(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 11 월 14 일 (14.11.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/168965 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/003957

(22) 국제출원일: 2013 년 5 월 7 일 (07.05.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
61/643,697 2012 년 5 월 7 일 (07.05.2012) US

(71) 출원인: **목암생명공학연구소 (MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE)** [KR/KR]; 446-799 경기도 용인시 기흥구 보정동 341 번지, Gyeonggi-do (KR). **부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 609-735 부산시 금정구 부산대학로 63 번길 2, Busan (KR).

(72) 발명자: **이복률 (LEE, Bok Luel)**; 609-751 부산시 금정구 금강로 503, 301 동 2103 호, Busan (KR). **켄지쿠로카와 (KENJI, Kurokawa)**; 859-3215 나가사키현 사세보하이키 1-초메, 1-4 파레메르 601, Nagasaki (JP). **정동준 (JUNG, Dong-Jun)**; 621-900 경상남도 김해시 가락로 241-15, 1 동 1502 호, Gyeongsangnam-do (KR). **안장현 (AN, Jang-Hyun)**; 791-779 경상북도 포항시 북구 학전로 43, 106 동 1805 호, Gyeongsangbuk-do (KR). **전유진 (JEON, Yu-Jin)**; 642-050 경상남도 창원시 성산구 삼동로 128 번길 49, 102 호, Gyeongsangnam-do (KR). **김나향 (KIM, Na Hyang)**; 607-772 부산시 동래구 충렬대로 487, 107 동 1004 호, Busan (KR). **카주에타카하시 (KAZUE, Takahashi)**; 02139-1229 매사추세츠주 캠브리지 아모리스트리트 97, Massachusetts (US). **김은미 (KIM, Eunmi)**; 446-799 경기도 용인시 기흥구 보정동 341 번지, Gyeonggi-do (KR). **안동호 (AHN, Dong Ho)**; 446-770 경기도 용인시 기흥구 보정동 303 번지, Gyeonggi-do (KR).

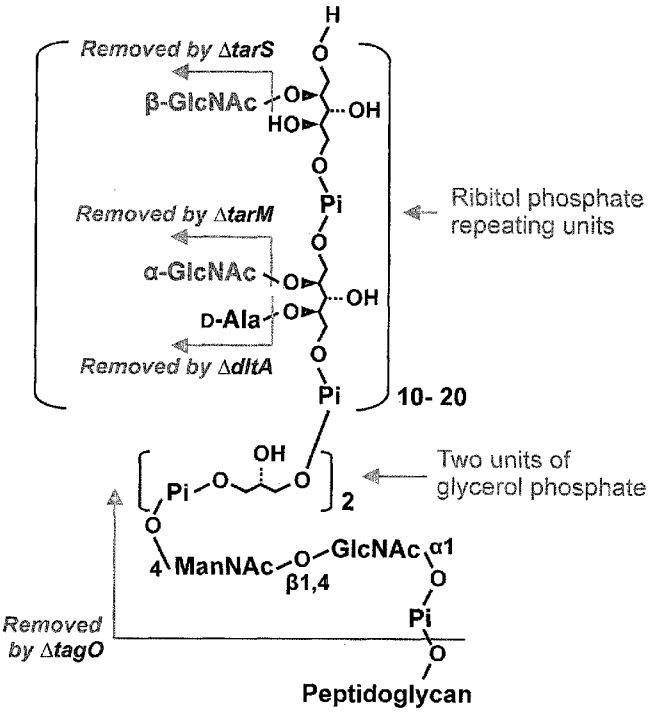
(74) 대리인: **제일특허법인 (FIRSTLAW P.C.)**; 137-739 서울시 서초구 양재동 275-7 트러스트타워, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: VACCINE COMPOSITION FOR PREVENTING STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTION

(54) **발명의 명칭** : 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a vaccine composition for preventing staphylococcus aureus infection containing, as an active ingredient, a ribitol-phosphate which has been modified only by a β-configuration in N-Acetylglucosamine (GlcNAc), a repeating unit of the ribitol-phosphate, or a wall teichoic acid (WTA) containing the repeating unit. The composition according to the present invention contains a coupling motif (an epitope) for an anti-WTA antibody, and thus can be effectively used as a vaccine composition or to prevent staphylococcus aureus infection by generating anti-WTA antibody.

(57) **요약서**: 본 발명은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염 또는 이의 반복 단위, 또는 상기 반복 단위를 포함하는 벽테이코산(WTA)을 유효성분으로 함유하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 항-WTA 항체에 대한 결합 모티프(에피토프)를 함유하므로 백신 조성물로서 또는 항-WTA 항체를 생산하여 포도상구균 감염을 예방하는 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2013/168965 A2

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

포도상구균 감염 예방용 백신 조성물

발명의 분야

본 발명은 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염 또는 이의 반복 단위, 또는 상기 반복 단위를 포함하는 벽테이코산(WTA)을 유효성분으로 함유하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물에 관한 것이다.

발명의 배경

포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 인간의 피부, 연조직(soft tissue) 및 혈류에서 중증 감염을 야기할 수 있다(Lowy FD, *The New England journal of medicine,* 339:520-532, 1998). 최근 메티실린(methicillin)-내성 포도상구균(MRSA)의 출현 및 확산으로 인해 상기 감염의 치료가 더 힘들어졌다. 포도상구균은 벽테이코산(wall teichoic acid, WTA), 펩티도글리칸, 리포테이코산 및 협막 다당류(capsular polysaccharide)를 포함하는 당중합체에 의해 둘러싸인 단일 세포막을 갖는 그람-양성 병원균이다(도 1 참조).

포도상구균의 WTA는 펩티도글리칸에 공유결합되어 있으며, 2개의 글리세롤 인산염 및 10-40개의 리비톨-인산염 반복 단위를 갖는 N-아세틸만노사민(ManNAc)-(β-1,3)-N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 이당류로 이루어진 리비톨-인산염의 당중합체이다(Weidenmaier C et al., *Nature reviews,* 6:276-287, 2008; Swoboda JG *et al.*, *Chembiochem.,* 11:35-45, 2010). 상기 구조에서 리비톨-인산염 반복 단위 상의 하이드록시기는 양이온성 D-알라닌

에스테르 및 GlcNAc로 치환될 수 있다(Xia G *et al.*, *Int. J. Med. Microbiol.*, 300:148-154, 2010; 도 2 참조).

포도상구균의 WTA는 세균 생존에 필수적인 것은 아니지만, 코의 상피 세포 부착에 관여하는 것으로 알려져 있다(Weidenmaier C, et al., *Nature medicine,* 10:243-245, 2004). 또한, 포도상구균의 WTA는 주요 조직적합성 복합체(MHC) II-의존적 방식으로 CD4+ T-세포 증식을 유도함으로써, 마우스 피부 감염 모델에서 농양(abscess) 형성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Weidenmaier C *et al.*, *PloS one* 5:e13227, 2010).

1960년대 초에 포도상구균 코펜하겐 균주의 세포벽의 화학적 및 항원적 구조를 분석하기 위해, 몇몇 그룹에서 토끼 혈청을 이용한 면역화학연구를 수행하였다. 이들은 항-혈청의 응집 활성이 포도상구균 WTA에 의해 그리고 정제된 α-GlcNAc 리비톨 단위에 의해 억제된다는 증거를 제공하였으며, 이 결과에 기초하여 토끼 혈청이 α-GlcNAc화된 WTA에 특이적인 항-WTA 항체를 함유하는 것으로 판단되었다(Nathenson SG *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 237:3839-3841, 1962; Juergens WG et al., *J. Exp. Med.*, 117:925-935, 1963). 또한, 이후 포도상구균 코펜하겐 및 NYH-6 균주를 인간에게 면역화함으로써 α-GlcNAc화(α-GlcNAcylation)된 WTA 및 β-GlcNAc화(β-GlcNAcylation)된 WTA 모두를 인식하는 항체들이 생산되었다(Gründling A *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 104, 8478-83, 2007).

현재까지 포도상구균 WTA의 에피토프 및 포도상구균 감염 후 생성된 혈청 항체의 특이성이 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 이들을 명확히 결정하기 위한 노력들이 계속되고 있다. 하지만, 포도상구균 WTA의 생합성에 관여하는 GlcNAc-합성 글리코실 전이효소에 대한 유전적 정보의 부족 및 β-GlcNAc화된 WTA가 결핍된 포도상구균 돌연변이 또는 α-GlcNAc화된 WTA가 결핍된 돌연변이 균주가 없어 α-GlcNAc화된 WTA나 β-GlcNAc화된 WTA를 정제하기 힘든 이유로 별다른 성과가 없었다.

최근에, 두 연구 그룹이 포도상구균 WTA의 α- 및 β-GlcNAc 생합성에 관여하는 새로운 글리코실 전이효소 TarM 및 TarS를 동정하였다(Xia G *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285:13405-13415, 2010; Brown S *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109:18909-18914, 2012). 상기 TarM 및 TarS 효소들은 UDP-GlcNAc-의존적 방식으로, WTA 내의 리비톨-인산염에 각각 α-GlcNAc 및 β-GlcNAc 잔기를 글리코실화(glycosylation)할 수 있는 것으로 판명되었다.

본 발명자들은 포도상구균의 WTA에 관하여 연구하던 중, 포도상구균 WTA의 β-GlcNAc 잔기가 고전적 보체-의존적 옵소닌 식세포작용(opsonophagocytosis)을 유발하고, 혈청 내에서 WTA의 β-GlcNAc 잔기를 에피토프로 인식하는 항체가 주로 생성된다는 사실을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 요약

따라서, 본 발명의 목적은 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 포도상구균의 항-WTA 항체를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식된 리비톨-인산염 반복 단위를 포함하는 천연형 WTA에서, (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된

리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 유효성분으로 함유하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물을 제공한다.

상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식되어 있는 천연형 벽테이코산(WTA)을 함유하는 포도상구균을 돌연변이시켜 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고 β-위치(β-configuration)로만 수식된 WTA를 함유하는 돌연변이 포도상구균을 제조하는 단계; (2) 상기 돌연변이 포도상구균으로부터 (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 분리 및 정제하는 단계; 및 (3) 상기 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 항원으로 하여 항-WTA 항체를 생산하는 단계를 포함하는, 포도상구균의 항-WTA 항체를 생산하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 포도상구균의 세포벽 구조를 나타낸 모식도이다.

도 2는 포도상구균의 벽테이코산(WTA)의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 3은 포도상구균의 WTA, 상기 WTA 상에 수식된 잔기 및 관련 유전자를 나타낸 모식도이다. 상기 도에서 GlcNAc는 N-아세틸글루코사민의 약어이며, ManNAc는 N-아세틸만노사민의 약어이고, D-Ala는 D-알라닌의 약어이며, Pi는 인산염의 약어이다.

