

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029786

(43) 공개일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/415 (2006.01) A01N 37/46 (2006.01)

A01N 65/08 (2009.01) A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

A01N 37/46 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7040336

(22) 출원일자(국제) 2023년05월10일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년12월04일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/062397

(87) 국제공개번호 WO 2023/217847

국제공개일자 2023년11월16일

(30) 우선권주장

22172622.7 2022년05월10일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

카보스 내추럴스 엔브이

벨기에 1500 할레 브뤼셀스테엔베그 450

(72) 발명자

코프 가비

벨기에 1500 할레 브뤼셀스테엔베그 450

베르나르트 헤르비히

벨기에 1500 할레 브뤼셀스테엔베그 450

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

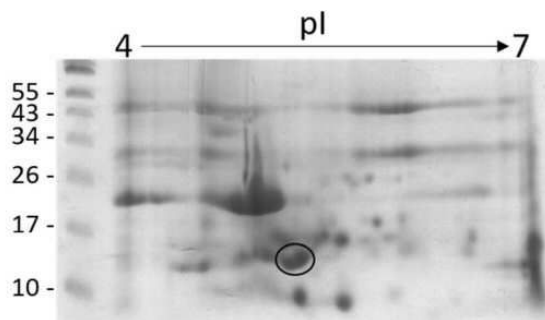
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 항미생물 활성을 갖는 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 가진 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 펩타이드를 포함하는 조성물뿐만 아니라 구체적인 용도를 개시한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A01N 65/08 (2013.01)
A01P 1/00 (2021.08)
A01P 3/00 (2021.08)
A61K 38/168 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 31/10 (2018.01)
C12N 15/8241 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)

(72) 발명자

울리히 마티아스

독일 28759 브레멘 캠퍼스 링 1

쿠네르트 니콜라이

독일 28759 브레멘 캠퍼스 링 1

쿠마리 네하

독일 01454 라테베르크 암 발 45씨

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 가지거나 또는 서열번호 2와 적어도 98%의 서열 동일성을 나타내거나 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 2개의 아미노산이 상이한 아미노산 서열을 가진, 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드가 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 펩타이드인, 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 펩타이드가 이의 N-말단에 신호 펩타이드를 포함하는 것인, 펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신호 펩타이드가 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 가지거나 또는 서열번호 3에 따른 서열을 가진, 펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 펩타이드가 항균 및/또는 항진균 활성을 가진, 펩타이드.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 활성이 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균, 바람직하게는 균사 진균 및 효모에 대한 것인, 펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 펩타이드가 테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*), 바람직하게는 테오브로마 카카오 변종 CCN-51로부터 유래 가능하거나 또는 단리된, 펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 펩타이드가 재조합 펩타이드 또는 합성 펩타이드인, 펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 펩타이드가 친화성 태그가 제공되어 있는 것인, 펩타이드.

청구항 10

서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 보이거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른

서열에 대해 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드; 및 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 펩타이드가 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 또는 서열번호 3에 따른 서열을 가진, 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 조성물이 액체, 반고체, 고체 또는 기체 형태이고/이거나, 상기 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 에어로졸, 페이스트, 시럽, 현탁액, 에멀전 또는 용액의 투여 형태(dosage form)인, 조성물.

청구항 13

치료학적 사용을 위한, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드 또는 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 펩타이드가 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 또는 서열번호 3에 따른 서열을 가진, 펩타이드 또는 조성물.

청구항 15

세균 및/또는 진균 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이의 치료에 사용하기 위한, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드 또는 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 펩타이드가 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 또는 서열번호 3에 따른 서열을 가진, 펩타이드 또는 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

상기 대상체가 사람 또는 동물인, 펩타이드 또는 조성물.

청구항 18

작물 보호에서, 사료 또는 식품 첨가물로서, 보존제로서, 오염 제거제로서 또는 화장품 적용에서, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드 또는 제10항 또는 제11항에 따른 조성물의 용도.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 펩타이드가 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 또는 서열번호 3에 따른 서열을 가진, 용도.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서,

상기 펩타이드 또는 조성물이 식물, 바람직하게는 작물에서 병원체를 방제하는 데 사용되는 것인, 용도.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 병원체가 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균의 균으로부터 선택되는 것인, 용도.

청구항 22

서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 수득하는 방법으로서,

상기 펩타이드가 제조합 펩타이드 또는 합성 펩타이드이거나, 테오브로마 카카오로부터 추출되거나 또는 침전되는 것인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 펩타이드가 코코아 콩 슬러리로부터 추출되는 것인, 방법.

청구항 24

서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖거나 또는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함하고, 선택적으로 N-말단 신호 펩타이드에 대한 서열을 포함하는 벡터로서,

상기 신호 펩타이드 서열은 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 가지며,

상기 벡터는 발현 시스템에서 상기 펩타이드의 발현을 가능하게 하도록 설계되어 있는 것인, 벡터.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물.

청구항 26

제25항의 유전자이식 식물을 생산하는 방법으로서,

상기 방법이 상기 펩타이드를 인코딩하는 핵산을 식물 세포 내로 도입하여 상기 펩타이드를 발현하는 형질전환 식물 세포를 생산하는 단계, 및 상기 형질전환 식물 세포를 유전자이식 식물로 재생하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드 또는 조성물로 코팅된 식물 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항미생물성 펩타이드의 기술 분야, 보다 구체적으로는 다양한 세균 및 진균 균주에 대해 항미생물 활성을 나타내는 천연 식물로부터 유래한 펩타이드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 코코아 식물 비실린 단백질로부터 유래된 천연, 제조합 또는 합성 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 식물, 동물 및 사람에서 세균 및 진균 감염의 치료를 위한 펩타이드의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세균의 항생제 내성은 식품 및 농업 산업, 의료 및 수의학계 등이 직면한 심각한 문제이다. 식용 동물로부터

사람 소비자로의 잠재적으로 치명적인 항생제 내성 세균의 전염 가능성이 특히 우려된다.

- [0003] 항생제 내성 세균의 발생 및 확산을 제어하기 위한 현재 방법은 항생제의 사용 및 다양한 항생제의 사용 패턴의 변화, 정부의 감시 및 규제 강화, 및 새롭고 개선된 항생제의 지속적 개발을 포함한다. 그러나, 항생제 사용에 적응하고 기존 항생제와 새로운 항생제에 대한 내성을 획득하는 대부분의 세균의 능력은 종종 이러한 통상적인 방법을 극복하며 세균에서 항생제 내성의 제어를 위한 대체 수단의 지속적 개발을 필요로 한다.
- [0004] 항미생물성 펩타이드(antimicrobial peptide: AMP)는 동물, 식물, 곤충 및 미생물에 존재하는 다양한 천연 화합물 그룹이다. 이들 펩타이드는 (다른) 미생물에 대한 방어를 담당하며, 이와 같이 화학 보존제에 대한 대체물로서 더욱 활용될 수 있다. 그러나, 식물, 사람 및/또는 동물의 미생물 감염 치료에서의 이들의 사용은 자연에서의 불충분한 입수 가능성 및 높은 생산 비용, 낮은 안정성, 및 적합한 치료 제품으로의 복잡한 제형화로 인해 현재까지 제한적이다. 따라서, 작물 보호뿐만 아니라 사람 및 수의학의 치료학적 적용에서의 항미생물성 펩타이드의 사용은 여전히 제한적이다.
- [0005] 항미생물성 단백질은 이의 활성과 안정성을 크게 결정하는 다양한 3차원 구조를 나타낸다. 특정 단백질의 안정성은 전형적으로는 입상 및/또는 산업적 적용을 위한 중요한 파라미터이다.
- [0006] AMP인 식물 유래된 분자의 초기 관심에 이어서, 최초의 식물 유래된 AMP인 푸로티오닌의 단리가 뒤따랐다. 문헌 [Caleya et al., Appl. Microbiol., 1972, 23(5) 998-100]은 슈도모나스 솔라나세아룸(*Pseudomonas solanacearum*), 크산토모나스 파세올리(*Xanthomonas phaseoli*), 크산토모나스 캄페스트리스(*X. campestris*), 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 및 5개의 코리네박테리움 균주와 같은 다수의 식물병원성 세균에 대해 효과적인 AMP로서 밀 및 보리 가루의 저분자량 단백질인 푸로티오닌을 보고하였다. 그 이후로, 티오닌(I ~ V형), 디펜신, 사이클로타이드, 2S 알부민 유사 단백질, 지질 전달 단백질을 비롯한 몇몇 주요 AMP 그룹이 발견되었다.
- [0007] 식물 비실린은 흔하게 발생하는 식물 종자 저장 단백질 클래스이다. 일부 비실린은 식물 방어 펩타이드를 생산하기 위해 처리되는 것으로 밝혀졌다. 비실린으로부터 생산된 가장 잘 특성화된 항미생물성 펩타이드는 마카다미아 인테그리폴리아(*Macadamia integrifolia*)의 것들이다. 마카다미아 너트 씨(kernel)는 N-말단 신호 서열에 인접한 212개 aa(아미노산)의 높은 친수성 영역을 포함하는 666개 aa의 비실린 단백질을 함유하고 있다.
- [0008] 국제공개공보 WO 1998/027805는 항미생물 특성을 갖는 비실린 유형 펩타이드 계열을 개시하고 있다. 프로토타입 단백질은 천연 기원이며, 마카다미아 인테그리폴리아뿐만 아니라, 테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*)를 비롯한 다른 종으로부터 단리된다. 특히, 47개 아미노산의 TcAMP1(테오브로마 카카오 항미생물성 단백질 1)과 60개 아미노산의 TcAMP2(테오브로마 카카오 항미생물성 단백질 2)로 표시된 2개의 서열은 566개 아미노산(aa)을 인코딩하는 코코아 비실린 종자 저장 단백질 유전자 서열로부터 유래되며, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*)에서 재조합적으로 발현되었다. 그러나, 단리된 재조합 펩타이드와 이로부터 제조된 조성물은 고용량(5 ~ 20 µg/ml)에서 유효한 항미생물 특성을 나타냈다.
- [0009] 문헌 [Marcus et al., Plant. Mol. Biol Rep (2008) 26, 75-87]은 바실린 종자 단백질의 N-인접 친수성 영역에서 식별된 3개의 마카다미아 인테그리폴리아 펩타이드 서열과 2개의 테오브로마 카카오 펩타이드 서열을 조사하였다. 펩타이드의 항미생물 활성은 N-말단에 인접한 친수성 영역에서 특유의 C-X-X-X-C-(10-12)-C-X-X-X-C 모티프의 존재에 근거하여 예측되었다. 추정 펩타이드의 His 태그된 버전은 에세리키아 콜라이에서 발현되었다. 수득된 재조합 펩타이드는 6개의 식물 병원체 균주에 대해 시험관내 항미생물 활성을 갖는 것으로 밝혀졌지만, 유효 용량은 매우 낮았다.
- [0010] 에콰도르는 전 세계 생산량의 약 50%를 차지하는 고급 향미 코코아의 가장 중요한 생산국이다. 에콰도르에서 생산되는 고급 향미 코코아 유형은 주로 나시오날 품종(때로는 나시오날 또는 아리바라로도 또한 호칭됨)에 속한다. 강한 향의 전통적인 나시오날 코코아 이외에도, 코코아 클론인 CCN-51은 1960년대부터 에콰도르에서 재배되었다. 나시오날과 달리, CCN-51은 약한 향 때문에 벌크 코코아 유형으로 간주된다. 그러나, 이는 다른 코코아 유형보다 기후 조건 변화에 대한 내성이 더 높고, 다양한 병원체에 대한 내성이 있고, 더 높은 수확량을 제공한다. 결과적으로, CCN-51 잡종은 에콰도르 농부에게 재배에 매우 인기가 있다. 미국 특허 출원 공개 US 2004/0172683은 코코아 향미를 담당하는 코코아 콩 종자의 몇몇 폴리펩타이드를 기재하고 있다.
- [0011] 코코아 향미 증진제로서 코코아와 초콜릿의 생산에 사용되는 비실린 유래된 펩타이드는 국제공개공보 WO 2002/086125 A2로부터 공지되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명은 광범위한 동물 및 식물 병원성 미생물에 대해 매우 효과적이고 활성을 갖는 코코아로부터 유래된 알려지지 않은 펩타이드를 기재한다. 펩타이드는 사용하기에 안전하고, 바람직하게는 독성이 있고 환경적으로 유해할 수 있는 공격적인 화학 물질을 함유하지 않는다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명 및 이의 실시 형태는 상기에서 언급된 단점 중 하나 이상에 대한 해결 방안을 제공하는 역할을 한다. 이를 위해, 본 발명은 제1항에 따른 항미생물 활성을 갖는 펩타이드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내는 펩타이드를 제공한다. 놀랍게도, 테오브로마 카카오로부터 수득될 수 있거나 재조합 또는 합성적으로 생산되는 이러한 펩타이드는 광범위한 병원체에 대해 항균 및/또는 항진균 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 펩타이드의 바람직한 실시 형태는 제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 나타나 있다.

[0014] 두 번째 양태에서, 본 발명은 제10항에 따른 펩타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물의 바람직한 실시 형태는 제11항 및 제12항에 나타나 있다.

[0015] 세 번째 양태에서, 본 발명은 제13항에 따른 치료학적 목적을 위한 펩타이드의 용도에 관한 것이다. 용도의 바람직한 실시 형태는 제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 나타나 있다. 보다 구체적으로, 펩타이드는 사람, 동물 또는 식물에서 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균, 바람직하게는 균사 진균 또는 효모에 의한 감염에 사용된다.

[0016] 네 번째 양태에서, 본 발명은 제22항 및 제23항에 따른 상기 펩타이드를 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0017] 다섯 번째 양태에서, 본 발명은 제24항에 따른 상기 펩타이드의 발현을 가능하게 하는, 펩타이드를 인코딩하는 유전자 서열을 포함하는 벡터, 제25항에 따른 유전자이식 식물 및 제26항에 따른 유전자이식 식물을 수득하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 마지막 양태에서, 본 발명은 제27항에 따른 상기 펩타이드로 코팅된 종자에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 2차원(2D) SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서의 분리 후 코코아 콩으로부터 분리된 단백질을 도시한 것이다. 수평 분리는 등전점(pI, pH 4 ~ 7)에 따라 이루어지며, 수직 분리는 분자량을 기준으로 한다. 강조된 스팟은 도 2a에 나타난 바와 같은 펩타이드 질량 지문 분석에 의해 분석되었다. 좌측 숫자는 참조 마커의 분자량(kDa)을 나타낸다.

도 2는 MALDI-ToF 분석에 의해 결정된 펩타이드 질량 지문 분석 단편의 검출 및 서열 위치에 대한 대표적인 방식을 도시한 것이다. 도 2a의 밑줄 친 아미노산 서열은 코코아 단백질의 2D SDS 폴리아크릴아미드 겔로부터 수득된 서열번호 1에 따른 펩타이드의 트립신 분해 생성물로서 식별되었다. 도 2b의 밑줄 친 아미노산 서열은 SDS 폴리아크릴아미드 겔로부터 수득된 서열번호 2에 따른 재조합 펩타이드의 트립신 분해 생성물로서 식별되었다.

도 3은 서열번호 2에 따른 펩타이드를 함유하는 샘플의 LC-MS 결과를 도시한 것이다. 검출된 펩타이드는 비환원 샘플(도 3a)과 환원 샘플(도 3b) 모두에서 15.3 kDa의 질량을 나타냈다.

도 4는 락테이트 탈하이드로게나아제(lactate dehydrogenase: LDH) 방출 어세이(assay)에 따른 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 및 HaCaT 세포에 대한 서열번호 2에 따른 펩타이드의 세포독성을 도시한 것이다. 각각의 실험은 1 시간 동안 상이한 농도의 펩타이드와 함께 인큐베이션된 10,000개의 세포로 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 의학적 또는 약제학적 사용을 위한 활성 성분으로서 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 아미노산 서열을 갖는다. 또한, 본 발명은 상기 펩타이드의 용도, 상기 펩타이드를 수득하는 방법 및 상기 펩타이드의 발현을 가능하게 하는 벡

터에 관한 것이다.

