



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월23일
(11) 등록번호 10-1266552
(24) 등록일자 2013년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-7024651

(22) 출원일자(국제) 2004년06월23일
심사청구일자 2009년04월22일

(85) 번역문제출일자 2005년12월22일

(65) 공개번호 10-2006-0084789

(43) 공개일자 2006년07월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/020048

(87) 국제공개번호 WO 2005/000347
국제공개일자 2005년01월06일

(30) 우선권주장
60/480,405 2003년06월23일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현
WO2003007985 A2*
US05888510 A1
US06146902 A1
US06248570 B1

(73) 특허권자
 박스터 헬쓰케어 에스.에이.
 스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우
 에르슈트라쎄 130

 백스터 인터내셔널 인코포레이티드
 미국 일리노이주 60015 디어필드 원 백스터 파크
 웨이

(72) 발명자
 미천, 프랜시스, 제이.
 미국, 메릴랜드 20814, 베테스더, 로즈데일 애비
 뉴 4401

(74) 대리인
 특허법인아주약현

(74) 대리인
특허법이 아주 양허

전체 청구항 수 : 총 25 항

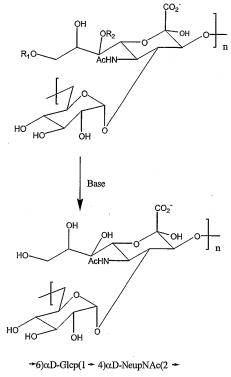
심사관 : 정현아

(54) 발명의 명칭 그룹 Y 수막염균에 대한 백신 및 그의 수막염균성 조합

(57) 요약

본 발명은 개질된 수막염균 Y 다당류(GYMP), 개질된 다당류 및 탑체를 포함하는 접합체, 그룹 Y 수막염균에 대하여 인간을 포함하는 온혈 동물의 면역용 백신, 및 상기 개질된 다당류, 접합체 및 백신의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

담체 단백질 및 O-아세틸-양성 그룹 Y 수막염균 다당류로부터 얻어지는 그룹 Y 수막염균 다당류 단편(여기서 상기 다당류 단편은 평균 분자량이 150 kDa 미만이고 염기 가수분해에 의해 적어도 80% 탈-O-아세틸화되어 있다)을 포함하는 면역원성 접합체로서,

상기 담체 단백질은 상기 다당류 단편의 절단된 시알산 고리밖 부사슬(exocyclic side chain)을 통하여 상기 다당류 단편에 공유결합되어 있고, 상기 면역원성 접합체의 다당류는 완전히 N-아세틸화되어 있으며,

상기 면역원성 접합체는 수막염균성 감염에 대한 백신으로 사용되기 위한 것인 면역원성 접합체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 다당류 단편은 100% 탈-O-아세틸화되는 것인, 면역원성 접합체.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 다당류 단편은 2.5 내지 100 kDa의 평균분자량을 가지는 것인 면역원성 접합체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 다당류 단편은 10 kDa 내지 20 kDa의 평균분자량을 가지는 것인, 면역원성 접합체.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 담체 단백질은 세균성 독소 또는 유독소인 면역원성 접합체.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 세균성 독소 또는 유독소는 디프테리아, 파상풍, 세균 슈도모나스(Pseudomonas), 포도당구균, 연쇄구균, 백일해(pertussis), 및 대장균(Escherichia coli) 독소 또는 유독소로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 면역원성 접합체.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 세균성 독소 또는 유독소는 파상풍 독소 또는 유독소인 면역원성 접합체.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 정의된 면역원성 접합체를 포함하며, 약학적으로 허용가능한 운반 매체(carrier medium), 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 백신.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 담체 단백질은 세균성 독소 또는 유독소이고, 디프테리아, 파상풍, 세균 슈도모나스 (Pseudomonas), 포도당구균, 연쇄구균, 수막염균성 포린(porin) B, 백일해 및 대장균(Escherichia coli) 독소 또는 유독소로 이루어지는 군에서 선택되는 백신.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 담체 단백질은 파상풍 독소 또는 유독소인 백신.

청구항 14

제 11항에 있어서, 보조제(adjuvant)를 더 포함하는 백신.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 보조제는 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide)인 백신.

청구항 16

제 11항에 있어서, 주사에 의한 투여용 백신.

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항에 정의된 다당류 단편을 그룹 Y 수막염균에 대한 수막염균용 백신의 제조에 사용하는 방법.

청구항 19

제1항에 정의된 면역원성 접합체를 그룹 Y 수막염균에 대한 수막염균용 백신의 제조에 사용하는 방법.

청구항 20

그룹 Y 수막염균에 대한 면역화 용도의 백신의 제조방법으로서,

제1항에 정의된 다당류 단편을 제공하는 단계;

상기 다당류 단편을 담체 단백질에 공유적으로 결합시키는 단계; 및

이것을 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 운반 매체, 희석제 및 보조제와 혼합하는 단계;를 포함하는 방법.

청구항 21

그룹 Y 수막염균에 대한 면역화 용도의 백신의 제조방법으로서,

제1항에 정의된 면역원성 접합체를 제공하는 단계; 및

이것을 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 운반 매체, 희석제 및 보조제와 혼합하는 단계;를 포함하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

제11항에 정의된 백신을 사용하여 그룹 Y 수막염균에 대한 온혈 동물의 백신접종용 백신을 제조하는 방법.

청구항 24

수막염균 Y 다당류를 0.1N NaOH를 이용하여 염기 가수분해하고, 완전한 재-N-아세틸화를 수행하는 것을 포함하는, 백신에 사용하기 위한 개질된 수막염균 Y 다당류의 제조방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

- (a) 적어도 부분적으로 정제된 수막염균 Y 다당류를 제공하는 단계;
- (b) 상기 다당류를 염기 가수분해하여 상기 다당류가 적어도 부분적으로 탈-0-아세틸화되도록 하는 단계;
- (c) (b) 단계의 생성물을 산 가수분해하여 상기 탈-0-아세틸화된 다당류가 단편화되도록 하는 단계; 및
- (d) (c) 단계의 생성물을 완전히 재(re)-N-아세틸화하는 단계;

를 포함하는,

10~20 kDa의 분자량을 가지며, 백신에 사용되기 위한 개질된 수막염균 Y 다당류 단편의 제조방법.

청구항 27

개질된 수막염균 Y 다당류를 담체 단백질에 결합시켜 접합체를 형성하도록 하는 커플링제의 존재하에서 제26항의 방법에 따라 제조된 개질된 수막염균 Y 다당류를 담체 단백질과 접촉시키는 단계를 포함하는 면역원성 접합체의 제조방법.

청구항 28

수막염균 Y, C, 및 W 135에 의해 야기되는 질병을 예방하기 위한 그룹 Y, 그룹 C 및 그룹 W135 수막염균의 탈-0-아세틸화된 다당류 형태를 포함하는 조합 수막염균 접합 백신으로서, 여기서 상기 탈-0-아세틸화된 그룹 Y 형태는 제1항에 정의된 다당류 단편을 포함하고, 상기 그룹 Y 다당류 단편은 담체에 접합되어 있는 것인, 조합 수막염균 접합 백신.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 면역원성 다당류가 100 kDa 미만의 평균분자량을 가지는 다당류 단편을 포함하는 것인, 면역원성 접합체.

청구항 30

제1항에 있어서, 상기 면역원성 다당류는 5 내지 50 kDa의 평균분자량을 가지는 다당류 단편을 포함하는 것인, 면역원성 접합체.

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 면역원성 다당류는 10 내지 20 kDa의 평균분자량을 가지는 다당류 단편을 포함하는 것인, 면역원성 접합체.

명세서**기술분야**

[0001] 본 발명은 개질된 수막염균성 Y 다당류(GYMP), 개질된 다당류 및 담체를 포함하는 접합체(conjugate), 그룹 Y 수막염균에 대한 인간을 포함한 온혈 동물의 면역용 백신, 및 상기 개질된 다당류, 접합체 및 백신의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세균성 뇌수막염(Bacterial meningitis)은 세계인의 건강에 심각한 위협을 준다. 수막염균은 세균성 뇌수막염 및 패혈증의 주된 원인이다. 수막염균은 다당류 협막(capsule)에 의해 쌓여 있다. 수막염균 분리는 화학적 및 항원적으로 명료한 다당류 협막에 기반하여 12그룹으로 분리할 수 있다. 이들 5개의 그룹 A, B, C, Y 및 W135은 인간에게 있어서 세균성 뇌수막염 및 패혈증의 모든 경우에 관한 실질적인 원인이 된다.

- [0003] 그룹 Y 수막염균성에 의해 야기된 세균성 뇌수막염의 발생이 증가하고 있다. 미국에서 1989년에서 1995년의 기간동안 시행된 활성 실험기반 관찰은 그룹 Y 수막염균 질병의 인구가 89년에 0%에서 1995년에 32.5%로 급격히 증가함을 보여주었다. 상기 기간동안 수막염균 질병의 전체 발생은 안정적이었다(Anonymous 1996 Serogroup Y meningococcal disease-Illinois, Connecticut, and selected areas, USA 1989-1996, Morb. Mortal. Rep. 45, 1010-1013).
- [0004] 그룹 Y 수막염균에 의해 야기되는 세균성 뇌수막염은 아이들 및 젊은 성인에게서 발생할 수 있지만, 중년에게서도 이 질병이 발생하는 경향을 갖고 있으며 세균성 뇌수막염의 다른 변종보다 폐렴을 더 야기하는 경향이 있다.
- [0005] 다당류 백신은 수막염균이 여러 그룹에 의해 발생된 질병을 억제하는데 사용되어 왔다. 그러나, 상기 백신들은 인구의 어떤 부분에서 수막염균에 의해 발생된 질병의 억제에 효율적이지 않다.
- [0006] 다당류는 T-비의존성(흉선-비의존성)항원이다. 이들은 단백질에 면역반응을 유도할 경우 만나지 않는 면역특성을 갖는다. 상기 특성은 면역반응, IgM의 우성을 유도하는 T-세포의 존재에 어떠한 명백한 요구를 포함하지 않고, 면역 후 기억 유도 또는 친화도 증진(affinity maturation)을 포함하지 않으며, 열악한 유아, 장년 및 면역 중간체(immunocompromised)의 면역성을 포함한다. 결과적으로, 순수 다당류 백신은 상기 환자들에 효율적으로 사용될 수 없다.
- [0007] 1970년대 Jennings(Bhattacharjee et al., Can.J.Biochem. 54:1-8, 1976)는 그룹 Y 다당류가 N-아세틸노이아민산(N-acetylneurameric acid) 및 D-포도당의 동량 몰비로 구성되며, 부분적으로 O-아세틸화된 것을 보고하였다.
- [0008] 대부분 그룹 Y 수막염균성 분리물은 O-아세틸 양성(OA) 다당류를 생성하며, O-아세틸 그룹은 시알산 잔기의 C-7 및 C-9 사이에서 배타적으로 분포된 것으로 알려져왔다. O-아세틸 그룹 분포에서 위치 및 농도면에서 상기 이질성이 다당류 접합체의 형성을 어렵게 한다.

