



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0034940
(43) 공개일자 2019년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/04 (2013.01)
A61K 2039/522 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0123571
(22) 출원일자 2017년09월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
전보영
강원도 원주시 단구로75번길 10-1(일산동)
(74) 대리인
이재영, 특허법인 정안

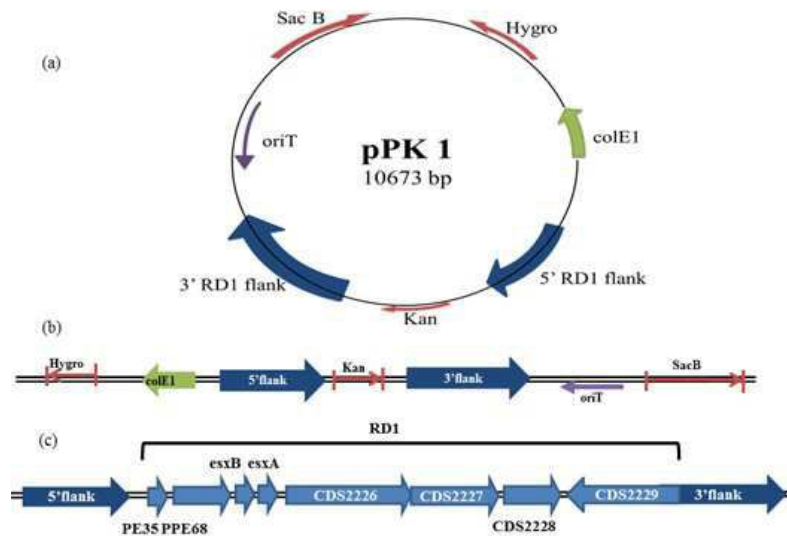
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 RD1 유전자가 제거된 변이체 및 이를 포함하는 동물용 백신용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사슴 및 동물 결핵병의 원인균인 마이코박테리움 보비스에서 RD1 유전자가 제거된 변이체 및 이를 포함하는 백신용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 사슴 결핵병 원인균인 마이코박테리움 보비스의 주 병원성 부위인 RD1 부분을 pPK1 벡터를 이용하여 제거함으로써 마이코박테리움 균주의 감염력, 성장율을 감소시킨 약독성 마이코박테리움 보비스 균주를 제공할 수 있으며, 이러한 마이코박테리움 보비스는 사슴 결핵병 예방에 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A61K 2039/552 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 314025-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농림축산식품연구개발사업

연구과제명 한국형 사슴결핵 예방백신 개발 및 유효성 평가

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2014.07.29 ~ 2017.07.28

명세서

청구범위

청구항 1

RD 부분 유전자가 결실된 변이체를 포함하는 결핵 백신용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

RD 부분은 RD1 부분인 백신용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 결핵 백신용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

인간을 제외한 동물용도로 사용되는 결핵 백신용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

변이체는 마이코박테리움 유래인 결핵 백신용 조성물.

청구항 6

RD 부분 유전자가 결실된 변이체.

청구항 7

제 6항에 있어서,

RD 부분은 RD1 부분인 변이체.

청구항 8

제 6항에 있어서,

RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 변이체.

청구항 9

제 6항에 있어서,

변이체는 마이코박테리움 유래인 변이체.

청구항 10

마이코박테리움 보비스에 RD1을 결실시키기 위한 벡터를 주입하는 단계; 및

형질전환된 마이코박테리움 보비스 균주 중 RD1 이 제거된 균주 선별하는 단계를 포함하는 약독화된 마이코박테리움 보비스를 제조하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 방법.