- [0021] 달리 정의되지 않는다면, 본 발명을 개시하는데 사용되는 기술 및 과학 용어를 비롯한 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 추가의 안내에 의해, 용어 정의는 본 발명의 교시를 보다 잘 이해하도록 포함된다.
- [0022] 본 출원에 사용되는 다음 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다:
- [0023] 본 출원에 사용되는 "한(a)", "하나(an)" 및 "상기(the)"는 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는다면 단수 및 복수의 지시 대상 모두를 지칭한다. 예로서, "한 구획(a compartment)"은 하나 또는 하나 초과와 구획을 지칭한다.
- [0024] 파라미터, 양, 시간적 지속 기간 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭하는 본 출원에 사용되는 "약(about)"은, 명시된 값의 또는 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 이하, 바람직하게는 $\pm 10\%$ 이하, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$ 이하, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$ 이하, 보다 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 이하의 변동이 본 개시된 발명에서 수행하기에 적절한 한, 이러한 변동을 포괄하는 것을 의미한다. 그러나, "약"이라는 수식어가 지칭하는 값 자체도 또한 구체적으로 개시되어 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0025] 본 출원에 사용되는 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)" 및 "포함한다(comprises)" 및 "~로 구성되는(comprised of)"은 "포함하다(include)", "포함하는(including)", "포함한다(includes)," 또는 "함유하다(contain)", "함유하는(containing)", "함유한다(contain)"와 동의어이고, 뒤에 오는 것, 예를 들어, 구성 요소의 존재를 명시하며 당해 분야에 공지되어 있거나 거기에 개시된 추가의 인용되지 않은 구성 요소, 특징, 요소, 구성원, 단계의 존재를 배제하거나 불가능하게 하지 않는 포괄적 또는 개방형 용어이다.
- [0026] 또한, 본 설명 및 청구범위의 첫 번째, 두 번째, 세 번째 등의 용어는 유사한 요소를 구별하는 데 사용되며, 달리 명시되지 않는다면 반드시 순차적 또는 시간적 순서를 기재하는 데 사용되는 것은 아니다. 이렇게 사용되는 용어는 적절한 상황 하에 상호 교환 가능하며, 본 출원에 기재된 본 발명의 실시 형태는 본 출원에 기재되거나 예시된 것과 다른 순서로 작동할 수 있음을 이해해야 한다.
- [0027] 종료점에 의한 수치 범위의 인용은 해당 범위 내에 포함된 모든 숫자 및 분수 뿐만 아니라 인용된 종료점을 포함한다.
- [0028] 여기에 및 본 설명 전반에 걸친 "중량%", "중량 퍼센트", "%wt" 또는 "wt%"라는 표현은, 달리 정의되지 않는다면, 제형의 전체 중량을 기준으로 개개의 구성 요소의 상대적 중량을 지칭한다.
- [0029] 구성원 그룹 중 하나 이상 또는 적어도 하나의 구성원(들)과 같은 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"라는 용어는 그 자체로 명확하지만, 추가의 예시에 의해, 상기 용어는 특히 상기 구성원 중 임의의 하나 또는 상기 구성원 중 임의의 2개 이상, 예를 들어, 상기 구성원 중 임의의 ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 또는 ≥ 7 등 및 상기 구성원 모두까지에 대한 언급을 포괄한다.
- [0030] 본 출원에 사용되는 "펩타이드"라는 용어는 하나의 아미노산 잔기의 카복실기 및 인접한 아미노산 잔기의 아미노기로부터 형성되는 아미드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 함유하는 임의의 화합물을 지칭한다. 아미노산 잔기는 L-형뿐만 아니라 D-형도 가질 수 있으며, 자연 발생 또는 합성, 선형뿐만 아니라 사이클릭일 수 있다.
- [0031] "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)"이라는 용어는 질환의 증상을 개선하는데 효과적인 양이다. 치료학적 유효량은, 예방(prophylaxis)이 요법으로 간주될 수 있으므로, "예방적 유효량(prophylactically effective amount)"일 수 있다.
- [0032] 본 출원에 사용되는 코코아 콩 "슬러리(slurry)"는 코코아 버터의 분리 후 분쇄된 코코아 님 덩어리(cocoa nibs mass)로서 정의된다.
- [0033] 달리 정의되지 않는다면, 본 발명을 개시하는데 사용되는 기술 및 과학 용어를 비롯한 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 추가의 안내에 의해, 본 설명에 사용되는 용어에 대한 정의는 본 발명의 교시를 더 잘 이해하도록 포함된다. 본 출원에 사용되는 용어 또는 정의는 단지 본 발명의 이해를 돕기 위해서만 제공된다.
- [0034] 본 명세서 전반에 걸친 "하나의 실시 형태" 또는 "한 실시 형태"에 대한 언급은, 실시 형태와 관련하여 기재된 특별한 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시 형태에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서

전반에 걸친 다양한 장소에서의 "하나의 실시 형태에서" 또는 "한 실시 형태에서"라는 문구의 출현은 모두 반드시 동일한 실시 형태를 지칭하는 것은 아니지만, 그럴 수도 있다. 또한, 특별한 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시 형태에서 본 개시 내용으로부터 당해 분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 본 출원에 기재된 일부 실시 형태는 다른 실시 형태에 포함된 일부 특징을 포함하지만 다른 특징을 포함하지 않는 반면, 상이한 실시 형태의 특징의 조합은 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이 본 발명의 범위 내에 있으며 상이한 실시 형태를 형성하는 것을 의미한다. 예를 들어, 하기 청구범위에서, 청구된 실시 형태 중 임의의 실시 형태는 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0035] 첫 번째 양태에서, 본 발명은 펩타이드에 관한 것이며, 여기서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80%의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 상기 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 보다 바람직하게는 100%의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 바람직한 한 실시 형태에서, 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0036] 본 출원에 사용되는 "서열 동일성(sequence identity)"이라는 용어는 서열이 비교 창을 통해 아미노산별 기준으로 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 비교 창을 통해 최적으로 정렬된 2개의 서열을 비교하고, 동일한 아미노산이 두 서열 모두에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치하는 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수(즉, 창 크기)로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 갭, 즉, 잔기가 한 서열에는 존재하지만 다른 서열에는 존재하지 않는 정렬의 위치는 비동일 잔기를 갖는 위치로서 간주된다. 서열 동일성의 백분율의 결정은 수동으로, 또는 당해 분야에서 이용 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 수행될 수 있다. 유용한 알고리즘의 한 예는 PILEUP이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공개적으로 이용 가능하다.

[0037] 또 다른 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열 중 하나와 최대 24개, 보다 바람직하게는 최대 23개, 보다 더 바람직하게는 최대 22개, 보다 더 바람직하게는 최대 21개, 보다 더 바람직하게는 최대 20개, 보다 더 바람직하게는 최대 19개, 보다 더 바람직하게는 최대 18개, 보다 더 바람직하게는 최대 17개, 보다 더 바람직하게는 최대 16개, 보다 더 바람직하게는 최대 15개, 보다 더 바람직하게는 최대 14개, 보다 더 바람직하게는 최대 13개, 보다 더 바람직하게는 최대 12개, 보다 더 바람직하게는 최대 11개, 보다 더 바람직하게는 최대 10개, 보다 더 바람직하게는 최대 9개, 보다 더 바람직하게는 최대 8개, 보다 더 바람직하게는 최대 7개, 보다 더 바람직하게는 최대 6개, 보다 더 바람직하게는 최대 5개, 보다 더 바람직하게는 최대 4개, 보다 더 바람직하게는 최대 3개, 보다 더 바람직하게는 최대 2개, 보다 더 바람직하게는 최대 1개의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 갖는다.

[0038] 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 갖거나 서열번호 2와 적어도 98%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 2에 따른 서열과 최대 2개의 아미노산이 상이하다.

[0039] 그렇지 않으면, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열 동일성을 갖는다.

[0040] 본 출원에 고려된 펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 치환, 삽입 또는 결실 변이체일 수 있다. 결실 변이체는 기능에 중요하지 않을 수 있는 펩타이드의 하나 이상의 잔기가 결핍되어 있다. 치환 변이체는 전형적으로는 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 대체 아미노산을 함유하며, 단백질 가수분해적 절단에 대한 안정성과 같은 폴리펩타이드의 하나 이상의 특성을 조절하도록 설계될 수 있다. 치환은 바람직하게는 보존적인데, 즉, 하나의 아미노산은 유사한 크기 및 측쇄 또는 작용기의 것으로 대체된다. 보존적 치환은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어, 알라닌에서 글리신, 발린 또는 류신으로의 변경; 아르기닌에서 라이신으로의 변경; 아스파라긴에서 글루타민으로의 변경; 아스파르트레이트에서 글루타메이트로의 변경; 시스테인에서 메티오닌으로의 변경; 글루타민에서 아스파라긴으로의 변경; 글루타메이트에서 아스파르트레이트로의 변경; 글리신에서 프롤린으로의 변경; 히스티딘에서 글루타민, 타이로신, 아르기닌, 라이신, 아스파라긴 또는 시스테인으로의 변경; 이소류신에서 류신 또는 발린으로의 변경; 류신에서 발린 또는 이소류신으로의 변경; 라이신에서 아르기닌으로의 변경; 페닐알라닌에서 타이로신, 류신 또는 메티오닌으로의 변경; 세린에서 트레오닌으로의 변경; 트레오닌에서 세린으로의 변경; 트립토판에서 페닐알라닌으로의 변경; 타이로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로의 변경; 및 발린에서 이소류신 또는 류신으로의 변경을 포함한다.

[0041] 바람직하게는, 본 발명의 펩타이드는 테오브로마 카카오로부터 유래되거나 단리된다. 보다 특히, 본 발명의 상

기 펩타이드는 테오브로마 카카오의 비실린 단백질의 N-말단 영역으로부터 유래된다. 비실린은 아나나스 코모수스(*Ananas comosus*), 아라키스 하이포가에아(*Arachis hypogaea*), 베타 불가리스(*Beta vulgaris*), 캡시쿰 안누움(*Capsicum annuum*), 캡시쿰 키넨세(*Capsicum chinense*), 카리아 일리노이넨시스(*Carya illinoensis*), 체노포디움 퀴노아(*Chenopodium quinoa*), 코르코루스 올리토리우스(*Corchorus olitorius*), 쿠쿠르비타 막시마(*Cucurbita maxima*), 프라가리아 베스카(*Fragaria vesca*), 고시피움 아르보레움(*Gossypium arboreum*), 헤라니아 움브라티카(*Herrania umbratica*), 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*), 자트로파 쿠르카스(*Jatropha curcas*), 주글란스 레지아(*Juglans regia*), 마카다미아 인테그리폴리아, 맥클레야 코르다타(*Macleaya cordata*), 무사 아쿠미나타(*Musa acuminata*), 파파베르 쉼니페룸(*Papaver somniferum*), 리시누스 코무니스(*Ricinus communis*), 솔라눔 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*), 스피나시아 올레라세아(*Spinacia oleracea*), 스테노카르푸스 시누아투스(*Stenocarpus sinuatus*), 테오브로마 카카오 및 제아 메이스(*Zea mays*)와 같은 몇몇 식물 중에 존재하고 특성화된 저장 단백질이다. 이러한 단백질은 전형적으로는 극도의 친수성 N-인접 영역과 C-말단 영역을 포함한다. 또한, 이들은 단백질 성숙 동안 일반적으로 제거되는 소수성 N-말단 신호 펩타이드를 가진 채로 생성된다. 상기 전구체 단백질의 N-인접 영역은 동일한 간격 패턴을 갖는 적어도 2개, 바람직하게는 4개 쌍의 시스템인 모티프(CXXXC)를 함유하고 있기 때문에 특히 흥미롭다.

[0042] 추가의 한 실시 형태에서, 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드는 테오브로마 카카오 변종 CCN-51로부터 유래된다. 놀랍게도, 미생물 감염에 대해 높은 내성을 갖는 것으로 공지된 카카오 변종 CCN-51은 비실린 유래된 N-말단 펩타이드가 특히 풍부한 것으로 밝혀졌다.

[0043] 또 다른 또는 추가 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 이의 N-말단에 신호 펩타이드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 신호 펩타이드는 서열번호 3에 따른 서열을 갖는다. 또 다른 실시 형태에서, 상기 신호 펩타이드는 서열번호 3과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 보다 바람직하게는 100%의 서열 동일성을 나타낸다. 그렇지 않으면, 상기 펩타이드는 서열번호 3의 서열과 최대 3개, 보다 바람직하게는 최대 2개, 보다 더 바람직하게는 1개의 아미노산 잔기가 상이한 신호 펩타이드 서열을 갖는다. 천연 공급원으로부터 단리된 비실린 단백질은 전형적으로는 상기 신호 펩타이드를 갖고 있지 않다. 놀랍게도, 신호 펩타이드가 펩타이드에 부가되었을 때, 이의 항미생물 활성은 증진된 것으로 밝혀졌다.

[0044] 또 다른 실시 형태에서, 펩타이드는 재조합 또는 합성 펩타이드이다. 에세리키아 콜라이와 같은 적합한 발현 시스템, 또는 당해 분야에 공지된 또 다른 적합한 시스템은, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 갖는 펩타이드에 대한 코딩 서열을 함유하는 벡터가 삽입되면, 펩타이드를 생성한다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 단백질/펩타이드 합성 방법이 본 발명의 펩타이드를 합성하기 위해 사용될 수 있다.

[0045] 추가 또는 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 이의 N-말단 및/또는 C-말단에 친화성 태그가 제공된다. 친화성 태그는 에세리키아 콜라이 및 다른 시스템에서 발현되는 재조합 단백질과 펩타이드의 친화성 정제에 사용된다. 상기 태그는 적어도 6개의 히스티딘(His) 잔기로 이루어진 아미노산 모티프인 폴리-히스티딘 태그일 수 있다.

[0046] 한 실시 형태에서, 신호 펩타이드를 함유하는 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드는 서열번호 4 또는 서열번호 5에 따른 서열 동일성을 갖는다.

[0047] 그렇지 않으면, 제한 없이, 펩타이드는 히스티딘과 글루타민 잔기를 번갈아 나오게 만드는 HQ 태그(HQHQQ), 히스티딘과 아스파라긴을 번갈아 나오게 만드는 HN 태그(HNNHNNHNNHNN), HAT 태그(KDHLIHNVHKEEHAHANK), ALFA 태그(SRLEEELRRRLTE), Avi 태그(GLNDIFEAQKIEWHE), C-태그(EPEA), 칼모듈린-태그(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSGAL), 폴리글루타메이트 태그, 폴리아르기닌 태그, E-태그(GAPVPYPDPLEPR), FLAG-태그(DYKDDDDK), HA-태그(YPYDVPDYA), Myc-태그(EQKLISEEDL), NE-태그(TKENPRSNQEESYDDNES), Rho1D4 태그(TETSQVAPA), S-태그(KETAAKFERQHMS), SBP 태그(DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRLARLEHHHPQGQREP) 또는 Strep-태그(WSHPQFEK)로 태그될 수 있다.

[0048] 본 발명의 펩타이드의 분석은 펩타이드가 항균 및/또는 항진균 활성을 가짐을 나타냈다.

[0049] 항미생물성 펩타이드 자체는 X선 결정학 또는 핵 자기 공명 기술을 사용하여 결정될 수 있는 특정한 3차원 구조를 갖는다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 이러한 구조는 상기 펩타이드의 관찰된 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 믿어진다. 본 발명의 펩타이드가 속하는 알파-나선형 식물 유래된 항미생물성 펩타이드(AMP)는 종종 주로 친수성인 나선의 한 면과 주로 소수성인 다른 면을 갖는 양친매성 나선을 갖는다. 이러한 구조는 세포막을 파괴하여 세포 내용물의 누출과 용해를 일으키는 AMP와 세포에 진입하여 세포 내의 다른 구조

를 공격하는 AMP에서 자주 발견된다. 알파-나선형 AMP는 일반적으로 용액 중에서 구조적으로 무질서해져 세포벽의 치밀한 망상의 통과를 용이하게 한다. 지질 머리 아래에 소수성이고 하전된 세포막에 결합하면, 단백질이 세포막을 관통하는 것을 가능하게 하는 2차 구조(알파-나선)를 형성한다. 이러한 질서/무질서 이행은 주로 알파-나선 내의 소수성 도메인의 길이에 의해 조절된다. 너무 긴 소수성 나선은 AMP 활성화에 부정적인 영향을 미치는 용액 내의 질서 구조를 초래한다.

[0050] 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및 진균, 바람직하게는 균사 진균 또는 효모에 대해 활성을 갖는다. 제한적이지는 않지만, 펩타이드는 아시네토박터 종, 바르토넬라 종, 보르데텔라 종, 보렐리아 종, 브루셀라 종, 캄필로박터 종, 클라미디아 종, 클로스트리듐 종, 코리네박테리움 종, 엔테로코커스 종, 엔테로박터 종, 에르위니아 종, 에세리키아 종, 프란시셀라 종, 헤모필루스 종, 헬리코박터 종, 클렙시엘라 종, 레지오넬라 종, 랩토스피라 종, 리스테리아 종, 마이코박테리움 종, 마이코플라스마 종, 나이세리아 종, 리케차 종, 살모넬라 종, 시겔라 종 스태필로코커스 종, 스트렙토코커스 종, 트레포네마 종, 우레아플라스마 종, 비브리오 종, 여시니아 종, 아시도보락스 종, 아그로박테리움 종, 아르트로박터 종, 바실러스 종, 부르크홀데리아 종, 클라비박터 종, 크로노박터 종, 쿠르토박테리움 종, 레피소니아 종, 판토에아 종, 페니바실러스 종, 펙토박테리움 종, 파이토플라스마 종, 프로테우스 종, 슈도모나스 종, 랄스토니아 종, 리조박터 종, 리조모나스 종, 로도코커스 종, 세라티아 종, 스피고모나스 종, 스피로플라스마 종, 스트렙토마이세스 종, 크산토모나스 종, 크실렐라 종 또는 크실로필루스 종을 포함하는 군으로부터 선택된 세균에 대해 활성을 갖는다.

[0051] 제한하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 펩타이드는 아젤로마이세스 종, 아스피질러스 종, 바시디오볼루스 종, 블라스토마이세스 종, 칸디다 종, 콕시디오이데스 종, 코니디오볼루스 종, 크립토코커스 종, 에몬시아 종, 히스토플라스마 종, 한세니아스포라 종, 라카지아 종, 파라콕시디오이데스 종, 뉴모시스티스 종, 스포르트릭스 종, 스타키보트리스 종, 탈라로마이세스 종, 아크로칼립마 종, 에시디움 종, 알보넥트리아 종, 알로두스 종, 알터나리아 종, 암포보트리스 종, 아피오스포리나 종, 아밀라리아 종, 블루메리아 종, 보트리오티니아 종, 보트리티스 종, 세라토시스티스 종, 콜레토티리쿰 종, 크립토스포리움시스 종, 엑소바시디움 종, 푸자리움 종, 하이포크레아 종, 랩토스파에리아 종, 마그나포르테 종, 펠람프소라 종, 메이에로지마 종, 모닐리니아 종, 미코스포렐라 종, 마이크로스포에라 종, 무코르 종, 페니실리움 종, 피키아 종, 파이토프토라 종, 사카로마이세스 종, 스포로볼로마이세스 종, 플라스모디오포라 종, 포도스포에라 종, 푸치니아 종, 피티움 종, 라이족토니아 종, 스클레로티니아 종, 셉토리아 종, 타프리카 종, 타나테포루스 종, 토룰라스포라 종, 유로마이세스 종, 우스틸라고 종, 벤틀리아 종 또는 버티실리움 종을 포함하는 군으로부터 선택된 진균에 대해 활성을 갖는다.

