



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118748911 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 08

(21) 申请号 202280092466.1

(22) 申请日 2022.10.28

(30) 优先权数据

10-2022-0006505 2022.01.17 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/016667 2022.10.28

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/136435 KO 2023.07.20

(71) 申请人 UE会社宇宜化学

地址 韩国

申请人 韩国化学研究院

(72) 发明人 朴钟穆 黄泰圭 徐凤国 郑佳莹

郑民周 金成哲

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277

专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int.Cl.

A01N 31/02 (2006.01)

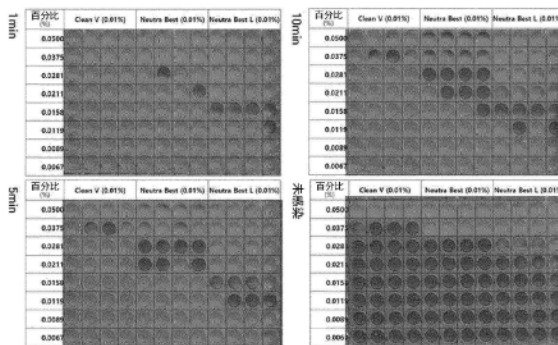
权利要求书1页 说明书14页 附图2页

(54) 发明名称

具有杀灭磷脂包膜病毒的功能的环境友好的防疫组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种环境友好的防疫组合物,其具有杀灭磷脂包膜病毒的功能,该组合物包含:相对于总计100重量%为10至40重量%的聚氧乙烯月桂基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯2-乙基己基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、以及余量的溶剂。根据本发明的环境友好的防疫组合物具有在1分钟内杀灭100%的SARS-CoV-2病毒并且在1至10分钟内杀灭100%的高致病性禽流感病毒的效果。此外,根据本发明的环境友好的防疫组合物具有低细胞毒性,针对人上皮角质细胞(HaCaT)、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)和人单核细胞(THP-1)的IC<sub>50</sub>值(%)为0.003至0.0045,并且对非致病菌株和致病菌株具有抗菌活性。



1. 一种环境友好的防疫组合物,其具有杀灭磷脂包膜病毒的功能,所述组合物包含:基于总计100重量%的所述组合物为10至40重量%的聚氧乙烯月桂基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯2-乙基己基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、以及余量的溶剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,在含有0.1重量%以下的所述组合物的稀释溶液中,SARS-CoV-2病毒去除率在1分钟内为100%。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中,在含有0.1重量%以下的所述组合物的稀释溶液中,100%的高致病性禽流感病毒在1至10分钟内被杀灭。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物具有低的细胞毒性,使得针对人上皮角质细胞(HaCaT)、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)和人单核细胞(THP-1)的 $IC_{50}$ 值(%)在0.003至0.0045的范围内。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物对非致病菌株和致病菌株具有抗菌活性。

6. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述组合物维持pH为6至8。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中,通过将所述组合物以0.01%至0.05%的含量在水中稀释来使用所述组合物。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述余量的溶剂进一步包含20重量%以下的乙醇。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其进一步包含所述组合物总重量的0.1重量%以内的防腐剂。

## 具有杀灭磷脂包膜病毒的功能的环境友好的防疫组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种环境友好的防疫组合物,其具有杀灭具有磷脂包膜的病毒(“磷脂包膜病毒”)的功能,更具体地,涉及一种有效地去除各种磷脂包膜病毒例如Covid-19、禽流感、非洲猪瘟以及严重急性呼吸综合征的环境友好的防疫组合物。

### 背景技术

[0002] 病毒具有由RNA或DNA的遗传物质以及包裹其的蛋白质外壳(衣壳)构成的非常简单的结构。一些病毒除蛋白质外壳外还可以具有由脂质构成的膜,这些具有由此类脂质构成的层(脂质层、脂质膜)的病毒为被包膜包裹的包膜病毒。

[0003] 众所周知,这种脂质层只存在于包膜病毒中,并且当暴露于乙醚或其他有机溶剂时失活,导致感染性丧失。据称,包膜病毒的脂质膜在将其自身基因导入宿主的基因组时发挥主要作用。如果阻断这一机制,则有望在有效地应对不同类型的病毒的同时不出现不必要的副作用。

[0004] 目前广泛地用作用于去除此类病毒的洗涤剂的醇类洗涤剂包含乙醇作为主要组分,其通过溶解病毒的包膜(磷脂)来表现出消毒作用,并且目前在韩国广泛使用。

[0005] 乙醇溶解包膜病毒的由这些磷脂层和蛋白质构成的包膜,使得不具有包膜的病毒能够在体外死亡,或者即使其侥幸进入宿主,也能够防止病毒穿透细胞和在细胞中增殖。

[0006] 同时,由于流感病毒感染呼吸系统、导致全身症状、周期性地改变其外观并且在宿主死亡前转移至另一宿主而不会杀死宿主,科学家猜测流感病毒将会存活至人类的终结。流感病毒是给人类造成最大经济损失的病毒,并且尽管已经研制出预防性疫苗,但仍不能跟上病毒的变异,对病毒的根本性治疗也尚未进行。

[0007] 其中,禽流感(avian influenza,AI)是一种由禽流感病毒感染引起的急性传染病,并严重危害诸如鸡、火鸡和鸭等家禽。根据病毒的致病性程度,其主要被分为低致病性禽流感和高致病性禽流感。

[0008] 1918年至2009年间出现的四种大流行性病毒包括造成最多死亡的西班牙流感(A/H1N1)、亚洲流感(A/H2N2)、流感(A/H3N2)以及最后的在韩国造成260人死亡的2009年的猪流感(A/H1N1)pdm09。

[0009] 最可能引发第五次大流行的禽流感病毒的爆发持续被报道。在2003年开始发现的禽流感A/H5N1在野生鸟类和家禽中出现,并传播至人类,截至2017年9月在16个国家造成454人死亡。此外,在2013年发生的禽流感A/H7N9的情况中,到2017年造成599人死亡。

