(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161137
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/04 (2006.01) *A61K 39/104* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01) *C07K 14/21* (2006.01)
C07K 14/33 (2006.01) *C07K 14/765* (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) *C07K 16/44* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07H 15/04 (2013.01)
A61K 39/104 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7033164
(22) 출원일자(국제) 2023년03월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월04일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2023/050297
(87) 국제공개번호 WO 2023/168520
국제공개일자 2023년09월14일
(30) 우선권주장
63/317,245 2022년03월07일 미국(US)

(71) 출원인
내셔날 리서치 카운실 오브 캐나다
캐나다 온타리오 케이1에이 0알6 오타와 몬트리올 로드 1200
(72) 발명자
콕스, 앤드류 데이빗
캐나다 온타리오 케이1제이 6케이4 오타와 더튼 크레센트 2160
비노그라도프, 에브게니
캐나다 온타리오 케이2비 5제이9 오타와 웬트워스 애비뉴 461
소바조, 자넬
캐나다 온타리오 케이1엠 0제트2 오타와 유닛 7 리도 테라스 110
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **녹농균 감염의 예방/치료**

(57) 요 약

본 개시내용은 일반적으로 대상체에서 면역 반응을 유도하여 활용하기 위한 화합물, 조성물, 항체 및 방법에 관한 것으로, 선택적으로 당접합체 형태의 운반 단백질에 연결시킨, 분리 또는 합성된 *녹농균* 글리칸을 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 본 개시내용에 기술된 *녹농균* 글리칸이나 당접합체에 선택적으로 결합하는 항체도 추가로 제공된다.

대 표 도 - 도1

2-α-Rha-3-α-Rha-3-α-Rha- A-PS **반복 단위**
A B C

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-2- **테트리톨** *-1d* OS**1**
E F L X

접합을 위해 이중 산화된 A-PS:

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-2- **글리세르알데히드** -3*d* OS**2**
E F L X

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Rha2OMe A-PS1
E F L M K D H

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man2OMe A-PS2
E F L M K D' G

(52) CPC특허분류
A61P 31/04 (2018.01)
C07H 1/00 (2013.01)
C07H 3/06 (2013.01)
C07K 14/21 (2013.01)
C07K 14/33 (2013.01)
C07K 14/765 (2013.01)
C07K 16/1214 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 A의 올리고사카라이드 부분을 포함하는 항원성 화합물:

α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-　　화학식 A

상기 식에서,

n은 1-5이고, 바람직하게는 2-4이며,

각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 A1을 갖는, 항원성 화합물:

α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X　　화학식 A1

상기 식에서,

n은 1-5이고,

X는 -H 또는 -(4α-Man3OMe)$_m$-핸들 (handle)이며;

이때, m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며;

각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

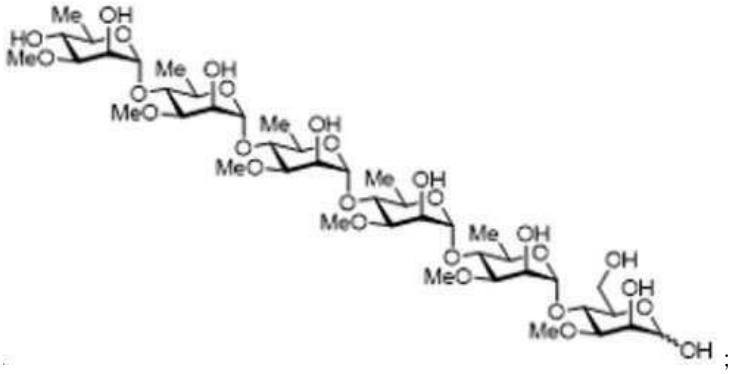
청구항 3

제2항에 있어서, 상기 핸들은 m이 1 또는 2인 경우에 2-글리세르알데히드이고, 상기 핸들은 m이 0인 경우에 -(CH2)$_z$NH$_2$ - 여기서, z는 1-5로 이루어진 군에서 선택된 정수임 -인 것인, 항원성 화합물.

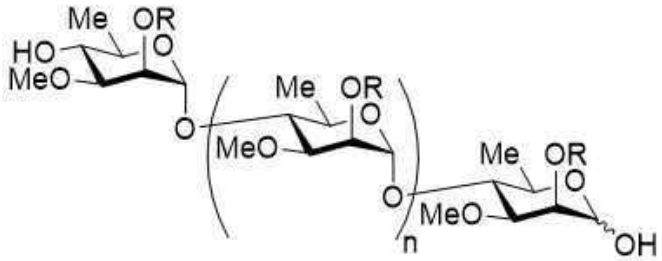
청구항 4

제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항원성 화합물:

- α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-글리세르알데히드-1d (OS2);
- 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (펜타사카라이드);
- 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (테트라사카라이드);
- 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (트리사카라이드);

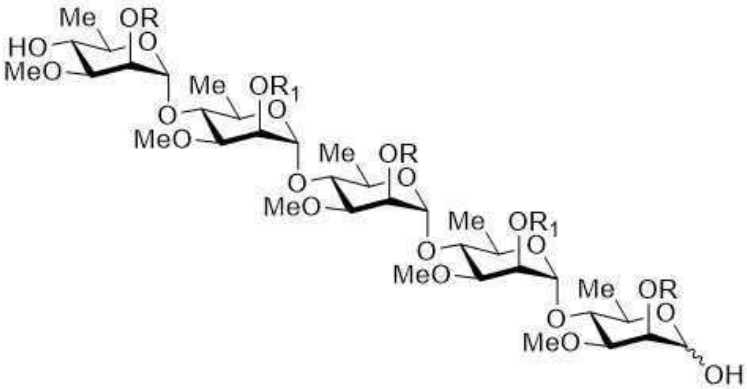


;



VIII: n=0, R=H
IX: n=3, R=Ac
X: n=2, R=Ac
XI: n=1, R=Ac
XII: n=0, R=Ac

; 및



XIII: R=Ac, R_1=H
XIV: R=H, R_1=Ac

.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 운반 단백질에 연결하기 위한 링커를 추가로 포함하는, 화학식 A2를 갖는 것인, 항원성 화합물:

α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X-링커 화학식 A2

상기 식에서, n은 1-5이고,

X는 -(4α-Man3OMe)$_m$-(핸들)$_p$-이며;

이때, m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며;

p는 0 또는 1이고;

각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

청구항 6

운반 단백질에 접합시킨 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 접합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 운반 단백질이 CRM197, 파상풍 변성 독소 (TT), *녹농균 (Pseudomonas aeruginosa)* 단백질, 인간 혈청 알부민 (HSA), 소 혈청 알부민 (BSA), 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 변성 독소 (DT), TT의 단편 C, 백일해 변성 독소, 콜레라 변성 독소, *대장균 (E. coli)* LT, *대장균* ST 또는 *녹농균*의 외독소 A를 포함하는 것인, 접합체.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제6항 또는 제7항의 접합체; 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 아주반트, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 접합체, 또는 제8항의 약제학적 조성물을 포함하는 백신.

청구항 10

대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 접합체, 제8항의 약제학적 조성물, 또는 제9항의 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

대상체에서 *녹농균* 감염을 예방하는 방법으로서, 상기 방법이 상기 대상체에게 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 접합체, 제8항의 약제학적 조성물, 또는 제9항의 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 12

녹농균 감염 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 접합체, 제8항의 약제학적 조성물, 또는 제9항의 백신.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 접합체, *녹농균*의 LPS 및/또는 *녹농균*의 세포에 선택적으로 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 14

하기 화학식의 분리된 산화된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS2)에 선택적으로 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-글리세르알데히드-1d (OS2).

