



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0005793  
(43) 공개일자 2016년01월15일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <b>A61K 39/02</b> (2006.01) <b>A61K 31/70</b> (2006.01)<br/> <b>A61K 39/00</b> (2006.01) <b>A61K 39/09</b> (2006.01)<br/> <b>A61K 47/48</b> (2006.01) <b>A61K 9/48</b> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <b>A61K 39/02</b> (2013.01)<br/> <b>A61K 31/70</b> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 <b>10-2015-7036786(분할)</b></p> <p>(22) 출원일자(국제) <b>2011년03월07일</b><br/>         심사청구일자 <b>없음</b></p> <p>(62) 원출원 <b>특허 10-2012-7026281</b><br/>         원출원일자(국제) <b>2011년03월07일</b><br/>         심사청구일자 <b>2013년05월30일</b></p> <p>(85) 번역문제출일자 <b>2015년12월28일</b></p> <p>(86) 국제출원번호 <b>PCT/EP2011/053400</b></p> <p>(87) 국제공개번호 <b>WO 2011/110531</b><br/>         국제공개일자 <b>2011년09월15일</b></p> <p>(30) 우선권주장<br/>         1003922.0 2010년03월09일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.</b><br/>         벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>비에만스, 랄프 레온</b><br/>         벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89<br/> <b>두비비어, 피에르</b><br/>         벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89<br/> <b>가바르드, 올리비에 프란시스 니콜라스</b><br/>         벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89<br/>         글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>특허법인 남앤드남</b></p> |
|--|---|

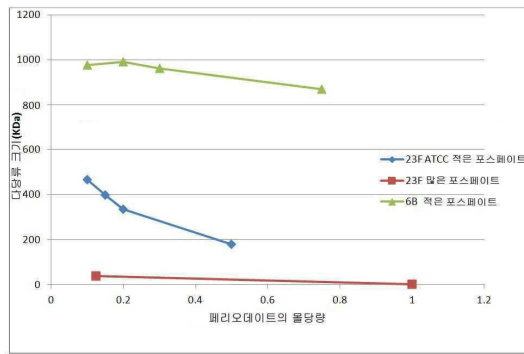
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **담체 단백질에 대한 박테리아 다당류의 컨주게이션 방법**

(57) 요약

환원성 아민화에 의한 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 및 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 당류를 포함하는 박테리아 당류의 컨주게이션 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/092* (2013.01)

*A61K 47/4823* (2013.01)

*A61K 47/48261* (2013.01)

*A61K 47/4833* (2013.01)

*A61K 9/48* (2013.01)

*A61K 2039/6037* (2013.01)

*A61K 2039/62* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

박테리아 당류를 컨주게이션시키고, 박테리아 당류의 사이징 효과(sizing effect)를 감소시키는 방법으로서,

a) 박테리아 당류와 0.001-0.7 몰당량의 페리오테이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

b) 활성화된 박테리아 당류와 담체 단백질을 혼합시키는 단계;

c) 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질과 환원제를 반응시켜 컨주게이트를 형성시키는 단계; 또는

a) 박테리아 당류와 0.1-0.5 몰당량의 페리오테이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

b) 활성화된 박테리아 당류와 링커를 혼합시키는 단계;

c') 환원제를 이용하여 활성화된 박테리아 당류와 링커를 반응시켜 박테리아 당류-링커를 형성시키는 단계;

d) 박테리아 당류-링커와 담체 단백질을 반응시켜 컨주게이트를 형성시키는 단계를 포함하며,

상기 방법에서, 단계 a)가 아민기를 함유하지 않는 포스페이트 완충액에서 발생하고, 상기 포스페이트 완충액이 pH 5.5-6.5에서 1-50mM의 농도를 갖고, 상기 박테리아 당류가 S. 뉴모니에(*S. pneumoniae*) 캡슐 당류 23F인, 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 포스페이트 완충액이 5-15mM의 농도를 갖는 방법.

#### 청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 단계 a)에서의 pH가 pH 6.0인 방법.

#### 청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 박테리아 당류의 평균 분자량이 단계 a) 후에 1-1100kDa인 방법.

#### 청구항 5

제 1항 또는 2항에 있어서, 23F 박테리아 당류의 평균 분자량이 단계 a) 후에 100-470kDa인 방법.

#### 청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 담체 단백질이 테타누스 독소이드, 테타누스 독소이드의 단편 C, 디프테리아 독소이드, CRM197, 뉴몰리신(Pneumolysin), 단백질 D, PhtD, PhtDE 및 N19로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 환원제가 소디움 시아노보로히드라이드 또는 소디움 트리아세톡시보로히드라이드를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨주게이트를 정제시키는 추가 단계 e)를 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨주게이트와 추가 항원을 혼합시키는 추가 단계를 포함하며, 상기 추가 항원이 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 S. 뉴

모니에 당류를 포함하는 방법.

**청구항 10**

제 12항에 있어서, 추가 항원이 폴리 히스티딘 트라이어드(Triad) 패밀리(PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX), CbpX 트렁케이트(truncate), LytX 패밀리, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체), 뉴몰리신(Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 S. 뉴모니에 단백질을 포함하는 방법.

**청구항 11**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 컨쥬게이트가 애쥬번트 또는 약학적으로 허용되는 부형제와 혼합되는 방법.

**청구항 12**

제 1항 또는 제 2항의 방법에 의해 수득가능한 컨쥬게이트.

**청구항 13**

제 12항의 컨쥬게이트 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 약학적 부형제가 말레레이트 완충액을 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 14**

제 13항에 있어서, 박테리아 질병의 예방 또는 치료용 면역원성 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

**기재**

[0001]

본 발명은 컨쥬게이션 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 환원성 아민화를 이용한 당류 및 단백질의 컨쥬게이션에 관한 것이다.

[0002]

**배경 기술**

**배경**

[0003]

박테리아 캡슐 다당류는 박테리아 질병의 예방을 위해 여러 해 동안 면역학에서 널리 사용되어 왔다. 그러나, 상기 사용의 문제는 면역 반응의 T-독립적 특성이다. 따라서, 이러한 항원은 어린 아동에서 면역원성이 불충분하다. 이러한 문제는 이후 삶의 첫번째 해에서도 T-의존성 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있는 담체 단백질(T-헬퍼 에피토프의 공급원)에 대한 다당류 항원의 컨쥬게이션을 통해 극복되었다.

[0004]

다양한 컨쥬게이션 기술이 당 분야에 공지되어 있다. 컨쥬게이트는 US200710184072(Hausdorff), US4365170(Jennings) 및 US4673574(Anderson)에 기재된 바와 같은 직접적인 환원성 아민화 방법에 의해 제조될 수 있다. 다른 방법이 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기재되어 있다. 컨쥬게이션 방법은 대안적으로 시아네이트 에스테르를 형성하는 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)를 이용한 당류의 히드록실기의 활성화에 의존할 수 있다. 이러한 컨쥬게이트는 PCT 공개 출원 WO 93/15760(Uniformed Services University) 및 WO 95/08348 및 WO 96/29094에 기재되어 있다. 또한, 문헌[Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256]을 참조하라.

[0005]

환원성 아민화는 (1) 항원의 산화 및 (2) 컨쥬게이트를 형성하는 항원 및 담체 단백질의 환원의 2 단계를 포함한다. 산화 단계는 페리오메이트와의 반응을 포함할 수 있으나, 페리오메이트에 의한 산화는 크기 감소를 발생시킬 수 있다(W094/05325).

[0006]

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

[0007]

**발명의 개요**

[0008]

본 발명자는 놀랍게도 적은 포스페이트의 존재하에서 페리오데이트의 낮은 농도를 이용하는 것이 크기의 유지 및/또는 에피토프의 유지를 발생시킬 수 있음을 발견하였다.

[0009]

본 발명의 첫번째 양태에서,

[0010]

a) 박테리아 당류와 0.001-0.7, 0.005-0.5, 0.01-0.5, 0.1-1.2, 0.1-0.5, 0.1-0.2, 0.5-0.8, 0.1-0.8, 0.3-1.0 또는 0.4-0.9 몰당량의 페리오데이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

[0011]

b) 활성화된 박테리아 당류와 담체 단백질을 혼합시키는 단계;

[0012]

c) 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질과 환원제를 반응시켜 컨주게이트를 형성시키는 단계; 또는

[0013]

a) 박테리아 당류와 0.001-0.7, 0.005-0.5, 0.01-0.5, 0.1-1.2, 0.1-0.5, 0.1-0.2, 0.5-0.8, 0.1-0.8, 0.3-1.0 또는 0.4-0.9 몰당량의 페리오데이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

[0014]

b) 활성화된 박테리아 당류와 링커를 혼합시키는 단계;

[0015]

c') 환원제를 이용하여 활성화된 박테리아 당류와 링커를 반응시켜 박테리아 당류-링커를 형성시키는 단계;

[0016]

d) 박테리아 당류-링커와 담체 단백질을 반응시켜 컨주게이트를 형성시키는 단계를 포함하는 박테리아 당류(들)을 컨주게이션시키는 방법이 제공되며,

[0017]

상기 단계 a)는 아민기를 함유하지 않는 완충액에서 발생하고, 상기 완충액은 1-100mM의 농도를 갖는다.

[0018]

본 발명의 두번째 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 컨주게이트가 제공된다.

[0019]

본 발명의 세번째 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득되는 컨주게이트가 제공된다.

[0020]

본 발명의 네번째 양태에서, 본 발명의 컨주게이트 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 면역원성 조성물이 제공된다.

[0021]

본 발명의 다섯번째 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물을 포함하는 백신이 제공된다.

[0022]

본 발명의 여섯번째 양태에서, 박테리아 질병의 예방 또는 치료에서 본 발명의 면역원성 조성물 또는 본 발명의 백신의 용도가 제공된다.

[0023]

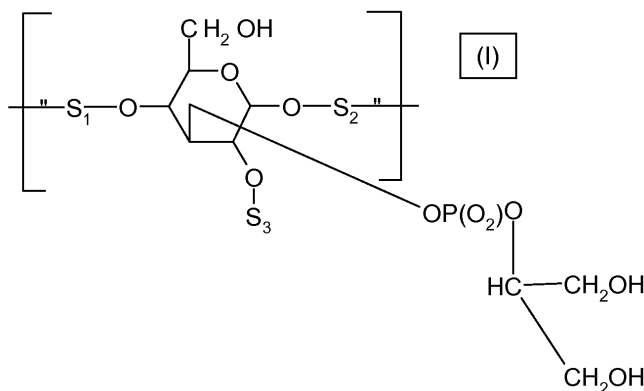
본 발명의 일곱번째 양태에서, 박테리아 질병의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 본 발명의 백신의 용도가 제공된다.

[0024]

본 발명의 여덟번째 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물 또는 본 발명의 백신의 환자로의 투여를 포함하는 박테리아 감염을 예방하거나 치료하는 방법이 제공된다.

[0025]

본 발명의 아홉번째 양태에서, 하기 화학식 (I)의 반복 단위를 포함하는 활성화된 박테리아 당류가 제공되며:



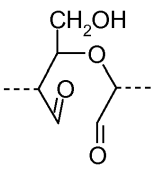
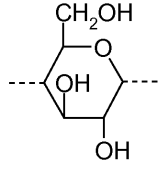
[0026]

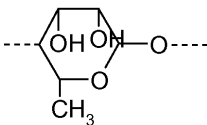
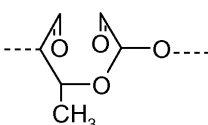
[0027]

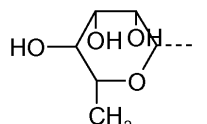
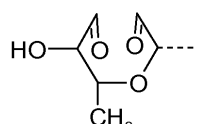
여기서, 활성화된 박테리아 당류는 n개의 반복 단위를 포함하고, n은 2 내지 2400, 500 내지 2000, 750 내지 1500, 1000 내지 2000 또는 1500 내지 2300이고;

[0028]

상기 식에서, S1의 적어도 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% 또는 30%이지만, 0.001%, 0.01%,

0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% 또는 50% 미만은  이고, 나머지는  이고,

[0029] S2는  또는  이고,

[0030] S3는  또는  이다.

**도면의 간단한 설명**

[0032] **도 1.** 페리오데이트 처리 후의 23F 및 6B 다당류의 크기. 삼각형으로 표시된 선은 10mM 포스페이트 완충액 중의 6B의 크기를 나타내고, 다이아몬드로 표시된 선은 10mM 포스페이트 완충액 중의 23F의 크기를 나타내고, 정사각형으로 표시된 선은 100mM 포스페이트 완충액 중의 23F의 크기를 나타낸다.

**도 2.** CDAP 또는 환원성 아민화 컨쥬게이션을 이용한 23F 컨쥬게이트의 면역원성의 비교. 그래프 a)는 ELISA 검정의 결과를 나타낸다. 그래프 b)는 옉소닌식작용(opsonophagocytosis) 검정의 결과를 나타낸다.

