



등록특허 10-2314731



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월18일

(11) 등록번호 10-2314731

(24) 등록일자 2021년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/36 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)  
A23K 10/14 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)  
A61K 38/47 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/2462 (2013.01)  
A01N 63/50 (2020.01)

(21) 출원번호 10-2020-0081693

(22) 출원일자 2020년07월02일

심사청구일자 2020년07월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170087770 A

KR102097127 B1

비특허문헌 1

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

유상열

서울특별시 강남구 언주로30길 13, A동 1001호

이찬영

경기도 수원시 영통구 법조로 134, 3001동 102호

김진우

서울특별시 관악구 쑥고개로 119, 501호(다산오피스텔)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 7 항

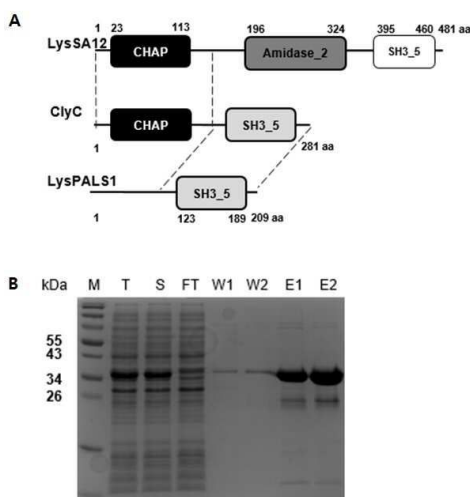
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 황색포도상구균에 대한 높은 사멸 능력을 가진 재조합 엔도라이신 ClyC

## (57) 요약

본 발명은 황색포도상구균에 대한 높은 사멸 능력을 가진 재조합 엔도라이신 ClyC에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기존의 엔도라이신에 비해 다양한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 향상된 균사멸능과 황색포도상구균의 생물막 제거능을 가지는 재조합 엔도라이신 ClyC에 관한 것이다. 본 발명은 황색포도상구균으로 인한 감염 사례가 많은 우유 및 실제 동물의 혈액과 혈청 조건 내에서도 효과적인 균 사멸능이 입증된 재조합 엔도라이신 ClyC를 제공할 수 있다. 또한, 모체 엔도라이신과 달리 약간의 열에도 최대 활성의 95%의 안정적인 항균활성을 나타내 식품, 의약 및 제약 산업에도 활용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

*A23K 10/14* (2016.05)

*A23L 29/06* (2016.08)

*A61K 38/47* (2013.01)

*A61P 31/04* (2018.01)

*C12Y 302/01017* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2A1A17069378

과제번호 NRF-2017R1A2A1A17069378

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 농식품 저장성과 안전성 향상을 위한 박테리오파지-숙주 상호작용 연구 및 박테리오파지, 엔도라이신 엔지니어링

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2020.08.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 생물막 제어능이 있는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황색포도상구균은,

메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 엔도라이신 ClyC.

#### 청구항 3

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 식품 조성물.

#### 청구항 4

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 황색포도상구균은,

메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 사료 조성물.

#### 청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 세정제 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 황색포도상구균에 대한 높은 사멸 능력을 가진 재조합 엔도라이신 ClyC에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기존의 엔도라이신에 비해 다양한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 향상된 군사멸능과 황색