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체 또는 인간화된 항체인, 항체 또는 그의 항원 결합 단

편.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 중쇄 가변 CDR1, 중쇄 가변 CDR2 및 중쇄 가변 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하되,

상기 중쇄 가변 CDR1이 서열번호 1, 서열번호 10 및 서열번호 19로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;

상기 중쇄 가변 CDR2가 서열번호 2, 서열번호 11 및 서열번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

상기 중쇄 가변 CDR3이 서열번호 3, 서열번호 12 및 서열번호 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 18

제17항에 있어서, 경쇄 가변 CDR1, 경쇄 가변 CDR2 및 경쇄 가변 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 추가로 포함하되,

상기 경쇄 가변 CDR1이 서열번호 6, 서열번호 15 및 서열번호 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;

상기 경쇄 가변 CDR2가 GTS 및 RVS로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

상기 경쇄 가변 CDR3이 서열번호 7, 서열번호 16 및 서열번호 25로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 19

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 도메인 (VH)과 경쇄 가변 도메인 (VL)의 조합을 포함하되, 상기 조합이 하기로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VL; 및

서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL.

청구항 20

녹농균 감염의 치료에 사용하기 위한, 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 21

녹농균 감염의 진단에 사용하기 위한, 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 22

녹농균 감염을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

동물, 바람직하게는 인간에서 *녹농균* 세균 감염을 진단하는 방법으로서, 상기 방법이 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 시험 샘플을 접촉시키는 단계, 및 그에 대한 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

제2항의 화학식 A1의 화합물을 제조하는 합성 방법으로서, m이 0이고, 상기 방법이 다음을 포함하는 것인, 방법:

- 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 아노머 탈보호로 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 형성하는 단계;

- 상기 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 아세틸화시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는 단계;

- 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 *O*-4를 부분적으로 탈보호시켜 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는 단계;

- 상기 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 결합시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계;

- 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드의 *O*-4를 탈보호시켜 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계; 및

- 상기 부분적으로 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 탈아세틸화시켜 화학식 A1의 화합물을 형성하는 단계.

청구항 25

제2항의 화학식 A1의 화합물을 제조하는 합성 방법으로서, X가 핸들이고, 상기 방법이 하기 단계들을 포함하는 것인, 방법:

- 보호된 아민을 포함하는 핸들을 사용하여 1-*O*에서 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체를 글리코실화하여 - 이때, 활성화된 모노람노피라노시드 중간체는 글리코실화 부위 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하는 단계;

- 4-*O*에서 보호기를 제거하여 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하고; 상기 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체에 결합시켜 - 이때, 활성화된 람노피라노시드 중간체는 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 메틸화된 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드를 형성하며; 상기 보호된 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드에서 모든 보호기들을 제거하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 글리칸, 단백질-글리칸 접합체를 함유하는 새로운 메틸화된 람노스의 확인과 합성 및 이들의 항원 및 백신으로서의 용도에 관한 것이다. 또한, 상기 글리칸 및 당접합체에 선택적으로 결합하는 항체들도 개시된다. 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*) 감염의 치료 및 예방에 있어서 이러한 글리칸, 당접합체, 이에 상응하는 조성물 및 항체의 용도도 논의된다.

배 경 기 술

[0002] 최근 몇 년간, 대형 제약 회사들은 잠재적으로 받을 수 있는 보상에 비해서 개발과 관련된 높은 위험성과 비용으로 인해 항생제 연구에서 멀어지기 시작하였다 [1]. 새로운 항생제에 대한 대안으로, 항생제 내성 박테리아로 인한 감염을 예방하는 백신이 개발되고 있다 [2]. 일부 백신들이 임상 시험 단계에 있지만, 항생제 내성 녹농균에 대한 백신은 아직 시장에 출시되지 않았다 [3-5].

[0003] 녹농균은 표면에 다양한 종류의 글리칸을 가지고 있다. 그 때문에, 당접합체 백신이 연구되었지만 [5-7], 이러한 백신들 중 어느 것도 인간에게 사용되도록 승인된 적은 없었다 [5].

[0004] 백신 접근 방식 외에도, 표면 탄수화물 표적들에 대한 항체의 치료적 잠재성도 고려사항이다. 현재 이런 접근 방식의 예로는 Medimmune의 Psl 표적화 및 Aridis의 LPS O-항원 표적화를 포함한다 [8-11]. Medimmune의 이중 특이적 항체 접근 방식은 제1상 시험을 넘어서지는 못하였지만 [12]; DNA 인코딩된 mAb 치료 (DMab)의 잠재력은 가능성을 보였기에, 직접적 mAb 치료의 고가의 비용을 완화할 수 있다 [13]. 이러한 연구들은 녹농균에 대한 항

체들이 치료적 용도로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 일반적으로 새롭게 분리 또는 합성된 녹농균 글리칸 항원 (선택적으로 당접합체 형태의 운반 단백질에 결합됨)을 포함하는 화합물, 조성물 및 백신에 관한 것이다. 또한, 녹농균 글리칸이나 당접합체에 선택적으로 결합하는 항체도 제공된다. 또한, 대상체에서 면역 반응을 유도 및 활용하는 방법과 치료의 용도 및 방법도 개시된다.

[0006] 한 측면에서, 본 발명은 화학식 A의 올리고사카라이드 부분을 포함하는 항원성 화합물을 제공한다:

[0007] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$- 화학식 A

[0008] 상기 식에서, n은 1-5이고, 바람직하게는 2-4이며, 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0009] 한 측면에서, 본 발명은 화학식 A1의 올리고사카라이드 부분을 포함하는 항원성 화합물을 제공한다:

[0010] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X 화학식 A1

[0011] 상기 식에서, n은 1-5 (바람직하게는 2-4)이고, X는 -H 또는 -(4α-Man3OMe)$_m$-핸들 (handle)이며; m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며; 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 상기 핸들이 -(CH2)$_z$NH$_2$ 또는 2-글리세르알데히드 (여기서, z는 1-5로 이루어진 군에서 선택된 정수임)인 항원성 화합물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 핸들은 m이 0인 경우에 -(CH2)$_2$NH$_2$, -(CH2)$_3$NH$_2$ 또는 -(CH2)$_3$NH$_2$이다.

[0013] 한 측면에서, m이 1 또는 2라면, 상기 핸들은 2-글리세르알데히드이다.

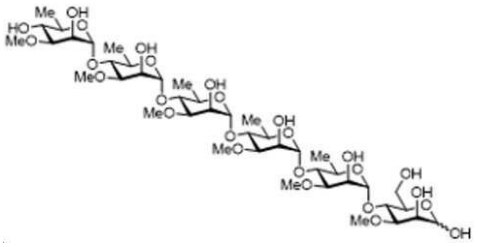
[0014] 한 측면에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 군에서 선택된 항원성 화합물을 제공한다:

[0015] α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-글리세르알데히드-1d (OS2);

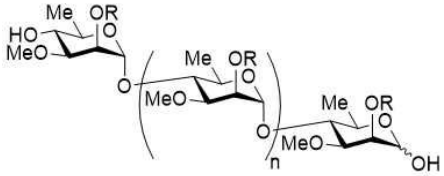
[0016] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (펜타사카라이드);

[0017] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (테트라사카라이드);

[0018] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (트리사카라이드);

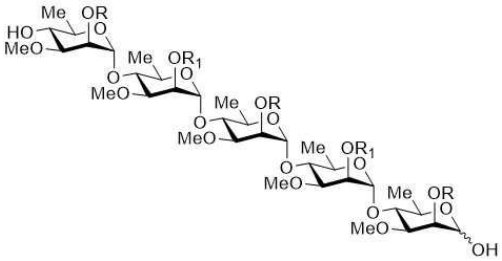
[0019] 

;



VIII: n=0, R=H
IX: n=3, R=Ac
X: n=2, R=Ac
XI: n=1, R=Ac
XII: n=0, R=Ac

[0020] ; 및



XIII: R=Ac, R_1=H
XIV: R=H, R_1=Ac

[0021] .

