[0069] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 C-말단이 아미데이션(amidation)된 KU-5878 변이체의 경우에 항균활성이 증가함을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0070] 따라서, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드의 아미노 말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 보호기가 결합될 수 있으며, 펩타이드의 카르복시 말단은 히드록시기(-OH), 아미노기($-NH_2$), 아자이드($-NHNH_2$) 등으로 변형될 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드의 말단 또는 아미노산의 R-잔기(R-group)에 지방산(fatty acids), 당사슬(oligosaccharides chains), 모든 나노입자(골드입자, 리포솜, 헤파린, 하이드로젤 등), 아미노산, 담체 단백질(carrier proteins) 등을 결합할 수 있다. 상술한 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 역가(potency)와 안정성을 개선하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 "안정성"은 생체 내(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(상온, 냉장, 냉동 보관 시 저장 안정성 포함)도 의미한다.

[0071] 한편, 본 발명의 Romo1 유래 항균 펩타이드는 이를 구성하는 하나 이상의 아미노산 서열이 결실된 펩타이드일 수 있다. 상기에 따라, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드를 구성하는 하나 이상의 아미노산을 치환(substitution), 변이(modification), 또는 결손(deletion)시킨 펩타이드에서도 항균활성을 확인할 수 있었는 바, 본 발명은 Romo1 유래 펩타이드 변이체를 항균 펩타이드로 제공할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 "변이체"는 항균활성을 나타내는 범위에서 상기 Romo1 유래 펩타이드를 구성하는 하나 이상의 아미노산이 치환(substitution), 변이(modification), 및/또는 결손(deletion)된 펩타이드를 의미하고, 항균활성을 나타낸다면 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드보다 우수한 항균활성을 나타내는 변이체인 것으로 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명의 항균 펩타이드는 서열번호 13의 아미노산 서열; 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 하기 (a) 내지 (h) 중 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0075] 상기 (a)는 1번째 아미노산 K를 R로 치환, (b)는 2번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, (c)는 5번째 아미노산 Q를 K 또는 R로 치환, (d)는 6번째 아미노산 S를 K, R, 또는 H로 치환, (e)는 9번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, (f)는 10번째 아미노산 F를 W로 치환, (g)는 16번째 아미노산 I를 L로 치환, (h)는 20번째 아미노산 I를 G 또는 L로 치환일 수 있다. 실시예 8 및 9에 따르면, 본 발명자는 KU-5878의 아미노산 서열을 상기 (a) 내지 (h) 중 어느 하나로 치환하면 펩타이드의 항균 효과가 향상됨을 확인하였다.

[0076] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 적어도 하나의 메티오닌이 노루루신 또는 이소루신으로 치환된 것일 수 있다. 노루루신(Norleucine)은 메티오닌과 비교하면 황(S)이 탄소로 치환된 것을 제외하면 구조가 동일하며, 이소루신은 노루루신과 비교하면 탄소수가 같은 알킬 치환기를 갖는 공통점을 갖는다. 본 발명자는 KU-5878의 아미노산 서열상에 있는 4개의 메티오닌 중 1 내지 4개를 노루루신으로 치환하면 항균 활성이 개선됨을 확인하였다. (표 13 참조)

[0077] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 17, 18, 및 19 번째 아미노산 중 어느 하나가 결손되거나; 또는 3 또는 4번째 아미노산, 및 7 또는 8번째 아미노산이 결손된 것일 수 있다. 본원 실시예 6, 7에 따르면, KU-5878의 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 17, 18, 및 19 번째 아미노산 중 어느 하나가 결손되면 항균활성이 증가하였으며, KU-5878의 일부 아미노산이 치환된 펩타이드에 대해서도 같은 효과를 기대할 수 있다.

[0078] 또 다른 구현예로서, 상기 항균 펩타이드는 C말단에 연결된 아미노산 서열을 더 포함하고, 상기 C말단에 연결된 아미노산 서열은 R 또는 K가 1 내지 3개 반복하는 서열로 이루어진 것일 수 있다. 실시예 10에 따르면, 본 발명

자는 KU-5878의 C말단에 RRR 또는 KK로 이루어지는 아미노산 서열을 더 부가하면 항균 활성이 증가함을 확인하였다.

[0079] 다른 양상은, 서열번호 24의 아미노산 서열; 또는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 1번째 K가 T로 치환되거나, 또는 12번째 아미노산 T가 G로 치환된 아미노산 서열; 또는 서열번호 24의 아미노산 서열에서 2번째 아미노산이 T로 치환된 아미노산 서열로 이루어지는 항균 펩타이드를 제공한다.

[0080] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 적어도 하나의 메티오닌이 노루루신 또는 이소루신으로 치환된 것일 수 있다.

[0081] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 하기 (a) 내지 (s) 중 어느 하나의 변이를 더 포함할 수 있다.

[0082] (a) 1 내지 12, 14 내지 15, 17 내지 21번째 아미노산 중 어느 하나의 아미노산이 결손; (b) 14번째 아미노산 결손; 및 1 내지 8, 12, 15, 또는 18번째 아미노산이 결손; (c) 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손 ; 및 1 내지 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손; (d) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 및 1, 2, 또는 12번째 아미노산 결손; (e) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 및 18번째 아미노산 결손; (f) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; (g) 3 또는 4번째 아미노산 결손; 14번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 5, 6, 7, 8, 12, 또는 15번째 아미노산 결손; (h) 14번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3, 4, 7, 또는 8번째 아미노산 결손; (i) 1, 2, 5, 또는 6 번째 아미노산 결손; 7, 8, 또는 11번째 아미노산 결손; 14 또는 15번째 아미노산 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; (j) 5 또는 6번째 아미노산 결손; 11번째 아미노산 결손; 15번째 아미노산 결손; 18번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 3 또는 4, 7 또는 8, 12, 및 14번째 중 어느 하나의 아미노산 결손; (k) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 및 15번째 아미노산 결손; (l) 1, 2, 5, 또는 6번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 14, 및 18 번째 아미노산 결손; (m) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12번째, 및 15번째 중 어느 하나의 아미노산 결손; (n) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 및 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손; (o) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 2개의 아미노산 결손; (p) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산이 결손; (q) 3, 4, 14, 및 18번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 및 1 또는 2, 7 또는 8, 12, 및 15번째 아미노산 중 선택된 3개의 아미노산 결손; (r) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 또는 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손; (s) 1 또는 2번째 아미노산 결손; 3 및 4번째 아미노산 결손; 5 또는 6번째 아미노산 결손; 7 또는 8번째 아미노산 결손; 12, 14, 15, 및 18번째 아미노산 결손.

[0084] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 10 및 14번째 아미노산쌍, 또는 14 및 18번째 아미노산쌍이 스테이플화된 것일 수 있다. 상기 스테이플화는 아미노산쌍이 펜테닐알라닌 또는 옥테닐알라닌으로 치환되고 상호 가교결합한 것일 수 있다.

[0085] 일 구체예에 따르면, 상기 항균 펩타이드는 C말단에 연결된 아미노산 서열을 더 포함할 수 있고, 상기 C말단에 연결된 아미노산 서열은 R 또는 K가 1 내지 3개 반복하는 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0087] 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체는 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성 박테리아에 대한 항균 활성을 가지고 있는바, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 세균 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0088] 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체가 증식 및/또는 그 생장을 방해하는 상기 그람 양성균의 비제한적인 예로는 포도상구균 속(*Staphylococcus sp.*), 간균 속(*Bacillus sp.*), 엔테로코커스 속(*Enterococcus sp.*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces sp.*), 및 스트렙토코커스 속(*Streptococcus sp.*) 등이 있으며, 바람직하게는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 고초균(*Bacillus subtilis*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 스트렙토마이세스 신데넨시스(*Streptomyces sindenensis*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 및/또는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)일 수 있다.

[0089] 또한, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체가 증식 및/또는 그 생장을 방해하는 상기 그람 음성균의 비

제한적인 예로는 대장균 속(*Escherichia sp.*), 클렙시엘라 속(*Klebsiella sp.*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter sp.*), 수도모나스 속(*Pseudomonas sp.*), 및 엔테로박터 속(*Enterobacter sp.*) 등이 있으나, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및/또는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)일 수 있다.

[0090] 또한, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체는 다제내성균에 대한 항균활성을 가지고 있는바, Romo1 유래 펩타이드 및 그 변이체가 증식 및/또는 그 생장을 방해하는 상기 다제내성균은 페니실린계(penicillins), 카바페넴계(carbapenems), 세팔로스포린계(cephalosporins), 퀴놀론계(quinolones), 마크로라이드계(macrolides), 테트라사이클린계(tetracyclins), 또는 글리코펩티드계(glycopeptides)에 속하는 1종 이상의 항생물질에 대한 내성을 갖는 상기 그람 양성균 또는 그람 음성균일 수 있으며, 바람직하게는 메티실린 내성 포도상구균 속(methicillin-resistant *Staphylococcus sp.*), 다제내성 수도모나스 속(multidrug-resistant *Pseudomonas sp.*), 반코마이신 내성 엔테로코커스 속(vancomycin-resistant *Enterococcus sp.*), 다제내성 클렙시엘라 속(multidrug-resistant *Klebsiella sp.*), 다제내성 아시네토박터 속(multidrug-resistant *Acinetobacter sp.*), 및/또는 반코마이신 내성 포도상구균 속(vancomycin-resistant *Staphylococcus sp.*) 일 수 있다.

[0091] 본 발명은 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물, 즉 항생제를 제공할 수 있으며, 본 발명의 약학적 조성물이 예방 또는 치료의 대상으로 하는 "세균성 감염 질환"은 상기 그람 양성균, 그람 음성균, 및/또는 다제내성균의 감염에 의한 질환일 수 있으며, 바람직하게는 상기 세균 감염에 의하여 유발되는 피부감염, 식중독, 중이염, 방광염, 복막염, 요로감염, 유방염, 폐렴, 심내막염, 결막염, 관절염, 자궁내막염, 선역, 균혈증, 패혈증, 및/또는 여드름 등일 수 있고, 더욱 바람직하게는 패혈증 또는 폐렴일 수 있다.

[0092] 또한, 본 발명은 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 세균성 감염 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0093] 본 발명에 있어서, "개체"란 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간 또는 가축일 수 있다.

[0094] 본 발명에서 예방이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 상기 그람 양성균, 그람 음성성균, 및/또는 다제내성 세균의 감염을 지연시키거나, 그 감염에 의한 질병의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 치료란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 상기 세균 감염에 따른 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0095] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 Romo1 유래 펩타이는 및/또는 그 변이체 외에 공지의 항생물질을 1종 이상 더 포함할 수 있으며, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0096] 본 발명에서 "담체(carrier)"란 비이클(vehicle)이라고도 불리우며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 디메틸술폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[0097] 본 발명에서 "희석제(diluent)"란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.

