



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0153047
(43) 공개일자 2022년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)
A61K 38/45 (2006.01) A61K 8/66 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1044 (2013.01)
A01N 63/50 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034975
(22) 출원일자(국제) 2021년03월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/021766
(87) 국제공개번호 WO 2021/183680
국제공개일자 2021년09월16일
(30) 우선권주장
62/988,918 2020년03월13일 미국(US)

(71) 출원인
큐리 컴퍼니 인코포레이티드
미국 27709 노스 캐롤라이나 더럼 데이비스 드라이브 6
(72) 발명자
컨텔, 윌
미국 27709 노스 캐롤라이나 더럼 데이비스 드라이브 6 큐리 컴퍼니 인코포레이티드
밀체크, 에리카
미국 27709 노스 캐롤라이나 더럼 데이비스 드라이브 6 큐리 컴퍼니 인코포레이티드
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 트랜스글루타미나제 변이체

(57) 요약

트랜스글루타미나제 변이체가 개시된다. 보존제, 살생물제로서, 그리고 단백질의 변형을 위한 사용을 포함한 변이체의 사용 적용분야가 개시된다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/45 (2013.01)

A61K 8/66 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12Y 203/02013 (2013.01)

C12N 2795/00043 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표 3에 나타난 서열에서 선택되며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 프로-서열을 추가로 포함하는 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 3

A10C 또는 Q, D14H, L, M, N, W, 또는 Y, R15A, E, 또는 T, D18E 또는 T, G47H, R48M, K49E 또는 T, Q74C, N134S 또는 T, A136C 또는 S, L137K, V, E, 또는 M, E164F, P169E, F170I, L, 또는 V, S199A 또는 G, 및 S299A, E, K, 또는 V에서 선택되며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는, 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*)의 성숙한 트랜스글루타미나제 효소의 변이체인 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 4

제3항에 있어서, 프로-서열을 추가로 포함하는 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 5

표 3에 나타내며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는 아미노산 서열 중 어느 것의 원형 퍼뮤턴트를 포함하는 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 6

제5항에 있어서, 프로-서열을 추가로 포함하는 트랜스글루타미나제 효소.

청구항 7

조성물을 포함하지 않는 동일한 생성물에 비해 1종 이상 미생물의 성장을 방지하거나 감소시키는 데에 효과적인 양으로 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 변이체를 생성물에 혼입하는 것을 포함하는, 생성물의 저장 수명의 증가 방법.

청구항 8

효소를 포함하지 않는 동일한 생성물에 비해 생성물의 저장 수명을 증가시키는 데에 효과적인 양으로 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소를 포함하는 생성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 개인 관리, 가정용, 산업용, 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 에너지, 플라스틱, 포장 또는 농업용 생성물인 생성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 막대 비누, 액체 비누, 손 살균제, 수술전 피부 소독제, 세척용 와이프, 소독용 와이프, 바디워시, 여드름 치료 생성물, 항진균 기저귀 발진 크림, 항진균 피부 크림, 샴푸, 컨디셔너, 화장용 탈취제, 향미생물 크림, 바디 로션, 핸드 크림, 국소용 크림, 애프터셰이브 로션, 피부 토너, 구강 세척제, 치약 및 일광차단 로션에서 선택되는 것인 생성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상처 치유 연고, 크림 및 로션, 상처 피복제, 화상 상처 크림, 붓대, 테이프 및 스테리-스트립

에서 선택되는 상처 관리 생성물인 생성물.

청구항 12

(i) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소; 및 (ii) 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자를 포함하는 트랜스글루타미나제 효소의 기질을 포함하는 효소 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자가 유리 아미노 기를 포함하는 분자에 접합되는 것인 효소 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 유리 아미노 기를 포함하는 분자가 리신, 카다베린, 푸트레쥬, 히드라진, 아디프산 디히드라지드, 세바스산 디히드라지드 및 헥사메틸렌디아민에서 선택되는 것인 효소 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자가 유리 글루타민 측쇄를 가지는 아미노산, 펩티드 또는 단백질에 접합되는 것인 효소 조성물.

청구항 16

제12항에 따른 효소 조성물을 포함하는 화장품 조성물.

청구항 17

관심 재료 또는 단백질을 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소, 및 색소 또는 염료 분자와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 트랜스글루타미나제 효소는 관심 재료 또는 단백질에 색소 또는 염료 분자를 공유 결합시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 관심 재료 또는 단백질에의 색상의 결합 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 관심 단백질이 피부에 존재하는 단백질인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 피부에 존재하는 단백질이 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

생성물과 접촉되었을 때 관심 단백질 또는 단백질-, 펩티드- 또는 아미노산-함유 재료상에 색상 분자를 추가하는 데에 효과적인 양으로 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소를 포함하는 생성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 개인 관리, 화장품, 가죽, 식품 또는 농업용 생성물인 생성물.

청구항 22

관심 단백질 또는 재료를 제21항에 따른 생성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 관심 단백질 또는 재료의 색상 변형 방법.

청구항 23

1종 이상 향미생물 효소, 펩티드 또는 단백질과 조합하여 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소를 포함하며, 보존, 살생물, 향미생물 또는 살바이러스 활성을 포함하는 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 향미생물 효소, 펩티드 또는 단백질이 리소자임, 키티나제, 리파제, 리신, 리소스타틴, 글루

카나제, DNase, RNase, 락토펙틴, 글루코스 옥시다제, 퍼옥시다제, 락토펙시다제, 락토나제, 아실라제, 디스페르신 B, α-아밀라제, 셀룰라제, 니신, 박테리오신, 시테로포어, 폴리믹신 및 테펜신에서 선택되는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 트랜스글루타미나제 효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 박테리오파지.

청구항 26

제25항에 있어서, 항미생물 활성을 포함하는 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[관련 출원의 상호-참조]

본 출원은 2020년 3월 13일자 U.S. 가출원 제62/988,918호의 우선권을 주장하며, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[발명의 분야]

본 발명은 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*) 트랜스글루타미나제의 신규 변이체에 관한 것이다. 상기 변이체는 단백질, 펩티드 또는 소형 분자를 야생형 스트렙토마이세스 모바라엔시스 트랜스글루타미나제에 비해 증가된 특이적 활성 및/또는 가교결합 활성 속도와 연계시키는 데에 사용될 수 있다. 상기 변이체는 또한 광범위한 미생물 억제제를 위한 작용제로서 사용하기 위한 활성 살생물 효소 및 그의 제제로 사용될 수 있다.

배경 기술

트랜스글루타미나제 (EC 2.3.2.13)는 펩티드 결합 글루타민 잔기의 γ-카르복시-아미드기가 아실 공여체인 아실 전달 반응을 촉매촉진할 수 있는 효소이다. 다양한 화합물의 일차 아미노기가 이후의 펩티드 결합 글루타민의 단일치환 γ-아미드 형성을 동반하여 아실 수용체로서 기능할 수 있다. 펩티드 사슬 중 리신 잔기의 ε-아미노기가 아실 수용체로서 작용하는 경우, 트랜스글루타미나제는 분자내 또는 분자간 γ-글루타밀-ε-리신 가교결합을 형성시킨다.

트랜스글루타미나제는 생물공학 및 식품 가공 산업에서 많은 적용분야를 찾아내었는데, 거기에서 그것은 "고기 접착제(meat glue)"라는 별명을 얻고 있다. 펩티드 가교결합 활성은 식품 가공, 생물공학, 약제학, 의료 장치, 개인 및 가정 용품, 그리고 가죽 및 직물 가공을 망라하는 다양한 산업적 목적에 유용한 것으로 나타나 있다.

발명의 내용

[발명의 개요]

본원에서는, 트랜스글루타미나제 (Tgase) 효소가 제공된다. 상기 효소는 스트렙토마이세스 모바라엔시스 Tgase (서열식별번호(SEQ ID NO): 1)의 변이체이다. 상기 변이체 중 일부는 야생형 스트렙토마이세스 모바라엔시스 효소에 비해 약 1.4-배, 약 1.6-배 또는 1.8-배 이상인 아미드교환 활성의 향상 (효소 활성에 있어서의 적어도 약 40 %, 약 60 % 또는 약 80 % 이상의 향상)을 나타낸다.

아미드교환 반응에서 글루타민-공여체 기질을 아민 기질과 가교결합시키는 데에 더 적은 양의 효소를 가능하게 함으로써 더 낮은 생분해 비용과 가능하게 하도록, 트랜스글루타미나제는 높은 특이적 활성을 가지는 것이 바람직하다. 또한, 더 짧은 반응 시간을 달성하도록 더 높은 최초 속도를 나타내는 트랜스글루타미나제의 돌연변이 변이체를 식별하는 것이 유익하다. 한 가지 그와 같은 예는 보존의 경우로서, 단백질, 예컨대 세포 표면

단백질의 빠른 가교결합이 비제한적으로 더 빠르거나 더 효과적인 미생물 사멸 속도와 같은 탁월한 미생물 억제로 이어진다.

[0010] 일 측면에서는, 트랜스글루타미나제 변이체 효소가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체는 표 3에 제공되어 있는 서열에서 선택되며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 A10C 또는 Q, D14H, L, M, N, W, 또는 Y, R15A, E, 또는 T, D18E 또는 T, G47H, R48M, K49E 또는 T, Q74C, N134S 또는 T, A136C 또는 S, L137K, V, E, 또는 M, E164F, P169E, F170I, L, 또는 V, S199A 또는 G, 및 S299A, E, K, 또는 V에서 선택되며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는, 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*)의 성숙한 트랜스글루타미나제 효소의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 표 3에 나타내었으며 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는 아미노산 서열 중 어느 것의 원형 퍼뮤턴트(permutant)이다. 일부 실시양태에서, 상기 트랜스글루타미나제 효소는 추가로 프로-서열(pro-sequence)을 포함한다.

[0011] 또 다른 측면에서는, 생성물의 저장 수명을 증가시키기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 조성물을 포함하지 않는 동일한 생성물에 비해 1종 이상 미생물의 성장을 방지하거나 감소시키는 데에 효과적인 양으로 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체를 생성물에 혼입하는 것을 포함한다.

[0012] 또 다른 측면에서는, 효소를 포함하지 않는 동일한 생성물에 비해 생성물의 저장 수명을 증가시키는 데에 효과적인 양으로 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체를 포함하는 생성물이 제공된다. 예를 들면, 상기 생성물은 개인 관리, 가정용, 산업용, 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 에너지, 플라스틱, 포장 또는 농업용 생성물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생성물은 막대 비누, 액체 비누, 손 살균제, 수술전 피부 소독제, 세척용 와이프(wipe), 소독용 와이프, 바디 워시, 여드름 치료 생성물, 향진균 기저귀 발진 크림, 향진균 피부 크림, 샴푸, 컨디셔너, 화장용 탈취제, 향미생물 크림, 바디 로션, 핸드 크림, 국소용 크림, 애프터셰이브 로션, 피부 토너, 구강 세척제, 치약 또는 일광차단 로션이다. 다른 실시양태에서, 생성물은 상처 치유 연고, 크림 및 로션, 상처 피복제, 화상 상처 크림, 붓대, 테이프 또는 스테리-스트립(steri-strip)에서 선택되는 상처 관리 생성물이다.

[0013] 또 다른 측면에서는, 하기를 포함하는 효소 조성물이 제공된다: (i) 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체 효소; 및 (ii) 트랜스글루타미나제 효소의 기질, 예컨대 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자. 일부 실시양태에서, 상기 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자는 유리 아미노기를 포함하는 분자에 접합되어 있다. 예를 들면, 유리 아미노기를 포함하는 분자는 리신, 카다베린, 푸트레신, 히드라진, 아디프산 디히드라지드, 세바스산 디히드라지드 또는 헥사메틸렌디아민일 수 있다. 일부 실시양태에서, 일광차단 분자, 색소 또는 염료 분자는 유리 글루타민 측쇄를 가지는 아미노산, 펩티드 또는 단백질에 접합되어 있다. 상기 효소 조성물을 포함하는 화장품 조성물도 제공된다.

[0014] 또 다른 측면에서는, 관심 재료 또는 단백질에 색상을 결합시키기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 관심 재료 또는 단백질을 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체 효소, 및 색소 또는 염료 분자와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 트랜스글루타미나제 변이체 효소는 관심 재료 또는 단백질에 색소 또는 염료 분자를 공유 결합시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, 상기 관심 단백질은 피부에 존재하는 단백질이다. 예를 들면, 피부에 존재하는 상기 단백질은 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴일 수 있다.

[0015] 또 다른 측면에서는, 생성물과 접촉되었을 때 관심 단백질 또는 단백질-, 펩티드- 또는 아미노산-함유 재료상에 색상 분자를 부가하는 데에 효과적인 양으로 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체 효소를 포함하는 생성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 생성물은 개인 관리, 화장품, 가축, 식품 또는 농업용 생성물일 수 있다. 관심 단백질 또는 재료를 상기 생성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 관심 단백질 또는 재료의 색상 변형 방법도 제공된다.

[0016] 또 다른 측면에서는, 1종 이상 향미생물 효소, 펩티드 또는 단백질과 조합하여 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체 효소를 포함하며, 보존, 살생물, 향미생물 또는 살바이러스 활성을 보유하는 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 향미생물 효소, 펩티드 또는 단백질은 리소자임, 키티나제, 리파제, 리신, 리소스타핀, 글루카나제, DNase, RNase, 락토페린, 글루코스 옥시다제, 퍼옥시다제, 락토퍼옥시다제, 락토나제, 아실라제, 디스페르신 B, α-아밀라제, 셀룰라제, 니신, 박테리오신, 시데로포어, 폴리믹신 또는 데펜신이다.

