(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 39/09
A61K 39/16

(45) 공고일자 2001년09월17일
(11) 등록번호 10-0293017
(24) 등록일자 2001년03월29일

(21) 출원번호 10-1995-0701137
(22) 출원일자 1995년03월24일
번역문 제출일자 1995년03월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US1993/09056
(86) 국제출원출원일자 1993년09월24일

(65) 공개번호 특1995-0703361
(43) 공개일자 1995년09월20일

(87) 국제공개번호 WO 1994/06467
(87) 국제공개일자 1994년03월31일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 체코, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 슬로바키아, 우크라이나, 베트남,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EA 유라시아특허: 벨라루스, 카자흐스탄, 러시아,
EP 유럽특허: 오스트리아, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 영국, 룩셈부르크, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 07/949970 1992년09월24일 미국(US)
08/125556 1993년09월23일 미국(US)

(73) 특허권자 내셔날 리서치 카운실 오브 캐나다
루시에 라포인테-쇼우, 카르타 커티 케이
캐나다 온타리오 케이1에이 0알6 오타와 몬트리올 로드 1200
브리검앤드위민즈하스피탈, 인코포레이티드
쉘비 칼베르그 모르스
미합중국,매사츄세츠02115,보스톤,프란시스스트리트75

(72) 발명자 하롤드제이.제닝스
캐나다온타리오케이1제이6지6글루체스터우드글렌크레센트2049
데니스엘.카스퍼
미합중국,메사츄세츠02159뉴톤센터워드스트리트544

(74) 대리인 이정훈

심사관 : 조명선

(54) 그룹B스트렙토코쿠스II형및V형다당류-단백질결합백신

요약

본 발명은 단백질에 공유 결합된 그룹 B 스트렙토코쿠스 II형의 혐막성 다당류로 이루어진 항원성 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 단백질에 공유 결합된 그룹 B 스트렙토코쿠스 V 형의 혐막성 다당류로 이루어진 항원성 결합 분자에 관한 것이다. 또한 본 발명은 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 (GBS II) 및/또는 그룹 B 스트렙토 코쿠스 V형 (GBS V)에의한 감염에 대해 인체를 포함한 포유동물을 면역화시키는 백신 및 그 방법에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 결합 분자 및 다른 병원성 세균에 대한 항원으로 이루어진 다가 백신에 관

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 및 V 형 다당류-단백질 결합 백신

[발명의 권리 선언]

본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 부여된 NIH 허여 A123339, A130628 및 A128040 하에서 정부 지원하에 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해서 특정한 권리를 갖는다.

[발명의 분야]

본 발명은 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 및 V 형의 단백질에 공유결합된 혐막성 다당류로 이루어진 항원성 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그룹 B스트렙토코쿠스 II형 (GBS II) 및/또는 V형(GBS V)에 의한 감염에 대해 인체를 포함하는 포유류를 면역화하는 백신 및 면역화 방법에 관한 것이다. 다른 병원성 세균에 대한 항원 및 본 발명의 결합 분자로 이루어진 다가 백신도 또한 포함된다.

[본 발명의 배경]

그룹 B 스트렙토코쿠스 (GBS)에 의한 감염은 선진국에서 신생아 패혈증 및 수막염의 가장 일반적인 단일 원인이다(3, 31). 미합중국 중앙으로부터의 최근 보고에 의하면 아미 최근 진단 및 강화된 치료로 인하여 1970년대 보다 치사율이 낮아진(9 내지 13 %) 것으로 확인되었다(1, 10). 그럼에도 불구하고, 치명적인 감염을 아직도 일어나고 있으며, 여전히 많은, GBS 수막염 생존자의 50 % 이하가 귀머거리 및 완화한 수학능력 장애 내지 심한 운동, 감각, 및 인식 손상에 걸쳐 만성 신경성 손상을 갖게 된다(3). 개선된 진단이나 치료보다는 예방을 하는 것이 GBS-관련 이환율 및 치사율을 한층 감소시키는 데에 가장 중요한 효과를 가질 것이다.

GBS 혐막성 다당류-특이적 항체는 실험 동물(23, 24) 및 인체 영아(4, 5) 모두를 GBS 감염으로부터 보호하는 것으로 나타났기 때문에, 몇 가지 다당류를 정제하여 실험 백신으로서 건강한 성인에게 시험하였다(6). 안전하고 효능이 있는 GBS 백신을 사용할 수 있다면, 임신 전 또는 임신중의 여성에제 주사하여 자궁의 태아에 전이되는 항체를 유발시켜 신생아 감염에 대해서 보호하도록 할 수 있을 것이다. 자원자에서 시험된 이들 GBS 다당류 (Ia, II 및 III 형) 중에서 II 형이 가장 높은 면역원성을 가지며 미리 면역되지 않은 수여체의 88 %에서 II형-특이적 항체 반응을 유발한다(6).

다양한 GBS 혈청형이 GBS 감염된 환자의 비율에 현저하게 영향을 주는 것으로 이미 알려져 있으나, V 형이 GBS 감염의 현저한 비율에 대해 영향을 준다는 것은 알려져 있지 않다. 신생아에서, II 형 GBS 감염에 대해 보호하는데에 필요한 특이적 항체의 수준은 정확하게 한정되어 있지는 않으나, 대략 2 내지 3μg/ml 이다(6). 예방에 필요한 최소치 보다 약간 높은 항체 반응을 달성하는 백신 수여체에서, 태반을 통해 전이되는 모체 항체의 양은 신생아에서 모체 면역글로불린 G(IgG) 의 반감기는 약 25일이므로 모체 IgG이 태아에게 불완전하게 전이되어, 조산아를 보호하는 데에는 부적합할 수 있다. 이들 두 그룹의 환자에서 백신투여에 있어서 특이적인 항체 반응의 배율을 높이는 경우 다수의 영아가 예방될 수 있다. 태아에 대한 모체 IgG의 전이는 제 3 삼개월간에 걸쳐 증가하여 더 높은 모체 항체 수준은 즉, 더 조산된 영아에게서 더 일찍 보호하게 될 것이다(16). 마찬가지로, 모체의 수준이 높으면 영아에서 더 오래 모체 항체가 유지됨으로써 후-발병 질환에 대해서도 보호할 수 있을 것이다.

여러 세균 다당류 항원의 면역원성은 다당류 또는 유도체 올리고당에 대해 적합한 담체 단백질을 부착함으로써 증가시켜 왔다(2, 14, 17-19, 22, 27, 29, 30, 34). 다당류-단백질 결합 백신의 바람직한 특성은 다당류에 대한 면역원성을 증가시키고, 유발체 용량에 대한 햅텐-특이적 항체 반응을 상승시키며, IgG 류 항체가 우월하다는 것이 포함된다. 최근, 지향성 단백질 결합 부위로서 측쇄 시알산 기를 사용함으로써 GBS Ⅲ-파상풍 톡소이드(TT)를 개발하는 데에 성공하였다(33). 비결합 Ⅲ-형 다당류는 토끼에서는 비면역원성인 반면, Ⅲ-TT 백신은 GBSⅢ 형-특이적, 옵소닌 활성 항체를 유발한다(33).

[발명의 요약]

본 발명은 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형으로부터 유도된 협막성 다당류 및 단백질 성분 또는 그룹 B 스트렙토코쿠스 V 형 및 단백질 성분으로 이루어지며, II 및 V 형 다당류 성분의 시알산 잔기가 말단인 2 또는 그 이상의 측쇄가 단백질에 대해 제 2 아민 결합을 통해 각각 연결됨을 특징으로 하는 항원성 결합 분자에 관한 것이다.

본 발명은 (a) 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형 협막성 다당류를 알데히드기를 다당류 골격에 결합된 2 또는 그 이사의 말단 시알 기에 도입하는 데에 충분하도록 과요오드산염 산화시키는 단계;

(b) 산화된 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형 협막성 다당류를 환원성 아민화를 통해 협막성 다당류와 단백질 사이에 2차 아민 결합을 생성시켜 단백질에 결합시키는 단계로 이루어짐으로 특징으로 하여 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형의 협막성 다당류의 결합 분자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 상기 방법에 따라 제조된 결합 분자도 또한 본 발명에 포함된다.

본 발명은 또한 상기 각각의 결합 분자로 이루어진 백신에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 결합 분자 및 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형 이외의 병원성 물질에 대한 항체를 생산시킬 수 있는 적어도 하나의 면역원성 분자로 이루어진 다가 백신에 관한 것이다. 특히, GBS II형 및/또는 V형 결합 분자로 이루어진 데에 추가하여, 본 발명에 따르는 다가 백신은 추가로 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ia, Ib, III, IV 형 및 헤모필루스인플루엔자(Haemophilus influenzae) b형 또는 V 형 및 이 콜라이 K1 형으로 구성된 그룹에서 선택된 병원에 대한 항체의 생산을 유발할 수 있는 다른 면역원성 분자를 포함한다.

본 발명의 또 다른 실시예에서, 신생아 면역화 방법은 본 발명의 결합분자로 이루어진 백신을 여성에게 면역원양을 투여하여 신생아가 태어날 때에 감염을 예방하는 데에 충분한 양으로 백신을 투여 전후에 임신된 태아로 전이될 수 있는 항체를 생성할 수 있도록 한다.

또한 본 발명은 본 발명의 결합 분자로 이루어진 백신을 성인에게 면역원량을 투여하여 성인을 면역화시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 결합 분자로 이루어진 백신을 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형에 의해 감염될 우려가 있는 인체에 면역원량을 투여함으로서 성인을 면역화시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 실시에서, 본 발명의 결합 분자로 이루어진 백신은 상기 그룹에 수동적으로 투여될 수 있는 혈청 또는 혈장을 수여하는 지원자 백신 수용체에 면역원량을 투여한다. 본 발명은 또한 그룹 B 스트렙토코쿠스 II 형 또는 V 형에 의해 감염될 위기에 있는 신생아, 어린이 및 성인을 포함하는 인체를 면역화 시키는 방법을 제공한다. 위기에 처해 있다는 것은 암 또는 당뇨병을 포함하여 여기에는 한정되지 않는 다양한 이유로 면역계가 저하된 인체를 포함할 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시예는 본 발명의 결합 단백질로 이루어진 백신을 낙농우에 면역원량을 투여하는 것으로 구성된 소 유선염에 대해서 가축을 면역화시키는 방법에 관한 것이다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 II 형 GBS 협막성 다당류의 헵타사카라이드 반복 단위의 구조.

제2도는 GBS II 형 다당류 경쟁적 ELISA. GBS Ia 형(○), II 형 (●), 및 III 형 (▲) 다당류를 II형 다당류로 피복된 플레이트에 결합하는 II-TT 백신 항체의 억제제로 사용하였다. 결과는 억제제가 없는 대조군 웰에 대한 억제 비율로 나타낸다.

제3도는 GBS II형 다당류 경쟁적 ELISA. 천연(●) 및 탈시알화 또는 핵 (□) II형 다당류를 II-TT 백신 항체의 억제제로 사용하였다. 데이타의 점은 3 회 측정한 평균을 (표준 편차와 함께) 나타낸 것이다. 결과 억제제가 없는 대조군 웰에 대한 억제 비율로 나타낸다.

제4도는 V 형 GBS 협막성 다당류의 반복 단위 구조.

