



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0058926
(43) 공개일자 2018년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A61K 31/397 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A61K 31/397 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0157873

(22) 출원일자 2016년11월25일

심사청구일자 2016년11월25일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

유진철

광주광역시 서구 송풍로 30 에스케이뷰아파트
102-502

최윤석

광주광역시 남구 노대실로 89 송화마을휴먼시아7
단지아파트 709-603

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김충호, 박희영

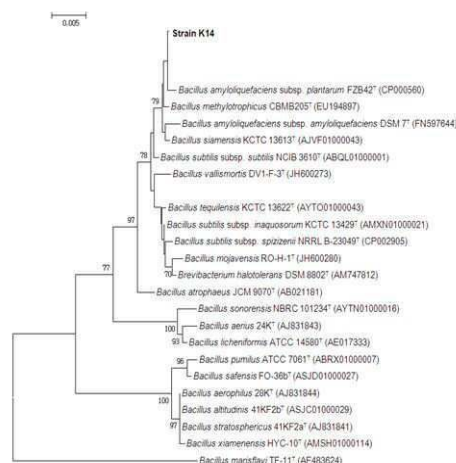
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14로부터 분리된 신규 항균 펩타이드 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 김치로부터 분리한 신규한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14 균주, 이 균주로부터 분리된 항균 펩타이드 및 상기 균주로부터 신규 항균 펩타이드를 정제하는 방법, 및 상기 신규 항균 펩타이드의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스로부터 분리 정제된 항균 펩타이드(CSpK14)는 MDR 병원균에 대한 적절한 항균 효능 뿐만 아니라, CSpK14는 β -락탐과 조합하였을 때 그의 활성을 현저히 증대시키므로 다약제 내성균을 제어하기 위한 조합 치료법에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/10 (2013.01)
C07K 1/16 (2013.01)
C07K 1/30 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

조승식

광주광역시 남구 회재로1186번길 52 현대1차아파트
 102동 1103호

(72) 발명자

최윤희

광주광역시 서구 상무공원로 114 해광한신아파트
 101-1103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711031645
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원
 연구과제명 다제내성균 제어능을 지닌 고분자 펩타이드 항생제 개발
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545011293
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농생명산업기술개발
 연구과제명 국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교 산학협력단
 연구기간 2015.12.18 ~ 2016.12.17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345240995
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원
 연구과제명 신규 미생물 효소를 이용한 펙틴 올리고머 연구
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

16S rRNA 서열 및 생화학적 특성으로 부터, 모 종은 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42(T) (CP000560)의 GenBank 참고 균주와 99.79% 상동성을 나타내며,

수탁번호 KCTC18514P로 2016.11.22자로 한국생명공학연구원에 기탁되고,

반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus* (VRSA) 및 *Enterococci* (VRE)에 대한 항균 활성 및 그의 β -락탐과의 시너지를 나타내는 항균 펩타이드를 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14(*Bacillus amyloliquefaciens* K14) 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 Tricine SDS-PAGE에 의해 ~4.6 kDa 의 분자량을 가지고, pH 6.0-11.5 및 80 °C 이하의 온도에서 안정하며, N-말단 아미노산 서열은 H-Y-D-P-G-D-S-G-N-T-G(서열번호: 1)인 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14 균주.

청구항 3

- 김치로부터 분리한 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* K14(수탁번호: KCTC18514P)를 1% 말토오스, 1% 펩톤, 및 0.01% NaCl을 함유한 배지에 16 시간 동안 증배양 시키는 단계;
- 상기 단계에서 얻어진 배양물을 대량 배양물로 옮긴 후 30 시간 동안 배양시키는 단계;
- 상기 단계에서 얻어진 배양물을 4 °C에서 30 분 동안 원심분리(10000 x g)하는 단계,
- 원심분리에 의해 수확된 브로쓰를 30~80% 암모늄 설페이트 침전시키는 단계;
- 상기 단계에서 얻어진 침전물을 10mM Tris/HCl (pH 7.5)에 대하여 투석시킨 후, 한외여과막으로 탈염을 수행하는 단계;
- 10mM Tris/HCl (pH 7.5) 완충액을 사용한 Sepharose CL-6B 컬럼으로 펩타이드를 정제하는 단계; 및
- 생물학적으로 활성인 분획들을 모으고, 농축한 후 동일한 완충액 시스템을 이용하여 Sephadex G-25 컬럼으로 더 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드(CSpK14)의 정제 방법.

청구항 4

제 4항에 따른 방법에 의해 얻어진 항균 펩타이드를 유효 성분으로 포함하거나 또는 β -락탐과 조합한 것을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 다약제 내성균을 제어하기 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 김치로부터 분리한 신규한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14 균주, 이 균주로부터 분리된 항균 펩타이드 및 상기 균주로부터 신규 항균 펩타이드를 정제하는 방법, 및 상기 신규 항균 펩타이드의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

항균 펩타이드류(AMPs)는 통상적인 항생제 요법에 대한 촉망되는 대안이다. 항균 펩타이드류에 대한 내성은 인간에 의해 생성된 것들과 유사하게 복제함으로써 세균이 항생제 자체 보다는 인간 자신의 면역계에 더욱 더 내성이 되게 한다. 많은 연구자들이 현재 다약제 내성을 극복하기 위하여 노력하고 있다. AMPs는 화학적 식품 보존제 및 흔히 사용되는 항생제에 대한 항균성 대안이다. 예를 들면, 유산균은 주된 일상 및 발효 식품에서 발생

하는 것으로서 이들이 인간의 장에 천연적으로 존재하기 때문에 최근 더욱 주목받고 있다. 이러한 이유로, 유산균 및 이들의 대사물은 항균제로서 양호한 대체 소스일 수 있다(Stanton et al. 2001; Reddy et al. 2004). 세균은 특이적인 단백질 및 대사물을 생산하고 이 생산은 정상적인 조건 보다는 적대적인 조건하에서 더 높다(Durairaj et al. 2010). 일부 요인들은 항균성 펩타이드의 선택과 유사하고 이들의 중요성은 양이온 특성이다. 포유류의 세포 표면은 세균의 막 보다 덜 음으로 하전되어 있기 때문에 항균 펩타이드류는 포유류 세포막 및 세균의 막에 대하여 다른 친화도를 갖는다. 막의 온전성이 붕괴된 경우 세균 막은 자발적으로 과당류화하여 세포의 내용물의 유출을 일으키는 횡단 포어의 형성을 초래한다(Hancock and Sahl 2006; Brogden 2005).

[0003] 횡단 포어의 형성은 단순한 항균성 펩타이드의 작용 모드가 아닌데; 나머지는 DNA 및 단백질 합성, 단백질 폴딩, 세포벽 합성 및 대사적 턴오버 등의 표적 키 세포의 과정들을 포함한다(Brogden 2005). 지금까지, 5,000 이상의 AMPs가 발견되거나 합성되었다(Zhao et al. 2013).

[0004] AMPs에 대한 최대의 위협은 트립신 및 키모트립신 등의 내재성 인간 프로테아제로 부터 나온다. 트립신은 Lys 및 Arg (염기성 잔기)에서 펩타이드를 공격하는 한편, 키모트립신은 소수성 잔기(Trp 및 Phe)에서 공격한다. AMPs는 병원균 유래의 프로테아제에 민감한 것으로 보고되었다. 예를 들면, LL-37는 *Staphylococcus aureus* aureolysin에 의해 파괴되는데, 이는 써모라이신 패밀리에 속하는 금속성 단백질이다(Sieprawska-Lupa et al. 2004; Koprivnjak and Peschel 2011). AMPs는 치료학적 이용성을 갖긴 하나, 이들은 독성을 지니며 낮은 안정성 및 높은 제조비용을 갖는다(Mookherjee and Hancock 2007). 연구자들은 따라서 낮은 독성과 고도로 개선된 안정성을 갖는 신규한 AMPs를 개발하는데 목적을 두고 있다. 어느 정도까지는 독성은 적절한 서열 수식에 의해서 감소될 수 있다(Podorieszach and Huttunen-Hennelly 2010; Hawrani et al. 2008; Ciornei et al. 2005).

[0005] 2004년에 세계보건기구는 항생제 방어의 최후 라인에 대한 내성에 관한 우려를 보고하였다. 이 보고는 vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 및 vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)를 제어하기 위한 신뢰적인 방법에 대한 연구를 초래하였다(WHO 2004).

[0006] 글리코펩타이드 항생제인 반코마이신은 MRSA 및 VISA 균주에 대한 약제로서 사용되어 오고 있다. VRSA 균주는 트랜스포존 Tn1546 (VRE로 부터 얻은)를 운반하는데, 이는 세포벽 구조 및대사를 변경시키는 것으로 알려져 있다(Gardete and Tomasz 2014). 세균은 다음의 세 가지 이유로 항생제 내성을 발달시킨다: (i)활성부위의 수식, (ii) 항생제의 직접적 파괴 또는 수식 및 (iii) 세포로부터 항생제의 배출(Sheldon Jr 2005). 항생제 내성을 극복하기 위한 최상의 접근법은 조합 요법의 사용이다. 항생제와 보조-약물로서 β -락타마아제 억제제의 사용은 알려져 있다(Lee et al. 2003). 항균 펩타이드 합성 및 이들의 높고 넓은-스펙트럼 활성에 있어서 최근의 진전은 개선된 특성을 갖는 신규 펩타이드류의 성공적인 단리 및 특성화를 초래하였다.

