



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월03일
(11) 등록번호 10-2084301
(24) 등록일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) C07H 15/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/02 (2013.01)
A61K 39/0016 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7034329(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년01월06일
심사청구일자 2019년01월02일
(85) 번역문제출일자 2017년11월28일
(65) 공개번호 10-2018-0053599
(43) 공개일자 2018년05월23일
(62) 원출원 특허 10-2015-7020818
원출원일자(국제) 2014년01월06일
심사청구일자 2015년07월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/010310
(87) 국제공개번호 WO 2014/107652
국제공개일자 2014년07월10일
(30) 우선권주장
61/748,880 2013년01월04일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06524584 B2*
US20100136042 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
오비아이 파머 인코퍼레이티드
대만, 타이페이 시티 115, 난강 디스트릭트, 유안
취 스트리트, 19층, 넘버 3
(72) 발명자
리, 웨이, 한
대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907
왕, 난-쉬엔
대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **보다 높은 탄수화물 항원 밀도 및 신규한 사포닌 애쥬번트를 갖는 백신**

(57) 요약

본 발명은 담체 단백질로서 디프테리아 독소(DT)에 컨쥬레이션된 탄수화물 항원을 포함하는 백신을 제공하고, 여기서 탄수화물 항원 분자의 수 대 담체 단백질 분자의 수의 비는 5:1 보다 높다. 신규한 사포닌 애쥬번트 및 본원에 기재된 유효량의 백신을 투여함에 의해 암 세포를 억제하는 방법이 또한 본원에 기재된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

C07H 15/24 (2013.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

(72) 발명자

창, 청, 하오

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 49 룸 더블유1907

셰이, 이-황

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907

왕, 쟡-치

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907

린, 유-신

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907

린, 유-첸

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907

첸, 아이-주

대만 11503 타이페이 난강 소프트웨어 파크 유안
쿠 스트리트 3 19 룸 더블유1907

유, 쟡 데르 토니

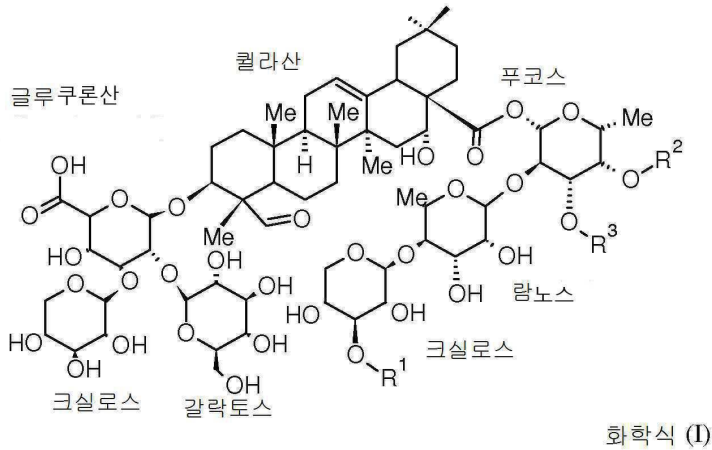
미국 92812 애너하임 피.오. 박스 9800

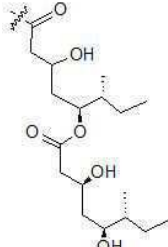
명세서

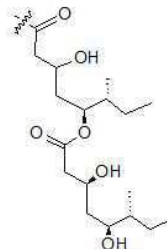
청구범위

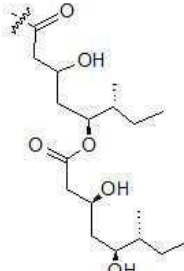
청구항 1

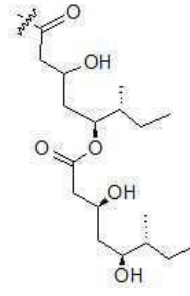
(a) 제1혼합물 1 내지 15몰% 및 (b) 제2혼합물 85 내지 99몰% 포함하는, 사포닌 애주번트로서, 상기 제1혼합물은 하기 화학식 (I)에서



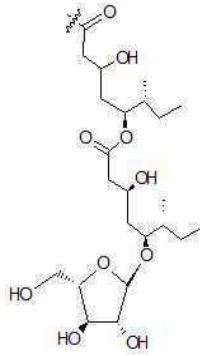
R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는  이고, R^3 은 H인 화학식 (I)의 화합물 60 내지 68.9몰%;

R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는 H이고, R^3 은  인 화학식 (I)의 화합물 1 내지 5 몰%;

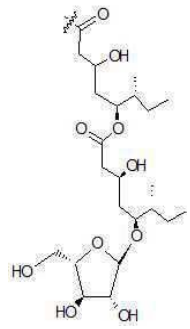
R^1 은 β -D-크실로스이고, R^2 는  이고, R^3 은 H인 화학식 (I)의 화합물 30 내지 38.9몰%;



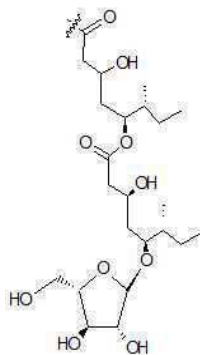
R^1 은 β -D-크실로스이고, R^2 는 H이고, R^3 은 인 화학식 (I)의 화합물 0.1 내지 3몰%를 포함하고, 상기 제2혼합물은



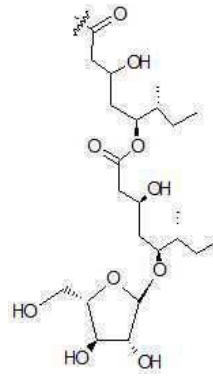
R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는 H이고, R^3 은 H인 화학식 (I)의 화합물 60 내지 68.9몰%;



R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는 H이고, R^3 은 인 화학식 (I)의 화합물 1 내지 5 몰%;



R^1 은 β -D-크실로스이고, R^2 는 H이고, R^3 은 H인 화학식 (I)의 화합물 30 내지 38.9몰%; 및



R¹은 β-D-크실로스이고, R²는 H이고, R³은 인 화학식 (I)의 화합물 0.1 내지 3몰%를 포함하는 것인, 사포닌 애주번트.

청구항 2

(a) 종양-연관 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 및 제1항의 사포닌 애주번트를 포함하는 암 치료용 백신.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 종양-연관 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편은 Globo H, SSEA-3, SSEA-4, Gb-4 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는, 백신.

청구항 4

제2항에 있어서, 담체 단백질을 더 포함하는, 백신.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 담체 단백질은 KLH인, 백신.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 담체 단백질이 DT인 백신.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 암이 GloboH 발현 암인, 백신.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 GloboH 발현 암은 유방암, 폐암, 식도암, 직장암, 담도암, 간암, 협측암, 위암, 결장암, 비인두암, 신장암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 고환암, 방광암, 두경부암, 구강암, 신경내분비암, 부신피질암, 갑상샘암, 골암, 피부암, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 흑색종 또는 뇌종양인, 백신.

청구항 9

(a) 제2항의 백신; 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후-참조

[0002] 본 출원은 2013년 1월 4일 출원된 미국 출원 61/748,880호의 이익을 주장하며, 이의 전문은 본원에 참조로서 포함된다.

배경 기술

[0003] 암 백신은 면역 시스템을 통해 자신을 보호하는 신체의 자연 능력을 높임에 의해 암을 치료하도록 설계된다. 이는 특히 암의 관리에 있어서 통상적인 수술, 방사선 및 화학요법의 많은 단점에 비추어, 항상 매우 매력적인 치료적 접근법을 제시하였다. 그러나, 암 탄수화물 항원의 낮은 면역원성과, 다수의 합성 백신이 주로 IgM을 유도하고 IgG 항체를 더 적은 정도로 유도한다는 사실로 인해, 그러한 암 백신의 유효성은 여전히 낮다. 면역 인지 및 활성화를 돕기 위해, 애주번트의 이용과 같은 다양한 접근법이 연구되었다.

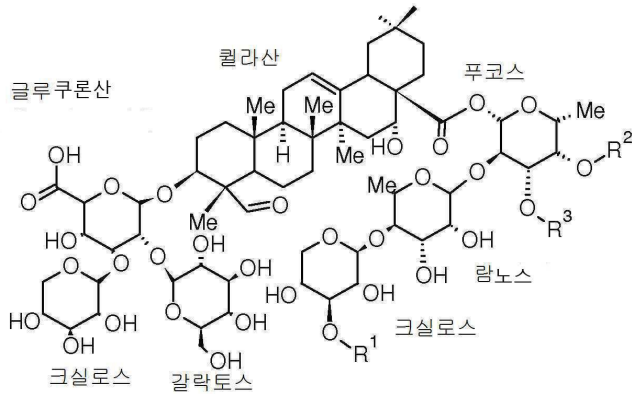
[0004] 개선된 면역 반응, 특히 IgG 반응을 지닌 효과적인 애주번트 및 암 백신을 개발하고자 하는 충족되지 않은 요구가 존재한다. 본 발명은 이러한 요구 및 다른 요구를 만족시키기 위한 탄수화물 항원에 대한 백신 및 애주번트를 제공한다.

발명의 내용

[0005] 한 구체예에서, 본 발명은 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 및 특소이드 단백질을 포함하는 백신을 기재하며, 여기서 탄수화물 항원 대 특소이드 단백질의 비는 5:1 내지 39:1의 범위이고, 상기 비는 탄수화물 항원 대 특소이드 단백질의 분자 수를 나타낸다. 탄수화물 항원 대 특소이드 단백질 비가 5:1 내지 39:1의 범위인 백

신의 IgG 생성은 탄수화물 항원 대 독소이드 단백질 비가 4:1과 동일하거나 그 미만인 백신의 IgG 생성에 비해 더 높은 것이 발견되었다.

[0006] 본 발명의 한 구체예는 하기 화학식 (I)의 분리된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다;



화학식 (I)

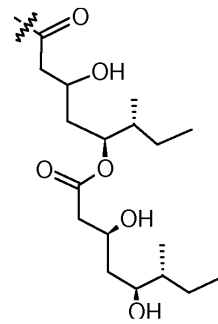
[0007]

상기 식에서,

[0008]

[0009] R¹은 β-D-아피오스 또는 β-D-크실로스로부터 선택되고;

[0009]

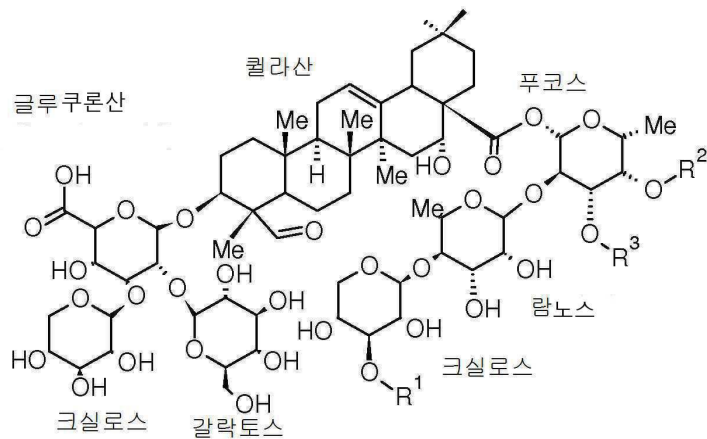


[0010]

R² 및 R³는 H, 알킬 또는  으로부터 선택된다.

