

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176830

(43) 공개일자 2024년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 37/46 (2006.01) A01N 33/12 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 37/46 (2013.01)

A01N 33/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0075965

(22) 출원일자 2023년06월14일

심사청구일자 2023년06월14일

(71) 출원인

(주)셀아이콘랩

대전광역시 유성구 유성대로 1662, 304호 (전민동, 대전바이오벤처타운)

(72) 발명자

성민규

대전광역시 유성구 학하중앙로 99, 308동 1801호 (계산동, 오투그란데리빙포레아파트)

이정숙

대전광역시 중구 서문로 96, 203동 702호 (문화동, 센트럴파크아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

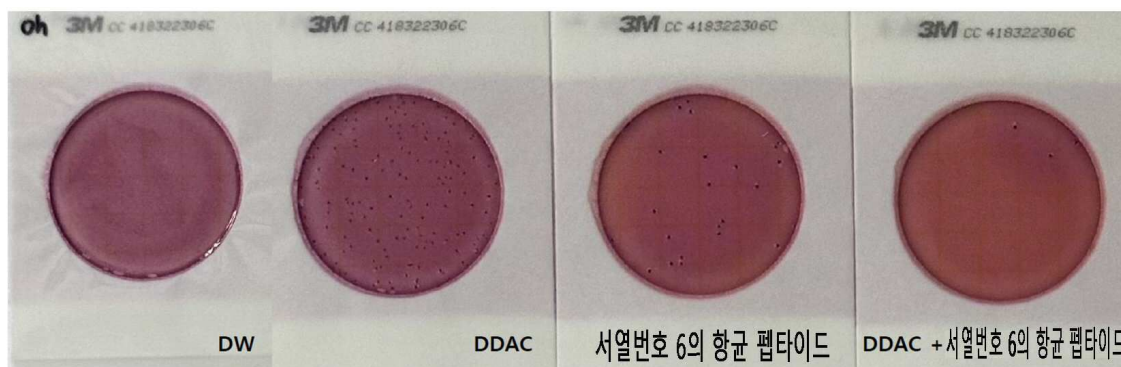
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규 항균 펩타이드 및 염화디데실메틸암모늄을 유효성분으로 포함하는 항균 또는 항바이러스 용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 DDAC를 포함하는 항균 또는 항바이러스용 조성물과, 이를 포함하는 화장료 조성물, 피부외용제 조성물, 의약품 조성물, 및 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A01P 1/00 (2021.08)

A01N 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

최원석

대전광역시 유성구 도안동로 523, 203동 1801호 (봉명동, 호반베르디움)

정영필

대전광역시 유성구 문지로 300, 103동 2003호 (문지동, 효성해링턴플레이스)

고세리

대전광역시 유성구 가정로 65 (신성동, 대림두레아파트) 101동 707호

안미영

대전광역시 유성구 온천로 45, 알파동 2810호 (봉명동, 유성 푸르지오 시티)

김수영

대전광역시 유성구 전민동 206-4, 205호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1425165797

과제번호

S3129492

부처명

중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명

중소기업기술정보진흥원

연구사업명

현장수요맞춤형 방역물품기술개발

연구과제명

지질막 용출 효과가 우수한 펩타이드 기반 지속성 항균·항바이러스 살균제 개발

기 여 율

1/1

과제수행기관명

주식회사 셀아이콘랩

연구기간

2021.06.15 ~ 2023.06.14

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및

염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 포함하는 항균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유도체는 상기 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나로 구성되는 항균 펩타이드의 N-말단으로부터 1번째, 2번째, 5번째, 6번째, 9번째, 및 12번째 위치로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나의 위치에 상응하는 아미노산이 다른 염기성 아미노산으로 치환된, 항균용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염기성 아미노산이 라이신(Lysine) 또는 아르기닌(Arginine)인 것인, 항균용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유도체는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 항균용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 대장균(*Escherichia coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 칸디다균(*Candida albicans*)으로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 생장을 저해하는 것인, 항균용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 서열번호 9 내지 서열번호 16의 서열 중 어느 하나의 서열로 코딩되는 것인, 항균용 조성물.

청구항 7

서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및

염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 포함하는 소독제 또는 살균제.

청구항 8

제7항에 있어서, 사물용 또는 섬유용인 것인, 소독제 또는 살균제.

청구항 9

서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및

염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 처리하는 단계를 포함하는 소독 또는 살균방법.

청구항 10

서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및

염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 포함하는 항바이러스용 조성물.

청구항 11

제11항에 있어서, 상기 바이러스는 HCoV-299E, IAV-H3N2 및 FCV로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 항바이러스용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄을 유효성분으로 포함하는 항균 또는 항바이러스용 조성물과 이를 포함하는 화장품 조성물, 의약품 조성물 및 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 펜데믹 시대에 대응하고자 우수한 항균력을 가진 제품의 수요가 증가하고 있으며, 항균 제품에 대한 다양한 시도들이 늘어나고 있다. 이에 대한 노력으로, 천연물 항생제에 대한 연구 개발이 진행되고 있다.

[0004] 구체적으로, 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물(한국 공개특허 제10-2020-0017912호)와 같은 천연물 유래 항생제가 알려져 있으나, 추출물과 같은 천연물은 입자의 크기가 큰 편이고, 천연물 하나만으로 유의미한 효과를 나타내기 어려워 항균 물질을 개발할 필요성이 대두되고 있다.

[0005] 이러한 배경 하에서, 본 발명자는 본원발명의 항균 펩타이드가 DDAC와의 조합에서 다른 항균제 조합 대비 항균 효과가 현저히 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)을 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)을 포함하는 소독제 또는 살균제를 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)을 처리하는 단계를 포함하는 소독 또는 살균방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 이하, 본 발명 내용에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시한 일 양태의 설명 및 실시형태는 공통된 사항에 대하여 다른 양태의 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 더불어, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0014] 본 발명의 일 양태는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에서 "항균 펩타이드"는 항 미생물 활성을 갖는 펩타이드를 의미하며, 항 미생물 활성은 미생물의 종류에 제한되지 않으므로, 상기 '항균'은 항-박테리아(antibacterial), 항-진균(antifungal), 항-살균 및 항생(antibiotic)과 혼용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 항균 펩타이드는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 항 미생물 활성을 갖는 한, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 유도체, 또는 이의 단편도 포함하는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 항균 펩타이드는 박테리아와 같은 미생물부터 식물, 곤충, 양서류, 포유류, 인간 등 다양한 종에서 개체를 보호하기 위한 내재 면역계(1차 방어)로 발현되는 물질일 수 있으며, 기존 항생제에 비해 항균력이 뛰어나고 내성이 거의 없다는 특성을 가질 수 있으나, 항균 펩타이드로서 기능을 한다면 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 본 발명의 항균 펩타이드는 항 미생물(antimicrobial) 활성을 갖는 것이라면 구조 등에 제한되지 않으며, 상기 미생물(microorganism)은 미생물의 범주에 포함되는 것이라면 제한되지 않고, 박테리아(bacteria) 및 진균(fungus) 등을 모두 포함할 수 있으며, 그 종류 및 유래 등에 제한되지 않는다.
- [0018] 구체적으로, 상기 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 대장균(*Escherichia coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 칸디다균(*Candida albicans*)으로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 생장을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 "염화디데실메틸암모늄(Didecyl methyl ammonium chloride, DDAC)"는 투명한 황색 액체, 황색 분말 혹은 무색 결정체를 가지는 물질로 항균제나 살균제로 이용되며, 벽, 바닥, 테이블, 화장실, 비품 등에 상업적 혹은 주거용으로 적용되고 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 및 이의 유도체가 DDAC와의 조합에서 대장균(*Escherichia coli*)과 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대하여 각각의 단독 대비 우수한 살균력과 살균 유지능을 가짐을 확인하였다(실시예 1과 2).
- [0021] 특히, 본 발명 서열번호 6의 항균 펩타이드에 DDAC가 아닌 미산성차염소산수라는 다른 른 종류의 항균제를 조합하였을 때는 오히려 항균력이 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 항균 펩타이드와 DDAC의 조합이 매우 우수한 항균 시너지력을 가지는 최적의 조합임을 입증하였다(실시예 2).
- [0023] 본 발명에서 "유도체"는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드의 유도체를 의미하며, 구체적으로 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열에서 일부 작용기가 부가되거나, 일부 아미노산 서열이 결실, 변형, 치환, 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 구체적으로, 본 발명에서의 유도체는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상

일 수 있고, 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드와 마찬가지로 항균 펩타이드로서 기능하는 것일 수 있으며, 항균 펩타이드에 대해서는 전술한 바와 같다.

