



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 47/48 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년04월25일 10-0593466 2006년06월19일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1998-0707414	(65) 공개번호	10-2000-0064696
(22) 출원일자	1998년09월18일	(43) 공개일자	2000년11월06일
심사청구일자	2002년12월17일		
번역문 제출일자	1998년09월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1998/000654	(87) 국제공개번호	WO 1998/31393
국제출원일자	1998년01월21일	국제공개일자	1998년07월23일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘,

AP ARIPO특허 : 케냐, 가나, 감비아, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 오스트리아, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국,

(30) 우선권주장                    97100884.2                    1997년01월21일                    유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자                    파스티르 메리오 세룸 에 박신  
프랑스공화국 F-69007 리용, 아베뉴 레콜레르, 58

(72) 발명자                    모뤼 모니끄  
프랑스공화국 F-69007 리용, 뤼 가리발디, 324

미스뜨레따 노멜르  
프랑스공화국 F-69210 쌍-벨, 케민 드 뷔리에

(74) 대리인                    백남훈

심사관 : 신영신

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 다당류-펩타이드접합체

(57) 요약

본 발명은 다당류-펩타이드 접합체에 관한 것으로서, 상기 다당류는 효과적인 면역원이고, 이는 최소 4개의 반복단위를 포함하는 다당류 사슬 및 복수개의 펩타이드 부분으로 구성되어 있으며, 상기 펩타이드 부분 각각은 시스테인 잔기를 포함하고, 다당류 사슬을 따라 무작위적으로 공유결합되어 있으며, 상기 공유결합은 시스테인 잔기의 티올기 및 다당류의 아미노, 하이드록실 또는 카복실기가 포함하는 간접적 결합이고, 상기 간접적 결합은 링커, 또는 스페이서-링커 부분의 스페이서가 다당류의 아미노, 하이드록실 또는 카복실기에 연결된 경우에는 스페이서-링커 부분에 의해 이루어진다. 본 발명의 목적을 위하여 상기 유용한 링커는 예를 들어, N-( $\gamma$ -말레이미도부티릴옥시) 석신이미드에스테르이다. 상기 접합체는 전형적으로 "갈퀴" 형상을 갖는다. 또한, 접합 방법이 개시된다. 본 발명의 접합체는 면역원성 다당류를 갖는 병원성 미생물에 대한 보호적 장기 면역반응을 야기하는 백신분야에 특히 유용하다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

다음을 포함하며 다당류가 면역원성을 나타내는 다당류-펩타이드 접합체:

- (i) 시스테인 잔기를 포함하며, 6 ~ 200개의 아미노산 잔기를 포함하고, T-세포 의존 에피토프를 포함하는 펩타이드 부분;
- (ii) 4 ~ 3000개의 반복단위를 포함하는 다당류 사슬; 및
- (iii) 링커부분으로서 펩타이드의 시스테인 잔기의 티올기에 결합하고, (a) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노기, 하이드록실기 또는 카복실기에 결합하며, 또는 (b) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 N-아실기의 가수분해에 의해 형성된 아미노기에 결합하거나, 또는 (c) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노기, 하이드록실기 또는 카복실기에 결합한 스페이서 부분의 유도체화에 의해 다당류에 도입된 작용기에 결합하되,

링커 부분은 화학식(I) RI-A-R2(RI은 티올기와 반응할 수 있는 반응기로서 티올기,  $\alpha, \beta$ -불포화 카보닐기 또는 이미딜기, 아실할로젠 또는 알킬할라이드이며, 상기 A는 탄소수 2 ~ 8개의 알킬렌, 페닐렌, 탄소수 7 ~ 12개의 아랄킬렌, 탄소수 2 ~ 8개의 알킬, 페닐, 탄소수 7 ~ 12개의 아랄킬, 탄소수 6개의 알카노일옥시 및 벤질카보닐옥시 중에서 선택되는 어느 하나의 방향족 또는 지방족 사슬로서 상기 알킬 알킬, 페닐, 알킬렌 및 페닐렌은 치환되거나 치환되어 있지 않은 것이고, 그리고 R2는 다당류의 작용기와 반응할 수 있는 아미노기, 카바모일기, 아미노카바모일기, 카복실기, 하이드록실기, 석시니이미딜기, 설포석시니이미딜기 및 아미노기를 포함하는 작용기 중에서 선택되는 어느 하나의 작용기)로 나타내고,

스페이서 부분은 화학식(II) R3-B-R4(R3은 아미노, 카복실 또는 하이드록실기와 반응할 수 있는 작용기이며, B는 카보닐, 탄소수 1 ~ 12개의 알킬, 탄소수 1 ~ 12개의 알킬렌 및 탄소수 1 ~ 12개의 다이카보닐 중에서 선택되는 어느 하나의 지방족 사슬이고, R4는 링커의 R2와 반응하는 아미노기 및 아미노기를 포함하는 작용기 중에서 선택되는 어느 하나의 작용기)로 나타낸다.

### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 시스테인 잔기를 포함하며 10 ~ 150개 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체.

### 청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 펩타이드는 시스테인 잔기를 포함하며 15 ~ 100개 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체.

### 청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 펩타이드는 시스테인 잔기를 포함하며 20 ~ 50개 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 시스테인 잔기는 펩타이드 부분의 N-말단 또는 C-말단에 위치되어 있는 것을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 다당류는 박테리아 지질다당류의 O-특이성 사슬, 탈 독성 박테리아 지질다당류, 및 캡슐 다당류로부터 선택되는 천연 다당류인 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 다당류는 조절된 산화성 가수분해 또는 염기성 가수분해에 의해 N-아세틸기를 포함하는 천연 다당류로부터 유래되는 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 8.

제 7 항에 있어서, 상기 다당류는 캡슐 다당류로부터 선택되는 천연 다당류로부터 유래되는 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 다당류는 4 ~ 1000개의 반복단위로 구성된 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 10.

제 9 항에 있어서, 상기 다당류는 7 ~ 700개의 반복단위로 구성된 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 11.

제 1 항에 있어서, 상기 접합체는 반복단위 50몰에 대해 펩타이드 1몰(1:50)에서부터 반복단위 1몰에 대해 펩타이드 1몰(1:1)까지 포함하는 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 12.

제 11 항에 있어서, 상기 접합체는 반복단위 30몰에 대해 펩타이드 1몰(1:30)에서부터 반복단위 3몰에 대해 펩타이드 1몰(1:3)까지 포함하는 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 13.

제 15 항에 있어서, 상기 접합체는 반복단위 20몰에 대해 펩타이드 1몰(1:20)에서부터 반복단위 5몰에 대해 펩타이드 1몰(1:5)까지 포함하는 것임을 특징으로 하는 접합체.

#### 청구항 14.

청구항 1, 청구항 2 내지 청구항 5, 청구항 6 내지 청구항 8 및 청구항 9 내지 청구항 13 중에서 선택되는 어느 한 항의 접합체 및 약제학적으로 수용 가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 15.

펩타이드를 시스테인 잔기의 티올기를 통해 링커에 커플링하는 과정 및 다당류를 (a) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노, 하이드록실 또는 카복실기를 통해, 또는 (b) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 N-아실기의 가수분해에 의해 형성된 아미노기를 통해, 또는 (c) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노, 하이드록실 또는 카복실기에 결합된 스페이서 부분에 의한 유도체화 반응에 따라 다당류 사슬에 도입된 작용기를 통해, 상기 링커에 결합하는 커플링 과정을 포함하며, 상기 펩타이드는 6 ~ 200개의 아미노산을 가지며 T-세포 의존 에피토프를 포함하고, 상기 면역원성 다당류 사슬은 4 ~ 3000개의 반복단위를 포함하고,

링커 부분은 화학식(I) R1-A-R2(R1은 티올기와 반응할 수 있는 반응기로서 티올기,  $\alpha,\beta$ -불포화 카보닐기 또는 이미딜기, 아실할로젠 또는 알킬할라이드이며, 상기 A는 탄소수 2 ~ 8개의 알킬렌, 페닐렌, 탄소수 7 ~ 12개의 아랄킬렌, 탄소수 2 ~ 8개의 알킬, 페닐, 탄소수 7 ~ 12개의 아랄킬, 탄소수 6개의 알카노일옥시 및 벤질카보닐옥시 중에서 선택되는 어느 하나의 방향족 또는 지방족 사슬로서 상기 알킬 알킬, 페닐, 알킬렌 및 페닐렌은 치환되거나 치환되어 있지 않은 것이고, 그리고 R2는 다당류의 작용기와 반응할 수 있는 아미노기, 카바모일기, 아미노 카바모일기, 카복실기, 하이드록실기, 석시니이미딜기, 설포석시니이미딜기 및 아미노기를 포함하는 작용기 중에서 선택되는 어느 하나의 작용기)로 나타내고,

스페이서 부분은 화학식(II) R3-B-R4(R3은 아미노, 카복실 또는 하이드록실기와 반응할 수 있는 작용기이며, B는 카보닐, 탄소수 1 ~ 12개의 알킬, 탄소수 1 ~ 12개의 알킬렌 및 탄소수 1 ~ 12개의 다이카보닐 중에서 선택되는 어느 하나의 지방족 사슬이고, R4는 링커의 R2와 반응하는 아미노기 및 아미노기를 포함하는 작용기 중에서 선택되는 어느 하나의 작용기)로 나타내는 것을 특징으로 하는 다당류-펩타이드 접합체의 제조방법.