[0010] 同时,严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome,SARS)是一种新型传染病,自从2002年冬天爆发以来,几个月内已经在世界范围传播,包括新加坡和加拿大。起因病原体是SARS相关冠状病毒(SARS-associated coronavirus,SARS-coV)。已知SARS-coV通过动物宿主冠状病毒的毒株从动物跨物种感染至人类。

[0011] 已知SARS的基本传播途径是通过呼吸道飞沫或被污染的介质直接或间接接触黏膜,并且,据报道,出现例如发热、不适、肌肉疼痛、头痛和寒战等症状,并且传染主要发生在

第二周。

[0012] 对疑似或推定患有SARS的患者进行隔离和住院治疗,并需要严格管理以防止传染。然而,由于目前还没有研制出疫苗或预防性药物,因此仍停留在通过避免前往具有高感染风险的地区或彻底洗手来预防由于直接接触导致的感染的层面。

[0013] 当通过透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)观察冠状病毒的结构时,其由双磷脂膜构成,并且磷脂膜具有含有 $C_{10}$ 至 $C_{18}$ 的长碳链的结构。

[0014] 本发明人在韩国专利申请No.2020-0137611中提出了一种洗涤剂组合物,该组合物是一种用于病毒防护的抗病毒组合物,并且包含基于总计100重量%的该组合物为10至30重量% (“wt. %”)的 $C_{13}H_{27}(OCH_2CH_2)_nOH$ (其中 $n=2$ 至15)、0.1至5重量%的2-乙基己醇乙氧基化物、0.1至5重量%的环氧乙烷-环氧丙烷的嵌段共聚物、以及余量的水。

[0015] 上述专利中用作主要组分的 $C_{13}H_{27}(OCH_2CH_2)_nOH$ 具有支化结构而不是13个碳的碳链的线性结构,因此该组分可以很好地与冠状病毒的磷脂双层膜中包含的由长碳链构成的疏水部分结合,并且增加聚集数量,进而增加冠状病毒的磷脂膜的溶解度。利用上述作用,本发明人制备了该洗涤剂组合物。

[0016] 在上述专利中,当使用具有支化结构的物质形成复杂的磷脂双层膜结构和胶束时,由于疏水性烃之间的排斥力,胶束的堆积密度可能会降低,因此可以形成对于溶解磷脂双层膜更加有利的结构。然而,作为主要组分包含的 $C_{13}H_{27}(OCH_2CH_2)_nOH$ 是一种从石油化工产品合成的材料,并且具有许多支化结构,因此可应用于多种用途,但是它不是可生物降解的,并且对环境不利,因此造成问题。

[0017] 此外,本申请人的韩国专利申请No.2020-0137612公开了一种洗涤剂组合物,其含有基于总计100重量%的该组合物为10至30重量%的辛基酚乙氧基化物(乙氧基化物中含有的环氧乙烷数( $n$ )为2至15)、0.1至5重量%的2-乙基己醇乙氧基化物、0.1至5重量%的环氧乙烷-环氧丙烷的嵌段共聚物、以及余量的水。

[0018] 根据上述专利,包含辛基酚乙氧基化物作为负责去除和抑制冠状病毒的主要组分,其中辛基酚乙氧基化物中的辛基酚基团是包括芳香酚基团的 $C_8$ 烷基,其很好地与冠状病毒的磷脂膜中包含的由长碳链构成的疏水部分结合,同时环氧乙烷部分用于对长碳链的疏水性赋予亲水性。同时,代表环氧乙烷数量的 $n$ 可以调整为2至15,优选5至10,从而将两种或更多种具有不同的 $n$ 的数量的材料混合,并且通过将亲水性调整到预定水平来使用。

[0019] 然而,尽管作为主要组分包含的辛基酚乙氧基化物在破坏磷脂双层膜方面是有效的,但是它对环境具有致命的缺点,这是由于烷基具有支化结构并且分解时酚组分残留。

[0020] 除上述专利之外,在考察对包括SARS病毒和流感病毒的病毒、细菌和真菌具有杀菌和抗菌活性的现有技术时,韩国专利特开公开No.2006-0079388公开了一种无机抗菌剂溶液,其使用如下溶液作为原料通过纳米级二氧化钛光催化剂的合成方法来生产,所述溶液通过制备纳米级银颗粒胶体、然后将该胶体与在预定浓度范围内的选自由包括蒸馏水的水、醇类和表面活性剂组成的组中的一种或多种溶剂混合来获得,以及以小瓶、喷雾剂和气雾剂等形式使用所生产的无机抗菌剂溶液及其稀释液的技术。

[0021] 此外,韩国专利注册号No.10-1317318公开了一种抗菌组合物,其用于预防和治疗由A/H1N1季节性流感病毒导致的季节性流感或新型流感、或由选自A/H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/1996)或A/H1N1的禽流感病毒导致的禽流感,所述抗菌组合物包括由没食子酸

(1)、对二没食子酸和间二没食子酸的混合物(2)、没食子酸乙酯(4)以及对二没食子酸乙酯和间二没食子酸乙酯的混合物(5)以(4.3:1:7.2:16.3)的含量比组成的70%至80%的乙醇混合溶剂提取物,或者从其中分离的五-O-没食子酰基葡萄糖、没食子酸乙酯、或对二没食子酸乙酯和间二没食子酸乙酯的混合物作为活性成分,其特征就在于,该提取物通过如下来获得:将干燥的没食子切成片,并且使用干重的10倍或20倍的70%至80%的乙醇混合溶剂,通过冷萃法、热提取法、超声波提取法或回流冷却提取法在20°C至100°C的提取温度下反复进行提取1至5次,持续2至5小时,然后减压浓缩。

[0022] 使用目前的技术,开发去除各种病毒的产品或疫苗仍然遥遥无期,同时也迫切需要开发一种环境友好的防疫产品,其可以有效地杀灭各种具有磷脂双层膜的包膜的病毒,并且在人类或动物中使用时不引起刺激。

