(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 2 월 27 일 (27.02.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/030801 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/415 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008424

(22) 국제출원일: 2012 년 10 월 16 일 (16.10.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0090439 2012 년 8 월 20 일 (20.08.2012) KR

(71) 출원인: **조선대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 501-759 광주시 동구 서석동 375, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **박윤경 (PARK, Yoon Kyung)**; 515-891 전라남도 장성군 남면 마흥길 45, Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

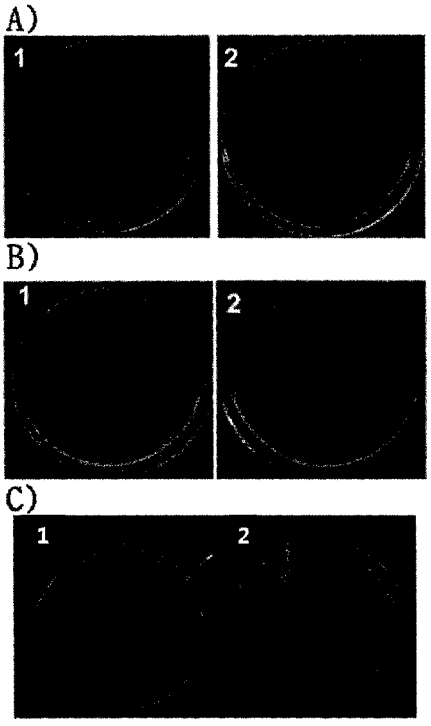
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: NOVEL ANTI-FUNGAL PEPTIDE PG-2 DERIVED FROM GOGU VALLEY POTATO, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 신규한 항진균 펩타이드 ＰＧ－２ 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a novel anti-fungal peptide PG-2 derived from Gogu Valley potato, and to a use thereof. More specifically the novel peptide of the present invention, which is isolated from the Gogu Valley potato (*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley) and has the amino acid sequence written down as sequence number 1, exhibits marked anti-bacterial and anti-fungal effects and is not cytotoxic and thus can advantageously be used as an anti-bacterial or anti-fungal pharmaceutical composition, cosmetic composition, agrichemical, food preservative, cosmetic preserving agent and drug preserving agent.

(57) **요약서**: 본 발명은 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 신규한 항진균 펩타이드 PG-2 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 고구밸리 품종의 감자(Solanum tuberosum L cv. Gogu Valley)로부터 분리한 서열번호 1 로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없으므로, 항균 또는 항진균용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2014/030801 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 신규한 항진균 펩타이드 PG-2 및 이의 용도

【기술분야】

본 발명은 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 분리한 신규한 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 항균 또는 항진균용 약학적 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

식물이나 동물들은 항균제 기능의 펩타이드를 자연적으로 생산하는 것으로 알려져 있다[Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, *59*, 395-414]. 이러한 펩타이드의 항균작용은 숙주 방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로[Boman, H. G., Cell, 65, 205, 1991; Boman, H. G., Annu. Rev. Microbiol., 13, 61, 1995], 이러한 항균기능의 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β-쉬트(sheet) 펩타이드, α-회전형(helical) 양친화성 분자, 및 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드로 분류된다[Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, *9*, 269-280]. 이 중에서 가장 많이 존재하는 구조는 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 분자이며, 곤충에서 발견된 세크로핀(cecropin)이 대표적인 항균 펩타이드 구조이다.

또한, 생체 내에서 생산되는 상기 펩타이드 이외에 박테리오신(bacteriocin)이란 단백질 역시 주변의 동종 또는 이종의 세균들과 경쟁하기 위해 분비되어 유해 세균을 죽이는 항생물질로서의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 박테리오신은 구조에 따라, 란티바이오틱스(lantibiotics), 비란티바이오틱스(nonlantibiotics) 및 신호 펩타이드(signal peptide)의 세 부류로 분류된다[Cintas et al., *J. Bad.*, 1998, *180*,

1988-1994]. 이러한 생체 내에서 생성되면서 항생 기능을 수행하는 펩타이드 또는 박테리오신은 기존의 항생제가 화학물질로 이루어져 유발되는 항생물질로 인한 항생제 내성, 항생제 쇼크 등의 문제점을 해소할 수 있다.

따라서, 기존의 항균제를 천연 항균제 개발로 대체하려는 노력이 꾸준히 진행되어 오고 있다. 여기서, 천연 항균제라 함은 천연소재, 식물 또는 미생물로부터 선택되어 생화학적 또는 생리학적 차이를 극대화하여, 바이러스, 세균, 효모, 곰팡이 등을 선택적으로 제어하고, 인체에 무해하거나 독성을 최소한으로 낮춘 항균제를 말한다. 현재 보고된 천연 항균제로는 편백나무에서 희노키티올, 목련에서 메그노놀, 자몽종자 추출물인 DF-100등이 있으나, 현재 사용되는 규모는 매우 미미하다.

