



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월01일  
(11) 등록번호 10-2415734  
(24) 등록일자 2022년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/00 (2006.01) A01N 37/46 (2006.01)  
A23K 20/147 (2016.01) A23K 20/195 (2016.01)  
A23L 3/34 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 8/64 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
A61Q 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 14/001 (2013.01)  
A01N 37/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0126066  
(22) 출원일자 2021년09월24일  
심사청구일자 2021년09월24일

(56) 선행기술조사문헌  
KR101341210 B1  
KR1020210007075 A\*  
P. Kosikowska 등, Expert opinion on  
therapeutic patents, 26(6):pp.689-702  
(2016.04.25.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
주식회사 웹스젠  
서울특별시 서초구 반포대로 222, 3101호(반포동,  
가톨릭대학교 의과대학)

(72) 발명자  
강충경  
서울특별시 서초구 바우피로 91, 111동 801호(양  
재동, 우성아파트)

김지은  
서울특별시 종로구 필운대로 112-4, 402호(신  
교동)  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 14 항

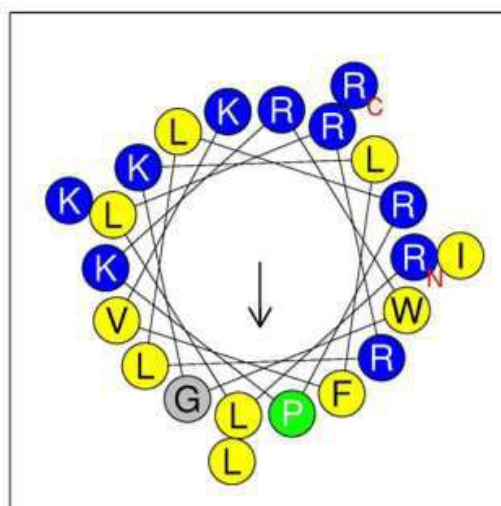
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 본 발명의 신규한 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 우수한 항균 활성을 가지고, 세포 재생 효과가 있으므로, 항균용 조성물 또는 감염성 질환의 예방과 치료 및 화장품 조성물, 방부제 조성물 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A23K 20/147* (2016.05)  
*A23K 20/195* (2016.05)  
*A23L 3/34* (2013.01)  
*A61K 38/00* (2013.01)  
*A61K 8/64* (2013.01)  
*A61P 31/04* (2018.01)  
*A61Q 17/005* (2013.01)  
*A61Q 19/00* (2013.01)

(72) 발명자

**한송미**

서울특별시 서초구 서초중앙로 51, 1307호(서초동)

---

**강태원**

서울특별시 관악구 봉천로 524-1, 403호(봉천동)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

**청구항 4**

제2항에 있어서, 상기 그람 음성균은 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

**청구항 5**

제2항에 있어서, 상기 항생제 내성균은 반코마이신(vancomycin) 내성 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 메치실린(meticillin) 내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), ESBL(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)을 생성하는 대장균(*Escherichia coli*), 카바페넴(carbapenem) 내성 대장균, 카바페넴 내성 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 카바페넴 내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 카바페넴 내성 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항균 펩타이드.

**청구항 6**

제1항의 항균 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 7**

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제.

**청구항 8**

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물.

**청구항 9**

제1항의 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장품 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 방부 조성물.

**청구항 14**

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

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 지구상에 존재하는 대부분의 생명체는 외부 미생물로부터의 침입을 막고, 자신을 지키기 위해 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, 이하 AMP)를 만드는 것으로 알려져 있다. 항균 펩타이드란 10~50개 사이의 아미노산들로 구성된 분자량 2~6 KDa 정도의 주로 양전하를 띠는 염기성 펩타이드로, 박테리아와 식물 그리고 척추동물과 무척추동물을 포함한 자연계 거의 모든 생물체에 존재하는 중요한 생체방어 인자(host defense factor)이다. 곤충, 갑각류 등의 면역시스템이 없는 무척추동물에게 항균 펩타이드는 유일한 방어시스템으로, 면역시스템을 갖는 척추동물에게는 외부 미생물의 공격에 대한 초기의 일차적 방어시스템 기작을 갖는 것 뿐만 아니라 이어지는 면역작용에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(G. Wang, (2014) *Pharmaceuticals*, 7:545-594; L. Zhang. et al., (2016) *Current Biology* 26:R1-R21).