[0098] 또한, 본 발명에 따른 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 유효성분으로 포함하는 세균성 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 본 발명의 항균용 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합된 형태로

약 0.001mg 내지 1000mg이 투여될 수 있다. 본 발명의 항균용 조성물은 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0099] 또한, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체는 세균 감염 질환의예방 또는 개선을 목적으로 하는 의약외품 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명의 의약외품 조성물은 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제, 또는 필터 충진제 등에 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0100] 또한, 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체는 화장료 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 화장료 조성물의 제형은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스쳐 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 또는 바디클렌저의 형태일 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품에 배합되는 다른 성분과 함께 배합될 수 있다.

[0101] 아울러, 본 발명은 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물 또는 사료 조성물을 제공한다. 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 식품 또는 사료의 첨가물로 사용할 경우, 상기 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체를 그대로 첨가하거나 다른 식품, 사료, 또는 그 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(세균의 증식 및 생장 억제를 통한 감염성 질환의 예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 사료, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 Romo1 유래 펩타이드 및/또는 그 변이체는 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품 및 사료의 종류에는 특별한 제한은 없다.

[0102] 본 발명에서는 아미노산 서열을 IUPAC-IUB 명명법에 따라 아래와 같이 약어로 기재하였다.

[0103] 아르기닌(Arg, R), 라이신(Lys, K), 히스티딘(His, H), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 글루타민(Gln, Q), 아스파라진(Asp, N), 메티오닌(Met, M), 루신(Leu, L), 이소루신(Ile, I), 발린(Val, V), 페닐알라닌(Phe, F), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y), 알라닌(Ala, A), 글리신(Gly, G), 프롤린(Pro, P), 시스테인(Cys, C), 아스파르트산(Asp, D) 글루탐산(Glu, E), 노르루신(Nle)

[0105] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0107] **[실시예]**

[0108] **실시예 1. Romo1 유래 펩타이드의 항균활성 확인 및 최적의 펩타이드 탐색**

[0109] Romo1 단백질은 2개의 알파 헬릭스(α-helix)를 포함하고 있다. 본 발명자들은 친수성 및 소수성의 양면성을 갖는 두 번째 알파 헬릭스(α-helix 2) 영역을 합성하고, 박테리아 살균 최소 농도 측정법(minimum bactericidal concentration: MBC)을 이용하여 그 항균 활성을 확인하고, 이를 KU-5279(Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역)으로 명명하였다. 이어서, 인체 적용에 유리하고 항균활성이 우수한 펩타이드를 탐색하기 위하여 Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역에서 임의의 아미노산을 기준으로 연속되는 아미노산 서열을 포함하는 수 종의 펩타이드를 합성하여 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 통해 각 펩타이드의 항균 활성을 비교 확인하였다(각 펩타이드의 정보는 하기 표 1 참조). 상기 각 펩타이드의 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 이용한 항균 활성 확인은 구체적으로 하기와 같이 수행되었다.

[0110] 먼저, 녹농균(ATCC 27853)과 황색포도상구균(ATCC 29213)을 3%(w/v) TSB(Tryptic Soy Broth) 액체 배지에

37℃, 200 rpm 조건으로 4 시간 배양한 후, 다시 동일한 조건에서 5×10^6 CFU/㎖ 농도가 되도록 3 시간 동안 2차 배양하였다. 상기 2차 배양한 각 균주의 최종 농도가 2×10^5 CFU/㎖ 농도가 되도록 SP(Sodium phosphate buffer: 10 mM Sodium phosphate, 1% TSB) 용액으로 희석하여 균주 용액을 준비하였다.

[0111] 이어서, 96-웰 마이크로 플레이트의 각 웰에 농도를 달리하여(0 ㎍/㎖ 내지 300 ㎍/㎖ 펩타이드) 각 펩타이드를 분주하고, 상기 준비된 균주 용액을 100 ㎕ (1×10^5 CFU/㎖)를 넣고 섞어 37℃ 항온기에서 1 시간 동안 반응시켰다.

[0112] 그리고, TS(Tryptic Soy) 30 g/L 및 한천 15 g/L을 증류수에 녹이고 멸균한 다음 100 ㎜ 원형 플레이트에 25 ㎖을 붓고 하루 이상 실온에서 굳혀서 제조한 TS 한천 플레이트에 상기 펩타이드와 균주의 반응 용액을 10 ㎕씩 일정한 크기로 도말하고, 37℃ 항온기에서 18 시간 동안 배양한 뒤, 플레이트에서 콜로니 생성을 확인하였다. 박테리아 살균 최소농도는 콜로니가 단 하나도 생성되지 않은 펩타이드의 최소 농도로 정의하였고, 실험 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0113]

서열 번호	펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값 (㎍/ml)	녹농균 MBC 값 (㎍/ml)
1	로모1	MPVAVGPYGQSQPSCFDRVKMGFVMGCAVGMAAGALFGTFSCLRIGMRGRELMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	불용성	불용성
2	KU-5278	LMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300
3	KU-5279	LMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	300	300
4	KU-5478	GGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300
5	KU-5479	GGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	200	300
6	KU-5678	IGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300
7	KU-5679	IGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	300	300
8	KU-5778	GKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	280	300
9	KU-5779	GKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	250	280
10	KU-5875	KTMMQSGGTFGTFMAIGM	>300	>300
11	KU-5876	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG	>300	>300
12	KU-5877	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI	>300	>300
13	KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100
14	KU-5879	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	150	150
15	KU-6079	MMQSGGTFGTFMAIGMGIRC	>300	>300
48	pCM19	CLRIGMRGRELMGGIGKTM	250	300
49	pCM12	CLRIGMRGRELM	>300	>300

[0115] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, pCM19와 KU-5279 펩타이드는 비슷한 살균력을 보이나, pCM12의 경우 낮은 살균력 때문에 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 항균 활성의 측정이 불가능 했다. 한편, 21개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 KU-5878 펩타이드의 항균활성이 가장 우수하였으며, KU-5878은 KU-5279보다 3배 우수한 항균 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0117] **실시예 2. KU-5878의 항균 활성 확인**

[0118] 2-1. 다양한 세균에 대한 항균 활성 확인

[0119] 상기 실시예 1에서 항균활성을 확인한 Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역 또는 그 일부 영역을 포함하는 펩타이드가 살균력을 발휘하는 세균의 종류를 확인하기 위하여, 상기 표 1에 나타낸 합성 펩타이드 중 KU-5878을 대표로 선정하여 하기 표 2에 나타낸 세균에 대한 항균 활성을 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 측정하였다. 박테리아 살균 최소 농도 측정법은 상기 실시예 1의 방법과 동일하다.

[0120] 구체적으로, 각 세균을 3%(w/v) TSB액체 배지에 37℃, 200 rpm 조건으로 4 시간 배양한 후, 다시 동일한 조건에서 5×10^6 CFU/㎖ 농도가 되도록 3 시간 동안 2차 배양하였다. 상기 2차 배양한 각 균주의 최종 농도가 2×10^5

CFU/㎖ 농도가 되도록 SP 용액으로 희석하여 균주 용액을 준비하였다.

[0121] 이어서, 96-웰 마이크로 플레이트의 각 웰에 농도를 달리하여(0 ㎍/㎖ 내지 300 ㎍/㎖ 펩타이드) KU-5878 펩타이드를 분주하고, 상기 준비된 각 균주를 100 ㎕ (1 × 10^5 CFU/㎖)를 넣고 섞어 37℃ 항온기에서 1 시간 동안 반응시켰다.

[0122] 그리고, TS 한천 플레이트에 상기 펩타이드와 균주의 반응 용액을 10 ㎕씩 일정한 크기로 도말하고, 37℃ 항온기에서 18 시간 동안 배양한 뒤, 플레이트에서 콜로니 생성을 확인하였다. 박테리아 살균 최소 농도는 콜로니가 단 하나도 생성되지 않은 펩타이드의 최소 농도로 정의하였고, 실험 결과는 하기 표 2와 같다.

[0123] 한편, 하기 표 2에서 다제내성 녹농균, 다제내성 아시네토박터, 및 다제내성 클렙시엘라는 고려대학교 안암병원의 환자로부터 분리한 균으로서, 다제내성 녹농균의 경우 피페라실린(piperacilin), 피페라실린타조박탐(piperacilin-tazobactam), 세프타지딤(ceftazidime), 이미페넴(imipenem), 메로페넴(meropenem), 젠타마이신(gentamicin), 아미카신(amikacin), 및 시프로플록사신(ciprofloxacin) 항생제에 내성을 나타내고, 다제내성 아시네토박터는 피페라실린, 피페라실린타조박탐, 세프타지딤, 이미페넴, 메로페넴, 젠타마이신, 아미카신, 시프로플록사신, 및 세페핌(cefepime) 항생제에 내성을 나타내며, 다제내성 클렙시엘라는 피페라실린타조박탐, 세프타지딤, 세페핌, 이미페넴, 젠타마이신, 및 시프로플록사신 항생제에 내성을 나타냄을 확인하고 실험에 이용하였다.