제5도는 GBS V 형 다당류 경쟁적 ELISA. GBS Ia 형 (-▲-), Ib 형 (-△-), II 형 (-●-), III 형 (-○-), V 형 (-■-) 및 VI 형 (-□-) 다당류를 V-TT 백신에 의해 유발된 항체의 억제제로서 사용했다. 데이타의 점은 2 회 측정한 평균이다. 결과는 억제제가 없는 대조군 웰에 대한 억제 비율로 나타낸다.

제6도는 GBS V 형 -TT 결합 백신에 대해 발생하는 토끼 항혈청에 의해 옵소닌 처리한 GBS V 형 균주 CJB III 의 인체 말초 혈액 림프구에 의한 시험관내에서의 옵소닌식세포 사멸. C'는 보체이다.

[바람직한 실시예의 설명]

본 발명은 협막성 다당류 성분 및 단백질 성분으로 이루어진 항원성 결합 분자에 관한 것이다.

세균 균주. GBS II 형 균주 18RS21 및 Ia 형 균주 090 을 록케펠러대학(Rockefeller University)의 고 레베카 랜스필드(Rebecca Lancefield)로부터 얻어서 -80℃에서 동결 배양으로 보존하였다. 균주 18RS21 는 시험관내 및 생체내 검정에서 사용하였으며 결합 백신에서 사용된 II 형 협막성 다당류의 원료이다. 두 GBS II 형 임상 분리물(균주 S16 및 S20) 및 III형 균주 M781 은 채닝 실험실의 배양 콜렉션(Channing Laboratory's culture collection)에서 얻었다.

이전에는 인체에서 GBS 감염 수에 중요한 영향을 주는 것을 인식하지 못하였으나, 최근의 증거는 V 형 혈청형이 GBS 감염의 약 15% 기여한다는 것을 보여주고 있다. GBS-V 형 결합 백신을 제조하기 위해서는, GBS V 형 균주 1169-NT1 을 젤린코바 박사(J. Jelinkova of The Institute of Hygiene And Epidomology, Prague, Czech Republic)로부터 얻어서 -80℃에서 동결 배양으로 보존하였다. 균주 1169-NT1 는 시험관내 및 생체내 검정에서 사용하였으며 결합 백신에서 사용된 V 형 협막성 다당류의 원료이다. GBS V 형 균주 CJB 111 는 베이커 박사(Carol Baker of Baylor University)로부터 얻었다.

GBS II 형 다당류 또는 V 형 다당류의 TT 와의 결합. II 형 혐막성 다당류를 III 다당류의 정제를 위해 상기의 방법에 의해 균주 18RS21 로부터 정제한다(33). II형 다당류의 단량체 TT 와의 결합은 TT 를 GBS III 형 다당류를 결합시키기 위해 앞에서 상술한 기술을 사용하여 수행한다(33). 간단히 말해서, 천연 II 형 다당류는 세파로스 CL-6B 칼럼(1.6 by 85 cm; Pharmacia Fine Chemicals) 상에서 크기에 따라 분획된다. 주 피크의 중간에 유출되는 물질을 모아서, 물에 대해 투석하고, 동결건조하면 상대 분자량 200,000 의 물질이 수득된다. 이 물질을 ^{1}H-핵자기 공명 스펙트로스코피로 500MHz에서 분석하여 천연 II형 다당류 구조이며(20) 및 그룹 B 항원이 없음(26)을 확인하였다. 본 발명의 결합 분자로 사용하는 데에 적합한 다당류는 분자량이 매우 다양한 범위에 걸쳐 있다. 다당류 성분으로 바람직한 분자량 범위는 약 5,000 내지 1,000,000 달톤 사이이다. 더욱 바람직한 범위는 100,000 내지 300,000 사이이다. 100,000 내지 300,000 의 범위내에서 약 200,000 달톤의 분자량을 갖는 다당류가 바람직하다.

크기-분획된 II 형 다당류는 나트륨 메타-과요오드산염으로 완화하게 산화시킨다(18). 이 과정에서 다당류의 시알산 부분이 탄소 8 개의 시알화동족체, 5-아세트아미도 3,5-디데옥시-D-갈락토실옥툴로손산으로 변화된다(33). 산화된 시알산 기의 비율은 상기한 바와 같이 시알산 기와 그들의 산화된 유도체의 가스 크로마토그래피-질량 스펙트로스코피에 의해 산출한다(33). 바람직하게는, 각 GBS II형 다당류의 약 5 내지 50% 의 시알산기가 변형되어 단백질에 결합되는 데에 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는 GBS II 형 다당류의 약 5 내지 25 % 의 시알산 기가 변형되어 단백질에 결합되는 데에 사용될 수 있다. GBS II 형 다당류의 약 5 내지 10 % 의 시알산 기의 변형이 가장 바람직하다.

GBS V 형 다당류의 산화는 반응성 알데히드를 형성하기 위한 말단 시알산 기의 약 5 내지 80% 를 변형시키는 것이 바람직하다. 말단 시알산군의 약 10 내지 50 % 의 변형이 더욱 바람직하다.

본 발명의 결합 분자의 단백질 성분은 어떤 생리학적으로 허용되는 단백질이라도 가능하다. 바람직한 단백질로는 파상풍 독소, 디프테리아 독소 및 CRM_{197} 과 같은 교차 반응 물질이 있다.

산화된 II 형 다당류는 상기한 바와 같은 환원성 아민화에 의해 단량체파상풍 톡소이드("TT")(Institute Armand Frappier, Montreal, Canada)에 결합된다(33). TT 는 상기에 기재된 바와 같이 겔 여과 크로마토그래피에 의해 단량체로 정제한다(33). 간단히 말해서, 10 ㎎ 의 과요오드산염-처리된 II 형 다당류 및 10 ㎎ 의 정제된 TT 를 0.6 ml 의 0.1 M 탄산 나트륨(pF 8.1)에 용해한다. 나트륨 시아노보로하이드리드(20mg) 를 혼합물에 넣고 5 일간 37℃에서 항온배양한다. 결합의 진행을 반응 혼합물 소량을 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC) 에 의해 수퍼로스 6(Pharmacia)겔 여과 크로마토그래피 상에서 분석하여 모니터링 한다. 반응은 칼럼의 공극 용적에서 유출된 피크의 높이(고분자량 결합체를 나타냄)가 일정해질때에 종료된다. 결합체를 상기한 바와 같이 바이오겔(Biogel) A, 0.5M(Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.)상에서 크로마토그래피함으로써 정제한다(33). 백신의 단백질 함량을 소혈청 알부민을 표준으로 하여 로우리 등(Lowry et al.)(25)방법으로 측정한다. 탄수화물 함량은 표준으로서 정제된 II 형 다당류를 사용하여 두보이스 등(Dubois et al.)의 방법(11)으로 측정한다.

V형 혐막성 다당류는 정제된 III 형 다당류에 대해서 상기 방법에 의해 GBS V 형 균주 1169-NT1 세포로부터 정제한다(33). V 형 다당류의 단량체 TT 와의 결합은 TT 를 GBS III 형 다당류에 결합시키기 위해서 상기한 기술을 사용하여 수행한다(33).

천연 V 형 다당류는 상대 분자량 200,000 달톤을 갖는다. 500 MHZ에서 H-핵자기 공명 스펙트로스코피에 의한 이 물질의 분석에 의해 천연 V형 구조(2)라는 것과 그룹 B 항원이 없다는 것(26)을 확인하였다.

단백질에 결합시키기 위해 V 형 다당류의 말단 시알산 잔기에 반응성 알데히드 기를 도입하기 위해서, V 형 다당류를 나트륨 메타-과요오드산염과 완화하게 산화시킨다(18). 이 과정에 의해 다당류의 시알산 기 부분이 8개 탄소의 시알산 동족체, 5-아세트이미도-3,5-디데옥시-D-갈락토실옥툴로 손산으로 변화된다(33). 산화된 시알산 기의 비율은 시알산 기 및 그의 산화 유도체의 기체 크로마토그래피-질량 스펙트로스코피로 측정한다.

산화된 V 형 다당류는 상기한 바와 같이 환원성 아미노화에 의해 단량체 TT (Institute Armand Frappier, Montreal, Canada) 에 결합된다(33).

TT 는 상기한 바와 같이 겔 여과 크로마토그래피에 의해 단량체로 정제한다(33). 간단히 말해서, 8.6 mg 의 과요오드산염-처리된 V 형 다당류 및 8.7 mg 의 정제된 TT 를 0.6 ml 의 0.1 M 탄산 나트륨(pH 8.2)에 용해한다.

나트륨 시아노보로하이드리드 (31.5 mg)를 혼합물에 넣고 10일간 37 ℃에서 항온배양한다. 결합의 진행을 반응 혼합물 소량을 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)에 의해 수퍼로스 6 (Pharmacia) 겔 여과 크로마토그래피 상에서 분석하여 모니터링 한다. 반응은 칼럼의 공극 용적에서 유출된 피크의 높이(고분자량 결합체를 나타냄)가 일정해질 때에 종료된다. 결합체를 2.6 X 91 ㎝ 세파크릴 S-300 HR (Pharmacia) 상에서 0.01 M 인산염, 0.15 M NaCl, pH 7 및 0.01% 티메로살을 유출 완충액으로 사용하여 크로마토그래피에 의해 수행한다. 백신의 단백질 함량을 소혈청 알부민을 표준으로 하여 로우리 등(Lowry et al.)(25)의 방법으로 측정한다. 탄수화물 함량은 표준으로서 정제된 II 형 다당류를 사용하여 두보이스 등(Dubois et al.)의 방법(11)으로 측정한다.

토끼의 II-TT 백신 및 V-TT 백신 접종. 각각 약 3 kg 의 토끼로 구성된 뉴질랜드 화이트 토끼 암컷(Millbrook Farms, Amherst, Mass.)의 세 그룹을 50 ug 의 비결합된 천연 II 형 다당류 또는 II-TT 백신을 각각 총 2 ml 의 부피가 되도록 완전 프룬드 아주번트와 에멀전화시켜서 토끼의 등의 4 부위에 피하주사하여 접종한다. 이들 동물에는 20 및 41 일에 불완전 프룬드 아주번트로 제조된 백신의 추가자극 주사(50 ug)를 한다. 혈청은 0, 20, 34, 41, 55 및 70 일에 각 동물로부터 취하여 멸균 여과하고 -80℃ 에서 저장한다.

약 3 kg 의 뉴질랜드 화이트 토끼 암컷(Millbrook Farms, Amherst, Mass.)을 50 ug 의 GBS V 형-TT 결합된 백신을 총 2ml 의 부피가 되도록 명반과 혼합하여 토끼의 등의 4 부위에 피하주사하여 접종한다. 이들 동물에는 22 및 42 일에 불완전 명반으로 제조된 백신의 추가자극 주사(50 ug)를 한다. 혈청은 0, 35, 56 및 91 일에 각 동물로부터 취하여 멸균 여과 하고 -80℃ 에서 저장한다.

