



등록특허 10-2084388



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월06일
(11) 등록번호 10-2084388
(24) 등록일자 2020년02월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 39/085* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) *C12N 9/52* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7034615
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월09일
심사청구일자 2018년05월08일
- (85) 번역문제출일자 2014년12월09일
- (65) 공개번호 10-2015-0039129
- (43) 공개일자 2015년04월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/040340
- (87) 국제공개번호 WO 2013/170022
국제공개일자 2013년11월14일
- (30) 우선권주장
61/644,799 2012년05월09일 미국(US)
61/736,813 2012년12월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 73, No. 1, p. 347-352 (2007)*

Jonathan Edward Schmitz, 박사 학위 논문,
Rockefeller University, EXPANDING THE
HORIZONS OF ENZYBIOTIC IDENTIFICATION (2011)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 34 항

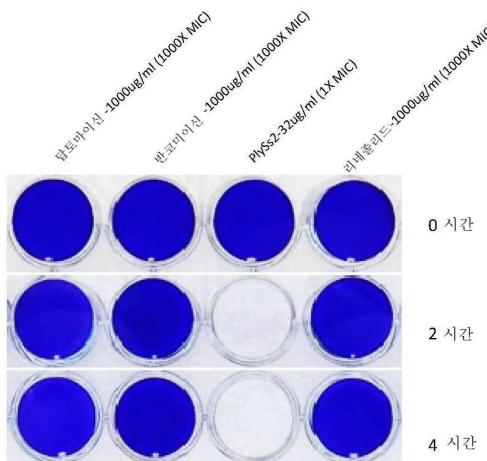
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 박테리오파지 리신을 이용한 생물막의 예방, 봉괴 및 치료

(57) 요약

본 발명은, 리신(lysine), 특히, 약물 내성 스태필로코커스 아우레우스를 포함하는 스태필로코커스 박테리아의 사멸시키는 능력을 갖는 리신, 특히, 리신 PlySs2를 이용한 박테리아 생물막의 예방, 제어, 봉괴 및 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은, 또한, 박테리아 생물막(들) 및 생물막 형성의 치료 또는 조정을 위해 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

위터킨드 마이클

미국 코네티컷주 06840 뉴 캐이년 마리오미 로드
66

칸 바바

미국 뉴욕주 12401 킹스톤 알바니 애비뉴 266

로틀로 지미

미국 뉴욕주 10075 뉴욕 이스트 80쓰 스트리트 345
에이피티. 8에프

명세서

청구범위

청구항 1

스테필로코커스(*Staphylococcus*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 중 적어도 하나를 사멸시킬 수 있는 리신 폴리펩타이드를 포함하는, 하나 이상의 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아를 포함하는 그램-양성 박테리아 생물막(biofilm)의 예방, 붕괴, 또는 치료에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 리신 폴리펩타이드가 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 폴리펩타이드와 80% 이상의 동일성을 갖고 생물막에서 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아 중 적어도 하나를 사멸시키는데 효과적인 이의 변이체를 포함하고,

여기서, 상기 생물막은 해체되거나 치료되고, 또는 표면 상에서 상기 생물막의 형성이 최소화되는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표면이 의료 기구의 표면을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 의료 기구가 카테터, 밸브, 보철장치, 약물 펌프, 스텐트, 또는 정형외과용 재료(orthopedic material)인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막이 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 시뮬란스(*Staphylococcus simulans*), 스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스트렙토코커스 에퀴(*Streptococcus equi*), 스트렙토코커스 에퀴 주(*Streptococcus equi zoo*), 스트렙토코커스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 샌구니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 고르도니이(*Streptococcus gordoni*), 스트렙토코커스 디스갈락티아에(*Streptococcus dysgalactiae*), G 그룹 스트렙토코커스, E 그룹 스트렙토코커스 및 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*)로부터 선택되는 하나 이상의 스태필로코커스 또는 스트렙토코커스 박테리아를 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막 내의 박테리아가 항생제-내성 박테리아 및 변경된 항생제 민감성을 포함하는 박테리아 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항생제-내성 박테리아가 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA), 반코마이신-내성 스태필로코커스 아우레우스(VRSA), 담토마이신-내성 스태필로코커스 아우레우스(DRSA) 및 리네졸리드-내성 스태필로코커스 아우레우스(LRSA) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 변경된 항생제 민감성 박테리아가 반코마이신 중간-민감성(intermediate-sensitivity) 스태필로코커스 아우레우스(VISA)를 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 하나 이상의 항생제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표면이 하나 이상의 항생제와 추가로 접촉되는, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 글리코펩타이드, 세팔로스포린, 매크로라이드 및 페니실린 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 페니실린을 포함하고, 상기 페니실린이 옥사실린, 암피실린 및 클록사실린 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 글리코펩타이드를 포함하고, 상기 글리코펩타이드가 반코마이신 및 타이코플라닌 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 매크로라이드를 포함하고, 상기 매크로라이드가 에리트로마이신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신 및 록시트로마이신 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 담토마이신, 반코마이신 및 리네졸리드 중 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리신 폴리펩타이드가 PlySs2를 포함하는, 조성물.

청구항 15

스테필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아 중 적어도 하나를 사멸시킬 수 있는 리신 폴리펩타이드를 포함하는, 대상체에서 스테필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아 중 적어도 하나의 그람-양성 박테리아 감염을 예방하거나 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 리신 폴리펩타이드가 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 폴리펩타이드와 80% 이상의 동일성을 갖고 생물막에서 스테필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아 중 적어도 하나를 사멸시키는데 효과적인 이의 변이체를 포함하고, 여기서, 상기 생물막은 해체되거나 치료되고, 또는 표면 상에서 상기 생물막의 형성이 최소화되는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 대상체에 의료 기구가 이식되는, 약제학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 이식된 의료 기구가 카테터, 맬브, 보철장치, 약물 펌프, 스텐트, 또는 정형외과용 재료인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 그람-양성 박테리아 감염이 심내막염(endocarditis), 골수염 또는 대체관절의 감염을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 그람-양성 박테리아 감염이 심내막염을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 의료 기구가 상기 대상체의 심장 또는 심장 혈관 내로 이식되는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 의료 기구가 스텐트인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 그람-양성 박테리아 감염이 골수염을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 그람-양성 박테리아 감염이 대체관절의 감염을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막이 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 시물란스, 스트렙토코커스 수이스, 스태필로코커스 에피데미디스, 스트렙토코커스 에퀴, 스트렙토코커스 에퀴 쥬, 스트렙토코커스 아갈락티아에, 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 센귀니스, 스트렙토코커스 고르도니아, 스트렙토코커스 디스갈락티아에, G 그룹 스트렙토코커스, E 그룹 스트렙토코커스 및 스트렙토코커스 뉴모니아로부터 선택되는 하나 이상의 스태필로코커스 또는 스트렙토코커스 박테리아를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 25

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막 내의 박테리아가 항생제-내성 박테리아 및 변경된 항생제 민감성을 포함하는 박테리아 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항생제-내성 박테리아가 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA), 반코마이신-내성 스태필로코커스 아우레우스(VRSA), 담토마이신-내성 스태필로코커스 아우레우스(DRSA) 및 리네졸리드-내성 스태필로코커스 아우레우스(LRSA) 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 변경된 항생제 민감성 박테리아가 반코마이신 중간-민감성 스태필로코커스 아우레우스(VISA)를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 하나 이상의 항생제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 하나 이상의 항생제와 함께, 이전에 또는 이후에 상기 대상체에 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 글리코펩타이드, 매크로라이드 및 페니실린 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 페니실린을 포함하고, 상기 페니실린이 옥사실린, 암피실린 및 클록사실린 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 글리코펩타이드를 포함하고, 상기 글리코펩타이드가 반코마이신 및 타이코플라닌 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 담토마이신, 반코마이신 및 리네졸리드 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 33

제27항에 있어서, 상기 하나 이상의 항생제가 매크로라이드를 포함하고, 상기 매크로라이드가 에리트로마이신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신 및 톡시트로마이신 중 적어도 하나를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 34

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리신 폴리펩타이드가 PlySs2를 포함하는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 일반적으로, 리신(lysine), 특히, 약물 내성 스태필로코커스 아우레우스를 포함하는 스태필로코커스 박테리아의 사멸시키는 능력을 갖는 리신, 특히, 리신 PlySs2를 이용한 박테리아 생물막의 예방, 제어, 붕괴 및 치료에 관한 것이다. 본 발명은, 또한, 박테리아 생물막(들) 및 생물막 형성의 조정을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 보다 많은 항생제들이 매우 다양한 질병 및 다른 병태들에 대해 사용되고 있으므로, 약물 내성 박테리아의 개발은 의학에서 중대한 과제이다. 보다 많은 항생제의 사용 및 내성을 보이는 박테리아의 수는 보다 긴 치료 시간을 유도하여 왔다. 추가로, 지금은 광범위하고 비특이적인 항생제들이 보다 더 빈번하게 사용되고 있고, 이들 항생제들 중 일부는 환자에게 유해한 영향을 갖는다. 이러한 증가된 사용과 관련된 문제는, 많은 항생제들이 점막 내층(mucus lining)을 쉽게 관통하지 못한다는 점이다.

[0003] 그램-양성 박테리아는, 폴리펩타이드 및 다당류를 함유하는 세포벽으로 둘러싸여 있다. 그램-양성 박테리아로는 액티노마이세스(*Actinomyces*), 바실러스(*Bacillus*), 리스테리아(*Listeria*), 락토코커스(*Lactococcus*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 및 클로스트리디움(*Clostridium*)이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 의학적으로 관련된 종으로는 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 엔테로코커스 패에칼리스(*Enterococcus faecalis*)가 포함된다. 포자-형성 바실러스 종은 탄저병 및 위장염을 야기한다. 포자-형성 클로스트리디움 종은 보툴리눔 식중독, 파상풍, 가스 괴저병, 및 위막성 결장염(*pseudomembranous colitis*)에 관여한다. 코리네박테리움 종은 디프테리아를 야기하고, 리스테리아 종은 뇌수막염을 야기한다.

[0004] 새로운 항균 치료요법들은 박테리오파지 리신과 같은 효소-기반 항생제("엔지바이오틱스(enzymiotics)")를 포함한다. 파지는 박테리오파지 리신을 이용하여 자신의 박테리아 숙주의 세포벽을 소화시키고, 저장성 용해(hypotonic lysis)를 통해 바이러스 자손을 방출시킨다. 정제된 재조합 리신을 그램-양성 박테리아에 외부에서 첨가한 경우, 유사한 결과가 수득된다. 그램-양성 병원체에 대한 리신의 높은 치사 활성은, 리신이 치료제로서의 개발을 위한 매력적인 후보물질이 되게 한다(Fischetti, V.A.(2008) *Curr Opinion Microbiol* 11:393-400; Nelson, D.L. et al (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4107-4112). 박테리오파지 리신은, 처음에 병원성 스트렙토코커스의 비인두 운반을 균절시키기 위해 제안되었다(Loeffler, J. M. et al (2001) *Science* 294:2170-2172; Nelson, D. et al (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4107-4112). 리신은, 이중 가닥의 DNA(dsDNA) 파지가 숙주 용해를 바이러스 어셈블리의 완성과 함께 조정하기 위해 이용하는 용해 기전의 일부이다(Wang, I. N. et al (2000) *Annu Rev Microbiol* 54:799-825). 리신은, 박테리아 벽 내의 결합들을 파괴하고, 펩티도글리칸 온전성(integrity)에 필수적인 공유결합성 결합을 급속하게 가수분해시켜, 박테리아 용해 및 동시에 자손 파지를 방출을 야기하는, 펩티도글리칸 하이드롤라제이다.

[0005] 리신 계열 구성원들은, 촉매성 도메인이 특이성 또는 결합성 도메인에 융합되는 모듈식 디자인을 나타낸다 (Lopez, R. et al (1997) *Microb Drug Resist* 3:199-211). 리신은, 박테리아 계놈 내의 바이러스 프로파지 서열로부터 클로닝되어 치료에 사용할 수 있다(Beres, S.B. et al (2007) *PLoS ONE* 2(8):1-14). 리신은, 외부에서 첨가된 경우, 그램-양성 세포벽의 결합에 접근할 수 있다(Fischetti, V.A. (2008) *Curr Opinion Microbiol* 11:393-400). 박테리오파지 용해 효소는, 각종 투여 경로를 통한 대상체에서의 각종 유형의 감염의 평가 및 특

이적 치료에 유용한 것으로 확립되었다. 예를 들면, 미국 특허 제5,604,109호(Fischetti et al.)는, 반(semi)-정제된 C 그룹 스트렙토코커스 과지 연관된 리신 효소에 의한 효소적 소화를 통한 임상 표본 중의 A 그룹 스트렙토코커스의 신속한 검출에 관한 것이다. 이 효소 작업은, 추가 연구의 기초가 되어 질환의 치료 방법을 유도한다. Fischetti 및 Loomis 특허(미국 특허 제5,985,271호, 제6,017,528호, 및 제6,056,955호)는, C1 박테리오파지로 감염된 C 그룹 스트렙토코커스 박테리아에 의해 생성된 리신 효소의 용도를 개시한다. 미국 특허 제6,248,324호(Fischetti 및 Loomis)는, 피부 조직에의 국소 적용에 적합한 담체 내의 용해 효소를 사용함에 의한 피부 감염용 조성물을 개시한다. 미국 특허 제6,254,866호(Fischetti 및 Loomis)는, 감염성 박테리아에 특이적인 용해 효소를 투여하는 단계를 포함하는, 소화관의 박테리아 감염을 치료하는 방법을 개시한다. 소화관에 하나 이상의 용해 효소를 전달하기 위한 담체는, 관장 좌제, 시럽, 또는 장용정(enteric coated pill)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 미국 특허 제6,264,945호(Fischetti 및 Loomis)는, 환자에게의 박테리아에 대해 특이적인 박테리오파지로 감염된 박테리아에 의해 생성된 하나 이상의 용해 효소 및 이 용해 효소를 전달하기 위한 적절한 담체의 비경구(근육내, 피하, 또는 정맥내) 도입에 의해 박테리아 감염의 치료하기 위한 방법 및 조성물을 개시한다.

[0006]

다양한 박테리오파지로부터, 과지 연관된 용해 효소가 동정되었고 클로닝되었으며, 각각의 효소는 특정 박테리아 균주를 사멸시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 미국 특허 제7,402,309호 및 제7,638,600호 및 공개된 PCT 출원 제WO2008/018854호는, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) 감염의 치료 또는 완화를 위한 항균 작용제로서 유용한 별개의 과지-연관된 용해 효소를 제공한다. 미국 특허 제7,569,223호는 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)에 대한 용해 효소를 기술한다. 미국 특허 제7,582,291호에는 엔테로코커스(*Enterococcus*)(반코마이신 내성 균주를 포함하는 이. 파에칼리스 및 이. 파에시움)에 유용한 리신이 기술되어 있다. 미국 특허 제2008/0221035호는, B 그룹 스트렙토코커스를 사멸시키는데 고도로 효과적인 돌연변이체 Ply GBS 리신을 기술한다. 제WO 2010/002959호에는 스태필로코커스 아우레우스를 포함하는 스태필로코커스 박테리아에 대해 활성을 갖는 키메라 리신(ClyS로 표기함)이 상세히 설명되어 있다. ClyS는, 스태필로코커스 박테리아에 대해 특이적이고, 스트렙토코커스 및 다른 그램 양성 박테리아에 대해서는 불활성이다.

[0007]

리신의 신속하고, 강력하며, 특정적인 세포벽-분해 및 살균 특성을 기초로 하여, 리신은, 세포 외부로부터 노출된 펩티도글리칸 세포벽을 공격함으로써 그램-양성 병원체를 방지하는 항균 치료제로서 제시되어 왔다(Fenton, M et al (2010) Bioengineered Bugs 1:9-16; Nelson, D et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112). 단일 작용제(agent)로서의 다양한 리신의 효능은, 인두염(Nelson, D et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:4107-4112), 폐렴(Witzenrath, M et al (2009) Crit Care Med 37:642-649), 중이염(McCullers, J.A. et al (2007) PLOS pathogens 3:0001-0003), 농양(Pastagia, M et al Antimicrobial agents and chemotherapy 55:738-744), 균혈증(Loeffler, J.M. et al (2003) Infection and Immunity 71:6199-6204), 심내막염(Entenza, J.M. et al (2005) Antimicrobial agents and chemotherapy 49:4789-4792), 및 뇌수막염(Grandgirard, D et al (2008) J Infect Dis 197:1519-1522)의 설치류 모델에서 입증되어 왔다. 또한, 리신은, 일반적으로, 자신의 박테리아 숙주 종에 대해 특이적이고, 사람 공생 박테리아를 포함하는 비-표적 유기체를 용해시키지 않고, 이는, 위장 항상성에 유리할 수 있다(Blaser, M. (2011) Nature 476:393-394; Willing, B.P. et al (2011) Nature reviews. Microbiology 9:233-243).

[0008]

미생물들은 다른 환경에서 중대한 생존 전략으로서 표면에 생물막 공동체를 부착 형성하는 성향이 있다. 생물막은 미생물 세포들과 이를 세포 스스로 생성한 다양류, 핵산 및 단백질과 같은 광범위한 세포외 고분자 물질들로 구성되어 있다(Flemming HC et al (2007) J Bacteriol 189:7945-7947). 생물막은 자연 및 산업 수생 환경, 조직 및 의료 재료 및 기구에서 발견된다(Costerton JW et al (1994) J Bacteriol 176:2137-2142). 대부분의 자연적인 생물막은 다수의 박테리아 종에 의해 형성되나, 단일 박테리아 균주에 의해 생물막이 형성될 수도 있다(Yang L et al (2011) Int J Oral Sci 3:74-81). 생물막 군체에 항생제를 적용했을 때 흔히 효과가 나타나지 않는 데 그 이유는 생물막 특유의 생리학적 및 물리학적 매트릭스 장벽때문이다.

[0009]

스태필로코커스는 흔히 생물막을 형성한다. 이 생물막은 세포외 매트릭스가 감싸고 있는 고착 공동체로서 생체 의학 이식 재료나 손상된 조직 및 건강한 조직에 부착한다. 생물막과 연관된 감염은 치료가 어렵고, 생물막내의 고착 박테리아는 상응하는 부유 박테리아보다 항생제에 대한 내성이 1,000 내지 1,500배 더 강하다. 이와 같이 생물막의 항생제 내성으로 인해 통상적인 항생제 요법은 흔히 실패로 이어지고 감염 기구들은 어쩔 수 없이 버려야 한다. 생물막의 스태필로코커스 아우레우스를 사멸시키고 또한 시험관내에서 플라스틱 및 유리 표면 상의 스태필로코커스 아우레우스 생물막의 세포외 매트릭스를 붕괴시킬 수 있는 것으로 리소스타핀(lysostaphin)이 제시된 바 있다(Wu, JA et al (2003) Antimicrob Agents and Chemother 47(11):3407-3414). 스태필로코커스 아우

레우스 생물막의 이 붕괴는 리소스타핀-민감성 스태필로코커스 아우레우스에 대해서만 특이적으로 일어났고 리소스타핀-내성 스태필로코커스 아우레우스의 생물막에는 영향을 주지 못했다. 고농도의 옥사실린(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 반코마이신(800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 클린다마이신(800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 형성된 스태필로코커스 아우레우스 생물막에 24시간이 지나서도 효과가 없었다. 리소스타핀은 또한 스태필로코커스 에피데미디스 생물막을 붕괴시켰으나 고농도가 필요하였다. 스태필로코커스 생물막의 제거에 파지 리신의 응용이 상반된 결과와 함께 보고되었다. 박테리오파지 리신 SAL-2는 스태필로코커스 아우레우스 생물막을 제거하는 것으로 보고되었다(Son JS et al (2010) Appl Microbiol Biotechnol 86(5):1439-1449). 2종의 유사한 파지 리신가운데 ph11은 스태필로코커스 생물막을 가수분해시킨 반면 ph12는 활성을 나타내지 않았다(Sass P and Bierbaum G (2007) Appl Environ Microbiol 73(1):347-352). 다양한 시스템에서 박테리아 생물막을 제거하고 살균하기 위한 여러 가지 효소 배합이 연구되었다(Johansen C et al (1997) Appl Environ Microbiol 63:3724-3728). 그러나, 이 방법은 생물막에 부착된 박테리아를 제거하는 1종의 효소 또는 작용제와 살균 활성을 갖는 제2 효소 또는 작용제로서 최소 2종의 효소 또는 작용제를 필요로 한다.

[0010]

현재 사용되고 있는 전통적인 항균 작용제와 연관된 결함 및 문제점에 비추어 본 분야에서는 박테리아 생물막의 효과적이고 효율적인 치료, 억제 및 예방을 위해 추가의 특이적인 박테리아 작용제 및 치료 방식이 필요하고 또한 보다 넓은 스펙트럼 작용제가 요구되며 이 경우 특히, 획득 내성의 높은 위험이 없어야 한다. 주목해야 할 것은 지금까지 병원성 및 임상적으로 관련된 그람 양성 박테리아의 많은 독립종에 대해 용해 활성이 입증되고 제조가 용이하며 안정적이고 내성 위험이 전혀 없거나 제한적인 것으로 알려진 리신가운데 생물막에 효과가 있는 것으로 제시된 것이 없다는 점이다. 따라서, 새로운 항균 방안, 특히, 생물막의 병원성 박테리아를 사멸시킬 수 있는 새로운 방식을 통해 운영되거나 새로운 수단을 제공하는 항균 대안이 상업적으로 필요하다.

[0011]

본원에서 참조문헌의 인용은 이러한 문헌들이 본 발명보다 선행하는 기술임을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 될 것이다.

발명의 내용

[0012]

본 발명의 요약

[0013]

본 발명은 박테리아 생물막의 예방, 붕괴 및 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 가장 광범위한 양상에서, 본 발명은 다수의 박테리아, 특히, 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 특히, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*, A그룹 스트렙토코커스) 및 스트렙토코커스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*, B그룹 스트렙토코커스)를 포함한 그람 양성 박테리아에 대해 광범위한 사멸 활성을 갖는 리신의 용도 및 응용을 제공한다. 본 발명의 리신 및 조성물은 엔테로코커스(*Enterococcus*) 및 리스테리아(*Listeria*) 박테리아 균주를 사멸시키는데 유용하고 적용가능하며, 그들 균주의 생물막에도 유용하고 적용할 수 있다. 본 발명은 생물막의 박테리아를 효과적으로 및 효율적으로 사멸시킬 수 있는 박테리오파지 리신을 이용하여 박테리아 생물막을 탈콜로니화, 해체 및 제거하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 박테리아 생물막의 치료, 탈콜로니화 및/또는 제거 및 한 종 이상의 그람 양성 박테리아, 특히, 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 엔테로코커스 및 리스테리아 박테리아종 한 종 이상이 의심되거나 존재하는 생물막의 붕괴 후 감염의 예방을 고려한다.

[0014]

본 발명에 따라, 스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*) 박테리아로부터 유도된 박테리오파지 리신이 본 발명의 방법 및 조성물에 사용된다. 본 발명에서 사용되는 리신 폴리펩타이드(들), 특히, 본원 명세서에서 그리고 도 5(서열번호 1)에서 제공되는 PlySs2 리신은 다수의 박테리아, 특히, 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 엔테로코커스 및 리스테리아 박테리아 균주를 포함한 그람 양성 박테리아에 대한 광범위한 사멸 활성을 입증하는데 특별한 물질이다. 이러한 한 양상에서, PlySs2 리신은 본원에서 입증되는 바와 같이 생물막의 스트렙토코커스 아우레우스 균주 및 박테리아를 사멸시킬 수 있다. PlySs2는 메티실린-내성 스트렙토코커스 아우레우스(MRSA), 반코마이신-내성 스트렙토코커스 아우레우스(VRSA), 딥토마이신-내성 스트렙토코커스 아우레우스(DRSA) 및 리네졸리드-내성 스트렙토코커스 아우레우스(LRSA)와 같은 항생제-내성 스트렙토코커스 아우레우스를 포함한 항생제-내성 박테리아에 대해 효과적이다. PlySs2는, 반코마이신 중간-민감성 스트렙토코커스 아우레우스(VISA)와 같은 변경된 항생제 민감성을 갖는 박테리아에 대해 효과적이다.

[0015]

본 발명의 양상에서, 그람 양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인 PlySs2 리신 폴리펩타이드 또는 이의 변이체를 포함하는 단리된 리신 폴리펩타이드를 생물막의 그람 양성 박테리아를 사멸시키는 유효량으로 포함하는 조성물을 생물막과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생물막의 그람 양성 박테리아를 사멸시키는 방법이 제공된다. 따라서, 생물막의 그람-양성 박테리아를 사멸시키는 방법으로서, 상기 방법은, 상기 생물막을, 상기 생물막의 그

그램-양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인 단리된 리신 폴리펩타이드의 양을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 단리된 리신 폴리펩타이드는 도 5에 또는 서열번호 1에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 단리된 리신 폴리펩타이드는, 상기 도 5의 또는 서열번호 1의 폴리펩타이드와 적어도 80%의 동일성, 85%의 동일성, 90%의 동일성, 95%의 동일성, 또는 99%의 동일성을 갖고, 또한, 생물막의 그램-양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인 상기 단리된 리신 폴리펩타이드의 변이체를 포함하는, 생물막의 그램-양성 박테리아를 사멸시키는 방법이 제공된다.

[0016] 본 발명의 양상에서, 생물막의 그램 양성 박테리아를 해체시켜 항생제 민감성 박테리아를 제거하고 방출시키는 방법으로서, 상기 방법은, 상기 생물막을, 상기 생물막의 그램-양성 박테리아를 해체시키는데 효과적인 단리된 리신 폴리펩타이드의 양을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 단리된 리신 폴리펩타이드는, 그램-양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인, 도 5에 또는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 PlySs2 폴리펩타이드, 또는 상기 PlySs2 폴리펩타이드의 변이체를 포함하는, 생물막의 그램 양성 박테리아를 해체시켜 항생제 민감성 박테리아를 제거하고 방출시키는 방법이 제공된다.

[0017] 상기 방법의 양상에서, 이들 방법은 시험관내 또는 생체내에서 수행하여 용액, 재료 또는 기구, 특히, 사람에 의해 사용되거나 인체 내에 사용되는 것들을 살균 또는 제염한다.

[0018] 본 발명은, 생물막의 그램-양성 박테리아 군체를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은, 상기 생물막을, 상기 생물막의 그램-양성 박테리아의 적어도 일부를 사멸시키거나 방출시키는데 효과적인 단리된 폴리펩타이드의 양을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 단리된 폴리펩타이드는 도 5의 아미노산 서열(서열번호 1)을 포함하거나, 또는 상기 단리된 폴리펩타이드는, 상기 도 5의 폴리펩타이드(서열번호 1)와 적어도 80%의 동일성을 갖고, 또한, 상기 그램-양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인 상기 단리된 폴리펩타이드의 변이체를 포함하는, 생물막의 그램-양성 박테리아 군체를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은, 인체 내에 생물막이 연루되어 있거나 포함된 항생제-내성 스태필로코커스 아우레우스 감염을 해체시키거나 치료하는 방법으로서, 상기 방법은, 항생제-내성 스태필로코커스 아우레우스 생물막 감염을 보유한 사람에게, 도 5의, 아미노산 서열(서열번호 1)을 포함하는 단리된 폴리펩타이드, 또는 상기 도 5의 폴리펩타이드(서열번호 1)와 적어도 80% 동일성, 85% 동일성, 90% 동일성 또는 95% 동일성을 갖고, 또한, 상기 생물막을 해체시켜 스태필로코커스 아우레우스를 사멸시키고/시키거나 상기 생물막으로부터 방출되는 스태필로코커스 아우레우스를 사멸시키는데 효과적인 단리된 폴리펩타이드의 변이체를 포함하는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해, 인체 내에 스태필로코커스 아우레우스의 수를 감소시키고 생물막 및 수반된 감염을 억제하여, 인체 내에 생물막이 연루되어 있거나 포함된 항생제-내성 스태필로코커스 아우레우스 감염을 해체시키거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명의 방법은, 박테리아 생물막을 보유하고 있거나, 보유하고 있는 것으로 의심되거나, 박테리아 생물막의 위험에 처해 있는 대상자에게, 도 5의 아미노산 서열(서열번호 1)을 포함하는 단리된 폴리펩타이드, 또는 상기 도 5의 폴리펩타이드(서열번호 1)와 적어도 80% 동일성, 85% 동일성, 90% 동일성 또는 95% 동일성을 갖고, 또한, 그램 양성 박테리아를 사멸시키는데 효과적인 단리된 폴리펩타이드의 변이체를 포함하는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 이에 의해, 인체 내에 그램 양성 박테리아의 수를 감소시키고 생물막 오염 및 감염을 억제하는, 인체 내에 한 종 이상의 스태필로코커스 또는 스트렙토코커스를 포함하는 그램 양성 박테리아 생물막을 예방, 해체 또는 치료하는 방법을 포함한다. 이 방법의 양상에서, 한 종 이상의 엔테로코커스 또는 리스테리아 박테리아를 포함하는 생물막이 효과적으로 예방, 해체 또는 치료된다. 이 방법의 특정 양상에서, 대상자는 한 종 이상의 스태필로코커스(예, 스태필로코커스 아우레우스) 또는 스트렙토코커스(특히, A그룹 스트렙토코커스 또는 B그룹 스트렙토코커스, 각각 예를 들면 스트렙토코커스 피오제네스 또는 스트렙토코커스 아갈락티아에)에 노출되거나 이들의 위험에 놓여있다. 또한, 리스테리아(예, 리스테리아 모노사이토제네스) 또는 엔테로코커스(예, 엔테로코커스 파에칼리스)와 같은 다른 박테리아가 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 관리, 예방, 해체 또는 치료될 수 있다. 대상자는 사람일 수 있다. 대상자는 성인, 아동, 유아 또는 태아일 수 있다.

[0021] 상기 방법 중 임의 것에 있어서, 민감성, 사멸된, 해체된 또는 치료된 생물막 박테리아는 스태필로코커스 아우레우스, 리스테리아 모노사이토제네스, 스태필로코커스 시뮬란스(*Staphylococcus simulans*), 스트렙토코커스 수이스, 스트렙토코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스트렙토코커스 에퀴(*Streptococcus equi*), 스트렙토코커스 에퀴 쥬(*Streptococcus equi zoo*), 스트렙토코커스 아갈락티아에(GBS), 스트렙토코커스 피오제네스(GAS), 스트렙토코커스 샌구니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 고르도니아(*Streptococcus*

gordonii), 스트렙토코커스 디스갈락티아에(*Streptococcus dysgalactiae*), G 그룹 스트렙토코커스, E 그룹 스트렙토코커스, 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*) 및 스트렙토코커스 뉴모니아로부터 선택될 수 있다.