도 4는 본 발명에 따른 포도상구균 모균주 및 돌연변이(*ΔtarMS*, *ΔtarS*, *ΔtarM*, *ΔdltA* 및 *ΔtagO*)를 대상으로 돌연변이 균주와 항-WTA 항체 간의 결합 및 C3 및 C4 침착을 유세포분석으로 확인한 결과이다.

도 5는 항-WTA 항체의 농도에 따른 항-WTA 항체의 결합능 및 C3 및 C4 활성화 분석 결과이다.

도 6은 모균주 및 본 발명에 따른 돌연변이 균주의 보체-매개된 옵소닌 식세포작용 유도를 확인한 것으로서, 100개의 인간 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophil, PMN)에 포식된 세균의 수를 측정한 결과이다.

도 7은 모균주 및 본 발명에 따른 돌연변이 균주로부터 분리된 WTA를 PAGE로 분석한 결과이다.

도 8은 ELISA를 이용하여 모균주 및 본 발명에 따른 돌연변이 균주의 WTA와 항-WTA IgG 간의 상대적 결합능을 분석한 결과이다.

발명의 상세한 설명

본 명세서에 사용된 용어 "벽테이코산(WTA)"은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 세포벽을 구성하는 성분 중 하나로서, 2개의 글리세롤 인산염 및 10-40개의 리비톨-인산염 반복 단위를 갖는 N-아세틸만노사민(ManNAc)-(β-1,3)-N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 이당류 링커를 가지는 리비톨 인산염의 당중합체를 지칭한다. 포도상구균의 천연형(native form) WTA 내의 리비톨-인산염에는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 및 D-알라닌이 수식되어 있으며, 상기 GlcNAc은 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration) 및/또는 β-위치(β-configuration)로 수식되어 있다.

또한, 본 명세서에 사용된 용어 "α-GlcNAc" 또는 "α-GlcNAc화(α-GlcNAcylation)"는 GlcNAc가 WTA 내의 리비톨 하이드록시기에 α-위치로 결합한 상태를 지칭하며, 마찬가지로 "β-GlcNAc" 또는 "β-GlcNAc화(β-GlcNAcylation)"는 GlcNAc가 WTA 내의 리비톨 하이드록시기 β-위치로

결합한 상태를 지칭한다. 나아가, "α-GlcNAc 결핍" 또는 "α-GlcNAc화(α-GlcNAcylation) 결핍"은 GlcNAc가 WTA 내의 리비톨-인산염의 α-위치에 결합하지 못한 상태를 지칭하며, 반대로 "β-GlcNAc 결핍" 또는 "β-GlcNAc화(β-GlcNAcylation) 결핍"은 GlcNAc가 WTA 내의 리비톨-인산염의 β-위치에 결합하지 못한 상태를 지칭한다.

또한, 본 명세서에 사용된 용어 "항-WTA 항체"는 WTA에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭하는 것으로서, 상기 항체는 보체-매개된 옵소닌 식세포작용(opsonophagocytosis)을 유도하여 포도상구균의 감염으로부터 숙주를 보호한다.

본 발명은 항-WTA 항체에 의해 인식되는 WTA 결합 모티프(에피토프)의 확인으로부터 출발한다. 본 발명은 포도상구균의 WTA 상의 α-GlcNAc 및 β-GlcNAc의 수식과 관련된 *tarM* 및/또는 *tarS* 유전자가 결핍된 돌연변이, α-GlcNAc 및 β-GlcNAc 두 잔기 모두가 결핍된 돌연변이들(*ΔtarM*, *ΔtarS* 및 *ΔtarMS*)를 이용한 다양한 실험들을 통해 WTA 내의 리비톨-인산염에 β-위치로 결합한 GlcNAc 잔기가 보체-매개된 옵소닌 식세포작용을 유도하는 항-WTA 항체에 대한 주요한 에피토프임을 제시한다.

구체적으로, 본 발명은 항-WTA 항체가 포도상구균의 모균주, *ΔtarM* 돌연변이 균주 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주로부터 분리된 β-GlcNAc화된 WTA에는 결합하지만, *ΔtarMS* 이중 돌연변이 균주, *ΔtarS* 돌연변이 균주 및 *ΔtagO* 돌연변이 균주로부터 분리된 β-GlcNAc가 수식되지 않은 WTA에는 결합하지 않음을 보여준다(실시예 2 참조). 또한, 본 발명은 β-GlcNAc화된 WTA를 갖는 포도상구균의 모균주, *ΔtarM* 돌연변이 균주 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주 상에서 C3 및 C4 침착(deposition)이 관찰되는 반면, β-GlcNAc화되지 않은 WTA를 갖는 *ΔtarMS* 이중 돌연변이 균주, *ΔtarS* 돌연변이 균주 및 *ΔtagO* 돌연변이 균주 상에서는 C3 및 C4 침착이 관찰되지 않음을 보여주며, 이는 β-GlcNAc화된 WTA가 보체 활성화를 유도함을 의미한다(실시예 2 참조). 나아가, 본 발명은 *ΔtarM* 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주 들만이 인간 다형핵 호중구(polymorphonuclear

neutrophil, PMN)에 의해 포식되는 반면, *Δ tarMS* 돌연변이 균주, *Δ tarS* 돌연변이 세균 및 *Δ tagO* 돌연변이 균주 들은 PMN에 의해 포식되지 않음을 보여주며, 이는 β-GlcNAc화된 WTA가 옵소닌 식세포작용을 야기함을 의미한다(실시예 3 참조).

따라서, 본 발명은 항-WTA 항체가 WTA에 α- 및/또는 β-위치로 수식되어 있는 천연형 WTA 중 β-위치로 수식된 GlcNAc 잔기에 결합하여 숙주 면역 반응을 유발한다는 사실을 제공한다.

이에, 본 발명은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식된 리비톨-인산염 반복 단위를 포함하는 천연형 WTA에서, (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 유효성분으로 함유하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 백신 조성물에서 유효성분으로 사용되는 (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA는 포도상구균의 WTA 내의 리비톨-인산염의 α-위치로 GlcNAc을 수식화(α-GlcNAcylation)하는 TarM 효소의 기능을 억제하여 WTA 내의 리비톨-인산염에 α-위치로 GlcNAc이 수식되는 것을 차단함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, IgG 결합 단백질 A가 결핍된 M0107 균주(문헌 [Oku Y *et al.*, *Journal of bacteriology*, 191:141-151, 2009] 참조)에서 TarM 효소를 코딩하는 *tarM* 유전자를 결실시켜 α-GlcNAc가

결핍된 돌연변이 균주가 제조된다.

본 발명에 따른 백신 조성물은 포도상구균의 감염, 구체적으로 신장 투석시 카테터의 사용으로 인한 감염 또는 외과 수술시의 감염, 피부 또는 연조직 감염(SSTI), 폐렴, 패혈증 또는 급성 호흡기 감염(acute respiratory tract infection)의 예방에 사용될 수 있다.

상기 포도상구균은 메티실린-내성(methicillin-resistant) 포도상구균(MRSA) 또는 병원성 포도상구균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

또한, 본 발명에 따른 백신 조성물은 상기 WTA 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 보강제를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 백신 조성물에 사용되는 담체는 투여 방법 및 경로, 그리고 표준 약물 조성물을 기초로 선택되고, 예를 들면, 담체 단백질(즉, 소혈청 알부민(BSA), 난백 알부민(OVA), 인간혈청 알부민(HSA) 및 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)), 용해제(즉, 에탄올, 폴리솔베이트 및 Cremophor EL™), 등장화제, 보존제, 항산화제, 부형제(즉, 락토스, 전분, 결정성 셀룰로오스, 만니톨, 말토스, 인산 수소 칼슘, 경무수 규산 및 탄산칼슘), 결합제(즉, 전분, 폴리비닐피로리돈, 히드록시프로필셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스 및 아라비아검), 윤활제(즉, 스테아린산 마그네슘, 탈크, 및 경화유 등) 및 안정화제(즉, 락토스, 만니톨, 말토스, 폴리솔베이트, 마크로졸, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유)일 수 있다. 필요에 따라, 글리세린, 디메틸아세트아미드, 70% 젖산 나트륨, 계면활성제 또는 염기성 물질 (즉, 수산화 나트륨, 에틸렌디아민, 에탄올 아민, 중탄산나트륨, 알기닌, 메글루민 또는 트리스아미노메탄) 등을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 백신 조성물은 항원성을 강화하기 위하여, 담체 단백질로서 공지의 KLH 용액(Calbiotec, 50% 글리세롤 용액 1ml 당 125 mg를 용해시킴)과 결합될 수 있다.

본 발명에 따른 백신 조성물에 사용되는 희석제는 투여 방법 및 경로, 그리고 실제 표준 약물 조성물을 기초로 하여 선택될 수 있다. 희석제의 예시는 물, 생리식염수, 인산염 완충 생리식염수 및 중탄산염 용액을 포함한다.

본 발명에 따른 백신 조성물에 사용되는 보강제는 투여 방법 및 경로, 그리고 실제 표준 약물 조성물을 기초로 선택된다. 보강제의 예시는 콜레라 독소, 대장균의 이열성 장독소(LT), 리포좀 및 면역 자극성 복합체(ISCOM)를 포함한다.

투여 경로는 포도상구균 감염의 염려가 있는 투여대상의 연령, 체중, 성별 및 일반적인 건강상태에 따라 다를 수 있으나, 투여는 경구투여 및 비경구 투여(예를 들면, 정맥 투여, 동맥 투여 및 국소 투여) 경로 중 어느 것으로도 투여될 수 있다. 그 중에서도, 비경구 투여가 바람직하다.

경구 투여 및 비경구 투여용 제형 및 그것의 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 경구 투여 및 비경구투여용 제형은 통상적인 공정, 예를 들면, 앞서 언급한 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 제조될 수 있다. 경구 투여용 제형의 예시는 용제, 정제, 과립제, 가루약 또는 캡슐제와 같은 고체 또는 액체 제형을 포함한다. 비경구 투여용 제형의 예시는 용제, 현탁제, 연고제, 크림, 좌제, 안제, 점비제 및 점이제를 포함한다. 본 제제의 서방을 원하면, 생물 분해성 폴리머(예를 들면, 폴리-D,L-락티드-코-그리코시드 또는 폴리글리코시드)를 버크 기제에 첨가할 수 있다(예를 들면, 미국특허 제5,417,986호, 제4,675,381호 및 제4,450,150호 참조). 경구 투여의 경우, 풍미제 및 착색료가 첨가될 수 있다. 적절한 약제학적 담체, 희석제와 그것의 사용을 위한 약제학적 필요한 물질은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]에 기재되어 있다.

