



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0026372

(43) 공개일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2006-7014496

(22) 출원일자 2006년07월19일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년07월19일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2004/001764

(87) 국제공개번호 WO 2005/058344

국제출원일자 2004년12월15일

국제공개일자 2005년06월30일

(30) 우선권주장 2003907002 2003년12월19일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인 더 유니버시티 오브 멜버른
오스트레일리아 3052 빅토리아 파크빌 로얄 퍼레이드

(72) 발명자 레이놀즈 에릭 찰스
오스트레일리아 3103 브이아이씨 발원 월시 스트리트 14
대쉬퍼 스투어트 자오프리
오스트레일리아 3057 브이아이씨 브룬스워크 이스트 리안 스트리트13
파올리니 리타 앤
오스트레일리아 3101 에이유 큐 펀던 크레산트 4

(74) 대리인 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 항미생물 조성물

(57) 요약

본 발명은 밀크 단백질 카세인 유래의 펩타이드 또는 재조합 DNA 기술에 의해 생산 또는 합성된 펩타이드와 이가 양이온을 포함하는 신규한 항 미생물 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 6

특허청구의 범위

청구항 1.

항미생물 조성물에 있어서, 상기 조성물은 이가 양이온 및 펩타이드를 포함하며, 상기 펩타이드는 약 100개 아미노산 미만의, 비글리코실화된 펩타이드로서, 하기 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu (SEQ ID NO: 1);

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu (SEQ ID NO: 2); 및

상기 서열의 보존적 치환을 갖는 서열.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 약 70개 아미노산 미만인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu (SEQ ID NO: 1); 및

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu (SEQ ID NO: 2).

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro
Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:3);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr hr Glu Ile Pro Thr hr Ile Asn Thr hr Ile Ala
Ser(*P*) Gly Glu Pro Thr hr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu
Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
(SEQ ID NO:4);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro
Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:5);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*)
Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*)
Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
NO:6);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:7);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:8);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val
Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:9);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala
Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn
Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:10);

; 및

상기 서열의 보존적 치환을 갖는 서열.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이가 양이온은 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , SnF^+ 및 CuF^+ 로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 이가 양이온은 Ca^{2+} 또는 Zn^{2+} 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 이가 양이온 : 상기 펩타이드의 몰비가 0.5 ~ 15.0 : 1.0 의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 상기 펩타이드에 대한 상기 이가 양이온 : 상기 펩타이드의 몰비가 0.5 : 1.0 내지 4.0 : 1.0의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 펩타이드에 대한 상기 이가 양이온 : 상기 펩타이드의 몰비가 1.0 : 1.0 내지 4.0 : 1.0의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 상기 펩타이드에 대한 상기 이가 양이온 : 상기 펩타이드의 몰비가 1.0 : 1.0 내지 2.0 : 1.0의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 조성물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 12.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 충치 또는 잇몸 질환의 치료 또는 예방 방법.

청구항 13.

제 12 항에 있어서, 상기 조성물을 대상체의 치아 또는 잇몸에 투여하는 것을 특징으로 하는 충치 또는 잇몸 질환의 치료 또는 예방 방법.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 상기 조성물은 국소 투여되는 것을 특징으로 하는 충치 또는 잇몸 질환의 치료 또는 예방 방법.

청구항 15.

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 대상체의 충치 또는 잇몸 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 사용하는 용도.

명세서

기술분야

본 발명은 유단백질인 카세인으로부터 수득될 수 있거나 또는 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산될 수 있는 펩타이드 및 이가 양이온을 포함하는 신규한 향미생물 조성물에 관한 것이다. 본 조성물은 향미생물성 방부제로서 식품에 사용될 수 있거나, 충치 및 치주병과 관련된 병원균의 억제 및 치아 플라그의 제어용으로 구강관리 제품 (예를 들면, 치약, 구강세정제, 치실)에 사용될 수 있다.

배경기술

카파신은 비글리코실화된 인산화 형태의 소 카세이노마크로펩타이드(CMP)로서, 그람 음성 및 그람 양성 구강 박테리아 모두에 대하여 시험관내에서 항 박테리아 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Malkoski et al., 2001). CMP는 카이모신에 의한 Phe¹⁰⁵와 Met¹⁰⁶ 사이의 펩타이드 결합의 가수분해로 인하여 소 κ -카세인으로부터 방출되는 64개 아미노산의 폴리펩타이드이다. 이는 κ -카세인의 106-169 C-말단 단편을 포함하며, κ -카세인에서 발견되는 모든 후반역 변형 부위를 포함한다. CMP는 다양하게 인산화되고 글리코실화되는 것으로 나타났다 (Pisano et al., 1984; Saito and Itoh, 1992; Talbo et al., 2001). MALDI-PSD 질량 분광광도계를 사용한 분석에 의하면 CMP는 Ser¹⁴⁹에서는 모두 인산화되며, Ser¹²⁷ 부위에

서는 부분적(10%)으로 인산화된다 (Talbo et al., 2001). 부가적으로 κ-카세인에는 적어도 6가지의 유전적 변이체가 있으며, 이중 A 및 B 변이체가 가장 흔하다 (Creamer and Harris, 1997). 변이체 A 및 B는 잔기 136 및 148에서 상이하며, 변이체 A의 친수성 잔기 Thr¹³⁶ 및 Asp¹⁴⁸은 변이체 B에서 소수성 잔기인 Ile¹³⁶ 및 Ala¹⁴⁸로 치환되어 있다. 카파신의 항박테리아성 활성 부위는 합성 펩타이드 Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-A(138-158)를 사용하여 실험한 결과 잔기 138-158인 것으로 나타났다. 상기 합성 펩타이드 κ-카세인-A(138-158)를 사용하여 실험한 결과, Ser¹⁴⁹의 인산화가 항박테리아 활성에 중요하다는 것을 발견하였다 (Malkoski et al., 2001). CMP 변이체 A의 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 대한 MIC는 68 mg/ml (100μM)인 반면, 변이체 B의 MIC는 1.04 mg/ml (154μM)로 활성이 덜하였다 (Malkoski et al., 2001).

카파신이 박테리아의 성장을 억제하는 기전은 아직 분명하지 않다. 카파신은 약한 산성의 성장 pH에서 *S. mutans*에 대하여 가장 효과적인 것으로 나타났다. 비글리코실화된 κ-카세인-B(130-158)은 특히 트리플루오로에탄올(TFE; Plowman, 1997)의 존재 중에서 양친매성 알파-나선을 형성하는 것으로 제안되었다. 이러한 특성은, 상기 펩타이드가 만약 표면활성제로서 작용하여, 세포막에 구멍을 형성한다면, 이의 항박테리아 활성을 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 이러한 작용 방식은 현재까지 분리된 대부분의 양이온성 항미생물 펩타이드에 대하여 제안되었다. 그러나, 카파신은 보다 잘 알려진 다른 양이온성 항박테리아성 펩타이드와 서열 유사성을 보이지 않는 펩타이드이며, 가능한 양친매성 나선 구조를 형성하는 성향은 별개로, 이러한 펩타이드들이 갖는 임의의 다른 특성을 갖지 않는다. 카파신은 최근 발견된 음이온성, 항박테리아성 펩타이드, 특히 엔켈리틴과 일부 특성을 공유한다. 이 펩타이드는, 카파신과 마찬가지로, 다수의 글루타미드 잔기를 포함하며, 인산화가 항박테리아의 활성에 중요하다(Goumon, 1996; Goumon, 1998; Strub, 1996). 인산화가 정전기적 반발 또는 이가성 금속이온 결합을 통하여 펩타이드의 구조를 변화시키는 것으로 제안되었으나, 인산화된 형태의 엔켈리틴의 구조는 규명되지 않았다 (Goumon, 1998; Kiefer, 1998). 카파신을 포함하는 음하전된 항박테리아성 펩타이드가 어떻게 박테리아 세포 표면과 상호작용하는지는 명확하지 않다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명자들은 펩타이드의 구조 및 항박테리아 활성에 미치는 pH 및 이가 금속양이온의 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 펩타이드와 이가 양이온간의 상승적 효과를 증명할 수 있었다.

따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 항미생물성 조성물로서, 상기 조성물은 이가 양이온 및 펩타이드를 포함하며, 상기 펩타이드는 비글리코실화된, 100개 미만의 아미노산으로, 바람직하게는 약 70개 아미노산 미만이며, 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu, (SEQ ID NO:1)

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu, (SEQ ID NO:2)

및 그 보존적(conservative) 치환을 갖는 아미노산 서열.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 펩타이드는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu, (SEQ ID NO:1) and Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu. (SEQ ID NO:2)

추가적인 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:3);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:4);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:5);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:6);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:7);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:8);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:9);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(*P*) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala
 Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(*P*) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn
 Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:10);

및 보존적(conservative) 치환을 갖는 아미노산 서열.

추가 구현예에서, 상기 펩타이드는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:3);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:4);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:5);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:6);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:7);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:8);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:9); and

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala
 Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn
 Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:10).

본 발명의 추가의 구현예에서, 상기 펩타이드는 하기로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다:

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:3);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:4);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly
 Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro
 Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:5);

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P)
 Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P)
 Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID
 NO:6);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:7);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:8);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val
 Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
 Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:9);

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala
 Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn
 Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:10);

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro (SEQ ID
 NO:1); and

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro (SEQ ID
 NO:2).

상기 이가양이온은 바람직하게는 Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Sn²⁺ 및 Mn²⁺로 구성되는 군으로부터 선택된다. 부가하여, 상기 이가양이온은 예컨대 Sn⁴⁺ 및 Cu⁺와 같이 불화물과 결합되어 있을 수 있다. 바람직한 이가양이온은 Ca²⁺ 또는 Zn²⁺이다.

상기 이가양이온 : 펩타이드의 몰비는 0.5 : 1.0 내지 15.0 : 1.0의 범위이며, 바람직하게는 0.5 : 1.0 내지 4.0 : 1.0의 범위이다. 나아가, 이가양이온 : 펩타이드의 몰비는 1.0 : 1.0 내지 4.0 : 1.0, 바람직하게는 1.0 : 1.0 내지 2.0 : 1.0의 범위인 것이 바람직하다.

바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 상기 조성물은 국소 및 전신 적용용의 치료성 항감염 조성물, 치아, 구강내 조성물일 수 있다. 치아 조성물 또는 치료 조성물은 젤, 액상, 고형, 분말, 크림 또는 로젠지의 형태일 수 있다. 치료 조성물은 또한 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있다.

추가 양태에서, 본 발명은, 본 발명의 조성물을 치치가 필요한 환자의 잇몸 또는 치아에 적용하는 단계를 포함하는, 대상체의 충치 또는 치주질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 조성물의 국소적용이 바람직하다.

항미생물 활성을 초래하는 것은 특정 펩타이드의 서열이라기 보다는 펩타이드의 물리적 성질이기 때문에, 펩타이드의 실질적인 활성의 손실없이 펩타이드 서열내에 소위 보존적 치환을 만들 수 있다. 실질적인 활성의 손실을 초래하지 않는 이러한 보존적 치환도 본 발명의 범위내이다.

보존적 치환의 개념은 기술분야의 당업자에게 공지된 것이긴 하지만, 분명하게 하기 위하여, 보존적 치환은 다음과 같다.

Gly, Ala, Val, Leu, Met;

Asp, Glu, Ser;

Asn, Gln;

Ser, Thr;

Lys, Arg, His;

Phe, Tyr, Trp, His; 및

Pro, Na-알칼아미노산.

