



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0033525
(43) 공개일자 2020년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A61K 39/092 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0112898

(22) 출원일자 2018년09월20일

심사청구일자 2018년09월20일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

한국원자력연구원

대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)

(72) 발명자

송준영

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1405동 603호(신정동, 목동신시가지아파트14단지)

최민주

인천광역시 계양구 장기로10번길 11(장기동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 다해

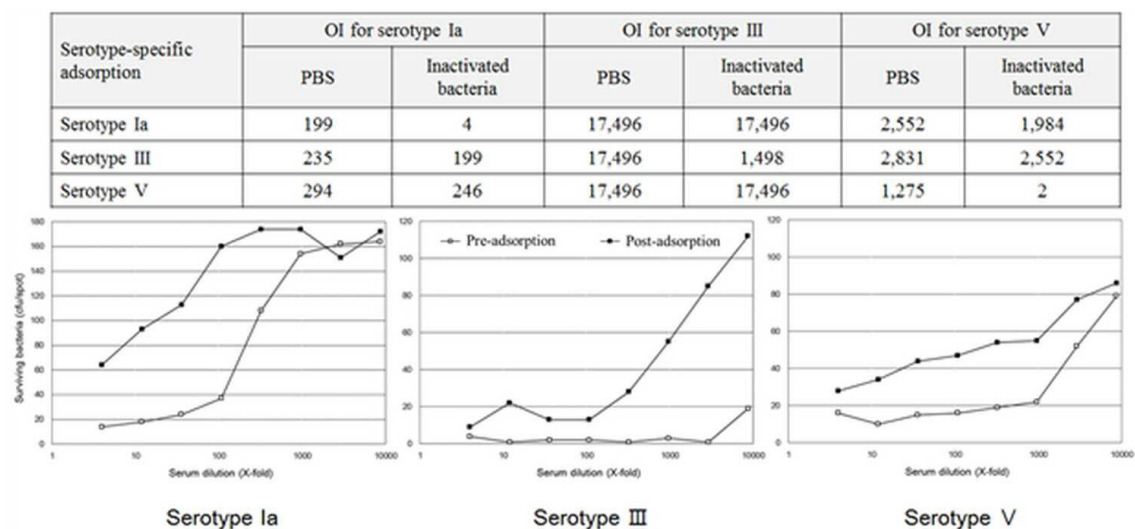
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 신규 B군 연쇄상구균 혈청형 균주 및 이를 포함하는 면역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 B형 연쇄상구균 백신에 포함된 여러 혈청형에 대해서 한번의 실험으로 동시에 면역원성을 평가할 수 있는 신규 B군 연쇄상구균 혈청형 균주 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 수탁번호 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주는 높은 혈청형 특이 항원성을 가지며, 선택적 항생제 내성을 가지므로 GBS 백신의 혈청형 특이 면역도를 다중 기능적항체역가 실험법(multiplexed opsonophagocytic assay, MOPA)으로 평가하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

A61K 2039/522 (2013.01)

C12R 1/46 (2013.01)

(72) 발명자

서호성

전라북도 정읍시 학산로 89-25, 102동 404호(상동, 엘드수목토)

이광문

세종특별자치시 도움3로 160, 413동 1704호(중촌동, 가재마을4단지)

유시형

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명로 200 예스오피스텔

김소영

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 111, 601동 2101호(오송호반베르디움아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 16172감염병264

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전처

연구사업명 감염병 예방안전관리연구

연구과제명 b형연쇄구균에대한면역원성평가법개발및면역도조사연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 13365BP 또는 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1 내지 또는 서열번호 2의 16s RNA 염기서열을 표시되는 것을 특징으로 하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13365BP 균주는 스펙티노마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13365BP 균주는 혈청형 III인 것을 특징으로 하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13366BP 균주는 카나마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13366BP 균주는 혈청형 V인 것을 특징으로 하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주.

청구항 7

수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는, B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 수탁번호 ATCC 12401 및 KCTC 13365BP, 또는 ATCC 12401 및 KCTC 13366BP, 또는 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP, 또는 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 스트렙토마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 혈청형 Ia인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 균주들은 불활성화되어 병원성을 상실한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 균주들은 약독화된 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 13

수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 대상체에 면역 후 면역여부를 판단하는 단계를 포함하는 면역확인방법.

청구항 14

수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는, B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물을 포함하는 백신 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 수탁번호 ATCC 12401 및 KCTC 13365BP, 또는 ATCC 12401 및 KCTC 13366BP, 또는 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP, 또는 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 스트렙토마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 혈청형 Ia인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 균주들은 불활성화되어 병원성을 상실한 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 균주들은 약독화된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 B형 연쇄상구균 백신에 포함된 여러 혈청형에 대해서 한번의 실험으로 동시에 면역원성을 평가할 수 있는 신규 B군 연쇄상구균 혈청형 균주 및 이를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 수탁번호 KCTC 13365BP 또는 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주 및 상기 균주를 포함하는 B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 영아와 소아의 침습성 감염 질환(Hib, 폐렴구균 등)은 관련 백신접종으로 현저히 감소되었으나 b군 연쇄구균(group B streptococci, GBS)은 여전히 신생아와 영아에서 치사율과 합병증 발생률이 매우 높게 나타나고 있다.
- [0004] 최근 유럽과 미국 등의 연구결과에 따르면 성인과 노인에서도 b형 연쇄구균에 의한 중증감염 사례가 증가하고 있다고 보고되고 있다.
- [0005] 현재, GBS 감염을 예방하기 위한 백신개발(단백질백신, 단백질-다당류 접합백신)과 임상시험이 대형 제약회사를 중심으로 활발히 진행되고 있으나, 국내/외에서 아직까지 GBS에 대한 면역원성을 평가하기 위한 시험법이 제대로 확립되어 있지 못하여, 향후 백신이 보급되었을 경우 효과적으로 대응하기가 매우 어려울 것으로 사료된다.
- [0006] GBS 백신 개발을 위한 혈청형에 따른 감염기작, 면역학적 반응, 유전체 연구 등과 관련된 기초 연구가 활발히 진행되고 있으며, 면역원성 평가 기술의 개발 시 백신 관련 기초연구의 중요한 정보 제공이 가능하다.
- [0007] 따라서, 고위험군에서 GBS에 대한 면역도를 평가하고, GBS 백신의 도입 후에는 백신의 명확한 면역원성 평가를 위해서는 표준화된 시험법 구축이 반드시 필요하다.
- [0008] 최근, 고위험 임신부를 위한 산전 GBS 배양 선별 검사 및 신생아 항생제 예방법(intrapartum antibiotic prophylaxis(IAP))은 조기 발견 질병(early-onset disease(EOD))을 줄이는데 효과적이었으나, 이를 제거하는 데는 효과적이지 않았다(Phares CR et al., *JAMA*, 299(17):2056-65, 2008; Van Dyke MK et al., *N Engl J Med*, 360(25):2626-36, 2009). 더욱이, 이 접근법은 성인의 늦게 발생하는 질병 (LOD)이나 감염을 예방할 수 없었다(Emerging infections program network. [accessed 2013 Apr 28]. <https://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.html>).
- [0009] 따라서, 현재의 태아기 전략의 함정과 고령자의 GBS 감염에 대한 부담을 감안할 때, 효과적인 GBS 백신의 개발과 백신의 면역원성 평가법이 절실히 필요하다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 혈청형 특이 항원성과 선택적 항생제 내성을 갖고 있는 B군 연쇄상구균 혈청형 Ia, III 및 V 균주를 찾고자 예의 노력한 결과, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주가 높은 면역원성을 가지므로 높은 항체 역가를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 효율적으로 백신 면역원성을 평가할 수 있는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는, B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 대상체에 면역 후 면역여부를 판단하는 단계를 포함하는 면역확인방법을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는, B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방 백신 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는, B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 대상체에 면역 후 면역여부를 판단하는 단계를 포함하는 면역확인방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는 B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주는 높은 혈청형 특이 항원성을 가지며, 선택적 항생제 내성을 가지므로 GBS 백신의 혈청형 특이 면역도를 다중 기능적항체역가 실험법(multiplexed opsonophagocytic assay, MOPA)으로 평가하는데 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 상기 균주를 포함하는 B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방 백신 조성물은 가임기 여성 또는 산모에게 GBS 백신을 접종하는 경우에 산모의 GBS 집락을 억제할 뿐 아니라 태반을 통해 모체로부터 신생아에게 항체가 전달되어서 영아기의 침습성 GBS 감염까지도 예방을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 GBS(group B Streptococcus) MOPA(multiplexed opsonophagocytic killing assay) 시험을 위하여 최적화된 보체(complement) 농도를 관찰한 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 GBS MOPA 시험의 특이도(specificity)를 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 GBS MOPA 시험법의 정확도(accuracy)를 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 GBS MOPA 시험법의 정확도(accuracy)를 다기관을 통하여 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 노인 등 고위험군에서 GB S 혈청형 Ia에 대한 기초 OPA 역가(opsonic index, OI)를 비교한 것이다((A) 평균값 비교, (B) OI의 분포도 비교).
- 도 6은 본 발명의 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 노인 등 고위험군에서 GB S 혈청형 III에 대한 기초 OPA 역가(opsonic index, OI)를 비교한 것이다((A) 평균값 비교, (B) OI의 분포도 비교).
- 도 7은 본 발명의 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 노인 등 고위험군에서 GB S 혈청형 V에 대한 기초 OPA 역가(opsonic index, OI)를 비교한 것이다((A) 평균값 비교, (B) OI의 분포도 비교).
- 도 8은 임신부에서 GBS 혈청형 별 기초 OPA 역가(opsonic index, OI) 비교: 임신 35~37주 산전검진시 GBS 회음부 집락 여부에 따른 OI 분포를 비교한 것이다(GBS 집락군, 파랑색 circle; GBS 미집락군, 빨강색 circle).
- 도 9는 본 발명의 GBS MOPA와 ELISA 시험 결과의 상관성을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명에서는 수탁번호 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주가 혈청형 특이 항원성을

가지며, 선택적 항생제 내성을 가지므로 GBS 백신의 혈청형 특이 면역도를 다중 기능적항체역가 실험법 (multiplexed opsonophagocytic assay, MOPA)로 평가하는데 유용하게 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