[0011]

본 발명의 또 다른 구체예는 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다:



화학식 (I)

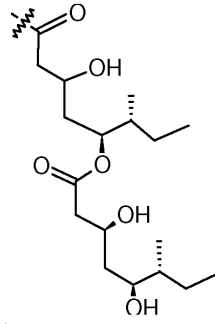
[0012]

상기 식에서,

[0013]

[0014] R¹은 β-D-아피오스 또는 β-D-크실로스로부터 선택되고;

[0014]



[0015] R² 및 R³는 H, 알킬 또는 C_6H_5 으로부터 선택된다.

[0016] 본 발명의 세 번째 구체예는 1857 화합물 V1A, 1857 화합물 V1B, 1857 화합물 V2A 및 1857 화합물 V2B를 포함하는 신규한 사포닌 애주버트, OBI-821을 제공한다.

[0017] 본 발명의 네 번째 구체예는 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 및 OBI-821 사포닌 애주버트를 포함하는 백신을 제공한다. 한 구체예에서, 백신은 담체 단백질을 추가로 포함한다. OBI-821 사포닌 애주버트를 지닌 백신의 IgG 생성, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC) 활성은 OBI-821 사포닌 애주버트를 지니지 않은 백신에 비해 더 높은 것이 발견되었다.

[0018] 본 발명은 또한 (i) 본원에 기재된 유효량의 백신을 투여하여 암 세포가 억제되게 함으로써, 암 세포를 억제하고, (ii) 본원에 기재된 유효량의 백신을 이를 필요로 하는 피검체에 투여하여, 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 또한 본원에 기재된 백신 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 기재한다.

[0020] 이러한 용어들을 포함하는 언급은 본원에 기재된 요지를 제한하거나 하기 특허청구범위의 범위 또는 의미를 제한하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 본 특허에 의해 포괄되는 발명의 구체예는 본 개요가 아닌 하기 청구범위에 의해 정의된다. 본 개요는 본 발명의 다양한 양태의 높은 수준의 개요이고 하기 상세한 설명 섹션에 추가로 기재되는 일부 개념을 소개한다. 본 개요는 청구된 요지의 핵심 또는 필수적인 특징을 밝히려는 의도가 아니며, 청구된 요지의 범위를 결정하는 것과 별도로 이용하려는 것도 아니다. 이러한 요지는 전체 명세서, 임의의 또는 모든 도면 및 각 청구범위의 적절한 부분을 참조로 이해되어야 한다.

[0021] 첨부된 도면 및 이어지는 상세한 설명과 함께 읽을 때 본 발명은 보다 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 본 발명의 예시적인 구체예는 다음의 도면을 참조하여 하기에 상세하게 기재된다:

도 1A는 조성물 Globo H/KLH/ OBI-821 사포닌, Globo H/DT/OBI-821 사포닌, Globo H/DT/C34 및 Globo H/KLH/C34에 대한 24일차 정량적인 항-Globo H IgG 역가를 예시하는 막대 그래프이다.

도 1B는 도 1A의 조성물의 24일 기간에 걸친 항-Globo H IgG 역가를 예시하는 선 그림이다.

도 2는 마우스에서 24일 기간에 걸쳐 G2 백신 (Globo H/DT (8:1)); G3 백신 (Globo H/DT (8:1)/OBI-821); 및 G4 백신 (Globo H/DT (24:1)/OBI-821)의 생체내 ADCC 및 CDC 활성을 도시하는 막대 그래프의 어셈블리이다. 도 2A는 ADCD 원시 데이터를 예시한다. 도 2B는 ADCD 표준화 데이터를 예시한다. 도 2C는 CDC 원시 데이터를 예시하고 도 2D는 CDC 표준화 데이터를 예시한다.

도 3A 및 도 3B는 24일 기간에 걸쳐 조성물 G1 (Globo H/KLH/ OBI-821), G2 (Globo H/DT (3:1)/ OBI-821), G3 및 G4 (Globo H/DT (8:1)/ OBI-821), G5 (Globo H/DT (8:1)/C34), G6 (Globo H/KLH/C34), G7 (Globo H/DT(16:1)/ OBI-821) 및 G8 (PBS)의 전반적인 IgM 및 IgG 역가를 예시하는 선 그림이다.

도 4는 도 3에 열거된 조성물의 10일, 17일 및 24일에서의 IgM 및 IgG 반응을 도시하는 막대 그래프의 어셈블리이다: 패널 (A)-(C)는 각각 10일, 17일 및 24일에 도 3에 나열된 조성물의 IgM 반응을 예시한다. 패널 (D)-(F)는 각각 10일, 17일 및 24일에 도 3에 나열된 조성물의 IgG 반응을 예시한다.

도 5A - 도 5C는 OBI-821 (화합물 1989 및 1857 포함)의 질량 스펙트럼 이미지이다.

도 6은 OBI-821의 크로마토그램 LC-UV 이미지이다.

도 7은 OBI-821의 크로마토그램 LC-MS 이미지의 어셈블리이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

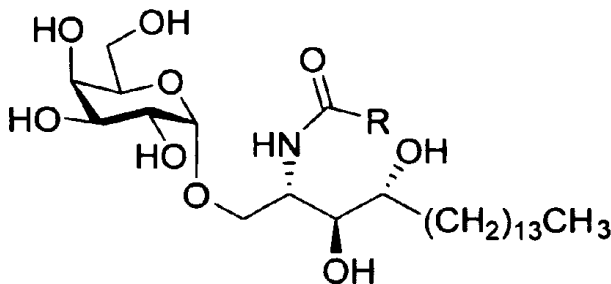
- [0023] 본 발명의 명백하고 준비된 이해를 제공하기 위하여, 특정 용어들이 본원에 정의된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 보통 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0024] 본원에서 사용되는 "유효량"은 촉진할 수 있는 질량으로서 임상적으로 또는 다양한 영상 수단을 통해 방사선적으로 검출될 수 있는, 비제한적으로, 체중 감소, 동통 및 종양 질량을 포함하는, 암의 증상 및 징후를 감소시키는 것에 충분한 백신 또는 약학적 조성물의 용량을 의미한다.
- [0025] 용어 "피검체"는 암에 걸린 척추동물 또는 암 치료가 필요할 것으로 여겨지는 척추동물을 나타낼 수 있다. 피검체는 온혈동물, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류, 및 보다 바람직하게는, 인간을 포함한다. 비-인간 영장류도 피검체이다. 피검체라는 용어는 고양이, 개 등과 같은 애완동물, 가축 (예를 들어, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등) 및 실험실 동물 (예를 들어, 마우스, 토끼, 래트, 케르빌루스쥐, 기니아 피그 등)을 포함한다. 따라서, 수의적 용도 및 의료 제형이 본원에서 고려된다.
- [0026] 본원에서 사용되는 용어 "알킬"은, 달리 언급되지 않는 한, 치환되거나 비치환될 수 있는 1-20개 탄소 원자, 예컨대 C₁-C₈ 또는 C₁-C₄를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 일가 탄화수소를 의미한다 (그 밖의 사슬 길이, 예컨대 21-30개도 본 발명에 포함될 수 있다). 알킬의 예는, 비제한적으로, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, 및 t-부틸을 포함한다.
- [0027] 용어 "실질적으로 순수한"은 그 자연 상태에서 보통 사포닌과 결합된 화합물이 실제로 없고, 일정하고 재현가능한 크로마토그래피 반응, 용리 프로파일, 및 생물학적 활성을 나타내는 것을 의미한다. 용어 "실질적으로 순수한"은 사포닌과 그 밖의 화합물의 인공 또는 합성 혼합물을 배제하려는 것이 아니다.
- [0028] 본원의 모든 숫자는 "약"에 의해 수정되는 것으로 이해될 수 있다.
- [0029] **높은 탄수화물 비를 갖는 백신**
- [0030] 종양 관련 탄수화물 항원은 일반적으로 불충분한 면역원성을 나타낸다. 담체 단백질과 컨쥬게이션된 탄수화물 항원은 상기 탄수화물 항원의 면역원성을 높이도록 채용되었다. 예를 들어, 약 700개의 Globo H 분자가 하나의 무독성 키흐 림펫 헤모시아닌 (KLH) 단백질에 컨쥬게이션되고, 평균 약 2 내지 4개의 Globo H 분자가 디프테리아 독소 (DT)에 컨쥬게이션되며, 약 8개의 Globo H 분자가 소혈청 알부민 (BSA)에 컨쥬게이션되고, 약 6개의 Globo H 분자가 과상풍 특소이드에 컨쥬게이션된다 (미국특허 8,268,969호의 표 1).
- [0031] 본 발명은 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 및 특소이드 단백질을 포함하는 백신을 제공하며, 여기서 탄수화물 항원 대 특소이드 단백질의 비는 5:1 내지 39:1의 범위이고, 상기 비는 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편의 분자 대 특소이드 단백질의 분자의 수를 반영한다. 그러한 백신은 탄수화물 항원 분자 대 특소이드 단백질 분자 비가 4:1과 같거나 그 미만인 핵산에 비해 보다 나은 면역원성을 나타낸다. 그 밖의 범위가 또한 본 발명에 포함되며, 예를 들어 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1, 37:1, 38:1 또는 39:1의 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편의 분자 대 특소이드 단백질의 분자의 수의 비가 포함된다.
- [0032] 한 구체예에서, 특소이드 단백질은 과상풍 특소이드 (TT)이고 탄수화물-TT 백신에서 탄수화물 항원 대 TT의 비는 7:1 내지 12:1의 범위이다.
- [0033] 본 발명은 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 및 디프테리아 독소 (DT)를 포함하는 백신을 제공하며, 여기서 탄수화물 항원 대 DT의 비는 5:1 내지 39:1의 범위이고, 상기 비는 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편의 분자 대 DT의 분자의 수를 반영한다, 또 다른 구체예에서, 탄수화물-DT 백신 중 탄수화물 항원 대 DT의 비는 8:1 내지 24:1의 범위이다.
- [0034] 탄수화물 항원의 예는, 비제한적으로, Globo H, 단계-특이적 배아 항원 3 (SSEA3) (또한 소위 Gb5), 단계-특이적 배아 항원 4 (SSEA-4), Gb-4, Gb-3, 루이스 항원, 예컨대 sLe^x, Le^x, sLe^a, Le^a, Le^y, 다당류 항원, 예컨대

폴리시알산 (PSA), sTn(c), Tn(c), 톰젠-프리덴라이히(Thomsen-Friedenreich) 항원 (TF(c)), 강글리오시드, 예컨대 GD1, GD2, GD3, 푸코실, GM1, GM1, GM2, GM3, GD1 α 및 GM2를 포함한다. 그 밖의 탄수화물 항원은, 비제한적으로, α -갈락토스, α -Man-6-포스페이트, α -L-람노스, α -GalNAc(Tn), α -NeuAc-OCH₂C₆H₄-p-NHCOOCH₂, Fuc α 1-2Gal β 1-4GalNAc β (H types3), NeuAc α 2-8NeuAc α , (NeuAc α 2-8)₂ 폴리시알산, NeuAc α 2-6Galb, NeuAc β 2-6Gala(STn), Gala1-3Galb1-4GlaNAcb (NeuAca2-8)₃, GalNAc α a-3(Fuc α 1-2)Gal β (혈액형 A), Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β (혈액형 B), 6Gal-HSO₃-SiaLex, 6GluNAc-HSO₃-SiaLex 및 α 2-6 시알산화 이촉각 (diantennary) N-글리칸을 포함한다. 한 구체예에서, 탄수화물 항원은 Globo H이다. "Globo H"는 원래 인간 유방암 세포주 MCF-7에서 분리된 육당류 (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1)이다 (Menard S, Tagliabue E, Canevari S, Fossati G, Colnaghi MI. (1983) Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res*, **43**, 1295-300; and Bremer EG, Lavery SB, Sonnino S, Ghidoni R, Canevari S, Kannagi R, Hakomori S. (1984) Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J Biol Chem*, **259**, 14773-7). Globo H는 결장암, 난소암, 위암, 췌장암, 자궁내막암, 폐암, 전립선암 및 유방암과 같은 다양한 상피 세포 종양에서 발현된다 (Menard S et al. *supra*; Bremer EG et al., *supra*; Canevari S, Fossati G, Balsari A, Sonnino S, Colnaghi MI. (1983). Globo H는 시판되며 (예를 들어, Carbosynth, UK), 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 글리코시드를 세라미드에 부착시킴에 의해 합성될 수 있다.