본 발명의 조성물은, 예를 들면, 식품의 항미생물성 보존제, 치아 플라그 제어용 구강관리 제품 (치약 및 구강세정제) 및 충치 및 치주질환과 연관된 병원균의 억제와 같은 다수의 응용분야를 갖는다. 본 발명의 항미생물성 조성물은 또한 약학 제제에 사용될 수 있다 (예를 들면, 국소 및 전신 투여용 항-감염 약물).

본 명세서를 통하여, 사용된 용어 "포함한다" 또는 이의 변형된 형태의 단어 "포함하는"은 언급된 요소 또는 정수(integer) 또는 일군의 요소 또는 정수를 포함하는 것을 의미하는 것이지 임의의 다른 요소 또는 정수 또는 일군의 요소 또는 정수를 제외하고자 하는 것이 아니다.

본 발명은 이가양이온 및 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 항미생물성 조성물에 관한 것이다. 이러한 펩타이드는 초기에는 카세인 κ -카세인(106-169)으로부터 유래되었다 [표 1].

펩타이드 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인 (117-169) 및 Ser(P)¹²⁷, Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인 (117-169)는 음이온 교환 및 역상 크로마토그래피(HPLC)의 표준 크로마토그래피 방법을 사용하여 소 카세인을 트립신으로 절단하여 정제될 수 있다. Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인 (106-169) 및 Ser(P)¹²⁷, Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인 (106-169)는 또한 초원심분리에 의해 치즈 유장(whey) 및 레넷(Rennet)으로부터 유장단백질을 제거하여 제조될 수 있거나, 또는 산 침전 후에 인산펩타이드를 역상 HPLC 분리하여 제조될 수 있다. 이러한 펩타이드는 다른 종의 카세인, 예를 들면 염소, 양 등의 카세인으로부터 제조될 수 있다.

[표 1]

카세인 향미생물 펩타이드

펩타이드	시열 ^a
Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein B (106-169)	Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:3)
Ser(P) ¹²⁷ , Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein B (106-169)	Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:4)
Ser(P) ¹⁴⁹ , κ-casein A (106-169)	Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:5)
Ser(P) ¹²⁷ , Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein A (106-169)	Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:6)
Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein B (117-169)	Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:7)
Ser(P) ¹²⁷ , Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein B (117-169)	Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:8)
Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein A (117-169)	Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:9)
Ser(P) ¹²⁷ , Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein A (117-169)	Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser(P) Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val (SEQ ID NO:10)
Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein B (138-158)	Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro (SEQ ID NO:1)
Ser(P) ¹⁴⁹ κ-casein A (138-158)	Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser(P) Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro (SEQ ID NO:2)

펩타이드 κ-카세인 (106-169)은 수개의 상이한 형태로 치즈 유장 또는 레닛 유장에 존재한다. 상기 펩타이드는 두 가지의 주 유전적 변이체(A 및 B)가 있으며 글리코실화 및 인산화에 의해 번역후에 변형된다. 카파-카세이노-글리코펩타이드 또는 글리코마크로펩타이드로도 알려진 글리코실화 형태는 상기 펩타이드의 쓰레오닌 잔기에 연결된 올리고사카리드 사슬에 의해 항-플라그 및 항-충치의 특성을 갖는 것으로 Neeser에 의해 기술되었다 [US patent Nos. 4,992, 420 및 4,994, 441]. Neeser는 상기 글리코펩타이드의 올리고사카리드의 사슬이 플라크 형성 구강 박테리아에 특이적으로 결합함으로써, 이들 박테리아가 침으로 코팅된 치아 에나멜에 부착되는 것을 방해하는 것으로 주장한다. 글리코실화 형태의 κ-카세인 (106-169)은 비글리코실화 형태의 κ-카세인(106-169)으로부터 크로마토그래피 (예를 들면, 음이온교환 및 역상 HPLC) 또는 선택적 침전 또는 초원심분리에 의해 분리될 수 있다. 단지 비글리코실화 형태의 κ-카세인(117-169) 또는 κ-카세인 (106-169)만이 향미생물 활성을 나타낸다. 글리코실화에 의해 향미생물 활성이 사라지기 때문에, 글리코- 및 비글리코-형태의 κ-카세인(117-169) 또는 κ-카세인 (106-169)을 분리하는 것이 바람직하며, 이는 크로마토그래피, 선택적 침전 또는 초원심분리를 통하여 달성될 수 있다. Ser¹⁴⁹ 및 정도가 낮은 Ser¹²⁷의 인산화는 향미생물 활성에 중요하며 인산화된 형태의 상기 두 가지의 주요 유전적 변이체 (A 및 B)는 동일한 활성을 갖는 것으로 보인다 (표 1). 상기 Neeser 특허는 κ-카세인 (106-169)의 향미생물 활성을 개시하지 않을 뿐 아니라, 비글리코실화 형태의 상기 펩타이드의 박테리아의 억제 용도를 개시하지 않는다.

특히 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 향미생물 조성물은 치약, 구강세정제 또는 충치 및 치주질환의 예방 및/또는 치료에 도움이 되는 구강용 제제와 같은 치약류에 통합된다. 상기 펩타이드는 치약류 조성물의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 구강 조성물의 경우, 본 발명의 조성물은 상기 조성물의 0.01 내지 50 중량% , 바람직하게는 0.1 내지 10 중량%로 투여되는 것이 바람직하다. 상기 언급한 펩타이드를 포함하는 본 발명의 구강 조성물

은 다양한 방법을 사용하여, 치약, 치분 및 액상 치약류, 구강세정제, 트로키제, 츄잉껌, 치아페이스트, 잇몸 마사지크림, 가글정제를 포함하는 구강용품, 로젠지(lozenge), 유제품 및 기타 음식류와 같은 입으로 들어갈 수 있는 제품에 다양한 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 구강 조성물은 나아가 특정 구강 조성물의 유형 및 형태에 따라 당업계의 주지된 성분을 부가적으로 포함할 수 있다.

특정의 매우 바람직한 본 발명의 형태에서, 구강 조성물은 특성상, 구강세정제, 또는 세척제와 같은 실질적으로 액체일 수 있다. 이러한 제제에서, 매체는 전형적으로 바람직하게는 하기 기술하는 습윤제를 포함하는 물-알콜 혼합물이다. 일반적으로, 물의 알콜에 대한 중량비는 약 1: 1 내지 약 20: 1의 범위이다. 이러한 유형의 제제에서 물-알콜의 총량은 전형적으로 상기 제제의 약 70 내지 약 99.9 중량%의 범위이다. 알콜은 전형적으로 에탄올 또는 이소프로판올이다. 에탄올이 바람직하다.

상기 액체 및 기타 본 발명의 제제의 pH는 일반적으로 약 4.5 내지 약 9의 범위이며, 전형적으로는 약 5.5 내지 8의 범위이다. pH는 바람직하게는 약 6 내지 약 8의 범위, 더욱 바람직하게는 7.4의 범위이다. pH는 산 (예를 들면, 시트르산 또는 벤조산) 또는 염기(예를 들면, 수산화나트륨)을 사용하여 조절되거나 또는 완충 (시트르산나트륨, 벤조산염, 탄산염, 또는 중탄산염, 인산수소이나트륨, 인산수소나트륨, 등)된다.

본 발명의 기타 바람직한 형태인, 구강 조성물은 실질적으로, 예컨대 치분, 구강정제, 또는 치약류, 즉 치약(구강 크림) 또는 젤과 같이, 특성상 고형 또는 페이스 형태일 수 있다. 상기의 고형 또는 페이스트형 구강 제제의 매체는 일반적으로 구강의 사용에 적합한 연마 물질을 포함한다. 연마 물질의 예는 수불용성 메타인산나트륨, 메타인산칼륨, 인산삼칼슘, 이수화인산칼슘, 무수인산이칼슘, 파이로인산칼슘, 오쏘인산마그네슘, 인산삼마그네슘, 탄산칼슘, 수화알루미나, 소성알루미나, 규산알루미늄, 규산지르코늄, 실리카, 벤토나이트 및 그 혼합물이 있다. 기타 적합한 연마물질은 예컨대 멜라민-, 페놀성- 및 우레아-포름알데하이드, 및 가교 폴리에폭사이드 및 폴리에스테르와 같은 미립자성 열경화 수지를 포함한다. 바람직한 연마 물질은, 평균 입자 크기가 약 1.1 마이크론 이하인, 약 5 마이크론 이하의 입자크기, 약 50,000cm²/gm 이하의 표면적을 갖는 결정형 실리카, 실리카젤 또는 콜로이드성 실리카, 및 복합성 무정형의 알카리금속 알루미늄규산을 포함한다.

시각적으로 투명한 겔을 사용하는 경우, 콜로이드성 실리카 연마물질, 예컨대 상표명 SYLOID로 판매되는 Syloid 72 및 Syloid 74 또는 상표명 SANTOCEL로 판매되는 Santocel 100, 알카리금속 알루미늄규산 복합체가, 치약류 분야에서 통상적으로 사용되는 겔화제-액체 (물 및/또는 습윤제 포함)시스템의 굴절률에 근접한 굴절률을 갖기 때문에 특히 유용하다.

소위 "수불용성" 연마물질로 불리는 많은 연마물질은 특성상 음이온성이며, 적은 양의 가용성 물질을 또한 포함한다. 따라서, 불용성 메타인산나트륨은 Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511에 기재된 바와 같이 임의의 적절한 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 적절한 물질의 또다른 예는 Madrell 염 및 Kurrol 염으로 알려진 불용성 형태의 메타인산나트륨이다. 이들 메타인산 염들은 물에 대한 용해도가 미미하며, 따라서 불용성 메타인산염 (IMP)로 불린다. 불순물로서 적은 양의 가용성 인산물질이 포함되어 있으나, 그 양은 4 중량%와 같이, 수 중량% 일 정도로 미미하다. 불용성 메타인산의 경우 가용성 트리메타인산나트륨을 포함하는 것으로 생각되는, 가용성 인산염 물질의 양은, 필요에 따라 물로 세척하여 감소되거나 또는 제거될 수 있다. 불용성 알카리 금속 메타인산은 전형적으로, 1% 이하의 물질이 그 크기가 1 마이크론 이하인 입자크기를 갖는 분말 형태로서 사용된다.

연마물질은 약 10% 내지 약 99 중량%의 농도의 일반적으로 고형 또는 페이스트 조성물의 형태로 존재한다. 치약 중에는 바람직하게는 약 10% 내지 약 75 중량%로 존재하며, 치분에는 바람직하게는 약 70% 내지 약 99 중량%의 양으로 존재한다. 치약의 경우, 연마물질이 그 성질상 규산성일 경우, 약 10 내지 약 30 중량%의 양으로 존재한다. 기타 연마물질은 전형적으로 약 30 내지 75 중량%의 양으로 존재한다.

치약에서, 액상 매체는 물 및 습윤제를 전형적으로 제제의 약 10 내지 약 80%의 양으로 존재한다. 글리세린, 프로필렌 글리콜, 솔비톨 및 폴리프로필렌 글리콜은 적합한 습윤제/담체의 예이다. 물, 글리세린 및 솔비톨의 액상 혼합물이 또한 바람직하다. 투명겔에서 굴절률이 중요한 요소인 경우에, 물 약 2.5 내지 30 w/w %, 글리세린 0 내지 약 70 w/w % 및 솔비톨 약 20-80 w/w %가 바람직한 양이다.