- [0026] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 수탁번호 KCTC 13365BP 또는 KCTC 13366BP의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 16s RNA 염기서열을 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13365BP 균주는 스펙티노마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 혈청형 III인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 상기 수탁번호 KCTC 13365BP 균주는 *Streptococcus agalactiae* KGP0296인 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명에서, 상기 수탁번호 KCTC 13365BP 균주는 서열번호 1의 16s RNA 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하며, SPEC-III로 명명하였다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 수탁번호 KCTC 13366BP 균주는 카나마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 혈청형 V인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 수탁번호 KCTC 13366BP 균주는 *Streptococcus agalactiae* KGP0307 인 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명에서, 상기 수탁번호 KCTC 13366BP 균주는 서열번호 2의 16s RNA 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하며, KANA-V로 명명하였다.
- [0034] 본 발명에서, b형 연쇄구균(group B streptococci, GBS)은 그람양성, beta-hemolytic 구균으로서 1910년부터 인간에게 감염이 보고되기 시작했으며, 1970년대 미국과 유럽을 중심으로 소아와 영아에게 심각한 수막염과 폐혈증 질병을 야기하는 주요 병원균으로 변이되었다. 1980년대 후반부터 b형 연쇄구균은 젖소와 인간뿐만 아니라, 민물 물고기, 돌고래, 악어 등 다양한 생물체에서 뇌수막염과 폐혈증을 일으키는 병원체로 변이가 되었다.
- [0035] GBS의 세포벽 탄수화물 항원(cell wall carbohydrate antigen 혹은 peptidoglycan)은 모든 균주에서 동일하나 두 번째 세포벽 탄수화물 항원(피막다당질; cell wall polysaccharide; CWPS)에 의해 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX 등의 혈청형으로 분류된다. 각 피막다당질은 다당류 종류 및 순서에 따라 그림 X와 같이 다른 구조와 면역원성을 가지고 있다.
- [0036] GBS에 의한 질병을 예방하기 위하여, 폐렴구균에서처럼 피막다당질은 단백질-다당류 백신으로 개발 중에 있으나, 몇몇 b형 연쇄구균 CWPS의 항원의 구조상 유사성으로 인하여 cross-protection의 가능성이 대두되기도 하였으나, 면역원성 실험법이 구축이 되지 않아 실험적으로 증명이 되지 못하고 있다.
- [0037] 본 발명은 다른 관점에서, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는 B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 수탁번호 ATCC 12401 및 KCTC 13365BP, 또는 ATCC 12401 및 KCTC 13366BP, 또는 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP, 또는 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 스트렙토마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 혈청형 Ia인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 서열번호 3의 16s RNA 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하며, STREP-Ia로 명명하였다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 균주들은 불활성화되어 병원성을 상실한 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 균주들은 약독화된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어 "면역원성"이라는 것은 특정 병원체에 대해 포유동물에서 면역 반응을 유발시키는 조성물의 능력을 의미한다. 면역 반응은 세포독성 T-세포 및 시토킨-생성 T-세포에 의해 주로 매개되는 세포 면역 반응, 또는 헬퍼(헬퍼) T-세포에 의해 주로 매개된 후 B-세포를 활성화시켜 항체를 생성시키는 체액 면역 반응일 수

있다.

- [0043] 본 발명의 면역원성 조성물은 유효한 양으로 투여될 수 있다. "유효한 양"이란 치료 또는 예방하고자 하는 증상을 완화 또는 제거하는데 요구되는 양을 의미하며, 당업자라면 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들면, 상기 치료학적으로 또는 예방학적으로 유효한 양은, 상기 이중 항원 단백질을 발현하는 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 1일 1×10^6 내지 1×10^{10} cfu/mL, 바람직하게는 1일 1×10^7 내지 1×10^9 cfu/mL, 더욱 바람직하게는, 1일 1×10^7 내지 1×10^8 cfu/mL의 범위로 투여할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 면역원성 조성물은, 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주에 더하여, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 아주반트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 면역원성 조성물에 있어서, 상기 담체는 희석제, 완충제, 보존제 등을 포함하는 의미로서 사용된다. 상기 담체에는 당업계에 알려진 부형제, 봉해제, 결합제 및 활택제로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 성분이 포함될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 상기 아주반트는 항원의 면역원성을 증진시키기 위하여 사용되는 물질이며, 본 발명에 사용하기에 적합한 아주반트로, 몇몇 아주반트 부류, 예컨대 미네랄 염, 예컨대 Alum, 알루미늄 히드록사이드, 알루미늄 포스페이트 및 칼슘 포스페이트; 계면활성제 및 미립자, 예컨대, 비이온성 블록 중합체 계면활성제(예컨대, 콜레스테롤), 비로솜(virosome), 사포닌(saponin)(예컨대, Quil A, QS-21 및 GPI-0100), 프로테오솜, 면역 자극 착체, 코클레아이트, 4차 아민(디메틸 디옥타데실 암모늄 브로마이드(DDA)), 아브리딘, 비타민 A, 비타민 E; 박테리아 생성물, 예컨대 RIBI 아주반트 시스템(Ribi Inc.), 미코박테리움 플레이(Mycobacterium phlei)의 세포벽 골격(Detox(등록상표)), 무라밀 디펩티드(MDP) 및 트리펩티드(MTP), 모노포스포릴 지질 A, 바실러스 칼메테-구에린(Bacillus Calmete-Guerin), 열-불안정한 대장균 엔테로톡신(enterotoxin), 콜레라 독소, 트레할로스 디미콜레이트, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드; 시토카인 및 호르몬, 예컨대, 인터류킨(IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), 과립구집락자극인자, 데히드로에피안드로스테론, 1,25-디히드록시 비타민 D3; 폴리아니온, 예컨대 텍스트란; 폴리아크릴릭(예컨대, 폴리메틸메타크릴레이트, Carbopol 934P); 담체, 예컨대 테타누스 독소이드, 디테리아 독소이드, 콜레라 독소 B 서브유닛, 엔테로톡시제닉 대장균의 돌연변이체 열-불안정한 엔테로톡신(rmLT), 열 쇼크 단백질; 수중유적형 유화액, 예컨대 AMPHIGEN(등록상표)(Hydronics, 미국); 및 유중수적형 유화액, 예컨대 프로인트(Freund)의 완전 및 불완전 아주반트가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 면역원성 조성물은 당업계에 알려진 임의의 형태 예를 들면, 액체 및 주사제의 형태일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 액체 또는 주사제의 경우, 필요시 10~40%의 프로필렌 글리콜, 및 용혈현상을 방지하는데 충분한 양 (예: 약 1%)의 염화나트륨을 함유할 수 있다. 상기 액체 또는 주사제에는 당업계에 알려진 임의의 희석제 또는 완충제가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 면역원성 조성물은, 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 동결건조하여 바이알과 같은 용기에 보존하고, 사용하기 전에 주사제에 필요한 담체 또는 아주반트, 식염수 등을 부가함으로써, 사용 직전에 조제될 수도 있다.
- [0048] 본 발명은 또 다른 관점에서, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 대상체에 면역 후 면역여부를 판단하는 단계를 포함하는 면역확인방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 대상체는 인간, 소, 돼지, 염소, 개, 양 등일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 대상체는 인간이다.
- [0050] 본 발명의 면역원성 조성물은, 당업계에 알려져 있는 임의의 투여 수단에 의하여 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 투여는 정맥내, 근육내, 경구, 경피 (transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하로 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여되는 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주로 야기되는 질병으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 질병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명에서, MOPA(multiplexed opsonophagocytic killing assay)의 유효성을 확인하기 위하여, 중화 혈청(neutralizing serum) 샘플에 대한 분석 특이성을 분석하였다. 비활성화된 혈청형 GBS를 사용하여 혈청형 항체를 흡착시킴으로써, 도 2에 도시된 바와 같이, 천연 혈청형의 OI는 Ia, III, V 형 각각 199, 17496, 1275이다.

대조적으로, 사전 흡착된 혈청의 OI는 혈청형 III에 대한 Ia 및 V 및 1498에 대해 검출되지 않았으며, 이것은 천연 혈청보다 11.7 배 낮았다. 이중 GBS 혈청형과의 사전 흡착은 0-30 %의 OI 감소를 가져와 혈청에서 교차 반응 항체의 존재 가능성을 나타낸다(도 2). 다양한 혈청 샘플의 OI 감소는 다양하게 나타났다.

[0053] 또한, 정확성을 확인하기 위하여, MOPA의 값을 이전에 기술된 SOPA의 값과 비교함으로써 조사하였다. 이를 위해 35 개의 혈청 샘플 (이전의 GBS 감염 20 명과 건강한 대상 15 명)을 두 검사에서 검사하고 MOPA (y 축)와 SOPA (x 축) OI를 비교하였다(도 3). 그래프의 파선 및 실선은 각각 동일성 및 동일성으로부터 2배의 편차를 나타낸다. 그 결과, 105 개의 데이터 점들 중 15 개가 동일성에서 2 배 이상 벗어났지만, 두 분석의 OI는 R- 제곱 상관 계수 (r^2) 값이 0.950을 초과하여 잘 상관되었다는 것을 확인하였다.

[0054] 또한, 정밀성을 확인하기 위하여, 정상 작동 조건(분석 간 편차)에서의 GBS-MOPA의 재현성은 연속하지 않은 4일 동안 5 개의 혈청 샘플을 사용하는 2 명의 독립적인 실험자에 의해 수행된 5 번의 독립적인 실험으로 평가하였다. 5 개의 독립적인 실험의 평균 OI, 표준 편차, 및 변동 계수를 계산하였다. 그 결과, 3 가지 혈청형의 변이 계수 (CV)는 0 %에서 31.2 % (평균 12.5 %)이다(표 1). 혈청형 Ia의 경우, 5 개의 혈청 샘플 중 4 개가 OI <4 로, 일관되게 탐지할 수 없는 옅소닌화를 보였다.

[0055] 하기 표 1은 GBS MOPA의 중간 분석 정밀도를 확인한 것이다.