[0052] 두 번째 양태에서, 본 발명은 상기 단락에 기재된 바와 같은 펩타이드를 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 약제학적 및 수의학적 적용, 작물 보호 및/또는 화장품 적용에 특히 적합하다.

[0053] 한 실시 형태에서, 상기 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드 및 부형제를 포함한다.

[0054] 본 출원에 개시된 바와 같은 조성물의 일부 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 서열번호 3에 따른 서열을 갖는다.

[0055] 한 실시 형태에서, 조성물은 액체, 반고체, 고체 또는 기체이고/이거나, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 에어로졸, 페이스트, 시럽, 현탁액, 에멀전 또는 용액의 투여 형태(dosage form)이다. 상기 조성물의 비제한적 예는 가용성 분말, 가용성 과립, 습윤성 과립, 정제 제형, 건조 액상수화제(flowable), 수성 액상수화제, 습윤성 분산성 과립, 오일 분산물, 현탁 농축물, 분산성 농축물, 유화성 농축물, 수성 현탁액, 비료 과립 또는 스프레이 가능 조성물이다. 상기 조성물은 경구, 주사, 정맥내, 근육내, 피부, 흡입, 국소 또는 비강내 투여에 적합하도록 제형화될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 물체의 코팅, 스프레이 처리, 스프레이 코팅, 증발, 네블라이징(nebulising), 아토마이징(atomising), 현탁, 희석 등을 가능하게 하도록 제형화된다.

[0056] 일부 실시 형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다. 바람직하게는, 상기 부형제는 충전제, 결합제, 붕해제, 감미료, 코팅제, 윤활제 및/또는 활택제로부터 선택된다. 희석제 또는 충전제는 고체 조성물의 벌크를 증가시키며, 환자와 보호자가 조성물을 포함하는 투여 형태를 다루기에 보다 용이하도록 할 수 있다. 본 발명에 따른 정제에 적합한 희석제는, 예를 들어, 미세결정질 셀룰로오스(예를 들어, 아비셀®), 초미세 셀룰로오스, 락토오스, 전분, 예비젤라틴화 전분, 탄산칼슘, 황산칼슘, 설탕, 텍스트레이트, 텍스트린, 텍스트로오스, 이염기성 인산칼슘 2수화물, 삼염기성 인산칼슘, 카올린, 탄산마그네슘, 산화마그네슘, 말토덱스트린, 만니톨, 폴리메타크릴레이트(예를 들어, 유드라짓®), 염화칼륨, 분말화 셀룰로오스, 염화나트륨, 소르비톨 및 탈크를 포함한다.

- [0057] 정제와 같은 투여 형태로 압밀화된 고체 조성물은 압축 후 활성 성분과 다른 부형제를 함께 포함하는 데 도움이 되는 기능을 포함하는 부형제를 포함할 수 있다. 적합한 결합제는 아카시아, 알긴산, 카보머(예를 들어, 카보폴), 카복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 텍스트린, 에틸셀룰로오스, 젤라틴, 구아 검, 수소화 식물성 오일, 하이드록시 에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스(예를 들어, 클루셀®), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스(예를 들어, 메토셀®), 액체 글루코오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 말토덱스트린, 메틸셀룰로오스, 폴리메타크릴레이트, 포비돈(예를 들어, 콜리돈®, 플라스돈®), 예비젤라틴화 전분, 알긴산나트륨 및 전분을 포함한다.
- [0058] 압밀화된 고체 조성물의 용해 속도는 조성물에 대한 봉해제의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 적합한 봉해제는 알긴산, 카복시메틸 셀룰로오스 칼슘, 카복시메틸 셀룰로오스 나트륨(예를 들어, Ac-Di-Sol®, 프리멜로오스®), 콜로이드성 이산화규소, 크로스카멜로오스 나트륨, 크로스포비돈(예를 들어, 콜리돈®, 폴리플라스돈®), 구아 검, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 메틸셀룰로오스, 미세결정질 셀룰로오스, 플라크릴린 칼륨, 분말화 셀룰로오스, 예비젤라틴화 전분, 알긴산나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트(예를 들어, 익스플로 탭®) 및 전분을 포함한다.
- [0059] 활택제는 비압밀화된 고체 조성물의 유동성을 개선하고 투여 정확성을 개선하기 위해 첨가될 수 있다. 활택제로서의 기능을 할 수 있는 부형제는 콜로이드성 이산화규소, 삼규산마그네슘, 스테아르산마그네슘, 분말화 셀룰로오스, 전분, 탈크 및 삼염기성 인산칼슘을 포함한다.
- [0060] 정제와 같은 투여 형태가 분말화 조성물의 압밀화에 의해 제조될 때, 조성물은 펀치와 염료로 인한 압력을 받게 된다. 일부 부형제와 활성 성분은 펀치와 염료의 표면에 부착되는 경향이 있어 생성물에 오목부 형성 및 기타 표면 불규칙성을 갖게 할 수 있다. 윤활제는 접착력을 감소시키고 염료로부터 생성물의 방출을 용이하게 하도록 조성물에 첨가될 수 있다. 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 수소화 피마자유, 수소화 식물성 오일, 미네랄 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 나트륨 라우릴 설페이트, 나트륨 스테아릴 푸마레이트, 스테아르산, 탈크 및 스테아르산아연을 포함한다. 바람직하게는, 상기 윤활제는 0.25 내지 1 중량%(w/w)로 존재한다.
- [0061] 향미제와 향미 증진제는 환자가 투여 형태를 보다 맛있게 느낄 수 있도록 해준다. 본 출원에 기재된 바와 같은 조성물에 포함될 수 있는 약제학적 제품을 위한 일반적인 향미제와 향미 증진제는 말톨, 바닐린, 에틸 바닐린, 멘톨, 시트르산, 푸마르산, 에틸 말톨 및 타르타르산을 포함한다.
- [0062] 고체 조성물은 또한 외관을 개선하고/하거나 제품 및 단위 투여 수준의 환자 식별을 용이하게 하기 위해 임의의 약제학적으로 허용되는 착색제를 사용하여 염색될 수 있다.
- [0063] 한 실시 형태에서, 특히, 조성물이 농업적 사용으로 의도될 때, 상기 부형제는 농업적으로 적합한 부형제이다. 비히클로서 간주될 수 있는 "농업적으로 적합한 담체(agricultural compatible carriers)" 또는 "농업적으로 적합한 부형제(agricultural compatible excipients)"는 일반적으로 불활성이며 농업에서 허용 가능해야 한다. 따라서, "농업적으로 적합한(agriculturally compatible)"이라는 문구는 재배자의 식재 장비를 방해하지 않으며 경작 지역에서 작물 발달 또는 목적하는 생태적 균형에 부정적인 영향을 미치지 않고도 현장 조건 하에 일상적으로 사용될 수 있는 물질을 의미한다.
- [0064] 농업적으로 적합한 담체 또는 부형제는 고체일 수 있다. 고체 담체 또는 부형제는 점토, 천연 또는 합성 실리케이트, 실리카, 수지, 왁스, 고체 비료, 중합체, 과립 덩어리, 펠라이트, 펠라이트 과립, 토탄, 토탄 펠렛, 토양, 질석, 숯, 설탕 공장 탄산화 프레스 진흙, 왕겨, 카복시메틸 셀룰로오스, 고운 모래, 탄산칼슘, 밀가루, 명반, 전분, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈 또는 이의 조합을 포함할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 농업적으로 적합한 담체 또는 부형제는 액체일 수 있다. 액체 담체 또는 부형제는 물, 알코올, 케톤, 석유 유분, 오일, 방향족 또는 파라핀 탄화수소, 염소화 탄화수소, 액화 가스 또는 이의 조합을 포함할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 농업적으로 적합한 담체 또는 부형제는 분산제, 계면활성제, 첨가제, 증점제, 케이킹 방지제(anti-caking agent), 잔기 분해제, 퇴비화 제형, 과립 적용제, 구조토, 착색제, 안정화제, 보존제, 중합체, 코팅제 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 당해 분야의 통상의 기술자는 특정 화합물, 접종물이 적용될 식물, 토양 유형, 기후 조건, 접종물이 액체, 고체 또는 분말 형태인지 여부 등과 같은 요인을 고려하여 사용될 적절한 담체 또는 부형제를 용이하게 결정할 수 있다. 첨가제는 오일, 검, 수지, 점토, 폴리옥시에틸렌 글리콜, 테르펜, 점성 유기물, 지방산 에스테르, 황산화 알코올, 알킬 설포네이트, 석유 설포네이트, 알코올 설페이트, 나트륨 알킬 부탄 디아메이트, 나트륨 티오부탄트 디오에이트의 폴리에스테르, 벤젠 아세토니트릴 유도체, 단백질성 물질 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 단백질성 물질은 유제품,

밀가루, 대두박, 혈액, 알부민, 젤라틴 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 증점제는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 올리에이트 또는 이의 조합의 장쇄 알킬설포네이트를 포함할 수 있다. 계면활성제는 중질 석유 오일, 중질 석유 증류액, 폴리올 지방산 에스테르, 폴리에톡실화 지방산 에스테르, 아릴 알킬 폴리옥시에틸렌 글리콜, 알킬 아민 아세테이트, 알킬 아릴 설포네이트, 다가 알코올, 알킬 포스페이트 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 케이크화 방지제는 아황산나트륨, 황산나트륨, 모노메틸 나프탈렌 설포네이트의 나트륨 염 또는 이의 조합과 같은 나트륨 염; 또는 탄산칼슘, 규조토 또는 이의 조합과 같은 칼슘 염을 포함할 수 있다.

[0065] 한 실시 형태에서, 상기 조성물은 물, 다른 영양 물질, 약산, 식물성 오일, 정유, 대사 자극제, 유화제, 점도 조절제, 착색 물질, 현탁제, 분산제, 보존제, 착화제, 안정화제, 담체, 비히클 또는 습윤제, 또는 이의 임의의 조합 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 한 실시 형태에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 오일, 계면활성제 및 중합체를 추가로 포함한다.

[0066] 조성물은 통상적인 방식으로 제조될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 본 출원에 제공된 조성물은 미생물 활성을 억제하기 위한 하나 이상의 보존제를 포함한다. 적합한 보존제는 메르펜 및 티오메르살과 같은 수은 함유 물질; 안정화된 이산화염소; 및 염화벤잘코늄, 브롬화세틸트리메틸암모늄 및 염화세틸피리디늄과 같은 4차 암모늄 화합물을 포함한다.

[0067] 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 0.1 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 45 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 40 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 35 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 30 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 25 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 20 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 15 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 9 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 8 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 7 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 6 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 5 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 4 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 3 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 2 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 1 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 0.9 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.1 내지 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 바람직하게는 0.1 내지 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 조성물에 제형화될 수 있다.

[0068] 그렇지 않으면, 펩타이드는 0.2 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.3 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.4 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.5 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.6 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.7 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.8 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.9 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 1 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 2 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 3 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 4 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 5 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 6 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 7 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 8 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 9 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 10 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 15 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 0.5 내지 20 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 25 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 30 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 35 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 40 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 바람직하게는 45 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 조성물에 제형화될 수 있다.

[0069] 또 다른 실시 형태에서, 조성물은 적어도 0.1 중량%의 펩타이드, 보다 바람직하게는 적어도 0.5 중량%, 1 중량%, 2 중량%, 3 중량%, 4 중량%, 5 중량%, 6 중량%, 7 중량%, 8 중량%, 9 중량%, 10 중량%, 11 중량%, 12 중량%, 13 중량%, 14 중량%, 15 중량%, 16 중량%, 17 중량%, 18 중량%, 19 중량%, 20 중량%, 21 중량%, 22 중량%, 23 중량%, 24 중량%, 25 중량%, 26 중량%, 27 중량%, 28 중량%, 29 중량%, 30 중량%, 31 중량%, 32 중량%, 33 중량%, 34 중량%, 35 중량%, 36 중량%, 37 중량%, 38 중량%, 39 중량%, 40 중량%, 41 중량%, 42 중량%, 43 중량%, 44 중량%, 45 중량%, 46 중량%, 47 중량%, 48 중량%, 49 중량%, 50 중량%, 51 중량%, 52 중량%, 53 중량%, 54 중량%, 55 중량%, 56 중량%, 57 중량%, 58 중량%, 59 중량%, 60 중량%, 61 중량%, 62 중량%, 63 중량%, 64 중량%, 65 중량%, 66 중량%, 67 중량%, 68 중량%, 69 중량%, 70 중량%, 71 중량%, 72 중량%, 73 중량%, 74 중량%, 75 중량%, 76 중량%, 77 중량%, 78 중량%, 79 중량%, 80 중량%, 81 중량%, 82 중량%, 83 중량%, 84 중량%, 85 중량%, 86 중량%, 87 중량%, 88 중량%, 89 중량%, 90 중량%, 91 중량%, 92 중량%, 93 중량%, 94 중량%, 95 중량%, 96 중량%, 97 중량%, 98 중량%, 99 중량% 또는 99.5 중량%의 펩타이드를 포함한다.

[0070] 세 번째 양태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 치료학적 사용에 적합하다.

[0071] 한 실시 형태에서, 치료학적 사용을 위한 펩타이드 또는 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 포함한다.

[0072] 추가의 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포

함하거나 서열번호 3에 따른 서열을 갖는다.

- [0073] 본 출원에 기재된 "치료학적 사용(therapeutic use)"은 사람 또는 비사람 동물에서 질환의 증상을 개선하기 위한 펩타이드 또는 이의 조성물의 사용을 지칭한다. 본 출원에 제공된 치료 또는 사용 방법을 실시함에 있어서, 치료학적 유효량의 본 출원에 기재된 약제학적 조성물은 치료될 질환, 장애 또는 병태를 갖는 포유 동물 또는 비-포유 동물과 같은 대상체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 사람이다. 치료학적 유효량은 질환의 중증도, 대상체의 연령 및 상대적 건강, 사용된 치료제의 효능 및 기타 요인에 따라 크게 달라질 수 있다. 본 출원에 기재된 치료제와 일부 경우에는 조성물은 단독으로 또는 혼합물의 구성 요소로서 하나 이상의 치료제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0074] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균, 바람직하게는 균사 진균 또는 효모를 비롯한 광범위한 미생물에 기인하는 감염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 이의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물에 사용된다. 상기 대상체는 사람 또는 동물일 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 항미생물성 펩타이드 및 적합한 담체를 포함할 수 있다.
- [0075] 한 실시 형태에서, 세균 및/또는 진균 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이의 치료에 사용하기 위한 펩타이드 또는 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 포함한다.
- [0076] 추가의 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 서열번호 3에 따른 서열을 갖는다.
- [0077] 본 출원에 기재된 펩타이드 또는 조성물은 정맥내, 동맥내, 경구, 비경구, 협측, 국소, 경피, 직장, 근육내, 피하, 골내, 경점막, 흡입 또는 복강내 투여 경로를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 적절한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 본 출원에 기재된 조성물은 수성 액체 분산물, 자가 유화 분산물, 고체 용액, 리포솜 분산물, 에어로졸, 고체 투여 형태, 분말, 속방성 제형, 제어 방출 제형, 빠른 용융 제형, 정제, 캡슐, 환제, 지연 방출 제형, 연장 방출 제형, 박동성 방출 제형, 다중 미립자 제형, 및 속방성과 제어 방출의 혼합 제형을 포함할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 가축에서 잠재적 미생물 감염을 감소시키기 위해 동물 사료에 첨가될 수 있다. 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 펩타이드 또는 조성물은 수의학에서 미생물 감염을 치료하기 위해 경구, 국소 또는 비경구 투여용으로 제형화된다.
- [0079] 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 작물 보호에서, 사료 또는 식품 첨가물로서, 약제학적 용도를 위해, 보존제로서 및/또는 오염 제거제로서 사용하기에 적합하다.
- [0080] 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드 또는 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 포함한다.
- [0081] 추가의 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 서열번호 3과 적어도 95%의 서열 동일성을 가진 신호 펩타이드를 포함하거나 서열번호 3에 따른 서열을 갖는다.
- [0082] 작물 보호에 사용될 때, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 상기에 기재된 실시 형태에 따른 농업적으로 적합한 담체 또는 농업적으로 적합한 부형제와 함께 제형화된다. 당해 분야의 통상의 기술자는 처리 작물과 표적화 병원체의 함수에서 상기 조성물의 올바른 용량, 형태 및 적용 방법을 결정할 것이다.
- [0083] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 펩타이드 또는 조성물은 사료 및 식품을 통한 병원체 확산을 방지하기 위해 사료 또는 식품 첨가물에 통합된다. 사료는 동물의 건강과 복지에 유해한 병원체를 옮길 수 있는 것으로 공지되어 있다. 포름알데하이드와 같은 소독 제품은 일반적으로 사료를 소독하는 데 사용되지만, 이들 제품은 결국 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 본 출원에 기재된 바와 같은 항미생물성 펩타이드는 안전한 대체물이다.
- [0084] 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 표면, 도구, 기구, 디바이스, 물체 또는 신체 부위의 오염 제거제 또는 소독제로서 사용되기에 적합하다. 한 실시 형태에서, 이러한 디바이스 또는 물체는 린넨, 천, 플라스틱, 라텍스 직물, 천연 고무, 이식 가능 디바이스, 표면 또는 보관 용기를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특별한 한 실시 형태에서, 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 세정제, 세제(detergent), 비누 또는 스프레이에 통합된다.
- [0085] 특정 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 다양한 건강 관리 제품, 특히, 화장품에도 통합될

수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 구강 또는 피부의 미생물 콜로니화 또는 재확립을 감소시키거나 예방하기 위해 치약, 구강 세정제, 샴푸, 비누, 크림 또는 발한 억제제에 통합될 수 있다.

