

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 14/315
A61K 39/09
G01N 33/53

(45) 공고일자 2002년08월 13일
(11) 등록번호 10-0331358
(24) 등록일자 2002년03월22일

(21) 출원번호	10-1995-0703989	(65) 공개번호	특 1996-0701096
(22) 출원일자	1995년09월 19일	(43) 공개일자	1996년02월24일
번역문제출일자	1995년09월 19일		
(86) 국제출원번호	PCT/SE1994/00246	(87) 국제공개번호	WO 1994/21685
(86) 국제출원일자	1994년03월21일	(87) 국제공개일자	1994년09월29일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남 우즈 베키스탄 슬로베니아 트리니다드토바고 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 타지키스탄 EP 유럽특허 : 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장 PCT/SE93/00234 1993년03월 19일 스웨덴(SE)

(73) 특허권자 구나르린달

스웨덴에스-222 24룬트마그누스스텐복스가탄5
마가레타스텔하마르-카를레말름

(72) 발명자 스웨덴에스-22651룬트피르닝스그렌덴1
라르스스텐베르그

스웨덴에스-22350룬트릴라알가탄9
구나르 린달

(74) 대리인 스웨덴 에스-222 24 룬트 마그누스 스텐복스가탄 5
박종혁, 장용식

심사관 : 한현숙

(54) 그룹B스트렙토코커스의많은균주들에대한면역성을제공하는세포표면단백질인Rib단백질,그단백질의정제방법,시약키트및제약조성물

요약

본 발명은 많은 그룹 B Streptococcus 균주들, 특히 혈청형 III인 것들의 감염에 대한 보호면역성을 제공하는 Rib으로 표시되는 새로운 단백질 및 그것의 서브단편, 다중체 또는 변이체에 관한 것이다.

본 발명은 이 단백질의 정제방법, 매우 특이적인 항체의 제조방법, 시약키트, 이 단백질을 암호화하는 BNA서열, 이 단백질 또는 그것의 단편이나 변이체를 함유하는 제약조성물을 포함한다.

대표도

도1

명세서

도면의 간단한 설명

제1도는 4가지 주요 혈청형을 나타내는 그룹 B Streptococcus 균주로부터 제조한 추출물의 웨스턴 블롯(Western blot)분석을 보여준다(타입 Ia:균주 A909; 타입 Ib: SB35; 타입 II: B1284; 타입 III: BS30). 면역블롯에서 보여지는 것처럼 타입 Ia 및 Ib의 균주는 알파 및 베타 단백질을 발현하고, 염색된 겔에서 이 단백질의 위치는 화살표로 표시된다(하부화살표: 알파항원; 상부화살표: 베타항원). 타입 III 균주 BS30의 95-kD Rib 단백질의 염색된 겔에서의 위치는 별표로 표시된다. 좌측에 나타난 분자량 마커의 단위는 kD이다.

제2A도 및 제2B도는 타입 III 균주 BS30으로부터 Rib 단백질의 정제를 보여준다. (A)DEAE 이온교환 크로마토그래피의 사전단계를 통해서 부분정제한 뮤타노리신(mutanolysin) 추출물을 DEAE Bio-Gel A의 30ml 컬럼에서 이온교환 크로마토그래피에 적용시켰다. 이것은 10mM Tris, pH 8.0중의 직선구배(800ml) 그다음

1M NaCl(60ml)로 용출시켰다. 빗금친 영역은 Rib 단백질을 포함하는 분획을 나타낸다. 삽입물은 SDS-PAGE로 분석한 Rib 단백질 함유 분획의 푸울을 보여준다. 좌측에 나타난 분자량 마커단위는 kD이며, Rib 단백질(95kD)의 위치는 화살표로 표시된다. (B) 이온교환 크로마토그래피의 Rib 단백질 함유 분획의 푸울을 Sepharose CL6B 컬럼(4.2 x 90cm)에서 걸여과시켰다. 빗금친 영역은 Rib 단백질 함유 분획을 나타내며, 삽입물은 SDS-PAGE로 분석한 이 분획의 푸울을 보여준다. Vo, 보이드 볼륨(void volume); Vt, 전체체적.

제3A도, 제3B도 및 제3C도는 알파, 베타 및 Rib 단백질의 세포표면 발현에 대한 4가지 주요 혈청형의 그룹 B Streptococcus 균주의 분석을 나타낸다. 5가지 균주를 테스트하였다: A909(타입 Ia); SB35(타입 Ib); B1284(타입 II), BS30(타입 III), 및 BM110(타입 III) 이 5가지 균주에 사용된 기호는 패널 C에서 보여진다. 세균 현탁액을 표시한 대로 알파, 베타, 또는 Rib 단백질에 대한 토끼 항혈청의 다른 희석물과 배양하였다. X-축의 수는 세균혼합물에서의 최종 항체 희석도를 나타낸다. 결합된 항체는 방사성 표지된 단백질 G와의 배양에 의해 검출되었다. 면역화전 토끼혈청과의 콘트롤은 모든 실험에서 포함되었고 모든 경우에 완전히 네가티브였다.

제4도는 정제된 단백질에 대해 만들어진 토끼 항혈청으로의 정제된 알파, 베타, 및 Rib 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 항혈청은 1:1,000희석도로 사용되었고, 결합된 항체는 방사성 표지된 단백질 G로 검출되었다, 좌측에 나타난 분자량 마커 단위는 kD이다.

제5도는 트립신 또는 펩신으로 처리한 정제된 알파, 베타, 및 Rib 단백질의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 트립신 처리는 pH 7.5에서 수행되었고, 펩신처리는 pH 4.0에서 수행되었다. SDS-PAGE 분석전에 샘플을 중화시켰다. 콘트롤은 트립신 또는 펩신을 포함하는 샘플과 동일한 방식으로 처리했지만 효소를 첨가하지 않았다. 그러한 처리는 단백질의 분해를 야기하지 않았다. P=펩신; T=트립신. 좌측에 나타난 분자량 마커 단위는 kD이다.

제6A도, 제6B도 및 제6C도는 균주 BM110에서의 rib-유전자의 클로닝 및 Escherichia coli에서 Rib 단백질의 발현의 결과를 보여준다.

(A) 7 가지 다른 λ 클론의 웨스턴 블롯 분석, 항-Rib과의 배양.

(B) 균주 BM110의 염색체 DNA의 제한분해.

(C) Rib 발현 λ - 클론 λ rib 3의 제한분해.

발명의 상세한 설명

본 발명은 그룹 B 스트렙토코커스 (Streptococcus)의 대부분의 침입성 균주들에 면역성을 제공하는 Rib이라고 명명된 신규단백질(및 그것의 서브단편, 변이체 및 다중체), 이 단백질의 정제방법, 단백질에 특이적인 항체, 단백질 또는 그것의 단편을 함유하는 시약키트 및 제약조성물에 관한 것이다.

지난 30년간 그룹 B Streptococcus는 서구세계에서 신생아 질환의 주요원인으로 나타났다. 미국에서만 이 세균에 의해 야기되는 침입성 질환이 매년 약 10,000 사례가 있다. 이러한 감염은 약 20%의 총사망율을 나타내며, 생존한 유아의 많은 수가 영구적인 신경병 후유증을 갖는다. 이러한 발견에 의해 그룹 B Streptococcus가 감염을 일으키는 기작을 분석하고 예방 및 치료법을 발견하려는 많은 노력이 행해졌다.

모든 여성의 약 20%는 그룹 B Streptococcus의 질(腔)에 의한 운반체이며, 어머니의 생식관으로부터의 수직전염이 아마도 이 세균에 의해 야기되는 신생아 질환의 가장 흔한 감염원이다. 그러나, 출산시 그룹 B Streptococcus에 의해 서식되는 유아들중 단지 1 내지 2% 만이 심한 감염에 걸린다. 따라서 출산시 세균에 노출되는 것과 다른 요인이 신생아 질환의 발현에 역할을 해야 한다. 감염된 유아들의 어머니들은 타입 III 캡슐에 대한 항체의 상당히 낮은 수준을 갖는데, 이것은 이 항체들이 신생아질환에 대한 보호에 중요하다는 것을 의미한다(Baker, C. J. 및 D. L. Kasper, N. Engl. J. Med. 1976, 294:753).

그룹 B Streptococcus균주는 다당류 캡슐의 구조에 따라 4가지 주요 혈청형(Ia, Ib, II 및 III)으로 나누어진다(Baker, J Inf Dis 1990. 161:917). 혈청형 I, II, 및 III는 정상서식지의 균주들에서 대략 동일한 비율로 존재하지만, 타입 III는 침입성 감염의 모든 분리물에서 약 2/3를 나타낸다. 캡슐은 공지된 독성 인자이기 때문에 특히 타입 III균주에서 상세히 연구되었다. 타입 III다당류 캡슐이 필수성분인 백신을 개발하려는 시도가 행해졌다. 그러나, 백신으로서 다당류 캡슐의 이용은 사람조직과의 교차반응 때문에 문제를 일으킬 수 있다(Pritchard et al., Infect Immun 1992. 60:1598). 따라서 다당류가 아닌 단백질에 기초한 백신을 개발할 수 있다면 매우 가치 있는 일일 것이다.

