

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0140265 (43) 공개일자 2014년12월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/74 (2006.01) A61K 39/112 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2013-0060851	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2013년05월29일	박용근 서울 도봉구 도봉로180나길 20, 101동 802호 (도봉동, 양우내안애아파트)	
심사청구일자 2013년05월29일	윤원석 서울 용산구 청파로 213, 이안프리미어 608호 (문배동)	
	김신연 서울 동대문구 제기로 131, 108동 703호 (청량리동, 한신아파트)	
	(74) 대리인 김순웅	

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라 및 이를 이용한 살모넬라 약독화 방법

(57) 요약

본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라 및 이를 이용한 살모넬라 약독화 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 살모넬라 균주는 스펙티노마이신에 의한 단백질 전사 이상 현상으로 거대화되고 운동성이 낮아지고 독성에 관여하는 유전자들이 결실되어 약독화된다. 따라서, 본 발명에 의하면 부작용을 최소화하면서 간편하고 경제적으로 살모넬라를 약독화하여 생백신을 제조할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스펙티노마이신 저항성 유전자는 aadA1인 살모넬라.

청구항 3

스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라; 및

약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 백신 조성물.

청구항 4

스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라를 스펙티노마이신이 포함된 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 살모넬라 약독화 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 스펙티노마이신 저항성 유전자는 aadA1인 살모넬라 약독화 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라 및 이를 이용한 살모넬라 약독화 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 스펙티노마이신에 의한 단백질 전사 이상 현상으로 거대화되고 운동성이 낮아지고 독성에 관여하는 유전자들이 결실된 약독화된 살모넬라 및 이를 이용하여 부작용을 최소화하면서 간편하고 경제적으로 백신을 제조할 수 있는 살모넬라 약독화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사람이나 가축에서 주요 질병으로 알려져 있는 살모넬라나 리스테리아, 부루셀라 및 결핵 병원균 등은 숙주에 침입하면 대식구나 호중구 및 임파구 등의 세포내에 생존하며 치료약이나 항체에 저항하여 치료가 어려운 것으로 보고되어 있다. 상기 질병의 치료에는 세포성 면역을 활성화시키는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다.
- [0003] 한편, 세포성 면역의 활성화에는 균체를 불활화시킨 사균 백신보다는 병원체를 약독화시킨 생균 백신이 효과적인 것으로 알려져 있다. 즉, 약독화된 생균 백신은 항체 반응에 추가하여 세포-매개된 면역원성을 유도할 수 있고, 주사기 감염 위험 없이 경구 투여가 가능하고 다중 점막 부위에 면역 반응을 유도할 수 있고, 생산 단가가 낮으며, 면역계에 재조합 항원의 운반을 위한 캐리어로써 이용이 가능하다.
- [0004] 따라서, 당업계에서는 다양한 약독화된 생균 백신을 제조하기 위한 방법이 개발되어 왔다. 예를 들어 유전자의 재조합 기술을 이용하여 병원성 유전자를 결실시키거나, 약품을 처리하여 플라스미드 등의 병원성 인자를 제거하거나, 영양 결핍 조건에서 병원균을 계대배양을 하여 약독화 변이 균주를 제조하여 왔다.
- [0005] 본 발명의 배경이 되는 기술로 한국등록특허 제97-010759호(1997.06.30)는 aro 유전자가 결실된 약독화된 살모넬라 변이균주를, 한국등록특허 제10-1146372호(2012.05.22)는 lon 유전자 및/또는 cpxR 유전자가 결실된 약독화된 살모넬라 변이균주를, 국제공개특허 W02007/106956호(2009.09.27)는 guaB 유전자가 결실된 약독화된 살모넬라 변이균주를 각각 개시하고 있다. 또한, 한국등록특허 제10-0568602호(2006.04.07)는 사이토카인 인터루킨 12 유전자로 형질전환된 살모넬라 균주를 포함하는 백신을, 한국등록특허 제10-1149872호(2012.06.27)는 호중구를 이용한 병원균의 약독화 방법을 개시하고 있다.
- [0006] 그러나, 상기와 같은 약독화 방법은 대부분 고도의 기술이 요구되고, 병원체가 원래 상태로 복귀하려는 특성이

있어 병원성이 회복될 가능성이 큰 문제점이 있다. 따라서 병원성이 회복되는 부작용을 최소화하고 간편하고 경제적으로 박테리아를 약독화할 수 있는 방법 내지 백신 제조 방법에 대한 요구가 계속하여 있어 왔다.

