



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0107985
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0030218
(22) 출원일자 2012년03월23일
심사청구일자 2012년03월23일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
박윤경
전라남도 장성군 장성읍 남면 분향리 876-3번지
송인성
미국 아칸소 대학교 피부과 교실
(74) 대리인
이원희

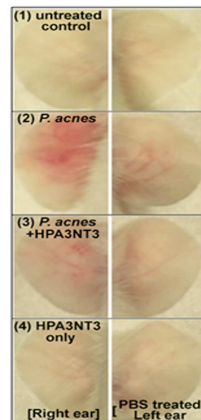
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 프로피오니박테리움 아크네스에 작용하는 신규한 항생 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 여드름을 유발하는 것으로 알려진 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대해 항균 활성을 가지는 항생 펩타이드(HPA3NT3)를 포함하는 항균용 약학적 조성물 및 항균용 화장품 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 헬리코박터 파이로리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 아미노산인 글루탐산과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환한 유사체 HPA3 펩타이드에서 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 뒤 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위의 아미노산 4개를 절단한 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 양친매성 항생 HPA3NT3 펩타이드는 프로피오니박테리움 아크네스에 대해 항균 활성을 가지며, 이로 인해 유발된 홍반, 염증 반응 및 균주의 성장을 억제하고, 사이토카인인 IL-8의 mRNA 발현 및 분비를 억제하는 활성을 가짐으로써 항균용 약학적 조성물 및 항균용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017532

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성세균에 작용하는
항균펩타이드 개발 및 제제화 연구

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대하여 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항생 펩타이드는

- 1) HP(2-20) 펩타이드의 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환하여 유사체 HPA3 펩타이드를 합성하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 HPA3 펩타이드의 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 후 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위를 절단하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 항생 펩타이드.

청구항 4

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.

청구항 5

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장품 조성물.

청구항 6

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 7항에 있어서, 상기 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 연고제, 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제 및 과립제로 구성되는 군으로부터 선택되는 제형인 것을 특징으로 하는 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항의 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 9

제 9항에 있어서, 상기 여드름 예방 또는 개선용 화장품 조성물은 크림, 로션, 스킨, 팩, 파운데이션, 비누, 화장수 및 세안품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 여드름 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 항생 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 여드름, 만성 안내염 및 포도막염을 유발하는 것으로 알려진 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대해 항균 활성을 가지는 항생 펩타이드(HPA3NT3) 및 이의 항생제 또는 항암제로의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)는 일반적인 그람 양성 세균이며 포자를 형성하지 않는 막대 모양의 미호기성 세균이다. 보통 프로피오니박테리움 아크네스는 전형적인 프로피오니박테리아(propionibacteria) 그룹과 피부질환을 일으키는 그룹으로 분류된다. 전형적인 프로피오니박테리아는 유제품 제조와 비타민 B12, 테트라 피롤(tetra pyrrole) 화합물 및 프로피온산 생산에 사용된다(Kiatpapan, P., Murooka, Y., J. Biosci. Bioeng. 93, 1-8, 2002). 피부질환과 관련된 그룹에는 프로피오니박테리움 아크네스, 프로피오니박테리움 그라놀로зум(*Propionibacterium granulosum*) 및 프로피오니박테리움 프로피오니쿰(*Propionibacterium propionicum*)이 포함된다. 이 중에서, 프로피오니박테리움 아크네스는 여드름과 만성 안내염 및 포도막염과 같은 질병을 유발한다(Csukas, Z., et al., Microbial. Pathog. 36, 171-174, 2004). 그 중 여드름은 가장 일반적인 피부질환이다.

[0003] 의학적 명칭으로 심상성 좌창이라고 불리는 여드름은 특히 2차 성성숙이 있는 청소년기에 주로 발병하는 피부질환으로서 11살에서 30세 사이에 약 80%가 발병하고, 30대 이후에서도 약 6%의 환자가 있는 것으로 보고되어 있으며, 최근 들어 스트레스에 의한 여드름이 20대 이후 발병하는 경우도 있다. 여드름의 1차적인 요인으로는 피지증가 및 성성숙기에 증가된 호르몬이다. 이에 의해서 초기여드름이 유발되는데, 특히 테스토스테론이 가장 주요한 호르몬으로서 인지된다. 호르몬은 피지선을 자극하여 피지의 생성을 증가하게 만들며, 생성된 피지는 초기분비시에 트리글리세올로 구성되나 점차 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)의 세포외 효소(Extracellular enzyme) 중 하나인 리파아제(lipase)에 의해서 유리지방산과 글리세올로 분해된다. 피부의 유리지방산 중 상기 세균에 의한 것이 95%를 차지하며 이는 미세면포의 형성과 염증반응을 유도한다. 프로피오니박테리움 아크네스의 세포외 효소에는 리파아제(lipase), 프로테아제(protease), 하이아루로니다제(hyaluronidase) 등이 대표적으로 존재하며 이것은 여드름의 진행에 있어서 중요한 영향을 미친다. 여드름 발명의 2차적인 요인으로는 프로피오니박테리움 아크네스의 작용으로 생성되는 유리지방산 및 호르몬의 영향을 받은 피부의 과각화와 피지의 과잉분비로 인한 누두부의 폐쇄이다. 이로 인해서 혐기성세균인 프로피오니박테리움 아크네스의 증식이 용이하게 된다. 3차적으로 상기의 과정을 통해서 혐기성 세균인 프로피오니박테리움 아크네스의 수가 증가된다. 이 세균에 의해서 생성된 유리지방산은 생체 내 염증반응을 유도하여 면포성 여드름에서 농포성 여드름으로 발전하게 된다. 이상이 여드름을 유발하는 가장 중요한 요인이지만, 이 외에 스트레스로 인한 신경단백체의 작용, 유전적 요인, 화장품, 과각화를 유발하는 열과 습기, 자외선등의 요인도 여드름 발생과 관련이 깊다. 이 중 신경단백체의 일종인 서브스텐스 피(substance P)는 피부말단에서 지방과 피지의 생성에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다. 종래의 여드름 치료는 프로피오니박테리움 아크네스균을 죽이는 항생제나 피지의 과잉 생산을 억제하기 위한 방법들이 주를 이루며, 기존약제로는 테트라사이클린, 미노사이클린, 독시사이클린, 에리스로마이신, 클린다마이신, 이소트레티노인, 트레티노인, 스피로락톤이 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 그 외에 새로운 연구개발분야는 주로 안드로겐 길항제와 레티노이드에 치중되어 있으며, 안드로겐 길항제로서 5-알파-환원효소 길항제(5 α -reductase inhibitor) 계통의 연구가 진행중이다. 상기와 같은 기존의 여드름 치료제가 개발 되어 있지만 여드름은 그 원발적 원인이 다양하기 때문에 근본적인 치료제의 개발은 힘든 상황이다. 이에 상당부분의 연구는 여드름을 심화시키는 원인인 프로피오니박테리움 아크네스의 억제 쪽으로 진행되고 있고, 이에 의해서 항생제의 사용이 보편화되고 있는 실정이다. 그러나 드레노 비 등(2001)은