[0022] 한 측면에서, 본 발명은 운반 단백질에 연결하기 위한 링커를 포함하는, 화학식 A2를 갖는 항원성 화합물을 제공한다:

[0023] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X-링커 화학식 A2

[0024] 상기 식에서, n은 1-5이고, X는 -(4α-Man3OMe)$_m$-(핸들)$_p$-이며; 이때, m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며; p는 0 또는 1이고; 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0025] 한 측면에서, 본 발명은 운반 단백질에 접합된 항원성 화합물의 접합체를 포함하는 항원성 화합물을 제공한다.

[0026] 한 측면에서, 상기 접합체는 하기의 화학식을 갖는다:

[0027] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X-(링커)$_q$-운반 단백질 화학식 A3

[0028] 상기 식에서, n은 1-5 (바람직하게는 2-4)이고, X는 -(4α-Man3OMe)$_m$-(핸들)$_p$-이며; 이때, m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며; p는 0 또는 1이고; q는 0 또는 1이며; 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0029] 한 측면에서, 본 발명의 운반 단백질은 CRM197, 파상풍 변성 독소 (TT), 녹농균 단백질, 인간 혈청 알부민 (HSA), 소 혈청 알부민 (BSA), 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 변성 독소 (DT), TT의 단편 C, 백일해 변성 독소, 콜레라 변성 독소, *대장균 (E. coli)* LT, *대장균* ST 또는 *녹농균*의 외독소 A를 포함한다. 한 측면에서, 운반 단백질은 CRM197, TT 또는 *녹농균* 단백질이다.

[0030] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 화합물 또는 접합체; 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 약제학적 조성물은 백신이다.

[0031] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 대상체에게 본원에 기술된 화합물, 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 것인, 방법을 제공한다.

[0032] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 녹농균 감염을 예방하는 방법으로서, 상기 대상체에게 본원에 기술된 화합물, 접합체 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 것인, 방법을 제공한다.

[0033] 한 측면에서, 본 발명은 *녹농균* 감염을 예방하는 데 사용하기 위한 화합물, 접합체, 백신 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0034] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 화합물 또는 접합체, *녹농균*의 LPS 및/또는 *녹농균*의 세포에 선택적으로

결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는데, 선택적으로 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0035] 한 측면에서, 본 발명은 분리된 형태의 산화된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS2)에 선택적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는데, 선택적으로 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다.

[0036] 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항체 또는 인간화된 항체인, 본원에 기술된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0037] 한 측면에서, 본 발명은 중쇄 가변 CDR1, 중쇄 가변 CDR2 및 중쇄 가변 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

[0038] • 상기 중쇄 가변 영역 CDR1이 서열번호 1, 서열번호 10 및 서열번호 19로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;

[0039] • 상기 중쇄 가변 영역 CDR2가 서열번호 2, 서열번호 11 및 서열번호 20으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0040] • 상기 중쇄 가변 영역 CDR3이 서열번호 3, 서열번호 12 및 서열번호 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0041] 한 측면에서, 본 발명은 상기 경쇄 가변 CDR1, 경쇄 가변 CDR2 및 경쇄 가변 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

[0042] • 상기 경쇄 가변 CDR1이 서열번호 6, 서열번호 15 및 서열번호 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;

[0043] • 상기 경쇄 가변 CDR1이 GTS 및 RVS로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0044] • 상기 경쇄 가변 CDR3이 서열번호 7, 서열번호 16 및 서열번호 25로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0045] 한 측면에서, 본 발명은 중쇄 가변 도메인 (VH)과 경쇄 가변 도메인 (VL)의 조합을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는데, 상기 조합은 하기로 이루어진 군에서 선택된다:

[0046] • 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0047] • 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 VL; 및

[0048] • 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 VH와 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 VL.

[0049] 한 측면에서, 본 발명은 녹농균 감염의 치료에 사용하기 위한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0050] 한 측면에서, 본 발명은 녹농균 감염의 진단에 사용하기 위한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0051] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 동물에서 *녹농균* 세균 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0052] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 시험 샘플을 접촉시키는 단계, 및 그에 대한 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 동물에서 *녹농균* 세균 감염을 진단하는 방법을 제공한다.

[0053] 한 측면에서, 본 발명은 m이 0인 화학식 A1의 화합물을 제조하는 합성 방법을 제공하는데, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0054] • 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 아노머 탈보호로 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 형성하는 단계;

[0055] • 상기 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 아세틸화시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는

단계;

[0056] • 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 *O*-4를 부분적으로 탈보호시켜 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는 단계;

[0057] • 상기 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 결합시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계;

[0058] • 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드의 *O*-4를 탈보호시켜 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계; 및

[0059] • 상기 부분적으로 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 탈아세틸화시켜 화학식 A1의 화합물을 형성하는 단계.

[0060] 한 측면에서, 본 발명은 X가 핸들인 화학식 A1의 화합물을 제조하는 합성 방법을 제공하는데, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0061] • 보호된 아민을 포함하는 핸들을 사용하여 1-*O*에서 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체를 글리코실화하여 - 활성화된 모노람노피라노시드 중간체는 글리코실화 부위 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하는 단계;

[0062] • 4-*O*에서 보호기를 제거하여 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하는 단계;

[0063] • 상기 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체에 결합시켜 - 활성화된 람노피라노시드 중간체는 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 메틸화된 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드를 형성하는 단계; 및

[0064] • 상기 보호된 올리고사카라이드에서 모든 보호기들을 제거하는 단계 - 상기 올리고사카라이드는 바람직하게는 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드임 -.

도면의 간단한 설명

[0065] **도 1**은 본원에 기술된 일부 분리된 화합물들의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 알칼리 처리 (아래 기록선)에 의해 LPS로부터 얻은 밴드-A 폴리사카라이드와 그의 $NaIO_4$ 산화 생성물인 OS 1 (위 기록선)의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. *는 불순물을 나타내고, R은 람난 반복 단위의 람노스 H-1을 나타내며, Rm은 3-OMe-Rha의 아노머 신호를 나타낸다.

도 3은 LPS (아노머 영역)의 약한 산 가수분해를 통해 녹농균 PAO1 wzy-돌연변이체로부터 분리된, A-PS의 gCOSY (70% 회색), TOCSY (50% 회색) 및 ROESY (검은색) 스펙트럼의 중첩을 나타낸 것이다.

도 4는 OS 1의 양이온 모드 ESI-MS 스펙트럼을 나타낸 것이다. *m/z* 1117.8과 1122.6으로 표시된 두 피크는 Rha_5Man_1 테트리톨-1$d_1$$Me_6$의 암모늄과 나트륨 부가물에 해당한다.

도 5a 및 **5b**는 CD_3OD로 기록된 L-모노사카라이드 (**도 5a**) 및 -모노사카라이드 (**도 5b**)의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 OS1의 유도된 옥틸 글리코시드와 표준물질의 GC-MS 기록선을 나타낸 것이다.

도 7은 CRIM에 접합되기 전 3-O-메틸 D-만노스 및 글리세르알데히드에 연결된 녹농균 A-밴드 3-O-메틸 D-람노스 펜타사카라이드 단부의 구조를 나타낸 것이다.

도 8a, 8b, 8c 및 **8d**는 BSA (**도 8a**), BSA-3-*O*-메틸 람난 접합체 (**도 8b**), CRM (**도 8c**) 및 CRM-3-*O*-메틸 람난 접합체 (**도 8d**)의 MALDI-MS 분석을 나타낸 것이다.

도 9a 및 **9b**는 IgM 항체 (왼쪽)와 IgG 항체 (오른쪽)를 사용하여 CRM-3-*O*-메틸 람난 접합체 (위쪽 곡선) vs.

BSA-3-O-메틸 람난 접합체 (아래쪽 곡선) vs. PAO1 wt LPS로 면역화시킨 마우스 (M1-M6)의 D56 혈청 (**도 9a**) 또는 CRM-3-*O*-메틸 람난 접합체 vs. PAO1 wt LPS (왼쪽) vs. BSA-3-*O*-메틸 람난 접합체 (오른쪽) (**도 9b**)로 면역화시킨 토끼 (R1-R2)의 D72 혈청에 대한 ELISA 적정을 나타낸 것이다.

