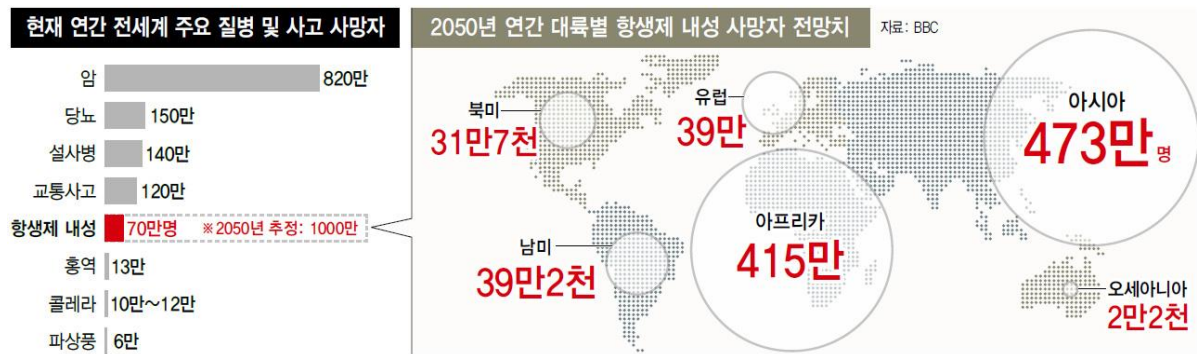


항균펩타이드 활용 항균코팅제 개발 연구동향

한국과학기술원
생명과학과 황영은

한국생명공학연구원
합성생물학연구단 성봉현

최근 CoViD-19으로 인하여 전 세계적으로 514만명이 넘는 확진자, 33만명이 넘는 사망자가 발생한 상황에서 (2020년 5월 23일 기준, 출처: 질병관리본부 코로나바이러스감염증-19 홈페이지 <http://ncov.mohw.go.kr/>), CoViD-19와의 싸움에 숨겨진 위험요소로 슈퍼박테리아(항생제 내성균)를 조심해야한다는 경고가 나오고 있다. 병원균 감염을 치료하기 위해 여러 효과적인 항생제들이 사용되어왔지만, 항생제의 남용은 미생물의 다제 내성을 유발하여 슈퍼박테리아의 출현을 야기하였다. 슈퍼박테리아가 바이러스 감염과의 직접적인 연관성은 없지만, CoViD-19로 입원한 환자 7명 중 1명(중국 우한내 2개 병원에서는 사망자 중 절반)이 2차 세균감염이 일어났다는 보고가 있다(Zhou et al. 2020). 영국 국가항생제 내성 대책위원회 연구에 따르면 슈퍼박테리아로 인한 사망자수는 2016년 약 70만 명에서 2050년 1000만 명까지 폭증할 것으로 예상된다. 따라서 항생제 내성균을 포함한 다양한 병원균의 증식 및 확산으로 인한 세균감염 증가를 막기 위한 효과적인 전략이 필요한 실정이다. 시민들의 위생 관념 수준이 높아짐에 따라 의료기관 뿐 아니라 일상생활에서도 항균 기능이 더해진 생활용품의 수요가 증가하고, 위생적인 환경을 만들기 위한 노력이 수반되고 있다.



<2050년 항생제 내성 사망자 전망>

병원균은 표면에 부착하여 고분자물질을 분비하여 바이오필름을 형성하는데, 이로 인해 항균물질이 세균 내로 쉽게 전달되지 않아 항균물질에 대한 내성이 수천 배 이상 높아진다(Buhmann et al. 2016). 따라서 바이오필름이 형성되기 전에 초기 세균의 성장을 저해하는 것이 무엇보다 중요하다. 세균이 표면에 접촉하지 못하게 하거나(anti-adhesion), 세균 자체를 죽일 수 있는(contact killing) 항균 표면을 만들어 감염질환을 예방 및 치료하기 위한 효과적인 연구전략이 필요하다.

