(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월15일
(11) 등록번호 10-1594202
(24) 등록일자 2016년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61L 31/16* (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7008716
(22) 출원일자(국제) 2009년09월23일
심사청구일자 2014년09월11일
(85) 번역문제출일자 2011년04월15일
(65) 공개번호 10-2011-0074868
(43) 공개일자 2011년07월04일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2009/006926
(87) 국제공개번호 WO 2010/035107
국제공개일자 2010년04월01일
(30) 우선권주장
61/136,673 2008년09월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2007089272 A3*
US20060051396 A1
US20060067951 A1
US20080241281 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
텔 하쇼머 메디컬 리서치 인프라스트럭쳐 앤드 서비시스 리미티드.
이스라엘, 52621, 라맛-간, 더 체임 쉐바 메디컬 센터 텔 하쇼머
(72) 발명자
즐로킨, 아미르
이스라엘, 52621 텔 하쇼머, 쉐바 메디컬 센터, 더 테크놀로지 트랜스퍼 컴퍼니 오브 체임, 인프라스트럭쳐 앤드 서비시스 리미티드, 씨/오 텔 하쇼머 메디컬 리서치
케스텐보임, 헨
이스라엘, 52621 텔 하쇼머, 쉐바 메디컬 센터, 더 테크놀로지 트랜스퍼 컴퍼니 오브 체임, 인프라스트럭쳐 앤드 서비시스 리미티드, 씨/오 텔 하쇼머 메디컬 리서치
(74) 대리인
정영수

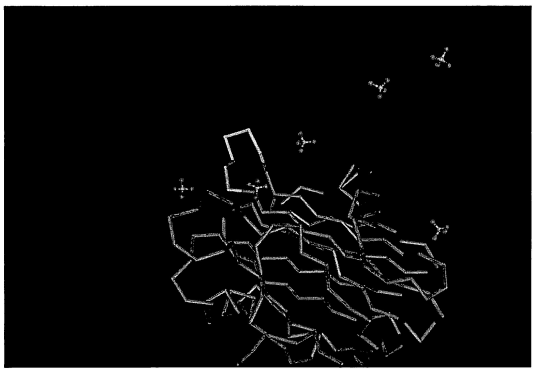
전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **세포 유착 방지를 위한 펩티드와 조성물 및 그것의 사용 방법**

(57) 요 약

예를 들어, 수생 생물 및 이끼와 같은 생물로부터 추출된 YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, FDYNWY, YDWNLY, YDWHLY 및 WDYNLY로 구성되는 군으로부터 선택된 서열 또는 본원에 설명된 어떤 다른 서열을 선택적으로 포함할 수 있는, 분리된 펩티드를 포함하는 조성물, 및 미생물 생물막의 형성 및 세포의 표면 유착을 처리 또는 방지하기 위한 것을 포함하는 그것의 사용 방법.

대 표 도



1GWY 사슬 A, 공극-형성 세포용해소 스티콜리신 Ii의 수용성 상태의 결정 구조

특허청구의 범위

청구항 1

서열 FDYNWY를 포함하는 펩티드로서, 상기 펩티드는 고리형이며, 30개 이하의 아미노산들 길이로 구성되는 펩티드.

청구항 2

필터, 직물, 섬유, 폼, 필름, 콘크리트, 석조물, 유리, 금속, 및 플라스틱으로 구성되는 군으로부터 선택된 표면에 대한 단세포 생물의 유착을 방지하는 방법에 있어서,

상기 방법은 서열 FDYNWY를 포함하는 펩티드를 포함하는 조성물을 단세포 생물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 상기 조성물은 세포독성 또는 세포증식억제 활성은 없으면서 단세포 생물의 표면 유착을 방지하거나 감소시키며, 상기 펩티드는 고리형이며, 30개 이하의 아미노산들 길이로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 2 항에 있어서, 서열 FDYNWY가 서열 MFSVPFDYNWYSNWW의 단백질에 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 2 항에 있어서, 필터는 역삼투 멤브레인인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제 2 항에 있어서, 조성물은 동결건조에 내성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 2 항에 있어서, 조성물은 세포들의 응집을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 2 항에 있어서, 단세포 생물은 생물막에 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 2 항에 있어서, 단세포 생물은 박테리아, 진균, 원생동물 및 고세균으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 진균은 효모를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 2 항에 있어서, 조성물은 스프레이, 젤, 및 도료로 구성되는 군으로부터 선택된 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

필터의 생물막 형성 또는 오염을 방지하거나 감소시키기 위한 수 처리 방법에 있어서,

서열 FDYNWY를 포함하는 분리된 펩티드를 포함하는 조성물로 물을 처리하는 단계를 포함하고, 이 때 상기 조성물은 세포독성 또는 세포증식억제 활성은 없으며, 상기 펩티드는 고리형이며, 30개 이하의 아미노산들 길이로 구성되는 것을 특징으로 하는 수 처리 방법.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

제 39 항에 있어서, 조성물은 동결건조에 내성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 39 항에 있어서, 조성물은 세포들의 응집을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 39 항에 있어서, 처리된 물을 역 삼투 필터에 공급하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제 39 항에 있어서, 생물막이 박테리아, 진균, 원생동물 및 고세균으로 구성되는 군으로부터 선택된 단세포 생물에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 진균은 효모를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

동물의 신체로부터 기원하지 않는 외부 유체에서 생물막 형성을 방지하거나 감소시키는 방법에 있어서,

서열 FDYNWY를 포함하는 분리된 펩티드를 포함하는 조성물로 유체를 처리하는 단계를 포함하고, 이 때 상기 조성물은 세포독성 또는 세포증식억제 활성은 없으며, 상기 펩티드는 고리형이며, 30개 이하의 아미노산들 길이로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

제 58 항에 있어서, 서열 FDYNWY가 서열 MFSVPFDYNWYSNWW의 단백질에 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

제 58 항에 있어서, 조성물은 동결건조에 내성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제 58 항에 있어서, 조성물은 세포들의 응집을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제 58 항에 있어서, 유체를 역 삼투 필터에 공급하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제 58 항에 있어서, 생물막이 박테리아, 진균, 원생동물 및 고세균으로 구성되는 군으로부터 선택된 단세포 생물에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제 75 항에 있어서, 진균은 효모를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련 특허 출원의 참조

[0002] 명세서, 도면, 청구항 및 요약서를 포함한 2008년 9월 24일 제출된 미국 우선권 출원 61/136,673이 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 분리된 천연 펩티드 및 세포 유착 방지를 위한 이들의 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 미생물은 환경 안을 자유롭게 유영하는 개별 세포로서(플랑크톤으로서) 살면서 증식할 수 있거나, 또는 이들은 표면 및 계면과 밀접하게 연합되어 자체 생산된 중합체 바탕질 안에 갇혀 매우 조직화된 다세포 공동체로서 성장할 수도 있다. 후자의 미생물 생활양식을 생물막이라고 한다. 생물막 형성은 적대적 환경에서 미생물의 생존을 허용하고 미생물로 하여금 새로운 장소로 흩어져서 군락을 형성하도록 하는 예전부터 알려진 보호적 성장 방식을 말한다(Hall-Stoodley et al., Nat Rev Microbiol. (2004) 2(2):95-108).

[0006] 생물막의 조성은 복잡하며, 상이한 미생물 종들마다 가변적이고, 심지어 같은 종들 안에서도 환경 조건이 다르면 변할 수 있다. 그렇지만, 생물막 형성은 어떤 환경에서든 미생물의 정상적인 생활양식이며, 모든 세균은 생물막을 만들 수 있다. 선행 연구들은 미생물 생물막 형성이, 표면 부착에서 시작하여 이주 및 분할로 이어져 미생물 군락을 형성하고 마침내 바탕질 중합체의 발현을 수반하는 성숙화에 이르는, 단백질 프로파일에 차이가 있는 다수의 발생 단계를 통해 진행된다는 것을 밝혔다(Sauer et al., J Bacteriol. (2002) 184(4):1140-54). 각 생물막 단계에서 박테리아들은 표현형을 나타내며, 플랑크톤 방식으로 성장하는 동일한 그룹의 박테리아들과는 현저히 상이한 특성들을 보유한다(Sauer et al., J Bacteriol. (2004) 186(21):7312-26).

[0007] 생물막은 인체 전신 감염(예를 들어, 원내 감염)의 주요 원인이다. 체내에서 생물막은 조직(예를 들어, 내이, 치아, 잇몸, 폐, 심장 판막 및 비뇨생식관)과 결합될 수 있다. 추정하기로는 인체 세균 감염의 65%가 사실상 생물막이다. 더구나, 생물막 형성 후, 미생물은 때로는 매우 심하게 자신의 속성을 변화시키려는 경향을 나타내므로, 정상적으로는 현탁된 배양물에서는 해당 생물을 죽이는 항생제의 용량이 동일한 미생물에 대해서 해당 유기물이 부착된 상태이거나, 생물막 형태로 뭉쳐 있을 때는 완전히 비효과적이 된다(미국특허 제7,189,351호).

[0008] 체내에 도입되는 제품들(예를 들어, 콘택트렌즈, 중심 정맥 카테테르, 기계적 심장 판막 및 심박동기)이나 체내로의 경로를 제공하는 제품들과 관련하여 주된 우려들 중 하나는 미생물 감염과 늘 일어나는 생물막 형성이다. 이런 감염들은 항생제로 치료하기가 어렵기 때문에 주로 장치의 제거가 필요하게 되고, 이것은 환자에게 외상을 일으키며 의료 비용을 증가시킨다. 따라서, 이러한 의료 장치에 대해서, 의료 장치 및 디바이스를 항균으로 만들기 위한 수단 및 방법들이 오랫동안 추구되어 왔다.

[0009] PCT 출원 No. WO 06/006172는 생물막의 형성을 억제하거나 기존 생물막을 분해하기 위한 방향족 화합물과 같은 항-아밀로이드제의 사용을 개시한다. 이 출원은 알쯔하이머에서 아밀로이드 원섬유 형성을 방지하는 화합물이 생물막의 원섬유 형성에 대해서도 작용할 수 있으며, 결론적으로 방향족 팔을 갖는 아미노산이 생물막에 대해 효과적임을 개시한다. 그러나, 이 분석은 전장 서열에만 제한되었다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은, 광범위한 미생물에 대해서, 초기 단계에서 생물막 형성을 방해하는 광범위한 천연 인자들을 제공한다. 이들 천연 인자들로부터, 잘 보존된 서열을 가진 펩티드가 분리되었고, 이들은 그것의 합성 입체형태에서 미생물 유착의 방지에 있어 높은 활성을 나타냈다. 보존된 서열은 말미잘, 몇몇 어류(*Danio rerio*-제브라피쉬

포함) 및 이끼인 *Physcomitrella patens subsp. Patens*의 여러 공지된 종들을 포함하는 몇몇 바다 생물에서 발견된다.

[0011] 상기 언급된 모든 인자들은 박테리아 기질 유착 및 그로부터 유래된 생물막 형성 방지에 관해서만 활성을 나타낸다. 집약적 미생물의 "번식 능력"에 의한 신속한 자연적 선택을 위한 강한 선택 압력을 제공하는, 항생제 펩티드와 이차 대사산물에 의해 드러난 흔히 관찰되는 치명적 살균 활성은 전혀 없다. 다른 한편, 박테리아 군락 형성의 광범한 억제는 박테리아 생존의 기본적 메커니즘을 길항한다. 따라서, 이러한 메커니즘의 적응적 변화 가능성이 그것의 지속력으로 인해 낮아진다.

[0012] Sher 등(Toxicon 45:865-879, 2005)은 생물정보학 접근법을 이용하여, 알로모날 시스템(allomonal system)의 성분일 수 있는 히드라에 의해 발현된 잠정적 생물학적 활성 단백질 및 폴리펩티드를 확인했다. 히드라는 액티노포린 과에 속하는 유자포동물 포스포리파제 A2 독소와 세포용해소의 오르토로그를 발현하고, 엘라피드-유사 포스포리파제, 시스테인-부화 분비 단백질(CRISP), 프로키네티신-유사 폴리펩티드, 및 독성 데옥시리보뉴클레아제와 유사한 단백질들을 발현한다고 알려져 있다.

[0013] 지금까지는 천연 공급원으로부터 분리된 펩티드들에서 세포독성 활성을 초래하는 특정 서열들이 확인되지 않았다.

[0014] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 설명된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 재료들도 본 발명의 실시나 검사에 사용될 수 있으며, 적합한 방법 및 재료들은 아래 설명된다. 상충되는 경우에는 정의를 포함하는 본 특허 명세서가 우선될 것이다. 또한, 재료, 방법 및 예들은 단지 예시일 뿐이며, 제한으로 여겨지지는 않는다.

[0015] 본원에 사용된 용어 "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)" 또는 이들의 문법적 변형들은 서술된 특징들, 정수들, 단계들 또는 성분들을 특정하는 것으로서 이해되어야 하지만, 하나 이상의 추가의 특징들, 정수들, 단계들, 구성요소들 또는 이들의 그룹들의 추가를 배제하는 것은 아니다. 이 용어는 용어 "로 구성되는" 및 "로 필수적으로 구성되는"을 포함한다.

[0016] 문구 "로 필수적으로 구성되는" 또는 그것의 문법적 변형은 본원에서 사용되었을 때 서술된 특징들, 정수들, 단계들 또는 구성요소들을 특정하는 것으로서 이해되어야 하며, 하나 이상의 추가의 특징들, 정수들, 단계들, 구성요소들 또는 이들의 그룹들의 추가를 배제하는 것은 아니지만, 다만 추가의 특징들, 정수들, 단계들, 구성요소들 또는 이들의 그룹들은 청구된 조성물, 장치 또는 방법의 기본적 속성과 신규 속성을 실질적으로 변경시키지 않아야 한다. 용어 "방법"은 주어진 임무를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 과정들을 말하며, 제한은 아니지만, 화학, 생물학 및 생물물리학 분야의 전문가들에게 공지된 방식, 수단, 기술 및 과정들, 또는 공지된 방식, 수단, 기술 및 과정들로부터 쉽게 개발되는 방식, 수단, 기술 및 과정들을 포함한다.

[0017] 본원에 사용된 용어 "약"은 ±10%를 말한다.

[0018] 본 발명의 다른 특징들과 이점들이 이후의 상세한 설명과 청구항으로부터 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 본 발명은 도면을 참조하여 단지 예시의 방식으로만 본원에 설명된다. 이제 도면을 구체적으로 상세히 참조하여, 나타낸 구체적인 내용들은 예시를 위해서 그리고 단지 본 발명의 바람직한 구체예들의 예시적 논의를 위한 것이고, 가장 유용하다고 생각되는 것을 제공하기 위해 그리고 본 발명의 원리와 개념적 양태들의 쉬운 이해를 위해 제시된다는 것이 강조된다. 이와 관련하여, 본 발명의 기본적 이해에 필요한 것보다 더 상세한 본 발명의 구조적 상세사항을 나타내려고 시도하지는 않으며, 도면과 함께 제시된 설명은 본 발명의 몇 가지 형태들의 실제로 어떻게 구현될 수 있는지를 당업자에게 분명히 알려준다.

도 1은 황색으로 표시된 활성 영역인 공극-형성 세포용해소 스티콜리신 Ii의 수용성 상태의 1GWY 사슬 A의 결정 구조를 나타낸다.

도 2는 황색으로 표시된 활성 영역인 공극-형성 세포용해소 스티콜리신 Ii의 수용성 상태의 1GWY 사슬 B의 결정 구조를 나타낸다.

도 3은 황색으로 표시된 활성 영역인 진핵 공극-형성 세포용해소 에퀴나톡신 Ii의 IKD6 사슬 A의 구조를 나타낸다.

도 4는 황색으로 표시된 활성 영역인 에퀴나톡신 돌연변이체의 3-차원 구성물을 나타낸다.

도 5는 24시간에 걸친 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853의 성장에 대한 상이한 농도의 합성 단백질들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다; 살균 효과나 정균 효과 없음.

도 6은 24시간에 걸친 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 이한 생물막 형성에 대한 상이한 농도의 합성 단백질들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 7은 24시간에 걸친 *Acinetobacter Baumannii*의 임상 분리주의 성장에 대한 상이한 농도의 합성 단백질들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다; 살균 효과나 정균 효과 없음.

도 8은 24시간에 걸친 *Acinetobacter Baumannii*의 임상 분리주에 의한 생물막 형성에 대한 상이한 농도의 합성 단백질들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 9는 양성 대조군으로서 PBS를 사용한, *Acinetobacter baumannii*에 의한 생물막 형성에 대한 *Actinia equina* 로부터의 선택된 촉수 분획들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 10은 다양한 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 의한 생물막 형성에 대한 13번 분획의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 11은 50㎍/ml 단백질 농도에서 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 *Anemonia*, *Aiptasia* 및 *Physcomitrella*(이끼)로부터의 조 추출물들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 12는 *Physcomitrella patens*의 이끼로부터의 5가지 합성 펩티드와 조 물질들의 효과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 13은 Sephadex G-10 칼럼에서 *Aiptasia pulchella*의 조 추출물의 분리에 의해 얻어진 분획들을 나타낸다.