#### 명세서

##### 기술분야

본 발명은 다당류-펩타이드 접합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 상기 접합체의 다당류로서 박테리아 또는 균류의 다당류를 이용함으로써 백신 용도로 유용한 다당류-펩타이드 접합체에 관한 것이다.

##### 배경기술

다당류는 다양한 분야에 이용되는 고분자를 구성하는 바, 어떠한 경우에 있어서, 이는 단백질과 같은 폴리펩타이드 또는 펩타이드와 커플링됨을 요구한다. 예를 들어, 다당류는 진단에 이용되거나, 펩타이드 시약에 대한 매트릭스 미디엄으로서 정제기술에 이용되기도 한다. 텍스트란과 같은 비항원성 다당류는 유럽특허 제 326,111호에 개시된 것과 같은 면역계에 작은 펩타이드를 제시하는데 유용하다. 요컨대, 펩타이드는 단백질 운반자에 연결되어야 하거나, 보조약(adjuvant)과 함께 투여되어야 하는 바, 가장 일반적으로 이용되는 보조약(adjuvant)은 알루미늄 화합물이다. 한편, 상기 보조약(adjuvant)과 함께 혼합, 흡착 또는 침전되는 작은 펩타이드는 알루미늄 겔에 의해 저해를 받으므로 면역계에 유용하지 않다. 상기 문제점을 극복하기 위하여 유럽특허 제 326,111호는 비항원성 다당류에 접합되어 있는 펩타이드를 제시하고 있는 바, 상기 접합체는 알루미늄 화합물의 존재시에도 펩타이드 부분에 대한 면역반응을 야기할 수 있다.

백신 분야에서, 펩타이드 또는 단백질과 접합한 다당류는 항원성 다당류로서 매우 관심이 집중되는 부분이며, 이는 다당류에 대한 면역반응을 수행한다. 요컨대, 박테리아의 캡슐 및 세포벽(및 균류의 세포벽)은 필수적으로 다당류로 이루어져

있고, 상기 다당류는 특이한 반복단위로 구성되어 있으며, 상기 반복단위는 에피토프를 포함하고, 이는 일반적으로 포유동물에서는 발견되지는 않으나 면역원성을 나타낸다. 따라서, 캡슐 다당류와 같은 다당류는 수막염, 폐렴 및 장티푸스와 같은 박테리아 유래의 질병에 대해 백신으로서 이용되고 있다.

한편, 백신으로서 다당류를 이용하는 경우에는 중요한 문제가 있다. 상기 다당류는 항원성, 즉 포유동물 등에게 투여한 경우에 미약하나마 면역반응을 야기하지만, 이는 T-세포의 도움없이 B-세포의 생산을 야기할 수 있는 매우 특이한 항원이다. 이에, 상기 다당류의 항원적 특성을 T-세포 독립적이라 한다.

T-세포 독립항원에 의해 야기되는 면역반응은 다음과 같은 특징을 갖고 있다:

- (i) 1차 반응은 T-세포 의존항원보다 미약하지만 보다 조기에 이루어지고;
- (ii) 항체 반응은 친화도가 증가함에 따라 T-세포 의존항원에서 관찰되는 바와 같은 IgG 고생산 단계로 성숙되지 않으며;
- (iii) T-세포 독립항원에 대한 면역 기억은 미약하고, 면역 기억은 백신작용의 기초를 이루는 2차 면역반응의 중요한 요소인 바, T-세포 독립항원은 장기간 면역반응을 유도하는데에는 열악한 항원이고; 그리고
- (iv) 1세 또는 2세 이전의 유아의 경우에는 다당류에 반응하지 못한다.

2차 면역반응을 유도하기 위해서는, T-세포 독립항원은 T-세포 의존항원의 성질을 부여하는 디프테리아독소, 파상풍독소와 같은 운반단백질에 공유결합되어 있어야 한다. 상기 접합체는 보조약(adjuvant)에 의해 보충되고, 상기 보조약(adjuvant)은 알루미늄 화합물 또는 완전 또는 불완전 프로인트 보조약(adjuvant) (후자 2개의 보조약(adjuvant)은 인간을 제외한 포유동물에 배타적으로 이용됨)가 있는 바, 이에 의해 면역반응이 강화된다(애주번트(adjuvant)효과).

"운반자"는 다당류와 같은 항원과 공유결합되는 물질로서, T-세포 의존반응을 촉진시킨다. 상기 반응은 항원-운반자 접합체의 최소 2회 투여, 즉 며칠, 몇주 또는 몇월 간격의 2회 투여(촉발 및 상승)로 구성되는 백신투여 계획에 따라 나타난다. 첫 접종(촉발)의 경우 약한 항체반응이 관찰되고, 상승 접종에서 항체반응이 높은 수준까지 일어난다. 상기 상승된 반응은 접합되지 않은 항원으로 구성된 대조군에서는 관찰되지 않는다.

한편, 다양한 접합방법이 당업계에 이미 공지되어 있다. 일반적으로 상기 접합에 관여하는 다당류의 작용기는 다당류의 반복단위에 위치하는 아미노, 카복실 또는 하이드록실기가 있으며, 또는 다당류의 말단 또는 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 알데히드기가 있다. 종종 상기 접합에 관여하는 다당류의 작용기는 아미노산 결사슬 또는 말단에 있는 아미노기 또는 카르복실기 또는 티올기가 있다.

일반적으로, 다당류 접합체는 3가지 구조를 나타내는 바, 이는 결합에 관여하는 다당류의 작용기(사슬을 따라 놓여 있거나 말단에 있는 것) 및 운반자의 위치에 따라 결정된다. 상기 3가지 구조는 "태양" 또는 "귀", "갈퀴" 및 "격자" 형으로 불리며, 이는 도 1에 도시되어 있는 바, (A)는 "태양" (신 당접합: neoglycoconjugate), (B)는 "갈퀴" 및 (C)는 "격자" 를 각각 나타낸다.

"태양" 형에 있어서, 다당류는 다당류 사슬의 말단에 위치한 반응기를 통하여 단백질 또는 펩타이드화 결합되어 있는 바, 이는 종종 다당류 사슬의 말단에 위치한 카보닐기를 포함한다. 여러 다당류 사슬이 단백질에 결합하는 바, 이 결합에는 보통 라이신 잔기 등에 의해 운반되는 아미노기가 관여한다. 상기 접합체는 신 당접합이라 불리기도 한다. 한편, 상기 접합체의 예로서는 Alonso de Velasco et al., *Infect. Immun.*, 63, 961(1995); Paradiso et al., *Vaccine Research*, 2(4), 239 (1993); 및 Jennings, 미합중국 특허 제 4,356,170호가 있다.

"갈퀴" 형에 있어서, 펩타이드는 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 작용기에 결합되어 있다. 상기 접합체의 예로서는 Lett et al., *Infect. Immun.*, 62, 785(1994); Lett et al., *Infect. Immun.*, 63, 2645(1995); 및 Konen-Waisman et al., *J. Immunol.*, 5977(1995)가 있다. 상기 결합에는 펩타이드 서열내에 있는 라이신 잔기의 아미노기 및/또는 말단 아미노기에 의해 이루어진다.

