

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07K 16/04 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년09월25일 10-0627635 2006년09월18일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2002-7005555	(65) 공개번호	10-2002-0065497
(22) 출원일자 번역문 제출일자	2002년04월30일 2002년04월30일	(43) 공개일자	2002년08월13일
(86) 국제출원번호 국제출원일자	PCT/NL2000/000783 2000년10월31일	(87) 국제공개번호 국제공개일자	WO 2001/32713 2001년05월10일

(81) 지정국                    국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장	60/162,752 00202709.2	1999년11월01일 2000년07월27일	미국(US) 유럽특허청(EPO)(EP)
------------	--------------------------	----------------------------	--------------------------

(73) 특허권자                    뮤코 박스 홀딩 비.브이.  
네덜란드 씨에이 라이텐 2333 닐스 보어웨그 11-13

(72) 발명자                        이상해  
네덜란드레이텐에이치엔엔엘-2331피엔테라마르스트라트26

(74) 대리인                        신정건  
  김성기

심사관 : 김지윤

## (54) 가축에서 유선 분비 항체를 제조하는 방법

### 요약

본 발명은 동일하거나 상이할 수 있는 둘 이상의 조성물을 동물에 투여하는 것을 포함하는, 가축의 유선 분비 생성물에서 항체를 얻는 수단 및 방법을 제공하며, 이때 상기 조성물은 상기 항체를 발생시킨 항원을 포함하며, 상기 방법은 높은 점액성 및/또는 전신성 면역 반응이 얻어지도록 상기 조성물중 적어도 첫 번째를 투여하는 것을 포함하며 이때 상기 조성물 중 적어도 두 번째는 상기 동물의 유선 및/또는 상유선 림프절에 투여된다.

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 면역학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 항체 생산을 위한 수단 및 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

항체는 과학 및 의학에서 많은 적용이 가능하다. 항체는 매우 특이적으로 표적에 결합하는 주목할만한 능력을 갖는다. 더욱이, 표적에 대한 새로운 항체를 생성하는 것이 꽤 용이하다. 항체는 다양한 방법으로 생산될 수 있다. 대부분의 적용 분야에서, 항체는 항체 생산 B-세포를 불멸화 세포주와 융합시켜 생성된 소위 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. 그러한 하이브리도마 세포는 쉽게 배양될 수 있으며, 항체는 배양 상청액으로부터 수집될 수 있다. 항체 생산을 위한 다른 방법은 면역된 동물의 혈청으로부터 수집하거나 박테리아에 의해 항체 단편을 생산하는 것이다. 물론 많은 다른 생산 방법들이 존재한다.

항체 생산을 위한 많은 다른 방법들이 존재함에도 불구하고, 그들은 모두 동일한 문제점을 가지고 있다. 생산 비용이 상대적으로 높은 것이다. 하이브리도마에 기초한 배양 시스템의 경우, 대형 배양 시스템이 준비되고 확인되고 유지되어야 한다. 혈청이 공급원인 경우에는, 혈액을 수집하고 처리해야 한다. 더욱이, 시스템들은 생성물의 미생물/바이러스 오염에 대해 감시되어야 한다. 높은 생산 비용은 항체의 비용이 중요한 많은 분야의 실시를 막는다. 예를 들어, 많은 질병 진단 키트들이 일반적으로 제3세계 국가들에는 이용가능하지 않다.

항체 생산 비용을 감소시키기 위해 연구되어 온 방법 중의 하나는 가축을 이용하는 것이다. 가축을 사육하는 기술은 널리 퍼져 있으며 가축 보유는 상대적으로 저렴하다. 가축의 젖에서 항체를 생산하기 위해 몇 가지 시도가 이루어져 왔다. 예를 들어, 상유선 림프절(supramammary lymph node)을 통한 면역이 [Guidry et al., J. Dairy Sci. 77(10): 2965-2974 (1994)]와 [Tomita et al., J Dairy Sci 81(8): 2159-2164 (1998)]에 개시되어 있다. 비강내 또는 유선내 경로를 통한 면역는 [Woods, J. Am. Vet. Med. Assoc. 173 (5Pt2): 643-647 (1978)]과 [Bohl et al., Infect. Immun. 11(1): 23-32 (1975)]에 개시되어 있다. 상업적 규모의 실시는 [Leitner et al., WO99/33954]에 개시된 대로 상유선 림프절을 통한 면역 및 [Petersen et al., USPN 3,376,198]과 [Hasting, USPN 5,017,372]에 개시된 대로 유선 조직으로의 직접 주사를 통한 면역에 의해 시도되었다. 하지만, 지금까지는 가축의 유선 분비 생성물에서 면역원-특이적 항체를 단지 제한된 양으로 얻는 것만이 가능하다. 최상의 결과는 초유, 즉 새끼를 낳은 후 암컷에 의해 생산되는 첫번째 유즙에서 얻어진다. 초유 단계를 지난 암컷에 의해 생산된 젖은 본원에서 성숙유(mature milk)라고 불린다. 초유는 유선의 독특한 생리적 및 기능적 상태로부터 생겨나는 꽤 독특한 생성물이다. 반추동물에서는, 초유와 성숙유 사이의 주된 조성 차이는 매우 높은 초유 면역글로불린 함량이며, IgG 부류가 80-90%를 차지한다.

면역글로불린(mg/ml)	초유	성숙유
IgG-전체	32-212	0.72
IgG <sub>1</sub>	20-200	0.6
IgG <sub>2</sub>	12.0	0.12
IgA	3.5	0.13
IgM	8.7	0.04

[McFadden, T. B. et al. (1997) in Milk Composition, Production and Biotechnology, Welch, R. A. S., Burns, S. R., Popay, A. I. and Prosser, C. G., Eds. pp133-152, CAB International, New York]

초유에서 항체 농도가 성숙유에서보다 높음에도 불구하고, 초유의 수집은 출산의 정확한 시기를 필요로 하는데, 이는 초유는 새끼의 출산 후 최대 2일 내지 3일 동안만 지속되기 때문이다. 더욱이, 초유는 단지 2일 또는 3일 동안만 주어지기 때문에, 동물 당 수집될 수 있는 항체의 절대량이 제한된다. 보다 큰, 상업적 규모의 항체 생산을 위해서는 많은 가축이 보유되어야 한다. 가축의 대 규모 수집에 대한 요구는 또한 더 많은 수의 면역을 필요로 하게 하고 따라서 물류 문제 및 생산 비용을 증가시킨다. 더욱이, 초유의 농후도/밀도(지방과 단백질이 매우 농후함)때문에, 초유의 후속 가공이 문제가 된다.

수십년 동안, 가축의 유선을 통한 면역원-특이적 항체의 생산을 증가시키기 위해 다양한 (면역적) 시도가 이루어져 왔다. 그러한 시도는 젖을 통해 면역원-특이적 항체를 대량 생산하는 것뿐만 아니라 부분적으로는 유선에서의 감염, 예를 들어 유방염(Guidry et al., J. Dairy Sci. 77(10): 2965-2974 (1994); Pighetti et al., J. Dairy Sci. 78(3): 528-537 (1995))을 조절하는 것을 목적으로 했다. 하지만, 성숙유에서 항체 농도는, 초유에서 얻어질 수 있는 것에 비해 여전히 낮다(대략 크기 차수 정도)(Hodgkinson et al., WO98/54226; Hastings, USPN5017372). 따라서, 대부분의 임상 및 전임상 연구에서 이용된 항원-특이적 항체는 초유에서 유래된 것이며 따라서 주로 IgG 부류에 속한다(Tollemar et al., Bone Marrow Transpl. 23: 283-290 (1999); Bostwick et al., USPN5,773,000; Cordle et al., USPN5,260,057).

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 항원에 특이적인 항체를 포함하는 수집된 유선 분비 생성물을 제공하며, 상기 유선 분비 생성물은 상기 항원에 대해 가축을 과면역시키는 단계, 상기 항원을 상기 동물의 유선 및/또는 상유선 림프절에 투여하는 단계, 및 상기 가축으로부터 상기 유선 분비 생성물을 수집하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다. 상기 유선 분비 생성물은 놀랍게도 당 업계에 공지된 통상의 방법에 의해 얻어진 분비 생성물보다 훨씬 높은 농도로 상기 항원에 특이적인 항체(본원에서는 항원-특이적 항체로 명명)를 함유한다. 더욱이, 본 발명의 방법을 이용하여 수유 동물의 성숙유에서 상당량의 항원-특이적 항체를 얻는 것이 가능하였다. 실제로, 이러한 항원-특이적 항체의 농도는 초유에서 생성될 수 있는 농도 범위였다. 과면역은 동물이 혈액 또는 점막 분비물에서 정상 이상 농도의 항원-특이적 항체를 생산하지만 유즙 분비물에서는 그렇지 않은 것을 의미한다. 정상 이상의 농도란 동물 체내의 항체 농도가 항원 투여 없을 때보다, 또는 항원의 1회 투여후 보다 높은 것을 말한다. 바람직하게는, 상기 과면역은 상기 항원을 상기 동물의 기도에 투여하는 것을 포함한다. 상기 기도 투여에 의해, 상기 항원을 상기 동물에 추가 면역 투여할 필요없이 동물의 젖에서 상당량의 항체가 지속적으로 생산되도록 하는 것이 가능하다. 하지만, 일정 시간 후 항원-특이적 항체의 농도가 떨어지는 것으로 발견될 경우에는 상기 동물에 상기 항원의 추가 투여가 수행될 수 있다. 바람직하게는, 상기 기도 투여는 상기 항원의 비강내 투여를 포함한다. 비강내 투여는 상대적으로 수행하기 쉬우며 기도 투여는 유선 분비 생성물에서 더 높은 농도의 항원-특이적 항체와 시간에 걸쳐 동물의 젖에서 항체의 더욱 지속적인 생산을 유도하는 것으로 관찰되었다. 바람직하게는, 상기 유선 분비 생성물은 젖이다. 젖은 수집하기 쉬우며, 젖에서 항원-특이적 항체 생산이 시간에 걸쳐 지속되기 때문에 젖에서 항원-특이적 항체의 최상의 농도를 갖는 동물 군을 선별하는 것이 가능하여 전체 성능과 과정의 물류를 개선시킨다.

