



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월03일

(11) 등록번호 10-2495306

(24) 등록일자 2023년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/52 (2006.01) A61K 31/22 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01) A61K 39/108 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

A61K 31/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0083699

(22) 출원일자 2020년07월07일

심사청구일자 2020년07월07일

(65) 공개번호 10-2022-0005925

(43) 공개일자 2022년01월14일

(56) 선행기술조사문헌

US05569680 A*

Esteban-Torres 등, Journal of Dairy Science,
제97권, 제11호, 페이지 6737-6744 (2014)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 바이오미

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명
연구센터 222호 (신촌동)

(72) 발명자

윤상선

서울특별시 은평구 백련산로 36, 303동 806호(응
암동, 백련산 힐스테이트 3차)

정다현

서울특별시 양천구 목동동로 350, 512동 503호(목
동, 목동신시가지아파트5단지)

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 11 항

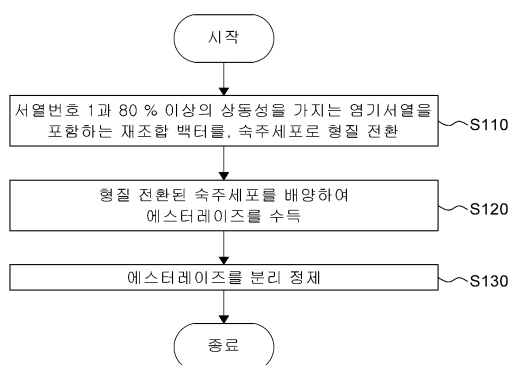
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 신규 에스테레이즈, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 미생물

(57) 요약

본 명세서에서는, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖고, 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는, 폴리뉴클레오타이드 및 이의 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/465 (2013.01)
A61K 39/0258 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/746 (2013.01)
C12N 9/18 (2013.01)
C12R 2001/19 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030988
과제번호	HR14C0006070020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	제2유닛 (7세부) 마이크로바이옴 활용 감염 및 면역질환 치료기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105311
과제번호	2017M3A9F3041233
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	새로운 유전자 스크리닝 시스템을 통한 프로바이오틱스 유전자 기능 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020903
과제번호	918003043SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖고, 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는, 에스테레이즈.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 에스테레이즈는,

트리부티린 (trybutirin) 을 기질로 하고,

상기 트리부티린을 가수분해하여 낙산 (butyrate) 을 생산하도록 구성된, 에스테레이즈.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 에스테레이즈를 생산하는 대장균 (기탁번호: KCTC 14204BP).

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 대장균은,

에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화된 대장균으로서,

에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되지 않은 대장균에 비하여 트리부티린에 대한 가수 분해 능이 10 배 이상인, 대장균.

청구항 6

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 에스테레이즈, 및 트리부티린을 포함하는, 염증성 장질환 치료용 또는 예방용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 4항에 기재된 대장균 및 트리부티린 (trybutirin) 을 포함하는, 염증성 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 (prodrug) 조성물.

청구항 10

서열번호 1의 염기서열을 포함하는, 재조합 벡터.

청구항 11

청구항 10항에 기재된 재조합 벡터로 형질 전환된 미생물.

청구항 12

청구항 10항에 기재된 재조합 벡터를, 숙주세포로 형질 전환하는 단계;
형질 전환된 상기 숙주세포를 배양하여 에스테레이즈를 수득하는 단계; 및
상기 에스테레이즈를 분리 정제하는 단계를 포함하는, 에스테레이즈 제조 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,
상기 숙주세포는, 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 엑시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus Reuteri*) 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 중 적어도 하나인, 에스테레이즈 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 에스테레이즈 코딩 폴리뉴클레오타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 트리부티린을 기질로 하여 낙산을 생산하도록 구성된 신규 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 이에 기초한 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 낙산 (butyric acid) 은 단쇄 지방산의 한 종으로서, 인간이나 동물의 생체내에 장내에서 존재하는 낙산 생산균에 의해 생성될 수 있다. 최근의 연구에 있어서, 낙산은 항 염증 작용이나 대장암 예방 작용 등의 여러 가지 생리 작용을 나타내고, 낙산에 의해 다양한 질환이 예방 또는 개선될 수 있다는 점이 보고되었다.

[0003] 이러한 이유로, 낙산을 질환의 예방·치료나 건강 증진에 이용하도록 하는 다양한 시도들이 진행되고 있는 실정이다. 한편 낙산은 강렬한 악취를 내뿜는 물질이기 때문에 낙산 자체를 의약품이나 식품에 첨가하는 것은 어려울 수 있다. 이에, 인간이나 동물의 장내에 있어서 낙산의 양을 증가시키는 처치가 다양하게 이루어지고 있다.

[0004] 따라서, 효과적으로 장내 낙산 수준을 증진시키는 새로운 낙산 증진 시스템의 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 장내 낙산 수준을 증진시키는 방법으로, 대사 중에 낙산을 생산하는 *클로스트리듐 부티리쿰* (*Clostridium butylicum*) 균주를 유효 성분으로하는 장내 낙산 생산균 증진제가 제안되었다.

[0007] 이러한, 프로바이오틱스 조성물은, 장내 낙산의 수준을 보다 증진할 수 있으나, 목표로하는 장내 낙산 농도의 설정이 어려울 수 있고, *클로스트리듐 부티리쿰* 균주의 장내 정착률이 사람마다 상이할 수 있다. 즉, 낙산 생산균에 기초한 증진에 의한 장내 낙산 생산 효율은, 사람마다 상이할 수 있다. 더욱이, 상기 증진제를 생산하는 것에 있어서 *클로스트리듐 부티리쿰* 균주는, 대장균과 같은 분열이 빠르거나 통형기성인 균주에 비하여 배양 조건이 까다로울 수 있다.