[0007] 펩타이드 개발에 관한 첫 번째 보고 이후, 다양한 진전들이 바이오테크놀로지 및 제약 산업의 분야에서 그의 응용을 포함하여 이루어졌다(Marcos et al. 2008). 억제제로서 그의 역할에 더하여, 펩타이드들은 저농도에서 시그널링 분자로서 작용하는 것으로 예견되었다. 섭-MIC에서 상이한 작용 모드 및 상이한 형상을 갖는 항균제 또는 항생제는 유전자 전사 과정에 강력하게 영향을 미치는 것이 명확하다(Davies et al. 2006).

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L (2011) Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 1102-1111

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 안전한 전통식품인 김치에서 신규한 용도의 미생물을 개발하기 위해 예의 연구한 바, 한국의 전통 김치로 부터 바실러스 아밀로리퀴페시언스(*Bacillus amyloliquefaciens*) CS14균주를 분리하는데 성공하였고, 상기 균주로 부터 펩타이드를 분리하여 항균성을 시험해 본 결과, 분리 정제된 항균 펩타이드는 MDR 병원균에

대한 적절한 항균 효용성 뿐만 아니라, CSpK14는 β -락탐과 조합하였을 때 그의 활성을 현저히 증대시키므로 다약제 내성균을 제어하기 위한 조합 치료법에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은
- [0011] 16S rRNA 서열 및 생화학적 특성으로 부터, 모 종은 *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB42(T) (CP000560)의 GenBank 참고 균주와 99.79% 상동성을 나타내며,
- [0012] 수탁번호 KCTC18514P로 2016.11.22일에 한국생명공학연구원에 기탁되고,
- [0013] 반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus* (VRSA) 및 *Enterococci* (VRE)에 대한 항균 활성 및 그의 β -락탐과의 시너지를 나타내는 항균 펩타이드를 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14(*Bacillus amyloliquefaciens* K14) 균주와 상기 균주에 의해 생산된 항균 펩타이드 및 그의 용도를 제공하데 있다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴페시엔스로부터 분리 정제된 항균 펩타이드는 MDR 병원균에 대한 적절한 항균 효용성 뿐만 아니라, CSpK14는 β -락탐과 조합하였을 때 그의 활성을 현저히 증대시키므로 다약제 내성균을 제어하기 위한 조합 치료법에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 균주 K14 및 일부 밀접하게 관련된 *Bacillus* 속과의 관계를 나타내는 거의 완전한 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 계통수이다.
- 도 2는 Sephadex G-25 컬럼(1.2 x 37 cm)으로 부터의 CSpK14의 겔 투과 용출 프로필을 나타내는 그래프도이다.
- 도 3은 *Bacillus* sps. K14 유래의 CSpK14의 트리신 SDS-PAGE (a 및 b) 및 바이오에세이 (c) 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 4는 상승 효과를 나타내는 타임 킬링 에세이를 나타내는 그래프도이다.
- 도 5는 약물 처리하지 않은 세균(상부), (CSpK14+ OXA)로 처리한 세균(중간) 및 (CSpK14 + AMP)로 처리한 세균의 바이오필름 형성을 나타내는 그래프도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은, 일면에 있어서,
- [0017] 16S rRNA 서열 및 생화학적 특성으로 부터, 모 종은 *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB42(T) (CP000560)의 GenBank 참고 균주와 99.79% 상동성을 나타내며,
- [0018] 수탁번호 KCTC18514P로 2016.11.22일에 한국생명공학연구원에 기탁되고,
- [0019] 반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus* (VRSA) 및 *Enterococci* (VRE)에 대한 항균 활성 및 그의 β -락탐과의 시너지를 나타내는 항균 펩타이드를 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14(*Bacillus amyloliquefaciens* K14) 균주와 상기 균주에 의해 생산된 항균 펩타이드 및 그의 용도를 제공한다.
- [0020] 본 발명에 있어서는 정제하기에 간단하고, 시험 조건하에서 높은 안정도를 갖고, 그의 상승적 항균 효과가 CSpK14가 항생제 내성을 극복하기 위한 주된 접근법으로 알려진 조합 요법의 보강을 위해 유리할 수 있음을 보여주는 항균 및 항-바이오필름 자산으로서 효율적인 항균성 펩타이드의 정확한 발견에 대하여 보고하고 기술한다.
- [0021] 본 발명자들은 항균 펩타이드(CSpK14)의 반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus* (VRSA) 및 *Enterococci* (VRE)에 대한 항균 활성 및 그의 β -락탐과의 시너지를 평가하여 수행하였다.
- [0022] 16S rRNA 서열 및 생화학적 특성으로 부터, 모 종은 *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB42(T)

(CP000560)의 GenBank 참고 균주와 99.79% 상동성인 것으로 나타났다. CSpK14는 sepharose Cl-6B 및 sephadex G-25 크로마토그래피를 사용하여 2 단계로 정제되었고, Tricine SDS-PAGE 및 in-situ 검사를 경유하여 ~4.6 kDa 의 분자량을 가졌다. 이는 pH 6.0-11.5 및 80 °C 이하의 온도에서 안정하였다. 또한, 다양한 금속 이온, 용매 및 프로테아제에 대해 안정하였다. N-말단 아미노산 서열은 H-Y-D-P-G-D-D-S-G-N-T-G이었고, 보고된 펩타이드류와의 어떠한 상동성도 나타내지 않았다. 그러나, 이는 상이한 미생물 유래의 알파-2-마크로글로불린 및 리간드-게이트드 채널 단백질과 어느 정도의 동일성을 보였다.

[0023] CSpK14는 β -락탐의 MICs를 상당히 감소시켰고, VRSA 및 VRE에 대하여, 비- β -락탐에 영향을 미치지 않았다. CSpK14/옥사실린 및 CSpK14/암피실린의 MICs는 각각 8-배 내지 64-배 및 2-배 내지 16-배 감소시켰다. 타임 킬링 에세이는 CSpK14/옥사실린($2.29-2.37 \Delta \log_{10} \text{CFU/ml at } 24 \text{ h}$) 및 CSpK14/암피실린($2.30-2.38 \Delta \log_{10} \text{CFU/ml at } 24 \text{ h}$) 사이의 시너지를 나타내었다.

[0024] 또한, VRSA 및 VRE에 의해 형성된 바이오필름은 완전히 감소되었다. CSpK14는 단리하기 용이하고, 낮은 분자량을 가졌으며, 넓은 pH 범위 및 시험된 케미컬에 대해 안정하였으며, 넓은 억제 스펙트럼을 가졌고, 유일한 N-말단 서열을 가졌으며, 강력한 상승적 항균-항바이오필름 특성을 소유하였다. CSpK14는 β -락탐의 효능을 상승적으로 증대시켰으므로 조합 요법에 적합하다.

[0025] 본 발명에 따른 신규 펩타이드는 MDR 병원균에 대한 적절한 항균 효능 뿐만 아니라, CSpK14는 β -락탐과 조합하였을 때 그의 활성을 현저히 증대시키므로 다약제 내성균을 제어하기 위한 조합 치료법에 유용하게 사용될 수 있고, 당업자는 그러한 질병, 상태 및 이상으로부터 고통을 받는 것으로 추정되는 개인들을 용이하게 파악할 수 있다.

[0026] 본 발명의 제약 조성물은 공지의 의약품 담체와 조합하여 제제화할 수 있다. 일반적으로는, 유효 성분을 약학적으로 허용할 수 있는 액상 또는 고체상의 담체와 배합하고, 또한 필요에 따라 용제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제 등을 가하고, 정제, 과립제, 산제, 분말제, 캡슐제 등의 고형제, 통상 액제, 현탁제, 유제 등의 액제로 할 수 있다. 또한 이것을 사용 전에 적당한 담체의 첨가에 의해 액상으로 만들 수 있는 건조품으로 할 수도 있다.

[0027] 본 발명의 제약 조성물은 경구제나, 주사제, 점적용제 등의 비경구제 중의 어떠한 것에 의해서도 투여할 수 있다.

[0028] 의약품 담체는, 상기 투여형태 및 제형에 따라서 선택할 수 있고, 경구제의 경우는, 예를 들어 전분, 유당, 백당, 만니톨, 카복시메틸셀룰로스, 콘 스타치, 무기염 등이 이용된다. 또한 경구제의 조제에 있어서는 추가로 결합제, 붕괴제, 계면활성제, 윤택제, 유동성 촉진제, 교미제, 착색제, 향료 등을 배합할 수도 있다.

