(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0004538
(43) 공개일자 2017년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/164 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2015-0095013
(22) 출원일자 2015년07월03일
심사청구일자 2015년07월03일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김석
경상남도 진주시 천수로 30, 102동 802호 (주약동, 한보은빛마을아파트)
(74) 대리인
최규환

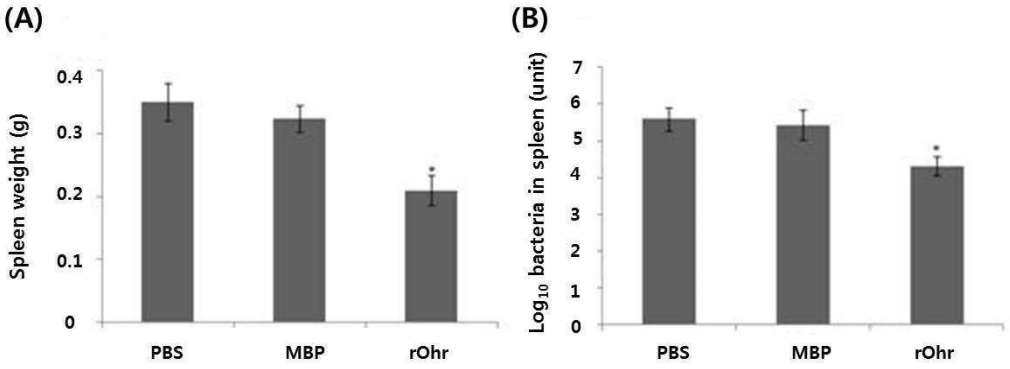
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에서는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 이용하여 브루셀라 감염증이 발병된 개체에 투여한 결과, 면역원성 및 체액성 면역반응이 높게 나타났으며, Ohr 재조합 단백질을 면역시킨 후 병원성 브루셀라 균을 공격접종하였을 때, 비장의 무게 및 비장 내 브루셀라 균의 수가 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 백신 조성물은 그의 유효성분인 Ohr 재조합 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 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 39/098 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/0021 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014-0680
부처명 농림축산부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 생명산업기술개발
연구과제명 고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2014.08.10 ~ 2015.08.09

명 세 서

청구범위

청구항 1

브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 면역원성을 갖는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 백신은 서브유닛 백신(subunit vaccine)인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및 어주번트로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 경구, 경피, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내 및 비강 중에서 선택된 어느 하나의 투여경로를 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 7

브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키는 단계 및 상기 형질전환된 숙주세포를 대량 발현하여 정제하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 Ohr 재조합 단백질의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 백신 조성물을 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나, 브루셀라 감염증이 발병된 가축에게 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료 방법.

청구항 9

브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 사료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부

터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 백신 조성물, 상기 Ohr 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키는 단계 및 상기 형질전환된 숙주세포를 대량 발현하여 정제하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 Ohr 재조합 단백질의 제조 방법, 상기 백신 조성물을 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나 브루셀라 감염증이 발병된 가축에게 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료 방법 및 상기 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 사료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 브루셀라 감염증은 대표적인 인수공통 전염병(인체;4군 법정전염병, 가축;2종 법정전염병)의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적 및 경제학적 심각한 문제를 야기한다고 알려져 있다. 최근 국내에서 본 브루셀라 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 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래할 수 있고, 국내에서는 브루셀라 어보투스(*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 치료 방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되고 있다. 그러나, 소에 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 특별한 증상 없이 장기간 동안 보균자로 유지하면서, 지속적으로 브루셀라균을 외부로 배출하므로, 조기진단에 어려움이 있을 뿐만 아니라 브루셀라균의 세포 내 탐식 기전 및 세포 내 증식 기전에 대한 연구결과가 많지 않아 상기 질환의 근절이 어렵다는 문제가 있다. 또한, 브루셀라균이 체내에 감염된 경우에도 면역원성이 낮아서 면역세포가 형성되기 어렵기 때문에 백신 개발에 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] 한편, 한국등록특허 제0263942호에는 브루셀라병의 예방에 사용될 수 있는 새로운 브루셀라 어보투스 균주 및 그의 제조방법에 대해 개시되어 있고, 미국공개특허 제2011-0033492호에는 브루셀라 감염증을 위한 백신에 대해 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질을 포함하는 브루셀라 감염증 예방 또는 치료용 백신 조성물에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 이용하여 브루셀라 감염증이 발병된 개체에 투여한 결과, 면역원성 및 체액성 면역반응이 높게 나타났으며, Ohr 재조합 단백질을 면역시킨 후 병원성 브루셀라 균을 공격 접종하였을 때, 비장의 증식 및 비장 내 브루셀라 균수가 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 Ohr 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키는 단계 및 상기 형질전환된 숙주세포를 대량 발현하여 정제하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 Ohr 재조합 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나 브루셀라 감염증이 발병된 가축에게 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 Ohr 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 이용하여 브루셀라 감염증이 발병된 개체에 투여한 결과, 면역원성 및 체액성 면역반응이 높게 나타났으며, Ohr 재조합 단백질을 면역시킨 후 병원성 브루셀라 균을 공격 접종하였을 때, 비장의 증식 및 비장 내 브루셀라 균수가 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 백신 조성물은 그의 유효성분인 Ohr 재조합 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