[0086] 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 및 조성물은 식품, 사료, 화장품 또는 약제학적 보존제로서, 또는 식료품을 처리하여 잠재적 병원체 또는 오염 물질을 제어, 감소 또는 제거하는 데 사용될 수 있다.

[0087] 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 식물, 바람직하게는 작물에서 병원체를 방제하는 데 사용되며, 여기서, 상기 병원체는 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균, 바람직하게는 균사 진균 또는 효모이다. 상기 식물은 사료작물(fodder) 또는 풀사료(forage) 콩과 식물, 관상용 식물, 식용 작물, 나무 또는 관목을 비롯한 단자엽 또는 쌍자엽 식물일 수 있다. 한 실시 형태에서, 상기 식물은 바람직하게는 작물이다. 바람직하게는, 상기 식물은 하기 식물 사이의 자손 및 잡종을 비롯하여, 에이서 종, 악티니디아 종, 아벨모스쿠스 종, 아가베 시살라나(*Agave sisalana*), 아그로피론 종, 아그로스티스 스톨로니페라(*Agrostis stolonifera*), 알리움 종, 아마란투스 종, 암모필라 아레나리아(*Ammophila arenaria*), 아나나스 코모수스, 아노나 종, 아피움 그라베올렌스(*Apium graveolens*), 아라키스 종, 아르토카르푸스 종, 아스파라거스 오퍼시날리스(*Asparagus officinalis*), 아베나 종, 아베로아 카람볼라(*Averrhoa carambola*), 밤부사 종, 베닌카사 히스피다(*Benincasa hispida*), 베르톨레티아 엑셀세아(*Bertholletia excelsa*), 베타 불가리스, 브라시카 종, 카다바 파리노사(*Cadaba farinosa*), 카멜리아 시넨시스(*Camellia sinensis*), 칸나 인디카(*Canna indica*), 칸나비스 사티바(*Cannabis sativa*), 캅시쿰 종, 카렉스 엘라타(*Carex elata*), 카리카 파파야(*Carica papaya*), 카리사 마크로카르파(*Carissa macrocarpa*), 카리아 종, 카르타무스 텅토리우스(*Carthamus tinctorius*), 카스타네아 종, 세이바 펜탄드라(*Ceiba pentandra*), 시코리움 엔디비아(*Cichorium endivia*), 시나모뎀 종, 시트룰루스 라나투스(*Citrullus lanatus*), 시트러스 종, 코코스 종, 코페아 종, 콜로카시아 에스쿨렌타(*Colocasia esculenta*), 콜라 종, 코르코루스 종, 코리안드룸 사티BUM(*Coriandrum sativum*), 코틸루스 종, 크라테구스 종, 크로커스 사티부스(*Crocus sativus*), 쿠쿠르비타 종, 쿠쿠미스 종, 시나라 종, 다우쿠스 카로타(*Daucus carota*), 데스모디움 종, 디모카르푸스 롱안(*Dimocarpus longan*), 디오스코레아 종, 디오스피로스 종, 에키노클로아 종, 엘라에이스 종, 엘레우시네 코라카나(*Eleusine coracana*), 에라그로스티스 테프(*Eragrostis tef*), 에리안투스 종, 에리오보트리아 자포니카(*Eriobotrya japonica*), 유칼립투스 종, 유제니아 유니플로라(*Eugenia uniflora*), 파고피룸 종, 파구스 종, 페스투카 아룬디나세아(*Festuca arundinacea*), 피쿠스 카리카(*Ficus carica*), 포르투넬라 종, 프라가리아 종, 징크고 빌로바(*Ginkgo biloba*), 글리신 종, 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 헬리안투스 종, 헤메로칼리스 풀바(*Heemerocallis fulva*), 히비스쿠스 종, 호르데움 종, 이포모에아 바타타스(*Ipomoea batatas*), 주글란스 종, 락투카 사티바(*Lactuca sativa*), 라티루스 종, 렌스 쿨리나리스(*Lens culinaris*), 리눔 유시타티시뎀(*Linum usitatissimum*), 리치 치넨시스(*Litchi chinensis*), 로투스 종, 루파 아쿠탕굴라(*Luffa acutangula*), 루피누스 종, 루줄라 실바티카(*Luzula sylvatica*), 라이코페르시콘 종, 마크로틸로마 종, 말루스 종, 말피기아 에마르기나타(*Malpighia emarginata*), 맘메아 아메리카나(*Mammea americana*), 망기페라 인디카(*Mangifera indica*), 마니호트 종, 마닐카라 자포타(*Manilkara zapota*), 메디카고 사티바(*Medicago sativa*), 멜릴로투스 종, 멘타 종, 미스칸투스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*), 모모르디카 종, 모루스 니그라(*Morus nigra*), 무사 종, 니코티아나 종, 올레아 종, 오피온티아 종, 오르니토피스 종, 오리자 종, 파니쿰 밀리아세움(*Panicum miliaceum*), 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*), 파시플로라 에둘리스(*Passiflora edulis*), 파스티나카 사티바(*Pastinaca sativa*), 페니세툼 종, 페르세아 종, 페트로셀리눔 크리스툼(*Petroselinum crispum*), 팔라리스 아룬디나세아(*Phalaris arundinacea*), 파세올루스 종, 플레움 프라텐세(*Phleum pratense*), 포에닉스 종, 프라그미테스 오스트랄리스(*Phragmites australis*), 피살리스 종, 피누스 종, 피스타치아 베라(*Pistacia vera*), 피습 종, 포아 종, 포폴루스 종, 프로소피스 종, 프루누스 종, 프시다움 종, 푸니카 그라나툼(*Punica granatum*), 피루스 코무니스(*Pyrus communis*), 쿠에르쿠스 종, 라파누스 사티부스(*Raphanus sativus*), 레움 라바르바룸(*Rheum rhabarbarum*), 리베스 종, 리시누스 코무니스, 루부스 종, 사카룸 종, 살릭스 종, 삼부쿠스 종, 세칼레 세레알레(*Secale cereale*), 세사뎀 종, 시나피스 종, 솔라눔 종, 소르굼 비콜로르(*Sorghum bicolor*), 스피나시아 종, 시지기움 종, 타게테스 종, 타마린두스 인디카(*Tamarindus indica*), 테오브로마 카카오, 트리폴리움 종, 트립사쿰 닥틸로이데스(*Tripsacum dactyloides*), 트리티코세칼레 림파우이(*Triticosecale rimpaui*), 트리티쿰 종, 트로페올룸 미누스(*Tropaeolum minus*), 트로페올룸 마주스(*Tropaeolum majus*), 바시니움 종, 비시아 종, 비그나 종, 비올라 오도라타(*Viola odorata*), 비티스 종, 제아메이스, 지자니아 팔루스트리스(*Zizania palustris*), 지지푸스 종의 그룹에 속한다.

[0088] 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드 또는 조성물은 식물, 식물 일부, 또는 상기 식물을 포함하거나 숙주하는 기질(substrate)에 도입되어 상기 식물에 병원체 내성 또는 병원체 방제를 부여하기에 적합하다. 상기 도입은

인위적일 수 있다.

- [0089] 펙타이드 또는 이의 조성물을 식물에 도입하는 방법은 식물 및/또는 식물 일부 및/또는 상기 식물이 성장하는 성장 배지의 처리, 종자의 접종, 종자의 코팅, 식물 또는 식물 일부의 직접 접종, 식물 또는 식물 일부(예를 들어, 이삭)의 스프레이 처리 또는 습윤 처리를 포함할 수 있다. 적절한 방법을 펙타이드 또는 조성물을 도입할 식물의 유형에 따라 선택할 수 있다.
- [0090] 또 다른 비제한적 예로서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펙타이드 또는 조성물을 코팅의 형태로 적용할 수 있다. 종자 상에 스프레이하거나 펙타이드 또는 조성물을 함유하는 용액에 상기 종자를 침지시킴으로써 코팅을 종자에 적용할 수 있다. 또 다른 예로서, 이전 예에 기재된 바와 같이 종자를 용액으로 코팅하기 위해, 결합제, 예를 들어, 탄화물(탄산 칼슘)을 포함하는 결합제를 첨가할 수 있다.
- [0091] 실시 형태에서, 벗겨지거나 미처리된 식물 일부에 코팅을 적용할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 코팅을 이전에 처리된 식물 일부에 오버코트로서 적용할 수 있다. 종자 코팅은 토양 매개성 진균 질환의 치료에 특히 바람직하다. 실시 형태에서, 벗겨지고 미처리된 종자에 종자 코팅을 적용할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 이전에 처리된 종자에 종자 오버코트로서 종자 코팅을 적용할 수 있다.
- [0092] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펙타이드 또는 조성물을 토양, 또는 상기 식물이 자라는 임의의 다른 기질에 적용하여 상기 기질로부터 해충 및/또는 병원체를 제거할 수 있다.
- [0093] 상기 식물 또는 식물 일부를 포함하거나 숙주하는 기질의 접종은, 예로서 그리고 제한하려는 의도 없이, 기질에 적용되는 분말, 과립, 펠렛, 플러그 또는 토양관주를 사용하여 수행될 수 있다. 접종을 또한 엽면 스프레이 또는 액체 조성물과 같은 액체시용에 의해 수행할 수 있다. 시용을 성장하는 식물 또는 기질에 적용할 수 있다. 식물, 특히, 농업 식물을 기질에서 재배할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 상기 기질은 토양, 모래, 자갈, 다당류, 뿌리 덮개, 퇴비, 토탄 이끼, 질, 통나무, 점토 또는 이의 조합이다. 또 다른 실시 형태에서, 기질은 또한 수경 재배 시스템 또는 시험관내 배양 시스템을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 상이한 적용 방법의 조합을 적용한다.
- [0094] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펙타이드 또는 조성물은 병원체 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용하기에 적합하며, 여기서, 병원체는 이전 실시 형태 중 임의의 실시 형태에 기재된 바와 같은 그람 양성균, 그람 음성균 및/또는 진균으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0095] 본 출원에 개시된 바와 같은 발명은 또한 이전 실시 형태 중 임의의 실시 형태에 기재된 펙타이드 또는 조성물로 코팅된 식물 종자에 관한 것이다.
- [0096] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 출원에 개시된 바와 같은 펙타이드를 수득하는 방법에 관한 것이며, 여기서, 상기 펙타이드는 재조합 펙타이드 또는 합성 펙타이드이거나, 테오브로마 카카오로부터 추출되거나 침전된다.
- [0097] 한 실시 형태에서, 본 출원에 개시된 바와 같은 방법은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펙타이드를 수득하는 방법으로서, 상기 펙타이드는 재조합 펙타이드 또는 합성 펙타이드이거나, 테오브로마 카카오로부터 추출되거나 침전된다.
- [0098] CCN-51 테오브로마 카카오 변종은 높은 수준의 본 발명의 펙타이드를 가지므로, 적합한 추출 및 침전 기법에 이어 최적화된 크로마토그래피 기법과 종래 기술에 공지된 다른 방법을 사용하여 CCN-51 코코아 콩으로부터 경제적으로 정제될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 항미생물 활성을 나타내는 펙타이드의 단리를 위해 CCN-51 코코아 콩, 특히, 발효되지 않은 CCN-51 코코아 콩의 직접적 가치 창출을 위한 해결 방안을 제공한다.
- [0099] 바람직한 한 실시 형태에서, 발효되지 않은 카카오 콩 및/또는 발효 및 건조된 카카오 콩을 본 출원에 개시된 바와 같은 펙타이드의 추출에 사용한다. 또 다른 실시 형태에서, 임의의 유형의 테오브로마 카카오 조직/기관을 추출하여 본 발명의 펙타이드를 수득한다. 카카오 열매(cacao pod) 및/또는 카카오 콩 껍질, 잎, 줄기 및 뿌리는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고도 본 발명의 펙타이드의 추출을 위한 식물 재료로서 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 개시된 바와 같은 펙타이드를 임의의 처리된 테오브로마 카카오 재료로부터 추출하거나 침전시킬 수 있다.
- [0100] 한 실시 형태에서, 카카오 식물 재료를 선택된 카카오 재배 농장으로부터 수집하고, 본 출원에 기재된 바와 같은 펙타이드를 단리하는 데 사용한다. 바람직하게는, 추가 처리를 위해 샘플을 4°C에 보관한다. 그렇지 않은

면, 샘플을 처리 전 -80°C 에 보관한다.

- [0101] 펩타이드의 추출을 위해, 발효되지 않은 잘 건조된 콩을 사용할 수 있다. 발효되지 않은 콩의 점액질 펄프를 전형적으로는 제거하고, 바람직하게는 닦아낸다. 종피를 멸균 메스, 겸자 및/또는 임의의 기타 적합한 기구로 벗겨낸다.
- [0102] 콩은 지질이 풍부하며, 바람직한 한 실시 형태에서는 펩타이드 추출 전에 코코아 콩을 탈지한다. 하나의 실시 형태에서, 분쇄된 코코아 콩을 아세톤으로 탈지하고, 잔류 콩 분말을 건조한 다음, 수성 완충액에서 추출할 수 있다. 추출 동안 매우 차가운 아세톤을 천천히 첨가하여 효소 불활성화를 감소시킨다.
- [0103] 한 실시 형태에서, 펩타이드 추출 전에 껍질 제거 과정을 상기 카카오 콩에 적용한다. 껍질 제거된 콩 재료는, 예를 들어, 껍질 및 펄프를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다른 코코아 부분과 비교하여 가장 우수한 펩타이드 추출성을 나타냈다.
- [0104] 적합한 밀, 분쇄기 또는 막자사발과 막자를 사용하여 코코아 콩을 잘게 분쇄하며, 여기서, 상기 장치는 바람직하게는 차가운 분위기, 냉동 챔버에서 사전 냉각되거나 액체 질소에 의해 냉각된다. 분쇄된 분말을 전형적으로는 4°C 를 초과하지 않는 온도, 바람직하게는 0°C 를 초과하지 않는 온도, 가장 바람직하게는 추가 처리를 위해 -20°C 에서 보관한다.
- [0105] 또 다른 실시 형태에서, 냉동 식물 재료를 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드의 추출에 사용한다. 모든 작업을 0°C 내지 4°C 에서(즉, 냉장실에서 또는 빙상에서) 수행한다. 추출 과정을 신속하게 수행하여 세포 파쇄시 방출되는 잠재적으로 손상을 주는 화합물과 효소에 대한 관심 단백질의 노출을 최소화한다.
- [0106] 한 실시 형태에서, 액체 질소가 조직과 접촉하지 않도록 카카오 콩을 분쇄한다. 샘플을 냉동 상태로 유지하는 것을 보장하기 위해, 막자사발/밀 및/또는 분쇄기를 얇은 액체 질소 풀(예를 들어, 표준 폴리스티렌 상자의 뚜껑) 내에 배치할 수 있다. 신선한 재료를 빙냉 완충액에서 직접 분쇄할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 조직 균질화기를 발효되지 않은 신선한 코코아 콩을 분쇄하는 데 사용한다. 또 다른 실시 형태에서, 코코아 콩을 산 세척된 모래의 첨가와 함께 블렌더 또는 막자사발과 막자에서 분쇄한다. 거품 발생은 블렌딩할 때 문제가 될 수 있으며, n-옥탄올 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 적합한 유기 용매를 몇 방울 첨가하여 어느 정도의 제어를 달성할 수 있다.
- [0107] 한 실시 형태에서, 바람직하게는 pH 8의 추출 완충액을 추출에 사용한다. 상기 완충액은 pH와 이온 강도 모두의 관점에서 단리된 펩타이드의 안정성을 유지한다. 사용되는 완충액의 비제한적 예의 일부는 아세톤, 페놀 또는 임의의 기타 적합한 용매 또는 이의 혼합물 중의 N-2-하이드록시에틸피페라진 N-2-에탄설포산(HEPES), 포스페이트, 2-(N-모르폴리노)-에탄설포산(MES), 트리스아미노메탄(TRIS), TAE 완충액(Tris 염기, 아세트산 및 EDTA), TBE(Tris 염기, 붕산 및 EDTA) 또는 이의 임의의 혼합물을 포함한다. 통상의 기술자는 완충액의 선택과 유형이 코코아 품종, 추출 과정에서의 발효되거나 발효되지 않은 콩의 사용에 따라 최적화됨을 이해해야 한다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않고도 최신 기술에서 일반적으로 사용되는 임의의 적합한 완충액을 사용하여 펩타이드를 추출할 수 있다. 식물 재료 및/또는 코코아 콩의 단위 중량 당 사용되는 추출 완충액의 부피는 식물 재료 유형과 펩타이드 농도에 좌우된다. 본 발명의 하나의 실시 형태에 따르면, 완충액 부피 대 식물 재료 및/또는 코코아 콩 중량의 보다 높은 비율(예를 들어, 10:1)을 사용하여 보다 우수한 추출을 달성한다.
- [0108] 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드의 추출 과정에서, 샘플 추출물을 먼저 농축시킨다. 이는 침전, 적합한 크로마토그래피 기법 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 수행될 수 있다. 한 실시 형태에서, 펩타이드의 안정성을 보장하기 위해 추출 완충액에 10% 내지 20%의 글리세롤(v/v)을 첨가한다.
- [0109] 한 실시 형태에서, 펩타이드의 산화를 방지하고 유리 설프하이드릴기의 환원 상태를 유지하고 페놀 화합물(phenolics)과 같은 다른 구성 요소의 산화를 감소시키기 위해, 항산화제를 추출 완충액에 첨가한다. 이러한 항산화제의 일부 비제한적 예는 디티오프레이톨(DTT), β -머캅토에탄올 또는 아스코르브산, 및 일부 경우에는 필요에 따라 나트륨 디티오나타이트와 같은 보다 강력한 환원제를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 예를 들어, DTT와 β -머캅토에탄올의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 1개 초과 환원제를 사용할 수 있다.
- [0110] 한 실시 형태에서, 막의 파괴 및 막 단백질의 가용화를 증진시키기 위해 세제를 완충액에 첨가한다. 일부 비제한적 예는 나트륨 도데실 설페이트(예를 들어, 0.1% 내지 1.0%), Tween 80(예를 들어, 0.1% 내지 1%), Triton X-100(예를 들어, 0.1% 내지 1%), 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시-1-프로판설포네이트(CHAPS) 또는 옥틸 글리코사이드, 또는 이의 혼합물을 포함한다. 통상의 기술자는 추출물에서 수득된 비실

린 (전구체) 펩타이드의 농도를 최대화하기 위한 계면활성제의 최적 조합을 결정하기 위해 초기 경험적 테스트가 필요함을 이해해야 한다.

