



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0031393
(43) 공개일자 2011년03월25일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
C07D 207/40 (2006.01) C07C 327/32 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7003763</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년07월21일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년02월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/004206</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/011284
국제공개일자 2010년01월28일</p> <p>(30) 우선권주장
61/135,493 2008년07월21일 미국(US)
61/208,155 2009년02월20일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75</p> <p>(72) 발명자
피어, 제랄드, 비.
미국 02446 메사추세츠주 브루클린 손다이크 스트리트 21
니판티에브, 니콜레이
러시아 117593 모스크바 리토브스키 불바르 13/12-481
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|---|--|

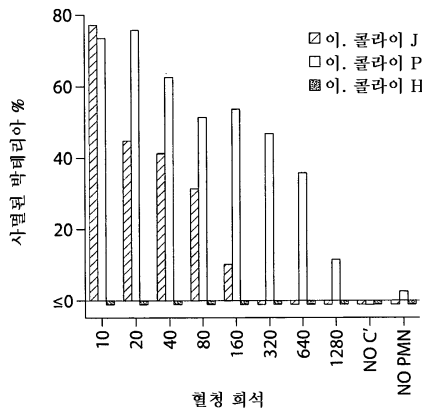
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 합성 베타-1,6 글루코사민 올리고당에 관한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 담체와 접합된 합성 올리고-β-(1→6)-2-아미노-2-데옥시-D-글루코피라노시드의 조성물, 및 그의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도16a



(72) 발명자

츠베타코브, 유리

러시아 119421 모스크바 노바토로브 스트리트
34/4-208

제닝, 마리나

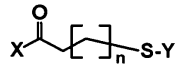
러시아 125047 모스크바 3-트베르스카야-얌스카야
스트리트 12-31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물.

<화학식 I>



식 중, X는 임의의 원자 또는 기이고, Y는 황 차단기이고, n은 1 초과이다.

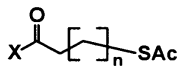
청구항 2

제1항에 있어서, Y가 아실 기인 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, Y가 아세틸 기인 하기 화학식 II의 구조를 갖는 화합물.

<화학식 II>



식 중, Ac는 아세틸 기이다.

청구항 4

제1항에 있어서, 화학식 I의 활성화된 에스테르인 화합물.

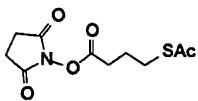
청구항 5

제1항에 있어서, 화학식 I의 활성화된 에스테르의 시아노, 아지도 또는 할로이드 유도체인 화합물.

청구항 6

제4항에 있어서, 하기 화학식 III의 구조를 갖는 화합물.

<화학식 III>



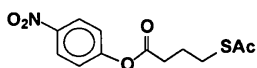
(N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰닐 부티레이트)

식 중, Ac는 아세틸 기이다.

청구항 7

제4항에 있어서, 하기 화학식 IV의 구조를 갖는 화합물.

<화학식 IV>



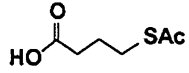
(N-니트로페닐 4-아세틸술폰닐 부티레이트)

식 중, Ac는 아세틸 기이다.

청구항 8

4-아세틸술폰과닐부티르산 (화학식 V)을 N-히드록시숙신이미딜 트리플루오로아세테이트 (CF₃COOSu)와 반응시켜 N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰과닐 부티레이트 (화학식 III)를 수득하는 것을 포함하는, N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰과닐 부티레이트 (화학식 III)의 합성 방법.

<화학식 V>

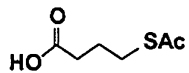


식 중, Ac는 아세틸 기이다.

청구항 9

4-아세틸술폰과닐부티르산 (화학식 V)을 N-니트로페닐 트리플루오로아세테이트 (CF₃COOpNp)와 반응시켜 N-니트로페닐 4-아세틸술폰과닐 부티레이트 (화학식 IV)를 수득하는 것을 포함하는, N-니트로페닐 4-아세틸술폰과닐 부티레이트 (IV)의 합성 방법.

<화학식 V>



식 중, Ac는 아세틸 기이다.

청구항 10

β-1-6 연결된 글루코사민인 올리고당을

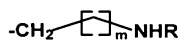
첫째, 하기 화학식 Va 또는 Vb의 구조를 갖는 화합물과 반응시키는 단계,

둘째, 화학식 I, II, III 또는 IV의 화합물과 반응시키는 단계, 및

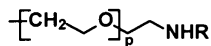
셋째, 담체와 반응시키는 단계

를 포함하는, 담체와 접합된 올리고당의 합성 방법.

<화학식 Va>



<화학식 Vb>

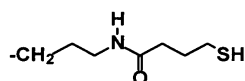


식 중, m은 1 내지 10으로부터 선택되는 수이고, p는 1 내지 20으로부터 선택되는 수이고, R은 H 또는 알킬 기이다.

청구항 11

하기 화학식 VI을 포함하는 0-연결된 링커를 갖는 올리고당을 포함하는 조성물.

<화학식 VI>



청구항 12

제11항에 있어서, 올리고당이 β -1-6 연결된 글루코사민인 조성물.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 올리고당이 2 내지 20개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 14

제10항 또는 제11항에 있어서, 올리고당이 5 내지 11개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 15

제10항 또는 제11항에 있어서, 올리고당이 7, 9 또는 11개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 올리고당이 100% 아세틸화된 것인 조성물.

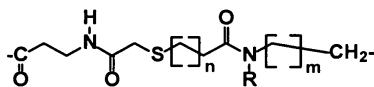
청구항 17

제15항에 있어서, 다당류가 50% 미만으로 아세틸화된 것인 조성물.

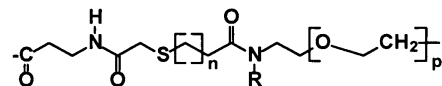
청구항 18

하기 화학식 VIIIa 또는 화학식 VIIIb의 링커를 통해 담체와 접합된 올리고당을 포함한 올리고당-담체 접합체 (여기서, 링커는 올리고당에 O-연결되고, 담체에 N-연결됨)를 포함하는 조성물.

<화학식 VIIIa>



<화학식 VIIIb>



청구항 19

제18항에 있어서, 담체가 펩티드인 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 담체가 단백질인 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 담체가 파상풍 독소이드인 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 올리고당이 β -1-6 연결된 글루코사민인 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 올리고당 대 담체의 비가 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 또는 100:1인 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 올리고당이 2 내지 20개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서, 올리고당이 5 내지 11개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 26

제22항에 있어서, 올리고당이 7, 9 또는 11개의 단량체 길이인 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서, 올리고당이 0-40% 아세틸화된 것인 조성물.

청구항 28

제18항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 더 포함하는 조성물.

청구항 29

제18항에 있어서, 아주반트를 더 포함하는 조성물.

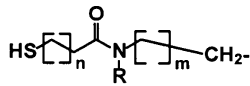
청구항 30

제18항에 있어서, 항박테리아제를 더 포함하는 조성물.

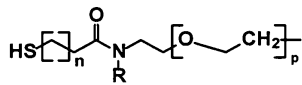
청구항 31

하기 화학식 IXa 또는 IXb의 링커와 접합된 올리고당을, 하기 화학식 X의 화합물과의 반응 후에 변형된 아미노기를 갖는 담체와 반응시켜, 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 구조를 갖는 링커를 통해 담체 화합물과 접합된 올리고당을 수득하는 것을 포함하는, 올리고당-담체 접합체의 합성 방법.

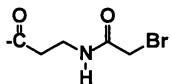
<화학식 IXa>



<화학식 IXb>



<화학식 X>



청구항 32

제31항에 있어서, 올리고당-담체 접합체의 올리고당 대 담체의 비가 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 또는 100:1인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 담체가 펩티드인 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 담체가 단백질인 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 담체가 과산화물 특소이드인 방법.

청구항 36

제31항에 있어서, 올리고당이 β -1-6 연결된 글루코사민인 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 올리고당이 2 내지 20개의 단량체 길이인 방법.

청구항 38

제31항에 있어서, 올리고당이 5 내지 11개의 단량체 길이인 방법.

청구항 39

제31항에 있어서, 올리고당이 7, 9 또는 11개의 단량체 길이인 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 올리고당이 0-40% 아세틸화된 것인 방법.

청구항 41

대상체에서 면역 반응을 자극하기 위한 유효량의 제18항 내지 제27항 중 어느 한 항의 올리고당-담체 접합체 또는 제31항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 대상체가 비-인간인 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 항체 또는 항체-형성 세포를 분리하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에 아주반트를 투여하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에 항박테리아제를 투여하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 47

면역 반응을 유도하기 위한 유효량의 제18항 내지 제27항 중 어느 한 항의 올리고당-담체 접합체 또는 제31항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를, PNAG를 생성하는 박테리아 종에 의해 유발된 감염을 갖거나 또는 감염이 발생할 위험성이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 PNAG를 생성하는 박테리아 종에 의해 유발된 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 감염이 스타필로코쿠스 감염인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 스태필로코쿠스 감염이 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 감염인 방법.

청구항 50

제47항에 있어서, 스태필로코쿠스 감염이 스태필로코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)인 방법.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 스태필로코쿠스에 노출될 위험성이 있는 것인 방법.

청구항 52

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 스태필로코쿠스에 노출되어 있는 것인 방법.

청구항 53

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 감염이 이. 콜라이(*E. coli*) 감염, 와이. 페스티스(*Y. pestis*) 감염, 와이. 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) 감염, 와이. 슈도투베르쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*) 감염, 아그레가티박터 악티노마이세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 감염, 악티노바실루스 플루로뉴모니아(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 감염, 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*) 감염, 비. 파라페르투스시스(*B. parapertussis*) 감염, 비. 브론키셉티카(*B. bronchiseptica*) 감염, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 감염, 부르크홀데리아(*Burkholderia*) 감염, 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 감염, 시겔라(*Shigella*) 감염 또는 클레브시엘라(*Klebsiella*) 감염인 방법.

청구항 54

제47항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고당-담체 접합체가 아주반트와 함께 투여되는 것인 방법.

청구항 55

PNAG에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량의 제18항 내지 제27항 중 어느 한 항의 올리고당-담체 접합체 또는 제31항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 대상체에게 투여하는 단계, 및

상기 대상체로부터 항체를 단리하는 단계

를 포함하는, 항체의 생성 방법.

청구항 56

PNAG에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량의 제18항 내지 제27항 중 어느 한 항의 올리고당-담체 접합체 또는 제31항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 대상체에게 투여하는 단계,

상기 대상체로부터 항체-생성 세포를 수거하는 단계,

상기 대상체로부터의 항체-생성 세포를 골수종 세포와 융합시키는 단계, 및

융합 서브클론으로부터 생성된 항체를 수거하는 단계

를 포함하는, 모노클로날 항체의 생성 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체인 방법.

청구항 58

제55항 또는 제56항에 있어서, 대상체가 토끼인 방법.

청구항 59

제55항 또는 제56항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

명세서

기술분야

- [0001] <관련 출원>
- [0002] 본 출원은 각각 2008년 7월 21일 및 2009년 2월 20일에 출원한 미국 가출원 제61/135493호 및 동 제61/208155호에 대해 우선권을 주장하며, 상기 두 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] <정부 지원>
- [0004] 본 발명은 미국 국립보건원으로부터 보조금을 일부 지원받았다 (R01AI046706). 미국 정부는 본 발명에서 권리를 갖는다.
- [0005] <본 발명의 분야>
- [0006] 본 발명은 합성 올리고-β-(1→6)-2-아미노-2-데옥시-D-글루코피라노시드에 관한 조성물 및 방법에 관한 것으로, 이는 본원에서 올리고-β-(1→6)-D-글루코사민 또는 올리고글루코사민으로 상호교환적으로 지칭된다.

배경기술

- [0007] 포도상구균(*Staphylococci*)은 일반적으로 인간의 피부 및 점막에 서식하여 군체를 형성하는 그람-양성 박테리아이다. 수술 또는 기타 외상 중에 피부 또는 점막이 손상되는 경우, 포도상구균이 내부 조직에 접근하여 감염을 발생시킬 수 있다. 포도상구균이 국소 증식하거나 림프계 또는 혈액계에 들어가는 경우, 포도상구균 균혈증과 연관된 것과 같은 심각한 감염성 합병증을 초래할 수 있다. 이러한 합병증으로는 패혈증 쇼크, 심내막염, 관절염, 골수염, 폐렴 및 각종 기관에서의 농양을 들 수 있다.
- [0008] 포도상구균은 유리 코아굴라아제를 생성하는 코아굴라아제-양성 유기체 및 이러한 유리 코아굴라아제를 생성하지 않는 코아굴라아제-음성 유기체를 모두 포함한다. 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 포도상구균의 가장 보편적인 코아굴라아제-양성 형태이다. 에스. 아우레우스(*S. aureus*)는 일반적으로 혈관의 또는 혈관내 국소 부위에서 감염을 일으키고, 이는 궁극적으로 균혈증을 초래할 수 있다. 에스. 아우레우스는 또한 급성 골수염의 주요 원인이며, 포도상구균 폐렴 감염을 일으킨다. 또한, 에스. 아우레우스는 박테리아성 수막염 사례의 대략 1-9% 및 뇌 농양의 10-15%의 원인이 된다.
- [0009] 에스. 에피더미디스(*S. epidermidis*), 에스. 사프로피티쿠스(*S. saprophyticus*), 에스. 호미니스(*S. hominis*), 에스. 와네리(*S. warneri*), 에스. 헤몰리티쿠스(*S. haemolyticus*), 에스. 사프로피티쿠스(*S. saprophyticus*), 에스. 코흐니(*S. cohnii*), 에스. 크실로수스(*S. xylosus*), 에스. 시물란스(*S. simulans*) 및 에스. 카피티스(*S. capitis*)를 비롯한 31종 이상의 공지된 코아굴라아제-음성 포도상구균의 종이 존재한다. 에스. 에피더미디스가 정맥내 접근 장치와 연관된 가장 빈번한 감염-유발 작인이며, 주요 원내 균혈증에서 가장 빈번한 단리물이다. 에스. 에피더미디스는 또한 인공관막 심내막염과 연관된다.
- [0010] 스타필로코쿠스는 또한 동물에서의 박테리아성 감염의 일반적인 원인이다. 예를 들어, 포도상구균성 유방염이 소, 양 및 염소와 같은 반추동물에서의 보편적인 문제이다. 상기 질환은 일반적으로 감염을 감소시키기 위해 항생제로 치료되지만, 이러한 치료는 비용이 많이 드는 절차이고 더욱이 우유 생산의 손실을 야기한다. 지금까지 밝혀진 가장 효과적인 백신은 피하 투여되는 무손상 생(live) 에스. 아우레우스 백신이다. 그러나, 생 백신의 투여는 감염의 위험과 연관된다. 이러한 이유로, 많은 연구원들은 사멸된 에스. 아우레우스 백신을 생산하고/하거나 에스. 아우레우스에 대한 면역성을 유도할 캡슐형 다당류 또는 세포 벽 성분을 단리하는 것을 시도해왔다.
- [0011] 종종 담체 화합물을 백신에 사용하여 항원에 대한 면역 반응을 향상시킨다. 예를 들어, 일부 백신에서의 담체는 항원 잔기에 대하여 T 세포 도움을 자극하는 데 유용하다. 천연 발생 항원 잔기 또는 천연 발생 물질의 단편은 종종 다루기 쉽지 않고, 용이하게 처리되지 않고/않거나, 담체 화합물과 같은 다른 잔기와 접합되어, 이러한 백신의 치료 효과를 감소시킬 수 있다.

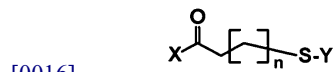
발명의 내용

[0012] 본 발명은 항원 조성물, 예컨대 이들로 한정되지는 않지만 백신을 생성하는 신규한 방법 및 화합물을 제공한다. 특히, 본 발명은 올리고당 항원을 변형시키는 신규한 방법을 제공한다. 이들 방법은, (a) 미리 정해진 순서의 단당류 단량체로 이루어지고 (b) 담체 화합물과 접합된 올리고당의 제어된 합성을 포함한다. 생성된 접합체는 관심있는 미생물 단당류 항원에 대한 면역 반응을 (유도 또는 향상에 의해) 보다 양호하게 자극할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 이러한 면역 반응은, 이들로 한정되지는 않지만 포도상구균 감염을 비롯한 다양한 감염의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

[0013] 본 발명의 다양한 측면은 특정 링커 (또는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어로서 연결제 또는 스페이서 또는 연결 시약), 및 접합체의 합성에서의 그의 용도에 관한 것이다. 올리고당 및 다양한 담체 화합물의 접합체가 특히 중요하다. 이러한 올리고당으로는 β-(1→6) 연결에 의해 서로 부착된 글루코사민 단량체로 이루어진 올리고-β-(1→6)-D-글루코사민 (본원에서 연결된 글루코사민으로도 지칭됨)을 들 수 있다. 연결된 글루코사민을 구성하는 하나 이상의 다양한 단량체는 N-아세틸화될 수 있다. 따라서, 단량체는 D-글루코사민 또는 N-아세틸-D-글루코사민 단량체일 수 있고, 연결된 글루코사민은 이들 단량체 (또는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어로서 단당류)의 하나 또는 두 유형 모두를 규정된 순서로 포함할 수 있다. 본 발명의 올리고글루코사민은 또한 그의 "환원" 말단 상에 티올 함유기를 갖는 스페이서를 포함한다. 스페이서는 올리고글루코사민을 담체에 연결하는 데 사용된다. 담체는 제한되지는 않지만 아미노산 (예컨대, 펩티드 또는 단백질)로 이루어질 수 있다.

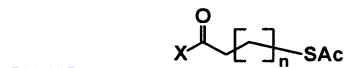
[0014] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물을 제공한다.

[0015] <화학식 I>



[0017] 식 중, X는 임의의 원자 또는 기이고, Y는 황 차단기이고, n은 1 초과이다. 일 실시양태에서, Y는 아실기이다. 또다른 실시양태에서, Y는 아세틸 기이고, 화합물은 하기 화학식 II의 구조를 갖는다.

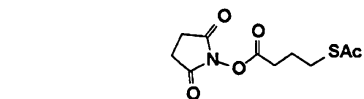
[0018] <화학식 II>



[0020] 식 중, Ac는 아세틸 기이다.

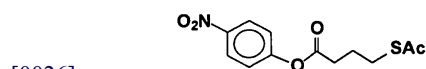
[0021] 또다른 실시양태에서, 화합물은 화학식 I의 활성화된 에스테르이다. 또다른 실시양태에서, 화합물은 화학식 I의 활성화된 에스테르의 시아노, 아지도 또는 할로이드 유도체이다. 또다른 실시양태에서, 화합물은 하기 화학식 III의 구조를 갖는다.

[0022] <화학식 III>



[0024] 식 중, Ac는 아세틸 기이고, 화합물은 N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰파닐 부티레이트로 지칭된다. 또다른 실시양태에서, 화합물은 하기 화학식 IV의 구조를 갖는다.

[0025] <화학식 IV>

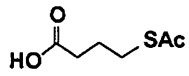


[0027] 식 중, Ac는 아세틸 기이고, 화합물은 N-니트로페닐 4-아세틸술폰파닐 부티레이트로 지칭된다.

