



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월09일
 (11) 등록번호 10-1998106
 (24) 등록일자 2019년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A01N 33/08* (2006.01)
A23K 20/147 (2016.01) *A23K 20/195* (2016.01)
A23L 3/3463 (2017.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A01N 33/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0122504

(22) 출원일자 2017년09월22일
 심사청구일자 2017년09월22일

(65) 공개번호 10-2019-0033837

(43) 공개일자 2019년04월01일

(56) 선행기술조사문헌
 Li Z. et al, Appl Microbiol Biotechnol
 100:pp.5069~5077 (2016. 3. 8.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 조선대학교산학협력단
 광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자
 박윤경
 전라남도 장성군 장성읍 매화7길 4
 김민경
 전라남도 화순군 화순읍 광덕로 165

(74) 대리인
 최규환

전체 청구항 수 : 총 13 항

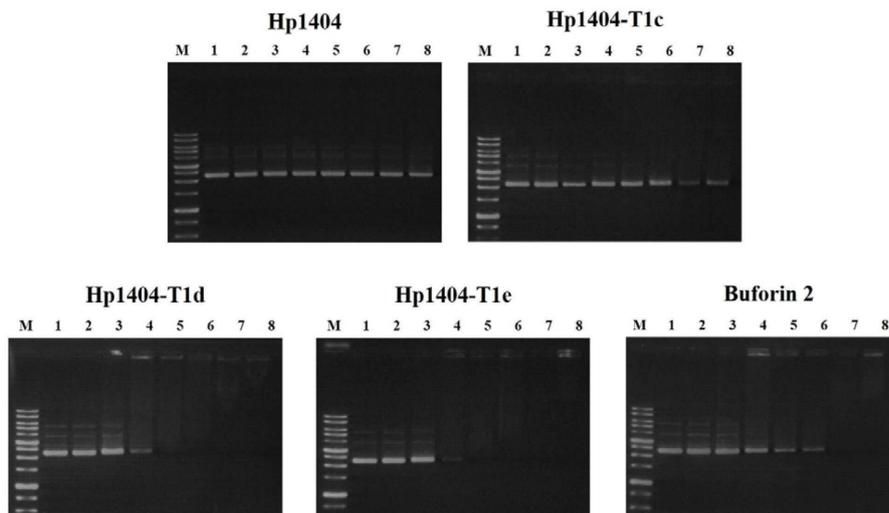
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **Hp1404 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Hp1404 펩타이드에서 i) 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고, ii) 4번째 및 8번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되고, iii) 7번째 아미노산이 루신(Leucine, L)으로 치환되고, iv) 9번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환되고, v) 12번째 아미노산이 세린(Serine, S)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환된 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대해 우수한 항균활성을 보이며, 쥐 및 인간 유래 세포에 대해 낮은 세포독성을 나타내어, 항균용 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제 및 생물 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

- A23K 20/147 (2016.05)
- A23K 20/195 (2016.05)
- A23L 3/34635 (2013.01)
- A61K 38/00 (2013.01)
- A61K 8/64 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014K1A1A2064460
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 글로벌연구실사업
 연구과제명 전염성 Superbugs 확산 제어를 위한 항생펩타이드 설계 및 원천기술 개발
 기여율 1/4
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2014.11.17 ~ 2020.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2A1A05005440
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 (후속연구)담석증 환자에서 분리한 Quinolone계와 Macrolide계 항생물질 다제 내성 세균에 작용하는 항균펩타이드 개발 및 제제화 연구
 기여율 1/4
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 N0001229
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국산업기술진흥원
 연구사업명 국제공동기술개발사업
 연구과제명 Acne vulgaris 세균에 작용하는 항생펩타이드 설계 및 코스메슈티컬 소재 개발
 기여율 1/4
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-0-01714
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 정보통신기술진흥센터
 연구사업명 정보통신·방송 연구개발 사업
 연구과제명 딥러닝 기술을 이용한 동물항생제 대체 펩타이드 서열 탐색 및 개발
 기여율 1/4
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2017.06.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열에서

- i) 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고,
- ii) 4번째 및 8번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되고,
- iii) 7번째 아미노산이 루신(Leucine, L)으로 치환되고,
- iv) 9번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되고,
- v) 12번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환된 항균 펩타이드.

청구항 2

삭제

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 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 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

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.

청구항 9

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물.

청구항 10

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제.

청구항 11

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제.

청구항 12

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약.

청구항 13

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물.

청구항 14

약학적으로 유효한 양의 제1항의 항균 펩타이드를 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Hp1404 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세균 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중 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 엔테로코커스 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).

[0003] 항생제 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus* sp.)에서 최초로 발견되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다. 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 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 활성화 시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

[0004] 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.

[0005] 작용 기작의 측면에서 항생제 내성은 크게 두가지 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 모두 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.

[0006] 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다.

[0007] 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리옌

(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. 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데, 상기 펩타이드 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나누어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-시트(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 있는데, 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 가지며, 이들 구조 중 전갈(scorpion)에서 발견된 항균 펩타이드인 Hp1404는 양친화성 알파 나선형 구조를 형성한다.