청구항 12

RD 부분 유전자가 결실된 변이체로 결핵 백신용 조성물을 제조하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항을 인간을 제외한 동물에 투여하여 백신화시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] RD1 유전자가 제거된 변이체 및 이를 포함하는 동물용 백신용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵균은 1882년 독일 미생물학자 로버트 코흐에 의하여 처음으로 발견되었으며 현재까지 약 150여종의 마이코박테리움이 알려져 있으며 이중에서 마이코박테리움 투버쿨로시스는 사람에게, 마이코박테리움 보비스는 소를 비롯한 주로 반추동물에서, 마이코박테리움 애비움은 닭 등 조류에서 그 병원성이 알려져 있다. 세계 인구의 1/3이 결핵균에 감염되었다고 추정되고 있으며, 동물에서는 전 세계적으로 어느 정도 감염이 이루어져 있는지에 대해서는 정확하게 알려진 것이 없으며 지역에 따른 감염 축종에 대해서만 보고되고 있다.

[0003] 가축 결핵병 살처분으로 인한 보상금 지급에 따른 세금의 과대손실 방지 및 가축전염병의 안정적 방어 및 사람과 동물에서 동시에 발생하는 인수공통 전염병 중에서 아주 오랜시간 동안 사람에 영향을 미치는 결핵병 예방을 위해서는 동물에서는 예방이 우선시 되어야 하며 국내에서는 가장 발생율이 높은 사슴에 대한 결핵병 예방하기 위한 그 필요성이 제기되고 있다. 이에 과학적 기술을 기반으로 한 병원성을 완전히 제거하면서도 면역원성이 강한 사슴 및 가축 결핵병 백신이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 RD 부분 유전자가 결실된 변이체 및 이를 포함하는 결핵 백신용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, RD 부분 유전자가 결실된 변이체로 결핵 백신용 조성물을 제조하는 방법과, 상기 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여 백신화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0006] 출원서 내 특별한 정의가 없으면 본 출원서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0007] 본 발명에서 "백신"은 불활화 백신과 생균 백신으로 나눌 수 있는데 현재 사용되어지고 있는 대부분의 백신은

과학적 기술을 토대로 생산, 보급되고 있으나 사람 결핵병 백신으로 사용되고 있는 BCG는 생균 백신일 뿐만 아니라 과학적 기술을 기반으로 하는 것이 아닌 장기간 인공배양 으로 인한 병원성 감소로 인하여 사용되는 것이며, 현재 생산되는 여러 가지 BCG 는 자연적 병원성 감소 균주에 일부 유전자를 결손 시킨 것 들이다. BCG 를 이용한 결핵병 생균백신에 대한 연구는 일부 국가에서 연구가 활발히 이루어지고 있으나 이는 사람에게 사용되어지는 것이며, 가축에서는 아직도 사용되지 않고 있는 실정이며 뉴질랜드 등 일부 국가에서는 사슴에 한하여 사용하고 있으나 BCG 가 자연적으로 병원성이 감소 된 것으로 백신용도로 사용하기 때문에 BCG의 효능에 대해서는 아직도 토론의 여지가 많을 뿐 아니라 국내 축산 현장에 부합되느냐 하는 문제도 안고 있다.

[0008] 본 발명의 백신 조성물은 또한 수의학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. "수의학적으로 허용 가능한 담체"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항원보강제, 안정제, 희석제, 보존제, 항균제 및 항진균제, 등장성 작용제, 흡착자연제 등을 포함한다. 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 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. 또한, 본 발명의 백신용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 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 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 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.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 "인간을 제외한 동물"은 포유류 또는 조류인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 "주입"은 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기에서 "주사" 또는 "투여"는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라 서로 백신의 투여량이 본 발명의 백신용 면역증강제는 비경구, 점막(경구 및 비강 등) 및 경피성 경로에 의한 백신 투여시 함께 사용할 수 있다.