[0028] 또다른 측면에서, 본 발명은 4-아세틸술폰파닐부티르산 (화학식 V)을 N-히드록시숙신이미딜 트리플루오로아세테이

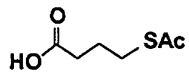
트 (CF_3COOSu)와 반응시켜 N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰닐 부티레이트 (화학식 III)를 수득하는 것을 포함하는, N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰닐 부티레이트 (화학식 III)의 합성 방법을 제공한다.

[0029] <화학식 V>



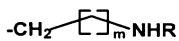
[0031] 또다른 측면에서, 본 발명은 4-아세틸술폰닐부티르산 (화학식 V)을 N-니트로페닐 트리플루오로아세테이트 (CF_3COOpNp)와 반응시켜 N-니트로페닐 4-아세틸술폰닐 부티레이트 (화학식 IV)를 수득하는 것을 포함하는, N-니트로페닐 4-아세틸술폰닐 부티레이트 (IV)의 합성 방법을 제공한다.

[0032] <화학식 V>

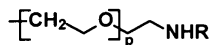


[0034] 또다른 측면에서, 본 발명은 β -1-6 연결된 글루코사민인 올리고당을 (a) 첫째, 하기 화학식 Va 또는 Vb의 구조를 갖는 화합물과 반응시키고, (b) 둘째, 화학식 I, II, III 또는 IV의 화합물과 반응시키고, (c) 셋째, 담체와 반응시키는 것을 포함하는, 담체와 접합된 올리고당의 합성 방법을 제공한다.

[0035] <화학식 Va>



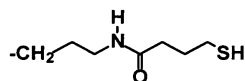
[0037] <화학식 Vb>



[0039] 식 중, m은 1 내지 10으로부터 선택되는 수이고, p는 1 내지 20으로부터 선택되는 수이고, R은 H 또는 알킬 기이다.

[0040] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 VI을 포함하는 0-연결된 링커를 갖는 올리고당을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0041] <화학식 VI>

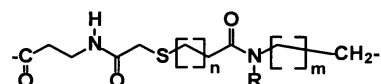


[0043] 일 실시양태에서, 올리고당은 β -1-6 연결된 글루코사민이다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 2 내지 20개의 단량체 길이이다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 5 내지 11개의 단량체 길이이다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 7, 9 또는 11개의 단량체 길이이다.

[0044] 일 실시양태에서, 올리고당은 0% 아세틸화되거나 또는 100% 아세틸화된다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 0-40% 아세틸화된다.

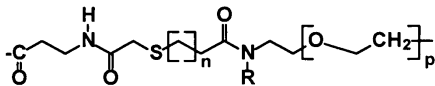
[0045] 또다른 측면에서, 본 발명은, 하기 화학식 VIIIa 또는 화학식 VIIIb의 링커를 통해 담체와 접합된 올리고당을 포함한 올리고당-담체 접합체 (여기서, 링커는 올리고당에 0-연결되고, 담체에 N-연결됨)를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0046] <화학식 VIIIa>



[0047]

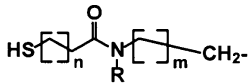
[0048] <화학식 VIIIb>



[0049]

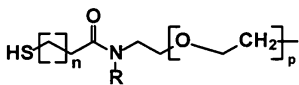
[0050] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 IXa 또는 IXb의 링커와 접합된 올리고당을, 하기 화학식 X의 화합물과의 반응 후에 변형된 아미노 기를 갖는 담체와 반응시켜, 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 구조를 갖는 링커를 통해 담체 화합물과 접합된 올리고당을 수득하는 것을 포함하는, 올리고당-담체 접합체의 합성 방법을 제공한다.

[0051] <화학식 IXa>



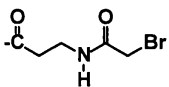
[0052]

[0053] <화학식 IXb>



[0054]

[0055] <화학식 X>



[0056]

[0057] 일 실시양태에서, 담체는 펩티드이다. 또다른 실시양태에서, 담체는 단백질이다. 담체의 예는 과산화물 특소이드이다.

[0058] 일 실시양태에서, 올리고당은 β-1-6 연결된 글루코사민이다.

[0059] 일 실시양태에서, 조성물은 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 또는 100:1의 올리고당 대 담체의 비를 갖는다.

[0060] 몇몇 실시양태에서, 올리고당은 2 내지 20개의 단량체 길이, 5 내지 11개의 단량체 길이, 또는 5, 7, 9 또는 11개의 단량체 길이이다.

[0061] 일 실시양태에서, 올리고당은 100% 아세틸화된다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 0% 아세틸화된다. 또다른 실시양태에서, 올리고당은 0-40% 아세틸화된다.

[0062] 몇몇 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체, 아주반트 및/또는 항박테리아제를 추가로 포함한다.

[0063] 또다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 자극하기 위한 유효량의 상기 기재된 올리고당-담체 접합체 또는 상기 기재된 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

[0064] 일 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또다른 실시양태에서, 대상체는 비-인간이다.

[0065] 또다른 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 항체 또는 항체-형성 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0066] 또다른 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에 아주반트를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또다른 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에 항박테리아제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0067] 또다른 측면에서, 본 발명은 면역 반응을 유도하기 위한 유효량의 상기 기재된 올리고당-담체 접합체 또는 상기 기재된 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를, PNAG를 생성하거나 PNAG를 생성할 수 있는 박테리아 종에 의해 유발된 감염을 갖거나 또는 감염이 발생할 위험성이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 PNAG를 생성하거나 PNAG를 생성할 수 있는 박테리아 종에 의해 유발된 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0068] 일 실시양태에서, 감염은 스타필로코쿠스 감염이다. 관련 실시양태에서, 스타필로코쿠스 감염은 스타필로코쿠스

스 아우레우스 감염이다. 또다른 관련 실시양태에서, 스태필로코쿠스 감염은 스태필로코쿠스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*)이다. 일 실시양태에서, 대상체는 스태필로코쿠스에 노출될 위험성이 있다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 스태필로코쿠스에 노출되어 있다.

[0069] 다른 실시양태에서, 감염은 이. 콜라이(*E. coli*) 감염, 와이. 페스티스(*Y. pestis*) 감염, 와이. 엔테로콜리티카 (*Y. enterocolitica*) 감염, 와이. 슈도투베르쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*) 감염, 아그레가티박터 악티노마이세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 감염, 악티노바실루스 플루로뉴모니아(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 감염, 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*) 감염, 비. 파라페르투스시스(*B. parapertussis*) 감염, 비. 브론키셉티카(*B. bronchiseptica*) 감염, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 감염, 부르크홀데리아(*Burkholderia*) 감염, 예컨대 부르크홀데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*), 스테노트로포모나스 말토티리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) 감염, 시겔라(*Shigella*) 감염, 또는 클레브시엘라(*Klebsiella*) 감염, 예컨대 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)이다.

[0070] 몇몇 실시양태에서, 올리고당-담체 접합체는 아주반트 및/또는 항박테리아제와 함께 투여된다.

[0071] 또다른 측면에서, 본 발명은 고유의 PNAG에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량의 상기 기재된 올리고당-담체 접합체 또는 상기 기재된 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 대상체에게 투여하고, 상기 대상체로부터 항체를 분리하는 것을 포함하는, 항체의 생성 방법을 제공한다.

[0072] 또다른 측면에서, 본 발명은 고유의 PNAG에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량의 상기 기재된 올리고당-담체 접합체 또는 상기 기재된 방법에 의해 합성된 올리고당-담체 접합체를 대상체에게 투여하고, 상기 대상체로부터 항체-생성 세포를 수거하고, 상기 대상체로부터의 항체-생성 세포를 골수종 세포와 융합시키고, 융합 서브클론으로부터 생성된 항체를 수거하는 것을 포함하는, 모노클로날 항체의 생성 방법을 제공한다.

[0073] 일 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 일 실시양태에서, 대상체는 토끼이다. 또다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0074] 하기에서 보다 자세히 논의되는 상기 개념 및 추가 개념의 모든 조합은 (이러한 개념이 서로 모순되지 않는 한) 본원에 개시된 본 발명의 주제의 일부로 고려되는 것으로 이해되어야 한다. 특히, 본 개시물의 하단에 나타낸 청구된 주제의 모든 조합은 본원에 개시된 본 발명의 주제의 일부로 고려된다. 또한, 참조로 포함된 임의의 개시물에서 나타날 수도 있는 본원에서 사용된 명백한 전문용어는 본원에 개시된 특정 개념과 가장 일치하는 의미에 따라야 한다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1a 및 b는 에스. 아우레우스로부터의 PNAG (A) 또는 dPNAG (B)에 대한, 비-아세틸화된 노나-글루코사민 (9G1cNH₂)에 대해 발생한 항혈청의 결합을 나타낸 그래프이다.

도 2a 및 b는 에스. 아우레우스로부터의 PNAG 또는 dPNAG에 대한, 완전 아세틸화된 노나-글루코사민 (9G1cNAc)에 대해 발생한 항혈청의 결합을 나타낸 그래프이다.

도 3a 및 b는 11G1cNAc 또는 11G1cNH₂에 대한, 접합된 9G1cNAc 또는 9G1cNH₂에 대해 발생한 항혈청의 결합을 나타낸 그래프이다.

도 4는 2마리의 토끼, 즉, 백신의 최종 주사 후에 2주가 소요된 항혈청과 함께 9G1cNH₂-TT 접합체를 수여받은 토끼 및 9G1cNAc-TT 접합체를 수여받은 토끼에서 발생한 항혈청을 이용한 에스. 아우레우스 균주 MN8 박테리아의 사멸을 나타낸 그래프이다.

도 5는 2마리의 토끼, 즉, 백신의 최종 주사 후에 4주가 소요된 항혈청과 함께 9G1cNH₂-TT 접합체를 수여받은 토끼 및 9G1cNAc-TT 접합체를 수여받은 토끼에서 발생한 항혈청을 이용한 에스. 아우레우스 균주 MN8 박테리아의 사멸을 나타내며, 또한 비교를 위해, 과상풍 독소이드 (TT)와 접합되고 추가 표지된 약 100 kDa의 dPNAG 분자로 이루어진 접합체 백신에 대해 발생한 항혈청 (051)에 의한 동일한 박테리아의 사멸을 나타낸다.

도 6-8은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민 (9G1cNH₂) (9G1cNH₂-TT)에 대한 토끼 항혈청 (블리드 1)에 의한 에스. 아우레우스 균주 (도 6 및 8, LAC (NT, USA300); 도 7, SF8300 (NT, USA300))의 사멸을 비교한 그래프이다. 비교를 위해, 과상풍 독소이드 (TT)와 접합되고 추가 표지된 약 100 kDa의 dPNAG 분자로 이루어진 접합체 백신에 대해 발생한 항혈청 (051)에 의한 동일한 박테리아의 사멸을

나타낸다.

도 9-16은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한 토끼 항혈청 ("블리드 2"로 표지됨)에 의한 에스. 아우레우스 균주 (도 9, MN8 (캡슐형 다당류 (CP) 8); 도 10, LAC (구별 불능형 (NT), USA300)); 도 11, SF8300 (NT, USA300)); 도 12, 뉴만(Newman) (CP5); 도 13, PS80; 도 14, 레이놀즈(Reynolds) (CP5); 도 15, 레이놀즈 (구별 불능형); 도 16, 레이놀즈 (CP8))의 사멸을 비교한 그래프이다. 비교를 위해, 과상풍 독소이드 (TT)와 접합되고 추가 표지된 약 100 kDa의 dPNAG 분자로 이루어진 접합체 백신에 대해 발생한 항혈청 (051)에 의한 동일한 박테리아의 사멸을 나타낸다.

도 16a는 최종 면역화 6주 후에 얻어진 9G1cNH₂-TT에 대한 토끼 항혈청에 의한 2종의 PNAG-양성 이. 콜라이 균주 (이. 콜라이 J 및 이. 콜라이 P) (PNAG-음성 이. 콜라이 균주 (이. 콜라이 H)는 아님)의 사멸을 나타낸 그래프이다.

도 17, 18 및 19는, TT와 접합된 9-mer 비-아세틸화된 올리고글루코사민 (9G1cNH₂-TT, 블리드 2)에 대해 발생하고 2×10^4 (도 17), 2×10^5 (도 18) 또는 2×10^6 (도 19) CFU의 에스. 아우레우스 균주 LAC로 감염되기 24시간 전에 마우스에 투여된 항혈청으로 면역화한 후의 에스. 아우레우스 피부 농양 감염의 예방에 관한 생체내 연구의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 20은 도 17-19의 결과의 요약이다.

도 21, 22 및 23은, 9-mer 비-아세틸화된 올리고글루코사민에 대해 발생하고 1×10^6 CFU의 에스. 아우레우스 MN8 (도 21), 4×10^6 CFU의 에스. 아우레우스 뉴만 (도 22), 및 4×10^6 CFU의 에스. 아우레우스 뉴만 Δ *ica* 및 1.5×10^6 CFU의 에스. 아우레우스 MN8 Δ *ica* (도 23)로 감염되기 전에 마우스에 투여된 항혈청으로 면역화한 후의 에스. 아우레우스 농양 감염의 예방에 관한 생체내 연구의 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 광범위하게는, 본 발명은 올리고당 접합체의 합성 및 사용에 관한 것이다. 본 발명은 신규 조성물을 생성하기 위한 새로운 합성 방법 및 상기 방법에서 사용되는 조성물을 제공한다. 이러한 합성 경로는 천연 발생 다당류 항원의 사용이 달리 가능하지 않을 수 있는 올리고당 또는 다당류의 변형을 촉진한다.

[0077] 특히, 본 발명은 정의된 단량체 순서를 갖는 올리고- β -(1 \rightarrow 6)-D-글루코사민 올리고당 또는 다당류의 제조 방법, 상기 올리고당 또는 다당류를 링커와 접합하고, 후속적으로 담체 화합물과 접합하는 방법, 올리고당-담체 접합체 또는 다당류-담체 접합체의 제조 방법, 및 이러한 여러 화합물의 조성물을 제공한다. 추가적으로, 본 발명은 이러한 제조 방법에서 이전에 알려진 링커에 비해 예상외로 보다 유용한 여러 신규 링커에 관한 것이다. 생성된 올리고당-담체 접합체는 올리고당 자체, 및 대응하는 천연 발생 PNAG 및 dPNAG 항원에 대한 항체의 생성을 비롯하여, 인간 및 비-인간 대상체에서의 생체내 면역 반응의 자극에 유용하다.

[0078] PNAG 및 dPNAG 항원은 PCT 출원 WO 2004/043405 (공개됨)에 보다 상세히 기재되어 있다. 요약하면, PNAG는 스타필로코쿠스, 에킨대 에스. 아우레우스 및 에스. 에피더미디스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 여러 박테리아 종에 의해 생성된 표면 다당류인 폴리 N-아세틸 글루코사민을 의미한다. 자연적으로, PNAG는 고 아세틸화 형태 및 저 아세틸화 형태로 존재한다. "고 아세틸화" PNAG 형태는 50% 초과 아세테이트 치환을 갖는 PNAG이다. 저 아세틸화 PNAG 형태 (본원에서 dPNAG로 지칭됨)는 0 내지 40%의 아세틸화를 가질 수 있다 (화학식 VII (여기서, R¹은 존재하는 경우 아세틸 기의 위치를 나타냄) 참조). 고유의 PNAG는 다양한 아세틸화 수준을 갖는 PNAG 형태의 혼합물이다. 고유의 PNAG는 보다 고도로 아세틸화된 PNAG 형태와의 혼합 상태의 dPNAG를 포함할 수 있다. PNAG 또는 dPNAG는 수백개 또는 수천개, 또는 그 이상의 글루코사민 단위 (또는 단량체)로 이루어져 있을 수 있다.

[0079] 본 발명의 올리고당은 PNAG 또는 dPNAG 영역과 유사하게 된다. 따라서, 생체내 사용되는 경우에, 올리고당-담체 접합체는 PNAG 및/또는 dPNAG와 유사하거나 또는 동일한 올리고당 영역에 관한 면역 반응을 유발하며, 따라서 이러한 면역 반응은 PNAG 및/또는 dPNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 표적 박테리아 종에서 유용하다.

[0080] 본 발명의 몇몇 측면에서, 올리고당은 D-글루코사민 단위로만 이루어져 있거나, 또는 N-아세틸-D-글루코사민 단위로만 이루어져 있거나, 또는 미리 정해진 비 및 순서의 이러한 두 단량체 형태 둘 다로 이루어져 있다. 몇몇

실시양태에서, 비 및 순서는 고유의 PNAG에서 발견되는 비 및 순서와 유사하게 된다. 올리고당은 그의 말단 (예를 들어, 그의 환원 말단)에 티올기를 갖는 스페이서 (또는 링커; 상기 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용됨)를 포함하도록 본 발명에 따라 제조된다.

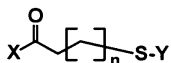
[0081] 하나 이상의 담체와의 접합에 적합한, 아민기를 포함하는 올리고당, 예컨대 연결된 글루코사민 올리고당 (또는 올리고글루코사민; 상기 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용됨)의 제조는 당업계에 흥미로운 것으로 입증되었다. 부분적으로, 이는 연결된 글루코사민의 입체 특이적 합성이, 단량체 사이에서의 필요한 β-글리코시드 결합을 형성하기 위해 글리코실 공여체에서의 참여하지만 일시적인 아실 N-보호기 (소위 "참여" 기)의 사용을 요구하기 때문이다. N-프탈로일, N-트리클로로에톡시카르보닐 및 몇몇 다른 잔기가 참여 기로서 적합하다. 그러나, 본 발명에서 고려되는 몇몇 올리고당에 존재하는 N-아세틸 참여 기를 비롯한 소정의 다른 참여 기는 덜 적합하다. 예로서, N-아세틸화 글리코실 공여체는 반응성이 낮으며, 단지 적당한 수율의 당화 생성물을 얻는다. 추가적으로, 글리코실 공여체에서의 N-아세틸 기의 존재는 옥사졸린 중간체 형성, N-아세틸 기의 이동 및 다른 바람직하지 않은 화학 반응으로 인해 당화 반응을 복잡하게 한다.

[0082] 연결된 글루코사민, 그의 구조, 및 보다 특히 그들이 함유하는 아미노기의 수에 대하여, 아미노기의 완전 유리 이전에 링커의 도입을 필요로 한다. 유리 올리고당을 제조하기 위한 상기 언급된 일시적 N-보호기의 제거를 염기성 조건 하에 수행한다. N-프탈로일 참여 기의 제거에 가장 효과적인 시약은 비등 에탄올 중의 히드라진 수화물이다. 또한, 상기 시약은 관심있는 올리고당에 포함되어 있을 수 있는 아세틸 및 벤조일기를 비롯한 O-아실 보호기를 효과적으로 제거한다.