## 发明内容

[0023] 发明要解决的问题

[0024] 本发明的目的是提供一种环境友好的防疫组合物,其具有杀灭磷脂包膜病毒的功能,该组合物能够通过破坏包膜病毒中包含的磷脂膜来有效地阻断由于病毒引起的传染或感染。

[0025] 用于解决问题的方案

[0026] 为实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种环境友好的防疫组合物,其具有杀灭磷脂包膜病毒的功能,该组合物包含:基于总计100重量%的该组合物为10至40重量%的聚氧乙烯月桂基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯2-乙基己基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、以及余量的溶剂。

[0027] 根据本发明的一个实施方案,在含有0.1重量%以下的该组合物的稀释溶液中,SARS-CoV-2病毒去除率在1分钟内可以为100%。

[0028] 此外,根据本发明的一个实施方案,在含有0.1重量%以下的该组合物的稀释溶液中,100%的高致病性禽流感病毒可以在1至10分钟内被杀灭。

[0029] 此外,该组合物可以具有低细胞毒性,使得针对人上皮角质细胞(HaCaT)、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)和人单核细胞(THP-1)的 $IC_{50}$ 值(%)在0.003至0.0045的范围内。

[0030] 此外,该组合物可以对非致病菌株和致病菌株具有抗菌活性。

[0031] 优选地,该组合物维持6至8的中性pH。

[0032] 此外,通过将该组合物以0.01%至0.05%的含量在水中稀释来使用该组合物。

[0033] 根据本发明的一个实施方案,余量的溶剂可以进一步包含20重量%以下的乙醇。

[0034] 根据本发明的一个实施方案,该组合物可以进一步包含该组合物总重量的0.1重量%以内的防腐剂。

[0035] 发明的效果

[0036] 根据本发明的环境友好的防疫组合物在含量为0.1重量%以下的稀释溶液中SARS-CoV-2病毒去除率在1分钟内为100%,并且具有在1至10分钟内100%杀灭高致病性禽流感病毒的效果。

[0037] 此外,针对人上皮角质细胞(HaCaT)、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)和人单核细胞(THP-1)的 $IC_{50}$ 值(%)可以在0.003至0.0045的范围内,从而表现出低细胞毒性,并且实现对

非致病菌株和致病菌株具有抗菌活性的效果。

### 附图说明

[0038] 图1显示根据实施例2(本发明)、比较例1(专利文献1的组合物)以及比较例2(专利文献2的组合物)的各组合物的SARS-CoV-2病毒去除率的测量结果。

[0039] 图2和图3显示测量根据实施例2(本发明, Neutra Best L)的组合物的致病菌性禽流感病毒杀灭效果的结果。

[0040] 图4和图5显示测量各组合物对与实验例3相同的样品的抗菌活性的结果。

### 具体实施方式

[0041] 下文将更详细地描述本发明。

[0042] 本文使用的术语用于描述具体的实施方案, 并且不旨在限制本发明。

[0043] 如本文所用, 除非上下文明确指出其他情况, 否则单数形式包括复数形式。此外, 当在本文中使用时, “包含(comprise)、包括(include)”和/或“包含(comprising)、包括(including)”用于限定形状、数字、步骤、操作、成员、要素和/或其组的存在, 并且不排除存在或添加一个或多个其他形状、数字、操作、成员、要素和/或其组。

[0044] 本发明提供一种环境友好的防疫组合物, 其具有杀灭多种多样的磷脂包膜病毒的功能。

[0045] 根据本发明的组合物具有包含如下的构成: 基于总计100重量%的该组合物为10至40重量%的聚氧乙烯月桂基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯2-乙基己基醚、0.01至10重量%的聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、以及余量的溶剂。

[0046] 本发明的组合物优选包含仅由线性结构构成的聚氧乙烯月桂基醚作为主要组分(意指组合物中除溶剂以外以最大量包含的组分)。聚氧乙烯月桂基醚是一种非离子表面活性剂, 其具有优异的与阴离子表面活性剂和阳离子表面活性剂的相容性, 并且即使在酸、碱和盐等共存的水溶液中也表现出优异的表面活性剂活性。

[0047] 在最近的实验中, 作为使用仅由线性结构构成的聚氧乙烯月桂基醚作为主要组分的结果, 本发明人证实了, 与包含具有支化结构的其他组分作为主要组分的情况(在先专利1和2)相比, 包膜病毒的包膜更有效地被去除。

[0048] 这是由于构成包膜病毒中包括的磷脂双层膜的磷脂的烷基是直链形式。因此, 在本发明中, 预期使用具有类似的线性形式的结构作为主要组分可以提高与磷脂双层膜的亲和性, 进而提高穿透能力, 即, 穿透进入磷脂双层膜时的渗透性。

[0049] 此外, 在有效地去除磷脂双层膜后, 其应当能够在水中以乳液状态稳定地存在。即使此时也可以提高稳定性程度, 并且仅由线性结构构成的聚氧乙烯月桂基醚在使用后可生物降解, 从而使得能够生产环境友好的组合物。

[0050] 优选以组合物总重量的10至40重量%的量包含此类聚氧乙烯月桂基醚, 如果其少于10重量%, 则去除磷脂双层膜的效果不足, 如果其超过40重量%, 则其他组分的含量相对较小, 并且可能会不利于制备环境友好的抗病毒组合物。

[0051] 本发明的组合物可以组合物总重量的0.01至10重量%的量包含聚氧乙烯2-乙基己基醚, 从而用作在进入包膜病毒的磷脂膜之间时增加渗透性的渗透助剂。由于聚氧乙烯

2-乙基己基醚具有烃在侧链被取代的不太规则的结构,因此可以预期提高渗透性,这是因为当它进入磷脂双层膜之间时会被间隔开。

[0052] 优选以组合物总重量的0.01至10重量%的量包含此类聚氧乙烯2-乙基己基醚,如果少于0.01重量%,则无法获得期望的效果,以及如果超过10重量%,则无法获得进一步提高渗透性的效果,并且因此是不可取的。