[0007] 한편, 스펙티노마이신은 아미노글리코사이드 계열 항생제의 일종으로 항산성균, 포도상구균, GRAM 음성균 등에 살균작용을 한다. 반면 연쇄상구균, 폐렴구균, 혐기성균, 진균 등에는 효과가 약한 특성이 있다. 이들의 효과 기전은 세균의 단백질합성을 억제하여 정균 작용을 도모하는 것으로 알려져 왔다.

[0008] 그러나, 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 박터를 이용하여, 병원성이 회복되는 부작용을 최소화하고 간편하고 경제적으로 살모넬라 균주를 약독화하고 백신개발에 이용하는 것에 대해 알려진 바는 없다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 97-010759호(1997.06.30)
 (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1146372호(2012.05.22)
 (특허문헌 0003) 국제공개특허 W02007/106956호(2009.09.27)
 (특허문헌 0004) 한국등록특허 제10-0568602호(2006.04.07)
 (특허문헌 0005) 한국등록특허 제10-1149872호(2012.06.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 스펙티노마이신 항생제의 단백질합성 억제에 의해 살모넬라균의 비정상적 분열이 유도되어 거대 해지고 운동성이 낮아지고 독성에 관여하는 유전자들이 결실되는 현상을 이용해서, 병원성이 회복되는 부작용을 최소화하고 간편하고 경제적인 새로운 차원의 살모넬라 약독화 방법 및 백신 제조방법을 구현하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 이용한 약독화된 살모넬라를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 스펙티노마이신 저항성 살모넬라 균주를 함유하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 이용하여, 부작용을 최소화하면서 간편하고 경제적으로 백신을 제조할 수 있는 살모넬라의 약독화 방법 및 백신 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 박터를 포함하는 살모넬라를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 박터를 포함하는 살모넬라; 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 박터를 포함하는 살모

넬라를 스펙티노마이신이 포함된 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 살모넬라 약독화 방법을 제공한다.

- [0019] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터가 형질도입된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 스펙티노마이신 저항성 유전자는 통상의 연구에서 스펙티노마이신을 이용해서 세균이 제거되는 것을 간섭하는 유전자로 저항성 기전을 가진 모든 유전자가 다 사용가능하다 (Identification of the novel spectinomycin resistance gene *spw* in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* of human and animal origin. Wendlandt S, Li B, Lozano C, Ma Z, Torres C, Schwarz S.; J Antimicrob Chemother. 2013 Mar 19 Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. Dione MM, Ikumapayi U, Saha D, Mohammed NI, Adegbola RA, Geerts S, Ieven M, Antonio M. J Infect Dev Ctries. 2011 Nov 15;5(11):765-75. ; Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. Koskiniemi S, Pranting M, Gullberg E, Nasvall J, Andersson DI. Mol Microbiol. 2011 Jun;80(6):1464-78. 등). 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 스펙티노마이신 저항성 유전자로 *aadA1*을 이용하였다(EMBL CAI40609.1; Liebert et al., 1999).
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 벡터는 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝 사이트를 가지고 있는 어떤 벡터도 사용할 수 있으며, 예를 들어 상기 벡터는 pcDNA3 벡터이다. 본 발명에 의한 구체적인 실시예에서는 상기 벡터는 스펙티노마이신 저항성 유전자로 *aadA1*을 포함하는 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR (INVITROGEN, USA) 벡터를 사용하였다.
- [0023] 본 발명에 있어서, pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR 벡터를 살모넬라에 형질도입하는 것은 당업계에서 통상 사용되는 형질도입방법에 의해 가능하며, 제조된 살모넬라는 스펙티노마이신 내성을 가진 살모넬라로 약독화된 균주로 작용한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 살모넬라는 그 종류에 특별한 제한이 있는 것은 아니며, 예를 들어 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위한 모균주로 병원성이 강한 살모넬라 타이피뮈리움 (*Salmonella typhimurium* UK 1)을 사용하였다.
- [0025] 본 발명에서 약독화란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하게 병원성 없애는 것을 말하며, 정상인에 투여 시 일정 기간 후 쉽게 사라져 버리게 되는 것을 의미한다.
- [0026] 또한 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라; 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 백신 조성물은 인체 또는 수의용으로 제형화되어 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통해서도 인체에 투여될 수 있다. 본 발명에서 백신 조성물은 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 경구투여할 수 있다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0028] 상기 백신 조성물은 살모넬라에 의한 질병 치료에 일반적으로 사용되는 약학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.
- [0029] 본 발명의 백신 조성물은 약학적 유효량으로 투여한다. 용어 '약학적 유효량'이란 백신효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 항원에 따라 달라지며, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있으며, 1회 내지 수회 투여 가능하다. 예컨대, 성인 기준으로 1회 10^5 세포수 내지 10^9 세포수로 투여할 수 있다.

