



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0040556
(43) 공개일자 2016년04월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/13 (2006.01) A61K 38/05 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
C07C 271/22 (2006.01) C07D 209/42 (2006.01)
C07K 5/062 (2006.01) C07K 5/072 (2006.01)
C07K 5/083 (2006.01) C07K 5/103 (2006.01)
C07K 7/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/13 (2013.01)
A61K 38/05 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7003053
(22) 출원일자(국제) 2014년07월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년02월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/046409
(87) 국제공개번호 WO 2015/006728
국제공개일자 2015년01월15일
(30) 우선권주장
61/845,273 2013년07월11일 미국(US)
62/016,044 2014년06월23일 미국(US)
- (71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
유세라, 에이미
미국 02139 메사추세츠주 케임브리지 메사추세츠
애비뉴 220
로빈슨, 자카리
미국 02474 메사추세츠주 알링턴 매그놀리아 스트리트 #3 59
콕, 제니퍼
미국 02139 메사추세츠주 케임브리지 메사추세츠
애비뉴 220
(74) 대리인
양영준, 이상영

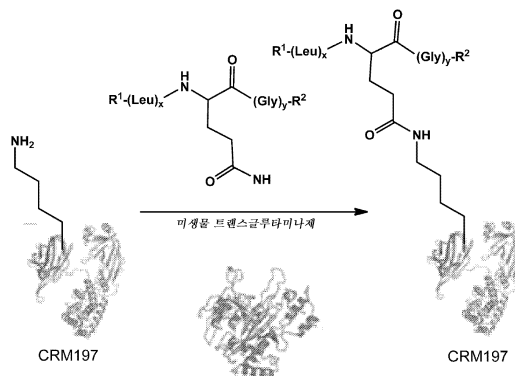
전체 청구항 수 : 총 101 항

(54) 발명의 명칭 미생물 트랜스글루타미나제를 사용한 리신-특이적 화학효소적 단백질 변형

(57) 요약

본 발명은 화학효소적 미생물 트랜스글루타미나제-매개 반응을 사용하는, 관능화된 펩티드를 이용한 리신 잔기를 갖는 단백질의 부위-선택적 변형에서 사용하기 위한 방법 및 시약에 관한 것이다. 관능화된 단백질은 연구 또는 치료적 용도에 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/48261 (2013.01)

A61K 49/0002 (2013.01)

C07C 271/22 (2013.01)

C07D 209/42 (2013.01)

C07K 5/06043 (2013.01)

C07K 5/06104 (2013.01)

C07K 5/0808 (2013.01)

C07K 5/101 (2013.01)

C07K 7/02 (2013.01)

명세서

청구범위

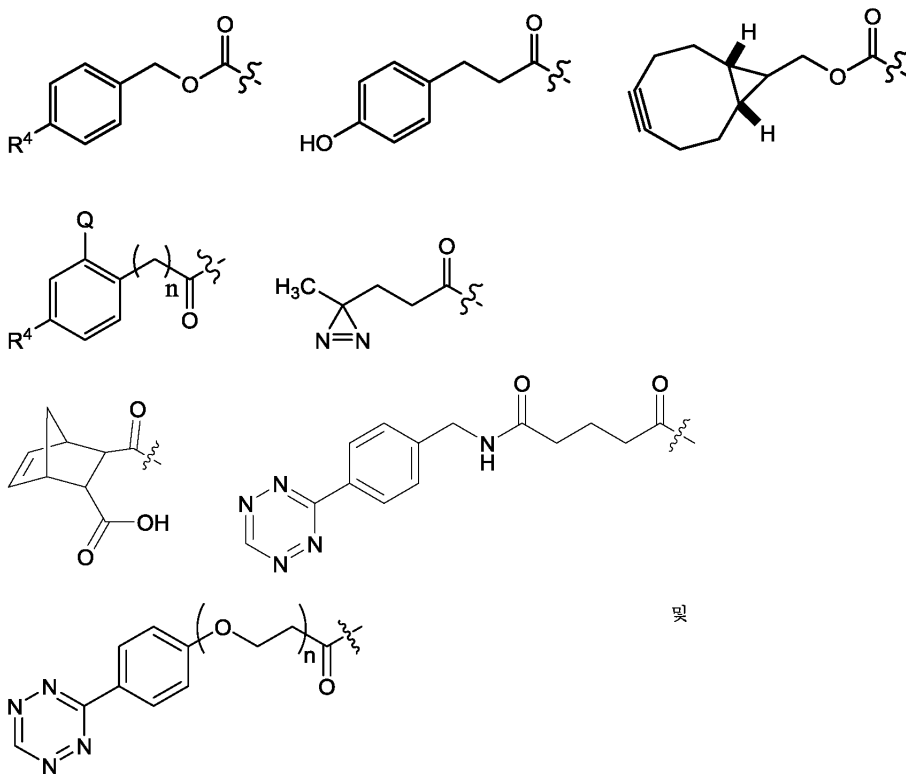
청구항 1

1개 이상의 리신 잔기를 갖는 표적 단백질을 제공하고;


표적 단백질을 미생물 트랜스글루타미나제의 존재하에 화학식 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 을 갖는 변형 화합물과 접촉시켜 변형된 단백질을 형성하는 것을 포함하는 단백질의 변형 방법.

상기 식에서, x 는 0 또는 1이고; y 는 0 또는 1이고; z 는 0 또는 1이고;

R^1 은 아세틸,



로 이루어진 군으로부터 선택되고;

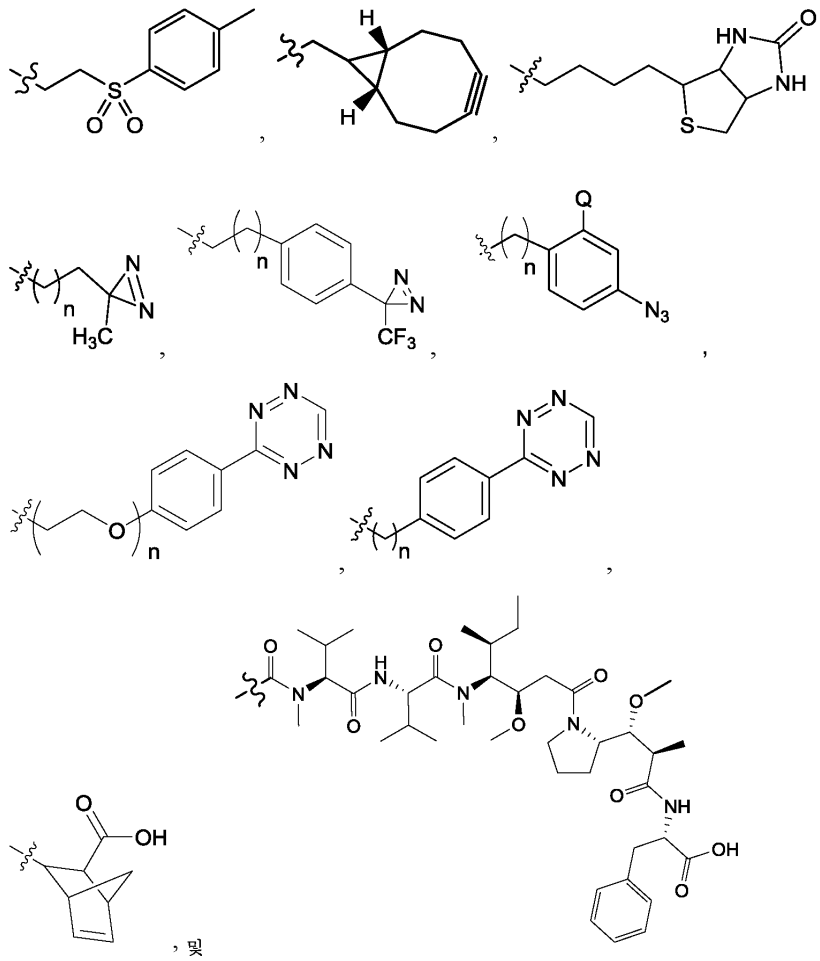
여기서 R^4 는 -H, -N₃, 및 로부터 선택되고;

W는 C₁-C₆ 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택되고;

A는 부재하거나 -O-, -NH-, 및 -S-로부터 선택되고;

B는 부재하거나 -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-, -NHS(O)-, -S(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- 및 =NH-N(C₁-C₂₀알킬)-로부터 선택되고;

R^2 는 지방산, 선형 또는 분지형 C_1-C_3 알킬- N_3 , 시클로옥티닐, 헵타단, 다당류, $-CH(OCH_3)_2$,



로 이루어진 군으로부터 선택되고;

각각의 n 은 0 내지 6으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;

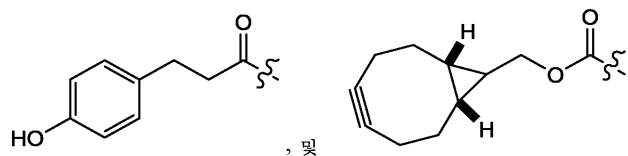
각각의 Q 는 H 및 NO_2 로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, x 가 1인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^1 이 아세틸,

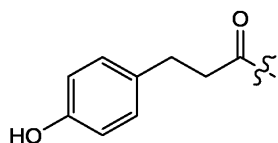


로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

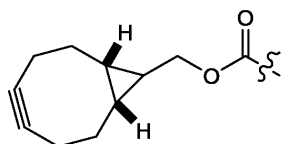
제3항에 있어서, R^1 이 아세틸인 방법.

청구항 5



제3항에 있어서, R^1 이 인 방법.

청구항 6



제4항에 있어서, R^1 이 인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, y 가 1이고 z 가 1인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, A가 -NH-인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -C(O)-인 방법.

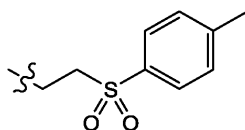
청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, W가 C_1 - C_6 선형 또는 분지형 알킬로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, W가 C_2 선형 알킬인 방법.

청구항 12

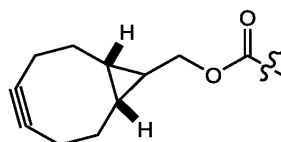


제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 인 방법.

청구항 13

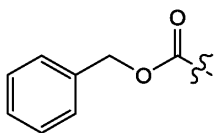
제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, y 가 1이고 z 가 0인 방법.

청구항 14



제1항에 있어서, x 가 0이고, y 가 1이고, R^1 이 인 방법.

청구항 15



제1항에 있어서, x 가 0이고, R^1 이 인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, y 가 0이고 z 가 1인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, y 가 1이고 z 가 1인 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 C_1 - C_6 선형 또는 분지형 알킬인 방법.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 C_2 선형 알킬인 방법.

청구항 20

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 C_5 선형 알킬인 방법.

청구항 21

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 약 40 내지 약 3000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

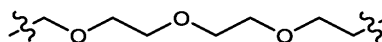
청구항 22

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 40 내지 200 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

청구항 23

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 약 40 내지 약 80 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜인 방법.

[청구항 23]



제15항 내지 제17항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서, W 가 인 방법.

청구항 24

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 선형 또는 분지형 C_1 - C_3 알킬- N_3 인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 C_2 -알킬- N_3 인 방법.

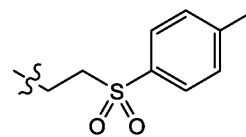
청구항 26

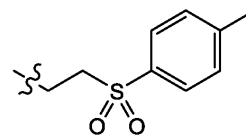
제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 시클로옥티닐인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ 인 방법.

청구항 28



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 인 방법.

청구항 29

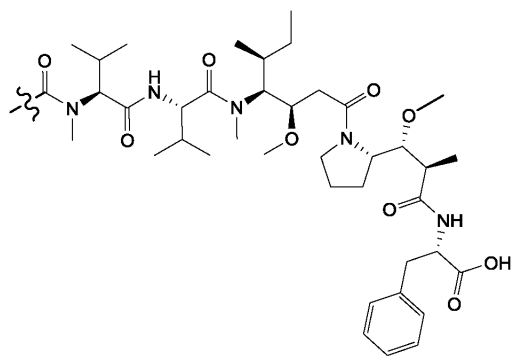
제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 형광단인 방법.

[청구항 29]

제26항에 있어서, 형광단이 알렉사 647, 알렉사 750, 알렉사 488, Cy5, Cy7, 로다민, 및 플루오레세인으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가



인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 다당류인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 다당류가 GBSII, GBSV, 및 MenA로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 GBSII인 방법.

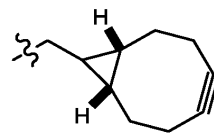
청구항 34

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 GBSV인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 MenA인 방법.

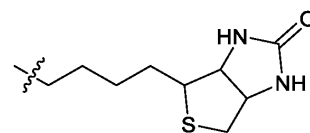
청구항 36



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

인 방법.

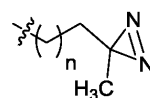
청구항 37



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가
방법.

인

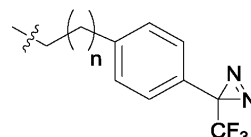
청구항 38



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

인 방법.

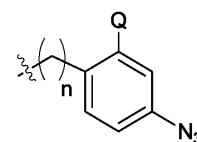
청구항 39



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

인 방법.

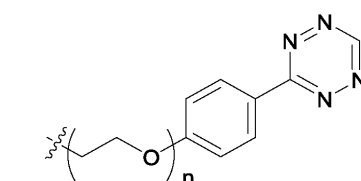
청구항 40



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

인 방법.

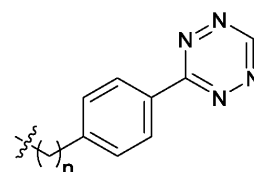
청구항 41



제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가
방법.

인

청구항 42

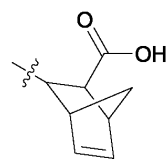


제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가

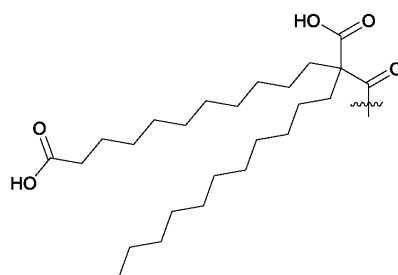


인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 지방산인 방법.

청구항 45



제44항에 있어서, 지방산이

인 방법.

청구항 46

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, A가 -O-인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, A가 -NH-인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, A가 -S-인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -O-인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -C(O)-인 방법.

청구항 51

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -NH-인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -C(O)NH-인 방법.

청구항 53

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 -NHC(O)-인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 NHC(O)O인 방법.

청구항 55

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-OC(O)NH-$ 인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-OC(O)O-$ 인 방법.

청구항 57

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-C=N(OH)-$ 인 방법.

청구항 58

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-S(O_2)-$ 인 방법.

청구항 59

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-NHS(O_2)-$ 인 방법.

청구항 60

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-S(O_2)NH-$ 인 방법.

청구항 61

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-S(O)-$ 인 방법.

청구항 62

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-NHS(O)-$ 인 방법.

청구항 63

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-S(O)NH-$ 인 방법.

청구항 64

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-C(O)O-$ 인 방법.

청구항 65

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $-OC(O)-$ 인 방법.

청구항 66

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $=NH-O-$ 인 방법.

청구항 67

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $=NH-NH$ 인 방법.

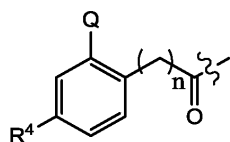
청구항 68

제1항 내지 제12항 및 제15항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, B가 $=NH-N(C_1-C_{20}알킬)-$ 인 방법.

청구항 69

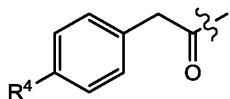
제1항에 있어서, y 및 z가 둘 다 0인 방법.

청구항 70



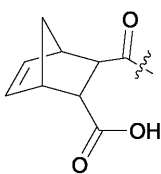
제69항에 있어서, R^1 이 이고, R^4 가 $-N_3$ 이고, Q가 H인 방법.

청구항 71



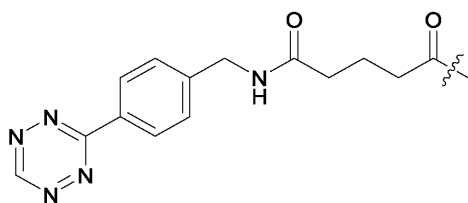
제69항에 있어서, R^1 이 이고, R^4 가 인 방법.

청구항 72



제69항에 있어서, R^1 이 인 방법.

청구항 73



제69항에 있어서, R^1 이 인 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 0인 방법.

청구항 75

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 1인 방법.

청구항 76

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 2인 방법.

청구항 77

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 3인 방법.

청구항 78

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 4인 방법.

청구항 79

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 5인 방법.

청구항 80

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, n이, 존재하는 경우, 6인 방법.

청구항 81

제28항에 있어서,
표적 단백질의 pH 환경을 7 초과 pH로 제어하고;
변형된 단백질을 시스테인 잔기를 갖는 분자와 접촉시키는 것
을 추가로 포함하는 방법.

청구항 82

제34항에 있어서, 시스테인 잔기를 갖는 분자가 N⁵-((R)-1-((카르복시메틸)아미노)-3-메르캅토-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민인 방법.

청구항 83

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물 트랜스글루타미나제가 아지노모토 미생물 트랜스글루타미나제 TI인 방법.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 운반 단백질인 방법.

청구항 85

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 CRM₁₉₇인 방법.

청구항 86

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 박테리아 독소, 박테리아 독소 단편, 해독된 박테리아 독소, 항체, 및 항체 단편으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, R₁ 기를 생물상호작용성 작용제 또는 분석용 작용제와 반응시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 88

제1항 내지 제12항, 제14항 내지 제68항, 및 제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, R² 기를 생물상호작용성 작용제 또는 분석용 작용제와 반응시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제87항 또는 제88항에 있어서, 분석용 작용제가 표지인 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 표지를 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 접합체.

청구항 92

제91항에 따라 제조된 접합체 또는 제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 따른 변형된 단백질을 포함하는 백신.

청구항 93

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 따라 제조된 변형된 단백질을 포함하는 치료용 단백질.

청구항 94

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 따라 제조된 변형된 단백질을 포함하는 영상화 작용제.

청구항 95

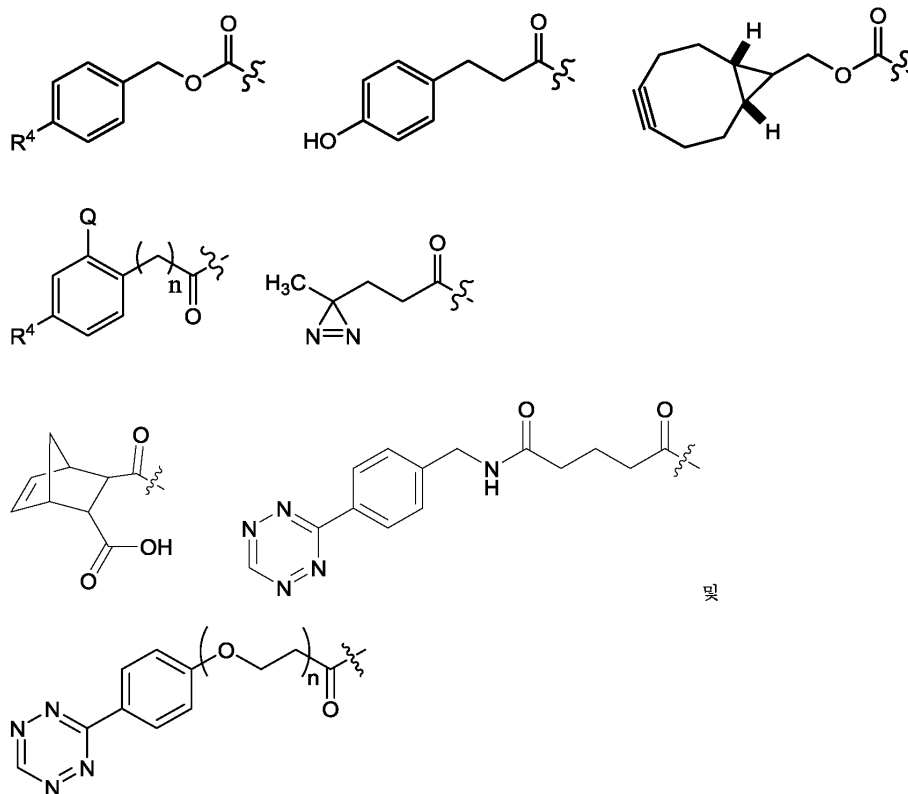
제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 따라 제조된 변형된 단백질을 포함하는 표지화 도구.

청구항 96


화학식 $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 의 화합물.

상기 식에서, x 는 0 또는 1이고; y 는 0 또는 1이고; z 는 0 또는 1이고;

R^1 은 아세틸,



로 이루어진 군으로부터 선택되고;

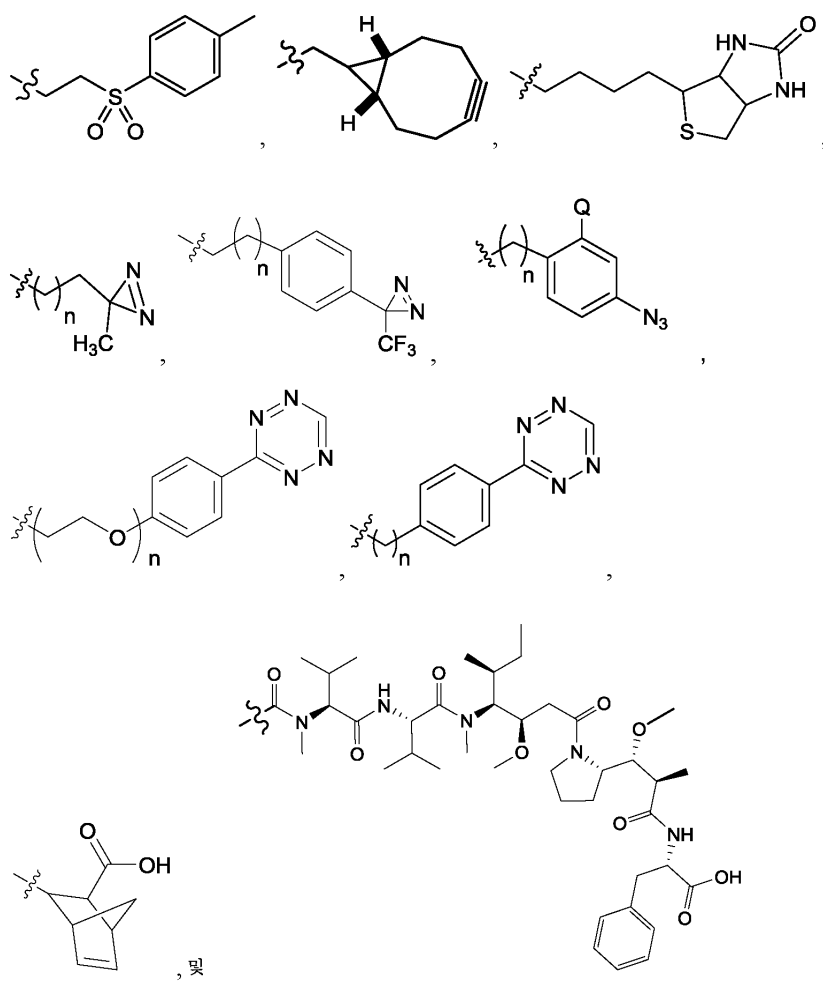
여기서 R^4 는 -H, $-N_3$, 및 로부터 선택되고;

W는 C_1-C_6 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택되고;

A는 부재하거나 -O-, -NH-, 및 -S-로부터 선택되고;

B는 부재하거나 -O-, $-C(O)-$, -NH-, $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-NHC(O)O-$, $-OC(O)NH-$, $-OC(O)O-$, $-C=N(OH)-$, $-S(O_2)-$, $-NHS(O_2)-$, $-S(O_2)NH-$, $-S(O)-$, $-NHS(O)-$, $-S(O)NH-$; $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, -S-, $=NH-O-$, $=NH-NH-$ 및 $=NH-N(C_1-C_{20}알킬)-$ 로부터 선택되고;

R^2 는 지방산, 선형 또는 분지형 C_1-C_3 알킬- N_3 , 시클로옥티닐, 헥사단, 다당류, $-CH(OCH_3)_2$,



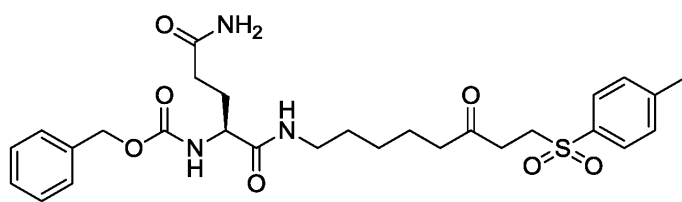
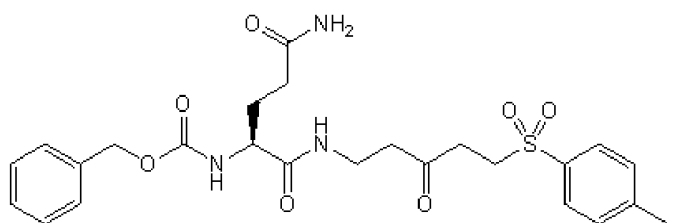
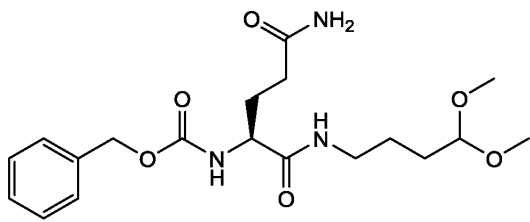
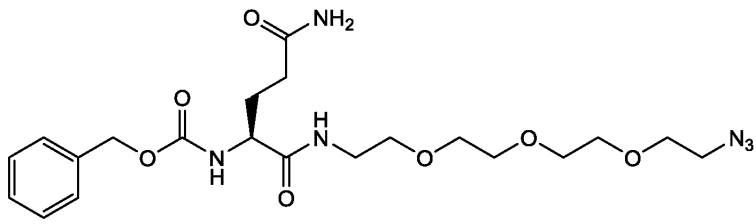
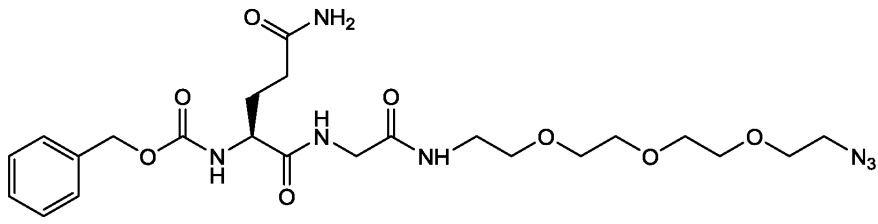
로 이루어진 군으로부터 선택되고;

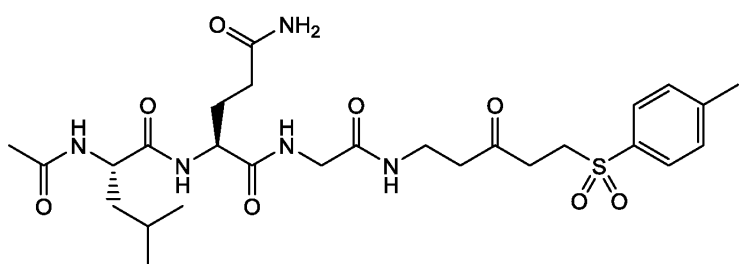
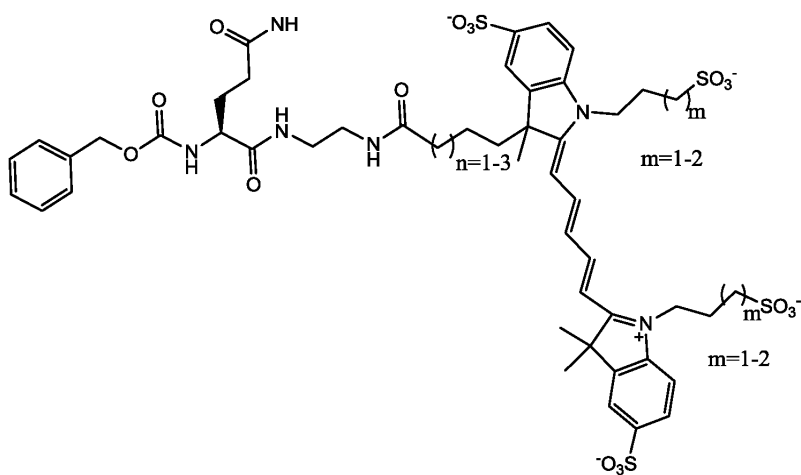
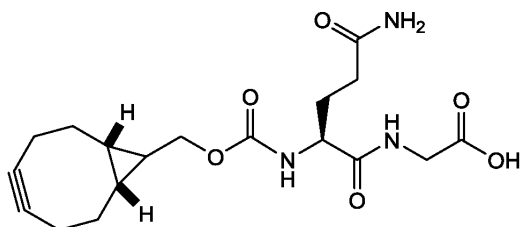
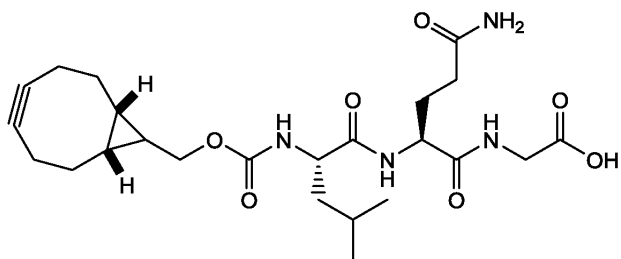
각각의 n 은 0 내지 6으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;

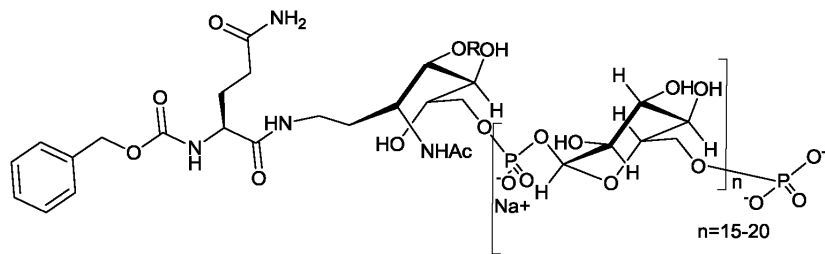
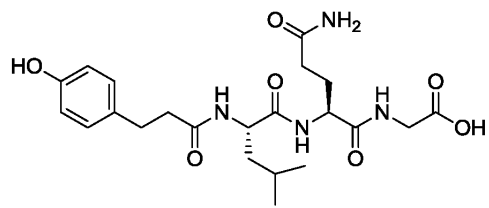
각각의 Q 는 H 및 $-NO_2$ 로부터 선택된다.

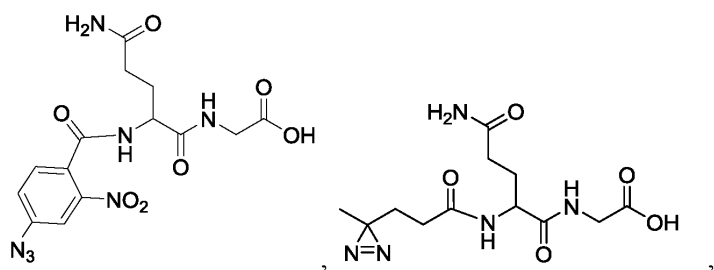
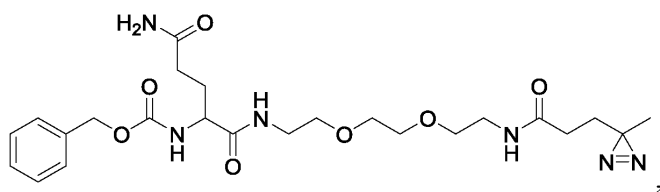
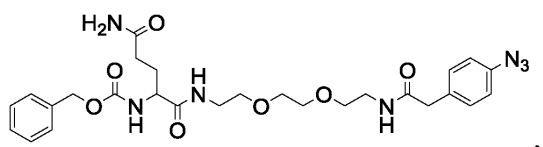
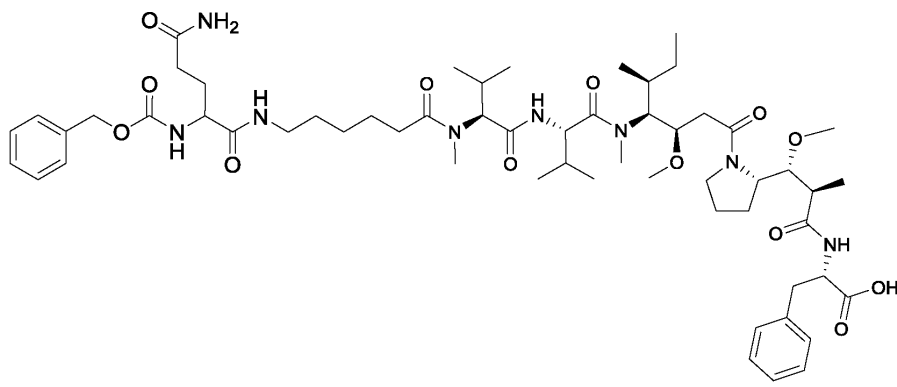
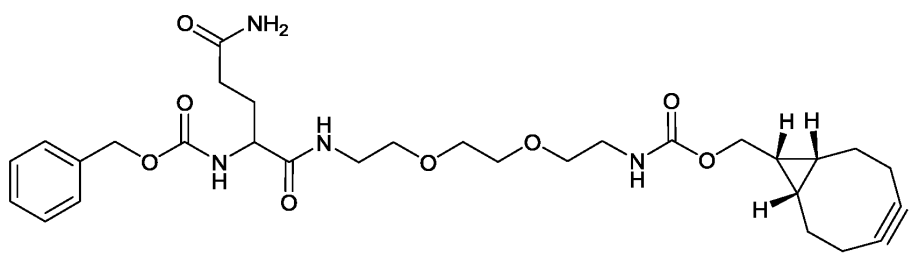
청구항 97

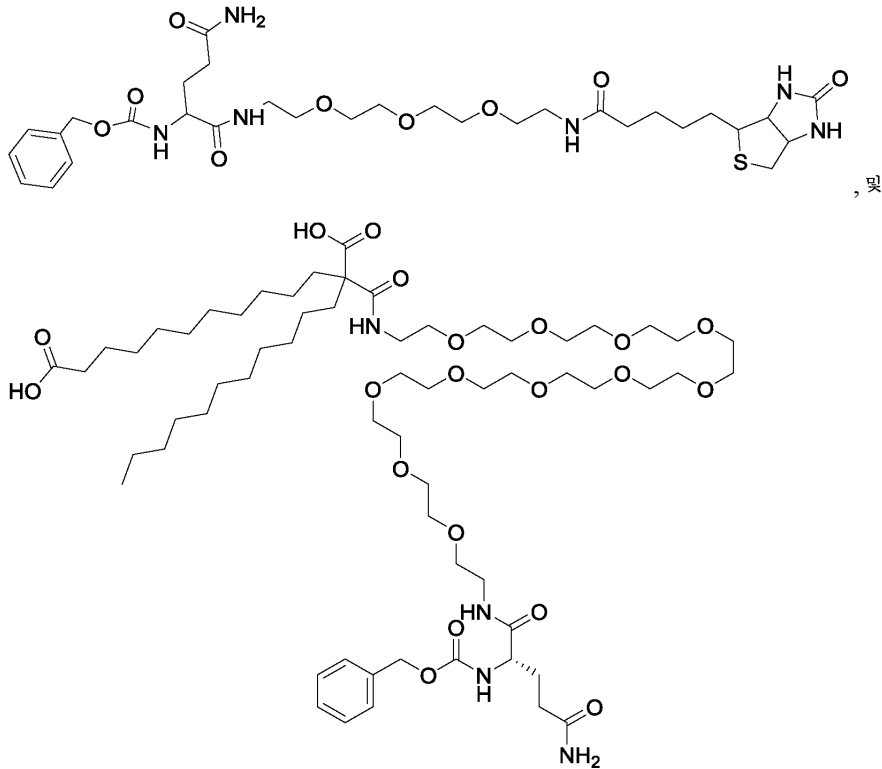
제96항에 있어서,











로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물.

청구항 98

제96항 또는 제97항의 화합물의 접합체.

청구항 99

제98항에 있어서, 접합체 단백질이 CRM₁₉₇인 접합체.

청구항 100

제98항에 있어서, 접합체 단백질이 GBS₈₀인 접합체.

청구항 101

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항의 접합체를 포함하는 백신.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 변형 기를 단백질에 도입하는 신규 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 단백질을 변형 시키기 위해 화학효소적 미생물 트랜스글루타미나제-매개 반응을 사용하는 단백질에서의 리신 잔기의 선택적 유도체화 및 그의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질의 특성 및 특징이 단백질에 대한 접합 기에 의해 변형될 수 있다는 것은 주지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,179,337은 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌 글리콜에 접합된 단백질을 개시하였다. 일반적으로, 이러한 접합은 일반적으로 단백질에서의 일부 관능기가 접합 기에서의 또 다른 관능기와 반응하는 것을 필요로 한다. 아미노 기, 예컨대 리신 잔기에서의 ε-아미노 기 또는 N-말단 아미노 기는 이러한 목적을 위해 적합한 아실화 시약과 조합되어 사용되어 왔다. 예컨대 접합 화합물이 단백질에 부착하는 접합 반응을 제어하고 몇 개

의 접합 기가 부착되는지를 제어하는 것이 종종 바람직하거나 필요하다. 이는 종종 특이성 또는 선택성으로 지칭된다.

[0003] 단백질의 부위-특이적 변형은 제약 및 생명공학 기술에서 오랜 도전과제이다. 고전적인 방법은 종종 비특이적 표지화 (예를 들어 NHS Lys 표지화)를 야기하거나 공학 기술 (예를 들어 말레이미드 Cys 표지화 또는 비천연 아미노산)을 필요로 한다. 게다가, 그러나, 선택적 화학 반응의 레퍼토리는 매우 제한되어 있다. 한 대안은, 재조합 방법에 의해, 특유의 반응성을 갖는 특수 비천연 아미노산을 도입한 다음에 이러한 반응성을 추가 유도체화에서 활용하는 것이다. 또 다른 대안은 변형되는 단백질의 구조 및 기능적 특질을 인식하는 효소의 사용이다. 이의 예는 미생물 트랜스글루타미나제 (mTGase)를 사용하여 성장 호르몬에서 Gln 잔기를 선택적으로 변형시키는 것이다. 다른 문서들은 트랜스글루타미나제를 사용하여 생리학상 활성 단백질의 특성을 변경시키는 것을 개시한다. 예를 들어 EP 950 665, EP 785 276 및 문헌 [Sato, Adv. Drug Delivery Rev., 54, 487-504 (2002)]을 참조하며, 이들 문헌은 트랜스글루타미나제의 존재 하에 1개 이상의 Gln 및 아미노-관능화된 PEG 또는 유사 리간드를 포함하는 단백질 간의 직접 반응을 기재하고; 또한 문헌 [Wada in Biotech. Lett., 23, 1367-1372 (2001)]을 참조하며, 이 문헌은 트랜스글루타미나제에 의하여 지방산과 P-락토글로불린의 직접 접합을 개시한다. 트랜스글루타미나제에 의해 촉매화된 반응은 글루타민 잔기의 1급 아미드가 반응 혼합물에 존재하는 1급 아민으로부터 2급 아미드로 전환되는 아미드교환(transamidation) 반응이다.

[0004] 단백질의 선택적 유도체화는 매우 곤란한 과제로 남아 있으며; 아실화에 의한 단백질에서의 리신의 유도체화는 훨씬 더 본질적으로 비선택적인 프로세스이다. 따라서, 현재 리신 잔기의 선택적 유도체화에 대한 어떤 효율적 방법도 없다. 따라서, 단백질 또는 폴리펩티드에서의 리신과 같은 아미노산 잔기를 선택적으로 유도체화하는 방법이 관련 기술분야에서 필요하다.

