

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 23일 (23.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/048028 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)
A61K 8/64 (2006.01) A01N 37/18 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) A23L 3/3463 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010291
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 12일 (12.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0130339 2015년 9월 15일 (15.09.2015) KR
- (71) 출원인: 조선대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박윤경 (PARK, Yoonkyung); 61452 광주시 동구 필문대로 309 조선대학교 생명공학관 205 호, Gwangju (KR). 한효미 (HAN, Hyomi); 61267 광주시 북구 북문대로 169 번길 20, 102 동 602 호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

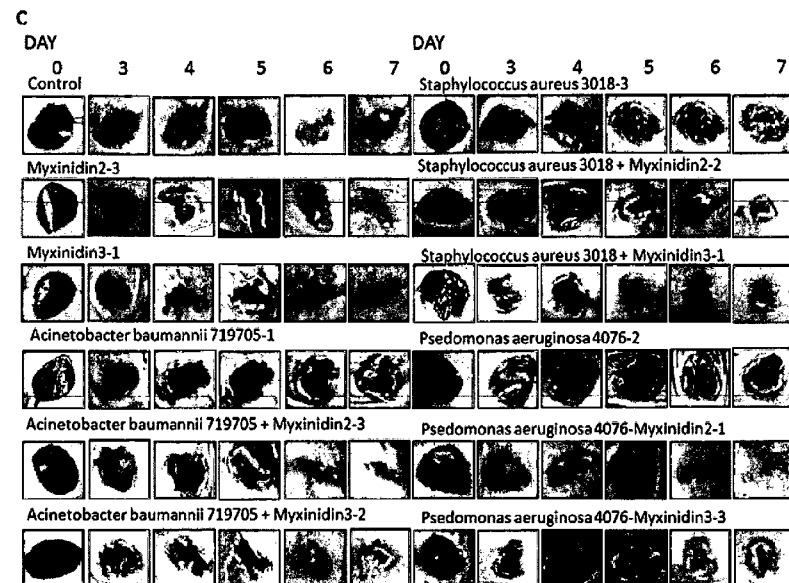
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE DERIVED FROM MYXINIDIN PEPTIDE, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도

[도 8c]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel antimicrobial peptide derived from myxinidin peptide, and a use thereof. The novel antimicrobial peptide (myxinidin 2 and myxinidin 3) of the present invention exhibits both excellent antimicrobial activity and low cytotoxicity to human cells, and exhibits anti-inflammatory and wound healing effects, and thus can be useful as an active ingredient of antibiotic, cosmetic composition, food additive, feed additive, biopesticide, quasi-drug and the like.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/048028 A1



본 발명은 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 신규 항균 펩타이드(마이시니딘 2, 마이시니딘 3)는 우수한 항균 활성과 동시에 인간 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내고 항염증 및 상처 치료에 효과를 나타내므로, 항생제, 화장품 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약품 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하여 세균의 항생제 저항성(resistance)이 야기되었다. 실제로, 세균이 새로운 항생제에 저항성을 나타내는 속도는 새로운 항생제의 유사체가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다.
- [3] 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus* sp.)에서 최초로 발견이 되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., *Nature*, 1970, 227, 138-140). 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.
- [4] 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다. 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.
- [5] 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두 가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic)

내성이며, 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은 오토라이신 활성의 하부조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하부조절은 외부자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용해를 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다.

- [6] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다. 또한, 그러한 새로운 항생제를 세균의 감염과 염증치료에 효과적으로 치료하기 위한 항생제를 제공하는 것이 필요하다.
- [7] 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신(bacteriocin)들은 구조적으로 세 부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며 두 번째는 비란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다. 해양생물을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데, 상기의 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -병풍(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -나선형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다. 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 해양생물인 먹장어류(Hagfish) 표피의 점액에서 발견된 항균 펩타이드인 마이시니딘(Myxinidin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 α -나선형을 형성하는 구조이다. 이러한 펩타이드 중에서도 해양생물에서 고안된 양친화성 펩타이드의 항균 활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되고 있다.
- [8] 한국등록특허 제1384577호에는 '황다랑어 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2015-0085935호에는 'CM-MA 펩타이드로부터 유래된 유사체 펩타이드 CMA3 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 항균 활성을 가지는 것으로 기존에 보고된 펩타이드로부터 항균 활성이 증진된 신규한 합성 펩타이드를 제조하기 위하여 노력한 결과, 양친화성을 갖는 마이시니딘(Myxinidin)을 주형으로 하여 3종의 마이시니딘 유사체(Myxinidin 1 내지 Myxinidin 3)를 합성하였고, 상기 합성된 펩타이드 유사체 중 마이시니딘2 및 마이시니딘3 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 내성균에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내면서 인간 적혈구 및 인간 정상 세포주(NHK)에 대하여 낮은 세포독성을 나타내고 항염증 및 상처 치료에 효과적임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은
- [11] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
- [12] i) 1번째 및 3번째 아미노산이 라이신(lysine, K) 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
- [13] ii) 7번째 및 10번째 아미노산이 라이신(lysine, K)이거나 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
- [14] iii) 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항염증용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 상처 치유용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [24] 본 발명은 마이시니딘 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 먹장어류(Hagfish) 표피의 점액에서 분리한 양친화성을 갖는 마이시니딘 항균 펩타이드를 주형으로 하여 합성된 신규 항균 펩타이드(마이시니딘2와 마이시니딘3)는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 효과가 우수하며, 인간 적혈구 세포 및 인간 정상 세포주(NHK)에 대하여 낮은 세포독성을 나타낸다. 또한, 사이토카인과 케모카인 및 염증반응에 관여하는 단백질을 조절하여 항염증 효과를 나타내며 항생제 내성균주들에 의해 감염된 피부각질세포 및 피부조직에도 항균 작용, 항염증 효과로 상처 치료에 도움이 되므로, 본 발명의 신규 항균 펩타이드는 항균용 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약품 등의 유효성분으로 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 막 조성에 따른 항균 펩타이드의 구조 분석 결과를 나타낸다. ---는 마이시니딘, — — —는 마이시니딘1, ---는 마이시니딘2 및 ...는 마이시니딘3을 나타낸다. PG, 포스파티딜글리세롤(Phosphatidylglycerol); PE, 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine); PC, 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine); CH, 콜레스테롤(cholesterol); SM, 스핑고미엘린(sphingomyelin).
- [26] 도 2는 대조군, 마이시니딘2(Myxinidin2), 마이시니딘3(Myxinidin3) 펩타이드 및 시프로플록사신(ciprofloxacin)의 대장균(*E. coli*)과 스탕필로코커스 아우레우스(*S. aureus*) 막에 대한 작용 여부를 확인한 결과를 나타낸다.
- [27] 도 3은 마이시니딘, 마이시니딘1, 마이시니딘2, 및 마이시니딘3 펩타이드의 대장균(*E. coli*)(좌)과 스탕필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)(우) 막에 대한 파괴능 여부 확인 결과를 나타낸다.
- [28] 도 4는 본 발명의 펩타이드와 상처 습윤제로 사용되는 젤라틴과의 혼합시 항균 활성을 확인한 결과를 나타낸다. A, 젤라틴 농도 변화에 따른 피부각질세포 생존율 측정; B, 젤라틴 농도별 펩타이드의 스탕필로코커스 아우레우스(*S. aureus* 3018), 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* 719705) 및 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa* 4076)에 대한 최소억제농도(MIC, μ M) 측정; C, 펩타이드 농도별 젤라틴 혼용 여부에 따른 스탕필로코커스 아우레우스(*S. aureus* 3018), 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii* 719705) 및 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa* 4076)에 대한 디스크 확산 항생제 감수성 시험 결과.
- [29] 도 5는 항생제 내성균에 감염된 피부각질세포에서 항균 펩타이드 처리시 STAT3, SAPK/JNK, P38 및 EGFR의 인산화 및 발현량을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. Myx2는 마이시니딘2, Myx3는 마이시니딘3를 나타내며, S.a는 스탕필로코커스 아우레우스, A.b는 아시네토박터 바우마니, P.a는 슈도모나스 에루지노사를 나타낸다.

- [30] 도 6은 항생제 내생균에 감염된 피부각질세포에서 항균 펩타이드 처리시 항염증 효과를 확인하기 위한 TNF- α , IL-6 및 IL-8의 발현량을 ELISA 방법으로 분석한 결과이다. Myx2는 마이시니딘2, Myx3는 마이시니딘3를 나타내며, S.a 은 스탕필로코커스 아우레우스, A.b는 아시네토박터 바우마니, P.a는 슈도모나스 에루지노사를 나타낸다.
- [31] 도 7은 항생제 내생균에 감염된 피부각질세포에서 항균 펩타이드 처리시 상처 치유 효과를 확인한 결과이다. M2는 마이시니딘2, M3는 마이시니딘3를 나타낸다.
- [32] 도 8은 항생제 내생균에 감염된 쥐의 피부에서 항균 펩타이드의 상처 치유 효과를 시간대별로 상처 크기 감소율로 확인한 결과이다.
- [33] 도 9는 항생제 내생균에 감염된 쥐의 피부에서 항균 펩타이드의 상처 치유 효과를 조직병리학적으로 관찰한 결과이다. M2는 마이시니딘2, M3는 마이시니딘3를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [35] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
- [36] i) 1번째 및 3번째 아미노산이 라이신(lysine, K) 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
- [37] ii) 7번째 및 10번째 아미노산이 라이신(lysine, K)이거나 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
- [38] iii) 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [39] 기존의 알려진 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 모체 펩타이드인 마이시니딘(Myxinidin)은 먹장어(Hagfish, *Myxine glutinosa* L.) 표피 점액에서 분리된 항균 펩타이드로 당업계에서 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다.
- [40] 본 발명의 항균 펩타이드는 상기 i), ii), 및 iii) 조건을 만족해야 하는데, 구체적으로 i) 조건의 경우에, 1번째 및 3번째 아미노산이 라이신(lysine, K) 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되어야 하는데, 1번째 및 3번째 아미노산이 모두 K인 경우와 모두 R인 경우뿐만 아니라 1번째 아미노산이 K이고, 3번째 아미노산이 R인 경우와 1번째 아미노산이 R이고, 3번째 아미노산이 K인 경우도 포함할 수 있다. 이는 K와 R은 모두 양전하를 갖는 염기성(basic) 아미노산으로 유사한 활성을 가질 수 있기 때문이다.
- [41] 다음으로 ii) 조건의 경우에, 7번째 및 10번째 아미노산이 라이신(lysine, K)이거나 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되어야 하는데, 7번째 및 10번째 아미노산이 모두 K인 경우와 모두 R인 경우뿐만 아니라 7번째 아미노산이 K이고, 10번째 아미노산이 R인 경우와 7번째 아미노산이 R이고, 10번째

- 아미노산이 K인 경우도 포함할 수 있다. 이는 K와 R은 모두 양전하를 갖는 염기성(basic) 아미노산으로 유사한 활성을 가질 수 있기 때문이다.
- [42] 마지막으로 iii) 조건의 경우에, 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환되어야 한다.
- [43] 본 발명의 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있는데, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 마이시니딘으로부터 1번째 및 3번째 아미노산이 라이신(lysine, K)으로 치환되고 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환된 항균 펩타이드로 마이시니딘2(Myxinidin2)로 명명하였고, 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 마이시니딘으로부터 1번째, 3번째, 7번째 및 10번째 아미노산이 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환된 항균 펩타이드로 마이시니딘3(Myxinidin3)로 명명하였다.
- [44] 상기 항균 펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 치환은 전극의 증/감을 이용하여 세포독성을 낮추며, 그람 음성균 및 그람 양성균에 대하여 항균 활성을 증가 또는 유지하기 위해 수행될 수 있다.
- [45] 상기 합성을 위한 방법으로 당업계에서 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상 고상법(Solution Phase Peptide synthesis), 고상 고상법(solid-phase peptide syntheses), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 고상법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [46] 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [47] 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 렙토스피라 속(*Leptospira* sp.), 리케치아 속(*Rickettsia* sp.), 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 대장균 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 살모넬라 속(*Salmonella* sp.) 및 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [48] 상기 그람 양성균은 스탕필로코커스 속(*Staphylococcus* sp.), 리스테리아 속(