**도 3.** Balb/c 마우스 모델에서 실시예 4에 기재된 컨쥬게이션 방법을 이용하여 컨쥬게이션된 PS06B-CRM의 면역원성의 평가.

**도 4.** 기니아 피그 모델에서 실시예 4에 기재된 컨쥬게이션 방법을 이용하여 컨쥬게이션된 PS06B-CRM의 면역원성의 평가.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**본 발명의 상세한 설명**

[0033] 본 발명은 담체 단백질에 항원을 컨쥬게이션시키는 개선된 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은,

[0034] a) 박테리아 당류와 0.001-0.7, 0.005-0.5, 0.01-0.5, 0.1-1.2, 0.1-0.5, 0.1-0.2, 0.5-0.8, 0.1-0.8, 0.3-1.0 또는 0.4-0.9 몰당량의 페리오데이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

[0036] b) 활성화된 박테리아 당류와 담체 단백질을 혼합시키는 단계;

[0037] c) 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질과 환원제를 반응시켜 컨쥬게이트를 형성시키는 단계; 또는

[0038] a) 박테리아 당류와 0.001-0.7, 0.005-0.5, 0.01-0.5, 0.1-1.2, 0.1-0.5, 0.1-0.2, 0.5-0.8, 0.1-0.8, 0.3-1.0 또는 0.4-0.9 몰당량의 페리오데이트를 반응시켜 활성화된 박테리아 당류를 형성시키는 단계;

[0039] b) 활성화된 박테리아 당류와 링커를 혼합시키는 단계;

[0040] c') 환원제를 이용하여 활성화된 박테리아 당류와 링커를 반응시켜 박테리아 당류-링커를 형성시키는 단계;

[0041] d) 박테리아 당류-링커와 담체 단백질을 반응시켜 컨쥬게이트를 형성시키는 단계를 포함하는 박테리아 당류(들)을 컨쥬게이션시키는 방법을 제공하며,

[0042] 상기 방법에서, 단계 a)는 아민기를 함유하지 않는 완충액에서 발생하고, 상기 완충액은 1-100mM의 농도를 갖는다.

[0043] 용어 '페리오데이트'는 페리오데이트 및 과요오드산 둘 모두를 포함한다. 이러한 용어는 또한 메타페리오데이

트( $IO_4^-$ ) 및 오르토펠리오데이트( $IO_6^{5-}$ ) 둘 모두를 포함하나, 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되는 페리오데이트는 메타페리오데이트이다. 용어 '페리오데이트'는 또한 소듐 페리오데이트 및 포타슘 페리오데이트를 포함하는 페리오데이트의 다양한 염을 포함한다. 한 구체예에서, 사용되는 페리오데이트는 소듐 메타페리오데이트이다. 항원이 페리오데이트와 반응하는 경우, 페리오데이트는 인접 히드록실기를 산화시켜 카르보닐 또는 알데히드기를 형성시키고, C-C 결합의 분해를 야기시킨다. 이러한 목적상, 용어 '항원과 페리오데이트를 반응시키다'는 페리오데이트에 의한 인접 히드록실기의 산화를 포함한다.

[0044] 본 발명의 목적상, '활성화된 박테리아 당류'는 본 발명의 방법의 단계 a)에 의해 활성화된 박테리아 당류이다.

[0045] 본 발명의 목적상, 용어 '컨쥬게이트'는 담체 단백질에 공유적으로 연결된 박테리아 당류를 나타낸다. 한 구체예에서, 박테리아 당류는 담체 단백질에 직접 연결된다. 두번째 구체예에서, 박테리아 당류는 스페이서(spacer)/링커를 통해 단백질에 연결된다.

[0046] 단계 a)에서 사용되는 완충액은 아민기를 함유하지 않는 완충액이다. 한 구체예에서, 완충액은 포스페이트 완충액, 보레이트 완충액, 아세테이트 완충액, 카르보네이트 완충액, 말레이트 완충액 및 시트레이트 완충액으로 구성되는 목록으로부터 선택된다. 두번째 구체예에서, 완충액은 무기 완충액이다. 용어 무기 완충액은 완충 능력이 탄소를 함유하지 않는 화합물의 존재로 인한 것인 임의의 완충 용액을 포함한다. 본 발명의 무기 완충액은 포스페이트 완충액 및 보레이트 완충액을 포함한다. 한 구체예에서, 완충액은 포스페이트 완충액이다.

[0047] 한 구체예에서, 완충액은 1-100mM, 5-80mM, 1-50mM, 1-25mM, 10-40mM, 1-10mM, 5-15mM, 8-12mM, 10-20mM, 5-20mM, 10-50mM, 약 10mM 또는 약 20mM의 농도를 갖는다. 한 추가 구체예에서, 단계 a)에서의 pH는 pH 2.5-8.0, pH 5.0-7.0, pH 5.5-6.5, pH 5.8-6.3, 또는 약 pH 6.0이다.

[0048] 본 명세서 전체에 걸친 용어 "당류"는 다당류, 테코인산(techoic acid) 또는 올리고당류를 나타낼 수 있고, 3개 모두를 포함한다. 이는 지질다당류(LPS) 또는 지질올리고당류(LOS)를 나타낼 수 있다. 사용 전, 다당류는 공급원 균주로부터 분리될 수 있거나, 공급원 균주로부터 분리될 수 있고, 공지된 방법(예를 들어, EP497524 및 EP497525 참조; Shousun Chen Szu et al. - Carbohydrate Research Vol 152 p7-20 (1986)), 예를 들어, 미세유동(microfluidisation)에 의해 어느 정도로 사이징(sizing)된다. 올리고당류는 적은 수의 반복 단위(통상적으로, 5-30개의 반복 단위)를 갖고, 이는 통상적으로 가수분해된 다당류이다.

[0049] 한 구체예에서, 박테리아 당류는 박테리아 캡슐 당류이다. 본 발명의 한 구체예에서, 박테리아 당류는 그룹 B 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)(*S. pneumoniae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)(*H. influenzae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)(*N. meningitidis*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(*S. aureus*), 엔테로코쿠스(*enterococci*), 살모넬라 Vi(*Salmonella Vi*), 또는 스태필로코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)(*S. epidermidis*)로부터 유래된다. 한 추가 구체예에서, 박테리아 당류는 *S. 뉴모니아*, *H. 인플루엔자*, *N. 메닝기티디스*, *S. 아우레우스*, 엔테로코쿠스, 살모넬라 Vi, 또는 *S. 에피더미디스*로부터 유래된다. 한 추가 구체예에서, 박테리아 당류는 *N. 메닝기티디스* 혈청군 A(MenA), B(MenB), C(MenC), W135(MenW) 또는 Y(MenY), 그룹 B 스트렙토코쿠스 군 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, 또는 VII, 스태필로코쿠스 아우레우스 타입 5, 스태필로코쿠스 아우레우스 타입 8, 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*)(Vi 당류), 비브리오 콜레라, 또는 *H. 인플루엔자* 타입 b로 구성되는 목록으로부터 선택된 박테리아 캡슐 당류이다. 한 구체예에서, 박테리아 당류는 스트렙토코쿠스 뉴모니아 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 또는 33F로부터의 캡슐 당류이다. 한 추가 구체예에서, 박테리아 당류는 5, 6B, 6A, 7F, 9V, 14, 또는 23F로 구성되는 군으로부터 선택된 *S. 뉴모니아* 캡슐 당류이다. 임의로, 본 발명의 박테리아 당류는 *S. 뉴모니아* 캡슐 당류 23F, 6B 또는 6A이다. 한 구체예에서, 박테리아 당류는 *S. 뉴모니아* 캡슐 당류 23F이다. 한 구체예에서, 박테리아 당류는 *S. 뉴모니아* 캡슐 당류 6B이다. 한 구체예에서, 박테리아 당류는 *S. 뉴모니아* 캡슐 당류 6A이다. 또 다른 추가 구체예에서, 박테리아 당류는 헤모필루스 인플루엔자 b(Hib) 다당류 또는 올리고당류이다. 한 구체예에서, 박테리아 당류가 인접 항 디올을 함유한다.

[0050] 박테리아 당류는 천연 다당류이거나, x2, x4, x6, x8, x10 또는 x20배 이하로 크기 감소될 수 있다(예를 들어, (미세유동[예를 들어, Emulsiflex C-50 장치에 의한] 또는 다른 공지된 기술[예를 들어, 열, 화학적, 산화, 음파처리 방법]에 의한). 한 구체예에서, 박테리아 당류는 단계 a) 전에 미세유동화된다. 올리고당류는 실질적으로 추가로 크기 감소될 수 있다[예를 들어, 공지된 열, 화학적, 또는 산화 방법에 의한].

[0051] 본 발명의 목적상, "천연 다당류"는 목적이 당류의 크기를 감소시키기 위한 것인 방법에 적용되지 않은 박테리아



아 당류를 의미한다. 다당류는 일반적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 이러한 당류는 여전히 천연 당류이다. 다당류가 당류의 크기를 감소시키는 기술에 적용되는 경우만 다당류는 천연인 것으로 간주되지 않는다.

[0052]

본 발명의 방법에 의한 컨주게이션에 적합한 박테리아 당류의 중량-평균 분자량은 20kDa 내지 2000kDa, 30kDa 내지 1000kDa, 40kDa 내지 500kDa, 50kDa 내지 400kDa, 75kDa 내지 300kDa 또는 1000kDa 내지 2000kDa일 수 있다. S. 뉴모니에로부터의 천연 23F 캡슐 당류의 경우, 천연 다당류의 평균 분자량은 750-1500 kDa 또는 1200-1300kDa이다. 천연 Hib 당류의 경우, 천연 다당류의 평균 분자량은 100 내지 250kDa이다. 본원의 당류의 분자량 또는 평균 분자량은 컨주게이션 전에 측정된 박테리아 당류의 중량-평균 분자량(Mw)을 의미하고, 이는 MALLS에 의해 측정된다. MALLS 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 당류의 MALLS 분석을 위해, 2개의 컬럼(TSKG6000 및 5000PWx1)이 조합하여 사용될 수 있고, 당류가 물에 용리된다. 당류는 광산란 검출기(예를 들어, 488nm의 10mW 아르곤 레이저가 장비된 Wyatt Dawn DSP) 및 간섭 굴절계(inferometric refractometer)(예를 들어, P100 셀(cell) 및 498nm의 적색 필터가 장비된 Wyatt Otilab DSP)를 이용하여 검출된다. MALLS 분석은 RI/DAWN-EOS 검출기를 이용하여 0.75 ml/분으로 용리 완충액으로서 TSKGMPwx1 및 50 mM Na/K P04, 200 mM NaCl pH 7.0을 이용하여 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 당류의 다분산도(polydispersity)는 1-1.5, 1-1.3, 1-1.2, 1-1.1 또는 1-1.05이고, 담체 단백질에 대한 컨주게이션 후, 컨주게이트의 다분산도는 1.0-2.5, 1.0-2.0, 1.0-1.5, 1.0-1.2, 1.5-2.5, 1.7-2.2 또는 1.5-2.0이다. 모든 다분산도 측정은 MALLS에 의해 생성된다.

[0053]

페리오테이트를 이용한 처리는 박테리아 당류의 크기에서의 감소를 발생시킬 수 있다(사이징 효과(sizing effect)). 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 이러한 사이징 효과를 감소시킨다. 이는 스트렙토코쿠스 뉴모니에로부터의 23F 박테리아 당류에 대해 관찰된다(실시에 1에서와 같음). 이러한 이유로, 한 구체예에서, 본 발명의 박테리아 당류의 평균 분자량은 단계 a) 후에 1-1100kDa, 100-470kDa, 200-300kDa, 600-1100kDa 또는 800-1000kDa이다(상기 기재된 바와 같이 MALLS에 의해 측정됨). 한 구체예에서, 23F 당류의 평균 분자량은 단계 a) 후에 100-470kDa 또는 200-300kDa이다. 한 구체예에서, Hib 박테리아 당류의 평균 분자량은 단계 a) 후에 1 내지 50kDa 또는 5 내지 10kDa이다.