[0008] 본 발명의 발명자들은 전술한 *클로스트리듐 부티리쿰*에 기초한 장내 낙산 생산균 증진제가 갖는 한계를 극복하기 위한 방안으로, 새로운 장내 낙산 수준 증진 시스템을 개발하고자 하였다.

[0009] 그 결과, 본 발명의 발명자들은, 트리부티린 (Tributyrin) 을 기질로 하여 낙산을 생산하는, 새로운 낙산 생산 유전자를 발견하기에 이르렀다.

- [0010] 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은, 트리부티린의 에스터결합을 가수분해함으로써 낙산을 생산할 수 있는, 신규 트리부티린 에스테레이즈 (esterase) 및 이를 코딩하는 장내 미생물 유래 신규 폴리뉴클레오타이드를 발견할 수 있었다.
- [0011] 이때, 본 발명의 발명자들은, 신규 에스테레이즈를 트리부티린과 함께 제공하거나 또는, 이를 생산하는 균주를 트리부티린과 함께 프로드러그 (prodrug) 형태로 제공할 경우, 장내 낙산 수준이 증진될 수 있음을 인지할 수 있었다.
- [0012] 특히, 본 발명의 발명자들은, 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제조합 벡터로 형질 전환된 대장균과 같은 장내 미생물을 트리부티린과 함께 제공할 경우, *클로스트리듐 부티리쿰*과 같은 낙산 생산균을 직접적으로 취했을 때 보다 장내 정착률이 높아진다는 것을 기대할 수 있었다.
- [0013] 더욱이, 본 발명의 발명자들은, 상기와 같은 새로운 장내 낙산 수준 증진 시스템이, 기질인 트리부티린의 수준을 조절함으로써 목표로하는 장내 낙산 수준의 설정이 용이할 수 있으며, 장내 낙산 생산 효율이 종래의 낙산 생산균보다 증진될 수 있음을 기대할 수 있었다.
- [0014] 또한, 본 발명의 발명자들은, 배양 조건이 상대적으로 단순한 대장균에 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 유전자를 포함하는 제조합 벡터로 형질 전환할 경우, 다량의 에스터결합을 가수 분해능을 갖고 낙산을 생산하는 균주를 용이하게 획득할 수 있음을 기대할 수 있었다.
- [0015] 나아가, 본 발명의 발명자들은 상기와 같은 새로운 장내 낙산 수준 증진 시스템이, 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), 나아가 *클로스트리듐 디피실리* (clostridium difficile) 감염증, 크론병, 과민성 장질환, 궤양성 대장염, 베체트병, 결핵성 장염, 및 허혈성 장질환과 같은 장질환의 치료에 적용될 수 있음을 인지할 수 있었다.
- [0016] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 장내의 낙산을 효과적으로 증가시킬 수 있는 신규 트리부티린 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 신규 트리부티린 에스테레이즈, 및 이를 이용한 장질환 치료 및 예방용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 실시예에 따른 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖고, 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0019] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 다른 실시예에 따른 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는, 에스테레이즈가 제공된다.
- [0020] 본 발명의 특징에 따르면, 에스테레이즈는 트리부티린 (trybutirin) 을 기질로 하고, 트리부틴을 가수분해하여 낙산 (butyrate) 을 생산하도록 구성될 수 있다.
- [0021] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 에스테레이즈를 생산하는 대장균 (기탁번호: 기탁번호 KCTC 14204BP) 이 제공된다.
- [0022] 본 발명의 특징에 따르면, 상기 대장균은, 에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화된 대장균으로서, 에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화되지 않은 대장균에 비하여 트리부티린에 대한 가수 분해 능이 10 배 이상일 수 있다.
- [0023] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 에스테레이즈 (esterase) 및 트리부티린 (trybutirin) 을 포함하는, 장질환 치료용 또는 예방용 조성물이 제공된다.
- [0024] 본 발명의 특징에 따르면, 에스테레이즈는, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 장질환은 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), *클로스트리듐 디피실리* (clostridium difficile) 감염증, 크론병, 과민성 장질환, 궤양성 대장염, 베체트병, 결핵성 장염, 및 허혈성 장질환 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0026] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른, 에스테레이즈를 생산하는

대장균 (기탁번호: 기탁번호 KCTC 14204BP) 및 및 트리부티린 (trybutirin) 을 포함하는, 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 (prodrug) 조성물이 제공된다.