[0083] 아미노-함유 리간드의 단백질에의 부착에 사용되는 시판되는 링커는 펜타플루오로페닐 S-아세틸티오글리콜레이트 (실시예에서 나타난 화학적 구조 (8)) 및 N-히드록시숙신이미딜 3-아세틸술폰과닐-프로피오네이트 (실시예에서 나타난 화학적 구조 (12))이다. 이러한 연결 시약을 사용하여 티올 잔기를 올리고당에 도입할 수 있으나, 실시예에서 보다 상세하게 기재된 것과 같이, 둘 모두 프탈로일기의 제거 조건 하에서 불안정하였다. 실시예 5는 티오글리콜산을 바탕으로 한 링커가 산화적 재배열을 겪는다는 것을 나타내며, 실시예 6은 3-머캅토프로피온산의 유도체가 부산물의 복합 혼합물을 생성한다는 것을 나타낸다. 두 변환 모두 필요한 티올 관능기의 손실을 유발한다.

[0084] 따라서, 본 발명은 부분적으로 올리고당 (그의 아민 함유 형태 포함)을 담체, 예컨대 단백질과 접합하기 위한 이전에 알려진 링커에 비해 효과적이며 우수한 부류의 링커의 발견 및 사용을 기초로 한다. 이러한 부류의 링커는 하기 화학식 I의 ω-아세틸술폰과닐 탄산의 유도체 (여기서, n > 1)로서 정의된다.

[0085] <화학식 I>



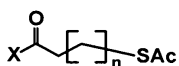
[0086]

[0087] 이러한 부류의 링커는 올리고당과의 부착 동안 효과적인 N-아실화를 제공한다. 링커는 화학식 I의 활성화된 에스테르, 또는 그의 시아노, 아지도 또는 할로이드 유도체일 수 있다. 이러한 유도체가 아실화제로서 활성이며, 따라서 본 발명의 올리고당과의 부착에 적합한 경우에, 이는 화학식 I의 또다른 유도체일 수 있다. Y는 환원자의 일시적 차단기를 나타내며, 이는 당업계에 알려져 있고, 아실 및 아세틸 기가 포함된다. Y기의 제거는 올리고당과 담체와의 부착에 필요한 SH기를 유리시킨다. X는 필요한 아실화 능력을 화학식 I의 화합물에 제공하는 임의의 이탈기를 나타낸다.

[0088] 본 발명에 의해 제공된 링커 부류 중 어느 하나가 올리고당을 담체 화합물과 접합하는데 사용될 수 있다고 이해된다.

[0089] 예로서, 한 링커 부류는 하기 화학식 II의 구조 (여기서, n > 1)를 포함할 수 있다.

[0090] <화학식 II>

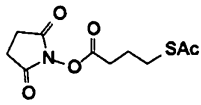


[0091]

[0092] 또다른 예로서, 또다른 링커 부류는 N-히드록시숙신이미딜 유도체를 포함할 수 있다. 이러한 링커의 예는, 실시예 1 및 3에서 기재된 것과 같이, N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰과닐 부티레이트 (반응식 1, 실시예 1 및

3에서의 화합물 (2))이다. 이러한 링커는 하기와 같은 화학식 III의 구조를 갖는다.

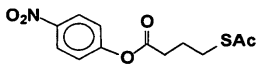
[0093] <화학식 III>



[0094] 상기 링커는 탄수화물, 예컨대 올리고당 및 다당류의 완전 탈보호 조건 하에서 안정하다.

[0095] 활성화된 에스테르의 또다른 예는 N-니트로페닐 4-아세틸술폰파닐 부티레이트 (실시예 2 및 3에서의 화합물 (3))이다. 상기 화합물은 하기와 같은 화학식 IV의 구조를 갖는다.

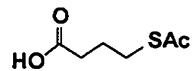
[0096] <화학식 IV>



[0097] (N-니트로페닐 4-아세틸술폰파닐 부티레이트)

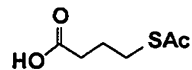
[0100] 본 발명은 N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰파닐 부티레이트 (화학식 III)의 합성 방법을 제공한다. 상기 방법은 4-아세틸술폰파닐부티르산 (화학식 V)을 N-히드록시숙신이미딜 트리플루오로아세테이트 (CF₃COOSu)와 반응시켜 N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰파닐 부티레이트 (화학식 III)를 획득하는 것을 포함한다.

[0101] <화학식 V>



[0102] 추가적으로, 본 발명은 N-니트로페닐 4-아세틸술폰파닐 부티레이트 (화학식 IV)의 합성 방법을 제공한다. 상기 방법은 4-아세틸술폰파닐부티르산 (화학식 V)을 N-니트로페닐 트리플루오로아세테이트 (CF₃COOpNp)와 반응시켜 N-니트로페닐 4-아세틸술폰파닐 부티레이트 (화학식 IV)를 획득하는 것을 포함한다.

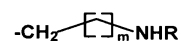
[0103] <화학식 V>



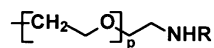
[0104] 상기 합성 방법은 실시예에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0105] 추가적으로, 본 발명은 올리고당의 "환원 말단"에서 글루코사민 단위의 O1-원자와 접합된 링커를 포함하는 올리고당을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 O1-접합된 링커는 화학식 I의 화합물과의 반응을 통해 SH-함유 링커를 부착하는데 사용된다. O1-접합된 링커는 아미노알킬기를 갖는 하기 화학식 Va의 구조를 가지며, 여기서 m은 1 내지 10으로 변할 수 있으며, R은 H 또는 단순 알킬기 (예를 들어, 메틸 또는 에틸 기)일 수 있다. 다르게는, O1-접합된 링커는 하기 화학식 Vb의 구조를 가질 수 있으며, 여기서 p는 1 내지 20으로 변할 수 있으며, R은 화학식 Va에서와 동일하다.

[0106] <화학식 Va>



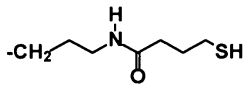
[0107] <화학식 Vb>



[0108] 따라서, 본 발명의 올리고당 접합체는 화학식 Va 또는 Vb의 화합물을 화학식 I의 화합물과 커플링하여 합성할 수 있다. 변환시키고, 후속적으로 일시적 S-차단기를 제거 (실시예 8)하거나, 또는 상응하는 중간체 디술폰이

드를 환원 (실시예 7)시켜, 올리고당과 담체 화합물과의 접합에서 사용되는 최종 연결기의 생성을 유발한다. 이러한 최종 연결기는 실시예 7 및 8에 기재되어 있으며, 하기 화학식 VI의 구조를 갖는다.

[0113] <화학식 VI>

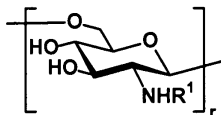


[0114]

[0115] 올리고당은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개 또는 100개의 단당류 단량체를 포함할 수 있다. 몇몇 중요한 실시양태에서, 올리고당은 5개, 7개, 9개 또는 11개의 단량체를 비롯한, 5개 이상의 단량체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 올리고당은 2개 내지 20개의 단량체, 또는 3개 내지 20개의 단량체, 또는 4개 내지 20개의 단량체, 또는 5개 내지 20개의 단량체를 포함한다.

[0116] 몇몇 중요한 실시양태에서, 단량체는 글루코사민이고, 올리고당은 연결된 글루코사민이다. 글루코사민 단량체의 구조 (연결된 글루코사민에 존재하는 것과 같음)는 다음과 같다.

[0117] <화학식 VII>



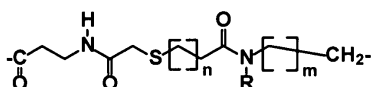
[0118]

[0119] 여기서, "유리" 아미노기를 갖는 글루코사민 단위의 경우에 R¹은 H이거나, 또는 N-아세틸화 글루코사민 단위의 경우에 R¹은 아세틸 기 (COCH₃)이다. 이러한 단위는 β-(1→6)-연결을 통해 연결된다. 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 50개, 또는 그 이상의 단위 내지 100개 이하의 단위 (아세틸 기로 치환되거나 또는 비치환됨)를 비롯한, 임의의 수의 글루코사민 단위가 연결될 수 있다.

[0120] 화학식 VII의 화합물에서의 N-아세틸화 수준은 변할 수 있다. 이는 0 내지 40%의 N-아세틸화를 비롯하여, 0 내지 50%의 N-아세틸화 (즉, 0 내지 50%의 R¹이 아세틸 기임) 범위일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, β-(1→6) 연결된 글루코사민은 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만으로 N-아세틸화된다. 몇몇 중요한 실시양태에서, 합성 방법에 따라서 N-아세틸화의 수준 및 올리고당 내의 아세틸 기의 위치가 알려져 있다. 즉, 올리고당은 N-아세틸 기를 갖거나 또는 N-아세틸 기가 결여된 규칙적인 글루코사민 단위 배열로부터 합성할 수 있다. 실시예는 규칙적으로 정의된 아세틸 치환을 갖는 올리고당의 제조 방법을 제공한다. 추가적으로, 문헌 [Gening et al. Carbohydrate Research 2007 342:567-575], [Gening et al. Russian J Bioorganic Chem 2006 32(4):389-399], [Yang and Du Carbohydrate Research 2003 338:495-502], [Yang et al. Carbohydrate Research 2003 338:1313-1318] 및 [Fridman et al. Organic Letters 2002 4(2):281-283]을 참조할 수 있다.

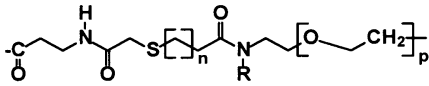
[0121] 추가적으로, 본 발명은 하기 화학식 VIIIa 또는 화학식 VIIIb의 링커를 통해 담체 화합물과 접합된 올리고당을 포함한 올리고당-담체 접합체 (여기서, 링커는 올리고당과 O-연결되고, 담체 화합물과 N-연결됨)를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0122] <화학식 VIIIa>



[0123]

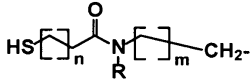
[0124] <화학식 VIIIb>



[0125]

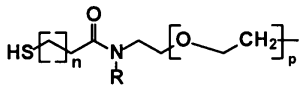
[0126] 추가적으로, 본 발명은 하기 화학식 IXa 또는 IXb의 구조를 갖는 것과 같은 SH-말단 링커를 포함하는 올리고당 접합체를 담체 화합물 (여기서, 말단 아미노기는 하기 화학식 X의 화합물의 부착에 의해 변형됨)과 반응시켜, 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 구조를 갖는 링커를 통해 담체 화합물과 접합된 올리고당을 수득하기 위한, 올리고당-담체 접합체의 합성 방법을 제공한다.

[0127] <화학식 IXa>



[0128]

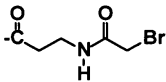
[0129] <화학식 IXb>



[0130]

[0131] (실시예 7 및 8로부터의 화합물의 경우)

[0132] <화학식 X>



[0133]

[0134] 몇몇 실시양태에서, 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 링커는 그의 말단 CH₂-기를 통해 올리고당의 "환원 말단"에서 글루코사민 단위의 O1-원자와 연결된다. 이러한 연결은 O-연결로 간주되며, 상기 올리고당은 링커와 O-연결되는 것으로 지칭된다.

[0135] 몇몇 실시양태에서, 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 링커는 말단 CO기를 통해 담체 화합물에서의 아미노기와 아마이드 결합에 의해 연결된다. 이러한 연결은 N-연결로 간주되며, 담체는 링커와 N-연결되는 것으로 지칭된다.

[0136] 상기 및 실시예 8 및 9에서 기재된 것과 같이, 아미노기-함유 담체, 및 SH-말단 링커를 갖는 올리고글루코사민의 접합체의 제조는 시약 SBAP를 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 아미노기-함유 담체 및 SH-말단 올리고당의 연결에 적합한 다른 시약의 사용을 고려한다 (특히, 문헌 [G. Hermanson "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition, Academic Press, 2008]에 기재되어 있음).

[0137] 담체 화합물

[0138] 본원에서 사용되는 "담체 화합물" (또는 담체, 상기 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용됨)은 본 발명의 링커의 사용을 통해 올리고당과 접합된 화합물이다. 통상적으로, 담체 화합물은 올리고당 리간드에 대한 면역 반응을 증진시키는 것이다.

[0139] 담체 화합물에는 단백질, 펩티드, 다당류, 핵산, 또는 다른 중합체, 지질, 및 소형 올리고머성 분자, 특히 덴드리머가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 몇몇 실시양태에서, 담체 화합물은 천연 물질일 수 있거나, 또는 천연 물질로부터 유래될 수 있다. 단백질에는 예를 들어 혈장 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 면역글로불린, 아포지질단백질 및 트랜스페린; 박테리아 폴리펩티드, 예컨대 과상풍 독소이드 (TT), TRPLE, β-갈락토시다제, 폴리펩티드, 예컨대 헤르페스 gD 단백질, 알레르겐, 디프테리아 독소이드, 살모넬라 플라젤린(salmonella flagellin), 헤모필루스 필린(hemophilus pilin), 헤모필루스 15kDa, 28-30kDa 및 40kDa 막 단백질, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 가열 표지 엔테로톡신 1tb, 콜레라 독소, 및 로타바이러스 VP 및 호흡기 세포융합 바이러스 f 및 g 단백질을 비롯한 바이러스성 단백질이 포함된다. 본 발명에서 유용한 담체에는 포유동물에의 투여에 안전하며, 임의로 면역학적으로 유효한 담체 단백질인 임의의 단백질이 포함된다. 따라서, 몇몇 실시양

태에서, 담체 화합물은 그 자체로 면역원성일 수 있다. 예에는 박테리아 종에 대한 백신에서 또는 백신으로서 사용되는 화합물, 예컨대 본원에서 열거된 것들 (이들로 한정되지는 않음)이 포함된다.

[0140] 면역화에 특히 유용한 담체 화합물에는 단백질, 예컨대 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제가 포함된다. 유사하게는, 면역화되는 동물 중에 면역원성인 임의의 다른 화합물을 사용할 수 있다.

[0141] 실시예에서 나타난 것과 같이, 본 발명의 올리고당-담체 접합체에서의 올리고당 대 담체의 비는 다양할 수 있다. 예를 들어, 올리고당-담체 접합체는 1:1, 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 또는 적어도 10:1의 올리고당 대 담체의 비를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 비는 올리고당 리간드의 부착에 대한 담체 화합물의 능력에 따라서 적어도 20:1, 적어도 30:1, 적어도 40:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 또는 그 이상, 예를 들어 100:1 또는 700:1까지일 수 있다. 예로서, 적어도 3:1의 올리고당 대 담체의 비를 갖는 접합체는 단일 담체 화합물에 부착된 3개 이상의 올리고당 잔기를 갖는 접합체이다.

[0142] 유용성

[0143] 본 발명의 조성물은 여러 시험관내 및 생체내 용도를 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 예를 들어 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염을 예방하기 위한 인간 및 동물의 능동 면역화를 위한 백신; 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염을 예방하거나 또는 치료하기 위해 다른 인간 또는 동물에게 투여할 수 있는 항-dPNAG 항체를 생성하기 위한 인간 또는 동물의 면역화를 위한 백신; 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염을 예방할 수 있는 모노클로날 항체, 항체 생성에 관여하는 유전자 라이브러리 또는 펩티드 유사체와 같은 생물학적 작용제에 대한 스크리닝을 위한 항원; 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염에 대한 진단학적 시약; 및 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염에 대한 인간 또는 동물의 감수성에 대하여 그의 면역 상태를 측정하기 위한 진단학적 시약과 같이 항체 반응의 생성에 유용하다.

[0144] 감염의 치료 및 예방

[0145] 본 발명은 본 발명의 올리고당-담체 접합체의 면역 반응을 유발하기 위한 유효량을 상기 감염을 갖거나 또는 상기 감염이 발생할 위험성이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0146] 본 발명의 또다른 측면은 대상체에서 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 의한 감염에 대한 방어를 위한 본 발명의 접합체의 능력을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 능동 면역을 유발하는 접합체를 대상체에게 투여하고, 고유의 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 박테리아 종에 대상체를 노출시키고, 대상체에서 박테리아 종의 존재를 시험하는 것을 포함한다.

[0147] 대상체는 박테리아 종에 노출될 위험성이 있는 대상체, 또는 박테리아 종에 노출된 대상체일 수 있다. 조성물에서, 접합체를 다른 작용제, 예컨대 1종 이상의 아주반트 및/또는 1종 이상의 항박테리아제 등 (이들로 한정되지는 않음)과 함께 투여할 수 있다.

[0148] 감염은 스타필로코쿠스 감염일 수 있다. 스타필로코쿠스 감염은 스타필로코쿠스 아우레우스 감염, 스타필로코쿠스 에피더미디스 감염일 수 있으나, 이들로 한정되지는 않는다. 감염은 이. 콜라이 감염, 와이. 페스티스 감염, 와이. 엔테로콜리티카 감염, 와이. 슈도투베르쿨로시스 감염, 아그레가티박터 악티노마이세텀코미탄스 감염, 악티노바실루스 플루로뉴모니아 감염, 보르데텔라 페르투스스 감염, 비. 파라페르투스스 감염, 비. 브론키셉티카 감염, 아시네토박터 감염 (아시네토박터 복합 유기체에 의한 감염 포함), 부르크홀데리아 감염 (부르크홀데리아 복합 유기체에 의한 감염 포함), 스테노트로포모나스 말토피리아 감염, 시겔라 (다양한 종) 감염, 및 클레브시엘라 (다양한 종) 감염일 수 있다.

[0149] 또한, 본 발명에 따라 생성된 항체는 올리고당-담체 접합체에 대한 면역 반응에 의해 유발된 항체와 반응하는

분자를 생성하는 임의의 감염성 또는 병원성 미생물에 의한 감염을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.