[0010] 본 발명에서 "결핵(병)"은 주로 폐에 병변을 일으키는 것으로 많이 알려져 있으나 결핵균이 혈액을 따라 흐르면서 생체 조직에서나 정착하여 질병을 야기하는데 림프구에 정착할 경우 결핵성 림프절 종양 또는 림프염, 관절에 정착할 경우 결핵성 관절염, 간에 정착할 경우 결핵성 간염 등으로 불리우고 있다. 결핵균은 일반세균과는 달리 세포내 기생하는 특성을 가지고 있어 일반 항생제로는 그 치료가 불가능에 가까운 정도로 매우 힘들뿐만 아니라 항생제 사용이 매우 제한적이다. 결핵균은 세균벽에 특수하게 지질층을 가지고 있기 때문에 일반 세균을 염색하는 그람염색법으로는 염색이 되지 않아 항산성 염색으로 염색이 되며 굳이 논하자면 그람 양성균에 해당한다고 하겠다. 결핵병에 감염되면 항생제 복용을 최소 6개월 이상 지속해야 하는 등 치료가 매우 어렵다. 사람의 경우에는 항생제 복용을 통하여 치료를 도모하지만 동물의 경우 현재까지 전 세계적으로 치료를 통한 동물결핵병을 관리하는 국가는 하나도 없으며 다만 양성 동물로 판정된 경우 살처분 또는 도태를 통한 결핵병 관리를 하고 있다. 그러나 아프리카 및 아시아 일부 국가에서는 소를 포함한 반추동물에 감수성이 높은 마이코박테리움 보비스가 사람 결핵병소에서 발견되기도 한다. 우리나라에서 동물의 결핵병은 보상금 지급을 통한 살처분으로 동물 결핵병을 관리하고 있다. 동물 결핵병 관리는 백신 접종을 통한 예방이 아니고 양성 동물에 대한 살처분으로 개체수 개체수 감소를 통하여 관리하기 때문에 어떻게 확산되는지 알 수가 없는 실정이다. 사슴의 경우 2009년부터 2013년 까지의 양성율을 보면 검사 농장에 대해서는 99 %의 양성율을 보이고 검사두수에 대한 양성율은 57%이 이르는 등 매우 높은 수치를 보이고 있으며, 역학적으로 보면 사슴 결핵병 발생 인근 지역에서는 소 결핵병 발생도 높은 편에 속한다. 사슴 결핵병은 2010년도를 정점으로 줄어든 듯한 경향을 보이는데 이는 살처분 보상금을 시가 100%에서 60%로 낮춘 것이 원인이라고 할 수 있다.

[0011] 본 발명에서 가축을 포함한 "동물 결핵병"은 사람과 달리 임상적으로 진단하기 어려울 뿐만 아니라 정기 검진

대상 질병이 아니며 다만 젖소에서는 우유를 통한 사람으로의 결핵병 감염 차단 및 우유 위생을 위하여 1년에 1회 이상 검사를 의무화하고 있으나 다른 축종에 대해서는 의무화 되어 있지 않고 2017년 현재 한우에 있어서도 농장간 거래 한우에 한하여 1년 이하 소에 대하여 거래 전 결핵병 검사를 의무화 하고 있으나 사슴에서는 아직도 결핵병 검사는 의무사항이 아니다. 국내 축산업의 형태는 집단화, 공장화, 산업화 하는 경향을 보임으로써 전염병 발생시 살처분 보상금이 상상을 초월할 정도로 많아지고 있으며 2010년-2011년 구제역 발생시의 경우 살처분 보상금이 2조원을 초과하였다. 또한 대규모 살처분으로 인하여 국내 축산물 가격 변동에도 막대한 영향을 미치고 있어 경제적 측면, 질병방어 측면에서 백신 접종을 통한 질병차단의 필요성이 대두되고 있는 실정이다. 현재 전 세계적으로 결핵병 예방백신으로는 사람에 한정적으로 비시지(*Bacillus Calmette -Guerin*)가 유일하게 일부지역에서 사용되고 있다. 비시지는 소 결핵균으로 알려진 마이코 박테리움 보비스를 글리세린 감자배지에서 13년간 1173번 계대 배양하는 과정에서 인공적 환경에서 자연적으로 병원성이 약해진 생독백신이다. 현재 백신으로 사용되고 있는 BCG는 13 종류가 있으며 우리나라에서는 주로 덴마크에서 생산하는 대니쉬 균주를 사용하고 있으며 일부 도쿄 균주를 사용하고 있으나 동물에서는 백신을 사용하지 않는다. 비시지는 사람에게 사용되어지고 있는 백신이며 가축에게는 아직도 사용되지 않고 있다. 그러나 가축의 사육형태가 대형화, 집단화 되면서 전염병이 발생할 경우 대규모로 발생하는 경향을 보인다는 것을 우리는 구제역과 조류인플루엔자 발생을 통하여 경험하였다.