[0053] 此外,本发明的组合物可以包含基于组合物的总重量为0.01至10重量%的通过使环氧乙烷和环氧丙烷共聚来制备的聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚。

[0054] 添加聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚以抑制在制造根据本发明的具有杀灭磷脂包膜病毒的功能的环境友好的防疫组合物期间可能会出现的气泡产生,并且可以组合物总重量的0.01至10重量%包含聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚以有效地去除气泡。

[0055] 此外,根据本发明的环境友好的防疫组合物的特征在于维持约6至8的中性pH。因此,本组合物具有将使用本组合物的材料的损害或变质降至最少的优点,以及特征在于表现出优异的病毒杀灭效果。

[0056] 此外,本发明的组合物可以包含除上述组分之外的余量的溶剂。溶剂可以包括水或有机溶剂,其中水没有特别限制,例如普通自来水或普通水中含有的所有杂质例如溶解的离子、固体颗粒、微生物和有机物质已从其中去除的纯化水。

[0057] 此外,如有必要,可以包含在总溶剂的20重量%以内的作为有机溶剂的醇类溶剂例如乙醇或异丙醇,以降低最终组合物的粘度或去除在制造组合物期间产生的气泡。此外,在低温下例如在冬天使用时,可以改善组合物的保存特性。

[0058] 此外,为了防止在保存根据本发明的组合物期间例如霉菌生长等问题并且从而改善储存稳定性,可以包含在组合物总重量的0.1重量%以内的已知的防腐剂,并且防腐剂的种类没有特殊限制。

[0059] 根据本发明的具有杀灭磷脂包膜病毒的功能的环境友好的防疫组合物可以通过将以上各组分在室温(r.t.)下充分混合来容易地制备,其中,制备的组合物的疏水-亲水平衡(HLB)值在12至15的范围内,从而当其用作用于各种用途的环境友好的防疫组合物时,可以在水中形成胶束,从而提高清洁效果。

[0060] 其中,根据本发明的组合物具有有效地杀灭例如COVID-19、禽流感、严重急性呼吸综合征(SARS)、中东呼吸综合征(MERS)、新型冠状病毒-19以及非洲猪瘟等各种具有磷脂双层膜包膜的病毒的功能。

[0061] 此外,根据本发明的组合物使用具有线性结构的聚氧乙烯月桂基醚作为主要组分,从而其在使用后被有效地生物降解,并且可以解决现有的具有支化结构的表面活性剂中残余毒性有机物质的问题,由此使得能够生产环境友好的组合物。因此,根据本发明的组合物在用于某些用途、例如在人体上喷雾或消毒手部时或者在应用于各种动物时可以安全地使用而没有其他副作用。

[0062] 根据本发明制备的上述环境友好的防疫组合物可以在水中稀释并且用于各种目的,例如喷雾、消毒和清洁等。

[0063] 稀释浓度基于100%的组合物可以为0.01至0.05重量%,但不限于此,并且对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以调整稀释浓度以适合预定目的。

[0064] 实施例

[0065] 以下,将通过以下实施例的方式更详细地描述本发明。然而,提出以下实施例仅用于说明性目的,并且不应理解为本发明的范围特别限制于此。此外,特定的化合物将在以下实施例中说明,但对于本领域技术人员而言显而易见的是,即使在使用其等同物时,也可以产生等同或类似的效果。

[0066] 实施例和比较例:组合物的制备

[0067] 根据下表1的构成组成,将各组合物放入纯化水中,在18°C下混合,并充分搅拌,以制备各防疫组合物。在下表1中,比较例1是本申请人的专利文献1中实施例2的组合物,比较例2是专利文献2中实施例2的组合物,其中各自包含具有支化结构的组分作为主要组分,并且与本发明比较。

[0068] [表1]

含量 (wt.%)	聚氧乙烯 月桂基醚	聚氧乙烯2- 乙基己基醚	聚氧乙烯聚 氧丙烯烷基 醚	$C_{13}H_{27}(OCH_2CH_2)_nOH$	辛基酚乙 氧基化物	水
实施例1	10	0.1	0.2	-	-	89.7
实施例2	27	0.5	0.5	-	-	72.0
实施例3	40	5.5	3.5	-	-	51.0
比较例1 <sup>(1)</sup>	1.0	0.5	0.5	27	-	72.0
比较例2 <sup>(2)</sup>	1.0	0.5	0.5	-	17	81.0
(1)专利文献1中实施例2的组合物						
(2)专利文献2中实施例2的组合物						
(3)实施例1中的组合物为 pH6, 实施例2中为 pH7, 实施例3中为 pH8。						

[0070] 实验例1:SARS-CoV-2抗病毒效果的测量

[0071] 根据实施例2(本发明,Neutra Best L)、比较例1(专利文献1的组合物,Neutra Best)以及比较例2(专利文献2的组合物,Clean V)的各组合物的SARS-CoV-2病毒去除率如下来测量,并且其结果在下图1中示出。

[0072] 将Vero细胞(猴肾上皮细胞)以每孔 $1 \times 10^4$ 个在96孔细胞板中培养。然后,在将 $1 \times 10^3$ 至 $5 \times 10^3$ 个感染性病毒分装到EP管中之后,混合病毒-细胞培养液(Gibco DMEM-0% FBS),直至组合物的浓度达到0.1%,然后进行反应,反应时间为30秒、1分钟、5分钟和10分钟。

[0073] 反应完成后,使用干冰将细胞培养液快速冷冻,然后将样品储存在-80°C的深度冷冻冰箱中。将制备的样品用细胞培养液在96孔U形底板中稀释10倍。将在96孔细胞板中培养的细胞用 $1 \times$ 磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗一次,并且将稀释的样品转移至清洗过的细胞中,并且使其反应1小时30分钟。反应完成后,除去先前含有的细胞培养液,并且更换为以适当浓度包含TPCK胰蛋白酶的细胞培养液。

[0074] 在2至3天,通过显微镜目视观察细胞变形和SARS-CoV-2病毒增殖状态,感染后3天,使用10%结晶紫染料对存活细胞进行染色。其结果在下表2和图1中示出。