포도상구균의 생물막 제거능을 가지는 재조합 엔도라이신 ClyC에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성균의 통성혐기성 세균으로 인간이나 동물의 피부, 분변, 소화관에 상재하는 포도상 구균의 하나이다. 황색포도상구균은 군집을 이루는 균의 모양이 포도 송이를 닮아 붙여졌으며 균이 덩어리져 있는 상태인 생물막(biofilm)을 쉽게 형성한다고 알려져 있다. 황색포도상구균이 내열성인 외독소(TSST-1, EF, 알파, 베타, 델타 독소)를 생산할 경우 심각한 식중독을 일으키기도 하며, 식세포를 죽이는 독소, 응고효소, 용혈소 등을 분비하여 감염 숙주세포의 면역 시스템에 저항하여 화농성 감염증을 일으킨다. 이로 인해 균혈증이나 패혈증 등의 심각한 질병을 유도하기도 한다.
- [0003] 상기와 같은 특징이 있는 황색포도상구균을 제어하기 위해, 현재까지는 항생제가 주로 사용되어 왔다. 하지만, 항생제의 광범위한 사용으로 인해 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*), 반코마이신 저항성 황색포도상구균(Vancomycin-resistant *S. aureus*)의 발병이 최근 증가하고 있다. 따라서 기존 합성 항생제와는 완전히 다른, 새로운 기작의 항생물질이 요구되고 있으며 박테리오파지 유래의 단백질인 엔도라이신이 최근 대안으로 떠오르고 있다.
- [0004] 엔도라이신(리신)은 세균을 죽이는 생물체인 박테리오파지가 세균을 사멸시킬 때 작용하는 일종의 효소로서, 그람 양성균의 밖에서 처리하였을 때 세균의 세포벽 내의 펩티도글리칸(peptidoglycan layer)의 특정 연결부위(linkage)를 전달하는 역할을 한다. 따라서 엔도라이신은 기존의 항생제가 가진 멸균 기작(저해하는 방식의 bacteriostatic)이 아닌 새로운 멸균 기작으로 항생제 내성 문제를 근본적으로 해결하면서 낮은 농도로 세균을 빠르게 사멸시키는 항생제 대체 물질로 각광받고 있다.
- [0005] 기존에 존재하는 황색포도상구균을 죽이는 엔도라이신은 몇가지 문제점을 가지고 있다. 황색포도상구균을 목표로 하는 엔도라이신의 도메인 성분(domain composition)에 따라 5개의 그룹으로 나뉘는데, 각 그룹내 아미노산 서열 상동성이 90% 이상으로 높아 새로운 엔도라이신에 대한 발견이 어렵다. 또한, 천연에서 발견된 엔도라이신의 경우 대장균 내에서 과발현하여 대량 생산하는 것이 어렵고, 생산되더라도 용해도(solubility)가 낮아 실제 활용에 어려움이 있다. 따라서 황색포도상구균에 대한 제어 효능이 좋은 새로운 엔도라이신의 개발이 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2097127호(등록일자: 2020.03.30)에는, 황색포도상구균 유래 바이오필름 제거에 효과적인 박테리오파지 CSA13 및 그 유래의 엔도라이신 LysCSA13에 관한 것으로, 더 상세하게는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 숙주감수성을 가지고, 황색포도상구균이 생성한 바이오필름(biofilm) 제거에 효과적인 CSA13 및 엔도라이신 LysCSA13에 관해 기재되어 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 기존의 엔도라이신에 비해 다양한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 향상된 균사멸능과 황색포도상구균의 생물막 제거능을 가지는 신규한 재조합 엔도라이신 ClyC를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 생물막 제어능이 있는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 제공한다.
- [0009] 한편, 본 발명의 엔도라이신 ClyC에 있어서, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0010] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 한편, 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0015] 본 발명은 기존의 모체 엔도라이신에 비해 다양한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 향상된 균사멸능과 황색포도상구균의 생물막 제거능을 가지는 신규한 재조합 엔도라이신 ClyC을 제공할 수 있다. 또한, 모체 엔도라이신과 달리 약간의 열에도 최대 활성의 95%의 안정적인 항균활성을 나타내 식품, 의약 및 제약 산업에도 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 Domain shuffling 방법을 활용한 재조합 엔도라이신 라이브러리를 구축하는 과정을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 항균활성이 우수한 엔도라이신 ClyC 선별을 나타낸 도식이다.
- 도 3은 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 도메인 분석(A) 및 단백질 정제 결과(B)를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 숙주세포 용균 효과를 나타낸 결과 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 최적 pH 및 온도 조건에 대한 항균 활성을 나타낸 결과 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 황색포도상구균 생물막 제거능을 나타낸 결과 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 기본 버퍼인 Tris-HCl 내에서의 항균 활성을 나타낸 결과 그래프이다. 비교를 위해 모체의 엔도라이신 LysSA12를 사용하였다.
- 도 8은 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 유제품(우유)(A) 및 동물의 혈액(B)과 혈청(C) 내 사멸 능력을 나타낸 결과 그래프이다. 비교를 위해 모체의 엔도라이신 LysSA12를 사용하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 생물막 제어능이 있는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 도메인 셔플링(domain shuffling) 기법을 활용하여 다양한 조합의 도메인들을 연결하여 재조합 엔도라이신 라이브러리를 구축하고(도 1), 신속 검출 시스템을 활용하여 우수한 항균 능력이 있는 엔도라이신을 선별하였다(도 2). 이를 통해 LysSA12의 CHAP(Cysteine-and Histidine- dependent Aminohydrolase Peptidase) 도메인과 LysPALS2의 CBD(Cell wall Binding Domain) 도메인으로 구성되어 있는 재조합 엔도라이신 ClyC를 얻을 수 있었다.
- [0019] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서는 황색포도상구균을 숙주로 하여 수행한 용균 활성 실험에서 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC가 모체가 되는 엔도라이신보다 병원균 황색포도상구균 중에도 대해 향상된 균 사멸능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0020] 한편, 생물막이란 미생물이 주된 구성 요소가 되어 생성된 막을 일컬으며, 황색포도상구균에 의해서도 폴리스티렌에 형성되게 된다. 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC는 모체가 되는 엔도라이신보다 황색포도상구균의 생물막에 대한 제거 효과도 뛰어남을 확인하였다.
- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC을 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포

도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)을 포함하는 것일 수 있다.