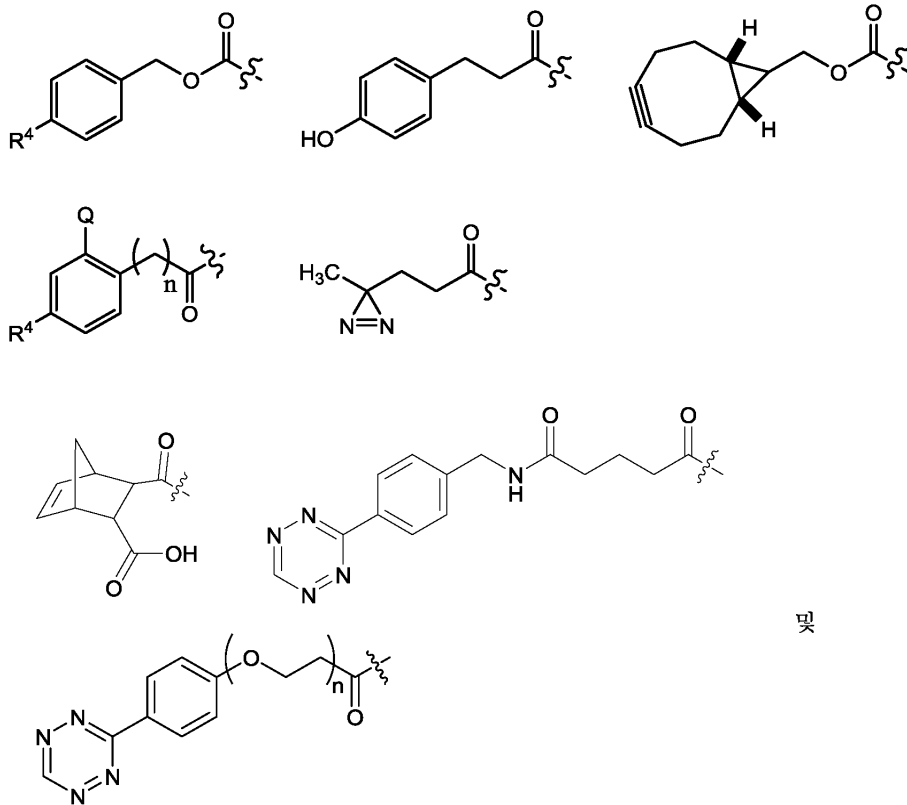
발명의 내용

[0005] 개요

[0006] 한 측면에서, 단백질을 변형시키는 방법이 개시된다. 방법은 부위 선택적 변형을 가능하게 한다. 방법은 1개 이상의 리신 잔기를 갖는 표적 단백질을 제공하고; 표적 단백질을 미생물 트랜스글루타미나제의 존재하에 화학식 $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 을 갖는 변형 화합물과 접촉시켜 변형된 단백질을 형성하는 것을 포함하며;


[0007] 상기 식에서, x는 0 또는 1이고; y는 0 또는 1이고; z는 0 또는 1이고;

[0008] R^1 은 아세틸,



및

[0009] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

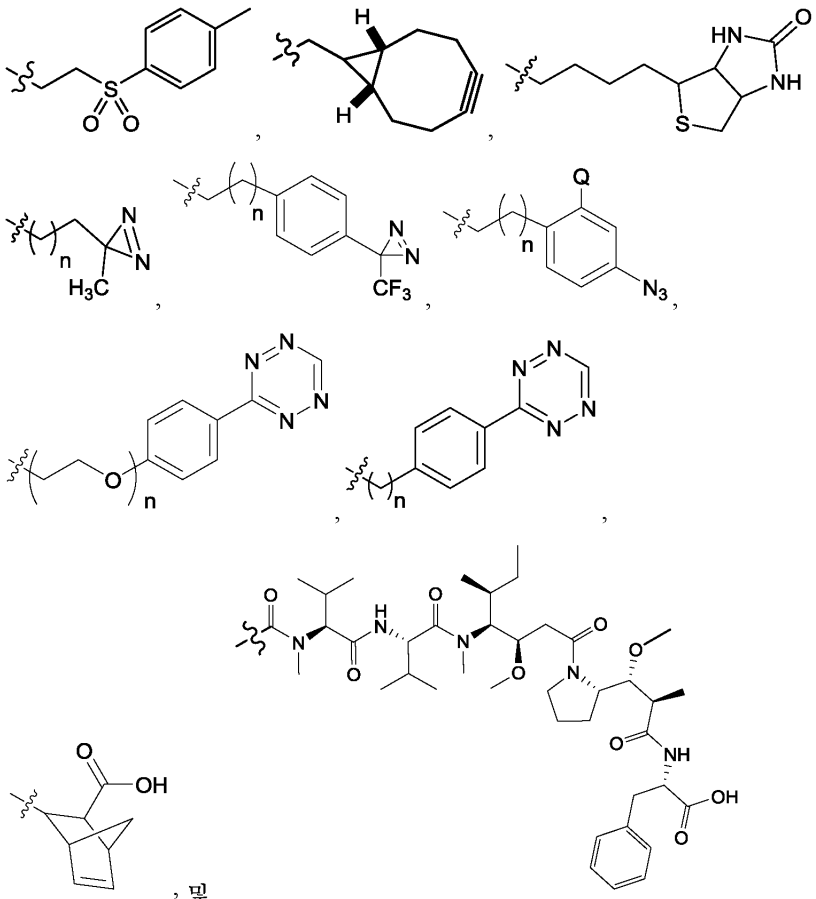
[0010] 여기서 각각의 R^4 는 -H, $-N_3$, 및 로부터 선택되고;

[0011] W는 C_1-C_6 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택되고;

[0012] A는 부재하거나 -O-, -NH-, 및 -S-로부터 선택되고;

[0013] B는 부재하거나 -O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O₂)-, -NHS(O₂)-, -S(O₂)NH-, -S(O)-, -NHS(O)-, -S(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- 및 =NH-N(C_1-C_{20} 알킬)-로부터 선택되고;

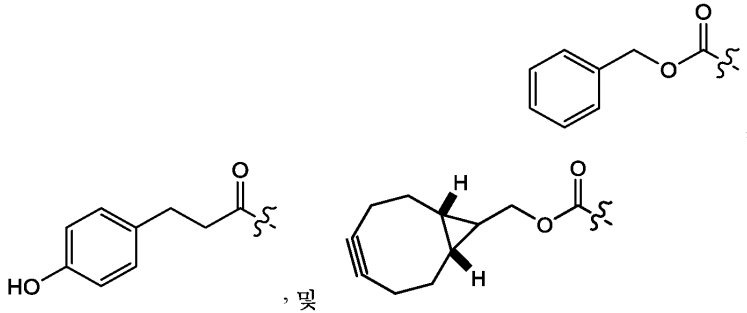
[0014] R^2 는 지방산, 선형 또는 분지형 C_1-C_3 알킬- N_3 , 시클로옥티닐, 형광단, 다당류, $-CH(OCH_3)_2$,



- [0015] 고; 로 이루어진 군으로부터 선택되
- [0016] 각각의 n 은 0 내지 6으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;
- [0017] 각각의 Q 는 H 및 $-NO_2$ 로부터 선택된다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 방법은 또한, 표적 단백질의 pH 환경을 7 초과 pH로 제어하고; 변형된 단백질을 시스테인 잔기를 갖는 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기를 갖는 분자는 $N^5-((R)-1-((\text{카르복시메틸})\text{아미노})-3\text{-메르캅토-1-옥소프로판-2-일})-L\text{-글루타민}$ 이다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 미생물 트랜스글루타미나제는 아지노모토(Ajinomoto) 미생물 트랜스글루타미나제 TI이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 운반 단백질이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 박테리아 독소, 박테리아 독소 단편, 해독된 박테리아 독소, 항체, 및 항체 단편으로부터 선택된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 방법은 R_1 기를 생물상호작용성 작용제(biointeractive agent) 또는 분석용 작용제(analytical agent)와 반응시키는 것을 포함한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 방법은 R^2 기를 생물상호작용성 작용제 또는 분석용 작용제와 반응시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분석용 작용제는 표지(label)이다. 일부 실시양태에서, 방법은 표지를 검출하는 것을 포함한다.
- [0023] 또 다른 측면에서, 개시된 방법에 의해 제조된 접합체가 또한 개시된다. 또 다른 측면에서, 개시된 방법에 의해 제조된 치료용 단백질이 개시된다. 또 다른 측면에서, 개시된 방법에 의해 제조된 영상화 작용제가 개시된다. 또 다른 측면에서, 개시된 방법에 의해 제조된 표지화 도구가 개시된다.
- [0024] 또 다른 측면에서, 화학식 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(A-W-B-R^2)_z$ 의 화합물이 개시되며, 상기 식에서 R^1 , x , y , A ,

W, B, R² 및 z는 본원에 기재된 의미를 갖는다.

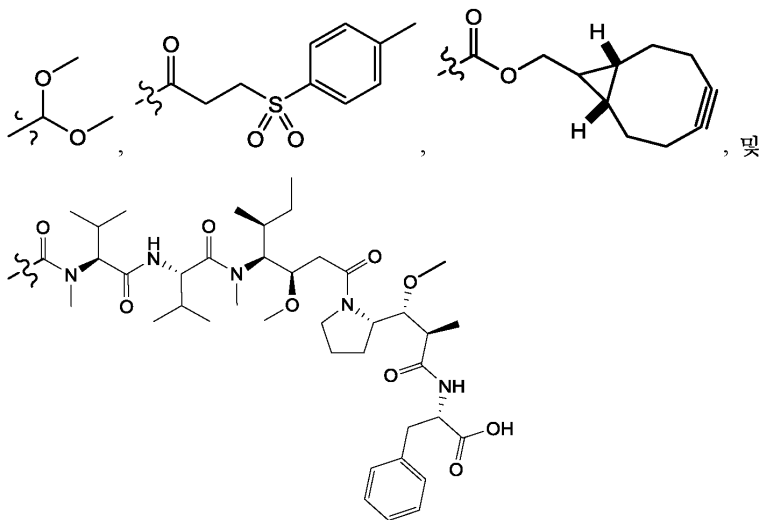
[0025] 한 측면에서, 단백질을 변형시키는 방법이 개시된다. 방법은 1개 이상의 리신 잔기를 갖는 표적 단백질을 제공하고; 표적 단백질을 미생물 트랜스글루타미나제의 존재하에 화학식 R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R²)_z을 갖는 변형 화합물과 접촉시켜 변형된 단백질을 형성하는 것을 포함하며, 상기 식에서, x는 0 또는 1이고; y는 0 또는 1이고; z는 0 또는 1이고; R¹은 아세틸,



[0026] , 및 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

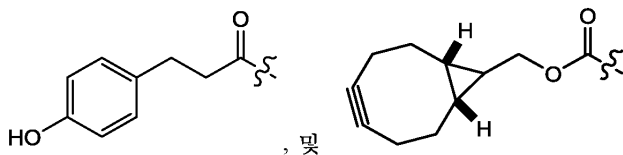
[0027] W는 C₁-C₆ 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택되고;

[0028] R²는 선형 또는 분지형 C₁-C₃ 알킬-N₃, 시클로옥티닐, 형광단, 다당류,



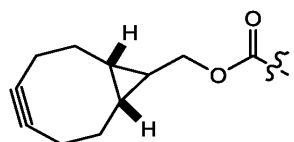
[0029] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 일부 실시양태에서, x는 1이다. 일부 실시양태에서, R¹은 아세틸,



로부터 선택된다.

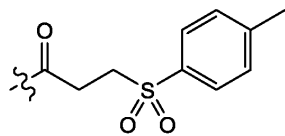
[0031] 일부 실시양태에서, R¹은 아세틸이다. 일부 실시양태에서, R¹은 HO-C₆H₄-CH₂-CH₂-C(=O)-R¹이다. 일부 실시양태



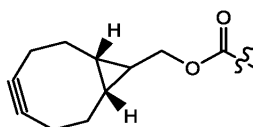
에서, R^1 은 이다.

[0032] 일부 실시양태에서, y 는 1이고 z 는 0이다. 일부 실시양태에서, 여기서 y 는 1이고 z 는 1이다.

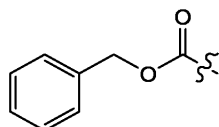
[0033] 일부 실시양태에서, W 는 C_1 - C_6 선형 또는 분지형 알킬로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W 는 C_2 선형 알킬이



다. 일부 실시양태에서, R^2 는 이다.



[0034] 일부 실시양태에서, x 는 0이고, y 는 1이고, R^1 은 이다.

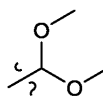


[0035] 일부 실시양태에서, 여기서 x 는 0이고 R^1 은 이다.

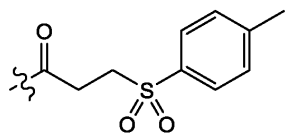
[0036] 일부 실시양태에서, y 는 0이고 z 는 1이다. 일부 실시양태에서, y 는 1이고 z 는 1이다.

[0037] 일부 실시양태에서, W 는 C_1 - C_6 선형 또는 분지형 알킬이다. 일부 실시양태에서, W 는 C_2 선형 알킬이다. 일부 실시양태에서, W 는 C_5 선형 알킬이다. 일부 실시양태에서, W 는 약 40 내지 약 3000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜이다. 일부 실시양태에서, W 는 약 40 내지 약 80 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜이다.

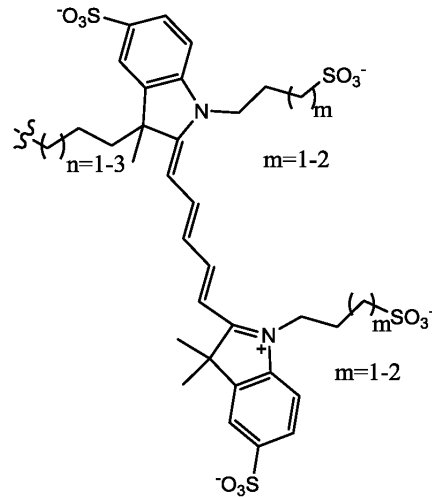
[0038] 일부 실시양태에서, R^2 는 선형 또는 분지형 C_1 - C_3 알킬- N_3 이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 C_2 -알킬- N_3 이다. 일부



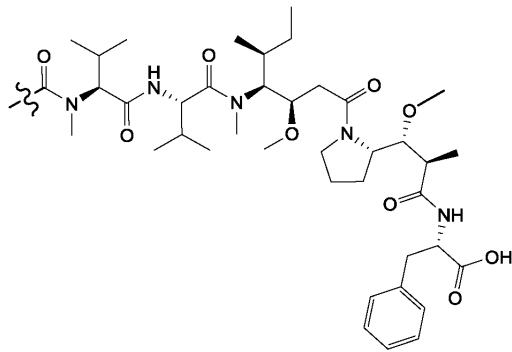
실시양태에서, R^2 는 시클로옥티닐이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 이다. 일부 실시양태에서, R^2 는



이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 알렉사 (alexa) 647, 알렉사 750, 알렉사 488, Cy5, Cy7, 로다민, 및 플루오레세인으로부터 선택된다. 일부 실시양태



에서 형광단은 화학식 R^2 이며, 상기 식에서, n 은 1 내지 3이고 각각의 m 은 1 내지 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이다. 일부 실시양태에서, n 은 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 3이다. 일부 실시양태에서, 하나의 m 은 1이고 다른 하나의 m 은 2이다. 일부 실시양태에서, m 둘 다는 1이다. 일부 실시양태에서, m 둘 다는 2이다. 일부 실시양태에서, R^2 는



이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 다당류이다. 일부 실시양태에서, 다당류는 GBSII, GBSV, 및 MenA로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, R^2 는 GBSII이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 GBSV이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 MenA이다.

[0039] 일부 실시양태에서, 방법은 표적 단백질의 pH 환경을 7 초과 pH로 제어하고; 변형된 단백질을 시스테인 잔기를 갖는 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기를 갖는 분자는 N^5 -((R)-1-((카르복시메틸)아미노)-3-메르캅토-1-옥소프로판-2-일)-L-글루타민이다.

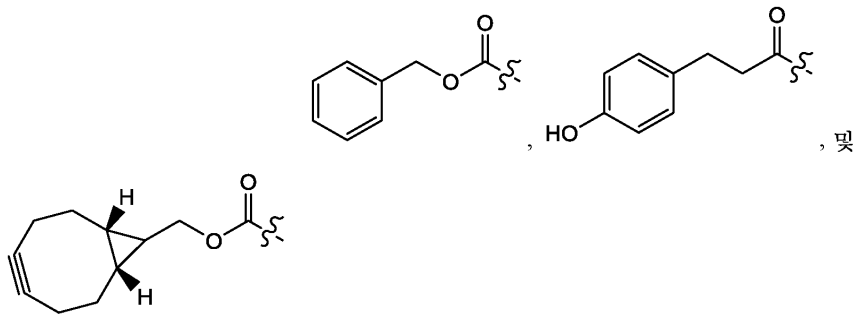
[0040] 일부 실시양태에서, 미생물 트랜스글루타미나제는 아지노모토 미생물 트랜스글루타미나제 TI이다.

[0041] 일부 실시양태에서, 단백질은 운반 단백질이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 박테리아 독소, 박테리아 독소 단편, 해독된 박테리아 독소, 항체, 및 항체 단편으로부터 선택된다.

[0042] 일부 실시양태에서, 방법은 또한 R_1 기를 생물상호작용성 작용제 또는 분석용 작용제와 반응시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 R^2 기를 생물상호작용성 작용제 또는 분석용 작용제와 반응시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분석용 작용제는 표지이다. 일부 실시양태에서, 방법은 또한 표지를 검출하는 것을 포함한다.

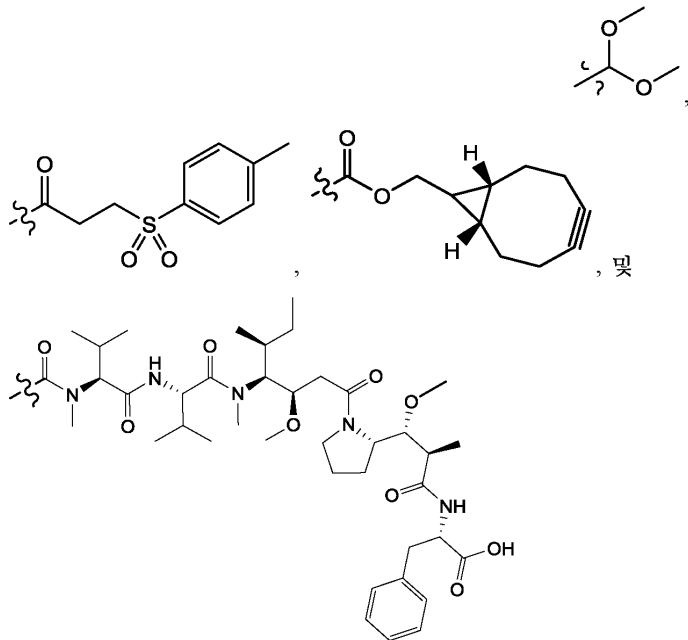
[0043] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 방법으로부터 제조된 접합체가 개시된다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 접합체 또는 변형된 단백질로 제조된 백신이 개시된다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 변형된 단백질을 갖는 치료용 단백질이 개시된다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 변형된 단백질을 갖는 영상화 작용제가 개시된다. 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 변형된 단백질을 갖는 표지화 도구가 개시된다.

[0044] 또 다른 측면에서, 화학식 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH}-W-R^2)_z$ 의 화합물이 개시되며, 상기 식에서, x 는 0 또는 1이고; y 는 0 또는 1이고; z 는 0 또는 1이고; R^1 은 아세틸,



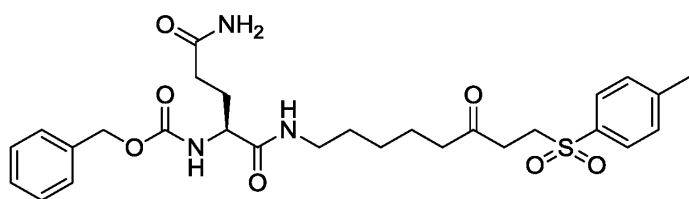
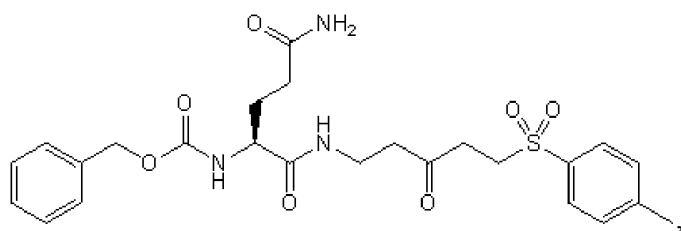
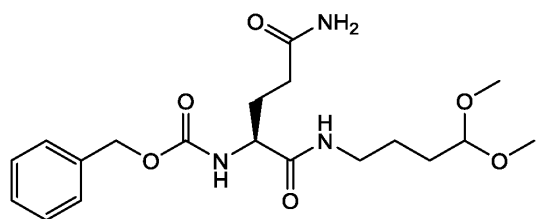
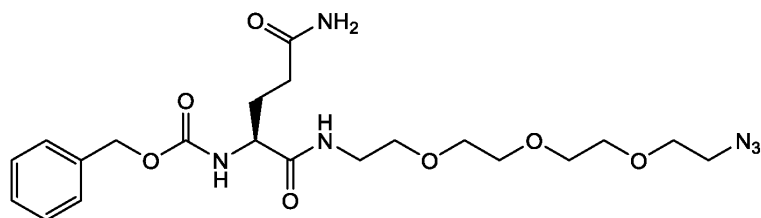
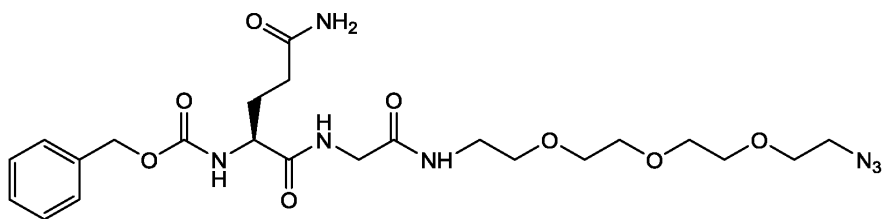
[0045]

[0046] 로 이루어진 군으로부터 선택되고; W 는 C_1-C_6 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택되고; R^2 는 선형 또는 분지형 C_1-C_3 알킬- N_3 , 시클로옥티닐, 헥사단, 다당류,

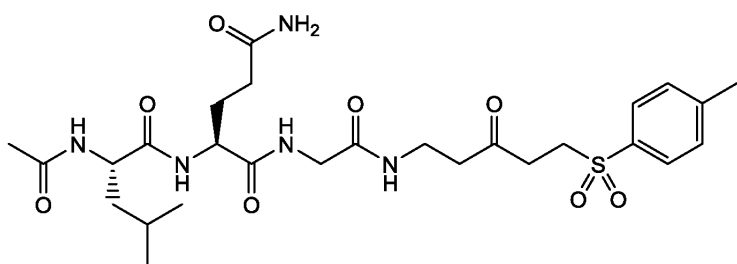
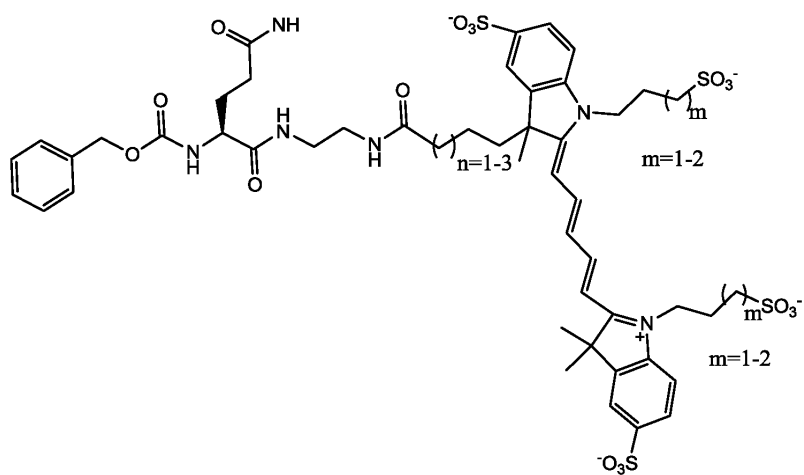
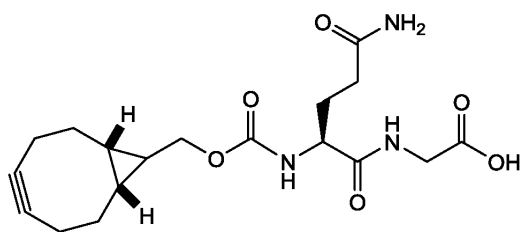
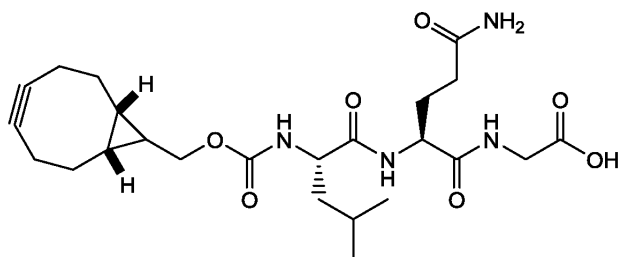


로 이루어진 군으로부터 선택된다.

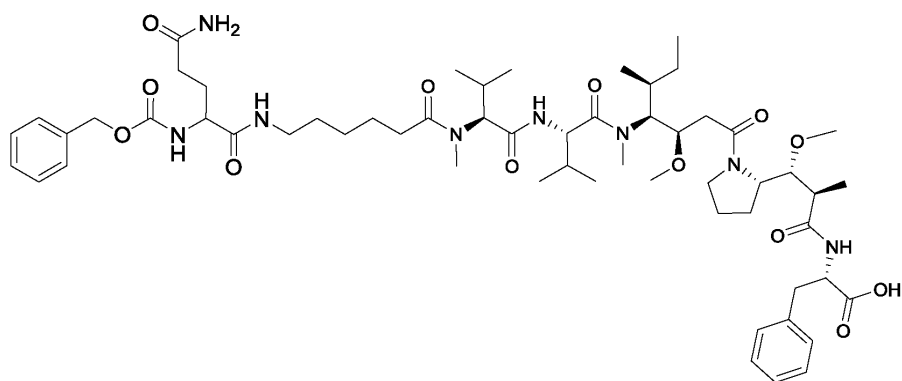
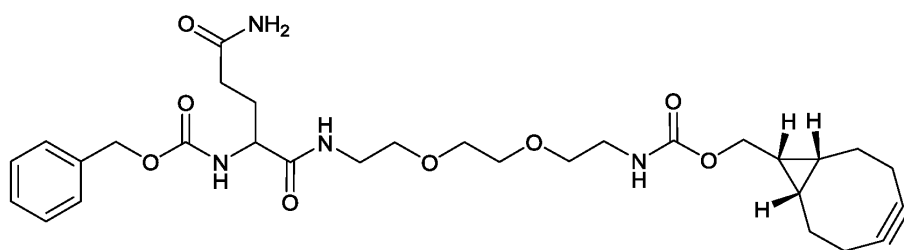
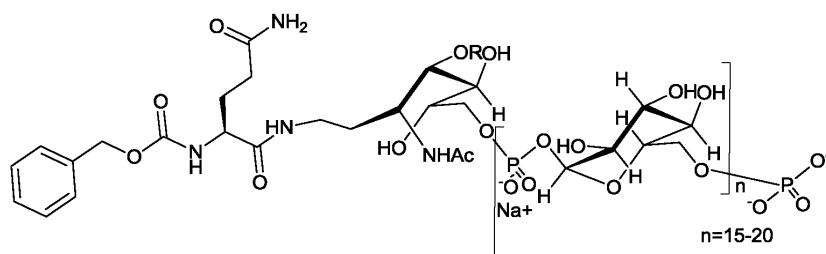
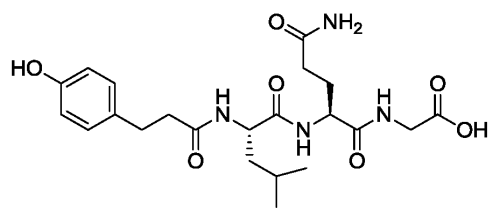
[0047] 일부 실시양태에서, 화합물은



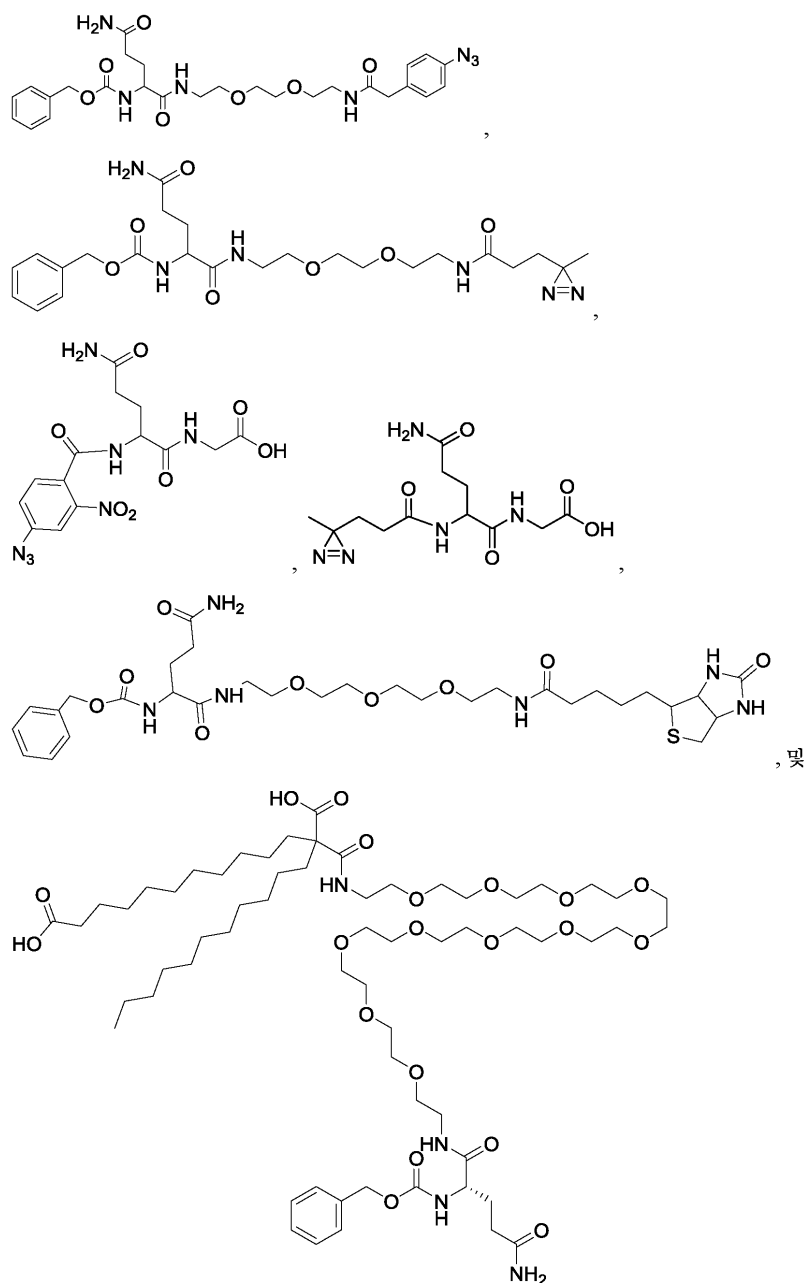
[0048]



[0049]



[0050]



[0051]

[0052] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0053] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 화합물 및 접합체 단백질을 포함하는, 화합물의 접합체가 개시된다. 일부 실시양태에서, 접합체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 실시양태에서, 접합체 단백질은 GBS₈₀이다.

[0054] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 접합체를 포함하는 백신이 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 미생물 트랜스글루타미나제에 의해 촉매화되는 단백질 (CRM197)과 반응하는 단백질 변형 기의 첨가를 도
시하는 합성 반응식이다.

도 2는 본 발명의 화합물을 사용하여 CRM₁₉₇과 MenA 다당류의 접합을 특성화하는 SDS-Page 겔 전기영동이다.

도 3은 본 발명의 화합물을 사용하여 CRM₁₉₇과 GBS80 항원 다당류의 부위 선택적 접합을 특성화하는 SDS-Page 겔 전기영동이며, 여기서 레인(lane) 1은 MW이고, 레인 2는 GBS80-K-N₃이고, 레인 3은 GBS80-K-N₃/PSV 1 mg의 단

백질이고, 레인 4는 GBS80-K-N₃/PSV 1 mg의 단백질이고, 레인 5는 GBS80-K-N₃/PSV 1 mg의 단백질이다.

도 4는 본 발명의 화합물을 사용하여 CRM₁₉₇과 접합된 GBS80 항원 다당류의 생성된 반응을 특성화하는 SDS-Page 겔 전기영동이며, 여기서 레인 1은 MW이고, 레인 2는 GBS80-K-N₃이고, 레인 3은 GBS80-K-N₃/PSII 1 mg의 단백질이고, 레인 4는 GBS80-K-N₃/PSII 1 mg의 단백질이고, 레인 5는 GBS80-K-N₃/PSII 1 mg의 단백질이다.

도 5는 GBS II 다당류 항원에 대하여 Ig 역가(titer)의 측정에 관한 ELISA 면역검정 결과를 나타내며, 여기서 ELISA 항 PSII IgG 및 생존 결과는 1.0 ug 용량의 PS에서이다.

도 6은 GBS V 다당류 항원에 대하여 Ig 역가의 측정에 관한 ELISA 면역검정 결과를 나타내며, 여기서 ELISA 항 PSV IgG 및 생존 결과는 1.0 ug 용량의 PS에서이다.

도 7은 GBS 균주를 사용한 옵소닌식균작용(opsonophagocytosis) 검정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

특히, 특허 공보, 및 기타 문헌에 대한 모든 참조는 법에 의해 허용되는 정도로 본 개시내용에 이들을 포함시키기 위한 것이다.

본 발명은, 통상적인 화학적 방법을 사용하면서, 변형 화합물을 표적 단백질에 변형 화합물과의 반응을 통해 선택적인 방식으로 도입하는 방법을 제공함으로써 상기 언급된 필요를 해결한다. 방법은 일반적으로 도 1에 도시되어 있다. 표적 단백질 (예를 들어 CRM₁₉₇)로부터의 리신 잔기는 화학식 I: R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R²)_z 또는 화학식 II: R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R²)_z의 변형 화합물로부터의 글루타민 잔기 (Gln)와 반응한다. 생성된 생성물은 추가의 화학적 관능화를 할 수 있는 하나 이상의 기를 갖는 단백질이다.

한 측면에서, 단백질을 변형시키는 방법은 (a) 보조 단백질과 변형 화합물 간의 활성화 복합체를 미생물 트랜스글루타미나제의 촉매 작용에 의해 형성시키고; (b) 활성화 복합체로부터의 변형 화합물을 표적 단백질에 옮기고 그로 인해 변형된 단백질을 추출하는 것을 포함한다. 그와 같이, 본원에 사용된 바와 같이 "변형된 단백질"은, 미생물 트랜스글루타미나제를 사용하여 변형 화합물의 첨가에 의해 선택적으로 변형된 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

일부 실시양태에서, 방법은 2개 이상의 리신 잔기를 갖는 표적 단백질과 변형 화합물의 트랜스글루타미나제 촉매화 반응을 포함한다. 변형 화합물은 화학식 I: R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R²)_z 또는 화학식 II: R¹-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R²)_z의 글루타민-함유 단백질이다.

이 방법에서, 활성화 아실 복합체는 변형 화합물 중의 글루타민 잔기를 미생물 트랜스글루타미나제와 반응시켜 변형 화합물을 부착시키도록 함으로써 형성된다. 한 실시양태에서, 변형 화합물을 아실화에 의해 표적 단백질 중의 리신 잔기에 전달된다. 한 실시양태에서, R¹ 및 R²는 목적하는 치환기이고, 여기서 이들 중 적어도 하나는 추가 변형에 적합한 화학적 기를 갖는다. 따라서 방법은 미생물 트랜스글루타미나제 반응을 포함하여 표적 단백질 중의 리신 잔기를 선택적으로 변형시키도록 한다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "amu"는 달톤(Dalton) 단위로도 빈번히 지칭되는 원자 질량 단위의 약자이다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 천연으로 또는 합성으로 생산되는 펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 약 10개 미만의 아미노산 잔기의 폴리펩티드는 통상 "펩티드"로 지칭된다. 용어 "펩티드"는 펩티드 결합에 의해 결합된 2개 이상의 아미노산의 서열을 나타내고자 하는 것이며, 여기서 상기 아미노산은 천연 또는 비천연일 수 있다. 이 용어는, 공유결합성 상호작용, 예를 들어 시스테인 가교 등, 또는 비공유결합성 상호작용에 의해 결합되는 2개 이상의 펩티드로 이루어질 수 있는, 용어 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다.

"단백질"은 1개 이상의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 거대 분자이다. 단백질은 또한 펩티드가 아닌 성분, 예컨대 탄수화물 기를 포함할 수 있다. 탄수화물 및 기타 펩티드가 아닌 치환기는 단백질이 생산되는 세포에 의해 단

백질에 첨가될 수 있으며, 세포의 유형에 따라 달라질 것이다. 단백질은 그의 아미노산 골격 구조의 면에서 본원에 정의되며; 탄수화물 기와 같은 치환기는 일반적으로 구체화되지 않으나, 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다. 비숙주(non-host) DNA 분자에 의해 코딩된 단백질 또는 폴리펩티드는 "이종(heterologous)" 단백질 또는 폴리펩티드이다.

[0065] "단리된 폴리펩티드"는, 세포 성분, 예컨대 탄수화물, 지질, 또는 천연에서 폴리펩티드와 회합된 기타 단백질성 불순물이 본질적으로 없는 폴리펩티드이다. 전형적으로, 단리된 폴리펩티드의 제조는 폴리펩티드를 고도로 정제된 형태, 즉, 약 80% 이상 순수, 약 90% 이상 순수, 약 95% 이상 순수, 95% 초과 순수, 예컨대 96%, 97%, 또는 98% 또는 그 초과 순수, 또는 99% 초과 순수로 함유한다. 특정의 단백질 제제가 단리된 폴리펩티드를 함유함을 나타내는 한 방법은 겔의 쿠마시 브릴런트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 염색 및 단백질 제제의 소듐 도데실 황산염 (SDS)-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의한 단일 밴드의 출현에 의한다. 그러나, 용어 "단리된"은 대안적 물리적 형태, 예컨대 이량체 또는 대안적으로 글리코실화 또는 유도체화된 형태로 동일 폴리펩티드의 존재를 배제하지 않는다.

[0066] 용어 "아미노-말단" 및 "카르복실-말단"은 폴리펩티드 내에 위치를 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 문맥이 허용하는 경우, 이들 용어는 근접성 또는 상대적 위치를 나타내기 위해 폴리펩티드의 특정의 서열 또는 부분을 참조하여 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드 내에 참조 서열에 대해 특정 서열 위치된 카르복실-말단은 참조 서열의 카르복실 말단에 근접하게 위치되지만, 완전한 폴리펩티드의 카르복실 말단에서는 반드시 아니다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같은 "생물상호작용성 작용제"는 생체 조직 또는 세포에 도입되는 경우 생물학적 반응을 야기하는 유기 모이어티 또는 화합물을 지칭한다. 생물상호작용성 작용제의 예는 항원, 독소, 치료용 단백질 등을 포함한다. 생물상호작용성 작용제는 작은 분자 및 거대 분자일 수 있다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같은 "분석용 작용제"는 분석용 작용제가 결합되거나 달리 회합되는 물질을 정성적으로 또는 정량적으로 특성화하기 위한 기기적 방법에 의해 검출될 수 있는 유기 모이어티 또는 화합물을 지칭한다. 이러한 분석용 작용제의 예는 표지, 예를 들어 형광단 또는 방사성 표지(radio label)를 포함한다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "알킬"은 선형 또는 분지형인 C_1 - C_{45} 알킬 기이다. 일부 실시양태에서, 알킬은 C_1 - C_{20} 이다. 일부 실시양태에서, 알킬은 C_1 - C_{12} 이다. 일부 실시양태에서, 알킬은 C_1 - C_6 이다. 알킬이 본원에 논의된 화학식 I 및 II에서의 W와 같은 기로서 정의되는 경우, 기는 알킬렌으로도 공지될 수 있어 1개의 인접한 기로 1회 치환 및 2개의 인접한 기 사이의 2회 치환이 있도록 함을 이해하여야 한다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 반복 $(O-CH_2-CH_2)_n$ 서브유닛 (여기서 n은 반복 에테르 서브유닛의 수를 나타내는 정수임)을 갖는 폴리에테르 화합물을 지칭한다. 폴리에틸렌 글리콜이 본원에 논의된 화학식 I 및 II에서의 W와 같은 기로서 정의되는 경우, 1개의 인접한 기로 1회 치환 (이러한 경우에 말단에 유리 알콜 기가 있을 수 있음) 또는 2개의 인접한 기 사이의 2개의 치환이 있도록 함을 이해하여야 한다.

[0071] 트랜스글루타미나제

[0072] 상기 언급된 바와 같이, 촉매는 변형 화합물을 표적 단백질에 공유적으로 결합시키기 위해 사용되어야 한다. 촉매는 미생물 트랜스글루타미나제 (본원에서 "mTGase"로도 교환가능하게 지칭됨)이어야 한다. 촉매는 미생물 공급원으로부터 단백질-글루타민- γ -글루타미드 트랜스퍼라제로도 공지되어 있고 단백질 또는 단백질 쇠 중 글루타민 (Gln) 잔기의 γ -카르복시아미도 기와 리신 (Lys) 잔기 또는 다양한 알킬아민에서의 ϵ -아미노 기 사이의 아실 전달 반응을 촉매화한다.

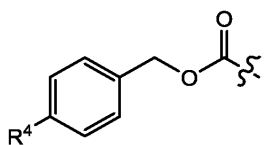
[0073] 본 발명의 방법에서 사용되는 트랜스글루타미나제는 특별한 제한 없이 다양한 미생물 기원으로부터 수득될 수 있다. 유용한 미생물 트랜스글루타미나제의 예는 예컨대 스트렙토마이세스 모바라엔스(*Streptomyces mobaraense*), 스트렙토마이세스 신나모네움(*Streptomyces cinnamoneum*), 및 스트렙토마이세스 그리세오카르네움(*Streptomyces griseocarneum*) (모두 U.S. 5,156,956에 개시되어 있고, 이 특허는 본원에 참조로 포함됨), 및 스트렙토마이세스 라벤둘라에(*Streptomyces lavendulae*) (U.S. 5,252,469에 개시되어 있고, 이 특허는 본원에 참조로 포함됨) 및 스트렙토마이세스 라다카눔(*Streptomyces ladakanum*) (본원에 참조로 포함됨 JP2003199569)으로부터의 트랜스글루타미나제를 포함한다. 구(former) 스트렙토베르티실리움(*Streptoverticillium*) 속의 구성원은 이제 스트렙토마이세스 속에 포함됨을 주목하여야 한다 [Kaempfer, J.Gen. Microbiol., 137, 1831-1892, 1991]. 다른 유용한 미생물 트랜스글루타미나제는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) (U.S.

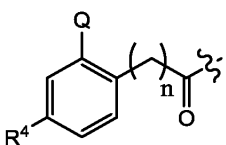
5,731,183에 개시되어 있고, 이 특허는 본원에 참조로 포함됨)로부터 및 다양한 므소마이세테스(*Myxomycetes*)로부터 단리되었다. 유용한 미생물 트랜스글루타미나제의 다른 예는 WO 96/06931 (예를 들어 바실루스 리디쿠스(*Bacillus lydicus*)로부터의 트랜스글루타미나제) 및 WO 96/22366에 개시되어 있고, 이들 둘 다 본원에 참조로 포함된다.

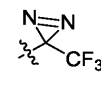
[0074] 변형 화합물

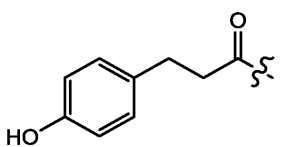
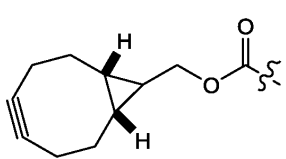
[0075] 개시된 방법에서 사용될 수 있는 변형 화합물은 화학식 I: $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 또는 화학식 II: $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$ 의 글루타민-함유 단백질이고, 상기 식에서 Leu는 존재하거나 부재하는 (즉 x가 각각 1 또는 0인 경우) 아미노산 류신 (예를 들어 L-류신)을 지칭하고; Gln은 아미노산 글루타민 (예를 들어 L-글루타민)을 지칭하고; Gly는 존재하거나 부재하는 (즉 y가 각각 1 또는 0인 경우) 아미노산 잔기 글리신 (예를 들어 L-글리신)을 지칭한다.

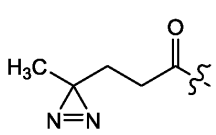
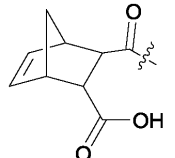
[0076] 일부 실시양태에서, x는 0이다. 일부 실시양태에서, x는 1이다. 일부 실시양태에서, y는 0이다. 일부 실시양태에서 y는 1이다. 일부 실시양태에서, z는 0이다. 일부 실시양태에서, z는 1이다.