[0008] 한편, 한국등록특허 제1006321호에는 '줄무늬감탕벌 독액으로부터 추출한 항생제 활성을 갖는 펩타이드와 이를 코딩하는 유전자'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1440112호에는 '애기뿔 소똥구리로부터 분리된 coprisin 항생 펩타이드의 항균, 항염제로서의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 Hp1404 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 기존에 보고된 항균 펩타이드로부터 항균 활성이 증진된 신규한 합성 펩타이드를 제조하기 위하여 양친화성을 갖는 Hp1404 항균 펩타이드를 주형으로 하여, 6종의 Hp1404 유사체(서열번호 2 내지 서열번호 7)를 합성하였고, 상기 합성된 펩타이드 유사체 중, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 펩타이드(서열번호 5 내지 서열번호 7)가 모체 펩타이드인 Hp1404에 비해 그람 양성균 및 그람 음성균 및 내성균에 대한 항균 활성이 우수하며, 쥐 적혈구 및 인간 정상 세포주(HaCaT)에 대하여 낮은 세포독성을 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 i) 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고, ii) 4번째 및 8번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되고, iii) 7번째 아미노산이 루신(Leucine, L)으로 치환되고, iv) 9번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환되고, v) 12번째 아미노산이 세린(Serine, S)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 신규한 항균 펩타이드(Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e)는 우수한 항균 활성과 동시에 낮은 세포 독성을 가지고 있으므로, 항생제, 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 생물 농약 및 의약품 등의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 항균 펩타이드인 Hp1404(대조군) 및 Hp1404 유사체 신규 펩타이드인 Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e(실험군)의 다양한 용매 상에서 2차 구조 형성 여부를 확인한 결과로, ○은 10mM 인산 나트륨 용액, □은 30mM 황산 도데실 나트륨 용액, 및 △은 50% 트리플루오로에탄올 용액을 의미한다.

도 2는 대조균인 Hp1404 펩타이드 및 신규 펩타이드 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e의 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 막에 대한 작용 여부를 확인한 결과이다.

도 3은 대조균인 Hp1404 펩타이드 및 신규 펩타이드인 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e의 박테리아 내부 물질인 DNA에 대한 결합능을 확인한 결과로, lane 1번부터 8번까지 펩타이드/DNA 비율은 각각 DNA 단독, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1 이다. Buforin 2: DNA에 결합하여 항균 활성을 나타내는 항균 펩타이드.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0021] 서열번호 1의 아미노산 서열에서
- [0022] i) 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고,
- [0023] ii) 4번째 및 8번째 아미노산이 리신(lysine, K)으로 치환되고,
- [0024] iii) 7번째 아미노산이 루신(Leucine, L)으로 치환되고,
- [0025] iv) 9번째 아미노산이 글리신(Glycine, G)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환되고,
- [0026] v) 12번째 아미노산이 세린(Serine, S)이거나 또는 리신(lysine, K)으로 치환된 항균 펩타이드를 제공한다.
- [0027] 기존의 알려진 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 모체 펩타이드인 Hp1404는 아시아인 포레스트 건갈(*scorpion Heterometrus petersii*)에서 분리된 항균 펩타이드로 당업계에서 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법에 특별히 한정되지 않는다. 상기 합성을 위한 방법으로 당업계의 통상적인 펩타이드의 화학적 합성 방법(W. H. Freeman and Co., Proteins; structures and molecular principles, 1983)으로 합성하는 것이 바람직하며, 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(solution-phase peptide synthesis), 고상 펩타이드 합성법(solid-phase peptide synthesis), 단편 응축법 및 F-moc 또는 T-BOC 화학법으로 합성하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로는 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)으로 합성하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 항균 펩타이드는 상기 i), ii), iii), iv) 및 v) 조건을 만족해야 하는데, 구체적으로 i) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 1번째 및 14번째 아미노산인 글리신(Glycine, G)과 페닐알라닌(Phenylalanine, F)이 모두 결실되어야 하는 것이며, ii) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 4번째 및 8번째 아미노산인 글리신(G)과 글루탐산(Glutamic acid, E)이 양전하를 갖는 염기성의 아미노산인 리신(lysine, K)으로 치환되어야 한다.
- [0029] 다음으로, iii) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 7번째 아미노산인 트립토판(Tryptophan, W)이 루신(Leucine, L)으로 치환되는 것으로, 루신은 비극성의 지방족 R기를 가진 아미노산이다.
- [0030] 다음으로, iv) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 9번째 아미노산이 글리신(Glycine, G) 그대로이거나 또는 글리신이 양전하를 갖는 염기성의 아미노산인 리신(lysine, K)으로 치환되어야 한다.
- [0031] 마지막으로, v) 조건은 서열번호 1의 모체 펩타이드에서 12번째 아미노산이 세린(Serine, S) 그대로이거나 또는 세린이 양전하를 갖는 염기성의 아미노산인 리신(lysine, K)으로 치환되어야 한다.
- [0032] 따라서, iv) 및 v) 조건을 만족하는 경우는 9번째 및 12번째 아미노산이 각각 글리신(G)과 세린(S)인 경우뿐만 아니라, 9번째 및 12번째 아미노산이 각각 리신(K)과 세린(S)인 경우, 9번째 및 12번째 아미노산이 모두 리신(K)인 경우를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있는데, 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 Hp1404로부터 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고, 4번째 및 8번째 아미노산이 리신(K)으로 치환되고, 7번째 아미노산이 루신(L)으로 치환된 항균 펩타이드로 Hp1404-T1c로 명명하였고, 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 Hp1404로부터 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고, 4번째, 8번째 및 9번째 아미노산이 리신(K)으로 치환되고, 7번째 아미노산이 루신(L)으로 치환된 항균 펩타이드로 Hp1404-T1d로 명명하였고, 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 모체 펩타이드인 Hp1404로부터 1번째 및 14번째 아미노산이 결실되고, 4번째, 8번째, 9번째 및 12번째

아미노산이 리신(K)으로 치환되고, 7번째 아미노산이 루신(L)으로 치환된 항균 펩타이드로 Hp1404-T1e로 명명하였다.

