



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0095231
(43) 공개일자 2012년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 9/52 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0014774
(22) 출원일자 2011년02월18일
심사청구일자 2011년02월18일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
이정섭
광주광역시 서구 풍암동 대주파크빌 202동 1305호
박정은
광주광역시 광산구 수등로258번길 10, 우미아파트 101동 201호 (신가동)
박종우
광주광역시 광산구 장수동 179
(74) 대리인
특허법인세신

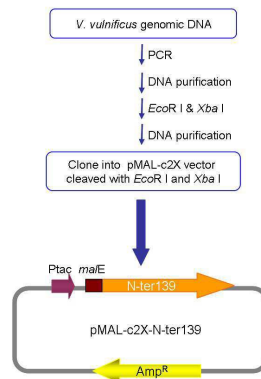
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 패혈증 비브리오균 유래의 재조합 융합 단백질과 그에 대한 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 패혈증 비브리오균(Vibrio vulnificus) 유래의 단백질 분해효소인 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위와 말토스가 결합되어 있는 재조합 융합 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것으로, 상기 본 발명의 재조합 융합 단백질에 대한 항체를 제작할 수 있으며, 제작된 항체를 이용하여 비브리오균의 감염여부를 진단할 수 있다. 또한 본 발명은 상기 항체를 포함하는 진단키트에 관한 것으로, 빠른 시간 내에 정확하게 감염 여부를 판단할 수 있는 방법으로 유용하게 임상적으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0064331
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자 지원사업 (지역대학우수과학자)
연구과제명	vEP 단백질분해효소에 의한 염증반응 매개인자의 유도발현기작
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0026037
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자 지원사업 (핵심연구-협동)
연구과제명	생물물리학-나노기반기술-세포생물학의 융합을 통한 세균 단백질분해효소의 염증유발기작
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2010.09.09 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

패혈증 비브리오균 유래의 단백질분해효소인 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위와 말토스가 결합되어 있는 재조합 융합 단백질로서, 상기 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위는 효소 활성 부위를 포함하지 않는 것인 재조합 융합 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위는 메탈로프로테아제의 아미노 말단 139 아미노산인 것인 재조합 융합 단백질.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위는 서열번호 1(N-ter139 펩타이드)의 아미노산 서열을 가지는 것인 재조합 융합 단백질.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위는 서열번호 1의 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 상동성을 가지는 것인 재조합 융합 단백질.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 상동성은 상기 메탈로프로테아제의 아미노 말단 139 아미노산에서 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 아미노 말단 및 카르복시 말단의 일부 결손에 의해 139 아미노산 보다 적은 수의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 재조합 융합 단백질.

청구항 6

제 1항의 재조합 융합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자.

청구항 7

제 6항의 재조합 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 담체 벡터 에 상기 재조합 유전자를 클로닝한 것인 재조합 벡터.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1에 도시된 개열지도를 갖는 플라스미드 pN-ter139인 것인 벡터.

청구항 10

제 7항의 재조합 벡터가 형질전환된 형질전환체.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균, 바실러스, 스트렙토마이세스, 슈도모나스, 프로테우스 미라빌리스, 스타필로코쿠스, 바실러스, 진균, 효모, 곤충세포, 식물세포 또는 포유동물인 것인 형질전환체.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균, 바실러스, 효모로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 형질전환체.

청구항 13

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 재조합 융합 단백질, 또는 제 11항 또는 제 12항의 형질전환체에 의해 생산된 재조합 융합 단백질과 교차반응하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 타입인 것인 항체.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 항체는 폴리클로날 타입인 것인 항체.

청구항 16

제 13항의 항체를 이용하여 비브리오균종의 감염을 진단하는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 진단 방법은 면역효소활성법, 항원-항체 응집법, 방사면역측정법, 형광면역측정법, 화학발광면역법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 진단방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 비브리오균종은 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 19

제 13항의 항체를 포함하는 비브리오균종 진단키트.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 진단키트는 면역효소활성법의 원리를 이용하는 것인 진단키트.

청구항 21

제 19항에 있어서, 상기 진단키트는 ELISA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 진단키트.

청구항 22

제 19항에 있어서, 상기 비브리오균종은 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 진단키트.

청구항 23

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 재조합 융합 단백질, 또는 제 11항 또는 제 12항의 형질전환체에 의해 생산된 재조합 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 패혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 패혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 25

제 23항에 있어서, 상기 백신 조성물은 면역 증강제를 추가로 포함하는 것인 패혈증 예방용 백신 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 패혈증 비브리오균 유래의 재조합 단백질과 그에 대한 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비브리오균은 인체에 감염되었을 때 패혈증, 위장염 및 설사증 등 다양한 증상과 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 패혈증의 경우 평균 122일의 짧은 잠복기를 거쳐 상처감염증, 원발성 패혈증을 유발하여 오한, 발열 등의 전신증상과 설사, 복통, 구토, 하지통증이 동반되면서 다양한 피부병변이 발생하는 등 사망률(40~50%)이 매우 높으므로 조기진단 및 신속한 치료가 매우 중요하다.