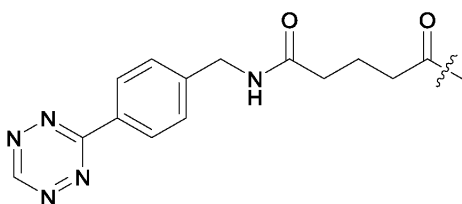
[0077] 일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태

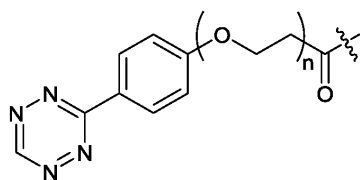
에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태에서, Q는 H이다. 일부 실시양태에서, Q는 $-NO_2$ 이다. 일부 실시양태에서, n은 0이다. 일부 실시양태에서, n은 1이다. 일부 실시양태에서, n은 2이다. 일부 실시양태에서, n은 3이다. 일부 실시양태에서, n은 4이다. 일부 실시양태에서, n은 5이다. 일부 실시양태에서, n은 6이다. 일부 실시양태에서, R^4 는 H이다. 일부 실시양태에서, R^4 는 $-N_3$ 이다. 일부 실시양태에서, R^4 는

이다.

[0078] 일부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이다.

이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일

부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태에서, R^1 은



이다.

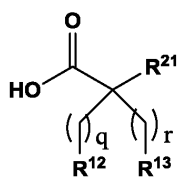
[0079] 일부 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 선형 또는 분지형 알킬이다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0080] 일부 실시양태에서, A는 부재한다. 일부 실시양태에서, A는 -O-이다. 일부 실시양태에서, A는 -NH-이다. 일부 실시양태에서, A는 -S-이다.

[0081] 일부 실시양태에서, B는 부재한다. 일부 실시양태에서, B는 -O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHC(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHC(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C=N(OH)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O₂)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHS(O₂)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O₂)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHS(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-O-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-N(C₁-C₂₀알킬)-이다.

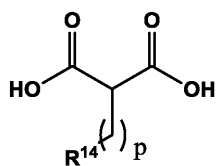
[0082] 일부 실시양태에서, R²는 지방산이다. 일부 실시양태에서, 지방산은 하기 화학식 A1, A2 또는 A3; 또는 그의 아마이드, 에스테르 또는 제약상 허용되는 염일 수 있다:

[0083] <화학식 A1>



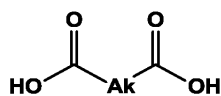
[0084]

[0085] <화학식 A2>



[0086]

[0087] <화학식 A3>



[0088]

[0089] 상기 식에서, R¹¹은 CO₂H 또는 H이고;

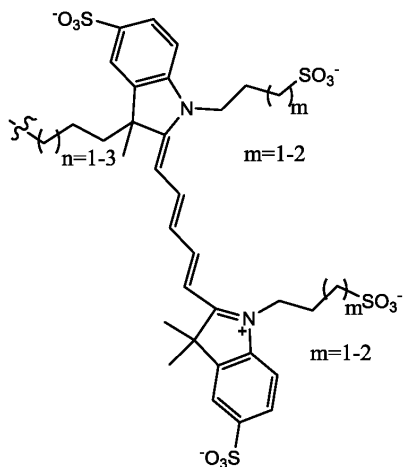
[0090] R¹², R¹³ 및 R¹⁴는 서로 독립적으로 H, OH, CO₂H, -CH=CH₂ 또는 -C≡CH이고;

[0091] Ak는 분지형 C₆-C₃₀알킬렌이고;

[0092] p, q, 및 r은 서로 독립적으로 6 내지 30의 정수이다.

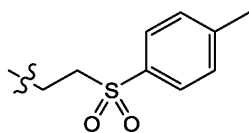
[0093]

일부 실시양태에서, R^2 는 선형 또는 분지형 C_1 - C_3 알킬- N_3 이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 시클로옥티닐이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 헥사판이다. 일부 실시양태에서 헥사판은 화학식

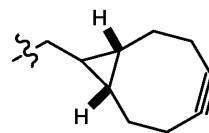


이며, 상기 식에서, n 은 1 내지 3이고 각각의 m 은 1 내지 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이다. 일부 실시양태에서, n 은 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 3이다. 일부 실시양태에서, 하나의 m 은 1이고 다른 하나의 m 은 2이다. 일부 실시양태에서, m 둘 다는 1이다. 일부 실시양태에서, m 둘 다는 2이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 다당류이다. 일부 실시양태에서, R^2 는 $-CH(OCH_3)_2$ 이다. 일부 실시양

태에서, R^2 는

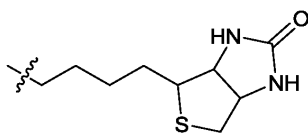


이다. 일부 실시양태에서, R^2 는

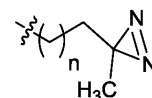


이다. 일부 실시양

태에서, R^2 는

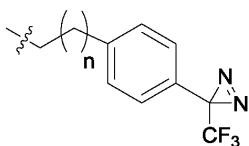


이다. 일부 실시양태에서, R^2 는



이다. 일부 실시양

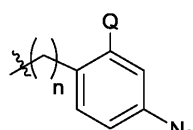
태에서, R^2 는



이다.

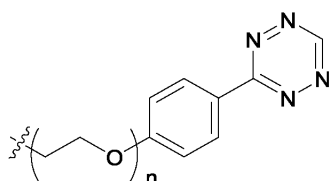
[0094]

일부 실시양태에서, R^2 는 $-NO_2$ 이다. 일부 실시양태에서, n 은 0이다. 일부 실시양태에서, n 은 1 내지 6이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이다. 일부 실시양태에서, n 은 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 3이다. 일부 실시양태에서, n 은 4이다. 일부 실시양태에서, n 은 5이다. 일부 실시양태에서, n 은 6이다.



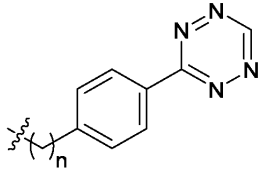
[0095]

일부 실시양태에서, R^2 는 $-CH_2CH_2O-$ 이다. 일부 실시양태에서, n 은 0이다. 일부 실시양태에서, n 은 1 내지 6이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이다. 일부 실시양태에서, n 은 2이다. 일부 실시양태에서, n 은 3이다. 일부 실시양태에서, n 은 4이다. 일부 실시양태에서, n 은 5이다. 일부 실시양태에서, n 은 6이다.



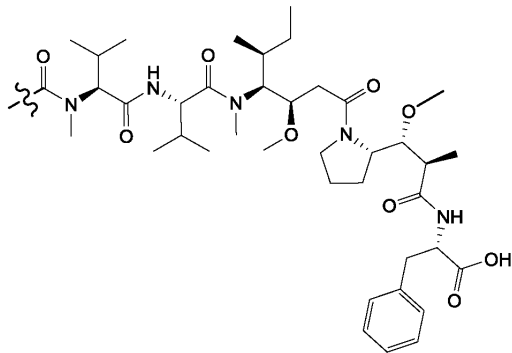
다.

[0096]

일부 실시양태에서, R^2 는 이다. 일부 실시양태에서, n은 0이다. 일부 실시양태에서, n은 1 내지 6이다. 일부 실시양태에서, n은 1이다. 일부 실시양태에서, n은 2이다. 일부 실시양태에서, n은 3이다. 일부 실시양태에서, n은 4이다. 일부 실시양태에서, n은 5이다. 일부 실시양태에서, n은 6이다.

[0097]

일부 실시양태에서, R^2 는 이다. 일부 실시양태에서, R^2 는



이다.

[0098]

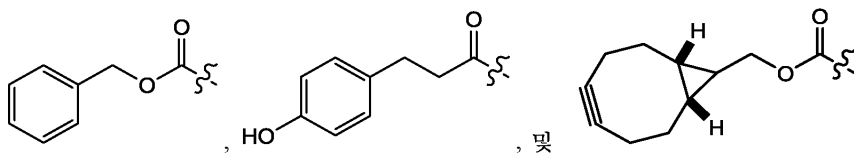
화학식 II의 화합물에서, 이하에 나타낸 R2 기는 이미, 상기 화학식 I 중의 B를 포함하는 일부 실시양태를 포함한다.

[0099]

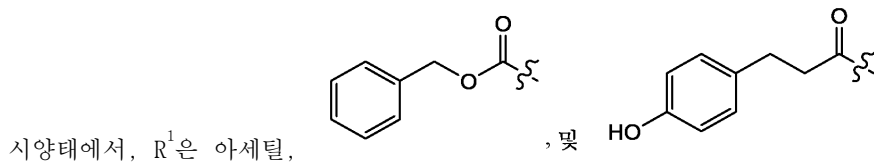
일부 실시양태에서, n은 0이다. 일부 실시양태에서, n은 1이다. 일부 실시양태에서, n은 2이다. 일부 실시양태에서, n은 3이다. 일부 실시양태에서, n은 4이다. 일부 실시양태에서, n은 5이다. 일부 실시양태에서, n은 6이다.

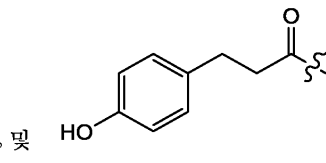
[0100]

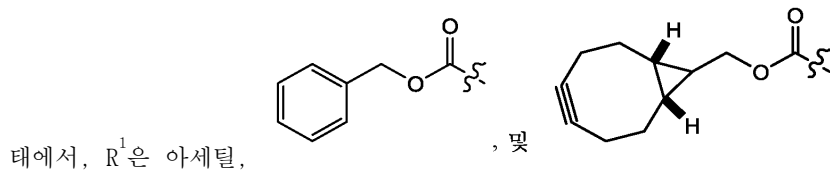
일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸,



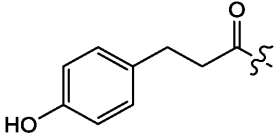
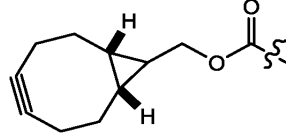
로부터 선택된다. 일부 실

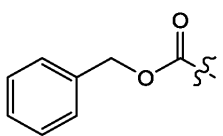
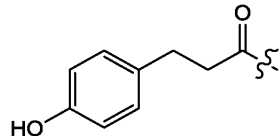
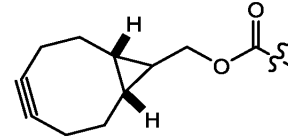


시양태에서, R^1 은 아세틸, 로부터 선택된다. 일부 실시양

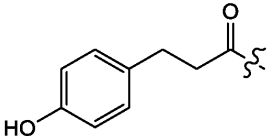
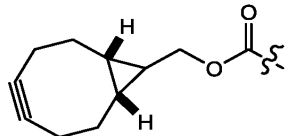


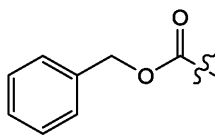
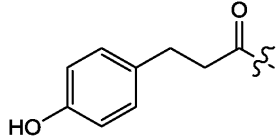
태에서, R^1 은 아세틸, 로부터 선택된다. 일부 실시양태에

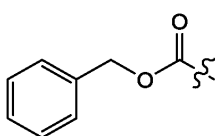
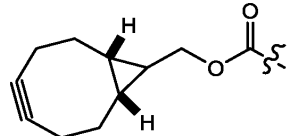
서, R^1 은 아세틸, , 및 로부터 선택된다. 일부 실시양태에

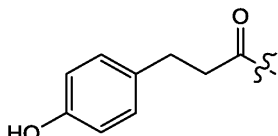
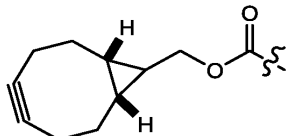
서, R^1 은 , , 및 로부터 선택된다.

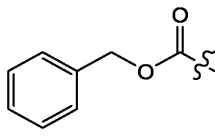
[0101] 일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸 및 로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸 및

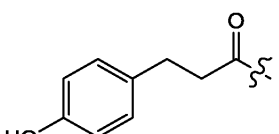
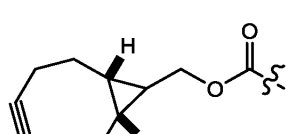
로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸 및 로

부터 선택된다. 일부 실시양태에서, R^1 은  및 로부터 선택된다.

일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸,  및 로부터 선택된다. 일부 실

시양태에서, R^1 은  및 로부터 선택된다.

[0102] 일부 실시양태에서, R^1 은 아세틸이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이다. 일부

실시양태에서, R^1 은 이다. 일부 실시양태에서, R^1 은 이

[0103] 게다가, 다관능성 기 $A-W-B-R^2$ 또는 $NH-W-R^2$ 는 존재하거나 부재할 수 있다 (즉 z 가 각각 1 또는 0인 경우).

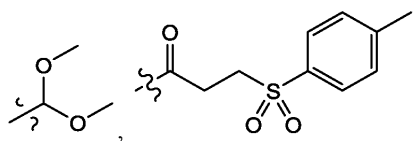
NH-W-R²를 갖는 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 선형 알킬로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 분지형 알킬로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 10,000 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 3,000 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 80 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 2,000 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 시약과 반응할 수 있는 헤테로원자 (예컨대 산소, 질소, 또는 황)로 관능화되어 또 다른 헤테로원자, 탄소, 카르보닐, 술폰, 티오닐 등과 결합을 형성한다.

[0104] A-W-B-R²를 갖는 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 선형 또는 분지형 알킬 또는 약 40 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 선형 알킬로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 C₁-C₆ 분지형 알킬로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 10,000 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 3,000 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 40 내지 약 80 amu의 분자량을 갖는 선형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, W는 약 2,000 내지 약 80,000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된다.

[0105] 일부 실시양태에서, A는 부재한다. 일부 실시양태에서, A는 -O-이다. 일부 실시양태에서, A는 -NH-이다. 일부 실시양태에서, A는 -S-이다.

[0106] 일부 실시양태에서, B는 부재한다. 일부 실시양태에서, B는 -O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHC(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는, -NHC(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C=N(OH)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O₂)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHS(O₂)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O₂)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -NHS(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S(O)NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 -C(O)O-이다. 일부 실시양태에서, B는 -OC(O)-이다. 일부 실시양태에서, B는 -S-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-O-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-NH-이다. 일부 실시양태에서, B는 =NH-N(C₁-C₂₀ 알킬)-이다.

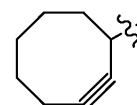
[0107] 일부 실시양태에서, R²는 C₁-C₃ 선형 또는 분지형 알킬-N₃, 시클로옥티닐, 형광단,



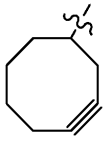
, 및 다당류로부터 선택된다.

[0108] 일부 실시양태에서, R²는 분지형 또는 선형 C₁-C₃ 알킬-N₃이다. 일부 실시양태에서, R²는 분지형 C₃ 알킬-N₃이다. 일부 실시양태에서, R²는 선형 C₁-C₃ 알킬-N₃이다. 일부 실시양태에서, R²는 C₁ 알킬-N₃이다. 일부 실시양태에서, R²는 C₂ 알킬-N₃이다. 일부 실시양태에서, R²는 분지형 C₃ 알킬-N₃이다.

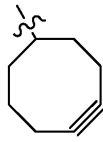
[0109] 일부 실시양태에서, R²는 시클로옥티닐이다. 알킬 관능기에 대한 부착점은 알킨이 후속적으로 반응되거나 관능



화될 수 있는 한 임의의 위치일 수 있다. 예를 들어, R²는 제3 위치, 즉 ; 제4 위치, 즉

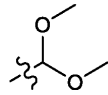


; 또는 제5 위치, 즉

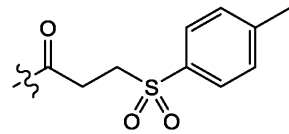


에서 W 또는 B에 연결될 수 있다.

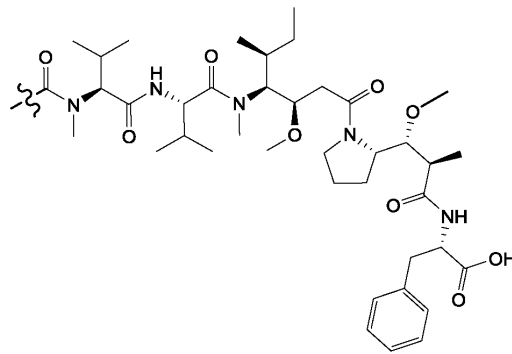
- [0110] 일부 실시양태에서, R^2 는 형광단이다. 적합한 형광단은 빛 여기 직후 빛을 재방출할 수 있는 것들을 포함한다. 전형적으로, 형광단은 방향족 기에 존재하는 바와 같은 수개의 공액 파이-결합(conjugated pi-bond)을 함유한다. 예는 플루오레세인, 로다민, Cy 염료, 예컨대 Cy5 및 Cy7, 알렉사 염료, 예컨대 알렉사 750, 알렉사 647, 및 알렉사 488, 쿠마린 등을 포함한다.



- [0111] 일부 실시양태에서, R^2 는 이다.



- [0112] 일부 실시양태에서, R^2 는 이다.



- [0113] 일부 실시양태에서, R^2 는 이고, 이는 카르보닐을 통해 NH-W- R^2 에서의 W에 연결된 세포독성 MMAF에 상응한다.

- [0114] 다관능성 기 A-W-B- R^2 또는 NH-W- R^2 가 부재하는 경우라면, 인접 아미노산 잔기는 글루타민이트 또는 글리신이든 잔기의 카르복실산 (변형 화합물의 펩티드 골격의 C-말단)으로 종결된다.

- [0115] 다당류

- [0116] 일부 실시양태에서, R^2 는 다당류이다. 다당류는 임의의 항원 다당류, 특히 병원성 미생물로부터의 다당류일 수 있다. 이들 다당류의 접합체는 병원성 미생물에 의해 유발된 감염에 대하여 대상체를 면역화하는데 유용할 수 있다. 예시적 다당류는 이하에 기재된다. 특히, 다당류는 박테리아성 다당류, 예를 들어 박테리아성 캡막 다당류(capsular polysaccharide)일 수 있다. 대표적 박테리아성 다당류를 표 1에 기재하였다.

[0117] [표 1]

다당류	반복 단위
해모필루스 인플루엔자에 (<i>Haemophilus influenzae</i>) 유형 b (PRP)	→3)-β-D-Ribf-(1→1)-D-리비톨-(5→OPO ₃ →
네이세리아 메닝기티데스 (<i>Neisseria meningitidis</i>) 군 A 군 C 군 W135 군 Y	→6)-α-D-ManpNAc(3OAc)-(1→OPO ₃ → →9)-α-D-Neu5Ac(7/8OAc)-(2→ →6)-α-D-Galp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→ →6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→
살모넬라 엔테리카티피 비 (<i>Salmonella enterica Typhi</i> Vi)	→-α-D-GalpNAcA(3OAc)-(1→
스트렙토코쿠스 뉴모니아에 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) 유형 1 유형 2 유형 3 유형 4	→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→ →4-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap- (1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-L-Rhap-(1→ →3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→ →3β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4)-α-

[0118]

[0119] 다당류는 올리고당의 형태로 사용될 수 있다. 이들은 편의상 정제된 다당류의 단편화에 의해 (예를 들어 가수분해에 의해) 형성되며, 대개 이후에 목적하는 크기의 단편이 정제될 것이다.

[0120] 다당류는 천연 공급원으로부터 정제될 수 있다. 정제에 대한 대안으로서, 다당류는 전체 또는 부분 합성에 의해 수득될 수 있다.

[0121] 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*) 협막 다당류

[0122] 다당류는 박테리아성 협막 다당류일 수 있다. 예시적 박테리아성 협막 다당류는 엔. 메닝기티디스로부터의 것들을 포함한다. 유기체의 협막 다당류를 기초로 하여, A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y, 및 Z를 포함한, 엔. 메닝기티디스의 다양한 혈청군(serogroup)이 동정되었다. 다당류는 이들 혈청군 중 어느 한 혈청군으로부터일 수 있다. 전형적으로, 다당류는 하기 수막구균 혈청군: A, C, W135 및 Y 중 하나로부터이다.

[0123] 협막 다당류는 일반적으로 올리고당의 형태로 사용될 것이다. 이들은 편의상 정제된 협막 다당류의 단편화에 의해 (예를 들어 가수분해에 의해)에 의해 형성되며, 대개 이후에 목적하는 크기의 단편이 정제될 것이다. 다당류의 단편화는 전형적으로 수행되어 30 미만의 올리고당에서의 최종 평균 중합도 (DP) (예를 들어, 혈청군 A의 경우 10 내지 20, 예를 들어 약 10; 혈청군 W135 및 Y의 경우 15 내지 25, 예를 들어 15 내지 20; 혈청군 C의 경우 12 내지 22 등)를 제공한다. DP는 편의상 이온 교환 크로마토그래피에 의해 또는 비색 검정에 의해 측정될 수 있다 (Ravenscroft et al. Vaccine 17, 2802-2816 (1999)).

[0124] 가수분해를 수행하는 경우, 가수분해물은 일반적으로 사이징되어 짧은 길이 올리고당을 제거하도록 할 것이다 (Costantino et al. Vaccine 17, 1251-1263 (1999)). 이는 다양한 방법으로, 예컨대 한외여과 후에 이온-교환 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 약 6 이하의 중합도를 갖는 올리고당은 혈청군 A의 경우 제거될 수 있고, 약 4 미만의 것들은 혈청군 W135 및 Y의 경우 제거될 수 있다.

[0125] 당류의 화학적 가수분해는 일반적으로 관련 기술분야에 표준인 조건 하에 산 또는 염기를 이용한 처리를 포함한다. 그의 구성성분 단당류에 대한 협막 다당류의 탈중합에 대한 조건은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 탈중합 방법은 과산화수소의 사용을 포함한다 (본원에 참조로 포함된 W002/058737을 참조).

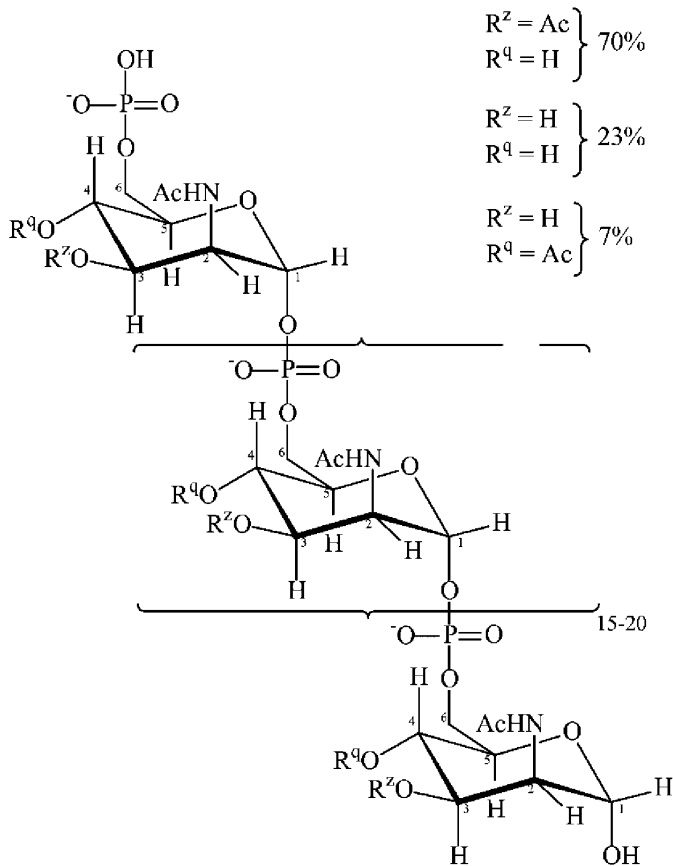
[0126] 과산화수소를 다당류에 첨가하여 (예를 들어 1%의 최종 H₂O₂ 농도를 제공하고), 그 다음에 혼합물을 목적하는 쇠 길이가 감소가 달성될 때까지 인큐베이션 (예를 들어 약 55°C에서)한다. 시간 경과에 따른 감소 후에 혼합물로부터 샘플을 제거한 다음에 샘플 중의 당류의 (평균) 분자 크기를 측정할 수 있다. 그 다음에 탈중합은 일단 목적하는 쇠 길이에 도달되면 급속 냉각에 의해 중단될 수 있다.

[0127] 혈청군 C, W135 및 Y

[0128] 수막구균으로부터의 협막 다당류의 제조 기법은 다년간 공지되어 왔고, 전형적으로 다당류 침전 (예를 들어 양이온성 세정제 사용), 에탄올 분별, 냉 페놀 추출 (단백질을 제거하기 위해) 및 초원심분리 (LPS를 제거하기 위해)의 단계를 포함하는 방법을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Frash, Advances in Biotechnological Processes

13, 123-145 (1990)] (eds. Mizrahi & Van Wezel) 참조).

- [0129] 한 이러한 방법은 다당류 침전 후에 저급 알콜을 사용한 침전된 다당류의 가용화를 포함한다 (본원에 참조로 포함되는 W003/007985 참조).
- [0130] 침전은 양이온성 세정제, 예컨대 테트라부틸암모늄 및 세틸트리메틸암모늄 염 (예를 들어 브로마이드 염), 또는 헥사디메틸린 브로마이드 및 미리스틸트리메틸암모늄 염을 사용하여 달성될 수 있다. 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 ('CTAB')가 특히 바람직하다 (Inzana, Infect. Immun. 55, 1573-1579 (1987)). 침전 물질의 가용화는 저급 알콜, 예컨대 메탄올, 프로판-1-올, 프로판-2-올, 부탄-1-올, 부탄-2-올, 2-메틸-프로판-1-올, 2-메틸-프로판-2-올, 디올 등을 사용하여 달성될 수 있지만, CTAB-다당류 복합체를 가용화하는데 에탄올이 특히 적합하다. 에탄올을 침전 다당류에 첨가하여 (에탄올 및 물의 전체 함량을 기준으로 하여) 50% 내지 95%의 최종 에탄올 농도를 제공할 수 있다.
- [0131] 재가용화후, 다당류를 추가로 처리하여 오염물을 제거할 수 있다. 이는 특히 심지어 사소한 오염도 허용되지 않는 상황에서 중요하다 (예를 들어 인간 백신 제조를 위해). 이는 전형적으로 하나 이상의 단계의 여과, 예를 들어 심층 여과, 활성화된 탄소가 사용될 수 있는 여과, 크기 여과 및/또는 한외여과를 포함할 것이다. 일단 여과되어 오염물을 제거하면, 다당류는 추가 처리 및/또는 가공을 위해 침전될 수 있다. 이는 편의상 양이온을 교환함으로써 (예를 들어 칼슘 또는 나트륨 염의 첨가에 의해) 달성될 수 있다.
- [0132] 정제에 대한 대안으로서, 본 발명의 헵막 다당류는 전체 또는 부분 합성에 의해 수득될 수 있으며, 예를 들어 Hib 합성은 문헌 [Kandil et al. Glvcoconi J 14, 13-17. (1997)]에, 그리고 MenA 합성은 문헌 [Berkin et al. Chemistry 8, 4424-4433 (2002)]에 개시되어 있다.
- [0133] 다당류는 화학적으로 변형될 수 있으며, 즉 이는 0-아세틸화 또는 데-0-아세틸화될 수 있다. 임의의 이러한 데-0-아세틸화 또는 과아세틸화(hyper-acetylation)는 다당류에서 특정의 위치에서 일 수 있다. 예를 들어, 대부분의 혈청군 C 균주는 시알산 잔기의 C-7 및/또는 C-8 위치에서 0-아세틸 기를 가지나, 약 15%의 임상적 단리물은 이들 0-아세틸 기가 결여되어 있다 (문헌 [Glode et al. J Infect Dis 139, 52-56 (1979)]; 또한 W094/05325 및 미국 특허 번호 5,425,946을 참조하며, 이들은 본원에 참조로 포함됨). 아세틸화는 보호적 효능에 영향을 미치는 것으로 보이지 않는다 (예를 들어 멘주게이트(Menjugate)TM 제품과 달리, NeisVac-C(네이스백-씨)TM 제품은 데-0-아세틸화 다당류를 사용하지만, 두 백신 모두 효과적이다). 혈청군 W135 다당류는 시알산-갈락토스 이당류 단위의 중합체이다. 이당류 반복 단위가 갈락토스 대신에 글루코스를 포함하는 것을 제외하고는, 혈청군 Y 다당류는 혈청군 W135 다당류와 유사하다. 혈청군 C 다당류와 같이, MenW135 및 MenY 다당류는 가변 0-아세틸화를 갖지만, 시알산 7 및 9 위치에서이다 (본원에 참조로 포함되는 W02005/033148 참조). 임의의 이러한 화학적 변형은 바람직하게는 접합 전에 일어나지만, 대안으로 또는 추가적으로 접합 동안에 일어날 수 있다.
- [0134] 상이한 혈청군으로부터의 다당류를 개별적으로 정제할 수 있고, 그 다음에 접합 전에 또는 후에 조합할 수 있다.
- [0135] 혈청군 A
- [0136] 다당류는 혈청군 A로부터일 수 있다. 다당류는 혈청군 C, W135 및 Y (상기 참조)의 경우에서와 동일한 방법으로 정제될 수 있지만, 이는 구조상 상이하며, 한편 혈청군 C, W135 및 Y의 캡슐은 시알산 (N-아세틸-뉴라민산, NeuAc) 주변에 기초를 두며, 혈청군 A의 캡슐은 시알산의 천연 전구체인 N-아세틸-만노사민에 기초를 두고 있다. 혈청군 A 다당류는 특히 가수분해되기 쉽고, 수성 매질 중에서의 그의 불안정성은 (a) 혈청군 A에 대하여 액체 백신의 면역원성이 시간 경과에 따라 감소하고, (b) 당류 가수분해 생성물이 백신으로 방출됨으로 인해, 품질 제어가 더욱 곤란함을 의미한다.
- [0137] 천연(native) MenA 헵막 다당류는 (α1→6)-연결된 N-아세틸-D-만노사민-1-포스페이트와, C3 및 C4에서의 부분 0-아세틸화의 동중중합체이다. 주요한 글리코시드 결합은 C1의 헤미아세탈 기 및 D-만노사민의 C6의 알콜 기를 포함하는 1-6 포스포디에스테르 결합이다. 평균 쇄 길이는 93개 단량체이다. 이는 하기 화학식을 갖는다:



[0138]

[0139] 천연 혈청군 A 다당류의 면역원성 활성을 보유하나 물에서 훨씬 더 안정성인 변형 다당류가 제조되었다. 단당류 단위의 탄소 3 및 4에 부착된 히드록실 기는 차단 기(blocking group)에 의해 대체된다 (W003/080678 및 W02008/084411 참조).

[0140] 히드록실 대신에 차단 기를 갖는 단당류 단위의 수는 달라질 수 있다. 예를 들어, 모든 또는 거의 모든 단당류 단위는 차단 기를 가질 수 있다. 대안으로, 단당류 단위의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상은 차단 기를 가질 수 있다. 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, 27, 28, 29, 또는 30개 이상의 단당류 단위는 차단 기를 가질 수 있다.

[0141] 마찬가지로, 단당류 단위 상의 차단 기의 수는 달라질 수 있다. 예를 들어, 임의의 특정 단당류 단위 상의 차단 기의 수는 1 또는 2일 수 있다.

[0142] 말단 단당류 단위는 그의 천연 히드록실 대신에 차단 기를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 단당류 단위 상에 유리 아노머 히드록실 기를 보유하여 추가 반응 (예를 들어 접합)을 처리하도록 하는 것이 바람직하다. 아노머 히드록실 기는 (예를 들어, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 사용하여) 환원적 아미노화에 의해 아미노 기 ($-\text{NH}_2$ 또는 $-\text{NH}-\text{E}$, 여기서 E는 질소 보호기임)로 전환될 수 있고, 그 다음에 다른 히드록실 기가 차단 기로 전환된 후에 재생될 수 있다.

[0143] 히드록실 기를 대체하는 차단 기는 히드록실 기의 유도체화 반응을 통해, 즉 히드록실 기의 수소 원자를 또 다른 기로 대체함으로써 직접 이용가능(accessible)할 수 있다. 차단 기로서 작용하는 히드록실 기의 적합한 유도체는, 예를 들어, 카르바메이트, 술포네이트, 카르보네이트, 에스테르, 에테르 (예를 들어 실릴 에테르 또는 알킬 에테르) 및 아세탈이다. 이러한 차단 기의 일부 구체적 예는 알릴, 알로에(Aloe), 벤질, BOM, t-부틸, 트리틸, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM, THP 등이다. 직접 이용가능하지 않고 히드록실 기를 완전히 대체하는 다른 차단 기는 C_{1-12} 알킬, C_{3-12} 알킬, C_{5-12} 아릴, C_{5-12} 아릴- C_{1-6} 알킬, $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ (R^{21} 및 R^{22} 는 하기 단락에서 정의됨), H, F, Cl, Br, CO_2H , $\text{CO}_2(\text{C}_{1-6}$ 알킬), CN, CF_3 , CCl_3 등을 포함한다.

[0144] 전형적 차단 기는 화학식 $-\text{O}-\text{X}'-\text{Y}'$ 및 $-\text{OR}^{23}$ 이고, 상기 식에서 X' 는 $\text{C}(\text{O})$, $\text{S}(\text{O})$ 또는 SO_2 이고; Y' 는 C_{1-12} 알킬, C_{1-12} 알콕시, C_{3-12} 시클로알킬, C_{5-12} 아릴 또는 C_{5-12} 아릴- C_{1-6} 알킬이고, 그 각각은 F, Cl, Br, CO_2H , $\text{CO}_2(\text{C}_{1-6}$ 알

킬), CN, CF₃ 또는 CCl₃로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 임의로 치환될 수 있거나; Y'는 NR²¹R²²이고; R²¹ 및 R²²는 독립적으로 H, C₁₋₁₂ 알킬, C₃₋₁₂ 시클로알킬, C₅₋₁₂ 아릴, C₅₋₁₂ 아릴-C₁₋₆ 알킬로부터 선택되거나; R²¹ 및 R²²는 결합하여 C₃₋₁₂ 포화 헤테로시클릭 기를 형성할 수 있고; R²³은 C₁₋₁₂ 알킬 또는 C₃₋₁₂ 시클로알킬이고, 그 각각은 F, Cl, Br, CO₂(C₁₋₆ 알킬), CN, CF₃ 또는 CCl₃로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 임의로 치환될 수 있거나; R²³은 C₅₋₁₂ 아릴 또는 C₅₋₁₂ 아릴-C₁₋₆ 알킬이고, 그 각각은 F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(C₁₋₆ 알킬), CN, CF₃ 또는 CCl₃로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 기로 임의로 치환될 수 있다. R²³이 C₁₋₁₂ 알킬 또는 C₃₋₁₂ 시클로알킬인 경우, 이는 전형적으로 상기 정의된 바와 같이 1, 2, 또는 3개의 기로 치환된다. R²¹ 및 R²²가 결합하여 C₃₋₁₂ 포화 헤테로시클릭 기를 형성하는 경우, 이는 R²¹ 및 R²²가 질소 원자와 함께 3 내지 12의 임의의 수의 탄소 원자 (예를 들어 C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂)를 함유하는 포화 헤테로시클릭 기를 형성함을 의미한다. 헤테로시클릭 기는 질소 원자 이외에 1 또는 2개의 헤테로원자 (예컨대 N, O, 또는 S)를 함유할 수 있다. C₃₋₁₂ 포화 헤테로시클릭 기의 예는 피롤리딘, 피페리딘, 모르폴린, 피페라지딘, 이미다졸리딘, 아제티딘 및 아지리딘이다.

[0145] 차단 기 -O-X-Y 및 -OR²³은 표준 유도체화 절차, 예컨대 아실 할라이드, 알킬 할라이드, 술폰 할라이드 등과의 히드록실 기의 반응에 의해 -OH 기로부터 제조될 수 있다. 따라서, -O-X'-Y' 중 산소 원자는 대개 히드록실 기의 산소 원자이며, 한편 -O-X'-Y' 중 -X'-Y' 기는 대개 히드록실 기의 수소 원자를 대체한다.

[0146] 대안으로, 차단 기는 치환 반응, 예컨대 미츠노부(Mitsunobu)-유형 치환을 통해 이용가능할 수 있다. 히드록실 기로부터 차단 기를 제조하는 이들 및 다른 방법은 주지되어 있다.

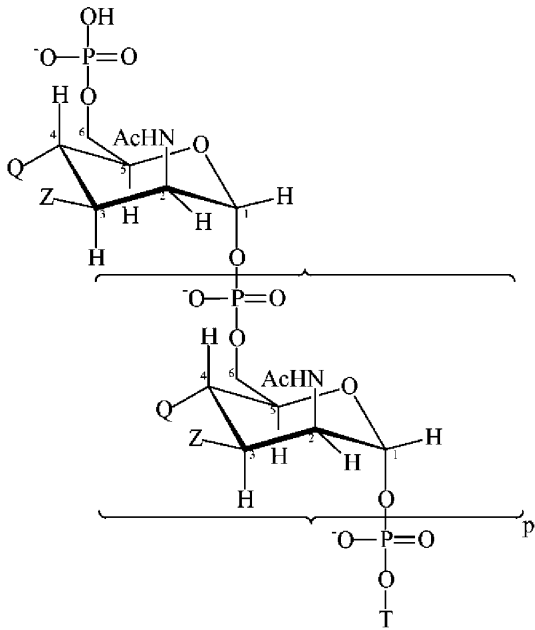
[0147] 본 발명에서 사용하기 위한 구체적 차단 기는 -OC(O)CF₃ (Nilsson & Svensson Carbohydrate Research 69, 292-296 (1979)) 및 카르바메이트 기 OC(O)NR²¹R²²이고, 여기서 R²¹ 및 R²²는 독립적으로 C₁₋₆ 알킬로부터 선택된다. 전형적으로, R²¹ 및 R²²는 둘 다 메틸이고, 즉 차단 기는 -OC(O)NMe₂이다. 카르바메이트 차단 기는 글리코시드 결합에 안정화 영향을 미치고 온화한 조건 하에 제조될 수 있다.

[0148] 특히 바람직한 차단 기는 -OC(O)CH₃ (WO2008/084411 참조)이다. 이 차단 기를 갖는 변형 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 혈청군 A 다당류에서의 4- 및/또는 3-위치의 비율은 달라질 수 있다. 예를 들어, 차단 기를 갖는 4-위치의 비율은 약 0%, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 약 100%일 수 있고, 적어도 80% 및 약 100%가 바람직하다. 유사하게, 차단 기를 갖는 3-위치의 비율은 약 0%, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 약 100%일 수 있고, 적어도 80% 및 약 100%가 바람직하다. 전형적으로, 차단 기를 갖는 4- 및 3-위치의 비율은 각각의 위치에서 대략 동일하다. 환언하면, 차단 기를 갖는 3-위치에 대한 차단 기를 갖는 4-위치의 비는 약 1:1이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 차단 기를 갖는 4-위치의 비율은 차단 기를 갖는 3-위치의 비율에 대해서 달라질 수 있다. 예를 들어, 차단 기를 갖는 3-위치에 대한 차단 기를 갖는 4-위치의 비는 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 또는 1:2일 수 있다. 유사하게, 차단 기를 갖는 4-위치에 대한 차단 기를 갖는 3-위치의 비는 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 또는 1:2일 수 있다.

[0149] 전형적인 변형 MenA 다당류는 n개의 단당류 단위를 함유하며, 여기서 단당류 단위의 적어도 h는 3 및 4 위치 둘 다에서 -OH 기를 갖지 않는다. h의 값은 24 이상 (예를 들어 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 또는 100)이고 대개 50 이상이다. 부재하는 -OH 기는 상기 정의된 바와 같은 차단 기이다.

[0150] 다른 전형적인 변형 MenA 다당류는 단당류 단위를 포함하며, 여기서 단당류 단위의 적어도 s는 3 위치에서 -OH를 갖지 않고 4 위치에서 -OH를 갖지 않는다. s의 값은 1 이상 (예를 들어 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, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90)이다. 부재하는 -OH 기는 상기 정의된 바와 같은 차단 기이다.

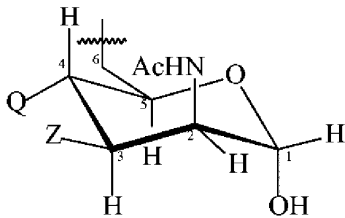
[0151] 적합한 변형 MenA 다당류는 하기 화학식을 갖는다:



[0152]

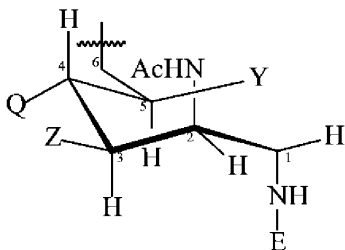
[0153] 상기 식에서, p는 1 내지 100의 정수 (특히 5 내지 25, 대개 15 내지 25의 정수)이고; T는 화학식 A 또는 B이고:

[0154] <화학식 A>



[0155]

[0156] <화학식 B>



[0157]

[0158] 각각의 Z 기는 독립적으로 OH 또는 상기 정의된 바와 같은 차단 기로부터 선택되고;

[0159] 각각의 Q 기는 독립적으로 OH 또는 상기 정의된 바와 같은 차단 기로부터 선택되고;

[0160] Y는 OH 또는 상기 정의된 바와 같은 차단 기로부터 선택되고;

[0161] E는 H 또는 질소 보호기이고; 여기서 Q 기의 약 7% 초과 (예를 들어 8%, 9%, 10% 또는 그 초과)는 차단 기이다. 일부 실시양태에서, 화학식 A에서의 탄소 1에서 부착된 히드록실 기는 상기 정의된 바와 같은 차단 기로 대체된다. 일부 실시양태에서, 화학식 B에서의 E는 이하에 논의된 바와 같은 링커 또는 담체 분자이다. E가 링커인 경우, 링커는 담체 분자에 공유 결합된다.

[0162] p+2 Z 기 각각은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 마찬가지로, n+2 Q 기 각각은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 모든 Z 기는 OH일 수 있다. 대안으로, Z 기의 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60% 이상은 OAc일 수 있

다. 전형적으로, Z 기의 약 70%는 OAc이고, Z 기의 나머지는 OH 또는 상기 정의된 바와 같은 차단 기이다. Q 기의 약 7% 이상은 차단 기이다. 전형적으로, Q 기의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 심지어 100%는 차단 기이다.

