



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월06일

(11) 등록번호 10-2097128

(24) 등록일자 2020년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/36 (2006.01) A23K 20/189 (2016.01)

A23L 33/18 (2016.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) C11D 3/386 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/2462 (2013.01)

A23K 20/189 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2019-0073058

(22) 출원일자 2019년06월19일

심사청구일자 2019년06월19일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170087770 A

KR101785487 B1

KR101200333 B1

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

유상열

서울특별시 강남구 언주로30길 13 A동 1001호 (도곡동)

손보경

서울시 관악구 관악로 30길 27, 103동 303호

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 7 항

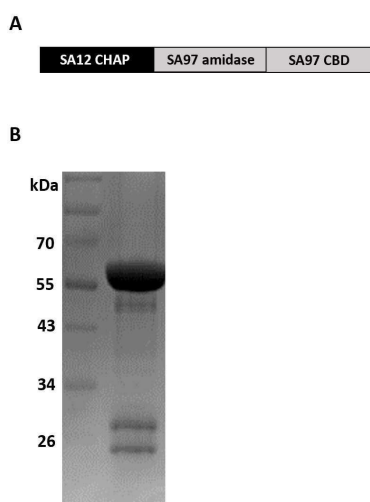
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 황색포도상구균 제어에 효과적인 키메라 엔도라이신 Lys109

(57) 요약

본 발명은 황색포도상구균 제어에 효과적인 키메라 엔도라이신 Lys109에 관한 것으로, 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 기존에 연구되지 않은 새로운 아미노산 서열을 갖는 엔도라이신이다. 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 넓은 범위의 황색포도상구균과 이것이 생성한 생물막을 효과적으로 억제할 수 있는 생물학적 조절제로 활용될 수 있다. 또한, 기존 항생제에 대한 내성 여부와 상관없이 황색포도상구균을 사멸시킬 수 있어 황색포도상구균의 감염에 의한 질환 치료용으로 광범위하게 사용할 수 있다. 또한, 항생제 내성을 갖는 황색포도상구균으로 인한 의료 문제의 해결에도 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
C11D 3/386 (2013.01)
C12Y 302/01017 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 710012-03-1-SB110
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업
 연구과제명 식중독균에 대한 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화
 기 여 율 4/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2017.09.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2A1A17069378
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 농식품 저장성과 안전성 향상을 위한 박테리오파지-숙주 상호작용 연구 및 박테리오파지, 엔도라이신 엔지니어링
 기 여 율 6/10
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 바이오필름 제어능을 발휘하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황색포도상구균은,

메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)인 것을 특징으로 하는 엔도라이신 Lys109.

청구항 3

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 식품 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 황색포도상구균은,

메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 사료 조성물.

청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 세정제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황색포도상구균 제어에 효과적인 키메라 엔도라이신 Lys109에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 황색포

도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대해 감수성을 나타내며, 실제품 우유에서도 뛰어난 효과를 보여주는 키메라 엔도라이신 Lys109에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성균으로, 포자를 형성하지 않는 통성혐기성균인데, 주로 가축 분변, 염증 상처 부위 혹은 사람의 손이 많이 닿는 조리도구 등에서 발견된다. 이는 인간과 동물에 감염하여 수술 후 감염, 농양, 심장 내막염 및 독소 증후군 등의 심각한 질병을 유도하기도 한다. 또한, 포도상구균은 TSST-1, EF, 알파, 베타, 델타 독소 등 열에 강한 독소를 생성하기 때문에, 쉽게 사멸되지 않고, 심각한 식중독을 유발하기도 한다.
- [0004] 상기와 같은 특징이 있는 황색포도상구균을 제어하기 위해, 현재까지는 항생제가 주로 사용되어 왔다. 하지만, 항생제의 광범위한 사용은 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*) 등 항생제에 대해 저항성을 보이는 세균을 발생시키는 문제를 유발했다.
- [0005] 이러한 문제를 극복하기 위한 방안으로 박테리오파지 및 박테리오파지 유래의 엔도라이신을 사용하는 것이 최근 대안으로 떠오르고 있다. 박테리오파지는 세균을 특이적으로 감염하는 바이러스의 일종으로, 식품, 토양, 하수 및 해수 등 지구상의 다양한 환경에 존재하며, 지구상에 약 1×10^{32} 이 존재한다고 추정된다. 박테리오파지는 크게 용균성 생활사(lytic cycle)만을 반복하는 독성 파지(virulent phage)와, 용균성 생활사와 용원성 생활사(lysogenic cycle)를 모두 거치는 약독성 파지(temperate phage)로 분류한다.
- [0006] 용균성 생활사에 있는 파지는, 세균 감염 약 30분 후에 100~200개의 새로운 파지를 만들어 세균의 막을 파괴하며 밖으로 나와 용균 시키는데, 세균의 증식속도보다 파지의 증식속도가 훨씬 빠르므로 세균의 증식을 제한하는 중요한 요인이 될 수 있다. 약독성 파지는 숙주세균의 유전자에 파지의 유전자 정보를 넣어 파지의 모양은 사라지지만, 숙주 세균이 파괴되지는 않는다. 이런 상태는 숙주세균이 좋은 환경조건에 있는 한 지속되는데, 숙주세균의 환경이 악화되면, 숙주세균의 유전자에 끼워져있던 일부 파지 유전자는 용균 사이클로 바뀌고 새로운 파지를 만들어 숙주세균을 용균한 후, 숙주 밖으로 방출된다. 이와 같은 이유로 독성 파지를 이용하여 다양한 질병을 성공적으로 예방 및 치료한 사례가 보고되고 있다.
- [0007] 한편, 엔도라이신(엔도리신)은 박테리오파지가 세균 세포벽의 펩티도글리칸을 분해하기 위해 만드는 효소로서, 박테리오파지의 용균 생활사 마지막 단계에 비리온(virion)을 세포 밖으로 방출시킬 때 사용된다. 엔도라이신은 낮은 농도로 세균을 빠르게 사멸시키고, 저항성 균이 잘 형성되지 않는 특징을 갖고 있으므로 항생제 대체 물질로 훌륭하다 할 수 있다.
- [0008] 황색포도상구균을 목표로 하는 엔도라이신의 경우 domain composition에 따라서 5개의 그룹으로 나뉜다. 그런데, 각 그룹 내 아미노산 서열의 상동성이 90% 이상으로 높아 유전적 다양성이 매우 낮으므로, 새로운 엔도라이신의 개발이 쉽지 않은 문제가 있다. 또한, 황색포도상구균을 목표로 하는 엔도라이신은 대장균 내에서 과발현이 어렵고, 과발현이 되더라도 가용성(soluble) 상태의 단백질을 얻는데 어려움이 있다. 따라서, 항생제 대체제로 황색포도상구균 제어 효과가 뛰어난 새로운 엔도라이신의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1596665호(2016.02.17.)에는, 황색포도상구균에 대해 숙주감수성을 나타내는 박테리오파지 SA12 및 이를 함유하는 조성물에 관하여 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국등록특허 제10-1818499호(2018.01.09)에는, 포도상구균 박테리오파지 유래 신규 엔도라이신 LysSA97과 에센셜 오일 성분을 함유하는 세균 사멸용 조성물에 관하여 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 항생제 대체제로 황색포도상구균 제어 효과가 뛰어난 신규의 엔도라이신을 개발하여 제공하고자 하는