그룹 B Streptococcus는 또한 소에서 유선염을 일으킬 수 있는데, 이것은 경제적으로 중요한 소의 질환이다. 따라서 그룹 B Streptococcus감염에 대한 백신의 개발은 수의학에서 중요하다.

2가지의 그룹 B Streptococcus 세포표면 단백질이 종전에 상세히 연구되었다: 알파 및 베타 단백질. 이 단백질은 단백질을 발현하는 균주에 대한 보호면역성을 제공하지만, 이것은 대다수의 심한 감염을 야기하는 타입 III 균주에 의해서는 대개 발현되지 않기 때문에 그룹 B Streptococcus질환에 제한적으로 관계된다.

본 발명은 B Streptococcus 세포표면 단백질, 및 그것의 변이체 및 서브단편에 관한 것이다. Rib 단백질로서 명명된 이 단백질은 혈청형 III의 그룹 B Streptococcus 균주로부터 뚜렷한 95kD단백질로서 분리되었다. Rib 단백질은 혈청형 III의 거의 모든 그룹 B Streptococcus 균주에 의해 그리고 II같은 다른 혈청형의 몇 균주에 의해 발현된다. Rib 단백질을 정제하는 방법이 고안되었으며 이 단백질에 대한 항체는 Rib 단백질을 발현하는 균주의 치명적인 감염에 대해 보호한다는 것이 밝혀졌다.

본 발명은 또한 Rib 단백질 발현세균, 즉 특히 혈청형III의 그룹 B Streptococcus 균주에 의해 야기되는 감염에 대해 보호할 수 있는 능력을 갖는 천연적으로 존재하는 및 인공적으로 변형된 그것의 변이체, 서브단편 및 다중체에도 관련된다.

본 발명은 또한 비-사람 숙주생물체내로의 삽입 및 상기 숙주로부터의 발현에 적합한 Rib 단백질 및 그것

의 변이체, 서브단편 및 단편의 유전암호를 함유하는 플라스미드, 코스미드 또는 파지 등의 벡터에도 관련된다. 본 발명은 특히 3개의 파지 클론, 각각 수탁번호 DSM 9039, 9040 및 9041을 갖는 람다 Rib 1-3, 람다 Rib 1-5 및 람다 Rib 1-7에 관한 것이다.

본 발명은 또한 플라스미드, 코스미드 또는 파지등의 적합한 벡터내에 삽입될 수 있는 Rib 단백질 및 그것의 변이체, 서브단편, 단편 및 다중체를 암호화하는 DNA 서열에도 관련된다. DNA 서열은 기탁된 파지 람다 Rib1-3, 람다 Rib1-5 및 람다 Rib1-7으로부터 얻어질 수 있다.

Rib 단백질은 다른 타입 III 균주에 의해 발현된다. 분석용 항-Rib혈청을 이용한 웨스턴 블로팅에 의해 분석된 여러다른 균주로부터 제조된 추출물은 거의 모든 추출물이 Rib 단백질을 포함하지만 단백질의 분자량은 65kD와 125kD사이에서 변한다는 것을 보였다(데이터는 나타내지 않음). 이 결과는 예기치 않은 것은 아니었다. 그것은 다른 그룹 B Streptococcus 단백질, 알파 및 베타 단백질에 대해서도 종전에 크기변이가 기술되었기 때문이다.

이용가능한 데이터는 단백질이 각 단위가 분자량 약 9kD에 해당하는 다수의 단위들로 구성될 수 있다는 것을 제안한다. 따라서 본 발명은 95kD 단백질 또는 동일 특성을 갖는 기본 단위의 다중체 및 서브단편을 포함한다. 변이체는 단백질 발현세균에 의해 야기되는 감염에 대해 보호할 수 있는 능력을 변화시키지 않는 아미노산의 치환 또는 삽입을 포함한다.

그룹 B Streptococcus 균주는 잘 알려져 있고 감염된 사람의 혈액으로부터 분리할 수 있다. 본 발명자에 의해 사용된 BM110균주는 S. Mattingly 박사에게서 얻었다(텍사스 산 안토니오 유니버시티 오브 텍사스). 여기서 언급된 모든 균주는 University of Lund 및 Lund University Hospital 에 있는 발명자들로부터 얻을 수 있다(Dr. Gunnar Lindahl, Department of Medical Microbiology, Sölvvegatan 23, S 22362 Lund, Sweden).

Rib 단백질은 혈청형III의 그룹 B Streptococcus 균주, 바람직하게는 균주 BS 30 또는 BM110에서 분리할 수 있다. 본 발명은 Rib 단백질의 정제방법에도 관련된다.

이 단백질은 하기의 방법에 의해 분리할 수 있다: 이 단백질을 발현하는 Streptococcus 그룹 B균주를 배양하고, 배지 및/또는 미생물을 분리하고, 세균을 효소, 바람직하게는 유타노리신(mutanolysin)으로 분해시키고, 프로테아제 억제인자를 선택적으로 첨가하고, 상징액으로부터 분해된 세균을 단리하고 상징액으로부터 Rib 단백질을 추출한다. 배지는 Todd-Hewitt 배양즙(Oxoid) 같은 Streptococcus배양에 적합한 어떤 배지일 수 있고 바람직하게는 세포를 1-30, 특히 12-20시간 배양한다. 효소, 바람직하게는 유타노리신으로의 분해는 진동없이 20 내지 40°C, 바람직하게는 37°C에서 1 내지 30 특히 10 내지 20, 바람직하게는 15 내지 18시간동안 수행된다. 단백질은 배지로부터 분리할 수 있으며, 그러한 경우에는 세포벽을 깨뜨리는데 사용되는 효소로 분해시킬 필요가 없다. 유타노리신을 오염시킬 수 있거나 미생물내에 존재할 수 있는 프로테아제 작용을 방해하기 위해서는 프로테아제 억제인자로서 염화벤조아미딘, 요오드아세트산 또는 플루오르화 페닐메틸술폰올 등을 첨가한다.

이 단백질은 이온교환 크로마토그래피, 바람직하게는 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔여과에 의해 정제할 수 있으며, 이 단백질을 함유하는 분획은 당업계에서 확립된 기술에 따라 수거할 수 있다.

본 발명은 특히 실질적으로 순수한 Rib 단백질 또는 그것의 서브단편에 관련된다. '실질적으로 순수한'이란 표현은 제약학적으로 해로운 물질을 포함하지 않는 물질을 나타낸다.

본 발명은 또한 Rib 단백질 및 그것의 서브단편, 변이체 또는 다중체에 대응하는 항체에도 관련된다. 동물을 항원, 이 경우엔 Rib 단백질로 면역화시키고, 혈액을 모으고, 혈청을 분리하고, 단백질과 반응하는 항체를 사용하는 방법은 잘알려져 있다. 항체를 포함하는 혈청 또는 IgG분획을 단백질 분석에 이용할 수 있다.

Rib 단백질에 대한 항체는 그룹 B Streptococcus 균주의 치명적인 감염에 대해 보호할 수 있기 때문에, 예컨대 임신한 여성이 그러한 감염으로부터 유아를 보호할 만큼 충분한 항체를 갖는지의 여부를 평가하기 위해서 그러한 항체의 수준을 측정하는 방법은 가치있을 수 있다. Rib 단백질 또는 그것의 서브단편을 이용하여 그러한 단백질에 대한 항체를 검출할 수 있다. 따라서 본 발명은 Rib 단백질 또는 그것의 서브단편을 함유하는 시약 키트에도 관련된다.

또한 Rib 단백질의 존재에 대해서 각종 샘플을 분석할 수도 있다. 이 단백질에 대한 항체를 이 목적에 사용할 수 있다. 따라서 본 발명은 Rib 단백질 또는 그것의 서브단편에 대한 항체를 함유하는, 단백질의 검출을 위한 시약키트에도 관련된다. 시약키트는 항체를 함유하는 상술한 혈액 분획중 어느 것을 포함할 수 있다. 그것은 또한 표준물로서 사용하기 위한 단백질, 그것의 서브단편 또는 다중체를 포함할 수 있다.