본 발명에 따른 백신 조성물의 투여량은 보강제의 종류, 투여 방법 및 빈도, 및 원하는 효과를 기초로 결정되며 일반적으로 성인 1회 투여시 WTA 1㎍ 내지 100mg일 수 있다. 본 발명의 백신 조성물에 보강제가 첨가되는 경우, 투여량은 일반적으로 성인 1회 투여시 WTA 1㎍ 내지 1mg일 수 있다. 상기 투여는 필요한 경우 수회 투여될 수 있다. 예를 들면, 1 주일 간격으로 초기 백신접종 및 그 다음 3회 보강 백신접종이 수행될 수 있다. 선택적으로, 보강 주사 및 두번째 보강 백신접종은 각각 동일한 제제를 사용하여 첫번째 면역화로부터 8 내지 12번째 주 및 16 내지 20번째 주에 수행될 수 있다.

나아가, 본 발명은 (1) N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식되어 있는 천연형 벽테이코산(WTA)을 함유하는 포도상구균을 돌연변이시켜 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고 β-위치(β-configuration)로만 수식된 WTA를 함유하는 돌연변이 포도상구균을 제조하는 단계; (2) 상기 돌연변이 포도상구균으로부터 (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 분리 및 정제하는 단계; 및 (3) 상기 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 항원으로 하여 항-WTA 항체를 생산하는 단계를 포함하는, 포도상구균의 항-WTA 항체를 생산하는 방법을 제공한다.

상기 단계 (1)은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식되어 있는 천연형 벽테이코산(WTA)을 함유하는 천연형 포도상구균을 돌연변이시켜 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고 β-위치(β-configuration)로만 수식된 WTA를 함유하는 돌연변이 포도상구균을 제조하는 단계이다. 상기 단계 (1)의 과정은 전술한 바와 같이, 포도상구균의 TarM 효소의 기능을 결손시켜 WTA 내의 리비톨-인산염에 α-위치로 GlcNAc이 수식되는 것을 차단함으로써 이루어질 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, IgG 결합 단백질 A가 결핍된 M0107 균주(문헌 [Oku Y *et al.*, *Journal of bacteriology,* 191:141-151, 2009] 참조)에서 TarM 효소를 코딩하는 *tarM* 유전자를 결실시켜 α-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주가 제조된다.

또한, 본 발명의 방법에서 단계 (2)는 상기 돌연변이 포도상구균으로부터 (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된

리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 분리 및 정제하는 단계이다. 상기 과정은 본 기술분야에서 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Shiratsuchi A *et al.*, *Immunology*, 129:268-277, 2010]의 방법에 따라 또는 이를 응용하여 수행될 수 있다. 또한, WTA를 수득하고, 이로부터 리비톨-인산염의 반복 단위만을 추가로 분리 및 정제하거나, 또한 상기 리비톨-인산염의 반복 단위로부터 리비톨-인산염만을 추가로 분리 및 정제할 수 있다.

또한, 본 발명의 방법에서 단계 (3)은 상기 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 항원으로 하여 항-WTA 항체를 생산하는 과정이다. 상기 과정은 항원으로부터 항체를 생산하는 본 기술분야에 알려진 다양한 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 포유동물에게 접종하여 면역화함으로써 수행될 수 있다.

상기 제조된 항-WTA 항체는 포도상구균의 감염, 예를 들어 신장 투석시 카테터의 사용으로 인한 감염 또는 외과 수술시의 감염, 피부 또는 연조직 감염(SSTI), 폐렴, 패혈증 또는 급성 호흡기 감염(acute respiratory tract infection)의 예방에 사용될 수 있다.

전술한 포도상구균은 메티실린-내성(methicillin-resistant) 포도상구균(MRSA) 또는 병원성 포도상구균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

또한, 본 발명은 상기 단계 (2)에서 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA 또는 단계 (3)에서 생산된 항-WTA 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포도상구균 감염의 예방 방법을 제공한다.

나아가, 본 발명은 상기 단계 (2)에서 분리 및 정제된 리비톨-인산염,

상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA 또는 단계 (3)에서 생산된 항-WTA 항체의 포도상구균 감염 예방용 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

이하 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하지만, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이로써 본 발명의 권리범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1: 포도상구균 돌연변이의 제조

포도상구균의 벽테이코산(WTA)은 2개의 글리세롤 인산염 다음에 α- 또는 β-GlcNAc 및 D-알라닌으로 치환된 리비톨 인산염-반복 단위의 긴 사슬을 갖는 아세틸만노사민(ManNAc)과 아세틸글루코사민(GlcNAc) 이당류 링커를 포함하면서 펩티도글리칸에 결합되어 있다(도 3 참조).

본 실시예에서는, 항-WTA 항체에 대한 에피토프를 확인하고자, WTA 내의 리비톨-인산염에 α-위치 또는 β-위치로 수식되는 GlcNAc 또는 D-알라닌을 결핍시킨 포도상구균 돌연변이를 제조하였다.

<1-1> IgG-결합 단백질이 결핍된 돌연변이 균주(MO107)의 제조

항-WTA 항체에 대한 에피토프를 확인하기에 앞서, 항-WTA 항체가 포도상구균 내의 IgG 결합 단백질 A와 결합하는 것을 방지하기 위해 RN4220 균주(Novick RP *et al.*, *Embo. J.*, 12:3967-3975. 1993)로부터 IgG-결합 단백질 A에 관한 유전자인 *spa* 유전자를 결실시켜 IgG-결합 단백질 A가 결핍된 돌연변이 균주(MO107)를 제조하였다(Oku Y, et al., *Journal of bacteriology*, 191:141-151, 2009).

구체적으로, RN4220 균주의 *spa* 유전자를 하기 프라이머를 사용한 이중-교차 재조합(double crossover recombination)에 의해 Phleo 내성 유전자로 치환하였다:

spa-P1: GGGTCTAGAAAAAAGTCAAGCCTGAAGTCG (서열번호 1);

spa-P2: TATTGGATCCAAAGTGGGGCTTTGAATGTG (서열번호 2);

spa-P3: CCCGGGTACCTGCAGCGTTATTAGCTGGAC (서열번호 3);

spa-P4: GGGGAATTCTAATTGGTGCAACTGGGACA (서열번호 4);

Phleo-P1: GGATCCAATAGACCAGTTGCA (서열번호 5); 및

Phleo-P3: GGTACCCGGGCGATTGCTGAA (서열번호 6).

<1-2> β-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주(T803)의 제조

도 3에서와 같이, 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주로부터 *tarS* 유전자를 결실시켜 β-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주(T803)를 제조하였다.

구체적으로, β-GlcNAc 트랜스퍼라아제를 코딩하는 *tarS* 유전자의 BamHI 및 EcoRI 위치에 *tarS* 유전자의 중심 오픈 리딩 프레임 영역(central open reading frame region)을 갖는 pSF151 플라스미드(km^r)(Tao L *et al.*, *Gene,* 120:105-110, 1992)를 삽입하여, *tarS* 유전자를 파괴시켰다. 상기 파괴된 *tarS* 유전자를 하기 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭시킨 후 전기영동으로 확인하였다:

SA0248-F-*Bam*HI: CAACTGGATCCAAATTCTGGTGGTCCAGGT (서열번호 7); 및

SA0248-R-*Eco*RI: TTTCGAATTCGCGTAGTGCAACAATGGTCGT (서열번호 8).

<1-3> α-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주(T790)의 제조

도 3에서와 같이, 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주로부터 *tarM* 유전자를 결실시켜 α-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주(T790)를 제조하였다.

구체적으로, α-GlcNAc 트랜스퍼라아제를 코딩하는 *tarM* 유전자의 *Hind*III 및 *Bam*HI 유전자 위치에 *tarM* 유전자의 중심 오픈 리딩 프레임 영역(central open reading frame region)을 갖는 pMutinT3 플라스미드(erm^r)(Vagner V et al., *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 11):3097-3104, 1998)를 삽입하여, *tarM* 유전자를 파괴시켰다. 상기 파괴된 *tarM* 유전자를 하기 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭시킨 후 전기영동으로 확인하였다.

tarM-F1-*Hind*III: ATGATGCGGACATACCTGCT (서열번호 9)

tarM-R2-*Bam*HI: CACGGATCCTAAATGCACCCGTATCATCGAA (서열번호 10)

<1-4> α-GlcNAc 및 β-GlcNAc가 결핍된 돌연변이 균주(T807)의 제조

도 3에서와 같이, 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주로부터 *tarM* 및 *tarS* 유전자를 결실시켜 WTA 내의 리비톨-인산염에 GlcNAc이 α- 및 β-위치로의 수식이 모두 결핍된 돌연변이 균주(T807)를 제조하였다. 상기 돌연변이는 실시예 <1-2> 및 <1-3>의 과정과 동일한 방법을 이용하여 제조하였다.

<1-5> D-알라닌이 결핍된 돌연변이 균주(T861)의 제조

도 3에서와 같이, 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주로부터 *dltA* 유전자를 결실시켜 D-알라닌이 결핍된 돌연변이 균주(T861)를 제조하였다.

구체적으로, *dltA* 유전자의 내부 영역(위치 46 내지 694; 위치 1은 번역 개시 부위임)을 PCR에 의해 증폭시키고 이를 pMutinT3 벡터에 삽입하여 플라스미드 pT0793을 제조하였다. 상기 플라스미드 pT0793을 M0107 균주에 형질전환시킨 후 에리트로마이신 내성 균주를 선별하여 *dltA* 유전자가 파괴된 돌연변이 균주(T861)을 수득하였다. 상기 *dltA* 유전자의 파괴 및 플라스미드의 원하는 염색체좌로의 삽입을 서던 블롯에 의해 확인하였다.

<1-6> WTA가 결핍된 돌연변이 균주(T258)의 제조

도 3에서와 같이, 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주로부터 *tagO* 유전자를 결실시켜 WTA가 결핍된 돌연변이 균주(T861)를 제조하였다.

구체적으로, *tagO* 유전자의 내부 영역(위치 36 내지 645)을 PCR에 의해 증폭시키고 이를 pMutinT3 벡터에 삽입하여 플라스미드 pT0702을 제조하였다. 상기 플라스미드 pT0793을 M0107 균주에 형질전환시켜 *tagO* 유전자가 파괴된 돌연변이 균주(T861)을 수득하였다.

전술한 돌연변이 균주의 정보를 하기 표 1에 나타내었다.

<표 1>

균주	실시예	유전형	표현형
RN4220		NCTC8324-5, 제한 돌연변이	
M0107	<1-1>	RN4220 *Δspa::phleo*	IgG-결합 단백질 A-결실됨
T803	<1-2>	M0107Δ*tarS::km*	WTA-β-GlcNAc화-결핍됨
T790	<1-3>	M0107Δ*tarM::erm*	WTA-α-GlcNAc화-결핍됨
T807	<1-4>	M0107Δ*tarM::erm*Δ*tarS::km*	WTA-α,β-GlcNAc화-결핍됨
T861	<1-5>	M0107Δ*dltA::erm*	WTA D-알라닌화-결핍됨
T258	<1-6>	M0107 Δ*tagO::erm*	WTA-결핍됨

상기 균주 중, 모균주 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주는 WTA 상에 α- 및 β-GlcNAc 잔기 모두를 갖는다. 하지만, *ΔtarS* 및 *ΔtarM* 돌연변이 균주는 각각 β- 및 α-GlcNAc화된 WTA를 합성할 수 없기 때문에, WTA 상에 각각 α-GlcNAc 및 β-GlcNAc 잔기만을 갖는다. 반면, *ΔtarM* 및 *ΔtarS* 이중 돌연변이(*ΔtarMS*) 및 *ΔtagO* 돌연변이 균주는 WTA 상에 GlcNAc 잔기가 없다.