표 2

[0124]

그룹	패혈증과 폐렴 원인균 및 다제내성균	관리 번호	KU-5878 MBC 값 (㎍/㎖)
그람 양성	황색포도상구균 *Staphylococcus aureus*	ATCC 29213	100
	고초균 *Bacillus subtilis*	ATCC 6633	90
	엔테로코커스 패시움(장내 구균) *Enterococcus faecium*	ATCC 19434	85
	스트렙토미세스 신데넨시스 *Streptomyces sindenensis*	ATCC 12392	95
	엔테로코커스 패칼리스 *Enterococcus faecalis*	ATCC 19433	85
	스트렙토코커스 뉴모니아 *Streptococcus pneumoniae*	NCCP 14585	100
그람 음성	대장균 *Escherichia coli*	ATCC 25922	85
	클렙시엘라 뉴모니아 *Klebsiella pneumoniae*	ATCC 13883	100
	아시네토박터 바우마니 *Acinetobacter baumannii*	ATCC 19606	100
	녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 27853	100
	엔테로박터 에어로게네스 *Enterobacter aerogenes*	ATCC 13048	90

다제내성균	메티실린 내성 황색포도상구균 methicillin-resistant *S. aureus*	ATCC 33591	100
	다제내성 녹농균 multidrug-resistant *P. aeruginosa*	-	110
	다제내성 아시네토박터 바우마니 multidrug-resistant *A. baumannii*	-	110
	다제내성 클렙시엘라 뉴모니아 multidrug-resistant *K. pneumoniae*	-	100
	반코마이신 내성 엔테로코커스 패시움 vancomycin-resistant *E. faecium*	NCCP 11522	100
	반코마이신 내성 황색포도상구균 vancomycin-resistant *S. aureus*	NCCP 15872	120

[0126] 상기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878은 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성 박테리아 모두에게서 광범위한 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0128] 2-2. 공지의 항균 펩타이드와 KU-5878의 항균 활성 비교 확인

[0129] In vitro에서 항균활성을 확인한 KU-5878 펩타이드가 in vivo, 특히 동물의 혈관 내에서의 세균에 대한 살균력을 효과적으로 발휘하는지 확인하기 위하여, 그람 양성균으로는 황색포도상구균, 그람 음성균으로는 녹농균, 다제내성균으로는 메타실린 내성 황색포도상구균 및 다제내성 녹농균을 대표로 선정하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0130] 구체적으로, 황색포도상구균, 메티실린 내성 황색포도상구균, 녹농균, 또는 다제내성 녹농균을 3%(w/v) TSB액체 배지에 37℃, 200 rpm 조건으로 4 시간 배양한 후, 다시 동일한 조건에서 5×10^{9} CFU/㎖ 농도가 되도록 3 시간 동안 2차 배양하였다. 상기 2차 배양한 각 균주의 최종 농도가 1×10^{5} CFU/㎕ 농도가 되도록 PBS 용액으로 희석하여 균주 용액을 준비하였다.

[0131] 이어서, 10 주령된 수컷 생쥐(C57BL/6)의 꼬리 정맥에 각 균주 100 ㎕를 정맥주사(IV, Intravenous Injection)를 실시하였다. 한 시간 뒤에 KU-5878을 10 mg/kg 농도로 정맥주사하였다. 대조군으로는 PBS를, 양성 대조군으로는 LL-37, 마개닌 2, 또는 답토마이신을 각각 10 mg/kg 농도로 정맥주사 하였다.

[0132] 각 약물의 정맥 주사 후 40 분 뒤에 쥐의 꼬리 끝의 약 1 cm 되는 지점을 수술용 가위를 이용하여 자르고, 절단면 끝 혈액의 10 ㎕를 채취하여 PBS에 희석시켰다. 희석시킨 혈액 샘플은 미리 준비한 TSB 한천 플레이트에 도말하고 37℃ 항온기에서 18 시간 동안 배양한 뒤 생성된 콜로니를 계수하여 비교하였다.

[0133] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 생쥐 혈관에 잔존하는 박테리아 수는 약물의 정맥주사에 의해 감소하였고, KU-5878의 투여시 가장 크게 감소함을 알 수 있었다. 상기로부터 KU-5878이 항균활성을 가진 것으로 공지된 LL-37, 마개닌 2, 및 답토마이신보다 현저하게 우수한 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0135] 2-3. 공지의 항생제와 KU-5878의 항균 활성 비교 확인

[0136] 상기 실시예 2-2에 이어서, in vivo에서 KU-5878 펩타이드의 항균활성을 확인하기 위하여, 그람 양성균으로는 황색포도상구균, 그람 음성균으로는 녹농균, 클렙시엘라 뉴모니아, 및 아시네토박터 바우마니, 다제내성균으로는 다제내성 녹농균, 메티실린 내성 황색포도상구균, 다제내성 클렙시엘라 뉴모니아, 다제내성 아시네토박터 바우마니를 선정하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0137] 실험방법은 상기 실시예 2-2와 같다. 다만, 생쥐에 투여하는 각 균주의 최종 농도는 하기 표 3과 같고, 양성 대조군은 생쥐에 상기 각 세균을 주사하고 24시간 경과 후에 카바페넴계 항생물질인 이미페넴을 30 mg/kg을 복강 주사(IP, Intraperitoneal injection)하고, 이후 12 시간 간격으로 총 4회 동량의 이미페넴을 복강

투여하였다. 각 대조군과 실험군의 생존률을 24 시간 간격으로 측정하였다.

표 3

[0139]

세균	최종 농도 (CFU)
황색포도상구균	1×10^8
녹농균	2×10^7
클렙시엘라 뉴모니아	8×10^8
아시네토박터 바우마니	4×10^8
메티실린 내성 황색포도상구균	3×10^8
다제내성 녹농균	8×10^7
다제내성 아시네토박터 바우마니	5×10^8
다제내성 클렙시엘라 뉴모니아	8×10^8

[0141] 그 결과, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 그람 양성 또는 그람 음성 박테리아만을 주사한 생쥐의 생존율은 0-20%, KU-5878을 주사한 생쥐의 경우 60%, 이미페넴을 주사한 생쥐는 약 60-80%의 생존율을 나타내었다. 또한, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 다제내성 박테리아만 주사한 생쥐는 0-7%, KU-5878을 주사한 생쥐의 경우 60-67%, 이미페넴을 주사한 생쥐는 7-27%의 생존율을 나타내었다.

[0143] **실시예 3. KU-5878의 독성 확인**

[0144] 상기 실시예 1 및 2에서 그람 양성, 그람 음성, 및 다제내성 세균에 대한 살균력을 확인한 Romo1 단백질의 52-79 아미노산 영역 또는 그 일부 영역을 포함하는 펩타이드가 개체에 적용 가능한지 확인하기 위하여 그 독성을 측정하고자 하였다. 이하 실험에서는 상기 표 1에 나타낸 합성 펩타이드 중 KU-5878을 대표로 선정하여 그 독성을 확인하였다.

[0145] 3-1. 혈관 내피세포 유래 휴벡 세포(HUVEC cells)에 대한 독성 확인

[0146] 인간의 혈관 내피세포 유래 세포주인 휴벡 세포를 96-웰 마이크로 플레이트에 배양하고, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliurn bromide)시약은 2 mg/ml 농도로 PBS 녹인 후 0.2 μm membrane filter로 멸균 여과하여 준비하였다. 대조군으로 PBS를 사용하였다.

[0147] 휴벡 세포 배지를 새로 교체하고, KU-5878, 멜리틴, 또는 마개닌 2를 농도를 달리하여(0 ㎍/㎖ 내지 300 ㎍/㎖) 분주하였다. 이어서 각 웰에 MTT시약을 100 μl처리하고 37℃에서 2 시간 항온 반응시켰다. 이어서, 세포가 분리되지 않도록 조심히 배지 및 펩타이드를 제거하고 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 100 μl를 첨가하고, 분광광도계로 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 상대적 세포 생존도를 대조군인 비처리세포의 생존도의 백분률로서 계산하였다.

[0148] 그 결과, 도 5로부터 확인되는 바와 같이, KU-5878은 휴벡 세포에서 매우 낮은 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0150] 3-2. 적혈구에 대한 독성 확인

[0151] 혈액 적혈구를 PBS로 희석한 후 900 g 로 10 분 동안 3 회 반복하여 원심분리하고 세척하였다. 상기 희석된 적혈구 용액(10 % v/v PBS)을 96-웰 마이크로 플레이트에 100 μl씩 분주하고, KU-5878, KU-5878-K4, KU-5878-K4-D, 멜리틴, 마개닌 2, 또는 답토마이신을 첨가하고, 200 μl이 되도록 PBS로 채워서 37℃의 인큐베이션(incubation)에서 1 시간 동안 배양하여 반응시켰다. 이어서, 상기 반응 용액의 상층액을 분리하고 분광광도계를 이용하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 PBS와 0.1% 트라이톤 X-100(Triton X-100) 용액

을 사용하였다.

[0152] 상기 흡광도 측정 결과를 기반으로 하기의 수학식 1에 따라 적혈구 세포 파괴 정도를 계산하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0153] [수학식 1]

[0154] % intact RBC = 100 (%)- [(펩타이드 처리 적혈구 용액 흡광도-PBS 처리 적혈구 용액 흡광도)/(트라이톤 X-100 처리 적혈구 용액-PBS 처리 적혈구 용액 흡광도) ×100 (%)]

[0155]

[0156] 그 결과, 도 6으로부터 확인되는 바와 같이, KU-5878은 높은 농도에서도 용혈현상이 거의 나타내지 않음을 확인하였다. KU-5878과 마찬가지로 KU-5878-K4 및 KU-5878-K4-D도 마개닌 2, 답토마이신, 및 멜리틴과 비교하여 적혈구의 용혈 현상이 거의 나타나지 아니하였는바, 적혈구에 대한 독성이 매우 낮음을 알 수 있었다.

[0158] 3-3. *in vivo*에서 독성 확인

[0159] *In vitro*에서 무독성을 확인한 KU-5878 펩타이드가 *in vivo*, 특히 동물(개체)의 혈관에 주사하였을 때 개체에 독성을 나타내지 않는지 확인하기 위하여, 10 주령된 수컷 생쥐(C57BL/6)의 꼬리 정맥에 KU-5878을 100 mg/kg 농도로 투여하였다. 이때, 주사 용량의 최대 부피는 150 μl였다. 주사 이후 1 시간 동안 생쥐의 행동을 관찰하였으며, 이후 24 시간 간격으로 12 일 동안 생쥐의 몸무게 변화를 측정하였다.