[0017] 또 다른 측면에서는, 본원에서 기술되는 바와 같은 트랜스글루타미나제 변이체 효소를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 박테리오파지가 제공된다. 일 실시양태에서, 상기 조성물은 향미생물 활성을 제공한다. 조성물은 제약

상 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본원에서 개시되는 Tgase 가교결합 효소는 건강관리 생성물, 개인 관리 또는 화장품 제제, 포장 (예컨대 식품, 화장품 및 약제), 직물 및 가죽 제조, 페인트 및 코팅, 그리고 수 처리 및 정제를 포함한 해양 적용분야에서 적용성을 가지는 신규한 미생물 억제제를 위한 살생물제로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 Tgase 효소는 염료 또는 단백질을 사용하여 관심 단백질, 예를 들면 케라틴 및 콜라겐을 영구적으로 변형시키는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 효소는 보존제로서 사용될 수 있다.
- [0019] 본원에서는, 스트렙토마이세스 모바라엔시스 Tgase의 돌연변이 형태인 Tgase 효소가 개시된다. 구체적으로, 본원에서 기술되는 효소는 야생형 Tgase의 폴리펩티드 서열 또는 그의 원형 퍼뮤턴트 중 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키고, 글루타민 아미노산 잔기와 아민 (또는 히드록실아민) 수용체 사이의 트랜스글루타미나제 아미드교환 활성을 관찰하는 것에 의해 수득되는 단백질이다.
- [0020] 돌연변이성 치환을 가지는 단백질의 재조합 발현 방법들이 이미 예를 들면 문헌 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Press (1989)], [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)] 등에서 기술된 바 있다. 단일 점 돌연변이 효소는 부위-지정 돌연변이유발 또는 관련 기술분야에 알려져 있는 임의의 다른 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 그와 같은 방법에는 비제한적으로 키트 및 시중에서 구입가능한 반응물을 사용하는 것, 예컨대 쿤켈법(Kunkel method), KLD법, 또는 간극 이중법(Gapped duplex method)이 포함될 수 있으며, 상기 키트의 예는 예를 들면 퀵체인지(QuickChange)TM 부위-지정 돌연변이유발 키트 (스트라타진(Stratagene)), 진아트(GeneArt)TM 부위-지정 돌연변이유발 시스템 (인비트로젠(Invitrogen)), Q5[®] 부위-지정 돌연변이유발 시스템 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), 타카라(TaKaRa) 부위-지정 돌연변이유발 시스템 (프라임 스타(Prime STAR)[®] 돌연변이유발 기본 키트), 또는 뮤타-디렉트(Muta-Direct)TM 부위 지정 돌연변이유발 키트 (인트론(iNtRON)) 등이다.
- [0021] I. 정의
- [0022] "하나"는 문맥상 분명하게 달리 지정되지 않는 한 복수의 언급을 포함한다.
- [0023] 본원에서, "약"이라는 용어는 값의 더하기 또는 빼기 10 퍼센트 (10 %)를 의미하는 데에 사용된다. 예를 들면, "약 100"은 90과 110 사이 임의의 수를 말한다.
- [0024] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때, "또는"은 상기에서 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 가지는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 목록의 항목을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것, 즉 수많은 요소 또는 요소 목록 중 적어도 하나를 포함하나 하나 초과도 포함하며 임의적으로는 열거되지 않은 추가적인 항목도 포함하는 것으로 해석되어야 한다. "~중 오로지 하나" 또는 "~중 정확하게 하나", 또는 청구범위에서 사용될 때의 "~로 이루어진"과 같이 분명하게 반대로 표시되는 유일한 용어는 수많은 요소 또는 요소 목록 중 정확하게 하나 요소의 포함을 지칭하게 된다. 일반적으로, "~중 어느 하나", "~중 하나", "~중 오로지 하나" 또는 "~중 정확하게 하나"와 같은 배제성의 용어가 선행하는 경우, 본원에서 사용될 때의 "또는"이라는 용어는 오로지 배제적인 대안 (즉 "하나 또는 다른 것, 그러나 둘 다는 아님")을 표시하는 것으로 해석되어야 한다. 청구범위에서 사용될 때, "본질적으로 ~로 이루어진"은 특허법 분야에서 사용될 때의 그의 일반적인 의미를 가져야 한다.
- [0025] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때, "및/또는"이라는 구는 그렇게 연계되는 요소, 즉 일부 경우에는는 합동으로 존재하며 다른 경우에는는 분리되어 존재하는 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 임의적으로는, 분명하게 반대로 표시되지 않는 한, 구체적으로 식별되는 요소와 관련되어 있는지 또는 무관한지에 관계없이, "및/또는" 문구에 의해 구체적으로 식별되는 요소가 아닌 다른 요소가 존재할 수 있다. 이에 따라, 비-제한적인 예로서, "포함하는"과 같은 개방-종료형 언어와 함께 사용될 경우, "A 및/또는 B"라는 언급은 일 실시양태에서는 B가 없는 A를 (임의적으로는 B가 아닌 다른 요소는 포함); 또 다른 실시양태에서는 A가 없는 B를 (임의적으로는 A가 아닌 다른 요소는 포함); 또 다른 실시양태에서는 A 및 B 둘 다를 (임의적으로는 다른 요소 포함) 지칭할 수 있는 등이다.
- [0026] "아미노산"이라는 용어는 알파-탄소로 지정된 탄소에 결합되어 있는 아민 기 및 카르복실 기 둘 다를 함유하는 분자를 지칭한다. 적합한 아미노 30 산에는 비제한적으로 자연 발생 아미노산의 D- 및 L-이성질체 둘 다는 물론, 유기 합성 또는 다른 대사 경로에 의해 제조되는 비-자연 발생 아미노산도 포함된다. 일부 실시양태에서,

단일 "아미노산"은 연장된 지방족 또는 방향족 백본 스캐폴드로 가용한 바와 같은 다수의 측쇄 잔기를 가질 수 있다. 문맥상 구체적으로 달리 표시되지 않는 한, 본원에서 사용될 때의 아미노산이라는 용어는 아미노산 유사체를 포함하고자 한다.

- [0027] 본원에서 사용될 때, "항미생물제"는 EPA에 따라 박테리아 및 바이러스를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하고자 하는 물질을 지칭한다.
- [0028] 본원에서 사용될 때의 "염기 쌍" 또는 "bp"라는 용어는 이중 가닥 DNA 분자에서의 아데닌 (A)과 티민 (T) 또는 시토신 (C)과 구아닌 (G)의 연합 (즉 수소 결합 쌍 형성)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 염기 쌍은 예를 들면 DNA/RNA 이중체에서의 우라실 (U)과 쌍을 형성한 A를 포함할 수 있다.
- [0029] 본원에서 사용될 때, "살생물제"는 U.S. 환경 보호국(Environmental Protection Agency) (EPA)에 의해 정의되어 있는 바와 같이 미생물을 사멸시키는 물질을 지칭한다.
- [0030] "원형 펩티드"는 그의 아미노산 서열에 있어서 참조 서열에 비해 변화된 아미노산 순서를 가지는 단백질을 지칭한다. 결과는 참조 단백질에 비해 상이한 연결성을 가지나 전체적으로 유사한 3-차원 (3D) 형상을 가지는 단백질 구조이다.
- [0031] "~로부터 유래하는"이라는 용어는 "~로부터 기원하는", "~로부터 수득되는", "~로부터 수득가능한", "~로부터 단리되는", "~로부터 정제되는" 및 "~로부터 생성되는"이라는 용어를 포괄하는데, 일반적으로 일 특정 재료가 또 다른 특정 재료에서 그의 기원이 발견되거나 또 다른 특정 재료와 관련하여 기술될 수 있는 특징을 가진다는 것을 표시한다.
- [0032] 본원에서 "이중체"라는 용어는 2개 폴리뉴클레오타이드 서열 사이에 존재하는 상보성 영역을 지칭한다. "이중체 영역"이라는 용어는 2개 올리고뉴클레오타이드 또는 단일 올리고뉴클레오타이드의 2개 부분 사이에 존재하는 서열 상보성의 영역을 지칭한다.
- [0033] 본원에서 사용될 때의 "유효량"은 미생물 성장을 방지하거나 억제하는 데에 충분한 본원에서 개시되는 바와 같은 보존제 조성물의 양 (예컨대 최소 억제 농도 (MIC))을 지칭한다. 본 특허의 보존제 조성물은 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 효모 및/또는 곰팡이에 대하여 활성이다.
- [0034] 본원에서 사용될 때, "발현"이라는 용어는 유전자의 핵산 서열을 바탕으로 폴리펩티드가 생성되는 과정을 지칭한다. 상기 과정에는 전사 및 번역 둘 다가 포함된다.
- [0035] "유전자"는 폴리펩티드를 생성시키는 데에 연관되어 있는 DNA 분절을 지칭하는 것으로서, 코딩 영역에 선행하는 영역 및 후속하는 영역은 물론, 개별 코딩 분절 (엑손) 사이의 개재 서열 (인트론)도 포함한다.
- [0036] "가정용 생성물"은 개별 소비자에 의해 사용되게 되는 개인 관리 생성물이 아닌 다른 생성물이다.
- [0037] "혼성화" 및 "어닐링(annealing)"은 뉴클레오타이드 잔기 염기 사이의 수소 결합을 통해 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 반응하여 안정화된 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨 크릭(Watson Crick) 염기 쌍형성, 후그스타인(Hoogsteen) 결합에 의해, 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 이루어질 수 있다. 복합체는 이중체 구조를 형성하는 2개의 핵산 가닥, 다중-가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일 자가-혼성화 가닥 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)의 개시, 결합 반응, 서열분석 반응 또는 절단 반응, 예컨대 리보자임에 의한 폴리뉴클레오타이드의 효소적 절단과 같은 더 광범위한 과정 중의 일 단계를 구성할 수 있다. 제2 서열 뉴클레오타이드 잔기 염기와 수소 결합을 통하여 안정화될 수 있는 제1 핵산 서열은 제2 서열에 "혼성화가능한" 것으로 지칭된다. 그와 같은 경우, 제2 서열 역시 제1 서열에 10 혼성화가능한 것으로 지칭될 수 있다. "혼성화된"이라는 용어는 뉴클레오타이드 잔기 염기 사이의 수소 결합을 통하여 안정화된 복합체 중 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0038] "산업용 생성물"은 산업에서 사용되는 생성물을 지칭한다.
- [0039] 본원에서 사용될 때의 "단리된", "정제된", "분리된" 및 "회수된"이라는 용어는 예를 들면 그것이 함유되어 있는 샘플 중 적어도 90 중량%, 또는 15 적어도 95 중량%, 또는 적어도 98 중량%의 농도로 그것이 자연상에서 연관되어 있는 적어도 하나의 구성요소로부터 제거된 재료 (예컨대 단백질, 핵산 또는 세포)를 지칭한다. 예를 들면, 이 용어는 예컨대 무손상인 생물학적 시스템과 같은 그의 자연 상태에서 발견될 때 보통 거기에 동반되는 구성요소가 실질적으로 또는 본질적으로 없는 재료를 지칭할 수 있다. 단리된 핵산 분자에는 일반적으로 핵산 분자를 발현하는 세포에 함유되어 있으나 세포외로 존재하거나 그의 자연상 염색체 위치와 상이한 염색체 위치

에 존재하는 핵산 분자가 포함된다.

- [0040] "성숙한" 폴리펩티드, 단백질 또는 효소는 그의 프로-서열의 절단 후 또는 프로-서열 부재하에서의 효소원 또는 전구단백질의 활성화된 형태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 성숙한 효소는 번역-후 프로세싱 (활성화) 단계를 배제하기 위하여 프로-서열과 별도의 폴리펩티드로서 생성될 수 있다.
- [0041] "미생물(microorganism)" 및 "미생물(microbe)"이라는 용어는 박테리아, 원생동물, 진균, 조류, 아메바, 바이러스 및 곰팡이의 생명 형태를 포함할 수 있다.
- [0042] 본원에서 "돌연변이"라는 용어는 비제한적으로 그에 의해 "돌연변이체"를 생성시키는 치환, 삽입 및 결실 (감축 포함)을 포함한, 모체 서열에 도입된 변화를 지칭한다. 돌연변이의 결과에는 모체 서열에 의해 코딩되는 단백질에서는 발견되지 않는 새로운 특징, 특성, 기능, 표현형 또는 특질의 야기가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 본원에서 "뉴클레오티드"라는 용어는 당 잔기 (5탄당), 포스페이트 및 질소성 헤테로고리형 염기로 이루어진 DNA 또는 RNA의 단량체 단위를 지칭한다. 염기는 글리코시드 탄소 (5탄당의 1' 탄소)를 통하여 당 잔기에 연결되는데, 염기와 당의 그와 같은 조합은 뉴클레오시드이다. 뉴클레오시드가 5탄당의 3' 30 또는 5' 위치에 결합된 포스페이트 기를 함유하는 경우, 그것은 뉴클레오티드로 지칭된다. 중합체성의 작용가능하게 연결된 뉴클레오티드의 서열은 본원에서 통상적으로 "염기 서열", "뉴클레오티드 서열", "폴리뉴클레오티드 서열", "올리고뉴클레오티드 서열" 또는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 "가닥"으로 지칭되는데, 본원에서는 그의 좌측에서 우측 배향이 각각 중합체 서열 "5'" 및 "3'" 말단의 말단 5' 포스페이트 기 및 말단 3' 히드록실 기를 말하는 5'-말단에서 3'-말단으로의 통상적인 방향인 화학식으로 표현된다.
- [0044] "임의적인" 또는 "임의적으로"는 이어져 기술되는 사례, 상황 또는 재료가 발생하거나 존재할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다는 것, 그리고 그 설명이 상기 사례, 상황 또는 재료가 발생하거나 존재하는 경우 및 그것이 발생하거나 존재하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.
- [0045] 본원에서 사용될 때, "병원체"는 인간, 동물 및/또는 식물에서 질환을 야기할 수 있는 미생물 (예컨대 박테리아, 바이러스 또는 기생충)을 지칭한다.
- [0046] "펩티드"는 사슬로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어지며 각 산의 카르복실 기가 유형 R-OC-NH-R'의 결합에 의해 다음 것의 아미노 기에 연결되어 있는, 예를 들면 약 2 내지 약 50개 아미노산의 화합물을 지칭한다.
- [0047] "폴리머라제"라는 용어는 본원에서 뉴클레오티드의 중합을 촉매촉진하는 (즉 폴리머라제 활성화) 효소를 지칭한다. 폴리머라제라는 용어는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제 및 리버스 트랜스크립타제를 포괄한다. "DNA 폴리머라제"는 데옥시리보뉴클레오티드의 중합을 촉매촉진한다. "RNA 폴리머라제"는 리보뉴클레오티드의 중합을 촉매촉진한다. "리버스 트랜스크립타제"는 RNA 주형에 대하여 상보적인 데옥시리보뉴클레오티드의 중합을 촉매촉진한다.
- [0048] "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 호환가능하게 사용된다. 이는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체 중 어느 하나인 임의의 길이를 가지는 중합체 형태의 뉴클레오티드를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3-차원 구조를 가질 수 있으며, 알려지거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있고, 단일- 또는 다중-가닥 (예컨대 단일-가닥, 이중-가닥, 삼중-나선 등)일 수 있으며, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 및/또는 변형된 뉴클레오티드 또는 염기 또는 이의 유사체를 포함한 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 유사체 또는 변형된 형태를 함유할 수 있다. 유전자 코드가 축퇴성이어서, 1종을 초과하는 코돈이 특정 아미노산을 코딩하는 데에 사용될 수 있기 때문에, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 폴리뉴클레오티드가 사용 조건하에서 원하는 기능성을 보유하는 한, 뉴클레아제 내성을 증가시키는 변형을 포함하여 (예컨대 데옥시, 2'-O-Me, 포스포포티오에이트 등) 어떠한 유형의 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체도 사용될 수 있다. 검출 또는 포획을 목적으로, 표지, 예를 들면 방사성 또는 비방사성 표지 또는 앵커(anchor), 예컨대 바이오틴이 도입될 수도 있다. 폴리뉴클레오티드라는 용어는 또한 펩티드 핵산 (PNA)을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 또는 비-자연 발생의 것일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 RNA, DNA 또는 둘 다, 및/또는 이의 변형된 형태 및/또는 유사체를 함유할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 구성요소에 의해 개재될 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결이 대안적인 연결 기에 의해 대체될 수도 있다. 이러한 대안적인 연결 기에는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈")에 의해 대체되는 실시양태가 포함되나, 이에 제한되지는 않으며, 여기서 각 R 또는 R'는 독

립적으로 H, 또는 임의적으로 에테르 (—O—) 연결을 함유하는 치환 또는 비치환의 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아탈딜이다. 하기는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역, 유전자간 DNA, 연결 분석으로부터 한정되는 좌위 (좌위), 엑손, 인트론, 전령 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은-헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로-RNA (miRNA), 소형 핵소체 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 어댑터 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드에는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체가 포함될 수 있다. 존재할 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 구성요소에 의해 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 표지화 구성요소, 태그, 반응성 잔기 또는 결합 상대물과의 접합에 의해 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 제공될 경우, 폴리뉴클레오타이드 서열은 달리 언급되지 않는 한 5'에서 3' 방향으로 열거된다.