- [0027] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는, 재조합 벡터가 제공된다.
- [0028] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는, 재조합 벡터로 형질 전환된 미생물이 제공된다.
- [0029] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 또 다른 실시예에 따른, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는, 재조합 벡터를 숙주세포로 형질 전환하는 단계, 형질 전환된 숙주 세포를 배양하여 에스테레이즈를 수득하는 단계; 및 에스테레이즈를 분리 정제하는 단계를 포함하는, 에스테레이즈 제조 방법이 제공된다.
- [0030] 본 발명의 특징에 따르면, 숙주세포는, 락토바실러스 람노시스 (*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 엑시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus Reuteri*) 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 중 적어도 하나일 수 있다.
- [0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은, 신규 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 기초한 장내 낙산 증진 시스템을 제공할 수 있다.
- [0033] 보다 구체적으로 본 발명은, 신규 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공할 뿐만 아니라, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질 전환된 신규 에스테레이즈 생산을 하는 균주를 트리부티린과 함께 프로드러그 (prodrug) 형태로 제공할 수 있어, 장내 낙산 수준을 증진시킬 수 있다.
- [0034] 특히, 본 발명은, 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 폴리뉴클레오타이드를 갖는 재조합 벡터로 형질 전환된 장내 미생물을 트리부티린과 함께 제공함에 따라, 낙산 생산균을 직접 섭취했을 때 보다 장내 정착률이 높을 수 있다.
- [0035] 발명은, 신규 에스테레이즈의 기질인 트리부티린의 수준을 조절함으로써 목표로하는 장내 낙산 농도의 설정이 용이할 수 있어, 장내 낙산 생산 효율이 종래의 낙산 생산균보다 증진될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은, 배양 조건이 상대적으로 단순한 대장균에 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환할 수 있어, 다량의 에스테르결합을 가수 분해능의 균주를 용이하게 획득할 수 있다.
- [0037] 나아가, 본 발명은, 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), 나아가 클로스트리듐 디피실리 (*clostridium difficile*) 감염증, 크론병, 과민성 장질환, 궤양성 대장염, 베체트병, 결핵성 장염, 및 허혈성 장질환과 같은 장질환의 치료에 적용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 에스테레이즈의 제조 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다
- 도 2 내지 도 4은 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 에스테레이즈를 생산하는 대장균 (기탁번호: 기탁번호 KCTC 14204BP) 의 트리부티린 가수 분해 활성을 도시한 것이다.
- 도 5a 및 5b는 내재적 활성에 비하여 활성이 강화된 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는, 폴리뉴클레오타이드의 블라스트 분석 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 구성요소(예: 제2 구성요소)에 "직접 연결되어" 있거나 "직접 접촉되어" 있다고 언급된 때에는, 상기 어떤 구성요소와 상기 다른 구성요소 사이에 다른 구성요소(예: 제3 구성요소)가 존재하지 않는 것으로 이해될 수

있다.

- [0041] 본 문서에서 사용된 표현 "~하도록 구성된(또는 설정된)(configured to)"은 상황에 따라, 예를 들면, "~에 적합한(suitable for)," "~하는 능력을 가지는(having the capacity to)," "~하도록 설계된(designed to)," "~하도록 변경된(adapted to)," "~하도록 만들어진(made to)," 또는 "~를 할 수 있는(capable of)"과 바꾸어 사용될 수 있다. 용어 "~하도록 구성된(또는 설정된)"은 하드웨어적으로 "특별히 설계된(specifically designed to)" 것만을 반드시 의미하지 않을 수 있다. 대신, 어떤 상황에서는, "~하도록 구성된 디바이스"라는 표현은, 그 디바이스가 다른 디바이스 또는 부품들과 함께 "~할 수 있는" 것을 의미할 수 있다. 예를 들면, 문구 "A, B, 및 C를 수행하도록 구성된(또는 설정된)프로세서"는 해당 동작을 수행하기 위한 전용 프로세서(예: 임베디드 프로세서), 또는 메모리 디바이스에 저장된 하나 이상의 소프트웨어 프로그램들을 실행함으로써, 해당 동작들을 수행할 수 있는 범용 프로세서(generic-purpose processor)(예: CPU 또는 application processor)를 의미할 수 있다.
- [0042] 본 문서에서 사용된 용어들은 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 다른 실시예의 범위를 한정하려는 의도가 아닐 수 있다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함할 수 있다. 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 용어들은 본 문서에 기재된 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가질 수 있다. 본 문서에 사용된 용어들 중 일반적인 사전에 정의된 용어들은, 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 동일 또는 유사한 의미로 해석될 수 있으며, 본 문서에서 명백하게 정의되지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다. 경우에 따라서, 본 문서에서 정의된 용어일지라도 본 문서의 실시 예들을 배제하도록 해석될 수 없다.
- [0043] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0044] 이하에서는, 설명의 명확함을 위해 본원 명세서 내에서 사용되는 용어를 설명한다.
- [0045] 본 명세서 내에서 사용되는 용어 "에스테레이즈 (esterase)" 에스테르결합을 가수분해하는 효소로서, 에스테라아제, 에스테르가수분해효소 등과 상호 교환적으로 이용될 수 있다. 바람직하게, 본원 명세서 내에서 에스테레이즈는, 트리부티린 (tributyrin) 에스테레이즈일 수 있다. 보다 구체적으로, 트리부티린 에스테레이즈는, 트리부티린을 기질로 하여 트리부티린의 에스테르 결합을 가수분해하는 효소이고, 가수분해의 산물로 낙산과 글리세롤이 획득될 수 있다.
- [0046] 본 명세서 내에서 사용되는 용어 "낙산"은, 단쇄 지방산 중 하나로, 뷰티르산, 부티르산과 동일한 의미로 해석될 수 있다. 이때, 낙산은, 탄수화물 (셀룰로스, 헤미셀룰로스, 전분) 이 미생물 발효에 의해 대장이나 반추위에서 주로 생산되는 생체 내 천연 산물일 수 있다. 한편, 낙산은 장내에서 장 내막세포에 중요한 연료로 작용할 수 있어 장 건강에 도움이되며, 장의 염증 낮출 수 있어, 염증성 장질환을 포함하는 다양한 장질환에 대하여 효과적일 수 있다. 나아가, 낙산은 항암 효과, 신경 보호 효과, 면역력 강화 및 항염 효과, 나아가 비만 감소 및 당뇨병 예방에 효과적일 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어, "내재적 활성"은 미생물이 천연으로 가지고 있는 활성상태를 의미할 수 있다. 이때, "내재적 활성에 비하여 강화된, 대장균"은 대장균이 본래 (originally) 갖고 있는 에스테레이즈 활성과 비교하였을 때, 가수분해 활성이 보다 향상된 대장균을 의미할 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 기탁번호 KCTC 14204BP의 에스테레이즈를 생산하는 대장균은, 트리부티린 에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화된 대장균으로서, 그렇지 않은 대장균에 비하여 트리부티린에 대한 가수 분해 능이 높을 수 있다. 즉, 기탁번호 KCTC 14204BP의 에스테레이즈를 생산하는 대장균은, 또한 내재적 활성에 비하여 강화되지 않은 대장균에 비하여 높은 수준으로 낙산을 생산할 수 있다.
- [0049] 한편, 기탁번호 KCTC 14204BP의 에스테레이즈를 생산하는 대장균은 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖고, 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 가질 수 있다.
- [0050] 그러나, 이에 제한되지 않고, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖고, 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 재조합 벡터로 형질 전환된 균주는, 에스테레이즈 활성이 내재적 활성에 비하여 강화된 균주일 수 있다. 즉, 상기 형질 전환된 균주는 그렇지 않은 균주에 비하여 트리부티린에 대한 가수 분해 능이 높고, 이에 높은 수준으로 낙산을 생산할 수 있다.