- [0026] 본 발명의 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 및 이의 유도체는 하기 화학식 1과 같은 서열을 가지면서, 항균 활성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] [화학식 1]
- [0029] $[X_1 - X_2 - \text{Leu} - \text{Phe} - X_3 - X_4 - \text{Ile} - \text{Leu} - X_5 - \text{Tyr} - \text{Leu} - X_6]$
- [0031] 상기 화학식 1에서 X_1 내지 X_6 은 염기성 아미노산에서 선택될 수 있고, 아르기닌, 라이신, 루이신 및 페닐알라닌에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 및 이의 유도체는 상기 화학식 1의 서열을 갖는 것일 수 있고, 일 구현예로는 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드일 수 있다. 또한, 본 발명의 유도체는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 서열번호 1: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys}-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0034] 서열번호 2: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Arg}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0035] 서열번호 3: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0036] 서열번호 4: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Phe}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0037] 서열번호 5: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0038] 서열번호 6: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$,
- [0039] 서열번호 7: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$, 및
- [0040] 서열번호 8: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0042] 구체적으로, 상기 유도체는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드의 N-말단으로부터 1번째, 2번째, 5번째, 6번째, 9번째, 및 12번째 위치로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나의 위치에 상응하는 아미노산이 다른 염기성 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [0043] 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature) 성질에 근거하여 발생할 수 있다. 구체적으로, 전하를 띠는 결사슬(electrically charged amino acid)을 갖는 아미노산 중 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌(Arginine; R), 라이신(Lysine; K), 및 히스티딘(Histidine; H)을, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 글루탐산(Glutamate; E) 및 아스파르트산(Aspartate; D)을 포함하고; 전하를 띠지 않는 결사슬(uncharged amino acid)을 갖는 아미노산 중 비극성 아미노산(nonpolar amino acid)은 글라이신(Glycine; G), 알라닌(Alanine; A), 발린(Valine; V), 류신(Leucine; L), 이소류신(Isoleucine; I), 메티오닌(Methionine; M), 페닐알라닌(Phenylalanine; F), 트립토판(Tryptophan; W) 및 프롤린(Proline; P)을 포함하고, 극성(polar) 또는 친수성(hydrophilic) 아미노산은 세린(Serine; S), 트레오닌(Threonine; T), 시스테인(Cysteine; C), 티로신(Tyrosine; Y), 아스파라긴(Asparagine; N) 및 글루타민(Glutamine; Q)을 포함하고, 상기 비극성 아미노산 중 방향족 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다.
- [0044] 본 발명에서 '다른 염기성 아미노산으로 치환'은 치환 전의 아미노산과 다른 염기성 아미노산으로의 치환이면 제한되지 않는다. 즉, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드의

N-말단으로부터 1번째, 2번째, 5번째, 6번째, 9번째, 및 12번째 위치로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나의 위치에 존재하는 치환 전 아미노산에서 다른 염기성 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , 및 X_6 위치로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나의 위치에 존재하는 아미노산이 다른 염기성 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 염기성 아미노산은 히스티딘, 라이신, 및 아르기닌에서 선택되는 것일 수 있고, 라이신 또는 아르기닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 목적상, 상기 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드의 유도체는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 및 이의 유도체가 DDAC와의 조합에서 대장균 (*Escherichia coli*)과 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)에 대하여 각각의 단독 대비 우수한 살균력과 살균 유지능을 가짐을 확인하였다(실시예 1과 2).

[0048] 본 발명에서 "단편"은 특정 서열을 갖는 펩타이드의 일부 서열을 의미하는 것으로, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드 또는 이의 유도체의 일부 서열일 수 있으며, 상기 항균 펩타이드 또는 이의 유도체와 마찬가지로 항 미생물 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0050] 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 천연물 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다.

[0051] 본 발명에서의 항균 펩타이드는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편으로 기재하였으나, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 아미노산 서열 앞뒤로의 무의미한 서열 추가 또는 항균 펩타이드로서 동일한 기능을 유지하게 하는 잠재성 변이를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편과 서로 동일 또는 상응하는 활성을 가지는 경우라면 본 발명의 항균 펩타이드에 해당됨은 당업자에게 자명할 수 있다. 구체적인 예를 들어, 본 발명의 항균 펩타이드는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 이의 단편, 또는 이와 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있으며, 보다 구체적으로 본 발명의 항균 펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 이의 단편, 또는 이와 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 ‘특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드’, ‘특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드’ 또는 ‘특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드’ 라고 기재되어 있더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단 그리고/또는 C-말단에 펩타이드의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

[0053] 상기 “보존적 치환(conservative substitution)”은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환은 펩타이드의 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0055] 본 발명의 펩타이드는 고체상에 일정하게 결합된 아미노산 골격에 하나 이상의 아미노산 또는 적합하게 보호된 아미노산을 연속적으로 아미드 결합을 형성하는 식으로 제조할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 펩타이드는 안정성을 크게 저하시키지 않는 범위에서 다른 아미노산의 삽입, 치환, 삭제가 가능하며, 이 또한

본 발명의 범주에 속한다.

[0057] 또한, 본 발명의 펩타이드는 세포내 이동을 촉진하는 세포 투과성 펩타이드(cell permeable peptide)를 C-말단 또는 N-말단에 결합한 형태로서 제조될 수도 있다. 예를 들면, 상기 세포 투과성 펩타이드에는 TAT 펩타이드(Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Tyr-Arg-Arg-Arg) 및 Tat-PTD 펩타이드(Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg: Tat PTD)일 수 있으나, 본 발명이 이에 국한되는 것은 아니며, 당업계에 공지된 세포 투과성 펩타이드가 본 발명에 따른 펩타이드의 활성을 저해하지 않는 범위 내의 것이라면 어느 것이라도 사용 가능하다.

[0059] 본 발명의 펩타이드 및 화합물들은 금속착화합물 형태로 제조할 수도 있으며, 상기 금속은 구리, 마그네슘, 칼슘, 철, 아연, 니켈, 은, 게르마늄, 및, 갈륨에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 구리를 사용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 한편, 본 발명의 펩타이드는 염의 형태로 존재할 수도 있다. 본 발명에 사용 가능한 염의 형태는 화합물의 최종 분리 및 정제 동안 또는 아미노기를 적절한 산과 반응시키는 것에 의해 만들어지는 것일 수 있다. 예를 들면, 산 부가염으로 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 디글루코네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 포르메이트, 푸마레이트, 하이드로 클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메시틸렌설포네이트, 메탄설포네이트, 나프틸렌설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 트리클로로아테이트, 트리플루오로아세테이트, 포스페이트, 글루타메이트, 바이카보네이트, 파라-톨루엔설포네이트 및 운데카노에이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 산 부가염을 형성하기 위해 사용될 수 있는 산의 예로는 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산과 같은 무기산 및 옥살산, 말레산, 숙신산 및 시트르산과 같은 유기산일 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 바람직하게는 본 발명의 펩타이드는 트리플로로아세테이트 염 또는 아세테이트 염 형태로 제조할 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물에 포함되는 펩타이드 제조를 위해 이용되는 아미노산의 아미노기 또는 카복실기는 적합한 보호기에 의해 보호될 수 있다. 보호된 아미노산은 고체 지지체에 부착되거나 아미드 결합을 형성하기에 적합한 조건하에서 다음의 아미노산을 첨가함으로써 용액 중에서 반응이 이루어질 수 있다. 또한, 보호기는 적합한 보호기로 보호된 아미노산을 첨가하기 이전에 완전히 제거될 수 있다. 모든 아미노산이 목적하는 바에 따라 연결된 후, 유리된 잔류 보호기 및 유리된 고형 지지체로부터 연속적으로 또는 동시에 분리하여 최종 목적하는 펩타이드를 얻을 수 있다.

[0065] 본 발명의 펩타이드 화합물을 제조하기 위한 가장 바람직한 합성 방법으로는 고체상 폴리머 지체를 이용하여 합성하는 고체상 펩타이드 합성방법을 이용할 수 있으며, 상기 방법을 통해 제조된 펩타이드의 α -아미노기는 산 또는 염기 민감성 작용기에 의해 보호될 수 있다. 이 때의 아미노산의 보호기는 펩타이드 축합반응 조건에서 안정한 성질을 가져야만 하고, 연장되는 펩타이드 사슬의 파괴 없이 또는 거기에 함유된 임의의 키랄 센터의 라세미제화 없이 용이하게 제거 가능한 성질을 가져야만 한다. 따라서, 적합한 보호기들로는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc), t-부톡시카보닐(Boc), 벤질옥시카보닐(Cbz), 비페닐이소프로필-옥시카보닐, t-아밀옥시카보닐, 이소보르닐옥시카보닐, (α , α)-디메틸-3,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 0-니트로페닐설페닐, 2-시아노-t-부틸옥시카보닐 등일 수 있으며, 이러한 목적으로 당업계에 알려진 적합한 다른 보호기들 또한 본 발명의 범위 내에서 사용 가능하다.

[0067] 본 발명의 펩타이드 합성에서 사용된 아미노산의 가장 바람직한 보호기로는 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(Fmoc) 보호기가 사용될 수 있다.