따라서 본 발명은 지속적인 방식으로 독특한 유즙을 생산하는 것이 가능함을 보여준다. 그러한 유즙의 특징은: a) 상기 유즙은 항원-특이적 항체 농도에 관한 한 초유의 특징을 갖는다; b) 그러나, 상기 유즙의 전체적인 조성상의 특징은 성숙유와 비교할 만하다는 것이다. 본원에서 항원-특이적 항체 농도에 관한 한 초유의 특징이라는 것은 항원-특이적 항체의 양 및/또는 종류가 성숙유보다 초유에 비할만하다는 것이다. 예를 들어, 유즙에서 항원-특이적 항체의 양은 성숙유에서 정상적으로 얻어진 항원-특이적 항체의 양보다 더 높다. 그 경우, 유즙내의 항원-특이적 항체의 양은 적어도 부분적으로는 초유내의 항원-특이적 항체의 양에 비교할 만하다. 왜냐하면 두 양 모두 성숙유에서 일반적으로 얻어지는 항원-특이적 항체의 양보다 많기 때문이다.

상기 항원에 대해 과면역된 동물로 귀결되는 임의의 면역 계획이 그 결과를 얻기 위해 유선 및/또는 상유선 림프절에의 항원 투여와 결합될 수 있다는 것은 명확하다. 유선 및/또는 상유선 림프절에의 항원 투여가 이루어지기 전에 동물이 과면역되는지를 평가할 필요는 없다. 상기 동물의 유선 분비 생성물에서 항체 농도를 쉽게 결정할 수 있다. 상기 분비 생성물에서 낮은 농도의 항체는 상기 동물이 과면역되지 않았으며 과면역을 이루기 위해서는 부가의 항원 투여가 필요함을 나타낸다.

상기 항원-특이적 항체가 생성되는 항원은 면역 반응을 일으킬 수 있는 임의의 화합물 또는 화합물 집합체일 수 있다. 일반적으로 상기 항원은 단백질 또는 그 기능성 부분, 유도체 및/또는 유사체를 포함한다. 상기 동물에 투여된 항원은 일반적으로 동물에의 매 투여마다 다르지 않다. 하지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 예를 들어 다른 단백질들과 같은 다른 항원 표시가 면역학적으로 동일한 적어도 한 부분을 포함한다면 다른 항원 표시를 사용하는 것이 가능하다. 면역학적으로 동일한

은 항체가 상기 항원의 다른 표지를 인식할 수 있음을 의미한다. 항원은 또한 상기 항원 또는 그 기능성 등가물을 암호하는 핵산을 상기 동물에 투여함으로써 투여될 수도 있다. 투여된 핵산은 상기 핵산이 전달된 상기 동물의 세포에 의해 발현될 수 있다. 상기 동물의 세포에서 상기 항원 또는 기능성 등가물의 발현은 면역 반응의 개시로 이끈다. 이 기술은 핵산 백신으로 불리며 역시 당업계의 범위내이다.

이론에 구애됨없이, 항원-특이적 항체 생산 세포의 실질적인 풀(pool), 순환 또는 보유고를 제공하기 위해서는 높은 일반적 면역 반응이 필요한 것으로 생각된다. 유선 및/또는 상유선 림프절 면역은 풀, 순환 또는 보유고로부터 유선 조직으로 세포를 끌어 유선 분비 생성물에 항원-특이적 항체가 분비되도록 하기 위해 요구된다. 풀, 순환 또는 보유고의 생성은 높은 점액성 면역 반응으로 귀결되는 면역 계획으로 이루어지는 것이 바람직한데, 이는 이러한 방식으로 풀, 순환 또는 보유고의 적어도 일부가 유선을 향해 제공될 수 있고, 따라서 유선 및/또는 상유선 림프절 면역시 항원-특이적 항체의 보다 빠르고 현저한 분비를 촉진할 수 있기 때문이다. 하지만, 바람직하게는, 풀, 순환 또는 보유고는 높은 점액성 및/또는 전신성 면역 반응으로 귀결되는 면역 계획을 통해 생성된다. 면역 계획은 가축에의 한번 이상의 항원 투여를 포함한다. 높은 점액성 및/또는 전신성 면역 반응으로 귀결되는 면역 계획은 상기 동물에 의한 항원의 흡입을 통해 적어도 부분적으로 이루어지는 것이 바람직하다. 흡입을 위한 조성물은 물론 그 조성물내의 항원이 상기 동물의 기도의 주요 부분을 통해 분배되도록 투여되는 것이 바람직하다. 기도 투여는 에어로졸 형태로 이루어지는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 기도 투여는 비강내 투여를 통해 이루어진다. 높은 점액성 및/또는 전신성 면역 반응으로 귀결되는 면역 계획은 항원을 포함하는 조성물의 적어도 두 번의 기도 투여를 포함하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 항원을 포함하는 조성물을 적어도 네번 기도 투여하는 것을 포함한다.

본 발명의 수단 및 방법으로, 유선 면역 및 항원 함유 조성물의 상유선 림프절 투여 둘다 가축의 젖에서 항원-특이적 항체의 대량 분비를 가능하게 하는 효과를 갖는다. 바람직하게는 적어도 한 번의 투여는 상유선 림프절에서 수행된다. 바람직하게는, 적어도 두 번의 투여가 상유선 림프절에서 수행된다. 상유선 림프절 투여는 젖에서 항원-특이적 항체의 더 높고 더 빠른 상승으로 귀결된다.

본 발명의 수단과 방법은 임의의 수유 포유류의 젖에서 높고 지속적인 항원-특이적 항체 생산을 얻기에 적합하다. 바람직하게는, 상기 동물은 가축이다. 가축은 사람에 의해 상업적 기초로 이용되며, 젖, 고기 또는 심지어 항체의 생산을 위해 이용된다. 젖의 상업적 규모의 생산을 위해 이미 이용되고 있는 가축이 본 발명에 바람직한데, 이는 이들 동물의 경우에는 젖 생산에 최적화된 특별한 계통 및/또는 혈통이 존재하기 때문이다. 바람직하게는, 상기 가축은 소이다. 다른 한편으로는, 상기 가축은 염소이다.

본 발명의 방법을 이용하여 예를 들어 초유 또는 성숙유와 같은 임의의 유선 분비 생성물에서 고 농도의 항원-특이적 항체를 얻는 것이 가능하다.

젖에서 항원-특이적 항체는 임의의 면역 부류일 수 있다. 하지만, 상기 항체는 IgG 및/또는 IgA 부류가 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 상기 항체는 IgA 부류이다.

항원-특이적 항체를 함유하는 젖은 동물의 젖을 짜서 모으는 것이 바람직하다. 이렇게 수집된 젖은 직접 이용되거나, 또는 예를 들어 항원-특이적 항체를 정제하기 위해 추가 가공될 수 있다. 젖으로부터 (항원-특이적) 항체의 (부분적) 정제를 위한 방법은 당업계에 공지이며 본원에서 나열될 필요는 없다.

본 발명의 항원-특이적 항체는 거의 모든 목적에 이용될 수 있다. 바람직하게는 상기 항체는 폴리클로날 항체를 당업계에 이용할 목적을 위해 이용될 수 있다. 하지만, 당업계의 정제 방법을 이용하여 주로 모노클로날 항체를 얻는 것이 가능하며, 예를 들어 주로 단지 하나의 면역원성 부분만을 포함하는 항원으로 면역시킴으로써 가능하다. 본질적으로 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 항체에 대한 단지 하나의 결합 부위만을 주로 포함하는 펩티드를 이용하여 항체를 면역 정제하는 것과 같은 다른 방법으로 생산될 수 있다. 항원-특이적 항체(젖으로부터 정제되건 아니건)는 의약 제조에 이용되는 것이 바람직하다. 그러한 항체는 예를 들어 피부 상처의 치료를 위한 의약의 제조에 이용될 수 있으며, 예를 들어 피부 세균에 특이적인 항체이다. 그러한 항체는 또한 위장관내의 병원균에 의해 야기되는 질병 치료에 특히 적합하다. 일반적으로, 가축의 젖으로부터의 항원-특이적 항체는 사람 신체의 임의의 (적어도 부분적으로) 면역 보호된 영역에 이용될 수 있다. 그러한 영역은 예를 들어 위장관, 호흡기, 생식로, 눈, 입 및 피부가 있다. 하지만, 그러한 항체는 또한 예를 들어 상기 개체에 항체를 전신성 투여한 후 환자에서 혈류에 의해 도달될 수 있는 항원에 결합하기 위해 이용될 수 있다. 치료될 개체가 일반적으로 사람이며 항체가 가축에서 유래됨을 고려할 때, 개체의 면역 시스템이 투여된 항체에 반응할 것이며, 특히 전신성 투여될 때 그러할 것으로 예상된다. 하지만, 그러한 항체의 전신성 투여의 많은 적용이 여전히 가능하다. 예를 들어, 개체가 그 항체에 대한 면역 반응을 아직 개시하지 않았을 때(예를 들어 상기 개체에서 처음 사용되는 경우) 또는 면역 반응이 감소할 때(시간에 걸쳐)이다.

항원-특이적 항체(젓으로부터 정제되건 아니건)는 또한 예를 들어 음식물의 제조에 이용될 수 있다. 많은 세균성 및 바이러스 미생물이 위장관에 존재할 수 있다. 이들 미생물 중 일부는 무증상적으로 존재할 수 있다. 본 발명 방법으로, 하나 이상의 상기 미생물에 특이적인 항체가 생성될 수 있다. 그러한 항체는 음식물 또는 다른 생성물을 제조하기 위해 이용될 수 있다. 그러한 생성물을 먹음으로써, 상기 하나 이상의 미생물에 대한 항체가 위장관내에 방출되어 적어도 부분적으로 상기 미생물이 증식하는 것을 막을 수 있다.

항체가 가축에서 생산되는 것을 생각할 때, 항체는 일반적으로 상기 동물에 자연적으로 존재하지 않는 항원(비-자기)에 대해 특이적일 것이다. 따라서 대개 항체는 그 동물에 외래인 임의 항원에 대해 생산될 수 있다. 그러한 항체는 박테리아, 바이러스 및 그 독소에 대해 특이성을 가질 것이다. 하지만, 항체는 또한 투여된 항원과 가축내의 그 항원의 상동체 사이에 충분한 차이가 존재할 경우 포유류 항원에 대해 생성될 수 있다. 덜 용이하긴 하지만, 적어도 일부의 자기-항원에 대한 항체 반응을 생성하는 것도 가능하다. 이 결과를 얻기 위한 몇 가지 방법이 당업계에 존재한다.

