



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월10일
(11) 등록번호 10-0757630
(24) 등록일자 2007년09월04일

(51) Int. Cl.

C08B 37/00(2006.01) C12P 19/00(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7013976(분할)

(22) 출원일자 2006년07월11일

심사청구일자 2006년07월11일

변역문제출일자 2006년07월11일

(65) 공개번호 10-2006-0086978

공개일자 2006년08월01일

(62) 원출원 특허 10-2000-7006995

원출원일자 2000년06월22일

심사청구일자 2003년12월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US1998/027375

국제출원일자 1998년12월23일

(87) 국제공개번호 WO 1999/32653

국제공개일자 1999년07월01일

(30) 우선권주장

60/068,608 1997년12월23일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Infect. Immun., Vol. 57(4), pp. 1089-1094
(1989)

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 1 항

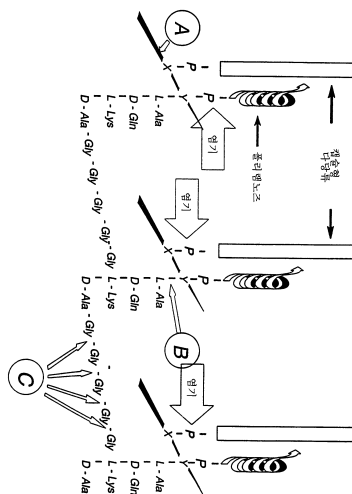
심사관 : 조영균

(54) 신규한 추출 및 분리 방법으로 수득되는 세균성 캡슐형 다당류

(57) 요약

염기 추출법을 이용하여 배양 상층액과 그람음성 및 그람양성 세균 세포로부터 대량의 캡슐형 다당류(CPS)를 분리하는 방법이 개시되어 있다. 이 과정은 간단하고, 빠르고, 재현가능하며 다양한 세균종에 응용할 수 있다. 이 방법으로 외부 캡티도글라이칸에 공유결합되지 않은 것을 특징으로 하는 새로운 CPS를 수득할 수 있다. 본 발명의 방법에서 수득된 CPS를 사용하여 세균감염에 대해 면역화하는 방법과 백신도 개시되어 있다.

대표도 - 도12



(56) 선행기술조사문헌

EP 0238739 A1

US 4413057

US 5190746 A

(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, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

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

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

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

정제된 B군 연쇄구균 캡슐형 다당류를 포함하는 백신에 있어서, 상기 정제된 B군 연쇄구균 캡슐형 다당류는 B군 연쇄구균 캡슐형 다당류와 핵산, 단백질, 또는 이들 모두를 포함하는 조성물을 pH 9 내지 14 인 염기 시약으로 처리하는 단계 및 상기 정제된 B군 연쇄구균 캡슐형 다당류를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되고, 상기 B군 연쇄구균 캡슐형 다당류(CPS)는 I a 타입 CPS, I b 타입 CPS, II 타입 CPS, III 타입 CPS 및 V 타입 CPS로 구성된 군으로부터 선택되며,

상기 분리 단계 이후의 I a 타입 CPS는 0.010-0.005 범위의 K_{av} ; 318-311(kg/mol) 범위의 M_w ; 1.35-1.31 범위의 M_w/M_n ;

상기 분리 단계 이후의 I b 타입 CPS는 0.191-0.150 범위의 K_{av} ; 218-170(kg/mol) 범위의 M_w ; 1.61-1.20 범위의 M_w/M_n ;

상기 분리 단계 이후의 II 타입 CPS는 0.152-0.115 범위의 K_{av} ; 289-246(kg/mol) 범위의 M_w ; 1.46의 M_w/M_n ;

상기 분리 단계 이후의 III 타입 CPS는 0.343-0.268 범위의 K_{av} ; 108-104(kg/mol) 범위의 M_w ; 1.24-1.22 범위의 M_w/M_n ;

상기 분리 단계 이후의 V 타입 CPS는 0.257-0.156 범위의 K_{av} ; 179-92(kg/mol) 범위의 M_w ; 1.28-1.15 범위의 M_w/M_n 을 갖는 것을 특징으로 하는 백신.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<13> 본원에 참조로 도입된, 1997. 12. 23. 출원한 U.S. 가출원번호 60/068,608 을 우선권으로 청구한다.

<14> 본 발명은 그람 음성, 그람 양성 세균 모두로부터 캡슐형 다당류(CPS)를 추출하고 단리하는 방법에 관한 것이다. 추출된 다당류는 다당류 단독 또는 단백질에 결합된 다당류를 포함하는 백신을 생산하는데 유용하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<15> 연쇄구균 (*Streptococcus*), 스태필로코코스 (*Staphylococcus*), 엔테로코코스 (*Enterococcus*), 바실러스 (*Bacillus*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 리스테리아 (*Listeria*), 에리시펠로스릭스 (*Erysipelothrix*), 클로스트리디움 (*Clostridium*) 과 같은 그람 양성 세균과 헤모필러스 (*Haemophilus*), 시겔라 (*Shigella*), 비브리오 콜레라 (*Vibrio Cholerae*), 나이세리아 (*Neisseria*) 와 특정 대장균에 의해 야기된 세균 감염은 전세계에 걸쳐 심각한 이환율을 갖는다. 항생제에 대한 세균의 저항성의 출현과 함께 이러한 사실은 세균성 백신을 개발할 필요를 제시한다. 예를 들어, 연쇄구균은 항원성과 세포벽 다당류의 구조에 근거하여 여러 군으로 분류되는 크고 다양한 속의 그람 양성 세균이다(26,27). 이러한 군 중의 두가지는 심각한 인간 감염과 관련된다. A 군 연쇄구균은 "스트렙 스로트 (strep throat)", 류마티스성 열, 연쇄구균성 농가진, 및 패혈증을 포함하여 다양한 감염성 질병을 유발한다.

<16> B 군 연쇄구균은 1970년 초에 표준 의학 교과서에서 인간의 병원체로 알려지기 시작했다. 그 시기 이후로, 연구를 통해 B 군 연쇄구균이 미국과 개발 도상국에서 출생전후 중요한 병원체임이 알려졌다(37). 초기 두 달 동안의 B 군 연쇄구균 전신 감염은 1000명 중 약 3명에 영향을 주며(12), 미국에서 연간 11,000건이 발생한다. 이러한 감염은 선천성 폐렴, 패혈증, 및 수막염의 증상을 일으킨다. 이러한 유아의 상당수가 죽거나 영구적인 신경학적 후유증을 갖는다. 게다가, B 군 연쇄구균 감염은 연간 거의 50,000명의 여자에게 발생하는 임신과 관련된 이환율에 높이 관련되어 있다. B 군 연쇄구균 감염이 위험한 다른 사람들은 선천적으로, 화학요법적으로

또는 다른 수단에 의해 면역 반응이 변화된 사람들이다.

- <17> B 군 연쇄구균은 세균의 캡슐형 다당류에 근거하여 여러 다른 형태로 더 분류될 수 있다. Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, 및 VIII 타입은 B 군 감염에 따른 병원성의 대부분을 이루고, B 군 연쇄구균 Ia, Ib, II, III, 및 V는 보고된 모든 경우의 90% 초과를 나타낸다. 각각의 다양한 형태의 다당류의 구조의 특성이 규명되었다 (19-22, 44). 사람의 세균성 병원균을 가지고 발견한 것과 비슷하게, 백신에 사용되었을 때 B 군 연쇄구균의 캡슐형 다당류는 이러한 세균의 감염에 대해 효과적인 보호를 제공할 수 있다(참조: 4, 6, 24, 29, 30, 42, 43, 45)
- <18> 그람 음성 세균도 병의 중요한 원인이다. 인플루엔자균 b 타입 세균(Hib)에 대한 다당류-단백질 백신을 최근에 개발하고 사용하기까지, Hib 세균 감염으로 유아의 여러 정신 지연 증례가 발생했다. 수막염균 (*N. meningitidis*) 와 대장균 K1 감염으로 신생아 수막염이 발생한다. 그람 음성 세균 균주인 대장균은 대장균으로 감염된 고기를 먹어서 사망한 것을 포함하여 심각한 병과 관련된다.
- <19> 캡슐형 다당류 백신과 캡슐형 다당류 결합백신을 대량 생산하기 위해서는 정제된 캡슐형 다당류의 적절한 공급이 필요하다. 세균 세포로부터 캡슐형 다당류를 분리하는 선행 기술의 방법 (40, 42)에서는 세포를 효소 뮤타노라이신으로 처리하는 것에 의존한다. 뮤타노라이신은 세포벽을 절단하여 세포 성분이 방출된다. 이 과정은 세포 용해물을 추가적인 효소로 처리하여 단백질과 핵산을 제거하고 분별 침전법과 크로마토그래피로 정제하는 것이 관여된다. 정제된 캡슐형 다당류를 수득하기 위한 더 효과적이고 더 고수율이며 더 단순한 방법이 바람직하다.

발명의 구성 및 작용

- <20> 본 발명의 개요
- <21> 본 발명은 그람 음성과 그람 양성 세균 모두의 세포 성분으로부터 캡슐형 다당류(CPS)를 추출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 세균 상층액이나 세균 세포로부터, CPS와 다른 세포 성분을 연결하는 염기에 약한 결합을 가수분해하여 CPS를 추출할 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 추출 공정의 장점은 추출된 CPS가 대부분 온전하다는 점이다.
- <22> 본 발명의 다른 구현에는 다른 세포 성분으로부터 CPS의 분리를 촉진하기 위해서 염기 추출동안 CPS의 N-아세틸기의 일정량을 탈아세틸화하여 정제된 캡슐형 다당류를 수득하는 방법을 제공한다. 자연형 다당류로서 N-아세틸기에 관해서 같은 반복 단위 구조를 가지는 정제된 CPS를 제공하기 위해서 일정량의 아세틸기를 재도입할 수 있거나 변형된 알킬기로의 아실화를 이용하여 변형된 CPS를 수득할 수 있다.
- <23> 바람직한 구현예에서, CPS는 B 군 연쇄구균으로부터 추출될 수 있다. 가장 바람직한 구현예에서, CPS는 GBS Ia, Ib, II, III, V, 및 VIII 타입으로부터 추출된다.
- <24> 다른 바람직한 구현예에서, CPS는 폐렴연쇄구균 (*S. pneumoniae*) 에서 추출된다. 가장 바람직한 구현예에서, CPS는 폐렴연쇄구균 III, IV, 및 XIV 타입에서 추출된다.
- <25> 다른 바람직한 구현예에서, CPS는 나이세리아속 또는 대장균속 세균으로부터 추출된다. 가장 바람직한 구현예에서, CPS는 수막염균 B, C, Y 또는 W135 타입 또는 대장균 K1로부터 추출된다.
- <26> 본 발명에 따라 세균 상층액 또는 세균 세포로부터 캡슐형 다당류를 정제하는 것은 다른 방법에 비해 다음의 잇점을 갖는다: (a) 단순성(최소의 단계수), (b) 효율성(고수율과 고순도), (c) 안전성(가연성 유기 용매의 사용을 감소 또는 배제), (d) 모든 그람 음성, 및 그람 양성 세균에 대한 일반적인 응용성.
- <27> 본 발명에 따른 방법은 농축된 추출물 및/또는 분리된 세균 세포를 염기성 용액으로 처리하는 것을 포함한다. CPS를 추출하는 것뿐만 아니라, 염기 추출은 N-아세틸기의 탈아세틸화를 일으킨다. 탈아세틸화의 정도는 반응 조건을 조정하면 변화될 수 있다. 이어서 추출된 CPS는 세포 성분으로부터 분리되어, 바람직하게는 크로마토그래피 분리로 CPS를 수득할 수 있다. 아세틸기의 일부 또는 대부분은 CPS나 변형된 CPS를 수득하기 위해서 재도입될 수 있다. CPS의 마지막 정제는 겔 투과 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 또다른 구현예에서, 본 발명은 백신이나 결합백신으로 사용하기에 적합한 것으로서, 염기성 추출 조건에서 수득한 신규하고 선택적으로 변형된 CPS를 제공한다.
- <28> 본 발명의 한 구현예는 포유동물 내에서 살균성이고 감염에 대해 동물을 보호하는 항체의 생성을 유도할 수 있는, 실질적으로 순수한 CPS를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