- [0030] 또한, 본 발명에 의한 백신 조성물을 동결건조하여 보관하다가 백신 투여가 필요한 시기에 적당량의 물에 희석한 후 경구투여할 수도 있다. 살모넬라는 위산에 대한 내성이 있기 때문에 다른 조치가 필요하지 않다.
- [0031] 본 발명에 의한 백신은 살모넬라증 등 박테리아 감염 및 다른 질병(다가 백신의 경우)에 대해 인간, 수의학적 종을 포함 동물을 면역화시키는 데 매우 적합하다. 따라서, 식품 또는 사료를 포함하는 다양한 분야에서 응용이 가능하다.
- [0032] 또한, 본 발명은 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하는 벡터를 포함하는 살모넬라를 스펙티노마이신이 포함된 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 살모넬라 약독화 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 약독화 방법에 의해, 제조된 살모넬라는 기존의 살모넬라 대비 20배 이상 크기가 커지면 운동성이 낮아지고 살모넬라 독성에 관여하는 유전자들의 결실이 발생하여 약독화된(도 1 ~ 도 3 참조). 동물에 경구 투여시 100% 생존율 및 항체 반응 유도됨을 확인할 수 있었다(도 4 및 도 5 참조)
- [0034] 본 발명에 있어서, 바람직하게 살모넬라 균주는 24시간 스펙티노마이신(200mg/l, Sigma-Aldrich Co. LLC.) 첨가 LB배양액에서 배양한다.
- [0035] 본 발명은 또한 스펙티노마이신 저항성 살모넬라를 제조하는 단계를 포함하는 살모넬라 생백신 제조방법 및 이에 의해 제조된 백신 조성물을 제공할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 의한 살모넬라 약독화 방법 내지 백신 제조방법은 기존 세균에 대한 백신의 제조방법인 계대 배양에 의해 약독화된 돌연변이 유발이나 병독성 유전자의 조작에 의한 약독화 기법보다 시간상으로 비용 및 제조기법의 용이성 등 면에서 이점이 있는 살모넬라를 간편하게 신속히 약독화시킬 수 있는 기법이라 할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명에 의한 약독화 방법은 본 발명의 모델 균주인 살모넬라 균주 외에도 레지오넬라 등의 세포 기생성 세균과, 결핵 병원균, 폐렴균 등 전염병을 유발하는 다양한 병원균의 백신개발에도 응용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

- [0038] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현 벡터를 포함하는 살모넬라 균주는 기존의 살모넬라 대비 20배 이상 크기가 커지면 운동성이 낮아지고 살모넬라 독성에 관여하는 유전자들이 결실되어 약독화되고, 병독성이 제거되는 것으로 확인되었다.
- [0039] 따라서, 기존의 백신 개발법과 달리 본 발명에 의하면 병원성이 회복되는 부작용을 최소화하면서 간편하고 효율적으로 백신을 제조할 수 있어 백신개발 및 보조 예방제제와 관련한 의약산업에 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 병독성이 있는 살모넬라와, 본 발명의 약독화 방법에 따라 병독성이 있는 살모넬라에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 도입한 후 스펙티노마이신이 처리된 배양액에서 배양한 살모넬라의 전자현미경 비교 사진이다.
- 도 2는 세균의 운동성을 확인할 수 있는 배지에서 병독성이 있는 살모넬라와, 본 발명의 약독화 방법에 따라 병독성이 있는 살모넬라에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 도입한 후 스펙티노마이신이 처리된 배양액에서 배양한 살모넬라의 운동성을 비교한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 병독성이 있는 살모넬라와, 본 발명의 약독화 방법에 따라 병독성이 있는 살모넬라에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 도입한 후 스펙티노마이신이 처리된 배양액에서 배양한 살모넬라에서 병독성에 관련된 유전자의 변화를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 병독성이 있는 살모넬라와, 본 발명의 약독화 방법에 따라 병독성이 있는 살모넬라에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 도입한 후 스펙티노마이신이 처리된 배양액에서 배양한 살모넬라를 마우스에 각각 경구