[0035] 탄수화물 항원 대 독소이드 단백질 비가 5:1 보다 크거나 이와 같은 백신은 염기성 조건에서, 즉 8 또는 그 초과, 9 또는 그 초과, 10 또는 그 초과, 11 또는 그 초과, 또는 12 또는 그 초과인 pH에서 제조된다. 탄수화물 항원 대 독소이드 단백질의 비는 당 분야에 공지된 방법, 예를 들어 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 결정될 수 있다. 미국특허 8,268,969호; 또한, 문헌[Morelle W, Faid V, Chirat F, Michalski JC. *Methods Mol Biol*. 2009;534:5-21. doi: 10.1007/978-1-59745-022-5_1. Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry]을 참조하라.

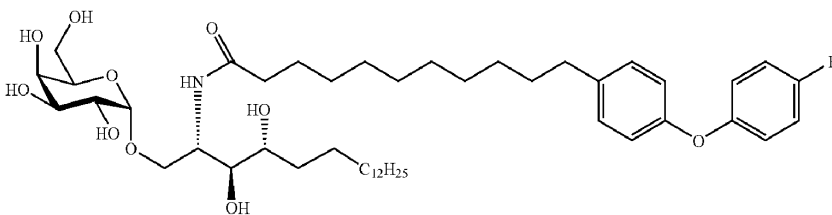
[0036] 백신은 애쥬번트를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 애쥬번트는 사포닌, 예컨대 본원에 기재된 OBI-821이거나 α -갈락토실-세라마이드의 합성 유사체 (α -GalCer 또는 C1)이다.

[0037] 용어 " α -갈락토실-세라마이드" 및 " α -GalCer"는 그 전체 내용이 참조로서 포함되는 미국특허 8,268,969호에 기재된 대로, T 헬퍼 (TH)1 및 TH2 사이토카인 둘 모두를 생성하기 위해 천연 킬러 T 세포를 자극하는 당지질이다. 한 구체예에서, α -GalCer 애쥬번트는 하기 구조를 갖는다:



[0038] 상기 식에서, R은 (CH₂)₂₄CH₃, (CH₂)₇PhF, (CH₂)₁₀PhOPhF 또는 (CH₂)₁₀PhF이다.

[0040] 한 구체예에서, R은 하기 구조를 갖는 C34 애쥬번트로서 공지된 (CH₂)₁₀PhOPhF이다:



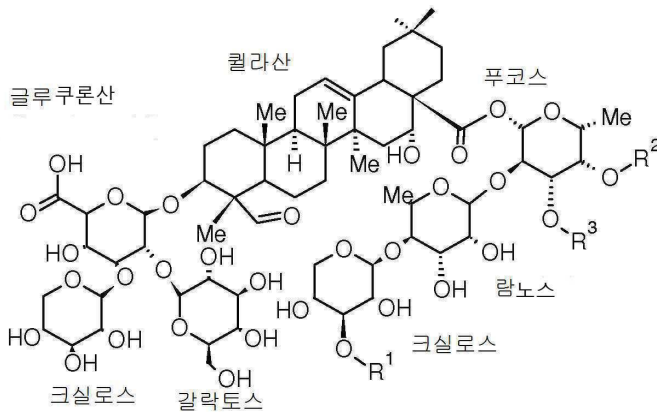
[0041]

[0042] **신규한 사포닌 애주번트**

[0043] 본 발명은 실질적으로 순수할 수 있는 OBI-821 사포닌을 제공한다. 본 발명은 실질적으로 순수한 OBI-821 사포닌 뿐만 아니라 생물학적으로 활성인 단편을 포함한다. 본 발명은 또한 불순한 형태의 OBI-821 사포닌을 포함할 수 있다. 정제된 OBI-821 사포닌은 본원에 기재된 백신과 함께 투여되거나 그 밖의 실질적으로 순수한 사포닌 또는 비-사포닌 애주번트와 혼합될 때 향상된 애주번트 효과를 나타낸다.

[0044] OBI-821 사포닌은, 예를 들어, 그 전체 내용이 참조로서 포함되는 미국특허 5,057,540호 및 미국특허 6,524,584호에 기재된 대로 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 저압 액체 실리카 크로마토그래피, 및 친수성 상호적 크로마토그래피 (HILIC)에 의해 퀴라자 사포나리아 몰리나(*Quillaja saponaria* Molina) 나무의 껍질로부터 고 정제도로 추출되는 자연 발생 글리코시드이다. 고압 액체 크로마토그래피 분석은 OBI-821이 구조적으로 관련된 이성질체 화합물의 혼합물임을 나타낸다. OBI-821 사포닌의 정제된 상이한 이성질체 화합물이 확인되고 본원에 기재되었다.

[0045] OBI-821 사포닌은 하기와 같은 화학식 I의 적어도 하나의 분리된 화합물을 포함한다:



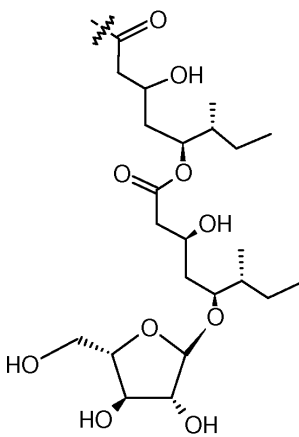
화학식 (I)

[0046]

[0047] 상기 식에서,

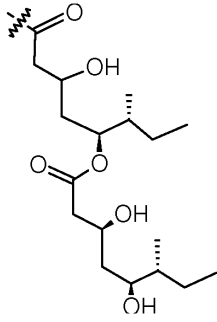
[0048] R¹은 β-D-아피오스 또는 β-D-크실로스이고;

[0049] R² 및 R³은 독립적으로 H, 알킬,



[0050]

(1989 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티), 또는

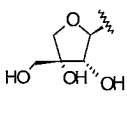
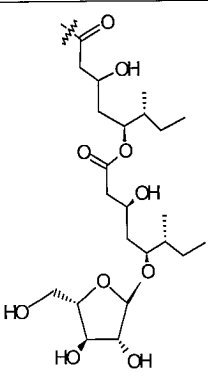
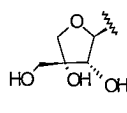
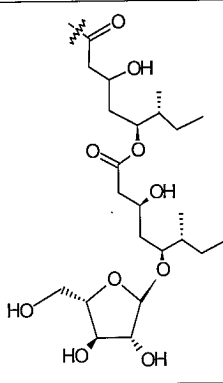
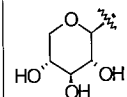
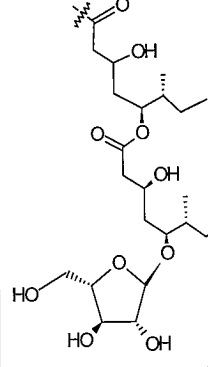


[0051] (1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티)이다.

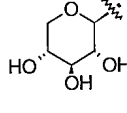
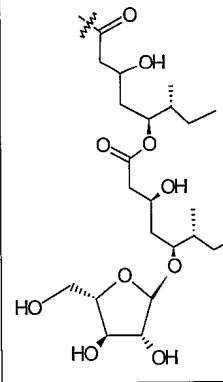
[0052] OBI-821 사포닌은 또한 화학식 I의 분리된 화합물을 포함할 수 있고, 여기서 (i) R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는 상기 묘사된 1989 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이고, R^3 은 H이거나 (1989 화합물 V1A); (ii) R^1 은 β -D-아피오스이고, R^2 는 H이고, R^3 은 상기 묘사된 1989 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이거나 (1989 화합물 V1B); (iii) R^1 은 β -D-크실로스이고, R^2 는 상기 묘사된 1989 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이고, R^3 은 H이거나 (1989 화합물 V2A); (iv) R^1 은 β -D- 크실로스이고, R^2 는 H이고, R^3 는 상기 묘사된 1989 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이다 (1989 화합물 V2B). 총괄적으로, 1989 화합물 V1A, 1989 화합물 V1B, 1989 화합물 V2A 및 1989 화합물 V2B를 "1989 화합물 혼합물"이라고 부른다.

[0053] 표 1은 1989 화합물의 작용기 및 1989 화합물 혼합물 중 각 1989 화합물의 몰 %를 요약한다.

[0054] 표 1

물 %	R ¹	R ²	R ³
1989 화합물 V1A 64.5%	β -D-아피오스 		H
1989 화합물 V1B 1.5%	β -D-아피오스 	H	
1989 화합물 V2A 33.3%	β -D-크실로스 		H

[0055]

1989 화합물 V2B 0.7%	β -D-크실로스 	H	
-------------------------	--	---	---

[0056]

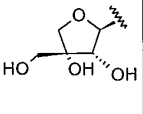
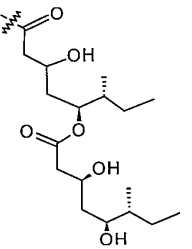
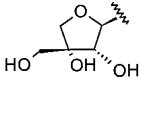
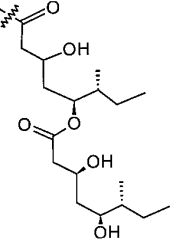
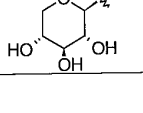
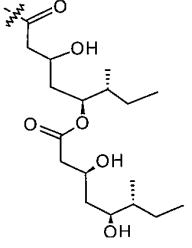
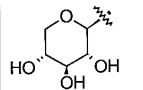
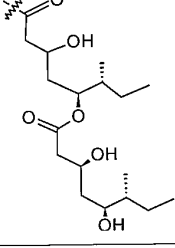
[0057]

OBI-821 사포닌은 화학식 I의 분리된 화합물을 포함할 수 있고, 여기에서 (i) R¹은 β -D-아피오스이고, R²는 상기 묘사된 1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이고, R³는 H이거나 (1857 화합물 V1A); (ii) R¹은 β -D-아피오스이고, R²는 H이고, R³는 상기 묘사된 1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이거나 (1857 화합물 V1B);

(iii) R¹은 β-D-크실로스이고, R²는 상기 묘사된 1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이고, R³는 H이거나 (1857 화합물 V2A); (iv) R¹은 β-D- 크실로스이고, R²는 H이고, R³는 상기 묘사된 1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티이다 (1857 화합물 V2B). 총괄적으로, 1857 화합물 V1A, 1857 화합물 V1B, 1857 화합물 V2A 및 1857 화합물 V2B를 "1857 화합물 혼합물"이라고 부른다.

[0058] 표 2는 1857 화합물의 작용기 및 1857 화합물 혼합물 중 각 1857 화합물의 몰 %를 요약한다.