- [0022] 본 발명의 식품 조성물은 바람직하게 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나에 첨가되는 것이 좋으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 엔도라이신 ClyC는 바람직하게 식품 첨가제 대비 0.1~20중량% 포함되는 것이 좋다. 0.1중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 20중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 엔도라이신 ClyC는 상술한 바와 같이 황색포도상구균을 특이적으로 사멸시키고 그것에 의해 형성된 생물막을 효과적으로 제거할 수 있어, 황색포도상구균에 의해 유발되고 그것이 형성한 생물막으로 인해 만성화된 다양한 질환, 예컨대 유방염, 피부염, 패혈증, 화농성 질환, 식중독, 폐렴, 골수염, 농가진, 균혈증, 심내막염, 및 장염 등에 관한 치료에 효과적일 수 있다. 다만, 이러한 목적의 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 이미 황색포도상구균에 대해 항균 활성이 입증된 다른 성분이 추가로 포함될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 엔도라이신 ClyC의 함량은, 사용방법, 복용자의 상태에 따라 바람직하게 조절하는 것이 좋다. 본 발명의 약학조성물에서 엔도라이신 ClyC의 함량은 약학조성물 대비 0.000001~5중량%일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있다. 또한, 예방 및 치료제가 약제일 경우 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0025] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제 (PLASTERS), 과립제 (GRANULES), 로션제 (LOTIONS), 리니먼트제 (LINIMENTS), 리모나데제 (LEMONADES), 방향수제 (AROMATIC WATERS), 산제 (POWDERS), 시럽제 (SYRUPS), 안연고제 (OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제 (LIQUIDS FORMULATIONS), 에어로솔제 (AEROSOLS), 엑스제 (EXTRACTS), 엘릭실제 (ELIXIRS), 연고제 (OINTMENTS), 유동엑스제 (FLUIDEXTRACTS), 유제 (EMULSIONS), 현탁제 (SUSPENSIONS), 전제 (DECOCTIONS), 침제 (INFUSIONS), 점안제 (EYE DROPS), 정제 (TABLETS), 좌제 (SUPPOSITORIES), 주사제 (INJECTIONS), 주정제 (SPIRITS), 카타플라스마제 (CATAPLASMA), 캡셀제 (CAPSULES), 크림제 (CREAMS), 트로키제 (TROCOES), 탱크제 (TINCTURES), 파스타제 (PASTES), 환제 (PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명 약학조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 약학조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.001~100mg/kg (체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 의해 변화될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 사료 조성물을 제공한다. 상기 사료 조성물은 총 중량에 대하여 상기 엔도라이신 ClyC를 0.000001~10중량% 함유할 수 있다. 본 발명의 상기 사료 조성물은 통상의 배합사료에 섞어서 경구투여의 방법으로 급여하며, 계속 투여 또는 과다 투여시에도 면역저하 등의 내성이나 부작용의 문제가 거의 없다.
- [0028] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 ClyC를 포함하는 세정제 조성물을 제공한다. 본 발명의 세정제 조성물은 세정제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 더 포함할 수 있으며, 예컨대 안정화제, 용해화제 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의



지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

- [0031] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0034] 의료용 세정제로 사용될 경우에는 스프레이 형태로 바이오필름 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법이 가능하다. 또한, 손을 사용한 세척은 물론이고 초음파 세척기 및 자동 세척기를 이용할 수도 있다. 또, 의료용 장치를 의료용세정제에 담구는 방법도 가능하다.
- [0035] 본 발명의 세정제 조성물은 조리 장소 및 조리 설비의 소독제로 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 의료용 세정제에서의 엔도라이신 ClyC의 유효 용량은 보통으로 숙련된 당업자에 의해서 간단한 사전 조사를 거쳐 용이하게 결정될 수 있다. 특정 용량은 응용하고자 하는 분야 및 적용방법에 의해 좌우될 것이다. 본 발명의 조성물은 엔도라이신의 경우 0.001%(w/v)~0.1%(w/v), 바람직하게는 0.002%(w/v)~0.01%(w/v), 가장 바람직하게는 0.005%(w/v)를 포함한다.
- [0037] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예 및 실험예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0039] **[실시예 1: 본 발명의 신규한 재조합 엔도라이신 ClyC 제조]**
- [0041] **1) 도메인 셔플링(Domain shuffling) 방법을 활용한 재조합 엔도라이신 라이브러리 구축**
- [0042] 본 발명은 단백질 공학 기술 중에 도메인 셔플링(Domain shuffling) 기법을 활용하여 만들어졌다. 자연의 엔도라이신은 EAD(Enzymatically active domain) 도메인과 CBD(Cell wall Binding Domain)으로 이루어져 있다. 여기서 EAD는 실제 세포벽(펩티도글리칸)의 bond를 자르는 역할을 하며, CBD는 특정한 세균에 대한 인식 및 접촉에 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 다양한 엔도라이신의 도메인끼리 다양하게 재조합시킴으로써 더 향상된 특징을 갖는 엔도라이신을 개발하고자 하였다.
- [0043] 먼저, 도 1과 같이 황색포도상구균에 작용하는 다양한 종류의 엔도라이신을 고르고 BLAST, HMMER 등의 프로그램을 이용하여 해당 엔도라이신들의 도메인의 위치를 파악하였다. 그 후 유전자 재조합 기술을 통해 다양한 조합의 도메인들을 연결하여 재조합 엔도라이신 라이브러리를 구축하였다.
- [0045] **(2) 신속 검출 시스템을 이용한 항균활성이 우수한 엔도라이신 ClyC 선별**
- [0046] 상기 재조합 엔도라이신 라이브러리를 구축한 후, 신속 검출 시스템을 활용하여 우수한 항균 능력이 있는 엔도라이신을 선별하였다. 도 2와 같이, 엔도라이신의 발현을 위해 2가지 종류의 프로모터를 갖는 벡터를 활용하였다.
- [0047] *E.coli* 세포 안에서 용해(lysis)시키는 단백질인 SPN1S를 나타내는 유전자가 발현 pBAD33 벡터에 들어가 있으며 재조합된 엔도라이신은 발현 pET28a 벡터에 들어가 있다. 따라서 SPN1S 유전자가 발현되면 *E.coli*가 깨트리면서 세포 내에서 발현된 엔도라이신이 밖으로 나오게 되고, 그 후 재조합 엔도라이신이 포함된 균 사멸물을 황색포도상구균이 도포된 고체 배지에 도팅(dotting)하게 되면, 투명한 형태의 용해 존(lysis zone)이 관찰되는데 이 크기와 선명도에 따라 다양한 엔도라이신의 항균 능력을 비교 및 대조할 수 있다. 본 발명에서는 600개 이상의 클론(clone)을 대상으로 스크리닝을 진행하여 신규 엔도라이신 ClyC를 선별하였다.
- [0049] **(3) 본 발명의 엔도라이신 ClyC의 서열 확인, 정제 및 분리**