발명의 상세한 설명

- [0009] 본 발명의 목적은 그룹 Y 수막염균에 대한 면역화용으로 적절한 백신을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명은 하나 이상의 개질된 수막염균 Y 다당류 또는 개질된 수막염균 Y 다당류의 단편 또는 수막염균성 Y 다당류의 단편을 포함하는 백신을 제공한다. 하기 문헌에서, "수막염균 Y 다당류"란 용어 및 그의 형태는 개질된 수막염균 Y 다당류, 개질된 수막염균 Y 다당류 및 수막염균 Y 다당류의 단편을 포함한다. 이를 다당류는 T-비의 존성(independent) 반응을 유도하는 항원적 조성물을 생성하는데 단독으로 사용될 수 있다.
- [0011] T-의존성 면역반응을 유도하기 위해, 전형적으로 개질된 수막염균 Y 다당류는 담체 단백질에 접합된다. 따라서, 본 발명은 개질된 수막염균 Y 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 접합 물질 및 접합 물질의 제조방법도 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 개질된 수막염균 Y 다당류의 제조방법을 제공한다. 수막염균 Y 다당류가 시알산 잔기의 C-7 및 C-9에서 배타적으로 분포된 O-아세틸 그룹을 함유하기 때문에, 수막염균 Y 다당류는 O-아세틸화에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 본 발명은 수막염균 Y 다당류의 디(de)-O-아세틸화 방법도 제공한다. 일 실시형태에 있어서, 디-O-아세틸화 다당류에 대해 염기성 가수분해를 사용될 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명은 디-O-아세틸화 수막염균 Y 다당류 또는 O-아세틸화 수막염균 Y 다당류를 단편하는 방법을 제공한다. 온화한 산성 가수분해가 일 실시형태에서 단편 다당류에 사용된다. 다당류의 글리코사이드 결합(glycosidic bond)의 분열용 기타 방법은 오존분해(ozonolysis), 초음파분해(sonication) 및 염기성 가수분해를 포함한다.

실시 예

- [0028] 본 발명에 따라서, 수막염균 Y 다당류는 염기성 가수분해를 사용하여 디-O-아세틸화될 수 있다. 염기성 가수분해는 염기로 다당류의 용액을 가열하여 수행될 수 있다.
- [0029] 수용성 염기는 알카리 금속 수산화물 또는 알카리 금속 알킬-산화물과 같은 강염기를 포함한다. 적절한 염기의 구체적인 예는 NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe, 및 KOTBu를 포함한다.
- [0030] 물론 사용되는 염기의 농도는 염기의 분리상수와 같은 고려사항을 포함하여, 사용된 염기의 성질에 따라 달라지게 된다. 당업자라면 적절한 염기의 농도를 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 염기가 NaOH일 경우, 다당류와 혼합할

때 적절한 염기농도는 0.1~10N이다. 다양한 실시형태에서 적절한 농도는 2N, 3N 또는 4N과 같이 1~5N이다.

[0031] 적절한 반응온도는 사용된 염기, 선택된 농도에 따라 달라지게 된다. 전형적으로 50~100°C의 반응온도가 적절하다. 바람직하게 약 80°C와 같이 75~85°C의 온도가 적절하다.

[0032] 반응시간은 사용된 염기, 염기의 농도 및 반응온도와 같은 인자에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, 반응시간은 염기농도 또는 온도가 감소함에 따라서 증가될 것이다. 적절한 반응시간은 전형적으로 10~25시간, 더 바람직하게는 예를 들어 16, 17, 18 또는 19시간과 같이 15~20시간이다.

[0033] 탄수화물화학 분야의 당업자라면 상기의 인자들은 바람직한 인자를 최적화하고 수율을 최적화하기 위해 조절될 수 있음을 인지할 것이다. 그와 같이 함으로써, 화학적 소모(염기), 온도, 및 시간과 같은 상업적으로 연관된 다양한 변수들은 특별한 시스템에서의 제조를 위해 최적화할 수 있다. 예를 들어, 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 생성하는데 요구되는 시간을 최소화하기를 바라며, 따라서 염기성 농도 및 온도에 대한 바람직한 범위의 상위부분을 사용하는 것을 선택한다. 상기 기재에서 제조되는 예는 상대적으로 작은 범위로 다당류의 제조를 설명하며, 상기의 인자들은 더 큰 범위의 생성시스템에 적합하도록 제시된 범위내에서 변화될 수 있다.

[0034] 상기 과정에 의해 수행된 디-0-아세틸화의 정도는 H-NMR 분광학에 의해 측정된 바와 같이 완전하다. 선택적으로, 디-0-아세틸화 다당류는 산성 가수분해를 할 수 있다. 상기 단계는 더 작은 M_w의 단편으로 큰 분자의 다당류를 절단하는데 사용되는 것이며, 출발물질의 그램당 분자를 나타내는 그룹 Y 수막염균 다당류 에피토프를 제공한다.

[0035] 산성 가수분해는 산 또는 완충-형성(buffer-forming) 화합물과 다당류 용액을 교반함으로써 수행될 수 있다. 적절한 산 또는 완충-형성 화합물은 초산나트륨과 같은 알카리 금속 아세테이트를 포함하며, 약 3-6사이의 산성 pH에서 완충된다. 화학 분야의 당업자라면 약산의 기타염이 상기 pH 범위에서 적절한 완충액을 제조하는데 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 완충액은 반응의 전체 기간에 걸쳐 상대적으로 일정농도로 수소이온(H⁺)의 소스를 유지하기 때문에, 본 발명의 방법에 특히 유용하다.

[0036] 물론, 사용된 산 또는 완충-형성화합물의 농도는 사용된 산 또는 완충-형성 화합물의 성질에 따라 달라지게 된다. 당업자는 산 및 완충-형성 화합물의 농도가 적절하도록 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 초산나트륨이 다당류와 혼합될 경우, 적절한 농도는 0.1N 초산나트륨과 같이, 예를 들어 0.05~0.5N, 및 0.01~1N이다.

[0037] 적절한 반응온도는 사용된 산 또는 완충-형성 화합물에 따라 달라지게 된다. 전형적으로, 반응온도는 50~100°C, 더 바람직하게는 약 70°C가 적절한 바와 같이 65~80°C이다.

[0038] 발명의 다양한 실시형태에 있어서, 반응혼합물을 교반될 수 있다. 교반 속도는 사용된 산 또는 완충-형성 화합물, 산 또는 완충-형성 화합물의 농도, 사용된 교반기의 형태, 및 반응온도와 같은 다양한 인자에 따라 달라지게 된다. 회전에 따라 반응용기가 교반될 경우, 교반의 적절한 속도는 전형적으로 50~100 rpm, 예를 들어 65rpm이다.

[0039] 산성 가수분해의 유무에 상관없이 디-0-아세틸화 다당류는 선택적으로 재(re)-N-아세틸화를 겪을 수 있다. 상기 단계는 염기성 가수분해 과정에서 생성된 모든 유리 일차 아민이 재-N-아세틸화되는 것을 확실하게 한다.

[0040] 재-N-아세틸화는 무수초산을 사용하여 수행될 수 있다. 전형적으로 상기 단계는 중성 또는 염기성 용액에서 일어날 수 있고 용액의 pH는 7~13이며, 7~9의 범위로, 예를 들어 8에서 발생한다. 재-N-아세틸화에 대한 기타 선택적 화학제제로는 염화아세틸, 펜타플루오로페닐 아세테이트 또는 4-나트로페닐 아세테이트를 포함한다. 상기 제제의 사용은 화학 분야에 공지되어 있다.

[0041] 적절한 반응온도는 반응혼합물의 pH 및 사용된 시약의 성질과 같은 인자에 따라 달라지게 된다. 전형적으로, 반응은 15~35°C, 더 전형적으로 20~25°C와 같이 상온에서 일어난다.

[0042] 발명의 일 실시형태에 있어서, 디-0-아세틸화 수막염균 Y 다당류 단편의 제조방법은 하기를 포함한다:

[0043] a) 적어도 부분적으로 정제된 수막염균 Y 다당류를 제공하는 단계;

[0044] b) 다당류의 염기성 가수분해;

[0045] c) 상기 (a) 단계의 생성물의 산성 가수분해.

[0046] 선택적으로, 상기 단계 (b)의 생성물은 재-N-아세틸화될 수 있다.

- [0047] 다당류를 정제하는데 강염기 처리의 사용은 참조로서 그 전체가 여기에 인용되는 미국특허 제 6248570호에 기재되어 있다.
- [0048] O-아세틸화 수막염균 Y 다당류는 상기에 기재된 산성 가수분해 과정을 사용하여 단편화될 수 있다.
- [0049] 산성 가수분해의 유무에 상관없이 디-O-아세틸화 다당류는 선택적으로 상기에 기재된 N-아세틸화를 겪을 수 있다.
- [0050] 상기에 기재된 방법에서 사용된 수막염균 Y 다당류는 사용에 앞서 수막염균 세균으로부터 분리된 형태일 수 있다. 당업계에 공지된 분리방법이 사용될 수 있다(미국특허 제 6248570호를 참조하기 바란다). 분리의 적절한 방법은 원심분리와 한외여과를 포함한다. 분리된 다당류의 동일성 및 정량의 확인은 H-NMR 분광학, 당류 구성의 GC-MS 분석, 항혈청을 사용한 ELISA, 또는 당업자에게 공지된 기타 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0051] 전형적으로 산성 가수분해 단계를 포함한 상기에 기재된 방법들을 사용하여 개질된 다당류는 저분자량이다. 여기에서 사용한 바와 같이, "저분자량"은 다중각 레이저광 분산 분석기에 결합된 크기배제 크로마토그래피에 의해 측정된 것으로 100kDa 이하, 5~50kDa와 같은, 예를 들어 10~20kDa의 분자량을 의미한다(SEC-MALLS).
- [0052] 디-O-아세틸화 다당류 및 O-아세틸화 다당류는 산화에 의한 환원성 그룹의 생성에 의해 활성화될 수 있다. 환원성 그룹의 생성에 적절한 방법은 알데하이드 말단을 생성하는 파요오드산염(periodate)(또는 파라파요드산(paraperiodic acid), 소듐 메타퍼리오데이트(metaperiodate) 및 포타슘 메타퍼리오데이트와 같은 관련된 시약)에 의한 제한된 산화적 절단을 포함한다.
- [0053] 특별한 이론에 제한없이, 출원인은 알데하이드 그룹이 다당류의 시알산 외향고리(exocyclic) 측쇄로 C-8에 선택적으로 도입되는 것을 제안한다. 즉, 산화는 C-8 및 C-9 위치 사이에서 발생하는 것이다.
- [0054] 활성화된 다당류 그룹은 적절한 담체 단백질과의 접합에 적절하다. 즉, 본 발명은 적절한 담체 단백질에 접합된 디-O-아세틸화 Y 수막염균 다당류 또는 그의 단편을 함유하는 접합 생성물을 제공한다. O-아세틸화 Y 수막염균 다당류가 활성화되는 바와 같이, 개시된 방법은 적절한 단백질에 접합된 O-아세틸화 Y 수막염균 다당류 또는 그의 단편을 제공한다.
- [0055] 적절한 단백질이 담체 단백질로 사용될 수 있다. 본 발명에서 적절하게 사용하도록 담체 단백질은 예를 들어, 유아와 같이 치료된 포유류에 투여하는데 안정적이어야 하고, 면역상 효율적이어야 한다. 안정성 요구는 알러지 반응의 일차 독성 및 최소 위험의 결핍을 포함한다.
- [0056] 적절한 담체 단백질은 세균성 독소 및 유독소를 포함한다. 적절한 세균성 독소 및 유독소의 예로는 특별히 한정되지 않지만, 디프테리아, 파상풍, 세균 슈도모나스(Pseudomonas), 포도당구균, 연쇄구균, rPorB와 같은 PorB(미국특허 제 5439808호에 기재) 및 이의 기타 유도체, 백일해(pertussis), 및 대장균(*Escherichia coli*) 독소 또는 유독소를 포함하는 장독소 세균을 포함한다. 또한, 적절한 면역자극성(immunostimulatory) 효과를 나타내는 전체 독소 및 유독소, 단백질 유독소의 단편 또는 부분이 사용될 수 있다. 예를 들면, 파상풍 유독소의 단편 C는 담체로 사용될 수 있다. 사용된 독소 및 유독소는 천연 소스(가령, 백일해 유독소에 백일해 세균(*Bordetella pertussis*))로부터 유도되거나 재조합적으로 생성될 수 있다.
- [0057] 적절한 담체 단백질을 선택함으로써 "담체 효과"가 얻어진다. "담체 효과"는 Y 수막염균 다당류가 단독으로 존재하는 경우보다, 담체에 부착으로 인해 Y 수막염균 다당류를 보다 면역성이 되도록 한다.
- [0058] 면역된 포유류가 미리 담체 단독으로 면역된다면, 향상된 반응을 얻을 수 있다. 유아들은 통상적으로 파상풍 및 디프테리아 유독소로 면역화된다. 따라서, Y 수막염균에 대하여 유아를 면역할 목적으로 백신에서 상기 유독소의 사용을 통해, 향상된 효과를 생성할 것을 기대할 수 있다. "담체 효과"의 성취는 다당류-담체 단백질 접합체와 경쟁하는 동물모델 및 인간의 면역반응을 모니터함으로써 입증될 수 있다.
- [0059] 파상풍 및 디프테리아 독소와 같은 세균성 독소는 2개 이상의 단백질로 이루어진다. 상기 단백질들의 하나는 포유류 세포 표면에 결합하는데 강한 친화력을 갖고 있다. 이론의 경계없이 상기 강한 결합력을 갖는 단백질의 사용은 면역시스템으로부터 반응을 보다 효과적으로 시작하는 것이 가능하다.
- [0060] 담체 단백질은 천연 독소 또는 해독된 독소(유독소)일 수 있다. 선택적으로, 항원적으로 독소와 유사하지만 비독성인 단백질을 제공하는 돌연변이 기술에 의해 유전적으로 개질된 단백질이 사용될 수 있다. 상기 방식에서 개질된 단백질은 교차반응물질(cross-reacting material) 또는 CRMs로 알려져 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 상기 물질의 하나는 CRM₁₉₇이다. CRM₁₉₇은 천연 디프테리아 독소를 기반으로 한다. 광범위한 형태의 독소에서 단