- [0051] 이때, 내재적 활성에 비하여 강화된 균주는, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 에스테레이즈를 생산할 수 있다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어, "상동성"은 본 명세서에 개시된 염기서열 또는 아미노산 서열과의 동일한 정도를 나타낼 수 있다. 구체적으로, 상동성의 비교는 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율 (%) 로 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 상동성의 비교를 통해, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈의 아미노산 서열과 80 % 이상 동일한 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드는 상기 에스테레이즈의 생물학적 활성을 실질적으로 보유한 것이라고 볼 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 상동성 비교를 통해 서열번호 1의 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열과 80 % 이상 동일한 염기서열로 이루어진 유전자는 실질적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 에스테레이즈의 생물학적 활성과 동일한 활성을 에스테레이즈를 코딩할 수 있는 것으로 볼 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 에스테레이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열의 첨가, 결실, 치환, 또는 그 조합으로 이루어질 수 있다. 구체적으로, 서열번호 2의 아미노산 내의 결실 돌연변이, 기능성 서열의 첨가 및 스와핑과 같은 결실 또는 첨가로도 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈와의 생물학적 활성을 실질적으로 보유한 폴리펩타이드라면, 내재적 활성이 강화된 에스테레이즈로 볼 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주 세포에서 단백질의 발현을 조절할 수 있는 조절 서열에 작동 가능하도록 연결된 DNA 서열 및 기타 유전자 조작을 용이하게 하거나 단백질의 발현을 최적화하기 위해 도입되는 서열들을 함유하는 DNA 작제물을 의미한다. 조절 서열은 전사를 조절하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위해 선택적으로 부가된 오퍼레이터 (operator), 적절한 mRNA 리보솜 결합 부위 및 전사와 해독의 종료를 조절하는 서열들이 포함될 수 있다.
- [0056] 구체적으로, 상기 벡터는 프로모터가 CAT 프로모터인 벡터로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 효모 벡터, 또는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 상기 벡터는 숙주세포의 게놈 내로 통합되어 있는 형태일 수도 있다.
- [0057] 본 명세서에서 사용되는 용어, "재조합"은 유전적 재조합일 수 있는데, 상기 유전적 재조합은 이중생물에서 분리된 유전자 DNA나 합성된 유전자를 이어 붙이는 것을 의미할 수 있다. "재조합 벡터"는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드를 포함하도록 재조합된 벡터를 의미할 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 사용되는 용어, "형질 전환"은 외부로부터 DNA를 받아들여 생물체의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미할 수 있다. 상기 형질 전환 방법으로는 리보솜의 사용, 전기천공, 유리 DNA 업테이크를 증가시키는 화학물질, 숙주세포로 DNA 직접 주입, 입자 총 충격 및 마이크로발사를 이용한 방법이 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않고 더 다양한 방법이 형질 전환 방법으로 이용될 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서 사용되는 용어, "숙주세포"는 바이러스 감염에 사용되는 세포 또는 플라스미드나 파지 DNA 등의 벡터 및 삽입유전자의 증식에 사용되는 세균을 의미할 수 있다.
- [0060] 예를 들어, 숙주세포는 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 숙주세포일 수 있다. 형질 전환 가능한 숙주세포로는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 (*Staphylococcus*) 와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균 (예를 들어, 아스페르길러스 (*Aspergillus*)), 효모 (예를 들어, 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 (*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*)) 등과 같은 하등 진핵 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0061] 이에, 본원 명세서 내에서, 형질 전환된 숙주 세포는, 형질 전환된 미생물과 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0062] 한편, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않고, 더 다양한 세포를 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 숙주세포로 이용할 수 있다.
- [0063] 바람직하게, 숙주세포는, 락토바실러스 람노시스 (*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 엑시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus Reuteri*) 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 중 적어도 하나의 장내 미생물일 수 있다. 이러한 장내 미생물들은 다른 숙주세포 보다

장내 정착률이 높을 수 있어, 장내 낙산 증진에 보다 효과적일 수 있다.