투여한 후에 생존율을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 약독화 방법에 따라 병독성이 있는 살모넬라에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 도입한 후 스펙티노마이신이 처리된 배양액에서 배양한 살모넬라를 2주 간격으로 10^5 cfu/100ul씩 경구투여 후 항체 생산을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] <실시예 1: IL-4 siRNA를 포함하는 유전자 발현벡터를 포함하는 살모넬라 균주의 제작>

[0043] 먼저, 병독성이 있는 살모넬라 균주 (*Salmonella typhimurium* UK1)를 루리아 별테니(Luria Bertani) 배지에서 37°C 배양하였다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현벡터를 형질도입하기 위하여, 상기 살모넬라 균주를 다시 100mL의 양으로 24시간 배양한 후 파장 600nm의 광학흡광도(O.D.600) 및 0.7을 나타내는 배양농도에서 세균을 5500rpm의 속도로 원심분리하였다.

[0044] 상기 원심분리 후 바닥에 가라앉은 세균만을 수집하여 배양부피와 동일한 부피의 차가운 증류수로 희석하였다. 상기 희석시킨 세균을 다시 상기와 동일한 방법으로 원심분리하여 2mL의 차가운 20% 글리세롤 증류수에 희석한 다음, 또다시 원심분리의 과정을 거쳐 수득한 세균을 100μl의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30μl(2μg)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현 벡터 플라스미드인 pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR 벡터 (INVITROGEN, USA)를 30μl(2μg) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다.

[0045] 다음, 살모넬라 균주를 24시간 스펙티노마이신 (200mg/l, Sigma-Aldrich Co. LLC.) 첨가 LB배양액에서 배양하였다.

[0046] 제작된 재조합 살모넬라 균주의 특성을 확인하기 위해서, 전자현미경으로 살모넬라의 변화를 관찰하였고 그 결과 스펙티노마이신 저항성 유전자 발현 살모넬라를 스펙티노마이신 배양액에서 배양 후 균주가 거대해지는 현상을 확인하였다 (도 1).

[0047] <실시예 2: 본 발명에 의해 형질도입 살모넬라 균주의 약독화 확인>

[0048] 상기 실시예 1에서 제조된 살모넬라의 약독화 여부를 확인하기 위해, 세균의 운동능력을 확인할 수 있는 배지 (Motility Test Medium-M1132/기산바이오텍)에서 거대해진 스펙티노마이신 처리 살모넬라의 운동기능이 저하됨을 확인하였다 (도 2).

[0049] 또한 동시에 살모넬라의 병독성에 관련된 HilA, HilC, HilD, InvF, avrA 등의 유전자의 발현이 감소하였음을 확인하였다 (도 3).

[0050] <실시예 3: 동물모델에서의 본 발명에 의한 살모넬라의 안전성 확인>

[0051] 6-7주령의 BALB/C 마우스에 상기 실시예 1에서 제조된 스펙티노마이신 처리 살모넬라 균주를 2주 간격으로 10^5 cfu/100ul씩 경구투여하여, 정상 살모넬라 균주와 스펙티노마이신 처리 살모넬라균주의 생존율을 비교하였다.

[0052] 그 결과 정상 살모넬라의 경우 치사율이 100%인 반면, 본 발명에 의한 스펙티노마이신 처리 살모넬라의 경우 100% 생존율을 보여주었고 (도 4) 항체반응도 유도됨을 확인할 수 있었다(도 5).

[0053] 이상 상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명이 제공하는 스펙티노마이신 저항성 유전자를 발현하고 스펙티노마이신 배양액에서 제조된 살모넬라 균주는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주의 특성을

보이며 이는 백신으로 활용될 수 있음을 보여준다.

