



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월27일
 (11) 등록번호 10-1707571
 (24) 등록일자 2017년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/46 (2006.01) *A61K 38/43* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 38/46 (2013.01)
A61K 38/43 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0010836
 (22) 출원일자 2015년01월22일
 심사청구일자 2015년01월22일
 (65) 공개번호 10-2016-0090707
 (43) 공개일자 2016년08월01일
 (56) 선행기술조사문헌
 Enz. Eng. 제4권, 제1호, 제1-7면(2015.01.15.).*
 KR1020130128141 A
 KR1020150000311 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 (72) 발명자
미첼 로버트 제임스
 울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-25, 107동
 302호 (울산구영동문굿모닝힐)
아제이 칼란자나 몬나파
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

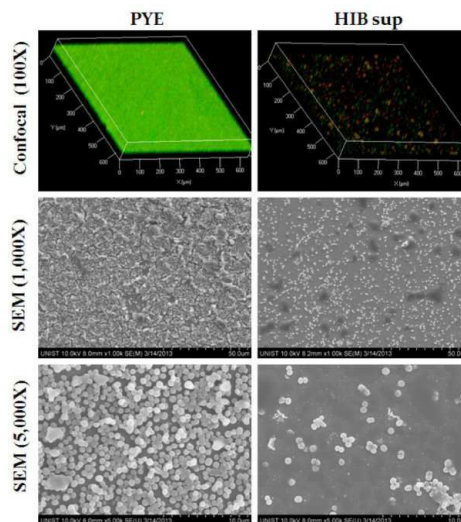
심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 **기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포루스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균의 생물막 억제 또는 제거용 조성물 및 이의 이용**

(57) 요약

본 발명은 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포루스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균의 생물막 억제 또는 제거용 조성물에 관한 것이다. 또한, 상기 조성물을 포함하는 포도상구균 감염 치료용 약학 조성물 및 이를 포도상구균에 처리하는 단계를 포함하는 포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3b



(72) 발명자

모하메드 드위다르

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

허진희

울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-12, 106동
1004호 (호반베르디움)

서정곤

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 401동
401호 (울산과학기술대학교 교수아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2.140197.01

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 포식미생물을 이용한 병원성 바이오필름 BIOCONTROL 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

기주 독립적인 델로비브리오 박테리오보로스(Host-independent Bdellovibrio bacteriovorus)의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는,

포도상구균(Staphylococcus)의 생물막(biofilm) 억제 또는 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오보로스는 기탁번호 KCTC18349P로 기탁된 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오보로스인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 세포 외 단백질 분해 효소는 상기 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오보로스의 배양 상층액에 포함된 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 세린 단백질 분해효소를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어지는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포 외 단백질 분해 효소의 분자량은 30 내지 50 kDa인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 포도상구균은 다약제 내성을 나타내는 포도상구균인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 포도상구균은 황색포도상구균(Staphylococcus aureus) 또는 표피포도상구균(Staphylococcus epidermidis)인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 포도상구균에 대한 항생제 내성 억제용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 포도상구균 감염 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 포도상구균 감염은 식중독, 심내막염, 패혈증, 요로감염, 복막염, 피부염 또는 여드름인 약학 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하며,
포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거하는 환경 소독용, 의료기구 세정용 또는 환경 정화용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스(Host Independent Bdellovibrio bacteriovorus, HIB)의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균(Staphylococcus)의 생물막(biofilm) 억제 또는 제거용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 포도상구균 감염 치료용 약학 조성물, 및 이를 포도상구균에 처리하는 단계를 포함하는 포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연 상태에서, 대부분의 세균은 다당류(polysaccharides) 또는 단백질을 이용하여 표면에 부착하는 고착성 미생물 군집인 생물막을 형성한다. 생물막은 폴리머 기질(다당류와 폴리펩타이드가 주성분임)로 된 점액질의 외막(extracellular matrix; mucosal surface)이 세균 집락을 둘러싸고 있는 형태이다. 즉, 생물막은 고형(solid)의 생물학적 표면(biological surface)인 세균 집락과 비생물학적 표면(non-biological surface)인 외막으로 구성된 복합체이다. 생물막은 자연계에 흔하게 발견되는데, 예컨대 바위나 연못에서 발견되는 점액질이 바로 그것이다. 생물막은 세균으로 이루어진 작은 도시라 할 수 있으며, 그 속에서 세균은 서로 의사소통을 하고, 외부 세계에 대하여 방어를 한다. 이로 인하여 생물막은 항생제를 포함한 여러 환경 스트레스(environmental stresses)에 대해서 저항성을 나타내고, 만성 감염에 대한 세균의 내성에 기여한다.

[0003] 생물막은 일반 자연 환경 외에 세균 감염성 질환과 관련하여서도 자주 발견된다. 사람의 장기에 형성되기도 하고 치아의 플라크 형태로 나타나기도 하며, 산업용 장비나 의료용 이식 기구에 생길 수도 있다. 이런 탓에 생물막은 치주 질환(periodontal disease)이나 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)에 동반하는 폐렴, 중이(middle ear)에 생기는 이통(earache) 등을 연구하는 학자들의 관심 대상이 되어 왔다. 미국 국립보건연구소는 2002년 보고에서는 박테리아균의 최대 80%가 이 같은 생물막 형성을 통해 병원균을 퍼트리고 있는 것으로 추산했다. 별개로 부유하던 세균(planktonic bacteria)에 대해 약효를 나타내던 항생제도 세균이 생물막을 형성하면 효능을 상실하는 경향이 커진다고 한다(Trends Microbiol 9: 34-39, 2001).

[0004] 세균이 생물막을 형성하면 생물막에 존재하는 외막을 항체 등이 투과할 수 없어 숙주의 면역체계(host immune system)를 무력화시키고, 항생제에 대한 세균의 저항성이 약 1,000배까지 높아질 수 있다고 한다(Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003). 이런 생물막 형성에 따른 항생제에 대한 저항성의 증가 원인은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나, 생물막이 형성됨으로써 주위 환경과 교환 작용에 대한 의존성이 낮아지고, 점액성 다당류로 구성된 외막이 항생물질이 개개의 세균까지 전달되는 것을 방해하기 때문이며, 생물막이 형성되면 그 생물막 속에 존재하는 내성이 없던 세균들도 주위의 내성세균으로부터 수평 유전자 전이(horizontal gene transfer)를 통하여 내성인자 관련 유전자를 획득하여 내성 세균화가 진행되기 때문으로 설명할 수 있다.

- [0005] 따라서, 생물막이 형성되게 되면 이는 항생제 내성 상태가 되었다고 볼 수 있고, 감염증 치료에 널리 사용되던 항생제의 작용이 어렵게 되어 결과적으로 항생제에 의한 치료 효과가 약화되는 문제점이 생기게 된다. 다르게 말하면, 생물막이 형성된다는 것은 만성적인 세균 감염 상태에 돌입한다는 것을 의미한다. 이러한 경우에는, 상기에 기술했듯이 세균들의 항생제에 대한 감수성이 낮아져 항생제를 사용해도 거의 효과가 없으며, 이를 극복하기 위해 단순하게 항생제를 과다 처방하면 세균의 항생제 내성만을 키우게 된다. 특히 생물막을 형성하고 있는 세균에 의한 감염은 여러 가지 항생제에 대해 내성을 갖는 다제내성(multi-drug resistance) 균에 의한 경우가 많아 더욱 문제가 심각하다.
- [0006] 생물막을 형성하는 세균들 중, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성(Gram positive)의 병원성 세균으로, 화농, 농양형성, 다양한 화농성 감염, 패혈증을 유발하는 전세계적인 의인성 감염 발생의 원인균이다. 황색포도상구균은 국내에서 조사된 항생제 메티실린에 대한 내성률이 평균 73%로 세계 최고 수준인 매우 위험한 병원균이다. 이는 항생제를 써도 죽지 않는 스태필로코커스 아우레우스가 73%가 된다는 뜻으로 내성이 매우 심각한 병원균이라고 할 수 있다. 스태필로코커스 아우레우스에 의한 생물막이 형성되면 만성적 감염증을 초래되고, 생물막이 형성된 황색포도상구균에 의해 유발된 질환의 치료는 다른 세균에 의해 형성된 생물막으로 인한 질환의 치료에 비해서도 특히 어렵다. 왜냐하면, 질환의 치료를 위해 약물을 사용해도 생물막으로 인한 약물전달의 어려움이 있을 뿐 아니라 설사 약물이 전달 되었다 할지라도 내성균주가 많은 황색포도상구균의 특성상 기존 항생제에 기반한 치료는 효과적이지 않기 때문이다.
- [0007] 세균의 생물막 형성 억제와 관련하여, 스트렙토마이세스 알부스(*Streptomyces albus*)추출물이 비브리오 하비(*Vibrio harvey*)의 생물막 형성을 억제하고(Applied Microbiology and Biotechnology 76: 1137-1144, You et al. 2007), 로도코커스속 BFI 332로 부터 생산된 인돌-3-아세트알데하이드는 장출혈 대장균 O157:H7의 생물막 형성을 억제하는 것(한국공개특허 10-2013-0128141)이 알려져 있다. 또한, 스태필로코커스 아우레우스의 생물막 억제와 관련하여, 리소스타핀(lysostaphin)을 이용하는 방법이 알려져 있으나(Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003), 스태필로코커스 아우레우스 중에는 리소스타핀에 민감하지 않은 것(lysostaphin-resistant strain)이 상당히 존재하고(J Clin Microbiol 11: 724-727, 1980; Antimicrob Agents Chemother 47: 3407-3414, 2003), 리소스타핀에 내성을 획득한 스태필로코커스 아우레우스가 생기고 있다는 점에서 문제가 있다.
- [0008] 상기 살펴본 바와 같이, 미생물의 생물막의 생성을 효과적으로 억제하고 제거하지 못하는 경우 산업 및 의학에서 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 따라서, 생물막의 형성으로 인한 항생제 치료의 무력화를 막기 위해서는, 생물막의 형성을 억제하고, 생물막이 형성되더라도 생물막을 제거할 수 있는 새로운 물질 또는 기존 항생제가 효능을 발휘할 수 있도록 생물막에 존재하는 외막을 분해 해 줄 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 생물적 환경 내지 비생물적 환경에서 포도상구균의 생물막의 형성을 억제하고, 이미 형성된 생물막을 효과적으로 제거하기 위한 것으로, 기주 독립적인 텔로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균(*Staphylococcus*)의 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 기주 독립적인 텔로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는, 포도상구균에 대한 항생제 내성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 포도상구균 감염 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 포도상구균의 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 포도상구균에 처리하는 단계를 포함하는 포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 HIB 배양액이 단백질 분해효소를 배지로 분비하는 것을 확인하고(실험결과 2), HIB 상층액을 *S. aureus*의 배지에 첨가하는 경우, *S. aureus* 균주에 독성없이 *S. aureus* 생물막의 형성을 80에서 90%까지 억제할 수 있음을 확인하였다(실험결과 3 및 도 1b).
- [0014] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는, HIB 상층액의 *S. aureus* 생물막 형성 억제 활성이 구체적으로 어떤 종류의 단백질 분해효소 때문인지를 확인하기 위하여, 다양한 단백질 분해효소 억제제를 함께 사용하는 경우, *S.*

aureus 생물막의 형성 억제 활성 변화를 확인하였다. 그 결과, 세린 단백질 분해효소에 대한 억제제를 처리하는 경우에 HIB 상층액의 S. aureus 생물막 형성 억제 활성이 부분적으로 회복됨을 확인하여, HIB 상층액 중 세린 단백질 분해효소가 S. aureus 생물막 형성 억제 활성에 기여함을 확인하였다(실험결과 4 및 도 2a).