실시예 2: 돌연변이 균주와 항-WTA 항체 간의 결합 확인

항-WTA 항체가 WTA의 어느 부위에 결합하는지 확인하고자, WTA로부터 항-WTA 항체를 제조하고, 상기 제조된 항체와 실시예 1에서 제조된 돌연변이 균주와의 결합을 분석하였다.

<2-1> WTA의 분리 및 정제

WTA를 분리하기 위해, 포도상구균 RN4220 균주로부터 펩티도글리칸 O-아세틸트랜스퍼라아제(*oatA*) 유전자 및 지질단백 디아실글리세롤 트랜스퍼라아제(*lgt*) 유전자가 결핍된 돌연변이 균주(T384)를 제조하였다. 구체적으로, RN4220 균주로부터 문헌[Nakayama M et al., *J. Immunol.*, 189 (12), 5903-5911, 2012; 및 Park KH et al., *J. Biol. Chem.*, 285 (35), 27167-2775, 2010]에 기재된 방법에 따라 각각 T363 균주(RN4220 Δ*lgt::phleo*) 및 T002

균주(RN4220 Δ*oatA*::*erm*)를 수득하고, 이들로부터 파아지 80알파 형질도입을 통해 T384 균주를 제조하였다. *lgt* 돌연변이는 세균 지질단백이 제거하므로, 이 균주로부터 지질단백 오염이 없는 WTA를 분리할 수 있다. 또한 *oatA* 돌연변이는 포도상구균 펩티도글리칸을 리소자임(lysozyme)에 민감하게 만든다.

상기 제조된 T384 균주를 LB 배지에서 배양한 후, 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 펠렛을 10 ml의 구연산나트륨(20 mM, pH 4.5)에 현탁한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 다시 펠렛을 1M NaCl이 보충된 20 ml의 구연산나트륨 (20 mM, pH 4.5)에 현탁하고, 글래스 비드(1L 당 12g)와 섞은 후 비드 블렌더(beads blender)를 사용하여 세포를 파괴하였다. 상기 파괴된 세포를 50 ml 튜브로 옮기고, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 수거한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 펠렛을 수거하였다.

상기 펠렛을 0.5% SDS가 함유된 20 mM 구연산나트륨(pH 4.5) 20ml에 현탁하고 60℃에서 30분간 끓인 다음, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 상기 과정을 5회 이상 반복하여 SDS를 완전히 제거한 후, 20 mM Tris(pH 7.0)로 세척하여 pH가 중성이 되도록 하였다. 그리고 나서, 펠렛을 5 ml의 20mM Tris(pH 7.0)에 현탁한 후, 50μl의 1M $CaCl_2$ 및 50μl의 트립신(20 mg/ml)을 가하여 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 배양액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 펠렛을 20 ml의 주사용 증류수에 현탁하여 세척시켰다. 상기 세척을 5-6회 반복한 후, 펠렛을 1 ml의 주사용 증류수에 현탁한 후, 동결건조하였다.

상기 WTA를 함유하는 동결건조물을 50 mg 당 1ml의 Tris(pH 7.0)에 현탁시키고, 리소스타핀(lysostaphin, Sigma Aldrich; 동결건조물 10 mg 당 0.1 mg 처리)을 처리하여 37℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 난백 리소자임(lysozyme, Bioshop, 동결건조물 10 mg 당 0.1 mg 처리)을 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 혼합물을 95℃에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음, 15,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 상기 수거된 상등액을 0.45 μm에서 여과하였다. 이후, 펩티도글리칸 단량체가 부착된 WTA만을 정제하기 위해 하기 조건 하에 이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다.

- 컬럼: Hitrap Q FF™ 5ml
- 유속: 0.5 ml/분
- 로딩 시료: 여과된 분획 2ml
- 완충액: A 완충액 - 20 mM Tris-HCl(pH 7.0)
  B 완충액 - 20 mM Tris-HCl + 1M NaCl(pH 7.0)
- 흡광도: λ 220 nm
- 민감도: 0.5AUFs
- 구배(Gradient): 50분간 0 ~ 100%
- 분획: 1 ml/튜브

상기 크로마토그래피로부터 얻은 분획을 차가운 아세톤과 1:3의 비율로 혼합하여 침전시킨 후, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이후, 상기 침전물에 아세톤을 40 내지 50 μl씩 뿌려 굳힌 후, 1.5 ml 튜브에 모아 1시간 동안 건조시켜 아세톤을 제거하였다. 상기 건조된 WTA를 500 μl의 주사용 증류수에 용해시킨 다음 동결건조시켰다.

<2-2> 항-WTA 항체의 분리 및 정제

실시예 <2-1>에서 수득한 WTA를 이용하여 시판중인 인간 정맥내 면역글로불린(IVIG, 녹십자, 한국, 총 400 mg)으로부터 항-WTA 항체를 분리 및 정제하였다.

구체적으로, WTA를 니트로셀룰로오스 막(10 x 90 mm, Whatman, 공극 0.45 μm) 위에 점적한 후, 100℃에서 1시간 동안 베이킹(baking)하였다. 상기 막을 완충제 A(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)로 세척하고 4℃에서 2시간 동안 완충제 D(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl 및 1% BSA)로 블로킹하였다. 상기 니트로셀룰로오스 막을 4℃에서 2시간 동안 40 ml의 완충제 E(10 mM Tris, pH 7.4, 140 mM NaCl)에 용해된 50 mg의 IVIG와 함께 배양하였다. 상기 막을 완충제 A로 세척한 후, WTA와 결합한 항체를 1 ml의 0.1 M 글리신(pH 2.8)으로 용리시키고 바로 1 M KOH를 이용하여 pH를 7.5로 중화시켰다. 이후, 상기 용리액 내에 존재하는 글리신을 완충제 A를 이용한 비바스핀 20(Vivaspin 20, Sartorius)으로 3회 원심분리하여 제거하였다.

이후, 항-펩티도글리칸 항체를 제거하기 위해, 상기 수득된 IgG 분획을 포름알데하이드로 미리-고정된 실시예 <1-6>의 T258 균주(*Δspa* 및 *Δtag0* 이중 돌연변이 균주)와 함께 4℃에서 2시간 동안 배양하여 상기 균주와 항-펩티도글리칸 항체를 결합시켰다. 상기 배양액을 원심분리한 후, 상층액을 비바스핀 20에 의해 농축시켜 항-WTA 항체를 수득하였다.

<2-3> 돌연변이 균주와 항-WTA 항체 간의 결합 분석

실시예 1에서 제조된 돌연변이 균주와 항-WTA IgG 간의 결합을 유세포 분석을 이용하여 확인하였다.

구체적으로, 에탄올로 고정된 실시예 <1-1> 내지 <1-6>의 돌연변이 균주(4 μl의 현탁액; OD_{600} = 3)를 4℃에서 2시간 동안 20 μl의 배양 완충액(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 140 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ 및 1% BSA)에 용해시킨 인간 혈청과 함께 배양하였다. 상기 배양된 균주를 세척하고, 일차 항체로서 마우스 항-인간 IgG mAb(Sigma, 1:200으로 희석됨)와 함께 배양한 다음, 이차 항체로서 플루오레세인 5-이소티오시아네이트(FITC)와 결합된 염소 $F(ab')_2$ 항-마우스 IgG 항체(Beckman coulter, 1:200으로 희석됨)와 함께 배양하였다. 상기 배양된 균주를 세척 완충제(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 140 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ 및 0.05% 트윈 20)로 세척하였다. 그리고 나서, 상기 세척된 균주를 15초 동안 초음파 처리하여 응집된 균주를 분산시킨 다음, 유세포 분석(Accuri C6, Beckman Coulter)을 수행하였다.

상기 유세포 분석 결과를 도 4의 a 내지 f에 나타내었다. 도 4의 a 내지 f에서 회색 영역은 에탄올로 사멸된 포도상구균 돌연변이 균주를 항-WTA IgG 없이 배양한 결과이며, 검정색 선은 에탄올로 사멸된 포도상구균 돌연변이 세균을 항-WTA 항체와 함께 배양한 결과이다.

도 4에서 보는 바와 같이, 정제된 항-WTA-IgG는 모균주인 M0107(a), *Δ tarM* 돌연변이 균주(d) 및 *Δ dltA* 돌연변이 균주(e)는 인식한 반면, *Δ tarMS* 이중 돌연변이(b), *Δ tarS*(c) 및 *Δ tag0* 돌연변이 균주(f)는 인식하지 못하였다. 상기 결과는 포도상구균의 β-GlcNAc화된 잔기가 항-WTA 항체와 결합하기 위한 결합 모티프(motif)임을 보여준다.

<2-4> C3 및 C4 침착(deposition) 여부 조사

고전적인 보체 활성화 경로에 따르면, 항원이 항체와 결합하면 보체 활성화가 이뤄지며 이때 보체 C3 및 C4의 침착(deposition)이 발생한다. 따라서, C3 및 C4 침착 여부를 살펴봄으로써 항-WTA 항체의 세균에의 결합 여부 및 보체 활성화를 판단할 수 있다. 본 실시예에서는 실시예 <1-1> 내지 <1-6>에서 제조된 돌연변이에서의 항-WTA 항체에 의해 매개된 보체 C3 및 C4 침착을 유세포 분석으로 조사하였다.

구체적으로, 건강한 성인 지원자로부터 얻은 성인 혈청을 문헌[Jung DJ *et al.*, *J. Immunol.*, 189:4951-4959, 2012]에 기재된 방법에 따라 실시예 <1-1>에서 제조된 M0107 균주를 처리하여 포도상구균으로 처리된 혈청을 제조하였다. 한편, 실시예 <1-1> 내지 <1-6>의 돌연변이 균주를 37℃에서 12시간 동안 OD 600 값이 1 내지 1.2가 될 때까지 배양한 다음, PBS 1 ml로 2회 세척하고 70% 에탄올을 사용하여 균주를 고정시켰다. 상기 고정된 균주를 배양 완충액(10 mM Tris, 140 mM NaCl (pH 7.4), 10 mM $CaCl_2$ 및 1% BSA)로 2회 세척하였다. 이후, 상기 인간 혈청 및 돌연변이 균주에 항-WTA 항체를 각각 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 세척 완충액(10 mM Tris, 140 mM NaCl (pH 7.4) and 10 mM $CaCl_2$) 100 μl로 2회 세척하였다. C3 침착의 경우 1차 항체로서 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 마우스 항-인간 C3 IgG 20 μl를 넣고 4℃에서 1시간 동안 반응시켰고, C4 침착의 경우 1차 항체로서 마우스 항-인간 C4 IgG (1:500 희석) 20 μl을 넣어 4℃에서 1시간 동안 반응시키고, 2차 항체로서 FITC가 결합된 항-마우스 IgG (1:200 희석) 20 μl를 넣고 4℃에 1시간 동안 반응시켰다. 항체와 반응 시킨 각 돌연변이 세포를 세척 완충액 100 μl로 2회 세척하고 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 C3 및 C4 침착을 확인하였다.