최근, 천연 허브추출물이 세포 증식 기작을 억제하여 미생물에 대한 살균 효과가 크고, 식물성 천연 살균 소독제로서 독성이 없고, 부식성이 없어 인체에 무해한 안전한 천연 항균제로 보고된 바 있으나, 재배 규모가 작거나, 다수가 외래종으로서 국내에서 재배하기에 까다로운 문제점 등으로 인하여 천연 항균제로서 활용하는 데에는 한계가 있다.

민간요법 중 하나로서, 감자껍질을 말려서 분쇄한 가루를 화장실 또는 습기가 많은 곳에 뿌려 두면 벌레가 생기지 않으며, 더운 물에 데었을 때 감자를 갈거나 얇게 썰어 환부에 붙여주면 흉터가 생기지 않고 잘 낫는다고 전해져 오고 있다.

따라서, 감자가 천연 항균제로서의 역할을 수행한다는 것이 전해지고 있으며, 이러한 감자는 재배지역이 넓으며, 그 수량 또한 많기 때문에 재료 확보가 용이하고 원료 단가를 낮출 수 있어, 천연 항균제로서 활용시, 원료 수급이 원활한 장점을 동시에 제공할 수 있다.

본 발명자들은 다양한 감자 유전자원을 개발하고자 노력한 결과, 종래 수입종인 수미와 대서의 장점을 고루 갖춘 새로운 식용감자를 개발하였을 뿐

아니라, 다양한 용도에 따라 적용할 수 있도록 감자의 과육의 색을 달리하거나 기능을 향상시킨 100여 종의 밸리감자를 개발하고 이를 국립종자관리소에 품종보호출원하여 등록받은 바 있다.

이에, 본 발명자들은 천연 식물소재인 감자 품종으로부터 천연 항균제를 개발하기 위해 노력한 결과, 감자품종 중, 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 추출, 분리 및 정제하여 신규한 PG-2 펩타이드를 수득하였고, 상기 PG-2 펩타이드가 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 사람의 적혈구 세포에서 용혈 활성을 측정을 통한 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인함으로써, 상기 펩타이드를 천연 항균 또는 항진균제의 유효성분으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 항균 또는 항진균 활성을 갖는 신규한 펩타이드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 세균에 기인한 질환을 예방 또는 치료 하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 진균에 기인한 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항진균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 무독성 농약의

제조에 이용하는 용도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)의 괴경을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;

2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및

4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 서열번호 1로 기재되는 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 세균에 기인한 질환을 예방 또는 치료 하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 진균에 기인한 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항진균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.

아울러, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 무독성 농약의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없으므로, 항균 또는 항진균용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)의 괴경으로부터 추출, 분리 및 정제하여 제조된 신규한 PG-2 펩타이드 및 상기 표준 단백질의 구성에 대한 SDS-PAGE 전기영동 분석결과를 나타낸 도이다.

도 2는 PG-2 펩타이드의 분자량을 확인한 도이다.

도 3은 PG-2 펩타이드의 항균 또는 항진균 효과를 확인한 도이다:

A) 1: 음성 대조군으로써, 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganinse*(KCTC9231) 단독 처리군;

A) 2: 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스 및 PG-2 펩타이드 처리군;

B) 1: 음성 대조군으로써, 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*(KCTC 7270)) 단독 처리군;

B) 2: 캔디다 알비칸스 및 PG-2 펩타이드 처리군;

C) 1: 음성 대조군으로써, 스타필로코쿠스 오레우스(*Staphlococcus aureus*)(KCTC1621)) 단독 처리군;

C) 2: 스타필로코쿠스 오레우스 및 PG-2 펩타이드 처리군.

도 4는 PG-2 펩타이드의 사람의 적혈구 세포에 대한 세포 파괴정도(Hemolytic)를 측정한 도이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 제공한다.

상기 펩타이드는 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 분리된 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 펩타이드는 분자량이 3228.5 Da인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 펩타이드는 병원성 박테리아 또는 병원성 진균에 대하여 항균 또는 항진균 활성을 갖는 것이 바람직하고, 상기 병원성 박테리아는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganinse*) 또는 스타필로코쿠스 오레우스(*Staphlococcus aureus*), 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 또는 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 신규한 펩타이드를 제조하기 위하여, 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)의 괴경으로부터 단백질을 추출하여 역상 HPLC(Reverse Phase HPLC)를 이용하여 신규한 PG-2 펩타이드를 수득하였고, 이를 SDS-PAGE 법에 의한 분자량에 있어서, 약 3 kDa의 존재를 확인하였다(도 1 참조).

또한, 본 발명자들은 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 신규한 PG-2 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열을 확인한 결과, 본 발명의 신규한 PG-2 펩타이드는 분자량이 3228.5 Da이고(도 2 참조), 서열번호 1로 기재되는 아미노산

서열을 갖는 신규한 펩타이드임을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 본 발명의 PG-2 펩타이드의 항균 또는 항진균 활성을 확인한 결과, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스, 캔디다 알비칸스 또는 스타필로코쿠스 오레우스에 대하여 현저한 항균 또는 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 3 참조).