- [0015] 다음으로, HIB 상층액의 S. aureus 생물막 형성 억제 활성을 분자량 별로 분획하여 알아보았다. 그 결과, 10 내지 30kDa 의 공극 크기로 분획한 경우는 S. aureus 생물막 형성 억제 활성이 거의 없으나, 50kD 이상의 공극 크기로 분획한 경우에는 S. aureus 생물막 형성 억제 활성이 현저히 증가함을 확인하여, 생물막 형성 저해 활성이 있는 단백질의 대부분은 30 내지 50 kD 사이임을 확인하였다(실험결과 4).
- [0016] 나아가, 30 내지 50kDa 사이에 일부 50kDa 이상의 단백질이 존재할 수 있음을 고려하여, 질량 분석법으로 30 내지 70 kDa 사이의 세포 외 단백질을 확인하였다. 그 결과, 세린 단백질 분해효소 외에도 많은 다른 단백질 분해효소 및 펩티다아제를 확인하였다(표 1).
- [0017] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, HIB 상층액의 이미 형성된 S. aureus 생물막을 제거하는 활성에 대하여 확인하였다. 그 결과, HIB 상층액을 첨가한 경우 70% 이상의 S. aureus 생물막 제거 활성을 확인하여, HIB 상층액이 이미 형성된 S. aureus의 생물막을 현저하게 분해하는 것을 입증하였다(실험결과 4 및 도 3a). 나아가, 세린 단백질 분해효소 억제제를 HIB 상층액에 첨가하여 S. aureus 생물막 제거 활성을 알아보았다. 그 결과, S. aureus 생물막 제거 활성에 큰 영향이 없는 것을 확인하여 HIB 상층액의 세린 단백질 분해효소 이외의 다른 가수분해효소들도 S. aureus 생물막 분산에 관계한다는 사실을 확인하였다(실험결과 4 및 도 3a).
- [0018] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서는, HIB 상층액은 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*)의 생물막 형성의 저해 및 제거 효과를 확인하였다. 그 결과, HIB 상층액을 첨가하는 경우 표피포도상구균 생물막이 60% 이상 제거되는 것을 확인하였다(실험결과 4 및 도 7).
- [0019] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에서는, S. aureus에 HIB 상층액을 처리하는 경우, S. aureus가 인간 상피 세포를 감염시키는 능력에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, HIB 상층액을 처리하는 경우, 인간 상피 세포 내부로 침입한 S. aureus가 5배 이상 감소하는 것을 확인하여, HIB 상층액이 S. aureus가 인간 상피 세포를 감염시키는 능력을 현저하게 감소시킬 수 있다는 것을 입증하였다(실험결과 5 및 도 4a).
- [0020] 이를 통하여, HIB가 세포 외로(또는 배지 내로) 분비하는 단백질 분해효소가 포도상구균의 생물막 형성 억제 효과, 이미 형성된 포도상구균의 생물막 제거 효과 및 포도상구균의 인간 상피 세포 감염 억제 효과가 있음을 입증하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0022] 본 발명의 하나의 양태는, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균의 생물막 억제 또는 제거용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서 "델로비브리오 박테리오포로스 HD100"은, 분류학적으로 델로비브리오 속에 속하는 그람 음성 세균 및 호기성 세균을 말하며, 다른 그람 음성 세균들을 포식하는 포식성 균주로, 그람 양성 세균에 대해서는 포식 능력이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 델로비브리오 박테리오포로스 HD 100의 계통은 2004년에 완전히 해독되었으며 (Science vol.303, p.689-692, 2004), 전체 계통 서열에 대한 정보는 NCBI Genbank 등록번호 BX842601.2 에 공개되어 있다. 또한, 상기 균주는 기탁번호 ATCC 15356, DSM 50701, NCIB 9529 등으로 기탁되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 델로비브리오 박테리오포로스 HD 100는 당업계에서 자명하게 통용되는 용어로 볼 수 있으며, 이를 입수하는데 별다른 어려움이 없다. 또한, 그람 양성 세균, 특히 포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거 효과와 관련하여 전혀 알려지지 않는다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 "기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스(Host independent Bdellovibrio bacteriovorus, HIB)"이란 피포식균의 포식을 통하여 생장을 하는 야생형의 델로비브리오 박테리오포로스와는 다르게, 피포식균이 없이 자랄 수 있는 균주를 의미한다. 예를 들어, 포식을 하지 않고 생장할 수 있는 델로비브리오 박테리오포로스 균주에 해당하는 한 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 야생형의 델로비브리오 박테리오포로스 HD100 균주를 돌연변이시켜 제조한 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스 균주(KCTC18349P)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 "세포 외 단백질 분해 효소"는 균주가 자신의 세포 바깥쪽으로 분비하는 단백질 분해 효소를 총칭하는 의미이다. 구체적으로 본 발명에서는 HIB 균주가 세포 바깥쪽으로 분비하는 단백질 분해효소를 의미하고,

세포 바깥쪽으로 분비됨으로써 상기 단백질 분해효소는 배지 내에 존재할 수 있다. 그에 따라, 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포 외 단백질 분해 효소는 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스 균주의 배양 상층액에 포함된 것 일 수 있다.

[0026] 따라서, 본 발명의 조성물은, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스 유래의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함할 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 상기 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 어떠한 형태도 본 발명의 조성물의 범위에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 상기 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 균주 또는 전세포(whole cell), 상기 균주 또는 전세포의 파쇄액 또는 이의 분액, 또는 배양물 (예를 들어, 배양 상층액) 등을 포함할 수 있으며, 세포의 단백질 분해 효소를 포함하고 있는 한 조성물의 형태는 제한되지 않는다.

[0027] 일례로, 상기 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스 균주의 배양 상층액은 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스 균주를 배양하고 원심분리한 후의 상층액일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명에서 상기 세포 외 단백질 분해효소는 세린 단백질 분해효소를 포함할 수 있다. 세린 단백질 분해 효소란, 활성 중심에 세린, 히스티딘 및 아스파르트산 잔기를 가지는 효소를 의미하고, 예를 들어 본 발명에서는, Bd2269 (Uniprot 등록번호 Q6MKV8, 서열번호 1), Bd2428 (Uniprot 등록번호 Q6MKG5, 서열번호 2), Bd2321 (Uniprot 등록번호 Q6MKR4, 서열번호 3), Bd2535 (Uniprot 등록번호 Q6MK75, 서열번호 4), Bd1444 (Uniprot 등록번호 Q6MN19, 서열번호 5) 또는 Bd2428 (Uniprot 등록번호 Q6MGR5, 서열번호 6)일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예로, 본 발명의 세포 외 단백질 분해효소는 30 내지 50 kDa의 분자량을 갖는 단백질 분해효소 일 수 있다. 예를 들어, 30kDa 이상의 단백질 분해효소일 수 있고, 분획분자량 필터를 이용하는 경우 30kDa 이하의 공극 크기로 여과할 수 있는 단백질 분해효소일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 "포도상구균"은, 분류학적으로 포도상구균 속에 속하는 그람 양성세균으로, 황색포도상구균(*S. aureus*), 표피(종)포도상구균(*S. epidermidis*), 비병원포도상구균(*S. saprophyticus*)으로 구분될 수 있다. 예를 들어, *S. 아우레우스*(*S. aureus*), *S. 시미애*(*S. simiae*), *S. 오리쿨라리스*(*S. auricularis*), *S. 카노서스*(*S. carnosus*), *S. 콘디멘트*(*S. condimenti*), *S. 마실리엔시스*(*S. massiliensis*), *S. 피시퍼멘탄스*(*S. piscifermentans*), *S. 시물란스*(*S. simulans*), *S. 카피티스*(*S. capitis*), *S. 카프래*(*S. caprae*), *S. 에피데미스*(*S. epidermidis*), *S. 사카롤리티쿠스*(*S. saccharolyticus*), *S. 데브리세이*(*S. devriesei*), *S. 해몰라이티쿠스*(*S. haemolyticus*), *S. 호미니스*(*S. hominis*), *S. 크로모젠스*(*S. chromogenes*), *S. 펠리스*(*S. felis*), *S. 델피니*(*S. delphini*), *S. 하이쿠스*(*S. hyicus*), *S. 인터미디우스*(*S. intermedius*), *S. 루트래*(*S. lutrae*), *S. 마이크로티*(*S. microti*), *S. 무스캐*(*S. muscae*), *S. 슈도인터미디우스*(*S. pseudointermedius*), *S. 로스트리*(*S. rostri*), 또는 *S. 갈리나룸*(*S. gallinarum*) 일 수 있으며, 바람직하게는 황색포도상구균 또는 표피포도상구균 일 수 있다.

[0031] 상기 황색포도상구균은 생물막을 형성함으로써 항생제 내성을 획득할 수 있고, 이는 하나의 항생제 내성만에 국한되는 것이 아니라 다 종류의 항생제에 대하여 내성을 획득한 것일 수 있다. 하지만, 본 발명의 조성물은 항생제 없이도 사용 가능하고, 황색포도상구균이 아니라 황색포도상구균이 형성하는 생물막의 형성을 억제하고 이미 형성된 생물막을 제거할 수 있으므로, 항생제 내성 또는 다약제 내성을 획득한 황색포도상구균에 대해서도 본 발명의 조성물이 적용될 수 있다.

[0032] 따라서, 또 하나의 양태로서 본 발명은, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는, 포도상구균에 대한 항생제 내성 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 또 하나의 양태로서 본 발명은, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균 감염 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0034] 포도상구균에 의해 유발된 질환의 치료는 생물막이 형성된 경우 매우 어려운데, 질환의 치료를 위해 약물을 사용해도 생물막으로 인한 약물전달의 어려움이 있을 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 조성물을 사용하여 포도상구균의 생물막 형성을 억제하고, 이미 형성된 생물막을 제거함으로써 포도상구균에 대한 항생제 내성을 억제하고, 나아가 포도상구균의 감염을 치료할 수 있다. 예를 들어, 포도상구균은 감염을 통하여 일어날 수 있는 식중독, 심내막염, 폐렴, 패혈증, 요로감염, 복막염, 피부염 또는 여드름 등의 치료에 적용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 감염은, 포도상구균이 식품과 함께 혼입되어 인체에 감염을 일으킬 수 있고, 집파리 등을 통하여 포도상구균이 인체에 옮겨져 감염이 일어날 수 있고, 가구나 실내의 먼지에도 포도상구균이 존재할 수 있어 인체에 감염이 일어날 수 있으나, 이에 제한되지 않고 인체에 대하여 직접적 또는 간접적으로 감염을 일으킬 수 있는 모든

경로를 포함한다. 예를 들어, 포도상구균은 종종 병원 또는 수술을 통하여 감염이 일어나기도 하는데, 병원에서 사용되는 집기, 기구, 도구 등의 물건을 통하여 인체에 감염을 일으키기도 하고, 인체에 사용되는 인공장기를 포함하는 각종 기기를 통하여 감염을 일으키기도 한다.

[0036] 일 구현예로, 본 발명의 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 포도상구균에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있다. 기존의 다른 항생제 또는 기타의 효능이 입증된 물질과 병용될 경우에는 본 발명의 조성물이 생물막을 억제하거나 분해해 줌으로 기존 항생제나 기타의 효능이 입증된 물질이 초기 목적대로 효능을 발휘할 수 있게 된다. 본 발명에서 조성물의 포도상구균 감염 치료 용도에 있어, 조성물의 유효 용량은 보통으로 숙련된 의사가 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 특정 용량은 치료하고자 하는 인간을 포함한 동물의 일령 또는 연령, 체중 및 임상 증상과 투여방법에 의해 좌우될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무, 분사 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수도 있으며, 비경구 투여의 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수도 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 본 발명의 조성물의 세균 관련한 질환의 치료에의 활용은 기존의 항생제에 기반한 치료에 비해 추가적 이점을 제공할 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 하나의 양태는, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 조성물을 포도상구균에 처리하는 단계를 포함하는 포도상구균의 생물막 형성 억제 또는 제거 방법에 관한 것이다.

[0039] 포도상구균은 생물학적 환경에 존재할 수도 있고, 비생물학적 환경에 존재할 수도 있으므로, 상기 방법은 예를 들어, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 조성물을 포도상구균이 존재할 수 있는 환경에 처리하여 포도상구균의 생물막의 형성을 억제하거나 제거함으로써 환경 소독 또는 환경 정화를 할 수 있고, 포도상구균이 존재할 수 있는 의료기구 등에 처리하는 경우에는 의료 세정을 할 수 있다. 이러한 목적의 조성물에는 추가적 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있으며, 통상의 소독용, 의료세정용, 환경 정화용 조성물에 들어가는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 조성물을 스프레이 형태로 생물막 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생물막 형성 부위에의 도포, 분무 또는 분사하는 방법을 포함할 수도 있다.