- [0111] 예를 들어, 폴리비닐 폴리피롤리돈(PVPP), 가용성 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 보호제를 사용하여 본 발명의 향미생물성 펩타이드에 대한 탄닌과 같은 폴리페놀의 결합을 방지할 수 있음을 이해해야 한다.
- [0112] 또한, 추출 후 단백질의 분해를 제어하기 위해 향미생물성 펩타이드의 추출 동안 임의의 프로테이나아제 억제제를 완충액에 첨가할 수 있다. 상기 프로테이나아제 억제제의 일부 비제한적 예는 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF), 소 체장 트립신 억제제(아프로티닌으로도 또한 공지됨), 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐-플루오라이드 하이드로클로라이드, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 1,10-페난트롤린 또는 2,2'-바이피리딘, 트랜스-에폭시식시닐-류실-아미도-(4-구아니디노)부탄, 안티파인 및 류펩틴, 펩스타틴, 아스파르트산 프로테이나아제, 식물에 맞게 조정된 이들 억제제의 각테일을 함유하는 상업적으로 이용 가능한 프로테이나아제 억제제(예를 들어, Roche에서 정제의 형태로 및 Sigma에서 용액으로서 제공되는 것들) 등이다.
- [0113] 특히 바람직한 실시 형태에서, 알칼리성 환경에서 임의로 프로테이나아제 억제제 각테일의 존재 하에 항산화제로서의 디티오프레이톨(DTT)과 음이온성 계면활성제로서의 나트륨 도데실 설페이트(SDS)를 첨가한 Tris-HCl 완충액을 추출에 사용한다.
- [0114] 추출/인큐베이션 시간은 추출 혼합물 및 식물 재료 중 향미생물성 펩타이드의 농도를 기준으로 최적화되며, 15분 내지 48 시간, 바람직하게는 30분 이상, 가장 바람직하게는 1 시간 이상, 및 바람직하게는 5 시간 이하, 가장 바람직하게는 3 시간 이하로 다양할 수 있다. 추출 온도는 바람직하게는 40°C를 초과하지 않아야 하며, 바람직하게는 실온(23°C)을 초과하지 않아야 하며, 가장 바람직하게는 15°C를 초과하지 않는 온도에서 수행되어야 한다.
- [0115] 한 실시 형태에서, 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드를 코코아 콩으로부터 분리할 수 있다. 상기 코코아 콩은 발효되거나 발효되지 않을 수 있다. 또 다른 또는 추가의 실시 형태에서, 이는 건조되고/되거나 건조되지 않은 코코아 콩일 수 있다. 바람직한 한 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드를 발효되지 않은 건조 코코아 콩으로부터 분리할 수 있다. 한 실시 형태에서, 코코아 콩을 조쇄하고, 껍질을 제거하고, 님을 익스펠러(expeller)에서 압착한다. 이렇게 함으로써, 버터와 슬러리의 혼합물을 수득한다. 일부 실시 형태에서, 상기 슬러리를 펩타이드 추출에 사용한다.
- [0116] 다른 카카오 식물 일부를 사용하여 펩타이드를 추출하는 실시 형태에서, 완충제, 항산화제, 프로테아제, 억제제 등과 같은 다양한 보호제를 사용하여 추출물 중의 단백질을 안정화시킨다. 추출 용매의 양을 적절한 최소한도로 유지하여 단백질 추출물의 희석을 피한다. 코코아 과일은 산성이고, 높은 수준의 폴리페놀 화합물을 갖고, pH를 유지하기 위해 높은 완충액 농도를 필요로 한다.
- [0117] 본 발명에 따른 추출 단계에 의해 수득된 단백질 추출물을 바람직하게는 침강, 원심분리, 여과 또는 임의의 기타 일반적으로 사용되는 기법을 사용하여 분리하여 잔류 식물 재료가 없는 단백질 추출물을 수득한다. 미라클로스(Miracloth)(이에 한정되지 않음) 등과 같은 천을 통한 여과를 사용할 수 있다. 또 다른 실시 형태에서, 나일론 메시 필터가 바람직한 데, 이는 매우 강하며, 세척하여 재사용될 수 있기 때문이다.
- [0118] 한 실시 형태에서, 여과물을 대형 플래시 크로마토그래피 컬럼을 통과시킨다. 이러한 방식으로, 대량 생산 동안 단백질에 결합하는 다양한 저분자량 폴리페놀을 단백질로부터 분리할 수 있다.
- [0119] 크루드 어세이(crude assay)를 위한 소량의 조직 샘플의 제조를 위해, PD-10 또는 NAP 컬럼(Amersham Biosciences)(이에 한정되지 않음) 등과 같은 소형 겔 여과 컬럼을 사용하여 추출물을 탈염시킬 수 있다.
- [0120] 또 다른 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 펩타이드를 등전 침전에 의해 코코아 콩으로부터 분리한다. 전형적으로는, 탄수화물, 지방 및/또는 오일과 같은 바람직하지 않은 분획을 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제거한 후, 이러한 침전을 수행한다. 이러한 단계는 식물 재료의 나머지 부분 중의 단백질을 농축시킨다.
- [0121] 본 발명에 따르면, 상기 부분을 특정 pH의 완충액에 용해시키고, 단백질의 등전점까지 pH를 낮추어 이를 침전시킬 수 있다. 바람직한 한 실시 형태에서, 추출물의 단백질을 암모늄 설페이트 용액, 바람직하게는 적어도 10 wt% 및 최대 20 wt% 농도의 암모늄 설페이트 용액, 가장 바람직하게는 12 내지 14 wt% 농도의 암모늄 설페이트 용액을 사용하여 침전시킨다. 단백질을 원심분리에 의해 단백질 침전물로부터 수집한다.

- [0122] 추가의 바람직한 한 실시 형태에서, 침전/추출된 단백질을 전기영동에 의해 추가로 분리한다. 특히 바람직한 실시 형태에서, 상기 전기영동 분리는 2차원 전기영동이다. 상기 전기영동을 바람직하게는 폴리아크릴아미드 겔에서 수행한다. 한 실시 형태에서, 상기 전기영동을 15% SDS-PAGE 겔에서 수행한다. 전기영동은 펩타이드의 높은 정제를 가능하게 하여 노동 집약적이고 비용이 많이 드는 비-전기영동 기법의 단점을 제거한다. 수직 장은 주로 분자량을 기준으로 하는 장 내의 이동도에 따라 단백질을 "분리한다(separates)".
- [0123] 추가의 한 실시 형태에서, 분리 후 전기 용출 등에 의해 펩타이드를 겔의 표면으로 끌어당겨 상기 펩타이드의 추출 및 후속적 분석을 가능하게 한다. 한 실시 형태에서, 펩타이드에 상응하는 밴드를 전기영동 겔로부터 절제하고, Tris-EDTA에서 세척하고, 초음파 처리와 원심분리를 통해 추출한다.
- [0124] 추가의 바람직한 한 실시 형태에서, 관심 펩타이드를 동결 건조에 의해 건조하거나 진공 원심분리한다. 그렇지 않으면, 펩타이드를 적합한 제제로 침전시킬 수 있다. 동결건조 및/또는 침전된 펩타이드를 임의로 증류수 및/또는 임의의 기타 적합한 용매에 재현탁하여 추가 분석에 사용한다.
- [0125] 또 다른 실시 형태에서, 추출되거나 침전된 펩타이드를 농축시킨다. 바람직하게는, 상기 펩타이드를 표준 염 또는 유기 용매 침전에 의해 농축시킨다. 그렇지 않으면, 펩타이드를 휘발성 완충액(예를 들어, 탄산암모늄)에 대한 투석에 의해, 필터 기반 농축기를 사용하여, 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 농축시킨다. 통상의 기술자는 추출물/침전물의 농축이 느리고 중요한 과정이므로, 펩타이드가 이들 과정 동안 폴리페놀과 프로테아나아제에 노출되지 않도록 특별한 주의를 기울여야 함을 알고 있어야 한다.
- [0126] 펩타이드 함량의 정량화를 로리법 또는 브래드포드 어세이와 같은 분광 광도법, 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 수행한다. 또 다른 실시 형태에서, 펩타이드의 정량화를 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 크로마토그래피 방법에 의해 수행한다. 바람직한 한 실시 형태에서, LC-MS 방법을 펩타이드 함량의 정량화를 위해 사용한다. 바람직한 한 실시 형태에서, MALDI-TOF 분석을 카카오 추출물로부터 수득된 단백질의 트립신 분해를 통해 생성된 단편에 대해 수행한다. 하나의 실시 형태에서, MALDI-MS 트립신 분해 분석으로부터 획득된 데이터는 번역화학 어세이를 준비하고 수행하여 샘플 사이의 특정 차이점을 검출함으로써 추가로 확증된다.
- [0127] 추가의 바람직한 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 다른 펩타이드가 실질적으로 없다. 본 출원에 사용되는 "실질적으로 없는(substantially free)"이라는 용어는 다른 펩타이드가 적어도 95 중량% 없음; 바람직하게는 다른 펩타이드가 적어도 99 중량% 없음을 의미한다. 바람직한 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 결정 및/또는 고체 형태로 존재한다.
- [0128] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함하고 임의로 N-말단 신호 펩타이드에 대한 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이며, 상기 신호 펩타이드 서열은 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 갖거나 서열번호 3에 따른 서열이고, 상기 벡터는 발현 시스템에서 상기 펩타이드의 발현을 가능하게 하도록 설계되어 있다. 바람직한 한 실시 형태에서, 벡터는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 96%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 98%, 보다 바람직하게는 99% 또는 보다 바람직하게는 100%의 동일성을 갖는 펩타이드의 코딩 서열을 포함한다. 한 실시 형태에서, 상기 벡터는 이전 실시 형태에 개시된 바와 같은 정제 태그를 포함한다.
- [0129] 한 실시 형태에서, 카카오 콩으로부터 추출된 DNA를 사용하여 펩타이드의 코딩 서열을 증폭시키고, 세포에서 유전자 발현을 위해 설계된 임의의 플라스미드 또는 바이러스와 같은 적합한 발현 벡터에 클로닝한다.
- [0130] 따라서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드를 추가 사용을 위한 펩타이드를 생산할 목적으로 임의의 적합한 시스템에서 발현시킬 수 있다. 단백질의 발현을 위한 적합한 숙주는 에세리키아 콜라이, 진균 세포, 곤충 세포, 포유 동물 세포 및 식물을 포함한다. 이러한 숙주에 단백질을 발현하기 위한 표준 방법은 *Current Protocols in Molecular Biology*(상기와 동일)의 섹션 16(단백질 발현)을 비롯한 다양한 텍스트에 기재되어 있다.
- [0131] 일반적으로, 관심 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA는 발현 벡터에 함유되어 있으며, 일부 경우에는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 임의로 N-말단에 서열번호 3을 포함하는 펩타이드를 인코딩하기 위해 5' 또는 3' 말단에서 또 다른 코딩 서열에 프레임 내에서 연결되어 있다. 전체 코딩 서열은 프로모터가 코딩 서열의 발현을 구동시키도록 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있다. 코딩 서열은 본 출원에서 "표적 유전자(target gene)"로도 또한 지칭된다.

- [0132] 한 실시 형태에 따르면, 프로모터는 미생물에 대한 본래의 프로모터(예를 들어, 에세리키아 콜라이 *trpE* 프로모터), Tac 프로모터와 같은 합성 프로모터, 또는 미생물에서 기능할 수 있는 이중 유기체, 예를 들어, 바이러스, 세균, 또는 파지 λ 또는 T7과 같은 박테리오파지로부터 수득 가능한 프로모터이다. 프로모터는 항시성 또는 보다 바람직하게는 유도성일 수 있다. 발현 벡터는 또한 암피실린, 테트라사이클린, 클로람페니콜 또는 카나마이신 내성 유전자와 같은 항생제 내성 유전자일 수 있는 선택 마커 유전자를 함유할 수 있다.
- [0133] 에세리키아 콜라이에서 본 발명의 펩타이드의 발현에 적합한 다수의 프로모터 시스템은 종종 상업적 공급원으로부터 이용 가능하다. 예를 들어, *araBAD*(아라비노오스) 오페론의 P_{BAD} 프로모터는 배경에 비해 1,200배 더 유도성인 유리한 유도 특성을 가지고 있다(문헌 [Guzman et al., 1995]). 기타 프로모터는 P_{LAC} , P_{TAC} , P_{TRC} , PL 및 PR을 포함한다. P_{TAC} 프로모터는 에세리키아 콜라이의 *trp* 및 *lac* 프로모터로부터 유래된 하이브리드이며, 공지된 가장 강력한 에세리키아 콜라이 기반 프로모터 시스템 중 하나이다. 이는 *lac* 프로모터처럼 IPTG에 의해 유도성이다.
- [0134] 본 발명의 바람직한 숙주 세포는 에세리키아 콜라이 M15 숙주 균주이다. 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 본 발명의 펩타이드의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용한다.
- [0135] 추가의 바람직한 한 실시 형태에서, 클론의 선택을 수행하고, Ni-NTA 아가로오스를 사용하여 친화성 태그를 통해 과발현된 펩타이드를 추출한다. 이전 실시 형태에서 천연 공급원으로부터 단리된 펩타이드에 적용된 것과 동일한 방법을 사용하여 재조합 펩타이드를 분리하고 정제한다.
- [0136] 유전자 조작된 세포에서의 새로운 펩타이드의 발현은 전형적으로는 카카오 식물 재료로부터 단리된 자연 발생 펩타이드와 동일한 3차원 구조를 갖는 생성물을 초래할 것이다. 이러한 3차원 구조는 시스템인 잔기 사이에 올바르게 형성된 분자내 이황화 결합을 포함한다. 그러나, 단백질이 화학적으로 합성된 경우에도, 필요하다면 단백질을 추가로 처리하여 바람직하지 않은 이황화 가교를 끊고 목적하는 시스템인 잔기 사이에 가교를 형성하여 목적하는 3차원 구조를 수득하는 방법이 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0137] 본 발명의 또 다른 실시 형태에서, 상기 펩타이드를 실온 펩타이드 합성기, 마이크로파 펩타이드 합성기, 병렬 펩타이드 합성기 등과 같은 기기 상에서 고상 합성과 같은 공지된 펩타이드 합성 기술을 사용하여 화학적 합성에 의해 수득할 수 있다.
- [0138] 본 발명의 하나의 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드를 유전자이식 식물에서 발현시키는 것이 가능하다. 결과적으로, 본 발명은 또한 본 출원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물에 관한 것이다.
- [0139] 한 실시 형태에서, 유전자이식 식물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 발현한다. 추가의 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 N-말단 신호 펩타이드에 대한 서열을 포함하고, 상기 신호 펩타이드 서열은 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0140] 추가의 한 실시 형태에서, 유전자이식 식물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 96%, 보다 바람직하게는 97%, 보다 바람직하게는 98%, 보다 바람직하게는 99% 또는 보다 바람직하게는 100%의 동일성을 갖는 펩타이드를 발현한다.
- [0141] 한 실시 형태에서, 상기 펩타이드는 이전 실시 형태에 개시된 바와 같은 정제 태그를 포함한다.
- [0142] 본 발명에 따르면, 식물 세포를 다양한 공지된 유전자 조작 방법(아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 형질전환, Ti 플라스미드, 전기천공, 미세주입, 미세투사 총, PEG 매개성 형질전환 등)에 따라 DNA 작제물로 형질전환시킬 수 있다. 본 출원에 사용되는 유전자 조작 방법은 목적하는 형질 또는 특성을 발현하는 유전자 변형 식물을 재생하기 위해 외래 DNA 서열을 식물 세포 내로 도입하는 데 사용되는 임의의 방법으로서 이해될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 하나의 실시 형태에서, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖거나 임의로 N-말단에 서열번호 3을 포함하는 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열뿐만 아니라 다른 식물 종의 동족체를 인코딩하는 DNA를, 성숙 단백질을 생성하는 프레단백질을 인코딩하는 DNA 서열과 함께 사용할 수 있다. 이러한 프레단백질은 단백질을 특정 세포 구획(예를 들어, 아포플라스트 또는 액포)에 표적화하는 본래의 펩타이드 서열을 포함한다. 이들 코딩 서열은 식물 세포에서 강력한 발현을 보장하는 식물 프로모터 서열에 연결될 수 있다. 이러한 프로모터 서열은 대부분 또는 모든 식물 세포에서 단백질의 강력한 항시성 발현을 보장할 수 있고, 미생물

감염에 취약한 특정 조직 또는 세포에서의 발현을 보장하는 프로모터일 수 있고, 또한 감염 과정 동안 강력한 발현 유도를 보장하는 프로모터일 수 있다. 이들 유형의 유전자 카세트는 또한 항미생물성 단백질을 인코딩하는 mRNA의 효율적인 생산과 안정화를 보장하기 위해 항미생물성 단백질 코딩 영역의 3'에 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 것이다. 본 출원에 개시된 항미생물성 펩타이드의 효율적인 발현을 이의 개별 DNA 서열을 훨씬 더 큰 펩타이드를 인코딩하는 서열에 포함시킴으로써 용이하게 하는 것이 가능하다.