심화된 여드름 환자에서 에리스로마이신에 대한 내성 균주를 보고하였고, 탄 등(2001)은 에리스로마이신에 내성을 갖는 균주는 클린다마이신에도 내성을 갖는 것을 보고하는 등 항생제에 대한 내성 균주가 보고되고 있지만 이를 해결하기 위한 연구는 미진한 편이다.

[0004] 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(Stuart B. Levy, *Scientific American*, **1998**, 46-53).

[0005] 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.

[0006] 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(Handwerger and Tomasz, *Rev. Infect. Dis.*, **1985**, 7, 368-386). 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건으로 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(Liu and Tomasz, *J. Infect. Dis.*, **1985**, 152, 365-372), 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

[0007] 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두 가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며(Tuomanen E., *Revs. Infect. Dis.*, **1986**, 3, S279-S291), 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 용혈을 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(Tuomanen et al., *J. infect. Dis.*, **1988**, 158, 36-43).

[0008] 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 약학적 조성물을 제공하는 것이 필요하다.

[0009] 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리옌(bacteriocin)들은 구조적으로 세부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이옌티크스(lantibiotics)이며 두 번째는 비란티바이옌티크스(nonlantibiotics)이고 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다(Cintas et al., *J. Bad.*, **1998**, 180, 1988-1994). 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데(Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, **1990**, 59, 395-414), 상기의 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나뉘어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-시트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α-회전형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **1998**, 9, 269-280). 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., *Cell*, **1991**, 65, 205;

Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, **1995**, 13, 61). 이러한 항생 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많은 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다.

[0010] 이러한 펩타이드 중에서도 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되었다. 지금까지 보고된 양친화성 펩타이드로는 마가이닌 2(magainin 2, MA), 세크로핀 A(cecropin A, CA) 및 멜리틴(melittin, ME) 펩타이드 등이 있다.

[0011] 세크로핀 계열의 양친화성 펩타이드는 초파리에서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은 창자에서도 발견되었는데, 세크로핀 A는 항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었으며(Boman, H. G. and Hultmark, D., *Annu. Rev. Microbiol.*, **1987**, 41, 103), 또한 마가이닌 2 펩타이드는 세포독성이 없으면서 항균활성과 함께 항진균, 항암 및 항-원생동물 효과가 있다고 알려져 있다(Zasloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 5449).

[0012] 아울러, 이러한 두 펩타이드의 일부 서열들을 재조합시킨 접합 펩타이드(conjugation peptide)를 제조하여 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드를 제조할 수 있음이 알려져 있다(Chan, H. C., et al., *FEBS Lett.*, **1989**, 259, 103; Wade, D., et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1992**, 40, 429).

[0013] 이에, 본 발명자들은 HP(2-20) 펩타이드 및 HPA3 펩타이드를 주형으로 하여 소수성 아미노산을 트립토판 및 양이온을 함유하는 라이신 아미노산으로 치환한 신규한 합성 펩타이드를 설계하고 합성하였으며, 합성된 합성 펩타이드가 여드름 유발 세균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대해 항균활성이 있음을 확인하여 상기 합성 펩타이드가 항균용 약학적 조성물 및 항균용 화장품 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 신규한 항생 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물 또는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 또는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 신규한 항생 펩타이드를 제공한다.

[0018] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.