일 아미노산 변화, 즉 글리신 52는 CRM₁₉₇에서 글루타민산으로 대체되고, 디프테리아 천연 독소와 면역적으로 구별할 수 없다.

- [0061] 본 발명의 일 양태에 있어서, 세균성 독소 또는 유독소는 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소이다.
- [0062] 따라서, 본 발명은 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소에 접합된 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류 또는 0-아세틸화 Y-수막염균 다당류를 포함하는 접합 생성물을 제공한다.
- [0063] 천연 독소가 사용될 경우, Y 수막염균 다당류에 접합은 천연 독소의 독성을 감소시킬 수 있다. 그러나, 잔여 독성수준이 너무 높다. 따라서, 해독작용이 더 필요할 수 있다. 당업계에 공지된 적절한 방법이 단백질을 해독하는데 사용될 수 있다. 종래의 방법은 단백질의 자유 아미노기와 반응하는 포르말린의 사용을 포함한다.
- [0064] 선택적으로, 천연 독소는 Y 수막염균 다당류에 대한 접합에 앞서서, 유독소를 생성하도록 포르말린으로 해독될 수 있다.
- [0065] Y 수막염균 다당류 및 적절한 담체 단백질의 접합체는 적절한 담체와 활성화된 다당류를 접촉시킴으로써 얻을 수 있다. 통상적으로, 단백질 담체에 걸쳐 과량의 다당류가 사용되며, 전형적으로 중량비로 2~3배이다. 단백질 담체에 다당류의 비율은 접합체당 항원성 다당류 부분의 상이한 수를 이루도록 당업자에 의해 변형될 수 있다. 접합체당 다당류 부분의 높은 비율을 위해, 담체 단백질당 높은 다당류로 시작해야 하고, 낮은 비율을 얻기 위해 담체 단백질당 낮은 다당류로 시작해야 한다.
- [0066] 환원성 아미노화(reductive amination)는 참조로서 그 전체가 여기에 인용되는 미국특허 제 4356170호에 기재된 바와 같이 커플링의 바람직한 형태이다. 따라서, 활성화된 다당류 및 담체가 환원성 커플링제의 존재하에 접촉하는 것이 바람직하다. 적절한 커플링제는 시아노보로하이드라이드(cyanoborohydride) 이온 또는 이의 등가물과 같은 환원성 제제를 포함하며, 소듐 시아노보로하이드라이드와 같이 적절한 염의 형태로 제공될 수 있다. 담체 또는 다당류에 악영향을 미치지 않고 대상의 환원성 밀단을 환원하지 않는 환원성 제제가 커플링제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 피리딘 보란(borane)은 상기 목적에 적절한 환원성 제제이다. 기타 적절한 환원성 제제는 당업자에 의해 인지될 것이다.
- [0067] 선택적인 환원성 커플링제는 다당류의 카보닐기 및 담체 단백질의 아미노기 사이에서 형성되는 쉬프 염기성 중간체의 온화한 선택적 환원성 제제로 작용한다. 상기 이온들은 접합이 발생한 후 다당류에 잔여하는 활성 알데히드기의 환원을 지연시키는 2차 효과를 갖고 있다.
- [0068] 커플링제제는 일반적으로 접합 생성물의 부분으로 형성되는 것이 아니라, 커플링 반응동안 소모된다. 다음에, 접합체는 잔류하는 커플링제제 및 기타 반응 부산물을 제거하도록 정제할 수 있다. 바람직하게, 정제된 접합체는 단백질에 탄수화물을 접합하는데 사용되어온 아디프 디히드라지드(adipic dihydrazide) 또는 p-니트로-페닐-에틸아민과 같은 독성 연결제제를 함유하지 않는다.
- [0069] 활성화된 다당류 및 담체가 접촉하는 조건은 담체의 성질에 따라 달라지게 된다. 파상풍 유독소일 경우, 활성화된 다당류 및 담체는 약 7.4의 대략 중성 pH, 약 20~50°C에서 접촉할 수 있으며, 30~40°C와 같이, 예를 들어 37°C의 온도에서 접촉할 수 있다.
- [0070] 일단 커플링 반응이 완성되면, 다당류의 잔여 알데히드기가 포획될 수 있다. 이는 활성화 단계동안 생성된 수막염균 다당류 사슬에서 잔여 알데히드기를 환원할 것이며, 담체 단백질에 다당류를 접합하는데 사용되지 않았다. 적절한 포획제제는 NaBH₄를 포함하며, 기타 환원제제는 알콜기에 잔여 알데히드기를 환원할 수 있는 것으로 당업자에게 공지된 것이다.
- [0071] 비록 상기 제조가 T-의존성 면역반응을 생성하지 않지만, 본 발명의 방법에 의해 생성된 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류는 백신 제조에서 항원으로서 사용될 수 있다. Y 수막염균 다당류 및 적절한 담체 단백질의 접합체는 백신 또는 그룹 Y 수막염균에 대한 면역화용의 백신 조성물로 사용된다. 따라서, 바람직한 실시형태에서 본 발명의 백신은 0-아세틸화 다당류를 함유하는 접합체를 포함한다. 실시예의 결과에서 알 수 있는 바 같이, 디-0-아세틸화 다당류 접합체는 0-아세틸화 다당류와 가교반응하는 항체를 생성하는 동물에서 면역반응을 유도할 수 있다.
- [0072] 실시형태에 따라, 다당류 또는 접합체는 백신으로서 조제 전 또는 후에 안전하고 피노제네시티(pynogenicity)의 결여를 확인한다. 일 실시형태에서 본 발명은 파상풍 독소 또는 유독소 또는 디프테리아 독소 또는 유독소에 접

합된 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 포함하는 백신을 제공한다. 백신은 통상적으로 백신 조성물에서 존재하는 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 백신은 하나 이상의 적절한 운반 매체, 첨가제, 희석제 또는 조절제를 포함할 수 있다.

- [0073] 적절한 담체는 생리적 소듐 인산완충용액(pH 7.4)을 포함한다. 조절제와 담체의 예로는 pH 6에서 소듐 인산완충용액에 혼탁된 0.125M 알루미늄 인산겔이 있다. 백신에서 사용하는데 적절한 약학적으로 허용가능한 기타 담체는 당업계에 공지된 것이며, 본 발명에서 사용될 수 있다. 적절한 조절제는 수산화 알루미늄, 및 일반적으로 면역핵산 또는 펩티드 화합물과 같이 당업자에 의해 공지된 기타 조절제를 포함한다.
- [0074] 본 발명의 백신은 적절한 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 근육내 또는 피하지방 주입에 의해 투여될 수 있다. 또한, 적절한 담체로 바늘없이 경피투여, 비강(intranasal) 또는 점막 투여가 사용될 수 있다.
- [0075] 전형적으로, 본 발명의 백신은 접합 물질을 5~100 μ g, 바람직하게 10~50 μ g을 함유한다. 추출복용량은 기본복용/반응 실험에 의해 결정될 수 있다. 백신은 1회 복용 또는 2회 이상 소량으로 투여될 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명의 접합 생성물은 수막염균의 변종에 대한 면역에 사용되는 백신으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 접합 생성물은 수막염균 Y에 더하여 하나 이상의 수막염균 A, C 및 W135에 대한 면역성을 제공하는 백신으로 사용될 수 있다. 또한, 접합 생성물은 수막염균에 더하여 기타 질병에 대한 면역성을 제공하는 백신으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 접합체는 Hib-수막염균 백신 조합을 생성하는 인플루엔자균과 조합될 수 있다.
- [0077] 백신으로서 본 발명의 접합 생성물의 사용은 "담체 효과"를 생성한다. Y 수막염균 다당류는 Y 수막염균 다당류 단독으로 존재할 경우와 비교하여 담체로서 더 강한 항원에 부착되어 있기 때문에, 보다 면역력이 우수할 수 있다. 특히, 본 발명의 백신은 인간을 포함한 짚은 포유동물에서 항-수막염균 Y 항체 형성의 유효수준을 유도하는데 사용될 수 있으며, 접합된 다당류를 포함하는 백신보다 나이(age)에 대한 의존성이 적다.
- [0078] 담체 단백질이 본 발명의 백신의 수령으로 예방접종 되어왔던, 예를 들어 파상풍 또는 디프테리아에 대한 질병의 세균성 독소 또는 유독소일 경우, 담체 독소 또는 유독소에 바람직한 면역성은 수막염균성 Y에 대한 면역성과 동일한 시간에서 이루어질 수 있다.
- [0079] 선택적으로, 본 발명의 접합 생성물을 함유하는 백신의 수령이 담체 독소 또는 유독소와 관련된 질병에 대하여 예방접종되었다면, 수막염균 Y에 대한 항체의 향상된 생성은 "효능촉진(booster) 효과"를 통하여 이를 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명은 그룹 Y 수막염균에 대하여 면역화에 사용되는 백신의 제조에서 상술한 바와 같이 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류 및/또는 0-아세틸화 Y 수막염균 다당류의 용도를 제공한다.
- [0081] 또한, 본 발명은 상술한 그룹 Y 수막염균에 대한 면역용 백신의 제조에서 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소와 같은 적절한 담체 및 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 포함하는 접합 생성물, 및/또는 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소와 같은 적절한 담체 및 0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 포함하는 접합 생성물의 용도를 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 상기에서 그룹 Y 수막염균에 대한 면역용 백신으로 기재된 바와 같이 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류 및/또는 0-아세틸화 Y 수막염균 다당류의 용도를 제공한다.
- [0083] 또한, 본 발명은 상술한 그룹 Y 수막염균에 대한 면역용 백신과 같이 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소와 같은 적절한 담체 및 디-0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 포함하는 접합 생성물, 및/또는 파상풍 독소 또는 유독소, 또는 디프테리아 독소 또는 유독소와 같은 적절한 담체 및 0-아세틸화 Y 수막염균 다당류를 포함하는 접합 생성물의 용도를 제공한다.
- [0084] 본 발명은 하기 비-제한적인 실시예에 의해 설명된다.
- [0085] **실시예 1 : 다양한 수막염균성 Y 변종으로부터 다당류의 0-아세틸 상태의 평가**
- [0086] **천연 다당류의 제조:**
- [0087] 수막염균성 Y 변종 S1975, S225, S3536 및 S3790은 Dr Carl Frasch(CBER/FDA, Bethesda, MD)에 의해 적합하게 제공되었다. 변종 Y 슬라테루스(Slaterus)는 Dr Francoise Collins(LCDC, Ontario, Canada)에 의해 제공되었다. 변종은 포도당 및 효모추출물을 함유하는 배지에서 37°C로 교반하에 쉐이크 플라스크(shake flask)에서 성장되었다. 배양은 8000rpm으로 원심분리하여 수득하였고, 부유물을 수집하여 0.22 μ m 여과단위로 무균

여과하였다.