표 1

Sample	STREP-Ia		SPEC-III		KAN-V	
	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Mean $\pm$ SD	CV (%)
Sample 1	2 $\pm$ 0	0	599.8 $\pm$ 174.3	29.1	753.8 $\pm$ 122.4	16.2
Sample 2	87.1 $\pm$ 23.4	26.8	6467.4 $\pm$ 1328.9	20.5	30.7 $\pm$ 27.9	9.1
Sample 3	2 $\pm$ 0	0	10.1 $\pm$ 1.8	17.9	7.8 $\pm$ 3.4	4.3
Sample 4	2 $\pm$ 0	0	14.3 $\pm$ 3.1	21.8	724.3 $\pm$ 230.9	31.9
Sample 5	2 $\pm$ 0	0	2.5 $\pm$ 0.4	4.3	2.7 $\pm$ 1.6	6.1

[0058] 임상 시험에서 후보 GBS 백신의 효능은 ELISA에 의해서만 측정되었기 때문에 낮은 항원 항체와 높은 항체 항체의 기능적 활성을 정확히 구별하지 못할 수 있으므로 후보 GBS 백신의 효능을 평가하기 위해서는 OPA가 필요하다.

[0059] GBS에 대한 OPA를 개발하기 위해서, (1) 시험에 사용할 수 있는 유아 혈청의 양이 극히 적기 때문에 다중화 되어야하며, (2) 새로 개발된 GBS-OPA 프로토콜의 주요 사용자가 주로 폐렴 구균 OPA 사용자인 것으로 예측되기 때문에 폐렴 구균 OPA (예 : 시약 및 프로토콜)와 호환 가능해야한다. 따라서 이들 사용자는 GBS 백신 평가를 위해 제안된 OPA에 쉽게 적응할 수 있다.

[0060] 본 발명에서는, 체계적인 메타 분석을 통해 EOD(early-onset disease)와 LOD(late-onset disease)의 적용 범위가 약 81% 인 혈청형 Ia, III, V를 대상으로 3 배 다중화된 GBS-OPA를 개발하였다.

[0061] 특정 폐렴 구균 혈청형과 유사하게, GBS 혈청형 V는 NSK의 특히 높은 수준을 보였다. 상기 높은 수준은 식균 작용 단계에서 5 % CO₂에서 배양한 후에도 관찰되었으며, 폐렴 구균 NSK가 크게 감소한 것으로 나타났다.

[0062] 종래에 알려진 바와 같이, 박테리아 협막(capsule) 발현 및 보체 농도의 수준은 NSK에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 그러므로 이러한 요소들은 기능성 항체에 의한 협막 박테리아의 옅소닌 식균 작용 (OPK)을 신뢰성있게 측정하기 위해 최적화되어야한다. 예를 들어, 작은 협막을 가진 폐렴 구균은 보체 매개 NSK에 대해 더 높은 민감성을 갖는 것으로 여겨지지만, 큰 협막을 갖는 폐렴 구균은 OPK에 상대적으로 내성이 있을 수 있다.

[0063] 본 발명에서, OPA가 여러 GBS 혈청형 군주로 수행되었을 때 매우 다양한 수준의 NSK와 OPK를 발견하였다. 그러나, 폐렴 구균 MOPA 프로토콜에 의해 권장된 바와 같이, 12.5 % BRC 대신에 9 % BRC를 사용함으로써 GBS의 NSK는 분석에서 유의하고 지속적으로 감소하였다(<30 %). 이전의 연구에 따르면 폐렴구균 OPA의 최적 보체 농도는 혈청형에 따라 8 %에서 16 %까지 다양하다고 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 GBS MOPA의 최적 농도로서 9 % BRC를 사용하였다. 상기 농도에서 NSK는 Ia 및 III에 대해 관찰된 40 %보다 일관되게 낮았다. 그러나, 이 시점에서 혈청형 V의 높은 수준의 NSK가 다른 GBS 혈청형에서의 협막 발현 수준의 차이로 인한 것인지 여부를 결정

하는 것은 불가능하다.

- [0064] 본 발명에서, GBS-MOPA는 특이성, 정확성 및 정확성과 관련하여 검증하였다. 에세이 특이성의 분석은 GBS-MOPA가 동종 불활성 GBS를 갖는 혈청형 흡착이 OIs의 현저한 감소를 가져왔기 때문에 충분히 특이적임을 보였다. 그러나, 또한 이중 혈청형 흡착을 가진 OI의 완전한 감소 (0-30 %)를 발견하였다(도 2). 이러한 교차 반응 항체는 GBS 표면에 발현 된 보존된 항원에 결합할 수 있다. 웨스턴 블랏팅으로 혈청 내 반응성 표면 항원 단백질을 조사 하였을 때, OI가 높은 혈청에서 적어도 세 개의 보존 된 세포벽 앵커링 단백질(cell wall-anchoring protein)이 발견되었다.
- [0065] 본 발명은 또 다른 관점에서, 수탁번호 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 B군 연쇄상구균 혈청형 균주를 포함하는 B군 연쇄상구균에 의한 질병 예방용 면역원성 조성물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 수탁번호 ATCC 12401 균주는 스트렙토마이신 항생제 내성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으며, 혈청형 Ia인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 수탁번호 ATCC 12401 및 KCTC 13365BP, 또는 ATCC 12401 및 KCTC 13366BP, 또는 KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP, 또는 ATCC 12401, KCTC 13365BP 및 KCTC 13366BP를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 균주들은 불활성화되어 병원성을 상실한 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 균주들은 약독화된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 용어 "약독화"란 독성 있는 균주가 변형 전보다 덜 독성 있는 균주거나 약한 병원균이 되는 방식으로 변형되는 것을 의미하며, 이러한 균주는 숙주 안에서 여전히 복제 분열될 수 있는 동안, 임상적 질병을 유발할 수 있는 능력이 현저히 감소된 것을 말한다. 본 발명의 약독화된 균주는 바람직하게, 독성 또는 병원성이 백신 용으로 투여를 허용할 수 있을 정도로 감소된 균주이며, 더욱 바람직하게는 균주가 숙주 내에서 여전히 복제할 수 있으면서도 임상적 질병을 유발할 수 없는 정도까지 약독화시키는 것을 의미한다.
- [0070] 본 발명의 백신을 투여할 수 있는 개체는 제한이 없으며, 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물을 포함한다.
- [0071] 본 발명의 백신에 대한 유효 투여량의 범위는 성별, 체표면적, 질환의 종류 및 중증도, 연령, 약물에 대한 민감도, 투여경로 및 배출비율, 투여시간, 치료기간, 표적세포, 발현 수준 등 기타 의학 분야에 잘 알려진 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 백신 조성물에는 상기 B군 연쇄상구균 혈청형 균주 이외에도, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 보조제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 면역보조제는 당업계에서 통상적으로 사용되는 면역보조제가 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게 상기 면역보조제는 콜레라독소 결합 유닛, 알루미늄 염, 지질 유제 (MF-59), 합성 세제 (Tween), 마이크로스피어, 리포솜, 점막점착 중합체 등을 들 수 있으나, 상기 예에 제한되는 것은 아니며, 이 분야의 새로운 제형이 개발되고 있는바, 이들 또한 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0076] 상세하게는, 제형화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일

과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0077] 본 발명의 백신 조성물이 적용되는 질병은 GBS 감염에 의해 야기되는 임의의 증상을 일컫으며, 예를들어 영아에서 패혈증 및 수막염 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0081] 실시예 1 : 실험 재료 및 방법

[0082] 실험은 GBS MOPA의 개발 및 최적화를 위한 두 단계로 수행되었다. 먼저, 표적 박테리아 군주가 생성되었고, 한천 플레이트 유형, 보체 농도 및 반응기-타겟 (E : T) 비율을 포함하는 OPA 조건이 최적화되었다. 둘째, Pneumococcal MOPA 프로토콜 (www.vaccine.uab.edu)에 나타난 바와 같이, 분석 특이성, 정확성 및 정밀도를 조사하였다. 상기 실험은 고려 대학교 구로 병원 윤리위원회(IRB No. KUGH16119)의 승인을 받았다.

[0084] 혈청 샘플

[0085] 본 발명의 실험은 고려 대학교 구로 병원 윤리위원회 (IRB No. KUGH14106)의 승인을 받았으며 헬싱키 선언 및 우수 임상 실습 (Good Clinical Practice)에 따라 수행되었다. KUGH의 기관 검토위원회는 미확인된 잔류 혈청 샘플 사용에 대한 서면 동의를 요구했다. 19 세의 건강한 성인 15 명에게서 혈청을 혼합하여 인간 혈청 풀(pool 1)을 제조하였다. 상기 풀은 OPA의 품질 관리에 사용되었다. 이전의 GBS 감염으로부터 회복된 대상자에서 20 개의 혈청 샘플을 얻었으며, 이전에 GBS 감염이 일어나지 않은 건강한 성인에서 15 개의 혈청 샘플을 수집하였다. 모든 연구 표본은 혈액 채취 전 3일 동안 항생제를 투여하지 않은 피험자에게서 채취하였다. 상기 채취한 샘플은 GBS MOPA를 최적화하고 검증하는 데 사용되었다.

[0087] 항생제 내성 GBS 군주 및 GBS 가공 군주의 생성

[0088] 이 연구에서 사용된 GBS 군주는 표 2에 기술하였다.

[0089] GBS 혈청형 Ia, III, V의 스펙티노마이신 내성, 스트렙토마이신-내성 및 카나마이신 내성 변이형은 자연 선택에 의해 생성되었다. 구체적으로, 증가하는 항생제 농도에서 0.5% 효모 추출물 (백톤 디킨슨) (THY broth)로 Todd-Hewitt broth (Becton Dickinson, Sparks, MD)에서 세포를 성장시켰다. 항생제 내성 GBS 군주를 37 °C에서 THY broth에서 배양하여 600 nm에서의 광학 밀도 (OD600)가 0.8 ~ 1.0이 될 때까지 배양하였다. 박테리아 가공 군주는 사용하기 전까지 15 % 글리세롤을 함유한 THY에서 -80 °C에서 동결되었다. MOPA 표준표적군주에 대한 희석배수(dilution factor)는 STREPA909(Ia)는 1,250X로, SPECNEM316 (III)는 1,250X로, KAN10/84 (V)는 1,000X로 하였다.