또한, 본 발명자들은 PG-2 펩타이드에 대하여, 적혈구 용혈활성을 통하여 세포독성 여부를 확인한 결과, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드는 적혈구 세포들이 전혀 파괴되지 않은 결과를 보임으로써, 세포독성이 전혀 없음을 확인하였다(도 4 참조).

따라서, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없으므로, 항균 또는 항진균용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

1) 감자의 괴경을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;

2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및

4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 본 발명의 PG-2 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 감자는 고구밸리 품종의 감자인 것이 바람직하고, 재배한 것, 시판되는 것 제한 없이 사용할 수 있다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 완충용액은 구체적으로 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% 디메틸 술폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 0.1%

β-메르캅토에칸올(β-mercaptoethanol)로 이루어지는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 방법에 있어서, 단계 4)의 크로마토그래피는 구체적으로 역상(Reverse Phase, RP)-고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 또는 고속단백질액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)인 것이 바람직하고, 역상 HPLC로 분리, 정제하는 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 PG-2 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 세균에 기인한 질환을 예방 또는 치료 하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 PG-2 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 병원성 진균에 기인한 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 항진균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

상기 항균용 약학적 조성물은 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganinse*) 또는 스타필로코쿠스 오레우스(*Staphlococcus aureus*)에 대하여 항균활성을 가지는 것이 바람직하고, 상기 항진균용 약학적 조성물은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 또는 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)에 대하여 항진균활성을 가지는 것이

바람직하나 이에 한정되지 않는다.

따라서, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없으므로, 항균 또는 항진균용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 신규한 펩타이드는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 본 발명의 신규한 펩타이드는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 신규한 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

본 발명의 신규한 펩타이드의 유효용량은 0.01 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 ㎎/㎏ 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 신규한 펩타이드의 총 유효량은

볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple does)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 신규한 펩타이드의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

또한, 본 발명은 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 신규한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약을 제공한다.

아울러, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드를 무독성 농약의 제조에 이용하는 용도를 제공한다.

본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 식물의 라이족토니아 병의 원인 곰팡이인 리족토니아 솔라니 또는 식물 병원성 박테리아인 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스에 대하여 현저한 항균 또는 항진균활성을 나타내고, 세포 독성이 없으므로 무독성 농약의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정하는 것은 아니다.

<실시예 1> 감자로부터 단백질 추출 단계

고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)의 괴경을 액체질소(Liquid nitrogen)가 첨가된 상태에서 막자사발과 절구공이를 이용하여 분말로 분쇄한 후, 상기 분말을 단백질 추출 완충용액(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10

mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.1% β-머캅토에탄올)에 첨가하여 잘 혼합한 후, 원심분리기를 이용하여 단백질을 추출하였다. 이때, 본 발명의 단백질 추출방법은 공지의 방법을 변형하여 수행하였다[Ana Segura et al, *Mol Plant Microbe Interact.*, 12(1): 16-23, 1999]. 이후, 추출된 추출물을 6,000 × g에서 30 분 동안 원심분리한 후, 상층액 만을 취하여 스펙트라/포아 7(Spectra/Por 7; MWCO: 3,500) 멤브레인(Spectrum Laboratories, Inc.)을 사용하여 50 mM 암모늄 바이카보네이트 완충용액(pH 8.0)으로 4℃에서 투석(Dialysis)하여 정제하였다.

<실험예 1> 펩타이드의 분리 확인

상기 <실시예 1>에서 수득한 추출액은 슬랩 젤(slab gel)을 이용하여, 라엠리 방법[Laemmli U.K., Nature, 27:680-685, 1972]에 따라 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)을 수행하였다. 이때, 상기 추출액 및 표준단백질은 15% 아크릴아마이드 젤(acrylamide gel)에 로딩하였다. 전기영동 후, 젤을 쿠마시 브릴러언트 블루(coomassie brilliant blue) R-250으로 염색하고, 탈색 완충용액(destaining buffer)(메탄올:빙초산:증류수=30:10:60)로 탈색하여 단백질의 밴드를 확인하였다. 이때, 분자량 표준 단백질로는 저분자량 영역(Low Molecular Weight Range)인 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin) 66 kDa, 치킨에그로부터 추출된 오브알부민(Chicken Egg Ovalbumin) 45 kDa, 토끼 근육으로부터 추출된 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지네이즈(Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) 36 kDa, 소적혈구로부터 추출된 카보닉 언하이드레이즈(Bovine Erythrocytes Carbonic Anhydrase) 29 kDa, 소 췌장으로부터 추출된 트립시노젠(Bovine Pancreas Trypsinogen) 24 kDa), 대두로부터 추출된 트립신 억제제(Soybean Trypsin Inhibitor) 20 kDa), 우유로부터 추출된 a-락트알부민(Bovine Milk a-Lactalbumin) 14.2 kDa, 소 허파로부터 추출된 아프로티닌(Bovine Lung Aprotinin) 6.5 kDa을 이용하였다.

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이,본 발명의 고구밸리 품종의 감자

추출물로부터 유래된 펩타이드는 단백질 저분자 표시마커와 비교해서 추측할 때 SDS-PAGE 법에 의한 분자량에 있어서 약 3 kDa의 존재를 확인하였다(도 1).