[0059] 표 2

몰 %	R ¹	R ²	R ³
1857 화합물 V1A 64.7%	β-D-아피오스 		H
1857 화합물 V1B 1.3%	β-D-아피오스 	H	
1857 화합물 V2A 33.4%	β-D-크실로스 		H
1857 화합물 V2B 0.6%	β-D-크실로스 	H	

[0060]

[0061] OBI-821 사포닌은 하기 화합물들 중 하나 이상을 포함한다: (i) 1857 화합물 V1A; (ii) 1857 화합물 V1B; (iii) 1857 화합물 V2A; (iii) 1857 화합물 V2B; (iv) 1989 화합물 V1A; (v) 1989 화합물 V1B; (vi) 1989 화합물 V2A; 또는 (vii) 1989 화합물 V2B. OBI-821 사포닌 중 1857 화합물 혼합물 및 1989 화합물 혼합물의 백분율은 하기의 범위일 수 있다:

[0062] (i) OBI-821의 약 1몰 % 내지 약 15몰 %가 1857 화합물 혼합물로 구성됨; 및

[0063] (ii) OBI-821의 약 85몰 % 내지 약 99몰 %가 1989 화합물 혼합물로 구성됨.

[0064] 모든 몰 %는 0.1% 증분만큼 변화될 수 있다 (예컨대, 약 87% 내지 약 90%, 약 90.5% 내지 약 97%, 약 3.5% 내지 약 11%, 약 10% 내지 약 14%).

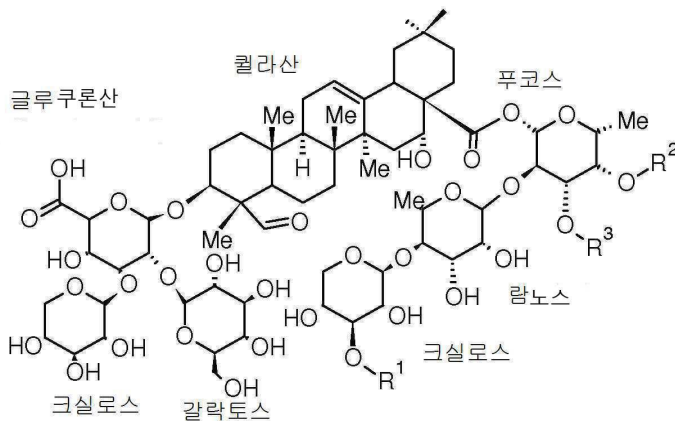
[0065] 1989 화합물 혼합물은 약 60-70몰 %의 1989 화합물 V1A; 약 1-5몰 %의 1989 화합물 V1B; 약 30-40몰 %의 1989 화합물 V2A; 및 약 0.1-3몰 %의 1989 화합물 V2B를 포함할 수 있다. 모든 몰 %는 0.1% 증분만큼 변화될 수 있다

(예컨대, 65%, 2.5%, 35.6%).

[0066] 1857 화합물 혼합물은 약 60-70몰 %의 1857 화합물 V1A; 약 1-5몰 %의 1857 화합물 V1B; 약 30-40몰 %의 1857 화합물 V2A; 및 약 0.1-3몰 %의 1857 화합물 V2B를 포함할 수 있다. 모든 몰 %는 0.1% 증분만큼 변화될 수 있다 (예컨대, 67%, 1.5%, 33.9%).

[0067] 또 다른 구체예에서, 실질적으로 순수한 OBI-821은 미정제 켈라자 사포나리아 추출물로부터 정제되며, 상기 OBI-821은, 11분에 A:B 95%:5% 내지 75%:25%의 이동상을 포함하고, 이동상 A가 0.1% 트리플루오로아세트산을 지닌 증류수이고, 이동상 B가 1ml/분의 유량의 0.1% 트리플루오로아세트산을 지닌 아세토니트릴인 용리 프로그램을 이용하여, 5 um 입자 크기, 100 Å 포어, 4.6mm IDx25cm L을 지닌 Symmetry C18 컬럼 상에서 역상-HPLC에 대해 분석하는 경우, 용매 피크를 제외하고, 크로마토그램의 모든 피크의 총 면적의 90% 이상을 포함하는 단일한 지배적인 피크를 특징으로 한다.

[0068] 한 구체예에서, 약학적 조성물은 하기 화학식 (I)의 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다:

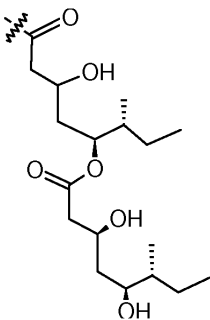


화학식 (I)

[0069] 상기 식에서,
 [0070]

[0071] R¹은 β-D-아피오스 또는 β-D-크실로스이고;

[0072] R² 및 R³은 독립적으로 H, 알킬, 또는



[0073] (1857 화합물에 대한 지방산 아실 모이어티)이다.

[0074] 백신은 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편 및 OBI-821 사포닌을 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 백신은 Globo H, SSEA-3, SSEA-4, Gb-4 또는 이의 혼합물로부터 선택되는 탄수화물 항원, DT, 및 OBI-821 사포닌을 포함한다. 또한 또 다른 구체예에서, 백신은 탄수화물 항원 또는 이의 면역원성 단편; 담체 단백질 및 OBI-821 사포닌을 포함한다. 담체 단백질의 비제한적인 예는 독소이드 단백질 및 비-독소이드 단백질, 예컨대 KLH를 포함한다.

[0075] **독소이드 단백질**

[0076] 탄수화물 항원에 컨쥬게이션된 독소이드 단백질은 디프테리아 독소 (DT) 또는 파상풍 독소이드 (TT)일 수 있다.

[0077] 독소는, 예를 들어, 포름알데히드, 글루타르알데히드, UDP-디알데히드, 피옥사이드, 산소로의 처리 또는 돌연변이 (예컨대, 재조합 방법 이용)에 의해 불활성화될 수 있다. 문헌[Relyveld *et al.*, Methods in Enzymology,

93:24, 1983. Woodrow and Levine, eds., *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1989. Genth *et al.*, *Inf. and Immun.*, 68(3):1094-1101, 2000]. 감소된 독성을 갖는 돌연변이주 디프테리아 독소가 또한 제조합 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 미국특허 5,085,862호; 5,221,618호; 5,244,657호; 5,332,583호; 5,358,868호; 및 5,433,945호.

[0078] DT는 디프테리아 독소 교차-반응 물질 (DT-CRM) 또는 디프테리아 독소이드이다. DT-CRM은, 예컨대, 돌연변이에 의해 또는 화학적 변형에 의해, 더 이상 충분한 ADP-리보실을 갖지 않게 된 돌연변이주 디프테리아 독소를 의미한다. DT-CRM의 비제한적인 예는 DT-CRM 30, DT-CRM 45, DT-CRM 176, DT-CRM 197 및 DT-CRM 228을 포함한다. 디프테리아 독소이드는 포르말데히드-불활성화된 디프테리아 독소이다. DT는 시판되거나, 그 전체 내용이 참조로서 포함되는 미국특허 5,614,382호에 기재된 제조합 DNA 기법과 같은, 당 분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0079] 본원에 기재된 백신의 탄수화물 항원은 그 전체 내용이 참조로서 포함되는 미국특허 8,268,969호에 기재된 합성 공정에 의해, p-니트로페닐 링커를 통해, 담체 단백질에 공유적으로 결합될 수 있다.

[0080] 본 발명의 백신은 하기 활성 중 하나 이상을 유도할 수 있다: IgM 역가에 비해 높은 IgG 역가, 높은 보체-의존성 세포독성 (CDC) 활성, 및/또는 높은 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 활성. 또 다른 구체예에서, 백신은 하기 세포 중 하나 이상을 유도한다: 천연 킬러 세포, CD4+ T 림프구 또는 CD8+ T 림프구. 비제한적으로 T 헬퍼 세포 활성화를 포함하는 그 밖의 면역학적 변수가 측정될 수 있다.

[0081] 본 발명은 또한 본원에 기재된 백신 및 약학적으로 허용되는 비히클, 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 적합한 비히클은, 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합물이다. 또한, 비히클은 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제, 또는 애쥬번트와 같은 그 밖의 부형제를 함유할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 본 발명의 약학적 조성물의 흡수 또는 제거율에 작용하는, 예컨대 안정화시키거나, 증가 또는 감소시키는 생리학적으로 허용되는 화합물을 함유할 수 있다. 생리학적으로 허용되는 화합물은, 예컨대 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 또는 텍스트란, 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 글루타티온, 킬레이팅제, 저분자량 단백질, 세척제, 리포솜 담체, 또는 그 밖의 안정화제 및/또는 완충제를 포함할 수 있다. 부형제는 비이온성 계면활성제, 폴리비닐피롤리돈, 인간 혈청 알부민, 알루미늄 하이드록사이드, 마취 작용제, 및 다양한 변형되지 않고 유도체화된 사이클로덱스트린일 수 있다. 보다 바람직하게는, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 폴리비닐피롤리돈은 바람직하게는 약제 등급의 폴리비닐피롤리돈인 플라스돈(Plasdone) C15일 수 있다. 마취 작용제는 바람직하게는 벤질 알콜이다. 그 밖의 생리학적으로 허용되는 화합물은 습윤제, 에멀전화제, 분산제 또는 보존제를 포함한다. 예컨대, 문헌[the 21st edition of Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, Pa. ("Remington's")]을 참조하라. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 보조 물질, 예컨대 약리학적 작용제, 사이토카인, 또는 그 밖의 생물학적 반응 개질제를 포함할 수 있다. 그러한 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화된다.

[0082] 백신은 하기 투여 경로용으로 제형화될 수 있다: 근내, 피내, 경구, 경피, 비강, 구강, 직장, 질, 흡입에 의해, 또는 피하 투여에 의해. 만족스러운 면역원성이 유도될 수 있는 한 다른 투여 방식도 적용될 수 있다.

[0083] 본 발명의 약학적 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 또는 주입 전에 액체 비히클에 용해 또는 현탁되기에 적합한 고체 형태로서, 주사가능하게 제조될 수 있다. 약학적 조성물은 또한 에멀전화된 고체 형태 또는 지속적인 전달에 사용하기 위해 리포솜 비히클 또는 다른 미립자 담체에 캡슐화된 활성 성분으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 오일 에멀전, 유중수 에멀전, 수중유중수 에멀전, 부위-특이적 에멀전, 장기-체류 에멀전, 점착성 에멀전, 마이크로에멀전, 나노에멀전, 리포솜, 미세입자, 미세구체, 나노구체, 나노입자 및 다양한 천연 또는 합성 중합체, 예컨대 재흡수불가능한 불침투성 중합체, 예컨대 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 및 Hytrel® 공중합체, 팽윤성 중합체, 예컨대 하이드로겔, 또는 재흡수가능한 중합체, 예컨대 콜라겐 및 특정 폴리산 또는 폴리에스테르, 예컨대 백신의 지속적인 방출을 가능케 하는, 재흡수가능한 봉합을 하는데 이용되는 것들의 형태일 수 있다.

