

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0002096
(43) 공개일자 2021년01월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C12Q 1/18* (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2020-0185332(분할)
(22) 출원일자 2020년12월28일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-0025242
원출원일자 2019년03월05일
심사청구일자 2019년03월05일

- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
용동은
서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705
- (74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 16 항

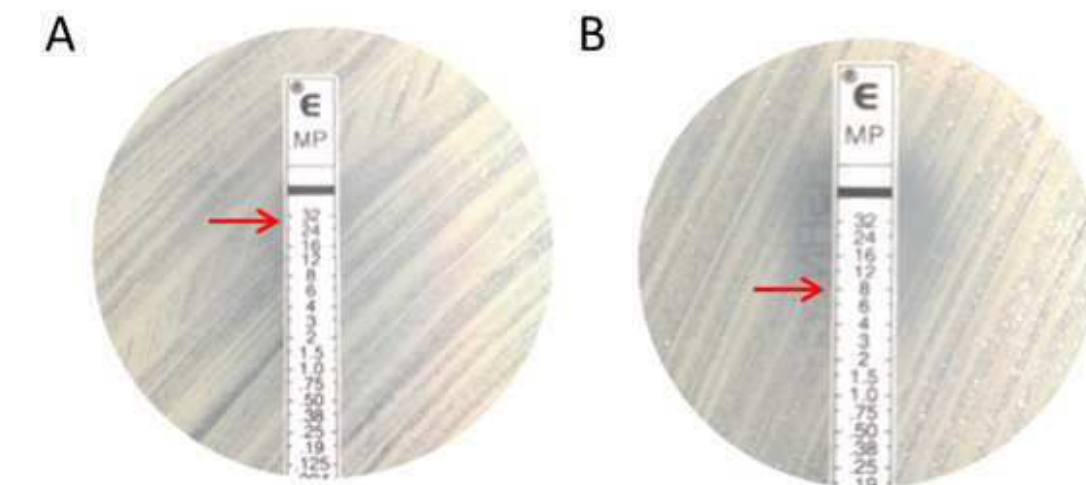
(54) 발명의 명칭 항균제 내성 균주의 내성 극복용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 항균제 내성 균주의 내성 극복용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 항균제 내성 균주에 결실되어 있는 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 감수성 균주와 유사한 수준으로 향상시킴으로써, 내성 균주의 항균제에 대한 감수성을 현저하게 증가시킬 수 있다. 나아가, 이를 적용하는 경우 동일한 항균제 농도에 서도 충분한 감수성을 발휘할 수 있기 때문에 항균제 내성 균주에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료를 위해 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 사용하는 경우, 항균제에 대한 내성 균주가 존재하는지 여부에 대한 판단을 통해, 개개인에 따라 사용되는 항균제의 종류 및 용량 등을 결정할 수 있으므로 항균제 오남용 등에 따른 부작용을 최소화할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)
C12Q 1/18 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545018734
과제번호	918003042SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	나노·소재원천기술개발사업
연구과제명	포스트게놈 신산업육성을 위한 다부처유전체사업
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711057975
과제번호	2017M3A7B4041973
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노·소재기술개발(R&D)
연구과제명	전기 나노바이오 센서 모듈 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	성균관대학교(자연과학캠퍼스)
연구기간	2019.02.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

KPHS_46730 유전자 및 KPHS_33600 유전자 중 적어도 하나의 유전자; 또는 이를 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함하는, 카바페넴계 항균제 내성 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)의 카바페넴계 항균제에 대한 감수성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 KPHS_46730 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 상기 KPHS_46730 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 KPHS_33600 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 상기 KPHS_33600 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

카바페넴계 항균제; 및 KPHS_46730 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함하는, 카바페넴계 항균제 내성 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)에 대한 항균제.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 KPHS_46730 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 항균제.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 항균제는 상기 KPHS_46730 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 것인, 항균제.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 항균제는 KPHS_33600 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 더 포함하는 것인, 항균제.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 *KPHS_33600* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것인, 항균제.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 항균제는 상기 *KPHS_33600* 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 것인, 항균제.

청구항 12

제 6항에 있어서,

상기 항균제는 생체 외(in vitro)에서 사용되는 것인, 항균제.

청구항 13

목적하는 개체로부터 분리되고, 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 포함하는 생물학적 시료에서,

KPHS_46730 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 카바페넴계 항균제 내성 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 측정된 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 상기 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체에 카바페넴계 항균제 내성 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 균주가 존재할 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 항균제 내성 균주의 스크리닝 방법.

청구항 15

카바페넴계 항균제 내성이 있는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)에 감염된 환자로부터 분리되어, 상기 카바페넴계 항균제 내성이 있는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 포함하는 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 생물학적 시료에서 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 카바페넴계 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법으로,

상기 항균제 내성 극복용 약제는, 카바페넴계 항균제 내성 균주에서 항균제에 대한 감수성을 증가시키는 것인, 카바페넴계 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 후보물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이, 항균제 감수성에서 분리된 생물학적 시료에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준으로 증가되는 경우, 상기 후보물질을 항균제 내성 극복용 약제로 선별하는 단계를 더 포함하는, 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 항균제 내성 균주의 내성 극복용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 오늘날 세균 감염에 의한 질병 등을 치료하기 위해 다양하게 사용되고 있는 항균제는 곰팡이로부터 추출된 성분을 갖는 것이 주를 이루며, 세균이 세포벽이나 단백질 등을 합성하는 시스템이 저해될 수 있도록 유도하는 역할을 한다. 20세기 플레밍에 의한 페니실린(Penicillin) 항균제의 발견을 시작으로, 세균의 감염으로 야기되는 질병으로부터 벗어나기 위하여 수없이 다양한 항균제가 개발되었다. 이러한 항균제는 우리의 삶에 있어 필수적인 위치를 차지하고 있으며, 의약품으로서 사용될 뿐만 아니라, 식품 및 화장품 보존제로 사용되는 등 그 응용 분야가 광범위하다. 그러나 화학합성 물질을 이용한 항균제에 대해 내성을 가지는 세균들이 점차 증가하고 있는 실정이며, 이에 따라 그 사용이 점차 제한되고 있다.