[0054]

용어 "담체 단백질"은 작은 펩티드 및 큰 폴리펩티드(>10 kDa) 둘 모두를 포함한다. 담체 단백질은 임의의 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 이는 하나 이상의 T-헬퍼 에피토프를 포함할 수 있다. 담체 단백질은 테타누스 독소이드(TT), 테타누스 독소이드 단편 C, 테타누스 독소이드의 비-독성 돌연변이[TT의 상기 모든 변이체는 본 발명의 목적상 동일 유형의 담체 단백질인 것으로 간주되는 것을 주의함], 테타누스 독소 T-세포 에피토프를 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어, N19(WO2006/067632), 디프테리아 독소이드(DT), CRM197, 디프테리아 독소의 다른 비-독성 돌연변이[예를 들어, CRM176, CRM197, CRM228, CRM 45(Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 및 CRM107 및 문헌[Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기재된 다른 돌연변이; Glu-148의 Asp, Gln 또는 Ser로의 돌연변이 또는 결실 및/또는 Ala 158의 Gly로의 돌연변이 또는 결실 및 US 4709017 또는 US 4950740에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 하나 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 US 5917017 또는 US 6455673에 개시된 다른 돌연변이; 또는 US 5843711에 개시된 단편](DT의 상기 모든 변이체는 본 발명의 목적상 동일한 유형의 담체 단백질인 것으로 간주되는 것을 주의함), 뉴모코쿠스 뉴몰리신(Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC(수막구균 외막 단백질 - 보통 N. 메닌기티디스 혈청군 B로부터 추출됨 - EP0372501), 합성 펩티드(EP0378881, EP0427347), 열충격 단백질(WO 93/17712, WO 94/03208), 퍼투시스 단백질(WO 98/58668, EP0471177), 사이토카인, 림포카인, 성장인자 또는 호르몬(WO 91/01146), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다수의 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질(Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), 예를 들어, N19 단백질(Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) 뉴모코쿠스 표면 단백질 PspA(WO 02/091998), 철 흡수 단백질(WO 01/72337), C. 디피실레(C. difficile)의 독소 A 또는 B(WO 00/61761), H. 인플루엔자 단백질 D(EP594610 및 WO 00/56360), 뉴모코쿠스 PhtA(WO 98/18930, Sp36로도 언급됨), 뉴모코쿠스 PhtD(WO 00/37105에 개시되고, Sp036D로도 언급됨), 뉴모코쿠스 PhtB(WO 00/37105에 개시되고, Sp036B로도 언급됨), 또는 PhtE(WO00/30299에 개시되고, BVH-3으로 언급됨)일 수 있다.

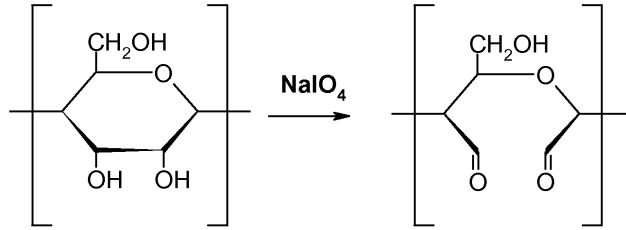
[0055]

본 발명의 한 구체예에서, 담체 단백질은 테타누스 독소이드(TT), 테타누스 독소이드의 단편 C, 디프테리아 독소이드(DT), CRM197, 뉴몰리신(Ply), 단백질 D, PhtD, PhtDE 및 N19로 구성되는 군으로부터 선택된다. 한 추가 구체예에서, 담체 단백질은 CRM197이다. 또 다른 추가 구체예에서, 담체 단백질은 테타누스 독소이드(TT)이다.



[0056] 한 구체예에서, 단계 a)는 어두운 곳에서 수행된다.

[0057] 항원이 페리오데이트와 반응하는 경우, 페리오데이트는 인접 히드록실기를 산화시켜 카르보닐 또는 알데히드기를 형성시키고, C-C 결합의 분해를 야기시킨다. 산화 단계(단계 a)는 하기 기재된 바와 같이 발생할 수 있다:

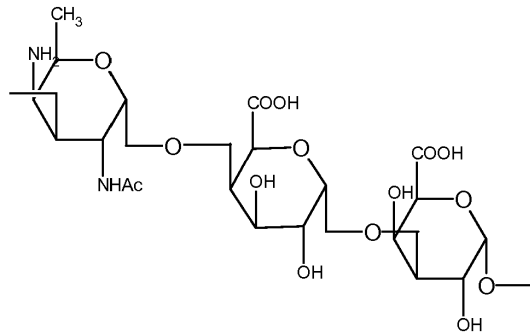


[0058]

[0059] 낮은 농도의 완충액, 특히 포스페이트 완충액 및 적은 양의 페리오데이트가 사용되는 경우, 이는 상기 기재된 사이징 효과를 감소시킬 수 있다.

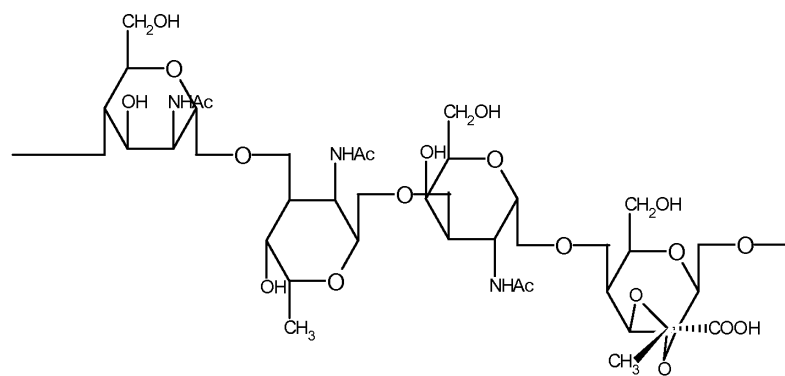
[0060] 스트렙토코쿠스 뉴모니에 캡슐 당류는 하기 제시되는 반복 영역의 구조로부터 관찰될 수 있는 바와 같이 페리오데이트에 의해 산화될 수 있는 인접 히드록실기를 함유한다:

[0061] PS1



[0062]

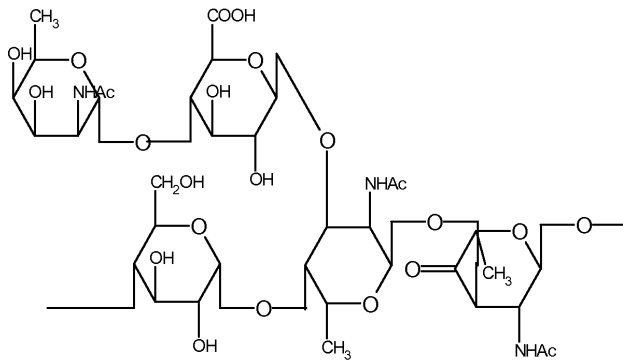
[0063] PS4



[0064]

[0065]

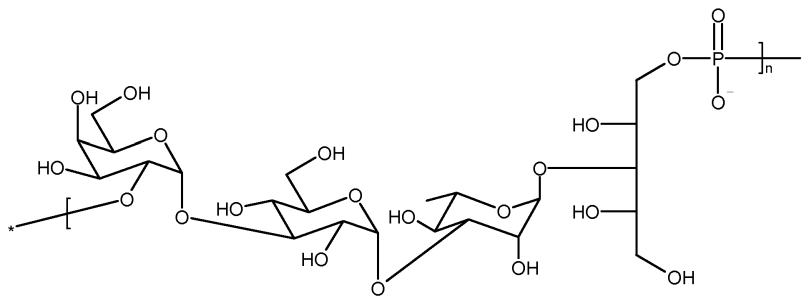
PS5



[0066]

[0067]

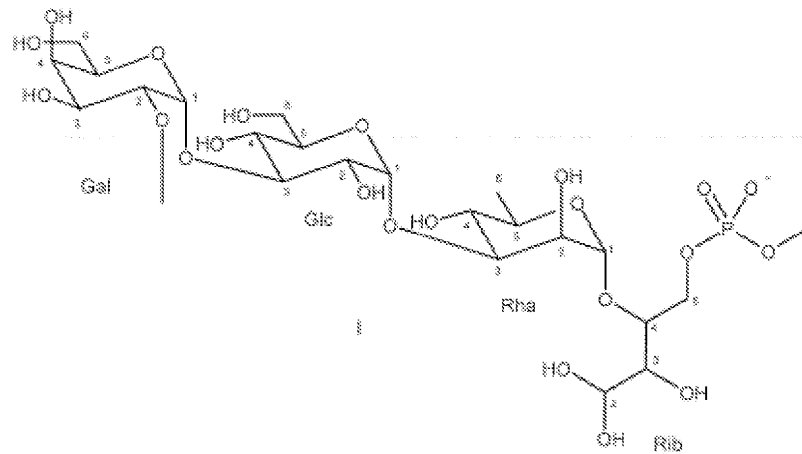
PS 6A



[0068]

[0069]

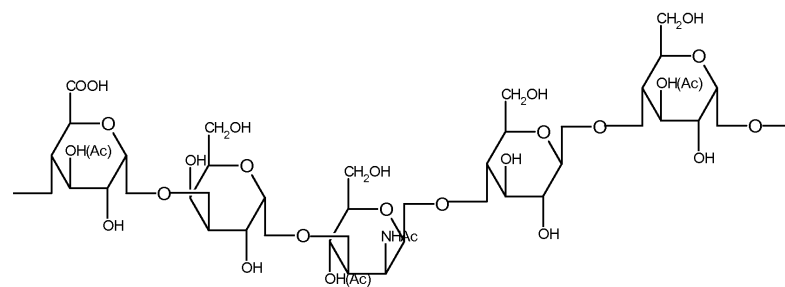
PS 6B



[0070]

[0071]

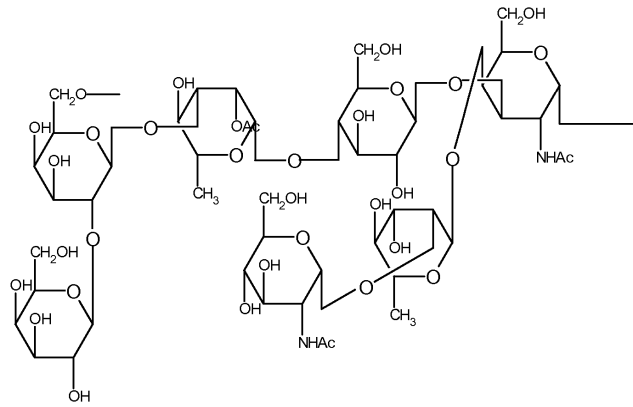
PS9



[0072]

[0073]

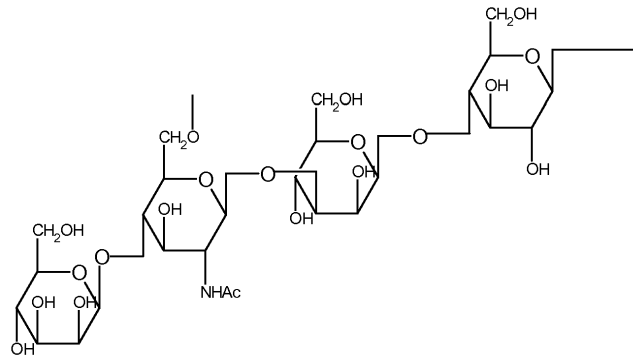
PS7F



[0074]

[0075]

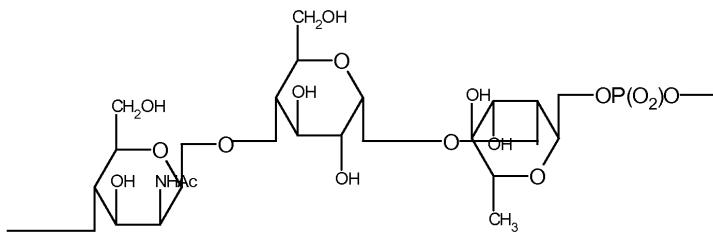
PS14



[0076]

[0077]

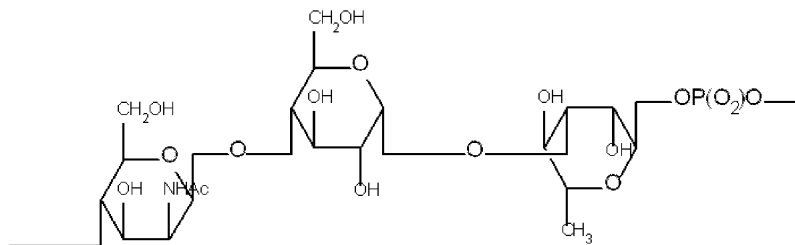
PS19F



[0078]

[0079]

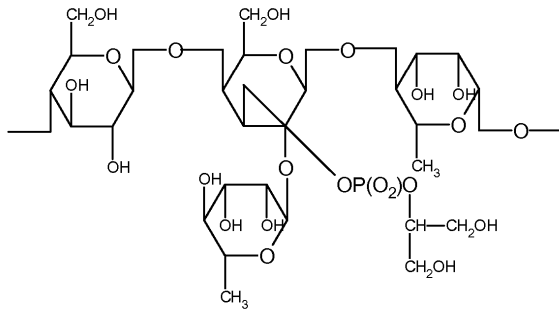
PS19A



[0080]

[0081]

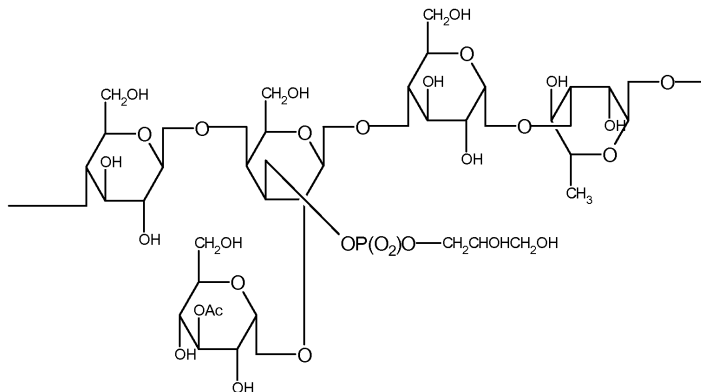
PS23F



[0082]

[0083]

PS18C



[0084]

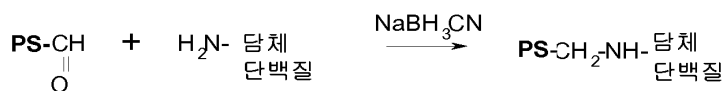
[0085]

한 구체예에서, 박테리아 당류의 인접 비율의 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% 또는 50% 미만은 단계 a) 동안 산화된다.

