(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0097134
(43) 공개일자 2020년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/1275 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0014539
(22) 출원일자 2019년02월07일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
에스케이바이오사이언스(주)
경기도 성남시 분당구 판교로 310 (삼평동)
(72) 발명자
김훈
경기도 성남시 분당구 판교로 310, SK바이오사이언스 바이오실 (삼평동)
이윤재
경기도 성남시 분당구 판교로 310, SK바이오사이언스 바이오실 (삼평동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **교차반응이 없는 폐렴구균 항혈청 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 교차반응이 제거된 폐렴구균 항혈청 및 이의 제조방법에 것으로서, 더욱 상세하게는 폐렴구균 균체를 이용하여 교차반응을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법 및 상기 방법에 따라 제조된 항혈청에 관한 것이다.

본 발명의 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청은 구조가 유사한 협막다당류를 발현하는 혈청형의 폐렴구균과의 교차반응이 제거되어 특정 혈청형에 대한 특이성이 매우 높다. 따라서, 폐렴구균 협막 다당류의 정확한 함량 측정이 요구되는 관련 기술분야에서 매우 유용하게 활용이 될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C07K 16/06 (2013.01)
G01N 33/56944 (2013.01)
(72) 발명자
백승범
경기도 성남시 분당구 판교로 310, SK바이오사이언스 바이오실 (삼평동)
신진환
경기도 성남시 분당구 판교로 310, SK바이오사이언스 바이오실 (삼평동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 개체에 투여하는 단계;

(b) 상기 개체로부터 혈청을 수득하는 단계;

(c) 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 상기 혈청에 혼합하고 교차반응(cross-reactivity) 유무를 확인하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계는 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 혈청형별로 순차적으로 상기 혈청에 혼합하여 교차반응 유무를 확인하는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계는 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균 2종 이상을 상기 혈청에 혼합하여 교차반응 유무를 확인하는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폐렴구균은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폐렴구균은 불활성화(inactivated) 또는 약독화(live attenuated) 폐렴구균인 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서의 폐렴구균은 2가 이상의 불활성화 또는 약독화 폐렴구균인 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 불활성화는 전자기 복사선의 조사, 가열 및 화학적 처리로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법에 의한 것임을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 약독화는 전자기 복사선의 조사, 가열, 화학적 처리 및 유전자 조작으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법에 의한 것임을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 교차반응을 제거하는 방법은 원심분리 또는 여과에 의한 제거인 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계는 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거한 후, 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 혈청형의 폐렴구균을 반복적으로 상기 혈청에 혼합하여 응집물을 제거하는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, (e) 상기 (d) 단계에서 응집물이 제거된 항혈청을 상기 (c) 단계에서의 폐렴구균과 혼합한 후 비탁분석을 수행하여 교차반응 제거여부를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 비탁분석 결과가 하기 (i) 및 (ii) 중 어느 하나 이상을 만족할 때까지, 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 혈청형의 폐렴구균을 반복적으로 상기 혈청에 혼합하여 응집물을 제거하는 것을 특징으로 하는 항혈청 제조방법:

(i) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 혈청형의 폐렴구균 균체 1.0㎍/mL의 비탁분석값 미만

(ii) 공시료(blank)의 평균 비탁분석값 + (3 x 표준편차) 미만

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청.

청구항 14

제13항의 폐렴구균 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제13항의 폐렴구균 항혈청을 포함하는 폐렴구균 감염 질환 진단용 조성물.

청구항 16

제13항의 폐렴구균 항혈청을 포함하는 폐렴구균 항원 정량용 조성물.

청구항 17

(a) 폐렴구균 항원량이 특정된 표준시료와 상기 제13항의 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계;

(b) 상기 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하여 표준곡선을 작성하는 단계;

(c) 검출대상 시료와 상기 제13항의 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서의 반응에 따른 탁도를 분석하고 상기 표준곡선에 적용하여 항원량을 산출하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 항원 정량방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 검출대상 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 활액, 뇨, 객담, 림프액, 세포간액 또는 백신 조성물인 것을 특징으로 하는 정량방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 (b) 및 (d) 단계에서의 탁도는 흡광도, 투과율 또는 비탁분석에 의한 것임을 특징으로 하는 정량방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 비탁분석은 네펠로미터에 의하여 측정되는 것을 특징으로 하는 정량방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 교차반응이 제거된 폐렴구균 항혈청 및 이의 제조방법에 것으로서, 더욱 상세하게는 폐렴구균 균체를 이용하여 교차반응을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법 및 상기 방법에 따라 제조된 항혈청에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 폐렴구균(*Streptococcal pneumoniae*)은 락토바실러스목 연쇄상구균과에 속하는 그람양성균으로서, 사람에게 폐렴(pneumonia), 수막염(meningitis), 패혈증(sepsis), 중이염(otitis media) 등의 질병을 유발한다. 폐렴구균은 각 세포의 주변을 감싸는 다당류 코팅인 협막(莢膜, capsule)을 가지며, 협막에 있는 다당류는 항원으로서 작용하여 인체 내 항체 생성을 유도한다. 또한, 폐렴구균은 협막다당류(capsular polysaccharide; capsular PS)의 혈청학적 특성에 따라 약 90종 이상의 혈청형으로 분류된다. 그 중 37 종의 혈청형이 심각한 침습성 질환을 유발하는 것으로 확인되었다. 이러한 폐렴구균 질환은 누구라도 걸릴 수 있지만, 특히, 2세 미만의 아동 및 65세 이상의 노인들이 폐렴구균 감염에 취약한 것으로 알려져 있다.

[0005] 폐렴구균 감염질환의 치료에는 항생제를 사용하고 있으며, 폐렴구균이 내성이 나타나지 않는 벤코마이신(vancomycin), 레보플록사신(revofloxacin) 또는 목시플록사신(moxifloxacin)을 주로 처방한다. 폐렴구균 감염질환은 건강한 사람이라면 항생제 치료 및 휴식만으로 치료될 수 있으나, 면역력이 약한 영유아와 노인에게는 치명적일 수 있어, 백신 접종을 통해 예방하는 것이 중요하다.

[0007] 폐렴구균 질환을 예방하기 위해, 폐렴구균의 협막다당류를 이용하여 다당류 백신 또는 다당류-접합체 백신을 제조하여 사용하고 있다. 다당류 백신은 노인 및 고위험 환자에서 폐렴구균 질환을 예방하는데 있어서 효과적인

것이 입증되었으나, 유아 및 소아에서는 다당류 백신의 유효성을 입증하지 못하였다. 반면, 다당류-접합체 백신은 유아 및 소아에서도 침습성 질환 및 중이염에 대해 면역원성이 높고 효과적인 것이 증명되었다(Whitney CG *et al.*, *N Engl J Med*, 348(18):1737-46, 2003).

[0009] 최근, 폐렴구균 다당류-접합체 백신의 침습성 질환 예방 효과를 높이기 위해 협막다당류 종류 및 함량을 증가시키는 방향으로 개발이 이루어지고 있다. 따라서 정확한 분석과 정량이 중요하고, 특히 추가되는 협막다당류가 다양해짐에 따라 적합한 분석법이 매우 중요하다.

[0011] 면역화학적 분석법은 항원-항체 간 특이적인 반응을 이용하는 분석법으로, 항원 또는 항체를 분석에 사용한다. 화학적 분석법과 비교해 특이성이 높은 장점이 있어 진단, 임상 시료의 분석, 생물학적 제제의 품질관리 등의 여러 목적으로 활용되고 있다. 면역화학적 분석법에는 효소면역정량법(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사능면역시험법(Radio immunoassay), 비탁측정법 (Rate Nephelometry) 등과 같이 다양한 종류가 있으며, 분석법에 따라 그 원리에는 약간의 차이가 있다.