[0019] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장품 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 아울러, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 항균용 펩타이드는 여드름, 만성 안내염 및 포도막염을 유발하는 것으로 알려진 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대해 항균 활성을 가짐을 *in vivo*로 확인하였으며, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)로 인해 발생한 홍반, 염증 및 상피 군주의 성장을 억제하며 사이토카인인 IL-8의 mRNA 발현과 분비를 억제함을 *in vivo*로 확인하였으므로 본 발명에 따른 항생 펩타이드(HPA3NT3)를 항생제, 항균용 화장품 조성물, 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 여드름 예방 또는 개선용 화장품 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1a는 마우스 귀에서 HPA3NT3 펩타이드의 *P. acnes*에 의해 유도된 홍반에 대한 억제 효과를 광학현미경으로 확인한 사진이다;

[Right ear]: 마우스의 오른쪽 귀;

(1) untreated control: 대조군;

(2) *P. acnes*: 프로피오니 박테리움 아크네스 군주를 주사한 양성 대조군;

(3) *P. acnes*+HPA3NT3: 프로피오니 박테리움 아크네스 군주 및 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드를 함께 주사한 실험군;

(4) HPA3NT3 only: 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드만을 주사한 음성 대조군; 및

[PBS treated Left ear]: PBS 만을 주사한 마우스의 왼쪽 귀.

도 1b는 *P. acnes*에 의해 유도된 염증에 따른 마우스의 귀의 두께를 주사 후 24시간, 48시간 및 72시간 뒤에 마이크로타이터를 이용해 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1c는 *P. acnes*를 주사한 마우스의 귀에서 추출한 생검 시료를 아가 플레이트에서 배양한 후 *P. acnes*의 CFU를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 인간 각질세포에서 *P. acnes* 감염에 의한 IL-8의 mRNA 발현 정도를 Real-time RT-PCR로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다;

HK control: 인간 각질세포에 아무것도 처리하지 않은 대조군;

HK+*P. acnes*: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 양성 대조군;

HK+*P. acnes*+HPA3NT3: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 후 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 실험군; 및

HK+*P. acnes*+HPN3: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 후 HPN3 펩타이드를 처리한 음성대조군.

도 2c는 인간 각질세포에서 *P. acnes* 감염에 의한 IL-8의 분비 정도를 ELISA로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다;

HK control: 인간 각질세포에 아무것도 처리하지 않은 대조군;

HK+*P. acnes*: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 양성 대조군;

HK+*P. acnes*+HPA3NT3: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 후 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 실험군;

HK+*P. acnes*+HPN3: 인간 각질세포에 *P. acnes*를 감염시킨 후 HPN3 펩타이드를 처리한 음성대조군;

HPA3NT3: 인간 각질세포에 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 대조군; 및

HPN3: 인간 각질세포에 HPN3 펩타이드를 처리한 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 항생 펩타이드를 제공한다.
- [0026] 상기 항생 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 HP(2-20) 펩타이드의 소수성 아미노산을 트립토판으로 치환한 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 HPA3 펩타이드의 소수성 아미노산이 양이온을 함유하는 라이신 아미노산으로 치환되고 C-말단이 절단된 항생 펩타이드인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 항생 펩타이드는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; *P. acnes*)에 대하여 항균 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명은
- [0029] 1) HP(2-20) 펩타이드의 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환하여 유사체 HPA3 펩타이드를 합성하는 단계; 및
- [0030] 2) 단계 1)의 HPA3 펩타이드의 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 후 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위를 절단하는 단계를 포함하는
- [0031] 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 상기 여드름 예방 및 치료용 약학적 조성물은 연고제, 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 용액제, 젤, 페이스트, 첵포제 및 과립제로 구성되는 군으로부터 선택되는 제형인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명자들은 신규한 항생 펩타이드를 제조하기 위하여, 헬리코박터 파이로리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드(서열번호 1)의 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환한 유사체 HPA3 펩타이드(서열번호 2)를 합성한 뒤, HPA3에서 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 후 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위의 아미노산 4개를 절단하여 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 양친매성 항생 HPA3NT3 펩타이드(peptide)를 합성하였다.
- [0036] 또한, 본 발명자들은 HPA3NT3 펩타이드가 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)에 대해 항균 활성을 가지는지 확인하기 위하여 MIC 값을 측정한 결과, 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*) ATCC11828 균주 및 ATCC6919 균주에서 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드는 양성 대조군인 HP(2-20)에 비해 약 2배, 음성 대조군인 HPN3에 비해 약 12배 이상의 높은 항균 활성 나타냈으며, *P. acnes*에 의해 유도된 홍반에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 효과를 생체 내에서(*in vivo*) 확인한 결과, HPA3NT3 펩타이드가 *P. acnes*에 의해 유도된 홍반을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 1a). 또한, *P. acnes*에 의해 유발된 염증반응을 마우스 귀의 두께로 측정한 결과, HPA3NT3 펩타이드에 의해 염증이 감소함을 알 수 있었으며(도 1b), 상기 귀에서 채취한 생검 시료를 배양한 결과 *P. acnes* 균주의 CFU/mg가 HPA3NT3 펩타이드에 의해 현저히 감소함을 확인하여 HPA3NT3 펩타이드가 *P. acnes*의 성장 또한 억제함을 확인하였다(도 1c 참조). 아울러, *P. acnes*에 의해 유발된 사이토카인 IL-8의 mRNA 발현을 HPA3NT3 펩타이드가 억제함을 Real-time RT-PCR로 확인하였으며(도 2a 참조), IL-8의 분비 또한 억제함을 ELISA 분석을 통해 알 수 있었다(도 2b 참조).
- [0037] 그러므로, 본 발명의 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA) 및 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 서열번호 1의 펩타이드(CA-MA)를 주형으로 하여 아미노말단 부위에 플러스 전하를 띤 아미노산과 소수성 성질을 띤 아미노산의 배열을 가지는 항생 펩타이드 HPA3NT3는 여드름을 유발하는 것으로 알려진 세균 프로피오니 박테리움