- [0144] 펩타이드를 인코딩하는 유전자 카세트를 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 식물 세포에서 발현시킨다. 첫째, 유전자 카세트를 다음을 보유하는 이진 벡터에 결합시킬 수 있다: i) 아그로박테리움 투메파시엔스 Ti 플라스미드의 T-DNA를 플랭킹(flaning)하는 좌측 및 우측 경계 서열; ii) 항생제 내성 식물 세포의 선택을 위한 적합한 선택 마커 유전자; iii) 아그로박테리움 투메파시엔스와 에세리키아 콜라이 모두에서 기능하는 복제 원점; iv) A아그로박테리움 투메파시엔스와 에세리키아 콜라이의 플라스미드 운반 세포의 선택을 가능하게 하는 항생제 내성 유전자. 제한하고자 하는 것은 아니지만, 본 출원에 개시된 펩타이드의 DNA 서열을 당해 분야에 공지된 임의의 이진 벡터, 예를 들어, 플라스미드(pEXA128, pBR322, pUC19), 박테리오파지(λ 파지, M13 파지), 코스미드, BAC 또는 YAC에 클로닝할 수 있다. 펩타이드의 DNA 서열을 운반하는 이진 벡터를, 무력화된(disarmed) Ti 플라스미드를 함유하는 아그로박테리움 투메파시엔스 균주, 예를 들어, LBA4404, GV3101 및 AGL1 균주, 또는 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*) 균주, 예를 들어, A4 또는 NCCP1885 균주 내로 열 충격, 전기천공 또는 삼친 교배에 의해 도입할 수 있다. 그 다음, 이들 아그로박테리움 균주를 적합한 식물 외식편 또는 온전한 식물 조직 및 항생제 내성을 사용하여 선택된 형질전환된 식물 세포 및/또는 재생물과 함께 공동 배양할 수 있다. 그렇지 않으면, 펩타이드의 DNA 서열을 운반하는 이진 벡터를 세균 또는 진균 세포에서 과발현시킬 수 있다.
- [0145] 본 개시 내용은 또한 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이하고 임의로 N-말단 신호 펩타이드에 대한 서열을 포함하는 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물을 수득하는 방법에 관한 것이며, 상기 신호 펩타이드 서열은 서열번호 3과 95%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0146] 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0147] (a) 임의로, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 나타내거나 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 서열과 최대 5개의 아미노산이 상이한 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하거나 합성하고;
- [0148] 핵산 서열을 적합한 발현 벡터에 통합하는 단계;
- [0149] (b) 핵산을 유전자 조작 방법에 의해 적어도 식물 세포 내로 도입하여 상기 펩타이드를 발현하는 형질전환 식물 세포를 생산하는 단계;
- [0150] (c) 형질전환 식물 세포를 완전한 유전자이식 식물로 재생하는 단계; 및
- [0151] (d) 적합한 스크리닝 방법을 사용하여 상기 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물을 선택하고 식별하는 단계.
- [0152] 본 출원에 개시된 바와 같은 방법의 한 실시 형태에서, 펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 유전자 클로닝 방법과 같은 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 단리한다. 유전자 클로닝의 비제한적 예는 PCR 기반 클로닝 및 제한 효소 기반 클로닝을 포함한다.
- [0153] 본 출원에 개시된 방법의 또 다른 실시 형태에서, 펩타이드의 DNA 서열을 유전자총 충격(biolistic bombardment)에 의해 식물 세포 내로 도입한다. 유전자총 충격은 유전자 총을 사용하여 외래 DNA 서열을 식물 세포 내로 도입하는 것을 수반한다. 본 출원에 개시된 바와 같은 항미생물성 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열을 금 입자와 같은 금속 입자에 부착시킨 다음, 식물 세포 내로 투사한다.
- [0154] 더 또 다른 실시 형태에서, 세포막에 기공을 생성하여 항미생물성 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열을 상기 세포에 유입하는 것을 가능하게 하는 전기 펄스의 사용을 포함하는 전기천공에 의해 펩타이드의 DNA 서열을 식물 세포 내로 도입한다. 그렇지 않으면, 항미생물성 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열을 식물 세포 내로 직접 주사(미세주사)할 수 있다.
- [0155] 더 또 다른 대체 실시 형태에서, 세포막에 임시적인 기공을 생성하여 DNA 서열을 세포에 유입하는 것을 가능하게 하는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 사용을 포함하는 PEG 매개성 형질전환에 의해 상기 펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열을 식물 세포 내로 도입한다.

- [0156] 임의의 식물 기관, 조직 또는 외식편을 유전자 조작 방법에 사용하여 본 출원에 개시된 바와 같은 유전자이식 식물을 수득할 수 있다. 비제한적 예는 개별 세포, 유합 조직, 종자, 잎 외식편, 줄기 외식편, 뿌리 외식편, 배아 조직, 분열 조직 또는 꽃가루를 포함한다.
- [0157] 전반적으로, 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물을 수득하기 위해 사용되는 구체적인 유전자 조작 방법과 외식편은 식물 중, 형질전환 방법의 효율, 및 향미생물성 펩타이드의 목적하는 발현 수준과 같은 요인에 좌우된다.
- [0158] 본 출원에 개시된 바와 같은 방법의 추가의 한 실시 형태에서, 형질전환 세포를 펩타이드를 발현하는 전체 식물로 재생한다.
- [0159] 펩타이드를 발현하는 유전자이식 식물을 식별하고 선택한다. 이러한 단계는 비-형질전환 식물을 제거하는 데 필수적이다. 항생제 또는 제초제 내성 선택은 유전자이식 식물에 가장 흔히 사용되는 선택 방법 중 하나이다. 유전자이식 식물을 항생제 또는 제초제에 대한 내성을 부여하는 유전자로 형질전환시킨 다음, 비-형질전환 식물을 사멸시키거나 이의 성장을 억제하는 항생제 또는 제초제를 함유하는 배지 상에서 성장시킨다. 일부 실시 형태에서, 유전자이식 식물을 리포터 단백질을 인코딩하는 유전자로 형질전환시킨 다음, 리포터 유전자의 발현에 기초하여 용이하게 식별하고 선택할 수 있다.
- [0160] 다른 실시 형태에서, 유전자이식 식물을 영양 선택에 의해 선택한다. 이러한 방법은 비-형질전환 식물의 성장에 필수적인 특정 영양소가 결핍된 배지 상에서 성장하는 유전자이식 식물의 능력에 기초한다. 유전자이식 식물을 결핍된 영양소를 합성할 수 있는 능력을 부여하는 유전자로 형질전환시킨다.
- [0161] 마커 없는 선택은 선택 후 유전자이식 식물로부터 제거될 수 있는 선택 마커의 사용을 포함한다. 이는 외래 DNA의 어떠한 흔적도 남기지 않고 선택 마커 유전자의 제거를 가능하게 하는 Cre-lox 시스템과 같은 부위 특이적 재조합 시스템을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0162] 본 발명을 추가로 예시하고 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않으며 그렇게 해석되어서도 안 되는 하기 비제한적 실시예에 의해 본 발명을 추가로 기재한다.
- [0163] **실시예**
- [0164] 실시예 1: 펩타이드 추출, 정제 및 식별
- [0165] 코코아 잡종 CCN-51로부터 유래된 코코아 콩 샘플을 에콰도르의 30년 초과 소규모 전통 코코아 농장으로부터 수집하였다. Barry Callebaut AG에서 발효되지 않은 형태와 발효/건조된 형태로 샘플을 제공받았다. 추가 처리를 위해, 발효되지 않은 샘플을 드라이아이스 상에 배송받고 도착 시 -80℃에 보관하고, 발효된 건조 샘플을 배송받고 4℃에 보관하였다. 발효되지 않은 콩의 점액질 펄프를 닦아내고, 멸균 메스로 종피를 벗겨냈다. 발효된 콩의 종피를 검자를 사용하여 제거하였다. 10,000 rpm의 Retsch Grindomix GM200 나이프 밀을 사용하여 콩을 잘게 분쇄하였다. 분쇄된 분말을 직접 사용하였다(또는 추가 처리를 위해 -20℃에 보관하였음).
- [0166] 250 mg의 잘게 분쇄된 분말을 2 ml 폴리프로필렌 마이크로원심분리용 튜브로 옮기고, 1 ml의 단백질 추출 완충액(100 mM Tris HCl, 1% DTT 및 1% SDS; 8.1로 조정된 pH; 제조업체의 지침에 따른 프로테아제 억제제 억제제)에 현탁시켰다. 혼합물을 60초 동안 완전히 와동시키고, 4℃에서 가볍게 진탕하면서 60분 동안 인큐베이션한 후, 벤치탑 5810R 원심분리기에서 13,200 rpm으로 20분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 단백질 분획을 함유하는 상청액을 피펫팅을 사용하여 새 컵으로 조심스럽게 옮기고, 추가 분석을 위해 -20℃에 보관하였다.
- [0167] 추출된 코코아 단백질의 함량을 문헌 [Bradford MM, "Analytical Biochemistry" 1976; 72: 248-54]에 개시된 방법을 사용하여 평가하였다.
- [0168] 브래드포드 방법에 따르면, 미세역가 플레이트 중의 10 μ l의 희석된 단백질 용액에 300 μ l의 브래드포드 시약을 첨가하고, 잠시 와동시켰다. 실온에서 10분 인큐베이션 후, 595 nm에서 흡광도를 삼중복으로 측정하였다. 추출된 단백질 농도를 1 ~ 1500 μ g/ml 농도 범위의 소 혈청 알부민을 사용하는 표준 곡선으로부터 정량화하였다.
- [0169] 추출된 코코아 단백질 및/또는 펩타이드를 SDS-PAGE를 사용하여 분자량에 따라 분리하였다. 요약하면, 25 μ l의 단백질 샘플을 추적 염료로서 브로모페놀 블루를 함유하는 6× 샘플 완충액 5 μ l와 혼합하였다. 혼합물을 95℃에서 5분 동안 가열하고, 12.5% 또는 15% (w/v) 아크릴아미드를 함유하는 SDS-PAGE 겔(83 mm×65 mm×1 mm) 상에 로딩하였다. 전기영동을 130 V에서 90분 동안 수행하였다. 전기영동 후, 겔을 Coomassie® Blue(45% (v/v) 메탄올, 10% 아세트산, 2.93×10^{-3} M Coomassie® Brilliant Blue G-250)로 20분 동안 염색하거나 문헌

[Towbin et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354]에 이전에 기재된 바와 같이 PVDF 멤브레인 상에 전기영동으로 블롯팅하였다. 블롯을 4℃에서 밤새 PBST 중의 5% (w/v) 우유로 처리하였다. 이어서, 5% (w/v) 분유를 함유하는 PBST 중에 1:2,000 희석된 다클론 항체로 단백질 블롯을 탐색하고, 실온에서 2 시간 (h) 동안 인큐베이션하였다. 또한, 블롯을 약한 진탕 하에 실온에서 5분씩 6회 세척하였다. 이어서, 5% (w/v) 분유를 함유하는 PBST 중에 실온에서 1 시간 동안 1:10,000 희석된 HRP 접합된 염소 항토끼 IgG 항체에서 블롯을 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 블롯을 약한 진탕 하에 실온에서 PBST로 5분씩 6회 세척하였다. 최종적으로, 문헌 [Mruk and Cheng, Spermatogenesis, 2011, 1, 121-122]에 기재된 바와 같이 과산화수소의 존재 하에 기질로서 루미놀을 사용하여, 간접적으로 결합된 HRP를 이의 효소 활성화에 의해 검출하였다.

[0170] 2차원 전기영동을 진행하기 전에, 총 단백질 추출물을 Ready Prep™ 2D 정화 키트를 사용하여 정제하였다. 이온성 세제, 지질 또는 페놀성 화합물과 같은 방해 물질의 제거를 위해, 상기 키트를 제조업체에서 권장하는 바와 같이 사용하여 총 단백질 추출물을 정제하였다. 키트와 함께 제공된 세척 완충액에서 침전 및 세척 후, 단백질 샘플을 130 μ l의 재수화 완충액(2 M 티오우레아, 6 M 우레아, 16.2×10^{-3} M CHAPS, 25.9×10^{-3} M DTT)에 재현탁시키고, 양성전해질로 보충하였다.

[0171] 코코아 단백질의 2D 겔 전기영동을 등전점 전기영동 및 후속적 SDS-PAGE에 의해 수행하였다. 이를 위해, 80 μ g의 단백질을 고정된 pH 구배(IPG) 스트립(7 cm, pH 3 ~ 10)에 적용하고, 실온에서 14 시간 동안 침지시켰다. 등전점 전기영동을 Bio-Rad Protean® i12™ IEF Cell 상에서 수행하였다(50 V, 70분; 150 V, 20분; 300 V, 15분; 600 V까지 구배, 10분; 600 V, 15분; 1,500 V까지 구배, 10분; 1,500 V, 30분; 3,000 V까지 구배, 20분; 3,000 V, 210분; 50 V에서 일시 정지). 다음으로, IPG 스트립을 평형 완충액(6 M 우레아, 30% (w/v) 글리세롤, 0.05 M Tris-HCl 완충액 중의 69.2×10^{-3} M SDS, pH 8.8)에 용해된 6.48×10^{-2} M DTT와 0.216 M 요오드아세트아미드 용액에 실온에서 15분 동안 평형화시켰다. 분자량 분리를 12.5 또는 15% 폴리아크릴아미드 겔을 통해 Bio-Rad Mini-Protean® Tetra 시스템(110V, 10분; 130V 추가) 상에서 수행하였다. 단백질의 분자량을 폴리아크릴아미드 겔에서의 시각적 이동과 아미노산 서열의 중량 예측에 의해 평가하였다. 염색과 탈색 후, 생성된 2D 겔을 Epson 스캐너로 스캔하였다.

[0172] 스캔된 2D 겔을 ImageMaster 2D Platinum 소프트웨어 6.0(GE Healthcare)에 의해 처리하였다. 이렇게 하면서, 모든 샘플에 대해 자동 스팟 검출 파라미터를 다음과 같이 설정하였다: 부드러움 = 6, 두드러짐 = 100, 최소 영역 = 5. 검출된 비단백질 스팟, 즉, 줄무늬와 먼지 입자를 포함하는 오염 인공물을 수동 스팟 선택 동안 제거하였다. 스팟 경계 내의 다른 모든 픽셀 값에서 스팟 경계 상의 가장 낮은 10% 픽셀 값을 제외하여 스팟 부피를 스팟 기준으로 디폴트 배경에서 공제하였다. 2D 겔 세트를 일치시키기 위해, 상이한 겔에 걸쳐 동일한 단백질 스팟의 식별을 가능하게 하는 마스터 겔이라고 하는 참조 샘플을 정의하였다. 생성된 일치 보고서는 개별적인 정규화된 상대적 스팟 부피와 함께 개개의 2D 겔 내의 일치하는 스팟과 마스터 겔 내의 상응하는 스팟을 나열한다.

[0173] 관심 단백질 스팟을 2D 겔로부터 절제하고, 작은 조각으로 썰고, 50% ACN(v/v)을 함유하는 100 μ l의 0.05 M 암모늄 바이카보네이트 완충액에서 15분 동안 2회 세척하였다. 겔 조각을 500 μ l의 아세트니트릴의 첨가에 의해 탈수시키고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 경사 여과와 짧은 공기 건조 후, 샘플을 트립신 분해 완충액으로 보충하고, 이전에 설정된 바와 같이 55℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화-TOF 질량 분광 분석법(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-TOF Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS) 분석에 직접 사용하였다.

[0174] 펩타이드 패턴의 분광 분석 식별을 위해, 펩타이드를 15 mM TCEP로 환원시키거나 비환원된 형태로 사용하였다. 협공 가드 컬럼인 Zorbax 300SB-C8(내부 직경 2.1 mm×12.5 mm, 입자 5 μ m)가 장착된 Proshell 300SB-C8 컬럼(내부 직경 1 mm×75 mm, 입자 5 μ l) 상에 펩타이드를 로딩하였다. 단백질을 95% 용매 A(물 중의 0.1% 포름산(FA), 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA))에서 90% 용매 B(아세트니트릴 중의 0.1% FA, 0.05% TFA)까지의 5분 선형 구배에 의해 컬럼으로부터 용출시킨 후, 90% 용매 B로 3분 동안 세척하고, 2.5분의 평형화를 위해 2분 후에 5% 용매 B로 되돌렸다. 질량 분광 분석기를 600 내지 4000 m/z의 질량 범위에서 60000의 해상도(m/z 400에서)로 MS 모드에서 작동시켰다. 1E7의 AGC 설정을 사용하여 트랩을 1초 동안 충전하게 하였다. 공급원 설정을 15V의 SID, 325℃의 모세관 온도, 4.2 kV의 전압으로 설정하였다.