표 2

[0090]

MOPA strain	Serotype	No.	Resistant antibiotic and concentration
STREP-Ia (A909)	Ia	ATCC 12401	Streptomycin (300 mg/L)
SPEC-III (NEM316)	III	KCTC 13365BP	Spectinomycin (300 mg/L)
KAN-V (NCTC10/84)	V	KCTC 13366BP	Kanamycin (300 mg/L)

[0092] GBS 기능성 페렴구균 항체 분석 방법

[0093] GBS 다중화된 옴소닌구 (GBS-MOPA)은 페렴 구균 MOPA의 변형된 버전으로 구성되었다. 요약하면, HL-60 세포는 5 일 동안 10% 소 태아 혈청(FBS, HyClone, Logan, UT) 및 0.8% 디메틸포름아미드(Fisher Scientific,

Pittsburgh, PA)로 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하여 과립구 세포로 분화시켰다. 분화된 HL-60 세포를 흡소닌화 분석 완충액 B로 107 세포/ml로 희석하였다(OBB; Hanks' buffer supplemented with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) 및 10% FBS). 각 시험 혈청 샘플의 30 μ l를 96-웰 플레이트에서 OBB로 3배 희석하였다. 분석은 10 μ l의 스톡 및 희석된 혈청을 사용하였다. 10 μ l의 열-불활성화된 보체를 음성 대조군으로 사용하였다. 세 가지 표적 GBS 균주 각각의 동결된 가공 균주를 사용 직전에 해동하고, OBB로 두 번 세척한 후 세포를 재현탁하고, OBB에서 1×10^5 CFU / mL로 조정했다. 3개의 GBS 균주를 동일하게 혼합한 다음, 10 μ l의 GBS 혼합물을 각 웰에 첨가하였다. 실온에서 30 분간 배양한 후 분화된 HL-60 세포 현탁액 42.8 μ l (4.28×10^5 cell/well) 및 7.2 μ l의 어린 토끼 보체 (BRC; Pel-Freez Biological; Rogers, AR)를 각 웰에 첨가하였다. 그 후 혼합물을 37 °C에서 45분 동안 진탕 배양하였다. 그 후, 각 웰에 최종 반응 혼합물 10 μ l를 1.5 % 박토-한천 (TSA; 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson))을 함유하는 트립신 대두 한천에 접종하였다.

[0094] 다음으로, 3개의 항생제 중 하나와 2,3,4-triphenyltetrazolium chloride(TTC; Sigma-Aldrich)를 함유하는 0.75 % bacto agar를 포함하는 THY 25 mL를 스포트된 플레이트 위에 도말한(overlaid) 후, 플레이트를 37 °C에서 밤새 배양하였다. 플레이트 상에 살아남은 박테리아 콜로니를 열거하고, 혈청 샘플의 흡소닉 지수(OIs)를 결정하였다. OI는 희석된 혈청 대신 열-불활성화된 보체 10 μ l가 첨가된 음성 대조군에 비해 50 %의 CFU 감소를 가져오는 혈청 샘플의 최종 희석액으로 정의되었다. 희석되지 않은 혈청 샘플은 GBS의 50%를 사멸시켰고, OI는 4이다. 대조군 혈청 샘플(pool 1)의 분석 검정 재현성을 모니터링하기 위해 각 검정법에 포함시켰다.

[0095] GBS 단일 흡소닌 식세포 식균 분석(GBS-SOPA)의 경우, GBS 균주가 3가지 혈청형 혼합물보다는 단일 GBS 혈청형으로 준비된다는 점을 제외하고는 동일한 프로토콜이 GBS-MOPA와 동일하게 수행되었다. GBS-MOPA에서 사용된 동일한 프로토콜을 따르고 나서, 각 웰로 부터의 최종 반응 혼합물 5 μ l를 1.5 % 박토 - 한천(TSA; Becton Dickinson)을 함유하는 트립신 대두 한천 상에 접종하였다. 그 다음, 2,3,4-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich)만을 함유한 0.75 % bacto agar를 포함하는 THY 25 mL를 spotted plate 위에 도말한(overlaid) 후, plate를 37 °C에서 하룻밤 배양하였다. 하룻밤 배양 후, 한천 플레이트상의 박테리아 콜로니는 미국 표준 통합 기술 연구소 (National Institute of Standards and Technology, US Integrated Colony Enumerator)를 사용하여 계수하였다.

[0097] 혈청 샘플 흡착에 의한 특이도 결정

[0098] 분석 특이성은 포르말린-불활성화된 헤테로-혈청형 또는 호모-혈청형 GBS를 이용한 혈청 샘플의 예비 흡착을 이용하여 분석하였다. 표시된 GBS 혈청형(Ia, III, 및 V)은 0.5의 OD600으로 THY 배지에서 배양하였다. 각 GBS 배양 배지 50 mL를 0.2 % 포르말린 (100 μ l, v/v)과 혼합하고 37 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 이어서, 불활성화된 GBS 세포를 원심 분리에 의해 수확하고, 15 % 글리세롤로 인산염 완충 식염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 1 mL의 분취량을 -80 °C에서 보관하였다. 흡착을 위하여, GBS 분취액을 13,000 x g에서 2 분간 원심 분리하여 OBB로 2 회 세척한 후 1 mL의 OBB에 재현탁시켰다. 불활성화된 GBS 50 μ l를 혈청 시료 450 μ l와 혼합한 후 4 °C에서 2 시간 동안 진탕 배양하였다. GBS 세포를 원심 분리 (13,000 x g, 5 분)에 의해 제거하고, 400 μ l의 흡수된 혈청을 수집하여 GBS-MOPA에 즉시 사용하였다.

[0100] 통계 분석

[0101] 모든 통계 분석은 SPSS 18.0 (SPSS Korea, Seoul, Korea)을 사용하여 수행되었다. 정밀도는 시험 조건이 동등한 것으로 간주되어 CV $\leq 20\%$ 로 재현 가능하다. 정확성과 관련하여, 선형 상관 분석에서 $r^2 \geq 0.95$ 으로 허용 가능하다고 간주되었다.

[0103] 실시예 2 : 실험결과

[0105] 반응기-타겟 (E : T) 비율

[0106] GBS MOPA 실험 과정에서 HL60 cell과 complement의 비율 E:C ratio를 4:1 (complement 농도 12.5%)의 비율로 적용했을 때, serotype V에 대한 non-specific killing이 80% 이상으로 반복적으로 높게 측정되어 최적의 비율

을 찾기 위한 실험을 시행하였다(tetracycline에 내성을 유도한 다른 serotype V GBS 균주에서도 non-specific killing이 80% 이상으로 높았으며, complement lot를 3회 변경해서 실험을 했으나 같은 결과를 얻었음). Single serotype OPA를 E:C ratio를 6:1(complement 농도 9%), 8:1(complement 농도 7%)의 비율로 적용했을 때, non-specific killing이 각각 40%, 20% 이하 수준으로 유지되어서 E:C ratio를 6:1 비율(9%)로 적용하는 것으로 결정하였다(도 1).

[0107] Baby rabbit serum complement의 5% 이상 농도에서 bacteria에 대한 non-specific killing이 발생한다는 보고가 있다. OPA 타겟 bacteria의 capsule size가 작을수록 non-specific killing이 불안정하게 높을 수 있다는 보고도 있으며 박테리아의 다양한 성분에 의해서 non-specific killing이 발생할 수 있어 Rob 등의 연구에서는 complement를 헤파막이 없는 박테리아로 흡착했을 때 non-specific killing이 현저히 감소하였다. 폐렴구균의 경우에 혈청형에 따라서 non-specific killing에 차이가 있어서 complement의 농도를 8-16%로 적용해 왔다. GBS의 경우는 헤파막의 size가 폐렴구균에 비해서 작기 때문에 적정 complement 농도가 낮을 수 있으며, 본 실험 결과를 고려해서 6:1 비율(9%)을 적용하기로 결정하였다.

[0108] GBS MOPA 실험 과정에서 최적의 HL60 cell과 target strain 농도의 비율을 찾기 위해서 GBS 감염 회복기 환자의 혈청(FGBS 5)을 이용해 800:1 (4×10^7 CFU/mL), 400:1 (2×10^7 CFU/mL), 200:1 (1×10^7 CFU/mL), 150:1 (1.5×10^7 CFU/mL)과 100:1 (0.5×10^7 CFU/mL)의 비율을 비교하였다. 150:1에서 800:1 사이의 E:T ratio가 안정적으로 변화 없이 유지되어서 200:1의 E:T ratio를 표준시험법에 적용하기로 결정하였다(표 3).

[0109] 하기 표 3은 Effector : target ratio에 따른 opsonic titer의 비교 평가한 결과이다.

표 3

E:T ratio	Opsonic titers		
	Serotype Ia	Serotype III	Serotype V
800:1 (4×10^7)	207	17,496	2,105
400:1 (2×10^7)	212	7,470	2,054
200:1 (1×10^7)	213	7,290	1,911
150:1 (1×10^7)	230	7,370	1,805
100:1 (0.5×10^7)	143	5,133	41

[0112] 특이도 평가

[0113] 3가지 Ia, III, V 사균 균주를 이용해서 혈청형 특이 항체를 중화시키는 전처치를 한 후에 MOPA 시험을 시행해서 시험법의 특이도를 평가하였다. 혈청형 Ia 또는 V 사균 균주를 이용해서 흡착을 한 경우에 특이 혈청형에 대한 OPA 역가가 완전히 억제되었다(도 2). 반면에, 혈청형 III GBS 사균 균주를 이용해 흡착한 경우에 혈청형 III GBS에 대한 OPA 역가가 조금 감소하는 경향을 보였으나 완전히 억제되지 않았다.

[0115] [Serotype Ia GBS 사균 균주를 이용한 neutralization inhibition assay]

[0116] 혈청형 Ia GBS 사균 균주를 이용해 흡착한 경우에 혈청형 Ia GBS에 대한 OPA 역가가 완전히 억제되었다. 다른 혈청형에 대해서는 다소 OPA 역가가 감소하는 경향을 보였다.