"격자" 형에 있어서, 단백질 및 다당류는 가교결합을 한다. 상기 결합은 단백질을 따라 놓여 있는 아미노기 또는 산기, 그리고 다당류를 따라 놓여 있는 반응기에 의해 달성된다. 상기 접합체는 Anderson 미합중국 특허 제 4,673,574호에 개시되

어 있으며, Schneerson et al., J. Exp. Med., 152, 361(1980)에는 "격자" 형의 제조방법이 개시되어 있고, 이는 CNBr 및 링커로서 아디프산다이하이드라지드(ADH)를 이용한다. 다당류 사슬을 따라 놓여 있는 하이드록실기 및 단백질의 결사슬 아미노기가 관여한다.

상기 구조 각각은 다양한 접합방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 결합은 직접적으로 이루어질 수 있는 바, 그 예로서는 Anderson 미합중국 특허 제 4,673,574호; Jennings 미합중국 특허 제 4,356,170호; Lett et al. 또는 Konen-Waisman et al.이 있다. 또한 상기 결합은 Schneerson et al에 의해 개시된 링커분자를 이용하여 간접적으로 이루어질 수도 있다. 상기 링커와 더불어, 스페이서가 Alonso de Valesco et al. 또는 Paradiso et al.에서 폐렴균 다당류에 이용되었다. 다당류, 단백질, 링커 또는 선택적인 스페이서에 있는 다양한 작용기가 관여한다.

상기 인용된 선행기술을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다:

상기한 Alonso de Valesco et al.의 경우, 약 20개의 아미노산 잔기의 펩타이드로 구성되어 있는 운반자가 개시되어 있는 바, 이의 양 말단에는 시스테인 잔기가 있다. 우선, *Streptococcus pneumoniae* 17F 다당류는 NaCNBH<sub>3</sub>의 존재하에 다이아미노프로판에 의해 환원성 아미노화반응에 따라 환원성 말단으로 변형된다. 이어, 상기 변형된 다당류는 링커로서의 N-석시니미딜브로모아세테이트에 의해 브로모아세틸화되고, 이렇게 활성화된 다당류는 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단 시스테인 잔기의 티올기와 커플링되어, 단독-말단 접합체가 수득된다.

상기한 Lett et al(1994)의 경우에는 우선, *S. mutans* 또는 *Saccharomyces cerevisiae* 다당류가 페이오데이트에 의해 산화됨으로써 다당류 사슬을 따라 알데히드기가 형성된다. 이어, 상기 산화된 다당류는 NaCNBH<sub>3</sub>의 존재하에 환원성 아미노화반응에 의해 펩타이드와 직접적으로 커플링된다.

상기한 Paradiso et al의 경우에는 두가지 다당류가 이용된다: 폐렴균 다당류 및 Haemophilus influenza의 폴리리비톨 프스페이트(PRP). 상기 폐렴균 다당류의 산화성 가수분해에 의해 다당류 사슬의 말단에 알도스기가 형성된다. 이어, 피리딘 보란의 존재하에서 다이아미노메틴에 의해 환원성 아미노화반응에 따라 사슬의 말단에 아미노기가 도입된다. 그런 다음, 상기 변형된 다당류는 아디프산의 석시니미딜 다이에스테르에 의해 활성화되며, 단백질 또는 펩타이드의 아미노기에 커플링된다: 상기 PRP의 경우에는 우선, 페이오데이트에 의해 산화성 절단이 이루어지고, 알데히드기가 양 말단에 형성된다. 이어, 산화된 PRP는 단백질 및 펩타이드의 아미노기에 커플링된다. 상기 두 경우에 있어서, "태양" 구조가 형성된다.

상기한 Konen-Waisman et al의 경우, Vi 다당류 및 펩타이드(시스테인 잔기를 포함하지 않음) 또는 단백질은 (3-다이메틸아미노프로필)-3-에틸 카보다이이미드하이드로클로라이드(EDAC)의 존재하에 직접적으로 커플링된다: 다당류의 카복실기 및 단백질 또는 펩타이드의 아미노기가 상기 커플링에 관여한다. 결과적으로, 단백질이 이용되는 경우에는 "격자" 구조가 형성된다. 펩타이드가 이용되는 경우에는 그 구조는 아미노기를 포함하고 있는 아미노산 잔기의 수에 따라 결정되는 바, "격자" 구조 또는 "갈퀴" 구조가 형성된다.

접합반응이 다당류에 있는 작용기가 모두 참여하고, 운반자가 단백질인 경우에는(단백질의 아미노기 또는 카복실기가 결합에 참여함) 가교성 접합체가 형성된다. 다당류 운반자가 하나의 결합자리를 갖는 경우에는 이에 의한 접합체는 "갈퀴" 구조를 형성한다(다당류가 몇 개의 결합자리를 갖으며, 다당류의 하나의 작용기만 반응하도록 폐쇄되고 엄격한 조건에서 접합반응이 일어나는 경우에도 상기 구조가 형성된다). 접합방법이 천연 다당류(또는 이의 단편)의 카복실기 또는 아미노기를 이용하는 경우에 있어서, "갈퀴" 구조를 얻기 위해서는 상기 단편은 작아야 하는 바, 이는 카복실기 또는 아미노기가 다당류에서 흔히 있는 작용기이기 때문이다.

상기 "갈퀴" 구조를 용이하게 제조할 수 있는 신규 접합 방법을 개발하였는 바, 이는 시스테인 잔기의 티올기를 이용한다. 상기 시스테인 잔기는 라이신 및 아스파르트산보다 단백질에 덜 포함된 것이기 때문에 상기 신규 방법은 보다 큰 펩타이드에 유용하다.

### 발명의 상세한 설명

운반자로서 펩타이드는 단백질보다 여러 가지 이점을 갖고 있는 바, 이는 용이하게 정제된다는 것, 또는 용이하게 합성되는 것 및 이를 위하여 보다 정제되고 한정될 수 있다는 것이다. 유해한 성질(독성)을 갖는 단백질 운반자와는 다르게 펩타이드는 단지 운반자의 특성만 갖도록 단백질로부터 제조할 수 있다.

한편, 당업계에서 공지된 다당류-펩타이드 접합체는 이에 대응하는 다당류-단백질 접합체보다 면역원성이 약하고, 보조약(adjuvant)을 필요로 하는 문제점이 있다. 한편, 본 발명 신규 방법에 의해 제조된 다당류-펩타이드 접합체는 우수한 면역원성을 갖는 바, 이는 펩타이드 부분이 충분히 크기 때문이다.

따라서, 본 발명은 다음을 포함하는 우수한 면역원성을 갖는 다당류-펩타이드 접합체에 관한 것이다:

(i) 최소 6개의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 아미노산 잔기중 최소 하나는 시스테인 잔기인 펩타이드 부분;

(ii) 최소 4개의 반복단위를 포함하는 다당류 사슬; 및

(iii) 링커부분으로서 이는 시스테인 잔기에 결합하고, (a) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노기, 하이드록실기 또는 카복실기에 결합하며, 또는 (b) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 N-아실기의 가수분해에 의해 형성된 아미노기에 결합하거나 또는 (c) 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노기, 하이드록실기 또는 카복실기에 결합한 스페이서 부분의 유도체화에 의해 다당류에 도입된 작용기에 결합한다.

상기 아미노, 하이드록실 또는 카복실기는 반복단위에서 발견되며, 이에 따라 다당류 사슬을 따라 놓여져 있기 때문에 본 발명의 접합체는 상술한 바와 같이 같귀 구조를 갖는다. 따라서, 본 발명의 접합체에 대한 택일적 및 등가적 정의는 다음과 같다:

다르게 언급된 바가 없으면, 본 발명의 접합체는 반복단위를 포함하는 다당류 사슬 및 복수개의 펩타이드 부분을 포함하며, 상기 펩타이드 각각의 부분은 하나의 시스테인 잔기를 포함하고, 다당류 사슬을 따라 무작위적으로 공유결합되어 있으며, 상기 공유결합은 시스테인 잔기의 티올기 및 다당류의 아미노, 하이드록실 또는 카복실기가 포함하는 간접적 결합이고, 상기 간접적 결합은 링커 또는 스페이서-링커 부분의 스페이서가 다당류의 아미노, 하이드록실 또는 카복실기에 연결된 경우에는 스페이서-링커 부분에 의해 달성된다.