[0049] 본원에서 사용될 때, "폴리펩티드"는 아미노산으로 구성되며 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 단백질로 인식되는 조성물을 지칭한다. 본원에서는, 아미노산 잔기의 통상적인 1-문자 또는 3-문자 코드가 사용된다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 본원에서 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭하는 데에 호환가능하게 사용된다. 상기 중합체는 선형이거나 분지형일 수 있으며, 그것이 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 그것이 비-아미노산에 의해 개재될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 개재; 예를 들면 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지화 구성요소와의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 또한, 정의 내에 포함되는 것은 예를 들면 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들면 비자연 아미노산 등 포함)를 함유하는 폴리펩티드는 물론, 관련 기술분야에 알려져 있는 기타 변형체이다.

[0050] 본원에서 사용될 때, "보존제"는 1종 이상 효용의 저하를 포함하여 생성물을 손상시키거나 악화시키는 미생물의 성장 또는 바람직하지 않은 화학 반응 (예컨대 산화)의 발생을 (소정의 시간 기간 동안) 방지하기 위하여 기술되는 바와 같은 생성물에 첨가되는 작용제이다.

[0051] "프로모터"는 RNA 폴리머라제에 의한 유전자의 전사를 개시하는 데에 연관되어 있는 조절 서열을 지칭한다. 프로모터는 유도성 프로모터 또는 상시성 5 프로모터일 수 있다. "유도성 프로모터"는 환경 또는 발생상의 조절 조건하에서 활성인 프로모터이다.

[0052] "프로-서열"은 효소와 같은 활성 단백질을 생성시키기 위하여 통상적으로 단백질로부터 절단되는, 트랜스글루타미나제와 같이 발현되는 단백질, 예컨대 효소원 또는 전구단백질 내 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프로-서열은 단백질의 올바른 폴딩에 필수적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로-서열의 절단은 불활성 효소의 활성 효소로의 전이를 초래한다.

[0053] "재조합"이라는 용어는 예컨대 변경된 폴리펩티드를 생성시키도록 코딩 서열을 돌연변이시키는 것, 또 다른 유전자의 것에 코딩 서열을 융합시키는 것, 다른 프로모터의 조절하에 유전자를 위치시키는 것, 이중 생물체에서 유전자를 발현시키는 것, 감소되거나 상승된 수준으로 유전자를 발현시키는 것, 그의 자연상 발현 프로파일과 다른 방식으로 조건부 또는 상시성으로 유전자를 발현시키는 것 등에 의해 그의 서열 또는 발현 특징이 변경되도록 변형된 유전 재료 (즉, 핵산, 그것이 코딩하는 폴리펩티드, 그리고 그와 같은 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 세포)를 지칭한다. 일반적으로, 재조합 핵산, 폴리펩티드, 및 이를 기반으로 하는 세포는 자연에서 발견되는 관련 핵산, 폴리펩티드 및 세포와 그것이 동일하지 않도록 조작되어 있다. 재조합 세포는 "조작된" 것으로 지칭될 수도 있다.

[0054] "저장 수명"은 일 항목 (예컨대 본원에서 기술되는 바와 같은 생성물)이 사용가능하거나, 소비용으로 적합하거나, 또는 판매가능하게 유지되는 시간의 길이를 지칭한다.

[0055] 적어도 2종 핵산의 맥락에서 "실질적으로 유사한" 및 "실질적으로 동일한"이라는 구는 통상적으로 폴리뉴클레오타이드가 참조 (예컨대 야생형) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드와의 비교시 적어도 약 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 심지어는 99.5 %의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 서열 동일성은 표준 파라미터를 사용하는 블라스트(BLAST), 얼라인(ALIGN) 및 클러스탈(CLUSTAL)과 같은 공지의 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다 (예컨대 문헌 [Altshul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]; [Henikoff et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:10915]; [Karin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873]; 및 [Higgins et al. (1988) Gene 73:237] 참조). 블라스트 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국

립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통하여 공적으로 가용하다. 또한, 파스타(FASTA) (문헌 [Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448.])를 사용하면, 데이터베이스를 탐색할 수 있다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 동일한 핵산 분자는 엄격 (예컨대 중간 내지 고 엄격도 범위 내) 조건하에서 서로 혼성화된다. 핵산 "합성"은 본원에서 주형 의존성인 방식으로 새로운 폴리뉴클레오티드 가닥을 제조하거나 기존 폴리뉴클레오티드 (즉 DNA 또는 RNA)를 연장하기 위한 임의의 시험관내 방법을 지칭한다. 본 발명에 따른 합성에는 폴리머라제를 사용하여 폴리뉴클레오티드 주형 서열의 복제물 수를 증가시키는 증폭이 포함될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 합성 (예컨대 증폭)은 폴리뉴클레오티드에 뉴클레오티드를 도입함으로써 (예컨대 프라이머로부터의 연장) 폴리뉴클레오티드 주형에 대하여 상보성인 새로운 폴리뉴클레오티드 분자를 형성시키는 것을 초래한다. 형성되는 폴리뉴클레오티드 분자 및 그의 주형은 추가적인 폴리뉴클레오티드 분자를 합성하기 위한 주형으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용될 때, "DNA 합성"은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 예컨대 프로브 및 올리고뉴클레오티드 프라이머, 또는 폴리뉴클레오티드 서열분석 용으로의 표지된 뉴클레오티드의 사용을 포함할 수 있다. "전사 조건하에서"는 폴리뉴클레오티드 서열의 전사가 전사의 개시에 기여하거나 그것을 촉진하는 요소에 그것이 작용가능하게 연결되어 있음에 의존한다는 것을 표시하는, 관련 기술분야에 잘 이해되어 있는 용어이다.

[0056] 관련 (및 유도체) 단백질은 "변이체" 단백질을 포괄한다. 변이체 단백질은 적은 수의 아미노산 잔기만큼 또 다른 (즉 모체) 단백질 및/또는 서로와 다르다. 그것이 유래하는 모체 단백질과 비교하였을 때, 변이체는 하나 이상의 아미노산 돌연변이 (예컨대 아미노산 결실, 삽입 또는 치환)를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 더하여, 변이체는 예컨대 블라스트, 얼라인 및 클러스탈 (하기 참조)과 같은 서열 정렬 툴(tool)을 사용하여 측정하였을 때 참조 단백질 또는 핵산과 특정한 서열 동일성 정도를 가질 수 있다. 예를 들면, 변이체 단백질 또는 핵산은 참조 서열과 적어도 약 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 심지어는 99.5 %의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0057] "효소원" 또는 "전구효소"는 효소의 불활성인 전구체를 지칭하는 것으로서, 촉매촉진 작용에 의해, 예컨대 프로-서열의 단백질분해 절단을 통하여 활성인 효소로 전환될 수 있다.

[0058] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시와 연계되어 사용되는 과학 및 기술 용어는 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가지게 된다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하게 되며, 복수 용어는 단수를 포함하게 된다. 본 개시의 방법 및 기술은 일반적으로 관련 기술분야에 잘 알려져 있는 통상적인 방법에 따라 수행된다. 일반적으로, 연계되어 사용되는 명명법, 그리고 본원에서 기술되는 생화학, 효소학, 분자 및 세포 생물학, 미생물학, 유전학, 및 단백질 및 핵산 화학, 그리고 혼성화의 기술은 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며 통상적으로 사용되는 것이다. 달리 표시되지 않는 한, 본 개시의 방법 및 기술은 일반적으로 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며 본 명세서 전체에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반 및 더 특수한 참고문헌에 기술되어 있는 바와 같은 통상적인 방법에 따라 수행된다.

[0059] II. Tgase 변이체

[0060] 본 개시에서는, *스트렙토마이세스 모바라엔시스* 유래의 야생형 효소 (서열식별번호: 1) 대비 효소 활성에 있어서 적어도 1.4-배 (40 %) 향상을 나타내는 Tgase 변이체가 논의된다.

[0061] **서열식별번호 1: 야생형의 성숙한 Tgase**

DSDDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQMQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRRAREVASVMNRALENAHQDESAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYALRNTPSPFKERNGGNHDP SRMKAVIYSKHFWSGQDRSSADKRKYGDPAFRPAPGTGLVDMRDNRNIPRSPSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTWVTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSEGYSDFDGRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW

[0063] 서열식별번호: 1에 제시되어 있는 야생형 서열에 대비한 그와 같은 변이체 예의 아미노산 서열은 표 3에 개시되어 있다. 예를 들면, 야생형 효소 대비 활성에 있어서 적어도 약 1.4-배 (40 %) 향상을 나타내는 Tgase 변이체는 표 3에 나타난 점 돌연변이 중 어느 것을 가질 수 있다.

[0064] 본원의 Tgase 변이체는 추가로 프로-서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변이체는 변이체 폴리펩티드 서열 (예컨대 표 3에 기술되어 있는 아미노산 서열의 연장체로서의 추가적인 아미노산 서열)의 일부 또는 별도의 폴리펩티드 중 어느 하나로서 프로-서열과 함께 발현된다. 일부 실시양태에서, 성숙한 변이체 폴리펩티드는 폴리펩티드 Tgase 프로-서열의 존재하에 발현된다. 일 실시양태에서는, 프로-서열을 코딩하는 DNA 서열과 성숙한 Tgase 변이체를 코딩하는 DNA 서열이 동일한 DNA 주형으로부터 별개의 폴리펩티드 서열로 발현된다. 또

다른 실시양태에서, 성숙한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열은 제1 DNA 주형으로부터 발현되며, 프로-서열을 코딩하는 DNA 서열은 별도의 제2 DNA 주형으로부터 발현된다. 또 다른 실시양태에서는, 프로-서열이 화학적으로 합성된 후, 성숙한 폴리펩티드의 발현 전, 동안 또는 후에 발현 시스템에 첨가된다. 일 예에서, Tgase 변이체는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 PCT 출원 제US20/49226호에 개시되어 있는 바와 같은 무세포 발현 시스템 중에서 발현될 수 있다.

[0065] 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 동종 프로-서열, 즉 Tgase 효소의 자연상 프로-서열, 즉 동일한 생물체 유래 야생형 Tgase 효소의 프로-서열과 함께 발현, 예컨대 재조합으로 발현된다. 다른 실시양태에서, Tgase 변이체는 이종 프로-서열, 즉 동일 효소이나 상이한 생물체로부터 유래하는 프로-서열 또는 동일하거나 상이한 생물체로부터 유래하는 다른 효소의 프로-서열과 함께 발현, 예컨대 재조합으로 발현된다.

[0066] 성숙한 야생형 스트렙토마이세스 모바라엔시스 Tgase 효소에는 효소를 코딩하는 유전자 서열에 의해 코딩되는 N-말단 메티오닌 잔기가 결핍되어 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 N-말단 메티오닌 잔기가 없는 성숙한 스트렙토마이세스 모바라엔시스 Tgase의 변이체로서 발현된다. 다른 실시양태에서, Tgase는 Tgase가 발현되는 발현 벡터에 의해 제공될 수 있는, 추가적인 N-말단 메티오닌 잔기가 있는 성숙한 Tgase로서 발현된다.

[0067] 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 Tgase 효소의 원형 퍼뮤턴트, 예컨대 야생형 Tgase 효소 (서열식별번호: 1) 또는 본원에서 기술되는 Tgase 변이체 (예컨대 표 3에 기술되어 있는 변이체)의 원형 퍼뮤턴트일 수 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 임의적으로 N-말단 메티오닌 잔기를 추가로 포함하는, 표 1에 기술되어 있는 바와 같은 Tgase 변이체의 원형 퍼뮤턴트일 수 있다. 원형 퍼뮤턴트는 모체 효소, 즉 야생형 효소 또는 개시되는 변이체, 예컨대 표 3에 나타난 바와 같은 것 대비 신규한 기질 특이성, 생성물 프로파일 및 반응 동역학을 제공할 수 있다. 원형 퍼뮤턴트는 모체 효소의 동일한 기본적 폴딩을 보유하나, 상이한 위치에 N-말단을 가지며, 원래의 N- 및 C-말단은 임의적으로 연결 서열에 의해 연결되어 있다. Tgase 야생형 또는 변이체 원형 퍼뮤턴트에서, 야생형 또는 변이체 효소의 N-말단 잔기는 자연상 N-말단이 아닌 다른 단백질 부위에 위치한다.

[0068] III. 항미생물 조성물

[0069] 개시되는 것은 본원에서 기술되는 바와 같은 1종 이상의 Tgase 변이체 효소, 예컨대 임의적으로 그의 원형 퍼뮤턴트를 포함하여 N-말단 메티오닌 잔기를 가지며 임의적으로 본원에서 기술되는 바와 같은 프로-서열을 가지는 표 3에 개시되어 있는 변이체 중 어느 것을 포함하는 조성물, 예컨대 살생물, 보존제, 항미생물, 항-박테리아 및 항바이러스 (살바이러스) 조성물이다. 이와 같은 조성물은 예를 들면 미생물 억제제를 위하여 보존될 생성물에, 또는 그와 함께 (예컨대 그 내부에 또는 그와 연관되어) 포함될 수 있다. 상기 Tgase 변이체 효소는 단백질질 아미노산 잔기의 반응을 촉매촉진함으로써, 예를 들면 단백질 가교-결합을 수행하거나 단백질에 관심 분자를 결합시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 보존될 생성물 중에서 미생물 (예컨대 박테리아) 성장을 억제하는 데에, 예를 들면 미생물 성장을 80 % 내지 100 %, 또는 적어도 약 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 % 중 어느 것으로 억제하는 데에 효과적인 양으로 예컨대 본원에서 기술되는 바와 같은 1종 이상의 Tgase 변이체를 포함하거나 이로 이루어지는 1종 이상의 Tgase 변이체 효소를 포함한다.