Rib 단백질의 성질은 그룹 B Streptococcus에 대한 백신의 개발을 위해 이 단백질을 사용할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서 본 발명은 활성성분으로서 단백질 또는 그것의 단편을 가능하게는 제약학적으로 허용가능한 보조약 및 부형제와 함께 함유하는 제약조성물에도 관련된다. 적합한 제약학적으로 허용가능한 보조약은 이 분야에서 종래 사용되던 것들이다. 적합한 부형제의 실례는 만니톨, 락토스, 전분, 셀룰로스, 글루코스 등이다. 보조약 및 부형제로 주어진 실례는 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

다른 혈청형의 몇 균주들의 유타노리신 추출물을 SDS-PAGE 및 알파 및 베타 단백질의 항혈청을 이용한 면역블로팅에 의해 분석하였다. 실시예 1참조. 4가지 주요 혈청형을 나타내는 4가지 균주로 얻어진 결과는 제1도에서 보여진다. 타입 Ia 균주 및 타입 Ib균주에 의해 발현되는 알파 및 베타 단백질은 염색된 겔의 고분자량 영역에서 뚜렷한 밴드를 나타낸다. 이 단백질은 이전의 관찰과 일치하게 두 균주 사이에서 크기가 다양하였다. 고분자량 영역에서 주요 단백질종은 타입 III 균주로부터 제조한 추출물에서도 존재하였는데, 이 균주는 알파단백질 또는 베타단백질을 발현하지 않는다. 그러한 뚜렷한 고분자량의 단백질종은 다른 타입 III 균주의 추출물에서도 관찰되었고, 단백질은 다른 균주사이에서 크기가 다양한 것으로 나타났다. 알파 및 베타 단백질의 이러한 유사성은 타입 III 균주의 고분자량 단백질을 보다 상세하게 연구하

도록 하였다. 균주 BS 30은 마우스에 독성이 있다고 알려졌기 때문에 이 연구를 위해 선택되었다. 이 균주에 의해 발현되는 95-kD 단백질(제1도)은 이온교환크로마토그래피 후 겔여과의 두번의 연속단계(제2도)를 이용하여 유타노리신 추출물로부터 정제하였다(실시예 2). 95-kD 단백질의 존재에 대해서 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 겔여과로부터 적당한 분획을 모아서 분석하였을때 단지 두 단백질종이 발견되었다: 다수 95-kD 단백질 및 소수 90-kD 단백질(제2B도 삽입물참조). 90-kD 단백질은 대부분 95-kD 단백질의 분해산물을 나타내는데, 그것은 이 두 단백질이 이차에 동일한 NH₂-말단서열을 갖는것을 보였기 때문이다. 정제된 단백질은 Rib 단백질(프로테아제에 대한 내성, 면역성, 그룹 B; resistance to proteases, immunity, group B)로서 나타낸다. Rib 단백질의 95-kD형태에 대한 항혈청은 SDS-PAGE 겔로부터 잘려진 조각으로 토끼를 면역화시켜서 제조하였다.

Rib 단백질이 세포표면 단백질인지를 분석하기 위해서, 4가지 주요혈청형을 나타내는 균주를 항-Rib혈청에 결합할 수 있는 능력에 대해 시험하였다(제3도). 연구된 5가지의 균주는 상술한 4가지 균주와 고독성 타입 III클론에 속하는 부가적인 타입 III 균주 BM 110을 포함하였다. 비교를 위해서 이 단백질의 고도로 정제된 제제의 항혈청을 이용하여 알파 및 베타단백질의 발현에 대해 이 5가지의 균주를 시험하였다.

항-알파혈청은 기대된대로 Ia 및 Ib 균주와 강하게 반응하였고, 또한 타입 III의 두 균주와 약하게 반응하였다(제3C도). 그러나, 타입 III 균주의 유타노리신 추출물은 웨스턴블롯으로 분석했을때 어떤 검출가능한 알파단백질을 포함하지 않았다. 따라서, 타입 III의 전체 세균과 항-알파혈청의 이러한 약한 반응성은 어떤 다른 세포벽 성분과 교차-반응성을 나타내는 것 같다. 이러한 데이터는 항-알파혈청과의 반응성은 균주가 세포표면상의 알파항원을 발현하는지를 명백하게 분석하는데 사용될 수 있다는 것을 보여준다. 항-베타혈청으로 유사한 데이터가 얻어졌다(제3B도).

Rib 단백질에 대한 항혈청은 두 타입 III 균주와 반응하였지만 타입 Ia 및 Ib 균주와는 그러하지 않았다(제3A도). 타입 II 균주에 대해서는 중간수준의 결합이 관찰되었다. 5 균주의 유타노리신 추출물을 분석용 항-Rib혈청을 이용하여 웨스턴블롯실험에서 분석하였을때, 타입 III 균주의 추출물은 강하게 반응하여 95kD에서 주요 블로팅 밴드를 나타냈지만, 3가지 다른 균주의 추출물은 완전히 반응성이 결핍되었다(데이터는 나타내지 않음). 이 결과는 타입 II 균주와 항-Rib혈청의 중간 반응성은 교차반응성 때문이며 이것은 웨스턴 블롯 조건하에서 사라진다는 것을 나타낸다. 따라서 Rib 단백질은 두 타입 III 균주의 세포표면에서 발현되지만 다른 3균주에서는 그러하지 않다.

그 다음엔 모두 침입성 감염으로부터 분리된 알려진 혈청형의 전체 58 균주를 Rib 단백질에 대한 항체에 결합할 수 있는 능력에 대해 시험하였다(표 1, 실시예 6 참조). 또한 각 균주를 알파 및 베타 단백질의 항체에 결합하는 것에 대해 시험하였다. 많은 균주들의 연구를 단순화하기 위해서 각 혈청을 제3도에서 보여지는 데이터의 기초하에 선택된 단일의 1000-배 희석도로 시험하였다. 이러한 유형의 분석은 명백한 결과를 나타냈고, 실시예 6의 표 1에서 요약하였다. Rib 단백질은 33 타입 III 균주중 31 그리고 13 타입 II 균주중 하나의 세포표면에서 발견되었지만, 타입 Ia 및 Ib의 12균주중 어느것에서도 그러하지 않았다.

세포표면에서 Rib 단백질이 결핍된 균주는 단백질을 배지속으로 분비하는 것이 가능한 것 같다. 표 1에서 나열된 58 균주의 배양상징액을 분석용 항-Rib혈청을 이용하여 도트-블롯 실험에서 분석하였다. 세포표면에서 단백질을 발현하지 않는 26 균주중 어느것의 상징액에서도 검출되지 않았지만 세포표면에서 단백질을 발현하는 32 균주중 26의 상징액에서는 발견되었다(데이터는 나타내지 않음).

마우스 보호 모델을 이용하여 Rib 단백질에 대한 토끼항체가 그룹 B Streptococcus로의 치명적인 감염에 대해서 보호할 수 있는지를 연구하였다(표 2, 실시예 7). 콘트를 동물에는 알파 단백질에 대한 항혈청 또는 면역화전 혈청을 표시한 대로 주입하였다. 데이터는 Rib 단백질에 대한 항혈청이 Rib 단백질을 발현하는 균주로의 치명적인 감염에 대해서 마우스를 보호하는 것을 보여준다.

Rib 단백질은 알파 및 베타 단백질처럼 보호면역을 제공하기 때문에 이 3가지 단백질을 비교하는 것은 흥미가 있었다. 분석을 위해 정제한 단백질의 항혈청을 이용하여 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다(제4도). 염색 겔은 3가지 단백질이 고도로 정제되었고 각 체제에 한가지의 다수종이 있다는 것을 보였지만, 웨스턴 블롯에서 보여지는 것처럼 3가지 단백질사이에서 어떤 혈청학적 교차반응은 없었다.

알파 및 베타 단백질은 본래 프로테아제 민감성의 차이 때문에 구별되었다. 알파단백질은 트립신에 저항성이 있지만 펩신에는 민감하며, 베타단백질은 이 두 프로테아제에 민감하다(Bevanger 및 Maeland, Acta Path Microbiol Scand Sect B 1979, 87:51). 정제한 알파 및 베타 단백질로의 실험은 이 차이를 확인시켰고 또한 Rib 단백질이 트립신 및 펩신에 저항성이 있다는 것을 나타냈다(제5도). 기대되는 것처럼 3가지 단백질 모두 프로티나제 K에 의한 분해에 민감하였다(데이터는 나타내지 않음). Rib 단백질의 프로테아제 저항성은 억제인자의 존재에 기인하지는 않았다. 그것은 Rib 단백질의 존재에서조차 베타단백질은 트립신 및 펩신에 의해 완전히 분해되었기 때문이다(데이터는 나타내지 않음).

이제는 본 발명을 하기의 실시예에 대해 기술할 것이다. 그러나 이것은 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

실시예 1. 단백질의 동정

4가지 주요혈청형을 나타내는 4가지의 그룹 B Streptococcus 균주를 기준균주로서 이용하였다: A 909, 타입 Ia/c; SB 35, 타입 Ib; B1284, 타입II; 여기서 기술된 BS30, 타입 III. BS30 균주는 Lund University Hospital에서 신생아 감염을 지닌 유아로부터 분리되었다. 모든 세균균주는 진동없이 37°C에서 Todd-Hewitt배양중(Oxoid)에서 성장시켰다. 균주의 유타노리신 추출물은 SDS-PAGE에 의해 그리고 알파 및 베타 단백질에 대한 항혈청을 이용한 면역블로팅에 의해 분석하였다. Streptococcus 균주의 소규모 유타노리신 추출물은 단백질 정제에 사용한 대규모 추출물에 대해 기술된 것처럼 제조되었다. 그러나 20%세균현탁액을 제조하는데 단지 50ml의 배양액을 사용하였고, 그중에서 1ml 샘플을 효소로 분해하였다.