Listeria sp.), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 및 바실러스 속(*Bacillus* sp.)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스태필로코커스 속(*Staphylococcus* sp.) 또는 리스테리아 속(*Listeria* sp.)인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [49] 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 대장균(*Escherichia coli* CCARM 1229, 1238), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa* CCARM 3592, 5018, 4076), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium* CCARM 8009, 8013), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus* CCARM 3114, 3709, 3018) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii* 719705)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [50] 상기 항생제는 이에 제한되지는 않으나, 아미노글리코사이드 계열 (아미노글리코사이드, 겐타마이신, 네오마이신 등), 페니실린 계열 (앰피실린 등), 숄폰아미드 계열, 베타-락탐 계열 (베타-락탐, 아목시실린/클라불란산 등), 클로람페니콜 계열, 에리트로마이신 계열, 플로르페니콜 계열, 포스포마이신 계열, 카나마이신 계열, 린코마이신 계열, 메티실린 계열, 퀴놀론 계열, 스트렙토마이신 계열, 테트라사이클린 계열, 트리메소프림 계열 및 반코마이신 계열의 항생제를 포함한다.
- [51] 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가질 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [53] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 전술한 바와 같다.
- [54] 본 발명의 마이시니딘 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 항균 펩타이드인 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [55] 본 발명의 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 항균 펩타이드를 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [56] 즉, 본 발명의 항균 펩타이드는 실제의 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제,

동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [57] 또한, 본 발명의 항균 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 항균 펩타이드의 유효용량은 0.1~100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지는 10 mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.
- [59] 본 발명의 항생제에서 본 발명의 신규한 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신규한 펩타이드의 항생제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [60] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [61] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 화장료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [62] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 항균 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [63] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 펩타이드는 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.
- [64] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나,

- 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [65] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸타, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [66] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [67] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [68] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸타 등이 이용될 수 있다.
- [69] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [70] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [71] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 식품 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [72] 본 발명의 펩타이드를 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 장기간의

- 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [73] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [74] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [75] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 사료 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 성장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [77] 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.
- [78] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.
- [79] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.
- [80] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [81] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 펩티드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 생물 농약, 방부 조성물 및 의약외품 조성물의

유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

- [82] 상기 방부 조성물에는 화장품 보존제 또는 의약품 보존제 등이 있다. 상기 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.
- [83] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 항균 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [84] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [85] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다. 상기 개체는 인간을 제외한 포유류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [86] 본 발명의 펩타이드는 항균 활성뿐만 아니라 항염증 및 상처 치유 촉진의 특징을 가지므로, 항균, 항염증 및 상처 치유용 약학, 화장품, 피부 외용제 조성물 등의 유효성분으로 유용하게 사용되어질 수 있다.
- [87] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항염증용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [88] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 상처 치유용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [89] 본 발명의 항균 펩타이드의 항염증 활성 및 상처 치유 효과는 항생제 내성균에 의해 유도된 염증 신호경로에서의 STAT3, SAPK/JNK, P38 및 EGFR 인산화/활성 조절, 사이토카인 및 케모카인 생성 억제를 특징으로 한다. 또한 상처 치유를 위한 세포 증식, 분화 및 성장을 유도하는 수용체인 표피성장인자수용체의 발현양이 증가함을 특징으로 한다.
- [90] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 항균 펩타이드의 항염증 활성은 항생제 내성균에 의해 감염된 피부각질세포 내에서 염증반응에 관여하는 단백질인 STAT3, SAPK/JNK 및 P38의 인산화 감소로 확인하였다. 또한, 염증반응에 관여하는 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 그리고 케모카인인 IL-8의 발현 양을 확인한 결과, 항생제 내성균을 감염시켰을 때 증가하였던 발현양이 항생 펩타이드를 처리하였더니 발현 양이 감소하는 것을 확인하였다.
- [91] 또한, 본 발명자들은 항균 펩타이드가 감염된 상처 치유에 효과를 나타내는지 세포의 이동을 현미경을 통해 관찰한 결과, 항생제 내성균주를 감염시킨

세포들은 사멸되거나 이동하지 않은 반면에 항균 펩타이드를 처리한 감염된 세포에서 펩타이드가 항균 작용과 항염증 효과를 나타내어 세포의 이동이 활발하게 이루어져 상처가 치유되는 것을 확인하였다(도 7 참조).

- [92] 또한, 본 발명자들은 감염된 상처난 쥐의 피부에 항균 펩타이드의 효과를 구체적으로 확인한 결과, 항균 펩타이드를 처리한 감염된 상처는 대조군인 감염되지 않은 상처와 같이 상피화가 빠르게 진행되어 피부가 재생되었고 같은 시간에 치유가 되는 반면 내성균에 감염된 상처는 삼출물이 증가하고 상피화되지 않아 치유가 되지 않은 것을 확인하였다(도 8 참조).

- [93] 본 발명의 펩타이드는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

- [94] 즉, 본원 발명의 펩타이드는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 습윤제로 바람직하게는 젤라틴을 사용할 수 있다.

- [95] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명자들은 항균 펩타이드가 상처 습윤제로 사용되는 젤라틴과 혼합시 항균 활성이 유지되는지 확인하기 위하여 디스크 확산 항생제 감수성 시험법을 이용하여 수행한 결과, 상기 펩타이드는 항균 활성이 유지되어 작용하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

- [96] 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 본 발명의 펩타이드를 그 유효량으로 포함하는 약제학적 조성물 형태로 제조될 수 있으며, 당업계에서 통상적으로 사용하는 하나 또는 그 이상의 무독성, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 또는 희석액 또는 다른 활성성분을 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체와 부형제를 이용하여 공지의 방법으로 제제화될 수 있다.

- [97] 또한 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 오일 또는 수성매질에서 용액, 현탁액 또는 유화액의 형태가 되거나, 사용하기 전에 무균, 발열물질이 제거된 물로 녹여 사용하는 건조분말의 형태로 제형화될 수 있다. 유중수형 유화액은 올리브유 같은 식물성 기름 또는 액상 파라핀 같은 광물성 오일을 유상으로 하고, 대두레시틴(soy bean lecithin) 등의 자연산 인지질 및 소르비탄모노올레이트와 같은 무수헥시톨이나 지방산의 에스테르에서 유래된 것, 리옥시에틸렌소르비톨모노올레이트와 같이 무수헥시톨(hexitol anhydride)과 지방산에서 유래한 부분 에스테르를 에틸렌 옥사이드와 축합한 화합물들을 유화제로 하여 활성성분을 유화시킨 것이다.

- [98] 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물이 화장료로 제형화될 경우, 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이 크림, 영양 크림, 마사지 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 파우더, 에센스 또는 팩 등의 제형을 가질 수 있다.

- [99]

- [100] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [101]
- [102] 실시예 1: 펩타이드의 합성 및 분리정제
- [103] 본 발명자들은 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법(Merrifield, RB., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963)에 따라, 모체 펩타이드인 마이시니딘으로 기재된 아미노산 서열을 가지는 펩타이드의 4번째 아미노산 잔기를 히스티딘으로 치환하였다. 1, 3번을 라이신 그리고 4, 9, 11번을 트립토판으로 치환하였다. 또한 마이시니딘으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 항균 펩타이드에 1, 3, 7, 10번을 아르기닌으로 치환하고 4, 9, 11번을 트립토판으로 치환하여 합성하였다(표 1).
- [104] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH_2 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-아미노산-왕 레진을 출발물질로 사용하였다.
- [105] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo trizole(HOBT)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노산 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, NMP(20% piperidine/N-methyl pyrrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 DCM(dichloromethane)으로 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid), 페놀(phenol), 싸이오아니졸(thioanisole), H_2O 및 트리이소프로필실레인(triisopropylsilane)을 각각 85:5:5:2.5:2.5(v/v)의 비율로 혼합한 용액을 가하고 2~3시간 동안 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 후, 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기 방법으로 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C_{18} 300Å, 15, 19.0 mm×30 m, Waters, 미국)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N HCl로 110°C에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정정한 후, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill 등, Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5:395, 1991)을 수행하였다.
- [106] 그 결과, 하기 표 1에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 서열번호 4로 기재되는 아미노산을 나타내는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다(표 1).

[107] [표1]

본 발명에서 합성한 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유 시간

펩타이드 명칭	아미노산 서열	서열번호	분자량	보유 시간
마이시니딘	GIHDILKYGKPS-NH ₂	1	1325.9	11.6
마이시니딘1	GIHHILKYGKPS-NH ₂	2	1347.9	7.3
마이시니딘2	KIKWILKYWKWS-NH ₂	3	1677.2	18.6
마이시니딘3	RIRWILRYWRWS-NH ₂	4	1789.2	19.3

아미노산 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
마이시니딘	G	I	H	D	I	L	K	Y	G	K	P	S
마이시니딘2	K	-	K	W	-	-	-	-	W	-	W	-
마이시니딘3	R	-	R	W	-	-	R	-	W	R	W	-

-: 아미노산 치환 없음. 진한 글자: 치환된 아미노산

[108]

[109] 실시예 2: 항균 활성 측정

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

[111] 구체적으로, 하기 표 2에 기재된 균주를 구입하여, 각각의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^5 세포/ $100 \mu\text{l}$ 의 균체 농도로 희석하여 마이크로타이터(microtiter) 플레이트(Nunc, 미국)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘1, 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 각각 96 웰(well)로부터 1/2배씩 BSA(Bovine serum albumin) 용액으로 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37°C에서 12시간 동안 배양하였고, 마이크로타이터 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 대조군으로는, 모체 펩타이드인 마이시니딘을 상기와 동일한 방법을 수행하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

[112] [표2]

본 발명에 사용한 균주 및 이의 입수처

구분	균주명	출처	기탁번호
그람 음성 균	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25922
	슈도모나스 에루지노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	미국 세포주은행	ATCC 27853
	살모넬라 타이피뮤리움(<i>Salmonella typhimurium</i>)	한국 세포주은행	KCTC 1926
그람 양성 균	스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25923
	리스테리아 모노사이토젠스(<i>Listeria monocytogenes</i>)	한국 세포주은행	KCTC 3710
내성 균	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 1229
	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 1238
	살모넬라 타이피뮤리움(<i>Salmonella typhimurium</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 8009
	살모넬라 타이피뮤리움(<i>Salmonella typhimurium</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 8013
	슈도모나스 에루지노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	분리주 3592	
	슈도모나스 에루지노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	분리주 5018	
	스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 3114
	스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	항생제내성균주은행	CCARM 3709

[113]

[114] 그 결과, 하기 표 3에 개시된 바와 같이 마이시니딘 2, 마이시니딘3 펩타이드는 대조균인 마이시니딘에 비해 그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균 모두에서 우수한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 3).

[115] [표3]

그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균에 대한 항균 펩타이드의 항균 활성

펩타이드	생육 최소억제농도(μ M)												
	그람 음성균			그람 양성균			내성균						
	대장균	P. 에루지노사	S. 타이피뮤리움	S. 아우레우스	L. 모노사이토젠스	대장균		P. 에루지노사		S. 타이피뮤리움		S. 아우레우스	
						1229	1238	3592	5018	8009	8013	3114	3709
마이시니딘	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
마이시니딘1	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
마이시니딘2	1	4	2	0.25	4	2	4	8	4	8	16	32	2
마이시니딘3	0.5	2	1	0.25	1	1	2	8	8	4	4	8	2

[116]

[117] 실시예 3: 염분 농도에서 항균 활성 측정

[118] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소억제농도(MIC) 값을 염분 농도에서 측정하였다.

[119] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주를 각 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^5 세포/ 100μ l의 균체 농도로 희석하여 마이크로타이터 플레이트(Nunc, 미국)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘1, 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 각각 96 웰(well)로부터 1/2배씩 BSA+150mM 염화나트륨(NaCl) 용액, 생리식염수(PBS) 용액 또는 10mM 인산화나트륨(SP) 용액으로 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37°C 에서 12시간 동안 배양하였고, 마이크로타이터 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한

MIC 값을 결정하였다. 대조군으로는, 모체 펩타이드인 마이시니딘을 상기와 동일한 방법을 수행하여 각 군주에 대한 MIC 값을 결정하였다.

[120] 그 결과, 하기 표 4에 개시된 바와 같이 마이시니딘 2, 마이시니딘3 펩타이드는 대조군인 마이시니딘에 비해 그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균주 모두에서 강한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 4).