- <29> 본 발명의 또다른 구현에는 감염, 전형적으로 CPS가 단리된 세균 균주에 의한 감염에 대해 인간이나 동물을 보호하기 위해서 백신에 상기 CPS를 단독 또는 폴리펩티드에 결합된 상태로 이용하는 것이다. 특별한 경우, 본 발명에 사용된 다당류는 다른 병원성 세균과 교차반응성인 항체의 생산을 유도하여 다른 세균에 의한 감염에 대해 보호할 수 있다.
- <30> 본 발명의 목적은 그람 음성 혹은 그람 양성 세균 상층액이나 그람 음성 혹은 그람 양성 세균 세포에 포함된 그람 음성 및 그람 양성 세포 성분 모두로부터 캡슐형 다당류를 단리하는 방법을 제공하는 것이다. 이러한 캡슐형 다당류는 백신으로 사용되거나 폴리펩타이드에 결합되어 백신으로 유용한 결합 분자를 형성할 수 있다.
- <31> 발명의 상세한 설명
- <32> 본 발명은 CPS를 세포 성분에 부착시키는 염기-불안정 결합의 염기 가수분해에 의해 그람 음성과 그람 양성 세균으로부터 캡슐형 다당류를 수득하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 세균 또는 세균 단편을 포함하는 용액과 염기를 접촉시켜 그람 양성, 그람 음성 세균 모두로부터 CPS를 추출하는 것을 포함한다. CPS는 다양한 방법으로 염기로부터 회수될 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 그람 양성 세균의 비제한적 예는 연쇄구균, 스타필로코코스, 엔테로코코스, 바실러스, 코리네박테리움, 리스테리아, 에리시켈로스릭스와 클로스트리디움이다. 특별히, 연쇄구균의 사용이 보다 바람직하고 B 군 연쇄구균 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 타입을 사용하는 것이 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용하기 위한 그람 음성 세균의 비제한적 예는 인플루엔자균, 수막염균, 및 대장균을 포함한다. 특별히, 인플루엔자균 b 타입, 수막염균 B, C, Y, 및 W135 타입, 및 대장균 K1이 더 바람직하다.
- <33> 본 발명에 따르면 수용성 또는 유기 용매에서 염기-불안정 결합을 가수분해하기 위해 다양한 조건이 사용될 수 있다. 탄수화물의 N-아세틸 결합이 가수분해되는 정도는 또한 반응 조건에 의해 조정될 수 있다. 나머지 세포 성분에 비해서 N-아세틸 결합이 절단되는 정도가 더 클수록 CPS는 더 친수성으로 되기 때문에, N-아세틸기의 가수분해는 CPS를 다른 세포 성분으로부터 분리하는데 이롭다. 극성의 차이는 효과적인 크로마토그래피 분리에 영향을 줄 수 있다. 극성의 차이에 근거한 혼합물의 두가지 이상의 성분의 분리는 당업자에게 잘 알려져 있다.
- <34> 예를 들어, 소수성-상호작용 크로마토그래피를 사용하면 상대적으로 소수성이 더 큰 화합물은 친수성이 더 큰 화합물보다 칼럼에 더 오래동안 머무른다. 반대로, 친수성-상호작용 크로마토그래피를 사용하면 친수성 화합물이 더 소수성인 화합물보다 칼럼에 더 오래동안 머무른다. 두가지 방법을 함께 연속적으로 사용하면 관심 대상인 화합물에 비해 상대적으로 덜 극성이고 더 극성인 불순물 모두를 제거할 수 있다.
- <35> 대안적으로, CPS에 존재하는 유리 아미노기나 카르복시실산은 효과적인 크로마토그래피 분리를 촉진하는데 사용될 수 있다. 전하의 차이에 근거해 혼합물의 두가지 이상의 성분을 분리하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다. 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하면, 프로톤화된 아민과 같은 양성으로 하전된 기를 포함하는 화합물은 양전하가 거의 없거나 전혀 없어서 칼럼을 상대적으로 빨리 통과하는 화합물보다 칼럼에 더 오래 머무른다. 반대로, 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하면 카르복실산과 같은 음성으로 하전된 화합물이 칼럼에 유지되는 반면에 음전하가 거의 없거나 전혀 없는 화합물은 칼럼을 상대적으로 빠르게 통과한다.
- <36> 다른 세포 성분으로부터 탈아세틸화된 CPS를 분리한 후에, 유리 아미노기를 다시 아세틸화할 수 있다. 아세틸화 시약과 반응 조건을 변화시켜서 실험자가 아미노기의 재아세틸화 정도를 조정할 수 있다. 아실화 단계에 도입된 불순물은 재아실화 CPS와 비교해서 크기가 작기 때문에 겔 투과 크로마토그래피로 CPS로부터 분리할 수 있다.
- <37> 예를 들어, 겔 투과 크로마토그래피는 상대적으로 큰 CPS를 효과적으로 분리할 수 있다. 대안적으로, CPS를 남아 있는 불순물로부터 정제하기 위해서 극성이나 전하의 차이가 사용될 수 있다.
- <38> A. 캡슐형 다당류의 준비
- <39> 본 발명에 의하면 세포 성분으로부터 세균성 다당류를 단리하고 정제하는 것은 네 단계로 달성될 수 있다: 염기 추출, 크로마토그래피 분리, N-아실화, 및 크로마토그래피 정제.
- <40> 1. 출발 물질
- <41> 균질화된 세균 세포나 적응용 배지 (conditioned medium) 로부터의 농축된 세균 상층액으로부터 CPS를 추출하기 위한 물질을 수득할 수 있다. 세포는 원심분리나 미세여과에 의해 분리되어, 상층액이 보통 10-15배 농축된다. 바람직하게 세균 상층액과 적응용 배지는 농축되어서 CPS는 약 5-20 mg/ml 의 농도로 존재한다. 추가적인

로, 펠릿화된 세포는 직접 추출될 수 있다.

<42> 2. 염기 추출

<43> 농축된 세균 상층액이나 적응용 배지는 CPS를 추출하기 위해서 다양한 염기와 접촉될 수 있다. 대안적으로, 분리된 세균 세포는 CPS를 추출하기 위해서 다양한 염기와 더 접촉될 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 염기의 비제한적인 예는 NaOH, KOH, LiOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, KCN, Et₃N, NH₃, H₂N₂H₂, NaH, NaOMe, NaOEt 또는 KO^tBu 이 있다. NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe 또는 KO^tBu 같은 염기는 0.5 N-5.0 N의 범위에서 가장 효과적으로 사용된다. NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, KCN 과 같은 염기는 용해도 한계만큼 높은 농도에서 사용될 수 있다. Et₃N과 같은 유기 염기도 가수분해에 영향을 주는 물이나 알콜과 같은 제제가 있으면 중간 내지 높은 (50-100%) 농도로 배지에서 사용될 수 있다. NH₃ 또는 H₂N₂H₂와 같은 염기도 100%를 포함하여 거의 모든 농도에서 사용될 수 있다. 물, 알콜(바람직하게는 C₁-C₄), 디메틸설폭사이드, 디메틸포름아마이드 또는 이것들과 다른 유기용매의 혼합물과 같은 용매가 사용될 수 있다. 물을 포함하는 염기 추출 용액이 가장 바람직하다.

<44> 세포 성분으로부터 CPS를 추출하는 가장 효과적인 pH 범위는 9에서 14까지이며 적정 pH는 약 12이다. 추출은 약 4°C부터의 온도에서 할 수 있지만, 바람직하게는 약 40에서 100°C 사이로 온도를 올리고/올리거나 반응 혼합물을 교반시키면 수율 증가가 예상된다. 약 1-20 g의 세포 페이스트를 약 1 리터의 염기 시약에 사용하는 것이 바람직하다. 대안적으로, 농축된 상층액은 10N NaOH로 반응 혼합물에서 2N NaOH의 최종농도까지 희석된다.

<45> 3. 크로마토그래피적 분리

<46> 염기 추출 시약에 존재하는 추출 CPS는 크로마토그래피에 의해서 세포 성분으로부터 얻어지는 불순물로부터 분리될 수 있다. 크로마토그래피적 분리 방법의 비제한적 예로는 이온 교환(양이온 또는 음이온), 친수성 상호작용, 소수성 상호작용 또는 겔 투과 크로마토그래피가 있다. 바람직한 방법은 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)이다. 더 바람직한 방법은 염기 추출로 대부분의 고분자량의 uv 활성인 오염물질을 제거할 페닐 세파로스 상의 소수성 상호작용 크로마토그래피이다. 캡슐형 다당류는 고 pH(pH 10에서 pH 8), 고염(2N에서 1N) 용출에서 용출되기 시작할 것이고 반면에 더 소수성인 단백질과 핵산은 보유될 것이다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 방법의 비제한적 예는 알킬 아가로스 또는 세파로스 수지이며, 페닐 세파로스 HP (파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech); 피스카타웨이, NJ) 가 바람직한 수지이다. 칼럼은 0.5-5.0 N NaHCO₃로 예비 평형화되고, 유속 0.5-50 ml/min 에서 1 칼럼 부피로 용출될 수 있다. NaHCO₃의 약 1 칼럼 부피로 용출한 후, 약 1에서 10 칼럼 부피의 물을 칼럼을 용출시키는데 사용할 수 있다. 이어서 당업자에게 알려진 수단에 의해서 다당류에 대해 분획을 분석할 수 있다. 시알산을 포함하는 다당류의 검출의 바람직한 방법은 실시예에 묘사된 마이크로스케일 오르시놀(orcinol) 분석이다.

<47> 4. N-아세틸화

<48> 염기성 조건에서 추출된 캡슐형 다당류의 분리에서는 시알산과 염기에 안정한 캡슐형 다당류의 아미노당 잔기로부터 N-아세틸기를 추출하는 동안 제거하는 것이 도움이 된다.

<49> 캡슐형 다당류를 포함하는 풀링된 HIC 분획은 선택적으로 다양한 아세틸화제를 사용하여 원하는 정도까지 다시 아세틸화될 수 있다. 아세틸화제의 비제한적 예로는 아세트산 무수물, 아세틸 클로라이드, 펜타플루오로페닐 아세테이트, 4-니트로페닐 아세테이트가 있다(참조: Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Syntheses*, 2nd Ed. (1991)). 바람직한 방법은 캡슐형 다당류의 유리 아미노기를 다시 아세틸화하기 위해서 약 0.5 M에서 약 2M의 농도에서, 바람직하게는 약 0.7 M 에서 약 1M의 농도의 아세트산 무수물과 섞어서 자연형 다당류 구조를 재생시키는 것이다.

<50> 5. 크로마토그래피 정제

<51> 항원과 백신과 같은 면역학적 시약을 준비할 때 사용되는 CPS를 생산하기 위해서 다시 아세틸화된 CPS 의 정제를 수행할 수 있다. 크로마토그래피 정제의 다양한 예가 본 발명에서의 사용에 적절하다. 예를 들어, 이온 교환(양이온 또는 음이온), 소수성 상호작용, 친수성 상호작용 또는 겔 투과 크로마토그래피가 반응 성분으로부터 다시 아세틸화된 CPS를 분리하는데 사용될 수 있다. 바람직한 방법은 잔여 오염물을 제거하고 CPS를 정제할 슈퍼텍스(상호 연결된 아가로스 및 텍스트란)에서 겔 투과 크로마토그래피를 사용하는 것이다. 특별히 바람직한 예는 텍스트란에 대한 분획화 범위(MW)가 1,000-100,000인 슈퍼텍스 200 PG이다. PBS를 용출제로 사용하면 유

속은 바람직하게는 약 0.1에서 10 ml/min이다.

- <52> 본 발명의 염기 추출 방법에 의해 생산되는 캡슐형 다당류는 신규하고(참조: 도 11과 12) 자연형 구조에서의 항원결정부위를 유지한다(도 5-10). 따라서, 본 발명에 따라 제조된 CPS는 자연형 CPS와 교차 반응성인 항체와 이들을 발현하는 세균의 생산을 유도한다. 본 발명에 따른 방법에 의해서 CPS를 수득하는 것은 (a) 본 발명이 수행되는 방법의 상대적인 용이성, (b) 증가된 단리 수율 및 (c) 증가된 결합 수율이라는 점에서 선행 기술의 방법보다 우월하다. 게다가, 세균성 DNA와 RNA는 염기 추출 단계에서 분해되므로, 본 발명에 따라 생산된 최종 산물에서 상당한 양으로 존재하지 않는다.
- <53> B. 추출된 CPS의 구조
- <54> 본 발명의 방법에 의해 추출된 캡슐형 다당류는 선행 방법에 의해 추출된 CPS와 비교해 독특한 구조를 가진다. 캡슐형 다당류와 폴리펩티드를 연결하는 포스포다이에스테르 결합의 염기 촉매 가수분해와 폴리펩티드와 펩티도글라이칸을 연결하는 포스포다이에스테르 결합의 염기 촉매 가수분해에 의해서 CPS가 수득된다(참조: 도 11). 세균 세포벽 구조의 대안적 모델에 의하면, 캡슐형 다당류와 펩티도글라이칸을 연결하는 포스포다이에스테르 결합의 염기 촉매 가수분해와 폴리펩티드를 펩티도글라이칸에 연결하는 포스포다이에스테르 결합의 염기 촉매 가수분해에 의해 구조적으로 독특한 동일 CPS가 수득된다(참조: 도 12). 선행기술의 방법은 다른 결합을 절단하기 위해서 효소를 사용한다. 예를 들어서, N-아세틸글루코사민/N-아세틸뮤라믹산 폴리머를 가수분해하기 위해서 리소자임을 사용한다. N-아세틸글루코사민/N-아세틸뮤라믹산 폴리머와 펩티드 부분의 결합을 가수분해하기 위해서 뮤타노라이신이 사용되고, 세균 세포벽의 펩티드 부분을 가수분해하기 위해서 리소스타핀(lysostaphin)이 사용된다.
- <55> 본 발명의 캡슐형 다당류의 절대 물 질량 분포는 낮은 다중분산도(M_w/M_n)으로 제시된 바와 같이 좁다(참조: 표 2). 이 단일성은 일관되고 효과적인 백신 제품을 생산하는데 중요하다.
- <56> C. 백신
- <57> 본 발명은 또한 백신 제조에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 위에서 개시된 단리된 CPS는 CPS에 대해 반응성인 항체를 생성하기 위해서 항원으로 사용될 수 있고, 따라서 CPS가 단리된 유기체에 대해 반응성이다.
- <58> 본 발명의 백신은 능동 또는 수동 면역성을 제공할 수 있다. 능동 면역성을 제공하는 백신은 본 발명의 정제된 CPS를 포함한다. 바람직하게는, 이 백신은 적어도 하나의 항원성 펩티드에 결합된 CPS를 포함한다.
- <59> 6. 항체
- <60> 충분한 양의 본 발명의 CPS를 생산하기 위해 위에서 제시된 CPS 추출과 단리 기법이 제공된다. 이것은 CPS에 대해 반응성인 항체의 생산을 촉진한다.
- <61> 다른 구현예에서, CPS에 대한 항체는 당분야에 잘 알려진 임의의 기술에 의해서 생산될 수 있다. 한 방법에 의하면, 단리된 CPS 제조물이나 이들의 유도체 또는 단편을 숙주 동물에 투여하여 항체를 생산할 수 있다. 숙주 동물은 비제한적으로 래트, 마우스, 토끼, 인간이 아닌 영장류, 또는 인간일 수 있다. 바람직하게는, 숙주는 인간이다. 당분야에 알려진 보조약을 사용하여 면역 반응을 증가시킬 수 있다.
- <62> CPS에 대한 단일클론 항체는 또한 당분야에 알려진 임의의 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 한 방법에 의하면, 하이브리도마 세포주의 배양이 사용된다(Kohler and Milstein(1975) *Nature* **256**:495-497). CPS에 대한 단일클론 항체는 인간 단일클론항체, 키메라 단일클론 항체 또는 당분야에 알려진 임의의 기법에 의해 제조된 인간화 단일클론 항체일 수 있다. 한 접근 방법에 의하면, 인간 불변 부위와 결합된 비인간(예: 마우스) 항원 결합 영역을 가지는 키메라 단일클론 항체가 생산될 수 있다(Takeda et al.(1985) *Nature* **314**:452). Queen 등의 미국 특허 5,585,089의 공정에 의하면 인간화 항체가 생산될 수 있다.
- <63> CPS에 대한 항체는 비제한적으로 면역 흡착 또는 면역 친화 크로마토그래피 또는 다른 크로마토그래피 방법(예, HPLC)을 포함하는 당분야에 공지된 임의의 기술에 의해서 정제될 수 있다. 항체는 또한 혈청, 혈장 또는 세포 배양 배지로부터 면역글로불린 분획으로 정제될 수 있다.
- <64> 본 발명의 항체 분자는 완전한 면역글로불린 분자, 실질적으로 완전한 면역글로불린 분자 또는 면역글로불린 분자의 일부, 예를 들어 항원 결합 부위를 포함하는 Fab 단편이다.
- <65> 당분야에 널리 공지된 임의의 기법으로 CPS에 대한 항체의 단편을 생산할 수 있다. (Campbell (1985) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burdon, et al. (eds.), Elsevier Science

Publishers, Amsterdam).

