(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년06월27일
(11) 등록번호 10-1044437
(24) 등록일자 2011년06월20일

(51) Int. Cl.
C08B 37/00 (2006.01) *A61K 39/385* (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7013266
(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년01월16일
심사청구일자 2008년11월10일
(85) 번역문제출일자 2005년07월18일
(65) 공개번호 10-2005-0093838
(43) 공개일자 2005년09월23일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2004/000089
(87) 국제공개번호 WO 2004/067574
국제공개일자 2004년08월12일
(30) 우선권주장
03/00,488 2003년01월17일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌
WO0199851339 A1
WO0200056358 A1
WO0200055210 A1
전체 청구항 수 : 총 30 항

(73) 특허권자
사노피 파스퇴르
프랑스, 리옹 세덱스 07 에프-69367, 애비뉴 퐁 파스퇴르 2
(72) 발명자
미스트리타, 노엘
프랑스 세인트-벨 에프-69210, 쉐민 데 뷰리우
댄비, 에밀리에
프랑스 타신 라 데미-룬 에프-69160, 배티맨트 에이, 루 줄리엇큐리에 140
모레우, 모니크
프랑스 리옹 에프-69007, 루 가리발디, 324
(74) 대리인
이학수, 백남훈, 한라특허법인

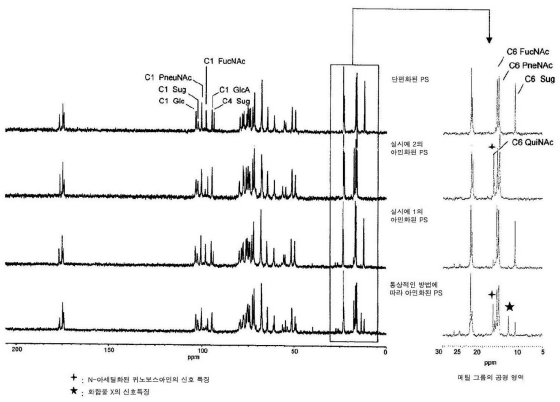
심사관 : 신현일

(54) 5 혈청형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 환원적아민화에 의해 수득된 접합체

(57) 요 약

본 발명은 5 혈청형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 환원적 아민화에 의해 수득되는 접합체에 관한 것이다. 상기 환원적 아민화 조건은 상기 접합체의 면역원성에 유해한 바람직하지 못한 화합물의 생성을 피한다는 점에서 통상적인 조건과 다르다. 탄소 NMR 분광측정법에서, 상기 바람직하지 못한 화합물은 13 내지 14 ppm의 공명 신호를 특징으로 한다. 상기 접합체의 제조에 수반되는 아민화된 폴리사카라이드는 13 내지 14 ppm의 공명 신호가 없는 탄소 NMR 스펙트럼을 갖는다. 본 발명에 따른 환원적 아민화 조건은 2 중이다. 첫 번째 방법에 따라, 상기 환원적 아민화를 최대 4 시간 동안 약산성의 pH(4 내지 6.5)에서 수행한다. 두 번째 방법에 따라, 상기 폴리사카라이드를 먼저 환원시키고, 이어서 단편화시키고 최종적으로 통상적이거나 통상적이지 않은 조건 하에서 환원적 아민화 자체를 수행한다. 사용되는 방법에 따라, 상기 아민화된 폴리사카라이드의 구조가 다양할 수 있지만(반복 단위의 Sug 잔기가 N-아세틸 퀴노보스아민 및 N-아세틸 푸코스아민으로 전환되거나 전환되지 않는다), 상기 변화는 탄소 NMR 분광측정법에서 기록되는 바와 같이 면역원성에 영향을 주지 않는다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

말단 알데히드 그룹 상에서 아민화되고, (i) 13 내지 14 ppm(포함)의 공명 신호가 결여된 탄소(^{13}C) NMR 스펙트럼; 또는 (ii) 푸코스아민과 뉴모스아민 피크 사이의 피크가 결여된 HPAEC-PAD 크로마토그램(상기 크로마토그램은 18 mM 수산화 나트륨 용액 중에서 카보팩(Carbopac)™ PA10 컬럼으로부터 1 ㎖/분의 유속으로 폴리사카라이드의 가수분해로부터 유도된 모노사카라이드를 15 분간 용출시켜 수득된다); 를 나타내는 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

(i) Sug 화합물의 특징인 11.5 내지 12.5 ppm(포함)의 공명 신호 및 N-아세틸화된 퀴노보스아민의 특징인 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 (^{13}C) NMR 스펙트럼에서 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호와 비교하여 보다 작은 탄소 NMR 스펙트럼; 또는

(ii) 퀴노보스아민의 특징인, 뉴모스아민 피크 바로 뒤에 위치한 피크를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 HPAEC-PAD 크로마토그램에서의 동등한 피크와 비교하여 보다 작은 HPAEC-PAD 크로마토그램;

를 나타내는 폴리사카라이드.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

(i) 17 내지 18 ppm의 공명 신호가 완전히 결여된 탄소 NMR 스펙트럼; 또는 (ii) 퀴노보스아민 피크가 결여된 HPAEC-PAD 크로마토그램(상기 피크는 통상적인 아민화 방법에 따라 아민화된 폴리사카라이드가 단지 선행 피크(뉴모스아민 피크)의 간단한 숄더 정도로 환원된 경우에 관찰되며, 상기 크로마토그램은 제 1 항에 열거된 조건 하에서 수득된다); 를 나타내는 폴리사카라이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

(i) Sug 화합물의 특징인 11.5 내지 12.5 ppm(포함)의 공명 신호가 결여되고, N-아세틸화된 퀴노보스아민의 특징인 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호를 포함하며, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 (^{13}C) NMR 스펙트럼에서 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호와 비교하여 증가된 탄소 NMR 스펙트럼; 또는

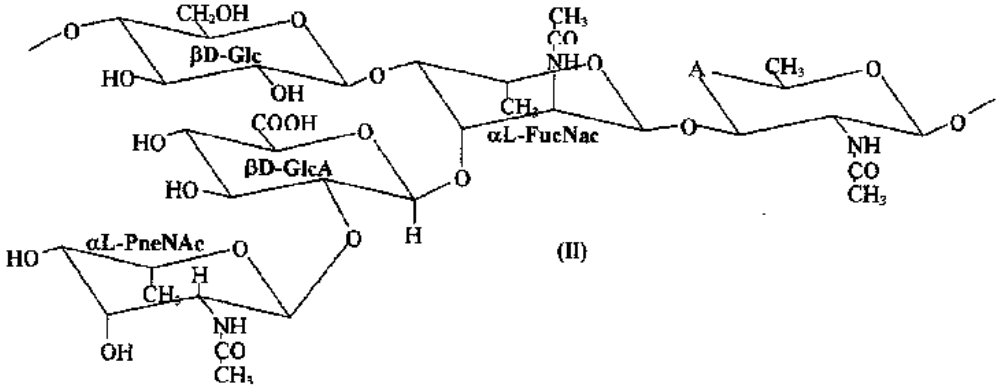
(ii) 퀴노보스아민의 특징인, 뉴모스아민 피크 바로 뒤에 위치한 피크를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 HPAEC-PAD 크로마토그램에서의 동등한 피크와 비교하여 증가된 HPAEC-PAD 크로마토그램(상기 크로마토그램은 제 1 항에서 열거된 조건 하에서 수득된다);

를 나타내는 아민화된 폴리사카라이드.

청구항 5

말단 알데히드 그룹 상에서 아민화되고, 반복 단위들로 이루어지며, 상기 반복 단위들 중 85 ~ 100%가 하기 화학식 II에 상응하는 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드:

화학식 II



상기 식에서, A는 독립적이고 무작위적으로 C=O 또는 CHOH이다.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 반복 단위의 90% 이상이 화학식 II에 상응하는 폴리사카라이드.

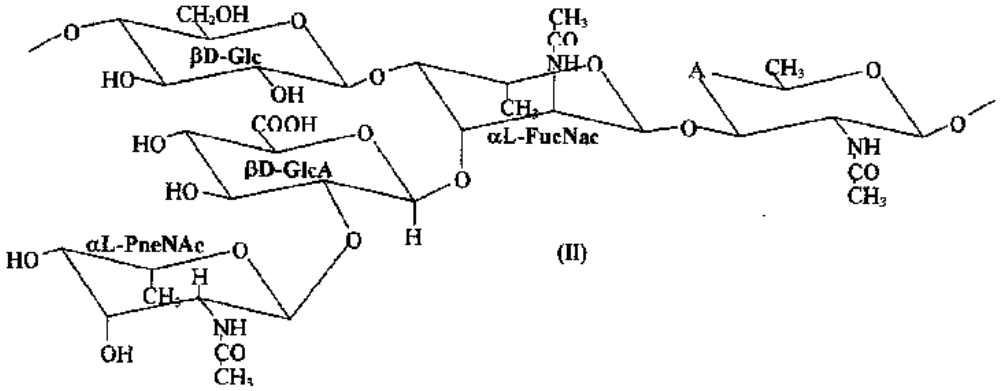
청구항 7

제 6 항에 있어서, 반복 단위의 95% 이상이 화학식 II에 상응하는 폴리사카라이드.

청구항 8

제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 II에 상응하는 반복 단위의 95% 이상이 하기 화학식 II'에 상응하는 폴리사카라이드:

화학식 II'

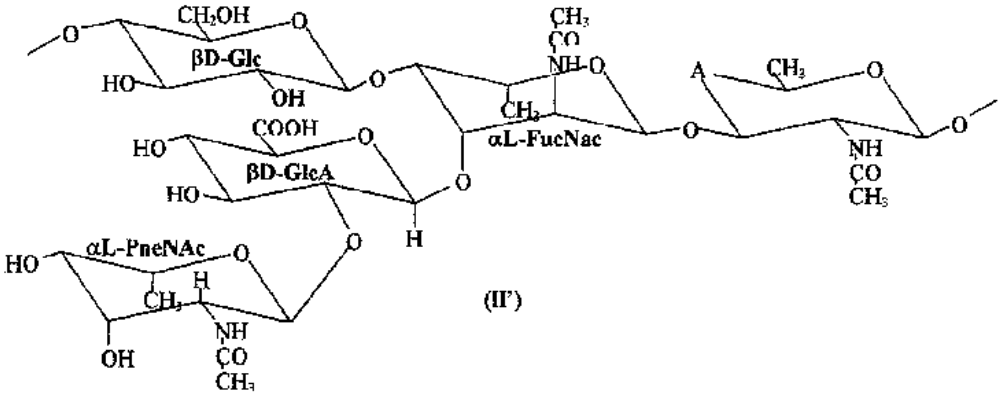


상기 식에서, A는 CHOH이다.

청구항 9

제 5 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 II에 상응하는 반복 단위의 85 내지 95%가 하기 화학식 II'에 상응하는 폴리사카라이드:

화학식 II'



상기 식에서, A는 C=O이다.

청구항 10

제 1 항 또는 제 5 항에 따른 폴리사카라이드가 담체 폴리펩티드(P)에 커플링된 접합체.

청구항 11

아민화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 제조 방법으로, 상기 폴리사카라이드를 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5의 pH에서 30분 내지 4시간 동안 환원적 아민화시키는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 폴리사카라이드를 5 내지 6의 pH에서 환원적 아민화시키는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, 쉬프 염기에 선택적인 환원제가 시아노붕수소화물 또는 피리딘 보란 착체인 방법.

청구항 15

아민화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 제조 방법으로,

(i) 상기 폴리사카라이드를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고, (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고, (iii) 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화시키는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응하는 폴리사카라이드가 고유 형태의 것인 방법.

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제가 $NaBH_4$인 방법.

청구항 18

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 환원된 폴리사카라이드를 산화적 유리-라디칼 해중합에 의해 단편화시키는 방법.