[0040] 일 구현예로, 포도상구균의 생물막은 의료 분야에서 카테터(catheters), 심장 판막(heart valves), 단락(shunts), 보철기구(prosthetic devices) 같은 대부분의 삽입된 인공 표면(implanted artificial surfaces)에서 발견될 수 있으므로, 삽입용 의료 장치(implantable medical devices)의 표면을 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 조성물을 이용하여 코팅하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명은 생물학적 환경 또는 비생물학적 환경에 존재하는 포도상구균의 생물막 형성을 억제 또는 생성된 생물막을 제거하기 위하여, 기주 독립적인 델로비브리오 박테리오포로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 포도상구균의 생물막 억제 또는 제거용 조성물을 제공하며, 이는 포도상구균의 감염으로 인한 질환의 치료에 이용할 수 있고, 특히, 다약제 내성을 가진 포도상구균도 생물막의 형성 억제 및 제거를 통하여 용이하게 제거할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1a는 B. bacteriovorus HD100의 포식에 의하여 그람 음성 병원성 균주의 농도가 감소하는 것을 확인한 결과이다. "Predated"는 포식에 의해 농도가 감소한 결과, "Unpredated"는 포식하지 않은 결과, "Se"는 Salmonella enterica KACC 11595, "Yb"는 Yersinia bercovieri KACC15319, "Ye"는 Yersinia enterocolitica KACC 15320, "Yp"는 Yersinia pseudotuberculosis KACC1532, "Yr"은 Yersinia rohdei KACC 15322, "Ab"는 Acinetobacter baumannii KACC 12454, "Ab-C1"은 임상적으로 고립시킨(clinical isolate) A. baumannii, "Sa"는 Staphylococcus aureus KACC 10768를 나타내고, 에러 바(error bar)는 표준편차를 나타낸다(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

도 1b는 HIB 상층액을 S. aureus의 배지에 처리하는 경우 S. aureus 생물막 형성에 미치는 영향을 나타낸다. "PYE"는 HIB 상층액을 처리하지 않은 경우, "HIB"는 HIB 상층액을 처리한 경우를 나타낸다.

도 1c는 단백질 분해효소 K의 농도에 따라 S. aureus 생물막 형성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 1d는 HIB 배양 상층액이 S. aureus KACC 10768의 생장에 미치는 영향(growth)을 나타낸 것이다.

도 2a는 단백질 분해효소 저해제의 종류에 따라 HIB 상층액의 항-생물막 활성화에 미치는 영향을 평가한 것이다. "AEBSF", "E64", "Bestatin" 및 "Pepstatin"은 단백질 분해효소 억제제, "PYE"는 PYE 배지를 첨가한 경우, "HIB"는 HIB 상층액을 첨가한 경우, "Mix"는 4 종류의 단백질 분해효소 억제제를 모두 첨가한 경우를 나타낸다.

단백질 분해효소 억제제 AEBSF, E-64, pepstatin, pepstatin A를 HIB 상층액에 독립적으로 또는 혼합하여 5,000, 50, 500 및 75 μM 각각 첨가하였다. 그 후, 상층액을 30분간 배양하고, 희석된 S. aureus를 배양중인 96-well 플레이트의 TSB 배지에 10% 첨가하였다. 대조군으로, 10%의 PYE 배지를 첨가하였다. 두 번째 대조군으로, 네 가지 단백질 분해효소 저해제를 모두 PYE 배지에 첨가하고 S. aureus 배양액에 첨가하였다. 그 후, 24시간 배양하고, 세척 후 CV 염색을 수행하였다.

도 2b는 HIB 상층액의 분자량에 따라 S. aureus 생물막 형성 저해에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 3a는 HIB 상층액, 단백질 분해효소 K 및 DNase I에 의한 S. aureus 생물막 제거 효과를 비교한 것이다. "PYE"는 PYE 배지를 첨가한 경우, "HIB"는 HIB 상층액을 첨가한 경우, "AEBSF"는 단백질 분해효소 억제제, "ProK"는 단백질 분해효소 K를 나타낸다.

도 3b는 HIB 상층액을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우에 실리콘 칩에 형성된 S. aureus 생물막을 공초점 현미경 및 SEM 현미경을 이용하여 관찰한 이미지를 나타낸다.

도 4a는 MCF-10a 세포(녹색)를 감염중인 S. aureus 세포(빨간색)를 나타낸다.

도 4b는 HIB 상층액이 S. aureus 감염에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 4c는 HIB 상층액을 처리한 후 S. aureus 표면 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다. 가장 왼쪽(M) 레인과 오른쪽 레인(M)은 상업적으로 판매되는 이미 염색된 서로 다른 단백질 마커(PageRuler, Thermo Scientific, USA and Wide-View, Wako Chemical, Japan)를 나타낸다.

도 5는 MFC-10a 인간 상피 세포의 생존에 HIB 상층액이 미치는 영향을 평가하기 위한 MTT assay 결과를 나타낸다.

도 6은 HIB 상층액을 처리한 경우(우측)와 처리하지 않은 경우(좌측)에 S. aureus 생물막 형성의 차이를 보여주는 사진이다.

도 7은 HIB 상층액에 의한 S. epidermidis 생물막 제거 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0044]

실험예 1. 균주 및 배양 조건

[0045] 본 발명을 위해서 Staphylococcus aureus KACC 10768, Staphylococcus epidermidis KACC 13234, Escherichia coli MG1655, Salmonella enterica KACC 11595, Yersinia bercovieri KACC 15319, Yersinia enterocolitica KACC 15320, Yersinia pseudotuberculosis KACC1532, Yersinia rohdei KACC 15322, Acinetobacter baumannii KACC 12454 및 임상적으로 고립(clinical isolate)시킨 A. baumannii의 균주를 사용하였다. 상기 모든 균주는 -80° C 냉동 글리세롤에서 보관하였다. 필요에 따라, nutrient broth (NB; Acumedia, USA) 한천 플레이트(agar plate)에서 37° C의 조건으로 밤새 배양하였다. 배양한 플레이트에서 콜로니 하나를 3 ml TSB broth에 접종하고, 교반(250rpm)하며 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양한 균주는 본 발명의 실험에 사용하였다.

[0046] 야생형 기주 의존적(Host dependant) 델로비브리오 박테리오보루스 HD100 은 독일의 DSMZ에서 구입하였다. 필요에 따라, 냉동 보관(stock)에서 꺼내어 먹이로 E. coli MG1655가 포함되어 있는 DNB top agar plate에 스트레킹(streaking)하였다. B.bacteriovorus 액체 배양액은 평균 1.5× 10⁹ PFU/ml 의 농도를 나타냈다.

[0047] **실험예 2. 포식에 대한 병원성 균주의 감수성 확인 실험**

[0048] 각 균주는 상기 설명한 플레이트 위에서 배양하고, 3 ml NB에 접종되어 30°C, 250 rpm에서 밤새 배양하였다. 상기 밤새 배양한 배양액 0.5 ml를 4 ml DNB에 첨가하고 24h 동안 배양하였다. 포식에 대한 감수성 확인을 위해, 포식자인 B. bacteriovorus HD100 0.5 ml를 첨가하였다. 최종 OD는 분광광도계(spectrophotometer)(Biophotometer +, Eppendorf, Germany)를 이용하여 24 시간 후에 600nm 에서 측정하였다. 각각의 실험은 3번 반복하여 수행하였다.

[0049] **실험예 3. 기주 독립적 B. bacteriovorus 의 분리 및 배양**

[0050] 기주 독립적 B. bacteriovorus의 분리 및 배양을 위해, "The Open Microbiology Journal, 2009, 3, 87-91"에 기재된 방법으로 상기 기주 의존적 B. bacteriovorus HD100 으로부터 기주 독립적인 B. bacteriovorus HD 100 를 제조하였다.

[0051] 상기 제조한 기주 독립적인 B. bacteriovorus HD 100을 대전에 소재하는 생명공학연구원에 2015년 1월 20일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC18349P를 부여받았다.

[0052] **3-1. 세균 균주, 배지 및 배양 조건**

[0053] 본 발명에서 기주 독립적 B. bacteriovorus의 분리 및 배양을 위해, 디아미노피멜산(diaminopimelic acid, DAP) 영양요구성 (auxotroph) 대장균 균주와 기주 의존적 B. bacteriovorus HD100을 사용하였다.

[0054] DAP 영양요구성 대장균 균주를 LB+DAP 배지에서 18시간 동안 배양하였다. 이후, 기주 의존적 B. bacteriovorus 와 함께 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 단계 희석한 용해물 100ul를 DAP 없는 PYE(peptone-yeast extract) 배지에 도말하고 기주 독립적 균주가 나타날 때까지 30°C에서 배양하였다.

[0055] **3-2. 기주 독립적 B. bacteriovorus 확인**

[0056] 상기 기주 의존적 B. bacteriovorus 배양 5일 후, 나타난 노란색 콜로니에 대하여 액상상태의 PYE 배지에 배양하였다. OD 값이 0.5가 될 때까지 배양을 지속하고 현미경을 통하여 기주 독립적 B. bacteriovorus 균주임을 확인하였다.

[0057] 분리한 균주의 배양 일부는 -80°C의 냉동 글리세롤에서 보관하였으며, 필요에 따라 꺼내어 PYE 한천 플레이트에 새롭게 배양하였다. PYE 미디어에서의 2차 배양은 일반적으로 OD 0.5 정도로 성장하였다. 생물막 실험을 위해서, 배양액을 원심분리(16,000g, 5 min)하고, 모든 세포를 제거하기 위해 0.22 마이크론 주사기 필터를 이용하여 여과시켰다.

[0058] 실험예 4. LC-MS/MS에 의한 세포 외 단백질의 분석

[0059] HIB 상층액에 존재하는 다른 세포 단백질을 확인하기 위하여, 0.50D의 HIB 배양액 10ml을 취하고, 16,000g에서 10분 간 원심분리하여 세균을 제거한 후 0.22 micron syringe filter를 이용하여 2번 여과하였다. 여과한 단백질은 15% 트리클로로아세트산을 이용하여 침전시키고 차가운 아세톤으로 세척하였다. 침전시킨 펩릿은 pH7.4의 PBS에 용해하였다.

[0060] 그 후, 단백질에 대하여 Tris-glycine SDS-PAGE gel (Biorad, USA) 전기영동을 수행하였다. Coomassie blue로 염색한 후, 30 내지 70kDa 단백질에 대하여 젤 내에서 tryptic digestion을 수행하였다. 트립신 분해 펩타이드 결과는 LC-MS/MS로 분석하였다.

[0061] 모든 질량 분석은 나노전기분무 이온화(nano electrospray ion source)가 가능한 LTQ-Orbitrap (Thermo, Bremen, Germany)에서 수행하였다. 펩타이드 혼합물을 분리하기 위해, 아세토나이트릴/0.1% 폼산, 경사도 66분, 유속 300nl/min의 C18 역상 HPLC 컬럼(150mm x 75 μm i.d.)을 이용하였다. MS/MS 분석을 위하여, internal lock mass가 있는 해상도 60,000, m/z400의 Orbitrap을 이용하여 전구체 이온 스캔 MS 스펙트럼(m/z 400-2000)을 얻었다. 가장 강한 세가지 이온을 분리하고 선형 이온 트랩(linear ion trap)내에서 CID(collisionally induced dissociation)를 통하여 단편화하였다.

[0062] 모든 MS/MS 스펙트럼은 Bdellobvrio bacteriovorus 균주 ATCC 15356, DSM 50701, NCIB 9529 및 HD100의 모든 단백질 코딩 서열을 포함하는 Bdellobvrio bacteriovorus 단백질 서열 데이터베이스(3583 entries, UniProt (<http://www.uniprot.org/>))의 curated version에 대하여 Sequest를 사용하여 분석하였다. 카바마이도메틸 시스테인과 산화 메티오닌은 고정된 변형 및 다양한 변형으로서 각각 설정하였다. missed cleavages는 최대 2개를 허용하였다. 네 번째 MS 피크에서 허용된 mass tolerance는 10ppm이고, Ms/MS 피크를 위해서는 0.8Da이었다. 이 후, 일치하는 펩타이드의 최소 수를 2 및 false discovery rate(fdr)를 0.01로 설정한 조건에서 추가로 여과하였다.

[0063] 실험예 5. 단백질 분해효소 정량분석

[0064] 시료에서 단백질 분해효소의 활성을 알아보기 위해, 2 ml 테스트 샘플 및 제조된 단백질 분해효소(proteinase) K 표준액을 준비된 azocoll 용액에 0.5 ml 첨가하고 2시간 동안 교반하며(250 rpm) 37℃에서 배양하였다. 원심 분리(16,000xg, 10 min) 후, 상층액 200 μl를 투명한 96 well 플레이트(Costar, USA)에 옮긴 후, 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Tecan, Infinite M200). 각각의 분석에는 세 개의 독립적인 샘플을 사용하였다.