[0012] 도 1은 본 발명의 브루셀라 어보투스 균주 유래의 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타낸 것이다. (A)는 SDS-PAGE 사진으로, M은 크기 마커; 레인 1은 Ohr 유전자를 삽입하지 않은 대조군; 2는 발현된 Ohr 재조합 단백질을 나타내며, (B)는 면역블롯 사진으로, 레인 1은 감염혈청으로 면역반응시킨 Ohr 재조합 단백질; 2는 감염혈청으로 면역반응시킨 Ohr 유전자가 도입되지 않은 pMAL 벡터; 3은 비감염혈청으로 면역반응시킨 Ohr 재조합 단백질; 4는 비감염혈청으로 면역반응시킨 Ohr 유전자가 도입되지 않은 pMAL 벡터를 나타내며, ←는 Ohr 재조합 단백질의 예상 사이즈인 59.15 kDa의 위치를 나타내며, ◀는 pMAL 벡터 사이즈인 43.5 kDa의 위치를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 Ohr 재조합 단백질의 면역접종에 따른 체액성 면역반응을 나타낸 것이다. (A)는 면역글로불린 1(IgG1)의 생성량; (B)는 면역글로불린 2(IgG2)의 생성량을 나타내며; MBP는 대조군인 pMAL 벡터 단백질; rOhr은 Ohr 재조합 단백질을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 Ohr 재조합 단백질을 면역한 후 브루셀라균의 공격접종을 통한 마우스의 비장무게 및 비장 내 균의 수를 나타낸 것이다. (A)는 비장 무게의 변화; (B)는 비장 내 균의 수 변화를 나타내며; PBS는 음성 대조군; MBP는 대조군인 pMAL 벡터 단백질; rOhr은 Ohr 재조합 단백질을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 따른 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질의 범위는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0015] 본 발명의 상기 조성물은 면역원성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 상기 백신은 서브유닛 백신(subunit vaccine)인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에서 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, 관절염 등 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.

[0018] 본 발명에서 용어, "예방"이란, 조성물의 투여로 브루셀라 감염증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 용어, "치료"란, 본 발명의 백신 조성물의 투여로 인해 이미 유발된 브루셀라 감염증의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0020] 본 발명의 백신 조성물은 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다. 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 당 등을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전일 수 있다. 비-수용액 담체의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식용유 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올리에이트를 들 수 있다. 수용액 담체는 식염수 및 완충배지를 포함하는, 물, 알콜/수용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 담체는 염화 나트륨 용액, 링거 덱스트로오스, 덱스트로오스 및 염화나트륨, 유산처리 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥주사용 담체는 예컨대 링거 덱스트로오스를 기본으로 하는 것과 같은 전해질 보충제, 액체 및 영양 보충제 등을 포함한다. 방부제 및 기타 첨가제 예컨대 항미생물제제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성가스 등과 같은 것이 추가로 존재할 수 있다. 바람직한 방부제는 포르말린, 티메로살, 네오마이신, 폴리믹신 B 및 암포테리신 B를 포함한다.