<실험예 2> 펩타이드의 정제

상기 <실시예 1>로부터 수득한 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 펩타이드를 심-팩(Shim-pack) VP-ODS, C18 column(4.6×50 mm; 4.6±0.3 im 입자(particle); 12.0 ± 1.0 nm 구멍(pore); Shimadzu) 역상 HPLC(Reverse Phase HPLC)를 이용하여 정제하였다. 이때, 완충용액(0.1% TFA가 포함된 아세토아니트릴(Acetonitrile)의 B)의 기울기(linear gradient, 5~65%, 2%/min, 30 min)에 의해 용출한 후, 피크의 분획을 모아 항진균 활성을 측정하였으며, 이를 "PG-2"로 명명하였다.

<실험예 3> 분자량 및 아미노산 서열 확인

상기 단계로부터 얻은 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드를 6N-HCl에 녹인 후 110℃에서 22 시간 동안 가수분해하여 건조시키고, 아미노산 분석기를 이용하여 아미노산 서열을 확인하였다.

또한, 질량분석기(회사명; 시마즈, Kratos, AXIMA-CFR)를 이용하여 상기 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드 분자량은 3228.5 Da이며, 상기 PG-2 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규 펩타이드인 것을 확인하였다(도 2).

<실험예 4> 항균 및 항진균 활성 측정

상기 <실험예 2>로부터 수득한 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드의 항균 및 항진균 활성을 측정하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

<4-1> PG-2 펩타이드의 항균 및 항진균 활성 분석

상기 <실시예 2>의 방법으로 수득한 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드의 항균 및 항진균 활성을 확인하기 위하여, 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해농도(MIC) 값을 측정하였다.

구체적으로, 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology(KRIBB),한국 대전)으로부터 제공받은 병원성 박테리아 각 균주(클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganinse*(KCTC9231) 및 스타필로코쿠스 오레우스(*Staphlococcus aureus*)(KCTC1621)) 및 한국농업미생물은행(Korea Agricultural Culture Collection(KACC), 한국)에서 제공받은 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*(KCTC 7270) 및 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*(KACC 40138)를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨; Sigma, 미국) pH 5.5, pH 6.2, pH 8.5 및 pH 9.8에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음 1% 박토 펩톤 배지(Difco, 미국)로 5×10^5세포/100㎕의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc, 미국)에 접종하였다. 상기 <실시예 2>에서 수득한 본 발명의 펩타이드를 각각 96 웰(well)로부터 1/2배씩 pH 5.5, pH 6.2, pH 8.5 및 pH 9.8에서 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 12시간 동안 배양하였고, 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader, 독일)를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였으며, 그 결과를 하기 [표 1]에 나타내었다.

또한, 항균 및 항진균 활성을 측정하기 위하여, 상기 병원성 박테리아 및 병원성 진균을 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)에 각 웰당 2×10^3 셀이 되도록 희석하여 상기 박테리아 또는 진균을 포함한 YPD 배지 100 ㎕를 플레이트에 분주한 후, 음성 대조군에는 각각 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스, 캔디다 알비칸스 또는 스타필로코쿠스 오레우스만을 각각 분주하고,

나머지 한 개의 플레이트에는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스, 캔디다 알비칸스 또는 스타필로코쿠스 오레우스에 상기 <실시예 2>로부터 수득한 고구밸리 품종의 감자 추출물로부터 유래된 PG-2 펩타이드를 같이 접종하여 30℃ 배양기에서 4 시간 동안 배양하였다. 이후, 항균 및 항진균 활성을 가시화하기 위해 도말하여 다시 30℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 펩타이드는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스, 캔디다 알비칸스 또는 스타필로코쿠스 오레우스에 대하여 현저한 항균 또는 항진균 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 3).

【표 1】

PG-2의 최소 생장 저해 농도

Microorganisms	MIC(㎛)
Fungal pathogens	
C. albicans	25
R. solani	25
Bacterial pathogens	
S. aureus	3.12
C. michiganense subsp. michiganinse	3.12

ND : 검출 안됨.

<실험예 5> 적혈구 용혈 활성의 측정

고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드에 대하여, 사람의 적혈구 용혈활성을 통하여 세포독성 여부를 판별하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

구체적으로, 사람의 적혈구(human erythrocytes)를 PBS(phosphate-buffered saline: 35 mM 포스페이트 완충용액/0.15 M NaCl의 혼합용액, pH 7.0) 완충용액으로 3회 세척하고, PBS 완충용액으로 희석한 8.0% 적혈구 용액을 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)에 100 ㎕씩 로딩한 후, 상기에 상기 <실시예 2>로부터

수득한 고구밸리 품종의 감자 추출물로부터 유래된 PG-2 펩타이드 용액을 100㎕씩 섞어 준 후, 37℃에서 1 시간 동안 배양한 후, 414 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 또한, 대조군으로서, 공지된 펩타이드인 멜리틴(melittin)에 동일하게 실시하였다. 이때, 0.1% 트리톤 X-100로 처리하였을 경우의 값을 100% 용혈도로 계산하고, 펩타이드의 용혈율, 즉 세포 파괴정도(hemolysis)는 하기 [수학식 1]에 의하여 산출하였다. 하기에서, A는 펩타이드 용액에서의 141 nm의 흡광도이고, B는 0.1% 트리톤 X-100에서의 141 nm의 흡광도이고, C는 PBS 용액에서의 141 nm의 흡광도를 나타낸다.