것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 바이오필름 제어능을 발휘하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 엔도라이신 Lys109에 있어, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)일 수 있다.
- [0015] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어, 상기 황색포도상구균은, 바람직하게 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)인 것이 좋다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 사료 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 기존에 연구되지 않은 새로운 아미노산 서열을 갖는 엔도라이신으로, 넓은 범위의 황색포도상구균과 이것이 생성한 생물막을 효과적으로 억제할 수 있는 생물학적 조절제로 활용될 수 있다. 또한, 기존 항생제에 대한 내성 여부와 상관없이 황색포도상구균을 사멸시킬 수 있어 황색포도상구균의 감염에 의한 질환 치료용으로 광범위하게 사용할 수 있다. 또한, 항생제 내성을 갖는 황색포도상구균으로 인한 의료 문제의 해결에도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1의 A는 엔도라이신 Lys109의 도메인 구성을 나타낸 것이고, 도 1의 B는 엔도라이신 Lys109(약 56 KDa)의 단백질 정제 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명 엔도라이신 Lys109의 황색포도상구균 사멸효과를 확인한 결과이다. 도 2의 A는 오로지 버퍼(buffer)만 첨가한 대조군(control)과 본 발명 엔도라이신 Lys109을 처리한 실험군을 비교한 결과이고, 도 2의 B는 처리 농도별로 본 발명 엔도라이신 Lys109을 모체 엔도라이신인 LysSA12, LysSA97과 비교한 실험 결과이다.
- 도 3은 pH와 열이 엔도라이신 Lys109의 황색포도상구균 용균 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다. 도 3의 A는 pH에 대한 실험 결과이고, 도 3의 B는 열에 대한 실험 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 엔도라이신 Lys109의 균막(생물막) 제거능을 확인한 결과이다.
- 도 5는 우유(유제품)에 엔도라이신 Lys109을 처리하여 균의 사멸효과를 측정한 결과이다. 도 5의 A는 엔도라이신 LysSA12를 처리한 결과이고, 도 5의 B는 본 발명의 엔도라이신 Lys109를 처리한 결과이며, 도 5의 C는 이들을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 황색포도상구균 용혈능 및 황색포도상구균 바이오필름 제어능을 발휘하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109을 제공한다.
- [0025] 본 발명자는 무작위 도메인 스와핑(random domain swapping)방법으로 엔도라이신을 엔지니어링하여, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이 LysSA12 CHAP 도메인과 LysSA97의 아미데이즈(amidase) 및 CBD (cell binding domain)로 구성된 키메릭 엔도라이신 Lys109를 개발할 수 있었다.
- [0026] 본 발명에서 개발된 키메릭 엔도라이신 Lys109의 염기서열 상동성을 BlastN, BlastP 프로그램을 이용하여 조사한 결과, 박테리오파지 StauST398-1의 엔도라이신과 78%의 상동성을 나타냈으며, 박테리오파지 ΦB166 및 Φ

B236와 80%의 상동성을 보였을 뿐, 전혀 연구가 된 바는 신규한 것이었다.