[0029] 한편, 비경구제의 경우는 통상의 방법에 따라서 본 발명의 유효성분인 단백분해효소를 포함하는 조성물을 희석제로서의 주사용 증류수, 생리식염수, 포도당 수용액, 주사용 식물유, 참기름, 낙화생유, 대두유, 옥수수유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등에 용해 내지 현탁시켜서 필요에 따라 살균제, 안정제, 등장화제, 무통화제 등을 가함으로써 조제된다.

[0030] 본 발명의 의약품 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여경로로 투여된다. 투여방법은 특히 한정할 필요는 없고, 내용, 외용 및 주사에 의해 투여할 수 있다. 주사제는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 피내 등에 투여할 수 있다.

[0031] 본 발명의 의약품 조성물의 투여량은, 그 제제형태, 투여방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일 당 예컨대 $10 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg/kg}$ 이다. 그러나, 당업자는 특정 시약의 약물동력학적인 특성 및 그의 투여 모드 및 경로; 수여자의 나이, 건강, 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 목적하는 효과 등의 공지의 요인에 따라서 투여량이 변화함은 이해할 것이다.

[0032] 본 발명의 조성물은 주요 성분의 함량이 특히 제한되지는 않으나, 예를 들면 조성물의 중량을 기준으로 0.1 내지 99.9%로 사용할 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] Sepharose CL-6B 및 Sephadex G-25은 Pharmacia(Uppsala, Sweden)로 부터 입수하였다. 모든 시약은 분석 등급

의 것들을 사용하였다.

[0035] **실시예 1: 균주 단리 및 배양 배지**

[0036] 다양한 지역에서 수집한 한국 전통 음식(김치) 시료에 대해서 세균 균주 단리를 수행하였다. 간단히, 김치 1gm 을 0.85% NaCl과 혼합한 후 37 °C에서 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. Muller-Hilton 브로쓰에서 단계별 희석을 10^{-7} 까지 수행하였다. 각각의 희석 배수로 부터 스트리킹을 수행하여 적절한 콜로니 형성 단위(CFU/ml)를 찾아내었다. 그 희석 배수를 스톡으로 고려하여 20% 글리세롤 중에 유지시키고, -70 °C에 보관하였다. Bergey's manual of systematic bacteriology 및 16S rRNA 유전자 서열 분석법에 따라 생화학적 특성을 토대로 동정을 실시하였다. 적당한 성장 배지의 선택은 상당량의 개별 박테리오신의 생산에 있어서 필수적인 역할을 한다. 박테리오신 생산을 증대시키기 위하여 다양한 배지가 다양한 저자에 의해 분석되었다. 표준 배양 배지 및 강화 배지는 펩타이드를 준비하는데 항상 효율적이지는 않다(Tagge et al. 1976; Tomas et al. 2002). 유산 세균 같은 까다로운 생물체는 MRS 등의 복합 합성 배지를 요한다(de Man et al. 1960). 대조군으로서 동일한 MRS(Difco, USA)을 사용함으로써 배양 배지의 최적화를 상이한 탄소원(만니톨, 전분, 과당, 소르비톨, 수크로오스, 글루코오스, 말토오스, 락토오스), 질소원(효모 엑스, 소고기 엑스, 맥아, 트립톤, 펩톤, 오토밀, 소이밀), 및 금속 이온(Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , FeSO_4 , NaCl , CaCl_2)으로 상이한 비율로 수행하였다. 발효는 20% 배지를 함유하는 250-ml Erlenmeyer 플라스크 중에서 35 °C에서 180 rpm으로 지속적인 진탕하여 수행하였다.

[0037] 콜로니 형태학, 생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자 서열에 기초하여, 모 균주는 *Bacillus* sps. 종으로 동정되었다. 이어서 본 발명자들은 16S rRNA 유전자를 사용하여 단리물의 유사성을 확인하였으며, 입수번호 CP000560의 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42(T)의 GenBank 참고 균주와 99.79% 상동성(3/1453의 차이). 16S rRNA 서열로 부터 제작된 계통수는 도 1에 나타났다. 도 1은 균주 K14 및 일부 밀접하게 관련된 *Bacillus* 속과의 관계를 나타내는 거의 완전한 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 계통수이다.

[0038] 항생 화합물의 유의한 생성은 후 지수기(Tagge et al. 1976) 동안에 일어났는데, 포자형성의 개시를 닮았다. 생산에 가장 유효한 성분은 1% 말토오스, 1% 펩톤, 및 0.01% NaCl이었는데, 배양 후 18 시간부터 유의한 생성이 개시되었고 30 시간에 피크에 달하였다. 배양 조건은 박테리오신 수율에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Tagge et al. 1976). 균주 K14에 의해 생산된 억제성 화합물의 정성 분석 결과는 CSpK14로 언급된 항생 화합물의 지속적인 생산과 분비를 나타낸 것으로 밝혀졌다. CSpK14는 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928의 성장에 영향을 미쳤다.

[0039] 상기 균주는 한국 생명공학연구원에 2016. 11. 22자로 기탁되어 기탁번호 KCTC 18514P를 부여받았다.

[0040] **실시예 2: 펩타이드 생산 및 정제**

[0041] 16 시간 후 종 배양물을 대량 배양물로 옮겼다. 30 시간에 원심분리(Hanil Science Industrial, Supra 22K, Korea) (10000 x g)를 4 °C에서 30 분 동안 수행하여 배양물을 수확하였다. 수확된 브로쓰를 30-80% 암모늄 설페이트 침전(Bollang and Edelstein 1991)시킨 다음 4 °C에서 50분 동안 원심분리(10000 x g)시켜 펩타이드를 회수하였다. 얻어진 침전물을 10mM Tris/HCl (pH 7.5)에 대하여 투석시켰다. 추가로 환외여과막(30, 10, 및 1 kDa, Millipore Corp)으로 탈염을 수행하였다. 10mM Tris/HCl (pH 7.5) 완충액을 사용한 Sepharose CL-6B 컬럼(2.5 x 5 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 펩타이드를 정제하였다. 생물학적으로 활성인 분획들을 모으고, 농축한 후 동일한 완충액 시스템을 이용하여 Sephadex G-25 컬럼(1.2 x 37 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 더 정제하고, 순도를 측정된 후 후속 실시예에서 사용하였다.

[0042] **실시예 3: CSpK14의 분자량 결정 및 in-situ 분석**

[0043] Bradford 법(Bradford 1976)을 이용하고, 소 혈청 알부민(BSA)을 표준으로 사용하여 CSpK14 농도를 측정하였다. 분자량 결정은 Tricine SDS-PAGE를 이용하여 수행하였다(Schagger 2006).

[0044] In situ 분석은 2.5% Triton X-100 내지 0.6% 아가를 함유하는 50mM Tris/HCl 완충액(pH 7.5)으로 수차례 세척한 후 Tricine SDS-PAGE 로 부터 프로세싱된 겔을 Muller Hinton media (DIFCO, USA) 배지 상에 겹치게 하고, 37 °C에서 인큐베이션시킴으로써 지시 생물(1.5×10^8 cfu/ml)에 대하여 수행하였다. 그 결과를 도 2 및 3에 나타낸다. 도 2는 Sephadex G-25 컬럼(1.2 x 37 cm)으로 부터의 CSpK14의 겔 투과 용출 프로필을 나타내는 그라프도이다. 도 3은 *Bacillus* sps. K14 유래의 CSpK14의 트리신 SDS-PAGE (a 및 b) 및 바이오에세이 (c) 결과를

나타내는 사진이다.

[0045] CSpK14는 완전히 최적화된 배지 중에서 대량 배양물 1500ml로 부터 생산되었다. 정제는 2 단계의 크로마토그래피 분리에서 이루어졌는데, 활성분획들을 항생 활성 및 단백질 농도(595nm)를 기초로 모았다(도 2 참조).

[0046] 결과의 항균 화합물은 Tricine SDS-PAGE 상에 단일 밴드를 나타냄으로써 순수한 것으로 확인되었고 ~4.6 kDa의 분자량을 가졌다(도 3a 및 b 참조). 이는 in-situ 검사에 의해 항균 펩타이드로서 확인되었는데(도 3 c 참조), 맑은 억제 대역이 지시 생물체에 대하여 동일 영역에서 나타났다. 항균 펩타이드들은 비교적 작았고(<10 kDa), 미생물에 대하여 넓은 활성의 스펙트럼을 나타냈다(Reddy et al. 2004).

[0047] 실시예 3: CSpK14의 안정성

[0048] CSpK14의 열 안정성은 0, 4, 10, 20, 37, 50, 60, 70, 및 80 °C에서 60 분 동안 및 121 °C/105 kPa에서 15 분 동안 정제된 시료를 인큐베이션시켜서 조사하였고, 잔여 활성은 표준 방법으로 분석하였다. 마찬가지로, 안정성은 citric acid/sodium phosphate(pH: 4.0 ~ 6.5), Tris/HCL(pH: 7.0 ~ 9.5), CAPS (pH: 9.0 ~ 11.0), KCL/NaOH (pH: 11.0 ~12.5)을 사용하여 분석하였다. 다양한 용매, 금속 이온 및상이한 농도의 프로테아제의 안정성 역시 검사하고 표 1에 그 결과를 나타내었다.

