(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월14일
(11) 등록번호 10-2350552
(24) 등록일자 2022년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/02 (2006.01) *A23K 20/195* (2016.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0208 (2013.01)
A23K 20/195 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2021-0018297
(22) 출원일자 2021년02월09일
심사청구일자 2021년02월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020200120791 A*
Journal of Fish Disease, 제40권, 507-516면(2017)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
강릉원주대학교산학협력단
강원도 강릉시 죽헌길 7(지변동)
(72) 발명자
홍수희
강원도 강릉시 화부산로111번길 24, 203동 903호(교동, 강릉 교동 롯데캐슬 2단지)
임종원
강원도 강릉시 지변길 34-2길 송림관 301호(지변동)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 이수정

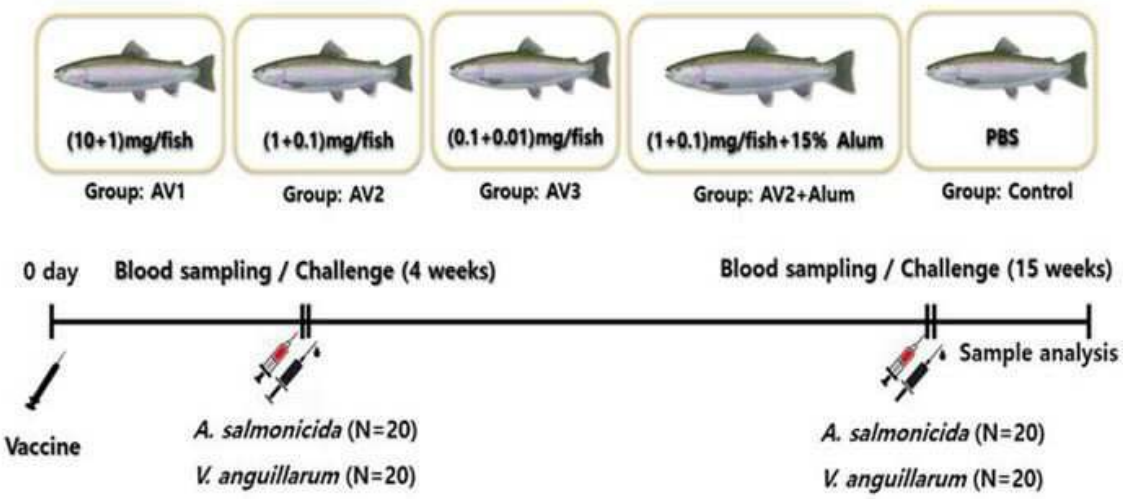
(54) 발명의 명칭 **절창병 및 비브리오병 예방을 위한 최적의 혼합 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 에어로모나스 살모니시다 RTDH(*Aeromonas salmonicida* RTDH) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질; 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 혼합 백신 조성물은 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염의 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 39/107 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61K 2039/521 (2013.01)
A61K 2039/522 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20170329
과제번호	200807721370301A
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산기술지역특성화사업
연구과제명	강원씨그랜트사업
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강릉원주대학교산학협력단
연구기간	2017.04.15 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH{*Aeromonas salmonicida* RTDH} 균주 또는 이로부터 유래한 단백질; 및 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR{*Vibrio anguillarum* RTBHR} 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 연어과 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 백신 조성물은 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체; 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체를 포함하는 백신 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

에어로모나스 살모니시다 RTDH 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체는 각각 1:0.00001 내지 10 비율로 혼합되는 것인, 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 연어과 어류는, 연어(*Oncorhynchus keta*), 왕연어(*O. tshawytscha*), 홍연어(*O. nerka*), 곱사연어(*O. gorbuscha*), 산천어(*O. masou*), 무지개송어(*O. mykiss*), 은연어(*O. kisutch*), 대서양연어(*Salmo salar*) 및 열목어(*Brachymystax lenok*)인 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

약학적으로 허용되는 어쥬번트 및 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 어쥬번트는 알루미늄 하이드록사이드 겔(aluminum hydroxide gel), 미네랄 오일 에멀젼(mineral oil emulsion), 사포닌(saponin), 폴리아이노이식:폴리시티딜산(Polyinosinic-polycytidylic acid), CpG 올리고데옥시 뉴클레오티드(CpG ODN), C-유형 렉틴 리간드(C-type lectin ligands), 비이온성 계면활성제, 스쿠알렌 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 백신 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 어쥬번트의 함량은 백신 조성물 중량에 대하여 10 내지 20(w/v)%인 것인, 백신 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 어류 1마리당 주입되는 항원의 함량은

상기 항원이 수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH{*Aeromonas salmonicida* RTDH} 균주 또는

이로부터 유래한 단백질일 때 0.01 내지 100mg/fish의 농도, 및

상기 항원이 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질일 때 0.0001 내지 10mg/fish의 농도인, 백신 조성물.

청구항 9

제1항에 따른 백신 조성물을 연어과 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 어류에 투여하는 것을 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 투여는 복강내 투여, 근육내 투여, 경구 투여, 피하 투여, 국소 투여 또는 침지 투여인 예방 또는 치료 방법.

청구항 11

제1항에 따른 백신 조성물을 포함하는 연어과 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 어류의 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방을 위한 사료 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 사료 조성물에 포함되는 에어로보나스 살모니시다 RTDH 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 함량은 사료 조성물 중량에 대하여 0.001 내지 10%(w/w)인 것인 사료 조성물.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 어류의 에어로모나스 살모니시다(Aeromonas salmonicida) 및 비브리오 앙귈라럼(Vibrio anguillarum) 감염의 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물 및 이를 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 연어과 어류인 무지개송어는 국내 내수면 양식 어업에서 뱀장어, 메기 다음으로 주요 품종이다. 최근 전국 각지에서 행해지는 송어, 산천어 축제 및 연어과 어류에 대한 선호도 증가로 인해 수요가 급증하고 있다. 무지개송어를 비롯한 연어과 어류는 냉수성 어종으로 여름철 고수온기에 에로모나스속의 세균감염에 의한 감염성 질병으로 양식 산업에서 매우 큰 경제적 손실이 발생하고 있다.

[0003] 또한, 해수 중에 널리 분포되어 있는 비브리오속 세균에 의한 질병인 비브리오 감염병은 가장 오래 전부터 알려진 질병 중 하나로, 무지개송어가 해수에서 순치하는 과정에서 염분의 변화 또는 이동 중의 스트레스 등의 원인으로 어류의 폐사를 야기한다.

[0004] 이러한 해수 양식 단계에서 발생하는 비브리오 감염을 치료하기 위해 종래에는 항생제를 사료와 함께 양식탱크에 투입하여 어류에 경구 투여되도록 함으로써 치료하였으나, 이러한 방법은 조기 치료 시에는 효과가 높지만 병원균이 장관 내에 정착하여 증식하고 반복적으로 발생하여 치료가 잘 되지 않으며, 다양한 항생제의 사용은 대량의 다제내성 병원체를 양산할 가능성이 높은 단점이 있다.

[0005] 그런데, 국내 어류가 주로 서식하는 담수 및 해수 양식장에서 발생되는 주요 질병의 원인균인 에어로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*) 및 비브리오 앙귈라럼(*Vibrio anguillarum*) 감염을 동시에 예방할 수 있는 혼합 백신은 없는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 항생제 사용과 세균성 어류질병의 치료, 전세규 외, 한국어병학회, 1992.05., 37-48.

(비특허문헌 0002) Lee NS. 2013. The current situation and suggestions of the mariculture of rainbow trout in Korea. Ocean Fish 3, 86-112.

(비특허문헌 0003) Kang SI, Kim KH, Lee JK, Kim YJ, Park SJ, Kim MW, Choi BD, Kim DS and Kim JS. 2014. Comparison of the food quality of freshwater rainbow trout Oncorhynchus mykiss cultured in different regions. Korean J Fish Aquat Sci 47, 103-113.

(비특허문헌 0004) Bergh P. V., Burr S. E., Benedicenti O., von Siebenthal B., Frey J., Wahli T.: Antigens of the type-three secretion system of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida prevent protective immunity in rainbow trout. Vaccine. 31(45):5256-61, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명은 수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH(*Aeromonas salmonicida* RTDH) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 어류의 비브리오 앙귈라럼 감염의 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 백신 조성물을 어류에 투여하는 것을 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 백신 조성물을 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방을 위한 사료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 이에, 본 발명자들은 어류에서 에어로모나스 살모니시다에 감염성을 가지는 균주 및 비브리오 앙귈라럼에 감염성을 가지는 균주를 분리하였고, 에어로모나스 살모니시다 균주 및 비브리오 앙귈라럼 균주 중 고병원성을 나타내는 균주 찾고자 노력한 결과, 신규한 에어로모나스 속 균주인 에어로모나스 살모니시다 RTDH 및 신규한 비브리오 속 균주인 비브리오 앙귈라럼 RTBHR를 분리, 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 본 발명의 실시예를 통해 분리된 절창병에 대해 고병원성을 나타내는 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열 분석 결과, 서열번호: 1의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 분석 결과, 상기 균주를 보다 정확히 동정하기 위하여 하우스키핑유전자인 RNA polymerase sigma factor (rpoD) 프라이머를 이용하여 rpoD 염기서열 분석 결과, 서열번호: 2의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다.

[0013] 따라서, 서열번호: 1의 16S rDNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 에어로모나스 살모니시다 RTDH(Aeromonas salmonicida RTDH)로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2019년 03월 13일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC13827BP).

[0014] 또한, 본 발명의 실시예를 통해 분리된 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해 고병원성을 나타내는 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열 분석 결과, 서열번호: 3의 16S rDNA 염기서열을 갖는 것으로 나타났다.

[0015] 따라서, 서열번호: 3의 16S rDNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR)로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2019년 08월 22일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC13926BP).

[0016] 하기 실시예에서는, 본 발명에 따라 제조된 혼합 백신 조성물의 최적의 혼합 농도를 찾기 위하여 1차 및 2차 실험으로 나누어 최적화 실험을 진행하였다. 1차 실험에서는 실험군 1((*A. salmonicida* RTDH 10 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.001mg)/fish), 실험군 2((*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.001mg)/fish), 실험군 3((*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.001mg)/fish + 15% Aluminum gel) 및 대조군(1xPBS)으로 실험군을 설정하여, 4주, 8주 및 16주에 걸쳐 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율 및 상대 생존율과 ELISA 실험을 통해 항체가 형성 정도를 확인하였다. 그 결과, 실험군 3에서 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해서 가장 효과적임을 알 수 있었으며, 본 발명에 따른 혼합 백신 조성물의 보호 효과가 최소 16주까지 지속되고, 상대 생존율(relative percent survival, RPS)이 약 60% 이상임을 확인하였다.