SDS-PAGE는 전체 폴리아크릴아미드 농도 10% 및 교차-결합제 3.3%를 이용하여 표준기술로 수행되었다. 전기영동전에 2% SDS 및 5% 2-메르캅토에탄올을 함유하는 용액중에서 샘플을 3분간 끓였다. 분리된 단백질은 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250으로 염색하거나 또는 Semi-Dry Electrobliotter(Ancos, Vig, Denmark)를

이용하여 메탄올-활성화된 폴리비닐리덴디플루오라이드의 막(Immobilon-P; Millipore Corp., Molsheim, France)으로 일렉트로블로팅에 의해 옮겼다. Immobilon막을 표준방법을 이용하여 젤라틴으로 블로킹한 다음, 표시된 유형의 1000배 희석된 토끼항혈청과 배양하였고(실시예 7참조), 그후 방사성 표시된 단백질 G와 배양하고 방사선 사진을 얻었다.

클로라민 T방법을 이용하여 단백질을 운반체 없는 ¹²⁵I(Amersham International, England)으로 방사성 표지화하였다. Micro BCA 단백질 분석시약(Pierce)으로 전체 단백질 농도를 측정하였다. SDS-PAGE 겔로부터 단백질의 전기용출은 Bio-Rad의 모델 422 Electro-Eluter로 수행되었다.

결과는 제1도에서 보여진다.

실시예 2. Rib 단백질의 정제

균주 BS30의 101 하룻밤 배양액중의 세균을 원심분리하고, 50mM Tris, pH 7.3으로 두 번 세척하고, 동일 완충액중에 20%(v/v)로 재현탁시켰다. 그 다음 10mM 인산칼륨, pH 6.2중에 5000 유닛/ml로 녹인 뮤타노리신(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 세균현탁액(125ml)에 첨가하여 최종농도 350유닛/ml을 얻었다. 천천히 진동시키면서 37°C에서 17 시간동안 분해시키고, 프로테아제 억제인자를 하기의 최종농도로 첨가하였다: 염화벤즈아미딘, 5mM; 요오드아세트산, 5mM; 페닐메틸술폰플루오라이드, 2mM. 현탁액을 원심분리하고 즉시 상정액을 10mM Tris, pH 8.0에 대해 투석시켰다(투석튜브 Spectrapor NO.4). 이렇게 투석시킨 제제를 두 번의 연속 이온 교환크로마토그래피 단계에 가하였는데, 이것은 예비실험에 의해 보여지는 것처럼 순수한 Rib 단백질의 최상의 회수를 가능하게 하였다. Rib 단백질의 존재는 SDS-PAGE에 의해 분석하였고 95-kD밴드의 존재에 대해서 겔을 육안으로 조사하였다. 첫번째 크로마토그래피 단계에서는 투석시킨 제제(110ml)를 10mM Tris, pH 8.0중의 0.4M NaCl의 동일체적 그리고 10mM Tris, pH 8.0으로 평형된 DEAE Bio-Gel A(Bio Rad Laboratories, Richmond, CA)30ml와 혼합하였다. 이 혼합물을 4°C에서 1시간동안 천천히 교반했고, 유리성유를 통한 여과에 의해 겔로부터 비흡착된 물질(Rib 단백질함유)을 분리시켰다. 두번째 크로마토그래피 단계(제2A도)에서는, Rib 단백질을 함유하는 여과액을 증류수로 20배 희석하여 이온세기를 줄이고, 상술한대로 평형시킨 DEAE Bio-Gel A 30ml과 혼합하였다. 16시간동안 4°C에서 천천히 교반한후, 여과에 의해 겔을 회수하고 10mM Tris, pH 8.0으로 세척하였다. 흡착된 단백질(Rib 단백질함유)을 80ml 직선 염 구배(10mM Tris, pH 8.0중의 0-0.2M NaCl) 그다음 1M NaCl(60ml)로 용출시켰다. 분획(10ml)을 모으고, Rib 단백질을 함유하는 것을 모아서 농축하고, PBSA(0.12M NaCl, 0.03M 인산염, 0.02% NaN₃, pH 7.2)중의 Sepharose CL6B(4.2cmx 90cm) 컬럼에서 겔여과시켰다(제2B도). 95kD밴드의 존재에 대해서 분획을 SDS-PAGE 전기영동에 의해 분석하였다. Rib 단백질을 함유하는 분획(10ml)을 모아서 동결시켰다. Rib 단백질의 수율은 세균 25g에서 약 6mg이었다. 면역화학적 분석에 사용된 Rib 단백질제제의 순도를 확보하기 위해서 단백질을 SDS-PAGE후 95-kD밴드의 전기용출에 의하여 더욱 정제하였다. 그러나 SDS-PAGE분석은 이 전기용출된 물질과 겔여과 단계로부터 회수된 것 사이에서 어떤 순도의 차이를 나타내지 않았다.

상기에서 언급한 것처럼 Rib 단백질은 또한 단백질을 발현하는 균주의 배지에서도 발견된다. 상술한 것과 유사한 기술을 이용하여 그러한 배지로부터 단백질을 정제할 수 있다.

Immobilon으로 옮겨진 단백질 밴드의 자동화된 아미노산 서열분석은 Applied Biosystems 470A 가스-액체 고체상 시퀀서(Sequenator)를 이용하여 직접 막에서 수행되었다. 단백질 밴드를 위치설정하기 위해 막을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하고, 그 다음 시퀀싱을 위해 절단하였다. 단백질 서열의 분석에는 SwissProt Data Bank를 사용하였다.

균주 BS30의 Rib 단백질의 NH₂-말단서열은 SEQ ID NO:1에 나타났다. 정제된 단백질 Rib에서 95kD 및 90kD의 측정분자량을 갖는 두 단백질(제2B도)은 동일한 NH₂-말단서열을 갖는 것으로 밝혀졌는데, 이것은 보다 작은 분자는 보다 큰 것의 분해산물이라는 것을 나타낸다. 데이터 서치는 Rib 단백질의 NH₂-말단서열이 특유하다는 것을 보였다.

균주 BM 110에서 Rib 단백질을 분리하는 데에도 동일한 정제방법을 수행하였다. 균주 BM110에서 분리한 Rib 단백질의 NH₂말단서열(SEQ ID NO:2)은 BS30에서 대응 단백질의 NH₂말단서열과 위치 7에서 다를 수 있으며, BH 110단백질은 Asp대신에 Ser을 가질 수 있다.

실시예 3. 알파단백질의 정제

알파단백질은 알파 및 베타 단백질을 발현하는 타입 1b 균주인 균주 SB35에서 정제하였다. 이용된 방법은 균주 BS30에서 Rib 단백질을 정제하는데 이용된 것과 유사하였다. 토끼 항-알파혈청(노르웨이 University of Trondheim의 Dr. L. Bevanger에 의해 제공됨) 및 ¹²⁵I로 방사성표지된 단백질 G(Calbiochem Co., San Diego, CA)를 이용하여 도트-블롯분석에 의하여 분획을 알파단백질의 존재에 대해 분석하였다. 이온교환 및 겔여과 단계에서 알파단백질의 양태는 Rib 단백질과 유사하였다(제2도 참조). 겔여과 단계로부터 회수한 알파단백질은 가파른 피크에 존재하였다. 이 물질의 다른 항혈청으로의 분석은 그것이 미량의 오염 베타 단백질을 포함하며 이것은 IgA-Sepharos의 작은 컬럼을 통해 제제를 통과시킴으로써 제거되었다. 정제된 알파단백질은 SDS-PAGE 분석에 따르면 약 110,000의 분자량을 나타냈다(제4도 참조). 알파단백질의 수율은 세균 39g에서 12mg이었다. 면역화학적 연구에 사용된 알파 단백질은 Rib 단백질에 대해 상술한 것처럼 SDS-PAGE 겔로부터 전기용출에 의해 더욱 정제하였다. 그러나, SDS-PAGE분석은 이렇게 전기-용출된 물질과 겔여과 단계로부터 회수된 것 사이에서 어떤 순도의 차이를 나타내지 않았다.

실시예 4. 베타 단백질의 정제

IgA-결합 베타 단백질(Russell-Jones et al., J Exp Med 1984, 160:1467)은 Rib 및 알파단백질에 대해 사용된 것과 유사한 방법에 의해 정제하였다. 출발물질은 50mM 글리신-NaOH 완충액, pH 11.0중에 세척한 SB35 세균을 배양함으로써 얻어졌다(현탁액의 최종 pH 9.7). 사전연구는 그러한 추출물에서 주요 단백질 중은 베타 단백질이라는 것을 보였다. 즉시 추출물(222ml)을 10mM Tris, pH 8.0에 대해 투석시키고, 증류

수로 20배 희석하고 BEAEBio-Gel A(10mM Tris, pH 8.0 으로 평형시킴) 40ml과 혼합하였다. 4°C에서 2시간 동안 약하게 교반한후, 겔을 컬럼으로 옮기고 800ml 직선 염 구배(10mM Tris, pH 8.0중의 0-0.2MNaCl)로 용출시켰다. 방사성 표지된 IgA 또는 항-베타항체 및 분석용 방사성 표지된 단백질 G를 이용하여 도트 블롯 방법을 이용하여 베타 단백질의 존재에 대해서 분획(10ml)을 시험하였다. 베타 단백질은 첫번째 구배 부분에서 용출되었다. 적당한 분획을 모아서 농축하고, PBSA중의 AcA34(Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)컬럼(4.2x 100cm)에서 겔여과하였다. 베타 단백질은 명확한 피크에서 용출되었다. 적당한 분획을 모아서 농축하고 동결시켰다. 수율은 세균 23g에서 순수단백질 9mg이었다. 그러한 제제에서 주요단백질 종은 SDS-PAGE에 따르면 약 130,000의 분자량을 가졌지만, 단백질을 웨스턴 블롯분석에 적용시켰을때 보다 낮은 분자량의 분해산물이 소량 보여졌다.