[0065] 실험예 6. HIB 상층액의 분자량 크기별 분류 및 단백질 분해효소 억제제의 효과 확인

[0066] HIB 상층액(500ul) 샘플은 100, 50, 30 및 10 kDa 분획분자량 원심 여과기(molecular mass cut-off centrifugal filters)를 통하여 여과하였다. 각 여과물에 대하여 S. aureus 배양액에서 항-생물막 효과를 시험하였다. 이를 위해, 각 여과물은 희석된 S. aureus를 배양중인 96-well 플레이트의 TSB 배지에 10% 첨가하였다. 플레이트는 생물막을 형성하기 위해 배양한 후, 세척하고, CV 염색을 수행하였다(a, b, c, d and e = p<0.05).

[0067] 단백질 분해효소 억제제는 AEBSF, E64, Bestatin, 및 Pepstatin A를 시험하였고, 모두 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하였다. 각각의 저장 용액(stock solution)은 제조업체의 설명서에 따라 준비하였다. 단백질 분해효소 억제제 AEBSF, E-64, pestatin, pepstatin A를 5,000, 50, 500 및 75 μM 농도로 HIB 상층액에 독립적으로 또는 혼합하였다. 그 후, 상층액을 30분간 배양하고, 희석된 S. aureus를 배양중인 96-well 플레이트의 TSB 배지에 10% 첨가하였다. 대조군으로, 10%의 PYE 배지를 첨가하였다. 두 번째 대조군으로, 네 가지 단백질 분해효소 저해제를 모두 PYE 배지에 첨가하고 S. aureus 배양액에 첨가하였다. 그 후, 24시간 배양하고, 세척 후 CV 염색을 수행하였다.

[0068] 실험예 7. 생물막 형성 억제 및 제거 활성 분석 실험

[0069] 생물막을 형성하기 위해서, TSB(trypticase soy broth)에서 밤새 배양한 S. aureus를 백배로 희석하여 새로운 TSB 배양액에 접종하였다. 96-well 플레이트 내 각각의 웰에 180ul의 상기 배양액을 첨가하였다. 각각의 웰에는 20ul의 PYE 배지, HIB 상층액 또는 다른 첨가물 중 하나를 첨가하였다. 첨가된 플레이트는 교반없이 37℃에서

24시간동안 배양하였다. 증류수로 조심스럽게 세척하고 건조한 후에, 0.1%의 크리스탈 바이올렛(crystal violet, CV)을 각각의 웰에 첨가하였다. 첨가된 플레이트는 상온에서 20분 동안 배양하고, 세척하고 건조하였다. 다음, 2% 아세트산을 보충한 에탄올 250ul를 각각의 웰에 30분 동안 첨가하였다. 그 후, Glomax Multi+ (Promega, USA)를 이용하여 560nm에서 각 웰의 흡광도를 측정하였다. S. aureus 또는 S. epidermidis의 생물막 제거 실험을 위해서, 상기 기재한 방법에 따라 S. aureus 및 S. epidermidis의 생물막을 준비하였다. 배지를 제거하고 각 웰을 10% PYE 배지, 10% HIB 상층액, 100 µg/ml의 단백질 분해효소 K (Invitrogen, USA) 또는 20 µg/ml DNase I(Invitrogen, USA) 중의 하나가 보충된 200ul의 HEPES 버퍼(with 2 mM CaCl₂ and 3 mM MgCl₂)로 채웠다. 그 후, 채워진 플레이트는 37°C에서 24시간 동안 배양하고, 세척하고 CV로 염색하였다. 상기 기재한 방법에 따라 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 실험예 8. 생물막 실험의 통계 분석

[0071] 각 실험에는 세 종류의 독립적인 S. aureus 를 사용하였으며, 각각 적어도 4 wells을 이용하여 배양하였다(각 실험에 12 wells이 쓰임). plate-to-plate 핸들링에 의한 오차를 최소화 하기 위하여, 각 플레이트에 대한 결과 는 주어진 플레이트 대조군에 대하여 분석하고, 다른 날 수행한 실험 결과와 함께 평균을 내어 분석하였다.

[0072] 실험예 9. 실리콘 칩에 생물막 형성

[0073] 본 발명에 사용된 실리콘칩은 실리콘 웨이퍼(Shin-Etsu, Japan)로 10 mm × 10 mm로 절단된 것이다. 상기 칩은 세척하고 10% PYE 배지(대조군) 또는 10% HIB 상층액 중 하나가 보충된 HEPES 버퍼에서 24시간 동안 배양하였다. 칩과 생물막은 전술한 바와 같이 제조하였다.

[0074] 실험예 10. 공 초점 및 주사 전자 현미경

[0075] 실리콘 칩에서 형성된 S. aureus의 생물막을 시각화 하기 위하여, 칩을 세척하고 살아있는 세포를 염색하는 CellTracker CFSE (1 µg/ml)(녹색) 및 죽은 세포와 세포 외 DNA를 염색하는 ethidium homodimer-1 (EthD-1, 0.004 mM)(Life Technologies, USA)(빨간색)를 함유한 HEPES 버퍼에 30분간 칩을 넣어 세균 세포를 염색하였다. 상기 염색약은 살아있는 세포 및 죽은 세포/세포 외 DNA를 각각 염색하였다. 그 후, 칩은 필요없는 염색약을 제거하기 위해 부드럽게 세척하고 현미경으로 이미지화 하였다. 공초점 현미경은 ZEN 2009 software에 의하여 작동하는 LSM700 confocal microscope (Carl Zeiss)를 사용하여 수행하였다. 상기 생물막의 주사 전자 현미경 이미지화는 이전에 기술된 방법으로 수행하였다.

[0076] 실험예 11. S. aureus 감염의 시각화

[0077] 현미경 관찰을 위해서, DMEM/F12 배지에 7.5x10⁴ cells/well를 접종하여 MCF 10a 세포 단분자층을 8-well chambered cover glass (Nunc® Lab- Tek® II, Thermo-Scientific)에 준비하였다. 36시간 배양 후에, 5 µg/ml 의CFSE (Invitrogen, USA)를 함유하는 0.5ml의 PBS로 37°C의 CO₂ 배양기에서 10분간 대체함으로써, MCF-10a 세포를 CFSE로 염색하였다. 그 후, 세포를 PBS로 2번 세척하고, 각 웰에는 0.5 ml 의 DMEM /F12 배지를 첨가하였다. 염색된 세포는 37°C에서 1시간동안 다시 배양하였다.

[0078] 밤새 배양한 S. aureus를 16,000xg에서 2분간 원심분리하고, 1ug/ml의 CellTracker Red CMTPX (Invitrogen, USA)가 보충된 HEPES 버퍼 내 OD 1.0으로 재현탁하였다. 37°C의 진탕배양기에서 20분간 배양하고, 상기 기재한 것과 같이 표지된 박테리아를 원심분리하고 HEPES 버퍼로 세 번 세척하였다. 세포 펠렛은 1ml의 HEPES 버퍼로 현탁하고 DMEM/F12 배지에 1:100으로 희석하였다. 침습을 위해서, 웰 내 배양 배지를 0.5ml의 준비한 S. aureus 용액으로 대체하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지(media)를 50 µg/ml gentamicin, 100unit/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, USA)를 함유하는 새로운 DMEM/F12 배지로 15분 간 대체하였다. 그 후, 상기 배지를 항생제가 없는 DMEM F12 배지로 대체하고 배양액을 공초점 현미경을 사용하여 즉시 이미지화 하였다. 침습한 세균을 나열하기 위하여, MCF-10a 세포를 manual disruption에 따른 0.2% triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA.)를 함유하는 PBS 1ml에 상온에서 10분 간 배양함으로써 용해시켰다. 그 결과로 생긴 세포 용해물을 단계 희석하고 균집 형성을 위해서 LB agar 플레이트에 플레이팅하고, 37°C, 24시간 배양하였다.

[0079] **실험예 12. S. aureus 표면 단백질 추출 및 처리**

[0080] S. aureus의 세 개의 다른 콜로니를 TSB 배지에서 밤새 배양하였다. 그 후, 각 튜브의 S. aureus 세포들은 대조군으로써 HIB 상층액 (10%) 또는 PYE (10%)가 포함된 5 ml HEPES 버퍼용액에서 OD₆₀₀ 1.0 으로 현탁하였다. 6개의 튜브는 37°C 에서 2 시간동안 배양하였다. 다음, 각 튜브에서 균체를 원심분리하고, PBS로 3번 세척하였다. 단백질은 SDS-PAGE 젤을 이용하여 분리하였다.

[0081] **실험예 13. HIB 상층액에 의한 S. epidermidis 생물막 제거 효과 확인 결과**

[0082] S. epidermidis 생물막은 96-well 플레이트의 TSB 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 형성하였다. 상기 배지는 제거하고, 각 웰을 부드럽게 세척하고 10%의 HIB 상층액 또는 새로운 PYE 배지(대조군) 중 하나가 보충된 HEPES 버퍼 200ul를 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 37°C에서 24시간 배양하고 세척한 후 CV로 염색하였다.

[0083] **실험결과**

[0084] **1. 기주 독립적 Bdellovibrio bacteriovorus 변이체 확인**

[0085] DAP 영양요구성 대장균 균주와 기주 의존적 B. bacteriovorus와 함께 24시간 동안 배양한지 5일 후에 나타난 노란색 콜로니에 대하여 액상상태의 PYE 배지에 OD 값이 0.5가 될 때까지 배양하고 현미경을 통하여 형태학적으로 기주 독립적 B. bacteriovorus 균주임을 확인하였다.

[0086] 현미경을 통하여 확인한 기주 독립적 B. bacteriovorus 균주의 세포 길이는 2 내지 60um로 다양하였고, 상대적으로 두께는 균일하였다.

[0087] **2. 기주 독립적 Bdellovibrio bacteriovorus HD100의 배지로 단백질 분해효소 방출 확인**

[0088] 본 발명에서 분리된 B. bacteriovorus (HIB) host-independent 돌연변이를 PYE 미디어에서 무균 배양하였다. 상기 균주는 다른 그룹에서 유사하게 개발된 기주 독립적 단백질 분해 효소를 분비하는 것으로 알려져 선택하였다. mid-log phase(OD 0.5)에서 세포가 없는(cell-free) 상등액을 분석하여, 단백질 가수분해 활성도는 13.7 ng/ml 단백질 분해효소 K에 반응하는 것을 확인하였다. 상등액에서 확인한 단백질의 종류는 표 1에 정리하였다.

표 1

[0089]

Gene	Uniprot Accession	Protein Name	Size (kDa)	Subcellular Localization
Proteases				
Bd2269	Q6MKV8	Serine protease, subtilase family	56.6	Extracellular
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit	33.5	Unknown
Bd2321	Q6MKR4	Subtilisin-like serine protease	74.9	Unknown
Bd2428	Q6MKG5	Serine protease	114.9	Extracellular
Bd1444	Q6MN19	Serine protease, subtilase family	111.5	Unknown
Bd2692	Q6MJS6	Protease	53	Extracellular
Bd2627	Q6MJY9	Periplasmic protease	32.3	Unknown
Bd2535	Q6MK75	Putative serine protease	28.5	Unknown
Bd3857	Q6MGR5	Alkaline serine protease subtilase family	43.2	Extracellular
Bd0449	Q6MQL6	Putative protease	57.2	Unknown
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit	33.5	Unknown
Peptidases				
Bd0306	Q6MQZ5	Carboxypeptidase	34	Unknown
Bd1962	Q6MLP5	Putative V8-like Glu-specific endopeptidase	31.3	Unknown
Bd3622	Q6MHC8	Aminopeptidase	45.6	Extracellular

cpt	Q6MIC9	Carboxypeptidase		N/A
dcp	Q6MII6	Peptidyl-dipeptidase		N/A
pip	Q6MHR0	Proline iminopeptidase		N/A
Bd1518	Q6MMV5	Amino peptidase	78	Unknown

[0090] **3. Bdellovibrio bacteriovorus 상등액의 S. aureus 생물막 형성 억제 확인**

[0091] 도 1a에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 B. bacteriovorus HD100은 다양한 그람 음성 병원성 균주를 공격에 의하여, 각 균주의 광학 밀도가 포식에 의해 크게 감소하였다. 그러나 많은 피부 감염과 가장 보편적인 병원 내 감염과 관련된 다 내약제성 생물인 황색포도상구균의 성장은 포식자 박테리아에 의한 영향을 받지 않았다. 이러한 점은 표피포도상구균이 그람 양성균이므로 B. bacteriovorus HD100에 의한 공격을 받지 않은 것으로 이해하였다.