- [0150] 본원에서 사용되는 "면역 반응 (예를 들어, 항체 반응)을 유발하기 위한 유효량"은 (i) 예를 들어 대상체에서 항체의 생성을 유발하고, 기억 세포의 생성, 및 가능하게는 세포독성 림프구 반응 등을 유발하여 대상체에서 그의 자체 면역 보호의 생성을 보조하고/거나; (ii) 스타필로코쿠스를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 감염성 또는 병원성 미생물에 노출된 대상체에서 감염 발생을 방지하기에 충분한 양이다.
- [0151] 몇몇 바람직한 실시양태에서, 면역 반응을 자극하기 위한 백신의 유효량은 2종 이상의 스타필로코쿠스, 예를 들어 에스. 아우레우스 및 에스. 에피테르미디스와 교차-반응성인 항체의 생성을 유발할 수 있는 백신의 양이다.
- [0152] 당업자들은 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 소정의 양이 능동 면역을 유발하는데 충분한지를 평가할 수 있다. 예를 들어, 접합체 또는 그의 대응하는 올리고당을 사용하여 마우스 또는 다른 대상체에서 항체에 대해 스크리닝하여 포유동물에서 항체를 생성하기 위한 특이적 접합체의 능력을 평가할 수 있다.
- [0153] 본원에서 사용되는 대상체에는 인간 및 비-인간 대상체가 포함된다. 비-인간 대상체에는 반려 동물, 예컨대 개, 고양이, 흰족제비, 조류 등, 농업 동물, 예컨대 소, 돼지, 염소, 양, 말, 닭 등, 동물원 동물, 예컨대 기린, 사자, 호랑이, 코끼리, 곰 등, 실험용 동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼 등이 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 대상체는 60세가 넘는 인간일 수 있다. 대상체는 건강한 대상체일 수 있다.
- [0154] 본 발명에 따라 치료되는 대상체에는 병원 환경에서 박테리아에의 노출의 결과로서 포도상구균 감염이 발생할 위험성이 있는 입원 환자가 포함된다. 에스. 아우레우스에 의한 감염 발생에 대한 특정 고위험 집단에는 예를 들어 투석 중인 신장 질환 환자, 및 고위험 수술을 받는 개체가 포함된다. 또한, 에스. 에피테르미디스에 의한 감염 발생에 대한 고위험 집단에는 예를 들어 내재 의료 장치, 예컨대 정맥내 주입로 (예를 들어, 중심정맥내 주입로(central line)) 또는 인공보철 (예를 들어, 인공 고관절 또는 인공슬관절)을 갖는 환자가 포함되는데, 임상적 단리물이 종종 플라스틱 표면에 고도로 점착성이기 때문이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 의료 장치 이식물이 수용된 대상체이고, 다른 실시양태에서, 대상체는 의료 장치 이식물이 수용되지 않았지만 수용하기로 계획된 대상체이다. 추가적으로, 에스. 에피테르미디스에 의한 감염이 발생할 위험성이 높은 대상체에는 예를 들어 조산 신생아, 및 화학 요법을 받는 환자가 포함된다. 본 발명에 따라 치료되는 추가의 대상체에는 병이 들게 되며 병원 또는 집단 환경에서 박테리아에의 노출의 결과로서 PNAG를 생성하거나 또는 생성할 수 있는 미생물로의 감염이 발생할 위험성이 있는 입원 환자 또는 집단 내의 개체가 포함된다.
- [0155] 면역 반응 유발 및 항체 생성
- [0156] 추가적으로, 본 발명은 대상체에서 면역 반응의 자극을 위한 유효량으로 본 발명의 올리고당-담체 접합체를 면역 반응의 자극이 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 면역 반응은 항원-특이적 면역 반응일 수 있다. 이는 세포성 및/또는 체액성 면역 반응일 수 있다. 예를 들어, 면역 반응은 항체 및/또는 항체-생성 세포의 생성을 유발할 수 있다.
- [0157] 본원에서 사용되는 "수동 면역"은 다양한 대상체 (동일한 대상체 및 상이한 대상체 포함)에서 생성되는 항체를 대상체에게 투여하여, 항체가 박테리아의 표면에 부착되고 박테리아가 식작용되도록 하는 것을 포함한다.
- [0158] 본 발명의 접합체를 사용하여 생성된 항체는 PNAG를 생성하는 종 또는 항체와 반응하여 수동 면역을 유발하는 또다른 분자를 생성하는 종에 의해 감염이 발생할 위험성이 있는 임의의 대상체에게 투여할 수 있으며, 몇몇 실시양태에서, 능동 면역을 유발이 가능하지 않은 대상체에 대해 특히 적합할 수 있다. 항원의 접종이 고위험 면역약화 대상체에서 완전히 효과적이지는 않을 수 있기 때문에, 이러한 대상체는 스타필로코쿠스 아우레우스로 인한 것과 같은 감염의 예방 또는 치료를 위한 본 발명의 올리고당-담체 접합체에 대해 생성된 항체 제제로의 치료로부터 유익할 것이다. 면역 반응을 유발할 수 없는 대상체는 면역약화된 대상체 (예를 들어, 화학요법을 받는 환자, AIDS 환자 등), 또는 면역계가 아직 발달되지 않은 대상체 (예를 들어, 조산 신생아)이다.
- [0159] 따라서, 본 발명은 본 발명의 올리고당-담체 접합체를 사용하여 유기체, 예컨대 스타필로코쿠스에 의해 발현된 PNAG 분자에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량을 대상체에게 투여하고, 상기 대상체로부터 항체를 단리하는 것을 포함하는, 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 항체는 폴리클로날 항체일 수 있다. 항체는 추가로 변형될 수 있다.
- [0160] 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 올리고당-담체 접합체를 사용하여 PNAG 분자에 특이적인 항체를 생성하기 위한 유효량을 대상체에게 투여하고, 대상체로부터의 항체-생성 세포를 함유하는 임의의 조직, 예컨대 비장 또는

혈액으로부터 상기 세포를 수거하고, 대상체로부터의 항체-생성 세포를 골수종 세포와 융합시키고, 융합 서브클론으로부터 생성된 항체를 수거하는 것을 포함하는, 모노클로날 항체를 생성하는 방법을 제공한다.

- [0161] 본 발명은 본 발명의 올리고- β -(1 \rightarrow 6)-D-글루코사민에 특이적인 여러 항체의 생성을 고려한다. 이들에는 키메라 항체, 예컨대 인간화 항체 및 항체 단편, 및 또한 원형 모노클로날 및 폴리클로날 항체가 포함된다. 본원에서 사용되는 "인간화 모노클로날 항체"는 인간 모노클로날 항체 또는 적어도 인간 불변 영역 및 인간 이외의 중으로부터의 항원 결합 영역 (예컨대, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR, 또는 1개 또는 2개의 가변 영역, 또는 Fab 또는 F(ab)₂ 단편)을 갖는 그의 기능적 활성 단편이다. 예를 들어, 인간화 모노클로날 항체는 비-인간 포유동물 항체의 비-CDR 영역을 유사한 인간 항체 영역으로 대체하되 고유 항체의 에피토프 특이성을 유지하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 비-인간 CDR 및 임의로 몇몇 프레임워크 영역을 인간 FR 및/또는 Fc/pFc' 영역과 공유적으로 결합시켜 기능적 항체를 생성할 수 있다. 그의 전문이 본원에 참조로 포함되는 유럽 특허 출원 0239400은 인간화 모노클로날 항체의 생성 및 사용의 예시적인 교시를 제공하며, 여기서 적어도 뮤린 (또는 다른 비-인간 포유동물) 항체의 CDR 부분이 인간화 항체에 포함된다. 단백질 디자인 랩스 (Protein Design Labs; 캘리포니아 마운틴 뷰(Mountain View California) 소재), 아브제닉스(Abgenix) 및 메다렉스(Medarex)와 같은, 특이적 뮤린 항체 영역으로부터 인간화 항체를 상업적으로 합성하는 회사가 미국에 있다.
- [0162] 특히, 본 발명의 몇몇 측면에서, 단리된 형태 또는 제약 제제 형태의 원형 인간화 모노클로날 항체가 적합하다. 인간화 항체는 특정 임상적 유용성을 갖는데, 항체 자체에 대한 인간에서의 면역 반응을 일으키지 않을 것이기 때문이다. 한 바람직한 실시양태에서, 뮤린 CDR을 인간 항체의 프레임워크 영역에 그래프팅하여 "인간화 항체"를 생성한다. 예를 들어, 문헌 [L. Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988)]; [M. S. Neuberger et al., Nature 314, 268 (1985)] 및 EPA 0 239 400 (1987년 9월 30일자로 공개됨)을 참조한다.
- [0163] 인간 모노클로날 항체는 당업계에 알려진 방법, 예컨대 미국 특허 제5,567,610호 (보레백(Borrebaeck) 등에게 허여됨), 미국 특허 제565,354호 (오스트베르그(Ostberg)에게 허여됨), 미국 특허 제5,571,893호 (베커(Baker) 등에게 허여됨), 문헌 [Kozber, J. Immunol. 133: 3001 (1984)], [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, new York, 1987)] 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147: 86-95 (1991)]에 개시된 방법 중 하나에 의해 생성될 수 있다.
- [0164] 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위한 통상적인 방법 이외에, 이러한 항체는 인간 항체를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물의 면역화에 의해 제조할 수도 있다 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., PNAS USA, 90: 2551 (1993)], [Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993)], [Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)] 및 미국 특허 제5,569,825호 (론베르그(Lonberg)에게 허여됨) 참조).
- [0165] 또한, 인간 항체는 혈액 또는 다른 인간 조직으로부터 항체-생성 림프구의 회수하여 얻을 수 있다. 이들 림프구를 처리하여 실험실에서 적절한 배양 조건 하에 스스로 성장하는 세포를 생성할 수 있다. 세포 배양물을 항체의 본 발명의 접합체로의 생성에 대해 스크리닝하고, 이후 클로닝할 수 있다. 클론 배양물을 사용하여 인간 모노클로날 항체를 생성할 수 있거나, 또는 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 부분을 코딩하는 유전자 요소를 클로닝하고 다양한 유형의 항체의 생성을 위한 핵산 백터에 삽입할 수 있다.
- [0166] 또한, 항체 단편이 본 발명에 포함된다. 잘 알려진 기능적 활성 항체 단편에는 항체의 F(ab')₂, Fab, Fv 및 Fd 단편이 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 원형 항체의 Fc 단편이 결여된 이러한 단편은 순환으로부터 보다 빠르게 제거되며, 이는 원형 항체에 비해 덜 비-특이적인 조직 결합을 갖는다 (문헌 [Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)]). 예를 들어, 단일-쇄 항체는 라드너 (Ladner) 등의 미국 특허 제4,946,778호에 기재된 방법에 따라서 구축될 수 있다. 이러한 단일-쇄 항체에는 가요성 링커 잔기에 의해 연결된 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 포함된다. 단리된 가변 중쇄 단일 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체 ("Fd")를 얻기 위한 방법이 또한 보고되었다 (예를 들어, 그의 표적 에피토프에 대하여 단리된 형태에서 그에 결합하는데 충분한 친화도를 갖는 항체 중쇄 가변 영역 (V_H 단일 도메인 항체)을 확인하기 위한 스크리닝 방법을 개시하는 문헌 [Ward et al., Nature 341:644-646 (1989)] 참조). 알려진 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 기초로한 재조합 Fv 단편을 제조하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 무어(Moore) 등의 미국 특허 제4,462,334호에 기재되어 있다. 항체 단편의 사용 및 생성을 기재하는 다른 참조 문헌에는 예를 들어 문헌 [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)] (Fab 단편), 문헌 [Hochman et al., Biochemistry 12: 1130 (1973)]; [Sharon et al., Biochemistry 15: 1591 (1976)]; 에를리히(Ehrlich) 등의

미국 특허 제4,355,023호 (Fv 단편), 및 오딜로레-하그리브스(Audilore-Hargreaves)의 미국 특허 제4,470,925호 (항체 분자의 부분)이 포함된다. 따라서, 당업자들은 항체의 특이성을 파괴하지 않고 원형 항체의 여러 부분으로부터 항체 단편을 구축할 수 있다.

[0167] 조성물 및 제약 제제

[0168] 예를 들어 본 발명의 올리고당-담체 접합체를 포함하는 본 발명의 조성물은 제약상 허용되는 비히클과 함께 제제화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용되는 비히클"은 인간 또는 다른 동물에의 투여에 적합한 1종 이상의 수용성 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 본 발명에서, 용어 "비히클"은 유기 또는 무기 천연 또는 합성 성분을 의미하며, 이들과 활성 성분이 조합되어 적용을 수월하게 한다. 또한, 제약 조성물의 성분은 원하는 제약학적 효율을 실질적으로 손상시킬 수 있는 상호작용이 없도록 하는 방식으로 접합체와, 및 서로와 혼합되도록 할 수 있다.

[0169] 따라서, 본 발명의 조성물은 제약 제제로 간주될 수 있다. 이는 생체내 사용될 수 있으나, 그로 제한되지는 않는다. 생체내 사용되는 경우에, 치료 목적, 예방 목적 또는 연구 목적이든지 관계없이 인간 또는 비-인간 대상체에서 사용될 수 있다. 예로서, 조성물을 사용하여 비-인간 대상체, 예컨대 마우스, 토끼 및 다른 적합한 동물 숙주에서 항체 및/또는 항체 생성 세포를 생성할 수 있다.

[0170] 따라서, 본 발명은 상기 올리고당-담체 접합체 중 어느 하나를 포함하는 제약 제제를 제공하며, 이는 백신으로서 사용할 수 있다. 이러한 제제는 면역 반응, 예컨대 항원-특이적 면역 반응을 자극하는데 유효한 양으로 접합체를 포함할 수 있다. 상기 제제는 다른 구성요소 또는 성분, 예컨대 아주반트 및 항박테리아제 (이들로 한정되지는 않음)를 포함할 수 있다. 전형적으로, 이러한 제제는 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제, 수용성 담체, 아주반트 및 임의로 다른 치료 성분을 함유할 수 있다.

[0171] 백신의 제제화에 적합한 담체 매질에는 인산나트륨-완충 염수 (pH 7.4) 또는 pH 6에서 인산나트륨-완충 염수에 현탁된 0.125 M 알루미늄 포스페이트 겔, 및 다른 통상적인 매질이 포함된다. 일반적으로, 백신은 약 5 내지 약 100 µg, 바람직하게는 약 10 내지 50 µg의 항원을 함유하여 온혈 포유동물에서 효과적인 수준의 항체를 유발한다.

[0172] 아주반트는 항원에 도입되거나 또는 항원과 함께 (동시에 또는 달리) 투여되는 임의의 물질이며, 이는 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 강화시킨다. 아주반트에는 알루미늄 화합물, 예를 들어 겔, 알루미늄 히드록시드 및 알루미늄 포스페이트, 및 프로인트 완전 또는 불완전 아주반트 (예를 들어, 여기서 항원은 파라핀유 에멀전 중 안정화된 물의 수성 상에 도입됨)가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 파라핀유는 상이한 유형의 오일, 예를 들어 스쿠알렌 또는 땅콩유로 대체할 수 있다. 아주반트 특성을 갖는 다른 물질에는 BCG (약독화된 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)), 인산칼슘, 레바미솔, 이소프리노신, 폴리음이온 (예를 들어, 폴리 A:U), 렌티난, 백일해 독소, 지질 A, 사포닌, QS-21 및 펩티드, 예를 들어 무라밀 디펩티드, 및 면역 자극 올리고뉴클레오티드, 예컨대 CpG 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 회토류 염, 예를 들어 란탄 및 세륨 또한 아주반트로서 사용할 수 있다. 아주반트의 양은 대상체 및 사용되는 특정 항원에 따르며, 과도한 실험 없이 당업자들에 의해 쉽게 측정될 수 있다.

[0173] 항박테리아제는 박테리아를 (예를 들어, 용균을 통해) 사멸시키거나, 또는 그의 분열을 방지하는 작용제이다. 박테리아 감염의 치료에서의 항생제의 사용은 일반적이다. 항박테리아제에는 페니실린 G, 페니실린 V, 암피실린, 아목시실린, 바캄피실린, 시클라실린, 에피실린, 헤타실린, 피밤피실린, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 카르베니실린, 티카르실린, 아즐로실린, 메즐로실린, 피페라실린, 암디노실린, 세팔렉신, 세프라딘, 세파독실(cefadroxil), 세파클로르, 세파졸린, 세프록심 악세틸, 세파만돌, 세포니시드, 세폭시틴, 세포탁심, 세프티죽심, 세프메녹심, 세프트리악손, 목살락탐, 세포테탄, 세포페라존, 세프타지딤, 이미페넴, 클라불라네이트, 티멘틴, 숄박탐, 네오마이신, 에리트로마이신, 메트로니다졸, 클로람페니콜, 클린다마이신, 린코마이신, 반코마이신, 트리메토프림-숄파메톡사졸, 아미노글리코시드, 퀴놀론, 테트라시클린 및 리팜핀이 포함된다 (문헌 [Goodman and Gilman's, Pharmacological Basics of Therapeutics, 8th Ed., 1993, McGraw Hill Inc.] 참조).

[0174] 접합체는 영상화제, 형광단, 효소 등과 같은 검출가능한 표지를 비롯한 (이들로 한정되지는 않음) 다른 잔기에 공유적으로 또는 비-공유적으로 부착될 수 있다.

[0175] 편리하게는, 비경구 투여에 적합한 조성물은 멸균 수성 제제를 포함하며, 이는 수용자의 혈액에 등장성일 수 있다. 이용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중 하나는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 추가적

으로, 멸균 불휘발성 오일이 용매 또는 현탁화 매질로서 통상적으로 이용된다. 이러한 목적을 위하여, 합성 모노 또는 디-글리세리드를 비롯한 임의의 불렌딩 불휘발성 오일을 이용할 수 있다. 추가적으로, 지방산, 예컨대 올레산을 주사용 제제에서 사용할 수 있다. 피하, 근육내, 복강내, 정맥내 등의 투여에 적합한 담체 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA]에서 발견할 수 있다.

[0176] 본 발명의 제제는 유효량으로 투여된다. 몇몇 상황에서, 상기 논의된 것과 같은 유효량은 단독으로 또는 추가의 용량과 함께 대상체에 따라 능동 또는 수동 면역을 유발하는 양이다. 투여 방식에 따라서, 1 나노그램/킬로그램 내지 100 밀리그램/킬로그램 범위의 용량이 효과적일 것으로 생각된다. 바람직한 범위는 500 나노그램 내지 500 마이크로그램/킬로그램, 가장 바람직하게는 1 마이크로그램 내지 100 마이크로그램/킬로그램 사이인 것으로 생각된다. 절대량은 투여가 아직 박테리아에 감염되지 않은 고위험 대상체에서 수행되는지 아니면 이미 감염된 대상체에서 수행되는지, 동시 치료, 투여 횟수, 및 연령, 신체적 상태, 크기 및 체중을 비롯한 개개 환자 파라미터를 비롯한 여러 요인에 따를 것이다. 이들은 당업자들에게 잘 알려진 요인이며, 단지 통상적인 실험으로 처리할 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 정상적인 의학적 판단에 따른 최대 안전 용량을 사용하는 것이 바람직하다.

[0177] 본 발명의 조성물의 다중 용량이 고려된다. 일반적으로, 면역화 계획은 고 용량의 항원의 투여, 이어서 후속적으로 수 주일의 대기 기간 후의 저용량의 항원의 투여를 포함한다. 추가의 용량 또한 투여할 수 있다. 수동 면역화에 대한 투여 일정은 필요한 경우 보다 주기적인 투여와는 완전히 다를 것이다. 박테리아 감염에 대한 증진된 면역 반응 및/또는 후속적으로 감염으로부터의 보호를 유발하는 임의의 요법을 사용할 수 있다. 특정 접합체의 다중 용량의 전달에 대한 원하는 시간 간격은 단지 통상의 실험을 이용하여 당업자들에 의해 측정될 수 있다.

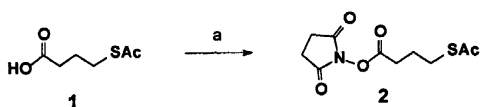
[0178] 여러 투여 경로가 이용가능하다. 선택되는 특정 방식은 물론 선택된 특정 접합체, 치료되는 특정 상태, 및 치료학적 효능에 필요한 투여량에 따를 것이다. 일반적으로, 본 발명의 방법은 의학적으로 허용되는 임의의 투여 방식 (임상적으로 허용되지 않는 부작용을 유발하지 않고 유효한 수준의 면역 반응을 생성하는 임의의 방식을 의미함)을 사용하여 시행될 수 있다. 바람직한 투여 방식은 비경구 경로이다. 용어 "비경구"에는 피하, 정맥내, 근육내, 복강내 및 흉골내 주사, 또는 주입 기법이 포함된다. 다른 경로에는, 경구, 비내, 피부, 설하 및 국소가 포함된다.

[0179] 하기 실시예는 예시 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범주를 제한하려고 하지는 않는다.