ELISA. GBS II 형-특이적 토끼 항체를 알칼린 포스파타제에 결합된 염소 항-토끼 IgG(Tago Inc. Burlingham, Calif.)와 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 1/3,000 희석하여 정량한다. 마이크로타이터(microtiter) 플레이트(Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc., Chantillty, Va.)를 상기한 바와 같이 웰당 폴리-L-리신에 결합된 정재된 II 형 다당류의 100 ng 으로 피복한다(15, 33). 항체 역가는 대수적으로 희석하여 기록하며, 그 결과 1/800 의 희석에서 기준 혈청(전체 GBS 18RS21 세포)으로 발생되는 토끼 항혈청)을 함유하는 웰이 0.5 의 A_{405} 에 도달하면 A_{405} 는 $\geq$ 0.3 이 된다. 결합 백신의 단백질 부분에 특이적인 항체의 양은 단량체 TT (웰 당 100ng)로 피복된 플레이트를 사용하여 ELISA 로 측정한다. TT-특이적 IgG 역가는 대수적으로 희석하여 기록하며, 그 결과 기질, p-니트로페닐 포스페이트(Sigma 104 phosphatase substrate tablets; Sigma Chemical Co.)를 첨가한지 35 분후에 A_{405} 가 $\geq$ 0.3 이 되었다.

GBS V 형-특이적 토끼 항체를 알칼린 포스파타제에 결합된 염소 항-토끼 IgG (Tago Inc. Burlingham, Calif.)와 ELISA 에 의해 1/3,000 희석하여 정량한다. 마이크로타이터 플레이트(Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc., Chantillty, Va.)를 상기한 바와 같이 웰당 폴리-L-리신에 결합된 정재된 V 형 다당류의 100 ng 으로 피복한다(15). 항체 역가는 대수적으로 희석하여 기록하며, 그 결과 1/3000 의 희석에서 기준 혈청(전체 V형 균주 1169-NT1 로 발생되는 토끼 항혈청)을 함유하는 웰이 0.3 의 A_{405} 에 도달하면 A_{405} 는 $\geq$ 0.3 이 된다.

면역 토끼 혈청으로부터 IgG 및 IgM 의 분리. 단백질 A-아가로스 친화성 칼럼 크로마토그래피(Pierce Chemical Co., Rockford, III.)를 상기한 바와 같이 II-TT 백신으로 유도되는 0.5 ml 의 충진된 면역 토끼 혈청으로부터 70 일 째에 얻어진 면역글로불린(IgG 및 IgM)을 분리하기 위해 사용했다(28). 항체류의 분리는 1/500 로 희석하여 사용하는 염소 항-토끼 IgG (γ 및 단쇄 특이적; Tago) 및 1/200 로 희석하여 사용하는 염소 항-토끼 IgM (μ 쇄 특이적; Ser

a-Lab, Westbury, N.Y.)를 사용하여 II 형 다당류-피복된 ELISA 플레이트로 확인한다.

경쟁적 ELISA. II-TT 백신으로 유도되는 토끼 혈청의 특이성은 억제제로서 동종 (II 형) 및 이종 (Ia 및 III 형) 다당류와 경쟁적 ELISA 에 의해 측정된다. 백신-유도된 풀링된 토끼 혈청(70 일에 채취)의 에피토프 특이성을 항체 결합 억제제로서 β-O-메틸갈락토피라노스 및 천연 및 탈시알릴화 II 형 다당류로 시험한다. 천연 II 형 다당류는 6 %의 초산으로 80℃에서 2 시간동안 처리함으로써 탈시알화시킨다. 다당류 억제제는 4 배로 일련적으로 희석하고 II-TT 백신을 접종한 후 70일에 채취한 풀링된 동량(75 μl)의 토끼 혈청과 혼합한다. 이 혼합물 (100 μl)을 II 형 다당류-피복된 ELISA 웰에 가한다. 알칼린 포스파타제-결합 항-토끼 IgG 을 1/3,000 희석하여 제 2 항체로서 사용한다. 결과는 다음과 같이 나타낸다: % 억제 = [(억제제 없을 때 A_{405} - 억제제 있을 때 A_{405})/억제제 없을 때 A_{405}] X 100.

GBS V-TT 토끼 항혈청의 혈청형 특이성은 GBS 형-특이적 다당류 Ia, Ib, II, III, V 및 VI 를 사용하여 평가한다. ELISA 웰은 폴리-L-리신에 결합된 GBS V 형 다당류로 100 ng/웰 농도로 피복한다. V-TT 백신에 대한 토끼 항혈청은 1/6,000 으로 희석되어 각각 다당류 억제제와 항온 배양시킨다. 항온 배양된 항혈청을 ELISA 웰에 가하여 플레이트를 염소항-토끼 IgG 알칼린 포스파타제 결합체(1/3000 희석), 및 기질로 상기한 바와 같이 처리한다(28).

시험관 내에서 GBS 의 항체-매개성 사멸. 인체 말초 혈액 백혈구에 의해 순차적으로 사멸시키기 위한 GBS 세포를 옵소닌처리한 백신-유도토끼 항체의 능력을 시험관내에서 옴소닌식세포 검정에 의해 측정한다(7, 8).

GBS V 형 활성 항체의 옵소닌식세포 활성을 측정하는 반응 검정은 1.5×10^7 백혈구(WBC)를 300 μl 의 완충액; 50μl 중의 3×10^6 CFU 의 V형 GBS 균주 CJB 111; 인체 보체 (GBS V 형 균주 세포로 흡수) (50 μl); 열-불활성화된 항체-항 V-TT (50 μl); 변형된 이글 배지(modified Eagle's Medium)(50 μl) 중에서 항온 배양하여 수행한다. GBS 콜로니 형성 유니트(CFU)에서의 차이를 표준 평판 계수법에 의해 37℃ 에서 1 시간동안 계속하여 항온배양하여 측정한다.

백신-유도 토끼 항체에 의한 마우스의 수동적 보호. 각각 18 내지 20 g 의 마우스인 스위스-웹스터 비근교계 마우스 암컷(Taconic Farms, Gernamtown, N.Y.) 각각 10 마리의 그룹을 II 형 다당류 또는 II-TT 백신을 접종한 토끼로부터 풀링된 0.2 ml 의 혈청(70 일)을 복강 주사한다. II 형 다당류로 면역화된 토끼로부터 70 일째에 얻은 풀링된 혈청의 ELISA 로 측정한 역가는 100 이며, II-TT 백신의 경우는 12,800 이었다. 풀링된 면역 화전 토끼 혈청 또는 풀링된 항혈청을 수여받은 5마리의 마우스의 대조군에서는 비결합 TT 가 유발되었다(27). 24 시간후, 마우스를 총 용량 1.0ml 의 토드-휴윗브로스 (Todd-Hewitt broth)중에 II 형 균주 18RS21 (마우스당 1.5×10^5 CFU)을 투여한다. 각 균주에 대한 투여 용량은 유사한 체중 및 연령의 마우스를 〉 90 % 치사시키는 것을 미리 결정한다. 생존 마우스를 3 일간 연속하여 매일 계수한다.

통계 분석. 피서 추출 시험(Fisher's extract test)를 이용하여 치사성 GBS 감염에 대해 마우스를 수동적으로 보호하기 위한 상이한 토끼 혈청 능력을 비교한다.

[결과]

II-TT 백신 및 V-TT 백신의 제조 및 조성. GBS II-TT 백신 및 GBS V-TT 백신을 GBS III 형 결합 백신의 구조에 대해 상기한 방법의 의해 제조한다(33). II 형 GBS 다당류의 제어된 과요오드산염 산화에 의해 기체 크로마토그래피-질량 스펙트로스코피 분석에 의해 측정된 바와 같이 다당류의 7 % 의 시알산 기가 변형되었다. 단량체 TT 는 환원적 아민화에 의해 II 형 다당류의 변형된 시알산 부위에 공유 결합하였다. 정제된 II-TT 백신은 32 % (wt/wt) 단백질 및 68 % (wt/wt)의 탄수화물을 함유한다. II-TT 백신의 최종 수율은 7.8 mg, 또는 39 % 이었다.

V 형 GBS 다당류의 제어된 과요오드산염 산화에 의해 다당류의 약 8 %, 25 % 및 50 % 의 시알산 기가 변형되었다.

단량체 TT 는 환원적 아민화에 의해 V 형 다당류의 변형된 시알산 부위에 공유 결합하였다. 다당류는 산화되어 약 8% 의 시알산 기가 변형됨으로써 단백질에 대하여 낮은 다당류의 몰 비율을 갖는 결합체를 형성한다. 말단 시알산의 25 또는 50 % 가 변형된 다당류는 단백질에 대한 더욱 바람직한 다당류의 몰 비율을 갖는 결합체를 형성한다. 25 % 의 시알산 기가 변형된 GBS V 형 다당류가 하기 표 1의 생화학적 특성을 갖는 결합 백신을 제조하는 데에 사용된다.

[표 1]

GBS V형-TT백신의 조성

다당류 크기(M^T)	200,000
산화된 시알산 기(%)	25
파상풍 톡소이드로서의 백신양(% 건조중량)	38
탄수화물로서의 백신양(% 건조중량)	62
탄수화물 몰수 / 단백질 몰수[a]	0.56

[a]파상풍 톡소이드 단량체의 측정 M^r 는 150,000 이다.

토끼에서 II - TT 백신 및 V - TT 백신의 면역원성. II - TT 백신 및 천연 II형 다당류의 면역원성을 토끼에서 비교하였다. II 형 - 특이적 항체의 증가가 II - TT 백신의 1 차 투여후 나타났다(표 2). 추가의 백신 촉진 용량 투여에 의해 항체 반응이 증가하였다. 항체 수준은 41 일 째, 제 2촉진 투여후에는 변화가 없거나 약간 증가하였고, 시험기간 나머지 동안을 걸쳐 유지되었다(표 2). II - TT 백신과는 대조적으로, 비결합 천연 GBS II형 다당류는 특이적 항체 반응을 유발하는 데에 실패하였다(표 2). II - TT 백신을 접종한 동물에서도 TT 에 대한 항체가 발생하여 면역전 수준에 비하여 약 3 - $\log_{10}$ 증가가 나타났다.

[표 2]

천연 Ⅱ다당류 또는 Ⅱ-TT 백신을 접종한 토끼의 GBS Ⅱ형 다당류-특이적 항체 역가

백신 및 토끼	날짜별 ELISA에 의한 항체 역가[a]					
	0	20[b]	34	41[b]	55	70
천연 Ⅱ형 다당류						
1	100	100	100	200	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	200	100	100	100	100	100
Ⅱ-TT						
1	100	400	3,200	3,200	6,400	12,800
2	100	1,600	3,200	6,400	6,400	25,600
3	100	6,400	12,800	25,600	12,800	12,800

[a]100 의 수치는 항체 역가 ≤ 100 을 나타낸다. 수치는 2회 측정 값의 평균이다. 토끼는 완전 프룬드 아주번트로 에멀젼화한 50 μg 의 백신을 0 일에 피하주사하여 백신 접종하였다.

[b]불완전 프룬드 아주번트를 포함한 촉진제를 투여하였다.

V-TT 백신의 면역원성(다당류는 25 % 산화됨)을 토끼에서도 측정하였다. 항체 (lgG) 수준은 V 형-TT 백신의 제 1 및 제 2 투여 후 증가하였으며, 시험 동안에 유지되었다 (표 3).

[표 3]

GBS V형 다당류-특이적 IgG 역가

백신	날짜별로 ELISA에 의해 측정한 IgG 역가[a]			
	0	35	56	91
$V_{25\%OX}$-TT				
토끼 1[a]	100	800	1,600	1,600

이 동물은 명반과 혼합된 백신을 0 일에 시작하여 3 주 간격으로 3 회 50 μg 용량으로 투여한다.