[0088] 미세여과된 배양 부유물은 Biomax 300 kDa Pellicon 막(0.5m²)(Millipore Corp., Bedford, Mass. USA)을 사용한 한외여과에 의해 농축하였다. 농축된 농축액을 1M NaCl에 대하여 12회, 중류수에 대하여 10회 다이아필터링 (diafiltration)하고 냉동건조하였다. 정제된 "천연" 다당류의 높은 평균분자량은 당류 조성용 GC-MS 및 O-아세틸 함량 및 위치의 평가용 H-NMR 분광학으로 500 MHz에서 분석하였다.

[0089] 하기 표 1은 GC-MS 및 H-NMR 분석의 결과를 요약한 것이다.

[0090] <표 1>

[0091] 다당류의 물리화학적 특성

변종	Glc	NeuAc	OAc	OAc(C-7) ^{ab}	OAc(C-9) ^{ab}
	몰/반복	몰/반복	몰/반복	몰	몰
S1975	1	1	ND	-	-
S225	1	1	ND	-	-
S3536	1	1	0.52	0.46	0.05
S3790	1	1	0.90	0.80	0.10
슬라테루스 (slaterus)	1	1	0.93	0.32	0.61

[0093] ^a OAc기는 반복단위의 NeuAc 부분위에 단독으로 함유된다.

[0094] ^b OAc 위치 및 시알산에 대한 상대적 함량은 포도당 부분의 H-1(a)에 대응하는 H-7(d, 5.04ppm) 및 H-9(d, 4.38ppm), H-9(dd, 4.15) 공명으로 지정된 H-NMR 신호를 기반으로 한다. 또한, OAc기의 퍼센트(또는 몰)는 OAc 음성 및/또는 C-9 NeuAc 잔기에서 O-아세틸화의 CH₃(NAc)에 대해 2.04ppm 및 C-7에서 NeuAc 잔기 O-아세틸화의 CH₃에 대해 1.96ppm 모두와 관련하여, 신호에 대응하는 CH₃(OAc)에 대해 2.14ppm에서의 신호 지정을 토대로 한다.

[0095] ND: 검출안됨.

[0096] 상기 표에서 알 수 있는 바와 같이, O-아세틸기의 위치뿐만 아니라, 협막 다당류의 O-아세틸 함량에 대응하는 변종-대-변종 이질성의 상당량이 존재한다. 예를 들어, 변종 S3790 및 슬라테루스가 동일한 OAc 함량을 갖고 있지만, 시알산 잔기 상의 상기 그룹(C-7 대 C-9)의 퍼센트는 완전히 상이하다. 변종 S3790으로부터의 다당류는 시알산의 한 위치(C-7)에서 거의 단독으로 OAc 기를 갖고 있는 반면, 슬라테루스로부터의 다당류는 C-9위에 우세적으로 갖고 있다.

실시예 2 : 그룹 Y 수막염균 다당류(GYMP)의 정제

dOA GYMP의 제조:

300kDa MWCO 막을 갖는 UF에 의한 다당류 포집:

[0100] 무세포 미세여과된 발효투과액의 약 13L를 Biomax 300 kDa Pellicon 막(0.5m²)(Millipore Corp., Bedford, Mass. USA)를 사용하여 한외여과기로 약 1 리터로 농축하였다. 농축된 농축액은 1M NaCl에 대하여 12회, 중류수에 대하여 10회 다이아필터링하였다. 약 0.2L로 더 농축하고 수집하였다.

다당류의 염기성 가수분해:

[0102] 300kDa 농축용액(ca 5mg PS/ml)를 2N NaOH의 최종 농도로 조절하고 16-18시간동안 80°C로 세팅된 오븐에 방치하였다. 반응혼합물을 50°C 미만으로 냉각한 후, 중류수 10L로 회석하였다. 30kDa MWCO Pellicon 막을 통한 농축 후, 농축용액을 1M NaCl에 대하여 12회 중류수에 대하여 10회 다이아필터링하였다. 약 0.2L로 더 농축하고 수집하였다.

dOA GYMP의 산성 가수분해:

[0104] 농축용액을 테프론 반응용기에 옮기고, 아세트산나트륨(NaOAc)를 부가하여 0.1N의 최종농도로 하였다. 반응혼합물을 6N HCl을 사용하여 pH 5로 조절하고 70°C로 세팅된 수조에 방치하였다. 다당류가 수퍼로즈 컬럼(superose

column)을 사용한 SEC-MALLS(다중각 레이저광 분산 분석기에 결합된 크기배제 크로마토그래피)에 의해 측정한 바, 20000 달톤의 표적 MW에 도달할 때까지 65rpm으로 교반하였다.

[0105] 단편 dOA 다당류의 재-N-아세틸화:

[0106] 용액의 pH는 6N HCl 용액을 사용하여 8로 조절한 다음, 무수초산을 0.8M 무수초산의 최종농도로 상온에서 적가하였다. 5N NaOH를 반응혼합물 pH를 7~9로 유지하도록 사용되었다. 반응의 종결후, 반응혼합물의 pH는 13으로 상승하였고, 혼합물을 1.5시간동안 부가적으로 교반하였다. 다음, 반응 pH는 6N HCl 용액으로 pH 8로 조절하였다. 반응혼합물을 1M NaCl의 4L속으로 부어 Pellicon Biomax 100kDa막(0.5m^2)을 갖는 고안을 사용하여 약 1L로 농축하고, 투과액을 수집하였다. 100K 최종 투과액을 Biomax 5K Pellicon 막(0.5m^2)을 사용하여 약 1리터로 UF에 의해 농축하였다. 농축된 농축용액은 종류수에 대하여 10회 다이아필터링한 다음, 약 0.2L로 농축하고 수집하였다.

[0107] OA GYMP의 제조:

[0108] OA GYMP의 정제방법은 과정에서 생략된 알카리 분해(alkaline degradation) 단계(2N NaOH)를 제외하고는 상기에 기재된 dOA 다당류의 것과 유사하였다. 상기 과정에서 얻어진 GYMP는 시알산의 C7 및 C9 위치 사이에 동등하게 분포된 반복단위(또는 시알산의 N-아세틸기에 상대적인 60%)당 O-아세틸기의 ca. 0.6M를 나타내었다.

[0109] 접합에 앞서 GYMP의 활성화:

[0110] 저분자량(LMW) OA 및 dOAc 다당류(10~20 kDa)는 소듐 메타페리오데이트(sodium metaperiodate)로 시알산 외향고리(exocyclic) 측쇄로 C-8에서 알데히드기를 선택적으로 도입하여 산화(C-9 및 C-8 사이의 산화)하였다.

그룹 Y 수막염균성 다당류(GYMP) 접합체의 제조

[0112] 과상풍 유독속에 수막염균성 Y 다당류의 접합:

[0113] 과요오드산염(periodate)-산화된 LMW GYMP 다당류(25mg) 및 과상풍 유독소(TT)(10mg)(Serum Statens Institute, Copenhagen, Denmark)를 0.2M 인산염 완충용액(pH 7.4)의 0.5ml에 용해하였다. 소듐 시아노보로하이드라이드(5mg)를 부가하고, 혼합물을 1일동안 37°C에서 배양하였다. 접합이 완료된 후, 잔여 알데히드의 협막을 1M 아세트산으로 7~9사이로 유지된 용액의 pH로 1mM NaOH에서 제조된 NaBH₄의 100mg/ml의 열음조 40~60μl에서 서서히 부가하여 수행하였다. 얻어진 접합체는 100kDa MWCO의 막 및 1M NaCl 및 다이아필터링 모드에서 식염수에 대하여 평행흐름 여과(tangential flow filtration, TFF) 시스템(Millipore)을 이용해 한외여과하여 정제하였다. 대부분 접합체를 조제 전에 2~4°C에서 보관하였다.

실시예 3: 쥐에서 GYMP 접합체의 유효성

[0115] 면역:

[0116] 4~6주의 암컷 스위스 웨스터 쥐에 수산화 알루미늄에 흡착된 접합 백신(Alhydrogel, Superfos, Denmark)을 피하주입하였다. 각 쥐에 0, 28 및 42일째에 접합된 다당류 2μg의 3 복용량을 주었다. 쥐는 0, 28, 38 및 52일째에 출혈하였다.

[0117] ELISA에 의한 GYMP-특이적 항체:

[0118] GYMP-특이적 IgG 역가는 코팅항원(coating antigen)으로 인간 혈청알부민에 연결된 LMW GYMP(OAc 또는 dOA)를 사용한 ELISA로 평가하였다.

[0119] 1회 및 1회 주입 후 GYMP-TT 접합체에 의해 유도된 menY PS-특이적 IgG 역가(기하평균)를 도 1에 나타내었다. 코팅항원으로 dOA GYMP-HSA를 사용한 ELISA에 의해 측정되었다. 하기 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, GYMP 접합체(OA 및 dOA)의 두 타입 모두 GYMP-특이성 IgG의 유사한 수준으로 생성되었으며, 이는 PS위 OA그룹이 면역성에 결정적이지 않음을 나타낸다. 도 2 및 도 3은 각각 OA 및 dOA GYMP-HSA 코팅된 플레이트 위 OA 및 dOA GYMP-TT 항혈청의 ELISA 결합을 나타낸다. 항원-코팅된 플레이트 모두에서 항-dOA GYMP-TT 항혈청(38일째)은 대응되는 OA 접합체 항혈청에서보다 더 약하게 반응하고, 이는 PS 위 OA가 면역성에 필요하지 않음을 나타낸다.

[0120] 혈청 살균력(Serum bactericidal activity; SBA):

[0121] 혈청의 혈청 살균력은 하기 표 1에 기재된 GYM 변종을 사용하여 평가하였으며, OA의 다양한 수준을 갖는 다당류를 발현하여 평가하였다. 도 4는 OA 및 dOA GYMP-TT 접합체로 유도되는 토끼 상보체 및 쥐 항혈청의 OA menY 변

종 3790으로 측정된 SBA 역가를 나타낸다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, dOA GYMP 접합체는 대응되는 OA 접합체와 유사하게 menY 변종 3790(OA 협막 PS로 발현함)에 대하여 SBA의 수준이 유도되었으며, 이는 PS위 OA 그룹이 면역성에 결정적이지 않으며 유효성이 없음을 의미한다. 또한, dOA GYMP 접합체로 유도된 항체는 OA의 다양한 정도로 협막 PS를 발현하는 GYM 변종을 사멸할 수 있다(표 2).

[0122] <표 2>

[0123] menY 변종에 대한 dOA GYMP-TT 접합 항혈청의 혈청 실균력(SBA) 역가(38일)

백신	GYM 3536 ^b	GYM 1975 ^b	GYM 3790 ^b
dOA GYMP-TT ^a	8200	5000	6000
PBS	〈50	〈50	〈50

[0125] ^a CD1 암컷 쥐들은 0 및 28일째에 접합 백신의 2 복용량을 받았다. 혈청은 38일째에 2차 주입 후 10일째에 얻었다.

[0126] ^b GYM 3536은 PS위 52% OA를 함유하고, GYM 3790은 90%를 갖고, GYM 1975는 OA가 없다.