7. 결합 분자

본 발명의 CPS는 단독으로 또는 폴리펩티드나 단백질과 같은 다른 면역원성 물질에 결합되어서 개인에서의 다양한 그람 음성, 그람 양성 세균에 대한 항체 반응을 야기하는데 사용될 수 있다. CPS를 폴리펩티드에 결합시키면 T-세포 비의존적인 CPS에 대한 면역 반응을 T-세포 의존적인 CPS에 대한 면역 반응으로 전환시킨다. 따라서, 폴리펩티드의 크기는 바람직하게는 반응을 T-세포 비의존적에서 T-세포 의존적으로 전환하기에 충분한 크기이다. 두번째 면역원을 제공하기 위해서 더 작은 폴리펩티드를 사용하는 것은 유용할 수 있다.

CPS 성분과 펩티드를 결합시키기 위해서 어떤 형태의 결합도 사용될 수 있다. 바람직한 방법으로 인근 디올을 산화성 절단하여 말단 알데히드를 다당류에 도입하고, 환원성 아민화에 의해서 알데히드를 펩티드 아미노기에 결합하는 방법이 미국 특허 4,356,170에 개시되어 있다.

하지만, 본 발명의 결합 백신이 환원성 아민화로 생산되는 것에 한정되는 것은 아니다. Schneerson, R. et al. (1980) *J. Exp. Med.* 1952:361-476와 미국 특허 4,644,059에 기술된 바와 같이 아디프산 디하이드라지드 스페이서와 같은 선행 기술에 알려진 임의 연결 방법 또는 예를 들어 Marburg, S. et al. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108:5282-5287 에 개시된 이원적 스페이서 기법으로 CPS와 펩티드를 결합하여 백신을 생산할 수도 있다.

본 발명은 펩티드가 CPS의 하나 이상의 부위를 통해서 CPS에 연결되는 결합 분자를 생산하는 능력을 제공한다. 따라서, 본 발명에 따라 제조된 결합 분자는 단백질 성분에 비해서 단량체, 이량체, 삼량체, 및 CPS가 다중 단백질에 교차연결하는 더 고도로 교차 결합된 분자일 수 있다.

본 발명의 다른 구현예에서, 숙주 개체에서 다른 개체로 수동 면역성을 전달하기 위해서 (즉, 그람 음성 또는 그람 양성 세균에 대한 개체의 면역 반응을 증가시키거나 또는 후천성 면역 결핍증 환자를 포함하는 면역 저하된 또는 면역 결핍된 개체에 반응을 제공하기 위해서) 본 발명의 CPS에 대한 항체는 치료 또는 예방 적용에서의 약학 제조물로 사용될 수 있다. 항체의 수동 전달은 당분야에 알려져 있고 알려진 임의 방법으로 달성할 수 있다. 한 방법에 의하면, 본 발명의 CPS 또는 이들의 결합체에 대한 항체는 면역능력이 있는 숙주("공급자")동물에서 생산되고 숙주 동물에서부터 수확되어 수용 개체로 주입된다. 예를 들어서, 인간 공급자는 본 발명의 CPS 또는 CPS 결합체에 대해 반응성이 있는 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 이어서 항체는 치료 또는 예방적으로 효과적인 양이 치료가 필요한 인간 수용자에게 투여되어 수용자에게 다당류 성분에 의해 야기된 항체에 의해 결합된 세균에 대한 저항성을 부여할 수 있다. (참조: Grossman, M. and Cohen, S. N., in "Basic and Clinical Immunology", 7th Ed., (Stites, D. P and Terr, A. T, eds., Appleton & Lange 1991) Chapter 58 "Immunization".)

8. 약품 조성물

본 발명의 약품 조성물은 CPS와 식염, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 약품학상 허용가능한 담체를 포함하는 CPS 또는 결합된 분자를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 약품 조성물은 펩티드 또는 본 발명의 CPS중 하나에 의해 야기된 항체를 포함하는 조성물과 같은 다른 면역학적 부분을 포함한다. 조성물은 또한 수용자의 면역 반응을 증강시키기 위해서 보조약을 포함할 수 있다. 상기 보조약은 알룸과 같은 알루미늄계 보조약, 또한 스테아릴 티로신 같은 장쇄 보조약일 수 있다 (참조: U.S. Serial No.583,372, filed 9/17/90; European Patent, EP 0 549 617 B1; Moloney et al. U.S. Patent No. 4,258,029). 또한 참조: Jennings, et al. U.S. Patent No. 5,683,699 및 Paoletti, et al. *J. Infectious Diseases* 1997; 175:1237-9. 이러한 약품 조성물은 백신으로서 특히 유용하다.

수동 면역성을 유도하기 위해서, 약품 조성물에는 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체 또는 위에서 언급된 이들의 유도체 또는 단편이 포함될 수 있다. 항체, 단편 또는 유도체의 양은 표준 진료 기법에 의해 결정된 치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 양일 것이다.

본 발명의 약품 제조물은 당분야에서 효과적인 방법으로 개인에게 도입될 수 있다. 비제한적으로 피내, 복강내, 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강내로 도입될 수 있다.

본 발명의 조성물은 생리적 식염수나 다른 주입가능한 액체와 같은 임의의 약품학상 허용가능한 담체를 포함하는 백신에 적절하고 당분야에 알려진 표준 담체, 버퍼나 방부제를 포함할 수 있다. 백신에 관례적인 첨가제로, 예를 들어 락토스나 소르비톨과 같은 안정화제와 알루미늄 포스페이트, 하이드록사이드 또는 설페이트, 및 스테아릴 티로신과 같은 면역 반응을 증강시키기 위한 보조약이 또한 존재할 수 있다. 본 발명에 의해 생산된 백신

은 다양한 감염체에 대한 면역 반응을 유도하는 다가 백신의 성분으로도 사용될 수 있다.

<77> 본 발명의 백신은 면역 반응의 일부로서 항체 생산을 유도하기에 충분한 양이 투여된다. 투여량은 백신을 공급 받는 개인의 크기, 체중 또는 나이에 따라 조정될 수 있다. 개인에 있어서 항체 반응은 항체 역가 또는 살균 활성을 분석하여 모니터링될 수 있고 필요하면 반응을 증강시키기 위해서 추가접종될 수 있다. 전형적으로, 유아에 대한 단일 투여량은 1 투여량당 약 10 μg 의 결합 백신 또는 약 0.5 μg -20 μg /kilogram이다. 성인은 약 0.5 μg -20 μg /kilogram의 결합 백신 투여량을 수용한다. CPS 백신의 경우에는 전형적인 투여량이 1 투여량당 각 개인 CPS 약 25 μg 이다. 즉, B 군 연쇄구균에 대한 백신은 9가지의 혈청타입 당 25 μg 의 각 CPS 형태를 포함할 수 있다.

<78> D. 진단 도구

<79> 다른 구현예에서, 본 발명의 CPS 또는 이들의 유도체 또는 단편은 뉴모라이시스 독소와 같은 독소를 도입시키지 않고도 여전히 그람 음성 또는 그람 양성 세균에 대한 항체의 존재를 나타낼 수 있는 더 안전한 진단 키트를 생산하는데 사용될 수 있다. 그러한 항체가 존재하면 병원체에 대한 선행 노출이 있음을 나타내고, 감염에 저항성일 수 있는 개인을 예측할 수 있다. 진단 키트는 본 발명의 적어도 하나의 CPS 또는 이들의 유도체 또는 단편, 및 변경된 CPS 또는 유도체 또는 단편이 그람 음성 또는 그람 양성 세균에 대한 항체를 포함하는 시료와 혼합되었을 때, 항체 반응의 검출에 적절한 시약을 포함할 수 있다. 항체 반응은 비제한적으로 ELISA 분석을 포함하는, 당분야에 개시된 임의의 방법에 의해서도 확인될 수 있다. 그러한 지식은 중요하며, 불필요한 예방접종을 회피할 수 있다.

<80> 대안적으로, 진단 키트는 고체 지지체나 자기 비드 또는 플라스틱 기질과 적어도 하나의 본 발명의 CPS 또는 이들의 유도체 또는 단편을 더 포함할 수 있다.

<81> 어떤 경우에, CPS 또는 유도체 또는 단편이 라벨되는 것이 바람직할 수 있다. 라벨화제는 당분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어서, 라벨화제는 비제한적으로 방사활성, 화학발광, 생물발광, 발광 또는 편리한 분석을 위한 다른 확인 "태그 (tag)" 를 포함한다. 체액 또는 조직 시료(예: 피, 혈청, 침)를 수집하고 정제한 후 진단 키트에 사용할 수 있다. CPS, 유도체 또는 단편은 정제되거나 정제되지 않을 수 있고, 분자 혼합물로 구성될 수 있다.

<82> 고체 기질은 당분야에 공지되어 있고 이용가능하며, 비제한적으로 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리 카보네이트, 또는 시험관, 구슬, 미세입자, 담금막대, 플레이트 등의 모양인 임의의 고체 플라스틱 물질을 포함한다. 추가적으로 기질은 비제한적으로 막, 96-웰 마이크로타이터 플레이트, 시험관, 에펜도르프 튜브를 포함한다. 일반적으로 그러한 기질은 리간드 결합제가 결합될 수 있는 임의 표면이나 스스로 리간드 부착 부위를 제공하는 표면을 포함한다.

<83> 여기에서 언급된 출판물, 특허, 및 기사는 본원에 참조로 인용되어 있다. 다음 실시예는 본 발명을 예시하도록 제시되어 있지만 본 발명의 범위를 한정하도록 해석되어서는 안된다. 당업자는 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않고 많은 변화와 치환이 가능함을 인지할 것이다.

<84> 실시예

<85> A. 세균 균주, 성장 배지와 배양 조건

<86> Ib 타입 B 군 연쇄구균 균주 H36b (ATCC 12401)을 ATCC (Rockville, MD)에서 수득했다. 하바드 의과 대학의 D.L. Kasper 가 사용한 다른 균주 090 (Ia 타입), 18RS21(II 타입), M781(III 타입), 및 1169-NTI(V 타입)를 공급해 주었다. CBER, FDA의 Carl Frasch 가 수막염균 B, C, Y와 W135 타입을 공급해 주었고, CBER, FDA의 Willie Vann이 대장균 K1을 공급해 주었다.

<87> 각 B 군 연쇄구균 균주는 투석물 중 (10,000 명목 분자량 한계(NMWL)막), 6% 글루코스로 보충된 3.5% 콜로이드 브로스(디프코 실험실 (Difco Laboratories, Inc.), 디트로이트, MI)의 펠리콘 카세트 시스템(밀리포어 코포레이션 (Millipore Corp.), 베드포드, MA)에서 개별 배양했다. 진탕 에rlenmeyer 플라스크에서 37°C에서 8시간 동안 배양된 150 ml 씨드 배양체는 14리터의 브로스(상동)로 채워진 바이오플로 (Bioflo) IV 20 리터 발효기(뉴 브런스윅 과학 회사 (New Brunswick Scientific Co.), 에디슨, NJ)를 접종하는데 사용되었다. 발효 배양체는 10N NaOH의 첨가로 pH 7.1로 계속 조정되고 1.5 ℓ /min으로 공기가 주입되며 37°C에서 유지되었다. 세 포는 미니크로스 (MiniKros) 0.2 μm 다공성 중공-섬유 카트리지(마이크로곤 (Microgon Inc.), 라그나 힐, CA)을 통한 미세여과에 의해 17시간 후에 수확되었다. 배양 상층액은 더 처리될 때까지 4°C에서 멸균상태로 유지

되었다. 마지막 세포 펠릿은 분리된 세포를 소발 (Sorvall) GSA 회전자(듀폰 진단 & 도구과 (Dupont Clinical & Instruments Div.), 윌밍턴, DE)에서 50분 동안 9000 rpm에서 원심분리하여 수득하였다.

<88> B. 캡슐형 다당류를 생산하는 일반적 방법

<89> 1. 추출과 소수성 상호작용 크로마토그래피

<90> 세포 페이스트의 그램 습윤 무게를 1 부피로 사용하여 펠릿은 4 부피의 1N NaOH에 현탁했다. 현탁액은 37°C에서 밤새 배양되었다. 세포 잔해를 소발 GSA 회전자에서 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 제거하였다. 진한 HCl (J.T. Baker, 필립스버그, NJ) 로 중화한 후에, 상층액은 펠리콘 (Pellicon) 10,000 NMWL막을 사용하여 2N NaHCO₃ (pH 9.6)에 대해 여과했다. 남은 보유액을 아래에 제시된 파마시아 제조용 크로마토그래피 체계를 사용하여 2N NaHCO₃ 로 미리 평형화한 페닐 세파로스 HP로 채워진 파마시아 XK 26/60 칼럼 ((Pharmacia Biotech); 피스카타웨이, NJ) 에 주입했다. 칼럼은 먼저 2N NaHCO₃의 한 칼럼 부피로, 이어서 두 칼럼 부피의 물로 4 ml/min 속도로 용출되었다. 분획을 다당류에 대해 분석하고 (아래 참조) 캡슐형 다당류를 포함하는 분획을 풀링했다.