【수학식 1】

$$\text{세포파괴정도}(Hemolytic)=\frac{A}{B-C}\times 100$$

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 공지의 펩타이드인 멜리틴의 경우, 펩타이드 농도 0.31 ㎛에서 세포의 용혈율이 30%를 나타냈으며, 펩타이드 농도 5 ㎛의 조건에서는 적혈구 세포들이 100% 파괴되었다. 반면에, 본 발명의 고구밸리 품종의 감자로부터 유래된 PG-2 펩타이드는 동일 농도 조건에서 실시한 결과, 적혈구 세포들이 전혀 파괴되지 않은 결과를 보임으로써, 세포독성이 전혀 없음을 확인하였다(도 4).

【산업상 이용가능성】

본 발명의 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 분리한 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 신규한 펩타이드는 현저한 항균 및 항진균 효과를 나타내고, 세포독성이 없으므로, 항균 또는 항진균용 약학적 조성물, 화장료 조성물, 농약, 식품방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 고구밸리 품종의 감자(*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 분자량이 3228.5 Da인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 병원성 박테리아 또는 병원성 진균에 대하여 항균 또는 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 병원성 박테리아는 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스(*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganinse*) 또는 스타필로코쿠스 오레우스(*Staphlococcus aureus*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 6】

제 4항에 있어서, 상기 병원성 진균은 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 또는 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

【청구항 7】

1) 감자의 괴경을 동결건조한 후 분말로 분쇄하는 단계;

2) 단계 1)의 분말을 완충용액으로 추출하여 추출물을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 추출물을 원심분리하여 추출물의 상층액 분획을 회수하는 단계; 및

4) 단계 3)의 상층액 분획을 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 제 1항에 기재된 펩타이드의 제조방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)의 완충용액은 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% 디메틸 술폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 및 0.1% β-메르캅토에칸올(β-mercaptoethanol)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제 1항에 기재된 펩타이드의 제조방법.

【청구항 9】

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 상기 항균용 약학적 조성물은 클라비박터 미시가넨시스 아종 미시가넨시스 또는 스타필로코쿠스 오레우스에 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균용 약학적 조성물.

【청구항 11】

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 항진균용 약학적 조성물은 캔디다 알비칸스 또는 리족토니아 솔라니에 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균용 약학적 조성물.

【청구항 13】

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 무독성 농약.

【청구항 14】

약학적으로 유효한 양의 제 9항의 항균용 약학적 조성물을 병원성 세균에 기인한 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 세균에 기인한 질환 치료 방법.

【청구항 15】

약학적으로 유효한 양의 제 9항의 항균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 세균에 기인한 질환 예방 방법.

【청구항 16】

제 1항의 펩타이드를 항균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도.

【청구항 17】

약학적으로 유효한 양의 제 11항의 항진균용 약학적 조성물을 병원성 진균에 기인한 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 진균에 기인한 질환 치료 방법.

【청구항 18】

약학적으로 유효한 양의 제 11항의 항진균용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 병원성 진균에 기인한 질환 예방 방법.