[0003] 최초로 발견된 항생제는 1928년 알렉산더 플레밍(Alexander Fleming)이 발견한 페니실린으로 알려졌지만 그 이전인 1922년에 플레밍은 사람 침 속에 항균활성을 갖는 라이소자임(lysozyme)을 찾아냈다. 이후 1940년대 그라미시딘(Gramicidin) 등 펩타이드 항생제가 개발되어 치료에 사용되었고 1980년대 이후 과학기술이 발달하면서 펩타이드의 분리와 구조분석을 위한 과학기술이 발달되면서 많은 펩타이드가 발견되었다. 특히 의료계에서 주목을 받기 시작한 것은 미국 국립보건원(National Institutes of Health)의 자슬로프 박사가 1987년 아프리카산 개구리에서 마가이닌(magainin)이란 항균 펩타이드를 당뇨병성족부궤양(diabetic food ulcer) 치료용으로 FDA 임상을 완료하고 신약 허가를 시도하면서 많은 주목을 받기 시작했다. 그 이후 1996년 한국산 두꺼비(*Bufo bufo gargarizans*)의 위(stomach)로부터 부포린(buforin)이란 펩타이드가 발견되는 등 여러 생물들로부터 다양한 항균 펩타이드들의 존재가 밝혀졌고, 특성 및 기능에 관한 많은 연구가 수행되고 있으며, 지금까지 약 1,500종류에 달하는 다양한 생물들에서 항균 펩타이드가 분리되었다. 그러나 이제까지 발견된 많은 항균 펩타이드들에 대한 연구들을 보았을 때 구조나 활성의 측면에서 알파 헬릭스( $\alpha$ -helix) 또는 베타 시트( $\beta$ -sheet) 그리고 염기성 등 일반적 경향성을 가지지만 아미노산의 서열상에서는 거의 유사성을 보이지 않고 있다. 이는 각각의 생물체가 자신이 살고 있는 환경에 적합하도록 자신의 펩타이드 구조 및 서열을 각기 다르게 진화시켜왔기 때문이라고 판단된다. 다양한 기작 모델이 제시되었고 하나의 예로 알파 헬릭스 구조의 항균 펩타이드는 세균의 세포막에 작용하여 세포막을 파괴함으로써 세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 항균 펩타이드가 새로운 의약품 및 화장품 원료 등으로써 지니고 있는 우수한 점을 요약하면 다음과 같다.

[0005] 첫째, 항생제의 오남용으로 항생제에 내성을 갖는 균주들이 계속 등장하여 인류 건강에 심각한 위협요소로 대두되고 있다. 대표적인 내성균으로 그람 양성균인 메치실린 저항성 녹농균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 반코마이신 내성 장알균(Vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE), 그람 음성균인 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 등이 있으며 이외에도 새로운 다제내성세균들이 계속 발견되면서 급성폐혈증, 호흡기계 감염, 낭포성 섬유증, 요로 감염 등 인체 부위와 장기를 가리지 않고 항생제 내성균이 살아남으면서 치료가 어려워 높은 사망률을 유발하고 있다. 그러나, 항균 펩타이드는 미생물 세포막을 물리적으로 파괴하는 작용기전을 갖고 있어 항생제 내성균의 출현을 막을 수 있다. 항균 펩타이드는 세포벽이나 핵산 합성을 방해함으로써 세균의 성장을 멈추는 일반 화학 합성 펩타이드와 달리 세포막을 뚫으면서 직접 세포를 파괴시킴으로써 항생제에 의한 내성이 생기는 적응기작을

피할 수 있다.

- [0006] 둘째, 항균 펩타이드는 신속하고 효과적이며 광범위한 항균 스펙트럼(antimicrobial spectrum)을 가진다.
- [0007] 셋째, 항균 펩타이드는 선택적으로 병원균에만 작용하므로 인체에 유효하다. 이는 사람의 진핵세포 경우 세포막에 중성전하를 띄는 콜레스테롤 등이 다량 존재하여 항균 펩타이드의 통과를 방해하기 때문이다.
- [0008] 넷째, 항균 펩타이드는 글리코실화(glycosylation) 등의 2차 변형이 없기 때문에, 유전공학의 공정을 이용한 대량생산이 가능하여 개발시 낮은 생산원가를 가진다.
- [0009] 다섯째, 대부분의 항균 펩타이드는 세포재생 즉 상처회복(wound healing)의 활성을 함께 갖고 있으므로 항균 활성과 함께 피부 미용에 활용될 수 있다(Ana Gomes et. al., (2017) Molecules, 22:1743-1761).
- [0010] 자연계 중에서 식물이나 육상 생물에 대한 항균 펩타이드 연구는 활발히 진행 중에 있고, 또한 지금까지 척추동물에서부터 무척추동물에 이르기까지 다양한 조직으로부터 분리되었다. 물리화학적 성질을 기초로 항균 펩타이드 라이브러리를 제조하고 이로부터 단점이 개선된 펩타이드를 탐색하려는 연구를 하거나, 자연계에서 신규 펩타이드를 탐색하여 개량하려는 연구가 수행되어 왔다. 특히 항균 펩타이드의 역가는 여러 물리적 성질 즉, 길이와 전기적 특성 등에 영향을 많이 받는다. 일반적으로 아미노산 길이는 50개 이하, 양이온(cationic) 아미노산이 많아야 하고 소수성(hydrophobic)을 띄며 양친매성(amphipathic) 구조를 가져야 한다. 특히 양이온 아미노산의 분포와 소수성이 중요한데 이는 세균의 세포막 표면이 음전하를 띄기 때문에 쉽게 결합할 수 있게 하기 때문이다. 알파 헬릭스 구조의 경우 아미노산 조성에 따라 헬릭스 회전수, 구조 및 특성에 영향을 미치므로 이를 시각적으로 표현하기 위한 수단으로써 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 이들 프로그램을 이용하면 헬릭스의 어느 부분에 소수성 아미노산이 몰려 있고, 세균의 세포막에 결합하기 쉬운 양이온 아미노산들 배열을 분석할 수 있다. 또한 알파 헬릭스 구조의 항균 펩타이드는 중간 부분에 구조적으로 꺾이는 부분(hinge) 역할을 하게끔 프롤린(proline)이 존재하면 항균력이 증가됨이 밝혀졌다(Ruth Ann Veach. et al., (2004) J. Biol. Chem. 279:(3), 11425-11431). 따라서 이러한 특성이 반영되면서 항균력을 증가시키는 펩타이드의 개량이 필요하다.
- [0011] 한편, 한국등록특허 제1734331호에는 '한국산 해삼에서 분리한 신규 항균활성 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제2039400호에는 'mBjAMP1 펩타이드로부터 유래한 신규 항균 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 신규한 항균 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 알려진 항균 펩타이드(서열번호 1 및 서열번호 2)의 아미노산 서열을 조합하여 제조한 신규 항균 펩타이드(서열번호 5)의 아미노산 서열 중 일부 잔기를 치환하여 제조한 신규한 항균 펩타이드(서열번호 6)가 모체 항균 펩타이드(서열번호 5)에 비해 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 항균 활성이 현저히 증가된 것을 확인하였으며, 상기 신규한 항균 펩타이드가 우수한 세포 재생 효과를 보이는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