[0003] 패혈증 비브리오 균은 1976년 미국 질병통제센터(Centers for Disease Control; 이하 CDC로 약함)의 홀리스(Hollis)등이 11년 동안 사람에서 분리된 호염성 병원성 비브리오 균의 세균학적 성상을 처음 보고한 이후, 유당(lactose)을 분해하는 특징 때문에 유당 분해 비브리오(lactose-fermenting *Vibrio* 또는 Lac(+))라 명명되었다. 1979년 CDC의 블레이크(Blake)등은 CDC에 보고된 39명의 환자들의 자료를 역학적으로 분석하여 임상증상에 따라 원발성 패혈증(primarysepticemia)균과 창상감염(wound infection)균으로 분류하였다(Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C., N. Engl. J. Med. 300:1-6, 1979). 같은 해 파머(Farmer)는 새로운 종으로서 *Vibrio vulnificus*(vulnus=wound, ficus=forming)라 명명하였으며, 오늘에 이르고 있다(Farmer, J.J. III, Lancet 2:903, 1979).

[0004] *V. vulnificus* 패혈증은 잠복기가 짧고, 일단 발병하면 전격적으로 진행하여 효과적 항균제 치료 타이밍을 놓치기 쉽다. *V. vulnificus* 패혈증은 대부분 40대 이상(약 90~95%)의 남자(90% 이상)에서 발생하며, 정상인에서는 거의 볼 수 없고, 기저질환을 가지고 있는 환자들에서 주로 발병한다. 전 세계의 발생증례를 분석해보면 원발성 패혈증의 경우, 대부분의 환자들은 간장 질환과 음주력 등 만성질환을 가지고 있으며, 간장 질환으로서는 간경변, 만성간염, 간암 등이 주종을 이루고, 그외 당뇨병, 폐결핵, 만성골수염, 류마티스성 관절염 등의 기저질환이 확인되었다. 그러나 5% 이하에서는 특별한 기저질환을 찾을 수 없는 경우도 있다. 미국의 경우 당뇨병, 악성종양, 혈색소증(hemochromatosis), 지중해빈혈(thalassemia) 등의 빈도가 비교적 높게 나타난다. 최근에는 AIDS 환자들에서 *V. vulnificus* 패혈증의 발생보고가 나오고 있어, 미국 CDC에서는 AIDS 환자들에게 여름철에는 굴 등의 해산물을 생식하지 말 것을 권고하고 있다.

[0005] *V. vulnificus*에 의한 발병 기전에 관한 연구는 1980년 중반부터 본격적으로 시작되었다. 초기에는 주로 다른 비브리오 속들과는 달리 *V. vulnificus*가 패혈증을 잘 일으키는 이유와 원발성 패혈증이 주로 간장 질환이 있는 환자들에서 발생하는 이유를 구명하기 위한 연구가 진행되었다. 그 결과를 살펴보면, 어패류를 통해 섭취되어 장관에 이른 *V. vulnificus*는 장관내 점막질을 통과하여 장관 상피세포에 부착한 다음, 장관 상피세포를 파괴하고 장관 점막층으로 침입하여 혈관으로 들어가는 것으로 생각되고 있다. 간장 질환 등의 기저질환을 가지고 있는 감수성이 높은 환자들의 혈류로 들어간 *V. vulnificus*는 활발하게 증식함으로써 패혈증을 일으키게 된다(Linkous, D.A., Oliver, J.D., FEMS Microbial. Lett. 174:207-214, 1999).

[0006] 한편, 종래의 병원성 미생물 진단방법으로는 선택배지를 이용하여 배양한 후 세균의 성장 및 형태를 보고 감염여부를 판단하는 방법을 사용하였으며, 보통 pre-enrichment media, selective enrichment media, isolation on selective media를 사용하였고 생물학적 방법과 혈청학적 방법에 의해 추정적인 근거를 확인했다. 그러나 이러한 방법은 분석시간이 오래 걸리기 때문에 식품에서 살모넬라의 존재를 검출하기 위해 병원균에 대한 특이적 검출 방법과 보다 신속한 검출방법을 확립하기 위한 방향으로 ELISA를 기본으로 하는 항원-항체 반응실험, polynucleotide 또는 oligonucleotide probes를 사용하는 DNA hybridization assays와 PCR(polymerase chain reaction)을 통한 DNA 검출 기법 등의 많은 방법들이 개발되었다. 특히 PCR을 기본으로 특정유전자를 검출, 증폭하는 방법은 병원성 세균 탐색에 있어서 높은 특이성을 갖는 것으로 보고되고 있으며, radio-immunoassay, fluorescence labeled antibody assay, enzyme-link immunosorbent assays(ELISA)등과 같은 항체를 이용하는 면역분석법은 단백질 또는 다른 항원의 양을 정량하는 데 사용되는 특이성이 매우 민감한 분석 방법으로 소량의 시료로도 분석이 매우 용이하여 분자 생물학 및 의학적 진단 용도로 이미 널리 이용되고 있다. 그러나 PCR을 이용한 방법들도 기존의 검출방법에 비해 높은 검출특이성을 갖지만, 특정부위의 유전자를 증폭하는데 2시간~4시간이 걸리며, 항체를 이용하는 면역분석법은 단백질 분해효