[0017] 또한, 2차 실험에서는 실험군 1((*A. salmonicida* RTDH 10 mg+ *V. anguillarum* BHR 1mg)/fish), 실험군 2((*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.1mg)/fish), 실험군 3((*A. salmonicida* RTDH 0.1 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.01mg)/fish), 실험군 4((*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* BHR 0.1mg)/fish + 15% Aluminum gel) 및 대조군(1×PBS)으로 실험군을 설정하여, 4주 및 15주에 걸쳐 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율 및 상대 생존율과 ELISA 실험을 통해 항체가 형성 정도를 확인하였다. 그 결과, 실험군 4에서 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해 가장 효과적임을 알 수 있었고, 1차 실험과 다르게 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 농도를 높였을 때 비브리오 앙귈라럼에 대한 매우 높은 보호효과를 보임을 확인하였다.

[0018] 그러므로 본 발명은 수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH(*Aeromonas salmonicida* RTDH) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질; 및 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료를 위한 백신 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 용어 “백신 조성물” 또는 "백신"은 생체에 면역을 주는 항원성 물질을 함유한 생물학적인 제제(製劑)로서, 감염증의 예방을 위하여 생물체에 주입 또는 주사하여 생체에 면역이 생기게 하는 면역원(免疫原)을 말한다. 생체내 면역은 병원균의 감염 후에 생체내 면역력이 자동으로 얻어지는 자동면역과 외부에서 주입한 백신에 의하여 얻어지는 수동 면역으로 크게 나누어진다. 자동면역이 면역에 관계하는 항체의 생성 기간이 길고 지속적인 면역력의 특징이 있는 반면, 백신에 의한 수동 면역은 감염증 치료에 즉시 작용하나 지속력이 떨어지는 단점이 있다.

[0020] 본 발명의 백신 조성물에 있어서, 상기 항원으로 사용될 수 있는 것은, 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주 그 자체 또는 이로부터 유래한 단백질 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주 그 자체 또는 이로부터 유래된 단백질일 수 있다. 여기에서 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주는 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체로서 사용될 수 있고, 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주는 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체로써 사용될 수 있다. 또한, 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주 유래의 단백질 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주 유래의 단백질이 사용될 수 있는데, 상기 각각의 단백질은 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주 또는 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주로부터의 통상적인 단백질 정제 또는 유전 공학적 재조합을 통해 항원을 만들어 사용할 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 본 발명의 혼합 백신 조성물은 에어로모나스 살모니시다 항원과 비브리오 앙귈라럼 항원 그리고 어쥬번트를 첨가했을 때 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대한 가장 높은 방어를 기대할 수 있음을 확인하였다.

[0022] 따라서, 본 발명의 혼합 백신 조성물은 에어로모나스 살모니시다 RTDH 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 불활화 균체, 약독화된 균체 또는 사균체는 각각 1:0.00001 내지 10 비율, 바람직하게는 1:0.0001 내지 0.1 비율로 혼합된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 복합 백신 조성물은 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대한 백신으로 생물학적 제제로써 사용되어 어류의 양식 산업 등에 적용시킬 수 있다.

[0024] 상기 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염은 연어과 어류에 대한 질병을 유발하며, 상기 연어과 어류는, 연어(*Oncorhynchus keta*), 왕연어(*O. tshawytscha*), 홍연어(*O. nerka*), 곱사연어(*O. gorbuscha*), 산천어(*O. masou*), 무지개송어(*O. mykiss*), 은연어(*O. kisutch*), 대서양연어(*Salmo salar*) 및 열목어(*Brachymystax lenok*)일 수 있으며, 바람직하게는 무지개송어일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 본 발명은 약학적으로 허용되는 어쥬번트(adjuvant) 및 담체를 추가로 포함하는 것인 백신 조성물을 제공

한다.

[0026] 상기 어쥬번트(adjuvant)는, 알루미늄 하이드록사이드 겔(aluminum hydroxide gel), 미네랄 오일 에멀젼(mineral oil emulsion), 사포닌(saponin), 폴리아이노이식:폴리시티딜산(Polyinosinic-polycytidylic acid), CpG 올리고데옥시 뉴클레오티드(CpG ODN), C-유형 렉틴 리간드(C-type lectin ligands), 비이온성 계면활성제, 스쿠알렌 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 어쥬번트의 함량은 백신 조성물 중량에 대하여 10 내지 20(w/v)%으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 12 내지 18(w/v)%으로 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 백신 조성물에 포함되는 항원의 함량은 적용 대상 어류 및 병원체에 따라 적절히 조절하여 설정할 수 있다.

[0029] 예를 들면, 상기 어류 1마리당 주입되는 항원의 함량은 상기 항원이 수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH(*Aeromonas salmonicida* RTDH) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질일 때 0.01 내지 100mg/fish의 농도, 및 상기 항원이 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질일 때 0.0001 내지 10mg/fish의 농도일 수 있고, 바람직하게는 상기 항원이 수탁번호 KCTC13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH(*Aeromonas salmonicida* RTDH)균주 또는 이로부터 유래한 단백질일 때 0.1 내지 10mg/fish의 농도, 및 상기 항원이 수탁번호 KCTC13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR(*Vibrio anguillarum* RTBHR) 균주 또는 이로부터 유래한 단백질일 때 0.001 내지 1mg/fish의 농도일 수 있다.

[0030] 본 발명의 백신 조성물은 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착지연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0032] 따라서, 본 발명은 상기 백신 조성물을 어류에 투여함으로써 어류의 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 투여는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 복강내 투여, 근육내 투여, 경구 투여, 피하 투여, 국소 투여 또는 침지 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명은 다른 측면에서 상기 백신 조성물을 포함하는 어류의 에어로모나스 살모니시다 및 비브리오 앙귈라럼 감염의 예방을 위한 사료 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 백신 조성물은 어분, 육분, 대두박, 면실박, 지렁이, 개구리, 새우 및 이들의 혼합물을 포함하는 사료 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 사료 조성물의 형태는 건사료와 같은 고형사료, 습사료, 또는 생사료 등 일반적인 사료 형태일 수 있다.

[0037] 본 발명의 사료 조성물에 포함되는 비브리오 앙귈라럼 RTBHR의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 0.001 내

지 10%(w/w)일 수 있다.

[0039] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주 또는 이로부터 유래한 단백질; 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주 또는 이로부터 유래한 단백질을 항원으로 포함하는 어류의 비브리오 앙귈라럼 감염 예방 또는 치료용 백신 조성물은 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해 어류의 면역을 증진시키는 효과를 나타냄으로써 감염을 효과적으로 예방할 수 있어, 어류의 양식 산업 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명에서 수행된 ELISA 실험의 개요를 보여준다.

도 2는 본 발명에서 수행된 웨스턴 블롯(Western blot) 실험 개요를 보여준다.

도 3은 본 발명의 혼합 백신 최적화 1차 실험 모델을 보여준다.

도 4는 본 발명의 혼합 백신 최적화 2차 실험 모델을 보여준다.

도 5는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 에어로모나스 살모니시다 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 6는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 7은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 8주 후 에어로모나스 살모니시다 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 8은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 8주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 9은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 16주 후 에어로모나스 살모니시다 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 10는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 16주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 11은 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 에어로모나스 살모니시다 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 12은 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 13은 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 15주 후 에어로모나스 살모니시다 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 14는 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 15주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 누적 폐사율과 상대 생존율을 보여준다.

도 15는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 에어로모나스 살모니시다에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 16은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 비브리오 앙귈라럼에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 17는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 8주 후 에어로모나스 살모니시다에 대한 항체가 형성

정도를 보여준다.

도 18은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 혼합 백신 처리 8주 후 비브리오 앙귈라럼에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 19은 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 16주 후 에어로모나스 살모니시다에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 20는 혼합 백신 최적화 1차 실험에서 16주 후 비브리오 앙귈라럼에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 21는 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 에어로모나스 살모니시다에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 22은 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 4주 후 비브리오 앙귈라럼에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 23은 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 15주 후 에어로모나스 살모니시다에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 24는 혼합 백신 최적화 2차 실험에서 혼합 백신 처리 15주 후 비브리오 앙귈라럼에 대한 항체가 형성 정도를 보여준다.

도 25는 본 발명의 혼합 백신이 처리된 무지개송어 혈청으로부터 특이 항체와 반응하는 균체의 주요 항원 단백질을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] [실시예]

[0047] **실시예 1: 에어로모나스 살모니시다 RTDH (*Aeromonas salmonicida* RTDH) 균주 분리 및 동정**

[0048] 2017년 1월에서 2018년 2월 사이에 22개 연어과어류 양식장으로부터 세균성 질병을 모니터링한 결과, 에로모나스속 균주가 가장 많이 분포되어 있는 것으로 나타났다. 이 중 가장 많이 분리된 에어로모나스 살모니시다와 에로모나스 소브리아 균에 대한 인위감염을 실시한, 결과 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주에서 가장 높은 병원성이 나타났고. 하기와 같이 분석하였다.

[0049] 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주는 2017년 8월 강원도 내 위치한 양식장에서 대량 폐사가 진행중이던 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리되었으며, 당시 절창병의 전형적인 특징인 근육 출혈을 나타내는 어체를 샘플링한 후, 병어의 외부 및 내부 증상을 관찰하고 전신, 비장, 간 및 아가미로부터 TSA배지를 이용하여 25℃에서 24시간 배양 후 세균을 분리 배양하였다. 분리균주는 그람 음성 간균으로 확인됐고, 티로신이 첨가된 배지에서 갈색색소를 보이며, 동그랗고 딱딱한 콜로니를 형성하였다.

[0050] 상기 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주를 동정하기 위하여 배양된 균주의 콜로니를 주형으로 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 94℃에서 10 분간 변성시킨 후, 94℃에서 30 초 변성, 55℃에서 30 초간 결합, 72℃에서 1 분간 신장을 35 회 반복하였다. 그 후, 72℃에서 7 분간 최종 신장 단계를 거쳤다. 상기 증폭된 PCR산물은 염기서열 분석을 하고, NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에 blast search (Megablast)을 통해 에로모나스속 임을 확인하였다.