**과제의 해결 수단**

- [0013] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0023] 본 발명의 신규한 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성균에 대한 우수한 항균 활성을 가지고, 세포 재생 효과가 있으므로, 항균용 조성물 또는 감염성 질환의 예방과 치료 및 화장품 조성물, 방부제 조성물 등 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0024] 도 1은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드의 헬리컬 휠 다이어그램(helical wheel diagram)이다.

도 2는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드의 헬리컬 휠 다이어그램(helical wheel diagram)이다.

도 3은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드의 세포 재생 효과 측정을 위한 스크래치 상처 치유 분석(scratch wound healing assay) 결과(A), 세포 밀도(B) 및 평균 간격(C)을 나타낸 결과이다. \*, \*\*\*은 무처리구 대비 펩타이드 처리구의 결과가 통계적으로 유의미하게 차이가 있다는 것을 의미하며, \*은  $p < 0.05$ , \*\*\*은  $p < 0.001$ 이다. 스케일 바(scale bar)=200  $\mu\text{m}$ .

도 4는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드의 세포 재생 효과 측정을 위한 스크래치 상처 치유 분석(scratch wound healing assay) 결과(A), 세포 밀도(B) 및 평균 간격(C)을 나타낸 결과이다. \*, \*\*, \*\*\*은 무처리구 대비 펩타이드 처리구의 결과가 통계적으로 유의미하게 차이가 있다는 것을 의미하며, \*은  $p < 0.05$ , \*\*은  $p < 0.01$ , \*\*\*은  $p < 0.001$ 이다. 스케일 바(scale bar)=200  $\mu\text{m}$ .

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0025] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드를 제공한다.

[0026] 본 발명에서 용어, "항균 펩타이드"는 아미드 결합(또는 펩타이드 결합)으로 연결된 아미노산으로 이루어진 폴리머로서, 미생물에 대한 생육 저해 활성을 가진 것을 의미한다.

[0027] 본 발명에 따른 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 신규한 항균 펩타이드는, 알려진 항균 펩타이드(서열번호 1 및 서열번호 2)의 아미노산 서열을 조합하여 제조한 항균 펩타이드(서열번호 5)의 아미노산 서열(RLLRRLRPKKGKAFVKILKK)에서 11번째, 12번째, 15번째, 22번째의 아미노산(밑줄)을 각각의 특성과 동일한 대체 아미노산으로 치환하여 제조하였다. 구체적으로는, 서열번호 5는 항균 활성이 공지된 서열번호 1의 아미노산 서열(RLLRRLR)로 이루어진 항균 펩타이드와 서열번호 2의 아미노산 서열(GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK)의 10번째부터 22번째까지(밑줄)의 뒤쪽 부분 서열을 접합하여 제조된 것으로, 항균 활성 증가 효과를 배가시키기 위해 상기 두 서열 사이에 구조적으로 꺾이는 부분(힌지, hinge) 역할을 하도록 프롤린(Proline, P)을 삽입하여 제조되었다. 이러한 서열번호 5에서 11번째, 12번째, 15번째, 22번째의 아미노산을 각각 R, W, L 및 R로 치환하여 신규한 항균 펩타이드(RLLRRLRPKRWGKLFVKILKR, 서열번호 6)를 제조하였다. 또한, 서열번호 4는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩타이드와 LK 펩타이드로 알려져 있는 항균 펩타이드(서열번호 3, LKKLLKLLKLLKL)의 4번째부터 14번째까지의 뒤쪽 부분 서열을 접합하여 제조되었다. 서열번호 4도 마찬가지로 두 서열 사이에 구조적으로 꺾이는 부분(힌지, hinge) 역할을 하도록 프롤린(proline, P)을 삽입하여 제조되었다(표 1 및 표 2 참고).

