

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0052951 (43) 공개일자 2017년05월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/76 (2015.01)	(71) 출원인 국방과학연구소	
(52) CPC특허분류 C12N 7/00 (2013.01) A61K 35/76 (2013.01)	대전광역시 유성구 북유성대로488번길 160 (수남동)	
(21) 출원번호 10-2015-0155106	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2015년11월05일	박상진	
심사청구일자 2015년11월05일	대전광역시 유성구 은구비남로 55, 703동 902호	
	강상현	
	서울특별시 송파구 올림픽로 99, 140동 1602호	
	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인	
	한양특허법인	

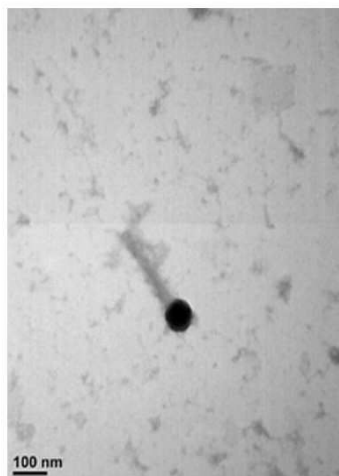
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 탄저균에 대한 광범위 항균 활성을 갖는 박테리오파지 Bac-THP-1, 이를 활용한 탄저균에 의해 유발되는 질환 방지용 또는 치료용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 탄저균에 대한 광범위 항균 활성을 갖는 자연으로부터 분리된 박테리오파지인 박테리오파지 Bac-THP-1(수탁번호: KCTC 12852BP)에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탄저균을 특이적으로 사멸시킬 수 있는 능력을 갖고, 전체 크기가 약 40 kb인 DNA 유전체를 가지며, 약 42.8 kDa, 55.5 kDa, 및 65.4 kDa 크기의 주요 구조 단백질질을 가지며, 형태학적으로 시포비리대(Siphoviridae)에 속하는 것을 특징으로 하는 박테리오파지 Bac-THP-1을 유효성분으로 포함하는 탄저균의 감염 방지 및 감염 후 치료 목적으로 활용될 수 있는 조성물 및 이 조성물을 이용한 탄저균의 감염을 방지 및 감염 후 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2795/00032 (2013.01)

C12N 2795/10332 (2013.01)

(72) 발명자

전수연

서울특별시 서초구 잠원로4길 34-11, 101동 1406호

손지수

서울특별시 양천구 목동중앙남로3가길 41, 401호

신희정

경기도 성남시 분당구 야탑로153번길 4-12, 202호

명세서

청구범위

청구항 1

탄저균에 대해 특이적 사멸 능력을 가지고 수탁번호가 KCTC 12852BP인 박테리오파지 Bac-THP-1.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 박테리오파지 Bac-THP-1은 전체 크기가 40 kb인 DNA 유전체를 가지며, 42.8 kDa, 55.5 kDa 및 65.4 kDa 크기의 단백질을 주요 구조 단백질로 갖는 것을 특징으로 하는 박테리오파지 Bac-THP-1.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 박테리오파지 Bac-THP-1은 형태학적으로 시포비리대(Siphoviridae)에 속하는 것을 특징으로 하는 박테리오파지 Bac-THP-1.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 박테리오파지 Bac-THP-1을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 탄저균 감염 방지 및 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물이 소독제 또는 약학적 조성물 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 탄저균 감염 방지 및 치료용 조성물.