[0127] 실시예 4: 접합 백신-유도된 항체의 특이성, 다당류위 OA 그룹의 역할

[0128] 접합 백신-유도된 항체의 결합 특이성:

[0129] OA GYMP HAS 접합체 또는 dOA GYMP-HSA 접합체에 백신-유도된 항체(OA GYMP 접합체 또는 dOA GYMP 접합체를 함유하는 백신)의 ELISA 결합의 경쟁적 억제는 C9(GYM Slaterus) 또는 C7(GYM S3790)에서 우세적으로 시알산 OA를 함유하거나 모두에서 OA가 없는 것(GYM S1975)을 함유하는 고분자량(HMW) GYMP 억제제를 사용하여 수행하였다.

[0130] 도 5는 C7에서 우세적으로 dOA GYMP, OA GYMP 및 C9에서 우세적으로 OA GYMP에 비례하는 dOA GYMP 접합체 항혈청의 특이성을 나타낸다. 세가지 모든 다당류 억제제는 코팅된 플레이트 OA GYMP HSA에 항혈청의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있다. OA GYMP(C9)은 최소한 효율적이며, 이는 dOA GYMP 접합체에 대하여 향상된 항체가 OA 및 dOA 다당류 사이에서 실제적으로 구별되지 않음을 나타낸다.

[0131] 도 6은 상기에 기재된 동일한 다당류 억제제에 비례하는 dOA GYMP 접합체 항혈청의 특이성을 나타내며, 이번에는 dOA GYMP HSA 코팅된 플레이트에 결합을 사용한 것이다. 다당류 억제제는 가장 우수한 억제제인 dOA 다당류로 완전하게 결합을 억제할 수 있다.

[0132] 도 7은 OA GYMP HSA 코팅된 플레이트를 사용하여 OA GYMP 접합체 항혈청의 특이성을 나타낸다. 세가지의 다당류 억제제는 코팅된 플레이트에 항체의 결합을 억제할 수 있지만, C9에서 OA GYMP 경우가 최상의 억제제이고, dOA GYMP가 뒤이어인 것으로 보이고, C7에서 OA GYMP이며, OA 접합이 C9에서 GYMP OA에 대하여 약간 증가하는 에피토프 특이성을 갖는 항체를 늘리는 것이다. 그러나, 상기의 항체들은 매우 중요한 방식으로 dOA 에피토프를 인지한다.

[0133] 도 8은 dOA GYMP HSA 코팅된 플레이트에 항-OA GYMP 접합체의 특이성을 고찰한다. 세가지 다당류 억제제는 최상으로 동등하게 유효성 억제제로 C7에서 dOA 및 OA GYMP로 코팅된 플레이트에 항혈청의 결합을 억제할 수 있다.

[0134] 총괄하여, 상기 결과는 쥐에서 GYMP 접합체의 dOA 형태는 OA 및 dOA GYM 다당류(각각 도 5 및 6)에서 동등하게 인지되는 항체를 유도할 것이다.

[0135] 항 GYMP 기능적 항체의 특이성, OA의 역할:

[0136] OA 또는 dOA GYMP 접합체에 의해 유도된 기능적 항체의 특이성은 C7 및 C9에서 우세적으로 시알산위 OA를 갖거나 전혀 없는 수용성 GYMP 억제제로 OA GYM 변종(3790)에 SBA(토끼 상보체를 사용하여)의 경쟁적 억제로 관측되었다.

[0137] 도 9는 쥐 항-dOA GYMP 접합체 항혈청을 사용한 억제의 결과를 나타낸다. 세가지 다당류 억제제는 (50%에서) 약 5배 정도 OA 다당류 억제제보다 보다 효율적인 dOA PS로 변종 3790의 사멸을 경쟁적으로 억제할 수 있으며, 서로 유사한 방식으로 억제하는 것으로 나타난다. 상기 결과는 OA 다당류를 발현하는 GYM 유기체의 표면에서 dOA GYMP에 대한 항체가 dOA 시알산을 함유하는 다당류 시알산(ca. 다당류의 10%) 또는 향상된 항체가 높은 친화력

을 갖는 것을 인지하는 것이다.

[0138] 도 10은 쥐 항-OA GYMP 접합체 항혈청을 사용한 SBA의 경쟁적 억제의 결과를 나타낸다. dOA GYMP 접합체 항혈청에 관한 한, dOA GYMP는 GYM 3790에 SBA를 억제하는데 최상의 다당류이고, 뒤이어 기타 두개의 OA GYMPs이다. 상기 결과는 다당류위 OA 그룹이 기능적 항체에 의해 인지되는 보호적 에피토프에 결정적으로 중요하지 않음을 강력하게 나타낸다.

실시예 5: GYMP 에피토프의 크기의 결정

dOA GYMP로부터 분리길이(1~9 반복)의 올리고당 억제제의 생성:

[0140] dOA GYMP는 0.1N 초산나트륨 완충용액 pH 3으로 2시간동안 80°C 이상에서 부분적으로 가수분해하였다. 분리길이 (1~9 반복단위)의 생성된 올리고당을 Superdex G-30(Pharmacia) 컬럼위 크기배제 크로마토그래피로 분리하였다. 올리고당의 용출액을 214nm에서 UV 검출로 모니터하였다. 분리 길이의 각각의 올리고당을 함유하는 분획을 조합하고 냉동저장하였다. 얻어진 억제제의 순도 및 크기는 600MHz에서 H-NMR로 수행하였다. 각 GYM 올리고당 억제제는 환원성 말단에서 환원성 베타 시알산 및 비-활원성 기타 말단에서 α-D-포도당을 갖는다.

올리고당 억제제를 사용한 ELISA에 의한 경쟁적 억제:

[0142] GYMP 에피토프의 크기 결정은 GYMP-특이적 토끼 항체 및 증가된 길이의 GYM 올리고당과 GYMP-HSA 코팅 플레이트 사이에서 결합의 경쟁적 억제(ELISA)에 의해 수행되었다.

[0143] 도 11은 1~10 반복단위의 dOA GYM 올리고당과 dOA GYMP-HSA 코팅 플레이트에 결합하는 토끼 항 전체 GYM 항체 (DIFCO, Maryland)의 ELISA 억제를 나타낸다. 상기 도에서 알 수 있는 바와 같이, 1 및 2 반복단위는 결합의 억제제로 부족한 반면, 3 반복단위 올리고당(6 글리코실 잔기)은 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있다. 상기 결과는 6번째 잔기인 환원성 시알산이 적도부위에서 카르복실산염 기와 함께 베타 형태로 있기 때문에, 항체의 결합부위가 아마 5 당류 잔기와 접촉하는 것을 나타낸다. 다당류의 크기 증가(4에서 10RUs)는 몰/몰 기본으로 억제가 증가하며, 에피토프 형태의 안정화는 증가된 길이를 갖는 항체에 의해 인지되었음을 나타낸다.

[0144] 도 12는 동일한 억제제로 OA GYMP-HSA 코팅 플레이트 위 동일한 항체 결합의 억제를 나타낸다. 억제의 방식은 3 RUs 올리고당 구조 범위를 넘어 증가된 결합으로 도 11에서 관측된 것과 유사하다. 상기 결과는 GYMP 접합체의 설계를 내포하고 있으며, 이는 담체 단백질에 접합된 GYMP 합텐의 최소 크기가 10 반복단위이어야만 하기 때문이다.

실시예 6: 조합에서 수막염균성 Y 접합 백신의 유효성

[0145] dOA GCMP-TT 및 dOA GWMP rPorB 접합 백신과의 조합에서 dOA GYMP-TT의 조합은 스위스 웹스터 쥐에서 유효성을 시험하였다. 동물들은 0 및 28일째에 조합적으로 또는 독립적으로 각 다당류 접합 항원의 2 μ g을 피하적으로 투여된다. 0, 28 및 38일째에 출혈하고, 혈청을 OA GYMP를 발현하는 GYM 변종 3790에 대한 SBA를 분석하였다.

[0146] 도 13은 실험의 결과를 나타낸다. 조합 접합체 항혈청에서 GYM에 대한 SBA는 독립적 GYMP 접합체 항혈청에서 측정된 것과 크게 상이하지 않았으며, 이는 3 접합체 사이에는 면역적 방해가 없음을 나타낸다. 유사하게, GCMP 및 GWMP 접합체 성분에서 일어나는 SBA는 조합이거나 독립적 접합체이거나 면역적 방해가 관측되지 않았다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 반복단위 디-0-아세틸화-그룹 Y("deOAc-Y") 수막염균성 다당류의 구조(아래쪽)를 나타내며, 천연 o-아세틸화 그룹 Y("OAc-Y") 수막염균성 다당류로부터의 제조(위쪽)를 나타낸다.

[0015] 도 2는 실시예 3에 기술한 바와 같이 측정한 것으로, 스위스 웹스터(Swiss Webster) 암컷 쥐에서 1회 또는 2회 주입 후, OAc-Y(위쪽) 및 deOAc-Y(아래쪽) 수막염균 다당류-파상풍 유독소 접합에 의해 유도된 Y 수막염균 다당류 특이적 IgG 역가의 기하평균을 나타낸다.

[0016] 도 3은 실시예 3에서 측정한 것으로, 38일째에 OAc-Y 수막염균 다당류-HSA 코팅 플레이트에서 OAc-Y 및 deOAc-Y 수막염균 다당류-파상풍 유독소 접합으로 유도된 쥐 항혈청의 ELISA 적정을 나타낸다.

[0017] 도 4는 실시예 3에서 측정한 것으로, 38일째에 deOAc-Y 수막염균 다당류-HSA 코팅 플레이트에 OAc-Y 및 deOAc-Y 수막염균 다당류-파상풍 유독소 접합으로 유도된 쥐 항혈청의 ELISA 적정을 나타낸다.

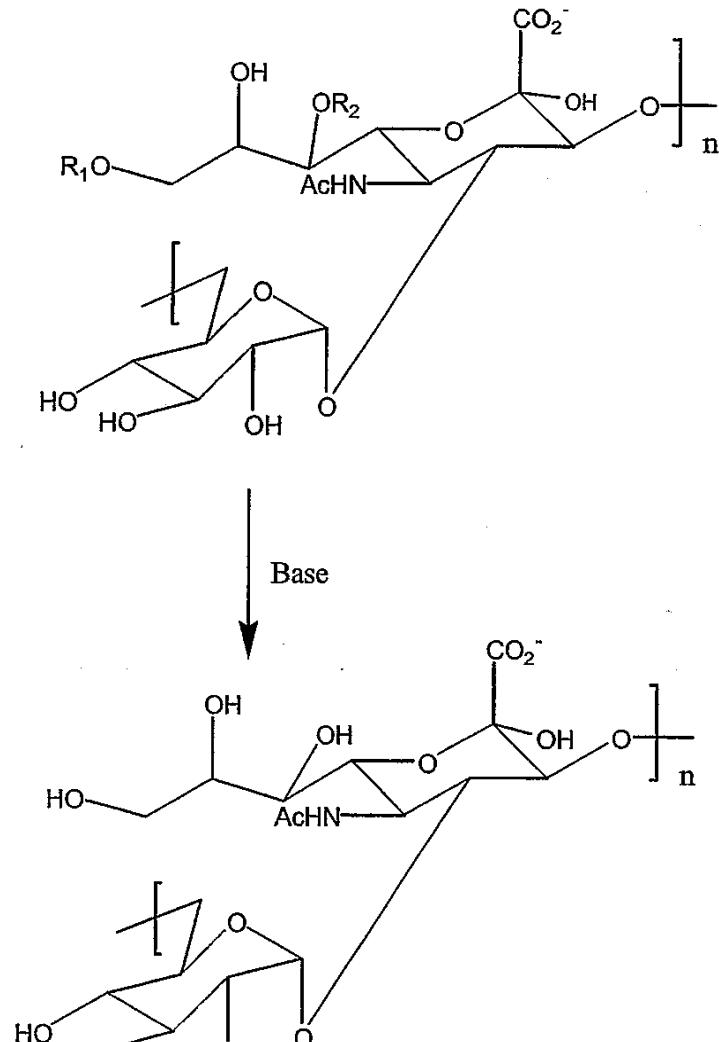
[0018] 도 5는 실시예 3에서 측정한 것으로, OAc-Y(위쪽) 및 deOAc-T(아래쪽) 수막염균 다당류-파상풍 유독소 접합으로

유도된 토끼 상보체(complement) 및 쥐 항혈청의 OAc-Y 수막염균 변종 3790으로 측정된 혈청 살균력 억제를 나타낸다.