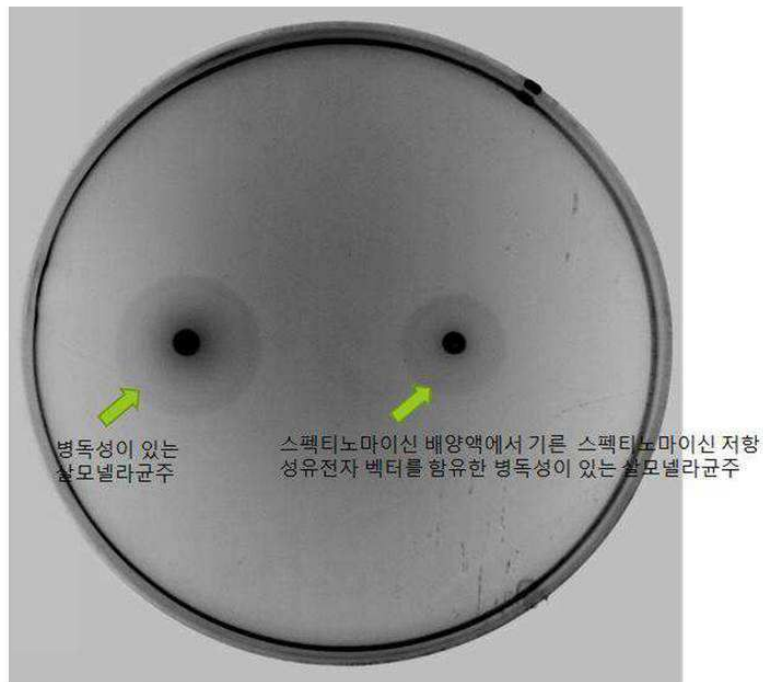
[0054] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

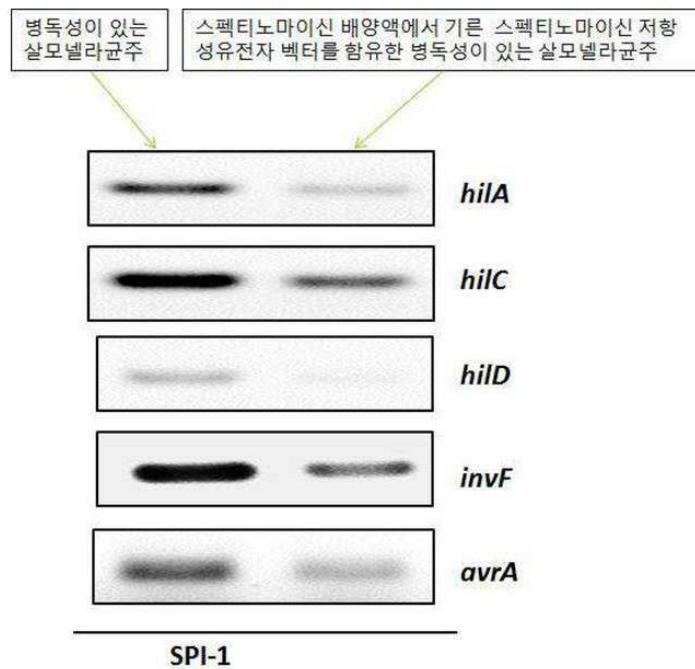
도면1



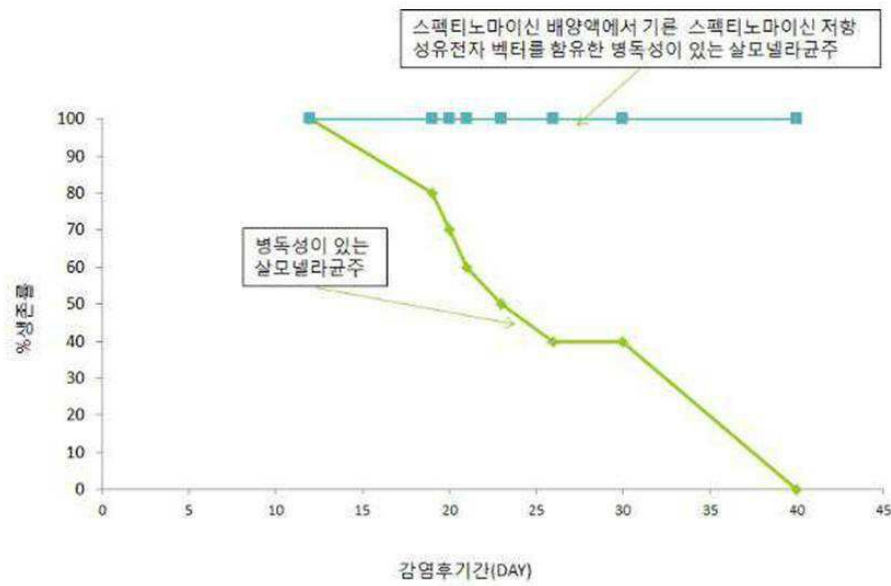
도면2



도면3



도면4



도면5