청구항 6

제4항의 조성물을 이용하여 인간을 제외한 동물에게 투여하거나 환경에 분사하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 탄저균 감염 방지 및 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 대한 광범위 항균 활성을 갖는 자연으로부터 분리된 박테리오파지를 유효성분으로 포함한 탄저균의 감염을 방지하거나 치료하는 데에 활용될 수 있는 조성물 및 이 조성물을 이용한 탄저균의 감염을 방지 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄저균(*Bacillus anthracis*)은 그람 양성, 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 이용되어질 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 24 시간 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 최근에는 거의 발생 사례가 없고 다만 산발적으로만 발생하고 있다. 그러나, 탄저균은 생물무기로 악용될 가능성이 높다. 생물테러 등에 있어서는 에어로졸 상태의 포자가 주로 이용되는데, 기도를 통해 들어온 탄저균이 상부 기도에서 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 병원체(Category A pathogens)에 포함시켜 위험성이 가장 높은 세균으로 취급하고 있다.
- [0005] 이러한 이유로 탄저균에 의한 생물테러나 생물학전을 대비해야 할 필요성이 있다. 탄저균의 감염 방지나 치료 목적으로 다양한 항생제들이 사용되어 왔으나 최근 항생제 내성균의 발생이 증가함에 따라 항생제 외의 다른 효과적 방어의 확보가 시급한 실정이다.
- [0006] 최근 세균성 질환의 대처 방안으로 박테리오파지(bacteriophage)의 활용이 크게 주목을 받고 있다. 특히 자연친화적 방식의 선호로 인하여 박테리오파지에 대한 관심은 어느 때보다 높다고 할 수 있다. 박테리오파지는 세균에 감염하는 아주 작은 미생물로서 보통 파지(phage)라고 줄여서 부르기도 한다. 박테리오파지는 박테리아에 감염(infection)한 후 박테리아 세포 내부에서 증식을 하고, 증식 후 자손 박테리오파지들이 박테리아 밖으로 나올 때 숙주인 박테리아의 세포벽을 파괴하는 방식으로 박테리아를 사멸시키는 능력을 갖고 있다. 박테리오파지의 박테리아 감염 방식은 매우 특이성이 높아서 특정 박테리아에 감염할 수 있는 박테리오파지의 종류는 일부로 한정된다. 즉, 특정 박테리오파지는 특정 범주의 박테리아에만 감염할 수 있고 이로 인하여 박테리오파지는 특정 박테리아만을 사멸시키며 다른 박테리아에는 영향을 주지 않는다.
- [0007] 박테리오파지는 1915년 영국의 세균학자 Twort가 포도상구균(Micrococcus) 집락이 어떤 것에 의해 투명하게 녹는 현상에 대한 연구에서 발견되었다. 또한, 1917년에는 프랑스의 세균학자 d'Herelle이 이질환자 변의 여과액 중에 적리균(*Shigella dysenteriae*)을 녹이는 작용을 가진 것이 있다는 것을 발견하고 이에 대한 연구를 통해 독립적으로 박테리오파지를 발견하였으며, 세균을 잡아먹는다는 뜻에서 박테리오파지라고 명명하였다. 이후 이질균, 장티푸스균, 콜레라균 등 여러 병원성 박테리아에 대한 박테리오파지가 계속적으로 발견되었다. 특정 세균에 대한 박테리오파지는 그 종류가 다르며 항균력이나 항균범위 측면에서 차이를 제공한다. 따라서 박테리오파지의 종류가 다르다면 그 산업적 활용성에서도 차이가 난다. 이러한 이유로 다양한 박테리오파지의 확보가 필요하다.
- [0008] 박테리아를 사멸시킬 수 있는 특별한 능력으로 인하여 박테리오파지는 발견 이후부터 박테리아 감염에 대응하는 효과적 방안으로 기대를 모았으며 관련하여 많은 연구들이 있었다. 그러나 Fleming에 의해 페니실린이 발견된 이후, 항생제의 보급이 일반화되면서 박테리오파지에 대한 연구는 일부 동유럽 국가들 및 구소련에 한정되어서만 명맥이 유지되었다. 그런데 2000년 이후에 항생제 내성균의 증가로 인하여 기존 항생제의 한계성이 나타나고, 기존 항생제의 대체 물질로의 개발 가능성이 부각되면서 다시 박테리오파지가 항-박테리아제로 주목을 받고 있다.
- [0009] 특히 최근 항생제 사용에 대한 정부 차원의 규제가 전 세계적으로 강화됨에 따라 박테리오파지에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1101377호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 상기와 같은 점을 감안한 본 발명은 탄저균에 대하여 광범위한 항균 활성을 갖는 자연으로부터 신규 분리된 박테리오파지를 유효성분으로 포함하고 탄저균의 감염을 방지하거나 치료하는데 활용 가능한 조성물의 제공에 목적이 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 분리된 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용한 탄저균 감