<91> 또한 캡슐형 다당류는 배양 상층액으로부터 정제되었다. 세포를 제거한 후에, 브로스는 10-15배 농축되고(펠리콘, 10,000 NMWL 막을 사용하여) 10부피의 물에 대해 여과되었다. 생성된 보유물에 마지막 농도 1M 로 10N NaOH가 추가되었다. 이 용액은 밤새 37°C에서 배양되고 진한 HCl로 중화되었다. 위에서 개시된 것과 같이 세포 추출에 대한 공정이 계속되었다.

<92> III 타입 캡슐형 다당류의 한 배치에 대해서, 세포와 배양 상층액은 다음과 같이 함께 추출되었다. 세포에서 분리된 배양 상층액은 농축되고 여과된 후 위에서 개시된 바와 같이 생성된 보유물은 염기로 처리되었다. 세포 펠릿은 염기 처리된 보유물의 4 부피에 현탁되고 세포 추출을 위해서 위에서 개시된대로 공정되었다 (상기 참조).

<93> 2. 재 N-아세틸화

<94> 다당류를 전에 언급된 추출 조건에 노출시키면 다당류로부터 N-아세틸기를 방출하기 때문에, 아세트산 무수물 (알드리치 화학 회사 (Aldrich Chemical Co.), 밀와키, WI)를 풀링된 분획에 최종 농도 0.8 M 로 적가하여 재-N-아세틸화했다. 이 반응 혼합물은 실내 온도에서 1시간동안 교반되고 10N NaOH를 첨가하여 pH 9에서 유지되었다. 반응 pH는 13까지 증가되었고 반응은 30분 동안 더 진행되었다. 재-N-아세틸화된 캡슐형 다당류를 포함하는 용액은 미니탄 (Minitan) 카세트 체계(10,000 NMWL 막, 밀리포어 (Millipore))를 사용하여 물에 대해 여과하고 보유물은 동결건조되었다. 동결건조물은 PBS(pH 7.4)에서 다시 용해되고 슈퍼텍스 200 PG (상기 참조) 상에서 겔 투과 크로마토그래피로 정제되었다. 캡슐형 다당류를 포함하는 분획은 풀링되고 물에 대해 여과하고 (상기 참조) 보유물은 동결건조하여 정제된 CPS를 얻었다.

<95> 3. 겔 투과 크로마토그래피

<96> 분석용 겔 투과 크로마토그래피는 파마시아 UV-1 자외선 검출기(280-nm 필터를 가진), 워터스 코포레이션(밀리포드, MA) R401 분별 굴절계, 및 파마시아 슈퍼로스 6 HR 10/30(고도로 교차 결합된 비드형 아가로스)칼럼이 장착된 파마시아 FPLC 체계에서 수행되었다. 칼럼은 pH 7.4 PBS를 가지고 0.5 ml/min의 속도로 용출되었다. 텍스트란(분자량 약 2×10^6 ; 시그마 화학 회사, St. Louis, MO)은 빈 부피(V_0)를 결정하는데 사용되고 나트륨아지드는 전체 베드 부피(V_t)를 결정하는데 사용되었다. 상대적 용출 부피는 $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ 로 표현된다. 여기서 V_e 는 R1 프로필로부터의 용출 부피이다. 제조용 GPC는 위에 언급된 검출기, P-50 펌프, FRAC-100 분획 수집기, GP-250 플러스 조정기, 및 슈퍼텍스 200 PG (파마시아)로 채워진 XK 26/100 칼럼을 포함한 파마시아 시스템에서 행해졌다. 칼럼은 PBS로 1 ml/min의 속도로 용출되었다.

<97> C. 다당류의 분석

<98> 1. 물질량의 결정

<99> 다당류의 절대 물질량 분포는 인라인 다각 레이저 광산란 광도측정기와 분별 굴절계(GPC-MALLS/RI)에 의한 분석적 GPC에 의해 결정되었다. 이 방법은 Jasco PU-980 HPLC 펌프(이스턴, MD), 리오딘 (Rheodyne) 모델 7125 주입 밸브(Cotati, CA), 및 PBS로 평형화된 슈퍼로스 6 HR 10/30 칼럼으로 구성된 액체 크로마토그래피 체계에서 0.5 ml/min 의 유속으로 수행되었다. 이동상은 초고순도의 물에서 제조되었고(Stephens Scientific,

Riverdale, NJ) 밀리포어 타입 GV 0.22- μm 막을 구비한 지름 25 mm의 인라인 필터(밀리포어)를 통해 여과되었다. 다당류 시료(1-2 mg)는 이동상에 10 mg/ml의 농도로 용해되었고 생성된 용액은 주입전에 미집자를 제거하기 위해서 14,000 rpm에서 2-3분 동안 마이크로센트리퓨즈에서 원심분리되었다. 칼럼 유출액은 Hewlett-Packard model 1047A 분별 굴절기에 결합된 인라인 미니DAWM 고정 삼각 레이저 광산란 광도측정기(Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA)로 직접 분석되었다. 굴절기의 아날로그 신호 출력은 보조 입력 채널을 통해서 미니DAWM에 연결되었다. 광산란 데이터를 취득하고 Wyatt's ASTRette와 EASI 소프트웨어로 처리하였다. 정점 면적은 정점의 전범위에 걸쳐 Wyatt 소프트웨어로 200-300 부등사변형 또는 슬라이스 면적의 합계로서 계산되었다. 취득된 면적으로부터, 주어진 정점에서 용출하는 다당류의 중량 평균 몰 질량과 수평균 몰 질량(각각 M_w , M_n)이 계산되었다. 구체적 굴절지수 증분(dn/dc)은 모든 다당류에 대해서 온라인 HP 1047A 굴절기를 사용하여 0.140 ml/g로 결정되었다. 이 값은 다른 다당류에 대해 이전에 취득한 값과 비교된다 (7,8,38).

<100>

2. NMR 분광측정

<101>

D₂O (Aldrich)에 있는 다당류 시료 (4-5 mg/ml)의 일차원적 ¹H NMR 스펙트럼은 브루커 (Bruker) 장비 AMX 500 분광기(Billerica, MA)상에서 500 MHz에서 기록되었다. 스펙트럼 자료는 50°C에서 취득되었고, 화학적 이동은 D₂O중에서 외부 2,2,3,3-테트라데루테오-3-(트리메틸실일)프로피오네이트(엘드리치)를 참조했다.

<102>

3. 화학적 분석

<103>

제조용 칼럼 용출액과 정제된 다당류 중 다당류의 양은 시알산에 대한 Reuter와 Schauer의 마이크로규모의 오르시놀 분석 (35)의 변경으로 결정되었다. 간략하게, 1-1.5 μg 의 NeuAc 표준 또는 정제된 캡슐형 다당류 최고 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함하는 100 μl 의 시료나 대조군은 1.5 ml 마이크로센트리퓨즈 튜브내의 100 μl 의 오르시놀 시약 (35)에 첨가되었다. 시료는 잘 혼합되고 15분 동안 끓는 워터베이스에서 가열되었다. 시료가 5분 동안 얼음물에서 냉각된 후에, 500 μl 의 이소아밀 알코올(플루카 화학 회사 (Fluka Chemical Co.), Ronkonkoma, NY)이 각 시료에 첨가되었다. 시료는 충분히 혼합되고 3000 rpm에서 2-3분동안 마이크로센트리퓨즈에서 원심분리되었다. 이 과정은 발색단을 알코올로 확실히 추출하기 위해서 반복되었다. 각 시료의 알코올상으로부터 취한 200 μl 를 96웰 편평바닥 저결합형 폴리스티렌 마이크로리터 플레이트(Coming Costar Corp., Cambridge, MA)로 전달하고 Molecular Devices Emax 마이크로플레이트 판독기(Menlo Park, CA)에서 560nm에서 판독했다. 마지막 다당류 제조물의 순도는 다음 공식 질량을 사용하여 시알산 양으로부터 도출되었다: 말단 NeuAc 잔기에 대한 314.3 g/mol; Ia, Ib, 또는 III 타입 CPS의 반복 단위에 대한 1004 g/mol; II 또는 V 타입 CPS의 반복 단위에 대한 1328 g/mol.

<104>

단백질량은 표준으로서 Pierce(Rockford, IL) Coomassie Plus 시약과 말 IgG를 사용하여 브래드포드 과정 (9)에 의해 PBS ml 당 1-2 mg 캡슐형 다당류를 포함하는 시료로부터 결정되었다. 핵산의 양은 260nm에서 직접 UV 광도측정기로 결정되었다. 이러한 분석에 대한 광도 측정은 Shimadzu model UV 160U 분광광도계 (Shimadzu Scientific Inst., Columbia, MD)로 이루어졌다.

<105>

D. 수율

<106>

다양한 B 군 연쇄구균 혈청타입으로부터 취득한 캡슐형 다당류의 수율은 표1에 나타낸다. 모든 혈청타입에 대해서, 세포 펠릿으로부터 정제된 다당류는 II 타입에 대한 4배 높은 수율로부터 Ib 타입에 대한 60배 더 높은 수율에 이르러, 배양 상층액으로부터 취득한 것을 증가한다. 비교를 위해서, 상층액으로부터 얻은 수율과 세포로부터 얻은 수율을 배양 리터 당 다당류의 밀리그램 (mg/ ℓ)으로 표1에 표시한다. 따라서, 14리터의 발효가 고려될 때, 세포로부터의 총 수율은 Ia 타입의 1.1g에서 II 타입의 0.6g에까지 이르고, 반면에 상층액으로부터의 총 수율은 II 타입의 150 mg에서 Ib 타입의 14mg에 이른다. III 타입 발효로부터 세포와 상층액이 같이 처리되면, 수율 63 mg/ ℓ 또는 전체 0.9 g은 세포 펠릿 단독으로 취득된 것과 유사했다. 세포로부터의 캡슐형 다당류의 단위 수율과 상층액으로부터 단위 수율의 비율에서 연구된 B 군 연쇄구균 균주사이의 편차는 현재 성장 조건에서 혈청타입사이에 캡슐형 다당류를 방출하는 경향이 다름을 제시한다. von Hunoistein 등이 보고한 바와 같이 (39) 본 방법에 의해 정제된 세포 결합 캡슐형 다당류의 양은 세포 결합 시알산(캡슐형 다당류의 마커로 사용됨)의 수준으로부터 유추가능한 Ia, III, IV, V, 및 VI 타입의 B 군 연쇄구균 균주의 배치 발효로 취득가능한 것으로 나타난 양에 접근한다. 더 강한 추출 조건(즉, 더 강염기, 더 고온, 또는 추출혼합물의 교반)은 세포 결합 캡슐형 다당류의 수율을 향상시킬 것으로 기대된다.

【표 1】

<107>

B 군 연쇄구균 캡슐형 다당류의 수율		
혈청타입	상층액에서의 수율 (mg/ℓ) ^A	세포 펠릿에서의 수율 (mg/ℓ) ^A
I a	4	79
I b	1	64
II	11	42
III ^B	4	65
V	5	65
^A 수율은 성장 배양물 리터당 최종 정제된 캡슐형 다당류의 mg으로 표시된다.		
^B 브로스와 세포가 같이 처리되었을 때, III 타입 B 군 연쇄구균은 63 mg/ℓ를 생산한다.		

<108>

결과

<109>

A. 정제된 다당류의 분석

<110>

연구된 B 군 연쇄구균 혈청타입 각각에 대해서, 양 공급원으로부터의 다당류 제조물의 일차원적 ¹H NMR 분광측정으로 각 타입 다당류에 대해 이미 공개된 스펙트럼의 데이터와 동일함을 확인하였다 (41, 44). 게다가, 모든 이러한 제조물의 NMR 스펙트럼은 오염 수준이 매우 낮다는 것을 나타냈다. 다섯개의 B 군 연쇄구균 다당류의 대표적 NMR 스펙트럼은 도1-5에 나타나 있다. 260 nm에서 직접적 uv 광도측정에 의해 검출된 핵산의 수준은 1 질량%를 초과하지 않은 반면 브래드포드 방법 (9)에 의해 분석된 단백질은 어느 다당류 제조물에서도 이 분석의 검출 하한(1 µg/ml)을 초과하여 검출되지 않았다. 변경된 마이크로규모 오르시놀 분석 (35)에 의해 예측된 시알산 양으로부터 계산된 모든 다당류의 순도는 약 100%이었다. 위에서 개시된 공정에 의해 수득된 모든 다당류 제조물에 대해서, 단백질이나 핵산에 의한 오염이 최소이고, 스펙트럼 및 분광 데이터는 고순도의 캡슐형 다당류와 일치한다.

<111>

B. 다당류의 분자 크기

<112>

RI-검출된 GPC 프로파일의 정점 최대값으로부터 수득한, 슈퍼로스6에서 정제된 다당류의 상대적 용출 부피(K_{AV})는 표2에 나와 있다.

<113>

각 분석에서 다당류의 절대 물질량 분포는 GPC-MALLS/RI로 결정하였다. 이 방법으로 유속과 보유 부피와 같은 크로마토그래피적 변수에 상관없이, 유체역학 성질은 분석물에 따라 크게 변할 수 있는 제 2의 표준이 필요하지 않고, 거대분자의 물질량을 직접 예측할 수 있다. 성격규명 방법으로서 GPC-MALLS/RI의 유용성은 약학적 관심사인 다당류에 대해 잘 확립되어 있다(7,8,10,17,25). 물질량 분포는 통상 중량평균물질량(M_w)과 다분산성(M_w/M_n)으로 제시되며, 이것은 분포의 폭을 제시한다. 다분산성이 단일성으로 접근함에 따라, 물질량 분포는 동질성으로 접근한다.