도 14는 도 13의 고분자량 분획의 재 크로마토그래피에 의해 얻어진 피크들을 나타낸다.

도 15는 도 14의 저분자량 분획의 c-18 칼럼을 사용한 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 얻어진 분획들을 나타낸다.

도 16a-b는 본 발명의 원리에 따른 펩티드의 유화제 팔을 가진 고리형 리드의 일반적인 구조를 나타낸다.

도 17은 유화성 팔을 가진 고리형 펩티드 리드의 개발을 나타내는 순서도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 박테리아 기질 유착 및 그로부터 유래된 생물막 형성 방지에 관하여 하나 이상의 효과를 가진 분리된 펩티드를 포함하는 조성물, 및 또한 선택적으로 세포-세포 유착 방지에 관한 것이다. 다른 효과들도 또한 선택적으로, 추가적으로 또는 대안적으로 제공될 수 있다. 비제한적 예로서, 펩티드는 선택적으로 그리고 바람직하게, 수생 생물 및 이끼와 같은 유기물로부터 추출된 YDYNWY, YDYNLY, YDYSFY, FDYNFY, FDYNLY, FDYNWY, YDWNLY, YDWHLY 및 WDYNLY로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하며, 이들을 사용하는 방법이 제공된다. 그 외 다른 서열들도 아래 설명된다.

[0021] 의약 분야에서 주된 우려 중 하나는 미생물 생물막 형성이다. 인체에서 생물막은 전신 감염(예를 들어, 원내 감염)의 원인이며, 체내에 제품(예를 들어, 콘택트 렌즈, 중심 정맥 카테테르, 기계적 심장 판막 및 심박동기)을 도입할 때의 주된 우려이다.

[0022] 생물막은 또한 식품, 제약, 도료, 물, 선박 및 가공 산업을 포함하는 많은 산업 분야에서 문제가 되고 있으며, 광범한 악영향들 중에서도 특히 산업 시스템의 부식 가속, 오일 부패 및 생물오염을 일으킨다. 예를 들어, 생물오염은 냉각 또는 탈염 설비, 관개시설 및 파워 스테이션의 냉각 타워, 급수 파이프 및 필터, 및 폐수 및 탈염 시스템에서 사용되는 것들과 같은 멤브레인을 포함하는 바다 또는 민물 환경 안의 어떤 표면에 유기물이 유착됨으로써 야기될 수 있다. 또한, 생물오염은 양식장의 양식 시스템에서도 일어난다.

[0023] 또한, 세계적으로 상업용 선박 선단들은 매년 대략 3억 톤의 연료를 소비한다. 오염방지 기준이 없다면 이러한 연료 소비는 40%까지 증가할 것이며, 이것은 매년 1억2천만 톤의 연료가 가외로 사용되는 것이 해당한다. 이것의 경제 비용은 2000년에 약 75억 달러라고 추산되었고, 더욱 최근에는 300억으로 추산된다.

[0024] 생물막 안에서 성장중인 세균들은 고도로 조직화되어 고온 및 항균제(예를 들어, 항생제)와 같은 적대적인 환경

도 견딜 수 있기 때문에 생물막은 제거하는 것이 매우 어렵다.

[0025] 연체 수생 무척추동물, 어류 및 이끼를 포함하는 바다 식물 및 민물 식물 및 생물은 광범위한 종들의 미생물 유기물에 둘러싸여 있다. 이러한 식물 및 생물은 특이적 면역을 결여하고 있으므로, 이들은 자신의 체표면 위에 미생물이 군락을 형성하는 것을 방지할 수 있는 몇몇 인자들을 생산한다.

[0026] 가장 "민감한" 생물은 말미잘, 산호, 해파리, 히드로충, 메두사, 및 부채산호를 포함하는 자포동물문에 속하는 무척추동물들이다. 비늘이나 껍질 같은 물리적 보호수단이 없는 이러한 연체 생물들은 그들을 둘러싼 미생물 환경으로부터 자신을 보호하기 위해서 단백질 및 이차 대사산물을 사용한다.

[0027] 바다 생물들(예를 들어, 해면)이 항균 및 항진균 활성을 나타내는 이차 대사산물을 생산한다는 것은 이미 보고되었다(Amade et al., 상동). 또한, 말미잘(예를 들어, *Actinia equina*)은 독성 공극-형성 펩티드(즉, 에퀴나톡신)을 생산하다고 밝혀졌는데, 이것은 다른 작은 항균 펩티드들과 유사하게 진핵세포를 용해하여 죽인다(Anderluh et al, 상동).

[0028] 다양한 단백질들의 전장 서열이 이들의 세포용해 기능과 관련된다고 본 분야에 알려져 있지만, 세포용해 효과를 초래하는 특정 펩티드는 아직 확인되지 않았다.

[0029] 본 발명자들은 액체 크로마토그래피 분리를 사용하여 말미잘로부터 얻어진 몇 개의 활성 분획들이 비생물적 표면에 대한 미생물의 유착을 높은 수준으로 방지한다는 것을 밝힌다. 말미잘에는 46개 과가 있으며, 이들은 전 세계 수원에서 발견될 수 있다. 대부분의 말미잘은 고착성으로서, 특수한 발을 사용하여 부드러운 기질에 자신을 고정하거나, 바위나 산호에 부착시킨다. *Actinia equine*, *Aiptasia* 및 *Anemonia*의 상이한 속에 속하는 몇몇 종의 말미잘에서 유착 방지 활성이 증명되었다. 말미잘 세포독소의 N-말단 영역이 세포독성 효과에 관련되는 것으로 나타났다(참고자료: Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): 진핵 공극-형성 독소인 에퀴나톡신에 의한 공극 형성은 유연한 N-말단 영역과 안정한 배타 샌드위치가 필요하다, J Biol Chem, 279(45):46509-46517). 세포독성에는 관련되지 않는 말미잘 세포독소의 C-말단 영역과 일부 유사한 단백질도 또한 본 발명자들에 의해 어류에서 확인되었다. 이 단백질은 미지의 기능을 가진 잘 보존된 영역을 가지며, 이것을 Trp-부화 도메인이라고 하는데, 지질 멤브레인과 단백질의 결합에 중요할 수 있다. 본 발명자들은 또한 이끼인 *Physcomitrella patens*에서도 이 영역을 발견했다.

[0030] 따라서, 본 발명자들은 이 영역이 생물막 형성 방지에는 매우 효과적이지만 세포독성 활성은 없는 펩티드를 제공한다는 가설을 세웠다. 본 발명자들은 매우 효과적인 생물막 방지 특성을 갖는 YDYNWY, YDYNLY, YDYSFY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY 및 YDWHLY로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 천연 펩티드를 분리하여 특성화했다.

[0031] 어떤 구체예들에 따라서, 상기 펩티드는 10개에서 약 30개 이하, 약 40개 이하, 약 50개 이하의 아미노산을 포함하는 서열의 일부를 포함한다.

[0032] 어떤 구체예들에 따라서, 상기 펩티드는 LFSVPYDYNWYSNWW, FSVPYDYNLYSNWW, MFSVPFDYNFYSNWW, MFSVPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYTNWW, MWSVPFDYNLYSNWW, MFSVPWDYNLYKNWF, MFSVPFDYNLYKNWL, MFSVPFFDYNWYSNWW, LFSVPFDYNLYSNWW, LFSVPYDYNWYSNWW, MASIPYDWNLYQSWA, MASIPYDWNLYSAWA, 및 MASIPYDWHLYNAWA로 구성되는 군으로부터 선택된다. 이후 본원과 실시예 부문에 나타낸 대로, 본 발명자들은 탠덤 질량 분광기(MS/MS) 분석을 이용하여 *Aiptesia pulchella* 말미잘로부터 추출된 활성 분획을 확인했다.

[0033] 본 발명자들은 ClustaLW 프로그램을 사용하여, 몇 가지 말미잘 세포독소 단백질의 생물학적으로 의미 있는 20개의 다수 서열 정렬을 확인하고, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에서 사용하기 위한 말미잘 세포독소 보편적 프라이머를 확인했다. 각각 서열 Eqt-F: GTR TCG ACA ACG AGT CRG G 및 Eqt-R252: TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG의 2개의 상이한 말미잘, 즉 *Aiptesia* 및 *Anemonia viridansm*로부터 얻은 세포독소 단백질의 250bp 영역을 증폭시켰다. 이들 영역의 펩티드로의 번역과 Genebank와의 BlastX 비교는 이들 영역이 말미잘 세포독소의 보존된 도메인의 일부라는 것을 나타냈다. 하기 실시예 부문에 더 상세히 논의되고, 도 5 내지 8에 나타낸 대로, 본 발명자들은 말미잘과 이끼로부터 얻은 여러 합성 펩티드들의 활성을 비교했고, 이들 펩티드들이 생물막의 형성은 방지했지만(도 6 및 8 내지 12), 박테리아를 죽이거나 성장을 억제하지는 않았다는 것을 알아냈다(도 5 및 7).

[0034] 이 유착 방지 효과는 몇 가지 박테리아 종들에서 증명되었으며(도 10), 따라서 본 발명자들은 이 활성 물질들이

종 특이적인 것은 아니며, 광범한 미생물 종들에 대해 활성이라는 결론을 내렸다.

[0035] 보존된 펩티드 영역은, 예를 들어 다음의 천연 단백질들에서 확인되었다:

[0036] LFSVPYDYNWYSNWW EqT-IV

[0037] FSVPYDYNLYSNWW 액티노포린 Or-A

[0038] MFSVPFDYNFYSNWW *Heteractis magnifica*의 HMg III

[0039] MFSVPFDYNLYSNWW Avt-I RTX-A

[0040] MFSVPFDYNLYTNWW Pstx20

[0041] MWSVPFDYNLYSNWW *Physcomitrella patens*

[0042] MFSVPWDYNLYKNWF *Danio rerio*

[0043] MFSVPFDYNLYKNWL *Tetraodon nigroviridis*

[0044] 선택적으로 그리고 바람직하게, 본 발명의 펩티드는 서열 CMFSVPFDYNWYSNWWC을 포함한다. 선택적으로 그리고 바람직하게, 본 발명의 펩티드는 약 100개 내지 약 300개 아미노산을 갖는 단백질에 포함된다.

[0045] 단일 가설에 제한되는 것은 아니지만, 2개의 말미잘 세포독소(에퀴나톡신 및 스티콜리신)의 3-차원 구조에 기초하여, 도 1-4에 나타낸 대로, 활성 영역은 바깥쪽을 향하고 있다.

[0046] 도 1 및 2는 세포용해소 스티콜리신 Ii의 1GWY 사슬 A 및 B의 결정 구조를 각각 나타낸다. 도 3은 진행 공극-형성 세포용해소 에퀴나톡신 Ii의 1KD6 사슬 A의 구조를 나타낸다.

[0047] 도 4는 위치 8, 18 및 69(1TZQ 사슬 A)에 도입된 3개의 시스테인을 가진 에퀴나톡신 돌연변이체의 3-차원 구성물을 나타낸다. 이 돌연변이체는 용혈 활성이 아닌 것이 이미 알려져 있다(Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): 진핵 공극-형성 독소인 에퀴나톡신에 의한 공극 형성은 유연한 N-말단 영역과 안정한 베타 샌드위치가 필요하다, J Biol Chem. 279(45):46509-46517). 이 단백질은 따라서 그것의 세포독성은 상실했지만, 박테리아 유착에 대해서는 여전히 활성이었다.

[0048] 본 발명의 원리 및 작동은 도면 및 첨부된 설명을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

[0049] 본 발명의 적어도 한 구체예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명이 그것의 적용에 있어서 이후 설명에 제시되거나 실시예에 의해 예시된 상세사항들에 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 본 발명은 다른 구체예들도 있을 수 있고, 다른 방식으로도 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에서 사용된 문구와 용어는 설명을 위한 것이며, 제한으로 여겨지지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0050] 본 발명의 한 양태에 따라서, YDYNWY, YDYNLY, YDYSFY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY 및 YDWHLY로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 분리된 천연 펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0051] 본 발명의 추가 양태에 따라서, 표면에 대한 단세포 생물의 유착을 방지하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 세포를 YDYNWY, YDYNLY, YDYSFY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY 및 YDWHLY로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 분리된 천연 펩티드를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 이로써 표면에 대한 세포의 유착이 방지된다.

[0052] 본 발명의 어떤 구체예에 따라서, 바람직하게, 상기 펩티드들 중 적어도 하나를 포함하고, 표면에 대한 세포 유착에 대항하는데 효과적인 도메인이 제공된다. 더 바람직하게는, 도메인은 단백질의 일부로서 포함된다. 선택적으로 그리고 가장 바람직하게는, 도메인은, 예를 들어 생물막의 형성 및/또는 처리를 위한 유착 방지 거동은 나타내지만, 세포독성 거동은 나타내지 않는다.

[0053] 예시적인 도메인들의 비제한적 선택이 아래 표에 제공된다.

표 1

[0054]

도메인 서열	종들
LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
FSVPYDYNLYSNWW	액티노포린 Or-A

MFSVPFDYNFYSNWW	*Heteractis magnifica*의 HMg III
MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
MWSVPFOYNLYSNWW	*Physcomitrella patens*
MFSVPWDYNLYKNWF	*Danio rerio*
MFSVPFDYNLYKNWL	*Tetraodon nigroviridis*

[0055] 다음 서열과 관련된 추가의 예시적인 서열들이 본원에 설명된다:

[0056] MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPH
GKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQRMYE
ELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA

[0057] 이 서열의 Genbank 수탁 식별번호는 >gi|48428895|sp|P61914.1|ACTP2_ACTEQ 에퀴나톡신-2 전구물질(에퀴나톡신 II)(EqT II)(EqTII) *Actinia equine*이고, 길이는 214 aa이다. 이 서열은 또 선택적으로 본 발명에 따른 예시적인 서열이다. 이 서열의 위치 38-213은 주석이 달린 도메인 pfam06369, *Anemone_cytotox*, 말미잘 세포독성 단백질에 적중된다. 따라서, 상기 서열의 이 부분 역시 선택적으로 본 발명의 예시적인 서열이다.

[0058] 어떤 구체예에서, 본 발명은 또한 상기 서열에 대한 어떤 관련 서열을 포함한다. 이러한 관련 서열은 선택적으로, 제한은 아니지만, BLASTP를 포함하는 어떤 타입의 서열 비교 소프트웨어를 실행시켜 발견할 수 있다. 아래에 선택된 분류군들과 이들의 EqtII(상기 서열)와의 정렬로부터 얻어진 대표적인 것들이 제공된다:

[0059] 1. 말미잘

[0060] 1a. *Stichodactyla helianthus*

[0061] >gi|2815496|sp|P07845.2|ACTP2_STOHE 스티콜리신-2 (스티콜리신 II)(StnII) (세포용해소 St II)(세포용해소 III)(세포독소)

[0062] ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVILPEFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAFAYYMSSGNTLGVMF
SVPFDYNWYSNWWDVKIYSGKRRADQGMYEDLYYGNPY

[0063] RGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR

[0064] 정렬:

[0065] >sp|P07845.2|ACTP2_STOHE 스티콜리신-2 (스티콜리신 II)(StnII) (세포용해소 St II)(세포용해소 III)(세포독소)

[0066] 길이 = 175

[0067] 점수 = 253 비트(646), 예상 = 8e-66, 방법: 조성-기반 통계

[0068] 동일성 = 118/176(67%), 양성 = 144/176(81%), 갭 = 1/176(0%)

```
Query  38   DVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLP  97
            +AG +I GASL+F +L  VLE LG V RKIAVG+DNESG TWTALN YFRSGT+D++LP
Sbjct  1    ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVILP  60

Query  98   HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIY  157
              VP+ KALLY+G+KD GPVATGAV   AY MS GNTL V+FSVP+DYNWYSNWW+V+IY
Sbjct  61   EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAFAYYMSSGNTLGVMFSVPFDYNWYSNWWDVKIY  120

Query  158  KGKRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK  213
             GKRRADQ MYE+LYY  +P+RGDNGWH +NLGYGL+ +G M S+G A ++I +S+
Sbjct  121  SGKRRADQGMYEDLYYG-NPYRGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR  175
```

[0069]

[0070] 2. 경골 어류

[0071] 2a. *Danio rerio*

[0072] >gi|125821212|ref|XP_001342650.1| 예상: 가설상의 단백질[Danio rerio]

[0073] MTESAEAVAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAHATGSVGVLTYDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWDYN
LYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKEMYYQKNQHGFVREEANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWDKLLSPMAQMDC

[0074] 정렬:

[0075] >ref|XP_001342650.1| UniGene infoGene info 예상: 가설상의 단백질[Danio rerio]

[0076] 길이 = 184

[0077] GENE ID: 100002992 apnl | 액티노포린-유사 단백질[Danio rerio]