[0180] <실시예>

[0181] 본 발명의 측면은 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 예시된다. 이들 실시예는 특히 올리고-β-(1→6)-D-글루코사민 올리고당의 제조 방법, 및 이러한 올리고당을 담체, 예컨대 단백질 담체와 접합시키는 방법을 예시한다. 이러한 접합체는 특히 백신으로서 이용될 수 있다.

[0182] 실시예 1. N-히드록시숙신이미딜 4-아세틸술폰부티레이트 (2)의 합성



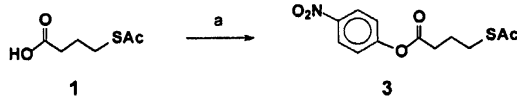
[0183] 반응식 1. 연결 시약 (2)의 합성. a: CF₃COOSu, 피리딘.

[0185] 디클로로메탄 (4 mL) 중 산 (1) (문헌 [Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; et al.; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713]) (237 mg, 1.46 mmol) 및 N-히드록시숙신이미딜 트리플루오로아세테이트 (431 mg, 2.02 mmol)의 용액에 피리딘 (355 μL, 4.4 mmol)을 첨가하고, 생성된 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄 (50 mL)으로 희석시키고, 빙냉 1 M HCl 및 물로 세척하고, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔 - 에틸 아세테이트 9:1)하여, 활성 에스테르 (2) (359 mg, 95%)를 무색 시럽으로서 수득하였다.

¹H NMR 데이터 (300 MHz, CDCl₃), δ 2.00 (m, 2 H, β-CH₂), 2.33 (s, 3 H, CH₃COS), 2.68 (t, 2 H, J 7.4 Hz, γ-CH₂), 2.81 (s, 4 H, 숙신이미드의 2 CH₂), 2.96 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH₂). ¹³C NMR 데이터 (62.9 MHz, CDCl₃): δ 24.7 (β-CH₂), 25.6 (숙신이미드의 CH₂), 27.9 (γ-CH₂), 29.7 (α-CH₂), 30.7 (CH₃COS), 168.0 (CO-N), 169.2 (숙신이미드의 CO), 195.4 (CH₃COS).

[0186]

[0187] 실시예 2. 4-니트로페닐 4-아세틸술폰과닐부티레이트 (3)의 합성



[0188]

[0189] 반응식 2. 연결 시약 (3)의 합성. a: CF₃COOpNp, Et₃N.

[0190]

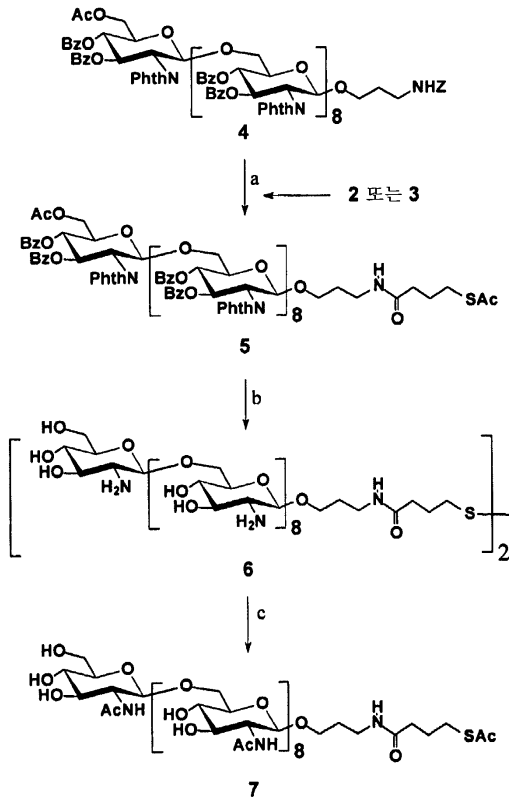
디클로로메탄 중 산 (1) (233 mg, 1.44 mmol) (문헌 [Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesper; et al.; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713]) 및 4-니트로페닐 트리플루오로아세테이트 (470 mg, 2 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (400 μl, 2.88 mmol)을 첨가하고, 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 (2)에 대해 기재된 바와 같이 후처리하고, 활성 에스테르 (3) (385 mg, 94%)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔 - 에틸 아세테이트 92:8)에 의해 분리하였다.

[0191]

¹H NMR 데이터 (300 MHz, CDCl₃), δ 2.03 (m, 2 H, β-CH₂), 2.36 (s, 3 H, CH₃COS), 2.68 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH₂), 3.01 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH₂), 7.28, 8.26 (2 d, 4 H, 방향족). ¹³C NMR 데이터 (62.9 MHz, CDCl₃): δ 24.7 (β-CH₂), 28.0 (γ-CH₂), 30.7 (CH₃COS), 32.7 (α-CH₂), 122.5, 125.2, 145.3, 155.3 (방향족 C), 170.4 (COO), 195.5 (CH₃COS).

[0192]

실시예 3. 연결 시약 (2) 또는 (3)을 사용한 리간드 (6) 및 (7)의 합성



[0193]

[0194] 반응식 3. 리간드의 합성. a: 1) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH/THF 2) (2) 또는 (3), Et₃N, CH₂Cl₂; b: N₂H₄ · H₂O, EtOH, Δ; c: DTT, NaHCO₃, Ac₂O, MeOH/H₂O.

[0195] 9당류 (4) (문헌 [M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, «Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*» Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575]) (110 mg, 0.023 mmol)를 MeOH (3 mL), THF (6 mL) 및 1 M HCl (0.2 mL)의 혼합물에 용해시키고, Pd(OH)₂/C (110 mg)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 수소 분위기하에 1시간 동안 교반하였다. 촉매를 여과하고, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CH₂Cl₂ (2 mL) 및 DMF (1 mL)의 혼합물에 용해시키고, 이어서 연결 시약 (2) (12 mg, 0.046 mmol, 1 mL의 CH₂Cl₂ 중 용액) 및 Et₃N (100 μl)을 첨가하였다. 30분 후, 혼합물을 톨루엔으로 희석시키고, 농축시키고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔/Me₂CO, 4:1)에 적용시켜, (5) (98 mg, 98%)를 무색 발포물로서 수득하였다. 링커의 도입을, 보호화된 탄수화물 리간드의 NMR 스펙트럼에서 상기 링커의 특징적인 신호의 존재로 확인하였다.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.88 (m, 2 H, β-CH₂), 2.21 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH₂), 2.31 (s, 3 H, CH₃COS), 2.88 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH₂). ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, CDCl₃): δ 25.7 (β-CH₂), 28.5 (α-CH₂), 30.6 (CH₃COS), 35.1 (γ-CH₂).

[0196] 보호화된 9당류 (5) (95 mg, 0.02 mmol), EtOH (5 mL) 및 N₂H₄ · H₂O (0.5 mL)의 혼합물을 환류하에 1시간 동안 교반하고, 이어서 농축시키고, 0.1 M 수성 AcOH 중에서 겔 침투 크로마토그래피 (TSK 겔 토요펠(Toyopearl) HW 40S, 2.5 x 40 cm)에 적용시켜, 9당류 (6) (28 mg, 86%)을 수득하였다. 겔 크로마토그래피 직후에는 SH-유도체를 수득할 수 있었으나 (질량-분석법에 의해 검출됨), 용액 중에서 보관한 후에 상기 SH-유도체는 상응하는 디설피드로 전환되었다 (¹³C NMR 실험에 의해 확인됨).

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1.95 (m, 2 H, β-CH₂), 2.32 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH₂SH), 2.71 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH₂). ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, D₂O): δ 29.7 (β-CH₂), 35.8 (γ-CH₂SH), 38.5 (α-CH₂), 42.1 (γ-CH₂SS).

[0198] 질량-스펙트럼: C₆₁H₁₁₄N₁₀O₃₈S에 대한 계산치 543.234 [M+3H]³⁺, 측정치 543.243 [M+3H]³⁺.

[0200] 9당류 (6) (15 mg)을 물/MeOH의 혼합물 (2 mL, 1:1 v/v)에 용해시키고, 디티오프레이톨 (15 mg) 및 NaHCO₃ (20 mg)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 5분 동안 교반하고, 이어서 아세트산 무수물 (100 μl)을 첨가하고, 30분 동안 교반을 계속한 후, 용매를 증발시켰다. 생성물을 0.1 M 수성 AcOH 중에서 겔 침투 크로마토그래피 (TSK 겔 토요펠 HW 40S, 2.5 x 40 cm)에 의해 정제하여, 아세틸화된 생성물 (7) (15 mg, 95%)을 수득하였다.

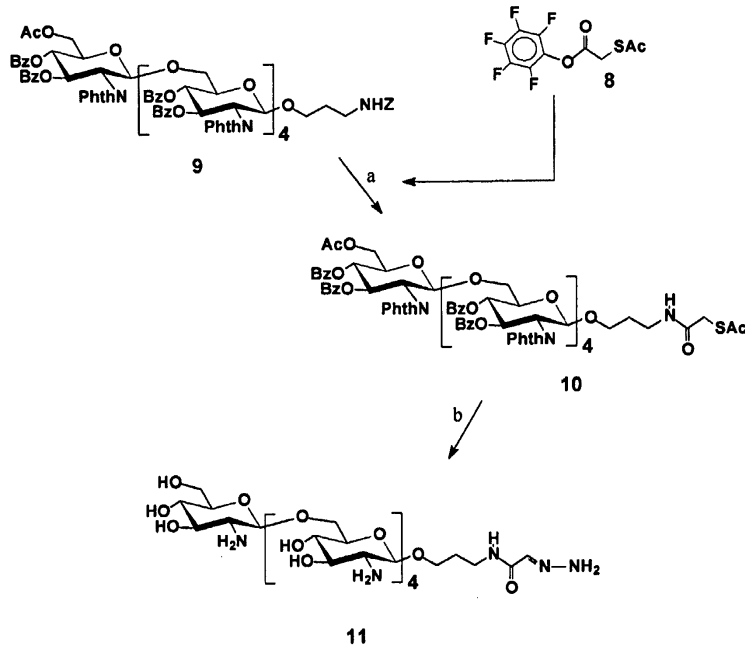
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 1.75 (m, 2 H, β-CH₂), 2.11 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH₂), 2.43 (s, 3 H, CH₃COS), 2.75 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH₂). ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, D₂O): δ 25.7 (β-CH₂), 28.5 (α-CH₂), 30.6 (CH₃COS), 35.1 (γ-CH₂).

[0201] 질량-스펙트럼: C₈₁H₁₃₄N₁₀O₄₈S에 대한 계산치 1024.418 [M+2H]²⁺, 측정치 1024.427 [M+2H]²⁺.

[0202] 실시예 4. 연결 시약 (3)을 사용한 보호화된 리간드 (5)의 합성

[0204] 9당류 (4) (60 mg, 0.013 mmol)를 MeOH (1.5 mL), THF (3 mL) 및 1 M HCl (0.1 mL)의 혼합물에 용해시키고, Pd(OH)₂/C (60 mg)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 수소 분위기하에 1시간 동안 교반하였다. 촉매를 여과하고, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CH₂Cl₂ (2 mL) 및 DMF (1 mL)의 혼합물에 용해시키고, 이어서 연결 시약 (3) (20 mg, 0.07 mmol, 1 mL의 CH₂Cl₂ 중 용액) 및 Et₃N (50 μl)을 첨가하였다. 20시간 후, 혼합물을 톨루엔으로 희석시키고, 농축시키고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔/Me₂CO, 4:1)에 적용시켜, (5) (37 mg, 68%)를 무색 발포물로서 수득하였다.

[0205] 실시예 5. 단백질과의 추가 접합을 위한 리간드의 제조에 대한, 연결 시약 (8)의 적용가능성 연구



[0206]

[0207] 반응식 4. 리간드의 합성. a: 1) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH/THF 2) (8), Et₃N, CH₂Cl₂; b: N₂H₄·H₂O, EtOH, Δ.

[0208] 5당류 (9) (150 mg, 0.026 mmol) (문헌 [M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, « Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*» Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575])를 MeOH (1.5 mL), THF (3 mL) 및 1 M HCl (0.1 mL)의 혼합물에 용해시키고, Pd(OH)₂/C (150 mg)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 수소 분위기하에 1 시간 동안 교반하였다. 촉매를 여과하고, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CH₂Cl₂ (2 mL) 및 DMF (1 mL)의 혼합물에 용해시키고, 이어서 연결 시약 (8) (30 mg, 0.1 mmol, 0.1 mL의 CH₂Cl₂ 중 용액) 및 Et₃N (50 μl)을 첨가하였다. 1시간 후, 혼합물을 톨루엔으로 희석시키고, 농축시키고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔/Me₂CO, 4:1)에 적용시켜, (10) (132 mg, 89%)을 무색 발포물로서 수득하였다.

[0209]

¹H NMR 데이터 (500 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (s, 3H, CH₃COS), 3.53 (s, 2H, CH₂S); ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, CDCl₃): δ 30.2 (CH₃COS), 32.9 (CH₂S).

[0210]

보호화된 5당류 (10) (100 mg, 0.017 mmol), EtOH (5 mL) 및 N₂H₄·H₂O (0.5 mL)의 혼합물을 환류하에 1시간 동안 교반하고, 이어서 농축시키고, 0.1 M 수성 AcOH 중에서 겔 침투 크로마토그래피 (TSK 겔 토요펠 HW 40S, 2.5 x 40 cm)에 적용시켜, 5당류 (11) (32 mg, 93%)을 수득하였다.

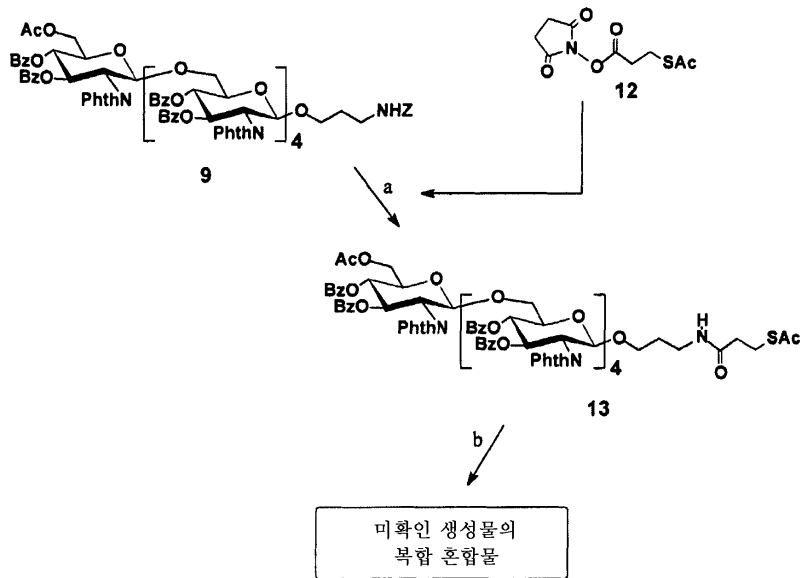
[0211]

¹H NMR 데이터 (500 MHz, D₂O): δ 7.17 (s, 1 H, CH=N); ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, D₂O): δ 134.6 (C=N-NH₂), 167.4 (C(O)-CH=N).

[0212]

질량-스펙트럼: C₃₅H₆₇N₈O₂₂에 대한 계산치 951.438 [M+H]⁺, 측정치 951.448 [M+H]⁺.

[0213] 실시예 6. 단백질과의 추가 접합을 위한 리간드의 제조에 대한, 연결 시약 (12)의 적용가능성 연구



[0214]

[0215] 반응식 5. 리간드의 합성. a: 1) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH/THF 2) (12), Et₃N, CH₂Cl₂; b: N₂H₄·H₂O, EtOH, Δ

[0216] 5당류 (9) (100 mg, 0.017 mmol) (문헌 [M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, « Synthesis of oligo-β(1→6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*» Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575])를 MeOH (1.5 mL), THF (3 mL) 및 1 M HCl (0.1 mL)의 혼합물에 용해시키고, Pd(OH)₂/C (150 mg)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 수소 분위기하에 1 시간 동안 교반하였다. 촉매를 여과하고, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CH₂Cl₂ (2 mL) 및 DMF (1 mL)의 혼합 물에 용해시키고, 이어서 연결 시약 (12) (15 mg, 0.061 mmol, 0.1 mL의 CH₂Cl₂ 중 용액) 및 Et₃N (50 μl)을 첨 가하였다. 1시간 후, 혼합물을 톨루엔으로 희석시키고, 농축시키고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (톨루엔 /Me₂CO, 4:1)에 적용시켜, (13) (87 mg, 85%)을 무색 발포물로서 수득하였다.

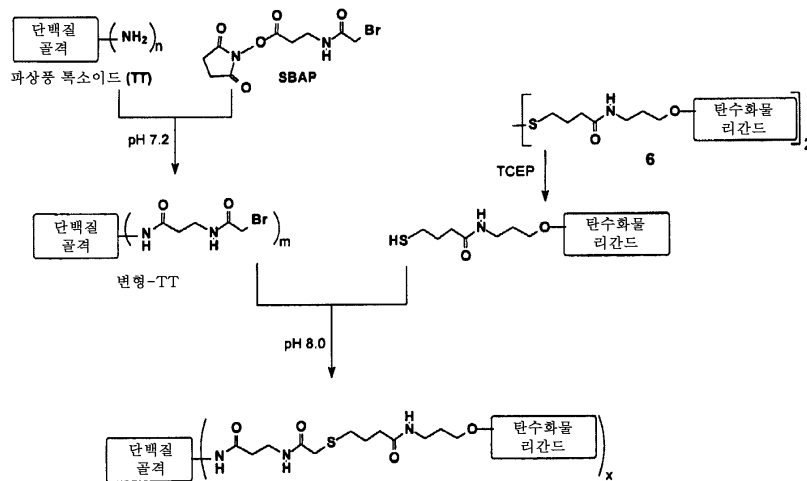
[0217]

¹H NMR 데이터 (500 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3H, CH₃COS), 2.52 (m, 2H, COCH₂), 3.15 (t, 2H, J 7.6, CH₂S); ¹³C NMR 데이터 (125 MHz, CDCl₃): δ 25.2 (CH₃COS), 29.2 (COCH₂), 35.9 (CH₂S).

[0218]

보호화된 5당류 (13) (80 mg, 0.015 mmol), EtOH (5 mL) 및 N₂H₄·H₂O (0.5 mL)의 혼합물을 환류하에 1시간 동안 교반하고, 이어서 농축시키고, 0.1 M 수성 AcOH 중에서 겔 침투 크로마토그래피 (TSK 겔 토요일 HW 40S, 2.5 x 40 cm)에 적용시켜, 미확인 생성물의 복합 혼합물을 수득하였다.

[0219] 실시예 7. 과상풍 톡소이드와 리간드 (6)의 접합체 - "TT-9NH₂"의 제조



과상풍 톡소이드와 리간드 6의 접합체 ("TT-9NH₂")

[0220]

[0221] 반응식 6. 리간드 (6)과의 접합.