- [0068] 특히, 본 발명의 펩타이드 합성에서 사용되는 아미노산 잔기의 보호기로는 N-메틸글루탐산의 경우, t-부틸(t-Bu)이고; 라이신의 경우, t-부톡시카보닐(Boc)이고; 세린의 경우, 7t-부틸(t-Bu)이고; 트레오닌 및 알로트레오닌의 경우, t-부틸(t-Bu)이고; 시스테인의 경우, 트리틸(Trt)인 것이 바람직하지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 고체상 펩타이드 합성 방법에서, C-말단 아미노산은 적합한 고형 지지체 또는 수지에 부착될 수 있다. 상기 합성을 위해 유용한 적합한 고형 지지체로는 단계적 축합-탈보호 반응의 시약 및 반응 조건에 불활성이고 사용되는 매질에 불용성인 물질이 바람직하며, 예를 들면, 2-클로로트리틸 클로라이드 수지(2-chlorotrityl chloride resin), 링크 아미드(link amid) 또는 링크 아미드 4-메틸벤질히드릴아민 수지(link amid MBHA resin)일 수 있다.
- [0072] 특히, C-말단 펩타이드에 대해 바람직한 고형 지지체는 Novabiochem Corporation으로부터 시판되는 2-클로로트리틸 클로라이드, 링크 아미드(link amid) 또는 링크 아미드 4-메틸벤질히드릴아민 수지(link amid MBHA resin)일 수 있다.
- [0074] C-말단 아미드(amide)는 디클로로메탄, N-메틸피리돈(NMP) 또는 DMF와 같은 용매 중에서 10℃ 내지 50℃의 온도에서, 바람직하게는 30℃의 온도조건에서, 1 내지 24시간 동안 4-디메틸아미노피리딘(DMAP), 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBt), N-메틸모르폴린(NMM), 벤조트리아졸-1-일옥시-트리스(디메틸아미노)포스포늄-헥사플루오로포스페이트(BOP) 또는 비스(2-옥소-3-옥사졸리딘)포스핀클로라이드(BOPCI)의 존재 또는 부재하에서 N,N'-디사이클로헥실카보디이미드(DCC), N,N'-디이소프로필카보디이미드(DIC), [O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트](HATU) 또는 O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HBTU)에 카르복실산을 활성화시켜 축합을 통해 수지 또는 고체상 지지체에 축합(결합, 커플링)될 수 있다.
- [0076] 고형 지지체가 링크 아미드 4-메틸벤질히드릴아민 수지인 경우, 바람직한 보호기로서 Fmoc 작용기는 C-말단 아미노산으로 축합하기 전에 2급 아민 용액, 바람직하게는 20%의 피페리딘 DMF 용액을 과량 사용하여 절단한다. 상기 탈보호된 4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸)페녹시아세트아미도메틸 수지에 목적하는 아미노산을 축합시키는데 사용되는 바람직한 시약들로는 적합하게 보호된 아미노산에 대하여 DMF 용매 중에서 N-메틸모르폴린(NMM), 1-하이드록시벤조트리아졸(HOBt) 및 O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HATU), O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HBTU), N,N'-디사이클로헥실카보디이미드(DCC) 또는 N,N'-디이소프로필카보디이미드(DIC)와 같은 축합 반응 시약들이다.
- [0078] 본 발명에서 수행되는 연속적인 아미노산의 축합은 관련 기술 분야에서 널리 알려져 있는 자동 펩타이드 합성기를 이용하거나 또는 수동으로 직접 수행할 수 있다. 바람직한 합성 반응의 조건으로는 Fmoc 그룹으로 보호된 α-아미노산을 2급 아민 용액, 바람직하게 피페리딘으로 처리하여 탈보호시킨 후, 충분히 과량의 용매로 세척하고 축합을 원하는 또 다른 각각의 보호된 아미노산을 이어서 3~7배 몰 과량 첨가하여, 바람직하게는 DMF 용매 중에서 반응을 수행할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 고체상 수지를 이용한 펩타이드의 합성 마지막 단계에서는 펩타이드를 연속적으로 또는 1회 조작으로 수지로부터 얻고자 하는 펩타이드를 제거하고 각각 아미노산의 잔기를 보호하고 있는 보호 그룹들을 탈보호시킬 수 있다. 수지로부터 펩타이드의 제거 및 잔기에 존재하는 보호기들의 탈보호 조건으로는 일반적으로 수지-펩타이드 간의 결합을 절단하는 절단 시약 각테일, 예를 들어, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIS), 티오아니올, 물 또는 에탄디티올(EDT)등으로 구성된 디클로로메탄 혼합 각테일 용액을 처리하여 얻을 수 있다. 이렇게 얻어진 혼합 용액은 냉장 보관된 디에틸에테르 용매를 과량 처리함으로써 침전물을 생성시킬 수 있다. 이상과 같이 얻어진 침전물을 원심분리시켜 완전히 침전시키고 과량의 트리플루오로아세트산, 트리이소프

로필실란, 티오아니졸, 물 및 에탄디티올 등을 일차 제거하고 이상의 절차를 2회 이상 반복하여 고형화시킨 침전물을 얻을 수 있다. 이 때, 완전히 탈보호된 펩타이드 염은 물과 아세트나이트릴 용매로 구성된 혼합 용매 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분리 정제할 수 있다. 분리 정제된 펩타이드 용액은 동결건조를 이용하여 완전히 농축 건조함으로써 고형의 펩타이드를 얻을 수 있다.

- [0082] 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 서열번호 9 내지 서열번호 16로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 서열로 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 유도체는, 예를 들어, 서열번호 9 내지 서열번호 16의 염기서열(nucleic acid sequence)을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 활성을 나타내는 펩타이드를 코딩하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 활성을 나타내는 펩타이드를 코딩하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 상기 폴리뉴클레오티드는, 본 발명에 따른 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 활성을 갖는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0086] 구체적으로, 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 활성을 나타내는 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 화학식 1, 상기 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편으로 기재한 아미노산을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 펩타이드를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 펩타이드의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 서열번호 9 내지 서열번호 16의 염기서열을 포함할 수 있으며, 이와 상동성 또는 동일성이 80%, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 더욱 구체적으로 99% 이상인 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 5 내지 서열번호 8, 이의 유도체, 또는 이의 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al.)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성 또는 동일성이 높은 폴리뉴클레오티드끼리, 40% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 더욱 구체적으로 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 폴리뉴클레오티드끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 쓰던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60℃, 1×SSC, 0.1% SDS, 구체적으로 60℃, 0.1×SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로 68℃, 0.1×SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [0089] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [0090] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55℃의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60℃, 63℃ 또는 65℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [0091] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는

해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).

- [0093] 본 발명에서 용어, '상동성 (homology)' 또는 '동일성 (identity)' 은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0094] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 펩타이드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오타이드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 역시 포함됨이 자명하다.
- [0095] 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0096] 폴리뉴클레오타이드 또는 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0097] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 다른 하나의 양태는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 (antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 포함하는 소독제 또는 살균제를 제공한다.
- [0100] 또한, 또 다른 하나의 양태는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 (antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 처리하는 단계를 포함하는 소독 또는 살균방법을 제공한다.
- [0101] 상기 "서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열, 항균 펩타이드, 유도체, 또는 이의 단편",

및 "염화디데실메틸암모늄" 은 전술한 바와 같다.

- [0102] 상기 소독제 또는 살균제는 물체 표면, 또는 인간을 포함한 동물인 개체 표면 등에 위치한 균을 죽이거나 일정 수준 이하로 떨어트리거나 하는 목적을 가진 제품으로, 구체적으로는 살균, 향균, 또는 살바이러스를 위한 것이며, 보다 구체적으로는 사물용 또는 섬유용일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0103] 일 구현예로, 상기 사물용 또는 섬유용 제품은 용제, 살균제, 컨디셔닝제, 가용화제, 소취제, 향료, 컨디셔닝제, 및/또는 pH 조절제를 추가로 포함할 수 있으며, 공지된 제품은 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0104] 상기 소독제 또는 살균제는 용매를 포함한 형태일 수 있으며, 일 구현예에서 수성 용매는 물일 수 있다.
- [0105] 상기 소독제 또는 살균제는 이를 포함하는 소비자 제품을 제공할 수 있다. 소비자 제품은, 예를 들어, 소독제 스프레이, 손 소독제 용액 또는 겔, 방부 와이프, 또는 방부 패치 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0106] 본 발명은 물품, 표면 또는 인간을 포함한 동물의 피부를 본원에 설명된 소독제 또는 살균제 조성물, 또는 본원에 설명된 소비자 제품으로 처리하는 것을 포함하는 물품 또는 표면을 소독하는 방법을 제공한다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.
- [0109] 또한, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 항바이러스용 조성물을 제공한다.
- [0110] 또한, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편을 포함하는 바이러스 관련 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0111] 상기 "서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열, 항균 펩타이드, 유도체, 또는 이의 단편", 및 "염화디데실메틸암모늄"은 전술한 바와 같다.
- [0112] 상기 바이러스는 HCoV-299E, IAV-H3N2 및 FCV로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0113] 상기 HCoV-299E는 인간을 감염시키는 7개 코로나 바이러스 중 하나로 감기를 일으키는 유형에 속한다. 인간과 박쥐를 감염시키며, 사람에게 흔하게 검출되는 대표적인 코로나바이러스 중 하나이다. 감염이 일어나면 건강한 성인은 일반적인 감기 증상을 나타내지만, 아동과 노인은 하기도 감염을 일으키기도 한다.
- [0114] 상기 IAV-H3N2는 인플루엔자를 일으키는 바이러스의 일종이다. 조류와 포유류를 감염시킬 수 있으며, 조류, 인간, 돼지에서 다양한 변종의 돌연변이가 존재한다고 보고된다. H3N2가 유행하는 해에는 입원 사례가 증가한다고 알려져 있다.
- [0115] 상기 FCV(Feline calicivirus) 고양이과 동물을 숙주로 삼는 칼리시바이러스과의 전염성 높은 호흡기 바이러스이다. 전형적인 징후로는 재채기, 콧물, 눈 분비물, 결막염, 혀의 궤양, 기면, 식욕 부진 및 열이 있다.
- [0116] 본 발명의 일 실시예에서, 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드가 HCoV-299E, IAV-H3N2, FCV에 대하여 우수한 항바이러스 활성을 가짐을 확인하였다(실시예 3).
- [0118] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 염화디데실메틸암모늄(DDAC)를 포함하는 항균용 또는 항바이러스 조성물을 포함하는 화장품 조성물, 피부외용제 조성물, 의약품 조성물, 또는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0119] 상기 "서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열, 항균 펩타이드, 유도체, 또는 이의 단편", "염화디데실메틸암모늄", "항균" 및 "항바이러스"는 전술한 바와 같다.
- [0121] 본 발명에서 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 향수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션

선, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0122] 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0123] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 상기 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [0124] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리암이드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로 하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0126] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 글리세린, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 글리세린, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0130] 본 발명에서 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0131] 본 발명의 상기 의약품 조성물은 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0132] 본 발명의 화장료 조성물 또는 의약품 조성물에서, 서열번호 5 내지 서열번호 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편은 전체 조성물 중 0.01 중량% 내지 100.0 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%로 함유될 수 있다.
- [0134] 본 발명의 "약학적 조성물"은, 서열번호 5 내지 서열번호 8의 아미노산 서열로 구성되는 항균(antimicrobial) 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편을 포함하는 것에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0135] 본 발명에서, 상기 "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 이를 투여 시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용될 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 상기 담체와 함께 제제화되어, 식품, 의약품, 사료 첨가제, 음용수 첨가제 등

으로 활용될 수 있다.

- [0136] 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0137] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 향산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제 들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0139] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 피부 외용제를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0140] 상기 피부 외용제의 비제한적인 예로는, 에어로졸제, 스프레이제, 세정제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있으며, 피부 외용제로 기능할 수 있다면 이에 제한되지 않는다.
- [0141] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 피부 외용제용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0142] 본 발명에서 "피부 외용제"는 피부에 바르는 제형을 의미한다. 본 발명에서 외용제는 피부에 바르는 제형이라면 형상 등에 제한되지 않으며, 외용제는 다시 연고제, 크림제, 로션제, 겔제 등으로 분류할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0143] 구체적으로, 상기 연고제는 피부에 도포하는 주성분을 기체에 녹이거나 분산시킨 반고형의 외용제일 수 있다. 기체는 성분에 따라 유지성 연고제 또는 수용성 연고제로 나눌 수 있다. 유지성 기체를 사용한 연고제는 피부연화 작용을 할 수 있으며, 밀봉성이 우수하고 상처에 적용하기 적합하지만 제거가 용이하지 않는 단점이 있다. 피부와 유사한 지용성 성질 및 피부 연화작용으로 인하여 피부 투과가 어려운 성분들을 국소적으로 투과 시킬 때에 유리한 제형일 수 있다.
- [0144] 상기 연고는 주로 기름과 같은 유상으로 이루어져 있어 보습이 우수하고 지용성 성분의 투과에 좋으나 끈적한 단점이 있으며, 상기 크림은 유중수형에 유화시킨 반고형의 외용제일 수 있으며, 유상과 수상을 혼합하여 연고의 끈적함을 개선한 제형일 수 있다. 유화 과정으로서, 유상과 수상을 혼합하기 위해 계면활성제 또는 특별한 공정을 거쳐 혼합할 수 있다. 또한, 크림은 연고제에 비해 도포 및 제거가 용이한 제형일 수 있으며, 로션은 크림보다 더 물과 유사한 성질을 가지는 제형으로 주성분을 수성액체에 용해시키거나 유화 또는 미세하게 분산시킨 외용제일 수 있다. 주성분, 첨가제, 및 정제수 등을 사용하여 용액, 현탁액, 또는 유탁액으로 하여 전체를 균질하게 한 것일 수 있다. 상기 겔제는 액체를 침투시킨 분자량이 큰 유기분자로 이루어진 반고형상의 외용제일 수 있다. 수성에 겔화제를 분산시킨 것일 수 있으며, 카보머 또는 합성고분자 등의 겔화제를 사용할 수 있다. 외용제의 종류는 유효성분, 사용 목적, 사용 방법 등에 따라 다양한 종류로 사용될 수 있으며, 본 발명의 외용제도 이에 제한되지 않는다.
- [0146] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학적 조성물을 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 등의 단위로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산 된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0147] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0148] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 피부 외용제용으로 제제화될 수 있으며, 보다 바람직하게는 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0150] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 약학적 유효량, 외용제를 위한 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0151] 또한, 본 발명에서 투여는 외용제로서의 투여일 수 있으며, 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은, 1일 1 mg/kg 내지 1,000 mg/kg일 수 있다.

[0153] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 피부 외용제의 방식으로 투여할 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무하는 방법을 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0154] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 바람직하게는 도포 또는 분무방식으로 투여될 수 있으며, 구체적으로, 피부 상태의 개선이나, 피부 질환을 예방, 개선 또는 치료할 필요가 있는 부위에 국소적으로 도포하는 방식으로 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0156] 본 발명의 항균 펩타이드 및 DDAC의 조합은 다른 항균제와의 조합에 비해서도 현저하게 증가된 항균 활성 및 감소된 독성을 갖는 바, 방부제, 의약품, 화장품 등의 업계에서 산업적 활용을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0158] 도 1은 DDAC 및 항균 펩타이드 조합의 대장균에 대한 항균력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 2는 DDAC 및 항균 펩타이드 조합의 녹농균에 대한 항균력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 3은 DDAC 및 항균 펩타이드 조합의 대장균에 대한 항균력을 살균 유지능으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 4는 DDAC 및 항균 펩타이드 조합의 녹농균에 대한 항균력을 살균 유지능으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 비교예로 미산성차염소산수 및 항균 펩타이드 조합의 대장균에 대한 항균력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 6은 비교예로 미산성차염소산수 및 항균 펩타이드 조합의 녹농균에 대한 항균력을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 7은 본 발명의 DDAC 및 항균 펩타이드 조합의 세포독성 실험 결과를 나타낸 도이다.
 도 8은 본 발명의 항균 펩타이드의 항바이러스 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0159] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0161] 제조예 1: 항균 펩타이드의 제조

[0162] 항균 펩타이드의 기능을 확인하기 위해, 서열번호 5 내지 서열번호 8 및 이의 유도체 펩타이드를 제조하였다.

[0164] **1-1: 서열번호 1의 펩타이드 합성**

[0165] 본 발명에 사용되는 아미노산의 약어 및 명칭은 아래와 같이 표기한다.

[0166] Phe: 페닐알라닌 / Ile: 이소류신 / Lys: 리신 / Leu: 류신 / Arg: 아르기닌 / Tyr: 타이로신

[0168] Novabiochem corporation으로부터 구입한 2-chlorotriethyl chloride resin(1.4 mmol/g 로딩된 수지)을 71.4mg (0.10mmol) 측량하여, 수지를 7.5 ml의 메틸클로라이드(methylchloride)로 용매화시키고 5분간 반응시킨 다음 메틸클로라이드를 제거하였다.

[0169] 이후, Fmoc-Lys(Boc)-OH(281.1mg, 0.60mmol)를 7.5 ml의 MC 용매에 완전히 녹인 다음, N,N'-디이소프로필에틸 아민(DIPEA)0.21ml, 1.2mmol를 넣고 수지에 첨가하였다. 반응액을 실온에서 12시간 동안 교반(shaking)한 후, 10ml의 DMF 용매로 4회 세척하였다.

[0170] 그 다음, 20%(w/v) 피페리딘(piperidine) DMF 용액을 7.5 ml 첨가하고 15분간 교반(shaking)하여, 전술한 수지에 첨가되었던 물질에서 9-플루오레닐메틸옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl; Fmoc) 보호기를 완전히 제거하고 10 ml의 DMF 용매를 이용하여 4회 세척하였다 (10 ml씩 4회 세척). 이 단계에서 Fmoc 보호기의 탈보호 반응 여부를 Kaiser test[E. Kaiser et al. Anal. Biochem., 1970, 34(2), 595-598.]를 실시하여 확인하였다.