[0013] 이러한 분석법은 항원-항체 간의 특이적인 반응을 이용하므로 다양한 항원이 존재하는 폐렴구균 다당류백신, 폐렴구균 접합백신, 또는 뇌수막구균 접합백신 등 다가백신의 품질관리에 사용되어 왔다. 폐렴구균 접합백신에 포함된 혈청형 별 항원(협막다당류)의 함량은 혈청형-특이적인 항혈청을 이용한 정량곡선을 구함으로써 측정할 수 있고, 이를 통해 항원함량이 완제품기준에 적합한지 판단한다. 그러나 항원의 구조가 매우 유사한 혈청형들의 경우, 항혈청의 교차반응으로 인해 정확성이 감소하는 문제가 발생한다. 예를 들어, 폐렴구균 혈청형 6A와 6B 협막다당류는 이를 구성하는 단당류의 종류가 같고 그 구조 또한 매우 유사하여 혈청형 6A 항혈청이 혈청형 6A 협막다당류 뿐만 아니라 혈청형 6B 협막다당류와도 교차반응성을 나타낸다. 이러한 항혈청의 교차반응성은 항원 정량법의 정확성을 저해하는 요소 중에 하나이며, 이는 백신 효능의 저하로 이어진다. 최근 들어 폐렴구균 접합백신은 침습성 폐렴구균 질환 예방 효과를 높이기 위해 함유 혈청형이 증가하는 방향으로 개발이 이루어지고 있으며, 이로 인해 항혈청의 교차반응성 또한 증가할 가능성이 높아지고 있다. 기존에 상업적으로 판매되고 있는 폐렴구균 항혈청이 있으나 혈청형에 따라 교차반응성을 나타내기도 한다. 따라서 항원 정량법의 정확성을 높이기 위해서는 교차반응성이 제거된 항원-특이적인 항혈청의 제조가 반드시 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) (Whitney CG et al., N Engl J Med, 348(18):1737-46, 2003).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 이에 본 발명자들은 다른 혈청형의 균체와는 교차반응을 나타내지 않으며 목적하는 특정 혈청형의 균체와 매우 높은 특이도를 나타내는 폐렴구균 항혈청을 제조하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 항혈청 제조에 이용된 혈청형의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 균체를 이용하여 상기 항혈청의 교차반응을 제거함으로써 특정 혈청형의 균체와 매우 높은 특이도를 나타내는 폐렴구균 항혈청을 제조할 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0018] 따라서, 본 발명의 목적은 (a) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 개체에 투여하는 단계; (b) 상기 개체로부터 혈청을 수득하는 단계; (c) 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 상기 혈청에 혼합하고 교차반응(cross-reactivity) 유무를 확인하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 목적은 상기 폐렴구균 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0024] 본 발명의 다른 목적은 상기 항혈청을 포함하는 폐렴구균 감염 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0026] 본 발명의 다른 목적은 상기 폐렴구균 항혈청을 포함하는 폐렴구균 항원 정량용 조성물을 제공하는 것이다.

[0028] 본 발명의 다른 목적은 (a) 폐렴구균 항원량이 특정된 표준시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; (b) 상기 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하여 표준곡선을 작성하는 단계; (c) 검출대상 시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서의 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하고 상기 표준곡선에 적용하여 항원량을 산출하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 항원 정량방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0030] 상기한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 개체에 투여하는 단계; (b) 상기 개체로부터 혈청을 수득하는 단계; (c) 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 상기 혈청에 혼합하고 교차반응(cross-reactivity) 유무를 확인하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법을 제공한다.

[0031]

[0032] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청을 제공한다.

[0034] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 폐렴구균 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 항혈청을 포함하는 폐렴구균 감염 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 폐렴구균 항혈청을 포함하는 폐렴구균 항원 정량용 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 폐렴구균 항원량이 특정된 표준시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; (b) 상기 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하여 표준곡선을 작성하는 단계; (c) 검출대상 시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서의 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하고 상기 표준곡선에 적용하여 항원량을 산출하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 항원 정량방법을 제공한다.

[0042] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0044] 본 발명은 (a) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 개체에 투여하는 단계; (b) 상기 개체로부터 혈청을 수득하는 단계; (c) 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 상기 혈청에 혼합하고 교차반응(cross-reactivity) 유무를 확인하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거하는 단계를 포함하는 폐렴구균 항혈청 제조방법을 제공한다.

[0046] 본 명세서에서 사용하는 용어 "항혈청"이란, 면역혈청으로도 불리며, 항체를 포함하는 혈청을 의미한다. 항혈청에는 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 면역글로불린들이 혼합된 형태의 항체 및 많은 종류의 다른 혈청 단백질을 포함하고 있다. 이때, 항체가 혈청에 포함되어 있는 경우에는 저온에서 유지하면 비교적 안정적이나, 정제하여 다른 혈청단백질을 제거한 경우 변성을 일으키기 쉽다. 따라서, 본 발명에서 상기 항혈청은 항체 이외에 다른 혈청 단백질들이 제거되지 않은 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 본 발명의 방법은 정제된 형태의 단일클론항체 또는 다클론항제 제조시에도 동일하게 적용이 될 수 있다.

[0048] 한편, 전술한 바와 같이 폐렴구균은 혈청학적 특성에 따라 현재까지 약 90종 이상의 혈청형이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 이들 혈청형에 따라 폐렴구균의 협막다당류는 그 종류가 조금씩 상이하다. 하지만, 유래가 되는 폐렴구균의 혈청형이 상이하다고 하더라도 협막다당류를 구성하는 단당류의 종류가 같고 그 구조 또한 매우 유사한 혈청형의 폐렴구균이 존재하기 때문에 특정 혈청형에 대한 항혈청으로 제조되었다고 하더라도 다른 혈청형의 폐렴구균 협막다당류와 반응을 일으킬 수 있다. 이와 같이, 목적하는 혈청형의 폐렴구균 이외에 다른 혈청형의 폐렴구균 협막다당류 등과 반응하는 것을 교차반응(cross-reactivity)라 하며, 이러한 교차반응이 완전히 제거되지 않은 항혈청은 그 유용성이 현저하게 낮고 이를 활용한 분석결과의 신뢰성을 낮추는 원인이 된다.

[0050] 본 발명의 상기 폐렴구균 항혈청 제조방법은 교차반응이 철저하게 제거되어 목적하는 혈청형의 폐렴구균에 매우 높은 특이도를 나타내는 항혈청을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 상기 본 발명의 항혈청 제조방법의 각 단계들을 이하 보다 구체적으로 설명한다.

[0054] **(a) 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 개체에 투여하는 단계;**

[0055] 상기 (a) 단계는 수득하고자 하는 혈청형의 폐렴구균을 개체에 투여하여 면역반응을 유도함으로써, 투여된 폐렴구균에 대한 항체가 동물의 혈액에서 생성될 수 있도록 유도하는 단계이다.

[0057] 본 명세서에서 사용하는 용어 "폐렴구균(*Streptococcal pneumoniae*)"이란, 락토바실러스목 연쇄상구균과에 속하는 그람양성균을 의미한다. 폐렴구균은 협막다당류(capsular polysaccharide; capsular PS)의 혈청학적 특성에 따라 약 90종 이상의 혈청형으로 분류되며, 본 발명에서 상기 폐렴구균은 당업계에서 현재까지 공지된 모든 종류의 혈청형의 폐렴구균 및 향후 새롭게 밝혀질 모든 종류의 혈청형의 폐렴구균으로부터 선택될 수 있다.

