(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0139036
(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0066499
(22) 출원일자 2014년05월30일
심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김석
경남 진주시 천수로 30, 106동 206호 (주약동, 한보은빛마을아파트)
(74) 대리인
손민

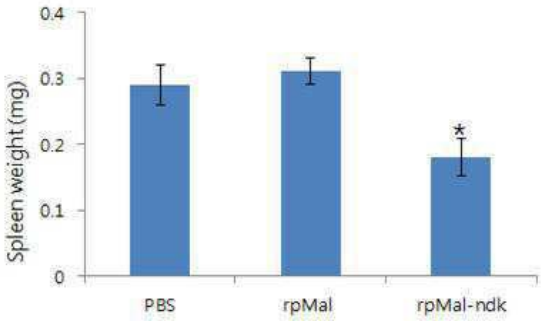
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **브루셀라 균주 유래 NDK 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방 방법**

(57) 요 약

본 발명은 브루셀라 균주로부터 유래된 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물 및 상기 백신 조성물을 이용하여 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 백신조성물은 그의 유효성분인 ndk 단백질에 의하여 브루셀라 균주가 감염되어도 이로 인한 피해를 감소시킬 수 있으므로, 보다 효과적인 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013-0839
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 생명산업기술개발
연구과제명 고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2013.08.10 ~ 2014.08.09

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질을 유효성분으로 포함하고, 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하기 위한 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 ndk 단백질은 브루셀라 균주(Brucella abortus)로부터 유래된 것인 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 ndk 단백질은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드로부터 발현되거나 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것인 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서.

약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 백신 조성물을 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나 또는 상기 브루셀라 감염증이 발병된 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 브루셀라 균주 유래 ndk 재조합 항원을 이용한 브루셀라 감염증 예방 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 브루셀라 균주로부터 유래된 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물 및 상기 백신 조성물을 이용하여 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 브루셀라 감염증은 대표적인 인수공통 전염병(인체;4군법정전염병, 가축;2종법정전염병)의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기한다고 알려져 있다. 최근 국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 폭발적인 증가를 보이고 있어 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 시급한 실정이다.

[0003] 브루셀라 감염증을 유발하는 브루셀라균은 *Brucella abortus*(소), *B. melitensis*(양, 염소), *B. canis*(개), *B.*

ovis(양), *B. suis*(돼지) 등이 알려져 있는데, 이들은 모두 모두 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래할 수 있고, 국내에서는 *Brucella abortus*가 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다. 상기 브루셀라 감염증이 발병되면, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다. 상기 브루셀라균은 세포내에서 증식하며 발병을 일으키기 때문에 인체감염의 경우 짧게는 수주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되고 있다. 그러나, 소에 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 특별한 증상없이 장기간 동안 보균자로 유지하면서, 지속적으로 브루셀라균을 외부로 배출하므로, 조기진단에 어려움이 있을 뿐만 아니라 브루셀라균의 세포내 탐식기전 및 세포내 증식기전에 대한 연구결과가 많지 않아 상기 질환의 근절이 어렵다는 문제가 있다. 또한, 브루셀라균이 체내에 감염된 경우에도 면역원성이 낮아서 면역세포가 형성되기 어렵기 때문에 백신개발에 대한 연구도 성과가 미미한 실정이다.

[0004] 특히, 소에서 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 소의 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 브루셀라 균에 대하여 심각하게 노출되어 있고, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정이다. 이를 위하여, 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하기 위한 백신의 개발이 요구되고 있으며, 이를 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0005] 예를 들어, 한국등록특허 제0263942호에는 브루셀라 어보투스 변이 균주를 포함하는 브루셀라 예방용 약학 조성물이 개시되어 있고, 미국공개특허 제2012-0202271호에는 브루셀라병을 일으키는 박테리아에 면역반응을 제공하는 특이항원인 LeuB와 Bp26를 이용한 백신이 개시되어 있다. 그러나, 이들 백신은 브루셀라 감염증에 대한 예방 또는 치료효과가 그다지 높지 않다는 단점이 있어, 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료에 사용되지 못하고 있는 실정이다.