상기 결과를 도 4의 g 내지 r에 나타내었다. 도 4의 g 내지 r에서 회색 영역은 항-WTA IgG 없이 C3 및 C4의 포도상구균에의 침착을 분석한 결과이며, 검정색 선은 항-WTA 항체의 존재 하에 C3 및 C4의 침착을 분석한 결과이다.

도 4의 g 내지 r에서 보는 바와 같이, 모균주(g, m), *ΔtarM* (j, p) 및 *ΔdltA* 돌연변이 세균(k, q)와 같이 β-GlcNAc화된 WTA를 합성하는 포도상구균

상에서만 C3 및 C4 침착이 관찰되었다. 상기 결과는 WTA내의 리비톨-인산염의 β-GlcNAc화된 잔기가 항-WTA가 매개하는 보체 활성화에 필수적임을 보여준다.

<2-5> 항-WTA 항체의 농도에 따른 항-WTA 항체의 결합능 및 C3 및 C4 활성화 분석

항-WTA 항체의 농도를 달리하는 것을 제외하고, 실시예 <2-4>의 방법에 따라 항-WTA 항체의 결합능 및 C3 및 C4 침착을 분석하였다.

상기 실험 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보는 바와 같이, β-GlcNAc 잔기를 갖는 모균주 및 *ΔtarM* 돌연변이의 경우 항-WTA 항체의 결합능, C3 및 C4 침착이 용량-의존적 방식으로 증가한 반면, β-GlcNAc가 없는 *ΔtarS*, *ΔtarMS* 및 *ΔtagO* 돌연변이 균주의 경우 항-WTA 항체의 결합능, C3 및 C4 침착이 관찰되지 않았다. 상기 결과는 WTA 내의 리비톨-인산염의 β-GlcNAc화된 잔기가 항-WTA 항체의 결합 및 보체 활성화에 필수적임을 보여준다.

실시예 3: 돌연변이 균주의 보체-매개된 옵소닌 식세포작용 유도 확인

항-WTA 항체가 WTA 내의 리비톨-인산염의 β-GlcNAc화된 잔기를 갖는 포도상구균에서 C3 침착을 유도하였기 때문에, C3로 옵소닌화된 균주들이 인간 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophil, PMN)에 의해 쉽게 포식되는 것으로 추정하였다. PMN에 의해 포식된 포도상구균을 정량화하기 위해, 실시예 <1-1> 내지 <1-6>에서 제조된 돌연변이 세균을 대상으로 100개의 인간 PMN에 의해 포식된 세균의 수를 측정하였다.

구체적으로, 에탄올로 사멸된 실시예 <1-1>에서 수득한 M0107(모균주) 및 실시예 <1-2> 내지 <1-6>에서 수득한 돌연변이 균주를 70% 에탄올로 사멸시키고, 0.1 M Na_2CO_3 완충제(pH 8.5)에 용해된 0.1 mM FITC(Sigma)를 이용하여 실온에서 30분 동안 표지한 후, HBSS(Hank's balanced salt solution)에 재현탁시켰다. 이후, 상기 FITC로 표지된 균주(1.5×10^7 CFU)를 포도상구균으로 처리된 혈청(10%)으로 옵소닌화하였다. 상기 옵소닌화된 세균에 항-WTA 항체(50 ng)

또는 IVIG(50 ng)를 첨가하였다. 한편, 문헌[Jung DJ *et al.*, *J. Immunol.* 189:4951-4959, 2012]에 기재된 방법에 따라 건강한 공여자로부터 폴리모프프렙(Polymorphprep) 용액(Nycomed Pharm As, Torshov, Norway)을 이용하여 말초 혈액 단핵 세포를 분리한 후, 트리판 블루 배제법에 의해 PMN을 수득하였다. 이후, 상기 PMN 현탁액(1.5×10^5 세포, 35 μl)을 5 μl의 옵소닌화된 세균(3.7×10^6 CFU: 감염다중도 ~25)에 첨가하여 37℃에서 60분 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 100개의 PMN에 의해 포식된 세균의 수를 형광 위상차 현미경 하에서 계수하였다. 상기 실험 결과를 도 6에 나타내었으며, 실험 데이터는 3회 반복한 후 평균±표준편차로 표시하였다($p<0.05$).

도 6에서 보는 바와 같이, 대조군의 경우, 포도상구균으로 처리된 혈청의 부재시 항-WTA IgG의 첨가로 PMN에 의해 포식된 포도상구균 모균주의 총 수가 1 ± 1(컬럼 1)에서 96 ± 44(컬럼 3)로 증가되었으며, 이는 PMN 상에서 IgG 수용체(FcγR)-매개된 식세포작용이 유도될 수 있음을 보여준다. 또한, *ΔtarM* 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주의 경우, 포도상구균으로 처리된 혈청의 부재시 PMN과 함께 배양되었을 때 낮은 수준의 FcγR-의존적 식세포작용이 관찰되었다(컬럼 16 및 20).

또한, 항-WTA IgG의 존재 하에 포식된 포도상구균 돌연변이 균주의 수를 계수하였을 때, *ΔtarM* 및 *ΔdltA* 돌연변이 균주들만이 PMN에 의해 포식되었으며(평균 535± 147 세균, 컬럼 18 및 22), *ΔtarMS* (컬럼 10), *ΔtarS* (컬럼 14) 및 *ΔtagO* 돌연변이 균주(컬럼 26)들은 PMN에 의해 포식되지 않았다.

상기 결과들은 항-WTA 항체에 의해 매개된 옵소닌 식세포작용이 포도상구균의 β-GlcNAc화된 WTA를 인식한 후에 유도되었음을 보여준다. 이는 β-GlcNAc화된 WTA가 항-WTA 항체가 매개하는 고전적 보체 활성화를 지시하여, 옵소닌 식세포작용을 야기함을 입증한다.

실시예 4: β-GlcNAc와 항-WTA IgG 간의 친화도 확인

ΔtarS 돌연변이 균주에서의 옵소닌 식세포작용의 불능이 *tarS* 유전자의 돌연변이로 인한 불충분한 GlcNAc 수식 때문일 것이라는 가설을 배제하기 위해,

실시예 1에서 제조된 *ΔtarS* 돌연변이 균주의 GlcNAc의 양을 정량화하였다.

<4-1> 포도상구균으로부터의 WTA의 분리 및 정제

실시예 1에서 수득한 균주들로부터 실시예 <2-1>에서와 동일한 방법으로 WTA를 분리 및 정제하였다.

<4-2> 돌연변이 균주의 WTA의 PAGE 분석

실시예 <4-1>에서 정제된 WTA(10 μg)를 PAGE(27%)에 의해 분리하고 은 염색(silver staining)에 의해 시각화하였다.

구체적으로, PAGE를 수행한 겔을 정제수를 이용하여 통에 옮겨담은 후, 0.5% 알시안 블루(alcian blue)를 함유한 5% 아세트산으로 5분간 염색하였다. 알시안 블루를 제거한 후, 염색된 겔을 정제수에 담궈 40분간 세척하였다. 세척된 겔을 고정화 완충액(메탄올 400 ml, 아세트산 100 ml 및 정제수 500 ml)으로 2시간 동안 고정하였다. 상기 고정된 겔을 1X 은 산화제(silver oxidizer, BioRad) 40 ml에 담궈 5분간 반응시킨 후, 겔을 정제수로 3분간 5회 세척한 후, 1X 은 제제(silver reagent, BioRad) 40 ml에 담궈 20분간 반응시킨 후 상기 제제를 제거하였다. 그 후, 은 염색 현상액(silver stain developer) 50 ml (50 ml의 정제수에 1.6 g의 현상액을 녹여 사용)로 반응시켜 WTA가 포함된 분획을 검출하였다.

상기 실험결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 보는 바와 같이, *ΔtagO* 돌연변이에서 얻은 WTA(레인 2)는 은 염색에 의해 어떤 신호도 나타내지 않았으며, 이는 상기 돌연변이에 WTA가 존재하지 않음을 보여준다. 한편, *ΔtarS* 및 *ΔtarM* 단일 돌연변이에서 얻은 WTA(레인 3 및 4)는 모균주에서 얻은 WTA(레인 1)보다 빠르게 이동하였고, *ΔtarMS* 이중 돌연변이로부터 얻은 WTA(레인 5)는 모균주 및 *ΔtarS* 및 *ΔtarM* 단일 돌연변이보다 더 빠르게 이동하였다. 상기와 같은 이동의 차이는 모균주와 비교하여 *ΔtarS* 및 *ΔtarM* 단일 돌연변이의 경우 한 가지 GlcNAc가 없고, *ΔtarMS* 이중 돌연변이의 경우 두 가지 GlcNAc가 없기 때문인 것으로 판단된다.

<4-3> 돌연변이 균주의 WTA의 GlcNAc 양 분석

돌연변이 균주의 WTA의 GlcNAc 양을 하기와 같이 측정하였다.

구체적으로, 산소로 인한 GlcNAc 잔기의 분해를 막기 위해, 실시예 <4-1>에서 수득한 WTA를 진공 하에서 100℃에서 3시간 동안 6N HCl로 산 가수분해한 후, 문헌[De Gubareff T *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 223:377-388, 1956]에 기재된 방법에 따라 무기 인산염의 함량을 측정하였다. 또한, 문헌[Enghofer E *et al.*, *Carbohydrate research*, 76:233-238, 1979]에 기재된 방법에 따라 GlcNAc 함량을 측정하여, 상기 함량으로부터 GlcNAc/Pi 비율을 계산하였다. 상기 결과를 표 2에 나타내었다.