- [0027] 한편, 본 발명의 엔도라이신 Lys109에 있어, 상기 황색포도상구균은, 일 예로 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)일 수 있다. 황색포도상구균을 숙주로 하여 수행한 하기 실험에서 본 발명의 엔도라이신이 플라크를 형성하여 황색포도상구균을 용해(lysis)시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명의 엔도라이신은 메티실린 저항성 황색포도상구균을 포함한 황색포도상구균을 적은 양으로 단시간 내에 사멸시킬 수 있었으며, 기존에 알려진 다른 엔도라이신에 비해서 우유 내에서 높은 황색포도상구균 용균 활성을 나타냄을 하기 실험을 통해 확인하였다.
- [0028] 한편, 세균이 감염된 부분에는, 폴리머(polymer) 기질로 감싼 세균의 집락인 점액질이 존재할 때가 있다. 세균에 의해 형성된 점액질의 세균 복합체를 바이오필름(biofilm)이라 부른다. 즉 바이오필름은 고형(solid)의 생물학적 표면(biological surface)인 세균집락과 비생물학적 표면(non-biological surface)인 외막으로 구성된 복합체인 것이다. 따라서, 본 명세서에서 '바이오필름'이란 이 외막과 그 속에 들어있는 세균집락을 포함한 전체를 의미하는 것으로 정의한다.
- [0029] 바이오필름은 세균으로 이루어진 작은 도시라 할 수 있으며, 그 속에서 세균은 서로 의사소통을 하고, 외부세계에 대하여 방어를 한다. 이로 인하여 바이오필름은 항생제를 포함한 여러 환경 스트레스(environmental stress) 아래에서도 세균의 생존을 가능하게 만든다.
- [0030] 한편, 별개로 부유하던 세균(planktonic bacteria)에 대해 약효를 나타내던 항생제도 세균이 바이오필름을 형성하면 효능을 상실하는 경향이 커진다. 세균이 바이오필름을 형성하면 바이오필름에 존재하는 외막을 항체 등이 투과할 수 없어, 항생제에 대한 세균의 저항성이 약 1,000배까지 높아질 수 있으며, 숙주의 면역체계(host immune system)를 무력화시키게 된다. 이러한 이유들로 인하여 바이오필름이 형성되면 감염증 치료에 널리 사용되던 항생제의 작용이 어렵게 되어 결과적으로 항생제에 의한 치료 효과가 약화된다.
- [0031] 바이오필름이 형성된다는 것은 만성적인 세균 감염 상태에 돌입한다는 것을 의미한다. 이 경우 상기에 기술했듯이 세균의 항생제에 대한 감수성이 낮아져 항생제를 사용해도 거의 효과가 없으며, 이를 극복하기 위해 단순히 항생제를 과다치방하면 세균의 항생제 내성만을 키우게 된다. 즉, 바이오필름이 형성된 세균 감염증은 단순히 항생제로만 치료하는 것은 더 이상의 효과적 치료가 되지 못함을 의미하는 것이다. 특히, 바이오필름을 형성하고 있는 세균에 의한 감염은 여러 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성(multi-drug resistance)균에 의한 경우가 많아 더욱 문제가 심각해진다.
- [0032] 바이오필름의 형성으로 인한 항생제 치료의 무력화를 막기 위해서는 바이오필름이 형성되더라도 이 바이오필름을 제거할 수 있는 새로운 항생제를 개발하거나, 기존 항생제가 효능을 발휘할 수 있도록 바이오필름에 존재하는 외막을 파괴해 줄 수 있는 성분을 기존 항생제와 함께 사용하여야 한다. 그런데, 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 폴리스티렌에 형성된 황색포도상구균 생물막을 효과적으로 제거할 수 있고, 기존 항생제에 관한 내성 여부와 상관없이 황색포도상구균을 사멸시킬 수 있는바, 매우 효율적이다.
- [0034] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 식품 조성물을 제공하는데, 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 식품 가공 공정 및 유통과정에서 큰 문제가 되는 황색포도상구균 및 이것이 형성한 생물막의 제거 목적으로 사용될 수 있다.
- [0035] 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 Lys109는 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.
- [0037] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 황색포도상구균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 상기 황색포도상구균은, 바람직하게 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 또는 메티실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin-sensitivity *S. aureus*, MSSA)인 것이 좋다. 본 발명의 엔도라이신 Lys109는 황색포도상구균 또는 이것이 생성하는 생물막으로 인해 발생하는 질환의 예방용으로 사용할 수 있고, 황색포도상구균 또는 이것이 생성하는 생물막으로 인해 유발되는 질환에 대한 치료용으로 사용이 가능하다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 엔도라이신 Lys109는 상술한 바와 같이 황색포도상구균을 특이적으로 사멸시

키고 그것에 의해 형성된 바이오필름을 효과적으로 제거할 수 있어, 황색포도상구균에 의해 유발되고 그것이 형성한 바이오필름으로 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.

[0039] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 엔도라이신 Lys109의 함량은, 사용방법, 복용자의 상태에 따라 바람직하게 조절하는 것이 좋다. 본 발명의 약학조성물에서 엔도라이신 Lys109의 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, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0040] 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 제형화 하는 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), 캡슐제 (CAPSULES), 크림제 (CREAMS), 트로키제 (TROCOES), 팅크제 (TINCTURES), 파스타제 (PASTES), 환제 (PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0041] 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.

[0043] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 포함하는 사료 조성물을 제공한다. 상기 사료 조성물은 총 중량에 대하여 상기 엔도라이신 Lys109를 0.000001~1.0중량% 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.

[0045] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 엔도라이신 Lys109를 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. 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.

[0046] 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.

[0047] 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 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0048] 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 클

로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설표숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 세정제가 의료용 세정제로 사용될 경우에는 스프레이 형태로 바이오필름 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법이 가능하다. 또한, 본 발명의 세정제는 초음파 세척기 및 자동 세척기의 세척을 위해서도 사용할 수도 있다. 이때, 의료용 장치를 본 발명의 세정제에 담구는 방법도 가능하다.

[0051] 본 발명의 세정제 조성물은 조리 장소 및 조리 설비의 소독제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 일반 세정제 및 의료용 세정제에서 엔도라이신 Lys109의 유효 용량은 보통으로 숙련된 당업자에 의해서 간단한 사전 조사를 거쳐 용이하게 결정될 수 있는데, 응용하고자 하는 분야 및 적용방법에 의해 좌우될 것이다. 바람직하게는 엔도라이신 Lys109를 0.001%(w/v)~0.1%(w/v) 포함할 수 있다.