치약, 크림 및 겔은 전형적으로 천연 또는 합성의 증점제 또는 겔화제를 약 0.1 내지 약 10 w/w %, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 5 w/w %의 양으로 포함한다. 적절한 증점제는 합성 헥토라이트, 합성 콜로이드성 마그네슘 알카리 금속 규산 복

합체 클레이이며, 이는 예를 들면 Laporte Industries Limited에서 Laponite (e. g. CP, SP 2002, D)로서 구입할 수 있다. Laponite D는 대략 58.00 중량%의 SiO₂, 25.40 중량%의 MgO, 3.05 중량%의 Na₂O, 0.98 중량%의 Li₂O, 및 기타 약간 물과 미량의 금속을 포함한다. 이의 실제 비중은 2.53이며, 겔보기 부피밀도는 8% 습도에서 1.0g/ml이다.

기타 적합한 증점제는 아이리쉬 모스, 이오타 카라기난, 트래거캔스고무, 전분, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시에틸프로필셀룰로스, 하이드록시부틸메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스 (예를 들면, Natrosol에서 구입가능), 카르복시메틸나트륨 셀룰로스, 및 콜로이드 실리카 예컨대 미세한 분말의 Syloid (e. g. 244)를 포함한다. 사용될 수 있는 가용화제는 습윤성 폴리올류 예컨대 프로필렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜 및 핵실렌 글리콜, 셀로솔브 예컨대 메틸셀로솔브 및 에틸셀로솔브, 올리브오일, 피마자유 및 광유(petrolatum)과 같은 직쇄상의 최소 약 12개 탄소를 포함하는 식물성유 및 왁스, 아밀아세테이트, 에틸아세테이트 및 벤질 벤조에이트와 같은 에스테르를 포함한다.

통상적으로, 구강제제는 적절하게 표시가 되어있는 포장에 담겨 팔리거나 또는 유통될 것으로 이해될 것이다. 따라서, 구강제정제병은 구강제정제 또는 구강세척제로서 그 성분 및 용도를 기술하는 표시가 되어 있을 것이며, 치약, 크림 또는 젤은, 치약, 젤 또는 치약 크림으로서, 그 성분을 기술하는 표시가 된, 안의 내용물을 밖으로 분배하는, 접히는(collapsible) 튜브 용기, 전형적으로는 알루미늄, 안을 댄 납 또는 플라스틱, 또는 기타 찢 수 있는 용기, 펌프, 또는 기밀(氣密) 구조에 담길 것이다.

유기성 표면활성제는 증가된 예방활성을 위해 본 발명의 조성물에 사용되며, 구강의 전체에 빈틈없고 완전히 활성제가 분산될 수 있도록 도움을 주며, 본 발명의 조성물을 화장품용으로 보다 적합하게 만든다. 상기 유기 표면활성제는 바람직하게는 본 발명의 항미생물성 펩타이드를 변성(denature)시키지 않을, 본질상 양쪽성, 음이온성, 또는 비이온성이며, 표면활성제로서, 본 발명의 펩타이드는 변성시키지 않으면서, 본 발명의 조성물에 세척성 및 거품성을 부여하는 세척성 물질을 사용하는 것이 바람직하다. 음이온성 계면활성제의 예로서 적합한 물질은 고급 지방산모노글리세리드 모노설페이트, 예컨대 수소로 경화처리된 코코넛 오일 지방산의 모노설페이트화 모노글리세리드의 나트륨염, 고급 알킬설페이트 예컨대 소디움로틸설페이트, 알킬아릴설포네이트 예컨대 소디움도데실벤젠설포네이트, 고급 알킬설포아세테이트, 1,2-디하이드록시프로판 설포네이트의 고급 지방산 에스테르, 및 실질적으로 포화된 고급 지방족 아실아미드의 저급 지방족 아미노 카르복실산 화합물, 예컨대, 지방산에 12 내지 16개의 탄소원자를 갖는 알킬 또는 아실라디칼 갖은 것 등을 들 수 있다. 마지막으로 언급한 아미드의 예는 N-라우로일 사르코신, 및 비누성분 또는 유사한 고급 지방산 물질이 실질적으로 들어 있지 않은 N-라우로일, N-미리스토일, 또는 N-팔미토일 사르코신의 나트륨, 칼륨, 및 에타놀아민 염이 있다. 본 발명의 구강 조성물에 이러한 화합물의 사용은 이러한 물질이 산성 용액에서의 치아 상아질의 용해도를 감소시키는 효과에 부가하여 탄수화물의 분해로 인한 구강내의 산 형성의 억제에 장기간의 현저한 효과를 나타내기 때문에 특히 장점이 있다. 펩타이드와의 사용에 적합한 수용성 비이온성 계면활성제의 예는 에틸렌 옥사이드와의 긴소수성 사슬을 갖는, 반응성을 보이는, 다양한 반응성 수소함유 화합물과의 축합산물이며, 이러한 축합산물("에톡사머")은 친수성 폴리옥시에틸렌 모이어티, 예컨대 폴리(에틸렌옥사이드)와 지방산, 지방알콜, 지방아미드, 다가 알코올(예를 들면, 소르비탄 모노스테아레이트) 및 폴리프로필렌옥사이드 (예를 들면, 폴루론 물질)의 축합산물을 포함한다.

표면활성제는 전형적으로 약 0.1 내지 5 중량%의 양으로 존재한다. 표면활성제는 본 발명의 펩타이드의 용해에 도움을 줄 수 있으며, 이로 인해 필요한 가용성 습윤제량이 감소된다.

예컨대 표백제, 보존제, 실리콘, 클로로필 화합물 및/또는 예컨대 우레아, 디암모늄 포스페이트 및 그 혼합물과 같은 암모늄 물질이 본 발명의 구강제제에 포함될 수 있다. 이들 아주번트는 존재하는 경우 목적하는 성질 및 특성에 실질적으로 악영향을 주지 않는 양으로 제제에 혼입된다.

임의의 적절한 풍미제 또는 감미제가 또한 사용될 수 있다. 적절한 풍미제의 예는 풍미유, 예를 들면, 스페아민트, 페퍼민트, 윈터그린, 사사프라스, 클로버, 세이지, 유칼리나무, 마저럼(marjoram), 시나몬, 레몬 및 오렌지, 및 메틸살리실레이트가 있다. 적절한 감미제는 수크로스, 락토스, 말토스, 소르비톨, 자일리톨, 시클라메이트나트륨, 페릴라르틴, AMP(아스파르트틸페닐알라닌, 메틸에스테르), 사카린 등을 포함한다. 적절하게 풍미제 및 감미제는 개별적으로 또는 함께 제제의 약 0.1 내지 5% 이상을 포함한다.

본 발명의 한 바람직한 예에서, 본 발명의 조성물을 포함하는 예컨대 구강세척제 또는 치약과 같은 본 발명에 따른 구강조성물은 바람직하게는 잇몸 및 치아에, 예컨대 매일 또는 이틀 또는 삼일에 한 번씩, 또는 바람직하게는 하루 1회 내지 3회에 걸쳐, 약 4.5 내지 약 9의 pH에서, 일반적으로는 약 5.5 내지 약 8, 바람직하게는 약 6 내지 8의 pH에서, 적어도 2주 내지 8주까지 또는 평생 규칙적으로 적용된다.

본 발명의 조성물은 로젠지 또는 슈잉검 또는 기타 제품에, 따뜻한 검 베이스에 섞어 넣거나 또는 검 베이스의 외부표면을 코팅하여 혼입될 수 있으며, 이의 예는 바람직하게는 통상의 가소제 또는 연화제, 슈가 또는 기타 감미제 또는 예컨대 글루코스, 소르비톨 등과 함께 사용되는 젤루통, 러버라텍스, 비닐라이트수지 등을 수 있다.

다른 구현예에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 0.01 내지 10 w/w%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 5 w/w%, 가장 바람직하게는 1 내지 5 w/w% 및 특히 2 w/w %를 포함하는 보존제로서 식품으로 제형화된다.

본 발명은 상술한 이가양이온 및 펩타이드를 담체와 함께 포함하는 약학조성물을 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 국소 또는 전신 적용용 치료성 항-감염 조성물, 치아, 구강내 조성물로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 치아 조성물 또는 치료성 조성물은 젤, 액상, 고상, 분말, 크림 또는 로젠지의 형태일 수 있다. 치료성 조성물은 또한 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있다.

본 발명은 또한 충치 또는 잇몸 질환의 치료 또는 예방 방법으로, 상기 방법은 본 발명의 조성물을 상기 치료가 필요한 대상체의 치아 또는 잇몸에 투여하는 단계를 포함한다. 본 조성물은 국소 투여가 바람직하다.

본 발명은 특별히 인간에의 적용을 언급하였지만, 본 발명이 또한 수의과적 사용에도 적합하다는 것이 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 모든 양태에서 본 발명은 예컨대 소, 양, 말 및 가금류와 같은 가축 및 고양이 및 개와 같은 애완동물 및 동물원의 동물에의 사용에도 또한 유용할 것이다.

본 발명의 특성을 보다 명확하게 이해하기 위하여, 이의 바람직한 구현예를 하기 비제한적 실시예를 참조로 하여 설명한다.

실시예

재료 및 방법

카파신 제제

카세이네이트-HCl(Bonlac Foods, Melbourne Australia)를 일정하게 저으면서, pH 8의 50°C의 탈이온수에 서서히 넣어 최종 농도 21.5 g/L가 되게 용해하였다. 일단 카세이네이트가 용해하면, 온도를 37°C로 낮추고 카세인의 침전을 피하기 위하여 1M HCl을 천천히 첨가하여 pH를 6.3으로 맞춘다. 가수분해 개시를 위해, Rennet (90% Chymosin EC 3.4. 23.4, 145 IMCU/ml, Single Strength, Chr. Hanson)을 최종농도 1.2 IMCU/g 카세인으로 첨가하고 37°C에서 1시간 교반하였다. 용액의 pH를 1 M HCl 및 1 M NaOH를 첨가하여 pH 6.3±0.2로 유지하였다. 트리클로로아세트산을 최종 농도 4%로 첨가하여 가수분해를 중단하고, 침전된 단백질은 원심분리하였다 (5,000g, 15분, 4°C). 카세이노마크로펩타이드(CMP)를 포함하는 상층액을 3000 Da 분자량 차단 막(S10Y3, Amicon)을 사용하여, 정용여과(diafiltration) 방식으로 농축하였다. 여과된 물질은 동결건조하였다. 상기 제제는 종래 기술된 바와 같이(Malkoski et al., 2001), C₁₈ 컬럼을 사용하며, 90% 아세토니트릴/0.1% v/v TFA로 용출하는 역상 HPLC를 사용하여, 글리코실화 형태, 비글리코실화 κ-카세인-A (106-169) 및 비글리코실화 κ-카세인-B (106-169) 형태로, 추가로 분획되었다. 용출액은 215nm의 주파장을 사용하여 모니터 링하였다. 각 분획의 정체는 Voyager linear matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometer (MALDI MS; PerSeptive Biosystems, MA, USA) 및 N-말단 서열 분석을 사용하여 종전에 기술된 대로 규명하였다 (Malkoski et al., 2001).