"펩타이드"는 최소 6개의 아미노산 잔기 및 효과적으로는 약 200개 이하의 아미노산 잔기를 갖는 것을 의미한다. 상기 효과적인 펩타이드는 최소 10개의 아미노산을 포함하며, 바람직하게는 최소 약 15개의 아미노산, 보다 바람직하게는 최소 약 20개의 아미노산을 포함한다. 상기 펩타이드는 효과적으로는 최대 약 150개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 최대 약 100개의 아미노산 잔기, 또는 최대 약 50개의 아미노산 잔기를 포함한다. 바람직하게는 펩타이드는 약 50 ~ 150개의 아미노산 잔기를 포함한다.

본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 1개 또는 몇 개의 시스테인 잔기를 포함한다. 상기 시스테인 잔기는 링커가 펩타이드에 결합하도록 한다. 커플링에 있어서, 시스테인 잔기의 이용은 커플링반응의 선택성을 강화하는 바, 이는 시스테인 잔기가 펩타이드에 혼하지 않기 때문이다. 시스테인 잔기는 상기 결합반응이 펩타이드의 구조 및 특성을 방해하지 않는다면 펩타이드의 말단 또는 내측에 위치되어질 수 있다. 시스테인 양에 무관하게, N-말단 또는 C-말단에 하나의 시스테인 잔기가 있는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 펩타이드는 두 개의 시스테인 잔기를 포함하는 것인 바, 시스테인 잔기 각각은 한쪽 말단에 있을 수 있으며, 또한 각각의 말단에 위치해 있을 수도 있다. 가장 바람직하게는 각각의 말단에 한 개씩의 시스테인 잔기가 놓여져 있는 것이다.

펩타이드 전체 아미노산 서열은 그 자체로서 발생되기도 하고, 보다 큰 폴리펩타이드의 일부로서 발생되기도 한다. 또한, N-말단 또는 C-말단 또는 부가적인 시스테인 잔기에 의한 양쪽 말단에서 연장되는 자연-발생적 서열에 의해서도 구성되기도 한다.

백신 접합체내 운반자로서 펩타이드는 효과적으로는 최소 한 개의 T-세포 의존 에피토프를 포함하며, 이를 포유동물 등에 접종한 경우에는 T-세포 의존항원으로서의 다당류에 대한 보호성 면역반응을 야기한다.

본 발명에 있어서, 펩타이드는 화학적으로 합성되거나 재조합 방식으로 제조될 수 있다. 상기 방법은 통상적인 방법에 따라 수행될 수 있다.

본 발명의 접합체는 하나의 펩타이드를 포함한다; 이 경우에 있어서, 다당류 사슬을 따라 존재하는 펩타이드 부분은 서로 동일하다. 한편, 여러개의 펩타이드 즉 다른 에피토프를 포함할 수도 있다. 펩타이드의 수는 한정되는 것이 바람직하다: 6개 이하 및 보다 바람직하게는 2 또는 3개의 펩타이드. 첫 번째 펩타이드가 T-세포 의존 에피토프를 갖는 경우에는 두 번째 펩타이드는 B-세포 의존 에피토프를 갖는다.



본 발명 접합체에 이용되는 다당류는 어떠한 종류도 가능하다. 본 발명의 구현예중 하나에서 접합체는 백신 목적으로 제조되는 바, 이에 적합한 다당류는 캡슐 다당류, 그람-음성 박테리아 세포벽의 지질다당류(LPS 또는 LOS)로부터 유래된 O-특이성 결사슬과 같은 다당류, 및 균류의 세포벽 다당류가 있다. 예를 들어, 다당류는 다음과 같은 박테리아 및 균류로부터 유래된다: *P. aeruginosa*와 같은 *Pseudomonas*, *Staphylococci*, *S. pneumoniae*와 같은 *Streptococci*, *K. pneumoniae*와 같은 *Klebsiellae*, *S. typhi* 및 *paratyphi*와 같은 *Salmonellae*, *Escherichia coli* K<sub>1</sub>, K<sub>100</sub>, 0157:H7, *N. meningitidis*와 같은 *Neisseriae*, *S. dysenteriae*, *somnei* 및 *flexneri*와 같은 *Shigellae*, *H. influenzae* type b와 같은 *Haemophilus*, 그리고 *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, 및 *Hansenula*.

다당류는 반복단위로 구성되어 있다. 본 발명 접합체에 있어서, 다당류는 최소 4개, 바람직하게는 3000개의 반복단위로 구성되어 있다. 백신 성분으로 이용되는 경우에는 다당류는 바람직하게는 4 ~ 1000개의 반복단위, 보다 바람직하게는 7 ~ 700개의 반복단위, 가장 바람직하게는 50 ~ 200개의 반복단위로 구성되어 있다.

반복단위는 다당류의 특성을 결정하는 것으로서 반복단위의 조성 및 분자량은 다당류에 따라 매우 다양하다. 예를 들어, 대부분의 캡슐 다당류의 반복단위는 하이드록실기 및 카복실기를 포함하는 바, 어떤 미생물은 아미노기를 포함하기도 하고(예: *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 1), 포함하지 않기도 하다(예: *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 14); 또한, 어떤 미생물은 N-아세틸기를 포함하기도 하고(예: *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 14), 포함하지 않기도 하다(예: *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 6B). 또한, 예를 들어 *Streptococcus pneumoniae* 타입 3 및 4의 캡슐 다당류의 분자량은 각각 360 및 847이다. 따라서, 다당류의 반복단위의 양과 분자량 사이에는 일반적인 대응성이 없다. 한편, 본 발명에 이용되는 다당류는 바람직하게는 평균 10,000 ~ 500,000의 분자량을 갖는다. 다당류는 이질적인 크기의 분자로 구성되어 있으므로 다당류의 분자량은 항상 평균값으로 나타낸다.

다당류는 통상적인 방법에 따라, 화학적으로 합성되거나 자연에서 정제될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 또는 균류의 다당류의 경우 미생물로부터 추출할 수 있고, 필요하다면 독소부분을 제거하기도 한다. 특히 유용한 방법은 Gotschlich et al., J. Exp. Med., 129, 1349(1969)에 개시되어 있다.

다당류는 합성 또는 정제를 통해 사용될 수 있으며, 사용전에 해중합하기도 한다. 요컨대, 천연 캡슐 다당류는 일반적으로 분자량이 500,000을 넘는다. 평균 분자량이 10,000 ~ 20,000인 저분자량의 캡슐 다당류가 바람직한 경우, 정제된 다당류는 단편화해야 한다. 상기 목적을 위하여 통상적인 방법이 이용될 수 있으며, 예를 들어 WO 제 93/7178호에 개시되어 있는 환원성 산화에 의한 단편화 방법이 이용될 수 있다.

결합에 관여하는 다당류 사슬의 반복단위에 위치하는 하이드록실, 카복실 또는 아미노기는 자연적인 작용기이다. 택일적으로, 작용기는 인위적으로 삽입될 수도 있다. 아미노기는 N-아세틸기와 같은 자연의 N-아실기의 조절된 산 또는 염기성 가수분해에 의해 형성된다.

하이드록실, 카복실, 아미노기 등(아미노기가 바람직하다)은 자연의 아미노, 하이드록실 또는 카복실기에 결합된 스페이서 부분으로 유도체화 반응하는 경우에 도입될 수 있다. 전형적으로, 스페이서는 두가지 기능을 갖는 바, 이의 한쪽 말단은 다당류의 자연적 하이드록실, 카복실 또는 아미노기와 반응하고, 다른쪽 말단은 링커와 반응한다. 따라서, 스페이서는 하이드록실, 카복실 및 아미노기를 포함하는 작용기를 제공하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 스페이서에 의해 제공될 수 있는 작용기는 티올기가 있으며, 아래에서 더욱 상세히 살펴해보도록 한다.

상술한 것과 다른 작용기를 특수 처리에 의해 도입할 수 있다. 예를 들어, 알데히드기는 인접한 하이드록실기를 갖는 두 개의 탄소원자사이에 있는 탄소-탄소 결합을 자르는 역할을 하는 페리오데이트 처리에 의하여 다당류 사슬을 따라 도입된다. 상기 페리오데이트 처리는 예컨대 *S. mutans*의 다당류상에서 수행하는 것이 바람직한 바, 이는 다당류 사슬이 이와 같은 처리에 의해 잘리지 않기 때문이다.

알데히드기가 접합목적으로 사슬을 따라 도입되는 경우, 사용되는 링커는 아미노기를 갖는 것이다.