[121] [표4]

그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균의 염분 농도에 따른 항균 펩타이드의 항균 활성

펩타이드		마이시니딘			마이시니딘1			마이시니딘2			마이시니딘3		
균주		NaCl	SP	PBS	NaCl	SP	PBS	NaCl	SP	PBS	NaCl	SP	PBS
그 람 음 성 균	대장균	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	2	4	8	2	2
	P. 에루지노사	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	8	4	4	4	4
	S. 타이피뮤리 움	>32	>32	>32	>32	>32	>32	2	2	4	2	2	2
그 람 양 성 균	S. 아우레우스	>32	>32	>32	>32	>32	>32	0.25	1	1	0.25	1	1
	L. 모노사이토 젠스	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	8	8	2	4	4
내 성 균	대장균 1229	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	2	2	2	2	2
	대장균 1238	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	4	2	8	2	4
	P. 에루지노사 3592	>32	>32	>32	>32	>32	>32	16	8	8	8	4	4
	P. 에루지노사 5018	>32	>32	>32	>32	>32	>32	16	2	4	8	2	4
	S. 타이피뮤리 움 8009	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	4	4	4	2	4
	S. 타이피뮤리 움 8013	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	4	8	8	2	4
	S. 아우레우스 3114	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	16	16	4	4
	S. 아우레우스 3709	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	4	8	4	4	4

[122]

[123] 실시예 4: 항생물막 활성 측정

[124] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 생물막 억제 농도값을 측정하였다.

[125] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 그람 음성균 및 그람 양성균을 각 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 5×10^5 세포/ $100 \mu\text{l}$ 의 균체 농도로 희석하여 마이크로타이터 플레이트(Nunc, 미국)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘1, 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 각각 96 웰(well)로부터 1/10배씩 생리식염수(PBS) 용액으로 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37°C 에서 12시간 동안 배양하였고, 상층액을 제거 후 100% 메탄올로 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색용액으로 2시간 반응시켜 3번 헹궈준 뒤 95% 에탄올로 용해하여 마이크로타이터 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 생물막 억제 농도값을 결정하였다. 대조군으로는, 모체 펩타이드인 마이시니딘을 상기와 동일한 방법을 수행하여 각 균주에 대한 생물막 억제 농도값을 결정하였다.

[126] 그 결과 하기 표 5에 개시된 바와 같이, 특히 $32 \mu\text{M}$ 및 $16 \mu\text{M}$ 의 마이시니딘 2, 마이시니딘3 펩타이드에서는 대조군인 마이시니딘에 비해 균주 모두에서 강한 항생물막 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 마이시니딘3 펩타이드는 $2 \mu\text{M}$ 에서부터 농도가 증가함에 따라 모든 균주에서 항생물막 활성을 억제함을 확인하였다.

[127] [표5]

그람 음성균 및 그람 양성균에 대한 항균 펩타이드의 항생물막 활성

	펩타이드	% 생물막 형성능(각 펩타이드 농도, μM)							
		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
P. 에루지노 사	마이시니딘	88	88	88	89	91	91	100	100
	마이시니딘 1	88	89	92	92	93	94	100	100
	마이시니딘 2	5	5	13	29	83	95	98	100
	마이시니딘 3	7	7	7	8	64	97	97	100
S. 아우레우 스	마이시니딘	73	73	74	80	80	86	93	100
	마이시니딘 1	75	79	83	83	86	87	88	98
	마이시니딘 2	15	24	89	93	97	97	97	100
	마이시니딘 3	14	16	17	28	71	84	84	85
L. 모노사이 토젠스	마이시니딘	95	99	100	100	100	100	100	100
	마이시니딘 1	93	97	98	99	100	100	100	100
	마이시니딘 2	33	45	93	99	100	100	100	100
	마이시니딘 3	16	18	21	22	83	87	87	94

[128]

[129] 실시예 5: 용혈 활성 측정

[130] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

[131] 구체적으로, 인간 적혈구를 8%의 농도가 되도록 생리식염수 용액(PBS, pH 7.4)으로 희석하고, 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘, 마이시니딘1,

마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 각각 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 μ M/웰의 농도로 처리하여, 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000 $\times$ g로 원심분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈량을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100(Sigma, 미국)을 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 트리톤 X-100의 적혈구 용혈 활성을 100%로 하여, 하기 수식식 1을 사용하여 상기 펩타이드의 용혈 활성을 계산하였다.

[132] [수식1]

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

[133] (상기 식에 있어서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 측정한 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 B는 414 nm 파장에서 측정한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 C는 414 nm 파장에서 측정한 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타낸다.)

[134]

[135] 그 결과, 모체 펩타이드인 마이시니딘과 실험군 펩타이드인 마이시니딘1, 마이시니딘2 및 마이시니딘3를 인간 적혈구에 대하여 25 μ M 농도를 처리하였을 때 본 발명의 마이시니딘2 및 마이시니딘3 펩타이드는 2% 또는 12%의 용혈작용이 유발되는 것을 확인한 결과 본 발명의 항균 펩타이드는 적혈구에 대한 세포독성이 낮다는 것을 확인하였다(표 6).

[136] [표6]

펩타이드	% 적혈구 파괴능(각 펩타이드 농도, μ M)			
	25	12.5	6.25	3.125
Myxinidin	3	2	1	0
Myxinidin1	2	1	0	0
Myxinidin2	2	1	0	0
Myxinidin3	12	5	1	0

[137]

[138] 실시예 6: 정상 세포주에서의 세포독성 확인

[139] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 정상 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해, NHK 세포(정상 사람 각질 배양 세포, Normal Human Keratinocyte cell)을 이용하여 독성을 측정하였다.

[140] 구체적으로, 10% HKGS(Human Keratinocyte Growth Supplement)(Gibco, 미국)가 함유된 Epilife Medium with 60 μ M Calcium(Gibco, 미국) 배지에서 배양된 NHK 세포를 1 $\times$ 10⁴씩 96웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, 상기 실시예 1에서

합성한 마이시니딘, 마이시니딘1, 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 각각 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 μ M/웰의 농도로 처리하여, 24시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응하였다. 배양 후, 생리식염수 용액(PBS)에 5mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 20 μ l를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200 μ l의 DMSO를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹여, 560 nm에서 흡광도를 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

- [141] 그 결과, 활성 범위 농도에 모체 마이시니딘 펩타이드와 마이시니딘1 내지 마이시니딘3를 처리했을 때, 12.5 μ M 농도 이하에서는 NHK 세포는 98% 이상의 세포 생존력을 나타내어 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드는 세포 독성이 거의 없음을 확인하였다(표 7).

- [142] [표7]

펩타이드	% 세포 생존력(각 펩타이드 농도, μ M)			
	25	12.5	6.25	3.125
마이시니딘	95	98	98	100
마이시니딘1	88	96	96	100
마이시니딘2	75	98	100	100
마이시니딘3	100	100	100	100

- [143]

- [144] 실시예 7: 원이색법 스펙트럼 측정

- [145] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α -나선형 구조 또는 β -병풍(sheet) 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

- [146] 구체적으로, 생리식염수(PBS, pH 7.4), PG, PE:PG, PC, PC:CH, PC:SM 또는 SM 용액에 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘, 마이시니딘1, 마이시니딘2 또는 마이시니딘3 펩타이드를 50 μ M로 첨가하여 0.1cm 길이(path-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25°C로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다.

- [147] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 생리식염수(PBS) 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 구조를 형성하지 않는 반면, PG, PE:PG에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 마이시니딘2와 마이시니딘3 펩타이드에서 2차 구조인 α -나선형 또는 β -병풍 구조를 형성하는 것을 통해, 본 발명의 항균 펩타이드는 미생물인 박테리아 막과 유사한 PE, PE:PG 상에서 α -나선형 또는 β -병풍 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 또한 PC, PC:CH, PC:SM, SM과 같은 동물의 세포막에서는 어떠한 구조를 형성하지 않는 것을 확인하였다.

[148]

[149] 실시예 8: 공초점 현미경 분석(Confocal microscopy)

[150] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드의 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스 막에 대한 작용 여부를 확인하기 위하여, 항균 활성이 높고 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 선별된 펩타이드인 마이시니딘2 또는 마이시니딘3를 PI(Propidium iodide)로 처리하여 공초점 현미경 분석하였다.

[151] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘2 또는 마이시니딘3를 PI(Propidium iodide) 용액과 대장균 또는 스탕필로코커스 아우레우스에 처리한 후 10분간 반응하였다. 반응 후, 순수 대장균만을 원심분리기(4,000rpm)를 이용해 수득하고, 상층액을 제거하였다. 그런 다음, 생리식염수(PBS) 50 μ l를 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거한 후 LSM510 공초점 현미경을 이용하여 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스막에서 펩타이드의 작용기작을 확인하였다.

[152] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 마이시니딘2 및 마이시니딘3 펩타이드 모두 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스 막에 작용하여 PI가 나타나는 것을 확인하였다.

[153]

[154] 실시예 9: 항균 펩타이드의 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스에 미치는 효과 확인

[155] 본 발명의 합성 펩타이드가 항균 활성을 나타내는 정도를 구체적으로 확인하기 위하여, 모체 펩타이드 마이시니딘과 마이시니딘1, 마이시니딘2 및 마이시니딘3 합성 펩타이드의 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스의 막에 대한 파괴능 여부를 주사전자현미경 분석(scanning electron microscopy, SEM)을 통해 확인하였다.

[156] 구체적으로, 대장균을 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에서, 스탕필로코커스 아우레우스는 TSB 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 생리식염수 용액에 2×10^7 세포/ml의 균체 농도로 희석하였다. 상기 희석한 균주에 상기 실시예 1에서 합성한 마이시니딘 또는 비교균인 마이시니딘1 내지 마이시니딘3 펩타이드를 각각 MIC 농도로 처리한 후 37°C에서 30분간 반응을 유발하였다. 그런 다음, 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 이용해 상기 균주에 첨가하여 상온에서 30분, 4°C에서 12시간 동안 고정하고, 완충제로 세척을 실시한 후 OsO₄에 재고정해 준 후 에탄올을 이용해 단계적으로 탈수시켰다. 탈수 후, 백금 코팅을 실시하여 저진공주사전자현미경 분석(Low vacuum scanning electron microscopy)에서 관찰하였다.

[157] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 마이시니딘 내지 마이시니딘3를 대장균과 스탕필로코커스 아우레우스에 처리한 경우, 마이시니딘2와 마이시니딘3 펩타이드가 대장균 막에 작용하면서 파괴하여, 효과적인 항균 활성을 나타내는

것을 확인하였다.

[158]

[159] 실시예 10: 항균 펩타이드와 상처습윤제로 사용되는 젤라틴과 혼합시 항생제 내성균에 나타나는 항균 활성 확인

[160] 본 발명의 합성 펩타이드와 젤라틴과의 혼합시 항균 활성을 구체적으로 확인하기 위하여, 마이시니딘2와 마이시니딘3 합성 펩타이드와 0.1%의 젤라틴과 혼합하여 항균 활성을 확인하기 위해 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스태필로코커스 아우레우스에 대한 최소억제농도 측정과 한천 확산법인 디스크 확산 항생제 감수성 시험을 통해 항균 활성을 확인하였다.

[161] 구체적으로, 배양한 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스태필로코커스 아우레우스를 2×10^5 세포/ml 농도로 희석하여 0.1% 젤라틴과 1% 아گار오스가 혼합된 용액과 섞은 후 배양하였다. 항균 활성을 보기 위해 6mm의 동그란 디스크에 펩타이드를 농도별로 올려 확산정도를 측정하였다.

[162] 그 결과, 젤라틴과 혼합한 항균 펩타이드 마이시니딘2와 마이시니딘3은 항균 활성을 유지하며 내성균주인 스태필로코커스 아우레우스, 아시네토박터 바우마니, 그리고 슈도모나스 에루지노사에 대해 항균효과가 나타났다(도 4). 이로써, 상처 습윤제로 사용되고 있는 젤라틴은 항균 펩타이드와 혼합해서 사용하여도 항균 펩타이드의 항균 활성이 유지되는 것을 알 수 있다.

[163] 도 4B는 젤라틴의 특성상 끈적이는 물질이어서 펩타이드가 정상적으로 항균활성을 유지할 수 있는지 확인하고 젤라틴의 사용농도를 확인한 그래프로써, 젤라틴 농도가 0.1%일 때 항균 펩타이드 MIC가 3.1uM의 농도로 펩타이드의 항균활성이 유지되는 것을 확인하였다.

[164] 또한 0.1% 젤라틴 농도에서 펩타이드의 항균활성을 확인한 결과 스태필로코커스 아우레우스 3018에서 마이시니딘2와 3는 젤라틴과 사용되어도 항균활성이 비슷하게 유지되며 아시네토박터 바우마니 719705에서 젤라틴과 마이시니딘2는 젤라틴과 사용되어도 활성이 유지되며 마이시니딘3는 항균활성이 펩타이드만 처리하였을 때 조금 더 항균활성이 높지만 젤라틴과 함께 존재하여도 활성은 유지되었다. 슈도모나스 에루지노사 4076도 역시 아시네토박터 바우마니와 비슷하게 작용을 하였다(도 4C).