고상 펩타이드 합성 및 정제

Ser(P)¹⁴⁹ κ-카세인-A(138-158) 및 Ser(P)¹⁴⁹ κ-카세인-B (138-158)에 상응하는 펩타이드를 종전에 기술된 대로 표준 고상 펩타이드 합성방법을 사용하여 합성하였다 (Malkoski et al., 2001). 펩타이드는 C₁₈ 컬럼을 사용하여 역상 HPLC를 사용하여 정제하였고, 종래 기술된 바대로 질량 분광법을 사용하여 규명하였다 (Malkoski et al., 2001).

항박테리아성 플랑크톤 분석

구강의 기회감염 병원균인 스트렙토코커스 뮤탄스 잉그브리트 (*Streptococcus mutans* Ingbritt)를 본 연구에서 제시자(indicator) 균주로서 사용하였다. 항박테리아 분석은 96웰 플레이트에서 수행하였으며, 종전에 기술한 바대로 박테리아의

성장은 40시간에 걸쳐 연속적으로 모니터링하였다 (Malkoski et al., 2001). 요약하면, 박테리아는 이스트 추출물 (5.0g/L) 및 100mM 칼륨인산을 포함하는 pH 6.3 또는 7.2의 Todd Hewitt Broth (36.4g/L)에서 배양하였다. 박테리아 접종물은 기하급수적 성장기의 세포를 성장배지에 2.7×10^4 생세포/ml의 농도로 희석하였다. 박테리아 성장 분석에서, 테스트 웰은 κ -카세인-A(106-169) 또는 κ -카세인-B(106-169)을 20 내지 120 μ M의 농도로 포함하였다. 이들 펩타이드는 또한 카파신:이가금속이온을 1:1 내지 1:4의 비율로 하여 아연 또는 칼슘 이온과 조합으로 테스트되었다. 합성 Ser (P)¹⁴⁹- κ -카세인-A(138-158) 및 Ser (P)¹⁴⁹- κ -카세인-B(138-158) 펩타이드를 또한 본 분석에서 테스트하였다. 상기 플레이트를 37°C에서 인큐베이션하고, 620nm에서 iEMS 마이크로플레이트 판독기(Labsystems, OY Research Technologies Division)를 사용하여 흡광도(OD)를 분석하였다.

S. mutans의 바이오필름 성장

균일한 두께의 필름 발효기(CDFF: Wimpenny, Cardiff University, UK)를 사용하여 바이오필름을 형성하였다. 상기 CDFF는 일정한 3rpm의 속도로 회전하며, 직경 4.5mm의 플러그 5개를 포함하는 15 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 팬을 포함하는 철강 디스크로 구성된다. 상기 플러그는 상기 철강 디스크의 0.4mm 아래에 위치하였다. 내장된 스크레이퍼를 사용하여 바이오필름의 두께를 0.4mm로 일정하게 유지하였다. 상기 스크레이퍼는 스테인레스 철강 디스크가 이들 아래에서 회전하도록 부착된다; 상기 스크레이퍼에는 스프링이 장착되어 있어서, 팬에 대하여 눌러있게 된다. N₂ 중의 5% CO₂ 가스를 연속적으로 공급하여 CDFF에 무기호흡 대기를 유지하였다. 상기 CDFF는 변형된 CO₂ 인큐베이터에 들어있으며, 이는 배양온도를 37°C로 일정하게 유지하기 위해 사용되었다. Todd Hewitt (35.4g/l), 이스트 추출물 (8 g/L) 브로스 (THYE) 중에서 기하급수적 성장을 하는 *S. mutans* Ingbritt 배지 배양물을 사용하여 CDFF를 5시간 동안 30ml/h의 유속에서 접종하였다. 상기 배양배지, 0.1% (w/v) 슈크로스를 포함하는 THYE를 이어서 40ml/h의 일정한 유속으로 CDFF로 펌프하여 넣었다.

상기 용액으로의 처리 전 및 후의 특정 시간에, 플러그를 CDFF에서 제거하고 세척하여 플랑크톤 성 박테리아를 제거하고, 살아있는 박테리아의 수를 계측하였다. 다양한 용액이 세포 생활도에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 상기 CDFF에의 성장 배지의 첨가를 10분 동안 중단하고, 이를 30 ml/h의 유속으로 용액으로 대체하였다. 10분 후에, 성장 배지 첨가를 개시하였다. CDFF에 테스트된 용액은 다음과 같다: 2 mM Tris-HCl pH6.0; 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 10 mg/ml 카파신 제제(상기 참조); 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 10 mg/ml 카파신 제제(상기 참조) 및 20 mM ZnCl₂; 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 20 mM ZnCl₂; 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 2 mM ZnCl₂; 및 탈이온수 중의 0.05% 클로로헥시딘 디글루코네이트.

이가금속 양이온 결합 분석

135 내지 540 μ M 사이의 특정 농도의 CaCl₂ 또는 ZnCl₂를 135 μ M의 농도의 정제된 κ -카세인-A(106-169)와 37°C, pH 7.3의 물에서 1시간 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 시료를 이어서 3,000 Da 분자량 차단 여과막 (YM3 셀룰로스, Millipore Bedford Ma, USA) 을 통하여 원심분리(1,000 g, 10 분)하여, 결합하지 않은 이가 양이온을 펩타이드에 결합한 양이온으로부터 분리하였다. 여과물 및 초기 시료 중의 칼슘 또는 아연 이온의 양을 각각 422.7 nm 또는 213.9 nm의 흡광모드로 셋팅된 원자 흡수 분광광도계 (Model 373 AAS, Perkin-Elmer)를 사용하여 결정하였다. 시료 중에 존재하는 아연 또는 칼슘의 총량 및 결합하지 않은 자유 아연 또는 칼슘의 총량은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다. κ -카세인-A(106-169)에의 결합은 Scatchard 분석법으로 결정하였다.

구조 결정

합성 Ser (P)¹⁴⁹- κ -카세인-A(138-158)의 1차원 ¹H NMR 스펙트라를 600MHz에서 작동되는 Varian Unity Inova 분광광도계 (Palo Alto, Ca, USA)를 사용하여 취득하였다. 일련의 스펙트라를 0, 5, 15 및 30%(v/v) 농도의 트리플루오로에탄올(TFE) 및 초기 농도 3mM의 펩타이드에 대하여 일정한 pH 6.5에서 기록하였다. 상기 pH는 1M HCl를 적가하여 조정하였다. 스펙트럼을 30% TFE 중의 최종 2.3mM 농도의 펩타이드 및 3mM CaCl₂에 대하여 기록하였다. 모든 스펙트라는 5°C의 프로브온도에서 기록되었다. 용매억제는 WET-1D 서열을 사용하여 달성되었다 (Smallcombe et al., 1995).

임상시험

열 명의 대상자를 모집하여 이중맹검, 교차 연구를 수행하였다. 모집한 대상자는 멜버른 대학교, 치과대학에 다니는 학부 학생이었다. 대상자군은 6명의 여자 및 4명의 남자로 구성되었으며, 평균 나이는 21세이었다. 시험시작 개시 전에 대상자를 검사하여, 중간 내지 심각한 정도의 잇몸질환을 갖거나 또는 치료되지 않는 충치가 없는 치열을 갖으며, 건강상태는 양호한 것을 확인하였다. 상기 대상자는 시험개시전에는 항미생물제를 포함하는 어떤 치약제제도 사용하지 않았다. 멜버른 대학교의 인간대상 연구 윤리위원회 (the Human Research Ethics Committee)의 승인을 얻었다.

임상시험의 개시시, 대상자들에게 모든 다른 형태의 구강위생 활동을 중지하고, 오로지 할당된 구강세정 용액만을 사용할 것을 지시하였다. 4가지 종류의 용액을 본 시험에서 구강세정제로서 시험하였다: 용액 A: 탈이온수. B: 탈이온수 중의 1% (w/v) 카파신 제제. C: 탈이온수 중의 20 mM ZnCl₂. D: 탈이온수 중의 1% (w/v) 카파신 제제 및 20 mM ZnCl₂. 모든 용액의 pH는 KOH를 사용하여 6.9±0.1로 맞추었다. 대상자에게 매일 3회 구강세정을 하도록 지시하였다: 15ml의 용액을 사용하여 1분 동안 아침, 점심 및 저녁. 각 시험기간은 4일 동안 계속되었으며, 시험 마지막에 임상평가를 하였다. Silness 및 Loe Plaque Index (PI)을 사용하여 플라크를 평가하였다 (Silness and Loe, 1964).

각 치아 표면의 잇몸질환 부위 (후방, 볼쪽, 안쪽(mesial) 및 혀쪽)에 0 내지 3의 점수를 부여하였다. 제3 어금니를 제외한 모든 치아에 대하여 시험의 결론시 점수를 매겼다. 각 시험 기간 후에, 대상자는 다음 임상시험 전 일주일 동안에 통상의 구강위생 습관을 재개하였다. 데이터는 비변수적 Wilcoxon rank 검사법으로 분석하였다.

결과

κ-카세인 (106-169)의 유전적 변이체의 항박테리아 활성

카파신[κ-카세인 (106-169)]의 두 개의 주요한 유전적 변이체간의 상대적 활성의 차이가 종전에 규명된, κ-카세인-A (06-169), 잔기 138-158의 활성부위의 서열차이에 기인하는지 여부를 결정하기 위하여, Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-B(138-158)을 합성하여 이의 활성을 테스트하였다. 합성된 Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-B(138-158)의 순도를 역상 HPLC를 사용하여 측정할 결과, 하나의 단일 피크가 관찰되었다 (도 1). 질량 분광법을 사용하여 수득한 상기 피크의 분석결과 관찰된 질량 (m/z)은 2233.9 Da이었으며, 이는 합성 펩타이드인 Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-B(138-158)의 계산된 질량에 상응하는 것이었다 (도 2). 상기 합성된 Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-B(138-158) 펩타이드를 마이크로플레이트 성장분석에서 pH 6.28에서 자라는 *S. mutans*에 대하여 시험된 경우, 계산된 MIC는 44μM이었다.

카파신과 이가 금속 양이온과의 상호작용

합성 활성 부위 펩타이드인 [Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-A(138-158) 및 Ser(P)¹⁴⁹κ-카세인-B(138-158)] 또는 정제된 전장 펩타이드의 유전적 변이체를 pH 7.20에서 *S. mutans*에 대하여 시험한 경우, *S. mutans*의 성장은 300μM까지에서는 억제되지 않았다. κ-카세인(106-169)의 두 개의 유전적 변이체를 동일 몰 농도의 항 박테리아성 이가 양이온 Zn²⁺의 존재 중에서 pH 7.20에서 박테리아의 활성 억제에 대하여 시험한 경우, 상승적 효과가 관찰되었다 (도 3). 아연 이온 단독은 MIC가 200μM 이며, 이는 1:1의 비로 시험된 경우에 카파신 및 아연의 상승적 효과를 차단하였다. 흥미롭게도, 아연 이온을 칼슘 이온으로 대체한 경우, κ-카세인-A(106-169)의 경우는 항박테리아 효과가 검출되었으나, 300μM까지 1:1의 비에서 κ-카세인-B(106-169) 및 칼슘은 *S. mutans*에 대한 효과가 없었다 (표 2).

