



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0128904
(43) 공개일자 2016년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01) A23L 3/3463 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0015464
(22) 출원일자 2016년02월11일
심사청구일자 2016년02월11일
(30) 우선권주장
1020150060700 2015년04월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조주현
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 1401호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
김현
경상남도 사천시 정동면 진삼로 1386, 101동 903호(사천3차한보아파트)
장주혜
경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 호원로 359, 218동 1104호(코오롱하늘채2차아파트)
(74) 대리인
김순웅

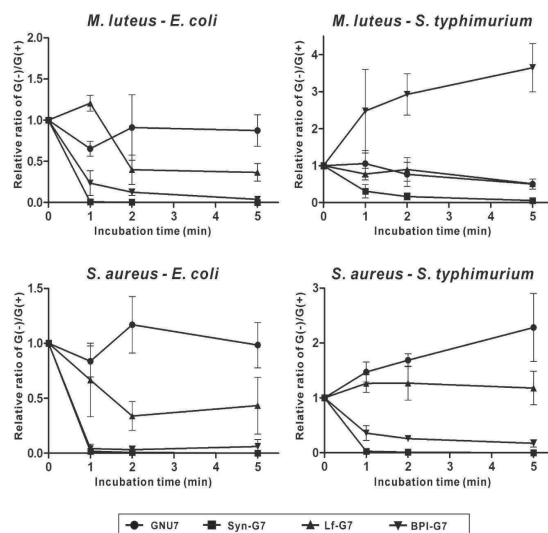
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 그람음성병원균 특이성이 증진된 항균 펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 항균 펩타이드 및 이를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그람음성균에 대한 특이성이 증진된 항균 활성 및 항염증 활성을 가지는 항균 펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항균 펩타이드는 그람음성균에 대한 높은 특이성 및 낮은 세포독성을 나타내며, 내독소(endotoxin)로 작용하는 LPS와 결합하여 LPS를 불활성화시킴으로써 항염증 및 항균 활성을 나타내는 효과가 우수하며, 그람음성균 특이적인 항균용 조성물로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 20/147 (2016.05)

A23L 3/3463 (2013.01)

A61K 8/64 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A6A8073556

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프런티어사업(지능형 바이오 시스템 설계 및 합성 연구)

연구과제명 지능형 항균활성균 개발

기 여 율 50/100

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A11050944

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업(도약연구지원사업)

연구과제명 병원균-특이적 생체방어펩타이드의 개발 및 표적 항생제로의 활용 연구

기 여 율 50/100

주관기관 경상대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 3으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 그람음성균에 결합하는 것을 특징으로 하는, 펩타이드

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 그람음성균은 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 쉬겔라(*Shigella*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상의 균인 것을 특징으로 하는, 펩타이드

청구항 4

표적 도메인(TD; targeting domain), 항균 활성 도메인(KD; killing domain) 및 링커(linker)를 포함하고, 하기 구조식 1의 형태로 배열된 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

[구조식 1]

TD-링커-KD

상기 표적 도메인(TD; targeting domain)은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열이고,

상기 항균 활성 도메인(KD; killing domain)은 서열번호 4의 아미노산 서열이다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람음성균에 특이적인 것을 특징으로 하는, 항균 펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 그람음성균은 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*)으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상의 균인 것을 특징으로 하는, 항균 펩타이드.

청구항 7

제4항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물.

청구항 8

제4항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항생제.

청구항 9

제4항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 식품 방부제.

청구항 10

제4항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 화장품 첨가제.

청구항 11

제4항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 항균 펩타이드 및 이를 포함하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그람음성균에 대한 특이성이 증진된 항균 활성 및 항염증 활성을 가지는 항균 펩타이드 및 이를 함유하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 페니실린 이후 많은 항생제들이 개발되어 생체 외부로부터 침입한 세균 퇴치에 사용되어 왔지만, 최근 항생제의 오남용으로 인해 항생제 내성균이 급격히 증가하고 있다. 이러한 항생제 내성균에 의한 질병을 치료하기 위해 많은 신규 항생제가 개발되고 있으나 항생제 대부분은 기존의 항생제와 유사한 작용 기전을 가지며, 항생작용 후 분해되지 않고 체내에 잔류함으로써 지속적인 항생제 내성 문제를 일으키고 있다. 또한 기존의 항생제는 내성을 유발할 뿐만 아니라, 비특이적인 항균작용으로 정상세균총을 파괴하여 다른 질병의 원인이 된다. 특히 항생제 복용으로 인한 장내 정상세균총의 파괴로 발생하는 항생제 연관 장염(*Clostridium difficile* infection, CDI)은 대표적인 항생제의 부작용으로 떠오르고 있으며, 화상 치료에 사용되는 광범위 항생제 역시 피부 정상세균총을 억제하여 곰팡이 감염의 원인이 된다. 따라서 기존의 항생제를 대체할 새로운 패러다임의 감염 치료제 개발이 절실한 실정이며, 기존의 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 항균 펩타이드가 주목 받고 있다.