[0003] 페니실린 및 세팔로스포린(Cephalosporin) 등과 같은 종래의 화학 항균제는 미생물의 세포벽 또는 단백질의 합성 저해에 의하여 항균 작용을 나타낸다. 그러나, 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항균제가 존재하는 경우에는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 이와 같이 항균제에 대한 내성은 저항성과는 구별되는 현상으로서, 1970년대에 뉴모코커스 속(*Pneumococcus sp.*)에서 최초로 발견이 되었으며, 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., Nature, 227, (1970): 138-140). 항균제에 대한 내성은 항균제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(Autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(Autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 발생된다.

[0004] 한편, 항균제 분야에서 가장 중요하게 인식되고 있는 베타 락탐계 항균제에는 페니실린으로 통용되는 페남(Penam), 세파로스포린으로 통용되는 세팸(Cefem). 페넴(Penem) 및 카바페넴(Carbapenem)의 구조를 갖는 항균제가 있으나, 최근 이와 같은 항균제에 대한 내성을 갖는 균주가 증가하고 있는 실정이다. 따라서, 이들 내성 균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메커니즘을 가지는 항균제의 개발이 시급하나, 아직까지 항균제 내성 균주의 내성을 극복할 수 있을 만한 물질에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 항균제 내성 균주의 내성 극복용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함하는 클렙시엘라 속 균주에 의해 유발되는 질환의 예방, 개선 또는 치료 보조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 항균제 내성 균주의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 항균제 내성이 있는 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 구현 예에서는 항균제 내성 균주의 내성 극복용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명의 상기 조성물은 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함한다.

[0013] 본 발명의 상기 조성물은 *KPHS_33600* 유전자; 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자에 의해 암호화되는 단백질은, *garL*로도 알려져 있으며, 2-디하이드로-4-데옥

시-D-글루카레이트(2-dehydro-4-deoxy-D-glucarate)가 피루브산(Pyruvate) 및 타르트론테이트 세미알데히드(Tarttonate semialdehyde)로 전환되도록 촉매하는 기능을 갖는다. 일반적으로 항균제가 작용하는 메커니즘은 TCA 사이클에 의존하기 때문에 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 유전자의 결함에 따른 피루브산 생성의 감소에 의하여 항균제 내성이 유발될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 약학 조성물은 *KPHS_46730* 유전자에 의해 암호화되는 단백질이 항균제 내성 균주에서 높은 수준으로 발현될 수 있도록 함으로써 피루브산 생성을 내성이 발생되지 않은 감수성 균주와 동일한 수준으로 증가시켜 항균제에 대한 내성이 극복될 수 있도록 할 수 있다.

[0015] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기 서열로 이루어진 유전자일 수 있고, 이에 의해 암호화되는 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 상기 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 MFS(Major facilitator superfamily) 전달자와 유전적 상동성이 높은 것일 수 있다. 상기 MFS 운반자는 일반적으로 항생제의 유출 펌프로 작용함에도 불구하고, 상기 유전자의 결실 돌연변이에 의해 항균제 내성이 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명의 목적상 상기 약학 조성물은 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질이 높은 수준으로 발현되도록 함으로써 피루브산 생성을 내성이 발생되지 않은 감수성 균주와 동일한 수준으로 증가시켜 항균제 내성이 극복될 수 있도록 할 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 *KPHS_33600* 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 유전자일 수 있고, 이에 의해 암호화되는 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 상기 조성물의 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자는 그 유전자 자체로서 포함될 수도 있고, 바람직하게는 재조합 발현 벡터에 포함되는 형태로 포함될 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터는 목적하는 숙주세포에서 목적하는 단백질 또는 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시 코돈, 종결 코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(In frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성 프로모터일 수 있다.

[0020] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터는 프로모터와 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자를 이루는 염기 서열 즉, 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 본 발명의 상기 '작동 가능하게 연결(Operably linked)'이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(Functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 발현 벡터와의 작동 가능하게 연결되는 것은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등이 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터의 백본(Backbone)으로 사용할 수 있는 벡터는 본 발명의 상기 단백질을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들면, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA, 상업적으로 개발된 플라스미드(pGEM[®] T 벡터, pET22b, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pGEX-4T-1, pET, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, AAAAA λgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백신시아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질인, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질은 공지의 단백질 합성법 또는 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 상기 단백질을 형질전환된 숙주세포를

이용하는 경우, 본 발명의 단백질을 암호화하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조한 뒤, 당업계에 공지된 임의의 방법을 적절하게 사용하여 상기 형질전환체를 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 상기 형질전환체로부터 단백질은 당업계에서 공지된 원심분리, 크로마토그래피, 전기 영동 등의 방법을 통해 분리 및 정제함으로써 얻을 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 의해 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 높은 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들면 상동성이 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상인 경우도 항균제 내성이 극복될 수 있는 기능을 유지하는 한 본 발명의 상기 단백질에 모두 포함된다.

[0024] 본 발명의 상기 상동성이란, 야생형(Wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기와 같은 서열 상동성 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(Bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능 하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.

[0025] 본 발명의 상기 항균제 내성이란, 통상적인 농도의 단일 또는 복합 항균제가 존재하는 경우에서 성장이 저해되는 것처럼 보이지만, 결과적으로 균주의 사멸이 유도되지 않는 현상, 즉 약효가 발휘되지 않는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명의 상기 항균제는 예를 들면, 카바페넴(Carbapenem)계 항균제, 베타락탐계(Beta-lactam) 항균제, 페니실린계(Penicillin) 항균제, 세팔로스포린계(Cephalosporins) 항균제 및 모노박탐계(Monobactams) 항균제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 카바페넴계 항균제일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메로페넴(Meropenem), 에르타페넴(Ertapenem), 설박탐(Sulbactam) 및 타조박탐(Tazobactam) 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 상기 항균제 내성은 일반적으로 항균제 내성 균주가 내성을 갖는 메커니즘인 카바페넴을 분해하여 효과의 발휘를 억제하는 카바페넴아제 효소(Carbapenemase)가 생산되는 것 일 수 있고, 본 발명의 목적상 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자가 결실되는 돌연변이가 발생된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 상기 항균제 내성 균주는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 클렙시엘라 오자에나에(*Klebsiella ozaenae*), 클렙시엘라 리노스클레로마티스(*Klebsiella rhinoscleromatis*), 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 클렙시엘라 플란티콜라(*Klebsiella planticola*) 및 클렙시엘라 테리게나(*Klebsiella terrigena*)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 클렙시엘라 뉴모니아일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 운화제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0031] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트,

셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0032] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 클랩시엘라 속 균주에 의해 유발되는 질환의 예방, 개선 또는 치료 보조용 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 보조용 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 보조용 조성물은 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 유효성분으로 포함한다.
- [0044] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 증가시킴으로써, 이와 같은 단백질이 결실되어 발생될 수 있는 항균제 내성이 극복되도록 할 수 있기 때문에, 기존의 항균제와 병용하여 투여하는 경우, 감수성 균주에 투여되는 동일한 농도의 항균제를 투여하는 경우에도 매우 효과적으로 항균제 내성이 존재하는 클랩시엘라 속 균주를 사멸시킴으로써 치료 효과가 발휘되도록 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 *KPHS_46730* 유전자, *KPHS_33600* 유전자, 상기 유전자들에 의해 암호화되는 단백질, 항균제 내성, 항균제 내성 균주, 항균제, 재조합 발현 벡터, 약학 조성물, 식품 조성물 등에 대한 기재는 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0046] 본 발명의 상기 클렙시엘라 속 균주에 의해 유발되는 질환인 감염성 질환은 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 폐혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 또는 이하선염을 포함하며, 이는 특히 클렙시엘라 뉴모니아에 의하여 발생하는 질병이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 상기 보조용 조성물은 클렙시엘라 속 균주가 갖는 항균제에 대한 내성을 회복시켜, 항균제에 대한 감수성 균주와 동등하거나 유사한 수준의 항균제 용량을 사용함으로써 균주의 사멸 또는 성장 저해 등의 효과가 발휘될 수 있도록 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 상기 "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 클렙시엘라 속 균주의 감염에 의해 유발되는 감염성 질환에 의한 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 클렙시엘라 속 균주의 감염에 의해 유발되는 감염성 질환에 의한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 상기 "개선"은 본 발명의 조성물을 이용하여 클렙시엘라 속 균주의 감염에 의해 유발되는 감염성 질환에 의한 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 항균제 내성 균주의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0054] 상기 스크리닝 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 항균제 감수성 균주에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체에 항균제 내성 균주가 존재할 것으로 예측하는 단계가 더 포함될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에서 *KPHS_46730* 유전자, *KPHS_33600* 유전자, 상기 유전자들에 의해 암호화되는 단백질, 항균제 내성, 항균제 내성 균주, 항균제 등에 대한 기제는 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0056] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 균주, 바람직하게는 항균제 내성 균주가 감염되었거나 감염이 의심되는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는) 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 생물학적 시료에 포함된 측정의 대상이 되는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여, 상기 측정 대상이 되는 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용될 수 있는 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 측정 대상이 되는 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 상기 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이

개시될 수 있다.

- [0059] 본 발명의 상기 프로브는 상기 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 mRNA의 존재 유무, 발현되는 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 염기 서열, 바람직하게는 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상이 지식을 가진 자가 공지된 방법에 의해 쉽게 제작될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 시료에 포함된 측정 대상이 되는 상기 단백질의 발현 수준을 확인하기 위한 제제를 의미한다.
- [0062] 상기 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질, 즉 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(Immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(Immunochromatography), FACS(Fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 상기 항체는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 상기 앵타머는 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 상기 항체는 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 염기 서열, 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 염기 서열로 이루어진 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질(항원)을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제작될 수 있고, 상기 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지의 방법에 따라 쉽게 제작될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0068] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 항균제 내성이 있는 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0069] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 상기 후보물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이, 항균제 감수성에서 분리된 생물학적 시료에서 측정된 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자의 발현 수준; 또는 이에 의해 암호

화되는 단백질의 발현 수준으로 증가되는 경우, 상기 후보물질을 항균제 내성 극복용 약제로 선별하는 단계를 더 포함한다.

[0070] 본 발명의 상기 항균제 내성 극복용 약제의 스크리닝 방법에서 *KPHS_46730* 유전자, *KPHS_33600* 유전자, 상기 유전자들에 의해 암호화되는 단백질, 항균제 내성, 항균제 내성 균주, 항균제, 재조합 발현 벡터, 단백질의 발현 수준 측정, 유전자의 발현 수준 측정 방법, 생물학적 시료 등에 대한 기제는 상기 약학 조성물 및 스크리닝 방법에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0071] 본 발명의 상기 후보물질은 항균제 내성을 극복하기 위한 활성, 즉 *KPHS_46730* 유전자 또는 *KPHS_33600* 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 감수성 균주와 동등, 또는 유사한 정도의 수준으로 증가시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0073] [서열목록]

[0074] 서열번호 1: *KPHS_46730*

[0075] 1 atggataacg caatttttcc gaacaaattt aaggccgcgc tggcggcgca tcaggtgcag
 [0076] 61 attggctgct ggtgcgcttt ggctaaccg attagcaccg aggtgctggg tctggcgggg
 [0077] 121 ttgactggc tggtgctgga cgcggaacac gcgcaaacg acgtcaccac gtcattccg
 [0078] 181 cagctgatgg cctgaaagg tagctccagc gcgcaggtag tccgtgtgcc gaccaatgaa
 [0079] 241 cccatcatca tcaagcgcat gctggacatc ggcttctata acttcttgtt gccgtttgtc
 [0080] 301 gagacggctg aacaggcggc gcaggcgggt gcttcgacct gttatccgcc ggaagggatc
 [0081] 361 cgcgggggtc cgttttccca ccgcggcaat atgtttggca ccgtgccgga ctacttcgcc
 [0082] 421 cagtccaaca agaacatttc cattctgggt cagattgaga gccagaccgg agtggacaac
 [0083] 481 gtcgagggca ttgccgcgac cgaggcggtg gacggtgtgt ttgtcggccc gagcgacctg
 [0084] 541 gccgcgcct taggccaattt gggcaatgcc gcccatcctg aggtgcagcg cgctatccag
 [0085] 601 catatcttcg ccagcgcgaa gaagcacggt aagccaagcg gcattctggc gccagtggaa
 [0086] 661 gccgatgcgc gccgctatct ggaatggggc gcgaccttcg tcgccgttgg cagcgatctg
 [0087] 721 ggcgctcttc gttctgcaac ccagaaactt gccgacgctg ttaaaaataa tcaccaggat
 [0088] 781 gaagagagag aacattatga caatcaaagt aggttttctc ggtcttggca ttatgggcaa
 [0089] 841 accgatgagc aaaaatttgc tgaaagcggg ttactcgtg gtgtgtctg a