[0050] 선별된 엔도라이신 ClyC는 pET28a 벡터 내에 클로닝되어 있기 때문에 0.5M IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 20시간의 발현 이후 Tris-Cl (pH 6.8, 300 Mm NaCl, 30% 글리세롤(glycerol)) buffer에 회석하여 세포벽을 깼다. 깨진 대장균을 원심분리함으로써 단백질을 분리하고 니켈 친화 크로마토그래피(Nickel affinity chromatography) 방법을 이용해 순수한 엔도라이신 ClyC를 얻을 수 있었다. 재조합 엔도라이신 ClyC는 도 3의 A와 같이 LysSA12의 CHAP(Cysteine-and Histidine- dependent Aminohydrolase Peptidase) 도메인과 LysPALS2의 CBD(Cell wall Binding Domain) 도메인으로 구성되어 있으며, 도 3의 B와 같이 단백질 정제 결과를 통해 약 34.7 kDa의 크기를 가짐을 확인하였다. 재조합 엔도라이신 ClyC는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 서열번호 2의 핵산서열에 의해 암호화되어 있다. 상기 정제된 엔도라이신의 특성 및 항균 능력 검정은 하기에서 수행하였다.

[실시예 2: 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 항균 능력 및 생화학적 특성 분석]

[0054] (1) 엔도라이신 ClyC의 황색포도상구균에 대한 속주 세포 용해 능력

[0055] 배양된 황색포도상구균 RN4220을 기존 버퍼(control)와 엔도라이신 ClyC를 처리하고 비교함으로써 세균의 용해 정도를 흡광도로 파악할 수 있었다. 도 4의 A와 같이 재조합 엔도라이신 ClyC의 경우 100 nM과 300 nM을 처리했을 경우, 각각 control(엔도라이신 처리 없이 기존 버퍼만 들어간 황색포도상구균)에 비해 흡광도가 현저히 빠르게 감소했음을 관찰할 수 있었다. 반면, 도 4의 B를 보면 모체 엔도라이신인 LysSA12의 경우 동일 양을 처리하였을 때 용균 효과가 훨씬 떨어짐을 알 수 있다. 따라서, 재조합 엔도라이신 ClyC는 황색포도상구균을 더 빠르고 많이 용균시킴으로서 모체 엔도라이신에 비해 더 효과적으로 균주를 제어한다고 판단할 수 있다.

[0057] (2) 엔도라이신 ClyC의 최적 활성 pH 및 온도에 대한 실험

[0058] 재조합 엔도라이신 ClyC의 황색포도상구균에 대한 항균 활성은 도 5의 A와 같이 pH 8-9에서 최적으로 나타났다. 또한 도 5의 B와 같이, 모체 엔도라이신은 37도 조건에서 활성이 많이 떨어진 것에 비해 재조합 엔도라이신 ClyC는 약간의 열(45 ℃)을 가했을 때도 최대 활성의 95 %의 안정적인 항균 활성을 보이기 때문에 내열성이 좋다고 판단하였다.

[0060] (3) 엔도라이신 ClyC의 항균 활성 범위에 대한 실험

[0061] 황색포도상구균의 다양한 종에 대한 재조합 엔도라이신 ClyC의 항균 감수성을 측정하였고, 그 결과는 표 1과 같았다.

표 1

[0062]

Strains		ClyC	LysSA12
<b>Staphylococcal strain</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	RN4220	+++	++
	Newman	++	+
	ATCC13301	+++	++
	ATCC23235	++	+
	ATCC33586	++	+
	ATCC33593	++	++
MRSA	CCARM3793	+	+
	CCARM3089	++	+
	CCARM3090	+++	+++
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC29970	++	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC35983	+	+
	CCARM3787	++	+
	CCARM3789	++	+
<i>Staphylococcus hominis</i>	ATCC37844	++	+
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC10290	-	-
<b>Other Gram positive bacteria</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC23857	-	-



<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19114	-	-
<b>Gram negative bacteria</b>			
<i>Salmonella Typhimurium</i>	SL1344	-	-
<i>Escherichia coli</i> MG 1655	ATCC47076	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC29544	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	-	-

[0064] 그 결과, 재조합 엔도라이신 ClyC은 메티실린 저항성 황색포도상구균 균주를 포함한 다양한 황색포도상구균에 대하여 강한 항균 활성을 보였다. 특히, 황색포도상구균 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)종에 대해서는 모체의 엔도라이신보다 높은 항균 능력을 나타냈다. 따라서, 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC은 황색포도상구균에 대해 모체 엔도라이신에 비해 전반적으로 더 강한 항균 활성 능력을 보유함을 확인할 수 있었다.

[실시예 3: 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 황색포도상구균 생물막 제거 효과 측정]

[0067] 황색포도상구균은 생물막을 형성한다고 알려져 있으며 이러한 생물막으로 인해 산업 시설 및 식품 산업에서 식중독 관리에 어려움을 겪고 있다. 또한 체내에 감염되었을 경우에도 쉽게 생물막을 형성함으로써 그 치료가 더 어렵다는 특징이 있다. 따라서 본 발명에서는 황색포도상구균 RN4220을 대상으로 하여 재조합 엔도라이신 ClyC가 생물막을 제거하는 활성을 얼마나 가지고 있는지 연구하였다.