- [0064] 본 명세서에서 사용되는 용어, "발현"은 상기 형질 전환된 숙주세포의 에스테레이즈를 코딩하는 유전자에서 폴리펩타이드가 발현하는 것 또는 생산되는 것을 의미할 수 있다.
- [0065] 분리 및 정제는 폴리펩타이드를 유효성분으로 분리하고 정제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리펩타이드를 분리 및 정제하는 과정은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 이온교환 크로마토그래피를 이용할 수 있다. 이때, 폴리펩타이드는, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈일 수 있다.
- [0066] 본 명세서에서 사용되는 용어, "장질환 치료용 또는 예방용 조성물"은 장질환의 치료 효과를 갖는 약학적 조성물을 의미할 수 있다.
- [0067] 이때, 약학적 조성물은 액상용액으로 제제화 되는 경우, 약학적으로 허용 가능한 담체에 의해 희석될 수 있다. 보다 구체적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체는 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 예를 들어, 액상용액으로 제제화 되는 약학적 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상이 혼합된 혼합물일 수 있다. 또한, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제가 첨가될 수 있다. 더 나아가, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제가 부가적으로 첨가되어 장질환 치료용 또는 예방용 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화될 수 있다.
- [0068] 장질환 치료용 또는 예방용 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있고, 질환 부위의 도포 또는 분무하는 방법으로 투여될 수도 있다. 장질환 치료용 또는 예방용 조성물은 또한, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여의 비경구로 투여될 수도 있다.
- [0069] 장질환 치료용 또는 예방용 조성물의 적합한 도포, 분무 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 대상이 되는 동물 및 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감도와 같은 요인들에 의해 다양할 수 있다. 또한, 숙련된 의사나 수의사는 목적하는 치료에 효과적인 장질환 치료용 또는 예방용 조성물의 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0070] 장질환 치료용 또는 예방용 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형은, 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제일 수 있다. 이때, 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 포함될 수 있으며, 캡슐 제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체가 더 함유될 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 용어, "장질환"은 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), 클로스트리듐 디피실리 (clostridium difficile) 감염증, 크론병, 과민성 장질환, 궤양성 대장염, 베체트병, 결핵성 장염, 및 허혈성 장질환 중 적어도 하나일 수 있다. 바람직하게, 본원 명세서 내에서 장질환은, 염증성 장질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 용어, "프로드러그 (prodrugs)"는, 어떤 약물을 화학적으로 변화시켜 물리·화학적 성질을 조절한 약물을 의미하며, 그 자체는 생리 활성을 나타내지 않지만 투여 후 체내에서 화학적으로, 혹은 효소의 작용에 의하여 원래의 약물로 바뀌어 약효를 발휘할 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 기탁번호: 기탁번호 KCTC 14204BP의 에스테레이즈를 생산하는 대장균 및 트리부티린 (trybutirin)을 포함하는, 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 조성물은, 경구 투여될 경우, 장내에 도달할 수 있다. 이때, 장내에 정착된 대장균의 대사에 의해 생성된 에스테레이즈는, 트리부티린을 가수분해함으로써, 장내 낙산의 수준을 증진시킬 수 있다. 이때, 달성하고자 하는 장내 낙산 수준은, 프로드러그 내에서 트리부티린의 수준을 조절함으로써 용이하게 설정될 수 있다.
- [0074] 한편, 상기 대장균 및 트리부티린으로 이루어진 프로드러그는, 액체 및 고체 약학 조제물, 예컨대 주사가 가능한 용액, 현탁액, 유화액, 정제, 코팅된 정제, 코팅된 정제 코어, 캡슐, 용액, 트로키제, 분산액, 펠렛, 과립, 좌

약, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐 등으로 제형화 될 수 있다.

[0075] 본 발명의 특징에 따르면, 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 조성물은, 장내에 도달하여 트리부티린을 가수분해 하고, 낙산 수준을 증진시키는 한, 다양한 조성을 가질 수 있다. 예를 들어, 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 조성물은, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는 에스테레이즈, 및 트리부티린으로 이루어질 수도 있다. 또는, 장질환 치료용 또는 예방용 프로드러그 조성물은, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는 에스테레이즈를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 균주 및 트리부티린으로 이루어질 수도 있다. 이때, 프로드러그는 장내에 도달할 때까지 위산, 항생제, 담즙산, 소화효소 등에 의해 분해되지 않도록 캡슐화 될 수 있다. 나아가, 형질 전환된 균주는 그 자체로 아포(spore)를 생성하여 장내 발아될 수 있는 균일 수도 있다.

[0076] 이하에서는 도 1을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 에스테레이즈 생산 절차에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0077] 도 1은 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 에스테레이즈의 제조 방법의 절차를 예시적으로 도시한 것이다

[0078] 도 1을 참조하면, 먼저 에스테레이즈의 제조를 위해, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는, 재조합 벡터가 숙주세포로 형질 전환된다 (S110). 그 다음, 형질 전환된 숙주세포를 배양하여 에스테레이즈가 획득된다 (S120). 마지막으로, 에스테레이즈가 분리 정제된다 (S130)

[0079] 보다 구체적으로, 재조합 벡터가 숙주세포로 형질 전환되는 단계 (S110) 에서, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상 상동성을 갖고, 에스테레이즈를 코딩하도록 구성된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터가 준비된다. 이때, 벡터는 pBAD24일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 그 다음, 상기 재조합 벡터는, 대장균, 나아가 *락토바실러스 람노서스* (*Lactobacillus rhamnosus*), *락토바실러스 엑시도필러스* (*Lactobacillus acidophilus*), *락토바실러스 루테리* (*Lactobacillus Reuteri*) 및 *바실러스 서브틸리스* (*Bacillus subtilis*) 중 적어도 하나를 포함하는 장내 균주를 숙주세포로 하여 형질 전환될 수 있다.

[0080] 그 다음, 에스테레이즈가 획득되는 단계 (S120) 에서, 형질 전환된 숙주세포의 배양에 의해, 에스테레이즈가 생성될 수 있다. 이때, 에스테레이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 가질 수 있고, 트리부티린을 기질로 하여 낙산을 생산하는 트리부티린 에스테레이즈일 수 있다.

[0081] 마지막으로, 에스테레이즈가 분리 정제되는 단계 (S130) 에서, 다양한 필터링 작업을 거쳐, 트리부티린 에스테레이즈가 정제될 수 있다.

[0082] 이상의 절차에 따른, 본 발명의 일 실시예에 따른 에스테레이즈 제조 방법에 의해, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 트리부티린 에스테레이즈가 높은 효율로 생산될 수 있다.

[0083] 평가 1: 본 발명의 다양한 실시예에 따른 대장균의 에스테레이즈 활성

[0084] 이하에서는, 도 2 내지 도 4를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 대장균의 에스테레이즈 활성 평가결과에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0085] 본 평가에서는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된, 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균을 실험군으로, 그렇지 않은 대장균을 대조군으로 설정하였다.