- [0034] 상기 항균 펩타이드는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 치환은 전극의 증/감을 이용하여 세포독성을 낮추며, 그람 음성균 및 그람 양성균에 대하여 항균활성을 증가 또는 유지하기 위해 수행될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 상기 그람 음성균은 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 대장균 속(*Escherichia*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*), 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 또는 대장균 속(*Escherichia*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*), 리스테리아 속(*Listeria*), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*), 락토바실러스 속(*Lactobacillus*) 및 바실러스 속(*Bacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 구체적으로 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*) 또는 리스테리아 속(*Listeria*)인 것이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 상기 항생제 내성균은 항생제 내성을 갖는 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 상기 항생제는 이에 제한되지는 않으나, 아미노글리코사이드 계열(아미노글리코사이드, 겐타마이신, 네오마이신 등), 페니실린 계열(엠펜실린 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.
- [0040] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 쥐 및 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다. 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다.
- [0042] 본 발명의 Hp1404 항균 펩타이드로부터 유래된 유사체 항균 펩타이드인 Hp1404-T1c(서열번호 5), Hp1404-T1d(서열번호 6), 및 Hp1404-T1e(서열번호 7) 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 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, 동결건조제, 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 위템솔(*witepsol*), 마크로골, 트윈(*tween*) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 항균 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(*carrier*)와 혼

합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

- [0046] 본 발명의 항균 펩타이드의 유효용량은 0.1 내지 2mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지는 1mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.
- [0047] 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.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나의 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.
- [0050] 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.
- [0051] 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.
- [0052] 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, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라카칸타, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리머 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드록arbon, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0055] 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.
- [0056] 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 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라카칸타 등이 이용될 수 있다.
- [0057] 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.
- [0058] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.

- [0059] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로, 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.
- [0060] 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 중량부이하, 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.
- [0061] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0062] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0063] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 상기 펩타이드는 강한 항균 활성을 나타내면서, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 나타내므로, 본 발명의 항생 펩타이드는 사료 첨가제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0064] 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.
- [0065] 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물군 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 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.
- [0066] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물, 항균용 생물 농약, 및 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0067] 상기 항균 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 5 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서 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.
- [0068] 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.
- [0069] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 분획물을 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.
- [0070] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또한, 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.

[0072] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1. 펩타이드의 합성 및 분리정제**

[0074] 본 발명자들은 메리필드(Merrifield)의 액상 펩타이드 합성법(Merrifield, RB., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149, 196)에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 모체 펩타이드인 Hp1404의 아미노산 서열에서 1번째와 14번째의 아미노산 잔기를 결실시켰다. 이후 4번째 아미노산 잔기를 리신(Lysine, K)으로, 7번째 아미노산 잔기를 루신(Leucine, L)으로, 8번째와 9번째 그리고 12번째 아미노산 잔기를 리신(K)으로 순차적으로 치환하여 합성하였다(표 1).

[0075] 구체적으로, 본 발명에서 설계한 펩타이드의 카르복실 말단이 NH₂ 형태인 펩타이드는 링크 아마이드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실 말단이 OH 형태의 펩타이드는 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다.

[0076] Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬(chain)의 연장은 DCC(N-hydroxybenzo triazole(HOBt)-dicyclo-hexycarbodiimide)법에 의해 실시하였다. 각 펩타이드의 아미노 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), 씨오아니솔(thioanisole), H₂O 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 침전하여 이를 수득하였다. 상기 수득한 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 컬럼(Delta Pak, C18300Å, 15, 19.0mm×30 cm, Waters, USA)을 이용하여 정제하였다. 합성 펩타이드를 6N 염산으로 110℃에서 가수분해한 후 잔사를 감압 농축하고, 0.02N 염산에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정정한 후, 펩타이드의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 MALDI 질량 분석법(Hill, et al., Rapid Commun. Mass Spectrometry, 5: 395, 1991)을 수행하였다.

[0077] 그 결과, 하기 표 1에서 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 서열번호 7의 아미노산 서열로 기재되는 펩타이드를 95% 이상의 순도로 합성하였고, 이의 분자량은 예상한 분자량과 동일한 분자량을 나타내는 것을 확인하였다.