[0160] 그 결과, KU-5878을 투여한 생쥐는 모두 생존하였으며 도 7에 나타낸 바와 같이, KU-5878은 생쥐의 체중에는 전혀 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

[0162] **실시예 4. KU-5878을 구성하는 일부 아미노산이 치환된 펩타이드의 항균 활성 확인**

[0163] 4-1. 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 변이체의 항균 활성 확인

[0164] 이어서, 보다 항균활성이 우수한 펩타이드를 탐색하기 위하여 KU-5878의 친수성 잔기를 포함하는 아미노산을 양전하를 포함하고 있는 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로 치환한 후 그 변이체의 항균 활성을 박테리아 살균 최소농도 측정법을 이용하여 비교 확인하였다. 실험은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. KU-5878 변이체의 구체적인 정보 및 각 세균에 대한 MBC 값은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0166]

서열 번호	펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값(μg/ml)	녹농균 MBC 값(μg/ml)	메티실린 내성 황색포도상구균 MBC 값(μg/ml)	다제내성 녹농균 MBC값(μg/ml)
13	KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110
17	KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	40	50	45	45
18	KU-5878-Q62K	KTMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	80	90	85	90
19	KU-5878-S63K	KTMMQKGGTFGTFMAIGMGIR	50	60	60	60
20	KU-5878-T66K	KTMMQSGGKFGTFMAIGMGIR	60	80	70	80
21	KU-5878-T69K	KTMMQSGGTFGKFMAIGMGIR	130	140	150	150
22	KU-5878-K2(T59K, Q62K)	KKMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	8	8	8	8

23	KU-5878-K3(T59K, Q62K, S63K)	KKMMKKGGTFGTFMAIGMGIR	4	4	5	4
24	KU-5878-K3(T59K, Q62K, S63K, T66K)	KKMMKKGGKFGTFMAIGMGIR	3	4	5	5
25	KU-5878-K58R	RTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	120	120	130	120
26	KU-5878-K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300
27	KU-5878-T59R	KRMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	25	30	30	35
28	KU-5878-R78A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIA	>300	>300	>300	>300
29	KU-5878-R78K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIK	>300	>300	>300	>300

[0168] 상기 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, Romo1 단백질의 59, 62, 63, 또는 66 번째 아미노산을 라이신으로 치환한 펩타이드와 59 번째 아미노산을 아르기닌으로 치환한 펩타이드가 KU-5878보다 항균 활성이 우수함을 알 수 있었다. 또한, Romo1 단백질의 58 번째 아미노산을 아르기닌으로 치환한 KU-5878 변이체도 KU-5878과 유사한 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 상기 결과로부터, Romo1 단백질의 α-helix 2 영역에서 친수성 아미노산을 양 전하를 포함하고 있는 아미노산, 특히 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로 치환하는 경우도 유사한 항균활성을 나타내거나 보다 우수한 항균활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0169] 상기 결과로부터, Romo1 단백질의 α-helix 2 영역에서 친수성 아미노산을 양 전하를 포함하고 있는 아미노산, 특히 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로 치환하는 경우도 유사한 항균활성을 나타내거나 보다 우수한 항균활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0171] 4-2. KU-5878-K4의 다양한 세균에 대한 항균 활성 확인

[0172] 상기 실시예 4-1에서 항균활성을 확인한 KU-5878 변이체가 살균력을 발휘하는 세균의 종류를 확인하기 위하여, 상기 표 4에 나타낸 KU-5878 변이체 중에서 KU-5878-K4를 대표로 선정하여 하기 표 5에 나타낸 세균에 대한 항균 활성을 박테리아 살균 최소 농도 측정법 이용하여 측정하였다. 박테리아 살균 최소 농도 측정법은 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 수행하였다.

표 5

[0173]

그룹	패혈증과 폐렴 원인균 및 다제내성균	관리 번호	KU-5878-K4 MBC 값 (μg/mℓ)
그람양성	황색포도상구균 *Staphylococcus aureus*	ATCC 29213	3
	고초균 *Bacillus subtilis*	ATCC 6633	5
	엔테로코커스 패시움(장내 구균) *Enterococcus faecium*	ATCC 19434	5
	스트렙토미세스 신데넨시스 *Streptomyces sindenensis*	ATCC 12392	5
	엔테로코커스 패칼리스 *Enterococcus faecalis*	ATCC 19433	5
	스트렙토코커스 뉴모니아 *Streptococcus pneumoniae*	NCCP 14585	4

그람음성	대장균 *Escherichia coli*	ATCC 25922	5
	클렙시엘라 뉴모니아 *Klebsiella pneumoniae*	ATCC 13883	5
	아시네토박터 바우마니 *Acinetobacter baumannii*	ATCC 19606	4
	녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 27853	4
	엔테로박터 에어로게네스 *Enterobacter aerogenes*	ATCC 13048	5
다제내성균	메티실린 내성 황색포도상구균 methicillin-resistant *S. aureus*	ATCC 33591	5
	다제내성 녹농균 multidrug-resistant *P. aeruginosa*	-	5
	다제내성 아시네토박터 바우마니 multidrug-resistant *A. baumannii*	-	4
	다제내성 클렙시엘라 뉴모니아 multidrug-resistant *K. pneumoniae*	-	5
	반코마이신 내성 엔테로코커스 패시움 vancomycin-resistant *E. faecium*	NCCP 11522	5
	반코마이신 내성 황색포도상구균 vancomycin-resistant *S. aureus*	NCCP 15872	6

[0175] 상기 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878-K4는 그람 양성균, 그람 음성균, 및 다제내성 박테리아 모두에게서 광범위한 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0177] 4-3. 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 변이체의 항균 활성 확인

[0178] 상기 실시예 4-1에서 KU-5878의 친수성 잔기를 양 전하를 포함하는 아미노산으로 치환하는 경우에도 그 항균 활성이 유지되거나 보다 우수한 항균활성을 나타냄을 확인하고, 이어서 KU-5878의 소수성 잔기를 포함하고 잔기의 구조가 유사한 메티오닌(M) 또는 이소루신(I)을 친수성 또는 잔기의 구조가 다른 아미노산으로 치환한 후 항균 활성을 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 비교 확인하였다. 실험은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. KU-5878 변이체의 구체적인 정보 및 각 세균에 대한 MBC 값은 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0179]

서열 번호	펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값(㎍/ml)	녹농균 MBC 값(㎍/ml)
31	KU-5878-M6OA	KTAMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300
32	KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFMAAGMGIR	>300	>300
33	KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMAKGMGIR	>300	>300
34	KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMAWGMGIR	300	300
35	KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGAR	>300	>300
36	KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGKR	>300	>300
37	KU-5878-I73T	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGTR	>300	>300
38	KU-5878-I73G	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGGR	90	80
39	KU-5878-4Nle	KT(Nle)(Nle)QSGGTFGTF(Nle)AIG(Nle)GIR	90	110

[0180] 상기 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878에서 소수성 잔기를 포함하고 잔기의 구조가 유사한 메티오닌 또는 이소루신 중 한 개를 친수성 아미노산으로 치환하였을 경우 항균 활성이 감소하였다. 반면에 메티오닌을 유사한 잔기 구조를 갖는 노루루신(Nle)으로 치환할 경우 항균 활성의 변화가 크지 않았다. 또한, 이소루신을

글리신(G)으로 치환할 경우 항균 활성이 증가함을 알 수 있었다.

[0182] 4-4. 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 변이체의 항균 활성 확인

[0183] 이어서, KU-5878의 항균활성에 상응하거나 그보다 상회하는 항균활성을 갖는 KU-5878 변이체를 탐색하기 위하여, KU-5878에서 소수성 잔기를 포함하는 페닐알라닌(F)을 친수성 또는 잔기의 구조가 다른 아미노산으로 치환한 후 항균 활성을 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 비교 확인하였다. 실험은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. KU-5878 변이체의 구체적인 정보 및 각 세균에 대한 MBC 값은 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0185]

서열 번호	펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값(㎍/ml)	녹농균 MBC 값(㎍/ml)
41	KU-5878-F67A	KTMMQSGGTAGTFMAIGMGIR	>300	>300
42	KU-5878-F67W	KTMMQSGGTWGTFMAIGMGIR	80	80
43	KU-5878-F70K	KTMMQSGGTAGTKMAIGMGIR	>300	>300
44	KU-5878-F70W	KTMMQSGGTAGTWMAIGMGIR	300	300

[0187] 그 결과, 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878에서 소수성 잔기를 포함하는 67번 페닐알라닌을 유사한 잔기 구조를 갖는 트립토판으로 치환할 경우 항균 활성이 증가함을 알 수 있었다.

[0189] 4-5. 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 KU-5878 변이체의 항균 활성 확인

[0190] 상기 실시예 4-4에 이어서, KU-5878에서 알라닌(A) 또는 글리신(G)을 각각 글리신 또는 알라닌으로 치환한 후 항균 활성을 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 비교 확인하였다. 실험은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. KU-5878 변이체의 구체적인 정보 및 각 세균에 대한 MBC 값은 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0192]

서열 번호	펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값(㎍/ml)	녹농균 MBC 값(㎍/ml)
46	KU-5878-A72G	KTMMQSGGTFGTFMGIGMGIR	350	350
47	KU-5878-G76A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMAIR	>400	>400

[0194] 그 결과, 상기 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878에서 알라닌을 글리신으로 치환 또는 글리신을 알라닌으로 치환한 펩타이드는 항균활성을 나타내기는 하였으나, KU-5878과 비교하여 감소된 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0196] 4-6. KU-5878 및 KU-5878-K4를 구성하는 아미노산 일부 또는 전부를 D-형 아미노산으로 치환한 펩타이드의 항균 활성 확인

[0197] 상기 실시예 1 내지 5에 이어서, KU-5878 및 KU-5878-K4을 구성하는 아미노산을 D-형 아미노산으로 치환한 펩타이드(KU-5878-D(all) 및 KU-5878-K4-D)를 합성하여 그 항균활성을 비교 확인하였다. KU-5878-K4-D는 KU-5878-K4에서 59번, 62번, 63번, 66번 라이신 아미노산 잔기를 D-형태의 아미노산으로 치환한 펩타이드이고, KU-5878-D(all)은 KU-5878의 모든 아미노산을 D-형태의 아미노산으로 치환한 펩타이드이다.

[0198] 소 혈청(bovine serum)의 유무를 달리하여 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 각 펩타이드의 살균 최초 농도 측정을 수행하여 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0200]

펩타이드 종류	소 혈청 X		소 혈청 O	
	황색포도상구균 MBC 값 (μg/ml)	녹농균 MBC 값 (μg/ml)	황색포도상구균 MBC 값 (μg/ml)	녹농균 MBC 값 (μg/ml)
KU-5878	100	100	300	300
KU-5878-D(all)	300	300	>500	>500
KU-5878-K4	3	4	40	32
KU-5878-K4-D	3	3	25	20

[0202] 상기 표 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 소 혈청을 추가한 항균 활성 실험에서 KU-5878과 KU-5878-K4는 항균 활성이 낮아졌지만 KU-5878-K4-D의 경우 KU-5878-K4와 비교하여 항균 활성 감소의 폭이 적음을 알 수 있었다.

[0204] **실시예 5. KU-5878을 구성하는 일부 아미노산이 변이된 펩타이드의 항균 활성 확인**

[0205] KU-5878의 우수한 항균활성과 보다 높은 안정성을 갖는 펩타이드를 탐색하기 위하여, KU-5878의 C-말단을 아미데이션(amidation) 후 펩타이드 항균 활성을 박테리아 살균 최소 농도 측정법을 이용하여 비교 확인하였다. 실험은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. KU-5878 변이체의 구체적인 정보 및 각 세균에 대한 MBC 값은 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0207]

펩타이드	아미노산 서열	황색포도상구균 MBC 값 (μg/ml)	녹농균 MBC 값 (μg/ml)
KU-5878-NH_2	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	70	60

[0209] 상기 표 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, KU-5878의 말단이 변이된 펩타이드의 경우 항균 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

[0211] **실시예 6. KU-5878에서 한 개의 아미노산이 결손된 펩타이드의 항균 활성 평가**

[0212] KU-5878(서열번호 13)의 아미노산 서열에 대하여 1개의 아미노산을 결손시킨 변이체를 제작하고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 11에 개시되어 있다.