스페이서 또는 링커로서 이용되는 화합물은 아래에서 보다 더 한정한다. 링커는 두가지 기능을 갖는 분자로서 적합한 길이를 갖고 있어야 하는 바, 이는 펩타이드 및 다당류 부분이 면역계에 제공되는 경우 서로 방해하지 않도록 하기 위함이다. 링커부분은 효과적으로는 이황화결합 또는 티오에테르 결합을 통하여 펩타이드의 시스테인 잔기에 연결되고, 에테르



또는 에스테르 결합을 통해 다당류의 하이드록실기에 연결되며, 아마이드 또는 카바메이트 결합을 통해 다당류의 아미노기에 연결되고, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트 결합을 통해 카복실기에 연결되며, 환원된 이민결합을 통해 알데히드기에 연결된다.

본 발명 백신용 접합체에 의해 야기되는 면역반응의 특성 및 정도는 펩타이드:다당류의 비에 의해 크게 영향을 받는다. 다당류내의 B-에피토프 및 펩타이드내의 T-세포 의존 에피토프의 유용성 및 면역체계로의 적합한 제시는 필수적 요소이다. 따라서, 상기 두 종류의 에피토프는 충분히 제시되어야 하며, 서로 균형을 맞추어야 하는 바, 이는 예컨대 펩타이드 부분에 의한 다당류 에피토프의 공간적 방해로 방지하기 위함이다. 면역반응을 최적화하기 위해 반복단위 1 ~ 50몰 : 펩타이드 1몰이 적합하다. 바람직하게는 상기 비는 반복단위 3 ~ 30몰 : 펩타이드 1몰이고, 보다 바람직하게는 상기 비는 반복단위 5 ~ 20몰 : 펩타이드 1몰이다.

본 발명의 접합체는 병원성 미생물에서 유래하는 면역원성 다당류에 대한 보호성 장기 면역반응을 야기하는데 특히 유용하다.

따라서, 본 발명은 약제학적으로 수용 가능한 희석제 또는 담체 및 본 발명 접합체의 치료학적 또는 예방학적 효과량을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 예컨대 알루미늄 화합물과 같은 보조약(adjuvant)처럼 다른 성분을 포함하기도 한다. 상기 적합한 알루미늄 화합물은 알루미늄하이드록사이드 또는 알루미늄포스페이트를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명 접합체의 면역원성을 증강하기 위하여 보조약(adjuvant)을 이용하는 것은 필수적이지 않다. 본 발명에 따른 조성물은 백신업계에서 통상적으로 이용되는 경로에 따라 투여될 수 있다. 투여경로의 선택은 사용되는 보조약(adjuvant)과 같은 변수의 수에 의해 결정된다.

또한, 본 발명은 펩타이드를 접합하는 방법에 관한 것인 바, 상기 펩타이드는 최소 6개의 아미노산을 갖으며, 상기 아미노산중 적어도 하나는 다당류에 결합하는 시스테인 잔기이고, 상기 면역원성 다당류 사슬은 최소 4개의 반복단위를 포함한다. 상기 접합방법은 펩타이드를 시스테인 잔기의 티올기를 통해 링커에 커플링하는 과정, 및 다당류를 (a) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노, 하이드록실 또는 카복실기를 통해 또는 (b) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 N-아실기의 가수분해에 의해 형성된 아미노기를 통해 또는 (c) 다당류의 반복단위에 위치하는 자연적인 아미노, 하이드록실 또는 카복실기에 결합된 스페이서 부분에 의한 유도체화 반응에 따라 다당류에 도입된 작용기를 통해 상기 링커에 결합하는 커플링과정을 포함한다.

링커를 다당류 또는 유도체화된 다당류와 먼저 반응시키는 것이 바람직한 바, 이에 펩타이드와 커플링하는데 이용되는 작용기를 제공하는 링커분자를 갖는 활성화된 다당류가 제조된다. 두 번째 과정에서, 상기 활성화된 다당류는 펩타이드와 반응하는 바, 링커의 작용기, 즉  $R_1$ 이 펩타이드 시스테인 잔기의 티올기와 반응한다.

다르게 언급되는 바가 없으면, 시스테인 잔기를 포함하는 펩타이드에 최소 4개의 반복단위로 구성된 다당류를 접합시켜, 면역원성 다당류를 제조하는 방법은 다음에서 두과정을 포함한다:

- (i) 활성화된 다당류를 얻기 위해 티올기와 반응할 수 있는 이기능성 링커에 의한 다당류 활성화과정으로서, 상기 링커의 복수개는 공유결합에 의해 다당류를 따라 무작위적으로 도입되고, 그리고
- (ii) 접합체를 얻기 위해 상기 (i) 과정에서 얻은 활성화된 다당류와 펩타이드의 반응과정으로서, 상기 펩타이드는 시스테인 잔기를 통해 상기 링커와 공유결합하며; 또는
- (iii) 티올기와 반응할 수 있는 이기능성 링커에 의한 펩타이드 활성화과정, 그리고
- (iv) 접합체를 얻기 위해 상기 (iii) 과정에서 얻은 활성화된 펩타이드와 다당류의 반응과정으로서, 상기 활성화된 펩타이드는 공유결합에 의해 다당류를 따라 무작위적으로 도입된다.

바람직한 제조방법은 상기 (i) 및 (ii)의 과정에 따라 수행하는 것이다.

본 발명에 따른 효과적인 제조방법은 일정한 조건하에서 이기능성 링커와 다당류를 반응시키는 과정을 포함하는 바, 상기 조건은 링커부분이 다당류에 충분한 양으로 도입되어 상기 과정 (ii)에서 접합체가 형성되도록 하는 조건으로서, 상기 접합체는 반복단위 1 ~ 50몰당 1몰 펩타이드를 포함하며, 바람직하게는 반복단위 3 ~ 30몰당 1몰 펩타이드를 포함하고,

보다 바람직하게는 반복단위 5 ~ 20몰당 1몰 펩타이드를 포함한다. 유사한 방법에 의해, 택일적인 방법은 일정한 조건하에서 활성화된 펩타이드와 다당류를 반응시키는 과정을 포함하는 바, 상기 조건은 활성화된 펩타이드가 다당류에 충분한 양으로 도입되어 상기 과정 (iv)에서 상기 상술한 특성을 갖는 접합체가 형성되도록 하는 조건이다.

효과적인 링커는 화학식(I) R1-A-R2로 나타내고, 상기 R1은 티올기와 반응할 수 있는 작용기이며, 상기 A는 방향족 또는 바람직하게는 지방족 사슬, 예컨대 탄소사슬로서 치환되거나 치환되어 있지 아니하고, 그리고 R2는 다당류의 작용기와 반응할 수 있는 작용기이다.

상기 사슬 A는 너무 짧아서도 안되고(공간적 간섭을 피하기 위함), 너무 길어서도 안된다(면역원성 부분과의 간섭을 피하기 위함). 따라서, 사슬 A는 1 ~ 12개의 탄소원자를 포함하고, 바람직하게는 3 ~ 8개의 탄소원자를 포함하며, 그리고 보다 바람직하게는 C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> 알킬렌, 페닐렌, C<sub>7</sub> ~ C<sub>12</sub> 아랄킬렌, C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> 알킬, 페닐, C<sub>7</sub> ~ C<sub>12</sub> 아랄킬, C<sub>6</sub> 알카노일옥시 및 벤질카보닐옥시에서 선택되는 것이고, 상기 알킬, 페닐, 알킬렌 및 페닐렌은 치환되거나 치환되어 있지 아니하다.

상기 R1은 바람직하게는 티올기; α,β-불포화 카보닐기 또는 이미딜기; 아실할로젠 또는 알킬할라이드이고, 상기 할로젠원은 Br, Cl 또는 I이다. 보다 바람직하게는 R1은 α,β-불포화 카보닐기 또는 이미딜기이고, 특히 말레이미딜기이다.

상기 R2는 다당류에 결합하도록 하는 링커의 작용기이다. 따라서, R2는 아미노, 카복실, 하이드록실 또는 알데히드기와 반응할 수 있는 기이다. R2는 바람직하게는 아미노, 카바모일, 아미노카바모일, 카복실, 하이드록실, N-하이드록시석시니이미딜과 같은 석시니이미딜, 그리고 N-하이드록시설포석시니이미딜과 같은 설포석시니이미딜기에서 선택되는 것이다. 링커가 하이드록실기 또는 카복실기 또는 알데히드기와 반응하는 경우, R2는 바람직하게는 아미노기 또는 아미노기가 있는 화합물, 예컨대 R2는 하이드라지드기, 즉 NH<sub>2</sub>-NH-CO-이다.