하나 이상의 면역 계획은 가축의 면역 반응을 자극 및/또는 조절할 수 있는 하나 이상의 다른 화합물의 투여를 포함할 수 있다. 적합한 어주번트가 당업계에 알려져 있으며 프로인트(Freund) 불완전 어주번트, 알루미늄 하이드록사이드, 사포닌/콜레스테롤계 면역 자극 복합체 ISCOMS, 및 글리세라이드-폴리소르베이트계 어주번트 'RhinoVax'(Jakobsen et al., Infect. Immun. 67: 4128-4133 (1999))를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 면역 보강제는 점액성 면역 반응에 대한 면역 반응을 조절할 수 있다. 그러한 화합물의 비제한적 예는 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ , 콜레라 홀로 독소, 클로스트리듐 디피실레 (*Clostridium difficile*)의 독소 A 및 독소 B, IL-5, IL-6, IL-12 또는 TGF-3와 같은 사이토카인, 포스포디에스테르 백분을 가진 비메틸화된 C $_p$ G(박테리아 DNA) 서열이다. 프로인트 완전 어주번트에 대한 시판되는 대체물은 리비(Ribi) 어주번트 시스템(RAS), 타이터 맥스(Titer Max), 신텍스(Syntex) 어주번트 제제(SAF), 엘박스(Elvax) 40W, 몬타니드(Montanide), 아주프라임(AdjuPrime), 게르부(Gerbu) 어주번트 및 슈퍼 담체(Super Carrier)를 포함한다. 항원은 또한 L-티로신으로 공침전될 수 있고 또는 느린 방출을 위해 니트로셀룰로스에 흡착될 수도 있다. 물론 어주번트의 조합이 이용될 수 있다.

본 발명 방법은 가축에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 이용될 수 있다. 하지만, 가축에서 항원에 대해 이미 존재하는 면역성을 증폭시키기 위해 본 발명 방법을 이용하는 것도 가능하다.

가축은 하나의 항원에 대해 면역될 수 있으나, 폴리클로날 면역 반응이 생성됨을 고려할 때, 젓 중의 항원-특이적 항체는 항원의 둘 이상의 다른 부분에 대한 특이성을 포함할 것이다. 다른 화합물의 복합체 혼합물을 포함하는 항원이 이용될 경우, 그 항원의 다른 부분들에 대한 특이성을 포함하는 다수의 항체가 생성될 것이며 동물의 젓 중에 존재할 것이다. 물론 다른 항원에 대해 한번 이상 본 발명 방법을 반복하여 하나 이상의 항원 또는 다수의 가교된 항원에 대한 항체 세트를 포함하는 유선 분비 생성물을 생성하는 것이 용이하다.

주어진 항원에 대한 가축의 면역 반응성은 동물에 대한 유전적 조작에 의해 추가로 증진될 수 있다. 예를 들어, B-세포 활성화로부터 점막 표면에서의 항체 분비로의 과정에 중요하게 관련된 많은 생화학적 단계의 각각이 유전적 변형을 통해 최적화될 수 있다. 비제한적 예로는 효율적인 항원 제시를 위한 특이적 MHC 항원 분자의 발현 증가, 증가된 IgA 이량체 형성을 위한 J-쇄의 발현 증가, 및/또는 활성화된 림프구의 유전 조직으로의 이동 증가를 위한 귀소 수용체의 발현 증가이다. 그 과정에 관여하는 많은 사이토카인과 림포카인의 발현은 또한 최대 항체 분비를 위한 최적 수준으로 조작될 수 있다. 더욱이, 주어진 항원에 대한 높은 반응자로 입증된 동물이 클론되어, 클론된 동물의 면역시 높은 항원-특이적 항체 수율이 보장될 수 있다.

한 구체예에서, 항원은 클로스트리듐 디피실레의 배양물로부터 수집된 화합물의 수집물을 포함한다. 이 화합물의 수집물은 포름알데히드-불활성화된 클로스트리듐 디피실레(VPI10463) 세포, 상기 박테리아의 포름알데히드-불활성화된 포자 및 독소 A와 독소 B인 포름알데히드-불활성화된 클로스트리듐 디피실레 독소 중 몇몇 단백질을 함유한다. 이 수집물에 대해 생성된 항체는 일반적으로 클로스트리듐 디피실레의 하나 이상의 단백질에 대한 특이성을 포함할 것이다. 바람직하게는, 상기 항체는 클로스트리듐 디피실레의 포자에 특이적인 항체를 포함한다. 그러한 항체 제제는 클로스트리듐 디피실레 감염과 관련된 질병 치료를 위한 의약 제조에 이용될 수 있다. 개체로의 투여는 항체가 장으로 전달되도록 수행되는 것이 바람직하다. 그러한 전달을 가능하게 하는 몇 가지 방법이 당업계에 존재하며, 예를 들어 항체는 그 내용물이 장에서 방출되는 정제에 함유될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명 항체는 클로스트리듐 디피실레의 포자에 대한 특이성을 포함한다. 그러한 항체는 적어도 부분적으로 클로스트리듐 디피실레 관련 질병의 재발을 방지하는 데 특히 유용하다. 일반적으로, 클로스트리듐 디피실레 관련 질병은 클로스트리듐 디피실레 박테리아 제거를 위한 투약으로 치료된다. 그러한 투약은 예를 들어 항생제 및/또는 클로스트리듐 디피실레의 하나 이상의 박테리아 성분에 대해 생성된 항체의 투여로

구성될 수 있다. 이 치료가 일반적으로 환자를 증상으로부터 치료하는 데 있어 성공적임에도 불구하고, 환자에서 질병의 재발을 방지하는 데는 충분하지 않다(케이스의 20%). 재발은 적어도 부분적으로 클로스트리듐 디피실레의 포자에 대해 특이적인 항체를 환자의 장으로 전달함으로써 방지될 수 있다. 상기 항체의 장내 클로스트리듐 디피실레의 적어도 일부와의 결합은 상기 포자가 부화할 수 있는 경향을 적어도 부분적으로 감소시킨다. 따라서 적어도 부분적으로 환자에서 시.디피실레 관련 질병의 재발을 방지한다. 따라서 본 발명은 또한 클로스트리듐 디피실레의 포자에 결합할 수 있는 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 의약 제조를 위한 클로스트리듐 디피실레 포자 특이적 항체의 용도가 또한 제공된다. 바람직하게는, 상기 항체는 클로스트리듐 디피실레 관련 질병의 치료를 위한 의약 제조에 이용된다.

수유하는 가축은 유선의 박테리아 및/또는 바이러스 감염으로 고통받을 수 있다. 그러한 감염은 유선의 분비 분획내로 항원-특이적 항체가 분비되도록 함으로써 적어도 부분적으로 치료될 수 있다. 그러한 질병 중 하나가 유방염이다. 따라서 본 발명은 동물에서 유선의 미생물 감염을 치료하기 위한 방법을 추가로 제공하며, 이는 고면역 반응이 얻어질 수 있도록 상기 동물에 항원을 투여하는 것과 상기 항원을 상기 동물의 유선 및/또는 상유선 림프절에 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 항원은 상기 미생물의 적어도 일부 또는 그 기능성 증가체 및/또는 유사체를 포함한다. 상기 면역 반응은 전신성 면역 반응일 수도 있다. 바람직하게는, 상기 면역 반응은 일반적인(전신성과 점액성 모두) 면역 반응이다. 바람직하게는, 상기 동물은 유방염을 앓고 있거나 앓을 위험이 있다.

본 발명은 추가로 유선의 미생물 감염을 치료하기 위한 의약 제조를 위한 항원의 용도를 제공하며, 이때 상기 의약은 상기 항원의 기도 투여를 위한 조성물과 상기 항원의 유선 및/또는 상유선 림프절 투여를 위한 조성물을 포함한다. 바람직하게는 상기 미생물 감염은 유방염을 일으킨다. 상기 의약은 또한 사람의 치료에도 적합할 수 있다.

유방염은 젖 생산의 일시적이고 때로는 영구적인 손실을 야기하는 질병이다. 젖 생산의 손실은 질병 그 자체에 의해, 또는 젖 생산에 영향을 주는 항생제의 사용에 의해, 또는 둘다에 의해 유도될 수 있다. 유방염을 앓고 있는 동물은 심하게 앓게 되며 때로는 죽는다. 유방염은 농부에게 노동량과 생산 비용에 상당한 영향을 준다.

다른 양상에서, 본 발명은 적어도 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 항원-특이적 항체를 포함하는, 수유 가축에서 얻어진 젖을 제공한다. 바람직하게는, 상기 젖은 적어도 15  $\mu\text{g/ml}$ 의 항원-특이적 항체를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 젖은 본 발명의 방법으로 면역된 상기 동물에 대한 항체를 적어도 50  $\mu\text{g/ml}$  포함한다.

상기 동물에의 항원 투여는 당업계에 공지된 수단을 통해 이루어질 수 있다. 일반적으로 항원은 대략 10 kDa의 단백질에 대해 5-500  $\mu\text{g}$  사이에서 변화하는 범위내로 투여된다. 전체(불활성화된) 세포 및/또는 포자에 기초한 항원은  $10^8$  내지  $10^{11}$  세포 및/또는 포자 범위에 상응하는 양이 상기 동물에 제공되도록 투여된다. 동물의 크기, 항원 및/또는 어주번트의 면역원성 및 당업계에 공지된 기타 변수에 의존하면서 다른 농도 및/또는 양이 이용될 수 있다.

소의 초유와 성숙유로부터 얻어진 병원체-특이적 항체가 다양한 병원체에 의해 야기된 위장관 감염의 방지 및 치료에 효과적이라는 많은 증거가 문헌에 존재한다. 하지만, 전망있는 사실들에도 불구하고, 충분한 양의 병원체-특이적 항체가 이용가능하지 않아 제품 개발은 크게 실용화되지 못했다.

통상적인 방법을 통한 면역 후 소의 초유로부터 항원-특이적 항체를 고농도로 얻는 것은 쉽다. 하지만, 초유의 분비는 새끼를 낳은 후 단지 2-3일간만 지속되며, 그들이 성숙 수유기로 들어가자마자 그러한 항체의 농도는 거의 제로에 가깝게 떨어진다. 본 발명에서는, 초유에서뿐만 아니라 수유 가축의 성숙유에서 지속적인 기간동안 고 농도의 항원-특이적 항체를 분비하게 하는 면역 방법을 개시한다. 실시예에 나타난 것처럼, 본 발명의 방법을 사용하여, 당업계의 통상의 방법을 사용하여 동물의 초유에서 평균적으로 얻을 수 있는 양의 적어도 절반의 양의 항원-특이적 항체를 포함하는 성숙유를 동물로부터 얻을 수 있다.