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 항균 펩타이드의 아미노산은 바람직하게는 L 형태를 가지나, D-형으로 치환된 것도 본 발명에서 배제하지 않는다.

[0029] 상기 항균 펩타이드는 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 합성을 위한 방법으로는 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 합성하

는 것이 보다 바람직할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 항균 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유전자 조작 대장균에서 발현시켜 생물학적으로 생산하는 방법이 있으나(Cheng KT et al., (2018) *Molecules*, 23(4):800-811), 이에 제한되지 않는다.

- [0030] 상기 항균 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 또는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus*), 엔테로코커스 속(*Enterococcus*), 바실러스 속(*Bacillus*), 리스테리아 속(*Listeria*) 또는 락토바실러스 속(*Lactobacillus*)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균일 수 있고, 바람직하게는 스태필로코커스 속, 엔테로코커스 속 또는 바실러스 속의 그람 양성균일 수 있으며, 가장 바람직하게는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 아시네토박터 속(*Acinetobacter*), 클렙시엘라 속(*Klebsiella*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스피라 속(*Leptospira*) 또는 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균일 수 있고, 바람직하게는 대장균 속, 슈도모나스 속, 아시네토박터 속 또는 클렙시엘라 속의 그람 음성균일 수 있으며, 가장 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 그람 양성균 및 그람 음성균 외, 본 발명의 항균 펩타이드는 항생제 내성균에 대해 항균 활성을 가질 수 있다. 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.
- [0034] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 항생제 내성균은 반코마이신(vancomycin) 내성 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 메치실린(meticillin) 내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), ESBL(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)을 생성하는 대장균(*Escherichia coli*), 카바페넴(carbapenem) 내성 대장균, 카바페넴 내성 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 카바페넴 내성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 카바페넴 내성 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지며, 세포 재생 효과가 있는 것이 특징이다.
- [0036] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항생제를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 전술한 바와 같다. 본 발명의 항균 펩타이드는 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균에 대해 강한 항균 활성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 항생제의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0039] 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.
- [0040] 본 발명의 항균 펩타이드는 비경구의 여러가지 제형으로 제조될 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, 에틸올레이트(Ethyl oleate)와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol),

마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0041] 또한, 본 발명의 항균 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 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.
- [0042] 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.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 항균용 의약외품은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0047] 상기 항균 펩타이드는 우수한 항균 활성을 가지고, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지며 세포 재생 효과가 있으므로, 항균용 화장료 조성물로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0048] 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.
- [0049] 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.
- [0050] 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.
- [0051] 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.
- [0052] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리머 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0053] 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.
- [0054] 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.



- [0055] 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 식품 첨가제를 제공한다.
- [0057] 상기 항균 펩타이드는 우수한 항균 활성을 가지고, 인간 유래 세포에 대하여 낮은 세포 독성을 가지며 세포 재생 효과가 있으므로, 항균용 식품 첨가제로 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0058] 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.
- [0059] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0060] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0061] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 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.
- [0062] 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 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.
- [0063] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 생물 농약을 제공한다.
- [0064] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 방부 조성물을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 상기 항균 펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로서, 그람 음성균, 그람 양성균 및 항생제 내성균에 대해 강한 항균 활성을 나타내므로, 본 발명의 항균 펩타이드는 항균용 생물농약 또는 방부 조성물의 유효성분으로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0066] 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.
- [0067] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 항균 펩타이드를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 항균 방법을 제공한다. 상기 개체는 인간을 제외한 포유류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 항균 펩타이드는 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0069] 본 발명의 항균 펩타이드의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하게 투여될 수 있으나, 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0070] 본 명세서에서 사용된 아미노산 서열은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 다음과 같이 약어로 기재하였다: 알라닌 A, 아르기닌 R, 아스파라긴 N, 아스파르트산 D, 시스테인 C, 글루탐산 E, 글루타민 Q, 글리신 G, 히스티딘 H, 이소류신 I, 류신 L, 라이신 K, 메티오닌 M, 페닐알라닌 F, 프롤린 P, 세린 S, 트레오닌 T, 트립토판 W, 티로신 Y, 발린 V. 또한, 상기 아미노산은 D형 아미노산과 L형 아미노산을 모두 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. 펩타이드 합성**

[0073] 본 발명에서는 펩타이드 합성 기술인 프록-케미스트리(Fmoc chemistry) 방법을 이용한 솔리드/솔루션 단계 (Solid/solution phase)를 통해 표 1의 펩타이드를 합성하였고, 순도가 95% 이상이 되도록 고성능 액체 크로마토그래피로 정제하였다.

**표 1**

합성한 펩타이드 정보

서열번호	항균 펩타이드	아미노산 개수	비고
1	RLLRLLR	8	한국등록특허 제1341210호
2	GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK	22	magainin, msi 78
3	LKLLKLLKLLKL	14	LK peptide
4	RLLRLLRPILLKLLKLLKL	21	신규 유도체 펩타이드(H10)
5	RLLRLLRPKKFGKAFVKILKK	22	신규 유도체 펩타이드(H11)
6	RLLRLLRPKRWGLFVKILKR	22	신규 유도체 펩타이드(H12)

[0075] 서열번호 1 및 서열번호 3의 펩타이드를 조합하여 서열번호 4(H10)의 펩타이드를 합성하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2(밀줄)의 펩타이드를 조합하여 서열번호 5(H11)의 펩타이드를 합성하였으며, 서열번호 5의 펩타이드에서 11번째, 12번째, 15번째, 22번째의 아미노산(밀줄)을 각각의 특성(비극성 또는 양전하)과 동일한 대체 아미노산으로 치환하여 서열번호 6(H12)의 펩타이드를 합성하였다(표 2).