[0068] 먼저 황색포도상구균을 0.25% D-(+)-포도당을 포함한 TSB 배지에서 12시간 배양 후, 이 배양액을 1:100로 희석하여 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 분주하였다. 그 후, 37℃에서 이 플레이트를 24시간 동안 정치 배양함으로써 생물막 생성을 유도하였고, 200  $\mu$ l의 PBS 버퍼로 3회 세척하였다. 각 well에 엔도라이신을 포함한 용액과 엔도라이신을 포함하지 않는 용액을 각각 첨가하고 37℃ 조건에서 3시간 동안 처리하여 엔도라이신이 생물막에 영향을 있는지를 확인하였다. 그 후 PBS로 한번 더 세척하고 각 well을 200  $\mu$ l의 1% 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 염색하면 들어있는 생물막의 양만큼 보라색으로 염색이 된다. 마지막으로 PBS로 각 well을 3회 세척 후 33% 아세트산(acetic acid)을 풀어주면 크리스탈 바이올렛 염색약으로 염색된 생물막의 양에 따라 색깔의 농도가 달라진다. 따라서 각 well의 흡광도(OD570)를 측정하게 되면 도 6의 A와 같이 엔도라이신의 농도에 따른 생물막의 제거 효과를 확인할 수 있었다.

[0069] 더 나아가, 메티실린 저항성을 가지는 황색포도상구균과 병원 환자 샘플에서 채취한 다양한 종류의 황색포도상구균에 대한 생물막 제거 효과도 측정하였다. 도 6의 B와 같이 다양한 균주에서 생물막이 빠르게 형성됨을 확인하였고, 본 재조합 엔도라이신 ClyC가 생물막을 잘 형성하는 모든 균주에 효과적인 생물막 제거능이 있음을 확인하였다.

[실시예 4: 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC의 시간에 따른 사멸 능력 측정]

(1) 재조합 엔도라이신 ClyC의 시간에 따른 기본 버퍼 조건 내 사멸 능력 측정

[0074] 재조합 엔도라이신 ClyC가 황색포도상구균의 수를 감소시키는 데 효과적인지 판단하기 위해 버퍼 조건에서 ClyC를 처리한 후 황색포도상구균의 수를 세어 균주에 대한 사멸 능력을 측정하였다. 흡광도를 측정한 용균 활성 능력과 달리 실제 황색포도상구균을 희석한 후 플레이트에 도팅(dotting)하여 그 수를 세면 더 정확한 항균 능력을 확인할 수 있다.

[0075] 먼저, 도 7의 A와 같이, 기본적으로 활용된 Tris-HCl (20mM, pH 8.0)에서의 시간에 따른 항균 효과를 측정하였다. 약  $10^{5-6}$  CFU/ml의 황색포도상구균으로 오염된 버퍼에 다양한 농도의 ClyC를 처리한 결과, 1  $\mu$ M의 재조합 엔도라이신 ClyC를 처리한 용액에서는 3시간 만에 모든 균이 사멸되었다. 반면, 모체의 엔도라이신은 동일 조건 하에 log 2-3 정도 죽이는 효과만 관찰되었다. 더욱이, 도 7의 B와 같이 3  $\mu$ M의 재조합 엔도라이신 ClyC를 처리한 용액에서는 1시간 안에 모든 균이 죽는 결과를 확인할 수 있었다.

(2) 재조합 엔도라이신 ClyC의 시간에 따른 유제품(우유) 및 동물의 혈액 내 사멸 능력 측정

[0078] 황색포도상구균에 의한 식중독이 빈번하게 일어난다고 알려진 유제품(우유)에 재조합 엔도라이신 ClyC를 처리한 후 항균 능력을 측정하였다. 도 8의 A에서 알 수 있듯이, 모체 엔도라이신은 0.7  $\mu$ M 뿐만 아니라 1.4  $\mu$ M 처리한 용액에서도 아무런 항균 효과를 관찰할 수 없었다. 반면, 재조합 엔도라이신 ClyC를 황색포도상구균에 오염된 우유에 처리한 후 1시간 내에 0.7  $\mu$ M의 경우 log 5가 감소하는 효과가 나타났고, 1.4  $\mu$ M를 처리한 경우 1시간

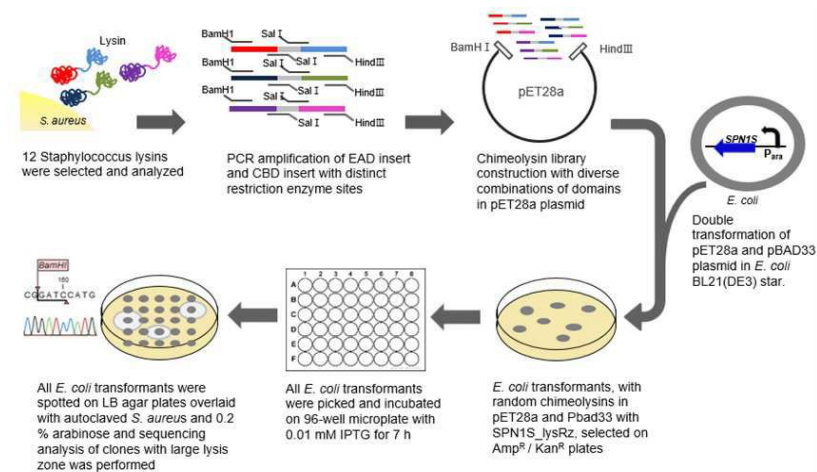
내에  $10^{6-7}$  CFU/ml의 황색포도상구균이 모두 사멸하는 효과가 확인되었다. 이와 같이 ClyC는 유제품 및 식품 산업에서 항미생물제제로 사용될 수 있는 높은 가능성을 가짐을 확인하였다. 한편, 재조합 엔도라이신 ClyC가 제약산업에 활용될 경우에 대비하여 동물의 혈액 내에서의 항균 활성도 비교하였다. 도 8의 B에서 알 수 있듯이, 재조합 엔도라이신 ClyC를 황색포도상구균에 오염된 동물의 혈액에 처리한 경우 1시간 이내에는 log 4-5의 감소 효과가, 2시간 이내에서는 log 5-6의 감소효과로 균이 모두 사멸됨을 확인할 수 있었다. 더 나아가 도 8의 C와 같이 재조합 엔도라이신 ClyC의 황색포도상구균에 오염된 동물의 혈청에서의 균 사멸능이 확인되었다. 이 경우에도 재조합 엔도라이신 ClyC는 1 uM을 처리했을 때 2시간 안에  $10^{6-7}$  CFU/ml의 황색포도상구균이 모두 사멸한데 반하여, 모체 엔도라이신은 동일 농도 처리 시 log 2의 효과만을 보였다.