[0012] 본 발명에서, 사람에 사용되는 결핵병 백신은 마이코박테리움 보비스를 장기간 인공적으로 계대 배양하여 병원성이 소실된 마이코박테리움 보비스 BCG를 사용하고 있어 사람의 개체에 따라 병원성이 회복 될 수도 있다. 또한 마이코박테리움 보비스 BCG에 대하여 어떤 부분이 완전히 소실되고 어떤 부분이 회복되는지에 대해서는 현재 여러나라에서 연구중에 있는 사안이며 마이코박테리움 보비스 BCG의 효능은 0-80% 로 지역에 따라 그 효능 편차가 매우 크게 나타나는데 이는 백신의 면역원성과 관계가 있는 것으로 보인다. 한편, 동물에서는 주로 분리되는 결핵균이 마이코박테리움 보비스인 관계로 마이코박테리움 보비스 BCG를 동물용 결핵병 백신으로는 뉴질랜드의 일부 축종을 제외하고는 전세계적으로 사용되지 않고 있다.

[0013] 본 발명에서, "RD(Regions of Difference)" 부분은 결핵병을 일으키는 마이코박테리움 균주는 Regions of Difference(RD) 부분으로 균주 종류에 따라 각 부분들이 존재 하기도 하고 결손되어 있기도하며 각 부분에는 병원성과 균주 생존에 필요한 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 마이코박테리움 튜버쿨로시스와 마이코박테리움 보비스 야생 균주는 RD 1이 존재하지만 마이코박테리움 보비스 비시지에는 RD 1 부분이 존재하지 않는다. 마이코박테리움 균주의 RD 부분에서도 RD1 부분은 병원성을 발현하는 유전자(Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878, Rv3879c)가 포함되어 있다. 이 중에서도 CFP-10, ESAT-6 유전자가 병원성과 면역성에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 상기와 같이 동물에 감염시 결핵병을 유발하는데 밀접한 관계가 있는 RD 1 부분을 제거 약독화 된 마이크로박테리움 보비스 생균 백신을 제조하고자 본 발명을 계획하게 되었다. 본 발명자들은 RD 1 부분을 제거하기 위하여 다운스트림 RD1 플랭크와 업스트림 RD1 플랭크 사이에 카나마이신 카세트가 삽입되어 있는 벡터에 히그로마이신 카세트를 더 삽입함으로써, RD 1 부분을 제거하되, 선별 마크로써 항생제 히그로마이신을 사용할 수 있도록 제작된 pPK1 벡터를 사용하였다. 사슴에서 분리한 마이코박테리움 보비스 야생 균주 1×10^8 개/ml, 400ul와 카나마이신 저항 대장균에서 추출한 pPK1 벡터함유 플라스마 DNA 농도 1 ug/ul, 4 ul를 직경 2mm 카세트에 넣고 전기자극기로 2,500v에서 25초간 자극하여 pPK1 벡터를 마이코박테리움 보비스 야생 균주에 삽입하여 RD1 부분을 제거하였다. 상기와 같이 제조된 마이코박테리움 보비스 약독화 균주는 야생 균주와 비교할 때 병원성이 현저하게 감소하였다.