소를 진단해야 할 경우 ELISA 키트 개발에 필요한 재조합 단백질이 불용화 형태로 발현되는 경우가 많고, 단백질 자체의 독성 때문에 항체 제작에 여러 가지 어려움을 겪는 등의 문제점이 있어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 패혈증을 일으키는 비브리오균으로부터 다량으로 분비되는 단백질 분해효소에 대하여 효소 활성화 부위를 포함시키지 않도록 재조합 융합 단백질을 제작함으로써 독성이 없는 항체를 생산할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 비브리오균종 유래의 메탈로프로테아제에 대하여 효소 활성화 부위를 포함시키지 않도록 아미노산 말단 부위를 포함하는 재조합 융합 단백질을 설계하고, 이 융합 단백질을 발현할 수 있는 미생물 시스템을 제작함으로써 본 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명의 재조합 융합 단백질 및 미생물 시스템을 이용하여 생산된 재조합 융합 단백질을 항원으로 하여 이에 대한 항체를 제작하였으며, 이를 이용하여 비브리오균종의 감염여부를 보다 신속 정확하게 감별할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) 유래의 단백질 분해효소인 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위와 말토스가 결합되어 있는 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 재조합 융합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자를 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하여 면역성 재조합 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 패혈증 비브리오균의 감염을 진단하는 진단 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 본 발명의 패혈증 비브리오균 유래의 재조합 융합 단백질 및/또는 상기 재조합 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 패혈증 예방용 백신 조성물 또는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 해결 수단, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용, 실시예 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) 유래의 단백질 분해효소인 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위와 말토스가 결합되어 있는 재조합 융합 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것으로, 상기 본 발명의 재조합 융합 단백질에 대한 항체를 제작할 수 있으며, 제작된 항체를 이용하여 비브리오균종의 유무를 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 재조합 융합 단백질(N-ter139) 생산을 위한 유전자 클로닝 단계를 도시한 것으로, PCR을 통해 420 bp 크기의 해당 유전자 부위를 증폭시키고 말토스 융합 단백질로 용해도가 높은 상태로 발현되는 발현 벡터에 EcoRI과 XbaI을 이용하여 클로닝하고, 재조합 플라스미드인 pN-ter139를 얻는 과정이다.

도 2는 본 발명의 항-N-ter139를 분리하는 과정을 도시한 것으로, 토끼에 3차 부스팅한 후 취득한 혈청을 N-ter139가 결합되어 있는 CNBr-activated sepharose 4 컬럼에 0.1 ml/min의 유속으로 흘려보낸 후 항원-항체 반응을 통해 선택적으로 결합한 항체를 제외한 단백질은 결합완충액[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl]

50 ml을 1 ml/min으로 흘려보내 제거한 후, 낮은 pH의 용출 완충액[100 mM CH₃COONa (pH 3.0), 500 mM NaCl] 50 ml을 0.5 ml/min의 유속으로 흘려보내줌으로서 분리해 낸 것이다.

도 3은 본 발명의 항원(N-ter139) 및 항체(항-N-ter139 항체)를 이용하여 ELISA 감도 측정 결과를 그래프로 나타낸 것으로, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 pg/ml의 N-ter139를 96 well plate에 부착시킨 후, 항-N-ter139 1차 항체와 anti-rabbit-HRP 2차 항체를 이용하여 측정 범위와 감도를 결정한 것이다.

도 4는 본 발명의 항체(항-N-ter139 항체)를 이용하여 사람의 임상가검물에서 주로 발견되는 9종의 비브리오균에 대한 검출 여부를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) 유래의 단백질 분해효소인 메탈로프로테아제의 활성부위의 아미노 말단 부위와 말토스가 결합되어 있는 재조합 융합 단백질에 관한 것이다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 재조합 융합 단백질을 코딩하는 재조합 유전자에 관한 것이다.

