



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052948
(43) 공개일자 2017년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
A61K 38/164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0155102
(22) 출원일자 2015년11월05일
심사청구일자 2015년11월05일

(71) 출원인
국방과학연구소
대전광역시 유성구 북유성대로488번길 160 (수남동)
(72) 발명자
박상진
대전광역시 유성구 은구비남로 55, 703동 902호
강상현
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 140동 1602호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

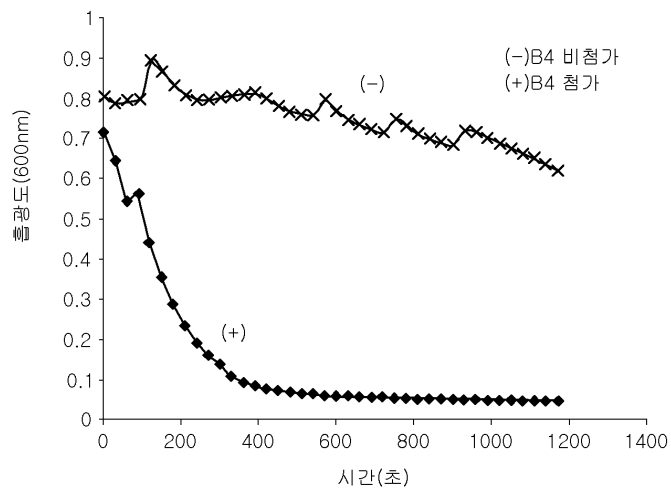
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 제조 방법 및 탄저균에 의해 유발되는 질환의 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 대하여 특이적인 용균능을 갖는 단백질 B4에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간을 포함한 동물에 감염하여 질환을 일으킬 수 있는 탄저균을 특이적으로 용균시킬 수 있는 능력을 갖는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4, 및 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 유효성분으로 포함하는 탄저균에 의해 유발되는 감염 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

전수연

서울특별시 서초구 잠원로4길 34-11, 101동 1406호

정기모

서울특별시 영등포구 디지털로43길 10-1

명세서

청구범위

청구항 1

탄저균(*Bacillus anthracis*) 특이적 용균 활성을 갖고, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 262개의 아미노산으로 구성되며, 분자량이 27.9 kDa인 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 *Escherichia coli* BL21-pBAD-B4(수탁번호 KCTC 12709BP)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4.

청구항 4

제1항 또는 제3항 중 어느 한 항의 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 탄저균 감염 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 항생제, 소독제, 살균제 및 치료제 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 탄저균 감염 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 대하여 특이적인 용균능을 갖는 신규한 단백질 B4에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간을 포함한 동물에 감염하여 질환을 일으킬 수 있는 탄저균을 특이적으로 용균시킬 수 있는 능력을 갖는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4, 및 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 유효성분으로 포함하는 탄저균에 의해 유발되는 감염 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄저균(*Bacillus anthracis*)은 그람 양성의 호기성균으로 아포를 형성하며 편모와 운동성은 없다. 감염동물의 혈액과 조직 내에서 단간균, 쌍간균 또는 연쇄간균으로 관찰되며, 생체 내에서는 아포를 형성하지 않는다. 탄저균은 '탄저' 또는 '탄저병'으로 알려져 있는 감염성 질환의 원인균이다. 탄저병은 주로 초식동물 및 잡식동물에서 발생하는 급성, 열성전염병으로서 발열, 호흡곤란 등으로 갑자기 폐사하는 급성전염병으로 가축의 제2종 법정전염병이다. 탄저균은 사람에게도 감염하는 인수공통 감염균으로 생물무기로도 이용되어 질 수 있다. 동물에서 탄저의 주요 감염경로는 탄저균에 오염된 토양이나 목초 등에 의한 경구감염이며, 상처를 통한 피부감염 또는 호흡기 감염도 일어난다. 또한 흡혈곤충도 감염원으로 작용할 수 있다.