[0058] 바람직하게는, 상기 폐렴구균은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0060] 본 발명에서 상기 폐렴구균은 생균, 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 가장 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체일 수 있다.

[0062] 본 발명에서 상기 "불활성화(inactivated) 균체"란 죽은 균체, 즉 사균(死菌)과 동일한 의미로서, 불활성화의 다양한 물리적 및 화학적 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 보다 구체적으로 "불활성화"는 폐렴구균의 면역원성(immunogenicity)을 유지하면서 불활성화되거나, 죽이도록 복사선이 조사되거나 (자외선 (UV), X-선 방사선, 전자 빔 또는 감마 방사선), 가열되거나, 화학적으로 처리되는 등의 방법에 의해 유도될 수 있다.

[0063] 일 실시태양에서, 상기 폐렴구균은 불활성화제의 처리에 의해 불활성화될 수 있다. 적합한 불활성화제로는 베타-프로피오락톤, 바이너리 또는 베타- 또는 아세틸-에틸렌이민, 글루타르알데히드, 오존, 포르말린(포름알데히드) 등을 들 수 있다.

[0065] 본 발명에서 상기 "약독화"는 균체의 독성을 감소시킴을 의미한다. 본 발명에서, "약독화"는 "비독성"과 동의어이다. 본 발명에서, 약독화된 폐렴구균은 독성이 감소되어 임상적 징후를 유발하지 않지만 개체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 세균이고 상기 약독화 균주는 당업계에 통상적인 약독화 방법에 의할 수 있으며, 예를 들어 전자기 복사선의 조사, 가열, 약독화를 일으키는 화학물질의 처리, 박테리오파지, 백혈구 등을 이용하거나 유전공학적 기법으로 단일 또는 복수의 유전자를 결손 또는 손상시켜 병원성이 소실 또는 약화된 약독화 균주를 생산할 수 있다.

[0067] 상기 본 발명의 (a) 단계에서 폐렴구균은 개체에 투여되어 체액성 면역 반응이 유도되며, 그 결과 동물에게 항체를 생산시킬 수 있다. 당업계에서 개체에 균체를 접종하여 면역반응을 유도하는 방법은 잘 공지되어 있으며, 이들 공지된 방법이 본 발명에 그대로 적용이 될 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 개체는 그 종류가 특별히 제한되지 않으나 바람직하게는 포유류 또는 조류이다. 상기 포유류는 마우스, 래트, 토끼, 염소, 기니어피그, 소, 말, 개, 고양이, 염소, 양 또는 돼지일 수 있으며, 상기 조류는 닭, 오리 또는 칠면조일 수 있다.

[0071] **(b) 상기 개체로부터 혈청을 수득하는 단계;**

[0072] 본 발명의 항혈청 제조방법에서 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에 의해 면역반응이 유도된 동물로부터 혈액을 수득한 뒤, 혈청을 분리하는 단계이다.

[0074] 본 명세서에서 사용하는 용어 "혈청"이란 혈액의 구성성분 중 세포성분(적혈구, 백혈구, 혈소판)을 제거한 혈장에서 섬유소원을 제거한 것을 의미한다. 상기 혈청에는 다양한 단백질(albumin, globulin, fibronectin, fetuin, α2-macroglobulin, transferrin 등), 호르몬, 무기물질, 영양소, 대사물질 뿐만 아니라, 폐렴구균의 접종에 의해 생성된 항체가 포함이 되어 있다. 특히, 본 발명에서는 정제된 항원을 투여하여 동물에서 면역반응을 유도하는 것이 아니고, 특정 혈청형의 폐렴구균 균체를 동물에 투여하여 면역반응을 유도하기 때문에 투여된 폐렴구균에 대한 다클론항체(polyclonal antibody)가 상기 혈청에 포함이 되어 있다.

[0076] 상기 (a) 단계에서 폐렴구균을 `동물에 투여한 후 혈액을 수득하는 시점은 투여된 폐렴구균의 상태, 실험조건, 동물의 종류, 동물의 면역반응 정도 등에 따라 달라질 수 있으며, 통상의 기술자가 동물로부터 수득한 혈액에서 항체가(antibody titer)를 측정함으로써 채혈시점을 결정할 수 있다. 항체가를 측정한 결과 그 값이 너무 낮을 경우에는 폐렴구균을 추가로 접종하여 면역반응을 부스팅(boosting) 시킬 수도 있다. 바람직하게는, 동물로부터 수득한 혈청을 6배 희석하여 비탁분석법(nephelometry)으로 항체가(titer)를 분석하였을 경우, 그 반응값(Rate unit)이 1 ug/mL의 항원량에 대해 20 이상이고, 6 ug/mL의 항원량에 대해 150 이상일 때, 동물로부터 혈액을 수득하여 혈청을 분리할 수 있다.

[0077] 본 발명에서 상기 비탁분석법은 항원과 항체(검체)가 반응하여 일어나는 면역침강(immonoprecipitin)으로 인해 주사된 빛의 산란을 측정하는 방법으로, light scattering rate(rate unit)을 단위로 사용하며 시간에 따른 산

란광의 변화율을 나타내는 방법이다. 비탁분석법에서 항원-항체 반응은 빛이 통과하는 셀 내에서 이루어지며, 침강반응으로 형성된 항원-항체 복합체로 인해 통과하는 빛이 산란되게 된다. 산란광의 강도가 변화하는 정도는 생성된 항원-항체 복합체의 양에 비례하므로, 항체의 양을 일정하게 유지하며 항원의 양을 변화시키면 항원의 양에 따른 정량곡선을 얻을 수 있다. 반대로, 항원의 양을 일정하게 유지하며 항체의 양을 변화시키면 항체의 양에 대한 정량곡선을 얻을 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용하는 용어 "항체가"란, 폐렴구균 표준액에 대한 반응값이 기준을 만족할 때의 항혈청의 희석배수의 역수를 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서, 항혈청의 항체가는 비탁 분석기기의 적절한 파라미터 조건에서, 1.0 ㎍/㎖ 농도의 표준액과 6.0 ㎍/㎖ 농도의 표준액에 대한 반응값이 기준을 만족할 때, 즉 1 ug/mL의 항원량에 대해 20 이상이고, 6 ug/mL의 항원량에 대해 150 이상일 때 나타내는 항혈청의 희석배수의 역수로 정의하였다. 제조를 위한 항혈청의 항체가는 비탁 분석기기의 적절한 파라미터 조건에서 1.0 ㎍/㎖ 농도의 표준액과 6.0 ㎍/㎖ 농도의 표준액에 대한 반응값이 기준을 만족하며, 정량곡선의 결정계수(R^2)가 0.98 이상을 나타내는 제조 항혈청의 희석배수 역수로 정의될 수도 있다.

[0081] 본 명세서에서 사용하는 용어 “표준액”이란, 특정 혈청형의 폐렴구균에서 유래한 협막다당류가 소정의 농도를 갖도록, 그 농도를 알고 있는 표준물질을 버퍼로 희석한 일련의 표준용액을 의미한다. 예를 들면, 상기 일련의 표준용액은 1.0 ㎍/㎖ 내지 10.0 ㎍/㎖, 예컨대 1.0 ㎍/㎖, 2.0 ㎍/㎖, 3.0 ㎍/㎖, 4.0 ㎍/㎖, 5.0 ㎍/㎖, 6.0 ㎍/㎖, 7.0 ㎍/㎖, 8.0 ㎍/㎖, 9.0 ㎍/㎖, 및 10.0 ㎍/㎖의 협막다당류 농도 범위를 포함할 수 있다. 이론적 표준용액 농도는 일련의 각 표준용액 농도의 반복세트의 측정된 평균 반응값에 대해 플로팅(plotting)하고, 기울기, y-절편 및 결정계수(R^2)는 선형 회귀 분석에 의해 계산하여 검량곡선을 통해 산출할 수 있다.