[0075] [表2]



百分比 (%)	Clean V (0.01%)			Neutra Best (0.01%)			Neutra Best L (0.01%)		
	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min	1 min	5 min	10 min
0.0500	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.0375	ND	<b>50%</b>	<b>25%</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
[0076] 0.0281	ND	ND	ND	<b>25%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	ND	ND	ND
0.0211	ND	ND	ND	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>75%</b>	ND	ND	ND
0.0158	ND	ND	ND	ND	ND	<b>25%</b>	<b>100%</b>	<b>75%</b>	<b>100%</b>
0.0119	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>
0.0089	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.00067	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND

[0077] 上表2显示了细胞存活率的测量结果,其中稀释浓度为0.0375%的根据比较例2(专利文献2的组合物,Clean V)的各组合物分别在5分钟时显示细胞存活率为50%和在10分钟时显示细胞存活率为25%。此外,比较例1(专利文献1的组合物,Neutra Best)在稀释浓度为0.0211%时通常显示出细胞活力。

[0078] 之后,参考图1中示出的结果,被病毒杀死的细胞或被洗涤剂毒性杀死的细胞未被染色并且观察到呈透明,而存活的细胞被结晶紫染色并且观察到呈深紫色。稀释浓度为0.0158%的根据本发明的实施例1的Neutra Best L在1分钟和10分钟杀灭所有病毒,因此可以确认细胞在上述时间显示100%的存活率,并且在5分钟显示75%的存活率(参见图1)。即,可以确认根据本发明的组合物在1分钟的非常短的时间内去除100%的SARS-CoV-2病毒。

[0079] 此外,可以看出,在稀释浓度为0.0089%以下时,所有细胞均被病毒杀死并且测得为ND(未被检测到)。由这些结果,应当理解的是,根据本发明的组合物可以在0.0158%以下的浓度下杀灭所有病毒。

[0080] 由这些结果,可以看出,根据本发明的Neutra Best L即使在较低浓度下也可以有效地杀灭病毒,同时细胞可以存活。

[0081] 实验例2:高致病性禽流感(AI)病毒杀灭效果及细胞毒性的测量

[0082] 根据实施例2(本发明,Neutra Best L)的组合物的高致病性禽流感病毒杀灭效果及细胞毒性(与实验例1相同)如下来测量,并且其结果在下图2和3中示出。

[0083] 对于高致病性禽流感病毒杀灭效果,使用利用红细胞(RBC)的称为血凝素测定的方法。具体地,其利用RBC通过流感病毒的称为血凝素的蛋白引起溶血的原理。如果流感病毒是活的,则利用RBC而发生溶血并且RBC破裂从而整体呈现红色。此外,如果病毒被杀灭或者使病毒生长的细胞被杀死,则形成红点,这是因为病毒不存在。这是由于用于该实验的板具有U形底部形状,并且RBC借助重力聚集到底部并且形成为如同一个单独的点。

[0084] 接下来,参考显示高致病性禽流感病毒杀灭效果的图2,当将样品以0.0375%的浓度稀释时,可见红细胞存活良好,并在1分钟、5分钟和10分钟时聚集为红点。另一方面,在浓度为0.0281%的情况下,在1分钟、5分钟和10分钟时分别有50%、25%及75%的红细胞存

活。结果,可以确认,在0.0375%以上的浓度下,所有100%的AI病毒可以在1分钟的非常短的时间内被杀灭。

[0085] 参考示出细胞毒性试验的结果的图3,可以看出,在稀释至0.0500%的浓度下,借助本发明的组合物,所有细胞都死亡并呈白色而与感染(O, X)无关。然而,由于可以看出在0.0375%以下的稀释浓度下,细胞存活而呈紫色,因此由这些结果确认到,浓度为0.0375%以下没有细胞毒性。

[0086] 实验例3:细胞毒性的测量

[0087] 使用实施例2(本发明,NB-3)、比较例1(专利文献1的组合物,NB-1)、比较例2(专利文献2的组合物,NB-2)和现有的市售产品以及各种表面活性剂,根据下表3的各组合物对三种细胞例如人上皮角质细胞(HaCaT)、人支气管上皮细胞(BEAS-2B)和人单核细胞(THP-1)的细胞毒性如下来评价。

[0088] [表3]

样品名	名称	备注
P-1	次氯酸钠	Yuhan Rox, 冠状病毒细胞凋亡稀释比例(水:rox =50:1)
P-2	苯扎氯铵	Jobs Green Pure 溶液, 冠状病毒细胞凋亡稀释比例(水:化学品=65:1)
P-3	硬脂酸钠	溶于蒸馏水 D.W(但是只在高温下溶解)
NB-1	Neutra Best 溶液	防腐剂 x
NB-2	Neutra Best clean V	防腐剂 x
NB-3	NB-L 溶液	防腐剂 x
NB-4	Neutra Best BC	pH 7.77
NB-5	Neutra Best BS	pH 9.93
NB-6	Neutra Best ES	pH 9.83
NB-7	Neutra Best LB	pH 6.57
NB-8	Neutra Best QC	pH 5.13
NB-9	Neutra Best SB	pH 3.92
P1: Yuhan Rox (其他制造商的市售消毒剂) P2: 含有阳离子表面活性剂的市售产品 P3: 使用由固体样品制成的表面活性剂的组合物 NB-1: 专利文献1的组合物 NB-2: 专利文献2的组合物 NB-3: 本发明实施例2的组合物 NB-4、NB-8: 包含阳离子表面活性剂作为主要组分的组合物 NB-5、NB-6: 包含阴离子表面活性剂作为主要组分的组合物 NB-7、NB-9: 包含两性表面活性剂作为主要组分的组合物		

[0089]

[0090] 1、细胞培养

[0091] 将HaCaT细胞、BEAS-2B细胞和THP-1细胞的各细胞系以 $0.5 \times 10^4$ 个细胞/孔、 $0.5 \times 10^4$ 个细胞/孔和 $3 \times 10^4$ 个细胞/孔接种在96孔细胞培养板上。细胞数量不同的原因是,在最