[0086]

한 구체예에서, 단계 a)에서 생성된 카르보닐기는 단계 c)에서 담체 단백질 상의 아민기와 반응한다. 이는 하기 반응식에 따라 발생할 수 있다:

[0087]



[0088]

한 구체예에서, 박테리아 당류는 단계 a)에서 0.2g/l 내지 14g/l, 8g/l 내지 12g/l, 10 g/l 내지 12g/l, 1 g/l 내지 4g/l, 0.2g/l 내지 1 g/l 또는 0.4g/l 내지 0.6g/l 또는 약 11 g/l 또는 약 0.5g/l의 농도로 존재한다. 한 구체예에서, 단계 b)에서 담체 단백질의 최초 농도는 0.5g/l 내지 35g/l, 25g/l 내지 35g/l, 0.5g/l 내지 5g/l 또는 0.8g/l 내지 2g/l 또는 약 32g/l 또는 1 g/l이다. 한 추가 구체예에서, 단계 b)에서 활성화된 박테리아 당류의 최초 농도는 0.2g/l 내지 20g/l, 10g/l 내지 28g/l, 또는 0.2g/l 내지 4g/l 또는 1 g/l 내지 2g/l 또는 약 15g/l 또는 1.6 g/l이다. 한 추가 구체예에서, 단계 b)에서 활성화된 박테리아 당류 대 담체 단백질의 최초 비는 2.0:1 내지 0.1:1, 1.8:1 내지 0.4:1, 1.4:1 내지 1.6:1, 1:1 내지 1.4:1, 1.8:1 내지 1.6:1, 0.8:1 내지 0.4:1, 0.7:1 내지 0.5:1, 또는 0.7:1 내지 0.6:1(w/w)이다. 한 추가 구체예에서, 단계 c) 또는 c') 후의 담체 단백질 대 박테리아 당류의 최종 비는 0.5:1 내지 4:1, 0.8:1 내지 3.2:1, 0.5:1 내지 1.8:1, 1.4:1 내지 1.8:1, 1:1 내지 1.2:1 또는 2.5:1 내지 3.5:1이다.

[0089]

한 구체예에서, 단계 a)에서의 반응의 온도는 4-40°C, 10-32°C, 17-30°C 또는 22-27°C이다. 통상적으로, 이러한 온도는 단계 a)를 통해 유지된다. 단계 c) 동안의 반응 온도는 4-40°C, 10-32°C, 17-30°C 또는 22-27°C이다. 통상적으로, 이러한 온도는 단계 c)를 통해 유지된다.

[0090]

한 구체예에서, 본 발명의 방법의 단계 a)는 30시간 미만, 5 내지 25시간, 15 내지 25시간, 30분 내지 25시간, 1시간 내지 35시간, 10 내지 20시간, 또는 15 내지 20시간, 약 18시간 또는 약 1시간 내에 발생한다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법의 단계 c)는 10-60시간, 10-20시간, 20-60시간, 30-50시간, 또는 35-45시간 내에 발생

한다.

- [0091] 컨쥬게이션은 또한 본 발명의 화학작용을 이용하여 이중-이기능성 또는 동중-이기능성 링커의 첨가를 통해 발생할 수 있다. 링커의 한 말단은 환원성 아민화에 의해 활성화된 항원과 반응할 것이나, 링커의 다른 말단은 임의의 유형의 화학작용을 이용하여 담체 단백질과 반응할 수 있다. 이러한 이유로, 링커는 적어도 하나의 반응성 아미노기를 함유할 것이고, 링커가 동중-이기능성인 경우, 링커는 2개의 반응성 아미노기를 함유할 것이고, 링커가 이중-이기능성인 경우, 링커는 하나의 반응성 아미노기 및 상이한 반응성기를 함유할 것이고, 한 구체예에서, 이러한 두번째 반응성 기는 반응성 카르보닐기이다. 한 구체예에서, 링커는 1 내지 20 옹스트롬 길이이다. 추가 구체예에서, 링커는 4 내지 20, 4 내지 12, 또는 5 내지 10개의 탄소 원자를 갖는다. 가능한 링커는 아디프산 디히드라이드(ADH)이다. 다른 링커는 B-프로피온아미도(WO 00/10599), 니트로페닐-에틸아민(Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), 할로알킬 할라이드(US4057685), 글리코시드 결합(US4673574, US4808700), 핵산 디아민 및 6-아미노카프로산(US4459286)을 포함한다.
- [0092] 일반적으로, 담체 단백질 상의 하기 유형의 화학적 기가 두번째 반응기로서 커플링/컨쥬게이션에 사용될 수 있다:
- [0093] A) 카르복실(예를 들어, 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 카르보디이미드 화학작용, 예를 들어, EDAC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드))를 이용하여 링커 상의 아미노기에 연결된다.
- [0094] 주의: 상기 EDAC 대신, 임의의 적합한 카르보디이미드가 사용될 수 있다.
- [0095] B) 아미노기(예를 들어, 리신을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 카르보디이미드 화학작용, 예를 들어, EDAC를 이용하여 링커 상의 카르복실기에 연결된다. 또 다른 구체예에서, 이러한 기는 링커 상의 CDAP 또는 CNBr을 이용하여 활성화된 히드록실기; 알데히드기를 갖는 링커; 숙신이미드 에스테르기를 갖는 링커에 연결된다.
- [0096] C) 술폰드릴(예를 들어, 시스테인을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 말레이미드 화학작용을 이용하여 브로모 또는 클로로 아세틸화 링커에 연결된다. 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘으로 활성화/변형된다.
- [0097] D) 상기 단백질은 알킬닐 또는 아지드기를 함유하도록 변형될 수 있고, 이는 '클릭(click)' 화학작용을 이용하여 링커에 컨쥬게이션될 수 있다(Tetrahedron letters (June 2005) 46:4479-4482에 기재됨).
- [0098] 주의: 상기 EDAC 대신, 임의의 적합한 카르보디이미드가 사용될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 환원제는 시아노보로히드라이드, 예를 들어, 소듐 시아노보로히드라이드, 보란-피리딘, 또는 보로히드라이드 교환 수지를 포함한다. 한 구체예에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드이다. 한 구체예에서, 0.5 내지 2, 0.6 내지 1.5 또는 0.8 내지 1.2 또는 약 1.0 몰당량의 소듐 시아노보로히드라이드가 단계 c)에서 사용된다. 한 추가 구체예에서, 환원제는 소듐 트리아세톡시보로히드라이드를 포함하고, 한 추가 구체예에서, 2 내지 10 또는 3 내지 9 몰당량 또는 약 2.5 몰당량의 소듐 트리아세톡시보로히드라이드가 단계 c)에서 사용된다.
- [0100] 단계 c) 전, 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질이 동결건조될 수 있다. 한 구체예에서, 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질이 함께 동결건조된다. 이는 단계 b) 전, 또는 단계 b) 후에 발생할 수 있다. 한 구체예에서, 동결건조는 비-환원 당의 존재하에서 발생하고, 가능한 비-환원 당은 수크로오스, 트레할로오스, 라피노오스, 스타키오스, 멜레지토오스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트를 포함한다.
- [0101] 한 추가 구체예에서, 비-환원 당은 수크로오스, 트레할로오스 또는 만니톨로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0102] 한 구체예에서, 단계 b) 및/또는 c)는 DMSO(디메틸설폭사이드) 용매에서 수행된다. 한 추가 구체예에서, 단계 b) 및/또는 c)는 DMF(디메틸포름아미드) 용매에서 수행된다. DMSO 또는 DMF 용매는 동결건조된 활성화된 박테리아 당류 및 담체 단백질을 재구성시키는데 사용될 수 있다.
- [0103] 단계 c)의 말단에서, 컨쥬게이트 내에 남아있는 반응되지 않은 카르보닐기가 존재할 수 있고, 이들은 적합한 캡핑(capping) 작용제를 이용하여 캡핑될 수 있다. 한 구체예에서, 이러한 캡핑 작용제는 소듐 보로히드라이드(NaBH<sub>4</sub>)이고, 예를 들어, 단계 c)의 생성물은 15분-15시간, 15분-45분, 2-10시간 또는 3-5시간, 약 30분 또는 약 4시간 동안 소듐 보로히드라이드와 반응될 수 있다. 한 추가 구체예에서, 캡핑은 단계 c)의 생성물과 약

2 몰당량 또는 1.5 내지 10 몰당량의 NaBH<sub>4</sub>를 혼합시킴으로써 달성된다.

[0104] 본 발명은 또한 컨주게이트를 정제시키는 추가 단계 e)를 제공하며, 단계 e)는 정용여과, 예를 들어, 100kDa의 컷-오프(cut-off)를 갖는 정용여과를 포함할 수 있다. 또한 또는 대안적으로, 단계 e)는 이온 교환 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 한 추가 구체예에서, 단계 e)는 크기 배제 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 청구항 1 내지 15항의 방법은 컨주게이트가 멸균 여과되는 추가 단계 f)를 포함한다.

[0105] 컨주게이트는 또한 추가 항원과 혼합될 수 있다. 한 구체예에서, 추가 항원은 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 S. 뉴모니에 당류를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 4, 6B, 9V, 14, 18C 및 19F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 4, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 및 19F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A 및 19F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A 및 19F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 S. 뉴모니에 당류 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함한다.

[0106] '추가 항원'으로 열거된 당류 중 임의의 당류가 본 발명의 방법 또는 상이한 방법에 의해 담체 단백질에 임의로 컨주게이션된다. 임의로, 이러한 추가 항원은 상기 나열된 담체 단백질에 컨주게이션된다.

[0107] 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 1을 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D, CRM197, 뉴몰리신 또는 PhtD 또는 이의 단편 또는 융합 단백질에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 3를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 4를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 5를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 6B를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 7F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 9V를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 14를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 단백질 D 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 23F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 테타누스 독소이드 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 18C를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 뉴몰리신 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 19A를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 CRM197 또는 PhtD 또는 이의 융합 단백질의 단편에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 22F를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 뉴몰리신 또는 H. 인플루엔자 단백질, 임의로 단백질 D 또는 PhtD 또는 이의 융합 단백질 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 6A를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 뉴몰리신 또는 H. 인플루엔자 단백질, 임의로 단백질 D 또는 PhtD 또는 이의 융합 단백질 또는 CRM197에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 6C를 포함한다. 한 구체예에서, 추가 항원은 디프테리아 독소이드(DT)에 컨주게이션된 S. 뉴모니에 캡슐 당류 19F를 포함한다.

[0108] 추가 항원은 또한 스트렙토코쿠스 뉴모니에 단백질을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 추가 항원은 폴리 히스티딘 트라이어드 패밀리(PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 패밀리, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체), 뉴몰리신(Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 1개의 단백질을 포함한다.

[0109] 추가 항원은 또한 추가 박테리아 종으로부터의 항원을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 백신 또는 면역원성 조성물은 S. 뉴모니에(S. 뉴모니에), 헤모필루스 인플루엔자(H. 인플루엔자), 나이세리아 메닌기티디스(N. 메닌기티디스), 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)(E. 콜리), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella cattharhalis*)(M. 카타랄리스), 테타누스, 디프테리아, 퍼투시스, 스태필로코쿠스 에피더미디스(S. 에피더미디스), 엔테로코쿠스, 슈도모나스 또는 스태필로코쿠스 아우레우스(S. 아우레우스)로부터 유래되는 항원을 포함한다.