청구항 19

제 11 항에 따른 방법을 사용하여, 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5의 pH에서 30분 내지 4시간 동안 환원적 아민화에 의해 담체 폴리사카라이드(P)와 커플링시키는 화학식 Ps-CH_2-NH-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 20

제 15 항에 따른 방법을 사용하여, 환원되고 단편화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 담체 폴리사카라이드(P)와 커플링시키는 화학식 Ps-CH_2-NH-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 21

(i) 제 11 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제(L)에 커플링시켜, 화학식 Ps-CH_2-NH-L의 아민화되고 활성화된 폴리사카라이드를 제조하고, 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

(ii) 제 11 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 화학식 L-P(여기에서 L은 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드에 커플링시키는

화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 22

(i) a) 제 15 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 환원되고 단편화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제(L)에 커플링시켜 화학식 Ps-CH_2-NH-L의 아민화되고 활성화된 폴리사카라이드를 제조하고,

b) 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

(ii) 제 15 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 화학식 L-P(여기에서 L은 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드에 커플링시키는

화학식 Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 23

(i) a) 제 11 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)에 커플링시켜, 화학식 Ps-CH_2-NH-S의 아민화되고 유도체화된 폴리사카라이드를 제조하고,

b) 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해 결합제(L')와 커플링시키고, 이어서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

(ii) b) 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 L'-P(여기에서 L'는 결합제이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와 커플링시키는

화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 24

(i) a) 제 15 항에 따른 방법을 사용하여, 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 환원되고 단편

화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)에 커플링시켜, 화학식 Ps-CH_2-NH-S의 아민화되고 유도체화된 폴리사카라이드를 제조하고,

b) 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해 결합제(L')와 커플링시키고, 이어서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

(ii) b) 화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 L'-P(여기에서 L'는 결합제이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와 커플링시키는

화학식 Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체의 제조 방법.

청구항 25

제 19 항 또는 제 20 항에 있어서, 담체 폴리펩티드 P가 디프테리아 변성독소 또는 파상풍 변성독소인 방법.

청구항 26

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서,

결합제(L)이 화학식 R1-A-R2의 화합물이고, 이때

A가 치환되거나 비 치환되고, 포화되거나 불포화될 수 있는 지방족 또는 방향족 쇄, 또는 혼합된 지방족 및 방향족 쇄를 나타내고;

R1이 1 급 아민 또는 1 급 아민을 갖는 화학적 라디칼을 나타내고;

R2가 카보닐, 티올 또는 아민 그룹과 반응할 수 있는 작용기를 나타내는 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 결합제(L)가 알킬 디하이드라지드 또는 디아미노알킬인 방법.

청구항 28

제 23 항 또는 제 24 항에 있어서, 이격자 S가 아미노티올이고 결합제 L'가 숙신이미딜말레이미딜알킬인 방법.

청구항 29

제 23 항 또는 제 24 항에 있어서, 이격자 S가 디아미노알킬 또는 디하이드라지드이고, 결합제 L'가 화학식 XIV R3-B-R4(여기에서 B는 알킬 그룹이고, R3은 숙신이미딜 그룹이고 R4는 숙신이미딜 또는 말레이미도 그룹이다)의 디숙신이미딜알킬 및 숙신이미딜말레이미도알킬 화합물 중에서 선택되는 방법.

청구항 30

제 10 항에 따른 접합체를 포함하며, 5 형 폐렴연쇄구균의 감염에 의한 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물.

청구항 31

제 19 항 또는 제 20 항에 따른 방법을 사용하여 수득된 접합체를 포함하며, 5 형 폐렴연쇄구균의 감염에 의한 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

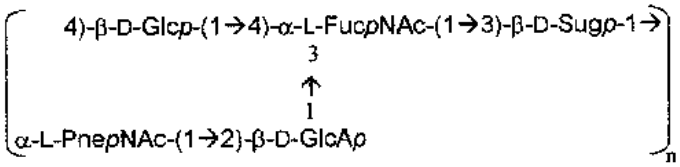
[0001] 본 발명은 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 특정한 아미드화된 형태, 상기 형태를 포함하는 접합체, 및 또한 이를 수득하기 위한 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐렴연쇄구균(스트렙토코커스 뉴모니아에)은 수막염 및 균혈증의 원인인 그람-양성의 피막으로 싸인 세균이다. 상기는 또한 성인과 아동에서 합병증과 함께 다수의 호흡기 감염, 예를 들어 기관지염, 비염 또는 이염을 일으킨다. 폐렴연쇄구균은 피막을 형성하는 폴리사카라이드의 구조에 따라 혈청형이 나뉜다. 폐렴연쇄구균의 혈청형 분류는 일련의 면역 혈청을 사용하여 수행되며, 각각의 면역 혈청은 단일 유형의 피막 폴리사카라이드에 특이적이다. 90 개 이상의 상이한 혈청형(모두 인간에게 병원성이다)이 등록되었다. 6B, 14, 18C, 19F 및 23F 혈청형은 어린 아동에서 만연하며, 폐렴과 이염을 일으킨다. 1 및 5 혈청형은 선진국에서보다 개발 도상국에서 더 흔하게 나타난다.

[0003] 인간에서 임상적으로 마주치는 주 혈청형에 대한 보호 백신이 개발되었거나 개발중이다. 폐렴연쇄구균 감염의 90%에 원인이 되는 23 개의 상이한 혈청형(1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F)의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 백신이 2 세 이상의 아동과 성인에서 유효하다. 다른 한편으로, 2 세 미만의 아동은 그의 면역 체계의 미성숙으로 인해 T-독립적인 폴리사카라이드 항원으로 이루어진 상기 백신에 반응하지 않는다. 이러한 장애는 하나 이상의 담체 단백질에 커플링된(접합된) 다양한 폐렴연쇄구균 혈청형의 피막 폴리사카라이드를 함유하는 백신의 개발로 극복되었다(WO 98/51339). 이들 접합체는 어린 아동에서 T-의존성 보호 체액 면역의 발달을 유도하여, 상기 접합체에 사용된 다양한 혈청형의 폴리사카라이드에 대한 특이 항체들을 생성시킨다.

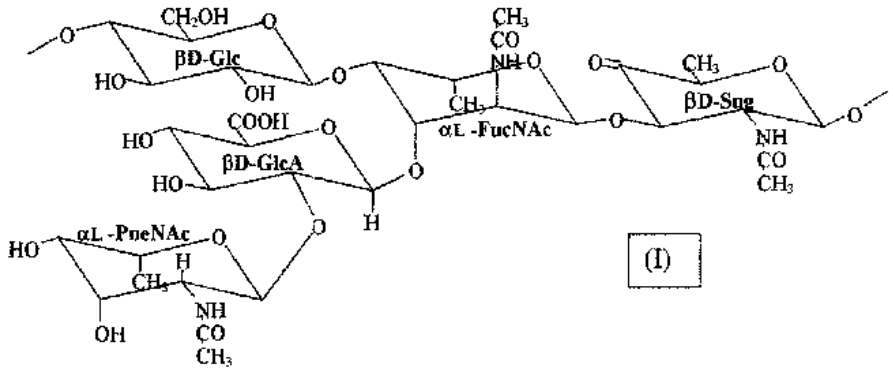
[0004] 폐렴연쇄구균의 다양한 형청형의 피막 폴리사카라이드는 모두 다수의 당들로 이루어진 반복적인 염기 단위(반복 단위)로 구성된다. 예시로서, 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드의 염기 단위가 하기 5 개의 헥소오스로 이루어짐을 나타낸다: 서로 결합되어 하기와 같이 축합된 방식으로 화학식을 형성하는 글루코스, N-아세틸화된 푸코스아민, N-아세틸화된 뉴모스아민(2-아세트아미도-2,6-데옥시탈로스), 글루쿠론산 및 Sug(2-아세트아미도-2,6-데옥시헥소오스-4-울로스)라 칭하는 당:



[0005]

[0006] 상기에 상응하는 연장된 식을 하기 화학식 I로 나타낸다:

화학식 I



[0007]

[0008] 상기식에서,

[0009] Sug는 2-아세트아미도-2,6-데옥시헥소오스-4-울로스를 나타내고;

[0010] PneNAc는 2-아세트아미도-2,6-데옥시탈로스(또한 N-아세틸화된 뉴모스아민이라고도 칭함)를 나타내고;

[0011] FucNAc는 2-아세트아미도-2,6-데옥시갈락토스(또한 N-아세틸화된 푸코스아민이라고도 칭함)를 나타내고;

[0012] GlcA는 글루쿠론산을 나타내고;

[0013] Glc는 글루코스를 나타낸다.

[0014] 상기 화학식은 문헌[P.E. Jannson et al., Carbohydrate Research(1985) 140(1):101]에 제공되어 있다. 그러나, 상기 폴리사카라이드의 반복 단위의 작은 퍼센트가 케톤 작용기 대신에 하이드록실 그룹을 가질 수도 있다.

[0015] 폴리사카라이드를 담체 단백질에 커플링시키는 많은 방법들이 존재한다. 이들 중에서, 예비적인 방식으로 폴리사카라이드의 환원적 아민화를 수반하는 방법들이 통상적으로 사용된다. 예를 들어, EP 562 107에 개시된 바와 같이, 먼저 상기 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 NH_2-R-NH_2 유형의 이작용성 이격자에 모두 커플링시키고, 이어서 상기와 같이 유도체화되고 아민화된 폴리사카라이드를 특히 아민 작용기와 반응할 수 있는 이작용성 결합제에 커플링시킨다. 이어서 상기와 같이 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시킨다. 다른 변수들에 따라, 상기 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 상기 단백질에 직접 커플링시키거나 또는 심지어 상기 이격자를 생략시킬 수도 있다.

[0016] 널리 공지된 바와 같이, 환원적 아민화 반응은 2 단계로 일어난다. 첫 번째 단계에서, 쉬프 염기라 지칭되는, 화학식 R-CH=NH^+-R'의 중간체 화합물이 첫 번째 분자(R-CHO)의 알데히드 그룹과 두 번째 분자의 1 급 아민 그룹(R'-NH_2)간의 상호작용으로부터 생성된다. 이어서 상기 쉬프 염기를 두 번째 단계로 환원제의 존재 하에서 환원시켜 아미노 화합물 R-CH_2-NH-R'를 형성시킨다. 상기 쉬프 염기의 이민 작용기를 특이적으로 환원시킬 수 있는 선택적인 환원제, 예를 들어 촉매에 의해 활성화된 수소, 시아노붕수소화 나트륨($NaCNBH_3$) 또는 아민 보란을 사용한다. 바람직하게는 시아노붕수소화물 또는 피리딘 보란이 사용된다.

[0017] 상기 모든 폴리사카라이드들은 쇄의 끝에 알데히드 작용기(말단 알데히드 작용기)를 가지므로, 상기 폴리사카라이드의 환원적 아민화를 포함하는 접합 방법을 매우 일반적으로 적용시킬 수 있으며, 반복 단위 중에 다른 알데히드 작용기(쇄 내 알데히드 작용기)가 존재하지 않는 경우, 상기와 같은 방법은 폴리사카라이드 분자가 담체 단백질의 단일 분자에 커플링된 접합체를 수득할 수 있게 한다.

[0018] 전적으로 통상적인 방식으로, 폴리사카라이드를 중성 또는 염기성 pH에서 24 내지 48 시간 이상 동안 상기 쉬프 염기에 대해 선택적인 환원제의 존재 하에서 환원적 아민화시킨다.

[0019] 따라서, 미국 특허 제 4,761,283 호에는 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에서 디프테리아 독소의 무독성 돌연변이체(돌연변이체 CRM 197)를 갖는 6A 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(산 가수분해에 의해 예비 단편화된)의 환원적 아민화가 개시되어 있다. 상기 반응 매질의 pH는 염기성(pH = 8)이고 배양 기간은 37 ℃에서 18 일이다.