[0021] 또한, 상기 백신 조성물은 어주번트(adjuvant, 면역조성제, 면역증강제)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 어주번트는 면역반응의 향상 및/또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 칭하는 것으로 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용 가능한 어주번트로는 프로인트 완전 어주번트, 프로인트 불완전 어주번트, 사포닌, 미네랄 젤 예컨대 수산화 알루미늄, 계면활성제 예컨대 리소레시틴, 플루론 폴리올, 다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키홀림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 백신 조성물은 경구, 경피, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내 또는 비강 중에서 선택된 어느 하나의 투여경로를 통해 투여될 수 있으며, 볼루스로 투여하거나 서서히 주입할 수 있으나, 바람직하게는 주사로 투여되는 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명의 백신 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란, 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양으로, 부작용 또는 심각하거나 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량의 수준은 치료하려는 장애, 장애의 중증도, 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 재조합 Ohr 단백질의 제거 속도, 치료 지속 기간, 재조합 Ohr 단백질과 조합되거나 동시에 사용되는 약물, 대상체의 연령, 체중, 성별, 식습관, 일반적인 건강 상태 및 의학 분야에 공지된 인자를 비롯한 다양한 인자들에 따라 달라질 수 있다. "치료상 유효량"의 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.

[0024] 또한, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키는 단계 및 상기 형질전환된 숙주세포를 대량 발현하여 정제하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료용 Ohr 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, Ohr 재조합 단백질을 제조할 수 있는 방법으로, 서열번호 2의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 *Ohr* 유전자를 대량 발현하여 정제한 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 유전자는 Ohr 단백질을 암호화하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0027] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고,

숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 흔히 "재조합 벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "재조합 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0028] 본 발명에서 용어, "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 브루셀라 감염증의 발병이 예상되거나, 브루셀라 감염증이 발병된 가축에게 상기 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0030] 용어 "가축"이란, 브루셀라 감염증이 발병될 수 있는 소, 돼지, 양, 염소, 개 등의 가축이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 백신 조성물을 상기 가축에게 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 않는다.

[0032] 또한, 본 발명은 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주로부터 유래된 Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질을 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명에 따른 Ohr 재조합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명은 당해 기술분야에 공지된 일반적인 사료 성분을 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 사료 조성물은 곡물 가루, 당질, 비타민, 아미노산, 단백질, 지질, 광물질 등을 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 사료 조성물에는 곡물 및 곡물 부산물이 사용될 수 있는데, 예컨대 평지씨, 면실, 대두, 밀기울, 미강, 탈지강, 맥강, 옥수수겨, 맥아근, 대두피, 감자 전분, 고구마 전분, 옥수수 전분, 커피박, 잠사, 잠분, 해조분, 타피오카, 대두박, 면실박, 임자박, 채종박, 아마박, 호마박, 옥수수글루텐, 밀글루텐, 낙화생박, 야자박, 해바라기씨박, 주정박, 옥수수배아박, 고추씨박, 장유박, 맥주박 중에서 선택된 하나 또는 2종 이상이 혼합될 수 있다.

[0036] 본 발명의 사료 조성물은 수용성 및 불용성 모노사카라이드, 디사카라이드 및 폴리사카라이드와 같은 당 및 복합 탄수화물을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 당질로서 보다 상세하게는, 포도당, 만노오스, 프룩토오스, 백당, 맥아당, 셀로비오스, 젖당, 트레할로오스, 멜리비오스, 라피노오스, 에스크린, 살리신, 아미그달린, 만니톨, 솔비톨, 소르보스, 멘티토오스 등을 들 수 있으며, 당밀, 자당 뿐만 아니라 올리고당도 병용하여 이용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 사료 조성물에 포함될 수 있는 임의의 아미노산 성분에는 아르기닌, 히스티딘, 이소로이신, 로이신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산나트륨, 글리신, 프롤린, 세린, 시스테인, 및 이들의 동족체, 및 이들의 염이 있다.