백신-유도 토끼 혈청의 항원 특성. 다당류의 단백질 담체와 결합은 천연 형태의 다당류에서 발견되는 중요한 항원성 에피토프를 변형시키지 않아야 한다. II-TT 백신-유도 항체의 특이성을 억제제로서 동종 및 이종 GBS 다당류를 사용하여 경쟁적 ELISA 에 의해 시험하였다. 450 ng/ml 농도의 천연 II 형 다당류는 II-TT 백신으로 유도되는 토끼 항체 결합의 50 %를 억제하였다. GBS Ia 형 및 III 형 다당류는 500 μg/mg 의 농도에서도 II-TT 백신으로 유도되는 혈청의 결합을 억제하지 않았다(제 2 도). 이들 결과는 II-TT 백신-유도 항체의 표적 항원에 대한 혈청형 특이성을 증명하며 결합 백신의 다당류 부분의 항원성 에피토프의 보존을 나타낸다.

시알산에 의해 영향을 받는 에피토프가 II-TT 백신이 제조되는 동안 유지되는지를 확인하기 위해서, 천연 및 탈시알릴화 II 형 다당류를 II-TT 백신으로 유도되는 토끼 항체의 결합 억제제로서 경쟁력 ELISA 에 사용하였다. 다당류의 탈시알릴화를 6 % 아세트산으로 80 ℃에서 2 시간 동안 수행하였다. 시알산 기의 정량적 제거는 표준으로서 N-아세틸뉴라민산(Sigma)를 사용하여 티오바르비투르산 검정법(32)을 사용하여 확인하였다. 산 처리전의 천연 II 형 다당류의 K_{av} 는 0.49 인 반면, 산처리된 다당류의 K_{av} 는 수퍼로스 6 FPLC 칼럼(LKB-Pharmacia, Sweden) 상에서 0.52 인데, 이는 천연 다당류 중량의 20 % 를 이루는 측쇄 시알산 기의 손실로 인하여 다당류의 분자 크기가 다소 감소되었음을 나타낸다. 200 μg/ml 의 탈시알릴 GBS II 형 다당류는 천연 II 형 다당류에 대한 II-TT 백신의 항체 결합을 33 % 억제시켰다. II-TT 백신 항혈청에 의한 탈시알릴화 또는 핵 II 형 다당류위 비교적 낮은 인식은 면역전기영동 겔에 의해 확인되며, 여기에서는 천연 II 형 다당류로 형성된 침강소 밴드가 나타났으나, 핵 II 형에서는 나타나지 않았다(도시되지 않음). 천연 II 형 다당류에 대한 II-TT 백신 항혈청의 결합은 0.01 내지 10 mg/ml 의 농도 범위로 사용하는 β-O-메틸갈락 토피라노스로는 억제될 수 없다(도시되지 않음).

GBS V 형-TT 백신-유도 항체의 특이성은 억제제로서 동종 및 이종 GBS 다당류를 사용하여 경쟁적 ELISA 로 시험한다. 천연 V 형 다당류는 V 형-TT 백신으로 유도되는 토끼 항체의 결합을 효율적으로 억제한다(제 5도). GBS Ⅰa 형, Ⅰb 형, Ⅱ 형, Ⅲ 형 및 Ⅵ 형은 V 형-TT 백신으로 유도되는 혈청의 결합을 억제하지 않는다(제 5 도). 이들 결과는 표적 항원에 대한 항체를 유도하는 V 형-TT 백신의 특이성을 나타낸다.

GBS 백신-유도 항체의 시험관내 활성. 인체 말초 혈액 백혈구에 의해 사멸시키기 위해 GBS 를 옵소닌 처리하는 면역계의 시험관 내에서의 능력은 동물 보호 실험에서 GBS 에 대한 보호 효능과 상호관계를 갖는다(27, 28). Ⅱ-TT 백신 접종한 3 마리의 토끼에서 발생된 항체는 GBS Ⅱ 형 균주 18RS21 의 사멸을 $\geq 1.8 \log_{10}$ 증가시킨다(표 4). 면역화 전의 토끼 혈청 또는 천연 GBS Ⅱ 형 다당류 또는 비결합 TT 로 백신 접종된 토끼의 혈청은 시험관내에서 GBS 의 사멸을 증가시키는 데에 실패하였다(표 4). 백신-유도된 토끼 항체는 두 GBS Ⅱ 형 임상 분리체(균주 S16 및 S20)의 인체 혈액 백혈구에 의한 사멸을 면역화전 토끼 혈청에 비하여 $\geq 1.8 \log_{10}$ 증가시킨다(표 5). Ⅱ 형-TT 백신에 대한 토끼 혈청은 시험관 내에서 이종성(Ⅰa 및 Ⅲ 형) GBS 균주의 사멸을 증가시키는 데에 실패하여 혈청형 특이성인 것으로 판단된다(표 5).

[표 4]

천연 Ⅱ형 다당류, Ⅱ-TT 백신, 또는 TT 를 유발하는 토끼 항혈청에 의한 GBS Ⅱ형 균주 18RS21의 시험관 내에서 옵소닌식세포성 사멸

혈청원료 (채집일)	CFU at[a]: 0 min	60 min	사멸된 GBS ($\log_{10}$)
Ⅱ형 다당류(70)[b]	4.3×10^6	6.6×10^6	-0.19
Ⅱ-TT 백신(0)	6.0×10^6	6.4×10^6	-0.03
Ⅱ-TT 백신(70)			
토끼 1	4.0×10^6	5.7×10^4	1.85
토끼 2	4.3×10^6	2.7×10^4	2.20
토끼 3	3.9×10^6	4.3×10^4	1.96
TT (70)	4.2×10^6	6.9×10^6	-0.21
없음	3.9×10^6	7.1×10^6	-0.26

[a]반응 혼합물은 시험될 혈청(최종 검정 농도 1%), 보체 원료 로서 II형 GBS-흡수 인체 혈청, 인체 말초 혈액 백혈구, 및 Ⅱ 형 GBS 18RS21를 함유한다. 수치는 2 회 측정치의 평균이다.

[b]토끼 혈처은 완전 프룬드 아주번트 중의 천연 Ⅱ 다당류의 1차 투여 후에 수집하였다.

[표 5]

Ⅱ-TT 백신을 유발하는 면역화전 및 면역 토끼 혈청에 의한 GBS 균주의 시험관내 옵소닌식세포성 사멸

GBS형 및 균주	사멸된 GBS(log_{10})[a]	
	면역화전(0일)	면역Ⅱ-TT백신(70일)
Ⅱ		
18RS21	-0.36	1.98
S16	0.96	2.78
S20	-0.01	1.84
Ia 090	ND	-0.51
Ⅲ M781	ND	-0.54

[a]60 분에서의 CFU(log_{10}) - 0 분에서의 CFU(log_{10}). 반응 혼합물은 시험할혈청, 보체 원료로서 II 형 GBS - 흡수 인체 혈청, 인체 말초 혈액 백혈구, 및 II 형 GBS 18RS21을 함유한다. 수치는 2 회 시험한 수치의 평균이다. ND 는 시험하지 않음.

단백질 A - 친화성 - 정제된 IgG 및 IgM 은 II 형 - TT 백신을 유도하는 풀링된 혈청으로 부터 얻어진다(28). 각 Ig 분획의 특이성은 분류 - 특이적 2 차 항체로 ELISA 에 의해 확인한다. IgM 및 IgG 분획(1/100으로 희석)의 A_{405} S 는 μ - 쇄 - 특이적 결합체와 각각 0.384 및 0.009 이었으며, 염소 항 - 토끼 IgG (γ 및 단쇄 특이적)와는 각각 0.086 및 2.367 이다. 분리된 IgM 및 IgG 는 인체 혈액 백혈구에 의한 II 형 GBS 의 옵소닌 사멸을 증가시키는 능력을 시험하였다. II 형 - TT 백신을 유도하는 비분획 혈청은 1:100 으로 희석하였으며, 동일한 혈청으로부터 IgG 분획의 동등한 1:100 희석에의해 II 형 GBS 의 사멸은 각각 1.65 ± 0.22 및 0.95 ± 0.09 $\log_{10}$ 증가하였다. 반대로, II 형 GBS 는 사멸되지는 않지만 면역전 혈청 (- 0.39 ± 0.13 $\log_{10}$) 및 II 형 - TT 백신 (- 0.28 ± 0.09 $\log_{10}$)을 유도하는 혈청으로부터의 IgM - 농축 분획의 존재하에서 옵소닌식세포성 검정에서 증가하였다.

인체 혈액 백혈구에 의해 GBS - V 형 균주 (CJB Ⅲ)의 사멸을 증가시키는 GBS V 형 - TT 백신 - 유도 토끼 항혈청의 능력은 시험관내에서 옵소닌 식세포 검정에 의해 평가하였다(8). 제 6 도에 도시된 바와 같이. 10 % 농도의 GBS V 형 - TT 항혈청은 대조군에 비해서 GBS V 형 균주 CJB Ⅲ 를 효율적으로 적정화시킨다. 대조군의 반응 조건은 다음과 같다: 항혈청없는 보체(10 %); 보체 없는 항혈청(10 %); 항혈청(1 %) 및 보체.

마우스 보호 검정. 백신 - 유도 항체의 생체내 보호 능력을 시험하기 위해서, 마우스를 II 형 GBS 18RS21 를 투여하기 전에 풀링된 II - TT 백신 혈청 (70 일)으로 수동적으로 면역화시킨다. 그 전에 투여 용량은 시험 마우스 90 내지 100 % 가 치사되도록 결정한다. GBS II - TT 백신을 유도하는 혈청을 수여받은 마우스 군에서 완전한(100 %) 보호가

달성되는 반면, 백신 접종전 혈청을 수여 받은 5 마리의 마우스 중 한 마리만이 생존하였다(표 6). 비결합 II 형 다당류 또는 비결합 TT 로 백신접종된 토끼로부터 혈청을 수여받은 마우스 중에서는 생존체가 없었다(표 6).

[표 6]

천연 II형 다당류 II-TT 백신 또는 TT[a]으로 백신 접종한 토끼로부터의 혈청에 의한 스위스-웹스터 비근교계 마우스의 GBS II 형 균주 18RS21에 대한 수동적 보호

토끼혈청[b] (채집일)	생존수/ 총 마우스수[c]	%생존률
II-TT 백신(70)	10/10	100[d]
II-TT 백신(0)	1/5	20
II형 다당류(70)	0/10	0
TT (70)	0/5	0

[a]마우스는 90 % 치사 용량(1.5×10^5 CFU)DML GBS를 투여했다.

[b]3 마리의 토끼로부터의 혈청 샘플을 풀링시킨다.

[c]치사율은 투여후 72 시간 후에 측정하였다.

[d]P=0.0037 은 면역화전 (0일) 수치와 비교하였다.

우선 수막염균에서 발달한 GBS III 형 다당체로 사용된 결합 방법(18)은 이들은 모두 시알산을 함유하고 있으므로 모든 GBS 협막성 다당류 항원에 적용될 수 있다. 그러나, 디-또는 트리사카리이드 측쇄의 말단 당류로서 시알산을 갖는 다른 GBS 다당류와는 달리, GBS II 형 다당류는 두 단당류 측쇄중 하나의 단일 당으로서 시알산을 갖는 반복 단위를 갖는다(9, 20).

GBS II 형 결합 백신을 작제하는 데에 있어서, II 형 다당류의 시알산 기의 7% 를 산화시켜서 이들을 다당류를 TT 에 결합시키는 데에 사용했다.