[0051] 결과로, 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 16S rDNA 염기서열 정보를 얻었으나, 이 단계에서 정확한 종 동정을 할 수 없었다.

[0052] <서열번호: 1> 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 16S rDNA(1086bp)

[0053] GGGCCGACGGCGCGGGAAGTTAGCTTTGCTTCCTTTCTGCCGGCGAAGCGGCGGACGGGTTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCCAGTCCGAGGGGGATAACA
GTTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGG
CGCCTAATACGTGTCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT

TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTA
GAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAAATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGAAATCAGAACACGAGTGCTGCGTGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATATTGGGGTAAGGTCCCGCAAAGGGGGGAAACCCCGTGCCTTTGTTGCCAGCAGT

[0055] 상기 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주를 보다 정확히 동정하기 위해 하우스키핑 유전자인 RNA polymerase sigma factor (rpoD) 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이하 과정은 상기 사용된 방법으로 동일하게 진행하여 에어로모나스 살모니시다 임을 확인하였고 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 rpoD 염기서열 정보를 얻었다.

[0056] <서열번호: 2> 에어로모나스 살모니시다 RTDH의 rpoD (593bp)

[0057] AAACTAAAACGTATCACCAGGTACAAGCTCCGTTGCCGAGTACCCAGAAGCGATTACCTATCTGCTTGAGCAGTATGATAAATACGAAGCCGAACAGCTGGG
TCTGTCCGATATCATCTCAGGTTTTATCGATCCCAACGAGGCCGATGATGTAGCACCGACTGCTACCCATATCGGTTCCGAACTCGGCGAAGACGATCTGGC
CGACGAAGACGAAGATGAAGACGACGATGGTGACAGCTCGGATGACGAAGGTGACGGTGGTCCTGATCCGGAAGTTGCTCGCGAGAAGTTTGGTGATCTGCG
TGCCCAGTATGAGGTAACTCGCCTCTCCATTCAGAAGAATGGCCGTGCTCACGAAGATACCCAGGCTGCGATTGCCCAGCTGGCCGATGTGTTCCGTCAATT
CCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCTTGGTCAACAACATGCGCGAAATGATGGAGCGCGTCCGCGTGCAAGAACGCATCATCATGAAGCTCTGCGTTGA
GCAGGCCCAAAAAAAAAAAGGAGGAGGCGGGTGGGGGGGGAGGGGGAGAGAGAGGGGGGGCAGGAGCCGAGGGGGGGGCGTCG

[0059] rpoD 프라이머 세트의 염기서열은 아래와 같다.

[0060] <서열번호: 4> rpoD-F2: 5`-GAAGGCGAAATCGACATCGC-3`

[0061] <서열번호: 5> rpoD-R1: 5`-CTCTGCGTTGAGCAGGCCAA-3`

[0063] **실시예 2: 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주 분리 및 동정**

[0064] 연어과 어류 양식장으로부터 세균성 질병을 모니터링한 결과, 비브리오 속 균주가 많이 분포되어 있는 것을 확인하고, 이 중 무지개송어 및 산천어로부터 분리된 비브리오 앙귈라럼 4균주에 대한 인위감염을 실시한 결과 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주에서 가장 높은 병원성이 나타났고, 하기와 같이 분석하였다.

[0065] 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주는 강원도 내 위치한 양식장에서 대량 폐사가 진행 중이던 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 분리되었으며, 당시 비브리오 앙귈라럼 감염의 전형적인 특징인 근육 출혈을 나타내는 어체를 샘플링한 후, 병어의 외부 및 내부 증상을 관찰하고 전신, 비장, 간 및 아가미로부터 TSA(Tryptic soy agar; 236950, BD, USA) 배지를 이용하여 25℃에서 24시간 내지 48시간 배양 후 세균을 분리 배양하였으며, 해수에서 분리된 균주는 1%의 Sodium chloride (Usb, USA)가 첨가된 TSA 배지에 배양하였다.

[0066] 상기 분리된 균주를 동정하기 위하여 배양된 단일 콜로니(single colony) 또는 TSB 배양액을 주형(Template)으로 이용하여 PCR을 실시하였다.

[0067] 반응 조건은 94℃에서 10분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초 변성, 55℃에서 30초 결합, 72℃에서 1분간 신장을 35 회 반복하였다. 그 후, 72℃에서 7분간 최종 신장 단계를 거쳤다.

[0068] 이후 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동 후 특이적인 밴드가 확인된 시료를 회수 및 정제하기 위해 Expin™ combo kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 Gel purification 을 진행하였다.

[0069] 겔 정제(gel purification) 산물은 마크로젠에서 염기서열 분석을 하고, NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)에 blast search (Megablast)을 통해 판정한 결과, 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주는 서열번호: 3의 16S rDNA 염기서열을 갖는 것으로 확인되었다.

[0070] <서열번호: 3> 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주의 16S rDNA (1300bp)

[0071] GGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGG
GCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
ACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTTGTTAATAGCAGCATCATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTGGATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTC
AACCTCGGAACCGCATTTGAAACTGGTTCACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGG

TGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCT
ACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCC
TTCGGGAGCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCA
GCGAGTCATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGC

[0073] **실시예 3: 백신 제작**

[0074] 수탁번호 KCTC 13827BP의 에어로모나스 살모니시다 RTDH 균주를 TSB 배지에 접종 후 20℃, 48시간, 180rpm으로 진탕 배양하였으며 수탁번호 KCTC 13926BP의 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 균주는 1% NaCl이 첨가된 TSB배지에 접종 후 20℃, 48시간 180rpm으로 진탕배양하였다.

[0075] 이후, 배양액에 포르말린(v/v) 2%을 넣고 3시간 동안 위와 동일한 조건으로 불활화 후 TSA배지에서 불활화를 확인하였다.

[0076] 배양물은 7,000g × 25min 원심 분리하여 Pellet을 제외하고 상층액을 완전히 제거하였으며, 배양물의 불순물을 제거하기 위해 멸균 1×PBS로 3회 세척 반복하였다.

[0077] 최종 배양물은 0.01% sodium azide와 1×PBS를 첨가하고 100mg/ml로 재현탁 후 4℃ 보관하였다.

[0079] **실시예 4: 혼합 백신 최적화**

[0080] - 백신 준비

[0081] [표 1] 혼합 백신 농도 (1/2)

[0082]

실험군(Group)	백신 (Vaccine)	처리 농도	개체 수(Fish No.)
실험군 1 (AV1)	항원 단독	(*A. salmonicida* RTDH 10 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.001mg)/fish	60 x 2
실험군 2 (AV2)	항원 단독	(*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.001mg)/fish	60 x 2
실험군 3 (AV2+Alum)	항원 단독 + 어쥬번트	(*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.001mg)/fish + 15% Aluminum gel	60 x 2
대조군(Control)	-	1×PBS	60 x 2

[0084] [표 2] 혼합 백신 농도 (2/2)

실험군(Group)	백신 (Vaccine)	처리 농도	개체 수(Fish No.)
실험군 1 (AV1)	항원 단독	(*A. salmonicida* RTDH 10 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 1mg)/fish	40
실험군 2 (AV2)	항원 단독	(*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.1mg)/fish	40
실험군 3 (AV3)	항원 단독	(*A. salmonicida* RTDH 0.1 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.01mg)/fish	40
실험군 4 (AV2+Alum)	항원 단독+ 어쥬번트	(*A. salmonicida* RTDH 1 mg+ *V. anguillarum* RTBHR 0.1mg)/fish + 15% Aluminum gel	40
대조군(Control)	-	1×PBS	40

[0085]

[0087] 상기 표 1, 2과 이 에어로모나스 살모니시다 RTDH 항원 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 항원을 적정 농도로 혼합하여 제조하였다.

[0089] - 혼합 백신 투여

[0090] 상기 표 1에서 사용된 10.09±0.29g의 규격인 무지개송어와 상기 표 2에서 사용된 12.15±0.18g 규격인 무지개송어 (12±1℃)에 준비된 백신을 주사하기 위해, 2-페녹시에탄올(2-phenoxyethanol)을 0.1% 농도로 사육수중에 혼합하여 마취상태를 유도한 뒤 상기 표 1과 같이 혼합 제조된 혼합 백신을 복강 내 100 ㎕ 주사하였다.

[0092] - 혼합 백신의 효능 검증

[0093] 상기 표 1에서 사용된 혼합백신을 투여한 후 4, 8, 16주와 상기 표 2에서 사용된 혼합백신을 투여한 후에 4 및 15주 후에 인위 감염을 통해 폐사율을 측정하였고, 상기 표 1에서 사용된 혼합백신을 투여한 반복 실험군들의 결과는 평균값으로 계산되었다.

[0094] ELISA 실험을 통해 실험군 혈청 내 특이 항체가 형성되는지 확인하였다. 상기 표 2에서 사용된 혼합백신을 사용한 실험에서는 웨스턴 블롯(Western blot)을 이용하여 주요 병원성 단백질 및 특이 항체가 생성되는지 확인하였다.

[0096] - 혼합 백신의 효능 검증 결과

[0097] 1) 인위 감염 결과 (1/2)

[0098] i) 단기(4주) 효능 검증 결과

[0099] 혼합 백신을 주사하고 4주 후 에어로모나스 살모니시다로 인위감염 시에 실험군 3(실험군 2+Alum)에서 18%의 누적 폐사율(상대생존율: 81.5%)로 백신의 효과가 가장 좋았고, 실험군 1 및 실험군 2는 각각 42% 및 64%의 누적 폐사율을 보였으나, 혼합 백신을 처리하지 않은 대조군은 97.5%의 높은 폐사율을 보였다(도 5).

[0100] 한편, 혼합 백신을 주사하고 4주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 실험군 1 및 실험군 2에서 22%의 누적 폐사율(상대생존율: 78%)로 백신의 효과가 가장 좋았으나, 혼합 백신을 처리하지 않은 대조군은 100%의 높은 폐사율을 보였다(도 6).

[0102] ii) 중기(8주) 효능 검증 결과

[0103] 혼합 백신을 주사하고 8주 후에 에어로모나스 살모니시다 인위감염 시에 실험군 3(실험군 2+Alum)에서 20%의 누적 폐사율(상대생존율: 70%)로 백신의 효과가 가장 좋았고, 실험군 1 및 실험군 2는 각각 40% 및 43.3%의 누적 폐사율을 보였으며, 백신 처리되지 않은 대조군은 66.7%의 높은 폐사율을 보였다(도 7).