[0014] 일 구체예에서, RD 부분 유전자가 결실된 변이체를 포함하는 결핵 백신용 조성물을 제공한다. 상기 구체예에서, RD 부분은 RD1 부분인 백신용 조성물이고, RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 결핵 백신용 조성물이며, 인간을 제외한 동물용으로 사용되는 결핵 백신용 조성물이며, 변이체는 마이코박테리움 유래인 결핵 백신용 조성물을 제공한다.

[0015] 일 구체예에서, RD 부분 유전자가 결실된 변이체를 제공한다. 상기 구체예에서, RD 부분은 RD1 부분인 변이체를 제공하고, RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876, Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 변이체를 제공하며, 변이체는 마이코박테리움 유래인 변이체를 제공한다.

[0016] 일 구체예에서, 마이크로박테리움 보비스에 RD1을 결실시키기 위한 벡터를 주입하는 단계; 및 형질전환된 마이코박테리움 보비스 균주 중 RD1 이 제거된 균주 선별하는 단계를 포함하는 약독화된 마이코박테리움 보비스를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 구체예에서 RD1 부분은 Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6, Rv3876,

Rv3878 및 Rv3879c로 구성된 유전자로 선택된 어느 하나 이상인 방법을 제공한다.

[0017] 일 구체예에서, RD 부분 유전자가 결실된 변이체로 결핵 백신용 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 또한 상기 결핵 백신용 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여 백신화시키는 방법을 제공한다.

[0018] 하기의 실험에 및 실시예들은 본 발명의 내용을 설명하나, 본 발명의 내용이 이에 한정된 것은 아니다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 RD 1 부분이 제거된 새로운 마이코박테리움 보비스 균주를 제공함으로써 사슴을 포함하는 동물의 결핵병 생균 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 RD1 부분이 제거된 벡터에 대한 전략적 도식을 나타낸다.

도 2는 공여 벡터인 pPK1 벡터지도도를 나타낸다.

도 3은 pPK1 벡터에 대한 플라스미드 DNA 전기영동 사진이다.

도 4는 RD1 제거된 마이코박테리움 보비스 균주, 마이코박테리움 보비스 야생 균주, 마이코박테리움 보비스 BCG 감별 사진이다.

도 5는 야생 균주 및 BCG 균주와의 감별을 위한 PCR 반응 도식이다.

도 6은 마이코박테리움 보비스 야생 균주, BCG 균주 마이코박테리움 투버쿨로시스 약독화 균주 및 RD 1 결실 마이코박테리움 보비스 균주에 대한 병원성 동물실험 중 접종 2주차 비장 사진이다.

도 7은 마이코박테리움 보비스 야생 균주, BCG 균주 마이코박테리움 투버쿨로시스 약독화 균주 및 RD 1 결실 마이코박테리움 보비스 균주에 대한 병원성 동물실험 중 접종 5주차 비장 사진이다.

도 8은 마이코박테리움 보비스 야생 균주 및 균주 및 RD 1 결실 마이코박테리움 보비스 균주에 대한 성장률 실험에 대한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

[0021] 마이코박테리움 보비스 야생 균주 RD1 제거

[0022] 1-1. 사용 균주 및 플라스미드

[0023] RD 1을 제거하고자 하는 균주로는 마이코박테리움 보비스 야생 균주 충주30(Mycobacterium bovis Wildtype Chungju30, 국내에서 사슴과 소에서 분리된 마이코박테리움 보비스에 대한 VNTR (variable number tandem repeat)기법을 이용한 분자유전학적 연구에서 국내에서 주된 마이코박테리움 보비스 유전형으로 조사됨)을 사용하였고, RD 1을 제거하기 위해 접합(conjugation)되는 클로닝하기 위한 균주로는 Escherichia coli DH5a(Sherman Lab., Seattle, USA)을 사용하였으며, 마이코박테리움 보비스 야생 균주를 접합하기 위한 벡터는 pPK1(미국 감염병연구센터, 시애틀)을 사용하였다.