[0083] **(c) 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균을 상기 혈청에 혼합하고 교차반응(cross-reactivity) 유무를 확인하는 단계;**

[0084] 본 발명의 항혈청 제조방법에서 상기 (c) 단계는 상기 (b) 단계에서 수득한 혈청에, 상기 (a) 단계에서의 혈청형과는 상이한 혈청형의 폐렴구균을 혼합하여 항원-항체 반응에 의한 응집반응을 유도하여 교차반응이 일어나는지 여부를 확인하는 단계이다.

[0086] 상기 "(a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균"은 항혈청을 제조하기 위해 상기 (a) 단계에서 개체에 투여한 혈청형의 폐렴구균을 제외한 모든 혈청형의 폐렴구균일 수 있다.

[0087] 일례로서, 본 발명의 항혈청 제조방법을 이용하여 혈청형 10A 폐렴구균에 대한 항혈청을 제조하는 경우, 상기 "(a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형"은 혈청형 10A를 제외한 모든 혈청형, 바람직하게는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군에서 선택되는 혈청형, 보다 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군에서 선택되는 혈청형을 의미하는 것일 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 10A를 제외한 폐렴구균 혈청형이란, i) 혈청형 1, 3, 4, ii) 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 9V, 11A 또는 iii) 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 일 수 있다.

[0089] 일 실시태양에서, 본 발명의 상기 (c) 단계에서는 상기 (a) 단계의 폐렴구균과는 혈청형이 상이한 어느 한 종류의 혈청형의 폐렴구균 균체만이 포함된 용액(이하 "단가 균체액"이라 함)을 혼합할 수 있다. 이 경우, 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과 혈청형이 상이한 모든 혈청형의 단가 균체액을 순차적으로 상기 항혈청에 혼합함으로써, 어떤 혈청형의 폐렴구균과 교차반응이 나타나는지 확인할 수 있다.

[0090] 일례로서, 상기 (a) 단계에서 혈청형 10A 폐렴구균을 동물에 투여하여 혈청을 수득한 경우, 상기 (c) 단계에서는 혈청형 10A를 제외한 나머지 혈청형의 단가 균체액을 순차적으로 상기 혈청에 혼합함으로써 어떤 혈청형에서 교차반응이 나타나는지를 확인할 수 있다. 보다 구체적으로, 혈청형 10A를 제외한 모든 혈청형의 폐렴구균 단가

균체액을, 바람직하게는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균 단가 균체액을, 보다 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균 단가 균체액을 순차적으로 상기 혈청에 혼합함으로써 어떤 혈청형의 폐렴구균과 교차반응이 나타나는지를 확인할 수 있다.

[0092] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 상기 (c) 단계에서는 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과는 혈청형이 상이한 두 종류 이상의 혈청형의 폐렴구균 균체가 포함된 용액(이하 "다가 균체액"이라 함)을 혼합할 수 있다. 이 경우, 최종적으로는 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균과는 혈청형이 상이한 모든 혈청형의 폐렴구균과 적어도 한 번씩은 상기 혈청이 혼합되는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균 중에서 상기 (a) 단계에서의 혈청형만이 제외된 균체가 모두 포함된 다가 균체액을, 보다 더 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균 중에서 상기 (a) 단계에서의 혈청형만이 제외된 균체가 모두 포함된 다가 균체액을 상기 혈청과 혼합하여 교차반응이 일어나는지 여부를 확인할 수 있다.

[0093] 한편, 이와 같이 2가 이상의 다가 균체액을 상기 혈청에 혼합하여 교차반응 유무를 확인한 결과 교차반응이 나타나지 않은 경우에는, 상기 다가 균체액에 포함된 혈청형의 폐렴구균 협막다당을 항원으로 인식하는 항체가 상기 혈청 내에 포함되어 있지 않은 것으로 판단할 수 있다.

[0094] 반대로, 교차반응이 나타난 경우에는 상기 다가 균체액에 포함된 혈청형의 폐렴구균 협막다당을 항원으로 인식하는 항체가 상기 혈청 내에 포함이 되어 있는 것으로 판단할 수 있으며, 교차반응을 일으킨 폐렴구균의 혈청형을 구체적으로 확인하고자 하는 경우에는 상기 다가 균체액에 포함된 혈청형의 폐렴구균 각각에 대한 단가 균체액을 상기 혈청에 순차적으로 혼합함으로써 교차반응을 일으킨 폐렴구균 혈청형을 확인해 볼 수 있다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는 용어 상기 "단가 균체액"은 어느 한 종류의 혈청형의 폐렴구균이 포함된 물질을 의미한다. 예를 들어, 폐렴구균 10A가 포함된 용액을 "10A 단가 균체액"이라 정의할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 상기 특정 혈청형의 폐렴구균 협막다당류가 6.6 ug/mL으로 포함된 단가 균체액을 "단가표준원액"으로 정의하였다. 상기 단가 균체액에 포함된 폐렴구균은 생균, 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 가장 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체일 수 있다.

[0098] 본 명세서에서 사용되는 용어 상기 "다가 균체액"은 두 종류 이상의 혈청형의 폐렴구균이 포함된 물질을 의미한다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균이 포함된 물질은 "25가 균체액"이라 정의할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 각 혈청형의 폐렴구균 협막다당류가 6.6 ug/mL씩 포함된 다가 균체액을 "다가표준원액"으로 정의하였다. 상기 다가 균체액에 포함된 폐렴구균은 생균, 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체 또는 약독화된(live attenuated) 균체일 수 있으며, 가장 바람직하게는 불활성화(inactivated) 균체일 수 있다.

[0100] 본 명세서에서 사용되는 용어 상기 "교차반응(cross-reactivity)"이란 항원-항체 반응에 따른 응집반응을 의미하는 것으로서, 상기 (b) 단계에서 수득한 특정 혈청형의 폐렴구균에 대한 항혈청 내에 존재하는 항체가 이와 상이한 혈청형의 폐렴구균 협막다당을 항원으로 인식하여 결합하는 경우 항원-항체 반응에 의한 응집반응이 일어나는 것을 의미한다. 상기 교차반응은 육안으로도 확인이 가능하며, 바람직하게는 비탁분석법을 통해 확인할 수 있다.

[0102] 일 실시태양에서, 상기 "(a) 단계에서의 폐렴구균과 상이한 혈청형의 폐렴구균"은 불활성화(inactivated) 또는 약독화(live attenuated) 폐렴구균일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0104] **(d) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 교차반응에 의한 응집물을 제거하는 단계;**

[0105] 본 발명의 항혈청 제조방법에서 상기 (d) 단계는 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 경우 이를 제거함으로써 특정 혈청형에 대한 특이도가 매우 높은 항혈청을 완성하는 단계이다.

[0107] 본 발명의 상기 (d) 단계에서 교차반응을 제거한다는 것은 혈청 내에 포함된 항체들 중에서 상기 (a) 단계에서의 폐렴구균 혈청형 이외에 다른 혈청형의 폐렴구균 협막다당을 항원으로 인식하는 항체를 제거한다는 것을 의미한다.

[0109] 상기 (b) 단계에서 수득된 혈청에 폐렴구균 단가 균체액 또는 다가 균체액을 혼합한 결과 교차반응, 즉 응집반응이 일어난 경우에는 응집물(agglutination)이 가라앉게 된다. 이러한 응집물을 원심분리를 통해 완전히 가라앉힌 후 상등액을 취하는 방식 또는 여과를 통해 응집물을 제거하는 방식으로 교차반응이 제거된 항혈청을 수득할 수 있다.