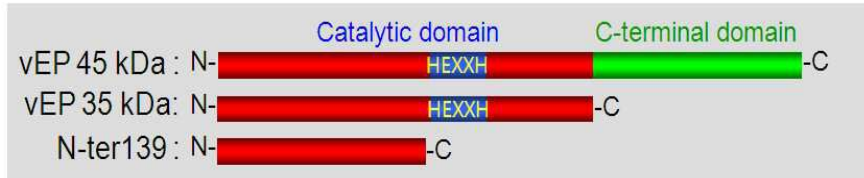
[0022] 비브리오는 슈도모나스목 스피리룸(나선균)에 속하는 세균으로, 그람 음성이며 하나 또는 여러 개의 편모가 있으며, 굽은 막대 모양을 하고 있다. 지금까지 34종이 알려져 있다. 세포가 길지 않지만 휘어져 있고 단립(單立)하거나 몇 개 연결되어 나선상이 된다. 몸의 한쪽 끝에는 1개 또는 여러 개의 편모가 나 있고, 이것으로 활발히 유영하여 움직인다. 그람 음성균으로써 야생종은 바닷물에 널리 분포하며, 담수와 토양에서도 많이 발견되는데 생활은 부생적(腐生的)이다. 사람이나 어류에서 병원성을 나타내는 것이 있는데, 병원성이 있는 대표 종으로는 비브리오콜레라균(*V. cholerae*)과 세균성 식중독으로 알려진 장염비브리오(*V. parahaemolyticus*)가 있다. 하기 표 1은 사람의 임상가검물에서 주로 검출되는 비브리오 균종으로 패혈증이나 호흡기 감염을 일으킨다.

표 1

세균명	오염원	질병	감염조건
<i>Vibrio vulnificus</i>	연안해수, 어패류	연조직감염, 패혈증	창상, 기초질환
<i>Vibrio mimicus</i>	사람, 어패류	연조직감염, 이감염, 패혈증	창상
<i>Vibrio fluvialis</i>	연안해수, 하천수	설사증, 위장염	
<i>Vibrio furnissii</i>	어패류		
<i>Vibrio hollisae</i>	연안해수, 어패류	설사증	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	연안해수	연조직감염, 이감염, 호흡기감염	창상
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	연안해수, 어패류	패혈증	기초질환
<i>Vibrio metschnikovii</i>	연안해수, 어패류	위장염, 패혈증	기초질환

[0024] 본 발명의 재조합 융합 단백질은 이러한 비브리오 균종에서 쉽게 분비되어 독성을 나타내는 단백질 분해 효소인 메탈로프로테아제(metalloprotease) 유래의 재조합 단백질에 관한 것으로, 메탈로프로테아제의 독성활성 부위가 포함되지 않도록 설계한 단백질 조각에 재조합 단백질이 불용화 상태로 발현되는 것을 방지하기 위하여 말토스를 결합시킨 형태인 것을 특징으로 한다.

[0025] 비브리오균의 메탈로프로테아제는 45 kDa 및/또는 35 kDa의 활성화 형태로 이루어져 있다. 본 발명의 재조합 융합 단백질은 특히 45 kDa 또는 35 kDa 부위의 아미노말단에 해당하는 아미노산 부위와 관련되어 있으며, 아미노산 및 유전자 서열정보는 동일한 특징을 가진다(하기 도 참조).



[0026]

[0027]

본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 재조합 융합 단백질은 비브리오 볼니피커스(*V. vulnificus*) ATCC29307의 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 부위 및 말토스를 포함하도록 제작되며, 이때, 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 139 아미노산 이후의 아미노산을 더 추가적으로 포함되도록 재조합 단백질을 제작할 경우 효소 활성 부위(독성을 나타내는 부위; 예컨대, 상기 도에서 독성활성을 나타내는 HEXXH motif에 해당)가 포함되므로, 상기 균주의 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 139 이하의 아미노산을 포함하도록 설계한다. 이때, 설계된 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 139 이하의 아미노산은 메탈로프로테아제의 다른 활성 형태인 35 kDa의 아미노말단 139와도 서열정보가 동일하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 재조합 융합 단백질은 상기 균주의 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단의 139 아미노산을 포함한다. 또한 본 발명의 재조합 융합 단백질의 구성이 되는 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단은 상기 균주의 메탈로프로테아제 45 kDa의 아미노말단의 139 아미노산에 대하여 70% 이상, 바람직하게는 80%이상, 더 바람직하게는 90%이상, 더 바람직하게는 95%이상, 더 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가진다. 예컨대, 상기 상동성은 상기 효소의 아미노말단의 139 아미노산에 대하여, 치환, 결손, 또는 삽입과 같은 변형을 갖는 것을 말하며, 이러한 변형에도 불구하고 본 발명의 재조합 융합 단백질의 구성인 상기 균주의 메탈로프로테아제 아미노말단 139 아미노산에 대하여 상기의 상동성을 가진다.