[0078] 점수 = 199 비트(505), 예상 = 1e-49, 방법: 조성-기반 통계

[0079] 동일성 = 49/167(29%), 양성 = 73/167(43%), 갭 = 12/167(7%)

```
Query  58   LEALGNVKRKIAVGVDNESG-KTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP  116
            + A  + +R   V + N +    +     Y  +G +       V   K  +    K
Sbjct  8    VAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAH  67

Query  117  VATGAVGVLAYLMSD------GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQRMYEE  170
             ATG+VGVL Y + +        TLA++FSVP+DYN Y NW+ V IY   +  DQ +Y+E
Sbjct  68   -ATGSVGVLTYDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWDYNLYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKE  126

Query  171  LYYNLSPF----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK  213
            +YY  +         NG      G  L  R  M   G AI+++ V
Sbjct  127  MYYQKNQHGFVREEANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWD  173
```

[0080]

[0081] 2b. *Tetraodon nigroviridis*

[0082] >gi|47218822|emb|CAG02807.1| 무명 단백질 산물[Tetraodon nigroviridis]

[0083] MESAEAVAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSGIPTGSVGVLTYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSF
YNNWFAVGIYETGTKCNEGLYKQMYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDAFFPFSE

[0084] 정렬:

[0085] >emb|CAG02807.1| 무명 단백질 산물[Tetraodon nigroviridis]

[0086] 길이 = 181

[0087] 점수 = 192 비트(489), 예상 = 1e-47, 방법: 조성-기반 통계

[0088] 동일성 = 46/170(27%), 양성 = 76/170(44%), 갭 = 14/170(8%)

```
Query  58   LEALGNVKRKIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP  116
            + A  +  R + + + N +          Y  SG +       V      +    K  G
Sbjct  7    VAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSG-  65

Query  117  VATGAVGVLAYLMSD------GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQRMYEE  170
            + TG+VGVL Y + +        TLA++FSVPYDY++Y+NW+ V IY+    + ++Y++
Sbjct  66   IPTGSVGVLTYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWFAVGIYETGTKCNEGLYKQ  125

Query  171  LYYNLSPF------RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA  214
            +Y               NG     +G  L  R  MN  G AI+++ V  A
Sbjct  126  MYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDA  175
```

[0089]

[0090] 3. 이끼류

[0091] 3a. *Physcomitrella patens*

[0092] >gi|168060237|ref|XP_001782104.1| 예상 단백질[Physcomitrella patens subsp. patens]

[0093] MVVHLIAMGLRYSETIMKTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLENLGVYFNSGSSDRSIAYKINAQEALLFSARKSDHTARG
TVGTFSYYIQDEDKTVHVMWSVPFDYNLYSNWWNIAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPDQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVELKKA

[0094] >ref|XP_001782104.1| Gene info 예상 단백질[Physcomitrella patens subsp. patens] gb|EDQ53098.1| Gene

info 예상 단백질[Physcomitrella patens subsp. patens]

[0095] 길이 = 199

[0096] GENE ID: 5945292 PHYPADRAFT_61094 | 가설상의 단백질[Physcomitrella patens subsp. patens]

[0097] 점수 = 230 비트(586), 예상 = 7e-59, 방법: 조성-기반 통계

[0098] 동일성 = 63/183(34%), 양성 = 101/183(55%), 갭 = 4/183(2%)

```
Query  35   RSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDI  94
            ++A +A A+I  A LS   L+ ++E +  V RKIA+G  N +  T   L  YF SG+SD
Sbjct  18   KTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLENLGVYFNSGSSDR  77

Query  95   VLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSD-GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWN  153
             + +K+   +ALL++ +K     A G VG  +Y + D   T+ V++SVP+DYN YSNWWN
Sbjct  78   SIAYKINAQEALLFSARKSDH-TARGTVGTFSYYIQDEDKTVHVMWSVPFDYNLYSNWWN  136

Query  154  VRIYKGKRRADQRMYEELYYNL--SPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHV  211
            + +  G++  D  +++ LY      P+      +  N   G    G M ++G A +E+ +
Sbjct  137  IAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPDQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVEL  196

Query  212  SKA  214
              KA
Sbjct  197  KKA  199
```

[0099]

[0100] 4. 조류

[0101] 4a. *Gallus gallus*

[0102] >gi|118129726|ref|XP_001231839.1| 예상: 가설상의 단백질 동형 1[Gallus gallus]

[0103] MPPKEKKENDKPCNDNCQPKPQGKGVESLMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLPFEIGPDSKGICIFAKTPYSLRGSVGTVVCKADT
FFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIFTEPNHLGNLGDVFSKMMKSKPYCGSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVEDMDPPPYSKGM

[0104] >ref|XP_001231839.1| UniGene infoGene info 예상: 가설상의 단백질 동형 1[Gallus gallus]

[0105] 길이 = 204

[0106] GENE ID: 769729 LOC769729 | 가설상의 단백질 LOC769729[Gallus gallus]

[0107] 점수 = 150 비트 (378), 예상 = 9e-35, 방법: 조성-기반 통계

[0108] 동일성 = 33/172(19%), 양성 = 63/172(36%), 갭 = 22/172(12%)

```
Query  58   LEALGNVKRKIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP  116
            L    +V R + + + N +   T T   +Y  SG     LP ++      +    K
Sbjct  29   LMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLPFEIGPDSKGICIFAKTP-Y  87

Query  117  VATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGKRRADQ-----RMYEEL  171
               G+VG +    +D   LA+ FS PYDY  Y   + + I+      +       ++ ++
Sbjct  88   SLRGSVGTVVCK-ADTFFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIF---TEPNHLGNLGDVFSKM  143

Query  172  YYNLSPFRG----------DNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK  213
                P+ G                      ++ +  M+++  AIL++ V
Sbjct  144  MK-SKPYCGSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVED  194
```

[0109]

[0110] 5. 오리너구리

[0111] 5a. *Omithorhynchus anatinus*

[0112] >gi|149491241|ref|XP_001516906.1| 예상: 가설상의 단백질[Omithorhynchus anatinus]

[0113] MAQTIEHLVHEVEAGRCVGIEITNTTNMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAGFCIFVKRKFSLRGSVGLLVYEIEDQTLAIMFSNPFDYNFFKVEFAV
ALSGYKEETQDLKAFFELLYHEKQKGWLKMAKEKLCECQCPVSLENNGIRVTATMSNNAKAIIKLSSPDAKPPEGDVADVQPTTVRRPNPPPFPSPRPRIGS
DLTGDQ LATLDFESGK

[0114] >ref|XP_001516906.1| Gene info 예상: 가설상의 단백질[Ornithorhynchus anatinus]

[0115] 길이 = 220

[0116] GENE ID: 100086848 LOC100086848 | 가설상의 단백질 LOC100086848 [Ornithorhynchus anatinus]

[0117] 점수 = 168 비트(426), 예상 = 2e-40, 방법: 조성-기반 통계

[0118] 동일성 = 36/167(21%), 양성 = 69/167(41%), 갭 = 12/167(7%)

```
Query  58   LEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPV  117
            L       R + + + N +  T+ +  T+  SG +       +    A      K R
Sbjct  8    LVHEVEAGRCVGIEITNTTNMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAGFCIFVK-RKFS  66

Query  118  ATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI--YKGKRRADQRMYEELYYNL  175
              G+VG+L Y + D  TLA++FS P+DYN++   + V +  YK + +  +  +E LY+
Sbjct  67   LRGSVGLLVYEIED-QTLAIMFSNPFDYNFFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEK  125

Query  176  --------SPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA  214
                           +          G++    M+++  AI+++    A
Sbjct  126  QKGWLKMAKEKLCECQCPVSLENNGIRVTATMSNNAKAIIKLSSPDA  172
```

[0119]

[0120] 본원에 사용된 용어 "분리된"은 자신의 생체내 장소로부터 제거된 조성물을 말한다(예를 들어, 수생 생물 또는 이끼). 바람직하게, 본 발명의 분리된 조성물은 실질적으로 자신의 생체내 장소에 존재하는 다른 물질(예를 들어, 유착 방지 효과를 포함하지 않는 다른 단백질)은 함유하지 않는다(즉, 정제 또는 반-정제된다).

[0121] 본원에 사용된 문구 "수생 생물"은, 예를 들어 어류 또는 고착성 수생 생물과 같은 물속 환경(바다 또는 민물)에서 사는 생물을 말한다.

[0122] 본원에 사용된 문구 "고착성 수생 생물"은 자신의 생활 주기의 적어도 어떤 일부 동안 자유롭게 움직이지 못하는 수생 생물을 말한다. 고착성 수생 생물은 일반적으로 기질에 대한 물리적 고정으로 인해, 또는 어떤 다른 이유 때문에(예를 들어, 스톤피쉬) 어떤 종류의 단단한 기질에, 예를 들어 바위나 배의 선체에 영구적으로 부착된다.

[0123] 예시적인 고착성 생물은, 제한은 아니지만, 고착성 유자포동물들, 예를 들어 산호, 말미잘(예를 들어, *Actinia equine* 및 *Aiptasia pulchella*), 바다 조름, 고착성 수생 유충(예를 들어, 해파리 유충), 관속 거주 말미잘 및 히드로충(예를 들어, *Chlorohydra viridissima* 및 *Hydra vulgaris*)을 포함한다.

[0124] 본 발명의 구체예에 따라서 사용될 수 있는 예시적인 어류는 바람직하게 얕은 물에 거주하는 것들이나, 또는 대양의 해저층에, 때로는 구멍이나 동굴에 숨어 있는 것들이다. 이러한 어류는 뱀장어 및 메기를 포함한다.

[0125] 본원에 사용된 문구 "이끼"는 *takakiposida, sphyagnopsida, andreaeopsida, anderaeobryopsida, polytirchopsida*, 또는 *bryopsisa*의 어느 부류를 포함하는 선태식물문에 속하는 비-포자 식물을 말한다.

[0126] 이끼는, 예로서 *physcomitrella patens, Funaria hygrometrica; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Bryophyta; Moss Superclass V; Bryopsida; Funariidae; Funariales; Funariaceae*; 또는 *Physcomitrella*를 포함할 수 있다.

[0127] 본 발명의 조성물은 또한 유전자 조작 기술을 사용하여(예를 들어, 트랜스제닉 고착성 수생 생물을 사용하여) 생체내 발현될 수 있다.

[0128] 본 발명의 어떤 구체예에 따라서, 본 발명의 조성물은 세포독성 또는 세포증식억제 활성이 없으며, 예를 들어 이들은 살균성이나 정균성이 아니다.

[0129] 본 발명의 어떤 구체예에 따라서, 본 발명의 조성물은 동결건조에 내성이며, 예를 들어 조성물의 활성이 냉동건조 후에도 보존된다.

[0130] 본원에 사용된 문구 "단세포 생물"은 단세포의 생물을 말하며, 미생물 또는 세균이라고도 한다. 본 발명의 단세포 생물은 진핵 단세포 생물(예를 들어, 원생동물문 또는 효모 등의 진균) 또는 원핵 단세포 생물(예를 들어, 박테리아 또는 고세균)일 수 있다. 본 발명의 단세포 생물은 분리된 세포 또는 세포 현탁액으로서 어떤 세포 환경에, 예를 들어 생물막에 존재할 수 있다.

[0131] 본원에 사용된 용어 "생물막"은 미생물이 흩어져서 및/또는 군락을 형성하는 세포외 바탕질을 말한다. 생물막은 전형적으로 다당류 및 다른 마이크로분자로 이루어진다.

[0132] 본 발명의 방법에 따라서 유착이 방지될 수 있는 예시적인 박테리아 세포는 그람 양성 박테리아 및 그람 음성 박테리아를 포함한다.

[0133] 용어 "그람-양성 박테리아"는 본원에서 사용되었을 때 세포 벽 구조의 일부로서 펩티도글리칸뿐만 아니라 다당류 및/또는 테이코산을 가지는 것을 특징으로 하며, 그람 염색 과정에서 청보라색 반응을 특징으로 하는 박테리아를 말한다. 대표적인 그람-양성 박테리아는 *Actinomyces* spp., *Bacillus anthracis*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium spp.*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Leuconostoc spp.*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium haemophilium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Nocardia* spp., *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus* spp., *Proprionibacterium* spp., *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdanensis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus similans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus agalactiae*(group B *streptococcus*), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*(group A *streptococcus*), *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*를 포함한다.

[0134] 용어 "그람-음성 박테리아"는 본원에서 사용되었을 때 각 박테리아 세포를 둘러싼 이중 막의 존재를 특징으로 하는 박테리아를 말한다. 대표적인 그람-음성 박테리아는 *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Chalmydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Fusobacterium* spp., *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteuretlaniultocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella* spp., *Proteus* spp., *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rochalimaea* spp., *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Shigella sonnei*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pallidum endemicum*, *Treponema pertenue*, *Veillonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*를 포함한다.

[0135] 용어 "진균"은 본원에서 사용되었을 때 키틴질 세포 벽의 존재, 및 대부분의 종들에서 다세포 균사로서 사상 형태의 성장을 하는 것을 특징으로 하는 종속영양성 생물을 말한다. 본 발명의 방법에 따라서 유착이 방지될 수 있는 대표적인 진균은 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* 및 *Candida dubliniensis*를 포함한다.

[0136] 본원에 사용된 문구 "유착을 방지하는"은 표면에 대한 세포 부착을 감소시키거나 제거하는 것을 말한다(예를 들어, 표면에서의 세포 성장을 감소시킴으로써). 바람직하게, 본 발명의 조성물은 세포 유착 분석에 의해 측정했을 때, 세포 유착을 10% 정도까지, 더 바람직하게 20%까지, 더 바람직하게 30%까지, 더 바람직하게 40%까지, 더 바람직하게 50%까지, 더 바람직하게 60%까지, 더 바람직하게 70%까지, 더 바람직하게 80%까지, 더 바람직하게 90%까지, 가장 바람직하게 100%까지 방지한다. 예시적인 세포 유착 분석이 이후 본원과 실시예 부문에 설명된다. 본 발명의 조성물이 또한 세포 응집을 방지할 수 있다는 것도 인정될 것이다(즉, 표면에서 세포가 응집되지 않는다).

[0137] 본 발명은 직물, 섬유, 폼, 필름, 콘크리트, 석조물, 유리, 금속, 플라스틱, 중합체 등을 포함하는 광범한 표면에 대한 세포 유착의 방지를 고려한다.

[0138] 한 구체예에 따라서, 표면은 생물막이 형성되기 쉬운 장치에 포함된다. 본 발명에 의해서 고려되는 표면을 가진 예시적인 장치는, 제한은 아니지만, 용기 표면, 자동차 표면, 항공기 표면, 멤브레인, 필터, 및 산업용 장비를 포함한다.

[0139] 또한, 표면은 의료 장치, 기구, 및 삽입물에 포함될 수 있다. 이러한 의료 장치, 기구, 및 삽입물의 예는 일시적으로 또는 영구적으로 포유류 생물, 예를 들어 사람에게 이식될 수 있는 어떤 물체를 포함한다. 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 대표적인 의료 장치, 기구, 및 삽입물은, 예를 들어 중심 정맥 카테테르, 요도 카테테르, 기관내 튜브, 기계적 심장 판막, 심박동기, 혈관 삽입물, 스텐트 및 인공 관절을 포함한다. 의료 장치에 세포가 부착되는 것을 방지하는 방법 및 이들의 추가 실시예가 이후 본원에 설명된다.

[0140] 다른 구체예에 따라서, 표면은 생물학적 조직, 예를 들어 포유류 조직, 예를 들어 피부에 포함된다.

[0141] 언급된 대로, 본 발명의 방법은 표면에 대한 세포의 유착을 방지할 수 있는 생물로부터 얻는 조성물을 세포와 접촉시킴으로써 행해진다.

[0142] 본원에 사용된 용어 "접촉시키는"은 본 발명의 조성물이 거기에 포함된 활성제가 세포의 유착을 방지할 수 있는 방식으로 유착성 세포와 직접 또는 간접적으로 접촉하도록 하는 본 발명의 조성물의 배치를 말한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 원하는 표면에 적용하는 것과 및/또는 유착 세포에 직접 적용하는 것을 모두 고려한다.

[0143] 접촉은 생체내(즉, 포유류 체내에서), 생체외(즉, 신체로부터 제거된 세포에서) 및/또는 시험관내(즉, 포유류 신체 외부에서) 행해질 수 있다.

[0144] 조성물과 표면의 접촉은 분무, 펴바르기, 적시기, 담지, 침지, 페인팅, 초음파 용접, 용접, 접합 또는 접착을 포함하는 본 분야에 공지된 어떤 방법을 사용하여 행해질 수 있다. 본 발명의 조성물은 단층 또는 복층으로 부착될 수 있다.

[0145] 한 구체예에 따라서, 본 발명의 조성물은 ㄹ아 있는 생물 전체에 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 살이 있는 수생 생물이 표면(예를 들어, 물밑 배관, 선체) 및/또는 표면에 부착된 세포와 접촉되어 거기에 미생물이 유착되는 것을 방지할 수 있도록 물밑 환경에 살아 있는 수생 생물을 첨가하는 것을 고려한다. 수생 생물로부터 활성제가 분비될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 이 경우, 수생 생물은 표면이나 미생물 세포와 직접 접촉될 필요는 없지만, 이 활성제가 작용 부위로 확산될 수 있도록 충분히 근접되어야 한다. 이와 같이, 본 발명의 조성물은 물로 분비될 수 있고, 해수나 염수의 탈염과 같은 수 정제 처리에서 사용될 수 있다.