[0020] EP 477 508에는 피리딘 보란(상기 쉬프 염기에 대한 환원제의 역할을 한다)의 존재 하에서 디아미노메탄 또는 디아미노에탄에 의한 6A, 14, 19F 및 23F 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드의 환원적 아민화가 개시되어 있다. 상기 반응의 pH는 9.2이다. 상기 반응은 48 시간 동안 일어난다.

[0021] 상기 언급한 EP 562 107에서, 상기 폴리사카라이드의 환원적 아민화를 pH 8에서 6 시간 동안 수행한다.

[0022] 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드는 쇄 내 케톤 작용기를 포함하므로, 이론적으로는 말단 알데히드 작용기 외에 상기 케톤 작용기가 상기 폴리사카라이드의 환원적 아민화 도중 아미노-환원됨이 예상될 것이다. 현재, 상기 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드, 및 임의의 쇄 내 알데히드 및 케톤 작용기를 포함하지 않는 또 다른 혈청형 또는 또 다른 종의 피막 폴리사카라이드를 나란히 아민화시키는 경우, 상기 아민화 정도는 동등하며, 이는 명백히 상기 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 말단 알데히드 작용기만이 아민화되고 오직 상기 작용기만이 반응 도중 변경됨을 입증하는 것으로 보인다. 현재, 실제로, 상기는 그 경우가 아니다.

[0023] 실제로는, 현재 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드의 반복 단위의 화학 구조는 통상적인 방법에 따른 환원적 아민화 후에 변경되는 것으로 밝혀졌다. 이는 핵자기 공명(NMR) 분광측정법 및 펄스화된 전류측정 검출에 커플링된 고 성능 음이온-교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD 크로마토그래피)에 의해 입증되었다. 상기 Sug 잔기의 거의 대부분은 3 개의 새로운 화합물을 위해 사라진다: (i) 상기 Sug 잔기의 케톤 작용기의 알콜 작용기로의 환원으로부터 유도된 N-아세틸화된 β-D-퀴노보스아민 및 (ii) 상기 Sug 잔기의 보다 상당한 전환으로부터 생성되는 화합물 X. 세 번째 화합물은 다름 아닌 상기 Sug 잔기의 환원으로부터 또한 유도된 N-아세틸화된 β-D-퀴노보스아민, 즉 N-아세틸화된 β-D-푸코스아민의 이성체이며, 이의 약간의 증가가 관찰된다.

[0024] NMR 분광측정에서 및 도 1에 나타낸 바와 같이, 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드는 그의 간단한 단편화된 고유 형태로, 당의 6 번 위치(C6)의 메틸 그룹 탄소에 대한 공명 영역에서 N-아세틸화된 뉴모스아민(PneNAc), N-아세틸화된 푸코스아민(FucNAc) 및 Sug 잔기의 메틸 그룹의 특징인 3 개의 공명 신호를 나타낸다(도 1-스펙트럼 1). 상기 단편화는 상기 스펙트럼을 어떠한 식으로도 변경시키지 않지만, 그의 분해능은 개선시킨다. 시아노붕수소화 나트륨($NaCNBH_3$)의 존재 하에서 디아미노헥산에 의한 통상적인 아민화 후에, 상기 Sug 잔기의 메틸 그룹의 공명 신호 특징("Sug 잔기의 신호 특징"이라 약기함)이 실질적으로 감소하며 상기 감소는 2 개의 새로운 공명 신호, 즉 N-아세틸화된 퀴노보스아민(QuiNAc)의 특징인 17 내지 18 ppm의 신호와, 알려지지 않은 구조의 새로운 화합물(이러한 이유로 화합물 X라 칭함)을 나타내는 13 내지 14 ppm의 다른 신호(도 1-스펙트럼 4)의 출현을 수반함이 주목된다.

[0025] HPAEC-PAD 크로마토그래피에서, 도 2에 나타낸 바와 같이(점-대시 곡선), 통상적인 환원적 아민화 후에 수득된 폴리사카라이드 및 고유 또는 해중합된 폴리사카라이드의, 120 ℃에서 2 시간 동안의 2N 트리플루오로아세트산에 의한 가수분해 생성물들에 대한 크로마토그램들을 비교하는 경우, 확인되지 않은 구조(화합물 X)의, 상기 환원적 아민화로부터 유도된 화합물에 상응하는 첫 번째 피크(크로마토그램을 이후에 열거하는 조건 하에서 수행하는 경우 5.50 내지 6.10 min), 및 또한 퀴노보스아민의 특징인 두 번째 피크(크로마토그램을 이후에 열거하는 조건 하에서 수행하는 경우 6.90 내지 7.40 min)의 출현이 주목된다. 또한, 푸코스아민에 상응하는 피크의 강도가 실질적으로 증가한다. 고유 또는 해중합된 폴리사카라이드의 크로마토그램을 포함하여 상기 크로마토그램들은 Sug 잔기에 상응하는 피크를 포함하지 않음에 주목해야 한다. 구체적으로, HPAEC-PAD 크로마토그래피를 수행하기 위해서, 상기 폴리사카라이드는 무엇보다도 가수분해되어야 한다. 상기 가수분해는 Sug 잔기를 파괴하며; 상기는 또한 QuiNAc, PneNAc 및 FucNAc를 퀴노보스아민(QuiN), 뉴모스아민(PneN) 및 푸코스아민(FucN)으로 전환시키는 효과를 갖는다.

[0026] 또한, Sug 화합물이 화합물 X로 전환되는 것은 이러한 전환이 단지 부분적이라 할지라도, 즉 상기 폴리사카라이드의 반복 단위의 전부에서가 아닌 일부에서만 전환이 일어난다 하더라도, 상기 폴리사카라이드의 면역원성에 유해한 것으로 밝혀졌다. 다른 한편으로, 상기 QuiNAc 또는 FucNAc 전환은 주목할만한 영향이 없다.

[0027] 따라서, 상기 화합물 X의 출현을 방지할 수 있게 하는 수단을 조사하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 이는 환원적 아민화의 통상적인 과정을 변경시킴으로써 가능해졌다. 또 다른 방식으로, 상기 고유(단편화되지 않은) 폴리사카라이드의 케톤 작용기(C=O)를 사전에 환원시키는 것이 또한 가능하다. 이는 $NaBH_4$와 같은 강한 환원제를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 환원제는 어떠한 바람직하지 못한 화합물도 생성시키지 않는다. 상기는 단지 케톤과 알데히드 작용기만을 환원시킨다. 그러나, 상기는 이들 작용기를 환원시키므로, 말단 알데히드 그룹을 다시 도입시키기 위해 환원된 폴리사카라이드를 단편화시킬 필요가 있다. 상기 케톤 작용기의 환원은 폴리사카라이드를 임의로 환원적 아민화시키는 경우에 임의의 후속적인 변경을 방지한다.

[0028] 발명의 요약

[0029] 상기 이유로, 본 발명의 주제는

[0030] (i) 말단 알데히드 그룹상에서 아민화되고, (i) 13 내지 14 ppm(포함)의 공명 신호가 결여된 탄소(^{13}C) NMR 스펙트럼; (ii) 푸코스아민과 뉴모스아민 피크 사이의 피크가 실질적으로 결여된 HPAEC-PAD 크로마토그램(상기 크로마토그램은 18 mM 수산화 나트륨 용액 중에서 카보팩(Carbopac)™ PA10 컬럼으로부터 1 ㎖/분의 유속으로 폴리사카라이드의 가수분해로부터 유도된 모노사카라이드를 15 분간 용출시켜 수득된다); 또는 (iii) 상기 모두를 나타내는 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드.

[0031] (ii) 본 발명에 따른 폴리사카라이드가 담체 폴리펩티드(P)에 커플링된 접합체.

[0032] (iii) 폴리사카라이드를 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에서 4 내지 6.5의 pH, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 환원적 아민화시킴에 따른 아민화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 첫 번째 제조 방법.

[0033] (iv) (i) 폴리사카라이드를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고, (ii) (i)에서 수득된 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고, (iii) 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화시킴에 따른 아민화된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 두 번째 제조 방법

[0034] 이다.

발명의 상세한 설명

[0035] 본 문의 나머지 부분에서, "아민화된 폴리사카라이드"란 용어는 말단 알데히드 그룹상에서 아민화된, 즉 상기 말단 알데히드 작용기와 아민 작용기와의 반응으로부터 유도된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 지칭한다.

[0036] 폴리사카라이드의 환원적 아민화는 폴리사카라이드의 말단 알데히드 작용기를, 매우 다양하지만 당연히 모두 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 가짐을 특징으로 하는 화합물과 반응시킴으로써 수행할 수 있다. 이러한 화합물은 폴리펩티드 또는 화학적 화합물일 수 있다. 이들 폴리펩티드 및 이들 화학적 화합물을 이후의 설명에서 보다 상세히 언급할 것이다. 폴리펩티드가 포함되는 경우, 환원적 아민화의 생성물은 실제로 폴리사카라이드-폴리펩티드 접합체이다.

[0037] 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위해서, 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드는 예를 들어 문헌[Gotschlich et al., J. Exp. Med. (1969) 129:1349]의 방법에 따라, 유리하게는 세균 배양물로부터 미리 정제된다.

[0038] 상기 폴리사카라이드를 변경시키지 않은 채(고유 형태를 참조하시오)로 사용하거나 또는 달리 단편화시킬 수 있다. 실제로, 상기 폴리사카라이드의 크기는 절대적으로 중요한 것은 아니다. 상기 폴리사카라이드는 그의 고유 형태에서 대략 300 개의 반복 단위를 함유한다. 단편화된 폴리사카라이드는 4 개 이상의 반복 단위, 일반적으로는 25 내지 100 개의 반복 단위로 이루어질 수 있다. 경우에 따라, 폴리사카라이드의 크기를 공지된 방법에 따라, 예를 들어 겔 여과에 의해 그의 KD를 측정하거나 또는 SEC-삼중 검출(삼중 검출: 굴절률 측정, 점도측정, 광 산란과 커플링된 배제-확산 크로마토그래피)에 의해 그의 분자 질량을 측정함으로써 측정할 수 있다.

[0039] 폴리사카라이드를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 다양한 방법에 따라, 예를 들어 EP 562 107에 개시된 바와 같이 조절된 산 또는 염기성 가수분해 또는 산화적 유리-라디칼 해중합에 의해 단편화시킬 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 첫 번째 방법에서, 단편화된 폴리사카라이드를 사용하는 것이 바람직하며; 두 번째에서는 고유 폴리사카라이드가 바람직하다.

[0041] 본 발명을 특성화시키기 위해서, 핵자기 공명(NMR) 분광측정법을 전적으로 통상적인 프로토콜에 따라 사용할 수 있으며; 특히 데이터를 상기 목적으로 의도된 임의의 유형의 장치를 사용하여 수집할 수 있다. 탄소 NMR 분광측정법은 이미 몇몇 피막 폴리사카라이드, 특히 폐렴연쇄구균의 폴리사카라이드의 반복 단위를 연구하는데 널리 사용되어 왔다. 예로서, 문헌[C. Jones et al., Carbohyd. Res. (2000) 325: 192]을 언급할 수 있다. 따라서 스펙트럼 분석 분야의 숙련가들은 스스로 탄소 NMR 분광측정법에 의해 상기 5 형 폴리사카라이드를 분석하기에 충분한 정보를 갖는다.

[0042] 그러나, 예로서, 광대역 측정 탐침(스펙트럼 폭: 27500 Hz)을 갖는 브루커(Bruker) DRX500 분광 광도계에서의 후속 측정에 특히 적합한 샘플을 제조하기 위한 프로토콜을 나타낸다. 12 내지 17 mg의 5 형 폴리사카라이드의 동결건조물을 중수(D_2O) 0.5 ml에 용해시킨다. 상기 샘플을 NMR 분석용으로 특수 고안된 0.5 mm 튜브에 넣는다. 이어서 상기 스펙트럼을 70 ℃(343 K)에서 기록한다.