[0104] 한편, 혼합 백신을 주사하고 8주 후 비브리오 앙귈라럼으로 인위감염 시에 실험군 1에서 20%의 누적 폐사율(상

대생존율: 76%)로 백신의 효과가 가장 좋았고, 실험군 3(실험군 2+Alum)에서도 26.7%의 누적 폐사율(상대생존율: 68%)로 높은 보호효과를 나타냈으며, 백신이 처리되지 않은 실험군에서는 83.3%의 높은 폐사율을 보였다(도 8).

[0106] iii) 장기(16주) 효능 검증 결과

[0107] 혼합 백신을 주사하고 16주 후 에어로모나스 살모니시다 인위감염 시에 실험군 1 및 3에서 30%의 누적 폐사율(상대생존율: 60%)로 백신의 효과가 가장 좋았고, 실험군 2는 35%의 누적 폐사율을 보였으며, 백신 처리가 되지 않은 대조군은 75%의 높은 폐사율을 보였다(도 9).

[0108] 또한, 혼합 백신을 주사하고 16주 후 비브리오 앙귈라럼으로 인위감염 시에 실험군 2 및 실험군 3에서 17.5%의 누적 폐사율(상대생존율: 65%)로 백신의 효과가 가장 좋았고, 백신 처리되지 않은 대조군은 50%의 높은 폐사율을 보였다(도 10).

[0110] 2) 인위 감염 결과 (2/2)

[0111] i) 단기(4주) 효능 검증 결과

[0112] 혼합 백신을 주사하고 4주 후 에어로모나스 살모니시다 인위감염 시에도 실험군 4(AV2+Alum)에서 누적 폐사율이 20%(상대생존율: 77.5%)로 가장 낮았고, 그 다음 실험군 1 순서였으나, 백신 처리되지 않은 대조군을 포함한 실험군 2 및 실험군 3에서는 백신에 대한 보호효과가 나타나지 않았다(도 11).

[0113] 또한, 혼합 백신을 주사하고 4주 후 비브리오 앙귈라럼 감염 시의 모든 실험군은 폐사가 거의 발생하지 않았으나, 백신 처리되지 않은 대조군은 95%의 높은 폐사율을 보였다(도 12).

[0115] ii) 장기(15주) 효능 검증 결과

[0116] 혼합 백신을 주사하고 15주 후 에어로모나스 살모니시다 인위감염 시에도 실험군 4에서 누적 폐사율이 20%(상대생존율:79%)로 가장 낮았고, 그 다음이 실험군 1 순서였다. 뿐만 아니라, 대조군의 누적 폐사율 95%에 비해 실험군 2 및 실험군 3에서도 누적 폐사율이 각각 52% 및 36%로 낮았다(도 13).

[0117] 또한, 혼합 백신을 주사하고 15주 후 비브리오 앙귈라럼으로 인위감염 시에도 거의 폐사가 발생하지 않았으나 백신 처리되지 않은 대조군에서는 39%의 누적 폐사율이 나타났다(도 14).

[0118] 종합하면, 에어로모나스 살모니시다 RTDH 및 비브리오 앙귈라럼 RTBHR 혼합 백신은 브비리오 앙귈라럼에 대해 효과가 매우 좋았으며, 에어로모나스 살모니시다에 대해서는 어쥬번트 Alum이 포함된 실험군에서 효과가 매우 좋았다.

[0120] 3) ELISA 결과 (1/2)

[0121] i) 단기(4주) 효능 검증 결과

[0122] 혼합 백신 주사 4주 후에 분리된 무지개송어의 혈청에서는 에어로모나스 살모니시다 항원에 대하여 0.662 내지 1.1 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 매우 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 15).

[0123] 또한, 혼합 백신 주사 4주 후에 분리된 무지개송어의 혈청에서는 비브리오 앙귈라럼 항원에 대하여 0.222 내지 0.555 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 매우 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 16).

[0125] ii) 중기(8주) 효능 검증 결과

[0126] 혼합 백신 처리 8주 후에 분리된 모든 실험군의 혈청에서는 에어로모나스 살모니시다 항원에 대하여 0.404 내지 0.493의 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 매우 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 17).

[0127] 또한, 혼합 백신 처리 8주 후에 분리된 무지개송어에서의 혈청에서는 비브리오 앙귈라럼 항원에 대하여 실험군 1에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며, 다른 실험군들은 대조군과 비교하여 차이가 없었다(도 18).

[0129] iii) 장기(16주) 효능 검증 결과

[0130] 혼합 백신 처리 16주 후에 분리된 실험군 3의 혈청에서만 에어로모나스 살모니시다 항원에 대하여 0.280 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 통계적으로 높은 항체가가 형성됨을 확인하였으나, 그 외 백

신 처리된 실험군은 대조군과 비교하여 항체가가 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(도 19).

[0131] 또한, 혼합 백신 처리 16주 후에 분리된 무지개송어에서의 혈청에서는 비브리오 앙귈라럼 항원에 대하여 실험군 1 및 실험군 2에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것을 확인하였으며, 다른 실험군들은 대조군과 비교하여 차이가 없었다(도 20).

[0133] 4) ELISA 결과 (2/2)

[0134] i) 단기(4주) 효능 검증 결과

[0135] 혼합 백신 처리 4주 후에 분리된 무지개송어의 혈청은 에어로모나스 살모니시다 항원에 대하여 0.713 내지 0.915의 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 21).

[0136] 또한, 혼합 백신 처리 4주 후에 분리된 무지개송어의 혈청에서는 비브리오 앙귈라럼 항원에 대하여 0.193 내지 0.410의 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 매우 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 22).

[0138] ii) 장기(15주) 효능 검증 결과

[0139] 혼합 백신 처리 15주 후에 분리된 무지개송어의 혈청에서는 에어로모나스 살모니시다 항원에 대하여 0.128 내지 0.462의 흡광도를 나타내어 백신이 투여되지 않은 실험군에 비해 매우 높은 항체가가 형성됨을 확인하였다(도 23).

[0140] 또한, 혼합 백신 처리 15주 후에 분리된 무지개송어의 혈청에서는 비브리오 앙귈라럼 항원에 대하여 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었다(도 24).

[0142] 5) Western blot 결과 (2/2)

[0143] 혼합 백신을 무지개송어 복강 내에 투여 시에 각 병원체에 대한 특이 항체의 생성 유무와 주요 항원 단백질을 알아보기 위해 웨스턴 블롯을 실시하였다.

[0144] Lane1 내지 4에서는 에어로모나스 살모니시다 항원과 결합하는 외막단백질 aopA (72-75kDa)과 aopH(37-50kDa)의 예상 단백질이 확인되었다.

[0145] Lane5 및 6에서 비브리오 앙귈라럼 항원과 결합하는 외막단백질 ompU (37kDa)의 예상 단백질이 확인되었다.

[0146] 또한, 혼합 백신 처리된 무지개송어의 혈청에서 두 병원체 단백질과 결합하는 특이 항체가 각각 생성된 것을 확인하였다(도 25).

[0148] 6) 혼합 백신 효과 요약 (1/2)

[0149] [표 3] 1차 혼합 백신 효과 요약

실험군	백신농도 (mg)	백신 형태	4주				8주				16주			
			누적 폐사율(%)		RPS		누적 폐사율(%)		RPS		누적 폐사율(%)		RPS	
실험군 1	(10+0.001)	항원 혼합	42*	22**	56.9	78	43.3	36.7	40.9	56	30	40	60	20
실험군 2	(1+0.001)	항원 혼합	64	22	34.4	78	46.7	20	36.4	76	35	17.5	53.3	65
실험군 3	(1+0.001+15%)	항원 혼합 +어쥬번트	18	56	81.5	44	20	26.7	72.7	68	30	17.5	60	65
대조군	PBS	-	97.5	100			73.3	83.3			75	50		

* 에어로모나스 살모니시다 감염: 푸른색 표시

** 비브리오 앙귈라럼 감염

[0150]

[0151] 상기 표 2에서 알 수 있듯이, 실험군 3에서 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해서 가장 효과적임을 알 수 있었다.

[0152] 또한, 보호 효과가 최소 16주까지 지속되었으며, 상대생존율이 약 60% 이상임을 알 수 있다.

[0154] 7) 혼합 백신 효과 요약 (2/2)

[0155] [표 4] 2차 혼합 백신 효과 요약

실험군	백신농도(mg)	백신 형태	4주				15주			
			누적 폐사율(%)		RPS		누적 폐사율(%)		RPS	
실험군 1	(10+1)	항원 혼합	35*	5**	60.7	94.4	35	5	63.2	100
실험군 2	(1+0.1)	항원 혼합	95	0	-6.7	100	52	0	45.3	100
실험군 3	(0.1+0.01)	항원 혼합	85	0	15.7	100	36	0	62.1	100
실험군 4	(1+0.1+15%)	항원 혼합+어쥬번트	20	0	77.5	100	20	0	79	100
대조군	PBS	-	89	95			95	39		

* 에어로모나스 살모니시다 감염: 푸른색 표시

[0156] ** 비브리오 앙귈라럼 감염

[0157] 2차 혼합 백신 실험에서, 각 실험군 별 단기 및 장기 실험에서의 누적 폐사율 및 상대 생존율을 종합하면, 실험군 4에서 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대해 가장 효과적이었다.

[0158] 1차 혼합 백신 결과와 다르게 비브리오 앙귈라럼 백신의 농도를 높였을 때, 비브리오 앙귈라럼에 대한 매우 높은 보호효과를 보였다.

[0159] 1차 및 2차 혼합 백신 결과를 종합하면, 에어로모나스 살모니시다 항원 1mg과 비브리오 앙귈라럼 항원 0.1mg 그리고 어쥬번트로서 알루미늄 겔(Aluminium gel) 15%를 첨가했을 때 에어로모나스 살모니시다 감염 및 비브리오 앙귈라럼 감염에 대한 가장 높은 방어를 기대할 수 있다.