링커로서 유용한 화합물은 석시니이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, N-석시니이미딜-4-(4-말레이미도페닐)부티레이트, N-석시니이미딜-4-말레이미도-부티레이트, N-석시니이미딜-3-말레이미도벤조에이트를 포함한다.

상술한 바와 같이, 다당류는 접합 이전에 스페이서로 유도체화된다. 따라서, 다당류는 우선적으로 화학식(II) R3-B-R4의 스페이서와 반응하고, 상기 R3는 아미노, 카복실 또는 하이드록실기와 반응할 수 있는 작용기이며, B는 방향족 또는 지방족 사슬이고, R4는 이어지는 접합과정에서 링커의 R2와 반응하는 작용기이다.

사슬 B는 탄소사슬이고, 바람직하게는 카보닐, C1 ~ C12 알킬 또는 알킬렌 또는 다이카보닐이다.

바람직하게는 R3 및 R4는 독립적으로 아미노기 또는 아미노기가 있는 화합물, 예컨대 R2는 하이드라지드기, 즉 NH<sub>2</sub>-NH-CO-이다.

본 발명에 있어서 스페이서로서 유용한 화합물은 시스테아민, 시스테인, 다이아미노헥산과 같은 다이아민, 아디프산 다이하이드라지드(ADH), 우레아, 세미카바지드, 및 시스타민을 포함한다.

시스테인 또는 시스테인이 스페이서로서 이용되는 경우, 티올기가 다당류상에 도입된다. 상기의 경우, 조합상 유용한 링커는 비스말레이미도헥산과 같은 비스말레이미딜화합물을 포함한다.

상술한 바와 같이 적합한 펩타이드:다당류비를 나타내는 접합체를 얻기 위해, 유도체화 과정 및/또는 활성화 과정에 관여하는 시약의 농도와 같은 반응조건의 조절은 당업자에게 공지된 범위이다. 보다 자세한 지침은 다음과 같다:

다당류의 아미노기가 반응되는 경우, 상기 반응은 바람직하게는 pH 4 ~ 7에서 (3-다이메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이이미드하이드로클로라이드(EDAC)와 같은 카보다이이미드 화합물의 존재하에서 수행하며, 반응에 참여하는 링커 또는 스페이서의 작용기는 아미노기이다.

다당류 반복단위:카보다이이미드의 몰비는 효과적으로는 0.1 ~ 2이고, 바람직하게는 0.1 ~ 1이며, 보다 바람직하게는 0.2 ~ 0.6이다. 용이하게 파악할 수 있는 것과 같이, 상기 비를 조절함으로써 반복단위당 펩타이드의 양을 조절할 수 있다.

다당류의 아미노기가 석신이미딜 또는 설포석신이미딜과 반응하는 경우에는 상기 반응은 효과적으로는 pH 6 ~ 9에서 수행하는 것이며, 바람직하게는 약 pH 7.5에서 수행하는 것이다. 석신이미딜기는 단지 아미노기와 반응한다. 적합한 실험조건이 이용되는 경우(예: 링커의 과량), 반응은 거의 약 5분이내에 즉시 발생한다. 반응에 이용되는 다당류가 아미노기를 갖는 천연 다당류의 경우, 석신이미딜기에 의한 치환의 양을 조절할 수 있는 유일한 방법은 역조건을 이용하는 것으로서(만일 이렇지 않은 경우에는 반응은 즉시 발생하여 모든 아미노기가 치환된다), 예컨대 반응 미디엄의 희석의 증가 또는 낮은 링커의 양과 같은 조건이 있다. 이는 펩타이드 및 반복단위의 비를 적합한 범위에서 조절할 수 있도록 한다. 가수분해 또는 유도체화가 다당류에 아미노기를 도입시키는데 이용되는 경우에는, 상기 비는 다당류상에 아미노기가 출현되는 것을 조절함으로써 용이하게 조절되어 질 수 있다.

다당류의 하이드록실기를 반응시키는 경우, 상기 반응은 바람직하게는 사이아노젠 화합물의 존재하에 수행하며; 만일 사이아노젠브로마이드가 이용되는 경우에는 pH 8 ~ 12에서; 1-사이아노-4-다이메틸아미노피리디늄테트라플루오로보레이트가 이용되는 경우에는 pH 6 ~ 10, 바람직하게는 pH 6 ~ 8에서 반응을 수행하는 것이다. 다당류 반복단위:사이아노젠 화합물의 몰비는 효과적으로는 0.1 ~ 3이고, 바람직하게는 0.1 ~ 2이다.

다당류 사슬을 따라 존재하는 알데히드기가 반응되는 경우에는, 상기 반응은 바람직하게는 pH 6.5 ~ 8에서 NaCNBH<sub>3</sub>와 같은 사이아노보로하이드라이드의 존재하에 수행한다.

본 발명의 방법에 따라, 링커 또는 스페이서 및 링커의 조합을 통해 결합한 다당류 및 펩타이드가 있는 접합체가 제조되는 되는 바, 상기 링커 또는 링터/스페이스는 최적의 길이를 갖고 있고, 다당류-펩타이드 결합은 안정한 것이다. 더욱이, 펩타이드대 다당류 반복단위의 비가 면역목적에 적합하게 된 접합체가 제조된다.

본 발명은 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다:

실시예 1: 다음 서열을 갖는 합성 105머 펩타이드의 제조:

Cys Leu Tyr Tyr Lys Asn Tyr Arg Tyr Tyr Ala Leu Lys Ser

Gly Gly Ser Val Asn Ala Pro Met Pro Glu Asn Gly Gln Thr Glu

Asn Asn Asp T계 Ile Leu Met Gly Ser Thr Gln Glu Glu Ala Lys

Lys Asn Ala Met Asn His Lys Asn Asn Gln Arg Ile Ser Gly Phe

Ser Gly Phe Phe Gly Glu Glu Asn Gly Lys Gly His Asn Gly Ala

Leu Asn Leu Asn Phe Asn Gly Lys Ser Ala Gln Asn Arg Phe Leu

Leu Ths Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Lys Ile Ser Val Thr Gln

Gly

상기 펩타이드는 자동 펩타이드 합성기(모델 431A, Applied Biosystems)를 가지고 패스트모크 화학(FastMoc chemistry)를 이용하여 합성하였다. 고체상은 링크(Rink) 레진(0.13 mM TentaGel S RAM Spezial, 0.15 mM g<sup>-1</sup>, Rapp Polymere, Tubingen, 독일)이고, 이를 통해 C-말단 아미드 캡화된 펩타이드를 얻는다. 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)을 이용하여 O-t-부틸-(아스파르트산, 글루탐산, 세린, 쓰레오닌 및 타이로신 카복실 또는 하이드록실기에 대한 것); 트리틸-(히스티딘, 아스파라긴 및 글루타민 아미노 또는 이미노기에 대한 것); t-부틸옥시카보닐-(라이신 아미노기에 대한 것); 또는 PMC(pentamethylchroman-6-sulfonyl; 아르기닌 이미노기에 대한 것) 결보호에 의해 아미노산을 보호화하였다.

활성화 및 커플링은 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-3,3,3-테트라메틸우로늄헥사플루오로포스페이트(HBTU)/다이이소프로필에틸아민의 존재하에서 수행하였다. 사이클 1 ~ 2, 4, 10 ~ 13, 17, 27, 32, 49, 59, 66, 75 ~ 78, 84 ~ 85, 88, 96

~ 97 및 104 ~ 105에서 이중 커플링을 실시하였으며, 자유 아미노기는 무수아세트산을 이용하여 아세틸화하여 폐쇄시켰다. 마지막 사이클 후에, 펩타이드를 피페리딘을 이용하여 탈보호하였으며, 최종산물은 무수아세트산에 의해 N-말단이 아세틸화된 것이다.