[0043] 특성화를 위해서, 상기 HPAEC-PAD 크로마토그래피를 컬럼 유형, 용출 용액 및 용출 유속에 대해 매우 정확한 조건 하에서 수행해야 한다. 완전한 과정을 하기에 제공한다.

[0044] 아민화된 폴리사카라이드를 무엇보다도 모노사카라이드로 가수분해시켜야 한다. 이를 위해서, 탈이온수 중의 10 내지 40 μg/ml 농도의 5 내지 20 μg의 아민화된 폴리사카라이드 용액을 마개로 막아 밀폐시킨 플라스크에서 120 ℃에서 2 시간 동안 2N 트리플루오로아세트산 500 μl로 처리한다. 가수분해산물을 40 ℃에서 질소 스트림하에 건조시켜 상기 트리플루오로아세트산을 제거한다. 이어서 잔사를 탈이온수 400 μl에 용해시킨다.

[0045] 크로마토그래피를 디오넥스(Dionex)에 의해 시판되는 카보팩™ PA10 분석 컬럼(4 x 250 mm) 상에서 수행한다. 상기 컬럼은 4 급 암모늄 그룹들이 그래프트된 라텍스 마이크로비드로 덮인 55%의 가교결합도를 갖는 설폰화된 디비닐벤젠과 폴리스티렌을 기본으로 하는 지지체로 이루어진다. 상기 라텍스(라텍스 마이크로비드)의 가교결합도는 5%이며; 상기 마이크로비드의 직경은 400 nm이다.

[0046] 가수분해산물 5 ㎍을 컬럼에 주입한다. 이어서 하전되지 않은 모노사카라이드 및 올리고사카라이드, 예를 들어 헥소오스 및 헥소아민을 용출시키기 위해서, 상기 컬럼에 18 mM 수산화 나트륨 용액을 15 분간 1 ㎖/분의 유속으로 흘려보낸다. 상기 크로마토그램을 완성하기 위해서, 후속적으로 상기 수산화 나트륨 용액의 몰 농도를 100 mM까지 점진적으로 증가시키고, 최종적으로 나머지 산성 모노사카라이드 및 올리고사카라이드를 100 mM 수산화 나트륨/300 mM 아세트산 나트륨 용액으로 용출시킬 수 있다.

[0047] 상기 전체 용출을 통해서, 유속은 1 ㎖/분이며 온도는 30 ℃이다.

[0048] 이러한 조건 하에서, 푸코스아민과 뉴모스아민 피크간의 거리는 대략 2 min이다. 상기 푸코스아민과 뉴모스아민 피크가 각각 4.75 및 6.75 min에서 나타나는 경우, 피크 X(나타난다면)는 5.50 내지 6.10(5.80 min) 사이에서 나타난다.

[0049] 본 발명에 따른 2 개의 방법 각각을 사용하여 수득한 생성물들은 모두 본 발명에 따른 생성물의 정의에 상응하지만, Sug 화합물과 N-아세틸화된 퀴노보스아민의 퍼센트와 관련하여서는 상이하다.

[0050] 본 발명에 따른 첫 번째 방법(환원적 아민화에 대해 최적화된 조건들을 열거한다)을 사용하는 경우, 하기를 타나내는 아민화된 폴리사카라이드가 수득된다:

[0051] (i) Sug 화합물의 특징인 11.5 내지 12.5 ppm(포함)의 공명 신호 및 N-아세틸화된 퀴노보스아민의 특징인 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 (^{13}C) NMR 스펙트럼에서 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 신호와 비교하여 보다 작은 탄소 NMR 스펙트럼; 또는

[0052] (ii) 퀴노보스아민의 특징인, 뉴모스아민 바로 뒤에 용출된 피크를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 HPAEC-PAD 크로마토그램에서의 동등한 피크와 비교하여 보다 작은 HPAEC-PAD 크로마토그램; 또는

[0053] (iii) 상기 모두.

[0054] 별도로 취한 폴리사카라이드 분자 또는 일련의 분자들 중의 환원적 아민화 후에 변경된 Sug 잔기의 퍼센트를 절대적인 용어로 정량화하는 것은 가능하지 않다. 다른 한편으로, 상기 Sug 잔기의 변경 정도가, 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 통상적인 방법에 따라 아민화시킨 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드에 비해 본 발명에 따른 첫 번째 방법을 사용하여 아민화시킨 형태로 수득하는 경우, 65% 이상까지(상기가 70 또는 75% 이상까지 감소되지 않는 경우) 감소됨을 나타낼 수 있다. 본 발명에 따른 첫 번째 방법에 따른 환원적 아민화 후, 지속되는 변경의 대부분은 상기 폴리사카라이드의 몇몇 Sug 잔기의 N-아세틸화된 퀴노보스아민으로의 전환과 관련이 있으며; 화합물 X는 탄소 NMR 스펙트럼 및 HPAEC-PAD 크로마토그램(도 1-두번째 스펙트럼 및 도 2-대시 곡선)에 반영된 바와 같이 실질적으로 형성되지 않는다. 구체적으로, 상기 스펙트럼은 화합물 X의 특징인 13 내지 14 ppm(포함)의 공명 신호를 나타내지 않으며, 상기 크로마토그램은 단순히 푸코스아민과 뉴모스아민 피크 사이(5.50 내지 6.10 min)의 매우 낮은 강도의 넓은 피크를 나타낸다.

[0055] 본 발명에 따른 첫 번째 방법을 사용하여, 심지어 (i) 17 내지 18 ppm의 공명 신호가 한정적으로 결여된 탄소 NMR 스펙트럼; (ii) 퀴노보스아민 피크(6.90 내지 7.40 min)가 결여된 HPAEC-PAD 크로마토그램(상기 피크는 통상적인 아민화 방법에 따라 아민화된 폴리사카라이드가 단지 선행 피크(뉴모스아민 피크)의 간단한 숄더 정도로 환원된 경우에 관찰된 것이다); 또는 (iii) 상기 둘 다를 나타내는 아민화된 폴리사카라이드를 수득할 수도 있다.

[0056] 본 발명에 따른 두 번째 방법은 고유 폴리사카라이드의 케톤 기의 선행 환원을 요한다. 이러한 상황 하에서, Sug 잔기를 N-아세틸화된 푸코스아민과 퀴노보스아민으로 필수적으로 전환시킴이 쉽게 이해된다. 이 경우에, "환원된 폴리사카라이드"를 참조하시오. 환원되고 단편화된 폴리사카라이드의 통상적인 과정에 따른 환원적 아민화는 반복 단위의 구조에 대해 주목할 만한 효과를 갖지 않는다. 이는 도 2-대시 및 점으로 나타낸 곡선에서 명백히 나타난다.

[0057] 따라서, 본 발명에 따른 두 번째 방법을 사용하는 경우,

[0058] (i) Sug 화합물의 특징인 11.5 내지 12.5 ppm(포함)의 공명 신호가 결여되고 N-아세틸화된 퀴노보스아민의 특징인 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호를 포함하며, 그의 강도가 시아노붕수소화 나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 (^{13}C) NMR 스펙

트럼에서 17 내지 18 ppm(포함) 사이에 위치한 공명 신호와 비교하여 증가된 탄소 NMR 스펙트럼; 또는

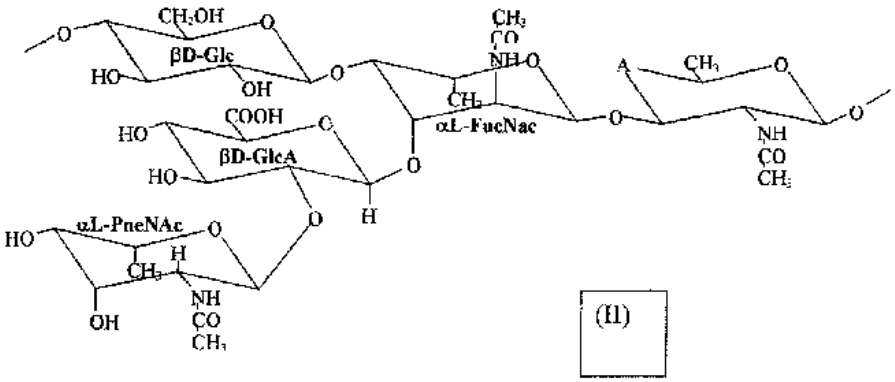
[0059] (ii) 퀴노보스아민의 특징인, 뉴모스아민 피크 바로 뒤에 위치한 피크를 포함하고, 그의 강도가 시아노붕수소화나트륨의 존재 하에 pH 8에서 48 시간 동안 환원적 아민화 후에 수득된 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 HPAEC-PAD 크로마토그램에서의 동등한 피크와 비교하여 증가된 HPAEC-PAD 크로마토그램; 또는

[0060] (iii) 상기 모두

[0061] 를 나타내는 아민화된 폴리사카라이드가 수득된다.

[0062] 즉, 말단 알데히드 그룹 상에서 아민화된, 본 발명에 따른 아민화된 폴리사카라이드는 하기 화학식 II의 반복 단위들로 필수적으로 이루어진다:

화학식 II

[0063] 

[0064] 상기 식에서,

[0065] A는 독립적이고 무작위적으로 C=O 또는 CHOH이다.

[0066] "필수적으로 이루어진 아민화된 폴리사카라이드"란 표현은 화학식 II의 반복 단위의 퍼센트가 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 전적으로 바람직하게는 95% 이상인 말단 알데히드 그룹 상에서 아민화된 폴리사카라이드를 의미하는데 사용된다.

[0067] 본 발명에 따른 아민화된 폴리사카라이드의 제조에 사용되는 방법에 따라, A가 C=O인 화학식 II(화학식 II')의 반복 단위의 비율이 상당히 변할 수 있으며, 결과적으로, A가 CHOH인 화학식 II(화학식 II")의 반복 단위의 비율이 상당히 변할 수 있다.

[0068] 본 발명에 따른 두 번째 방법은 NMR에서 Sug 잔기에 상응하는 공명 신호가 N-아세틸화된 퀴노보스아민에 상응하는 공명 신호를 위해 사라지기 때문에 반복 단위가 화학식 II"에 상응하는 아민화된 폴리사카라이드를 생성시킨다. 상기 폴리사카라이드는 95% 이상의 화학식 II"의 반복 단위를 함유한다.

[0069] 다른 한편으로, 본 발명에 따른 첫 번째 방법에서 화학식 II'의 단위/화학식 II"의 단위 비가 명백히 다른 아민화된 폴리사카라이드가 생성된다. 구체적으로, NMR에서 Sug 잔기에 상응하는 공명 신호를 N-아세틸화된 퀴노보스아민에 상응하는 바와 같이 볼 수 있다. 상기 폴리사카라이드는 85 내지 95%의 화학식 II'의 반복 단위를 함유한다.

[0070] 앞서 지적한 바와 같이, 본 발명에 따른 폴리사카라이드를 다양한 화합물들을 사용하여 아민화시킬 수 있다. 본 발명에 따른 폴리사카라이드를 접합체의 제조에 사용하는 경우, 상기 폴리사카라이드의 아민화를 위한 화합물을 유리하게는 상기 접합체가 제공하기 바라는 구조에 따라 선택한다. 일반적으로, 본 발명에 따른 접합체는 하기 화학식에 상응한다.

[0071] $Ps-CH_2-NH-R$

[0072] 상기 식에서,

[0073] Ps는 화학식 II의 반복 단위로 필수적으로 이루어진 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 나타내고;

[0074] R은 담체 폴리펩티드 P;

[0075] 화학식 III L-P의 화합물(이때 담체 폴리펩티드가 결합제(L)에 결합된다); 또는

[0076] 화학식 III' S-L'-P의 화합물(이때 담체 폴리펩티드 P가 결합제(L')를 통해 이격자(S)에 결합된다)이고;

[0077] C는 폴리사카라이드의 말단 알데히드 그룹의 탄소 원자를 나타내고;

[0078] N은 R에 의해 제공된 아민 그룹의 질소 원자를 나타낸다.