[0163] 글루칸

[0164] 다당류는 글루칸일 수 있다. 글루칸은 특히 진균성 세포 벽에서 발견되는 글루코스-함유 다당류이다. 글루칸은 글루코스 서브유닛 사이의 하나 이상의 α -결합을 포함하며, 한편 β -글루칸은 글루코스 서브유닛 사이의 하나 이상의 β -결합을 포함한다. 본 발명에 따라서 사용된 글루칸은 β 결합을 포함하고, 단지 β 결합 (즉 α 결합 없음)을 함유할 수 있다.

[0165] 글루칸은 하나 이상의 β -1,3-결합 및/또는 하나 이상의 β -1,6-결합을 포함할 수 있다. 이는 또한 하나 이상의 β -1,2-결합 및/또는 β -1,4-결합을 포함할 수 있으나, 통상적으로 그의 유일한 β 결합은 β -1,3-결합 및/또는 β -1,6-결합일 것이다. 글루칸은 분지형 또는 선형일 수 있다. 전장(full-length) 천연 β -글루칸을 불용성이고 메가달톤 범위의 중량 평균 분자량을 갖는다. 따라서, 접합체에서 가용성 글루칸을 사용하는 것이 더 양호하다. 가용화는 긴 불용성 글루칸을 단편화함으로써 달성될 수 있다. 이는 가수분해에 의해 또는, 더욱 편의상, 글루카나제를 이용한 (예를 들어 β -1,3-글루카나제 또는 β -1,6-글루카나제를 이용한) 분해(digestion)에 의해 달성될 수 있다. 대안으로서, 짧은 글루칸은 단당류 빌딩 블록을 결합함으로써 합성적으로 제조될 수 있다.

[0166] 저분자량 글루칸, 특히 100 kDa 미만 (예를 들어 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 또는 15 kDa 미만)의 중량 평균 분자량을 갖는 글루칸이 바람직하다. 또한, 예를 들어 60개 이하 (예를 들어 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4)의 글루코스 단당류 단위를 함유하는 올리고당을 사용하는 것이 바람직하다. 이 범위 내에서, 올리고당은 10 내지 50개 또는 20 내지 40개의 단당류 단위를 갖는다. 글루칸은 진균성 글루칸일 수 있다. 진균성 글루칸은 일반적으로 진균으로부터 수득될 수 있으나, 특정의 글루칸 구조가 진균 및 비-진균 (예를 들어 박테리아, 하등 식물 또는 조류(algae)에서) 둘 다에서 발견되는 경우라면, 비-진균성 유기체가 대안적 공급원으로서 사용될 수 있다. 따라서 글루칸은 칸디다(*Candida*), 예컨대 *씨. 알비칸스(C. albicans)*로부터, 또는 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 트리코피톤 베루코숨(*Trichophyton verrucosum*), 블라스토마이세스 데르마티디스(*Blastomyces dermatidis*), 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 파라콕시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 또는 피티움 인시디오숨(*Pythium insidiosum*)으로부터의 세포 벽으로부터 유래될 수 있다.

[0167] 진균성 β -글루칸의 다양한 공급원이 있다. 예를 들어, 순수한 β -글루칸은 시판되고 있으며 예를 들어 푸스톨란 (칼리오켄(Calbiochem))은 움빌리카리아 파풀로사(*Umbilicaria papulosa*)로부터 정제된 β -1,6-글루칸이다. β -글루칸은 다양한 방법으로 진균성 세포 벽으로부터 정제될 수 있다. 문헌 [Tokunaka et al. Carbohydrate Research 316, 161-172. (1999)]은, 예를 들어, NaClO 산화 및 DMSO 추출을 포함한, 세포 벽 만난이 없는 칸디다로부터 수용성 β -글루칸 추출물을 제조하는 두-단계 절차를 개시한다. 생성된 생성물 ('칸디다 가용성 β -D-글루칸' 또는 'CSBG')은 주로 선형 β -1,3-글루칸과 선형 β -1,6-글루칸 모이어티로 이루어진다. 유사하게, W003/097091은 *씨. 알비칸스*로부터의 GG-zym의 생산을 개시한다. *씨. 알비칸스*로부터의 이러한 글루칸은, (a) β -1,6-글루칸과 β -1,3-글루칸 측쇄 및 약 30의 평균 중합도, 및 (b) β -1,3-글루칸과 β -1,6-글루칸 측쇄 및 약 4의 평균 중합도를 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 글루칸은 예를 들어 라미나린(laminarin)에서 보여지는 바와 같은 일부 β -1,6 분지(branching)를 갖는 β -1,3 글루칸이다. 라미나린은 갈조류 및 해초에서 발견된다. 라미나린의 β (1-3): β (1-6) 비는 상이한 공급원에서 달라지는데, 예를 들어 에이센니아 비시클리스 라미나린(*Eisenia bicyclis laminarin*)에서는 3:2 만큼 낮지만, 라미나리아 디지털리타 라미나린(*Laminaria digitata laminarin*)에서는 7:1 만큼 높다 (Pang et al. Biosci Biotechnol Biochem 69, 553-8 (2005)). 따라서 글루칸은 1.5:1 내지 7.5:1, 예를 들어 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 또는 7:1의 β (1-3): β (1-6) 비를 가질 수 있다. 임의로, 글루칸은 말단 만니톨 서브유닛, 예를 들어 1,1-O-연결된 만니톨 잔기를 가질 수 있다 (Read et al. Carbohydr Res. 281, 187-201 (1996)). 글루칸은 또한 만노스 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0169] 다른 실시양태에서, 글루칸은 커드란(curdian)에서 보여지는 바와 같이, 오로지 또는 주로 β -1,3 결합을 갖는

다. 이들 글루칸은 다른 결합을 포함하는 글루칸, 특히 β -1,3 결합 및 보다 큰 비율의 β -1,6 결합을 포함하는 글루칸보다 양호한 보호를 도출할 수 있다. 따라서 글루칸은 단지 β -1,3-연결된 글루코스 잔기 (예를 들어 오로지 1,3 결합을 갖는 선형 β -D-글루코피라노스)로 이루어질 수 있다. 임의로, 비록 글루칸이 β -1,3-연결된 글루코스 잔기가 아닌 단당류 잔기를 포함할 수 있지만, 예를 들어 이는 β -1,6-연결된 글루코스 잔기를 포함할 수 있다. 이들 다른 잔기에 대한 β -1,3-연결된 글루코스 잔기의 비는 적어도 8:1 (예를 들어 >9:1, >10:1, >11:1, >12:1, >13:1, >14:1, >15:1, >16:1, >17:1, >18:1, >19:1, >20:1, >25:1, >30:1, >35:1, >40:1, >45:1, >50:1, >75:1, >100:1 등)이어야 하고/거나 단지 β -1,3 결합에 의해 다른 잔기에 연결된 5개 이상의 (예를 들어 >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12, >13, >14, >15, >16, >17, >18, >19, >20, >30, >40, >50, >60 등) 인접 비-말단 잔기의 하나 이상의 (예를 들어 >1, >2, >3, >4, >5, >6, >7, >8, >9, >10, >11, >12 등) 서열이 있다. "비-말단"이란 잔기가 글루칸의 유리 말단(free end)에 존재하지 않음을 의미한다. 일부 실시양태에서, 인접하는 비-말단 잔기는 담체 분자 또는 링커에 커플링된 어떤 잔기도 포함하지 않을 수 있다. 단지 β -1,3 결합에 의해 다른 잔기에 연결된 5개의 인접 비-말단 잔기의 존재는, 예를 들어 씨. 알비칸즈에 대하여 보호적 항체 반응을 제공할 수 있다.

[0170] 추가 실시양태에서, 접합체는 2개의 상이한 글루칸, 예를 들어 1.5:1 내지 7.5:1의 β (1-3): β (1-6)의 비를 갖는 제1 글루칸, 및 오로지 또는 주로 β -1,3 결합을 갖는 제2 글루칸을 포함할 수 있다. 예를 들어 접합체는 라미나린 글루칸 및 커드란 글루칸 둘 다를 포함할 수 있다. β -글루칸이 β -1,3 및 β -1,6 결합 둘 다를 목적하는 비 및/또는 서열로 포함하는 경우라면 이 글루칸은 천연에서 발견될 수 있거나 (예를 들어 라미나린), 인공적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 이는 화학적 합성에 의해, 전부 또는 부분적으로 제조될 수 있다.

[0171] β -1,3/ β -1,6 글루칸의 화학적 합성을 위한 방법은 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Takeo and Tei Carbohydr Res. 145, 293-306 (1986)], [Tanaka et al. Tetrahedron Letters 44, 3053-3057 (2003)], [Ning et al. Tetrahedron Letters 43, 5545-5549 (2002)], [Geurtsen et al. Journal of Organic Chemistry 64 (21):7828-7835 (1999)], [Wu et al. Carbohydr Res. 338, 2203-12 (2003)], [Nicolaou et al. J. Am. Chem. Soc. 119, 449-450 (1997)], [Yamada et al. Tetrahedron Letters 40, 4581-4584 (1999)], [Yamago et al. Org. Lett. 24, 3867-3870 (2001)], [Yuguo et al. Tetrahedron 60, 6345-6351 (2004)], [Amaya et al. Tetrahedron Letters 42:9191-9194 (2001)], [Mei et al. Carbohydr Res. 340, 2345-2351 (2005)]으로부터 공지되어 있다.

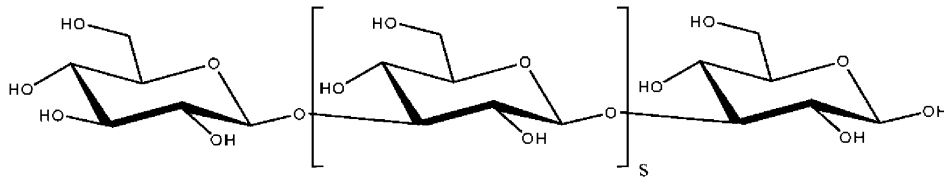
[0172] β -1,3 및 β -1,6 결합 둘 다를 목적하는 비로 포함하는 β -글루칸은 또한 이용가능한 글루칸으로부터 출발하고 이를 β -1,6-글루카나제 (글루칸 엔도-1,6- β -글루코시다제, 1,6- β -D-글루칸 글루카노히드롤라제 등; EC 3.2.1.75로도 공지됨) 또는 β -1,3-글루카나제 (예컨대 엑소-1,3-글루카나제 (EC 3.2.1.58) 또는 엔도-1,3-글루카나제 (EC 3.2.1.39)로 목적하는 비 및/또는 서열에 이를 때까지 처리함으로써 제조할 수 있다.

[0173] 단지 β -1,3-연결 글루코스를 함유하는 글루칸을 목적으로 하는 경우라면, β -1,6-글루카나제가 결국 순수한 β -1,3 글루칸을 산출할 것이므로, β -1,6-글루카나제 처리가 완료할 때까지 추구될 것이다. 그러나, 더욱 편의상, 순수한 β -1,3-글루칸을 사용할 수 있다. 이들을 예를 들어 (1 \rightarrow 3)- β -D-글루칸 신타제를 사용하여 화학적 및/또는 효소적 합성에 의해 합성적으로 제조할 수 있고, 그 몇몇은 많은 유기체 (박테리아, 효모, 식물 및 진균)로부터 공지되어 있다. β -1,3 글루칸의 화학적 합성 방법은 예를 들어 문헌 [Takeo et al. Carbohydr Res. 245, 81-96 (1993)], [Jamois et al. Glycobiology 15(4), 393-407 (2005)], [Lefebvre et al. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. II 332, 101-104 (2001)] 및 [Huang et al. Carbohydr Res. 340, 603-608 (2005)]으로부터 공지되어 있다. 합성에 대한 유용한 대안으로서, 천연 β -1,3-글루칸, 예컨대 커드란 (알칼리게네스 파에칼리스 변종 미코게네스(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*)로서 이전에 공지된 아그로박테리움(*Agrobacterium*)으로부터의 선형 β -1,3-글루칸; 예를 들어 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) 카탈로그 C7821로부터 시판됨) 또는 파라밀론(*Euglena*)로부터의 β -1,3-글루칸)이 사용될 수 있다. β -1,3-글루칸의 높은 수준을 생산하는 유기체는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 5508191 또는 문헌 [MiKyoung et al. Biochemical Engineering Journal. 16, 163-8 (2003)]의 아그로박테리움, 또는 문헌 [Barsanti et al. J. Appl. Phycology, 13, 59-65 (2001)]의 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*)이다.

[0174] 라미나린 및 커드란은 전형적으로, 예를 들어 100 kDa 이상의 중량 평균 분자량을 갖는 고분자량 중합체로서 천연에서 발견된다. 이들은 종종 수성 매질에서 불용성이다. 따라서, 그의 천연 형태에서, 이들은 면역화에 그다지 적합하지 않다. 따라서, 일부 실시양태에서, 더 짧은 글루칸은 예를 들어 60개 이하의 글루코스 단당류 단위 (예를 들어 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4)를 함유하는 것이다. 2 내지 60개의 범위로 글루코스 잔기, 예를 들어 약 10

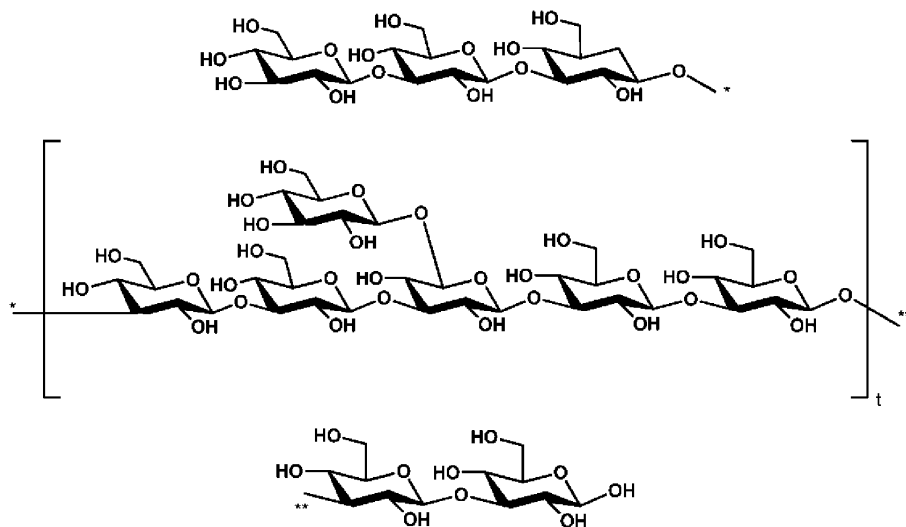
내지 50개 또는 약 20 내지 40개의 글루코스 단위를 갖는 글루칸을 사용할 수 있다. 25-30개의 글루코스 잔기를 갖는 글루칸이 특히 유용하다. 적합한 글루칸은 예를 들어 천연 글루칸의 산 가수분해에 의해, 또는 예를 들어 글루카나제, 예컨대 β -1,3-글루카나제를 이용한 효소적 분해에 의해 형성될 수 있다. 11-19개, 예를 들어 13-19개 및 특히 15 또는 17개의 글루코스 단당류 단위를 갖는 글루칸이 또한 유용하다. 특히, 하기 구조식 A 또는 B를 갖는 글루칸이 사용을 위해 구체적으로 예상된다:

[0175] <구조식 A>



[0176] 상기 식에서, s+2는 2-60, 예를 들어 10-50 또는 2-40의 범위이다.

[0177] 일부 실시양태에서, s+2는 25-30 또는 11-19, 예를 들어 13-17의 범위이다. 특히, s+2 = 15가 적합하다. 게다가, s+2 = 6이 적합하다.



[0179] 상기 식에서, t는 0-9, 예를 들어 1-7 또는 2-6의 범위이다. 바람직하게는, t는 3-4 또는 1-3의 범위이다. 특히, t = 2가 적합하다. * 및 **는 다당류 단위의 각각의 부착점을 나타낸다.

[0181] 일부 실시양태에서, 글루칸은 5 내지 7개의 글루코스 단당류 단위 (즉 5, 6 또는 7)를 함유한다. 특히, 6개의 글루코스 단당류 단위를 갖는 글루칸이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 글루칸은 6개의 글루코스 단당류 단위를 갖는 커드란일 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 글루칸은 단일 분자 종이다. 이들 실시양태에서, 글루칸 분자의 모두가 서열 면에서 동일하다.

[0183] 따라서, 글루칸 분자의 모두는 분자량 등을 포함한, 그의 구조적 특성 면에서 동일하다. 전형적으로, 이러한 형태의 글루칸은, 예를 들어 상기 기재된 방법을 사용하여 화학적 합성에 의해 수득된다. 대안으로, 다른 실시양태에서, 글루칸은 천연 글루칸, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 엘. 디지타타(*L. digitata*), 아그로박테리움 또는 유글레나로부터의 글루칸으로부터 수득될 수 있고, 여기서 글루칸은 요구되는 단일 분자량 종이 수득될 때까지 정제된다. 이러한 방법으로 정제된 천연 글루칸은 시판되고 있다. 단일 분자 종인 글루칸은 글루칸 샘플의 다분산도 (M_w/M_n)를 측정함으로써 동정될 수 있다. 이 파라미터는 편의상, 예를 들어 문헌 [Bardotti et al. Vaccine 26, 2284-96 (2008)]에 기재된 바와 같이 SEC-MALLS에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서 사용하기에 적합한 글루칸은 약 1, 예를 들어 1.01 이하의 다분산도를 갖는다.

[0184] 천연 글루칸, 예컨대 커드란의 용해도는, 이온성 기를 (예를 들어 술페이트화에 의해, 특히 커드란 중 0-6개에서) 도입함으로써 증가될 수 있다. 이러한 변형은 본 발명으로 사용될 수 있지만, 이들이 글루칸의 항원성을

변경시킬 수 있기 때문에, 이상적으로는 회피된다.

[0185] 다당류가 글루칸인 경우, 이는 전형적으로 라미나린이다.

[0186] 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) 협막 다당류

[0187] 상기에서 논의된 바와 같이, 다당류는 또한 박테리아성 협막 다당류일 수 있다. 추가로 예시적 박테리아성 협막 다당류는 에스. 뉴모니아에로부터의 것들을 포함한다. 다당류가 에스. 뉴모니아에로부터의 협막 다당류인 경우, 이는 전형적으로 하기 폐렴구균 혈청형: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 및 33F 중 하나로부터이다. 일부 실시양태에서, 이는 1, 5, 6B, 14, 19F, 및 23F로부터이다. 에스. 뉴모니아에로부터의 협막 다당류는 8개 이하의 당 잔기를 함유할 수 있는 반복 올리고당 단위를 포함한다. 주된 에스. 뉴모니아에 혈청형에 대한 올리고당 단위는 상기 표, 문헌 [Jones An. Acad. Bras. Cienc, 77(2), 293-324 (2005)] 및 [Jones, J Pharm Biomed Anal 38, 840-850 (2005)]에 기재되어 있다.

[0188] 에스.아갈락티아에(*S. agalactiae*) 협막 다당류

[0189] 추가의 예시적 박테리아성 협막 다당류는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) ("GBS")로부터의 것들을 포함한다. 협막 다당류는 GBS의 펩티도글리칸 골격에 공유적으로 결합되어 있고, 군 B 항원과 구별되며, 이는 펩티도글리칸 골격에 부착되는 또 다른 다당류이다.

[0190] GBS 협막 다당류는 화학적으로 관련되지만, 항원적으로 매우 상이하다. 모든 GBS 협막 다당류는 하기 삼당류 코어를 공유한다: β -D-GlcpNAc(1→3) β -D-Galp(1→4) β -D-Glcp

[0191] 다양한 GBS 혈청형은 이 코어가 변형되는 방법에 의해 차이가 난다. 혈청형 Ia와 III의 차이는, 예를 들어, 연속 삼당류 코어를 연결하기 위한 이 코어에서 GlcNAc (Ia) 또는 Gal (III)의 사용으로부터 발생된다.

[0192] 혈청형 Ia 및 Ib 둘 다 이 코어에서 GlcNAc에 연결된 [a-D-NeupNAc(2→3) β -D-Galp-(1→)] 이당류를 갖지만, 결합은 1→4 (Ia) 또는 1→3 (Ib)이다.

[0193] GBS-관련 질환은 주로 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, 및 VIII로부터 발생하고, 여기서 85% 초과는 5개 혈청형: Ia, Ib, III 및 V에 의해 유발된다. 이들 4개 혈청형 중 하나로부터의 다당류를 사용할 수 있다. 이들 4개 혈청형 각각의 협막 다당류는 (a) 모든 경우에 글루코스 잔기에 대해 2→3으로 연결된, 말단 N-아세틸-뉴라민산 (NeuNAc) 잔기 (시알산으로 통상 지칭됨); 및 (b) 삼당류 코어 내에 N-아세틸-글루코사민 잔기 (GlcNAc)를 포함한다.

[0194] 모든 4개의 다당류는 삼당류 코어 내에 갈락토스 잔기를 포함하지만, 혈청형 Ia, Ib, II 및 III은 또한 각각의 반복 단위에서 추가적 갈락토스 잔기를 함유한다.

[0195] 사용된 다당류는 그의 천연 형태일 수 있거나, 변형되었을 수 있다. 예를 들어, 다당류는 천연 협막 다당류보다 짧거나, 화학적으로 변형될 수 있다. 특히, 본 발명에서 사용된 혈청형 V 협막 다당류는 W02006/050341 및 문헌 [Guttormsen et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(15), 5903-8 (2008) Epub 2008 Mar 31]에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 예를 들어, 혈청형 V 협막 다당류는 실질적으로 탈시알화된다. 탈시알화 GBS 혈청형 V 협막 다당류는 정제된 GBS 혈청형 V 협막 다당류를 온화한 산성 조건 (예를 들어 60분 동안 80℃에서 0.1 M 황산) 하에 처리하거나 뉴라미니다제로 처리함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 따라 사용된 다당류는 천연에서 발견되는 바와 같은, 실질적으로 전장 협막 다당류일 수 있거나, 천연 길이보다 더 짧을 수 있다. 전장 다당류를, 예를 들어 약산 중에서의 가수분해에 의해, 가열함으로써, 사이징 크로마토그래피 등에 의해 탈중합시켜 본 발명으로 사용하기 위한 더 짧은 단편을 제공할 수 있다. 특히, 본원에서 사용된 혈청형 II 및/또는 III 협막 다당류는 W096/40795 및 문헌 [Michon et al. Clin Vaccine Immunol. (2006) 13(8), 936-43]에 기재된 바와 같이 탈중합될 수 있다.

[0196] 다당류는 천연에서 발견되는 바와 같은 협막 다당류에 비해 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 다당류는 데-O-아세틸화 (부분 또는 전부), 데-N-아세틸화 (부분 또는 전부), N-프로피온화 (부분 또는 전부) 등이 될 수 있다. 탈아세틸화는 접합 전에, 동안에 또는 후에 일어날 수 있지만, 바람직하게는 접합 전에 일어난다. 특정의 다당류에 따라, 탈아세틸화는 면역원성에 영향을 미치거나 미치지 않을 수 있다. 다양한 혈청형에서 GBS 다당류에 대한 O-아세틸화의 관련성은 문헌 [Lewis et al. PNAS USA 101, 11123-8 (2004)]에서 논의되어 있고, 일부 실시양태에서 7, 8 및/또는 9 위치에서 시알산 잔기의 O-아세틸화는 접합 전에, 동안에 및 후에 예를 들어 보호/탈보호에 의해, 제-아세틸화 등에 의해 보유된다. 그러나, 전형적으로 본 발명에서 사용된 GBS 다당류는

7, 8 및/또는 9 위치에서 시알산 잔기의 어떤 O-아세틸화도 실질적으로 없다. 특히, GBS 다당류가 이하에 기재된 바와 같은 염기 추출에 의해 정제된 경우, O-아세틸화는 전형적으로 상실된다. 탈아세틸화 등의 효과는 통상적인 검정에 의해 평가될 수 있다.

- [0197] 협막 다당류는 문헌 [Wessels et al. Infect Immun 57, 1089-94 (1989)]에 기재된 바와 같이, 공지된 기법에 의해 정제될 수 있다. 전형적 방법은 염기 추출, 원심분리, 여과, RNase/DNase 처리, 프로테아제 처리, 농도, 크기 배제 크로마토그래피, 한외여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 및 추가의 한외여과를 포함한다. 박테리아성 세포 벽을 분해하여 세포 벽 성분을 없애는, 효소 뮤타노리신을 이용한 GBS 세포의 처리가 또한 유용하다.
- [0198] 대안으로서, W02006/082527에 기재된 정제 방법을 사용할 수 있다. 이는 염기 추출, 에탄올/CaCl₂ 처리, CTAB 침전, 및 재-가용화를 포함한다. 추가의 대안적 방법은 W02009/081276에 기재되어 있다.
- [0199] 에스. 아우레우스(S. aureus) 협막 다당류
- [0200] 추가의 예시적 박테리아성 협막 다당류는 에스. 아우레우스로부터의 것들, 특히 에스. 아우레우스 유형 5 및 유형 8의 협막 다당류를 포함한다. 유형 5 및 유형 8 협막 다당류의 구조는 문헌 [Moreau et al. Carbohydrate Res. 339(5), 285-91 (1990)] 및 [Fournier et al. Infect. Immun. 45(1), 87-93 (1984)]에 하기로서 기재되었다:
- [0201] 유형 5
- [0202] → 4)-β-D-ManNAcA(30Ac)-(1→ 4)-α-L-FucNAc(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1
- [0203] 유형 8
- [0204] → 3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→ 3)-α-L-FucNAc(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1
- [0205] 최근 NMR 분광법 데이터 (문헌 [Jones Carbohydrate Res. 340(6), 1097-106 (2005)])는 이들 구조를 다음과 같이 수정(revision)하였다:
- [0206] 유형 5
- [0207] → 4)-β-D-ManNAcA-(1→ 4)-α-L-FucNAc(30Ac)-(1→ 3)-β-D-FucNAc-(1
- [0208] 유형 8
- [0209] → 3)-β-D-ManNAcA(40Ac)-(1→ 3)-α-L-FucNAc(1→ 3)-α-D-FucNAc(1→
- [0210] 다당류는 천연에서 발견되는 바와 같은 협막 다당류에 비해 화학적으로 변형될 수 있다.
- [0211] 예를 들어, 다당류는 데-O-아세틸화 (부분 또는 전부), 데-N-아세틸화 (부분 또는 전부), N-프로피온화 (부분 또는 전부) 등이 될 수 있다. 탈아세틸화는 접합 전에, 동안에 또는 후에 일어날 수 있지만, 전형적으로 접합 전에 일어난다. 탈아세틸화 등의 효과는 통상적인 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 에스. 아우레우스 유형 5 또는 유형 8 협막 다당류에 대한 O-아세틸화의 관련성은 문헌 [Fattom et al. Infect Immun. 66(10):4588-92 (1998)]에 논의되어 있다. 천연 다당류는 이 문서에서 75% O-아세틸화를 갖는 것으로 언급되어 있다. 이들 다당류는 다당류 골격 및 O-아세틸 기 둘 다에 대해 항체를 유도시켰다. 0% O-아세틸화를 갖는 다당류는 여전히 다당류 골격에 항체를 도출시켰다. 두 유형의 항체 모두 그의 O-아세틸 함량에서 변하는 에스. 아우레우스 균주에 대하여 옉소닌성(opsonic)이었다. 따라서, 본 발명에서 사용된 유형 5 또는 유형 8 협막 다당류는 0 내지 100% O-아세틸화를 가질 수 있다.
- [0212] 다당류의 O-아세틸화 정도는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 양성자 NMR (예를 들어 문헌 [Lemercinier and Jones Carbohydrate Res. 296, 83-96 (1996)], [Jones and Lemercinier, J Pharm BiomedAnal. 30(4), 1233-47 (2002)], W005/033148 또는 W0 00/56357에 기재된 바와 같음)에 의해 측정될 수 있다. 추가 방법은 문헌 [Hestrin J. Biol. Chem. 180, 249-261 (1949)]에 기재되어 있다. 유사한 방법을 사용하여 다당류의 N-아세틸화의 정도를 측정할 수 있다. O-아세틸 기는 가수분해에 의해, 예를 들어 염기, 예컨대 무수 히드라진 (문헌 [Konadu et al. Infect. Immun. 62, 5048-5054 (1994)]) 또는 NaOH (문헌 [Fattom et al. Infect Immun. 66(10):4588-92 (1998)])을 이용한 처리에 의해 제거될 수 있다. 유사한 방법을 사용하여 N-아세틸 기를 제거할 수 있다. 유형 5 및/또는 8 협막 다당류에 대해 높은 수준의 O-아세틸화를 유지하기 위해, O-아세틸 기의 가수분해를 야기하는 처리, 예를 들어 pH의 극치(extreme)에서의 처리가 최소화된다.
- [0213] 협막 다당류는 본원에서의 참고문헌에 기재된 바와 같이, 공지된 기법에 의해 정제될 수 있다. 전형적 방법은

에스. 아우레우스 세포의 페놀-에탄올 불활성화, 원심분리, 리소스타핀 처리, RNase/DNase 처리, 원심분리, 투석, 프로테아제 처리, 추가의 투석, 여과, 에탄올/CaCl₂을 이용한 침전, 투석, 동결-건조, 음이온 교환 크로마토그래피, 투석, 및 동결-건조, 크기 배제 크로마토그래피, 투석 및 동결-건조를 포함한다 (Fattom et al. Infect Immun. 58(7), 2367-74 (1990)). 대안적 방법은 에스. 아우레우스 세포의 오토클레이빙(autoclaving), 다당류-함유 상청액의 한외여과, 농축, 동결건조, 소듐 메타페리오테이트로 처리하여 테이코산 제거, 추가의 한외여과, 투석여과, 고성능 크기 배제 액체 크로마토그래피, 투석 및 동결-건조를 포함한다 (Gilbert et al. J. Microb. Meth. 20, 39-46 (1994)). 그러나, 본 발명은 천연 공급원으로부터 정제된 다당류에 제한되지는 않고, 다당류는 다른 방법, 예컨대 전체 또는 부분 합성에 의해 획득될 수 있다.

[0214] 기타 박테리아성 협막 다당류

[0215] 추가의 예시적 박테리아성 협막 다당류는 헤모필루스 인플루엔자에 유형 b(*Haemophilus influenzae* Type b), 살모넬라 엔테리카 티피 비(*Salmonella enterica Typhi* Vi) 및 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*)로부터의 것들을 포함한다.

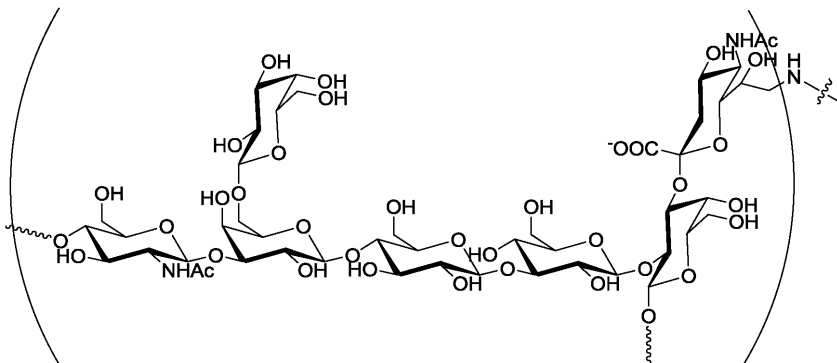
[0216] 에스.아갈락티아에 탄수화물: 비-협막 박테리아성 다당류를 또한 사용할 수 있다. 예시적 비-협막 박테리아성 다당류는 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) GAS 탄수화물 (GAS 세포 벽 다당류, 또는 GASP로도 공지됨)이다. 이러한 다당류는 교호 알파-(1→2) 및 알파-(1→3) 링크 및 교호 람노스 고리에 연결된 D-N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 잔기 베타-(1→3)-로 이루어진 L-람노피라노스 (Rhap) 골격을 갖는 분지형 구조를 특징으로 한다 (Kreis et al. Int J Biol Macromol. 17(3-4), 117-30 (1995)).

[0217] GAS 탄수화물은 일반적으로 그의 천연 형태일 것이지만, 이는 변형되었을 수도 있다. 예를 들어, 다당류는 천연 GAS 탄수화물보다 짧을 수 있거나, 화학적으로 변형될 수 있다.

[0218] 따라서 본 발명에 따라 사용되는 다당류는 천연에서 발견되는 바와 같은, 실질적으로 전장 GAS 탄수화물일 수 있거나, 천연 길이보다 더 짧을 수 있다. 전장 다당류를, 예를 들어 약산 중에서의 가수분해에 의해, 가열함으로써, 사이징 크로마토그래피 등에 의해 탈중합시켜 본 발명으로 사용하기 위한 더 짧은 단편을 제공할 수 있다. GAS 탄수화물 상의 말단 단위에 상응하는 것으로 생각되는 짧은 단편이 백신에서 사용하기 위한 것으로 제안되었다 (Hoog et al., Carbohydr Res. 337(21-23), 2023-36 (2002)). 따라서, 짧은 단편이 본 발명에서 예상된다. 그러나, 실질적으로 전장의 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. GAS 탄수화물은 전형적으로 약 10 kDa, 특히 약 7.5-8.5 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는다. 분자 질량은 폴루란 표준, 예컨대 폴리머 스탠다드 서비스(Polymer Standard Service) (www.Polymer.de)로부터 입수가 가능한 것들에 대해 TSK 겔(Gel) G3000SW 칼럼 (시그마(Sigma))을 사용하는 HPLC, 예를 들어 SEC-HPLC에 의해 측정될 수 있다.

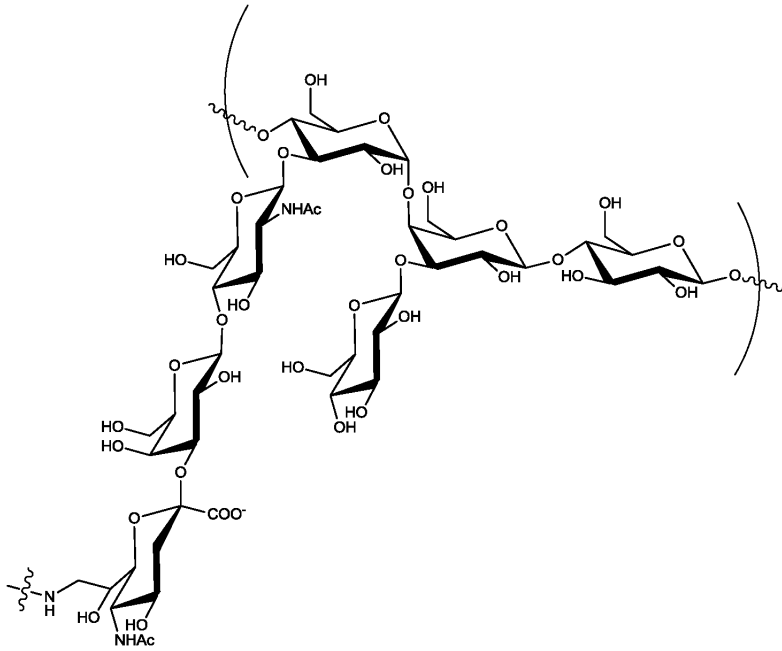
[0219] 다당류는 천연에서 발견되는 바와 같은 GAS 탄수화물에 비해 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 다당류는 데-N-아세틸화 (부분 또는 전부), N-프로피온화 (부분 또는 전부) 등이 될 수 있다. 예를 들어 면역원성에 대한 탈아세틸화 등의 효과는 통상적인 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 다당류는 이하에 나타낸 구조를 갖는 GBSII 항원 다당류이다:

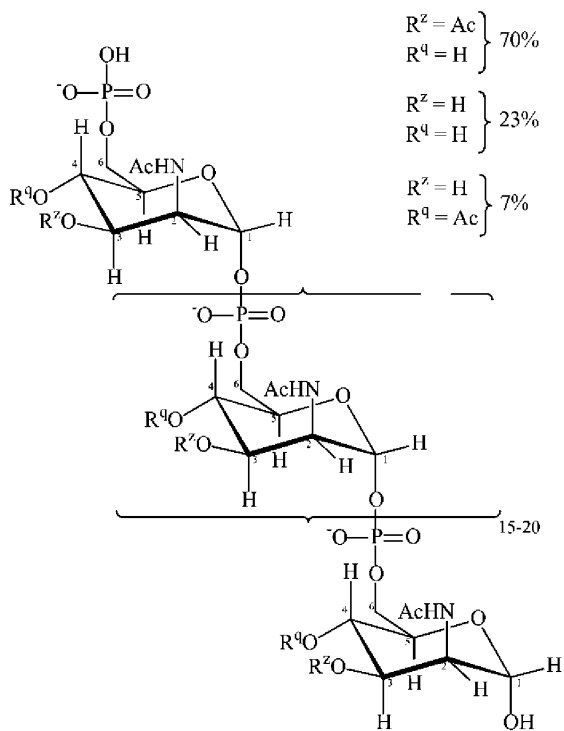


[0221]

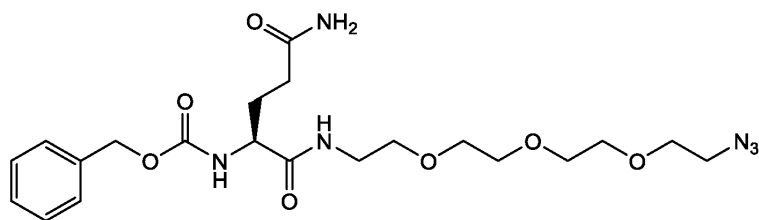
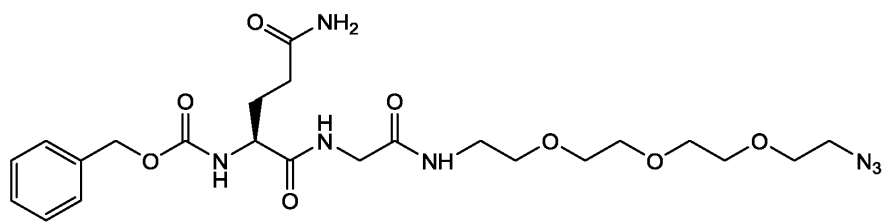
[0222] 일부 실시양태에서, 다당류는 이하에 나타낸 구조를 갖는 GBSV 항원 다당류이다:



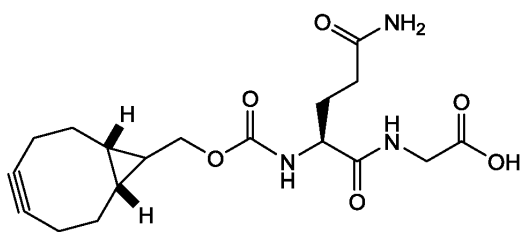
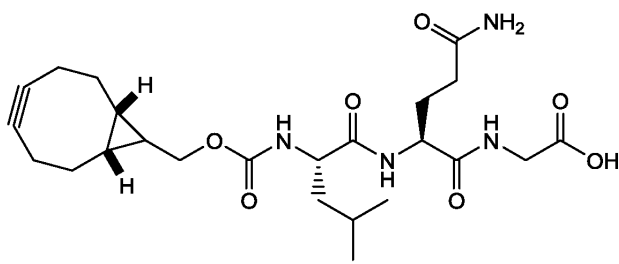
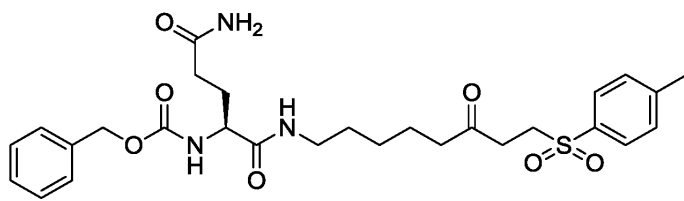
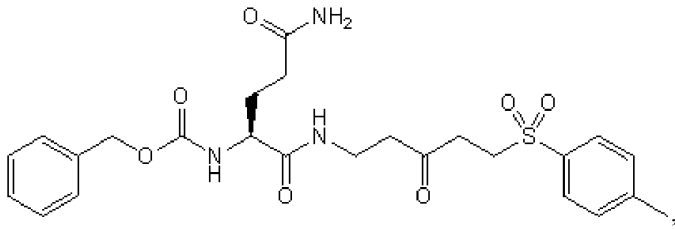
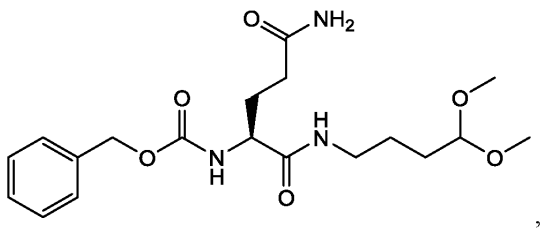
- [0223]
- [0224] 일부 실시양태에서, 다당류는 이하에 나타낸 구조를 갖는 MenA 항원 다당류이다:



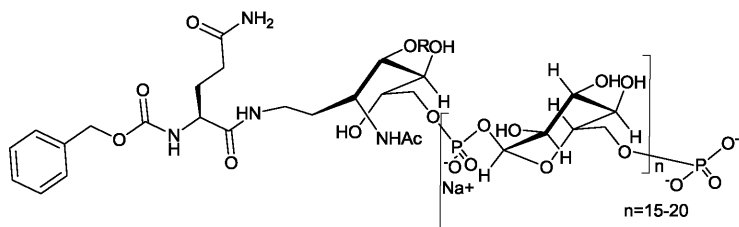
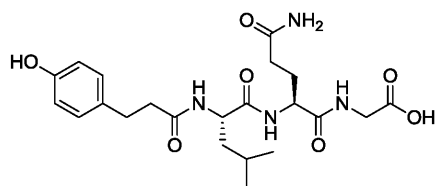
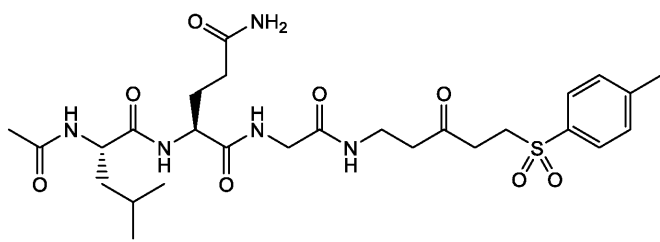
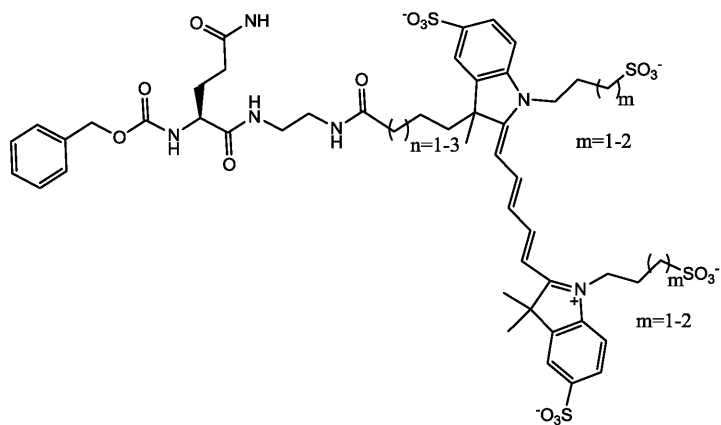
- [0225]
- [0226] 또 다른 측면에서, 화학식 I $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 또는 화학식 II $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$ 의 화합물이 개시되며, 상기 식에서 x , y , z , R^1 , R^2 , A, B, 및 W는 상기에 정의되어 있다. 일부 실시양태에서, 화합물은 하기 중 어느 하나이다:



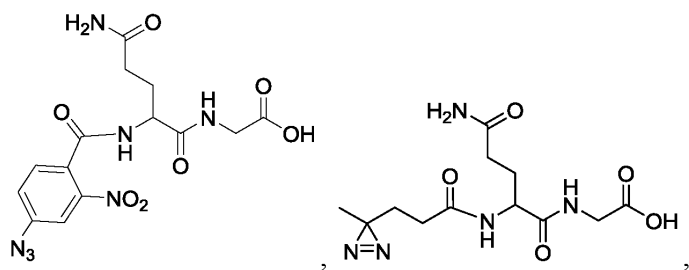
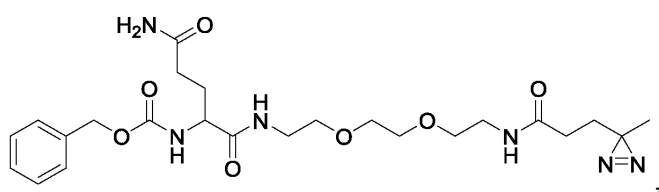
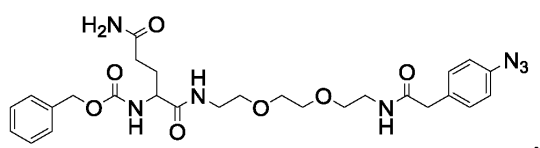
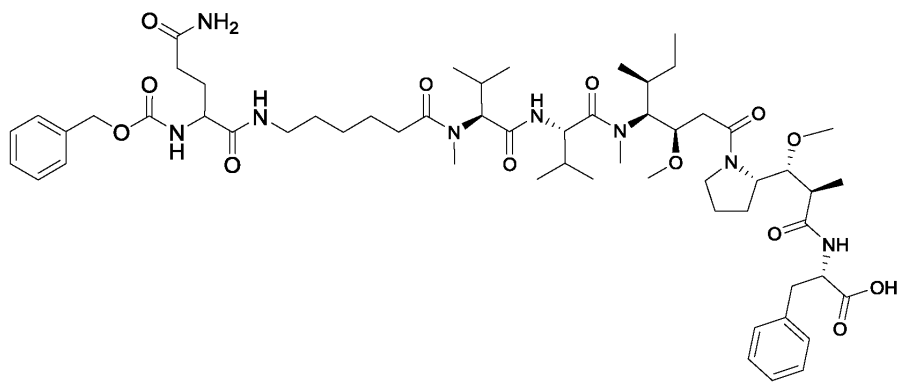
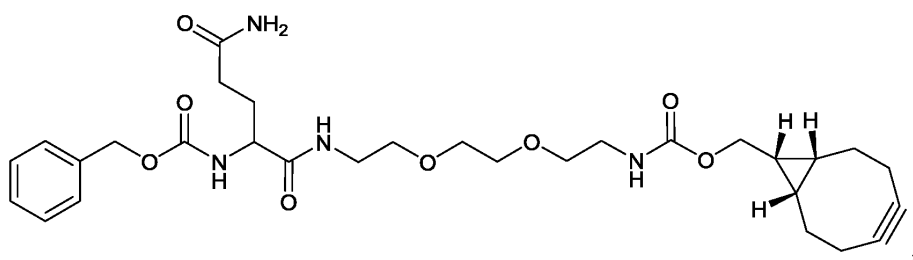
[0227]



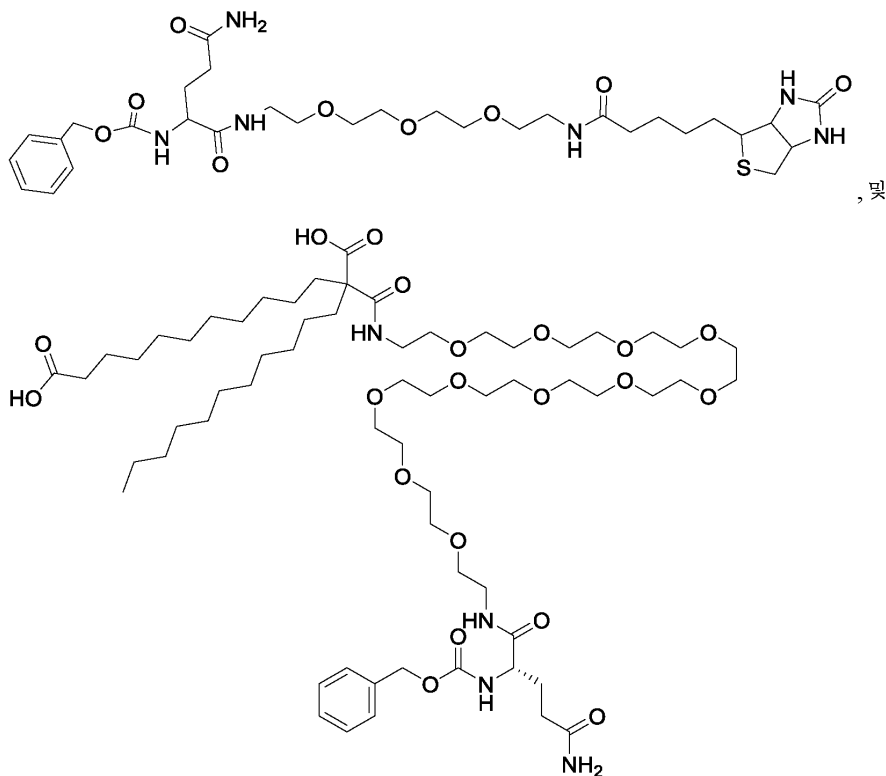
[0228]



[0229]



[0230]



[0231]

[0232]

8-원 시클로알킨 기를 갖는 실시양태에서, 그 기는 공유 연결에 의해 변형 기에 부착될 수 있다. 전형적으로, 8-원 시클로알킨 기는 스페이서를 통해 및 스페이서의 말단에서 부착된다. 스페이서의 다른 말단은 펩티드의 아미노산 또는 카르복실산 말단을 통해 변형 기에 부착을 위한 관능 기를 갖지만, 글루탐인의 ϵ -아미노 기에서는 아니다. 예를 들어, 변형 기의 아민 부분에서 부착될 것이라면, 스페이서는 아민 (예를 들어 숙신이미딜 에스테르)에 부착되게 하는 임의의 관능기를 포함할 수 있다. 유사하게, 변형 기의 카르복실산 부분에서 부착될 것이라면, 스페이서는 카르복실산 (예를 들어 아민)에 부착되게 하는 임의의 관능기를 포함할 수 있다.

[0233]

일부 실시양태에서, 8-원 시클로알킨 기는 1개 이상의 질소 원자, 예컨대 1, 2 또는 3개의 질소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 8-원 시클로알킨 기는 1개 이상의 다른 고리계, 예컨대 시클로프로판 또는 벤젠에 융합된다. 한 바람직한 실시양태에서, 8-원 시클로알킨 기는 시클로프로판 기에 융합된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 8-원 시클로알킨 기는 2개의 벤젠 기에 융합된다. 가장 바람직한 실시양태에서, 8-원 시클로알킨 기는 시클로옥텐 기이다.

[0234]

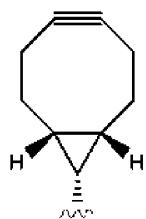
한 실시양태에서, 부착은 화학식 X^1-L-X^2 를 갖는 화합물을 사용하여 수행되며, 여기서 X^1 은 8-원 시클로알킨 기이고 X^2-L 은 스페이서이다. 이들 실시양태에서, X^2 는 펩티드 상에 아민 기에 대한 관능기와 반응할 수 있는 임의의 기일 수 있고, L은 스페이서에서의 연결 모이어티이다.

[0235]

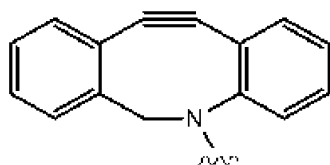
한 실시양태에서, X^2 는 N-옥시숙신이미드이다. 이 기는 펩티드 상에 아민에 대한 부착에 적합하다. L은 1 내지 10개의 탄소 원자 (예를 들어 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10})를 갖는 직쇄 알킬, 예를 들어 $(CH_2)_4$ 또는 $(CH_2)_3$ 이다. L은 전형적으로 화학식 $-L^3-L^2-L^1$ 을 갖고, 여기서 L^1 은 카르보닐이고, L^2 는 1 내지 10개의 탄소 원자 (예를 들어 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10})를 갖는 직쇄 알킬, 예를 들어 $(CH_2)_4$ 또는 $(CH_2)_5$ 이거나 L^2 는 부재하고, L^3 은 $-NHC(O)-$, 카르보닐 또는 $-O(CH_3)-$ 이다.

[0236]

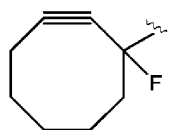
한 실시양태에서, L^1 은 카르보닐이고, L^2 는 $(CH_2)_5$ 이고 L^3 은 $-NHC(O)-$ 이다. 또 다른 실시양태에서, L^1 은 카르보닐이고, L^2 는 $(CH_2)_4$ 이고 L^3 은 카르보닐이다. 또 다른 실시양태에서, L^1 은 카르보닐이고, L^2 는 부재하고 L^3 은 $-O(CH_3)-$ 이다.



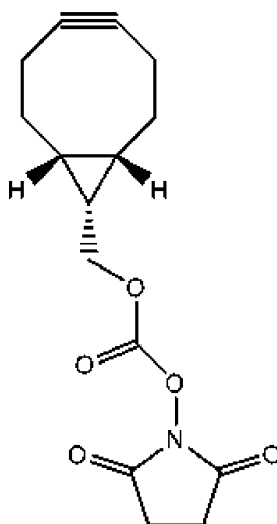
[0237] 한 실시양태에서, X^1 은 이다.



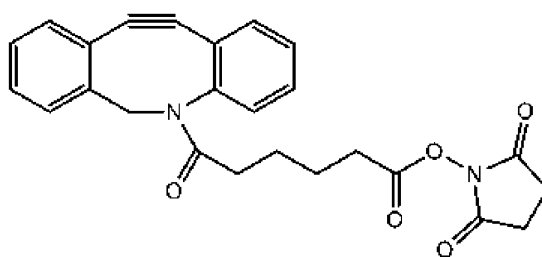
[0238] 또 다른 실시양태에서, X^1 은 이다.



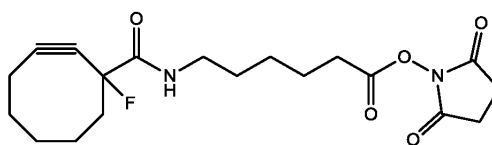
[0239] 또 다른 실시양태에서, X^1 은 이다.



[0240] 한 실시양태에서, 화학식 X^1-L-X^2 를 갖는 화합물은 이다.



[0241] 한 실시양태에서, 화학식 X^1-L-X^2 를 갖는 화합물은 이다.

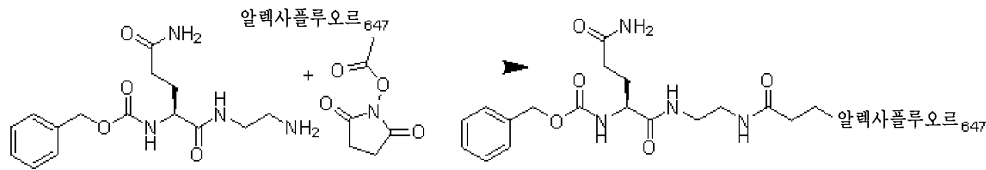


[0242] 한 실시양태에서, 화학식 X^1-L-X^2 를 갖는 화합물은 이다.

[0243] R^2 기가 형광단을 포함하는 경우, 적합한 형광단 군은 관련 기술분야에 주지된 기법에 따라 제조될 수 있다. 예

를 들어 반응식 I에 나타낸 바와 같이, 일반 프로토콜은 형광단 관능화된 변형기를 제조하기 위해 예시된다.

반응식 I.



표적 단백질

표적 화합물은 미생물 트랜스글루타미나제에 대한 기질인 것, 예를 들어 미생물 트랜스글루타미나제에 대한 기질인 단백질일 수 있다. 한 측면에서, 표적 화합물은 1개 이상의 Lys 잔기를, 그리고 일부 실시양태에서는 2개 이상의 Lys 잔기를 함유한다. 표적 화합물이 트랜스글루타미나제 기질 자체가 아닌 경우, 단백질중 1개 이상의 Gln 또는 Lys 잔기, 특히 Lys 잔기를 도입하여 단백질을 트랜스글루타미나제에 대한 기질로 만드는 것이 가능하다. 대안으로, 리신 잔기 (펩티드 태그(tag))를 함유하는 펩티드 서열을 삽입할 수 있다. 원칙적으로, 이러한 Gln 또는 Lys 잔기는 서열에서 임의의 위치에서 삽입될 수 있다. 전형적으로, 삽입은 단백질의 이용가능한 부분에서 또는 플렉서블 루프(flexible loop)에서 이어야 한다. 이는 또한 단백질의 생리학적, 예컨대 치료 활성이, 단백질이 예를 들어 치료 개입에서 더 이상 유용하지 않은 정도로 영향을 받지 않는 위치에서 삽입될 수 있다. 단백질 중의 아미노산 잔기의 삽입은 통상의 기술자에게 공지된 표준 기법, 예컨대 번역후 화학적 변형 또는 유전자도입 기법에 의해 야기될 수 있다.

트랜스글루타미나제에 대한 기질인 임의의 표적 화합물 또는 단백질, 예를 들어 효소, 단백질 호르몬, 성장 인자, 항체 및 항체 단편, 시토카인, 수용체, 림포카인 및 백신 항원 등은 본원에 개시된 방법에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 항원 펩티드이다.

일부 실시양태에서, 특히 R이 다당류인 경우, 폴리펩티드는 담체 분자이다. 일반적으로, 담체에 대한 다당류의 공유 접합은 이것이 다당류를 T-비의존적 항원에서 T-의존적 항원으로 전환시킴으로써 다당류의 면역원성을 증진시키고, 따라서 면역 기억을 프라임할 수 있게 한다. 접합은 소아과 백신에 특히 유용하고 (예를 들어 문헌 [Ramsay et al. Lancet 357(9251):195-196 (2001)] 참조), 주지된 기법이다 (문헌 [Lindberg Vaccine 17 Suppl 2:S28-36 (1999)], [Buttery & Moxon, J R Coll Physicians Lond 34, 163-168 (2000)], [Ahmad & Chapnick, Infect Dis Clin North Am 13:113-33, vii (1999)], [Goldblatt J. Med. Microbiol. 47, 563-567 (1998)], 유럽 특허 477 508, 미국 특허 번호 5,306,492, W098/42721, 문헌 [Dick et al. Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 10, 48-114 (1989)] 및 [Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368]에서의 검토 참조).

운반 단백질은 박테리아 독소 변성독소(toxoid)일 수 있다. 유용한 운반 단백질은 박테리아 독소 또는 변성독소, 예컨대 디프테리아 변성독소 또는 파상풍 변성독소, 디프테리아 및 콜레라 독소 및 그의 서브유닛, 예컨대 파상풍 변성독소의 단편 C 및 디프테리아 독소의 CRM197 돌연변이체를 포함한다. 다른 적합한 운반 단백질은 엔.메닌기티디스 외부 막 단백질, 합성 펩티드, 열 충격 단백질, 백일해 단백질, 시토카인, 림포카인, 호르몬, 성장 인자, 인간 혈청 알부민 (제조함 포함), 다양한 병원체-유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질, 예컨대 N19, 에이치. 인플루엔자(H. influenzae)로부터의 단백질 D, 페렴구균 표면 단백질 PspA, 페렴구균용혈소, 철-흡수 단백질, 씨. 디시필레(C. difficile)로부터의 독소 A 또는 B, 재조합 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 엑스포테인 A (rEPA), GBS 단백질 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 단백질은 섬모 단백질, 예컨대 GBS 단백질, 예를 들어 GBS67 및 GBS80이다.

추가 유도체화

본 발명의 표적 단백질 (즉 관심 단백질)을 변형시킬 필요성은 많은 이유로 일어날 수 있고, 이는 또한 본 발명의 방법에 따라 선택적으로 변형될 수 있는 화합물의 종류에서 반영된다.

일반적으로, 본 발명의 방법은 2개 이상의 리신을 함유하는 단백질과 화학식 I $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 또는 화학식 II $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$ 의 펩티드를 함유하는 글루타민의 미생물 트랜스글루타미나

제 촉매화 반응을 포함한다.

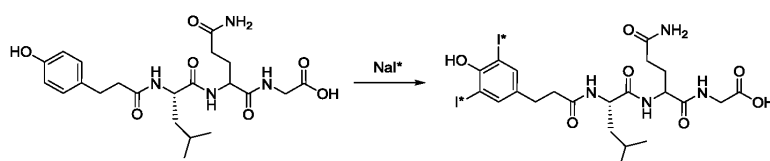
[0254] 한 실시양태에서, 방법은, (a) 화학식 I $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 의 화합물의 펩티드 합성, 및 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 정제에 의한 제조 단계; (b) 과량의 이 화합물 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 을, 임의로 유기 용매, 세정제 또는 다른 개질제를 함유하는, 수성 완충제 중의, 1개 이상의 리신, 및 일부 실시양태에서는, 1개 초과 리신을 함유하는 표적 단백질과 혼합하는 단계; (c) 촉매량의 미생물 트랜스글루타미나제를 이 혼합물에 첨가하는 단계; (d) mTGase 억제제를 임의로 혼합물에 첨가할 수 있는 단계; (e) 혼합물을, 전형적으로 단위 조작, 예컨대 한외여과 또는 투석여과 및/또는 크로마토그래피 (이온 교환, 크기 배제, 소수성 상호작용 등)를 포함하는 정제 공정에 적용시키는 단계로 이루어진다. 그로 인해 선택적으로 변형된 단백질이 수득된다. 단백질은 크로마토그래피, 전기영동, 펩티드 맵핑 및 질량 분석법을 포함한 표준 단백질 분석 방법에 의해 특성화된다.

[0255] 한 실시양태에서, 방법은, (a) 화학식 II $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$ 의 화합물의 펩티드 합성, 및 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 정제에 의한 제조 단계; (b) 과량의 이 화합물 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$ 을, 임의로 유기 용매, 세정제 또는 다른 개질제를 함유하는, 수성 완충제 중의, 1개 이상의 리신, 및 일부 실시양태에서는, 1개 초과 리신을 함유하는 표적 단백질과 혼합하는 단계; (c) 촉매량의 미생물 트랜스글루타미나제를 이 혼합물에 첨가하는 단계; (d) mTGase 억제제를 임의로 혼합물에 첨가할 수 있는 단계; (e) 혼합물을, 전형적으로 단위 조작, 예컨대 한외여과 또는 투석여과 및/또는 크로마토그래피 (이온 교환, 크기 배제, 소수성 상호작용 등)를 포함하는 정제 공정에 적용시키는 단계로 이루어진다. 그로 인해 선택적으로 변형된 단백질이 수득된다. 단백질은 크로마토그래피, 전기영동, 펩티드 맵핑 및 질량 분석법을 포함한 표준 단백질 분석 방법에 의해 특성화된다.

[0256] 임의로, 단계 (b) 또는 (c)에 이어서, 변형된 단백질을, 존재하는 경우, 예를 들어 형광단 표지 (하나가 이미 존재하지 않는 한)로, R^1 또는 R^2 또는 둘 다의 관능기를 통해 추가로 변형시킬 수 있다. 표지를 첨가하는 경우, 변형된 단백질은 형광 또는 방사성표지화와 같은 표지의 특성에 따라 다양한 기법을 사용하여 검출될 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, R^1 또는 R^2 또는 둘 다의 관능기를 방사성표지화할 수 있다. 예를 들어, 아이오딘 방사성 표지화를 반응식 II에 나타낸 바와 같이 링커에 첨가할 수 있다.

[0258] 반응식 II.



[0259]

[0260] mTGase-매개 아미드교환의 기전의 부분으로서, 분자내 티오에스테르는 mTGase의 활성 부위에서의 Cys와 Gln 기질 사이의 반응에 의해 형성된다. 용어 "아미드교환"은 글루타민의 측쇄에서의 질소가 또 다른 화합물로부터의 질소, 특히 친핵체를 함유하는 또 다른 질소로부터의 질소와 교환되는 반응을 나타내고자 하는 것이다. 이 중간체는 활성화 Gln-잔기로서 간주될 수 있고, 활성 종은 mTGase-티오에스테르이고, 이는 아민, 예를 들어 단백질 리신 잔기와 반응한다. 반응의 선택성은 1) Lys-함유 단백질 기질과 상호작용하면서 mTGase-티오에스테르의 전단 입체 벌크(shear steric bulk), 2) mTGase-티오에스테르와 Lys-함유 단백질 기질 사이의 더 한정된 비-공유 결합상호작용의 결과이다. 이의 즉각적인 결과는 활성화 아실기 보유 단백질, 아실-X-단백질 (여기서 X는 단백질-리신 아민에 의해 친핵성 공격 쪽으로 아실 기를 활성화하는 원자 또는 기임)이 본 발명에 포함된다는 것이다.

[0261] 따라서, 단백질을 변형시켜 단백질의 물리-화학적 특성을 변경시키고, 예를 들어 치료용 단백질의 생체이용률을 변형시키기 위해 용해도를 증가 (또는 감소)시키는 것 등이 바람직할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 혈장 단백질, 예를 들어 알부민 등에 결합하는 단백질에 화합물을 접합시킴으로써, 또는 단백질의 크기를 증가시켜 신장으로부터의 배출을 방지 또는 지연시킴으로써 체내 청소율을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 접합은 또

한, 가수분해에 대한 단백질의 민감성, 예를 들어 생체내 단백질 가수분해 등을 변경, 특히 감소시킬 수 있다.

[0262] 또 다른 실시양태에서, 표지를 접합시켜 단백질의 분석을 용이하게 하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광 마커, 예컨대 이미 기재된 형광단 및 효소 기질을 포함한다.

[0263] 또 다른 실시양태에서, 화합물을 단백질에 접합시켜 단백질의 단리를 용이하게 한다. 예를 들어, 특정 칼럼 물질(column material)에 대한 특이적 친화도를 갖는 화합물을 단백질에 접합시킬 수 있다. 또한, 단백질의 면역원성을, 예를 들어 단백질을 접합시켜 단백질에서 하나 이상의 면역원성 에피토프를 숨기거나, 차폐하거나 가리도록(eclipse) 함으로써 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 명사로서의 용어 "접합체"는 변형된 펩티드, 즉 펩티드의 특성을 변형시키기 위해 그에 결합된 모이어티를 갖는 상기 펩티드를 나타내고자 하는 것이다. 동사로서, 상기 용어는 펩티드의 특성을 변형시키기 위해 모이어티를 상기 펩티드에 결합시키는 방법을 나타내고자 하는 것이다.

[0264] 한 실시양태에서, 본 발명은 표적 단백질의 약리학상 특성을 개선시키는 방법을 제공한다. 개선은 상응하는 비 변형된 단백질에 대하여이다. 이러한 약리학상 특성의 예는 임의의 특이적 단백질의 기능적 생체내 반감기, 면역원성, 신장 여과, 프로테아제 보호 및 알부민 결합을 포함한다.

[0265] 한 측면에서, 본 발명의 변형된 단백질을 R^1 , $(A-W-B-R^2)_z$, 및/또는 $NH-W-R^2$ 의 추가의 유도체화를 통해 추가로 변형시킬 수 있다. 구체적으로, R^1 및/또는 R^2 는 추가 변형에 적합한 화학적 기를 포함할 수 있다. 이러한 추가 관능화의 예는, R^1 또는 R^2 가 아지드 또는 시클로옥틴 기를 포함하는 경우, 더 통상적으로 클릭 화학(click chemistry)으로서 공지된, 아지드-알킨 히스겐 고리화 첨가반응(Huisgen cycloaddition)을 포함한다. R^2 가 α, β -불포화 케톤까지 제거하는 토실 술폰을 포함하는 경우, 접합체 첨가는 티올과 같은 친핵체를 사용한 추가 변형에 적용될 수 있을 것이다.

[0266] 이미 상기 기재된 일부 실시양태에서, W는 덴드리머, 폴리알킬렌 옥시드, 폴리알킬렌 글리콜 (PAG), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG), 분지형 PEG, 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리카르복실레이트, 폴리-비닐 피롤리돈, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 텍스트린, 카르복시메틸-텍스트란; 혈청 단백질 결합-리간드, 예컨대 알부민에 결합하는 화합물, 예컨대 지방산, C_5 - C_{24} 지방산, 지방산 이산(diacid) (예를 들어 C_5 - C_{24}), 글리칸이 수용체 (예를 들어 아시알로당단백질 수용체 및 만노스 수용체)에 결합하지 못하도록 하는 구조 (예를 들어 시알산 유도체 또는 모방체), 생리학적 조건을 변형하고, 전하 특성을 변경하는 작은 유기 분자 함유 모이어티, 예컨대 카르복실산 또는 아민, 또는 글리칸 특이적 인식을 방지하는 중성 치환기, 예컨대 저급(smaller) 알킬 치환기 (예를 들어 C_1 - C_5 알킬), 저분자량 유기 하전 라디칼 (예를 들어 C_1 - C_{25}) (이는 1개 이상의 카르복실산, 아민, 술폰산, 포스폰산, 또는 그의 조합물을 함유할 수 있음); 저분자량 중성 친수성 분자 (예를 들어 C_1 - C_{25}), 예컨대 시클로텍스트린, 또는 폴리에틸렌 쉼 (임의로 분지형일 수 있음); 2-40 kDa의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜; 정의가 명확한 정밀 중합체(precision polymer), 예컨대 700 내지 20,000 Da, 또는 더욱 바람직하게는 700 내지 10,000 Da 범위에 이르는 정확한 분자 질량을 갖는 덴드리머; 및 실질적으로 비-면역성 폴리펩티드, 예컨대 알부민 또는 항체 또는 항체의 부분 (임의로 Fc-도메인 함유)로부터 선택될 수 있다.

[0267] 한 실시양태에서, W는 "PEG"로도 지칭되는, 약 40 내지 약 10,000 amu의 분자량을 갖는 선형 또는 분지형 폴리에틸렌 글리콜이다. 용어 "PEG"는, 예를 들어 분지 말단 OH-기가 알콕시 기, 예컨대 메톡시 기, 에톡시 기, 또는 프로폭시 기에 의해 대체된, 그의 유사체를 포함한 폴리에틸렌 글리콜을 나타내고자 하는 것이다.

[0268] mPEG의 제조 방법으로 인해, 이들 분자는 종종 특정 분자량 분포를 갖는다. 이러한 분포는 다분산 지수(polydispersity index)로 기재된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "다분산 지수"는 중합체 화학의 분야에 공지된 바와 같은, 중량 평균 분자량과 수 평균 분자량 사이의 비를 의미한다 (예를 들어 문헌 ["Polymer Synthesis and Characterization", J.A. Nairn, University of Utah, 2003] 참조). 다분산 지수는 1 이상의 수이고, 이는 겔 투과 크로마토그래피 데이터로부터 추산될 수 있다. 다분산 지수가 1인 경우, 생성물은 단분산성이고 따라서 단일 분자량을 갖는 화합물로 이루어진다. 다분산 지수가 1 초과인 경우, 이는 그 중합체의 다분산도의 척도, 즉 상이한 분자량을 갖는 중합체의 분포의 범위이다.

[0269] 화학식, 화합물 명칭에서 또는 분자 구조에서 예를 들어 "mPEG2000"의 사용은 mPEG가 다분산성이고 대략 2,000

Da의 분자량을 갖는 mPEG 잔기를 나타낸다.

- [0270] 다분산 지수는 전형적으로 PEG 또는 mPEG의 분자량에 따라 증가한다. 2,000 Da PEG, 특히 2,000 Da mPEG에 대해 언급되는 경우, 이는 1.06 미만, 예컨대 1.05 미만, 예컨대 1.04 미만, 예컨대 1.03 미만, 예컨대 1.02 내지 1.03의 다분산 지수를 갖는 화합물 (또는 사실상 화합물의 혼합물)을 나타내고자 하는 것이다. 3,000 Da PEG, 특히 3,000 Da mPEG에 대해 언급되는 경우, 1.06 미만, 예컨대 1.05 미만, 예컨대 1.04 미만, 예컨대 1.03 미만, 예컨대 1.02 내지 1.03의 다분산 지수를 갖는 화합물 (또는 사실상 화합물의 혼합물)을 나타내고자 하는 것이다.
- [0271] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 또한, 단백질의 pH 환경을 7 초과 pH로 제어하고 부위 선택적 표지된 단백질을 시스테인 잔기를 갖는 펩티드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기를 갖는 펩티드는 $N^5-((R)-1-((\text{카르복시메틸})\text{아미노})-3\text{-메르캅토-1-옥소프로판-2-일})-L\text{-글루타민}$ 이다. 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기를 갖는 펩티드는 임의의 티올 함유 분자, 예컨대 티올을 갖는 다당류, 티올을 갖는 세포독소, 티올-관능화된 PEG 등으로 치환될 수 있다.
- [0272] 제약 조성물
- [0273] 또 다른 측면에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 방법 중 어느 한 방법에 의해 변형된 단백질을 포함한다. 한 측면에서, 이러한 제약 조성물은 10-15 mg/ml 내지 200 mg/ml, 예를 들어 10-10 mg/ml 내지 5 mg/ml 등의 농도로 존재하는, 변형된 단백질, 예컨대 성장 호르몬 (GH)을 함유하며, 여기서 조성물은 2.0 내지 10.0의 pH를 갖는다. 조성물은 완충 시스템, 보존제(들), 등장화제(tonicity agent) (들), 킬레이트제 (들), 안정화제 및 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 수성 조성물이다. 이러한 조성물은 전형적으로 용액 또는 현탁액으로서 존재한다. 추가 실시양태에서, 제약 조성물은 수용액이다. 용어 "수성 조성물"은 50% w/w 이상의 물을 포함하는 조성물로서 정의된다. 마찬가지로, 용어 "수용액"은 50% w/w 이상의 물을 포함하는 용액으로서 정의되고, 용어 "수성 현탁액"은 50% w/w 이상의 물을 포함하는 현탁액으로서 정의된다.
- [0274] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 동결-건조 조성물이며, 여기에 의사, 환자, 또는 약사가 사용 이전에 용매 및/또는 희석제를 첨가한다. 또 다른 실시양태에서 제약 조성물은 어떤 사전의 용해 없이 즉시 사용가능한 건조 조성물 (예를 들어 동결-건조 또는 분무-건조)이다.
- [0275] 추가 측면에서, 제약 조성물은 변형된 단백질, 예를 들어 변형된 GH 단백질 등, 및 완충제의 수용액을 포함한다 (여기서 변형된 단백질, 예를 들어 변형된 GH 단백질 등은 0.1-100 mg/ml 이상의 농도로 존재하고, 여기서 상기 조성물은 약 2.0 내지 약 10.0의 pH를 갖는다).
- [0276] 또 다른 실시양태에서, 조성물의 pH는 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 및 10.0으로 이루어진 목록으로부터 선택된다.
- [0277] 추가 실시양태에서, 완충제는 중탄산암모늄, 아세트산나트륨, 탄산나트륨, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 인산이수소나트륨, 인산수소이소나트륨, 인산나트륨, 및 트리스(히드록시메틸)아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산, TRIS, 또는 그의 혼합물로부터 선택된다.
- [0278] 추가 실시양태에서, 조성물은 또한 제약상 허용되는 보존제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 방부제는 페놀, o-크레졸, m-크레졸, p-크레졸, 메틸 p-히드록시 벤조에이트, 프로필 p-히드록시벤조에이트, 2-페녹시에탄올, 부틸 p-히드록시벤조 에이트, 2-페닐에탄올, 벤질 알콜, 클로로부탄올 및 티오메로살, 브로노폴, 벤조산, 이미드 우레아, 클로로헥시딘, 소듐 데히드로아세테이트, 클로로크레솔, 에틸 p-히드록시벤조에이트, 벤제토늄 클로라이드, 클로르페네신 (3p-클로르페녹시프로판-1,2-디올), 또는 그의 혼합물일 수 있다. 보존제는 0.1 mg/ml 내지 20 mg/ml 또는 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재할 수 있다. 추가 실시양태에서, 보존제는 5 mg/ml 내지 10 mg/ml 또는 10 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 존재한다.
- [0279] 추가 실시양태에서, 조성물은 등장제(isotonic agent)를 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 등장제는 염 (예를 들어 염화나트륨), 당 또는 당 알콜, 아미노산 (예를 들어 L-글리신, L-히스티딘, 아르기닌, 리신,

이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌), 알디톨 (예를 들어 글리세롤 (글리세린), 1,2-프로판디올 (프로필렌글리콜), 1,3-프로판디올, 1,3-부탄디올) 폴리에틸렌글리콜 (예를 들어 PEG400), 또는 그의 혼합물로부터 선택된다. 예를 들어 프럭토스, 글루코스, 만스, 소르보스, 크실로스, 말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 텍스트린, 폴루란, 텍스트린, 시클로텍스트린, 가용성 전분, 히드록시에틸 전분 및 카르복시메틸셀룰로스-Na를 포함함, 임의의 당, 예컨대 모노-, 디-, 또는 다당류, 또는 수용성 글루칸을 사용할 수 있다. 한 실시양태에서 당 첨가제는 수크로스이다. 당 알콜은 1개 이상의 -OH 기를 갖는 C₄-C₈ 탄화수소로서 정의되며, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 들시톨, 크실리톨, 아라비톨, 및 그의 혼합물을 포함한다. 한 실시양태에서, 당 알콜 첨가제는 만니톨이다. 한 실시양태에서, 당 또는 당 알콜 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 150 mg/ml, 또는 1 mg/ml 내지 50 mg/ml이다. 등장제는 1 mg/ml 내지 7 mg/ml 또는 8 mg/ml 내지 24 mg/ml, 또는 25 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로 존재한다. 제약 조성물에서 등장제의 사용은 통상의 기술자에게 주지되어 있다. 편의상, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000]을 참조한다.

[0280]

본 문맥에서, 용어 "제약상 허용되는 염"은 환자에게 유해하지 않은 염을 나타내고자 하는 것이다. 이러한 염은 제약상 허용되는 산 부가염, 제약상 허용되는 금속 염, 암모늄 및 알킬화 암모늄 염을 포함한다. 산 부가염은 무기 산뿐만 아니라 유기 산의 염을 포함한다. 적합한 무기 산의 대표적 예는 염산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 인산, 황산, 질산 등을 포함한다. 적합한 유기 산의 대표적 예는 포름산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 프로피온산, 벤조산, 신남산, 시트르산, 푸마르산, 글리콜산, 락트산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 옥살산, 피크르산, 피루브산, 살리실산, 숙신산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 타르타르산, 아스코르브산, 파코산, 비스메틸렌 살리실산, 에탄디술폰산, 글루콘산, 시트라콘산, 아스파르트산, 스테아르산, 팔미트산, EDTA, 글리콜산, p-아미노벤조산, 글루탐산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등을 포함한다. 제약상 허용되는 무기 또는 유기 산 부가염의 추가 예는 문헌 [J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2]에 기재된 제약상 허용되는 염을 포함하며, 이 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 금속 염의 예는 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘 염 등을 포함한다. 암모늄 및 알킬화 암모늄 염의 예는 암모늄, 메틸암모늄, 디메틸암모늄, 트리메틸암모늄, 에틸암모늄, 히드록시에틸암모늄, 디에틸암모늄, 부틸암모늄, 테트라메틸암모늄 염 등을 포함한다.

[0281]

추가 실시양태에서, 조성물은 킬레이트제를 포함한다. 킬레이트제는 에틸렌아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산, 및 아스파르트산, 및 그의 혼합물의 염으로부터 선택된다. 킬레이트제는 0.1 mg/ml 내지 5 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 2 mg/ml, 또는 2 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 존재한다. 제약 조성물에서 킬레이트제의 사용은 통상의 기술자에게 주지되어 있다. 편의상, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000]을 참조한다.

[0282]

추가 실시양태에서, 조성물은 안정화제를 포함한다. 제약 조성물에서 안정화제의 사용은 통상의 기술자에게 주지되어 있다. 편의상, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000]을 참조한다. 더욱 특히, 본 발명의 조성물은 치료 활성 성분이 액체 제약 조성물 중에서 보관 동안에 응집체 형성을 나타낼 수 있는 단백질을 포함하는 안정화된 액체 제약 조성물이다. "응집체 형성"이란, 용액으로부터 침전되는 큰 가시적 응집체, 또는 가용성인 상태로 남아 있을 수 있는, 올리고머의 형성을 초래하는 단백질 분자 간의 물리적 상호 작용을 의미한다. "보관 동안에"란, 일단 제조된 후, 대상체에게 즉시 투여되지 않는 액체 제약 조성물 또는 조성물을 의미한다. 정확하게는, 제조 후에, 액체 형태로, 동결 상태로, 또는 건조 형태로 (액체 형태로 또는 대상체에게 투여하기에 적합한 다른 형태로 추후의 재구성용) 보관을 위해 포장된다. "건조 형태"란 액체 제약 조성물 또는 조성물이 동결 건조 (즉, 동결건조; 예를 들어, 문헌 [Williams and Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59] 참조), 분무 건조 (문헌 [Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676]; [Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206]; 및 [Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20] 참조), 또는 공기 건조 (문헌 [Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470]; 및 [Roser (1991) Biopharm. 4:47-53])에 의해 건조됨을 의미한다. 액체 제약 조성물의 보관 동안에 단백질에 의한 응집체 형성은 그 단백질의 생물학적 활성에 악영향을 줄 수 있으며, 결과적으로 제약 조성물의 치료 효능을 상실시킨다. 더욱이, 응집체 형성은 단백질-함유 제약 조성물을 주입 시스템을 사용하여 투여하는 경우 튜빙(tubing), 막, 또는 펌프의 막힘과 같은 다른 문제를 유발할 수 있다.

[0283]

제약 조성물은 또한 조성물의 보관 동안에 단백질에 의한 응집체 형성을 감소시키기에 충분한 특정 양의 아미노산 염기를 포함할 수 있다. "아미노산 염기"란 아미노산 또는 아미노산의 조합을 의미하고, 여기서 임의의 소정의 아미노산은 그의 유리 염기 형태 또는 그의 염 형태로 존재한다. 아미노산 조합이 사용되는 경우, 아미노산 모두가 그의 유리 염기 형태로 존재할 수 있고, 모두는 그의 염 형태로 존재할 수 있거나, 일부는 그의 유리

염기 형태로 존재할 수 있으며, 한편 다른 것들은 그의 염 형태로 존재한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물을 제조하는데 사용되는 아미노산은 하전 측쇄를 함유하는 것들, 예컨대 아르기닌, 리신, 아스파르트산, 및 글루탐산이다. 특정의 아미노산 (메티오닌, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌 및 그의 혼합물)의 임의의 입체이성질체 (즉, L 또는 D 이성질체, 또는 그의 혼합물) 또는 이들 입체이성질체의 조합물 또는 글리신 또는 유리 염기 (예컨대 이미다졸이나 이에 제한되지 않음)는 특정의 아미노산 또는 유기 염기가 그의 유리 염기 형태 또는 그의 염 형태로 존재하는 한은 제약 조성물에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서 아미노산의 L-입체이성질체가 사용된다. 한 실시양태에서 L-입체이성질체가 사용된다. 본 발명의 조성물은 또한 이들 아미노산의 유사체로 대체화될 수 있다. "아미노산 유사체"란 본 발명의 액체 제약 조성물의 보관 동안에 단백질에 의한 응집체 형성을 감소시키는 바람직한 효과를 야기하는 자연 발생 아미노산의 유도체를 의미한다. 적합한 아르기닌 유사체는, 예를 들어, 아미노구아니딘, 오르니틴 및 N-모노에틸 L-아르기닌을 포함하고, 적합한 메티오닌 유사체는 에티오닌 및 부티오닌을 포함하고, 적합한 시스테인 유사체는 S-메틸-L-시스테인을 포함한다. 다른 아미노산과 같이, 아미노산 유사체를 그의 유리 염기 형태 또는 그의 염 형태로 조성물에 혼입시킨다. 추가 실시양태에서, 아미노산 또는 아미노산 유사체는 단백질의 응집을 방지 또는 지연 시키기에 충분한 농도로 사용된다.

[0284] 추가 실시양태에서, 메티오닌 (또는 황 함유(sulphuric) 아미노산) 또는 유사 아미노산을, 메티오닌 잔기가 메티오닌 술폭시드로 산화되는 것을 억제하기 위해 첨가할 수 있다 (치료제로서 작용하는 단백질이 이러한 산화에 민감한 1개 이상의 메티오닌 잔기를 포함하는 단백질인 경우). "억제하다"란, 시간 경과에 따라 메티오닌 산화된 종의 최소의 축적을 의미한다. 메티오닌 산화를 억제하는 것은 결과적으로 그의 적당한 분자 형태에서 단백질을 더 많이 보유하게 된다. 메티오닌의 입체이성질체 (L 또는 D 이성질체) 또는 그의 임의의 조합물을 사용할 수 있다. 첨가되는 양은 메티오닌 술폭시드의 양이 규제 기관에게 허용되도록 메티오닌 잔기의 산화를 억제 하기에 충분한 양이어야 한다. 전형적으로, 이는 조성물이 약 10% 내지 약 30% 이하의 메티오닌 술폭시드를 함유함을 의미한다. 일반적으로, 이는 메티오닌 잔기에 첨가되는 메티오닌의 비가 약 1:1 내지 약 1000:1, 예컨대 10:1 내지 약 100:1의 범위에 이르도록 메티오닌을 첨가함으로써 수득될 수 있다.