[165] 또한, 피부각질세포에 젤라틴의 농도별(0%~1%)로 처리하였을 때 독성의 유무를 확인한 결과 독성이 나타나지 않았으며 오히려 세포가 증식되어 100% 이상의 세포생존을 확인하였다(도 4A).

[166]

[167] 실시예 11: 항균 펩타이드에 의해 항생제 내성균에 감염된 피부각질세포에서 발현되는 단백질 및 신호경로 확인

[168] 본 발명의 합성 펩타이드가 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스태필로코커스 아우레우스에 의해 감염된 피부각질세포에서 발현되는

단백질을 구체적으로 확인하기 위하여 웨스턴 블롯(Western blot) 방법을 이용하여 분석하고 이의 신호 경로를 확인하였다.

- [169] 구체적으로, 피부각질세포를 5×10^5 세포/ml의 농도로 배양한 후에 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스태필로코커스 아우레우스를 감염시킨 후 최소억제농도 2배의 펩타이드를 처리하여 단백질을 추출하였다. 그리고 30-40 μ g의 단백질을 10% 또는 12%의 SDS 폴리아크릴라마이드 겔에 전기영동하여 PVDF막에 이동시켜 STAT3, SAPK/JNK, P38, 그리고 EGFR 단백질 발현량 및 인산화를 웨스턴 블롯 방법으로 수행하였다.
- [170] STAT는 사이토카인과 성장인자를 발현하도록 해주는 전사인자로 세포 성장과 사멸에 관여하며, 염증이 일어나게 되면 IL-6, TNF- α 와 같은 전구염증 사이토카인에 의해 인산화되어 활성을 일으킨다. 이에, 항생제 내성균주에 감염되어 염증이 일어나 STAT3 인산화가 증가된 반면, 펩타이드를 처리하였을 때 인산화가 감소하는 것을 확인하였다(도 5). 하위 신호경로인 MAP 키나아제(MAP Kinase) 중 SAPK/JNK과 P38은 염증반응에 기여하며 세포 성장, 분화, 생존 등 세포의 기능을 조절하는데 감염된 세포에서는 SAPK/JNK과 P38 인산화가 증가하고 펩타이드를 처리하면 SAPK/JNK과 P38 인산화가 감소하였다(도 5). 세포 표면 수용체의 구성원중 하나인 표피성장인자 수용체(EGFR)는 표피성장인자 및 성장인자-알파와 결합하여 MAP 키나아제 하류 신호전달로 이어져 DNA 합성이나 세포 이동, 부착 및 증식에 관여하는데 항균 펩타이드를 처리하면 감염된 세포에서 표피성장인자 수용체의 인산화가 증가되어 세포가 성장한다(도 5).
- [171]
- [172] 실시예 12: 항균 펩타이드가 항생제 내성균에 감염된 피부각질세포에 미치는 항염증 효과 확인
- [173] 본 발명의 합성 펩타이드의 항염증 효과를 구체적으로 확인하기 위하여, 마이시니딘2와 마이시니딘3 합성 펩타이드가 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스태필로코커스 아우레우스를 감염시켜 사이토카인과 케모카인인 인터루킨-6(IL-6)와 인터루킨-8(IL-8), 그리고 종양괴사인자 알파(TNF- α)를 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 확인하였다.
- [174] 구체적으로, 인터루킨-6, 인터루킨-8 그리고 종양괴사인자-알파는 사람의 면역분석법 키트에 의해서 수행되었으며 사람의 피부각질세포에 항생제 내성균주인 스태필로코커스 아우레우스, 아시네토박터 바우마니, 그리고 슈도모나스 에루지노사를 감염시킨 후 펩타이드를 2배의 최소억제농도를 처리하여 반응시킨 후 상층액만 회수하여 효소면역분석방법으로 수행하였다.
- [175] 그 결과, 염증이 분비되는 사이토카인인 인터루킨-6와 TNF- α , 케모카인인 인터루킨-8은 내성균주인 스태필로코커스 아우레우스, 아시네토박터 바우마니,

그리고 슈도모나스 에루지노사에 감염되었을 때 급격히 증가하였으며, 항균 펩타이드인 마이시니딘2와 마이시니딘3을 처리하였더니 염증반응이 분비되는 사이토카인과 케모카인의 발현이 감소하였다(도 6).

[176]

[177] 실시예 13: 항균 펩타이드가 항생제 내성균에 감염된 피부각질세포의 이동을 통해 상처치료 효과 확인

[178] 본 발명의 합성 펩타이드가 항생제 내성균주인 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스탕필로코커스 아우레우스에 감염된 피부각질세포의 이동을 활성화시켜 상처가 치료되는지 확인하기 위하여, 부착된 세포를 손상시켜 감염시킨 후 마이시니딘2와 마이시니딘3을 처리하여 현미경으로 관찰하였다.

[179] 구체적으로, 1×10^6 세포/ml의 사람 피부각질세포를 배양한 후에 팁을 이용하여 긁은 후 항생제 내성균주인 스탕필로코커스 아우레우스, 아시네토박터 바우마니, 그리고 슈도모나스 에루지노사를 감염시키고 2배의 최소억제농도의 펩타이드를 처리하여 세포의 이동을 현미경을 통해 관찰하였다.

[180] 그 결과, 감염된 피부각질세포는 시간에 따라 이동이 현저히 떨어지며 긁힌 부분을 채우지 못하고 세포가 사멸하는 것을 확인하였다(도 7). 반면 감염된 피부각질세포에 항균 펩타이드를 처리한 것은 세포의 이동이 20시간부터 증가하기 시작하여 24시간에는 급격하게 세포의 이동이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(도 7). 스탕필로코커스 아우레우스에 감염시 마이시니딘3를 처리하면 더 빠르게 재생되었고 마이시니딘2도 속도는 느리지만 세포가 사멸되지 않고 증식이 이루어졌다. 아시네토박터 바우마니 역시 마이시니딘3의 재생속도가 빠르지만 마이시니딘2도 세포의 사멸없이 증식되었다. 슈도모나스 에루지노사는 마이시니딘2를 처리했을 때 세포 증식 속도가 빠르게 일어났으며 마이시니딘3를 처리한 것도 세포의 사멸없이 증식이 이루어졌다. 이로써 감염된 상처에 항균 펩타이드를 처리하면 항균효과 및 세포의 이동을 증가시켜 상처 치유의 속도가 빠르게 진행된다는 것을 알 수 있다.

[181]

[182] 실시예 14: 항균 펩타이드가 항생제 내성균에 감염된 쥐 피부의 상처에 미치는 항염증효과 및 상처치유 확인

[183] 본 발명의 합성 펩타이드가 항생제 내성균주인 아시네토박터 바우마니, 슈도모나스 에루지노사 그리고 스탕필로코커스 아우레우스에 감염된 쥐의 상처난 피부의 치유과정을 기간에 따라 관찰하고 조직을 헤마톡실린 & 에오신(H&E)의 염색방법을 통해 염증이 일어난 피부조직을 살펴보았다.

[184] 구체적으로, 6주~7주령 BALB/c 암컷 쥐에 5mm의 바이오피스핀치를 이용해 상처를 낸 후에 내성균주 스탕필로코커스 아우레우스, 아시네토박터 바우마니, 그리고 슈도모나스 에루지노사를 감염시키고 2배 최소억제농도의 펩타이드를 투여하여 상처의 크기와 치유과정을 2주동안 관찰하고 3일과 7일째의

피부조직을 2cm×2cm 크기로 추출하여 헤마톡실린 & 에오신 염색을 통해 피부조직의 염증 정도를 확인하였다.

[185] 그 결과, 내성균주에 감염된 쥐의 피부조직은 상처가 치유되지 않고 염증이 심해지고 상처 삼출액이 분비되었다(도 8). 반면에 항균 펩타이드인 마이시니딘2와 마이시니딘3를 투여한 쥐의 상처는 상피화가 되고 상처가 성숙되는 것을 알 수 있다. 이로써 감염된 상처에 항균 펩타이드를 처리하면 항염증반응 효과를 가지며 상처치유 속도가 빨라지며 상처가 치료되는 것을 알 수 있다.

[186] 도 9에 개시된 바와 같이 7일째의 피부조직의 염증 정도를 헤마톡실린 & 에오신 염색을 통해 확인한 결과 항균 펩타이드를 처리하는 경우 피부염증이 억제되는 것을 확인하였다.

[187]

[188] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[189] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[190] <1-1> 산제의 제조

[191] 본 발명의 펩타이드 20 mg

[192] 유당 20 mg

[193] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[194]

[195] <1-2> 정제의 제조

[196] 본 발명의 펩타이드 10 mg

[197] 옥수수전분 100 mg

[198] 유당 100 mg

[199] 스테아린산 마그네슘 2 mg

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

[201]

[202] <1-3> 캡슐제의 제조

[203] 본 발명의 펩타이드 10 mg

[204] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[205] 락토오스 14.8 mg

[206] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg

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

[208]

[209] <1-4> 액제의 제조

[210] 본 발명의 펩타이드 20 mg

[211] 이성화당 10 g

- [212] 만니톨 5 g
- [213] 정제수 적량
- [214] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [215]
- [216] <1-5> 주사제의 제조
- [217] 본 발명의 펩타이드 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- [218] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지
- [219] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1 ml
- [220] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 펩타이드를 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120°C에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액을 제조하였다.
- [221]
- [222] <제조예 2> 화장품의 제조
- [223] <2-1> 유연화장수(스킨)
- [224] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 표 8에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [225] [표8]

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

[226]

[227] <2-2> 영양화장수(로션)

[228] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 표 9에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

[229] [표9]

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

[230]

[231] <2-3> 에센스

[232] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 에센스를 제조하기 위해 하기 표 10에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

[233] [표10]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
시토스테롤	1.7
폴리글리세릴2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
콜레스테롤	1.5
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
방부제	미량
향료	미량
정제수	To 100

[234]

[235] <2-4> 세안제(클렌징폼)

[236] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 표 11에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[237] [표11]

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

[238]

[239] <2-5> 영양크림

[240] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 표 12에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

[241] [표12]

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

[242]

[243] <2-6> 마사지크림

[244] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 표 13에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조한다.

[245] [표13]

성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0
토코페닐아세테이트	0.1
폴리솔베이트60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
산탄검	0.5
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[246]

[247] <2-7> 팩

[248] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 팩을 제조하기 위해 하기 표 14에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

[249] [표14]

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

[250]

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

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
 i) 1번째 및 3번째 아미노산이 라이신(lysine, K) 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
 ii) 7번째 및 10번째 아미노산이 라이신(lysine, K)이거나 또는 아르기닌(arginine, R)으로 치환되고,
 iii) 4번째, 9번째 및 11번째 아미노산이 트립토판(tryptophan, W)으로 치환된 항균 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 리스테리아 모노사이토젠스(*Listeria monocytogenes*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 습윤제로 사용되는 젤라틴과 혼합시에도 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.
- [청구항 9] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.
- [청구항 10] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물.
- [청구항 11] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제.
- [청구항 12] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제.
- [청구항 13] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약.
- [청구항 14] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품