[0028]

[0029]

본 발명의 재조합 융합 단백질의 구성이 되는 비브리오 볼니피커스(*V. vulnificus*) ATCC29307의 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 139 아미노산('N-ter139'로 명명하기로 함)의 아미노산 서열 정보는 서열번호 1로서, 본 발명에 첨부되어 있다. 또한, 상기 N-ter139의 유전자 서열 정보는 서열번호 2로서, 본 발명에 첨부되어 있다.

[0030]

또한 본 발명의 재조합 융합 단백질의 다른 구성인 말토스는 메탈로프로테아제의 45 kDa의 아미노말단 부위로 효소를 재조합하면서 상기 단백질(효소)이 불용화 상태로 발현되는 것을 방지하기 위하여 융합한 것으로, 본 발명의 재조합 단백질의 제작 및 발현시 불용화되지 않는다면 굳이 말토스를 융합할 필요는 없다.

[0031]

본 발명은 또한 재조합 융합 단백질을 코딩하는 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0032]

본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 적제물을 말한다.

[0033]

상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0034]

본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 본 발명의 재조합 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 대장균 발현용 벡터로 pMAL-e2x를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pMAL-e2x벡터를 사용하여 본 발명의 재조합 융합 단백질인 말토스-N-ter139(말토스-비브리오균 유래의 메탈로프로테아제의 아미노 말단 부위)의 유전자 부분을 포함하는 DNA 절편을 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 "pN-ter139"라 명명하였다(도 1 참조).

- [0035] 본 발명은 또한 재조합 융합 단백질 또는 N-ter139을 코딩하는 본 발명의 유전자 및 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- [0036] 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [0038] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균[예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)], 효모[예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)]등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 재조합 벡터 pN-ter139를 대장균 균주 DH5 α에 도입하여 형질전환체를 제조하였다.
- [0040] 본 발명은 또한 본 발명의 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 배양하여 재조합 융합 단백질을 대량으로 획득할 수 있다.
- [0041] 상기 재조합 융합 단백질은 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 바람직하다.
- [0042] 상기 재조합 융합 단백질은 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 아미노산 서열의 일부에 얼마든지 변형이 있을 수 있다. 상기 변형은 결실, 삽입 또는 치환에 의한 변형을 의미한다.
- [0043] 본 발명은 또한 본 발명의 재조합 융합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.
- [0044] 상기 항체는 단일 클론 또는 다클론 항체를 모두 포함하나, 바람직하게는 다클론 항체이다.
- [0045] 상기 항체의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 제조하는 것이 바람직하다.
- [0046] 본 발명의 재조합 융합 단백질을 SPF(specific pathogen free)동물에 1 내지 수회 주사하여 면역화시킨다. 최종면역 후 일정 시간이 지난 뒤에 전채혈하여 혈청만을 취해 본 발명의 단백질에 대한 다클론성 항체를 얻는다.
- [0047] 상기 면역화 동물은 통상 면역화에 사용되는 동물이면 특별히 제한하지 않으나, 토끼인 것이 바람직하다. 상기 면역화를 위한 주사 횟수, 기간 및 투여방법은 당업자 수준에서 변형 또는 변경 가능하므로 특별히 제한하지 않는다.
- [0048] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 패혈증 비브리오균의 감염을 진단하는 진단 키트에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 진단 키트는 비브리오균종의 존재 여부, 즉 더 구체적으로는 항원으로서는 비브리오균이 생산해내는 단백질 분해 효소인 메탈로프로테아제의 존재 여부를 검출하는 분석방법에 사용될 수 있는 것

이면 어떠한 형태의 키트이든지 가능하다. 이러한 진단키트의 종류는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 본 발명의 항체를 포함한다면 당업자에 의하여 용이하게 재구성될 수 있는 것이다. 예컨대, ELISA 키트 및 면역 효소 방법을 이용하는 키트가 포함될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 키트로 검출할 수 있는 검출대상으로는 모든 비브리오균종, 바람직하게는 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*이며, 가장 바람직하게는 *Vibrio vulnificus*이다.

[0051] 본 발명은 또한 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) 유래의 메탈로 프로테아제 아미노말단 부위를 포함하는 재조합 융합 단백질 또는 서열번호 2에 기재된 염기서열을 갖는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 패혈증 예방용 백신 조성물, 또는 면역증강용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0052] 상기 재조합 융합 단백질 코딩 유전자는 발현 벡터에 삽입되어 있는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 도 1의 개열지도를 갖는 pN-ter139 이다.

[0053] 상기 패혈증은 패혈증 비브리오균종의 감염에 의해 유발된 것임을 특징으로 한다.

[0054] 상기 비브리오균종은 모든 균종의 비브리오이며, 바람직하게는 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*이며, 가장 바람직하게는 *Vibrio vulnificus*이다.