[0054] 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.

[0056] **[실시예 1: 본 발명의 키메릭 엔도라이신 Lys109 획득]**

[0057] **(1) Random domain swapping 방법을 이용한 엔도라이신 엔지니어링**

[0058] 서로 다른 종류의 프로모터(promoter)를 갖는 두 가지의 벡터(vector)를 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 형질전환(transformation) 하기 위하여, 4종류 (LysSA11, LysSA12, LysSAP4, LysSA97에서 획득)의 서로 다른 CBD 유전자가 포함되어 있는 pET28a 벡터에 4종류의 CHAP 도메인(domain; LysSA11, LysSA12, LysSAP4, LysSA97에서 획득) 유전자와 3종류의 아미데이즈 도메인(amidase domain; LysSA12, LysSAP4, LysSA97에서 획득) 유전자를 무작위적으로 연결(ligation) 시킨 후 형질전환하였다. 이후, 대장균을 세포 안에서 용해(lysis) 시키는 단백질인 SPN1S를 코딩(coding)하는 유전자를 pBAD33 벡터에 결합시키고, 이 벡터 또한 대장균에 형질전환하였다.

[0059] 상기 SPN1S 단백질을 통해 대장균이 깨지면서 안에서 발현된 엔도라이신이 용출되며, 숙주 박테리아인 스탕필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)를 만나 용균반(clear zone)이 형성된다. 더욱 자세히 설명하면, 각 클론(clone)의 새로운 엔도라이신은 96웰 플레이트에서 IPTG에 의해 발현이 시작되고, 이후 아라비노스(arabinose)의 첨가를 통해 SPN1S 단백질이 발현된다. 5 μ l의 배양물(culture)을 스탕필로코커스 아우레우스 세포로 오버레이(overlay)된 고체 배지에 dotting(dotting)하고, 배양 후 생성되는 용균반을 확인함으로써 새로운 엔도라이신의 스크리닝을 진행하였다.

[0061] **(2) 엔도라이신 Lys109 확인 및 분리**

[0062] 상기 스크리닝 결과, 엔지니어링되지 않은 엔도라이신을 포함하여 약 20개 정도의 용균반을 형성하는 키메릭 엔도라이신을 확보하고, 염기서열분석(sequence analysis)을 통해 구성하고 있는 엔도라이신의 도메인 조합을 분석하였고, 그 중 활성이 가장 높은 Lys109를 확보하였다 (도 1의 A).

[0063] 한편, pET-28a 벡터에 클로닝되었던 Lys109는 0.5mM IPTG의 첨가에 의해 발현이 유도되었다. 그 후 균주의 세포벽을 제거하고 원심분리를 한 뒤, 상등액을 Ni-NTA Superflow column에 통과시킴으로써 순수한 키메릭 엔도라이신 Lys109를 얻을 수 있었다 (도 1의 B). 도 1의 A는 엔도라이신 Lys109의 도메인 구성을 나타낸 것이고, 도 1의 B는 엔도라이신 Lys109(약 56 KDa)의 단백질 정제 결과를 나타낸 것이다. 엔도라이신 Lys109는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되며, 서열번호 2의 핵산서열에 의해 암호화되어 있다.

[0065] **[실시예 2: 본 발명 엔도라이신 Lys109의 특성 분석]**

[0066] **(1) 엔도라이신 Lys109의 숙주 용해능**

[0067] 정제기 단계의 황색포도상구균 CCARM 3090 배양액에 실시예 1에서 분리한 엔도라이신 Lys109를 30nM 처리하였는데, 실험 결과, 오로지 버퍼(buffer)만 첨가한 대조군(control)에 비해 효과적으로 흡광도가 감소하였다 (도 2의 A). 또한, 서로 다른 농도를 첨가하였을 때, 농도가 의존적으로 흡광도가 감소하였으며, 모체 엔도라이신인

LysSA12와 LysSA97에 비해서 월등히 높은 용균 활성을 나타내었다 (도 2의 B). 도 2는 본 발명 엔도라이신 Lys109의 황색포도상구균 사멸효과를 확인한 결과이다.

[0068] 이상의 결과로부터, 본 발명 엔도라이신 Lys109는 감수성 균주의 성장을 단순히 억제시키는 것이 아니라 해당 균주를 용균시키는 것을 알 수 있었으며, 저농도에서도 모체 엔도라이신들에 비해 효과적으로 감수성 균주를 제어하는 것으로 판단할 수 있었다.

[0070] (2) 엔도라이신 Lys109가 효과적인 항균 활성을 나타내는 조건

[0071] 본 발명의 엔도라이신 Lys109의 항균 활성은 pH 6.5에서 9.0까지 염기 범위에서 안정하게 나타났다 (도 3의 A). 또한, 25~55℃에서 활성을 보였으며, 25~37℃에서 가장 효과적인 항균 활성을 나타내었다 (도 3의 B). 도 3은 pH와 열이 엔도라이신 Lys109의 황색포도상구균 용균 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[0073] (3) 엔도라이신 Lys109의 항균 활성 범위

[0074] 다양한 세균에 대한 엔도라이신 Lys109의 감수성을 확인하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0075] 엔도라이신 Lys109의 감수성을 확인