[0092] 그러나 단백질 분해효소 K는 S. aureus 생물막 형성을 억제할 수 있다. 실험결과 1에서, HIB B. bacteriovorus HD100 배양액이 단백질 분해효소를 배지로 분비하는 것을 확인하였고, 포식자와 포식자가 분비한 가수분해효소의 S. aureus에 의한 생물막 형성 억제 효과를 확인하였다. 도 1b에서 알 수 있는 바와 같이, HIB 세포가 없는 상층액의 10% 첨가는 S. aureus 생물막의 형성을 80에서 90 %까지 억제하였다. 이러한 결과는 도 6에서 TSB를 배지로 하여 96 well 플레이트에서 37°C에서 24시간 배양한 S. aureus에 HIB 상층액을 10% 처리한 경우(도 6의 우측)가 HIB 상층액을 처리하지 않은 경우(PYE 배지를 10% 첨가)(도 6의 좌측)에 비해 투명한 표면을 나타내는 것과 일치하는 결과이다.

[0093] 비록 일반적으로 알려진 S. aureus 생물막을 방지하고 제거하는 단백질 분해효소 K의 농도는 1 또는 2 ug/ml에서 100 µg/ml이나, 본 발명에서는 단백질 분해효소 K를 PYE 배지로 단계 희석(serial dilution)하고 S. aureus를 배양중인 96 well 플레이트에 첨가하여 S. aureus 생물막 형성 방지에 미치는 효과를 구체적으로 알아보았는데, 단백질 분해효소 K의 농도가 1 ng/ml 경우에도 여전히 63%의 억제효과가 있음을 확인하였다(도 1c). 이러한 결과는, 10% 희석 후 1.4 ng/ml 프로테아나아제 K와 비교되는 HIB 상층액과 단백질 가수분해 활성과 일치하는 것을 확인하였다.

[0094] 또한, HIB 배양 상층액이 S. aureus KACC 10768의 성장에 미치는 영향(growth)을 알아보기 위해, S. aureus 배양액을 TSB 배지에서 100배로 희석하고, HIB 배양 상층액을 S. aureus 배양액에 10% 첨가하였다. 대조군으로, 10%의 PYE 배지를 첨가하였다. 각 플레이트는 37°C에서 교반하며 배양하였고 S. aureus 생장은 12시간 후에 OD₆₀₀을 측정하여 확인하였다. 그 결과, S. aureus 생물막 형성의 심각한 손실에도 불구하고 HIB 배지는 S. aureus 균주에 독성이 없어 성장에 영향을 미치지 않았다는 것을 확인하였다(도 1d).

[0095] **4. 세포 외 세린 단백질 분해효소의 S. aureus 생물막 형성 억제 효과 확인**

[0096] 실험결과 2가 세포 외 단백질 분해효소 때문임을 입증하기 위해, 우리는 AEBSF, E64, bestatin, pepstatin을 포함하는 몇몇의 다른 단백질 분해효소 억제제를 사용하여, HD100 배양액 내 단백질 분해효소들의 활성에 부적절한 영향을 주는지에 대하여 실험하였다. 억제제의 대부분은 억제에 효과를 나타내지 않았으나(도 2a), 세린 단백질 분해효소의 강력한 억제제인 AEBSF를 처리하는 경우 생물막을 형성하는 S. aureus의 능력이 26%에서 55%로 부분적으로 회복됨을 확인하였다. 상기 4 가지 억제제는 단일 샘플에서 함께 사용하였 때, AEBSF 샘플 결과와 동일한 것을 확인하였다(도 2a).

[0097] 단백질 분해효소 억제제가 미치는 영향을 더 알아보기 위하여, HIB 상등액을 몇몇의 다른 분획분자량 필터(molecular weight cut-off filters)를 이용하여 분획(fractionate)하였다. 각 통과액(flow-through)은 S. aureus의 생물막 형성을 저해할 수 있는 능력이 있는지 확인하기 위해 시험하였다(도 2c)(//도 2c 가 없습니다. 확인하여 주시기 바랍니다.). 50kD 이상의 공극 크기(pore size)에서, 우수한 생물막 형성 저해 활성을 확인하였다. 그러나, 상대적으로 작은 공극 크기를 사용하였을 때는, 상층액의 생물막 형성 저해 활성이 사라진 것을 확인하였다. 이를 통하여, 생물막 형성 저해 활성이 있는 단백질의 대부분은 30 내지 50 kD 사이임을 입증하였다.

[0098] 질량 분석법(mass spectrometry)으로 30 내지 70 kDa 사이의 세포 외 단백질을 확인하였을 때, 표 1의 Bd2269 및 Bd3857를 포함하는 다수의 세린 단백질 분해효소가 있음을 확인하였고, 도 2a에서 AEBSF 결과를 다시 입증하였다. Bd1444 및 Bd2428, 두 가지 세린 단백질 분해효소는 상등액에서 확인하였으나, 분석을 위해 선택된 분자

량 크기에 기초하였을 경우 예상보다 훨씬 많이 있음을 확인하였다. 이를 통하여, HIB에 의해 배지 내로 분비된 이러한 단백질들은 단백질 가수 분해 효소에 의하여 더 작은 단편으로 점차적으로 분해되는 것으로 가정하였다. 세린 단백질 분해효소 이외에도, 많은 다른 단백질 분해효소 및 펩티다아제를 확인하였고, 도 2a에서 알 수 있는 바와 같이 생물막 형성 저해에 기여함을 확인하였다.

[0099] 이전 연구들에서도 기주 독립적인 *B. bacteriovorus* 변이체들에서 분비되는 단백질 가수분해 효소를 확인하였다. 그 중 2-D gel 전기영동을 이용하여 단백질을 확인한 연구에서는 약 100 개의 단백질 스팟(spots)을 확인하였다. 단백질 분해효소를 확인한 연구에서는 HIB 변형체의 상층액에서 세린 단백질 분해효소인 Bd1962와 Bd2269 및 카르복시펩티다아제인 Bd03066를 포함하는 단백질 분해효소를 확인하였다. 다른 기술을 통하여 이러한 단백질을 확인한 것은 실험한 HIB 변형체 균주에서 상기 단백질이 분비되는 것을 입증하고, 이는 모든 HIB 변형체의 공통적인 특징일 수도 있음을 제공하는 것이다.

[0100] 단백질 분해효소 K는 *S. aureus*의 생물막 형성을 감소시킬 뿐만 아니라 *S. aureus*에 의해 이미 형성된 생물막을 분산시키는 효과가 있다. 세포 외 중합체인 생물막은 단백질을 포함하는 서로 다른 거대 분자들로 구성되어 있어서, 단백질 분해효소를 이용하여 세균, 곰팡이뿐만 아니라 이들 균주 또는 종의 다수로 구성된 군에 의해 이미 형성된 생물막을 분산시킬 수 있다. 최근 연구는 표피포도상구균에서 분비된 세린 단백질 분해효소는 *S. aureus*의 생물막의 형성을 저해하고 제거하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0101] 많은 세포 외 단백질 분해효소가 세린 단백질 분해효소이므로, HIB 상층액의 이미 형성된 *S. aureus* 생물막 제거 활성에 대해 실험하였다. 그 결과, 도 3a에서 확인할 수 있는 바와 같이 HIB 상층액을 10% 첨가한 경우 특성화된(well-characterized) 단백질 분해효소 K 및 DNase I 효소와 유사한 제거 활성을 확인하였다. 이는 형광 현미경 및 SEM 이미징(SEM imaging)을 통하여 추가 확인하였고(도 3b), 이를 통하여 HIB 상층액 첨가 및 그 활성에 의하여 이미 형성된 *S. aureus*의 생물막이 현저하게 분산됨을 입증하였다. 또한, 도 3a에서 마찬가지로 확인할 수 있는 것은, AEBSF를 HIB 상층액에 첨가하여도 제거 효율에 거의 영향이 없음을 알 수 있었고, 이는 다른 가수분해 효소들도 *S. aureus* 생물막 분산에 관계있다는 것을 제공하는 것이었다.

[0102] HIB 상층액은 표피포도상구균의 생물막 형성의 저해 및 제거에도 효과가 있음을 확인하였다(도 7). 이는 *S. epidermidis*에 의한 군체 형성(colonization)이 *S. aureus*이 존재하지 않은 것과 관계있다는 것으로, *S. epidermidis*의 세포 외 세린 단백질 분해효소는 *S. aureus*의 생물막을 분산시키나 자신의 생물막에 대해서는 효과가 없다는 최근 연구와 반대되는 것이다. 이러한 결과를 통하여 HIB 상층액 내 가수분해 효소가 상기 두 가지 병원성 미생물에 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이는 AEBSF의 존재하는 경우에서도 마찬가지였고, 따라서 세린 단백질 분해효소 이외의 다른 단백질 분해효소 또한 기여하는 것을 확인하였다.

[0103] **5. *S. aureus*에 HIB 상층액 처리는 독성 및 병원성 감소시킨**

[0104] 도 4a를 통하여 *S. aureus*에 의하여 MCF-10a 세포가 감염되는 것을 확인하고, *S. aureus* 배양액에 10% HIB 상층액을 2 시간 동안 처리한 경우 상층액을 처리하지 않은 경우보다 병원성이 5배 감소하는 것을 확인하였다(그림 4b). 이를 통하여, *S. aureus*에 HIB 상층액을 처리하는 경우, 생물막 형성하거나 유지하는 능력을 억제할 뿐만 아니라, 인간의 상피 세포에 침입 할 수 있는 능력을 감소시킬 수 있음을 입증하였다(도 4b). 도 4c에서 알 수 있는 바와 같이, SDS-PAGE 분석을 통하여 HIB 상층액이 처리된 세포(도 4c의 HIB 라인)에서 병원성과 관련된 표면 단백질이 명백하게 감소하였음을 확인하였고, 이를 통하여 침습성이 낮아진 이유를 다시 한 번 입증하였다.

[0105] *S. aureus* 표면 단백질의 가수분해는 *Listeria monocytogenes* 에서와 같이 침투를 감소시키는데 기여하는 것으로 보였다. 하지만, 최근 연구에 의한 또 다른 가능성으로 *S. aureus*의 군체 형성을 위해 필요한 상피 세포(epithelial cell)에 존재하는 수용체(fibronectin, vitronectin 및 fibrinogen)의 절단을 들었으나, 이는 수행한 프로토콜 상 타당하지 않은 것으로 확인하였다. 기본적으로, 처리된 *S. aureus*는 펠릿화하고 세척하여 침투를 수행하였으므로, 상피 세포 배양액으로 이동된 HIB 단백질 분해효소는 최소화되었다.

[0106] 또한, 96-well 플레이트에서 Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit를 사용하고 72시간 노출하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, MFC-10 인간 세포 배양의 생존이 HIB 상층액 첨가에 의해 영향 받지 않는 것을 확인하였다(도 5).