[0004] 항균 펩타이드는 자연면역체계(innate defense system)의 하나로 모든 생물체가 가지고 있는 10~50개의 아미노산으로 구성된 작은 크기의 펩타이드로서 생물체가 병원균에 감염되었을 때 1차 방어물질로 작용한다. 항균 펩타이드는 전체적으로 양전하 (+2~+9)를 띠며, 30% 정도의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고 있다. 이러한 특징으로 인해 항균 펩타이드는 음전하를 띤 세균 세포막과 접촉한 뒤 양친성 α -나선구조 (amphipathic α -helix) 혹은 β -병풍구조 (β -sheet)를 형성하여 세포막 속으로 끼어 들어가 세포막의 전위를 변화시키거나 세포막 자체에 구멍을 내어 세포막을 파괴함으로써 세균을 죽인다. 또한 일부 항균 펩타이드는 세포 내로 들어간 다음 세포 내 타겟을 공격하여 세포 기능을 마비시킴으로써 항균 활성을 나타낸다. 그러므로 항균 펩타이드는 특정 수용체를 타겟으로 하는 기존의 항생제에 비해 내성을 유발할 가능성이 현저히 낮다. 또한 항균 펩타이드는 신속한 작용 기전, 기존 항생제 내성균에 작용, 항 내독성 (anti-endotoxicity) 등의 특징을 가지고 있어 신규 감염 치료제로서 개발하기에 적합하다.

[0005] 하지만 항균 펩타이드 역시 광범위한 항균작용을 가지기 때문에, 병원균뿐만 아니라 숙주의 정상세균총 (microflora)에도 작용하여 미생물 무리에 변화를 주고, 이로 인해 다른 질병을 일으키는 문제가 있다. 따라서 항균 펩타이드를 실제 항생제 대체물질로 개발하기 위해서는 병원균에 특이성이 높은 항균 펩타이드를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 장내 질병을 일으키는 주요 원인균인 그람음성균에 대한 특이성을 증진시키기 위해 리포폴리사카라이드(LPS; lipopolysaccharide, 이하 LPS라 함) 결합 서열로 구성된 펩타이드 및 상기 펩타이드에 항균 활성을 갖는 펩타이드 서열을 부가한 3종의 항균 펩타이드(Syn-G7, Lf-G7, BPI-G7)를 개발하였으며, 상기 항균 펩타이드가 그람음성균 특이적인 항균력 및 항염증 활성을 갖는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 그람음성균에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 항균 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 상기 항균 펩타이드를 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 표적 도메인(TD; targeting domain), 항균 활성 도메인(KD; killing domain) 및 링커(linker)를 포함하는 항균 펩타이드를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항생제를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 식품 방부제를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 화장품 첨가제를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 항균 펩타이드는 그람음성균에 대한 높은 특이성 및 낮은 세포독성을 나타내며, 내독소(endotoxin)로 작용하는 LPS와 결합하여 LPS를 불활성화시킴으로써 항염증 및 항균 활성을 나타내는 효과가 우수한바, 그람음성균 특이적인 항균용 조성물로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명에 따른 항균 펩타이드의 그람음성균 특이적 항균 활성을 나타낸 도이다(세로축은 그람양성균의 콜로니(colony) 수와 그람음성균의 콜로니(colony) 수의 비율을 나타낸다).
- 도 2는 본 발명에 따른 항균 펩타이드의 항염증 활성을 나타낸 도로서, 대식세포에서 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, MCP-1의 mRNA 발현 정도를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 항균 펩타이드의 LPS 결합 활성(LPS binding activity)을 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 항균 펩타이드의 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT cell)에 대한 세포독성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열 중 1종 이상의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 제공한다.