도 10은 1B1, 3B8 및 3C4 mAb를 함유하는 하이브리도마 상청액 (희석없이 원액 그대로 사용함)이 *녹농균* 균주인 PAO1wt, PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5457) 및 PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5458)의 정제된 LPS 항원에 결합하는 것에 대한 ELISA 분석을 나타낸 것이다.

도 11a, **11b** 및 **11c**는 1B1 (**도 11a**), 3B8 (**도 11b**) 및 3C4 (**도 11c**)의 정제된 단일클론 항체 (mAb) (모두 100 μg/ml)가 *녹농균* 균주인 NRCC # 6678, 6668-70, 6954-60 및 음성 대조군 균주인 *M. 카타랄리스 (catarrhalis)* 6541과 *N. 메닌기티디스 (meningitidis)* 6263의 사멸된 전세포에 결합하는 것에 대한 ELISA 분석을 나타낸 것이다 (균주들에 대한 전체 세부 정보에 대해서는 **표 1** 참조).

도 12는 mAb 3C4 (패널 a), 3B8 (패널 b) 및 1B1 (패널 c)의 정제된 mAb (모두 100 μg/ml)가 *녹농균* 균주인 NRCC # 6678, 6944-53임상 분리주의 사멸된 전세포에 결합하는 것에 대한 ELISA 분석을 나타낸 것이다 (균주들에 대한 전체 세부 정보에 대해서는 **표 1** 참조).

도 13a 및 **13b**는 녹농균 균주 PAO1 BAA-47 (**도 13a**) 및 녹농균 균주 537 (**도 13b**)에 대한 mAb 1B1 (실선), 3B8 (점선) 및 3C4 (점선)의 옵소닌 식세포 분석 (opsonophagocytic assay) 적정 곡선을 나타낸 것이다.

도 14a는 정제된 PAO1 LPS에 대한 mAb 1B1과 3C4 간의 경쟁 ELISA를 나타낸 것이다.mAb 1B1은 PAO1 LPS로 코팅된 ELISA 플레이트 상의 x축에 표시된 희석배율로 적정되었다. 상기 플레이트를 세척한 후 mAb 3C4를 일정한 농도 (62.5 μg/ml)로 첨가하였다. mAb 3C4에 특이적인 2차 mAb를 첨가하고 착색 시약을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다 (사각형 마커가 있는 선). 1B1 경쟁이 없는 플레이트에 3C4를 첨가했을 때 얻은 흡광도는 삼각형 마커가 있는 선으로 나타냈다.

도 14b는 정제된 PAO1 LPS에 대한 mAb 3B8과 3C4 간의 경쟁 ELISA를 나타낸 것이다.mAb 3B8은 PAO1 LPS로 코팅된 ELISA 플레이트 상의 x축에 표시된 희석배율로 적정되었다. 상기 플레이트를 세척한 후 mAb 3C4를 일정한 농도 (62.5 μg/ml)로 첨가하였다. mAb 3C4에 특이적인 2차 mAb를 첨가하고 착색 시약을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다 (사각형 마커가 있는 선). 3B8 경쟁이 없는 플레이트에 3C4를 첨가했을 때 얻은 흡광도는 삼각형 마커가 있는 선으로 나타냈다.

도 15a, **15b** 및 **15c**는 LPS (왼쪽 패널; 사각형 마커 - *녹농균* PAO1 BAA-47, 역삼각형 마커 - *녹농균* (wzy ::Gm)(Δpa5458), 다이아몬드 마커 - *N. 메닌기티디스 galE/lpt3* 및 원형 마커 - PBS 대조군) 또는 말단 메틸화된 람난을 나타내는 합성 올리고사카라이드 (오른쪽 패널; 검은색 원형 마커 - 펜타사카라이드 , 빈 사각형 마커 - 테트라사카라이드, 빈 원형 마커 - 트리사카라이드, 역삼각형 마커 - 디사카라이드, 다이아몬드 마커 - 링커가 있는 디사카라이드, 삼각형 마커 - L-단량체, 검은색 사각형 마커 - D-단량체)을 사용한 *녹농균* PAO1 BAA-47 LPS에 대한 mAb 1B1 (**도 15a**), 3C4 (**도 15b**) 및 3B8 (**도 15c**)의 억제 ELISA를 나타낸 것이다. LPS 또는 합성 올리고사카라이드의, x축에 표시된, 단계 희석배율의 희석물을 10 μg/ml의 mAb와 동일한 부피로 혼합하였다. 1시간의 항온배양 후, 상기 억제 혼합물 100 μl를 PAO1 BAA-47 LPS로 코팅된 플레이트에 첨가하였다. 1차 mAb에 특이적인 2차 mAb를 첨가하고 착색 시약을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다. mAb가 추가의 LPS나 합성 올리고사카라이드에 의해 억제되지 않을 때 얻은 흡광도는 PBS에 의한 억제와 동일하다.

도 15d, **15e** 및 **15f**는 LPS (왼쪽 패널; 사각형 마커 - *녹농균* PAO1 BAA-47, 역삼각형 마커 - *녹농균* (wzy ::Gm)(Δpa5458), 다이아몬드 마커 - *N. 메닌기티디스 galE/lpt3* 및 원형 마커 - PBS 대조군) 또는 말단 메틸화된 람난을 나타내는 합성 올리고사카라이드 (오른쪽 패널; 검은색 원형 마커 - 펜타사카라이드 , 빈 사각형 마커 - 테트라사카라이드, 빈 원형 마커 - 트리사카라이드, 역삼각형 마커 - 디사카라이드, 다이아몬드 마커 - 링커가 있는 디사카라이드, 삼각형 마커 - L-단량체, 청색 사각형 마커 - D-단량체)을 사용한 *녹농균* PAO1 BAA-47 전세포에 대한 mAb 1B1 (**도 15d**), 3C4 (**도 15e**) 및 3B8 (**도 15f**)의 억제 ELISA를 나타낸 것이다. LPS 또는 합성 올리고사카라이드의, x축에 표시된, 단계 희석배율의 희석물을 10 μg/ml의 mAb와 동일한 부피로 혼합하였다. 1시간의 항온배양 후, 상기 억제 혼합물 100 μl를 PAO1 BAA-47 전세포로 코팅된 플레이트에 첨가하였다. 1차 mAb에 특이적인 2차 mAb를 첨가하고 착색 시약을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다. mAb가 추가의 LPS나 합성 올리고사카라이드에 의해 억제되지 않을 때 얻은 흡광도는 PBS에 의한 억제와 동일하다.

도 16은 합성 올리고사카라이드가 고밀도 1B1 IgM 표면에 결합하는 것을 보여주는 SPR 센서그램을 제공하고 있다. 다양한 농도 범위의 합성 올리고사카라이드 (실험부 참조)를 IgM 1B1 및 관련 없는 IgM인 Fn 4F1에 흘려 보

냈다. 동역학과 친화도는 **표 5**에 기록하였다. Mcat lgt2/4: 대조군 올리고사카라이드.

도 17은 화합물 **디사카라이드**의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다 (600 MHz, CD_3OD).

도 18은 화합물 **트리사카라이드**의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다 (500 MHz, CD_3OD).

도 19는 화합물 **테트라사카라이드**의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다 (500 MHz, CD_3OD).

도 20은 화합물 **펜타사카라이드**의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다 (600 MHz, CD_3OD).

도 21은 화합물 **디사카라이드**의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다 (600 MHz, D_2O).

도 22는 D-모노사카라이드의 합성에 대한 반응식을 나타낸 것이다 (**반응식 1**).

도 23은 L-모노사카라이드의 합성에 대한 반응식을 나타낸 것이다 (**반응식 2**).