[0079] 화합물 P, L 및 S를 접합체에 대해 제공된 이후의 설명에서 개시할 것이다. 그러나, 이 시점으로부터 상기 화합물들이 물론 모두 알데히드 작용기와 반응할 수 있는 유리 1 급 아민 그룹을 포함해야 함을 알아야 한다. 상기 화합물들을 어떠한 차이 없이 본 발명에 따른 2 개의 방법 각각에 사용할 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 첫 번째 방법에서, 폴리사카라이드에 가해지는 환원적 아민화는 특히 상기 폴리사카라이드를 아민 작용기를 포함하는 화합물, 예를 들어 화합물 P, L 또는 S와, 시프 염기에 선택적인 환원제, 예를 들어 시아노붕수소화물 또는 피리딘 보란의 존재 하에서 이미 열거한 pH 및 온도 조건 하에, 바람직하게는 30 분 내지 4 시간 동안 반응시키는 것이다.

[0081] 통상적인 조건 하에서 수득되는 것과 유사한 아민화 정도를 얻기 위해서, 2 내지 4 시간(포함)의 배양 시간이 권장된다. 상기 배양 시간이 2 시간을 초과하지 않는 경우, Sug 화합물은 변경되지 않는다. 2 시간 이상의 경우 일반적으로 폴리사카라이드 쇄 중에 변경되지 않은 Sug가 공존하는, N-아세틸화된 β-D-퀴노보스아민 및/또는 N-아세틸화된 β-D-푸코스아민 형태의 환원된 Sug가 관찰된다. 결과적으로, 배양 시간이 길수록 환원된 Sug의 비율이 커진다. 4 시간 이상의 경우, 바람직하지 못한 화합물 X가 NMR에 의해 확인된다.

[0082] 상기 환원적 아민화 반응 시간이 필요 시간을 넘지 않도록 하기 위해서, 상기 반응을 신속한 방법, 특히 아민화된 폴리사카라이드의 선택적인 침전에 의해 정지시켜야 한다. 상기 아민화된 폴리사카라이드를 예를 들어 상기 아민화된 화합물이 결합제 또는 이격자인 경우 알콜 침전에 의해 정제시킨다. 상기 아민화된 화합물이 폴리펩티드인 경우 황산 암모늄에 의한 침전이 바람직하다. 침전에 의한 정제 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 통상적인 방법이다.

[0083] 상기 환원적 아민화는 일반적으로 완충된 배지 중에서 일어나며, 예를 들어 시트레이트/포스페이트 완충제가 사용되나, 2.5 내지 6의 pKa를 갖는 또 다른 완충제도 또한 적합하다. 예로서, 시트레이트, 아세테이트 또는 숙시네이트 완충제가 사용될 수 있다. 그러나 화학식이 아미노 그룹을 수반하는 화합물을 포함하는 완충제, 예를 들어 글리신 완충제는 피한다.

[0084] 반응 매질의 온도는 사용되는 아민화된 화합물에 따라 일반적으로는 4 내지 70 ℃, 바람직하게는 20 내지 50 ℃이며, 상기 아민화된 화합물이 폴리펩티드인 경우 20 내지 37 ℃가 더욱 더 바람직하다.

[0085] 본 발명에 따른 첫 번째 방법에 사용하기 위해서, 상기 폴리사카라이드는 고유의 것이거나 또는 미리 단편화시킬 수 있다. 상기 고유 폴리사카라이드의 구조적 완전성이 보존되는 조건이라면 어떠한 단편화 방법도 적합할 수 있다. 이후에 개시되는 유리-라디칼 단편화가 가장 특히 적합하다.

[0086] 폴리사카라이드, 아민화된 화합물과 시아노붕수소화물간의 중량비는 중요하지 않지만, 결합제 L 또는 이격자 S를 아민화된 화합물로서 사용하는 경우 1/0.1/0.02 내지 1/5/0.2 범위의 폴리사카라이드/아민화된 화합물/시아노붕수소화물 중량비 범위; 또는 담체 폴리펩티드가 아민화된 화합물로서 사용되는 경우 1/0.2/0.02 내지 1/1/0.2 범위의 중량비 범위에서 보다 양호한 아민화된 폴리사카라이드 수율이 얻어진다. 아민화된 폴리사카라이드의 최적 수율은 상기 아민화된 화합물이 결합제 또는 이격자인 경우 1/1/0.1 비에서 얻어지고, 상기 아민화된 화합물이 담체 폴리펩티드인 경우에는 1/0.5/0.1 비에서 얻어진다.

[0087] 본 발명에 따른 두 번째 방법에 사용하기 위해서, 상기 폴리사카라이드는 고유의 해중합되지 않은 폴리사카라이드가 바람직한데, 그 이유는 상기 두 번째 방법을 수행하기 위해서는 상기 폴리사카라이드를 말단 알데히드 그룹을 재 도입시키기 위해서 환원 후에 반드시 단편화시켜야 하기 때문이다.

[0088] 본 발명에 따른 두 번째 방법에서, 상기 폴리사카라이드의 환원을 통상적으로, 예를 들어 주변 온도에서 수성 매질 중에서 염기성 pH, 바람직하게는 8 내지 10의 pH에서 수행한다. 상기 케톤 및 알데히드 작용기에 특이적인 강한 환원제를 폴리사카라이드보다 과잉으로, 예를 들어 10 배 이상, 바람직하게는 100 배 이상의 몰 농도로 사용한다. 붕수소화물, 예를 들어 붕수소화 나트륨($NaBH_4$)이 환원제로 선택된다. 반응 시간은 30 분 내지 2 시간, 바람직하게는 1 시간일 수 있다. 이어서 상기 환원된 폴리사카라이드를 임의의 방법에 의해, 바람직하게는 알콜 침전에 의해 정제시킬 수 있다. 상기 환원된 폴리사카라이드의 해중합을 특히 조절된 가수분해에

의해 수행할 수 있다. EP 562 107에 개시된 바와 같은 산화적 유리-라디칼 해중합 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 이어서 상기 단편화된 폴리사카라이드를 통상적으로, 예를 들어 환원적 아민화 단계 전에 알콜 침전에 의해 정제할 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 두 번째 방법에서, 상기 환원적 아민화를 통상적인 조건을 포함한 임의의 조건 하에서 수행할 수 있는데, 그 이유는 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드의 구조 중에 어떠한 Sug 화합물도 더 이상 존재하지 않으며, 결과적으로 바람직하지 못한 화합물 X가 형성될 어떠한 위험도 더 이상 없기 때문이다.

[0090] 따라서, 본 발명에 따른 두 번째 방법에서 상기 폴리사카라이드에 가해지는 환원적 아민화는 단순히 상기 폴리사카라이드를 아민 작용기를 포함하는 화합물, 예를 들어 화합물 P, L 또는 S와, 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에서 반응시킴을 필요로 한다.

[0091] 본 발명에 따른 첫 번째 방법에 대해 개시한 조건들을 사용하는 것도 가능하며, 따라서 이 경우에 배양 시간 및 또한 pH는 더 이상 중요하지 않고, 시간 제한이나 pH 범위와 관련된 제한이 있거나 없다. 일반적으로는 통상적인 조건 하에서, 반응 매질의 pH는 5 내지 9의 광범위한 범위 내에 있지만, 5 내지 8의 pH를 선택하는 것이 바람직하다. 일반적으로 2 시간 내지 48 시간의 배양 시간은 양호한 아민화된 폴리사카라이드 수율을 제공한다. 배양 온도는 일반적으로 20 내지 50 ℃이다.

[0092] 일단 환원적 아민화가 성공적인 결론으로 수행되었으면, 상기 아민화된 폴리사카라이드를 필요에 따라 유용한 방법을 사용하여, 예를 들어 알콜 또는 황산 암모늄 침전에 의해, 투석에 의해, 배제-확산 크로마토그래피에 의해 또는 한외여과에 의해 반응 매질로부터 정제시킨다.

[0093] 앞서 언급한 바와 같이, 아민화된 폴리사카라이드는 상기 폴리사카라이드의 말단 알데히드 작용기와 반응한 화합물이 담체 폴리펩티드인 경우 이미 접합체일 수 있다. 상기 접합체는 화학식 Ps-CH_2-NH-P를 가질 수 있으며, 이때 상기 폴리사카라이드(Ps)는 담체 폴리펩티드(P)에 직접 커플링된다.

[0094] 상기 이유로, 본 발명의 주제는 또한 하기와 같다:

[0095] a. 화학식 IV Ps-CH_2-NH-P(여기에서 Ps는 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 나타낸다)의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로; 상기 방법에 따라 상기 폴리사카라이드를 담체 폴리사카라이드(P)와, 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 반응시킨다.

[0096] b. 화학식 IV Ps-CH_2-NH-P(여기에서 Ps는 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 나타낸다)의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로; 상기 방법에 따라 (i) 고유 폴리사카라이드를 케톤과 알데히드 작용기에 특이적인 강한 환원제로 환원시키고, (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고, (iii) 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드 P의 존재 하에서 환원적 아민화시킨다.

[0097] c. 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0098] (i) 화학식 VI Ps-CH_2-NH-L의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서, 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제(L)와 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 반응시키고,

[0099] (ii) 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

[0100] d. 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 화학식 VII L-P(여기에서 L은 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제이고 P는 담체 폴리펩티드이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와, 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 반응시킨다.

[0101] e. 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0102] (i) 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고,

[0103] (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고,

[0104] (iii) 화학식 VI Ps-CH_2-NH-L의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제(L)와 커플링시키고,

[0105] 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)와 커플링시키거나, 또는 한편으로

[0106] f. 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0107] (i) 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고,

[0108] (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고,

[0109] (iii) 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 화학식 VII L-P(여기에서 L은 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 결합제이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와 커플링시킨다.

[0110] g. 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0111] (i) 화학식 IX Ps-CH_2-NH-S의 유도체화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)와 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 반응시키고,

[0112] (ii) 화학식 X Ps-CH_2-NH-S-L'의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 결합제(L')와 커플링시키고,

[0113] (iii) 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)와 커플링시키거나; 또는 한편으로

[0114] h. 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0115] (i) 화학식 IX Ps-CH_2-NH-S의 유도체화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)와 쉬프 염기에 선택적인 환원제의 존재 하에 4 내지 6.5, 바람직하게는 5 내지 6의 pH에서 4 시간을 초과하지 않는 기간 동안 반응시키고,

[0116] (ii) 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 XI L'-P(여기에서 L'는 결합제이고 P는 담체 폴리펩티드이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와 커플링시킨다.

[0117] i. 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0118] (i) 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고,

[0119] (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고,

[0120] (iii) 화학식 IX Ps-CH_2-NH-S의 유도체화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 상기 아민화되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)에 커플링시키고,

[0121] (iv) 화학식 X Ps-CH_2-NH-S-L'의 활성화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서, 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 결합제(L')에 커플링시키고,

[0122] (v) 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 담체 폴리펩티드(P)에 커플링시키거나; 또는 한편으로

[0123] j. 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 본 발명에 따른 접합체의 제조 방법으로, 상기 방법에 따라:

[0124] (i) 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드(Ps)를 케톤 작용기를 환원시킬 수 있는 작용제와 반응시키고,

[0125] (ii) 상기 환원된 폴리사카라이드를 단편화시키고,

[0126] (iii) 화학식 IX Ps-CH_2-NH-S의 유도체화된 폴리사카라이드를 수득하기 위해서 상기 아민화되고 단편화된 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 하나 이상의 1 급 아민 작용기를 갖는 이격자(S)에 커플링시키고,

[0127] (iv) 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L'-P의 접합체를 수득하기 위해서 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 화학식 XI L'-P(여기에서 L'는 결합제이고 P는 담체 폴리펩티드이다)의 활성화된 담체 폴리펩티드와 커플링시킨다.