[0084] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용되는 염 및 이의 생리학적 기능성 유도체는 알칼리 금속 (예를 들어, 소듐, 포타슘), 알칼리 토금속 (예를 들어, 칼슘, 마그네슘), 암모늄 및 NX_4^+ (상기 식에서, X는 C₁-C₄ 알킬이다)와 같은 적절한 염기로부터 유래된 염을 포함한다. 아미노기의 약학적으로 허용되는 염은 유기 카르복실산, 예컨대 타르타르산, 예를 들어, 포름산, 글루쿠론산, 말산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤

조산, 알트라닐산, 메실산, 살리실산, 하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 만델산, 엠본산(파모산), 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, 판토텐산, 툴루엔설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 설파닐산, 스테아르산, 알켄산, 하이드록시부티르산, 사이클로헥실아미노설폰산, 갈락타르산 및 갈락투론산 등, 락토비온산, 푸마르산, 및 숙신산과 같은 유기산의 지방족, 사이클로지방족, 방향족, 헤테로사이클릭, 카르복실산 및 설폰산 부류; 유기 설폰산, 예컨대 메타니에설폰산(methanesulfonic), 에탄설폰산, 이소티온산, 벤제닐설폰산(benzenesulfonic) 및 p-톨루엔설폰산; 및 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 니트르산, 카르본산, 황산, 설파산 및 인산 등의 염을 포함한다. 하이드록시기를 지닌 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 Na^+ , NH_4^+ 또는 NX_4^+ (여기서 X는, 예를 들어, C₁-C₄ 알킬기이다), Ca^{++} , Li^+ , Mg^{++} , 또는 K^+ 및 아연과 같은 적합한 양이온과 함께 상기 화합물의 음이온으로 구성되거나 유기 염은 일차, 이차 및 삼차 아민, 사이클릭 아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민 (N-메틸글루카민) 및 프로카인 등으로부터 제조된다. 이러한 모든 염은, 예를 들어 적절한 산 또는 염기를 유리 형태의 화합물과 반응시킴에 의해 상응하는 화합물로부터 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다.

[0085] 면역 반응을 유도/암 세포를 억제하는 방법

[0086] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 유효량의 백신을 이를 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함하는, 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 면역 반응은, 비제한적으로, NK 세포 반응, ADCC 및 CDC 활성화, 및 IgM 및 IgG 생성을 포함한다.

[0087] 또한 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 유효량의 백신을 이를 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함하는, 암 세포를 억제하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 암은 유방암, 폐암, 식도암, 직장암, 담도암, 간암, 협측암, 위암, 결장암, 비인두암, 신장/콩팥암, 뇌 종양, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 고환암, 방광암, 두경부암, 구강암, 신경내분비암, 부신피질암, 갑상샘암, 골암, 피부암 (예컨대, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종)으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 암은 Globo H 발현성 암이다. Globo H 발현성 암의 비제한적인 예는 유방암, 폐암, 위암, 결장암, 췌장암, 전립선암, 난소암 및 자궁내막암을 포함한다. 항-Globo H 항체와 같이, 백신에 의해 생성된 항체는 본질적으로 Globo H 발현성 암을 억제한다.

[0088] 특정한 구체예에서, 백신의 유효량은 피검체에서 특수한 탄수화물 항원 (예컨대, Globo H)에 대해 IgG 생성을 자극하는 것과 같이, 요망되는 면역학적 효과를 유도하는 것이다. 백신 또는 약학적 조성물의 유효량 또는 용량은 탄수화물 항원의 양, 이용된 애주번트의 유형, 투여 방식, 및 치료되는 피검체의 연령, 크기, 및 조건에 따라 달라질 수 있다. 면역원성을 유도하는데 요구되는 백신 또는 약학적 조성물의 정확한 양은 주치의에 의해 결정될 것이다.

[0089] 백신은 수 개월 내지 수 년 간의 장기 면역 보호 효과를 달성하기 위해, 특정 시간 간격으로 1회 이상의 추가 용량과 함께 또는 없이 일정한(stat) 용량으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 증상의 중증도, 요망되는 면역보호의 정도, 약학적 조성물이 예방용 또는 치료용으로 사용되었는지 여부 등과 같은 임의의 다양한 인자에 의존적일 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 매일 1회, 매일 2회, 매일 3회, 격주(qow), 매주 1회(qw), 매주 2회(biw), 매주 3회(tiw), 매주 4회, 매주 5회, 매주 6회, 격일(qod), 매일(qd), 하루에 2회(qid), 또는 하루에 3회(tid) 투여된다. 백신은 또한 화학요법, 표적 요법 또는 암 치료용 중앙 관련 탄수화물 항원을 표적화하는 항체와 같은 그 밖의 통상적인 요법과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

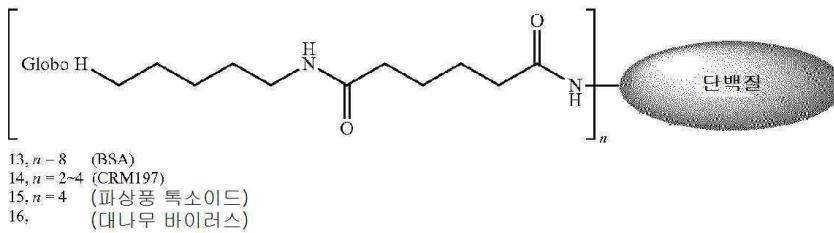
[0090] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이러한 실시예는 제한이라기보다 설명을 목적으로 제공된다. 당업자는, 본 설명에 비추어, 많은 변화가 기재된 특정 구체예에서 이루어질 수 있고 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으며 같거나 유사한 결과가 여전히 얻어질 수 있음을 이해하여야 한다.

[0091] 실시예 1: 더 높은 탄수화물/독소 단백질 비를 갖는 백신의 제조 및 OBI-821의 추출

[0092] Globo H는, 예를 들어, 그 내용의 전문이 본원에 참조로서 포함되는 미국특허 6,544,952 또는 8,268,969호에 기재된 대로, 당 분야에 공지된 방법에 따라 KLH 또는 DT와 컨주게이션되었다. 생성된 백신은 Globo H:DT (Globo H 대 DT의 분자의 비=2-4:1)를 포함하였다.

[0093] 글리코컨주게이트를 생성하기 위한 일반적인 절차

[0094] 글리코컨쥬게이트를 다음과 같이 제조하였다:



[0095]

[0096]

BSA, DT-CRM197, 및 파상풍 독소이드 (Adimmune, Taiwan)를 100 mM 포스페이트 완충제 pH 7.2 (~5 mg/ml)에 용해시키고, 30 내지 40 당량의 Globo H 하프 에스테르 35를 상기 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 24시간 동안 실온에서 부드럽게 교반시켰다. 그 후 혼합물을 탈이온수에 희석시키고, 5회 변경의 탈이온수에 대해 투석하였다. 이어서 용액을 백색 분말로 냉동건조시켰다(lyophilized). 수득된 Globo H-단백질 쥬게이트를 MALDI-TOF 분석에 의해 특성화하여 탄수화물 혼입 비율을 결정할 수 있다. 41 (GH-BSA), MALDI-TOF 실측치 76029, 42 (GH-DT-CRM197) 실측치 62138, 43 (GH-TT) 실측치 162902, 44 (GH-BaMV)는 결정되지 않았다. 글리코컨쥬게이트에 대한 MALDI-TOF MS 분석. 글리코컨쥬게이트 및 일차 담체 단백질을 ddH₂O (~1 µg/µl)로 재구성할 수 있다. 매트릭스인 시나핀산을 아세트니트릴 및 탈이온수 1:1로 새롭게 제조하여, 0.1% TFA를 포함하는 10 mg/ml의 최종 매트릭스 농도가 되게 하였다. 매트릭스 용액 및 글리코컨쥬게이트를 부드럽게 부하시키고 혼합시킨 다음, 플레이트를 공기 건조시켰다. 측정 전에 소혈청 알부민을 이용한 캘리브레이션이 필수적이었다. 각각의 글리코컨쥬게이트 및 일차 단백질 샘플을 선형 양성 모드 하에 검출하였다. 평균 분자량은 담체 단백질 상에 혼입된 탄수화물 분자의 평균 수를 계산할 수 있게 한다.

[0097]

5:1을 넘는 탄수화물 항원 분자:독소 단백질 분자 비를 갖는 백신을 하기 단계에 따라 제조하였다:

[0098]

(a) 10ml-25ml의 Globo H (OBI Pharma, Taiwan에서 시판됨) 및 p-니트로페닐 에스테르 링커 (OBI Pharma, Taiwan에서 시판됨)를 25 µl DMF (Sigma-Aldrich, USA에서 시판됨)에 용해시켰다.

[0099]

(b) 25mg의 DT를 2.5ml의 포스페이트 완충제 (즉, pH>8인 염기성 완충제)에 용해시켰다.

[0100]

(c) 단계 (a)의 혼합물을 단계 (g)의 혼합물에 실온에서 밤새 첨가하였다. 생성된 혼합물은 8 내지 9.2의 pH를 가졌다.

[0101]

결과: MALDI-TOF MS에 의해 측정되는 바와 같이, 10ml의 Globo H가 Globo H: DT (8:1)를 포함하는 백신을 생성하였고 25의 Globo H가 Globo H: DT (24:1)를 포함하는 백신을 생성하였다.

[0102]

OBI-821 사포닌의 제조

[0103]

OBI-821 사포닌은 켈라자 사포나리아 추출물로부터 하기 단계에 따라서 추출되었다:

[0104]

(a) 켈라자 사포나리아 추출물을 큰 입자 C18 역상 크로마토그래피에 의해 미리-여과시킨 다음, 실리카 기반 예비 순상 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 이에 의해 미정제 OBI-821이 생성되었다.

[0105]

(b) 단계 (a)의 미정제 OBI-821을 다시 큰 입자 C18 역상 크로마토그래피에 의해 미리-여과시킨 다음 역상 예비 HPLC로 처리하였다. OBI-821 물질은 탈염 및 동결건조 공정에 의해 순차적으로 완성되었다.

[0106]

켈라자 사포나리아 몰리나 나무의 껍질로부터 추출된 정제된 OBI-821 사포닌을 질량 스펙트럼에 의해 분석하였다. 도 5a에서 1989.01의 질량 피크, 도 5b에서 1989.12의 질량 피크 및 1989.13의 질량 피크는 약 1989의 분자량을 갖는 화합물의 존재를 예시한다. 약 1989의 분자량을 갖는 화합물의 몰 비는 도 5a에서 89.8%, 도 5b에서 96.8% 및 도 5c에서 87.0%이다. 유사하게, 도 5a에서 1856.97의 질량 피크, 도 5b에서 1856.02의 질량 피크 및 1857.09의 질량 피크는 약 1857의 분자량을 갖는 화합물의 존재를 예시한다. 약 1857의 분자량을 갖는 화합물의 몰 비는 도 5a에서 10.2%, 도 5b에서 3.2% 및 도 5c에서 13%이다.

[0107]

정제된 OBI-821 사포닌은 크로마토그래피에 의해 추가로 분석되었다. 도 6은 크로마토그램 LC-UV 이미지이다 (컬럼: PolyLC PolyHYDROXYETHYL A 200* 4.6mm 5µm, 300A). 첫 번째 피크는 1989 V1 (A & B) 화합물 및 1857 화합물 V1 (A & B) 화합물 (약 65.94%)의 존재를 나타내고, 두 번째 피크는 1989 V2 (A & B) 화합물 및 1857 V2 (A & B) 화합물 (약 34.06%)의 존재를 나타낸다. 도 7은 크로마토그램 LC-MS 이미지이다 (컬럼: Waters

Symmetry ODS 150*2.1mm). 상부 패널에서 피크 1은 1989 화합물 V1B 및 V2B (약 2.2%)의 존재를 나타내는 한편, 피크 4는 1989 화합물 V1A 및 V2A (약 97.8%)의 존재를 나타낸다. 하부 패널의 피크 2는 1857 화합물 V1 B 및 1857 화합물 V2 B (약 1.9%)의 존재를 나타내고 피크 3은 1857 화합물 V1A 및 1857 화합물 V2A의 존재를 나타낸다.