[0111] 일 실시태양에서, 상기 (c) 단계에서 각 혈청형의 폐렴구균 단가 균체액을 순차적으로 상기 혈청에 혼합하여 교차반응 유무를 확인한 경우에는 교차반응이 나타난 혈청형의 폐렴구균 단가 균체액을 다량 혼합하여 응집물을 완전히 제거한 후, 나머지 혈청형의 폐렴구균 단가 균체액을 순차적으로 혼합하여 추가적인 교차반응이 일어나는지 여부를 확인함으로써 모든 혈청형에 대한 교차반응을 완전히 제거할 수 있다.

[0113] 또 다른 일 실시태양에서, 상기 (c) 단계에서 2가 이상의 다가 균체액을 상기 혈청에 혼합하여 교차반응 유무를 확인한 경우에는 교차반응이 나타난 다가 균체액을 과량 혼합하여 응집물을 완전히 제거할 수도 있으며, 또는 단가 균체액을 이용하여 교차반응이 나타난 혈청형을 확인한 후 해당 혈청형의 단가 균체액을 과량 혼합하여 응집물을 완전히 제거할 수도 있다.

[0115] 또 다른 일 실시태양에서, 상기 교차반응을 제거하는 과정은 반복적으로 수행이 될 수 있다. 구체적으로, 교차반응이 확인된 혈청형에 대한 단가 균체액을 과량 혼합하여 응집물을 원심분리 또는 여과를 통해 제거한 후, 다시 동일한 단가 균체액을 혼합하여 응집물을 반복적으로 제거할 수 있다.

[0117] 한편, 상기 (d) 단계 이후에 (e) 상기 (d) 단계에서 응집물이 제거된 항혈청을 상기 (c) 단계에서의 폐렴구균과 혼합한 후 비탁분석을 수행하여 교차반응 제거여부를 확인하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0119] 구체적으로, 단가 또는 다가 균체액을 혈청에 혼합한 후 비탁분석법을 통해 해당 혈청을 분석하고, 그 값을 동일한 방법으로 측정한 공시료(Blank)의 반응값 또는 단가 균체액 농도 1.0 ㎍/㎖의 반응값과 비교하여 교차반응이 완전히 제거되었는지 여부를 판단할 수 있다.

[0120] 예를 들어, 항혈청의 비탁분석값이 "공시료의 평균 비탁분석값" 미만, "공시료의 평균 비탁분석값+(표준편차)"값 미만, "공시료의 평균 비탁분석값 +(2*표준편차)"값 미만, "공시료의 평균 비탁분석값+(3*표준편차)"값 미만 또는 단가 균체액 농도 1.0 ㎍/㎖의 반응값 미만인 경우 교차반응이 제거되었다고 판단할 수 있다.

[0121] 또는, 상기 비탁분석 결과가 하기 (i) 및 (ii) 중 어느 하나 이상을 만족할 때까지, 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 혈청형의 폐렴구균(단가 균체액 또는 다가 균체액)을 반복적으로 상기 혈청에 혼합하여 응집물을 제거하는 과정을 수행할 수 있다:

[0122] (i) 상기 (c) 단계에서 교차반응이 확인된 혈청형의 폐렴구균 균체 1.0㎍/mL의 비탁분석값 미만

[0123] (ii) 공시료(blank)의 평균 비탁분석값 + (3*표준편차) 미만

[0125] 폐렴구균을 개체에 투여하여 얻어지는 항혈청의 경우에는 폐렴구균 협막다당류에 대한 항체뿐만 아니라, 모든 혈청형의 폐렴구균에 존재하는 세포벽 다당류(cell wall phlysaccharide)나 협막단백(capsular protein)들에 대한 항체도 함께 포함이 되어 있다. 그런데, 상기 (a) 내지 (d) 단계를 포함하는 본 발명의 항혈청 제조방법은 폐렴구균, 불활성화 폐렴구균 또는 약독화 폐렴구균 자체를 사용하여 항혈청에서의 교차반응을 제거하기 때문에 폐렴구균의 협막 다당류에 교차반응을 보이는 항체뿐만 아니라, 상기 세포벽 다당류나 협막단백에 대하여 교차반응을 나타내는 항체도 제거할 수 있어서 특정 혈청형의 항혈청의 특이성을 현저히 향상시킬 수 있다.

[0126] 또한, 교차반응을 제거하는 단계에서 별도의 복잡한 절차나 장비의 도움 없이 원심분리 또는 여과와 같은 매우 간단한 방법을 통해 교차반응을 철저하게 제거할 수 있기 때문에 제조 공정 측면에서도 매우 큰 이점이 있다.

[0128] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청을 제공한다.

[0130] 본 발명에서 상기 항혈청은 바람직하게는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 으로 이루어진 군에서 선택되는 폐렴구균에 대한 항혈청일 수 있으며, 더 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 폐렴구균으로 이루어진 군에서 선택되는 폐렴구균에 대한 항혈청일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 교차반응이 제거된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F 폐렴구균에 대한 항혈청을 제조하였다.

[0131] 예를 들면, 교차반응이 제거된 혈청형 1 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0132] 교차반응이 제거된 혈청형 3 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0133] 교차반응이 제거된 혈청형 4 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0134] 교차반응이 제거된 혈청형 5 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0135] 교차반응이 제거된 혈청형 6A 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0136] 교차반응이 제거된 혈청형 6B 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0137] 교차반응이 제거된 혈청형 7F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0138] 또한, 교차반응이 제거된 혈청형 8 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0139] 교차반응이 제거된 혈청형 9N 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0140] 교차반응이 제거된 혈청형 9V 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0141] 교차반응이 제거된 혈청형 10A 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0142] 교차반응이 제거된 혈청형 11A 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V,

10A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0143] 교차반응이 제거된 혈청형 12F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0144] 교차반응이 제거된 혈청형 14 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0145] 또한, 교차반응이 제거된 혈청형 15B 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0146] 교차반응이 제거된 혈청형 18C 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0147] 교차반응이 제거된 혈청형 19A 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19F, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0148] 교차반응이 제거된 혈청형 19F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 22F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0149] 교차반응이 제거된 혈청형 22F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 23F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0150] 교차반응이 제거된 혈청형 23F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F 또는 33F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0151] 교차반응이 제거된 혈청형 33F 폐렴구균에 대한 항혈청의 경우, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F 또는 23F의 폐렴구균과의 교차반응이 제거된 것일 수 있다.

[0152] 상기 예시는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 이에 제한되는 것은 아니다.

[0154] 상기 교차반응이 제거된 항혈청은 항원으로서 작용한 혈청형의 폐렴구균에 대해 특이적으로 결합하면서 다른 혈청형의 폐렴구균에는 반응하지 않는다. 따라서, 상기 교차반응이 제거된 항혈청은 혈청형별 폐렴구균 균체를 정량하는 분석법에 사용할 경우, 분석법의 정확성을 높일 수 있다.

[0156] 또한, 상기 교차반응이 제거된 항혈청은 항원으로서 작용한 폐렴구균의 균체 내에 존재하는 에프토프에 대한 항체들 중 다른 혈청형의 폐렴구균의 균체 내에 존재하는 에프토프와 교차반응이 일어나지 않는 항체들을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 교차반응이 제거된 항혈청은 항원으로서 작용한 폐렴구균의 균체 내에 존재하는 협막다당류에 대한 항체들 중 다른 혈청형의 폐렴구균 내에 존재하는 협막다당류와 교차반응이 일어나지 않는 항체를 포함할 수 있다.