수탁번호

[0161]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13827BP

수탁일자 : 20190313

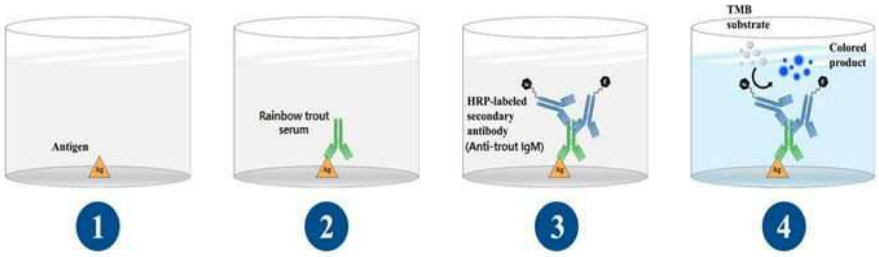
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13926BP

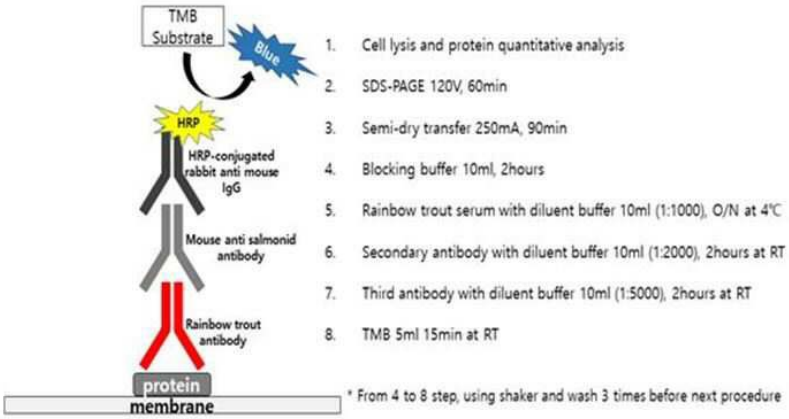
수탁일자 : 20190822

도면

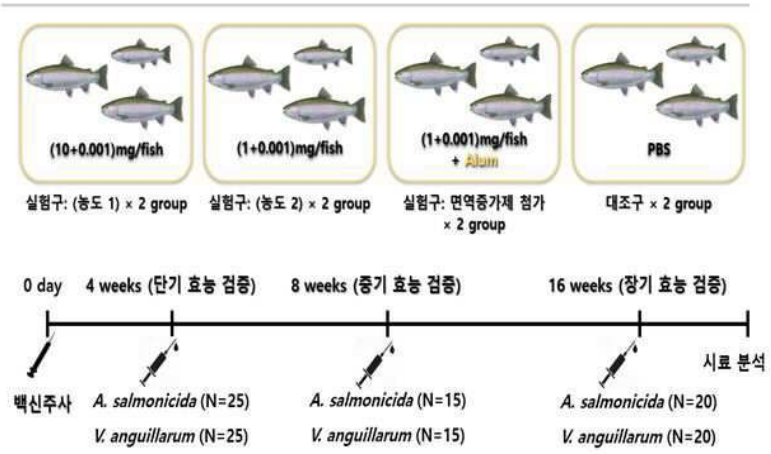
도면1



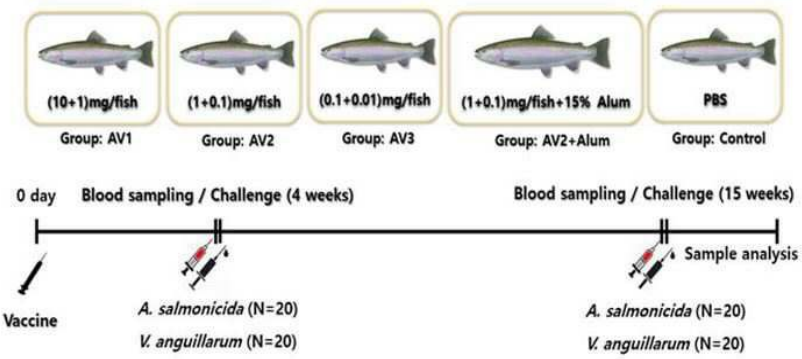
도면2



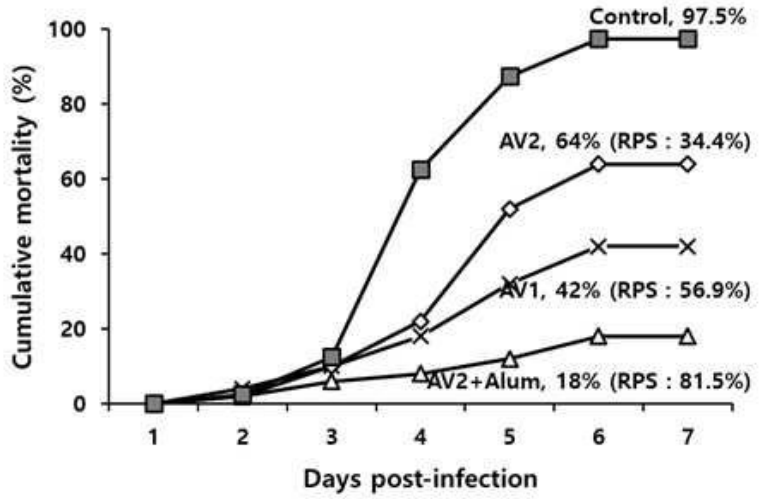
도면3



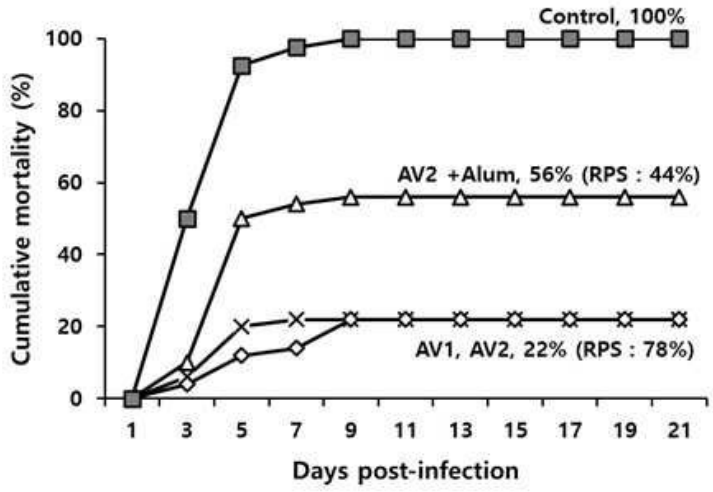
도면4


(10+1)mg/fish
(1+0.1)mg/fish
(0.1+0.01)mg/fish
(1+0.1)mg/fish+15% Alum
PBS
Group: AV1
Group: AV2
Group: AV3
Group: AV2+Alum
Group: Control
0 day
Blood sampling / Challenge (4 weeks)
Blood sampling / Challenge (15 weeks)
Sample analysis
Vaccine
A. salmonicida (N=20)
V. anguillarum (N=20)
A. salmonicida (N=20)
V. anguillarum (N=20)

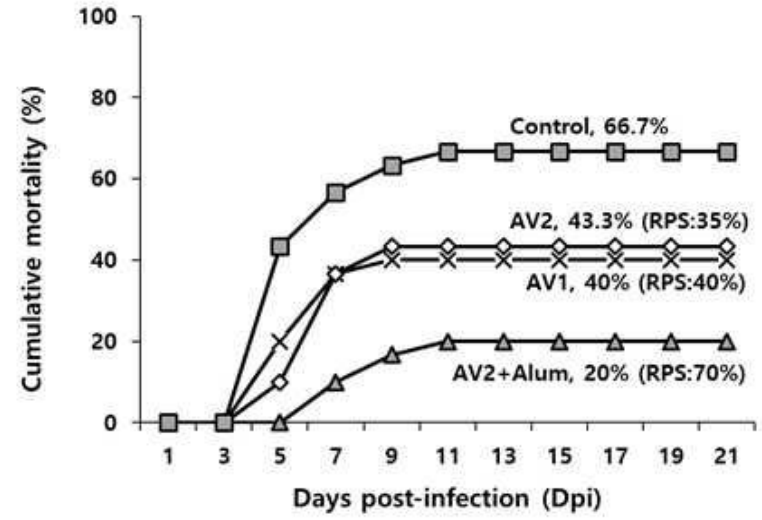
도면5


Control, 97.5%
AV2, 64% (RPS : 34.4%)
AV1, 42% (RPS : 56.9%)
AV2+Alum, 18% (RPS : 81.5%)
Cumulative mortality (%)
Days post-infection
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7

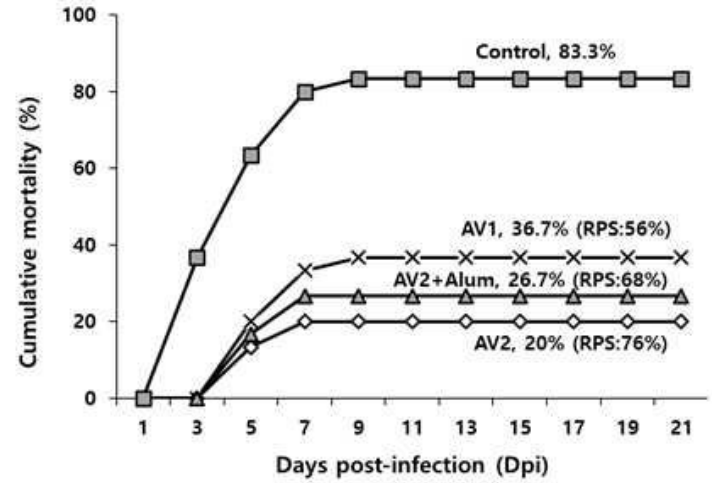
도면6


Control, 100%
AV2 +Alum, 56% (RPS : 44%)
AV1, AV2, 22% (RPS : 78%)
Cumulative mortality (%)
Days post-infection
100
80
60
40
20
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21