[0108] 실시예 2: 더 높은 탄수화물/독소 단백질 비를 갖는 백신의 면역원성 및 OBI-281 사포닌의 애주번트 효율

[0109] 실시예 1의 Globo H/DT (8:1) 백신의 생체내 면역원성 평가 및 OBI-821 사포닌의 애주번트 효율 평가를 CL57B/6 마우스를 이용하여 수행하였다.

[0110] 약 8주령의 CL57B/6 마우스를 하기 4개의 연구 그룹으로 무작위화하였다:

그룹	처리	N(마우스의 수)	투여 경로	면역화 일
Globo H-DT/S	Globo H/KLH/ OBI -821 사포닌	6	피하	0, 7, 14 및 21 일
Globo H-KLH/C34	Globo H/KLH/C34	6		
Globo H-DT/S	Globo H/DT(Globo H 대 DT 의 분자의 비=8:1)/ OBI -821 사포닌	6		
Globo H-DT/C34	Globo H/DT(Globo H 대 DT 의 분자의 비=8:1)/C34	6		

[0111]

[0112] 혈액 샘플을 첫 번째 주입 전 또는 0일, 및 각 주입의 3일 후(즉, 10일, 17일 및 24일)에 항응고제 없이 눈-뒤 또는 안면 정맥을 통해 수집하였다. 혈액 샘플을 원심분리시켜 혈청 및 혈액 세포를 분리하였다. 혈청을 수집하여 -20℃에 저장하였고, 이는 이후에 ELISA에 의해 분석되었다. 각 마우스로부터의 혈청을 항-Globo H IgG 분석을 위해 연속 희석시켰다. Globo H-세라미드를 검정 플레이트 상에 밤새 코팅시킨 다음 30분 동안 1X 차단 완충제 (Sigma)로 차단시키고 PBST로 세척하였다. 희석된 혈청 샘플을 검정 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하고, 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG-AP 이차 항체 (Southern Biotech)를 샘플에 첨가하고, 45분 동안 RT에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 다시 세척한 다음, 크로모젠 기질을 첨가하고 37℃에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 정지 용액을 첨가하여 반응을 종료하였다. 광학 밀도를 405 nm 파장에서 플레이트 리더(Molecular Device)에 의해 정량하였다. 통계적 분석에 Mann-Whitney t-테스트를 이용하였다. 도 1A 및 도 1B는 시험된 백신의 정량적인 항-Globo H IgG 역가를 나타낸다.

[0113] 결과: Globo H/DT (비 8:1)-면역된 마우스로부터의 IgG 역가는 C34 애주번트를 이용한 Globo H/KLH의 역가보다 현저하게 높았다 (P<0.01). Globo H/DT (비 8:1)-면역된 마우스로부터의 IgG 역가는 OBI-821 사포닌 애주번트를 이용한 Globo H/KLH의 역가보다 높았다 (도 1(A) 참조). 이용된 담체 단백질의 유형과 관계없이, OBI-821 사포닌은 C34 애주번트에 비해 통계적으로 현저하게 높은 IgG 역가를 유발하였다 (P<0.05, 도 1A 및 도 1B 참조).

[0114] 실시예 3: ADCC 및 CDC 검정을 이용한 더 높은 탄수화물/독소 단백질 비를 갖는 백신의 면역원성 평가 및 OBI-

281 사포닌의 애쥬번트 효율

[0115] 네 그룹의 Lewis 래트를 표 3의 백신으로 면역시켰다.

[0116] 표 3: 백신 조성물

그룹	백신 조성물
G1	포스페이트 완충된 염수 (PBS)
G2	7.5 µg GH-DT(Globo H 대 DT 의 분자의 비 8:1)
G3	7.5 µg GH-DT(Globo H 대 DT 의 분자의 비 8:1) + 25µg OBI-821 사포닌
G4	7.5 µg GH-DT(Globo H 대 DT 의 분자의 비 24:1) + 25µg OBI-821 사포닌

[0117]

[0118] 래트를 표 3에 열거된 백신으로 0, 7, 14, 및 21일에 s.c. 면역시켰다. 말초혈 단핵구 (PBMC) 및 혈장을 첫 번째 주입 전 (즉, 0일) 및 10일, 17일 및 24일에 수집하였다.

[0119] ADCC 및 CDC 검정을 당 분야에 공지된 칼세인 AM 방출 방법을 이용하여 수행하였다. 절차는 하기와 같이 기재된다:

[0121] *칼세인 AM으로 표지된 표적 세포

[0122] MCF-7 유방암 세포 (표적 세포)를 2 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트 및 0.01 mg/mL 인슐린, 10% 우태아 혈청이 보충된 최소 필수 배지에서 배양시켰다. 표적 세포를 96 웰 플레이트에 첨가하고 (웰 당 5×10^3 개 세포), 37°C에서 가습된 5% CO₂ 대기에서 밤새 인큐베이션하였다. 배지를 폐기하고, 각 웰을 PBS로 1회 세척하였다. 100 L의 20 M 칼세인-AM 용액을 각 웰에 첨가하고 (웰 당 2 nmole)에 첨가하고, 37°C에서 가습된 5% CO₂ 대기에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 건조시키고, 각 웰을 PBS로 3회 세척하였다.

[0123] 샘플 혈장과 인큐베이션된 표적 세포

[0124] 샘플 혈장을 열-불활성화시키고 50 L의 1/5X 열-불활성화된 샘플 혈장을 "전체 방출" 및 "배경" 대조군을 제외한 각 웰에 첨가하였다. 50 L의 PBMC 또는 혈청의 첨가 후에 최종 희석 배수는 1/10X일 것이다. 플레이트를 37°C (암실에서)에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0125] PBMC 또는 보체와 인큐베이션된 표적 세포

[0126] 인큐베이션 후에, 50 마이크로리터의 PBMC (2×10^6 개 세포/mL) (E:T 비에 대해:20:1)를 ADCC 검정에서 각 웰에 첨가하고, 50 마이크로리터의 1/10X 희석된 혈청을 CDC 검정에서 "전체 방출" 및 "배경" 대조군을 제외한 각 웰에 첨가하였다. 반응의 혼합물을 37°C에서 가습된 5% CO₂ 대기에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 2% 트리톤 용액을 함유한 페놀-레드 비함유 MEM(50 마이크로리터)을 적어도 15분의 인큐베이션 시간에 "전체 방출" 대조군에 첨가하였고, 페놀-레드 비함유 MEM(50 마이크로리터)을 "배경" 대조군에 첨가하였다. 플레이트를 5분 동안 100g에서 원심분리시킨 다음 상청액 80 마이크로리터를 96-웰 블랙 플레이트로 옮겼다. 형광성을 485 nm 여기 및 538 nm 방출 파장에서 측정하였다.

[0127] 도 2A 내지 2D는 G2, G3 및 G4 백신의 생체내 ADCC 및 CDC 활성을 나타낸다.

[0128] 결과: 도 2B 및 2D에 예시된 대로, 24일에 G3 백신 (OBI-821 사포닌 애쥬번트를 지님)의 ADCC 및 CDC 활성은 G2 백신 (사포닌 애쥬번트 없음) 보다 높았다. 도 2B 및 2D에 예시된 대로, 24일에 G4 백신 (Globo H/DT 비는 24:1이다)의 ADCC 및 CDC 활성은 G3 백신 (Globo H/DT 비는 8:1이다) 보다 높았다. 이러한 결과는 OBI-821 사포닌 애쥬번트 및 5:1이 넘는 탄수화물 항원/독소 단백질 비를 갖는 백신이 ADCC 및 CDC 반응을 향상시키고 더

길게 지속되는 ADCC 및 CDC 반응을 유도함을 나타낸다.

[0129] 실시예 4: 더 높은 탄수화물/독소 단백질 비를 갖는 백신의 면역 반응 및 OBI-821 사포닌의 애쥬번트 효율

[0130] 실시예 1에서 Globo H/DT (8:1) 및 Globo H/DT (16:1) 백신 및 OBI-821 사포닌 애쥬번트의 생체내 평가를 CL57B/6 마우스 또는 Balb/c 마우스를 이용하여 수행하였다.

[0131] 약 8주령의 CL57B/6 마우스를 하기 8개의 연구 그룹으로 무작위화하였다:

그룹	처리	N (마우스의 수)	면역화 용량 및 스케줄
G1	Globo H/KLH/ OBI-821 사포닌	6	0, 7, 14, 및 21 일에 2 x s.c. 주입. 각각의 주입은 100 μ L 이다
G2	Globo H/DT(Globo H 대 DT의 분자 비 3:1)/ OBI-821	6	
G3	H/DT(8:1)/ OBI-821 사포닌	6	
G4	Globo H/DT(Globo H 대 DT의 분자 비 8:1)/ OBI-821 사포닌	6	
G5	Globo H/DT(Globo H 대 DT의 분자 비 8:1)/C34	6	
G6	Globo H/KLH/C34	6	
G7	Globo H/DT(Globo H 대 DT의 분자 비 16:1)/ OBI-821 사포닌	6	
G8	PBS (포스페이이트 완충된 염수)	3	

[0132]

[0133] 혈액 샘플을 첫 번째 주입 전 또는 0일, 10일, 17일 및 24일에 항응고제 없이 눈-뒤 또는 안면 정맥을 통해 수집하였다. 혈액 샘플을 원심분리시켜 혈청 및 혈액 세포를 분리하였다. 혈청을 수집하여 -20°C에 저장하였고, 이는 이후에 ELISA에 의해 분석되었다. 각 마우스로부터의 혈청을 항-Globo H IgG 및 IgM 분석을 위해 연속 희석시켰다. 도 3A, 도 3B 및 도 4는 시험된 백신의 정량적인 항-Globo H IgM 및 항-Globo H IgG 역가를 나타낸다.

[0134] 결과: OBI-821 사포닌 애쥬번트를 지닌 백신은 C34 애쥬번트를 지닌 백신에 비해 통계적으로 현저하게 더 많은 항-Globo H IgM 및 항-Globo H IgG를 유도한다 (도 3A, 도 3B 및 도 4를 참조하라). 다음의 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다:

[0135] • G3 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgM 역가는 17일에 G5 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.02);

[0136] • G1 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgM 역가는 17일에 G6 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p = 0.03),

[0137] • G3 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgM 역가는 24일에 G5 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.03),