- [0025] 본 발명에서 용어, “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법에 따라 제조될 수 있으며, 바람직하게는 고체상 합성 기술에 따라 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명에서 용어, “그람음성균”은 그람염색법으로 염색했을 때 적색으로 염색되는 세균으로, 그람음성균의 세포벽은 얇고(약 10nm) 외층에 다량의 리포폴리사카라이드(LPS)를 함유하고 있는 것이 대부분이며, 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 쉬겔라(*Shigella*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*) 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드로 구성되는 표적 도메인(TD), 항균 활성 도메인(KD) 및 링커(linker)를 포함하고, 하기 구조식 1의 형태로 배열된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [0029] [구조식 1]
- [0030] TD-링커-KD
- [0031] 본 발명에 있어서, 표적 도메인(TD)은 그람음성균 외막에 존재하는 LPS에 특이적으로 결합하는 서열로 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열 중 1종 이상의 서열을 의미한다. 상기 표적 도메인(TD)은 그람음성균의 LPS에 결합하는 펩타이드 또는 이들의 유도체를 포함하며, 바람직하게는 락토페린(lactoferrin)의 28 내지 34번째 아미노산 서열(서열번호 2), BPI(bactericidal/permeability-increasing protein)의 서열 84 내지 99번째 아미노산 서열(서열번호 3)로 표시되는 펩타이드를 포함하며, 보다 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 포함한다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 항균 활성 도메인(KD)은 항균활성을 가지는 펩타이드를 의미하는 것으로, 바람직하게는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드이다.
- [0033] 본 발명의 링커(linker)는 당업계에 공지된 다양한 링커를 포함하며, 바람직하게는 2 내지 10개의 글리신 또는 세린 아미노산과 기타 아미노산들로 구성될 수 있고, 더욱 바람직하게는 3개의 Gly 잔기로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항균 펩타이드는 그람음성균의 외막에 존재하는 LPS에 특이적으로 결합하여 그람음성균 특이적 항균 활성을 나타내고, LPS를 불활성화시킴으로써 항염증 및 항균 활성을 나타내며, 낮은 세포 독성을 갖는바, 항균용 조성물로서 다양한 분야에서 활용될 수 있다.
- [0036] 이에, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명에서, 항균용 조성물은 세균이나 곰팡이와 같은 미생물의 생육을 저해하는 활성을 가진 조성물로서, 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 모든 형태가 포함될 수 있으며, 예를 들어, 의약품, 의약외품, 식품첨가제 또는 사료 첨가제 등의 형태일 수 있다. 구체적으로, 의약에 있어서는 항생제나 오염방지제와 같은 목적으로, 식품에 있어서는 방부나 항균목적으로, 농업에 있어서는 항균, 살균, 소독의 목적으로, 화장품이나 생활용품에 있어서는 비듬억제용, 무좀방지용, 겨드랑이 채취억제용, 향여드름용 등 미생물과 직접 연관된 제품에 사용되거나 청소용 세정제나 식기세척용 세정제 등에 방부나 항균 또는 살균 목적으로 사용되어 질 수 있으며, 이러한 목적으로만 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 따라서, 본 발명의 항균용 조성물은 약학적 조성물인 항생제, 식품 방부제, 화장품 첨가제 또는 사료 첨가제의 형태로 제조될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 상기 항균 펩타이드와 함께 항균 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염

수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근 판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0042] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 항균 펩타이드의 일일 투여량은 2~10 mg/kg, 바람직하게는 4~8mg/kg이나 임상결과에 따라 가감될 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

[0044] 본 발명의 항균용 식품 방부제는 공지의 식품 방부제 중 1종 이상 포함하여 제조될 수 있다. 식품 방부제로는 데히드로초산, 소르빈산칼륨, 소르빈산칼슘, 안식향산나트륨, 안식향산칼륨, 안식향산칼슘, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 프로피온산나트륨, 프로피온산칼슘 등이 사용되고 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] 본 발명의 항균용 식품 방부제는 상기 항균 펩타이드를 식품 방부제 총 중량에 대해 0.01 ~ 1 중량% 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0047] 본 발명의 항균용 화장품 첨가제는 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 화장품 첨가제는 상기 항균 펩타이드 외에 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다. 또한, 적합한 화장품의 제형으로는, 예를 들면 상기 항균 펩타이드를 첨가한 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소나 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 또한 화장품 첨가제에 사용되는 부형제로서 알부틴(arbutin), 코직산(kojic acid), 루시놀(rucinol), 비타민 C(vitamin C) 및 비타민 C 유도체 등을 추가로 함유할 수 있으며, 주름개선 효과를 목적으로 레티놀(retinol) 및 그 유도체, 인돌아세트산(indol acetic acid) 및 그 유도체, 아데노신(adenosin), 토코페롤(tocopherol) 및 그 유도체, 카이니틴 등을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기 부형제에는 화장품 첨가제에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0048] 본 발명의 항균용 화장품 첨가제에는 상기 항균 펩타이드를 화장품 첨가제 총 중량에 대해 0.01 ~ 1 중량%를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 본 발명의 사료 첨가제는 사료 원료에 적절하게 배합하여 사료로 제공되는데, 상기 사료 원료로 곡물유, 조강류, 식물성 유박류, 동물성 사료 원료, 기타 사료 원료, 정제품 등이 사용되고 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0052] 이하, 본 발명의 내용을 실시예, 실험예 및 제제예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1 : 항균 펩타이드의 제조

[0055] 그람음성균 특이적 항균 펩타이드를 제조하기 위하여 선행연구결과와 문헌 조사, APD(Antimicrobial Peptide Database) 데이터베이스 분석 및 분자 모델링 결과를 이용하였다.