- [0019] 도 6은 실시예 4에서 측정한 것으로, 탄소 9(*9/7) 또는 탄소 7(*7/9)에서 다량의 o-아세틸화의 OAc-Y 및 deOAc-Y 수막염균 다당류에 비례하여 OAc-GYMP-HSA로 코팅된 마이크로타이터(microtiter) 플레이트에서 deOAc-Y 수막염균 다당류 접합 항혈청의 결합 억제를 나타낸다.
- [0020] 도 7은 실시예 4에서 측정한 것으로, OAc 및 deOAc-Y 수막염균 다당류에 비례하여 DeOAc-GYMP-HSA 접합으로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에서 deOAc-Y 수막염균 다당류 접합 항혈청의 결합 억제를 나타낸다.
- [0021] 도 8은 실시예 4에서 측정한 것으로, OAc-Y 및 deOAc-Y 수막염균 다당류에 비례하여 OAc-Y 수막염균 다당류-HSA 접합으로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에서 OAc-Y 수막염균 다당류 접합 항혈청의 결합억제를 나타낸다.
- [0022] 도 9는 실시예 4에서 측정한 것으로, OAc-Y 및 deOAc-Y 수막염균 다당류에 비례하여 deOAc-Y 수막염균 다당류-HSA 접합으로 코팅된 마이크로타이터 플레이트에서 OAc-Y 수막염균 다당류 접합 항혈청의 결합억제를 나타낸다.
- [0023] 도 10은 실시예 4에서 측정한 것으로, 쥐 항-dOAc-Y 수막염균 다당류 접합 항혈청을 사용하여 수용성 Y 수막염균 다당류 억제제와 함께 OAc-Y 수막염균 다당류 변종(3790)에 SBA(토끼 상보체를 사용)의 경쟁적 억제에 의해 측정한 것으로, OAc-Y 또는 deOAc-Y 수막염균 다당류 접합에 의해 유도된 기능적 항체의 특이성을 나타낸다.
- [0024] 도 11은 실시예 4에서 측정한 것으로, 쥐 항-OAc-Y 수막염균 다당류를 사용하여 SBA의 경쟁적 억제의 결과를 나타낸다.
- [0025] 도 12는 실시예 5에서 측정한 것으로, 1~10 반복단위의 deOAc-Y 수막염균 올리고당과 함께 deOAc-Y 수막염균 다당류-HSA 코팅플레이트에서 토끼 항-전세포(whole cell) OAc-Y 수막염균 다당류 항체 결합의 ELISA 억제를 나타낸다.
- [0026] 도 13은 실시예 5에서 측정한 것으로, 1~10 반복단위의 deOAc-Y 수막염균 올리고당과 함께 OAc-Y 수막염균 다당류-HSA 코팅플레이트에서 토끼 항-전체 세포 OAc-Y 수막염균 다당류 항체 결합의 ELISA 억제를 나타낸다.
- [0027] 도 14는 실시예 6에서 측정한 것으로, 스위스 웨스터 쥐에서 deOAc-C 수막염균 다당류 및 파상풍 유독소 접합, 및 deOAc-W 수막염균 다당류 및 rPorB 접합의 조합에서 deOAc-Y 수막염균 다당류 및 파상풍 유독소 접합의 유효성에 관한 시험의 결과이다.

도면

도면1

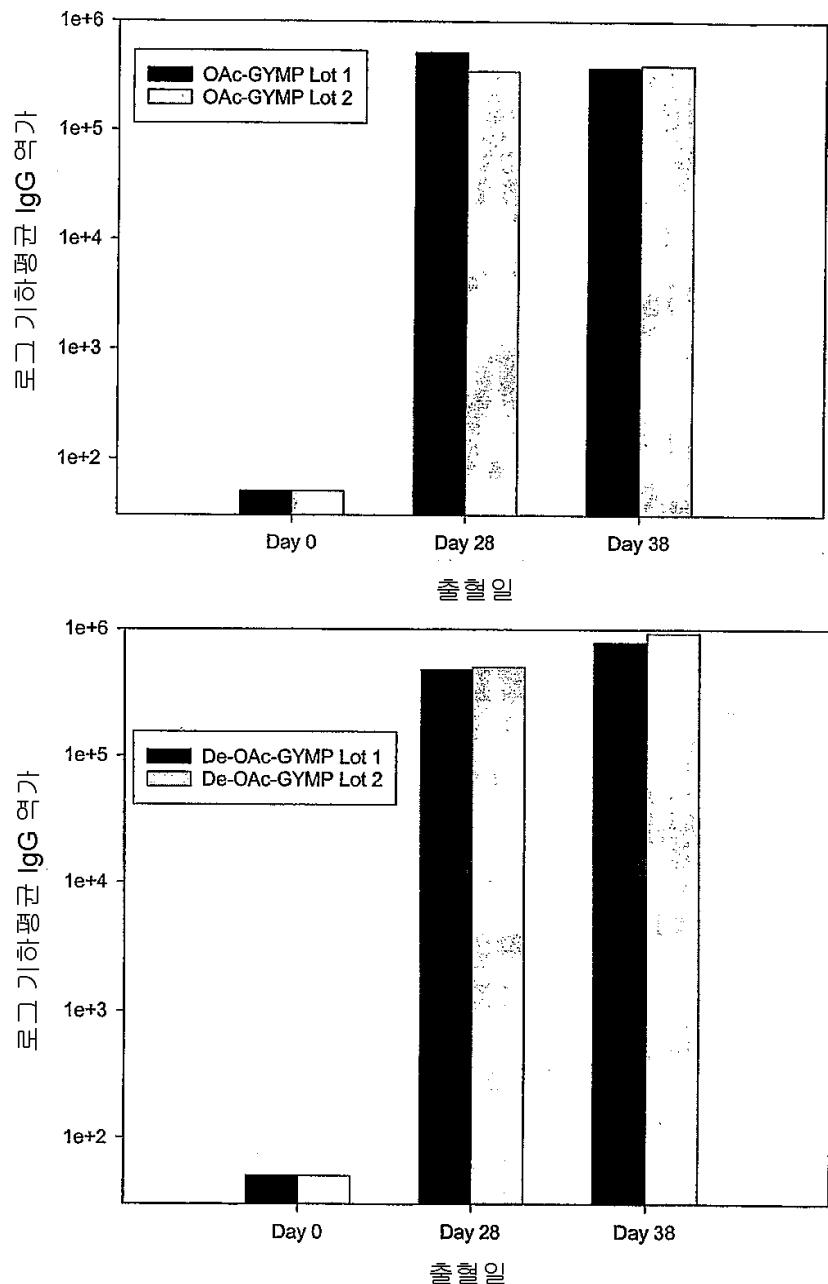


$\rightarrow 6)\alpha\text{D-Glcp}(1 \rightarrow 4)\alpha\text{D-NeupNAc}(2 \rightarrow$