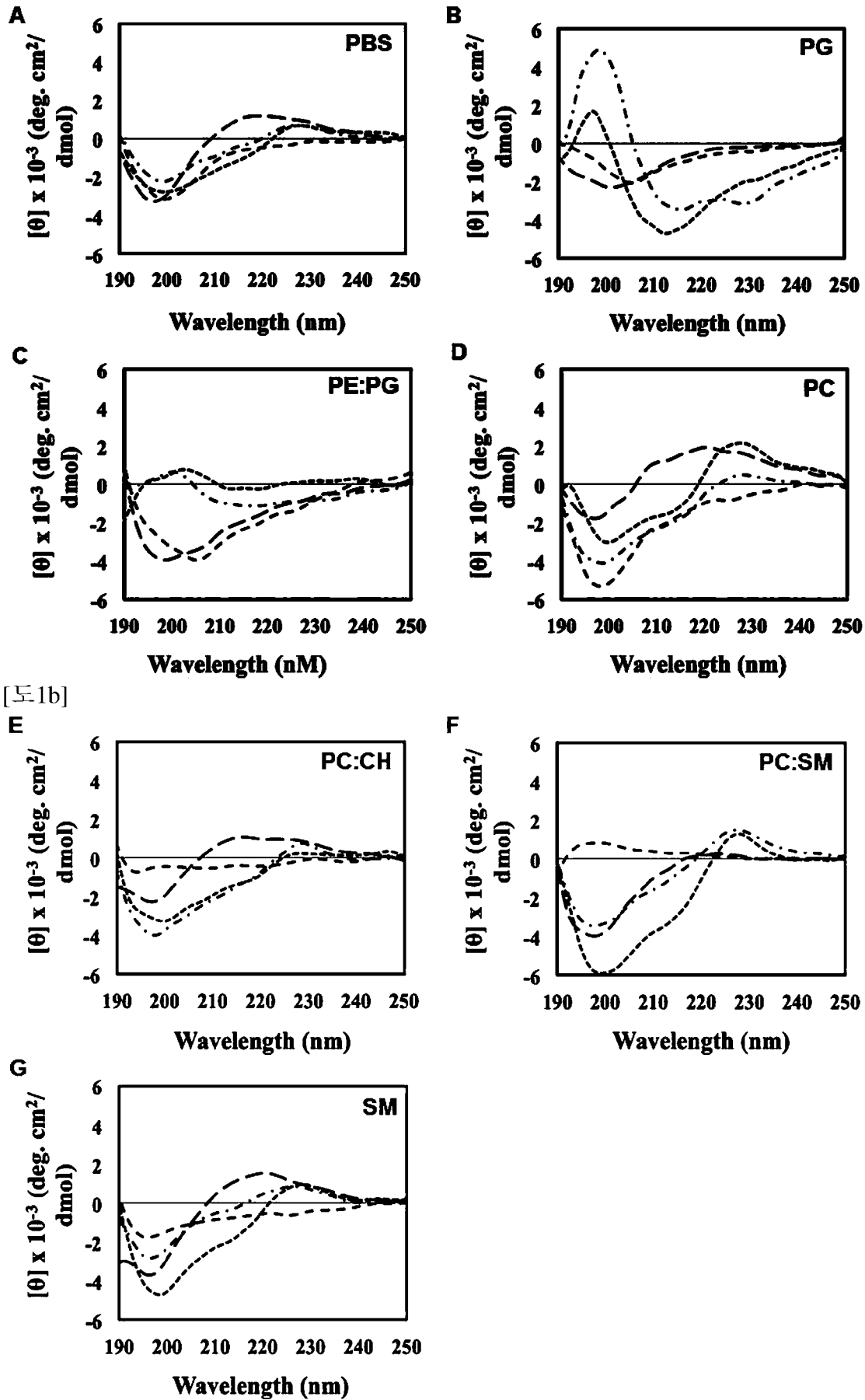
조성물.

[청구항 15] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법.

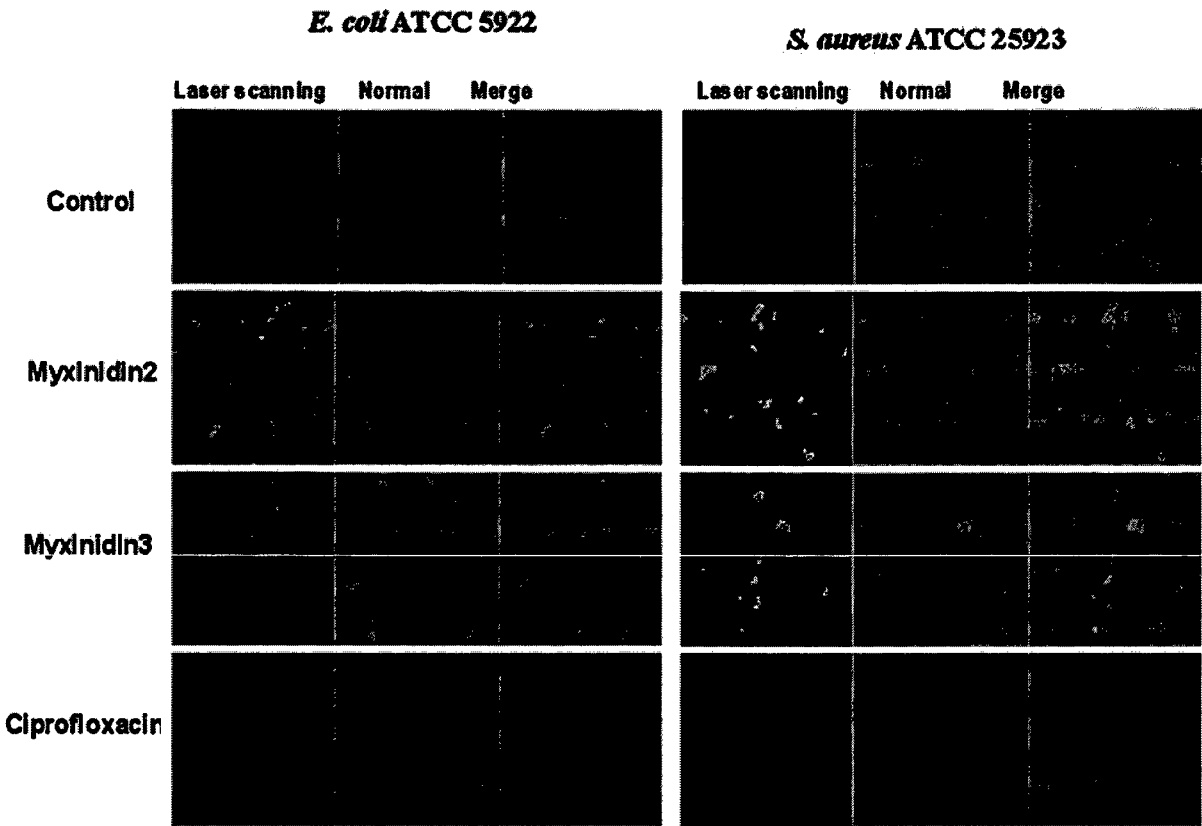
[청구항 16] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항염증용 피부 외용제 조성물.

[청구항 17] 제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 상처 치유용 피부 외용제 조성물.

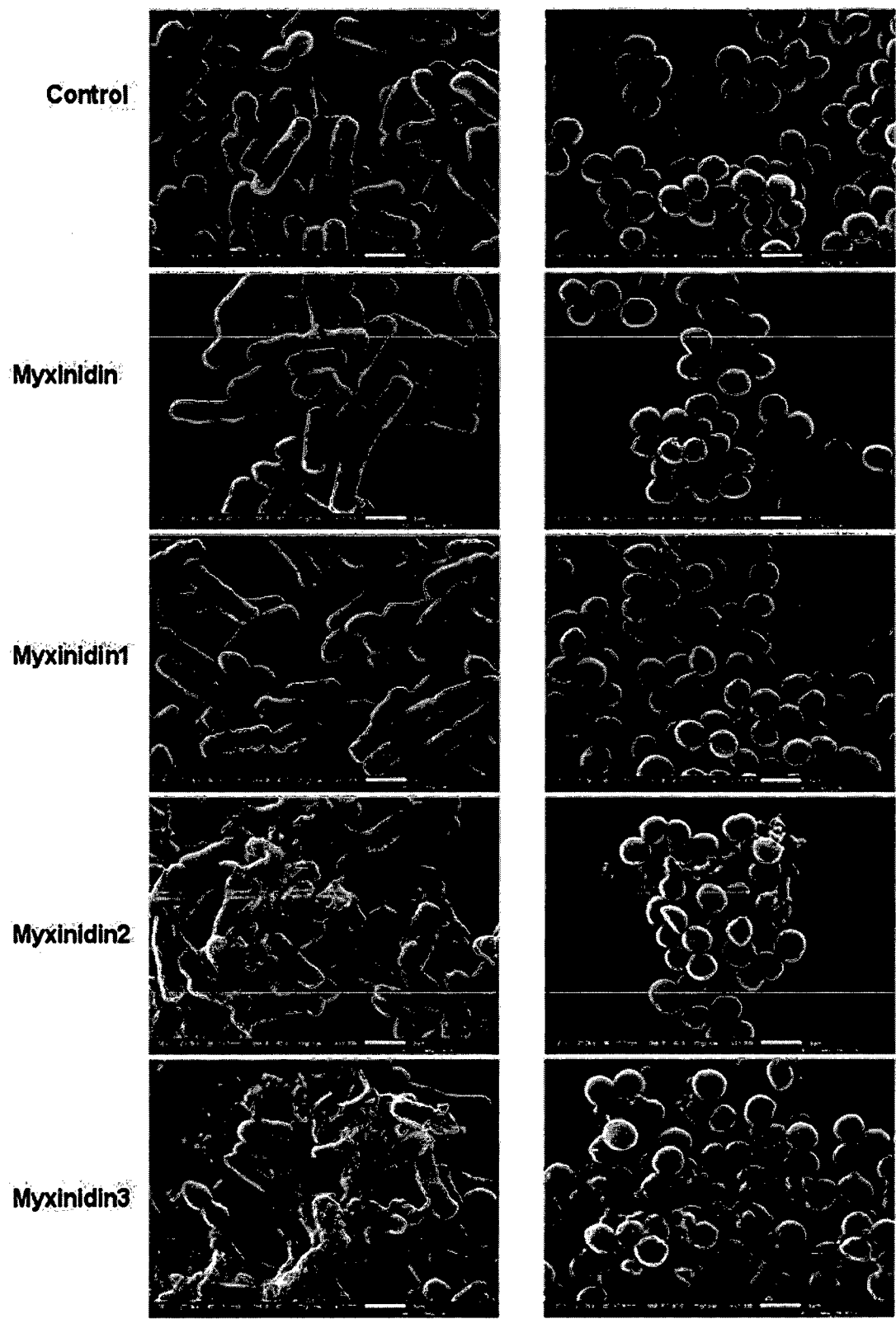
[도 1a]



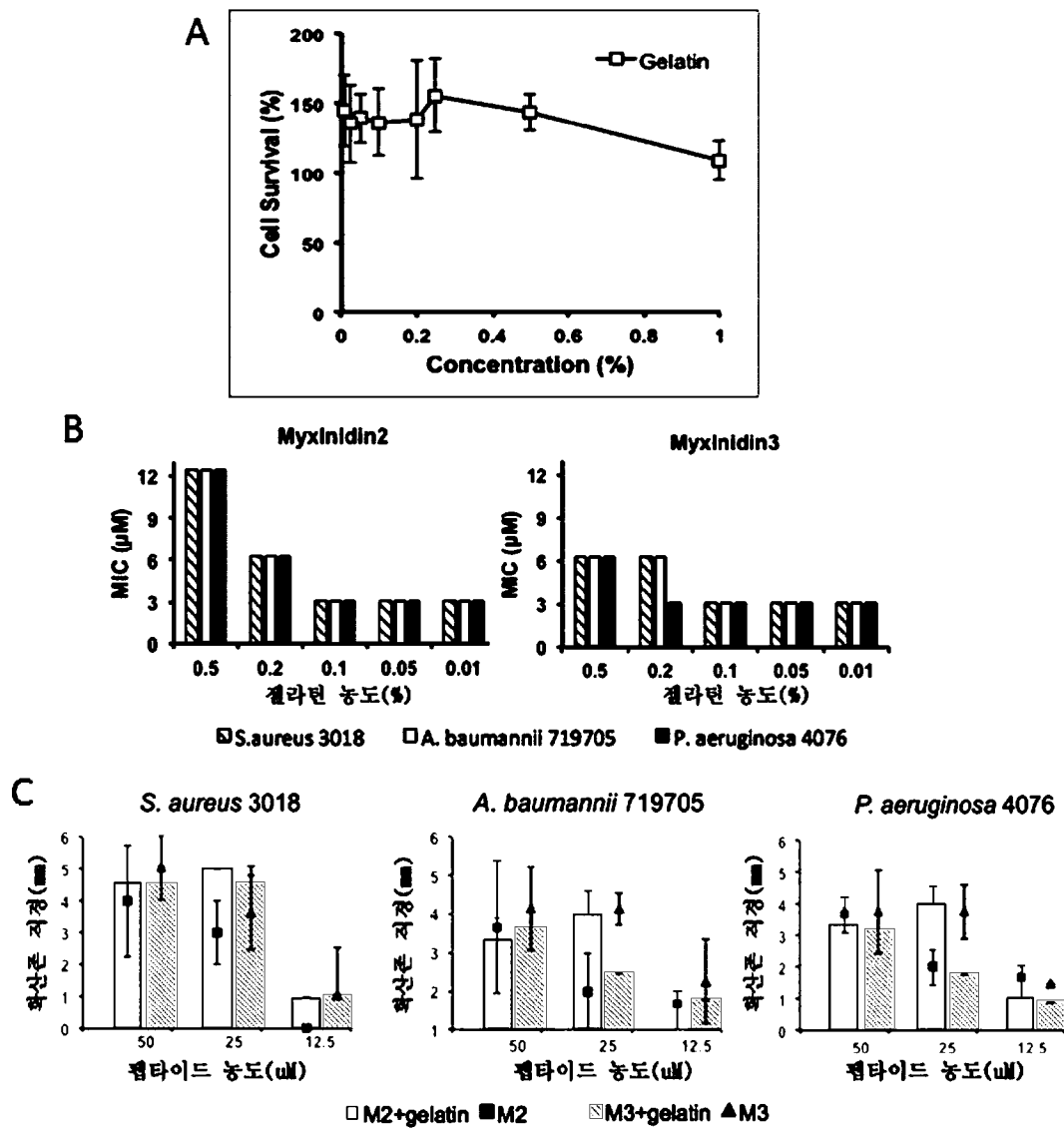
[도 2]