염 예방 및 감염 처치 목적의 소독제 및 약학적 조성물을 제공하고, 또한 이 조성물을 이용한 탄저균의 방지 및 처치하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은 탄저균에 대해 특이적 사멸 능력을 가지고 수탁번호가 KCTC 12852BP인 자연으로부터 분리된 박테리오파지 Bac-THP-1을 제공한다.
- [0014] 본 명세서에서의 "분리" 또는 "분리된"은 자연 상태에서부터 여러 실험 기법을 활용하여 박테리오파지를 분리하는 것과 타 박테리오파지와 구별하여 특정 지을 수 있는 특징들을 확보하는 일을 지칭하며, 이에 더하여 생물공학 기술로 박테리오파지를 산업적으로 활용할 수 있게끔 증식시키는 것도 포함한다.
- [0015] 상기 박테리오파지 Bac-THP-1은 전체 유전체 크기가 약 40 kb인 DNA 유전체를 가지며, 42.8 kDa, 55.5 kDa 및 65.4 kDa 크기의 단백질을 주요 구조 단백질로 가지며, 형태학적으로 시포비리대(Siphoviridae)에 속한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 상기 박테리오파지 Bac-THP-1을 유효성분으로 포함하며 탄저균의 감염을 방지 및 처치하는데 활용할 수 있는 탄저균 감염 방지 및 처치용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 탄저균 감염 방지 및 처치용 조성물에 포함되는 박테리오파지 Bac-THP-1은 다양한 탄저균에 대해 광범위한 항균 활성을 가지므로 다양한 탄저균에 의해 유발되는 다양한 질환의 예방과 치료에 효과를 나타낸다. 따라서 본 발명의 조성물은 다양한 탄저균에 의해 유발되는 질환에 대한 방지 및 처치 목적으로 활용되는 소독제 또는 약학적 조성물의 용도로 사용될 수 있으나 이에 국한된 것은 아니며, 본 발명의 조성물은 활용 방식에 따라 다양한 용도로 사용될 수 있다.
- [0018] 여기서 탄저균에 의해 유발되는 질환이란 탄저균 감염에 의한 발열, 호흡 곤란 등을 수반하는 증상을 총칭한다.
- [0019] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "방지" 또는 "예방"이라는 용어는 상기 박테리오파지 Bac-THP-1을 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공하여 탄저균에 의해 유발된 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 또한, 본 명세서에서 사용된 "처치" 또는 "치료"라는 용어는 탄저균에 의해 유발된 질환의 억제 및 탄저균에 의해 유발된 질환의 병적 상태를 경감하는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 조성물에는 박테리오파지 Bac-THP-1이 유효성분으로 포함된다. 이때, 포함되는 박테리오파지 Bac-THP-1의 양은 1×10^1 PFU/ml 내지 1×10^{30} PFU/ml 또는 1×10^1 PFU/g 내지 1×10^{30} PFU/g로 포함되며, 바람직하게는 1×10^4 PFU/ml 내지 1×10^{15} PFU/ml 또는 1×10^4 PFU/g 내지 1×10^{15} PFU/g로 포함된다.
- [0022] 본 발명의 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. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다.
- [0023] 상기 조성물이 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 글루코스, 말토덱스트린, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 여기서 상기 "약학적으로 허용되는 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 유효성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다.
- [0025] 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.
- [0026] 본 발명의 탄저균 감염의 방지 및 처치용 조성물을 이용한 탄저균 감염의 예방 및 치료 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 본원 발명의 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 경