[0146] 본 발명의 추가 양태에 따라서, 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 활성 성분으로서 분리된 천연 펩티드로부터 분리된 펩티드를 포함하는 제약 조성물이 제공되며, 상기 펩티드는 YDYNWY, YDYNLY, YDYSFY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY 및 YDWHLY, 또는 본원에 설명된 어떤 다른 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0147] 본 발명의 다른 구체예에 따라서, 상기 펩티드는 선택적으로 비-펩티드 유사체를 형성하도록 변형될 수 있으며, 이것은 제한은 아니지만, 덜 불안정한 결합에 의한 하나 이상의 결합의 치환, 결정화(아래에 더 상세히 설명된다) 등을 포함한다. 추가로 또는 대안으로서, 펩티드는 선택적으로 컴퓨터 모델링을 통하여 작은 분자로 전환될 수 있으며, 이것은 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 PCT 출원 No. WO 2007/147098에 설명된다.

[0148] "펩티드 의태 유기 부분"이 선택적으로 보존성 및 비-보존성 치환으로서 본 발명에 따른 펩티드의 아미노산 잔기들을 치환할 수 있다. 이런 부분들을 "비-천연 아미노산"이라고도 하며, 선택적으로 아미노산 잔기, 아미노산을 치환할 수 있거나, 또는 결실된 아미노산 대신에 펩티드에서 스페이서 기로서 작용할 수 있다. 선택적으로 그리고 바람직하게, 펩티드 의태 유기 부분은 치환된 아미노산과 유사한 입체적, 전자적 또는 입체구조적 특성을 지니며, 이러한 펩티드 의태체들을 사용하여 필수적 위치에 있는 아미노산을 치환할 수 있으며, 이것은 보존성 치환으로서 여겨진다. 그러나, 이러한 유사성이 반드시 필요한 것은 아니다. 펩티드 의태체 사용에 대한 유일한 제한은 그 조성물이 본 발명에 따른 본래 펩티드와 비교하여 그 자신의 생리학적 활성을 적어도 실질적으로 보유한다는 점이다.

[0149] 펩티드 의태체는 선택적으로 효소 과정 또는 다른 변성 과정에 의한 펩티드의 변성을 억제하기 위해서 사용될 수 있다. 선택적으로 그리고 바람직하게, 펩티드 의태체는 유기합성 기술에 의해 생산될 수 있다. 적합한 펩

티드 의태체의 비제한적 예는 상응하는 L 아미노산의 D 아미노산, 테트라졸(Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880(1988)); 아미드 결합 동배체(Jones et al., Tetrahedron Lett. 29:3853-3856(1988)); LL-3-아미노-2-프로페니돈-6-카르복실산(LL Acp)(Kemp et al., J. Org. Chem. 50:5834-5838(1985))을 포함한다. 유사한 유사체들이 Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5081-5082(1988)와 Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5057-5060(1988), Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:4935-4938 (1988) 그리고 Kemp et al., J. Org. Chem. 54:109-115(1987)에 제시된다. 다른 적합한 예시적인 펩티드 의태체들이 Nagai 및 Sato, Tetrahedron Lett. 26:647-650(1985); Di Maio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687(1985); Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30:2317(1989); Olson et al, J. Am. Chem. Soc. 112:323-333(1990); Garvey et al., J. Org. Chem. 56:436(1990)에 제시된다. 더 이상의 적합한 예시적인 펩티드 의태체는 히드록시-1,2,3,4-테트라히드로이소퀴놀린-3-카르복실레이트(Miyake et al., J. Takeda Res. Labs 43:53-76(1989)); 1,2,3,4-테트라히드로-이소퀴놀린-3-카르복실레이트(Kazmierski et al, J. Am. Chem. Soc. 133:2275-2283(1991)); 히스티딘 이소퀴놀린 카르복실산(HIC)(Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991)); (2S,3S) 메틸페닐알라닌, (2S,3R) 메틸페닐알라닌, (2R,3S) 메틸페닐알라닌 및 (2R,3R) 메틸페닐알라닌(Kazmierski 및 Hruby, Tetrahedron Lett. (1991))을 포함한다.

[0150] 전형적이며 예시적인 비제한적 비-천연 아미노산은 베타-아미노산(베타 3 및 베타 2), 호모-아미노산, 고리형 아미노산, 방향족 아미노산, Pro 및 Pyr 유도체, 3-치환된 알라닌 유도체, 글리신 유도체, 고리-치환된 Phe 및 Tyr 유도체, 선형 중심 아미노산 또는 디아미노산을 포함한다. 이들은 Sigma-Aldrich(USA)와 같은 다양한 공급자로부터 입수할 수 있다.

[0151] 본 발명에서, 펩티드의 어떤 부분이 선택적으로 화학적으로 변형될 수 있는데, 즉 작용기의 부가에 의해 변화될 수 있다. 선택적으로, 이 변형은 만일 화학 합성 과정에 따른다면 분자의 합성 동안, 예를 들어 화학적 변형된 아미노산을 첨가함으로써 수행될 수 있다. 그러나, 아미노산 분자에 이미 존재하는 경우에는 아미노산의 화학적 변형도 가능하다("인시튜" 변형).

[0152] 분자의 서열 영역들 중 어느 것의 아미노산은 선택적으로 이후 예시적인 타입의 변형 중 어느 것에 따라서 변형될 수 있다(개념적으로는 "화학적으로 변형된" 것으로 보이는 펩티드에서). 비제한적인 예시적인 변형의 타입은 카르복시메틸화, 아실화, 포스포릴화, 글리코실화 또는 지방 아실화를 포함한다. 세린이나 트레오닌 히드록실과 당의 히드록실을 연결하기 위해서 선택적으로 에테르 결합이 사용될 수 있다. 글루타메이트 또는 아스파르테이트 카르복실기와 당의 아미노기를 연결하기 위해서는 아미드 결합이 선택적으로 사용될 수 있다(Garg 및 Jeanloz, 탄수화물 화학 및 생화학의 진보, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26:294-308 (1987)). 또한, 아세탈 및 케탈 결합이 아미노산과 탄수화물 사이에 선택적으로 형성될 수 있다. 지방산 아실 유도체들이, 예를 들어 자유 아미노기(예를 들어, 리신)의 아실화에 의해 선택적으로 제조될 수 있다(Toth et al., 펩티드: 화학, 구조, 및 생물학, Rivier 및 Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

[0153] 본원에 사용된 용어 "화학적 변형"은 본 발명에 따른 펩티드를 말할 때 그것의 아미노산 잔기 중 적어도 하나가 가공이나 다른 번역 후 변형과 같은 자연적인 과정에 의해서, 또는 당업자에게 잘 알려진 화학적 변형 기술에 의해서 변형된 펩티드를 말한다. 수많은 공지된 변형들의 예들은 전형적으로, 제한은 아니지만, 아세틸화, 아실화, 아미드화, ADP-리보오스화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 메틸화, 미리스틸화, PEG화, 프레닐화, 포스포릴화, 유비퀴틴화, 또는 어떤 유사한 과정을 포함한다.

[0154] 본 발명의 이 양태의 어떤 구체예에 따라서, 필요한 피험체에서 병원균 감염을 예방하거나 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 제약 조성물의 치료적 유효량을 피험체에 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 병원균 감염이 치료되거나 예방된다.

[0155] 본 발명의 이 양태의 대안의 구체예에 따라서, 위장관에 외인성 박테리아의 부착을 예방하는 방법이 제공된다.

[0156] 포유류의 위장관은 매우 다양한 토착 미생물총을 함유하며, 이들은 장내 병원균에 의한 군락 형성에 대해 내성을 제공한다. 병원균에 대해 강화된 방어 기전을 가진 숙주를 제공하는 것에 대한 응답으로, 토착 미생물총은 영양물-부화된 안정한 환경에 대한 접근성을 획득하며, 이로써 숙주의 장관과 공생 관계에 들어가게 된다.

[0157] 공생성 박테리아는 친화성이 높은 수용체-매개 부착에 의해 인체의 위장 상피에 부착된다. 반면에, 외인성 박테리아는 친화성이 낮은 메커니즘에 의해 상피에 부착된다. 단일 가설에 제한되는 것은 아니지만, 본 발명의 조성물은 이 저-친화성 부착을 선택적으로 예방하거나 감소시킴으로써 생물막 형성의 초기 단계를 방지할 것으

로 기대된다.

[0158] 따라서, 본 발명의 조성물은, 예를 들어 교원성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염, 감염성 대장염 및 베체트 증후군을 포함하는 크론병 또는 궤양성 대장염과 같은 위장관 질환의 치료 또는 예방에 유용하다.

[0159] 본원에 사용된 "제약학적 조성물"은 본원에 설명된 활성 성분들 중 하나 이상과 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 다른 화학적 성분들의 제조물을 말한다. 제약 조성물의 목적은 생물에 화합물의 투여를 용이하게 하는 것이다.

[0160] 본원에 사용된 용어 "활성 성분"은 의도된 생물학적 효과를 초래할 수 있는 생물 조성물(및 그로부터 정제된 제제)을 말한다.

[0161] 이후, 문구 "생리학적으로 허용되는 담체" 및 "제약학적으로 허용되는 담체"는 서로 교환하여 사용될 수 있으며, 생물에 유의한 자극을 일으키지 않고, 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 없애지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 애쥬번트가 이들 문구에 포함된다.

[0162] 여기서, 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더 용이하게 하기 위해서 제약 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 말한다. 부형제의 예는, 제한은 아니지만, 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당 및 녹말, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물 기름, 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0163] 약물 조제와 투여를 위한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co., 팬실베니아 이스턴) 최신판에서 찾을 수 있으며, 이 책은 본원에 참고로 포함되고, 이후 본원에서 더 설명된다.

[0164] 언급된 대로, 본 발명의 제약 조성물은 병원균 감염을 예방하거나 치료하기 위하여 필요한 피험체에 투여될 수 있다.

[0165] 본원에 사용된 용어 "필요한 피험체"는 포유류, 바람직하게 사람을 말한다.

[0166] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 병원균 감염의 유해한 효과의 치유, 반전, 약화, 완화, 최소화, 억제 또는 중단을 말한다.

[0167] 본원에서 사용된 문구 "병원균 감염"은 병원성 유기물에 의해서 야기되는 어떤 의학적 상태를 말한다. 병원균 감염의 예는, 제한은 아니지만, 만성 감염성 질환, 아급성 감염성 질환, 급성 감염성 질환, 바이러스성 질환, 세균성 질환, 원충 질환, 기생충 질환, 진균 질환, 미코플라즈마 질환, 고세균 질환, 및 프리온 질환을 포함한다.

[0168] 한 구체예에 따라서, 병원균 감염은 생물막 안에서 또는 생물막 위에서 자랄 수 있는 유기물에 의해서 야기된다.

[0169] 미생물 생물막이 야기하는 병원균 감염의 예는 자연 판막 심내막염(NVE), 중이염(OM), 만성 세균성 전립선염, 낭성 섬유증(CF) 및 치주염을 포함한다. 특별히 생물막으로 인한 것은 아닌 추가 병원균 감염은, 제한은 아니지만, 요도 감염, 여성 생식관 감염 및 폐렴을 포함한다. 의료 장치의 이식으로 인한 감염은 혈관 카테테르 감염, 동맥 보철물 감염, 인공 심장 판막 감염, 인공 관절 감염, 중추신경계 션트 감염, 정형외과 삽입물 감염, 심박동기 및 세동제거기 감염, 혈액투석 및 복막투석 감염, 안구 감염, 요도관 감염, 여성 생식관 감염, 기관내 삽관 및 기관절개술 관련 감염 및 치아 감염을 포함한다.

[0170] 본원에 사용된 문구 "병원성 유기물"은 질환을 야기할 수 있는 어떤 단세포 생물, 특히 박테리아나 진균과 같은 살아 있는 미생물을 말한다. 바람직하게, 병원성 유기물은 생물막 안에서 또는 그 위에서 자랄 수 있다. 많은 공통된 병원성 유기물이 생물막으로서 포유류(예를 들어, 사람)에 존재하며 질환을 일으킨다. 이들은, 제한은 아니지만, *Mannheimia haemolytica* 및 *Pasteurella multocida*(폐렴을 일으킴), *Fusobacterium necrophorum*(간농양을 일으킴), *Staphylococcus aureus* 및 *Pseudomonas aeruginosa*(상처 감염을 일으킴), *Escherichia coli* 및 *Salmonella* spp.(장염을 일으킴), *Staphylococcus aureus* 및 *Staphylococcus epidermidis*(OM을 일으킴) 그리고 *Streptococci* sp., *Staphylococci* sp., *Candida* 및 *Aspergillus* sp.(NVE를 일으킴)를 포함한다.

[0171] 본 발명에 따른 감염성 질환의 치료가 본 분야에 공지된 다른 치료 방법과 조합될 수 있다는 것이 인정될 것이다(즉, 조합 치료법). 이들은, 제한은 아니지만, 페니실린, 세팔로스포린, 카르바페넴, 아미노글리코시드, 마크롤리드, 린코마이신, 테트라시클린, 클로람페니콜, 및 그리세오풀빈과 같은 항균제를 포함한다.

[0172] 적합한 투여 경로는, 예를 들어 경구, 직장, 경점막, 특히 경비 경로, 장, 또는 근육내, 피하, 및 골수내 주사뿐만 아니라 경막내, 직접 뇌실내, 정맥내, 복강내, 비내, 또는 안내 주사를 포함하는 비경구 송달을 포함할 수 있다.

[0173] 또는 달리, 제약 조성물은 전신 방식보다는 국소 방식으로, 예를 들어 제약 조성물을 환자의 조직 영역에 직접 주사함으로써 투여될 수 있다.

[0174] 본 발명의 제약 조성물은 당업자에게 잘 알려진 과정에 의해서, 예를 들어 종래의 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 분말화, 유화, 캡슐화, 포집, 또는 동결건조 과정에 의해서 제조될 수 있다.

[0175] 이와 같이, 본 발명에 따라서 사용하기 위한 제약 조성물은 제약학적으로 사용될 수 있는 활성 성분의 제조물로의 가공을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 종래의 방식으로 조제될 수 있다. 적절한 조제물은 선택된 투여 경로에 따를 것이다.

[0176] 주사용은, 제약 조성물의 활성 성분들이, 바람직하게는 행크 용액, 링거 용액, 또는 생리학적 염 완충액과 같은 생리학적으로 적합한 완충액 중에서 수성 용액으로 조제될 수 있다. 경점막 투여용은, 침투될 장벽에 적절한 침투제가 조제물에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 본 분야에 알려져 있다.

[0177] 국소 투여용은, 본 발명의 조성물이 젤, 크림, 세정제, 린스 또는 스프레이로서 조제될 수 있다.

[0178] 경구 투여용은, 활성 화합물들과 본 분야에 잘 공지된 제약학적으로 허용되는 담체를 조합함으로써 제약 조성물이 쉽게 조제될 수 있다. 이러한 담체는 제약 조성물이 환자에 의한 경구 섭취에 알맞은 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 조제될 수 있도록 한다. 경구 용도의 약학적 조제물은 고형의 부형제를 사용하여, 원한다면 적합한 보조제를 첨가한 후, 선택적으로는 결과의 혼합물을 분쇄하고, 과립의 혼합물을 가공하여 정제나 당의정의 핵을 얻음으로써 제조될 수 있다. 적합한 부형제는, 특히 충전재, 예를 들어 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당; 셀룰로오스 제조물, 예를 들어 옥수수 녹말, 밀 녹말, 쌀 녹말, 감자 녹물, 젤라틴, 트래거캔스검, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 및 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스; 및/또는 생리학적으로 허용되는 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈(PVP)이다. 원한다면, 가교된 폴리비닐피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 그것의 염, 예를 들어 나트륨 알기네이트와 같은 붕해제가 첨가될 수 있다.

[0179] 당의정 핵에는 적합한 코팅이 제공된다. 이 목적을 위해, 농축 당 용액이 사용될 수 있으며, 이것은 선택적으로 아라비아검, 탈크, 폴리비닐피롤리돈, 카르보폴 젤, 폴리에틸렌 글리콜, 이산화티탄, 래커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있다. 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 식별하거나 특성화하기 위해서 염료 또는 안료가 정제나 당의정 코팅에 첨가될 수 있다.

[0180] 경구 사용될 수 있는 제약 조성물은 젤라틴으로 만들어진 푸시-핏 캡슐뿐만 아니라 젤라틴과 글리세롤이나 소르비톨과 같은 가소제로 만들어진 연질 밀봉 캡슐을 포함한다. 푸시-핏 캡슐은 락토오스 같은 충전재, 녹말 같은 바인더, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트 같은 윤활제, 및 선택적으로 안정제와 혼합하여 활성 성분들을 함유할 수 있다. 연질 캡슐의 경우, 활성 성분들은 적합한 액체, 예를 들어 지방 오일, 액체 파라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 이에 더하여, 안정제가 첨가될 수 있다. 경구 투여용의 모든 조제물은 선택된 투여 경로에 적합한 용량별로 조제되어야 한다.