**표 2**

신규 유도체 펩타이드 서열 비교

서열번호	code No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	MW
4	H10	R	L	L	R	R	L	L	R	P	I	L	L	K	L	L	K	K	L	L	K	L		2610
5	H11	R	L	L	R	R	L	L	R	P	K	<b>K</b>	<b>F</b>	G	K	<b>A</b>	F	V	K	I	L	K	<b>K</b>	2710
6	H12	R	L	L	R	R	L	L	R	P	K	<b>R</b>	<b>W</b>	G	K	<b>L</b>	F	V	K	I	L	K	<b>R</b>	2847

[0076]

[0077] (MW: molecular weight)

[0078] 위 표의 펩타이드는 모두 L-형태를 가지나 D-형태로 치환된 것도 본 발명에서 배제하지 않는다.

[0079] **실시예 2. 신규 유도체 펩타이드의 항균 활성 측정**

[0080] 합성한 신규 유도체 펩타이드의 항균 활성을 비교하기 위하여 그람 음성균 및 그람 양성균의 비내성 또는 항생제 내성 균주에 대해 항균 활성을 각각 측정하였다. 항균 활성은 영양분이 충분한 MH(Mueller Hinton) 배지에서 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소성장 억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 하기 표 3에 기재된 균주를 입수하여, 세균수가 ml 당  $2 \times 10^6$  CFUs(colony-forming units)가 되도록 MH 배지로 희석하고 100  $\mu$ l씩 96-웰 마이크로 적정 플레이트(Microtiter plate)에 분주한 후, MH 배지로 희석한 펩타이드

용액을 각 웰에 100  $\mu$ l씩 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 16시간 동안 배양한 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 MIC를 결정하였다.

**표 3**

신규 유도체 펩타이드의 항균 활성 분석

Bacteria		대상 균주		펩타이드 MIC( $\mu$ g/ml)		
		Strain	항생제 내성 특성	서열번호 4 (H10)	서열번호 5 (H11)	서열번호 6 (H12)
그람 양성	<i>Enterococcus faecium</i>	BM 4147	비내성 (susceptible)	128	>128	<b>32</b>
		KHIDI 70	반코마이신 내성 (VRE)	8	8	<b>8</b>
		KHIDI 73	반코마이신 내성 (VRE)	8	16	<b>4</b>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	비내성 (susceptible)	64	>128	<b>64</b>
		KHIDI 25	메치실린 내성 (MRSA)	64	>128	<b>128</b>
		KHIDI 29	메치실린 내성 (MRSA)	64	>128	<b>64</b>
그람 음성	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	비내성 (susceptible)	64	>128	<b>32</b>
		KHIDI 77	ESBL <sup>1)</sup>	32	64	<b>32</b>
		KHIDI 7	카바페넴 내성	32	128	<b>16</b>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	비내성 (susceptible)	128	>128	<b>64</b>
		KHIDI 9	카바페넴 내성	128	>128	<b>32</b>
		KHIDI 16	카바페넴 내성	128	>128	<b>32</b>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KHIDI 61	비내성 (susceptible)	64	32	<b>32</b>
		KHIDI 58	카바페넴 내성	64	32	<b>8</b>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KHIDI 2	카바페넴 내성	64	128	<b>&gt;128</b>

1) ESBL: 확장스펙트럼 베타 락타메이즈 효소 (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)

[0082] 그 결과, 본 발명의 서열번호 6의 신규 유도체 펩타이드가 서열번호 4 및 서열번호 5의 신규 유도체 펩타이드에 비해 강력한 항균 활성을 보임을 알 수 있었다. 또한, 서열번호 1의 항균 펩타이드는 그람 양성균 및 그람 음성균 모두에 대해 1 mg/ml 즉, 1,000  $\mu$ g/ml 수준의 MIC를 나타내는 것으로 보고된 바 있어(한국등록특허 제 1341210호 참고), 본 발명에서 새롭게 합성된 항균 펩타이드(서열번호 6)가 신규 유도체 펩타이드(서열번호 4, H10) 및 모체 펩타이드(서열번호 5, H11)에 비해 현저히 증가된 항균 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(표 3).

[0083] 반코마이신 내성 엔테로코쿠스 패시움(Vancomycin-resistance *Enterococcus faecium*, VRE)은 질병관리본부의 보고에 의하면 최근 3년간 지역별에 따라 12-23%로 큰 증가를 보이고 있다. 본 발명의 항균 펩타이드(서열번호 6)의 VRE에 대한 항균 활성은 비내성(susceptible) 균주에 비해 우수한 것으로 확인되었다.