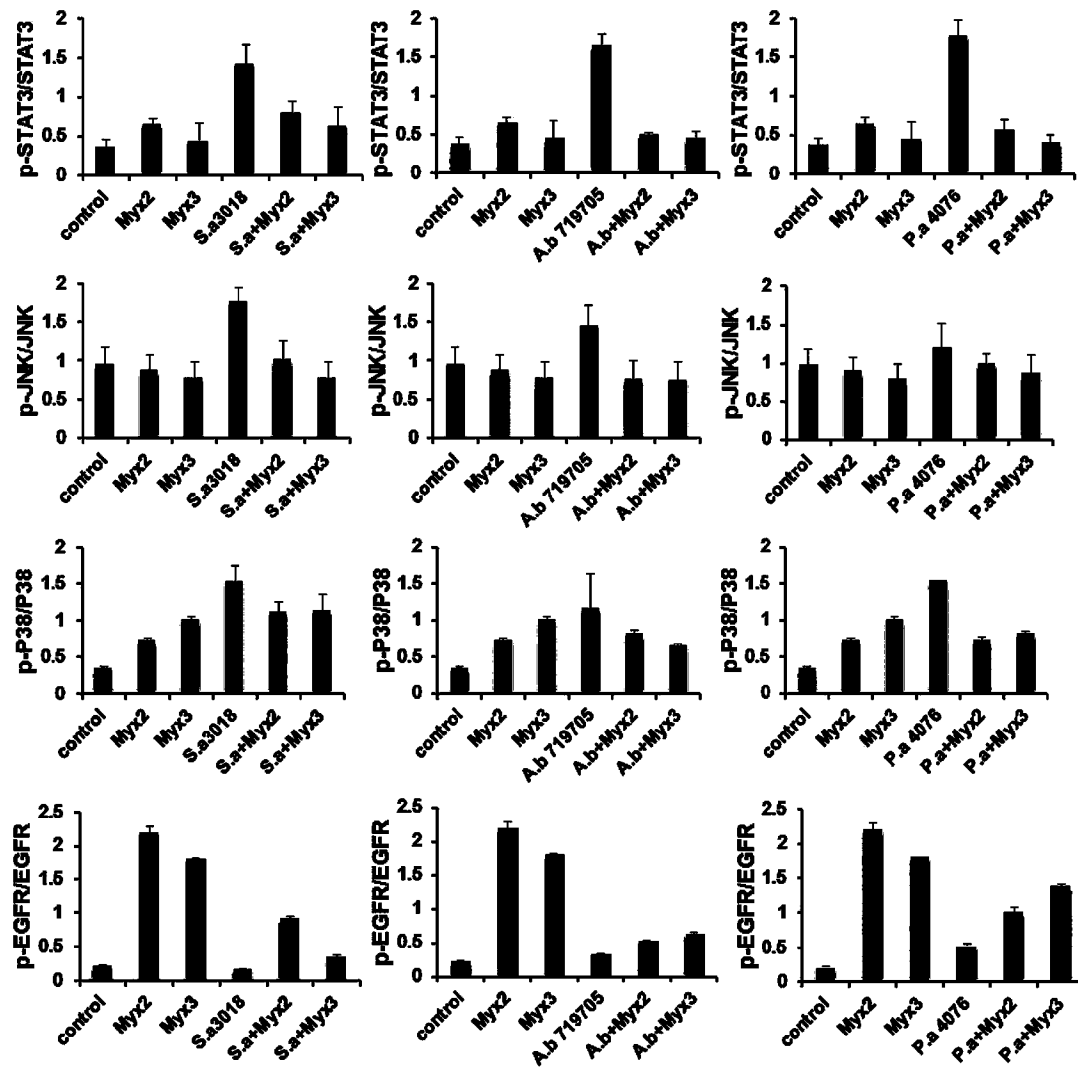
[도 3]



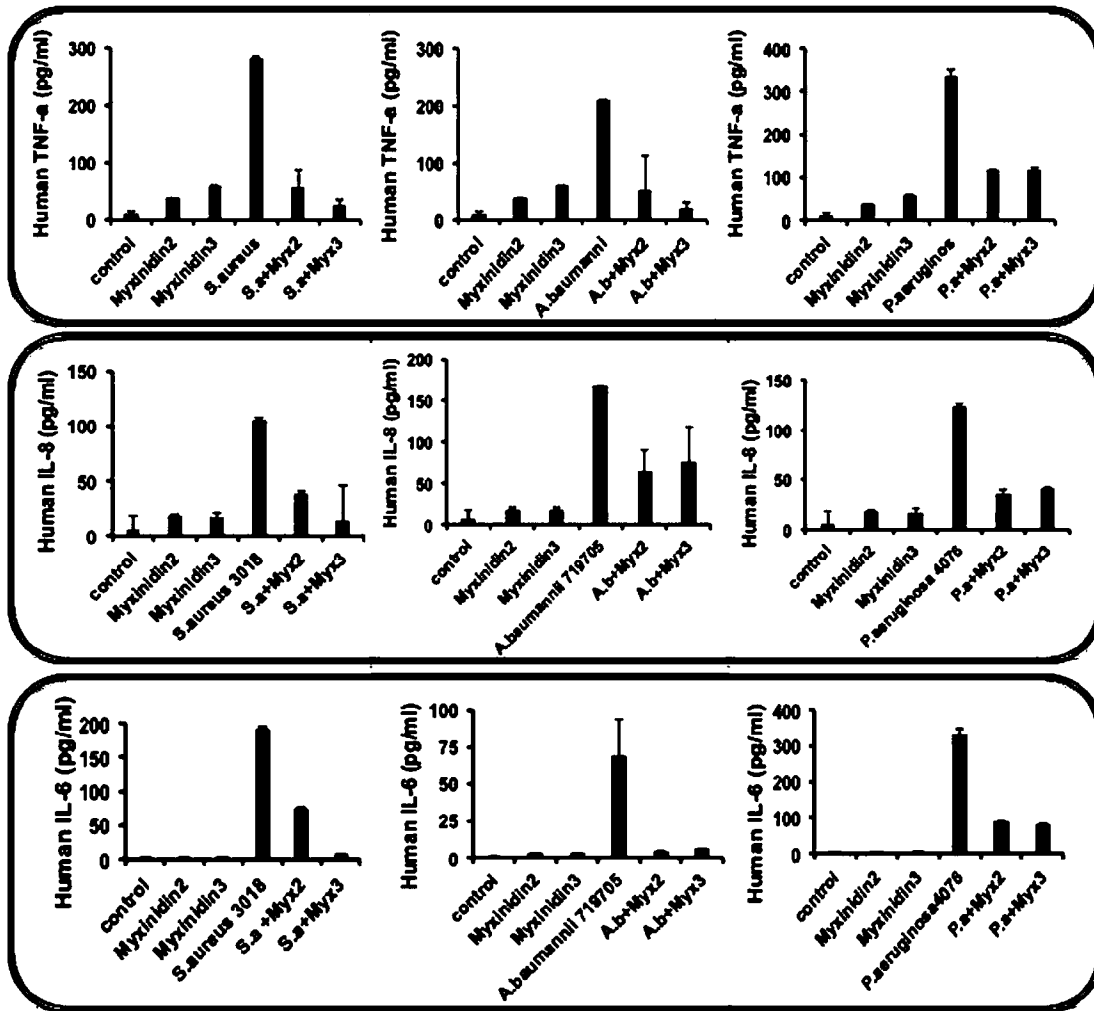
[도4]



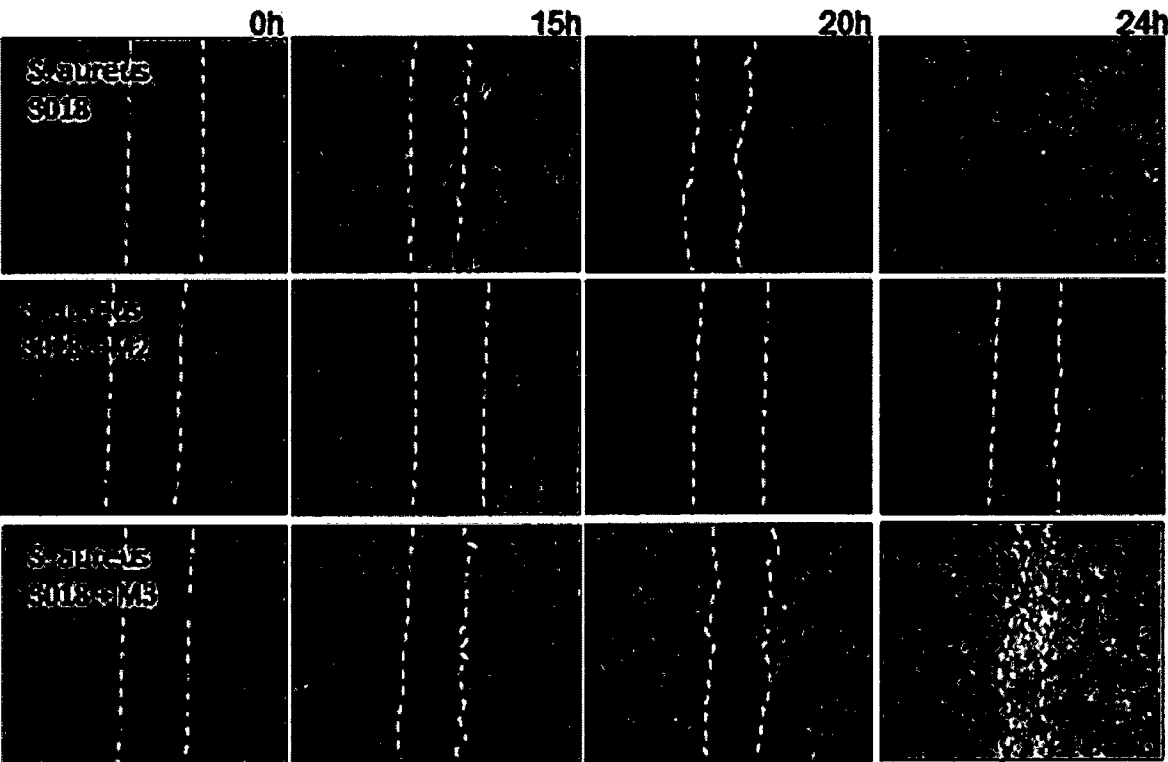
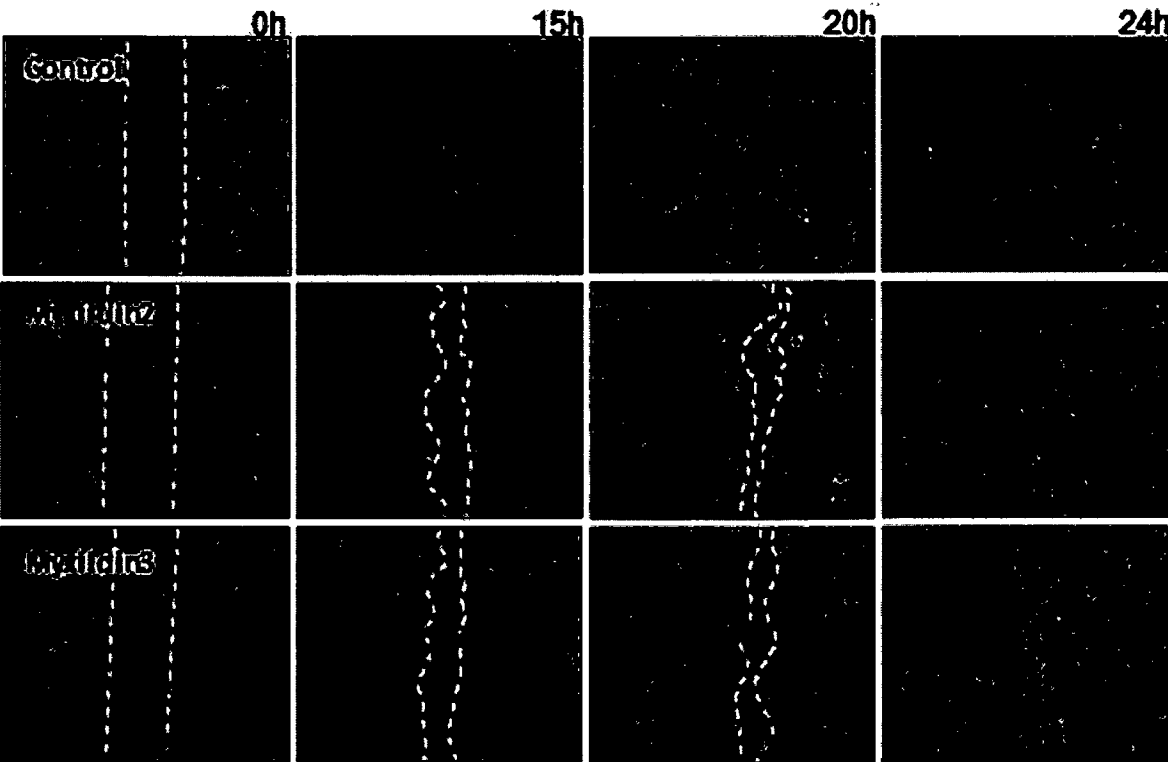
[도5]