[0181] 협측 투여용은, 조성물이 종래의 방식으로 조제된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.

[0182] 코 흡입에 의한 투여에서는, 본 발명에 따라서 사용되는 활성 성분들이 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로테트라플루오로에탄, 또는 이산화탄소를 사용하여 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무의 형태로 편리하게 송달된다. 가압된 에어로졸의 경우, 계량된 양을 송달할 수 있는 밸브를 제공함으로써 용량이 결정될 수 있다. 디스펜서에 사용되는, 예를 들어 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물과 락토오스나 녹말 같은 적합한 분말 베이스의 분말 믹스를 함유하여 조제될 수 있다.

[0183] 본원에 설명된 제약 조성물은, 예를 들어 일시 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 조제될 수 있다. 주사용 조제물은 단위 제형에, 예를 들어 앰플에, 또는 복수 용량 용기에 담겨질 수 있고, 선택적으로 보존제가 첨가된다. 조성물은 현탁액, 용액, 또는 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀젼일 수 있으며, 현탁제, 안정제 및/또는 분산제와 같은 배합제를 함유할 수 있다.

[0184] 비경구 투여용 제약 조성물은 수용성 형태의 활성 제조물의 수성 용액을 포함한다. 또한, 활성 성분들의 현탁액이 적절한 오일 또는 수성-기반 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 동결건조 용매 또는 비히클은 지방

오일, 예를 들어 참깨 기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트, 트리글리세리드 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 덱스트란과 같은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정제 또는 활성 성분들의 용해도를 증가시키는 제제를 함유할 수 있으며, 이로써 상당히 농축된 용액의 제조가 가능해진다.

[0185] 또는 달리, 활성 성분은 분말 형태일 수 있으며, 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균, 발열원-무함유, 수성-기반 용액과 함께 구성된다.

[0186] 또한, 본 발명의 제약 조성물은, 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 종래의 좌약 베이스를 사용한, 좌약 또는 정체 관장제와 같은 직장 조성물로 조제될 수 있다.

[0187] 본 발명과 관련하여 사용하기에 적합한 제약 조성물은 활성 성분들이 의도된 목적을 달성하는데 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 더 구체적으로, "치료적 유효량"은 치료될 피험체의 병원균 감염 증상(예를 들어, 열)을 예방, 완화 또는 개선하거나, 또는 피험체의 생존을 연장하는데 효과적인 활성 성분들(예를 들어, 수생 생물 조성물 또는 이끼 조성물)의 양을 의미한다.

[0188] 치료적 유효량의 결정은, 특히 본원에 제공된 상세한 개시에 비추어 볼 때, 당업자의 능력 범위 내이다.

[0189] 본 발명의 방법에서 사용되는 어떤 제조물에 대해, 용량 또는 치료적 유효량은 시험관내 분석 및 세포 배양 분석으로부터 처음에 추정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 원하는 농도나 역가를 달성할 수 있는 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보를 사용하여 인체에 유용한 용량을 더 정확히 결정할 수 있다.

[0190] 본원에 설명된 활성 성분들의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물에서 시험관내 표준 제약 과정에 의해 결정될 수 있다. 이들 시험관내 분석 및 세포 배양 분석과 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인체에서 사용하기 위한 용량 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 용량은 사용될 제형 및 이용될 투여 경로에 따라서 변할 수 있다. 정확한 조제물, 투여 경로, 및 용량은 환자의 상태를 고려하여 각 의사에 의해서 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl, E. et al. (1975), "Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p. 1).

[0191] 투약량 및 투여 간격은 생물학적 효과를 유도하거나 억제할 수 있는 활성 성분의 충분한 혈장 수준 또는 뇌 수준을 제공하도록 개체별로 조정될 수 있다(즉, 최소 유효 농도, MEC). MEC는 각 제조물마다 다를 것이며, 시험관내 데이터로부터 추정될 수 있다. MEC를 달성하는데 필요한 용량은 개체 속성 및 투여 경로에 따를 것이다. 검출 분석을 사용하여 혈장 농도를 결정할 수 있다.

[0192] 치료될 상태의 중증도 및 반응성에 따라서, 투약은 1회 투여 또는 복수 회 투여로 이루어질 수 있으며, 치료 과정은 수일에서 몇 주까지, 또는 치유가 행해지거나 질환 상태의 축소가 달성될 때까지 지속된다.

[0193] 투여되는 조성물의 양은 물론 치료될 피험체, 질병의 중증도, 투여 방식, 주치의의 판단 등에 따를 것이다.

[0194] 본 발명의 조성물은, 원한다면, 팩 또는 디스펜서 장치, 예를 들어 FDA-승인 키트에 담겨질 수 있으며, 이들은 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 제형을 함유할 수 있다. 팩은, 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예를 들어 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여를 위한 설명서를 수반할 수 있다. 또한, 팩 또는 디스펜서 장치는 제조, 사용 또는 제약 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 규정된 형태의 고지를 수반할 수 있으며, 이러한 고지는 인체 투여나 수의과적 투여를 위한 조성물 형태를 당국이 승인했음을 반영한다. 이러한 고지는, 예를 들어 처방 약물이나 승인된 제품 삽입물에 대한 미국 식품의약국에 의해 승인된 라벨을 포함할 수 있다. 또한, 제약학적으로 허용되는 담체 중에 조제된 본 발명의 제조물을 포함하는 조성물은 상기 더 상세히 설명된 대로, 제조되고, 적합한 용기에 넣어지고, 지시된 상태의 치료를 위한 라벨이 부착될 수 있다.

[0195] 언급된 대로, 의료 장치 및 삽입물은 기회감염 박테리아 및 다른 감염성 미생물(예를 들어, 진균)에 의해 통상 감염되며, 어떤 경우에는 이식된 장치의 제거가 필요하다. 이러한 감염은 또한 질병, 장기 입원, 또는 심지어 사망을 유발할 수 있다. 따라서, 의료 장치에서 생물막 감염 및 감염의 방지가 매우 소망된다.

[0196] 따라서, 본 발명은 또 상기 설명된 조성물이 부착된 의료 장치를 고려한다.

[0197] 본원에 사용된 용어 "의료 장치"는 질환 또는 다른 상태의 진단, 치료, 치유 또는 예방에서 사용하기 위한 목적을 가진, 어떤 삽입물, 기구, 장치, 도구, 기계, 디바이스 또는 어떤 다른 유사한 또는 관련된 물체(어떤 구성요소 또는 악세사리를 포함하는)를 말한다. 이러한 의료 장치는 사람이나 다른 동물에서 사용되도록 의도되며, 신체 구조나 신체의 어떤 기능에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 이러한 의료 장치는 화학적 작용을 통해서 그

것의 일차 의도된 목적을 달성하는 것은 아니며, 일차 의도된 목적의 달성을 위해서 대사작용에도 의존하지 않는다.

[0198] 본원에 사용된 용어 "삽입물"은 살아 있는 조직이 아닌 인체에 배치하기 위한 어떤 물체를 말한다. 삽입물은 일시적 또는 영구적일 수 있다. 삽입물은 카테테르 또는 심박동기 같은 인공적 구성요소를 포함하는 물품일 수 있다. 또한, 삽입물은 그것의 살아 있는 조직이 약화되도록 가공된 자연 유래된 물체를 포함할 수 있다. 예로서, 뼈 이식편은 그것의 살아 있는 세포는 제거되지만(무세포화), 숙주로부터 뼈가 안으로 성장하는 것의 주형으로서 사용할 수 있게 모양은 유지되도록 가공된다. 다른 예로서, 자연적으로 생긴 산호를 사용하여 어떤 정형외과 치료법 및 치과 치료법에서 신체에 적용될 수 있는 히드록시아파타이트 제조물을 얻을 수 있다.

[0199] 따라서, 본 발명은 본 발명의 조성물로 의료 장치를 코팅하는 것을 고안하며, 이로써 의료 장치에 대한 세포 유착을 방지함으로써 이식 후 발생한다고 알려진 어떤 가능한 세포 응집 및 생물막 형성을 감소/제거할 수 있다. 장치-관련 감염은 일반적으로 장치를 삽입하거나 이식하는 과정 동안 미생물, 주로 박테리아가 도입됨으로써, 또는 새로 삽입된 장치에 혈액-유래 유기물이 부착되고 계속해서 이들이 장치 표면에서 증식함으로써 일어난다. 따라서, 본 발명의 조성물로 의료 장치를 코팅하는 것은 하나 이상의 미생물 종의 생물막 형성을 억제하고, 의료 장치-관련 감염을 방지하고, 결과적으로는 항생제 치료 필요성이나 피험체로부터 의료 장치를 제거할 필요성을 줄일 것이다.

[0200] 본 발명의 교시에 따라서 코팅될 수 있는 의료 장치는, 제한은 아니지만, 인공 혈관, 카테테르 또는 환자로부터 유체를 제거하거나 환자로 유체를 송달하기 위한 다른 장치, 인공 심장, 인공 신장, 정형외과용 핀, 인공 관절, 의치 및 임플란트; 카테테르 및 다른 튜브(비뇨기 및 담즙 튜브, 기관내 튜브, 말초 삽입가능한 중심 정맥 카테테르, 투석 카테테르, 장기적 터널 형성용 중심 정맥 카테테르, 말초 정맥 카테테르, 단기 중심 정맥 카테테르, 동맥 카테테르, 폐 카테테르, Swan-Ganz 카테테르, 요도 카테테르, 복막 카테테르를 포함한다), 요도 장치(장기적 요도 장치, 조직 결합 요도 장치, 인공 요도 괄약근, 요도 확장장치를 포함한다), 션트(환기용 션트 또는 동맥-정맥 션트를 포함한다); 보철(유방 삽입물; 음경 보철물, 혈관 이식 보철물, 동맥류 수선 장치, 기계적 심장 판막, 인공 관절, 인공 후두, 이과용 삽입물을 포함한다), 연결 장치, 혈관 카테테르 포트, 혈관 스텐트, 클램프, 색전 장치, 상처 배액관, 안구 렌즈, 치아 임플란트, 수두증 션트, 심박동기 및 이식용 세동제거기, 무바늘 커넥터, 후두 보철물 등을 포함한다.

[0201] 본 발명의 조성물의 다른 가능한 적용은 의료 환경 및 치과 환경에서 발견되는 표면의 코팅이다. 이러한 표면은 일회용이든 재사용 가능한 것이든 각종 기구 및 장치의 내면 및 외면을 포함한다. 이러한 표면은 의료 용도로 적합하게 된 전 범위의 물품을 포함하며, 제한은 아니지만, 외과용 메스, 바늘, 가위 및 침습적 수술, 치료 또는 진단 과정에서 사용되는 다른 장치들; 혈액 필터를 포함한다. 다른 예들도 당업자에게 자명할 것이다.

[0202] 또한, 의료 환경에서 발견되는 표면은 의료 장비, 건강관리 환경에서 담당자가 착용하거나 소지하게 되는 의료 장비, 의료 도구의 피스들의 내면 및 외면을 포함한다. 이러한 표면은 장갑, 앞치마 및 안면보호구와 같은 의료 환경에서 감염성 유기물에 대한 생물학적 장벽으로서의 목적을 가진 표면을 포함할 수 있다. 생물학적 장벽으로서 일반적으로 사용되는 재료는 폴리에틸렌, 데이크론, 나일론, 폴리에스테르, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리우레탄, 라텍스, 실리콘 및 비닐과 같은 열가소성 재료 또는 중합체 재료이다. 다른 표면은 의료 과정에서, 또는 산소, 분무기 안의 용해된 약물 및 마취제의 투여를 포함하는 호흡기 치료에 사용되는 의료 장치, 튜브 또는 캐니스터를 준비하는데서 사용되는 장소에 있는 평평한 작업대 및 고정대를 포함할 수 있다. 다른 이러한 표면은 멸균되지 않는 의료 장비나 치과용 장비를 위한 핸들 및 케이블을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 표면은 혈액이나 체액 또는 다른 위험한 생물물질을 흔하게 접하게 되는 장소에서 발견되는 튜브 및 다른 장치들의 멸균되지 않는 외면을 포함할 수 있다.

[0203] 본 발명의 조성물은 이들 의료 장치의 표면에 또는 내부에 사용될 수 있으며, 이로써 미생물 군락 형성에 대한 장기적 보호를 제공하고, 장기-관련 감염 발생을 감소시킬 수 있다. 이들 조성물은 또한 의료 장치용 코팅제에 항균제(예를 들어, 항생제)와 조합하여 혼입될 수 있다. 이러한 조합은 군락을 형성하는 박테리아를 초기에 충분히 죽이거나 억제할 수 있을 것이며, 그 물질이 장치-세균 계면에 억제 농도로 존재하는 한 장치-관련 감염을 방지할 것이다.

[0204] 본 발명의 조성물은 중합체 합성 단계에서 또는 장치 제조 단계에서 의료 장치의 중합체 바탕질에 직접 혼입될 수 있다. 조성물은 또한 의료 장치 중합체에 공유 부착될 수 있다. 의료 장치를 코팅하는 이들 방법 및 많은 다른 방법들이 당업자에게 자명하다.

[0205] 본 발명의 교시에 따라서 처리될 수 있는 추가 표면은 물 정제, 물 저장 및 물 수송에 관련된 물품들, 및 식품 가공에 관련된 물품들의 내면 및 외면을 포함한다. 따라서, 본 발명은 식품이나 음료 용기의 단단한 표면을 코팅하는 것을 고안하며, 이로써 용기 내용물의 저장수명이 연장될 수 있다.

[0206] 또한, 건강과 관련된 표면은 영양 섭취, 위생 설비 또는 질병 예방을 제공하는데 관련되는 가정용 물품들의 내면 및 외면을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 외부 표면에서 질병을 야기하는 미생물을 제거하는데 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어 가정용 식품 가공 도구, 유아 케어용 재료, 탐폰, 비누, 세제, 건강 및 스킨케어 제품, 가정용 세정제 및 화장실 변기를 포함할 수 있다.

[0207] 또한, 표면은 실험실 물품일 수 있으며, 제한은 아니지만, 현미경 슬라이드, 배양 후드, 페트리 접시 또는 어떤 다른 적합한 타입의 조직 배양병이나 본 분야에 알려진 용기를 포함한다.

[0208] 본 출원의 발명자들은 또한 오염방지제로서 본 발명의 조성물을 사용하는 것을 고안한다.

[0209] 본원에 사용된 용어 "오염방지제"는 단세포 생물의 부착으로부터 물밑의 표면을 보호하는데 사용되는 화합물을 말한다. 이들 단세포 생물은 박테리아 및 진균과 같은 미생물을 포함한다.

[0210] 이러한 물밑 표면은 어떤 물에 잠긴 표면을 포함하며, 선박/보트의 선체(즉, 선박이나 보트의 바디 또는 프레임), 잠수함, 항행보조설비, 스크린, 그물, 구조물, 부유형 또는 정박형 근해 플랫폼(예를 들어, 선창), 부표, 신호 장치 및 해수나 염수와 접촉하는 물품들을 포함한다. 다른 물밑 표면은 말뚝, 해양 표식, 케이블 및 파이프와 같은 바다밑의 송수관, 어획용 그물, 칸막이, 냉각 타워, 및 물속에 잠긴 채로 작동되는 어떤 장치나 구조를 포함하는 해수에 노출되는 구조들을 포함한다.

[0211] 본 발명의 조성물은 바람직하지 않은 바다 오염을 제한하기 위해서 해양용 코팅제에 혼입될 수 있다. 따라서, 본 발명의 오염방지제는 효능은 그대로 보유하면서 독성 물질(중금속 같은)을 함유하지 않도록 조제될 수 있다. 본 발명의 오염방지 도료는 바인더(들), 안료(들), 용매(들) 및 첨가제(들)을 더 함유할 수 있다.

[0212] 사용될 수 있는 용매의 예는 방향족 탄화수소, 예를 들어 크실렌 및 톨루엔; 지방족 탄화수소, 예를 들어 헥산 및 헵탄, 에스테르, 예를 들어 에틸 아세테이트 및 부틸 아세테이트; 아미드, 예를 들어 N-메틸피롤리돈 및 N,N-디메틸포름아미드; 알코올, 예를 들어 이소프로필 알코올 및 부틸 알코올; 에테르, 예를 들어 디옥산, THF 및 디에틸에테르; 및 케톤, 예를 들어 메틸에틸케논, 메틸이소부틸케논 및 메틸이소아밀케톤을 포함한다. 용매는 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0213] 사용될 수 있는 바인더의 예는 알키드 수지, 아크릴 또는 비닐 에멀젼, 폴리우레탄 수지, 에폭시 수지, 실리콘 기재 수지, 아크릴 수지, 무기 실리케이트 기재 수지, 비닐 수지, 특히 염화비닐/비닐 아세테이트 공중합체, 및 로진을 포함한다.