[0091] 서열번호 2: *KPHS_46730*

[0092] 1 mdnaifpnkf kaalaahqvq igcwalanp istevlglag fdwlvldaeh apndvttlip
 [0093] 61 qlmalkgsss aqvrvptne piiikrldi gfynflvpfv etaeqaaqav astryppegi
 [0094] 121 rgvsvshrgn mfgtvpdyfa qsnknisilv qiesqtgvdn veaiaategv dgfvvgpsdl
 [0095] 181 aaalghlgnahpevqraiq hifasakkhg kpsgilapve adarrylew g atfvavgsdl
 [0096] 241 gvfrsatqkl adafknnhd eerehydngs rfyrswyhgq tdeqkfaesg llaggv

[0098] 서열번호 3: *KPHS_33600*

[0099] 1 atgctaaact catcattcaa aaaaccgttt catttaagac tcatattcac catggataaa
 [0100] 61 aattcttctg atggcgtgcc gtggccgcaa cgctatggcg ccattctgac catcgtgctt
 [0101] 121 gggctgacca tggccgtgct tgacggggct atcgccaacg tcgcgctgcc gactatcgcc
 [0102] 181 agcgatctca acgcctcacc ggccggcttca atctggatcg ttaacgccta ccaaatcgcc
 [0103] 241 attgtcatcg ccttctgccc gctctccttc ctggcgaca tggcggcta tcggcgatc
 [0104] 301 tataagatag gcctgggtgt gtttatcttt acctcgctgg cctgcgcgt gtcgcgtagc
 [0105] 361 ctgaaatgc taaccttcgc ccgctgcgcg cagggtatgg gcggcgccgc gctgatgagc
 [0106] 421 gtcaacaccg cgctgatccg tctgatttat ccgcagcgt ttcttggtcg cggcatgggc
 [0107] 481 attaaactct ttgtcgttgc cgtctcttcg gcggcaggcc cgactatcgc cgcagcgatc
 [0108] 541 ctctccctcg cctcatggca atggctgttt ttaattaacg tgcctctcgg catcgtcgcc
 [0109] 601 tttgttctgg ccatgcgctt tctgccgcc aacagcgcgc gcagcaaat catccgttc
 [0110] 661 gatctgccga ggcgcattat gaacgccctt accttcgggc tgcgatcac cgccctgagc
 [0111] 721 ggtttcgcc aggggcagtc cactcagctg gtgctggcgg aggtcgccgc tatgctggtg
 [0112] 781 gtgggttctt tcttcttcg ccgccagtc acgatgccg tccccctgct gccggtcgac
 [0113] 841 ctgctgcgta tccactctt ttctctctt atctgcatt ccatctgctc ctctgcgcg
 [0114] 901 cagatgctgg cgatggtctc tctgccctt tttctgcagt cgatgatggg gcgcagcgaa
 [0115] 961 gtggagaccg gtctgctgct aacgccgtgg ccgttagcga ccatggtgat ggccgcgctg
 [0116] 1021 gccggctatt tgatcgagaa atgcatgcc gggctgctgg gggctatcgg ttgctgatt
 [0117] 1081 atggcctgcg gcctgttcgg cctggcgctg ctgccctctg cgccctccga tctggatc
 [0118] 1141 atctggcgca tggcgctgtg cggcgccgcg ttcgggctgt ttcagtcgcc gaacaacat
 [0119] 1201 accatcgctg cctcggtccc gagccatcgt agcggcgccg ccagcggcat gctgggcacc
 [0120] 1261 gctcgctgc tcggacagag caccggcgcg gcgctggtgg cgctgctatt caatttctc
 [0121] 1321 ggtaacaacg gcacccacac cgccctgctg ctggccggca ccttggtat cgtcgccgcg
 [0122] 1381 ctaattagcg gtctgcgggt cactcagccg cgcgcagcct ga

[0124] 서열번호 4: *KPHS_33600*

[0125] 1 mlnssfkpfl hlrlftmdk nssdgvplpq rygailtvl gltmavldga ianvalptia
 [0126] 61 sdnaspaas iwivnayqia iviallplsf lgdmvgyrri ykiglvvfif tslacalsrs
 [0127] 121 lemltfarva qglggaalms vntalirliy pqrflgrmg insfvavss aagptiaaai
 [0128] 181 lslasqwlf linvplgiva fvlamrflpp nsarskiirf dlpsaimnal tfgllitals
 [0129] 241 gfaqqstql vlaevaamlv vggffvrrql tmpvpllpvd llriplfsls ictsicsfca
 [0130] 301 qmlamvslpf flqsmmrse vetgllltpw platmvmapl agyliekcha gllgaiglli
 [0131] 361 macglfglal lpsspsldi iwrmlcagag fglfqspnh tivasapshr sggasgmlgt
 [0132] 421 arllgqstga alvallfnll gnnghthall lagtlaivaa lisglrvtpq raa

[0134] 서열번호 5: *KPHS_33600* 정방향 프라이머

[0135] TAAGCAGAATTCACCTCGTCGTAACGTGT

[0137] 서열번호 6: *KPHS_33600* 역방향 프라이머

[0138] TGCTTAGGATCCTTCTGACGCTGAAAACG

[0140] 서열번호 7: *KPHS_46730* 정방향 프라이머

[0141] TAAGCACTGCAGCTGGTCATTACGCTGATG

[0143] 서열번호 8: *KPHS_46730* 역방향 프라이머

[0144] TGCTTAGAATTCTCGCACTGTTTCGGCAATC

발명의 효과

[0145] 본 발명에 따른 조성물은 항균제 내성 균주에 결실되어 있는 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 감수성 균주와 유사한 수준으로 향상시킴으로써, 내성 균주의 항균제에 대한 감수성을 현저하게 증가시킬 수 있다. 나아가, 이를 적용하는 경우 동일한 항균제 농도에서도 충분한 감수성을 발휘할 수 있기 때문에 항균제 내성 균주에 의해 유발되는 질환의 예방 및 치료를 위해 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