따라서, 한 양상에서, 본 발명은 포유류의 초유에서 얻을 수 있는 항원-특이적 항체의 평균양의 적어도 50%의 양으로 항원-특이적 항체를 포함하는, 포유류에서 얻을 수 있는 성숙유를 제공하는 데, 이때 상기 초유는 상기 포유류를 상기 항원에 대해 면역시킨 후 얻어진다. 바람직하게는, 상기 항원-특이적 항체는 IgA로 구성되며, 이는 IgA가 복합체를 매우 잘 형성할 수 있는 이량체를 형성하기 때문이다.

본원에서 초유에서 얻을 수 있는 상기 항원-특이적 항체의 평균 양이란, 상기 항원에 대해 면역된 다른 비선별된 동물로부터의 초유로부터 얻어진 항원-특이적 항체의 평균 수율인 양을 의미한다.



적어도 50%의 수율은 중요한 개선이다. 왜냐하면 선행 기술에서 성숙유에서 항원-특이적 항체의 수율은 초유에서 얻어진 수율에 비하여 약 1/10만이 가능했기 때문이다. 하지만, 실시예에서 보는 바처럼, 본 발명은 당업계의 통상적인 방법을 이용하여 초유에서 얻어진 수율보다 더 높은 수율로 성숙유에서 IgA를 제공한다. 따라서, 바람직한 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 성숙유를 제공하며, 이때 그 퍼센티지는 적어도 100%, 더욱 바람직하게는 적어도 200%이다.

## 실시예

### 재료 및 방법

사람에게 사용이 허가된 경구 콜레라 백신인 DUKORAL(등록상표명)을 SBL Vaccin AB, Stockholm에서 구입하였다. 각 앰플은 3 ml 포스페이트 완충 염수(pH7.4)(PBS)중에 각각  $10^{11}$  세포와 1 mg 단백질의 농도의 포르말린-불활성화된 비브리오 콜레라와 콜레라 독소 서브유닛-B(CTB)로 구성된다.

### 클로스트리듐 디피실레 전세포

클로스트리듐 디피실레 전세포를 전술한 대로 제조하고 불활성화시켰다. 요약하면, 클로스트리듐 디피실레 VPI 10463을 혐기성 대기하에서 36시간 동안 37°C에서 BHI 배지에서 성장시켰다. 배양물을 원심분리하고 PBS로 세포를 세번 세척하였다. 얻어진 펠릿을 1%(V/V) 포름알데히드를 함유하는 PBS에 재현탁하고 사용할 때까지 4°C에서 유지하였다. 각 면역 전에, PBS로 두 번 세척하여 과다한 포름알데히드를 제거하였다.  $10^9$  클로스트리듐 디피실레 CFU에 상응하도록(1 cm 광경로에서 550 nm에서 1.0의 광학 밀도를 갖는 세포 현탁액) BHI 배지에 접종하여 혐기성 대기하에서 37°C에서 36시간후 성장은 없었다.

### 클로스트리듐 디피실레 독소

클로스트리듐 디피실레 배양물 여과액을 전술한 대로 제조하고 불활성화시켰다. 요약하면, 클로스트리듐 디피실레 VPI 10463을 37°C에서 48시간 동안 프로테아제 펩톤-효모 추출물 배지에서 성장시키고 포름알데히드를 1%(V/V) 농도로 첨가하여 불활성화시켜 만들고 그것을 1시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 상청액을 여과 멸균하고, 한외여과(Amicon, 30kDa)에 의해 PBS로 세번 세척하고, 500 ml 세포 농축기에서 10배 농축하여 사용할 때까지 -20°C에서 저장하였다.

### 동물

임신중인 홀스테인 프리시안(Holstein-Frisian)과 MRY 젓소를 네델란드에서 일반적으로 허용되는 젓소 유지 실무에 따라 유지하였다. 본원에서 개시되는 실험에서는, 주로 홀스테인 프리시안 소를 이용하였다. 부가적으로, 임신한 염소를 선별하여 일반적으로 허용되는 유지 실무에 따라 별도의 농장에서 유지하였다.

### 면역 경로 및 관리

소: 근육내(IM), 유선내(IUDR) 또는 상유선 림프절내(LMF) 면역을 위해, PBS중의 백신 제제 2 ml를 각 조직에의 직접 주사를 통해 투여하였다. 비강내(IN) 면역을 위해서는, 얼굴이 위로 가게 한채 백신 제제 2 ml를 시린지에 부착된 노즐을 통해 소의 콧구멍중의 하나로 분사하였다. 콜레라 백신으로 면역시키기 위해서는, DUKORAL을 PBS중에 희석하여 각 2 ml 이  $6.5 \times 10^9$  비브리오 콜레라 (*V.cholera*)와 66  $\mu$ g의 CTB를 함유하도록 한다. 클로스트리듐 디피실레(CD) 백신의 경우, 독소와 전세포 제제를 혼합하고 PBS에 희석하여 2 ml에 배양물 상청액의 단백질 5.5 mg과  $5 \times 10^{10}$ 의 불활성화된 클로스트리듐 디피실레가 되도록 한다.

염소: 소를 위해 제조된 백신을 동부피의 PBS로 추가 희석한다(50%로). 각 면역을 위해, 2 ml을 이용하며 LMF의 경우에만 1 ml을 이용하였다.

### 샘플 수집과 혈청 및 유장 제조

일반적으로, 각 쿼터로부터 5 ml의 우유 샘플을 매주 수집하였다. 필요할 경우, 또한 꼬리 정맥으로부터 5 ml의 혈액 샘플을 수집하였다. 전술한 대로 우유 샘플로부터 유장을 제조하였다. 요약하면, MSE 미스트랄 센트리퓨지 6000에서 4,300

X g에서 15분 동안 4°C에서 원심분리를 통해 지방을 제거한다. 카제인은 아세트산 나트륨과 아세트산을 첨가하여 pH 4.6에서 산침전시키고 이어서 3,500 x g에서 15분동안 상온에서 원심분리하여 제거한다. 혈액은 4°C에서 밤새 응고되도록 방치하고 원심분리하여 혈청을 얻었다.

## 분석

간접적 ELISA를 수행하여 유장과 혈청 샘플에서 면역원-특이적 IgG와 IgA 농도를 측정하였다. 초기에는(DUKORAL로 면역된 소로부터의 샘플), ELISA를 수동으로 수행하였으나, 이후에는(CD 백신으로 면역된 소로부터의 샘플과 DUKORAL과 CD 백신으로 면역된 염소로부터의 샘플) ELISA 로봇 BioTek OMNI를 이용하였다. 두 경우 모두, 미세역가 플레이트(Greiner 655902, Grenier)를 웰당 각각 0.3  $\mu\text{g}$  CTB 또는  $2 \times 10^7$  세포 농도의 CTB 또는 불활성화된 클로스트리듐 디피실레 전세포로 피복하였다. 피복은 CTB로 37°C에서 2시간 또는 클로스트리듐 디피실레 전세포로 70°C에서 2시간 동안 항온처리하여 이루어졌다. 각 항온 처리 단계 후, 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 플레이트를 세척하였다. 웰을 PBS중의 2% 젤라틴으로 상온에서 1시간 동안 차단시켰다. 샘플을 두별로 PBS중에 희석시키고 1시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 수집된 샘플에서 항원-특이적 소 항체를 측정하기 위하여, 디옥시제닌-표지된 모노클로날 항-소 IgA 또는 항-소 IgG 항체를 실험실에서 제조하고 이차 항체로 이용하였다. 수집된 샘플에서 항원-특이적 염소 항체를 측정하기 위하여, 항-소 항체 대신 모노클로날 항-염소 항체를 이차 항체로 이용하였다. 검출을 위해서는, 서양 고추냉이 퍼옥시다제-표지된 염소 항-디옥시제닌-POD, Fab 단편(Boehringer Mannheim)을 이용하였다. ABTS, 2,2'-아지노 디에틸벤조티아졸린 설폰산(Sigma)을 서양 고추냉이 퍼옥시다제를 위한 기질로 이용하였다. 37°C에서 30분동안 항온처리한 후 Bio-Tek EL<sub>x</sub>800 판독기로 415 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

## 역가

샘플내의 면역원-특이적 Ig의 농도는 1000 유닛/ml의 기준에 대해 유닛으로 표현하였다. 기준은 Dukoral로 또는 CD 백신으로 면역된 소의 초유로부터의 유장 제제이다.

## 우유내의 총 Ig의 측정

면역된 우유와 면역되지 않은 우유로부터 제조된 각 유장 샘플내의 총 Ig 함량을 고압 젤 투과 액체 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다.

## 결과

### 항원-특이적 항체 분석을 위한 기준의 생성

임신 후반기의 소를, 새끼를 낳기 전에, 면역 간에 3주의 간격을 두고 네 번 면역시켰다. 각 면역을 위해, 비강내(IN)와 피하(SC) 경로의 조합을 이용하였다. 면역원은 IN 경로를 위해서는 콜레라 독소(50  $\mu\text{g}$ /소/면역)로 보충되고, SC 경로를 위해서는 프로인트 불완전 어주번트(면역원과 동부피)로 보충된, 두 백신(DUKORAL과 CD 백신)의 동부피로 이루어졌다. 각 소로부터, 첫번째 수유의 초유를 수집하고 유장을 제조했다. PBS로 필요한 희석을 한 후(항-CTB IgA 320 x; 항-CTB IgG 8,000 x; 항-CD IgA 130 x; 및 항-CD IgG 8,000 x), ELISA를 실시하였다. 415 nm에서의 광학 밀도 측정이 도 1(항-CTB 항체)과 도 2(항-CD 항체)에 나타난다. 유장 제제를 모아서 기준으로 이용하였다.

### 콜레라 백신, Dukoral로 면역시킨 후 소의 우유에서의 항-CTB Ig 농도

지속적인 기간동안 포유류의 젖에서 면역원-특이적 Ig를 고농도로 얻기 위해, 항원으로서 다양한 투여량의 Dukoral을 다양한 면역 방법을 이용하여 수유소에서 시험하였다. 예를 들어, 피하(SC), 유선내(IUDR), 상유선 림프절 내(LMF), 질내(IVG) 및 복강내(IP) 경로의 조합을, 50배 희석에서 비희석까지의 범위의 DUKORAL 농도와 이용하였다. 대부분의 경우, 젖 중의 항-CTB IgA와 IgG 역가는 1000 유닛/ml의 기준과 비교할 때 극히 낮았다(도 3과 도 4). 몇몇 경우에는, 농도가 몇백 유닛까지 도달하였으나, 1주 이상 지속되지 못했다. 더욱이, 그러한 간헐적인 피크의 출현 시기는 면역 시기와 관련하여 예측할 수가 없었다.