[0070] 보존제는 미생물 오염물의 성장을 억제하고 그의 양을 감소시키는 것에 의해 생성물의 미생물학적 안전성을 유지하기 위하여 생성물 제제에 첨가되는 항미생물 성분이다. US 약전은 화장품 및 개인 관리 생성물 중 보존제에 대하여 허용가능한 미생물 생존율에 대한 프로토콜을 공표하고 있다. 관심 시험에는 USP 51 (항미생물 효과성 시험) 및 USP 61 (미생물 한계 시험)이 포함된다 (<https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf>).

[0071] 본원에서 개시되는 보존제 시스템의 효과성은 비제한적으로 그램 양성 박테리아, 그램 음성 박테리아, 효모 및/또는 곰팡이 (예컨대 *이. 콜리(E. coli)* DH10 B, *이. 콜리* ATCC 8739, *비. 서브틸리스(B. subtilis)* BGSC 1A976, *씨. 알비칸스(C. albicans)* ATCC 10231 및/또는 *에이. 브라질리엔시스(A. brasiliensis)* ATCC 16404를 포함한 다양한 미생물에 대한 MIC (최소 억제 농도)를 기준으로 측정된다. 최소 억제 농도 (MIC)는 미생물의 성장을 억제하게 되는 항미생물제의 최저 농도로 정의된다. 미생물 성장은 예를 들면 분광광도측정법 (600 nm에서의 광학 밀도)에 의해, 또는 세포 생존력 검정 (박타이터 글로(BacTiter Glo), 프로메가(Promega))을 사용하여 측정될 수 있다.

[0072] 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 추가적인 살생물 효소, 예컨대 가교-결합 효소, 뉴클레아제, 히드롤라제, 프로테아제 및/또는 용해 효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 추가로 1종 이상의 살생물 화학물질, 예컨대 비제한적으로 키토산, 폴리리신 및/또는 사차 암모늄 화합물을 포함한다. 살생물 효소, 조성물

및 제제, 그리고 그의 사용 방법의 예시적이나 비제한적인 예가 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제 PCT/US20/21211호에 개시되어 있다.

[0073] 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 살생물 효소의 사용은 추가적인 항미생물 작용 메커니즘을 제공하는 것에 의해 살생물 화학물질의 항미생물 특성을 강화한다. 예를 들면, 키토산은 세포 멤브레인을 붕괴시켜, 세포 내용물의 유출로 이어진다. 가교-결합성인 Tgase 효소는 세포의 표면 및 세포 내 둘 다에서 세포 기능에 필수적인 단백질을 가교-결합시킬 수 있다. 두 재료의 이와 같은 상호 조합은 요구되는 재료의 양을 감소시키며, 효소에 추가적인 안정성을 제공함으로써 시간이 지나면서 더 큰 활성을 가능하게 하고 (더 적은 키토산 및 더 적은 효소), 살생물제 키토산의 사용에 동반할 수 있는 바람직하지 않은 효과를 감소시킨다.

[0074] **A. 살생물 단백질 및 펩티드**

[0075] 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 항미생물 펩티드를 포함한다. 항미생물 펩티드의 예에는 니신 및 페디오신이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 항미생물 단백질을 포함한다. 항미생물 단백질의 예에는 카세인이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0077] 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소와의 조합으로서 포함될 수 있는 알려져 있는 살생물 효소 및 항미생물 펩티드의 비제한적인 예를 표 1에 나타내었다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 표 1에 기술되어 있는 항미생물 효소, 펩티드 또는 단백질 중 1종 이상과 조합되어 살생물, 보존제, 항-박테리아 또는 항-바이러스 (살바이러스) 조성물에서 이용될 수 있다.

표 1. 공지의 항미생물 특성을 가지는 효소, 펩티드 및 단백질

메카니즘	효소	설명	인용
용해성	리소자임	동물에 의해 선천 면역 시스템의 일부로서 생성됨. 세균 세포 벽에서 펩티도글리칸 서브유닛을 가수분해함.	Ibrahim et al. (2001) <i>FEBS Letters</i> 506(1):27-32; Małaczewska et al. (2019) <i>BMC Vet. Res.</i> 15:318
	키티나제	<i>박실루스 투립기엔시스</i> 를 포함한 토양 세균에 의해 분비되어 곤충 및 진균을 방지함.	Martínez-Zavala et al (2020) <i>Front. Microbiol.</i> 10:3032
	리파제	세포의 지질 및 중합체를 가수분해함.	Prabhawathi et al. (2014) <i>PLoS One</i> 9(5)
	리신	박테리오파지에 의해 이용되어 세균 세포 벽의 글리칸 성분을 가수분해함.	Hoops et al. (2008) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 75:5, 1388-1394
	리소스타핀	세포벽 펩티도글리칸에서 발견되는 펜타글리신 가교를 절단하는 메탈로엔도펩티다제.	Kokai-Kun et al. (2003) <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 47(5):1589-1597
	글루카나제	<i>박실루스</i> 종을 포함한 토양 세균에 의해 분비되어 진균 세포 벽을 분해함. 살조제로서, 그리고 균막 억제에도 이용되고 있음.	Shafi et al. (2017) <i>Biotechnology & Biotechnological Equipment</i> 31:3 446-459
뉴클레아제	DNase	세포의 핵산 및 바이러스 게놈 DNA를 가수분해함.	Kaplan et al. (2012) <i>J. Antibiot. (Tokyo)</i> 65(2):73-77
	RNase	바이러스 RNA를 가수분해함.	Wirth (1992) WO1994000016A1
	락토펜	필수 철 이온을 봉쇄하여 미생물 성장을 방지함. 뉴클레아제 활성도 보유하고 있으며, 균막 중합체를 가수분해함.	Niaz et al. (2019) <i>International Journal of Food Properties</i> 22:1 1626-1641
옥시도리덕타제	글루코스 옥시다제	글루코스를 D-글루코노-δ-락톤 및 수소 퍼옥시드로 산화시킴.	Wong et al. (2008) <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 78(6):927-938
	퍼옥시다제	불활성 기질을 산화시켜 살생물 활성물질을 형성시킴.	Ihalin et al. (2006) <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 445, 261-268

[0078]

	락토퍼옥시다제	불활성 기질을 산화시켜 살생물 활성물질들을 형성시킴.	White et al. (1983) <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 32(2): 267-272
쿠오럼 센싱	락토나제	쿠오럼 센싱 락톤을 가수분해하여 군막- 및 발병기전-촉진 경로의 활성화를 방지함.	Schwab et al. (2019) <i>Front Microbiol.</i> 10:611
	아실라제	쿠오럼 센싱 락톤을 가수분해하여 군막- 및 발병기전-촉진 경로의 활성화를 방지함.	Vogel et al. (2020) <i>Front. Chem.</i> 8:54
히드롤라제	디스페르신 B	군막 중합체를 가수분해함.	Izano et al. (2007) <i>J Dent Res</i> 86(7):618-622
	α -아밀라제	세포의 다당류를 가수분해함.	Craigen et al. (2011) <i>Open Microbiol J.</i> 5: 21-31
	셀룰라제	군막 및 조류 세포 벽의 셀룰로스 성분을 가수분해함.	Loiselle et al. (2003) <i>Biofouling</i> 19(2):77-85
항미생물 펩티드	니신	미생물 세포 멤브레인의 투과성을 증가시킴.	Li et al. (2018) <i>Appl Environ Microbiol</i> 18(12)
	박테리오신	작용 양식에 세포 벽 합성의 억제에 포함되며, 세포 멤브레인 투과성을 증가시킴.	Meade et al. (2020) <i>Antibiotics</i> 9(1):32
	시데로포어	철 이온에 결합하여 그것을 봉쇄함.	Raaska et al. (1999) <i>J Indust Microbiol Biotechnol</i> 22, 27-32
	폴리믹신	미생물 세포 멤브레인의 투과성을 증가시킴.	Poirel et al. (2017) <i>Clin Microbiol Rev</i> 30:577-596
	데펜신	미생물 세포 멤브레인의 투과성을 증가시킴.	Gans (2003) <i>Nat Rev Immunol</i> 3, 710-720

B. 살생물 화학물질

일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체는 예를 들면 살생물, 보존제, 항-박테리아 또는 항-바이러스 (살바이러스) 조성물로서 사용하기 위하여, 비제한적으로 키토산, 폴리리신 또는 사차 암모늄 화합물을 포함한 1종 이상의 살생물 화학물질과 함께 제제화될 수 있다. 살생물 화학물질의 비제한적인 예를 표 2에 나타내었다.

표 2. 항미생물 적용분야를 위한 살생물 화학물질의 예

분류	화학물질
중합체	키토산
	N,N,N-트리메틸 키토산
	ϵ -폴리-리신
	폴리비닐벤질-디메틸부틸
	암모늄 클로라이드
	폴리비닐벤질 트리메틸
	암모늄 클로라이드
	사차 암모늄
	폴리에틸렌이민
	사차 포스포늄 변형된
	에폭시화 천연 고무
	아르기닌-트립토판-풍부
	쿼터드
	구아닐화
	폴리메타크릴레이트
사차 암모늄	암모늄 에틸
	메타크릴레이트 단일중합체
	메탈로-터페리딘
	카복시메틸 셀룰로스
	폴리(<i>n</i> -비닐이미다졸)
변형된 실리콘 고무	변형된 실리콘 고무
	코코아미도프로필 베타인
	미리스트아미도프로필-pg-
	디모늄 Cl 포스페이트
	벤즈알코늄 클로라이드
세제	쿼터늄-6
	코코 베타인
	소듐 라우릴 술페이트
무질서유발제	도데실벤젠술포산
	폴리아미도프로필
	비구아니트
유기 산	구아니디늄 클로라이드
	락트산
	시트르산
	살리실산
	소르브산
	아세트산
	데히드로아세트산
	피아세트산
	벤조산
페놀 & 알콜	에탄올
	이소프로판올
	디클로로벤질 알콜
	글리세롤

[0082]

	카프릴릴 글리콜
	에틸헥실글리세린
	벤질 알콜
	2-페녹시에탄올
	글루타르알데히드
알데히드 & 알데히드 방출제	포름알데히드
	소듐
	히드록시메틸글리세레이트
	DMDM 히단토인
염기	소듐 히드록시드
산화제	수소 퍼옥시드
파라벤	메틸 파라벤
	에틸 파라벤
	프로필 파라벤
Misc	나타마이신
	벤즈이소티아졸리논
	브로노폴
	소르비탄 카프릴레이트
	에틸 라우로일
	아르기네이트
	메틸이소티아졸리논
	세틸피리디늄 클로라이드
	클로르페네신
	아연 옥사이드
	소듐 옥사이드
	N-(3-아미노프로필)-N-도데실프로판-1,3-디아민
	메틸클로로이소티아졸리논
	2,2-디브로모-3-니트릴로프로판아미드
	1-옥타데칸아미늄, N,N-디메틸-N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]-, 클로라이드
	사포닌
	소듐 벤조에이트

[0083]

[0084]

1. 사차 암모늄 화합물

[0085]

키토산 및 그의 더 아세틸화된 형태인 키틴과 같은 생체중합체를 함유하는 사차 암모늄 화합물은 그의 향미생물 활성에 대하여 잘 알려져 있다 (문헌 [Kong, et al. (2010) *Int. J. of Food Microbiol.* 144: 51-63]). 박테리아, 효모 및 진균과 같은 여러 미생물 군에 대한 키틴, 키토산 및 그의 유도체의 향미생물 활성이 알려져 있다.

[0086]

사차 암모늄 화합물 (비-제한적인 예로는 세틸 피리디늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 폴리아미노프로필 비구아니드가 포함됨)은 다른 화장품 성분과의 특정한 부적합성으로 인하여 개인 관리 산업에 대해서는 제한된 용도를 가진다.

[0087]

론자(Lonza)의 지오가드(Geogard) 시리즈 보존제 블렌드는 그의 새로운 생성물 (지오가드 233S, 지오가드 233S, 지오가드 233S, 지오가드 361)에서의 파라벤의 사용을 기피하지만, 이 향미생물 조성물은 국소용 개인 관리 제품의 중요한 부분을 형성하는 많은 음이온 성분에 의해 비활성화되는 양이온성 벤즈에토늄 클로라이드를 기재로 한다.

[0088]

2. 알데히드 & 알데히드-방출 화합물

[0089]

포름알데히드는 범주 3 CMR (발암원성, 돌연변이원성 및 생식성 독성)으로 분류된다. 그러나, 포름알데히드를 천천히 방출하는 몇 가지 향미생물체가 여전히 사용되고 있으며 시중에서 제조되고 있는 것으로 알려져 있는 것은 흥미롭다. 효과적이며 충분히-허용성인 향미생물체의 부족으로 인하여, 업계는 DMDM 히단토인 (CAS 6440-58-0), 이미다졸리디닐 우레아 및 디아졸리디닐 우레아 (CAS 39236-46-9)와 같은 포름알데히드 공여체를 계속 사용할 것을 압박받고 있다. 이 물질에 의해 방출되는 포름알데히드는 그의 매우 반응성인 알데히드 카르보닐 관능기를 통하여 몇 가지 화장품 성분과 반응할 수 있다. 예를 들면, 유일하게 가용하며 전세계적으로 승인되어 있는 UV-A 흡수제인 아보벤존(Avobenzene)은 포름알데히드 유도체에 의해 방출되는 포름알데히드와 반응한다. 이는 일광차단 제제에서는 상당한 단점이다. 보존제 블렌드인 클라리안트(Clariant)의 니아파가드(Niapaguard) PDU 및 코그니스(Cognis)의 엘레스타브(Elestab) 305, ISP의 게르마벤(Germaben) II, 게르마벤 H-E

는 파라벤의 디아졸리디닐 우레아와의 조합을 활용한다. ISP의 게르말 플러스(Germall Plus) 및 론자의 글리단트 플러스(Glydant Plus)는 아이오도프로피닐 부틸 카르바메이트 (IPBC)와 함께 디아졸리디닐 우레아를 이용한다. 맥킨타이어(McIntyre)의 파라곤(Paragon) 시리즈는 DMDM 히단토인, 그리고 파라벤, 페녹시 에탄올 및 IPBC와 같은 다른 향미생물제를 포함한다. 심라이즈(Symrise)의 네오-드라고시드(Neo-Dragocide) 및 토르(Thor)의 마이크로케어(Microcare) IMP는 파라벤과 이미다졸리디닐 우레아 사이의 상승작용을 활용한다.