[0118] [Serotype III GBS 사균 균주를 이용한 neutralization inhibition assay]

[0119] 혈청형 III GBS 사균 균주를 이용해 흡착한 경우에 혈청형 III GBS에 대한 OPA 역가가 감소하는 경향을 보였으나 완전히 억제되지 않았다. 혈청형 III GBS에 대한 opsonic antibody 역가가 너무 높아서 완전히 억제가 되지 않는 것으로 보인다. 다른 혈청형에 대한 OPA 역가도 약간의 감소를 보였으나 매우 낮은 범위 내에서의 변화 이므로 의미있는 변화로 보이지는 않으나 GBS 균주의 teichoic acid와 표면 단백질에 대한 비특이적 opsonophagocytic activity가 억제되는 것일 가능성이 있다. MOPA 시행 준비 단계에서 헤파막이 없는 GBS 균주로

흡착을 하는 단계가 필요할 수 있다.

[0121] [Serotype V GBS 사균 균주를 이용한 neutralization inhibition assay]

[0122] 혈청형 V GBS 사균 균주를 이용해 흡착한 경우에 혈청형 V GBS에 대한 OPA 역가가 완전히 억제되었다. 다른 혈청형에 대해서는 OPA 역가의 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

[0124] 정밀도(precision) 평가

[0125] MOPA 시험법의 정밀도를 검증하기 위해서 5개 validation sample을 이용해서 MOPA 시험법의 정밀도를 검증하였다. 2명의 실험자가 1주일 간격으로 각각 4회 opsonic titer를 측정하여서 8회 측정한 검사치의 변동계수(Coefficient of variation, CV)를 계산하였음. CV값은 0-31.2%로 평균 CV는 20% 미만(12.5%)으로 유지되었으며, 특정 serotype이 높은 CV를 보이지는 않았다(표 4).

[0126] 하기 표 4는 GBS MOPA 시험법의 정밀도(precision) 밸리데이션을 정리한 것이다.

표 4

Sample	Serotype Ia		Serotype III		Serotype V	
	mean±SD	CV (%)	mean±SD	CV (%)	mean±SD	CV (%)
1	2	0	599.8±174.3	29.1	753.8±122.4	16.2
2	87.1±23.4	26.8	6467.4±1328.9	20.5	30.7±27.9	9.1
3	2	0	10.1±1.8	17.9	7.8±3.4	4.3
4	2	0	14.3±3.1	21.8	724.3±230.9	31.9
5	2	0	2.5±0.4	4.3	2.7±1.6	6.1

[0129] 정확도(accuracy) 평가

[0130] MOPA 시험법의 정확도를 검증하기 위해서 35개 validation sample을 이용해서 MOPA 시험과 SOPA (single serotype opsonophagocytic killing assay) 시험을 통해서 얻은 opsonic titer의 상관성(correlation)을 평가하였다. MOPA와 SOPA로 실험한 결과는 좋은 일치도를 보였으며, 3가지 혈청형에 대해서 모두 r값 0.9 이상의 높은 상관성을 보였다. 선형회귀분석을 시행했을 때에도 r^2 값이 각각 0.996, 0.986, 0.956으로 좋은 상관관계를 보였다(도 3).

[0132] MOPA 시험법의 다기관 밸리데이션

[0133] 다기관에서 시행한 MOPA 시험 결과의 정확도를 검증하기 위해서 65세 이상 노인 샘플 30개를 이용해서 고려대학교 구로병원과 원자력연구원에서 MOPA 시험을 통해서 얻은 opsonic titer의 상관성(correlation)을 평가하였다(도 4).

[0134] 혈청형 Ia, III, V에 대한 선형회귀분석을 시행했을 때 r^2 값은 각각 0.88, 0.60, 0.35로 충분히 높은 수준의 일치도를 보여주지 못했다. 그러나, 반복실험한 QC 혈청의 중위값을 기준으로 고려대학교 구로병원과 원자력연구원에서 측정한 opsonic titer를 보정했을 때, 혈청형 Ia, III, V에 대한 r^2 값은 각각 0.89, 0.73, 0.77로 개선되었다(도 4).

[0136] GBS 감염의 고위험군에서 혈청형별 기초면역도 평가

[0137] 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 고령자 등 3개 고위험군에서 GBS에 대한 혈청형 특이 기초 면역도를 평가하였다(표 4, 표 5 및 도 5 내지 도 7). 신생아/영아, 임신부, 고령자 군의 평균연령은 각각 1.3개월(1-3개월), 31.9세(23-41세), 68.8세(65-76세)였다.

[0138] 하기 표 5는 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 노인 등 고위험군에서 혈청형별 기초 OPA 역가(opsonic index) 비교한 결과이다.

표 5

[0139]

Serotypes	Groups	Opsonic index (mean)	95% CI	p-value
Ia	neonates/infants	137	33 - 241	0.596
	pregnant women	285	17 - 552	
	old adults	231	3 - 459	
III	neonates/infants ^a	338	105 - 570	0.002
	pregnant women ^b	1377	941 - 1813	
	old adults ^b	1350	700 - 2000	
V	neonates/infants ^a	161	-5 - 327	<0.001
	pregnant women ^b	9414	6825 - 12003	
	old adults ^c	3669	1579 - 5759	

[0141]

Serotype Ia에 대해서는 3개 고위험군 사이에 opsonic index (OI)의 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 각 고위험군의 평균 OI는 생후 3개월 이내의 신생아/영아(mean $\pm$ standard deviation, 137 $\pm$ 278), 임신부 (285 $\pm$ 717), 65세 이상 노인(231 $\pm$ 610) 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만(p=0.596), 신생아/영아에서 상대적으로 낮은 OI를 보였다(표 10 및 도 5). OI의 수준을 100미만, 100-499, 500-999, 1,000 이상 4구간으로 계층화해서 각 고위험군별 분율을 비교했을 때 신생아/영아의 70%, 임신부, 65세 이상 노인의 80% 이상이 OI 100 미만의 낮은 역가를 보였으며, 전체적으로 낮은 면역도가 유의한 차이를 보이지 않는 요인이다(표 6, p=0.156).

[0142]

Serotype III의 경우는 신생아/영아의 OI (mean $\pm$ standard deviation, 338 $\pm$ 623)가 임신부(1377 $\pm$ 1167), 65세 이상 노인(1350 $\pm$ 1741)에 비해서 통계적으로 유의하게 낮았다(p=0.002). OI의 수준을 100미만, 100-499, 500-999, 1,000 이상 4구간으로 계층화해서 각 고위험군별 분율을 비교했을 때에도 신생아/영아의 60%는 OI 역가가 100 미만으로 임신부, 65세 이상 노인과 유의한 차이를 보였다(표 6, p <0.001).

[0143]

Serotype V의 경우는 신생아/영아(mean $\pm$ standard deviation, 161 $\pm$ 445), 65세 이상 노인(3669 $\pm$ 5597), 임신부(9414 $\pm$ 6394) 순으로 OI가 유의하게 낮았으며, 세 고위험군 사이에 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 5 및 표 6, p <0.001). OI의 수준을 100미만, 100-499, 500-999, 1,000 이상 4구간으로 계층화해서 각 고위험군별 분율을 비교했을 때에도 신생아/영아의 76.7%의 OI 역가가 100 미만인 반면에 임신부의 93.3%, 65세 이상 노인의 70%에서 1,000 이상의 높은 OI를 보였다(표 6, p <0.001).

[0144]

하기 표 6은 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 노인 등 고위험군에서 혈청형별 기초 OPA 역가(opsonic index) 비교: opsonic index (OI)의 층화된 범위 구간별 분율 비교한 결과이다.

표 6

[0145]

Serotype	Opsonic index	Case No. (%)			p-value
		neonates/infants	pregnant women	old adults	
Ia	<100	21 (70)	24 (80)	25 (83.3)	0.156
	100-499	6 (20)	2 (6.7)	2 (6.7)	
	500-999	2 (6.7)	0 (0)	0 (0)	
	>1,000	1 (3.3)	4 (13.3)	3 (10)	
III	<100	18 (60)	4 (13.3)	4 (13.3)	<0.001
	100-499	4 (13.3)	4 (13.3)	6 (20)	
	500-999	6 (20)	6 (20)	7 (23.3)	
	>1,000	2 (6.7)	16 (53.3)	13 (43.3)	

V	<100	23 (76.7)	0 (0)	2 (6.7)	<0.001
	100-499	5 (16.7)	0 (0)	2 (6.7)	
	500-999	1 (3.3)	2 (6.7)	5 (16.7)	
	>1,000	1 (3.3)	28 (93.3)	21 (70)	

[0147] 연구에 참여한 임신부 30 명 중 26명에서 임신 35-37주에 산전 GBS 스크리닝을 시행했으며, 26명 중 4명 (15.4%)에서 GBS 양성을 보였다.

[0148] GBS 집락이 확인된 그룹과 집락이 확인되지 않은 그룹 사이에 serotype Ia (1230 ± 1467 vs. 139 ± 416, p=0.234), III (1705 ± 1569 vs. 1327 ± 1124, p=0.556), V (6318 ± 7465 vs. 9890 ± 6879, p=0.346)에 대한 OI의 차이는 수직적 제한으로 통계적 유의성을 확인할 수는 없었다(도 8).

[0149] OI의 수준을 100미만, 100~499, 500~999, 1,000 이상 4구간으로 계층화해서 GBS 집락 임신부 그룹과 미집락 임신부 그룹의 OI 분포 분율을 비교했을 때, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, 집락여부와 상관없이 serotype III의 경우는 50% 이상에서, serotype V의 경우는 90% 이상에서 OI 1,000이상의 높은 역가를 보였다 (표 7). 임신부에서 높은 OI 역가를 보이는 반면에 신생아/영아의 낮은 OI를 고려하면, 실제 신생아에게 태반을 통한 체액성 면역의 전파를 위해서는 태반 통과 효율이 높은 subclass의 항체가 필요하고, 더 높은 수준의 면역이 필요할 가능성이 있다. 또한, GBS에 대해 반복 노출된 성인에서 GBS 균주의 teichoic acid와 표면 단백에 대한 비특이적 opsonophagocytic activity로 실제 보다 역가가 높게 측정되었을 가능성을 배제할 수 없다.

[0150] 하기 표 7은 임신부에서 혈청형별 기초 OPA 역가(opsonic index) 비교: 35~37주 산전검진시 GBS 회음부 집락 여부에 따른 opsonic index (OI)의 층화된 범위 구간별 분율 비교한 결과이다.