실시에 5. 프로테아제 민감성의 분석

프로테아제 민감성의 분석을 위해서(제5도) 정제한 알파, 베타 또는 Rib 단백질의 200 µl 샘플(0.5mg/ml)을 트립신, 펩신, 또는 프로틴아제 K(0.2mg/ml)와 37°C에서 1시간동안 배양하였다. 트립신 분해는 0.25M인산나트륨, pH 7.5에서, 펩신분해는 0.25M 아세트산나트륨, pH 4.0에서, 프로틴아제 K분해는 0.25M Tris, pH 7.4에서 수행하였다. SDS-PAGE에 의한 분석전에 샘플을 중화시켰다.

실시에 6. 알파, 베타 및 Rib 단백질의 세포표면 발현에 대한 Streptococcus 균주의 분석 5 가지의 기준 균주를 먼저 알파, 베타 및 Rib 단백질의 표면발현에 대해 분석하였다. 이후에 모두 침입성 감염 사례로부터 분리된 58 그룹 B Streptococcus 균주를 이용하여 세포표면 단백질의 발현을 연구하였다(표 1 참조). 그룹 B Streptococcus 균주의 분류는 표준기술을 이용하여 Lund University Hospital의 Clinical Microbiology Laboratory에서 수행되었다.

10ml 하룻밤 배양액중의 세균을 PBSAT(0.05% Tween 20 으로 보충된 PBSA)로 두번 세척하였고 PBSAT중의 1%현탁액을 제조하였다. 이 세균현탁액 샘플(180 µl)을 PBSAT로 희석한 토끼 항혈청 20 µl와 혼합하고 혼합물을 1시간동안 23°C에서 배양하였다. 그다음 PBSAT 2ml을 첨가하고, 세균을 원심분리하고, 2ml PBSAT로 한번 세척하고, 200 µl PBSAT중에 재현탁시켰다. 결합된 IgG의 검출을 위해 방사성 표지된 단백질 G 25 µl(PBSAT중의 약 104cpm)를 첨가하고 1시간동안 23°C에서 배양을 계속하였다. PBSAT 2ml 첨가후 세균을 원심분리하고 PBSAT2ml첨가에 의해 펠렛을 세척하였다. 최종 원심분리후 상정액을 버리고 펠렛의 방사능을 측정하였다. 많은 균주를 알파, 베타 및 Rib 단백질의 발현에 대해 시험할 때(표 1) 1:1,000의 단일의 최종 항혈청 희석도를 이용하였다. 면역화전 토끼 항혈청으로의 컨트롤이 항상 포함되었고 모든 경우에 완전히 네가티브였다. Rib 단백질은 33 타입 III 균주중 31의 세포표면에서 발견되었지만, 타입 Ia 및 Ib의 12 균주중 어느 것에서도 발견되지 않았다.

표 1. 침입성 감염을 갖는 환자로부터 분리한 58 그룹 B Streptococcus 균주에 의한 알파, 베타 및 Rib 단백질의 세포 표면 발현

캡슐타입

발현된 단백질	Ia	Ib	II	III
	(n=9)	(n=3)	(n=13)	(n=33)
알파	6	0	4	0
베타	1	0	0	0
알파 및 베타	1	3	5	0
Rib	0	0	1	31
없음	1	0	3	2

제3도에서 보여지는 것처럼 알파, 베타 및 Rib 단백질의 세포표면 발현은 특정항혈청으로 분석하였고, 결합된 항체는 방사성 표지된 단백질 G로 검출하였다.

여기서 연구된 58 균주는 침입성 감염 사례로부터 모두 분리되었지만, 그러한 균주들의 임의의 집합을 나타내지는 않는다. 그것은 단지 두 타입 II 균주만을 포함한 본래 연구된 집합에 후에 타입 II 균주 대부분이 첨가되었기 때문이다.

실시에 7. 항혈청의 제조 및 마우스 보호 테스트

모든 항혈청은 토끼에서 생성되었는데, 이것은 등의 피하내로 면역화시켰다. 균주 BS30에 의해 발현된 Rib 단백질에 대한 항혈청의 제조를 위해서, SDS-PAGE겔에서 몇몇 95kD밴드에 해당하는 겔조각을 절단하고, 작은 조각으로 나누고, 완전 프로인트 보제와 혼합하였다. 초기 면역화를 위해서 2ml PBS중의 6조각(단백질 약 60 µg)을 보제 1ml과 혼합하였다. 부스터 주사에는 3개의 밴드(단백질 30 µg)를 이용했다.

첫번째 부스터는 4주일 후 주어졌고 3번의 추가부스터는 2주일 간격으로 주어졌다. 토끼를 3주일간격으로 3번 방혈시켰다. 이 3번의 방혈로부터 얻은 혈청을 모으고 여기서 기술된 실험에 이용하였다. 알파 단백질에 대한 항혈청도 동일방법에 의해 제조하였다. 정제하는 동안 분획들을 분석하는데 사용된 항-알파혈청의 첫번째 샘플은 Dr. Lars Bevanger, Trondheim으로부터 얻어졌다. 정제한 베타단백질에 대한 항혈청은 본 발명자의 실험실에서 구할 수 있었다.

본 발명자 실험실에서 사육된 C3H/HeN마우스를 10-20주일 나이에 이용하였다. 마우스에 PBS중에서 5배 희석한 토끼혈청 0.5ml을 복막내 주사하였고, 4시간후 Todd-Hewitt배양즙에서 희석한 로그단계세균 0.5ml의 복막내 주사에 의하여 감염시켰다. 90% 치사투여량(LD90)으로 평가된 이용된 세균의 수는 균주 BM 110, BE 210, 및 SB35sed1 은 2×10^6 c.f.u., BS30 및 L25은 2×10^7 c.f.u.였다. 4일동안 매일 죽은 동물을 카운트했다. 콘트롤 동물은 대개 25시간내에 죽었다.

표 2. Rib 단백질을 발현하는 그룹 B Streptococcus 균주의 치명적인 감염에 대해서 Rib 단백질의 토끼 항혈청은 마우스를 보호한다.

균주	접수 타입	관련 세포표면 단백질	예비처리후 생존한 마우스		
			항-Rib 혈청	항-알파 혈청	정상 혈청
BS30	III	Rib	29/32 ^a	1/15	4/20
BM110	III	Rib	15/24 ^a	0/15	0/15
L25	III	.	0/15	2/14	n.d.
BE210	II	Rib	10/15 ^a	0/14	n.d.
SB35sed 1	Ib	알파	1/15	10/15 [~]	n.d.

C3H/HeN 마우스에 0.1ml의 토끼 항혈청(PBS로 0.5ml로 희석함)을 복막내 주사하였고 4시간후 0.5ml의 Todd-Hewitt배양즙으로 희석한 로그단계의 세균의 LD90투여량으로 공격하였다. 생존 데이터를 카이제곱 테스트에 의해 분석하였다.

* 이 실험에 관련된 두 항원, Rib 단백질 또는 알파 단백질의 발현

+ 4일동안 생존한 마우스의 수/감염된 마우스의 전체수

§ 항-알파혈청 또는 정상혈청을 주입한 콘트롤과 비교했을때 $P < 0.001$

|| n.d.= 측정하지 않음

^a 항-알파혈청을 주입한 콘트롤과 비교했을때 $P < 0.001$

* * 항-Rib혈청을 주입한 콘트롤과 비교했을때 $P < 0.01$

표 2의 데이터는 Rib 단백질의 항혈청은 그 단백질의 정제된 타입 III 균주 BS 30의 치명적인 감염에 대해서 보호한다는 것을 나타낸다. 콘트롤혈청 실험에 의해 보여지는 것처럼 이러한 보호는 비특이적이지 않다. 또한 항-Rib혈청은 그룹 B Streptococcus 균주의 고독성클론에 속하는 다른 타입 III 균주 BM 110의 치명적인 감염에 대해서도 보호하였다(Musser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:4731). 반대로, 항-Rib혈청은 Rib 단백질을 발현하지 않는 타입 III 균주중 하나인 L25의 감염에 대해서는 보호하지 않았다(표 1). Rib 단백질을 발현하는 타입II균주 실험에 의해 보여지듯이 항-Rib혈청의 보호효과는 타입 III 균주에 제한되지 않았다. 기대되는 것처럼 항-Rib혈청은 알파항원을 발현하는 타입 Ib균주에 대해서는 보호하지 않았다. 이러한 데이터는 Rib 단백질은 거의 모든 타입 III 균주에서 그리고 어떤 타입 II 균주에서 즉 침입성 감염을 일으키는 대부분의 그룹 B Streptococcus 균주에서 독성인자로서 작용한다는 것을 강하게 나타낸다.