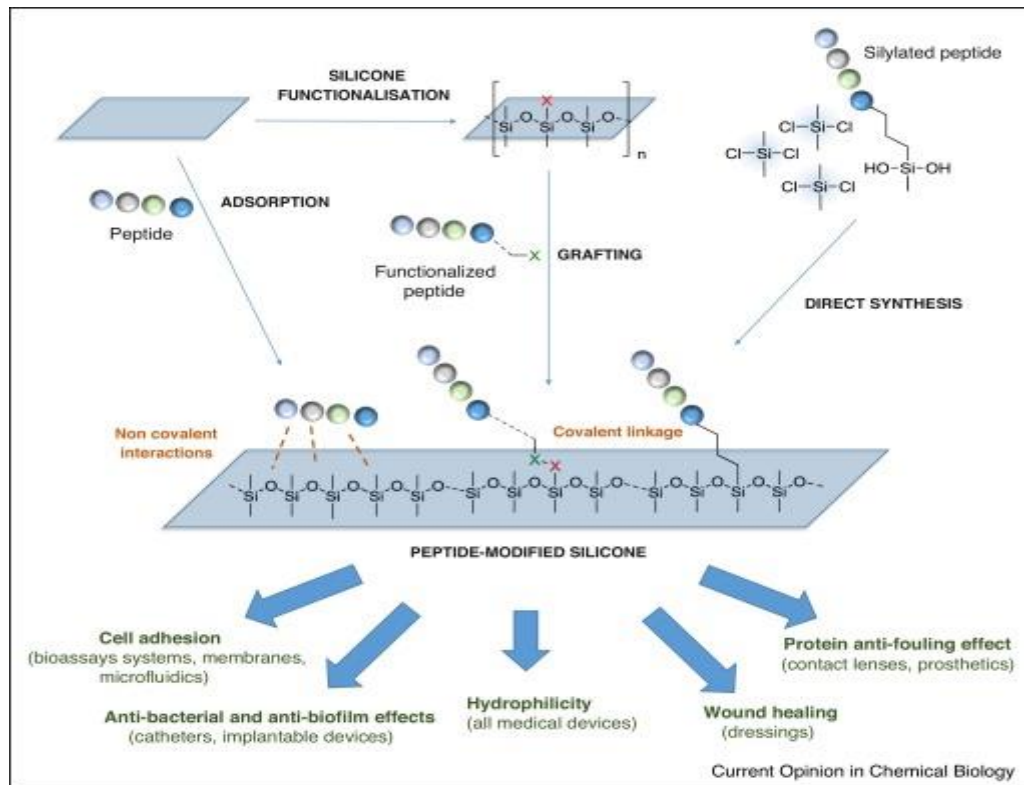
세균이 표면에 자라지 못하게 하는 anti-adhesion 전략은 표면을 polyethylene glycol (PEG)과 같은 폴리머를 이용하여 물질 표면을 세균이 잘 붙어 자랄 수 없는 친수성으로 개질하는 것인데, 세균의 군집화에 대하여 장기간 보호할 수 없을 뿐 아니라 세균 자체를 불활성화하는 것이 아니므로, 단독으로 적용하기에는 불완전하다. 최근에는 하이드로 겔과 같은 친수성 폴리머에 은이나 항생제와 같은 항균물질을 내포하는 연구 등이 활발히 진행되고 있다. (Zhu et al. 2019)

반면, 미생물을 사멸시키는 항균제를 이용한 contact killing 전략은 금속나노입자 (은, 구리 등)와 같은 무기물과 항생제와 같은 유기물을 천천히 방출시켜서 세균을 죽이거나, 다

단계의 화학 반응을 거쳐 표면에 항균제를 고정화 하는 방법을 이용하고 있다. 하지만 사용되는 항균제 및 유기용매의 생체 독성 문제, 낮은 활성, 코팅 방법의 복잡함 등의 한계점을 가진다. 따라서 항생제 내성균을 포함한 다양한 병원균을 친환경적으로 퇴치하고 항생제 내성을 유발하지 않는 물질 개발 연구가 필요하다.