[0056] 항균 펩타이드는 그람음성균의 외막에 존재하는 LPS를 타겟팅(targeting) 할 수 있는 표적 도메인(TD; targeting domain), 실질적인 항균 활성을 나타내는 항균 활성 도메인(KD; killing domain), 그리고 이 두 서열을 연결하는 링커(linker)로 구성하였다. 표적 도메인(TD)의 경우, LPS-결합 활성 부위(LPS-binding activity)를 가지고 있는 항균 펩타이드들의 서열을 비교하여 제작한 신규한 서열인 Syn(서열번호 1), 락토페린(Lactoferrin)의 아미노산 서열 중 28~34번째 서열(서열번호 2, 이하 Lf라고 함), 그리고 BPI(bactericidal/permeability-increasing protein)의 아미노산 서열 중 84~99번째 서열(서열번호 3, 이하 BPI라고 함)을 선택하였다. 상기 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 표적 도메인을 기 개발한 항균 펩타이드인 서열번호 4로 구성된 항균 활성 도메인(KD, 이하 GNU7이라 함)의 N-말단에 위치시키고 그 사이를 GGG의 서열로 표시되는 링커(linker)로 연결하여 3종의 항균 펩타이드를 제조하였다. 그 구체적인 서열을 표 1에 나타내었다.

[0057] [표 1]

펩타이드	서열(Sequence)		
	표적 도메인(TD)	링커(linker)	항균 활성 도메인(KD)
Syn-G7	GLRLLRKIRGRWK(서열번호1)	GGG	RLLRPLLQLLKQKLR(서열번호4)
Lf-G7	RKVRGPP(서열번호2)	GGG	RLLRPLLQLLKQKLR(서열번호4)
BPI-G7	NIKISGKWKAKRFLK(서열번호3)	GGG	RLLRPLLQLLKQKLR(서열번호4)

[0058]

[0059] 표 1에 나타낸 3종의 항균 펩타이드들은 자동화합성기(PeptrEx-R48, 펩트론사, 대전, 대한민국)를 이용하여 Fmoc 고체상 방법으로 합성하였으며, 합성된 3종의 펩타이드는 C18 분석 RP 칼럼(Shiseido capcell pak)을 사용한 역상 HPLC(Prominence LC-20AB, Shimadzu사, 일본)로 정제하고, 질량분석기(HP 1100 Series LC/MSD, Hewlett-Packard사, Roseville, 미국)를 이용하여 동정 및 확인하였다.

[0061] 실험예 1 : 항균 펩타이드의 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

[0062] 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드의 그람양성균과 그람음성균에 대한 항균력을 확인하기 위해 브로스 극소 희석 분석법(Broth microdilution assay)을 이용하였다. 보다 구체적으로, 각 세균을 5ml의 TSB(tryptic soy broth) 배지에 넣고, 37℃에서 하룻밤 동안 배양한 후 다시 새로운 배지로 옮겨 2~3 시간 배양하여 대수 증식기에 있도록 하였으며, 대수 증식기의 세균을 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 1×10^6 CFU/ml 농도가 되도록 희석하였다. 폴리프로필렌 96-웰 플레이트의 각 웰에 세균 희석액(50 μ l)과 2배수로 연속 희석된 펩타이드(50 μ l)를 섞어준 다음, 37℃에서 3시간 배양하고 여기에 다시 새로운 배지 100 μ l를 넣은 뒤 37℃에서 18~20 시간 배양하였다. 그 후 Bio-Rad사의 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 각 웰의 흡광도(absorbance)를 595nm에서 측정하여 미생물의 성장을 완전히 억제하는 가장 낮은 펩타이드 농도를 최소저해농도(MIC)로 결정하였다. MIC 값들은 한번에 3개씩, 3번의 독립적인 실험을 통해 얻은 수치의 평균값으로 결정하였다.

[0063] 상기 방법을 이용하여 측정한 항균 펩타이드의 최소저해농도를 측정하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0064] [표 2]

미생물	최소 저해 농도(MIC)(μ M)			
	GNU7	Syn-G7	Lf-G7	BPI-G7
그람-양성균				
<i>M. luteus</i>	1	0.5	0.5	0.5
<i>S. aureus</i>	4	1	2	1
그람-음성균				
<i>E. coli</i>	16	0.5	2	1
<i>S. typhimurium</i>	32	1	4	2

[0065]

[0066] 표 2에 나타난 바와 같이, 항균 활성 도메인으로만 구성된 펩타이드인 GNU7에 비해 LPS에 특이적으로 결합하는 표적 도메인(TD)을 가지고 있는 3종의 항균 펩타이드, Syn-G7, Lf-G7, BPI-G7의 그람음성균에 대한 항균력이 크게 증가한 것을 확인하였다.