[0038] 또한, 본 발명의 사료 조성물에 임의로 첨가할 수 있는 티아민(비타민 B1)· HCl, 리보플라빈(비타민 B2), 피리독신(비타민 B6)·HCl, 니아신(비타민 B3), 니아신아미드(수용성비타민과 비타민 B의 복합체), 이노시톨(비타민 B8), 염화콜린(비타민 B4), 판토텐산칼슘(비타민 B5), 바이오틴(비타민 B7), 폴산(비타민 B9) 등의 비타민 B군 및 비타민 A, C, K, D 및 E 등이 있다. 이 중, 특히 비타민 A, 비타민 B군 및 비타민 E는 항산화 물질로도 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 사료 조성물에 포함될 수 있는 지방산은, 예를 들어, 대두유, 평지씨유, 옥수수유, 홍화유, 해바라기유, 라이스유, 비프스테이크 식물유, 달맞이꽃유, 유리지치유, 아마인유 등의 식물유, 및 가다랭이, 고등어, 정어리 등의 어유 및 각종 미생물 유래의 트리글리세라이드 등의 유지를 가수분해 처리함으로써 획 득할 수 있고, 상기에서 얻어지는 지방산의 금속염으로서 지방산의 칼슘염 및 마그네슘염 또한 포함될 수 있다. 본 발명의 사료 조성물에는 사장석, 벤토나이트, 맥반석 등 공지의 바이오세라믹 물질이 소량 첨가되어 항균 기능 등을 배가

시킬 수 있다.

[0040] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0041] **재료 및 방법**

[0042] **1. 공시균주**

[0043] 본 발명에 사용된 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus, B. abortus*) 544 균주는 농림축산검역검사본부에서 분양받아 공시하였으며, 재조합 단백질 발현을 위해 *E. coli* DH5α(Invitrogen)를 이용하였다. 브루셀라 균은 브루셀라 액체 배지(BD, USA)에 배양하였으며, *E. coli* 균은 LB 배지(BD, USA)에서 37℃에서 밤새동안 진탕 배양하였다. 고형 배지의 경우, 같은 종류의 액체 배지에 1.5%(w/v) agar(Takara, Japan)를 첨가하였으며, 필요에 따라 암피실린(100㎍/㎖)을 첨가하였다.

[0044] **2. Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질 제조**

[0045] 상기 공시균주인 브루셀라균의 총 게놈 DNA는 밤새동안 배양된 브루셀라균 5ml을 원심분리하고, bacteria genomic DNA purification kit(Intron사, Korea)를 이용하여 정제하였다. 브루셀라 어보투스(*Brucella abortus*) 균주 유래의 Ohr 재조합 단백질 제작을 위하여, Ohr을 암호화하는 유전자를 찾아 프라이머를 제작한 후 PCR을 이용하여 *Ohr* 유전자를 증폭하였다. PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다. 증폭된 *Ohr* 유전자는 pMal 벡터(New England Biolabs, USA)에 삽입한 후 유전자 발현을 위해 *E. coli* DH5α에 형질전환하였으며, *Ohr* 유전자가 삽입된 플라스미드의 염기서열을 통해 *Ohr* 유전자를 확인하였다.

표 1

[0046] 본 발명에 사용된 프라이머

서열번호	정방향(5'-3') 프라이머 서열	역방향(5'-3') 프라이머 서열
3	AAT TC GAATTCATGCCAATTCTTTACACG	-
4	-	AGG C AAGCTTTCAGGCTACGCTCAGGCG

[0047] **3. Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질 정제**

[0048] 암피실린(100㎍/ml)이 포함된 LB 배지 1ℓ에 0.2mM IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 가하여 *Ohr* 유전자가 삽입된 플라스미드를 함유한 대장균을 37℃에서 4시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후, 배양된 세균은 원심분리기(5,000rpm, 20분간)를 이용하여 상층액을 제거하였다. 원심분리된 세균은 50㎖의 컬럼 버퍼(20mM Tris HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% Triton X100 및 10% Glycerol, pH 7.4)에 부유한 후 70℃에서 3회의 동결과 해동을 수행하였으며, 초음파기(Bandelin electronic, Germany)를 이용하여 분쇄한 다음, 8000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 수거하여 말토오스 레진 컬럼(maltose resin column, Bio-Rad Laboratories, USA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 재조합 단백질을 정제하였다.