표 1

Parameters	Concentration	Relative stability (%)*
Hydrogen Peroxide	10% (v/v)	100 ± 0.00
Sodium Perborate	100 mM	100 ± 0.00
Beta-mercaptoethanol	100 mM	67 ± 0.50
EDTA	100 mM	100 ± 0.00
EGTA	100 mM	100 ± 0.00
Triton X-100	100 mM	100 ± 0.00
Tween-20	50 mM	100 ± 0.00
Tween-80	50 mM	75 ± 0.50
Deoxycholic Acid	30 mM	100 ± 0.00
SDS	50 mM	76 ± 0.289
CHAPS	30 mM	110 ± 0.289
Calcium (as chloride)	100 mM	100 ± 0.00
Magnesium (as chloride)	100 mM	110 ± 0.289
Cobalt (as chloride)	100 mM	118 ± 0.289
Copper (CuSo4.5H2O)	100 mM	69 ± 0.577
Ni++ (Nickel chloride.6H2O)	100 mM	82 ± 0.289
Zinc (Zinc Sulphate .7H2O)	100 mM	69 ± 0.577
Manganese (MnCl2.4H2O)	100 mM	100 ± 0.00
Iron (FeCl2)	100 mM	28 ± 0.577
Barium (BaCl2)	100 mM	100 ± 0.00
Acetone	100 mM	100 ± 0.00
Chloroform	100 mM	100 ± 0.00
Dimethyl Sulfoxide	100 mM	110 ± 0.289
Methanol	100 mM	100 ± 0.00
Ethanol	100 mM	100 ± 0.00
2-propanol	100 mM	100 ± 0.00
1-Butanol	100 mM	100 ± 0.00
Toluene	100 mM	69 ± 0.577
DiEthyl Ether	100 mM	100 ± 0.00
Tri Chloroacetic Acid	100 mM	68 ± 0.289
Sodium Chloride	100 mM	100 ± 0.00
Potassium Chloride	100 mM	100 ± 0.00

[0049]

Reagents	Concentration	Relative Stability (%)*
Lipase	2mg/ml	100 ± 0.00
Lipase	1mg/ml	100 ± 0.00
Trypsin	2mg/ml	100 ± 0.00
Trypsin	1mg/ml	100 ± 0.00
Pronase	2mg/ml	100 ± 0.00
Pronase	1mg/ml	100 ± 0.00

[0050]

[0051]

박테리옌들은 열 및 pH 조건에 민감하다(Tomas et al. 2002). 열 및 pH에서 약간의 변화는 항균 펩타이드를 분해할 수 있다. CSpK14의 열 안정성을 결정하기 위하여, 잔여 활성을 상이한 농도에 노출시킨 후에 시험하였다. 50 °C와 같은 높은 온도까지 노출시킨 후에도 활성 손실이 전혀 없었다. 활성은 80°C에서 점차 감소되었고, 60 분 동안 인큐베이션시킨 후에 활성의 약 50% 정도가 유지되었다. 오토클레이브 조건에 노출시켰을 때 활성의 완전한 손실이 있었다. 저온에서 CSpK14의 보존은 활성을 변경시키지 않았다. CSpK14는 넓은 온도 관용성을 가지므로 실험들은 실온에서 수행될 수 있다. CSpK14의 pH 안정성을 검사하기 위하여, 시료를 상이한 pH 값에서 인큐베이션시켰다. 잔여 활성은 그의 보유된 생물학적 활성에 따라 확인하였다. CSpK14는 pH 6.0 ~ 11.5에 대하여 관용성이 있는 것으로 발견되었다. *Bacillus sp*(Baruzzi et al. 2011; Kayalvizhi and Gunasekaran 2010)에 의해 생산된 항균 화합물과 마찬가지로, CSpK14도 역시 넓은 범위의 pH 및 온도 안정성을 보였다. 다양한 pH 값에서 활성을 보유하는 능력은 단백질의 가역적 변성에 기인할 수도 있다. AMPs의 치료학적 적용은 그들의 낮은 안정성 및 독성에 기인하여 제한된다(Mookherjee and Hancock 2007). 산화제(H₂O₂, 소듐 퍼보레이트), 킬레이트제(EDTA, EGTA), 세제(Triton X-100, Tween 20, DCA, CHAPS), 금속 이온(Ca²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Co²⁺), 및 용매(아세톤, 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 1-부탄올, 디에틸에테르, 염화나트륨, 염화 칼륨, 디메틸 술폭시드)의 존재하에서 및 시험된 농도에서 측정된 펩타이드의 효능과 CSpK14의 특성들은 영향을 받지 않았다.

[0052]

대부분의 경우에 있어서, CSpK14에 대한 케미컬, 세제, 및 기타 용매의 영향은 *Bacillus sp* 균주 8A에 의해 생성된 박테리옌에 필적할만 하다(Bizani and Brandelli 2002). 효능은 Mg²⁺, Co²⁺, CHAPS, 또는 디메틸 술폭시드(용매)의 첨가시 증대되었다. 본 발명에 따른 펩타이드는 시험된 몇가지 케미컬에 대하여 어느 정도는 감수성인 것으로 밝혀졌는데 이는 그의 단백질 성질을 나타낸다. 시험된 금속 이온 및 용매들의 전체 리스트를 표 1a에 나타내었다. 펩타이드 및 펩타이드 제형의 안정성은 생체내에서는 자세히 연구되지 않았다. 프로테아제 억제제를 사용한 아미노산 조성의 수식은 이들로 하여금 프로테아제에 의해 인식될 수 있도록 한다(Reddy et al. 2004).

[0053]

본 발명에 있어서, CSpK14는 60 분 인큐베이션시까지는 다양한 농도의 트립신, 리파아제 및 프로노오스 등의 프로테아제 중에서 안정된 것으로 밝혀졌다(표 1b). 반응은 100 °C에서 2 ~ 3 분 동안 끓임으로써 정지시켰다. *Bacillus cereus*에 의한 세포의 프로테아제의 생산이 기술된 바가 있으며(Makinen and Makinen 1987), 단백질 분해 활성은 항균 펩타이드에 해로울 수도 있다. 대신에, 박테리옌 활성은 손실되지 않았는데 박테리옌은 *Bacillus cereus*의 세포의 프로테아제에 내성임을 의미한다. CSpK14는 트립신, 리파아제 및 프로노오스에 내성인 것으로 밝혀졌는데 이 펩타이드는 *Bacillus sp* (Martirani et al. 2002)에 의해 생산되는 박테리옌 유사 펩타이드 보다는 단백질분해 처리에 보다 내성임을 의미한다. Von Dohren에 따르면, *Bacillus*는 흔치 않는 아미노산을 함유하는 사이클릭 펩타이드인 항미생물제를 생산하므로 프로테아제에 대해 더 내성을 갖는다(Von Dohren 1995).

[0054]

본 발명자들의 결과는 이 사실과 일치하며, 프로테아제에 대한 내성이 *Bacillus sp* strain 8A (Bizani and Brandelli 2002) 또는 *Bacillus licheniformis* MKU3 (Kayalvizhi and Gunasekaran 2010)로 부터의 박테리옌에 유사함을 의미한다. 10 kDa 미만의 분자량, 단백질 안정성 결과, CSpK14 상의 효소 활성의 결핍은 이것이 억제성 물질임을 의미한다.

[0055]