[0213] 그 결과, KU05878의 아미노산 순서를 58번 내지 78번으로 보면, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 74, 75, 또는 76번째 아미노산이 결손된 경우 항균활성이 증가하였다. 동일 아미노산이 연속된 것을 고려하면, 61번째 M 결손은 60번째 M 결손과 동일하고, 65번째 G 결손은 64번째 G 결손과 동일하다.

[0214] 서열번호 13을 기준으로는 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 17, 18, 또는 19번째 아미노산이 결손된 경우 항균 활성이 증가하였다.

표 11

[0216]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	
5878-d58K	-TMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300	300	>300	
5878-d59T	K-MMQSGGTFGTFMAIGMGIR	150	150	150	150	
5878-d60M	KT-MQSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	0
5878-d61M	KTM-QSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	0
5878-d62Q	KTMM-SGGTFGTFMAIGMGIR	100	90	100	100	0
5878-d63S	KTMMQ-GGTFGTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d64G	KTMMQS-GTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	0
5878-d65G	KTMMQSG-TFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	0
5878-d66T	KTMMQSGG-FGTFMAIGMGIR	90	90	100	90	0
5878-d67F	KTMMQSGGT-GTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d68G	KTMMQSGGTF-TFMAIGMGIR	25	20	18	25	0
5878-d69T	KTMMQSGGTFG-FMAIGMGIR	120	120	140	140	
5878-d70F	KTMMQSGGTFGT-MAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d71M	KTMMQSGGTFGTF-AIGMGIR	250	250	300	300	
5878-d72A	KTMMQSGGTFGTFM-IGMGIR	150	150	170	160	
5878-d73I	KTMMQSGGTFGTFMA-GMGIR	>300	>300	>300	>300	
5878-d74G	KTMMQSGGTFGTFMAI-MGIR	20	25	30	25	0
5878-d75M	KTMMQSGGTFGTFMAIG-GIR	100	100	100	110	0
5878-d76G	KTMMQSGGTFGTFMAIGM-IR	80	70	90	90	0
5878-d77I	KTMMQSGGTFGTFMAIGMG-R	>300	>300	>300	>300	
5878-d78R	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI-	300	300	>300	>300	

[0218] **실시예 7. KU-5878에서 2 개 이상의 아미노산이 결손된 펩타이드의 항균 활성 평가**

[0219] KU-5878(서열번호 13)의 아미노산 서열에 대하여 하나의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 12에 개시되어 있다.

[0220] 60번째 M, 64번째 G를 결손시킨 경우를 제외하고 대부분 항균활성이 저하되었다. 동일 아미노산이 연속된 것을 고려하면, 60번째 M 결손은 61번째 M 결손과 동일하고, 64번째 G 결손은 65번째 G 결손과 동일하다.

[0221] 서열번호 13을 기준으로는 3 또는 4번째 아미노산이 결손되고, 7 또는 8번째 아미노산이 결손된 경우 항균 활성이 증가하였다.

표 12

[0222]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
5878-d60M, d64G	KT-MQS-GTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110	0
5878-d71M, d75M	KTMMQSGGTFGTF-AIG-GIR	300	250	300	300	
5878-d60M, d72A, d75M	KT-MQSGGTFGTFM-IG-GIR	300	280	300	300	
5878-d64G, d71M, d76G	KTMMQS-GTFGTF-AIGM-IR	200	200	200	200	
5878-d60M, d64G, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTFM-IG-GIR	120	100	120	120	
5878-d60M, d64G, d71M, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTF- -IG-GIR	200	200	200	200	

[0224] **실시예 8. KU-5878에서 1개의 아미노산이 치환된 펩타이드의 항균 활성 평가**

[0225] KU-5878(서열번호 13)의 아미노산 서열에 대하여 하나의 아미노산을 치환시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 13에 개시되어 있다.

[0226] 서열번호 13을 기준으로는 1번째 아미노산 K를 R로 치환, 2번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, 5번째 아미노산 Q를 K 또는 R로 치환, 6번째 아미노산 S를 K, R, 또는 H로 치환, 9번째 아미노산 T를 K 또는 R로 치환, 10번째 아미노산 F를 W로 치환, 16번째 아미노산 I를 L로 치환, 20번째 아미노산 I를 G 또는 L로 치환한 경우 항균 활성이 증가하였다.

[0227] 또한 하기 표 13의 KU-5878-4Nle을 참고하면, KU-5878의 4개의 메티오닌을 모두 노루루신(Norleucine)으로 치환한 결과 항균 활성이 개선되었음을 확인하였다. 이는 메티오닌과 노루루신이 황이 탄소로 변경된 것을 제외하면 구조가 동일하기 때문인 것으로 추측된다.

표 13

[0229]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	50	40	50	50	0
KU-5878-Q62K	KTMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	90	80	90	90	0
KU-5878-S63K	KTMMQKGGTFGTFMAIGMGIR	60	50	50	50	0
KU-5878-T66K	KTMMQSGGKFGTFMAIGMGIR	80	60	70	80	0
KU-5878-T69K	KTMMQSGGTFGKFMAIGMGIR	140	130	150	150	
KU-5878-T59R	KRMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	30	25	30	30	0
KU-5878-Q62R	KTMMRSGGTFGTFMAIGMGIR	80	80	80	90	0
KU-5878-S63R	KTMMQRGGTFGTFMAIGMGIR	20	15	20	25	0
KU-5878-T66R	KTMMQSGGRFGTFMAIGMGIR	80	90	80	90	0
KU-5878-T59H	KHMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62H	KTMMHSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63H	KTMMQHGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110	0
KU-5878-T66H	KTMMQSGGHFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T59S	KSMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62S	KTMMSSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63T	KTMMQTGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T66S	KTMMQSGGSFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T59A	KAMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	150	120	130	140	
KU-5878-Q62A	KTMMASGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63A	KTMMQAGGTFGTFMAIGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-T66A	KTMMQSGGAFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T69A	KTMMQSGGTFGAFMAIGMGIR	300	300	300	300	
KU-5878-K58R	RTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	120	120	120	120	
KU-5878-K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIA	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIK	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-M60A	KTAMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFMAAGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMAKGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMAWGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGAR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGKR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77T	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGTR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77G	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGGR	80	90	100	90	0
KU-5878-4Nle	KT(Nle)(Nle)QSGGTFGTF(Nle)AIG(Nle)GIR	110	90	100	100	0
KU-5878-F67A	KTMMQSGGTAGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F67W	KTMMQSGGTWGTFMAIGMGIR	80	80	80	90	0

KU-5878-F70K	KTMMQSGGTFGTKMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F70W	KTMMQSGGTFGTWMAIGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-A72G	KTMMQSGGTFGTFMGIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-G76A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMAIR	>300	>300	>300	>300	

[0231] **실시예 9. KU-5878에서 59번 아미노산 치환을 기초로 하는 다치환 펩티드의 항균 활성 확인**

[0232] U-5878-T59K 아미노산 서열에 대하여 Q62K, S63K, T66K의 치환을 순차적으로 추가하고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 14에 개시되어 있다.

[0233] 상기 T59K, Q62K, S63K, T66K의 치환 위치는 서열번호 13을 기준으로 2, 5, 6, 9번째 아미노산에 해당한다.

표 14

[0234]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	50	40	50	50	0
KU-5878-K2 (T59K,Q62K)	KKMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	8	8	6	8	0
KU-5878-K3 (T59K,Q62K,S63K)	KKMMKKGGTFGTFMAIGMGIR	4	4	4	5	0
KU-5878-K4 (T59K,Q62K,S63K,T66K)	KKMMKKGGKFGTFMAIGMGIR	4	3	3	4	0

[0236] **실시예 10. C말단에 아미노산 서열 추가된 KU-5878의 항균 활성 확인**

[0237] KU-5878의 C말단에 아미노산 반복 서열을 추가하고 항균 활성도를 평가하였다. 하기 표 15에 따르면, KU-5878의 C 말단에 R(arginine) 반복 서열 또는 K(lysine) 서열을 부가하면 항균 활성이 증가하였다.

표 15

[0238]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
5878-3R	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRRRR	8	8	8	10	0
5878-KK	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRKK	15	16	16	16	0
5878-Q	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRQ	150	180	180	180	

[0240] **실시예 11. KU-5878-K4 변이체의 항균 활성 확인**

[0241] KU-5878의 서열에서 T59K, Q62K, S63K, 및 T66K의 변이를 갖는 KU-5878-K4를 기초로 아미노산 변이시 항균 활성 변화를 확인하였다. KU-5878-K4는 이하 K4로 간략히 지칭할 수 있다.

[0242] K4의 서열은 서열번호 24에 개시되어 있다. 하기 표 16에서, K4-K58T는 서열번호 24에서 첫 번째 아미노산이 T로 치환된 펩타이드를 의미하고, K4-4MI는 K4의 서열에 존재하는 4개의 메티오닌 모두가 이소루신으로 치환된 펩타이드를 의미하고, K4-T69G는 서열번호 24에서 12번째 아미노산이 G로 치환된 펩타이드를 의미한다. 이들은 모두 KU-5878보다 항균활성이 높았다.

표 16

[0243]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
K4-K58T	TKMMKKGGKFGTFMAIGMGIR	3	3	3	4	0
K4-4MI	KKIIKKGGKFGTFIAIGIGIR	3	2	3	3	0
K4-T69G	KKMMKKGGKFGGFMAIGMGIR	2	2	2	3	0

[0245] **실시예 12. 1개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0246] K4의 아미노산 서열에 대하여 하나의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 17에 개시되어 있다.

[0247] 하기 표 17에 따르면, 서열번호 24의 1번째 내지 12번째 아미노산, 14 내지 15번째 아미노산, 17 내지 21번째 아미노산 중 하나의 아미노산이 결손된 경우 5878보다 항균 활성이 높았다.