[0175] 기록된 스펙트럼을 Freestyle 소프트웨어(Thermo fisher scientific, USA)의 Xtract™ 알고리즘으로 디컨볼루션하였다.

- [0176] **결과:** 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드를 CCN-51 코코아 품종의 콩으로부터 분리된 총 단백질을 분획에서 식별하였다. 코코아 콩으로부터 분리된 단백질의 2D 분리 후, 15 kDa에 상응하는 스팟을 절제하고, 트립신 분해하였다(도 1). 분해된 펩타이드를 MALDI-TOF-MS 분석을 사용하여 식별하였다(도 2a). 서열번호 2의 재조합 펩타이드를 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하고, 겔로부터 절제하고, 트립신 분해에 적용하여 도 2b에 묘사된 MALDI-TOF-MS 펩타이드 지문을 생성하였다. 서열번호 2에 따른 펩타이드를 함유하는 환원 및 비환원 샘플 모두에서, 온전한 질량 지문 분석을 사용하여 15.3 kDa의 질량을 검출하였다. 서열번호 2에 따른 샘플의 LC-MS 결과는 도 3에 도시되어 있다.
- [0177] 실시예 2: 재조합 펩타이드 생산
- [0178] 총 DNA를 CCN-51 코코아 콩의 배아로부터 추출하고, 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 프라이머 Forward_BamH1-5'CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT3' 및 Reverse_Kpn1-5' CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT3'을 사용하여 증폭시켰다. 이는 300 bp DNA(관심 DNA)의 증폭된 단편을 생성하였다.
- [0179] 증폭된 DNA 단편을 클로닝 벡터 pEXA128의 BamH1/Kpn1 부위에 연결하였다. 펩타이드의 DNA를 담당하는 플라스미드와 pQE30 과발현 플라스미드 모두를 증폭을 위해 이. 콜라이(*E. coli*) DH5 α 세포에 형질전환시켰다. 플라스미드를 하룻밤 배양물로부터 추출하고, 37°C에서 2 시간 동안 BamHI 및 KpnI로 분해하고, 1% 아가로오스 겔 상에서 분리하였다. 선형화된 pQE30 플라스미드와 pEXA128 플라스미드의 인서트를 겔로부터 추출하고, 인서트를 pQE30 플라스미드에 연결하였다. pQE30 과발현 플라스미드는 HIS 태그를 인코딩하며, 본 발명의 펩타이드의 과발현은 펩타이드와 N-말단 HIS 태그로 이루어진 융합 펩타이드를 생성한다. 생성된 플라스미드를 이. 콜라이 M15 과발현 세포에 형질전환시켰다. 하룻밤 배양물로부터 추출된 플라스미드를 서열 분석하고, 예상 서열과 일치하는 클론만을 과발현에 사용하였다. 16 ml의 하룻밤 배양물을 사용하여 37°C에서 800 ml의 액체 LB 배지에 접종하였다. 0.6 내지 0.8의 OD₆₀₀에 도달하면, IPTG를 1 mM의 최종 농도까지 첨가하여 과발현을 유도하였다. 신호 펩타이드를 함유하는 펩타이드를 과발현하는 세포를 20°C에서 24 시간 동안 인큐베이션하고, 신호 펩타이드를 함유하지 않는 펩타이드를 과발현하는 세포를 37°C에서 5 시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0180] 재조합 펩타이드를 실시예 1에 기재된 바와 같이 정제하고 식별하였다.
- [0181] 실시예 3: 펩타이드의 합성
- [0182] 서열번호 1 및 서열번호 2와 동일한 서열을 갖는 펩타이드를 Seramun Diagnostica GmbH(Heidesee, Germany)에서 화학적으로 합성하였다.
- [0183] 실시예 4: 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration: MIC) 어세이
- [0184] MIC 어세이는 화합물이 미생물 집단의 성장을 억제하는 최저 농도를 결정한다. 본 출원에 기재된 펩타이드의 항미생물 잠재력을 국제공개공보 WO 1998/027805에서 논의된 바와 같은 2개의 다른 AMP인 TcAMP1 및 TcAMP2, 및 항생제 또는 살진균제의 활성과 비교하였다. 몇몇 세균 및 진균 중에 대해 비교 MIC 어세이를 실시하였다(표 1).
- [0185] 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 및 서열번호 7에 따른 펩타이드를 연속 희석하여 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 내지 303 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 농도 서열을 생성하였다.
- [0186] 판토틴, 스타필로코커스 및 리스테리아를 1.7% 카세인 펩톤, 0.3% 대두 펩톤, 0.25% 글루코오스, 0.5% NaCl, 0.25% K₂HPO₄ 및 임의로 1.5% 아가로 이루어진 트립티카아제 대두 브로쓰(Trypticase Soy Broth: TSY) 배지에서 배양하였다. 칸디다 세포를 1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 글루코오스 및 임의로 2% 아가로 이루어진 효모 추출물 펩톤 텍스트로오스(Yeast Extract Peptone Dextrose: YPD) 브로쓰 배지에서 배양하였다. 세라토시스티스, 보트리티스, 랩토스페리아, 마이코스포렐라, 스크레로티니아 및 버티실리움을 2.4% Difco 프리믹스 브로쓰와 임의로 1.5% 아가로 이루어진 감자 텍스트로오스 아가(Potato Dextrose Agar: PDA) 배지에서 배양하였다.
- [0187] MIC 어세이를 위해, 세균과 진균을 이의 개개의 배지를 갖는 아가 플레이트 상에 성장시켰다. 단일 세균 콜로니 또는 작은 진균 조각을 5 ml의 개개의 액체 배지에 접종하여 사전 배양물을 제조하였다. 광학 밀도(optical density: OD)를 1 내지 5일 후에 600 nm에서 측정하고, 1의 OD₆₀₀로 조정하였다. 이러한 세포 현탁액을 사용하여 ml 당 약 2×10^6 개의 미생물 세포에 상응하는 1:500 희석물을 제조하였다.
- [0188] MIC를 평가하기 위해, 96-웰 플레이트를 테스트 항미생물성 펩타이드로 준비하였다. 각각의 웰은 100 μl 의 미

생물 세포 배양물, 90 μl 의 배양 배지 및 상응하는 희석의 10 μl 의 펩타이드 또는 대조군을 함유하였다. 각각 테스트된 유기체의 최적 성장 온도에서 플레이트를 밤새(overnight: ON) 인큐베이션하였다(표 1). 결과를 육안으로 평가하고, MIC를 성장 또는 비성장을 기준으로 결정하였다.

[표 1]

다양한 항미생물성 펩타이드에 대한 MIC 어세이에서 테스트된 유기체. 종 명칭, 분류뿐만 아니라 성장 조건도 제공된다. DSM은 독일 미생물 및 세포 배양물 컬렉션 게엠베하(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH; DSMZ; Braunschweig, Germany)의 주문 번호를 지칭한다. SF는 예나 미생물 자원 컬렉션(Jena Microbial Resource Collection: JMRC; Jena, Germany)으로부터 수득된 유기체를 지칭한다.

종	주문 번호	분류	성장 배지	성장 온도
판토에아 아글로메란스(<i>Pantoea agglomerans</i>)	JUB-CC-3253	그람 음성균	TSY	37°C
스태필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>) MRSA	DSM 11729	그람 양성균	TSY	37°C
리스테리아 모노사이토게네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)	DSM 102976	그람 양성균	TSY	37°C
칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)	DSM 1386	효모	YPD	30°C
세라토시스티스 파라독사(<i>Ceratosystis paradoxa</i>)	DSMZ 63054	진균	PDA	18°C
보트리티스 시네레아(<i>Botrytis cinerea</i>)	DSMZ 877	진균	PDA	24°C
렙토스페리아 마쿨란스(<i>Leptosphaeria maculans</i>)	SF 70	진균	PDA	18°C
마이코스페렐라 피노데스(<i>Mycosphaerella pinodes</i>)	DSMZ 62763	진균	PDA	30°C
스클레로티니아 스클레로티오룸(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	SF 79	진균	PDA	18°C
버티실리움 다흘리에(<i>Verticillium dahliae</i>)	SF 76	진균	PDA	28°C

MIC 어세이를 적어도 2회의 독립적 중복과 상이한 펩타이드 출발 농도로 수행하였다. 사전 테스트는 테스트 단백질 정제하기 위해 수행된 단계 중 어느 단계도 획득된 MIC에 영향을 미치지 않았음을 나타냈다.

결과: 본 발명에 따른 모든 펩타이드는 테스트된 모든 유기체에 대해 강력한 항미생물 활성을 나타냈다.

진균 종에 대한 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 및 서열번호 7에 따른 펩타이드에 대해 획득된 MIC 값은 표 2에 나타나 있다. 본 발명의 모든 펩타이드는 종래 기술의 펩타이드보다 더 낮은 농도에서 진균 성장을 억제하는 데 더 효율적이었다.

[표 2]

테스터 유기체로서의 진균 종 및 본 발명의 펩타이드(서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 4) 및 종래 기술의 펩타이드(서열번호 6 및 7)에 의한 MIC 어세이 결과. 클로트리마졸을 참조로서 사용하였다.

진균	최소 억제 농도($\mu\text{g/ml}$)					
	클로트리마졸	서열 번호 1에 따른 본 발명의 펩타이드	서열 번호 2에 따른 본 발명의 펩타이드	서열 번호 4에 따른 본 발명의 펩타이드	서열 번호 6에 따른 종래 기술의 펩타이드	서열 번호 7에 따른 종래 기술의 펩타이드
칸디다 알비칸스	3.1	0.4	3.1	0.4	13.1	12.75
세라토시스티스 파라독사	0.4	5	6.25	1	4.8	4.7
보트리티스 시네레아	6.25	6.25	6.25	3.1	14.5	12.75
렙토스페리아 마쿨란스	0.4	3.75	6.25	4.1	37.9	9.4
마이코스포렐라 피노데스	3.1	1.9	4.5	2	13.12	10.68
스클레로티니아 스클레로티올	25	10.25	19.3	1.5	27.2	23.5
버티실리움 다홀리에	1.56	1.6	3.1	1.55	14.5	12.7

[0197]

[0198]

세균 중에 대한 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 및 서열번호 7에 따른 펩타이드에 대해 획득된 MIC 값은 표 3에 나타나 있다. 본 발명의 모든 펩타이드는 세균 성장을 억제하였으며, 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 4에 따른 펩타이드는 테스트된 모든 종에서 기존 기술의 펩타이드보다 더 효율적이었다.

[0199]

[표 3]

[0200]

테스터 유기체로서의 세균 종 및 본 발명의 펩타이드(서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 4) 및 종래 기술의 펩타이드(서열번호 6 및 7)에 의한 MIC 어세이 결과. 겐타마이신과 스트렙토마이신을 참조로서 사용하였다.

세균	최소 억제 농도($\mu\text{g/ml}$)						
	겐타마이신	스트렙토마이신	서열 번호 1	서열 번호 2	서열 번호 4	서열 번호 6	서열 번호 7
스테필로코커스 아우레우스	0.8	>125	3.1	7.1	1.8	13	13.6
리스테리아 모노사이토게네스	0.4	7.8	3.1	7.1	1.8	3.25	13.6
판토에아 아글로메란스	1.56	NA	1.1	1.9	1	7.9	9.45
이. 콜라이	1	NA	3.1	6.2	NA	NA	NA

[0201]

[0202]

실시예 5: 체액 중의 펩타이드 안정성

[0203]

양 혈액 어세이

[0204]

본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드의 혈액내 거동을 테스트하기 위해 칸디다 알비칸스에 대해 시험관내 실험을 수행하였다. 사람 혈액의 칸디다 알비칸스 분리주(DSMZ 6569)를 사용하였다. 서열번호 1에 따른 펩타이드를 1 mg/ml의 농도로 조정하고, 양 혈액과 동일한 비율로 혼합하였다. 이러한 혼합물을 30°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 혈액의 고체 부분을 제거하기 위해, 혼합물을 원심분리하고, 수득된 혈장 상청액을 MIC에 사용하였다.

[0205]

소변 어세이

[0206]

본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드의 소변내 거동을 테스트하기 위해 칸디다 알비칸스에 대해 시험관내 실험을 수행하였다. 서열번호 1에 따른 펩타이드를 1 mg/ml의 농도로 조정하고, 합성 소변 또는 사람 소변과 동일한 비율로 혼합하였다. 이들 혼합물을 30°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 소변의 고체 부분을 제거하기 위해, 혼합물을 원심분리하고, 수득된 상청액을 MIC에 사용하였다.

[0207] **우유 어세이**

[0208] 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드의 3.5% 지방 우유내 거동을 테스트하기 위해 리스테리아 모노사이토게네스에 대해 시험관내 실험을 수행하였다. 서열번호 1에 따른 펩타이드를 1 mg/ml의 농도로 조정하고, 우유와 동일한 비율로 혼합하였다. 이러한 혼합물을 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 우유의 고체 부분을 제거하기 위해, 혼합물을 원심분리하고, 수득된 상청액을 MIC에 사용하였다.

[0209] **결과:** 펩타이드를 양 혈액과 혼합하였을 때, 칸디다 알비칸스 세포 성장을 억제하는 능력의 감소가 관찰되었다. 그러나, 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 양 혈액에서 25 µg/ml에서도 여전히 활성을 나타냈다(표 4).

[0210] 칸디다 알비칸스 세포 성장을 억제하는 능력은 펩타이드와 소변의 혼합에 의해 보다 적게 영향을 받았다. 대조 조건의 0.4 µg/ml와 비교하여, 합성 소변에서는 효율적인 항미생물 활성을 2 µg/ml의 펩타이드에서 달성하고, 사람 소변에서는 효율적인 항미생물 활성을 5 µg/ml의 펩타이드에서 달성하였다(표 4).

[0211] 유사하게, 펩타이드를 우유와 혼합하였을 때, 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 억제하는 농도는 우유 무함유 조건의 3.2 µg/ml에서 80 µg/ml까지 증가하였다(표 4).

[0212] 펩타이드는 체액에서 세균과 효모의 성장을 억제하는 능력을 완전히 상실하지 않았는데, 이는 치료학적 용도에 적합함을 시사한다.

[0213] **[표 4]**

[0214] 본 발명의 펩타이드(서열번호 1)를 양 혈액, 소변 또는 우유와 혼합하였을 때의 MIC 어세이 결과. 대조군은 체액을 함유하지 않는 펩타이드이며, 카스포펄린과 테트라사이클린을 참조로서 사용한다.

테스트된 유기체	조건	최소 억제 농도(µg/ml)
칸디다 알비칸스	대조군	0.4
	카스포펄린	0.5
	양 혈액	25
	합성 소변	2
	사람 소변	5
리스테리아 모노사이토게네스	대조군	3.1
	테트라사이클린	1.6
	우유	80

[0215]

[0216] **실시예 6: 토양 슬러리 중의 MIC 어세이**

[0217] 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드의 토양 슬러리내 거동을 테스트하기 위해 에르위니아 아밀로보라에 대해 시험관내 실험을 수행하였다. 5 g의 토양을 20 ml의 물에 혼합하여 토양 슬러리를 생성하였다. 이러한 혼합물을 오버헤드 진탕기에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 고체 부분을 원심분리로 제거하고, 토양 슬러리로서 지칭되는 수득된 상청액을 MIC 어세이에 사용하였다. 동일 부피의 서열번호 1에 따른 펩타이드(8 mg/ml)와 토양 슬러리를 혼합하고, 28℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 혼합물을 에르위니아 아밀로보라에 대한 MIC에 사용하였다.

[0218] **결과:** 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 대조 조건의 15 µg/ml와 비교하여 토양 슬러리에서는 25µg/ml에서 세균 성장을 억제하였다. 본 출원에 기재된 바와 같은 펩타이드는 토양에서 세균 성장을 억제하는 능력을 완전히 상실하지 않으므로 농업 용도에 적합하다.

[0219] **실시예 7: 기술적 표면에 대한 펩타이드의 적용 가능성**

[0220] 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드의 기술적 표면 상의 거동을 테스트하기 위해 칸디다 알비칸스에 대해 실험을 수행하였다.

[0221] 이러한 유기체의 바이오필름 형성을 바이오필름 반응기의 세라믹(기공 크기 1100 µm), 스테인리스강 및 실리콘

표면에 대해 테스트하였다. 3개 표면의 디스크를 각각 함유하는 4개의 디스크 몸통을 각각의 반응기에 넣고, 나사로 단단히 고정시켰다. 모든 디스크가 장착된 시스템을 오토클레이브하였다. 반응기 각각에 297 ml의 SU 배지를 충전하고, SU 중의 3 ml의 칸디다 알비칸스(질 분리주) 전배양물($OD_{600}=0.1$)을 첨가하였다. 바이오필름 반응기를 30℃에서 200 rpm 교반 하에 인큐베이션하였다. 총 3개의 생물반응기 시스템을 실행하였다: 대조군, 0 일차부터의 펩타이드 풍부한 코코아 추출물 처리군 및 3 일차부터의 상기 추출물 처리군. 코코아 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 총 단백질 농도를 나타냈다.

[0222] 1, 3, 5 및 7 일차에, 각각의 반응기로부터 디스크 몸통을 제거하였다. 디스크를 풀고, 2 ml의 SU에 잠기게 하였다. 이들 액체를 SU 배지에 희석하고, $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 의 희석 시리즈를 제조하였다. 희석물을 YPD 고체 배지 상에 플레이팅하고, 30℃에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트 상에 형성된 콜로니를 계수하고, 콜로니 형성 단위(colony forming unit: CFU)/디스크 cm^2 를 계산하였다.

[0223] **결과:** 칸디다 알비칸스의 어떠한 성장도 테스트된 모든 표면 상에서 관찰되지 않았다. 이들 결과는 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드가 표면 소독제 또는 오염 제거제로서 사용하기에 매우 안정하고 효과적임을 시사한다.