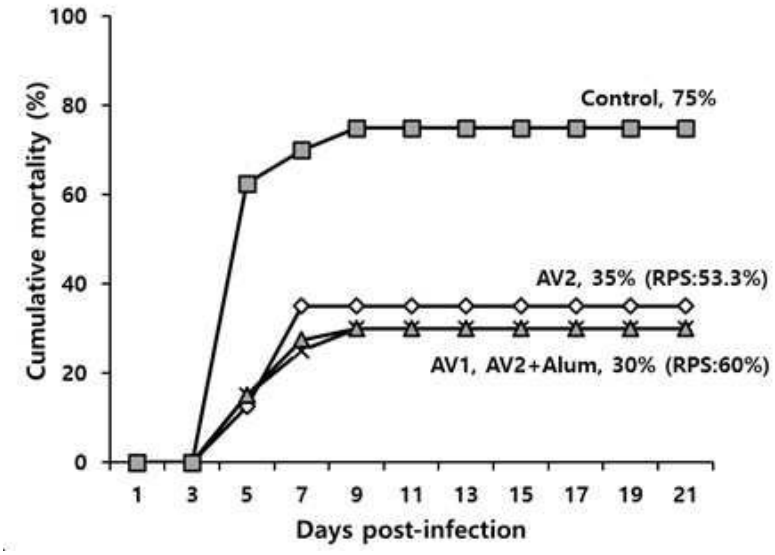
도면7


Cumulative mortality (%)
100
80
60
40
20
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
Days post-infection (Dpi)
Control, 66.7%
AV2, 43.3% (RPS:35%)
AV1, 40% (RPS:40%)
AV2+Alum, 20% (RPS:70%)

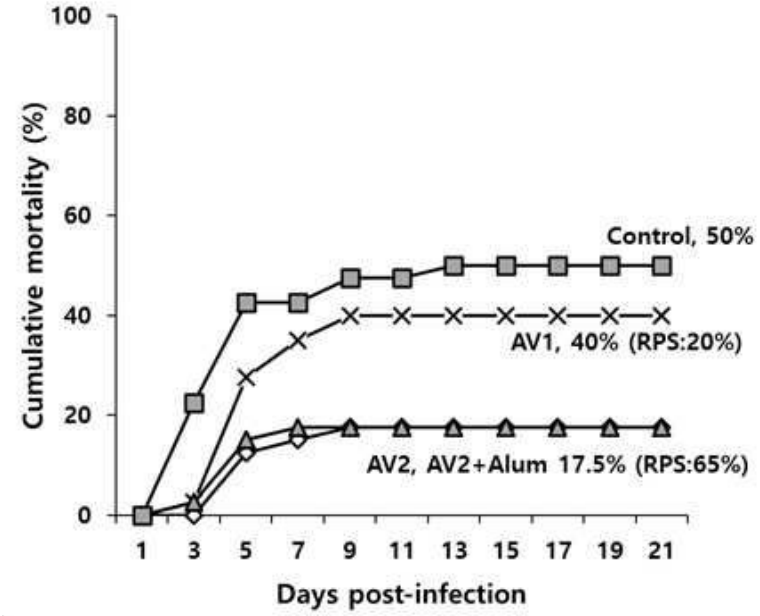
도면8


Cumulative mortality (%)
100
80
60
40
20
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
Days post-infection (Dpi)
Control, 83.3%
AV1, 36.7% (RPS:56%)
AV2+Alum, 26.7% (RPS:68%)
AV2, 20% (RPS:76%)

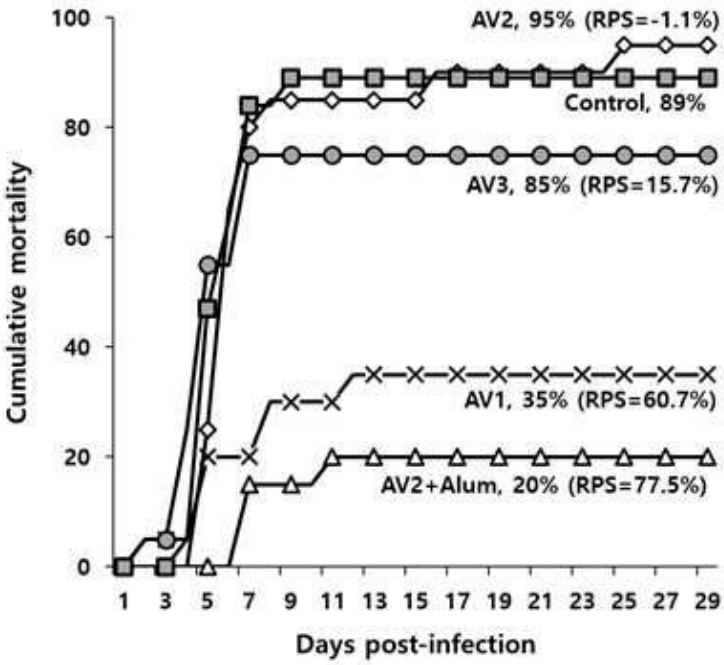
도면9


100
80
60
40
20
0
Cumulative mortality (%)
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
Days post-infection
Control, 75%
AV2, 35% (RPS:53.3%)
AV1, AV2+Alum, 30% (RPS:60%)

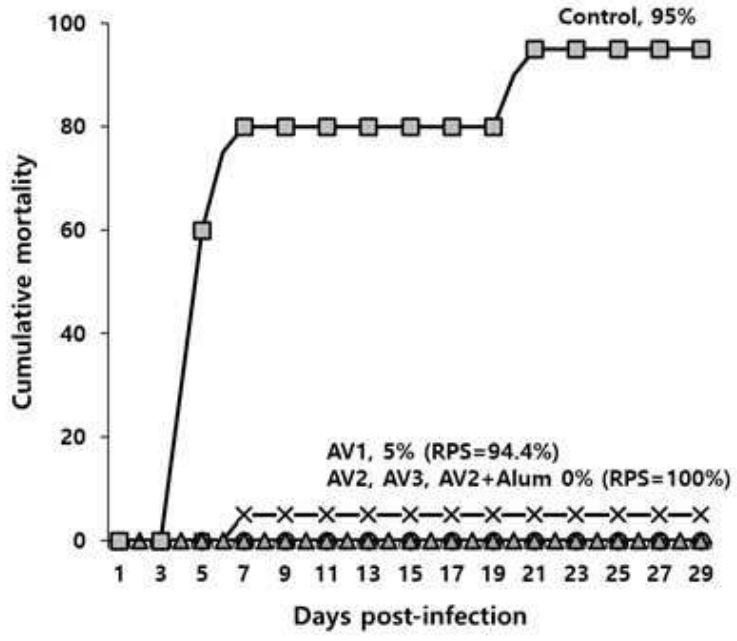
도면10


100
80
60
40
20
0
Cumulative mortality (%)
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
Days post-infection
Control, 50%
AV1, 40% (RPS:20%)
AV2, AV2+Alum 17.5% (RPS:65%)

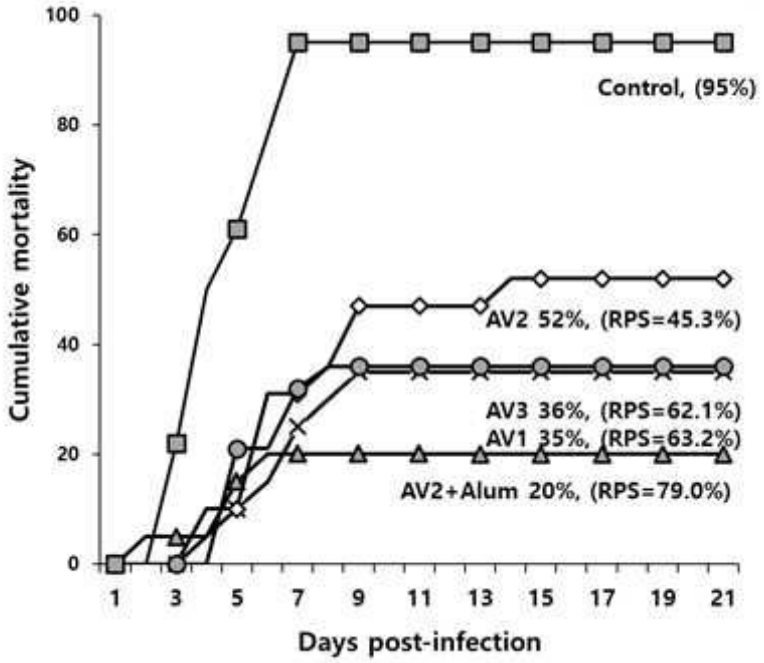
도면11


AV2, 95% (RPS=-1.1%)
Control, 89%
AV3, 85% (RPS=15.7%)
AV1, 35% (RPS=60.7%)
AV2+Alum, 20% (RPS=77.5%)
Cumulative mortality
Days post-infection
0
20
40
60
80
100
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29

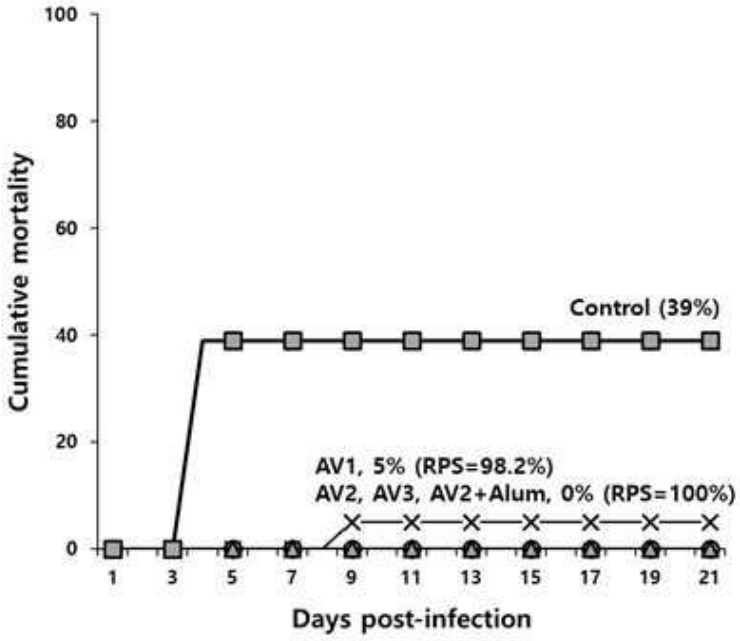
도면12


Control, 95%
AV1, 5% (RPS=94.4%)
AV2, AV3, AV2+Alum 0% (RPS=100%)
Cumulative mortality
Days post-infection
0
20
40
60
80
100
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29