아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*)에 대하여 항균 활성이 있으며, 이에 의해 유발되는 염증 또는 사이토카인의 발현 및 분비를 억제함을 생체내에서 확인하였으므로 항생제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 신규한 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0039] 즉, 본 발명의 신규한 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 신규한 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 담체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 신규한 펩타이드의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규 펩타이드의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple does)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 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0043] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0044] 아울러, 항생 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0045] 상기 여드름 예방 및 개선용 화장료 조성물은 크림, 로션, 스킨, 팩, 파운데이션, 비누, 화장수 및 세안품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 본 발명의 신규한 항생 펩타이드 HPA3NT3는 여드름 유발 세균인 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*)에 대하여 항균 활성 및 이로 인한 염증 억제 효과를 나타냄을 생체내에서 확인하였으므로 여드름 예방 또는 치료를 위한 항균용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분으로 상기 신규한 펩타이드 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0048] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 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(세안품), 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수

있다.

- [0049] 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.
- [0050] 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 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0051] 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, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0052] 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.
- [0053] 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.
- [0054] 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 식품이나 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 화장품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 화장품 및 의약품 보존제의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0056] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예 1> 재조합 펩타이드의 합성
- [0058] 본 발명자들은 HP(2-20)과 HPA3 펩타이드를 변형하여 플러스 전극과 소수성 영역이 증가된 항생 펩타이드(antimicrobial, AMP)인 HPA3NT3 펩타이드를 합성하였다.
- [0059] 구체적으로, 헬리코박터 파이로리로부터 유래된 펩타이드로 양친화성을 갖고 항생 활성을 갖는 모체 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환하여 유사체 HPA3 펩타이드를 합성한 후, 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환하고 HPA3 펩타이드에서 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위의 아미노산 4개를 절단하였다.
- [0060] 그 결과, 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 HPA3NT3 펩타이드가 합성되었다(표 1).

표 1

[0061]

펩타이드명	서열	분자량	서열번호
HP(2-20)	AKKVFKRLEKLFSKIQNDK-NH ₂	2320.0	1
HPA3	AKKVFKRLEKLFSKIWNWK- NH ₂	2449.2	2
HPA3NT3	FKRLKKLFKKIWNWK- NH ₂	2062.6	3

[0062] <실험예 1> HPA3NT3 펩타이드의 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*)에 대한 생육 억제 활성 확인

[0063] 본 발명자들은 HPA3NT3 펩타이드가 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*)에 대해 항균 활성을 가지는지 확인하기 위하여 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 MIC 값을 측정하였다.

[0064] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 제조한 HPA3NT3 펩타이드의 항균 활성을 측정하기 위하여, 여드름 유발균으로 알려진 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*) ATCC11828 균주 및 ATCC6919 균주를 사용하였다. 상기 두 균주를 Sabouraud dextrose 배지(0.1% glycerol, 0.5% Tween 80, 0.8% olive oil)에서 배양한 다음 2×10^5 세포/ml의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트리이트 플레이트에 접종하였다. 상기 <실시예 2>에서 합성한 펩타이드, 양성 대조군인 HP(2-20) 항생 펩타이드 및 음성 대조군인 HPN3 펩타이드를 각각 200 μ M/웰(well) 부터 1/2배씩 과산화벤조일(BPO)에 각각 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 18 내지 24시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트리이트 플레이트(microtiter plate) 판독기를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였다.

표 2

항생 펩타이드(AMPs)	최소생육저지 농도(MIC: μ M)	
	<i>P.acnes</i> ATCC11828	<i>P.acnes</i> ATCC6919
HPA3NT3	0.78	0.78
HP(2-20)	1.6	1.6
HPN3	> 10	> 10
BPO	150	150

[0066] 그 결과, 상기 표 1에서 보는 바와 같이 프로피오니 박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*, *P.acnes*) ATCC11828 균주 및 ATCC6919 균주에서 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드는 양성 대조군인 HP(2-20)에 비해 약 2배, 음성 대조군인 HPN3에 비해 약 12배 이상의 높은 항균 활성 나타냈다는 것을 확인하였다(표 1).

[0067] <실험예 2> HPA3NT3 펩타이드의 생체 내에서의 *P.acnes* 감염에 대한 억제 효능 확인

[0068] <2-1> HPA3NT3 펩타이드의 *P.acnes*에 의한 홍반 억제 효과 확인

[0069] 본 발명자들은 *P.acnes*에 의해 유도된 홍반에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 효과를 생체 내에서(*in vivo*) 확인하였다.

[0070] 구체적으로, 2×10^8 CFU/20 μ l의 *P.acnes* 균주, 6.4 μ M의 HPA3NT3 펩타이드, 또는 *P.acnes* 균주 및 HPA3NT3 펩타이드를 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 피내 주사하였고 왼쪽 귀에는 20 μ l의 PBS 만을 주사하였다. 음성 대조군 마우스는 오른쪽 귀에는 아무것도 처리하지 않았고 왼쪽 귀에는 실험군 마우스와 동일하게 20 μ l의 PBS를 주사하였다. 주사 24시간 후, 마우스들의 귀에 발생한 홍반을 광학현미경으로 확인하였다.

[0071] 그 결과, *P.acnes* 균주만을 주사한 마우스의 귀에서보다 *P.acnes* 균주 및 HPA3NT3 펩타이드를 함께 주사한 마우스의 귀에서 홍반(erythema)이 적게 관찰되었다(도 1A).