표 7

Serotype	Opsonic index	Case No. (%)		p-value
		GBS-positive (N = 4)	GBS-negative (N = 26)	
Ia	<100	2 (50)	22 (84.6)	0.065
	100-499	0 (0)	2 (7.7)	
	500-999	0 (0)	0 (0)	
	>1,000	2 (50)	2 (7.7)	
III	<100	0 (0)	4 (15.4)	0.764
	100-499	1 (25)	3 (11.5)	
	500-999	1 (25)	5 (19.2)	
	>1,000	2 (50)	14 (53.9)	
V	<100	0 (0)	0 (0)	0.566
	100-499	0 (0)	0 (0)	
	500-999	0 (0)	2 (7.7)	
	>1,000	4 (100)	24 (92.3)	

[0153] GBS 집락이 확인된 임신부 4명으로부터 분리된 GBS 균주의 혈청형 분석을 시행하였으며, 집락된 혈청형의 OI가 높게 측정되었으며, serotype V에 대한 OI가 비특이적으로 높은 경향을 보였다(표 8 및 도 8).

[0154] 하기 표 8은 GBS 집락 임신부에서 집락 혈청형과 OPA 역가(opsonic index)의 연관성을 평가한 결과이다.

표 8

No.	Age	Serotypes	Opsonic index (OI)		
			Serotype Ia	Serotype III	Serotype V
1	30	NT	2	11	2,773
2	34	I a	2,001	3,218	3,020
3	29	III, VIII	2,916	2,876	17,496
4	27	I b	2	614	1,984

[0157] MOPA와 ELISA로 측정된 GBS 면역도의 상관성 평가

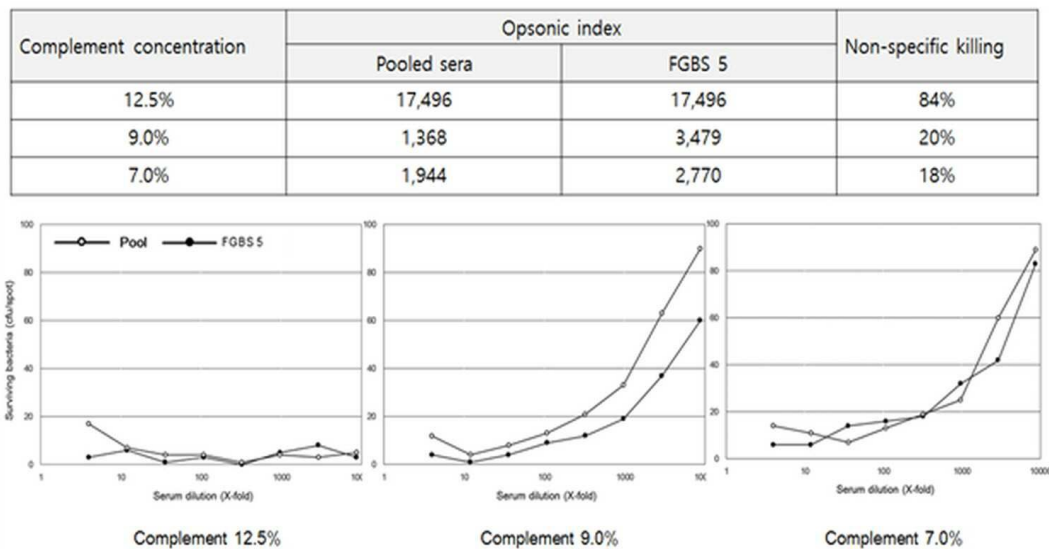
[0158] 신생아/영아, 임신부, 65세 이상 고령자 등 3개 고위험군의 90개 혈청 샘플에 대해서 GBS에 대한 혈청형 특이 기초 면역도를 MOPA와 ELISA로 각각 측정하고, 상관성(correlation)을 평가하였다. ELISA로 측정된 혈청형 Ia, III, V에 대한 항체 역가는 3개 고위험군에서 모두 매우 높게 측정이 되었고, 상관분석을 시행했을 때 상관관계수 r값은 3개 혈청형 모두에 대해서 0.5 미만으로 매우 낮은 수준의 상관성을 보였다(도 9).

[0159] 최근 유럽에서 시행된 연구(DEVANI study)에서 혈청형 Ia, Ib, III에 대한 OPA 역가와 ELISA 역가의 상관도를 비교 평가하였으며, ELISA 역가 1ug/mL인 혈청은 OPA 역가 64~128로 70~80%의 일치도를 보였다.

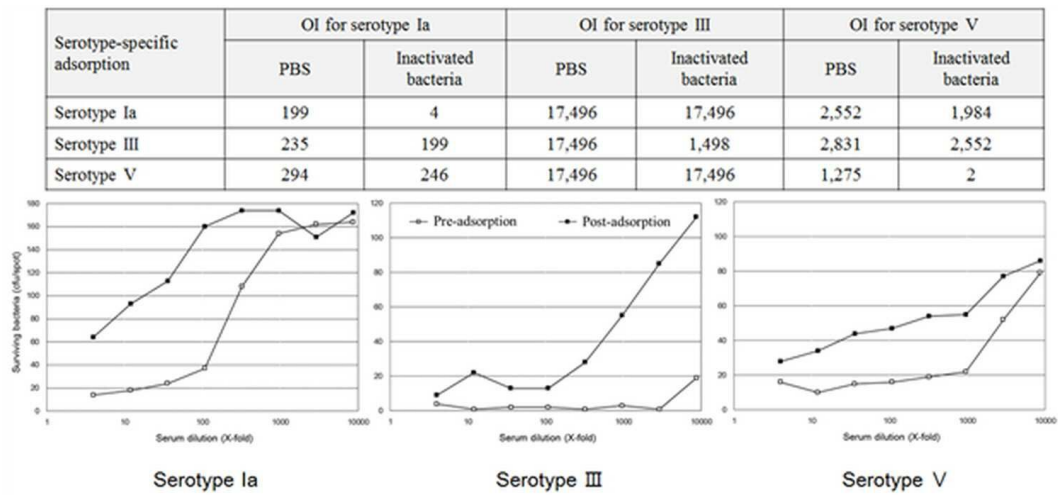
[0161] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