[0285] 추가 실시양태에서, 조성물은 고분자량 중합체 또는 저분자량 화합물의 군으로부터 선택된 안정화제를 포함할 수 있다. 안정화제는 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어 PEG 3350), 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리비닐피롤리돈, 카복시-/히드록시셀룰로스 또는 그의 유도체 (예를 들어 HPC, HPC-SL, HPC-L 및 HPMC), 시클로덱스트린, 황-함유 물질, 예컨대 모노티오글리세롤, 티오글리콜산 및 2-메틸티오에탄올, 및 상이한 염들 (예를 들어 염화나트륨)로부터 선택될 수 있다.

[0286] 제약 조성물은 또한 추가적 안정화제를 포함할 수 있으며, 이는 조성물에서 치료 활성 단백질의 안정성을 추가로 증진시킨다. 안정화제는 메티오닌 및 EDTA (이는 메티오닌 산화에 대하여 단백질을 보호함), 및 비이온성 계면활성제 (이는 동결-해동 또는 기계적 전단과 관련된 응집에 대하여 단백질을 보호함)을 포함하나, 그에 제한되지 않는다.

[0287] 추가 실시양태에서, 조성물은 또한 계면활성제를 포함한다. 계면활성제는 세정제, 에톡실화 피마자유, 폴리글리콜화 글리세리드, 아세틸화 모노글리세리드, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시프로필렌폴리옥시에틸렌 블록 중합체 (예를 들어 폴록사머류(poloxamers), 예컨대 플루로닉(Pluronic)® F68, 폴록사머 188 및 407, 트리톤(Triton) X-100), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 및 폴리에틸렌 유도체, 예컨대 알킬화 및 알콕실화 유도체 (트윈(tween)류, 예를 들어 트윈-20, 트윈-40, 트윈-80 및 브리지(Brij)-35), 모노글리세리드 또는 그의 에톡실화 유도체, 디글리세리드 또는 그의 폴리옥시에틸렌 유도체, 알콜, 글리세롤, 렉틴 및 인지질 (예를 들어 포스파티딜 세린, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 디포스파티딜 글리세롤 및 스펅고미엘린), 인지질의 유도체 (예를 들어 디팔미토일 포스파티드산) 및 리소인지질 (예를 들어 에탄올아민, 콜린, 세린 또는 트레오닌의, 팔미토일 리소포스파티딜-L-세린 및 1-아실-sn-글리세로-3-포스페이트 에스테르), 및 리소포스파티딜 및 포스파티딜콜린의 알킬, 알콕실 (알킬 에스테르), 알콕시 (알킬 에테르)- 유도체, 예를 들어 리소포스파티딜콜린의 라우로일 및 미리스토일 유도체, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 극성 헤드 기(head group), 즉 콜린, 에탄올아민, 포스파티드산, 세린, 트레오닌, 글리세롤, 이노시톨, 및 양전하의 DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, 리소포스파티딜세린 및 리소포스파티딜트레오닌의 변형, 및 글리세로인지질 (예를 들어 세팔린), 글리세로당지질 (예를 들어 갈락토피라노시드, 스펅고당지질(예를 들어 세라미드, 강글리오시드), 도데실포스포콜린, 달걀(hen egg) 리소레시틴, 푸시드산 유도체- (예를 들어 소듐 타우로-디히드로 푸시데이트 등), 장쇄 지방산 및 그의 염 C₆-C₁₂ (예를 들어 올레산 및 카프릴산), 아실카르니틴 및 유도체, 리신, 아르기닌 또는 히스티딘의 N^a-아실화 유도체, 또는 리신 또는 아르기닌의 측쇄 아실화 유도체, 리신, 아르

기닌 또는 히스티딘 및 중성 또는 산성 아미노산의 임의의 조합을 포함하는 이단백질(diprotein)의 N^a -아실화 유도체, 중성 아미노산 및 2개의 하전 아미노산의 임의의 조합을 포함하는 삼단백질(triprotein)의 N^a -아실화 유도체, DSS (도큐세이트(docusate) 소듐, CAS 등록 번호 [577-11-7]), 도큐세이트 칼슘, CAS 등록 번호 [128-49-4]), 도큐세이트 칼륨, CAS 등록 번호 [7491-09-0]), SDS (소듐 도데실 술페이트 또는 소듐 라우릴 술페이트), 소듐 카프릴레이트, 콜산, 또는 그의 유도체, 담즙산 및 그의 염 및 글리신 또는 타우린 접합체, 우르소데옥시콜산, 소듐 콜레이트, 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 글리코콜레이트, N-헥사데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판술포네이트, 음이온성 (알킬-아릴술포네이트) 1가 계면활성제, 양성이온성 계면활성제 (예를 들어 N-알킬-N,N-디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 3-콜아미도-1-프로필디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 양이온성 계면활성제 (4급 암모늄 염기) (예를 들어 세틸-트리메틸암모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드), 비이온성 계면활성제 (예를 들어 도데실 P-D-글로코피라노시드), 폴록사민 (예를 들어 테트로닉(Tetronic's)), (이는 프로필렌 옥시드 및 에틸렌 옥시드의 에틸렌디아민으로의 순차적 첨가로부터 유래된 사관능성 블록 공중합체임)로부터 선택될 수 있거나, 계면활성제는 이미다졸린 유도체, 또는 그의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

[0288] 제약 조성물에서 계면활성제의 사용은 통상의 기술자에게 주지되어 있다. 편의상, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000]을 참조한다.

[0289] 제약 조성물에 기타 성분을 존재시킬 수 있음이 가능하다. 이러한 추가적 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 증량제(bulking agent), 장성 개질제(tonicity modifier), 킬레이트제, 금속 이온, 유지성 비히클, 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 양성이온 (예를 들어, 아미노산, 예컨대 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티딘)을 포함할 수 있다. 이러한 추가적 성분은, 물론, 제약 조성물의 전반적인 안정성에 악영향을 미치지 않아야 한다.

[0290] 변형된 단백질, 예를 들어 변형된 GH 단백질 등을 함유하는 제약 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 몇몇 부위에서, 예를 들어, 국소 부위, 예를 들어, 피부 및 점막 부위에서, 흡수, 예를 들어 동맥내, 정맥내, 심장내의 투여를 우회하는 부위에서, 및 흡수, 예를 들어 피부내, 피부하, 근육내 또는 복강내의 투여를 포함하는 부위에서 투여할 수 있다.

[0291] 제약 조성물의 투여는 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게, 투여의 몇몇 경로, 예를 들어, 구강내의, 혀, 설하, 협측, 구강, 위장 및 장 내, 비강, 폐 (예를 들어, 세기관지 및 폐포 또는 그의 조합을 통해), 표피, 진피, 경피, 질, 직장, 눈 (예를 들어, 결막을 통해) 요관, 및 비정구를 통해서 일수 있다.

[0292] 조성물은 몇몇 투여 형태로, 예를 들어, 용액, 현탁액, 에멀전, 마이크로에멀전, 다중 에멀전, 발포체, 연고, 페이스트, 첩부제, 연고, 정제, 코팅된 정제, 세정액, 캡슐, 예를 들어, 경질 젤라틴 캡슐과 연질 젤라틴 캡슐, 좌제, 직장 캡슐, 드롭제, 젤, 스프레이, 분말, 에어로졸, 흡입제, 점안액, 안과 연고, 안과 세정액, 질 페서리, 질내 고리, 질 연고, 주사 용액, 계내 변환 용액, 예를 들어 계내 겔화, 계내 설정, 계내 침전, 계내 결정화, 주입 용액 및 임플란트로서 투여될 수 있다.

[0293] 본 발명의 조성물은, 예를 들어 공유, 소수성 및 정전기적 상호 작용을 통해, 약물 담체, 약물 전달 시스템 및 고도의 약물 전달 시스템으로 추가로 배합, 또는 그에 부착되어, 변형된 GH 단백질의 안정성을 추가로 증진시키고, 생체 이용률을 증가시키고, 용해도를 증가시키고, 부작용을 감소시키고, 통상의 기술자에게 주지된 시간 요법을 달성하고, 환자 순응도 또는 그의 임의의 조합을 증가시키도록 할 수 있다. 담체, 약물 전달 시스템 및 고도의 약물 전달 시스템은 중합체, 예를 들어 셀룰로스 및 유도체, 다당류, 예를 들어 텍스트란 및 유도체, 전분 및 유도체, 폴리(비닐 알콜), 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 중합체, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 그의 블록 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 운반 단백질, 예를 들어 알부민, 젤, 예를 들어, 써모겔링 시스템(thermogelling system), 예를 들어 블록 공중합체 시스템 (통상의 기술자에게 주지됨), 미셀, 리포솜, 미세구, 나노미립자, 액정 및 그의 분산액, L2 상 및 그의 분산액 (지질-물 시스템에서의 상 거동의 통상의 기술자에게 주지됨), 중합체성 미셀, 다중 에멀전, 자기-유화, 자기-미세유화, 시클로텍스트린 및 그의 유도체, 및 텐드리머를 포함하나, 그에 제한되지 않는다.

[0294] 조성물은, 예를 들어 계량 용량 흡입기, 건조 분말 흡입기 및 네블라이저를 사용 (모두 통상의 기술자에게 주지된 장치임)하여, 변형된 단백질, 예를 들어 변형된 GH 단백질 등의 폐내 투여를 위한 고체, 반고체, 분말 및 용액의 조성물에서 유용하다.

[0295] 변형된 단백질의 치료적 용도

[0296] 비변형된 단백질이 치료용 단백질인 정도까지, 본 발명은 또한 치료에서 변형된 단백질의 용도, 특히 변형된 단백질을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 및 "치료하는"은 상태, 예컨대 질환 또는 장애를 치료할 목적으로 하는 환자의 관리 및 치유를 의미한다. 상기 용어는 환자가 앓고 있는 소정의 상태에 대한 전 범위의 치료, 예컨대 활성 화합물을 투여하여 증상 또는 합병증을 완화, 질환, 장애 또는 상태의 진전의 지연, 증상 및 합병증의 완화 또는 경감, 및/또는 질환, 장애 또는 상태의 치유 또는 제거뿐만 아니라 상태의 예방을 포함하고자 하며, 여기서 예방은 질환, 상태, 또는 장애를 치료할 목적으로 환자의 관리 및 치유로서 이해되어야 하며, 증상 또는 합병증의 발병을 예방하기 위한 활성 성분의 투여를 포함한다. 치료되는 환자는 바람직하게는 포유동물, 특히 인간이지만, 이는 또한 동물, 예컨대 개, 고양이, 소, 염소 및 돼지를 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 치료 요법 및 예방 (예방적) 요법은 본원에 개시되고 치료하는 의사 또는 수의사에 의해 고려되는 용도를 위한 별개의 측면을 나타냄을 인식하여야 한다.

[0297] 본원에 사용된 바와 같은 변형된 단백질의 "치료 유효량"은 소정의 질환 및 그의 합병증의 임상적 징후를 치유, 완화 또는 부분적으로 정지시키기에 충분한 양을 의미한다. 이를 완수하기에 적당한 양은 "치료 유효량"로서 정의된다. 각각의 목적을 위한 유효량은 예를 들어 질환 또는 상해의 중증도뿐만 아니라 대상체의 체중, 성별, 연령 및 일반 상태에 따라 달라질 것이다. 적절한 투여량을 측정하는 것이 통상적인 실험을 사용하여, 값의 행렬을 구축하고 그 행렬 내에 상이한 지점을 시험함으로써 달성될 수 있음 (이는 모두 훈련된 의사 또는 수의사의 통상의 기술 내에 있음)이 이해될 것이다.

[0298] 본원에 개시된 방법 및 조성물은 치료에서 사용하기 위한 변형된 단백질을 제제공한다. 그와 같이, 전형적 비경구 용량은 투여당 10~9 mg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중의 범위이다. 전형적 투여 용량은 투여당 약 0.0000001 내지 약 10 mg/kg 체중이다. 정확한 용량은 예를 들어 적응증, 의약, 투여 빈도 및 방식, 치료되는 대상체의 성별, 연령 및 일반 상태, 치료되는 질환 또는 상태의 성질 및 중증도, 치료의 목적하는 효과 및 통상의 기술자에게 명백한 기타 인자에 따라 달라질 것이다. 전형적 투여 빈도는 1일 2회(twice daily), 1일 1회, 1일 2회(bi-daily), 주 2회, 주 1회 또는 심지어 더 장기 투여 간격으로 이다. 상응하는 비-접합된 단백질과 비교하여 활성 화합물의 연장된 반감기로 인해, 긴 투여 간격, 예컨대 주 2회, 주 1회 또는 심지어 더 장기 투여 간격을 이용하는 투여 요법이 특정의 실시양태이다. 많은 질환이 병용 투여되거나 순차적으로 투여되는, 치료에서 하나 초과 의약을 사용하여 치료된다. 따라서, 질환 중 하나의 치료를 위한 치료 방법에서의 변형된 단백질을 질환의 치료에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 다른 치료 활성 화합물과 조합하여 사용할 수 있음이 고려된다. 또한, 그 질환을 위한 의약의 제조에서 질환의 치료에서 통상적으로 사용되는 다른 치료 활성 화합물과 조합되는 변형된 단백질의 용도가 고려된다.

[0299] 실시예

[0300] 변형 화합물을 위한 일반 제조 방법

[0301] 달리 구체화되지 않는 한, 출발 물질은 일반적으로 상업적 공급원, 예컨대 알드리치 케미컬즈 캄파니(Aldrich Chemicals Co.) (위스콘신주 밀워키), 란캐스터 신테시스, 인크.(Lancaster Synthesis, Inc.) (뉴햄프셔주 윈덤), 아크로스 오가닉스(Acros Organics)(뉴저지주 페어론)로부터 입수가 가능하다. 미생물 트랜스글루타미나제는 아지노모토 노스 아메리카, 인크.(Ajinomoto North America, Inc.) (일리노이주 이타스카)에 의해 제공된다. CRM₁₉₇ (CAS 번호 92092-36-9)은 알드리치 케미컬즈 캄파니 (위스콘신주 밀워키)로부터 입수가 가능하다. 모노메틸 아우리스타틴 F는 콘코르티스(Concortis) (캘리포니아주 샌디에이고)로부터 구매하였다. 시클로옥틴 시약은 시나픽스(Synaffix) (네덜란드 나이메헨)로부터 구매하였다. MenA 항원 다당류는 노바르티스 엔브이앤디(Novartis NV&D)에 의해 공급되었다.

[0302] 변형 화합물을 칼럼 크로마토그래피 (인터침 퓨리플래시(Interchim puriflash) 430)에 의해 정제하고, NMR 분광법 (400MHz Bruker), LCMS (워터스 액유티(Waters Acquity) UPLC-UV-CAD-MS), 및 LCUV (애질런트(Agilent) 1200 시리즈 UPLC-UV)에 의해 분석하였다. 표지된 CRM₁₉₇은 LCMS (UPLC-UV-TOF-MS HRMS 워터스 액유티 UPLC Qtof)에 의해 특성화하였다. 표지된 CRM₁₉₇은 아미콘 필터 (3kDa 또는 10kDa MWC0), 및/또는 SEC (제너럴 일렉트릭(General Electric) AKTA 정제기)에 의해 정제하였다.

[0303] 변형의 단백질 부위의 동정 (부위 선택성)을 단백질 맵핑에 의해 특성화하였다. 실시예에서 사용된 mTGase는 아지노모토 노스 아메리카, 인크.(일리노이주 이타스카)로부터의 미생물 트랜스글루타미나제이다.

[0304] 이하에 실시예에서 사용된 하기 두문자어는 상응하는 의미를 갖는다:

[0305] MMAF: 모노메틸아우리스타틴 F

[0306] mTGase: 미생물 트랜스글루타미나제

[0307] MWC0: 분자량 컷오프(cut off)

[0308] NHS: N-히드록시숙신이미드

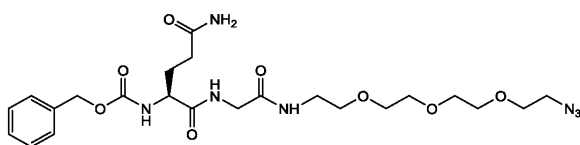
[0309] BCN-NHS: (1*R*,8*S*,9*S*)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메틸 *N*-숙신이미딜 카르보네이트

[0310] HATU: (*O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트)

[0311] RT: 실온

[0312] Rt: 채류 시간

[0313] Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃:



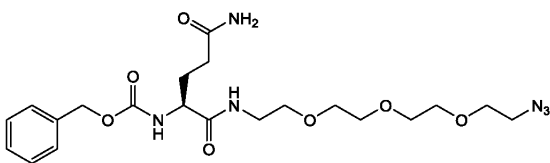
[0314]

[0315] 시판되는 ZQG (1 g, 2.96 mmol), 아민-PEG-아지드 (0.882 mL, 4.45 mmol), DIPEA (1.553 mL, 8.89 mmol), 및 HATU (1.127 g, 2.96 mmol)를 DMF 중에서 함께 첨가하고 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 용액을 55 g C-18 RP 칼럼 상에 직접 로딩하고 칼럼 크로마토그래피 5-80% MeCN/물에 로딩하였다. 샘플을 로딩하는데 필요한 다량의 MeOH로 인해 불량한 피크 형상이 관찰되었다. 목적하는 피크의 감소된 부피를 칼럼에 재로딩하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피 5-80% MeCN/물에 의해 또 한번 정제하였다. 수율: 300 mg (19% 수율).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.65 - 1.79 (m, 1 H) 1.82 - 1.95 (m, 1 H) 2.07 - 2.17 (m, 2 H) 3.14 - 3.26 (m, 2 H) 3.36 - 3.44 (m, 4 H) 3.46 - 3.56 (m, 8 H) 3.57 - 3.62 (m, 2 H) 3.68 (d, *J*=5.81 Hz, 2 H) 3.91 - 4.04 (m, 1 H) 5.03 (d, *J*=2.27 Hz, 2 H) 6.77 (br. s., 1 H) 7.23 - 7.34 (m, 2 H) 7.34 - 7.39 (m, 4 H) 7.55 (d, *J*=7.58 Hz, 1 H) 7.82 (t, *J*=5.56 Hz, 1 H) 8.16 (t, *J*=5.68 Hz, 1 H); HRMS 계산치 (C₂₃H₃₅N₇O₈): 537.2547 관찰치: (M+1) 538.2623.

[0316]

[0317] ZQ-NH-(PEG)₃N₃



[0318]

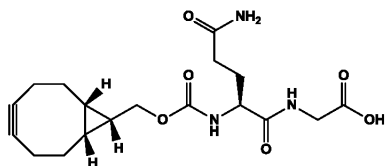
[0319] 시판되는 NH₂-(PEG)₃-N₃ (0.087 mL, 0.318 mmol), 휘니그 염기(Huenig's Base) (0.069 mL, 0.398 mmol), 및 시판되는 ZQ-NHS (100 mg, 0.265 mmol)를 DMSO에서 합하고 16시간 동안 실온에서 혼합하였다. 반응물을 35 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 10-75% MeCN/H₂O로 정제하였다. 수율: 90 mg (70% 수율).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.62 - 1.75 (m, 1 H) 1.77 - 1.91 (m, 1 H) 2.08 (dt, $J=9.14, 5.88$ Hz, 2 H) 3.11 - 3.27 (m, 2 H) 3.35 - 3.43 (m, 4 H) 3.48 - 3.56 (m, 8 H) 3.57 - 3.62 (m, 2 H) 3.94 (td, $J=8.31, 5.38$ Hz, 1 H) 5.01 (s, 2 H) 6.73 (br. s., 1 H) 7.23 (br. s., 1 H) 7.28 - 7.41 (m, 6 H) 7.88 (t, $J=5.62$ Hz, 1 H); HRMS 계산치 ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_7$): 480.2332 관찰치: (M+1) 481.2440.

[0320]

[0321]

시클로옥틴-시클로프로필- $\text{CH}_2\text{-OC(O)NH-Q-G}$



[0322]

[0323]

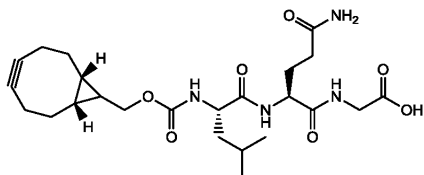
시판되는 QG (92 mg, 0.316 mmol) 및 휘니그 염기 (64.5 μL , 0.369 mmol)를 2 mL의 1:1 물:DMSO에 용해시키고 35°C로 가온하였다. 시판되는 클릭-이지(Click-easy)TM BCN *N*-히드록시숙신이미드 에스테르 I (50 mg, 0.246 mmol)를 2 mL의 DMSO에 용해시키고 반응물에 서서히 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 40°C에서 혼합하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (20 g C-18, 0-70 MeCN/물). 생성물을 약 50% MeCN으로 용리하였다. 수율: 46 mg (49% 수율).

[0324]

[0325]

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.87 (t, $J=9.66$ Hz, 2 H) 1.27 (quin, $J=8.53$ Hz, 1 H) 1.52 (d, $J=10.88$ Hz, 2 H) 1.62 - 1.75 (m, 1 H) 1.81 - 1.95 (m, 1 H) 2.04 - 2.25 (m, 8 H) 3.14 (br. s., 1 H) 3.49 - 3.73 (m, 2 H) 3.89 - 3.99 (m, 1 H) 4.05 (d, $J=7.95$ Hz, 2 H) 6.72 (br. s., 1 H) 7.21 - 7.31 (m, 2 H) 7.88 (br. s., 1 H); HRMS 계산치 ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$): 379.1743 관찰치: (M+1) 380.1811.

시클로옥틴-시클로프로필- $\text{CH}_2\text{-OC(O)NH-L-Q-G}$



[0326]

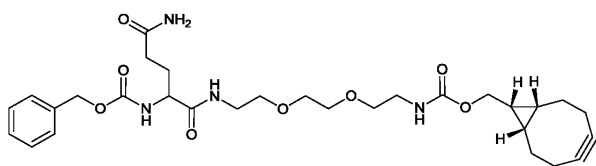
[0327]

류신-글루타민-글리신 펩티드를 펩티드 합성장치를 사용하여 제조하였다. 합성장치를 류신-글루타민-글리신 서열용으로 프로그래밍하였다. 수지를 회수하고 펩티드를 TFA로 제거하였다. 용액을 에테르 (냉)에 서서히 첨가하고 생성물을 침전시켰다. 용액을 원심분리하고 에테르를 경사(decant)시켰다. 고체를 물에 용해시키고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (35 g RP C-18 칼럼). 생성물을 100% 물로 용리시켰다 (84% 수율로).

[0328]

류신 글루타민 글리신 펩티드 (30 mg, 0.07 mmol), 휘니그 염기 (0.030 mL, 0.174 mmol), 및 시판되는 클릭-이지TM BCN *N*-히드록시숙신이미드 에스테르 I (20 mg, 0.070 mmol)를 DMF에서 합하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응물을 20 g C-18 칼럼 (0-20% MeCN/물)에 직접 로딩하고 10 CV 상에서 정제하여 20 mg (58% 수율)의 생성물을 수득하였다. HRMS 계산치 ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_7$): 492.2584 관찰치: (M+1) 493.2682.

[0329] Z-Q-NH-(PEG)₂-NHC(O)O-CH₂-시클로프로필시클로옥틴



[0330]

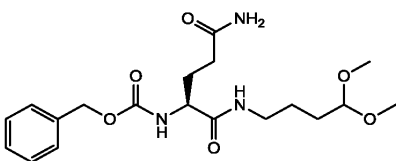
[0331] DMSO 중의 시판 BocNH-(PEG)₃-아민 (0.308 mL, 0.994 mmol)을 시판되는 ZQ-NHS (250 mg, 0.663 mmol)에 첨가하고 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응물을 30 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 정제하였다 (0-50% MeCN/물). 생성물을 45% MeCN에서 용리시켰다. 용매를 제거하여 백색 잔류물 (200 mg, 59.1% 수율)을 수득하였다. LCMS 계산치 (C₂₁H₃₂N₆O₇): 510.27 관찰치: (M+1) 511.4.

[0332] Boc-보호 생성물 (200 mg, 0.392 mmol)을 TFA (3 mL, 38.9 mmol)로 처리하고 10분 동안 실온에서 진탕하였다. 반응물을 밤새 고진공 상에서 건조시키고 조 ZQ-NH-(PEG)₂-NH₂를 그 다음 반응에서 직접 사용하였다. 휘니그 염기 (2 mL, 11.45 mmol)를 1 mL의 DMSO 중 ZQ-NH-(PEG)₂-NH₂ (150 mg, 0.365 mmol)에 첨가하였다. 그 다음에 시판되는 BCN-NHS (106 mg, 0.365 mmol)를 첨가하고 반응물을 수시간 동안 교반하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (35 g C-18 칼럼 15-75% MeCN/물). 생성물을 DMSO 피크 하에서 뿐만 아니라 ~60% MeCN에서 용리시켰다. 분획을 합하고 10 mL로 농축하였다. 20-50% MeCN/물에서 제2 칼럼을 시행하였다. 생성물을 45% MeCN에서 용리시켰다. 용매를 감압 하에 제거하여 50 mg (23% 수율)의 생성물을 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.78 - 0.91 (m, 2 H) 1.26 (quin, *J*=8.53 Hz, 1 H) 1.41 - 1.59 (m, 2 H) 1.62 - 1.75 (m, 1 H) 1.77 - 1.90 (m, 1 H) 1.95 - 2.30 (m, 8 H) 3.11 (q, *J*=5.95 Hz, 2 H) 3.20 (td, *J*=12.87, 6.66 Hz, 2 H) 3.36 - 3.42 (m, 4 H) 3.49 (s, 4 H) 3.88 - 3.98 (m, 1 H) 4.02 (d, *J*=8.07 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 6.73 (br. s., 1 H) 7.07 (t, *J*=5.44 Hz, 1 H) 7.23 (br. s., 1 H) 7.29 - 7.37 (m, 6 H) 7.88 (t, *J*=5.62 Hz, 1 H). HRMS 계산치(C₃₀H₄₂N₄O₈): 586.3003 관찰치: (M+1) 587.3092.

[0333]

[0334] Z-Q-NH-(CH₂)₃-디메틸아세탈



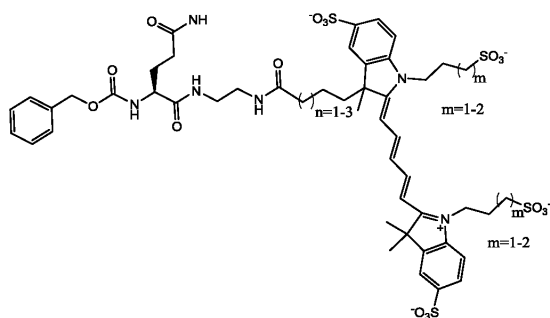
[0335]

[0336] ZQNHS (100 mg, 0.265 mmol), 4,4-디메톡시부탄-1-아민 (0.049 mL, 0.292 mmol), 및 휘니그 염기 (0.046 mL, 0.265 mmol)를 DMF에 용해시키고 1시간 동안 실온에서 혼합하였다. 반응물을 35 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 정제하였다 (0-40% MeCN/H₂O). 용매를 감압 하에 제거하여 50 mg (48% 수율)의 생성물을 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.30 - 1.43 (m, 2 H) 1.43 - 1.54 (m, 2 H) 1.58 - 1.75 (m, 1 H) 1.76 - 1.89 (m, 1 H) 2.01 - 2.16 (m, 2 H) 3.04 (dt, *J*=12.57, 6.47 Hz, 2 H) 3.19 (s, 6 H) 3.89 (td, *J*=8.46, 5.31 Hz, 1 H) 4.32 (t, *J*=5.56 Hz, 1 H) 5.00 (s, 2 H) 6.76 (br. s., 1 H) 7.26 (br. s., 1 H) 7.28 - 7.42 (m, 6 H) 7.86 (t, *J*=5.68 Hz, 1 H) LCMS 계산치 (C₁₉H₂₉N₃O₆): 395.21 관찰치: (M+1) 396.5.

[0337]

[0338] Z-Q-NH-(CH₂)₂-NH-C(O)-CH₂-알렉사플루오르647

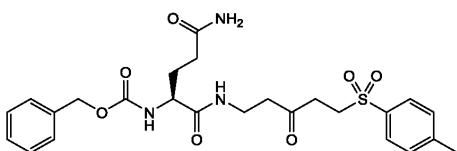


[0339]

[0340] 시판되는 ZQ-NHS (286 mg, 0.758 mmol), 휘니그 염기 (0.5 mL, 2.86 mmol) 및 tert-부틸 (2-아미노에틸)카르바메이트 (0.3 mL, 1.498 mmol)를 DCM에서 합하고 초음파처리하였다. 용액을 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 DCM으로 세척한 후에 증발시켰다. 잔류물을 MeOH/DCM 1:10에 용해시키고, HCO₃ 포획 및 방출 칼럼에 통과시켜 산 부산물을 제거하였다. 생성된 생성물을 15 mL의 DCM 중 TFA (1 mL, 12.98 mmol)로 처리하였다. 반응물을 30분 동안 혼합한 다음에 회전증발기 상에서 증발시켰다. 잔류물을 MeOH/DCM 1:10에 용해시키고 HCO₃ 포획 및 방출 칼럼에 통과시켜 산 부산물을 제거하였다. 용매를 제거하여 300 mg (91% 수율)의 생성물을 수득하였다.

[0341] 생성된 아민 링커 (5.1 mg, 0.016 mmol)를 DMSO (0.5 mL)에 용해시키고 휘니그 염기 (3.66 μ l, 0.021 mmol)에 이어서 알렉스플루오르647 (5 mg, 5.24 μ mol)을 첨가하였다. 반응물을 X 동안 실온에서 교반하였다. 반응물을 35 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 칼럼 크로마토그래피 정제하였다 (5-35% MeCN/물). 생성물을 ~10% MeCN으로 용리시켰다. 생성물을 동결건조시켜 짙은 자주색 분말을 수득하였다. 수율: 3.5 mg (57% 수율). HRMS 계산치 (C₅₁H₆₇N₆O₁₇S₄⁺): 질량 기대치: 1163.34 질량 관찰치: M+1, 1164.

[0342] Z-Q-NH-(CH₂)₂-C(O)-(CH₂)₂-SO₂-톨(Tol)



[0343]

[0344] 3-((tert-부톡시카르보닐)아미노)프로판산 (2 g), HATU (4.42 g), 휘니그 염기 (4.62 mL) 및 N,O-디메틸히드록실아민 히드로클로라이드 (1.134 g)를 DCM에서 합하고 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응물을 물에 붓고 유기물을 추출하였다. 유기 층을 증발시켜 조 황색 오일을 수득하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (50 g C-18, 10-70% MeCN/물). 분획을 수집하고 농축하여 황색 오일을 수득하였다. 수율: 1.3 g, 53% 수율. 기대 질량: 232, 관측치 M+1: 233.

[0345] tert-부틸 (3-(메톡시(메틸)아미노)-3-옥소프로필)카르바메이트 (1.3 g, 5.60 mmol)를 무수 THF에 용해시키고 플라스크를 질소로 퍼징하였다. 용액을 0°C로 냉각한 다음에 THF 중 비닐마그네슘 브로마이드 (20 mL, 20.00 mmol)를 서서히 첨가하였다. 반응물을 실온 ON으로 가온하였다. 반응물을 냉 포화 NH₄Cl에 붓고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기물을 건조시키고 용매를 회전 증발기 상에서 제거하였다. 조 물질을 계속하여 행하였다.

[0346] tert-부틸 (3-옥소펜트-4-엔-1-일)카르바메이트 및 4-메틸벤젠티올을 MeOH에서 합하고 3일 동안 실온에서 교반하였다. 메탄올을 회전 증발기에 의해 제거하여 농후한 오일상 황색 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 DCM에 용해시키고 물 2x로 세척하였다. 유기 층을 건조시키고 용매를 회전 증발기 상에서 제거하여 황색 오일을 수득하였다. 이 생성물 (1 g, 3.09 mmol)을 DCM에 용해시키고 0°C로 냉각하였다. TFA (3 mL, 38.9 mmol)를 서서히 첨가한 다음에 실온으로 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하고 잔류물을 DCM에 용해시키고 카르보네이트 포획 및 방출 칼럼에 이어서 카르복실산 포획 및 방출 칼럼에 통과시켰다. 생성물은 둘 다를 거쳤다. 칼럼을 세척하고, 용매를 합한 다음에 용매를 회전증발기에 의해. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제

하였다 (50 g C-18 10-70% MeCN/물). 생성물을 수집하고 용매를 증발에 의해 제거하여 황색 오일을 수득하였다. 생성물을 수집하고 용매를 증발에 의해 제거하여 황색 오일을 수득하였다. 생성물을 임의의 추가 정제 없이 계속하여 행하였다. 850 mg, 정량적 수율.

[0347]

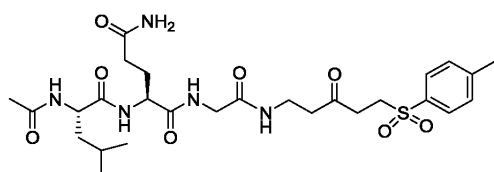
1-아미노-5-(p-톨릴티오)펜탄-3-온 (100 mg, 0.448 mmol) 및 휘니그 염기 (0.130 mL, 0.746 mmol)를 DMF에 용해시킨 다음에 시판되는 ZQ-NHS (141 mg, 0.373 mmol)를 첨가하고 실온에서 혼합하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (25 g C-18 칼럼 10-75% MeCN/물). 생성물을 수집하고 유기물을 회전 증발기에 의해 증발시켰다. MeOH를 물 중 술폰드 링커에 첨가하였다. 옥손 (229 mg, 0.373 mmol)을 첨가하고 반응물을 RT ON에서 교반하였다. 반응물을 여과하고 칼럼 크로마토그래피 (25 g C-18 칼럼 10-75% MeCN/물)에 의해 정제하고 생성물을 동결건조시켜 75 mg (39% 수율)을 얻었다.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.59 - 1.72 (m, 1 H) 1.75 - 1.89 (m, 1 H) 2.06 (dt, $J=8.99$, 5.90 Hz, 1 H) 2.42 (s, 3 H) 2.60 (t, $J=6.60$ Hz, 2 H) 2.77 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 3.11 - 3.26 (m, 2 H) 3.39 - 3.48 (m, 2 H) 3.86 (td, $J=8.28$, 5.32 Hz, 1 H) 5.01 (d, $J=1.83$ Hz, 3 H) 6.74 (br. s., 1 H) 7.23 (br. s., 1 H) 7.28 - 7.42 (m, 6 H) 7.47 (d, $J=8.19$ Hz, 2 H) 7.78 (d, $J=8.19$ Hz, 2 H) 7.83 (t, $J=5.50$ Hz, 1 H). HRMS 계산치 ($\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$): 질량 기대치: 517.1883 질량 관찰치: M+1, 518.1974.

[0348]

[0349]

Ac-L-Q-G-NH-(CH_2)₂-C(O)-(CH_2)₂-SO₂-톨



[0350]

[0351]

1-아미노-5-(p-톨릴티오)펜탄-3-온을 Z-Q-NH-(CH_2)₂-C(O)-(CH_2)₂-SO₂-톨의 합성에서 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. LQG를 시클로옥탄-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G의 합성에서 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. LQG (27 mg, 0.085 mmol), Ac20 (9.66 μ l, 0.102 mmol) 및 휘니그 염기 (0.045 mL, 0.256 mmol)를 DCM에서 합하고 수시간 동안 실온에서 교반함으로써 LQG를 N-말단에서 아세틸화하였다. 용매를 증발시키고 물을 첨가하였다. 생성물을 동결건조시키고 그 다음 반응에서 직접 사용하였다. LCMS 관찰 질량: (M+1) 359.2; 목적 질량: 358.4

[0352]

Ac-LQG (38 mg, 0.106 mmol), 1-아미노-5-(p-톨릴티오)펜탄-3-온 (47.4 mg, 0.212 mmol), 및 휘니그 염기 (0.074 mL, 0.424 mmol)를 DMF에서 합하였다. HATU (40.3 mg, 0.106 mmol)를 첨가하고 반응물을 실온 ON에서 교반하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 (35 g C-18 칼럼 10-50% MeCN/물) 수득하였다.

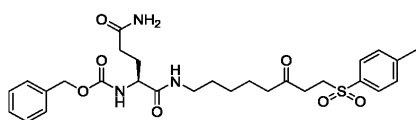
[0353]

술폰드 (13.5 mg, 0.024 mmol)를 1:1 물:MeOH에 용해시켰다. 옥손 (44.2 mg, 0.072 mmol)을 첨가하고 반응물을 실온 ON에서 교반하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (25 g C-18 칼럼 10-60% MeCN/물).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.85 (dd, $J=16.08$, 6.54 Hz, 6 H) 1.36 - 1.45 (m, 2 H) 1.59 (dt, $J=13.27$, 6.57 Hz, 1 H) 1.69 - 1.79 (m, 1 H) 1.83 (s, 3 H) 2.00 - 2.14 (m, 2 H) 2.41 (s, 3 H) 2.57 - 2.64 (m, 2 H) 2.75 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 3.18 (q, $J=6.52$ Hz, 1 H) 3.27 (s, 2 H) 3.41 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 3.59 (dd, $J=5.75$, 3.18 Hz, 2 H) 4.07 - 4.17 (m, 1 H) 4.21 - 4.30 (m, 1 H) 6.74 (br. s., 1 H) 7.24 (br. s., 1 H) 7.46 (d, $J=7.95$ Hz, 2 H) 7.68 (t, $J=5.50$ Hz, 1 H) 7.76 (d, $J=8.31$ Hz, 2 H) 7.93 - 8.05 (m, 2 H) 8.11 (d, $J=7.09$ Hz, 1 H) HRMS 계산치 ($\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$) 목적 질량: 595.2676 관찰 질량: (M+1) 596.2755.

[0354]

[0355] Z-Q-NH-(CH₂)₄-C(O)-(CH₂)₂-SO₂-톨



[0356]

[0357] 6-((tert-부톡시카르보닐)아미노)헥산산 (1 g, 4.32 mmol)을 DCM에 용해시킨 다음에 N,O-디메틸히드록실아민 히드로클로라이드 (0.464 g, 4.76 mmol), HATU (1.808 g, 4.76 mmol), 및 TEA (0.723 mL, 5.19 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 수시간 동안 실온에서 교반하고, 반응이 완료되지 않았으므로, 추가의 아민, HATU, 및 TEA를 첨가하였다. 반응물을 16시간 교반하였다. 반응물을 여과하고 용매를 증발시켰다. 에테르를 첨가하고 반응물을 다시 여과하였다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 (25 g 칼럼 0-45% EtOAc/Hep) 385 mg (32.5% 수율)을 얻었다.

[0358]

Tert-부틸 (6-(메톡시(메틸)아미노)-6-옥소헥실)카르바메이트 (385 mg, 1.403 mmol)를 무수 THF에 용해시키고 0℃로 냉각하였다. 비닐마그네슘 브로마이드 (4.210 mL, 4.21 mmol)를 서서히 첨가하였다. 반응물을 밤새 실온으로 가온하였다. 반응물을 포화 NH₄Cl에 붓고 유기물을 EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고 증발시켰다. 생성물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 (선파이어(Sunfire) RP HPLC 10-40% MeCN/물 0.1% TFA, 226 nm UV에서 10분에 걸쳐) 280 mg (83% 수율)을 수득하였다.

[0359]

Tert-부틸 (6-옥소옥트-7-엔-1-일)카르바메이트 (280 mg, 1.160 mmol) 및 4-메틸벤젠티올 (173 mg, 1.392 mmol)을 MeOH에 용해시키고 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 메탄올을 제거하고 생성물을 크로마토그래피에 의해 정제하여 (25 g 칼럼 0-30% EtOAc/Hep) 160 mg (38% 수율)을 수득하였다.

[0360]

Tert-부틸 (6-옥소-8-(p-톨릴티오)옥틸)카르바메이트 (160 mg, 0.438 mmol) 및 옥손 (807 mg, 1.313 mmol)을 MeOH/물 50/50에 함께 합하고 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응물을 물에 붓고 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 증발에 의해 건조시키고 디옥산 중 4몰 HCl을 첨가하고 수시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 증발에 의해 제거하여 회백색 잔기를 수득하였다. 생성물을 선파이어 RP HPLC (10-40% MeCN/물 0.1% TFA)에 의해 정제하여 33 mg (25% 수율)을 수득하였다.

[0361]

8-아미노-1-토실옥탄-3-온 (20 mg, 0.067 mmol) 및 시판되는 ZQNHS (23.07 mg, 0.061 mmol)를 DMSO에서 합하고 1시간 동안 37℃에서 혼합하였다. 반응이 완료되지 않았고 어떤 진전도 수시간 후에 관찰되지 않았다. 휘니그 염기 (5.34 μl, 0.031 mmol)를 첨가하고 반응을 진전시켰다. 반응물을 칼럼 (6 g C-18 0-75% MeCN/물)에 직접 로딩하여 정제하였다. 칼럼을 2회 시행하여 2.4 mg (7% 수율)을 얻었다.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.17 (q, *J*=7.58 Hz, 2 H) 1.28 - 1.44

(m, 4 H) 1.61 - 1.75 (m, 1 H) 1.77 - 1.90 (m, 1 H) 2.00 - 2.16 (m, 2 H) 2.37 - 2.43

(m, 5 H) 2.74 (t, *J*=7.34 Hz, 2 H) 2.92 - 3.08 (m, 2 H) 3.43 (t, *J*=7.34 Hz, 2 H) 3.90

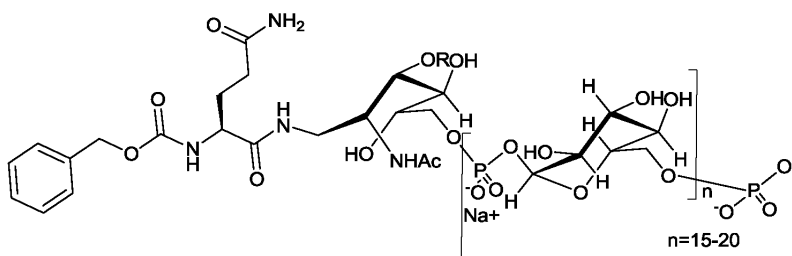
(td, *J*=8.31, 5.50 Hz, 1 H) 5.01 (s, 2 H) 6.74 (br. s., 1H) 7.25 (br. s., 1 H) 7.28 - 7.40

(m, 6 H) 7.46 (d, *J*=7.82 Hz, 2 H) 7.77 (d, *J*=8.31 Hz, 2 H) 7.78 - 7.84 (m, 1 H).

HRMS 계산치 (C₂₈H₃₇N₃O₇S): 559.2352 관찰치: (M+1) 560.2426.