初设定细胞数量条件时,将溶媒(Veh,只用药物溶剂处理的组)的OD(光密度570nm)设定为约1.0。

#### [0092] 2、处理

[0093] 将细胞铺在96孔细胞培养板上,并且在24小时后用药物处理。将一滴药物的量稀释至培养基体积的约1/100(在100 $\mu$ l培养基中滴加1 $\mu$ l药物)。例如,在96孔板中,在将细胞铺板时使用100 $\mu$ l培养基。因此,如果旨在处理最终浓度为0.0075%的药物,则意味着应制备初始浓度为0.75%的药物。即,这意味着,当将1 $\mu$ l 0.75%的药物滴加至100 $\mu$ l培养基中时,实际作用于细胞的浓度为0.0075%。

#### [0094] 3、MTT溶液

[0095] 在用药物预先处理细胞24小时后,以与培养基体积相同的量添加MTT溶液(1mg/ml),并且使其在培养箱中反应2至3小时。这里,与培养基体积相同的量意指,培养基为100 $\mu$ l,向培养基中添加100 $\mu$ l的MTT溶液。

#### [0096] 4、不溶性甲臞

[0097] 当上述反应完成时,在96孔细胞培养板的底部形成蓝紫色不溶性物质,这是当MTT四唑盐通过借助线粒体的细胞呼吸被还原成不溶于水的MTT甲臞时发生的现象。

[0098] 因此,在反应之后,将上清液完全除去,将不溶于水的MTT甲臞溶解在有机溶剂DMSO中,并且使用酶标仪在OD<sub>570nm</sub>处对颜色深度进行数值确定。

[0099] 代表生物抑制浓度的IC<sub>50</sub>值(%)通过如下来计算:根据各浓度绘制回归图,并且通过趋势线得出方程 $y=ax+b$ ,从而计算出 $y=50$ 时的 $x$ 浓度,并且其结果在下表4中示出。

#### [0100] [表4]

IC <sub>50</sub> 值(%)			
	HaCaT	BEAS-2B	THP-1
P1	0.001951	0.00243	0.00142
P2	0.000412	0.00038	0.00119
P3	0.005292	0.00969	0.4165
NB-1	0.003644	0.00301	0.00413
NB-2	0.003711	0.00319	0.00526
NB-3	0.003608	0.00343	0.00419
NB-4	0.000797	0.00394	0.00277
NB-5	0.003953	0.0032	0.00517
NB-6	0.005083	0.0031	0.00339
NB-7	0.000907	0.00279	0.00286
NB-8	0.005061	0.00039	0.00438
NB-9	0.014485	0.00293	0.01497

[0101]

[0102] 参考上表4的结果,生物抑制浓度IC<sub>50</sub>值(%)证明了细胞毒性值,该值越小,则细胞毒性越大。在根据本发明的NB-3的情况下,确认到细胞毒性低于使用阳离子表面活性剂作为加湿器消毒剂中包含的组分的市售产品(P2)的细胞毒性。即,可以看出细胞毒性低,这是因为它对正常人体细胞没有显著影响。

[0103] 实验例4:抗菌活性

[0104] 为了评估各组合物对与实验例3相同的样品的抗菌活性,进行以下程序。使用纸盘法进行抗菌活性试验,并且本文中使用的菌株和培养基在下表5中示出。

[0105] [表5]

	微生物	KCTC No.	培养基
[0106]	枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	1021	营养肉汤 (Becton and Dickinson, BD, NJ, 美国)
	白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	7965	酵母麦芽肉汤 (BD, NJ, 美国)
	植物乳杆菌 ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	3108	MRS 肉汤 (BD, NJ, 美国)
	清酒乳杆菌 ( <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>Sakei</i> )	3598	
	肠膜明串珠菌右旋葡聚糖亚种 ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> )	3530	
	大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	1924	Luria Bertani 肉汤 (LPS, 韩国)
	铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	1750	
	鼠伤寒沙门氏菌( <i>Salmonella typhimurium</i> )	1926	
	金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	1927	
	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	1917	
变异链球菌( <i>Streptococcus mutans</i> )	3065		

[0107] 将每种菌株振荡培养24小时,并且使用菌液作为接种培养液。在制备适合各菌株的培养基后,添加1.5%琼脂(Becton and Dickinson, BD, NJ, 美国)以对培养基进行灭菌,然后将经灭菌的培养基冷却,并且在约40°C下添加1%的接种培养液。然后,通过各分装20ml,制备抗菌活性板培养基。使各样品以1 $\mu$ g/50 $\mu$ l、10 $\mu$ g/50 $\mu$ l、100 $\mu$ g/50 $\mu$ l的浓度吸收在8mm (Advantec Ltd., 东京, 日本)中,轻轻放置在抗菌活性培养基的表面上,并且在37°C下温育18至24小时,然后确认是否产生生长抑制区(透明区),然后测量其直径。其结果在下表6至7和图4至5中示出。

[0108] [表6]

[0109]

	非致病菌株											
	革兰氏阳性菌株								革兰氏阴性菌株			
	枯草芽孢杆菌				表皮葡萄球菌				大肠杆菌			
$\mu\text{g}/$ 50 $\mu\text{l}$	1	10	100	MIC	1	10	100	MIC	1	10	100	MIC
<b>P-1</b>	-	-	12	<b>50</b>	-	-	(12)	<b>50</b>	-	-	12	<b>50</b>
<b>P-2</b>	-	-	(11)	<b>50</b>	-	12	20(30)	<b>5</b>	-	-	14	<b>50</b>
<b>P-3</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-1</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	(12)	<b>50</b>	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-2</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$	-	-	(13)	<b>50</b>
<b>NB-3</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	(11)	<b>50</b>	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-4</b>	-	-	15	<b>50</b>	10	18	21(30)	$\leq 1$	-	-	14	<b>50</b>
<b>NB-5</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	13	<b>50</b>	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-6</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	12	<b>50</b>	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-7</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	10	<b>50</b>	-	-	-	$\geq 100$
<b>NB-8</b>	-	-	(12)	<b>50</b>	10	17	25	$\leq 1$	-	-	11(17)	<b>50</b>
<b>NB-9</b>	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$