표 1

[0078] 본 발명에서 합성한 펩타이드의 서열, 분자량 및 보유시간

펩타이드 명칭	아미노산 서열														서열번호	보유시간	분자량
Hp1404	GILGKLWEGVKSIF-NH ₂														1	36.251	1545.7
Hp1404-T1	ILGKLWEGVKS I-NH ₂														2	23.176	1342.2
Hp1404-T1a	ILKKLWEGVKS I-NH ₂														3	20.756	1413.5
Hp1404-T1b	ILKKLLEGVKS I-NH ₂														4	20.875	1340.2
Hp1404-T1c	ILKKLLKGVKS I-NH ₂														5	17.643	1338.0
Hp1404-T1d	ILKKLLKVKSI-NH ₂														6	17.741	1409.8
Hp1404-T1e	ILKKLLKVKKI-NH ₂														7	16.002	1451.0
아미노산 번호																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Hp1404	G	I	L	G	K	L	W	E	G	V	K	S	I	F			
Hp1404-T1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Hp1404-T1a			-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Hp1404-T1b			-	K	-	-	L	-	-	-	-	-	-				
Hp1404-T1c			-	K	-	-	L	K	-	-	-	-	-				
Hp1404-T1d			-	K	-	-	L	K	K	-	-	-	-				
Hp1404-T1e			-	K	-	-	L	K	K	-	-	K	-				

[0079] [공백 : 아미노산 결실, - : 아미노산 치환 없음]

[0080] 실시예 2. 항균 활성 측정

[0081] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 값을 측정하였다.

[0082] 구체적으로, 하기 표 2에 기재된 균주를 구입하여, 각 균주에 적합한 조성의 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 2×10^4 세포/100 μ l의 농도로 희석하여 마이크로 적정 플레이트(Nunc, USA)에 준비하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 또는 Hp1404-T1e 펩타이드를 각 웰에 1/2배씩 계열 희석(serial dilution)하여 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하였고, 마이크로 적정 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 600nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 MIC 값을 결정하였다. 모체 펩타이드인 Hp1404를 대조군으로 사용하였다.

표 2

[0083] 본 발명에서 사용한 박테리아 균주 및 이의 입수처

구분	균주명	출처	기탁번호
그람 음성균	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25922
	슈도모나스 에루지노사 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	미국 세포주은행	ATCC 27853
그람 양성균	스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	미국 세포주은행	ATCC 25923
	리스테리아 모노사이토젠스 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	한국 세포주은행	KCTC 3710
항생제 내성균	슈도모나스 에루지노사 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	분리주 138	
		분리주 431	
		분리주 434	
		분리주 557	
		분리주 559	
		분리주 778	
		분리주 1034	
		분리주 1162	
		분리주 3290	
		분리주 3399	
		분리주 3592	
		분리주 3904	
		분리주 4007	
		분리주 4319	
		분리주 4891	
분리주 5018			
분리주 671973			

[0084] 그 결과, 하기 표 3에서 나타난 바와 같이 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d, 및 Hp1404-T1e 펩타이드는 대조군인 모체 펩타이드 Hp1404에 비해 스타필로코커스 아우레우스와 슈도모나스 에루지노사에 대해 유사하거나 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 3

그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균에 대한 항균 펩타이드의 MIC

균주	펩타이드	최소 저해 농도 (μM)						
		Hp1404	Hp1404-T1	Hp1404-T1a	Hp1404-T1b	Hp1404-T1c	Hp1404-T1d	Hp1404-T1e
그람 음성균	대장균	6.25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
	P. 에루지노사	12.5	>25	>25	>25	3.13	1.56	1.56
그람 양성균	S. 아우레우스	3.13	>25	>25	>25	12.5	6.25	3.13
	L. 모노사이토젠스	3.13	>25	>25	>25	25	>25	>25
내성균	P. 에루지노사 138	12.5	>25	>25	>25	25	12.5	6.25
	P. 에루지노사 431	12.5	>25	25	>25	12.5	3.13	3.13
	P. 에루지노사 434	12.5	>25	25	25	6.25	3.13	3.13
	P. 에루지노사 557	6.25	>25	>25	>25	25	3.13	3.13
	P. 에루지노사 559	25	>25	>25	>25	25	12.5	6.25
	P. 에루지노사 778	12.5	>25	>25	>25	6.25	3.13	1.56
	P. 에루지노사 1034	6.25	>25	>25	>25	6.25	3.13	1.56
	P. 에루지노사 1162	12.5	>25	>25	>25	3.13	1.56	1.56
	P. 에루지노사 3290	12.5	>25	>25	>25	>25	6.25	6.25
	P. 에루지노사 3399	6.25	>25	25	>25	3.13	1.56	0.78
	P. 에루지노사 3543	6.25	>25	>25	>25	>25	25	12.5
	P. 에루지노사 3592	6.25	>25	12.5	25	6.25	3.13	1.56
	P. 에루지노사 3904	6.25	>25	25	>25	6.25	6.25	3.13
	P. 에루지노사 4007	25	>25	>25	>25	12.5	6.25	3.13
	P. 에루지노사 4319	12.5	>25	>25	>25	6.25	3.13	3.13
	P. 에루지노사 4891	6.25	>25	25	>25	6.25	3.13	1.56
	P. 에루지노사 5018	12.5	>25	>25	>25	3.13	1.56	1.56
	P. 에루지노사 671973	3.13	>25	25	>25	6.25	1.56	1.56

[0085]

[0086] 실시예 3. 항생물막 활성 측정

[0087] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 항균 활성을 비교하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 생물막 억제 농도값을 측정하였다.