[0055] 또한, 상기 백신 또는 면역증강용 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 또는 면역증강제(아췌반트)를 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 면역원의 보관 및 환자에 대한 면역원의 투여를 용이하게 한다. 약학적으로

[0057] 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명에서 "면역증강제"는 면역 반응 형성에서 면역원을 보조할 수 있는 물질로, 항원의 생물학적 또는 면역학적 반감기 증가; 항원 제공 서열로의 항원 전달 개선; 항원 제공 세포에 의한 항원 프로세싱 및 제공의 개선 및 면역조절성 사이토카인의 생산 유도를 포함하는 하나 이상의 기작과 같은 여러 기작을 통해 작용할 수 있다.

[0059] 상기 면역증강제로 수산화알루미늄, 인산알루미늄 또는 기타 다른 알루미늄 염, 인산칼슘, DNA CpG 모티프, 모노포스포릴 지질 A, 콜레라 독소, 대장균 열불활화 독소, 백일해 독소, 뮤라밀 디펩타이드, 프로인트 불완전 아췌반트, MF59, SAF, 면역자극성 복합체, 리포솜, 생체분해성 미소구, 사포닌, 비이온성 블록 공중합체, 뮤라밀 펩타이드 유사체, 폴리포스파젠, 합성 폴리뉴클레오타이드, IFN- γ , IL-2, IL-12, 또는 ISCOMS 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 재조합 융합 단백질 또는 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하고, 면역 증강제 또는 약학적으로 허용 가능한 담체를 첨가한 약학적 조성물은 주사 형태로 투여할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 상기 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0061] 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 통상 성인(체중 60 kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20752 mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.

[0062] 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

[0063] 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은

아니다.

실시예 1

제조합 융합 단백질 N-ter139 및 제조합 플라스미드 pN-ter139의 제조

ATCC에서 구입한 비브리오 볼니피커스(*V. vulnificus*) ATCC29307 균주를 0.5%의 NaCl이 포함된 LB 배지에서 37℃로 12시간 배양한 후 비브리오 균을 원심분리를 통하여 수거한 다음 용출 완충액[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1M EDTA, 0.5% SDS, 50 ug/ml RNase A]을 첨가하고 37℃에서 1시간동안 유지한 후 단백질을 분해효소 K를 50℃에서 3시간 처리하고, 세포용출액에 포함된 단백질 및 세포부산물을 페놀 추출법을 통해 제거한 뒤에 에탄올 침전법을 사용하여 전체 게놈 DNA를 획득하였다. 상기 전체 게놈 DNA 및 하기의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였으며, 이를 통해 N-ter139 유전자 부분을 클로닝하였다. 이때 사용한 프라이머 염기 서열은 다음과 같으며 발현 벡터의 클로닝을 위하여 forward에는 EcoRI, reverse에는 XbaI 제한효소 사이트를 삽입하여 디자인하였다.

Forward : 5'-TCAGCCTTCGGAGCGCAAGCAGACGGCACTGGA-3'

Reverse : 5'-GACTCTAGAGGACAACGGATAGAAGGTAGACGC-3'

유전자 증폭을 위한 PCR 반응 조건은 94℃에서 30초 변성, 60℃에서 30초 결합, 72℃에서 40초 동안 신장반응을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 유전자 산물의 크기는 420 bp였으며, EcoRI와 XbaI를 이용하여 절단한 후 pMAL-c2X 벡터에 클로닝하여 대장균 DH5α에 형질전환하여 형질전환체를 얻었으며, 선별된 형질전환균주를 균주 은행에 기탁하였다. 또한 상기 형질전환 균주에서 제조합 플라스미드를 얻었으며 pN-ter139라 명명하였다(도 1).

실시예 2

제조합 융합 단백질 N-ter139의 발현 및 분리정제

실시예 1에서 제조한 제조합 플라스미드로부터 단백질을 발현시키기 위해 대장균 DH5α 균주를 이용하였다. 제조합 플라스미드 pN-ter139를 함유하고 있는 단일 클론을 100 mg/ml의 암피실린 항생제를 포함하고 있는 50 ml LB 배지에 접종하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 그런 다음, 10 ml의 배양액을 500 ml의 신선한 항생제 포함 LB 배지에 접종하고, A₆₀₀에서 0.5에 이를 때까지 배양하였다. 배양 후 단백질 발현 유도를 위해 0.3 mM의 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 37℃에서 4시간 동안 처리한 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 50 ml의 용출 완충액[(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 10% glycerol)]에 녹이고 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파괴하였다. 세포 파쇄물(cell lysate)을 10,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 모은 후, 제조합 플라스미드 특성상 말토스(maltose) 융합 단백질에 친화성을 띄는 amylose 컬럼에 상층액을 흘려보냈다. 그런 다음, 컬럼 부피의 10배의 완충액을 흘려보내고, 10 mM의 말토스가 포함되어 있는 용출 완충액을 이용하여 제조합 단백질을 분리해 내었다.