### 비강 분무 후 유선내 면역 후 소의 우유와 혈액에서 항-CTB Ig 농도



성숙 수유기에 있는 여섯 마리의 소의 집단을 5주 연속하여 1주에 한번씩 콜레라 백신, Dukoral로 비강내 면역시켰다. 이 5주 기간동안, 우유의 유장과 혈액중의 CTB-특이적 IgA와 IgG의 농도를 감시하였다. 유장에서의 낮은 농도(제로에서 약 50까지의 범위)는 이전의 실험에서 얻어진 결과와 크게 다르지 않았다(도 5와 도 6). 하지만, 혈액에서의 항-CTB IgG 농도는 반복된 IN 처리에 따라 계속 증가한 반면(약 10에서 시작하여 5번 면역 기간 끝에는 약 1000 유닛), 혈액중의 CTB-특이적 IgA는 실험 기간 내내 검출가능한 수준 이하였다. 하지만, 단일의 추가 면역 처리는 많은 양상에서 이들 결과에 흥미로운 변화를 가져왔다(도 5와 도 6). 마지막 IN 면역 후 6주 째에 주어진 추가 면역 처리는 후면 우측 콧구에서 한번의 IM, 한번의 IUDR, 그리고 후면 우측 콧구에서 한번의 LMF(각 2 ml)로 이루어졌다. 5개월에 걸친 항-CTB IgA와 항-CTB IgG 역가의 측정이 도 5와 도 6에 나타난다. 유선내 추가 면역에서 기인한 몇몇 두드러진 변화는 다음과 같다: i) 항-CTB IgA와 항-CTB IgG 반응 둘다가 모든(6/6) 동물에서 관찰되었다; ii) 기준에서의 역가(1000 유닛/ml)와 비교하여, IgA 반응이 매우 강하여 일부 소에서는 기준 농도의 약 300-500%에 도달하였다. IgG 반응은 IgA보다 덜하였으나, 여전히 매우 높았다(높은 반응자에서는 기준의 30%에 달함); iii) IgA 반응은 IgG 보다 상당히 오래 지속되었다; iv) 면역 반응에서 동물들간에 큰 변이가 있었음에도 불구하고, 본원에서 이용된 면역 방법은 동물간에 일치되는 방식으로 반응을 야기할 수 있었다; v) IgA 반응은 면역된 콧구에 다소 제한되는 반면, IgG 반응은 모든 네 콧구로 퍼졌다.

**비강 분무 후 유선내 면역 후 우유중의 항-클로스트리듐 디피실레(전세포) Ig 농도**

이전의 실험에서 이루어진 관찰은 본 발명자들로 하여금 다른 면역원으로 실험을 확장하도록 자극하였다. 따라서, 상기에서 이용된 프로토콜에 몇몇 변형을 가지고 CD 백신을 이용하여 실험을 수행하였다. 새 프로토콜에서 이용된 변화는 유선내 주사 전의 IN 면역의 횟수의 중요성과 IN과 유선내 면역 사이의 간격의 중요성을 평가하기 위하여 의도되어졌다. 수유기 중반에 있는 10마리 소의 그룹의 각 소에게 한번의 2 ml IN과 한번의 2 ml IM 면역을 시켰다. 프라이밍 후, 추가 면역 전에 수집된 샘플에서 항-CD(전세포) IgA와 IgG 농도의 측정은 예상한 결과를 보여주었다: 검출하기 힘들(도 7). 프라이밍 후 3주째에, 각 소에게 후면 우측 콧구에서 한번의 2 ml IN, 한번의 2 ml IUDR, 그리고 후면 우측 콧구에서 한번의 2 ml LMF로 이루어진 추가 면역 처리를 하였다. 우유 샘플을 매주 수집하고 항-CD(전세포) 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 소에 따라 130 내지 430 유닛/ml 범위(1000 유닛/ml의 항-CD 기준에 대해)의 면역원-특이적 IgG의 동조 상승이 추가 면역 처리 후 첫째 주에 관찰되었다(도 7). 콜레라 백신을 이용한 경우에 관찰된 것처럼, 항-CD IgG 분비는 네 콧구 사이에 균등하게 분배되었으며 고 농도 분비는 상대적으로 짧게 유지되어 2주 내에 약 50% 농도로 감소하였다. 추가 처리 후 즉각적인 IgG 반응과는 달리, 항-CD IgA 반응은 천천히 나타났으며 한달 이상 후에 검출될 수 있었으며(도 8), 이때 7 마리 소(10 마리 중)를 선별하여 재면역시켰다. 재면역은 1주 간격을 둔 두번의 IN 면역으로 시작하였다. 그 2주 후, 각 소를 한번의 IN과 두 번의 LMF 면역(각 후면 콧구에 대해 한번)의 추가 면역 시켰다. IgG 반응의 경우와는 달리, 놀랍게도, 항-CD IgA 반응은 면역된 소들 사이에서 동조화되지 않았다. (항-CD IgA 반응의 동조화는 LMF와 IMA 경로의 조합이 추가 면역으로 가해질 때 회복될 수 있었다(도 11 참고)). 이 실험에서 다른 예상치 못한 결과는, 항-CTB IgA 반응의 경우에 관찰되었던 강한 콧구-특이성이 더 이상 관찰되지 않는 것이었다. 즉, 면역된 콧구(후면 우측)가 반드시 가장 높은 농도의 항-CD IgA를 분비하는 것은 아니었다.

**면역 경로의 상대적 중요성**

우유에서 항체 분비의 최종 결과에 대한 각 면역 경로의 상대적 기여도를 평가하기 위하여, 8마리 소를 CD 백신으로 면역시켰다. 예상한 대로, 2주의 간격을 둔 IN 경로를 통한 두 번의 연속적인 면역 후 우유에서는 항-CD 항체가 검출되지 않았다(도 9와 도 10). 두 번째 IN 후 1주째에 모든 소에게 전면 콧구에 IMA 면역시키고 세번째 IN 면역시켰다(5/22/2000). 그 후 1주째에(5/28/2000), 항-CD IgG를 모든 네 콧구에서 검출할 수 있었으나 매우 낮았다(도 9). 하지만, 항-CD IgA는 모든 네 콧구에서 검출할 수 없었다(도 10). 이어서 8마리 소를 두 그룹으로 나누었다. 네 마리(그룹 1)에게 CD 백신을 주사하고 다른 네 마리(그룹 2)에게 LMF 경로를 통해 염수를 주사하였다(5/29/2000). 1주 후, 그룹 1에서만 항-IgG 분비의 주목할만한 증가가 있었으며, 이는 IMA 경로가 IgG 부류의 분비에 상대적으로 중요하지 않음을 의미한다(도 9). 예상한 대로, 분비에 대한 콧구 특이성은 없었다. 하지만, IgA 부류의 경우, 두 그룹 모두에서 상당한 농도의 항-CD 항체 분비가 관찰되었으며, 시간 경과에 따라 급격히 감소하긴 했으나 염수 처리된 군에서도 관찰되었다(도 10). 이 자료는 LMF 경로가 IgA 분비를 위해 주요한 역할을 하지만 IMA 경로도 덜한 정도로 역할을 함을 함축한다. (이전의 실험에 더하여) 다시, 콧구 특이성이 명백히 사라졌다. 이 관찰은 면역의 경로와는 무관하게 보이며, 따라서 사용된 백신, 즉 CD의 약독화된 독소 A, CD의 약독화된 독소 B 및/또는 불활성화된 CD 세포의 결과임에 틀림없다. 이 관찰은 소의 단지 후면 콧구로부터만 우유를 수집해야만 하는 바람직하지 못한 물류적 문제에 대한 해결책으로 이끌 수 있으므로 중요하다(LMF 경로를 통한 소의 전면 콧구의 면역은 수술없이 불가능하다). 이 실험에서 항-CD-항체, IgA와 IgG 둘다의 전체적인 농도(도 9와 도 10)는 이전에 관찰된 것보다는 그 정도가 낮은 양이었다. 이 결과는 LMF 경로를 통한 추가 면역이 IMA, 질내, 직장내 및/

또는 바람직하게는 비강내와 같은 다른 점막내 경로를 수반하는 것이 매우 바람직함을 명확히 나타낸다. IN 경로를 통해 프라이밍한 후 LMF와 IMA 경로를 통해 소가 면역된 한 가지 그러한 예가 도 11(항-CD IgA)과 도 12(항-CD IgG)에 나타난다.

### 면역된 소의 우유에서 총 Ig 농도의 수준

본원에서 개시된 방법을 이용하여, 항원-특이적 항체의 농도는 면역된 소의 초유에서 정상적으로 발견되는 범위에(가까이) 도달할 수 있다. 면역되지 않은 소의 초유에서 총 Ig 농도는 성숙우보다 대략 2차수 배 더 높기 때문에, 명백한 의문은 면역된 소의 우유에서 총 Ig 농도는 얼마인가이다. 고압 액체 크로마토그래피를 이용하여 실시된 측정은 면역 우유의 총 Ig 양은 평균 0.3 mg/ml인 비면역 우유의 총 Ig 양과 크게 다르지 않음을 보여주었다. 면역 및 비면역 우유중의 총 Ig의 상대적 양은 도 13에서 나타난다(각 소의 면역반응성을 위해서는 도 8 참고). 대조군의 값은 모아진 것(9 샘플)의 값이다.

### 소 이외의 포유류의 면역-반응성.

유사한 결과를 위해 다른 포유류에게 동일한 면역 방법을 적용할 수 있는지를 시험하기 위해, 염소를 선택하였다: 염소는 쉽게 구할 수 있으며 한 마리가 최대 2000 리터의 젖을 생산할 수 있다. 자동 젖짜기 시스템이 이용가능하며 젖으로부터 치즈 제조 방법, 유장 제조 방법 및 염소의 질병 상태 및 처리에 대한 정보가 널리 알려져 있다.