<표 2>

WTA	Pi (nmole/μg)	GlcNAc (nmole/μg)	GlcNAc/Pi 비율
모균주	1.62	1.26	0.78
Δ tarM	3.14	1.13	0.36
Δ tarS	2.00	1.43	0.72
Δ tarMS	2.87	0.03	0.01

상기 표 2에서 보는 바와 같이, *Δ tarMS* 이중 돌연변이에서 GlcNAc가 검출되지 않았다. 또한, 모균주 및 *Δ tarS* 돌연변이의 GlcNAc/무기 인산염의 비율은 각각 0.78 및 0.72로 측정되었고, 이는 *Δ tarS* 돌연변이 균주가 모균주와 거의 대등한 양의 GlcNAc 잔기를 갖는다는 것을 보여준다. 그러나, 실시예 3에서 *Δ tarS* 돌연변이는 항-WTA IgG-매개된 옵소닌 식세포작용을 나타내지 않았다. 그에 반해, *Δ tarM* 돌연변이의 GlcNAc/Pi 비율은 0.36으로 모균주보다 훨씬 낮음에도 불구하고, 실시예 3에서 모균주와 유사한 정도의 옵소닌 식세포작용을 나타내었다.

· 상기 결과들은 *Δ tarS* 돌연변이가 항-WTA IgG-매개된 옵소닌 식세포작용을 나타내지 않는 것은 WTA 내의 리비톨-인산염의 α-GlcNAc화된 GlcNAc 잔기는 충분히 존재하나, β-GlcNAc화된 GlcNAc 잔기가 존재하지 않음에 인한 것임을 보여준다.

<4-4> ELISA를 이용한 돌연변이 균주의 WTA와 항-WTA IgG 간의 상대적 결합능 분석

포도상구균 돌연변이 균주로부터 얻은 WTA에 대한 항-WTA 항체의 상대적 결합을 ELISA를 이용하여 분석하였다.

구체적으로, 60 μl의 PBS(pH 7.5)에 용해시킨 각각의 WTA(5 nmole 인산염)를 F96 Cert. maxisorp 면역 플레이트(triplicate, Nunc)에 도포하여 실온에서 밤새 흡착시켰다. 상기 WTA-코팅된 마이크로플레이트를 50 μl의 완충제(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 140 mM NaCl, 및 1% BSA)에 용해시킨 인간 혈청과 함께 4℃에서 2시간 동안 배양하였고, 결합된 IgG를 마우스 단일클론 항-인간-IgG 항체 (Sigma-Aldrich) 및 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP; Beckman Coulter, 1:10000 희석)와 결합된 염소 $F(ab')_2$ 항-마우스 IgG(H+L) 항체(인간 Ads)로 검출하였다. 상기 플레이트를 어두운 곳에서 기질로서 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(Zymed Laboratories)을 이용하여 현상하였고 2N H_2SO_4에 의해 중지시켰다. 이후, 마이크로플레이트 리더(Thermo Scientific USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 항-WTA 항체의 농도를 항-WTA-IgG 대조군과 비교하여 평가하였다.

상기 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 보는 바와 같이, *Δ tarS* 돌연변이 및 *Δ tarMS* 이중 돌연변이로부터 얻은 β-GlcNAc-결핍된 WTA는 정제된 혈청 항-WTA IgG와 결합하지 않았다. 반면, *ΔtarM* 돌연변이 균주로부터 얻은 β-GlcNAc화된 WTA는 모균주와 비슷한 수준의 결합능을 나타내었다. 상기 결과는 항-WTA 항체가 β-GlcNAc화된 WTA에 특이적으로 결합함을 보여준다.

실시예 5: 인간 혈청 내의 항-WTA 항체의 종류 분석

인간 혈청 및 시판중인 인간 정맥내 면역글로불린(IVIG) 내에 어떤 형태의 WTA를 인식하는 항-WTA 항체가 존재하는지를 살펴보았다. 이 실험을 위해, 건강한 성인으로부터 6종의 혈청을 수집하였고, 2종의 IVIG(아이비 글로불린에스, 녹십자, 한국; 리브감마, SK chemical, 한국)를 구입하였다.

한편, 상기 혈청으로부터 항-WTA IgG, 항-*Δ tarM* WTA IgG, 항-*Δ tarS* WTA

IgG 및 항-*Δ tarMS* WTA IgG의 양을 측정하였다.

구체적으로, 실시예 <2-1>에서 분리된 WTA를 5 nmol 인산염/50 μl의 농도로 1xPBS에 녹인 후, 상기 WTA를 96웰 플레이트에 웰당 50 μl씩 넣고 상온에서 2일 동안 보관하여 96 웰 플레이트에 코팅하였다. 상기 WTA가 코팅된 96 웰 플레이트에 블로킹 완충액(20mM Tris 150mM NaCl pH 7.4 및 1% BSA)을 웰 당 200 μl씩 넣고, 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 블로킹 후, 상기 플레이트에 세척 완충액(10mM Tris 140mM NaCl pH 7.4) 200 μl 넣고 상온에서 1분간 세척하였다. 이후, 확인하고자 하는 사람의 혈청에 배양 완충액(10mM Tris 140mM NaCl pH 7.4 및 1% BSA)을 넣어 전체 부피를 50 μl로 맞춰 시료를 준비한 후, 상기 시료를 각 웰에 첨가하고 4℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 200 μl의 세척 완충액으로 상온에서 30초간 5회 반복하여 세척하였다. 그 후, 각 웰에 마우스 단일클론 항-인간-IgG 항체(Sigma-Aldrich, 1:1000 희석) 50 μl를 넣고 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 200 μl의 세척 완충액을 이용하여 상온에서 30초간 5회 반복하여 세척하였다. 그리고 나서, 각 웰에 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 염소 $F(ab')_2$ 항-마우스 IgG (H+L) 항체(Beckman Coulter, 1:10000 희석) 50 μl를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 세척 완충액을 이용하여 상온에서 30초간 5회 반복하여 세척하였다. 세척 후, 각 웰에 테트라메틸 벤지딘(TMB) 100 μl를 넣고 10분 반응시킨 후 2N 황산 100 μl를 넣어 반응을 정지시켰다. 이후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Thermo scientific)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

상기 측정 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<표 3>

혈청 번호	성별	연령	항-WTA IgG (ng/μl)	항-*Δ tarM* WTA IgG	항-*Δ tarS* WTA IgG	항-*Δ tarMS* WTA IgG
성인-1 (A-1)	M	28세	610	400	< 5	< 5
성인-2 (A-2)	F	26세	460	450	24	< 5
성인-3 (A-3)	F	24세	540	350	22	< 5
성인-4 (A-4)	M	28세	420	340	< 5	< 5

성인-5 (A-5)	F	26세	540	480	< 5	< 5
성인-6 (A-6)	M	30세	700	510	19	< 5
평균			550 (100%)	420 (76%)	22	< 5
IVIG-1	NA	NA	33	27	8.6	< 4
IVIG-2	NA	NA	32	25	8.9	< 4
평균			33 (100%)	26 (70%)	8.8	< 4

상기 표 3에서 보는 바와 같이, A-1 내지 A-6 혈청은 모두 항-WTA IgG를 함유하였다. ELISA에 의해 정제된 WTA를 이용하여 β-GlcNAc화된 WTA에 특이적인 IgG 및 α-GlcNAc화된 WTA에 특이적인 IgG의 양을 측정한 경우, 놀랍게도 포도상구균 모균주에 대해 특이적인 전체 항-WTA IgG 중 평균 76%가 β-GlcNAc화된 WTA에 결합하였다. 6명의 성인에서 α,β-GlcNAc화된 WTA 및 β-GlcNAc화된 WTA에 대해 특이적으로 결합하는 IgG의 평균 양은 각각 550 ng/μl 및 420 ng/μl이었다. IgG 중 평균 14%가 α-GlcNAc화된 WTA에 대해 특이적 결합을 나타내었고, *Δ tarMS* 이중 돌연변이 균주로부터 정제된 WTA에는 특이적 결합을 나타내지 않았다. 또한, 상업적으로 이용가능한 2종의 IVIG 역시 α- 및 β-GlcNAc화된 WTA에 특이적인 IgG(33 ng/μl) 중에서 β-GlcNAc화된 WTA에 특이적인 IgG를 70%(평균 26 ng/μl)의 비율로 함유하였다. 상기 결과는 인간 혈청이 β-GlcNAc화된 WTA에 대해 특이적인 항체를 주된 항체로서 함유한다는 것을 보여준다.

특허청구범위:

청구항 1. N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식된 리비톨-인산염 반복 단위를 포함하는 천연형 벽테이코산(WTA)에서,

(i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염,

(ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는

(iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA

를 유효성분으로 함유하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물.

청구항 2. 제1항에 있어서, 상기 (i), (ii) 및 (iii)의 리비톨-인산염, 리비톨-인산염의 반복 단위 및 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA는, 포도상구균의 TarM 효소의 기능을 억제하여 WTA 내의 리비톨-인산염에 α-위치로 GlcNAc이 수식되는 것을 차단함으로써 수득되는 것을 특징으로 하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물.

청구항 3. 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 포도상구균 감염이 신장 투석시 카테터의 사용으로 인한 감염 또는 외과 수술시의 감염, 피부 또는 연조직 감염(SSTI), 폐렴, 패혈증 또는 급성 호흡기 감염(acute respiratory tract infection)인 것을 특징으로 하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물.

청구항 4. 제1항에 있어서, 상기 포도상구균이 메티실린-내성(methicillin-resistant) 포도상구균(MRSA) 또는 병원성 포도상구균인 것을 특징으로 하는, 포도상구균 감염 예방용 백신 조성물.

청구항 5. (1) N-아세틸글루코사민(GlcNAc)으로 수식되어 있는 천연형 벽테이코산(WTA)을 함유하는 포도상구균을 돌연변이시켜 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고 β-위치(β-configuration)로만 수식된 WTA를 함유하는 돌연변이 포도상구균을 제조하는 단계;

(2) 상기 돌연변이 포도상구균으로부터 (i) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치(α-configuration)로는 수식되지 않고, β-위치(β-configuration)로만 수식된 리비톨-인산염, (ii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 (iii) GlcNAc이 상기 리비톨-인산염에 α-위치로는 수식되지 않고, β-위치로만 수식된 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 분리 및 정제하는 단계; 및

(3) 상기 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 항원으로 하여 항-WTA 항체를 생산하는 단계

를 포함하는, 포도상구균의 항-WTA 항체를 생산하는 방법.

청구항 6. 제5항에 있어서, 상기 단계 (1)의 돌연변이가 포도상구균의 TarM 효소의 기능을 억제하여 WTA 내의 리비톨-인산염에 α-위치로 GlcNAc이 수식되는 것을 차단함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7. 제6항에 있어서, 상기 TarM 효소의 기능의 억제가 TarM 효소를 코딩하는 *tarM* 유전자를 결실시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8. 제5항에 있어서, 상기 항-WTA 항체의 생산이 단계 (2)에서 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA를 포유동물에게 접종하여

면역화함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9. 제5항의 단계 (2)에서 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA 또는 단계 (3)에서 생산된 항-WTA 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포도상구균 감염의 예방 방법.