[0090] 3. 파라벤

[0091] 파라벤은 p-히드록시 벤조산의 에스테르이다. 파라벤 화합물에는 구체적으로 메틸-파라벤 (CAS 99-76-3), 에틸-파라벤 (CAS 120-47-8), 프로필-파라벤 (CAS 94-13-3), 부틸-파라벤 (CAS 94-26-8), 이소프로필-파라벤 (CAS 4191-73-5), 및 벤질-파라벤 (CAS 94-18-8)이 포함된다. 클라리안트의 '페노립(Phenonip)'은 그 중 5종이 파라벤인 6종 향미생물제의 블렌드이다. 동사는 '니파스타트(Nipastat)' 및 '니파셉트(Nipasept)'로서 파라벤만의 블렌드를 제공하고 있다. 코그니스의 엘레스탑 FL 15, 엘레스탑 48, 엘레스탑 50J, 엘레스탑 305, 엘레스탑 388, 엘레스탑 3344, 엘레스탑 4112, 엘레스탑 4121, 엘레스탑 4150 리포(Lipo)는 모두 향미생물제의 그 내부의 적어도 1종 파라벤과의 블렌드이다. 인두켄(Induchem)의 유니펜(Uniphen) P23, ISP의 게르마벤 및 리쿠아파르(LiquaPar) 시리즈 블렌드는 수종의 파라벤을 함유한다. 갤럭시 서팩탄츠(Galaxy Surfactants)는 페녹시 에탄올과의 각각 4 및 5종 파라벤 블렌드를 기재로 하는 갈가드(Galguard) NK1 및 갈가드 NK2 블렌드를 제공한다. 그의 '파라곤' 시리즈에 속하는 맥킨타이어/로디아(Rhodia)의 5종 블렌드는 수종의 파라벤을 포함한다. 롬 앤 하스(Rohm and Haas)의 네올론(Neolone) MXP는 메틸 이소티아졸리논과 함께 파라벤을 포함한다. 심라이즈의 네오-드라고시드 시리즈 블렌드는 파라벤을 포함한다. 숄케 앤 마이어(Schulke and Mayr)의 욱실(Euxyl) K 300은 5종의 파라벤을 포함한다. 토르의 마이크로케어 PM4 및 마이크로케어 PM5는 각각 4종 및 5종의 파라벤을 포함한다. 파라벤은 페놀 유도체로서; 모든 페놀계 향미생물제는 10의 pKa를 가지는 매우 산성인 수소를 보유하는 매우 반응성인 유기 관능기인 페놀계 '히드록실' 기를 가진다.

[0092] 4. 할로젠화 화합물

[0093] 날코(Nalco)의 메르가드(Merguard) 시리즈 (4종 블렌드)는 할로젠화 분자인 메틸 디브로모 글루타로니트릴 및 2-브로모-2-니트로-1,3-디올에 의존한다. 숄케 앤 마이어의 욱실 시리즈의 수종 블렌드는 클로로티아졸리논, 메틸 디브로모 글루타로니트릴, 2-브로모-2-니트로-1,3-디올 및 디아졸리디닐 우레아를 기재로 한다. 토르의 마이크로케어 시리즈는 파라벤, 2-브로모-2-니트로-1,3-디올, 아이오도프로피닐 부틸카르바메이트 (IPBC), 이미다졸리디닐 우레아 및 디아졸리디닐 우레아를 사용한다.

[0094] 할로젠화 향미생물제의 다른 예는 클로르페네신 및 클로르헥시딘이다. 페놀계 화합물과 마찬가지로, 할로젠화 유기 분자가 상당 수준의 독성 효과를 나타낸다는 것은 상식이다. 예를 들면, IPBC는 그의 아이오딘 함량으로 인하여 갑상선 호르몬 교란의 위험성이 있다. 그것은 일본에서는 허용되어 있지 않으며, EU에서는 잔류(leave-on) 생성물에 0.02 %까지만 허용되어 있다. 마찬가지로, EU는 유일하게 세정-제거 생성물에서 0.1 %까지만 메틸 디브로모 글루타로니트릴의 사용을 허용한다. 브로노폴인 2-브로모-2-니트로프로판-1,3-디올은 일부 질소 함유 화장품 성분과의 상호작용에서의 발암원인인 니트로소아민의 생성에 연관되어 있다. 메틸 클로로 이소티아졸리논의 향미생물 효능은 너무 강력해서 세정-제거 생성물에서만 15 ppm 농도로 그것이 허용되어 있다. 클로로메틸 이소티아졸리논은 매우 넓은 향-미생물 활성 범위를 가지고 있으나, 그와 같이 강력한 향-미생물 독성이 극히 높아서, 화장품 제조자가 오랜 시간 동안 인간 피부상에 잔류하는 화장품에 이러한 종류의 강력한 향미생물제를 사용하는 것을 선호하지 않는다. 저농도 (ppm 수준)인 임의의 강한 살박테리아제는 인간 세포를 포함한 살아있는 생물체의 임의의 다른 세포에도 동일하게 치명적일 가능성이 있을 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 이것이 일본에서 생성물이 점막 멤브레인과의 접촉될 예정인 경우 클로로메틸 이소티아졸리논이 보존용으로 허용되지 않는 정확한 이유이다.

[0095] 할로젠화 화합물에는 2,4-디클로로벤질-알콜, 클로로크실렌을 (4-클로로-3,5-디메틸-페놀로도 알려져 있음), 브로노폴 (2-브로모-2-니트로프로판-1,3-디올로도 알려져 있음), 아이오도프로피닐 부틸 카르바메이트가 포함된다.

[0096] C. 백터 전달

[0097] 본원에서 기술되는 조성물은 본원에서 기술되는 바와 같은 1종 이상 살생물 효소(들)를 코딩하는 유전 재료의 전달을 위하여 백터 (예컨대 박테리오파지)를 포함할 수 있다.

[0098] 본원에서 사용될 때, "박테리오파지" 및 "파지"는 계놈에서 적어도 약 90 %, 95 %, 99 %, 99.9 % 또는 그 이상

중 어느 것의 서열 동일성을 공유하는 것과 같이 단리물의 구성원이 실질적으로 동일한 유전자 구성을 가지는 박테리오파지 단리물을 지칭하는 데에 호환가능하게 사용된다. "박테리오파지" 또는 "파지"는 모체 박테리오파지는 물론, 그의 자손 또는 유도체 (예컨대 유전자 조작된 버전)도 지칭한다. 박테리오파지는 자연 발생 파지 단리물, 또는 벡터를 포함한 조작된 파지, 또는 적어도 모든 필수 유전자를 코딩하는 핵산, 또는 숙주 박테리아 내부에서의 파지의 생활 주기를 수행하기 위한 파지의 전체 게놈일 수 있다.

[0099] IV. 생성물

[0100] 본원에서 개시되는 생성물에는 생성물 중에서 향미생물 작용제, 예컨대 보존제로서 작용하는 데에 효과적인 양, 예를 들면 약 0.0001 % w/v 내지 약 5 % w/v의 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 본원에서 기술되는 바와 같은 그의 조성물을 포함하는 개인 관리 생성물, 가정용 생성물, 산업용 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 접착제, 에너지, 플라스틱, 포장 또는 농업용 생성물이 포함된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Tgase 변이체는 개인 관리 생성물, 예컨대 비제한적으로 막대 비누, 액체 비누 (예컨대 손 비누), 손 살균제 (세정 제거 및 잔류형 알콜 기재 및 수-기재 손 소독제 포함), 수술전 피부 소독제, 세척용 와이프, 소독용 와이프, 바디 워시, 여드름 치료 생성물, 항진균 기저귀 발진 크림, 항진균 피부 크림, 샴푸, 컨디셔너, 화장품 (비제한적으로 액체 또는 분말 파운데이션, 액체 또는 고체 아이라이너, 마스카라, 크림 아이 섀도우, 착색 분말, 건조하거나 가습된 메이크 업 제거 생성물 등으로 사용될 "팬케이크" 유형 분말 포함), 탈취제, 향미생물 크림, 바디 로션, 핸드 크림, 국소용 크림, 애프터셰이브 로션, 피부 토너, 구강 세척제, 치약, 일광차단 로션, 그리고 유아용 생성물 예컨대 비제한적으로 세척용 와이프, 유아용 샴푸, 유아용 비누 및 기저귀 크림에 포함된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Tgase 변이체는 상처 관리 물품, 예컨대 비제한적으로 상처 치유 연고, 크림 및 로션, 상처 피복제, 화상 상처 크림, 붕대, 테이프 및 스테리-스트립, 그리고 의료 물품 예컨대 의료용 가운, 모자, 안면 마스크 및 신발-덮개, 수술용 드롭(drop) 등에 포함된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Tgase 변이체는 구강 관리 생성물, 예컨대 구강 세정제, 치약, 또는 치과용 치실 코팅, 수의과 또는 애완동물 관리 생성물, 보존제 조성물, 또는 표면 소독제, 예컨대 소독제 용액, 스프레이 또는 와이프에 포함된다.

[0102] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Tgase 변이체는 예를 들면 보존제 물질로서 가정용 또는 산업용 생성물에 혼입된다. 예를 들면, Tgase 변이체(들)는 가정용 세척제, 예컨대 농축된 액체 세척제 또는 스프레이 세척제, 세척용 와이프, 접시 세척 액체, 접시 세척제 세제, 스프레이-대걸레 액체, 가구 광택제, 실내용 페인트, 실외용 페인트, 먼지제거 스프레이, 세탁물 세제, 식물 유연제, 양탄자/식물 세척제, 창문 및 유리 세척제, 화장실 보울 세척제, 액체/크림 세척제 등에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Tgase 변이체는 예를 들면 소비, 포장 및 식품 코팅 전에 과일 및 채소를 세척하도록 고안되는 식품 세척 생성물에 포함될 수 있다.

[0103] 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체가 혼입될 수 있는 다른 생성물로는 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 에너지 (예컨대 수압파쇄(fracking) 액체), 플라스틱, 포장 및 농업용 생성물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 HVAC 시스템, 냉각지(cooling pond), 수 정제 시스템에 혼입될 수 있거나, 또는 비제한적으로 펄프 및 종이 가공과 같은 산업 적용분야에서 사용될 수 있다.

[0104] 본원에서 개시되는 생성물에는 색상을 표면에 결합시키는 데에, 예컨대 1종 이상의 피부 단백질, 예컨대 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴에, 또는 식품 생성물의 단백질, 예컨대 가공된 식품 생성물의 식용가능한 외피, 예컨대 소시지 외피에 공유 결합시키는 데에 효과적인 양으로 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 또는 그의 조성물, 및 1종 이상의 색상 생성 분자를 포함하는 화장품 및 개인 관리 생성물이 포함된다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체 효소의 효과적인 양은 약 1 % w/v까지이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체를 포함하는 생성물 또는 조성물은 추가로 아실 트랜스퍼아제, 알파-아밀라제, 베타-아밀라제, 알파-갈락토시다제, 아라비노시다제, 아릴 에스테라제, 베타-갈락토시다제, 카라기나제, 카탈라제, 셀로비오히드롤라제, 셀룰라제, 콘드로이티나제, 큐티나제, 엔도-베타-1,4-글루카나제, 엔도-베타-만나제, 에스테라제, 엑소-만나나제, 갈락타나제, 글루코아밀라제, 헤미셀룰라제, 히알루로니다제, 케라티나제, 락카제, 락타제, 리그니나제, 리파제, 리폭시제나제, 만나나제, 옥시다제, 펙테이트리아제, 펙틴 아세틸 에스테라제, 펙티나제, 펜토사나제, 피옥시다제, 페놀옥시다제, 포스파타제, 포스포리파제, 피타제, 폴리갈락투로나제, 베타-글루카나제, 탄나제, 크실란 아세틸-에스테라제, 크실라나제, 크실로글루카나제, 크실로시다제, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제 또는 이의 조합에서 선택되는 1종 이상의 추가적인 효소를 포함한다.

- [0106] 일부 실시양태에서, 임의적으로 그의 원형 퍼뮤턴트를 포함하여 N-말단 메티오닌 잔기를 가지며 임의적으로 본원에서 기술되는 바와 같은 프로-서열을 가지는 표 3에 개시되어 있는 변이체 중 어느 것과 같은 Tgase 변이체 효소, 또는 본원에서 기술되는 바와 같은 그의 조성물은 적어도 약 0.0001 % w/v, 0.0005 % w/v, 0.001 % w/v, 0.005 % w/v, 0.01 % w/v, 0.05 % w/v, 0.1 % w/v, 0.5 % w/v, 1 % w/v, 1.5 % w/v, 2 % w/v, 2.5 % w/v, 3 % w/v, 3.5 % w/v, 4 % w/v, 4.5 % w/v, 또는 5 % w/v 중 어느 것의 농도로 본원에서 개시되는 생성물 중 어느 것에 향미생물 작용제로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 그의 조성물 중 Tgase 변이체 효소는 약 0.0001 % w/v 내지 약 0.0005 % w/v, 약 0.001 % w/v 내지 약 0.005 % w/v, 약 0.005 % w/v 내지 약 0.01 % w/v, 약 0.01 % w/v 내지 약 0.05 % w/v, 약 0.05 % w/v 내지 약 0.1 % w/v, 약 0.1 % w/v 내지 약 0.5 % w/v, 약 0.5 % w/v 내지 약 1 % w/v, 약 1 % w/v 내지 약 1.5 % w/v, 약 1.5 % w/v 내지 약 2 % w/v, 약 2 % w/v 내지 약 2.5 % w/v, 약 2.5 % w/v 내지 약 3 % w/v, 약 3 % w/v 내지 약 3.5 % w/v, 약 3.5 % w/v 내지 약 4 % w/v, 약 4 % w/v 내지 약 4.5 % w/v, 약 4.5 % w/v 내지 약 5 % w/v, 약 0.0001 % w/v 내지 약 0.001 % w/v, 약 0.001 % w/v 내지 약 0.01 % w/v, 약 0.01 % w/v 내지 약 0.1 % w/v, 약 0.1 % w/v 내지 약 1 % w/v, 약 1 % w/v 내지 약 2.5 % w/v, 약 2.5 % w/v 내지 약 5 % w/v, 또는 약 1 % w/v 내지 약 5 % w/v 중 어느 것의 농도로 포함된다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물이 향미생물 작용제로서 포함되는 생성물은 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질, 예컨대 비제한적으로 파라벤, 포름알데히드 및 포름알데히드 방출제, 이소티아졸리논, 페녹시에탄올 및/또는 유기 산 (예컨대 소듐 벤조에이트)은 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 단독, 또는 살생물 화학물질, 예컨대 키토산과 조합되는 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 생성물 중 유일한 향미생물 작용제, 예컨대 항박테리아제 또는 보존제이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 비제한적으로 1종 이상의 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질(들)과 같은 1종 이상의 추가적인 향미생물 작용제(들)과 조합되어 향미생물 작용제로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 비제한적으로 1종 이상의 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질(들)과 같은 1종 이상의 추가적인 향미생물 작용제(들)과 조합되어 향미생물 작용제로 포함된다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 보존제 블렌드는 생성물과 상용성이며, 산화제 또는 환원제, 그리고 다양한 생성물의 정상 pH 범위 (4.5 내지 8.0)에 대하여 안정하다.
- [0109] 본원에서 기술되는 Tgase 변이체가 혼입될 수 있는 생성물의 비-제한적인 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 PCT 출원 제PCT/US20/21211호, 및 U.S. 가출원 제63/010,987호, 제63/074,288호 및 제63/075,763호에 기술되어 있다.
- [0110] **A. 개인 관리 생성물**
- [0111] 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물, 예컨대 보존제 조성물은 임의의 개인 관리 생성물에 혼입될 수 있다. 개시되는 Tgase 변이체 효소 조성물이 혼입될 수 있는 개인 관리 생성물에는 막대 비누, 액체 비누 (예컨대 손 비누), 손 살균제 (세정 제거 및 잔류형 알코올 기재 및 수-기재 손 소독제 포함), 수술전 피부 소독제, 세척용 와이프, 소독용 와이프, 바디 워시, 여드름 치료 생성물, 향진균 기저귀 발진 크림, 향진균 피부 크림, 샴푸, 컨디셔너, 화장품 (비제한적으로 액체 또는 분말 파운데이션, 액체 또는 고체 아이라이너, 마스크라, 크림 아이 섀도우, 착색 분말, 건조하거나 가습된 메이크업 제거 생성물 등으로 사용될 "팬케이크" 유형 분말 포함), 탈취제, 향미생물 크림, 바디 로션, 핸드 크림, 국소용 크림, 애프터셰이브 로션, 피부 토너, 구강 세척제, 치약, 일광차단 로션, 그리고 유아용 생성물 예컨대 비제한적으로 세척용 와이프, 유아용 샴푸, 유아용 비누 및 기저귀 크림이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 대상은 상처 관리 물품, 예컨대 비제한적으로 상처 치유 연고, 크림 및 로션, 상처 피복제, 화상 상처 크림, 붕대, 테이프 및 스테리-스트립, 그리고 의료 물품 예컨대 의료용 가운, 모자, 안면 마스크 및 신발-덮개, 수술용 드롭(drop) 등에 적용될 수도 있다. 추가적인 개인 관리 생성물에는 용액, 스프레이 또는 와이프를 포함한 구강 생성물, 예컨대 구강 세정제, 치약, 치과용 치실 코팅, 수의과 또는 애완동물 관리 생성물, 보존제 조성물, 및 표면 소독제가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0112] 일반적으로, 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 c는 피부의 외관을 변형시키는 데에 사용하도록 예정되는 임의의 적합한 개인 관리 생성물, 예컨대 화장품 생성물 (예컨대 립스틱, 파운데이션, 블러시 또는 아이 메이크업)에 혼입될 수 있다. 개시되는 조성물이 혼입될 수 있는 화장품 생성물에는 액체 또는 분말 파운데이션, 액체 또는 고체 아이라이너, 블러시, 아이 섀도우, 착색 분말, 건조하거나 가습된 립 색상, 또는 메이크