[0088] 구체적으로, 상기 표 2에 기재된 균주 중 생물막이 잘 형성되는 균을 각 배지에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 5×10^4 세포/100μl의 균체 농도로 희석하여 마이크로 플레이트(SPL)에 접종하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 합성한 Hp1404, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 또는 Hp1s404-T1e 펩타이드를 각 웰에 1/10 배씩 10mM 인산 나트륨 용액(sodium phosphate, pH 7.2)으로 희석하여 10μl 첨가한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 상층액을 완벽히 제거한 후 100% 메탄올로 15분간 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색용액으로 1시간 염색시킨 후, 3번 세척한 뒤 95% 에탄올로 용해하여 마이크로 적정 플레이트 판독기를 이용하여 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주에 대한 생물막 최소억제 농도값을 확인하였다.

[0089] 그 결과, 하기 표 4에 개시된 바와 같이 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d, 및 Hp1404-T1e 펩타이드에서는 대조균인 Hp1404에 비해 균주 모두에서 비슷하거나 강한 생물막 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 4

[0090] 그람 음성균, 그람 양성균 및 내성균에 대한 항균 펩타이드의 항생물막 활성

	생물막 최소억제농도 (μM)			
	Hp1404	Hp1404-T1c	Hp1404-T1d	Hp1404-T1e
S. 아우레우스 (ATCC 25923)	3.13	12.5	6.25	12.5
P. 에루지노사 (ATCC 27853)	25	25	12.5	12.5
P. 에루지노사 434	25	50	12.5	12.5
P. 에루지노사 559	50	25	12.5	12.5
P. 에루지노사 778	25	25	12.5	6.25
P. 에루지노사 1034	25	25	12.5	6.25
P. 에루지노사 1162	25	12.5	6.25	6.25
P. 에루지노사 3543	6.25	>50	>50	50
P. 에루지노사 3399	12.5	25	25	12.5
P. 에루지노사 4007	25	>50	50	12.5

[0091] 실시예 4. 용혈 활성 측정

[0092] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 세포독성을 비교하기 위하여, 합성한 펩타이드들의 적혈구 용혈 활성을 측정하였다.

[0093] 구체적으로, 쥐(Balb/c, 6주령, 암컷) 적혈구를 8%의 농도가 되도록 PBS(pH 7.0)로 희석하고, Hp1404, Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 또는 Hp1404-T1e 펩타이드를 각각 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 및 200.0 μM/웰의 농도로 처리하여, 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000xg로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 1% 트리톤 X-100(sigma, USA)을 처리하여 37°C에서 1시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 상기 흡광도 값을 적혈구 용혈활성 100%로 하여, 하기 수학적 식 1을 사용하여 각 펩타이드의 용혈활성(hemolysis)을 계산하였다.

[0094] [수학적 식 1]

[0095] 적혈구 파괴능(%) = (흡광도 A-흡광도 B)/(흡광도 C-흡광도 B) X 100

[0096] (상기 식에 있어서, 흡광도 A는 414nm 파장에서 측정된 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 B는 414nm 파장에서 측정된 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타내며; 흡광도 C는 414nm 파장에서 측정된 1% 트리톤 X-100를 처리한 반응 용액의 흡광도를 나타낸다.)

[0097] 그 결과, 하기 표 5에 나타난 바와 같이 모체 펩타이드인 Hp1404 펩타이드는 200 μM 농도를 처리하였을 때 쥐 적혈구에 대하여 100%의 용혈작용이 유발되는 것을 확인한 것에 비해, Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 펩타이드는 200 μM 농도에서도 적혈구에 대한 파괴능을 나타내지 않는 것을 확인하여, 본 발명의 항균 펩타이드가 모체 펩타이드에 비해 세포독성이 감소한 것을 확인하였다.

표 5

[0098] 항균 펩타이드의 용혈활성

	% 적혈구 파괴능 (펩타이드 농도, μM)					
	200	100	50	25	12.5	6.25
Hp1404	100	92.64	55.41	11.01	2.16	0.01
Hp1404-T1	0.53	0	0	0	0	0
Hp1404-T1a	0.55	0	0	0	0	0
Hp1404-T1b	1.05	0	0	0	0.19	0.07
Hp1404-T1c	0.65	0	0	0	0	0
Hp1404-T1d	0.08	0	0	0	0	0
Hp1404-T1e	0.55	0.15	0	0.41	0.28	0.10

[0099] 실시예 5. 정상 세포주에서 세포독성 확인

[0100] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드들의 정상 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위해, 사람의 각질 형

성 세포주(HaCaT cell line, Dr. NE. Fusenig, Heidelberg, Germany)을 이용하여 독성을 측정하였다.

[0101] 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HaCaT 세포를 2×10^5 세포/웰로 마이크로 적정 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후, Hp1404, Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 또는 Hp1404-T1e 펩타이드를 각각 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 또는 200.0 μM /웰의 농도로 처리하여, 24시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 반응시켰다. 24시간 후, 인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에 0.5mg/ml MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 녹인 반응 용액 100 μl 를 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 상층액을 제거하고, 200 μl 의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 넣어 형성된 MTT 크리스탈을 녹인 후, 560nm에서 파장을 확인하여 세포 생존능을 확인하였다.