$$\begin{aligned} R_1 &= \text{Ac or H} \\ R_2 &= \text{Ac or H} \end{aligned}$$

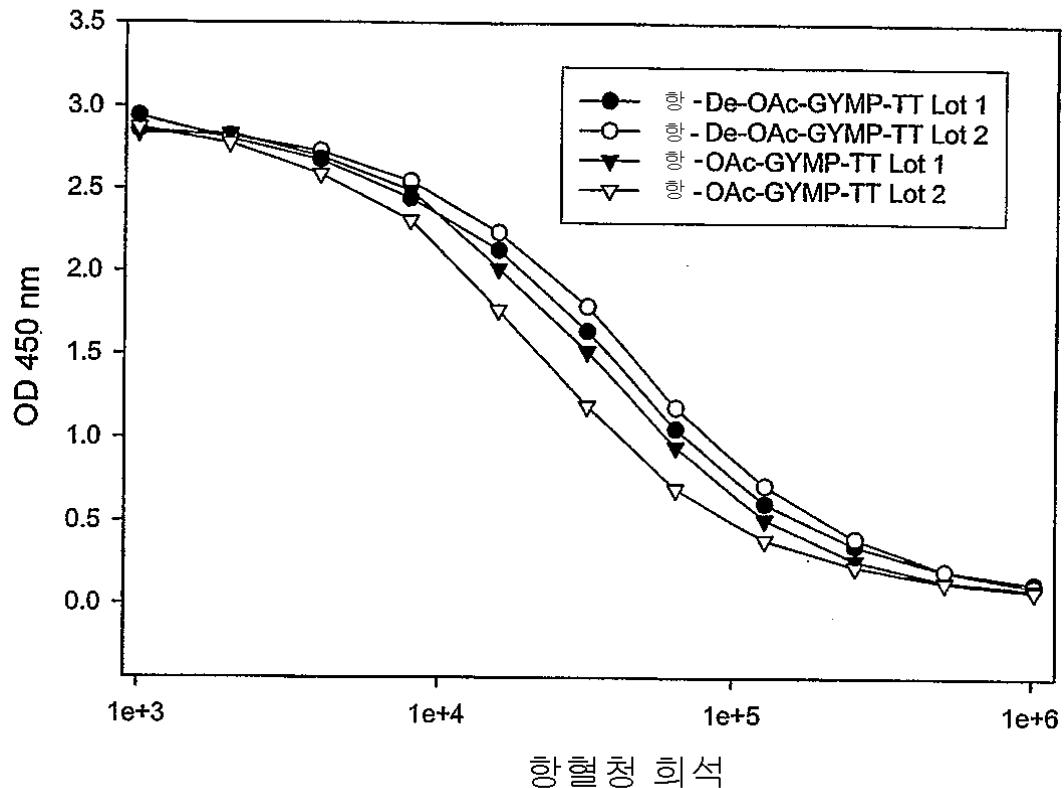
도면2

GYMP-TT 접합 백신에 의해 유도된 PS-특이적 IgG



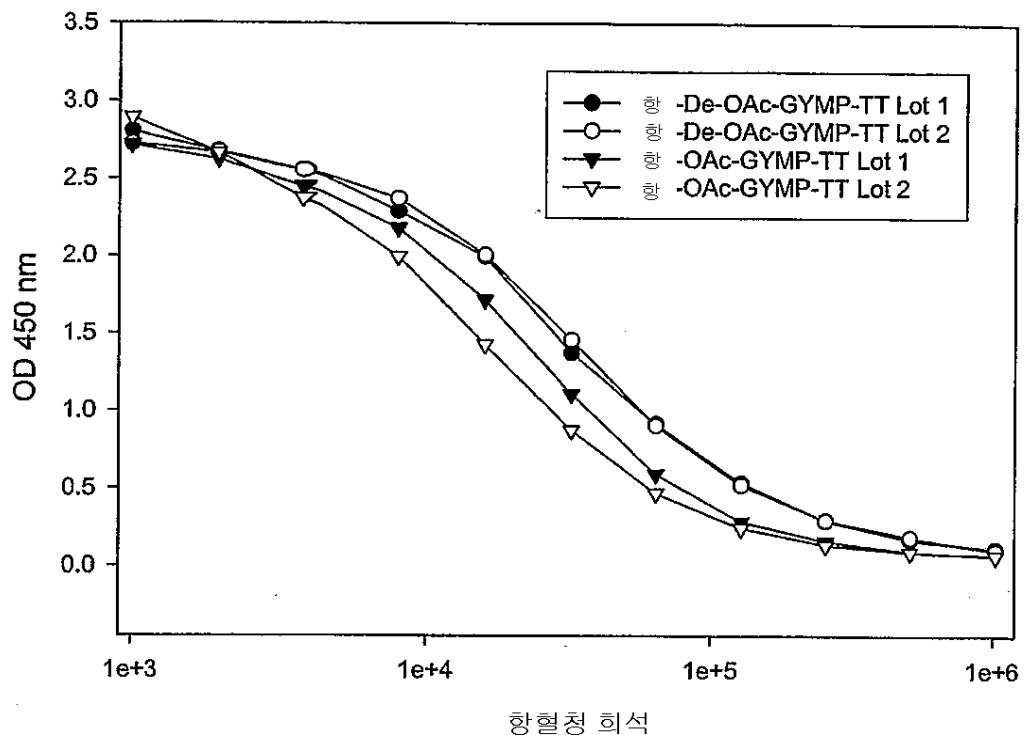
도면3

OAcGYMP-HSA 코팅 플레이트 060702-2에서 쥐 항혈청의 적정



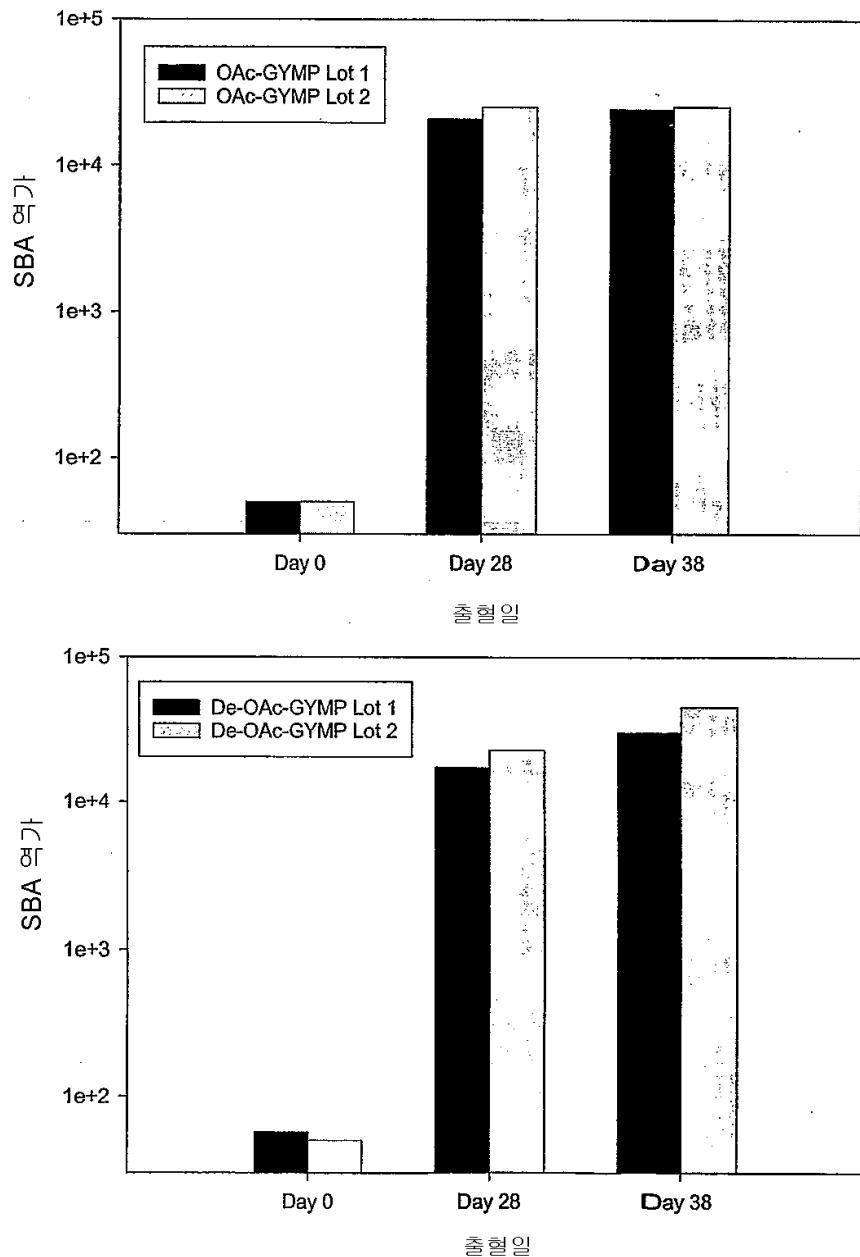
도면4

GYMP-HSA 코팅 플레이트 060702-1에서 주 항혈청의 적정



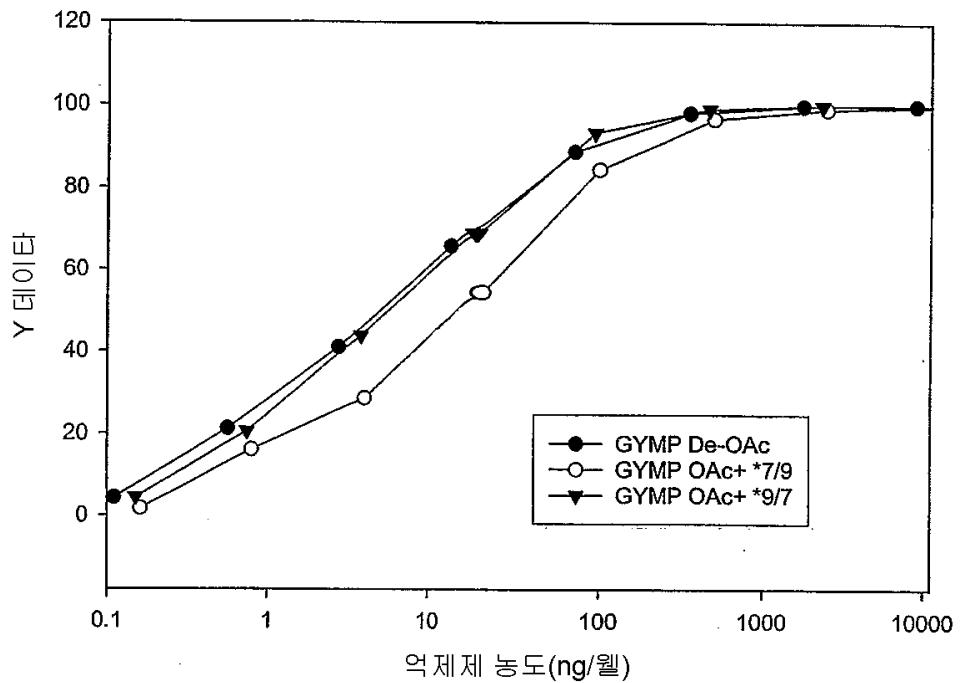
도면5

GYMP-TT 접합 백신으로 면역된 스위스 웰스터 쥐의 SBA 역가



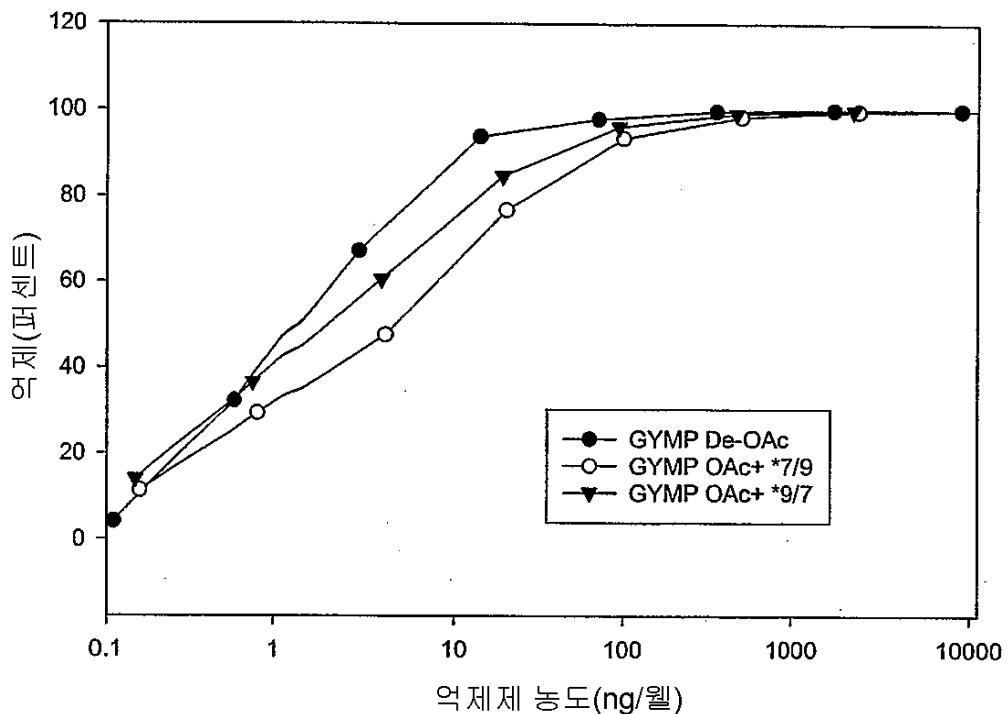
도면6

OAc-GYMP-HSA 코팅 플레이트 061402-3에서 쥐 항-GYMP-TT의 억제



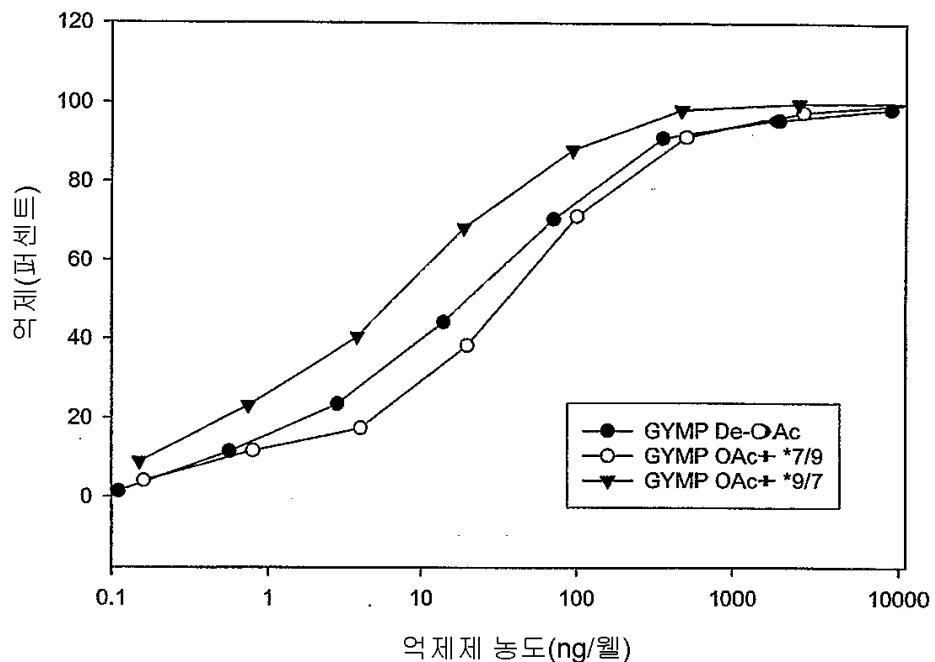
도면7

GYMP-HSA 코팅 플레이트 061402-1에서 쥐 항-GYMP-TT 억제