업 설정 스프레이 등으로 사용될 "팬케이크" 유형 분말이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 개시되는 조성물은 브론저(bronzer) 또는 인공 태닝 생성물에 혼입될 수도 있다. 또한, 개시되는 조성물은 예를 들면 일광차단 발색단 (예컨대 비제한적으로 옥시벤존, 아보벤존, 옥티살레이트, 옥토크릴렌, 호모살레이트, 또는 옥티녹세이트, 또는 이의 유도체)을 피부 단백질에 결합시키기 위하여 일광차단 생성물, 예컨대 화학적 일광차단체에 혼입될 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 개시되는 효소 및 조성물에 의해 미생물 오염으로부터 보호되는 개인 관리 생성물은 에멀션, 젤, 혈청, 용액, 토너, 로션, 크림, 스프레이, 젤, 분말, 스틱(stick) 및 세척제와 같은 임의의 유형의 것일 수 있다.

[0114] 개인 관리 생성물 제제는 통상적으로 본 개시의 보존제 조성물이 첨가되는 베이스 제제를 포함한다. 베이스 제제는 최종 사용 적용분야에 따라 수많은 서로 다른 성분을 함유할 수 있다. 개인 관리 생성물 제제는 예를 들면 용매, 계면활성제, 에멀션화제, 농밀도 인자, 키티너, 완화제, 피부 관리 성분, 보습제, 증점제, 윤활제, 충전제, 향산화제, 다른 보존제, 활성 성분, 특히 피부학적으로 활성인 성분, 방향제 등은 물론, 이의 혼합물을 함유할 수 있다. 본원에서 언급될 때의 활성 성분에는 예를 들면 항-염증제, 및 임의적으로 항-박테리아제, 항진균제 등의 작용제가 포함된다. 국소 적용용으로 적합한 활성 성분이 특히 바람직하다.

[0115] 일부 실시양태에서, 개인 관리 생성물은 석유화학 유래의 보존제 물질과 같은 임의의 추가적인 보존제는 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 개인 관리 생성물은 본원에서 기술되는 효소 또는 효소/중합체 조성물 이외에 석유화학 유래의 보존제와 같은 1종 이상의 추가적인 보존제 물질을 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 개인 관리 생성물은 개인 관리 생성물에 통상적으로 포함되는 통상적인 항-박테리아 및/또는 항진균 "활성 작용제"는 포함하지 않는다. 손 비누에 사용되는 통상적인 항-박테리아제에는 하기가 포함된다: 클로플루카르반, 플루오로살란, 헥사클로로펜, 헥실레소르시놀, 아이오딘 착물 (암모늄 에테르 술페이트 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트), 아이오딘 착물 (알킬아릴옥시 폴리메틸렌 글리콜의 포스페이트 에스테르), 노닐페녹시폴리(에틸렌옥시) 에탄올아이오딘, 폴록사머-아이오딘 착물, 포비돈, 운데코일륨 클로라이드 아이오딘 착물, 메틸벤즈에토늄 클로라이드, 페놀, 페놀 16, 이차 아미트리크레졸, 소듐 옥시클로로센, 트리브롬살란, 트리클로카르반, 트리클로산 및 삼중 염료. 소비자 생성물 제제에 보존제로서 사용되는 통상적인 향미생물제에는 하기가 포함된다: 파라벤, 포름알데히드 및 포름알데히드 방출제, 이소티아졸리논, 페녹시에탄올 및 유기 산 (예컨대 소듐 벤조에이트).

[0117] 일부 실시양태에서, 단독, 또는 비제한적으로 키토산을 포함한 살생물 화학물질과의 조합 (예컨대 블렌드)으로서의 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 생성물 중 유일한 항박테리아제, 항진균제, 향미생물제 또는 보존제이다. 일부 실시양태에서, 단독, 또는 비제한적으로 키토산과 같은 살생물 화학물질과의 조합 (예컨대 블렌드)으로서의 Tgase 변이체 효소는 1종 이상의 추가적인 보존제 물질, 예컨대 1종 이상의 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질과 조합된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생체기반 보존제 (즉 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물)는 1종 이상의 합성 보존제 (예컨대 석유화학적으로 유래하는 물질)와 조합되며, 생체기반 및 합성 보존제 사이에서 달성되는 보존 (예컨대 향미생물) 효과는 상가작용성 또는 상승작용성이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생체기반 보존제 (즉 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물)는 1종 이상의 추가적인 보존제 물질, 예를 들면 폴리리신, 키토산, 벤조에이트, 니신, 리소자임 및 키토산, 또는 이의 임의의 조합에서 선택되는 살생물 물질과 조합되며, 생체기반 보존제와 추가적인 보존제 물질(들) 사이에서 달성되는 보존 (예컨대 향미생물) 효과는 상가작용성 또는 상승작용성이다.

[0118] 일부 실시양태에서, 개인 관리 생성물은 완화제를 포함할 수 있다. 완화제에는 비제한적으로 아몬드 오일, 피마자 오일, 세라토니아 추출물, 세토스테아로일 알콜, 세틸 알콜, 세틸 에스테르 왁스, 콜레스테롤, 면실 오일, 시클로메티콘, 에틸렌 글리콜 팔미토스테아레이트, 글리세린, 글리세린 모노스테아레이트, 글리세릴 모노올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 라놀린, 레시틴, 경량 무기질 오일, 중간-사슬 트리글리세리드, 무기질 오일 및 라놀린 알콜, 바셀린, 바셀린 및 라놀린 알콜, 대두 오일, 전분, 스테아릴 알콜, 해바라기 오일, 크실리톨 및 이의 조합이 포함된다. 일 실시양태에서, 완화제는 에틸헥실스테아레이트 및 에틸헥실 팔미테이트이다.

[0119] 통상적인 에멀션화제는 하기이다: 금속 비누, 특정 동물 및 채소 오일, 그리고 다양한 극성 화합물. 적합한 에멀션화제에는 아카시아, 음이온계 에멀션화 왁스, 칼슘 스테아레이트, 카르보머, 세토스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 콜레스테롤, 디에탄올아민, 에틸렌 글리콜 팔미토스테아레이트, 글리세린 모노스테아레이트, 글리세릴 모노올레에이트, 히드록시프로필 셀룰로스, 하이프로멜로스, 수성 라놀린, 라놀린 알콜, 레시틴, 중간-사슬 트리

글리세리드, 메틸셀룰로스, 무기질 오일 및 라놀린 알콜, 일염기성 소듐 포스페이트, 모노에탄올아민, 비이온계 에멀션화 왁스, 올레산, 폴록사머, 폴록사머류, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 피마자 오일 유도체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 프로필렌 글리콜 알기네이트, 자가-에멀션화 글리세릴 모노스테아레이트, 소듐 시트레이트 탈수물, 소듐 라우릴 술페이트, 소르비탄 에스테르, 스테아르산, 해바라기 오일, 트라가칸트, 트리에탄올아민, 크산탄 검 및 이의 조합이 포함된다. 일 실시양태에서, 에멀션화제는 글리세롤 스테아레이트이다.

[0120] 적합한 비-이온계 계면활성제에는 에멀션화 왁스, 글리세릴 모노올레에이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 피마자 오일 유도체, 폴리소르베이트, 소르비탄 에스테르, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 시클로텍스트린, 글리세린 모노스테아레이트, 폴록사머, 포비돈 및 이의 조합이 포함된다. 일 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 스테아릴 알콜이다.

[0121] 적합한 향산화제에는 예를 들면 술폰이트 (예컨대 소듐 술폰이트), 토코페롤 또는 그의 유도체, 아스코르브산 또는 그의 유도체, 시트르산, 프로필 갈레이트, 키토산 글리콜레이트, 시스테인, N-아세틸 시스테인 더하기 아연 술폰이트, 티오술폰이트 (예컨대 소듐 티오술폰이트), 폴리페놀 글루타치온, 디티오프레이톨 (DTT), 수퍼옥사이드 디스무타제, 카탈라제 등이 포함된다.

[0122] 에틸렌 디아민 테트라아세트산 (EDTA)과 같은 킬레이팅제가 포함될 수도 있다.

[0123] 적합한 증점제에는 예를 들면 아크릴레이트/스테아레이트-20 메타크릴레이트 공중합체, 카르보머, 카르복시메틸 전분, 세라 알바, 디메티콘/비닐 디메티콘 가교중합체, 프로필렌 글리콜 알기네이트, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 실리카, 실리카 디메틸 실릴레이트, 크산탄 검 및 수소화된 부틸렌/에틸렌/스티렌 공중합체가 포함된다.

[0124] 적합한 보습제에는 예를 들면 부틸렌 글리콜, 세틸 알콜, 디메티콘, 디미리스틸 타르트레이트, 글루코스 글리세레이트-26, 글리세린, 글리세릴 스테아레이트, 가수분해된 우유 단백질, 락트산, 락토스 및 기타 당, 라우레트-8, 레시틴, 옥트옥시글리세린, PEG-12, PEG 135, PEG-150, PEG-20, PEG-8, 펜틸렌 글리콜, 헥실렌 글리콜, 피탄트리올, 폴리 쿼터늄-39 PPG-20 메틸 글루코스 에테르, 프로필렌 글리콜, 소듐 히알루로네이트, 소듐 락테이트, 소듐 PCA, 소르비톨, 숙시노글리칸, 합성 밀랍, 트리-C14-15 알킬 시트레이트 및 전분이 포함된다.

[0125] 1. 색상 분자

[0126] 본원에서 기술되는 조성물은 표면에 적용하여 결합시키기 위한, 예컨대 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴과 같은 피부 표면상 1종 이상의 단백질에 결합시키거나 소시지 외피와 같은 식품 생성물의 식용가능한 외피에 결합시키기 위한 1종 이상의 색상 생성 분자, 예컨대 염료 또는 색소 분자를 함유할 수 있다. 색상 생성 분자의 비제한적인 예는 문헌 ["Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices," US Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices>]에 기술되어 있다.

[0127] 2. 일광차단 분자 및 링커

[0128] 본원에서 기술되는 조성물은 생성물 제제 내 또는 피부 표면상 단백질 또는 펩티드, 예컨대 콜라겐, 케라틴, 엘라스틴, 가수분해된 콜라겐, 가수분해된 케라틴 및/또는 가수분해된 엘라스틴에 적용하여 결합시키기 위한 1종 이상의 UV-차단 분자(들), 예컨대 일광차단제를 함유할 수 있다.

[0129] 일광차단제 및/또는 일광차단제 유사체 분자의 비제한적인 예에는 파라-아미노벤조산, 트롤아민 살리실레이트, 시녹세이트, 디옥시벤존, 엔술리졸, 호모살레이트, 메라디메이트, 옥티녹세이트, 옥티살레이트, 옥토크릴렌, 파디메이트 0, 솔리소벤존, 옥시벤존, 아보벤존 및 벤조페논 히드라존이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0130] 일부 실시양태에서, 일광차단제는 단백질 또는 펩티드에의 효소 결합을 위한 기질 취급성을 제공하도록 링커 분자를 사용하여 관능화된다. 이와 같은 관능화의 비-제한적인 예는 일광차단 분자와 링커 사이의 쉬프 염기 (Schiff base) 형성을 통하여 이루어질 수 있다. 이와 같은 관능화의 비-제한적인 예는 일광차단 분자와 링커 사이의 카르바메이트 연결 형성을 통하여 이루어질 수도 있다. 상기 링커는 일차 아민, 히드라진, 히드라지드 또는 알콕시아민 잔기의 형태로 효소 인식에 가용한 아민을 포함할 수 있다. 링커는 효소 인식을 위한 글루타민 잔기를 포함할 수도 있다. 링커는 일광차단제-링커 분자의 제자리 형성을 위한 가변 길이의 지방족 탄소 사슬에 의해 연결된 2개의 관능성 화학 말단 기로 이루어질 수 있다. 링커의 비제한적인 예로는 리신, 카다베린,

푸트레신, 히드라진, 아디프산 디히드라지드, 세바스산 디히드라지드 및 헥사메틸렌디아민이 포함된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 일광차단제-링커 부가물은 관심 단백질 또는 펩티드에 결합되며, 이어서 가수분해에 의해 일광차단제가 방출될 수 있다. 일 실시양태에서, 일광차단 분자는 링커로부터 가수분해가능하거나 달리 방출가능하다. 일부 실시양태에서, 일광차단제-링커 부가물은 단백질 또는 펩티드, 예컨대 피부상에 존재하는 단백질 또는 펩티드에 결합되어 유지되면서 UV-차단 보호를 제공한다.