[0022] 본 발명의 방법중 임의 것에 따라, 민감성 박테리아 또는 생물막 박테리아는 항생제 내성 박테리아일 수 있다. 이 박테리아는 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA), 반코마이신 내성 스태필로코커스 아우레우스(VRSA), 담토마이신-내성 스태필로코커스 아우레우스(DRSA) 또는 리네졸리드-내성 스태필로코커스 아우레우스(LRSA)를 포함하여 항생제 내성일 수 있다. 박테리아는 변이된 항생제 민감성을 가질 수 있고, 예를 들면 반코마이신 중간민감성 스태필로코커스 아우레우스(VISA)이다. 민감성 박테리아는 임상적 관련성 또는 병원성 박테리아일 수 있고, 특히, 사람에 대한 임상적 관련성 또는 병원성 박테리아일 수 있다. 방법(들)의 양상에서, 리신 폴리펩타이드(들)는 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 엔테로코커스 및 리스테리아 박테리아 균주를 사멸시키는데 효과적이다.

[0023] 의료 이식 재료를 항미생물제로 피복하는 것이 그 이식 재료에 스태필로코커스 생물막이 초기에 착생하는 것을 효과적으로 예방할 수 있다는 것이 제시된 바 있다. 생체의료 재료를 리신으로 피복하는 것 또한 그 이식 재료에 스태필로코커스를 포함한 박테리아가 초기에 착생하는 것을 예방하고 그럼으로써 생물막이 형성되는 것을 방지하는데 있어서 성공적이다는 것이 입증될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 기구, 이식 재료 또는 분리막(예, 투과증발막, 투석막, 역삼투막, 한외여과막 및 정밀여과막)의 표면에 PlySs2 리신을 포함한 본 발명의 리신을 투여하거나 피복함으로써 그 표면 위에서의 생물막 성장을 감소시키거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0024] 다른 활성적이고 적합한 리신이 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 유용한 리신으로서 및/또는 하나 이상의 추가적인 효과적이고 유용한 리신으로서 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 용도의 추가적인 양상 또는 실시형태에 있어서, 스태필로코커스 특이적 리신 ClyS가 단독으로 사용되거나 본원에 제공되고 기술된 PlySs2 리신과 병용되어 사용된다.

[0025] 다른 목적 및 이점들은 본 분야의 전문가들이 아래의 설명을 검토하고 이어서 아래의 도해적인 도면을 참고할 때 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 4시간까지 표시된 시간 동안 표시된 양으로 담토마이신, 반코마이신, PlySs2 리신 또는 리네졸리드로 치료된 BAA-42 MRSA의 생물막을 보여준다. 항생제 담토마이신, 반코마이신 및 리네졸리드 각각은 1000X MIC로 첨가되었다. PlySs2는 1X MIC로 첨가되었다. 치료 후 생물막은 크리스털 바이올렛(crystal violet)으로 확인한다.

도 2는 6시간 까지 표시된 시간동안 표시된 양으로 담토마이신, 반코마이신, PlySs2 리신 또는 리네졸리드로 치료된 BAA-42 MRSA의 생물막을 보여준다. 치료 후 생물막은 크리스털 바이올렛으로 확인한다.

도 3은 24시간 까지 표시된 시간동안 표시된 양으로 담토마이신, 반코마이신, PlySs2 리신 또는 리네졸리드로 치료된 BAA-42 MRSA의 생물막을 보여준다. 치료 후 생물막은 크리스털 바이올렛으로 확인한다.

도 4는 표시된 용량으로 0.5시간, 1시간, 4시간 및 24시간 동안 PlySs2 리신 또는 담토마이신으로 치료된 24웰 디쉬내 BAA-42 MRSA의 생물막을 보여준다. 치료 후 생물막은 크리스털 바이올렛으로 확인한다.

도 5는 리신 PlySs2의 아미노산 서열(서열번호 1)과 암호화 핵산 서열(서열번호 2)을 제공한다. PlySs2 리신의 N-말단 CHAP 도메인과 C-말단 SH-3 도메인은 음영처리되어 있고, CHAP 도메인(서열번호 3)은 LNN부터 YIT까지이고, SH-3 도메인(서열번호 4)는 RSY부터 VAT까지이다. PDB 2K3A(Rossi P et al (2009) Proteins 74:515-519)와 상동성으로 동정된 CHAP 도메인 활성 부위 잔기(Cys₂₆, His₁₀₂, Glu₁₁₈ 및 Asn₁₂₀)에는 밀줄로 표시되어 있다.

도 6은 크리스털 바이올렛 염색에 의해 24시간동안 시간별로 평가된 것으로 MRSA 생물막에 대한 PlySs2 및 항생제 활성의 분석결과를 제공한다. 항생제 담토마이신(DAP), 반코마이신(VAN) 및 리네졸리드(LZD) 각각은 1000X MIC로 첨가되었다. PlySs2는 1X MIC로 첨가되었다.

도 7은 MRSA 생물막에 대한 PlySs2 및 항생제 활성의 24시간 시간별 분석으로서 생물막의 지시제로 유지된 색소의 정량분석결과를 보여준다. 항생제 담토마이신(DAP), 반코마이신(VAN) 및 리네졸리드(LZD) 각각은 1000X MIC로 첨가되었다. PlySs2 리신은 1X MIC로 첨가되었다.

도 8은 크리스털 바이올렛 염색에 의해 평가된 것으로 MRSA 생물막상에서의 PlySs2 MIC 미만의 농도 대 배지 단독의 24시간 경과를 보여준다. PlySs2는 0.1X MIC 및 0.01X MIC 양으로 MRSA 균주 BAA-42 생물막에

첨가되었다.

도 9a 및 9b는 DEPC 카테터상에서 성장한 MRSA에 대한 생물막 박멸 연구를 보여준다. 도 9a: 카테터 생물막을 배지 단독, 1X MIC 담토마이신, 1000X MIC 담토마이신 및 1X MIC PlySs2로 24시간 치료하고 관류(fushing)한 후 메틸렌 블루로 염색하고 사진촬영하였다. 도 9b: 24시간 치료 후 2중 카테터 시료를 용해 완충액으로 치료하여 잔여 생물막을 제거하고 박테리아 CFU를 박테리아의 기지 농도에 대해 교정된 루시페라제 시약을 이용하여 상대 라이트 유닛(relative light unit)으로 산출하였다.

도 10은 완충액 또는 적정 MIC의 PlySs2(1X MIC, 0.1X MIC, 0.01X MIC, 0.001X MIC, 0.0001X MIC 및 0.00001X MIC PlySs2)로 4시간 치료 후 메틸렌 블루에 의한 DEPC 카테터 MRSA 생물막 염색의 적정 분석을 보여준다.

도 11은 완충액 또는 적정 MIC의 담토마이신(DAP)(5000X MIC, 1000X MIC, 100X MIC, 10X MIC 및 1X MIC)으로 4시간 치료 후 메틸렌 블루에 의한 DEPC 카테터 MRSA 생물막 염색의 적정 분석을 보여준다.

도 12a 및 12b는 DEPC 카테터의 MRSA 생물막에 대한 PlySs2 활성의 시간별 분석을 보여준다. 카테터를 1X MIC PlySs2($32 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 5분, 15분, 30분, 60분, 90분, 2시간, 3시간, 4시간 및 5시간 치료하고 관류한 후, 메틸렌 블루로 염색하고 사진촬영하였다. 각 지정 시간의 치료 후, 2중 카테터 시료를 용해 완충액으로 치료하여 잔여 생물막을 제거하고 박테리아 CFU를 박테리아의 공지 농도에 대해 교정된 루시페라제 시약을 이용하여 상대 라이트 유닛으로 산출하였다.

도 13은 도 11 및 도 12에 제시된 연구와 같은 방식으로, DEPC 카테터 MRSA 생물막을 표시된 약물 농도로 4시간 치료한 후 그 카테터 생물막 CFU 수의 적정 분석을 보여준다. 약물 치료 후 잔여 박테리아 CFU를 박테리아의 공지 농도에 대해 교정된 루시페라제 시약을 이용하여 상대 라이트 유닛으로 산출하였다. 디(2-에틸헥실)프탈레이트(DEHP) 카테터의 관(lumen)에 형성된 스태필로코커스 아우레우스 균주 ATCC BAA-42 생물막을 표시된 농도의 PlySs2 또는 담토마이신(DAP)으로 4시간 치료하였다. 대조군으로 젖산령거액 단독이 포함되었다. 치료 후 카테터에서 액체를 빼내고 세척한 다음, 아데노신 트리포스페이트(ATP) 방출-기본 방법(BacTiter-GloTM Microbial Cell Viability Assay kit)을 이용하여 콜로니-형성 단위(CFU)를 측정하였다. 적색 선은 치료된 카테터 관내의 생물막 감소를 거의 동일하게 유도한 DAP와 PlySs2의 농도를 가리키며 DAP의 농도는 5000X MIC(최소 억제 농도)이고 PlySs2는 0.1X MIC이다. * = 검출 임계값 이하.

도 14는 스태필로코커스 아우레우스 생물막에 대한 리신 ClyS 활성을 보여준다. BAA-42 MRSA 생물막을 표시된 농도의 ClyS 리신(1X MIC $32 \mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1X MIC $3.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, 0.01X MIC $0.32 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 0.001X MIC $0.032 \mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 배지 단독으로 24시간 치료하였다. 각 웨를 세척하고 2% 크리스털 바이올렛으로 염색하였다.

도 15는 마우스에 피하 이식된 카테터에 PlySs2 리신을 여러 투여 방식으로 치료한 생체내 생물막 연구 결과를 제공한다. 카테터에 생물막을 형성시킨 후 카테터를 마우스에 이식하고 마우스를 치료한다. 카테터를 제거하고 메틸렌 블루로 염색한 후, 염색을 600 nm에서 흡광도로 정량한다. 음성 대조군(박테리아 없음), PlySs2 대조군(박테리아 없이 치료), 비히클 치료, PlySs2 복강 투여(IP), PlySs2 정맥내투여(IV) 및 PlySs2 피하투여(SC)에 대해 카테터 그램당 600nm/g에서의 흡광도를 그래프로 나타낸다.

도 16은 PlySs2 리신 또는 항생제 담토마이신으로 치료된 MRSA 카테터 생물막의 관 내용물을 분석하고 PlySs2 또는 항생물의 치료 시간에 따른 박테리아 생존율과 관 살균상태를 평가한 시간별 연구 결과를 보여준다.

도 17은 스태필로코커스 에피더미디스 균주 CFS 313(NRS34, VISE 균주) 박테리아 생물막이 형성된 카테터에 대한 적정 분석 결과를 보여준다. 완충액 또는 적정 MIC의 PlySs2(10X MIC, 1X MIC($8 \mu\text{g}/\text{ml}$), 0.1X MIC, 0.01X MIC, 0.001X MIC 및 0.0001X MIC PlySs2)로 4시간 치료 후 메틸렌 블루로 염색한 생물막이 제시되고 있다.

도 18은 24웨일 평판에 BAA-42 MRSA 박테리아를 접종하고 곧 바로 완충액 또는 1X MIC($32 \mu\text{g}/\text{ml}$)로부터 0.0001X MIC까지 표시된 농도로 희석된 PlySs2를 첨가한 후의 생물막 예방 검정 결과를 보여준다. 플레이트는 6시간 동안 항온배양하였고, PBS로 세척하였고, 크리스털 바이올렛으로 염색하여 생물막 생성을 평가하였고, 사진촬영하였다.

도 19는 카테터에 형성된 MRSA 균주 CFS 553(ATCC 43300) 생물막에 완충액 또는 적정 MIC의 PlySs2(10X MIC, 1X MIC($16 \mu\text{g}/\text{ml}$), 0.1X MIC, 0.01X MIC 및 0.001X MIC PlySs2)로 4시간 치료 후 메틸렌 블루로 염색한 후의 적정 분석 결과를 보여준다.

도 20은 카테터에 형성된 MRSA 균주 CFS 992(JMI 5381) 생물막에 완충액 또는 적정 MIC의 PlySs2(10X MIC, 1X

MIC($32 \mu\text{g}/\text{ml}$), 0.1X MIC, 0.01X MIC 및 0.001X MIC PlySs2)로 4시간 치료 후 메틸렌 블루로 염색한 후의 적정 분석 결과를 보여준다.

도 21은 카테터에 형성된지 3일된 스태필로코커스 아우레우스 생물막을 PlySs2로 치료하고, 세척, 고정 및 주사한 후의 주사전자현미경(SEM) 사진을 보여준다. 0분, 30초 및 15분간 PlySs2 치료된 사진(5000배 확대)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 분야의 기술에 속하는 통상적인 문자생물학, 미생물학 및 DNA 재조합기술은 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 이러한 기술들은 문헌에 자세히 설명되어 있다(참조문헌: Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)).

[0028]

따라서, 다음의 용어들은 본원에서 사용되는 경우 아래에서 정의하는 의미를 갖는다.

[0029]

용어 "PlySs 리신(들)", "PlySs2 리신", "PlySs2" 및 특정적으로 수록되지 않은 모든 변이체들은 본원에서 서로 교환하여 사용할 수 있고, 본원 명세서 및 특허청구범위 전체에서 한 개 또는 여러 개의 단백질을 포함하는 단백질성 물질을 가리키고 본원에 기술되어 있고, 도 5에 그리고 서열번호 1로 제시된 아미노산 서열 데이터 및 본원 명세서 및 특허청구범위에 설명된 활성 프로필을 갖는 단백질을 포함한다. 따라서, 실질적으로 균등하거나 변이된 활성을 나타내는 단백질도 동일하게 고려된다. 이들 변형은 예를 들어 위치지정 돌연변이에 의해 수득된 변형과 같이 인위적일 수 있거나 그 복합체 또는 이의 지명된 아단위의 생산자인 숙주에서의 돌연변이를 통해 수득된 변형과 같이 우연적일 수 있다. 또한, 용어 "PlySs 리신(들)", "PlySs2 리신" 또는 "PlySs2"는 이의 범위 안에 본원에 특정적으로 나열된 단백질뿐만 아니라 모든 실질적인 상동성 유사체, 단편 또는 절두형(truncation) 및 형질대립 변이체를 확실히 포함한다. PlySs2 리신은 미국 특허 제61/477,836호 및 국제 특허 PCT/US2012/34456에 기술되어 있다. 최근 논문 Glimer DB et al (2013) Antimicrob Agents Chemother Epub 2013 April 9 [PMID 23571534]에도 PlySs2 리신이 기술되어 있다.

[0030]

용어 "ClyS" 또는 "ClyS 리신"은 스태필로코커스 아우레우스를 포함하는 스태필로코커스 박테리아에 대한 활성을 갖는 키메라 리신 ClyS를 가리키며, WO2010/002959에 상세히 설명되어 있고 또한 Daniel, A et al (2010) Antimicrobial Agents and Chemother 54(4):1603-1612에도 기술되어 있다. ClyS의 이러한 예시적 아미노산 서열은 서열번호 5에 제공된다.

[0031]

"용해 효소"는 적합한 조건하에 관련된 기간동안에 하나 이상의 박테리아를 사멸시키는 모든 박테리아 세포벽 용해 효소를 포함한다. 용해 효소의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 여러 가지 아미다제 세포벽 용해 효소가 포함된다.

[0032]

"박테리오파지 용해 효소"는 박테리오파지로부터 추출되거나 분리된 용해 효소 또는 용해 효소 기능을 유지하면서 유사한 단백질 구조를 갖는 합성 용해 효소를 가리킨다.

[0033]

용해 효소는 박테리아 세포의 펩티도글리칸에 존재하는 결합을 특이적으로 절단하여 박테리아 세포벽을 붕괴시킬 수 있다. 또한 현재 추정되고 있는 바에 따르면 박테리아 세포벽 펩티도글리칸은 대부분의 박테리아에 고도로 보존되고 있으며 불과 소수의 결합이 절단되더라도 박테리아 세포벽은 붕괴될 수 있다. 박테리오파지 용해 효소는 비록 다른 유형의 효소들이 가능할 수 있으나 아미다제일 수 있다. 이들 결합을 절단하는 용해 효소의 예로는 뮤라미다제, 글루코사미나다제, 엔도펩티다제 또는 N-아세틸-뮤라모일-L-알라닌 아미다제를 들 수 있다. Fischetti 등(1974)은 C1 스트렙토코커스 파지 리신 효소가 아미다제임을 보고하였다. Garcia 등(1987, 1990)은 스트렙토코커스 뉴모니아에 Cp-1 파지로부터의 Cp1 리신이 라이소자임임을 보고하였다. Caldentey와 Bamford(1992)는 phi 6 슈도모나스 파지로부터의 용해 효소가 멜로-디아미노피밀산과 D-알라닌에 의해 형성된 펩타이드 브릿지를 자르는 엔도펩티다제임을 보고하였다. 이. 콜라이 T1 및 T6 파지 용해 효소들은 리스테리아 파지로부터의 용해 효소(ply)와 같은 아미다제이다(Loessner et al, 1996). 또한, 박테리아 세포벽을 절단할

수 있는 본 분야에 알려져 있는 다른 용해 효소들도 있다.

[0034] "박테리오파지에 의해 유전자적으로 암호화된 용해 효소"는 예를 들어 숙주 박테리아에 대한 세포벽 용해 활성을 적어도 일부 가짐으로써 숙주 박테리아를 사멸시킬 수 있는 폴리펩타이드를 포함한다. 이 폴리펩타이드는, 고유 서열 용해 효소 및 이의 변이체를 포함하는 서열을 가질 수 있다. 이 폴리펩타이드는 박테리오파지("파지")와 같은 다양한 기원으로부터 분리하거나 재조합 또는 합성 방법으로 제조할 수 있다. 이 폴리펩타이드는 카르복실 말단부에 콜린-결합 부분을 포함할 수 있고 아미노 말단부에서 세포벽 웨티도글리칸을 절단할 수 있는 효소 활성(예, 웨티도글리칸내의 아미드 결합에 작용하는 아미다제 활성)에 의해 특성화될 수 있다. 다수의 효소 활성을 포함하는, 예를 들면 PlyGBS 리신과 같이 두 개의 효소 도메인을 포함하는 용해 효소들이 공개되어 있다.

[0035] "고유 서열 파지 연관된 용해 효소"는 박테리아로부터 유래된 효소와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이와 같은 고유 서열 효소는 분리될 수 있거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0036] 용어 "고유 서열 효소"는 자연적 발생 형태(예, 선택적 이어맞춤 형태 또는 변이 형태) 및 자연적 발생 변이체를 포함한다. 본 별명의 한 실시형태로서, 고유 서열 효소는 스트렙토코커스 수이스에 대해 특이적인 박테리오파지로부터의 유전자에 의해 유전자적으로 암호화된 성숙 또는 전장 폴리펩타이드이다. 물론, 문헌[예, Lopez et al., *Microbial Drug Resistance* 3: 199-211 (1997); Garcia et al., *Gene* 86: 81-88 (1990); Garcia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 914-918 (1988); Garcia et al., *Streptococcal Genetics* (J. J. Ferretti and Curtis eds., 1987); Lopez et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 439-448 (1992); Romero et al., *J. Bacteriol.* 172: 5064-5070 (1990); Ronda et al., *Eur. J. Biochem.* 164: 621-624 (1987) 및 Sanchez et al., *Gene* 61: 13-19 (1987)]에 밝힌 바와 같이 다수의 변이체가 가능하고 공지되어 있다. 이들 각 참고문헌의 내용, 특히, 서열 상동성에 대한 설명을 포함하여 서열을 비교하는 서열목록 및 관련 텍스트는 이들 전체가 특별히 본원에 참고로 삽입된다.

[0037] "변이 서열 용해 효소"는 용해 효소의 서열과 다르지만 작용 활성을 유지하는 폴리펩타이드로 특성화된 용해 효소를 포함한다. 용해 효소는, 일부 실시형태로서, 도 5에 그리고 서열번호 1에 제공된 용해 효소 서열과 특정적인 아미노산 서열 동일성을 갖는 PlySs2의 경우와 같이 스트렙토코커스 수이스에 대해 특이적인 박테리오파지에 의해 유전자적으로 암호화될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태로서, 작용상 활성적인 용해 효소는 박테리아의 세포벽을 봉괴시킴으로써 표 1, 2 및 3에 나타낸 것을 포함하여 본원에 제공된 스트렙토코커스 수이스 박테리아 및 다른 민감성 박테리아를 사멸시킬 수 있다. 활성적인 용해 효소는 도 5에 그리고 서열번호 1에 제공된 용해 효소 서열과 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 또는 99.5% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 이와 같은 파지 연관된 용해 효소 변이체들은 예를 들어 도 5에 그리고 서열번호 1에 제공된 용해 효소 서열의 N 또는 C 말단에 한 개 이상의 아미노산 잔기가 부가 또는 결실된 용해 효소 폴리펩타이드를 포함한다.

[0038] 특정 양상에서, 파지 연관된 용해 효소는 고유 파지 연관된 용해 효소 서열과 적어도 약 80% 또는 85% 아미노산 서열 동일성, 특히, 적어도 약 90%(예, 90%) 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 가장 특정적으로는, 파지 연관된 용해 효소 변이체는 PlySs2 리신에 대해 도 5에 그리고 서열번호 1에 제공된 고유 파지 연관된 용해 효소 서열 또는 WO2010/002959 및 Daniel et al (Daniel, A et al (2010) *Antimicrobial Agents and Chemother* 54(4):1603-1612)에 기술된 것을 포함하여 ClyS에 대해 이전에 기술된 고유 파지 연관된 용해 효소 서열과 적어도 약 95%(예, 95%) 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0039] 동정된 파지 연관된 용해 효소 서열과 관련하여 "아미노산 서열 동일성 퍼센트"는, 본원에서, 후보 서열과 파지 연관된 용해 효소 서열을 동일한 리딩 프레임에 정렬하고 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존 치환도 고려하지 않으면서 최고 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해 필요한 경우 캡을 도입한 후, 후보 서열의 아미노산 잔기가 파지 연관된 용해 효소 서열의 아미노산 잔기와 동일한 백분율로서 정의된다.

[0040] 본원에 동정된 파지 연관된 용해 효소 서열과 관련하여 "핵산 서열 동일성 퍼센트"는 후보 서열의 뉴클레오타이드와 파지 연관된 용해 효소 서열의 뉴클레오타이드를 정렬하고 최고 퍼센트의 서열 동일성을 달성하기 위해 필요한 경우 캡을 도입한 후 후보 서열의 뉴클레오타이드가 파지 연관된 용해 효소 서열의 뉴클레오타이드와 동일한 백분율로서 정의된다.

[0041] 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 동일성 퍼센트를 결정하는데 있어서, 그 두 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 제1 뉴클레오타이드 서열에 캡이 도입될 수 있다). 그런 다음, 상응하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 위치의 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 비교된다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의

상응하는 위치와 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산에 의해 점유될 때 이 분자들은 그 위치에서 동일한 것이다. 두 서열간의 동일성 퍼센트는 두 서열에 의해 공유된 동일 위치 수의 합수이다(즉, 동일성(%) = 동일 위치의 수/ 위치의 총 수 x 100).

[0042] 두 서열사이에 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 두 서열의 비교를 위해 사용되는 수학적 알고리즘의 비체한적인 예는 Karling 등의 알고리즘이다(Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993)). 이 알고리즘은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 목적하는 동일성을 갖는 서열을 동정하는데 사용할 수 있는 NBLAST 프로그램에 적용된다. 비교 목적의 캡삽입 정렬을 얻기위하여, 캡삽입 BLAST를 Altschul et al., Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997)에 기술된 바와 같이 사용할 수 있다. BLAST 및 캡삽입 BLAST 프로그램을 사용할 때 각 프로그램(예, NBLAST)의 기본값 매개변수를 사용할 수 있다(참조: National Center for Biotechnology Information(National Library of Medicine, National Institutes of Health)에 의해 제공된 프로그램).

[0043] "폴리펩타이드"는 다수의 아미노산들이 선형으로 결합되어 이루어진 중합체 분자를 포함한다. 일부 실시형태로서, 폴리펩타이드는 자연발생적 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 분자에 상응할 수 있다. 이 폴리펩타이드는 천연 아미노산이 유사한 특성을 가진 아미노산에 의해 치환되고 폴리펩타이드의 기능에 변화를 일으키지 않는 보존치환을 포함할 수 있다.

[0044] 용어 "변이된 용해 효소"는 셔플링되고/되거나 키메라화된 용해 효소를 포함한다.

[0045] 특정 과자로 감염된 박테리아에 대해 특이적인 과자 용해 효소는 해당 박테리아의 세포벽을 효과적으로 및 효율적으로 붕괴시키는 것으로 밝혀져 있다. 용해 효소는 단백질분해 효소활성이 없는 것으로 알려져 있고, 이에 따라 박테리아 세포벽을 분해하는 동안 포유류 단백질과 조직이 존재하더라도 이들을 파괴하지 않는다. 게다가, 항생제와 다르게 과자 용해 효소의 작용은 표적 병원균에만 특이적인 것으로 밝혀져 있기 때문에, 정상균총은 반드시 온전하게 남아 있음이 확실하다(M. J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer, Mol Microbiol 16, 1231-41 (1995)-이 문헌의 내용은 본원에 인용에 의해 포함된다). 실제로, PlySs2 리신은 독특하게 광범위한 박테리아 종 및 균주를 사멸시킨다는 것이 입증되어 있는 한편, 본원에 기술된 바와 같이 이. 콜라이를 포함한 정상균총을 포함하는 박테리아에 대해 비교적으로 특별하게 활성을 나타내지 않는다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용해 효소 또는 폴리펩타이드는 감염 증상 환자에게 노출된 사람이 병에 걸리지 않도록 방지하는 예방제 또는 감염되어 이미 병에 걸린 사람을 위한 치유하는 치료제로서 박테리아 유기체가 특정 박테리오파자로 감염된 후에 생성할 수 있거나 재조합 또는 합성에 의해 생성 또는 제조할 수 있다. 리신 폴리펩타이드 서열과 이를 암호화하는 핵산이 본원에 기술되어 있고 이를 참고할 수 있다는 점에서, 용해 효소(들)/폴리펩타이드(들)은 바람직하게는 본원에 예시된 것을 포함한 본 분야의 표준 방법을 사용하여 과자 계놈으로부터 단리된 용해 효소 유전자를 전달 벡터에 삽입하고 이 전달 벡터를 발현 시스템내로 클로닝함으로써 생성할 수 있다. 용해 효소(들) 또는 폴리펩타이드(들)는 절두형, 키메라형, 셔플링형 또는 "천연형"이고 조합형일 수 있다. 관련된 미국 특허 제5,604,109호는 이의 전체 내용이 본원에 인용에 의해 포함된다. "변형된" 용해 효소는 다양한 방법으로 생성할 수 있다. 바람직한 실시형태로서, 과자 계놈으로부터의 변이된 용해 효소 유전자를 전달 또는 이동 벡터, 바람직하게는 플라스미드내에 삽입하고, 플라스미드를 발현 벡터 또는 발현 시스템내로 클로닝한다. 본 발명의 리신 폴리펩타이드 또는 효소를 생성하는 발현 벡터는 이. 콜라이, 바실러스 또는 많은 다른 적당한 박테리아에 적합한 것일 수 있다. 또한, 벡터 시스템은 무세포 발현시스템일 수 있다. 유전자 또는 유전자 세트를 발현시키는 상기 방법들 모두는 본 분야에 알려져 있는 것들이다. 또한, 용해 효소는 스트렙토코커스 수이스를 이 균주에 특이적인 박테리오파자로 감염시킴으로써 생성할 수 있으며, 여기서 상기 용해 효소중 적어도 하나는 존재하는 다른(예, 천연적인 또는 공생적인) 박테리아 균총에 기껏해야 최소의 영향을 미치면서 스트렙토코커스 수이스의 세포벽만을 독단적으로 용해시킨다(다양한 사람 장내 공생 박테리아에 대한 용해 활성 연구 결과를 제공하는 표 5 참조).

[0047] "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 이종 폴리펩타이드에 작동가능하게 연결된 본 발명에서 사용되는 폴리펩타이드의 전부 또는 (바람직하게는 생물학적으로 활성적인) 일부를 포함한다. 키메라 단백질 또는 웨타이드는 예를 들면 둘 이상의 활성 부위를 갖는 둘 이상의 단백질을 결합시킴으로써 형성한다. 키메라 단백질 및 웨타이드는 동일 또는 다른 분자에 독립적으로 작용할 수 있고, 그럼으로써 같은 시간에 두 가지 이상의 다른 박테리아 감염을 치료할 수 있는 잠재능을 가진다. 또한, 키메라 단백질 및 웨타이드는 하나 이상의 위치에서 세포벽을 절단하고, 그럼으로써 단일 리신 분자 또는 키메라 웨타이드로부터 보다 더 신속하거나 효과적인 (또는 상승 작용적인) 사멸을 잠재적으로 제공함으로써 박테리아 감염을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0048]

DNA 작제물 또는 웨타이드 작제물의 "이종" 영역은 자연에서 더 큰 분자와 결합하고 있는 것으로 발견되지 않는 것으로서 더 큰 DNA 분자내에서 동정가능한 DNA 단편 또는 더 큰 웨타이드 분자내에서 동정가능한 웨타이드 단편이다. 따라서, 이종 영역이 포유류 유전자를 암호화하고 있는 경우, 이 유전자는 기원 유기체의 게놈내에 포유류 게놈 DNA 양쪽에 위치하지 않는 DNA를 인접시키는 것이 보통이다. 이종 암호화 서열의 다른 예는 암호화 서열 자체가 자연에서 발견되지 않는 작제물(예, 게놈 암호화 서열이 인트론을 함유한 cDNA 또는 고유 유전자의 것과 다른 코돈을 갖는 합성 서열)이다. 대립형질 변이 또는 자연 발생적 돌연변이 발생은 본원에 정의된 DNA 또는 웨타이드의 이종 영역을 생성하지 않는다.

[0049]

용어 "작동적으로 연결된"은 본 발명의 폴리웨타이드와 이종 폴리웨타이드가 프레임내에서 융합되어 있음을 의미한다. 이종 폴리웨타이드는 본 발명의 폴리웨타이드의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 키메라 단백질은 화학적 합성에 의해 효소적으로 생성되거나 DNA 재조합 기술에 의해 생성된다. 많은 키메라 효소들이 생성되고 연구되어 왔다. 유용한 융합 단백질중 한 예는 본 발명의 폴리웨타이드가 GST 서열의 C-말단에 융합된 GST 융합 단백질이다. 이러한 키메라 단백질은 본 발명의 재조합 폴리웨타이드의 정체를 촉진할 수 있다.