- [0138] • G3 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgG 역가는 17일에 G5 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.001),
- [0139] • G1 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgG 역가는 17일에 G6 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.003),
- [0140] • G3 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgG 역가는 24일에 G5 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.03),
그리고
- [0141] • G1 백신 (OBI-821 사포닌)의 IgG 역가는 24일에 G6 백신 (C34)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.004).
- [0142] 이러한 결과는 OBI-821 사포닌 애쥬번트가 C34 애쥬번트에 비해 IgM 및 IgG 반응을 현저하게 향상시킴을 예시한다.
- [0143] Globo H/KLH/ OBI-821 사포닌(G1)은 17일 및 24일에 Globo H/DT(3:1)/ OBI-821 사포닌(G2)에 비해 현저하게 높은 IgM 및 IgG 역가를 유도한다. 특정 이론에 의해 구속하지 않으며, G1은 보다 높은 탄수화물 밀도 (KLH 담체 단백질에 대해 약 700 Globo H 단위)를 가지며 더 강한 면역 반응을 유도한 반면, G2는 보다 낮은 탄수화물 밀도 (DT 담체 단백질에 대해 3 Globo H 단위)를 가지며 더 약한 면역 반응을 유도한다고 여겨진다. 다음의 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다:
- [0144] • G1 백신 (KLH)의 IgM 역가는 17일에 G2 백신 (DT)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.003),
- [0145] • G1 백신 (KLH)의 IgM 역가는 24일에 G2 백신 (DT)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.03),
- [0146] • G1 백신 (KLH)의 IgG 역가는 24일에 G2 백신 (DT)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.004).
- [0147] Globo H/DT(8:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)/ OBI-821 사포닌(G3 및 G4) 및 Globo H/DT(16:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)/ OBI-821 사포닌(G7)의 IgM 및 IgG 역가는 17일 및 24일에 Globo H/KLH/ OBI-821 사포닌(G1)의 IgM 및 IgG 역가에 필적한다 (도 4를 참조하라). GH-KLH (700:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)보다 낮은 탄수화물 밀도에도 불구하고, GH-DT(8:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)는 GH-KLH에 필적하는 면역원성을 나타내었다.
- [0148] 더 높은 Globo H/DT 비 (8:1 또는 16:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)를 갖는 백신은 더 낮은 Globo H/DT 비 (3:1)를 갖는 백신에 비해 더 높고 오래 지속되는 IgM 및 IgG 역가를 유도한다. 다음의 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다:
- [0149] • G3 백신 (8:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgM 역가는 17일에 G2 백신 (3:1 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.02),
- [0150] • G7 백신 (16:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgM 역가는 17일에 G2 백신 (3:1 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.006),
- [0151] • G3 백신 (8:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgG 역가는 17일에 G2 백신 (3:1 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.01),
- [0152] • G7 백신 (16:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgG 역가는 17일에 G2 백신 (3:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.03),
- [0153] • G3 백신 (8:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgG 역가는 24일에 G2 백신 (3:1 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.01),
- [0154] • G7 백신 (16:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 IgG 역가는 24일에 G2 백신 (3:1 비 - Globo H 대 DT의 분자 비)의 역가보다 현저하게 더 높았다 (p=0.01),
- [0155] Globo H/DT (8:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)/ OBI-821 사포닌(G3) 및 Globo H/DT(16:1)/ OBI-821 사포닌(G7)의 IgG 역가는 17일 및 25일에 Globo H/DT(3:1 - Globo H 대 DT의 분자 비)/ OBI-821 사포닌(G2)의 IgG 역가보다 현저하게 높았다 (P<0.05).
- [0156] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각 개개의 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리

고 개별적으로 참조로서 포함된다고 표시된 것처럼 본원에 참조로서 포함된다.

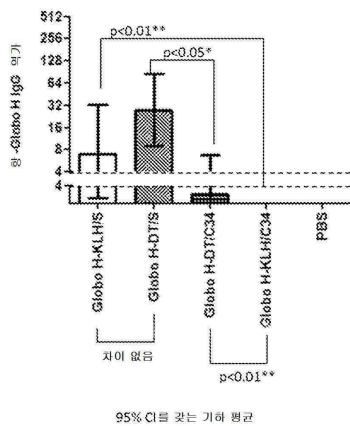
[0157]

본 발명은 본원에 기재된 구체예의 범위에 한정되는 것이 아니며, 이러한 구체예는 본 발명의 개별적인 양태의 하나의 예시이고 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 본원에 기재된 것들에 더하여, 본 발명의 모델 및 방법의 다양한 변형이 상기 설명 및 교시로부터 당업자에게 자명해질 것이고, 이들은 마찬가지로 본 발명의 범위 내에 포함된다. 그러한 변형 또는 다른 구체예는 본 발명의 진정한 범위 및 정신을 벗어나지 않고 실시될 수 있다.