[0025] 1-2. 배지

[0026] 마이코박테리움 보비스를 배양하기 위해 사용된 배지는 OADC(Oleic acid, Bovine Albumine Fraction V, Dextrose, Catalase) 10%(v/v), 글리세린 0.2%(v/v), Tween 20 0.05%(v/v), 피브르산 나트륨(Sodium pyruvate) 40mM을 첨가한 7H9 broth(BD, USA)로 37℃, 200rpm의 조건으로 진탕배양하였다. 선별배지로는 0.005% 히그로마이신 및 10% 수크로스를 함유한 7H10 아가(BD, USA)를 사용하였으며, 37℃에서 4-5주간 배양하였다.

[0028] 1-3. 대장균 DH5a로 부터 pPK1 벡터추출 및 확인

[0029] pPK1 벡터가 대장균에 잘 삽입되어 본 실험에 사용할 수 있는지를 확인하기 위하여 pPK1 벡터가 삽입된 대장균을 LB 배지(BD., USA)에 넣어 진탕 배양기에서 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 플라스마 DNA 추출 키트(Cosmogenetech, Seoul, Korea)를 사용하여 제조자 방식에 따라 플라스마 DNA를 추출한 후, 6X 색소를 섞은 후 0.8% 아가로스 겔을 이용, 100V, 1시간으로 전기영동하여 10.6Kb에서 밴드를 확인하였다

[0031] 1-4. pPK1 벡터를 마이코박테리움 보비스 야생 균주에 삽입 및 RD1 제거

[0032] 마이코박테리움 보비스 야생 균주를 1 X 10⁸개/ml 정도 배양하고, pPK1 벡터가 들어있는 플라스마 DNA 농도를 1 ug/ul 으로 조절한 후, 400ul의 야생 균주와 4 ul의 플라스마 DNA를 직경 2mm 큐벳에 넣고 전기자극기 마이크로펠스(Bio-rad, USA)를 이용하여 2,500v에서 2.5초간 자극하여 pPK1 벡터를 마이코박테리움 보비스 야생 균주에 삽입하여 RD1 부분을 제거하였다.

실시예 2

[0034] 2-1. pPK1 벡터삽입균주 선별

[0035] pPK1 벡터가 삽입되어 RD1이 제거된 마이코박테리움 보비스 균주를 선별하기 위해서 전기자극으로 벡터를 삽입한 균주 400 ul 에 10% OADC, 0.05% Tween 20이 첨가된 7H9 broth(BD, USA) 800 ul를 첨가하여 200rpm 속도로 진탕 배양하였다. 37℃에서 3시간 동안 배양한 후 0.005% 히그로마이신, 10% OADC, 0.2% 글리세린 0.05%, Tween 20을 첨가한 7H10 배지(BD, USA)에서 37℃, 4-5 주간 배양하였다. 히그로마이신 첨가 7H10 배지에서 성장한 마이코박테리움 보비스 콜로니로부터 각각 게놈 DNA를 추출하여 연쇄중합효소반응(PCR)을 이용하여 RD1이 제거되었는지를 확인하였다. 만약 DNA 검사에서 RD1이 제거된 균주와 야생 균주가 혼합되어 있을 경우에는 10% 수크로스가 첨가된 7H10 배지(BD, USA)에서 37℃, 4-5주간 배양하였으며 다시성장한 마이코박테리움 보비스 콜로니 각각에서 게놈 DNA를 추출하여 연쇄중합효소반응(PCR)을 이용하여 증폭시킨 다음 2% 아가로스에서 100V, 50분간 전기영동하여 1.45Kb에서 밴드가 형성되어 RD1 제거가 확인된 콜로니를 선택 후 연구에 활용하였다.