표 17

[0248]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
5878-K4-d58K(=d59K)	-KMMKKGGKFGTFMAIGMGIR	2	6	6	2	0
5878-K4-d60M(=d61M)	KK-MKKGGKFGTFMAIGMGIR	2	3	4	2	0
5878-K4-d62K(=d63K)	KKMM-KGGKFGTFMAIGMGIR	2	6	6	6	0
5878-K4-d64G(=d65G)	KKMMKK-GKFGTFMAIGMGIR	2	2	4	2	0
5878-K4-d66K	KKMMKKGG-FGTFMAIGMGIR	4	6	4	4	0
5878-K4-d67F	KKMMKKGGK-GTFMAIGMGIR	4	6	5	4	0
5878-K4-d68G	KKMMKKGGKF-TFMAIGMGIR	4	4	6	4	0
5878-K4-d69T	KKMMKKGGKFG-FMAIGMGIR	4	2	3	2	0
5878 K4-d70F	KKMMKKGGKFGT-MAIGMGIR	100	140	160	110	
5878-K4-d71M	KKMMKKGGKFGTF-AIGMGIR	2	4	6	4	0
5878-K4-d72A	KKMMKKGGKFGTFM-IGMGIR	2	2	4	3	0
5878-K4-d73I	KKMMKKGGKFGTFMA-GMGIR	300	300	>300	>300	
5878-K4-d74G	KKMMKKGGKFGTFMAI-MGIR	2	2	4	3	0
5878-K4-d75M	KKMMKKGGKFGTFMAIG-GIR	2	2	4	2	0
5878-K4-d76G	KKMMKKGGKFGTFMAIGM-IR	4	4	4	4	0
5878-K4-d77I	KKMMKKGGKFGTFMAIGMG-R	4	7	6	4	0
5878-K4-78R	KKMMKKGGKFGTFMAIGMGI-	4	10	8	4	0

[0250] **실시예 13. 2개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0251] K4의 아미노산 서열에 대하여 두 개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 18에 개시되어 있다.

[0252] 하기 표 18에 따르면, 서열번호 24의 14번째 아미노산이 결손되고, 1 내지 8, 12, 15, 및 18번째 아미노산 중 어느 하나의 아미노산이 더 결손된 경우 5878보다 항균 활성이 높았다.

표 18

[0254]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
K4-d58K-d71M	-KMMKKGGKFGTF-AIGMGIR	10	8	10	10	0

K4-d60M-d71M	KK-MKKGGKFGTF-AIGMGIR	10	10	10	12	0
K4-d62K-d71M	KKMM-KGGKFGTF-AIGMGIR	12	12	12	12	0
K4-d64G-d71M	KKMMKK-GKFGTF-AIGMGIR	15	15	18	18	0
K4-d69T-d71M	KKMMKKGGKFG-F-AIGMGIR	10	10	12	12	0
K4-d71M-d72A	KKMMKKGGKFGTF--IGMGIR	20	20	20	20	0
K4-d58K-d75M	-KMMKKGGKFGTFMAIG-GIR	150	150	160	180	
K4-d60M-d75M	KK-MKKGGKFGTFMAIG-GIR	200	200	200	210	
K4-d71M-d75M	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	4	5	0
K4-d72A-d75M	KKMMKKGGKFGTFM-IG-GIR	200	200	200	200	

[0256] **실시예 14. 3개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0257] K4의 아미노산 서열에 대하여 3 개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 19에 개시되어 있으며, 5878보다 항균 활성이 높았다.

표 19

[0259]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 75M	-K-MKKGGKFGTFMAIG-GIR	6	6	8	8	0
d 60M 71M 72A	KK-MKKGGKFGTF--IGMGIR	8	8	8	10	0
d 69T 71M 72A	KKMMKKGGKFG-F--IGMGIR	2	2	3	4	0
d 60M 71M 75M	KK-MKKGGKFGTF-AIG-GIR	2	2	3	2	0
d 71M 72A 75M	KKMMKKGGKFGTF--IG-GIR	2	3	2	3	0
d 58K 71M 75M	-KMMKKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	2	4	0
d 62K 71M 75M	KKMM-KGGKFGTF-AIG-GIR	3	4	4	3	0
d 64G 71M 75M	KKMMKK-GKFGTF-AIG-GIR	2	3	3	3	0
d 69T 71M 75M	KKMMKKGGKFG-F-AIG-GIR	2	2	3	2	0

[0261] **실시예 15. 4개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0262] K4의 아미노산 서열에 대하여 4 개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 20에 개시되어 있다.

표 20

[0263]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 71M 72A	-K-MKKGGKFGTF--IGMGIR	20	15	20	20	0
d 58K 64G 71M 72A	-KMMKK-GKFGTF--IGMGIR	8	8	8	10	0
d 58K 64G 72A 75M	-KMMKK-GKFGTFM-IG-GIR	6	6	8	8	0
d 62K 68G 72A 75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	1	1	2	3	0
d 60M 61M 71M 75M	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2	0
d 60M 62K 71M 75M	KK-M-KGGKFGTF-AIG-GIR	2	2	3	3	0
d 60M 64G 71M 75M	KK-MKK-GKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2	0
d 60M 71M 72A 75M	KK-MKKGGKFGTF--IG-GIR	2	1	2	3	0
d 60M 69T 71M 75M	KK-MKKGGKFG-F-AIG-GIR	2	1	2	2	0

[0265] **실시예 16. 5개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0266] K4의 아미노산 서열에 대하여 5개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 21에 개시되어 있다.

표 21

[0267]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d 58K 64G 69T 71M 72A	-KMMKK-GKFG-F--IGMGIR	2	2	3	3	0
d 62K 68G 71M 72A 75M	KKMM-KGGKF-TF--IG-GIR	20	20	20	25	0
d 58K 62K 68G 72A 75M	-KMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	16	15	15	18	0
d 60M 62K 68G 72A 75M	KK-M-KGGKF-TFM-IG-GIR	4	4	4	5	0
d 62K 64G 68G 72A 75M	KKMM-K-GKF-TFM-IG-GIR	4	4	4	4	0
d 62K 68G 69T 72A 75M	KKMM-KGGKF--FM-IG-GIR	8	8	8	10	0
d 60M 61M 62K 71M 75M	KK---KGGKFGTF-AIG-GIR	80	80	80	80	0

[0269] **실시예 17. 6개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0270] K4의 아미노산 서열에 대하여 6개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 22에 개시되어 있다.

표 22

[0271]

펩타이드 명	**아미노산 서열**	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	**CRPA**	**MRSA**	
d 58K 64G 69T 71M 72A 75M	-KMMKK-GKFG-F--IG-GIR	8	6	8	10	0
d 60M 61M 62K 64G 71M 75M	KK---K-GKFGTF-AIG-GIR	80	90	90	90	0
d 60M 61M 62K 69T 71M 75M	KK---KGGKFG-F-AIG-GIR	30	30	30	30	0
d 60M 61M 62K 71M 72A 75M	KK---KGGKFGTF--IG-GIR	100	100	110	120	

[0273] **실시예 18. 7개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0274] K4의 아미노산 서열에 대하여 7개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 23에 개시되어 있다.

표 23

[0275]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d 58K 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-KMM-K-GKFG-F--IG-GIR	4	4	5	5	0
d 60M 61M 62K 64G 69T 71M 75M	KK---K-GKFG-F-AIG-GIR	15	16	16	16	0
d 60M 61M 62K 64G 71M 72A 75M	KK---K-GKFGTF--IG-GIR	100	100	100	100	
d 60M 61M 62K 69T 71M 72A 75M	KK---KGGKFG-F--IG-GIR	90	100	100	100	

[0277] **실시예 19. 8개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0278] K4의 아미노산 서열에 대하여 8개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 24에 개시되어 있다.

표 24

[0279]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-K-M-K-GKFG-F--IG-GIR	4	4	5	5	0
d 58K 60M 61M 62K 64G 71M 72A 75M	-K---K-GKFGTF--IG-GIR	8	12	10	12	0
d 58K 60M 61M 62K 64G 69T 71M 75M	-K---K-GKFG-F-AIG-GIR	4	8	6	8	0
d 58K 60M 61M 62K 69T 71M 72A 75M	-K---KGGKFG-F--IG-GIR	8	8	8	8	0
d 60M 61M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	KK---K-GKFG-F--IG-GIR	2	3	4	4	0

[0281] **실시예 20. 9개의 아미노산이 결손된 K4 펩타이드의 항균 활성**

[0282] K4의 아미노산 서열에 대하여 9개의 아미노산을 결손시키고 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 하기 표 25에 개시되어 있다.

표 25

[0283]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				비고
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
d58K 60M 61M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-K---K-GKFG-F--IG-GIR	15	16	15	15	0

[0285] **실시예 21. 페길화(pegylation)된 K4의 항균 활성 확인**

[0286] 4개 아미노산이 결실된 K4 및 8개 아미노산이 결실된 K4를 페길화시키고 항균 활성을 측정하였다.

[0287] 하기 표 26에 따르면, 항균 활성은 페길화 전보다는 약간 감소하였으나, 5878보다는 월등히 우수한 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

표 26

[0288]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
PEG-K4-d62K68G72A75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	2	3	3	2	0
PEG-K4-d58K60M61M62K69T71M72A75M	-K---KGGKFG-F--IG-GIR	30	32	32	32	0

[0290] **실시예 22. 스테이플 펩타이드의 항균 활성**

[0291] K4의 아미노산 서열에 대하여 2번째 아미노산을 T로 치환하고(이하 K4-K59T로 지칭할 수 있다) 항균 활성을 평가하였다.

[0292] K4-K59T는 서열번호 23의 K3와 비교하면 2번째 아미노산 및 9번째 아미노산 서열에서 차이가 있는 다른 서열이다. 하기 표 27에서 스테이플화(stapled)는 한 쌍의 아미노산이 펜테닐알라닌 또는 옥테닐알라닌으로 치환되고, 이들이 서로 가교결합한 경우를 의미한다. stapled peptide-1은 10 및 14번째 아미노산쌍이 펜테닐알라닌(S5로 표시)으로 치환되어 상호 가교결합한 것이고, stapled peptide-2는 14 및 18번째 아미노산쌍이 펜테닐알라닌으로 치환되어 상호 가교결합한 것이다.

[0293] K4-K59T 및 스테이플화된 K4-K59T에 대한 항균 활성 평가는 하기 표 27에 개시되어 있다.

표 27

[0294]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC				활성 증가
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA	
5878-K3 (62, 63, 66)	KTMMKKGGKFGTFMAIGMGIR	4	4	4	5	0
Stapled peptide-1	KTMMKKGGKFGTF{S5}AIG{S5}GIR	2	3	3	3	0
Stapled peptide-2	KTMMKKGGK{S5}GTF{S5}AIGMGIR	16	16	18	20	0

[0296] **실시예 23. C말단에 서열이 부가된 K4 변이체의 항균 활성 확인**

[0297] K4의 2결실 변이체의 C 말단 또는 K4의 4결실 변이체의 C 말단에 R 또는 K 아미노산을 부가하고 항균 활성을 측정하였다. 하기 표 28에 따르면 R 또는 K의 단독 또는 반복 서열이 부가된 펩타이드는 항균활성이 증가하였다.