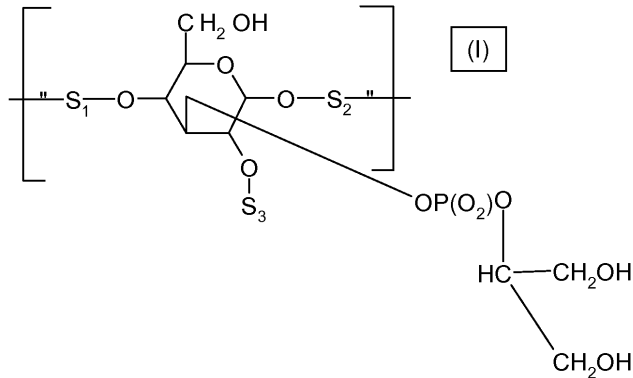
- [0110] 한 구체예에서, 추가 항원은 M. 카타랄리스 항원을 포함하고, 바람직한 M. 카타랄리스 항원은 OMP106[WO 97/41731(Antex) & WO 96/34960(PMC)]; OMP21; LbpA & LbpB[WO 98/55606(PMC)]; TbpA & TbpB[WO 97/13785 & WO 97/32980(PMC)]; CopB[Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1/2[WO 93/03761(University of Texas)]; 및 OmpCD이다. 조합 백신(특히, 중이염 예방용)에 포함될 수 있는 유형 분류할 수 없는(non-typeable) 헤모필루스 인플루엔자 항원의 예는 펄브린 단백질[US 5766608 - Ohio State Research Foundation] 및 이로부터의 펩티드를 포함하는 융합체(예를 들어, LB1(f) 펩티드 융합체; US 5843464(OSU) 또는 WO 99/64067); OMP26[WO 97/01638(Cortecs)]; P6[EP 281673(State University of New York)]; TbpA 및 TbpB; Hia; Hmw1,2; Hap; 및 D15를 포함한다.
- [0111] 한 추가 구체예에서, 추가 항원은 디프테리아 독소이드(DT), 테타누스 독소이드(TT), 및 퍼투시스 성분(통상적으로, 임의의 퍼탁틴(PRN) 및/또는 아글루티닌 1+2를 갖는 무독화된 퍼투시스 독소이드(PT) 및 섬유상 헤마글루티닌(FHA)], 예를 들어, DT, TT, PT, FHA 및 PRN 항원을 함유하거나, Tritanrix™으로서 SmithKlineBeecham Biologicals s.a.에 의해 시판되는 것과 같은 전체 세포 퍼투시스 성분을 갖는 시판되는 백신 INFANRIX-DTPa™(SmithKlineBeecham Biologicals)을 포함한다. 한 추가 구체예에서, 추가 항원은 B형 간염 표면 항원(HepB)을 포함한다.
- [0112] 한 추가 구체예에서, 추가 항원은 H. 인플루엔자(Hib)의 PRP 캡슐 당류를 포함한다.
- [0113] 한 추가 구체예에서, 추가 항원은 N. 메닌기티디스 A, C, W 또는 Y로부터의 적어도 하나의 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 추가 항원은 N. 메닌기티디스 A, C, W 또는 Y로부터의 캡슐 당류의 적어도 하나의 컨주게이트를 포함한다.
- [0114] 컨주게이트는 또한 애주번트와 혼합될 수 있다. 적합한 애주번트는 알루미늄 염(알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 히드록시드), 모노포스포릴 지질 A(예를 들어, 3D-MPL), 사포닌(예를 들어, QS21), 수중유 에멀전, 그람 음성 박테리아 균주로부터의 수포 또는 외막 소포 제조물(예를 들어, W002/09746에 교시된 것), 지질 A 또는 이의 유도체, 알킬 글루코사미드 포스페이트 또는 상기 애주번트 중 2개 이상의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0115] 한 추가 구체예에서, 본 발명의 컨주게이트는 약학적으로 허용되는 부형제와 혼합된다.
- [0116] 본 발명의 한 추가 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 컨주게이트가 제공된다. 본 발명의 한 추가 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득되는 컨주게이트가 제공된다. 본 발명은 또한 본 발명의 컨주게이트 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 한 구체예에서, 약학적으로 허용되는 부형제는 클로라이드 염을 함유하지 않고, 한 추가 구체예에서, 약학적 부형제는 소듐 클로라이드를 함유하지 않는다. 한 구체예에서, 약학적 부형제는 말레에이트, 트리스, 또는 시트레이트로 구성되는 군으로부터 선택된 완충액을 포함한다. 한 추가 구체예에서, 완충액은 말레에이트 완충액이다.
- [0117] 본 발명의 면역원성 조성물은 추가 항원, 특히 상기에 '추가 항원'으로 기재된 것을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 애주번트, 특히 상기 기재된 것을 포함할 수 있다.
- [0118] 본 발명은 또한 본 발명의 면역원성 조성물을 포함하는 백신을 제공한다.
- [0119] 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 백신 제조물은 전신 또는 점막 경로를 통해 상기 백신을 투여함으로써 감염에 민감한 포유동물을 보호하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 투여는 근내, 복막내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/영양, 기도, 비뇨생식관을 통한 주입을 포함할 수 있다. 폐렴 또는 중이염의 치료를 위한 백신의 비내 투여가 가능하다(뉴모코쿠스의 비인두 운반이 더욱 효과적으로 방지될 수 있고, 이에 따라 가장 초기 단계에서 감염이 감쇠될 수 있음). 본 발명의 백신은 단일 용량으로 투여될 수 있으나, 이의 성분은 또한 동시에 또는 상이한 시간에 함께 함께 공동 투여될 수 있다(예를 들어, 뉴모코쿠스 당류 컨주게이트는 서로 관련하여 면역 반응의 최적 협동을 위해 별개로, 동시에, 또는 백신의 임의의 박테리아 단백질 성분의 투여 1-2주 후에 투여될 수 있음). 단일 경로의 투여에 더하여, 2개의 상이한 경로의 투여가 이용될 수 있다. 예를 들어, 당류 또는 당류 컨주게이트는 IM(또는 ID) 투여될 수 있고, 박테리아 단백질은 IN(또는 ID) 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 백신은 프라이밍(priming) 용량에 대해 IM 투여될 수 있고, 부스터 용량에 대해 IN 투여될 수 있다.
- [0120] 백신 내의 단백질 항원의 함량은 통상적으로 1-100 µg, 임의로 5-50 µg, 가장 통상적으로 5-25 µg의 범위 내일 것이다. 최초 백신접종 후, 피검체는 적절한 간격을 두어 1회 또는 수회의 부스터 면역접종을 받을 수 있다.



- [0121] 백신 제조물은 일반적으로 문헌[Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)]에 기재되어 있다. 리포솜 내의 캡슐화는 풀러톤(Fullerton)의 미국 특허 4,235,877에 기재되어 있다.
- [0122] 본 발명의 백신은 임의의 경로에 의해 투여될 수 있으나, 피부로의 기재된 백신의 투여(ID)가 본 발명의 한 구체예를 형성한다. 인간 피부는 표피 위에 얇은 각질층으로 불리는 외부 "각질" 껍질을 포함한다. 상기 표피 아래는 진피로 불리는 층이며, 이는 차례로 피하 조직을 덮고 있다. 연구자들은 피부, 특히 진피로의 백신의 주사가 다수의 추가 장점과 또한 관련될 수 있는 면역 반응을 자극하는 것을 밝혀내었다. 본원에 기재된 백신을 이용한 피내 예방접종은 본 발명의 임의의 특징을 형성한다.
- [0123] 피내 주사의 통상적인 기술인 "망토우 방법(mantoux procedure)"은 피부를 세척하는 단계, 및 이후에 한손으로 피부를 펴고, 폭이 좁은 게이지 바늘(26-31 게이지)의 베벨(bevel)을 위로 향하게 하면서 바늘을 10-15°의 각도로 삽입하는 단계를 포함한다. 바늘의 베벨이 삽입된 후, 바늘의 몸통이 낮아지고, 피부 아래서 바늘을 높이기 위한 약간의 압력을 제공하면서 바늘의 몸통이 추가로 진전된다. 이후, 액체가 매우 천천히 주사되어 피부 표면 상에 수포 또는 범프(bump)가 형성된 후, 바늘이 천천히 회수된다.
- [0124] 더욱 최근에는, 피부 내로 또는 피부를 가로질러 액체 작용제를 투여하도록 특별히 설계되는 장치가 기재되었으며, 예를 들어, 상기 장치는 WO 99/34850 및 EP 1092444에 기재되어 있고, 또한 제트(jet) 주사 장치가, 예를 들어, WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기재되어 있다. 백신 제조물의 피내 투여의 대안적 방법은 통상적인 주사기 및 바늘, 또는 고체 백신의 발리스틱(ballistic) 전달을 위해 설계된 장치(WO 99/27961), 또는 경피 패치(WO 97/48440; WO 98/28037)를 포함할 수 있거나; 피부의 표면에 적용(경피 또는 피부통과 전달 WO 98/20734; WO 98/28037)될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 백신이 피부, 더욱 특히 진피에 투여되어야 하는 경우, 백신은 적은 액체 부피, 특히 약 0.05 ml 내지 0.2 ml의 부피로 존재한다.
- [0126] 본 발명의 피부 또는 피내 백신 중의 항원의 함량은 근대 백신에서 발견되는 통상적인 용량(상기 참조)과 유사할 수 있다. 그러나, 이는 제형이 "적은 용량"으로 존재할 수 있는 피부 또는 피내 백신의 특징이다. 따라서, "적은 용량" 백신 내의 단백질 항원은 임의로 용량 당 0.1 내지 10 µg 또는 0.1 내지 5 µg만큼 적은 양으로 존재하고; 당류(임의로, 컨쥬게이션된) 항원은 용량 당 0.01-1 µg, 또는 0.01 내지 0.5 µg 당류의 범위 내로 존재할 수 있다.
- [0127] 본원에서 사용되는 용어 "피내 전달"은 피부 내의 진피의 영역으로의 백신의 전달을 의미한다. 그러나, 백신은 반드시 진피 내에만 위치되는 것은 아니다. 진피는 인간 피부에서 표면으로부터 약 1.0 내지 약 2.0 mm에 위치한 피부 내의 층이나, 개체 및 신체의 상이한 부분 사이에서 일정량의 변화가 존재한다. 일반적으로, 피부의 표면 아래로 1.5 mm 진입함으로써 진피에 도달하는 것으로 예상될 수 있다. 진피는 표면의 각질층 및 표피와 아래의 피하층 사이에 위치된다. 전달 방식에 따라, 백신은 궁극적으로 진피 내에만 또는 진피 내에 주로 위치될 수 있거나, 백신은 궁극적으로 표피 및 진피 내에 분산될 수 있다.
- [0128] 본 발명의 한 양태에서, 임의로 동결건조된 형태의 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 바이얼을 포함하고, 본원에 기재된 바와 같은 에쥬번트를 함유하는 바이얼을 추가로 포함하는 백신 키트가 제공된다. 본 발명의 이러한 양태에서, 동결건조된 면역원성 조성물을 재구성시키기 위해 에쥬번트가 사용될 것이 예견된다.
- [0129] 본 발명의 추가 양태는 면역보호량의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트를 숙주에 투여하는 단계를 포함하는, 박테리아 질병 감염에 대해 인간 숙주를 면역화시키는 방법이다. 본 발명의 추가 양태는 면역보호량의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트를 숙주에게 투여하는 단계를 포함하는, S. 뉴모니아 및/또는 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기되는 감염에 대해 인간 숙주를 면역화시키는 방법이다.
- [0130] 본 발명의 추가 양태는 박테리아 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물이다. 본 발명의 추가 양태는 S. 뉴모니아 및/또는 헤모필루스 인플루엔자 감염에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물이다.
- [0131] 본 발명의 추가 양태는 박테리아 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트의 용도이다. 본 발명의 추가 양태는 S. 뉴모니아 및/또는 헤모필루스 인플루엔자 감염에

의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트의 용도이다.

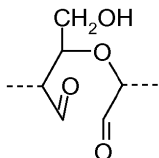
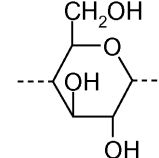
[0132] 본 발명은 또한 하기 화학식 (I)의 반복 단위를 포함하는 활성화된 박테리아 당류를 제공하며:



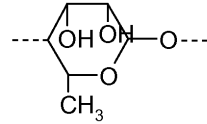
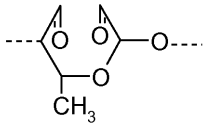
[0133]

[0134] 여기서, 활성화된 박테리아 당류는 n개의 반복 단위를 포함하고, n은 2 내지 2400, 20 내지 2000, 50 내지 1500, 1000 내지 2000, 1000 내지 2500 또는 1500 내지 2300이고;

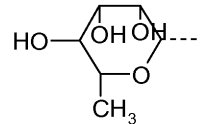
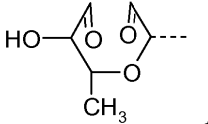
[0135] 상기 식에서, S1의 적어도 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% 또는 30%이지만, 0.001%, 0.01%,

0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% 또는 50% 미만은  이고, 나머지는  이고,

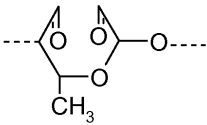
[0136]

S2는  또는  이고,

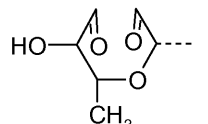
[0137]

S3는  또는  이다.