결사슬 탈보호 및 레진 지지체로부터의 절단은 실온에서 3시간동안 2.1%(v/v) 1,2-에탄다이티올, 4.2%(v/v) 티오아니솔, 4.2%(v/v) 물, 6.2%(v/v) 페놀 및 83%(v/v) 트리플루오로아세트산(TFA)에 의해 수행되었다. 상기 레진은 여과를 통해 제거하였고, 트리에틸실란을 용액의 색깔이 없었질 때까지 한방울씩 적가하였다. 이어 상기 용액을 실온에서 3시간동안 항온처리한 후, t-부틸메틸에테르에 의해 침전시키고, 원심분리 및 냉동건조함으로써 미정제 펩타이드 360 mg을 수득하였다. 그런 다음, 상기 미정제 펩타이드 130 mg를 pH 8.3에서 50 mM 다이티오쓰레이톨을 포함하는 40 ml 50 mM 에틸모르포린에 용해하고, 실온에서 하룻밤동안 항온처리 하였다. 그리고나서, pH를 10% TFA로 처리하여 3.5로 조절하였고, 역상 HPLC(Pep-S, C2/C18, 100 Å 동공크기, 12 μm 22.5 mm × 25 cm, Pharmacia)에 의하되, 아세토니트릴 농도구배 25 ~ 45%(v/v), 0.1% TFA 10 ml min<sup>-1</sup>, 0.33% min<sup>-1</sup> 구배를 이용하여 펩타이드를 정제하였다. 펩타이드는 약 25% 아세토니트릴에서 하나의 피크로 용출되었고, 상기 피크 부분을 냉동건조 하였다(73 mg). HPLC 및 질량분석기에 의한 분석은 최종산물의 65% 이상이 원하는 서열을 갖고 있음을 나타내었다. N-말단 서열은 N-말단 아세틸화전에 N-말단 에드만 서열 결정방법에 따라 결정하였다.

## 실시예 2: *N. meningitidis* 혈청그룹 C 다당류-펩타이드 접합체

*Neisseria meningitidis* 혈청그룹 C로부터 캡슐 다당류(이하, 다당류 C라 한다)의 건조분말을 Gotschlich et al, J. Exp. Med., 129, 1349(1969)에 개시된 추출 방법에 따라 수득하였다. 다당류 C 100 mg을 0.2 M NaCl에 용해하여 11.1 mg/ml 농도의 용액을 얻었다(용액 A). 0.2 M NaCl내에 있는 0.2 M 아디프산다이하이드라이드(ADH) 용액(용액 B)을 제조하였다. 0.2 M NaCl내에 있는 0.5 M 에틸다이메틸아미노프로필카보다이이미드(EDAC) 용액(용액 C)을 제조하였다. 상기 용액 A 9 ml, 용액 B 10 ml 및 용액 C 1 ml을 혼합하여, 다당류 C 5 mg/ml, 0.125 M ADH 및 0.025 M EDAC를 포함하는 용액을 제조하였다. 이어, 0.1 M HCl을 첨가하여 pH를 6.5로 조절하였으며, 상기 pH는 전체 반응시간인 45분동안 유지시켰고, 이때 온도는 약 20°C였다.

반응은 0.1 N NaOH 40 μl를 첨가하여 pH를 7.1까지 상승시킴으로써 종결시켰다. 이어, 상기 반응액을 0.5 M NaCl로 투석하였고, 10 mM 포스페이트로 또 투석하였으며, 물로 다시 한 번 투석한 다음, 냉동건조하였다.

상기 유도체화한 다당류 C의 크기는 HPLC 배타적 칼럼 TSK 4000(제조원, Tosohaas)을 이용하여 조절하였으며, 그 결과 해중합이 유도체화 과정에서 발생되지 않음을 확인할 수 있었다.

유도체화 과정동안, 반복단위 약 3.4%가 NH<sub>2</sub>기로 유도체화하였다.

상기 냉동건조된 생성물을 0.02 M 포스페이트 완충액(pH 7)내에 용해하여 6.25 mg/ml 농도로 하고, 기체를 제거하였다. N-(γ-말레이미도부틸옥시) 석신이미드 에스테르(GBMS)를 질소하에서 다이메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하여 25 mg/ml 농도로 하고, 이를 동량의 유도체화된 다당류 C에 첨가하였다. 이어, 상기 반응액을 질소하에서 실온에서 90분동안 교반한 후, 활성화된 다당류 C를 세파텍스 G50 배타적 칼럼크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 그런 다음, 배제된 부분을 회수하고, 한외여과(30K 아미콘막)에 의해 약 7.5 mg/ml 농도까지 농축하였으며, 상기 농축된 용액에서 기체를 제거하였다.

실시예 1에서 제조한 펩타이드 20 mg을 질소하에서 10 mg/ml 농도로 물에 용해한 다음, 펩타이드 용액 1.5 ml을 상기 활성화된 다당류 C를 포함하는 제조액 1.2 ml에 첨가함으로써, 말레이미도 잔기/티올잔기의 비를 2로 하였다. 상기 혼합반응액을 실온에서 교반하면서 하룻밤동안 정치하고, 반응하지 않은 말레이미도 잔기를 0.010 ml 머캅토에탄올을 첨가하여 불활성화시켰다.

접합체 생성물을 4BCL 세파로스 컬럼상에서 정제하였고, 용출액내 당류(시알산) 및 펩타이드의 존재에 대해 분석시험을 하였으며, 이때 두가지 분석에서 양성반응을 나타내는 부분을 수집하였다.

시알산 잔기의 양은 Svennerholm., Biochem. Biophys. Acta, 24, 604(1957)에 개시된 용량방법에 따라 결정되었고, 펩타이드의 양은 Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265(1951)에 개시된 방법에 따라 결정하였다. 상기 분석결정 결과 펩타이드/다당류 C 반복단위의 몰비는 1:18이었다(중량비로는 1.8:1).

**실시예 3: *S. pneumoniae* 다당류-펩타이드 접합체**

*Streptococcus pneumoniae* 타입4로부터 캡슐 다당류(이하, 뉴모 4 다당류라 한다)의 건조분말을 특허출원 WO 82/01995 "백신으로서의 *Streptococcus pneumoniae*의 다당류의 정제방법"에 개시된 추출 방법에 따라 수득하였다. 뉴모 4 다당류 100 mg을 0.2 M NaCl에 용해하여 11.1 mg/ml 농도의 용액을 얻었다(용액 A). 0.2 M NaCl내에 있는 0.25 M 아디프산다이하이드라지드(ADH) 용액(용액 B)을 제조하였다. 0.2 M NaCl내에 있는 0.5 M 에틸다이메틸아미노프로필카보다이이미드(EDAC) 용액(용액 C)을 제조하였다. 상기 용액 A 9 ml, 용액 B 10 ml 및 용액 C 1 ml을 혼합하여, 뉴모 4 다당류 5 mg/ml, 0.125 M ADH 및 0.025 M EDAC를 포함하는 용액을 제조하였다. 이어, 1 N HCl을 첨가하여 pH를 4.9로 조절하였으며, 상기 pH는 전체 반응시간인 30분동안 유지시켰고, 이때 온도는 약 25°C였다.

반응은 1 N NaOH 0.28 ml를 첨가하여 pH를 7.5까지 상승시킴으로써 종결시켰다. 이어, 상기 반응액을 0.5 M NaCl로 투석하였고, 물로 다시 한 번 투석한 다음, 냉동건조하였다.

상기 유도체화한 뉴모 4 다당류의 크기는 HPLC 배타적 칼럼 TSK 4000(제조원, Tosohaas)을 이용하여 조절하였으며, 그 결과 해중합이 유도체화 과정에서 발생되지 않음을 확인할 수 있었다.

유도체화 과정동안, 뉴모 4 다당류의 반복단위 약 8.2%가 NH<sub>2</sub>기로 유도체화하였다.

상기 냉동건조된 생성물을 0.05 M NaCl에 용해하여 2.76 mg/ml 농도로 하고, 기체를 제거하였다. N-( $\gamma$ -말레이미도부틸옥시) 석신이미드 에스테르(GBMS)를 질소하에서 다이메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하여 25 mg/ml 농도로 하고, 상기 GBMS 1.75 ml를 질소의 존재하에서 상기 다당류 용액에 16 ml에 첨가하였다. 이어, 상기 반응액을 질소하에서 실온에서 5시간동안 교반한 후, 활성화된 뉴모 4 다당류를 세파텍스 G50 배타적 칼럼크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 그런 다음, 배제된 부분을 회수하고, 한외여과(30K 아미콘막)에 의해 약 7 mg/ml 농도까지 농축하였으며, 상기 농축된 용액에서 기체를 제거하였다.