표 28

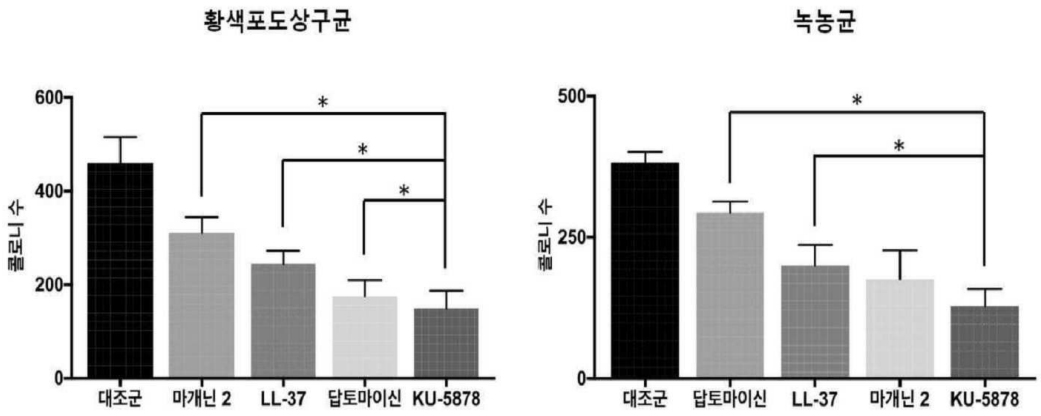
[0298]

펩타이드 명	아미노산 서열	MBC			
		녹농균	황색포도상구균	CRPA	MRSA
K4-d71M75M	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	4	5
K4-d71M75M-R	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIRR	3	2	3	3
K4-d71M75M-K	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIRK	2	1	1	2
K4-d60M61M71M75M	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2
K4-d60M61M71M75M-RRR	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIRRRR	2	1	1	2
K4-d60M61M71M75M-KKK	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIRKKK	1	1	1	1
K4-d62K68G72A75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	1	1	2	3
K4-d62K68G72A75M-RRR	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIRRRR	1	1	2	2

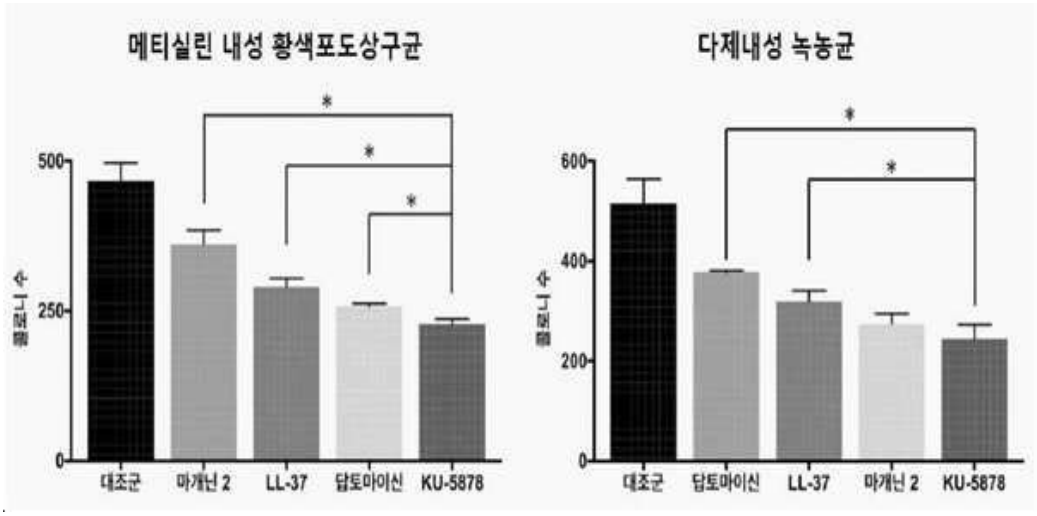
[0300] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