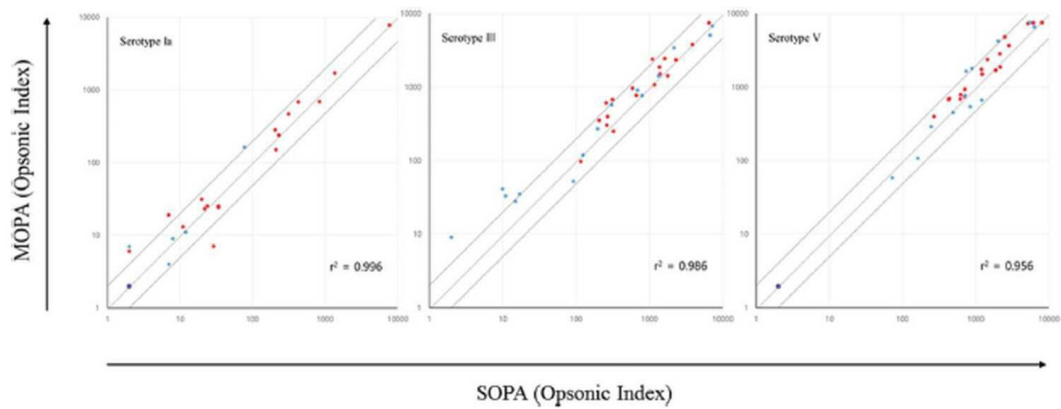
도면1



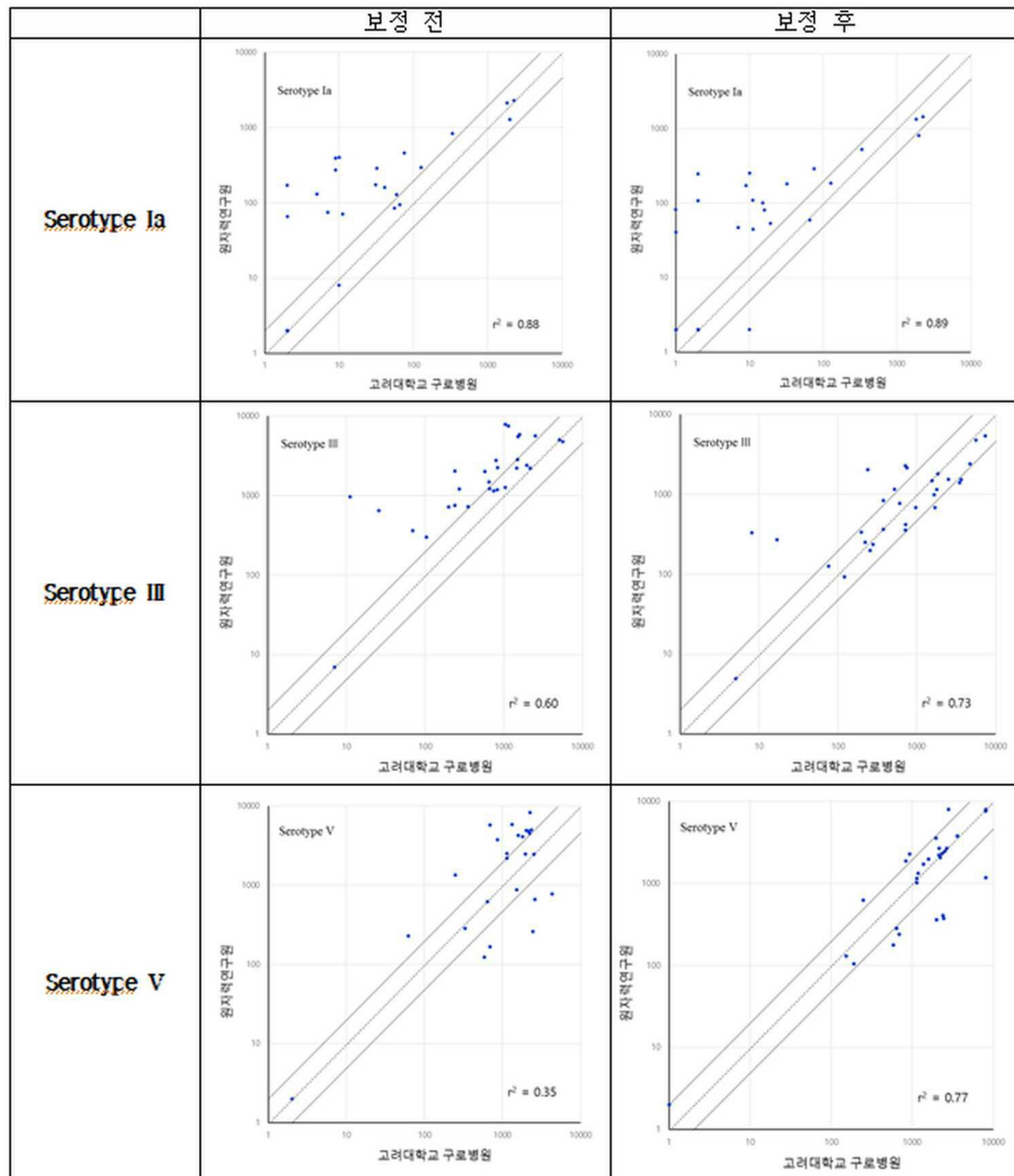
도면2



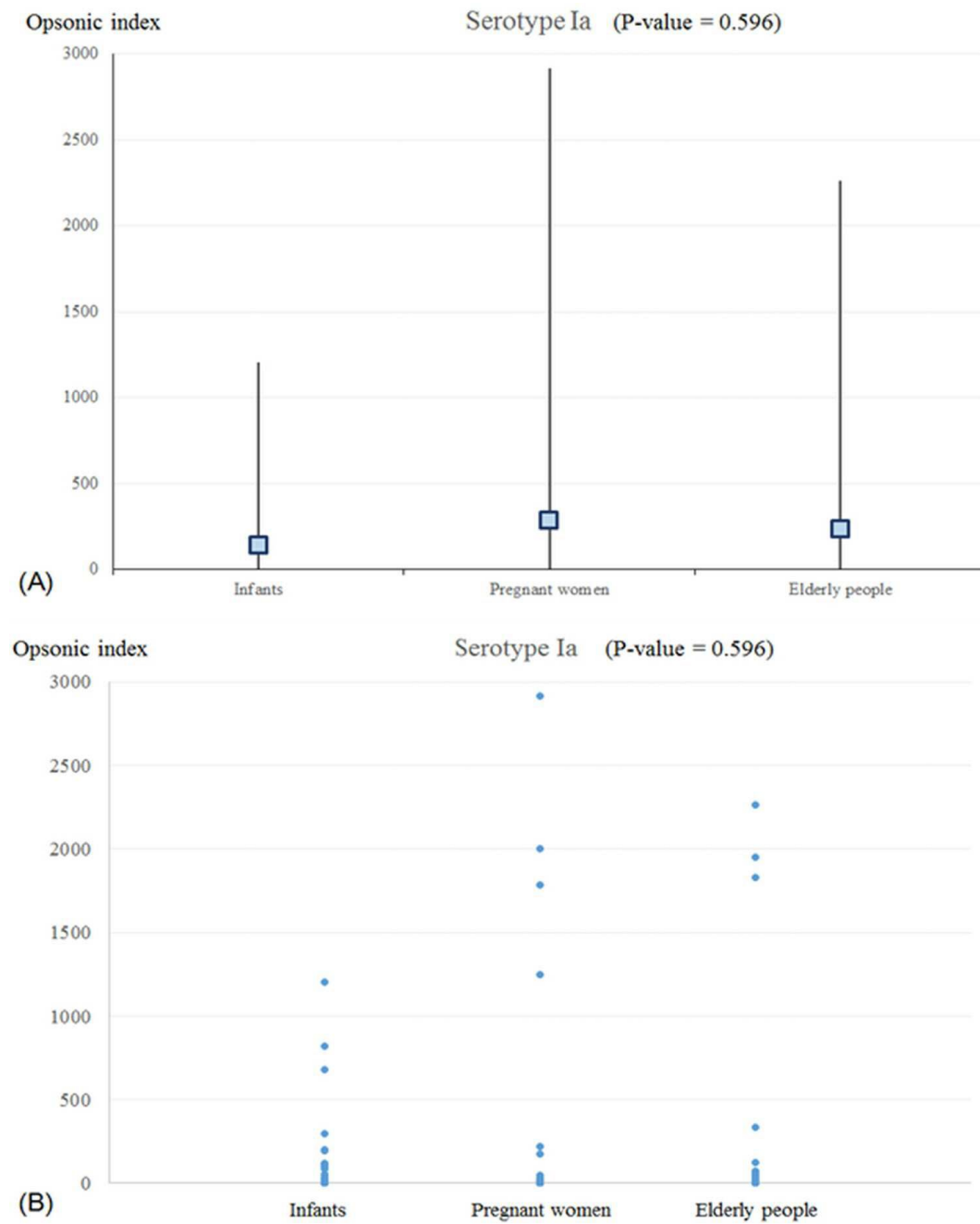
도면3



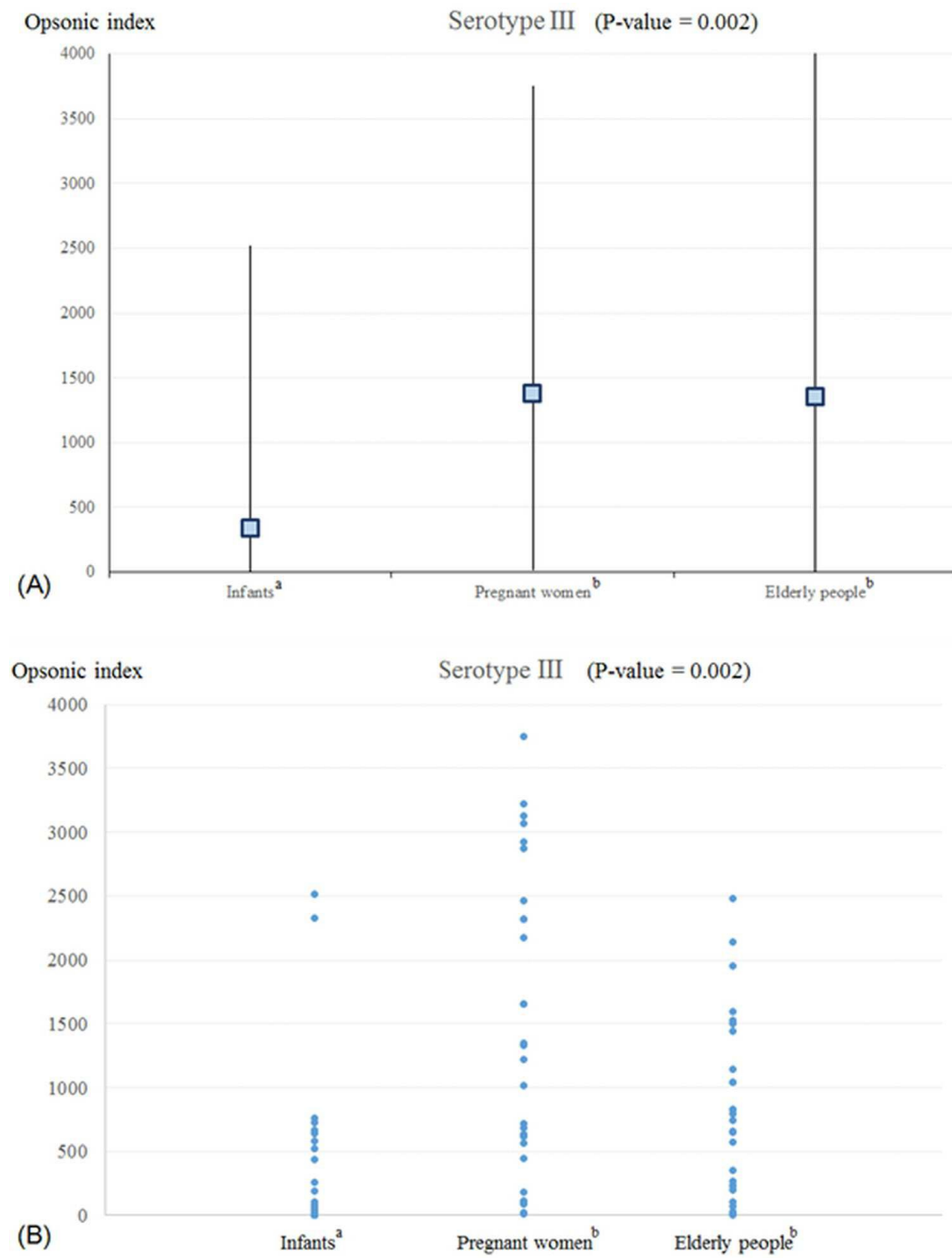
도면4



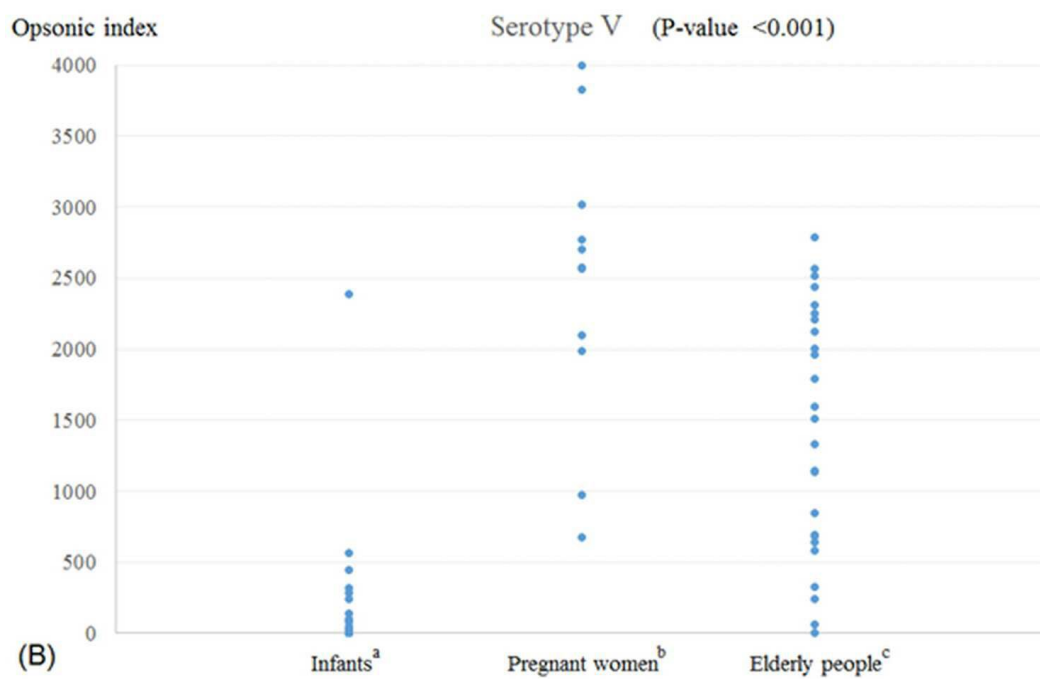
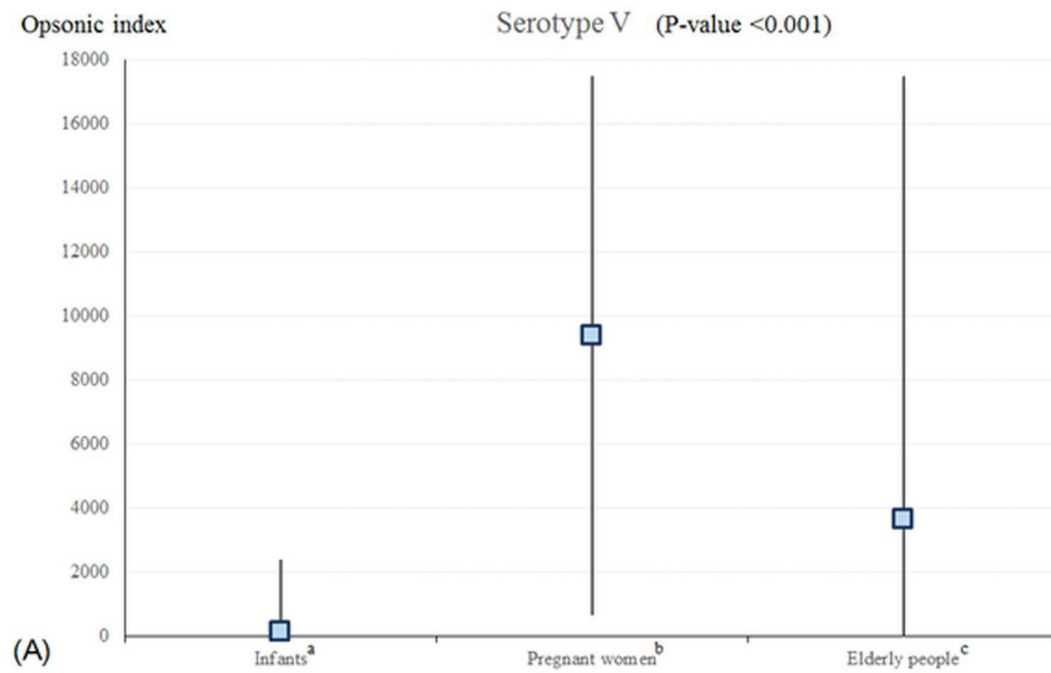
도면5



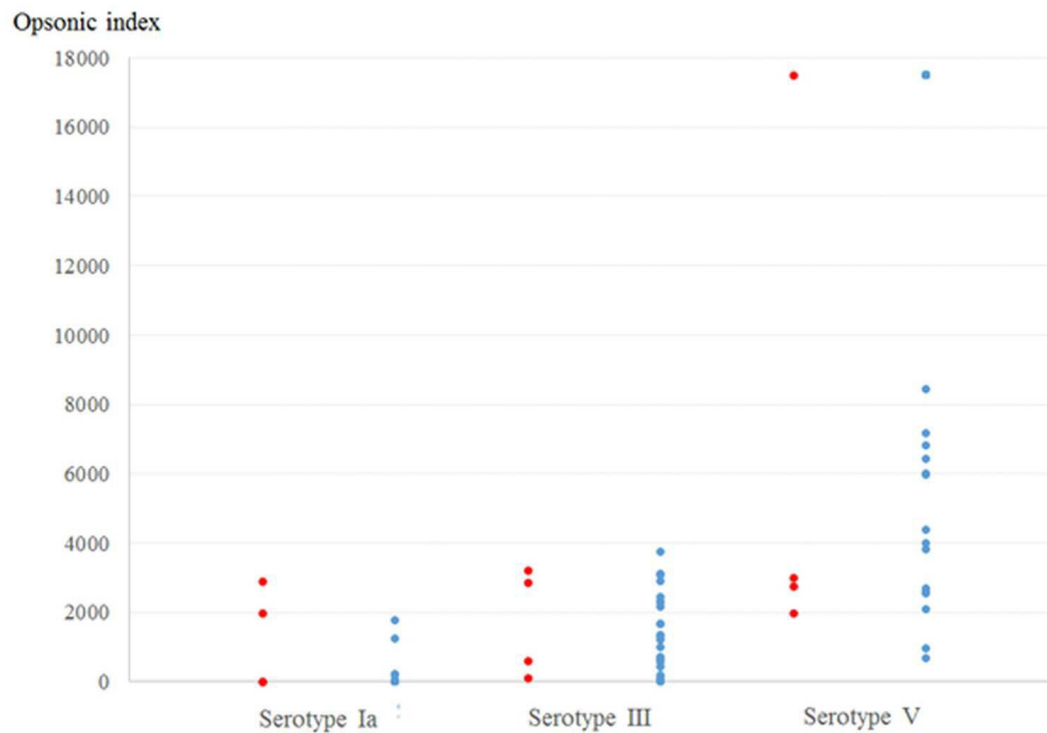
도면6



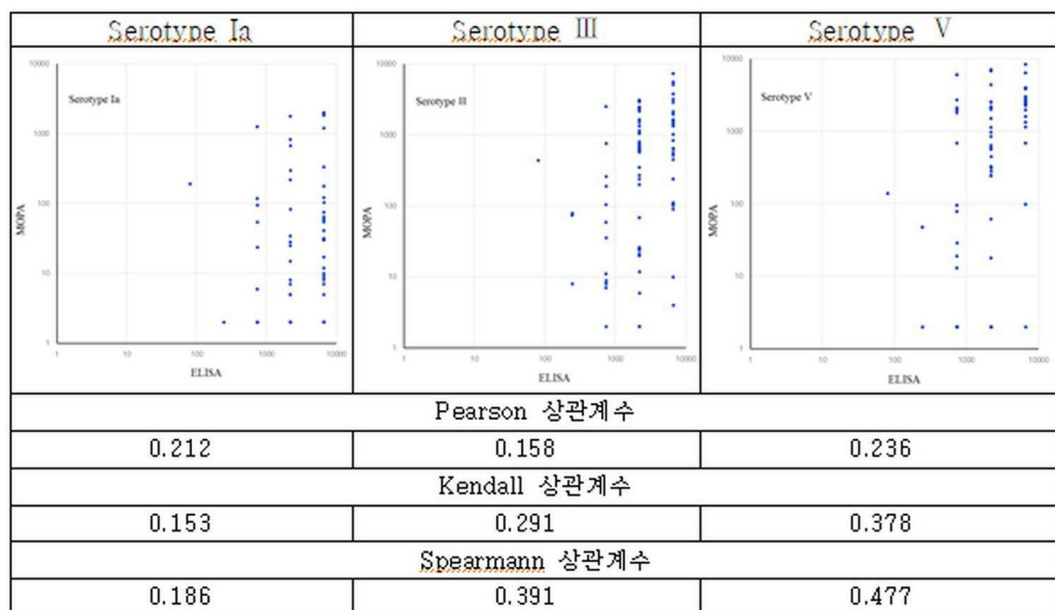
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Novel Group B Streptococcus Serotype Strain and Immunogenic Composition Comprising the Same
- <130> DHP17-612
- <160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 660

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KCTC 13365BP 16s RNA sequence

<400> 1

```

cgatgagtgc taggtgttag gccctttccg gggcttagtg ccgcagctaa cgcattaagc      60
actccgcctg gggagtagca ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca      120

caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac      180
atccttctga ccggcctaga gataggcttt ctcttcggag cagaagtac aggtggtgca      240
tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc      300
tattgttagt tgccatcatt aagttgggca ctctagcgag actgccggtg ataaaccgga      360
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta      420
caatggttgg tacaacgagt cgcaagccgg tgacggcaag ctaatctctt aaagccaatc      480
tcagttcgga ttgtaggctg caactgcctt acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg      540

atcagcacgc cgcgggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga      600
gagtttgtaa caccgaagt cggtgaggta accttttagg agccagccgc ctaaggtggg      660

```

<210> 2

<211> 660

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KCTC 13366BP 16s RNA sequence

<400> 2

```