청구항 10. 제9항에 있어서, 상기 포도상구균 감염이 신장 투석시 카테터의 사용으로 인한 감염 또는 외과 수술시의 감염, 피부 또는 연조직 감염(SSTI), 폐렴, 패혈증 또는 급성 호흡기 감염(acute respiratory tract infection)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11. 제9항에 있어서, 상기 포도상구균이 메티실린-내성(methicillin-resistant) 포도상구균(MRSA) 또는 병원성 포도상구균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12. 제5항의 단계 (2)에서 분리 및 정제된 리비톨-인산염, 상기 리비톨-인산염의 반복 단위, 또는 상기 리비톨-인산염의 반복 단위를 포함하는 WTA 또는 단계 (3)에서 생산된 항-WTA 항체의 포도상구균 감염 예방용 약제의 제조를 위한 용도.

FIG. 1

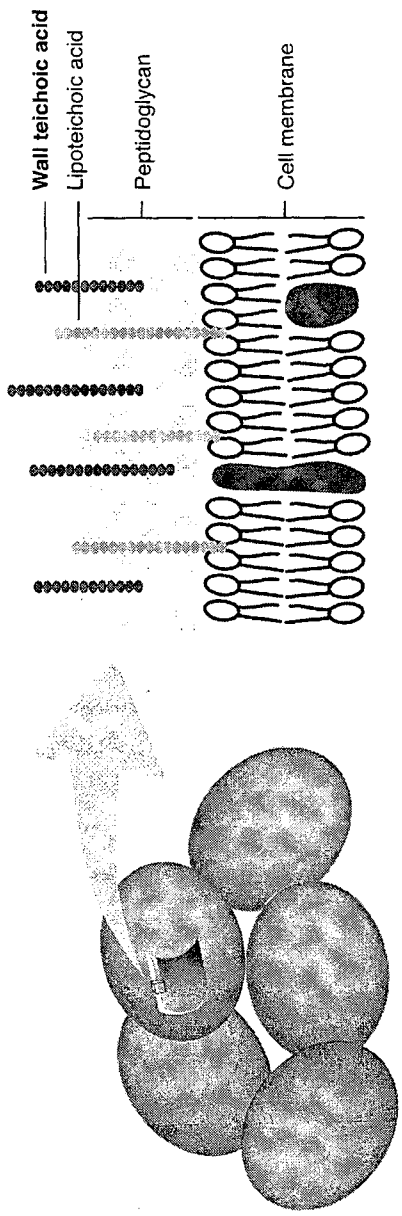

Wall teichoic acid
Lipoteichoic acid
Peptidoglycan
Cell membrane

FIG. 2

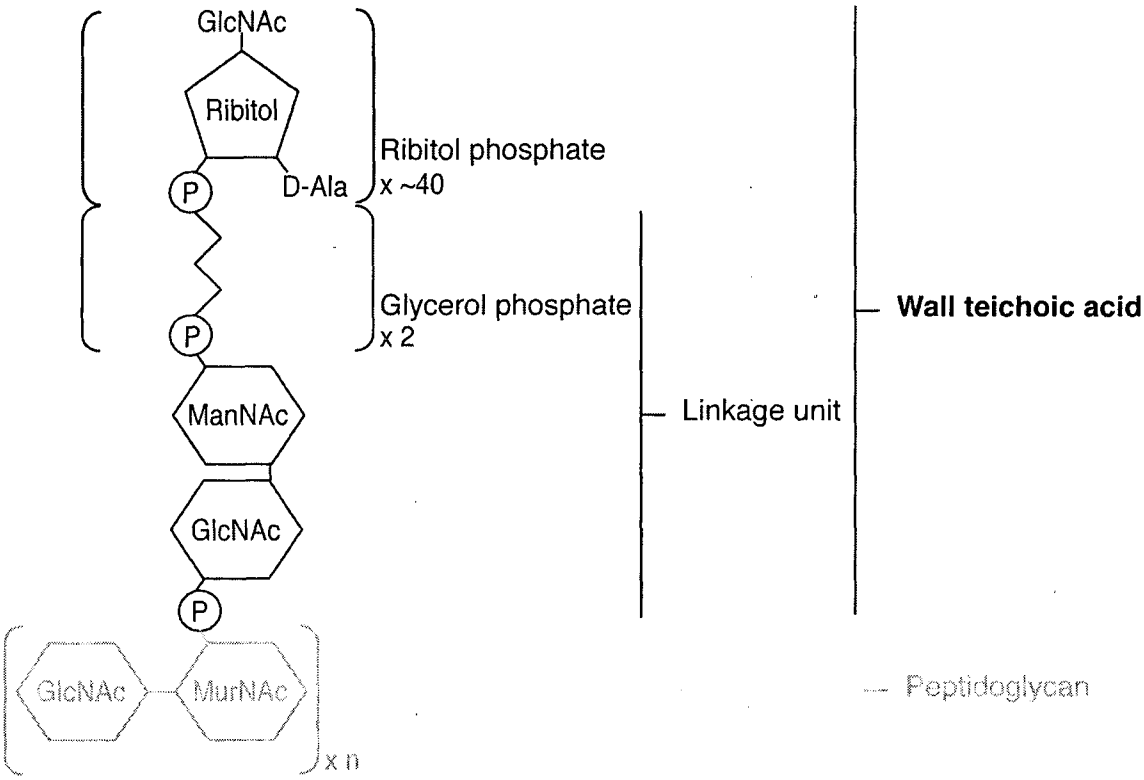

GlcNAc
Ribitol
P
D-Ala
Ribitol phosphate
x ~40
P
Glycerol phosphate
x 2
ManNAc
GlcNAc
P
GlcNAc
MurNAc
x n
Linkage unit
Wall teichoic acid
Peptidoglycan

FIG. 3

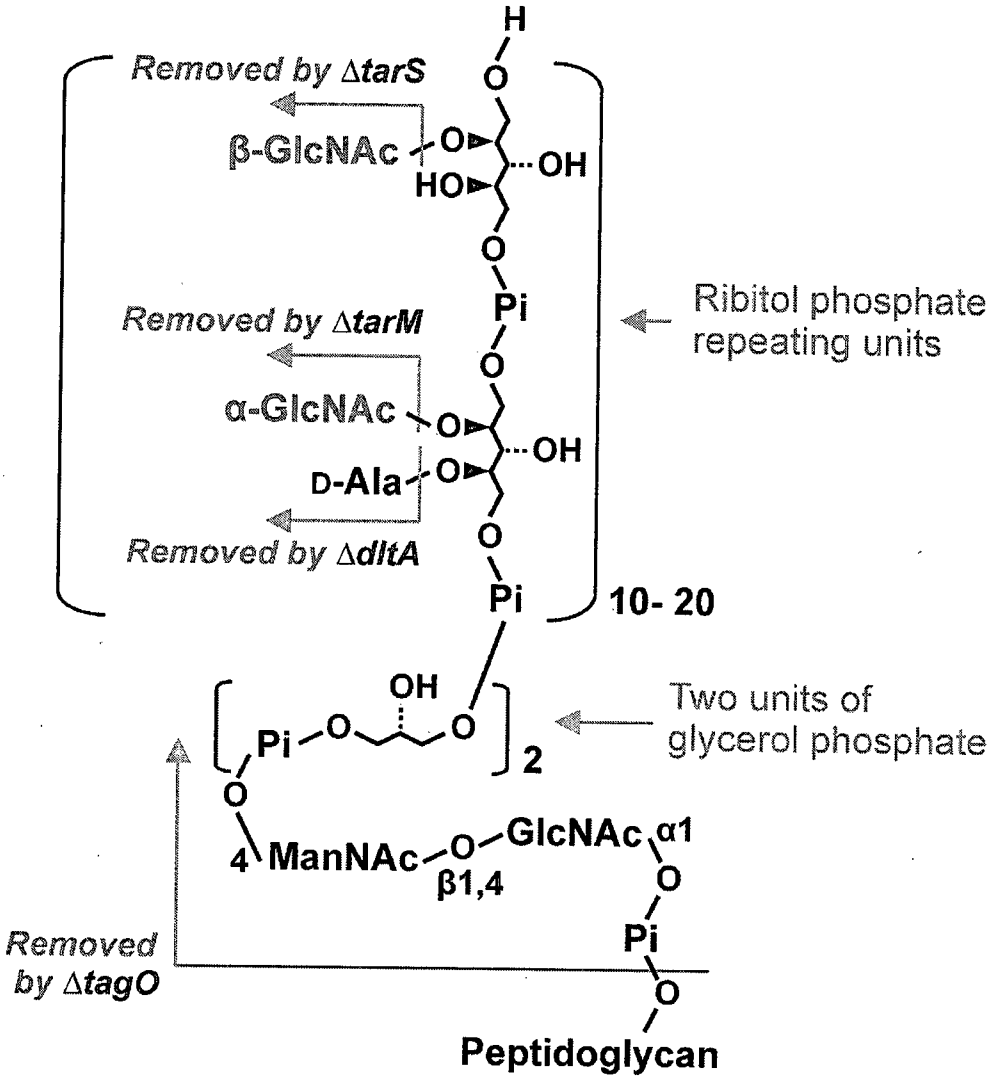

Removed by ΔtarS
β-GlcNAc
Removed by ΔtarM
α-GlcNAc
D-Ala
Removed by ΔdltA
Ribitol phosphate repeating units
10- 20
Two units of glycerol phosphate
2
4
ManNAc
β1,4
GlcNAc
α1
Removed by ΔtagO
Peptidoglycan

FIG. 4

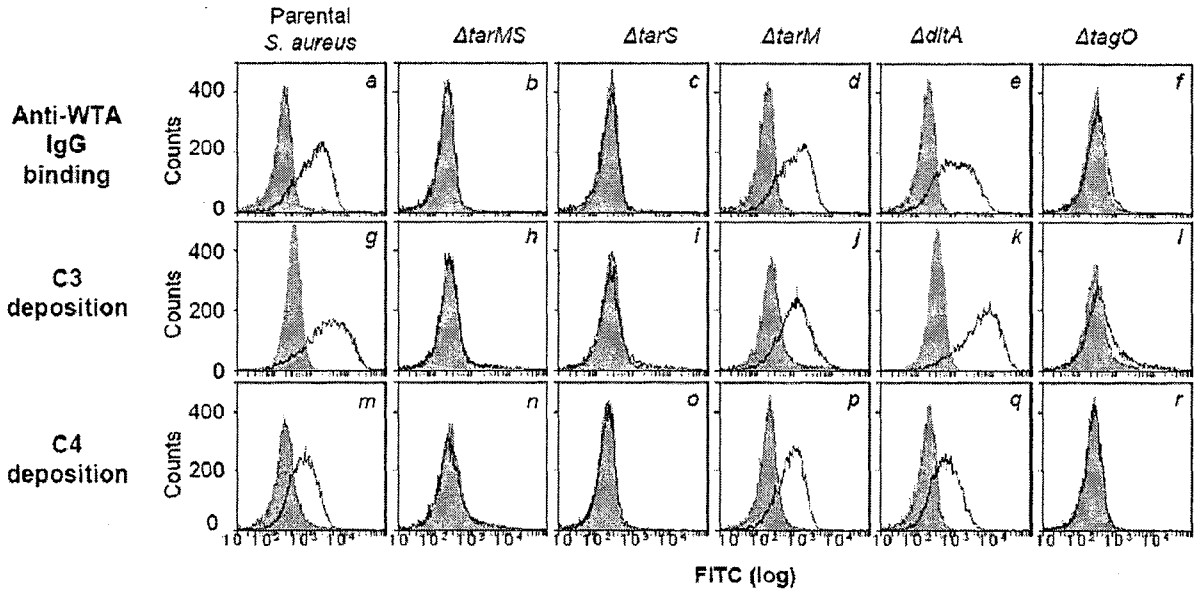

Parental S. aureus
ΔtarMS
ΔtarS
ΔtarM
ΔdltA
ΔtagO
Anti-WTA IgG binding
C3 deposition
C4 deposition
Counts
400
200
0
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
FITC (log)