[0214] 사용될 수 있는 안료의 예는 이산화티탄, 산화구리, 산화철, 탈크, 알루미늄 플레이크, 운모 플레이크, 산화제2철, 구리 티오시아네이트, 산화아연, 구리 아세테이트 메타-아르세네이트, 아연 크로메이트, 아연 디메틸 디티오카르바메이트, 아연 에틸렌 비스(디티오카르바메이트) 및 아연 디에틸 디티오카르바메이트를 포함한다.

[0215] 코팅 조성물에 혼입될 수 있는 첨가제의 예는 습기제거제, 습윤/분산제, 침전방지제, 박리방지제, 건조/경화제, 흠집방지제 및 안정제 및 거품방지제와 같은 코팅 조성물에 일반적으로 사용되는 첨가제들을 포함한다. 또한, 해수에 잘 녹지 않는 어떤 항생제가 해양용 오염방지 도료에 사용될 수 있다.

[0216] 해양용 오염방지 도료를 제조하는 방법은 미국특허 제4,678,512호; 미국특허 제4,286,988호; 미국특허 제4,675,051호; 미국특허 제4,865,909호; 및 미국특허 제5,143,545호에 상세히 설명된다.

[0217] 본 발명의 조성물은 또한 화장품에 항균 특성을 제공하기 위해 사용될 수 있으며, 이로써 제품의 변질이 방지된다.

[0218] 또한, 조성물은, 예를 들어 치약, 구강세정제 또는 츄잉검에 혼입됨으로써, 구강, 치아 및 잇몸에 항균 효과를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 종합하면, 본 발명의 교시는 수생 생물 및 이끼와 같은 생물로부터 분리된 광범한 신규한 유착방지제를 묘사한다. 미생물 생물막 형성의 초기의 취약한 단계에 영향을 미치는 능력과 함께 이들 제제의 광범위한 유착 방지 효과(예를 들어, 그람 양성 및 그람 음성 박테리아의 유착을 억제하는)는 이들 제제를 중요한 생물막 방지제 후보로 만든다. 또한, 본원에 설명된 유착방지제는 클로닝될 수 있으며, 이들의 변형 및 대량 생산이 가능할 수 있다. 이에 더하여, 이들의 안정성(즉, 환경 조건에 대한 내성)은 이들 제제를 다양한 형태의 용도에 적합하게 한다.

[0219] 본 발명의 추가의 목적, 장점 및 신규 특징들이 다음의 실시예의 시험에 의해 당업자에게 분명해질 것이며, 이들 실시예는 본 발명을 제한하지 않는다. 또한, 상기 서술되고 이후 청구항에서 청구된 본 발명의 다양한 구체예 및 양태의 각각은 다음의 실시예에서 실험적으로 뒷받침된다.

[0220] 일반적으로, 본원에서 사용된 명명법 및 본 발명에서 이용된 실험실 과정은 분자학, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술들을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 잘 설명된다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al.(1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed.(1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA" Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series," Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시된 방법들; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III Cellis, J.E. ed.(1994); "Current Protocols in Immunology," Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology," (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 및 Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology," W. H. Freeman and Co., New York (1980)를 참조한다; 이용가능한 면역분석들도 특허 문헌과 과학 문헌들에 광범하게 설명되며, 예를 들어 미국특허 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호; 및 제5,281,521호; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J.ed.(1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., 및 Higgins S. J., eds.(1985); "Transcription and Translation," Hames, B. D., 및 Higgins S. J., Eds.(1984); "Animal Cell Culture," Freshney, R.I. ed.(1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press(1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B.(1984) 및 "Methods in Enzymology," Vol. 1317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications," Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual," CSHL Press (1996)를 참조한다; 이들은 모두 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 다른 일반적인 참고자료들도 본 명세서 전체에서 제공된다. 거기에 설명된 과정들은 본 분야에 잘 알려져 있다고 생각되며, 독자의 편의를 위해 제공되는 것이다. 거기에 포함된 모든 정보는 본원에 참고로 포함된다.

[0221] 실시예

[0222] 상기 설명과 함께 다음 실시예를 참조하여 본 발명을 비제한적 방식으로 예시한다.

[0223] 실시예 1

[0224] *Aiptesia* 말미잘로부터 추출된 활성 분획의 MS/MS 분석

[0225] *Aiptasia pulchella*(전체 생물)의 조 추출물을 Sephadex G-10 칼럼에서 분리하여 2개 분획을 얻었으며, 이들은 모두 유착/생물막 형성 방지 활성을 나타낸다(도 13).

[0226] Sephadex G-10로부터 얻은 고 분자량 분획을 Sephadex G-75에서 다시 크로마토그래피하여 고 분자량 분획과 저 분자량 분획을 나타내는 2개의 메인 피크를 얻었다(도 14).

[0227] G-75 칼럼으로부터 얻은 저 분자량 분획에 대해 c-18 칼럼을 사용한 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 분리를 2ml/분의 유속에서 0.1% TFA 중의 아세토니트릴의 선형 구배(3-80%, 5-75분)로 수행하여 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 대해 유착 방지 화합물인 몇 가지 활성 분획을 얻었다. 분획들은 2분마다 수집했다(도 15).

[0228] 모든 활성 분획들을 트립신 분해하고, Qtof Premier(Waters)와 LTQ-Orbitrap (Thermo)에서 LC-MS/MS에 의해 분석하고, nr 데이터베이스의 진핵세포 부분에 대해서 Pep-Miner 및 Sequest 소프트웨어로 확인했다. 72.3% 아세토니트릴에서 용출된 활성 분획(적색 화살표로 표시)이 *Actinia equine*로부터의 에퀴나톡신 5와 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0229] 실시예 2

[0230] 말미잘 세포용해소의 보존된 영역의 확인

[0231] *Aiptasia pulchella* 및 *Anemonia viridans 25mg*으로부터 Wizard 게놈 DNA 정제 키트(Promega, USDA)를 사용하

여 동물 조직으로부터 게놈 DNA를 분리하는 제조자의 프로토콜에 따라서 정제된 주형 DNA를 제조했다. Reddy Mix PCR 마스터 믹스(ABgene, UK)를 사용하여 *Aiptasia pulchella* 및 *Anemonia viridans*로부터 정제된 주형 DNA 500ng으로 PCR을 수행했으며, 다음 프로토콜에 따랐다: 95℃-5분(95℃ 30초, 52℃ 30초 그리고 72℃ 1분) X 35, 72℃ 10분.

[0232] 프라이머 Eqt-F(GTR TCG ACA ACG AGT CRG G)와 Eqt-R252(TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG)를 각 반응물에 각각 0.5 μM의 최종 농도로 첨가했다.

[0233] 양성 PCR 반응은 약 250bp 크기의 DNA 앰플리콘을 산출했고, 이것을 DNA 서열화했다.

[0234] *Aiptasia pulchella*로부터의 PCR 앰플리콘은 다음의 265bp 서열을 산출했다:

[0235] GTGTCGCCAACGAGTCGGGATGCACTTGGGAAAAGCCAAATACATACTTCTTCTCTG
GTACTGAGGTATAAAGTGCCTCCCTCTAAAGCTTGAGAATAAAAAAGCACTTTTGTA
CGGCCCACGTAAGACAACAGGGCCTGTTGCCACGGGAGCTGTTGGAGTGCTCACTT
ACAAAATGTTGTGCACCAATGAGACGAACACTCTGGCTGTTCTTTTCAGTGTACCCT
TCGACTACAACTTGTACAGCAACTGGTGGAAATGTCAA

[0236] 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 예상된 아미노산 서열과 GeneBank의 기지의 단백질 서열의 BLASTx 비교는, 용혈성 독소[Actineria villosa], PsTX-20A[Phyllodiscus semoni], 세포용해소 I 전구물질[Sagartia rosea] 및 에퀴나톡신 IV 전구물질[Actinia equina]; (수탁 번호: BAD74019.1, BAC45007.1, AAP04347.1 및 AF057028_1)와 같은 다른 말미잘 세포용해소들에 대해 동일성 = 54/88 (61%), 양성 = 62/88(70%)의 결과를 나타냈다.

[0237] 관련 펩티드 서열[FSVPFDYNLYSNWW]이 Aiptasial 서열에 보인다.

[0238] *Anemonia viridans*로부터의 PCR 앰플리콘은 다음의 254bp 서열을 산출했다:

[0239] TGTGTCGACAACGAGTCgGGCaagacgtGgaCCGCAntgaaCACATACTTCCGTTCTGGcAC
CTCTGATnTCrTCCTTCCCCATACAGTTCCACATGGTAAGGCACTGCTCTACAACGGT
CAGAAAGATCGTGGTCCAGTTGCGACTGGCGtgGTTGGAGTACTTGCTTATGcCATGA
GCgATGGAAACACCCtGGCCGTTTTgTTCAGCrTTCCCTaTGACTATAACCtGTACAGCA
ACTGGTGGAATGTCAA

[0240] GeneBank의 기지의 뉴클레오티드 서열과의 BLASTn 비교는, 대응하는 에퀴나톡신 5[수탁 번호: AEU51900], 4[수탁 번호: AF057028] 및 2[수탁 번호: AEU41661]에 대해 97%, 96% 및 95%의 유사성을 나타냈다.

[0241] 2차 양성 ORF의 번역에 기초한 예상된 아미노산 서열은 다음의 AA 서열을 산출했다:

[0242] CRQRVGMHLGKAKYILLLWY*GIKCLPLKLENKKALLYGPRKTTGPVATGAVGVLTYK
MLCTNETNTLAVLFSVPFDYNLYSNWWKCQ

[0243] 실시예 3

[0244] 합성 펩티드들의 활성 비교

[0245] Peptron Inc.(대한민국 대전)에 따라서, 아래 나열된 펩티드들을 고상 방법을 사용하여 합성하고, 90% 비율까지 정제했다.

[0246] 이 펩티드들을 20μl 디메틸 술폭시드(DMSO)를 사용하여 용해하고, 5mg/ml의 농도로 증류수에서 2배 희석했다. 포스페이트 완충 식염수(PBS)로 더 희석했다.

[0247] *Acinetobacter Baumannii* 및 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853의 임상 분리주에 대해 500-0.5μg/ml 범위의 펩티드 농도에서 다음의 합성 펩티드들의 활성을 연구했다. 적절한 농도로 희석된 펩티드를 24-48시간 동안 박테리아와 함께 인큐베이션했다.

[0248] 박테리아 유착 생물분석을 위해, 96-웰 둥근-바닥 폴리스티렌 플레이트에서 생물막을 성장시켰다. 간단히 말해서, 하룻밤 배양한 배양물 180μl를 PBS에 희석된 적절한 펩티드 20μl로 보충된 웰에 첨가했다. 37℃에서 24시간 인큐베이션 후, 각 웰을 물로 세척하고, 크리스탈 바이올렛 용액 250μl로 염색했다. 다음에, 물로 완전히 세척하여 염료를 제거했다. 부착된 세포의 정량을 위해, 크리스탈 바이올렛을 1% 나트륨 도데실 술페이트

(SDS) 250㎕에 용해하고, 595nm에서 흡광도를 측정했다.

[0249] CMFSVPFDYNWYSNWWC AbacZ-17C

[0250] Ac-MFSVPFDYNWYSNWW-NH2 AbacZ-15

[0251] CFSVPFDYNWYSNWWC AbacZ-16C

[0252] FDYNWY AbacZ-6

[0253] CFDYNWYC AbacZ-8C

[0254] 결과를 도 1-12에 나타낸다. 도 1, 3, 5 및 7에 보이는 대로, 이 펩티드들은 박테리아를 죽이거나 성장을 억제하지 않았다. 도 2, 4, 6, 8 및 10 내지 12는 이 펩티드들이 생물막의 형성을 방지했다는 것을 나타낸다.

[0255] 실시예 4

[0256] 바람직한 펩티드의 확인

[0257] 본 발명에 따른 가장 활성인 고리형 펩티드를 확인하기 위해, 펩티드 정제장치를 구비한 수동 병행 펩티드 합성장치를 사용하여 길이와 고리화 전략이 서로 다른 펩티드들을 생산한다. 각 펩티드는 마이크로플레이트와 유세포분석기에서 유착 방지 활성에 대해 스크리닝하고, 고 활성 펩티드를 선택한다. 몇 가지 버전의 펩티드들을 컴퓨터로 모델링하여 활성 화합물의 선택을 최적화한다.

[0258] 더욱 민감한 스크리닝을 위해, Promega(USA)의 BacTiter-Glo 미생물 세포 생육성 분석기를 이용하여 생물분석의 규모를 늘렸다. 이 방법은 발광에 기초한 더욱 민감한 분광 기술을 이용한다.

[0259] 다양한 고리화 전략을 사용하여 만족할 만한 생물활성을 가진 선형 유사체로부터 최적화된 고리형 펩티드를 얻는다. 도 16a는 유화제 팔을 가진 고리형 리드의 일반적인 구조를 나타낸다. 이 선형 유사체는 약물 분자구조로서 확인된 소수성 코어(6aa)를 가진 14-mer 펩티드이다. 이 약물 분자구조를 보존하여 고리형 리드를 제조하고, 다음에 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, Teflon 등과 같은 유화성 팔(소수성 부분)을 부가하여 소수성 중합체 표면에 대한 흡착 능력을 제공한다(도 16b).

[0260] 에피토프 맵핑, 이스캐닝 및 시클로스캔 방법을 사용하여 원하는 생물학적 활성을 보유한 더 짧고 더욱 비용 효과적인 펩티드를 밝혀낸다.

[0261] 9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐 고상 펩티드 합성(FmocSPPS)을 이용하여 고리형 리드를 제조한다.

[0262] 대표적인 과정에 따르면, 도 17에 나타낸 대로, 처음 보호된 아미노산이 디클로로메탄(DCM) 중에서 N,N-디이소프로필에틸아민(DIEA)을 사용하여 클로로티트리릴(Cl-Trt) 수지와, 또는 커플링 시약으로서 O-벤조트리아졸-N,N,N,N-테트라메틸-우로늄-헥사플루오로-포스페이트(HBTU)를 사용하여 링크 아미드와 축합된다.

[0263] 다음번 커플링은 표준 Fmoc 프로토콜을 이용하여 N-메틸-2-피롤리디논(NMP) 중에서 2-(1H-7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸 유로늄 헥사플루오로포스페이트 메탄아미늄(HATU) 또는 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBoP), DIEA를 사용하여 수행된다. 아세틸히드록시드/N-메틸 말레이미드/디에텐 클로라이드(AcOH/NMM/DCE) 칵테일을 사용하여 Pd-트리페닐포스핀(테트라키스)에 의해 알릴옥시카르보닐(alloc) 기가 탈보호된다.

[0264] 고리화 단계는 표준 커플링 반응으로서(아미드 결합이 형성되는 경우) 또는 버블링 산소에 의해(디술피드 브릿지가 형성되는 경우) 수행된다. 본 분야에 알려진 다른 타입의 고리화 반응도 수행될 수 있다.

[0265] Cl-Trt 수지의 경우는 30분 동안 1,2-에탄디티올의 존재하에, 그리고 링크 아미드의 경우는 95% TFA, TIS 및 H_2O의 존재하에 1:98:1의 트리플루오로아세트산:디클로로메탄:트리이소프로필실란((TFA:DCM:TIS)으로 처리하여 수지로부터 펩티드가 절단된다.

[0266] 용액(AcOH/H_2O 1:1) 중의 조 생성물을 예비 HPLC 또는 MPLC에 의해 정제하여 순수한 고리형 펩티드를 수득한다. 분석 HPLC에 의해 순도를 결정한다. LC-MS 및 AA 분석에 의해 구조를 확인한다.

[0267] 다음번 단계는 고리형 펩티드 리드에 흡수 특성을 도입하기 위한 소수성 팔의 결합을 포함한다. 이 팔은 표준 SPPS 프로토콜을 사용하여 연결된다.

[0268] 도 17은 유화성 팔을 가진 고리형 펩티드 리드의 개발을 위한 과정을 개략적으로 나타낸 순서도를 나타낸다.

[0269] 실시예 5

[0270] 물 또는 유체 배지의 처리

[0271] 선택적으로 그리고 바람직하게, 상기 펩티드 및/또는 조성물 및/또는 생물은 물 및/또는 유체 배지, 또는 이러한 것을 함유하는 시스템 또는 장치를 처리하기 위해서 사용될 수 있으며, 이들은 역삼투 필터 및/또는 여과 장치 또는 시스템을 포함한다.