[0128] "담체 폴리펩티드(P)"란 용어는 그의 가장 일반적인 범위에서, 그의 크기 및 일어날 수 있는 번역 후 변경에 관계없이, 하나 이상의 "T-헬퍼" 에피토프를 포함하는 아미노산들의 쇄를 나타낸다. T-헬퍼 에피토프는 10 내지 15 개의 아미노산들로 이루어질 수 있는 것으로 공지되어 있으므로, 상기 "담체 폴리펩티드"란 용어는 펩티드를 포함한다. 물론, 상기는 또한 단백질을 포함한다.

[0129] "T-헬퍼 에피토프"란 용어는 하나 이상의 MHC 분자와 관련하여 T-헬퍼 림프구를 활성화시키는 아미노산 쇄를 의미한다. 상기 접합체의 담체 폴리펩티드는 상기 접합체의 투여에 이어서 상기 폴리사카라이드에 대한 특이적인 항체의 생산과 함께 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드에 특이적인 T-의존성 면역성의 발달을 유도한다. 상기는 또한 추가접종 면역 시에 상기 특이 항체 역가의 증가를 유도한다.

[0130] 본 발명에 따른 접합체에 사용하기 위해서 상기 담체 폴리펩티드는 화학적 해독에 의해 수득되는 세균 변성독소, 예를 들어 파상풍 변성독소, 또는 유전적 돌연변이에 의해 수득되는 세균 변성독소, 예를 들어 디프테리아 변성독소(예로서 CRM 197), 슈도모나스 아에루기노사 외부단백질 A 또는 스타필로코커스 아우레우스 외독소 A일 수 있다. 세균의 외막 단백질, 예를 들어 네이세리아 메닌지티디스의 OMP1 또는 OMP2 단백질; 에스케리키아 콜라이의 lambB, OmpC, OmpaA, OmpF 및 PhoE 단백질, 바실러스 서브틸리스의 CotC 또는 CotD 단백질, 세균 구멍단백질, 예를 들어 네이세리아 메닌지티디스 B 1 군 구멍단백질 또는 클렙시엘라 뉴모니아에 구멍단백질 P40; 또한 지단백질, 예를 들어 보렐리아 부르그도르피 OspA, 스트렙토코커스 뉴모니아에 PspA, 네이세리아 메닌지티디스 트랜스페린 결합 단백질 2 형(TBP2), 에스케리키아 콜라이 TraT, 스트렙토코커스 뉴모니아에 부착소 A를 또한 사용할 수 있다. 바이러스 기원의 단백질, 예를 들어 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌이 또한, WO 94/29339에 개시된 p24E, p24N, p24M 및 p24H 펩티드가 T-헬퍼 에피토프, 또는 문헌[Del guercio et al., Vaccine(1997), Vol. 15/4, p. 441-448]에 개시된 PADRE(PanDR T-헬퍼 에피토프) 펩티드를 운반할 수 있는 바와 같이, 담체 폴리펩티드의 역할을 수행할 수 있다.

[0131] 화학식 IV Ps-CH_2-NH-P의 접합체의 제조를 단일 단계로 수행한다, 즉 폴리사카라이드의 환원적 아민화 반응이 또한 상기 폴리사카라이드를 상기 폴리펩티드에 접합시킨다. 다른 한편으로, 화학식 V Ps-CH_2-NH-L-P 또는 화학식 VIII Ps-CH_2-NH-S-L-P의 접합체의 제조를 다수의 상이한 단계들로 수행한다, 즉 첫 번째 단계는 화합물 L 또는 S에 의한 폴리사카라이드의 환원적 아민화를 생성시키는 본 발명에 따른 아민화된 폴리사카라이드의 2 개의 제조 방법 중 하나의 실행으로 이루어진다.

[0132] 이격자 S 및 결합제 L 및 L'는 상대적으로 반대 방향으로 화합물 내에 배열된 2 개 이상의 작용기를 갖는다. 이격자 S 및 결합제 L에 대해서, 상기 작용기들 중 하나는 상기 환원적 아민화 도중 폴리사카라이드의 말단 알데히드와 반응할 수 있어야 하며, 다른 것은 각각 결합제 L' 또는 담체 폴리펩티드와 반응할 수 있어야 한다. 결합제 L'에 대해서, 상기 작용기들 중 하나는 상기 이격자와 반응할 수 있어야 하며, 다른 것은 담체 폴리펩티드와 반응할 수 있어야 한다.

[0133] 본 발명의 목적을 위해서, 상기 결합제 L은 화학식 XII R1-A-R2의 화합물이며, 상기 식에서:

[0134] A는 치환되거나 비 치환되고, 포화되거나 불포화될 수 있는 지방족 또는 방향족 쇄, 또는 혼합된 지방족 및 방향족 쇄를 나타내고;

[0135] R1은 1 급 아민 또는 1 급 아민을 갖는 화학적 라디칼, 예를 들어 라디칼 하이드라지드 NH_2-NH-CO를 나타내고;

[0136] R2는 담체 폴리펩티드의 작용기와 반응할 수 있는 작용기를 나타낸다.

[0137] 유리하게는, A는 탄소수 1 내지 12, 유리하게는 2 내지 8, 바람직하게는 2 내지 6의 알킬, 알킬렌 또는 디티오알킬을 나타낸다.

[0138] 유리하게는, R2는 카복실, 티올 또는 아민 그룹과 반응할 수 있다. 따라서, R2는 R1, 아민 그룹 또는 아민 그룹을 갖는 라디칼, 예를 들어 라디칼 하이드라지드와 독립적일 수 있다. R2는 또한 티올 또는 카복실 그룹일 수 있다.

[0139] 따라서, 화학식 R1-A-R2의 화합물은 알킬 디하이드라지드, 예를 들어 아디프산 디하이드라지드; 모노아미노 티오알킬, 예를 들어 시스테인 또는 시스테아민, 또는 디아미노 티오알킬, 예를 들어 시스타민; 디아미노알킬 또는 디아미노알킬렌, 예를 들어 디아미노메탄, 디아미노에탄 또는 디아미노헥산일 수 있다.

[0140] 본 발명의 목적을 위해서, 이격자 S는 화학식 XIII R1-A-R2'의 화합물이며, 상기 식에서:

[0141] A는 치환되거나 비 치환되고, 포화되거나 불포화될 수 있는 지방족 및/또는 방향족 쇄를 나타내고;

[0142] R1은 1 급 아민 또는 1 급 아민을 갖는 화학적 라디칼, 예를 들어 라디칼 하이드라지드 NH_2-NH-CO를 나타내고;

[0143] R2'는 결합제 L'의 작용기와 반응할 수 있는 작용기를 나타낸다.

[0144] 특정한 방식에 따라, 상기 이격자 S를 화학식 XII R1-A-R2의 화합물들 중에서 선택할 수 있다.

[0145] 본 발명의 목적을 위해서, 상기 선택된 결합제 L'를 먼저 S에 의해 수반되는 작용기 R2'에 의해 처리하고, 이어서 상기 접합 과정을 중재해야 하는 담체 폴리펩티드의 작용기에 의해 처리한다. 상기 결합제 L'는 화학식 XIV R3-B-R4의 화합물이며, 상기 식에서:

[0146] B는 치환되거나 비 치환되고, 포화되거나 불포화될 수 있는 지방족 및/또는 방향족 쇄를 나타내고;

[0147] R3은 작용기 R2'와 반응할 수 있는 작용기를 나타내고;

[0148] R4는 담체 폴리펩티드의 작용기와 반응할 수 있는 작용기를 나타낸다.

[0149] 유리하게는, B는 탄소수 1 내지 12, 바람직하게는 2 내지 8의 치환되거나 비 치환될 수 있는 알킬 또는 알킬렌; 탄소수 7 내지 12의 아릴, 알킬아릴 또는 아릴알킬렌; 치환되거나 비 치환될 수 있는 페닐 또는 페닐렌을 나타낸다.

[0150] R2'가 티올 그룹인 경우, R3은 티올 그룹; 불포화된 α- 또는 β-카보닐 또는 이미딜 그룹, 특히 말레이미딜 그룹; 아실 할라이드 또는 알킬 할라이드(여기에서 할로겐은 브롬, 염소 또는 요오드이다)일 수 있다.

[0151] 유리하게는, R4는 카복실, 티올 또는 아민 그룹과 반응할 수 있다. 따라서, 접합 과정을 중재해야 하는 담체 폴리펩티드의 작용기가 티올인 경우 R4는 말레이미드 그룹일 수 있다. 유사하게, 상기 접합 과정을 중재해야 하는 담체 폴리펩티드의 작용기가 아민인 경우 R4는 카복실 그룹 또는 바람직하게는 N-하이드록시숙신이미딜 또는 N-하이드록시설포숙신이미딜 그룹일 수 있다.

[0152] 이격자 S가 아미노티올, 예를 들어 시스테인, 시스테아민 또는 시스타민인 경우, 결합제 L'는 유리하게는 숙신이미딜 말레이미딜 알킬이다. 상기 후자는 특히 γ-말레이미도부티르산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르 또는 N-설폰숙신이미드 에스테르(GMBS 또는 설포-GMBS), ε-말레이미도카프로산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(MCS), 숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐) 부티레이트(SMPB) 또는 설포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐) 부티레이트(설포-SMPB), 말레이미도벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(MBS) 또는 말레이미도벤조산 N-하이드록시설포숙신이미드 에스테르(설포-MBS), 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산카복실산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(SMCC) 또는 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산카복실산 N-하이드록시설포숙신이미드 에스테르(설포-SMCC)일 수 있다.

[0153] 이격자 S가 디아미노알킬 또는 디하이드라지드인 경우, 결합제 L'는 유리하게는 화학식 XIV R3-B-R4(여기에서 B는 알킬 그룹이고, R3은 숙신이미딜 그룹이고 R4는 숙신이미딜 또는 말레이미도 그룹이다)의 디숙신이미딜알킬 및 숙신이미딜말레이미도알킬 화합물 중에서 선택된다.

[0154] 상기 디숙신이미딜 그룹은 디숙신이미딜 수베레이트(DSS), 비스(설포숙신이미딜) 수베레이트(BS3), 디숙신이미딜 글루타레이트(DSG), 아디프산의 숙신이미딜 디에스테르(SIDEA) 또는 숙신산의 숙신이미딜 디에스테르일 수 있다. 상기 숙신이미딜 및/또는 설포숙신이미딜 그룹은 아민 그룹과 반응할 수 있다. 상기 숙신이미딜말레이미도알킬 화합물은 상기 언급한 것들 중 하나일 수 있다.

[0155] 접합 방법 a 내지 j에서, 유도체화, 활성화 및 접합 단계 자체를 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 과정에 따라 수행할 수 있다. 상기는 특히 생물접합 기법(1996)이란 표제하의 에드 아카데믹(Ed Academic) 출판사의 참고 논문에 개시되어 있다. 예로서, 아민 그룹과 카복실 그룹을 사용하는 접합 반응을 유리하게는 카보디이미드의 존재 하에서 수행함을 나타내는 상기 논문을 참조하시오.

[0156] 유도체화, 활성화 및 접합 단계들은 폴리사카라이드의 반복 단위의 화학 구조에 대해 영향을 미치지 않는다.

[0157] 방법 a 내지 j 중 하나에 따라 수득된 접합체를 최종적으로, 잔류의 접합되지 않은 폴리사카라이드 및 단백질 분획들을 제거하기 위해서 예를 들어 황산 암모늄 침전, 한외여과, 배제-확산 크로마토그래피 또는 분배 크로마토그래피에 의해 정제시킬 수 있다.