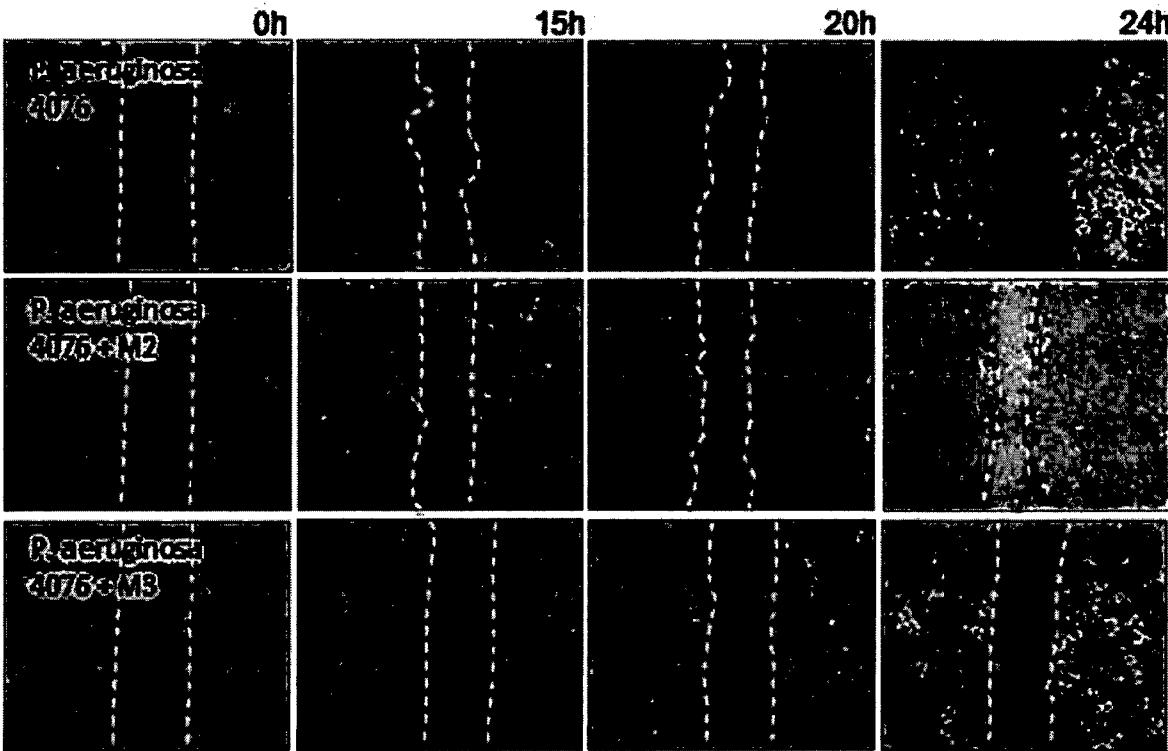
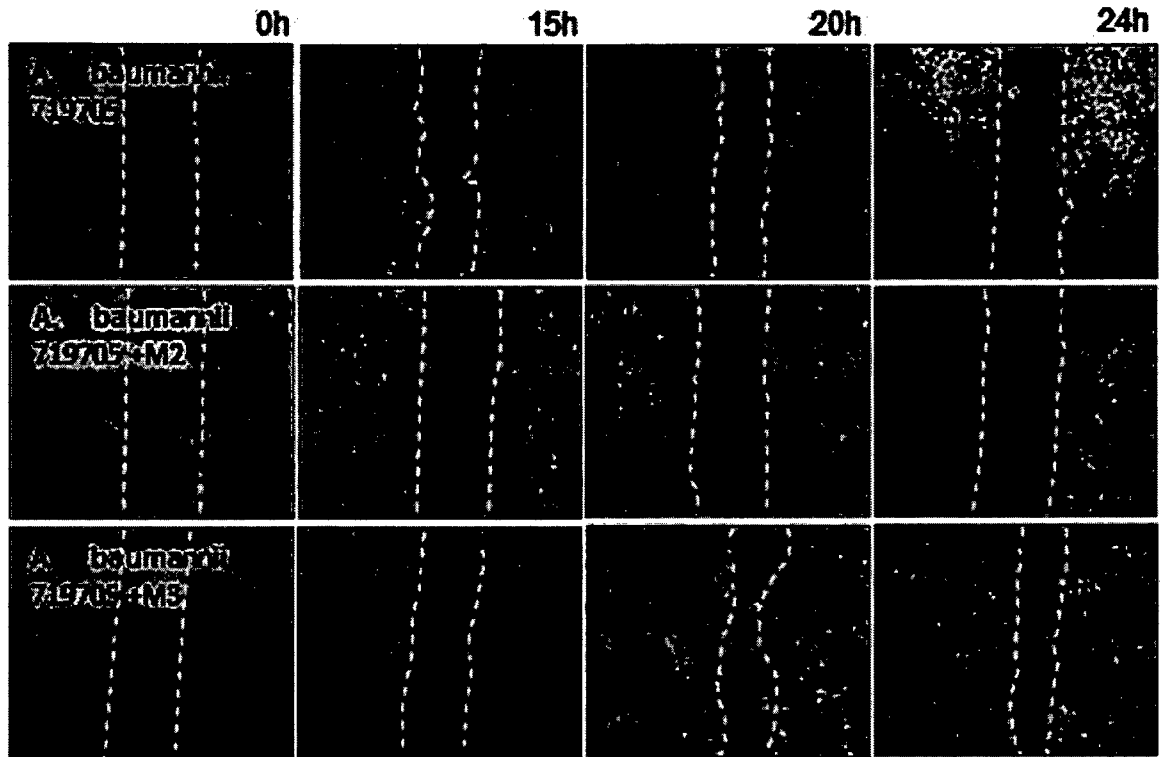
[도6]



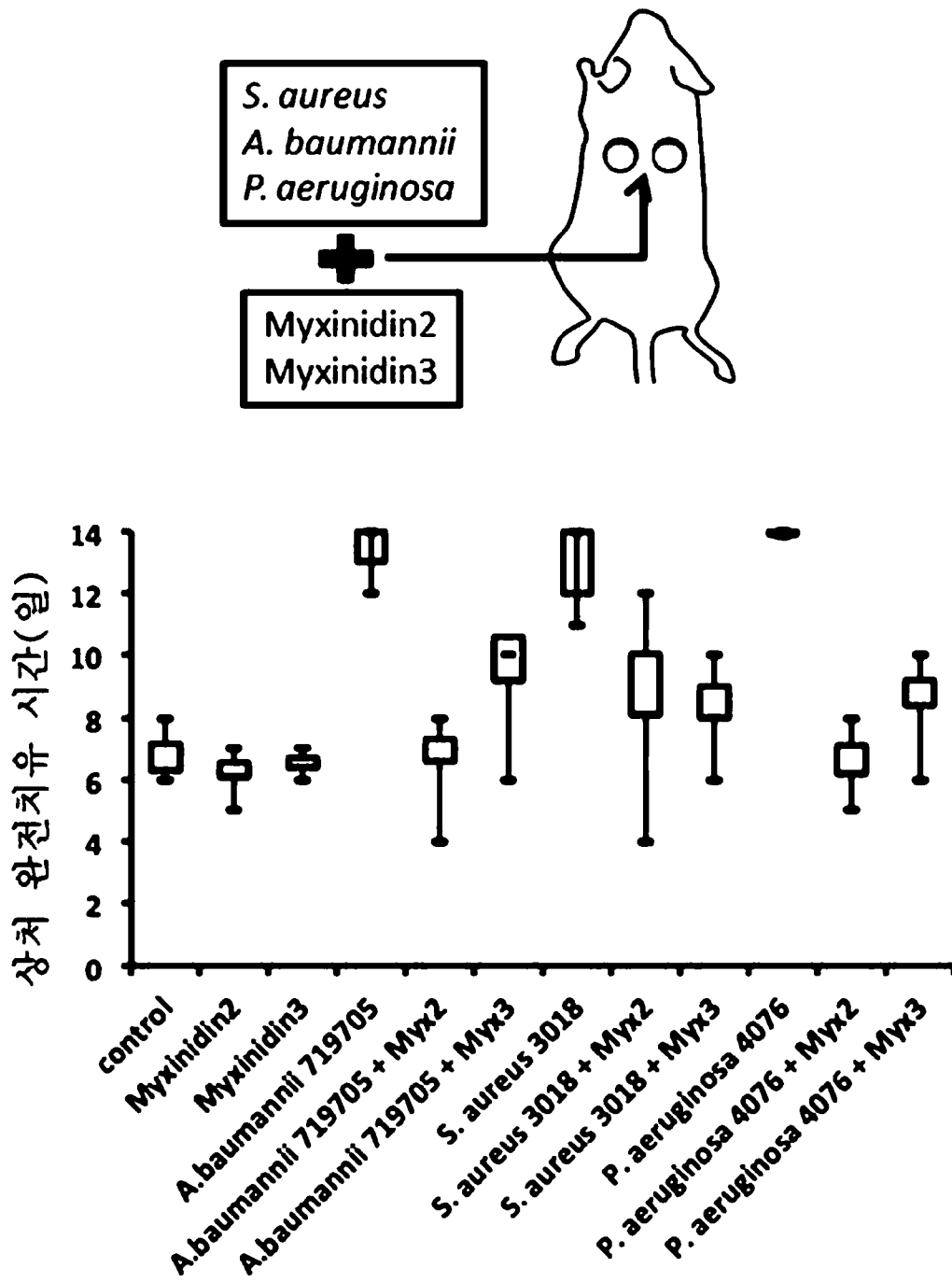
[도 7a]