[0080]

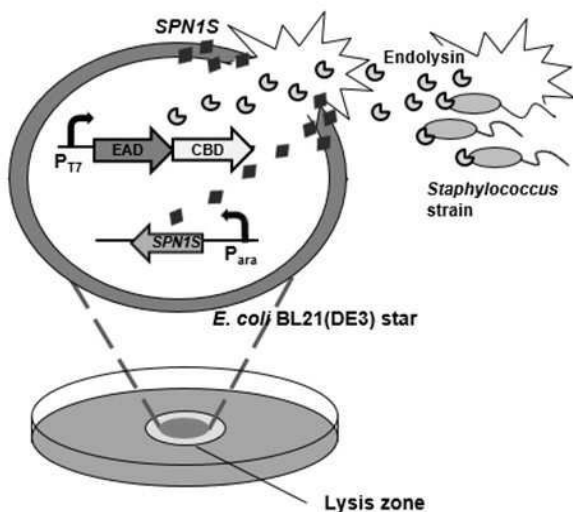
이상 종합하면, 본 발명의 재조합 엔도라이신 ClyC는 항생제를 대체하여 다양한 황색포도상구균과 그로 인해 형성되는 생물막까지도 효과적으로 제어할 수 있는 신규 항균 물질로 이용될 수 있다. 또한, 버퍼 조건에서만 아니라 우유나 동물의 혈액, 혈청 내에서도 항균 활성이 뛰어난 것을 통해 제약 및 식품 산업 분야에서도 적용되어 효과적인 황색포도상구균 질병과 식중독을 제어할 수 있다고 판단된다.