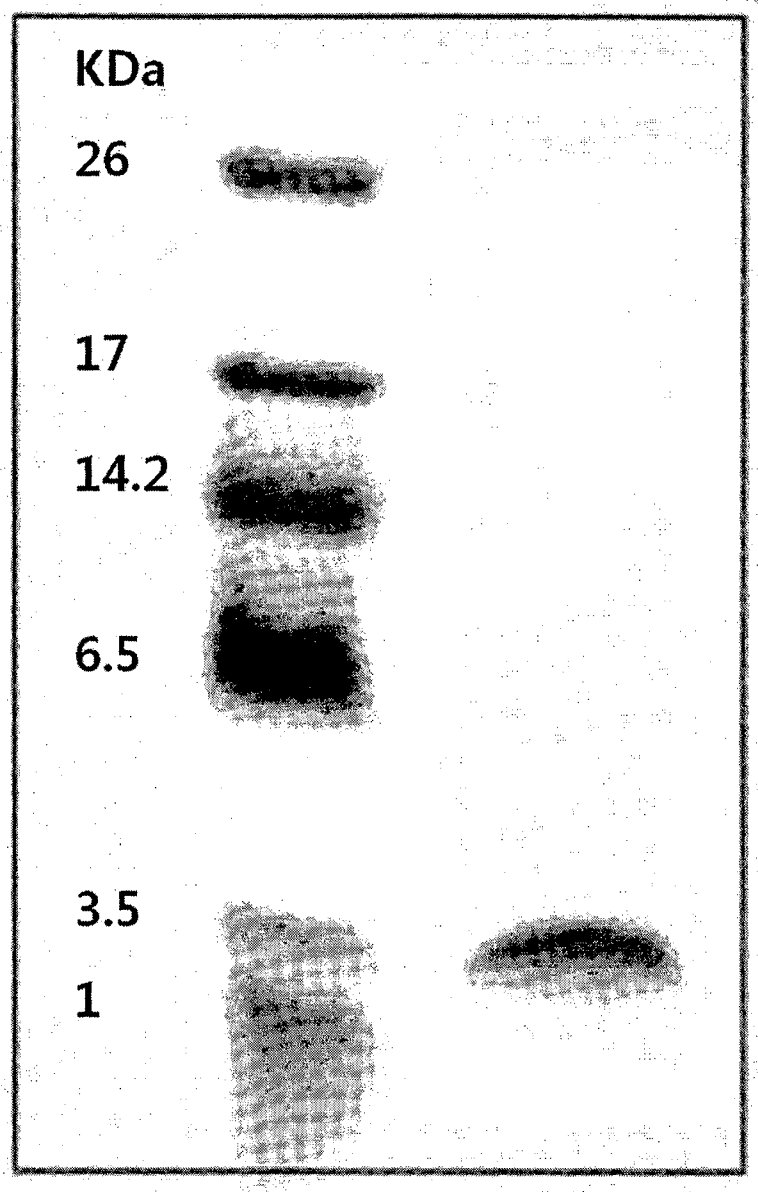
【청구항 19】

제 1항의 펩타이드를 항진균용 약학적 조성물의 제조에 이용하는 용도.

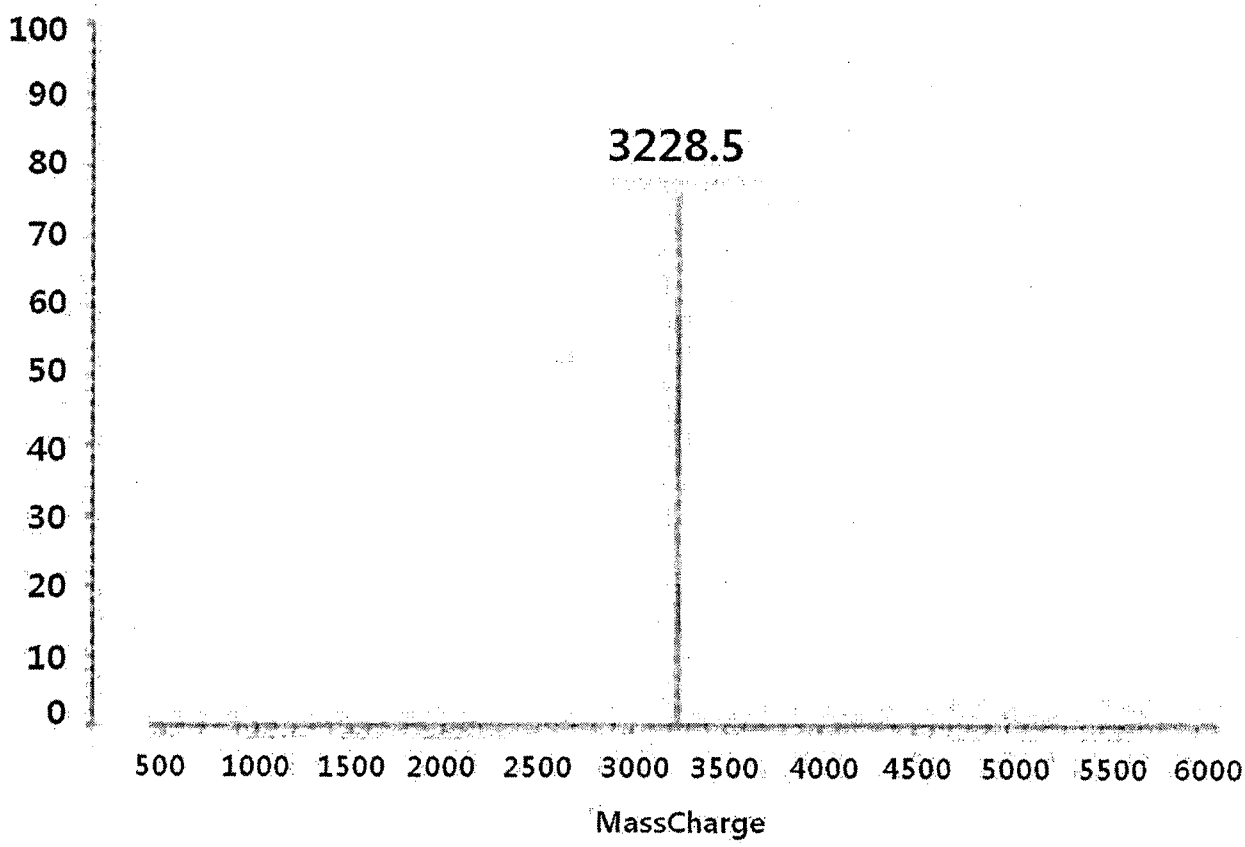
【청구항 20】

제 1항의 펩타이드를 무독성 농약의 제조에 이용하는 용도.