정제된 II-TT 백신을 수퍼로스 6 칼럼(분자량) 〉 10^6에 해당)의 공극 용적으로 유출시켜 68 %(wt/wt) 의 탄수화물 및 32 % (wt/wt)의 단백질로 구성된다.

아주번트로 에멀젼화된 II 형-TT 백신은 토끼에서 비결합 천연 II 형 다당류에 대비되는 면역원성을 가지며, II 형 다당류-특이적 항체를 발생시키는데에 실패하였다. 면역화된 3 마리의 토끼 중 2 마리는 II-TT 백신의 단일 투여한지 3 주후에 강력하게 반응한다. II-TT 백신의 촉진제 투여후 3 주에 3 마리 토끼 모두에서 최적 형-특이성 항체가 얻어졌다. 또한, II-TT 백신의 제 3 투여 후에는 II 형-특이적 항체 역가의 증가는 나타나지 않았다. 시험관 내 및 생체내 실험 결과는 II-TT 백신을 유발시키는 항체가 II 형 GBS 에 대해서 기능적 활성이 있다는 것을 나타낸다. II-TT 백신을 접종한 3 마리의 토끼 각각의 혈청은 인체 말초 백혈구에 의한 II 형 GBS 의 시험관 내 사멸을 증가시키고 II 형 GBS 의 치사 용량에 대해서 완전히 (100 %) 보호된 비근교계 마우스를 제공한다. II-TT 백신 항혈청은 동종성 GBS 균주(18RS21, S16, 및 S20)에 대해서 옵소닌 처리 활성을 나타내지만 시험되는 이종성 GBS 혈청형 (Ia 및 III)에서는 그렇지 않았다.

천연 II 형 다당류가 II 형 다당류-피복된 ELISA 웰에 대한 II-TT 백신 항혈청의 결합을 억제하는 반면, 탈시알릴화 II 형 다당류에서는 200 μg/ml 의 농도로 사용할 경우에도 〈 40 % 의 억제율을 나타냈다. 이 결과는 II 형 다당류의 중요한 항원성 결정기가 시알산 잔기의 존재에 의존한다는 것을 말해준다. 이 결과는 전체 II 형 유기를 를 유발시키는 토끼 항혈청에 의해 얻어지는 결과를 확인해준다(21). 그러나, 억제제로서 β-O-메틸갈락토스피라노스를 사용하는 ELISA 억제 실험은 II-TT 백신을 유발시키는 토끼 항혈청은 갈락토스-특이적 항체를 함유하지 않는다는 것을 나타낸다. II 형 천연 다당류에 대한 II-TT 백신 항혈청의 결합 억제는 10mg/ml의 농도의 β-O-메틸갈락토스피라노스에 의해서도 달성할 수 없다. 그러므로, 측쇄 갈락토스는 다당류가 TT 에 결합할 경우에 II 형 다당류의 면역우성 에피토프인 것 같지는 않다. 이들 결과는 전체 II 형 GBS 유기체(12, 21)를 유발하는 토끼 혈청으로 수행된 면역화학성 연구에서 갈락토스 측쇄가 시알산-의존적 에피토프를 따라 II 형 다당류의 두 면역우성 부위 중 하나인것으로 나타나는 것과는 대조적이다. 상기 연구(12, 21)에서 사용되고 pH-제어 조건으로 배양되지 않은 전체 II 형 GBS 세포는 어느 정도는 시알산이 부족한 다당류를 가질 수 있다. 이들 조건에서는, 측쇄 갈락토스가 주요 항원성 에피토프일 수 있다. II-TT 백신을 합성하는 데에 사용되는 II 형 다당류의 원료는 pH 7.0으로 유지되는 II 형 GBS 배양물이며; 최종 분석에서 시알산이 다당류의 -20 % (wt/wt)를 구성한다는 것이 확인되었다. TT 에 대한 결합 II 형 다당류가 다당류의 형태를 변화시킴으로써, 숙주 면역계가 인식하는 갈락토스 에피토프를 사용할 수 없게 하는 가능성도 배제할 수 없다. II-TT 백신-유도 토끼 항체는 갈락토스-특이적 항체가 없지만, 이들은 II 형 GBS 유기체에 대해서 시험관내 및 생체내에서의 완전한 기능을 한다. 몇가지 시알산 잔기의 화학적 변형이나 이들 부위로의 TT의 순차적인 결합 어느 것도 기능적 II 형-특이적 항체를 유발시키는 데에 필요한 중요한 항원 에피토프를 변화시키지 않는다. II-TT 백신을 유발하는 토끼 혈청으로부터 정제된 IgG 는 인체 백혈구에 의한 II 형 GBS 의 시험관내 사멸을 촉진하며, 이것은 그것을 TT 에 결합시킴으로써 II 형 다당류의 면역원성이 증가될 뿐만 아니라, 기능적 IgG 항체가 발생된다는 것을 제시한다.

GBS V 형 혐막성 다당류는 인접 당 기에 두 개의 상이한 측쇄를 함유하는 트리사카라이드 골격으로 구성된 반복 단위 구조를 갖는다. (참고 35; 제 4 도). GBS V 형-TT 결합 백신 제제중 하나에서, V 형 다당류의 더긴 측쇄(즉, 3 당기)의 시알산 기중 25 % 가 산화되었다. 산화된 시알산기는 V 형 다당류를 TT 에 결합시키는 부위로서 사용된다. 정제된 V 형-TT 백신은 38 % (wt/wt)의 TT 및 62% (wt/wt) 의 탄수화물로 구성된다. 명반과 혼합한 V 형-TT 백신은 토끼에서 면역원성인 것으로 나타났다. 강한 반응은 V 형-TT 백신의 제 1 투여 및 촉진제 투여 후에 관측되었다. 제 2 촉진제는 V 형-다당류 IgG 역가를 더욱 증가시킨다. V 형-TT 유도 검정법의 혈청특이성이 경쟁적 ELISA 에서 나타났다. V-TT 백신에 대해 발생한 토기 항혈청은 인체 백혈구 및 보족 존재시 시험관네에서 V 형 GBS를 사멸시키는 능력으로 입증된 바와 같이 기능적 활성을 갖는다.

III-TT 백신과 같이, II-TT 백신은 활성 다당류에 비해서 토끼에서 개선된 면역원성을 나타내며 다당류 구조, TT 가 결합된 다당류 상의 시알산의 위치, 백신 조성의 차이에도 불구하고 토끼에서 옵소닌 처리 활성 IgG 를 유발시킨다. V 형-TT 백신은 또한 토끼에서 면역원성이며 생체내에서 기능적으로 항체를 유도할 수 잇따고 확인되었다. 이 설계의 GBS 다당류-단백질 결합체가 인체 질병과 매우 빈번하게 연관되는 GBS 혈청형에 대해서 보호하게 할 수 있는 다가 GBS 백신의 성분을 궁극적으로 구성하는 것으로 예측된다.

또한, 백신이 결합 분자를 약제학적으로 허용되는 담체에 첨가함으로써 본 발병의 결합 분자로부터 생산될 수 있을 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 항원성 분자의 교차-결합 정도는 0.2 미크론 필터를 통해 필터 멸균될 수 있는 백신을 제공하는 데에 충분한 정도로 제어된다. 이러한 백신은 바람직하게는 가용성이다. 면역화는 필요에 따라 수여체 포유류에 백신을 일단 주사한 다음 순차적으로 촉진제를 주사함으로써 효과적이 될 수 있다. 투여할 충분한 용량의 백신은 다당류 량에 기초할 수 있다: 3- 80μg 범위의 다당류 성분의 결합 백신을 투여할 수 있다.

[참고 문헌]

출원인은 이 최종 실시예가 이전의 실시예와 결합되어 본 발명의 방법의 전체 수행 가능성 및 장점을 예시한다고 생각한다.

그러나 본 발명의 이들 수 많은 특성 및 장점은 본 발명의 구조 및 기능의 상세한 설명과 함께 기재하였으며 이러한 개시는 단지 예시일 뿐 세부사항, 특히 형상, 크기 및 배열 문제, 단계의 순서 및 시간에 관해서는 본 발명의 첨부된 특허청구의 범위에 기재한 용어의 광범위한 일반적인 의미로 충분한 정도로 표시되는 광범위한 원리내에서 변화를 줄 수 있다.

1. Adams, W. G., J. Kinney, A. Schuchat, C. Collier, C. Papasian, H. Kilbride, F. Riedo, and C. Broome, 1991, Program Abstr. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1056.

2. Avery, O.T., and W.F. Goebel, 1931. Chemoimmunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein. J. Exp. Med. 54:437-447.

3. Baker, C.J., and M.S. Edwards, 1990, Group B streptococcal infections, p. 742-811, In J.S. Remington and J.O. Klein (ed.), Infectious diseases of the fetus and newborn infant. The W.B. Saunders Co., Philadelphia.

4. Baker, C.J., M.S. Edward, and D.L. Kasper, 1981, Role of antibody to native type III polysaccharide of group B Streptococcus in infant infection, Pediatrics 68:544-549.

5. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1976. Correlation of material antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection, N. Engl. J. Med. 294:753-756.

6. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1985. Group B streptococcal vaccines. Rev. Infect. Dis. 7:458-467.

7. Baker, C.J., M.A. Rench, M.S. Edwards, R.J. Carpenter, B.M. Hays, and D.L. Kasper, 1988. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B Streptococcus. N. Engl. J. Med. 319:1180-1220.

8. Baltimore, R.S., D.L. Kasper, C.J. Baker, and D.K. Goroff, 1977. Antigenic specificity of opsonophagocytic antibodies in rabbit anti-sera to group B streptococci. J. Immunol. 118:673-678.

9. De Cueninck, B. J., T.F. Grebar, T.K. Eisenstein, R.M. Swenson, and G.D. Schockman, 1983. Isolation, chemical composition, and molecular size of extracellular type II and type Ia polysaccharides of group B. streptococci. Infect. Immun. 41:527-534.

10. Dillon, H.C., S. Khare, and B.M. Gray, 1987. Group B streptococcal carriage and disease: a six-year r etrospective study. J. Pediatr. 110:31-36.

11. Dubois, M., K.A. Gilles , J.K. Hamilton, P.A. Rebars, and F. Smith. 1956. Colormetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

12. Freimer, E.H. 1967. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci, J. Exp. Med. 125 :381-392.

13. Gelfand, H.M., J.P. Fox, D.R. LeBlanc, and L. Elveback, 1960. Studies on the development of natural i mmunity to poliomyletis in Louisiana.

V. Passive transfer of polioantibody from mother to fetus, and natural decline and disappearance of antibo dy in the infant. J. Immunol. 85:46-55.

14. Goebel, W.F., and O.T. Avery, 1931. Chemo-Immunological studies on conjugated

carbohydrate-proteins. IV. The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance o f type III pneumococcus and its coupling with protein. J. Exp. Med. 54:431-436.

15. Gray, B.M. 1979. ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. J. Immunol. Methods 28:187-192.

16. Hobbs, J. R., and J.A. Davis, 1967. Serum gamma-G globulin levels and gestational age in premature babies. Lancet 493:757-759.

17. Insel, R.A., and P.W. Anderson, 1986.

Oligosaccharide-protein conjugate vaccines induce and prime for oligoclonal IgG antibody responses th th e Haemophilus Influenzae bcapsular polysaccharide in human infants. J.Exp. Med. 163:262-269.

18. Jennings, H.J., and C. Lugowski, 1981.

Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. J. Immu nol. 127:1011:1018.