[0050]

다른 실시형태로서, 키메라 단백질 또는 웨타이드는 이의 N-말단에 이종 시그널 서열을 함유한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리웨타이드의 고유 시그널 서열은 제거되어 다른 알려진 단백질로부터의 시그널 서열로 치환될 수 있다.

[0051]

융합 단백질은 리신 폴리웨타이드를 다른 성능을 갖고 있거나 리신 폴리웨타이드에 추가의 성능 또는 추가의 특성을 제공하는 단백질 또는 폴리웨타이드와 결합시킨 것일 수 있다. 융합 단백질은 본 발명의 폴리웨타이드의 전부 또는 일부가 많은 면역글로불린 단백질 계열로부터 유도된 서열과 융합된 면역글로불린 융합 단백질일 수 있다. 면역글로불린은 항체일 수 있고, 예를 들면 민감성 또는 표적 박테리아의 표면 단백질 또는 에피토프이다. 면역글로불린 융합 단백질은 본 발명의 폴리웨타이드의 동족 리간드의 생체이용률을 변경시킬 수 있다. 리간드/수용체 상호작용의 억제는 박테리아-연관된 질병 및 질환의 치료와 세포 생존의 조절(즉, 촉진 또는 억제) 모두를 위해 치료학적으로 유용하다. 융합 단백질은 특정 조직 또는 기관으로 리신을 안내하거나 기구, 플라스틱 또는 막과 같은 표면으로 리신을 안내하는 것을 포함하여 리신을 표적으로 유도하거나 리신이 표적물이 되도록 하는 수단을 포함할 수 있다. 본 발명의 키메라 및 융합 단백질 및 웨타이드는 표준 DNA 재조합 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0052]

본원에 기술된 단백질 또는 웨타이드 및 웨타이드 단편의 변형 또는 변이 형태는 화학적으로 합성되거나 DNA 재조합 기술에 의해 제조되거나 양 방법에 의해 생성되는 단백질 또는 웨타이드 및 웨타이드 단편을 포함한다. 이들 기술은 예를 들어 키메라화 및 셔플링을 포함한다. 본원에서 사용되는, 셔플링된 단백질 또는 웨타이드, 유전자 생성물 또는 한 개 이상의 관련된 과자 단백질 또는 단백질 웨타이드 절편을 위한 웨타이드는 무작위로 절단되고 더 활성적이거나 특이적인 단백질로 재조립되었다. 셔플링된 올리고뉴클레오타이드, 웨타이드 또는 웨타이드 절편 분자들은 목적하는 기능성을 갖는 분자의 동정을 위해 선택 또는 선별된다. 셔플링은 주형 단백질보다 더 활성적인, 예를 들면 10배 내지 100배 더 활성적인 단백질을 생성하기 위해 사용할 수 있다. 주형 단백질은 다른 여러 종류의 리신 단백질중에서 선택된다. 셔플링된 단백질 또는 웨타이드는 예를 들면 한 개 이상의 결합 도메인과 한 개 이상의 촉매 도메인을 구성한다. 단백질 또는 웨타이드가 화학적 합성에 의해 생성될 때, 이 단백질 또는 웨타이드에는 바람직하게는 화학전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다. 즉, 합성된 단백질 또는 웨타이드는 이의 합성에 연루된 화학전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리되어 있다. 따라서, 이와 같은 단백질 작용제는 화학전구체 또는 목적하는 폴리웨타이드외에 다른 화합물을 약 30%, 20%, 10%, 5%(건조 중량 기준) 미만으로 갖는다.

[0053]

또한, 본 발명은 본 발명에 유용한 폴리웨타이드의 다른 변이체에 관한 것이다. 이와 같은 변이체들은 효능제(유사제)로 작용할 수 있는 변이된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 변이체는 돌연변이유발, 즉 독립적인 점돌연변이 또는 절두에 의해 형성될 수 있다. 효능제는 천연 단백질 형태와 실질적으로 동일한 생물학적 활성 또는 부분 활성을 유지할 수 있다. 단백질의 길항제는 천연 단백질 형태의 활성중 하나 이상을 억제할 수 있으며, 예를 들면 목적하는 단백질을 포함하여 세포 신호전달 체계의 하류 또는 상류 구성원과 경쟁적으로 결합함으로써 억제할 수 있다. 따라서, 특이적인 생물학적 효과들은 기능이 제한적인 변이체로 처치함으로써 규명할 수 있다. 천연 단백질 형태의 생물학적 활성중 부분 활성을 갖는 변이체로 대상자를 처치하는 것은 그 천연 단백질 형태로 대상자를 처치한 경우에 비하여 부작용을 적게 유발할 수 있다. 효능제(유사제) 또는 길항제로 작용하는 것으로서 본 발명에서 사용되는 단백질 변이체들은 본 발명 단백질의 돌연변이체(예, 절두 돌연변이체)들의 조합라이브러리를 선별하여 동정할 수 있다. 한 실시형태로서, 변이체들의 다양화 라이브러리는 핵산 수준에서 조합 돌연변이유발로 형성하며 다양화 유전자 라이브러리에 의해 암호화되어 있다. 축퇴되어 있는 올리고뉴클레오타

이드 서열로부터 본 발명의 잠재적인 폴리펩타이드 변이체의 라이브러리를 생성하기 위해 사용할 수 있는 방법들은 다양하다. 본 발명 폴리펩타이드의 암호화 서열의 절편의 라이브러리들을 사용하여 변이체, 활성 단편 또는 절편을 선별하고 이어서 선택하기 위한 폴리펩타이드의 다양화 집합체를 형성할 수 있다. 점돌연변이 또는 절두에 의해 생성된 조합 라이브러리의 유전자 생성물을 선별하는 기술과 특정 성질을 갖는 유전자 생성물의 cDNA 라이브러리를 선별하는 기술은 본 분야에 서너 가지가 알려져 있다. 대규모 유전자 라이브러리를 선별하는데 고속처리분석이 가능한 것으로 가장 폭넓게 사용되고 있는 기술들은 복제성 발현 벡터내로 유전자 라이브러리를 클로닝하고, 생성된 벡터 라이브러리로 적당한 세포를 형질전환시키며, 목적하는 활성을 검출하여 검출물 유전자를 함유한 벡터의 분리를 촉진하는 조건하에서 조합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 이러한 맥락에서, 실시형태에 따른 가장 작은 단백질(또는 이 단백질의 암호화 핵산) 부분은 리신 단백질을 생성하는 과자를 특이적인 것으로 인식할 수 있는 에피토프이다. 따라서, 표적 또는 수용체(예, 항체)와 결합할 것으로 기대할 수 있고 일부 실시형태를 위해 유용한 가장 작은 폴리펩타이드(및 이 폴리펩타이드를 암호화하는 관련 핵산)는 길이가 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85 또는 100개의 아미노산일 수 있다. 비록 길이가 8, 9, 10, 11, 12 또는 15개의 아미노산 정도로 작은 서열들이 표적 또는 에피토프로 작용하기에 충분한 구조임에는 확실하지만, 길이가 5, 6 또는 7개 아미노산으로 더 짧은 서열들도 일부 조건에서 표적 또는 에피토프 구조를 나타낼 수 있고 가치있는 실시형태이다. 따라서, 도 5에 그리고 서열번호 1에 기술된 것 및 서열번호 3 및 4의 도메인 서열을 포함하여 본원에 제공된 단백질(들) 또는 리신 폴리펩타이드의 가장 부분은 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 또는 16개 아미노산으로 구성된 작은 폴리펩타이드를 포함한다.

[0054]

본원에 기술된 실시형태들의 단백질 또는 펩타이드 단편의 생물학적 활성 부분은 본 발명의 리신 단백질의 아미노산 서열과 충분히 동일하거나 이 서열로부터 유도된 아미노산을 포함하고, 전장 리신 단백질보다 적은 수의 아미노산을 포함하며, 전장 리신 단백질의 활성중 적어도 하나를 나타내는 폴리펩타이드를 포함한다. 전형적으로, 생물학적 활성 부분은 전장 리신 단백질의 활성중 적어도 하나를 갖는 도메인 또는 모티프를 포함한다. 본 발명에 따른 단백질 또는 단백질 단편의 생물학적 활성 부분은 예를 들면 길이가 10, 25, 50, 100개 미만의 아미노산인 폴리펩타이드일 수 있다. 게다가, 단백질의 다른 영역이 결실되거나 부가된 다른 생물학적 활성 부분은 재조합 기술로 제조하고 실시형태들의 고유 폴리펩타이드 형태의 작용 활성중 하나 이상에 대해 평가할 수 있다.

[0055]

본 분야의 전문가가 인정할 수 있는 정도의 작은 단백질 및/또는 핵산(또는 더 큰 분자의 단백질 및/또는 핵산 영역)과 기능성을 공유하는 상동성 단백질 및 핵산을 제조할 수 있다. 상동성일 수 있는 그와 같은 작은 분자 및 보다 큰 분자의 짧은 영역들은 특별히 실시형태로서 제시된다. 이러한 가치있는 영역들은 도 5에 그리고 서열번호 1에 기술된 것 및 서열번호 3 및 4의 도메인 서열을 포함하여 본원에 제공된 리신 폴리펩타이드와 바람직하게는 적어도 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 적어도 99%의 상동성을 갖는다. 이를 상동성 퍼센트 값은 보존 아미노산 치환에 의한 변이를 포함하지 않는다.

[0056]

두 아미노산 서열은 아미노산 잔기의 약 70% 이상(바람직하게는 약 80% 이상, 약 85% 이상 및 바람직하게는 약 90% 또는 95% 이상)이 동일하거나 보존 치환을 나타낼 때 "실질적으로 상동성"이다. 유사 리신들, 예를 들어 유사 PlySs2 리신들 또는 유사 C1yS 리신들의 서열은 리신 폴리펩타이드의 아미노산중 한 개 또는 그 이상, 또는 서너 개, 또는 10%까지, 또는 15%까지 또는 20%까지가 유사한 또는 보존적 아미노산 치환으로 치환되고 유사 리신들이 본원에 기술된 리신(예, PlySs2 리신 및/또는 C1yS 리신)의 활성, 항균효과 및/또는 박테리아 특이성의 프로필을 가질 때 실질적으로 상동성이다.

[0057]

본원에 기술된 아미노산 잔기는 바람직하게는 "L" 이성체형이다. 그러나, 폴리펩타이드가 목적하는 면역글로불린-결합 기능성을 유지하는 한 어떠한 L-아미노산 잔기도 "D" 이성체형의 잔기로 치환될 수 있다. NH₂는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노기를 가리킨다. COOH는 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 존재하는 유리 카르복시기를 가리킨다. 아래 연계표는 폴리펩타이드 표준 명명법(J. Biol. Chem. 243:3552-59 (1969)에 따른 아미노산 잔기의 약어를 보여준다.

대응표		아미노산
부호	1-문자	3-문자
Y	Tyr	티로신
G	Gly	글리신
F	Phe	페닐알라닌
M	Met	메티오닌
A	Ala	알라닌
S	Ser	세린
I	Ile	이소류신
L	Leu	류신
T	Thr	트레오닌
V	Val	빌린
P	Pro	프롤린
K	Lys	리신
H	His	히스티딘
Q	Gln	글루타민
E	Glu	글루탐산
W	Trp	트립토판
R	Arg	아르기닌
D	Asp	아스파르트
N	Asn	아스파라긴
C	Cys	시스테인

[0058]

돌연변이가 아미노산 서열에서거나, 도 5에 그리고 서열번호 1에 기술된 리신 서열에서 또는 서열번호 3 또는 4의 도메인 서열에서 또는 이의 활성 단편 또는 절편에서를 포함하여 본 발명의 폴리펩타이드 및 리신을 암호화하는 핵산 서열에서거나, 이들의 활성 단편 또는 절편에서 이루어 질 수 있으며, 그 결과로 특정 코돈이 다른 아미노산을 암호화한 코돈으로 변경되거나, 한 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되거나, 하나 이상의 아미노산이 결실된다. 이러한 돌연변이는 일반적으로 가능한 가장 적은 수의 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 변경시킴으로써 달성한다. 이러한 유형의 치환 돌연변이는 생성된 단백질의 아미노산 변경을 비보존 방식으로(예를 들면, 특정 크기 또는 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 다른 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변경시킴으로써) 또는 보존 방식으로(예를 들면, 특정 크기 또는 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 동일 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변경시킴으로써) 달성할 수 있다. 이러한 보존 변경은 일반적으로 생성된 단백질의 구조 및 기능에 적은 변화를 유도한다. 비보존 변경은 생성된 단백질의 구조, 활성 또는 기능에 더 많은 변화를 일으킨다. 본 발명은 생성된 단백질의 활성 또는 결합 특성에 유의하게 변화를 일으키지 않는 보존 변경을 함유한 서열을 포함하는 것으로 고려되어야 한다.

[0060] 다음은 아미노산의 다양한 그룹 분류중에서 한 예를 보여준다:

[0061] 비극성 R 기를 갖는 아미노산

[0062] 알라닌, 브로필, 류신, 이소류신, 프로필, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌

[0063] 하전되지 않은 극성 R 기를 갖는 아미노산

[0064] 글리신 세린 트레오닌 시스테인 티로신 아스파라기 글루타민

[0065] 하전된 금속 R 기($\text{pH} 6.0$ 에서 음전하)를 갖는 아미노산

[0066] 앤스파트산 글루탐산

[0067] 열기성 아미노산(pH 6.0에서 양적한)

[0068] 러시 야르기너 히스티딘(pH 6.0에서)

[0069] 다른 그룹, 복음을 페니 그룹: 페니알란니 트럼펫과 티로시온을 갖는 이들 아미노산의 수 있다

[0070] 다른 그룹 복률는 복자량(즉 R 기의 크기)으로 한 숟 있다.

[0071] 글쓰기 75 [0072] 외국어 80

[0072] 세류 105 표류리 115

[0073] 밤길 117 트레일러 119

[0074]	시스테인	121	류신	131
[0075]	이소류신	131	아스파라긴	132
[0076]	아스파트산	133	글루타민	146
[0077]	리신	146	글루탐산	147
[0078]	메티오닌	149	히스티딘	155 (pH 6에서)
[0079]	페닐알라닌	165	아르기닌	174
[0080]	티로신	181	트립토판	204
[0081]	특히, 바람직한 치환은 다음과 같다:			
[0082]	- 양전하가 유지될 수 있도록 Arg을 Lys으로 및 Lys을 Arg으로			
[0083]	- 음전하가 유지될 수 있도록 Asp를 Glu으로 및 Glu을 Asp으로			
[0084]	- 유리 -OH가 유지될 수 있도록 Thr이 Ser으로			
[0085]	- 유리 NH ₂ 가 유지될 수 있도록 Asn이 Gln으로			
[0086]	바람직한 보존적 아미노산 치환의 예로는 다음의 것을 포함한다:			
[0087]	글루탐산(E)을 글루타민(Q)으로 및 반대로; 발린(V)을 류신(L)으로 및 반대로; 트레오닌(T)을 세린(S)으로 및 반대로; 발린(V)을 이소류신(I)으로 및 반대로; 글루타민(Q)을 리신(K)으로 및 반대로; 메티오닌(M)을 이소류신(I)으로 및 반대로; 아스파라긴(N)을 세린(S)으로 및 반대로; 메티오닌(M)을 류신(L)으로 및 반대로; 글루탐산(E)을 리신(L)으로 및 반대로; 세린(S)을 알라닌(A)으로 및 반대로; 페닐알라닌(F)을 티로신(Y)으로 및 반대로; 아스파트산(D)을 글루탐산(E)으로 및 반대로; 이소류신(I)을 류신(L)으로 및 반대로; 아르기닌(R)을 리신(K)으로 및 반대로.			
[0088]	또한, 아미노산 치환은 특히, 바람직한 특성을 갖는 아미노산을 도입하기 위해 이루어질 수 있다. 예를 들면, Cys는 다른 Cys와의 이화화 가교를 위한 잠재적 자리로서 도입될 수 있다. His는 특히, "촉매적" 자리로서 도입될 수 있다(즉, His는 산 또는 염기로서 작용할 수 있고 생화학적 촉매반응에서 가장 일반적인 아미노산이다). Pro는 이의 특별한 평면 구조가 단백질 구조에 β-회전을 유도하기 때문에 도입될 수 있다.			
[0089]	따라서, 본 분야의 전문가는 본원에 제공된 PlySs2 리신 폴리펩타이드의 서열을 검토하고 다른 리신 폴리펩타이드에 대한 지식과 공개 정보를 기반으로 리신 폴리펩타이드 서열에 아미노산 변경 또는 치환을 이룰 수 있다. 아미노산 변경은 본원에 제공된 리신의 서열에서 한 개 또는 그 이상, 한 개 또는 두세 개, 한 개 또는 서너 개, 한 개 내지 다섯 개, 한 개 내지 열 개 또는 이러한 다른 개수의 아미노산을 교체 또는 치환시켜 돌연변이체 또는 변이체를 생성함으로써 달성할 수 있다. 이와 같은 돌연변이체 또는 변이체들은 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 리스테리아 또는 엔테로코커스 박테리아를 포함한 박테리아의 사멸 작용에 대해 예측될 수 있거나, 상기 박테리아의 사멸 작용 또는 사멸 능력 및/또는 본원에 기술되고 특별히 제공된 리신과 유사한 활성의 유무에 대해 검사받을 수 있다. 따라서, 리신의 서열에 변형을 이룰 수 있고 서열에 변형을 갖는 돌연변이체 또는 변이체는 실시예에 있는 것을 포함하여 본원에 기술되고 예시된 검정 및 방법을 사용하여 검사할 수 있다. 본 분야의 전문가는 리신의 도메인 구조를 근거로 치환 또는 교체에 적합한 한 개 또는 그 이상, 한 개 또는 서너 개 아미노산 및 합당한 보존 또는 비보존 치환을 포함하여 치환 또는 교체에 적합하지 않은 한 개 또는 그 이상의 아미노산을 예측할 수 있다.			
[0090]	이러한 양상에서 그리고 PlySs2 리신을 예로 하였을 때 언급하지 않을 수 없는 것은 비록 PlySs2 폴리펩타이드 리신이 프로파지 용해 효소의 다른 부류를 대표하더라도 PlySs2 폴리펩타이드 리신은 도 5에 도시된 N-말단 CHAP 도메인(시스테인-히스티딘 아미도하이드롤라제/펩티다제)(서열번호 3) 및 C-말단 SH3-5형 도메인(서열번호 4)를 포함한다는 점이다. 도메인의 아미노산 서열은 회색의 그림자 영역으로 구분되어 있고, CHAP 도메인은 LNN으로 시작하는 첫번째 그림자 영역의 아미노산 서열에, SH3-5형 도메인은 RSY로 시작하는 두번째 그림자 영역의 아미노산 서열에 해당한다. CHAP 도메인들은 이전에 특성화된 서너 개의 스트렙토코커스 및 스태필로코커스 파지 리신에 포함된다. 따라서, 본 분야 전문가는 PlySs2의 CHAP 도메인 및/또는 SH-3 도메인으로의 치환 또는 교체를 적정하게 만들고 검사할 수 있다. CHAP 및/또는 SH-3 도메인 서열중 어느 하나 또는 둘 다를 진뱅크 데이터베이스와 서열비교하거나 PlySs2 리신 전체 아미노산 서열을 진뱅크 데이터베이스와 서열비교하여 예를 들면			

치환을 위한 아미노산을 동정할 수 있다.

[0091]

PlySs2 리신은 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 리스테리아 또는 엔테로코커스 박테리아를 포함하여 분류상 구분되는 많은 균주와 종의 그램 양성 박테리아를 사멸시키는 활성과 능력을 나타낸다. 특히, 중요한 것으로, PlySs2는 스태필로코커스 아우레우스를 포함한 스태필로코커스 균주, 특히, 항생제-민감성 균주와 뚜렷한 항생제-내성 스태필로코커스 균주 모두를 사멸시키는 활성을 나타낸다. 또한, PlySs2는 스트렙토코커스 균주의 사멸 활성을 나타내며 특히, A그룹 및 B그룹 스트렙토코커스 균주에 대해 효과적인 사멸 활성을 나타낸다. 아래 표 1은 분리주에 대한 시험관내 로그 사멸 평가를 근거로 나열한 PlySs2 리신의 박테리아 사멸능을 보여준다. 아래 표 2 및 3은 여러 그램 양성 및 그램 음성 유기체 및 항생제 내성 스태필로코커스 아우레우스 균주에 대한 PlySs2의 활성을 보여준다. 해당 박테리아에 대한 PlySs2의 MIC 범위는 상대적인 사멸 활성을 제공한다.

표 1

다양한 박테리아의 성장시의 PlySs2 감소(부분적 목록)

박테리아	PlySs2에 의한 상대적 사멸
스태필로코커스 아우레우스 (VRSA, VISA, MRSA, MSSA)	+++
스트렙토코커스 수이스	+++
스태필로코커스 에피데르미디스	++
스태필로코커스 시플란스	+++
리스테리아 모노사이토게네스	++
엔테로코커스 파에칼리스	++
스트렙토코커스 디스갈락티아에 - GBS	++
스트렙토코커스 아갈락티아에 - GBS	+++
스트렙토코커스 퍼오게네스 - GAS	+++
스트렙토코커스 에퀴	++
스트렙토코커스 샌궈니스	++
스트렙토코커스 고르도나이	++
스트렙토코커스 소브리누스	+
스트렙토코커스 라투스	+
스트렙토코커스 오랄리스	+
스트렙토코커스 뉴모니네	+
바실러스 투린기엔시스	-
바실러스 세레우스	-
바실러스 서브틸리스	-
바실러스 안트라시스	-
에스케리키아 콜라이	-
엔테로코커스 파에시움	-
슈도모나스 아에루기노사	-

[0092]

표 2

민감성 및 비-민감성 박테리아 균주

유기체 및 민감성 서브세트 (시험된 수)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	50%	90%	범위
스테필로코커스 아우레우스			
메티실린 민감성 (103)	4	8	1-16
메티실린 내성 (120)	4	8	1-16
스트렙토코커스 피오케네스, 그룹 A (54)	2	8	0.5-8
스트렙토코커스 아길락티아에, 그룹 B (51)	8	16	1-64
다른 그램-양성 유기체			
스테필로코커스 투그디엔시스 (10)	8	8	8
스테필로코커스 에피데르미디스 (11)	128	512	4-512
스트렙토코커스 뉴모니아에 (26)	16	64	1-64
스트렙토코커스 뮤란스 (12)	64	256	2-256
리스테리아 모노사이토케네스 (12)	128	512	1-512
엔테로코커스 파에갈리스 (17)	>512	>512	32->512
엔테로코커스 파에시움 (5)	>512	>512	32->512
바실리스 세레우스 (10)	>512	>512	>512
그램-음성 유기체			
아시네토박터 바우만나이 (8)	>512	>512	>512
에스캐리키아 콜라이 (6)	>512	>512	>512
슈도모나스 아에루기노사 (5)	>512	>512	>512

[0093]

표 3

항생제-내성 스테필로코커스 아우레우스에 대한 PlvSs2의 활성

민감성 서브세트 (시험된 수)	MIC (mg/mL)		
	50%	90%	범위
반코마이신-내성 (14)	2	4	1-4
반코마이신-중간 민감성 (31)	8	32	1-64
리네졸리드-내성 (5)	2	2	2-4
답토마이신-내성 (8)	2	4	2-4

[0094]

[0095] 다양한 문법형식으로 표현되는 용어 "모노클로날 항체"는 특정 항원과 면역반응할 수 있는 단지 한 종의 항체 결합 부위만을 가진 항체를 가리킨다. 이에, 모노클로날 항체는 전형적으로 이 항체와 면역반응하는 임의 항원에 대해 단일 결합 친화성을 나타낸다. 따라서, 모노클로날 항체는, 다수의 항체 결합 부위들을 갖고 각각의 항체 결합 부위는 하나의 상이한 항체에 대해 면역 특이적인 항체 분자를 포함할 수 있고; 예를 들면 이중 특이적 (키메라) 모노클로날 항체이다.

[0096] 용어 "특이적"은 특이적 결합 쌍의 한 구성원이 이의 특이적 결합 파트너가 아닌 분자들에 대한 유의적 결합을 나타내지 않는 상황을 가리키기 위해 사용될 수 있다. 또한, 이 용어는 예를 들어 항원 결합 도메인이, 다수의 항원이 보유하는 특정 애피토프에 대해 특이적인 경우 적용될 수 있으며, 이 경우, 상기 항원 결합 도메인을 보유한 특이적 결합 멤버는 상기 애피토프를 보유한 여러 항원과 결합할 수 있다.

[0097] 용어 "포함하는"은 하나 또는 그 이상의 특징 또는 요소들의 존재를 허용함을 의미한다.

[0098] 용어 "필수적으로 구성되는"은 보다 큰 생성물에 공유 결합되지 않은 한정 개수의 잔기들의 생성물, 특히, 펩타

이드 서열을 가리킨다. 그러나, 본 발명 펩타이드의 경우에서, 본 분야의 전문가는 보호기 등을 부가하기 위해 말단을 화학적으로 변형시키는 것(예, C-말단의 아미드화)과 같이 그 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에서의 작은 변형이 고려될 수 있음을 인식할 것이다.

[0099] 용어 "단리된"은 본 발명에 따른 리신 폴리펩타이드(들) 또는 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 자체의 상태를 가리킨다. 이러한 폴리펩타이드 및 핵산은 천연적으로 함께 결합된 물질, 예를 들면 자연 환경에서 함께 발견되거나 시험관내 또는 생체내에서 재조합 DNA 기술로 제조하는 환경(예, 세포 배양물)에서 함께 발현되는 다른 폴리펩타이드 또는 핵산으로부터 유리되어 있거나 실질적으로 유리되어 있다. 폴리펩타이드 및 핵산은 희석제 또는 보조제와 함께 제형될 수 있고 실용 목적상 더 분리될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 보통 중합체 또는 점막접착제 또는 다른 담체와 혼합되며, 만일 진단 또는 치료용으로 사용되는 경우는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합된다.

[0100] 본 발명에 유용하고 응용가능한 스트렙토코커스 수이스 PlySs2 리신 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 핵산들이 본원에서 제공된다. 이러한 맥락에서 대표적인 핵산 서열은 도 5의 또는 서열번호 1의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 특히, 서열번호 1의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 염증한 조건하에서 서열번호 2 및/또는 도 5의 DNA 서열의 상보 서열과 하이브리드화하는 서열이다. 또한, 이들 서열 및 도면에 도시된 것과 하이브리드화하는 핵산 서열의 변이체가 본 발명에 따른 용해 효소의 생성용으로 고려되며, 상기 변이체에는 수득할 수 있는 천연 변이체도 포함된다. 과거 연관된 용해 효소를 암호화하는 아주 다양한 단리된 핵산 서열 또는 cDNA 서열 및 이러한 유전자 서열과 하이브리드화하는 부분 서열은 본 발명의 리신 효소 또는 폴리펩타이드의 재조합 생성에 유용하다.

[0101] "레플리콘"은 시험관내에서 DNA 복제의 자가 단위로 작용하는(즉, 자신의 조절하에 복제할 수 있는) 임의 유전자요소(예, 플라스미드, 염색체, 바이러스)이다.

[0102] "벡터"는 다른 DNA 절편이 결합될 수 있고 이 결합된 절편의 복제를 유도하는 레플리콘으로서 예로는 플라스미드, 과거 또는 코스미드를 들 수 있다.

[0103] "DNA 문자"는 단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 나선으로서 데옥시리보뉴클레오타이드(아데닌, 구아닌, 티민 또는 시토신)의 중합체 형태를 가리킨다. 이 용어는 단지 일차 및 이차 문자 구조만을 가리키며 어떠한 특정 삼차 형태도 이 용어에 포함되지 않는다. 따라서, 이 용어는 특히, 선형 DNA 문자(예, 제한 단편), 바이러스, 플라스미드 및 염색체에서 발견되는 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 문자의 구조를 논의함에 있어서, 본원에서 서열들은, 5'으로부터 3'으로의 방향의 서열만 제공하는 표준 규약하에 비전사 DNA 가닥(즉, mRNA와 상동성인 서열을 갖는 가닥)을 따라 기술될 수 있다.

[0104] "복제원"은 DNA 합성에 참여하는 DNA 서열을 가리킨다.

[0105] DNA "암호화 서열"은 적절한 조절 서열의 통제를 받도록 배치되었을 때 생체내에서 전사되고 폴리펩타이드로 해독되는 이중 가닥 DNA 서열이다. 암호화 서열의 범위는 5'(아미노) 말단의 출발 코돈과 3'(카르복실) 말단의 해독 정지 코돈에 의해 결정된다. 암호화 서열은 이들로 한정되는 것은 아니지만 원핵 서열, 진핵 mRNA로부터의 cDNA, 진핵(예, 포유류) DNA로부터의 계놈 DNA 서열을 포함하고, 심지어 합성 DNA 서열도 포함할 수 있다. 보통 암호화 서열의 3'에는 폴리아데닐화 시그널 및 전사 종결 서열이 위치한다.

[0106] 전사 및 해독 조절 서열은 숙주 세포에서 암호화 서열의 발현을 유도하는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 시그널, 터미네이터 등과 같은 DNA 조절 서열이다.

[0107] "프로모터 서열"은 세포내에서 RNA 폴리머라제와 결합하고 하류(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 본 발명을 명백히 하기 위한 목적으로서, 프로모터 서열은 그 경계가 3' 말단에서 전사 개시 부위까지이고 상류(5' 방향)으로 전사를 배경 이상의 검출가능한 수준으로 개시하는데 필요한 염기 또는 요소들을 최소 수로 포함한다. 프로모터 서열내에는 전사 개시 부위(뉴클레아제 S1을 이용한 지도작성에 의해 간편하게 규명된다)뿐만 아니라 RNA 폴리머라제의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인(공통염기서열)이 발견된다. 진핵 프로모터는 항상 그런 것은 아니고 자주 "TATA" 박스와 "CAT" 박스를 포함한다. 원핵 프로모터는 -10 및 -35 공통염기서열과 함께 샤인-달가르노 서열을 포함한다.

[0108] "발현 조절 서열"은 다른 DNA 서열의 전사 및 해독을 통제하고 조절하는 DNA 서열이다. 암호화 서열은 RNA 폴리머라제에 의해 mRNA로 전사된 다음 단백질로 해독될 때 세포내에서 전사 및 해독 조절 서열의 통제를 받는다.