[0003] 탄저는 소, 양, 산양, 노새, 개 등 대부분의 포유동물에서 발생할 수 있고, 또한 감염된 동물의 축산물을 섭취할 경우에 사람에게도 발생할 수 있다. 탄저병의 잠복기는 1 내지 5일이며, 임상증상은 증상이 나타난 후 1 내지 2 시간 후 폐사하는 심급성형의 경우와 24시간 내에 폐사하는 급성형이 있다. 일반적으로 갑작스런 발열, 호흡곤란, 침울 등을 볼 수 있다.

[0004] 우리나라 탄저병 발생은 1907년에 최초 공식보고가 있는 이후에 1930년대까지 동물에서 흔히 발생하였으나 백신 개발 등으로 동물에서의 발병은 급격히 감소하여 최근의 거의 발생 사례가 없고 다만 산발적으로만 발생하고 있

다. 그러나, 탄저균은 생물무기로 악용될 가능성이 높다. 생물테러 등에 있어서는 에어로졸 상태의 포자가 주로 이용되는데, 기도를 통해 들어온 탄저균이 상부 기도에 잠복해 있다가 폐 주위의 림프계에 침투하고 탄저균 독소는 폐 조직에 출혈, 괴사, 부종 등을 일으켜 초기에는 감기와 비슷한 증상을 일으키지만 결국에는 호흡 곤란에 의한 사망에 이르게 된다. 미국 질병통제예방센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)는 탄저균을 범주A(Category A) 병원체에 포함시켜 위험성이 가장 높은 세균으로 취급하고 있다.

[0005] 이러한 이유로 탄저균에 의한 생물테러나 생물학전을 대비해야 할 필요성이 있다. 그런데 탄저의 매우 빠른 질병 발전 특징으로 효과적인 감염 치료 방안의 마련이 쉽지 않다. 통상의 페니실린 제제 등 항생제 치료로는 일부 경우에 효과를 기대할 수 있지만 급성 경과를 보이는 경우에는 거의 치료 효과를 기대할 수 없다.

[0006] 따라서 신속한 치료 효과를 제공해 줄 수 있는 방안의 마련 및 이에 효과적으로 활용될 수 있는 약학적 제제의 개발이 매우 절실한 형편이다. 신속한 치료 효과를 얻기 위해서는 탄저균에 작용하여 작용 즉시 탄저균을 용균시킬 수 있는 약제의 개발이 필요하다. 그런데 기존 항생제들은 이러한 측면에서 만족스럽지 못하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0974485호 (2010.08.02)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 상기와 같은 점을 감안한 본 발명은 유해 병원성 박테리아인 탄저균을 특이적으로 용균시킬 수 있는 단백질 및 상기 단백질을 효과적으로 제조할 수 있는 방법의 제공에 목적이 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄저균을 특이적으로 용균시킬 수 있는 단백질을 유효성분으로 포함하는 탄저균 감염 치료용 약학적 조성물을 제공하고, 또한 이 조성물을 이용한 탄저균 감염의 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 탄저균을 특이적으로 용균시킬 수 있는 활성을 갖고, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖으며, 또한 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 262개의 아미노산으로 구성되며, 분자량이 약 27.9 kDa인 것을 특징으로 한다.

[0011] 여기서 본 발명의 아미노산 서열은 당업자에 의해 일부 변형될 수 있음은 자명하다. 이러한 변형에는 아미노산 서열의 일부 치환, 아미노산 서열의 일부 첨가, 및 아미노산 서열의 일부 결실을 포함한다. 그렇지만, 본 발명에서 개시하고 있는 서열번호 1의 아미노산 서열을 준용하는 것이 가장 바람직하다.

[0012] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 본 발명자들에 의해 개발 제작되어 2014년 11월 12일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁된 균주 *Escherichia coli* BL21-pBAD-B4(수탁번호 KCTC 12709BP)로부터 유래된 것이다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 유효성분으로 포함하는 탄저균 감염 치료에 효과적으로 활용될 수 있는 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 상기 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 상술한 바와 같이 탄저균을 특이적으로 용균시키므로, 탄저균에 의해 유발되는 질환의 치료에 효과를 나타낸다. 따라서 본 발명의 약학적 조성물은 항생제, 소독제, 살균제, 치료제 등으로 구현되어 탄저균에 의해 유발되는 다양한 동물의 질환 치료에 활용될 수 있다. 또한 생물테러나 생물학전으로 인한 탄저균 감염 치료에도 활용될 수 있다.