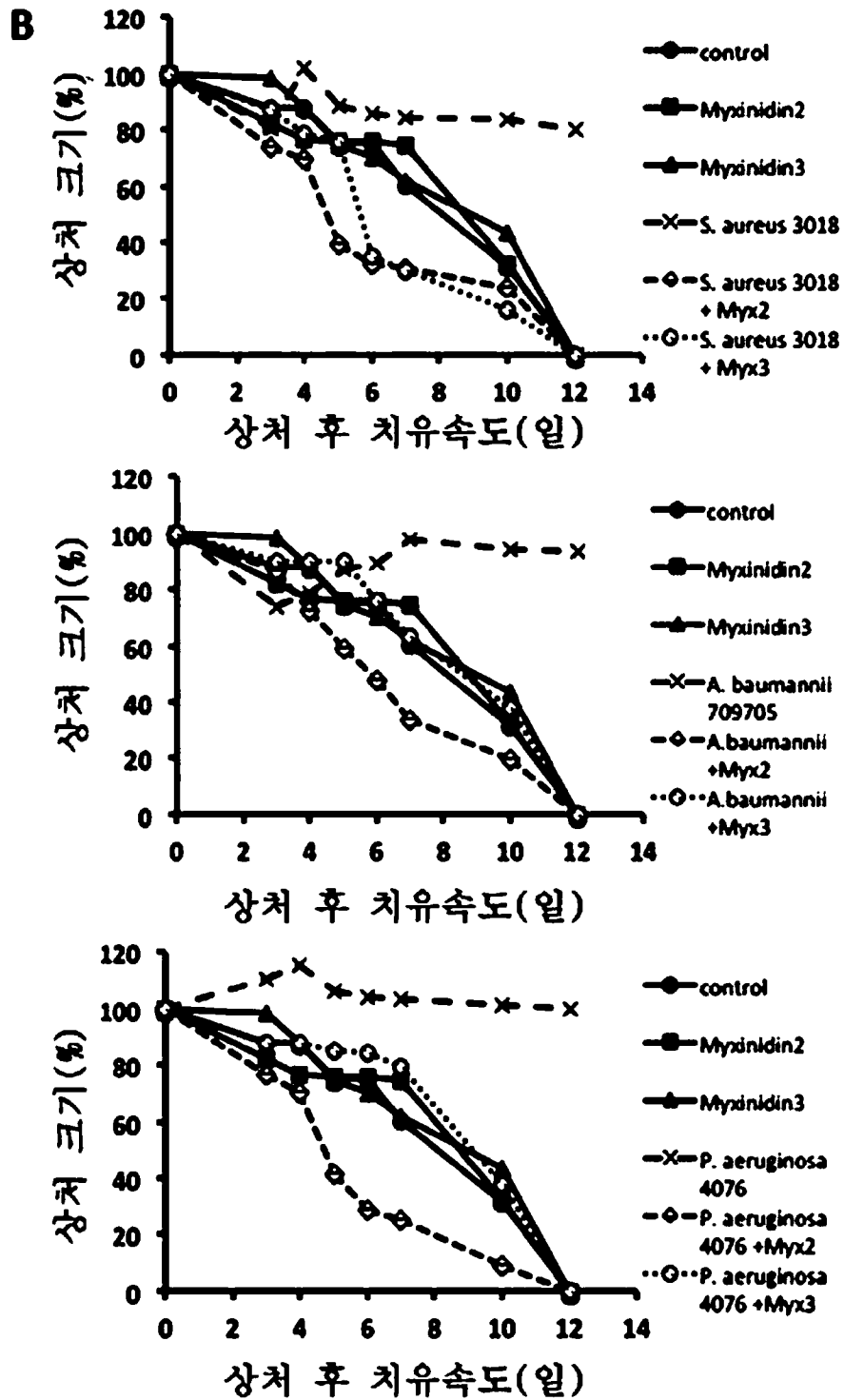
[도 7b]



[도8a]

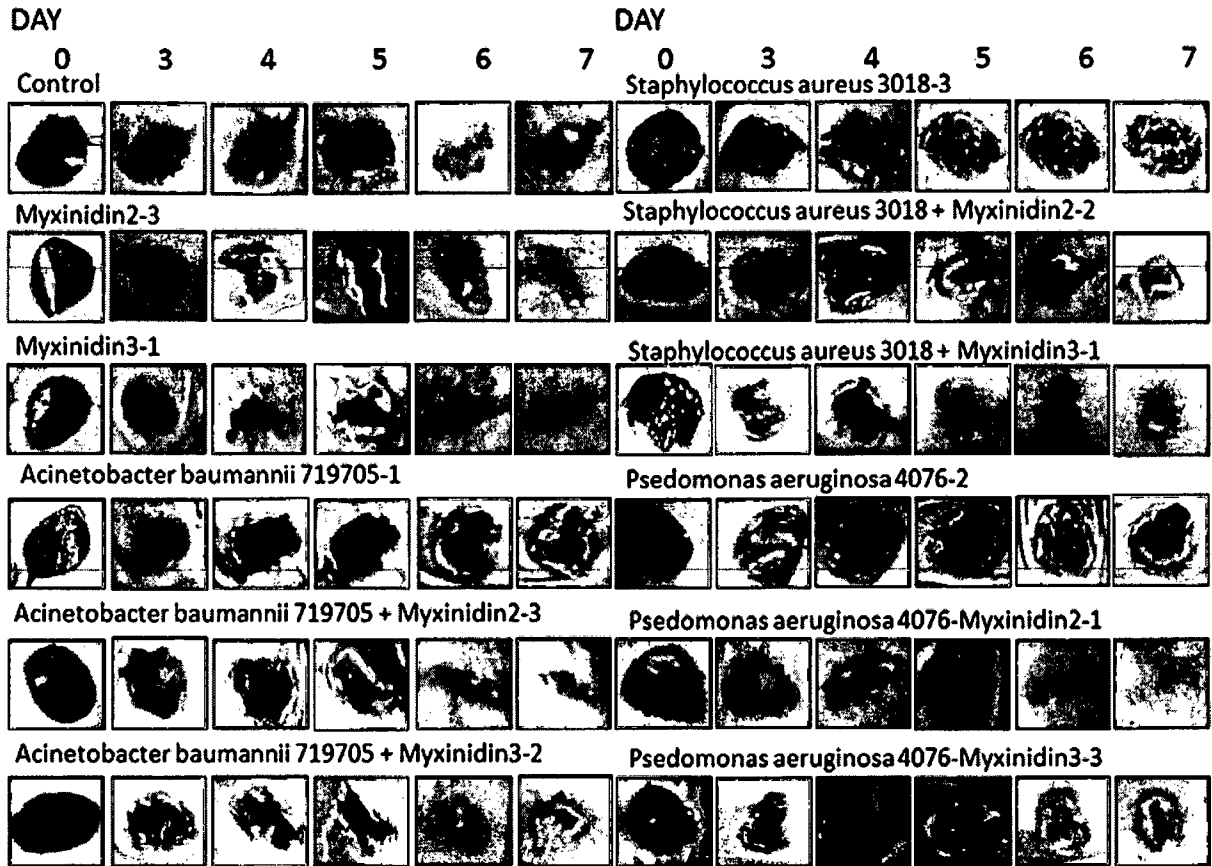
A

[도8b]

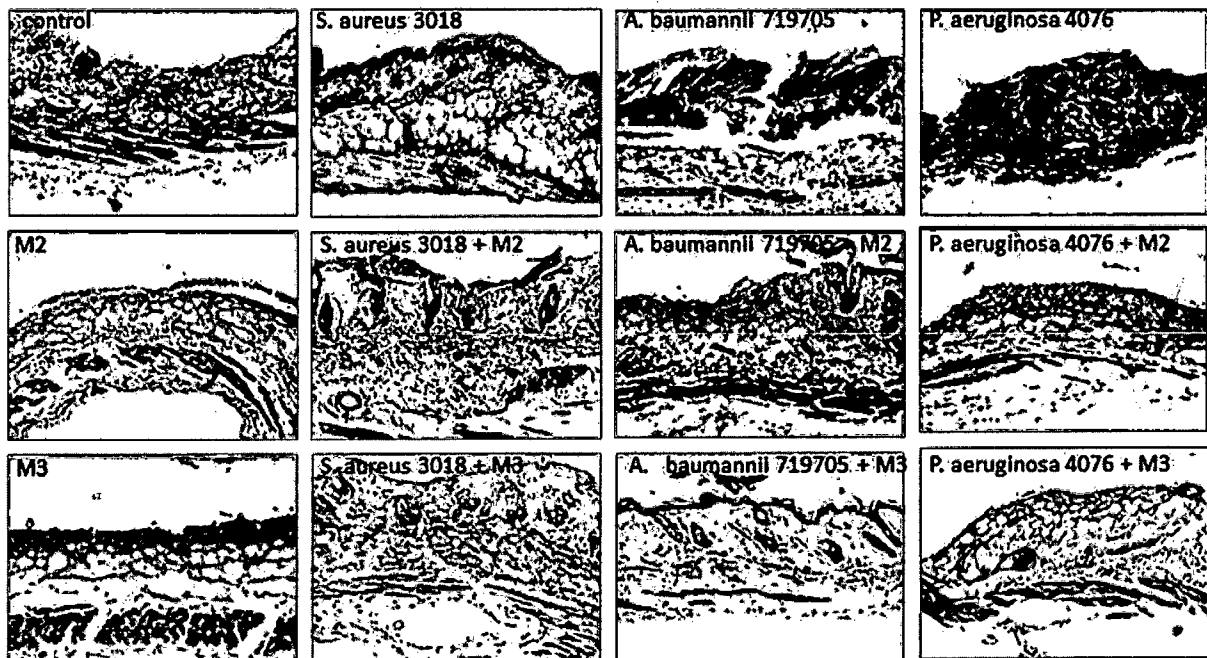


[도 8c]

C



[도 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010291**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 7/08(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A01N 37/18(2006.01)i, A23L 3/3463(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/08; C07K 14/46; C12N 15/12; A61K 38/10; A61K 8/64; A23K 20/147; A01N 37/18; A23L 3/3463

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: myxinidin, antimicrobial peptide, substitution

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CANTISANI et al., "Structural Insights into and Activity Analysis of the Antimicrobial Peptide Myxinidin", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 58, no. 9, pp. 5280-5290 (2014) See pages 5280-5282; and tables 1-2.	1-14,16-17
A	CANTISANI et al., "Structure-Activity Relations of Myxinidin, an Antibacterial Peptide Derived from the Epidermal Mucus of Hagfish", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 57, no. 11, pp. 5665-5673 (2013) See pages 5665-5667; and table 1.	1-14,16-17
A	WO 2009-149554 A1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 17 December 2009 See the entire document.	1-14,16-17
A	SUBRAMANIAN et al., "Myxinidin, a Novel Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Hagfish, Myxine Glutinosus L.", Marine Biotechnology, vol. 11, no. 6, pp. 748-757 (2009) See the entire document.	1-14,16-17
A	KR 10-2013-0109543 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 08 October 2013 See the entire document.	1-14,16-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 DECEMBER 2016 (06.12.2016)

Date of mailing of the international search report

07 DECEMBER 2016 (07.12.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010291

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HAN et al., "Design and Membrane-Disruption Mechanism of Charge-Enriched AMPs Exhibiting Cell Selectivity, High-Salt Resistance, and Anti-Biofilm Properties", Amino Acids, vol. 48, no. 2, pp. 505-522 (e-pub. 08 October 2015) See the entire document.	1-14,16-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010291

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 pertains to a method for treatment of the human body by administration, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/010291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-149554 A1	17/12/2009	NONE	
KR 10-2013-0109543 A	08/10/2013	KR 10-1384577 B1	11/04/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i, A61K 8/64(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, A23K 20/147(2016.01)i, A01N 37/18(2006.01)i, A23L 3/3463(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08; C07K 14/46; C12N 15/12; A61K 38/10; A61K 8/64; A23K 20/147; A01N 37/18; A23L 3/3463

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 마이시니딘, 항균 펩타이드, 치환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CANTISANI 등, 'Structural insights into and activity analysis of the antimicrobial peptide myxinidin' Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.58, No.9, pp.5280-5290 (2014) 페이지 5280-5282; 및 테이블 1-2 참조.	1-14,16-17
A	CANTISANI 등, 'Structure-activity relations of myxinidin, an antibacterial peptide derived from the epidermal mucus of hagfish' Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.57, No.11, pp.5665-5673 (2013) 페이지 5665-5667; 및 테이블 1 참조.	1-14,16-17
A	WO 2009-149554 A1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 2009.12.17 전체 문헌 참조.	1-14,16-17
A	SUBRAMANIAN 등, 'Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, Myxine glutinosa L.' Marine Biotechnology, Vol.11, No.6, pp.748-757 (2009) 전체 문헌 참조.	1-14,16-17
A	KR 10-2013-0109543 A (부경대학교 산학협력단) 2013.10.08 전체 문헌 참조.	1-14,16-17

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 06일 (06.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 07일 (07.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	HAN 등, ‘Design and membrane-disruption mechanism of charge-enriched AMPs exhibiting cell selectivity, high-salt resistance, and anti-biofilm properties’ Amino Acids, Vol.48, No.2, pp.505-522 (e-pub. 2015.10.08) 전체 문헌 참조.	1-14, 16-17

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15는 투여를 통한 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-149554 A1	2009/12/17	없음	
KR 10-2013-0109543 A	2013/10/08	KR 10-1384577 B1	2014/04/11