[0109] "시그널 서열"은 암호화 서열 앞에 포함될 수 있다. 이 서열은 숙주 세포와 교신하여 폴리펩타이드를 세포 표면

으로 유인하거나 폴리펩타이드를 배지내로 분비시키는 역할을 하고 폴리펩타이드의 N-말단에 위치하는 시그널 웨პ타이드를 암호화하며, 이 시그널 웨პ타이드는 단백질이 세포를 떠나기에 앞서 숙주 세포에 의해 제거된다. 시그널 서열은 원핵생물 및 진핵생물 고유의 여러 단백질과 결합된 상태로 발견될 수 있다.

[0110] 본 발명의 프로브와 관련하여 본원에서 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 2개 이상의 리보뉴클레오타이드, 바람직하게는 3개 이상의 리보뉴클레오타이드로 구성된 문자로서 정의된다. 이의 정확한 크기는 많은 요소들에 의해 좌우되며, 이들 요소들은 올리고뉴클레오타이드의 궁극적인 기능과 용도에 의해 좌우된다.

[0111] 본원에 사용된 용어 "제한 엔도뉴클레아제" 및 "제한효소"는 특정 뉴클레오타이드 서열에서 또는 근처에서 이중 가닥 DNA를 절단하는 박테리아 효소를 가리킨다.

[0112] 세포는 외인성 또는 이종 DNA에 의해 "형질전환"되었다는 것은 세포내로 그러한 DNA가 도입되었음을 의미한다. 형질전환 DNA는 세포의 계놈을 구성하는 염색체 DNA내로 통합될 수 있거나(공유결합) 그렇지 않을 수 있다. 예를 들어 원핵생물, 효모 및 포유류 세포에서, 형질전환 DNA는 플라스미드와 같은 에피솜 요소에서 유지될 수 있다. 진핵 세포에 있어서, 안정하게 형질전환된 세포는 이의 염색체내로 형질전환 DNA가 통합된 후 염색체 복제를 통해 딸세포로 유전되는 과정이 이루어지는 세포이다. 이러한 안정성은 진핵세포가 형질전환 DNA를 함유한 딸세포의 집단으로 구성되는 세포주 또는 클론을 수립하는 능력에 의해 입증된다. "클론"은 단일 세포 또는 공통 조상세포가 유사분열하여 형성된 세포 집단이다. "세포주"는 시험관내에서 많은 세대를 거치는 동안에 안정하게 성장할 수 있는 초대 세포의 클론이다.

[0113] 두 DNA 서열이 "실질적으로 상동성"이다는 것은 이들 DNA 서열의 정해진 길이에서 일치하는 뉴클레오타이드 비율이 적어도 약 75%(바람직하게는, 약 80% 이상, 가장 바람직하게는 약 90% 또는 95% 이상)인 경우를 가리킨다. 실질적으로 상동성인 서열은 서열 데이터 뱅크에서 입수할 수 있는 표준 소프트웨어를 이용하여 서열을 비교하여 동정하거나 서던 하이브리드화 실험을 예를 들어 이의 특정 시스템에 맞춘 엄중한 조건하에서 수행하여 동정할 수 있다. 적합한 하이브리드화 조건을 정하는 것은 본 분야의 전문가에게는 용이한 것이다(참조예: 상기 Maniatis et al.; 상기 DNA Cloning, Vols. I & II; 상기 Nucleic Acid Hybridization).

[0114] 본원에 특정적으로 기술된 것의 유도체이고 본원에 기술된 것과 뉴클레오타이드의 결실, 부가 또는 치환에 의해 다르지만 리신 폴리펩타이드의 기능성 특징을 가진 단백질을 여전히 암호화하고 있는 DNA 문자 및 뉴클레오타이드 서열이 본 발명에서 고려된다. 또한, 기술된 DNA 문자로부터 유도된 작은 DNA 문자들도 포함된다. 이와 같은 작은 DNA 문자들은 하이브리드화 프로브 또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 프라이머로 사용하기에 적합한 올리뉴클레오타이드를 포함한다. 이에 따라 이들 작은 DNA 문자들은 스태필로코커스 수이스의 박테리오파지에 의해 유전자적으로 암호화된 용해 효소의 결편을 적어도 포함하고, PCR의 목적을 위해서는 그 유전자의 최소 10-15 뉴클레오타이드 서열, 더 바람직하게는 15-30 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기된 본 발명의 DNA 문자로부터 유도된 DNA 문자 및 뉴클레오타이드 서열은 또한 본 발명의 DNA 서열 또는 이의 단편과 엄중한 조건하에서 하이브리드화하는 DNA 서열로서 정의될 수 있다.

[0115] 본 발명의 바람직한 실시형태로서, 엄중한 조건은 25% 이상의 서열 변이(또한, "불일치"라고 한다)를 갖는 DNA 문자가 하이브리드화를 이를 수 없는 조건으로 정의될 수 있다. 더 바람직한 실시형태로서, 엄중한 조건은 15% 이상의 불일치를 갖는 DNA 문자가 하이브리드화를 이를 수 없는 조건이다. 더 더욱 바람직하게는, 엄중한 조건은 10% 이상의 불일치를 갖는 DNA 서열이 하이브리드화를 이를 수 없는 조건이다. 바람직하게는, 엄중한 조건은 6% 이상의 불일치를 갖는 DNA 서열이 하이브리드화를 이를 수 없는 조건이다.

[0116] 유전자암호의 축퇴성은 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 유지하면서 DNA 문자의 뉴클레오타이드 서열에서 주요 변이를 가능하게 하기 때문에 추가로 실시형태의 범위를 넓혀 준다. 따라서, 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 암호화된 단백질의 아미노산 조성 및 단백질의 특징에 영향을 미치지 않으면서도 그 위치에서 세개 코돈중 임의 것으로 변경될 수 있다. 특정 아미노산에 대한 뉴클레오타이드 코돈의 유전자암호 및 변이는 본 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다. 변이 DNA 문자는, 유전자암호의 축퇴성을 기초로, 상기된 표준 DNA 돌연변이유발 기술을 사용하여 본원에 기술된 cDNA 문자로부터 유도하거나 DNA 서열을 합성하여 유도할 수 있다. 유전자암호의 축퇴성에 근거한 서열 변이때문에 기술된 cDNA 서열과 엄중한 조건하에서 하이브리드화하지 않는 DNA 서열은 본원의 설명으로부터 이해되는 부분이다.

[0117] 따라서, P1ySs2 및 P1ySs1을 포함한 본 발명의 리신을 암호화하고 도 5에 또는 서열번호 1에 제공된 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열에서 축퇴되어 있는 DNA 서열 또는 도 5 및 서열 번호 2에 제공된 대표적인 핵산 서열에서 축퇴되어 있는 DNA 서열이 본 발명의 범위에 속하는 것은 당연히 받아

들여야 한다. 용어 "에서 축퇴되어 있는"은 특정 아미노산을 정하는데 다른 3문자 코돈이 사용됨을 의미한다. 개개의 특정 아미노산을 암호화하고 상호교환하여 사용할 수 있는 코돈들은 본 분야에 잘 알려져 있다.

[0118] 본 분야의 전문가는 본원에 기술되어 있고 본 분야에 알려져 있는 DNA 돌연변이유발 기술들로부터 스트렙토코커스 수이스의 박테리오파지 리신을 암호화하면서도 본원에 기술되고 제공된 용해 폴리펩타이드의 필수적인 특성을 유지하는 아주 다양한 DNA 문자를 생성할 수 있음을 인정할 것이다. 또한, 아래에서 보다 자세하게 설명되는 바와 같이, 용해 폴리펩타이드의 특성에 변이를 얻기위하여, 새롭게 유도된 단백질들을 선택할 수도 있다. 이와 같은 유도체들은 아미노산 서열에 소수의 결실, 부가 및 치환과 같은 변이가 있는 것을 포함한다.

[0119] 아미노산 서열 변이를 도입하는 부위는 사전에 결정될 수 있으나, 돌연변이 그 자체가 미리 결정될 필요는 없다. 아미노산 치환은 잔기 한 개에서의 치환이 일반적이지만, 1개 또는 그 이상, 1개 또는 서너개, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개 잔기에서 치환이 일어날 수 있고, 삽입은 보통 약 1 내지 10개의 아미노산 잔기이며, 결실은 약 1 내지 30개 잔기이다. 결실 또는 삽입은 아미노산 잔기 1개의 단일 형태로 일어날 수 있으나, 바람직하게는 인접한 한 쌍의 아미노산 잔기들에서 일어날 수 있다(즉, 잔기 2개의 결실 또는 잔기 2개의 삽입). 치환, 결실 및 삽입은 최종 작제물의 생성을 위해 임의로 조합할 수 있다. 치환 변이체는 아미노산 서열로부터 적어도 1개의 잔기가 제거되고 이 자리에 다른 잔기가 삽입된 것이다. 이와 같은 치환은 단백질 특성에 유의한 영향이 전혀 발생하지 않도록 하기 위해 도입하거나 단백질 특성에 미세한 변화를 주고자 할 때 도입할 수 있다. 단백질내 고유 아미노산을 대신하여 삽입될 수 있고 보존 치환으로서 간주되는 아미노산들은 위에 기술되어 있고 본 분야의 전문가에 의해 인식되는 것들이다.

[0120] 본 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, DNA 서열은 이를 적절한 발현 벡터내의 발현 조절 서열에 작동적으로 연결하고 이 발현 벡터로 적당한 단세포 숙주를 형질전환시킴으로써 발현시킬 수 있다. 본 발명의 DNA 서열을 발현 조절 서열에 작동적으로 연결한다는 것은 개시코돈 ATG가 DNA 서열의 일부가 아니라고 한다면 당연히 그 개시코돈을 DNA 서열의 상류에서 정확한 판독 프레임에 배치하는 것을 포함한다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시킴에 있어서 아주 다양한 숙주/발현 벡터 조합이 이용될 수 있다. 유용한 발현 벡터는 예를 들면 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열의 단편들로 구성될 수 있다. 이들 벡터내에서 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여 아주 다양한 발현 조절 서열(즉, DNA 서열과 작동적으로 연결되어 DNA 서열의 발현을 조절하는 서열)이 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 서열을 발현시키는데 아주 다양한 숙주 단세포들이 유용하다. 이들 숙주는 이.콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균(예, 효소) 및 조직 배양된 동물세포, 인간세포 및 식물세포와 같이 잘 알려진 진핵 및 원핵 숙주를 포함할 수 있다. 본 분야의 전문가는 본 발명의 범위에서 벗어나지 않고서 목적으로 하는 발현을 달성하는데 과도한 실험부담을 갖지 않으면서도 적당한 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주를 선택할 수 있을 것이다.

[0121] 본원에서 사용되고 본 분야에서 언급되는 생물막은 뚜렷한 형체의 미생물 응집체이다. 생물막 형성은 자유롭게 떠다니는 미생물이 표면에착생하는 것과 연관이 있다. 생물막은 하나의 크기가 불과 1 또는 2 마이크로미터인 미생물 세포들이 높이가 수백 마이크로미터일 수 있는 타워 형태를 포함하여 회선구조의 형태를 이룬 미생물 군체이다. 생물막내부의 채널들은 유체가 채워진 도관으로 작용함으로써 살아있는 생물막 군체를 유지하는데 필요한 질소, 산소, 노폐물 등을 순화시킨다. 전형적으로, 생물막 또는 미생물(박테리아, 진균 또는 조류) 군체는 이들 세포에 의해 생성된 세포외 생체고분자가 감싸고 있고 액체와 표면사이의 경계면에서착생한다. 생물막의 캡슐화 특성은 생물막내의 미생물 유기체들에게 항미생물 표준 요법에 대한 고도의 내성을 부여하는 몇 가지 특징가운데 하나이다. 예를 들어, 생물막안에서 자라는 박테리아는 항생제에 고도로 내성을 나타내며, 일부 경우에는 생물막의 거대구조물이 없이 성장한 같은 박테리아보다 1000배 이상의 내성을 갖는다.

[0122] 이식 재료가 생물막으로 오염된 것으로 검출되면 표준 항생제 요법은 효과가 없으며 이런 상황에서 유일한 조치는 오염된 이식 재료를 제거하는 것이다. 게다가, 생물막은 많은 만성 질환에 연루되어 있다. 예를 들면, 낭포성 섬유증 환자는 흔히 항생제 내성을 생물막을 유도하는 슈도모나스 감염을 앓는다. 생물막 형성은 자유롭게 부유하는 미생물들이 스스로 표면에착생할 때 일어난다. 생물막은 박테리아를 보호하기 때문에 흔히 전통적인 항미생물 치료에 대해 더 내성을 나타내어 건강에 심각한 위협이 되고 있다. 이것은 매년 카테터-연관된 요로감염증(CAUTI)이 백만건 이상 보고되고 있고 이들중 상당수가 생물막-연관된 박테리아에 의한 것일 수 있다는 사실에 의해 입증된다(Donlan, RM (2001) Emerg Infect Dis 7(2):277-281; Maki D and Tambyah P (2001) Emerg Infect Dis 7(2):342-347).

[0123] 다양한 방안들이 생물막 형성을 예방하고자 시도되었다. 이 가운데는 화학적 및 기계적 수단을 이용하여 단백질 흡착 또는 생물막 착생을 억제하는 방법이 포함된다. 화학적 방안은 유치 기구상에 항미생물 코팅 및 고분자 변

형을 포함한다. 항생제, 살생물제 및 이온 코팅은 생물막 예방을 위한 화학적 방법의 예들이며 미성숙한 생물막의 착생과 확장을 방해할 수 있다. 그러나, 이들 코팅은 단기간(약 1주)에만 효과적이고 그 이후는 항균 작용제의 누출로 그 코팅물의 효능이 떨어진다(Dror N et al (2009) Sensors 9(4):2538-2554). 몇 가지 시험관내 연구에서 은이 코팅 형태나 고분자 매트릭스내에 분산된 나노입자로서 감염 예방에 효능이 있는 것으로 확인되었다. 그러나, 은은 사람 조직에 잠재적으로 독성을 나타낼 수 있어 생체내에 은을 적용하는 것은 우려의 소지가 있고 은 코팅물은 사용에 제한이 있어왔다. 그럼에도 불구하고, 은 코팅물은 카테터와 같은 기구에 사용된다(Vasilev K et al (2009) Expert Rev Med Devices 6(5):553-567). 고분자 변형을 통해 항균 작용제는 길고 유연한 고분자 쇄를 이용하여 기구 표면상에 고정시킬 수 있다. 이들 쇄는 공유결합에 의해 기구 표면에 고정되어 비누출(non-leaching) 접촉-치사(contact-killing) 표면을 생성한다. 한 시험관내 연구에 의하면 항균 작용제인 N-알킬피리디늄 브로마이드가 폴리(4-비닐-N-헥실피리딘)에 연결될 때 이 고분자는 스태필로코커스 에피데미디스, 이, 콜라이 및 슈도모나스 아에루기노사 박테리아의 99% 이상을 불활성화시킬 수 있음이 밝혀졌다(Jansen B and Kohnen W (1995) J Ind Microbiol 15(4):391-396).

[0124] 생물막을 예방하는 기계적 방법은 카테터와 같은 기구의 표면을 변형시키는 것이 포함되며, 예를 들어 기구 표면의 소수성을 변형시키거나, 활면 재료(smooth-surfaced material)를 이용하여 기구의 물리적 특성을 변형시키거나, 표면 전하를 조절하는 것이다. 고분자 쇄의 소수성 및 전하는 양전하 폴리양이온(polycation)을 포함하여 몇 가지 주체 화합물과 항균 작용제를 사용함으로써 조절할 수 있다. 다른 방법으로는 전지식 소자로부터 저에너지 탄성표면파를 생성하는 것으로, 이 소자는 주기적인 사각형 펄스와 방형파를 표면(본 발명의 경우 카테터)에 확산시켜 수평편파를 발생시킴으로써 표면에 박테리아가 착생하는 것을 막아준다. 이 기술은 흰토끼와 기니아 피크에 시험 적용되었고 생물막 성장을 감소시켰다(Hazan, Z et al (2006) Antimicrob Agents and Chemother 50(12):4144-152).

[0125] 본 발명은 박테리아 생물막을 예방, 해체 및 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다. 이들 방법 및 조성물은 특히, 스태필로코커스 박테리아를 포함하는 생물막의 예방, 해체 및 치료를 위해 제공된다. 특히, 항생제 내성 및/또는 항생제 민감성 스태필로코커스 아우레우스를 포함하여 스태필로코커스 아우레우스를 포함하는 생물막의 예방, 해체 및 치료를 위한 방법 및 조성물이 본 발명의 양상이다. 본 발명의 양상에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 항생제 내성 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아를 포함하여 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아를 사멸시킬 수 있는 리신, 특히, PlySs2 리신을 포함한다.

[0126] 특히, PlySs2 리신을 포함하는 본 발명의 방법 및 조성물은 생물막의 예방 또는 해체를 위한 화학적 또는 기계적 수단, 조성물 또는 방법과 조합되거나 혼합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 특히, 유치 기구 또는 카테터 내에 또는 상에 생물막의 성장 또는 형성을 최소화하는데 있어서 항생제, 살생물제 및 이온 코팅제와 병용 또는 혼합될 수 있다. 한정하는 것이 아니라 예시적인 것으로서, PlySs2를 함유하는 조성물은 유치 기구 또는 카테터에 생물막이 존재하지 않도록 하거나 박테리아 착생이 감소되도록 하거나 생물막 형성 위험이 감소되도록 유치 기구 또는 카테터를 사전 살균하거나 유지하는데 투여되거나 다른 방법으로 제공될 수 있다. 따라서, PlySs2를 함유하는 조성물은 유치 기구 또는 카테터에 생물막이 존재하지 않도록 하거나 박테리아 착생이 감소되도록 하거나 생물막 형성 위험이 감소되도록 유치 기구, 카테터 등을 관류하거나 규칙적으로 세정하고 유지하기 위해 용액으로 사용할 수 있다. 생물막이 의심되거나, 확실하거나, 입증된 경우에, PlySs2를 함유하는 조성물은 그 생물막의 해체, 감소, 제거 또는 치료가 촉진되거나 개시되거나 달성되도록 그 생물막에 또는 기구, 영역, 위치, 부위에 투여하거나 다른 방법으로 접촉시킬 수 있다. 따라서, 예를 들면, 기구나 카테터로 인해 환자에게 체온상승, 불쾌감, 발적 또는 종창이 일어난 경우 PlySs2를 함유하는 조성물을 환자에게 투여하거나 그 기구나 카테터와 접촉시켜 형성중에 있거나 이미 형성된 생물막을 해체, 억제 또는 치료함으로써 관련된 온도, 불쾌감, 발적 또는 종창을 완화, 해소 또는 치료할 수 있다.

[0127] 본 발명에 따르면, 리신, 특히, PlySs2 리신 또는 이의 활성 변이체를 포함하는 조성물은 단일 또는 수회 용량 또는 투여로, 형성되었거나 의심되는 생물막 또는 생물막이 존재하는 기구, 영역, 위치 또는 부위에 투여하거나 다른 방법으로 접촉시킬 수 있다. 리신은 하나 이상의 항생제와 함께, 전에 또는 후에 투여할 수 있다. 리신은 예를 들면 최초 용량을 항생제와 함께 투여하거나 항생제를 후속적으로 투여할 수 있고, 최초 용량의 리신에 이어서 후속 용량의 리신을 투여할 수 있다. 이러한 한 상황으로, 리신, 특히, PlySs2의 최초 용량은 생물막을 해체시키는 역할을 할 수 있고, 뒤이은 리신의 후속 용량(부분적으로 생물막의 초기 반응 및 해체에 따라서 최초 용량보다 저용량, 동일용량 또는 고용량일 수 있다)은 생물막내의 박테리아 또는 생물막의 박테리아 또는 생물막으로부터의 박테리아를 더 해체시키거나 추가로 사멸 또는 탈콜로니화하는 역할을 할 수 있다. 또한, 항생제를 후속적으로 또는 추가적으로 투여하여 생물막내의 박테리아 또는 생물막의 박테리아 또는 생물막으로부터의

박테리아를 더 해체시키거나 추가로 사멸 또는 탈콜로니화할 수 있다.

[0128] 본 발명에서 제공된 방법 및 응용에 사용하는 용해 효소(들)/폴리펩타이드(들)을 포함하는 치료학적 또는 약제학적 조성물뿐만 아니라 연관된 사용 방법이 본원에 제공된다. 치료학적 또는 약제학적 조성물은 하나 이상의 용해 폴리펩타이드를 포함할 수 있고, 임의로 천연, 절두형, 키메라 또는 셔플링 용해 효소를 포함하며, 임의로 담체, 비히클, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 홀린 단백질, 하나 이상의 항생제 또는 적합한 부형제, 담체 또는 비히클과 같은 다른 성분과 병용된다. 본 발명은 생물막내의 그람 양성 박테리아를 사멸, 감소, 탈콜로니화, 프로필락시스 또는 치료하고, 특히, 생물막을 해체, 예방 또는 치료하는데 사용하는데 사용하기 위한, PlySs2를 포함한 본 발명의 리신의 치료학적 조성물 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0129] 본 발명의 방법에 사용되는 치료학적 조성물에 포함되는 효소(들) 또는 폴리펩타이드(들)는 비변이 과지 관련 용해 효소(들), 용해 폴리펩타이드 절두체, 용해 폴리펩타이드(들) 변이체 및 키메라 및/또는 셔플링된 용해 효소 중 하나 이상이거나 임의의 병용물일 수 있다. 추가로, 동일한 박테리아의 치료를 위해 다른 과지에 의해 유전자적으로 암호화된 다른 용해 폴리펩타이드가 사용될 수 있다. 이들 용해 효소는 또한 "비변이" 용해 효소 또는 폴리펩타이드, 용해 폴리펩타이드(들) 절두체, 용해 폴리펩타이드 변이체(들) 및 키메라 및 셔플링된 용해 효소의 임의의 병용물일 수 있다. 스트렙토코커스, 스태필로코커스, 엔테로코커스 및 리스테리아박테리아 균주를 포함한 그람 양성 박테리아를 위한 치료학적 또는 약제학적 조성물중의 용해 효소(들)/폴리펩타이드(들)은 단독으로 또는 항생제와 병용되어 사용되거나 치료해야 할 다른 침습성 박테리아 유기체가 있다면 이 표적 박테리아에 대해 특이적인 다른 과지 관련 용해 효소와 병용되어 사용될 수 있다. 용해 효소, 절단 효소, 변이 효소, 키메라 효소 및/또는 셔플링 용해 효소는 홀린 단백질과 함께 사용될 수 있다. 홀린 단백질의 양은 또한 다양할 수 있다. 리소스타핀과 함께 또는 리소스타핀이 없이 상기 효소(들) 또는 폴리펩타이드(들)를 함유하는 치료학적 조성물에 다양한 항생제들이 임의로 포함될 수 있다. 치료학적 조성물에는 하나 이상의 용해 효소 또는 폴리펩타이드가 포함될 수 있다.

[0130] 본 발명의 방법에 사용되는 약제학적 조성물은 또한 화학적 합성 또는 재조합 DNA 기술에 의해 생성되는 하나 이상의 변이된 용해 효소를 포함할 수 있고, 변이된 용해 효소에는 이의 이소자임, 유사체 또는 변이체들이 포함된다. 특히, 변이된 용해 단백질은 아미노산 치환, 결실, 절두, 키메라화, 셔플링 또는 이의 조합에 의해 생성될 수 있다. 약제학적 조성물은, 하나 이상의 천연 용해 단백질과 하나 이상의 절두, 변이, 키메라 또는 셔플링 용해 단백질과의 병용물을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 동종 또는 이종 박테리아로부터 유도된 적어도 하나의 용해 단백질의 펩타이드 또는 펩타이드 단편과 임의로 첨가되는 하나 이상의 보충 작용제 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 함유할 수 있다.

[0131] 본 발명의 방법에 사용되는 약제학적 조성물은 특히, 본원에 제공된 하나 이상의 항미생물제 및/또는 하나 이상의 통상적인 항생제를 포함하는 보충 작용제를 함유할 수 있다. 감염의 치료 또는 박테리아 생물막의 해체를 가속화하기 위하여, 치료제는 용해 효소의 살균 활성을 증가시킬 수 있는 보충 작용제를 적어도 하나를 추가적으로 포함할 수 있다. 항균 작용제는 세포벽 합성의 억제, 세포막 기능의 억제 및/또는 단백질과 DNA 합성을 포함한 대사기능의 억제에 의해 세포벽의 구조 또는 기능을 방해함으로써 작용하는 것이 대체적이다. 항생제는 폭넓게 그람 양성 박테리아에서 세포벽 펩티도글리칸 생합성에 영향을 미치는 것과 DNA 또는 단백질 합성에 영향을 미치는 것으로 분류할 수 있다. 페닐실린 및 이와 유사한 항생제를 포함한 세포벽 합성 저해제는 단단한 세포외벽을 봉괴시키며, 그 결과로 지지대를 상실한 세포들은 팽윤하고 궁극적으로 터져버린다. 이 보충 작용제는 용해 효소의 치료 효과를 상승작용적으로 증가시키는 유효량의 에리트로마이신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신, 록시트로마이신, 매크로라이드 계열의 다른 항생제, 페니실린, 세팔로스포린 및 이의 임의의 병용물과 같은 항생제일 수 있다. 실제로 어떠한 다른 항생제도 변이 및/또는 비변이 용해 효소와 함께 사용될 수 있다. 세포벽 펩티도글리칸 생합성에 영향을 주는 항생제는 펩티도글리칸 매트릭스내로 N-아세틸무람산(NAM)과 N-아세틸글루코사민(NAG) 펩타이드 아단위의 삽입을 방지함으로써 펩티도글리칸 합성을 억제하는 글리코펩타이드를 포함한다. 입수 가능한 글리코펩타이드로는 반코마이신과 타이코플라닌이 포함된다. 페니실린은 펩티도글리칸 가교의 형성을 억제한다. 페니실린의 작용기 β -락탐 잔기는 박테리아내의 펩티도글리칸 분자들을 연결하는 DD-트랜스 펩티다제와 결합하고 억제시킨다. 가수분해 효소들은 연속해서 세포벽을 파괴하고 삼투압때문에 세포용해 또는 사멸이 일어난다. 보편적인 페니실린으로는 옥사실린, 암피실린 및 클록사실린이 포함되고, 원형질막의 외부에서 펩티도글리칸 빌딩블록을 가져오는 C₅₅-이소프레닐 피로포스페이트의 탈인산화를 저해하는 폴리펩타이드가 또한 포함된다. 세포벽에 충격을 주는 폴리펩타이드는 바시트라신이다. 다른 유용한 관련 항생제로는 반코마이신, 리네졸리드 및 딥토마이신이 포함된다.

- [0132] 마찬가지로, 다른 박테리아 또는 박테리아 감염의 치료 또는 해체를 위해 다른 용해 효소들이 담체중에 포함될 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 적어도 하나의 용해 단백질의 펩타이드 또는 펩타이드 단편, 하나의 홀린 단백질 또는 적어도 하나의 홀린과 하나의 용해 단백질과 임의로 침가되는 보충 작용제와 적합한 담체 또는 희석제를 함유할 수 있으며, 상기 용해 및 홀린 단백질은 각각 박테리아 동종 또는 이종으로부터 유도된다.
- [0133] 또한, 생체내에서 유효량의 용해 폴리펩타이드 또는 이의 펩타이드 단편을 단독으로 또는 다른 핵산 분자와 조합되어 발현할 수 있는 핵산 분자를 함유하는 조성물이 본 발명의 방법에서 사용된다. 또한, 이들 핵산 분자, 폴리뉴클레오타이드 및 이들 분자를 보유하고 시험관내 및 생체내에서 발현하는 벡터를 함유하는 세포 배양물이 제공된다.
- [0134] 본 발명의 방법은 다양한 담체와 병용된 용해 폴리펩타이드를 포함하는 치료학적 또는 약제학적 조성물을 이용하여 박테리아를 해체 또는 탈콜로니화하거나 민감성 그람 양성 박테리아에 의해 유발된 질병을 치료할 수 있다. 담체는 적합하게는 등장성 및 화학안정성을 증가시키는 물질과 같은 첨가제를 소량 함유한다. 이러한 물질은 사용 용량 및 농도에서 피투여자에게 무독성이고 인산염, 시트르산염, 석신산염, 아세트산 및 다른 유기산 또는 이의 염과 같은 완충제; 아스코빈산과 같은 산화방지제; 폴리아르기닌 또는 트리펩타이드와 같은 저분자량(약 10개 미만의 잔기); 혈청알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신; 글루탐산, 아스파트산, 히스티딘 또는 아르기닌과 같은 아미노산; 셀룰로즈 또는 이의 유도체, 글루코즈, 만노즈, 트레할로즈 또는 텍스트린과 같은 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 만니톨 또는 솔비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 짹이온; 폴리솔베이트, 폴록사민 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제; 및/또는 중성염을 포함한다. 글리세린 또는 글리세롤(1,2,3-프로판트리올)은 약제용으로 판매되고 있다. DMSO는 많은 국소 적용 약물의 침투를 협저하게 증가시키는 능력을 가진 비양자성 용매이다. 담체 비히클은 또한 링거액, 완충액 및 텍스트로즈액을 포함할 수 있고, 특히, 정맥주사액을 준비할 때 포함할 수 있다.
- [0135] 용해 폴리펩타이드는 이들 물질에 액체 형태로 침가되거나, 타액과 같은 체액과 혼합되어 용해되는 동결건조 상태로 침가될 수 있다. 폴리펩타이드(들)/효소는, 또한, 미셀(micelle) 또는 리포솜으로 존재할 수 있다.
- [0136] 본 발명에 사용하기 위한 본 발명의 변이 또는 비변이 용해 효소/폴리펩타이드의 유효 투약률(dosage rate) 또는 유효량은 부분적으로 효소/폴리펩타이드를 치료학적으로 사용할 것인지 예방적으로 사용할 것인지의 여부, 피투약자가 감염 박테리아에 노출된 기간, 피투여자의 크기 및 중량 등에 의해 결정될 것이다. 또한, 효소/폴리펩타이드를 함유한 조성물의 사용 기간은 예방 목적인지 치료 목적에 따라 결정되며, 예방 목적인 경우는 단기간 동안 매시간, 매일 또는 매주 사용되는 것일 수 있고, 치료 목적인 경우엔 조성물의 섭생이 보다 더 집중적일 필요가 있어 용법을 수 시간, 수 일 또는 수 주간 지속할 수 있고/있거나 일일기준으로 또는 그 날 정한 시간 간격으로 지속할 수 있다. 사용되는 투약형은 어떠한 것도 최소간의 시간에 최소수의 단위를 제공해야 한다. 장기방출형 또는 서방출형(예, 특정 비강 스프레이 또는 로젠지제)으로 분류되는 담체들은 mL당 저농도의 활성(효소) 단위를 보유 또는 제공할 수 있으나 장기간에 걸쳐 이루어지는 반면, 단기방출형 또는 속방형 담체(예, 가글)는 mL당 고농도의 활성(효소) 단위를 보유 또는 제공할 있으나 단기간에 걸쳐 이루어진다. mL당 활성 단위의 양 및 노출 기간은 감염 유형, 치료가 예방적인지 치료적인지 여부 및 다른 변수들에 의해 결정된다. 상황에 따라서는 mL당 단위용량이 훨씬 더 높거나 낮을 수 있다.
- [0137] 용해 효소/폴리펩타이드는 사용시 그의 활성이 나타날 수 있는 pH 환경에 있어야 한다. 안정화 완충제는 리신 효소/폴리펩타이드의 활성을 최적으로 조성할 수 있다. 완충제는 디티오프레이탈 또는 베타 멀리포에탄올(BME)과 같은 환원제를 함유할 수 있다. 안정화 완충제는 또한 에틸렌디아민테트라아세트산 이나트륨 염과 같은 금속킬레이트화제일 수 있거나 포함할 수 있다. 또한, 안정화 완충제는 인산염 또는 시트르산염-인산염 완충제 또는 임의의 다른 완충제를 함유할 수 있다.
- [0138] 순한 계면활성제가 치료학적 또는 약제학적 조성물에 사용된 용해 효소/폴리펩타이드의 치료 효과를 증가시키는 유효량으로 치료학적 또는 약제학적 조성물에 함유될 수 있다. 순한 계면활성제로 적합한 것은 특히, 폴리옥시에틸렌 솔비탄과 지방산의 에스테르(트윈 시리즈), 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올(트리톤-X 시리즈), n-옥틸-베타-D-글루코파라노시드, n-옥틸-베타-D-티오글루코파라노시드, n-데실-베타-D-글루코파라노시드, n-도데실-베타-D-글루코파라노시드 및 생물학적 계면활성제(예, 지방산, 글리세라이드, 모노글리세라이드, 데옥시콜레이트 및 데옥시콜레이트의 에스테르)을 포함한다.
- [0139] 또한, 보존제가 본 발명에 사용될 수 있으며, 바람직하게는 조성물의 총 중량에 약 0.05% 내지 0.5%이다. 보존제는 작용제에 미생물이 성장하는 것을 방지 또는 감소시킴으로써 작용제가 미생물에 오염되지 않도록 한다. 본

발명에 유요한 일부 보존제는 메틸파라벤, 프로필파라벤, 부틸파라벤, 클로록실레놀, 나트륨 벤조에이트, DMDM 하이단토인, 3-요오도-2-프로필부틸 카르바메이트, 칼륨 솔베이트, 클로르헥시딘 디글루코네이트 또는 이들의 병용물을 포함한다.