[0146] 또한, 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 사용하는 경우, 항균제에 대한 내성 균주가 존재하는지 여부를 판단함으로써 개개인에 따라 사용되는 항균제의 종류 및 용량 등을 결정할 수 있으므로 항균제 오남용 등에 따른 부작용을 최소화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0147] 도 1의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 *KPHS_33600* 유전자 돌연변이에 의한 메로페넴(Meropenem)에 대한 최소 저해 농도(Minimum inhibitory concentration; MIC)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 *KPHS_46730* 유전자 돌연변이에 의한 메로페넴에 대한 최소 저해 농도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0148] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0150] 실시예

[준비에 1] 임상 균주(K26 균주 및 K56 균주) 분리 및 확인

[0153] 세브란스 병원(한국)의 연구실에서 유지되고 있는 박테리아 컬렉션에서 클립시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*; 이하, '*K. pneumoniae*'라고 함) 임상 균주인 K26 균주 및 K56 균주를 선택하였다. 상기 선택된 균주는 단일 환자로부터 분리된 것으로서, 카바페넴 중에서 메로페넴(Meropenem) 치료를 받기 이전의 감수성 균주(K26 균주) 또는 치료를 받은 이후의 내성 균주(K56 균주)를 선택하였다. MALDI-TOF MS Biotyper CA 시스템(Bruker Daltonik GmbH)을 사용하여 상기 균주들을 동정하였으며, 펄스-필드 겔(Pulse-field gel) 전기 영동을 사용하여 상기 균주들의 클론 관련성을 결정하였다. 여기서, 녹농균(*P. aeruginosa*) ATCC 27853 및 대장균(*E. coli*) ATCC 25922를 CLSI 가이드라인에 따라 대조균으로 사용하였다.

[0154] 상기 균주들의 메로페넴의 최소 억제 농도(Minimum inhibitory concentration; MIC)는 통상적으로 사용되는 E-테스트를 통해 결정하였다. 상기 K26 균주와 K56 균주의 최소 억제 농도를 비교한 결과, K26 균주에 비해 K56

균주에서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 32 $\mu\text{g/ml}$ 이상 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[준비에 2] 돌연변이 균주 제작(1)

32mg/L의 메로페넴 최소 억제 농도를 나타낼 때까지, 맥콘키(MacConkey) 플레이트 상에서 메로페넴 농도를 증가 시키면서 상기 준비예 1에서 얻은 K26 균주를 모체 균주를 배양하는 과정을 통해 메로페넴 내성 균주인 K26M 균주를 제작하였다.

상기 K26M 균주의 메로페넴 최소 억제 농도를 상기 준비예 1에서와 동일한 방식으로 측정한 결과, 16 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나는 것을 확인하였다.

[준비에 3] 돌연변이 균주 제작(2)

KPHS_33600 또는 KPHS_46730가 포함되어 있는 ZpUC19 플라스미드 (J. Craig Venter Institute, 미국)를 K56 균주 또는 K26M 균주에 전기 천공 방법을 통해 도입함으로써 형질전환 하였다. 그런 다음, 상기 형질전환된 상기 균주들이 회복될 수 있도록 저염 LB 배지(Sigma Aldrich, 미국)에서 배양한 뒤, 상기 균주들을 1000 $\mu\text{g/ml}$ 제오신(Zeocin)이 포함되어 있는 저염 LB 아가 플레이트에 각각 도말하고 배양하는 과정을 통해 형질전환된 균주만을 선별하였다.

상기 균주들로부터 분리된 DNA를 주형으로, 하기 표 1에 기재되어 있는 서열번호 5 내지 8의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행함으로써, 최종적으로 상기 플라스미드가 제대로 도입된 균주만을 최종적으로 선별하였다.

표 1

유전자	서열번호	구분	염기 서열 (5'-3')
KPHS_33600	서열번호 5	정방향	TAAGCAGAATTCACCTCGTCGTAACGT
	서열번호 6	역방향	TGCTTAGGATCCTTCTGACGCTGAAAACG
KPHS_46730	서열번호 7	정방향	TAAGCACTGCAGCTGGTCATTACGCTGATG
	서열번호 8	역방향	TGCTTAGAATTCTCGCACTGTTCGGCAATC

이렇게 선별된 균주들을 5ml의 LB 배지에 접종하여, 37℃에서 하룻동안 진탕배양한 다음, 상기 배양액을 새로운 LB 배지에 접종한 후 GraphPad Prism 5.01 for Windows (GraphPad Software Inc., 미국)을 사용하여, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 및 24 시간에서 OD₆₀₀ 값을 측정하였다.

[실시에 1] 유전자 돌연변이 확인

상기 준비예 1 내지 준비예 3의 K26 균주, K56 균주 및 K26M 균주로부터 분리된 mRNA를 이용하여, K26 균주를 기준으로 상기 균주들 간의 β -락타마아제 유전자(β -Lactamase gene) 및 포린 유전자의 돌연변이(Mutation in porin genes)를 비교하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

균주	β -락타마아제 유전자	포린 유전자의 돌연변이	
		OmpK35	OmpK36 (KPHS_37010)
K26	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{LEN-11}	54T 결실	돌연변이 없음
K56	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{LEN-11}	54T 결실	전이인자 삽입
K26M	<i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{LEN-11}	54T 결실	74 th 위치에 종결코돈

[0173] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 항균제 내성을 획득하는 돌연변이로 알려져 있는 OmpK35의 54T 결실 돌연변이가 K26 균주, K56 균주 및 K26M 균주에 존재하는 것을 확인하였다. 다만, 페로페넴에 감수성을 나타내는 K26 균주에서 위와 같은 54T 결실 돌연변이가 확인된 것은 OmpK35 단일 결실이 항균제 내성에 유의한 영향을 미치지 않은 것으로 설명될 수 있다.

[0175] [실시예 2] 감수성 균주 및 내성 균주간의 유전자 변이 비교

[0176] 균주에서 발생하는 유전적 변이에 의해 카바페넴과 같은 항균제 내성의 획득하는 것으로 보고되어 있어, 어떠한 유전자에 발생하는 유전적 변이가 항균제 내성의 획득과 관련성이 있는지 확인하였다.