[0172] 한편, Fmoc-Leu-OH(212.0 mg, 0.60 mmol)와 헥사플로오로포스페이트 벤조트리아졸 테트라메틸우로늄(hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyluronium; HBTU) (227.6 mg, 0.60 mmol) 및 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole; HOBt) (81.0 mg, 0.6 mmol)를 7.5 ml DMF 용매에 완전히 녹인 후 DIPEA(0.21 ml, 1.2 mmol)를 넣고 전술한 수지에 첨가하였다. 반응액을 상온에서 3시간 동안 교반(shaking)한 후, 10 ml씩 DMF용매로 4회 세척하였다. 이 단계에서 Kaiser test를 실시하여 반응종결을 확인 하였다.

[0174] 다음으로는 아래와 동일한 합성 주기에 따라 연속적으로 펩타이드를 축합(커플링)시켰다.

[0176] (1) DMF 용매(10 ml)로 4회 세척;

[0177] (2) 20%(w/v) 피페리딘 DMF 용액(7.5 ml)을 사용하여 15분간 탈보호;

[0178] (3) DMF 용매(10ml)로 4회 세척;

[0179] (4) Fmoc-아미노산, HBTU, HOBt, DIPEA 첨가;

[0180] (5) HBTU, HOBt, DIPEA 축합 시약을 첨가하여 아미노산 활성화 및 3시간 축합;

[0181] (6) DMF 용매(10 ml)로 4회 세척;

[0183] 상기 (1) 내지 (6)은 계속 반복하였으며, 이 때, Fmoc-Leu-OH 이후의 Fmoc으로 보호된 아미노산(0.60mmol)은 다음에 기술된 순서로 수지 반응용기에 첨가하여 축합시켰다.

[0184] (i) Fmoc-Tyr(tBu)-OH ;

[0185] (ii) Fmoc-Lys(Boc)-OH ;

[0186] (iii) Fmoc-Leu-OH ;

[0187] (iv) Fmoc-Ile-OH ;

[0188] (v) Fmoc-Lys(Boc)-OH ;

- [0189] (vi) Fmoc-Lys(Boc)-OH ;
- [0190] (vii) Fmoc-Phe-OH ;
- [0191] (viii) Fmoc-Leu-OH ;
- [0192] (ix) Fmoc-Lys(Boc)-OH ;
- [0193] (x) Fmoc-Lys(Boc)-OH ;
- [0195] Fmoc-Lys(Boc)-OH 축합 후의 (6) 이후에는, 마지막으로, 20% 피페리딘 DMF 용액(7.5ml)으로 처리후 10 ml씩 DMF용매 3회, MC용매 3회, 디에틸에테르 용매 3회 세척하였다.
- [0196] 상기와 같은 합성 종결 즉시, 펩타이드가 축합된 수지를 3시간 동안 트리플루오로아세트산/트라이소프로필실란/물(95:2.5:2.5)의 혼합물을 사용(10 ml)하여, 수지로부터 펩타이드를 절단하였다. 이렇게 얻어진 혼합 용액에 냉장 보관된 디에틸에테르 용매를 100 ml 처리함으로써 침전물을 생성시켰다. 얻어진 침전물을 원심 분리하여 완전히 침전시키고 트리플루오로아세트산 1차 제거하고 이상의 절차(디에틸에테르 용매를 100 ml 첨가하여 침전물을 세척하고 원심분리하는 단계 - 1차 제거를 시도했던 트리플루오로아세트산을 제거하기 위한 작업)를 2회 반복하여 고형화시킨 침전물을 얻었다.
- [0197] 상기 침전물(펩타이드)을 C-18 칼럼을 사용하여 50분에 걸쳐 0.001% 트리플루오로아세트산을 함유하는 5% 내지 100%의 아세트오니트릴/물 농도구배 용매 시스템을 사용하는 HPLC로 정제하였다. 순수 정제된 분획물을 동결건조시켜 백색분말형의 트리플루오로아세트레이트염으로서 하기 서열번호 1의 항균 펩타이드 155mg을 얻었다.
- [0199] 서열번호 1: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Tyr-Leu-Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0200] MS(ESI)m/e, $[\text{M}+\text{H}]^+= 1550.17$; (155 mg)
- [0202] **1-2: 서열번호 2 ~ 서열번호 8의 합성**
- [0203] 상기 제조예 1-1과 동일한 제조 과정을 이용하되, Fmoc으로 보호된 아미노산의 순서를 달리하여 하기의 서열번호 2 ~ 서열번호 8의 펩타이드를 제조하였다.
- [0205] 서열번호 2: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Tyr-Leu-Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0206] MS(ESI)m/e, $[\text{M}+\text{H}]^+= 1718.23$; (171 mg)
- [0208] 서열번호 3: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg-Phe-Leu-Phe-Arg-Leu-Ile-Leu-Arg-Tyr-Leu-Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0209] MS(ESI)m/e, $[\text{M}+\text{H}]^+= 1666.18$; (166 mg)
- [0211] 서열번호 4: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Leu-Ile-Leu-Arg-Tyr-Leu-Phe}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0212] MS(ESI)m/e, $[\text{M}+\text{H}]^+= 1666.18$; (166 mg)
- [0214] 서열번호 5: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg-Lys-Leu-Phe-Lys-Arg-Ile-Leu-Arg-Tyr-Leu-Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$
- [0215] MS(ESI)m/e, $[\text{M}+\text{H}]^+= 1634.2$; (153 mg)

[0217] 서열번호 6: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$

[0218] MS(ESI) m/e , $[\text{M}+\text{H}]^+= 1634.2$; (143 mg)

[0220] 서열번호 7: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{Arg}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Lys}]-\text{CO}_2\text{H}$

[0221] MS(ESI) m/e , $[\text{M}+\text{H}]^+= 1634.2$; (132 mg)

[0223] 서열번호 8: $\text{H}_2\text{N}-[\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Arg}]-\text{CO}_2\text{H}$

[0224] MS(ESI) m/e , $[\text{M}+\text{H}]^+= 1634.2$; (172 mg)

[0226] 실시예 1: 서열번호 6 및 DDAC 조합의 항균 활성 평가

[0227] 본 발명의 항균 펩타이드 및 DDAC를 포함하는 조성물의 살균력 또는 항균력을 확인하였다. 구체적으로 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 항균 펩타이드 및 DDAC 조합에 대하여 평가하였다.

[0228] 구체적으로, 항균 활성을 평가하기 위해 대장균(*Escherichia coli*)과 녹농균에 대한 항균 활성을 측정하였으며, 대장균과 녹농균에 각각 항균 펩타이드 및 DDAC 조합을 처리하여 세포의 생존률을 측정한 후 비교하였다.

[0230] 항균 활성 평가 방법

[0231] 본 실험에 사용된 대장균과 녹농균은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KTCC)에서 분양 받아 LB 배지를 사용하여 배양하였으며, 인간선유아세포(HDF)는 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 구매하여, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA)에 37°C 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

[0232] 항균 펩타이드 및 DDAC 조합에 대한 항균 활성 효능을 실험하기 위해 대장균과 녹농균을 각각 LB 배지를 사용하여 8시간 정도 배양한 뒤, 배양한 균을 96웰 플레이트에 분주하였다. 각 웰(well)에 농도별 항균 펩타이드 및 DDAC 조합 시료를 넣고 24시간 37°C에서 배양 후 마이크로 플레이트 리더기를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고 시료를 처리하지 않은 군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0233] 구체적으로는 항균활성에 대하여 항균력(살균력)과 살균유지능으로 나누어 확인하였다.

[0235] 항균력(살균력)으로 항균 활성 평가

[0236] 먼저 본 발명의 서열번호 6의 항균 펩타이드 및 DDAC 조합의 항균력(살균력)을 대장균을 가지고 확인하였다.

[0238] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 대조군인 DW군 대비 DDAC 50ppm 처리시 84% 균이 감소하였고, 서열번호 6의 항균 펩타이드 단독을 50ppm 처리시 90%의 균이 감소하였으나, 이들의 조합인 DDAC 50ppm 및 본 발명 서열번호 5의 항균 펩타이드 50ppm 처리시에는 99%의 균이 감소하는 현저한 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0240] 대장균과 유사하게 다른 균에 대해서도 항균력을 가지는지 확인해 보기 위하여 녹농균으로 상기와 같이 동일한 과정으로 확인하였다.

[0242] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 대조군인 DW군 대비 DDAC 50ppm 처리시 75% 균이 감소하였고, 서열번호 5의 항균 펩타이드 단독을 50ppm 처리시 73%의 균이 감소하였으나, 이들의 조합인 DDAC 50ppm 및 본 발명의 항균 펩타이드 50ppm 처리시에는 98%의 균이 감소하는 녹농균에 대해서도 현저히 우수한 항균 효과를 가짐을 확인할

수 있었다.

[0243] 특히, 대장균 대비 녹농균에 대하여 본 발명의 DDAC 및 펩타이드 조합이 보다 더 우수한 항균 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0245] 살균유지능으로 항균활성 평가

[0246] 다음으로 항균력 관련하여, 항균력(살균력)이 어느 정도 지속되는지를 살균 유지능으로도 확인하였다.