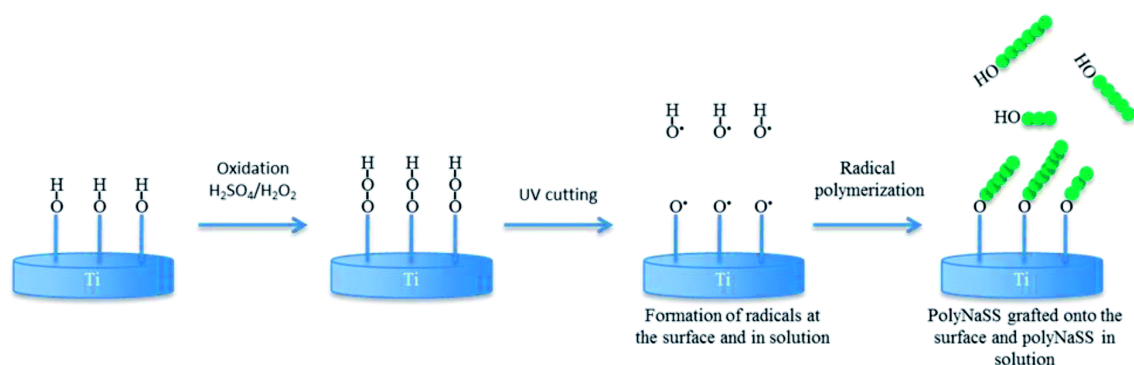
항생제 대체제로서, 생체유래 항균물질인 항균펩타이드는 50개 이하의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로, 모든 생물체가 선천적 면역 체계로 가지는 방어물질이다 (Pasupuleti et al. 2012). 이들 대부분이 양전하를 띠고 소수성 아미노산 잔기를 포함하여 양친매성을 나타내기 때문에, 음전하를 띠는 세균의 세포막을 와해시키거나, 세포막을 통과 후 내부 물질과 결합하여 세균을 사멸시킨다. 이러한 이유로 특정 수용체를 표적화하는 항생제에 비해 내성 유발 가능성이 적다. 또한 신속하게 작용 후 분해되기 때문에 체내에 안전하고, 항생제 내성균에도 작용하기 때문에 항생제 대체제로서의 이용가치가 높다 (Yu et al. 2017).

이러한 이유로 현재 항균펩타이드를 항균코팅제로서 이용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있고, 다양한 코팅 방법이 시도되어왔다. 그 예로는, 하이드로겔과 같은 고분자 사이에 항균펩타이드를 내포하여 multi-layer로 코팅하는 방법이나, 유기용매를 사용하여 polymer brush로 공유결합을 통해 표면에 고정화하는 방법, catechol anchor를 이용하여 항균펩타이드의 amine기 혹은 thiol기의 공유결합을 통해 코팅하는 방법 등이 있다.