[0132] 3. 단백질 및 펩티드

[0133] 본원에서 기술되는 조성물은 일광차단, 피부 관리 및/또는 화장품 생성물 또는 사용 적용분야를 위하여 1종 이상의 관심 단백질 또는 펩티드를 함유할 수 있다. 피부 관리 생성물 및 화장품용인 관심 단백질 및 펩티드의 비제한적인 예는 하기이다: 콜라겐, 가수분해된 콜라겐, 케라틴, 가수분해된 케라틴, 엘라스틴, 가수분해된 엘라스틴, 실크, 가수분해된 실크, 실크 피브로인 펩티드, 아세틸 헥사펩티드-3, 아세틸 헥사펩티드-8, 아세틸 테트라펩티드-5, 아세틸 테트라펩티드-9, 아세틸아르기닌트립토판 디페닐글리신, 구리 트리펩티드-1, CT-2, 디펩티드-2, 헵타펩티드-7, 헥사노일 디펩티드-3 노르류신 아세테이트, 헥사펩티드-9, 헥사펩티드-11, 망가니즈 트리펩티드-1, 미리스토일 헥사펩티드-16, 미리스토일 헥사펩티드-16, 미리스토일 펜타펩티드-17, 노나펩티드-1, 팔미토일 디펩티드-5 디아미노부티로일 히드록시트레오닌, 팔미토일 디펩티드-5 디아미노히드록시부티레이트, 팔미토일 헥사펩티드-12, 팔미토일 헥사펩티드-14, 팔미토일 헥사펩티드-6, 팔미토일 펜타펩티드-4, 팔미토일 테트라펩티드-7, 팔미토일 트리펩티드-1, 팔미토일 트리펩티드-3, 팔미토일 트리펩티드-38, 펜타펩티드-3, 펜타펩티드-18, sh-올리고펩티드-1, sh-올리고펩티드-2, sh-폴리펩티드-1, sh-폴리펩티드-11, sh-폴리펩티드-9, 대두 펩티드, 테트라펩티드 PKKK, 테트라펩티드-21, 트리펩티드-1, 트리펩티드-10 시트룰린, 및 헤모글로빈, 쌀, 콩, 밀 단백질, 옥수수, 피브로넥틴, 레티쿨린, 혈청 단백질, 밀 글루텐의 변형된 가수분해물.

[0134] 본원에서 기술되는 조성물은 1종 이상의 관심 모델 펩티드를 함유할 수 있다. 관심 모델 펩티드의 한 가지 비-제한적인 예로는 Cbz-Gln-Gly가 포함된다.

[0135] B. 가정용/산업용 생성물

[0136] 단독, 또는 1종 이상의 추가적인 보존제 물질, 예컨대 1종 이상의 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질과의 조합 중 어느 하나로서 개시되는 Tgase 변이체 효소 또는 본원에서 개시되는 바와 같은 그의 조성물을 보존제 물질로서 혼입할 수 있는 가정용/산업용 생성물의 비-제한적인 실시양태에는 가정용 세척제, 예컨대 농축된 액체 세척제 및 스프레이 세척제, 세척용 와이프, 접시 세척 액체, 접시 세척제 세제, 스프레이-대걸레 액체, 가구 광택제, 실내용 페인트, 실외용 페인트, 먼지제거 스프레이, 세탁물 세제, 직물 유연제, 양탄자/직물 세척제, 창문 및 유리 세척제, 화장실 보울 세척제, 액체/크림 세척제 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 본원에서 기술되는 조성물은 예를 들면 소비 전에 과실 및 채소를 세척하도록 고안되는 식품 세척 생성물에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생체기반 보존제 (즉 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물)는 1종 이상의 합성 보존제 (예컨대 석유화학적으로 유래하는 물질)와 조합되며, 생체기반 및 합성 보존제 사이에서 달성되는 보존 (예컨대 항미생물) 효과는 상가작용성 또는 상승작용성이다.

[0137] C. 가죽

[0138] 일반적으로, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 임의의 자연 콜라겐 함유 생성물에 혼입될 수 있거나, 또는 가죽 가공 동안 가죽 중 1종 이상의 단백질, 예컨대 동물 또는 비-동물 유래 콜라겐, 케라틴, 실크 및/또는 엘라스틴 단백질에 색상이 공유 결합되도록 가죽을 변형시키는 데에 사용될 수 있다.

[0139] D. 식품 생성물

[0140] 일반적으로, 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 임의의 식품 단백질에 혼입될 수 있거나, 또는 식품 가공 동안 식품 단백질의 색상을 변형시키는 데에 사용될 수 있다. 개시되는 Tgase 변이체 효소가 혼입될 수 있는 식품 생성물에는 콜라겐 또는 젤라틴 (가수분해된 콜라겐)을 함유하는 동물-유래 생성물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 여기에는 젤라틴 생성물, 고기 생성물 또는 고기 유사체 생성물 예컨대 소시지 외피, 돼지고기 껍질, 또는 동물의 피부 층 및/또는 콜라겐을 포함한 임의의 고기 또는 해양 생성물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 효소 조성물은 비-동물 유래 콜라겐-함유 생성물 또는 임의의 콜라겐-함유 생성물에 혼입될 수 있다.

[0141] E. 기타 생성물

- [0142] 개시되는 Tgase 변이체 효소 또는 본원에서 개시되는 바와 같은 그의 조성물이 혼입될 수 있는 기타 생성물로는 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 접착제, 에너지 (예컨대 수압파쇄 액체), 플라스틱, 포장 및 농업용 생성물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 개시되는 효소 또는 본원에서 개시되는 효소-중합체 조성물은 HVAC 시스템, 냉각지, 수 정제 시스템에 혼입될 수 있거나, 또는 비제한적으로 펄프 및 종이 가공과 같은 산업 적용분야에 사용될 수 있다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 살생물 효소, 즉 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소는 1종 이상의 추가적인 보존제 물질, 예컨대 1종 이상의 석유화학적으로 유래하는 보존제 물질과 조합된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생체기반 보존제 (즉 본원에서 개시되는 바와 같은 Tgase 변이체 효소 또는 그의 조성물)는 1종 이상의 합성 보존제 (예컨대 석유화학적으로 유래하는 물질)와 조합되며, 생체기반 및 합성 보존제 사이에서 달성되는 보존 (예컨대 항미생물) 효과는 상승작용성 또는 상승작용성이다.
- [0144] **V. 사용 방법**
- [0145] 단백질 또는 펩티드의 가교결합이 요구되거나 유익한 다양한 사용 적용분야에서의 본원에서 개시되는 Tgase 변이체 (임의적으로 그의 원형 퍼뮤턴트를 포함하여 N-말단 메티오닌 잔기를 가지며 임의적으로 본원에서 기술되는 바와 같은 프로-서열을 가지는 표 3에 개시되어 있는 변이체 중 어느 것 포함)의 사용을 위한 방법이 제공된다.
- [0146] 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체는 비제한적으로 보존제, 항미생물제, 약제, 화장품, 국소용, 산업용, 에너지, 건강관리 또는 해양 적용분야와 같은 사용 적용분야에서 사용될 수 있다.
- [0147] Tgase 변이체는 건강관리 생성물, 개인 관리 또는 화장품 제제, 포장 (식품, 화장품 및 약제), 직물 및 가죽 제조, 페인트 및 코팅, 그리고 수 처리 및 정제를 포함한 해양 적용분야에서 적용성을 가지는 항미생물 작용제로서 사용될 수 있다. Tgase 변이체는 염료 또는 단백질을 사용하여 관심 단백질, 예를 들면 케라틴 및 콜라겐을 영구적으로 변형시키는 데에 사용될 수 있다.
- [0148] 본원에서 기술되는 Tgase 변이체가 사용될 수 있는 방법의 비-제한적인 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 PCT 출원 제PCT/US20/21211호, 그리고 U.S. 가출원 제63/010,987호, 제63/074,288호 및 제63/075,763호에 기술되어 있다.
- [0149] **A. 보존 방법**
- [0150] 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 (즉, 임의적으로 그의 원형 퍼뮤턴트를 포함하여 N-말단 메티오닌 잔기를 가지며 임의적으로 본원에서 기술되는 바와 같은 프로-서열을 가지는 표 3에 개시되어 있는 변이체 중 어느 것)는 비제한적으로 파라벤, 포름알데히드 및 글루타르알데히드, 그리고 은 (상처 관리 생성물에 사용됨)을 포함한 통상적인 살생물제와 같은 통상적인 보존제의 대안으로서, 또는 그에 더하여 보존제를 필요로 하는 다양한 적용분야, 예를 들면 개인 관리, 가정용, 산업용, 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 접착제, 에너지, 플라스틱, 포장 및 농업용 생성물에 사용될 수 있다. Tgase 변이체는 잠재적으로 유해한 박테리아, 진균 및/또는 기타 미생물의 성장을 억제하는 항미생물 (예컨대 보존제) 성분으로 사용될 수 있으며, 그에 따라 관심 생성물에서 박테리아, 진균 및/또는 미생물 성장을 억제하는 데에 효과적인 양으로 보존될 생성물에 첨가될 수 있다. 그와 같은 사용 적용분야의 비제한적인 예는 예컨대 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제 PCT/US20/21211호에 기술되어 있다. 일부 실시양태에서는, USP <51> 통과 기준이 달성되는 바, 즉 범주 2 생성물: 박테리아: 14일에서의 최초 계산 계수로부터의 2.0 log 이상 감소, 및 28일에서의 14일 계수로부터의 증가 없음; 효모 및 곰팡이의 경우: 14 및 28일에서의 최초 계산 계수로부터의 증가 없음이다. 일부 실시양태에서, 효소 및 효소-생체중합체 제제의 항미생물 거동은 미생물 성장의 대략 80-100 %, 또는 적어도 약 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 또는 99 % 중 어느 것만큼의 미생물 성장의 감소를 초래하는 그래프-양성 및 그래프-음성 박테리아는 물론 진균에 대한 MIC (최소 억제 농도)을 특징으로 한다.
- [0151] 본원에서 기술되는 바와 같은 생성물, 예컨대 개인 관리, 가정용, 산업용, 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 접착제, 에너지, 플라스틱, 포장 또는 농업용 생성물과 조합될 경우, 또는 본원에서 개시되는 생성물 또는 시스템 중 어느 것에서, 예컨대 제제, 또는 생성물 또는 시스템에의 혼입물에서 보존제로서 조성물은 광범위한 pH 범위에 걸쳐 효과적인 넓은 범위의 보존 활성을 가질 수 있다.
- [0152] 일부 실시양태에서, 방법은 개인 관리, 가정용, 산업용, 식품, 약제, 화장품, 건강관리, 해양, 페인트, 코팅, 접착제, 에너지, 플라스틱, 포장 또는 농업용 생성물과 같은 생성물 또는 시스템, 또는 본원에서 개시되는 생성

물 또는 시스템 중 어느 것, 예컨대 제제, 또는 생성물 또는 시스템에의 혼입물에 본원에서 기술되는 바와 같은 보존제 조성물 (예컨대 본원에서 기술되는 바와 같은 Tgase 변이체 또는 그의 조성물)을 첨가하는 것으로서, 상기 보존제 조성물을 함유하지 않는 동일한 생성물에 비해 미생물 성장이 감소되고/거나 생성물의 저장 수명이 증가되는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비제한적으로 포름알데히드 및/또는 글루타르알데히드와 같은 다른 보존제는 생성물 조성물에 포함되지 않는다.

[0153] 일부 실시양태에서는, 개인 관리, 가정용 또는 산업용 생성물과 같은 생성물 조성물의 저장-수명, 완전성 또는 미생물이 없는 (예컨대 박테리아 및/또는 진균이 없는) 상태의 증가 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에서 기술되는 바와 같은 보존제 조성물의 유효량을 생성물 (예컨대 개인 관리, 가정용 또는 산업용 생성물)에 혼입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 유효량은 대략 80-100 % 만큼의 미생물 성장의 감소, 또는 본원에서 기술되는 바와 같은 미생물 성장의 적어도 약 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 또는 99 % 감소 중 어느 것을 초래하는, MIC (최소 억제 농도)으로 지칭되는 양일 수 있다.

[0154] 본원에서 기술되는 방법 또는 조성물의 일부 실시양태에서, Tgase 변이체 효소는 약 0.01 % w/v 내지 약 5 % w/v, 또는 적어도 약 0.01 % w/v, 0.05 % w/v, 0.1 % w/v, 0.5 % w/v, 1 % w/v, 1.5 % w/v, 2 % w/v, 2.5 % w/v, 3 % w/v, 3.5 % w/v, 4 % w/v, 4.5 % w/v 또는 5 % w/v 중 어느 것, 또는 약 0.01 % w/v 내지 약 0.05 % w/v, 약 0.1 % w/v 내지 약 0.5 % w/v, 약 1 % w/v 내지 약 1.5 % w/v, 약 1.5 % w/v 내지 약 2 % w/v, 약 2 % w/v 내지 약 2.5 % w/v, 약 2.5 % w/v 내지 약 3 % w/v, 약 3 % w/v 내지 약 3.5 % w/v, 약 3.5 % w/v 내지 약 4 % w/v, 약 4 % w/v 내지 약 4.5 % w/v, 약 4.5 % w/v 내지 약 5 % w/v, 약 0.01 % w/v 내지 약 0.1 % w/v, 약 0.1 % w/v 내지 약 1 % w/v, 약 1 % w/v 내지 약 5 % w/v, 약 0.05 % w/v 내지 약 0.5 % w/v, 약 0.5 % w/v 내지 약 5 % w/v, 약 1 % w/v 내지 약 2.5 % w/v, 또는 약 2.5 % w/v 내지 약 5 % w/v 중 어느 것의 농도로 포함될 수 있다.