[0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 브루셀라 감염증을 보다 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 백신을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 소의 브루셀라를 유발하는 주요 원인균인 *Brucella abortus*에서 발현되는 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질이 브루셀라 균주의 감염시에 유발되는 면역반응과 유사한 면역반응을 유발시킬 수 있고, 상기 ndk 단백질의 사전접종이 브루셀라 균주의 감염에 의한 피해를 감소시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 브루셀라 균주로부터 유래된 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 백신 조성물을 이용하여 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 브루셀라 감염증을 보다 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 백신조성물을 개발하기 위하여, 다양한 연구를 수행하던 중, 브루셀라 균주에서 발현되는 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질에 주목하게 되었다. 상기 브루셀라 균주로부터 ndk 유전자를 수득하고, 이를 클로닝하여 재조합 ndk 단백질을 대량생산하였으며, 상기 대량생산된 재조합 ndk 단백질의 백신으로서의 효과를 검증한 결과, 상기 재조합 ndk 단백질이 브루셀라 균주의 감염시 유발되는 것과 유사한 형태의 면역반응을 유발시킬 수 있고, 상기 재조합 ndk 단백질이 사전 접종된 마우스에서는 브루셀라 균주가 공격접종되어도, 이에 의한 피해가 감소됨을 확인하였다.

[0010] 따라서, 본 발명에서 제공하는 재조합 ndk 단백질은 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료효과를 갖는 백신조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0011] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태에 의하면, 본 발명은 재조합 ndk(nucleoside diphosphate kinase) 단백질을 유효성분으로 포함하고, 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하기 위한 백신조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 용어 "ndk(nucleoside diphosphate kinase)"란, 약 140개의 아미노산으로 구성되고, 서로 다른 NDP(nucleoside diphosphate) 간에 인산기의 교환을 촉매하는 효소를 의미한다. 상기 ndk는 서로 다른 NTP(nucleoside triphosphates)의 농도균형을 유지하는 역할을 수행하는데, 예를 들어, 시트르산 대사경로에서 생산된 GTP를 ATP로 전환시키는 활성을 나타낸다. 상기 유전자의 구체적인 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: YP_221449.1, ACU47687.1 등).

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 ndk는 소의 브루셀라균(*Brucella abortus*)에서 발현된 ndk가 될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되거나 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시된 것이 될 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "브루셀라 감염증(brucellosis)"이란, 다양한 브루셀라균의 감염에 의하여 발병되는 전염병을 의미하는데, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 브루셀라 감염증은 소의 브루셀라균(*Brucella abortus*)에 의하여 소에서 발병되는 법정 전염병인 소 브루셀라 감염증(bovine brucellosis)을 의미하는 것으로 해석될 수 있으며, 이는 본 발명의 백신조성물의 투여에 의하여 치료될 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어 "예방"이란, 조성물의 투여로 브루셀라 감염증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0017] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 백신조성물의 투여로 인해 이미 유발된 브루셀라 감염증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 브루셀라 균주로부터 ndk 유전자를 수득하고, 이를 벡터에 삽입하여 발현벡터를 수득한 다음, 이를 대장균에 도입하여 ndk를 생산하는 형질전환체를 수득하였으며, 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 ndk 단백질을 대량생산하고 정제하였다. 또한, 상기 정제된 재조합 ndk 단백질을 대상으로 웨스턴 블럿 분석을 수행한 결과, 상기 재조합 ndk 단백질이 면역원성을 나타냄을 확인하였다(도 1). 상기 재조합 ndk 단백질이 브루셀라 균주의 감염으로 인한 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료할 수 있는 백신조성물의 유효성분으로 사용될 수 있는지를 확인하기 위하여, 상기 재조합 ndk 단백질을 마우스에 접종하고 면역반응이 발생되는지의 여부를 확인하였다. 그 결과, 마우스에 상기 재조합 ndk 단백질을 주사하면 면역글로불린의 수준이 유의하게 증가하고(표 1), 면역반응에 관여하는 사이토카인의 혈중수준이 증가함을 확인하였다(표 2). 이에, 상기 재조합 ndk 단백질의 백신효능을 평가하기 위하여, 마우스에 재조합 ndk 단백질을 주사하여 면역반응을 유발시킨 다음, 상기 마우스에 브루셀라 균주를 공격접종하고, 재조합 ndk 단백질의 주사여부에 따른 면역반응의 변화를 확인하였다. 그 결과, 재조합 ndk 단백질이 접종된 마우스는 브루셀라 균주를 공격접종하더라도 비장의 중량증가가 유의하게 억제되었고(도 2), 비장내 브루셀라 균주의 균체수의 증가가 억제됨(표 3)을 확인하였다.