<114>

정제된 B 군 연쇄구균 다당류에 대한 물질량 데이터는 표2에 나와 있다. 각 혈청타입에 대해서, 양 공급원으로부터 제조된 다당류에 대한 물질량 분포는 비슷했다. 이러한 제조물의 중량평균 물질량은 V 타입으로부터의 세포 관련 캡슐형 다당류에 대한 92 kg/mol에서부터 배양 상층액으로부터 정제된 I a 타입의 캡슐형 다당류에 대한 318 kg/mol까지 이른다. 낮은 저분산성값 (M_w/M_n ≤ 1.6)으로 알 수 있듯이, 모든 제조물의 분포는 좁았다. 이러한 값은 여러 혈청타입의 페렴균과 인플루엔자균 b 타입의 캡슐형 다당류의 유사 분석으로 수득한 값과 필적했다(7,17).

【표 2】

<115>

정제된 B 군 연쇄구균 캡슐형 다당류의 생화학적, 생물리적 성격규명					
혈청타입	K_{av}	M_w (kg/mol) ^A	다분산성 M_w/M_n	핵산의 양(%)	단백질양(%)
I a (S) ^B	0.005	318	1.35	0.23	0.21
I a (C) ^C	0.010	311	1.31	0.15	< 0.01
I b (S)	0.191	170	1.20	0.95	< 0.01
I b (C)	0.150	218	1.61	0.33	< 0.01
II (S)	0.152	246	1.46	0.13	< 0.01
II (C)	0.115	289	1.46	0.12	< 0.01
III (S)	0.343	ND	ND	0.58	< 0.01
III (C)	0.268	108	1.24	0.10	< 0.01
III (S+C)	0.272	104	1.22		
V (S)	0.257	92	1.28	0.26	0.27
V (C)	0.156	179	1.15	0.17	0.09
V (C)	0.241	99	1.20		
^A 물질량은 GPC-MALLS/RI로 결정되었다					
^B (S)는 다당류가 상층액으로부터 정제되었음을 나타낸다.					
^C (C)는 다당류가 세포 펠릿으로부터 정제되었음을 나타낸다.					

<116>

NMR 스펙트럼 데이터를 참고하여, 각 혈청타입에 대하여 물질량 분포는 상층액이나 세포 펠릿(III 타입에 있어서 결합된 두 공급원에서도)으로부터 정제된 다당류 사이의 차이가 중요하지 않음을 나타낸다. 각 혈청타입의 제조물에 대한 NMR 스펙트럼은 이들이 화학적으로 동일함을 나타내기 때문에, 이 제조물의 면역화학적 거동은 동일할 것으로 기대된다. 따라서, 배양 상층액과 추출용 세포를 결합할 것인지의 결정은 상층액으로부터 예상되는 수율에 대한 기여에만 기초한다(표1). 따라서, II 타입의 결합된 추출물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

<117>

면역화학적 분석

<118>

A. 경쟁적 방해 ELISA

<119>

마이크로타이터 플레이트(NUNC Polysorp)는 37 °C에서 1시간동안 PBS(50 mM의 인산나트륨, 150 mM NaCl, pH=7.4)에 희석된 GBSP_{Ia}-HSA, GBSP_{Ib}-HSA, GBSP_{II}-HSA, GBSP_{III}-HSA 또는 GBSP_V-HSA(각 웰에 100 μ l 중 100 ng의 다당류)로 수동적으로 코팅되었다. 플레이트가 PBS + 0.05% Tween 20(PBS-Tween, pH=7.4)으로 세척된 후, 플레이트는 PBS + 0.1% 소 혈청 알부민의 150 μ l/웰로 차단되었다. 포스트코팅 후에, 플레이트는 다시 세척되고 사용될 때까지 4°C에서 저장되었다.

<120>

GBSP_{Ia}, GBSP_{Ib}, GBSP_{II}, 및 GBSP_{III}에 대한 토끼 항-전체 세포 B 군 연쇄구균 항혈청 (Dennis Kasper) 은 GBSP_{Ia}-HSA, GBSP_{Ib}-HSA, GBSP_{II}-HSA, 및 GBSP_{III}-HSA으로 코팅된 플레이트에서 개별적으로 적정되었다. 비슷하게, 토끼 항-GBSP_V-TT 항혈청은 GBSP_V-HSA로 코팅된 플레이트에서 적정되었다. 최대 신호의 약 50%에 해당하는 희석이 억제 연구에 적합한 것으로 선택되었다.

<121>

항혈청은 PBS-Tween에서 희석되었다. 억제제는 희석된 항혈청을 포함하는 버퍼에서 연속적으로 5배로 희석되었다. 다음, 이러한 시료의 100 μ l은 2 개씩 코팅된 마이크로타이터 플레이트의 웰에 첨가되고 1시간동안 상온에서 배양되었다. 세척된 후에, 제조자의 지시사항에 따라 PBS-Tween에서 희석된 100 μ l의 염소 항-토끼 면역글로불린 고추냉이 결합물(Kirkegaard & Perry)이 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는 상온에서 배양되었고 다시 세척되었다. TMB 마이크로웰 기질(cat. no. 50-76-04, Kirkegaard & Perry)의 100 μ l 가 각 웰에 첨가되었다. 100 μ l 의 단일성분 정지액(cat. no. 50-85-04, Kirkegaard & Perry)을 첨가하여 5분 후에 반응을 정지시키고,

450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 억제도는 억제제가 전혀 없을 때 희석된 항혈청으로 얻어진 최대 신호의 백분율로 결정되었다.

B. 결과

상동 캡슐형 다당류 항원으로의 각각의 특이적 GBS 항혈청 Ia, Ib, II, III, V에 대한 결합 억제 곡선을 표 5-10에 각각 나타낸다. 이러한 곡선이 제시하듯이, 각 PS 항원은 배양 상층액 또는 브로스에서 추출되든지 비슷한 억제 성질을 가지며 이는 항원적 동등성을 나타낸다. 따라서, 캡슐형 다당류를 생성하기 위해 사용된 과정은 항원성에 영향을 주지 않는다.

(참고문헌)

1. Anderson, P., G. Peter, R.B. Johnson, L.H. Wetterlow and D.H. Smith. 1972. 인간의 인플루엔자균 b 타입의 캡슐형 항원인 폴리리보포스페이트로의 면역화 (Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b). *J.Clin.Invest.* **51**:39-44.
2. Avery, O.T. and W.F. Goebel. 1931. 결합된 탄수화물-단백질 V에 대한 화학-면역학적 연구 (Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins V). 3 타입 폐렴구균의 캡슐형 다당류와 외부 단백질을 조합하여 제조된 항원의 면역학적 특이성 (The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type 3 pneumococcus with foreign protein). *J.Exp.Med.* **54**:437-447.
3. Baker, C.J. and D.J. Kasper. 1985. B 군 연쇄구균백신 (Group B streptococcal vaccines). *Rev.Inf.Dis.* **7**:458-467.
4. Baker, C.J., M.A. Rench, M.S. Edwards, R.J. Carpenter, B.M. Hays and D.L. Kasper. 1988. 임신한 여자의 B 군 연쇄구균의 다당류 백신으로의 면역화 (Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*). *N.Engl.J.Med.* **319**:1180-1185.
5. Baker, C.J., M.A. Rench and D.L. Kasper. 1990. 유아가 침입적 B 군 연쇄구균 감염된 여자에서 III 타입 다당류에 대한 반응 (Response to type III polysaccharide in women whose infants have had invasive Group B streptococcal infection). *New Engl.J.Med.* **322**:1857-1860.
6. Baltimore, R.S., D.L. Kasper and J. Vecchitto. 1979. B 군 III 타입 연쇄구균에 대한 마우스 보호 시험 (Mouse protection test for group B *Streptococcus* type III). *J.Infect.Dis.* **140**:81-86.
7. Bednar, B. and J.P. Hennessey. 1993. 폐렴 연쇄구균으로부터 캡슐형 다당류 제조물의 분자 크기 분석 (Molecular size analysis of capsular polysaccharide preparation from *Streptococcus pneumoniae*). *Carbohydr.Res.* **243**:115-130.
8. Beri, R.G., J. Walker, E.T. Reese and J.E. Rollings. 1993. 크기 배제크로마토그래피와 다각레이저 광산란 기법을 통한 키토산의 성격규명 (Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique). *Carbohydr.Res.* **238**:11-26.
9. Bradford, M.M.. 1976. 단백질-염료 결합의 원리를 이용한 마이크로그램 단위의 단백질의 정량화를 위한 빠르고 민감한 방법 (A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding). *Analyt.Biochem.* **72**:248-254.
10. D'Ambra, A.J., J.E. Baugher, P.E. Concannon, R.A. Pon and F. Michon. 1997. b 타입 인플루엔자균의 캡슐형 다당류의 단편을 물질량 분석하는 직접, 간접적인 방법 (Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b). *Anal.Biochem.* (In Press).
11. Dick, W.E., Jr. and M. Beurret. 1989. 세균 탄수화물 항원의 당결합물 (Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens). p. 48-114. In: J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr., Contributions to microbiology and immunology. S.Karger, Basel.
12. Dillon, H.C., Jr., S. Khare and B.M. Gray. 1987. B 군 연쇄구균 보균과 병 (Group B streptococcal carriage and disease): A 6-year prospective study. *J.Pediatr.* **110**:31-36.

- <137> 13. Goebel, W.F. and O.T. Avery. 1931. 결합된 탄수화물-단백질 IV에 대한 화학-면역학적 연구 (Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins IV). 제 3 타입 폐렴구균의 가용성 특이적 물질의 p-아미노벤질 에테르의 합성과 단백질과의 결합 (The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type 3 pneumococcus and its coupling with protein). J.Exp.Med. **54**:431-436.
- <138> 14. Gold, R., M.L. Lepow, I. Goldschneider, T.L. Draper and E.C. Gotschlich. 1975. 유아에서 A 군과 C 군 수막구균 다당류 백신의 임상적 평가 (Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants). J.Clin.Invest. **56**:1536-1547.
- <139> 15. Gold, R., M.L. Lepow, I. Goldschneider and E.C. Gotschlich. 1977. A 군과 C 군 수막염균의 다당류 백신에 대한 인간 유아의 면역 반응 (Immune response of human infants to polysaccharide vaccine of Group A and C *Neisseria meningitidis*). J.Infect.Dis. **136S**:S31-S35.
- <140> *16. Gold, R.M., M.L. Lepow, I. Goldschneider, T.F. Draper and E.C. Gotschlich. 1978. 2개월, 4개월, 6개월령에 투여된 3투여량의 A 군 수막염균 백신에 대한 유아의 항체 반응 (Antibody responses of human infants to three doses of group A *Neisseria meningitidis* vaccine administered at two, four and six months of age). J.Infect.Dis. **138**:731-735.
- <141> 17. Hennessey, J.P., B. Bednar and V. Manam. 1993. b 타입 인플루엔자균 캡슐형 다당류의 분자 크기 분석 (Molecular size analysis of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide). J.Liq.Chromat. **16**:1715-1729.
- <142> 18. Howard, J.G., G.H. Christie, B.M. Courtenay, E. Leuchars and A.J.S. Davies. 1971. Studies on immunological paralysis. VI. 제 III 타입 폐렴구균 다당류에 대한 내성과 면역성의 흥선 비의존성 (Thymic-independence of tolerance and immunity to type III pneumococcal polysaccharide). Cell.Immunol. **2**:614-626.
- <143> 19. Jennings, H.J., E. Katzenellenbogen, C. Lugowski and D.L. Kasper. 1983. Ia 타입 또는 Ib 타입의 B 군 연쇄구균의 자연형 다당류 항원의 구조 (Structure of the native polysaccharide antigens of type Ia and type Ib Group B *Streptococcus*). Biochemistry **22**:1258-1263.
- <144> 20. Jennings, H.J., K.-G. Rosell and D.L. Kasper. 1980. 제 III 타입 B 군 연쇄구균의 자연형 다당류 항원의 구조 결정과 혈청학 (Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type III group B *Streptococcus*). Can.J.Biochem. **58**:112-120.
- <145> 21. Jennings, H.J., K.-G. Rosell and D.L. Kasper. 1980. 제 Ia 타입 B 군 연쇄구균의 자연형 다당류 항원의 구조와 혈청학 (Structure and serology of the native polysaccharide antigen of type Ia group B *Streptococcus*). Proc.Nat.Acad.Sci.USA. **77**:2931-2935.
- <146> 22. Jennings, H.J., K.-G. Rosell, E. Katzenellenbogen and D.L. Kasper. 1983. 제 II 타입 B 군 연쇄구균의 캡슐형 다당류 항원의 구조적 결정 (Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II Group B *Streptococcus*). J.Biol.Chem. **258**:1793-1798.
- <147> 23. Jennings, H.J. and R.K. Sood. 1994. 인간 백신으로서의 합성 당결합물 (Synthetic glucoconjugates as human vaccines). p. 325-371. In: Y.C. Lee and R.T. Lee, Neoglycoconjugates: Preparation and applications. Academic Press, New York.
- <148> 24. Kasper, D.L., C.J. Baker, R.S. Baltimore, J.H. Crabb, G. Schiffman and H.J. Jennings. 1979. 제 III 타입 B 군 연쇄구균에 대한 인간 면역성의 면역결정부 특이성 (Immunodeterminant specificity of human immunity to type III group B *Streptococcus*). J.Exp.Med. **149**:327-339.
- <149> 25. Knobloch, J.E. and P.N. Shaklee. 1997. 다각 레이저 광산란 검출로의 크기배제 크로마토그래피에 의한 저분자량 헤파린의 절대 분자량 (Absolute molecular weight of low-molecular-weight heparins by size-exclusion chromatography with multiangle laser light scattering detection). Anal.Biochem. **245**:231-241.
- <150> 26. Lancefield, R.C.. 1933. 인간과 용혈 연쇄구균의 다른 군의 혈청학적 분화 (A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci). J.Exp.Med. **57**:571-595.