[0158] 본 발명은 또한 상기 폐렴구균 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0160] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 특정 혈청형의 폐렴구균에 대한 항체가 다량 포함되어 있어 폐렴구균의 감염 질환, 바람직하게는 폐렴구균의 감염에 의한 질환의 초기에 혈청요법(serotherapy)으로 활용이 될 수 있다.

[0162] 특히, 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분이 되는 상기 항혈청은 특정 혈청형에 특이적인 항혈청이므로 환자에게 감염된 폐렴구균의 혈청형이 정확히 확인이 된 경우에 더욱 유용하게 활용이 될 수 있다.

[0164] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 폐렴구균 항혈청을 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되

는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

[0166] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0168] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[0170] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

[0172] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈,메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0174] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA,1995)에 기재되어 있다.

[0176] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1㎏ 당 약 0.01㎍ 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1㎍ 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0178] 본 발명에서 상기 폐렴구균 감염 질환은 폐렴, 균혈증, 수막염, 중이염, 패혈증 또는 부비동염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0180] 본 발명은 또한 상기 폐렴구균 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 감염 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0182] 본 발명에 따른 폐렴구균 감염질환 진단용 조성물은 특정 혈청형의 폐렴구균의 협막다당류와 결합하는 항혈청을 포함하는데, 상기 항혈청과 특정 혈청형의 폐렴구균과의 결합여부를 확인하여 폐렴구균 감염을 진단할 수 있다. 이때, 항혈청과 특정 혈청형의 폐렴구균의 협막다당류 결합여부는 비탁분석법(Nephelometry)을 통해 확인할 수 있다.

[0184] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 특정 혈청형에 대한 특이도가 매우 높은 항혈청을 주요성분으로 포함하므로, 감염질환의 원인이 되는 폐렴구균의 혈청형을 정확하게 판별할 수 있어 정확한 진단이 가능할 뿐만 아니라, 이를 통해 감염 질환의 치료제 선택 등에 유용한 정보를 제공할 수 있다는 측면에서 매우 유리하다.

[0186] 본 발명의 상기 진단용 조성물은 키트의 형태로 제공이 될 수도 있다. 상기 키트에는 항혈청과 결합한 폐렴구균 협막다당의 혈청형을 확인하는데 필요한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 또는 검출 장치가 포함될 수도 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 폐렴구균 감염질환 진단용 키트는 검출 가능한 형광을 발생시키는 형광물질이 결합된 항혈청과 상기 항혈청으로부터 발생되는 형광을 검출할 수 있는 검출장치를 포함할 수 있다. 또한, 상기 검출장치에서 측정된 형광값을 보정하기 위한 보정수단을 추가로 포함할 수도 있다.

[0188] 상기 폐렴구균 감염 질환은 상술한 바와 같다.

[0190] 본 발명은 또한 상기 항혈청을 유효성분으로 포함하는 폐렴구균 항원 정량용 조성물을 제공한다.

[0192] 상기 폐렴구균 항원 정량용 조성물은 다양한 항원이 한 샘플 내에 존재하는 폐렴구균 다당류 백신, 폐렴구균 접합 백신, 또는 뇌수막구균 접합 백신 등의 품질관리에 사용될 수 있다.

[0193] 즉, 본 발명의 항원 정량용 조성물을 백신 등의 검체와 반응시킨 후 응집반응의 정도를 비탁분석법을 통해 분석함으로써, 해당 검체에 포함되어 있는 항원의 함량을 정확하게 측정하고 각 백신의 완제품이 기준에 적합한지를 확인할 수 있다.

[0195] 본 발명은 또한 (a) 폐렴구균 항원량이 특정된 표준시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; (b) 상기 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하여 표준곡선을 작성하는 단계; (c) 검출대상 시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서의 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하고 상기 표준곡선에 적용하여 항원량을 산출하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 항원 정량방법을 제공한다.

[0197] **(a) 폐렴구균 항원량이 특정된 표준시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계;**

[0198] 상기 (a) 단계에서 표준시료란 검출하고자 하는 혈청형의 폐렴구균 항원량이 정확하게 특정이 되어 있는 시료를 의미하는 것으로서, 상업적으로 이용가능한 것을 구매하여 이용하거나 또는 다양한 방법의 정량분석을 통해 항원량이 정확하게 확인된 물질을 이용할 수 있다.

[0200] 상기 항혈청이란 전술한 본 발명의 방법에 따라 제조된 것으로서 다른 혈청형의 폐렴구균과 교차반응이 제거된 항혈청을 의미한다. 또한, 상기 표준시료에 포함되어 있는 항원의 유래가 되는 폐렴구균의 혈청형과 동일한 혈청형의 폐렴구균 항혈청을 의미한다.

[0202] **(b) 상기 반응에 따른 시료의 탁도를 분석하여 표준곡선을 작성하는 단계;**

[0203] 상기 (a) 단계에서 표준시료와 상기 항혈청을 반응시키면 항원-항체 반응이 일어나 응집이 발생하며, 이러한 응집에 의해 시료가 탁해지는 변화가 나타난다. 항원-항체 반응에 따른 응집은 시료에 포함되어 있는 항원 및 항체의 반응량에 따라 변화가 되기 때문에, 시료의 탁도와 표준시료에 포함된 항원량의 상관관계 분석을 통해 (항원량-탁도)의 정량적인 관계를 나타내는 표준곡선을 작성할 수 있다.

[0205] 본 발명에서 상기 표준곡선은 당업계에서 정량분석을 위해 이용되는 통상적인 표준곡선 작성법이 동일하게 적용이 될 수 있으며, 예를 들어 항원량이 특정된 표준시료를 1 내지 10 구간의 농도로, 바람직하게는 3 내지 8 구간의 농도로, 보다 더 바람직하게는 4 내지 7 구간의 농도로 희석하고 이들 각 농도의 표준시료와 상기 항혈청과의 반응에 따른 탁도를 분석함으로써 (항원량-탁도)의 정량적인 관계를 나타내는 표준곡선을 작성할 수 있다.

[0207] 본 발명의 항원 정량방법에서 상기 표준곡선이 정확하게 작성이 되지 않을 경우에는 이후 (c) 및 (d) 단계에서 검출대상 시료에 포함된 항원량을 정확하게 산출할 수 없다. 따라서, 상기 (a) 및 (b) 단계에서 표준곡선의 정확도에 영향을 미칠 수 있는 인자들을 명확히 한 후, 반복적인 실험을 통해 최적의 조건을 설정하는 것이 매우 중요하다. 예를 들어, 상기 표준곡선의 정확도에 영향을 미칠 수 있는 인자들이란 표준시료의 농도구간, 실험에 사용이 되는 버퍼의 양, 항혈청의 항체가(titer), 항혈청의 희석배수, 항원-항체 반응시간, 반응온도 등을 들 수 있다.

[0209] 상기 (b) 단계에서 탁도를 분석하는 방법은 특별히 제한되는 것은 아니며 당업계에서 시료의 탁도를 분석하기 위하여 현재 사용되고 있는 방법 또는 장래 새롭게 개발되는 방법이 모두 본 발명의 상기 (b) 단계에 적용이 될 수 있을 것임은 통상의 기술자에게 자명하다. 상기 탁도를 분석하는 방법의 비제한적인 예시로는 흡광도, 투과율 또는 비탁분석 등이 있으며, 바람직하게는 비탁분석일 수 있다.