구투여, 비경구투여 또는 비강 분무 등을 통해 투여될 수 있으며, 환경에 분무하는 방식에 의해서도 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 신규 분리된 박테리오파지 Bac-THP-1을 활용한 조성물 및 이 조성물을 이용한 탄저균의 감염 방지 및 치료하는 방법은 기존의 항생제 등의 화학물질에 기반을 둔 방식에 비하여 탄저균에 대한 특이성이 매우 높다는 장점을 제공할 수 있다. 이는 다른 유용한 상재균에는 영향을 주지 않으면서도 탄저균의 감염 방지 또는 치료 목적으로 사용할 수 있음을 의미하며, 이러한 탄저균에 대한 특이성으로 인하여 사용에 따른 부작용이 매우 적다. 통상적으로 항생제 등의 화학물질을 사용하면 일반 상재균들도 피해를 함께 입게 되어 결과적으로 동물의 면역력 저하 등을 초래하여 다양한 부작용이 나타난다.
- [0028] 한편, 본 발명은 자연계에 이미 존재하는 박테리오파지를 분리하여 조성물의 유효성분으로 사용하기 때문에 매우 자연 친화적이라는 장점 또한 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 박테리오파지 Bac-THP-1의 전자현미경 사진이다.
- 도 2는 박테리오파지 Bac-THP-1의 주요 구조 단백질을 일차원 전기영동법으로 분석한 결과이다.
- 도 3은 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체 크기를 펄스장전기영동법(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)으로 분석한 결과이다.
- 도 4는 박테리오파지 Bac-THP-1의 탄저균에 대한 사멸 능력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명에서 사용되는 기술적 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아님을 유의해야 한다. 또한 본 발명에서 사용되는 기술적 용어는 본 발명에서 특별히 다른 의미로 정의되지 않는 한, 본 발명의 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미로 해석되어야 하며, 과도하게 포괄적인 의미로 해석되거나, 과도하게 축소된 의미로 해석되지 않아야 한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 일반적인 용어는 사전에 정의되어 있는 바에 따라, 또는 전후 문맥상에 따라 해석되어야 한다.
- [0031] 또한, 본 발명에서 사용되는 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "구성된다" 또는 "포함한다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 여러 구성 요소들, 또는 여러 단계들을 반드시 모두 포함하는 것으로 해석되지 않아야 하며, 그 중 일부 구성 요소들 또는 일부 단계들은 포함되지 않을 수도 있고, 또는 추가적인 구성 요소 또는 단계들을 더 포함할 수 있는 것으로 해석되어야 한다.
- [0032] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 실시예 1은 탄저균을 사멸시킬 수 있는 박테리오파지의 분리에 관한 것으로, 이 분리에는 자연 환경으로부터 수집된 시료들을 이용하며, 여기서 박테리오파지 분리에 탄저균인 *Bacillus anthracis* delta-Sterne를 이용한다.
- [0034] 박테리오파지 분리 과정을 상세히 설명하면, 수집된 시료를 1/1000 비율로 탄저균인 *Bacillus anthracis* delta-Sterne를 접종한 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지(카제인 췌장효소 소화물(Pancreatic Digest of casein) 17 g/L, 파파인 소화물(Papaic Digest of Soybean) 3 g/L, 텍스트로스(Dextrose) 2.5 g/L, 염화나트륨 5 g/L, 디포타슘 포스페이트(Dipotassium Phosphate) 2.5 g/L)에 함께 첨가한 다음 37℃에서 3 내지 4시간동안 진탕배양 한다. 배양 후, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 회수한다. 회수한 상등액에 탄저균을 1/1000 비율로 접종한 다음 37℃에서 3 내지 4시간동안 또 다시 진탕배양 한다.
- [0035] 여기서, 박테리오파지가 시료에 포함되어 있었을 경우 박테리오파지의 수(titer)가 증가될 수 있도록 이러한 과정을 총 5회 반복한다. 5회 반복 후에 배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 회수한 상등액을 0.45 μm의 필터를 이용하여 여과를 해 준다. 얻어진 여과액을 사용한 통상의 점적 실험(spot assay)을 통하여 탄저균을 사멸시킬 수 있는 박테리오파지가 있는지를 조사한다.