10마리 염소를 3주 간격으로 IN 경로를 통해 세번 면역시켰다. 세번째 IN 후 2주째에 각 염소는 IN, IMA 및 LMF 경로를 통해 각 한번씩 세번 면역시켰다. 유장 샘플에서 항-CTB IgG, 항-CTB IgA, 항-CD IgG와 항-CD IgA의 농도를 측정하고 결과 면역된 소의 우유에서 관찰된 면역 반응의 유사한 일반적 패턴을 보여주었다.

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

### 도면의 간단한 설명

도 1은 면역된 소의 초유에서 항-CTB IgA와 IgG의 상대적인 농도(기준으로 이용됨)를 그래프로 도시하고 있다.

도 2는 면역된 소의 초유에서 항-CD IgA와 IgG의 상대적인 농도(기준으로 이용됨)를 그래프로 도시하고 있다.

도 3은 당업계에 공지된 다양한 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CTB IgA 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 4는 당업계에 공지된 다양한 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CTB IgG 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 5는 본 발명의 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CTB IgA 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 6은 본 발명의 다양한 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CTB IgG 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 7은 본 발명의 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CD IgG 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 8은 본 발명의 면역 방법의 적용 후 소의 우유에서 항-CD IgA 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 9는 다양한 면역 경로 후 우유에서 상대적인 항-CD IgG 반응성을 그래프로 도시하고 있다.

도 10은 다양한 면역 경로 후 우유에서 상대적인 항-CD IgA 반응성을 그래프로 도시하고 있다.

도 11은 LMF와 IMA 경로를 통하여 추가 면역한 결과 소의 우유에서 항-CD IgA 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 12는 LMF와 IMA 경로를 통하여 추가 면역한 결과 소의 우유에서 항-CD IgG 반응(대 기준 1000 유닛/ml)을 그래프로 도시하고 있다.

도 13은 면역되지 않은 소와 비교하여 면역된 소의 우유에서 총 Ig의 상대적인 농도를 그래프로 도시하고 있다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

(a) 가축을 항원에 대해 과면역시키는 단계로서, 상기 과면역은 가축의 기도, 질내, 직장내 및 비강내로 구성된 군에서 선택된 점막내 경로를 통해 항원을 투여하는 것을 포함하는 것인 단계;

(b) 상기 항원을 상기 가축의 유선 및/또는 상유선 림프절에 투여하는 단계; 및

(c) 상기 가축으로부터 상기 유선 분비 생성물을 수집하는 단계

를 포함하는, 항원에 특이적인 항체를 포함하는 유선 분비 생성물의 제조 방법.

### 청구항 2.

삭제

### 청구항 3.

제1항에 있어서, 유선 분비 생성물이 젖인 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 4.**

제1항에 있어서, 항체가 IgA 항체인 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 5.**

제1항에 있어서, 가축에서 항원에 대한 면역 반응을 증대시키는(boosting) 단계를 추가로 포함하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 6.**

제5항에 있어서, 증대 단계가 가축의 기도, 유선 및/또는 상유선 림프절에 항원을 투여하는 것을 포함하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 7.**

제1항에 있어서, 항원 또는 이의 기능성 등가물을 코딩하는 핵산을 투여함으로써 항원을 투여하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 8.**

제1항에서, 가축이 소 또는 염소인 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 9.**

제1항에 있어서, 과면역 단계가 어주번트를 가축에 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 10.**

제9항에 있어서, 어주번트가 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*)의 독소 B인 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 11.**

제1항에 있어서, 항원을 가축의 유선 및/또는 상유선 림프절에 투여한 후에 2차 과면역 단계를 수행하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 12.**

제1항에 있어서, 항원이 클로스트리듐 디피실레의 배양물로부터 유래된 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 13.**

제12항에 있어서, 항원이 클로스트리듐 디피실레의 포자인 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 14.**

제12항에 있어서, 항원이 클로스트리듐 디피실레 독소 A, 독소 B 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 유선 분비 생성물의 제조 방법.

**청구항 15.**

(a) 제1항의 방법으로 항원에 특이적인 항체를 포함하는 유선 분비 생성물을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 유선 분비 생성물로부터 항체 조성물을 유도하는 단계

를 포함하는, 항원에 특이적인 항체를 포함하는 항체 조성물의 제조 방법.

**청구항 16.**

(a) 제1항의 방법으로 항원에 특이적인 항체를 포함하는 유선 분비 생성물을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 유선 분비 생성물로부터 항원-특이적 항체를 정제하는 단계

를 포함하는, 항원-특이적 항체의 제조 방법.

**청구항 17.**

(a) 제1항의 방법으로 제조된 유선 분비 생성물;

(b) 제15항의 방법으로 제조된 항체 조성물; 또는

(c) 제16항의 방법으로 제조된 항원-특이적 항체

를 약제에 통합시키는 단계를 포함하는, 항원에 특이적인 항체를 포함하는 약제의 제조 방법.

**청구항 18.**

(a) 제1항의 방법으로 제조된 유선 분비 생성물;

(b) 제15항의 방법으로 제조된 항체 조성물; 또는

(c) 제16항의 방법으로 제조된 항원-특이적 항체

를 식품에 통합시키는 단계를 포함하는, 항원에 특이적인 항체를 포함하는 식품의 제조 방법.

**청구항 19.**

가축의 기도, 질내, 직장내 및 비강내로 구성된 군에서 선택된 점막내 경로를 통해 항원을 투여하는 것을 포함하는 과면역에 의해 항원에 대해 과면역되고 이 가축의 유선 및/또는 상유선 림프절에 상기 항원이 투여된 가축으로부터 얻을 수 있는 성숙유로서, 상기 성숙유는 항원에 대해 면역된 다른 비선택된 가축의 초유로부터 얻을 수 있는 항원 특이적 IgA 항체의 평균량의 200% 이상의 양으로 항원 특이적 IgA 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 성숙유.

**청구항 20.**

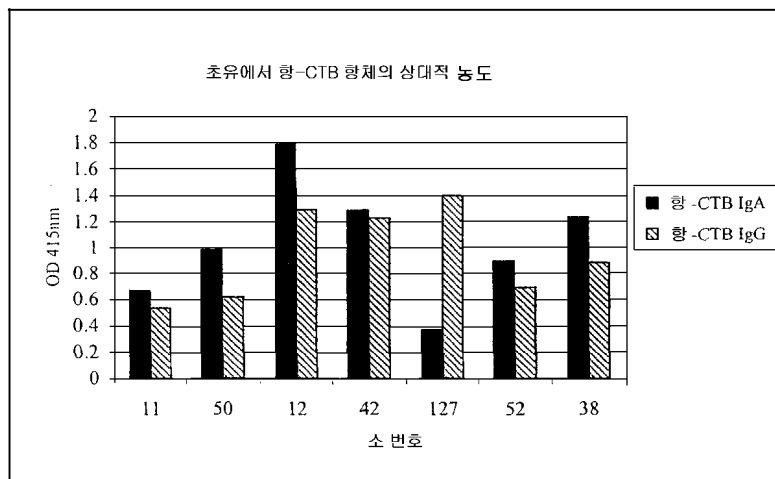
가축의 기도, 질내, 직장내 및 비강내로 구성된 군에서 선택된 점막내 경로를 통해 항원을 투여하는 것을 포함하는 과면역에 의해 항원에 대해 과면역되고 이 가축의 유선 및/또는 상유선 림프절에 상기 항원이 투여된 가축으로부터 얻을 수 있는 성숙유로서, 상기 성숙유는 15 µg/ml 이상의 항원 특이적 폴리클로날 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 성숙유.

**청구항 21.**

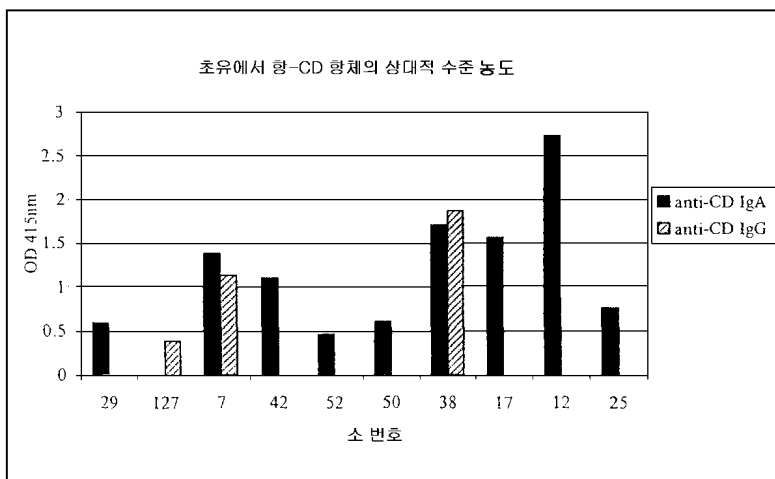
제20항에 있어서, 항원 특이적 항체는 IgA로 구성되는 것인 성숙유.