19. Jennings, H. J., C. Lugowski, and F.E. Ashton, 1984, Conjugation of meningococcal Iipopolysaccharide R-type oligosaccharides to tetanus toxoid as a route to a potential vaccine against group B Neisseria men ingitidis. Infect. Immun. 43:407-412.

20. Jennings, H.J., K.G. Rosell, E.

Katzenellenbogen, and D.L. Kasper. 1983.

Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II group B Streptococcus. J. Biol. Chem. 258:1793-1798.

21. Kasper, D.L., C.J. Baker, B. Galdes, E.

Katzenellenbogen, and H. J. Jennings. 1983.

Immunochemical analysis and immunogenicity of the type II group B streptococcal capsular polysaccharid e. J. Clin. Invest. 72:260-269

22. Lagergard, T., J. Shiloach, J.B. Robbins, and R.

Schneerson. 1990. Synthesis and immunocological properties of conjugates composed of group B Streptoc occus type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. Infect. Immun. 58:687-694.

23. Lancefield, R. C. 1972. Cellular antigens of group B streptococci, p. 57-65. In L.W.

Wannamaker and J.M. Matson (ed.), Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding, and management. Academic Press, Inc. New York.

24. Lancefield, R.C., M. Mccarty, and W.N. Everly.

1975. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. J. Exp. Med. 142:165-179.

25. Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Foli n phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275

26. Michon, F., E. Katzenellenbogen, D.L. Kasper, and H.L. Jennings. 1987. Structure of the complex grou p-specific polysaccharide of group B Streptococcus. Biochemistry 26:476-486

27. Paoletti, L. c., D.L. Kasper, F. Michon, J.

Difabio, K. Holme, H.J. Jennings,and M.R. Wessels. 1990. An oligosaccharide-tetanus toxoid conjugate v accine against type III group B Streptococcus. J. Biol. Chem. 265:18278-18283.

28. Paoletti, L.C., D.L. Kasper, F. Michon, H. J.

Jennings, T.D. Tosteson, and M.R. Wessels.

1992. Effects of chain length on the immunogenicity in rabbits of group B Streptococcus type III oligosacc haride-tetanus toxoid conjugates. J. Clin. Invest. 89:203-209.

29. Schneerson, R. O. Barrera, A. Sutton, and J.B. Robbins. 1980. Preparation, characterization and immun ogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. J. Exp. Med. 152:361-37 6.

30. Svenson, S. B. and A.A. Lindberg. 1979.

Coupling of acid-labile Salmonella specific oligosaccharides to macromolecular carriers. J. Immunol. Met hods 25:323-335.

31. Walsh, J. A., and S. Hutchins. 1989. Group B streptococcal disease: its importance in the developing world and prospect for prevention with vaccines. Pediatr. Infect. Dis. J. 8:271-276.

32. Warren, L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234:1971-1975.

33. Wessels, M.R., L.C. paoletti, D.L. Kasper, J.L. Difabio, F. Michon, K. Holme, and H. J. Jennings. 1990. Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B Strepto coccus, J. Clin. Invest. 86:1428-1433.

34. Zigterman, J.W.J., J.E.G. van Dam, H. Snippe, F.T.M Rottsveel, M. Jansze, J.M.N. Willers, J.P. Kamer ling, and J.F.G. Vliegenthart. 1985.

Immunogenic properties of octasaccharide-protein conjugates derived from Klebsiella serotype II capsula r polysaccharide. Infect. Immun. 47:421-428.

35. Wessels, M.R., J.L.D;Fabio, V. J. Benedi, D.L. Kasper, F. Michon, J-R. Brisson, J.Jelinkova and H.J.J ennings 1991. Structural Determination and Immunochemical Characterization of the Type V Group B Stre ptococcus Capsular Polysaccharide. Journal of Biological Chemistry 266:8714-8719.

이상에서 본 발명의 많은 실시예를 기재하였으나, 이들은 본 발명의 방법을 사용하는 다른 구체예를 제공하기 위해 변형될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 범위는 실시예로 제시된 특정 구현예에 의해서 보다는 이하 첨부된 특허 청구의 범위에 의해 정해지는 것으로 본다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

그룹 B 스트렙토코쿠스 II형 또는 V형 세균으로부터 유도된 협막성 다당류 및 단백질 성분을 포함하며, 상기 다당류 성분 말단에 시알산기가 결합된 2또는 그 이상의 측쇄가 2차아민 결합을 통해 단백질에 각각 연결되고 상기 다당류의 분자량이 적어도 5000 달톤임을 특징으로 하는 항원성 결합분자.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 결합 전에 상기 다당류의 5 내지 50%의 말단 시알산기가 단백질과 결합가능함을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 결합전에 상기 다당류의 5 내지 25%의 말단 시알산기가 단백질과 결합가능함을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 결합전에 상기 다당류의 5 내지 10%의 말단 시알산기가 단백질과 결합가능함을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 5.

제4항에 있어서, 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 II형이며 상기 다당류의 7%의 말단 시알산기가 단백질과 결합가능함을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 6.

제1항에 있어서, 항원성 결합분자가 0.2미크론 필터를 통해 필터멸균될 수 있음을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 7.

제1항에 있어서, 다당류 성분이 약 5,000 내지 1,000,000 달톤의 분자량을 가짐을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 8.

제1항에 있어서, 다당류 성분이 약 50,000 내지 500,000 달톤의 분자량을 가짐을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 9.

제1항에 있어서, 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 V형이며 상기 다당류의 말단 시알산기의 약 25%가 단백질에 결합됨을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 10.

제8항에 있어서, 다당류 성분이 약 100,000 내지 300,000 달톤의 분자량을 가짐을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 11.

제9항에 있어서, 다당류 성분이 약 200,000 달톤의 분자량을 가짐을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 12.

제1항에 있어서, 단백질이 파상풍 독소, 디프테리아 독소 및 CRM(교차반응물질) 197로 구성된 그룹에서 선택된 것임을 특징으로 하는 결합분자.

청구항 13.

(a) 다당류 골격에 결합된 2 또는 그 이상의 말단 시알산기에 알데히드 그룹을 도입하는데 충분한 정도로 그룹 B 스트렙토쿠스 II형 또는 V형 혐막성 다당류를 과요오드산염 산화시키는 단계;

(b) 산화된 그룹 B 스트렙토코쿠스 II형 또는 V형 혐막성 다당류를 환원성 아민화를 통해 단백질에 결합시킴으로써 상기 혐막성 다당류 및 상기 단백질 사이의 2차아민 결합이 생성되도록 하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 그룹 B 스트렙토코쿠스 II형 또는 V형 혐막성 다당류 및 단백질의 결합분자 제조방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 50%의 시알산기를 산화시켜 단백질과 결합가능한 알데히드 그룹을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 25%의 시알산기를 산화시켜 단백질과 결합가능한 알데히드 그룹을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 10%의 시알산기를 산화시켜 단백질과 결합가능한 알데히드 그룹을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제16항에 있어서, 상기 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅱ형이며 상기 다당류 중 7%의 시알산기가 산화되어 단백질에 결합가능한 알데히드 그룹을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제13항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 50%의 시알산기가 단백질에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 25%의 시알산기가 단백질에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, 상기 다당류 중 5 내지 10%의 시알산기가 단백질에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제19항에 있어서, 상기 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅱ형이며 상기 다당류의 약 5%의 시알산기가 단백질에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제13항에 있어서, 상기 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 V형이며 상기 다당류의 약 25%의 시알산기가 단백질에 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제13항에 따른 방법에 의해 제조된 결합분자.

청구항 24.

제1항에 따른 결합분자를 포함하는 백신.

청구항 25.

제1항에 따른 결합분자 및 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅱ형 이외의 병원성 물질에 대한 항체의 생성을 유발할 수 있는 적어도 하나의 다른 면역원성 분자로 구성됨을 특징으로 하는 다가백신.

청구항 26.

제25항에 있어서, 다른 면역원성 분자가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ia형, Ib형, Ⅱ형, Ⅲ형, Ⅳ형 및 Ⅴ형, 헤모필루스 인플루엔자 b형 및 대장균 K1형으로 구성된 그룹에서 선택된 병원성 물질에 대한 항체의 생성을 유발할 수 있는 것임을 특징으로 하는 다가백신.

청구항 27.

제26항에 있어서, 다른 면역원성 분자가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅰa형, Ⅰb형, Ⅱ형, Ⅲ형, Ⅳ형, 헤모필루스 인플루엔자 b형 및 대장균 K1형으로 구성된 그룹에서 선택된 병원성 물질에 대한 항체의 생성을 유발할 수 있는 것임을 특징으로 하는 다가백신.

청구항 28.

제27항에 있어서, 다른 면역원성 분자가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅰa형, Ⅰb형, Ⅱ형, Ⅲ형 및 대장균 K1형으로 구성된 그룹에서 선택된 병원성 물질에 대한 항체의 생성을 유발할 수 있는 것임을 특징으로 하는 다가백신.

청구항 29.

제28항에 있어서, 다른 면역원성 분자가 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅰa형, Ⅰb형, Ⅱ형, Ⅲ형으로 구성된 그룹에서 선택된 병원성 물질에 대한 항체의 생성을 유발 할 수 있는 것임을 특징으로 하는 다가백신.

청구항 30.

인간을 제외한 포유동물을 대상으로 하며, 동물의 출산시 새끼의 감염을 방지하기에 충분한 양으로 태내의 새끼에게 통과될 수 있는 항체를 생성하기 위해 암컷에게 면역원량의 결합분자를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 결합분자는 Ⅱ형 및 V형 그룹 B 스트렙토코쿠스 세균으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 혐막성 다당류 및 단백질 성분으로 구성되고, 상기 다당류 성분의 시알산기가 말단에 결합된 2 또는 그 이상의 측쇄가 2차아민 결합을 통해 각각 연결되고 및 상기 다당류의 분자량이 적어도 5,000 달톤임을 특징으로 하는 출생 전의 새끼에 대한 면역화방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, 상기 백신은 암컷이 임신하기 전에 투여되고 필요한 경우 암컷을 면역시키기 위해 부스터(booster)를 투여함을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 32.

제30항에 있어서 백신이 임신 중에 투여됨을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 33.

제1항에 따르는 결합분자를 포함하는 백신을 인체를 제외한 포유동물에게 면역원량으로 투여함을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 34.

제1항에 따르는 결합분자를 포함하는 백신을 그룹 B 스트렙토코쿠스 Ⅱ형 또는 V형에 의해 감염될 우려가 있는 인체를 제외한 포유동물에게 면역원량으로 투여함을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 35.

제34항에 있어서, 면역체계가 저하된 대상에게 투여됨을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 36.

제35항에 있어서, 면역체계의 저하가 암 또는 당뇨병으로 구성된 그룹에서 선택된 질병에 의한 것임을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 37.

제36항에 있어서, 백신이 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여됨을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 38.

제1항에 따르는 결합분자를 포함하는 백신을 낙농우에게 면역원량으로 투여하는 것으로 구성됨을 특징으로 하는 소 유선염에 대한 면역화방법.

청구항 39.