[0211] **(c) 검출대상 시료와 상기 본 발명에 따른 폐렴구균 항혈청을 반응시키는 단계;**

[0212] 본 발명에서 상기 (c) 단계는 폐렴구균의 항원이 포함되어 있거나 또는 포함되어 있다고 의심되는 검출대상 시료에 폐렴구균 항혈청을 반응시켜 항원-항체 응집반응을 유도하는 단계이다.

[0214] 상기 (c) 단계에서 폐렴구균 항혈청은 상기 (a) 단계에서의 항혈청과 동일한 항혈청이며, 상기 검출대상 시료에 항혈청의 혈청형과 동일한 혈청형의 폐렴구균 또는 이의 항원 단백질이 존재할 경우 항원-항체 응집반응에 의해 상기 검출대상시료의 탁도가 변화한다.

[0216] 이 때, 상기 (c) 단계에서 검출대상 시료와 항혈청을 반응시키는 조건들은 상기 (a) 단계에서 표준시료와 항혈청을 반응시키는 조건과 동일한 것이 바람직하다.

[0218] 본 발명에서 상기 검출대상 시료는 검출하고자 하는 혈청형의 폐렴구균 또는 이의 항원이 포함되어 있거나 또는 포함되어 있다고 의심되는 시료를 의미하며, 그 범위가 특별히 제한되는 것은 아니나 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 활액, 뇨, 객담, 림프액, 세포간액 등과 같은 생물학적 시료 또는 백신 조성물일 수 있다.

[0219] 상기 검출대상 시료가 개체로부터 유래한 생물학적 시료인 경우에는 항원 정량을 통해 감염의 진단, 예후 예측, 치료 전략 설정 등이 가능할 수 있으며, 상기 검출대상 시료가 백신 조성물인 경우에는 백신에 포함된 항원의

함량을 정확하게 분석함으로써 각 백신의 완제품이 기준에 적합한지를 확인할 수 있다.

[0221] **(d) 상기 (c) 단계에서의 반응에 따른 탁도를 분석하고 상기 표준곡선에 적용하여 항원량을 산출하는 단계;**

[0222] 상기 (d) 단계는 상기 검출대상 시료에 포함된 항원량을 상기 (b) 단계에서 작성된 표준곡선에 적용하여 산출하는 단계이다.

[0224] 상기 (d) 단계에서 탁도를 분석하는 방법은 상기 (b) 단계에서 설명한 바가 동일하게 적용이 될 수 있다.

[0226] 검출대상 시료와 항혈청과의 반응에 따른 탁도를 상기 (b) 단계에서 작성한 표준곡선에 대입함으로써 항원량을 산출하는 방법은 표준곡선의 형식에 따라 통상의 기술자가 용이하게 적용할 수 있다.

[0228] 이상 설명한 본 발명의 항원 정량방법은 교차반응이 제거된 본 발명의 항혈청을 이용함으로써, 특히 다양한 혈청형의 폐렴구균이 혼합되어 존재하는 생물학적 시료 또는 다가 백신 조성물에서 목적하는 혈청형의 폐렴구균을 매우 높은 정확도로 정량할 수 있다는 장점이 있다.

발명의 효과

[0230] 본 발명의 방법에 따라 제조된 폐렴구균 항혈청은 구조가 유사한 협막다당류를 발현하는 혈청형의 폐렴구균과의 교차반응이 제거되어 특정 혈청형에 대한 특이성이 매우 높다. 따라서, 폐렴구균 협막 다당류의 정확한 함량 측정이 요구되는 관련 기술분야에서 매우 유용하게 활용이 될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0232] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0234] **실시예 1. 폐렴구균 균체백신 제조**

[0235] 폐렴구균 배양은 당업자에게 공지된 방법에 의해서 수행하였다. 혈청형 별(혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F) 폐렴구균 균주는 ATCC, JCM, KCCM 등의 수탁기관이나 학교, 기관 등으로부터 입수하였다. 협막과 비운동성, 그람 양성, 란셋 모양의(lancet-shaped) 쌍구균 및 혈액한천배지에서 알파용혈 현상으로 폐렴구균을 동정하였다. 혈청형은 특정 항혈청을 이용한 협막팽화시험(Quellung test)을 이용하여 확인하였다.

[0236] 균주를 증대시키고 동물성 기원의 성분을 제거하기 위해, 원종균(seed stock)을 F1, F2 및 F3 세대 배양하였다. 또한, 원종균을 추가적으로 2 세대 더 배양하였다. F3 바이알로부터 추가적인 제1세대는 배양하였고, 후속 세대는 추가적인 제1세대의 바이알로부터 배양하였다. 냉동보존제로서 합성 글리세롤과 함께 종균 바이알을 -70℃ 이하 온도에서 냉동보관하였다. 균주은행 제조를 위하여, 모든 배양물을 대두-기제 배지에서 증식시켰다. 냉동시키기 전에, 원심분리를 통해 균주를 농축시키고 사용된 배지를 제거한 후, 합성 글리세롤을 함유하는 새로운 배지에 균주 펠렛을 재현탁시켰다.

[0237] 상기 각 혈청형의 균체백신 제조용 균주를 pH 7.0±8.2(단, 혈청형 4, 9N, 9V, 12F는 pH 8.1±0.1, 혈청형 14는 pH 7.5±0.1)의 대두-기제 배지를 함유하는 종균 플라스크에 접종하였다. 교반하지 않으면서 36±2℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 흡광도(O.D.600)가 0.5 이상이 될 때까지 10 내지 12 시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 검경을 통해 오염 여부를 확인하였다. 그 후, 종균 플라스크를 사용하여 대두-기제 배지를 함유하는 배양 발효기에 접종하였다. 3 N 농도의 NaOH를 사용하여 배양액의 pH를 유지하였으며, 폐렴구균의 혈청형에 따라 흡광도

($O.D._{600}$)가 0.6 내지 1.0이 되도록 4 내지 12시간 동안 배양하였다.

[0238] 최종 농도가 0.5 내지 2 %(v/v) 가 되도록 37 %(v/v) 포름알데히드를 첨가하고 30분 동안 균질화시킨 후, 상온에서 하룻밤 동안 불활화를 진행하였다. 불활화시킨 배양액을 4℃의 온도에서 30분 동안 원심분리하였다. 단, 혈청형 3은 40분 동안 원심분리하였다. 그 후, 상등액을 버리고 펠렛을 회수한 후, Sorensen Buffer(인산 완충액, 포름알데히드)를 넣어 현탁하여 2 내지 8℃ 온도에 보관하였다.

[0239] 불활화된 균체의 현탁액을 0.9%(w/v) 염화나트륨 혹은 주사용수로 적절하게 희석하여 상기 각 혈청형의 균체백신 원액으로 하였으며, 2 내지 8℃ 온도에서 보관하였다. 균체백신 원액의 흡광도(O.D.600) 값과 용량을 기록하고, 불활화 시험, 그람 염색 및 협막팽화 시험을 실시하였다.

[0240] 동물 접종용 균체백신은 균체백신 원액을 흡광도($O.D._{600}$)가 4.0 이하가 되도록 Serensen Buffer로 희석하여 준비하였으며, 2 내지 8℃ 온도에 보관하였다.

[0241] 또한, 항혈청의 교차반응을 제거하기 위한 각 혈청형별 흡착용 균체백신은 균체백신 원액을 흡광도(O.D.600)가 4.0 이상이 되도록 Serensen Buffer로 희석하여 준비하였으며, 2 내지 8℃ 온도에서 보관하였다.

[0243] **실시예 2. 항혈청 항체가 및 교차반응 분석을 위한 표준액 준비**

[0244] 항혈청의 항체가(Titer)와 교차반응 유무를 확인하기 위해 다가표준원액과 다가표준액을 준비하였다. 다가표준원액은 농도를 알고 있는 단가원액을 희석 또는 혼합하여 제조하였으며, 다가표준액은 다가표준원액을 희석하여 준비하였다. 상기 단가원액이란 폐렴구균의 각 혈청형 별로 생산된 monovalent bulk를 의미한다.