Species	Strains	LysSA12 (pmol)		Lys109 (pmol)	
		167	16.7	167	16.7
<i>S. aureus</i>	Human isolate 117	+	-	++	+
	Human isolate 119	+	-	++	-
	Animal isolate 154	+	-	++	-
	Animal isolate 134	+	-	++	-
	Clinical isolate 1163	+	-	++	-
	Clinical isolate FMB1	+	-	++	-
	Matitis cow milk isolate	++	-	++	+
	ATCC 23235	+	-	++	+
	ATCC 13301	+	-	++	-
	CCARM 3090	+	-	++	-
<i>S. hominis</i>	ATCC 37844	+	-	++	+
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	+	-	++	+
<i>S. heamolyticus</i>	ATCC 29970	+	-	++	-
<i>S. capitis</i>	ATCC 35661	+	-	++	-
<i>Bacillus cereus</i>	KCCM 40133	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	168	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 19258	-	-	-	-

[0077] 실험 결과, 엔도라이신 Lys109는 메티실린 저항성 황색포도상구균 균주를 포함한 다양한 황색포도상구균에 대하여 강한 활성을 보였다. 다만, 그람 양성균은 사멸시키지 못하였다. 이상의 결과로부터, 본 발명의 Lys109 엔도라이신은 포도상구균에 대해 넓은 범위의 항균 활성 범위를 가지는 것으로 확인할 수 있었다.

[0079] [실시예 3: 본 발명 엔도라이신 Lys109의 생물막 제어능 확인]

[0080] 균막(생물막)을 생성하는 황색포도상구균 RN4220을 대상으로 하여, 본 발명 엔도라이신 Lys109의 균막 제거 활성을 조사하기 위하여, 황색포도상구균을 0.25% D-(+)-포도당을 포함한 TSB 배지에서 한밤 배양하였다.

[0081] 이 황색포도상구균의 배양액을 D-(+)-포도당이 포함된 TSB 배지를 사용하여 1:100으로 희석한 후, 96 웰 플레이트에 200μl씩 분주하였다. 이후, 37℃에서 24시간 동안 정치배양 하였고, 24시간 배양 후 200μl의 인산완충식염수로 3회 세척해 준 다음 엔도라이신을 포함한 용액과 엔도라이신을 포함하지 않는 용액을 각각 웰에 첨가해 준 뒤, 37℃에서 24시간 동안 정치 배양시켰다. 그 후, 배지를 제거한 다음 인산완충식염수로 각 웰을 1회 세척해 주었다. 이후, 각 웰을 200μl의 1% 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 염색한 다음 인산완충식염수로 각 웰을 3회 세척해 주었다. 33% 아세트산(acetic acid)로 염색된 생물막을 용출시키고 용출된 용액의 흡광도

(OD570)를 측정하여 생물막의 제거 정도를 확인하였다 (도 4). 도 4는 본 발명의 엔도라이신 Lys109의 균막 제거능을 확인한 결과이다.

[0082] 실험 결과, 엔도라이신 Lys109는 웰 내부에 형성된 황색포도상구균 생물막을 효과적으로 제거하였음을 확인할 수 있었다.

[0084] [실시예 4: 우유에서 엔도라이신 Lys109의 용균 활성 측정]

[0085] 황색포도상구균에 의한 식중독이 빈번하게 일어나는 것으로 보고된 유제품에 엔도라이신 Lys109를 처리한 후, 살균 효과를 측정하였다. 시판중인 S 우유를 각 상온(25℃)에 보관하면서, 엔도라이신 Lys109의 효과를 확인하였다. 상기 유제품은 약 10^5 CFU/ml 수준으로 포도상구균에 오염되어 있었는데, 엔도라이신 Lys109를 처리한 결과, 상온(25℃)에서 모두 1시간 이내에 황색포도상구균이 검출되지 않았다 (도 5). 도 5는 우유(유제품)에 엔도라이신 Lys109를 처리하여 균의 사멸효과를 측정한 결과이다. 도 5에서 A는 엔도라이신 LysSA12를 처리한 결과이고, B는 본 발명의 엔도라이신 Lys109를 처리한 결과이며, C는 이들 둘을 비교한 결과이다.

[0086] 상기의 결과로부터, 본 발명 엔도라이신 Lys109이 항생제를 대체할 수 있는 신규 항균 물질이 될 수 있음을 보다 더 명확히 확인할 수 있었다.

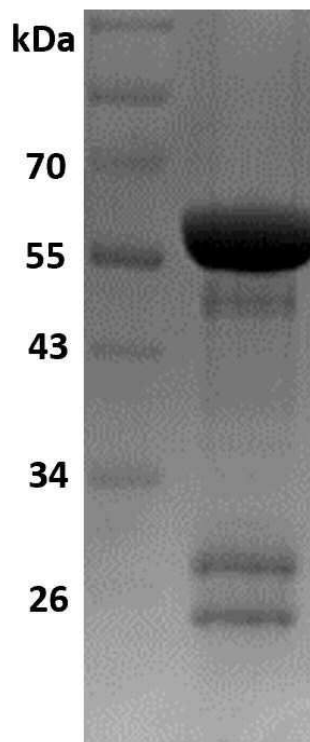
도면

도면1

A

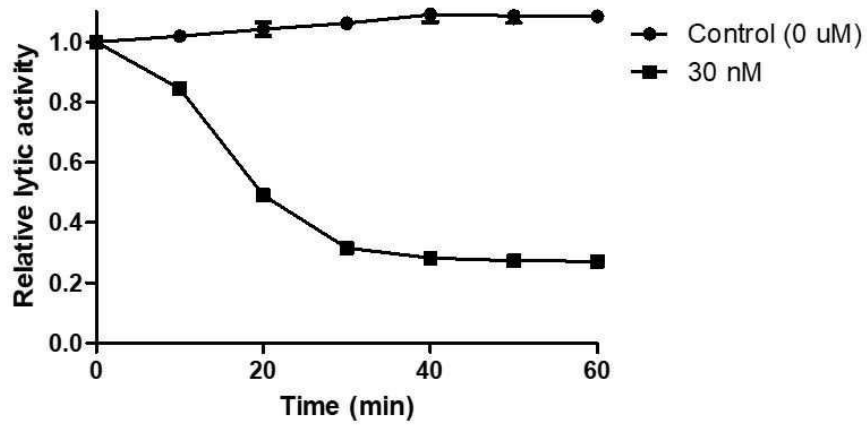
SA12 CHAP	SA97 amidase	SA97 CBD
-----------	--------------	----------