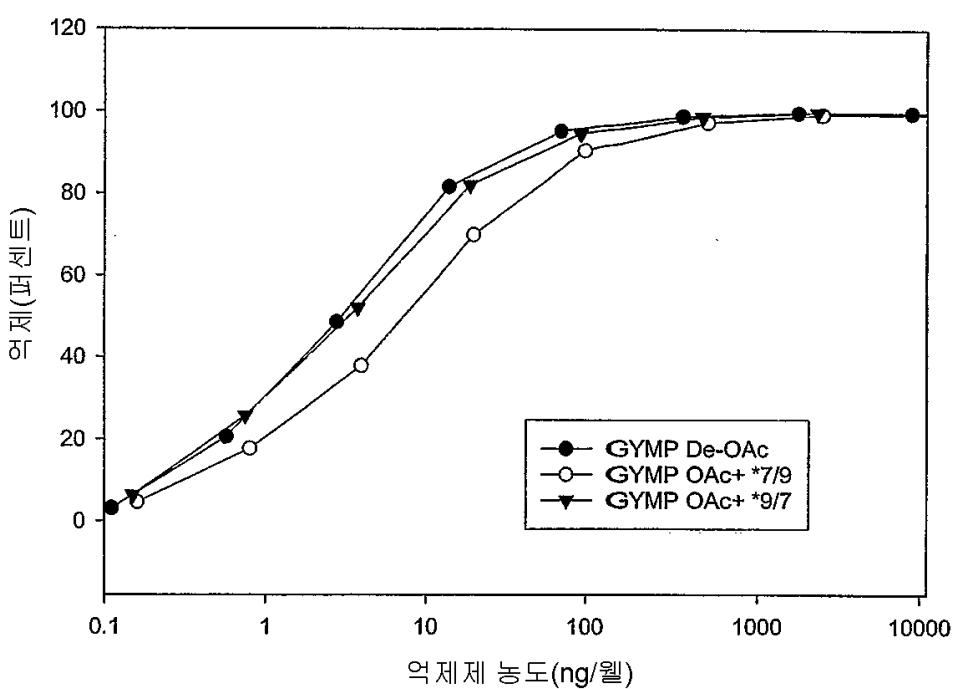
도면8

OAc-GYMP-HSA 코팅 플레이트 061402-4에서 쥐 항-OAc-GYMP-TT의 억제



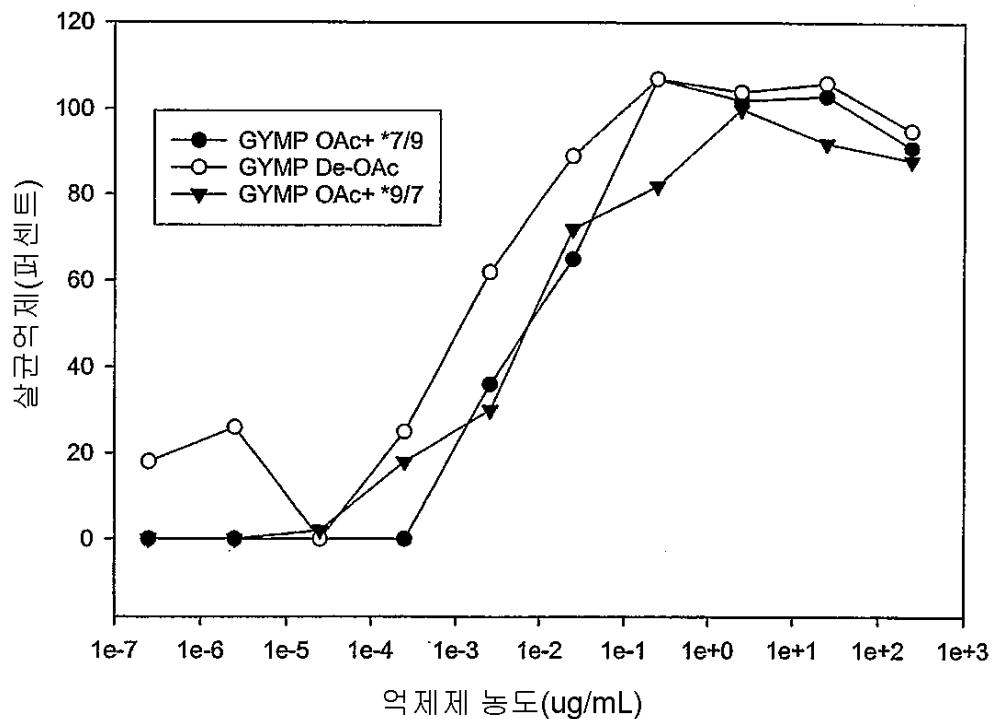
도면9

GYMP-HSA 코팅 플레이트 061402-2에서 쥐 항-OAc-GYMP-TT의 억제



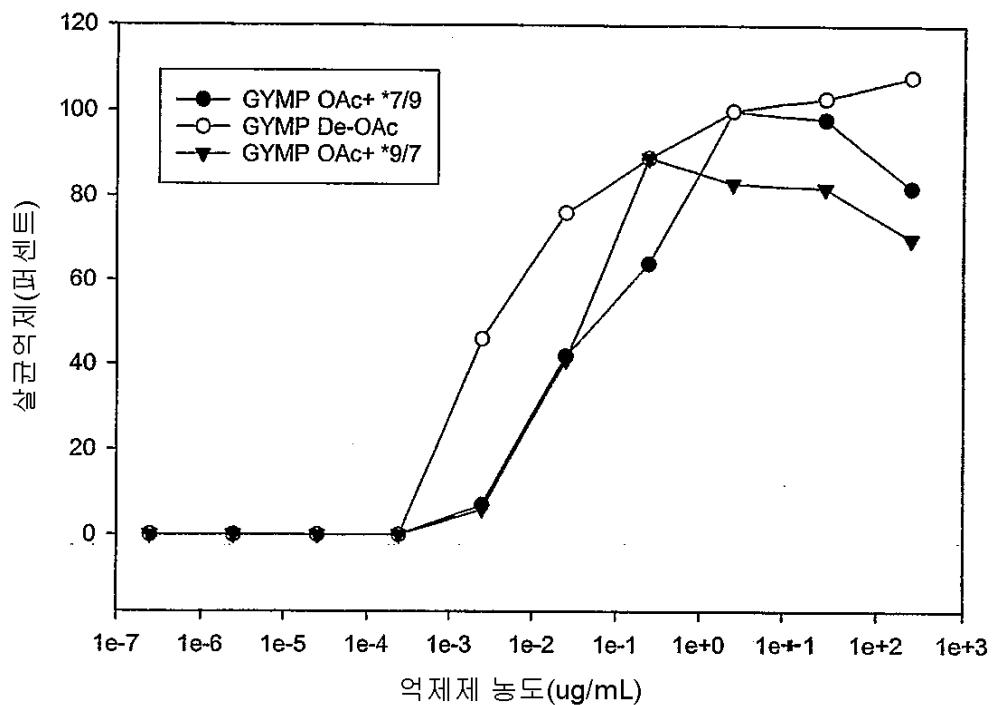
도면10

디-OAc-GYMP-TT 접합 백신으로 면역된 후, 상이한 아세틸화
경향으로 다당류에 의한 혈청 살균력의 억제



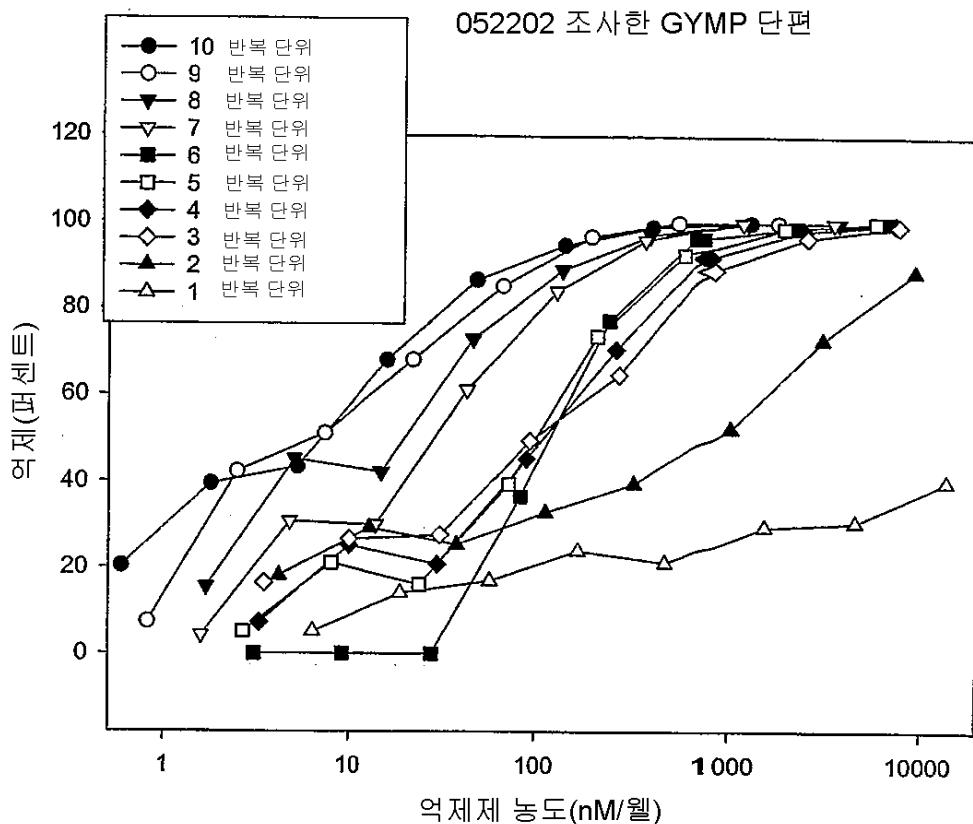
도면11

OAc-GYMP-TT 접합 백신으로 면역화 후, 상이한 아세틸화
경향으로 다당류에 의한 혈청 살균력의 억제



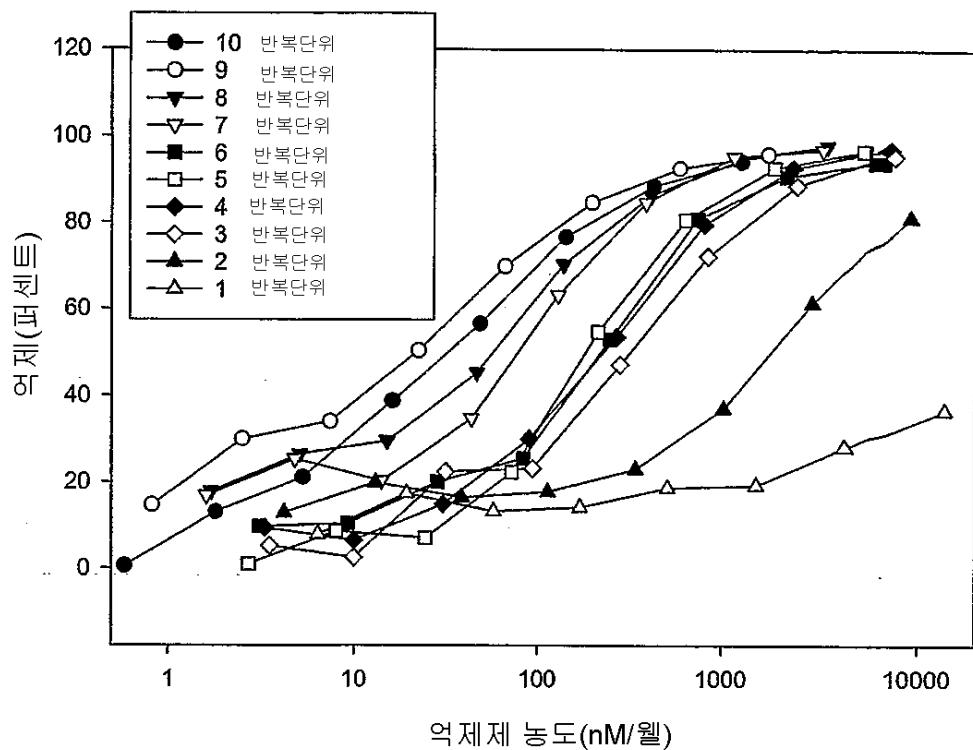
도면12

GYMP-HSA 코팅 플레이트에서 토끼 항-NMY의 억제



도면13

OAc-GYMP-HSA 코팅 플레이트에서 토끼 항-NMY의 억제
052202 조사된 GYMP 단편



도면14

쥐에서 3가 CY-YY/W135-rPorB 접합 백신에 의해 유도된
그룹-특이적 수막 염균 살균력