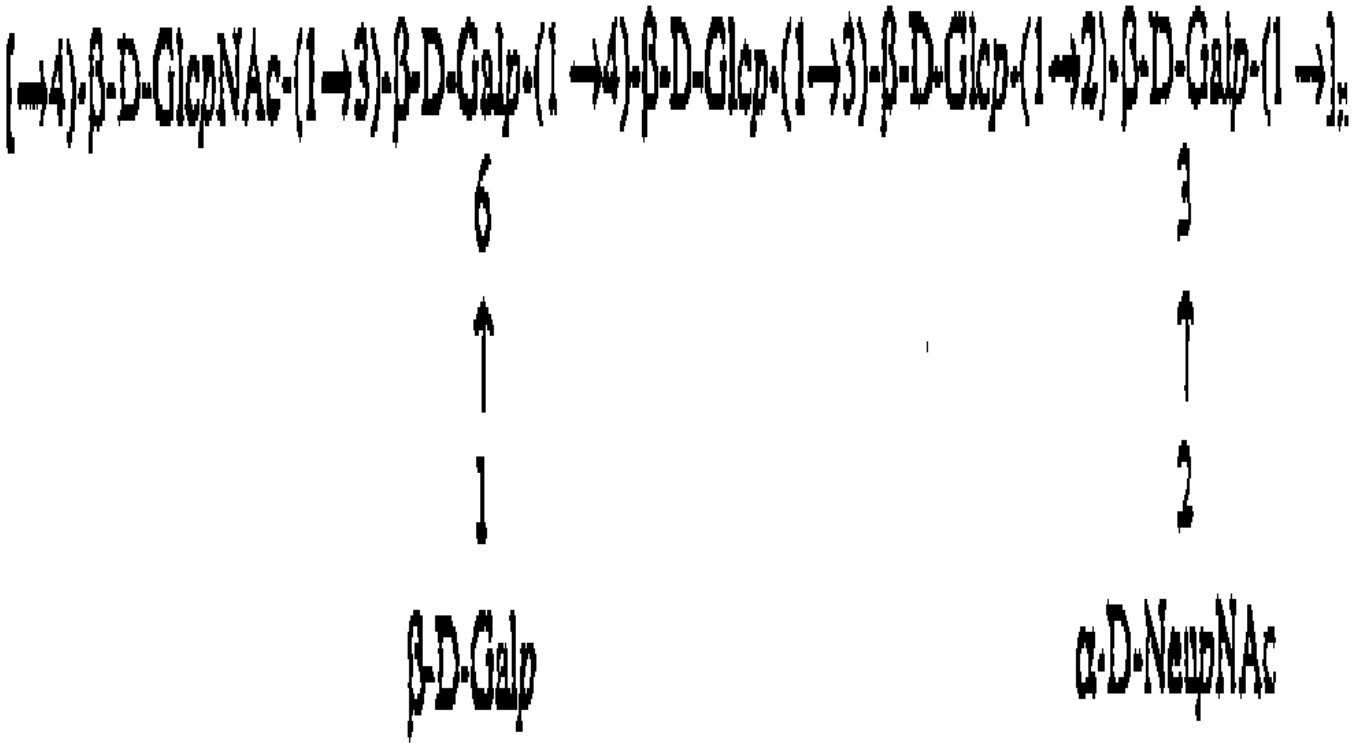
제30항에 있어서, 상기 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 II형 세균으로부터 유도된 것임을 특징으로 하는 면역화방법.

청구항 40.

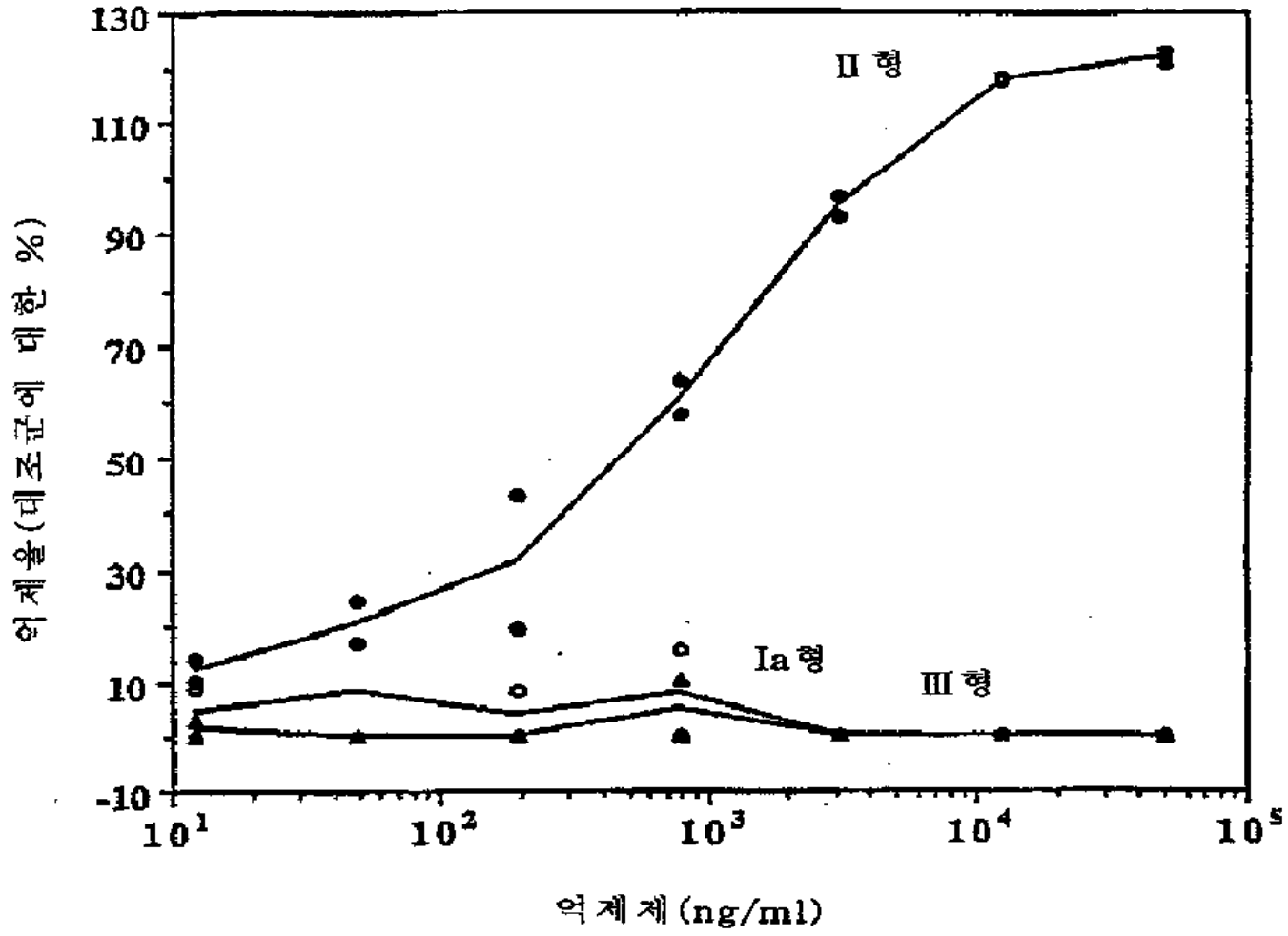
제30항에 있어서, 상기 다당류가 그룹 B 스트렙토코쿠스 V형 세균으로부터 유도된 것임을 특징으로 하는 면역화방법.

도면

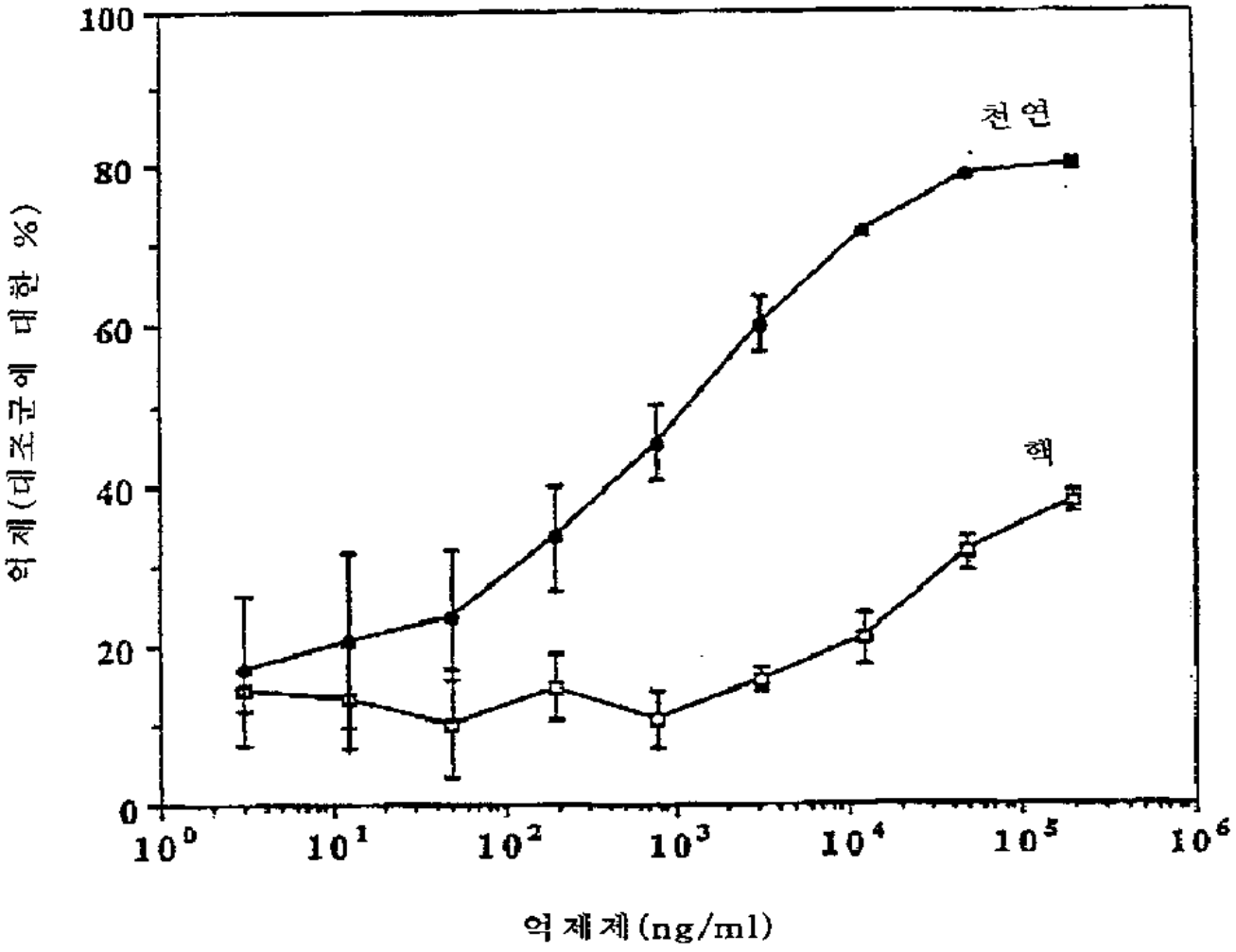
도면 1


[→4)-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-Galp-(1 →4)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→2)-β-D-Galp-(1 →]n
6
3
1
2
β-D-Galp
α-D-NeupNAc