도 24는 3-*O*-메틸 D-람노스 올리고사카라이드의 합성에 대한 반응식을 나타낸 것이다 (**반응식 3**).

도 25는 디사카라이드에 아미노에틸 핸들을 첨가하는 반응식을 나타낸 것이다 (**반응식 4**).

도 26은 HSA (레인 2)와 HSA-3-O-메틸 람난 펜타사카라이드 접합체 (2가지 농도, 레인 3 및 4)에 대한 SDS-PAGE (**도 26a**, 왼쪽) 및 웨스턴 블롯 (**도 26b**, mAb 1B1 사용; 오른쪽) 분석을 나타낸 것이다. 분자량 마커들은 레인 1에 나타내었다.

도 27은 a) HSA, b) HSA-3-O-메틸 람난 펜타사카라이드 접합체의 MALDI-MS 분석을 나타낸 것이다.

도 28a, 28b, 28c, 28d, 28e, 28f, 28g 및 **28h**는 합성 접합 면역화에서 얻은 마우스 혈청을 사용하여 *녹농균* LPS를 인식하는 능력을 알아보기 위한 ELISA를 나타낸 것이다.다양한 시점에서의 IgM 및 IgG 항체들의 적정을 나타내었다.

도 29는 합성 올리고사카라이드 접합체 유래의 항혈청과 사멸된 전세포의 ELISA를 나타낸 것이다.

도 30은 핸들과 선택적으로 링커를 포함하는 트리-, 테트라- 및 펜타-사카라이드의 합성을 위한 반응식을 나타낸 것이다.

도 31a는 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S22**)의 NMR (^{1}H NMR, 600MHz, CD_3OD)을 나타낸 것이다.

도 31b는 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S23**)의 NMR (^{1}H NMR, 600MHz, CD_3OD)을 나타낸 것이다.

도 32는 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S24**)의 NMR (^{1}H NMR, 600MHz, CD_3OD)을 나타낸 것이다.

도 33. LPS (왼쪽 그래프; *녹농균* PAO1 BAA-47 (wt); *N. 메닌기티디스 galE/lpt3*; PBS 대조군) 또는 말단 메틸화된 람난을 나타내는 링커가 있는 합성 올리고사카라이드 (오른쪽 그래프; 펜타사카라이드; 테트라사카라이드; 트리사카라이드; 녹농균 PAO1 BAA-47 (wt) LPS에 대한 것)를 사용한 mAb 1B1의 억제 ELISA. 단계 희석배율은 x 축에 표시된 바와 같다.

도 34a. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 이전에 면역전 (pre-immune) 마우스 혈청 IgM (1:40 희석)과 BSA-올리고사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이다.

도 34b. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 이전에 면역전 마우스 혈청 IgM 적정과 Pa wt LPS를 비교하여

ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이다.

도 35a. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 최종 채혈 마우스 혈청 IgM 적정과 BSA-트리사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 35b. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 최종 채혈 마우스 혈청 IgM 적정과 BSA-테트라사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 35c. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 최종 채혈 마우스 혈청 IgM 적정과 BSA-펜타사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 35d. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 최종 채혈 마우스 혈청 IgM 적정과 LPS를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 36a. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 이전에 면역전 마우스 혈청 IgG (1:40 희석)과 BSA-올리고사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이다.

도 36b. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 이전에 면역전 마우스 혈청 IgG 적정과 Pa wt LPS를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받을 것이다.

도 37a. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 최종 채혈 마우스 혈청 IgG (1:20 희석)과 표시된 BSA-펜타사카라이드 및 Pa wt LPS를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다. 면역전 혈청 (Pre)은 음성 대조군으로 포함시켰,고 mAb 3C4 (동형 IgG2b)는 Pa wt LPS에 대한 양성 대조군으로 포함시켰다.

도 37b. CRM-올리고사카라이드 접합체 면역화 후에 채혈전 및 최종 채혈 마우스 혈청 IgG (1:40 희석)를 모아서 표시된 Pa wt, Pa wzy5457, Pa wzy5458 및 Nm wt(음성 대조군) LPS를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 마우스 MRha3V 1-5는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 마우스 MRha4V 6-10은 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 마우스 MRha5V 11-15는 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다. 면역전 혈청 (Pre)은 음성 대조군으로 포함시켰다.

도 38a. CRM 올리고사카라이드 접합체 면역화 전과 후의 면역 전과 면역 후 (D70) 토끼 혈청 (1:500 및 1:1500 희석)과 BSA 올리고사카라이드 접합체를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 토끼 RRha3V 1-2는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 토끼 RRha4V 3-4는 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 토끼 RRha5V 5-6은 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 38b. CRM 올리고사카라이드 접합체 면역화 전과 후의 면역 전과 면역 후 (D70) 토끼 혈청 적정과 Pa wt, Pa wzy5457 및 Pa wzy5458 LPS를 비교하여 ELISA로 인식을 측정하였다. 토끼 RRha3V 1-2는 트리사카라이드 CRM 접합체를 투여받았고, 토끼 RRha4V 3-4는 테트라사카라이드 CRM 접합체를 투여받았으며, 토끼 RRha5V 5-6은 펜타사카라이드 CRM 접합체를 투여받았다.

도 39a. 면역 전과 후의 마우스 혈청을 모은 것들 (IgM 및 IgG 모두 1:40 희석)이 녹농균 균주 NRCC # 6678, 6667-70, 6954-60 및 음성 대조군 균주 *M. 카타랄리스* 6541의 사멸된 전세포에 대한 결합의 ELISA 분석 (균주에

대한 상세한 내용에 대해서는 **표 7** 참조).

도 39b. 면역 전과 후의 개별 토끼 혈청 (모두 1:1500 희석)이 녹농균 균주 NRCC # 6678, 6667-70, 6954-60 및 음성 대조군 균주 *M. 카타랄리스* 6541의 사멸된 전세포에 대한 결합의 ELISA 분석 (균주에 대한 상세한 내용에 대해서는 **표 7** 참조).

도 39c. 면역 전과 후의 개별 토끼 혈청 (모두 1:1500 희석)이 녹농균 균주 NRCC # 6678, 6944-46, 6948-53 및 음성 대조군 균주 *N. 메닌기티디스* 6263과 *M. 카타랄리스* 6541의 사멸된 전세포에 대한 결합의 ELISA 분석 (균주에 대한 상세한 내용에 대해서는 **표 7** 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 본 발명은 부분적으로는 NMR과 화학 분석을 통한 새로운 *녹농균* 폴리사카라이드 구조에 대한 확인에 기반하고 있다. 본원에 제공된 구조들은 *녹농균* A-밴드 말단 에피토프 항원 (A-PS)을 최초로 확인한 것이거나 처음으로 정확하게 확인한 것으로 생각된다.

[0067] *녹농균* (*Pseudomonas aeruginosa; P. aeruginosa*라고도 칭함)은 기회감염성의 세균 병원체로서, 의료 관련 폐렴, 인공호흡기 관련 폐렴, 낭포성 섬유증 (CF) 환자의 만성적인 폐감염, 화상 및 연부 조직 감염을 비롯한 잠재적으로 생명을 위협하는 여러 감염들의 병인체이다. 약제 내성 *녹농균* 감염의 유병률이 증가하고 있다. 따라서, 일부 예에서, "*녹농균*"이라는 용어는 β-락탐 항생제 (예: 페니실린), 피페라실린, 이미페넴, 토브라마이신 또는 시프로플록사신에 내성이 있는 *녹농균* 균주와 같은, 항생제 내성 균주를 포함하나 이에 국한되지 않는 *녹농균*의 병원성 균주를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "*녹농균*"은 낭포성 섬유증 환자들을 감염시키는 병원성 균주를 지칭한다.