수탁번호

[0107]

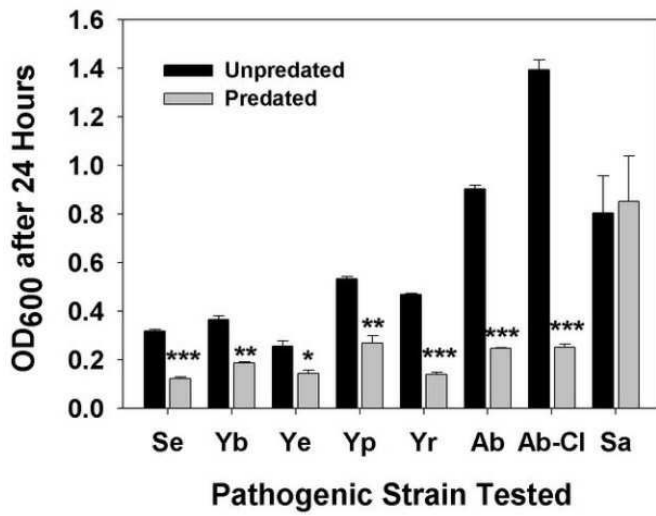
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18349P

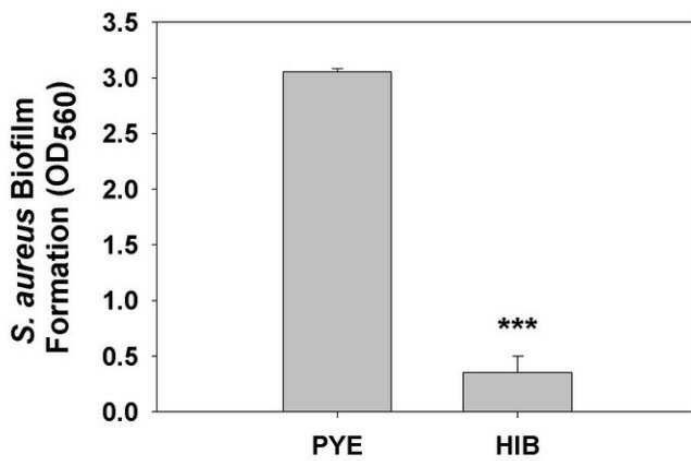
수탁일자 : 20150120

도면

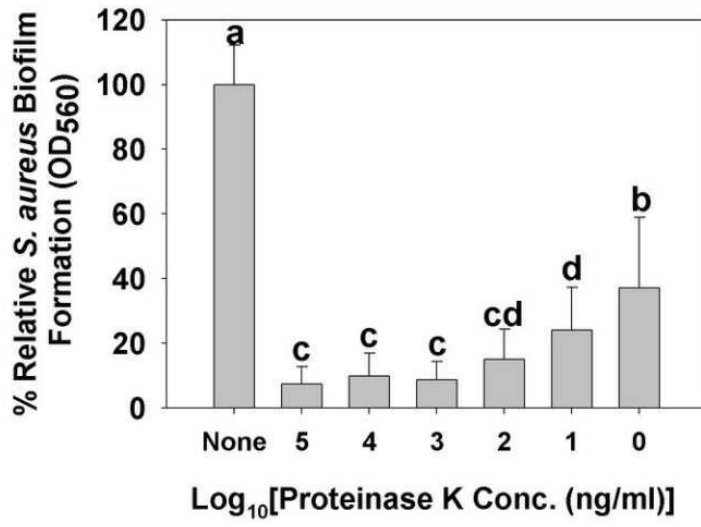
도면1a



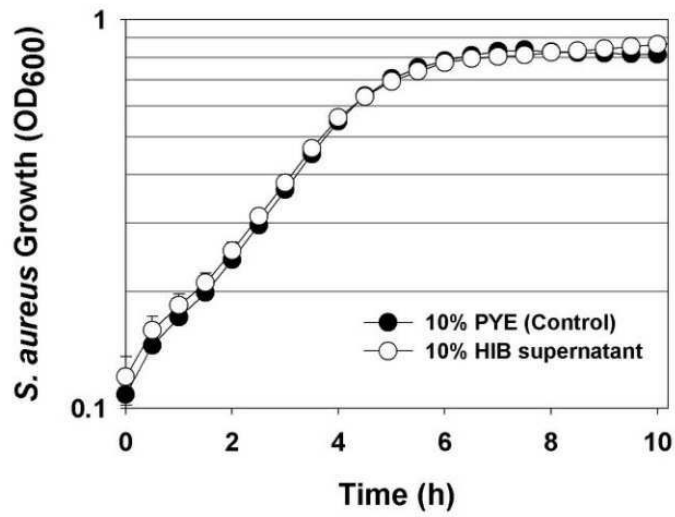
도면1b



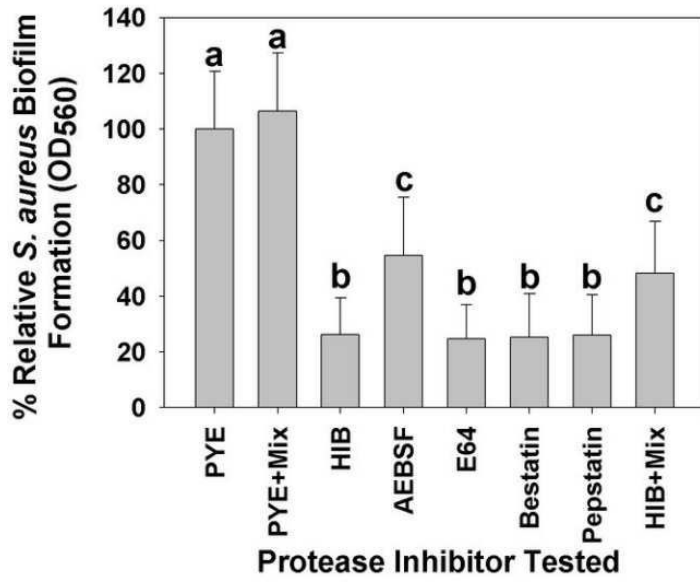
도면1c



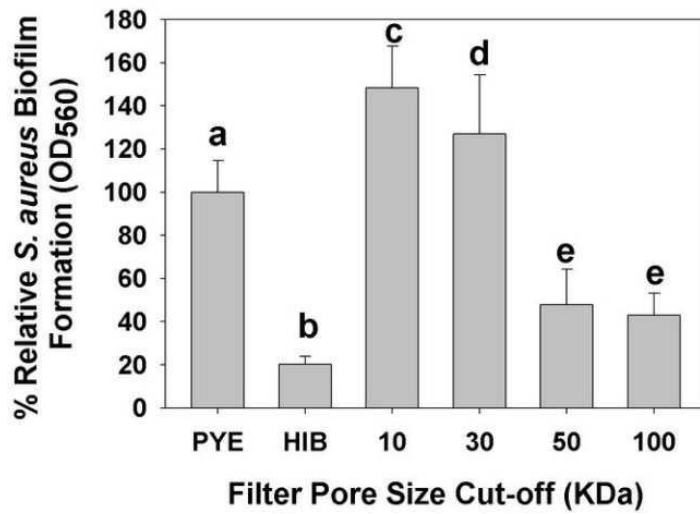
도면1d



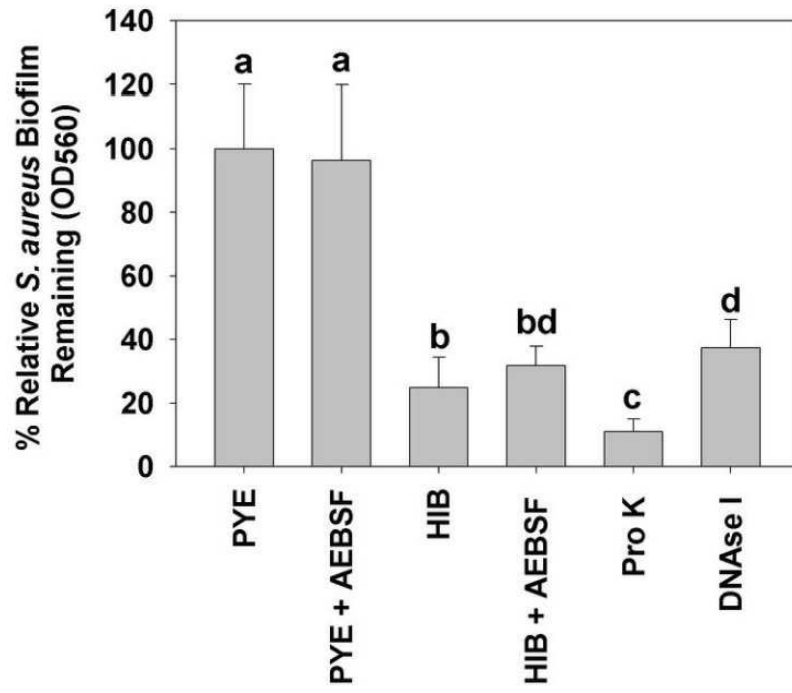
도면2a



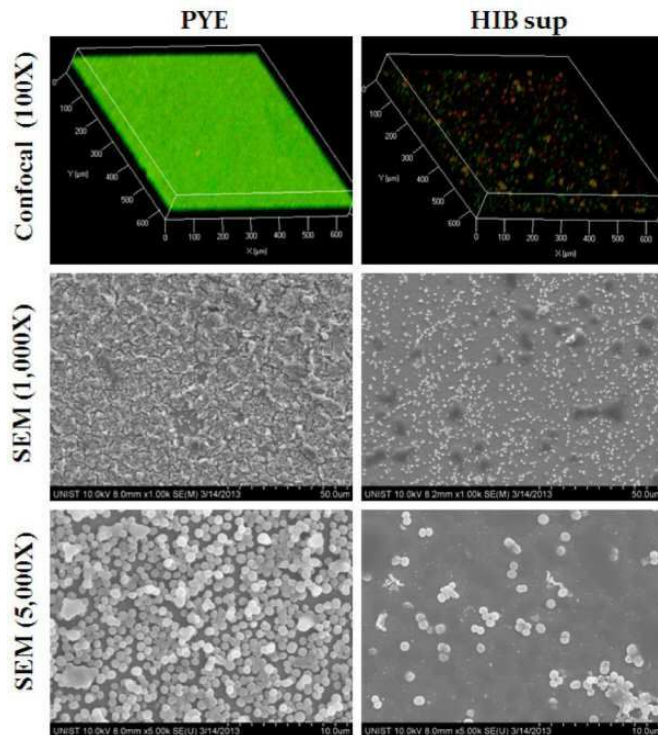
도면2b



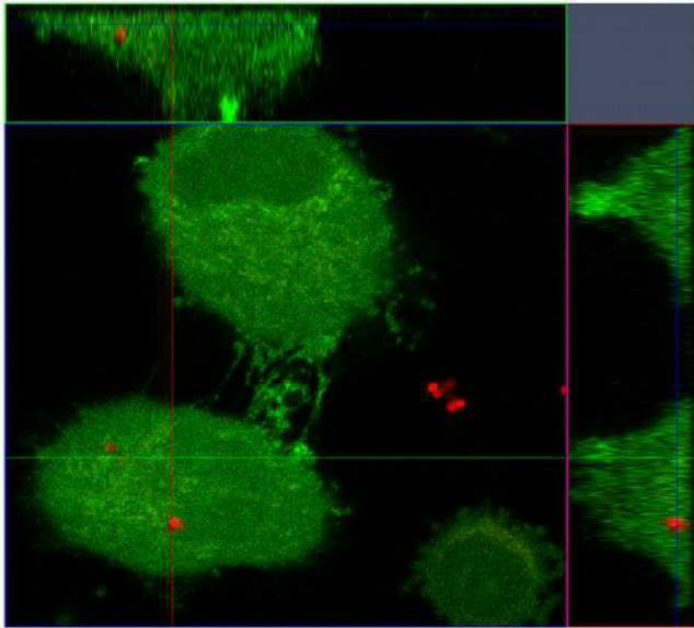
도면3a



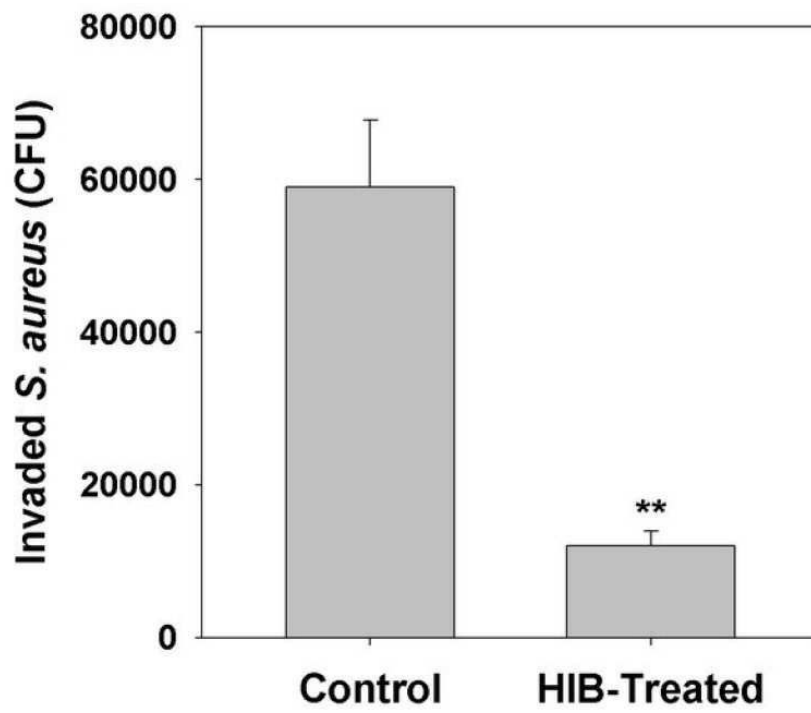
도면3b



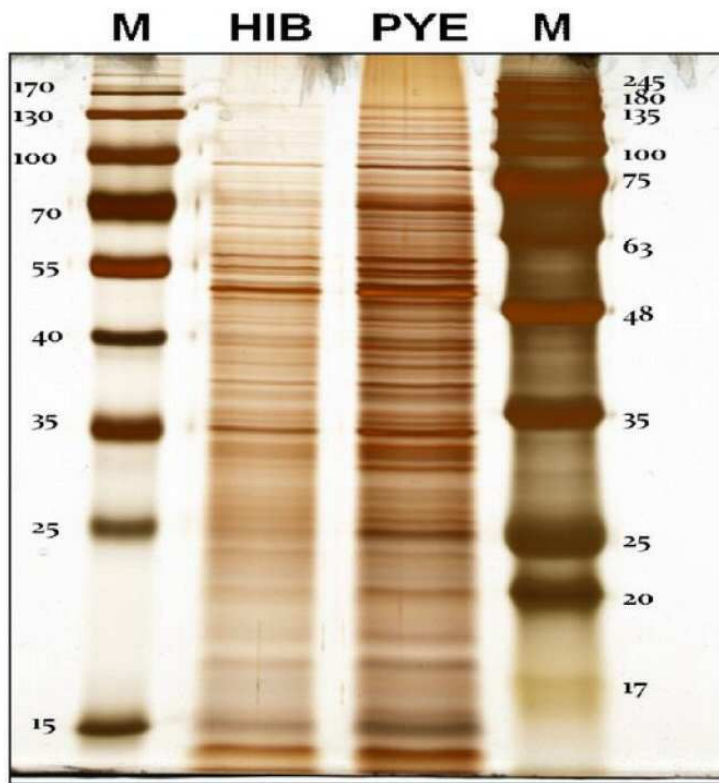
도면4a



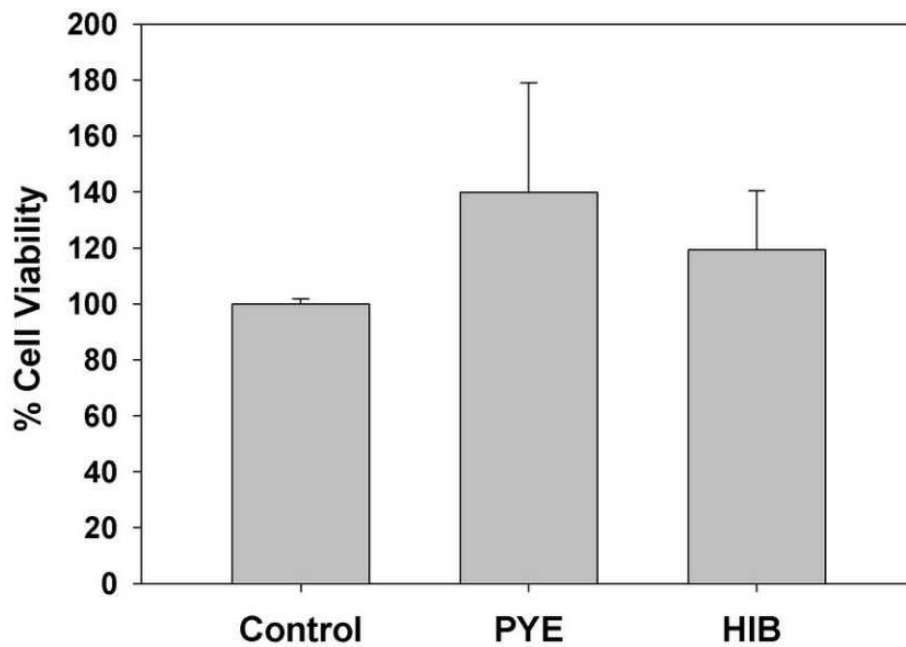
도면4b



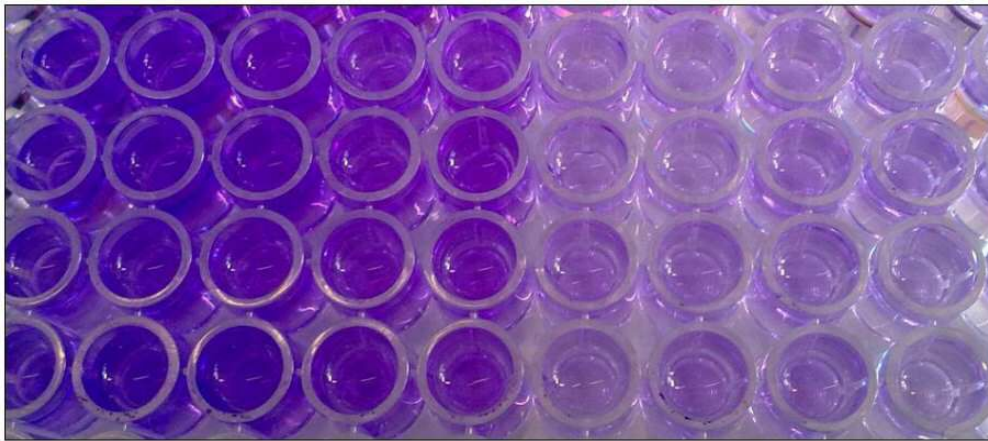
도면4c



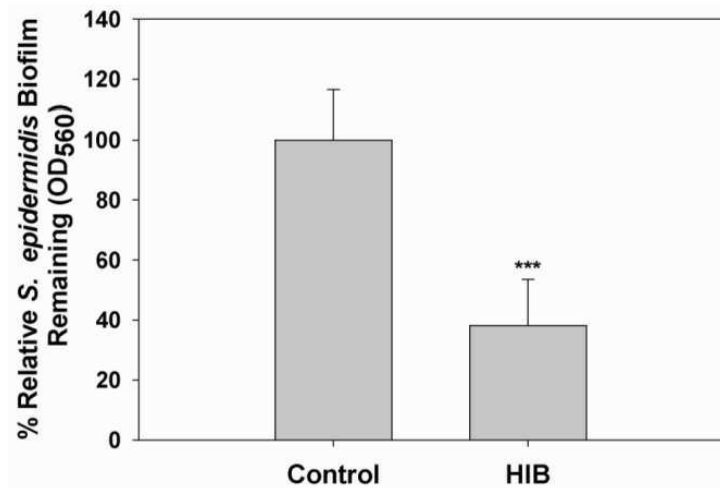
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION
- <120> Composition comprising extracellular protease of host independent Bdellovibrio bacteriovorus HD 100 for repressing or removing Staphylococcus sp. biofilm and using the same
- <130> DPP20136983KR
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 549
- <212> PRT
- <213> Bdellovibrio bacteriovorus
- <220><221> PEPTIDE
- <222> (1)..(549)

<223> serine protease

<400> 1

Met Lys Ser Met Asp Met Gly Gly Ile Val Met Lys Phe Asn Val Phe

1 5 10 15

Ala Leu Ile Val Ser Val Leu Phe Ala Thr Ser Ala Gln Ala Glu Arg

20 25 30

Val Leu Val Ile Met Lys Asp Gln Gln Ser Phe Asn Lys Ala His Met

35 40 45

Ala Tyr Lys Met Lys Gly Ser Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Asp Leu Gly

50 55 60

Val Gln Ser Gln Ala Val Gly Gln Leu Glu Asp Ser Leu Ala Asn Leu

65 70 75 80

Asn Ser Leu Val Val Asn Thr Asp Asn Asp Ala Gln Ile Glu Lys Leu

85 90 95

Lys Ala Asn Pro Ala Val Ala Tyr Val Glu Lys Glu Ile Phe His Asp

100 105 110

Ala Pro Ala Pro Val Lys Gly Phe Leu Gly Gln Ser Arg Gln Ser Gln

115 120 125

Pro Lys Leu Gly Gln Lys Thr Pro Trp Gly Ile His Ala Val Lys Ala

130 135 140

Thr Gln Ala Trp Asn Lys Ser Gly Arg Gly Ala Gly Ala Arg Val Leu

145 150 155 160

Val Leu Asp Thr Gly Ile Asp Glu Ala His Pro Ser Leu Ala Ala Asn

165 170 175

Phe Glu Lys Gly Lys Asp Phe Thr Gly Asp Ser Asn Gly Ser Asp Phe

180 185 190

Ser Asp Lys Val Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Gly

195 200 205

Val Leu Asp Asn Thr Gly Phe Thr Gly Val Ala Pro Lys Ala Lys Val

210 215 220

Leu Ala Gly Arg Val Cys Ser Glu Gln Gly Cys Ser Asn Val Ala Ile