*S. mutans*에 대하여, 마이크로플레이트 성장분석을 통하여 다양한 비를 테스트 하여, 생활성을 위한, 칼슘 대 κ-카세인-A (106-169)의 적정 비를 결정하였다. 2: 1의 비가 1: 1의 경우보다 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 반면, 칼슘 대 κ-카세인-A (106-169)의 비를 1:4까지 올려도 활성은 증가하지 않았다 (도 4).

이가 양이온 Zn²⁺와 κ-카세인-A (106-169)를 사용한 결합 분석을 Scatchard 법으로 분석한 결과 상기 펩타이드에는 두 개의 결합 부위가 있는 것으로 나타났다 (도 5), 칼슘 결합 분석에서도 유사한 결과를 수득하였다.

[표 2]

	MIC (μM)
κ -casein-A(106-169)	NI
κ -casein-B(106-169)	NI
κ -casein-A(106-169) and Calcium	248
κ -casein-B(106-169) and Calcium	NI
κ -casein-A(106-169) and Zinc	161
κ -casein-B(106-169) and Zinc	200
Ser(P) ¹⁴⁹ κ -casein-A(138-158) and Zinc	149
Ser(P) ¹⁴⁹ κ -casein-A(138-158)	NI
ZnCl ₂	200
CaCl ₂	NI

* 1mM 이하의 농도에서 억제하지 않음

상기 표는 단독으로 또는 아연 또는 칼슘과 1:1의 비의 조합으로 *S. mutans*에 대하여 pH 7.20 에서 테스트된 비글리코실화, 인산화된 κ -카세인 (106-169) 및 합성 펩타이드 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-A(138-158)의 두 개의 유전적 변이체의 최소억제 농도를 나타낸다.

바이오필름으로 배양된 스트렙토코쿠스 뮤탄스의 생활도에 미치는 카파신 및 아연의 효과

CDFE 바이오필름 배양기로 접종된 후, *S. mutans*는 신속하게 플러그당 5~6 x 10⁸ 생세포를 포함하는 안정된 바이오필름을 형성하였다. 5 ml의 2 mM Tris-HCl pH 6.0의 첨가는 상기 바이오필름의 *S. mutans*의 생세포수에 거의 영향이 없었다. 대조적으로, 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 5ml의 1%(w/v) 카파신 제제를 첨가하면, *S. mutans*의 생세포수에 급격한 감소가 나타나며, 첨가 후 2시간이며 생세포수가 99.5% 감소된다. *S. mutans* 바이오필름의 회복은 카파신의 첨가 후에 느려졌으며 첨가 3일 후 박테리아수는 여전히 처리하기 전 수준의 13% 미만이었다. CDFE 중의 안정한 *S. mutans* 바이오필름에의 5 ml의 2 mM Tris-HCl pH 6.0 중의 2mM ZnCl₂의 첨가는 세포수를 약 60% 정도 감소시켰다. 생세포의 수는 이러한 처리로부터 급격히 회복하였다. 동일한 방식으로 상기 바이오필름에 20mM ZnCl₂의 첨가는 생세포수에 있어 약 92%의 감소를 초래하였다. 마찬가지로 생세포수의 빠른 회복이 관찰되었다. *S. mutans* 바이오필름에의 카파신:아연(1% w/w 카파신, 20mM Zn)의 첨가는 2시간에 96.0%의 감소를 야기하며, 생세포수에 있어 급격한 감소를 야기하였다. 그러나, 카파신:아연 처리 3일 후, 바이오필름 중의 살아있는 *S. mutans*의 수는 처리전 수준의 0.5% 미만으로 감소하였다. 나아가, 바이오필름 중의 *S. mutans*의 생활도는 그 뒤 15일에 걸쳐 회복되지 않았다. 카파신 및 카파신:아연의 효능 비교 검사를 위해, 0.05% (w/v)의 클로르헥시딘 디글루코네이트 용액을 CDFE 바이오필름 배양기의 *S. mutans*에 대하여 테스트 하였다. 48%의 *S. mutans* 세포 생활도 감소는 처리 후 3.5시간 후에 처리 전의 생활도와 실질적으로 차이가 없을 정도로 빠른 회복을 보였다.

구조적 분석

90% H₂O/10% D₂O 용액 중에서 기록된 합성 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-A(138-158)의 ¹H 스펙트럼의 아마이드 영역은, 아마이드 공명이 잘 분산되지 않으며, 약 88.15부터 88.75에 걸친 0.6ppm 영역에서 나타나는 것을 보여준다. 이는 '무작위-코일' 형태의 펩타이드의 특성이다. 5% (v/v) TFE의 첨가는 일부 공명에 있어 화학적 시프트 및 피크의 일반적인 광폭화

를 초래하였다. 상기 피크의 광폭화는 화학적 교환의 결과이며, 이 경우 펩타이드 분자는 두 가지의 환경, 즉 수용액 또는 보다 비극성인 TFE 미셀 환경에서 존재한다. 펩타이드 분자는 상기 두 가지 환경에서의 아마이드 화학적 시프트의 차이에 필적하는 속도로 이들의 환경에서 교환한다. TFE를 시료에 더 많이 첨가하면 할수록, 펩타이드는 비극성 TFE 환경과의 연합을 선호하며, 수성상과의 교환속도는 느려진다. 이러한 변화는 아마이드 화학적 시프트 및 NMR 공명의 일반적인 샤프닝에 있어서의 추가의 변화와도 관련되어 있다. 그러나, 화학적 시프트의 범위는 약 88.1 내지 88.7의 0.6ppm의 범위로 상대적으로 여전히 적으며, 이는 펩타이드가 여전히 '무작위코일' 형태에 있는 것을 의미한다. 칼슘 이온을 몰(mole) 과량으로 첨가하면, 특정 구조를 갖는 펩타이드의 특징적 범위인, 87.75 내지 89.0에 걸친 1.25ppm 범위에 걸쳐 퍼져있는 아마이드 공명을 초래한다.

임상시험

시중에서 구입한 카파신이 풍부한 CMP를 사용하여 이중맹검, 교차 방식으로, 10명의 대상자를 대상으로 하여 작은 규모로 항플라크 임상시험을 수행하였다. 상기 제제의 HPLC 분석 결과에 의하면 1ml용액당 10.0mg 중에, ml당 4.4mg의 비글리코실화 κ -카세인-A(106-169), ml 당 1.9mg의 비글리코실화 κ -카세인-B(106-169) 및 ml 당 3.0mg의 글리코실화 κ -카세인 (106-169)가 있는 것으로 나타났다. 글리코실화 κ -카세인-A(106-169)에 대하여 계산된 평균 분자량 7500을 기본으로 하여, 제제 중에는 모든 형태의 κ -카세인 (106-169)의 농도는 ~1.33mM이었고, 그러므로, Zn: CMP의 비는 ~15:1이었다.

유일한 구강위생제의 형태로서, 물(대조군) 구강세정제 사용 4일 후에, 평균 전체 구강 Silness 및 Loe Plaque Index Score는 178.9 ± 33.5 이었다; 단지 뒤쪽 치아를 고려한 경우에, 평균 Plaque Index Score는 85.9 ± 14.4 이었다. 물 대조군과 비교하여, 카파신 구강세정은 뒤쪽 치아의 평균 Plaque Index Score에 있어 7%의 감소를 초래하였으며, ZnCl₂ 구강세정은 9%의 감소를 초래하였으며, 반면 Zn:카파신 치료는 21%의 감소를 초래하였다 (도 6). ZnCl₂ 구강세정은 물 치료와 비교하여 플라크 축적을 상당히 감소시켰으며 ($P < 0.05$), 이는 뒤쪽 치아 플라크 인덱스 스코어를 고려한 Wilcoxon rank 검사법으로 결정하였다. 카파신 구강세정은 물 대조군과 비교하여 유의적으로 큰 차이가 없었다. Zn: 카파신 구강세정은 모든 다른 치료와 비교하여 플라크 축적을 상당히 감소시켰다 ($P < 0.05$).

뒤쪽 치아에 대한 플라크 스코어의 분포는 또한 사용한 구강세정제 유형에 따라 변화하였다. Zn: 카파신을 포함하는 구강세정제는 플라크 인덱스 스코어가 2 이상인 표면은 단지 47%인 반면, 물 구강세정제의 경우에는 플라크 인덱스 스코어가 2 이상인 표면이 78%이었다 (도 7).

검토

비글리코실화, 인산화 형태의 카세이노마크로펩타이드 [κ -카세인(106-169)] (카파신)은 산성 pH에서 그람 양성 및 그람 음성의 구강 박테리아 모두에 대하여 항박테리아 활성을 나타내었다. 6개의 공지된 유전적 변이체중, κ -카세인-A(106-169) 및 κ -카세인-B(106-169)이 월등히 가장 풍부한 형태이다. 종전에 본 발명자들은 카세인-A(106-169)이 κ -카세인-B(106-169)보다 더 우수한 항박테리아 활성을 갖는 것을 밝혀내었으며, 상기 박테리아 카세인-A(106-169)의 항박테리아 활성은 잔기 138~158에 위치할 수 있으며, Ser¹⁴⁹의 인산화가 활성에 필수적임을 밝혔다 (Malkoski et al., 2001, W099/26971). κ -카세인-B(106-169)의 낮은 박테리아 활성이 138 ~ 158 영역에서의 친수성 아미노산의 소수성 아미노산으로의 치환(변이체 A에서는 Asp¹⁴⁸이며, 변이체 B에서는 Ala¹⁴⁸임)에 기인하는지 여부를 결정하기 위하여, 합성 펩타이드 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-B(138-158)의 활성을 결정하였다. pH 6.28에서의 S.mutans에 대한 합성 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-B(138-158)의 MIC는 44 μ M이었으며, 동일한 조건에서의 합성 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-A(138-158)에 대한 MIC가 26 μ M인 종전의 연구와 비교하였다 (Malkoski et al., 2001). 그러므로, 활성부위의 아미노산의 차이는 전부가 아니라면 대부분, pH 6.28에서의 S. mutans에 대한 κ -카세인(106-169)의 A 및 B 유전적 변이체의 활성 차이를 설명한다.