## 도면

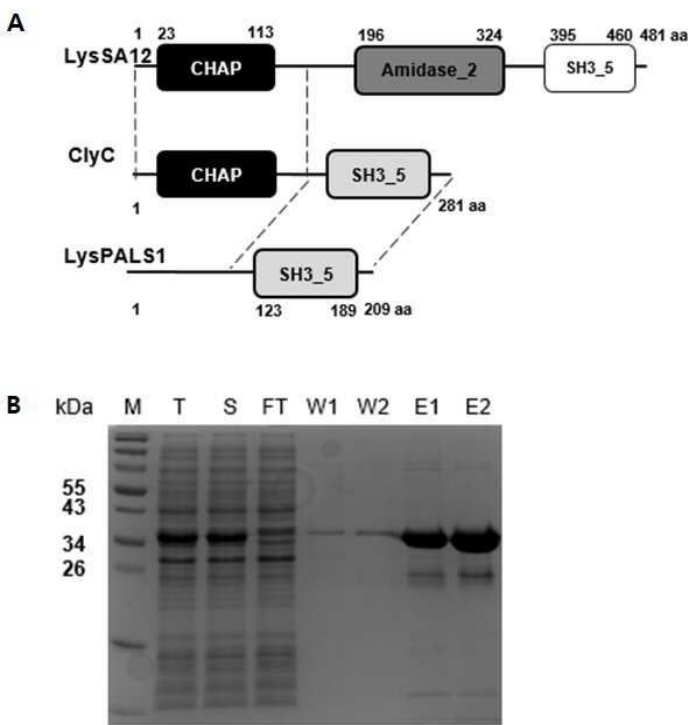
### 도면1



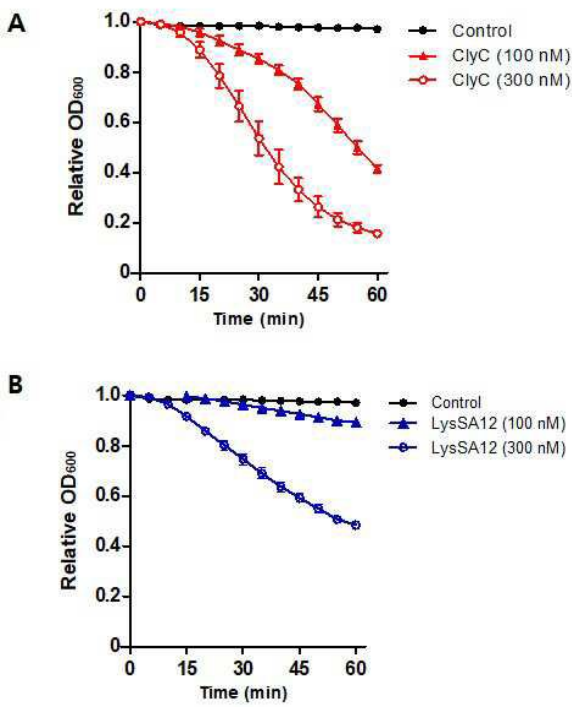
### 도면2



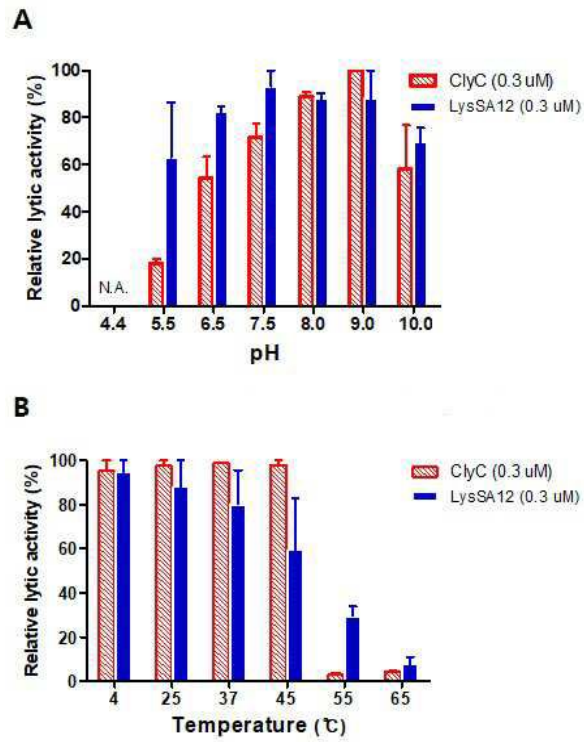
도면3



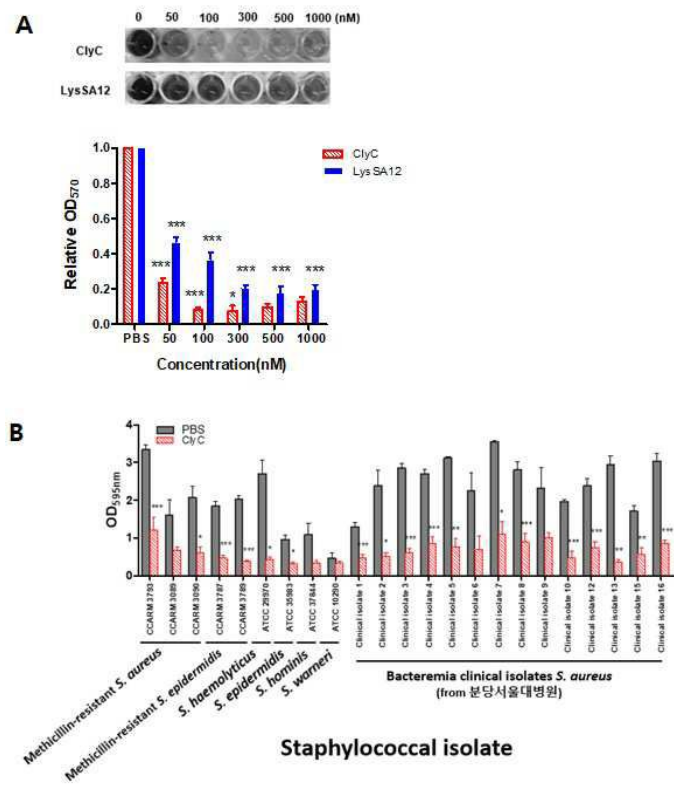
도면4



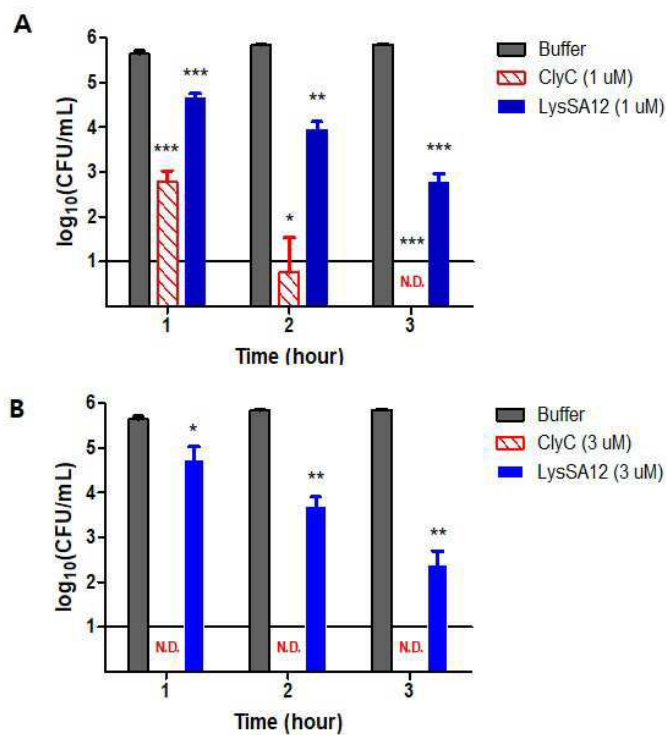
도면5



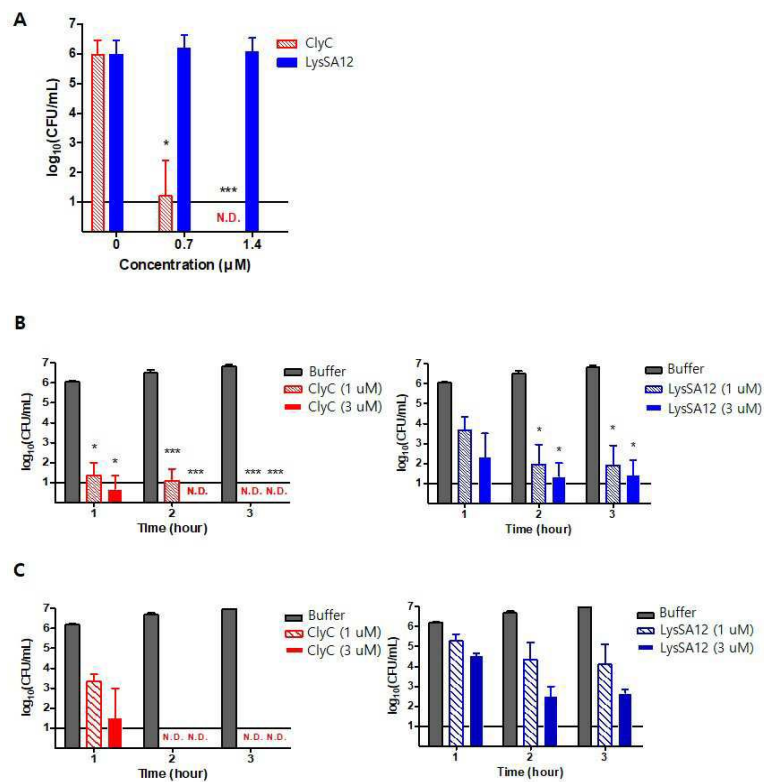
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Seoul National University R&DB Foundation

<120> Recombinant endolysin ClyC with potential bacteriocidal activity  
against Staphylococcus aureus

<130> YP-20-069

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Endolysin ClyC

<400> 1

Met Gln Ala Lys Leu Thr Lys Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Thr

1 5 10 15

Ser Glu Gly Lys Gln Tyr Asn Ala Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Gln Cys

20 25 30

Phe Asp Tyr Ala Asn Ala Gly Trp Gln Val Leu Phe Gly Tyr Asn Leu

35 40 45

Lys Gly Val Gly Ala Lys Asp Ile Pro Ser Ala Asn Asp Phe Asn Gly

50 55 60

Leu Ala Thr Val Tyr Gln Asn Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gln Pro Gly

65 70 75 80

Asp Met Val Val Phe Gly Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly His Val

85 90 95

Ala Trp Val Ile Glu Ala Thr Leu Asp Tyr Ile Ile Val Tyr Glu Gln

100 105 110

Asn Trp Leu Gly Gly Gly Trp Thr Asp Gly Val Gln Gln Pro Gly Ser

115 120 125

Gly Trp Glu Lys Val Thr Arg Arg Gln His Ala Tyr Asp Phe Pro Met

130 135 140

Trp Phe Ile Arg Pro Asn Phe Lys Ser Glu Thr Ala Pro Arg Ser Val

145 150 155 160

Gln Ser Pro Thr Gln Ala Ser Lys Lys Glu Thr Val Asp Ser Ala Ser



165	170	175
Thr Pro Ala Thr Arg Pro Val Thr Gly Ser Trp Lys Lys Asn Gln Tyr		