[0019] 따라서, 본 발명에서 제공하는 재조합 ndk 단백질은 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료효과를 갖는 백신조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0020] 본 발명의 재조합 ndk 단백질은 백신으로 투여되어 브루셀라 감염증에 대한 면역성을 유도할 수 있는데, 상기

재조합 ndk 단백질은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 적절하게 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 주사제는 생리식염액 및 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스텔(예, 올레인산에칠 등) 및 알코올류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 분사제의 경우에는 적합한 분사제, 예컨대 , 압축공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기반 낮은 끓는점 용매 등을 사용하여 가압팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시체의 형태로 편리하게 전달될 수 있다.

[0021] 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0022] 상기 백신조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 인체 또는 수의용으로 제형화되어 다양한 경로로 투여된다. 본 발명의 재조합 ndk 단백질은 비경구 경로, 예컨대 혈관내, 정맥내, 동맥내, 근육내 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있고, 경구, 비강, 직장, 경피 또는 에어로졸을 통한 흡입 경로로 투여될 수도 있으며, 볼루스로 투여하거나 또는 서서히 주입할 수도 있으나, 바람직하게는 주사로 투여되는 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란, 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 치료될 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 재조합 ndk 단백질의 제거 속도, 치료 지속 기간, 재조합 ndk 단백질과 조합되거나 또는 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태, 및 의약 업계 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다. "치료상 유효량" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gilman et al., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990]에 기재되어 있다.

[0025] 본 발명의 백신조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0026] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나 또는 상기 브루셀라 감염증이 발병된 개체에게 상기 백신조성물을 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 용어 "개체"란, 브루셀라 감염증이 발병할 수 있는 살아있는 유기체를 의미하는데, 바람직하게는 브루셀라 감염증의 증상이 나타날 수 있는 고등 척추동물이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 브루셀라 감염증이 발병될 수 있는 소, 돼지, 양, 염소, 개 등의 가축 및 이로부터 감염될 수 있는 사람이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 소 및 이로부터 감염될 수 있는 사람이 될 수 있다.

[0028] 본 발명의 백신 조성물을 상기 개체에 투여하면, 브루셀라 감염증을 유발시키는 균주에 대하여 개체의 면역성을 증진시켜서, 브루셀라 감염증을 예방 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 백신 조성물의 투여대상은 일차적으로는 소, 돼지, 양, 염소, 개 등의 가축이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 상기 가축에 의하여 브

루셀라 감염증이 전염될 수 있는 인간의 예방 또는 치료에도 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에서 제공하는 백신조성물은 그의 유효성분인 ndk 단백질에 의하여 브루셀라 균주가 감염되어도 이로 인한 피해를 감소시킬 수 있으므로, 보다 효과적인 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 브루셀라 유래 재조합 ndk 단백질의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타내는 사진으로서, 1-5번 레인은 브루셀라 유래 재조합 ndk 단백질의 발현을 나타내는 SDS-PAGE 사진으로, 1번 레인은 크기마커를 나타내고, 2번 레인은 발현벡터가 도입되지 않은 대장균 파쇄물을 나타내며, 3번 레인은 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내고, 4번 레인은 과발현된 재조합 ndk 단백질을 나타내며, 5번 레인은 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타내고; 6-9번 레인은 면역블럿 사진으로, 6번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내며, 7번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타내고, 8번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내며, 9번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타낸다.

도 2는 재조합 ndk 단백질 면역접종 후, 브루셀라균을 공격접종하고, 비장의 중량을 측정함으로서, 브루셀라균에 대한 면역방어력을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **실시예 1: 재조합 ndk 단백질의 과발현 및 면역원성 규명**

[0033] 본 발명에서 사용된 브루셀라 균주는 *B. abortus* 544 균주를 농림축산검역검사본부에서 분양받아 공시하였으며, 재조합 단백질 발현을 위해 *E. coli* DH5α(Introgen)을 이용하였다. 상기 브루셀라 균주를 Brucella broth(BD, USA)를 사용하여 배양하고, *E. coli*는 LB broth (BD, USA)를 사용하여 37℃에서 하루동안 진탕배양하였다. 고형배지의 경우 동일한 종류의 broth에 1.5%(w/v) 아가로스(Takara, Japan)를 첨가하고, 필요에 따라 항생제인 암피실린(100 mg/㎖)을 첨가하였다.

[0034] 브루셀라 균주의 총 게놈 DNA는 하루동안 배양된 브루셀라균 5㎖를 원심분리하고, bacteria genomic DNA purification kit(Intron, Korea)를 이용하여 수득하였다. 상기 수득한 총 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 ndk 유전자를 증폭시켰다.