실시에 8. rib-유전자의 클로닝 및 Escherichia coli 에서 Rib 단백질의 발현

Rib 단백질의 구조 유전자는 고독성 클론에 속하는 혈청형 III 균주인 균주 BM 110에서 클로닝되었다. 이 균주에 의해 발현되는 Rib 단백질(SEQ ID NO:2)과 균주 BS30에 의해 발현되는 Rib 단백질(SEQ ID NO:1)은 유사한 크기와 NH₂-말단서열을 갖는다. 박테리오파지 람다중의 균주 BM 110 DNA의 라이브러리를 제조하였

다. 균주 BM 110의 500ML 로그단계 Todd-Hewitt 배양물중의 세균을 원심분리하였다. 펠렛을 3번 동결 및 해빙시키고, 20ML TE완충액(10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0)중에 현탁시키고, 원심분리하고, 세척하고 동일 완충액 4ml에 재현탁시켰다. 10mM 인산칼륨, pH 6.2중에 5000유닛/ml로 녹인 유타노리신(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 세균현탁액에 첨가하여 최종농도 500유닛/ml를 얻었다. 리소짐(Sigma)을 최종농도 8mg/ml로 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 분해시켰다. 200 μ l의 10% SDS 및 500 μ l Tween 용해혼합물(2% Tween-20, 50mM Tris pH 8.0 및 60mM EDTA)의 첨가, 그후 다시 200 μ l의 10% SDS의 첨가에 의해 세균세포를 용해시켰다. 용해물을 50°C에서 19시간동안 프로티나제 K(Sigma, 100 μ g/ml)로 처리하고, 페놀 및 클로로포름 추출을 반복하였다. DNA를 에탄올로 침전시키고, SpeedVac 농축기(SAVAC)에서 건조시키고, 4.5ml TE 완충액에 녹였다. CsCl 밀도구배 초원심분리에 의해 DNA를 더욱 정제하고 TE 완충액에 대해 투석하였다. 이때 DNA농도는 대략 2.5 μ g/ μ l였다. 이 DNA를 Sau3AI(Promega)으로 부분분해시키고, Bam HI절단된 λ EMBL3의 암(arm)(Stratagene)에 결합시켰다. 재조합 파지 DNA를 Gigapack II Gold Packaging Extract(Stratagene)를 이용하여 시험관내 패키징시켰다. 라이브러리를 E.coli 균주 LE392에 플레이팅하고 면역블로팅 기술로 Rib 단백질 생성에 대해서 스크리닝하였다. 약 1000플라크를 갖는 플레이트를 니트로 셀룰로스 막으로 덮고 1시간동안 4°C에서 방치하였다. 막을 제거하고, 블로킹시키고, 50배 희석한 토끼 항-Rib혈청을 함유하는 완충액에서 배양하였다. 포지티브 플라크 즉 토끼 IgG에 결합하는 것은 퍼옥시다제-표지된 단백질 A(Simna)(20 μ g/ml)의 첨가에 의해 검출하였고 표준기술을 이용하여 퍼옥시다제의 존재를 가시화하였다. 7개의 독립적인 Rib발현 램다 클론이 분리되었다. 이 클론중 3개, 즉 램다 Rib 1-3, 램다 Rib 1-5 및 램다 Rib 1-7은 각각 수탁번호 DSM 9039, 9040 및 9041로 브라운쉬바이그 디-38124 백 1배 마세로더에 있는 도이체 잠룡 폰 미크로오르가니즘에서 수탁되었다. 약 0.5 μ g/ μ l의 DNA농도를 갖는 램다 Rib 1-3클론에서 DNA의 제제가 만들어졌다. 이 7개의 클론의 용해물을 항-Rib혈청을 이용하여 웨스턴 면역블롯 분석하였다(제6도 참조). 클론중 몇몇은 균주 BM 110에서 직접 분리된 Rib 단백질과 동일한 크기의 Rib 단백질을 발현한다.

서열목록

(1) 일반정보:

(i) 출원인 :

- (A) 명칭: 구나르 린달
- (B) 거리: 마그누스 스텐복스가탄 5
- (C) 도시: 룬트
- (E) 국가: 스웨덴
- (F) 우편번호(ZIP):222 24

(ii) 발명의 명칭: 그룹 B Streptococcus의 많은 균주들에 대한 면역성을 제공하는 세포표면 단백질인 Rib 단백질: 그 단백질의 정제방법, 시약키트 및 제약조성물.

(iii) 서열의 수: 2

(iv) 컴퓨터 판독형태:

- (A) 매체유형: 플로피디스크
- (B) 컴퓨터: IBM PC호환기종
- (C) 오퍼레이팅 시스템: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어: Patent In Release #1.0, Version #1.25(EPO)

(v) 분출원 데이터:

출원번호:

(2) SEQ ID NO: 1에 대한 정보

(i) 서열특징:

- (A) 길이: 12 아미노산
- (B) 유형: 아미노산
- (D) 형태: 선형

(ii) 분자유형: 단백질

(iii) 가정: NO

(iv) 안티-센스: NO

(v) 단편유형: N-말단

(vi) 본래의 출처:

- (A) 생물체: Streptococcus 그룹 B
- (B) 균주: BS 30

(xi) 서열기술: SEQ ID NO: 1:

Ala Glu Val Ile Ser Gly Asp Ala Val Thr Leu Asn
1 5 10

(2) SES ID NO: 2에 대한 정보

(i) 서열특징:

(A) 길이: 12 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자유형: 단백질

(iii) 가정: NO

(v) 단편유형: N-말단

(vi) 본래의 출처:

(A) 생물체: Streptococcus 그룹 B

(B) 균주: BM 110

(xi) 서열기술: SEQ ID NO: 2:

Ala Glu Val Ile Ser Gly Ser Ala Val Thr Leu Asn
1 5 10

(57) 청구의 범위

청구항 1

- 그룹 B Streptococcus 균주, 특히 혈청형 III인 것들로부터 얻을 수 있고,
- 트립신 및 펩신에 의한 분해에 비교적 저항성이 있고,
- SEQ ID NO: 1에 따른 N-말단 아미노산 서열 또는 그것과 적어도 90% 상동인 서열을 갖고, 및
- 이 단백질을 발현하는 그룹 B Streptococcus 균주에 대해서 보호면역성을 제공하는 것을 특징으로 하는 Rib으로 표시되는 정제된 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 균주 BS 30 또는 BM 110이고 단백질은 SDS-PAGE에 의해 결정할 때 약 95kD의 겔보기 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 3

Rib 단백질을 발현하는 Streptococcus 그룹 B 균주를 배양하고, 배지 및/또는 미생물을 분리하고, 세균을 효소 바람직하게는 유타노리신으로 분해시키고, 프로테아제 억제인자를 선택적으로 첨가하고, 분해된 세균을 상징액으로부터 분리하고, Rib 단백질을 상징액으로부터 추출하는 것을 특징으로 하는 Rib 단백질의 분리방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 단백질은 투석, 이온교환 크로마토그래피에 의한 분리 및 겔여과에 의해 상징액으로부터 추출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에서 정의된 Rib 단백질에 매우 특이적인 항체.

청구항 6

Rib 단백질에 대한 항체의 검출을 위한 시약키트에 있어서, 제 1 항에서 정의된 Rib 단백질을 함유하는 것을 특징으로 하는 시약키트.

청구항 7

Rib 단백질의 검출을 위한 시약키트에 있어서, 제 1 항에서 정의된 단백질에 특이적인 항체, 및 선택적으로 표준물로서 Rib 단백질을 함유하는 것을 특징으로 하는 시약키트.

청구항 8

제 1 항에서 정의된 Rib 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 벡터.

청구항 9

제 8항에 있어서, Rib 단백질을 암호화하는 벡터의 DNA서열은 수락번호 DSM 9039를 갖는 파지 람다 Rib

1-3의 대응 DNA 서열중 어느 것과 본질적으로 동일한 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 10

제 8 항에 있어서, Rib 단백질을 암호화하는 벡터의 DNA 서열은 수탁번호 DSM 9040을 갖는 파지 람다 Rib 1-5의 대응 DNA 서열중 어느 것과 본질적으로 동일한 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 11

제 8 항에 있어서, Rib 단백질을 암호화하는 벡터의 DNA 서열은 수탁번호 DSM 9041을 갖는 파지 람다 Rib 1-7의 대응 DNA 서열중 어느 것과 본질적으로 동일한 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 12

수탁번호 DSM 9039를 갖는 파지 람다 Rib 1-3.

청구항 13

수탁번호 DSM 9040를 갖는 파지 람다 Rib 1-5.

청구항 14

수탁번호 DSM 9041를 갖는 파지 람다 Rib 1-7.

청구항 15

제 8 항에서 정의된 벡터로부터 얻을 수 있는, Rib 단백질을 암호화하는 DNA 서열.