[0086] 도 2 내지 도 4는 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 에스테레이즈를 생산하는 대장균 (기탁번호: 기탁번호 KCTC 14204BP) 의 트리부티린 가수 분해 활성을 도시한 것이다.

[0087] 먼저, 도 2를 참조하면, 트리부티린을 함유하는 영양 아가 배지 (Nutrition agar+Tributyryl 0.8%) 상에 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균 및 대조군의 대장균을 접종한 결과가 도시된다.

[0088] 보다 구체적으로, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균이 접종되었을 때, 트리부티린의 분해에 따른 투명한 환이 생성된 것으로 나타난다. 이때, 환의 직경은 대조군보다 큰 것으로 나타난다.

[0089] 이러한 결과는, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균이 대조군의 대장균과 다르게, 트리부티린을 가수 분해하고 이로 인해 낙산이 생성되었다는 결과를 의미할 수 있다.

[0090] 다음으로, 도 3 및 도 4를 참조하면, 5mM의 트리부티린과 0.02 %의 TritonX100을 함유하는 NB (펩톤 (peptone) 2.5g + 효모 (yeast extract) 1.5g + NaCl 1.5g/500ml) 배지에 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균과 대조군의 대

장균 각각을 24 시간 동안 배양한 후, 상등액을 취하여 필터링 후 HPLC 분석을 통해 낙산의 농도를 분석한 결과가 도시된다. 이때, 낙산 농도의 분석은 3 반복 수행되었다.

[0091] 보다 구체적으로, 대조군의 경우, 배양 동안 트리부티린의 가수분해에 따른 산물인 낙산의 수준이 평균 81.57333 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타난다. 그러나, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균에 의한 낙산의 수준은 평균 1314.787 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 나타난다.

[0092] 이러한 결과는, 본 발명의 다양한 실시예에 이용되는 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균의 낙산 생산량이 일반 대장균보다 약 16배 높은 것을 의미하며, 대조군의 대장균에 비하여 트리부티린에 대한 가수 분해 능이 10 배 이상인 것을 의미할 수 있다.

[0093] 이상의 평가 1의 결과로, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된, 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균은, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에스테레이즈를 생산하여 트리부티린을 가수 분해하고, 장내 낙산의 수준을 증진시킬 수 있다. 이에, 상기 대장균과 트리부티린을 포함하는 프로드러그 조성물, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에스테레이즈와 트리부티린을 포함하는 약학 조성물은, 장내 낙산 수준을 증진시켜, 장 건강을 증진하고, 장의 염증 낮출 수 있다. 이에, 상기 조성물들은 염증성 장질환을 포함하는 다양한 장질환에 대하여 효과적일 수 있다. 나아가, 상기 조성물들은 항암 효과, 신경 보호 효과, 면역력 강화 및 항염 효과, 나아가 비만 감소 및 당뇨병 예방에 효과적일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 조성물들은 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease), 나아가 클로스트리듐 디피실리 (*Clostridium difficile*) 감염증, 크론병, 과민성 장질환, 궤양성 대장염, 베체트병, 결핵성 장염, 및 허혈성 장질환과 같은 장질환의 치료에 적용될 수 있다.

[0094] 한편, 본 발명의 효과는 이에 제한되는 것이 아니다.

[0095] 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 균주는, 기탁번호 KCTC 14204BP의 대장균과 동일한 활성을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 형질 전환된 균주는 트리부티린을 가수분해하여 장내 낙산 수준을 증진시키는 에스테레이즈를 생산하고, 이에 의해 낙산 수준을 증진하는 것에 기여할 수 있다.

[0096] 특히, 본 발명은, 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 폴리뉴클레오타이드로 형질 전환된 대장균과 같은 장내 미생물을 트리부티린과 함께 제공함에 따라, 낙산 생산균을 직접 섭취했을 때 보다 장내 정착률이 높을 수 있다.

[0097] 또한, 발명은, 신규 에스테레이즈의 기질인 트리부티린의 수준을 조절함으로써 목표로하는 장내 낙산 농도의 설정이 용이할 수 있어, 장내 낙산 생산 효율이 종래의 낙산 생산균보다 증진될 수 있다.

[0098] 또한, 본 발명은, 배양 조건이 상대적으로 단순한 대장균에 신규 트리부티린 에스테레이즈 코딩 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환할 수 있어, 다량의 에스테르결합을 가수 분해능의 균주를 용이하게 획득할 수 있다.

[0099] 평가 2: 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈 코딩 유전자 및 에스테레이즈의 동정

[0100] 이하에서는, 도 5를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈 코딩 유전자 및 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈의 동정 결과를 설명한다.

[0101] 도 5a 및 5b는 내재적 활성에 비하여 활성이 강화된 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 블라스트 분석 결과를 도시한 것이다.

[0102] 먼저, 도 5a를 참조하면, 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 내재적 활성에 비하여 활성이 강화된 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 대한 블라스트 n 분석 결과가 도시된다. 이때, 대상 유전체들은 E 값 (E value) 에 따라, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드와의 유사도가 높은 순서대로 나열된다.

[0103] 보다 구체적으로, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드와의 유사도가 가장 높은 것으로 분석된, *클로스트리듐 렌토셀룸* (*Clostridium lentocellum*) DSM 5427의 완전 유전체 (complete genome) 는, 오직 72 % 에 해당하는 영역이 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드와 67.41 % 상동성을 갖는 것으로 나타난다.