실시예 3

제조합 융합 단백질 N-ter139에 대한 항체 생산

분리한 말토스가 융합된 제조합 N-ter139 펩타이드를 펩트론(주)에 보내 항체 생산을 의뢰하였다. 토끼에 3차 부스팅 후 ELISA titration 결과 titer가 증가함을 확인하고 전체혈을 통해 항체를 획득하였다(표 2).

표 2

ELISA data

	1/1,000	1/10,000	1/100,000
Product	1.959	1.780	1.506
Control	0.199	0.086	0.075

[0074] 획득한 혈액으로부터 순수한 항-N-ter139 IgGs를 분리하기 위하여, 2 mg의 N-ter139를 CNBr-activated sepharose 4 컬럼에 결합시키고, 비 부착 결합 부위를 1 M ethanolamine으로 4시간 동안 상온에서 blocking한 후, 10배 부피의 결합 완충액[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl]을 이용하여 세척하였다. 그 후 토끼 혈청을 컬럼에 흘려보낸 후 결합 항체를 용출 완충액[100 mM CH₃COONa (pH 3.0), 500 mM NaCl]을 이용하여 분리하였다 (도 2).

실시예 4

[0075] **항-N-ter139 IgGs 감도 측정**

[0076] 분리한 항-N-ter139 IgGs의 감도를 측정하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 이때 사용한 1차 항체는 항-N-ter139 IgGs, 2차 항체는 발색을 위해 horseredish peroxidase가 부착되어있는 anti-rabbit IgGs를 사용하였다. 96 well plate에 다양한 농도의 N-ter139를 2시간 동안 상온에서 고정된 후 결합하지 않은 시료를 제거하고 PBS로 씻어내었다. 그 후 1차 항체를 1시간 동안 부착하고 부착되지 않은 항체를 PBS로 씻어낸 다음 발색을 위해 horseredish peroxidase가 부착되어있는 2차 항체를 1시간 동안 결합시키고 다시 결합하지 않은 항체를 PBS로 씻어내었다. 마지막으로 peroxidase의 기질을 첨가하여 효소-기질 반응을 통해 발색되는 색의 흡광도를 A₄₅₀에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 측정범위는 20 ~ 600 pg/ml 정도로 신속하고 간단하게 측정이 가능하였다 (도 3).

실시예 5

[0077] **비브리오균으로부터 분리되는 단백질 분해효소 측정**

[0078] 주로 인체 임상가검물에서 발견되는 비브리오균 9종(표 3)을 대상을 하여 각 균을 10 ml의 marine broth 배지에 접종하여 37℃에서 14 시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 농축한 후 동일량의 단백질을 96 well plate에 부착시킨 후 실시예 4에서 실시한 ELISA 감도 측정 방법을 이용하여 실제로 존재하는 단백질 분해효소의 양을 측정하였다(도 4).

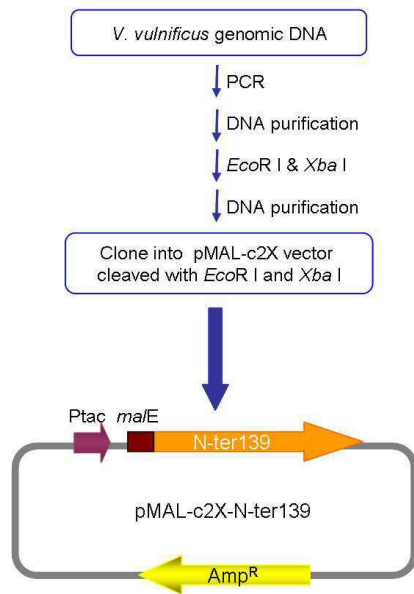
표 3

[0079]

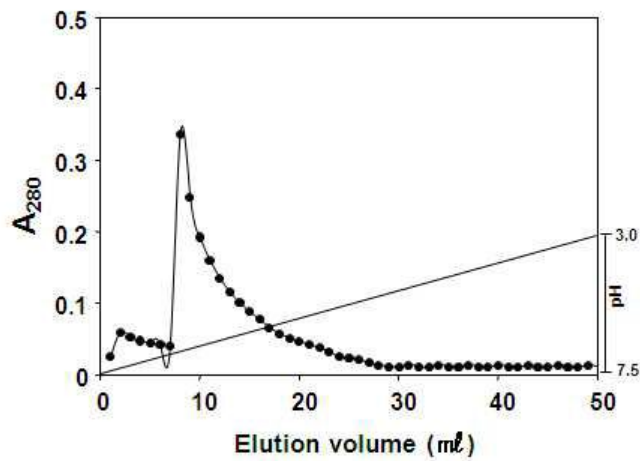
	세균명
대조예	배양배지
실험예 1	<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC29307
실험예 2	<i>Vibrio vulnificus</i> MO6-24/0
실험예 3	<i>Vibrio mimicus</i> KCCM 42257
실험예 4	<i>Vibrio fluvialis</i> KCCM 40827
실험예 5	<i>Vibrio furnissii</i> KCCM 41679
실험예 6	<i>Vibrio hollisae</i> KCCM 41680
실험예 7	<i>Vibrio alginolyticus</i> KCCM 40513
실험예 8	<i>Vibrio cincinnatiensis</i> KCCM 41683
실험예 9	<i>Vibrio metschnikovii</i> KCCM 41681