[0084] 다제내성균으로 유명한 메치실린 저항성 스태필로코쿠스 아우레우스(meticillin-resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 경우, 본 발명의 항균 펩타이드(서열번호 6)가 비내성 균주와 비슷한 MIC 값을 보였음을 알 수 있었다.

[0085] 카바페넴 내성 대장균(*Escherichia coli*) 균주에 대해서는 본 발명의 항균 펩타이드(서열번호 6)는 서열번호 4, 서열번호 5에 비해 우수한 항균 활성을 보였다. 그리고 확장스펙트럼 베타 락타메이즈 효소(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL)는 플라스미드에 의해 전파되는  $\beta$ -lactamase로 ESBL을 생성하는 그람 음성 균주들에 의한 병원감염 빈도가 점차 증가하고 있으며 페니실린, 세파로스포린, 카바페넴 등에 다중내성을 보여 감염 시 치료에 어려움이 있는 것으로 보고되었다(윤필훈 등 (2014) Korean J Nosocomial Infect Control 19(2):45-51). 이들은 최후의 수단인 카바페넴 내성도 갖고 있어 12.9%의 사망률을 보였다는 보고도 있다. 서열번호 6의 아미노

산 서열로 이루어진 신규한 항균 펩타이드는 이들 ESBL 다중내성 균주에도 항균 활성을 보였다.

[0086] 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 피부감염부터 폐렴, 욕창, 패혈증, 수막염 등을 유발하는 주요 의료관련 원 인균이다. 이것 역시 카바페넴계, 아미코글리코사이드계 등의 항생제에 다제내성을 보이고 있는데 본 발명의 항 균 펩타이드(서열번호 6)는 카바페넴계 비내성 균주에 비해 카바페넴계 내성 녹농균에서 오히려 뛰어난 항균 활 성을 보여주었다.

[0087] 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)는 2007년 이후 세계적으로 병원 내 감염발생 수는 증가되었고 그에 따른 카바페넴계 항생제를 포함한 다제내성물도 크게 증가하기 시작하였다. 2010년 일본도쿄대학병원에서 아시네토박터균의 감염으로 46명이 감염되고 이 중 10명이 숨진 사건은 충격적이었고 우리나라의 경우, 질병관 리본부에서 발간한 「국가 항균제 내성정보」 (KARMS, 2010)에 의하면 카바페넴계 항생제인 내성율이 2007년 27%에서, 2010년 71.7%으로 급속한 내성률의 증가를 보이고 있다(차정욱 등 (2012), PUBLIC HEALTH WEEKLY REPORT, KCDC 제7권 제29호, 630-632). 다제내성 아시네토박터 바우마니균은 면역저하, 만성폐질환 또는 장기입 원환자에게 감염을 유발할 수 있어 병원에서는 특히 주의해야 할 내성균이다. 본 발명의 항균 펩타이드(서열번 호 6)는 비내성균에 비해 카바페넴 내성 아시네토박터 바우마니균에 더 뛰어난 항균 활성을 보여주었다.

[0088] 폐렴막대균이라 불리는 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)의 카바페넴 내성균에도 역시 강력한 항균 활성을 보여주었다. 이상의 결과로부터 본 발명의 항균 펩타이드(서열번호 6)는 그람 양성균 및 그람 음성균을 비롯하여, 다양한 항생제 내성균에 대해서도 우수한 항균 활성을 보이므로, 항균용 조성물 또는 감염성 질환의 예방과 치료 및 화장품 조성물, 방부제 조성물 등 다양한 분야에서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예측되었다.

[0089] **실시예 4. 신규한 항균 펩타이드의 특성 분석**

[0090] 신규한 항균 펩타이드(서열번호 6)의 뛰어난 항균 활성을 분석하기 위해 헬리컬 휠 다이어그램(helical wheel diagrams) 기법을 사용하여 구조적 특성을 규명했다. 서열번호 6의 헬리컬 휠 구조(도 1)와 서열번호 4의 헬리 컬 휠 구조(도 2)를 비교해보면 서열번호 4는 접힘 구조(hinge) 역할의 아미노산 P(proline)의 위치가 소수성 단면(hydrophobicity face)에 있지 않으나, 서열번호 6은 소수성 단면(hydrophobicity face)에 있어 소수성으 로의 특성이 더 강화된 것으로 판단되었다. 또한, 서열번호 6은 서열번호 1의 헬리컬 휠 구조와 서열번호 2의 헬리컬 휠 구조와 같이 펩타이드의 하단에 소수성 아미노산이 일정하게 배열되어 있어 항균 펩타이드가 가져야 할 기본적 특성을 잘 갖춘 것으로 판단되었다. 또한, 서열번호 6의 펩타이드는 평균 소수성(mean hydrophobicity)이 0.362으로 서열번호 5의 0.280보다 높아 뛰어난 항균 활성을 뒷받침하고 있다.