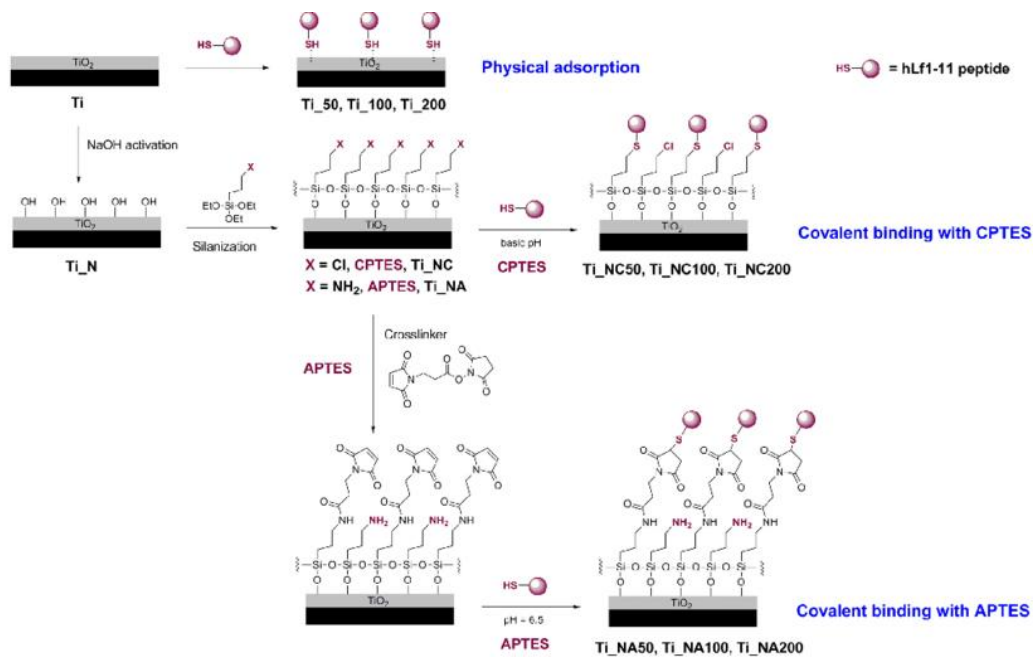


<실리콘 부착 항균펩타이드 및 응용(Martin et al. 2019)>

Grafting from은 중합체를 표면에 고정화 하는 데에 사용하는 방법으로, 작용기를 붙인 표면에 이온성 폴리머를 올리는 방법이다. 표면에 먼저 황산이나 과산화수소를 처리하여 표면을 수산화물이나 과산화물로 만들고, UV 조사 혹은 열을 가한 후 원하는 단량체를 처리하면 중합반응에 의해 폴리머가 올려진다. Poly-sodium styrene sulfonate (polyNaSS)로 코팅한 표면에서 황색포도상구균의 성장을 70% 저해한다는 보고가 있다. (Alcheikh et al. 2013)

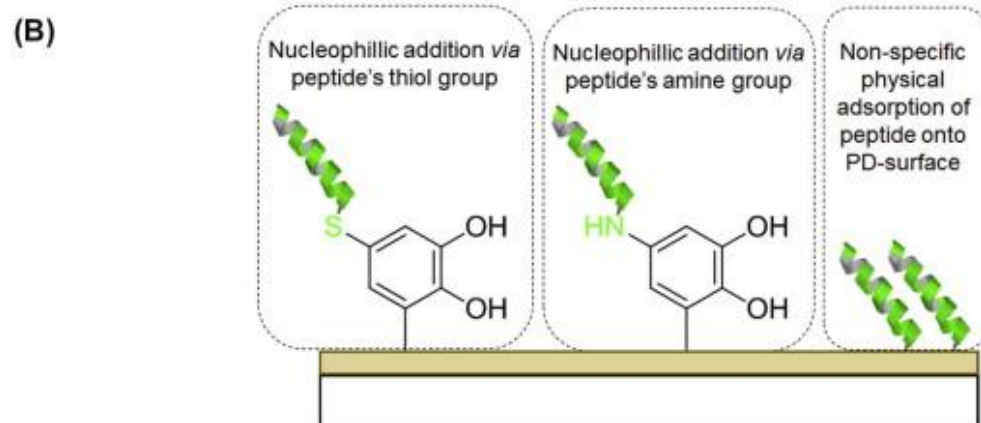
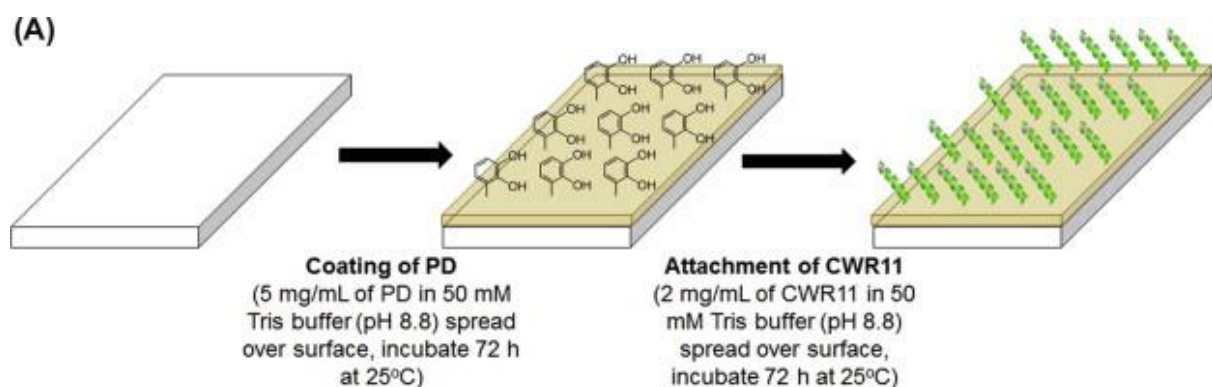