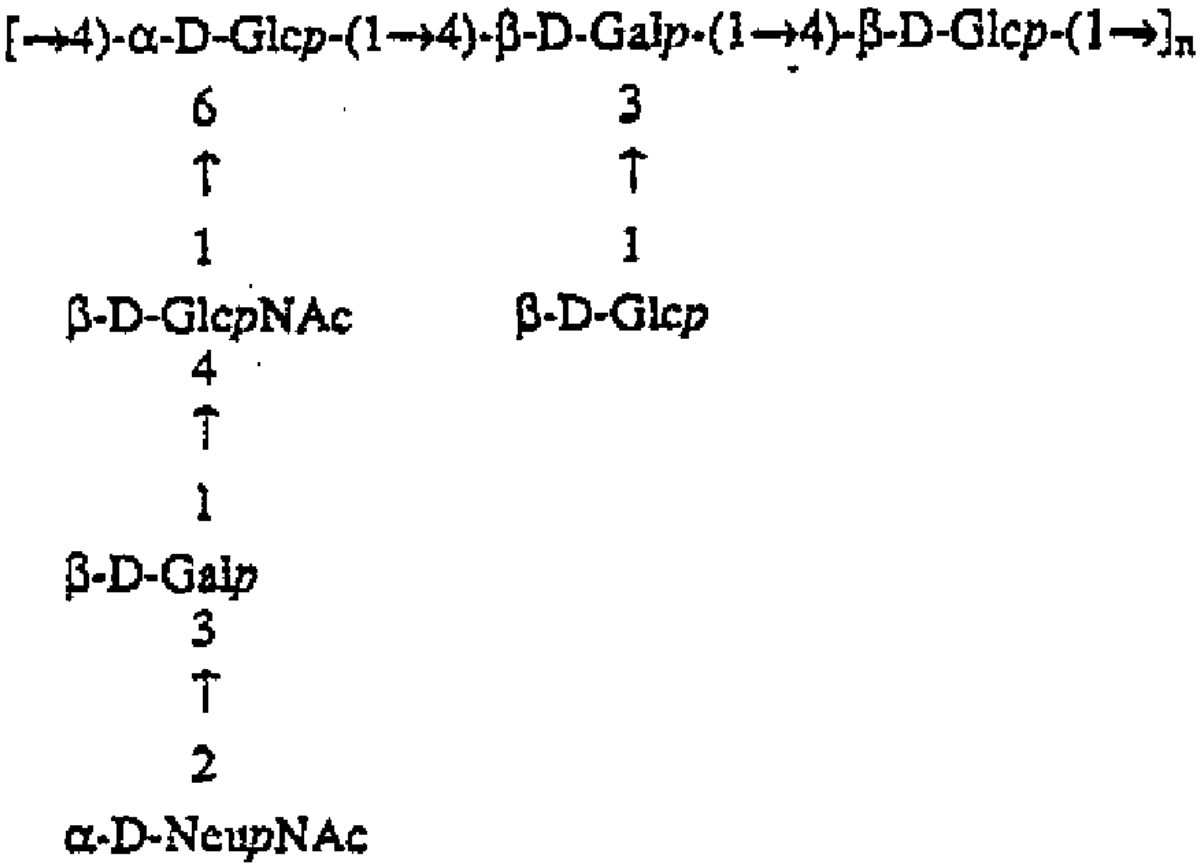
도면 2


130
110
90
70
50
30
10
-10
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
억제율(대조군에 대한 %)
억제제(ng/ml)
II 형
Ia 형
III 형

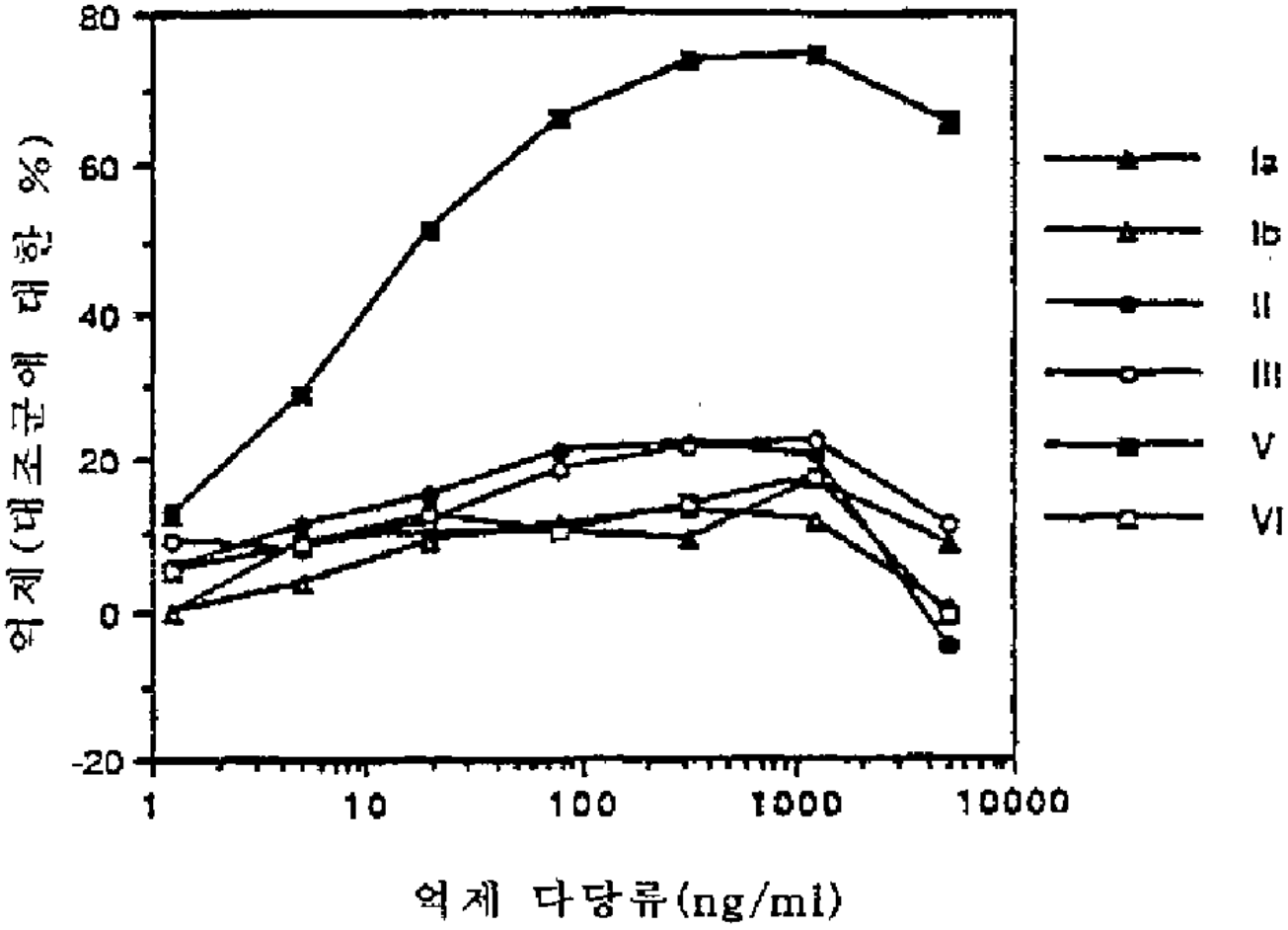
도면 3


100
80
60
40
20
0
천연
핵
억제(대조군에 대한 %)
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
억제제(ng/ml)

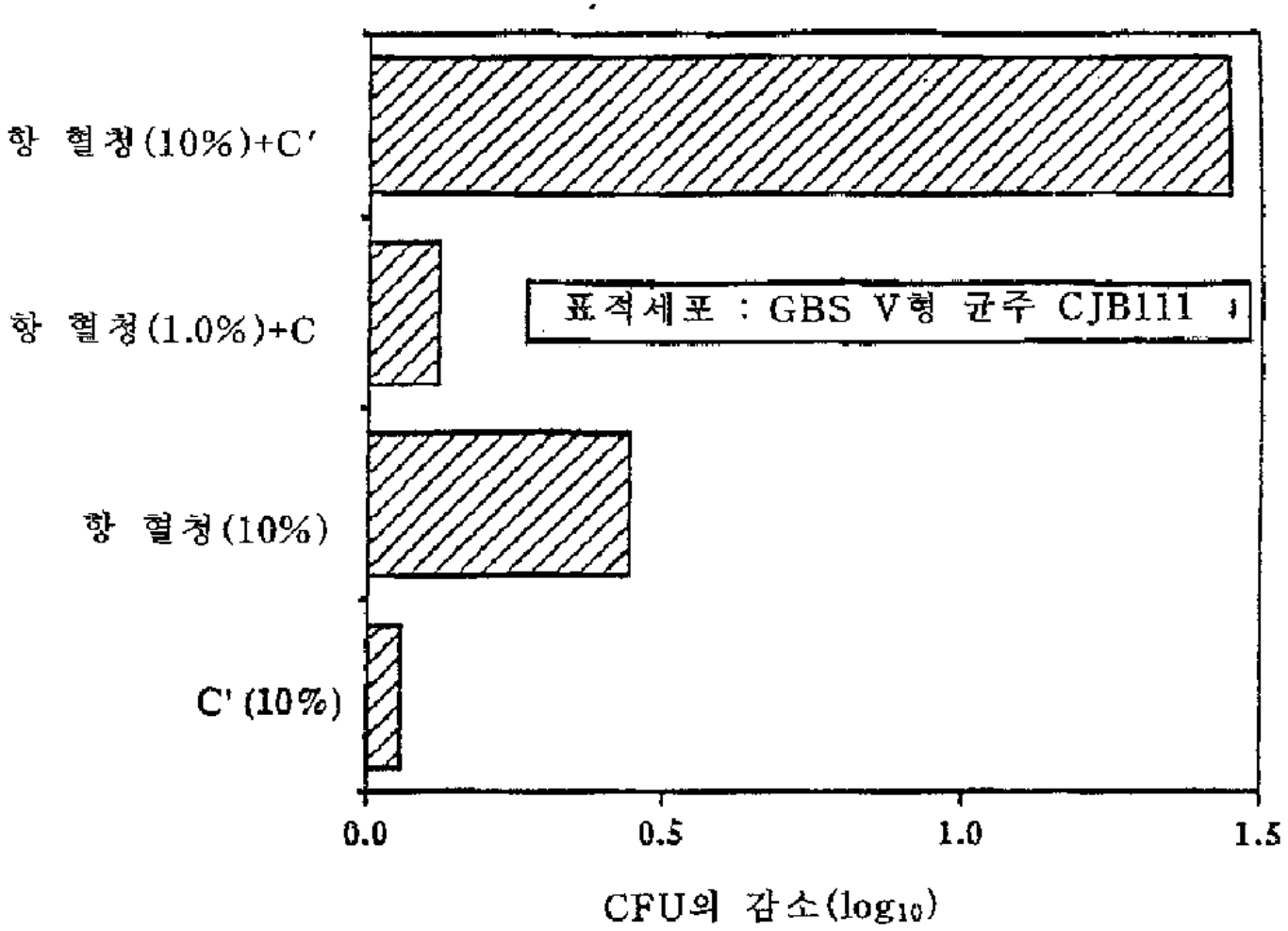
도면 4


[→4)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→]n
6
3
β-D-GlcpNAc
β-D-Glcp
4
β-D-Galp
3
2
α-D-NeupNAc

도면 5


80
60
40
20
0
-20
1
10
100
1000
10000
억제(대조군에 대한 %)
억제 다당류(ng/ml)
Ia
Ib
II
III
V
VI

도면 6


항 혈청(10%)+C'
항 혈청(1.0%)+C
항 혈청(10%)
C'(10%)
표적세포 : GBS V형 균주 CJB111
0.0
0.5
1.0
1.5
CFU의 감소(log10)