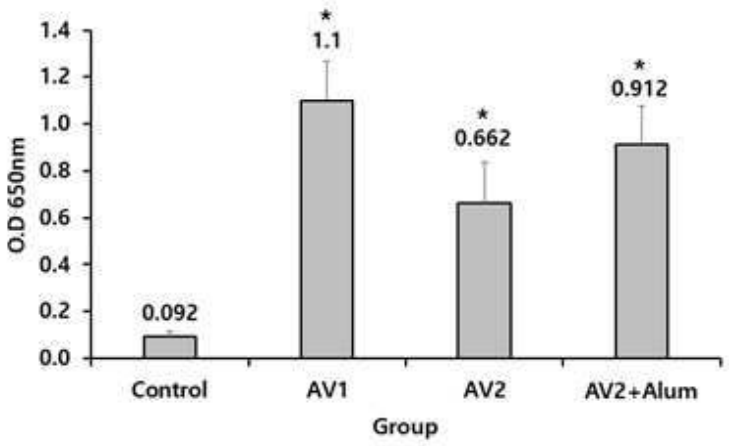
도면13


Cumulative mortality
Days post-infection
Control, (95%)
AV2 52%, (RPS=45.3%)
AV3 36%, (RPS=62.1%)
AV1 35%, (RPS=63.2%)
AV2+Alum 20%, (RPS=79.0%)

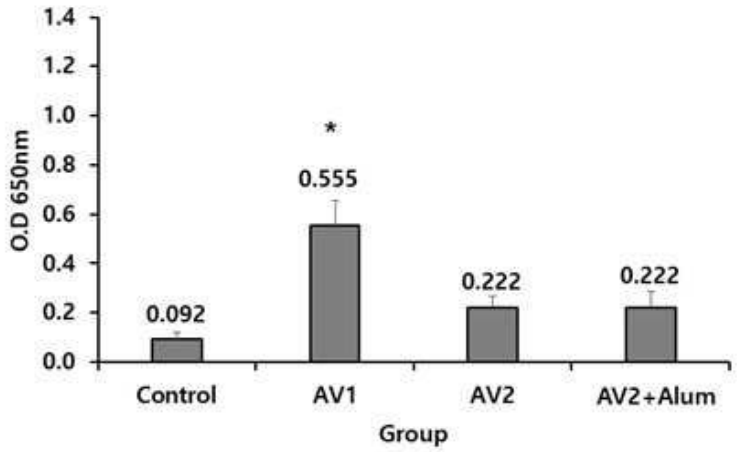
도면14


Cumulative mortality
Days post-infection
Control (39%)
AV1, 5% (RPS=98.2%)
AV2, AV3, AV2+Alum, 0% (RPS=100%)

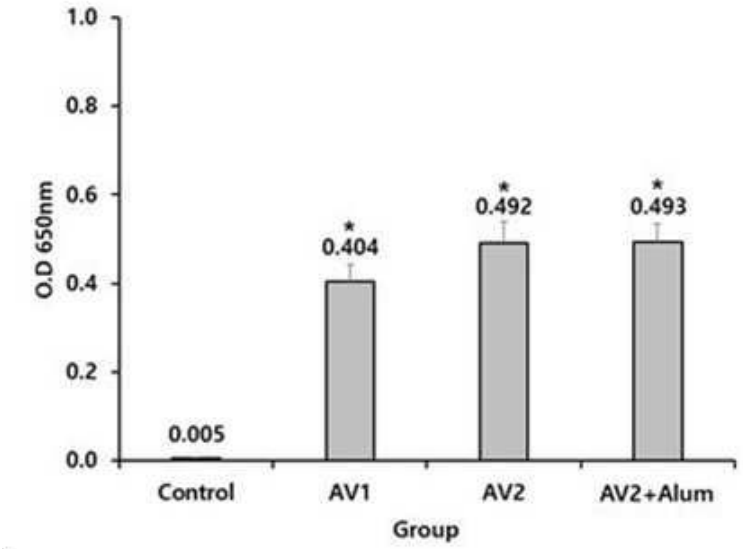
도면15


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
O.D 650nm
*
1.1
*
0.662
*
0.912
0.092
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

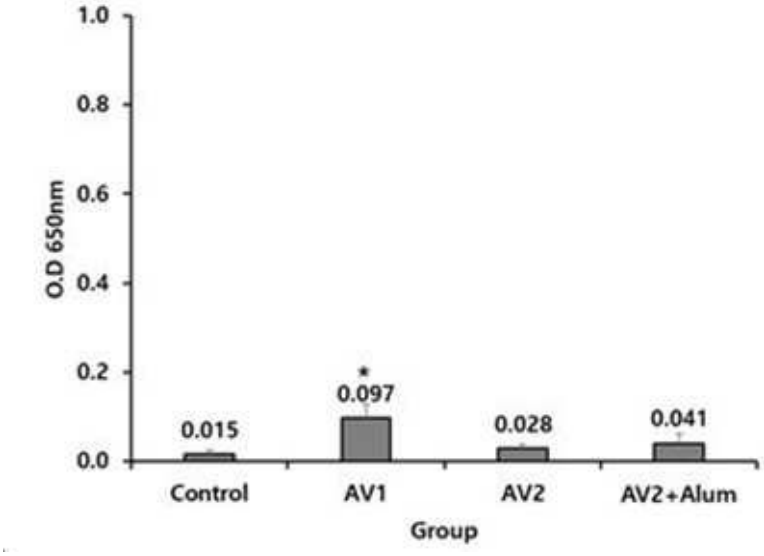
도면16


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
O.D 650nm
*
0.555
0.222
0.222
0.092
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

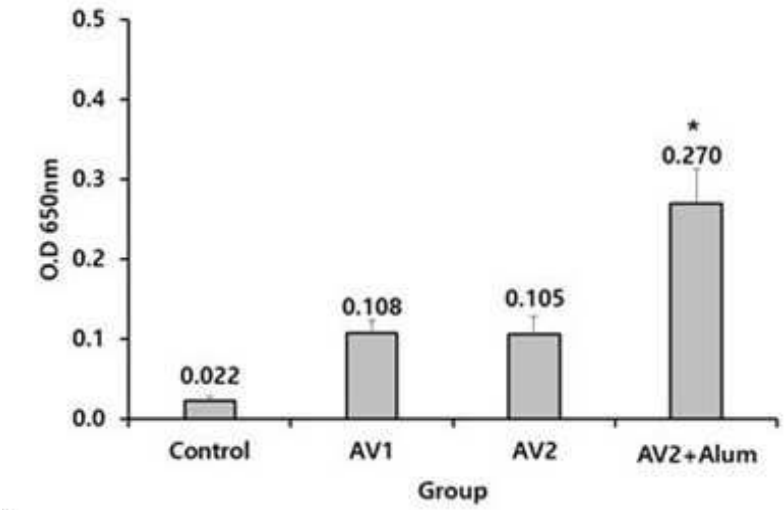
도면17


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
O.D 650nm
0.005
0.404
0.492
0.493
*
*
*
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

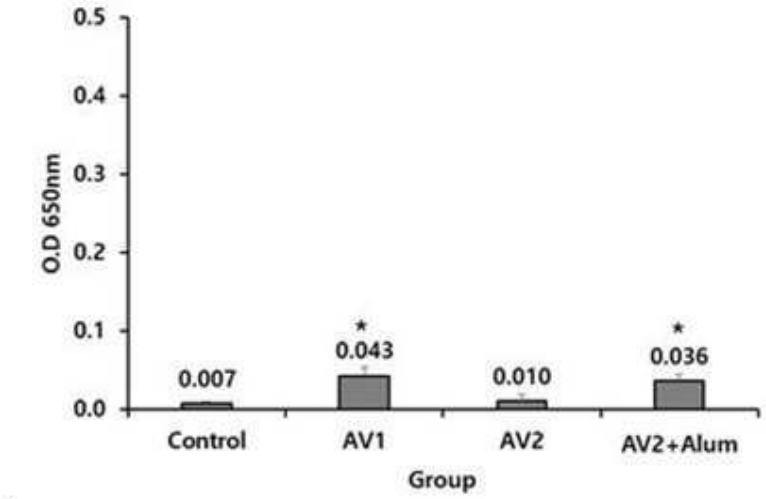
도면18


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
O.D 650nm
0.015
0.097
0.028
0.041
*
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

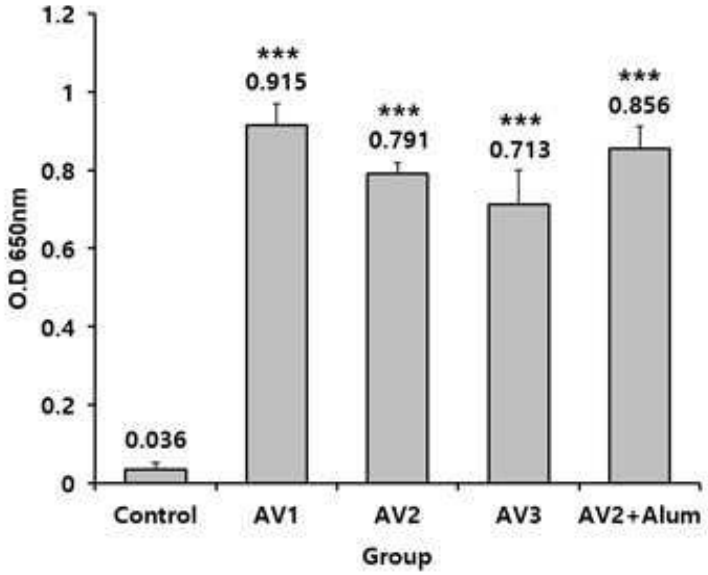
도면19


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
O.D 650nm
0.022
0.108
0.105
★
0.270
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

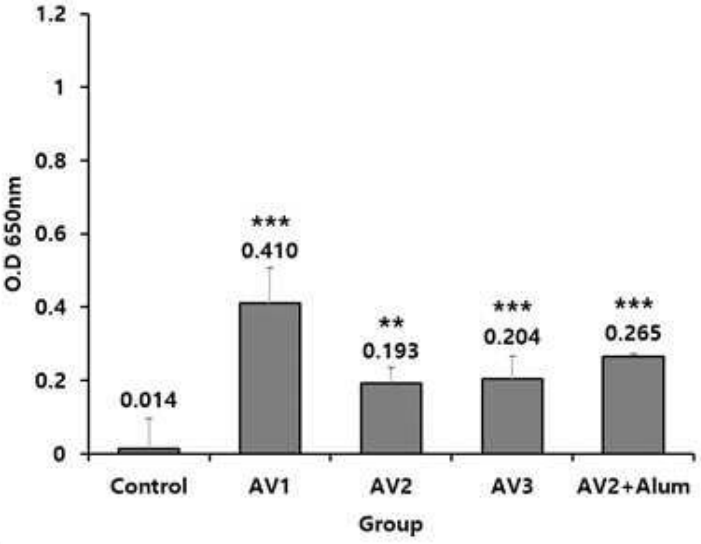
도면20


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
O.D 650nm
0.007
★
0.043
0.010
★
0.036
Control
AV1
AV2
AV2+Alum
Group