- <151> 27. Lancefield, R.C.. 1938. 용혈 연쇄구균을 분류하는 미세침전기법과 항원을 생산하는 향상된 방법 (A micro-precipitin technique for classifying hemolytic streptococci and improved methods for producing antigen). Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. **38**:473-478.
- <152> 28. Lancefield, R.C., M. McCarty and W.N. Everly. 1975. B 군 연쇄구균에 대한 복합 마우스-보호항체 (Multiple mouse-protective antibodies directed against group B *Streptococci*): 단백질 항원에 대해 효과적인 특정 항체에 대한 참조(Special reference to antibodies effective against protein antigens). J.Exp.Med. **142**:165-179.
- <153> 29. Madoff, L.C., L.C. Paoletti, J.Y. Tai and D.L. Kasper. 1994. B 군 연쇄구균 제 III 타입 다당류-베타C 단백질 결합물로 마우스를 모체 면역화시키면 복합 혈청타입에 대한 보호항체를 유발시킨다 (Maternal immunization of mice with Group B Streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes). J.Clin.Invest. **94**:286-292.
- <154> 30. Marques, M.B., D.L. Kasper, A. Shroff, F.Michon, H.J.Jennings and M.R. Wessels. 1994. 다당류-단백질 결합백신에 의해 야기된 B 군 연쇄구균의 B 군 다당류에 대한 항체의 기능적 활성 (Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide of group B streptococci elicited by a polysaccharide-protein conjugate vaccine). Infect.Immun. **62**:1593-1599.
- <155> 31. Maekelae, P.R.H., H. Peltola, H. Kayhty, et al. 1977. A 군 수막염균과 b 타입 인플루엔자균에 대한 다당류 백신(Polysaccharide vaccines of group A *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b): A field trial in Finland. J.Infect.Dis. **136**:S43-50.
- <156> 32. Michon, F., J.R. Brisson, A. Dell, D.L. Kasper and H.L. Jennings. 1988. B 군 연쇄구균의 복합안테나 집단 특이적 다당류(Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *streptococcus*). Biochem. **27**:5341-5351.
- <157> 33. Peltola, A., H. Kaeyhty, A. Sivonen and P.R.H. Maekelae. 1977. 유아에서 인플루엔자균 b 타입 캡슐형 다당류 백신(*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children): 핀란드에서 3월령에서 5세 연령의 100,000백신의 이중 맹검 연구 (A double blind field study of 100,000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland). Pediatrics **60**:730-737.
- <158> 34. Peltola, H., P.R.H. Maekelae, H. Jousimies, et al. 1977. 3월령에서 5세 연령의 유아에서 수막구균 A 군 백신의 치료 효율 (Clinical efficacy of meningococcal group A vaccine in children three months to five years of age). N.Engl.J.Med. **297**:686-691.
- <159> 35. Reuter, G. and R. Schauer. 1994. 시알산의 결정 (Determination of sialic acids). p. 168-199. In: W.J. Lennarz and G.W. Hart, Methods in Enzymology Vol. 230 Techniques in Glycobiology. Academic Press, New York.
- <160> 36. Robbins, J.B. and R. Schneerson. 1990. 다당류-단백질의 결합물 (Poysaccharide-protein conjugates): 새로운 세대의 백신 (A new generation of vaccines). J.Infect.Dis. **161**:821-832.
- <161> 37. Smith, A.L. and J. Haas. 1991. 신생 세균성 수막염 (Neonatal Bacterial Meningitis). p.313-333. In: W.M. Scheld, R.J. Whitley and D.T. Durack, Infections of the Central Nervous System. Raven Press, Ltd., New York.
- <162> 38. Tsunashima, T., K. Moro, B. Chu and T.-Y. Liu. 1978. 광산란 분광기에 의한 C 군 수막균 다당류의 성격 규명 (Characterization of group C meningococcal polysaccharide by light-scattering spectroscopy). III. Determination of molecular weight, radius of gyration, and traslational diffusional coefficient.. Biopolymers **17**:251-265.
- <163> 39. von Hunolstein, C., L. Nicolini, S.D' Ascenzi, C. Volpe, G. Alfarone and G. Orefici. 1993. 다른 생장 조건에서 스트렙토코코스 아갈락티아에 의한 시알산과 생물질의 생산 (Sialic acid and biomass production by *streptococcus agalactiae* under different growth conditions). Appl.Microbiol.Biotechnol. **38**:458-462.
- <164> 40. Wessels, M.R., W.J. Benedi, H.J. Jennings, F. Michon, J.L. DiFabio and D.L. Kasper. 1989. IV 타입 B 군 연쇄구균 캡슐형 다당류의 단리와 성격규명 (Isolation and characterization of type IV group B

Streptococcus capsular polysaccharide). *Infect.Immun.* **57**:1089-1094.

- <165> 41. Wessels, M.R., J.L. DiFabio, V.J. Benedi, et al. 1991. V 타입 B 군 연쇄구균 캡슐형 다당류의 구조적 결정과 면역화학적 성격규명 (Structural determination and immunochemical determination of the type V group B streptococcus capsular polysaccharide). *J.Biol.Chem.* **266**:6714-6719.
- <166> 42. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, D.L. Kasper, et al. 1990. 동물에서 III 타입 B 군 연쇄구균에 대한 다당류-단백질 결합백신의 면역원성 (Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *streptococcus*). *J.Clin.Invest.* **86**:1428-1433.
- <167> 43. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, A.K. Rodewald, et al. 1993. Ia 타입 다당류 과상풍 유독소 결합 백신에 의한 Ia 타입과 Ib 타입 B 군 연쇄구균에 대한 보호항체의 자극 (Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine). *Infect.Immun.* **61**:4760-4766.
- <168> 44. Wessels, M.R., V. Pozsgay, D.L. Kasper and H.J. Jenings. 1987. III 타입 B 군 연쇄구균의 캡슐형 다당류의 올리고사카라이드 반복 단위의 구조와 면역화학 (Structure and Immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsule polysaccharide of type III group B *streptococcus*): III 타입 B 군 연쇄구균 다당류 항체에 대한 개정된 구조 (A revised structure for the Type III Group B streptococcal polysaccharide antigen). *J.Biol.Chem.* **262**:8262-8267.
- <169> 45. Wyle, S.A., M.S. Artenstein, B.L. Brandt, et al. 1972. B 군 수막구균 다당류 백신에 대한 인간의 면역 반응 (Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines). *J.Infect.Dis.* **126**:514-522.

발명의 효과

- <170> 간단하고, 빠르고, 재현가능하며 다양한 세균종에 응용할 수 있는 염기 추출법을 이용하여 배양 상층액과 그람 음성 및 그람양성 세균 세포로부터 대량의 캡슐형 다당류(CPS)를 분리할 수 있다. 이 방법으로 외부 펩티도글라이칸에 공유결합되지 않은 것을 특징으로 하는 새로운 CPS를 수득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 50℃에서 D₂O중에서 기록된 B 군 연쇄구균 Ia 타입으로부터 수득한 캡슐형 다당류의 NMR 스펙트럼(500 MHz),
- <2> 도 2는 50℃에서 D₂O중에서 기록된 B 군 연쇄구균 Ib 타입으로부터 수득한 캡슐형 다당류의 NMR 스펙트럼(500 MHz),
- <3> 도 3은 50℃에서 D₂O중에서 기록된 B 군 연쇄구균 II 타입으로부터 수득한 캡슐형 다당류의 NMR 스펙트럼(500 MHz),
- <4> 도 4는 50℃에서 D₂O중에서 기록된 B 군 연쇄구균 III 타입으로부터 수득한 캡슐형 다당류의 NMR 스펙트럼(500 MHz),
- <5> 도 5는 50℃에서 D₂O중에서 기록된 B 군 연쇄구균 V 타입으로부터 수득한 캡슐형 다당류의 NMR 스펙트럼(500 MHz),
- <6> 도 6은 GBSP I a-HSA 코트된 플레이트에서 토끼 항GBSP I a 항혈청의 억제력을 도시하는 그래프이고,
- <7> 도 7은 GBSP I b-HSA 코트된 플레이트에서 토끼 항GBSP I b 항혈청의 억제력을 도시하는 그래프이고,
- <8> 도 8은 GBSP II-HSA 코트된 플레이트에서 토끼 항GBSP II 항혈청의 억제력을 도시하는 그래프이고,
- <9> 도 9는 GBSP III-HSA 코트된 플레이트에서 토끼 항GBSP III 항혈청의 억제력을 도시하는 그래프이고,
- <10> 도 10은 GBSP V-HSA 코트된 플레이트에서 토끼 항GBSP V-TT 항혈청의 억제력을 도시하는 그래프이고,
- <11> 도 11은 그룹 서브캡슐형 항원(폴리랩노즈) 및 캡슐형 다당류와 함께 펩티도글라이칸을 도시한 GBS 구조 배열체 (Michon et al., *Biochemistry* 1988, 27:5341-5351). X와 Y는 각각 N-아세틸글루코사민과 N-아세틸뮤라믹산의

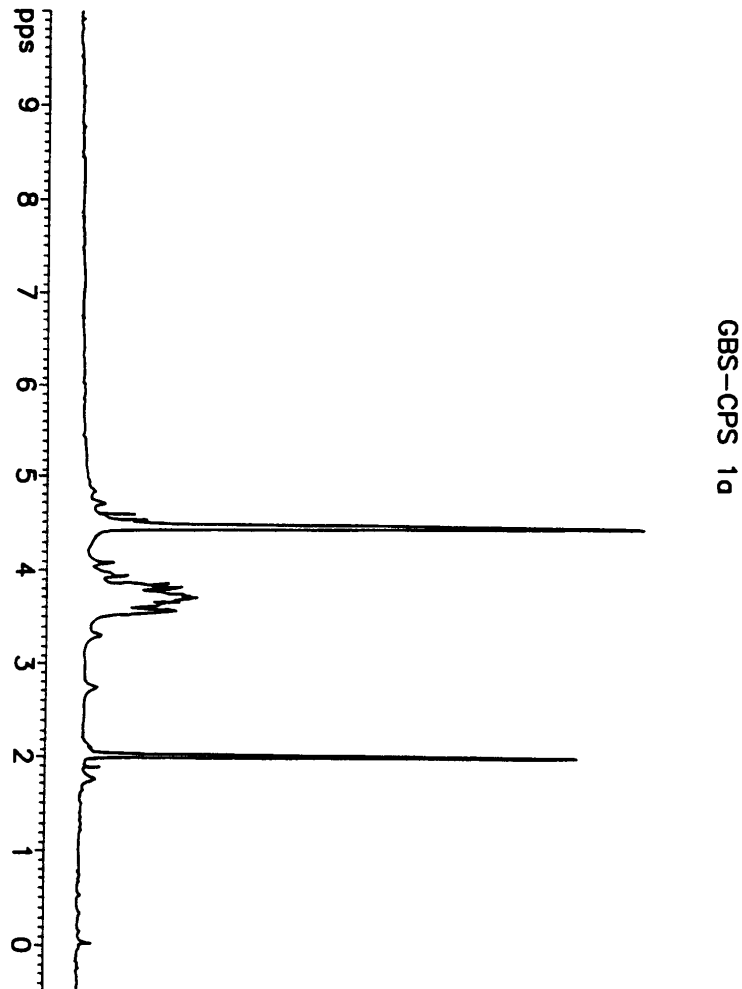
잔기를 나타낸다. 백색 화살표는 캡슐형 다당류와 폴리램노즈를 펩티도글라이칸에 결합시키는 포스포디에스테르 결합의 가수분해에 의한 리소자임(A), 뮤타노라이신(B), 리소스타핀(C) 또는 염기에 의한 예상되는 절단 위치를 나타낸다.

<12>

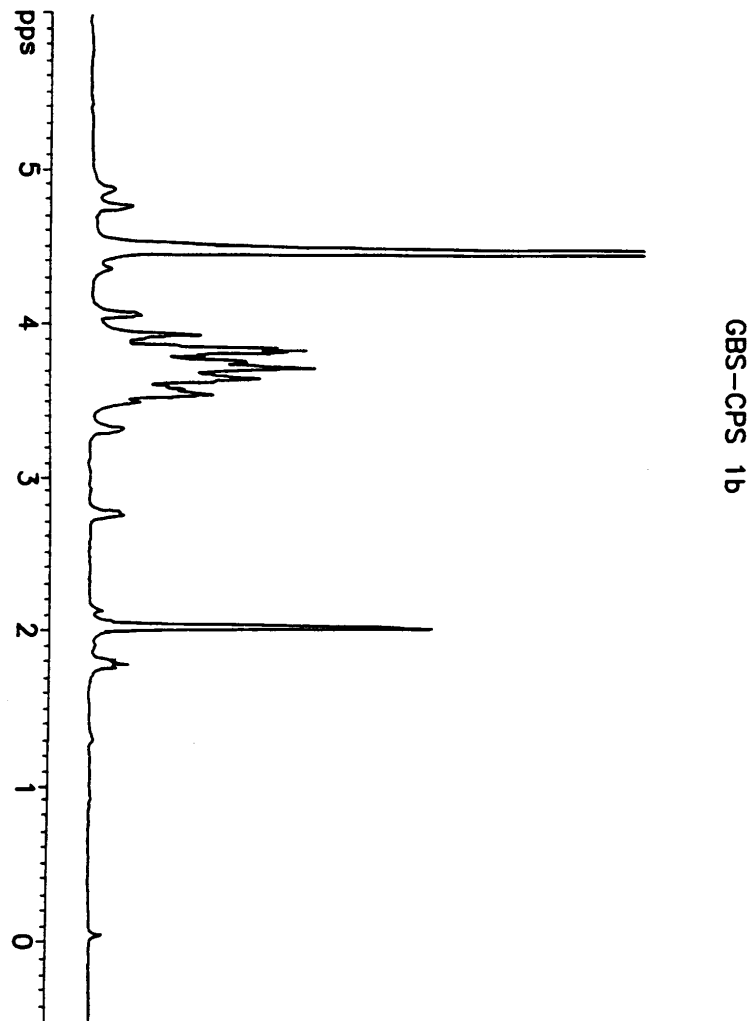
도 12는 그룹 서브캡슐형 항원(폴리램노즈) 및 캡슐형 다당류와 함께 펩티도글라이칸을 도시한 GBS 구조 배열체 (Michon et al., *Biochemistry* 1988, 27:5341-5351). X와 Y는 각각 N-아세틸글루코사민과 N-아세틸뮤라믹산의 잔기를 나타낸다. 백색 화살표는 캡슐형 다당류를 펩티도글라이칸에 결합시키는 포스포디에스테르 결합의 가수분해 및 폴리램노즈를 펩티도글라이칸에 결합시키는 포스포디에스테르 결합의 가수분해에 의한 리소자임(A), 뮤타노라이신(B), 리소스타핀(C) 또는 염기에 의한 예상되는 절단 위치를 나타낸다.