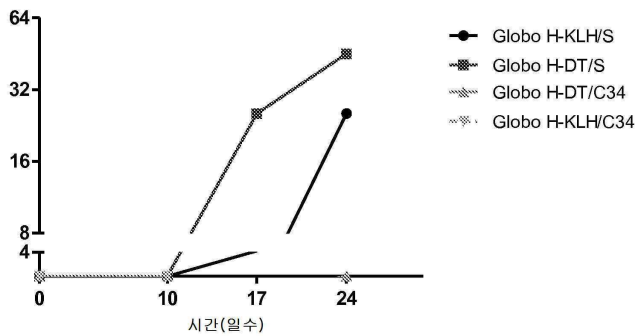
도면

도면1

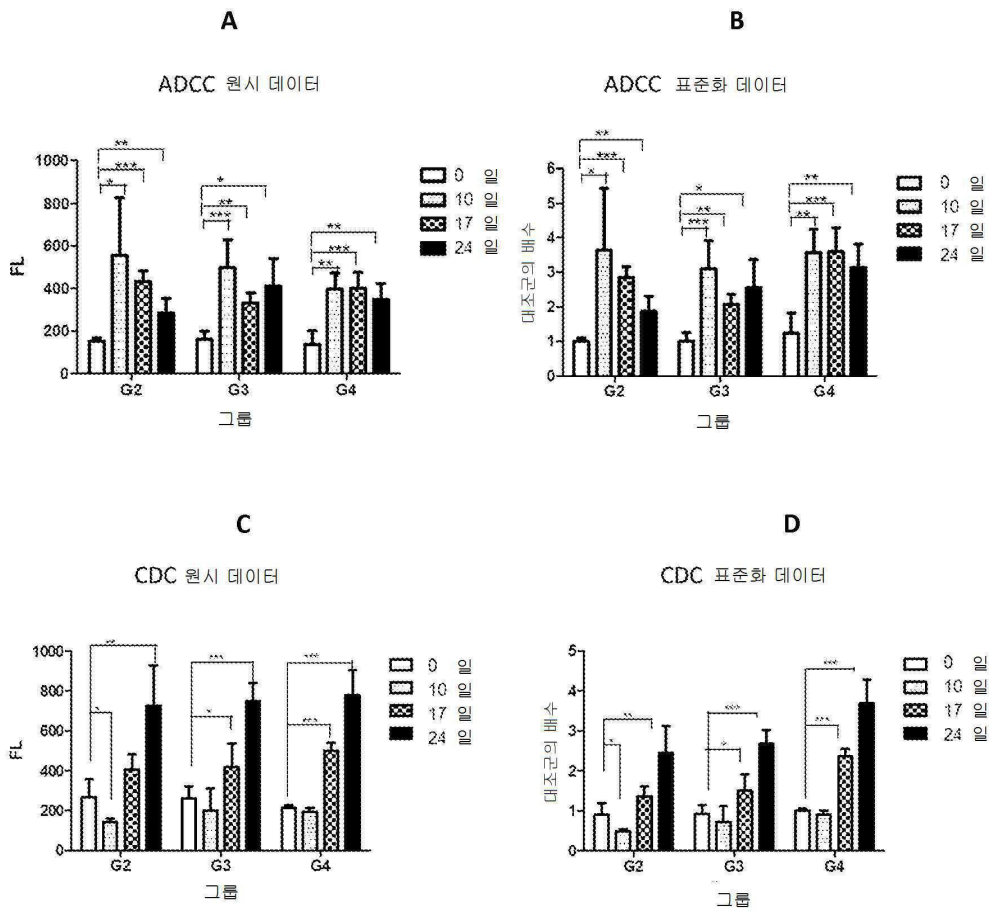
A



B

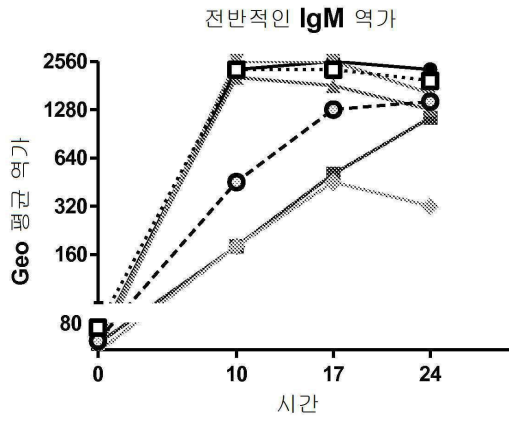


도면2

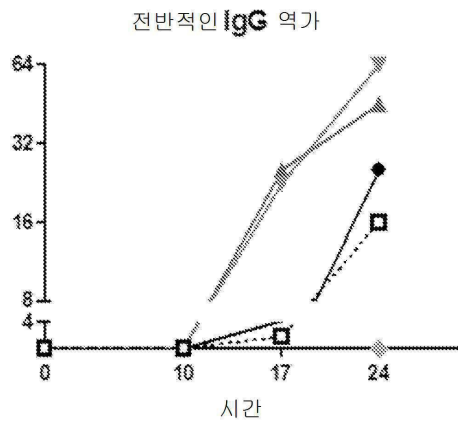


도면3

A

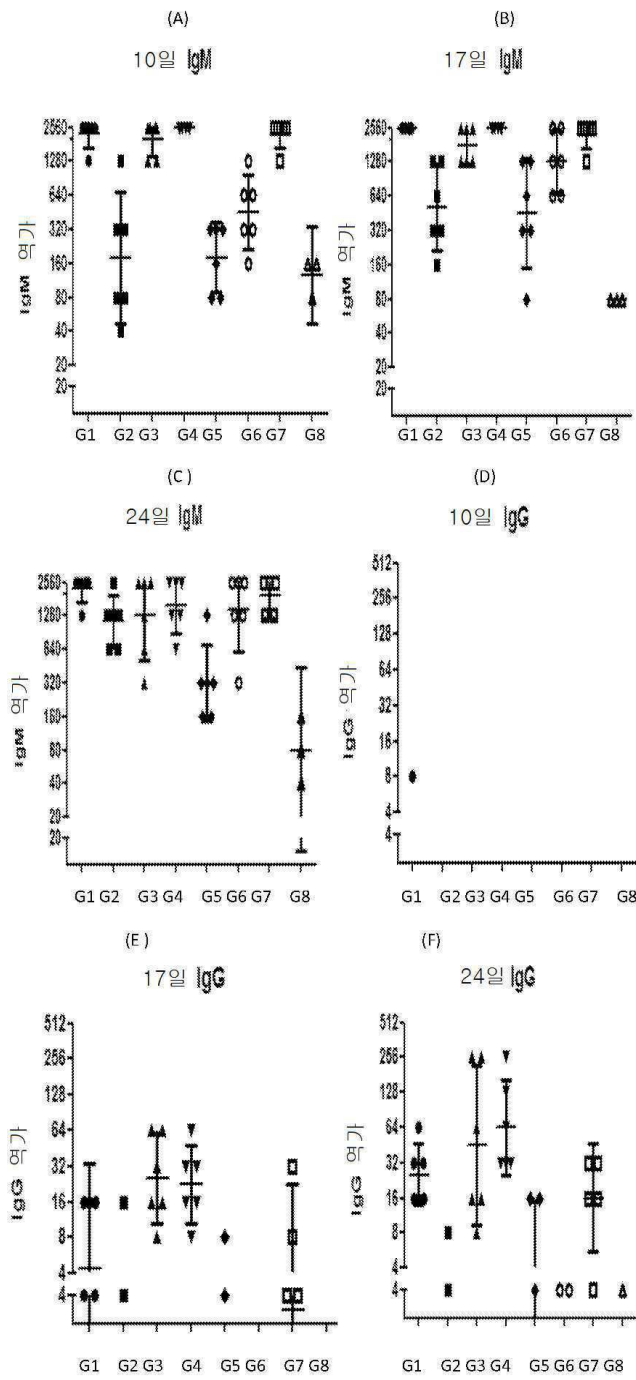


B

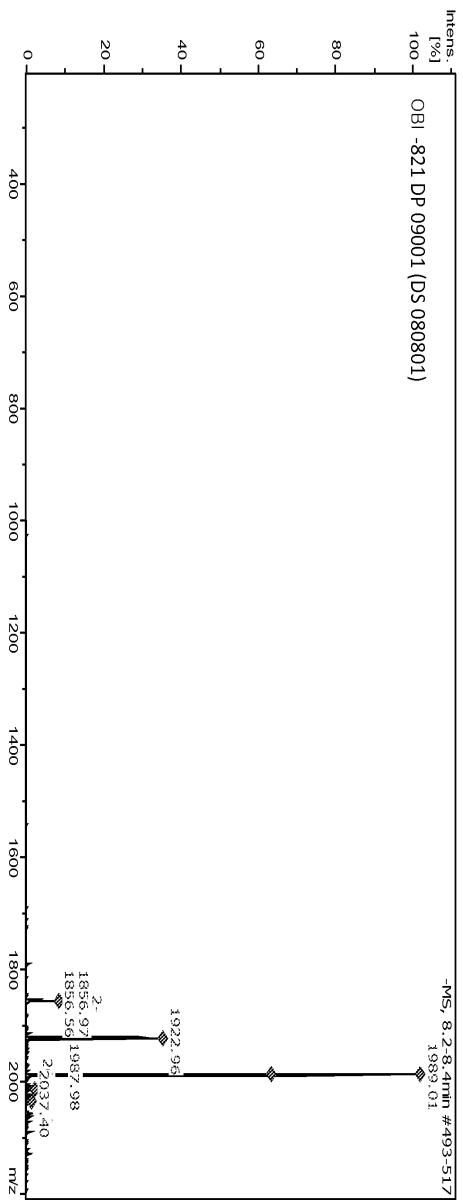


- G1
- G2
- G3
- G4
- ◇ G5
- ◊ G6
- ◻ G7

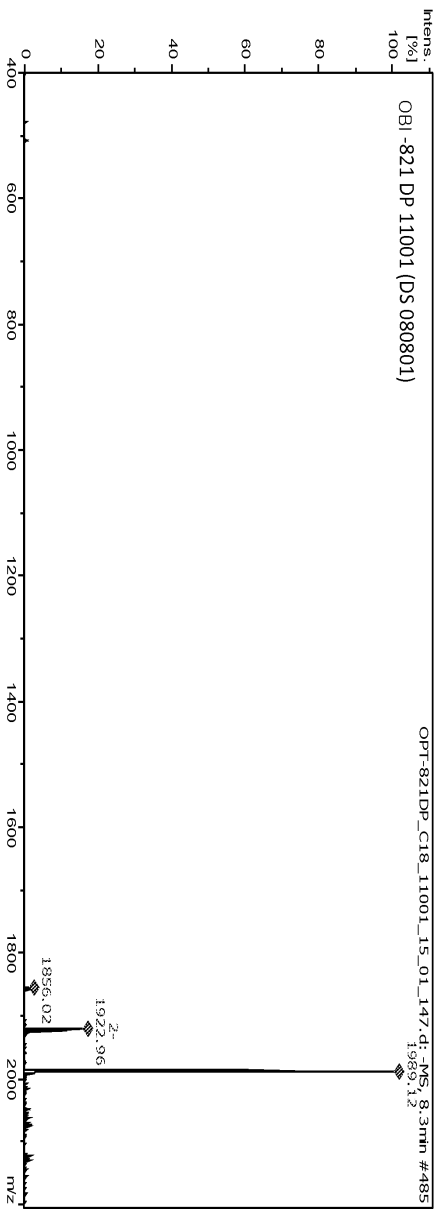
도면4



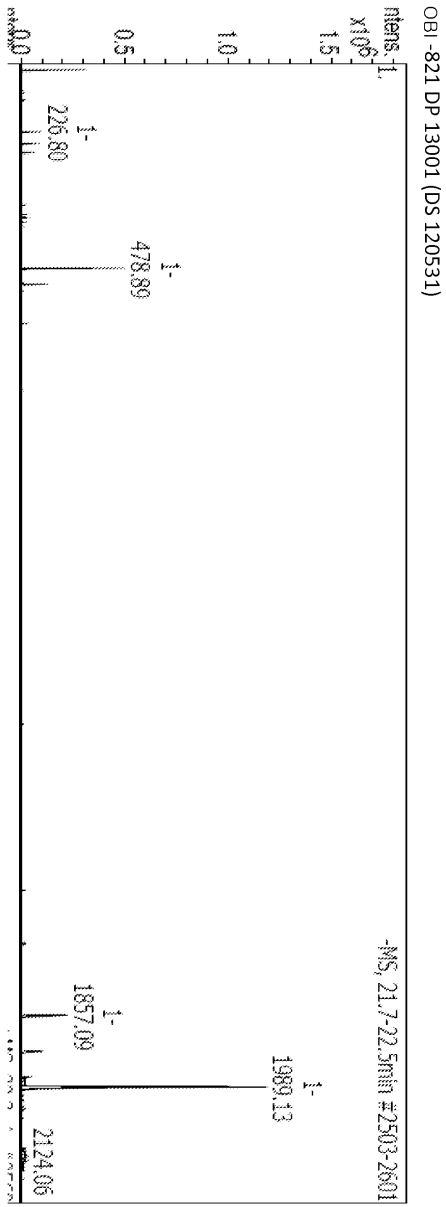
도면5a



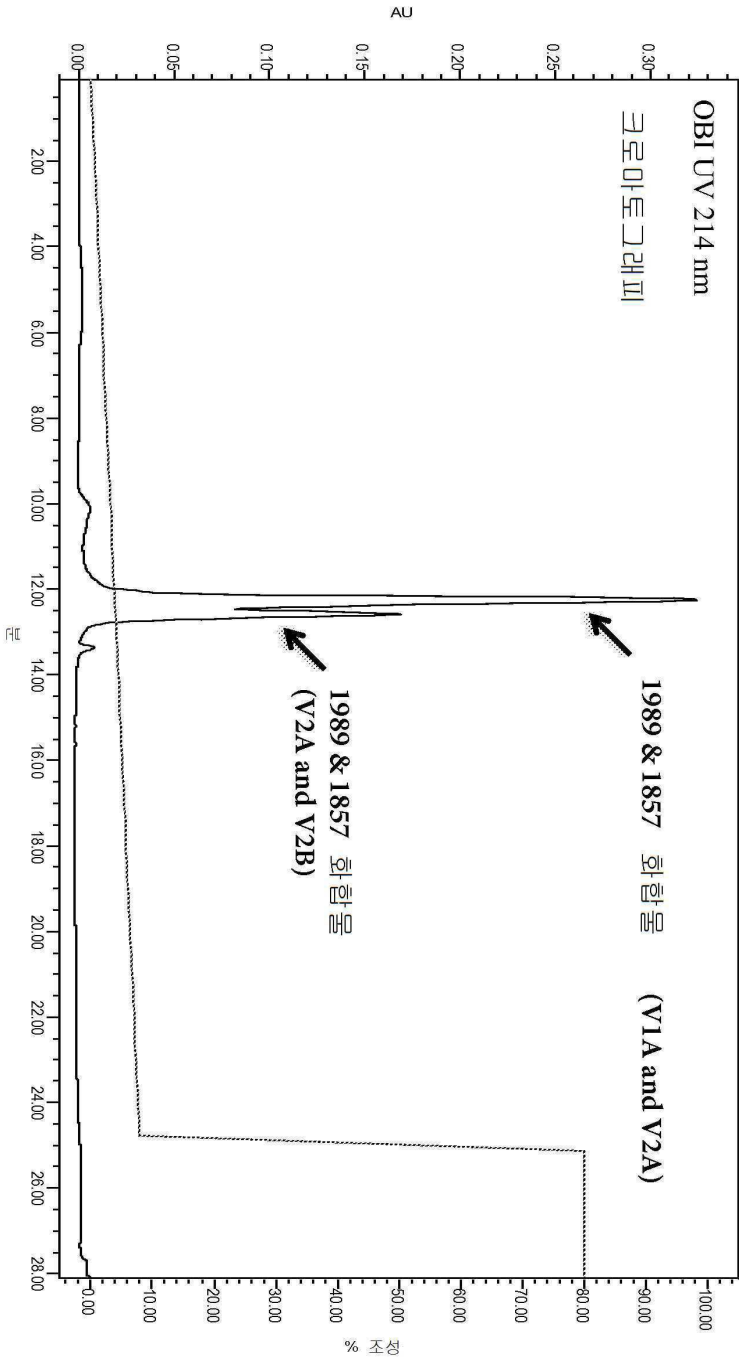
도면5b

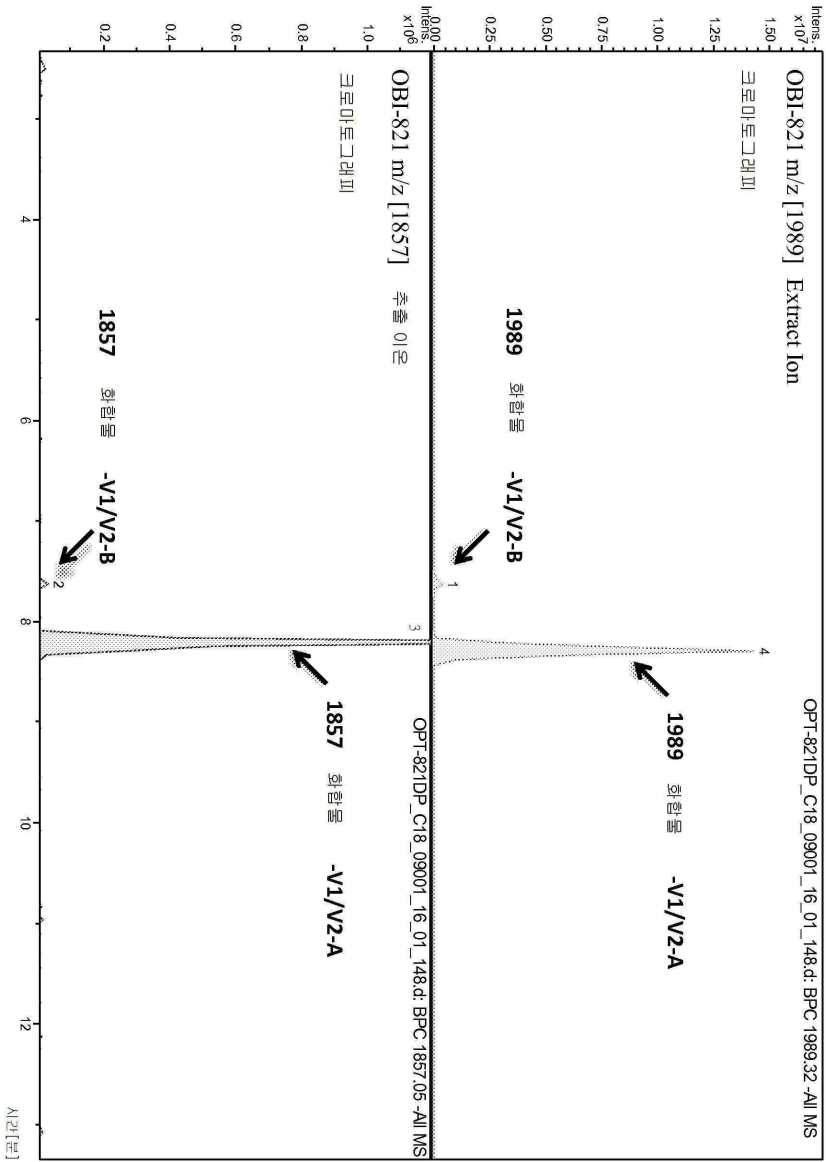


도면5c



도면6





도면7