- [0036] 상기 점적 실험은 다음과 같이 실시한다. TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 탄저균을 1/1000 비율로 접종한 다음 37℃에서 한밤동안 진탕배양 한다. 이렇게 하여 준비된 탄저균의 배양액 2 ml(OD₆₀₀ 값은 2.0 임)을 TSA(Tryptic Soy Agar) 평판 배지(카제인 체장효소 소화물(Pancreatic Digest of casein) 17 g/L, 파파인 소화물(Papaic Digest of Soybean) 3 g/L, 염화나트륨 5 g/L, 아가(Agar) 15 g/L)에 도말 (spreading)하였다. 도말한 평판 배지를 클린벤치(clean bench)에서 약 30분 정도 방치하여 도말액이 건조되게 한다. 건조 후 앞에서 준비한 여과액 10 μ l를 탄저균이 도말된 TSA(Tryptic Soy Agar) 평판 배지 위에 점적하였다. 이를 30분 정도 방치하여 건조시킨다. 건조 후 점적한 평판 배지를 37℃에서 하루 정치 배양한 다음 여과액이 떨어진 위치에 투명한(clear zone)의 생성을 조사한다. 투명한이 생성되는 여과액의 경우가 탄저균을 사멸 시킬 수 있는 박테리오파지가 포함되어 있다고 판단할 수 있다. 이러한 조사를 통하여 탄저균에 대한 사멸 능력을 가진 박테리오파지를 포함한 여과액을 확보할 수 있다.
- [0037] 탄저균에 대한 사멸 능력을 가진 박테리오파지의 존재가 확인된 여과액을 이용하여 순수 박테리오파지의 분리를 실시할 수 있으며, 이와 같은 순수 박테리오파지의 분리에는 통상의 용균반 분석(plaque assay)을 이용한다.
- [0038] 이를 자세히 설명하면, 용균반 분석에서 형성된 용균반 하나를 멸균된 팁을 이용하여 회수한 다음 이를 탄저균 배양액에 첨가해 주어 37℃에서 4 내지 5 시간 동안 함께 진탕 배양 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻고, 얻어진 상등액에 50분의 1의 부피로 탄저균 배양액을 첨가해 준 다음 다시 37℃에서 4 내지 5 시간 진탕 배양한다. 박테리오파지의 수를 증가시키기 위하여 이러한 과정을 최소 5회 이상 실시한 다음 최종적으로 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 얻는다. 얻어진 상등액을 사용하여 다시 용균반 분석을 실시한다.
- [0039] 통상 순수 박테리오파지의 분리가 상기 과정의 1회로 달성되지 않기 때문에 이때 형성된 용균반을 이용하여 앞에 기술한 단계를 전체적으로 다시 반복한다. 상기 기술된 과정을 전체적으로 최소 5회이상 반복 실시함으로써 순수한 박테리오파지를 포함한 용액을 확보한다. 최종적으로 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 사용하여 다시 용균반 분석을 실시하며, 순수 박테리오파지의 분리는 형성된 용균반의 크기 및 모양이 모두 유사하게 될 때까지 반복하는 것이 바람직하다.
- [0040] 그리고 최종적으로는 전자현미경 분석을 통하여 박테리오파지의 순수 분리 여부를 확인한다. 전자현미경 분석에서 순수 분리가 확인될 때까지 앞에 기술한 과정을 반복하고, 본 발명에서는 통상의 전자현미경 분석 방법에 따라 전자현미경 분석을 실시하였다.