[0272] 여과 없이 플로우 셀에 들어 있는 폴리아미드 조각을 사용하여 생물막 형성에 대한 *Actiniaria* 추출물의 효과를 다음과 같이 시험한다. 생물막 성장의 효과를 RO(역삼투) 활성층인 유사한 폴리아미드 표면 위에서 공초점 현미경 전용 플로우 셀에서 분석한다. 이중 채널 플로우 셀(FC 270, Biosurface Technologies, 미국 몬타나)은 상이한 농도(ml 당 수 나노그램에서 수 마이크로그램까지)의 추출물로 보충된 지중해 바다의 선택된 장소에 놓인 역삼투(RO) 멤브레인 조각으로부터 취해진 실제 미생물 접종물과 모델 균주 양자에 대해 작동된다. 플로우 셀 안에서 흐름 양상은 층상이며, 전형적인 RO 작동상 흐름 상태와 유사하다. 모델 균주의 경우, 해수 합성 배지가 결정되고(예를 들어, Fritzmann et al., 2007: Fritzmann, C., Lowenberg, J., Wintgens, T., 및 Melin, T. (2007) 최신 역삼투 탈염 기술, Desalination 216:1-76) 및 IDE 보고서 http://www.ide-tech.tech.com/ 참조), 세포 부착 생물막 성장 실험에 사용된다. 팔마췸에 있는 탈염 플랜트로부터 분리된 미생물 조합에 대해서는, 실제 해수가 미생물 부착 및 생물막 성장 실험을 위한 배지로서 사용된다. *Vibrio fisheri*와 *Caulobacter crescentus*이 모델 균주로서 사용된다. 이중 채널 플로우 셀에서, 한 채널은 추출물로 보충하고, 다른 채널에는 배지에 용매만 첨가하여 대조군으로서 사용한다(예를 들어, 추출물이 에탄올에 용해될 경우).

[0273] 플로우 셀 생물막을 상이한 시점들(실험 14일까지)에서 현미경으로 분석하는데, 이때 생육성 세포, 죽은 세포 및 가외의 세포성 중합체 물질(EPS)을 형광 프로브(상이한 형광 표지된 렉틴들이 EPS의 상이한 다당 구성성분의 프로브로서 사용된다)로 염색하여 레이저 스캐닝 공초점 현미경(LSCM)으로 시각화한다. COMSTAT 및 Imaris bit-plane와 같은 영상 처리 분석 소프트웨어를 사용하여 현미경 분석을 수행한다(Heydorn et al, 2002: Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T. et al, (2002) *Pseudomonas aeruginosa* 생물막 발생의 통계적 분석: 경련성 이동, 세포-세포 신호화 및 정지상 시그마 인자 발현에 관련된 유전자에 생긴 돌연변이의 영향. Applied and Environmental Microbiology 68: 2008-2017).

[0274] 또, 생물막의 유착성 및 압축성에 대해 유의한 효과를 가진 칼슘을 모니터하고, Fura-2 같은 칼슘 특이적 형광색소를 사용하여 LSCM을 시각화한다(Grynkiewicz et al., 1985: Grynkiewicz, G., Poenie, M., 및 Tsien, R.Y. (1985) 형광 특성이 상당히 개선된 새로운 세대의 Ca2+ 인디케이터, Journal of Biological Chemistry 260:3440-3450; Neu et al., 2002: Neu, T.R., Kuhlicke, U., 및 Lawrence, J.R. (2002) 생물막의 2-광자 레이저 스캐닝 현미경검사를 위한 형광색소 평가, Applied and Environmental Microbiology 68:901-909).

[0275] 또한, 오염 방지 특성을 상이한 펩티드에 공유 결합된 QCM-D 표면-변형 결정을 사용하여 상이한 타입의 EPC/박테리아의 유착을 분석함으로써 시험한다.

[0276] QCM-D는 라벨을 부착할 필요 없이 질량 흡착을 실시간 모니터할 수 있는 디자인으로서, 잘 한정된 기하구조와 수력학적 특성을 가진 플로우 셀 안에 들어 있는 초-감음성 질량 센서(실리카-코팅된 석영 결정)을 사용한다. 압전 석영 결정은 석영 결정에 고정된 전극에 전압이 인가되면 1-2nm의 진폭으로 옆으로 진동한다. 결정 표면에 부착(흡착)이 일어남에 따라, 결정의 진동 주기가 이동하게 된다. 흡착된 질량을 결정하기 위해 주기 이동을 모니터하는 것에 더하여, 흡착된 층의 두께 및 구조적 입체형태가 소산된 에너지를 동시에 모니터함으로써 추출될 수 있으며, 이것은 진동 주기당 시스템 내에서 손실된 에너지의 총 합계이다. 흥미롭게도 상이한 환경 조건(즉, 이가 양이온 농도의 변화) 하에 상이한 타입의 EPS(즉, 다당류/단백질 함량의 변화)의 흡착 및 유착을 측정하는 것에 더하여, QCM-D 역시 침전된 나노-층의 점탄성 특성, 입체형태적 변화 및 두께를 드러낼 수 있다.

[0277] 실시예 6

[0278] 탈염 조건에서 역삼투 생물오염에 대한 활성 펩티드의 효과

[0279] 탈염 조건에서 역삼투 생물오염에 대한 *Actiniaria* 추출물의 효과를 결정한다.

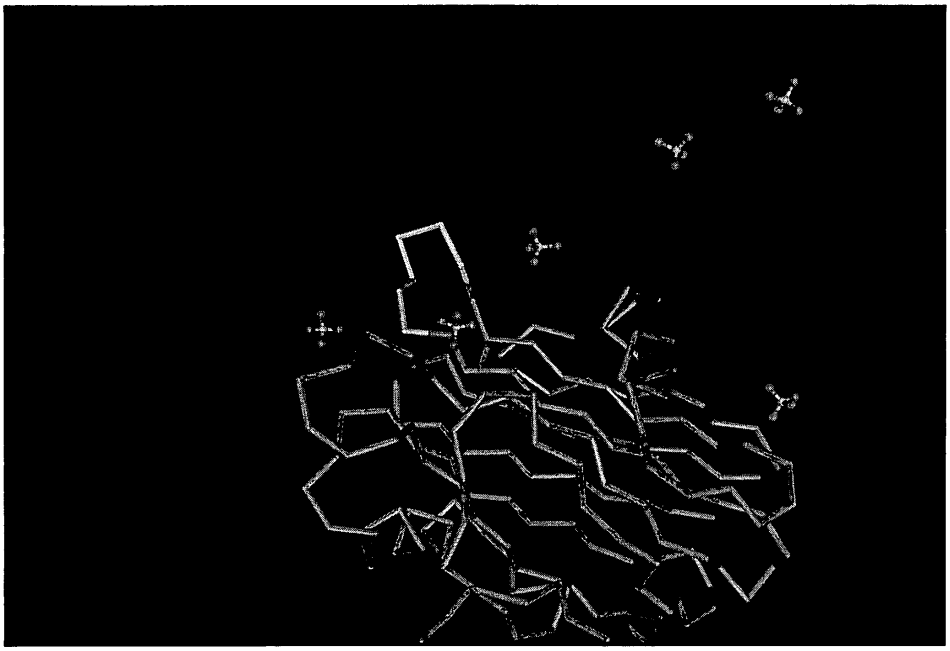
[0280] 2개의 RO(역삼투) 벤치-스케일 유닛을 해수 탈염을 위해 작동시키고, GES 탈염 플랜트(상기 언급된)로부터 분리된 미생물 조합과 후보 모델 균주 양자를 사용한 생물오염 실험을 합성 해수 배지와 실제 해수에서 수행한다. Dow-Filmtec의 상업용 플랫-시트 멤브레인 SW-30을 이 생물오염 실험에 사용한다. 과정 조건의 특정 값들을 구한다: 침투 플럭스, 총 유기 탄소(TOC), 침투물 및 간수 용액 중의 산소 농도, 산소 흡수율 및 멤브레인에 의한

상이한 이온 및 양이온의 거부. 상이한 생물막 성분들을 분석한다: 생물오염 층의 화학적 분석은 단백질, 탄수화물, 지질 및 DNA의 특성화를 포함할 것이다. 현미경 관찰 및 분석을 상기 언급된 대로 수행한다.

[0281] 본 발명은 제한된 수의 구체예와 관련하여 설명되었지만, 본 발명의 많은 변이형, 변형 및 다른 적용들이 이루어질 수 있다는 것이 인정될 것이다.

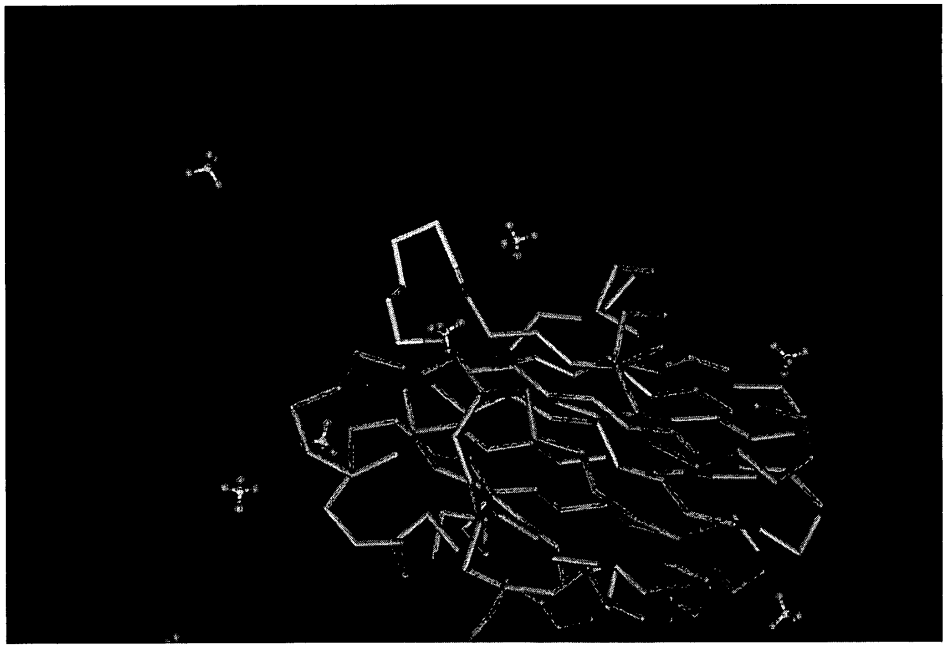
도면

도면1



1**GWY** 사슬 **A,** 공극-형성 세포용해소 스티콜리신 **Ii**의 수용성 상태의 결정 구조

도면2

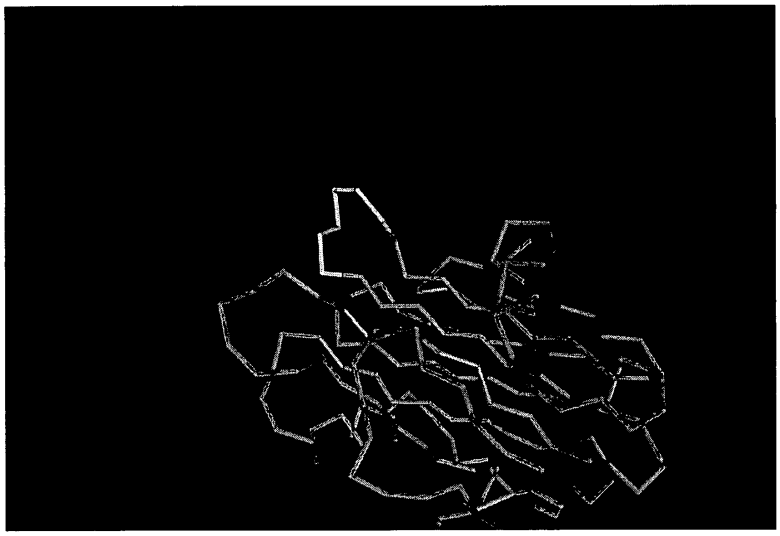


1**GWY** 사슬 **B,** 공극-형성 세포용해소 스티콜리신 **Ii**의
수용성 상태의 결정 구조

도면3

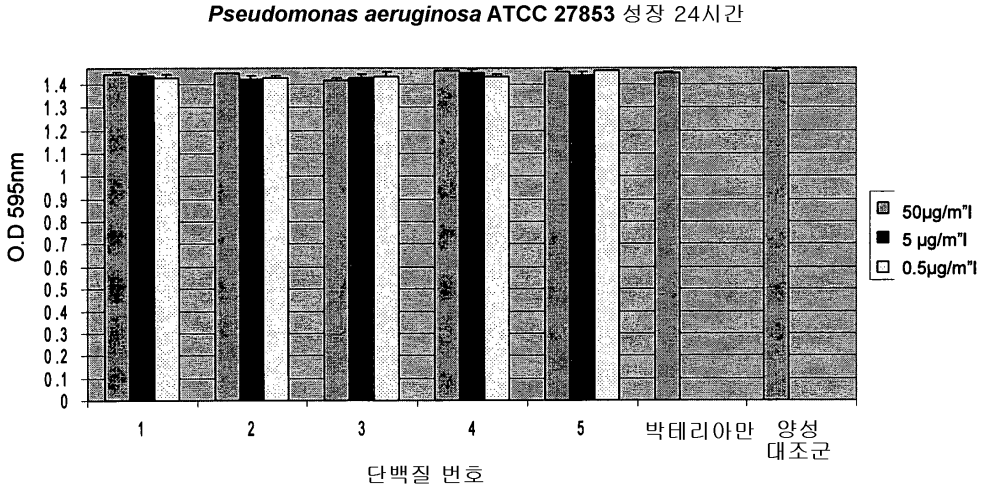
1**KD6** 사슬 **A,** 진핵 공극-형성 세포용해소
에퀴나톡신 **Ii**의 용액 구조

도면4



1TZQ 사슬 **A,** 에퀴나톡신 **Ii 8-69**
이중 시스테인 돌연변이체의 결정 구조

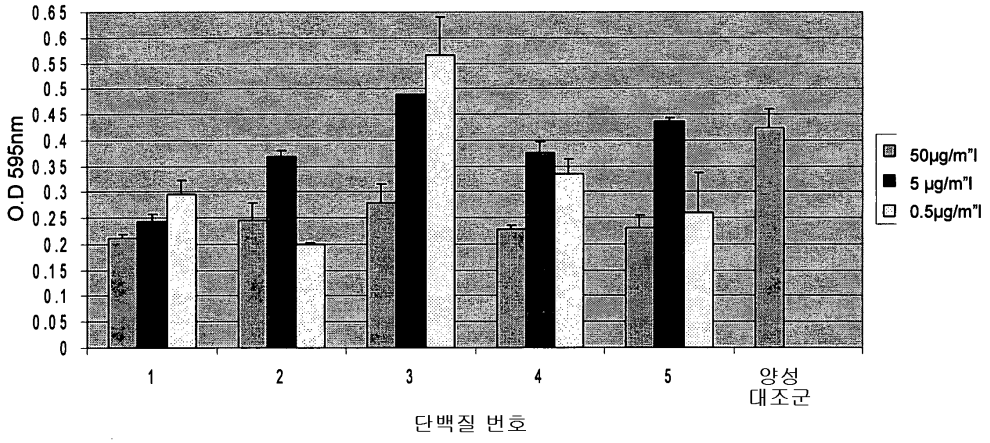
도면5



1- AbacZ-17C
2- AbacZ-17
3- AbacZ-16C
4- AbacZ-6
5- AbacZ-8C

도면6

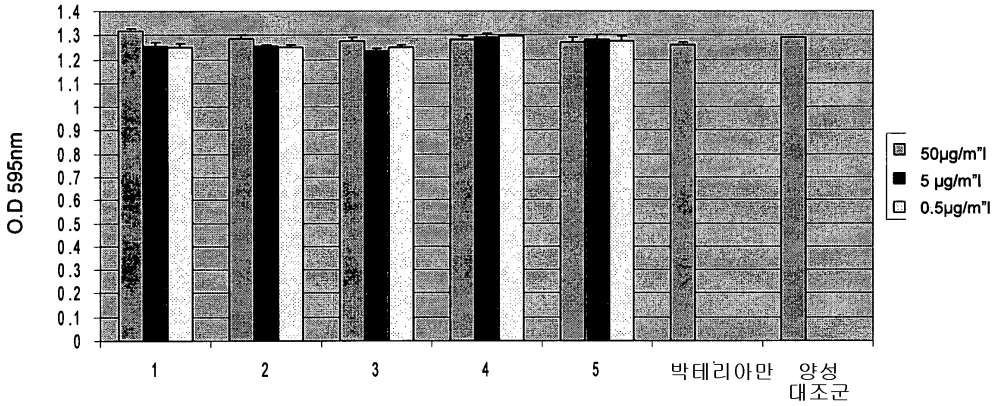
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 생물막 형성의 방지**