[0140] 본 발명의 방법 및 응용에 사용되는 치료학적 조성물은 추가로 민감성 그람 양성 박테리아와 함께 존재하는 스태필로코커스 아우레우스 박테리아의 치료용 효소 라이소스타핀과 같은 다른 효소를 포함할 수 있다. 스태필로코커스 시뮬란스(*Staphylococcus simulans*)의 유전자 생성물인 라이소스타핀은 세포벽의 폴리글리신 가교를 효소적으로 분해함으로써 스태필로코커스 아우레우스에 정균 및 살균 효과를 나타낸다(Browder et al., Res. Comm. 19: 393-400 (1965)). 이후 라이소스타핀 유전자는 클로닝 및 서열분석되었다(Recsei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1127-1131 (1987)). 치료학적 조성물은 또한 뮤타노리신 및 라이소자임을 포함할 수 있다.

[0141] 본 발명의 방법에 따른 용해 효소/폴리펩타이드를 포함하는 치료학적 조성물의 적용 수단은 이들로 한정되는 것은 아니지만 직접, 간접, 매개 및 특별 수단 또는 이의 임의 병용 수단을 포함한다. 용해 효소/폴리펩타이드의 직접 적용은 생물막 부위, 감염 부위 또는 박테리아 콜로니화 부위에 폴리펩타이드를 직접 접촉시키는 모든 적합한 수단에 의해 이루어질 수 있고, 예를 들면 비(nasal) 영역(예, 비분무제), 피부 적용(예, 국소용 연고 또는 작용제), 좌제, 탐폰 적용 등이다. 비 적용은 예를 들면 비분무제, 점비액, 비연고제, 세비액, 비주사액, 비페킹, 기관지분무제 및 흡입제를 포함하고, 인후로젠지제, 구강세정제 또는 가글의 사용을 통한 간접 적용 또는 비공 또는 안면에 적용되는 연고의 사용을 통한 간접 적용 또는 이들 및 유사 적용 방법의 임의 병용을 포함한다. 용해 효소를 투여할 수 있는 형태는 이로써 한정되는 것은 아니지만 로젠지제, 트로키제, 캔디, 주입제, 츄잉껌, 정제, 산제, 분무제, 액제, 연고 및 에어로졸을 포함한다.

[0142] 용해 효소의 적용 방식은 많은 다른 유형 및 배합의 담체들을 포함하고, 예를 들면 이들로 한정하는 것은 아니지만 수성 액제, 알콜계 액제, 수용성젤, 로션, 연고, 비수성 액상 베이스, 미네랄 오일 베이스, 미네랄 오일과 페트롤라툼의 혼합물, 라놀린, 리포좀, 단백질 담체(혈청, 알부민 또는 젤라틴), 셀룰로즈 카르멜 분말 및 이들의 병용물이다. 담체를 함유한 치료제의 전달 방식은 이들로 한정하는 것은 아니지만 스미어(smear), 스프레이, 지속방출성 패치, 액체-흡수된 와이프(wipe) 및 이들의 조합을 포함한다. 용해 효소는 밴디지에 직접 적용되거나 다른 담체중 하나에 적용될 수 있다. 밴디지는 습식 또는 건식으로 판매될 수 있으며, 밴디지위의 효소는 동결건조 형태이다. 이 적용 방법이 피부 감염의 치료에 가장 효과적이다. 국소용 조성물의 담체는 반고체 및 겔유사 비허클을 포함할 수 있고 이의 예로는 고분자 중점제, 물, 보존제, 활성 계면활성제 또는 유화제, 산화방지제, 선스크린 및 용매 또는 혼합용매계가 포함된다. 사용될 수 있는 고분자 중점제는 본 분야의 전문가에게 알려진 것을 포함하며, 예를 들면 화장 및 제약 업계에서 흔히 사용되는 친수성 및 수성알콜성 겔화제이다. 다른 바람직한 겔화 고분자는 하이드록시에틸셀룰로즈, 셀룰로즈 검, MVE/MA 데카디엔 크로스폴리머, PVM/MA 공중합체 또는 이들의 병용물을 포함한다.

[0143] 점막 조직에 흡착하고 장기간에 걸쳐 하나 이상의 파지 효소 및 다른 보충 작용제와 함께 투여될 물질을 갖는다는 것은 장점이 될 수 있다. 제어 방출능을 갖는 물질이 특히 바람직하며, 지속 방출 점막 점착제의 이용은 상당한 관심 대상이었다. 친수성 물질과 소수성 물질이 조합된 점막 점착제가 이용된 다른 방안들이 알려져 있다. 효소의 방출을 제어하기 위하여 마이셀 및 다층 마이셀이 또한 사용될 수 있다. 플라스틱, 막, 임상실습용 기구와 같은 표면을 표적으로 삼거나 이에 접촉하는 능력을 가진 물질, 특히, 카테터, 밸브, 보철장치, 약물 또는 화합물 펌프, 스텐트, 정형 재료 등과 같이 신체에 이식되고 박테리아 점착 또는 바이오필름 개발에 취약한 물질 또는 성분이 본 발명에서 사용되는 리신과 병용, 혼합 또는 융합될 수 있다.

[0144] 또한, 본 발명의 치료학적 또는 약제학적 조성물은 생물학적 활성 작용제의 방출을 제어하기 위하여 친수성 주쇄와 소수성 그래프트쇄를 갖는 그래프트 공중합체를 포함하는 고분자 점막 점착제를 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임의로 폴리(아크릴산), 폴리-(비닐파롤리돈) 및 나트륨 카르복시메틸 셀룰로즈 가소제와 같은 다른 고분자 물질과 다른 약제학적으로 허용되는 담체를 조성물의 점막 점착성에 나쁜 영향을 일으키지 않는 양으로 함유할 수 있다.

[0145] 본 발명의 용해 효소/폴리펩타이드는 본 발명에 따른 용도를 위해 국소, 경구 또는 비경구를 포함하여 약제학적으로 적용가능한 또는 허용되는 수단으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 용해 효소/폴리펩타이드는 그람 양성 박테리아의 감염을 치료하기 위해 근육내, 척수관내, 피하 또는 정맥내로 투여할 수 있다. 비경구 주사를 투여방식으로 선택한 경우, 등장 작용제를 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 등장용 첨가제는 염화나트륨, 텍스트로즈, 만니톨, 솔비톨 및 락토즈를 포함할 수 있다. 경우에 따라서는 인산완충식염수와 같은 등장액이 바람직

하다. 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다. 혈관수축 작용제가 제형에 첨가될 수 있다. 본 발명의 약제는 무균 및 무발열원 상태로 제공된다.

[0146] 어떤 화합물의 경우에도 처음에는 세포배양 검정 또는 동물 모델, 보통 마우스, 토끼, 개 또는 돼지에서 치료유효량을 정할 수 있다. 또한, 동물 모델을 사용하여 목적하는 농도 범위와 투여 경로를 정한다. 그런 후 이러한 정보를 사용하여 사람에게 유용한 투여 용량 및 경로를 결정할 수 있다. 정확한 용량은 의사가 치료 대상 환자를 고려하여 선택한다. 용량과 투약은 활성 잔기를 충분한 수준으로 제공하거나 목적하는 효과를 유지하도록 조정한다. 고려할 수 있는 추가의 요소로는 환자의 중증도, 연령, 체중 및 성별, 식습관, 목적하는 치료 기간, 투여 방법, 투여 시간, 투여 횟수, 약물 병용, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응이 포함된다. 장기 기능성 약제 조성물은 특별한 제형의 반감기 및 청소율에 따라 매 3 내지 4일, 매주 투여되거나 2주 1회 투여될 수 있다.

[0147] 용해 효소/폴리펩타이드(들)의 투여 유효량 및 유용량 및 치료 기간은 부분적으로 감염의 중증도, 환자(특히, 사람) 체중, 감염 박테리아에 대한 피투약자의 노출 기간, 피부 또는 조직의 감염 면적(제곱센티미터), 감염 깊이, 감염 중증도 및 여러 가지 많은 변수에 따라 결정된다. 조성물은 장소에 상관없이 하루 또는 일주에 1회 또는 수회 적용될 수 있고, 수일 또는 수주와 같이 단기간 또는 여러 주 또는 여러 달과 같이 장기간 적용될 수 있다. 용법은 수일 또는 수주간 지속될 수 있다. 사용되는 어떠한 투약형도 최소간의 시간에 최소수의 단위를 제공해야 한다. 효소의 유효량 또는 유효용량을 보장하는 효소의 활성 단위의 농도는 적절히 선택할 수 있다.

[0148] 리신은 단독적으로 또는 하나 이상의 항생제와 같은 다른 작용제와의 병용물로 단일 용량 또는 수회 용량으로 투여될 수 있다. 리신은 임의로 항생제와 같은 다른 작용제와 함께 동일한 투여 방식에 의해 또는 상이한 투여 방식에 의해 투여될 수 있다. 리신은 한 번 이상 병용하거나 또는 개별적으로 1회, 2회 또는 수회로 투여할 수 있다. 따라서, 리신의 최초 용량이 투여된 후, 특히, 생물막의 반응 및 박테리아 사멸 또는 탈콜로니화 또는 해체 또는 생물막내의 박테리아 사멸에 따라서 후속 용량 또는 용량들이 투여될 수 있고, 항생제 용량과 병용되거나 항생제 용량으로 교체될 수 있다. 본 발명의 특정 양상에서, 리신, 특히, PlySs2 또는 항생제와 리신과의 병용물은 장기간 투여할 수 있고 투여 기간은 내성의 위험없이 연장할 수 있다.

[0149] 용어 "작용제(agent)"는 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 화학적 화합물 및 작은 분자를 포함한 모든 분자를 의미한다. 특히, 용어 작용제는 피검 화합물, 첨가된 부가 화합물(들) 또는 리신 효소 화합물과 같은 화합물을 포함한다.

[0150] 용어 "효능제(agonist)"는 가장 넓은 의미로 수용체와 결합해서 그 수용체를 자극하는 리간드를 가리킨다.

[0151] 용어 "검정"은 화합물의 특정 성질을 측정하기 위해 사용되는 임의 방법을 의미한다. "선별 검정"은 여러 화합물들의 무리로부터 선별 대상 화합물의 활성을 근거로 선별 대상 화합물을 특성확인(characterization)하거나 선택(selection)하기 위해 사용하는 방법을 의미한다.

[0152] 용어 "예방하는" 또는 "예방"은 질환 원인 작용제에 노출될 수 있거나 발병에 앞서 그 병에 취약한 대상자가 그 질병에 걸릴 위험 또는 그 병이 발생할 위험을 감소시킴을 의미한다(즉, 그 병의 임상 증상을 중 적어도 하나가 발생하지 않도록 함을 의미한다).

[0153] 용어 "프로필락시스"는 용어 "예방"과 관련이 있고 이 용어에 내포되며, 질병의 치료 또는 치유보다 질병을 예방하고자 하는 조치 또는 과정을 가리킨다. 프로필락시스 조치의 비제한적 예로는 백신 투여; 예를 들어 부동화 때문에 혈전증의 위험에 있는 입원 환자에게 저분자량 혼과린의 투여; 및 말라리아 유행 지역 또는 말라리아 발병 위험이 높은 지역에 방문하기에 앞서 클로로퀸과 같은 항 말라리아 작용제의 투여가 포함될 수 있다.

[0154] "치료학적 유효량"은 의사 또는 다른 임상의에 의해 결정되는 것으로 대상자로부터 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 약물, 화합물, 항미생물제, 항체, 폴리펩타이드 또는 약제의 양을 의미한다. 특히, 그램 양성 박테리아 감염과 그램 양성 박테리아 성장과 관련하여 용어 "유효량"은 살균 및/또는 정균 효과를 나타내는 것을 포함하여 그램 양성 박테리아의 양 또는 감염 정도에서의 생물학적으로 유의한 감소를 일으키는 화합물 또는 작용제의 유효량을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치료학적 유효량"은 감염 박테리아의 성장 또는 양 또는 감염 박테리아의 존재 및 활성에 의해 수반될 수 있는 다른 병리적 특징(예, 발열 또는 백혈구수 증가)에서의 임상적으로 유의한 변동을 예방하고, 바람직하게는 적어도 약 30%까지, 더 바람직하게는 적어도 50%까지, 가장 바람직하게는 적어도 90%까지 감소시키기에 충분한 양을 의미한다.

[0155] 임의의 질병 또는 감염과 관련하여 사용되는 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 한 실시형태로서 그 질병 또는 감염을 완화시킴(즉, 그 질병을 정지시키거나 감염성 작용제 또는 감염 박테리아의 증식을 정지시키거나 그 질병

의 임상 증상들 중 적어도 하나의 징후, 정도 또는 중증도를 감소시킴)을 의미한다. 다른 실시형태로서, "치료하는" 또는 "치료"는 대상자로부터 확진할 수 없는 적어도 하나의 신체적 변수를 완화함을 의미한다. 또 다른 실시형태로서, "치료하는" 또는 "치료"는 그 질병 또는 감염을 육체적으로 조절하거나(예, 확진된 증상의 안정화), 생리학적으로 조절하거나(신체적 변수의 안정화), 이를 둘 다로 조절함을 가리킨다. 추가의 실시형태로서, "치료하는" 또는 "치료"는 질병의 진행을 늦추거나 감염을 감소시키는 것이다.

- [0156] 어구 "약제학적으로 허용되는"은 사람에 투여되었을 때 생리학적으로 받아들일 수 있고 일반적으로 알러지 반응 또는 유사 부반응, 예를 들면, 위 역류, 및 현기증 등을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 말한다.
- [0157] 생체내에서 수행되는 치료 방법 또는 본원 명세서 및 특허청구범위에 따른 의학적 및 임상 치료 방법의 맥락에서 사용되는 용어 대상자, 환자 또는 개인은 사람을 가리킨다.
- [0158] 용어 "그람 양성 박테리아", "그람 양성" 및 특정적으로 수록되지 않은 임의 변이체들은, 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있고 본원 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐 사용되는 상기 용어들은, 알려져 있고/있거나 특정 세포벽의 존재 및/또는 세포막 특징 및/또는 그람 염색의 의해 동정될 수 있는 그람 양성 박테리아를 가리킨다. 그람 양성 박테리아는 알려져 있고 쉽게 동정될 수 있으며 이들로 한정하는 것은 아니지만, 리스테리아, 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 엔테로코커스, 마이코박테리움, 코리네박테리움 및 클로스트리디움중에서 선택될 수 있고 이들의 임의의 그리고 모든 확인 또는 미확인 종 또는 균주를 포함한다. 본 발명의 양상에서, PlyS리신 민감성 그람 양성 박테리아는 리스테리아, 스태필로코커스, 스트렙토코커스 및 엔테로코커스 중 하나 이상으로부터 선택된 박테리아를 포함한다.
- [0159] 용어 "살균"은 박테리아 세포를 사멸시킬 수 있는 능력을 가리킨다.
- [0160] 용어 "정균"은 성장하고 있는 박테리아 세포를 억제함을 포함하여 박테리아 성장을 억제할 수 있는 능력을 가리킨다.
- [0161] 용어 "약제학적으로 허용되는"은 사람에 투여되었을 때 생리학적으로 받아들일 수 있고(physiologically tolerable) 일반적으로 알러지 반응 또는 유사 부반응(예, 위역류, 현기증 등)을 일으키지 않는 물질 및 조성물을 가리킨다.
- [0162] 본원에 사용된 용어 "치료학적 유효량"은 표적 세포 덩어리의 정지기 활성 또는 표적 세포 덩어리의 존재 및 활성에 의해 수반될 수 있는 다른 병리적 특징(예, 혈압상승, 발열 또는 백혈구수 증가)에서의 임상적으로 유의한 변동을 예방하고, 바람직하게는 적어도 30%까지, 더 바람직하게는 적어도 50%까지, 가장 바람직하게는 적어도 90%까지 감소시키기에 충분한 양을 의미한다.
- [0163] 본 발명은 MRSA를 포함한 스태필로코커스 아우레우스 박테리아를 사멸시킬 수 있는 능력을 가진 리신, 특히, PlySs2 리신을 투여하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 그람 양성 박테리아, 특히, 하나 이상의 스태필로코커스, 스트렙토코커스, 엔테로코커스 및 리스테리아 박테리아가 의심되거나 존재하는 박테리아 생물막을 예방, 해체, 치료 및/또는 탈콜로니화하고 생물막의 해체 후 감염을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명은 기구, 이식 재료 또는 분리막(예, 투과증발막, 투석막, 역삼투막, 한외여과막 및 정밀여과막)의 표면에 MRSA를 포함한 스태필로코커스 아우레우스 박테리아를 사멸시킬 수 있는 능력을 가진 리신, 특히, PlySs2 리신을 투여하거나 사용하는 단계를 포함하는, 상기 표면상에서의 생물막 성장을 감소시키거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0164] 본 발명은 PlySs2 리신을 포함하는 조성물을 투여함으로써 감염 원인이 생물막-연관된 박테리아에 있는 카테터-연관된 요로감염증(CAUTI)을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 감염 원인이 생물막-연관된 박테리아에 있는 카테터-연관된 요로감염증(CAUTI)을 치료하는데 사용하기 위한 것으로 PlySs2 리신을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법 또는 조성물은, 도 5에 또는 서열번호 1에 제공된 폴리펩타이드 또는 스태필로코커스 아우레우스를 포함한 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 박테리아를 사멸시킬 수 있는 PlySs2 리신의 변이체를 포함하는, PlySs2 리신을 포함한다. 본 발명의 방법 또는 조성물은 추가로 하나 이상의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0165] 심장 또는 이의 혈관에 이식된 대동맥판 또는 다른 판 또는 스텐트 또는 기구에서와 같은 스태필로코커스 심내막염을 포함한 심내막염은 많은 심장 환자에게 임상적으로 중대한 증상이고, 위험 요소이며, 현실이다. 본 발명은 스태필로코커스 심내막염을 포함한 심내막염을 경감, 예방, 저해 또는 치료하는 방법 및 심장 판막 또는 혈관 스텐트상의 생물막을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 이들 방법에서, 본원에서 제공된 리신, 특히, PlySs2 리신 또는 이의 활성 변이체가 스태필로코커스 심내막염 또는 심장 판막 또는 혈관 스텐트상의 생물막을 예방 또는 치료하기 위해 투여된다.

[0166] 본 발명은 아래의 비제한적인 실시예를 참고로 할 때 이해가 좀 더 용이할 수 있다. 이를 실시예는 본 발명의 예로서 제공되며 본 발명의 바람직한 실시형태를 좀 더 완전하게 입증하기 위해 제시되는 것이므로 어떠한 상황에서든 본 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로 해석해서는 안된다.

[0167] 실시예 1

[0168] PlySs2 리신은 스태필로코커스 아우레우스의 메티실린 및 반코마이신 내성 및 민감성 균주(MRSA, MSSA, VRSA 및 VISA)를 포함하여 임상적으로 중요한 그램 양성 박테리아의 다양한 균주를 사멸시키는 능력을 입증한다. PlySs2는 광범위한 종 사멸 활성을 나타내는 특이한 리신이고 다수의 박테리아 종, 특히, 그램 양성 박테리아, 중요하게는 다양한 항생제 민감성 및 항생제 내성 스태필로코커스 및 A그룹 및 B그룹 스트렙토코커스를 포함한 스트렙토코커스를 사멸시킬 수 있다. 다른 PlySs2 민감성 박테리아로는 엔테로코커스 및 리스테리아 박테리아 균주가 포함된다. 상기 표 2 및 3에는 PlySs2 리신에 민감한 스태필로코커스 및 스트렙토코커스를 포함한 여러 박테리아가 제공되고 있다.

[0169] 아래 표 4는 추가적인 MIC 연구를 보여준다.

표 4

에스. 아우레우스 균주에 대한 PlySs2 및 항생제 활성 *

유기체 (균주의 수)	PlySs2		답토마이신		반코마이신		옥사실린		리네졸리드	
	MIC ₉₀	[uM]	MIC ₉₀	[uM]	MIC ₉₀	[uM]	MIC _{50/90}	[uM]	MIC _{50/90}	[uM]
MRSA (n=45)	4	0.15	1	0.6	1	0.7	>4*	>10.0	2	5.7
MSSA (n=28)	4	0.15	1	0.6	1	0.7	n/a	n/a	2	5.7
VISA (n=10)	32	1.2	8	4.9	4	2.7	n/a	n/a	2	5.7
VRSA (n=14)	2	0.08	1	0.6	>16	>10.6	n/a	n/a	2	5.7
LRSA (n=5)	2	0.08	1	0.6	1	0.7	n/a	n/a	>64	>183
DRSA (n=8)	4	0.15	16	9.9	1	0.7	n/a	n/a	2	5.7

* MIC는, 브로츠 마이크로회석법을 사용하고 CLIS 법(M07-A9)에 따라 80%의 성장 저해율(%)을 평가하여 측정하였다.

*적색/불드체=약물 실패 (MIC 값이, 에스. 아우레우스에 대한 표시된 약물의 EUCAST 중단점 초과이다)

[0170]

[0171] 뚜렷하면서 독특하게는, PlySs2는, 많은 스태필로코커스 및 스트렙토코커스 균주 및 상기 표에 표시된 다른 피검 균주들을 포함하여 수 많은 임상적으로 중요한 박테리아에 대한 활성에도 불구하고, 다른 박테리아, 특히, 천연 또는 공생 균종에 대해 기껏해야 최소 효과만을 나타낸다. 아래 표 5는 여러 종의 공생하는 사람 장내 박테리아에 대해 PlySs2의 아주 낮은 용해 활성을 입증한다.

표 5

PlySs2에 대한 사람 장 박테리아의 민감성

유기체	N	CF-301 MIC (ug/ml)
살모넬라 엔테리디티스	1	>512
슈도모나스 아에루기노사	11	>512
에스카리키아 콜라이	10	>512
클렙시엘라종	8	>512
프로테우스 미라빌리스	2	>512
락토바실러스 종	6	>512
락토코커스 종	3	>512

[0172]

생물막 형성은 많은 박테리아 감염의 발병 과정에서 나타나는 핵심적인 특징이다(31). 스태필로코커스 아우레우스와 같은 박테리아 병원체는 감염 조직(즉, 심내막염의 심장판막 또는 골수염의 뼈) 내에서 또는 이식 재료(즉, 대체관절 및 카테터) 상에 생물막으로 존재한다. 이러한 생물막은 항생제와 면역계의 작용에 대해 방어하면서 성장과 생존을 위해 유리한 환경을 제공한다(32). 본원에 제공되는 연구들은 1000X MIC 농도로 사용된 항생제들의 완전한 불활성과 대조적으로 불과 1X MIC 농도에서 PlySs2 리신의 강력한 항-생물막 활성을 입증한다. 이와 같이 강력한 리신 항-생물막 활성은 생물막에 대해 효과적이고 리신에 의해 붕괴된 생물막에 항생제들이 접근할 수 있음으로써 항생제들의 작용을 특이하게 보상해 줄 수 있는 수단과 조성물을 제공한다.

[0174]

PlySs2 리신이 수 많은 임상적으로 중요한 박테리아 균주 및 종에 대해 신속한 박테리아 사멸과 효과를 나타낸다는 측면에서, 스태필로코커스 아우레우스 생물막에 대한 PlySs2 리신의 효능을 시험관내 생물막 검정법을 이용하여 검사하였다.

[0175]

메티실린 내성 스태필로코커스 아우레우스 MRSA 균주 ATCC BAA-42에 대한 PlySs2 리신의 최소 억제 농도는 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 결정되었다. 이 값은 MIC 검정에서 환원제(예, DTT 또는 BMS)의 존재하에서 결정된 MIC이다. 환원제는, MIC 값을 측정시 검정들 간에 재현성을 향상시킬 목적을 위해 첨가한다. 생물막 연구는 환원제를 첨가하지 않고서 수행한다. 환원제의 부재하에 BAA-42에 대한 MIC 값은 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다. 이 MIC 값은 앞서 제공된 표에서 확인되는 바와 같이 평균적으로 다른 MRSA 균주에 대한 것과 일치한다(표 2 및 4 참조). MIC는 임상실험표준연구원(CLSI) 문서 M07-A9(Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32(Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute [US], 2012)에 기술된 표준방법에 따른 브로쓰 마이크로희석법(broth microdilution method)을 사용하여 결정하였다.

[0176]

생물막은 문헌[Wu JA et al (2003) Antimicrob Agents and Chemother 47(11):3407-3414]에 기술된 방법을 변형하여 형성하였다. 간단히 설명하면, 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(MRSA) 균주 ATCC BAA-42의 1×10^6 정지기 세포를 1% 글루코즈가 보충된 트립신분해 콩 브로쓰 2 ml 에 접종하고 통기하지 않고 37°C 하에 24-웰 조직 배양 접시에서 18시간 성장시켰다. 부유 세포(비착생 박테리아)를 1X PBS로 세척하여 제거하고, 이어서 잔여 박테리아(고착 또는 생물막 박테리아)를 다양한 농도의 PlySs2 리신 또는 항생제(Sigma-Aldrich로부터 입수한 딥토마이신, 리네졸리드 또는 반코마이신)로 24시간까지 치료하였다. 여러 시점에서(0시간, 2시간, 4시간, 24시간), 웰을 1X PBS로 세척하고, 37°C에서 15분간 대기 전조시켜 고정한 다음, 1% 크리스탈 바이올렛 용액(Sigma-Aldrich) 1 ml 로 염색하여 잔여 생물막을 육안으로 확인하였다. 또한, 크리스탈 바이올렛으로 염색된 생물막의 흡광도를 측정하여 보다 정확하게 정량 비교를 하였다. 도 7은 예시적인 흡광도 연구를 제공한다.

[0177]

초기 연구에서는 BAA-42 MRSA의 생물막을 딥토마이신, 리네졸리드 및 반코마이신의 경우 각각 1000X MIC 농도 ($1000 \mu\text{g}/\text{ml}$)로, PlySs2 리신의 경우 1X MIC(32 μg)로 치료하였다(환원제는 첨가되지 않았다). 모든 MIC 값은 임상실험표준연구원(CLSI) 문서 M07-A9(Methods for dilutional antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. Volume 32(Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute [US], 2012)에 기술된 표준방법에 따른 브로쓰 마이크로희석법(broth microdilution method)을 사용하여 결정하였다. 도 1은 4시간까지 치료된 MRSA 생물막을, 도 2는 6시간까지 치료된 MRSA 생물막을, 도 3은 24시간까지 치료된 MRSA 생물막을 보여준다. 생물막은 1X MIC 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 PlySs2 리신 단독으로 치료되었을 때 2시간내에 제거된다(도 1, 2

및 3). 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1000X MIC)의 담토마이신, 반코마이신 또는 리네졸리드로 치료되었을 때는 4시간 또는 6시간 안에 생물막에 시작적으로 아무런 변화도 보이지 않았다(도 1 및 2). 이 결과는 아주 높은 용량(10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 반코마이신에 대해 생물막의 민감성이 최소로 나타났다는 종전의 보고와 일치한다(Weigel LM et al (2007) Antimicrob Agents and Chemother 51(1):231-238).

[0178] 좀 더 낮은 농도의 PlySs2 리신 및 담토마이신으로 치료된 MRSA 균주 BAA-42의 생물막에 대해 평가하였다. 생물막은 PlySs2의 MIC 미만의 낮은 용량으로 0.5시간, 1시간, 4시간 및 24시간 치료되었다. 상기한 바와 같이, 24 웨л 디쉬에 BAA-42 생물막을 형성하고 웰을 PlySs2 리신 또는 담토마이신 항생제로 치료하였다(적절한 배지 대조군과 함께). PlySs2의 경우, 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/10X MIC 값) 또는 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/100X MIC 값)의 MIC 미만의 용량을 사용하였다. 담토마이신의 경우는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1X MIC 값) 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10X MIC 값)을 사용하였다. 웰을 24시간까지 배양하고, 세척, 고정 및 염색하였다. 도 4는 이 결과를 보여준다. PlySs2 리신은 1/100th MIC에서도 생물막 분해가 관찰된다. 유의한 분해는 PlySs2 리신 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/10X MIC)의 4시간에서 입증되며, 일부 용해 조차도 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/100X MIC)의 4시간에서 관찰된다. 담토마이신은 10X MIC까지의 농도에서 분해가 전혀 관찰되지 않는다.