[0015] 여기서 "탄저균에 의해 유발되는 질환"이란 탄저균 감염에 의한 발열, 호흡 곤란 등을 수반하는 증상을 총칭한다.

[0016] 또한, 본 명세서에서 사용된 "치료" 또는 "치유"라는 용어는 탄저균에 의해 유발된 질환의 억제 및 탄저균에 의

해 유발된 질환의 병적 상태를 경감하는 모든 행위를 의미한다.

- [0017] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 및 또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다.
- [0018] 상기 약학적 조성물이 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것이 아니다.
- [0019] 여기서 상기 "약학적으로 허용되는 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다.
- [0020] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다.
- [0022] 본 발명의 탄저균 감염 치료용 약학적 조성물을 이용한 탄저균 감염을 치료하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 본 발명의 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 예를 들어 상기 약학적 조성물은 경구 투여, 비경구투여 또는 비강 분무 등을 통해 투여될 수 있으며, 환경에 분무하는 방식에 의해서도 사용될 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 대상이 되는 동물 및 연령, 체중, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사나 수의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 병원성 세균이면서 생물테러 등에서 악용될 수 있는 탄저균 감염을 효과적으로 치료할 수 있는 탄저균 특이적 용균 단백질 B4와 이를 유효성분으로 포함한 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존 항생제들에 비교하여 매우 신속한 치료 효과를 제공할 수 있다. 따라서 감염 동물이나 감염 인체로부터 탄저균을 신속히 퇴치할 수 있게 할 수 있어 감염이 악화되는 것을 효과적으로 억제하고 궁극적으로는 체내에서 탄저균을 신속하게 박멸시켜 준다. 한편, 본 발명의 탄저균 특이 용균 단백질 B4는 탄저균 외의 다른 체내의 정상 상재균에는 영향을 주지 않아 이를 유효성분으로 포함하고 있는 약학적 조성물의 사용에 따른 부작용을 최소화 시켜 줄 수 있다. 기존 항생제들의 경우에는 신속한 균의 박멸을 제공해 주지 못할 뿐만 아니라 체내의 유익균들에도 악영향을 초래하여 여러 가지의 부작용을 유발시키곤 했었다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 제조한 단백질 형태로 제조한 결과를 보여주는 전기영동 사진이다.
- 도 2는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 탄저균 대상 용균 활성을 보여주는 평판 점진 사진이다.
- 도 3은 *Bacillus anthracis* ATCC 14578을 대상으로 한 혼탁도 감소 분석법 (turbidity reduction assay) 결과이다.
- 도 4는 *Bacillus anthracis* delta-Sterne을 대상으로 한 혼탁도 감소 분석법 (turbidity reduction assay) 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 실시예 1은 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 제조 방법에 관한 것으로, 탄저균 특이 용균 단백질로 선발된 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 제조에 대하여 이하에 설명한다.
- [0028] 본 발명의 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 생산하는 균주는 본 발명자들에 의해 2014년 11월 12일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁된 균주인 *Escherichia coli* BL21-pBAD-B4(수탁번호 KCTC 12709BP)를 생산균주로 사용하였다.