[0068] **실험예 2 : 항균 펩타이드의 그람음성균에 대한 특이성 측정**

[0069] 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드의 그람음성균 특이성을 확인하기 위해 콜로니 카운팅 분석법(colony counting assay)을 이용하였다. 보다 구체적으로, 2종의 그람양성균(*S. aureus*, *M. luteus*)과 2종의 그람음성균(*E. coli*, *S. typhimurium*) 각각을 PBS에 2×10^6 CFU/ml 농도가 되도록 희석하였다. 상기 그람양성균 중 1종의 희석액(50 μ l)과 그람음성균 중 1종의 희석액(50 μ l)을 1:1 (v/v)으로 혼합한 다음, 1종의 그람양성균-1종의 그람음성균이 포함된 희석액에 GNU7, Syn-G7, Lf-G7, BPI-G7 각각의 펩타이드(각 펩타이드의 농도는 1종의 그람양성균, 1종의 그람음성균 각각에 대한 MIC 중 낮은 쪽의 절반 농도임) 100 μ l를 37°C에서 1, 2, 5분간 처리하였다. 반응이 끝난 후 일정 용액을 취하여 순차 희석한 후, 각각 MHA(Mueller-Hinton Agar)와 0.0001%의 크리스탈 바이올렛이 포함된 MHA에 분사하고, 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 살아남은 그람음성균의 수는 0.0001% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)이 포함된 MHA에서 자란 콜로니(colony) 수를 이용하여 구하였으며, 살아남은 그람양성균의 수는 MHA에서 자란 콜로니(colony)와 0.0001% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)이 포함된 MHA에서 자란 콜로니(colony)의 수의 차를 이용하여 구하였다. 상기 3종의 항균 펩타이드의 그람음성균 특이성은 그람양성균 콜로니(colony)수와 그람음성균의 콜로니(colony)수의 비율로 나타냈으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0070] 도 1에 나타난 바와 같이, 항균 활성 도메인으로만 구성된 펩타이드인 GNU7에 비해 LPS에 특이적으로 결합하는 표적 도메인(TD)을 가지고 있는 3종의 항균 펩타이드가 그람음성균에 대해 높은 항균활성을 나타내는 것을 확인하였고 특히 Syn-G7이 높은 그람음성균 특이성을 가지는 것을 확인하였다.

[0072] **실험예 3 : 항균 펩타이드의 항염증 활성 측정**

[0073] 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드의 항염증 활성을 확인하기 위해 쥐 대식세포(mouse macrophage cell)(RAW264.7)에서 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, MCP-1)의 mRNA 발현 정도를 정량적 실시간 PCR(Quantitative Real-Time PCR)을 이용하여 분석하였다. 보다 구체적으로, 2×10^5 cells/well 농도의 쥐 대식세포주를 12-웰 플레이트에서 10% FBS와 2mM l-glutamine을 포함한 RPMI-1640을 이용하여 5% CO₂ 존재 하에서 16시간 동안 배양하고, 이들 세포에 LPS (20ng/ml)와 상기 실시예 1에서 제조한 3종의 항균 펩타이드 1 μ M을 각각 처리한 후, 3시간 동안 추가 배양하였다. 이후 세포를 회수하여 세포로부터 RNeasy 키트(Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 추출하고 cDNA 합성 키트(Power cDNA synthesis kit, Intron)를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 대조군인 GAPDH 및 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, MCP-1의 mRNA의 발현을 CFX96™ 실시간 PCR 감지 시스템(Real-Time PCR Detection system)과 택 프로브(SSoFast™ EvaGreen Supermix, Bio-rad)를 이용하여 확인하였다. 상대적인 mRNA 발현량 [mRNA induction (%)]은 하기 수학적 식 1로 계산하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내

었다.

[0074] [수학식 1]

[0075] mRNA 발현량 (%) = (LPS와 항균 펩타이드 처리시 mRNA 발현량 / LPS 처리시 mRNA 발현량) × 100%

[0076] 도 2에 나타난 바와 같이, 항균 활성 도메인으로만 구성된 펩타이드인 GNU7는 염증성 사이토카인의 발현에 영향을 미치지 않는 반면, 본 발명의 항균 펩타이드의 경우 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키는 우수한 항염증 활성을 가지고 있음을 확인하였다. 특히 Syn-G7은 다른 항균 펩타이드에 비해 높은 항염증 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[0078] **실험예 4 : 항균 펩타이드의 LPS 결합 활성도(LPS binding activity) 측정**

[0079] 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드의 LPS 결합 활성도(LPS binding activity)를 확인하기 위해 생물학적 내독소 시험(Limulus amoebocyte lysate assay, LAL assay) (Lonza)을 수행하였다. 보다 구체적으로, 96-웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 5, 10 μM 농도의 항균 펩타이드를 25 μl씩 1U/ml 농도의 LPS 25 μl와 섞은 다음 37℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후 아메보사이트 라이세이트 반응액(amebocyte lysate reagent) 100 μl을 처리하고 10분 동안 반응시킨 다음, 색소 생산 물질(chromogenic substrate) 100 μl을 처리하여 6분간 추가 반응시켰다. 각 웰에 정지 용액(stop solution)으로 25%의 빙초산 100 μl을 처리한 다음, 415nm에서 흡광도를 측정하여 항균 펩타이드의 LPS 결합 활성도(LPS binding activity)를 확인하였다. LPS 결합 활성도(LPS binding)(%)는 하기 수학식 2로 계산하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0080] [수학식 2]