[0102] 그 결과, 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 200 μM 의 모체 Hp1404 펩타이드를 처리했을 때, HaCaT 세포는 0%의 세포 생존력을 나타내어 Hp1404 펩타이드가 매우 높은 세포 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 이에 반해, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c 및 Hp1404-T1d 펩타이드는 200 μM 의 농도에서 각각 30.67%, 31.95%, 39.87% 및 18.35%의 세포 생존력을 나타내어 낮은 세포 독성을 가지는 것을 확인하였고, 특히 Hp1404-T1와 Hp1404-T1e 펩타이드는 200 μM 농도에서 100%의 세포 생존력을 나타내어, 모체 Hp1404 펩타이드에 비해 세포 독성을 거의 보이지 않는 것을 확인하였다.

표 6

항균 펩타이드의 세포독성 분석

[0103]

	% 세포 생존력 (펩타이드 농도, μM)					
	200	100	50	25	12.5	6.25
Hp1404	0	0.11	30.48	100	100	100
Hp1404-T1	100	100	100	100	100	100
Hp1404-T1a	30.67	100	100	100	100	100
Hp1404-T1b	31.95	80.86	100	100	100	100
Hp1404-T1c	39.87	48.56	51.28	100	100	100
Hp1404-T1d	18.35	34.56	33.09	38.90	53.93	100
Hp1404-T1e	100	100	100	100	100	100

[0104] 실시예 6. 원이색법 스펙트럼 측정

[0105] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드를 이용하여 2차 구조인 α -나선형 구조를 유도하는지 확인하고자 원이색법(circular dichroism) 방법을 이용하여 측정하였다.

[0106] 구체적으로, 10mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7.4), 50% 트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol, TFE) 또는 30mM 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액에 Hp1404, Hp1404-T1, Hp1404-T1a, Hp1404-T1b, Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 또는 Hp1404-T1e 펩타이드를 40 μM 로 첨가하여 0.1cm 길이(path-length)의 셀에 가한 후, jasco 810 분광광도계(spectrophotometer)에 온도를 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정하여 원이색법 스펙트럼을 측정하였다. 상기 원이색법 스펙트럼을 위한 α -나선형 구조 계산식은 하기 수학적 2를 사용하였다.

[0107] [수학적 2]

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{obs}}}{10 \cdot l \cdot c}$$

(상기 식에 있어서, θ_{obs} 는 신호의 밀리도(milidegrees)를 나타내며;

l은 셀 크기(cm)의 광학 길이(optical path-length)를 나타내고; 및

c는 첨가한 펩타이드의 농도(mol/l)를 나타낸다.)

[0108]

[0109] 그 결과, 10mM 인산나트륨 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 구조를 형성하지 않은 반면, 50% TFE 용액과 30mM SDS 용액에 펩타이드를 첨가하였을 때에는 정도의 차이를 보이지만 모든 펩타이드에서 2차 구조인 α -나선

형 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 이의 결과를 통해, 본 발명의 항균 펩타이드는 미생물인 박테리아 막과 유사한 SDS와 TFE 용액 상에서 α -나선형 구조를 형성하는 것을 확인하였다(도 1).

[0110] **실시예 7. 유세포분석기(Flow cytometry) 측정**

[0111] 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 펩타이드가 박테리아 막에 작용하는지 여부를 확인하기 위하여, 모체 펩타이드와 유사한 항균활성을 보이며, 고농도에서도 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 확인된 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 펩타이드를 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하였다.

[0112] 구체적으로, 모체 Hp1404 펩타이드 또는 Hp1404-T1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 펩타이드의 최소억제농도(MIC)의 2배 값을 스타필로코커스 아우레우스와 슈도모나스 에루지노사에 처리한 후 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 후, 원심분리기(10,000rpm)를 이용해 상층액을 제거한 다음 10 μ g/ml 농도의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)로 4°C에서 30분간 염색하였다. 그런 다음, 결합하지 않은 프로피디움 요오드화물을 원심분리기를 이용해 제거하고 생리식염수(PBS) 1ml를 첨가하여 세포의 뭉침 현상을 제거한 후, Bechman 유세포분석기를 이용하여 박테리아 막에 대한 펩타이드의 영향을 확인하였다.

[0113] 그 결과, Hp1404 펩타이드는 박테리아 막에 손상을 주어 형광시그널이 오른쪽으로 이동된 반면, Hp1404-1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 펩타이드는 형광시그널이 이동되지 않아 박테리아 막에 손상을 주지 않았음을 확인할 수 있었다(도 2). 이의 결과를 통해, 본 발명의 신규 펩타이드는 대조군인 모체 펩타이드와 박테리아 막에 작용하는 기작이 다를 수 있음을 유추할 수 있었다.

[0114] **실시예 8. 항균 펩타이드와 DNA의 결합 유무 분석**

[0115] 본 발명의 합성 펩타이드가 항균활성을 나타내는 기작이 무엇인지 구체적으로 확인하기 위하여, Hp1404, Hp1404-1c, Hp1404-T1d 및 Hp1404-T1e 합성 펩타이드가 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합하는지 여부를 전기영동을 통해 확인하였다.