실시예 4: N-말단 아미노산 서열

- [0056] CSpK14의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model 492 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여 Edman 분해법에 의해 결정하였다.
- [0057] CSpK14의 N-말단 아미노산 서열은 12 아미노산의 서열을 나타내었다: H-Y-D-P-G-D-D-S-G-N-T-G(서열번호 1). 얻어진 서열을 non-redundant NCBI database에 존재하는 서열과 비교하였다. 이 데이터에는 이 서열과 일치하는 것은 없었다. BLAST 서치 결과는 바실러스 유래의 다른 세포의 및 생활성인 화합물과 상동성을 나타내지 않았다. CSpK14의 N-말단 아미노산 서열은 *Burkholderia*의 다른 종들로부터 유래한 알파-2-마크로글로불린과 75% 상동성(9/12)을 나타내었다. 알파-2-마크로글로불린은 결합 숙주 또는 외래 펩타이드 및 입자들의 기능을 공유하고, 그 결과로서 척추동물의 혈장 및 조직에서 병원체에 대한 체액 방어 벽으로써 작용한다.
- [0058] Borth에 따르면, 생물학적으로 활성인 펩타이드의 알파-2-마크로글로불린 수용체를 발현하는 상이한 세포 타입으로의 표적화를 허용하는 메카니즘에서 알파-2-마크로글로불린은 알파-2-마크로글로불린 또는 표적화 및 세포 내 트래픽킹(trafficking)에 있어서 중요성을 갖는 단백질의 알려진 기능과 같은 그의 특화된 특성으로 결합 또는 전달 단백질로서 작용할 수 있다(Borth 1992). *Burkholderia terrae* BS001로부터의 알파-2-마크로글로불린 도메인-함유 단백질은 박테리오킨의 생합성을 위한 몇몇 유전자 또는 항생제 및 독성 화합물에 대한 내성을 수반하는 숙주 수식에 있어서 중요할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Nazir et al. 2012).
- [0059] CSpK14의 N-말단 아미노산 서열은 또한 *Pseudomonas*의 다른 종으로 부터의 리간드-게이티드 채널 단백질과 50%의 상동성을 보였다. 리간드-게이티드 채널은 화학적 메신저(리간드)의 결합을 도와서 단백질의 구조를 발견한다. 활동 전위의 전달에 대한 약간의 명목적 필요성을 갖는 세균, 그의 동족체는 화학 수용체로서 작용하는 것으로 간주된다(Tasneem et al. 2004).
- [0060] CSpK14의 N-말단 아미노산 서열과 관련된 단백질을 비교하여 표 2에 나타내었다. CSpK14의 모든 이러한 중요한 닮음성 및 생화학적 특성은 치료 용도에 유용할 수 있다. 이러한 독특한 특징은 CSpK14의 신규성을 의미한다.

표 2

Protein	Amino acid sequences	Identity (%)	Reference
CSpK14	HYDPGDDSGNTG	100	Current study
alpha-2-macroglobulin from <i>Burkholderia terrae</i> BS001	YFPPGDDSGNTG	75	[35]
ligand-gated channel protein from <i>Pseudomonas fluorescens</i>	VEHYDDSGNTF	50	NCBI Reference Sequence: WP_038850474.1

[0061]

실시예 5: 최소 억제 농도의 결정

- [0062]
- [0063] 아가 희석법(Wiegand et al. 2008)을 이용하여 CSpK14의 최소 억제 농도(MIC)를 결정하였다. MIC는 그람양성균 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 9341, 반코마이신 내성 *Enterococci* 4, 메치실린 내성 *Staphylococcus aureus* 5-3, 메치실린 내성 *Staphylococcus aureus* 4-5, 반코마이신 내성 *Staphylococcus aureus*, 반코마이신 내성 *Enterococci* 98, 반코마이신 내성 *Enterococci* 89, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Micrococcus luteus* ATCC 9341) 및 그람 음성균 (*Escherichia coli* KCTC 1923, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, 확장된 스펙트럼 베타락타마아제 V4 (*Escherichia coli*), *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004)에 대하여 수행하였다. 최소 억제 농도는 밤새 인큐베이션 시킨 후 미생물의 가시적 성장을 억제할 수 있는 항생미물제의 최소 농도이다. 바시트라신 및 반코마이신을 참고 항생제로 사용하였다. 시험 미생물(1.5×10^8 cfu/ml)을 다양한 농도의 항생제와 대조군(무항생제)와 함께 접종하고, 37 °C에서 인큐베이션 시켰다. 결과는 Wiegand et al의 방법에 따라

관찰하였다(Wiegand et al. 2008). 최소 살균 농도(MBC)는 브로쓰 희석법에 의해 결정하였다. 다수의 펩타이드들이 항미생물 및 항바이러스 활성 등의 바람직한 특성들을 갖는 것으로 나타났다(Reddy et al. 2004). CSpK14 연구의 항미생물 활성은 MIC의 측면에서 측정하였다. 다약제 내성의 출현은 제약 연구를 위해서는 장애가 된다(WHO 2004).

[0064] 본 연구에 있어서, 본 발명자들은 새로이 추출된 항균 펩타이드의 활성을 반코마이신 및 바시트라신의 것과 비교하고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

Microorganisms	MIC(ug/ml)		
	CSpK14	Bacitracin	Vancomycin
Gram +ve bacteria			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>128	64	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64	8	4
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 9341	>128	>128	2
Vancomycin Resistant <i>Enterococci</i> 4	8	64	>128
Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 5-3	16	4	2
Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 4-5	16	4	2
Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	64	>128	>128
Vancomycin Resistant <i>Enterococci</i> 98	64	>128	>128
Vancomycin Resistant <i>Enterococci</i> 89	64	64	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	32	>128	8
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	8	64	4
Gram -ve bacteria			
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	>128	>128	>128
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	>128	>128	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1637	>128	>128	>128
Extended-spectrum beta-lactamase V4 (<i>Escherichia coli</i>)	>128	>128	>128
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 1004	>128	>128	>128

MIC, Minimum inhibitory concentration; +ve, positive; -ve, negative.

[0065]

[0066] CSpK14는 다양한 다약제 내성 병원체에 대하여 길항 효과를 나타내었다. Tagg et al은 이전에 박테리옌 생선과 무관한 일부 안타고니즘(antagonism)을 보고하였다(Tagg et al. 1976). CSpK14는 반코마이신-내성 *Enterococci* 4, 반코마이신-내성 *Staphylococcus aureus*, 반코마이신-내성 *Enterococci* 98, 반코마이신-내성 *Enterococci* 89 등의 병원체에 대해 반코마이신 및 바시트라신 보다 강한 효능을 가졌다.

[0067] 반코마이신-내성 세균에 대한 CSpK14의 항균 활성은 8 ~ 64 $\mu\text{g/ml}$ (MICs) and 256 ~ 1024 $\mu\text{g/ml}$ (MBCs)이었다(테이터는 나타내지 않음). CSpK14는 그람 양성 세균에 대한 항미생물 활성을 나타내었으나, 그람 음성균에 대해서는 그렇지 않았다. 이 결과는 김치로 부터 단리한 *Bacillus sp* 유래의 펩타이드와 일치한다(Choi et al. 2012). CSpK14의 항-MRSA 활성 패턴은 *Bacillus licheniformis* DSM13 유래의 두 펩타이드 1 항생제 리케니시딘(lichenicidin)의 것과 다소 간 차이는 있으나 비교할만 하였다(Dischinger et al. 2009). 바실러스 유래의 항균 펩타이드의 상대적인 비교는 어렵다. 그러나, 항-MRSA 피토케미컬(phytochemical)의 치료적 가능성은 점점 확인되고 있다(Gibbons 2004). 항생제의 작용 모드 및 활성 부위에 상관 없이, 저 농도에서 세균 세포에 대한 다중의 효과를 갖는 화합물은 항생제-유발 부작용을 제공한다는 정보가 없다(Davies et al. 2006). CSpK14는 다른 병원 균 보다는 그람 양성 반코마이신 내성 세균에 대한 더 양호한 효능을 갖는다. CSpK14는 *Staphylococcus* 및 *Enterococcus*의 반코마이신-내성 균주에 대해 특히 효과적이었다. CSpK14 유일한 N-말단 특성, 단백질 안정성, 넓은 항균 억제 특성 및 특히 *Staphylococcus* 및 *Enterococcus*의 반코마이신-내성 균주에 대한 효능성을 고려하여 추가의 실험들을 수행하였다.

[0068] 실시예 6: 항생제를 사용한 CSpK14의 민감도

[0069] CSpK14의 민감도는 MHB를 사용한 브로쓰 희석 법(Wiegand et al. 2008)에 의해 단독으로 또는 CSpK14의 조합으

로 옥사실린(Sigma, USA), 암피실린(Sigma, USA), 페니실린 G(USB, UK), 사이플로플록사신(Sigma, USA), 바시테라신(USB, UK), 및 반코마이신(Sigma, USA)으로 분석하였다. 항생제와 조합된 CSpK14의 효능은 CSpK14의 0.5 MIC를 첨가하여 수행하였다. MIC는 동일한 표준 지침으로 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

Antibiotics	MIC(ug/ml)			
	VRSA	VRE 4	VRE 89	VRE 98
CSpK14	64	8	64	64
Oxacillin	64	32	>64	64
Oxacillin + CSpK14	4	8	4	4
Ampicillin	16	8	32	16
Ampicillin + CSpK14	2	4	2	4
Penicillin G	32	16	16	32
Penicillin G + CSpK14	1	4	8	4
Ciprofloxacin	2	4	1	2
Ciprofloxacin + CSpK14	4	4	2	2
Bacitracin	>128	64	64	>128
Bacitracin + CSpK14	>128	64	64	>128
Vancomycin	>128	>128	>128	>128
Vancomycin + CSpK14	>128	>128	>128	>128

MIC, minimum inhibitory concentration.