180	185	190
Gly Thr Trp Tyr Lys Pro Glu Ser Ala Thr Phe Val Asn Gly Asn Gln		
195	200	205
Pro Ile Val Thr Arg Ile Gly Ser Pro Phe Leu Asn Ala Pro Val Gly		
210	215	220
Gly Asn Leu Pro Ala Gly Ala Thr Ile Val Tyr Asp Glu Val Cys Ile		
225	230	235
		240
Gln Ala Gly His Ile Trp Ile Gly Tyr Asn Ala Tyr Asn Gly Asn Arg		
245	250	255
Val Tyr Cys Pro Val Arg Thr Cys Gln Gly Val Pro Pro Ser His Val		
260	265	270
Pro Gly Val Ala Trp Gly Thr Phe Lys		
275	280	
<210>	2	
<211>	846	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Endolysin ClyC	
<400>	2	
atgcaagcaa aactaactaa aaaagagttt atagagtggg tgaaaacatc tgaggga	60	
caatataatg cggacggatg gtatggattt caatgctttg actatgccaa tgcaggttgg	120	
caagtcttat ttggctacaa cttaaaaggt gtaggtgcc aagacatccc aagtgcta	180	
gattttaacg gactagctac tgtataccaa aatacaccag acttcttagc gcaacctggc	240	
gacatggttg tattcggtag taattatggt gcaggatacg gtcatgttgc atgggtaatt	300	
gaagcaactt tagattatat cattgtatat gaggagaatt ggctcggcgg tggctggaca	360	
gacggtgtac aacaacctgg ctctggttgg gaaaaagtta caagacgcca acacgttac	420	
gacttccta tgtggtttat ccgtcctaac ttcaaaagcg aaacagctcc acgatcagta	480	
caatctccta cgcaagcatc taaaaaggaa acggtcgaca gtgcaagtac accggcaact	540	
agaccagtta caggttcttg gaaaaagaat cagtacggaa cttggtacaa accggaatcg	600	
gcaacatttg ttaatggtaa ccaacctata gtaactagaa tcggttctcc attcttaaat	660	

gctccagtag gaggttaactt accggcagga gctacaattg tatatgacga agtttgtatc	720
caagcaggtc atatgttgat aggttataat gcttacaacg gtaacagagt atattgccct	780
gttagaactt gtcaaggtgt tccacattca catgtacctg gagttgcctg gggaacattc	840
aagtag	846