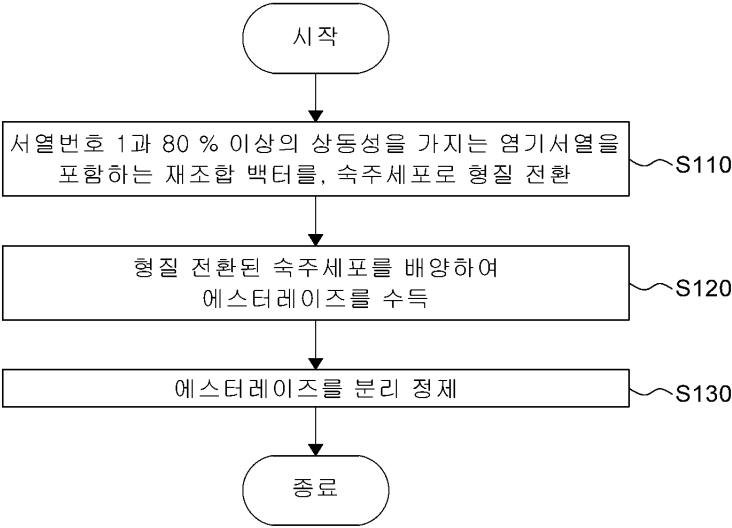
[0104] 나아가, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드와의 유사도가 두 번째로 높은 것으로 분석된, 허비닉스 (*Herbinix*) 종, SD1D 유전체, 염색체: I은, 오직 71 %에 해당하는 영역이 본 발명의 다양한 실시예에 따

른 폴리뉴클레오타이드와 67.9 % 상동성을 갖는 것으로 나타난다.

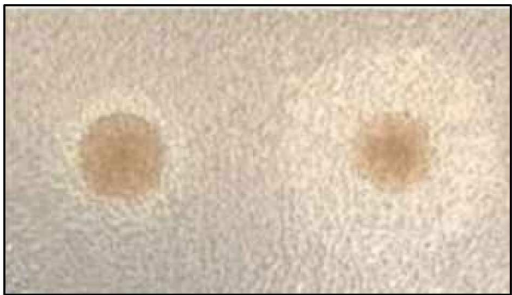
- [0105] 이러한 분석 결과는, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드가 종래에 알려진 유전체들과 상이한 유전체임을 의미할 수 있다.
- [0106] 관련하여, 도 5b를 더욱 참조하면, 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 내재적 활성에 비하여 활성이 강화된 에스테레이즈 (esterase) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 아미노산화하여 분석한 블라스트 x 결과가 도시된다. 이 때, 대상 단백질들은 E 값 (E value) 에 따라, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드와의 유사도가 높은 순서대로 나열된다.
- [0107] 보다 구체적으로, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드에 기초한 단백질과의 유사도가 가장 높은 것으로 분석된, *클로스트리듐 렌토셀룰* 유래의 알파/베타 하이드롤레이즈 폴드 도메인-함유 단백질 (alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein) 은, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드에 기초한 단백질과 오직 60.46 %의 상동성을 갖는 것으로 나타난다.
- [0108] 나아가, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드에 기초한 단백질과의 유사도가 세 번째로 높은 것으로 분석된, *허비닉스* 중 유래 가설 단백질 (hypothetical protein) 은, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드에 기초한 단백질과 오직 59.09 %의 상동성을 갖는 것으로 나타난다.
- [0109] 이러한 분석 결과는, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드가 종래에 공지된 유전체들과 상이한 신규 유전체이고, 서열번호 2의 에스테레이즈가 종래에 알려진 단백질과 상이한 신규한 단백질을 의미할 수 있다.
- [0110] 또한, 이러한 유전적 상이함은, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 에스테레이즈의 내재적 활성 강화에 기여한다는 것을 시사할 수도 있다.
- [0111] 이에, 서열번호 1의 염기서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 균주, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 에스테레이즈는 장 건강 증진을 위한 다양한 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0112] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0113] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



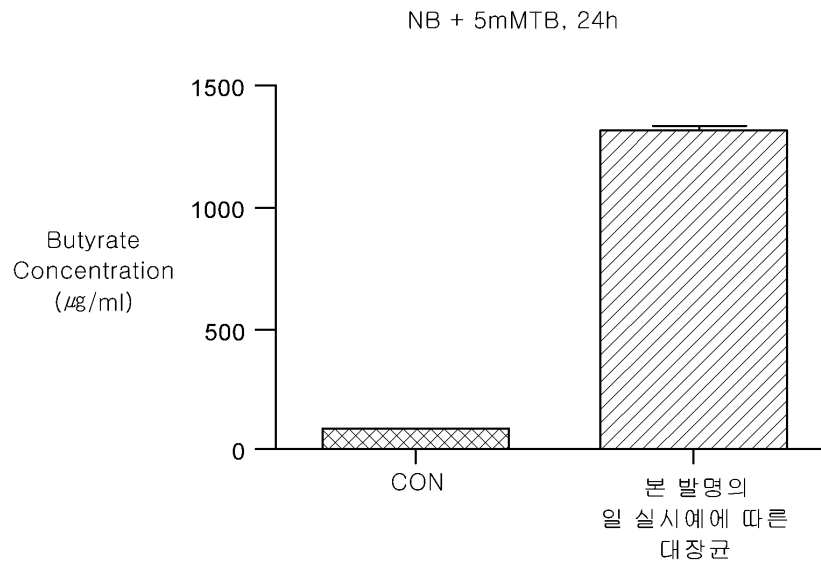
도면2



CON

본 발명의
일 실시예에 따른
대장균

도면3



도면4

	1	2	3	average
CON	80.57	81.67	82.48	81.57333
BUTY1	1287.55	1360.77	1296.04	1314.787