[0158] 본 발명의 주제는 또한 본 발명에 따른 폴리사카라이드를 바람직하게는 접합체의 형태로 포함하는, 치료 또는 예방용의 약학 조성물이다. 상기 접합체를 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 지지체, 예를 들어 인산염 완충제, 및 적합한 경우 동결건조 부형제와 함께 제형화할 수 있다. 일반적으로는, 상기 생성물을 상기 방법의 작용 및 투여 경로 및 표준 약학적 관행에 따라 선택할 수 있다. 적합한 희석제 및 또한 약학 조성물의 개발에 필수적인 것들이 당해 분야의 표준 참고문헌으로서 소용되는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]에 개시되어 있다. 상기 조성물은 또한 보강제, 예를 들어 수산화 알루미늄, 인산 알루미늄 또는 하이드록시인산 알루미늄을 함유할 수 있다. 보존제, 예를 들어 페녹시에탄올 포르몰을 또한 사용할 수 있다. 면역화 용량을 0.1 내지 2 ㎖의 부피, 바람직하게는 0.5 ㎖의 부피로 제조할 수 있다. 예로서, 1 회 용량은 0.475 ㎎의 PO_4^{2-} 이온, 4.5 ㎎의 염화 나트륨 및 임의로 300 ㎍의 Al^{3+} 이온을 함유할 수 있음이 지적된다. 본 발명에 따른 면역화 조성물을 또한 다른 면역화 항원, 특히 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드 항원(폴리펩티드 담체에 접합되거나 접합되지 않을 수 있다)과 배합시킬 수 있다. 이어서 폐렴연쇄구균에 대한 다가 백신을 수득하며, 이때 상기 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드는 본 발명에 개시된 형태들 중 하나의 것이다.

[0159] 본 발명의 주제는 또한 유아, 어린 아동, 성인 또는 노인에게 5 형 폐렴연쇄구균에 대한 특이적인 보호 면역 반응을 유도하기에 충분한 용량의, 임의로 항원보강된 본 발명에 따른 조성물을 투여하는, 상기 병원체에 대한 치료 또는 예방 방법이다. 상기 방법을 1 회 이상의 면역화 용량의 본 발명에 따른 조성물을 투여함으로써 수행한다. 예를 들어, 각 주입기간 사이에 한 달의 기간을 두고 1 내지 3 회, 바람직하게는 3 회 주입할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물을 백신 분야에 통상적인 임의의 사용 경로에 의해, 특히 전신적으로 즉 비 경구적으로, 예를 들어 피하, 근육 내, 피 내 또는 정맥 내; 또는 점막을 통해, 예를 들어 경구 또는 코를 통해 투여할 수 있다. 투여되는 양은 상기 투여 경로에 사용되는 담체 폴리펩티드를 고려한다. 예로서, 비 경구 투여에 따른 5 혈청형에 대한 보호 면역성을 관찰하기 위해서 상기 접합체 중에 함유되는 필요 폴리사카라이드 용량은 상기 담체 단백질이 파상풍 변성독소인 경우 일반적으로 0.5 내지 10 ㎍, 바람직하게는 0.5 내지 5 ㎍, 훨씬 더 바람직하게는 0.5 내지 2 ㎍이다. 접합되지 않은 형태에서, 필요한 폴리사카라이드의 용량은 10 내지 50 ㎍, 바람직하게는 20 내지 30 ㎍이다.

[0160] 하기 실시예에 비추어 본 발명이 보다 명확하게 이해될 것이며, 이들 실시예는 본 발명을 비 제한적으로 예시한다.

[0161] 도 1은 다양한 제조 방법에 따라 아민화된 폴리사카라이드의 NMR 스펙트럼을 나타낸다.

[0162] 첫 번째 스펙트럼은 산화적 유리-라디칼 해중합 후 단편화된 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드의 스펙트럼이다. 상기 스펙트럼의 높은 장 영역에서, 상기 폴리사카라이드의 반복 단위의 3N-아세틸화된 헥소스아민의 메틸 탄소: N-아세틸화된 푸코스아민(C6 FucNAc), N-아세틸화된 뉴모스아민(C6 pneNAc) 및 Sug(C6 Sug)의 공명 신호들이 확인된다.

[0163] 두 번째 스펙트럼은 본 발명의 주제인 두 번째 방법에 따라 수득된 아민화된 폴리사카라이드의 스펙트럼이다. Sug(C6 Sug)에 해당하는 신호의 소실과 N-아세틸화된 퀴노보스아민(C6 QuiNAc)에 해당하는 새로운 신호의 출현이 관찰된다.

[0164] 세 번째 스펙트럼은 본 발명의 주제인 첫 번째 방법에 따라 수득된 아민화된 폴리사카라이드의 스펙트럼이다. 상기는 단편화된, 아민화되지 않은 폴리사카라이드의 NMR 스펙트럼과 일치한다.

[0165] 네 번째 스펙트럼은 통상적인 조건 하에서 아민화된 폴리사카라이드의 스펙트럼이다. 상기 스펙트럼의 높은 장 영역에서 2 개의 추가적인 신호의 존재가 주목되며, 이는 N-아세틸화된 퀴노보스아민과 화합물 X에 해당하며, 또한 Sug에 해당하는 신호의 높이가 감소한 것이 주목된다.

[0166] 도 2는 통상적인 환원적 아민화 방법(파선), 본 발명의 주제인 첫 번째 방법(대시 곡선) 또는 본 발명의 주제인 두 번째 방법(대시와 점으로 나타낸 곡선)에 따라 아민화된 폴리사카라이드, 해중합된 고유 폴리사카라이드(실선으로 나타낸 곡선)의 HPAEC-PAD에 의해 수득된 크로마토그램을 나타낸다.

실 시 예

[0167] **실시예 1: 단편화 후 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의, pH 6에서 2 시간 동안의 환원적 아민화**

[0168] a) 고유 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드의 유리 라디칼 해중합

[0169] 수용액 중의 2.5 mg/㎖ 농도의 폴리사카라이드를 아스코르브산, 황산 제 1 철 및 또한 황산 구리로 단편화시킨다. 아스코르브산의 밀리몰 수량은 황산 제 1 철 및 황산 구리의 100 배 이상이다. 아스코르브산 대 폴리사카라이드의 중량 비는 0.1이다. 상기 반응 혼합물을 암실에서 30 ℃ 수욕에서 1 시간 30 분 동안 배양한다. 가수분해된 폴리사카라이드를 80% 에탄올 중의 침전에 이어서 원심분리에 의해 정제한다. 상기 원심분리 펠릿을 투석시키고 이어서 동결건조시킨다. 상기 단편화된 폴리사카라이드의 평균 크기는 삼중 검출(Viscotec k)과 함께 배재 크로마토그래피에 의해 측정 시 대략 30 내지 35 반복 단위이다.

[0170] b) 폴리사카라이드의 환원적 아민화

[0171] 상기 단편화된 폴리사카라이드를 디아미노헥산(DAH) 하이드로클로라이드(Aldrich) 및 시아노붕수소화 나트륨($NaCNBH_3$)(Sigma)의 존재 하에서 시트레이트/포스페이트, 0.2 M 완충제, pH 6에 10 mg/㎖의 농도로 재 용해시킨다. 상기 폴리사카라이드/DAH 하이드로클로라이드 및 $NaCNBH_3$/DAH 하이드로클로라이드 중량비는 각각 0.8 및 0.1이다. 상기 반응 혼합물을 50 ℃ 수욕에서 2 시간 동안 배양한다. 이어서 상기 아민화된 폴리사카라이드를 80% 에탄올에 침전시킨 다음 원심분리시켜 반응을 정지시킨다. 이어서 침전 펠릿을 0.5M NaCl에 10 mg/㎖의 폴리사카라이드 비율로 용해시키고, 이어서 8 회 연속적인 투석 욕(처음 4 회 욕은 0.5M NaCl 용액 중에서 수행하고, 이어서 4 회 욕은 한외여과된 물 중에서 수행한다)을 가한다. 상기 유도체화되고 아민화된 폴리사카라이드를 최종적으로 동결건조시킨다.

[0172] **실시예 2: 환원 및 단편화 후 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드의 환원적 아민화**

[0173] a) 고유 폴리사카라이드의 환원 및 단편화

[0174] 시아노붕수소화 나트륨($NaBH_4$) 10 mg을 고유 폴리사카라이드의 수용액 10 ㎖에 10 mg/㎖로 가하고, pH를 1N 수성 암모니아로 9±0.5로 조절하고, 이어서 상기 반응 혼합물을 암실에서 주변 온도에서 2 시간 동안 방치시킨다. 이어서 상기 $NaBH_4$를 몇 방울의 빙초산을 가하여 파괴시킨다. 상기 환원된 폴리사카라이드를 이어서 물에 대해 투석시키고, 이어서 실시예 1의 단락 a)에 개시된 프로토콜을 사용하여 단편화시킨다. 평균 30 내지 35 개의 반복 단위를 함유하는 폴리사카라이드를 수득한다. 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 후속적으로 동결건조시킨다.

[0175] b) 환원되고 단편화된 폴리사카라이드의 환원적 아민화

[0176] 상기 환원되고 단편화된 폴리사카라이드를 즉석에서 제조된 디아미노헥산(DAH) 하이드로클로라이드 및 시아노붕수소화 나트륨($NaCNBH_3$)의 존재 하에서 0.2 M 포스페이트 완충제, pH 7.5에 10 mg/㎖의 농도로 재 용해시킨다. 상기 폴리사카라이드/DAH 하이드로클로라이드 및 $NaCNBH_3$/DAH 하이드로클로라이드 중량비는 각각 0.8 및 0.1이다. 상기 반응 혼합물을 50 ℃ 수욕에서 48 내지 72 시간 동안 배양한다. 이어서 상기 아민화된 폴리사카라이드를 80% 에탄올에 침전시킨 다음 원심분리시켜 정제시킨다. 침전 펠릿을 0.5M NaCl에 10 mg/㎖의 폴리사카라이드 비율로 용해시키고, 이어서 8 회 연속적인 투석 욕(처음 4 회 욕은 0.5M NaCl 용액 중에서 수행하고, 이어서 4 회 욕은 한외여과된 물 중에서 수행한다)을 가한다. 상기 유도체화되고 아민화된 폴리사카라이드를 최종적으로 동결건조시킨다.

[0177] **실시예 3: 실시예 1 및 2의 유도체화되고 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득한 접합체의 제조 및 면역원능력에 대한 연구**

[0178] a) 접합체의 제조

[0179] 실시예 1 및 2의 아민화된 폴리사카라이드를 DSS를 통해 파상풍 변성독소(TT)에 접합시킨다. 처음에, 상기 아민화된 폴리사카라이드를 DSS로 활성화시키고, 이어서 파상풍 변성독소를 상기 활성화된 폴리사카라이드에 접합

시킨다.

[0180] 실시예 1 또는 2의 아민화된 폴리사카라이드를 수용액에 40 ㎎/㎖의 농도로 용해시킨다. DSS를 DMSO 용액에 5 ㎎/㎖의 비율로 용해시킨다. 상기 아민화된 폴리사카라이드의 수용액 2.5 ㎖을 DSS 용액 10 ㎖에 교반하면서 적가한다. 1 시간 30 분 동안 배양시킨 후에, 아세톤 50 ㎖에 침전시켜 반응을 정지시킨다. 상기 침전물을 5 번 부흐너 상에서 여과시켜 회수하고, 이어서 이를 20 내지 50 ㎖의 아세톤으로 5 회 세척한다. 이어서 침전물을 진공 하에서 및 이어서 질소 스트림 하에서 건조시킨다.