[0110] [表7]

	致病菌株															
	革兰氏阳性菌株								革兰氏阴性菌株							
	金黄色葡萄球菌				变异链球菌				铜绿假单胞菌				鼠伤寒沙门氏菌			
$\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$	1	10	100	MIC	1	10	100	MIC	1	10	100	MIC	1	10	100	MIC
P-1	-	-	11	50	-	-	12	50	-	-	13	50	-	-	12	50
P-2	-	14	25	5	-	(10)	12(24)	5	-	11	24	5	-	-	(11)	50
P-3	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$
[0111] NB-1	-	-	12	50	-	-	19	50	-	-	13	50	-	-	(12)	50
NB-2	-	-	-	$\geq 100$	-	-	12	50	-	-	(10)	50	-	-	(12)	50
NB-3	-	-	(12)	50	-	-	(11)	50	-	-	10	50	-	-	-	$\geq 100$
NB-4	9	22	26	$\leq 1$	-	(14)	14(26)	5	-	16	26	5	-	-	(10)	50
NB-5	-	-	16	50	-	-	18	50	-	11	22	5	-	-	(11)	50
NB-6	-	-	-	$\geq 100$	-	-	11	50	-	-	11	50	-	-	-	$\geq 100$
NB-7									-	-	10	50	-	-	-	$\geq 100$
NB-8									-	16	31	5	-	-	15	50
NB-9									-	-	-	$\geq 100$	-	-	-	$\geq 100$

[0112] 参考上述表6至7和图4至5的结果,根据本发明的组合物(NB-3)对非致病菌株中的革兰氏阳性菌株枯草芽孢杆菌和革兰氏阴性菌株以及致病菌株中的鼠伤寒沙门氏菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为100以上,并且对其余菌株为50以上。

[0113] 在致病菌株的情况下,可以确定MIC浓度越低,则抗菌活性越好。然而,一般来说,有利的是对非致病菌株没有抗菌活性。本发明的组合物显示与上述效果相符的结果,尽管两者之间存在些许差异。

[0114] 产业上的可利用性

[0115] 根据本发明的抗病毒组合物可以通过使用具有线性结构的材料作为主要组分来提高与包膜病毒中包含的磷脂膜的亲和性,从而提高穿透进入磷脂双层膜时的渗透性并有效地将其溶解,由此有效地使层融合,从而有效地去除各种各样的包膜病毒。

[0116] 此外,在破坏包膜病毒的磷脂双层膜后,其应当能够以乳液状态在水中稳定地存在。即使这时,也可以提高稳定性,这是由于作为主要组分包含的物质的线性结构所导致的。