[0035] 정방향 프라이머; 5'-AGCGCGGATCCATGGCAATTGAACGTACGC-3'(서열번호 3)

[0036] 역방향 프라이머: 5'-AGGCCTGCAGTCAGCCAACGATTTCGGT-3'(서열번호 4)

[0037] 증폭된 ndk 유전자를 pMal 벡터(New England Biolabs, USA)에 삽입하여, 발현벡터를 수득하고, 상기 수득한 발현벡터를 *E. coli* DH5α에 도입하여 형질전환체를 수득하였으며, 상기 수득한 형질전환체를 암피실린(100 ㎍/㎖)이 포함된 LB 배지에서 배양하고, 0.2 mM IPTG를 가하여 상기 ndk 유전자의 발현을 유도한 후, 37℃에서 4시간 동안 진탕배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양물을 5,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 수득하고,

[0038] 상기 균체를 -70℃에서 동결과 해동을 3회 반복한 다음, 초음파조사기(Bandelin electronic, Germany)를 이용하여 초음파처리함으로써, 균체를 분쇄하였으며, 상기 분쇄된 균체를 8000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 상층액을 수거하여 maltose resin column(Bio-Rad Laboratories, USA)에 적용하여 재조합 ndk 단백질을 정제하였으며, 이를 SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다(도 1의 1-5번 레인).

[0039] 한편, 정제된 재조합 ndk 단백질을 대상으로, *B. abortus* 비감염혈청 또는 감염혈청을 이용한 웨스턴블럿 분석을 수행하여, 상기 재조합 ndk 단백질의 면역원성을 분석하였다. 이때, 상기 *B. abortus* 비감염혈청 또는 감염혈청은 농림축산검역검사본부에서 입수하였다(도 1의 6-9번 레인).

[0040] 도 1은 브루셀라 유래 재조합 ndk 단백질의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타내는 사진으로서, 1-5번 레인은 브루셀라 유래 재조합 ndk 단백질의 발현을 나타내는 SDS-PAGE 사진으로, 1번 레인은 크기마커를 나타내고, 2번 레인은 발현벡터가 도입되지 않은 대장균 파쇄물을 나타내며, 3번 레인은 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내고, 4번 레인은 과발현된 재조합 ndk 단백질을 나타내며, 5번 레인은 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타내고; 6-9번 레인은 면역블럿 사진으로, 6번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내며, 7번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타내고, 8번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 ndk 유전자가 도입되지 않은 pMal 벡터를 나타내며, 9번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 ndk 단백질을 나타낸다. 도 1에서 보듯이, *B. abortus* 균주로부터 유래된 재조합 ndk 단백질을 생산하고, 이를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 약 59kDa의 재조합 ndk 단백질을 생산하고, 상기 생산된 재조합 ndk 단백질은 *B. abortus* 균주의 감염에 의한 것과 동일한 면역원성을 나타냄을 확인하였다.

[0041] **실시예 2: 재조합 ndk 단백질의 백신효능 평가**

[0042] **실시예 2-1: 재조합 ndk 단백질의 면역접종**

[0043] 15마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스를(Japan SLC, Japan), 5마리씩 세 그룹으로 나눈 후, 각 그룹의 마우스에 PBS 100㎕(음성대조군), ndk 유전자가 포함되지 않은 pMal 벡터가 도입된 형질전환체로부터 발현된 단백질 20㎍(대조군) 또는 재조합 ndk 단백질 20㎍(실험군)을 각각 incomplete Freund's adjuvant(IFA)(Sigma, USA)에 첨가하여, 0주, 2주 및 5주에 걸쳐 복강내로 접종하여 면역반응을 유발시켰다. 최초 면역반응 유발후 5주 및 7주가 경과된 시점에서 각 마우스의 꼬리정맥을 통하여 채혈하고, 각각의 혈액을 수득하였다.

[0044] **실시예 2-2: 혈청검사를 통한 면역글로불린 수준 평가**

[0045] 상기 실시예 2-1에서 수득한 각각의 채혈된 혈액으로부터 각각의 혈청을 수득하고, 상기 수득한 혈청을 ELISA(abcam, USA)에 적용하여, 각 혈청에 포함된 IgG1값 및 IgG2a값을 산출하였다(표 1).