[0081] LPS 결합 활성도(LPS binding) (%) = [1- {(A_s - A₀) / (A_c - A₀)}] x 100%

[0082] A_s : 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드를 처리한 시료의 흡광도;

[0083] A_c : 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드를 처리하지 않은 대조군의 흡광도;

[0084] A₀ : 아메보사이트 라이세이트 반응액만의 백그라운드(background) 흡광도.

[0085] 도 3에 나타난 바와 같이, 항균 활성 도메인으로만 구성된 펩타이드인 GNU7은 10 μM의 농도에서 13%의 LPS 결합 활성도를 나타낸 반면, 본 발명의 항균 펩타이드인 Lf-G7 및 BPI-G7은 10 μM에서 각각 68%, 60%의 LPS 결합 활성도를 나타내었다. 특히, Syn-G7은 10 μM의 농도에서 대부분의 LPS와 결합하여 LPS를 중화시키는 것을 확인하였다.

[0087] **실험예 5 : 항균 펩타이드의 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT cell)에 대한 세포독성 측정**

[0088] 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드의 인간 세포에 대한 독성 여부를 측정하기 위하여, 인간 피부 각질화 세포주(HaCaT)에 3종의 항균 펩타이드를 처리한 후 MTT 분석법(MTT assay)을 수행하였다. 보다 구체적으로, HaCaT 세포주(8000 cells/well)를 96-웰 플레이트에서 10% FBS를 포함한 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)을 이용하여 5% CO₂ 존재 하에서 16시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포에 상기 실시예 1에서 제조한 3종의 항균 펩타이드(0.5 내지 8 μM)를 각각 처리하고 24시간 추가 배양한 다음, 세포의 생존 정도를 셀타이터 96-세포 증식 측정 키트(CellTiter 96-cell proliferation assay kit, Promega)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포생존율[Viability (%)]은 하기 수학식 3으로 계산하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0089] [수학식 3]

[0090] 세포생존율 (%) = {(A_s - A₀) / (A_c - A₀)} x 100%

[0091] A_s : 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드를 처리한 시료의 흡광도;

[0092] A_c : 상기 실시예 1에서 제조한 항균 펩타이드를 처리하지 않은 대조군의 흡광도;

- [0093] A₀ : 배지만의 백그라운드(background) 흡광도.
- [0094] 도 4에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 3종의 항균 펩타이드인 Syn-G7, Lf-G7, BPI-G7 모두 실험조건에서 인간 세포에 대한 독성이 낮음을 확인하였다.
- [0096] 이하 본 발명의 항균용 약학적 조성물, 식품 방부제, 화장품 첨가제 및 사료 첨가제의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0098] **제제예 1. 항균용 약학적 조성물의 제조**
- [0099] **1-1. 산제의 제조**
- [0100] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 20 mg
- [0101] 유당 100 mg
- [0102] 탈크 10 mg
- [0103] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0105] **1-2. 정제의 제조**
- [0106] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 10 mg
- [0107] 옥수수전분 100 mg
- [0108] 유당 100 mg
- [0109] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0110] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0112] **1-3. 캡슐제의 제조**
- [0113] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 10 mg
- [0114] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0115] 락토오스 14.8 mg
- [0116] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0117] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0119] **1-4. 주사제의 제조**
- [0120] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 10 mg
- [0121] 만니톨 180 mg
- [0122] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0123] Na₂HPO₄·2H₂O 26 mg

[0124] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0126] **1-5. 액제의 제조**

[0127] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 20 mg

[0128] 이성화당 10 g

[0129] 만니톨 5 g

[0130] 정제수 적량

[0131] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100.ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0133] **제제예 2. 항균용 식품 방부제의 제조**

[0134] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 0.5%

[0135] 테히드로초산 0.1%

[0136] 소르빈산칼륨 0.1%

[0137] 소르빈산칼슘 0.2%

[0138] 안식향산나트륨 0.5%

[0139] 안식향산칼륨 0.1%

[0140] 안식향산칼슘 0.5%

[0141] 파라옥시안식향산메틸 0.1%

[0142] 파라옥시안식향산프로필 0.1%

[0143] 프로피온산 나트륨 0.1%

[0144] 프로피온산칼슘 0.1%

[0145] 통상의 방부제 제조방법에 따라 각각 포함시켜 제조한다.