[0248] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이, 대장균 처리한 균에서, DDAC 50 ppm 단독 처리시에는 0시간, 6시간, 24시간 켜 각각 확인하였을 때, 85%, 82%, 79%로 감소되고, 항균 펩타이드 단독 처리 시에는 동일한 시간에서 88%, 86%, 86%였으나, DDAC 및 항균 펩타이드 조합 처리시 0시간에서 99 %, 6시간에서 95.8%, 24 시간에서 94% 감소되어 살균력이 매우 우수하게 유지되는 확인하였다.

[0250] 이러한 결과는 녹농균에서도 유사하게 본 발명의 DDAC 및 항균 펩타이드 조합에서 0시간에서 99%, 6시간에서 95%, 24시간에서 98%로 감소되어 이 역시 항균력이 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0252] 실시예 2: 본 발명의 항균 펩타이드 및 미산성차염소산수 조합에서의 항균 활성 평가(비교예)

[0253] 본 발명의 항균 펩타이드에 DDAC가 아닌 다른 항균제로 공지된 미산성차염소산수를 조합하였을 때는 항균력에 있어 시너지 효과가 있는지를 확인해 보았다.

[0254] 구체적인 실험 방법은 상기 실시예 1과 같으며 대장균과 녹농균을 이용하여 확인하였다.

[0256] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이, 대조균인 DW균 대비 미산성차염소산수 100% 처리시 91% 균이 감소하였고, 항균 펩타이드 단독을 50ppm 처리시 89%의 균이 감소하였으나, 이들의 조합인 미산성차염소산수 100% 및 본 발명의 항균 펩타이드 50ppm 처리시에는 64%의 균이 감소하여 오히려 본 발명의 항균 펩타이드에 DDAC가 아닌 미산성차염소산수를 조합시에는 항균력이 오히려 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0258] 이는 녹농균에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었는데, 도 6에서 확인할 수 있듯이, 대조균인 DW균 대비 미산성차염소산수 100% 처리시 84% 균이 감소하였고, 항균 펩타이드 단독을 50ppm 처리시 82%의 균이 감소하였으나, 이들의 조합인 미산성차염소산수 100% 및 본 발명의 항균 펩타이드 50ppm 처리시에는 76%의 균이 감소하여 오히려 본 발명의 항균 펩타이드에 DDAC가 아닌 미산성차염소산수를 조합시에는 항균력이 오히려 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0260] 이러한 결과를 통해 공지된 항균제라 하더라도 본 발명의 항균 펩타이드와 조합하여 모두 항균력에서 우수한 시너지 효과를 가지는 것이 아니며, DDAC를 조합할 때가 매우 우수한 효과를 가지는 것임을 알 수 있다.

[0262] 실시예 2: 본 발명의 항균 펩타이드 및 DDAC 조합에서의 세포독성 평가

[0263] 본 발명의 항균 펩타이드 및 DDAC 조합이 항균용 조성물로서 기능하기 위해서는 미생물의 생존만을 저해하고 세포 독성은 최소화해야 하므로, 인간섬유아세포에 DDAC 단독과 항균 펩타이드 및 DDAC를 처리하여 세포의 생존률을 측정함으로써, 인간섬유아세포에 대한 세포 독성을 함께 평가하였다.

[0265] 인간섬유아세포에 대한 구체적인 세포 독성 평가 방법은 다음과 같다.

[0266] 서열번호 6의 항균펩타이드 및 DDAC 조합에 대한 HDF 세포의 생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다.

HDF 세포를 96-well plate에 2×10^5 cells/ml로 24 시간 배양한 후 농도별 시료를 처리하고 다시 24시간 배양하였다. 배양된 배지를 제거하고 MTT 용액 (0.5 mg/ml in PBS)을 처리하였다. 4시간 후 MTT 용액을 제거하고 DMSO를 각 well에 가하여 30분 동안 37°C에서 formazan을 용해한 뒤, 마이크로 플레이트 리더기 (Molecular Devices Spectra MAX, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 각 농도마다 3개 well의 평균값을 취하여 통계처리 하였으며, 시료 무처리군과 비교하여 상대적인 생존율(%)로 표시하였다.

[0267] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있듯이, DDAC 세포독성농도를 확인하고, DDAC와 항균 펩타이드 50ppm 조합을 동시에 처리했을 때 세포독성을 확인한 결과, DDAC 5ppm에서 81%에서 70%로 독성이 줄어들었고, DDAC 1ppm 과 항균 펩타이드 50 ppm 을 동시에 처리했을 때는 33 %에서 27 %로 독성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0269] 진술한 결과로부터, 본 발명의 항균 펩타이드, 이의 유도체, 또는 이의 단편; 및 DDAC의 조합은 우수한 항균 활성 및 감소된 세포 독성이 있으므로, 항균용 조성물, 소독제 또는 살균제로서 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

[0271] 실시예 3: 본 발명 서열번호 6의 항균 펩타이드의 항바이러스 활성 확인

[0272] 구체적으로 본 발명의 항균 펩타이드의 항바이러스 활성을 확인하였다.

[0274] 그 결과, 도 8에서 확인할 수 있듯이, 서열번호 6의 항균 펩타이드는 HCoV-299E와 IAV-H3N2 및 FCV 바이러스 모두에 대하여 바이러스 역가 계산과 로그 감소값 계산 모두에서 90% 이상으로 바이러스를 감소시켜 항바이러스 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0276] 제품예 1: 소독제 제조

[0277] 상기 실시예 1과 2에서 설명한 본 발명의 항균용 조성물로 하기 표 1과 같이 사물 또는 섬유용 소독제를 제조하였다.

[0278] [표 1]

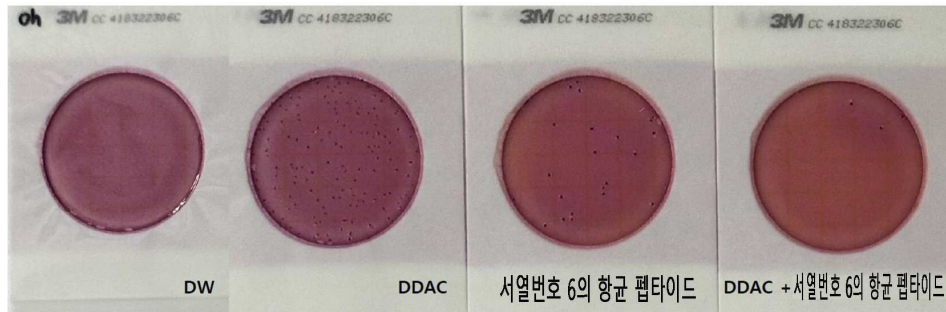
	INGREDIENT NAME	%(w/w)	FUNCTION
사물용	정제수	to 100	용제
	에탄올	적량	용제/살균제
	에톡시다이글라이콜	3	컨디셔닝제
	피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일	1	가용화제
	사이클로텍스트린	1	소취제
	향료	0.5	향료
	피이지-75	1	컨디셔닝제
	시트릭애시드	0.03	pH 조절제
	다이데실다이모늄클로라이드(DDAC)	적량	살균제
	올리고펩타이드-187	적량	살균보조제

[0279]

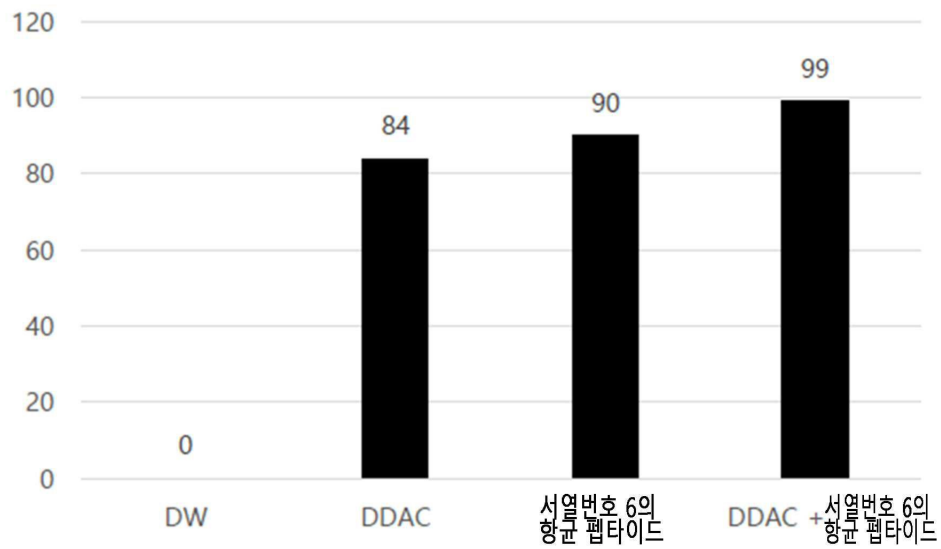
[0281] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