[0155] 개시되는 Tgase 변이체 및 그의 조성물을 이용하는 보존 방법이 적용될 수 있는 개인 관리 생성물의 비-제한적인 예에는 막대 비누, 액체 비누 (예컨대 손 비누), 손 살균제 (세정 제거 및 잔류형 알콜 기재 및 수-기재 손 소독제 포함), 수술전 피부 소독제, 세척용 와이프, 소독용 와이프, 바디 워시, 여드름 치료 생성물, 향진균 기저귀 발진 크림, 향진균 피부 크림, 샴푸, 컨디셔너, 화장품 (비제한적으로 액체 또는 분말 파운데이션, 액체 또는 고체 아이라이너, 마스카라, 크림 아이 섀도우, 착색 분말, 건조하거나 가습된 메이크 업 제거 생성물 등으로 사용될 "팬케이크" 유형 분말 포함), 탈취제, 향미생물 크림, 바디 로션, 핸드 크림, 국소용 크림, 애프터 셰이브 로션, 피부 토너, 구강 세척제, 치약, 일광차단 로션, 그리고 유아용 생성물 예컨대 비제한적으로 세척용 와이프, 유아용 샴푸, 유아용 비누 및 기저귀 크림이 포함된다. 본 발명의 대상은 상처 관리 물품, 예컨대 비제한적으로 상처 치유 연고, 크림 및 로션, 상처 피복제, 화상 상처 크림, 붕대, 테이프 및 스테리-스트립, 그리고 의료 물품 예컨대 의료용 가운, 모자, 안면 마스크 및 신발-덮개, 수술용 드롭 등에도 적용될 수 있다. 추가적인 생성물에는 구강 생성물, 예컨대 구강 세정제, 치약, 및 치과용 치실 코팅, 수외과 및 애완동물 관리 생성물, 보존제 조성물, 그리고 용액, 스프레이 또는 와이프를 포함한 표면 소독제가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0156] 개시되는 Tgase 변이체 및 그의 조성물을 이용하는 보존 방법이 적용될 수 있는 가정용/산업용 생성물의 비-제한적인 예에는 가정용 세척제, 예컨대 농축된 액체 세척제 및 스프레이 세척제, 세척용 와이프, 접시 세척액, 접시 세척제 세제, 스프레이-대걸레 액체, 가구 광택제, 실내용 페인트, 실외용 페인트, 먼지제거 스프레이, 세탁물 세제, 직물 유연제, 양탄자/직물 세척제, 창문 및 유리 세척제, 화장실 보울 세척제, 액체/크림 세척제 등이 포함된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 대상의 보존 방법은 소비 전에 과실 및 채소를 세척하도록 고안되는 식품 세척 생성물, 포장 및 식품 코팅에 사용될 수 있다.

[0157] B. 단백질 변형 방법

[0158] 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 UV-차단 일광차단제 및/또는 착색제, 예컨대 색소 또는 염료를 포함한 장기-지속 기능성 성분 적용분야에 사용될 생성물에 포함될 수 있다. 예를 들면, Tgase 변이체는 포유동물 (예컨대 인간) 피부, 모발 또는 손발톱에의 비제한적으로 모발 섬유 표면의 영구 (공유) 색상 변형과 같은 활성물질 또는 기능성 성분의 전달을 위한 조성물에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 UV-차단 (일광차단) 생성물 또는 화장품 생성물과 같이 국소적으로 적용되며 개체의 피부에 결합되는 생성물에 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 가죽 가공과 같이 동물의 피부에 영구적인 색상 적용을 제공하는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Tgase 변이체는 식품 가공에서 영구적인 색상 적용을 제공하는 데에 사용될 수 있다.

- [0159] 본원에서는, 관심 단백질 또는 재료에 대하여 색상을 변형시키거나 부가하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 관심 단백질, 펩티드 또는 재료를 본원에서 기술되는 바와 같은 1종 이상의 Tgase 변이체, 그리고 일광차단제 및/또는 색상-생성 분자, 예컨대 염료 또는 색소 분자를 포함한 1종 이상의 기능성 성분과 접촉시키는 것을 포함한다. Tgase 변이체 효소(들)는 관심 단백질, 펩티드 또는 재료에 일광차단 및/또는 색상 분자(들)를 공유 결합시키기에 충분한 (즉 효과적인) 양으로 존재한다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 상기 관심 단백질은 피부에 존재하는 1종 이상의 단백질이며, Tgase 효소(들) 및 일광차단제(들) 및/또는 색상 분자(들)는 화장품 또는 개인 관리 생성물의 형태로 존재할 수 있다. 피부에 존재하는 단백질은 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴일 수 있다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 상기 관심 재료는 피부로부터 유래하는 1종 이상의 단백질 또는 펩티드이며, Tgase 변이체 효소(들) 및/또는 일광차단제(들) 및/또는 색상 분자(들)는 화장품 또는 개인 관리 생성물의 형태로 존재할 수 있다. 생성물 제제에 존재하는 단백질은 콜라겐, 케라틴 및/또는 엘라스틴일 수 있다. 생성물 제제에 존재하는 펩티드는 가수분해된 콜라겐, 가수분해된 케라틴 및/또는 가수분해된 엘라스틴일 수 있다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 관심 단백질 또는 재료는 가죽, 식품 생성물 또는 농업용 생성물, 또는 그 안의 관심 단백질이며, Tgase 변이체 효소(들) 및/또는 색상 분자(들)는 가죽, 식품 생성물 또는 농업용 생성물, 또는 그 안의 관심 단백질을 변형시키거나 거기에 색상을 부가하는 데에 적합한 조성물의 형태로 존재한다.
- [0163] 일부 실시양태에서는, 포유동물 (예컨대 인간) 피부, 모발 또는 손발톱 중 단백질 또는 펩티드에 활성물질 또는 기능성 성분 (예컨대 일광차단 분자 또는 착색제)을 전달하기 위한 방법이 제공된다. 예를 들면, 상기 방법은 포유동물 (예컨대 인간) 피부, 모발 또는 손발톱 중 단백질 또는 펩티드에의 본원에서 기술되는 바와 같은 조성물의 적용, 또는 포유동물 (예컨대 인간) 개체의 피부, 모발 또는 손발톱에의 조성물의 국소적 적용을 포함할 수 있다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 포유동물 (예컨대 인간) 피부, 모발 또는 손발톱 중 단백질 및/또는 펩티드를 하기를 포함하는 조성물과 접촉시키는 것을 포함한다: (a) 유효량의 적어도 1종 활성물질 또는 기능성 성분 (예를 들면 일광차단 분자 또는 착색제); 및 (b) 포유동물 (예컨대 인간) 피부, 모발 또는 손발톱 중 단백질 또는 펩티드에의 활성물질 또는 기능성 성분의 가교결합을 촉매촉진하는 데에 효과적인 양의 Tgase 변이체 효소. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 포유동물 (예컨대 인간) 개체의 피부, 모발 또는 손발톱에의 조성물의 국소적 적용을 포함하며, 특정 실시양태에서 상기 조성물은 하기를 함유할 수 있다: (c) 개체의 피부, 모발 또는 손발톱에 Tgase 변이체 효소 및 활성물질 또는 기능성 성분을 전달하는 데에 효과적인 양의 제약용이거나 허용가능한 캐리어.
- [0165] 예를 들면, 상기 활성물질 또는 기능성 성분은 활성물질 또는 기능성 성분상에 직접적인 것 또는 거기에 결합되는 (예컨대 공유 결합되는) 링커상에 간접적인 것 중 어느 하나로 적어도 1종의 알킬아미노 ($-RNH_2$), 히드라진, 히드라지드 또는 히드록실아민 잔기를 포함할 수 있으며, 상기 방법은 활성물질 또는 기능성 성분의 아미노기와 피부, 모발 또는 손발톱 중 단백질 또는 펩티드의 아미노기 (예컨대 글루타민 및/또는 리신 아미노산 잔기 측쇄상 아미노기) 사이를 가교결합시키는 (예컨대 공유 결합의 형성) 트랜스글루타미나제 효소에 의한 촉매촉진을 포함한다.
- [0166] **[실시예]**
- [0167] 하기 실시예는 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니라, 예시하고자 하는 것이다.
- [0168] **실시예 1**
- [0169] 단일 점 돌연변이 효소 변이체를 생성시키기 위하여, 성숙한 트랜스글루타미나제 (서열식별번호: 1)의 부위 포화 라이브러리(site saturation library)를 합성하였다. 빠른 사멸 속도를 가지며 생성물 제제에서 수명이 긴 효소 변이체를 생성시키기 위하여 노력으로서, 최초 활성 속도에 있어서의 강화를 식별하는 것에 더하여 종말점 검정에서 활성을 나타내는 변이체를 식별하였다.
- [0170] 표준 방법에 의해 DNA 변이체를 합성하여, 효소를 발현시켰다. 일차 선별, 즉 Tgase에 대한 표준 비색 히드록사메이트 활성 검정 (문헌 [Folk and Cole (1965) *J Biol Chemistry* 240(7):2951-60])을 사용하여 생성되는 단일 점 돌연변이 효소 변이체를 검정하고, 단실카다베린에 의한 카세인의 트랜스글루타미나제-촉매촉진 표지화 (예컨대 독일 제디라(Zedira)의 트랜스글루타미나제 형광원형 활성 검정 키트 T036과 같은 시중에서 구입가능한

키트)를 사용하여 이차 선별을 수행함으로써, 활성 돌연변이의 최초 활성 속도를 측정하였다.

[0171] 간단하게 말하자면, 표준 히드록사메이트 검정은 N-카르보벤즈옥시-L-글루탐리닐글리신 (Z-Gln-Gly 또는 CBZ-Gln-Gly)을 아민 수용체 기질로, 히드록실아민을 아민 공여체로 사용한다. 트랜스글루타미나제의 존재하에서, 히드록실아민은 혼입되어 Z-글루타밀히드록사메이트-글리신을 형성하며, 그것은 37 °C에서 1-3시간 동안 인큐베이션 후 525 nm에서 검출가능한 철(III)과의 착색된 착물을 발현한다. 보정은 표준으로서 L-글루탐산 γ-모노히드록사메이트 (밀리포어 시그마(Millipore Sigma))를 사용하여 수행하였다. 1 단위의 Tgase는 분 당 γ-글루타밀히드록실아민의 펩티드 유도체 1 μmol 형성을 촉매촉진하는 효소의 양으로 정의된다.

[0172] 트랜스글루타미나제 형광원성 활성 검정 키트는 단일 기 형광의 강도 및 파장에 있어서의 이동을 야기하는 N,N-디메틸카세인에의 모노단실카다베린의 트랜스글루타미나제-촉매촉진 공유 결합을 모니터링한다. 트랜스글루타미나제 활성은 형광의 측정 (여기 파장 332 nm; 방출 파장 500 nm)에 의해 온라인으로 모니터링될 수 있다. 상대적 트랜스글루타미나제 활성은 시간 경과에 따른 형광 강도의 증가로 나타낸다.

[0173] 각 변이체를 평가하고, 야생형 Tgase에 대비한 활성의 향상에 대하여 순위화하였다. 어느 하나의 검정에서 적어도 약 1.4-배 (40 %)의 향상된 활성을 나타낸 변이체를 식별하고, 이 변이체의 돌연변이를 표 3에 나타내었다. 표 3에 나타낸 돌연변이의 아미노산 위치는 서열식별번호: 1에 나타낸 야생형 스트렙토마이세스 모바라엔시스 성숙한 Tgase 서열에 대비한 것이다.

[0174] 표 3

변이체	활성 향상
A10C	+
A10Q	++
D14H	+
D14L	+
D14M	+
D14N	++
D14W	+
D14Y	+
R15A	+
R15E	+
R15T	+
D18E	+
D18T	+
G47H	++
R48M	+
K49E	++
K49T	++
Q74C	+
N134S	+
N134T	+
A136C	+
A136S	+
L137K	+++
L137V	+
L147E	+
L147M	+
E164F	+
P169E	+
F170I	++
F170L	+
F170V	++
S199A	++
S199G	+
S299A	+
S299E	+
S299K	+
S299V	++

[0175] 표 1. 스트렙토마이세스 모바라엔시스 Tgase 변이체 및 야생-형 에스. 모바라엔시스 Tgase에

대비한 활성의 향상. 아미노산 위치의 번호지정은 서열식별번호: 1에 나타낸 성숙한 *예스*. *모바라엔시스* Tgase 아미노산 서열을 참조하였음. 1.4-배 이상의 효소 활성 향상은 “+”로 나타내었으며; 1.6-배 이상의 향상은 “++”로 나타내었고; 1.8-배 이상의 향상은 “+++”로 나타내었음.

[0176]

[0177]

이해의 선명성을 목적으로 예시 및 예에 의해 전기한 발명을 다소 상세하게 기술하기는 하였지만, 관련 기술분야 통상의 기술자라면, 본 발명의 기술사상 및 영역에서 벗어나지 않고도 특정 변화 및 변형이 실행될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 따라서, 상세한 설명이 첨부된 청구범위에 서술되어 있는 본 발명의 영역을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0178]

본원에서 인용된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은 모든 목적에 있어서, 그리고 각 개별 공개, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고도 개별적으로 그렇게 참조로 포함되는 것으로 표시되어 있는 경우와 동일한 정도로 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CURIE CO. INC.

<120> TRANSGLUTAMINASE VARIANTS

<130> 12527004W01

<140> PCT/US2021/021766

<141> 2021-03-10

<150> 62/988,918

<151> 2020-03-12

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 331

<212> PRT

<213> *Streptomyces mobaraensis*

<400> 1

Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg

35 40 45

Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys

50 55 60

Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu
65 70 75 80
Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn
85 90 95
Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val
100 105 110
Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu
115 120 125
Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser
130 135 140
Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala
145 150 155 160
Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn
165 170 175
Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg
180 185 190
Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg
195 200 205
Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg
210 215 220
Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile
225 230 235 240
Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr
245 250 255
Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp
260 265 270
Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met
275 280 285
His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp
290 295 300
Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn

305	310	315	320
Thr	Ala	Pro	Asp
Lys	Val	Lys	Gln
Gly	Trp	Pro	
	325	330	
<210>	2		
<211>	332		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic		
	polypeptide		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(1)..(1)		
<223>	M or absent		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(11)..(11)		
<223>	A, C or Q		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(15)..(15)		
<223>	D, H, L, M, N, W or Y		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(16)..(16)		
<223>	R, A, E or T		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(19)..(19)		
<223>	D, E or T		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(48)..(48)		
<223>	G or H		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(49)..(49)		
<223>	R or M		
<220><221>	MOD_RES		
<222>	(50)..(50)		
<223>	K, E or T		
<220><221>	MOD_RES		

<222> (75)..(75)

<223> Q or C

<220><

221> MOD_RES

<222> (135)..(135)

<223> N, S or T

<220><221> MOD_RES

<222> (137)..(137)

<223> A, C or S

<220><221> MOD_RES

<222> (138)..(138)

<223> L, K or V

<220><221> MOD_RES

<222> (148)..(148)

<223> L, E or M

<220><221> MOD_RES

<222> (165)..(165)

<223> E or F

<220><221> MOD_RES

<222> (170)..(170)

<223> P or E

<220><221> MOD_RES

<222> (171)..(171)

<223> F, I, L or V

<220><221> MOD_RES

<222> (200)..(200)

<223> S, A or G

<220><221> MOD_RES

<222> (300)..(300)

<223> S, A, E, K or V

<400> 2

Xaa Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Xaa Glu Pro Leu Xaa Xaa

1 5 10 15

Met Pro Xaa Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val

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

Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala
 275 280 285

Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Xaa Glu Gly Tyr Ser
 290 295 300

Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp
 305 310 315 320

Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
 325 330