- [0029] 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 카나마이신이 포함된 LB배지(트립톤 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 10 g/L) 20 ml에 *Escherichia coli* BL21-pBAD-B4를 20 μl 첨가하여 접종한 다음 37°C에서 6 내지 7 시간 동안 진탕 배양한다. 이렇게 배양한 배양액 20 μl 를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 카나마이신이 포함된 LB배지 200 ml에 접종한 다음 37°C에서 한밤동안 진탕 배양한다. 다음날, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 카나마이신이 포함된 LB배지 5 L가 들어 있는 배양기에 한밤 배양한 배양액을 OD₆₀₀(600 nm에서의 흡광도)이 0.1이 되도록 첨가한다. 200 rpm의 속도로, 분당 5 L의 통기(aeration)하고, 37°C 온도 조건에서 배양을 실시한다. 세포 농도가 600 nm에서의 흡광도 기준으로 0.5가 되었을 때, 최종 농도가 0.2%가 되도록 L-아라비노스(L-arabinose)를 첨가하여 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 발현을 유도한 후에 37°C에서 4시간 배양을 추가 실시한다.
- [0030] 배양 종료 후, 세포 배양액을 취하여 6,000 rpm에서 10분간 4°C에서 원심분리하여 세포 침전물을 회수하고, 회수한 세포 침전물은 200 ml의 20 mM 트리스-염산(Tris-HCl, pH 8.0) 완충액에 부유시킨다. 이렇게 준비된 세포 부유액을 초음파 분쇄법을 이용하여 세포를 파쇄하는데, 상기 초음파 분쇄법은 3초간 초음파를 가하여 세포를 깨고, 3초간 멈추는 조건을 총 15분간 반복하여 실시하며, 이때 얼음 조(ice bath)에서 실시한다.
- [0031] 세포 파쇄 후에 세포 파쇄액을 13,000 rpm에서 20분간 4°C에서 원심분리하여 얻어진 상등액을 통상의 양이온-교환 크로마토그래피(cation-exchange chromatography) 정제 공정을 통하여 정제한다.
- [0032] 정제 공정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 본 실시예에서는 양이온-교환수지(cation-exchange resin)로 5 ml의 HiTrapTM SP HP(GE Healthcare사)를 사용하였다. 크로마토그래피는 칼럼을 Buffer A(20 mM 트리스-염산(Tris-HCl), pH 8.0)로 미리 평형화시킨 다음 실시하고, 시료를 칼럼에 적하한 다음에는 5 ml/분의 유량(flow rate)으로 상기 buffer A를 5 CV 흘려주어 세척을 실시한다. 세척 후에는 5 ml/분의 유량(flow rate)으로 buffer A에서 buffer B(20 mM 트리스-염산(Tris-HCl), 500 mM 염화나트륨, pH 8.0)로의 농도 기울기(gradient)가 0%에서 100%가 되게 하는 조건으로 크로마토그래피를 수행한다.
- [0033] 이 과정에서 목적하는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 용출이 달성되었으며, 또한 본 공정을 통하여 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 90% 이상의 순도로 확보할 수 있다.
- [0034] 도 1에서는 크로마토그래피 정제 공정을 이용하여 정제한 단백질 B4를 전기영동으로 분석한 결과를 나타낸 것으로, 여기서 레인 M은 단백질 크기 마커이다.
- [0035] 실시예 2에서는 상기 실시예 1에서 제조한 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제조에 관한 것으로, 본 실시예 2에서 제시하는 조성은 적용 가능한 조성예일 뿐이며 이에 국한되지 않음은 당연하다.
- [0036] 약학적 조성물에 적용 가능한 다양한 완충액 조건, 여러 종류의 안정화제, 여러 종류의 첨가제를 이용한 여러 조성을 준비하여 각 조성에 탄저균 특이 용균 단백질 B4를 첨가하였을 때 산업적으로 활용 가능한 수준의 안정성을 제공해 줄 수 있는 조성을 탐색하였다. 이때, 완충액 조건, 안정화제 종류, 첨가제 종류를 선정함에 있어서는 의약품 허용기준에 따른 약학적으로 허용되는 성분인가와 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 등전점(isoelectric point)을 주요하게 고려하였다.
- [0037] 구체적으로 안정성 조사는 2,500 rpm에서 2 시간동안 교반(agitation) 및 40°C 온도에서 16 시간 동안 가열(heating)과 같은 물리적 스트레스에 견디는 정도와 4주 단기 보관 안정성을 비교하는 방식으로 실시하고, 안정성 평가에는 흡광도 측정과 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)분석을 사용하였다. 그 결과, 하기 표 1에서처럼 4가지의 조성을 탄저균 특이 용균 단백질 B4에 대한 적합 제형으로

선발할 수 있었다.