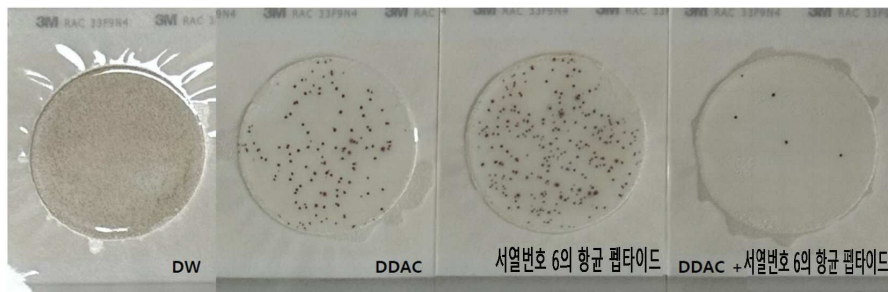
도면1a



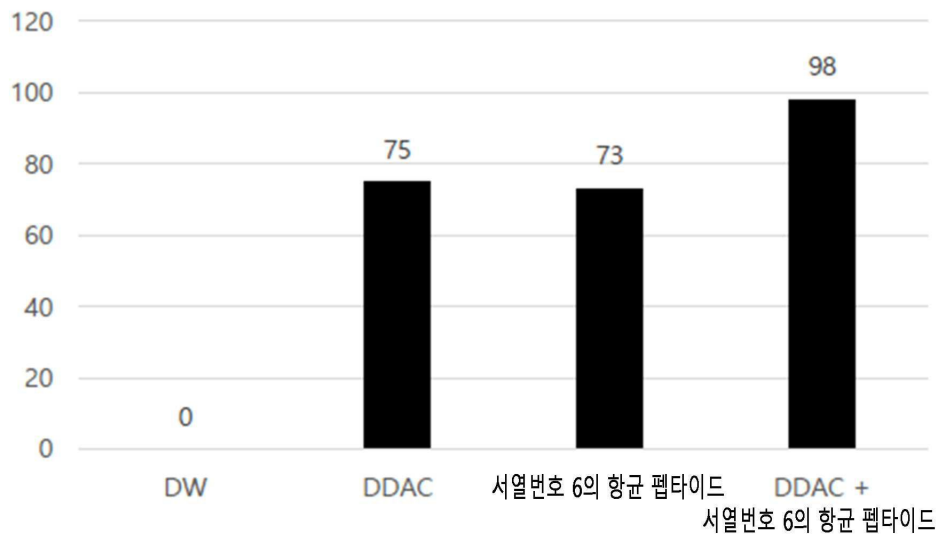
도면1b



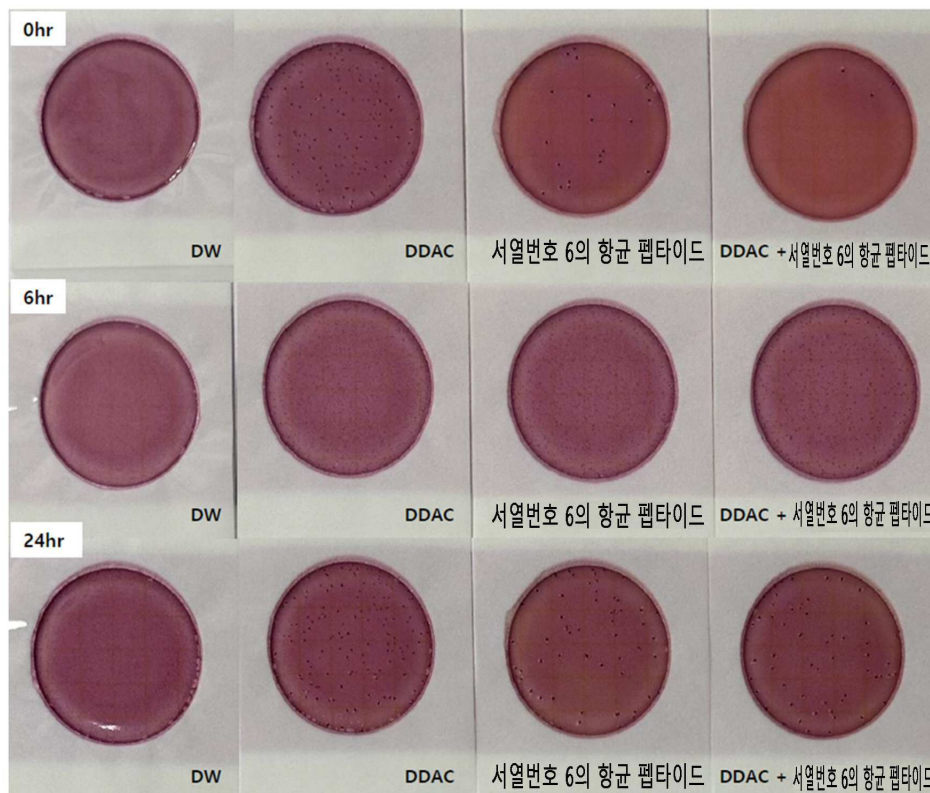
도면2a



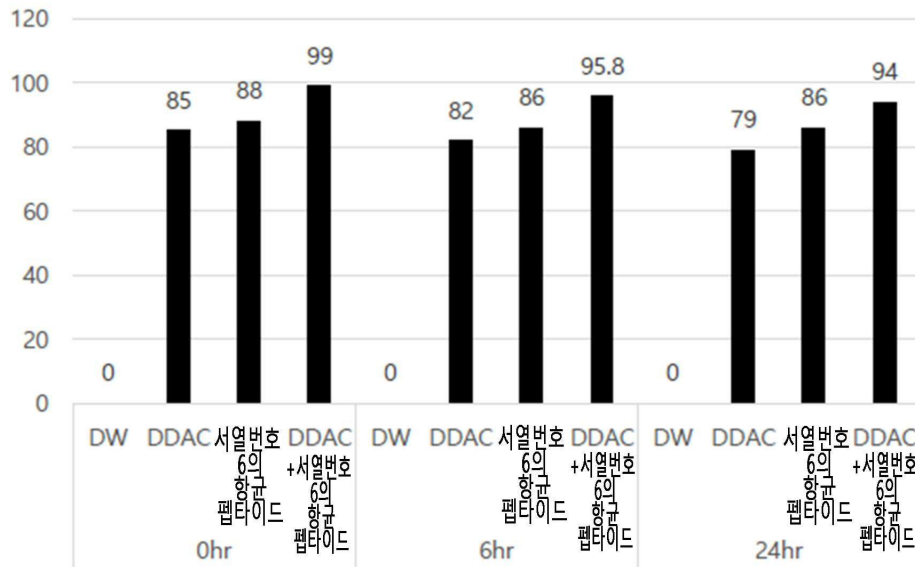
도면2b



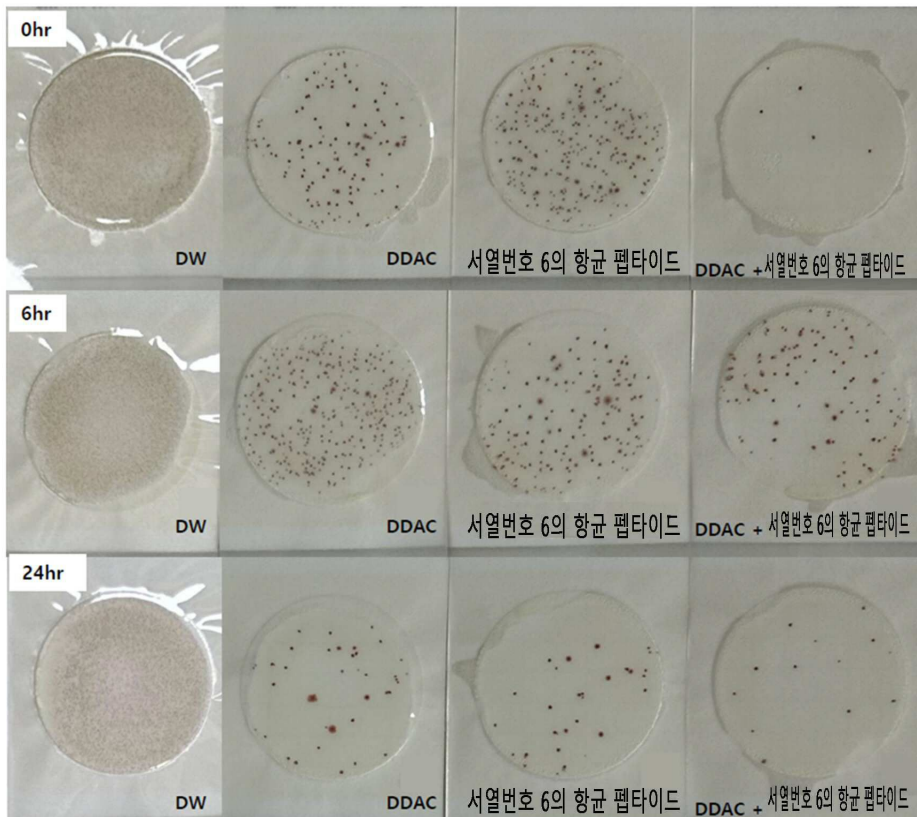
도면3a



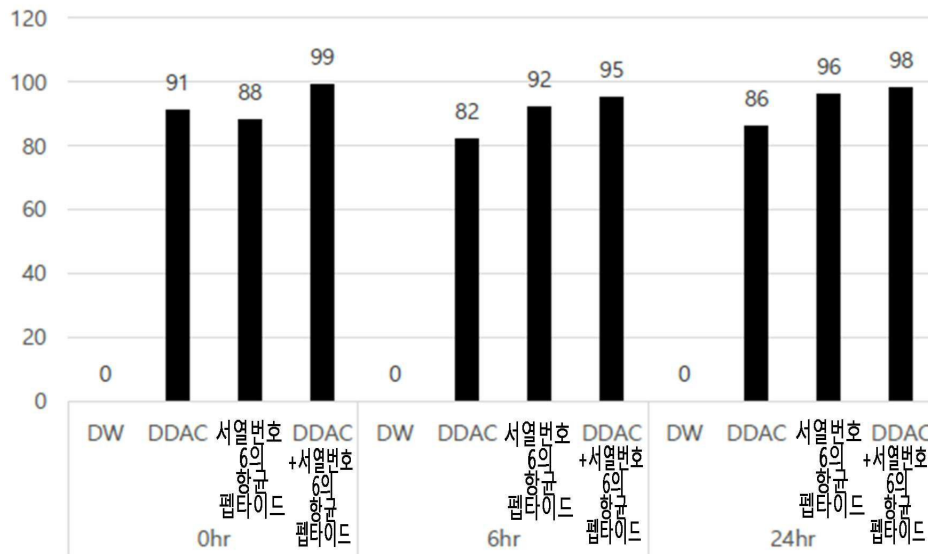
도면3b



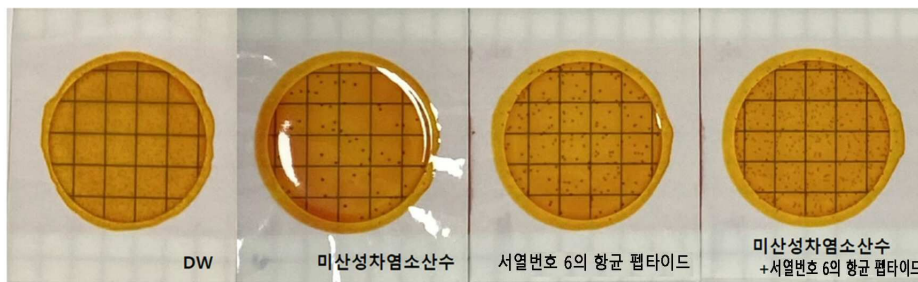
도면4a



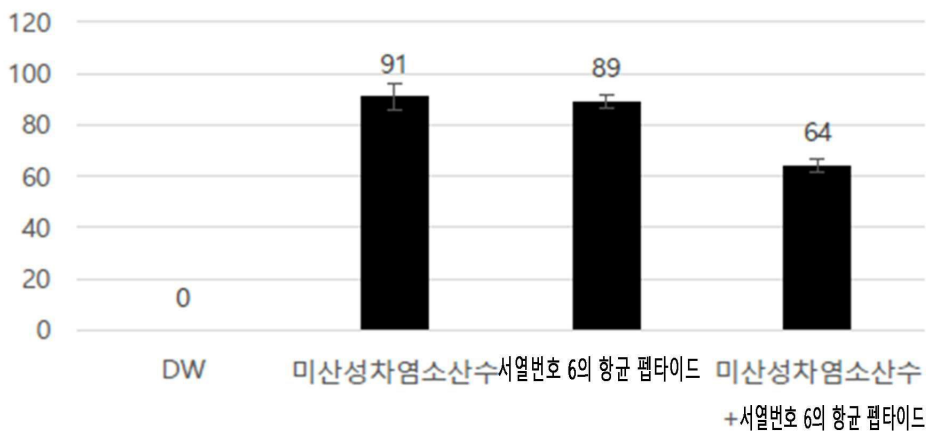
도면4b



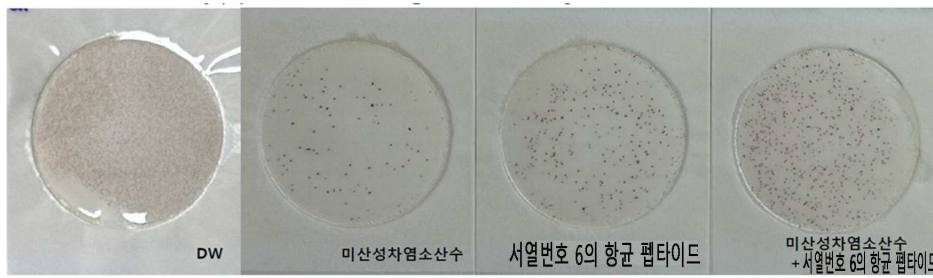
도면5a



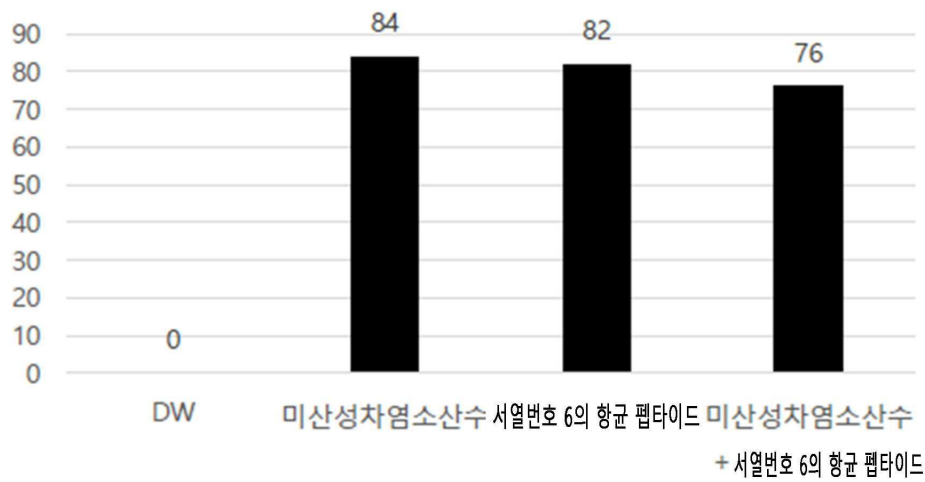
도면5b



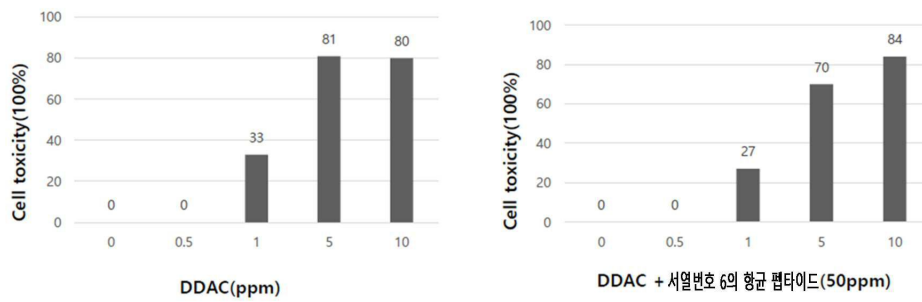
도면6a



도면6b



도면7



도면8a

바이러스역가 계산

바이러스	간접배양	시험 바이러스 농도 (log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	시험항목	시험결과	
				반복 횟수	바이러스역가 (log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)
HCoV-229E	FBS	8.38 ± 0.41	대조군	1회	8.13 ± 0.37
			시험군		6.25 ± 0.50