[0117] 此外,由于使用后生物降解的可能性高,因此,与使用具有支化结构的传统物质相

比,可以提供一种环境友好的防疫组合物。

[0118] 因此,根据本发明的环境友好的防疫组合物可以有效地用于去除包括例如COVID-19、禽流感、SARS和非洲猪瘟病毒等包膜病毒。



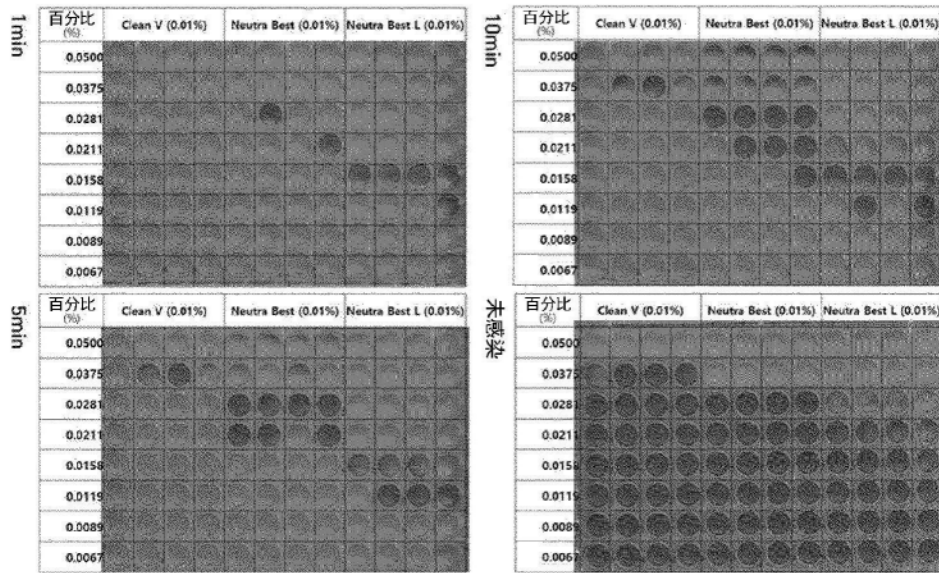


图1

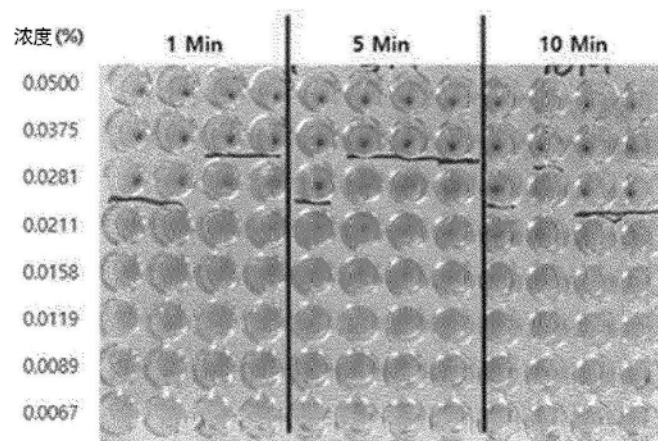


图2

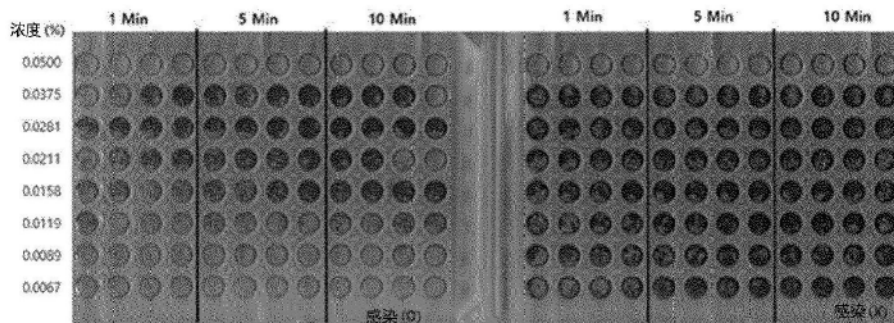


图3

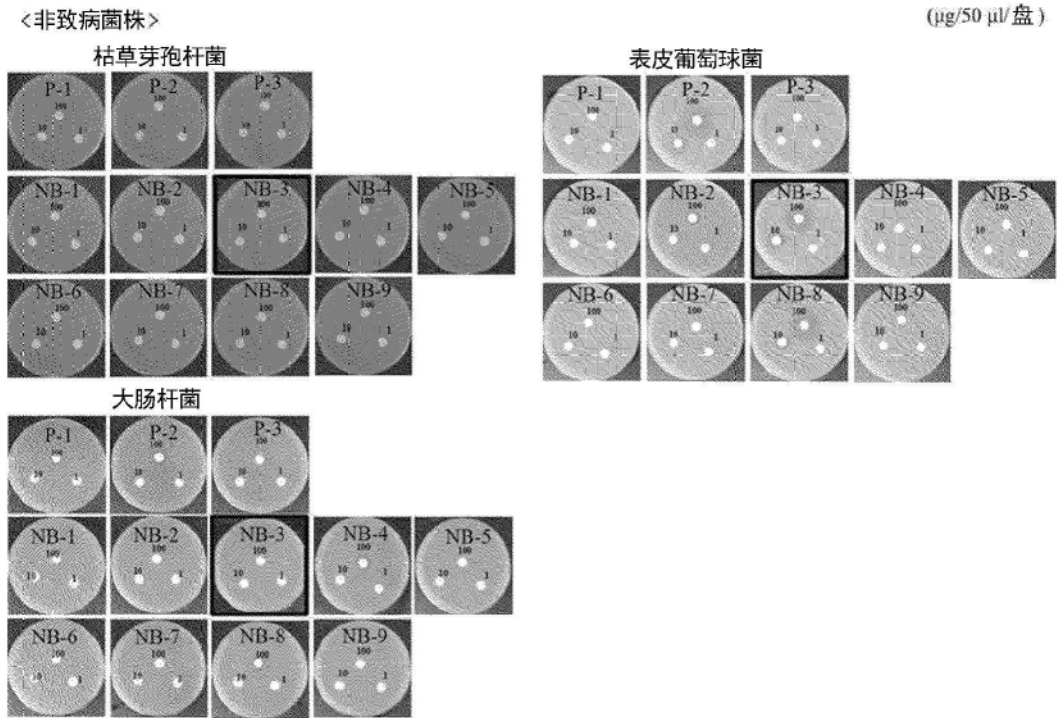


图4

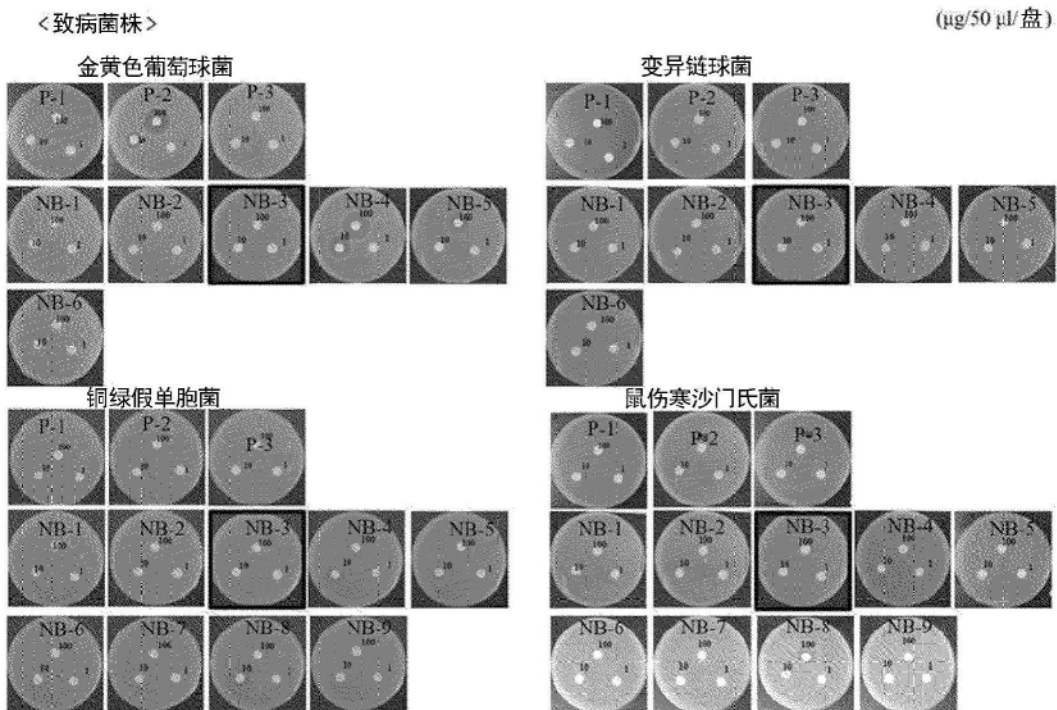


图5