**도면**

**도면1**

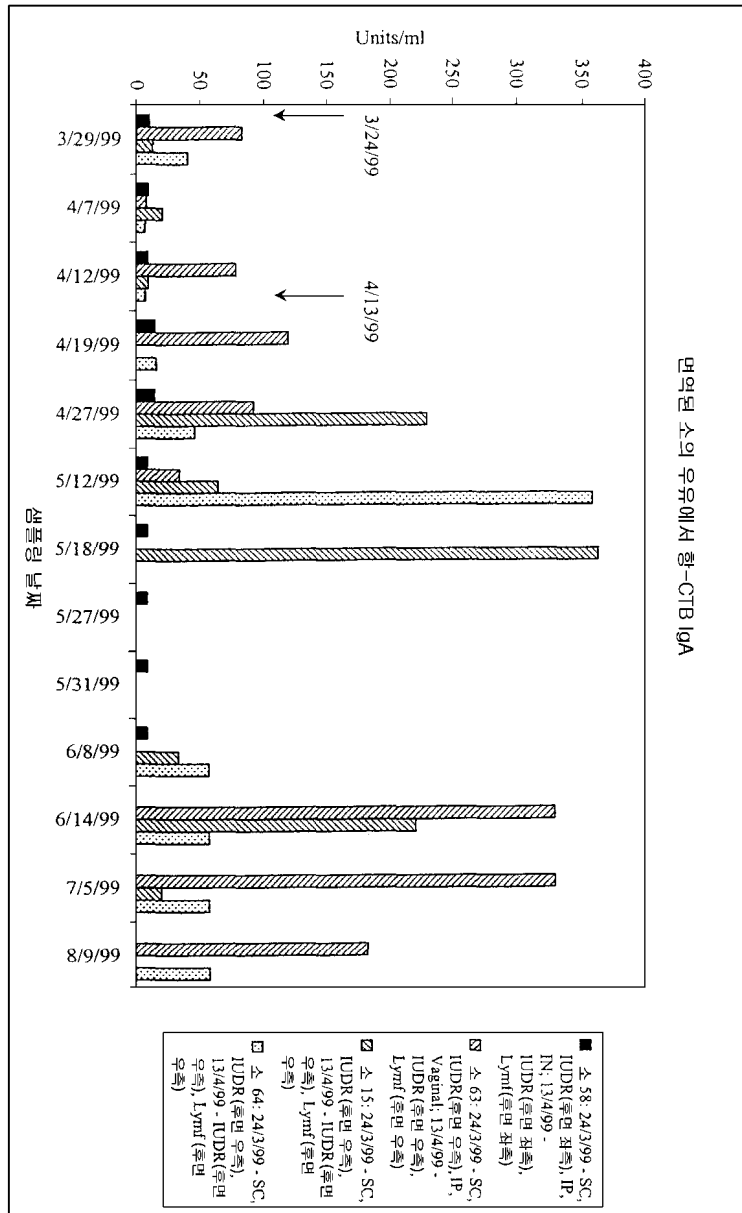


**도면2**

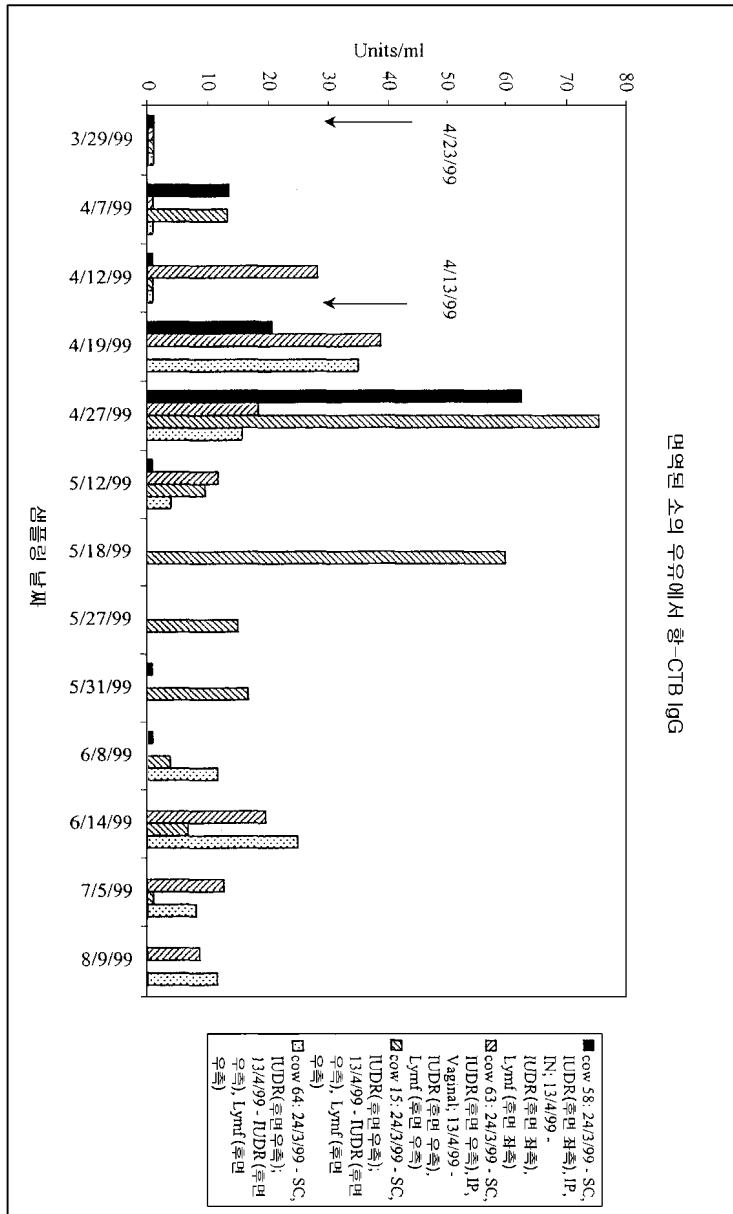




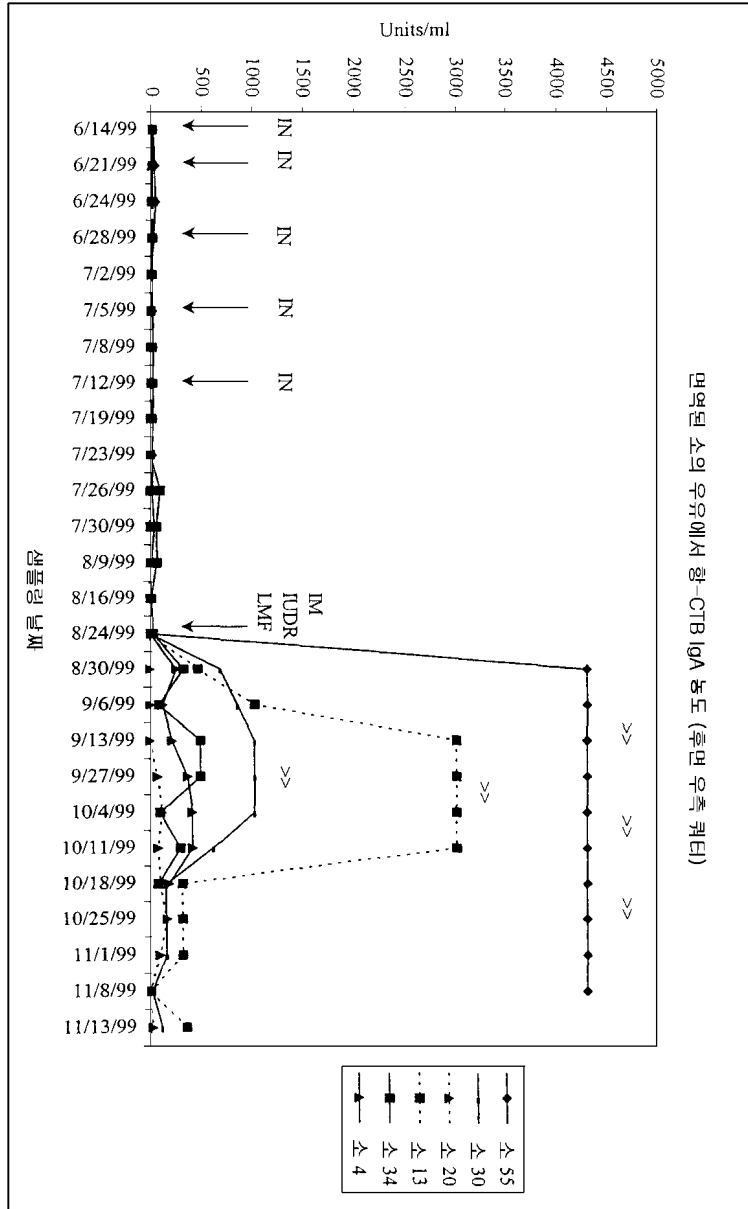
도면3



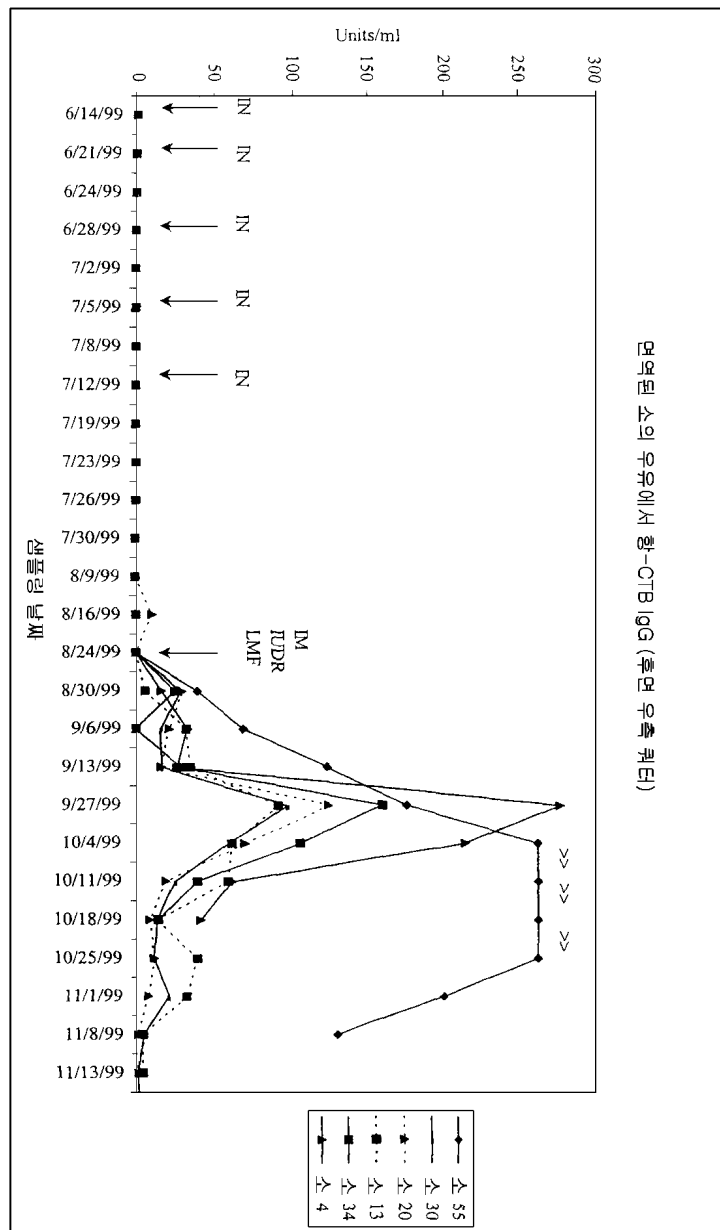
도면4



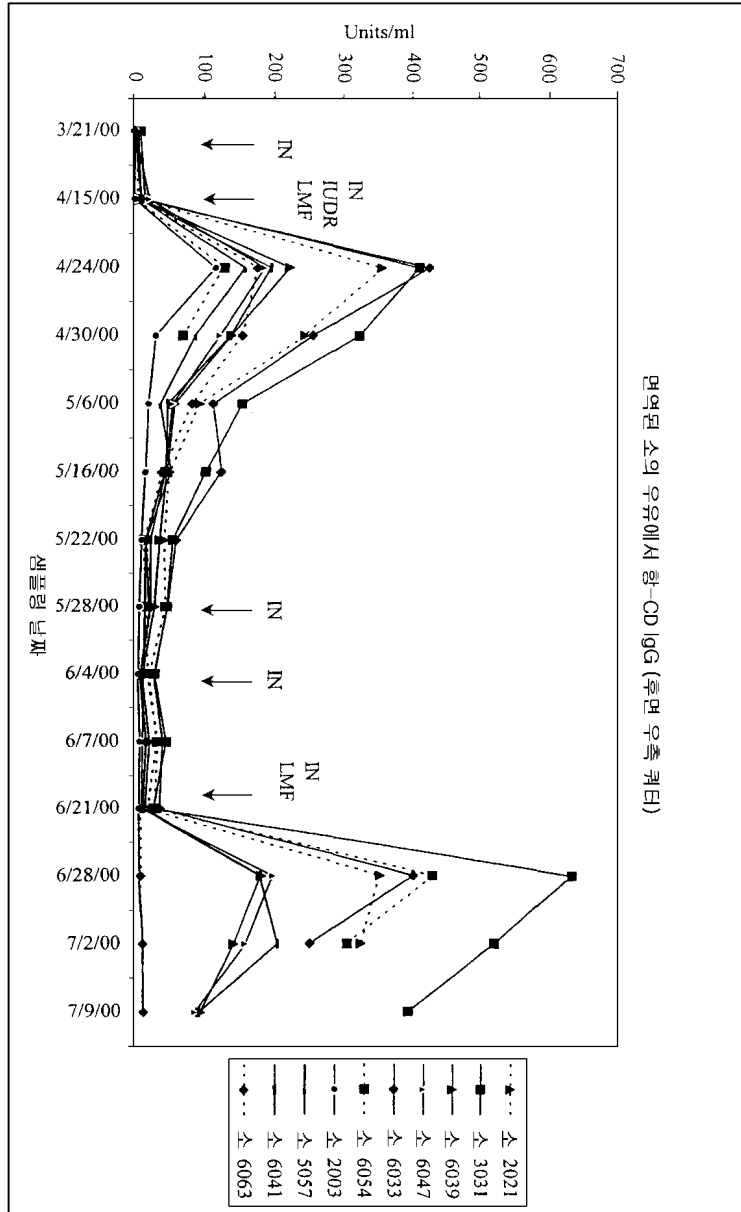
도면5