[0036]

실시예 3

[0037] 3-1. RD1 결실 균주(백신 후보주), 야생 균주 및 BCG 균주 선별

[0038] RD1 결실 마이코박테리움 보비스를 백신균주로 사용할 경우에는 야생 균주 및 기존 BCG 균주와의 구별할 수 있는 기술이 필요하다. 따라서, 각각의 균주를 7H9 broth(BD, USA)에서 배양한 후 1 X 10⁵ 개 정도 되게 채취하여 8,000 g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 균주 펠렛에 증류수 100 ul 를 넣은 후 95℃-100℃ 사이에서 10분간 반응시켜 고온법으로 DNA를 추출하였다. DNA를 추출한 후 프 라이머를 PCR 방법으로 증폭하여 2% 아가로스에서 100V, 60분간 전기영동하여 겔 상에서 밴드를 확인하여 구별할 수 있었다. 제작 프라이머(Cosmo Genetech, seoul, Korea)는 표 1과 같고 PCR 조건은 표 2와 같다. PCR 반응액은 2X TOP simple DyeMIX-multi HOT(enzynomics, Korea)를 사용하였으며 PCR 반응액 구성은 표 3과 같다.

표 1

<PCR에 사용한 프라이머>

[0040]

프라이머명	서열	머(mer)
MTB5F-F1	CTG GCG GTC AAC CTG AAG AAG C	22
MTB5F-R1	CCG CGA GGC GAT CTG GCG GTT T	22
MTBRD1-F2	TAG GGT CAT TCT CCA GGA TAT G	22
MTBRD1-R2	TCG CCC GAA AGG AAC ATT GTC G	22

표 2

[0041]

<PCR 반응액 구성>

시약	Amount (ul)
2X TOPsimple DyeMIX- <i>multi</i> HOT	25
Primer	4
Template DNA	5
D.W	16
Total	50

표 3

[0042]

<PCR 반응 조건>

반응 단계	온도	반응 시간	사이클 수
Pre-denaturation	95 °C	5 분	1
Denature	95 °C	30 초	30
Annealing	60 °C	30 초	
Extension	72 °C	30 초	
Final	72 °C	7 분	1

[0044]

3-2. RD1 결실 균주(백신 후보주) 병원성 확인

[0045]

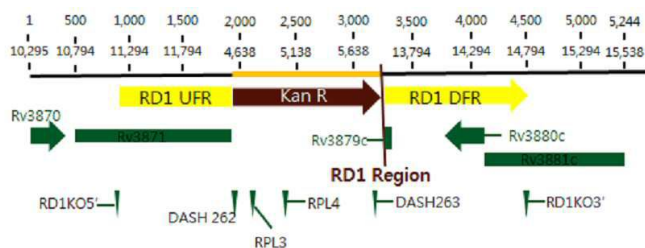
마이코박테리움 보비스 야생 균주에서 병원성이 있는 부위를 제거하여 사슴 및 동물용 결핵병 백신균주로 사용하고 하는 목적에서 과연 병원성이 제거 되었는지를 확인하기 위하여 동물 접종 실험을 하였다. 동물은 C57BL/6 마우스로 주령은 6주령, 몸무게는 15 - 20g, 암컷, 그룹당 3마리씩 사용하였으며, 사용된 균주는 마이코박테리움 보비스 야생 균주, RD1 결실 마이코박테리움 보비스, H37Ra, 마이코박테리움 보비스 BCG 4종류이며 접종량과 접종경로는 500,000 CFU이며 미정맥으로 접종하였다. 접종 후 2주 후 그룹당 2마리씩, 5주 후 1마리를 각각 부검하여 비장 크기를 비교하였으며 마취제로는 자일라진을 사용하였다. 접종 2주 후 비장 크기에서 마이코박테리움 보비스 야생 균주는 매우 확장되어 있었으며, RD1 결실 마이코박테리움 보비스와 마이코박테리움 보비스 BCG 비슷한 비장 크기로 나타났으며 병원성이 자연적으로 소실되었다고 알려져 있는 마이코박테리움 투버쿨로시스 H37Ra 크기와 비슷하게 나타났으며, 접종 5주 후에는 비장의 크기에서 정상 크기로 회복하였으나 야생 균주가 다른 접종 균주에 비하여 약간 크게 나타났다.