[0091] **실시예 5. 용혈 활성 측정**

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

[0093] 구체적으로, 인간 적혈구를 8%의 농도가 되도록 PBS(pH 7.0)로 희석하고, 서열번호 2, 4 또는 6의 펩타이드를 각각 웰당 1, 5, 10, 20 또는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여, 37°C에서 1 시간 동안 반응하였다. 그런 다음, 1,000 xg로 원심 분리하여 수득한 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 확 인하였다. 세포 파괴 정도의 기준이 되는 대조군으로, 0.2% 트리톤(Triton)을 처리하여 37°C에서 1 시간 동안 반응한 후 수득한 상등액의 흡광도를 측정하였고, 상기 흡광도 값을 적혈구 용혈활성 100%로 하여, 하기 식을 사용하여 각 펩타이드의 용혈 활성(hemolysis)을 계산하였다.

[0094] 용혈 활성 = (흡광도 A-흡광도 B)/(흡광도 C-흡광도 B)

[0095] (흡광도 A: 414nm 파장에서 측정된 각 펩타이드를 처리한 반응 용액의 흡광도, 흡광도 B: 414nm 파장에서 측정 한 PBS를 처리한 반응 용액의 흡광도, 흡광도 C: 414nm 파장에서 측정된 0.2% 트리톤을 처리한 반응 용액의 흡 광도.)

[0096] 용혈 활성을 백분율로 나타낸 용혈활성도(%)를 비교한 결과, 서열번호 2의 펩타이드의 용혈활성도는 농도 1, 5, 10, 20 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.5 \pm 0.4\%$ ,  $1.2 \pm 0.4\%$ ,  $1.8 \pm 0.7\%$ ,  $2.9 \pm 1.0\%$  및  $9.2 \pm 2.9\%$ 로 나타났다. 서열번호 4(H10)의 펩타이드의 용혈활성도는 농도 1, 5, 10, 20 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $7.2 \pm 0.6\%$ ,  $34.4 \pm 2.2\%$ ,  $53.8 \pm 3.9\%$ ,  $75.7 \pm 4.3\%$  및  $95.7 \pm 1.9\%$ 로 나타났다. 서열번호 6(H12)의 펩타이드의 용혈활성도는 농도 1, 5, 10, 20 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $-0.9 \pm 0.6\%$ ,  $0 \pm 0.9\%$ ,  $0.7 \pm 0.4\%$ ,  $1.2 \pm 0.8\%$  및  $6 \pm 1.5\%$ 로 나타났다(표 4). 모든 용 혈활성도(%)는 평균±표준편차로 표시하였다.

[0097] 상기 결과를 바탕으로, 본 발명의 신규한 항균 펩타이드(서열번호 6)의 용혈활성도가 저농도(1, 5 및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 1% 미만인 것을 확인함으로써, 다른 항균 펩타이드에 비해 가장 안정적이며 인간 적혈구에 대한 세포독성을 보이지 않는다는 것을 알 수 있었다.

**표 4**

항균 펩타이드의 용혈활성도

Test	sample	PBS	펩타이드 농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					Triton
			1	5	10	20	100	
서열번호 2 (msi78)	1	0	0.000	0.008	0.014	0.019	0.065	1
	2	0	0.006	0.010	0.012	0.024	0.071	1
	3	0	0.004	0.013	0.019	0.031	0.107	1
	4	0	0.010	0.018	0.028	0.043	0.126	1
서열번호 4 (H10)	1	0	0.073	0.340	0.534	0.735	0.955	1
	2	0	0.064	0.323	0.500	0.723	0.932	1
	3	0	0.074	0.375	0.591	0.820	0.971	1
	4	0	0.078	0.339	0.526	0.750	0.973	1
서열번호 6 (H12)	1	0	-0.011	-0.011	0.002	0.002	0.042	1
	2	0	-0.004	-0.002	0.007	0.014	0.070	1
	3	0	-0.015	0.002	0.007	0.012	0.075	1
	4	0	-0.003	0.010	0.012	0.021	0.067	1

[0099] \* 용혈활성도(%)는 상기 표에 기재된 수치에 100을 곱한 값임.

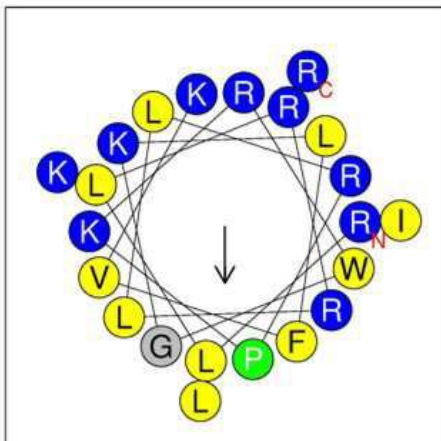
[0100] **실시예 6. 세포 재생 효과 측정**

[0101] 본 발명의 항균 펩타이드의 세포 재생 효능을 측정하기 위해서 스크래치 상처 치유 분석(scratch wound healing assay)을 수행하였다. HaCaT 세포를 12웰 플레이트에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하여 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하여 안정화한 후, 10% FBS를 제외한 DMEM 배지로 교체하여 24시간 동안 starvation을 진행하였다. 웰 내에 세포가 100%의 밀집도(confluency)를 보이면 200  $\mu\text{l}$  tip을 이용하여 각 웰의 중앙을 일정하게 긁은 후, 배지를 모두 제거하고 PBS로 수세하였다. 이후, 펩타이드를 1, 5, 10, 25 또는 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 각각 처리하고 24시간 배양한 후, 현미경을 이용하여 관찰하고 펩타이드를 처리하지 않은 웰과 비교하여 세포 사이의 인위적으로 만든 간극(gap)의 채워졌는지에 대한 변화를 확인하였다.