[0072] <2-2> HPA3NT3 펩타이드의 *P.acnes*에 의한 염증 억제 효과 확인

[0073] 본 발명자들은 *P.acnes*에 의해 발생한 염증에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 효과를 확인하기 위하여 *P.acnes*를 주사한 후 마우스의 귀 두께를 측정하였다.

[0074] 구체적으로, 2×10^8 CFU/20 μ l의 *P.acnes* 균주, 6.4 μ M의 HPA3NT3 펩타이드, 또는 *P.acnes* 균주 및 HPA3NT3 펩타이드를 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 피내 주사하였고 왼쪽 귀에는 20 μ l의 PBS 만을 주사하였다. 음성 대조군 마우스는 오른쪽 귀에는 아무것도 처리하지 않았고 왼쪽 귀에는 실험군 마우스와 동일하게 20 μ l의 PBS를 주

사하였다. 주사 24시간, 48시간 및 72시간 후, 음성 대조군 마우스들의 왼쪽 귀 두께 대비 실험군 마우스들 각각의 오른쪽 귀의 두께를 마이크로캘리퍼(microcaliper)를 이용하여 측정하였다. 유발된 염증 비율은 실험군 각각에 대해 실험군 마우스의 귀의 두께/음성대조군 마우스의 귀의 두께의 백분율로 계산되었다.

[0075] 그 결과, *P.acnes* 균주만을 주사한 마우스의 귀의 두께보다 *P.acnes* 균주 및 HPA3NT3 펩타이드를 함께 주사한 마우스의 귀의 두께가 감소하였으며, 이를 통해 *P.acnes* 균주에 의해 유발된 염증 정도가 HPA3NT3 펩타이드에 의해 감소함을 알 수 있었다(도 1B).

[0076] <2-3> HPA3NT3 펩타이드의 *P.acnes* 성장 억제 효과 확인

[0077] 본 발명자들은 *P.acnes*의 성장에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 억제 효과를 *P.acnes*를 주사한 마우스의 귀에서 채취한 생검 시료를 배양하여 확인하였다.

[0078] 구체적으로, 2×10^8 CFU/20 μ l의 *P.acnes* 균주, 6.4 μ M의 HPA3NT3 펩타이드, 또는 *P.acnes* 균주 및 HPA3NT3 펩타이드를 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 피내 주사하였고 왼쪽 귀에는 20 μ l의 PBS 만을 주사하였다. 음성 대조군 마우스는 오른쪽 귀에는 아무것도 처리하지 않았고 왼쪽 귀에는 실험군 마우스와 동일하게 20 μ l의 PBS를 주사하였다. 주사 24시간 후, 마우스의 귀를 8 mm 펀치로 펀칭하여 250 μ l의 PBS에 넣어 조직 그라인더(tissue grinder)로 분쇄하였다. 상기 분쇄물을 아가 플레이트에 계열 희석(serial dilution) 후 배양하여 *P.acnes* 균의 CFU를 확인하였다. 각각 3번의 실험의 모든 값은 mean $\pm$ SD를 나타낸다.

[0079] 그 결과, *P.acnes* 균주만을 주사한 군에 비해 *P.acnes* 균주와 HPA3NT3 펩타이드를 함께 주사한 군에서의 *P.acnes* 균주의 CFU/mg가 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 1C).

[0080] 따라서, HPA3NT3 펩타이드가 *P.acnes* 균의 성장을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0081] <실험예 3> 인간 각질세포에서 *P.acnes* 감염에 의해 유도된 IL-8에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 억제 효능 확인

[0082] <3-1> HPA3NT3 펩타이드의 *P.acnes* 감염에 의한 IL-8 mRNA의 발현 억제 효과

[0083] 본 발명자들은 인간 각질세포(keratinocyte)에서 HPA3NT3 펩타이드에 의한 급성 염증 반응시 호중구를 활성화하는 IL-8의 mRNA 발현 억제 효과를 Real-time RT-PCR로 측정하였다.

[0084] 구체적으로, 인간 각질세포를 *P.acnes* 균주 2×10^8 CFU/ml로 24시간 동안 감염시켰고, 감염 24시간 후 HPA3NT3 펩타이드 3.2 μ M 또는 음성대조군 HPN 펩타이드 3.2 μ M이 24시간 동안 처리되었다. 그 후, 각질세포에서 추출한 총 RNA를 이용하여 IL-8의 mRNA의 발현 정도를 Real-time RT-PCR로 측정하였다.

[0085] 그 결과, *P.acnes* 균이 감염에 의해 증가한 IL-8의 mRNA의 발현량이 HPA3NT3 펩타이드에 의해 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 2A).

[0086] <3-2> HPA3NT3 펩타이드의 *P.acnes* 감염에 의한 IL-8 mRNA의 분비 억제 효과

[0087] 본 발명자들은 인간 각질세포(keratinocyte)에서 HPA3NT3 펩타이드에 의한 급성 염증 반응시 호중구를 활성화하는 IL-8의 분비 억제 효과를 ELISA를 이용하여 측정하였다.