청구항 16

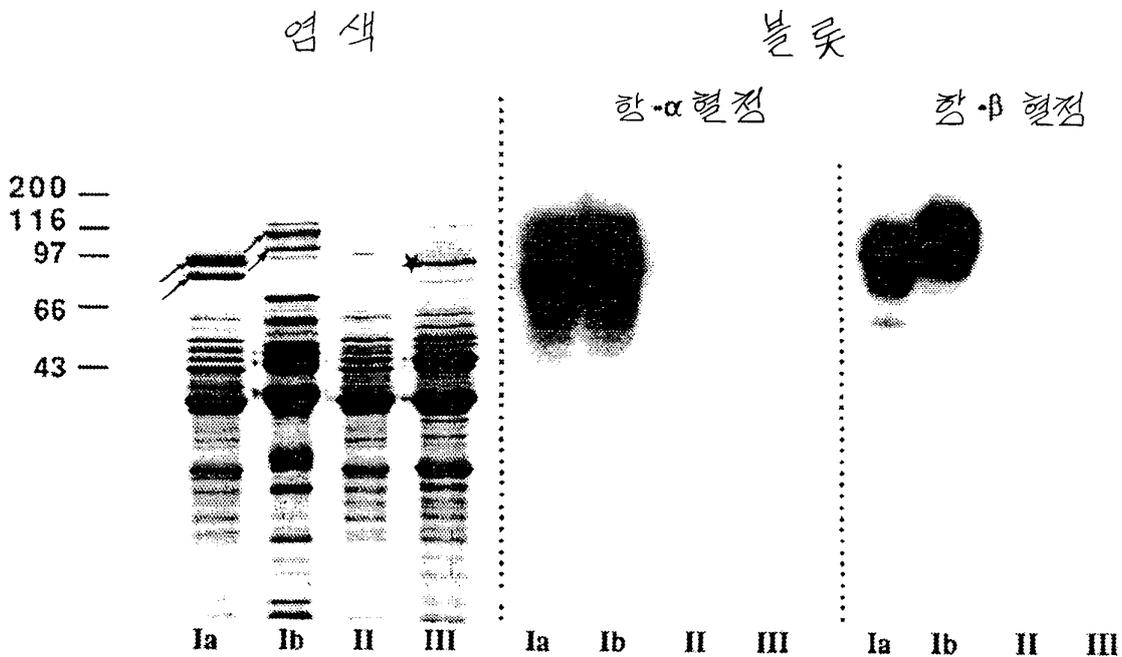
제 1 항에서 정의된 Rib 단백질을 함유하는 제약조성물로서, 상기 조성물은 추가로 제약학적으로 허용가능한 보조약 또는 부형제를 함유하고, 숙주내에서 Streptococcus 그룹 B 감염의 예방에 적합한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

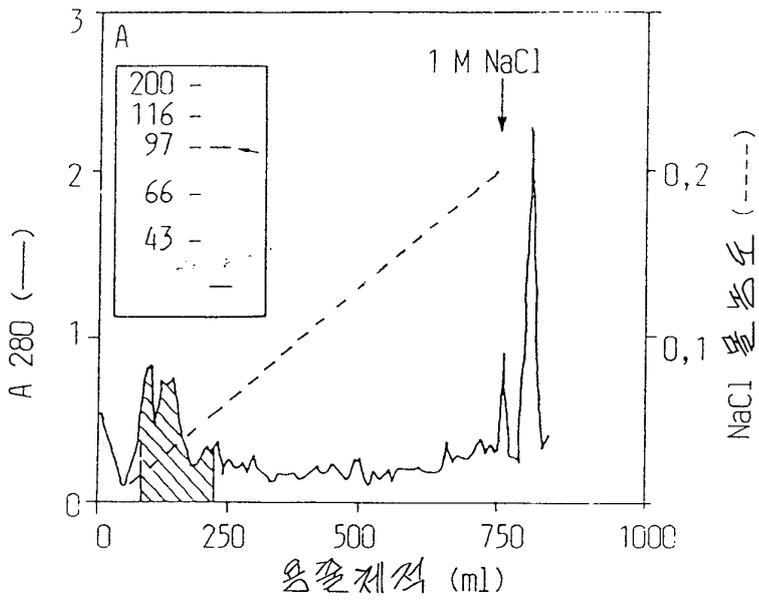
제 1 항에서 정의된 Rib 단백질을 함유하는 백신으로서, 상기 백신은 추가로 제약학적으로 허용가능한 보조약 또는 부형제를 함유하고, 숙주내에서 Streptococcus 그룹 B 감염의 예방에 적합한 것을 특징으로 하는 백신.