도면

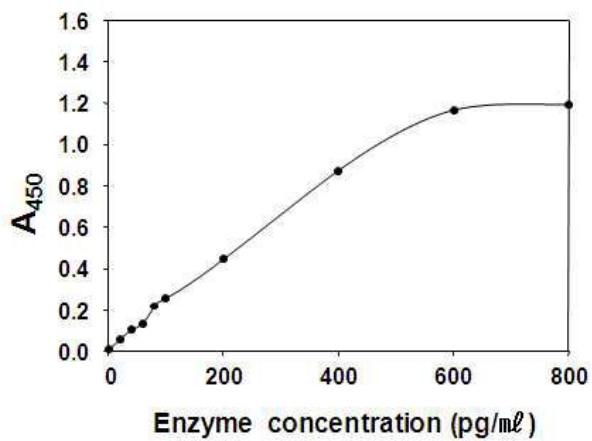
도면1



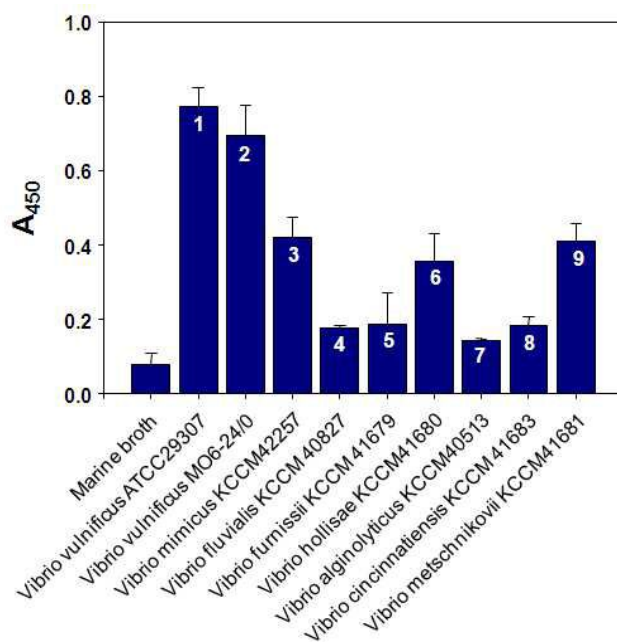
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> A recombinant protein from vubrio vulnificus, its antibody and use thereof
- <130> dp-2011-0016
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 139
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> N-ter139

<400> 1

Ala Gln Ala Asp Gly Thr Gly Pro Gly Gly Asn Ser Lys Thr Gly Arg

1 5 10 15

Tyr Glu Phe Gly Thr Asp Tyr Pro Ser Phe Val Ile Asp Lys Val Gly

20 25 30

Thr Thr Cys Thr Met Glu Asn Ser Val Val Lys Thr Val Asp Leu Gln

35 40 45

Asn Arg Thr Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Ser Tyr Ser Cys Pro Gly Ala

50 55 60

Ser Asn Tyr Asn Asp His Lys Ala Val Asn Gly Ala Tyr Ser Pro Leu

65 70 75 80

Asn Asp Ala His Tyr Phe Gly Lys Val Val Tyr Asp Met Tyr Lys Asp

85 90 95

Trp Met Asn Thr Ala Pro Leu Thr Phe Lys Leu Thr Met Arg Val His

100 105 110

Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Asn Ala Phe Trp Asp Gly Ser Ala Met Thr

115 120 125

Phe Gly Asp Gly Ala Ser Thr Phe Tyr Pro Leu

130 135

<210> 2

<211> 417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-ter139

<400> 2

gcgcaagcag acggcactgg acctggaggc aacagtaaaa cgggccgtta tgagtttggt 60

actgattacc caagctttgt catcgataaa gtcggaacga cttgtacgat ggaaaacagc 120

gtggtgaaaa cggtcgattt acaaaaccga acttcgggct caacagcgta cagctacagc 180

tgtccaggag ccagcaatta taacgatcac aaagcggtca acggcgcgta ttcgcctttg 240

aacgatgcac actacttcgg caaagtgggtg tatgacatgt acaaagattg gatgaacacc 300

gcaccgttga cgttcaagct gacgatgcgt gtccactaca gcagcaatta tgaaaatgcc 360

ttttgggatg gctctgcgat gacatttggc gatggtgcgt ctaccttcta tccgttg 417