도면

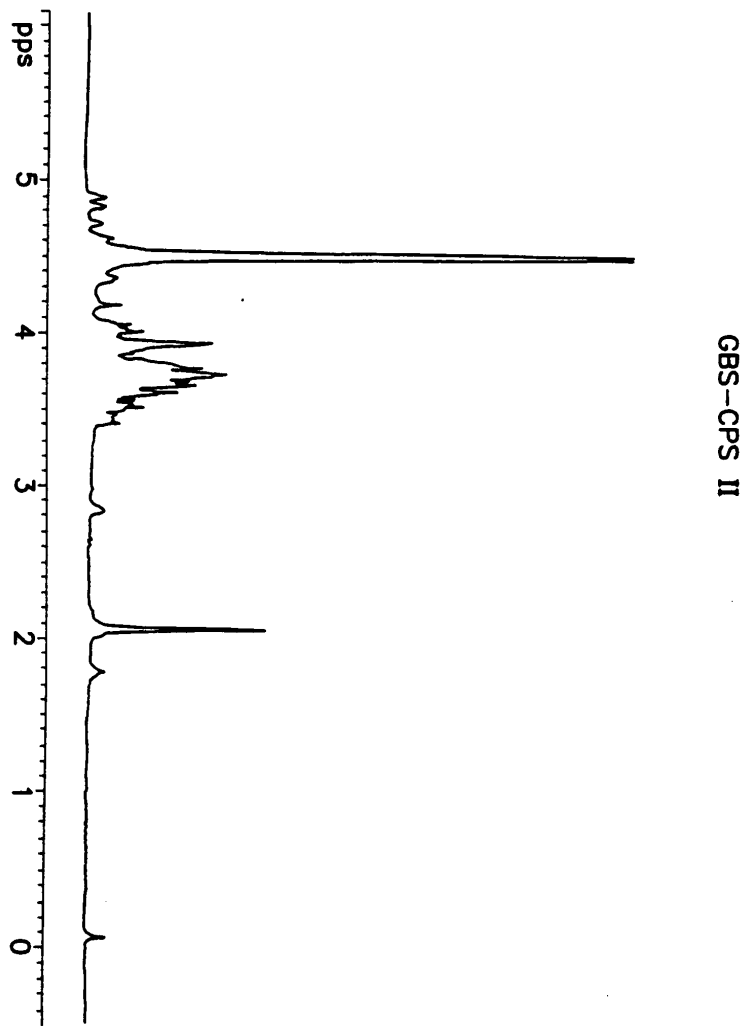
도면1



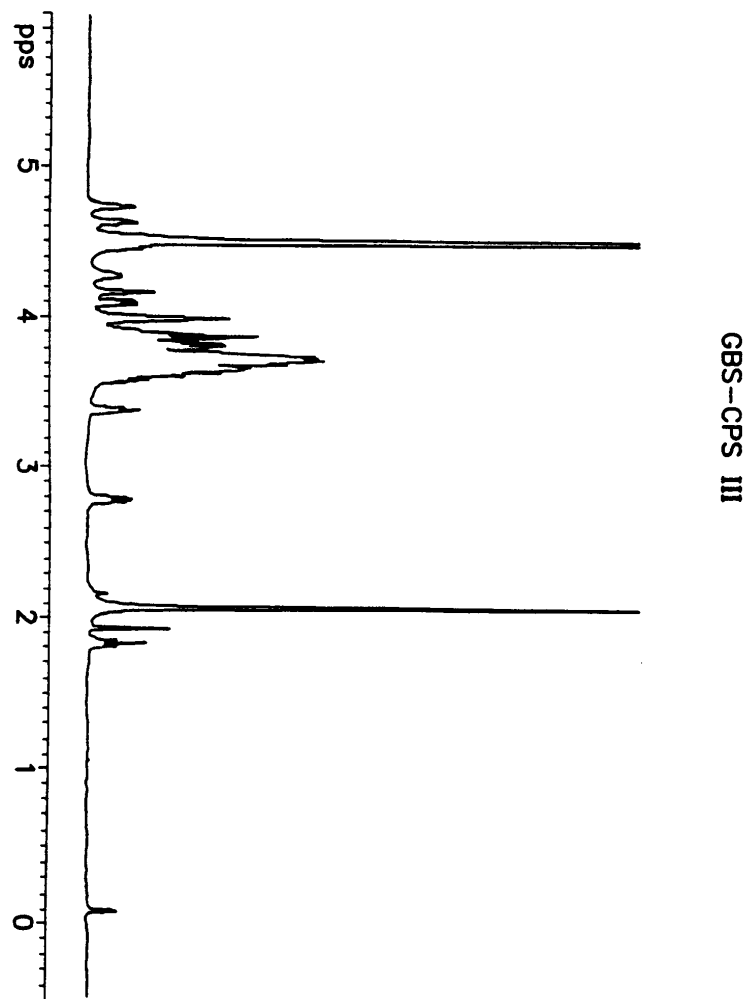
도면2



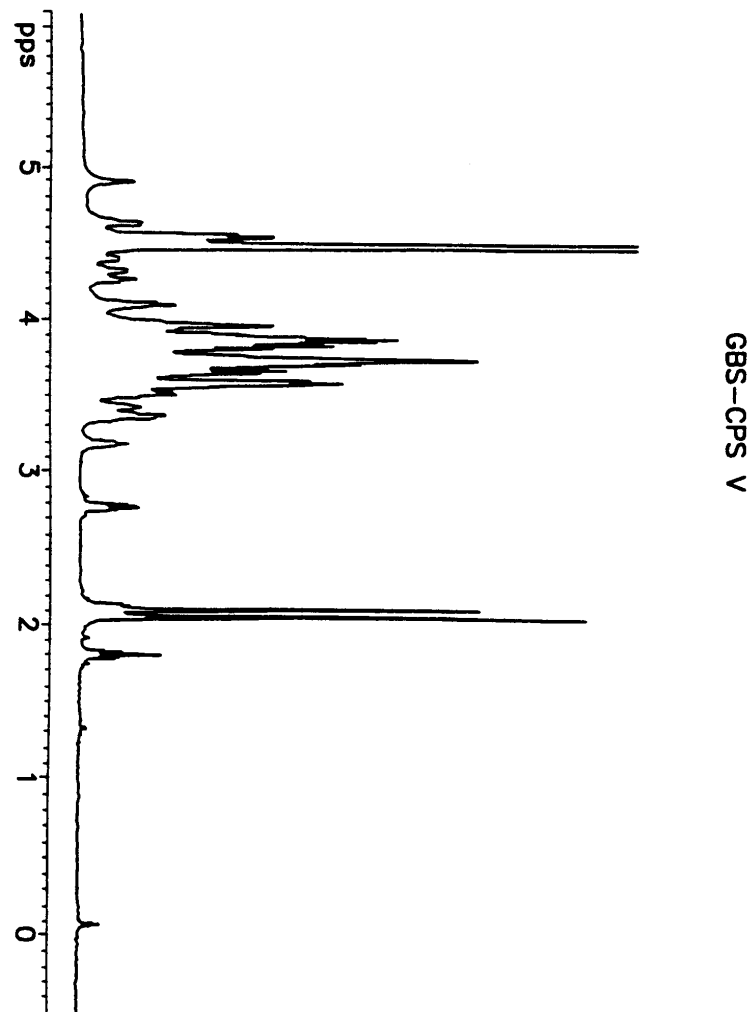
도면3



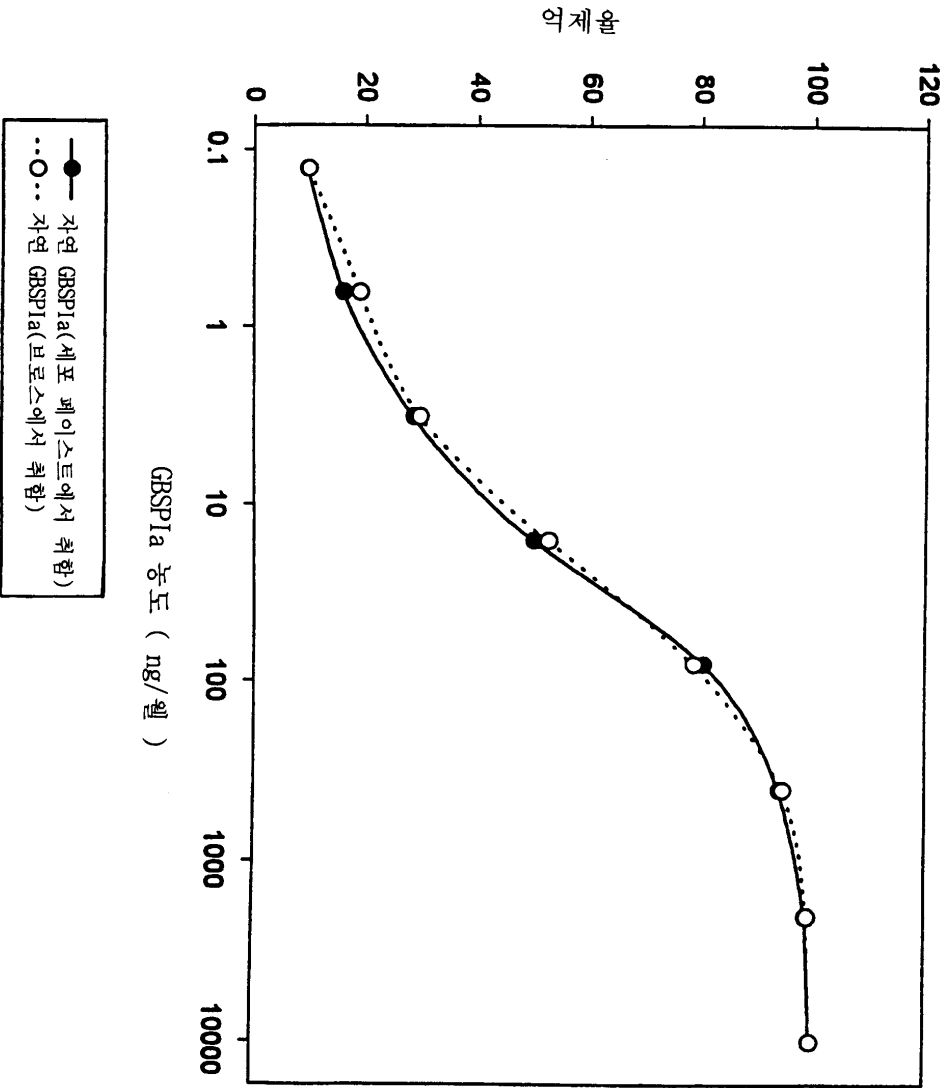
도면4



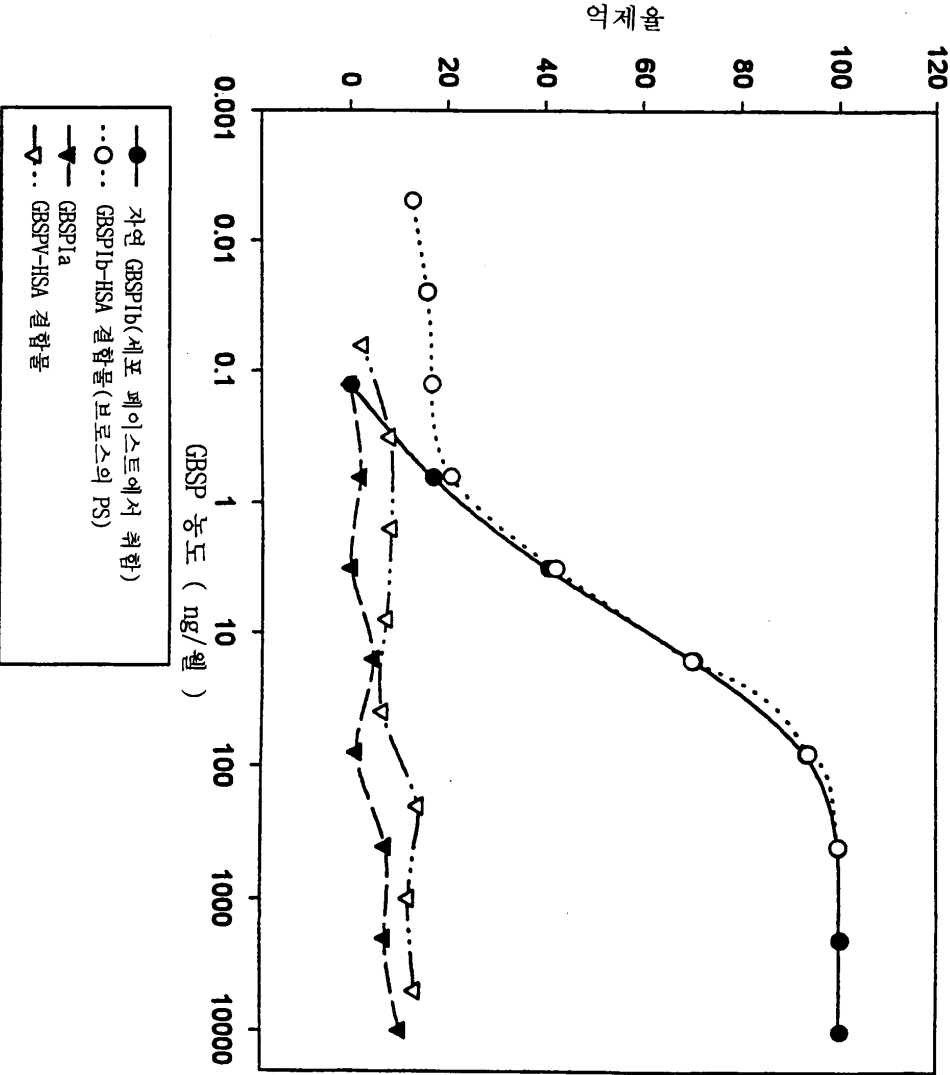