[0179] 다른 스태필로코커스 리신, 특히, ClyS 리신을 ATCC BAA-42 MRSA 생물막에 대해 사용함으로써 비슷한 MIC 연구를 완성하였다. 스태필로코커스 아우레우스 균주에 대한 ClyS 리신의 MIC는 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 폴리스티린 조직 배양 평판에 웰당 5×10^5 CFU의 스태필로코커스 아우레우스 균주 ATCC BAA-42를 접종하고(0.2% 글루코즈 함유 트립신분해 콩 브로쓰중에) 35°C에서 24시간 배양하여 생물막이 형성되도록 두었다. 생성된 생물막을 3회 세척하여 부유 세포를 제거하고 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ClyS 리신(또는 배지 단독)으로 35°C에서 24시간 치료하였다. 각 웰을 세척하고 2% 크리스털 바이올렛으로 염색하였다. 크리스털 바이올렛은 부착한 생물막을 염색한다. 도 14는 여러 농도의 ClyS를 이용한 결과를 보여준다. ClyS는 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1X MIC) 및 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.1X MIC)에서 생물막을 해체시킨다. 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 염색된 생물막의 감소가 관찰되며, 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 약간의 감소가 관찰된다. 스태필로코커스 리신 ClyS는 스태필로코커스 아우레우스 생물막을 해체시키고 감소시킬 수 있다.

실시예 2

[0181] 담토마이신과 리신과의 병용물을 MIC 미만의 용량으로 생물막에 대해 평가한다. PlySs2 리신과 담토마이신은 스태필로코커스 아우레우스 부유 세포에 상승작용적인 사멸 효과를 발휘하는 것으로 밝혀졌다(미국 가특허원 제 61/644,944호 및 제61/737,239호). 이러한 상승작용 효과가 생물막의 박테리아도 사멸시킬 수 있는지를 연구하기 위하여 일련의 실험을 수행한다. 브로쓰 마이크로히석 체커보드 방법(Spirala MM et al. (2010) Antimicrob Agents and Chemother 54(11):4678-4683)을 96-웰 마이크로티터 디쉬에서 자란 성숙한 스태필로코커스 아우레우스 생물막에 적용한다. 0.2 mL 혼탁액에서 성장시킨 것을 제외하고 상기와 동일한 방식에 의해 성장된 MRSA 균주 ATCC BAA-42의 18시간 생물막에 대해서 리신과 담토마이신의 MIC 미만의 농도의 병용물의 활성을 검사한다. 생물막 형성 후 웰을 1X PBS로 세척하고 PlySs2 단독, 담토마이신 단독 또는 일련의 병용물로 통기하지 않으면서 24시간 치료한다. 이어서, 상기와 같이 생물막을 세척, 고정 및 염색하여 생물막 형성을 평가한다. MIC 미만의 약물 병용물의 효과를 동일한 MIC 미만의 농도의 각 약물 단독의 효과와 비교하여 평가한다.

실시예 3

혼합된 생물막의 시험관내 연구

[0184] PlySs2 리신은, 또한, 담토마이신과의 병용물로 사용하여 다수-종 생물막들도 표적으로 한다. 생물막들은, 흔히, 한 종 이상의 박테리아를 함유한다(Yang L et al (2011) FEMS Immunol and Med 62(3):339-347). PlySs2-민감성 및 담토마이신-민감성 에스. 아우레우스 균주 ATCC BAA-42, 및 PlySs2-내성, 담토마이신-민감성 엔테로코커스 파에칼리스 균주로 이루어진 생물막을 표적으로 하기 위해 PlySs2 리신과 담토마이신을 이용한다. 이. 파에칼리스는 부유형으로의 담토마이신에 민감성이지만, 그럼에도 불구하고 이들은 생물막의 고착 구성원으로서의 담토마이신에 대해 내성이다. 엔테로코커스는, 엔테로코커스가 생물막으로부터 방출되는 경우에만 담토마이신에 대해 내성이 된다. 이러한 방출을 매개하는(그리고, 이에 의해 이. 파에칼리스를 담토마이신에 대해 민감성이 되게 하는) PlySs2의 능력을 시험하기 위해서, 하기의 실험을 수행한다.

[0185] 1×10^6 스태필로코커스 및 1×10^6 엔테로코커스의 초기 접종물을 (각각 단독으로 그리고 함께) 사용하여 상기 기술된 바와 같이 24 웨л 디쉬에서 생물막들을 생성시킨다. 상기 생물막들을 PBS로 세척하고, PlySs2 단독, 담

토마이신 단독, 및 이들의 병용물(일련의 MIC 미만의 병용물을 이용)로 24시간 동안 치료한다. 치료 후, 생물막 웰을 비착생(생 박테리아와 사멸 박테리아 둘 다를 포함)과 착생(생물막 형태)의 두 분획으로 나눈다. 비착생 분획은, 스태필로코커스 및 엔테로코커스의 생존율을 위해 플레이팅하여 상대적인 CFU 수를 측정한다. 이 CFU 수를, 완충액 대조군으로 치료된 생물막의 CFU 수와 비교한다. 동시에, 나머지 생물막을, 초음파로 붕괴시키고 생존율을 위해 플레이팅한다. 이러한 방식으로, PlySs2가, 담토마이신에 의해 사멸될 수 있는 생물막으로부터 이. 파에칼리스의 방출을 매개할 수 있는지를 결정할 수 있다.

[0186] 또한, 생물막을 리신^S항생제^S, 리신^R항생제^R, 리신^R항생제^S 병용물을 이용하여 하기에 주지된 바와 같이 평가한다.

I. 스태필로코커스/엔테로코커스 혼합 생물막 - 상기 기술된 바와 같이 리신 + 항생제로 치료.

II. 스태필로코커스 아우레우스/스태필로코커스 에피더미디스 혼합 생물막 또는 스태필로코커스 에피더미디스 단독 생물막을 생성하고 평가한다. 또한, 스태필로코커스 아우레우스와 스태필로코커스 에피더미디스 박테리아로부터 형성된 생물막을 사용하여 상기와 같이 실험을 수행한다.

III. 스태필로코커스 + 스트렙토코커스 박테리아 병용 생물막, PlySs2 및 담토마이신 또는 다른 항생제로 치료.

[0189] 스태필로코커스 아우레우스와 스트렙토코커스 피오게네스(또는 스트렙토코커스 디스갈락티아에) 둘 다로부터 형성된 생물막을 사용하여 상기와 같이 실험을 수행한다. 스트렙토코커스 피오게네스(A그룹 스트렙토코커스) 및 스트렙토코커스 디스갈락티아에(B그룹 스트렙토코커스) 둘 다는 PlySs2에 민감성이기 때문에 이들 실험은 담토마이신을 사용하지 않는다. 대신, 단독의 PlySs2 리신을 스태필로코커스와 스트렙토코커스로 구성된 혼합 생물막 내의 유기체를 붕괴시키고 사멸시키는 효능에 대해 평가한다.

실시예 4

시험관내 카테터-기본 생물막 모델

[0190] 유치 기구와 연관된 스태필로코커스 아우레우스 감염은 박테리아 생물막이 통상적인 항생제에 저항하는 성질때문에 치료가 아주 곤란할 수 있고, 일반적으로 카테터와 같은 감염 기구는 어쩔 수 없이 제거해야 한다. 각종 항생제들이 투여될 수 있고 기구 착생 박테리아의 대부분이 제거된 것처럼 보일 수 있으나 불과 수일안에 감염 재발이 나타난다. 이러한 이유로 확실한 것은 생물막에 남아 존속한 스태필로코커스가 점차 증식하여 생물막 군체를 재형성하고 기구 자리나 다른 위치에 감염을 다시 퍼뜨리기 때문이다(Darouiche RO (2004) N Engl J Med 350:1422-1429). 따라서, 생물막내의 스태필로코커스를 신속히 사멸시키면서 부유 박테리아에도 효과를 나타낼 수 있는 치료는 상당히 이로운 방법이 될 수 있다. PlySs2 리신은 앞선 실시예에서 스태필로코커스 아우레우스 생물막을 시험관내에서 신속하고 효과적으로 제거하는 것으로 입증된다. 이번 연구는 마우스의 생체내에 이식된 카테터상에 설정된 스태필로코커스 아우레우스 생물막을 PlySs2 리신이 박멸하는 능력을 평가한다.

[0191] 옆구리 피하, 복강내 또는 대퇴부 근육 안쪽에 이식된 카테터를 이용하여 카테터-기본 모델을 평가하였다(Zhu Y et al (2007) Infect Immunol 75(9):4219-4226의 방법을 변형함). 카테터-기본 뮤린 모델을 사용하여 생체내에서 생물막 생존율에 미치는 PlySs2의 영향을 평가한다. 이식에 앞서, 카테터 관(가소제로서 DEHP[디(2-에틸헥실)프탈레이트]가 함유된 PVC(폴리비닐 클로라이드); CareFusion SmartSite infusion set, #72023)의 소영역(segment)상에 생물막을 시험관내에서 성장시킨다. 각 2 인치 카테터의 관에 2×10^7 CFU의 스태필로코커스 아우레우스를 함유하고 0.25% 글루코즈가 보충된 200 μl 의 트립신분해 콩 브로쓰(TSB)를 접종하고 37°C에서 72시간 동안 생물막을 형성시킨다. 다른 방법으로는, 카테터를 2 mm 소영역으로 절단하여 0.25% 글루코즈가 보충된 1.0 ml의 TSB 접종물에 넣고 이식하기 전 3일간 신선한 배지로 매일 옮겨준다. 6-8주령 Balb/c 마우스에 0.15 ml의 100 mg/kg 케타민과 10 mg/kg 자일라진(Butler-Schein)을 복강내 주사하여 마취시킨다. 카테터 절편을 마우스의 각 옆구리에 피하 이식하거나 복강 안쪽에 또는 대퇴부 근육내에 이식한다. 5 내지 10 마리의 마우스로 구성된 여러 그룹들에 생물막이 착생되었다. 착생 후 1-24시간 시점에 마우스를 적당량의 PlySs2, 항생제, 또는 비히클, 또는 PlySs2 + 항생제의 병용물로 치료한다. 각 그룹의 모든 마우스는 감염 후 1-4일 시점에 인도적으로 살처분하였다. 생물막 형성을 정량하기 위하여, 감염된 카테터를 살처분 직후 제거하고 무균 PBS중에서 유연하게 3회 세척하여 비착생 박테리아를 제거한 다음, 5 ml의 무균 PBS중에 담갔다. 착생 박테리아는 초음파(sonication)에 의해 카테터로부터 제거한다. 이어서, 회수된 박테리아의 수를 연속 희석과 적당한 선별 배지에서의 평판 계수에 의해 정량한다. 다른 방법으로, 세척된 카테터를 메틸렌 블루중에서 15분간 항온배양하여 염색하고, 5 ml의 무균 PBS중에서 2회 세척하여 육안 검사하였다. 이후 실온하에 0.2 ml의 30%

아세트산중에서 탈색하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 메틸렌 블루 색소를 정량할 수 있다. 잔여 생물막 농도의 양은 600 nm 흡광도 측정값을 카테터 절편 중량으로 나눈 값으로 결정된다(OD_{600}/gm).

[0195] 도 15는 3일간 형성된 스태필로코커스 아우레우스(MRSA 균주 ATCC BAA-42) 생물막이 착생된 카테터를 마우스의 피하 공간에 이식한 다음 이식 후 24시간째에 치료한 카테터 연구의 결과를 제공한다. 각 마우스에 2개의 카테터를 이식하고 2마리 마우스를 다음과 같은 각 조건에 대해 평가하였다: 음성 대조군(생물막 없음, 작용제 없음), PlySs2 대조군(생물막 없고 PlySs2 작용제로 치료), 비히클 단독, PlySs2 복강내 투여(IP), PlySs2 정맥내 투여(IV) 및 PlySs2 피하 투여(SC). PlySs2는 100 μ g의 단일 볼루스(bolus)로 투여하였다(마우스의 5 mg/kg 및 용량 약 50 μ g/ml에 해당함). 치료 후 6시간째에 카테터를 제거하고 메틸렌 블루로 염색하였다. 도 15는 각 조건하의 상대적 염색량(600 nm에서 육안검사)을 보여준다. IP, IV 및 SC 용량 각각은 염색을 감소시켰고, 이 가운데 피하 볼루스 치료는 카테터내 염색을 대조 수준에 근사한 정도로 제거하였다.

[0196] 실시예 5

[0197] 다른 조의 실험에서, 마우스에 이식된 경정맥 카테터에 PlySs2 리신을 사전 주입함으로써 마우스가 생물막 감염으로부터 보호되는지를 평가한다. 상기된 경정맥 카테터 동물 모델을 이용하여, 스태필로코커스 아우레우스 챌린지(challenge) 24시간 전에 마우스의 경정맥에 이식된 카테터에 PBS중의 PlySs2 리신을 주입하여 카테터를 사전 처리해둔다. 대조 동물의 경우는 카테터를 PBS 단독으로 사전 처리한다. 챌린지 당일의 챌린지 2시간 전에 모든 카테터를 PBS로 관류하여 과량의 미결합 리신을 제거한 다음, 상기한 바와 같이 마우스의 꼬리를 통해 마우스에 스태필로코커스 아우레우스를 챌린지한다. 박테리아 챌린지 후 여러 날짜에서 챌린지 동물을 사멸시킨 후 카테터와 기관을 회수하고 상기한 바와 같이 박테리아를 정량하였다.

[0198] 실시예 6

[0199] 스태필로코커스 심내막염은 실험에 의해 래트의 대동맥판에 유도할 수 있는 생물막-원인성 감염이다(Entenza JM et al (2005) IAI 73:990-998). 간단하게 설명하면, 래트에 무균 대동맥 베지테이션(aortic vegetation)을 생성하고 리신을 전달하기 위한 주입 펌프를 공지된 바와 같이 설치한다(Entenza et al). 10^5 내지 10^7 스태필로코커스로 정맥내 챌린지하여 24시간 후에 심내막염을 유도한다. 감염 후 24 또는 48시간 시점에 리신 및/또는 항생제(예, 담토마이신, 반코마이신 또는 리네졸리드)를 정맥내 투여한다. 래트 대조군에는 완충액만 투여한다. 감염 후 72시간까지 여러 시점에서, 동물을 사멸시키고 정량 혈액 및 베지테이션 배양을 실시하였다. 박테리아 밀도는 각각 mL당 \log_{10} CFU 또는 조직 그램당 \log_{10} CFU로 표시한다.

[0200] 실시예 7

[0201] PlySs2와 치료기준 항생제의 상대적인 생물막 박멸 활성을 비교하기 위하여, MRSA 생물막에 대한 PlySs2와 항생제 활성의 24시간 시간별 분석을 수행하였다. 웰당 0.2% 글루코즈가 함유된 0.5 ml 트립신분해 콩 브로쓰(TSB+)에 10^5 박테리아(MRSA 균주 ATCC BAA-42)를 접종함으로써 24-웰 폴리스티렌 평판에 생물막을 형성하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 평가하고자 하는 각각의 치료 시점(0, 0.5, 1, 2, 4, 6 및 24시간)에 대해 한 개의 평판을 준비하였다. 24시간 후에 배지를 흡인하고, 웰을 1X PBS로 2회 세척한 다음, 약물을 첨가하여 치료 시점을 개시하였다. 1 ml MHB2(또는 ml당 50 μ g CaCl₂가 보충된 MHB2)중의 표시된 약물 농도(담토마이신, 반코마이신 또는 리네졸리드의 경우 1000X MIC; PlySs2 리신의 경우 1X MIC)를 각 웰에 첨가하고 표시된 기간 동안 배양한 후 흡인하고, 1X PBS로 2회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시켰다. 웰을 3% 크리스탈 바이올렛 용액 1ml로 5분간 염색한 후, 흡인하고, 1X PBS로 3회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시키고, 사진촬영하였다. 모든 실험은 2중으로 수행하였다. 도 6 및 7은 그 결과를 보여준다. 도 6은 웰의 크리스탈 바이올렛 염색을 보여주고, 도 7은 평판의 웰에 남아있는 색소의 정량값을 보여준다. PlySs2는 1X MIC에서 2시간안에 생물막을 완전히 제거한 반면, 1000X MIC 농도의 담토마이신, 반코마이신 및 리네졸리드는 24시간째에 생물막 제거를 보여주지 못했다.

[0202] MIC 미만의 농도의 PlySs2가 생물막을 치료하는 능력을 결정하기 위하여, 24시간 시간별 분석을 수행하였다. 웰당 0.2% 글루코즈가 함유된 0.5 ml 트립신분해 콩 브로쓰(TSB+)에 10^5 박테리아(MRSA 균주 ATCC BAA-42)를 접종함으로써 24-웰 폴리스티렌 평판에 생물막을 형성하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 평가하고자 하는 각각의 치료 시점(30분, 1시간, 4시간 및 24시간)에 대해 한 개의 평판을 준비하였다. 24시간 후에 배지를 흡인하고, 웰을 1X PBS로 2회 세척한 다음, PlySs2를 첨가하여 치료 시점을 개시하였다. 1 ml MHB2중의 표시된 PlySs2 농도(0.1X MIC 및 0.01X MIC) 또는 배지 단독을 각 웰에 첨가하고 표시된 기간 동안 배양한 후 흡인하고, 1X PBS로 2회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시켰다. 웰을 3% 크리스탈 바이올렛 용액 1 ml로 5분간 염색한 후,

흡인하고, 1X PBS로 3회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시키고, 사진촬영하였다. 모든 실험은 2중으로 수행하였다. 도 8은 그 결과를 보여준다. 0.1X MIC의 PlySs2는 4시간안에 생물막을 제거하였다. 0.01X MIC의 PlySs2는 4시간째에 부분 제거를 제공하였고 24시간째에서는 완전히 제거하는 것으로 관찰되었다.

[0203] 실시예 8

카테터상에 자란 MRSA 생물막에 대한 PlySs2와 담토마이신의 생물막 박멸 활성을 평가하였다. 카테터 관(가소제로서 DEHP[디(2-에틸헥실)프탈레이트]를 함유하는 PVC(폴리비닐 클로라이드), CareFusion SmartSite infusion set, #72023)의 2인치 소영역에 소영역당 0.2% 글루코즈 함유 트립신분해 콩 브로쓰(TSB+) 0.2ml에 10^5 박테리아(MRSA 균주 ATCC BAA-42)를 접종하여 생물막을 형성하고 37°C에서 72시간 배양하였다. 모든 시료는 메틸렌 블루 염색 또는 CFU 정량을 위해 이중으로 준비하였다. 72시간 후에 배지를 관류 제거하고 소영역들을 1 ml의 1X PBS로 세척한 후, 치료 약물을 가했다. 젖산 링거액 0.2 ml중의 표시 농도의 약물(담토마이신의 경우 1X MIC 및 1000X MIC, PlySs2의 경우 1X MIC)을 각 소영역에 가하고 24시간 배양한 후 관류하고 1 ml의 1X PBS로 세척하였다. 이후 이중 시료를 다음과 같이 검사하였다: 생물막 박멸을 평가하기 위하여, 소영역을 0.02% 메틸렌 블루 수용액 0.22 ml로 15분간 염색하였다. 소영역을 관류하고, 중류수로 3회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시키고 사진촬영하였다. 잔여 생물막에 존재하는 살아있는 세포의 양을 정량하기 위하여 2중 소영역을 0.22 ml의 용해 완충액(젖산 링거액중의 100 μ g/ml 리소스타핀)으로 8분간 치료하였다. 이어서, 0.1 ml 시료를 제거하고, 96-웰 솔리드 화이트 폴리스티렌 평판에 첨가한 다음, 0.1 ml의 Promega BacTiter-Glo 루시페린/루시페라제 시약과 혼합한 후 즉시 키트 제조사의 지침에 따라 상대 라이트 유닛(RLU)를 측정하고 박테리아의 기지 농도와 RLU 값의 공지된 표준 상관 곡선과 비교하였다. 이러한 방식으로 각 생물막의 박테리아 CFU 값을 결정하였다.

[0205] 도 9는 그 결과를 보여준다. 도 9a는 상대적인 생물막 염색을 보여준다. PlySs2는 1X MIC에서 카테터의 생물막을 완전히 제거하였고, 반면에 담토마이신은 1000X MIC에서도 생물막을 유의하게 제거하지 못했다. 도 9b에서 보는 바와 같이, PlySs2는 1X MIC에서 CFU를 검출 한계값인 100 CFU/ml로 감소시켰고, 반면에 담토마이신은 1X MIC에서 CFU 감소를 보이지 않았고 1000X MIC 담토마이신에서 2 로그 감소(일억 CFU/ml로부터 백만 CFU/ml로)가 관찰되었다.

[0206] 카테터로부터 생물막을 박멸하는데 필요한 최저량의 PlySs2를 결정하기 위하여, 적정 실험을 실시하였다(도 10). DEHP 카테터 관의 2cm 소영역에 소영역당 0.2% 글루코즈 함유 트립신분해 콩 브로쓰(TSB+) 0.2 ml에 10^5 박테리아(MRSA 균주 ATCC BAA-42)를 접종하고 37°C에서 72시간 배양하여 생물막을 형성하였다. 72시간 후에 배지를 관류 제거하고 소영역들을 1 ml의 1X PBS로 세척한 후, 치료 약물을 가했다. 젖산 링거액 0.2 ml중의 표시 농도의 약물(PlySs2의 1X, 0.1X, 0.01X, 0.001X, 0.0001X 및 0.00001X MIC)을 각 소영역에 가하고 24시간 배양한 후 관류하고 1 ml의 1X PBS로 세척하였다. 소영역을 0.02% 메틸렌 블루 수용액 0.22 ml로 15분간 염색하였다. 소영역을 관류하고, 중류수로 3회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시키고 사진촬영하였다. 염색에 의해 결정된 것으로 생물막을 완전히 박멸하는데 필요한 PlySs2의 양은 0.01X MIC(0.32 μ g/ml)이었다(도 10). 마찬가지로 담토마이신(1X, 10X, 100X, 1000X, 5000X MIC)으로 적정 분석한 결과 5000X MIC(5 mg/ml)의 담토마이신 농도가 생물막을 제거하지 못했다(도 11).

[0207] 생물막을 리신 또는 항생제로 치료한 후 잔여 CFU를 정량하기 위하여 도 10 및 도 11에서 평가된 2중 소영역을 0.22 ml의 용해 완충액(젖산 링거액 중의 리소스타핀 100 μ g/ml)으로 8분간 치료하였다. 이어서, 0.1 ml 시료를 제거하고, 96-웰 솔리드 화이트 폴리스티렌 평판에 첨가한 다음, 0.1 ml의 Promega BacTiter-Glo 루시페린/루시페라제 시약과 혼합한 후 즉시 키트 제조사의 지침에 따라 상대 라이트 유닛(RLU)를 측정하고 박테리아의 기지 농도와 RLU 값의 공지된 표준 상관 곡선과 비교하였다. 이러한 방식으로 각 생물막의 박테리아 CFU 값을 결정하였다. 적정 분석으로 메틸렌 블루 염색의 결과를 검증하였고 도 13은 그 결과를 보여준다. PlySs2는 0.01X MIC 농도에서 생물막 박테리아를 제거하고 감소시키는데 활성적인 반면, 담토마이신은 5000X MIC의 농도에서도 완전히 효과가 없다.

[0208] 이어서, MRSA 카테터 생물막에 대한 PlySs2 활성을 시간별로 분석하였다(도 12). DEHP 카테터 관의 2인치 소영역에 소영역당 0.2% 글루코즈 함유 트립신분해 콩 브로쓰(TSB+) 0.2 ml에 10^5 박테리아(MRSA 균주 ATCC BAA-42)를 접종하여 생물막을 형성하고 37°C에서 72시간 배양하였다. 각각의 표시된 시점(0분, 5분, 15분, 30분, 60분, 90분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간)에 대해 2개의 시료를 준비하고 메틸렌 블루 염색과 CFU 정량을 실시하였다. 72시간 후에 배지를 관류 제거하고 소영역들을 1 ml의 1X PBS로 세척한 후, 치료 약물을 가했다. 젖산 링거액 0.2 ml중의 PlySs2(1X MIC 농도 또는 32 μ g/ml)을 각 소영역에 가하고 표시된 시간 동안 배양한 후 관류하

고 1 ml의 1X PBS로 세척하였다. 이후 이중 시료를 각 시점에서 다음과 같이 검사하였다: 소영역을 0.02% 메틸렌 블루 수용액 0.22 ml로 15분간 염색하였다. 소영역을 관류하고, 중류수로 3회 세척한 다음, 15분간 대기 건조시키고 사진촬영하였다. 2중 소영역을 0.22 ml의 용해 완충액(젖산 링거액중의 100 μ g/ml 리소스타핀)으로 8분간 치료하였다. 이어서, 0.1 ml 시료를 제거하고, 96-웰 솔리드 화이트 폴리스티렌 평판에 첨가한 다음, 0.1 ml의 Promega BacTiter-Glo 루시페린/루시페라제 시약과 혼합한 후 즉시 키트 제조사의 지침에 따라 상대 라이트 유닛(RLU)를 측정하고 박테리아의 기지 농도와 RLU 값의 공지된 표준 상관 곡선과 비교하였다. 이러한 방식으로 각 생물막의 박테리아 CFU 값을 결정하였다. 시간별 분석 결과 1X MIC PlySs2에 의해 시간이 경과하면서 염색되는 생물막이 카테터로부터 점진적으로 제거되어 60분안에 완전히 제거되었다(도 12a). CFU 분석에서도 유사하게 점진적인 시간 경과가 나타났고 60분안에 CFU 값이 검출 한계값(100 CFU/ml)에 이르렀다(도 12b).

[0209] 실시예 9

[0210] 가상 카테터 세트에서의 PlySs2의 안정성을 결정하기 위하여, PlySs2를 젖산 링거액 중에 여러 농도로 하여 37°C에서 항온배양하였다. 7일 후 1×10^5 스태필로코커스를 가하고, 4시간 배양한 후 다음 프로테이나제 K를 치료하여 잔여 PlySs2를 제거하고, 연속 희석하고 플레이팅하여 생존율을 결정함으로써 PlySs2의 용해 활성을 평가하였다. 각 조건에서 수득한 CFU 값을 1×10^5 으로 나누어 활성 소실율(%)을 결정하였다.

[0211] 표 6은 그 결과를 보여준다. 37°C 하에 젖산 링거액 중에서 7일 항온배양 후에, PlySs2의 10X 및 100X MIC 농도에서는 검출할 수 없는 활성 소실이 관찰된 한편 1X MIC 시료에서는 58.3% 소실이 결정되었다.

표 6

젖산 링거액 중의 37°C에서의 PlySs2 안정성

치료	활성의 손실율(%) (7일)
1X MIC	58.3
10X MIC	<0.002
100X MIC	<0.002

[0212]

[0213] 위 결과는 가상 카테터 세트에서 PlySs2가 적어도 7일까지는 활성적이고 안정하며 스태필로코커스를 효과적으로 사멸시킬 수 있고 그럼으로써 젖산 링거액(대표적인 표준치료 IV 및 관류 용액)에서 항온배양 시간을 연장한 후에도 박테리아 콜로니화를 예방할 수 있다.

[0214] 실시예 10

[0215] 카테터 관에 리신을 치료한 후 또는 치료한 때 생물막으로부터 떨어져서 관내 액상에 혼탁되는 박테리아의 생존율을 결정하고 관내 살균상태를 평가하는 시간별 연구를 수행하였다. 상기된 도 12는 1시간 안에 벽에 부착된 생물막들이 제거되고 완전히 해체된다는 것을 입증하였다. 본 연구에서, 살아있는 세포를 검출하는 CFU 분석에 의해 평가된 것으로, 관내 박테리아의 살균(완전한 사멸)은 약 6 내지 24시간의 범위에서 일어난다. 균주 ATCC BAA-42로 37°C에서 3일간 생물막을 형성하였다. 생물막을 1X PBS로 치료하여 부유 세포를 제거하고, 젖산 링거액(완충액 대조군) 또는 PlySs2 리신(1X MIC 농도) 함유 젖산 링거액, 담토마이신(1X MIC 농도) 함유 젖산 링거액 및 PlySs2 리신(10X MIC 농도)로 치료하였다. 생물막을 24시간까지 치료하였고, 이때 2분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 6시간 및 24시간의 시점에 CFU를 평가하였다. 각 시점에서, 카테터의 관 내용물을 제거하고 플레이팅하여 생존율을 결정하였다. 도 16은 1X MIC(32 μ g/ml), 1X MIC 담토마이신 및 10X MIC(320 μ g/ml)의 치료군 대 완충액 단독의 결과를 보여준다.

[0216] 실시예 11

[0217] 스태필로코커스 에피데미디스 생물막에 대한 리신의 효능을 평가하였다. 다양한 스태필로코커스 에피데미디스의 생물막을 폴리스티렌 24-웰 마이크로티터 평판에서 형성하고 PlySs2 리신으로 치료하여 각 균주에 대한 PlySs2의 최소 억제 농도(MIC) 및 생물막 박멸 농도(BEC)를 결정하였다. 아래 표 7은 20주의 독립적인 스태필로코커스 에피데미디스 균주에 대한 결과를 보여준다. MIC(마이크로그램/ml)는 앞선 실시예에 기술 및 인용된 표준 CLSI 브로쓰 마이크로희석법을 이용하여 결정 및 산출하였다. PlySs2의 생물막 박멸 농도(BEC, 마이크로그램/ml)는

표시된 균주의 24시간 생물막을 완전히 파괴시키는 회석 범위에서 최소 농도이다.

[0218] BEC를 결정하기 위하여, 24웰 평판에 24시간 생물막을 성장시키고, PBS로 2회 세척한 다음, 젖산 링거액에 조성된 PlySs2(회석 범위)로 치료하거나 PlySs2가 없이 치료하였다. 치료된 평판을 37°C(주변 공기)에서 24시간 배양하고, PBS로 세척한 다음, 크리스털 바이올렛(CV)으로 15분간 염색하였다. 이어서, 각 웰에서 CV 색소를 33% 아세트산 1 mL중에 용해시킨 후, 200 μL의 용해된 CV로 흡광도(OD_{600nm})를 측정하였다. 웰의 흡광도를 리신이 없는 웰(생물막 대조군)의 흡광도로 나누어 생물막 비율(%)을 결정하였다. BEC는 >75%의 생물막 제거율을 나타내는 값으로서 결정하였다.