[0116] 구체적으로, 260ng의 플라스미드 DNA(pRSETB)를 펩타이드와 비율별(lane 1번부터 8번까지 펩타이드/DNA 비율은 각각 DNA 단독, 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1로 실시)로 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 1% 아가로스 겔에 전기영동을 수행하여 브로민화 에티듐(Ethidium bromide, EtBr)으로 염색하고 UV로 확인하였다. 박테리아의 DNA에 결합하여 항균활성을 나타내는 항균 펩타이드인 Buforin 2를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0117] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 Hp1404와 Hp1404-T1c 펩타이드는 DNA와 어떠한 결합도 하지 않았으며 Hp1404-T1d와 Hp1404-T1e는 DNA와 결합하는 결과를 보여주었다(도 3). 상기 결과를 통해, Hp1404-T1d와 Hp1404-T1e 펩타이드가 일부 아미노산 잔기의 치환 또는 결실로 인해, 박테리아 막에 작용하여 항균활성을 나타내는 모체 펩타이드인 Hp1404와는 달리, 박테리아 내부 물질인 DNA와 결합하여 항균활성을 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

[0118] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0119] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0120] **<1-1> 산제의 제조**

[0121] 본 발명의 펩타이드 20mg

[0122] 유당 20mg

[0123] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0124] **<1-2> 정제의 제조**

[0125] 본 발명의 펩타이드 10mg

[0126] 옥수수전분 100mg

[0127] 유당 100mg

[0128] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0129] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0130] **<1-3> 캡슐제의 제조**

- [0131] 본 발명의 펩타이드 10mg
- [0132] 결정성 셀룰로오스 3mg
- [0133] 락토오스 14.8mg
- [0134] 스테아린산 마그네슘 0.2mg
- [0135] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0136] <1-4> 액제의 제조

- [0137] 본 발명의 펩타이드 20mg
- [0138] 이성화당 10g
- [0139] 만니톨 5g
- [0140] 정제수 적량
- [0141] 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.

[0142] <1-5> 주사제의 제조

- [0143] 본 발명의 펩타이드 10 μ g/ml
- [0144] 묽은 염산 BP pH 7.6로 될 때까지
- [0145] 주이용 염화나트륨 BP 최대 1ml
- [0146] 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 $^{\circ}$ C에서 15분 이상 고압증기멸균기로 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0147] <제조예 2> 화장품의 제조

[0148] <2-1> 유연화장수(스킨)

- [0149] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 유연화장수를 제조하기 위해 하기 표 7에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 7

[0150] 유연화장수 조성

성분	합량(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

[0151] <2-2> 영양화장수(로션)

- [0152] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 항균용 영양화장수를 제조하기 위해 하기 표 8에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 8

영양화장수 조성

[0153]

성분	합량(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

[0154]

<2-3> 에센스

[0155]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 에센스를 제조하기 위해 하기 표 9에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.

표 9

에센스 조성

[0156]

성분	합량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
시토스테롤	1.7
플리글리세틸2-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

[0157]

<2-4> 세안제(클렌징폼)

[0158]

본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 세안제(클렌징폼)를 제조하기 위해 하기 표 10에 기재된 것처럼 배합하여 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

표 10

세안제 조성

[0159]

성분	합량(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

[0160] <2-5> 영양크림

[0161] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 영양크림을 제조하기 위해 하기 표 11에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 11

영양크림 조성

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

[0163] <2-6> 마사지크림

[0164] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 마사지크림을 제조하기 위해 하기 표 12에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조한다.

표 12

마사지크림 조성

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

[0166] <2-7> 팩

[0167] 본 발명의 펩타이드를 포함하는 향균용 팩을 제조하기 위해 하기 표 13에 기재된 것처럼 통상적인 화장품 분야

에서의 제조 방법에 따라 제조한다.

표 13

[0168]

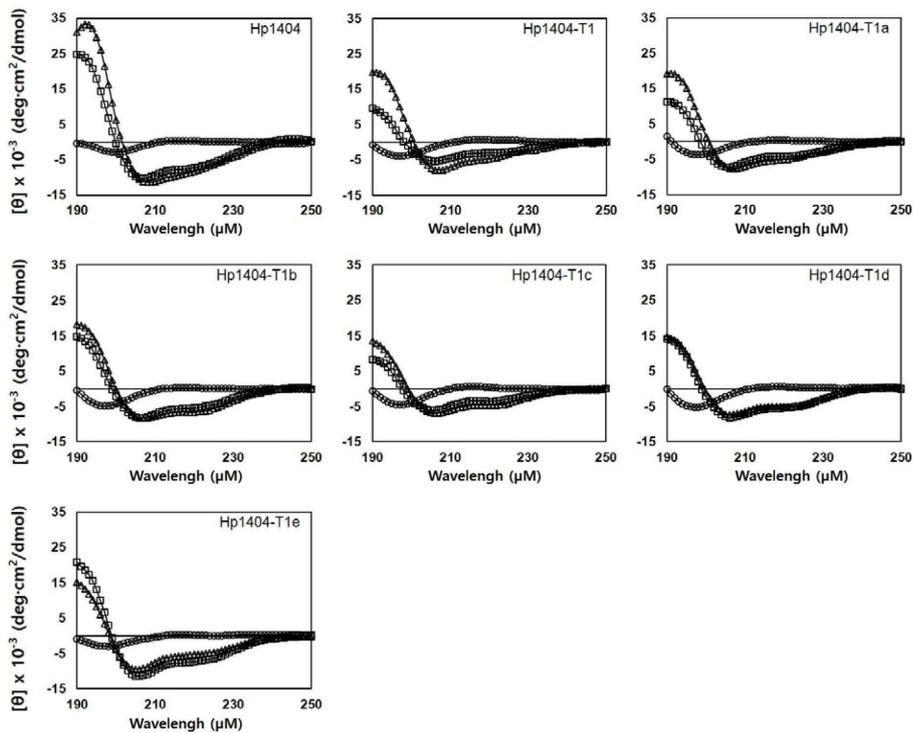
성분	함량(중량%)
본 발명의 펩타이드	0.1~30
프로필렌글리콜	2.0
글리세린	4.0
폴리비닐알코올	10.0
에탄올	7.0
파이지-40 히드로게비티드캐스터오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
향료, 방부제	미량
정제수	To 100