Silane anchor를 이용한 코팅은 유리 및 금속 산화물 표면과 같은 광물 성분 표면에 유기 작용성 알콕시 실란 분자로 표면을 덮은 후 생체분자를 올리기 위한 방법으로, 표면에 UV/Ozone 처리로 산화시켜 하이드록시기를 생성하고, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)을 처리하여 amino-silaization 반응이 일어나게 되면, 그 표면에 펩타이드가 공유 결합으로 부착될 수 있다. 이 때, 가교결합 반응을 위한 glutaraldehyde 와 같은 물질이 필요하기도 한다. 항균펩타이드인 Melimine을 이와 같은 방법으로 표면에 코팅하였을 경우, in vitro 및 in vivo 에서 바이오필름 형성을 억제하는 결과를 확인하였는데, 녹농균과 황색포도상구균의 부착을 최대 62%, 84% 저해하는것을 확인하였다 (Chen et al. 2016).



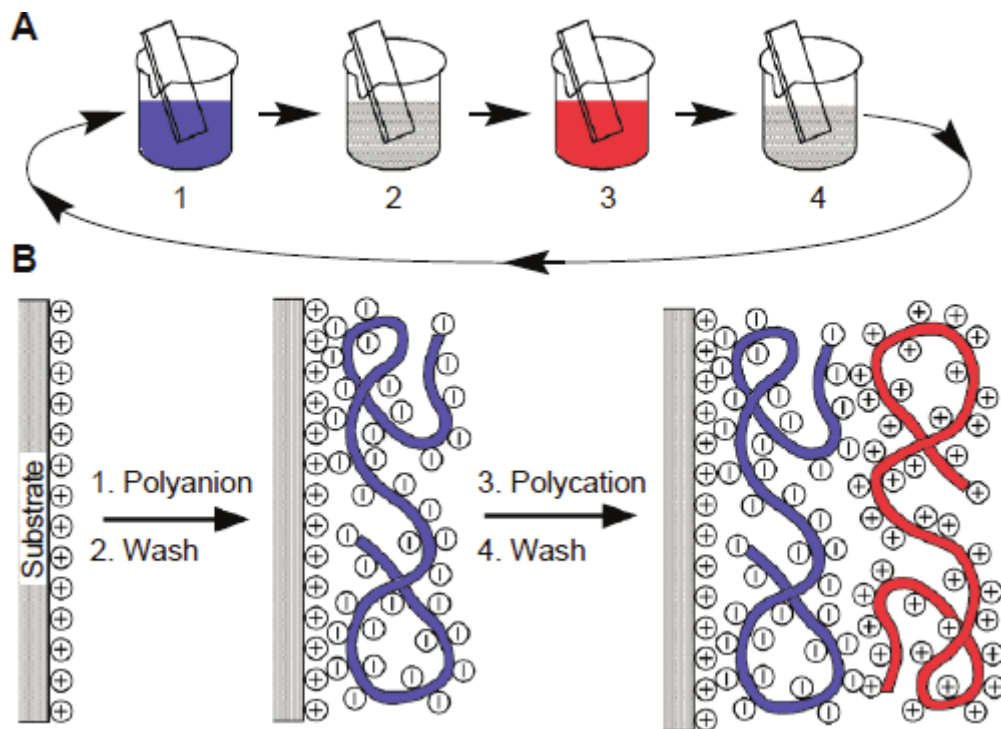
Catechol anchor를 이용한 코팅은 홍합의 강한 접착력에 착안하여 그의 접착력에 중요한 역할을 한다고 알려진 catechol 작용기를 이용하여 생체분자를 표면에 코팅하는 방법으로, catechol기는 hydrogen bonds, hydrophobic interactions, cation- π interactions, π - π interactions, covalent cross-links 과 같은 다양한 작용으로 여러 표면에 고정화될 수 있