[0088] 구체적으로, 인간 각질세포를 *P.acnes* 균주 2×10^8 CFU/ml로 24시간 동안 감염시켰고, 감염 24시간 후 HPA3NT3 펩타이드 3.2 μ M 또는 음성대조군 HPN 펩타이드 3.2 μ M이 24시간 동안 처리되었다. 감염 24시간 후 인간 각질세포의 배양액을 수득하였다. 아무것도 처리하지 않은 인간 각질세포의 배양액, *P.acnes* 균주로 감염시킨 세포 배양액, HPA3NT3 펩타이드를 처리한 배양액 및 음성대조군인 HPN 펩타이드를 처리한 배양액을 이용하여 ELISA 분석을 수행하였다. 모든 실험은 각각 3회씩 반복되었고 모든 값은 mean $\pm$ STDEV를 나타낸다.

[0089] 그 결과, 인간 각질세포에 *P.acnes* 균주로 감염시킨 양성대조군의 IL-8의 분비가 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하였으며, 이를 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 경우 유의적으로 월등히 감소함을 확인할 수 있었다. 음성대조군인 HPN 펩타이드를 처리한 경우에는 IL-8의 분비가 거의 변화가 없었음을 확인하였다(도 2B).

[0090] <실험예 4> HPA3NT3 펩타이드의 세포 독성 측정

[0091] 본 발명자들은 본 발명의 합성 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 합성 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다.

[0092] 사람의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고 여기에 12.5 M/웰부터 1/2의 농도로 합성 펩타이드를 연속적으로 희석하여 37에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1,000 g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 이때, 양성대조군으로는 멜리틴을 사용하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤-X100을 첨가하여 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 합성 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

수학식 1

$$\% \text{ 적혈구 파괴능(hemolysis)} = \left(\frac{\text{흡광도 A} - \text{흡광도 B}}{\text{흡광도 C} - \text{흡광도 B}} \right) \times 100$$

[0093]

[0094] 상기 식에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액의 흡광도, 흡광도 B는 414 nm 파장에서 PBS의 흡광도 및 흡광도 C는 414 nm 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

[0095] 상기 식에 의한 적혈구 파괴능의 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0096] HPA3NT3 펩타이드의 세포 독성 측정

펩타이드	% 적혈구 파괴능 (M)							
	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097
HPA3NT3 펩타이드	0	0	0	0	0	0	0	0
멜리틴	100	100	95	93	31	0	0	0

[0097] 그 결과, 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면에 양성 대조군으로 사용한 별독인 멜리틴은 세포 독성이 매우 높게 나타남을 알 수 있었다.

[0098] <실험예 5> 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성실험

[0099] 본 발명자들은 6주령의 특정병원체부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다.

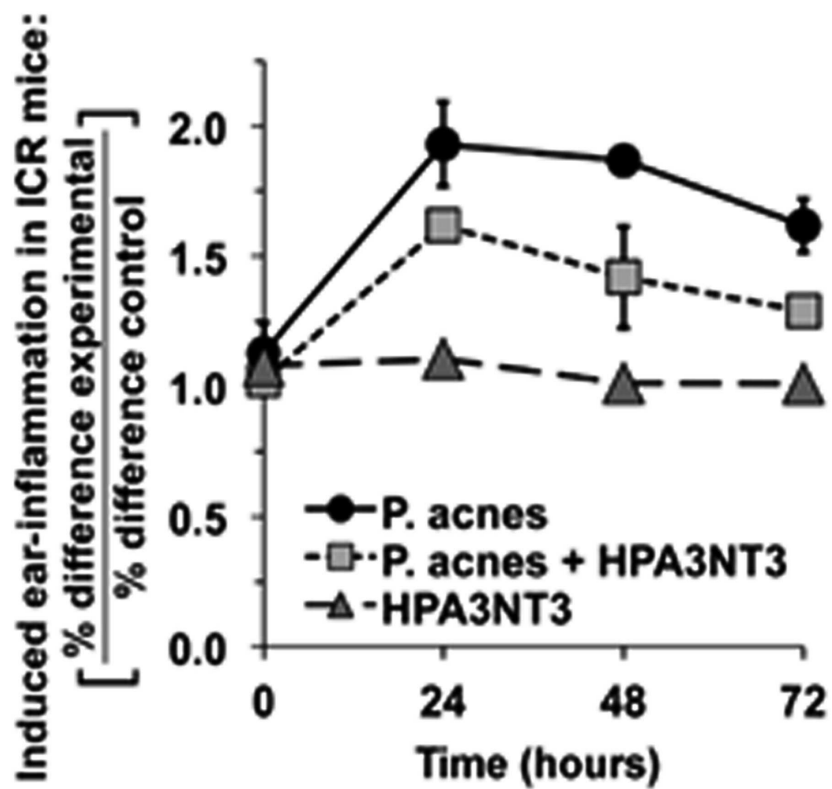
[0100] 구체적으로, 군당 2 마리씩의 동물에 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드를 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 현탁하여 1 g/kg/15 ml의 용량으로 단회 비경구투여하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 시험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검조건 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 실험된 본 발명의 항생 펩타이드는 랫트에서 5 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 비경구투여 최소치사량(LD₅₀)은 10 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