[0362]

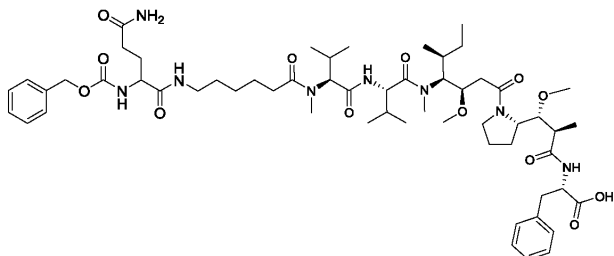
[0363] Z-Q-NH-MenA 다당류



[0364]

[0365] 아민 관능화된 MenA 항원 다당류 (10 mg)를 DMSO와 염기 중에 시판되는 ZQNHS (10 mg 26.4 μmol)에 첨가하고 수시간 동안 교반하였다. 반응물을 동결건조시키고, 물에 용해시키고, 10 KD 아미콘(Amicon) 필터 4x에 의해 정제하였다. 그 다음에 통과액(flow through)을 3 KD 아미콘에 통과시켜 추가 생성물을 회수하였다. 이를 ~50%의 예상 수율을 갖는 조물질에 대해 계속하여 행하였다.

[0366] Z-Q-NH-(CH₂)₅-C(O)-모노메틸아우리스타틴 F



[0367]

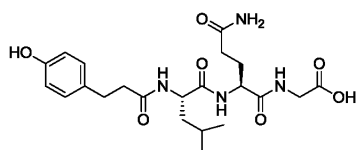
[0368] 6-((tert-부톡시카르보닐)아미노)헥산산 (46.5 mg, 0.201 mmol)을 DMSO (1 mL)에 용해시키고 휘니그 염기 (0.08 mL, 0.458 mmol) 및 HATU (76 mg, 0.201 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 30분 동안 실온에서 교반한 후에 반응 혼합물을 MMAF (50 mg, 0.067 mmol)에 첨가하였다. 그 다음에 반응물을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 35 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다 (5-75% MeCN/물 0.1% 포름산). 용매를 회전 증발기 상에서 제거하고 밤새 고 진공에 배치하였다.

[0369] 생성된 생성물을 0°C에서 TFA (2 mL)로 처리하고 실온으로 이끌어 5분 동안 교반하였다. 반응물을 35 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 칼럼 정제하였다. 용매를 감압 하에 제거하여 30 mg (52% 수율)을 수득하였다.

[0370] 탈보호된 아민 (20 mg, 0.023 mmol)을 THF에 용해시킨 다음에 LiOH (1 mL, 4.00 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 30분 동안 실온에서 교반한 다음에 칼럼 (35 g C-18 칼럼)에 직접 로딩하여 정제하였다 (0% MeCN에 이어서 20-40% MeCN/물). 생성물을 THF로 용리시키고 칼럼을 상기 조건 하에 재시행하여 10 mg을 51% 수율로 수득하였다.

[0371] 생성된 생성물 (5 mg, 5.92 μmol)을 DMSO에 용해시키고, 시판되는 ZQNHS (4.4 mg, 0.012 mmol)에 첨가하고, 20분 동안 37°C에서 교반하였다. 반응 혼합물을 25 g C-18 칼럼에 직접 로딩하여 칼럼 크로마토그래피 정제하였다 (20-75% MeCN/물). 용매를 감압 하에 제거하여 3 mg을 46% 수율로 수득하였다. LCMS 계산치 (C₂₁H₃₂N₆O₇): 1106.6627 관찰치: (M+1) 1107.9.

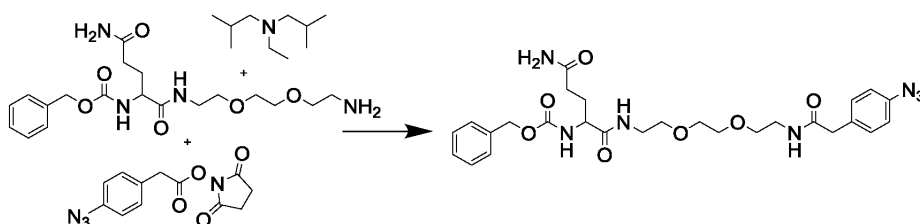
[0372] 페놀-(CH₂)₂-C(O)-L-Q-G



[0373]

[0374] LQG를 상기 "시클로옥탄-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G의 합성"에 기재된 바와 같이 제조하였다. 시판되는 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 3-(4-히드록시페닐)프로파노에이트 (14.65 mg, 55.6 μmol)를 LQG (16 mg, 50.6 μmol)에 DMSO와 휘니그 염기 (18 μL , 101 μmol) 중에 첨가하고 반응물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응물을 20 g 칼럼에 직접 로딩하여 정제하여 (10-50% MeCN/물) 13 mg의 생성물을 55% 수율로 수득하였다. HRMS 계산치 (C₂₁H₃₂N₆O₇): 464.2271 관찰치: (M+1) 465.2356.

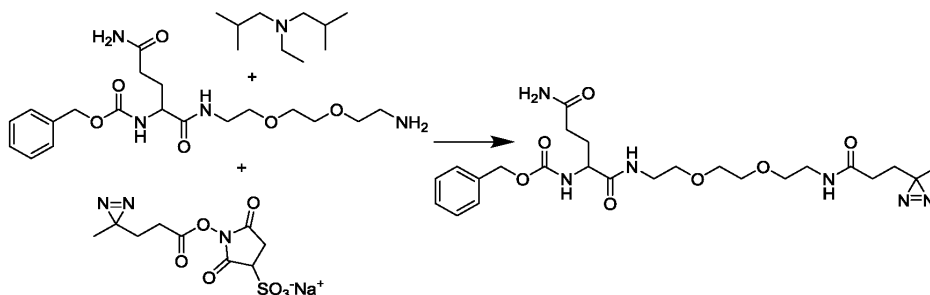
[0375] ZQ(PEG)₂아지도벤질아미드



[0376]

[0377] 4-아지도페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (캠퍼시픽(ChemPacific), 26.7 mg, 0.073 mmol)를 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 혼합하였다. DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합하고 이 시점에서 DIPEA (61 μ L, 6 eq.) 및 4-아지도페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (9 mg, 0.024 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 2일 동안 실온에서 혼합하였다. 4-아지도페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (89 mg, 0.24 mmol)를 첨가하고 반응물을 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제하였다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 μ m 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, A: 물 (0.1% 포름산); B: ACN 구배 0분 5% B; 1.70분 내 5%에서 95% B; 2.0분 95% B; 2.1분 5% B 유량 2 ml/분 1.5 ml 주입; 튜브 트리거(Tube Trigger) M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시켜 3.6 mg의 담황색 분말 (13%)의 ZQ(PEG)₂아지도-벤질아미드 (벤질 (17-아미노-1-(4-아지도페닐)-2,13,17-트리옥소-6,9-디옥사-3,12-디아자헵타데칸-14-일)카르바메이트)를 수득하였다. LCMS SQ2; 생성물 분석-산성; R_t = 1.79; MS [M+H]⁺ 관찰치: 570.3, 계산치: 569.6.

[0378] ZQ(PEG)₂아미도에틸메틸디아지린



[0379]

[0380] 술포-NHS-디아지린 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 23.92 mg, 0.073 mmol)을 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 혼합하였다. 반응물을 교반하여 합하고 DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 2시간 동안 실온에서 교반하고 이 시점에서 반응물이 탁해졌고 0.5 mL DMF를 첨가하였다. 반응물을 추가 2시간 동안 교반하고 DIPEA (61 μ L) 및 술포-NHS-디아지린 (8 mg)을 첨가하였다. 반응물을 16 시간 동안 실온에서 혼합하고 이 시점에서 출발 물질의 소모를 LCMS 분석에 의해 관찰하였다. 용액을 MH-유발 HPLC를 통해 정제하였다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 μ m 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 521). 목적 생성물을 갖는 분획, ZQ(PEG)₂아미도에틸메틸디아지린 (벤질 (18-아미노-1-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)-3,14,18-트리옥소-7,10-디옥사-4,13-디아자옥타데칸-15-일)카르바메이트)을 모으고 동결건조시켜 2 mg의 목적 화합물을 백색 분말 (8%)로서 수득하였다. LCMS SQ2; 생성물 분석-산성; R_t = 1.49; MS [M+H]⁺ 관찰치: 521.4, 계산치: 520.6.

[0381] 2-(((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)카르보닐)-2-운데실트리데칸디오산



[0382]

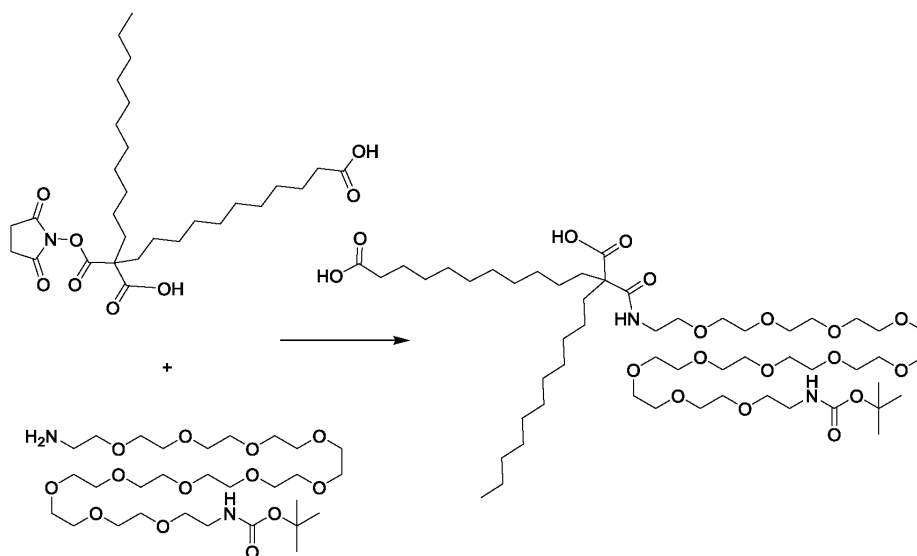
[0383] DCM (1.57 mL) 중 DCC (126 mg, 0.610 mmol)의 용액을 N2 하에 DCM (5 mL) 및 THF (5 mL) 중의 중간체 4 및 N-히드록시숙신이미드의 용액에 첨가하였다. 3.5 시간 후에, 용매를 증발시키고 잔류물을 초임계 액체 크로마토그래피에 의해 정제하여 (SFC; 프린스턴(Princeton) 2-에틸-피리딘, 20x150 mm, 20-30% MeOH / CO₂), 표제 화합물을 무색 오일 (138 mg, 0.256 mmol, 50%)로서 수득하였다: LCMS 방법 B Rt = 1.21 분, M+H 540.5;

¹H NMR (600

MHz, 아세토니트릴-*d*3) δ ppm 0.91 (t, *J*=7.20 Hz, 3 H) 1.22 - 1.42 (m, 34 H)

1.57 (quin, *J*=7.34 Hz, 2 H) 1.93 - 1.96 (m, 2 H) 2.28 (t, *J*=7.47 Hz, 2 H) 2.79 (br. d, *J*=6.30 Hz, 4 H).

[0384]



[0385]

[0386] 2-((2,2-디메틸-4-옥소-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-도데카옥사-5-아자테트라콘탄-40-일)카르바모일)-2-운데실트리데칸디오산.

[0387] t-Boc-N-아미도-dPEG₁₁-아민 (100 mg, 0.155 mmol, 쿼타 바이오디자인(Quanta Biodesign)) 및 2-(((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)카르보닐)-2-운데실트리데칸디오산 (80 mg, 0.148 mmol)을 THF (3 mL)에 용해시키고 질소 하에 실온에서 교반하였다. 30분 후에, DIPEA (0.05 mL, 0.286 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 완전 전환을 LCMS에 의해 관찰하였다 (산성 용리액 A: 물 + 0.05% 트리플루오로아세트산, 용리액 B: ACN, 칼럼 선파이어 C18 3.5 μm 3.0x30 mm - 40°C, 5-95% 구배 2분, 체류 시간 1.92분). 반응 혼합물을 감압 하에 농축한 다음에, 약 1.5 mL의 아세토니트릴에 용해시켰다. MS-유발 HPLC (선파이어 30x50 mm 5 μm 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, 65-95% ACN 3.5분 구배, 체류 시간 3.23분) 상에서 정제하고 분획을 모으고 동결건조시켜 85 mg의 순수한 생성물(clean product)을 54% 수율로 수득하였다. 투명한 오일. LCMS: SQ4, RXNMON-산성-비극성 Rt= 1.18분, M+H 1079.1;

^1H NMR (400 MHz, 아세토니트릴- d_3) δ ppm 0.82 - 1.03 (m, 1 H)

1.11 - 1.37 (m, 10 H) 1.37 - 1.51 (m, 2 H) 1.51 - 1.64 (m, 1 H) 1.69 - 1.82 (m, 1 H)

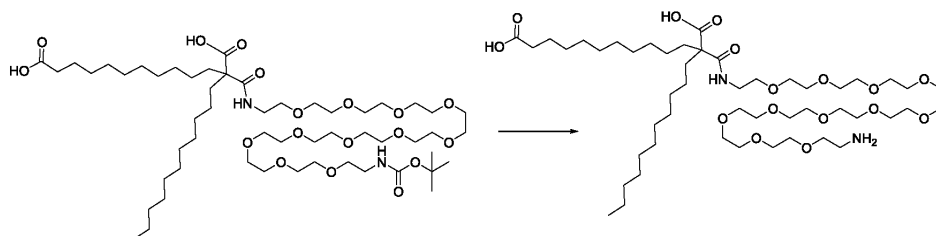
1.90 - 2.04 (m, 66 H) 2.05 - 2.21 (m, 8 H) 2.21 - 2.42 (m, 1 H) 3.17 - 3.28 (m, 1 H)

3.40 - 3.68 (m, 13 H).

[0388]

[0389]

2-((35-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-운데카옥사헵타트리아콘틸)카르바모일)-2-운데실트리테칸디오산



[0390]

[0391]

2-((2,2-디메틸-4-옥소-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-도데카옥사-5-아자테트라콘탄-40-일)카르바모일)-2-운데실트리테칸디오산 (5 mg, 4.68 μmol)을 DCM (부피: 2 mL)에 용해시킨 다음에, 트리플루오로아세트산 (25 μl , 0.324 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 약 2시간 동안 질소 대기 하에 실온에서 교반하였다. 완전 전환을 LCMS에 의해 관찰하였다 (산성 용리액 A: 물 + 0.05% 트리플루오로아세트산, 용리액 B: ACN, 칼럼 선파이어 C18 3.5 μm 3.0x30 mm - 40°C, 5-95% 구배 2분, 체류 시간 1.45분). 반응 혼합물을 감압 하에 농축한 다음에, DCM으로 세정하고 다시 3회 농축하였다. 아세토니트릴과 DMSO의 혼합물에 용해시켰다. MS-유발 HPLC (선파이어 30x50 mm 5 μm 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, 45-70% ACN 3.5분 구배, 체류 시간 2.50분) 상에서 정제하고 분획을 모으고 동결건조시켜 2.5 mg의 순수한 생성물을 55% 수율로 수득하였다. 투명한 오일.

[0392]

LCMS ZQ1 RXNMON_산성 Rt = 1.45분, M+H 969.9;

^1H NMR (400

MHz, 아세토니트릴- d_3) δ ppm 0.62 - 0.91 (m, 2 H) 0.91 - 1.10 (m, 3 H) 1.10 -

1.31 (m, 18 H) 1.46 (quin, $J=7.21$ Hz, 2 H) 1.59 - 1.89 (m, 35 H) 1.94 - 2.09 (m, 1 H)

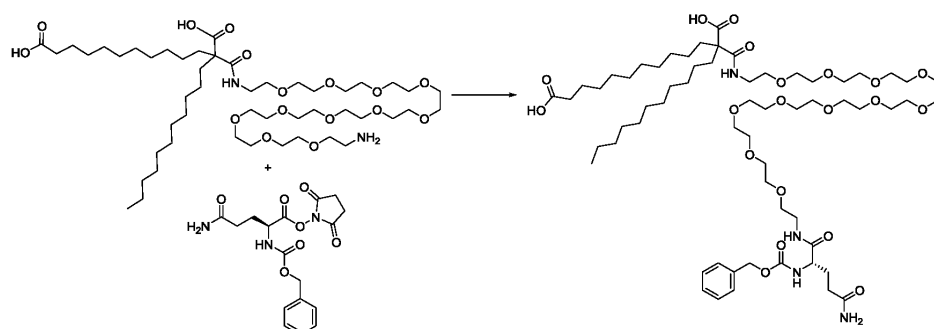
2.16 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 2.97 - 3.11 (m, 1 H) 3.24 - 3.37 (m, 1 H) 3.37 - 3.61 (m, 28

H) 3.61 - 3.89 (m, 2 H) 7.85 (br. s., 1 H).

[0393]

[0394]

2-(((S)-5-(3-아미노-3-옥소프로필)-3,6-디옥소-1-페닐-2,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-도데카옥사-4,7-디아자도테트라콘탄-42-일)카르바모일)-2-운데실트리테칸디오산 (ZQ-FA)



[0395]

[0396]

THF (부피: 2 mL) 중 2-((2,2-디메틸-4-옥소-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-도데카옥사-5-아자테트라콘탄-40-일)카르바모일)-2-운데실트리테칸디오산 (20 mg, 0.018 mmol)의 용액을 Z-L-Gln-Osu (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), CAS 34078-85-8, 11 mg, 0.029 mmol)에 첨가한 다음에, DIPEA (75 μl , 0.429 mmol)를 첨가하였다. 주말에 걸쳐 질소 분위기 하에 실온에서 교반하였다. 완전 전환을 LCMS에 의해 관찰하였다 (산성 용리액 A: 물 + 0.05% 트리플루오로아세트산, 용리액 B: ACN, 칼럼 선파이어 C18 3.5 μm 3.0x30 mm - 40°C, 5-95% 구배 2분, 체류 시간 1.77분). 반응 혼합물을 감압 하에 농축한 다음에 아세토니트릴

에 용해시켰다. MS-유발 HPLC (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, 55-80% ACN 3.5분 구배, 체류 시간 2.70분) 상에서 정제하고 분획을 모으고 동결건조시켜 10.5 mg의 순수한 생성물 ZQ-FA를 46% 수율로 투명한 무색 오일로서 수득하였다.

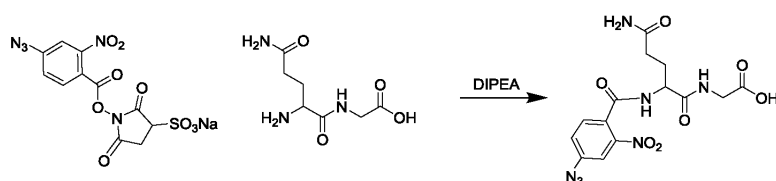
[0397] LCMS SQ4 RXNMON_산성 Rt = 1.60분, M+H 1232.4;

¹H NMR (400

MHz, 아세트니트릴-*d*₃) δ ppm 0.67 - 0.93 (m, 2 H) 0.93 - 1.10 (m, 2 H) 1.10 - 1.32 (m, 15 H) 1.45 (quin, *J*=7.24 Hz, 1 H) 1.59 - 1.69 (m, 1 H) 1.75 - 1.93 (m, 30 H) 1.94 - 2.21 (m, 20 H) 3.23 (quin, *J*=5.26 Hz, 1 H) 3.28 - 3.51 (m, 23 H) 3.95 (td, *J*=7.73, 5.44 Hz, 1 H) 4.92 - 5.22 (m, 1 H) 5.78 (br. s., 1 H) 6.13 - 6.42 (m, 1 H) 6.88 (br. s., 1 H) 7.20 - 7.36 (m, 2 H) 7.42 (t, *J*=5.07 Hz, 1 H).

[0398]

[0399] 아지도-니트로페닐-글루타민-글리신



[0400]

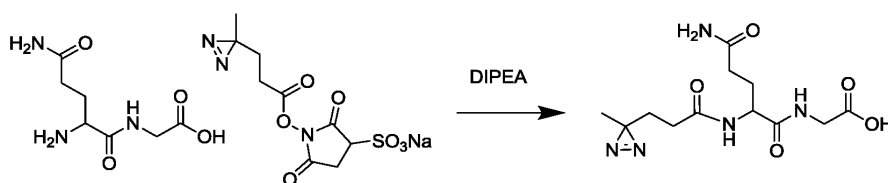
[0401] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 소듐 1-((4-아지도-2-니트로벤조일)옥시)-2,5-디옥소피롤리딘-3-술포네이트 (60.1 mg, 0.148 mmol)를 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 다음에 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, rt=1.53) 목적 생성물을 62% 수율로 수득하였다. LCMS SQ4 RXNMON_산성 Rt = 0.68분, M+H 394.3;

¹H NMR (400 MHz, 메탄올-*d*₄) δ ppm 1H NMR (메탄올 -

d₄, 400MHz): 8.12-8.26 (m, 1H), 7.21-7.40 (m, 2H), 4.60 (dd, *J*=8.3, 5.7 Hz, 1H), 3.83-4.15 (m, 2H), 2.36-2.54 (m, 2H), 2.21 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 2.07 (d, *J*=6.6 Hz, 1H).

[0402]

[0403] 디아지린-QG



[0404]

[0405] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000) 중 소듐 1-((3-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)프로파노일)옥시)-2,5-디옥소피롤리딘-3-술포네이트 (50 mg, 0.153 mmol)에 이어서 DIPEA (0.031 mL, 0.177 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 직접 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 15-20% 구배 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, rt=2.46) 목적 생성물을 52% 수율로 수득하였다. LCMS SQ4 RXNMON_산성 Rt = 0.61분, M+H 314.2;

¹H NMR (400 MHz, 메탄올-*d*₄) δ ppm 1H NMR (메탄올-d₄,

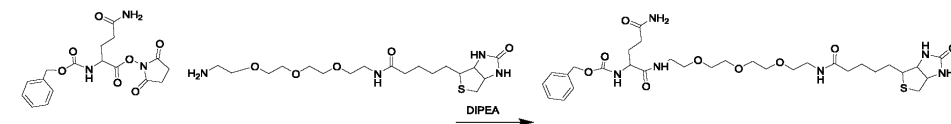
400MHz): 4.39 (dd, *J*=8.3, 5.7 Hz, 1H), 3.76-4.04 (m, 2H), 2.34 (m, 2H), 2.11-2.19 (m, 2H), 2.07-2.11 (m, 1H), 1.89-2.00 (m, 1H), 1.62-1.74 ppm (m, 2H), 1.01 (s, 3H).

[0406]

[0407] ZQ(PEG)₃ 비오틴

[0408]

[0409]



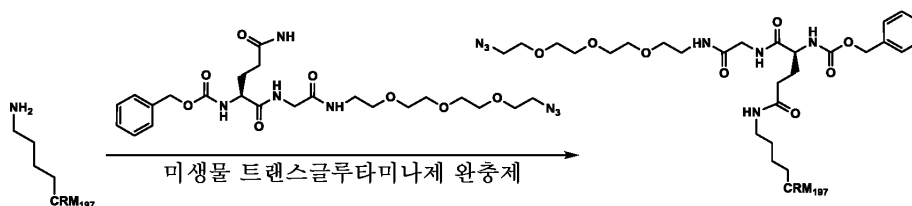
ZQ NHS (45.1 mg, 0.119 mmol), 비오틴 아민 (피어스(Pierce) 카탈로그 번호 21347, 50 mg, 0.119 mmol), 및 DIPEA (23 μ L, 0.131 mmol)를 DMF (2 mL)에서 합하고 2시간 동안 실온에서 교반하고 이 시점에서 LCMS는 대부분 생성물을 나타냈다. 반응물을 HPLC (선파이어 30x50 mm 5 μ m 칼럼 15-20% 구배 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입, r_t =2.46)에 로딩하여 목적 생성물을 43% 수율로 수득하였다. LCMS SQ4 RXNMON_산성 R_t = 0.79 분, M+H 681.4;

¹H NMR (메탄올-d₄, 400MHz): δ = 7.33-7.41 (m, 4H), 7.27-7.33 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.48 (dd, J =7.8, 4.4 Hz, 1H), 4.29 (dd, J =7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.57-3.67 (m, 8H), 3.49-3.57 (m, 4H), 3.34-3.43 (m, 4H), 3.15-3.23 (m, 1H), 2.92 (dd, J =12.8, 5.1 Hz, 1H), 2.70 (d, J =12.8 Hz, 1H), 2.26-2.36 (m, 2H), 2.21 (t, J =7.4 Hz, 2H), 2.04 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.53-1.77 (m, 4H), 1.44 ppm (m, 2H).

[0410]

[0411] CRM₁₉₇로의 변형 화합물의 접합

[0412] Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃



[0413]

[0414]

32 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 1000 μ L의 Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL)에 첨가하고 100 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 30분 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 1.5 CV에 걸쳐 PBS 1x의 러닝 완충제로 SEC를 통해 정제하였다. 링커의 1회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 58929; 관찰치: (M+1) 58930. 수득량: 700 μ g, 68% 수율.

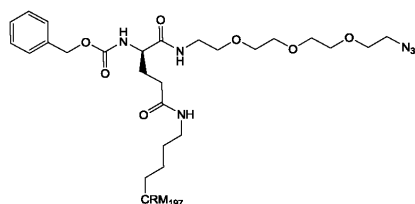
[0416]

32 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 1000 μ L의 Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL)에 첨가하고 100 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 18시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 1.5 CV에 걸쳐 PBS 1x의 러닝 완충제로 SEC를 통해 정제하였다. 링커의 2회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 59450; 관찰치: (M+1) 59451. 수득량: 700 μ g, 68% 수율.

[0417]

32 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 6 아세트산나트륨 완충제 중 1000 μ L의 Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃ (2 mg/mL)에 첨가하고 100 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 3일 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 1.5 CV에 걸쳐 PBS 1x의 러닝 완충제로 SEC를 통해 정제하였다. 링커의 3회 및 4회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 59971, 60492; 관찰치: (M+1) 59972, 60493. 수득량: 700 μ g, 68% 수율.

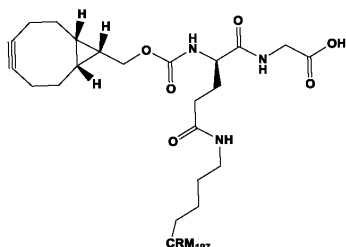
[0418] ZQ-NH-(PEG)₃N₃



[0419]

[0420] 63 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 1800 μ L의 *Z-Q-NH-(PEG)₃-N₃* (2 mg/mL)에 첨가하고 150 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 1.5 CV에 걸쳐 PBS 1x의 러닝 완충제로 SEC를 통해 정제하였다. 링커의 1회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 58872; 관찰치: (M+1) 58875. 수율: 1.3 mg (67%).

[0421] 시클로옥틴-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-Q-G

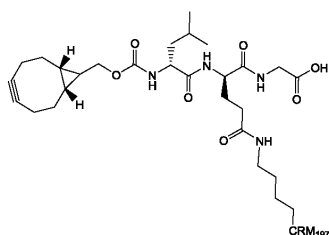


[0422]

[0423] 32 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 1000 μ L의 *시클로옥틴-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-Q-G* (2 mg/mL)에 첨가하고 100 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 3시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 1.5 CV에 걸쳐 PBS 1x의 러닝 완충제로 SEC를 통해 정제하였다.

[0424] 링커의 1회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 58771 관찰치: (M+1) 58771. 수율: 0.475 mg, 50% 수율.

[0425] 시클로옥틴-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G

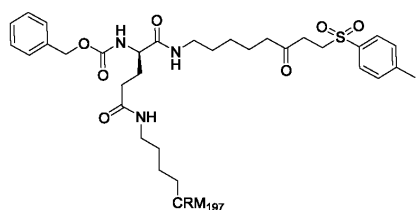


[0426]

[0427] 1 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 30 μ L의 *시클로옥틴-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G* (2 mg/mL)에 첨가하고 3 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 링커의 1회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 58884 관찰치: (M+1) 58885.

[0428] 1 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 30 μ L의 *시클로옥틴-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-L-Q-G* (2 mg/mL)에 첨가하고 3 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 24시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 링커의 2회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 59360 관찰치: (M+1) 59361.

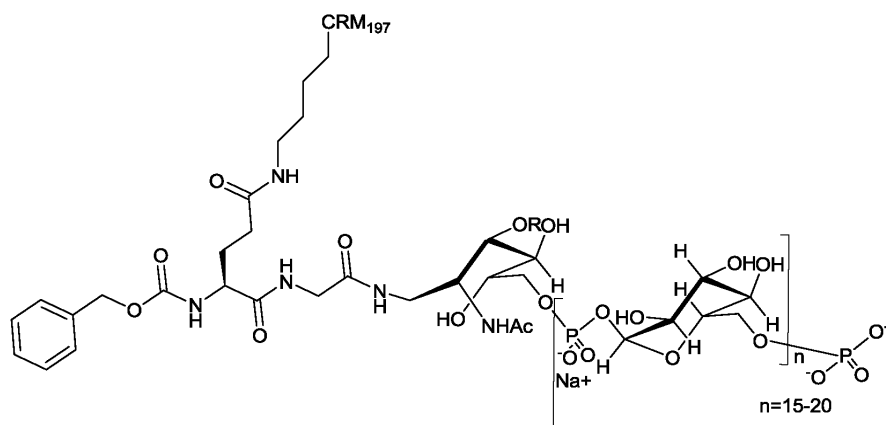
[0438] Z-Q-NH-(CH₂)₄-C(O)-(CH₂)₂-SO₂-톨



[0439]

[0440] 1 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 6 아세트산나트륨 완충제 중 30 μ L의 Z-Q-NH-(CH₂)₄-C(O)-(CH₂)₂-SO₂-톨 (1 mg/mL)에 첨가하고 3 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 3시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 10 kDa 아미콘 필터를 통해 정제하였다. 링커의 1회 첨가를 질량 스펙트럼에 의해 관찰하였다. LCMS 계산치: 58951 관찰치: (M+1) 58953.

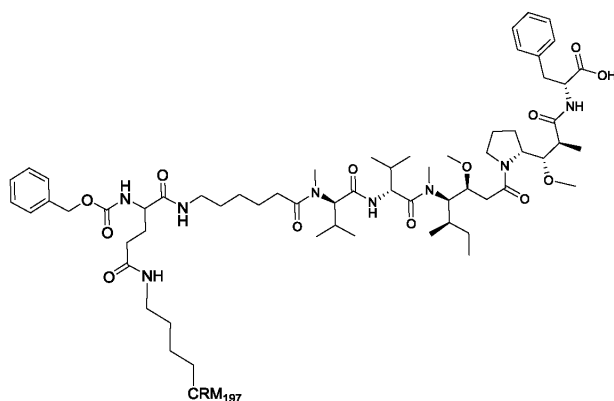
[0441] Z-Q-NH-MenA 다당류



[0442]

[0443] 156 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 5000 μ L의 Z-Q-NH-MenA 다당류 (1 mg/mL)에 첨가하고 488 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로부터 제조된 PBS 1x 중 50 mg/mL 스탁)를 첨가하였다. 반응물을 18시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 반응물을 50 kDa 아미콘 필터를 통해 정제하여 그 결과 2 mg의 생성물 (38% 수율)의 최종 수율을 초래하였다. 생성물은 SDS page (상기 도면의 간단한 설명 단락에서)에 의해 생성물이 다당류의 이질성으로 인해 이질적 혼합물인 것으로 확인되었다.

[0444] Z-Q-NH-(CH₂)₅-C(O)-모노메틸아우리스타틴 F



[0445]

[0446] 50 μ L의 CRM197 (32 mg/mL)을 100 mM pH 8 트리스 완충제 중 1500 μ L의 Z-Q-NH-(CH₂)₅-C(O)-모노메틸아우리스타틴 F (1 mg/mL)에 첨가하고 150 μ L의 미생물 트랜스글루타미나제 (말토시클로텍스트린 중 시판 1% mTGase로

[0456]

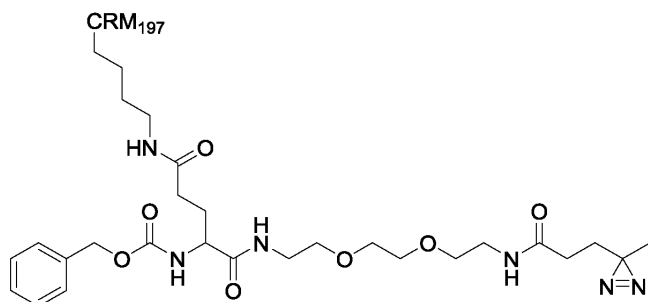
트리스 완충제 pH 8 중 ZQ(PEG2)아지도벤질아미드의 용액 (벤질 (17-아미노-1-(4-아지도페닐)-2,13,17-트리옥소-6,9-디옥사-3,12-디아자헵타데칸-14-일)카르바메이트) (3.5 mg/mL, 86 μ L, 0.527 μ mol)에 CRM197 (33 mg/mL, 7.55 μ L, 0.0043 μ mol)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 7.61 μ L, 0.0100 μ mol)을 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 37°C에서 교반하고 이 시점에서 LCMS 분석은 +1, +2 및 +3 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT2; 단백질_35-70 kDa_3분: R_t = 1.48분; MS [M+링커]: 관찰치: 58958, 계산치: 58962; MS [M+(2개의 링커)]: 관찰치: 59513, 계산치: 59514; MS [M+(3개의 링커)]: 관찰치: 60067, 계산치: 60066.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R_t (분)
CRM197	58410	58408	19	1.48
CRM197 +1 ZQ-링커	58962	58958	36	1.48
CRM197 +2 ZQ-링커	59514	59513	25	1.48
CRM197 +3 ZQ-링커	60066	60067	20	1.48

[0457]

[0458]

CRM197 + ZQ(PEG)₂아미도에틸메틸디아지린의 mTGase-매개 표지화



[0459]

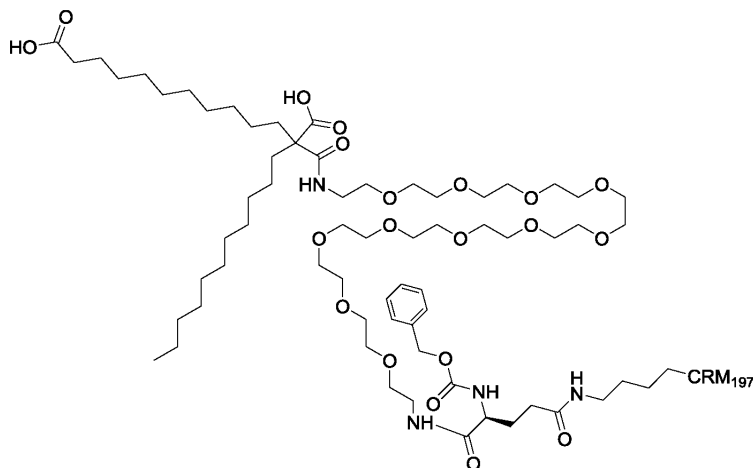
[0460]

트리스 완충제 pH 8 중 벤질의 용액 (18-아미노-1-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)-3,14,18-트리옥소-7,10-디옥사-4,13-디아자옥타데칸-15-일)카르바메이트 (3.5 mg/mL, 50 μ L, 0.336 μ mol)에 CRM197 (33 mg/mL, 4.82 μ L, 0.0027 μ mol)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 4.85 μ L, 0.0064 μ mol)을 첨가하였다. 반응물을 2일 동안 실온에서 교반하고 이 시점에서 LCMS 분석은 +1, +2 및 +3 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT2; 단백질_35-70 kDa_3분: R_t = 1.69분; MS [M+링커]: 관찰치: 58912, 계산치: 58913; MS [M+(2 x 링커)]: 관찰치: 59415, 계산치: 59416; MS [M+(3 x 링커)]: 관찰치: 59918, 계산치: 59919.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R_t (분)
CRM197	58410	58408	11	1.69
CRM197 +1 ZQ-링커	58913	58912	45	1.69
CRM197 +2 ZQ-링커	59416	59415	32	1.69
CRM197 +3 ZQ-링커	59919	59918	12	1.69

[0461]

[0462] CRM197 + ZQ-FA의 mTGase-매개 표지화



[0463]

[0464] 100 mM 트리스 완충제 pH 8 중 ZQ-FA의 용액 (8 mg/mL, 203 μ L, 1.316 μ mol)에 CRM197 (33 mg/mL, 1.515 μ L, 0.00086 μ mol)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 0.455 μ L, 0.00060 μ mol)을 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 10 kDa MWCO 아미콘 원심 여과기를 사용하여 반응물을 회석하고 100 μ L의 부피로 5회 농축함으로써 100 mM 트리스 완충제 pH 8로 교환하였다. LCMS 분석은 +1, +2 및 +3 및 +4 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT2; 단백질_35-70 kDa_3분: R_t = 1.45분; MS [M+ZQ-FA]: 관찰치: 59625, 계산치: 59624; MS [M+(2 x ZQ-FA)]: 관찰치: 60839, 계산치: 60838; MS [M+(3 x ZQ-FA)]: 관찰치: 62054, 계산치: 62052; MS [M+(4 x ZQ-FA)]: 관찰치: 63270, 계산치: 63266.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R _t (분)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197 +1 ZQ-FA	59624	59625	14	1.45
CRM197 +2 ZQ-FA	60838	60839	23	1.45
CRM197 +3 ZQ-FA	62052	62054	35	1.45
CRM197 +4 ZQ-FA	63266	63270	28	1.45

[0465]

[0466] CRM197 + 아지도 니트로페닐 OG의 mTGase-매개 표지화:

[0467] 100 mM 트리스 완충제 pH 8 중 아지도니트로페닐-QG의 용액 (8 mg/mL, 100 μ L)에 CRM197 (33 mg/mL, 1.0 μ L, 33 ug)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 1.0 μ L, 말토시클로텍스트린 중 0.1% TGase)을 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. LCMS 분석은 +1, +2, 및 +3 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT1; 단백질_20-70 kDa_3분: R_t = 1.67분; MS [M+ 1 아지도 니트로페닐 QG]: 관찰치: 58815, 계산치: 58803; MS [M+ 2 아지도 니트로페닐 QG]: 관찰치: 59191, 계산치: 59196; MS [M+ 3 아지도 니트로페닐 QG]: 관찰치: 59585, 계산치: 59589.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R _t (분)
CRM197	58410	58428	5	n/a
CRM197 +1 아지도니트로페닐QG	58803	58815	50	1.67
CRM197 +2 아지도니트로페닐QG	59196	59191	40	1.67
CRM197 +3 아지도니트로페닐QG	59589	59585	5	1.67

[0468]

[0469] CRM197 + 디아지린-QG의 mTGase-매개 표지화:

[0470] 100 mM 트리스 완충제 pH 8 중 디아지린-QG의 용액 (8 mg/mL, 100 μ L)에 CRM197 (33 mg/mL, 1.0 μ L, 33 μ g)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 1.0 μ L, 말토시클로텍스트린 중 0.1% TGase)을 첨가하였다. 반응물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. LCMS 분석은 +1 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT1; 단백질_20-70 kDa_3분: R_t = 1.67분; MS [M +디아지린-QG]: 관찰치: 58705, 계산치: 59706.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R_t (분)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197 +1 디아지린-QG	58706	58705	100	1.67

[0471]

[0472] CRM197 + ZQ(PEG)₃비오틴의 mTGase-매개 표지화

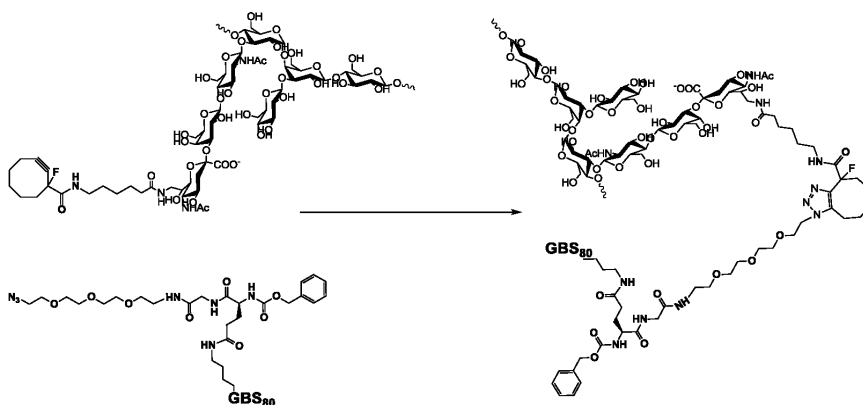
[0473] 100 mM 트리스 완충제 pH 8 중 ZQ(PEG)₃비오틴의 용액 (8 mg/mL, 100 μ L)에 CRM197 (33 mg/mL, 1.0 μ L, 33 μ g)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 1.0 μ L, 말토시클로텍스트린 중 0.1% TGase)을 첨가하였다. 반응물을 16시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. LCMS 분석은 +1 생성물로의 전환을 나타냈다. LCMS QT1; 단백질_20-70 kDa_3분: R_t = 1.67분; MS [M + 1 ZQ(PEG)₃비오틴]: 관찰치: 59073, 계산치: 59074; MS [M + 2 ZQ(PEG)₃비오틴]: 관찰치: 59737, 계산치: 59738; MS [M + 3 ZQ(PEG)₃비오틴]: 관찰치: 60403, 계산치: 60402.