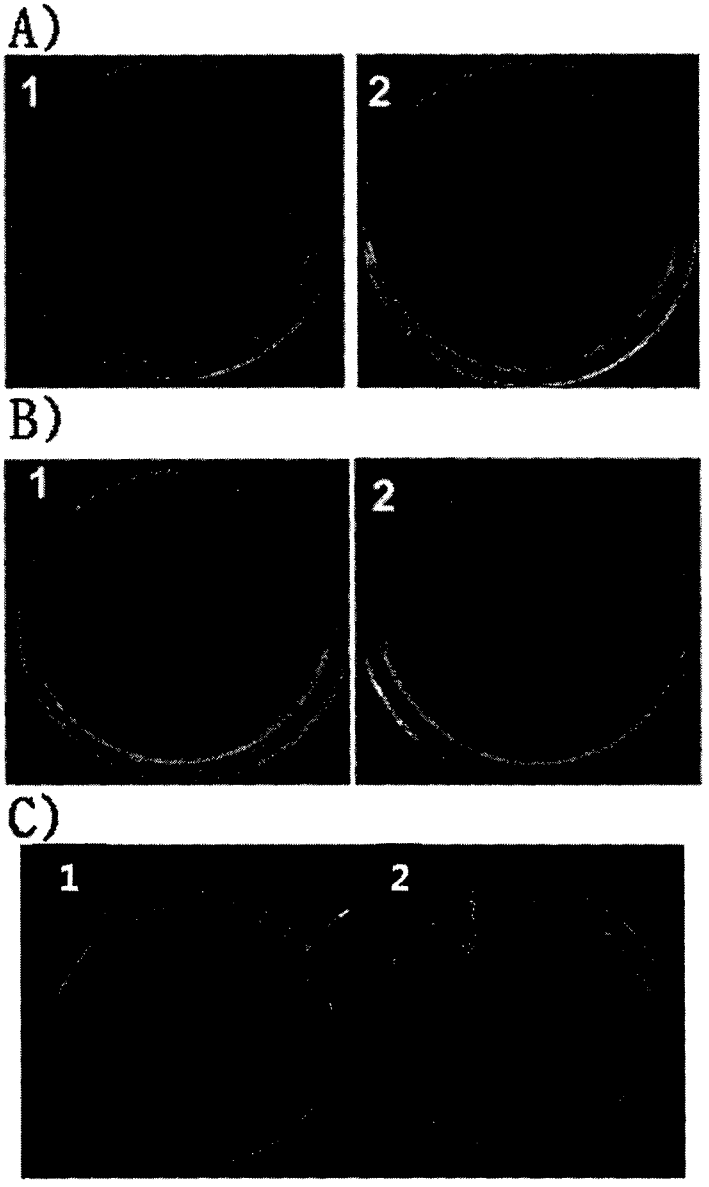
[도 1]



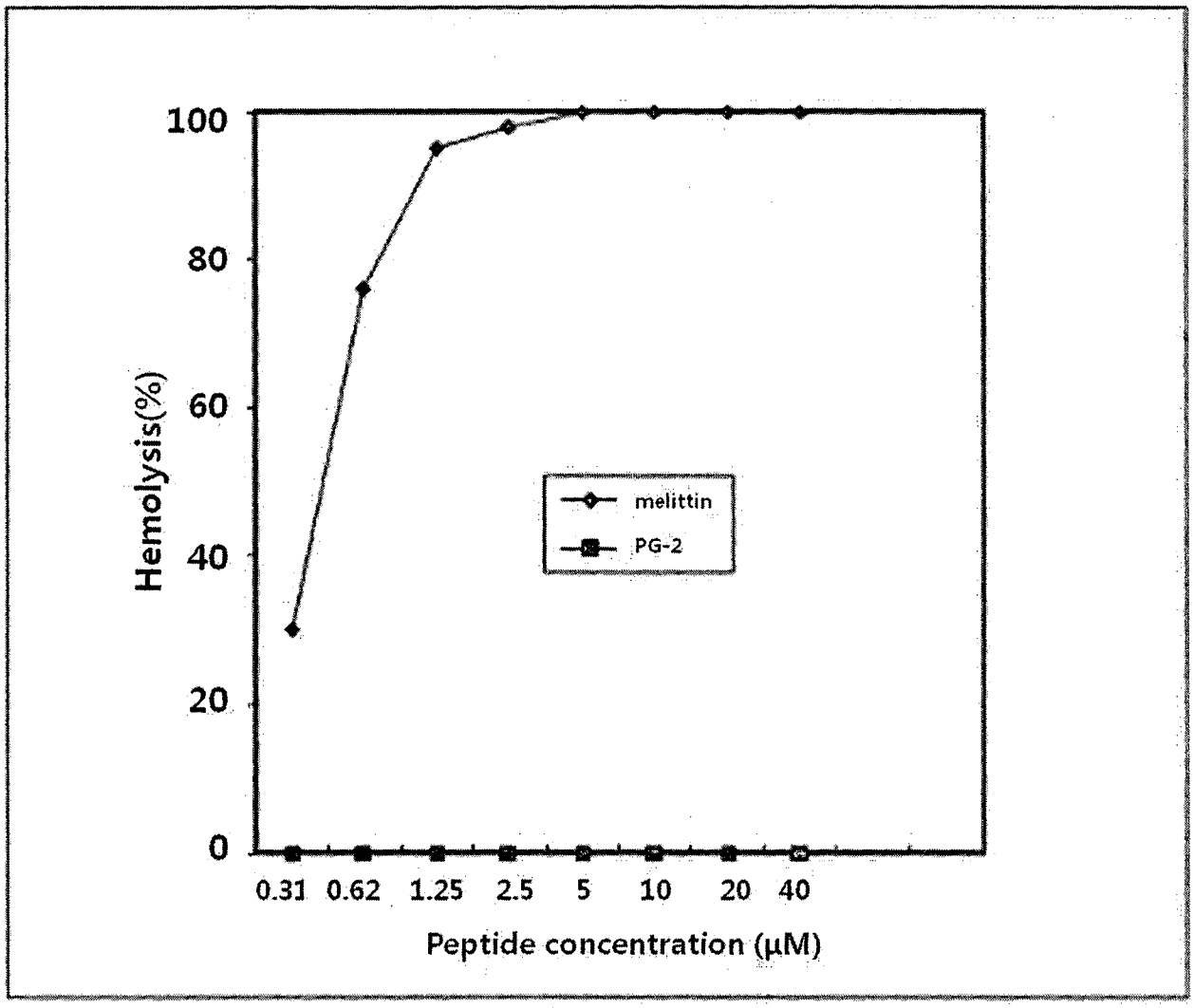
[도 2]