도면

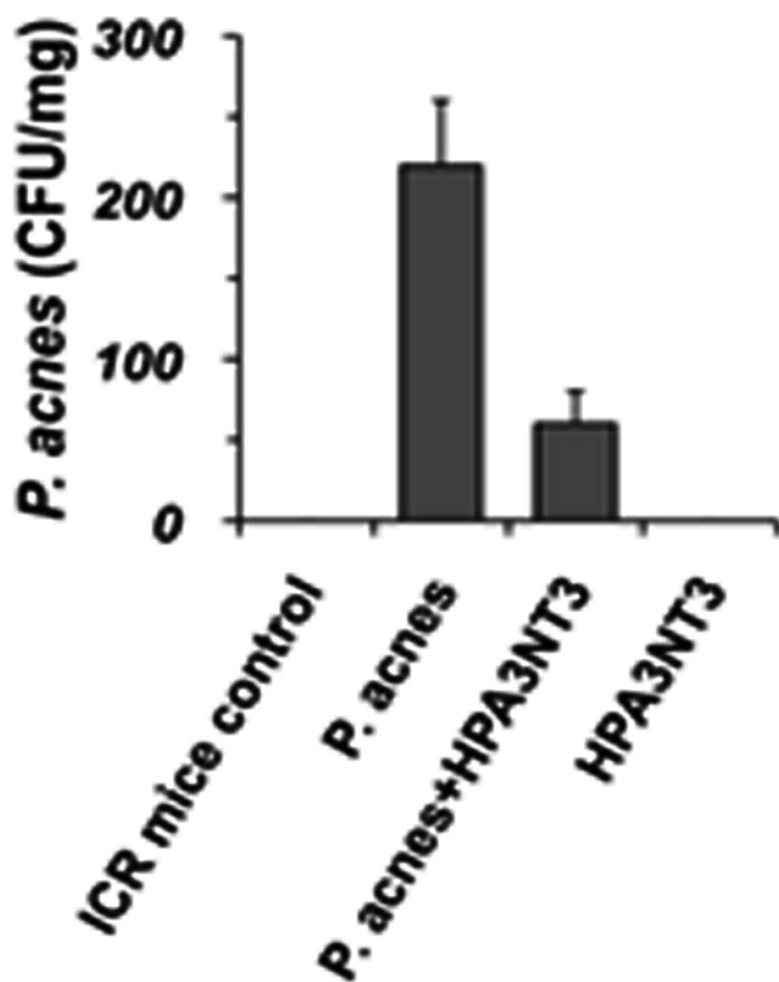
도면1a



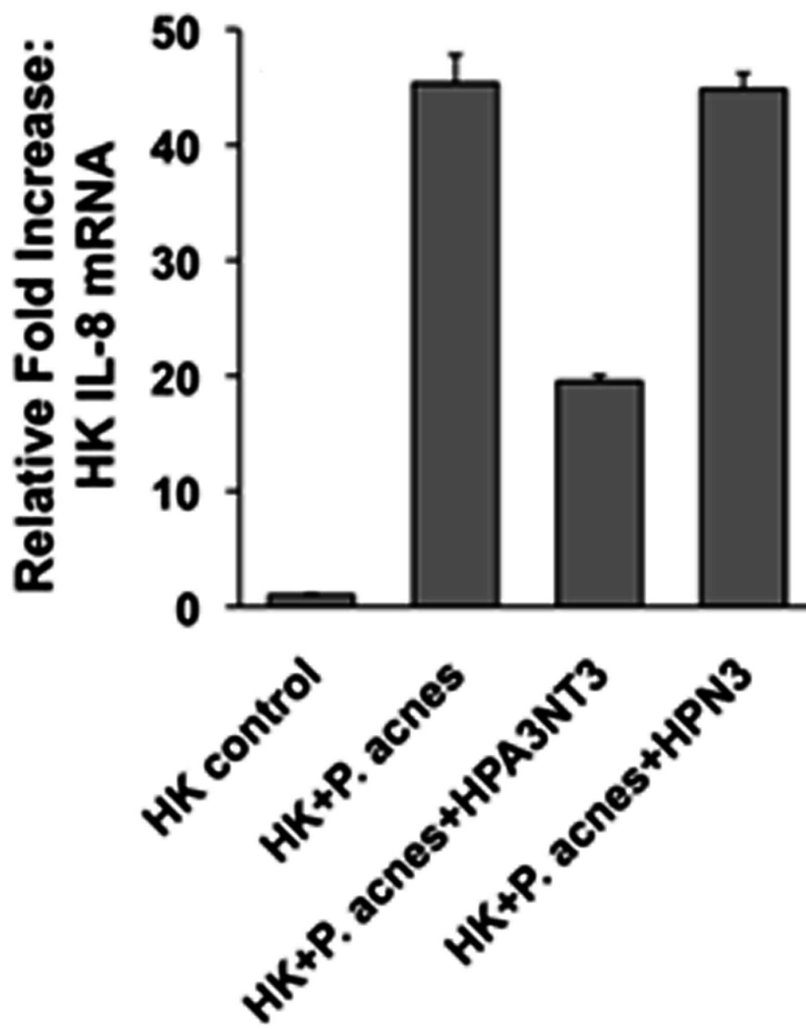
도면1b



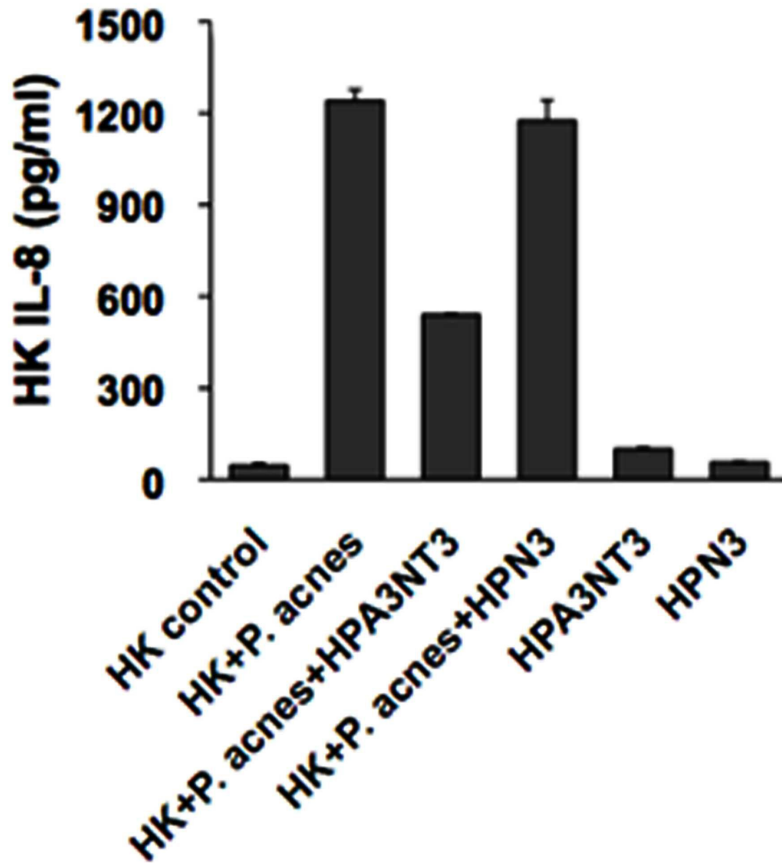
도면1c



도면2a



도면2b



서열 목록

<110> Korea Atomic Energy Research Institute

<120> A Method for regulating structural and functional change using surplus cysteine

<130> 9p-03-13

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PP1084

<400> 1

Met Ser Val Leu Val Gly Lys Lys Ala Pro Asp Phe Thr Val Pro Ala

1 5 10 15

Val Leu Gly Asn Gly Glu Ile Val Asp Ser Phe Asn Leu Ala Ser Ala

20 25 30
 Ile Lys Gly Lys Tyr Gly Leu Val Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
 35 40 45
 Phe Val Cys Pro Ser Glu Leu Ile Ala Leu Asp Asn Arg Ile Pro Asp
 50 55 60
 Phe Gln Ala Arg Asn Val Glu Val Ile Gly Val Ser Ile Asp Ser His
 65 70 75 80
 Phe Thr His Asn Ala Trp Arg Asn Thr Pro Val Asn Asn Gly Gly Ile
 85 90 95

Gly Gln Val Lys Tyr Thr Leu Ala Ala Asp Met Thr His Glu Ile Cys
 100 105 110
 Lys Ala Tyr Asp Val Glu Ser Glu Gly Gly Val Ala Phe Arg Gly Ala
 115 120 125
 Phe Leu Ile Asp Thr Asn Gly Val Val Arg Ser Gln Ile Val Asn Asp
 130 135 140
 Leu Pro Leu Gly Arg Asn Met Asp Glu Leu Leu Arg Leu Val Asp Ala
 145 150 155 160
 Leu Gln Phe His Glu Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys

165 170 175
 Lys Gly Asp Lys Gly Met Asn Ala Ser Pro Glu Gly Val Ala Ala Tyr
 180 185 190
 Leu Ser Glu Asn Ala Gly Lys Leu
 195 200

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PA3529

<400> 2

Met Ser Val Leu Val Gly Lys Lys Ala Pro Asp Phe Asn Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Gly Asn Gly Glu Ile Val Glu Ser Phe Thr Leu Ser Glu Ala

20 25 30
 Ile Lys Gly Lys Tyr Gly Leu Val Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
 35 40 45