표지화의 정도	계산치	관찰치	%	R_t (분)
CRM197	58410	없음	0	n/a
CRM197 +1 ZQ(PEG) ₃ 비오틴	59074	59073	40	1.75
CRM197 +2 ZQ(PEG) ₃ 비오틴	59738	59737	55	1.75
CRM197 +3 ZQ(PEG) ₃ 비오틴	60402	60403	5	1.75

[0474]

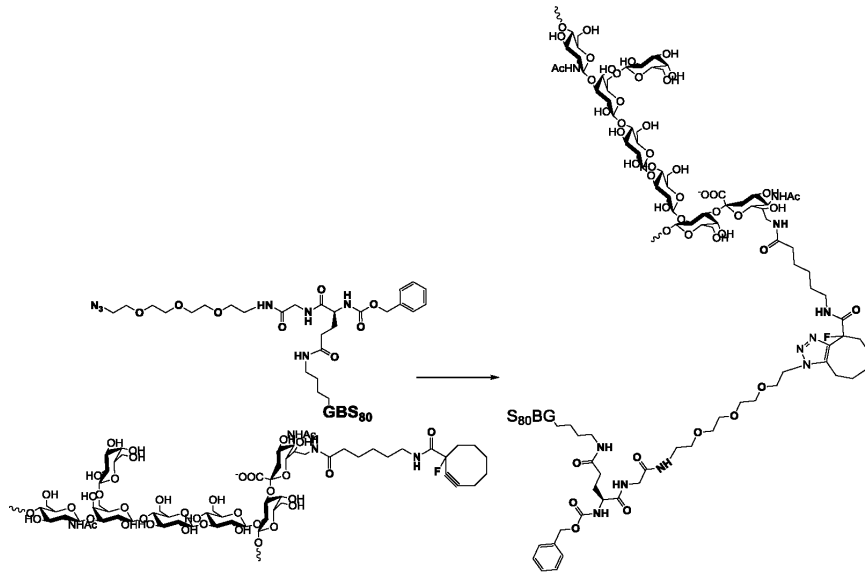
[0475] 단백질의 표지된 mTGase 촉매화 선택적 리신 표지화의 관능화의 실시예:

[0476] Z-Q-G-NH-(PEG)₃-N₃



[0477]

[0478] 3.2 mg의 아지도 표지된 단백질을 다당류와 PS/Prot 6:1 w/w의 접합 비로 합하였다. 생성물을 2X HA 칼럼에 의해 정제하였다. 제1 시행 (블록(BLOCK) 1 = NaPi 2 mM pH 7.2, 블록 2 = NaPi 400 mM pH 7.2)은 유리 단백질을 제거하였다. 제2 시행 (블록 1 = NaPi 2 mM/NaCl 550 mM pH 7.2, 블록 2 = NaPi 10 mM pH 7.2, 블록 3 = NaPi 35 mM pH 7.2, 블록 4 = NaPi 400 mM pH 7.2)은 유리 다당류를 제거하였다.



[0479]

[0480]

3.3 mg의 아지도 표지된 단백질을 다당류와 PS/Prot 6:1 w/w의 접합 비로 합하였다. 생성물을 2X HA 칼럼에 의해 정제하였다. 제1 시행 (블록 1 = NaPi 2 mM pH 7.2, 블록 2 = NaPi 400 mM pH 7.2)은 유리 단백질을 제거하였다. 제2 시행 (블록 1 = NaPi 2 mM/NaCl 550 mM pH 7.2, 블록 2 = NaPi 10 mM pH 7.2, 블록 3 = NaPi 35 mM pH 7.2, 블록 4 = NaPi 400 mM pH 7.2)은 유리 다당류를 제거하였다.

[0481]

도 2 내지 도4에 나타낸 바와 같이, 이들 실험의 생성물의 SDS page 겔 특성화를 수득하였다. 각각의 수율을 또한 이하에 표 3에 나타냈다.

[0482]

[표 3]

샘플	단백질	접합 화학	당류 /단백질 (w/w)	유리 당류 % (디오넥스 (dionex))	단백질 TOT mg	접합에 사용된 당류 /단백질 (w/w)	수율 (% 최종 단백질)
GBS PSV(alk)- GBS80(K-N3)	X	CFCC	4.3	6.7	570.7	6:1	20.6
GBS PSII(alk)- GBS80(K-N3)	X	CFCC	1.5	< 3.3	1685.7	6:1	24.0

[0483]

[0484]

mTGase 표지화 방법을 통해 수득된 이들 클릭된 GBS80 접합체 각각을 이하에서 논의된 생물학적 검정으로 시험하였다.

[0485]

GBS II 또는 V 다당류 항원에 대하여 Ig 역가의 측정을 위한 ELISA 면역 검정

[0486]

면역화 동물로부터 혈청 중 GBS 다당류 II 또는 V에 대하여 IgG 역가를 다음과 같이 측정하였다.

[0487]

마이크로타이터(Microtiter) 플레이트 (넉스 맥시소르프(Nunc Maxisorp))를 인산염 완충 식염수 (PBS) 중에서 100 μ L의 1.0 μ g/mL HSA-adh (인간 혈청 알부민 - 아디프산 디히드라지드) 접합된 다당류 II 또는 V로 코팅하였다. 플레이트를 실온에서 밤새 인큐베이션한 다음에 세척 완충제 (PBS 중 0.05% 트윈 20)로 3회 세척하였다. 웰당 250 μ L의 PBS, 2% BSA, 0.05% 트윈 20을 분배한 후, 플레이트를 37°C에서 90분 인큐베이션한 다음에 흡입하여 코팅후 용액을 제거하였다. 시험 혈청을 PBS, 2% BSA, 0.05% 트윈 20 중 1:400로 희석하였다. 표준 혈청을 과면역 혈청을 모아 제조하고 표준 풀(pool)의 초기 희석을 선택하여 405 nm에서 약 2.000의 광학 밀도(OD)를 수득하였다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음에 세척 완충제로 세척하고 1:1000 희석 완충제 중 100 μ L의 알칼리 포스파타제-접합된 항-마우스 IgG를 각각의 웰에 분배하였다. 플레이트를 37°C에서 90분 인큐베이션한 다음에 세척 완충제로 세척하였다. 기질 완충제 중 p-니트로페닐포스페이트 (p-NPP) 4.0 mg/mL의 100 μ L의 용액을 각각의 웰에 분배하였다. 플레이트를 실온에서 30분 인큐베이션한 다음에 EDTA

7% (w/v) 이나트륨 염 100 μ L의 용액에 더하여 Na_2HPO_4 3.5% pH 8.0을 각각의 웰에 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. 405 nm에서의 광학 밀도 (OD)를 측정하였다. GBS 다당류 항원 (II 또는 V)에 대하여 전체 IgG 역가를 기준선 검정(Reference Line Assay) 방법을 사용함으로써 계산하고 결과를 임의(arbitrary) ELISA 유닛 (Unit)/mL (EU/mL)으로서 표시하였다. 세 항원 각각에 대해, 표준 혈청 IgG 역가를 임의로 1.0 EU/mL의 값으로 할당하였다. 수득된 OD를 표준 푸울의 적정 곡선 (편향 및 기울기)으로 내삽함으로써 각각의 혈청의 IgG 역가를 추산하였다. 결과를 도 5 및 도 6에 나타냈다.

[0488] 마우스 활성화 모체 면역화 모델

[0489] 8마리 CD-1 암컷 마우스의 군 (연령, 6-8주)을 제1일, 제21일, 및 제35일에 명반(alum) 아주반트에서 제제화된 20 μ g의 항원 또는 완충제 (PBS)로 면역화하였다. 그 다음에 마우스를 교미시키고, 계산된 GBS 용량으로 그의 새끼들을 복강내 시험감염시켜 새끼 중 90%에서의 죽음을 유도하였다. 보호 값을 [(대조군 사망률% - 백신 중 사망률%)/대조군 사망률%] \times 100으로서 계산하였다. 마우스를 1일 기준으로 모니터링하고 그들이 노바르티스 동물 복지 정책(Novartis Animal Welfare Policies)에 따른 연구를 위해 사전에 확립된 정의된 인도적 종말점 (humane endpoint)을 나타낼 때 죽었다. 피셔 정확 검정(Fisher exact test)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 결과를 이하에 표 4 및 표 5에 나타냈다.

[0490] [표 4]

항원	보호/처리	% 보호	
PBS	18/60	30	
CRM-II	32/50	64	
TT-II	19/30	63	
GBS80-II	37/70	53	
GBS59-1523-II	59/70	84	
-	GBS80-K-N3/PSII	58/69	84
시험감염 균주 유형			
II 5401			

[0491]

[0492] [표 5]

항원	보호/처리	% 보호
PBS	19/40	47
CRM-V	61/70	87
TT-V	-	-
GBS80-V	54/57	95
GBS59-1523-V	69/79	87
GBS80-K-N3/PSV	53/60	88
시험감염 균주 유형		
V CJB111		

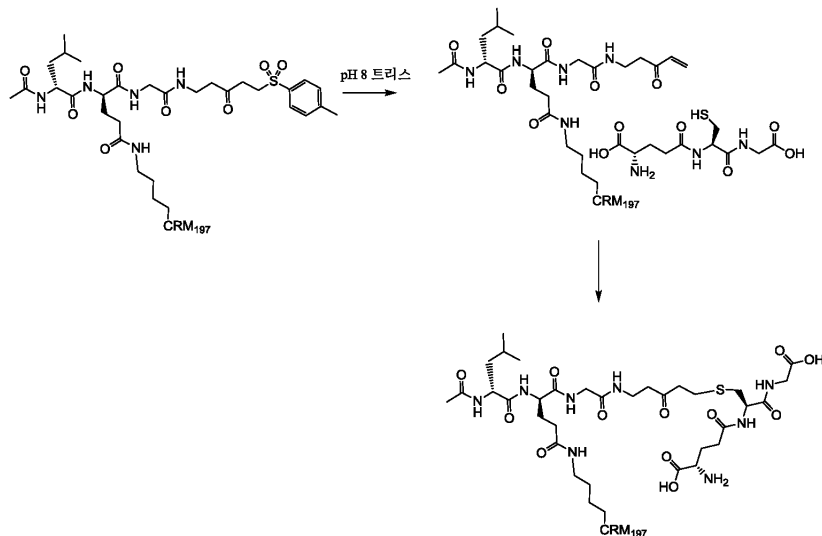
[0493]

[0494] 옵소닌식균작용 검정

[0495] 4일 동안 성장 배지로 100 mM의 N, N 디메틸포름아미드 (시그마)를 첨가함으로써, 과립구-유사 세포로 분화시킨, HL-60 세포주 (ATCC; CCL-240) 및 표적 세포로서 GBS 균주를 사용하여 옵소닌식균작용 검정을 수행하였다. 중간-대수증식(Mid-exponential) 박테리아성 세포를 식세포, 10% 새끼 토끼 보체 (시더레인 (Cedarlane)), 및 열-불활성화된 마우스 항혈청의 존재 하에 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 음성 대조군은 면역이전 혈청을 갖거나, 또는 HL-60 없이, 또는 열-불활성화된 보체를 갖는 반응물로 이루어졌다. 제로 시점에서 CFU 수의 로그로부터 1-h 검정에서 생존 콜로니 수의 로그를 차감함으로써 옵소닌식균작용 사멸의 양을 측정하였다.

[0496] 실험의 결과를 도 7에 나타냈다. GBS80-K-N3/PSII OPKA 및 IgG 역가는 무작위 K 접합에 의해 이루어진 GBS80-II 접합체에 통계학상 필적하였다. OPKA 및 IgG 역가는 시험감염 동물 모델에서 생존률(%)과 양호한 상관관계를 나타냈다.

[0497] $\text{Ac-L-Q-G-NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_2-\text{톨}$



[0498]

[0499] L-글루타티온 (5 μL , 0.813 μmol)에 이어서 50 μL 의 250 mM 트리스 HCl 완충제 pH 8을 첨가하여 반응물 pH를 8로 상승시켰다. 4시간 후, CRM 모두가 질량 분석법 특성화에 의해 확인된 바와 같이 하나의 링커로 표지되었다. 25°C에서 또 다른 16시간 후, CRM 모두가 L-글루타티온으로 표지되었다. L-글루타티온의 첨가: 기대 질량: 59138, 관찰 질량: 59139.

[0500] 펩티드 맵핑 실험 요약:

[0501] 펩티드 맵핑 분해(Digestion): 5 μg 변형 CRM197 및 양성 대조군 CRM197 샘플을 20 mM DTT로 환원시키고 트립신과 밤새 26°C에서 1/30 (w/w) 효소/단백질로 분해하였다. 트립신 분해 단백질의 분취액을 26°C에서 4시간 동안 1/20 효소/단백질 비로 GluC 효소로 추가로 분해하였고; 모든 효소는 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics) (독일 게엠베하)로부터 구매하였음을 주목한다.

[0502] 역상 LC-MS/MS 분석: 생성된 분해된 펩티드를 애질런트 CapLC (캘리포니아주 산타 클라라)에 커플링된 써모 LTQ 오비트랩 디스커버리(Thermo Orbitrap Discovery) (써모 피셔 사이언티픽 인크.(Thermo Fisher Scientific Inc.), 매사추세츠주 윌섬) 상에 액체 크로마토그래피 전자분무 탠덤 질량분석(electrospray tandem mass spectrometry) (LC-ESI MS/MS)에 의해 분석하였다. ~10-15 pmole의 CRM 대조군 및 변형 CRM197 분해물(digest)을 40°C에서 칼럼 (워터스 액쿼티) BEH C18, 1.7 μm , 1x100 mm 칼럼)에 로딩하였다. 10 μL /분으로, 0-1분에서 시작하여, 1.1분에서 4% B에서 7% B로, 55분에서 45% B로, 그 다음에 63분에서 95% B로 증가시키는 전체 구배 80분으로 시행한 후에, 세척 및 칼럼 평형시켰다. 질량 분광계 파라미터는 30 ms 동안 m/z 300-2000으로부터 30000 해상도로 FTMS 분석기를 사용하여 전체 스캔 사건(full scan event)을 포함하였다. 충돌 유도 해리 MS / MS는 30 ms 동안 500 (모든 사건의 경우) 신호 강도 역치 계수에서 활성화된, 이온 트랩 분석기에서 (1+ 이온을 제외한) 상단 7개 강한 이온 상에서 수행하였다.

[0503] 데이터 분석 및 데이터베이스 검색: 모든 질량 스펙트럼은 퀄 브라우저(Qual Browser) V 2.0.7 (써모 사이언티픽)에서 진행하였다. 마스코트 일반 파일(Mascot generic file) (mgf)을 MS 토큰툴즈(DeconTools) (알.디. 스미스 랩(R.D. Smith Lab), PPNL)로 발생시키고, 오염 단백질에 대한 SwissProt 데이터베이스 (V57, 513,877 서열 이용) 및 인-하우스 커스텀 데이터베이스(in-house custom database)에 첨가된 제공된 단백질 서열에 대하여 마스코트 V2.3.01 (매트릭스 사이언스 인크.(Matrix Science Inc.), 매사추세츠주 보스턴) 데이터베이스 검색을 사용하여 검색하였다. 검색 파라미터는, 효소: 세미트립신 또는 트립신/Glu-C, 미절단(missed cleavage) 3 이하로 허용; 가변 변형: 소분자의 기대 질량 (362.147787 Da 및 463.206698 Da)을 "CRM Tgase +알킨 362Da mod (CKR),CRM Tgase +알킨 362Da mod (N-term),CRM Tgase+아지드 463Da mod (CKR),CRM Tgase + 아지드 463Da mod (N-term)"라 칭해지는 데이터베이스에 부가; 펩티드 내성(tolerance): ± 20 ppm; MS/MS 내성: ± 0.6 Da를 포함

하였다. 서열 커버리지(coverage) 및 소분자 변형 평가를 >95% 신뢰도로 이온 스코어(ion score)에 대하여 행하였다. 그 다음에, 스코어가 높은(high-scoring) 펩티드를 웹 브라우저를 사용하여 수동 MS/MS 분석용으로 선택하였다.

[0504] CRM + 시클로옥탄-시클로프로필-CH₂-OC(O)NH-Q-G에 대한 결과

[0505] 트립신 분해물(Trypsin digest): 83% 서열 커버리지; 이러한 이온 스코어 역치에서 어떤 변형도 검출되지 않았다. 트립신/GluC 분해물: 97% 서열 커버리지; Lys37 또는 Lys39에 대해 변형이 검출되었다.

[0506] CRM Exp095 트립신/GluC 분해

[0507] 서열 커버리지:91%, 매칭된 펩티드는 **볼드체**로 나타냄

[0508] K37 또는 K39, CRM Tgase + 아지드 463Da mod (CKR)로 변형됨

1 GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYYDSIQKGIGKPKSGTQGNYYDDDW
51 KEFYSTDNKKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVVKVTPGLTKVLALKVDNAE
101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYI
151 NNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEQMAQACAGNRVRRSVGSSLS
201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF
251 HQTALHPSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALLSMLVAQAIPLVGEL
351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGYAVSWNT
401 VEDSIIRTGFGQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVKNKSKTHI
451 SVNGRKIRMRRCRAIDGDTVFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSESEKIH
501 SNEISSDSIGVLGYQKTVTDHTKVNSKLSLFFFEIKS

[0509]

[0510] 서열 1

[0511] CRM + ZQ-NH-(PEG)₃N₃에 대한 결과

[0512] 트립신 분해물: 69% 서열 커버리지; 이러한 이온 스코어 역치에서 어떤 변형도 검출되지 않았다. 트립신/GluC 분해물: 91% 서열 커버리지; Lys37 또는 Lys39에 대해 변형이 검출되었다.

[0513] CRM Exp083 트립신/GluC 분해

[0514] 서열 커버리지:97%, 매칭된 펩티드는 **볼드체**로 나타냄

[0515] K37 또는 K39, CRM Tgase + 알킨 362Da mod (CKR)로 변형됨

1 GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYYDSIQKGIGKPKSGTQGNYYDDDW
51 KEFYSTDNKKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVVKVTPGLTKVLALKVDNAE
101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYI
151 NNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEQMAQACAGNRVRRSVGSSLS
201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF
251 HQTALHPSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT
301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALLSMLVAQAIPLVGEL
351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGYAVSWNT
401 VEDSIIRTGFGQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVKNKSKTHI
451 SVNGRKIRMRRCRAIDGDTVFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSESEKIH
501 SNEISSDSIGVLGYQKTVTDHTKVNSKLSLFFFEIKS

[0516]

[0517] 서열 2

[0518] CRM 대조군

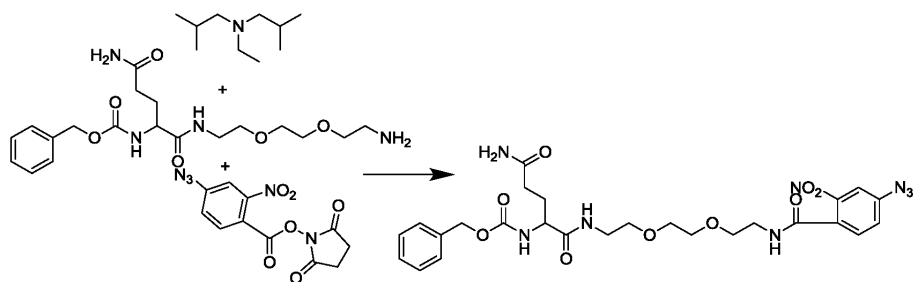
[0519] 트립신 분해물: 85% 서열 커버리지.

[0520] 트립신/GluC 분해물: 79% 서열 커버리지.

[0521] 본 발명은 예시를 위해 본원에 제시된 실시양태로 제한되는 것이 아니라, 상기 기재내용의 범주 내에 속하는 바와 같은 그의 모든 이러한 형태를 포괄하는 것으로 이해된다.

[0522] 예언적 실시예

[0523] 벤질 (17-아미노-1-(4-아지도-2-니트로페닐)-2,13,17-트리옥소-6,9-디옥사-3,12-디아자헵타데칸-14-일)카르바메이트



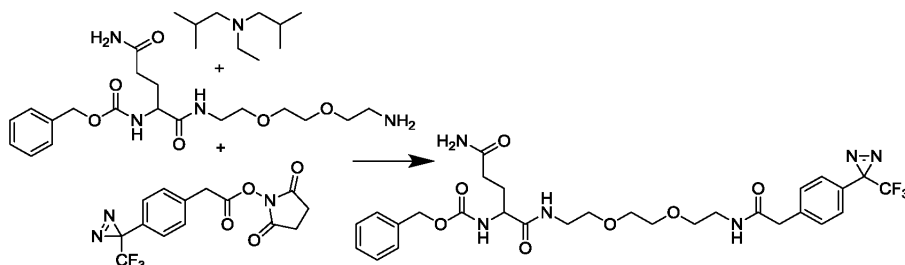
[0524]

[0525]

4-아지도-2-니트로페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (0.073 mmol)를 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 합한다. DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합한다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제한다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0526]

ZQ-(PEG2) 페닐 트리플루오로메틸다이아지린



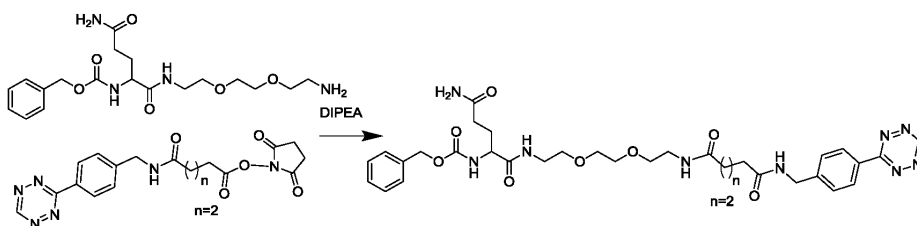
[0527]

[0528]

4-트리플루오로메틸 다이아지린 페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (0.073 mmol)를 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 합한다. DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합한다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제한다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0529]

ZQ-(PEG2)-테트라진

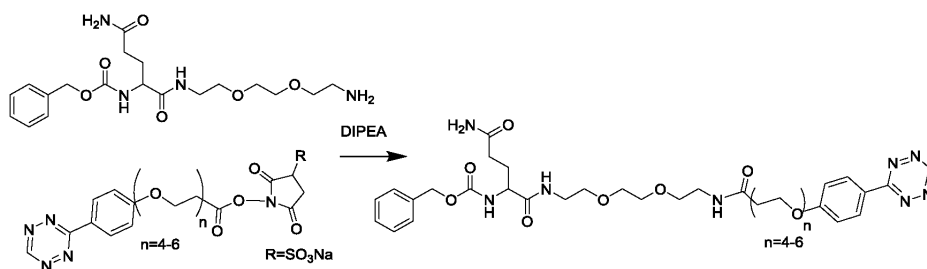


[0530]

[0531]

다이아지린 N-숙신이미도 에스테르 (0.073 mmol)를 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 합한다. DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합한다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제한다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시킨다.

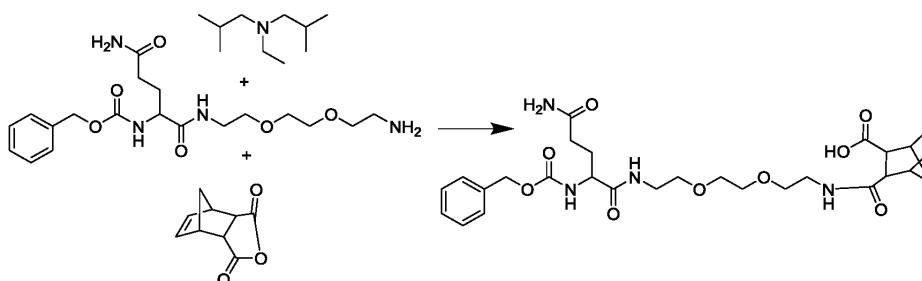
[0532] ZQ-(PEG2)-테트라진



[0533]

[0534] 테트라진 (PEG) N-숙신이미도 에스테르 (0.073 mmol)를 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중의 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (20 mg, 0.049 mmol)의 용액과 혼합한다. DIPEA (0.121 mL, 0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합한다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제한다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시킨다.

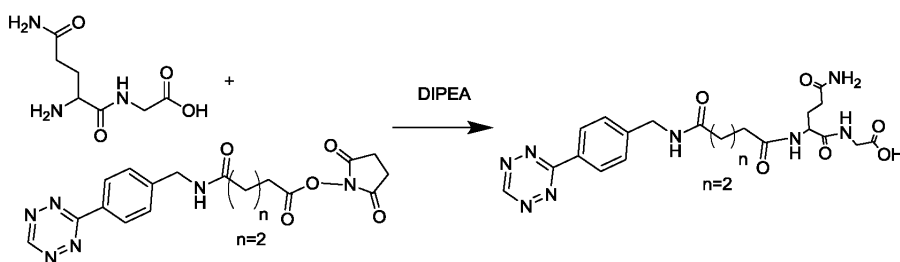
[0535] ZQ(PEG2)-(3aR,4S,7R)-3a,4,7,7a-테트라히드로-4,7-메타노이소벤조푸란-1,3-디온



[0536]

[0537] (3aR,4S,7R)-3a,4,7,7a-테트라히드로-4,7-메타노이소벤조푸란-1,3-디온 (0.162 mmol) (0.073 mmol)을 DMF (1 mL)에 용해시키고 DMF (2.3 mL) 중 벤질 (5-아미노-1-((2-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)에틸)아미노)-1,5-디옥소펜탄-2-일)카르바메이트 (0.049 mmol)의 용액과 혼합한다. DIPEA (0.585 mmol)를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 실온에서 혼합한다. 용액을 MS-유발 HPLC를 통해 정제한다 (100-Prep3; 산_방법 3; 선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분, 1.5 ml 주입; 튜브 트리거 M = 570). 목적 생성물을 갖는 분획을 모으고 동결건조시킨다.

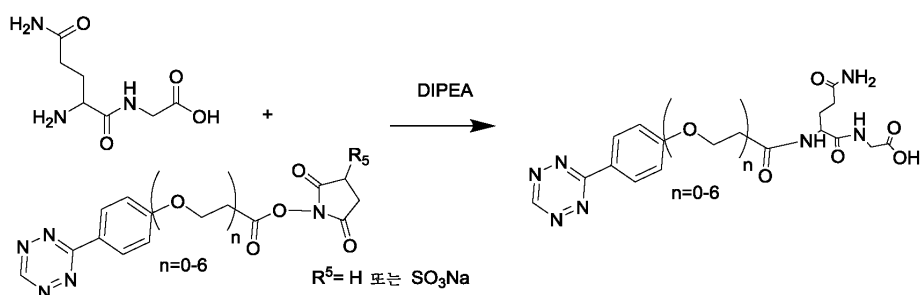
[0538] 테트라진-QG



[0539]

[0540] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 NHS 테트라진 (0.148 mmol)을 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 후에 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입) 목적 생성물을 수득한다. 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0541] 테트라진(PEG)_nQG

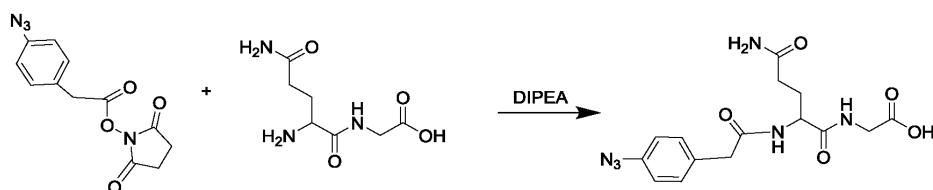


[0542]

[0543] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 NHS PEG_n테트라진 (0.148 mmol)을 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 후 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입) 목적 생성물을 수득한다. 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0544] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 NHS 테트라진 (0.148 mmol)을 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 후 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입) 목적 생성물을 수득한다. 분획을 모으고 동결건조시킨다.

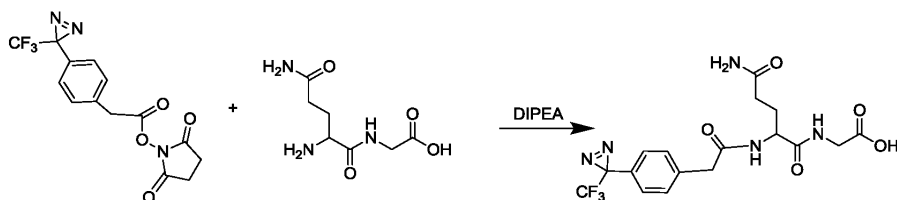
[0545] 4-아지도-페닐-글루타민-글리신



[0546]

[0547] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 4-아지도-페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (0.148 mmol)를 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 후 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입) 목적 생성물을 수득한다. 목적 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0548] 트리플루오로메틸디아지린-벤질-글루타민-글리신



[0549]

[0550] QG (30 mg, 0.148 mmol)를 DMF (부피: 1 mL, 비: 1.000)에 용해시키고 4-트리플루오로메틸-디아지린-페닐아세트산 N-숙신이미도 에스테르 (0.148 mmol)를 H₂O (부피: 1.000 mL, 비: 1.000)에 첨가한 후에 DIPEA (0.177 mmol)를 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 교반하고 이 시점에서 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 (선파이어 30x50 mm 5 um 칼럼 ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/분 1.5 ml 주입) 목적 생성물을 수득한다. 목적 분획을 모으고 동결건조시킨다.

[0551] CRM197의 mTGase-매개 표지화를 위한 일반 절차

[0552] 트리스 완충제 pH 8 중 링커의 용액 (3.5 mg/mL, 0.527 μmol 또는 상기 명시된 링커에 따라 다른 양 및 상대

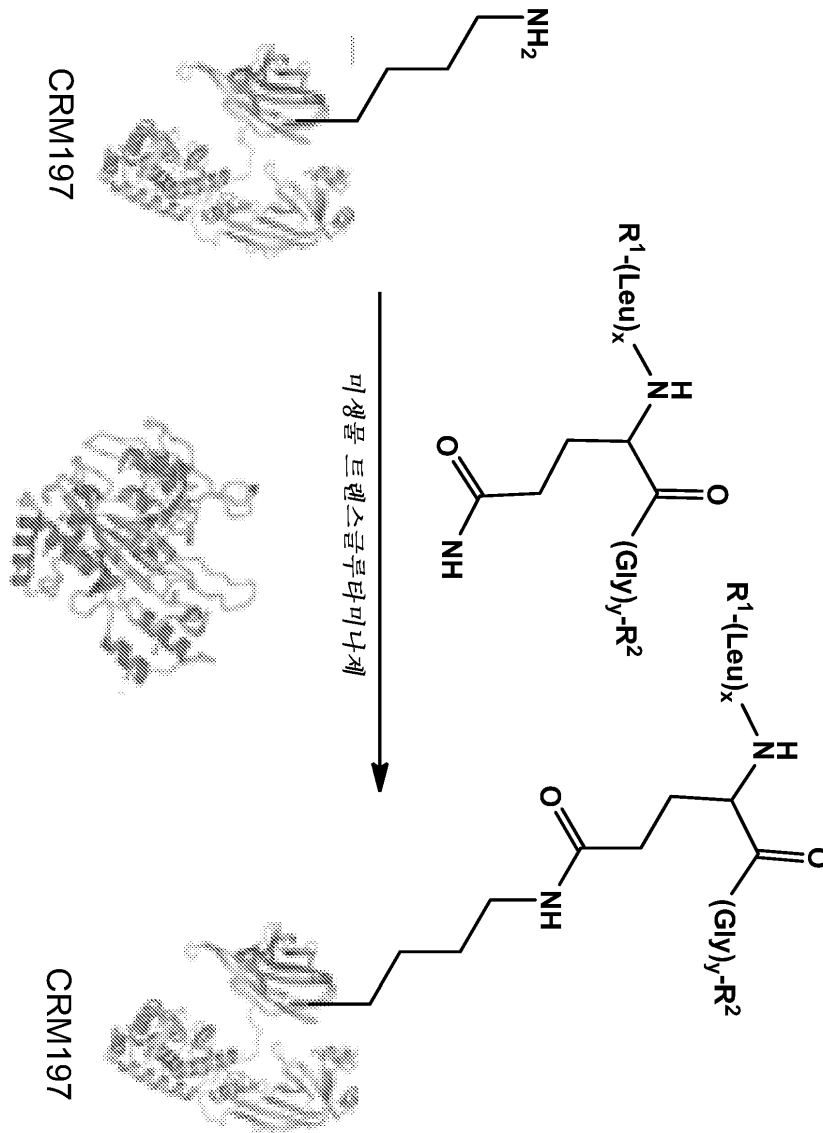
마이크로몰 농도)에 CRM197 (33 mg/mL, 7.55 μ L, 0.0043 μ mol)에 이어서 PBS 중 트랜스글루타미나제 효소의 용액 (50 mg/mL, 7.61 μ L, 0.0100 μ mol)을 첨가한다. 반응물을 16시간 동안 실온 또는 37°C에서 교반한다.

[0553]

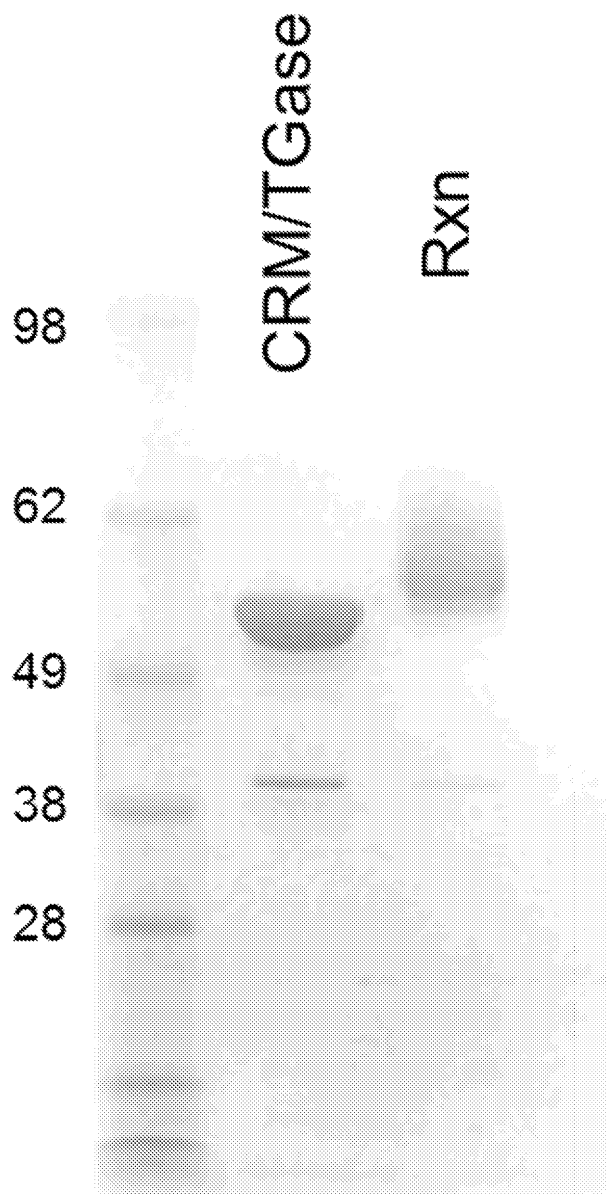
이렇게 하여 본 발명의 예시적 실시예를 기재하였지만, 본 개시내용은 단지 예시적이며 다양한 다른 대안, 개조 및 수정이 본 발명의 범위 내에서 이루어질 수 있다는 것은 통상의 기술자에게 주목되어야 한다. 따라서, 본 발명은 거기에 예시된 바와 같은 구체적 실시양태로 제한되지 않는다.

도면

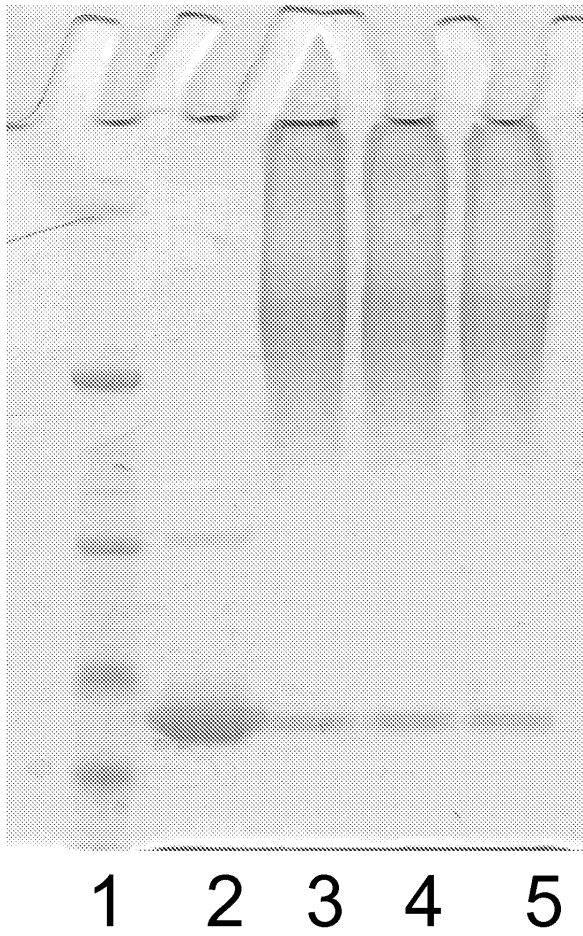
도면1



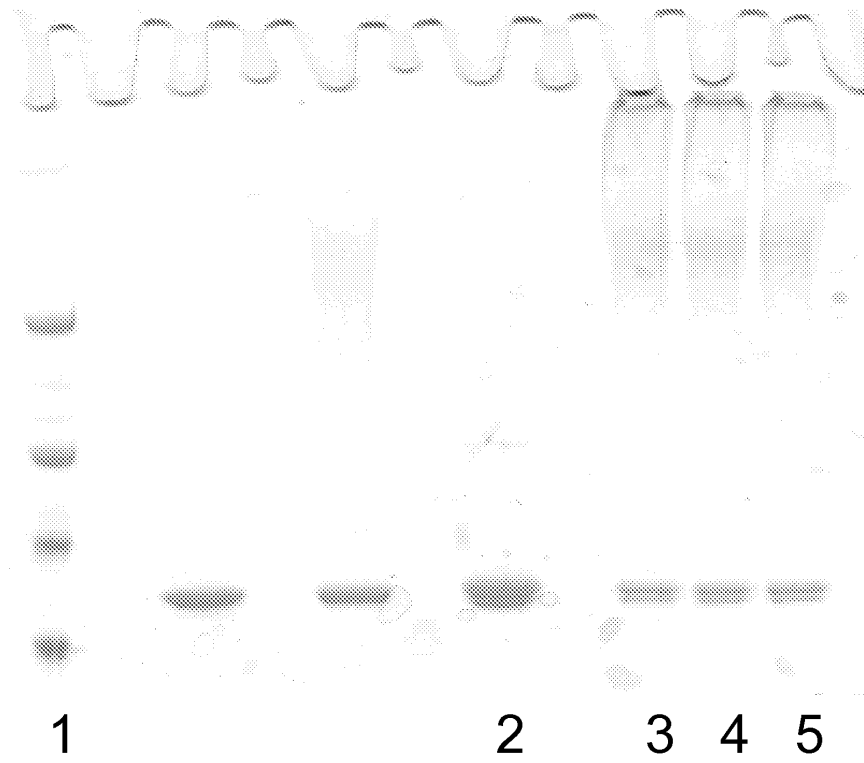
도면2



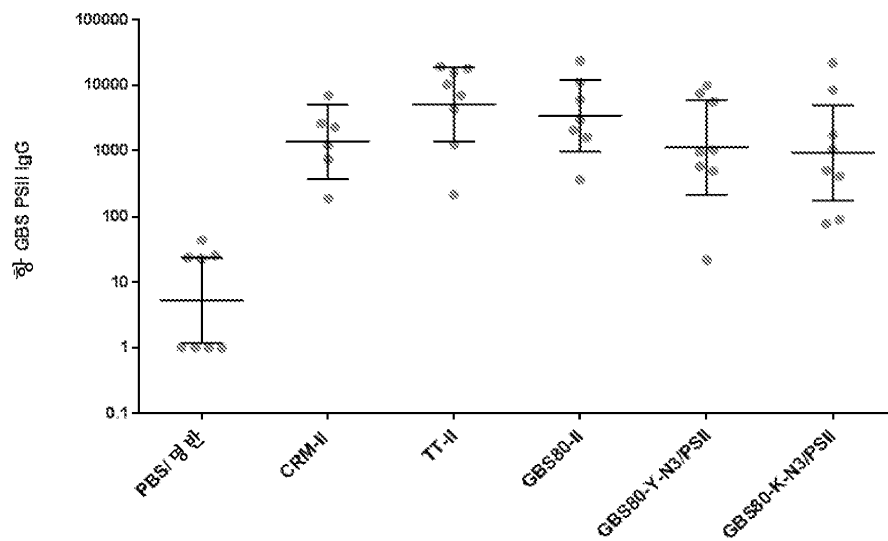
도면3



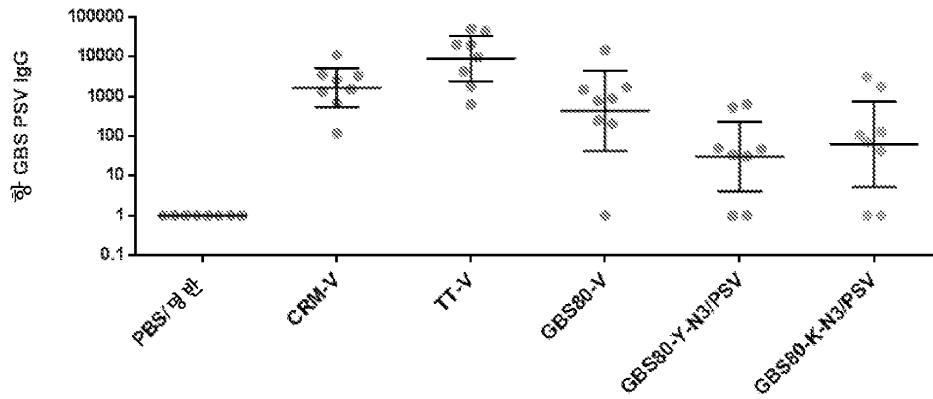
도면4



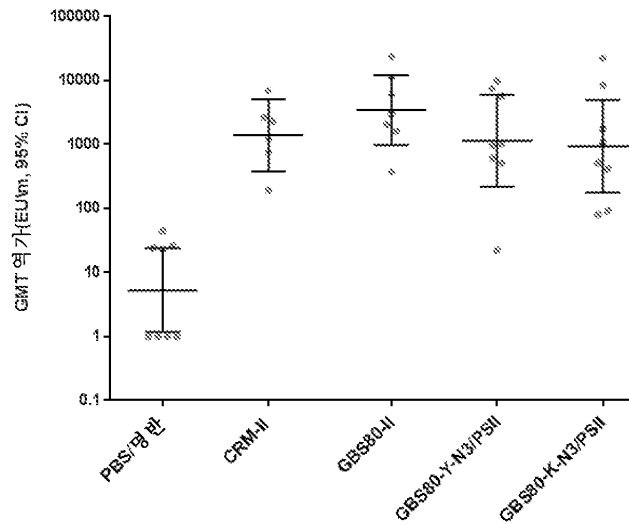
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Usera, Aimee
 Robinson, Zachary
 Cobb, Jennifer
- <120> SITE-SPECIFIC CHEMOENZYMATIC PROTEIN MODIFICATIONS
- <130> 14293-223
- <140> Not yet assigned
- <141> 2014-07-11
- <150> 61/845,273
- <151> 2013-07-11

<150> 62/016,044

<151> 2014-06-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 1

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn

1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln

20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp

35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly

50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val

65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val

85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser

130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser

145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp

165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg

180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val

 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val

 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser

 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr

 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535
 <210> 2
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium diphtheriae
 <400> 2
 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser

130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser

145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp

165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg

180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val

195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly

210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu

225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu

245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val

260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val

275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu

290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala

305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser

325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp

340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe

 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

 420 425 430
 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser

 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535