도면5



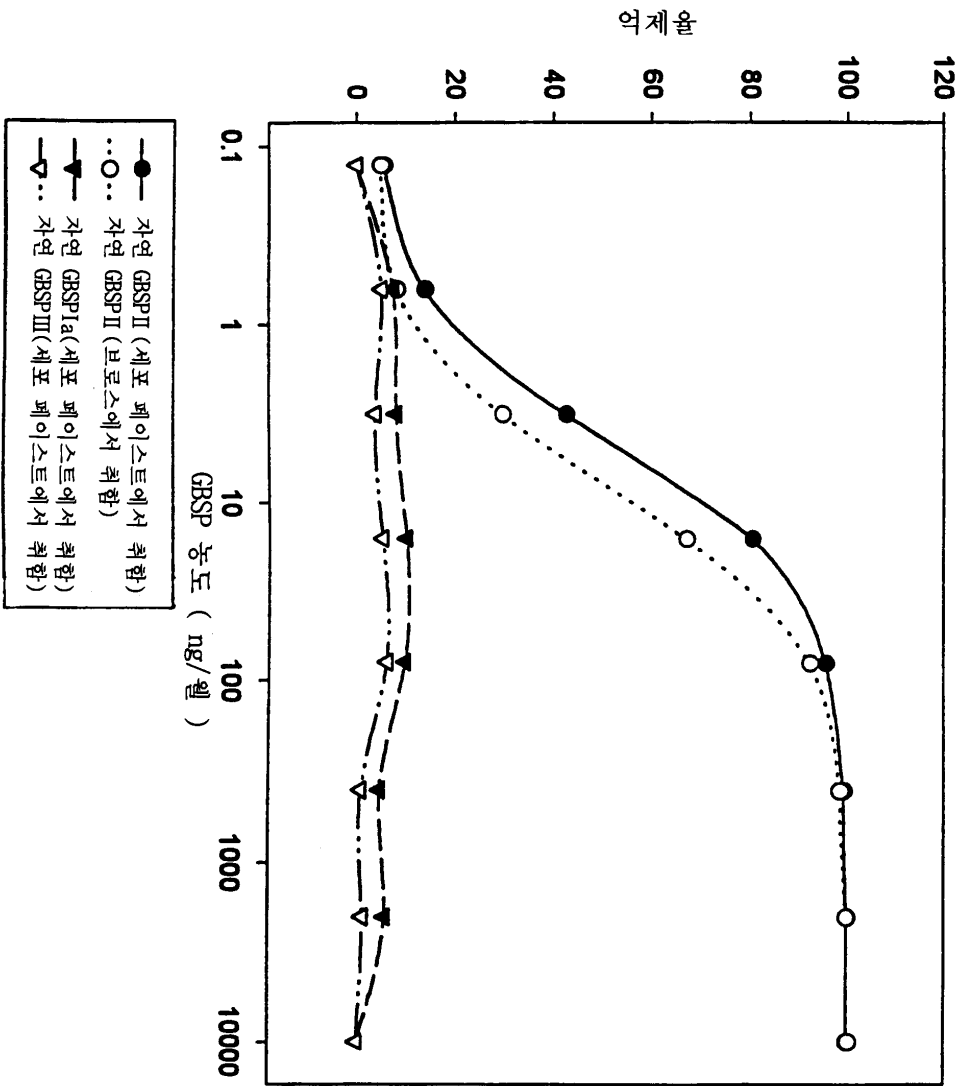
도면6



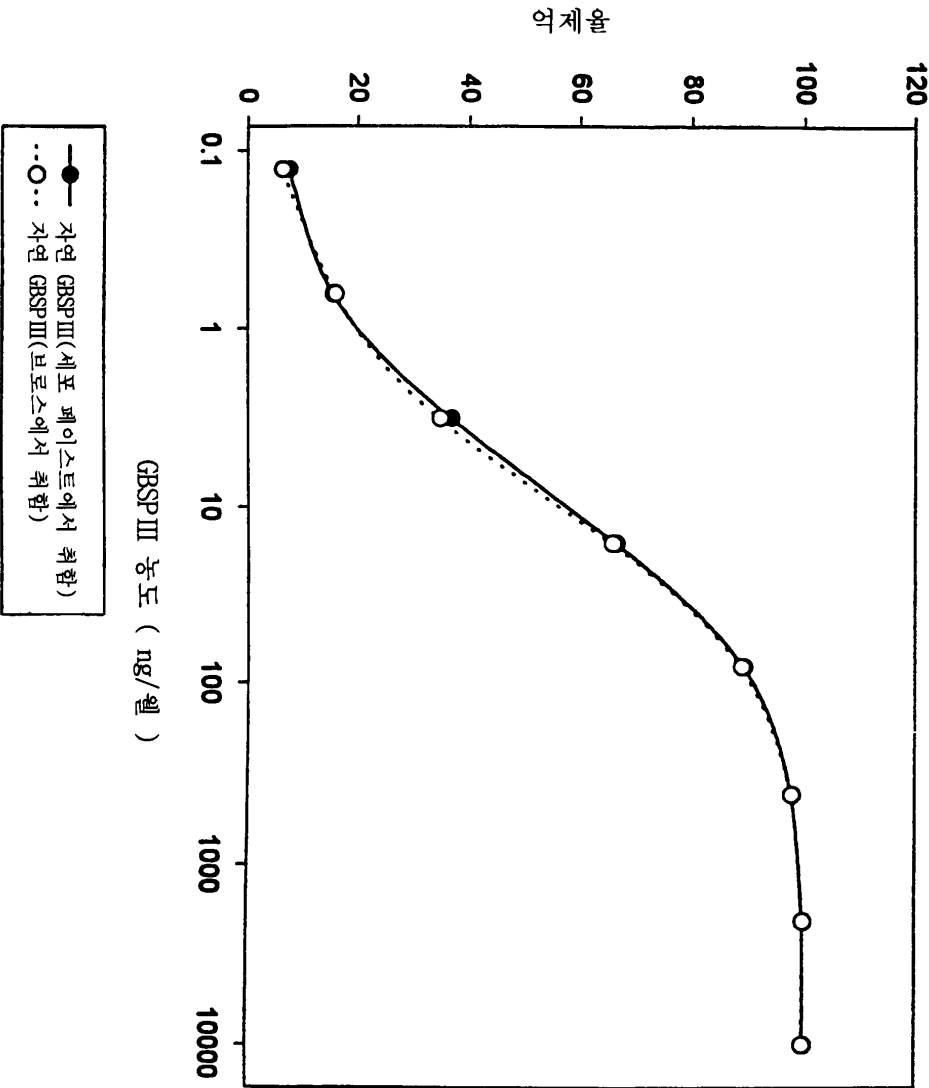
도면7



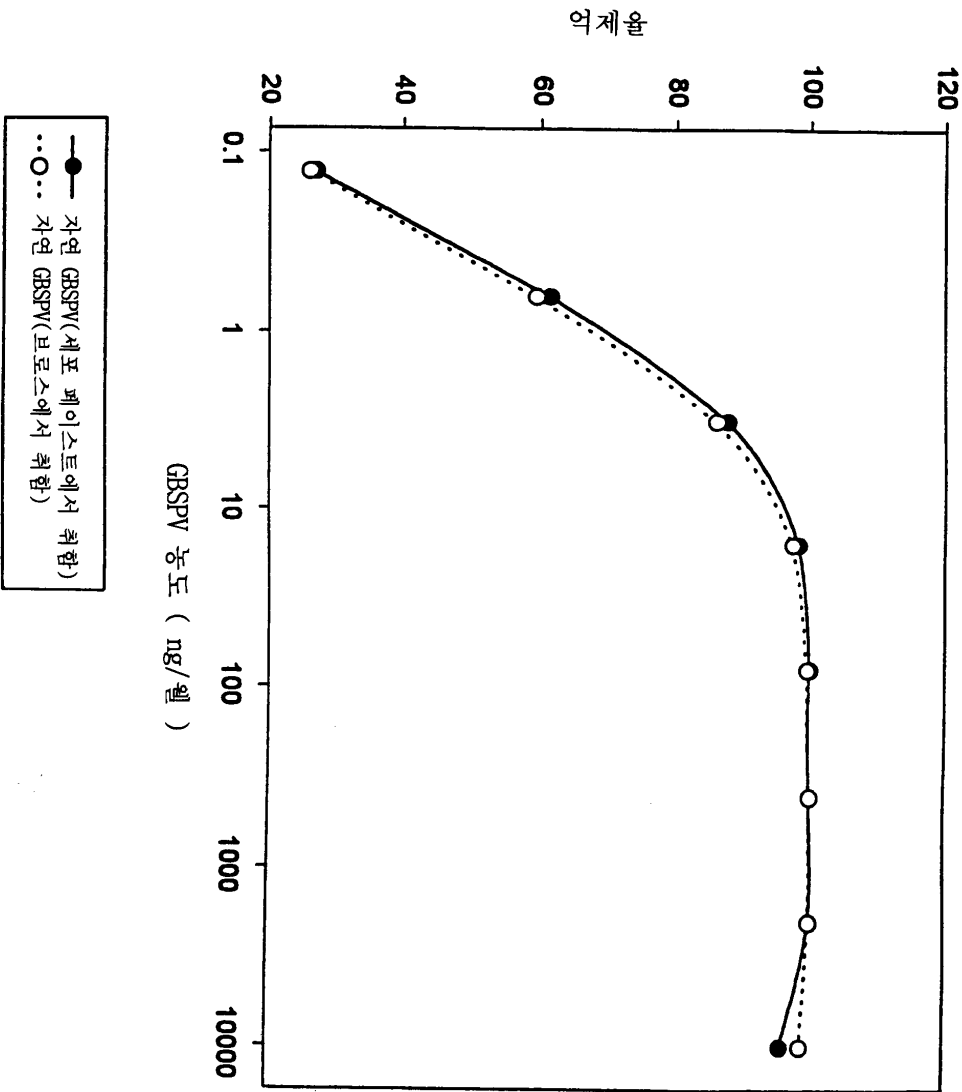
도면8



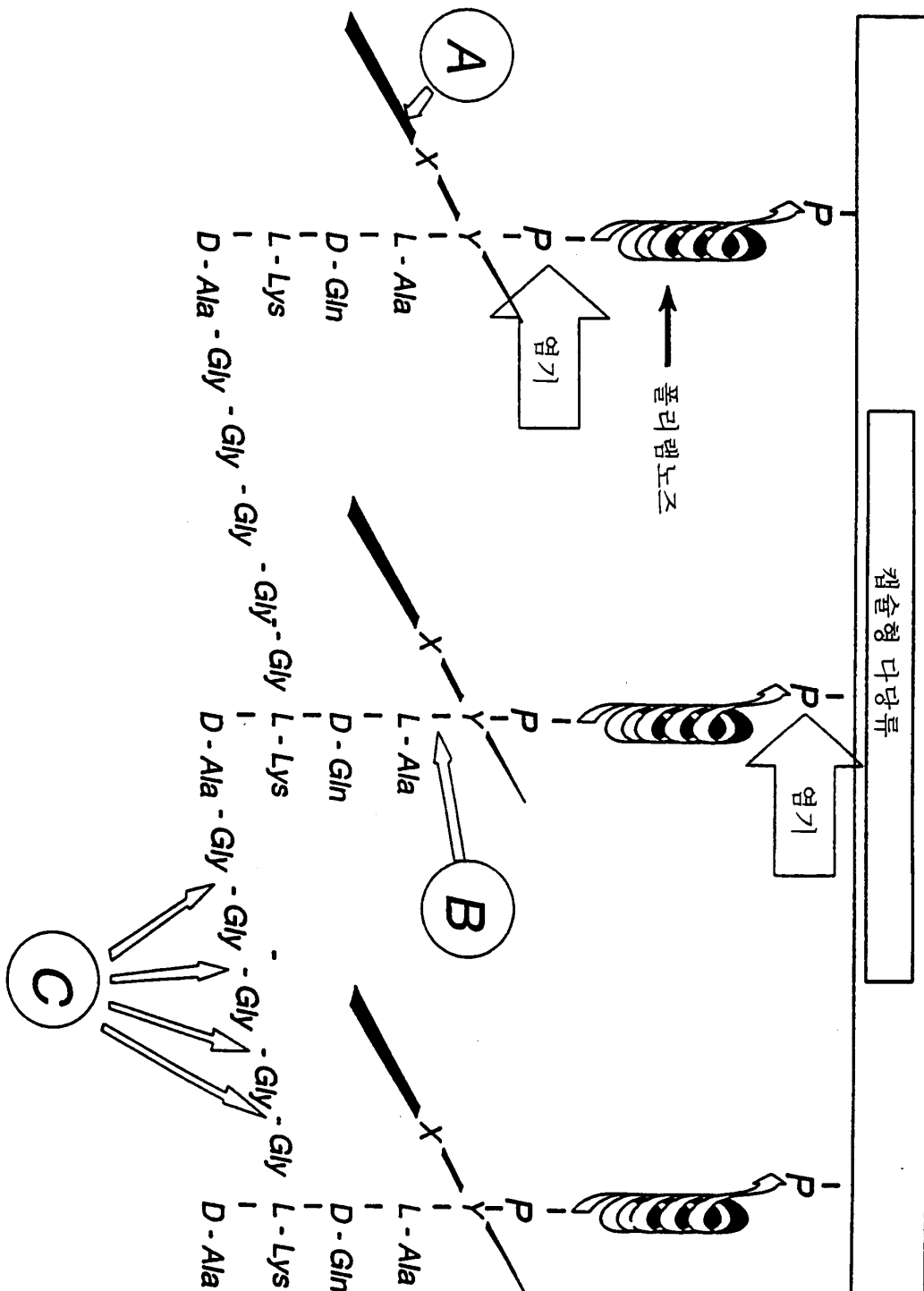
도면9



도면10



도면11



도면12