[0138]

한 구체예에서, S2의 0.001%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% 또는 50% 미만은  이다.

[0139]

한 구체예에서, S3의 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% 또는 50% 미만은  이다.

[0140]

"약" 또는 "대량"은 본 발명의 목적상 제공된 수의 10% 이상 또는 이하 내로 정의된다.

[0141]

본원의 용어 "포함하는", "-들을 포함하다" 및 "-을 포함하다"는 각각 모든 경우에 용어 "구성되는", "-들로 구성되다" 및 "-로 구성되다"로 임의로 대응될 수 있는 것으로 본 발명의 발명자에 의해 고려된다.

[0142]

본 발명의 "백신 조성물"과 관련된 본원의 구체예는 또한 본 발명의 "면역원성 조성물"과 관련된 구체예에 적용

가능하며, 그 반대도 마찬가지이다.

- [0143] 본 특허 명세서 내에 인용된 모든 참고문헌 또는 특허 출원은 본원에 참조로서 포함된다.
- [0144] 본 발명이 보다 잘 이해될 수 있도록 하기 위해, 하기 실시예가 기재된다. 이러한 실시예는 단지 예시 목적이며, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어선 안된다.
- [0145] **실시예**
- [0146] **실시예 1 - 페리오테이트를 이용한 23F 및 6B의 산화**
- [0147] 다당류(PS) 23F 또는 6B를 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4), 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 또는 WFI에 용해시켜 2mg PS/ml의 용액을 형성시켰다. 용액을 실온에서 교반하에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이 시간 후, pH를 1N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조정하였다. 페리오테이트를 다양한 양의 분말 또는 액체 형태(WFI 중 10mg/ml)로 첨가하여 다양한 물비를 달성하였다(표 1). 용액을 실온(20-25℃)에서 17시간 동안 인큐베이션시키고, 이 시간 후, 샘플을 WFI에 대해 투석시키거나 정용여과시켰다.
- [0148] 굴절률 및 다각 레이저 광산란(multiangle laser lights scattering)(MALLS-) 검출기와 커플링된 고성능 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 분자량을 측정하였다. 크기 배제 매체(TSK5000PWXL-Tosoh)를 사용하여 다당류의 분자 크기 분포를 프로파일링하였다(NaCl 0.2M-Na<sub>3</sub> 0.02% 중 0.5ml/분 용리).
- [0149] 표 1 및 도 1에는 상기 실험의 결과가 기재되어 있다. 이는 23F 당류에 대해, 100mM 포스페이트 완충액 중의 높은 몰당량의 페리오테이트를 이용하여 산화에 대해 실질적 사이징(sizing)이 발생하는 것을 나타낸다. 이러한 사이징 효과는 포스페이트 완충액의 농도 또는 사용되는 페리오테이트의 몰당량을 감소시킴으로써 감소될 수 있다.

[0150] 표 1:

| 23F            |                |                |             | 6B |                |               |             |
|----------------|----------------|----------------|-------------|----|----------------|---------------|-------------|
| 샘플             | 페리오데이트의<br>몰당량 | 완충액            | 크기<br>(KDa) | 샘플 | 페리오데이트의<br>몰당량 | 완충액           | 크기<br>(KDa) |
| 23F 천연         | 0              | 물              | 861         | 6B | 0              | 10mM<br>포스페이트 | 1022        |
| 23F 천연         | 0              | 10mM<br>포스페이트  | 847         | 6B | 0.1            | 10mM<br>포스페이트 | 975         |
| 23F 천연         | 0              | 100mM<br>포스페이트 | 860         | 6B | 0.2            | 10mM<br>포스페이트 | 990         |
| 23F ATCC<br>천연 | 0              | 100mM<br>포스페이트 | 1655        | 6B | 0.3            | 10mM<br>포스페이트 | 961         |
| 23F            | 1              | 100mM<br>포스페이트 | <1          | 6B | 0.75           | 10mM<br>포스페이트 | 868         |
| 23F            | 1              | 물              | 36          |    |                |               |             |
| 23F            | 1.2            | 100mM<br>포스페이트 | <1          |    |                |               |             |
| 23FATCC        | 1              | 100mM<br>포스페이트 | 2           |    |                |               |             |
| 23FATCC        | 0.125          | 100mM<br>포스페이트 | 39          |    |                |               |             |
| 23F            | 0.1            | 10mM<br>포스페이트  | 466.9       |    |                |               |             |
| 23F            | 0.15           | 10mM<br>포스페이트  | 398.5       |    |                |               |             |
| 23F            | 0.2            | 10mM<br>포스페이트  | 336         |    |                |               |             |
| 23F            | 0.5            | 10mM<br>포스페이트  | 179.1       |    |                |               |             |

[0151]

[0152] 실시예 2 - 환원성 아민화 및 CDAP 화학작용을 이용한 CRM197로의 23F의 컨주게이션

[0153] 환원성 아민화

[0154] 1 g의 PS23F를 500ml의 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.15에 용해시켰다. 이러한 용액을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. pH를 1M HCl을 이용하여 6.0N으로 조정하였다. 111 mg의 페리오데이트( $\text{NaIO}_4$ , 0.4 몰당량의 페리오데이트)를 PS23F 용액에 첨가하고, 용액을 실온에서 어두운 곳에서 17시간 동안 인큐베이션시켜 PS23F를 산화시켰다. 이후, 용액을 WFI에 대해 정용여과시켰다.

[0155] 활성화된 PS23F를 안정화 작용제의 존재하에서 CRM197 단백질과 함께(CRM/PS 비(w/w):0.625) 동결건조시켰다.

[0156] 350ml의 DMSO 용매를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시킴으로써 900mg의 동결건조된 PS23F/CRM197 혼합물을 용해화시켰다. PS23F/CRM197 혼합물을 환원시키기 위해, 1 몰당량의  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 을 첨가하였다(WFI 중 100mg/ml의 용액 735  $\mu\text{l}$ ). 용액을 교반하에서 실온(15°C-25°C)에서 추가 40시간 동안 인큐베이션시켰다. 이 시간 후, 2 몰당량의  $\text{NaBH}_4$ (WFI 중 100mg/ml)를 첨가하고, 용액을 실온에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 2200ml의 150mM NaCl을 첨가하고, 정용여과(컷-오프 100kDa)시키고, DEAE에 의해 정제하였다. 관심 분획을 풀링(pooling)시키고, 0.22  $\mu\text{m}$  필터를 통해 여과시켰다.

[0157] CDAP

[0158] 200mg의 미세유동화된 PS23F를 10mg/ml의 농도가 수득될때까지 물에 용해시켰다. NaCl을 2M의 최종 농도로 상기 용액에 첨가하였다.

- [0159] 충분한 CDAP 용액(5/50 v/v의 아세트니트릴/WFI 중에서 새로이 제조된 100mg/ml)을 첨가하여 0.75mg/mg PS의 CDAP:PS 비에 도달시켰다.
- [0160] 90초 후, 0.1N NaOH를 첨가하여 pH를 pH 9.5로 상승시켰다. 3분 후, 충분한 CRM197(0.15M NaCl 중 10mg/ml)을 첨가하여 1.5의 비(CRM197:PS (w/w))에 도달시키고, pH를 pH 9.5에 유지시켰다. 이러한 용액을 pH 9.5에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0161] 이러한 커플링 단계 후, 10ml의 2M 글리신 용액을 혼합물에 첨가하고, pH를 pH9.0(켄칭 pH)로 조정하였다. 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 컨쥬게이트를 5µm 필터, 및 이후에 Sephacryl S400HR(XK50/100)을 이용하여 정제하여 소분자 및 컨쥬게이션되지 않은 다당류 및 단백질을 제거하였다. 유속을 150ml/시간으로 고정시켰다. 용리를 150mM NaCl을 이용하여 달성하였다. 관심 분획을 푸울링시키고, Milipack 20을 이용하여 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1.35/w의 최종 CRM197/PS 비(w/w)를 가졌다.
- [0162] **실시에 3 - 환원성 아민화 및 CDAP 화학작용에 의해 제조된 23F-CRM197 컨쥬게이트의 면역원성**
- [0163] 컨쥬게이트를 실시에 2에 기재된 방법을 이용하여 제조하였다. 암컷 기니아 피그를 0.25µg의 PS23F-CRM197 컨쥬게이트로 3회(0, 14 및 28일) 근내 면역화시켰다. 동물을 42일에 채혈하고, PS23F에 대한 항체 반응을 ELISA 및 OPA에 의해 측정하였다.
- [0164] **ELISA**
- [0165] 마이크로플레이트를 PBS 완충액 중의 정제된 뉴모코쿠스 다당류로 코팅시켰다. 플레이트를 0.9% NaCl 및 0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 혈청을 PBS 0.05% Tween 20 중 CPS(V/V)와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 혈청을 마이크로웰에 첨가하고, PBS-0.05% Tween 중에 연속 희석(2배 희석 단계)시켰다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 교반하에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고, 항-기니아 피그 IgG 항체 퍼옥시다제 컨쥬게이트를 첨가한 후, 플레이트를 RT에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, 기질(10 ml의 시트레이트 0.1M pH 4.5 및 5 µl의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 중 4 mg의 OPDA)을 15분 동안 각각의 웰에 첨가하였다. HCl 1N을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 분광광도계를 이용하여 490-620 nm에서 흡광도를 관독하였다. 발달된 색은 혈청 내에 존재하는 항체의 양과 직접 비례한다. 혈청에 존재하는 항-PS IgG의 수준은 각 플레이트에 첨가되는 참조 곡선 혈청과의 비교에 의해 결정되고, µg/ml로 표현된다.
- [0166] 분산의 동일성(homogeneity of variance)(코크란 C 검정(Cochran's C test)에 의해 확인) 및 정규성(샤피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk test)을 이용하여 확인)을 가정한 후에 결과를 통계적으로 분석하였다. 모든 통계학을 log 변환 농도 IgG에 대한 Anova(Tukey-HSD)를 이용하여 수행하였다.
- [0167] **육소년식작용**
- [0168] 혈청 샘플을 56°C에서 45분 동안 가열하여 임의의 잔여 내인성 성분을 불활성화시켰다. 각각의 1:2 희석된 혈청 샘플의 25 마이크로리터의 분취량을 96-웰 둥근 바닥 미세역가 플레이트의 웰 당 25 µl OPA 완충액(HBSS-14.4% 불활성화 FBS) 중에서 연속 희석(2배)시켰다. 이후, 예를 들어, 4/2/1 비(v/v/v)의 25 µl의 활성화된 HL-60 세포(1 x 10<sup>7</sup> 세포/ml), 새로이 해동된 뉴모코쿠스 워킹 시드(working seed) 및 새로이 해동된 아기 토끼 보체의 혼합물을 희석된 혈청에 첨가하여 50 µl의 최종 부피를 생성시켰다. 검정 플레이트를 회전 교반(210 rpm)과 함께 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션시켜 식작용 과정을 촉진시켰다. 마이크로플레이트를 적어도 1분 동안 얼음 상에 두어 반응을 중지시켰다. 이후, 플레이트의 각각의 웰의 20 µl 분취량을 96-웰 편평 바닥 마이크로플레이트의 해당 웰로 옮기고, 50 µl의 Todd-Hewitt Broth-0.9% 아가(agar)를 각각의 웰에 첨가하였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서의 밤새 인큐베이션 후, 아가 내에서 출현하는 뉴모코쿠스 집락을 자동화 이미지 분석 시스템(KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 계수하였다. 혈청 샘플이 없는 8개의 웰을 웰 당 뉴모코쿠스의 수를 결정하기 위한 박테리아 대조군으로 이용하였다. 대조군 웰의 CFU의 평균 수를 결정하고, 각각의 혈청 샘플에 대한 사멸 활성의 계산에 이용하였다. 혈청 샘플에 대한 OPA 역가를 뉴모코쿠스의 50% 사멸을 촉진시킬 수 있는 혈청의 역수 희석(reciprocal dilution)에 의해 결정하였다. 4-파라미터 곡선 적합도 분석을 이용함으로써 육소년식작용 역가를 계산하였다.
- [0169] 분산의 동일성(코크란 C 검정에 의해 확인) 및 정규성(샤피로-윌크 검정을 이용하여 확인)을 가정한 후에 결과를 통계적으로 분석하였다. 모든 통계학을 ELISA에 대해 log 변환 농도 IgG에 대한 Anova(Tukey-HSD) 및 OPA에 대해 log 희석에 대한 크루스칼-윌리스(Kruskal-Wallis)에 의해 수행하였다.