B

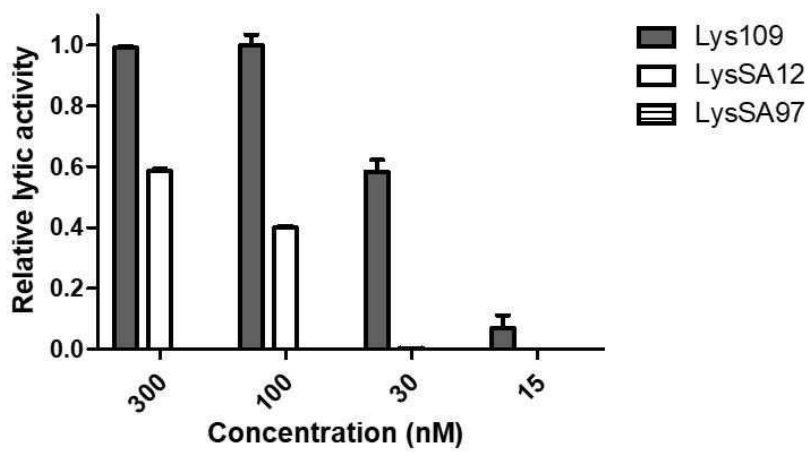


도면2

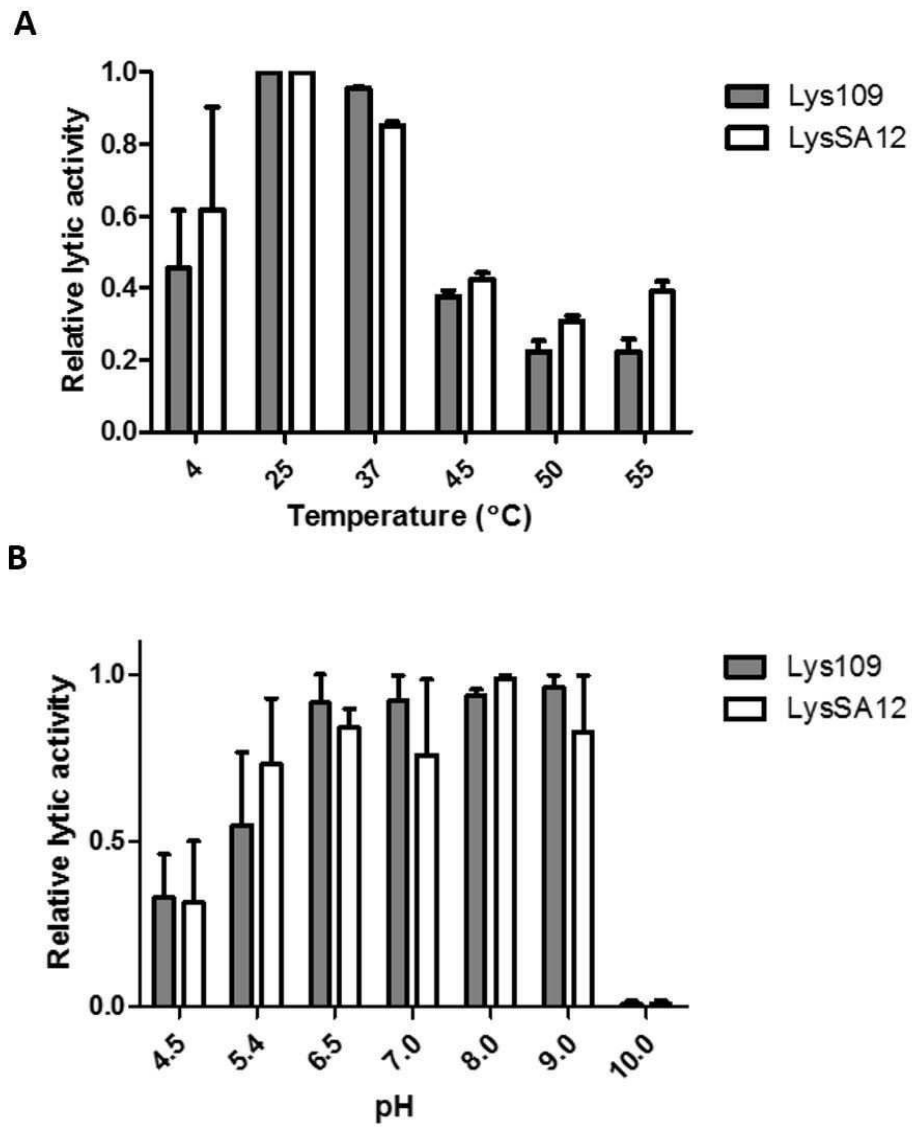
A



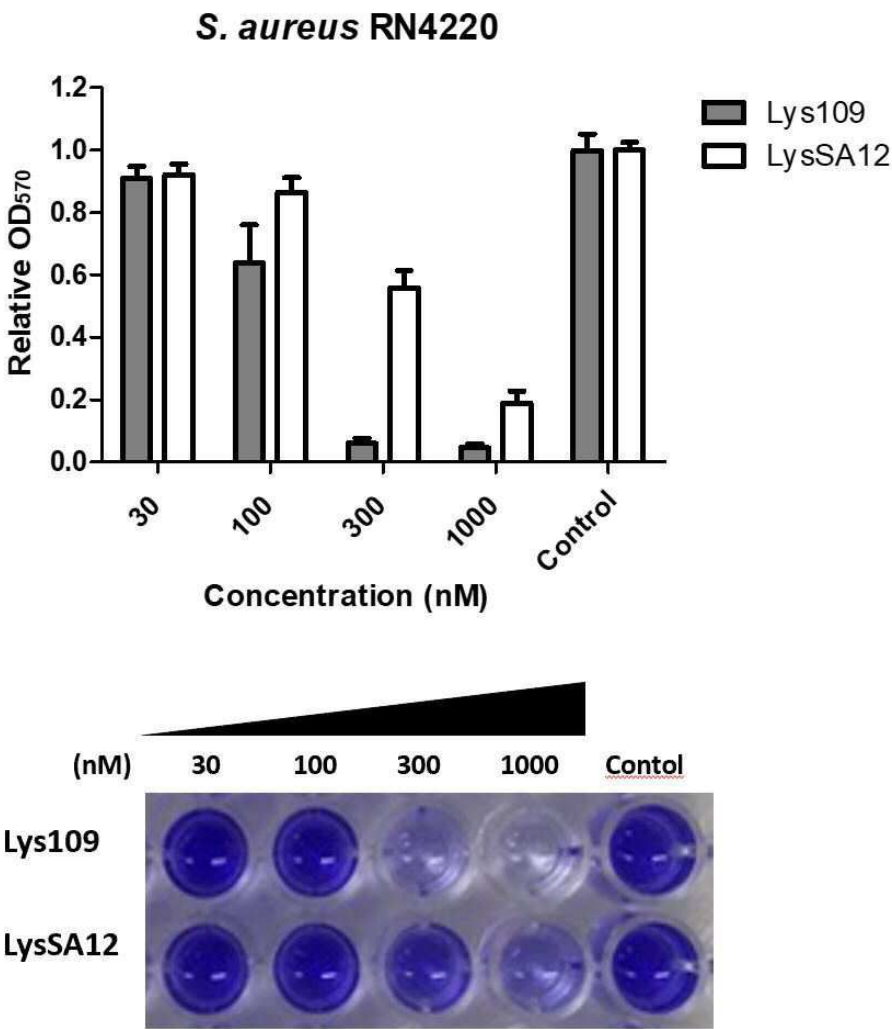
B



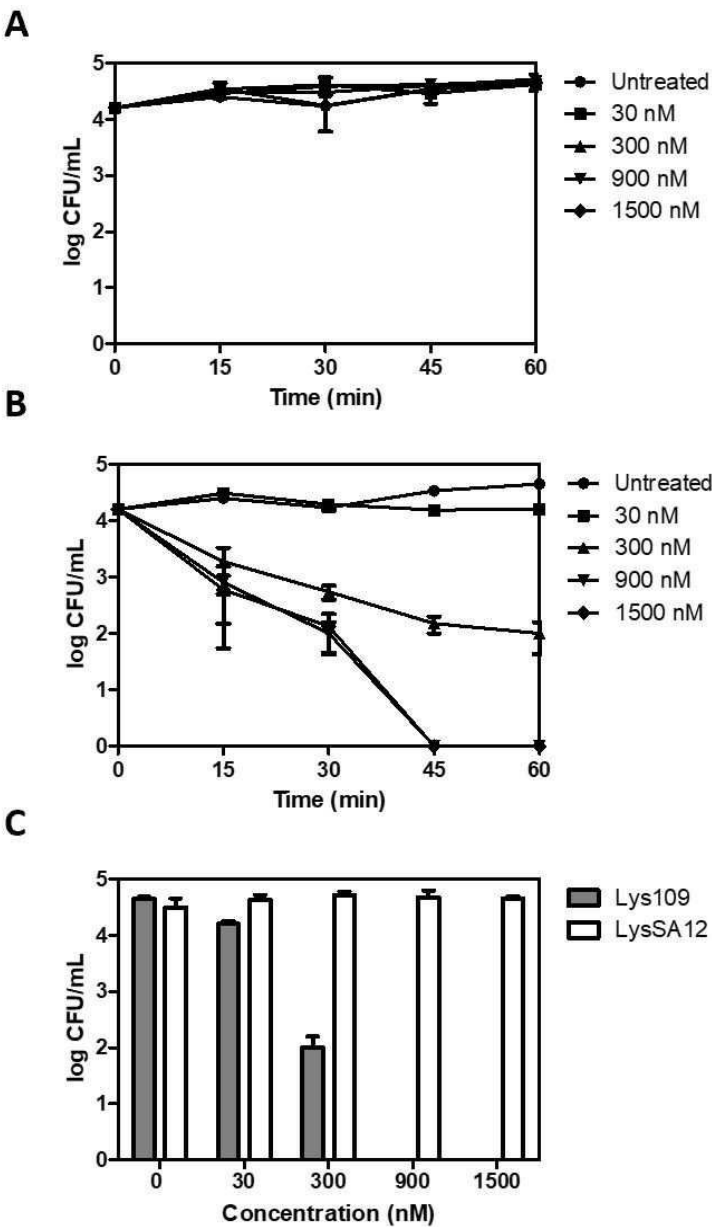
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Chimeric endolysin Lys109 with antimicrobial activity against Staphylococcus aureus
- <130> YP-19-031
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 476
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Lys109