485 490 495
 Val Ala Leu Met Lys Ala Ala Asn Lys Ala Leu Thr Gly Ala Gln Val
 500 505 510

Lys Glu Ile Leu Lys Arg Thr Ala Thr Pro Leu Ser Pro Asn Ser Ala
 515 520 525
 Asn Glu Leu Gly Ala Gly Ile Val Asn Ala Glu Ala Ala Val Gln Ala
 530 535 540

Ala Ile Asp Ala Lys

545

<210> 2

<211> 1033

<212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(1033)

<223> serine protease

<400> 2

Met Arg Ser Leu Ile Leu Ser Val Ile Ser Met Ser Phe Leu Ala Gly

1 5 10 15
 Gln Val Gln Ala Ala Asp Pro Phe Ala Asp Lys Gln Trp Gly Leu Asn
 20 25 30
 Asn Gln Gly Val Pro Gln Met Ile Asp Leu Asp Pro Leu His Thr Tyr
 35 40 45
 Lys Ile Pro Ala Arg Ala Gln Glu Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Val
 50 55 60
 Lys Ala Lys Asn Lys Val Ile Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Ala
 65 70 75 80

Lys Asn His Pro Asp Leu Lys Gly Val Ile Arg Arg Asn Glu Ser Glu
 85 90 95
 Cys Arg Ala Leu Ala Lys Phe Glu Ala Cys Val Ala Asp Ser Asp Arg
 100 105 110

Lys Thr Cys Glu Lys Lys Trp Met Asp Leu Asn Asn Pro Glu Val Asp

Gly Val Pro Ala Asp Glu Ile Tyr Ala Arg Leu Val Leu Gly Ala Arg
 370 375 380
 Pro Leu Lys Ser Asn Leu Ser Leu Val Ser Gly Gly Ser His Glu Gln
 385 390 395 400
 Gly Gln Val Leu Ser Pro Glu Arg Glu Ile Tyr Lys Lys Tyr Ser Val
 405 410 415
 Ala Gly Asn Met Asp Val Glu Gln Ser Leu Lys Val Ser Val Gln Pro
 420 425 430
 Leu Ile Val Pro Ala Asp Lys Glu Lys Val Glu Ile Asn Trp Asp Arg
 435 440 445
 Lys Ser Lys Asp Leu Ser Phe Glu Ile Ser Phe Val Asn Lys Trp Gln
 450 455 460
 Ala Val Glu Ile Gly Lys Val Lys Met Asn Ala Gln Phe Ile Lys Pro
 465 470 475 480
 His Val Asp Ala Val Arg Pro Trp Ile Thr Ala Ile Lys Glu Ala Ala
 485 490 495
 Pro Tyr Pro Gly Val Trp Gln Gln Asn Glu Val Arg Lys Tyr Val Val
 500 505 510

 Met Met Ser Leu Val Asp Ser Gln Asp Pro Ser Gln Ser Arg Ile Pro
 515 520 525
 Ser Glu Leu Asp Leu Thr Val Asp Val Arg Val Gly Asp Ala Glu Ala
 530 535 540
 Arg Arg Tyr Val Phe Glu Ser Glu Val Val Val Ser Val Thr Pro Glu
 545 550 555 560
 Met Ala Ser Ser Asp Val Lys Thr Phe Asn Ile Thr Gly Met Pro Arg
 565 570 575
 Ala Arg Val Ser Phe Leu Pro Leu Asp Glu Asn Leu Asp Asn His Pro
 580 585 590
 Glu Gln Arg Asp Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Gln Asn Asn Thr Trp Gln
 595 600 605
 Leu Trp Leu Val Ala Asp Asn Gly Asn Gly Ala Tyr Thr Ala Val Gly
 610 615 620