표 1

[0038]

조성	세부 성분
조성 1	10 mM L-Histidine, 0.1% Polysorbate 80, 5% Mannitol, pH6.0
조성 2	10 mM L-Histidine, 0.1% Polysorbate 80, 5% Sorbitol, pH6.0
조성 3	10 mM Sodium phosphate, 0.1% Polysorbate 80, 5% Mannitol, pH6.0
조성 4	10 mM Sodium phosphate, 0.1% Polysorbate 80, 5% Sorbitol, pH6.0

[0039]

최종적인 약학적 조성물은 실시예 1에서 얻어진 단백질 B4 시료를 상기 표 1에 제시된 조성으로 완충액을 교환하여 1차 제조한 후에 이를 최종 농도가 1 mg/ml가 되게 조정하여 제조한다.

[0040]

실시예 3은 상기 실시예 2에서 제조한 조성 1이 적용된 약학적 조성물을 사용하여 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 탄저균에 대한 용균 활성을 조사한 것으로, 용균 활성 조사에는 *Bacillus anthracis* ATCC 14578, *Bacillus anthracis* delta-Sterne, *Bacillus anthracis* Sterne, *Bacillus anthracis* HS, *Bacillus anthracis* HY 및 *Bacillus anthracis* KJ로 6종의 탄저균이 사용된다.

[0041]

구체적으로 용균 활성 조사는 TSA(Tryptic Soy Agar) 배지에 600 nm에서 흡광도가 1 정도 되는 탄저균 배양액 1 ml을 도말하여 말린 후 37°C 배양기에서 한밤동안 배양한 다음, 다음날 평판배지 위에 형성된 박테리아 론(lawn)에 상기 실시예 2에서 제조한 조성 1이 적용된 약학적 조성물 10 μ l를 떨어뜨리고 다시 이를 10분간 건조시킨 다음에 이를 37°C 배양기에서 2 내지 4 시간 배양하면서 용균 정도를 확인하는 방식으로 실시한다.

[0042]

그 결과는 도 2와 하기 표 2에 제시하였으며, 실시예에서 사용한 모든 탄저균에서 본 발명의 탄저균 특이 용균 단백질 B4에 의한 용균작용으로 투명용균반이 형성된 것이 확인할 수 있다. 참고로 조성 1뿐만 아니라 실시예 2에서 선발된 나머지 조성들을 적용했을 때도 유사한 결과들이 확인되었다.

표 2

[0043]

	탄저균					
	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578	<i>Bacillus anthracis</i> delta-Sterne	<i>Bacillus anthracis</i> Sterne	<i>Bacillus anthracis</i> HS	<i>Bacillus anthracis</i> HY	<i>Bacillus anthracis</i> KJ
용균 활성	○	○	○	○	○	○
○: 용균 활성 확인됨, ×: 용균 활성 확인되지 않음						

[0044]

이상의 결과로 본 발명의 탄저균 특이 용균 단백질 B4가 탄저균을 용균시킴으로 결국 사멸시킬 수 있음을 알 수 있다. 이러한 특성은 탄저균 특이 용균 단백질 B4가 포함된 약학적 조성물이 탄저균 감염 시에 탄저균 사멸 목적으로 활용될 수 있음을 보여주고, 또한 탄저균 감염 치료 목적으로 통상의 항생제와 같은 방식으로 활용할 수 있음을 보여 준다.

[0045]

참고로 탄저균 특이 용균 단백질 B4가 포함된 약학적 조성물을 이용하여 다른 균종들로 슈도모나스(*Pseudomonas*), 시겔라(*Shigella*), 락토코쿠스(*Lactococcus*) 및 대장균(*Escherichia coli*)에 대하여 용균 활성을 조사해 보았을 때 용균 활성은 나타나지 않았다. 이로부터 본 발명의 단백질의 용균 활성이 탄저균에 매우 특이적이라는 것을 확인할 수 있었다.

[0046]

실시예 4에서는 상기 실시예 2에서 제조한 조성 1이 적용된 약학적 조성물을 사용하여 탄저균 특이 용균 단백질 B4의 탄저균에 대한 용균 활성을 상기 실시예 3과는 다른 방식으로 조사한 것으로, 용균이 신속하게 일어나고 있음을 확인하기 위하여 통상의 혼탁도 감소 분석법(turbidity reduction assay)으로 실시하였다. 본 실시예 4에서는 탄저균 *Bacillus anthracis* ATCC 14578과 *Bacillus anthracis* delta-Sterne를 대상으로 하였다.