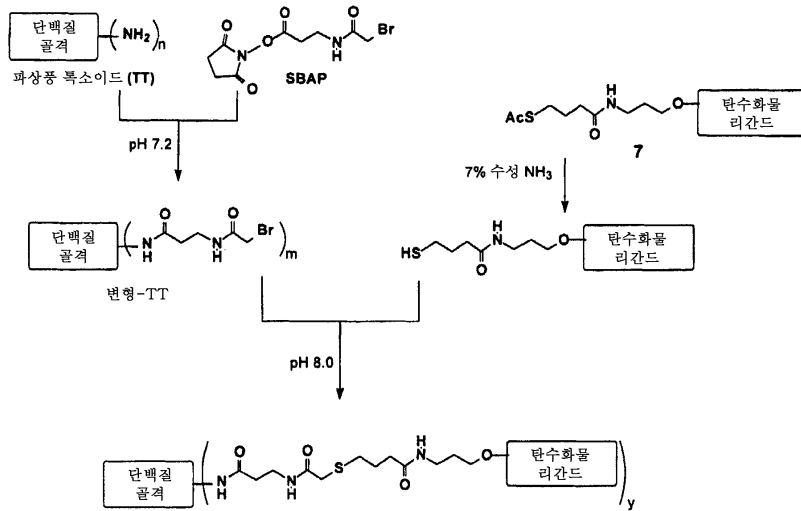
[0222] 단계 1. 단백질 변형. 과상풍 톡소이드 (120 μ l 중 4 mg, 원액)를 400 μ l의 pH 7.2 완충액 (0.1 M 나트륨 포스페이트, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA)으로 희석시키고, DMSO (80 μ l) 중 SBAP (2.6 mg)의 용액을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 반응하지 않은 SBAP를 pH 8.0 러닝 완충액 (0.1 M 나트륨 포스페이트, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA) 중에서 PD-10 컬럼을 사용하여 제거하고, 생성된 변형 단백질의 3.5 mL 용액을 400 μ l로 농축시켰다.

[0223] 단계 2. 디설피드 환원. 고정된 TCEP 디설피드 환원 겔 (물 중 50% 슬러리 200 μ l)을 원심분리하고, 과량의 물을 제거하고, 디설피드 (6) (100 μ l의 pH 8.0 완충액 (0.1 M 나트륨 포스페이트, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA) 중 1.5 mg)를 첨가하였다. 로터 랙(rack) 상에서 45분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, SH-유도체의 용액을 원심분리에 의해 겔로부터 분리하고, 고정된 TCEP를 동일한 pH 8.0 완충액 (100 μ l)으로 3회 세척하였다.

[0224] 단계 3. 접합. 단계 2에서 수득한 리간드의 용액 (pH 8.0 완충액 중 400 μ l)을 즉시 변형 단백질 (pH 8.0 완충액 중 400 μ l, 단계 1.)과 합하고, 실온에서 밤새 교반하였다. 상기 시간 후, 수퍼로즈(Superose) 6 분취-등급 컬럼 상에서 겔 여과에 의해, 접합체를 커플링되지 않은 성분으로부터 분리하였다. TT-9NH₂ 접합체를 함유하는 분획을 수집하고, 농축시키고, -20°C에서 냉동 보관하였다.

[0225] 접합체의 화학적 분석. 표준으로서의 화합물 (6)과 함께, 스미스(Smith) 및 길커슨(Gilkerson)에 의해 기재된 헥소사민 분석 (문헌 [R.L. Smith and E. Gilkerson, 1979 Analytical Biochem. 98: 478-480])을 이용하여, 접합체를 그의 올리고당 함량에 대해 분석하고, 브래드포드(Bradford) 분석 (문헌 [M.M. Bradford, 1976, Analytical Biochem. 72:248 - 254])으로 단백질에 대해 분석하였다. 이들 분석에 따르면, 접합체 TT-9NH₂는 단백질 분자 1개당 74개의 탄수화물 리간드를 함유한다 (x = 74).

[0226] 실시예 8. 과산화물 특소이드와 리간드 (7)의 접합체 - "TT-9Nac"의 제조



과산화물 특소이드와 리간드 7의 접합체 ("TT-9Nac")

[0227]

[0228]

반응식 7. 리간드 (7)과의 접합.

[0229]

단계 1. 단백질 변형. 접합체 TT-9NH₂에 대해 상기 기재된 바와 같이, TT를 SBAP로 변형시켰다.

[0230]

단계 2. S-아세틸 탈보호. 9당류 (7) (2.1 mg)을 200 μ l의 7% NH₃ 수용액에 용해시키고, 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 정치시키고, 이어서 동결건조시켰다.

[0231]

단계 3. 접합. 동결건조된 올리고당을 즉시 400 μ l의 pH 8.0 완충액 (0.1 M 나트륨 포스페이트, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA)에 용해시키고, 동일한 완충액 중 변형-TT 용액 400 μ l와 혼합하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 상기 시간 후, 수퍼로즈 6 분취-등급 컬럼 상에서 겔 여과에 의해, 접합체를 커플링되지 않은 성분으로부터 분리하였다. TT-9Nac 접합체를 함유하는 분획을 수집하고, 농축시키고, -20°C에서 냉동 보관하였다.

[0232]

접합체의 화학적 분석. 접합체 TT-9NH₂ (실시예 7)에 대한 것과 동일한 방식으로 분석을 수행하여, 접합체 TT-9Nac가 단백질 분자 1개당 71개의 탄수화물 리간드를 함유한다는 것을 밝혔다 (y = 71).

[0233]

실시예 9. 올리고당 접합체를 사용한 항체 생성

[0234]

방법. 토끼에게 과산화물 특소이드 (TT)와 접합된 노나글루코사민 (즉, 9개의 연결된 단량체)과 등가의 다당류 10 μ g를 당량 용적의 스페콜(Specol) 아주반트와 함께 1주 간격으로 2회 피하주사하여 토끼를 면역화시켰다. 제3주에, 토끼를 식염수 중 PS-동등물 (IV) 10 μ g으로 3회 (즉, 월요일, 수요일 및 금요일) 면역화시켰다. 최후의 면역화 후, 토끼를 2주 동안 쉬게 하고, 2주마다 채혈하였다. 본 프레젠테이션에서의 데이터는 면역화 후 얻은 제1 혈청 (블리드 1) 및 제2 혈청 (블리드 2)으로부터의 결과를 통합한 것이다.

[0235]

결과. 도 1a 및 b는 에스. 아우레우스로부터의 PNAG (a) 또는 dPNAG (b)에 대한, 비-아세틸화된 노나-글루코사민 (9G1cNH₂)에 대해 발생한 항혈청의 결합에 관한 데이터를 나타낸다. 본 실험에서 사용된 dPNAG는 약 15% 아세틸화된 것이었다. 그러나, 아세틸화 수준이 0 내지 40% 범위일 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 데이터는 항혈청이 PNAG 및 dPNAG 둘 모두에 동등하게 결합하였다는 것을 입증한다.

[0236]

도 2a 및 b는 에스. 아우레우스로부터의 PNAG 또는 dPNAG에 대한, 완전 아세틸화된 노나-글루코사민 (9G1cNac)에 대해 발생한 항혈청의 결합에 관한 데이터를 나타낸다. 데이터는 항혈청이 고도로 아세틸화된 PNAG에 dPNAG보다 더 잘 결합하였다는 것을 입증한다.

[0237]

도 3a 및 b는 접합되지 않은 11G1cNac 또는 11G1cNH₂에 대한, TT-접합된 9G1cNac 또는 9G1cNH₂에 대해 발생한 항혈청 결합에 관한 데이터를 나타낸다. 데이터는 아세틸화된 9G1cNac에 대해 발생한 항혈청이 비-아세틸화된 9G1cNH₂에 대해 발생한 항혈청에 비해 아세틸화된 11G1cNac에 더 잘 결합하였다는 것을 입증한다. 11G1cNH₂에 대한 결합에 대해서는 결과가 상반되었는데, 9G1cNH₂-TT 접합체에 대한 항혈청은 6400배 미만의 혈청 희석에서

는 측정 한도를 초과하였다.

- [0238] 도 4 및 5는 에스. 아우레우스 MN8 및 2종의 USA300 균주에 대한, 블리드 1로부터의 항혈청을 사용한 결과를 나타낸다. 도 4는 파상풍 독소이드 (TT)와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 항혈청 ("블리드 1"로 지칭됨)에 의한 에스. 아우레우스 MN8 (CP8)의 사멸을 비교한 것이다. 도 5는 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 항혈청 (블리드 1)에 의한 에스.아우레우스 MN8의 사멸을 비교한 것이다. 항dPNAG-TT 접합체 항혈청이 비교대상으로 사용되었다. 도 6은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 1)에 의한 에스. 아우레우스 LAC (NT, USA300)의 사멸을 비교한 것이다. 도 7은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 1)에 의한 에스. 아우레우스 SF8300 (NT, USA300)의 사멸을 비교한 것이다. 도 8은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 1)에 의한 에스. 아우레우스 LAC (NT, USA300)의 사멸을 비교한 것이다. 일반적으로, 9G1cNH₂-TT에 대해 발생한 혈청이 종합적으로 가장 양호한 활성을 나타내었으나, 대부분의 분석에서 9G1cNAc-TT에 대해 발생한 혈청에 비해 단지 약간 더 양호하였다.
- [0239] 도 9-16은 블리드 2 혈청을 사용함으로써 생성된 사멸 데이터를 나타낸다. 토끼 항 dPNAG-TT 대조군이 균주 MN8, SF8300 및 LAC에 대한 비교대상으로 사용되었다. 염소 항dPNAG-TT가 뉴만 (CP5), PS80 (CP8) 및 동종 균주 레이놀드 CP5, 레이놀드 구별 불능형 및 레이놀드 CP8에 대한 비교대상으로 사용되었다.
- [0240] 도 9는 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 MN8 (CP8)의 사멸을 비교한 것이다. 도 10은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 LAC (NT, USA300)의 사멸을 비교한 것이다. 도 11은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 SF8300 (NT, USA300)의 사멸을 비교한 것이다. 도 12는 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 뉴만 (CP5)의 사멸을 비교한 것이다. 도 13은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 PS80의 사멸을 비교한 것이다. 도 14는 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 레이놀드 (CP5)의 사멸을 비교한 것이다. 도 15는 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 레이놀드 (구별 불능형)의 사멸을 비교한 것이다. 도 16은 TT와 접합된 완전 아세틸화된 또는 비-아세틸화된 9-mer 올리고글루코사민에 대한, 토끼 혈청 (블리드 2)에 의한 에스. 아우레우스 레이놀드 (CP8)의 사멸을 비교한 것이다.
- [0241] 일반적으로, 올리고당 접합체에 대해 발생한 항혈청 사용시 dPNAG-TT에 대해 발생한 항혈청에 비해 더 높은 정도의 사멸이 달성된다. 균주 LAC 및 SF8300의 사멸은, ELISA 결합 곡선이 유사함에도 불구하고, 블리드 1 혈청보다 블리드 2 혈청에 의해 더 양호하였다. 블리드 2 사용시, 9G1cNAc에 대해 발생한 혈청을 사용한 용해에 비해, 9G1cNH₂에 대해 발생한 항혈청을 사용한 사멸에서 더 큰 차이를 보였다.
- [0242] 실시에 10. 토끼 항혈청 및 이. 콜라이의 흡소닌 사멸.
- [0243] (상기 기재된 바와 같은) 면역화 후 토끼 항혈청 내 토끼 항체는, PNAG를 생성하는 것으로 앞서 입증된 2종의 이. 콜라이 균주의 흡소닌 사멸을 매개하였으나, 이. 콜라이에서 PNAG를 위한 생합성 효소를 코딩하는 *pga* 유전자가 결핍된 세 번째 균주는 그렇지 않았다 (도 16a).
- [0244] 실시에 11. 마우스 피부 농양 모델.
- [0245] 도 17, 18 및 19는 마우스 피부 농양 모델을 이용한 생체내 연구, 및 에스. 아우레우스 균주 LAC (USA300)에 의한 항원투여의 결과를 나타낸다. 9G1cNH₂에 대해 발생한 항혈청은 에스. 아우레우스 LAC (USA300) 피부 감염에 대한 보호 효능을 나타내었다. 군 1 (9G1cNH₂-TT로 표지됨)에 0.2 mL의 9G1cNH₂-TT 항혈청 (블리드 2)을 감염 24시간 전에 투여하였다. 군 2 (NRS로 표지됨)에 0.2 mL의 정상 토끼 혈청 (NRS)을 감염 24시간 전에 투여하였다. 마이크로텍스(microdex) 비드 (10 g/mL)를 함유한 100 μ l의 피하 주사액 중 2 x 10⁴ CFU (도 17), 2 x 10⁵ CFU (도 19), 또는 2 x 10⁶ CFU (도 20) (농양 1개당)로 마우스를 감염시켰다. 에스. 아우레우스 LAC 균주를 TSB 중에서 밤새 성장시키고, 이어서 세척하고, 투여에 앞서 마이크로텍스 비드에 첨가하였다. 72시간 후, 각

각의 농양을 절개하고, 1 mL의 TSB에 재현탁시키고, 균질화시키고, 희석시키고, 이어서 100 μ l의 균질액을 연속 희석하면서 플레이팅하였다. 검출 하한은 10 CFU/농양이었다. 도 17, 18 및 19는 9G1cNH₂-TT 항혈청을 투여받은 마우스에서, 정상 토끼 혈청을 투여받은 마우스에 비해 농양 1개당 CFU 숫자가 크게 감소한다는 것을 나타낸다. 도 20은 모든 에스. 아우레우스의 용량에서, 9G1cNH₂를 투여받은 마우스가 에스. 아우레우스 항원투여에 대해 더 양호하게 보호되었다는 것을 나타내는 도 17-19의 결과를 요약한다.

[0246] 도 21 및 22는 선행 단락에 기재된 것과 동일한 마우스 피부 농양 모델 및 과정 (단, 항원투여 균주가 2종의 추가적인 에스. 아우레우스 균주인 MN8 및 뉴만임)을 이용한 두 생체내 연구의 결과를 나타낸다. 마이크로텍스 비드 (10 g/mL)를 함유한 100 μ l의 피하 주사액 중 1 x 10⁶ CFU의 균주 MN8 (도 21) 또는 4 x 10⁶ CFU의 균주 뉴만 (도 22) (농양 1개당)으로 마우스를 감염시켰다. 도 21 및 22는 9G1cNH₂-TT 항혈청을 투여받은 마우스에서, 정상 토끼 혈청을 투여받은 마우스에 비해 농양 1개당 CFU 숫자가 유의하게 감소되었다는 것을 나타낸다.

[0247] 도 23은 9G1cNH₂-TT 접합체 백신에 대해 발생한 항혈청의 불능이 에스. 아우레우스 균주 MN8 Δ ica 및 뉴만 Δ ica의 CFU/농양을 유의하게 (P>0.05) 감소시킨다는 것을 나타낸다. 이들 2종의 균주는 ica 유전자 위치가 제거되어, 더이상 PNAG 표면 다당류를 합성할 수 없게 되었다. PNAG 항원 없이는, 9G1cNH₂ 올리고당에 대한 항체는 에스. 아우레우스 피부 감염에 대한 어떠한 보호 면역성도 제공할 수 없다.

[0248] 실시예 12. 이. 콜라이 복막염에 대한 보호 효능.

[0249] 9G1cNH₂-TT에 대한 항체의 보호 효능을 이. 콜라이 감염의 치사성 복막염 모델에서 시험하였다. NRS를 받은 대조군은 모두 생존하지 못한 데 반해, 상기 항체는 2종의 PNAG-양성 이. 콜라이 분리주 (표 1, UTI 균주 J 및 P)에 의해 유발된 감염에 대해, 면역화된 마우스 모두를 보호하였다. PNAG-음성 이. 콜라이 균주 H에 대해서는, 9G1cNH₂-TT 항혈청에 대한 항체에 의한 보호가 전혀 제공되지 않았다.

[0250] 표 1. 이. 콜라이에 의해 유발된 치사성 복막염에 대해, 9G1cNH₂-TT에 대한 항체의 보호 효능.

항원투여 이. 콜라이 균주	총 마우스 중 생존 개체수	P값 (피셔(Fisher)의 정확 검정)
	항-9G1cNH ₂ TT	NRS ^a
J (PNAG ⁺)	8/8	0/8
P (PNAG ⁺)	8/8	0/8
H (PNAG ⁻)	0/8	0/8
		0.0002
		0.0002
		1.0

[0251]

[0252] ^a NRS: 정상 토끼 혈청

[0253] 결과에 대한 논의

[0254] 완전 비-아세틸화된 합성 G1cNH₂-TT 접합체 백신을 사용하여, 동물에서 높은 수준의 옴소닌 항체 및 보호 항체를 생성하는 데 아세테이트가 전혀 요구되지 않는다는 것, 견고한 면역 반응을 위해 크기가 5개의 G1cNH₂-단량체만큼 작은 분자를 접합시키는 것으로 충분하다는 것, 및 이들 항체가 N-아세틸화된 PNAG에는 매우 쉽게 결합하고, 아세틸화된 dPNAG 및 비-아세틸화된 올리고당에는 불량하게 결합한다는 것이 본 발명에 따라 밝혀졌다. 따라서, 이들 보호 항체는, 아세틸화 수준을 비롯한 조성과 무관하게 자연 발생 PNAG에 결합할 것이다.

[0255] 본 발명은 추가로, 본 발명의 비-아세틸화된 올리고당을 비롯한 다수의 항원을 포함하는 백신을 생성하는 것을 고려한다. 반응성 술프히드릴 기를 함유하는 환원 말단 링커와 G1cNH₂-올리고머의 합성은, G1cNH₂-올리고당을 독성(virulence) 인자 및 백신 항원으로서 기능하는 미생물 단백질과 접합시킴으로써, PNAG를 생성하는 미생물을 표적으로 하는 백신을 더 효과적이게 할 수 있다는 것을 제시한다. 예를 들어, 와이. 페스티스의 LcrV 단백질은 페스트에 대한 보호를 위한 표적이나 (문헌 [Garmory et al. Vaccine 22:947-57 (2004); Overheim et al. Infect. Immun. 73:5152-9 (2005); Quenee et al. Infect. Immun. 76:2025-2036 (2008)], 중앙 아시아에서 순환하는 와이. 페스티스 균주 중에서 상기 단백질의 혈청학적 변형체가 공지되어 있는데 (문헌 [Anisimov et al. Clin. Microbiol. Rev. 17:434-464 (2004)]), 이는 이러한 균주가 단일 LcrV 백신 성분에 의해 발생하는 면역성을 회피할 수 있게 한다. 와이. 페스티스는 PNAG를 발현시키므로, G1cNH₂-올리고머를 LcrV와 접합시키는 것은 페스트 백신의 보호 범위를 증진시킬지도 모른다. 합성 버전의 dPNAG 올리고당이 상당히 저렴하게 생성될

수 있으며, 중요하게는 이는 어떠한 다른 미생물성 오염물질도 갖지 않을 것이므로, 백신 생성에 대한 상기 접근은 매력적이다.

[0256] 이들 발견은 종합적으로, 담체 단백질과 접합된 베타(1→6)-연결 글루코사민의 소형 올리고머가 높은 역가의 흡소닌 항체를 유도할 수 있으며, 또한 실험적 에스. 아우레우스 피부 감염 및 이. 콜라이로 인한 치사성 복막염에 대한 보호성이 있다는 것을 제시한다.