표 7

CFS	유형	명칭	MIC	BEC
166	스테필로코커스 에피데르미디스	환경적 실험실 오염물질; NY, NY, 16S rRNA 서열분석	na	5.12
224	스테필로코커스 에피데르미디스	HER 1292	512	5.12
225	스테필로코커스 에피데르미디스	HPH-6	128	0.512
226	스테필로코커스 에피데르미디스	HPH-5	512	5.12
227	스테필로코커스 에피데르미디스	HCN-4	>512	5.12
272	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS53 (VISE)	128	0.215
280	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS101 (MRSE)	128	0.512
300	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS8, (VISE)	32	0.512
313	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS34 (VISE)	8	0.512
533	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS6; (VISE); 혈류 USA	>512	0.512
552	스테필로코커스 에피데르미디스	ATCC #12228 (MSSE)	na	51.2
769	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS101	64	0.512
1152	스테필로코커스 에피데르미디스	ATCC-14990	na	5.12
1154	스테필로코커스 에피데르미디스	ATCC-49461	na	5.12
1161	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS850-VCU028	na	5.12
1164	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS853-VCU041	na	5.12
1165	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS854-VCU045	na	5.12
1168	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS857-VCU065	na	0.512
1174	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS864-VCU112	na	51.2
1184	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS874-VCU126 9	na	5.12
1185	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS875-VCU127	na	5.12
1186	스테필로코커스 에피데르미디스	NRS876-VCU128	na	0.512

MIC = 표준 CLSI 브로쓰 마이크로회석 법에 의해 산출된 PlySs2의 최소 저해 농도(μg/ml).
na는, 이용불가능한 데이터를 나타낸다.

BEC = PlySs2의 생물막 박멸 농도(μg/ml)는, 표시된 균주의 24시간 생물막을 완전히 파괴하는 회석 범위의 최저 농도이다.

[0219]

[0220] 이들 결과는 스타필로코커스 에피데르미디스 생물막에 대한 PlySs2 리신의 강력한 활성을 입증한다. 특히, 강력한

활성은 높은 PlySs2 MIC 에피더미디스 생물막의 균주에까지 영향을 발휘한다. 특히, 강력한 활성은 높은 PlySs2 MIC의 균주에까지 영향을 미친다. 이를 데이터는 PlySs2가 넓은 범위의 스태필로코커스 에피더미디스 생물막에 대해 활성을 나타낼 수 있음을 가리킨다.

[0221] 카테터 내의 스태필로코커스 에피더미디스 생물막을 PlySs2로 치료하고 상기한 스태필로코커스 아우레우스 연구 방법을 이용하여 평가하였다. 스태필로코커스 아우레우스는 앞서 기술한 스태필로코커스 아우레우스 균주만큼 강력하게 카테터에 생물막을 형성하지는 않지만 생물막 성장은 발생하여 평가할 수 있었다.

[0222] 도 17은 카테터상의 스태필로코커스 에피더미디스(반코마이신 중간 민감성 스태필로코커스 에피더미디스(VISE) 균주인 CFS 313 NRS34) 생물막을 10X MIC 미만의 PlySs2로 치료한 연구 결과를 보여준다. 스태필로코커스 에피더미디스 생물막은 0.1X MIC 미만의 PlySs2 농도에서 파괴되었다. 이때의 MIC는 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 비슷한 결과와 유사한 수준의 활성이 스태필로코커스 아우레우스 CFS 218(MRSA 균주 ATCC BAA-42)에서도 관찰되었다.

실시예 12

[0224] 도 18은 생물막 예방 검정의 결과를 보여준다. 24웰 평판에서 한 횡렬의 각 웰에 함유된 2 mL 의 TSB+0.2% 글루코즈에 스태필로코커스 아우레우스 MRSA 균주 BAA-42(5×10^5 박테리아/ mL)를 접종하였다. 그 즉시 1X MIC(32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0.1X MIC, 0.01X MIC, 0.001X MIC 및 0.0001X MIC의 리신 PlySs2를 첨가하고 주변 공기하에 37°C에서 6시간 배양하였다. 웰을 PBS로 세척하고, 크리스털 바이올렛으로 염색한 후 사진촬영하여 각 조건하에서의 생물막 형성을 평가하였다. 동시에 완충액 대조군도 평가하였다. 이 연구에서, 박테리아와 리신 PlySs2(다른 농도)는 동시에 첨가되었고 생물막 형성은 6시간 진행되도록 두었다. 도 18에 제시된 바와 같이, 1X MIC 및 0.1X MIC의 PlySs2를 이용한 전배양은 이후의 생물막 형성을 효과적으로 및 완전히 예방할 수 있다. 따라서, PlySs2는 이미 형성된 생물막을 박멸할 수 있을 뿐만 아니라 생물막의 새로운 형성도 예방할 수 있다.

실시예 13

[0225] 상기된 바와 같이 BAA-42 MRSA에 의해 형성된 생물막과 별도로, 추가하여 스태필로코커스 아우레우스 균주 생물막의 PlySs2 리신에 대한 민감성을 평가하였다. 상기 방법을 이용한 카테터 연구에서 MRSA 균주 CFS 553(ATCC 43300)(도 19) 및 CFS 992(JMI 5381) 각각을 평가하였다. 각 경우에, 3일된 생물막을 세척하고 표시된 PlySs2 농도로 4시간 치료하였다. 균주 ATCC 4330에 대한 1X MIC는 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 균주 JMI 5381에 대한 1X MIC는 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 도 19 및 20에 제시된 바와 같이, 이를 MRSA 균주 생물막은 PlySs2에 민감하였고 PlySs2는 10X MIC, 1X MIC 및 0.1X MIC의 양에서 카테터 생물막을 박멸하고 완전히 해체시켰다. 0.01X MIC PlySs2의 사용에 의해 각 균주의 생물막이 유의하게 감소되었다.

실시예 14

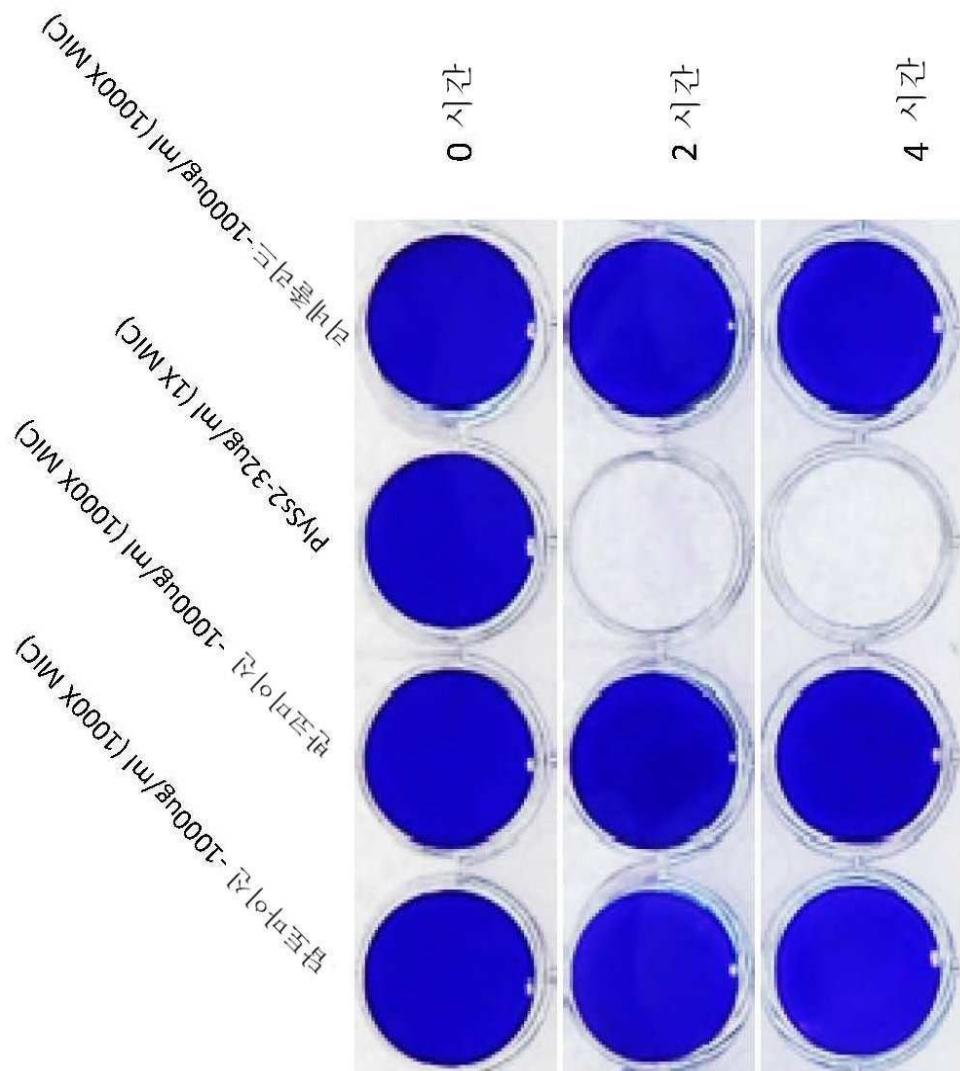
[0226] 상기와 같이 카테터 관(가소제로 DEHP가 사용된 PVC)에 생물막을 형성하고 PlySs2 민감성에 대해 주사전자현미경(SEM)으로 평가하였다. 카테터 표면에서 3일된 MRSA 균주 CFS 218(MRSA 균주 ATCC BAA-42) 생물막을 젖산 링거액중의 1X MIC 농도(즉, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PlySs2로 30초 또는 15분간 치료하고 세척한 후 잔여 생물막을 글루테르알데하이드로 고정하였다. 카테터 표면에 고정된 시료를 어는 정도 방치해 둔 다음, 5000배 확대하에 주사전사현미경으로 분석하였다(도 21). 완충액 단독(즉, 젖산 링거액 단독) 치료가 대조군으로 포함되었다. 도 21에서 보는 바와 같이, PlySs2 치료는 MRSA 생물막을 신속하게 감소시켰고(30분내), 15분 안에 생물막이 거의 완전히 제거되었다.

[0227] 본 발명은 이의 핵심 또는 본질적인 특징에서 벗어나지 않으면서 다른 형태로 구현되거나 다른 방식으로 실시될 수 있다. 따라서, 본원 내용은 모든 양상에서 제한적인 것이 아니고 예시적인 것으로서 고려되어야 하고, 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해 확정되며, 균등의 의미 및 범위에 속하는 모든 변화는 분명히 본 발명에 포함된다.

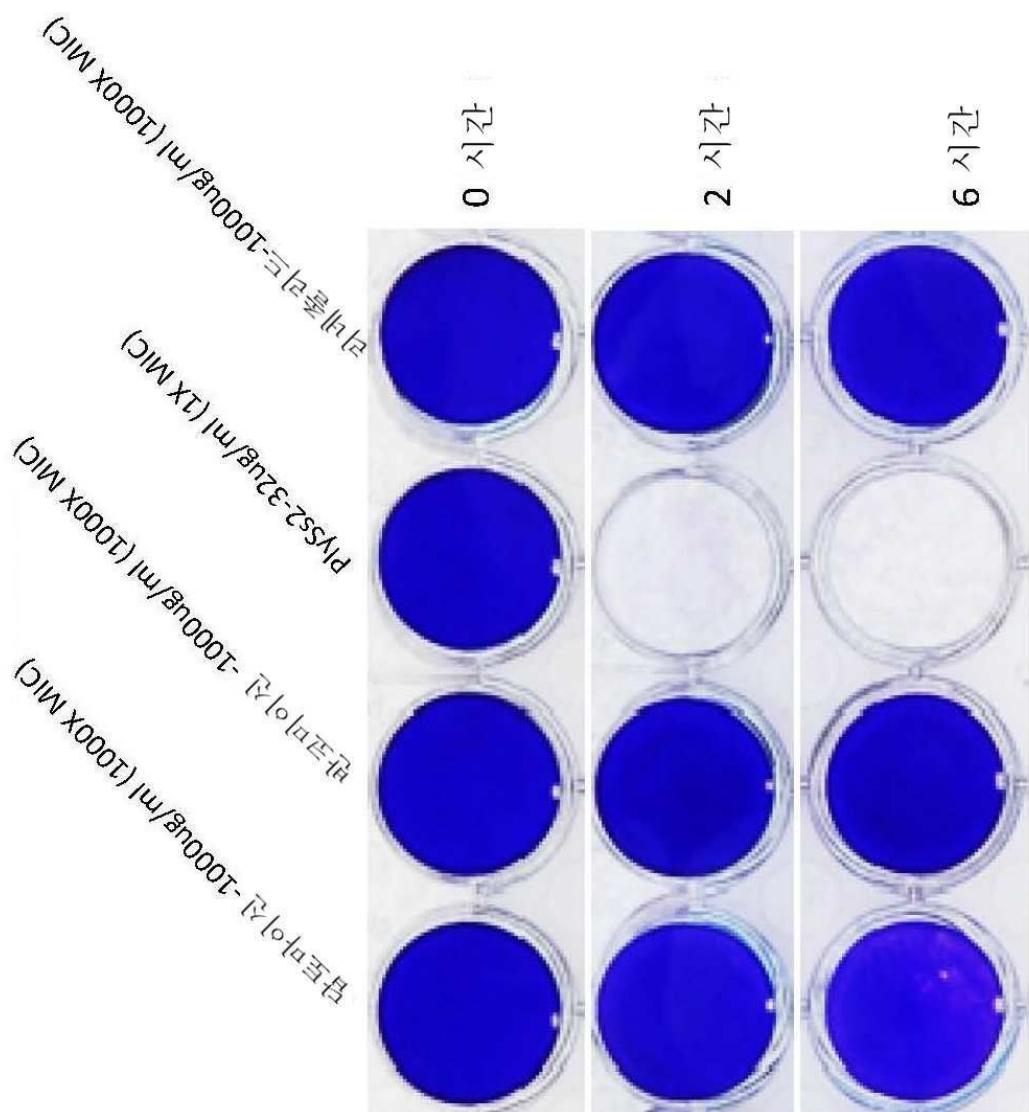
[0228] 본원 명세서에는 여러 참조문헌들이 인용되고 있는데 각 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

도면

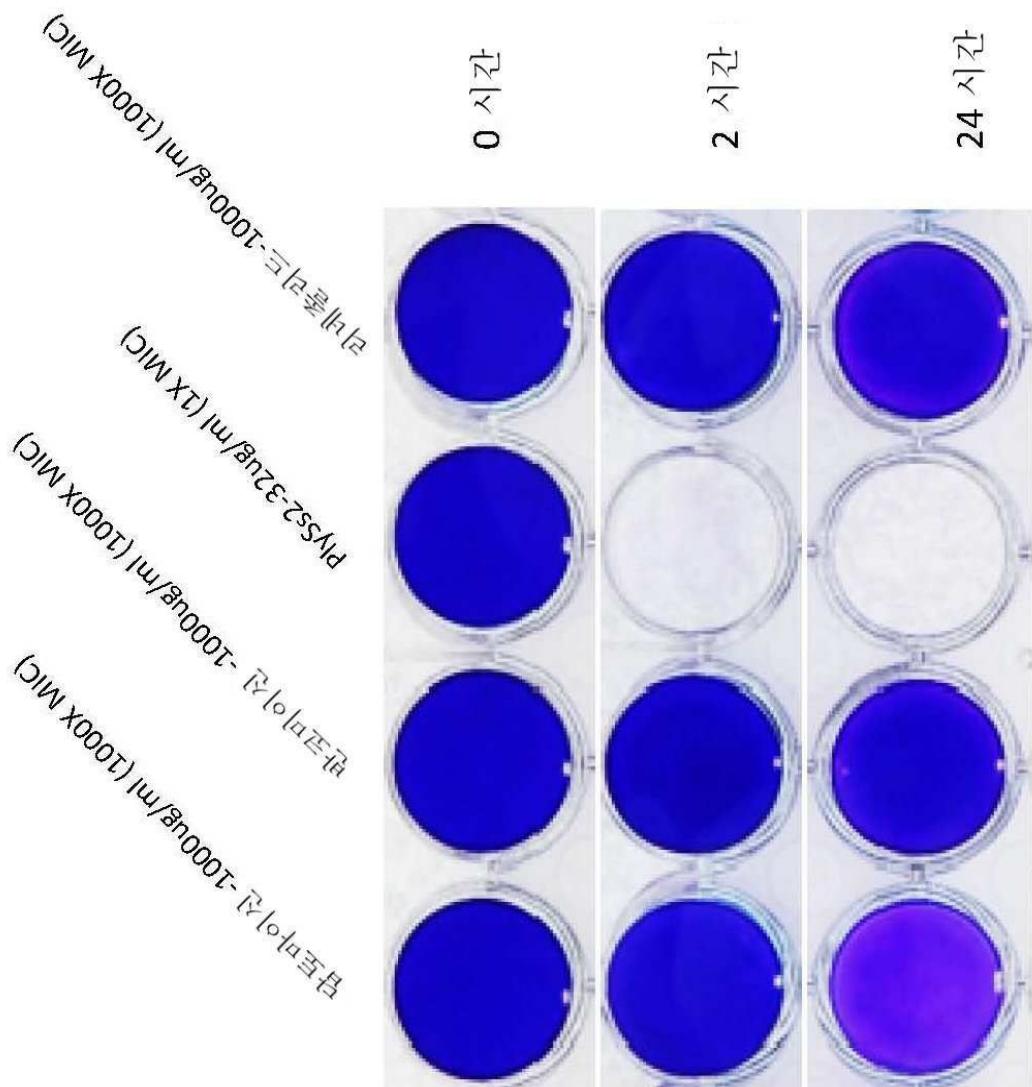
도면1



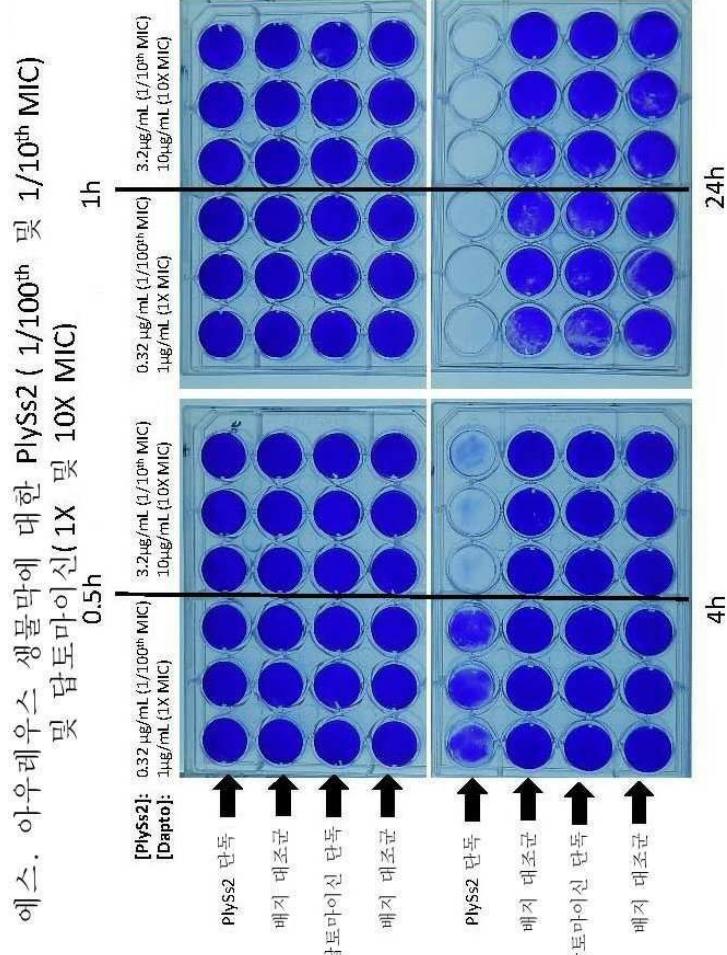
도면2



도면3



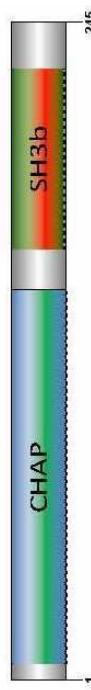
도면4



도면5

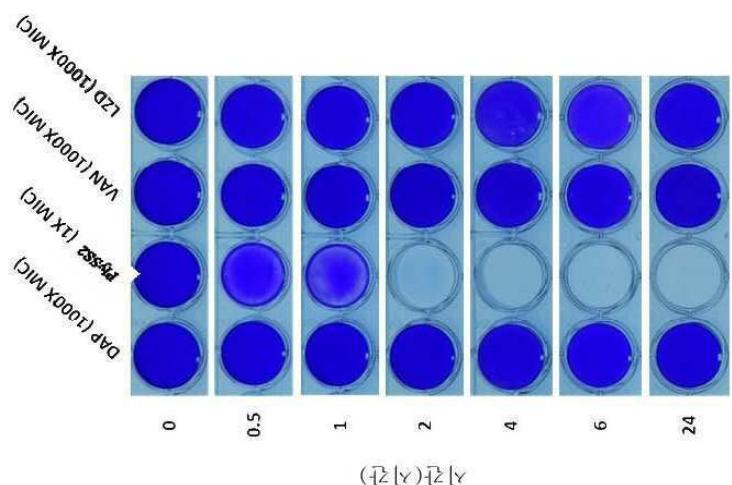
MTTVNEALNN VRAQVGSVSV VGENGE₁CYALLA SWTERMISPD ATVGLGAGVG WVSGAIGDTI SAKNTGSSYN
 WQANGWIVST SGDFEKQQIV TIGATPGNPV GHVIVEAHD GDRLTILEQN YGGKRYPVRN YISSAASYRQO
 VVHYITPPGT VAQSAFNLAG SRSYRETGIM TVTVDALNVR RAPNTSGEIV AVYKRGESFD YDTVILIDVNG
 YVWVSYIGGS GKRNYVATGA TKDGKR.FGNA WGTEFK

노색 LNNVR...VHYIT에 19) CHAP 도메인
 적색 RSYRE...GKRNYVAT에 19) SH3-5 도메인

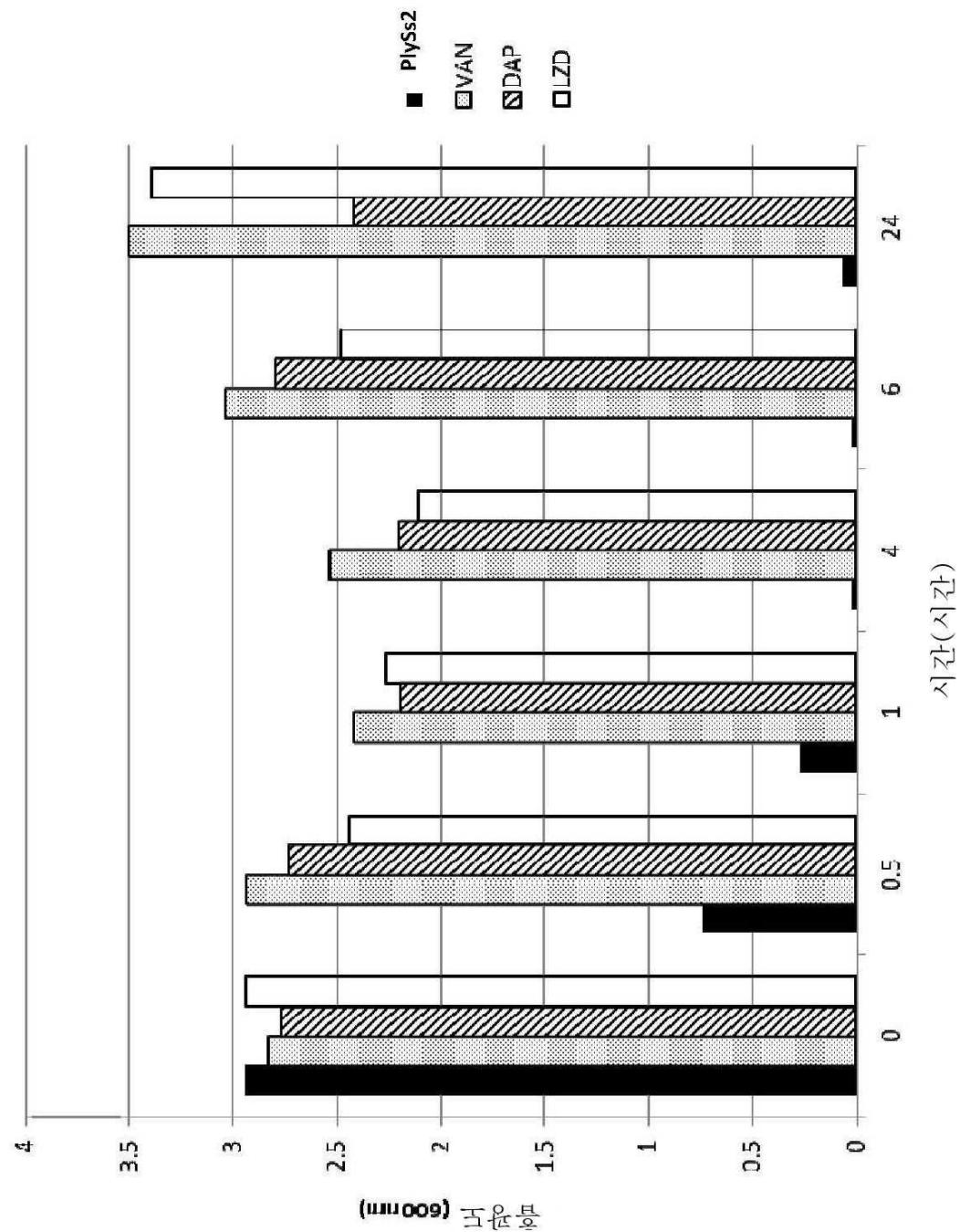


ATGACAAACAG TAAATGAAAGC ATAAATAAT GTAAGAGCTC AGGTGGGTCT CGGTGGTCT GTGGCAACG
 CGCGAATGCTA CGCTTTGGCT AGTTGGTAGC AGGGCATGAT TAGTCCGGAT GCAACTGTC GACTTGGC
 TGGTGTGGC TGGGTAGCG GTGCAATCGG CGATACAATC TCTGCCAAA ACATGGCTC ATCATACAAAC
 TGGCAAGCTA ACGGCTGGAC AGTTTCCACA TCTGGTCCAT TAAAGCAGG TCAGATTGTG AGCTTGGG
 CAACACCAAG AAACCCCTAC GGACATGTGG TAATCGTCGA AGCAGTGGAC GGCAGATAGAT TGACTATT
 GGAGCAAAAC TACGGGGGA AACGTTATCC CGTCCGTAAT TATTACAGC CTGCAAGCTA TCGTCAACAG
 GTCGTGCATT ACATCACACC GCTGGCACG GTCGCACAGT CAGGACCCAA CCTTGCAGGC TCTCGTCC
 ATCGCGAGAC GGGCACTATG ACTGTCACGG TCGATGCTC CATGTTCGC AGGGGCCAA ATACTTCAGG
 CGAGATTGTA GCAGTATAACA AGCGTGGTGA ATCATTGAC TATGATACTG TCATCATCGA TGTCATGGC
 TATGTCGGG TGCTTACAT AGGGGGCACG GGCAACAGTA ACTACGTTGC GACGGGGGCT ACCAAAGACG
 GTAAAGCGTT CGGCAATGCT TGGGGTACAT TAAATAA