[0049] **4. SDS-PAGE 및 면역블로팅(Immunoblotting)**

[0050] SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 방법은 림 등(Lim et al., 2012)의 방법을 참고하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 정제된 Ohr 재조합 단백질을 램리 샘플 버퍼(Laemmli sample buffer)에 넣고 100℃에서 10분간 가열처리를 한 후 SDS-PAGE를 수행하였고, 그 후 이모빌린-P 멤브레인(Immobilon-P membranes, Milipore, USA)을 이용하여 트랜스퍼(transfer)하였다. 멤브레인(membrane)은 1% BSA(bovine serum albumin)를 이용하여 블로킹(blocking)하고, 농림축산검역검사본부에서 분양받은 브루셀라 어보투스(*B. abortus*) 비감염 마우스혈청과 감염 마우스혈청을 이용하여 Ohr 재조합 단백질의 면역원성 규명을 위해 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 수행하였다. 결과는 엑스-레이필름(X-rayfilm, Fuji, Japan)에 현상하

여 면역반응 여부를 확인하였다.

[0051] **5. 혈청검사**

[0052] 백신한 마우스의 IgG1 값 및 IgG2a 값은 ELISA(abcam, USA)를 이용하여 제조사의 설명서를 참고하여 측정하였으며, 혈중 존재하는 다양한 사이토카인(IL-6, IL-10, MCP-1, INF-, TNF 및 IL-12p70)은 사이토메트릭 비드 어레이(cytometric bead array, BD CBA Mouse Inflammation Kit)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0053] **6. 마우스 면역 및 공격접종**

[0054] 15마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스(Japan SLC, Japan)를 5마리씩 세 그룹으로 나눈 후, 각 그룹의 마우스는 *Ohr* 재조합 단백질 20㎍(실험군), pMal 단백질 20㎍(대조군) 및 PBS(음성대조군) 100㎕를 IFA(incomplete Freunds adjuvant, Sigma, USA)에 첨가하여, 0주, 2주 및 5주에 걸쳐 복강 내로 면역을 수행하였다. 각 마우스의 혈청은 접종 후 5주 및 7주에 꼬리정맥을 통하여 채혈하였으며, 최종 면역 후 2주 후에 2-5 x 10^4 CFU 브루셀라 어보투스(*B. abortus*) 균주를 100㎕의 PBS에 부유하여 복강 내로 공격접종을 수행하였다.

[0055] **7. Protective experiments**

[0056] 공격접종 2주 후에 모든 마우스는 부검을 통해 비장을 채취하여 무게를 측정하고, PBS에 균질화하여 브루셀라 아가(Brucella agar)에 도말 후 37℃에서 3일 동안 배양하여 세균수를 측정하였다.

[0057] **8. 통계 분석**

[0058] 각 실험을 통해 나온 결과는 평균값±표준편차로 표기하였으며, 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 수행하였다.

[0059] **실시예 1. Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질의 발현 및 면역원성 규명**

[0060] 브루셀라 균의 *Ohr* 유전자는 pMal 플라스미드에 클로닝되어 유전자 염기서열을 통해 확인되었으며, 대장균에 형질전환한 후 IPTG에 의해 발현되었다. 발현된 Ohr 재조합 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 약 59.15 kDa(pMAL 벡터는 43.5 kDa)의 크기로 확인되었으며, 정제과정을 거쳐 분리된 Ohr 재조합 단백질의 면역원성을 규명하기 위하여, 브루셀라 감염 마우스 혈청을 이용한 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 수행한 결과, SDS-PAGE에서 발현된 재조합 단백질과 동일한 사이즈에서 특이적인 면역반응이 확인되었다(도 1).

[0061] **실시예 2. Ohr(Organic hydroxide resistance) 재조합 단백질의 서브유닛(subunit) 백신 효능 평가**

[0062] 정제된 Ohr 재조합 단백질을 마우스에 접종한 후 5주 및 7주가 경과한 시점에서 항체가를 측정해 본 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 IgG1 및 IgG2a의 값이 MBP(pMal 단백질; 대조군)를 접종한 마우스와 비교하였을 때 상당히 높게 나타났다. 또한, 면역 마우스의 사이토카인 농도를 측정해 본 결과, MBP(pMal 단백질; 대조군)의 경우, TNF(tumor necrosis factor)에서만 증가된 반면, rOhr(Ohr 재조합 단백질; 실험군)을 면역한 마우스의 경우 IFN-γ, MCP-1, TNF, IL-6 및 IL-10의 값이 대량 증가되는 것을 확인하였다(표 2).