[0257] <동등물>

[0258] 본 발명의 몇몇 실시양태가 본원에 기재 및 예시되었다 할지라도, 당업자는 기능을 수행하고/거나 본원에 기재된 결과 및/또는 하나 이상의 이득을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 계획할 것이며, 이러한 변화 및/또는 변형 각각은 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 당업자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질 및 배열이 예시를 위한 것이며, 실제의 파라미터, 치수, 물질 및 배열은 본 발명의 교훈이 이용되는 특정 적용 또는 적용들에 따라 달라질 것임을 쉽게 인지할 것이다. 당업자는 일상적인 실험의 한도 내에서 이를 이용하여, 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태의 다수의 동등물들을 이해하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 실시양태가 단지 예로서 표시된 것이며, 본 발명에 첨부된 청구범위 및 동등물의 범위 내에서, 본 발명의 실시양태는 구체적으로 기재 및 청구된 것에 더하여 달리 실행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 명세서의 발명의 실시양태는 본원에 기재된 각각의 개별 특징, 시스템, 조항, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 둘 이상의 이러한 특징, 시스템, 조항, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은, 이러한 특징, 시스템, 조항, 물질, 키트, 및/또는 방법이 상호 모순되지 않는 경우, 본 명세서의 발명의 범위 내에 포함된다.

[0259] 본원에 정의되고 사용된 모든 정의는, 사전적 정의, 거명에 의해 포함된 문헌에서의 정의, 및/또는 정의된 용어의 통상적 의미에 걸쳐 제어하는 것으로 이해되어야 한다.

[0260] 본원에 개시된 모든 참조문헌, 특허 및 특허 출원은 거명에 의해, 각각이 인용된 주제에 관해 본원에 포함된다 (일부 경우, 문헌 전체를 포함할 수 있음).

[0261] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 부정 관사 "a" 및 "an"은 명확하게 반대로 지시되지 않은 경우, "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0262] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 어구 "및/또는"은 연합된 구성요소, 즉, 일부 경우에 접합적으로 존재하고 다른 경우에 분리적으로 존재하는 구성요소 "둘 중 하나 또는 둘 모두"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"과 함께 열거된 다수의 구성요소는 동일한 방식으로, 즉, 연합된 구성요소 중 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. 다른 구성요소는, 임의로 "및/또는" 절에 의해 구체적으로 확인되는 구성요소 이외의 것일 수 있다 (구체적으로 확인되는 구성요소와 관련이 있든지 없든지). 따라서, 비제한적인 실시예로서, "A 및/또는 B"의 언급은, 개방형(open-ended) 술어, 예컨대 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, 일 실시양태에서, A만 (임의로 B 이외의 구성요소 포함); 또다른 실시양태에서, B만 (임의로 A 이외의 구성요소 포함); 또다른 실시양태에서, A 및 B 둘 모두 (임의로 다른 구성요소 포함); 등을 지칭할 수 있다.

[0263] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 "또는"은 상기 정의된 "및/또는"과 마찬가지로 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목들을 분리하는 경우, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉, 하나 이상을 포함하는 것, 뿐만 아니라 하나 초과와 숫자 또는 구성요소의 목록, 및 임의로 열거되지 않은 추가 항목을 포함하는 것으로 해석될 것이다. 명확하게 반대로 지시되는 용어, 예컨대 "오직 하나의" 또는 "정확히 하나의", 또는 청구범위에서 사용되는 경우 "~로 이루어진"은 숫자 또는 구성요소의 목록 중 정확히 하나의 구성요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 용어 "또는"은, 배타성이 있는 용어, 예컨대 "둘 중 하나", "하나의", "오직 하나의" 또는 "정확히 하나의"가 선행되는 경우, 배타적 대안 (즉, "둘 모두가 아닌 하나 또는 다른 하나")을 제시하는 것으로만 해석될 것이다. 청구범위에서 사용되는 경우, "본질적으로 ~로 이루어진 그의 특허법 분야에서 사용되는 바와 같은 통상적 의미를 가질 것이다.

[0264] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 어구 "하나 이상"은, 하나 이상의 구성요소 목록의 언급에서, 구성요소 목록에서 구성요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 구성요소를 의미하나, 구성요소 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 모든 구성요소 중 하나 이상을 반드시 포함하는 것은 아니며, 구성요소 목록 내 구성요소의 어떠한 조합도 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 상기 정의는 또한, 어구 "하나 이상"이 지칭하는 구성요소 목록 내에서 구체적으로 확인되는 구성요소 이외의 구성요소가 임의로 존재할 수 있게 한다 (구체적으로 확인되는 구성요소와 관련이 있든지 없든지). 따라서, 비제한적인 실시예로서, "A 및 B 중 하나 이상" (또

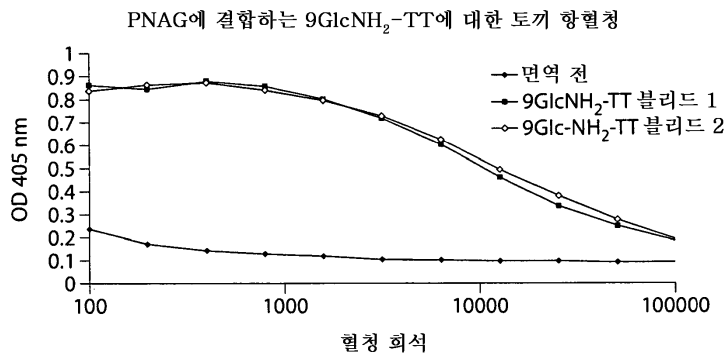
는, 동등하게 "A 또는 B 중 하나 이상", 또는 동등하게 "A 및/또는 B 중 하나 이상")은, 일 실시양태에서, 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 A (B는 존재하지 않음) (및 임의로 B 이외의 구성요소 포함); 또다른 실시양태에서, 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 B (A는 존재하지 않음) (및 임의로 A 이외의 구성요소 포함); 또다른 실시양태에서, 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 A 및 하나 이상 (임의로 하나 초과 포함)의 B (및 임의로 다른 구성요소 포함); 등을 지칭할 수 있다.

[0265] 또한, 명확하게 반대로 제시되지 않는다면, 하나를 초과하는 단계 또는 작용을 포함하는 본원에 청구된 임의의 방법에서, 상기 방법의 단계 또는 작용의 순서는, 반드시 상기 방법의 단계 또는 작용이 열거된 순서로 한정되지는 않는다.

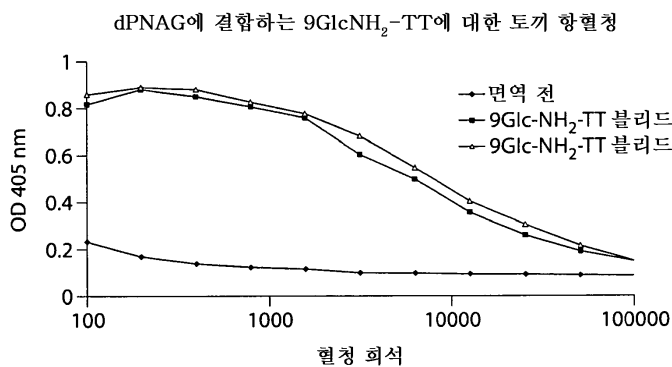
[0266] 상기 명세서에서와 마찬가지로, 청구범위에서 모든 연결구, 예컨대 "포함하는", "포함하는", "유지하는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "보유하는", "~로 구성된" 등은 개방형인 것으로, 즉, 포함하나 그에 한정되지는 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 미국 특허청 특허 심사 절차 매뉴얼, 제2111.03항에 명시된 바와 같이, 연결구 "~로 이루어진" 및 "본질적으로 ~로 이루어진"만이 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 연결구일 것이다.