[0169]

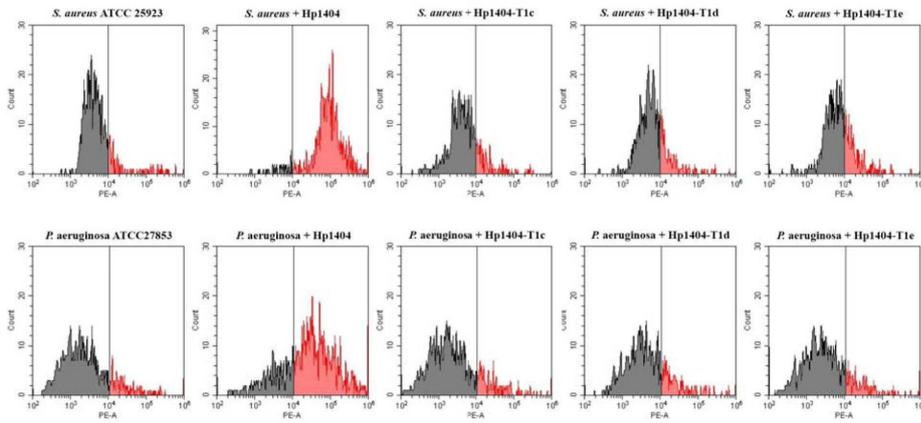
이상의 본 발명은 상기에 기술된 실시예 및 제조예에 의해 한정되지 않고, 통상의 기술자들에 의해 다양한 변형 및 변경을 가져올 수 있으며, 그외의 색조 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얇게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있고, 이는 첨부된 청구항에서 정의되는 본 발명의 취지와 범위에 포함된다.

도면

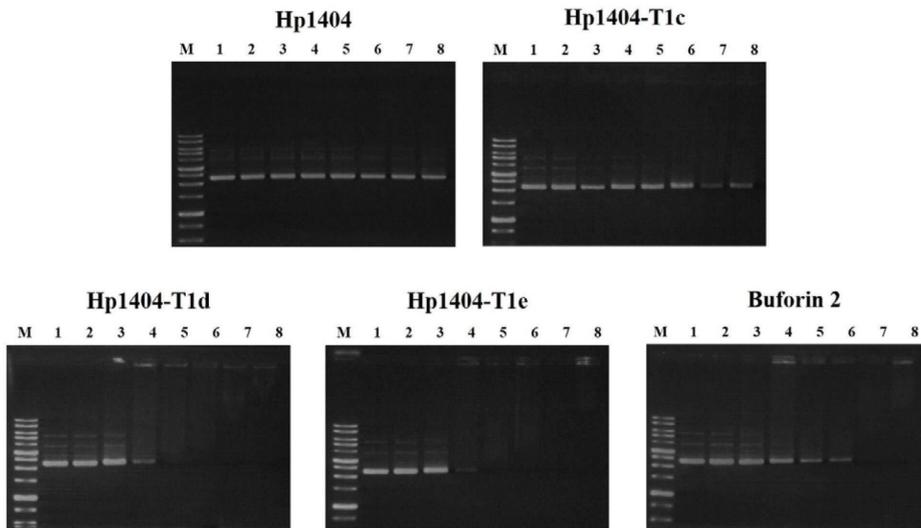
도면1



도면2



도면3



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Novel antimicrobial peptide derived from Hp1404 peptide and uses thereof
- <130> PN17360
- <160> 7
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> scorpion *Heterometrus petersii*
- <400> 1

Gly Ile Leu Gly Lys Leu Trp Glu Gly Val Lys Ser Ile Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Hp1404-T1

<400> 2

Ile Leu Gly Lys Leu Trp Glu Gly Val Lys Ser Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hp1404-T1a

<400> 3

Ile Leu Lys Lys Leu Trp Glu Gly Val Lys Ser Ile

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hp1404-T1b

<400> 4

Ile Leu Lys Lys Leu Leu Glu Gly Val Lys Ser Ile

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hp1404-T1c

<400> 5

Ile Leu Lys Lys Leu Leu Lys Gly Val Lys Ser Ile

1 5 10
<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Hp1404-T1d
<400> 6
Ile Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Val Lys Ser Ile

1 5 10
<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Hp1404-T1e

<400> 7
Ile Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys Val Lys Lys Ile
1 5 10