cgatgagtgc taggtgttag gccctttccg gggcttagtg ccgcagctaa cgcattaagc      60
actccgcctg gggagtagca ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca      120

caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac      180
atccttctga ccggcctaga gataggcttt ctcttcggag cagaagtac aggtggtgca      240
tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc      300
tattgttagt tgccatcatt aagttgggca ctctagcgag actgccggtg ataaaccgga      360
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta      420

```

caatggttgg tacaacgagt cgcaagccgg tgacggcaag ctaatctctt aaagccaatc 480
tcagttcgga ttgtaggctg caactcgcct acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg 540

atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga 600
gagtttgtaa caccgaagt cggtaggta accttttagg agccagccgc ctaaggtggg 660
660

<210> 3

<211> 660

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATCC 12401 16s RNA sequence

<400> 3

cgatgagtgc taggtgttag gccctttccg gggcttagtg ccgcagctaa cgcattaagc 60
actccgcctg gggagtagca ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccga 120

caagcggtag agcatgttgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac 180
atccttctga ccggcctaga gataggcttt ctcttcggag cagaagtac aggtggtgca 240
tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc 300
tattgttagt tgccatcatt aagttgggca ctctagcgag actgccggtg ataaaccgga 360
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta 420
caatggttgg tacaacgagt cgcaagccgg tgacggcaag ctaatctctt aaagccaatc 480
tcagttcgga ttgtaggctg caactcgcct acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg 540

atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga 600
atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga 660
660