도면

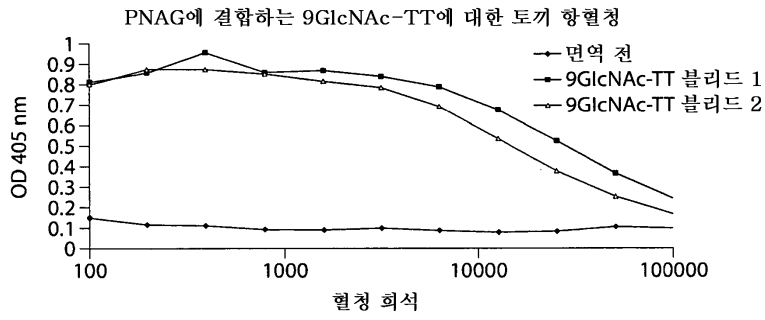
도면1a



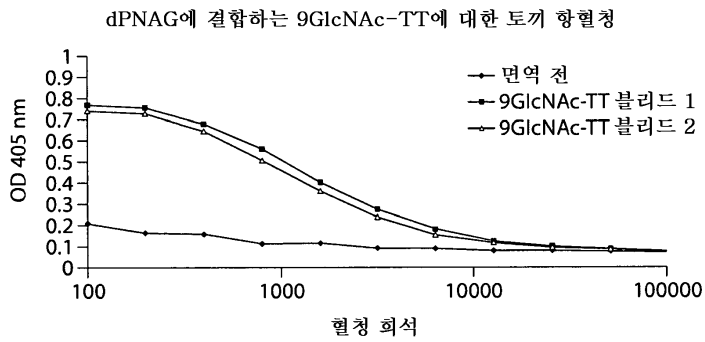
도면1b



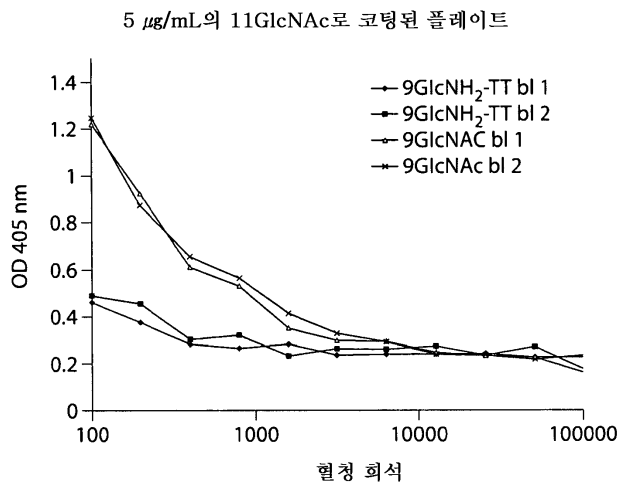
도면2a



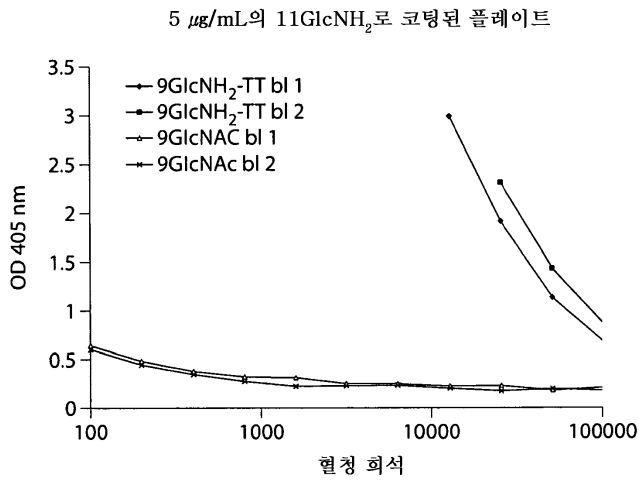
도면2b



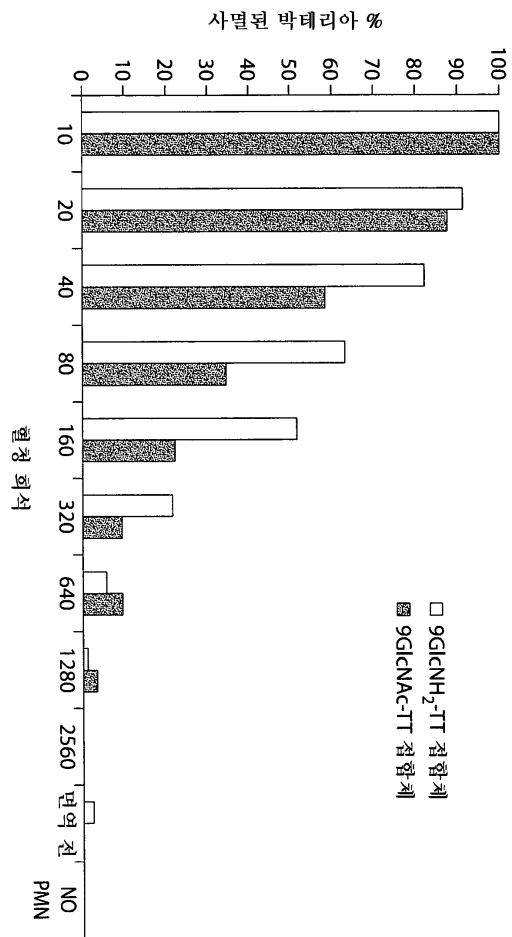
도면3a



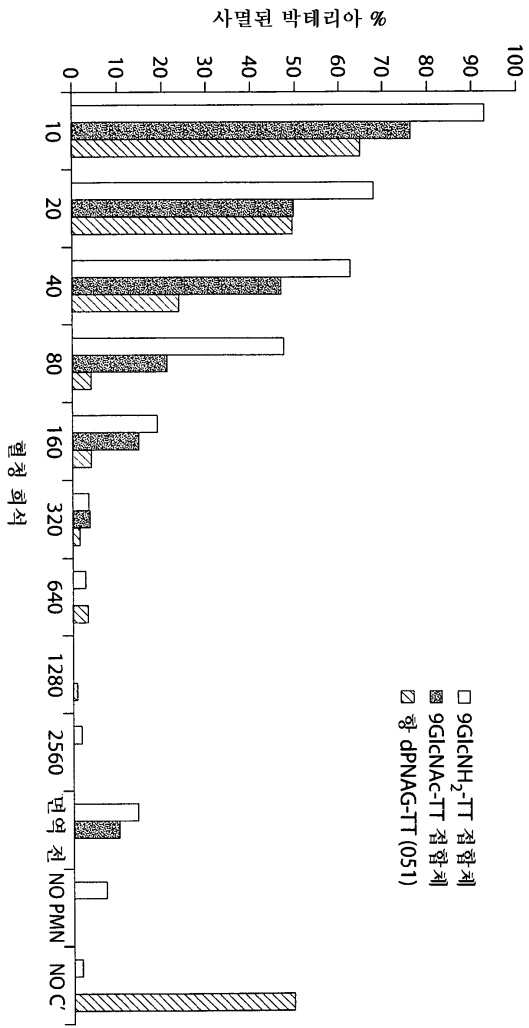
도면3b



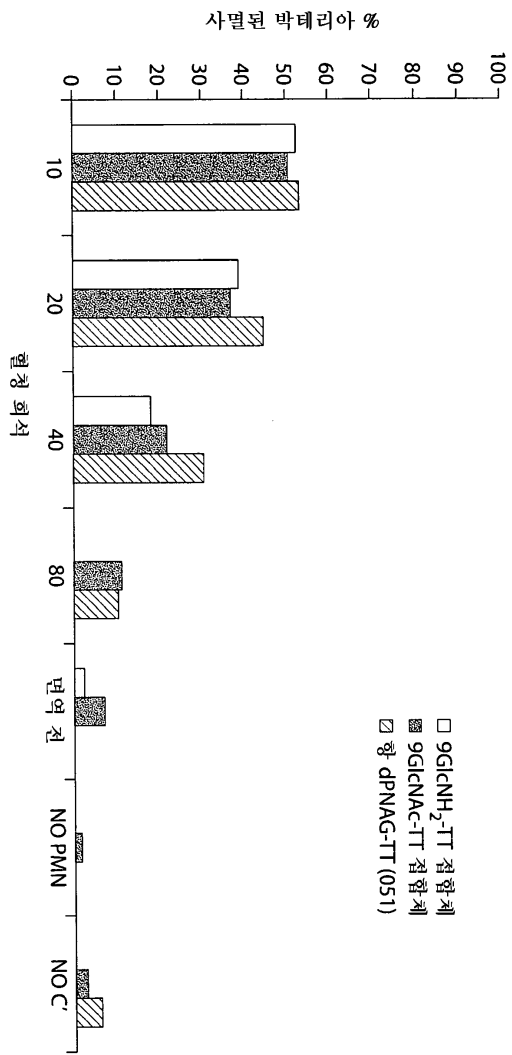
도면4



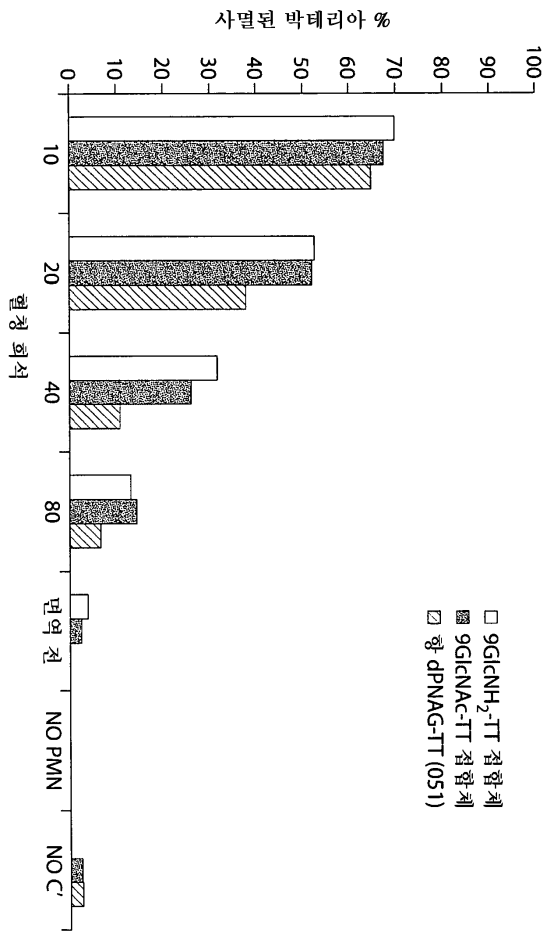
도면5



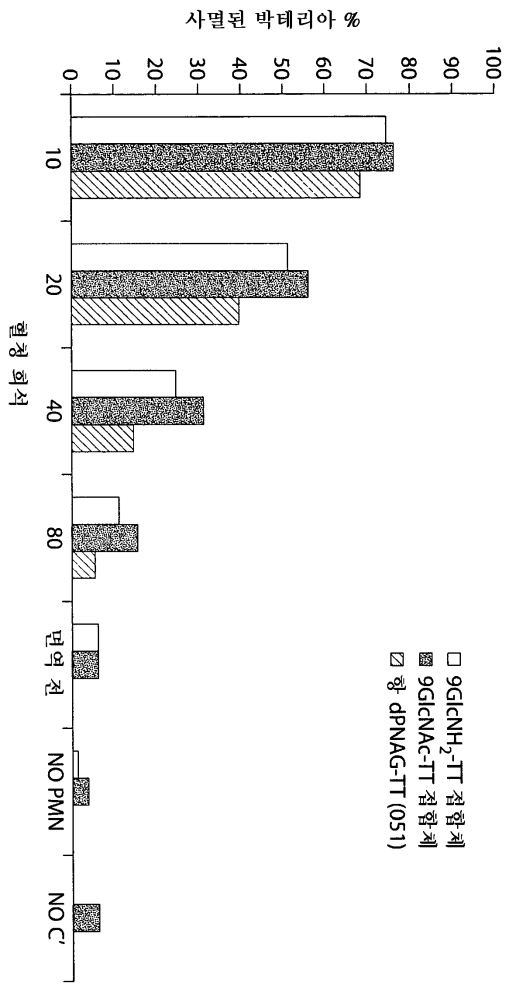
도면6



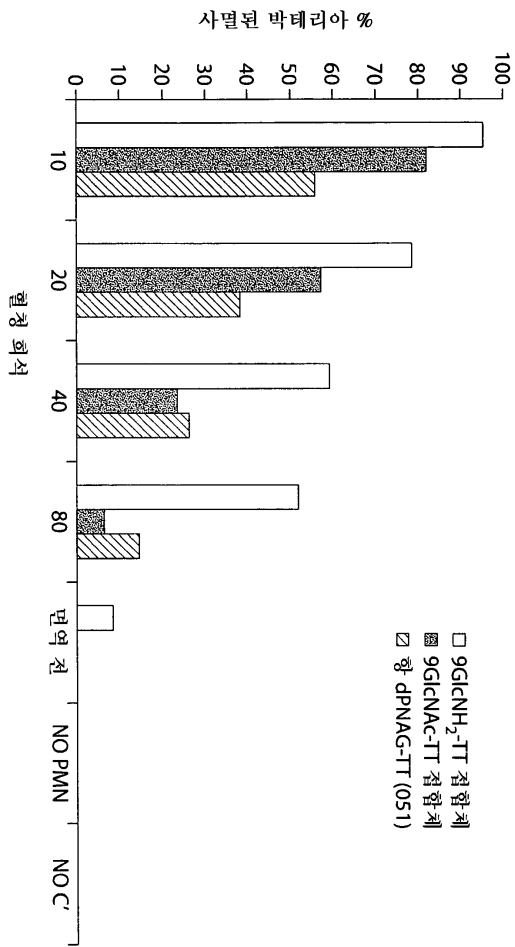
도면7



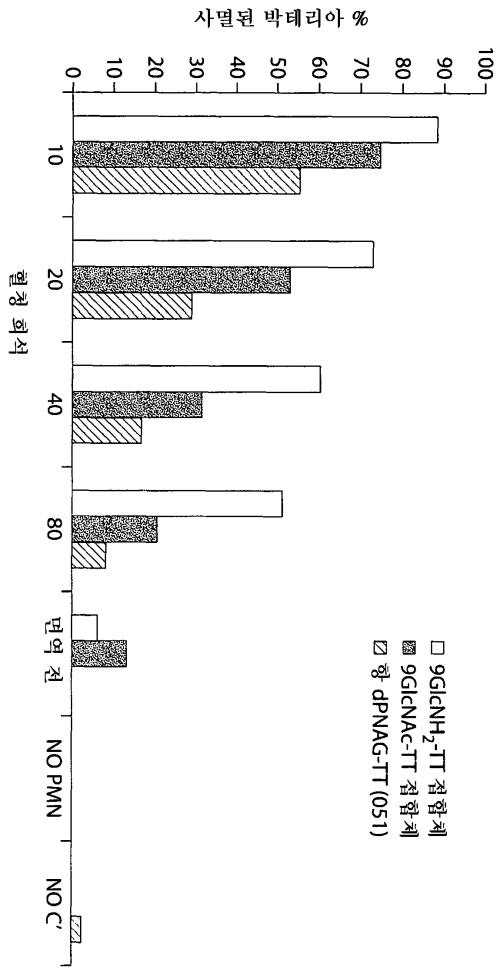
도면8



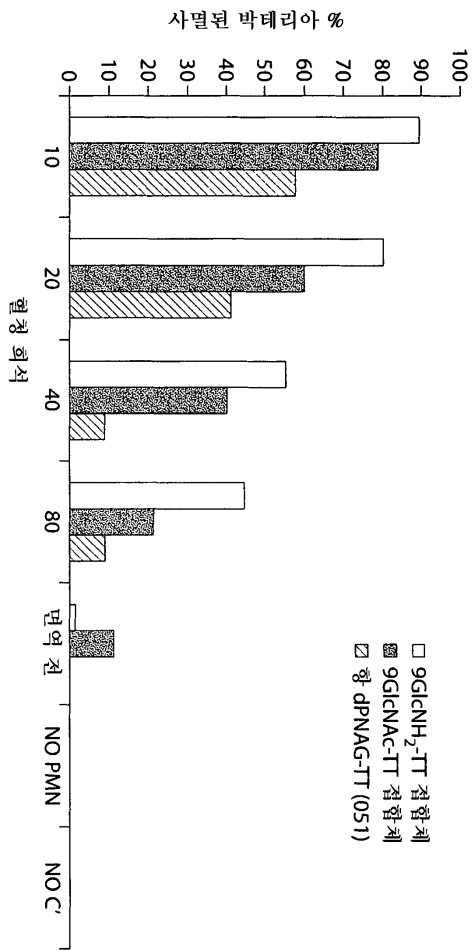
도면9



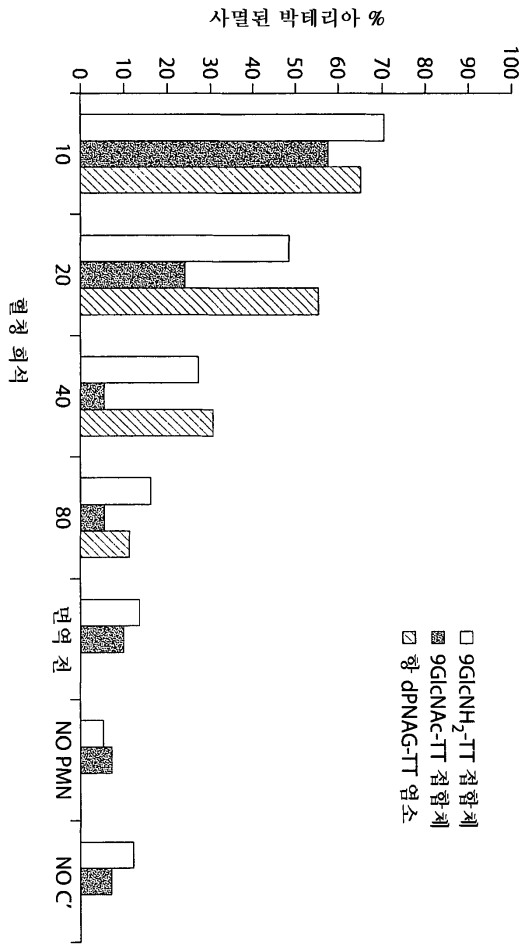
도면10



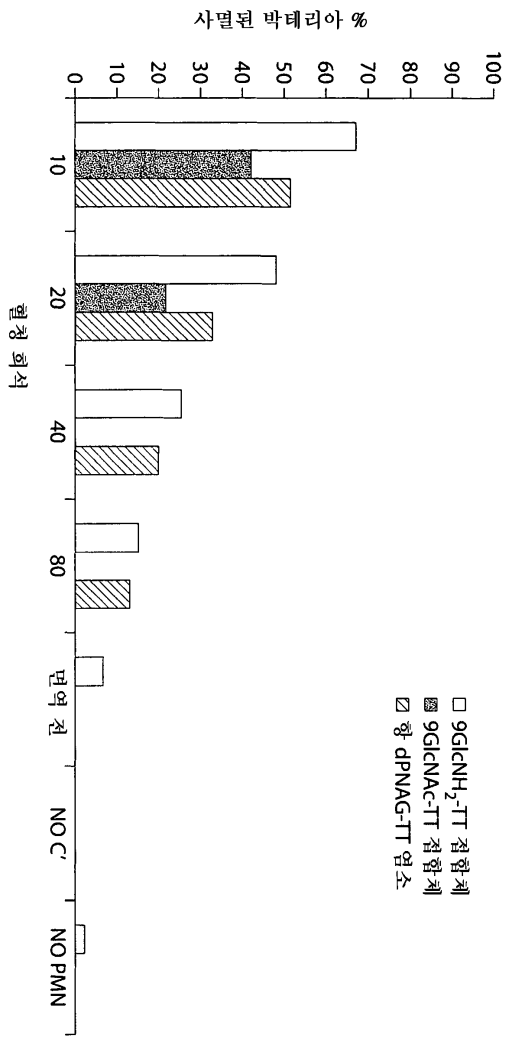
도면11



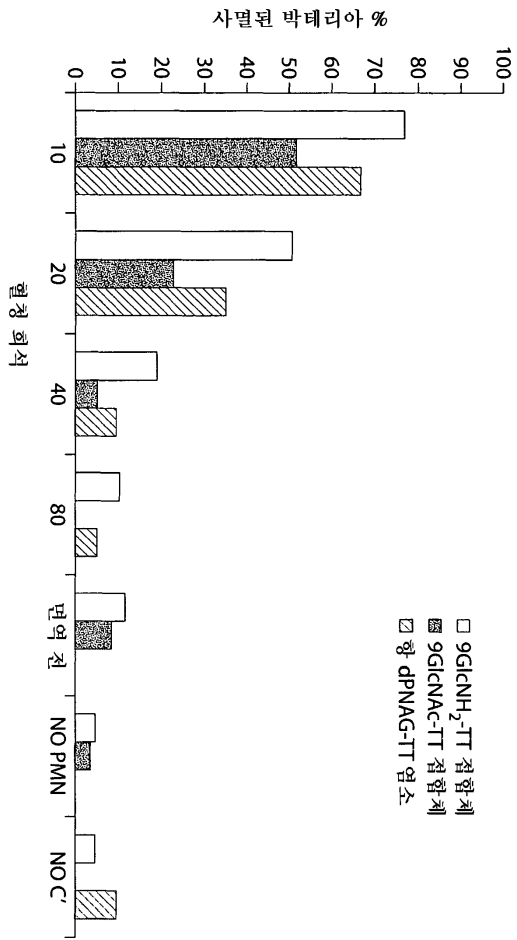
도면12



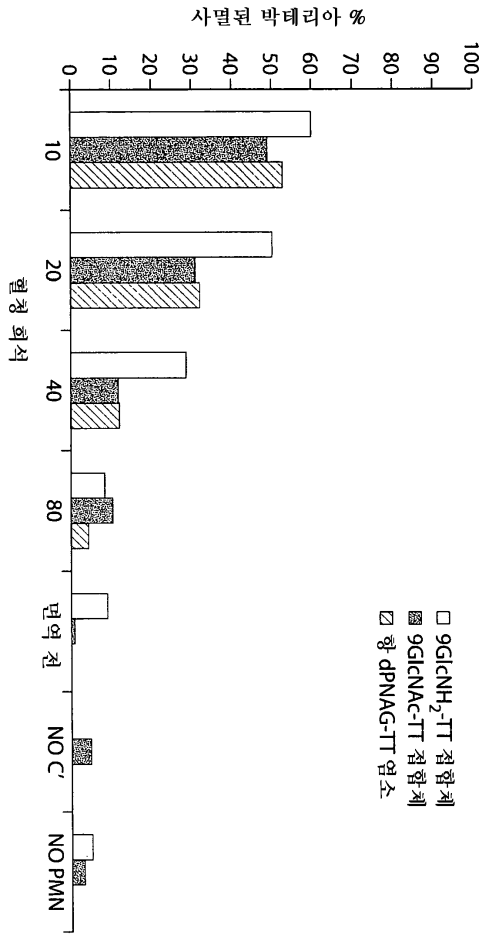
도면13



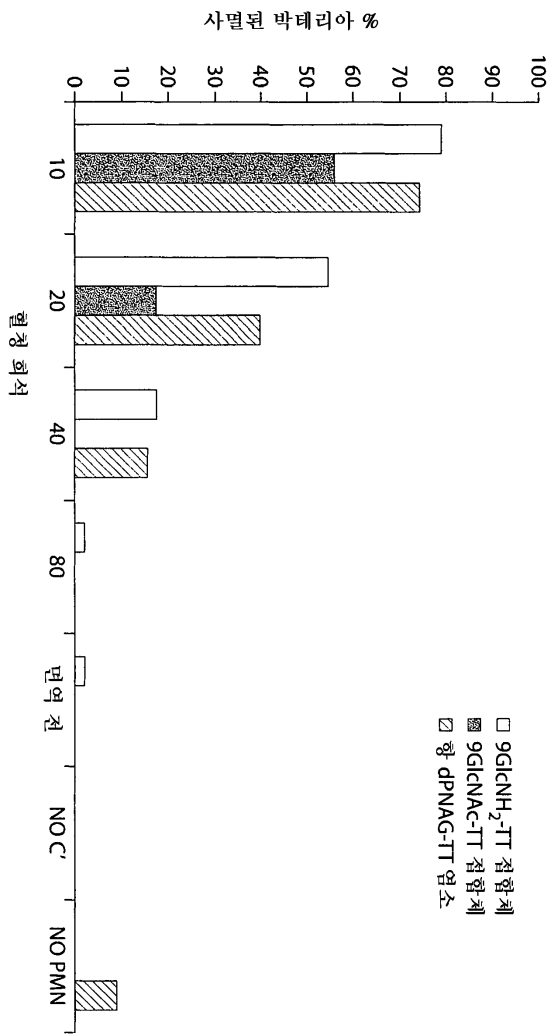
도면14



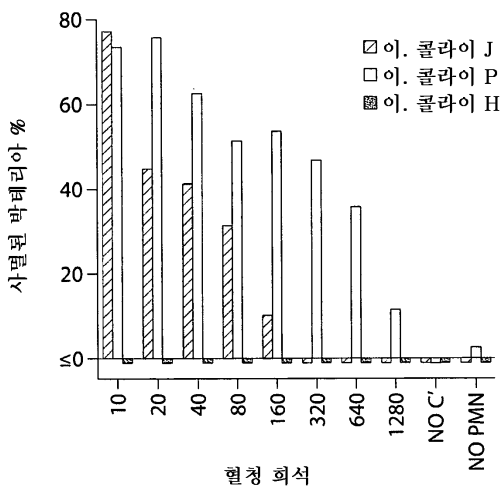
도면15



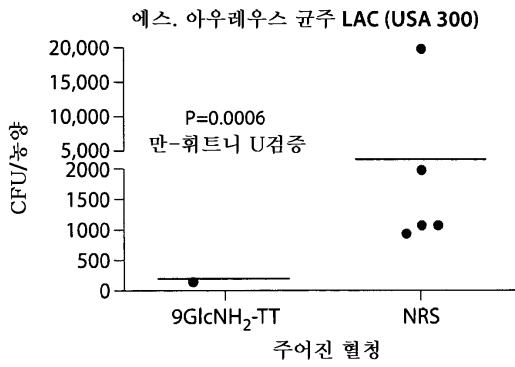
도면16



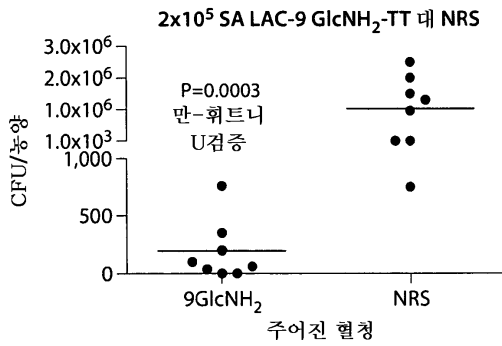
도면16a



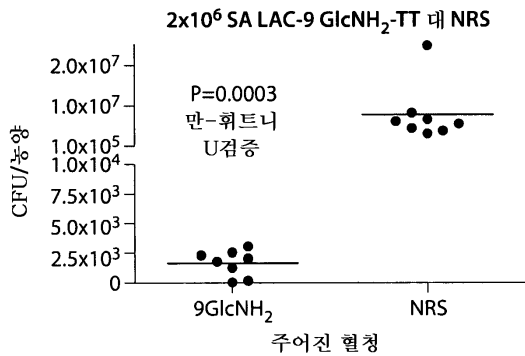
도면17



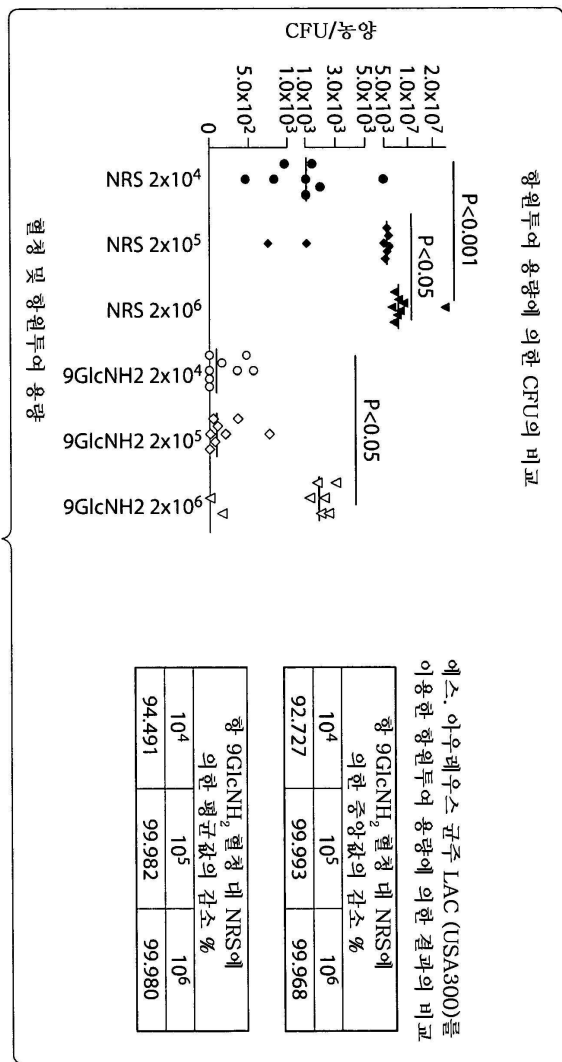
도면18



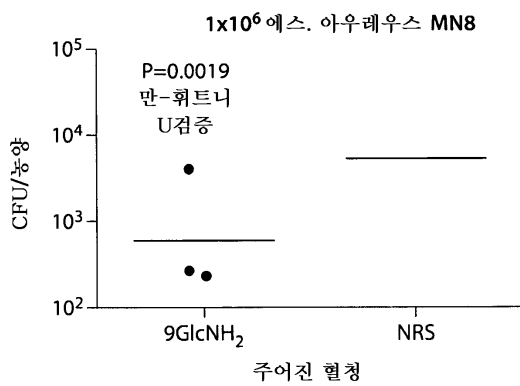
도면19



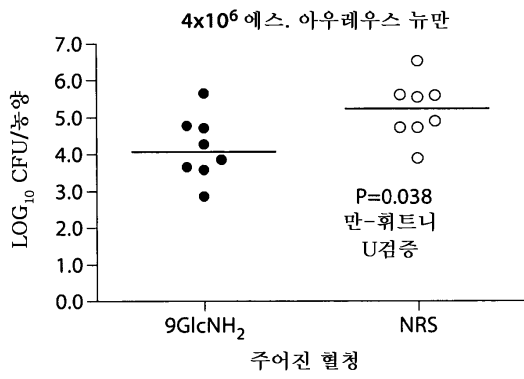
도면20



도면21



도면22



도면23