[0068] "감염"이란 용어는 대상체의 신체에 발생하는 임의의 미생물 감염을 의미한다. 감염에는 미생물의 환자의 신체에 침입하는 것과 그 후에 해당 미생물이 대상체의 신체에서 증식하는 것도 포함된다. 구체적인 예로서, 미생물은 *녹농균*이다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "대상체"란 동물을 가리키며, 예를 들어 고양이, 개 등의 가축, 소, 말, 돼지, 양, 염소 등의 가축, 마우스, 토끼, 랫트, 기니피그 등의 실험 동물, 포유동물, 인간이 아닌 포유동물, 영장류, 인간이 아닌 영장류, 설치류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 및 임의의 기타 동물들을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 대상체는 인간이다.

[0070] **글리칸**

[0071] 본원에 사용되는 용어 "탄수화물", 글리칸, "사카라이드", "올리고사카라이드" 및 "폴리사카라이드"는 서로 교환하여 사용할 수 있으며, 통상적으로 글리코시드 결합 (본원에서 연결이라고도 칭함)으로 연결된 당 단량체로 구성된 올리고머 또는 중합체를 지칭한다. 글리칸 내에서 모노사카라이드 단량체들은 모두 동일할 수도 있고 서로 다를 수도 있다. 통상적인 단량체로는 트리오스, 테트로스, 펜토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 람노스 및 3-O-메틸 람노스, 자일로스, 아라비노스, 릭소스, 알로스, 알트로스, 만노스 및 3-O-메틸 만노스, 굴로스, 이도스, 리보스, 만노헵툴로스, 세도헵툴로스 및 탈로스가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 아미노당은 글리칸 내에서 단량체일 수도 있다. 이러한 당을 포함하는 글리칸을 본원에서는 아미노글리칸이라고 한다. 본원에 사용된 아미노당은 하이드록실기 대신에 아민기를 포함하는 당 분자이거나, 또는 일부 실시형태에서는 그러한 당에서 유래된 당이다. 아미노당의 예로는 글루코사민, 갈락토사민, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 시알산 (N-아세틸뉴라민산 및 N-글리콜릴뉴라민산을 포함하되 이에 국한되지 않음) 및 L-다우노사민을 포함하나 이에 국한되지는 않는다.

[0072] 경우에 따라서, 글리칸은 표지, 핸들, 링커, 스페이서, 운반체 등을 포함하지만 이에 국한되지 않는 하나 이상의 글리칸이 아닌 성분으로 변형될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 글리칸은 당접합체를 포함할 수 있다. 당접합체에는 당단백질, 당지질 또는 프로테오글리칸이 포함될 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 당단백질은 공유결합된 올리고사카라이드 사슬 (글리칸)을 함유하는 임의의 단백질을 포함한다. 달리 명시하지 않는 한, 본원에 사용된 폴리사카라이드 명명법은 1980년 생화학 명명법에 관한 IUB-IUPAC 공동위원회 (JCBM)의 권장 사항을 따른다. 문헌 [JCBN, 1982, J. Biol. Chem. 257: 3352-3354]을 참고한다.

[0073] 본원에서, 예컨대 도면에 사용된 "D-모노사카라이드"라는 표시는 구체적으로는 3-O-메틸-D-람노스를 지칭하고, 본원에서, 예컨대 도면에 사용된 "L-모노사카라이드"라는 표시는 구체적으로는 3-O-메틸-L-람노피라노스를 지칭하며, 본원에서, 예컨대 도면에 사용된 "디사카라이드"라는 표시는 구체적으로 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-

(1→4)-3-O-메틸-D-람노피라노스를 지칭하는데, 이는 맥락으로부터도 분명하게 알 수 있을 것이다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "항원"은 면역 반응을 개시하고 매개할 수 있는 물질을 의미한다. 항원에 의해 자극되는 면역 반응은 체액성 또는 세포성 면역 반응 중 어느 하나이거나 양자 모두일 수 있으며, 일반적으로는 해당 항원에 특이적이다. 면역 반응을 자극하거나 강화하는 항원은 면역원성이 있다고 하며, 면역원이라고도 지칭한다. 항원을 포함하는 조성물은 "항원성 조성물" 또는 "면역원성 조성물"이라고도 칭할 수 있다.

[0075] 따라서, 항원은 항체 분자나 T 세포 수용체에 의해 결합될 수 있는 물질이다. 다양한 유형의 생물학적 분자들과 기타 분자들도 항원으로 작용할 수 있다. 예를 들어, 항원은 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 당, 지질, 인지질, 당인지질과 기타 분자들, 및 이들의 단편 및/또는 조합을 포함하되 이에 국한되지 않는 분자들로부터 유래할 수 있다.

[0076] 항원은 선천적 공급원에서 유래할 수 있거나, 또는 특정 포유동물이나 다른 동물의 외부 공급원 (예컨대, 감염원)으로부터 유래할 수도 있다. 항원은 다수의 항원 결정기를 보유할 수 있어서, 포유동물이 항원에 노출되면 서로 다른 특이성들을 갖는 다수의 해당 항체 또는 세포성 면역 반응을 만들어낼 수 있다.

[0077] 상기 언급한 바와 같이, 구체적인 예에서, *녹농균*으로부터 분리되거나 화학적으로 합성된 글리칸 항원이 설명되어 있다.

[0078] 항원은 세포 표면에서 MHC 분자들과 결합하고 있는 항원을 제시함으로써 숙주를 민감하게 하는 기능을 할 수 있다. 또한, 항원 특이적 T세포 또는 항체를 생성하여 향후 면역화된 숙주의 보호를 제공할 수도 있다. 따라서, 면역원성 조성물은 숙주를 박테리아 감염으로부터 보호하고, 중증도를 감소시키거나, 또는 박테리아 감염으로 인한 사망으로부터 숙주를 보호할 수도 있다. 항원은 다클론 항체나 단일클론 항체를 생성하는 데 사용될 수도 있는데, 이들 항체들은 대상체에게 수동형 면역을 부여하는 데 사용될 수 있다. 또한, 항원은 동물 효능 모델에서, 또는 옵소닌 식세포 사멸 분석을 통한 박테리아의 사멸에 의해 측정시 기능적인 항체를 생성하는 데 사용될 수도 있다.

[0079] 폴리사카라이드와 관련하여, 본원에 사용된 "분리된"이라는 용어는 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄을 사용한 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피의 사용을 비롯한, 당업계에 공지된 정제 기술을 사용하여 정제된 폴리사카라이드로부터 A-밴드 말단 에피토프 항원 (A-PS)을 분리하는 것을 의미한다. 일반적으로, 분리된 폴리사카라이드는 단백질, 핵산 및 비특이적인 내인성 폴리사카라이드를 부분적으로 제거한 것을 말한다. 분리된 폴리사카라이드는 단백질 불순물 및/또는 핵산을 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만으로 함유한다.

[0080] 박테리아 폴리사카라이드와 관련하여, 본원에 사용된 "정제된"이라는 용어는 원심분리, 침전 및 한외여과와 같은 방법을 통해 세포 용해물로부터 폴리사카라이드를 정제하는 것을 의미한다. 일반적으로, 정제된 폴리사카라이드는 세포 잔해물과 DNA를 제거한 것을 말한다.

[0081] 박테리아 글리칸은 자연적으로 발생하는 박테리아, 유전자 조작된 박테리아에서 유래될 수 있거나, 또는 합성 제조될 수도 있다. 폴리사카라이드는 일반적으로 사용 전에 하나 이상의 가공 단계, 예를 들어, 정제, 작용화, 약산성 또는 산화 조건을 사용한 해중합, 탈아세틸화 등을 거치게 된다. 필요하다면, 사후 처리 단계들도 사용할 수 있다. 적절한 폴리사카라이드 및 올리고사카라이드를 합성, 제조 및/또는 정제하는 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법을 사용할 수 있다.