표 1

[0046] 재조합 ndk 단백질의 면역접종에 따른 IgG 수준 비교

시간 (주)	마우스의 항체 역가의 로그값			
	대조군		실험군	
	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
5	2.2±0.05	2.2±0.04	4.0±0.1	4.8±0.05
7	2.6±0.09	2.4±0.06	4.8±0.08	5.2±0.06

[0047] 상기 표 1에서 보듯이, pMal 벡터 단백질(대조군)을 투여한 경우에 비하여, 재조합 ndk 단백질(실험군)을 투여한 경우에는 면역글로불린의 수치가 증가함을 확인하였다. 이로부터 재조합 ndk 단백질이 투여된 경우 면역반응

이 유발되었음을 알 수 있었다.

[0048] **실시예 2-3: 혈청내 사이토카인의 수준 비교**

[0049] 상기 실시예 2-1에서 수득한 각각의 채혈된 혈액을 cytometric bead array (BD CBA Mouse Inflammation Kit)에 적용하여, 상기 각 혈액에 포함된 사이토카인(IL-12p70, TNF, INF-γ, MCP-1, IL-10 및 IL-6)의 농도를 측정하교 비교하였다(표 2).

표 2

[0050] 면역접종 후 사이토카인의 농도 변화

시간 (주)	사이토카인	접종군에 따른 사이토카인의 농도(pg/mℓ)		
		음성대조군	대조군	실험군
5	IL-12p70	0.23±0.04	0.15±0.1	0.17±0.08
	TNF	1.51±0.12	4.29±0.41	4.46±0.27
	INF-γ	0	0	4.52±0.21
	MCP-1	12.48±0.52	14.17±0.35	54.37±2.14
	IL-10	0	0	2.98±0.09
	IL-6	0	0	2.02±0.15
7	IL-12p70	0.38±0.09	0.29±0.05	0.41±0.08
	TNF	1.46±0.2	4.79±0.24	11.45±0.54
	INF-γ	0	0.1±0.04	8.67±0.41
	MCP-1	14.93±1.13	16.89±1.06	99.28±6.22
	IL-10	0	0	2.42±0.04
	IL-6	0	0	2.35±0.09

[0051] 상기 표 2에서 보듯이, PBS(음성대조군)가 투여된 경우에 비하여, pMal 벡터 단백질(대조군)을 투여된 경우에는 TNF를 제외하고는 사이토카인의 농도가 변화되지 않았으나, 재조합 ndk 단백질(실험군)을 투여한 경우에는 TNF, INF-γ, MCP-1, IL-10 및 IL-6의 농도가 유의하게 증가함을 확인하였다. 이로부터, 재조합 ndk 단백질이 투여된 경우 면역반응이 유발되었음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0052] **실시예 2-4: 재조합 ndk 단백질의 백신효능 평가**

[0053] 상기 실시예 2-1에서 설정한 음성대조군, 대조군 및 실험군에 최종 면역접종을 수행하고 2주가 경과된 시점에서 PBS에 브루셀라균을 5 x 10^4CFU/100㎕의 농도로 부유시킨 현탁액을 각 마우스의 복강에 투여하여 공격접종을 수행하고, 2주가 경과된 시점에서 상기 각 실험군의 마우스를 희생시켰으며, 이로부터 비장을 적출하였다.

[0054] 그런 다음, 상기 적출된 비장의 평균중량을 측정하여, 브루셀라균에 대한 방어효과를 평가하였다(도 2).

[0055] 도 2는 재조합 ndk 단백질 면역접종 후, 브루셀라균을 공격접종하고, 비장의 중량을 측정함으로서, 브루셀라균에 대한 면역방어력을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 대조군인 PBS 또는 pMal 벡터를 투여한 것과는 달리 본 발명의 재조합 ndk 단백질을 투여한 후에는 비장의 중량증가가 유의하게 억제됨을 확인하였다.

[0056] 브루셀라 균이 공격접종되지 않은 마우스의 비장중량은 약 1.3 내지 1.5mg 수준임을 감안한다면, 브루셀라 균의 공격접종에 의하여 전체적으로 비장의 중량이 증가함을 알 수 있었는데, 이는 브루셀라 균이 비장에서 증식함에 따라 이에 의한 면역반응 및 염증반응이 유발되어 염증세포가 증가함에 따라 비장의 중량이 증가되는 것으로 분석되었다. 이같은 비장의 중량증가량은 본 발명의 재조합 ndk 단백질을 투여함에 의하여 최소화되었으므로, 이

로부터 본 발명의 재조합 ndk 단백질이 브루셀라 균의 감염에 의하여 발병되는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 백신으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0057] 한편, 상기 적출된 비장을 PBS에 침지하고 균질화하여, Brucella 아가로스 배지에 도말하였으며, 37℃에서 3일 동안 배양한 다음, 배양된 브루셀라균의 균체수를 계수하고, 이들의 평균값을 측정한 후, 이로부터 면역방어 효율을 산출하였다(표 3). 이때, 방어율 로그값은 비장내 존재하는 브루셀라 균체수가 본 발명의 백신접종에 의하여 감소된 수준을 나타내는데, 비장에서 브루셀라균 균체수의 로그값을 사용하여 음성대조군의 값에서 대조군 또는 실험군의 값을 차감하여 산출하였다.