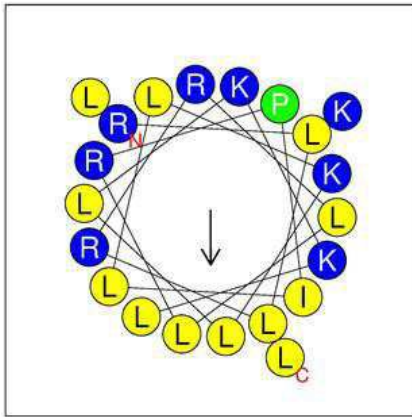
[0102] 그 결과, 서열번호 4 및 서열번호 6의 펩타이드는 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서는 세포 재생 효과가 없는 것을 확인하였다. 서열번호 4의 펩타이드는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 재생 효과가 가장 우수한 반면, 서열번호 6의 펩타이드는 5 내지 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 재생 효과가 가장 우수한 것을 확인하였다(도 3, 도 4).

**도면**

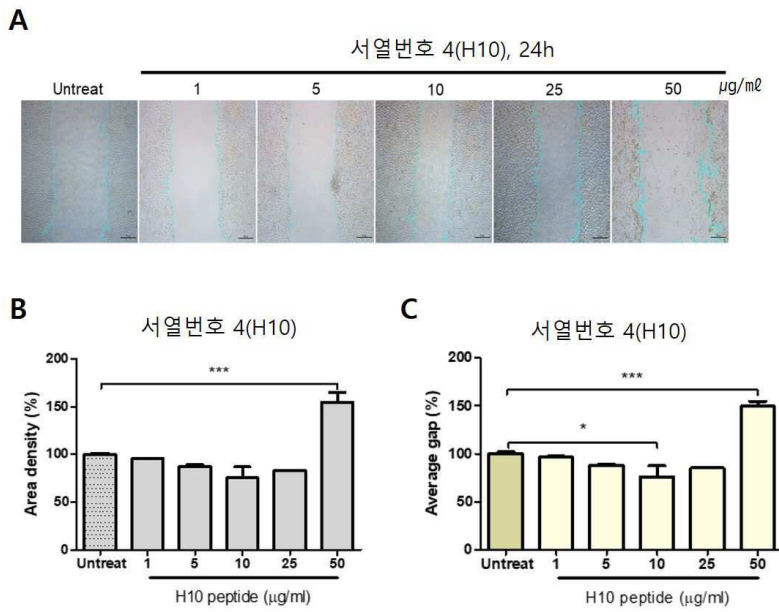
**도면1**



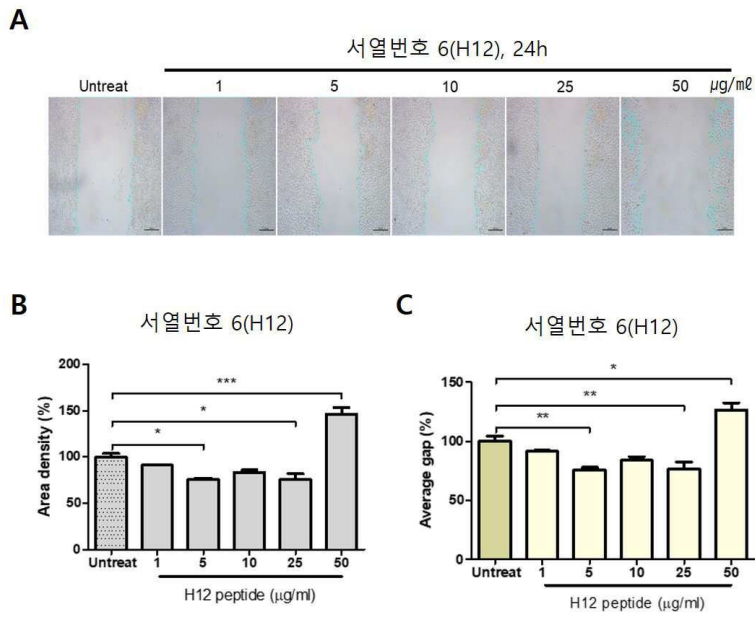
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110> PepXGen Inc.

<120> Novel antimicrobial peptide and uses thereof

<130> PN21301

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 1

Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg

1                      5

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 2

Gly Ile Gly Lys Phe Leu Lys Lys Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe

1                    5                    10                    15  
 Val Lys Ile Leu Lys Lys

20

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 3

Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu

1                    5                    10

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 4

Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg Pro Ile Leu Leu Lys Leu Leu Lys

1                    5                    10                    15

Lys Leu Leu Lys Leu

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 5

Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg Pro Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe

1                    5                    10                    15

Val Lys Ile Leu Lys Lys

20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> antimicrobial peptide

<400> 6

Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg Pro Lys Arg Trp Gly Lys Leu Phe

1                    5                    10                    15

Val Lys Ile Leu Lys Arg

20