[0147] **제제예 3. 항균용 화장품 첨가제의 제조**

[0148] **2-1. 유연화장수(스킨로션)의 제조**

[0149] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 0.5%

[0150] 베타-1,3-글루칸 1.0%

[0151] 부틸렌글리콜 2.0%

[0152] 프로필렌글리콜 2.0%

[0153] 카르복시비닐폴리머 0.1%

[0154] 피이지-12 노닐페닐에테르 0.2%

[0155] 폴리솔베이트 80 0.4%

- [0156] 에탄올 10.0%
- [0157] 트리에탄올아민 0.1%
- [0158] 방부제, 색소, 향료 적량
- [0159] 정제수 to 100%

[0161] **2-2. 영양화장수(밀크로션)의 제조**

- [0162] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 0.5 %
- [0163] 베타-1,3-글루칸 1.0 %
- [0164] 밀납 4.0 %
- [0165] 폴리솔베이트 60 1.5 %
- [0166] 솔비탄세스퀴올레이트 1.5 %
- [0167] 유동파라핀 0.5 %
- [0168] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
- [0169] 글리세린 3.0 %
- [0170] 부틸렌글리콜 3.0 %
- [0171] 프로필렌글리콜 3.0 %
- [0172] 카르복시비닐 폴리머 0.1 %
- [0173] 트리에탄올아민 0.2 %
- [0174] 방부제, 색소, 향료 적량
- [0175] 정제수 to 100 %

[0177] **2-3. 영양크림의 제조**

- [0178] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 1.0 %
- [0179] 베타-1,3-글루칸 5.0 %
- [0180] 밀납 10.0 %
- [0181] 폴리솔베이트 60 1.5 %
- [0182] 피이지 60 경화피마자유 2.0 %
- [0183] 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 %
- [0184] 유동파라핀 10.0 %
- [0185] 스쿠알란 5.0 %
- [0186] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 %
- [0187] 글리세린 5.0 %
- [0188] 부틸렌글리콜 3.0 %
- [0189] 프로필렌글리콜 3.0 %

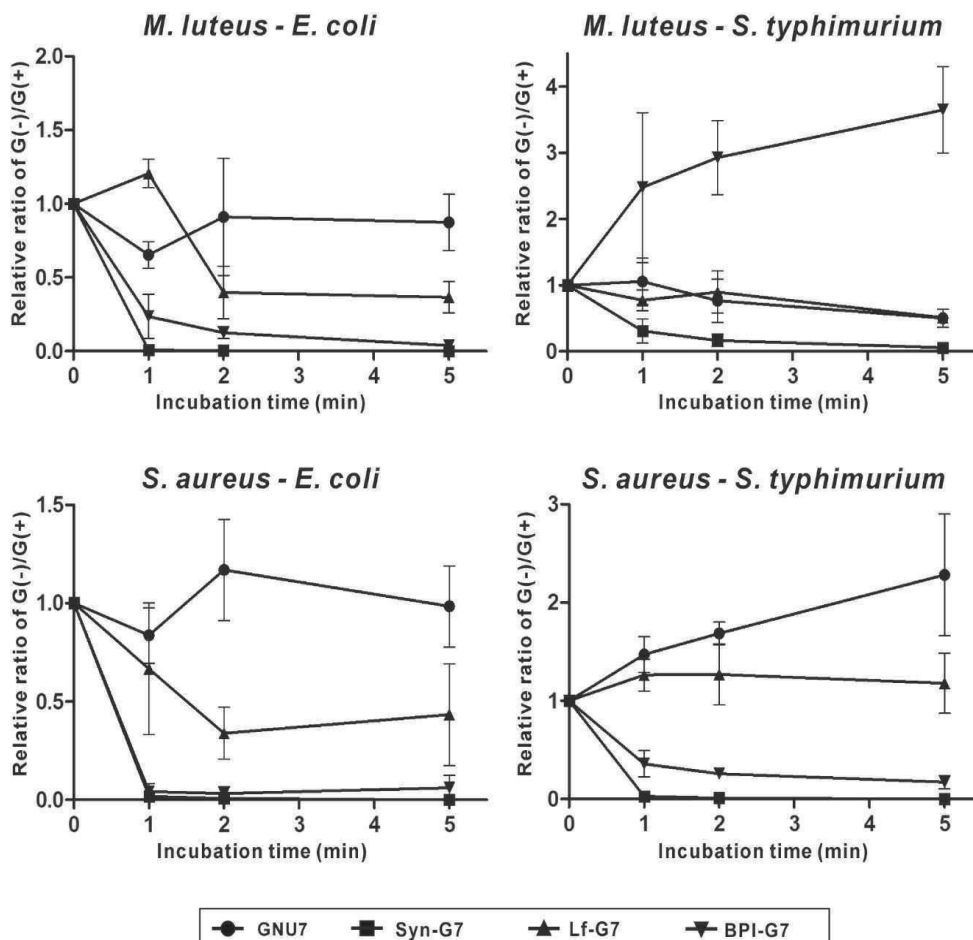
- [0190] 트리에탄올아민 0.2 %
- [0191] 방부제, 색소, 향료 적량
- [0192] 정제수 to 100%