실시예 1에서 제조한 펩타이드 20 mg을 질소하에서 4.6 mg/ml 농도로 0.1 M NaCl, 0.01 M 포스페이트 완충액(pH 7.5)에 용해하였다. 한편, 펩타이드 용액 2.2 ml을 상기 활성화된 뉴모 4 다당류를 포함하는 제조액 1.25 ml에 첨가함으로써, 말레이미딜 잔기/티올잔기의 비를 1로 하였다(뉴모 4-펩타이드-1 접합체). 상기 혼합반응액을 질소하에서 실온에서 교반하면서 6시간동안 정치한 후, 4°C에서 하룻밤동안 정치하였다. 반응하지 않은 말레이미딜 잔기를 0.005 ml 머캅토에탄올을 첨가하여 불활성화시켰다.

접합체 생성물을 4BCL 세파로스 컬럼상에서 정제하였고, 용출액내 당류 및 펩타이드의 존재에 대해 분석시험을 하였으며, 이때 두 가지 분석에서 양성반응을 나타내는 부분을 수집하였다.

당류의 양은 Dubois et al., Anal. Chem., 3, 350(1956)에 개시된 용량방법에 따라 결정되었고, 펩타이드의 양은 Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265(1951)에 개시된 방법에 따라 결정하였다. 상기 분석결정 결과 뉴모 4-펩타이드-1 접합체의 펩타이드/다당류 반복단위의 몰비는 1:30이었다(중량비로는 0.4:1).

**실시예 4: *N. meningitidis* 혈청그룹 A 다당류-펩타이드 접합체**

*Neisseria meningitidis* 혈청그룹 A로부터 캡슐 다당류(이하, 다당류 A라 한다)의 건조분말을 Gotschlich et al, J. Exp. Med., 129, 1349(1969)에 개시된 추출 방법에 따라 수득하였다. 다당류 A 100 mg을 물에 용해하여 5 mg/ml 농도의 용액을 얻었다(용액 A). 물내에 있는 CNBr의 용액을 67 mg/ml 농도로 하였다(용액 B). 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>내에 있는 아디프산다이하이드라지드(ADH) 용액을 150 mg/ml로 하였다(용액 C). 상기 용액 A 12 ml 및 용액 C 0.75 ml을 혼합하여, 다당류/CNBr의 중량비가 1인 용액을 제조하였다. 이어, 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH를 10.8로 조절하였으며, 상기 pH는 전체 반응시간인 60분동안 유지시켰고, 이때 온도는 약 20°C였다.

이어, 0.1 N HCl 0.15 ml를 첨가하여 pH를 8.5까지 감소시켰다. 상기 용액 C 17 ml을 첨가하여 ADH/다당류의 중량비가 3.5가 되도록 하였다. 상기 pH는 15분동안 유지하였으며, 상기 반응 혼합액을 4°C에서 교반하면서 하룻밤동안 정치하였다. 이어, 1 N HCl 0.1 ml을 첨가하여 pH를 7까지 감소시키고, 0.5 M NaCl로 투석하였고, 물로 다시 한 번 투석한 다음, 냉동건조하였다.

상기 유도체화한 다당류 A의 크기는 HPLC 배타적 칼럼 TSK 4000(제조원, Tosohaas)을 이용하여 조절하였으며, 그 결과 해중합이 유도체화 과정에서 발생되지 않음을 확인할 수 있었다.

유도체화 과정동안, 다당류 A의 반복단위 약 2.5%가 NH<sub>2</sub>기로 유도체화하였다.

이어, 상기 실시예 2의 제조과정을 이용하여 유도체화된 다당류 A를 활성화 하였고, 실시예 1에서 제조한 펩타이드를 활성화된 다당류A에 접합시켰다.

#### 실시예 5: 실시예 2에서 수득한 *N. meningitidis* 혈청그룹 C 접합체의 면역원 성 연구

다당류 접합체에서 운반자로서 상기 실시예 1 펩타이드의 유용성을 다음과 같이 확인하였다.

7주된 NMRI 쥐에게 피하 투여경로에 의해 다음 조성중 하나를 0.5 ml씩(매 투여마다) 투여하였으며, 보조약(adjuvant)을 이용하는 경우에는 복막내 투여를 하였다:

- a) 보조약(adjuvant) 없이 1, 15 및 29일에 펩타이드 없는 5 µg 다당류 C;
- b) 1일에 완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께 5 µg 다당류 C 및 9 µg 펩타이드를, 15 및 29일에 불완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께;
- c) 1일에 완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께 5 µg 다당류 C 및 9 µg 펩타이드, 15 및 29일에 불완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께;
- d) 보조약(adjuvant) 없이, 1, 15 및 29일에 1 µg 다당류 C 및 1.8 µg 펩타이드를 포함하는 실시예 2에서 수득한 접합체;
- e) 보조약(adjuvant) 없이, 1, 15 및 29일에 5 µg 다당류 C 및 9 µg 펩타이드를 포함하는 실시예 2에서 수득한 접합체;
- f) 1일에 완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께 5 µg 다당류 C 및 9 µg 펩타이드를 포함하는 실시예 2에서 수득한 접합체, 15 및 29일에 불완전 프로인트 보조약(adjuvant)과 함께 실시예 2에서 수득한 접합체; 및
- g) 디프테리아 아나톡신(DT)와 함께 5 µg 다당류 C의 접합체.

15, 29 및 43일(최초 접종한 날로부터 계산)에, 혈액시료를 수집하고, 항다당류 C 항체를 ELISA에 의해 측정하였고, 그 결과는 다음 표 1에 나타내었다.

[표 1]

접종 화합물	접종한 다당류의 양( $\mu\text{g}$ )	접종한 펩타이드의 양( $\mu\text{g}$ )	접종날짜	혈액시료를 수집한 날짜	항-다당류 항체 적정값 (ELISA 유니트)
(a)	5		1	15	10
			15	29	32
			29	43	115
(b)	5		1	15	22
			15	29	39
			29	43	74
(c)	5	9	1	15	24
			15	29	34
			29	43	47
(d)	1	1.8	1	15	32
			15	29	1052
			29	43	630
(e)	5	9	1	15	56
			15	29	321
			29	43	516
(f)	5	9	1	15	1006
			15	29	2854
			29	43	2492
(g)	5		1	15	13
			15	29	1197
			29	43	1531

비-접합 다당류 C에 대한 항체반응은 각 경우에 있어서, 극히 미약하였고, 시간에 따라 증가하지 아니하였으며, 반면 DT 또는 펩타이드에 접합되어 있는 다당류 C에 대한 반응은 만족할만 하였다. 본 발명 접합체의 경우, 이차 접종이후 상승효과가 나타났는 바, 이는 지속적인 면역반응을 통해 확인할 수 있었다. 접합체 다당류 C-펩타이드의 반응은 다당류 C-DT 접합체에서 얻어지는 반응과 동등하였다.

**실시예 6: 실시예 3에서 수득한 *S. pneumoniae* 접합체의 면역원 성 연구**

펩타이드대 다당류의 중량비(w/w)가 0.4:1(반복단위당 펩타이드의 비가 1:30(몰/몰)에 해당)인 실시예 3에서 제조된 접합체를 상기 실시예 5의 방법을 이용하여 쥐에서 실험을 하였다. 보조약(adjuvant)의 존재시 쥐에서 면역원성을 나타내었으며, 이차 접종 후에는 상승효과를 나타내었고, 그 결과는 다음 표 2에 나타내었다.

[표 2]



접종 화합물	접종한 다당류의 양 ( $\mu\text{g}$ )	접종한 펩타이드의 양 ( $\mu\text{g}$ )	접종날짜	혈액시료를 수집한 날짜	항-다당류 항체 적정값 (ELISA 유니트)
뉴모 타입 4 다당류+보조약	5		1	15	< 10
			15	29	< 10
			29	43	< 10
뉴모 타입 4 다당류+펩타이드+보조약	5	1.9	1	15	~ 18
			15	29	~ 24
			29	43	< 10
접합체 뉴모 4-펩타이드-1+보조약	5	1.9	1	15	~ 61
			15	29	458
			29	43	2601
염류			1	15	< 10
			15	29	< 10
			29	43	< 10

도면

도면1