[0082] *녹농균*은 다양한 세포 표면 글리칸을 생성한다. 과거 연구들에서는 비교적 보존된 세포 표면 탄수화물로서 중성 D-람난 트리사카라이드 반복 단위로 구성된 통상적인 폴리사카라이드 (PS) 항원 (A-밴드 PS라고도 칭함)을 확인한 바 있다. 한 연구에서 중성 D-람난 트리사카라이드에서는 면역원성 효과가 없었던 것으로 나타났다 [25]. 상기 언급한 바와 같이, 본 발명자들은 새로운 *녹농균* 폴리사카라이드 구조를 확인했으며, 해당 탄수화물 항원이 A-밴드 PS의 비환원성 말단에서 면역원성인 메틸화된 람난 올리사카라이드로 이루어져 있음을 밝혀냈다:

[0083] α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4-)$_4$-

[0084] 특히, 본 발명자들은 A-PS1과 A-PS2를 분리하여 특성을 분석하였다 (**도 1** 참조). 본원에 제공된 구조들은 *녹농균* A-밴드 말단 에피토프 항원을 최초로 확인한 것이거나 처음으로 정확하게 확인한 것으로 생각된다. A-PS 말단 (**도 1**의 A-PS1과 A-PS2 참조)을 항원 성분으로 추가로 분리하여 OS1 및 OS2를 제조하였다. 메틸레이트 람노스 부분이 항원성을 제공하였던 것으로 밝혀졌다. 디, -트리, -테트라 및 -펜타 3 OMe 람노스 올리고사카라이드들은 환원성 말단에 핸들이 있는 경우와 없는 경우로 합성되었다.

[0085] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 화학식 A의 올리고사카라이드 부분을 포함하는 항원성 화합물을 제공한다:

[0086] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$- 화학식 A

[0087] 상기 식에서, n은 1-5이고, 바람직하게는 2-4이며, 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0088] 한 측면에서, 본 발명은 화학식 A1의 올리고사카라이드 부분을 포함하는 항원성 화합물을 제공한다:

[0089] α-Rha3OMe(-4α-Rha3OMe)$_n$-X 화학식 A1

[0090] 상기 식에서, n은 1-5 (바람직하게는 2-4)이고, X는 -H 또는 -(4α-Man3OMe)$_m$-핸들 (handle)이며; m은 0, 1 또는 2이고, 바람직하게는 0 또는 1이며; 각 Rha3OMe 사카라이드 부분의 2번 위치는 독립적으로 -OAc 또는 -OH로 치환된다.

[0091] 사카라이드 단량체 부분은 독립적으로 D 또는 L 배열일 수 있다.

[0092] 일부 예에서, 사카라이드 부분은 2-O에서 독립적으로 아세틸화될 수 있다. 다른 예에서, 3-O-메틸 람노스 아세틸화 및 비아세틸화가 번갈아 나타나는 패턴이 사용될 수 있다. 다른 예에서, 2-O는 면역원성을 개선하기 위해 아세테이트가 이외의 다른 기, 예컨대 글리콜릴 및 락틸로 치환될 수 있다.

[0093] 메틸화된 람노스 올리고사카라이드의 구체적인 예들은 다음을 포함한다:

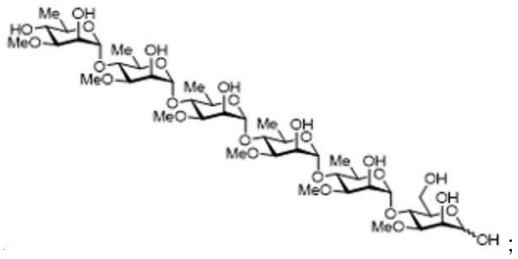
[0094] α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-글리세르알데히드-1d (OS2);

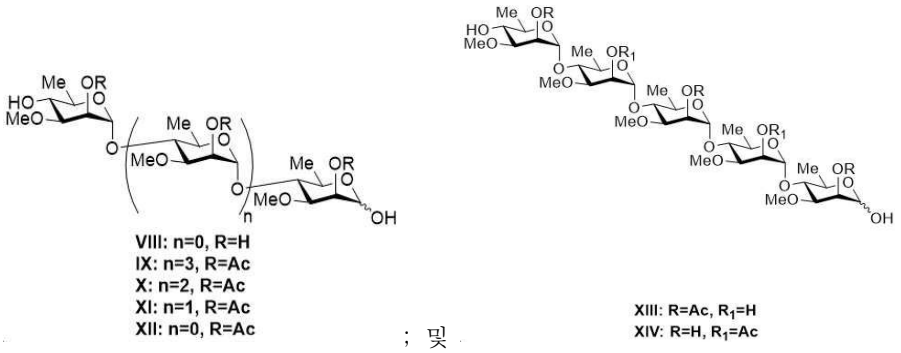
[0095] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (펜타사카라이드);

[0096] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (테트라사카라이드) (III);

[0097] 3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스 (트리사카라이드);

[0098] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-4-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드;

[0099] 
;

[0100] 

; 및 .

[0101] 본 발명의 메틸화된 람노스 올리고사카라이드는 화학적으로 분리되거나 합성될 수 있다. 다르게는, 분리된 올리고사카라이드는 화학적으로 추가로 변형시킬 수도 있다.

[0102] ***A-밴드 말단 에피토프 항원의 분리:*** 본 발명자들은 A-밴드 말단 에피토프 항원 (A-PS)을 분리하는 방법을 개발하였다. 한 측면에서, *녹농균*으로부터 분리된 LPS (리포폴리사카라이드)를 산 또는 알칼리 가수분해하여 중합체 분획을 제조하는 단계를 포함하는 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS1)을 제조하는 방법이 제공된다. 한 예에서, 중합체 분획은 예컨대 아세트산을 이용하는 산 가수분해를 거친다. 한 예에서, 중합체 분획은 예컨대 KOH와의 반응에 의한 알칼리 가수분해를 거친 후, HCl로 처리된다.

[0103] 이어서, 중합체 분획을 산화 단계를 거치게 한 후, 산 가수분해 단계를 거쳐 OS1을 생성한다. 한 예에서, 상기 제1 산화 단계는 상기 중합체 분획을 $NaIO_4$와 반응시키고, 에틸렌 글리콜과 $NaBD_4$와 반응시키며, AcOH와 반응시키고, 염을 제거하여 생성물을 생성하는 단계, 및 상기 생성물을 산 가수분해하여 분리된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS1)을 생성하는 단계를 포함한다. 구체적인 예에서, 하기 화학식을 갖는 *녹농균*의 분리된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS1)이 설명되어 있다:

[0104] α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-테트리톨-*1d* (OS1)

[0105] OS1이 추가의 산화 단계를 거치게 되면, 추가로 분리된 A-밴드 말단 에피토프가 얻어지며, 본원에서는 이를 OS2로 확인한다. 한 예에서, 상기 제2 산화 단계는 OS1을 $NaIO_4$와 반응시키고, 에틸렌 글리콜과 $NaBD_4$와 반응시키며, AcOH와 반응시키고, 염을 제거하여 생성물을 생성하는 단계, 및 상기 생성물을 산 가수분해하여 분리된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS2)을 생성하는 단계를 포함한다. 구체적인 예에서, 하기 화학식의 화합물의 글리칸인, *녹농균*의 분리된 산화된 A-밴드 말단 에피토프 항원 (OS2)이 설명되어 있다:

[0106] α-D-Rha3OMe-4-(α-D-Rha3OMe-4)$_4$-4-α-D-Man3OMe-2-글리세르알데히드-1d (OS2).

[0107] 일부 예에서, 화합물은 항원이다.

[0108] ***화학적 합성:*** 본 발명의 화합물의 화학적 합성은 실시예들에 상세히 설명되어 있으며, **도 22-24** 및 **도 30**에 예시되어 있다.