표 2

[0063] 면역접종 후 사이토카인의 농도 변화

사이토카인	면역접종 후 나타나는 마우스의 사이토카인의 농도(pg/mℓ)					
	PBS(음성 대조군)		MBP(대조군)		rOhr(실험군)	
	5*	7	5	7	5	7

IL-12p70	0	0.82 ±0.39	0	0.90 ±0.30	1.83 ±0.05[a,1]	3.49 ±0.99[a,1]
TNF	1.97 ±1.46	2.76 ±0.81	4.28 ±1.33	5.77 ±1.04[a]	12.51±2.41[a,1]	12.59±3.10[a,1]
INF-γ	0.06 ±0.08	0.75 ±0.74	0	0.34 ±0.28	0.36 ±0.28	5.21 ±0.98[a,1]
MCP-1	25.23±9.09	26.24±8.44	30.8 ±11.82	29.28±5.41	50.07 ±3.15[a]	47.82±1.13[a,1]
IL-10	0	0.12 ±0.11	0	0	1.49 ±0.03[a,1]	2.96 ±1.35[a,1]
IL-6	0	0	0	0.05 ±0.04	0.99 ±0.84[a,1]	1.49 ±1.09[a,1]

[0064] *은 첫번째 면역접종 후의 주.

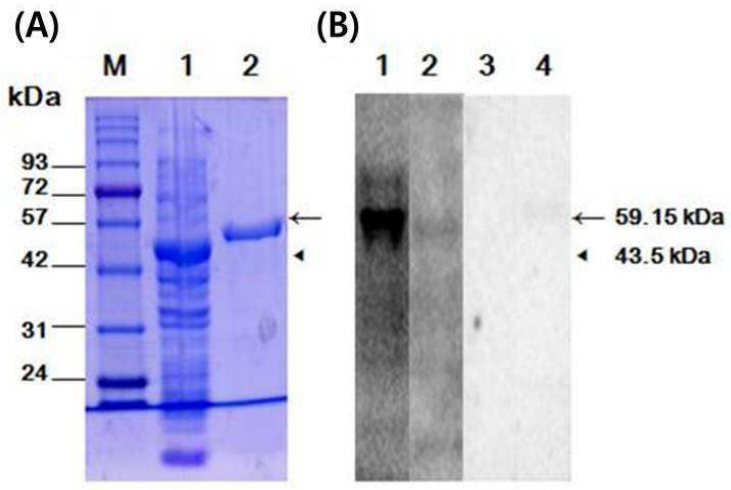
[0065] a는 PBS로 면역반응시킨 그룹으로부터 유의적 차이.

[0066] 1은 MBP로 면역반응시킨 그룹으로부터 유의적 차이.

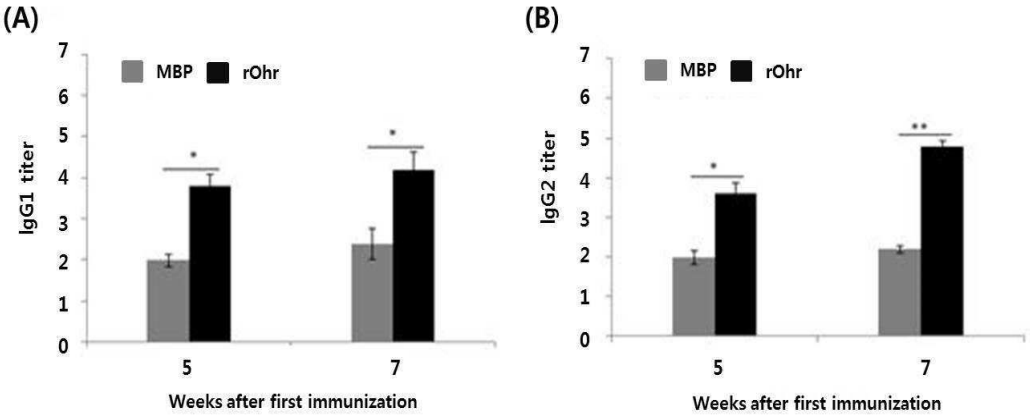
[0067] 또한, Ohr 재조합 단백질의 서브유닛 백신(subunit vaccine)으로서의 효능을 평가하기 위하여, 각 다섯 마리의 세 그룹에 Ohr 재조합 단백질(실험군), pMal 단백질(대조군) 및 PBS(음성 대조군)을 면역한 후, 병원성 브루셀라 균을 공격접종하여, 2주 후 비장의 무게 및 비장 내 브루셀라 균의 수를 확인해 본 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 대조군에 비하여 Ohr 재조합 단백질을 면역시킨 마우스에서 비장의 무게 및 비장 내 브루셀라 균의 수가 확연히 감소하였다.