도면

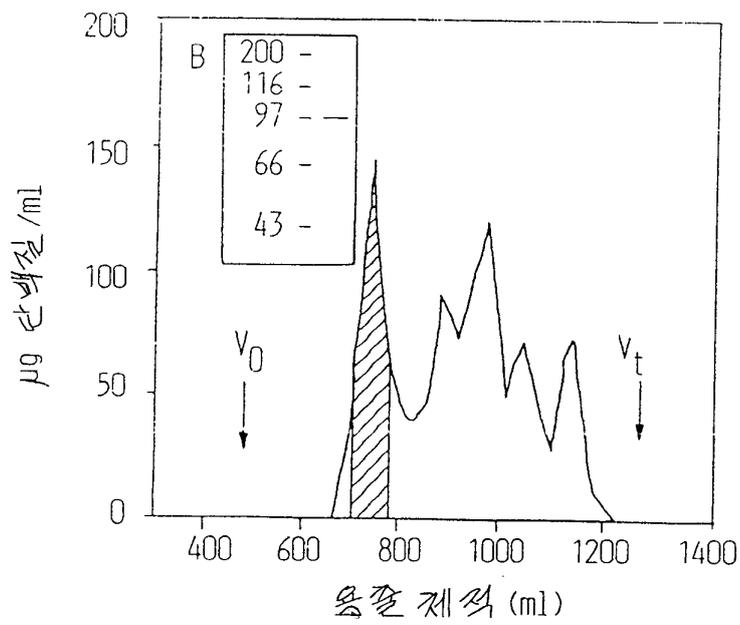
도면1



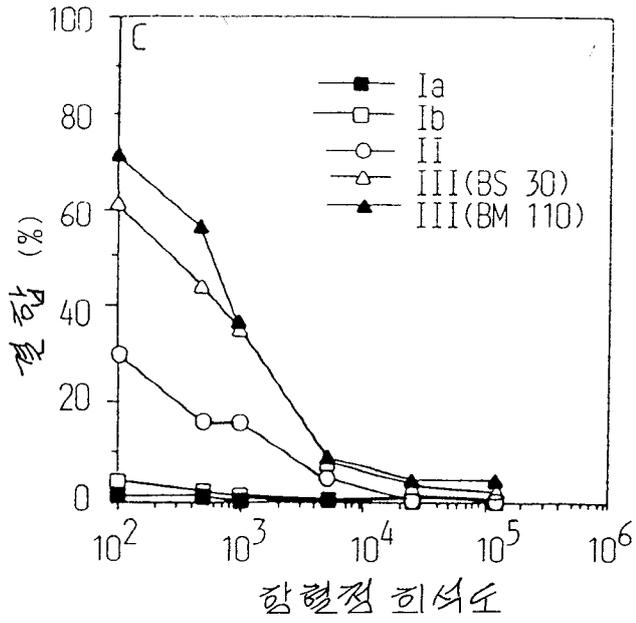
도면2a



도면2b

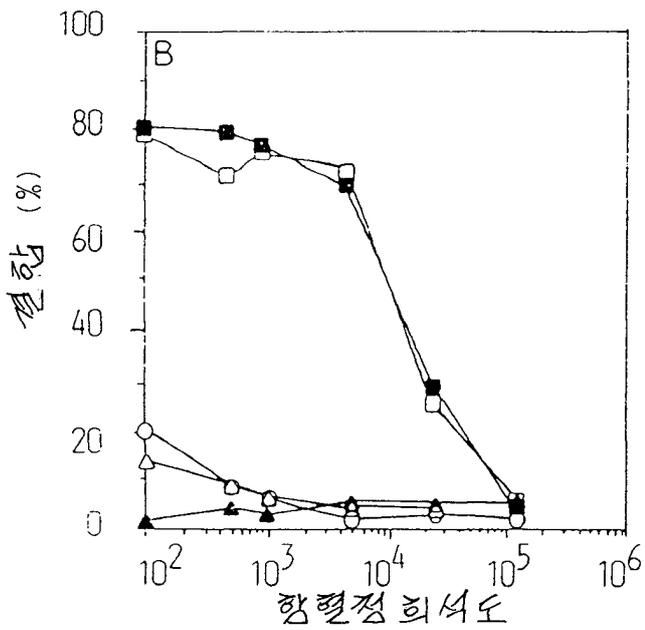


도면3a



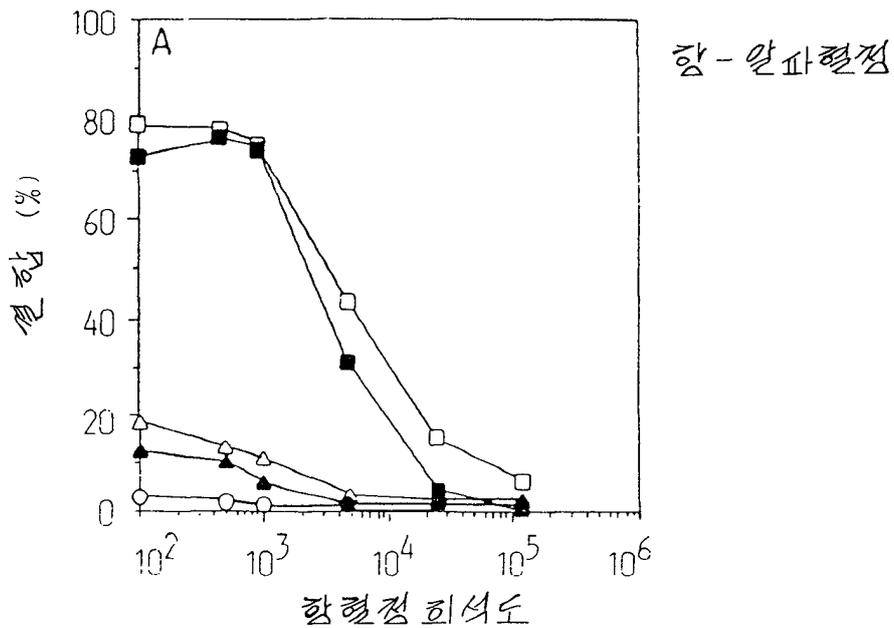
항-Rib 결합

도면3b

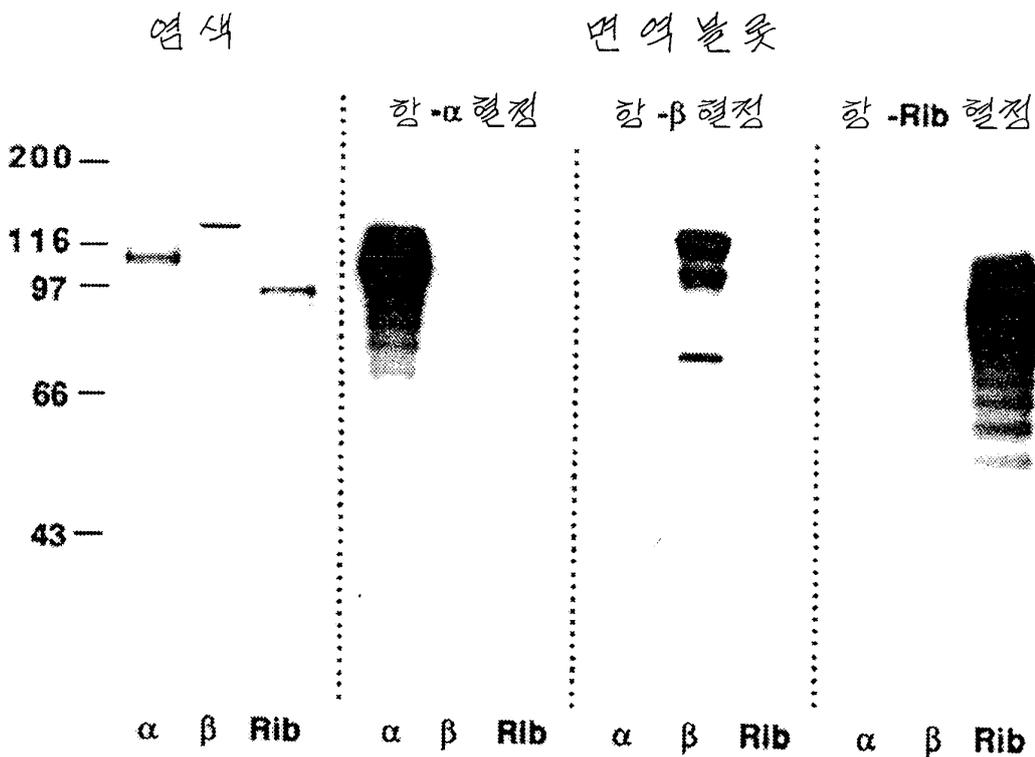


항-베타 결합

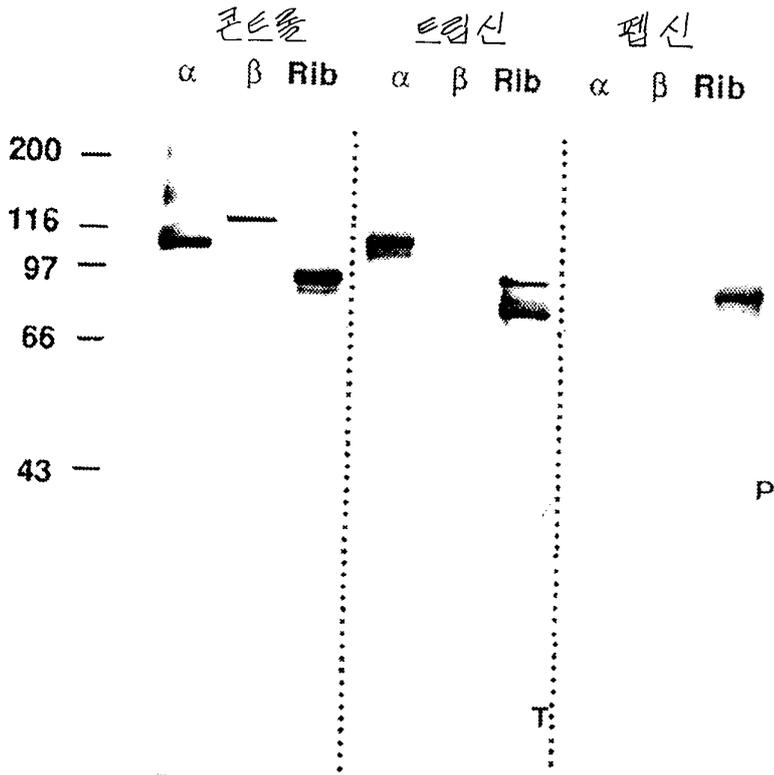
도면3c



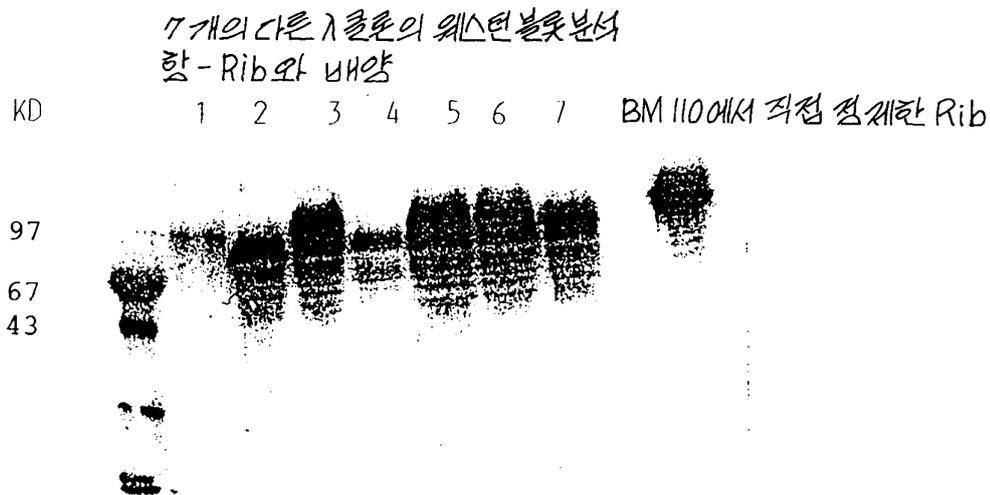
도면4



도면5



도면6a



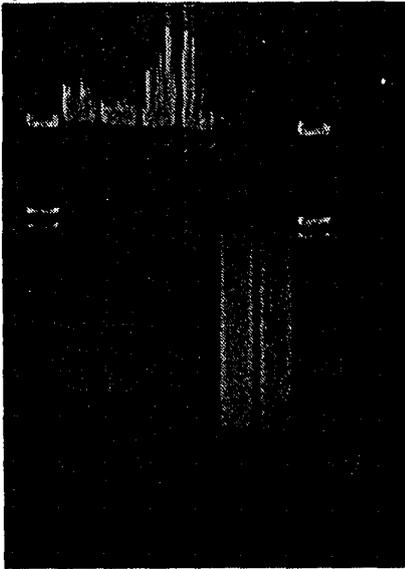
도면6b

염색제 Streptococcal DNA

레인

1+8 λ EcoRI/HindIII2 BM110 DNA before CsCl 1 μ l4 BM110 DNA after CsCl 1 μ l6 BM110 DNA Sau3AI 1 μ l

1 2 3 4 5 6 7 8



도면6c

 λ Rib 3 DNA(λ Maxi prep Promega)

라인

- 1 λ EcoRI/HindIII
- 2 λ Rib 3
- 3 λ Rib 3 BamHI
- 4 λ Rib 3 Sall
- 5 λ Rib 3 PstI

12345