- [0041] 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 순수한 박테리오파지를 포함한 용액을 구리 격자(copper grid)에 묻히고 2% 유라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 역염색법(negative staining)과 건조를 수행한 후 투과전자현미경을 통해 그 형태를 확인하며, 이와 같이 하여 본 발명의 실시예 1에 따라 분리된 박테리오파지를 분석한 결과가 도 1에 제시되어 있다.
- [0042] 도 1에서처럼, 본 발명의 실시예 1을 따라 분리된 박테리오파지는 형태적 특징으로 판단할 때 시포비리대(Siphoviridae) 박테리오파지임을 확인할 수 있다.
- [0043] 상기 기술된 방식으로 확인된 순수 박테리오파지를 포함한 용액은 다음의 정제 과정을 거쳐 얻을 수 있다. 먼저, 순수 박테리오파지를 포함한 용액 전체 부피의 50분의 1의 부피로 탄저균 배양액을 첨가해 준 다음 다시 37℃에서 4 내지 5 시간 진탕 배양 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 얻으며, 충분한 수의 박테리오파지가 포함된 액을 얻기 위해 이러한 과정을 총 5회 반복한다. 최종 원심분리로 얻어진 상등액을 0.45 μ m의 필터를 이용하여 여과한 다음 통상의 폴리에틸렌 글리콜 (Polyethylene Glycol, PEG) 침전 과정을 실시한다.
- [0044] 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 침전과정은 구체적으로, 여과액 100 ml에 10% PEG 8000, 0.5 M 염화나트륨(NaCl)이 되게 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 염화나트륨(NaCl)을 첨가한 다음 4℃에서 2 내지 3시간 동안 정치한 후, 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 박테리오파지 침전물을 얻는다. 이렇게 얻어진 박테리오파지 침전물을 완충액 (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% 젤라틴(Gelatin), pH 8.0) 5 ml로 부유하고, 이하에서 이를 박테리오파지 부유액 또는 박테리오파지 액이라 지칭한다.
- [0045] 이렇게 하여 정제된 순수 박테리오파지를 확보할 수 있고, 이 박테리오파지를 박테리오파지 Bac-THP-1로 명명한 뒤, 2015년 6월 23일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터 (수탁번호 KCTC 12852BP)에 기탁하였다.
- [0046] 실시예 2는 상기 실시예 1에서 얻어진 박테리오파지 Bac-THP-1의 주요 구조 단백질 분석에 관한 것으로, 박테리오파지 Bac-THP-1의 겔 외곽을 구성하는 단백질을 획득하기 위해 실시예 1에서 얻어진 박테리오파지 Bac-THP-1