[0070]

[0071]

천연 소스 유래의 다양한 생성물은 MDR *Staphylococcus aureus* 및 기회성 세균에 대한 상승 작용을 갖는다(Chin et al. 2008; Hwang et al. 2013; Shimizu et al. 2001). CSpK14단독은 반코마이신-내성 세균에 대하여 약하거나 보통의 활성을 나타내었다. 이들 미생물에 대한 CSpK14 및 다양한 항생제의 조합 효능은 다양한 β -락탐(옥사실린 및 암피실린)의 MIC를 2- 내지 64-배 까지 상당히 감소시켰으나, β -락탐 상에는 거의 영향을 미치지 않았다. 옥사실린 및 암피실린의 MIC는 각각

[0072]

decreased 8- 내지 64-배 및 2- 내지 16-배 감소시켰다. 다약제(β -락탐)-내성 *Staphylococcus aureus*에 의해 발현되나 non- β 락탐에 의해서는 발현되지 않는 PBP2a를 억제하는 다수의 천연 항미생물제들이 있다(Shimizu et al. 2001).

[0073]

통상의 항생제와 조합하여, 펩타이드는 국소 및 전신 감염에 대해 보호하는 것으로 알려졌다(Reddy et al. 2004).

[0074]

실시예 7: VRSA 및 VRE에 대한 살균 효과의 상승작용 시험

[0075]

β -락탐 및 비 β -락탐과 조합된 CSpK14 상의 항-VRSA 및 -VRE 상승 효능을 타임 킬링 에세이(시간 경과 살균 에세이)로 수행하였다. 상호작용은 24 h(Δ LC24)에서 세≥포를 죽음에 있어서 가장 활성인 단일 약제와 비교하여 $\log_{10}$ CFU/ml 증대로 다음과 같이 기록하였다: Δ LC24 $\geq 2\log_{10}$ CFU/ml, 시너지; Δ LC24 = $1-2\log_{10}$ CFU/ml, 상가(additivity); Δ LC24 = $\pm 1 \log_{10}$ CFU/ml, 비변화; Δ LC24 $> -1 \log_{10}$ CFU/ml, 안타고니즘(Chin et al. 2008). 실험은 3회 반복하고 데이터는 평균 표준 편차로 나타내었다.

표 5

Synergistic effect of CSpK14 with Oxacillin						
Mos	MIC	Log ₁₀ CFU/ml, 24 hrs		Difference	ΔLC 24	Interpretation
		MASC	CSpK14+OXA			
VRSA	64	6.8	4.43	2.37	2.37±0.009	Synergy
VRE 4	32	6.8	4.49	2.31	2.31±0.006	Synergy
VRE 89	>64	6.79	4.49	2.3	2.30±0.021	Synergy
VRE 98	64	6.78	4.48	2.29	2.29±0.007	Synergy

[0076]

표 6

Synergistic effect of CSpK14 with Ampicillin						
Mos	MIC	Log ₁₀ CFU/ml, 24 hrs		Difference	ΔLC 24	Interpretation
		MASC	CSpK14+AMP			
VRSA	16	6.82	4.43	2.38	2.38±0.015	Synergy
VRE 4	8	6.81	4.5	2.31	2.31±0.023	Synergy
VRE 89	32	6.79	4.49	2.3	2.30±0.021	Synergy
VRE 98	16	6.81	4.5	2.31	2.31±0.008	Synergy

Abbreviation and result interpretation: see table 4

[0077]

[0078]

타임 킬링 에세이에 따른 CSpK14 및 β-락탐의 상승 효과는 24 h에서 CSpK14/oxacillin 및 CSpK14/ampicillin의 조합(24 h에서 $\Delta \log_{10} \text{CFU/mL}$): 각각 2.29 ~ 2.37 및 2.30 ~ 2.38)은 시험된 모든 4 균주에 대한 단일 최대 활성인 약물에 비교하여 2 $\log_{10} \text{CFU/mL}$ 증대되었다(표 5 & 6에 나타냄). 이 상승 효과는 세포벽 합성을 돕고, 여기서 반코마이신은 세포벽에 결합하여 세포벽 형성을 방해하는 것으로 보인다. 반코마이신은 세균 세포벽 전구체의 d-알라닌-d-알라닌 C-말단에 결합되는데, 여기서 반코마이신은 세포벽 생성 부위에 작용함으로써 트랜스 펩티데이션(transpeptidation)을 통하여 가교 결합을 방해하여 세포벽 형성의 억제를 초래한다(Gardete and Tomasz 2014). 유전 물질의 교환은 VRSA 균주 기능에 의한 다른 메커니즘이다. VRSA의 위험에 처한 환자는 VRE 및 MRSA로 동시 감염되는데 바이오필름 조건에서 VanA 유전자의 VRE에서 MRSA로의 이동을 허용하여 VRSA 균주를 초래한다(Finks et al. 2009).

[0079]

본 발명자들의 연구에 있어서 CSpK14 및 β-락탐의 상승 작용은 Tn1546의 플라스미드-생성 카피를 운반하는 MRSA 균주가 동일한 변경된 세포벽을 생산함을 입증한다(VRE 균주에서 기재한 바와 같이). 이 내성 균주는 또한 mecA 결정소를 운반하고, 여기서 d-Ala-d-Ala 잔기가 반코마이신 친화도가 크게 감소된 d-Ala-d-Lac로 대체된다. 몇몇 연구에 있어서, 펩타이드는 VanA 반코마이신 내성 표현형을 발현하는 *Enterococci* 뿐만 아니라 MRSA(Kruszewski et al. 2004)를 포함하는 그람 양성 세균의 in-vitro 및 in-vivo 성장을 성공적으로 억제하였다. 수식은 hVISA 및 VISA 균주의 반코마이신 내성 표현형에 관여할 수 있는데, 이는 또한 유사한 타입의 항생

제에 대한 보호를 제공할 수 있다(Hoiby et al. 2010). 따라서, CSpK14의 상승작용은 구조적으로 변경된 세포벽 전구체를 이용할 수 있을 것이고 MRSA에서 β -락탐 내성 메커니즘의 핵심 성분인 PBP2a의 생성을 억제할 수도 있다. 이 결과는 Schimizu M. et al.과 비교되고(Shimizu et al. 2001), 또한 Piper et al에 유사한데(Hoiby et al. 2010), 이 경우 항생제의 활성은 MRSA 및 VRE에 대하여 유효하였다. VRSA 상의 CSpK14 및 β -락탐의 상승 효과는 CSpK14가 옥사실린 또는 암피실린 등의 β -락탐과 조합으로 존재하는 경우에는 명백하였다(도 4a 및 b 참조). 도 4는 상승 효과를 나타내는 타임 킬링 에세이를 나타내는 그래프도이다. 항생제와 보조 약물로서 β -락타마아제 억제제의 사용은 알려져 있다(Lee et al. 2003). 본 발명자들의 결과는 항생제 내성을 극복하는 최선의 접근법인

[0080] 조합 요법의 개발을 더 강조하는 것이다.

[0081] 실시예 8: CSpK14의 항생 필름 특성

[0082] 이 연구를 위하여, 4 개의 반코마이신-내성 세균 균주를 사용하였다. 4 개의 균주의 바이오필름 형성은 단독으로 그리고 효과적인 항생제들과 조합하여 CSpK14로 평가하였다. 간단히, 세균 세포($100\ \mu\text{l}$)를 0.2% 글루코오스로 보충한 MHB 중의 96-well TCPs 중에 위치시켰다. 세포가 없는 배지를 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 37°C 에서 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 형성된 바이오필름을 정량화하기 위하여, 배양 배지를 버리고 PBS로 세척한 후, 100% 메탄올($100\ \mu\text{l}$)로 고정시킨 다음, 15 분 동안 인큐베이션시켰다. 메탄올을 제거한 후, 0.4% 크리스탈 바이올렛 용액으로 30 분 동안 염색하고, 증류수로 행군 다음 플레이트를 기건 시켰다. 이어서 100% 에탄올을 각 시험된 웰에 가하고 흡광도를 $620\ \text{nm}$ 에서 측정하였다. 실험은 3 회 반복하고 데이터는 평균화하였다. 이들 광학 밀도 값은 바이오필름을 형성함으로써 표면에 부착된 세균의 부분의 척도로 고려되었다(Hwang et al. 2013).

[0083] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 약물 처리하지 않은 세균(상부), (CSpK14+ OXA)로 처리한 세균(중간) 및 (CSpK14 + AMP)로 처리한 세균의 바이오필름 형성을 나타내는 그래프도이다.

[0084] 바이오필름 형성은 크리스탈 바이올렛 염색에 의하여 정량화하였다. 모든 4 가지 균주로 얻어진 흡광도 값은 바이오 필름 형성을 명확하게 보여준다. 바이오필름 형성은 많은 잔인하고 만성적인 감염의 주된 원인으로 여겨진다(Hwang et al. 2013). β -락탐 항생제와 조합하여 처리한 경우에 바이오필름 형성이 현저히 줄어들거나 또는 형성이 관찰되지 않았다.

[0085] 따라서, 바이오필름 형성을 방해하는 임의의 시약의 능력은 피부 및 전신 감염에 국소적으로 가해진 경우의 바이오필름 상태 및 그렇지 않은 상태 모두에 있어서 MRSA 및 VRSA에 대해서 매우 효과적일 수 있다.