다. 항균펩타이드인 Magainin I (Mag) 을 티타늄 표면에 고정화한 연구에서는 표면에 먼저 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid를 처리하여 catechol 작용기를 붙이고, cross-linker 역할을 하는 poly(ethylene glycol) (PEG) 를 반응시키면 Magainin I 이 공유결합으로 결합하여 *Listeria ivanovii* 세균부착을 90% 억제한다는 보고가 있다 (Peyre et al. 2012). 또한 표면에 폴리도파민(PD)를 이용하여 코팅하고 펩타이드를 결합하여 바이오필름 형성을 92% 억제한 결과도 보고되었다(Lim et al. 2015)



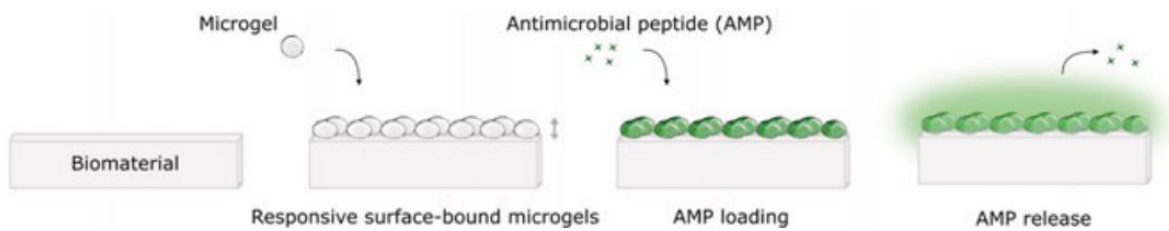
Layer-by-layer (LBL) deposition 방법은 정전기적 인력, 할로젠결합, 수소결합 등 연속적

으로 상반되는 인력을 이용하여 물질을 교대로 흡착시켜 형성하는 다층 박막 제조법으로, 제조가 단순하고 쉬워서 의료, 디스플레이, 바이오센서 등 여러 분야에서 널리 응용되는 방법이다. pH 조건에서의 이온화도 차이를 이용해서 물질의 방출 정도를 조절할 수 있고, 메기 유래의 항균펩타이드 parasin I을 스테인리스강에 tannic acid와 LBL 증착방식으로 코팅하였을 경우, 그람음성균 (*Pseudomonas* sp. and *E. coli*), 그람양성균 (*S. aureus* and *S. epidermidis*), 미세조류 (*Amphora coffeaeformis*) 에 대한 표면 부착을 감소시키는 것을 확인하였고, layer 수가 많을수록 항균력과 세균오염방지효과가 증가하는 것을 확인하였다. (Xu et al. 2016)