[0170] 도 2에서 관찰되는 바와 같이 CDAP 화학작용에 의해 컨쥬게이션된 PS23F-CRM197 보다 환원성 아민화에 의해 컨쥬게이션된 PS23F-CRM197을 이용한 면역화 후에 기니아 피그에서 유의하게 더 높은 항체 반응이 유도되었다.

| 검정               | 환원성 아민화에 의해 제조된 23F-CRM197 | CDAP 에 의해 제조된 23F-CRM197 |
|------------------|----------------------------|--------------------------|
| ELISA 역가 (µg/ml) | 213.3                      | 40.5                     |
| OPA (50% 사멸)     | 9232                       | 591                      |

[0171]

[0172]

표 2

[0173]

**실시예 4 - 23F의 환원성 아민화의 추가 예**

[0174]

23F-CRM-RA-116

[0175]

150 mg의 천연 PS23F(PS23FP114)를 4시간 동안 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에 2 mg/ml의 농도로 용해시켰다. 용해 후, 1N HCl을 이용하여 pH를 pH 6.0으로 조정하였다. 이후, 0.4 몰당량의 페리오데이트(NaIO<sub>4</sub>)를 PS 용액에 첨가하고, 25℃에서 어두운 곳에서 17시간 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 용액을 WFI에 대해 정용여과(컷 오프 30 kDa)시키고, 산화된 PS를 0.22 µm 막에서 여과시켰다.

[0176]

안정화 작용제의 존재하에서 50 mg의 산화된 PS 및 75 mg의 CRM197을 함께(CRM/PS 비(w/w):1.5/1) 동결건조시켰다. 동결건조된 PS + CRM197을 실온(15-25℃)에서 2시간 동안 20 ml의 DMSO로 용해화시켰다. 이후, 1 몰당량의 TAB(소듐 트리아세톡시보로히드라이드)을 첨가(13.7 mg)하고, 교반하에서 17시간 후, 2 몰당량의 NaBH<sub>4</sub>(0.1M NaOH 중 100 mg/ml)를 첨가한 후, 30분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. WFI를 첨가하여 용액을 5x 희석시킨 후, 10 mM 포스페이트 완충액, 150 mM NaCl pH 7.2에 대해 정용여과(컷-오프 30 kDa)시켰다. 이후, 컨쥬게이트를 DEAE 수지 상에 로딩시키고, 10 mM 포스페이트 완충액, 500 mM NaCl pH 7.2 중에서 용리시켰다. 컨쥬게이트를 최종적으로 0.22 µm 상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 2.3/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 갖는다.

[0177]

추가 컨쥬게이트를 위해, 완충액(최종 완충액으로서 150 mM NaCl)을 변경시키기 위해 DEAE 컬럼 후에 두번째 정용여과 단계를 추가시켰다.

[0178]

**실시예 5 - 환원성 아민화(상이한 단백질:당류 비 및 상이한 사이징된 미세유동화 6B 당류를 이용함) 및 CDAP 화학작용을 이용한 CRM197로의 6B의 컨쥬게이션**

[0179]

6B-CRM-RA-122

[0180]

200 mg의 미세유동화된 PS6B(84 kDa, 11.7 mg/ml)를 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 2 mg/ml로 희석시켰다. pH를 1N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조정하였다. 이후, 0.1 몰당량의 페리오데이트(NaIO<sub>4</sub>)를 PS 용액에 첨가하고, 실온에서 어두운 곳에서 17시간 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 용액을 WFI에 대해 정용여과(컷 오프 30 kDa)시켰다. 50 mg의 PS 및 30 mg의 CRM197을 안정화 작용제의 존재하에서 함께(CRM/PS 비(w/w):0.6/1) 동결건조시켰다. 동결건조된 PS + CRM197을 실온에서 3시간 동안 20 ml의 DMSO로 용해화시켰다. 이후, 2.5 몰당량의 TAB(소듐 트리아세톡시보로히드라이드)를 첨가(38.7 mg)하고, 교반하에서 16시간 후, 2 몰당량의 NaBH<sub>4</sub>(0.1M NaOH 중 100 mg/ml)를 첨가한 후, 30분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 용액을 WFI의 첨가에 의해 4x 희석시킨 후, 정용여과(컷-오프 100 kDa)시켰다. 이후, 컨쥬게이트를 0.22 µm 상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1.1/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 갖는다.

[0181]

6B-CRM-RA-123:

[0182]

동결-건조 단계가 2/1의 최초 CRM197/PS 비(w/w)를 이용하여 수행되고, 30ml의 DMSO가 DMSO 단계에서 용해에 사용(20 ml 대신)된 것을 제외하고는, 6B-CRM-RA-122에 대해 기재된 바와 같이 미세유동화된 PS6B(84 kDa)를 CRM197에 컨쥬게이션시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 3.0/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 가졌다.

[0183]

6B-CRM-RA-124:

[0184]

350 kDa의 분자량을 갖는 200 mg의 미세유동화된 PS6B(350 kDa, 11.7 mg/ml)를 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에 2 mg/ml로 희석시켰다. pH를 1N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조정하였다. 이후, 0.1 몰당량의 페리



오테이트( $\text{NaIO}_4$ )를 PS 용액에 첨가하고, 실온에서 어두운 곳에서 17시간 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 용액을 WFI에 대해 정용여과(컷 오프 100 kDa)시켰다. 50 mg의 PS 및 60 mg의 CRM197을 안정화 작용제의 존재하에서 함께(CRM/PS 비(w/w):1.2/1) 동결건조시켰다. 동결건조된 PS + CRM197을 실온에서 5시간 동안 20 ml의 DMSO로 용해시켰다. 이후, 2.5 몰당량의 TAB(소듐 트리아세톡시보로히드라이드)를 첨가(38.7 mg)하고, 교반하에서 16시간 후, 2 몰당량의  $\text{NaBH}_4$ (0.1M NaOH 중 100 mg/ml)를 첨가한 후, 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 용액을 WFI의 첨가에 의해 4x 희석시킨 후, 정용여과(컷-오프 100 kDa)시켰다. 이후, 컨쥬게이트를 0.22  $\mu\text{m}$  상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1.6/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 갖는다.

[0185] 6B-CRM-RA-125:

[0186] 동결-건조 단계가 2/1의 최초 CRM197/PS 비(w/w)를 이용하여 수행되고, DMSO 중의 용해가 33 ml(20 ml 대신)를 이용하여 수행된 것을 제외하고는, 6B-CRM-RA-124에 대해 기재된 바와 같이 미세유동화된 PS6B(350 kDa)를 CRM197에 컨쥬게이션시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 2.9/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 가졌다.

[0187] 6B-CRM-003:

[0188] 50 mg의 미세유동화된 PS6B를 물(10 mg/ml) 중에 10 mg/ml로 희석시켰다. 고체 형태의 NaCl을 첨가하여 2M의 최종 농도에 도달시켰다. CDAP 용액(50/50 v/v 아세트니트릴/WFI 중에서 새로이 제조된 100 mg/ml)을 첨가하여 적절한 CDAP/PS 비(1.5 mg/mg PS)에 도달시켰다. 1.5분 후, 0.1N NaOH를 첨가하여 pH를 활성화 pH 9.5까지 상승시키고, CRM197의 첨가때까지 이러한 pH에서 안정화시켰다. 3분 후, CRM197(0.15M NaCl 중 10 mg/ml)을 첨가하여 2의 CRM197/PS 비(w/w)에 도달시키고; pH를 커플링 pH 9.5에서 유지시켰다. 용액을 pH 조절하에서 2시간 동안 방치시켰다.

[0189] 커플링 단계 후, 2.5 ml의 2M 글리신 용액을 혼합물에 첨가하였다. pH를 케칭 pH(pH 9.0)로 조정하였다. 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이후, 컨쥬게이트를 5  $\mu\text{m}$  필터를 이용하여 여과시키고, Sephacryl S400HR(XK26/100) 컬럼 상에 주입하여 소분자(DMAP를 포함함) 및 컨쥬게이션되지 않은 PS 및 단백질을 제거하였다. 유속을 30 ml/h에서 고정시켰다. 용리를 150 mM NaCl에서 수행하였다. 관심 분획을 풀출시키고, Millipack 20 상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1.5/1의 최종 CRM197/PS 비(w/w)를 가졌다.

[0190] 6B-CRM-RA-144

[0191] 1 g의 미세유동화된 PS6B(245 kDa, 9.47 mg/ml)를 10 mM 포스페이트 완충액(pH 7.2) 중에서 2 mg/ml로 희석시켰다. pH를 1N HCl을 이용하여 pH 6.0으로 조정하였다. 이후, 0.1 몰당량의 페리오테이트( $\text{NaIO}_4$ )를 PS 용액에 첨가하고, 실온에서 어두운 곳에서 18시간 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 용액을 WFI(Sartocon Slice200 Hydrosart 100kDa)에 대해 정용여과시켰다. 200 mg의 산화된 PS 및 240 mg의 CRM197을 안정화 작용제의 존재하에서 함께(CRM/PS 비(w/w):1.2/1) 동결건조시켰다. 동결건조된 PS + CRM197을 25°C에서 6시간 동안 80 ml의 DMSO로 용해시켰다. 이후, 2.5 몰당량의 TAB(소듐 트리아세톡시보로히드라이드)를 첨가(154.9 mg)하고, 25°C에서 교반하에서 16시간 후, 2 몰당량의  $\text{NaBH}_4$ (0.1M NaOH 중 100 mg/ml)를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다. 용액을 WFI에서 5x 희석시키고, 30분 후 150 mM NaCl로 10x 정용여과시킨 후,  $\text{PO}_4(\text{K}/\text{K}_2)$  10mM pH7.2 + 150 mM NaCl(Sartorius Sartocon Slice 200 Hydrosart 100 kDa)로 5x 정용여과시켰다. 이후, 보전물(retentate)을 DEAE 컬럼(XK26/40) 상에 로딩시켰다. 컬럼을  $\text{PO}_4(\text{K}/\text{K}_2)$  10mM pH7.2/NaCl 150mM 완충액으로 세척하였다. 컨쥬게이트를  $\text{PO}_4(\text{K}/\text{K}_2)$  10mM pH7.2/NaCl 500 mM 완충액으로 용리시켰다. 용리액을 농축시키고, 5 부피의 150 mM NaCl로 정용여과시킨 후, 0.22  $\mu\text{m}$  필터 상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1.6/1의 최종 CRM/PS 비(w/w)를 갖는다.

[0192] 실시예 6 - 환원성 아민화 및 CDAP 화학작용에 의해 제조된 6B-CRM197 컨쥬게이트의 면역원성

[0193] 40 마리의 암컷 Balb/c 마우스(4 주령)의 군을 AIP $\text{O}_4$  상에서 체형화된 환원성 아민화 또는 CDAP 화학작용에 의해 생성된 0.1  $\mu\text{g}$ 의 PS6B 컨쥬게이트를 이용하여 0, 14 및 28일에 3회 근내 면역화시켰다. PS6B-PD를 기준으로 이용하였다. 마우스를 42일에 채혈하고, 각각의 항원에 대한 항체 반응을 ELISA 및 OPA에 의해 측정하였다.

[0194] 20 마리의 암컷 기니아 피그(Hartley로부터 150 gr)의 군을 AIP $\text{O}_4$ 와 에쥬번트화된 환원성 아민화 또는 CDAP 화학작용에 의해 생성된 0.25  $\mu\text{g}$ 의 PS6B 컨쥬게이트를 이용하여 0, 14 및 28일에 3회 근내 면역화시켰다. PS6B-PD를 기준으로 이용하였다. 기니아 피그를 42일에 채혈하고, 각각의 항원에 대한 항체 반응을 ELISA 및



OPA에 의해 측정하였다.

[0195] 마우스 및 기니아 피그 OPA

[0196] 혈청 샘플을 56℃에서 45분 동안 가열하여 임의의 남아있는 내인성 성분을 불활성화시켰다. 각각의 1:2 희석된 혈청 샘플의 25 마이크로리터의 분취량을 96-웰 둥근 바닥 미세역가 플레이트의 웰 당 25 μl의 OPA 완충액 (HBSS-14.4% 불활성화 FBS) 중에서 2배 연속 희석시켰다. 이후, 예를 들어, 4/2/1 비(v/v/v)의 25 μl의 활성화된 HL-60 세포(1 x 10<sup>7</sup> 세포/ml), 새로이 해동된 뉴모코쿠스 워킹 시드(working seed) 및 새로이 해동된 아기도기 보체의 혼합물을 희석된 혈청에 첨가하여 50 μl의 최종 부피를 생성시켰다. 검정 플레이트를 회전 교반(210 rpm)과 함께 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켜 식작용 과정을 촉진시켰다. 마이크로플레이트를 적어도 1분 동안 얼음 상에 두어 반응을 중지시켰다. 이후, 플레이트의 각각의 웰의 20 μl 분취량을 96-웰 편평 바닥 마이크로플레이트의 해당 웰로 옮기고, 50 μl의 Todd-Hewitt Broth-0.9% 아가(agar)를 각각의 웰에 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서의 밤새 인큐베이션 후, 아가 내에서 출현하는 뉴모코쿠스 집락을 자동화 이미지 분석 시스템(KS 400, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 계수하였다. 혈청 샘플이 없는 8개의 웰을 웰 당 뉴모코쿠스의 수를 결정하기 위한 박테리아 대조군으로 이용하였다. 대조군 웰의 CFU의 평균 수를 결정하고, 각각의 혈청 샘플에 대한 사멸 활성의 계산에 이용하였다. 혈청 샘플에 대한 OPA 역가를 뉴모코쿠스의 50% 사멸을 촉진시킬 수 있는 혈청의 역수 희석(reciprocal dilution)에 의해 결정하였다. 4-파라미터 곡선 적합도 분석을 이용함으로써 흡소닌식작용 역가를 계산하였다.