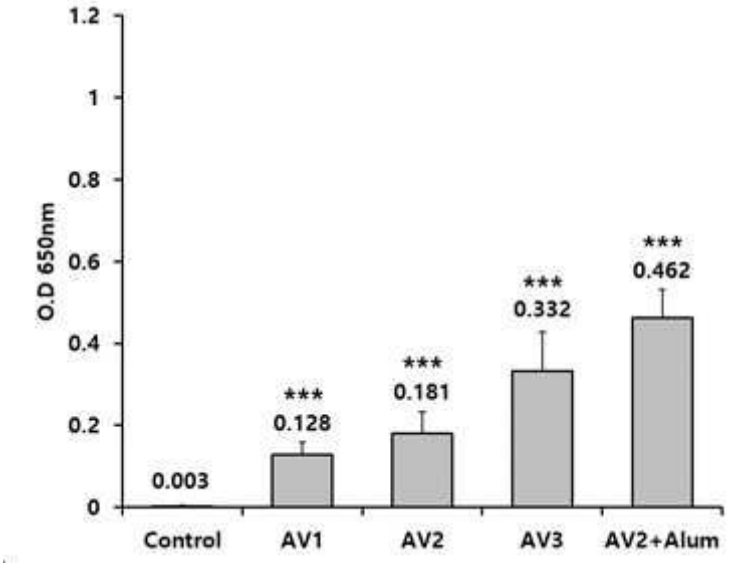
도면21


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
O.D 650nm
0.036
***
0.915
***
0.791
***
0.713
***
0.856
Control
AV1
AV2
AV3
AV2+Alum
Group

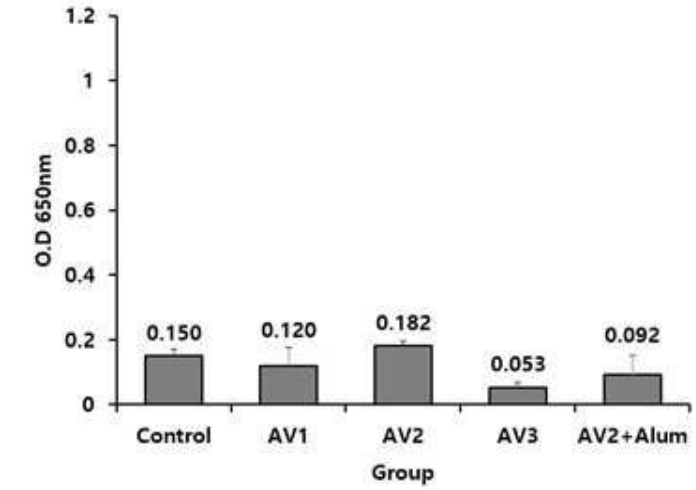
도면22


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
O.D 650nm
0.014
***
0.410
**
0.193
***
0.204
***
0.265
Control
AV1
AV2
AV3
AV2+Alum
Group

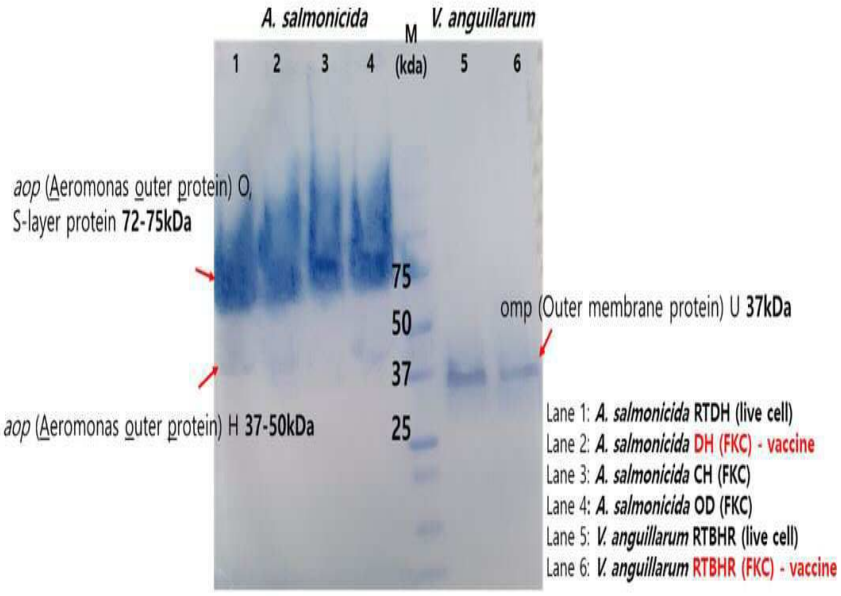
도면23


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
O.D 650nm
0.003
***
0.128
***
0.181
***
0.332
***
0.462
Control
AV1
AV2
AV3
AV2+Alum

도면24


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
O.D 650nm
0.150
0.120
0.182
0.053
0.092
Control
AV1
AV2
AV3
AV2+Alum
Group

도면25



서 열 목 록

<110> GANGNEUNG-WONJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION GROUP

<120> OPTIMAL COMBINATION VACCNE COMPOSITION FOR PREVENTION OF FURUNCULOSIS AND VIRIOSIS

<130> P20U12C2097

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1086

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Aeromonas salmonicida RTDH

<220><221> gene

<222> (1)..(1086)

<223> 16S rDNA of Aeromonas salmonicida RTDH

<400> 1

gggccgacgg cgcgggaagt tagctttgct tcctttctgc cggcgaagcg gcggacgggt 60

tgagtaatgc ctggggatct gcccagtccg aggggggataa cagtttggaa acgactgcta 120

ataccgcata cgccctacgg gggaaaggag gggaccttcg ggcctttcgc gattggatga 180

acccaggtgg gattagctag ttggtggggt aatggctcac caaggcgacg atccctagct 240

ggtctgagag gatgatcagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg 300

cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagccatgcc gcgtgtgtga 360

agaaggcctt cgggttgtaa agcactttca gcgaggagga aaggttggcg cctaatacgt 420

gtcaactgtg acgttactcg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt 480

aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg caggcggttg 540

gataagttag atgtgaaagc cccgggctca acctgggaat tgcatttaaa actgtccagc 600

tagagtcttg tagaggggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctgg 660

aggaataccg gtggcgaagg cggccccctg gacaaagact gacgctcagg tgcgaaagcg 720

tggggagcaa acaggattaa ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tcgatttgga 780

ggctgtgtcc ttgagacgtg gcttccggag ctaacgcgtt aaatcgaccg cctggggagt 840

acggccgcaa ggttaaaact caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg 900

tggtttaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctggcct tgacatgtct ggaatcctgt 960

agagatacgg gagtgccttc ggaaatcaga acacgagtgc tgcgtggctg tcgtcagctc 1020

gtgtcgtgag atattggggt aaggtcccgc aaaggggga aaccccgtgc ctttgttgcc 1080

agcagt 1086

<210> 2

<211> 593

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> rpoD of Aeromonas salmonicida RTDH

<220><221> gene

<222> (1)..(593)

<223> rpoD of Aeromonas salmonicida RTDH

<400> 2

aaactaaaac gtatcaccag gtacaagctc cgttgccgag tacccagaag cgattaccta 60

tctgcttgag cagtatgata aatacgaagc cgaacagctg ggtctgtccg atatcatctc 120

aggttttatc gatcccaacg aggccgatga tgtagcaccg actgctaccc atatcggttc 180

cgaactcggc gaagacgatc tggccgacga agacgaagat gaagacgacg atggtgacag 240

ctcggatgac gaaggtgacg gtggtcctga tccggaagtt gctcgcgaga agtttggtga 300

tctgcgtgcc cagtatgagg taactcgcct ctccattcag aagaatggcc gtgctcacga 360

agatacccag gctgcgattg cccagctggc cgatgtgttc cgtcaattcc gcctgatgcc 420

caagcagttc gatcgcttgg tcaacaacat gcgcgaaatg atggagcgcg tccgcgtgca 480

agaacgcatc atcatgaagc tctgcgttga gcaggcccaa aaaaaaaaag gaggaggcgg 540

gtgggggggg agggggagag agaggggggg caggagccga gggggggcg tcg 593

<210> 3

<211> 1168

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 16S rDNA of Vibrio anguillarum RTBHR

<400> 3

gggtgagtaa tgcctaggaa attgccctga tgtgggggat aaccattgga aacgatggct 60

aataccgcat gatgcctacg ggccaaagag ggggaccttc gggcctctcg cgtcaggata 120

tgcctaggtg ggattagcta gttggtgagg taatggctca ccaaggcgac gatccctagc 180

tggtctgaga ggatgatcag ccacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag 240

gcagcagtgg ggaatattgc acaatgggcg caagcctgat gcagccatgc cgcgtgtatg 300

aagaaggcct tcgggttgta aagtactttc agtcgtgagg aaggtggtgt tgttaatagc 360

agcatcattt gacgttagcg acagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg 420

taatacggag ggtgcgagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcat gcaggtggtg 480

gattaagtca gatgtgaaag cccggggctc aacctcggaa ccgcatttga aactggttca 540

ctagagtact gtagaggggg gtagaatttc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg 600

aaggaatacc ggtggcgaag gcggcccccc ggacagatac tgacactcag atgcgaaagc 660

gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtctacttgg 720

aggttgtggc cttgagccgt ggctttcgga gctaacgcgt taagtagacc gcctggggag 780

tacggtcgca agattaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat 840

gtggtttaat tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctactc ttgacatcca gagaagccag 900

cggagacgca ggtgtgcctt cgggagctct gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct 960

cgtgttgtga aatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttatcc ttgtttgcca 1020

gcgagtcatg tcgggaactc cagggagact gccggtgata aaccggagga aggtggggac 1080

gacgtcaagt catcatggcc cttacgagta gggctacaca cgtgctacaa tggcgcatac 1140

agagggcagc aagctagcga tagtgagc 1168

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> rpoD-Forward primer

<220><221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> rpoD-Forward primfer

<400> 4

gaaggcgaaa tcgacatcgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> rpoD-Reverse primer

<220><221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> rpoD-Reverse primer

<400> 5

ctctgcgttg agcaggccaa 20