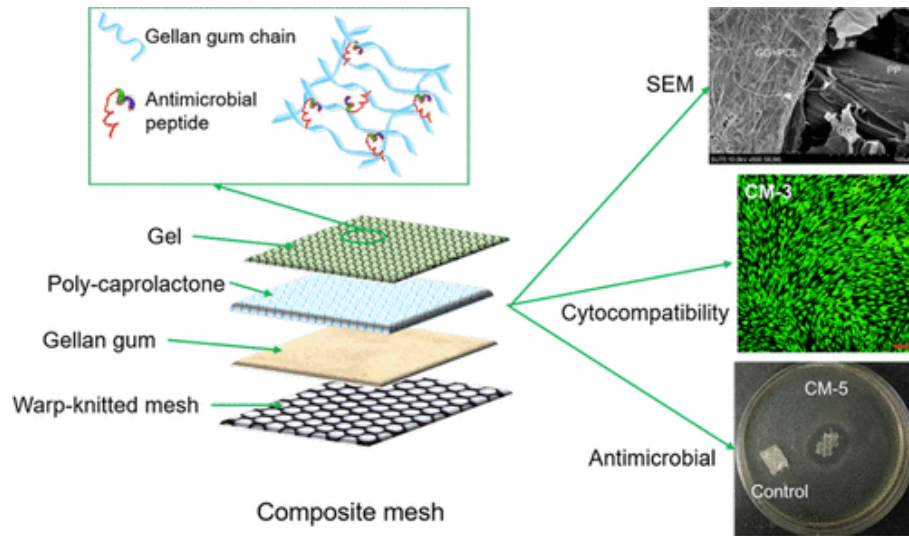


Microgel-based coating. 마이크로젤은 온도, pH, 이온 강도, 산화 환원 조건, 빛과 같은 다양한 매개변수에 의해 유발되는 자극-반응성 팽윤력을 갖는 느슨하게 가교된 하이드로젤 입자이다. 디자인 및 합성이 용이하기 때문에 표면 코팅을 위한 building block으로도 관심을 많이 받는 물질이다. Avidin이 Biotin에 매우 강하게 결합하는 특징을 이용하여,

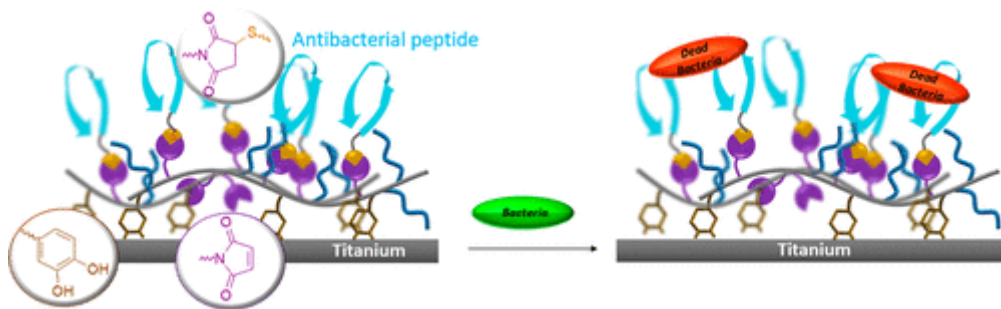
Biotynyl화된 마이크로겔과 avidin을 교대로 가교한 마이크로겔에, 항균펩타이드 KYE28를 넣었을 때, 약 1.5시간까지는 시간에 따라 항균펩타이드가 방출되지만, 그 이후에는 일정하게 유지되어, 더 오랜 시간 (수일~수주) 동안 천천히 방출되는 것을 확인하였고, 세균 부착을 줄여주는 것을 확인하였다. (Nystrom et al. 2018)



생분해성 폴리머인 poly(ϵ -caprolactone) (PCL) 을 이용하여 항균성 복합 메쉬를 개발하기 위한 연구에서는, 거대 다공성 폴리 프로필렌 메쉬를 기판으로, 전기 방사 된 PCL 나노 필름과 젤란검을 사용하였다. 젤란검은 음이온성 다당류로, 항균펩타이드 PEP-1 (RRRGRRRGPPGRRRGRRR) 를 효과적으로 전달하기 위한 매체로 사용되었다. 젤란검과 폴리카프로락톤은 모두 미국 FDA에 바이오소재로 승인 받은 물질로, 생분해성이면서 독성이 없다. 이러한 항균 메쉬는 cm^2 당 3 mg 처리하였을 때, 그람음성균과 그람양성균에 효과적인 것을 확인하였고, 10일 동안 60%의 펩타이드가 방출되어, 지속적으로 방출하는 되는 시스템인 것을 확인하였다. (Liu et al. 2019)