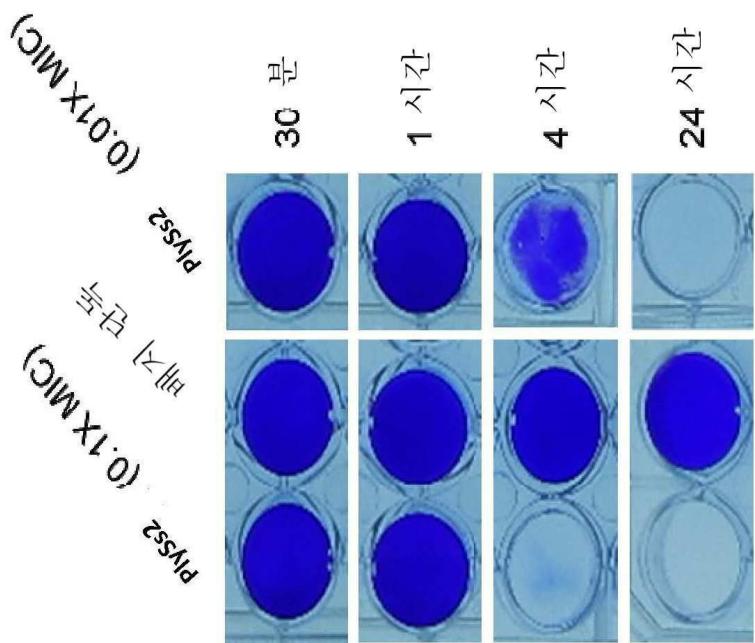
도면9



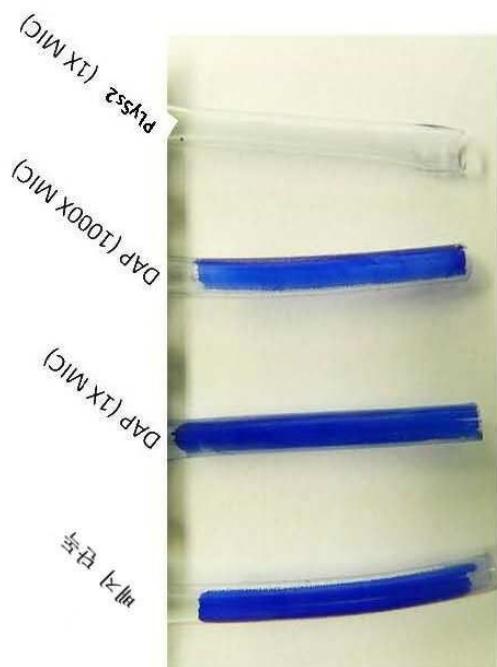
도면7



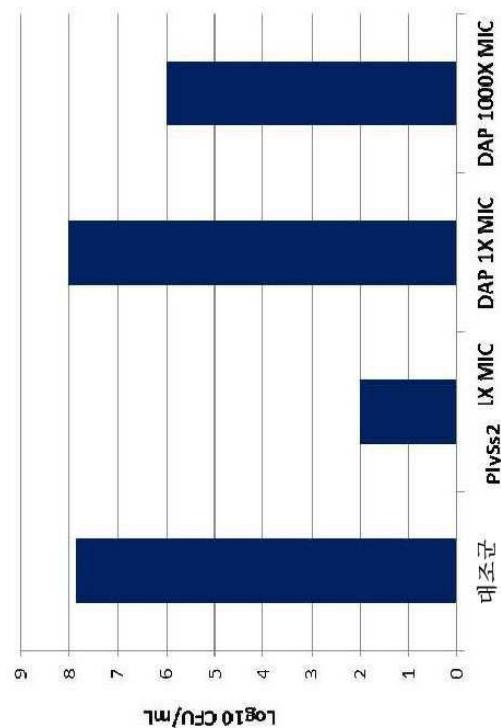
도면8



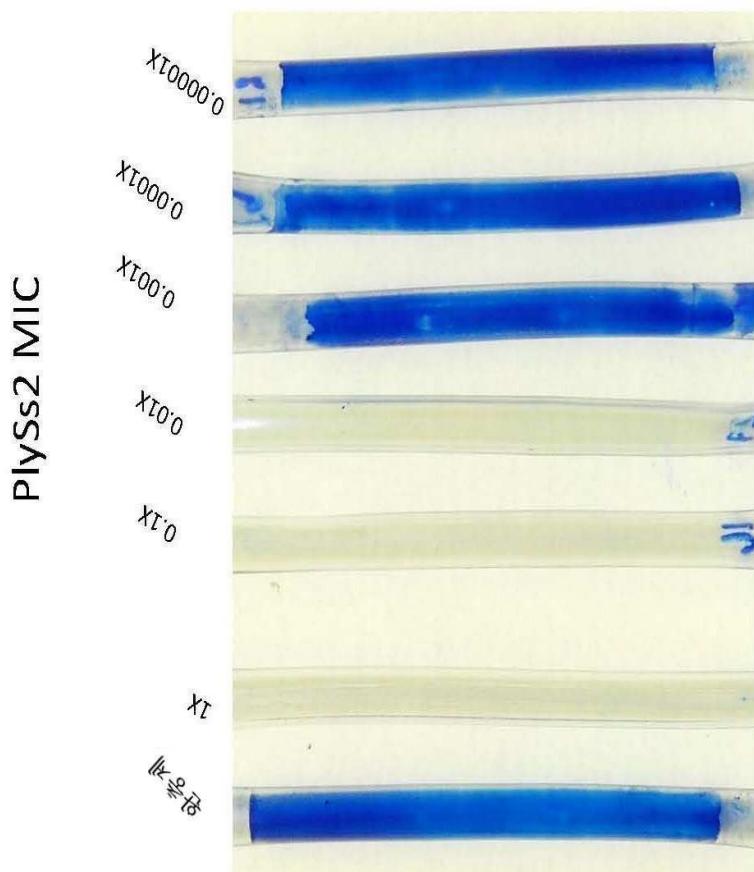
도면9a



도면9b



도면10



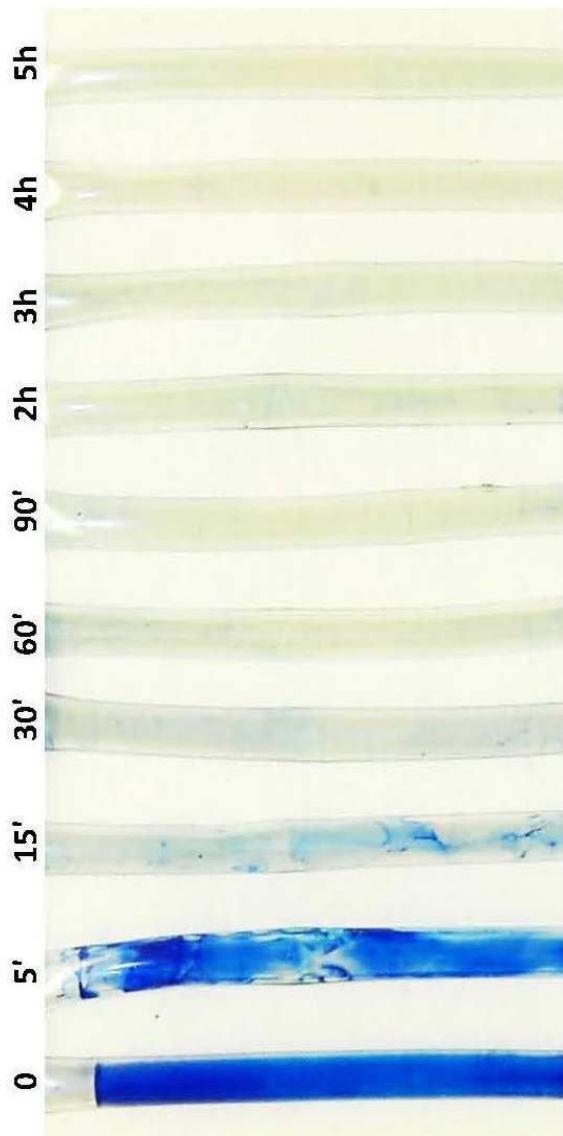
도면11

DAP MIC

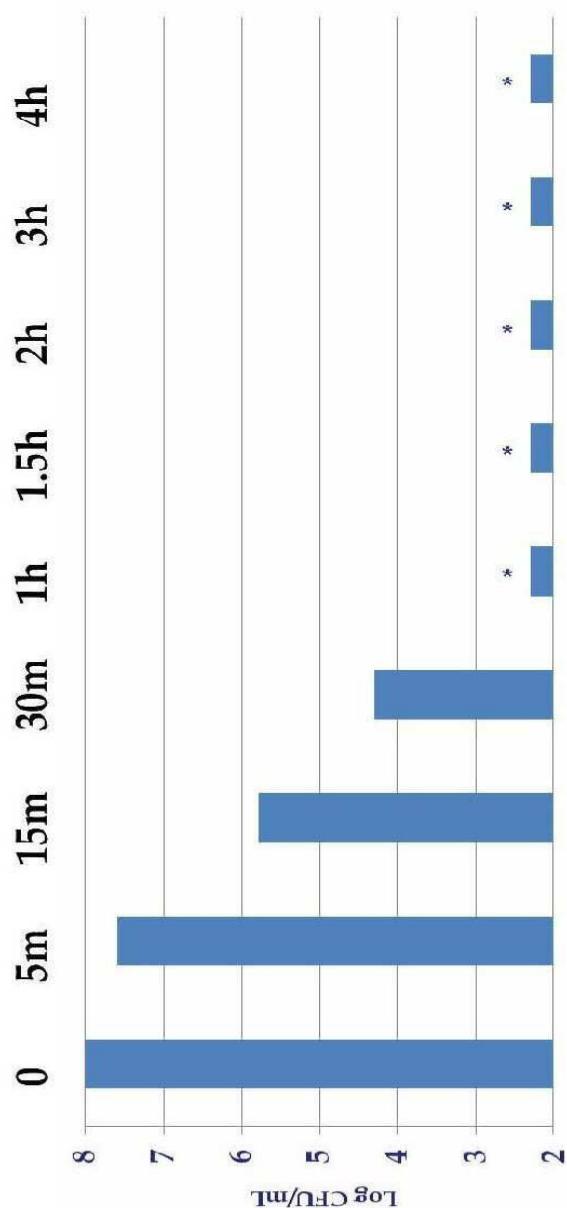
$\times 2$
 $\times 10$
 $\times 100$
 $\times 1000$
 $\times 5000$
 $\times 50$



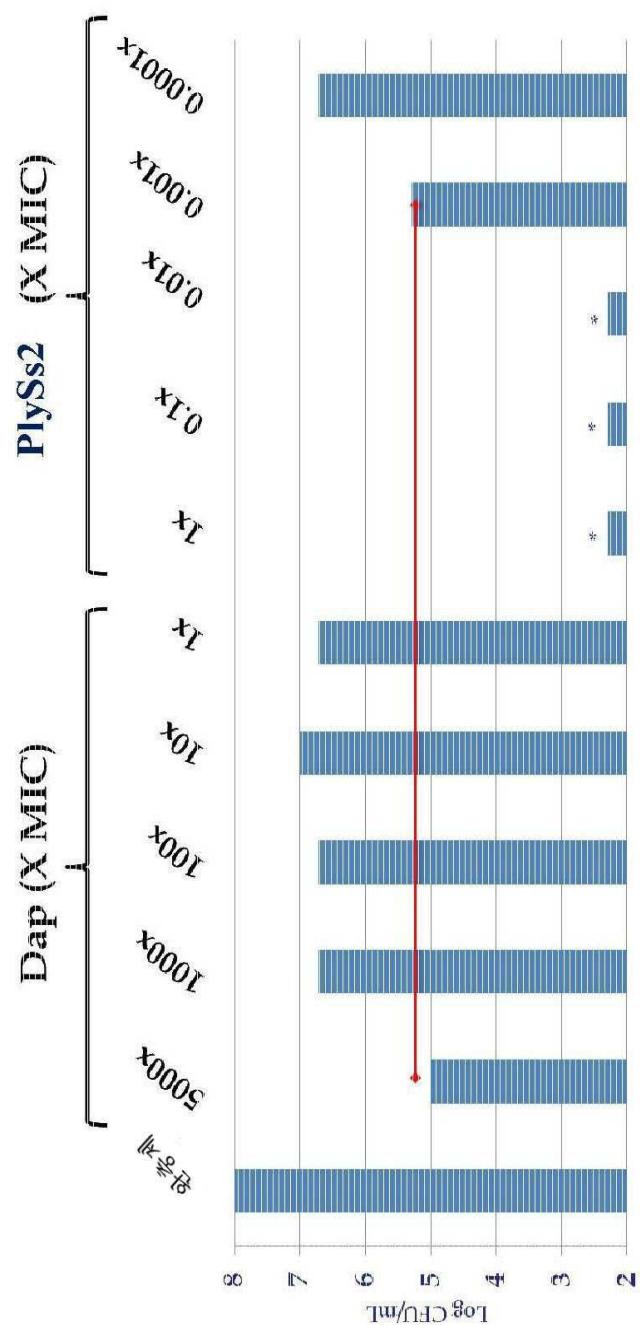
도면 12a



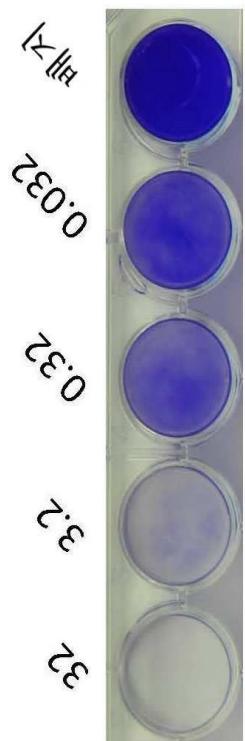
도면12b



도면13

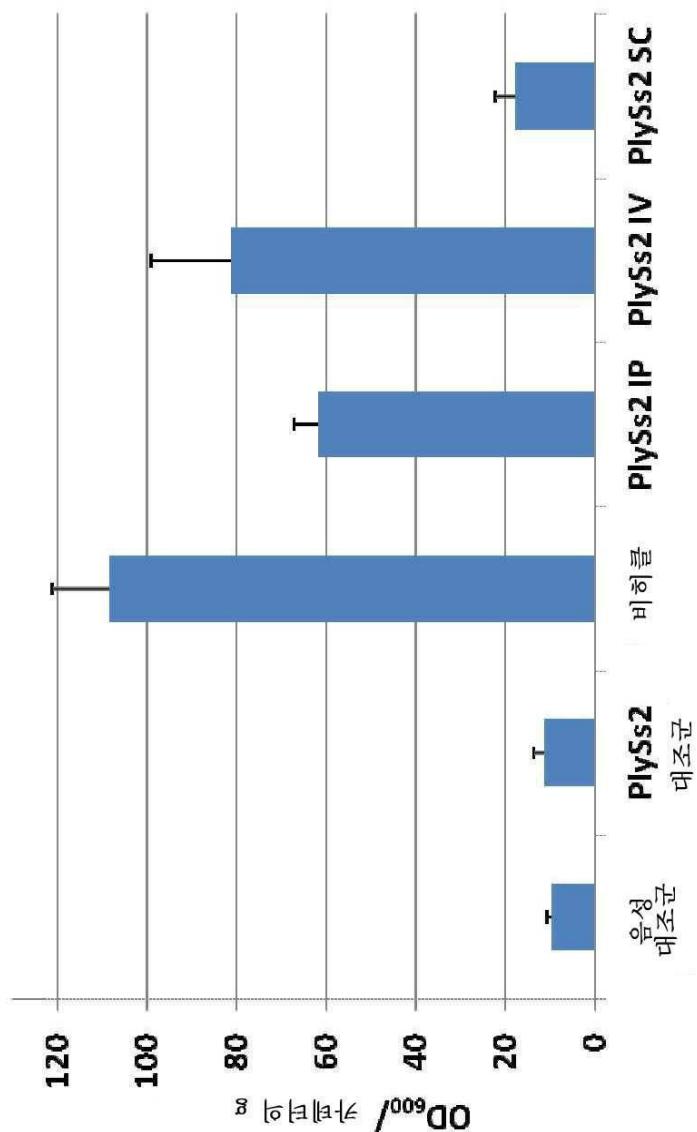


도면14

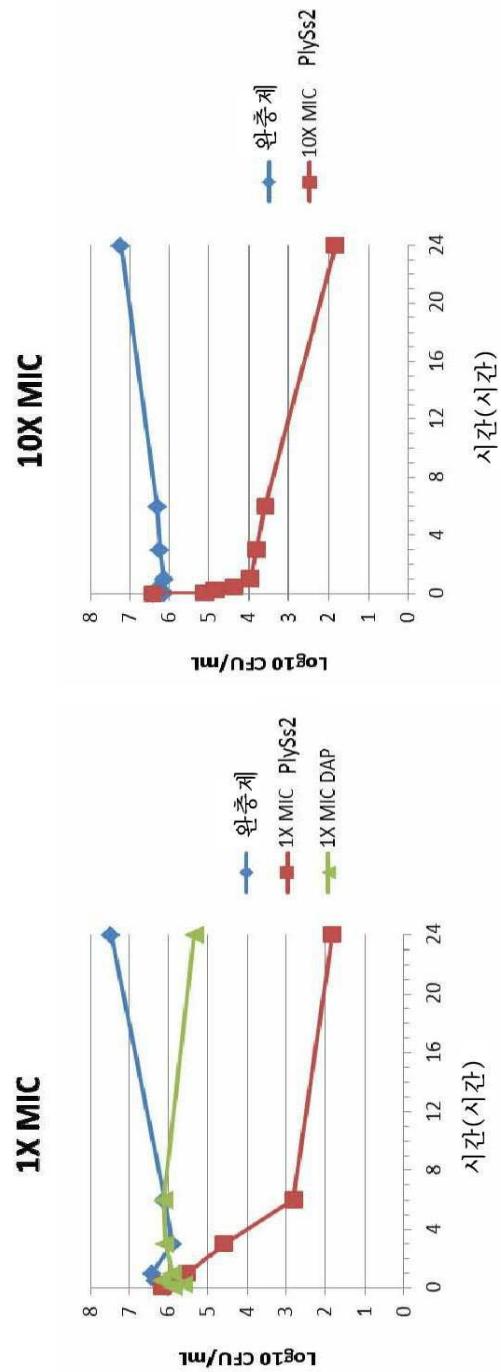


[ClYS] ($\mu\text{g/ml}$):

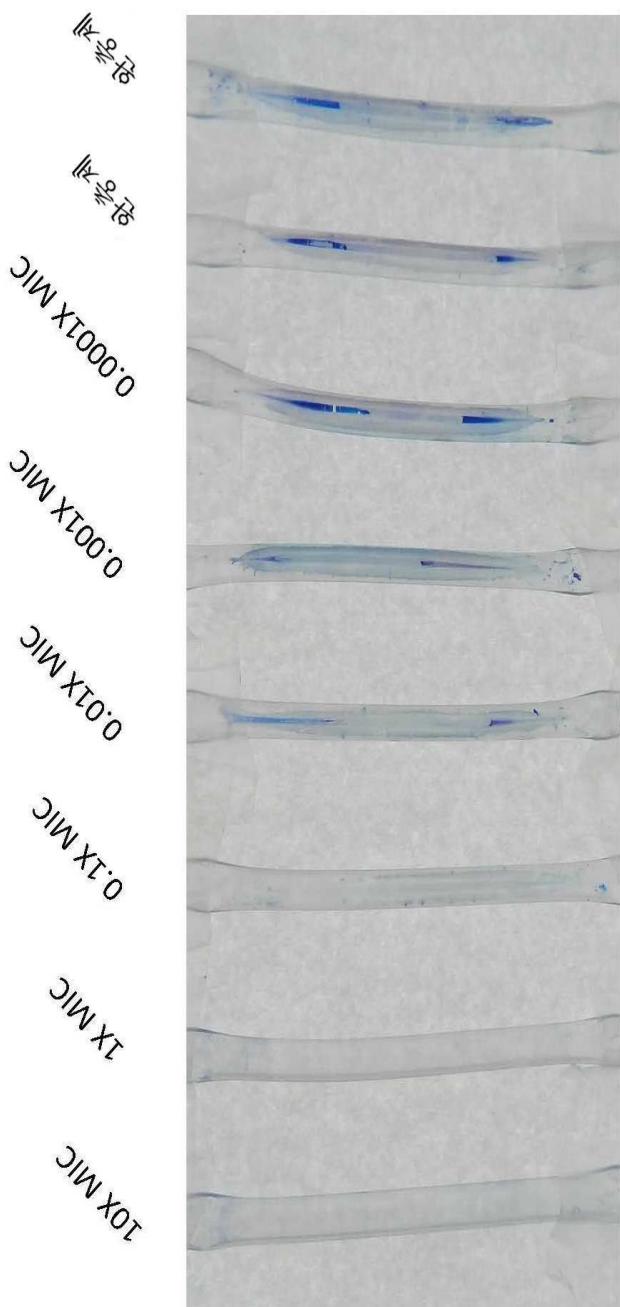
도면15



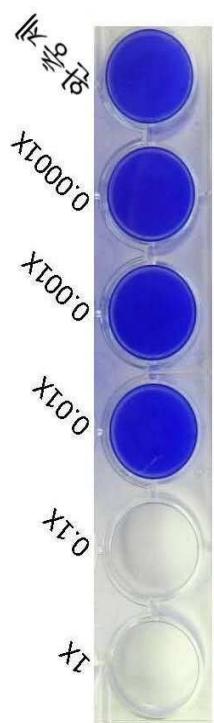
도면16



도면17



도면18



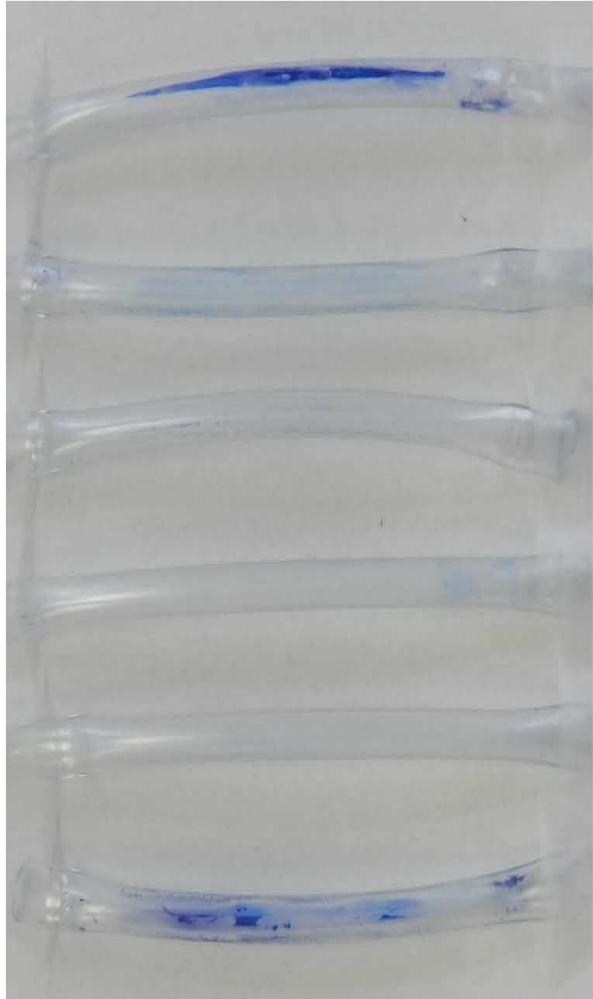
도면19

0.001X MIC
0.01X MIC
0.07X MIC
0.1X MIC
1X MIC
10X MIC
50X MIC



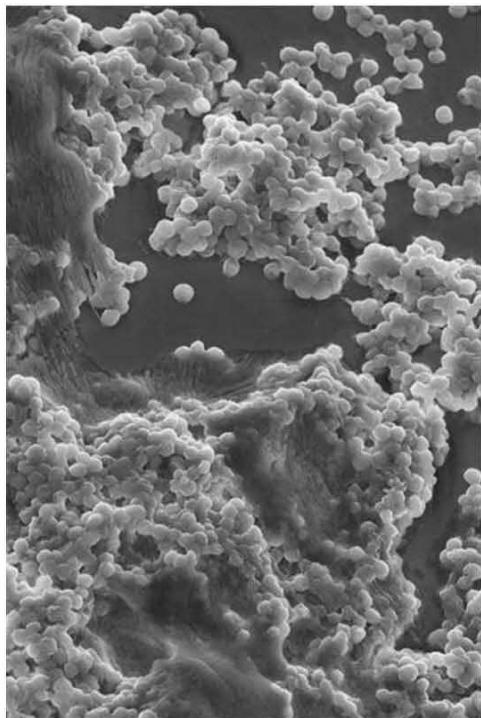
도면20

0.001XMIC
0.01XMIC
0.1XMIC
1XMIC
10XMIC
100XMIC



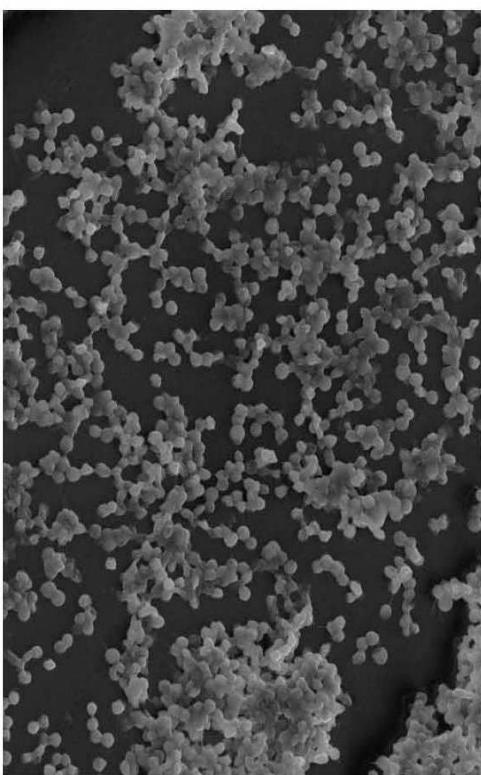
도면21a

0 분



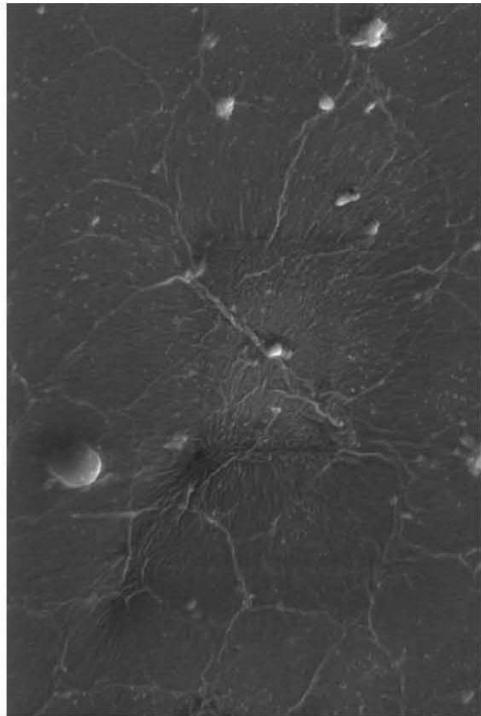
도면21b

30 초



도면21c

15 분



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CONTRAFECT CORPORATION

<120> BIOFILM PREVENTION, DISRUPTION AND TREATMENT WITH BACTERIOPHAGE LYSIN

<130> 3136-1-008PCT

<150> US 61/644,799

<151> 2012-05-09

<150> US 61/736,813

<151> 2012-12-13

<160> 5

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 245

<212> PRT

<213> *Streptococcus suis*

<400> 1

Met Thr Thr Val Asn Glu Ala Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly

1	5	10	15
Ser Gly Val Ser Val Gly Asn Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp			
20	25	30	
Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Ala Gly			
35	40	45	
Val Gly Trp Val Ser Gly Ala Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn			
50	55	60	
Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr			
65	70	75	80
Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro			
85	90	95	
Gly Asn Pro Tyr Gly His Val Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp			
100	105	110	
Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln Asn Tyr Gly Lys Arg Tyr Pro Val			
115	120	125	
Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr			
130	135	140	
Ile Thr Pro Pro Gly Thr Val Ala Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ala Gly			
145	150	155	160
Ser Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala			
165	170	175	
Leu Asn Val Arg Arg Ala Pro Asn Thr Ser Gly Glu Ile Val Ala Val			
180	185	190	
Tyr Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val			
195	200	205	
Asn Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Ser Gly Lys Arg Asn			
210	215	220	
Tyr Val Ala Thr Gly Ala Thr Lys Asp Gly Lys Arg Phe Gly Asn Ala			
225	230	235	240
Trp Gly Thr Phe Lys			
245			

<210> 2

<211> 738

<212> DNA

<213> Streptococcus suis

<400> 2

atgacaacag taaatgaagc attaataat gtaagagctc aggttgggtc cggtgtgtct	60
gttggcaacg gcbaatgcta cgcttggct agttggtagc agcgcataat tagtccggat	120

gcaactgtcg gacttggcgc tgggtgtggc tgggtcagcg gtcaatcg cgataacaatc	180
tctgccaataa acatcggtc atcatacaac tggcaagcta acggctggac agttccaca	240
tctggtccat ttaaaggcagg tcagattgtg acgcttgggg caacaccagg aaacccttac	300
ggacatgtgg taatcgatcg agcagtggac ggcgatagat tgactatgg ggagcaaaac	360
tacggcggga aacgttatcc cgtccgtaat tattacagcg ctgcaagcta tcgtcaacag	420
gtcgtgcatt acatcacacc gcctggcagc gtgcacagt cagcacccaa cttgcaggc	480
tctcgccct atcgcgagac gggcactatg actgtcacgg tcgatgtct caatgttcgc	540

agggcgccaa atactcagg cgagattgtt gcaatataca agcgtggta atcatttgc	600
tatgatactg tcatacatcgta tgtcaatggc tatgtctggg tgtcttacat aggccgcagc	660
ggcaaacgtt actacgttgc gacgggcgtt accaaagacg gtaagcggtt cggcaatgtt	720
tgggttacat ttaaataaa	738

<210> 3

<211> 139

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 3

Leu Asn Asn Val Arg Ala Gln Val Gly Ser Gly Val Ser Val Gly Asn

1 5 10 15

Gly Glu Cys Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Tyr Glu Arg Met Ile Ser Pro

20 25 30

Asp Ala Thr Val Gly Leu Ala Gly Val Gly Trp Val Ser Gly Ala

35 40 45

Ile Gly Asp Thr Ile Ser Ala Lys Asn Ile Gly Ser Ser Tyr Asn Trp

50 55 60

Gln Ala Asn Gly Trp Thr Val Ser Thr Ser Gly Pro Phe Lys Ala Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Ile Val Thr Leu Gly Ala Thr Pro Gly Asn Pro Tyr Gly His Val

85	90	95
----	----	----

Val Ile Val Glu Ala Val Asp Gly Asp Arg Leu Thr Ile Leu Glu Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Asn Tyr Gly Lys Arg Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Tyr Ser Ala Ala

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Tyr Arg Gln Gln Val Val His Tyr Ile Thr

130	135
-----	-----

<210> 4

<211> 67

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 4

Arg Ser Tyr Arg Glu Thr Gly Thr Met Thr Val Thr Val Asp Ala Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Lys Arg Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Asp Thr Val Ile Ile Asp Val Asn

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Val Trp Val Ser Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Lys Arg Asn Tyr

50	55	60
----	----	----

Val Ala Thr

65

<210> 5

<211> 280

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 5

Met Glu Thr Leu Lys Gln Ala Glu Ser Tyr Ile Lys Ser Lys Val Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Gly Thr Asp Phe Asp Gly Leu Tyr Gly Tyr Gln Cys Met Asp Leu

20	25	30
Ala Val Asp Tyr Ile Tyr His Val Thr Asp Gly Lys Ile Arg Met Trp		
35	40	45
Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Ser Phe Gly Gly Thr Ala Thr		
50	55	60
Val Tyr Lys Asn Tyr Pro Ala Phe Arg Pro Lys Tyr Gly Asp Val Val		
65	70	75
Val Trp Thr Thr Gly Asn Phe Ala Thr Tyr Gly His Ile Ala Ile Val		
85	90	95
Thr Asn Pro Asp Pro Tyr Gly Asp Leu Gln Tyr Val Thr Val Leu Glu		
100	105	110
Gln Asn Trp Asn Gly Asn Gly Ile Tyr Lys Thr Glu Leu Ala Thr Ile		
115	120	125
Arg Thr His Asp Tyr Thr Gly Ile Thr His Phe Ile Arg Pro Asn Phe		
130	135	140
Ala Thr Glu Ser Ser Val Lys Lys Asp Thr Lys Lys Pro Lys		
145	150	155
Pro Ser Asn Arg Asp Gly Leu Asn Lys Asp Lys Ile Val Tyr Asp Arg		
165	170	175
Thr Asn Ile Asn Tyr Asn Met Val Leu Gln Gly Lys Ser Ala Ser Lys		
180	185	190
Ile Thr Val Gly Ser Lys Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Trp Ser Lys Gly		
195	200	205
Ala Tyr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Gly Leu Gly Ala Thr Ser Ala Thr		
210	215	220
Arg Tyr Gly Asp Asn Arg Thr Asn Tyr Arg Phe Asp Val Gly Gln Ala		
225	230	235
Val Tyr Ala Pro Gly Thr Leu Ile Tyr Val Phe Glu Ile Ile Asp Gly		
245	250	255
Trp Cys Arg Ile Tyr Trp Asn Asn His Asn Glu Trp Ile Trp His Glu		
260	265	270

Arg Leu Ile Val Lys Glu Val Phe

275

280