부유액 200 μ l와 아세톤 800 μ l를 섞어 격렬히 혼합한 후 10분간 -20°C 에 정치시키고, 4°C 에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리를 실시한 후 상층액을 제거한 다음, 자연 건조 (air dry)시켰다. 이를 5배로 농축된 전기영동용 시료 완충액을 50 μ l 가하여 부유시킨 다음 5분 정도 끓여 시료를 준비한다. 이렇게 준비된 시료를 일차원 전기영동을 통하여 박테리오파지 Bac-THP-1의 주요 구조 단백질을 분석해 보았다.

[0047] 그 결과, 도 2에서 알 수 있듯이 약 42.8 kDa, 55.5 kDa, 및 65.4 kDa 크기의 주요 구조 단백질들이 확인되었다. 도 2에서 레인 M은 단백질 크기 마커이고, 레인 1은 Bac-THP-1의 단백질 시료이며, 주요 구조 단백질 밴드는 "*"로 표시한 것이다.

[0048] 실시예 3은 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체의 분리 및 특성 분석에 관한 것으로, 상기 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체 분리에는 상기 실시예 1에서와 같은 방법으로 얻어진 박테리오파지 Bac-THP-1 부유액을 이용한다.

[0049] 먼저 부유액에 포함되어 있을 수 있는 탄저균의 DNA와 RNA를 제거하기 위해, 박테리오파지 부유액 10 ml에 DNA 분해효소로 DNase I과 RNA 분해효소로 RNase A를 각각 200 U씩 첨가한 다음 37°C 에서 30분간 방치하고, 방치 후에 DNase I과 RNase A의 활성을 제거하기 위해, 0.5 M 에틸렌디아민테트라아세트산 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 500 μ l를 첨가한 다음 다시 10분간 정치시켰다. 그리고 이를 추가로 10분간 65°C 에 정치시킨 다음 박테리오파지 외벽을 와해시키기 위해 20 mg/ml 농도의 proteinase K 100 μ l를 첨가한 후 37°C 에서 20분간 반응시켰다. 그 후 10% 도데실 황산 나트륨염(sodium dodecyl sulfate, SDS) 500 μ l를 첨가한 다음 다시 65°C 에서 1시간 동안 반응한 후, 이 반응액에 25:24:1의 구성비를 갖는 페놀(phenol) : 클로로포름(chloroform) : 이소아밀알코올(isoamylalcohol)의 혼합액 10 ml를 첨가해 준 후 잘 섞고, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 층이 분리되게 한 다음 분리된 층들 중에서 위층을 취하여 여기에 1.5배 부피비의 이소프로판 알코올(isopropyl alcohol)을 첨가한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 유전체를 침전시킨다. 침전물을 회수한 후 침전물에 70% 에탄올 (ethanol)을 첨가한 다음 다시 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 세척한 후, 세척된 침전물을 회수하고 진공 건조 시킨 다음 100 μ l의 물에 녹였다. 상기 과정을 반복하여 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체를 다량 확보한다.

[0050] 이렇게 얻어진 유전체를 이용하여 펄스장젤전기영동법(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)을 통해 박테리오파지 Bac-THP-1의 전체 유전체 크기를 분석하였다. 본 발명의 펄스장젤전기영동법(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)에서는 Bio-Rad사의 CHEF-DR III variable angle system을 사용하였다. 펄스장젤전기영동법(PFGE)은 장비제조사의 지침을 따라 실시하였으며, 그 결과, 도 3과 같이 분리한 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체의 전체 크기가 약 40 kb 정도임을 확인할 수 있었다. 도 3에서 레인 M은 DNA 크기 마커이며, 레인 1은 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체 시료이다. 참고로 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체 크기는 DNA 크기 마커를 근거로 하여 박테리오파지 Bac-THP-1의 유전체의 겔(gel) 상에서의 상대적 위치로부터 계산된 것이다.

[0051] 실시예 4는 상기 실시예 1에서 분리된 박테리오파지 Bac-THP-1의 탄저균에 대한 사멸 능력에 관한 것으로, 이러한 탄저균에 대한 박테리오파지 사멸능 조사는 통상의 용균반 분석(plaque assay)을 이용한다.

[0052] 실시예 4에서 사멸능 조사에 사용된 탄저균은 *Bacillus anthracis* ATCC 14578, *Bacillus anthracis* delta-Sterne, *Bacillus anthracis* Sterne, *Bacillus anthracis* HS 및 *Bacillus anthracis* HY로 5종의 탄저균들이다.

[0053] 박테리오파지 Bac-THP-1은 실험에 대상이 된 탄저균 모두에 대하여 사멸능을 발휘하였다. 탄저균을 대상으로 한 대표적 실험 결과가 도 4에 제시되어 있다. 한편, 박테리오파지 Bac-THP-1의 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코쿠스 패슘(*Enterococcus faecium*), 스트렙토코쿠스 미티스(*Streptococcus mitis*), 스트렙토코쿠스 우베리스(*Streptococcus uberis*) 및 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 사멸능 조사도 실시하였는데, 결과로 박테리오파지 Bac-THP-1은 이들 균종들에 대해서는 사멸능을 갖고 있지 않았다.

[0054] 이상의 결과로 박테리오파지 Bac-THP-1은 탄저균에 대하여 광범위한 항균 활성 범위를 가진다는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실로 박테리오파지 Bac-THP-1은 탄저균의 감염 방지 및 감염 치료 목적의 조성물의 유효성분으로 활용 가능함을 확인할 수 있었다.

[0055] 실시예 5는 본 발명의 박테리오파지 Bac-THP-1의 감염 예방 및 감염 치료에 대한 효능을 확인하는 것으로, 본 실시예 5에서는 실험 결과의 용이한 확인을 위해 효능확인용 감염 모방 조건에서 실시한다.