최근 항균펩타이드인 E6 (RRWRIVVIRVRR)를 티타늄 표면에 코팅한 연구에서는, dopamine, PEG, maleimide 를 포함하는 copolymer 코팅 방법을 개발하였다. 항균펩타이드 E6의 Cysteine이 maleimide에 thiol-maleimide click reaction으로 결합하여 펩타이드가 표면에 고정화되었고, 그 결과 PEG에 의한 세균 부착 감소 효과와 부착세균을 80% 사멸시키는 결과를 확인하였다. (Gevrek et al. 2019)



이상과 같이 다양한 항균펩타이드를 활용한 코팅제 개발에 대한 연구가 진행되고 있지만, 높은 항균활성을 가지면서도 보다 쉽게 적용 가능하기 위해서는, 항균펩타이드의 경제적 대량생산 및 효과적인 코팅방법 개발이 추가적으로 필요하다.

Reference

- Alcheikh, A., G. Pavon-Djavid, G. Helary, H. Petite, V. Migonney and F. Anagnostou (2013). "PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion." J Mater Sci Mater Med **24**(7): 1745-1754.
- Chen, R., M. D. Willcox, K. K. Ho, D. Smyth and N. Kumar (2016). "Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models." Biomaterials **85**: 142-151.
- Gevrek, T. N., K. Yu, J. N. Kizhakkedathu and A. Sanyal (2019). "Thiol-Reactive Polymers for Titanium Interfaces: Fabrication of Antimicrobial Coatings." Acs Applied Polymer Materials **1**(6): 1308-1316.
- Lim et al. (2015) "Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptidecoating with antimicrobial and antibiofilm properties" Acta Biomaterialia **15**:127-138.
- Liu, P., K. Fu, X. Zeng, N. Chen and X. Wen (2019). "Fabrication and Characterization of Composite Meshes Loaded with Antimicrobial Peptides." ACS Appl Mater Interfaces **11**(27): 24609-24617.
- Martin, J. et al. (2019) "Silicone grafted bioactive peptides and their applications" Curr Opin Chem Biol **52**: 125-135.
- Nystrom, L., N. Al-Rammahi, S. M. Haffner, A. A. Stromstedt, K. L. Browning and M. Malmsten (2018). "Avidin-Biotin Cross-Linked Microgel Multilayers as Carriers for Antimicrobial Peptides." Biomacromolecules **19**(12): 4691-4702.
- Pasupuleti, M., A. Schmidtchen and M. Malmsten (2012). "Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system." Crit Rev Biotechnol **32**(2): 143-171.
- Peyre, J., V. Humblot, C. Methivier, J. M. Berjeaud and C. M. Pradier (2012). "Co-grafting of amino-poly(ethylene glycol) and Magainin I on a TiO₂ surface: tests of antifouling and antibacterial activities." J Phys Chem B **116**(47): 13839-13847.
- Xu, G., D. Pranantyo, B. Zhang, L. Q. Xu, K. G. Neoh and E. T. Kang (2016). "Tannic acid anchored layer-by-layer covalent deposition of parasin I peptide for antifouling and antimicrobial coatings." Rsc Advances **6**(18): 14809-14818.
- Yu, K., J. C. Lo, M. Yan, X. Yang, D. E. Brooks, R. E. Hancock, D. Lange and J. N. Kizhakkedathu (2017). "Anti-adhesive antimicrobial peptide coating prevents catheter associated infection in a mouse urinary infection model." Biomaterials **116**: 69-81.
- Zhou F, Yu T, Du R, et al. (2020). "Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study." Lancet. **395**(10229): 1054-1062.
- Zhu, Z., Z. Wang, S. Li and X. Yuan (2019). "Antimicrobial strategies for urinary catheters." J Biomed Mater Res A **107**(2): 445-467.