			대조군	2회	8.25 ± 0.33
			시험군		6.25 ± 0.33
			대조군	3회	8.00 ± 0.38
			시험군		6.38 ± 0.25
IAV-H3N2	FBS	7.13 ± 0.37	대조군	1회	7.00 ± 0.38
			시험군		5.88 ± 0.37
			대조군	2회	6.75 ± 0.33
			시험군		5.83 ± 0.41
			대조군	3회	7.00 ± 0.38
			시험군		6.00 ± 0.38
FCV	FBS	7.88 ± 0.45	대조군	1회	7.50 ± 0.35
			시험군		5.83 ± 0.25
			대조군	2회	7.88 ± 0.37
			시험군		5.88 ± 0.37
			대조군	3회	7.50 ± 0.00
			시험군		5.75 ± 0.33

도면8b

로그 감소값 계산

바이러스	간접배양	시험결과 ¹⁾		
		반복 횟수	로그 감소값	평균 로그 감소값
HCoV-229E	FBS	1회	1.88 ± 0.62	1.83 ± 0.52
		2회	2.00 ± 0.46	
		3회	1.63 ± 0.45	
IAV-H3N2	FBS	1회	1.13 ± 0.53	1.08 ± 0.53
		2회	1.13 ± 0.53	
		3회	1.00 ± 0.53	
FCV	FBS	1회	1.88 ± 0.43	1.88 ± 0.43
		2회	2.00 ± 0.52	
		3회	1.75 ± 0.33	

¹⁾ 결과의 해석

로그 감소값	감소율 (%)
1 이상	90 % 이상
2 이상	99 % 이상
3 이상	99.9 % 이상
4 이상	99.99 % 이상
5 이상	99.999 % 이상

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.