중성 pH (7.20)에서는, 비글리코실화, 인산화 κ -카세인 (106-169) 유전적 변이체의 어느 것도 제시중인 S. mutans 에 대하여 항박테리아 활성을 보이지 않았다 (표 2). 1:1의 비로 κ -카세인(106-169)과 이가 금속 양이온 아연의 첨가는 S. mutans에 대하여 MIC 161 μ M의 항 박테리아 효과를 나타내었으며, 이는 아연 단독을 사용한 경우와 비교하여 낮은 값이었다(표 2, 도 3). 1:1로의 아연과 κ -카세인-B (106-169)의 조합은 아연 단독과 비교하여 낮은 MIC값을 나타내지 않았지만, 그러나, MIC 아래의 농도에서 상기 조합은 동일한 농도의 아연 또는 κ -카세인-B (106-169) 단독에서는 검출되지 않았던, 일부 성장 억제 효과를 갖고 있었다 (도 3). 아연과 합성 펩타이드 Ser(P)¹⁴⁹ κ -카세인-A(138-158)의 1:1로의 조합은 아연: κ -카세인-A (106-169)에서 관찰된 것과 유사한 MIC를 나타냈으며, 이는 이가 금속이온은 펩타이드의 이 영역에서 상호작용할 수 있다는 것을 나타낸다. 이러한 중성 pH에서의 향상된 활성이 아연의 항박테리아 활성에 기인하는 것인

지 또는 펩타이드 칼슘의 구조의 변화에 기인하는 것인지를 결정하기 위하여, 항박테리아 활성이 없는 이가 금속 양이온을 CMP-유래의 펩타이드와 테스트하였다. 1:1의 비로 칼슘과 κ -카세인-A (106-169)의 첨가는 248 μ M의 MIC로 *S. mutans*에 대하여 항박테리아 효과를 나타내었다 (표 2). 칼슘 이온 단독으로는 1mM 이하의 농도 이하에서 *S. mutans*에 대하여 항박테리아 효과를 나타내지 않았다. 칼슘과 κ -카세인-B (106-169)의 조합에서는 항박테리아 활성이 검출되지 않았다 (표 2). 이는 이가 금속 양이온의 존재가 중성 pH에서 가능하게 펩타이드의 구조를 변형시킴으로서, κ -카세인-A (106-169)의 활성의 강화를 돕는 것을 나타낸다. 칼슘을 사용한 경우, 이가 금속 양이온 대 κ -카세인-A (106-169)의 가장 효과적인 비는 2:1인 것으로 결정되었으며 (도 4), 이는 κ -카세인-A (106-169)의 이가 금속 양이온(칼슘 또는 아연; 도 5)에의 특이적 결합을 나타내는 Scatchard 분석의 결과와 일치하는 것이다.

생체내 구강 박테리아는 단단한 조직(치아)에 부착된 바이오필름으로서의 치아 플라크로서 발견되었다. 보다 근접한 구강 조건에 근접한 조건을 만들기 위해, 일정 두께의 필름 배양기에서 슈크로스가 들어 있지 않은 배지에서 *S. mutans*를 바이오필름으로서 키웠다. 제제의 항미생물 활성을 보다 정확하게 결정하기 위해서는 바이오필름 모델에서 테스트하여야만 한다 (Wilson, 1996). 일정한 두께의 필름 배양기는 항플라크 활성에 대하여 예측가능한 결과를 나타내는 항미생물제제의 효과의 정량에 사용될 수 있는 다수의 바이오필름을 재현성 있게 생산하는 정교한 수단을 제공한다 (Hope and Wilson, 2003; Shu et al., 2003; Wilson, 1996; Wimpenny et al., 1989). 카파신 또는 카파신:아연 용액을 *S. mutans* 바이오필름에의 첨가는 생세포의 수를 급격하게 감소시켰다. 흥미롭게도, 이러한 박테리아 세포수의 감소는 오랜 기간 동안 지속되었으며, 이는 카파신이 플라크톤성 박테리아보다 바이오필름 박테리아에 대하여 보다 효과적으로 작용하는 것을 나타낸다. 구강세정제에 있어 항플라그성 첨가제로서 인식된 클로르헥시딘 0.05% 용액과 비교하여, *S. mutans* 생활도에 대한 효과가 적었으며, 지속효과도 떨어졌다.

카파신은 특이한 항박테리아성 펩타이드로서, 높은 비율의 음하전된 아미노산을 포함한다. κ -카세인-A (106-169)의 Pi는 3.9이며, 5 내지 8에 걸친 pH 범위에서, 분자의 하전상태에는 대략 -7로서 거의 변화가 없다.

합성 펩타이드 κ -카세인-A (106-169)의 구조적 분석은 이 펩타이드가 비극성 상, 예컨대 박테리아 세포막과 상호작용하며, 과량의 칼슘 이온의 존재 중에서, 환경에 맞는 특이적 구조를 갖는다는 것을 나타낸다. 이러한 결론은 Smith 등(2002) 및 Plowman (1997)의 결과와 일치하는 것으로, 상기 Smith 등은 칼슘의 부재 중에서의 글리코실화 및 비글리코실화된 CMP의 구조를 결정하여, 이들이 대체로 무작위의 유연적 구조인 것을 밝혔으며, Plowman은 TFE의 존재 중에서 CMP의 상기 부위가 양친매성 알파-나선을 형성하는 경향이 있다는 것을 발견하였다.

카세인으로부터 제조된 시중의 카파신 제제를 임상 항플라크 시험에 사용하였다. 이 제제에서, CMP의 비글리코실화 형태(카파신)는 건조 중량의 63%이며, 이중 70%는 유전적 변이체 A이며, 30%는 B이었다. 카파신-아연 조합의 구강세정제는 카파신 또는 아연을 단독으로 포함하는 구강세정제보다, 유일한 구강 세정 방법으로 사용된 경우 치은상(supragingival) 치아 플라크를 실질적으로 더욱 효과적으로 제어하며, 이는 상승효과를 제시하는 것이다. 시트르산아연은 종전에 이중맹검 교차 시험에서 대상체에서의 Turesky 플라크 인덱스를 사용한 측정에 의하면, 플라크 축적을 5~8% 정도 상당히 감소시키는 것으로 나타났다 (Addy et al., 1980). 염화아연 구강세정제는 본 연구에서 유사한 결과를 나타냈으며, 여기에서 평균 전체 구강 플라크 텍스 스코어, 평균 뒤쪽 치아 플라크 인덱스 스코어는 각각 6% 및 9% 감소하였다. Giertsen 등 (1988)은 구강세정제로서 염화아연의 사용은 물 대조군과 비교하여, Silness 및 Loe 플라크 인덱스를 사용한 경우, 플라크가 없는 치아 표면에 9%의 상당한 플라크의 증가를 초래한다는 것을 보여주었다. 비록 카파신 구강세정제는 물과 비교하여 뒤쪽 치아에 있어 7%의 치은상 플라크의 감소를 나타냈지만, 이러한 플라크의 감소는 대조군과 비교하여 통계적 차이가 있는 것은 아니다. 본 연구에서, Silness 및 Loe 플라크 인덱스를 플라크 두께의 변화, 특히 잇몸 경계의 플라크 두께의 변화를 나타내기 위해 사용하였으며, 이는 치아 표면의 플라크의 분포에 변화와 비교하여 관찰이 더 용이하다. 그러므로, 시험기간(5일)이 짧았고 대상자의 수가 적었기 때문에 Silness 및 Loe 인덱스는 가장 적절한 플라크 스코어링 시스템이었다. 염색되지 않은 플라크 스코어는 염색된 플라크 스코어보다 잇몸질환, 건조 및 습 플라크 중량과 연관성이 보다 높은 것으로 나타났다 (Loesche and Green, 1972).

아연 및 주석 염은 항박테리아 활성을 가지면, 상대적으로 높은 안정성 프로파일을 갖는 것으로 오랫동안 인식되어 왔다 (Moran et al., 2000). 아연은 활성 티올기를 포함하는 효소와의 상호작용을 통하여, 당분해를 포함하는 막수송 및 대사과정을 방해함으로써, 항박테리아 활성을 나타내는 것으로 생각된다 (Cummins and Creeth, 1992, Opperman and Rolla, 1980; Opperman et al., 1980). 아연의 플라크 박테리아에의 흡착은 세포 표면 단백질과의 정전기적 상호작용 및 뒤이은 세포로의 이동을 포함한다. 플라크 억제 효과는 세정 후에 구강 및 치아 플라크에서 이온을 유지를 통하여 플라크 미생물에 대한 장기간의 박테리아 정균 효과를 나타내는 것으로 생각된다 (Giertsen et al., 1988). 아연염은 항미생물제인 트리클로산, 클로르헥시딘 및 생구이나린과 조합으로 치약 및 구강세정제에 사용되어 왔다. 이들은 상승작용적인 항박테리아 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Giertsen et al., 1988; Moran et al., 2000).

카파신-아연 함유 구강세정제로의 세정은 뒤쪽 치아 플라크 인덱스 스코어에 있어 21% 감소를 초래하였다 (도 6). 이러한 결과는 클로르헥시딘 구강세정제에 필적하는 것이다. 클로르헥시딘은 현재까지 시험된 화합물 중에 가장 효과적인 항-플라크 및 항-잇몸질환 화합물로 생각된다. 그러나, 치아 및 보철의 외부 착색, 맛의 변화, 및 혀의 착색을 포함하는 클로르헥시딘의 사용으로 인한 부작용으로 인해 장기간의 사용을 제한한다 (Elderidge et al., 1998).

일정 기간에 걸친 치은상 플라크의 축적은 잇몸질환과 치주질환의 발생과 연관되어 있다는 것은 인정된 사실이며, 치은상의 플라크 제어 단독으로는 잇몸질환의 치료에 충분하지 않다는 것도 인정된 사실이다 (Corbet and Davies, 1993). 본 연구결과는 천연 펩타이드와 아연이온과의 조합이 치은상 플라크 제어에 효능이 있는 구강세정제의 생산에 유효하다는 것을 나타낸다.

본 발명의 조성물을 포함하는 제형물

제형 1

성분 % w/w

디칼슘 포스페이트 디하이드레이트 50.0

글리세롤 20.0

소듐 카복시메틸 셀룰로스 1.0

소듐 라우릴 설페이트 1.5

소듐 라우로일 사르코니세이트 0.5

풍미제 1.0

소듐 사카린 0.1

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

텍스트라나제 0.01

본 발명의 조성물 1.0

물 밸런스

제형 2

성분 % w/w

디칼슘 포스페이트 디하이드레이트 50.0

솔비톨 10.0

글리세롤 10.0

소듐 카복시메틸 셀룰로스 1.0

소듐 라우릴 설페이트 1.5

소듐 라우로일 사르코니세이트 0.5

풍미제 1.0

소듐 사카린 0.1

소듐 모노플루오로포스페이트 0.3

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

텍스트라나제 0.01

본 발명의 조성물 2.0

물 밸런스

제형 3

성분 % w/w

디칼슘 포스페이트 디하이드레이트 50.0

솔비톨 10.0

글리세롤 10.0

소듐 카복시메틸 셀룰로스 1.0

라우로일 디에탄올아미드 1.0

슈크로스 모노라우레이트 2.0

풍미제 1.0

소듐 사카린 0.1

소듐 모노플루오로포스페이트 0.3

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

텍스트라나제 0.01

본 발명의 조성물 5.0

물 밸런스

제형 4

성분 % w/w

솔비톨 10.0

아이리쉬 모스 1.0

소듐 하이드록사이드 (50%) 1.0

Gantrez 19.0

물 (탈이온화) 2.69

소듐 모노플루오로포스페이트 0.76

소듐 사카린 0.3

파이로포스페이트 2.0

수화 알루미나 48.0

풍미유 0.95

본 발명의 조성물 1.0

물 밸런스

제형 5

성분 % w/w

소듐 폴리아크릴레이트 50.0

솔비톨 10.0

글리세롤 20.0

소듐 사카린 0.1

소듐 모노플루오로포스페이트 0.3

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

에탄올 3.0

본 발명의 조성물 2.0

리놀산 0.05

물 밸런스

구강세정 제형

제형 1

성분 % w/w

에탄올 20.0

풍미제 1.0

소듐 사카린 0.1

소듐 모노플루오로포스페이트 0.3

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

라우로일 디에탄올아미드 0.3

본 발명의 조성물 2.0

물 밸런스

제형 2

성분 % w/w

Gantrez S-97 2.5

글리세린 10.0

풍미유 0.4

소듐 모노플루오로포스페이트 0.05

클로르헥시딘 글루코네이트 0.01

라우로일 디에탄올아미드 0.2

본 발명의 조성물 2.0

물 밸런스

로젠지 제형

성분 % w/w

슈가 75-80

옥수수시럽 1-20

풍미유 1-2

NaF 0.01-0.05

본 발명의 조성물 3.0

Mg 스테아레이트 1-5

물 밸런스

잇몸 마사지 크림 제형

성분 % w/w

백 광유 8.0

프로필렌 글리콜 4.0
 스테아릴 알콜 8.0
 폴리에틸렌 글리콜 4000 25.0
 폴리에틸렌 글리콜 400 37.0
 슈크로스 모노스테아레이트 0.5
 클로로헥시딘 글루코네이트 0.1
 본 발명의 조성물 3.0
 물 밸런스

추잉검 제형

성분 % w/w

검 베이스 30.0
 칼슘 카보네이트 2.0
 결정형 솔비톨 53.0
 글리세린 0.5
 풍미유 0.1
 본 발명의 조성물 2.0
 물 밸런스

본 명세서에 언급된 모든 문헌은 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 물질, 장치, 물건 등에 관한 임의의 논의는 본 발명을 설명하기 위한 목적일 뿐이다. 이는 이들의 일부 또는 전부가 본 출원의 우선일 전의 선행기술의 일부를 형성하는 것으로 자인하거나 또는 호주 또는 그 밖의 나라에 존재하는 본 발명과 연관된 분야의 일반적 상식임을 자인하는 것도 아니다.