FIG. 5

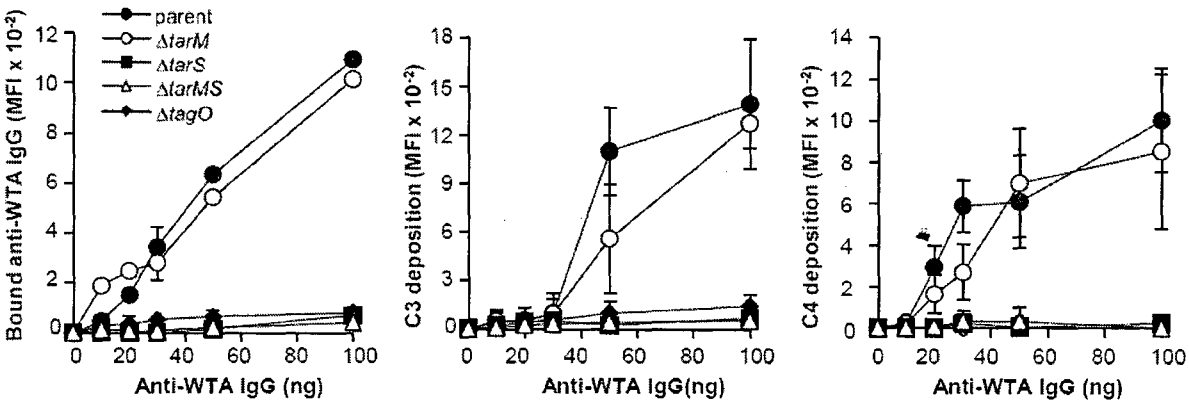

parent
ΔtarM
ΔtarS
ΔtarMS
ΔtagO
Bound anti-WTA IgG (MFI x 10-2)
Anti-WTA IgG (ng)
C3 deposition (MFI x 10-2)
Anti-WTA IgG(ng)
C4 deposition (MFI x 10-2)
Anti-WTA IgG (ng)

FIG. 6

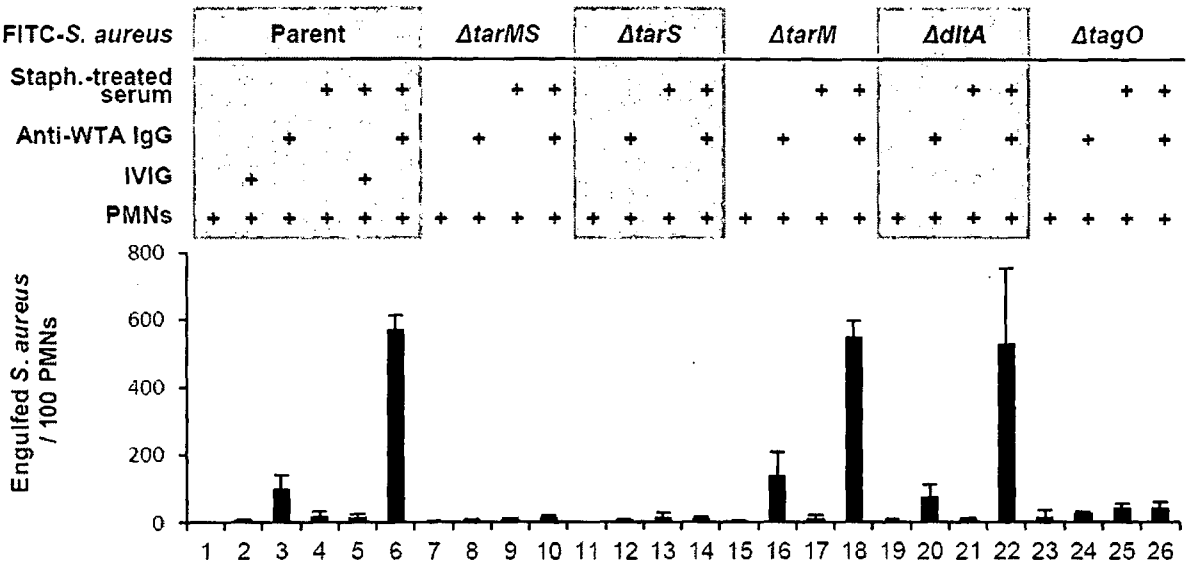

FITC-S. aureus
Parent
ΔtarMS
ΔtarS
ΔtarM
ΔdltA
ΔtagO
Staph.-treated serum
Anti-WTA IgG
IVIG
PMNs
Engulfed S. aureus / 100 PMNs
800
600
400
200
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

FIG. 7

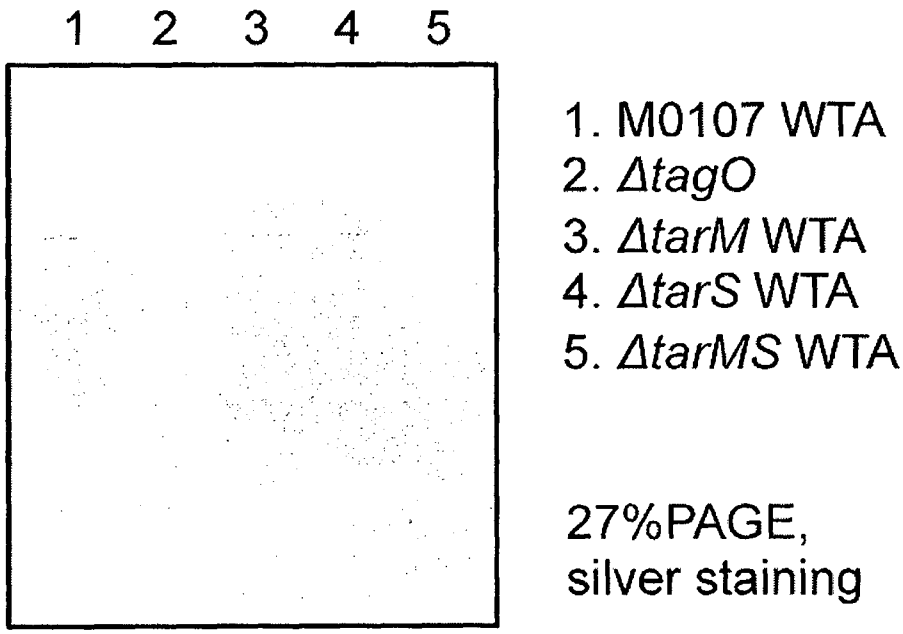
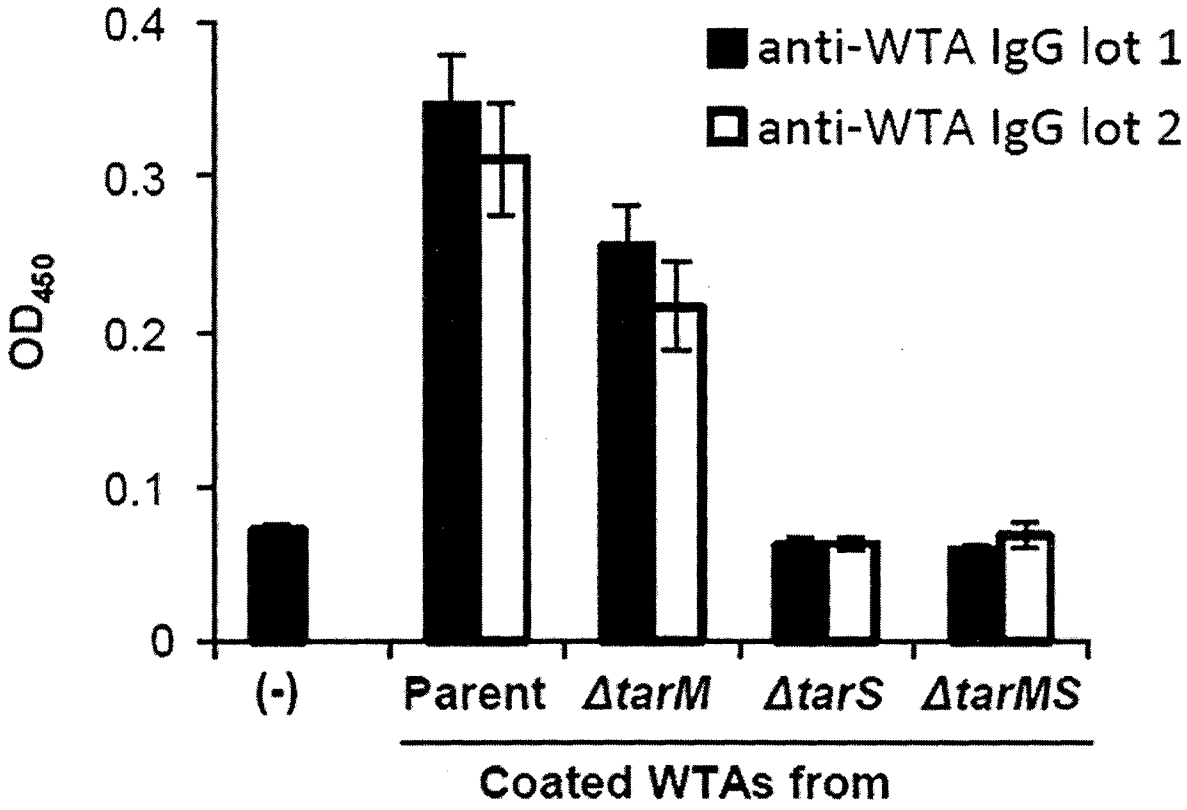

1 2 3 4 5
1. M0107 WTA
2. ΔtagO
3. ΔtarM WTA
4. ΔtarS WTA
5. ΔtarMS WTA
27%PAGE,
silver staining

FIG. 8


0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD_{450}
anti-WTA IgG lot 1
anti-WTA IgG lot 2
(-)
Parent
ΔtarM
ΔtarS
ΔtarMS
Coated WTAs from