표 3

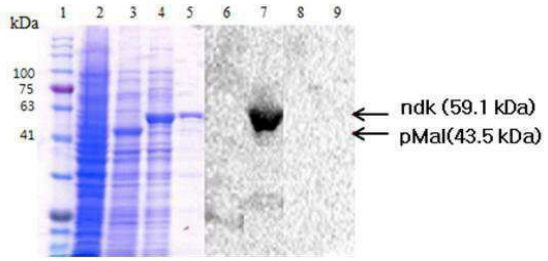
[0058] 재조합 ndk 단백질을 면역접종한 마우스의 비장내 브루셀라균의 균체수

백신	비장에서 브루셀라균 균체수의 로그값(평균±표준편차)	방어율 로그값	유의성
음성대조군	5.56±0.12	-	-
대조군	5.51±0.08	0.05	P>0.05
실험군	3.82±0.13	1.71	P<0.01

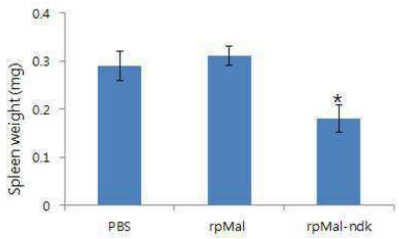
[0059] 상기 표 3에서 보듯이, 대조군인 PBS 또는 pMal 벡터를 투여한 것과는 달리 본 발명의 재조합 ndk 단백질을 투여한 후에는 비장내 브루셀라균의 균체수가 유의하게 감소하고, 이로 인하여 면역방어율이 증가함을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for preventing brucellosis using recombinant ndk antigen derived from Brucella sp.

<130> KPA140334-KR

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleoside diphosphate kinase cDNA

<400> 1

atggcaattg aacgtacttt ctccatgatc aagcccgatg cgacccgccg caacctgact 60

ggcgcgatca tcgccaagct tgaagaagcg ggcctgcgcg ttgtcgcatc gaagcgcgtc 120

tggatgagcc gccgtgaagc tgaaggcttc tacgccgttc acaaggaccg tccgttcttt 180

ggcgaactgg ttgaattcat gtcctccggc ccgacggtcg ttcaggttct cgaaggcgaa 240

aacgcaattg ccaagaaccg tgaagtcatg ggcgccacca acccggccaa tgccgacgaa 300

ggcaccatcc gcaagacctt cgccctgtcc atcggtgaaa attcggttca cggttcggat 360

gctcccgaaa ccgctgccga agaaatcgcc tactggtttt cgggcaccga aatcgttggc 420

420

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant nucleoside diphosphate kinase

<400> 2

Met Ala Ile Glu Arg Thr Phe Ser Met Ile Lys Pro Asp Ala Thr Arg
1 5 10 15

Arg Asn Leu Thr Gly Ala Ile Ile Ala Lys Leu Glu Glu Ala Gly Leu
20 25 30

Arg Val Val Ala Ser Lys Arg Val Trp Met Ser Arg Arg Glu Ala Glu
35 40 45

Gly Phe Tyr Ala Val His Lys Asp Arg Pro Phe Phe Gly Glu Leu Val

50 55 60

Glu Phe Met Ser Ser Gly Pro Thr Val Val Gln Val Leu Glu Gly Glu

65 70 75 80

Asn Ala Ile Ala Lys Asn Arg Glu Val Met Gly Ala Thr Asn Pro Ala

85 90 95

Asn Ala Asp Glu Gly Thr Ile Arg Lys Thr Phe Ala Leu Ser Ile Gly

100 105 110

Glu Asn Ser Val His Gly Ser Asp Ala Pro Glu Thr Ala Ala Glu Glu

115 120 125

Ile Ala Tyr Trp Phe Ser Gly Thr Glu Ile Val Gly

130 135 140

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

agcgcggatc catggcaatt gaacgtacgc 30

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

aggcctgcag tcagccaacg atttcggt 28