도면5a

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percent Identity	Accession
1	Clostridium lentocellum DSM 5427, complete genome	164	164	72%	1.00E-35	67.41	CP002582.1
2	Herbix sp. SD1D genome assembly SD1D, chromosome : 1	144	197	71%	1.00E-29	67.9	LN8/79430.1
3	Cellulosilyticum sp. WCF-2 chromosome, complete genome	142	142	69%	4.00E-29	66.91	CP034675.1
4	[Clostridium] stercorarium subsp. leptospartum DSM 9219, complete genome	75.2	75.2	16%	5.00E-09	73.33	CP014673.1
5	[Clostridium] stercorarium subsp. thermolacticum DSM 2910, complete genome	75.2	75.2	16%	5.00E-09	73.33	CP014672.1
6	Thermoclostridium stercorarium subsp. stercorarium DSM 8532 chromosome, complete genome	75.2	75.2	16%	5.00E-09	73.33	CP003992.2
7	Thermoclostridium stercorarium subsp. stercorarium DSM 8532 chromosome, complete genome	75.2	75.2	16%	5.00E-09	73.33	CP004044.1
8	Uncultured bacterium Cortig1767 genomic sequence	72.5	72.5	21%	6.00E-08	69.46	KC246776.1
9	Uncultured microorganism clone MetaFAXYLN-SH1 genomic sequence	71.6	71.6	16%	6.00E-08	71.64	JN571491.1
10	Uncultured bacterium clone SHEN-SHENG feruloyl esterase gene, complete cds	71.6	71.6	16%	6.00E-08	71.64	HQ338149.1
11	Uncultured bacterium DNA fragment from Bos taurus rumen, clone 25116	63.5	63.5	21%	3.00E-05	68.26	LT674546.1
12	Rumen-Carbanate active on Tween 20 and imipranil substrates	63.5	63.5	21%	3.00E-05	68.26	LT674546.1
13	Uncultured bacterium DNA fragment from Bos taurus rumen, clone 50E19	63.5	63.5	21%	3.00E-05	68.26	LT674541.1
14	Uncultured bacterium FAE7 (fae7) gene, complete cds	56.3	56.3	28%	0.005	66.81	KC493569.1
15	Lactobacillus agilis strain La3, complete genome	54.5	54.5	8%	0.016	77.61	CP016766.1
15	Epinephelus fuscoguttatus DNA, LG10, complete sequence	50	50	3%	0.2	100	AP022684.1

도면5b

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percent identity	Accession
1	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Cellulosilyticum lentocellum]	353	353	99%	5.00E-120	60.46	WP_013655742.1
2	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Cellulosilyticum sp. WCF-2]	350	350	99%	5.00E-119	60.08	WP_127065730.1
3	hypothetical protein [Herbrix luporum]	344	344	99%	2.00E-116	59.09	WP_058258634.1
4	acetyl/esterase [Herbrix hemicellulosilytica]	341	341	99%	2.00E-115	58.33	WP_103201759.1
5	acetyl/esterase [Clostridiales bacterium]	338	338	99%	5.00E-114	58.33	NLJ91413.1
6	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Clostridiales bacterium]	337	337	99%	1.00E-113	57.79	NLL00881.1
7	acetyl/esterase [Clostridium sp. E02]	336	336	99%	3.00E-113	58.56	WP_124066337.1
8	acetyl/esterase [Clostridiaceae bacterium]	330	330	99%	6.00E-111	57.2	WP_158342256.1
9	acetyl/esterase [Clostridiales bacterium]	327	327	99%	7.00E-110	56.27	NLL73497.1
10	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Clostridiales bacterium]	327	327	99%	9.00E-110	56.06	NLK02983.1
11	MULTISPECIES: acetyl/esterase [unclassified Coprococcus]	326	326	99%	5.00E-109	57.03	WP_117500563.1
12	MULTISPECIES: alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Clostridiales]	325	325	99%	6.00E-109	57.79	WP_118798397.1
13	esterase [Roseburia inulinivorans]	325	325	99%	7.00E-109	57.58	WP_021923145.1
14	hypothetical protein [[Clostridium] cellulosi]	324	324	99%	2.00E-108	56.82	WP_034840400.1
15	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein [Lachnospiraea glycerini]	323	323	99%	4.00E-108	54.75	WP_094378359.1

서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> NOVEL NUCLEOTIDES ENCODING ESTERASE AND USE THEREOF
- <130> 20PD5341KR
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 795
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence for novel esterase encoding gene

<400> 1

atggcattat taacacttca atattacagt acggccttat gcaggccac cagagtacaa	60
ttgcttctgc cgaatgatgt ccaggagatg gctgtgcagg acaacgaaaa ttataataga	120
ccgatgaaga cgcttgtctt gctgcatggc tacagcggca gctgtgacga ctggctgact	180
ggcagcagag tccaggaaat atcgggtatg tataacctgg caattgcaat gccgtcaggg	240
gaaaacagtt ttacctgga tcagaaggga accggaaggg catatgccac atttgtgggt	300
aaggagctta ttgcgtatct gcaaaagact ttcggcattg ccatgaaggc tgaggatacc	360
ttcatagggg gcttatccat gggaggattt ggcgccctgc acacggggct ttgtatccg	420
gagaattact caaagattgc tgctctttcg tccgcactga tcgtgcatga ggttatggaa	480
atgaaagaag gcatcgcaa tgctgtggct gactatgatt actataaagc cacattcgga	540
gagccgaaag agctggcaat gagcaaaaat aatccggaat atattatcag acagcgcaga	600
gagaggggag agtccattca gcctgttttt atggcctgtg gaactgagga ctttttactg	660
gaaaataacc ggagctttta tgagttcctg aaaaaggagg gcatagaggt agattatcac	720
gaaagtccgg gaactcatga ctggaaattc tggaatgaat atctggaacc ggcagttaaa	780
tggatgctgc aatga	795

<210> 2

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein sequence for novel esterase

<400> 2

Met Ala Leu Leu Thr Leu Gln Tyr Tyr Ser Thr Ala Leu Cys Arg Pro

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

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