[0056] 9 ml의 TSB 배지를 담은 하나의 튜브에 1×10^9 PFU/ml 수준의 박테리오파지 액 100 μ l를 넣어주고, 다른 하나의

9 ml의 TSB 배지를 담은 튜브에는 동량의 TSB 배지만을 첨가한다. 그 다음에 각 튜브에 600 nm에서 흡광도가 0.5 정도가 되도록 실시예 4에서 사용했던 탄저균 중 1종인 *Bacillus anthracis* Sterne의 배양액을 넣어 탄저균을 첨가한 후 튜브들을 37℃의 진탕배양장치에 옮겨 배양하면서 탄저균의 성장 상태를 관찰하였다.

[0057] 그 결과 하기 표 1에 제시된 바와 같이, 박테리오파지 액을 첨가해 준 튜브에서는 탄저균의 성장 억제 및 저감이 관찰된 반면에 박테리오파지 액을 첨가하지 않은 튜브에서는 탄저균의 성장 억제가 관찰되지 않았다.

표 1

구분	OD ₆₀₀ 흡광도 값		
	배양 0분	배양 후 30분	배양 후 60분
박테리오파지 액 미첨가	0.5	0.7	1.3
박테리오파지 액 첨가	0.5	0.3	0.1

[0059] 상기와 동일한 방법으로 상기 실시예 4에서 사용했던 나머지 탄저균들을 대상으로 하여 탄저균의 성장 억제를 조사하여 보았으며 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

[0060] 이 결과들로부터 본 발명의 박테리오파지 Bac-THP-1이 탄저균의 성장을 저해할 뿐만 아니라 사멸까지 시키는 능력이 있음을 확인할 수 있었고, 이로부터 박테리오파지 Bac-THP-1이 탄저균의 감염을 방지 및 치료하는 목적의 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0061] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0062]

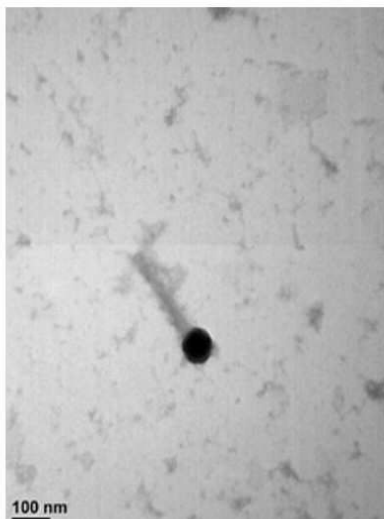
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12852BP

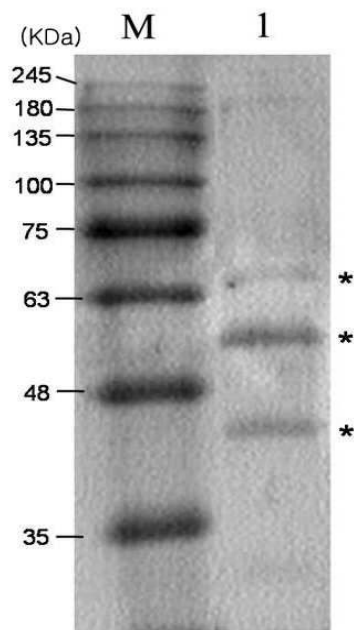
수탁일자 : 20150623

도면

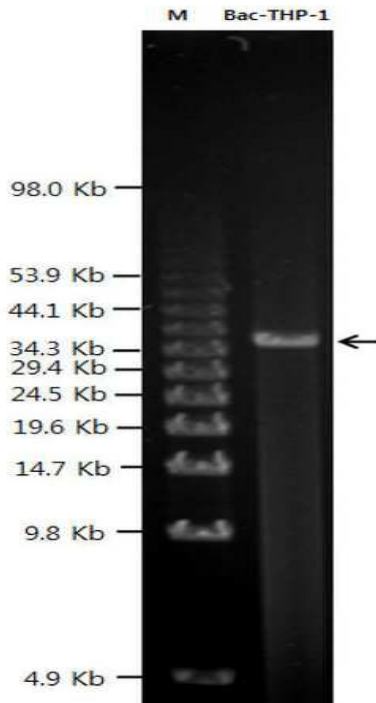
도면1



도면2



도면3



도면4