 Phe Val Cys Pro Ser Glu Leu Ile Ala Leu Asp His Arg Ile Pro Glu
 50 55 60
 Phe Gln Ala Arg Asn Val Glu Val Ile Gly Val Ser Ile Asp Ser His
 65 70 75 80
 Phe Thr His Asn Ala Trp Arg Asn Thr Pro Val Asp Lys Gly Gly Ile
 85 90 95

Gly Ala Val Lys Tyr Thr Leu Ala Ala Asp Thr Lys His Glu Ile Ala
 100 105 110
 Lys Ala Tyr Asp Val Glu Ser Asp Gly Gly Val Ala Phe Arg Gly Ala
 115 120 125
 Phe Leu Ile Asp Lys Glu Gly Val Val Arg Ser Gln Ile Val Asn Asp
 130 135 140
 Leu Pro Leu Gly Arg Asn Met Asp Glu Leu Leu Arg Leu Val Asp Ala
 145 150 155 160
 Leu Gln Phe His Glu Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys

165 170 175
 Lys Gly Asp Lys Gly Met Thr Ala Ser Pro Glu Gly Val Ala Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Ala Glu Asn Ala Ser Lys Leu
 195 200

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PP1084 forward primer

<400> 3

ccgctcgaga tgagcggtact c

21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PP1084 reverse primer

<400> 4

cgagctctta cagcttgcca gc 22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PA3529 forward primer

<400> 5

ccgctcgaga tgagcgta ctgta 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PA3529 reverse primer

<400> 6

cccaagcttt tacagcttgc tggc 24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S31C-P1084(C112S) forward primer

<400> 7

ttcaacctgg cctgcgcat caagggc 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S31C-P1084(C112S) reverse primer

<400> 8

gcccttgatg gcgcaggcca ggttgaa 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y192C-P1084(C112S) forward primer

<400> 9

ggcgttgctg cctgcctgag cgagaac

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Y192C-P1084(C112S) reverse primer

<400> 10

gttctcgctc aggcaggcag caacgcc

27