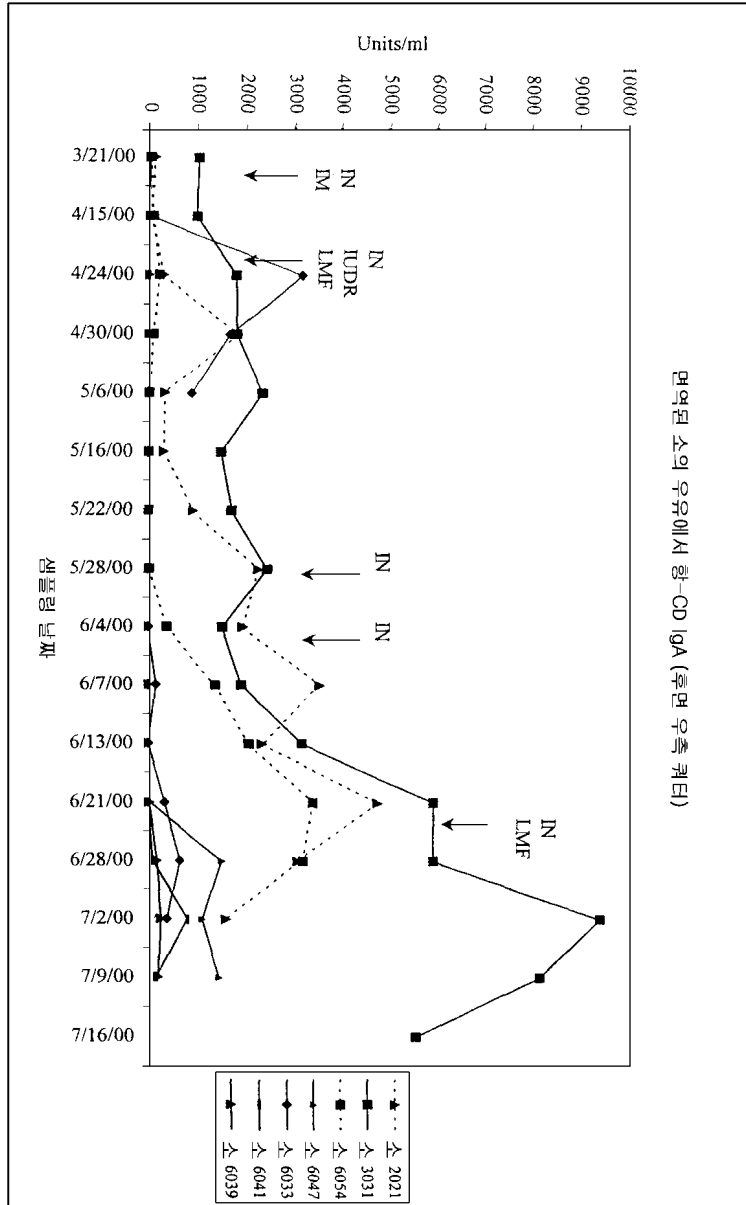
도면6



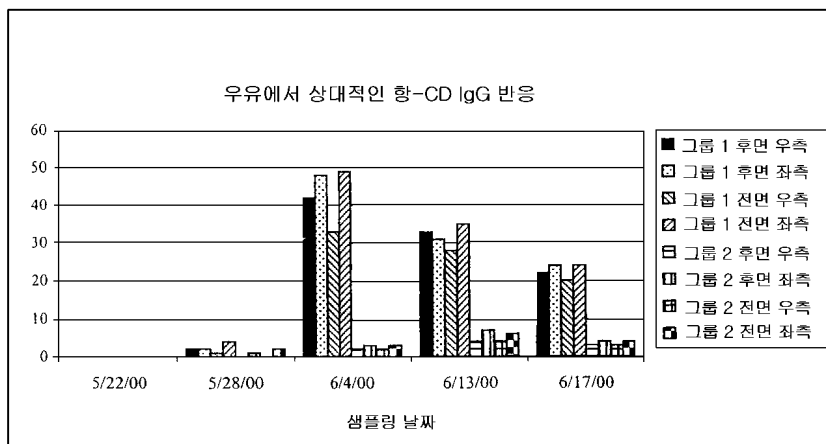
도면7



도면8

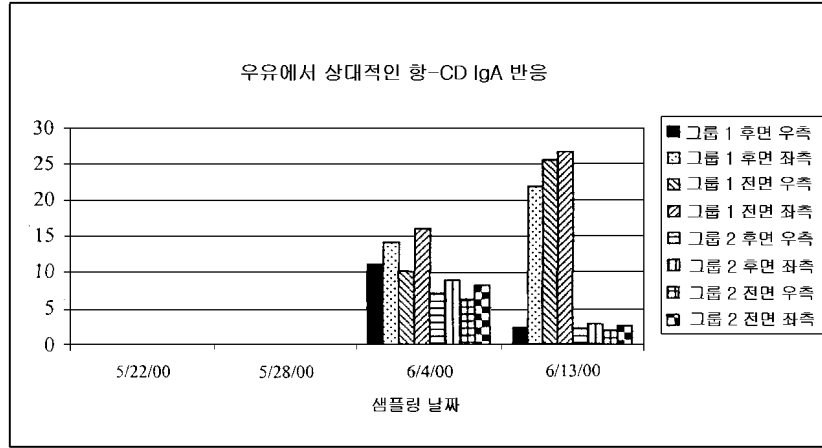


도면9

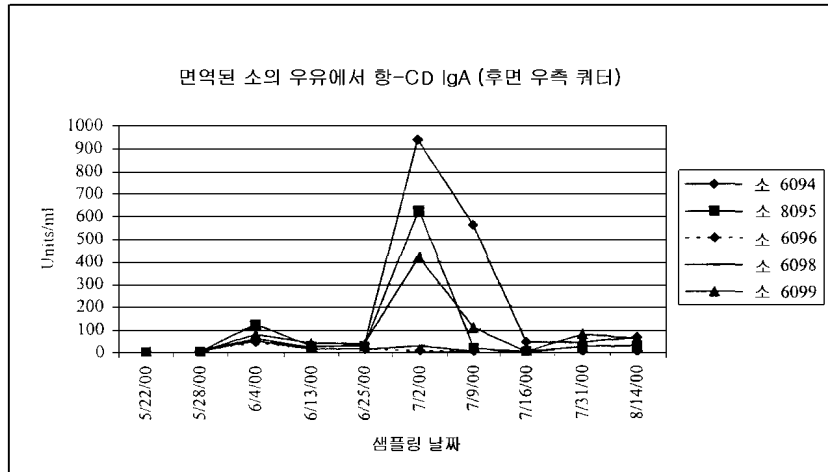




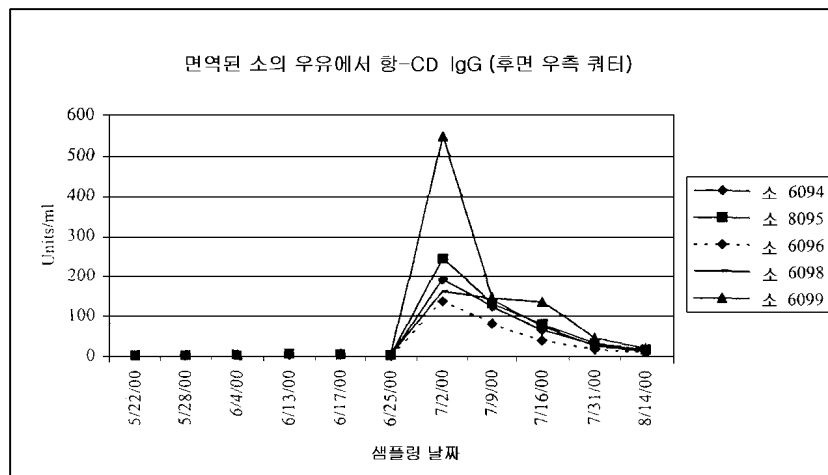
도면10



도면11



도면12



도면13