기술분야의 당업자라면, 광범위하게 기술된 본 발명의 범위 또는 정신을 벗어남이 없이 특정 구현예로 나타난 본 발명에 다양한 변형 및/또는 변화가 가해질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 구현예는 그러므로 모든 면에서, 제한적이지 아닌, 예시적인 것으로서 다루어져야 한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 정제된 Ser(*P*)¹⁴⁹ κ-카세인-B(138-158)의 크로마토그램이다. 정제된 펩타이드 분획 시료를 RP-HPLC 분석용 컬럼에 적용하였다. 정제된 펩타이드를 0~100% 완충액 B의 선형구배를 사용하여 컬럼에서 용출하였다 (30분). 유속은 1mL/분이었다. 완충액 A는 pH 5.5(TEA), 물중의 0.1% 아세트산이고, 완충액 B는 pH 5.5(TEA), 물중의 0.1% 아세트산을 포함하는 60% 아세토니트릴이었다.

도 2는 MALDI-TOF MS를 사용한 분획 B의 RP-HPLC 질량 분광 분석이다. 합성 펩타이드, Ser(*N*)¹⁴⁹ κ-카세인-B (138-158)에 해당하는 MW 2233.9 Da의 주피크가 관찰되었다. 취득한 스펙트럼은 가속 전압 20 kV, 93% 그리드(grid) 전압 및 100ns의 펄스 지연시간으로 선형, 네가티브 모드에서 취득되었다.

도 3은 pH 7.2의 THYE에서의 스트렙토코커스 뮤탄스의 성장에 미치는 영향: κ-카세인-A(106-169) [▲]; κ-카세인-B (106-169) [◇]; ZnCl₂[X]; 1:1 비의 Zn: κ-카세인-B (106-169) [■] 및 1:1 비의 Zn: κ-카세인-A (106-169) [◆].

도 4는 pH 7.2에서의 S.mutans에 대하여 시험된 250μM의 κ-카세인-A(106-169)의 성장 억제활성에 미치는 칼슘 이온 농도의 효과. CaCl₂ 대조군(◆); Ca: κ-카세인-A (106- 169) (▲). κ-카세인-A (106-169)은 상기 분석에 첨가되기 전에 1시간 동안 1:0 내지 1:4 사이의 비로 CaCl₂와 인큐베이션되었다.

도 5는 κ-카세인-A (106- 169)에 대한 Zn 결합의 Scatchard 분석이다. ZnCl₂를 pH 7.3의 물중의 정제된 κ-카세인-A (106- 169)와 37°C에서 인큐베이션하였다. 시료를 이어서 분자량 3,000 차단 여과막을 통하여 원심분리하였다. 아연 이온의 농도는 원자 흡수 분광광도계로 측정하였다.

도 6은 유일한 형태의 구강 청결제로서 구강세정제를 사용한 경우, 카파신(10 mg/ml), ZnCl₂(20mM) 및 카파신:ZnCl₂의 뒤쪽 치아에 대한 평균 플라크 지수에 미치는 효과를 관찰한 것이다. Wilcoxon rank 테스트를 사용하여 측정함; a= 물 대조군과 비교하여 상당히 상이함; b= 모든 기타 처리와 비교하여 상당히 상이함;

도 7은 뒤쪽 치아에 대한 평균 플라크 지수 점수 분포에 대한 구강세정제의 효과이다.

서열목록

<110> The University of Melbourne
 <120> Antimicrobial Composition
 <130> WJP PJXC 03 1377 3773
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 1

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
 1 5 10 15
 Glu Ser Pro Pro Glu
 20

<210> 2
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 2

Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
 1 5 10 15
 Glu Ser Pro Pro Glu
 20

<210> 3
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 3

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1 5 10 15
 Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu
 20 25 30
 Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
 35 40 45
 Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
 50 55 60

<210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 4

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr

1 5 10 15
 Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Ile Glu
 20
 Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Ile
 35
 Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
 50 55 60

<210> 5
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 5

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1 5 10 15
 Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu
 20
 Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
 35
 Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
 50 55 60

<210> 6
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 6

Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
 1 5 10 15
 Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu
 20
 Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp Ser Pro Glu Val Ile
 35
 Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val
 50 55 60

<210> 7
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 7

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala
 20
 Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ala Val
 50

<210> 8
 <211> 53

<212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 8

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Pro Thr Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala
 20 25 30
 Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ala Val
 50

<210> 9
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 9

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Pro Thr Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp
 20 25 30
 Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ala Val
 50

<210> 10
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> bovine
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> PHOSPHORYLATION
 <400> 10

Thr Glu Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Pro Thr Thr Thr Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp
 20 25 30
 Ser Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ala Val
 50

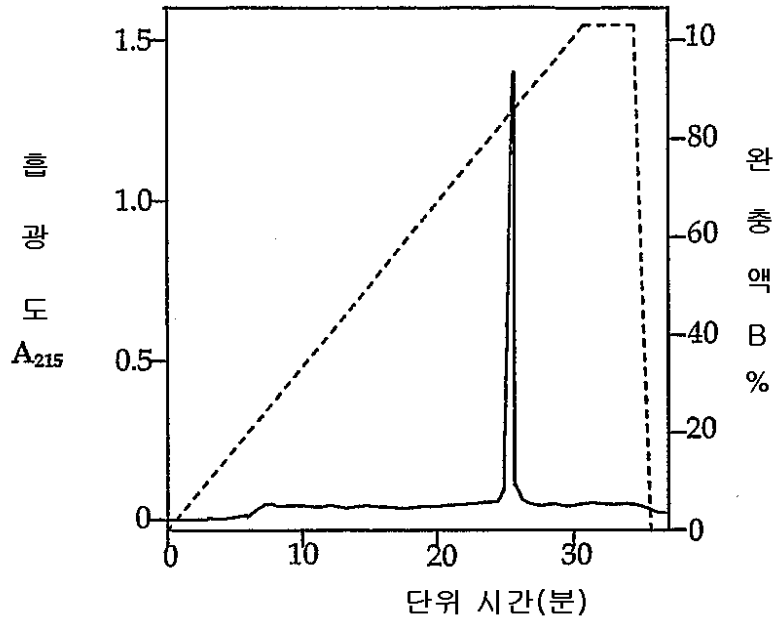
참고문헌

- Addy M., Richards J. and Williams G. (1980), Effects of a Zinc Citrate Mouthwash on Dental Plaque and Salivary Bacteria, *Journal of Clinical Periodontology* **7**, 309-315.
- Corbet B.F. and Davies W.L.R. (1993), The Role of Supragingival Plaque in the Control of Progressive Periodontal-Disease - a Review, *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 307-313.
- Creamer L. and Harris D. (1997). Relationship between milk protein polymorphism and physico-chemical properties. In: Milk Protein Polymorphism: International Dairy Federation Special Issue 9702, pp. 110-123.
- Cummins D. and Creeth J.E. (1992), Delivery of Antiplaque Agents from Dentifrices, Gels, and Mouthwashes, *Journal of Dental Research* **71**, 1439-1449.
- Eldridge K.R., Finnie S.F., Stephens J.A., Mauad A.M., Munoz C.A. and Kettering J.D. (1998), Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent, *Journal of Prosthetic Dentistry* **80**, 685-690.
- Folch J., Lees M. and Stanley G.H.S. (1957), A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Gierlesen E., Scheie A. and Gunnar R. (1998), Inhibition of plaque formation and plaque acidogenicity by zinc and chlorhexidine combinations, *Scandinavian Journal of Dental Research* **96**, 541-550.
- Goumon Y., Strub J.M., Moniatte M., Nullans G., Poteur L., Hubert P., VanDorselaer A., Aunis D. and MetzBoutigue M.H. (1996), The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity, *European Journal of Biochemistry* **235**, 516-525.
- Hogg S. (1990), Chemical control of plaque, *Dental Update* **17**, 332-334.
- Hope, C. K., and M. Wilson. 2003. Measuring the thickness of an outer layer of viable bacteria in an oral biofilm by viability mapping. *J. Microbiol. Methods* **54**:403-410.
- Malkoski M., Dashper S.G., O'Brien-Simpson N.M., Talbo G.H., Macris M., Cross K.J. and Reynolds E.C. (2001), Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2309-2315.

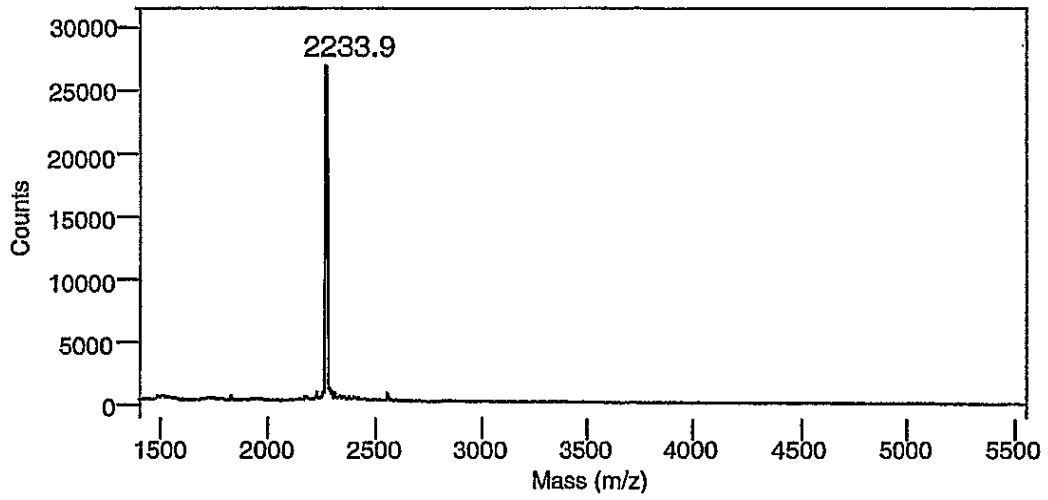
- Nikaido H., Nikaido K. and Harayama S. (1991), Identification and Characterization of Porins in *Pseudomonas-Aeruginosa*, *Journal of Biological Chemistry* 266, 770-779.
- Plowman J.E., Creamer L.K., Liddell M.J. and Cross J.J. (1997), Solution conformation of a peptide corresponding to bovine kappa-casein B residues 130-153 by circular dichroism spectroscopy and H-1-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Dairy Research* 64, 377-397.
- Shu, M., C. M. Browngardt, Y. Y. Chen, and R. A. Burne, 2003. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infect. Immun.* 71:7188-7192.
- Smallcombe S.H., Patt S.L. and Keifer P.A. (1995), WET solvent suppression and its applications to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance Series A* 117, 295-303.
- Smith M.H., Edwards P.J.B., Palmano K.P. and Creamer L.K. (2002), Structural features of bovine caseinomacropeptide A and B by H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Dairy Research* 69, 85-94.
- Strub J.M., Goumon Y., Lugardon K., Capon C., Lopez M., Moriatte M., VanDorselaer A., Aunis D. and MetzBoutigue M.H. (1996), Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules, *Journal of Biological Chemistry* 271, 28533-28540.
- Talbo G.H., Suckau D., Malkoski M. and Reynolds E.C. (2001), MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide, *Peptides* 22, 1093-1098.
- Wilson, M. 1996. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J. Med. Microbiol.* 44:79-87.
- Wimpenny, J., A. Peters, and M. Scourfield. 1989. Modeling spatial gradients, p. 111-127. In W. Characklis and P. Wilderer (ed.), *Structure and function of biofilms*. John Wiley and Sons, Chichester.