[0086] 실시예 9: 제약학적 제제

[0087] 제형의 형태(정제)

[0088] 정제 펩타이드(실시예 2) 10 mg

[0089] 락토오스 80 mg

[0090] 전분 17 mg

[0091] 스테아르산 마그네슘 3 mg

[0092] 결정성 셀룰로오스 10 mg

[0093] 정제는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 한 바람직한 실시형태는 통상의 장용성 피복(예를 들면, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트), 당코팅 또는 피막 코팅을 갖는 정제 또는 연질캡셀 형태이다.

[0094] 결론적으로, MDR 병원균에 대한 적절한 항균 효용성 뿐만 아니라, CSpK14는 β -락탐과 조합하였을 때 그의 활성을 현저히 증대시켰다. 용이한 정제 단계, 반코마이신 내성 균주에 대한 상당한 효용성, 항바이오필름 특성, 뛰어난 환경적 관용성, 상승적 효과 및 새로운 아미노산 서열로부터 CSpK14는 신규 단리된 항생제이다. 펩타이드의 대규모 생산은 제조합 합성 기술에 의해 달성될 수 있으나, 장점은 저비용 고 수율로 신규 펩타이드들을 동정하는데에 맞추어져야 한다(Reddy et al. 2004). VRSA의 치료에 유용한 약물의 수는 제한된다. Quinupristin-dalfopristin 및 linezolid은 MDR Staphylococci에 대한 활성을 갖는 유용한 두개의 최근의 항균제이다(대부분의 VISA 및 VRSA 균주 *in vitro*).

[0095] 유효한 항균 및 항바이오필름 자산을 초래하는 정제에 있어서 용이성과 그의 상승적 항균 효능은 CSpK14가 조합

치료법의 증대에 유익할 수 있고 항생제 내성을 극복하기 위한 주된 접근법으로 인정될 수 있음을 나타낸다.

[0096] **참조문헌:**

- [0097] Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L (2011) Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* and applications in food. *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 1102 -1111
- [0098] Bizani D, Brandelli A (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* Strain 8 A. *J Appl Microbiol* 93:512 -519
- [0099] Bollang DM, Edelstein SJ (1991) Protein methods. Wiley-Liss, New York
- [0100] Borth W (1992) Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 6:3345 -3353
- [0101] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248 -254
- [0102] Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacterial. *Nat Rev Microbiol* 3:238-250
- [0103] Chin JN, Jones RN, Sader HS, et al (2008) Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 61:365-370
- [0104] Choi YH, Cho SS, Simkhada JR, Yoo JC (2012) A novel thermotolerant and acidotolerant peptide produced by a *Bacillus* strain newly isolated from a fermented food (kimchi) shows activity against multidrug-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 40:80-83
- [0105] Ciornei CD, Sigurdardottir T, Schmidtchen A, Bodelsson M (2005) Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2845-2850
- [0106] Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9:445-453
- [0107] de Man JD, de Man JD, Sharpe ME, et al (1960) A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130-135
- [0108] Dischinger J, Josten M, Szekat C, et al (2009) Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS One* 4:e6788
- [0109] Durairaj S, Srinivasan S, Lakshmanaperumalsamy P (2010) In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electr J Biol* 6:92-97
- [0110] Finks J, Wells E, Dyke TL, et al (2009) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 15:943
- [0111] Gardete S, Tomasz A (2014) Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J clin Invest* 124:2836-2840
- [0112] Gibbons S (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 21:263-277
- [0113] Hancock REW, Sahl H-G (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24:1551-1557
- [0114] Hawrani A, Howe RA, Walsh TR, Dempsey CE (2008) Origin of low mammalian cell toxicity in a class of highly active antimicrobial amphipathic helical peptides. *J Biol Chem* 283:18636-18645
- [0115] Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:222-232
- [0116] Hwang IS, Hwang JS, Hwang JH, et al (2013) Synergistic effect and antibiofilm activity between the

antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria. *Curr Microbiol* 66:56-60

- [0117] Kayalvizhi N, Gunasekaran P (2010) Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Biotechnol Bioprocess Eng* 15:365-370
- [0118] Koprivnjak T, Peschel A (2011) Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cell Mol Life Sci* 68:2243-254
- [0119] Kruszezka D, Sahl H-G, Bierbaum G, et al (2004) Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemother* 54:648-653
- [0120] Lee N, Yuen K-Y, Kumana CR (2003) Clinical role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 63:1511-1524
- [0121] Makinen KK, Makinen P-L (1987) Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain Soc 67). *J Biol Chem* 262:12488-12495
- [0122] Marcos JF, Munoz A, Perez-Paya E, et al (2008) Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu Rev Phytopathol* 46:273-201
- [0123] Martirani L, Varcamonti M, Naclerio G, De Felice M (2002) Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact* 1:1
- [0124] Mookherjee N, Hancock REW (2007) Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci* 64:922-933
- [0125] Nazir R, Hansen MA, Sorensen S, van Elsas JD (2012) Draft genome sequence of the soil bacterium *Burkholderia terrae* strain BS001, which interacts with fungal surface structures. *J Bacteriol* 194:4480-4481
- [0126] Podorieszach AP, Huttunen-Hennelly HEK (2010) The effects of tryptophan and hydrophobicity on the structure and bioactivity of novel indolicidin derivatives with promising pharmaceutical potential. *Org Biomol Chem* 8:1679-1687
- [0127] Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 24:536-547
- [0128] Schager H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1:16-23. doi: 10.1038/nprot.2006.4
- [0129] Sheldon Jr AT (2005) Antibiotic resistance: a survival strategy. *Clin Lab Sci* 18:170
- [0130] Shimizu M, Shiota S, Mizushima T, et al (2001) Marked potentiation of activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3198-3201
- [0131] Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, et al (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4673-4679
- [0132] Stanton C, Gardiner G, Meehan H, et al (2001) Market potential for probiotics. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. *Am J Clin Nutr* 73:476-483
- [0133] Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40:722
- [0134] Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L (2004) Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol* 6:R4
- [0135] Tomas J, Bru E, Wiese B, et al (2002) Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J Appl Microbiol* 93:714-724
- [0136] Von Dohren H (1995) Peptides. In: L. C. Vining and C. Stuttard (eds.). *Genetics and Biochemistry of*

Antibiotic Production. Newton, Butterworth-Heinemann, MA, USA, pp 129-171

- [0137] WHO (2004) Monitoring of antimicrobial resistance. In: report of an intercountry workshop Vellore, Tamil nadu, India, 14-17 October 2003. WHO project: ICP BCT 001
- [0138] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 3:163-175
- [0139] Zhao X, Wu H, Lu H, et al (2013) LAMP: A database linking antimicrobial peptides. PloS One 8:e66557

부호의 설명

- [0140] AMP: 암피실린
- AMPs: 항균 펩타이드(Antimicrobial peptides)
- BLAST: Basic local alignment search tool
- BSA: Bovine serum albumin
- CFU: Colony forming unit
- CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
- CSK14: *Bacillus* sp CSK14
- CSpK14: Antimicrobial peptide from *Bacillus* strain (current study)
- DCA : Deoxycholic acid
- EDTA: 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl dinitrilo)tetraacetic acid
- EGTA: *Ethylene glycol tetraacetic acid*
- kDa: Kilo-Dalton
- MASC: Most active single compound
- MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
- Mos: Microorganisms
- NCBI: National center for biotechnology information
- N-terminal: Amino (NH₂) terminal
- OXA: Oxacillin
- rpm: Revolution per minute
- SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis
- Tris: Tris [hydroxymethyl] aminomethane
- VISA: Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*
- VRE: Vancomycin resistant *Enterococci*
- VRSA: Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