[0194] **제제예 4. 사료 첨가제의 제조**

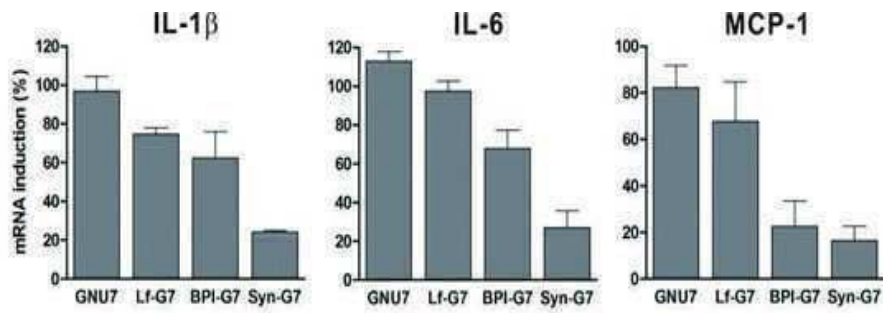
- [0195] 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 표적 도메인으로 하고, 상기 표적 도메인에 항균 활성 도메인을 링커로 연결한 항균 펩타이드 2.0%
- [0196] 글루코스 2.0 %
- [0197] 펩톤 1.0 %
- [0198] 효모추출물 1.0 %
- [0199] 제이인산 0.2 %
- [0200] 황산마그네슘 0.05 %
- [0201] 시스테인 0.05 %
- [0202] 정제수 to 100 %
- [0203] 부형제 탈지강 적량

도면

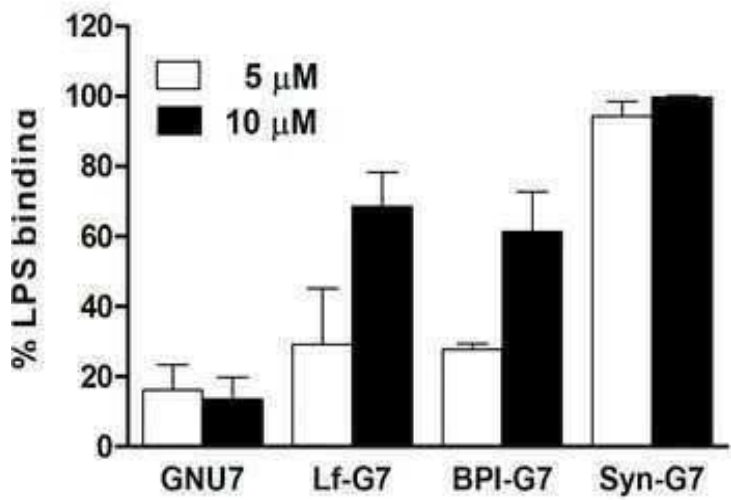
도면1



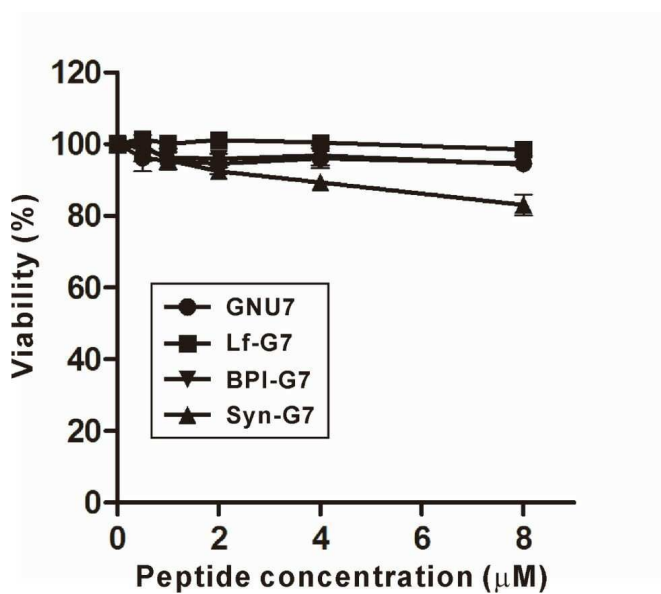
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Antimicrobial peptide with improved specificity to gram-negative pathogen and antimicrobial composition comprising the same

<130> GNU_1.237P-1

<150> KR 10-2015-0060700

<151> 2015-04-29

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Syn-G7

<400> 1

Gly Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Ile Arg Gly Arg Trp Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lf-G7

<400> 2

Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BPI-G7

<400> 3

Asn Ile Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe Leu Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Killing Domain

<400>

4

Arg Leu Leu Arg Pro Leu Leu Gln Leu Leu Lys Gln Lys Leu Arg

1

5

10

15