[0224] 실험 8: 효모 및 포유 동물 세포의 시험관내 어세이

[0225] 펩타이드의 성장 억제 효과가 미생물고정(microstatic) 또는 살균(microcidal) 성질을 갖는지 여부를 조사하기 위해, 선택된 모델 유기체로서의 칸디다 알비칸스(질 분리주)와 사람 각질 세포(HaCaT) 세포에 대해 락테이트 데하이드로게나아제(LDH) 방출 어세이를 수행하였다. LDH는 다수의 세포 유형에 존재하는 효소이다. 세포막에 대한 손상은 LDH의 세포 배양 배지로의 방출을 초래하며, 이는 이후 커플링된 효소적 발색 반응을 통해 검출 및 정량화될 수 있다.

[0226] HaCaT 세포를 4.5 g/L 글루코오스, 2 mM L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum: FCS)으로 보충된 DMEM 배지에서 37℃ 및 8% CO_2 에서 성장시켰다. 세포를 대략 20 ml의 DMEM을 함유하는 75 cm^2 세포 배양 플라스크에서 성장시켰다. 배지를 주 2회 교체하였다. 90% 초과와 함류에 도달하면 세포를 1:10의 비율로 계대시켰다. 계대 용액은 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 를 함유하지 않는 PBS 중 EDTA(0.05% 스톡)와 트립신(0.1% 스톡)의 1:1 혼합물로 이루어졌다.

[0227] LDH 세포독성 어세이 CyQUANT™(Invitrogen, 번호 C20300 및 C20301)를 회사에서 제공된 프로토콜에 따라 수행하였다. 최적 씨딩 밀도를 키트에 기재된 바와 같은 표준 프로토콜에 따라 HaCaT 또는 칸디다 알비칸스 세포에 대해 100 μl 당 10,000개 세포로 결정하였다. 세포를 1.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위의 농도를 갖는 서열번호 2에 따른 펩타이드에 1 시간 또는 밤새 노출시키고, LDH 방출을 검출하였다. 회사에서 제공된 다음 수학적식을 사용하여 세포독성을 계산하였다: $\text{세포독성 \%} = [(\text{펩타이드} - \text{처리된 LDH 활성}) - (\text{자발적 LDH 활성})] / (\text{최대 LDH 활성}) - (\text{자발적 LDH 활성}) \times 100$, 여기서, 자발적 LDH 활성은 미처리된(물 첨가된) 샘플에서 측정되며, 최대 LDH 활성은 키트 공급업체에서 제공된 용해제에서 측정된다.

[0228] **결과:** 검출된 표적 유기체 칸디다 알비칸스 세포 사멸은 가장 높은 테스트 단백질 농도에서의 92%의 세포 독성까지 0 내지 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 선형적이었다(도 4). 대조적으로, HaCaT 세포를 펩타이드로 처리하면, LDH의 방출은 거의 유도되지 않거나 전혀 유도되지 않았다. HaCaT 세포에 대한 펩타이드의 세포독성은 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 펩타이드 농도까지 0% 내지 1%이고, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 펩타이드 농도에서 6%에 도달하였다(도 4).

[0229] 본 발명은 이전에 기재된 임의의 구현 형태에 제한되지 않으며, 첨부된 청구범위의 재평가 없이도 제시된 제조예에 대한 일부 변형은 추가될 수 있다고 가정한다. 예를 들어, 본 발명의 바람직한 실시 형태는 테오브로마 카카오의 CCN-51 품종에 관한 것이지만, 추가 처리를 위한 충분한 양의 비실린을 생성하는 임의의 코코아 품종을 본 발명의 범위를 벗어나지 않고도 사용할 수 있다.

[0230] 실시예 9: 발효되지 않은 코코아 콩의 펩타이드 추출

[0231] 본 출원에 개시된 바와 같은 펩타이드를 발효되지 않았지만 잘 건조된 코코아 콩으로부터 분리하였다. 코코아 콩을 콩 조쇄기로 기계적으로 조쇄하여 낱과 껍질의 혼합물을 수득하였다. 껍질을 제거하고, 껍질 제거된 낱을 익스펠러로 옴겼다. 이렇게 함으로써, 버터와 슬러리의 혼합물을 수득하고, 40℃에서 10분 동안 16,600 $\times$ g로 원심분리하여 분리하였다. 상단에서 수집된 버터 분획을 폐기하고, 고체 슬러리 펠렛을 분쇄하여 추가 사용 전

까지 4℃에 보관하였다.

[0232] 그 다음, 펩타이드를 3개의 방식으로 추출하였다.

[0233] 방법 1: 단백질 추출 완충액(protein extraction buffer: PEB) 추출

[0234] 분쇄된 슬러리 펠렛을 50℃의 수조에서 10분 도안 예열한 다음, 단백질 추출 완충액(100 mM Tris, 1% SDS 및 1 % DTT, pH 8.1)에 용해시켰는 데, 여기서, 1:4 w/v의 펠렛 대 완충액 비율로 첨가하였다. 그 다음, 용해된 슬러리 펠렛을 교반 하에 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 20분 동안 16,600 × g로 원심분리하였다. 펩타이드 함유 액체상을 투석 또는 한외여과(Centricon Plus-70, Merck Chemicals GmbH, Merck KGaA의 계열사, Darmstadt, Germany)를 통해 수집하고 정제하여 PEB의 구성 요소를 제거하였다.

[0235] 방법 2: PEB 추출 후 산 침전

[0236] 분쇄된 슬러리 펠렛을 방법 1에 기재된 바와 같이 처리하였는 데, 즉, 분쇄된 슬러리 펠렛을 50℃의 수조에서 10분 동안 예열한 다음, PEB에 용해시켰다. 그 다음, 용해된 슬러리 펠렛을 교반 하에 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 20분 동안 16,600 × g로 원심분리하였다. 펩타이드 함유 액체상을 수집하고, 산 침전에 적용하여 단백질 믹스 중 본 발명의 펩타이드를 이의 등전점에 기초하여 풍부화시켰다. 이렇게 함으로써, 단백질 추출물의 pH를 1 M 시트르산으로 6.0으로 낮추어 짙은 회색에서 적색으로의 색 변화를 초래하였다. 이러한 혼합물을 10분 동안 16,600 × g로 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 초음파 처리를 사용하여 단백질 펠렛을 PEB에 재현탁시켜 펠렛을 적절하게 용해시켰다. 이후에, 5 kDa MWCO(Centricon Plus-70, Merck Chemicals GmbH, Merck KGaA의 계열사, Darmstadt, Germany) 한외여과를 통해 유해 물질을 제거하였다.

[0237] 방법 3: 열 추출

[0238] 분쇄된 슬러리 펠렛을 수돗물에서 1:4 w/v의 펠렛 대 물 비율로 교반 하에 10분 동안 60℃로 가열하였다. 수득된 혼합물을 10℃에서 20분 동안 16,600 × g로 원심분리하였다.

[0239] 방법 1 내지 3 중 임의의 방법에 의한 추출 후 수득된 펩타이드 함유 상청액을 수집하고, SDS-PAGE 및 MIC에 의해 정량화하거나 분석하였다. 단백질 추출물을 적용 전에 고농축(up-concentration)을 위해 동결 건조시키거나 진공 원심분리하였다.

[0240] **서열 목록**

[0241] **서열번호 1(본 발명의 한 실시 형태에 따른 펩타이드)**

[0242] YGRKQYERDPQQYEQCRRCESEATEEREQECEQRCEREYKEQQRQEEELQRQYQQCGRCQEQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKN

[0243] **서열번호 2(본 발명의 한 실시 형태에 따른 펩타이드)**

[0244] YGRKQYERDPQQYEQCRRCESEATEEREQECEQRCEREYKEQQRQEEELQRQYQQCGRCQEQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHK

[0245] **서열번호 3(본 발명의 한 실시 형태에 따른 신호 펩타이드)**

[0246] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA

[0247] **서열번호 4(본 발명의 한 실시 형태에 따른 펩타이드)**

[0248] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPQQYEQCRRCESEATEEREQECEQRCEREYKEQQRQEEELQRQYQQCGRCQEQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKN

[0249] **서열번호 5(본 발명의 한 실시 형태에 따른 펩타이드)**

[0250] MVISKSPFIVLIFSLLLSFALLCSGVSA YGRKQYERDPQQYEQCRRCESEATEEREQECEQRCEREYKEQQRQEEELQRQYQQCGRCQEQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHK

[0251] **서열번호 6(종래 기술의 펩타이드)**

[0252] YERDPQQYEQCRRCESEATEEREQECEQRCEREYKEQQRQEEEL

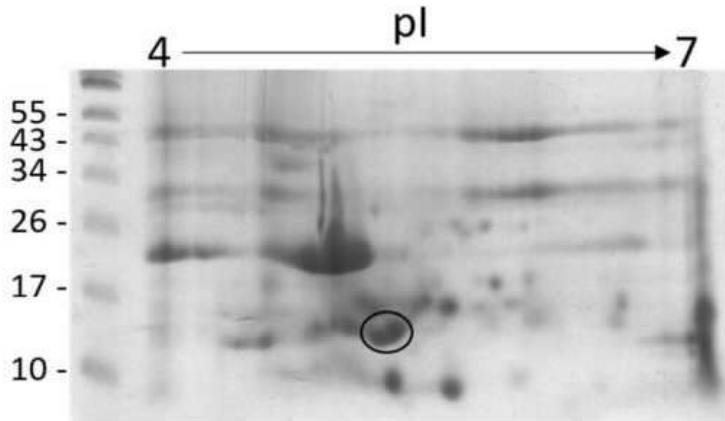
[0253] **서열번호 7(종래 기술의 펩타이드)**

[0254] LQRQYQQCGRCQEQQGQREQQQCQRKCWEQYKEQERGEHENYHNHKKNRSEEEEGQQR

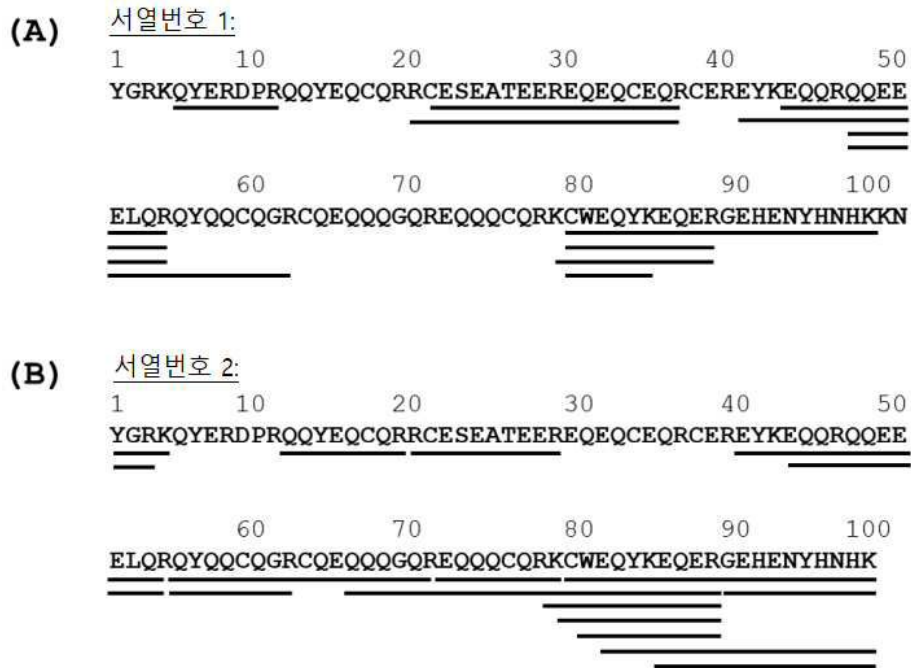
[0255]	서열번호 8(Forward_BamH1 정방향 프라이머)
[0256]	CGCGGATCCTATGGCAGAAAACAATAT
[0257]	서열번호 9(Reverse_Kpn1 정방향 프라이머)
[0258]	CGCGGTACCTTTGTGATTATGGTAATT
[0259]	서열번호 10(HQ 태그)
[0260]	HQHQQH
[0261]	서열번호 11(HN 태그)
[0262]	HNHNHNHNHNHN
[0263]	서열번호 12(HAT 태그)
[0264]	KDHL IHNVHKEEHAHAHNK
[0265]	서열번호 13(ALFA 태그)
[0266]	SRLEEELRRRLTE
[0267]	서열번호 14(Avi 태그)
[0268]	GLNDIFEAQKIEWHE
[0269]	서열번호 15(C-태그)
[0270]	EPEA
[0271]	서열번호 16(칼모듈린-태그)
[0272]	KRRWKKNF IAVSAANRFKK ISSSGAL
[0273]	서열번호 17(E-태그)
[0274]	GAPVPYPDPLEPR
[0275]	서열번호 18(FLAG-태그)
[0276]	DYKDDDDK
[0277]	서열번호 19(HA-태그)
[0278]	YPYDVPDYA
[0279]	서열번호 20(Myc-태그)
[0280]	EQKLISEEDL
[0281]	서열번호 21(NE-태그)
[0282]	TKENPRSNQEESYDDNES
[0283]	서열번호 22(Rho1D4 태그)
[0284]	TETSQVAPA
[0285]	서열번호 23(S-태그)
[0286]	KETAALKFERQHMS
[0287]	서열번호 24(SBP 태그)
[0288]	DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP
[0289]	서열번호 25(Strep-태그)
[0290]	WSHPQFEK

도면

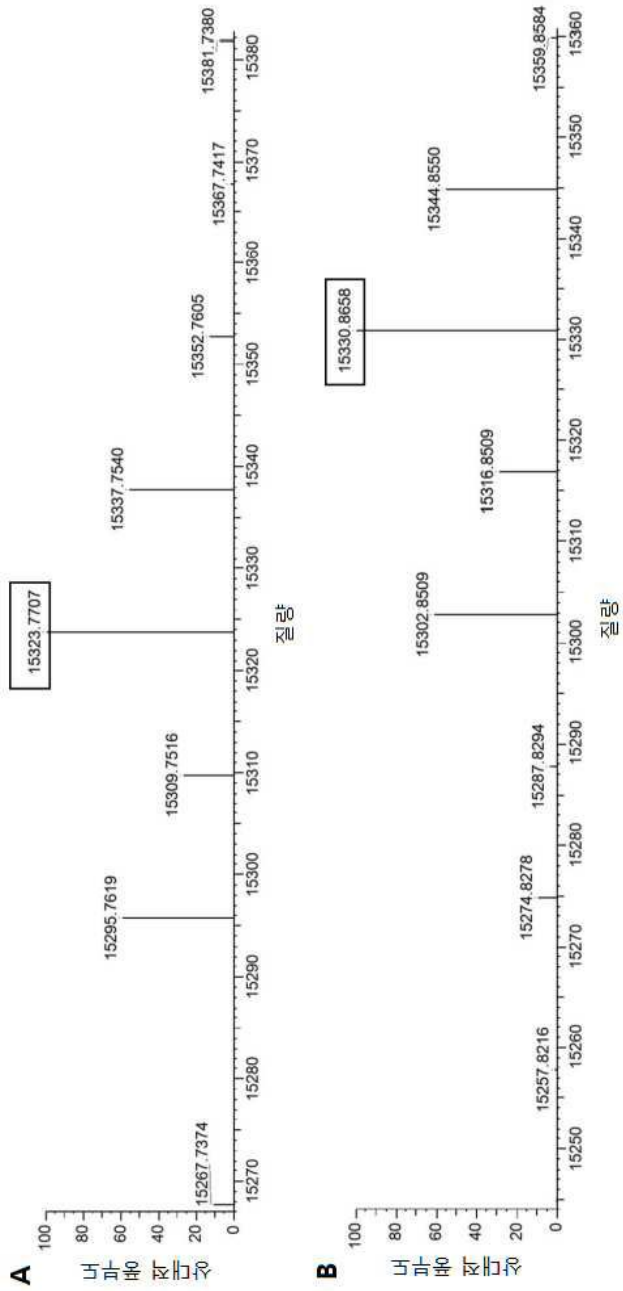
도면1



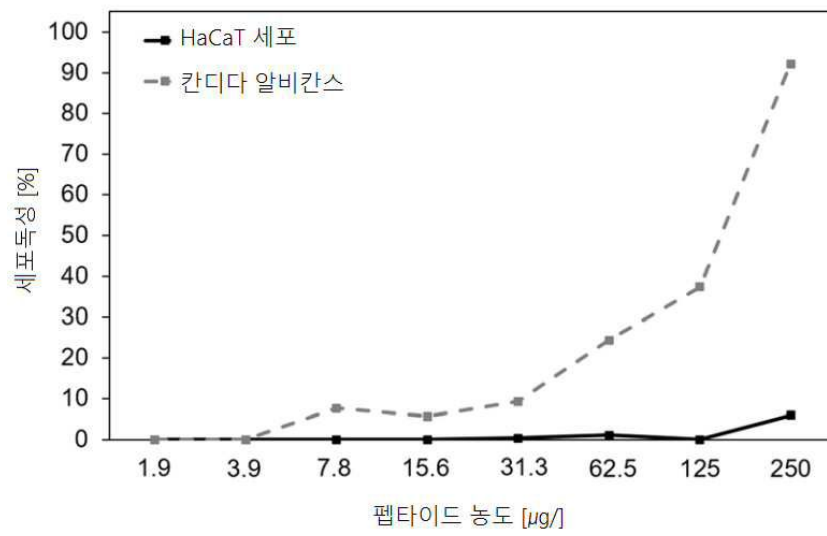
도면2



도면3



도면4



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.