[0197] 표 3은 실시예 4의 방법을 이용하여 제조된 컨쥬게이트를 이용한 balb/c 마우스의 면역화에 의해 수득된 GMC 수준을 기재한다.

|             | G1                           | G2                                | G3                                   | G4                                   | G5                     | G6       |
|-------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------|
| 피검체/결과      | PS06B-CRM122<br>(R:1/1,PS 84 | PS06B-CRM123<br>(R:3/1,PS 84 kDa) | PS06B-CRM124<br>(R:1.5/1,PS 350 kDa) | PS06B-CRM125<br>(R:2.9/1,PS 350 kDa) | PS06B-CRM003<br>(CDAP) | PS06B-PD |
| GMC (UG-ML) | 0.83                         | 0.37                              | 1.18                                 | 0.64                                 | 0.31                   | 0.10     |
| 반응자(%)      | 31/40                        | 26/40                             | 33/40                                | 29/40                                | 29/40                  | 15/40    |

[0198]

[0199] **표 3**

[0200] balb/c 마우스에서의 상기 컨쥬게이트의 면역원성은 도 3에 제시된다. 도 3과 함께, 표 3은 마우스 모델에서 환원성 아민화에 의해 생성된 컨쥬게이트가 CDAP 화학작용을 이용하여 생성된 것과 동등한 것을 나타낸다. 특히, 도 3은 환원성 아민화를 이용하여 생성된 컨쥬게이트의 면역원성이 CDAP 화학작용을 이용하여 제조된 컨쥬게이트의 면역원성보다 높은 것을 나타낸다.

[0201] 표 4는 실시예 4의 방법을 이용하여 제조된 컨쥬게이트를 이용한 기니아 피그의 면역화에 의해 수득된 GMC 수준을 기재한다.

|             | G1                                | G2                               | G3                                   | G4                                   | G5                  | G6       |
|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|----------|
| 피검체/결과      | PS06B-CRM122<br>(R:1/1,PS 84 kDa) | PS06B-CRM123<br>(R:3/1,PS84 kDa) | PS06B-CRM124<br>(R:1.5/1,PS0350 kDa) | PS06B-CRM125<br>(R:2.9/1,PS 350 kDa) | PS06B-CRM003 (CDAP) | PS06B-PD |
| GMC (UG-ML) | 3.51                              | 7.70                             | 2.84                                 | 19.93                                | 3.70                | 1.55     |
| 반응자(%)      | 20/20                             | 20/20                            | 20/20                                | 20/20                                | 20/20               | 20/20    |

[0202]

[0203] **표 4**

[0204] 기니아 피그에서의 상기 컨쥬게이트의 면역원성은 도 4에 제시된다. 마우스 모델에서 수행된 실험과 유사하게, 표 4 및 도 4의 결과는 환원성 아민화에 의해 생성된 컨쥬게이트가 CDAP 화학작용을 이용하여 생성된 것과 동등한 것을 나타내며, 특히 PS06B-CRM125는 CDAP를 이용하여 생성된 컨쥬게이트보다 유의하게 높은 GMC 수준 및 면역원성을 나타내었다.

[0205] **실시예 7. 환원성 아민화를 이용한 테타누스 독소이드로의 Hib의 컨쥬게이션**

[0206] Hib-I04-LS080

[0207] 2.9 g의 PS(오르시놀 투여량, AHIBCPA007 lot)를 실온에서 4시간 30분 및 이후 +4℃에서 밤새 260 ml의 10 mM 포스페이트 완충액(Na/K<sub>2</sub>) pH 6.2에 용해시켰다. 용해 동안 점도 추적검사를 수행하였다. 4시간의 용해 후, 점도는 안정적인 것으로 보였다. PS를 포스페이트 완충액을 이용하여 10 mg/ml로 희석시킨 후, 60분 동안 0.07 몰당량의 NaIO<sub>4</sub>를 이용하여 어두운 곳에서 산화시켰다. 산화된 PS를 3.5 부피의 포스페이트 완충액에 대해 정

용여과(Sartorius Hydrosart 2 kDa)시킨 후, 0.22  $\mu$ m 필터 상에서 여과시켰다. 산화 후에 수득된 반복 단위의 수를  $^1\text{H-NMR}$ 에 의해 평가하고, 이는 약 21인 것으로 밝혀졌다.

[0208]

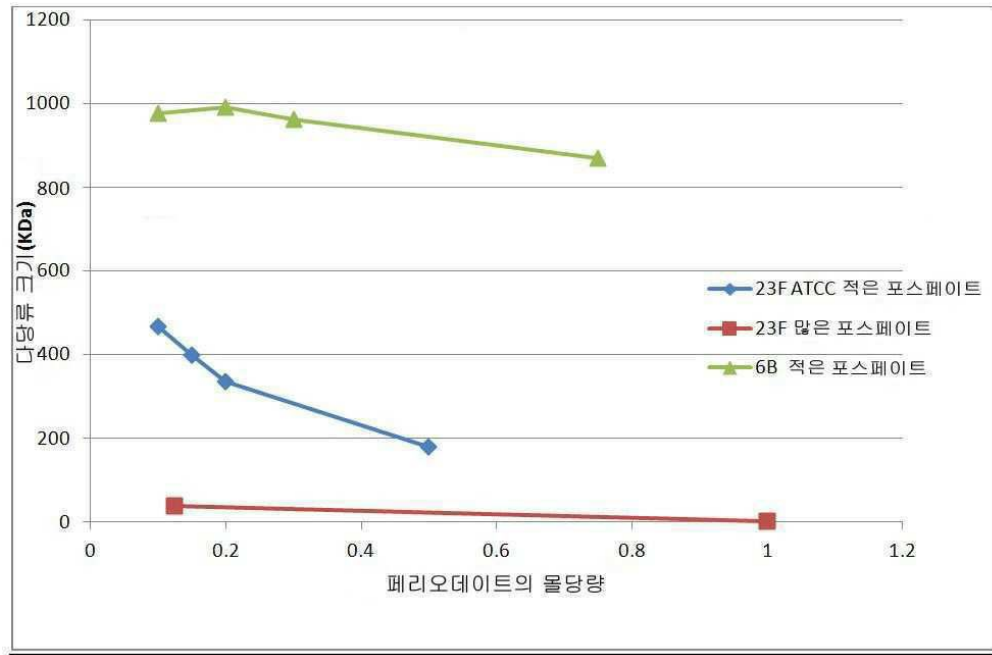
Hib-TT-LS210, 212 및 213

[0209]

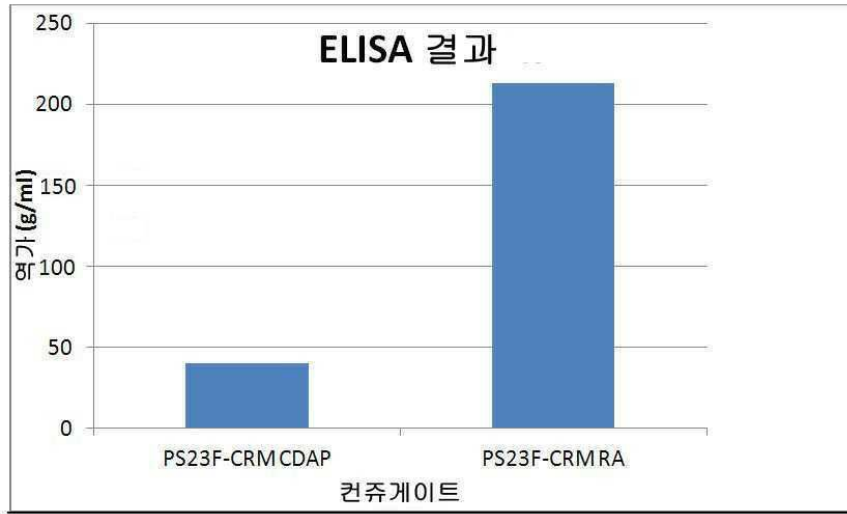
200 mg의 산화된 PS(14.56 mg/ml)를 300 mg의 TT(31.18 mg/ml, TT/PS 비(w/w):1.5/1)와 혼합시키고, 36.64 ml의 10 mM 포스페이트 완충액( $\text{Na/K}_2$ ) pH 6.2을 이용하여 4 mg/ml로 희석시켰다. 용액을 안정화 작용제의 존재하에서 동결건조시켰다. 동결건조된 PS + TT를 25°C에서 6시간 동안 20 ml의 DMSO로 용해화시켰다. 이후, 10 몰당량의 TAB(소듐 트리아세톡시보로히드라이드)를 첨가(38.7 mg)하고, 교반하에서 16시간 후, 2 몰당량의  $\text{NaBH}_4$ (0.1M NaOH 중 100 mg/ml)를 첨가한 후, 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 용액을 WFI의 첨가에 의해 3x 희석시킨 후, 정용여과 단계(5 부피의 WFI 후, 5 부피의 10 mM 아세테이트 완충액 150 mM NaCl pH 6.2, 100 kDa MWC0)를 수행하였다. 이후, 샘플을 Sephacryl S300HR 수지 상에 로딩시켰다. 용리를 150 mM NaCl(pH 6.2)을 이용하여 10 mM 아세테이트 완충액 중에서 수행하였다. 관심 분획을 푸울링시키고, 0.22  $\mu$ m 필터 상에서 여과시켰다. 생성된 건중계이트는 2.1/1의 최종 TT/PS 비(w/w)를 가졌다.

**도면**

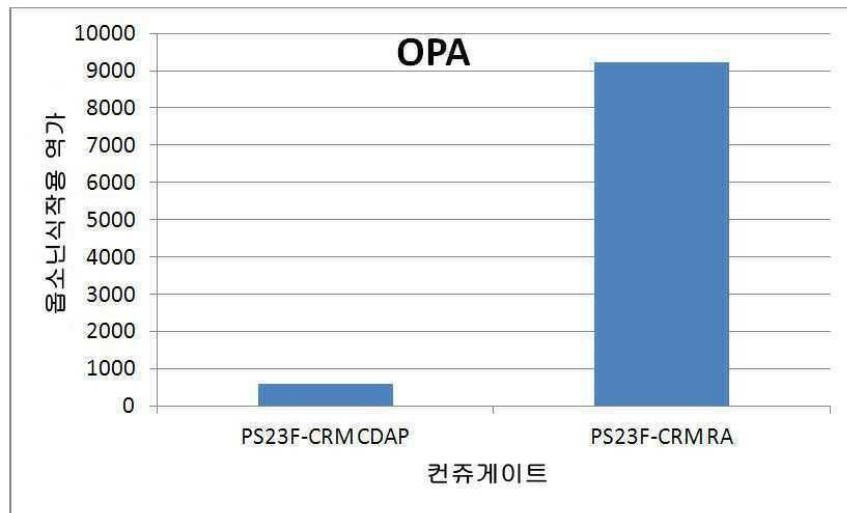
**도면1**



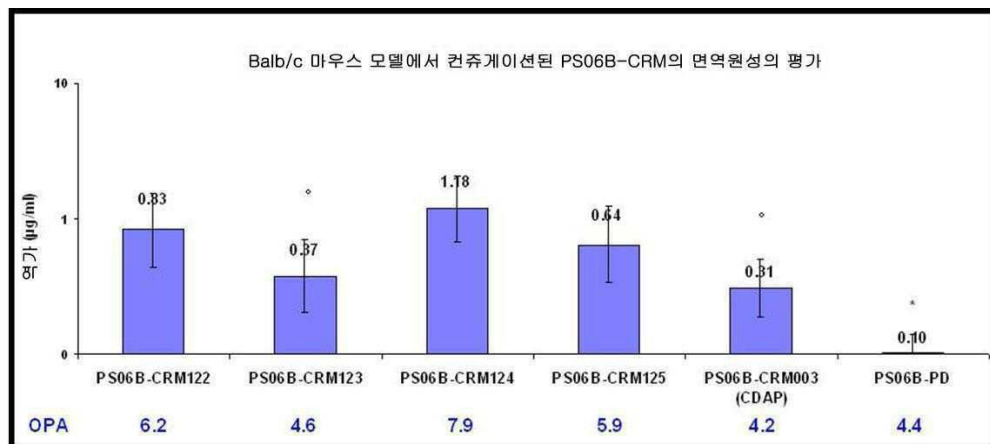
도면2a



도면2b



도면3



도면4