[0245] 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 각각의 단가원액을 혈청형 별 협막다당류가 6.6 ㎍/㎖의 농도로 포함되도록 혼합하여 다가(21가)표준원액을 제조하였다. 100 ㎖을 기준으로 필요한 각 혈청형별 단가원액의 양을 계산하고 플라스틱 용기에 넣은 후, 총 부피가 100 ㎖이 되도록 검체 희석액(0.85%(v/v) 염화나트륨/5 mM 숙신산/0.02%(v/v) 폴리소르베이트80/ 1 mg/㎖ 알루미늄 포스페이트, pH 5.8)을 첨가하였다. 그 후, 21가 표준용액을 실온에서 2시간 이상 천천히 교반하여 혼합한 후 냉장보관하였다.

[0247] 또한, 각 혈청형별 단가원액을 협막다당류의 농도가 6.6 ㎍/㎖이 되도록 희석하여 총 21종의 단가표준원액을 각각 제조하였다. 구체적으로, 100 ㎖을 기준으로 필요한 단가원액의 양을 계산하고 플라스틱 용기에 넣은 후, 총 부피가 100 ㎖이 되도록 검체 희석액을 첨가하였다. 실온에서 2시간 이상 천천히 교반하여 혼합한 후 냉장보관하였다.

[0248] 단가표준액 및 다가표준액은 협막다당류의 농도가 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 및 6.0 ㎍/㎖이 되도록 단가표준원액 및 다가표준원액을 희석하여 준비하였다. 각 표준액은 희석액과 표준원액을 첨가하고 혼합한 후, 수산화나트륨 용액과 시트르산을 차례로 가하고 혼합하여 표준액으로 하였다.

[0250] **실시예 3. 폐렴구균 항혈청 제조**

[0251] 각각의 혈청형마다 2 또는 3마리의 뉴질랜드 화이트(NewZealand White) 토끼(Female, 3 내지 4kg)를 사용하여 면역화 시켰다. 실시예 1.에서 제조한 동물 접종용 균체백신을 토끼에 투여하기 전에 37℃ 온도에서 10분 동안 가온하였다. 가온된 균체백신은 귀정맥으로 투여하였으며, 백신 투여 전 귀정맥에서 2 ㎖을 채혈하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 1시간 동안 정치한 후, 다시 4℃ 온도에서 하룻밤 동안 정치하였다. 다음날, 채혈한 혈액을 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 항체가(Titer)는 혈청을 희석액 1(Diluent 1, Beckman Coulter)로 1:3, 1:6, 1:10, 1:30 등의 순으로 희석하여 비탁측정법으로 분석하였다. 최종 면역일로부터 6 내지 7일 경과 후, 6배 희석한 혈청의 반응 값(Rate unit)이 20 내지 150일 때 심장에서 최종 채혈하였다.

[0252] 면역 일정 및 투여 용량을 하기 표 1에 나타내었다. 4주 이후에는 면역 일정과 투여량이 동일하다.

표 1

[0254]

Weeks	투여용량 (㎖/Head)						
	월요일	화요일	수요일	목요일	금요일	토요일	일요일
1	0.1	0.2	0.2	Rest	Rest	Rest	Rest
2	0.2	0.3	0.3	Rest	Rest	Rest	Rest
3	0.5	0.5	0.7	Rest	Rest	Rest	Rest
4	시혈/1.0	1.0	1.0	Rest	Rest	Rest	Rest

[0255] 각각의 토끼의 심장에서 최종 채혈한 혈액을 상온에서 1시간 동안 정치한 후, 다시 4℃ 온도에서 하룻밤 동안 정치하였다. 다음날, 채혈한 혈액을 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 최종 채혈한 혈청의 용량을 기록하고 56℃ 온도에서 30분 동안 열처리한 후, 실온에 정치하여 온도를 떨어뜨렸다. 열처리한 혈청의 일부를 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 최종 채혈 혈청의 항체가와 교차반응 여부는 상기 실시예 2에서 제조한 각 혈청형별 단가표준원액(6.6 ug/mL)에 대하여 비탁측정법으로 분석하였다.

[0256] 구체적으로, 분리된 혈청의 항체가는 종래 공지된 방법에 따라 해당 혈청형의 단가표준원액을 이용하여 비탁측정법으로 분석하였다.

[0257] 또한, 제조된 각 혈청형별 폐렴구균 항혈청의 교차반응 유무를 확인하기 위해서, 항혈청을 제조하기 위해 동물에 투여한 혈청형의 폐렴구균을 제외한 나머지 20종의 단가표준원액을 순차적으로 각 혈청에 혼합하고, 항원-항체 응집반응이 일어나는지 여부를 비탁측정법으로 분석하였다.

[0258] 교차반응이 나타나지 않은 경우, 항체가가 1 이상인 토끼의 혈청들을 합치고 0.0975 %(w/v)의 농도로 아지드화나트륨(NaN_3)를 첨가하였다. 그 후, 실온에서 40 내지 80 rpm 조건으로 10 내지 15분 동안 교반한 후, 0.22 ㎛ 필터를 사용하여 무균 여과하였다. 여과된 항혈청을 분주하고 2 내지 8℃ 온도에 보관하였다.

[0259] 교차반응이 나타난 경우, 항체가가 1 이상인 토끼의 혈청을 합친 후, 교차반응을 나타낸 혈청형의 흡착용 균체백신과 반응하였다. 흡착용 균체백신은 혈청 용량의 0.5 내지 1.0의 비율로 준비하였으며, 교차반응을 보이는 모든 혈청형에 대해서 각각 준비하였다. 흡착용 균체백신을 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 토끼의 항혈청을 균체 침전물에 가하고 균일하게 현탁시켰다. 실온에서 100 내지 150 rpm 조건으로 30분 동안 교반한 후, 원심분리하고 상등액을 수득하였다.

[0261] 각 혈청형의 항혈청과, 이를 제외한 나머지 혈청형의 균체백신과의 교차반응 여부에 대한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0263]

단가원액 / 항혈청	1	3	4	5	6A	6B	7F	8	9N	9V	10A	11A	12F	14	15B	18C	19A	19F	22F	23F	33F
12F	O	X	X	X	O	O	X	X	X	X	X	X	/	X	X	X	O	X	X	O	X

[0264] 만약, 두 개 이상의 혈청형에 대해 교차반응을 보인 경우에는 하나씩 순차적으로 동일한 제거 과정을 반복하였다. 흡착 반응 후 얻은 상등액의 교차반응 여부를 비탁측정법으로 재확인하고, 교차반응이 제거될 때까지 흡착 과정을 반복하였다. 최종적으로 얻은 상등액의 교차반응 여부를 비탁측정법으로 확인하고 교차반응 정도가 "공시료(Blank)의 평균 반응값(Rate Unit)+(3*표준편차)" 혹은 다가표준액 농도 1.0 ㎍/㎖의 반응값 미만이 될 때

까지 흡착 과정을 반복하였다.

[0265] 교차반응이 기준 이하로 떨어지면 항혈청에 0.0975 %(w/v)의 농도로 아지드화나트륨를 첨가하였다. 그 후, 실온에서 40 내지 80 rpm 조건으로 10 내지 15분 동안 교반한 후, 0.22 ㎛ 필터를 사용하여 무균 여과하였다. 여과된 항혈청을 분주하고 2 내지 8℃ 온도에 보관하였다.