[0046]

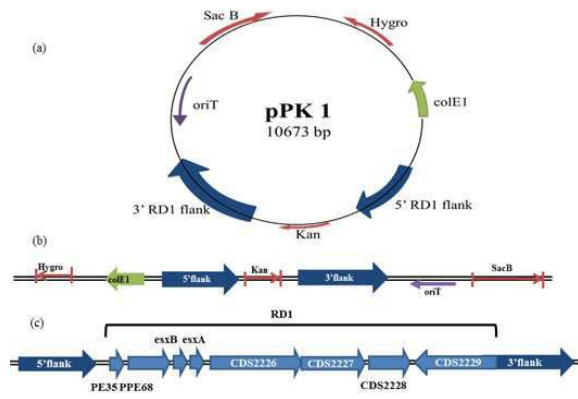
본 명세서에서 인용한 모든 참조문헌, 기사, 공보 및 특허 및 특허 출원이 온전히 본 명세서에 참조로 병합되어 있다. 따라서, 하기 청구의 범위의 진의 및 범주는 상기한 바람직한 실시형태의 설명에 제한되어서는 안 된다.

도면

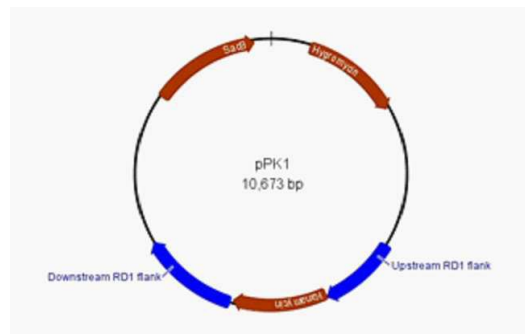
도면1a



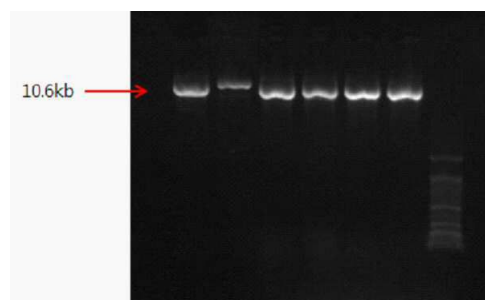
도면1b



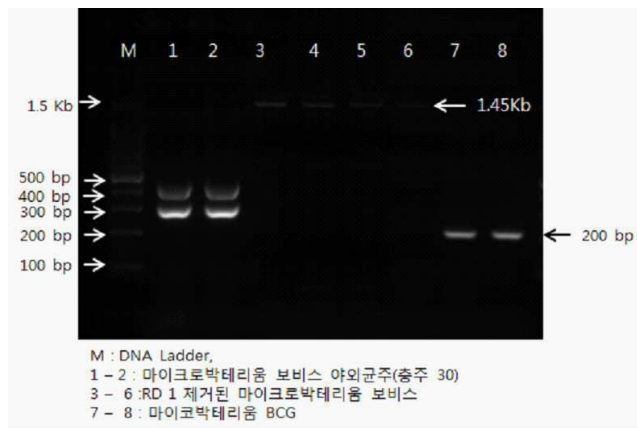
도면2



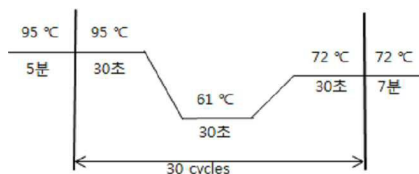
도면3



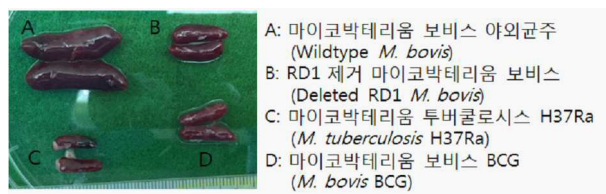
도면4



도면5



도면6



도면7



도면8