<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 Leu

145 150 155 160

Glu Gln Asp Lys Leu Ser Lys Gly Lys Lys Ile Met Leu Val Ala Gly

165 170 175

His Gly Ile Gly Ala Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Ala Val Ala Asn Gly

180 185 190

Glu Asn Glu Arg Asp Phe Asn Arg Lys Asn Ile Ile Pro Arg Val Lys

195 200 205

Lys Tyr Leu Glu Ser Val Gly Asn Thr Val Leu Leu Tyr Gly Gly Asn

210 215 220

Ser Met Asn Gln Asp Leu Tyr Gln Asp Thr Leu Tyr Gly Gln Arg Val

225 230 235 240
 Gly Asn Tyr Lys Asp Tyr Gly Met Tyr Trp Ile Lys Ser Glu Val Lys
 245 250 255
 Pro Asp Ala Ile Ile Glu Phe His Leu Asp Ser Ala Ser Pro Gln Ala
 260 265 270
 Ser Gly Gly His Val Ile Ile Ser Asp Arg Phe Pro Ala Asp Asp Ile
 275 280 285
 Asp Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu Asp Lys Thr Val Gly Lys Ile Arg
 290 295 300
 Gly Val Thr Pro Arg Gly Asp Leu Leu Asn Ala Asn Val Ser Ala Asp

 305 310 315 320
 Leu Asn Leu Asn Tyr Arg Leu Ile Glu Leu Gly Phe Ile Thr Ser Thr
 325 330 335
 Lys Asp Leu Asn Tyr Ile Lys Asn Asn Leu Asp Ser Phe Thr Lys Arg
 340 345 350
 Ile Ala Glu Ala Ile Asn Gly Arg Gln Ile Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 355 360 365
 Ser Glu Phe Ser Ser Lys Pro Ser Ala Asp Lys Ile Thr Trp Asn Trp
 370 375 380

 Lys Gly Val Phe Tyr Pro Asn Pro Glu Lys Ala Ile Arg Val Arg Lys
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Leu Thr Gly Thr Val Val Glu Glu Asp Ser Trp Leu Tyr
 405 410 415
 Thr Lys Asp Asp Trp Val Lys Phe Asp Gln Val Ile Lys Lys Asp Gly
 420 425 430
 Tyr Trp Trp Ile Arg Phe Lys Tyr Gln Arg Glu Gly Ser Ser Thr Asn
 435 440 445
 Asn Phe Tyr Cys Ala Val Cys Arg Ile Thr Asp Lys Glu Gln Lys Ile

 450 455 460
 Lys Asn Glu Lys Tyr Trp Gly Thr Ile Glu Trp Ala
 465 470 475

<210> 2

<211> 1431

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lys109

<400> 2

atgcaagcaa aactaactaa aaaagagttt atagagtggg tgaaaacatc tgagggaata	60
caatataatg cggacggatg gtatggattt caatgctttg actatgcaa tgcaggttgg	120
caagtcttat ttggctacaa cttaaaaggt gtaggtgcca aagacatccc aagtgtctaat	180
gattttaacg gactagctac tgtatacca aatacaccag acttcttagc gcaacctggc	240
gacatggttg tattcggtag taattatggt gcaggatcgc gtcattgtgc atgggtaatt	300
gaagcaactt tagattatat cattgtatat gagcagaatt ggctcggcgg tggctggaca	360
gacggtgtac aacaacctgg ctctggttgg gaaaaagtta caagacgcca acacgttac	420
gacttccta tgtggtttat ccgtcctaac ttcaaaagcg aaacagctcc acgatcactc	480
gagcaagata agttatcaaa aggtaaaaaa atcatgcttg tggctggtca tggatttggg	540
gcatactcta acgaccagg tgccgttcgc aatggagaaa acgaaagaga ttttaaccgt	600
aaaaatatta tacctagagt gaaaaagtat cttagatcag taggcaacac agtattgtta	660
tacggtggca actcgatgaa tcaagattta tatcaagata cattgtacgg tcaacgtgtt	720
ggaaactata aagattatgg catgtactgg attaaaagtg aagtcaaacc ggatgcaatc	780
atagagtttc atttagattc tgctagccca caagcaagtg gcgggcatgt aatcattagc	840
gatcgtttcc cagctgatga cattgacaag gcattaagta gtgcattaga taaaacagtg	900
ggtaaaataa gaggtgtgac acctagaggg gattttatga acgctaactg gtctgtgat	960
cttaacttta attatcgttt aatcgaatta ggttttatca catctacgaa agatttaaac	1020
tacattaaaa acaatttaga cagcttcacg aagcggattg ctgaagccat taacggcaga	1080
caaattgatg cgccaagtag tggatccgaa tccagtagta agccaagcgc tgacaaaata	1140
acatggaatt ggaaaggcgt attttatcct aatccagaaa aagctataag agtcagaaaa	1200
acagctggat taaccggcac agtcgttgaa gaagattcat ggctatacac aaaagatgat	1260
tgggtaaaat tcgaccaagt cattaaaaaa gatggctact ggtggattag attcaaatat	1320
caacgtgagg gctctagtag taacaatttc tattgtgcag tgtgtagaat tactgataag	1380
gaacaaaaga ttaaaaatga aaaatattgg ggcacgattg agtgggctta a	1431