[0177] 구체적으로, Ion Torrent PGM™ 시스템 (Life technologies)을 사용하여 감수성 균주 (K26 균주) 및 내성 균주 (K56 균주 및 K26M 균주)에 대한 전체 유전체 염기 서열 분석을 수행한 뒤, *K. pneumoniae* HS11286을 참조 게놈으로 사용하는 breseq 소프트웨어를 사용하여, 변형 호출 분석을 수행하고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0179]

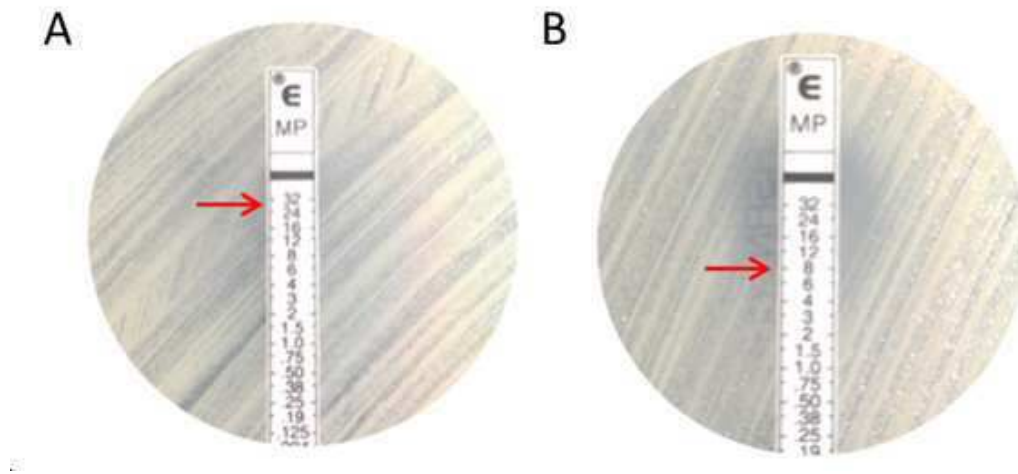
유전자	감수성 균주와 비교하여 내성 균주에서의 변이	Log2FC	n(Neighbor)	p-value	설명
KPHS_33470	전체 유전자 결실	-3.2254741	212	0	PTS 효소 IIAB, 만노스 특이적(mannose-specific)
KPHS_33480	전체 유전자 결실	-4.17576329	53	0	PTS 효소 IIC, 만노스 특이적
KPHS_33490	전체 유전자 결실	-3.29038045	90	0	만노스 특이적 PTS 시스템 단백질 IID
KPHS_33500	전체 유전자 결실	-2.3410061	24	0	가설 단백질
KPHS_33510	전체 유전자 결실	-4.14922574	21	0	가설 단백질
KPHS_33520	전체 유전자 결실	-4.32517444	29	0	리보솜 RNA 거대 서브유닛 메틸트랜스퍼라제 A(large subunit methyltransferase A)
KPHS_33590	전체 유전자 결실	-6.91287357	27	0	IclR 패밀리의 전사 조절자(transcriptional regulator)
KPHS_33600	전체 유전자 결실	-3.96018967	34	0.000064	추정 수송 단백질
KPHS_35510	Asp297Glu, Gln303Lys, 2bp >GC coding(909-910/1005 nt)	0.1129611	89	0.002914	우리딘 디포스페이트 갈락투로네이트 4-데피머라제(uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase)
KPHS_33610	전체 유전자 결실	-0.54896563	141	0.008394	열충격단백질(heat shock protein) HtpX
KPHS_33460	전체 유전자 결실	-0.75037909	77	0.014156	추정 막관통 단백질(putative transmembrane protein)
KPHS_11800	프레임쉬프트(A)5>6 coding (131/183 nt)	-0.0527962	19	0.02718	50S 리보솜 단백질 L36
KPHS_46730	삽입 (T)5>6 coding (763/891 nt)	0.063920382	46	0.047698	알파-디하이드로-베타-디옥시-D-글루카레이트 알도라제(alpha-dehydro-beta-deoxy-D-glucarate aldolase)
KPHS_37010(in-vitro)	Tyr74*	-0.830388794	46	0.009963	OmpK36 포린(porin)

<i>KPHS_46730</i> (<i>in-vitro</i>)	삽입 (T)5>6 coding (763/891 nt)	-0.1587	46	0.013534	알파-디하이드로-베타-디 옥시-D-글루카레이트 알돌 라제
--	----------------------------------	---------	----	----------	---------------------------------------