도면

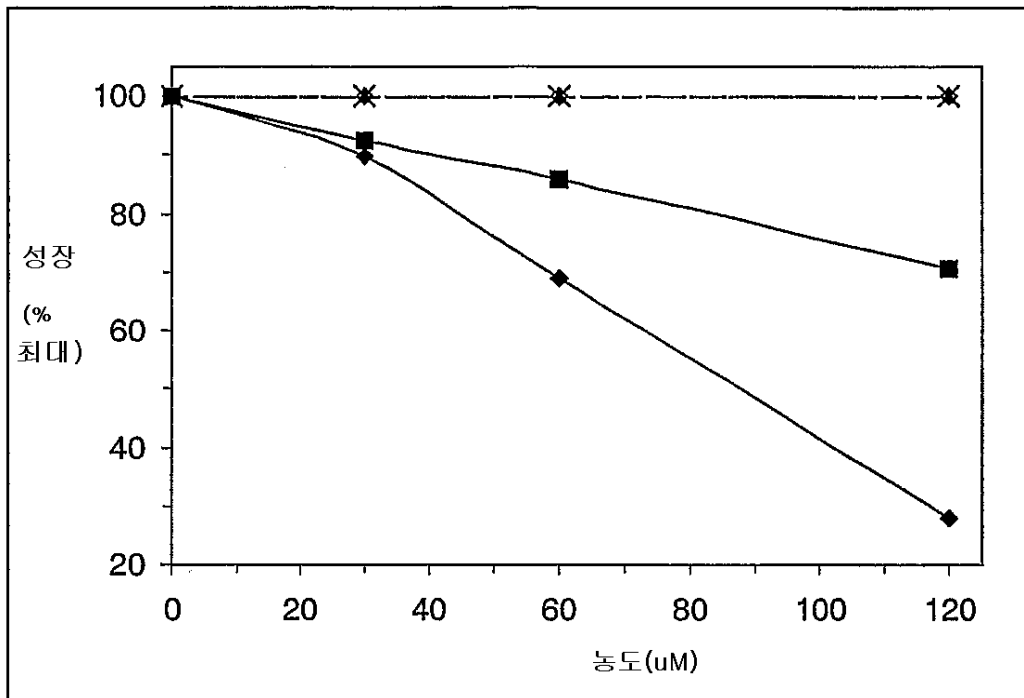
도면1



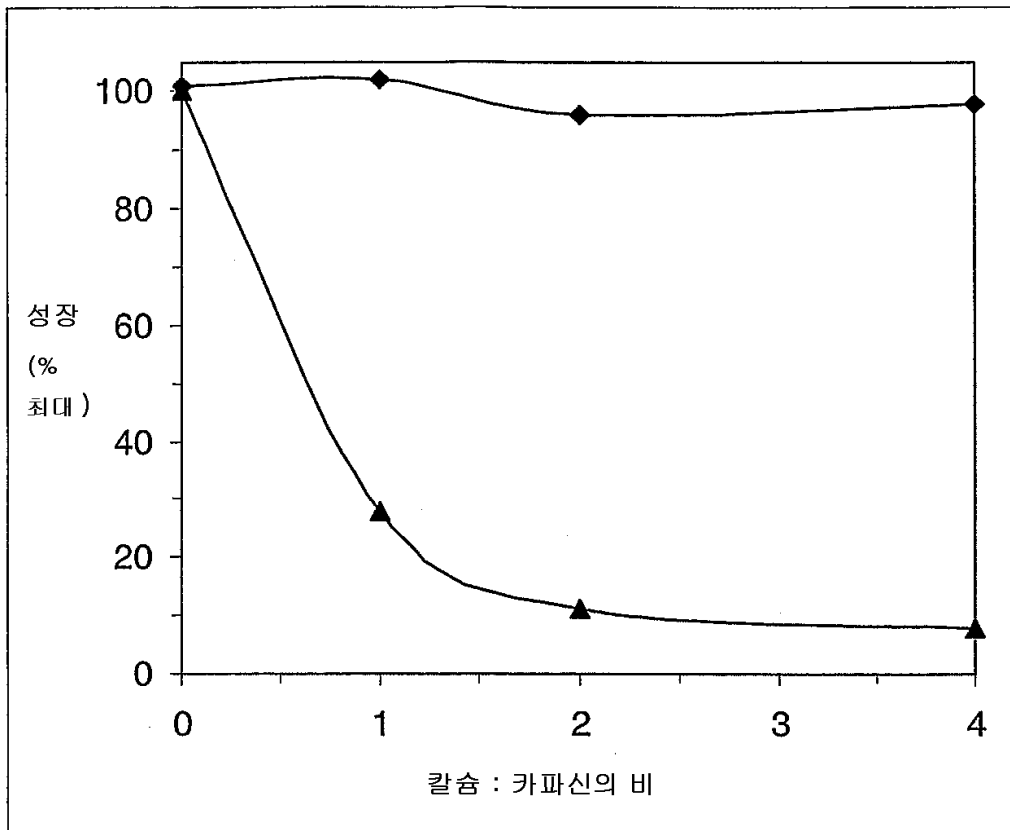
도면2



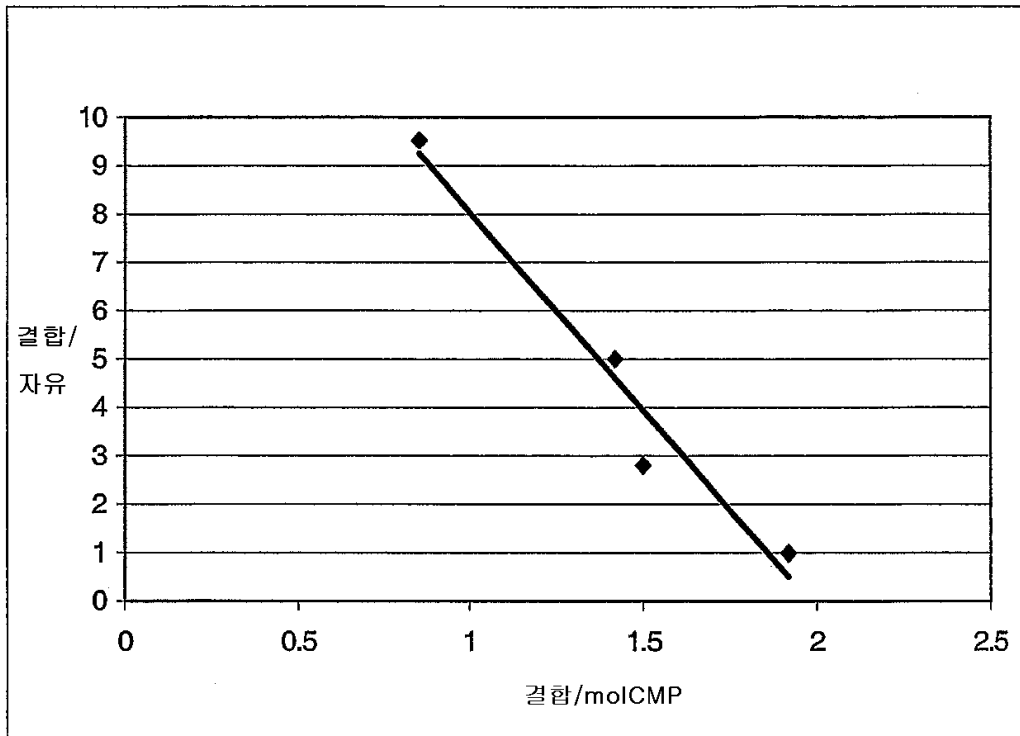
도면3



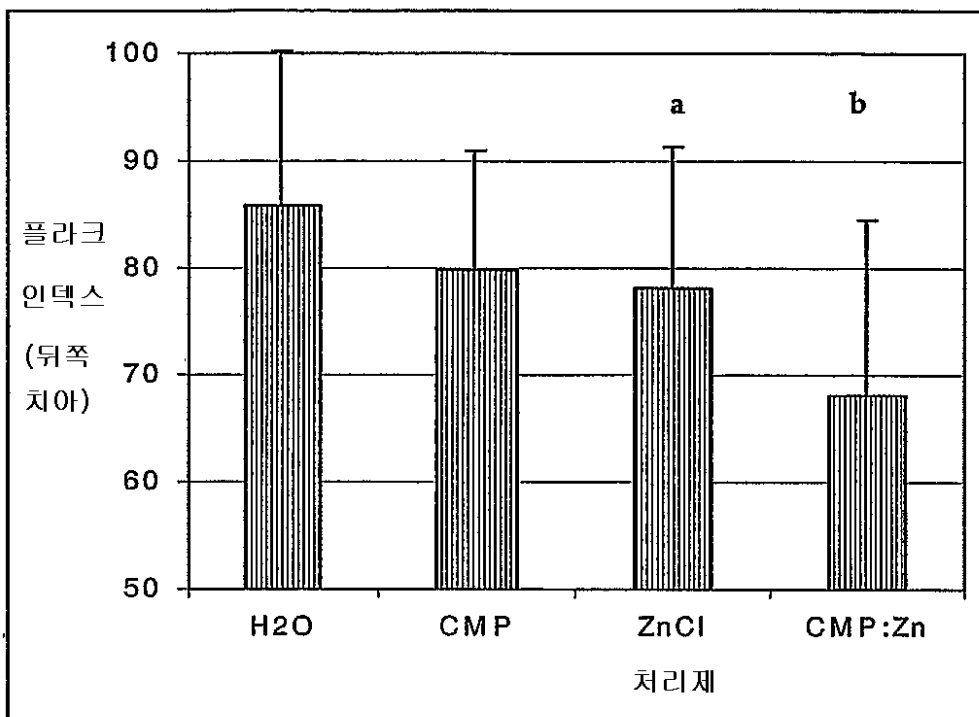
도면4



도면5



도면6



도면7