1- AbacZ-17C
2- AbacZ-17
3- AbacZ-16C
4- AbacZ-6
5- AbacZ-8C

도면7

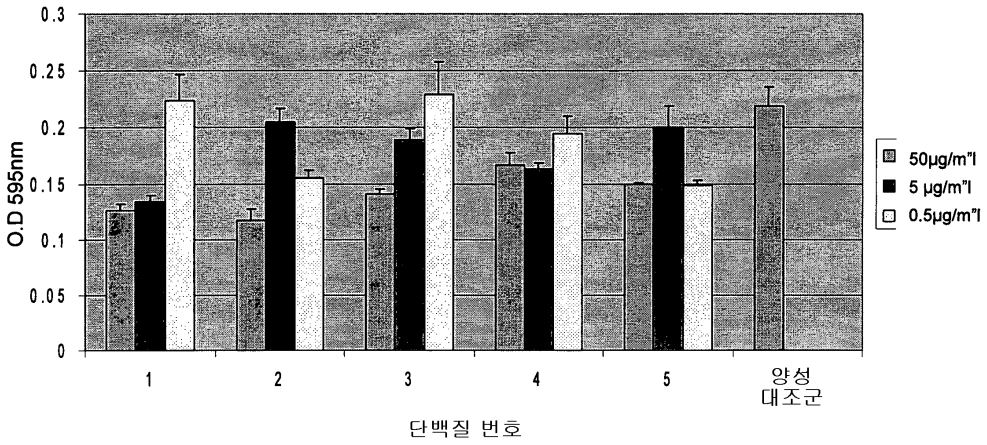
Acinetobacter Baumanni(임상 분리주) 성장 24시간



1- AbacZ-17C
2- AbacZ-17
3- AbacZ-16C
4- AbacZ-6
5- AbacZ-8C

도면8

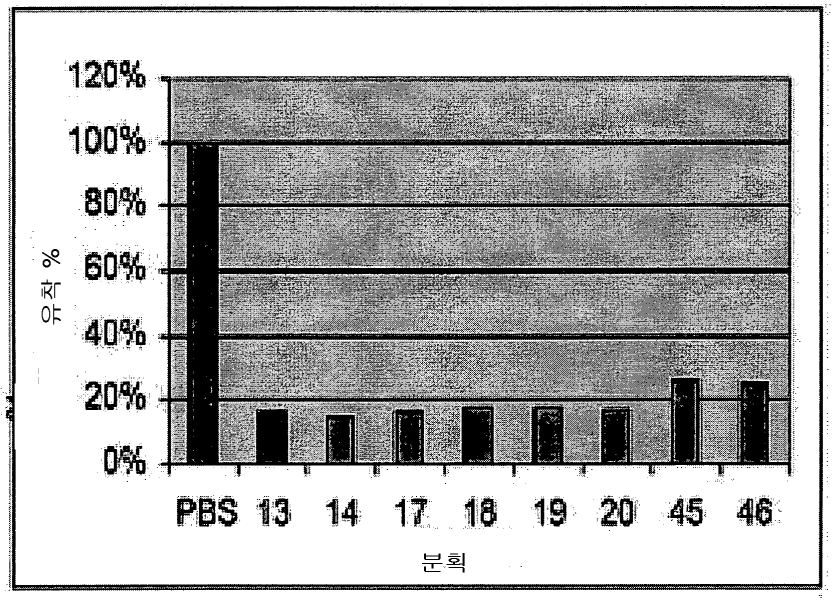
Acinetobacter Baumanni(임상 분리주) 생물막 형성의 방지



1- AbacZ-17C
2- AbacZ-17
3- AbacZ-16C
4- AbacZ-6
5- AbacZ-8C

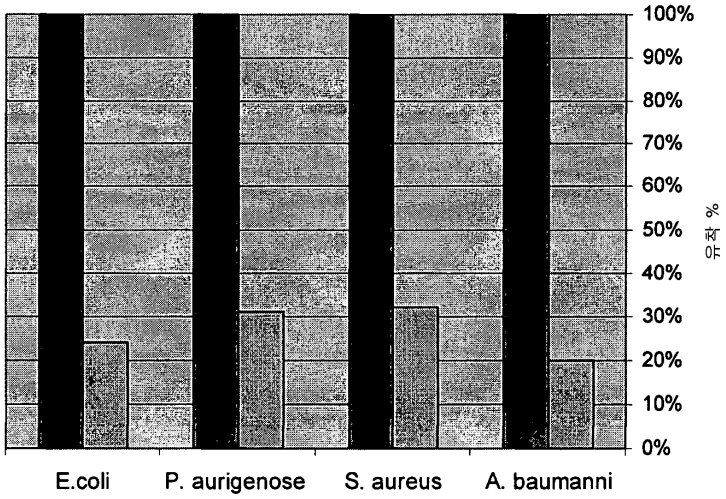
도면9

Actinia equina 분획들에 의한
Actinetobacter baumannii 생물막 형성의 방지



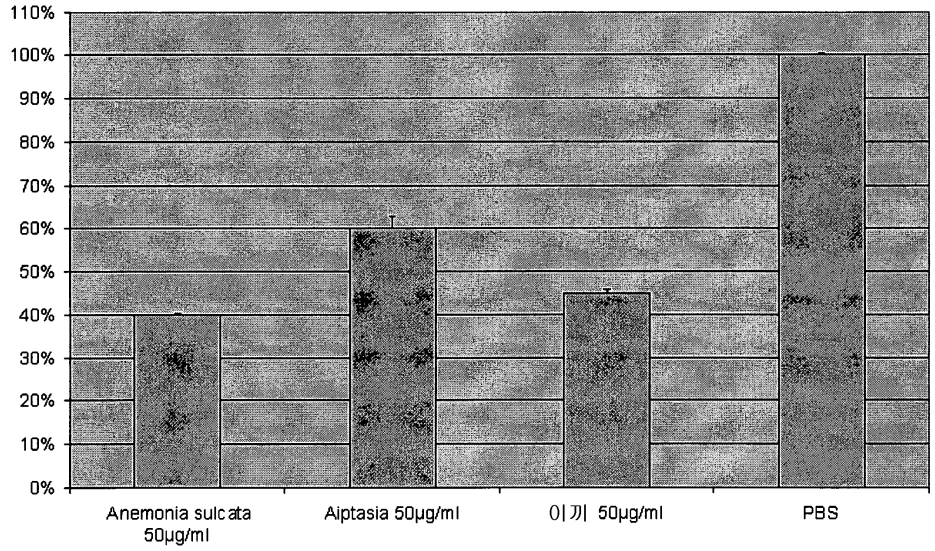
도면10

13번 분획에 의한 생물막 형성 방지



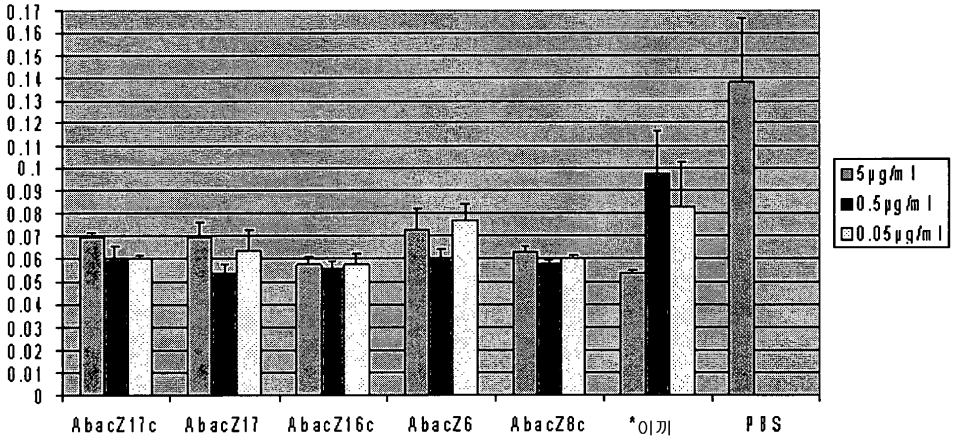
도면11

Anemonia, Aiptasia 및 ***Physcomitrella*** (이끼)에 의한
Pseudomonas aeruginosa 생물막 형성 방지



도면12

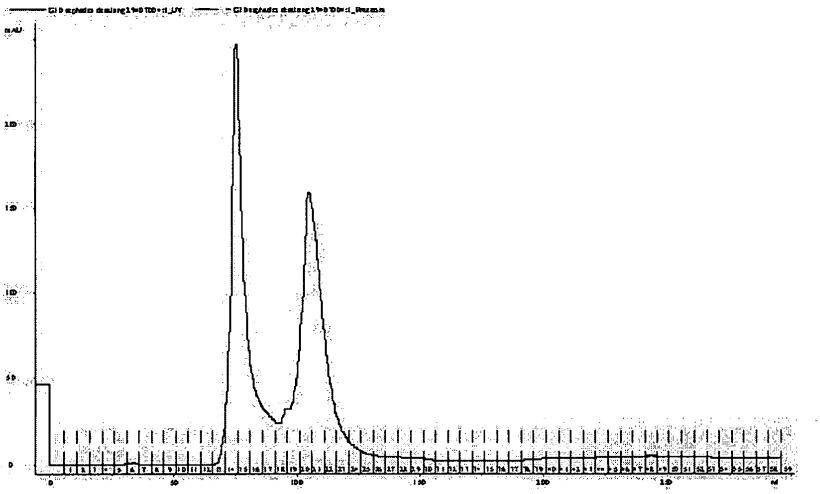
*S. a*에서 **AbacZ** 펩티드 및 이끼를 사용한 유착 방지 시험



* 이끼 농도는 50μg/ml, 5μg/ml 및 0.5μg/ml 이다.

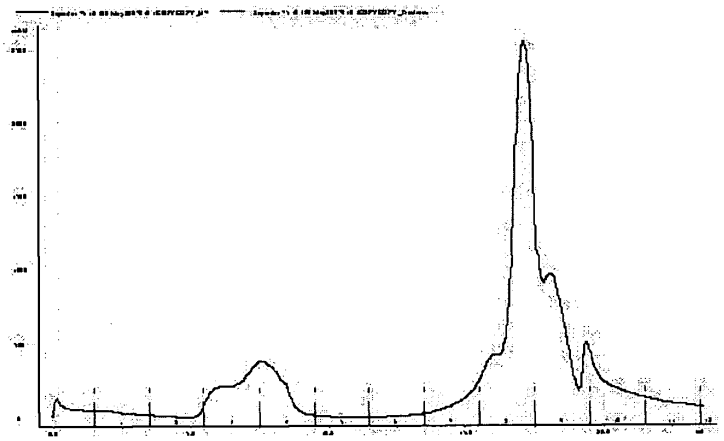
도면13

도 8

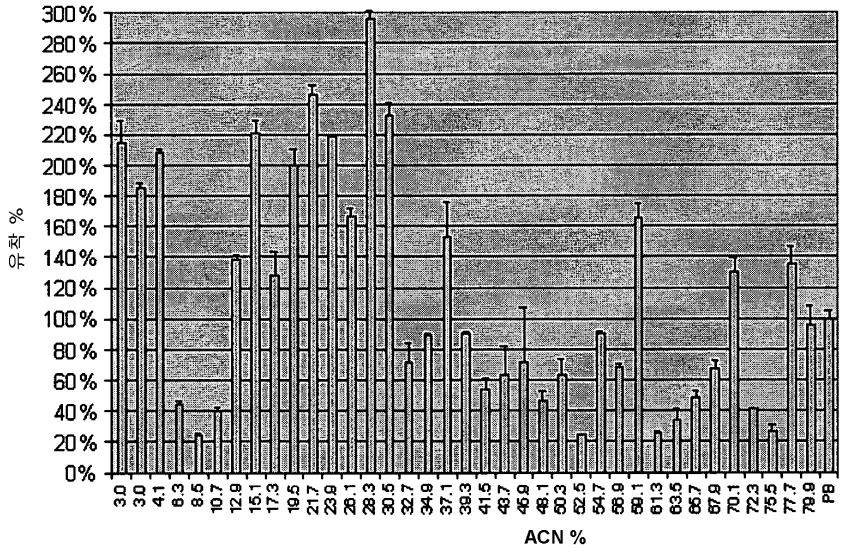


도면14

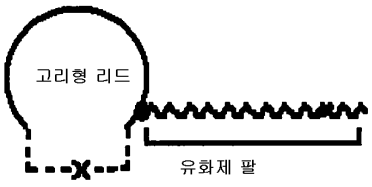
도 9



도면15

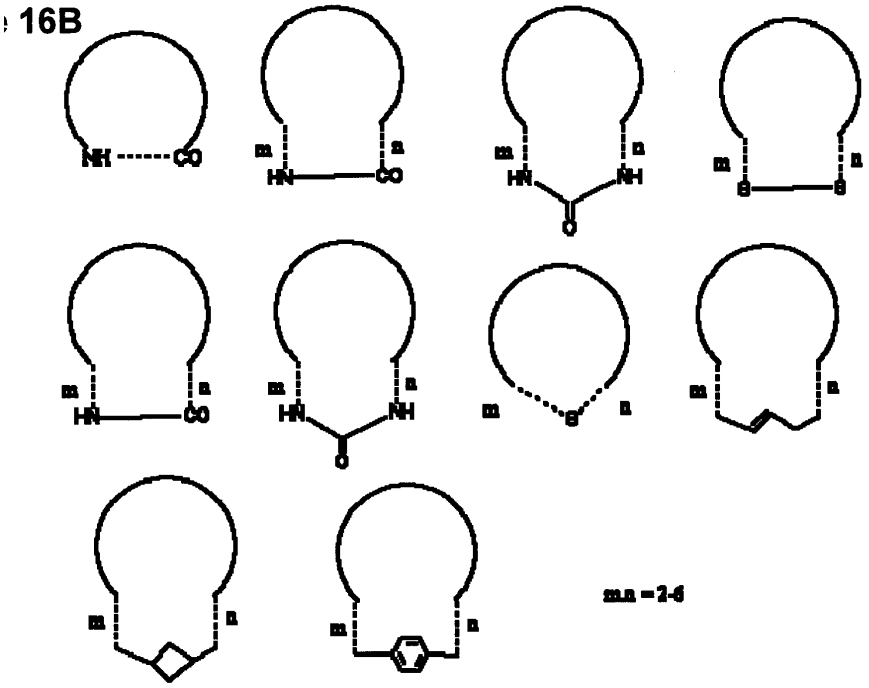

300%
280%
260%
240%
220%
200%
180%
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
유착 %
3.0
3.0
4.1
8.3
8.5
10.7
12.9
15.1
17.3
19.5
21.7
23.9
26.1
28.3
30.5
32.7
34.9
37.1
39.3
41.5
43.7
45.9
48.1
50.3
52.5
54.7
56.9
59.1
61.3
63.5
65.7
67.9
70.1
72.3
75.5
77.7
79.9
PB
ACN %

도면16a

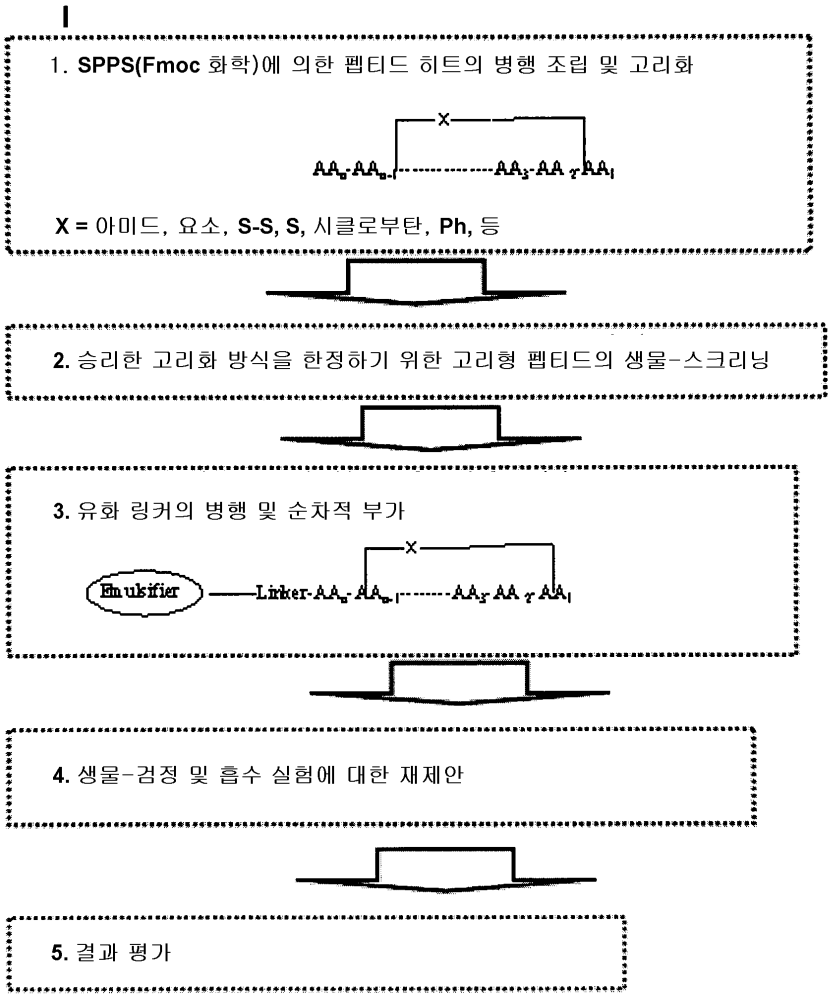


계획안 1: 유화제 팔을 가진 고리형 리드의 일반적 구조

도면16b



계획안 2: 고리화 전략

도면17

유화성 팔을 가진 고리형 펩티드 리드의 개발을 위한 순서도