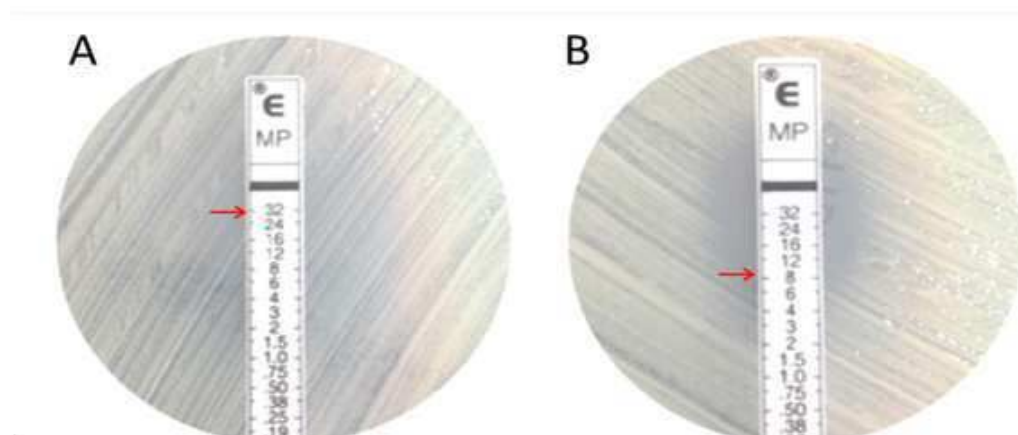
- [0181] 상기 표 3에서 보는 바와 같이, 감수성 균주인 K26 균주와 비교하여, 내성 균주인 K56 균주 및 K26M 균주에서 *KPHS_33600* 유전자의 결실 돌연변이 및 *KPHS_46730* 유전자의 삽입 돌연변이를 포함하는 총 15개의 유전자에 돌연변이가 있는 것을 확인하였다.
- [0182] 상기 결과를 통해, *KPHS_33600* 유전자 및 *KPHS_46730* 유전자에 해당하는 두개의 유전자는 내성 균주에서 돌연변이를 통해 손상된 것으로 확인되는 바, 상기 *KPHS_33600* 유전자 및 *KPHS_46730* 유전자의 돌연변이에 의해 메로페넴에 대한 내성이 발생될 수 있음을 알 수 있다.
- [0184] **[실시예 3] 최소 저해 농도 확인**
- [0185] 상기 제조예 3에서 형질전환된 균주(*KPHS_33600*)에 도입된 K56 균주(K56::ZpUC-19_*KPHS_33600*) 및 *KPHS_46730*에 도입된 K26M 균주(K26M::ZpUC-19_*KPHS_46730*)와, 대조군(K56 균주, K26M 균주, 유전자 없이 벡터만이 도입된 균주(K56::ZpUC-19 및 K26M::ZpUC-19)) 각각을 저염 LB 배지에서 3시간 동안 배양한 뒤, 4,000 X g에서 20분 동안 원심 분리하여 펠렛을 수득하였다. 상기 펠렛을 세척하고, PBS 완충액에 재현탁 하였다. 그런 다음, 상기 준비예 1에서와 동일한 방법으로 메로페넴에 대한 최소 저해 농도를 측정하여, 그 결과를 도 1의 A 및 B와, 도 2의 A 및 B에 나타내었다.
- [0186] 도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 메로페넴에 대한 최소 저해 농도가, K56 균주 및 K26M 균주의 경우에는 16 µg/ml로 확인되었고, K56 균주 및 K26M 균주에 벡터만이 도입된 경우(K56::ZpUC-19 및 K26M::ZpUC-19)에서는 32 µg/ml로 확인되었다(도 1의 A 및 도 2의 A). 반면, *KPHS_33600* 유전자 또는 *KPHS_46730* 유전자가 형질전환된 균주(K56::ZpUC-19_*KPHS_33600* 또는 K26M::ZpUC-19_*KPHS_46730*)에서는 메로페넴에 대한 최소 저해 농도가 8 µg/ml에 해당하는 것을 확인하였다(도 1의 B 및 도 2의 B).
- [0187] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 *KPHS_33600* 또는 *KPHS_46730* 유전자에 대한 결실은 항균제에 대한 내성이 발휘되도록 할 수 있고, 이와 같은 유전자를 형질전환함으로써 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 증가시키는 경우 항균제에 대한 내성을 극복할 수 있음을 알 수 있다.
- [0189] 이상으로 본 발명의 특징한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A Pharmaceutical composition for overcoming resistance to
antibacterial agent
- <130> PDPB187349d01
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 891
- <212> DNA
- <213> Klebsiella pneumoniae

<400> 1

atggataacg caatttttcc gaacaaattt aaggccgcgc tggcggcgca tcaggtgcag	60
attggctgct ggtgcgcttt ggctaaccgc attagcacgc aggtgctggg tctggcgggg	120
ttcgactggc tgggtgctgga cgcggaacac gcgccaacg acgtcaccac gtcattccg	180
cagctgatgg cctgaaaagg tagctccagc gcgcaggtag tccgtgtgcc gaccaatgaa	240
cccatcatca tcaagcgcac gctggacatc ggcttctata acttcctggt gccgtttgtc	300
gagacggctg aacaggcggc gcagggcgtg gcttcgaccc gttatccgc ggaaggatc	360
cgcggggctc cgttttccca ccgcggaat atgtttggca ccgtgccgga ctacttcgcc	420
cagtccaaca agaacatttc cattctgggtg cagattgaga gccagaccgg agtggacaac	480
gtcagaggcg ttgccgcgac cgagggcgtg gacggtgtgt ttgtcgccc gagcgacctg	540
gccgcgcct taggceattt gggcaatgcc gcccatcctg aggtgcagcg cgctatccag	600
catatcttcg ccagcgcgaa gaagcacggt aagccaagcg gcattctggc gccagtggaa	660
gccgatgcgc gccgctatct ggaatggggc gcgaccttcg tcgccgttgg cagcgatctg	720
ggcgtcttcc gtctgcaac ccagaaactt gccgacgctg ttaaaaataa tcaccaggat	780
gaagagagag aacattatga caatcaaagt aggttttata ggtcttggca ttatgggcaa	840
accgatgagc aaaaatttgc tgaaagcggg ttactcgtg gtggtgtctg a	891

<210> 2

<211> 296

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 2

Met Asp Asn Ala Ile Phe Pro Asn Lys Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala

1	5	10	15
His	Gln	Val	Gln
Ile	Gly	Cys	Trp
Cys	Ala	Leu	Ala
Asn	Pro	Ile	Ser
20	25	30	
Thr	Glu	Val	Leu
Gly	Leu	Ala	Gly
Phe	Asp	Trp	Leu
Val	Leu	Asp	Ala
35	40	45	
Glu	His	Ala	Pro
Asn	Asp	Val	Thr
Thr	Leu	Ile	Pro
Gln	Leu	Met	Ala
50	55	60	
Leu	Lys	Gly	Ser
Ser	Ser	Ala	Gln
Val	Val	Arg	Val
Pro	Thr	Asn	Glu
65	70	75	80