[0047]

간략하게 혼탁도 감소 분석법(turbidity reduction assay)을 살펴보면, 생리식염수에 탄저균을 600 nm에서 흡광도가 1.0 정도가 되도록 부유시킨 부유액을 준비한다. 준비된 부유액 0.9 ml을 담은 튜브에 상기 실시예 2에서 제조한 조성 1이 적용되고, 단백질 B4의 농도가 1 mg/ml로 포함된 약학적 조성물을 5 μ g/ml이 되게 추가 희석하여 준비한 희석액 0.1 ml을 넣어주고, 또 다른 하나의 부유액 0.9 ml을 담은 튜브에 생리식염수 0.1 ml을 넣어준 후, 600 nm에서 흡광도를 20분간 측정하였다.

[0048] 도 3과 도 4는 상기 실시예 4에 따른 혼탁도 감소 분석법(turbidity reduction assay)을 실시한 결과를 나타내며, 도 3은 *Bacillus anthracis* ATCC 14578을 대상으로 한 결과이고 도 4는 *Bacillus anthracis* delta-Sterne를 대상으로 한 결과이다.

[0049] 도 3과 도 4에 나타난 바와 같이, 탄저균 특이 용균 단백질 B4가 탄저균에 대하여 확실한 사멸 효과를 제공하며, 사멸이 매우 짧은 시간 안에 일어남을 알 수 있다. 이러한 신속한 용균 효과는 기존의 어떤 항생제들도 제공하지 못하는 특성이다.

[0050] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0051]

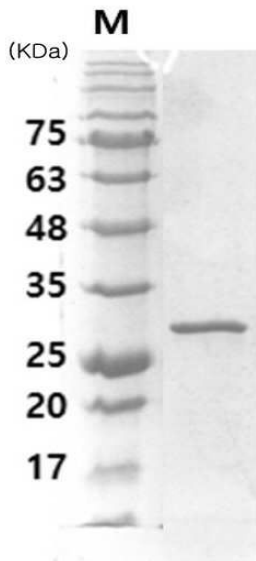
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12709BP