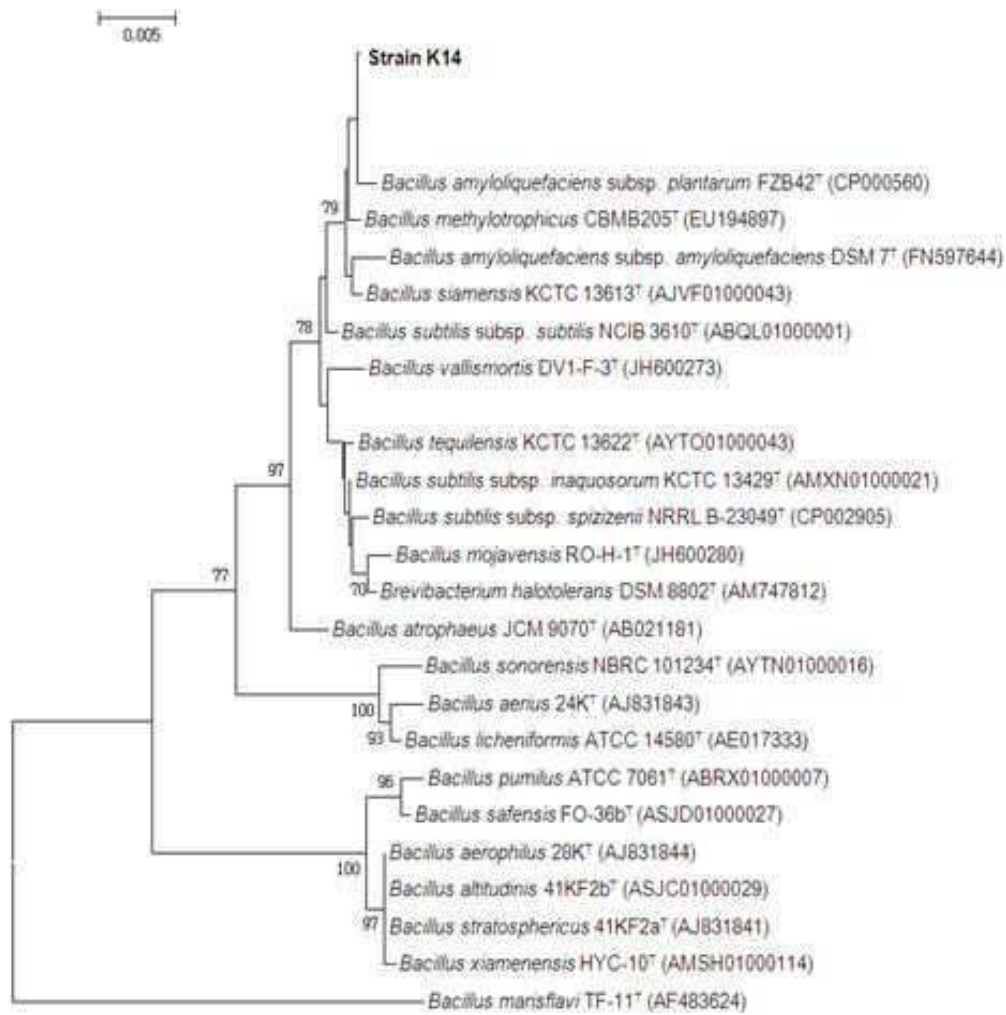
수탁번호

- [0141] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- 수탁번호 : KCTC18514P

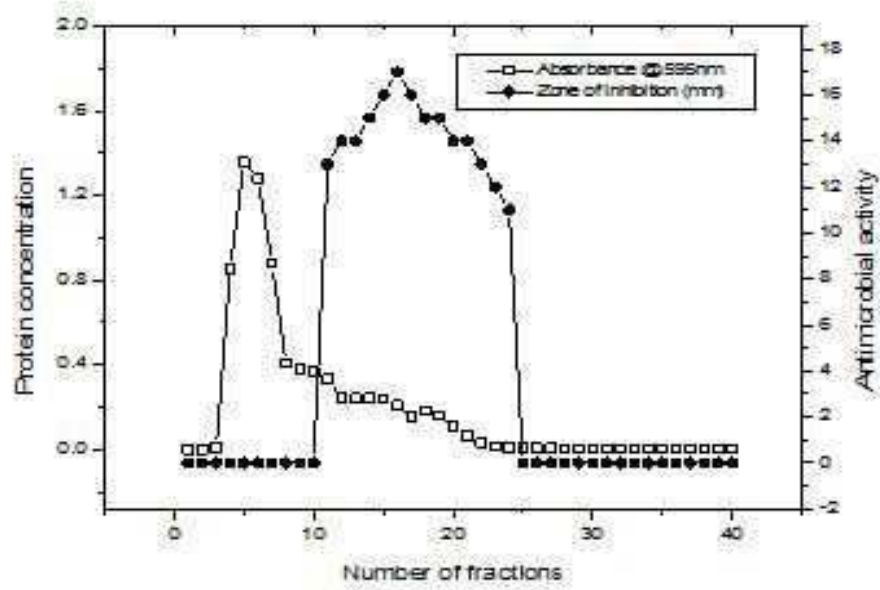
수탁일자 : 20161122

도면

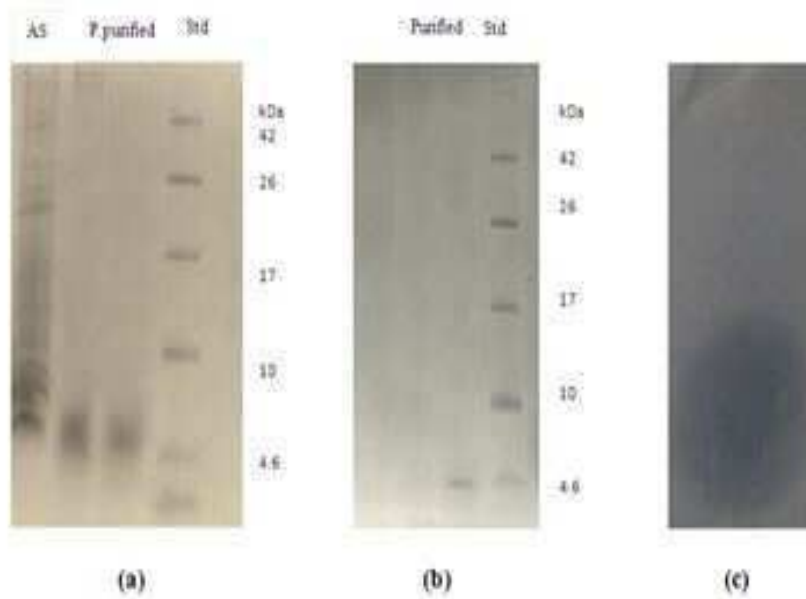
도면1



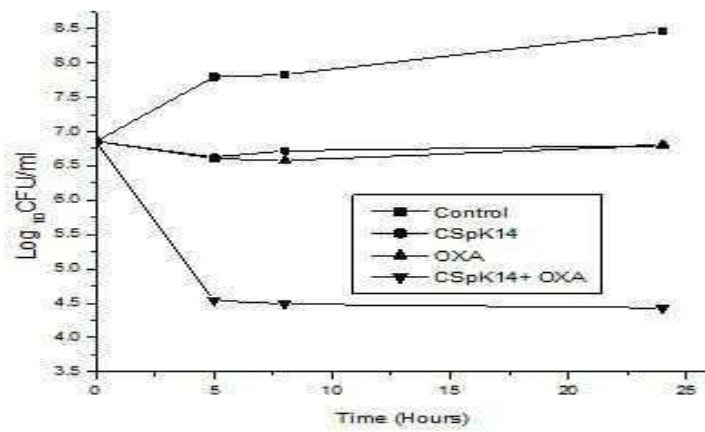
도면2



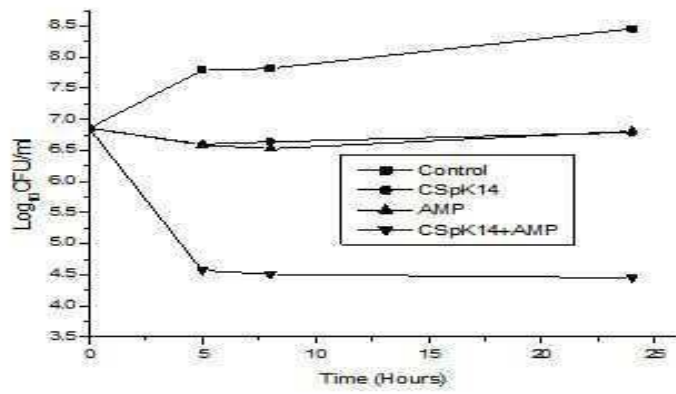
도면3



도면4

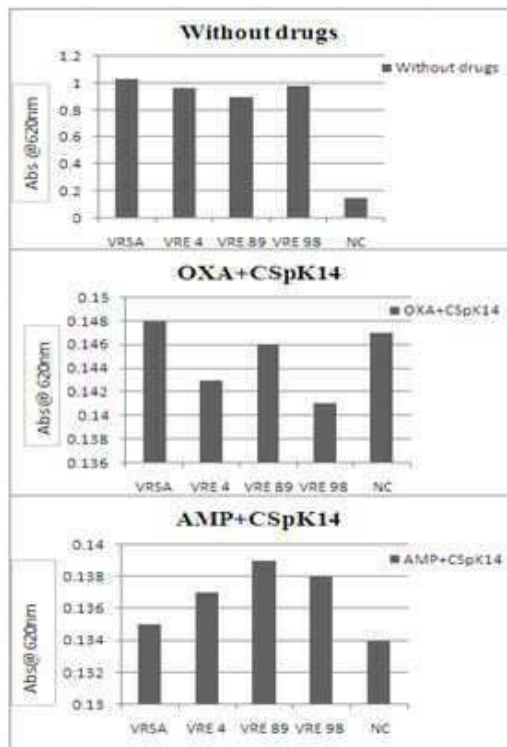


(a)



(b)

도면5



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens*
K14 and its use in combinatorial drug therapy
- <130> 1551
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> *Bacillus amyloliquefaciens*
- <400> 1

His Tyr Asp Pro Gly Asp Asp Ser Gly Asn Thr Gly

1

5

10