[0181] 상기 유도체화된 폴리사카라이드를 함유하는 침전물을, 상기 유도체화된 폴리사카라이드 대 파상풍 변성독소 중량비가 1 내지 2가 되도록 0.2M 인산염 완충제 중의 파상풍 변성독소 용액 10 ㎎/㎖의 적합한 부피로 용해시킨다. 상기 혼합물을 교반하면서 실험실 온도에서 16 내지 20 시간 동안 배양시킨다. 이어서 0.2M 인산염 완충제로 상기 혼합물을 4 배 희석한 후에 70% 황산 암모늄으로 침전시켜 반응을 정지시킨다. 상기 침전물을 함유하는 매질을 실험실 온도에서 1 시간, 이어서 +4 ℃에서 4 내지 20 시간 동안 교반한다. 상기 침전물을 원심분리에 의해 회수한 후에, 상기를 최종적으로 0.2M 인산염 완충제에 용해시킨다. 상기 접합체의 용액을 실질적으로 순수한 형태로 수득한다. 접합되지 않은 파상풍 변성독소 및 접합되지 않은 폴리사카라이드의 양은 무시할만하다. 상기 용액을 최종적으로 면역화에 사용할 목적으로 목적하는 농도로 조절한다. 상기 접합체 중의 폴리사카라이드/단백질 비는 1/5이다.

[0182] b) 접합체의 면역원 능력에 대한 연구

[0183] 상기와 같이 수득된 접합체의 면역원 능력을 하기 개시하는 바와 같이, 미리 통상적인 환원적 아민화를 가한 5 형 폐렴연쇄구균 피막 폴리사카라이드를 사용하여 제조한 접합체의 능력과 비교한다: 고유 폴리사카라이드를 우선 실시예 1의 단락 a)의 과정에 따라 유리-라디칼 해중합에 의해 단편화시킨다. 30 내지 35 개의 반복 단위를 함유하는 해중합된 폴리사카라이드를 수득한다. 이어서 상기 단편화된 폴리사카라이드에 실시예 2의 단락 b)의 과정에 따른 환원적 아민화를 가한다. 이어서 상기 아민화된 폴리사카라이드를 실시예 3의 단락 a)의 작용 조건 하에서 DSS를 통해 파상풍 변성독소에 접합시킨다. 상기와 같이 수득된 접합체는 동일한 순도 특징을 가지며 백신으로서 사용될 수 있다. 상기 접합체 중의 폴리사카라이드/단백질 비는 1/5이다.

[0184] 3 개의 상이한 그룹으로 나눈 15 마리의 NZB 토끼에게 토끼 및 주입 당 폴리사카라이드 0.5 ㎍ 및 파상풍 변성독소 2.5 ㎍ 비율의 3 개 폴리사카라이드 접합체 중 하나를 D1 및 D23 일째에 근육 내 주입한다. 그룹 1은 실시예 1의 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득한 접합체로, 그룹 2는 실시예 2의 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득한 접합체로, 그룹 3은 본 실시예의 선행 단락에 개시된 통상적인 방법에 따라 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득한 접합체로 면역시킨다. "대조용" 토끼 그룹에게 D1 및 D23 일째에 생리 염수를 근육 내 주입한다.

[0185] 고유 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드로 코팅된 미세플레이트(1 ㎍/미세웰) 상에서 ELISA에 의해, 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드에 특이적인 혈청 항체의 역가를 조절하기 위해서 D1, D23 및 D36 일째에 혈액 샘플을 취한다. 각각의 토끼에 함유된 항체 역가는 착색된 지시약인 트리메틸벤지딘을 사용하여 ELISA 분석의 전개에 이어 분광광도계 상에서 1의 광학 밀도를 제공하는 혈청 희석비의 역으로서 정의된다. 결과를 하기 표 I에 나타낸다:

표 I

[0186]

그룹	D1	D23	D36
1	<10	239 *(122-469) **	2824(1758-4535)
2	<10	110(74-164)	2929(1180-7270)
3	<10	57(29-113)	423(166-1078)
대조용	<10	<20	<20

*: 5 마리 토끼의 특이적인 혈청 항체 역가의 기하 평균을 나타낸다

**: 각 그룹에서 최저 항체 역가 및 최고 항체 역가의 값을 가리킨다

[0187] 2 회의 면역화 후에, 실시예 1 및 2의 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득한 접합체로 면역시킨 토끼들의 특이적인 항체 역가의 평균 값은 통상적인 환원적 아민화에 따라 아민화된 폴리사카라이드를 사용하여 수득된 접합체로 면역시킨 토끼보다 대략 5 배 이상 더 높다.

[0188] 폴리사카라이드/파상풍 변성독소 중량비를 1/0.5에서 1/5의 범위로 변화시키는 경우, 앞서 개시된 분석에서 수득되는 결과들은 모든 면에서 유사하다.

[0189] 이들 항체의 작용성을 항체매개포식작용 분석을 사용하여 조절한다. 상기 옵소닌화 역가를 세균의 50%를 죽일 수 있는 혈청 희석비의 역으로서 정의한다. 결과를 하기 표 II에 나타낸다.

표 II

[0190]

그룹	D1	D23	D36
1	n.t.	7 *(3-18)**	128(27-599)
2	n.t.	2(2-3)	185(60-565)
3	n.t.	2(1-5)	35(11-110)
대조용	n.t.	n.t.	n.t.

*: 5 마리 토끼의 옵소닌화 역가의 기하 평균을 나타낸다

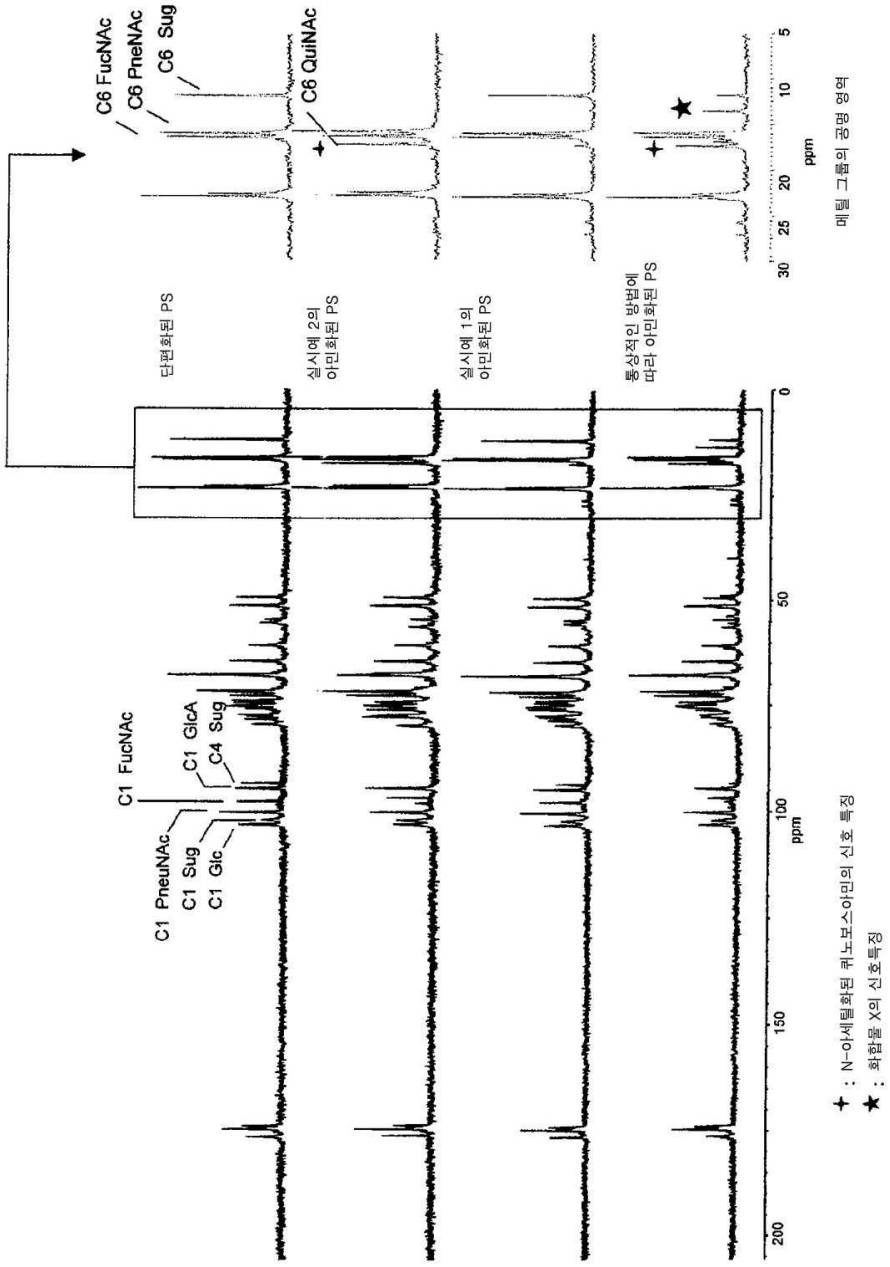
**: 각 그룹에서 최저 옵소닌화 역가 및 최고 옵소닌화 역가의 값을 가리킨다

n.t.: 적정되지 않음

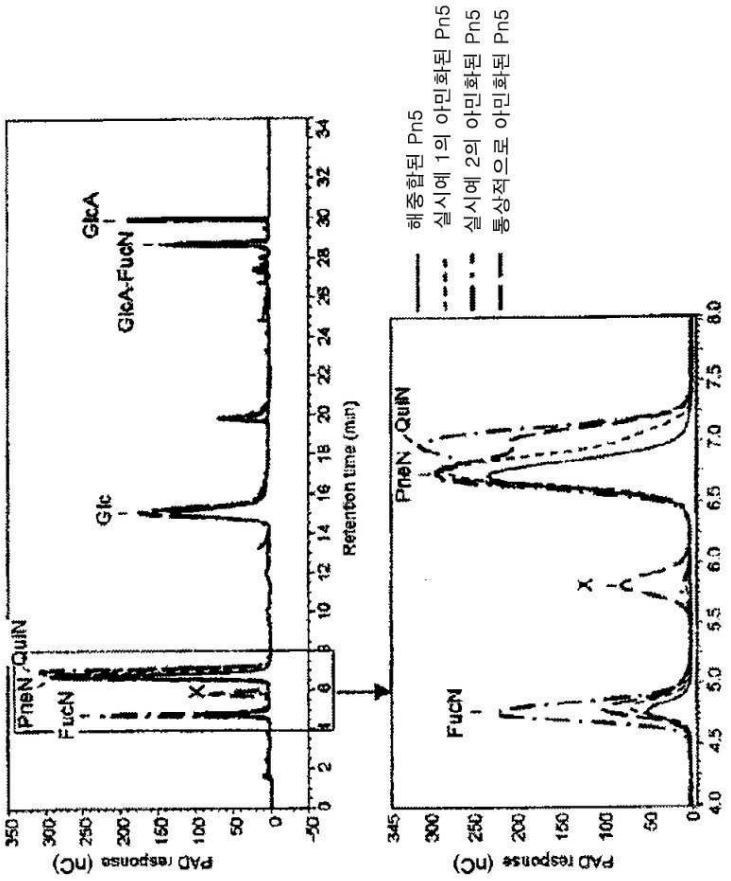
[0191] 상기 옵소닌화 역가는 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드에 특이적인 혈청 항체의 역가와 서로 관련이 있다.

도면

도면1


C6 FucNAc
C6 PneNAc
C6 Sug
C6 QuiNAc
C1 FucNAc
C1 PneuNAc
C1 Sug
C1 Glc
C1 GlcA
C4 Sug
단편화된 PS
실시예 2의 아민화된 PS
실시예 1의 아민화된 PS
통상적인 방법에 따라 아민화된 PS
ppm
메틸 그룹의 공명 영역
+ : N-아세틸화된 퀴노보스아민의 신호 특징
★ : 화합물 X의 신호특징

도면2



TFA에 의한 가수분해 후에 5 형 폐렴연쇄구균 폴리사카라이드(Pn5)의 카보팩 PA 10 컬럼 상에서의 HPAEC-PAD의 크로마토그램

FucN = fucosamine **QuiN = quinovosamine**
X = compound X **PneN = pneumosamine**
GlcA = glucuronic acid
GlcA-FucN = glucuronic acid-fucosamine disaccharide