도면

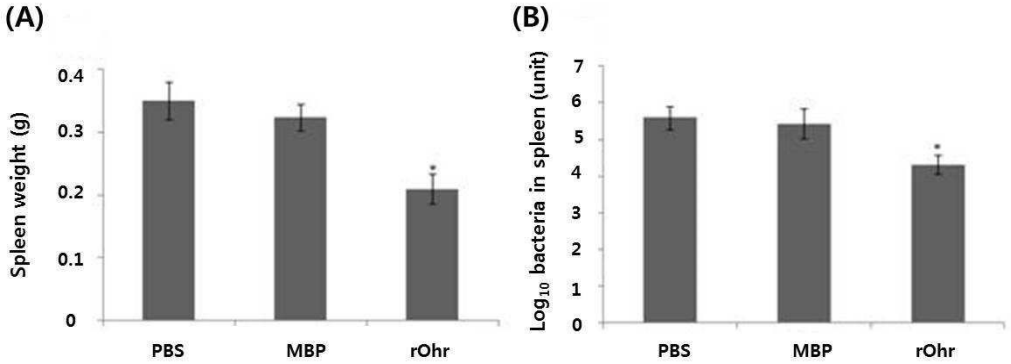
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Vaccine composition for prevention or treatment of brucellosis comprising recombinant organic hydroxide resistance protein derived from Brucella abortus as effective component

<130> PN15093

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Brucella abortus

<400> 1

Met Pro Ile Leu Tyr Thr Thr Gln Ser Thr Ala Thr Gly Gly Arg Thr

1 5 10 15

Gly Ser Ala Lys Thr Ala Asp Gly Arg Leu Ser Val Val Leu Asp Thr
20 25 30
Pro Lys Glu Leu Gly Gly Gln Gly Gly Glu Gly Thr Asn Pro Glu Gln
35 40 45
Leu Phe Ala Ser Gly Tyr Ala Ala Cys Phe Leu Gly Ala Leu Lys Phe
50 55 60
Ala Ala Ala Lys Glu Lys Ile Ser Ile Pro Ala Glu Ser Thr Val Thr
65 70 75 80
Ala Thr Val Gly Ile Gly Pro Arg Glu Asp Gly Thr Gly Phe Gly Leu

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

<210> 2

<211> 423

<212> DNA

<213> Brucella abortus

<400> 2

atgccaattc tttacacgac ccagtccacg gcaaccggtg gccgcacggg cagcgccaag 60

accgccgatg ggcgcctcag cgtcgttctc gacacgccga aggaacttgg cgggcagggc 120

ggtgaaggca ccaatcccga acagcttttt gcttccggct atgctgcctg ctttctcggg 180

gcgctgaaat tcgcggcggc gaaagaaaag atttcgatcc ccgctgaaag caccgtgacc 240

gcgacagttg gcatcggccc gcgcgaggat ggcaccggtt tcggccttga cgtggcgctg 300

tcaattgctc ttcctggcat cgacaaggca aaggcggagg agctggtgca ggccgcccac 360

atcgtttgcc cctattcgca cgcgacgcgg ggcaatctcg acgttcgcct gagcgtagcc 420

tga 423

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aattcgaatt catgccaatt ctttacacg 29

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aggcaagctt tcaggctacg ctcaggcg 28