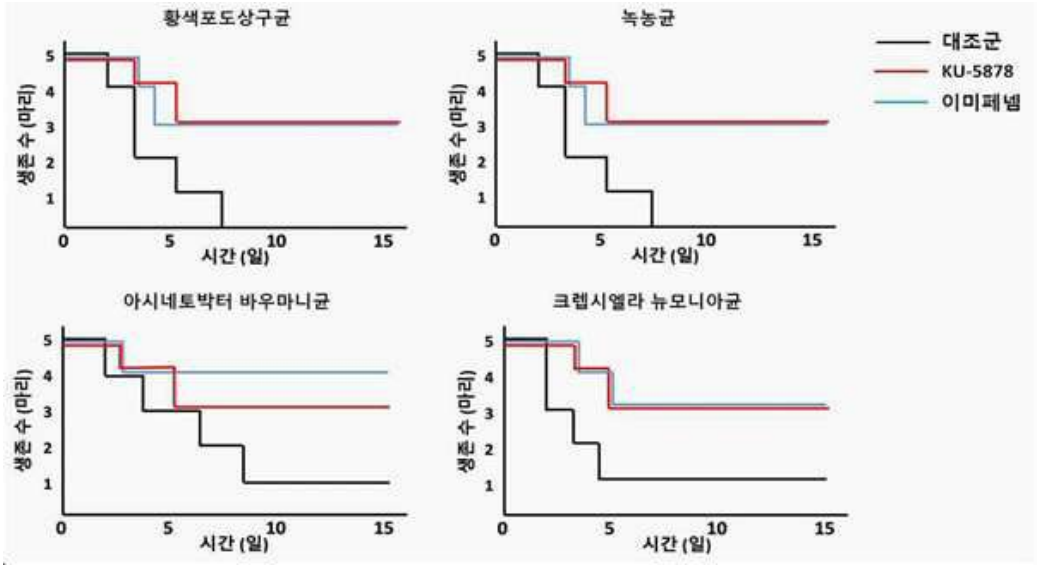
도면1



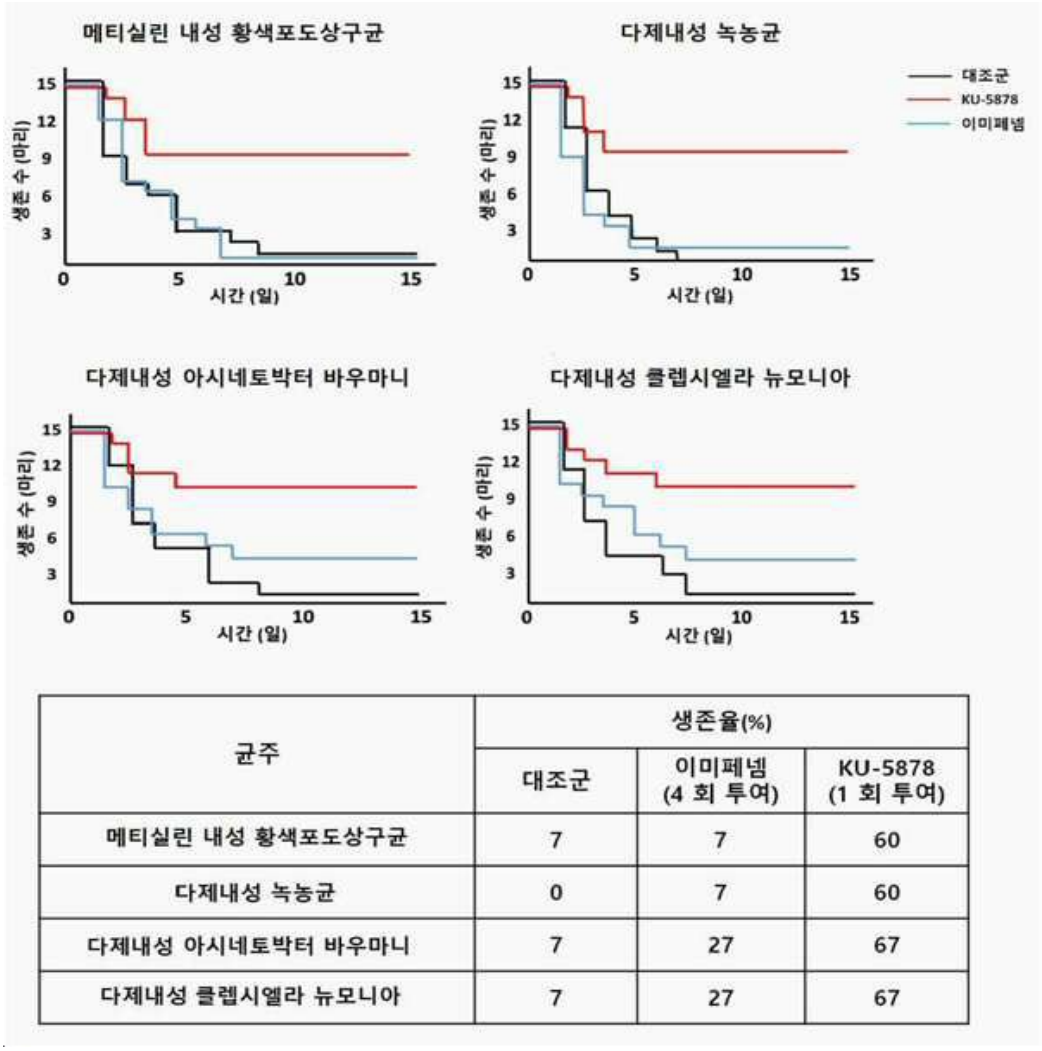
도면2



도면3

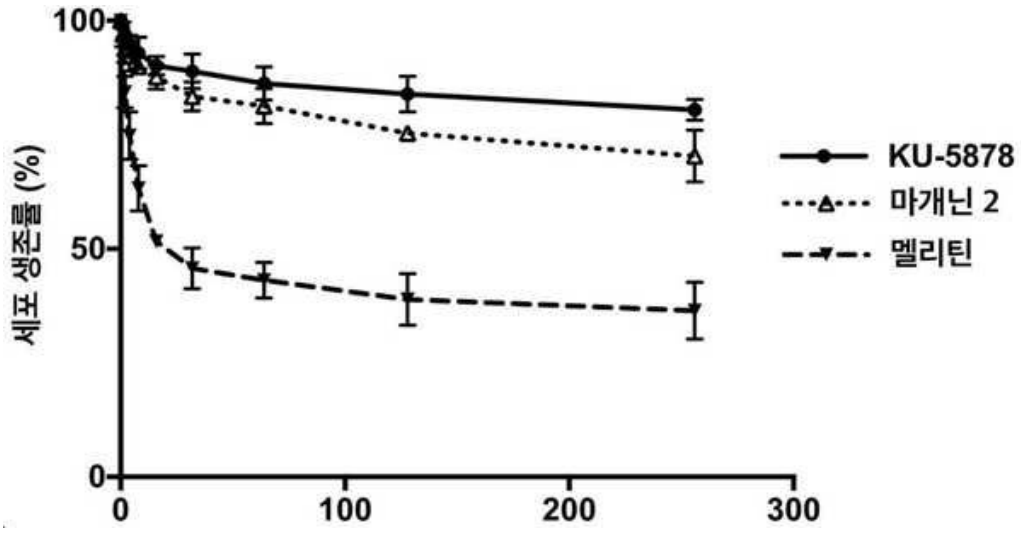


도면4

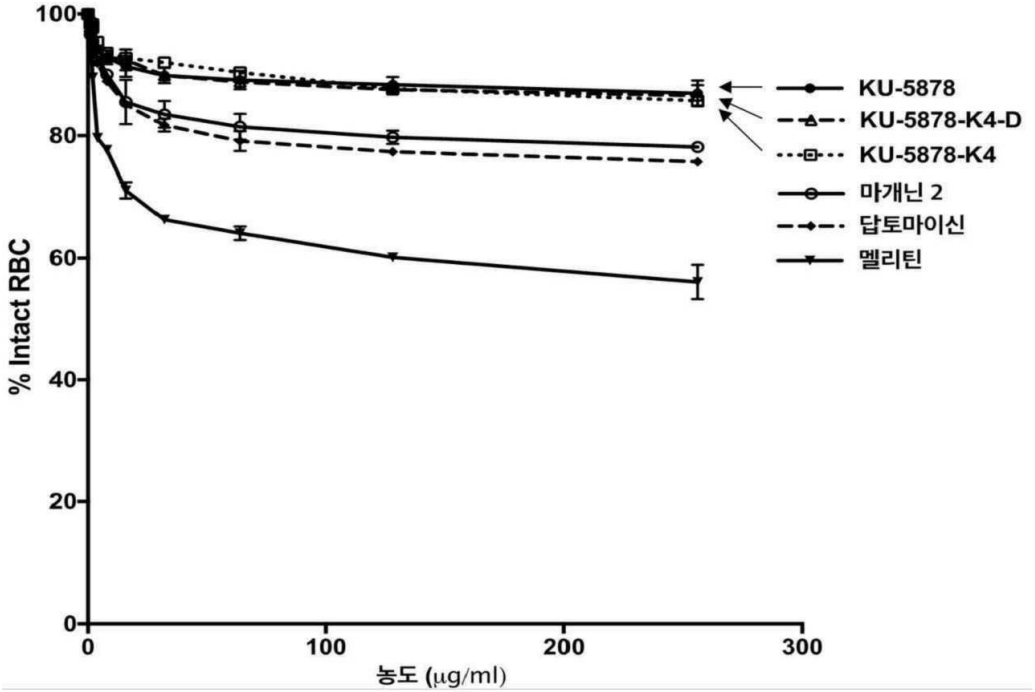


균주	생존율(%)		
	대조군	이미페넴 (4 회 투여)	KU-5878 (1 회 투여)
메티실린 내성 황색포도상구균	7	7	60
다제내성 녹농균	0	7	60
다제내성 아시네토박터 바우마니	7	27	67
다제내성 클렙시엘라 뉴모니아	7	27	67

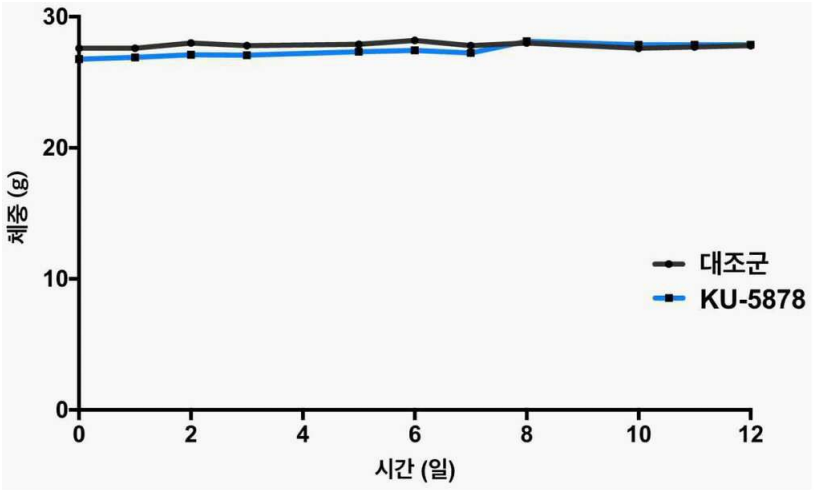
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Buisness Foundation

<120> Romo1-derived antimicrobial peptides and variants thereof

<130> PN200192

<150> KR 10-2019-0071635

<151> 2019-06-17

<160> 49

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo sapiens Romo1

<400> 1

Met Pro Val Ala Val Gly Pro Tyr Gly Gln Ser Gln Pro Ser Cys Phe
1 5 10 15

Asp Arg Val Lys Met Gly Phe Val Met Gly Cys Ala Val Gly Met Ala
20 25 30

Ala Gly Ala Leu Phe Gly Thr Phe Ser Cys Leu Arg Ile Gly Met Arg
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly
50 55 60

Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
65 70 75

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5278

<400> 2

Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe
1 5 10 15

Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg
20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5279

<400> 3

Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe
1 5 10 15

Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys

20 25

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5478

<400> 4

Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr

1 5 10 15

Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg

20 25

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5479

<400> 5

Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr

1 5 10 15

Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys

20 25

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5678

<400> 6

Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met

1 5 10 15

Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5679

<400> 7

Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met
1 5 10 15

Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5778

<400> 8

Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala
1 5 10 15

Ile Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5779

<400> 9

Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala
1 5 10 15

Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
20

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5875

<400> 10

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5876

<400> 11

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5877

<400> 12

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile
20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878

<400> 13

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5879

<400> 14

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg Cys

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-6079

<400> 15

Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met

1 5 10 15

Gly Ile Arg Cys

20

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial peptide

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(2)

<223> X = any one of: R, K, H, S, T, Q, or N

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(6)

<223> X = any one of: R, K, H, S, T, Q, or N

<220><221> VARIANT

<222> (9)

<223> X = any one of: R, K, H, S, T, Q, or N

<220><221> VARIANT

<222> (12)

<223> X = any one of: R, K, H, S, T, Q, or N

<400> 16

Xaa Xaa Met Met Xaa Xaa Gly Gly Xaa Phe Gly Xaa Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-T59K

<400> 17

Lys Lys Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-Q62K

<400> 18

Lys Thr Met Met Lys Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-S63K

<400> 19

Lys Thr Met Met Gln Lys Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-T66K

<400> 20

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Lys Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-T69K

<400> 21

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Lys Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-K2

<400> 22

Lys Lys Met Met Lys Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-K3

<400> 23

Lys Lys Met Met Lys Lys Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-K4

<400> 24

Lys Lys Met Met Lys Lys Gly Gly Lys Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-K58R

<400> 25

Arg Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-K58A

<400> 26

Ala Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-T59R

<400> 27

Lys Arg Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 28

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-R78A

<400> 28

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Ala

20

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-R78K

<400> 29

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Lys

20

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial peptide

<220><221

> VARIANT

<222> (3)..(4)

<223> X = any one of: Met, Leu, Ile, Val, or Nle

<220><221> VARIANT

<222> (14)

<223> X = any one of: Met, Leu, Ile, Val, or Nle

<220><221> VARIANT

<222> (16)

<223> X = any one of: Met, Leu, Ile, Val, or Nle

<220><221> VARIANT

<222> (18)

<223> X = any one of: Met, Leu, Ile, Val, or Nle

<220><221> VARIANT

<222> (20)

<223> X = any one of: Met, Leu, Ile, Val, Gly, or Nle

<400> 30

Lys Thr Xaa Xaa Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Xaa Ala Xaa

1 5 10 15

Gly Xaa Gly Xaa Arg

20

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-M60A

<400> 31

Lys Thr Ala Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I73A

<400> 32

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ala

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 33

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I73K

<400> 33

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Lys

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 34

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I73W

<400> 34

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Trp

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I77A

<400> 35

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ala Arg

20

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I77K

<400> 36

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Lys Arg

20

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I77T

<400> 37

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Thr Arg

20

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-I77G

<400> 38

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Gly Arg

20

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-4Nle

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(4)

<223> X = Norleucine(Nle)

<220><221> VARIANT

<222> (14)

<223> X = Norleucine(Nle)

<220><221> VARIANT

<222> (18)

<223> X = Norleucine(Nle)

<400> 39

Lys Thr Xaa Xaa Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Xaa Ala Ile

1 5 10 15

Gly Xaa Gly Ile Arg

20

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial peptide

<220><221> VARIANT

<222> (10)

<223> X = any one of: F, Y, or W

<220><221> VARIANT

<222> (13)

<223> X = any one of: F, Y, or W

<400> 40

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Xaa Gly Thr Xaa Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 41

<211
> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-F67A

<400> 41

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Ala Gly Thr Phe Met Ala Ile
1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg
20

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-F67W

<400> 42

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Trp Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-F70K

<400> 43

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Lys Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 44

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-F70W

<400> 44

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Trp Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial peptide

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(8)

<223> X = any one of: A or G

<220><221> VARIANT

<222> (11)

<223> X = any one of: A or G

<220><221> VARIANT

<222> (15)

<223> X = any one of: A or G

<220><221> VARIANT

<222> (17)

<223> X = any one of: A or G

<220><221> VARIANT

<222> (19)

<223> X = any one of: A or G

<400> 45

Lys Thr Met Met Gln Ser Xaa Xaa Thr Phe Xaa Thr Phe Met Xaa Ile

1 5 10 15

Xaa Met Xaa Ile Arg

20

<210> 46

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-A72G

<400> 46

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Gly Ile

1 5 10 15

Gly Met Gly Ile Arg

20

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KU-5878-G76A

<400> 47

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile

1 5 10 15

Gly Met Ala Ile Arg

20

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCM19

<400> 48

Cys Leu Arg Ile Gly Met Arg Gly Arg Glu Leu Met Gly Gly Ile Gly

1 5 10 15

Lys Thr Met

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCM12

<400> 49

Lys Thr Met Met Gln Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Met Gly

1 5 10 15

Ile Arg