수탁일자 : 20141112

도면

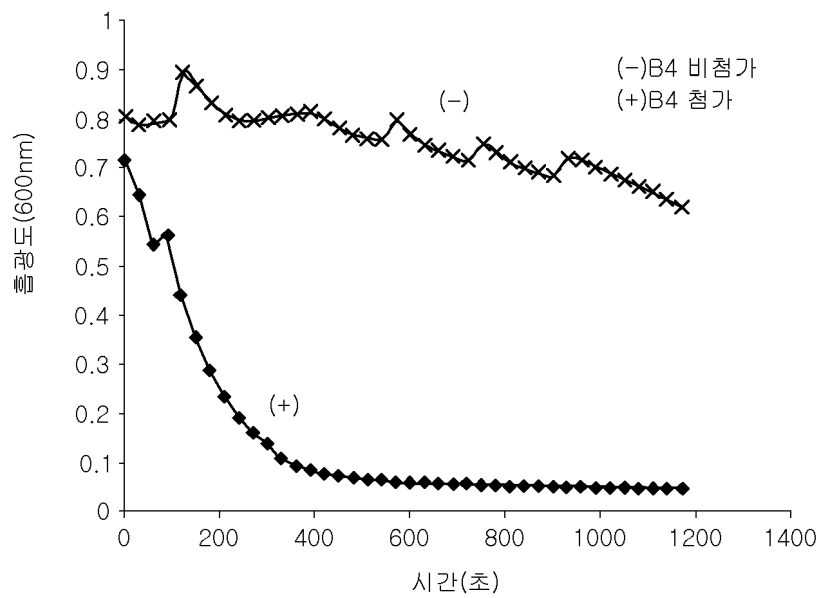
도면1



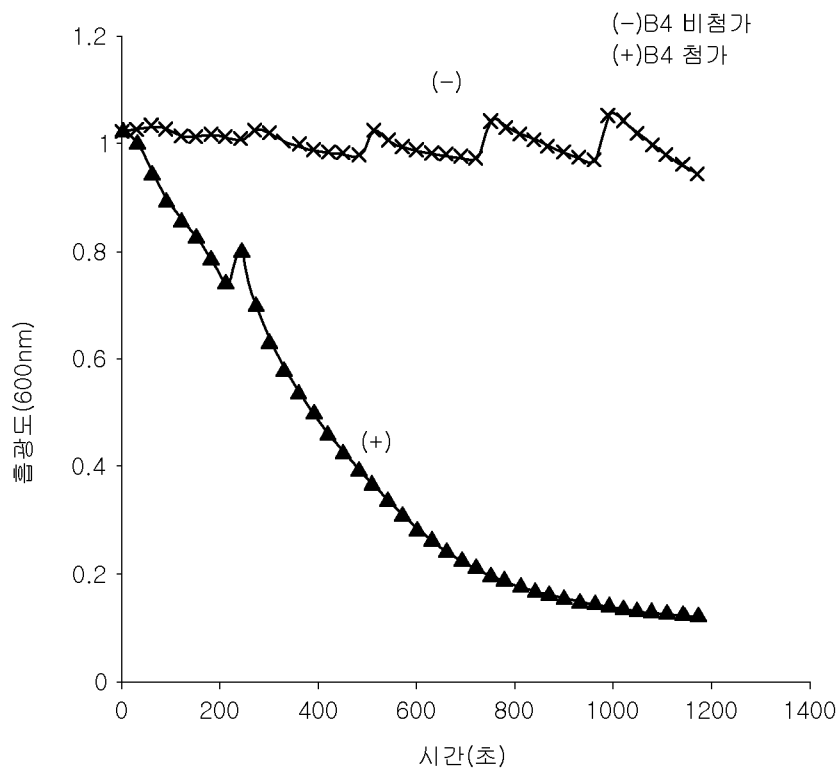
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> AGENCY FOR DEFENSE DEVELOPMENT
- <120> Novel Protein B4 Having Lysis Activity Specific to Bacillus anthracis
- <130> AD150136
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 262
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> B4
- <400> 1

Met Ala Met Ala Leu Gln Thr Leu Ile Asp Lys Ala Asn Arg Lys Leu

1 5 10 15

Asn Val Ser Gly Met Arg Lys Asp Val Ala Asp Arg Thr Arg Ala Val

20 25 30

Ile Thr Gln Met His Ala Gln Gly Ile Tyr Ile Cys Val Ala Gln Gly
 35 40 45
 Phe Arg Ser Phe Ala Glu Gln Asn Ala Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Thr
 50 55 60
 Lys Pro Gly Ser Ile Val Thr Asn Ala Arg Gly Gly Gln Ser Asn His
 65 70 75 80
 Asn Tyr Gly Val Ala Val Asp Leu Cys Leu Tyr Thr Gln Asp Gly Ser
 85 90 95
 Asp Val Ile Trp Thr Val Glu Gly Asn Phe Arg Lys Val Ile Ala Ala
 100 105 110
 Met Lys Ala Gln Gly Phe Lys Trp Gly Gly Asp Trp Val Ser Phe Lys
 115 120 125
 Asp Tyr Pro His Phe Glu Leu Tyr Asp Val Val Gly Gly Gln Lys Pro
 130 135 140
 Pro Ala Asp Asn Gly Gly Ala Val Asp Asn Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly
 165 170 175
 Gly Tyr Asp Ser Ser Trp Phe Thr Lys Glu Thr Gly Thr Phe Val Thr
 180 185 190
 Asn Thr Ser Ile Lys Leu Arg Thr Ala Pro Phe Thr Ser Ala Asp Val
 195 200 205
 Ile Ala Thr Leu Pro Ala Gly Ser Pro Val Asn Tyr Asn Gly Phe Gly
 210 215 220
 Ile Glu Tyr Asp Gly Tyr Val Trp Ile Arg Gln Pro Arg Ser Asn Gly
 225 230 235 240
 Tyr Gly Tyr Leu Ala Thr Gly Glu Ser Lys Gly Gly Lys Arg Gln Asn
 245 250 255
 Tyr Trp Gly Thr Phe Lys
 260