865 870 875 880
 Glu Arg Ser Gln Phe Asp Ser Ala Leu Trp Val Arg Ala Val Phe Ala
 885 890 895
 Gly Leu Gln Arg Lys Gly Ala Phe Val Leu Thr Asn Ser Glu Ile Gln
 900 905 910
 Tyr His Asp Leu Val Thr Thr Arg Val Val Ser Lys Ser Phe Glu Arg
 915 920 925
 Tyr Thr Phe Phe Pro Asp Met Leu Met Thr Asn Leu Tyr Phe Pro Leu
 930 935 940

 Thr Leu Lys Asn Ala Arg Asp Ala Ser Thr Lys Ile Pro Ala Leu Phe
 945 950 955 960
 Thr Thr Glu Ser Ser Glu Leu Ser Arg Gly Val Lys Met Leu Val Pro
 965 970 975
 Val Phe Ala Arg Asp Gly Ser Ala Ile Glu Leu Val Ser Pro Ala Arg
 980 985 990
 Leu Arg Phe Lys Ser Ser Thr Gly Cys Arg Pro Met Asp Thr Pro Val
 995 1000 1005
 Phe Asp Gly Val Lys Gly Ala His Ser Phe Asp Tyr Tyr Cys Gly Asp

 1010 1015 1020
 Lys Leu Leu Arg Val Asn Leu Thr Tyr
 1025 1030
 <210> 3
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Bdellovibrio bacteriovorus
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(711)
 <223> serine protease
 <400> 3
 Met Asn His Leu Val Lys Gly Ile Thr Val Ser Thr Val Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Ser Ala Ala Gln Ala Gly Thr Val Leu Lys Phe Asn Ala

Gly Val Ile Ser Gly Tyr Pro Phe Gly Leu Trp Ser Lys Ser Trp Ser
 275 280 285
 Asp Pro Met Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Ser Val Met Gly Arg
 290 295 300
 Gly Thr Ala Ser Lys Gly Leu Leu Lys Gly Gly Ala Tyr Glu Ala Asn
 305 310 315 320

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

 385 390 395 400
 Asp Gly Arg Ile Asp Ser Asn Ser Met Ala Ser Pro Gly Thr Ala Lys
 405 410 415
 Asn Val Leu Thr Val Gly Ala Ser Glu Asn Val Thr Lys Ser Gly Gly
 420 425 430
 Ile Gln Val Pro Ile Ser Lys Leu Arg Ala Ala Lys Asp Glu Trp Pro
 435 440 445
 Ser Glu Pro Ile Tyr Ser Ser Tyr Ile Ser Asp Asn Gly Asn Gly Leu
 450 455 460

 Ala Met Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Thr Asp Gly Arg Thr Lys Pro
 465 470 475 480
 Asp Ile Val Ala Pro Gly Thr Asn Val Leu Ser Val Phe Ser Gln Glu
 485 490 495
 Lys Asp Ala Ser Pro Leu Trp Gly Ala Tyr Asn Lys Asp Tyr Val Trp
 500 505 510
 Ser Gly Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro Leu Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 515 520 525

Ile Ala Arg Gln Val Leu Val Glu Lys Leu Gly Met Lys Asn Pro Ser

530 535 540

Ala Ala Leu Met Lys Ala Thr Met Leu His Thr Ala Val Asp Met Tyr

545 550 555 560

Pro Gly Gln Phe Gly Glu Ile Gly Ala Ala Arg Gly Gln Glu Ile Leu

565 570 575

Thr Arg Arg Pro Asn Ser Asp Glu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Val Ala

580 585 590

Asn Ile Ala Asn Leu Gly Gly Ala Thr Gln Phe Val Asp Asn Arg Gln

595 600 605

Gly Val Ala Gln Gly Ala Glu Val Ser Tyr Glu Phe Thr Leu Asn Ala

610 615 620

Pro Gly Ser Leu Tyr Ala Asn Leu Val Trp Thr Asp Ala Pro Gly Ser

625 630 635 640

Ala Asn Ala Ala Gln Ala Leu Val Asn Asp Leu Asp Leu Val Leu Thr

645 650 655

Leu Pro Asn Gly Gln Thr Leu Ser Met Asn Asp His Ile Asn Asn Leu

660 665 670

Glu Met Ile Glu Lys Ser Gly Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Lys Leu Thr

675 680 685

Val Lys Gly Phe Lys Val Pro Gln Gly Lys Asn Gly Ala Gln Ala Tyr

690 695 700

Ala Leu Val Tyr Thr Ala Lys

705 710

<210> 4

<211> 266

<212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(266)

<223> serine protease

<400> 4

Met Leu Lys Lys Ile Ser Leu Met Met Val Ser Ala Ala Met Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Cys Ala Asp Gln Asn Ala Ala Gln Ile Gln Ala Gln Gly Gln Asp
 20 25 30

Val Ile Gly Gly Asp Lys Val Ser Ala Asn Asp Ile Ile Ala Arg Ser
 35 40 45

Thr Val Gly Leu Tyr Asp Glu Lys Ala Gly Ala Leu Cys Ser Gly Thr
 50 55 60

Leu Ile Ala Pro Gln Leu Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Asp Pro
 65 70 75 80

Asn Ser Asp Lys Leu Ile Val Phe Phe Gly Gln Glu Met Lys Gly Leu
 85 90 95

Asp Pro Ala Lys Val Arg Lys Thr Val Lys Ala Leu Gln His Lys Asp
 100 105 110

Tyr Asn Pro Glu Arg Val Glu Asp Thr Ala Asp Val Ala Leu Val Arg
 115 120 125

Phe Glu Gly Ala Leu Pro Ala Gly Tyr Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Thr
 130 135 140

Asp Phe Asn Gln Leu Gln Lys Gly Ser Thr Val Val Val Ala Gly Phe
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Trp Ala Trp Gly Val Lys Lys Gly Ala Gly Thr Leu Arg
 165 170 175

Thr Thr Glu Leu Lys Val Lys Arg Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Glu Ile
 180 185 190

Met Leu Asp Gln Ser Ile Arg Lys Gly Ile Cys Ser Gly Asp Ser Gly
 195 200 205

Gly Pro Ala Tyr Val Gln Lys Asp Gly Arg Leu Tyr Leu Met Gly Val
 210 215 220

Ala Ser Arg Gly Asp Ser Leu Pro Ile Pro Leu Thr Pro Asp Cys Phe
 225 230 235 240

Met Met Ser Ile Phe Ser Arg Val Asp Ala Tyr Thr Pro Trp Ile Ala

420 425 430
 Val Tyr Ile Gly Thr Ala Ala Lys Pro Leu Asp Glu Ala Thr Lys Ala

435 440 445
 Arg Leu Leu Gly Lys Ile Ala Phe Ile Asp Arg Gly Glu Val Asn Phe

450 455 460
 Ser Val Lys Ile Gln Val Ala Gln Asp Asn Gly Ala Ile Gly Val Val
 465 470 475 480

Val Ala Asn Asn Ala Glu Gly Ala Pro Ile Val Met Gly Gly Asp Gly
 485 490 495

Lys Phe Asp Ile Pro Gly Ile Met Ile Asp Leu Thr Ser Ala Lys Arg
 500 505 510

Ile Lys Ala Ala Leu Ala Gln Gly Pro Val Glu Ala Asn Leu Lys Thr
 515 520 525

Thr Ala Gln Ile Glu Lys Pro Trp Met Ala Asp Thr Ile Ser Pro Ser
 530 535 540

Ser Ser Arg Gly Pro Arg Ser Glu Asp Gly Ile Ile Lys Pro Glu Ile
 545 550 555 560

Ser Ala Pro Gly Thr Asn Ile Ile Ser Ala Ala Ser Gly Ala Gly Glu
 565 570 575

Lys Gly Ala Thr Met Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Ile Ala

580 585 590
 Gly Val Met Ala Leu Leu Lys Gln Lys Tyr Asn Thr Leu Ser Pro Ala

595 600 605
 Glu Leu Lys Ser Val Leu Leu Ala His Gly Lys Val Ile His Ala Ala

610 615 620
 Asp Lys Lys Val Tyr Ser Val Ser Arg Gln Gly Ala Gly Arg Val Gln

625 630 635 640
 Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Lys Ile Val Thr Val Pro Ser Val Ile

645 650 655

Ser Phe Gly Ile Thr Asp Val Glu Lys Gln Lys Thr Leu Ala Lys Glu
 660 665 670

Ile Val Val Lys Asn Ile Ser Asp Glu Thr Val Thr Leu Thr Ala Gln
 675 680 685
 Trp Ser Gly Ser Glu Ala Leu Gln Ile Thr Ala Ala Thr Val Thr Leu
 690 695 700
 Ala Ala Gly Glu Ser Lys Thr Val Leu Val Lys Gly Lys Ile Asn Ser
 705 710 715 720
 Ser Leu Met Gln Asn Ser Thr Asp Glu Leu Asp Gly Phe Leu Thr Phe
 725 730 735
 Lys Ala Gln Asp Lys Thr Leu Ala Gln Leu Pro Ala Leu Ala Val Thr
 740 745 750
 Arg Lys Ile Ser Lys Ile Ser Ala Ser Pro Val Val Val His Ser Ser
 755 760 765
 Ser Lys Ala Asp Ser Ala Gly Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Lys Asn
 770 775 780
 Asp Ser Val Asn Pro Gly Glu Ala Tyr Leu Phe Asn Leu Leu Gly Ala
 785 790 795 800

 Asp Gly Arg Lys Lys Ser Pro Lys Gln Asp Leu Val His Asn Arg Asn
 805 810 815
 Cys Asp Leu Gln Ser Ala Gly Tyr Arg Val Asn Glu Ser Asp Lys Gly
 820 825 830
 Arg Val Leu Gln Val Ala Leu Lys Leu Tyr Glu Gly Met Thr Thr Trp
 835 840 845
 Gln Arg Cys Glu Val Asn Val Gln Ile Asp Ser Asn Gly Asp Gly Leu
 850 855 860
 Ala Asp Gln Glu Leu Ala Gly Leu Pro Ala Ser Asp Leu Pro Gly Met

 865 870 875 880
 Thr Gly Asp Glu Phe Val Ser Leu Leu Leu Asp Gly Asn Gln Ala Arg
 885 890 895
 Glu Met Arg Arg Gln Tyr Glu Lys Asp Phe Val Thr Asp Pro Ser Lys
 900 905 910
 Ala Lys Glu Asp Tyr Ser Gly Ala Val Leu Asp Met Arg Gly Met Gly
 915 920 925

Val Phe Asp Asn Ser Thr Leu Ala Ile Ile Glu Ala Asp Ile Ser Met
 930 935 940

Leu Ser Phe Ala Glu Thr Gly Glu Ile Ser Leu Lys Val Ser Thr Thr
 945 950 955 960

His Gly Asp Asn Gly Ala Ile Glu Tyr Asp Asp Tyr Leu Gly Glu His
 965 970 975

Ser Ser Gln Trp Glu Lys Val Ser Val Asn Thr Asn Ala Gln Ala Tyr
 980 985 990

Thr Gln Ile Pro Glu Val Ile Glu Leu Glu Ala Gln Ser Ser Thr Thr
 995 1000 1005

Val Asn Leu Ile Lys Gly Tyr Gly Ala Gly Asp Leu Ile Leu Tyr Ala

1010 1015 1020

Pro Gln Asn Arg Ser Val Arg Asp Val Leu Leu Glu Asp Asn Gln Ser
 1025 1030 1035 1040

Gln Leu Ile Pro Ala Thr Phe Ser Asp Glu Asn

1045 1050

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> Bdellovibrio bacteriovorus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(409)

<223> serine protease

<400> 6

Met Asp Val Gln Lys Ile Leu Ser Ala Val Ala Cys Val Phe Val Phe
 1 5 10 15

Ala Ala Cys Ser Gln Lys Ser Ala Glu Thr Val Phe Pro Glu Asn Gly
 20 25 30

Ala Leu Asp Ser Ser Ala Cys Arg Gly Gln Ala Leu Glu Asn Lys Phe
 35 40 45

Ile Val Gln Trp Glu Asp Gly Ser Phe Thr Thr Glu Thr Ala Ala Asn
 50 55 60