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

<210> 3
<211> 1422
<212> DNA
<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 3

atgctaaact catcattcaa aaaaccgttt catttaagac tcatattcac catggataaa	60
aattcttctg atggcgtgcc gttgccgcaa cgtataggcg ccattctgac catcgtgctt	120
gggctgacca tggccgtgct tgacggggct atcgccaacg tcgcgctgcc gactatcgcc	180
agcgatctca acgcctcacc ggcggttca atctggatcg ttaacgccta ccaaatcgcc	240
attgtcatcg cctgctgcc gctctccttc ctggcgaca tggtcggcta tcggcgatc	300
tataagatag gcctgggtgt gtttatcttt acctcgctgg cctgcgcgct gtcgctagc	360
ctcgaatgc taaccttcgc ccgctcgcg cagggtatgg gcggcgccgc gctgatgagc	420
gtcaacaccg cgtgatccg tctgatttat ccgcagcgct ttcttggtcg cggcatgggc	480
attaactcct ttgtcgttc cgtctcttcg gcggcaggcc cgactatcgc cgcagcgatc	540
ctctccctcg cctcatggca atggctgttt ttaattaacg tgcctctcgg catcgtcgcc	600
tttgttctgg ccatgcgctt tctgccgcc aacagcgcg gcagcaaat catccgttc	660
gatctgccga gcgccattat gaacgccctt accttcgggc tgctgatcac cgccctgagc	720
ggtttcgccc aggggcagtc cactcagctg gtgctggcgg aggtcgccgc tatgctggtg	780
gtggggttct tcttcgttcg ccgccagctc acgatgccg tccccctgct gccggtcgac	840
ctgctgcgta tccactctt ttctctctct atctgcactt ccatctgctc cttctgcgcg	900
cagatgctgg cgatggtctc tctgcccttt ttctgcagt cgatgatggg gcgcagcgaa	960
gtggagaccg gtctgctgct aacgccgtgg ccgttagcga ccatggtgat ggcccgctg	1020
gccggctatt tgatcgagaa atgtcatgcc gggctgctgg gggctatcgg ttgctgatt	1080
atggcctgcg gcctgttcgg cctggcgctg ctgccctcgt cgccctccga tctggatc	1140
atctggcgca tggcgtgtg cggcgccggc ttgggctgt ttcagtcgcc gaacaacat	1200
accatcgctc cctcggtcc gagccatcgt agcgcgcg ccagcgcat gctgggcacc	1260
gctcgctgc tcggacagag caccggcgcg gcgctggtgg cgctgctatt caatttgctc	1320
ggtaacaacg gcacccacac cgccctgctg ctggccggca ccctggctat cgtcgccgcg	1380
ctaattagcg gtctgcggt cactcagccg cgcgcagcct ga	1422

<210> 4

<211> 473

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 4

Met Leu Asn Ser Ser Phe Lys Lys Pro Phe His Leu Arg Leu Ile Phe

1 5 10 15
 Thr Met Asp Lys Asn Ser Ser Asp Gly Val Pro Leu Pro Gln Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Ala Ile Leu Thr Ile Val Leu Gly Leu Thr Met Ala Val Leu Asp
 35 40 45
 Gly Ala Ile Ala Asn Val Ala Leu Pro Thr Ile Ala Ser Asp Leu Asn
 50 55 60
 Ala Ser Pro Ala Ala Ser Ile Trp Ile Val Asn Ala Tyr Gln Ile Ala
 65 70 75 80

 Ile Val Ile Ala Leu Leu Pro Leu Ser Phe Leu Gly Asp Met Val Gly
 85 90 95
 Tyr Arg Arg Ile Tyr Lys Ile Gly Leu Val Val Phe Ile Phe Thr Ser
 100 105 110
 Leu Ala Cys Ala Leu Ser Arg Ser Leu Glu Met Leu Thr Phe Ala Arg
 115 120 125
 Val Ala Gln Gly Leu Gly Gly Ala Ala Leu Met Ser Val Asn Thr Ala
 130 135 140
 Leu Ile Arg Leu Ile Tyr Pro Gln Arg Phe Leu Gly Arg Gly Met Gly

 145 150 155 160
 Ile Asn Ser Phe Val Val Ala Val Ser Ser Ala Ala Gly Pro Thr Ile
 165 170 175
 Ala Ala Ala Ile Leu Ser Leu Ala Ser Trp Gln Trp Leu Phe Leu Ile
 180 185 190
 Asn Val Pro Leu Gly Ile Val Ala Phe Val Leu Ala Met Arg Phe Leu
 195 200 205
 Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Lys Ile Ile Arg Phe Asp Leu Pro Ser
 210 215 220

 Ala Ile Met Asn Ala Leu Thr Phe Gly Leu Leu Ile Thr Ala Leu Ser
 225 230 235 240
 Gly Phe Ala Gln Gly Gln Ser Thr Gln Leu Val Leu Ala Glu Val Ala
 245 250 255
 Ala Met Leu Val Val Gly Phe Phe Phe Val Arg Arg Gln Leu Thr Met

260 265 270
Pro Val Pro Leu Leu Pro Val Asp Leu Leu Arg Ile Pro Leu Phe Ser
275 280 285
Leu Ser Ile Cys Thr Ser Ile Cys Ser Phe Cys Ala Gln Met Leu Ala

290 295 300
Met Val Ser Leu Pro Phe Phe Leu Gln Ser Met Met Gly Arg Ser Glu
305 310 315 320
Val Glu Thr Gly Leu Leu Leu Thr Pro Trp Pro Leu Ala Thr Met Val
325 330 335
Met Ala Pro Leu Ala Gly Tyr Leu Ile Glu Lys Cys His Ala Gly Leu
340 345 350
Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Ile Met Ala Cys Gly Leu Phe Gly Leu
355 360 365

Ala Leu Leu Pro Ser Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ile Ile Trp Arg Met
370 375 380
Ala Leu Cys Gly Ala Gly Phe Gly Leu Phe Gln Ser Pro Asn Asn His
385 390 395 400
Thr Ile Val Ala Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Gly Gly Ala Ser Gly
405 410 415
Met Leu Gly Thr Ala Arg Leu Leu Gly Gln Ser Thr Gly Ala Ala Leu
420 425 430
Val Ala Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gly Asn Asn Gly Thr His Thr Ala

435 440 445
Leu Leu Leu Ala Gly Thr Leu Ala Ile Val Ala Ala Leu Ile Ser Gly
450 455 460

Leu Arg Val Thr Gln Pro Arg Ala Ala

465 470

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KPHS33600 forward primer

<400>	5	
taagcagaat tcacctcgtc gtaactgtt		29
<210>	6	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KPHS33600 reverse primer	
<400>	6	
tgcttaggat ccttctgacg ctgaaaacg		29
<210>	7	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KPHS46730 forward primer	
<400>	7	
taagcactgc agctgggtcat tacgctgatg		30
<210>	8	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	KPHS46730 reverse primer	
<400>	8	
tgcttagaat tctgcactg ttcggcaatc		30