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3228.5
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500
6000
MassCharge

[도 3]



[도 4]


100
80
60
40
20
0
Hemolysis(%)
melittin
PG-2
0.31
0.62
1.25
2.5
5
10
20
40
Peptide concentration (μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/415(2006.01)i, C07K 1/16(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/415; A61K 36/81; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: gogu valley, potato, antibiotic, antifungul, peptide, agricultural chemicals

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GenBank Accession No. AAU09272: Kunitz-type proteinase inhibitor group B [Solanum tuberosum]. 05 February 2004 See the entire document.	1-13,16,19,20
A	KR 10-2006-0054497 A (POTATO VALLEY CO., LTD.) 22 May 2006 See the entire document.	1-13,16,19,20
A	KIM, J. Y. et al., "Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity", Int. J. Mol. Sci. (2009) vol. 10, no. 6, pages 2860-2872 See the entire document.	1-13,16,19,20
A	KIM, J. Y. et al., "Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato", Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) vol. 330, no. 3, pages 921-927 See the entire document.	1-13,16,19,20
A	KR 10-2000-0113526 A (POTATO VALLEY CO., LTD.) 02 November 2009 See the entire document.	1-13,16,19,20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 MARCH 2013 (21.03.2013)	**22 MARCH 2013 (22.03.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/008424

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14, 15, 17, 18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14, 15, 17 and 18 pertain to a method for treatment of the human by surgery or therapy, and to a diagnostic method under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/008424

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0054497 A	22.05.2006	KR 10-0654231 B1	05.12.2006
KR 10-2009-0113526 A	02.11.2009	KR 10-0963094 B1	10.06.2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008424

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/415(2006.01)i, C07K 1/16(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 31/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/415; A61K 36/81; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고구밸리, 감자, 항균, 항진균, 펩타이드, 농약

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GenBank Accession No. AAU09272: Kunitz-type proteinase inhibitor group B [Solanum tuberosum]. 2004.02.05 전문 참조.	1-13,16,19,20
A	KR 10-2006-0054497 A ((주)포테이토밸리) 2006.05.22 전문참조.	1-13,16,19,20
A	KIM, J. Y. 외 6명, "Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity", Int. J. Mol. Sci. (2009) 10권, 6호, 페이지2860-2872 전문 참조.	1-13,16,19,20
A	KIM, J. Y. 외 5명, "Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato", Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 330권, 3호, 페이지921-927 전문 참조.	1-13,16,19,20
A	KR 10-2000-0113526 A ((주)포테이토밸리) 2009.11.02 전문 참조.	1-13,16,19,20

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 03월 21일 (21.03.2013)	**2013년 03월 22일 (22.03.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
정재철
전화번호 82-42-481-3479

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008424

제**1**기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열**(**첫 번째 용지의 **1.c**의 계속**)**

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008424

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **2**의 계속**)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **14,15,17,18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14, 15, 17, 및 18은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 및 진단방법에 속합니다(조약 제17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **3**의 계속**)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/008424

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2006-0054497 A	2006.05.22	KR 10-0654231 B1	2006.12.05
KR 10-2009-0113526 A	2009.11.02	KR 10-0963094 B1	2010.06.10