[0109] 한 측면에서, 본 발명의 화합물을 제조하는 합성 방법이 제공되는데, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0110] • 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 아노머 탈보호로 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 형성하는 단계;

[0111] • 상기 3-*O*-메틸화된 람노피라노스를 아세틸화시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는 단계;

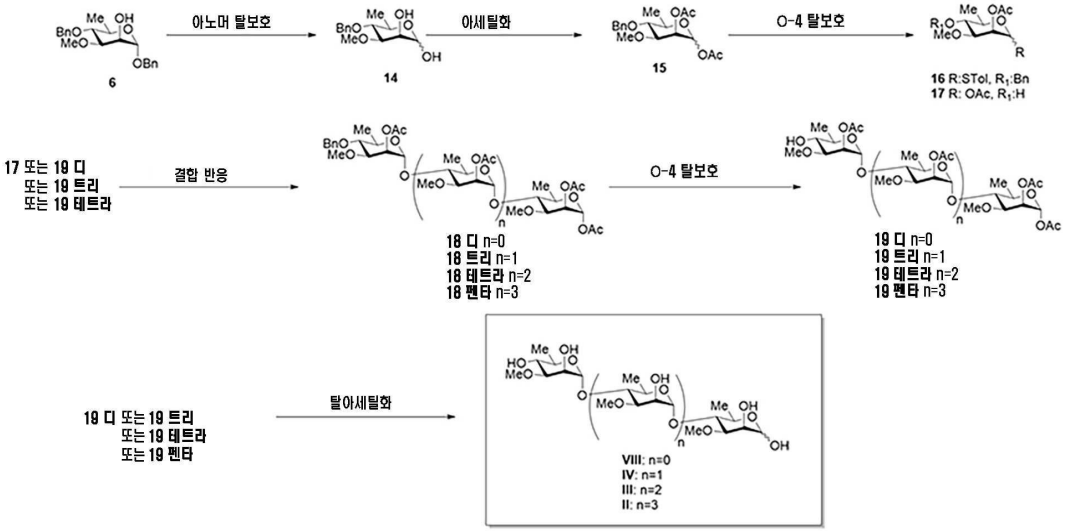
[0112] • 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드의 *O*-4를 부분적으로 탈보호시켜 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 형성하는 단계;

[0113] • 상기 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 람노피라노시드를 결합시켜 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계;

[0114] • 상기 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드의 *O*-4를 탈보호시켜 *O*-4 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 형성하는 단계; 및

[0115] • 상기 부분적으로 탈보호된 아세틸화된 3-*O*-메틸화된 올리고사카라이드를 탈아세틸화시켜 화합물을 형성하는 단계.

[0116] 한 측면에서, 본 발명의 화합물을 제조하는 합성 방법이 제공되는데, 상기 방법은 다음을 포함한다:



[0117]

[0118] ***핸들:*** 본 발명의 화합물에는 "핸들"을 포함하는 화합물들도 포함된다. 본 발명의 내용에서 "핸들"은 말단 α-Rha3OMe 반복부에 대해 원위의 부위에서 반응성기를 형성하기 위한 화학적 변형이다. 그 예로는 2-글리세르알데히드, $-CH_2-NH_2$, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $(CH2)_5NH_2$, -C(O)OH, -C(O)H, $-C(O)NH_2$ 및 $-CH_2N_3$을 포함한다. 해당 화합물이 -4α-Man3OMe를 포함하는 경우 (즉, m이 1 또는 2인 경우), 핸들은 바람직하게는 2-글리세르알데히드이다. 화합물이 4α-Man3OMe를 포함하지 않는 경우(즉, m이 0인 경우), 핸들은 바람직하게는 $-CH_2-NH_2$, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $(CH2)_5NH_2$, -C(O)OH, -C(O)H, $-C(O)NH_2$ 및 $-CH_2N_3$, 보다 바람직하게는 $-CH_2-NH_2$, $-(CH_2)_2NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$ 또는 $-(CH_2)_5NH_2$이다.

[0119] 한 예에서, 상기 합성 방법은 하기 단계들을 수행함으로써 핸들을 추가하는 단계를 추가로 포함한다:

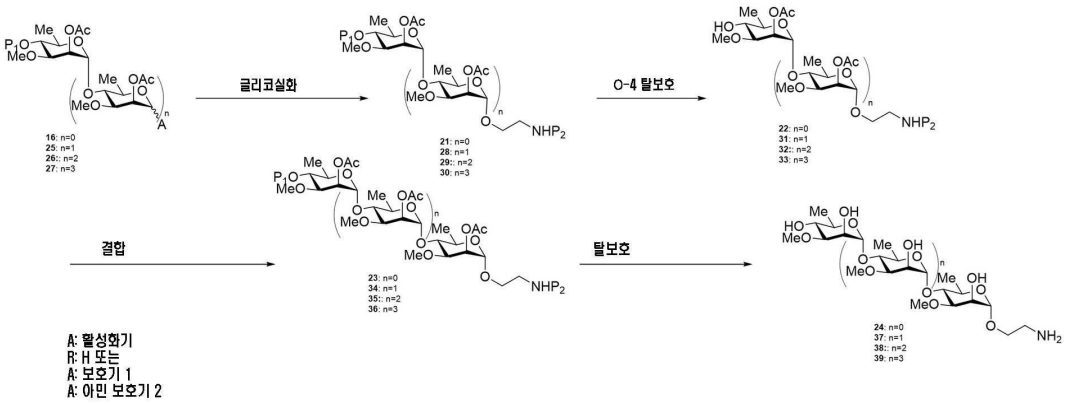
[0120] • 보호된 아민을 포함하는 핸들을 사용하여 1-*O*에서 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체를 글리코실화하여 - 활성화된 모노람노피라노시드 중간체는 글리코실화 부위 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하는 단계;

[0121] • 4-*O*에서 보호기를 제거하여 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 형성하는 단계;

[0122] • 상기 탈보호된 1-*O* 글리코시드 중간체를 활성화된 *O*-3 메틸화된 람노피라노시드 중간체에 결합시켜 - 활성화된 람노피라노시드 중간체는 4-*O*에서 보호기를 포함함 -, 보호된 메틸화된 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드를 형성하는 단계; 및

[0123] • 상기 보호된 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드에서 모든 보호기들을 제거하는 단계.

[0124] 한 예에서, 상기 합성 방법은 하기 단계들을 수행함으로써 본 발명의 화합물에 핸들을 추가하는 단계를 추가로 포함한다:



[0125]

[0126] ***링커***: 정제되거나 합성된 올리고사카라이드들은 선택적으로 링커를 포함할 수 있는데, 이 링커는 본 발명의 올리고사카라이드에 직접적으로 접합되거나, 또는 올리고사카라이드 상의 핸들을 통해 접합될 수도 있다. 당업계의 숙련자라면 이해할 수 있는 바와 같이, 링커는 원하는 목적을 위한, 예를 들어 4α-연결된 글리칸을 운반 단백질에 접합시키는 데 적합한 임의의 링커일 수 있다. 산, NHS 에스테르 또는 PFP 에스테르와 같은 양쪽 말단에 작용기를 함유하는 적합한 링커들은 당업자에게 공지되어 있는데, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 선형 폴리-아미도아민 (PAA), 폴리(2-옥사졸린) (POx), 폴리(글리세롤 아디페이트) (PGA), 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA) 및 문헌 [Munneke et al.] [42]에 기술된 것들과 같은 당접합체의 제조에 적절한 기타 링커들을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다. 적합한 링커의 예로는, 예를 들어 BroadPharm®에서 BCN PEG 및 BCN 시약을 구입할 수 있다.

[0127] 특정 실시형태에서, 올리고사카라이드는 링커에 결합되어 폴리사카라이드-링커를 형성할 수 있는데, 여기서 링커의 자유 말단은 에스테르기이다. 따라서, 링커는 적어도 하나의 말단이 에스테르기인 것이다. 다른 말단은 올리고사카라이드과 반응하여 올리고사카라이드-링커 중간체를 형성할 수 있도록 선택된다.

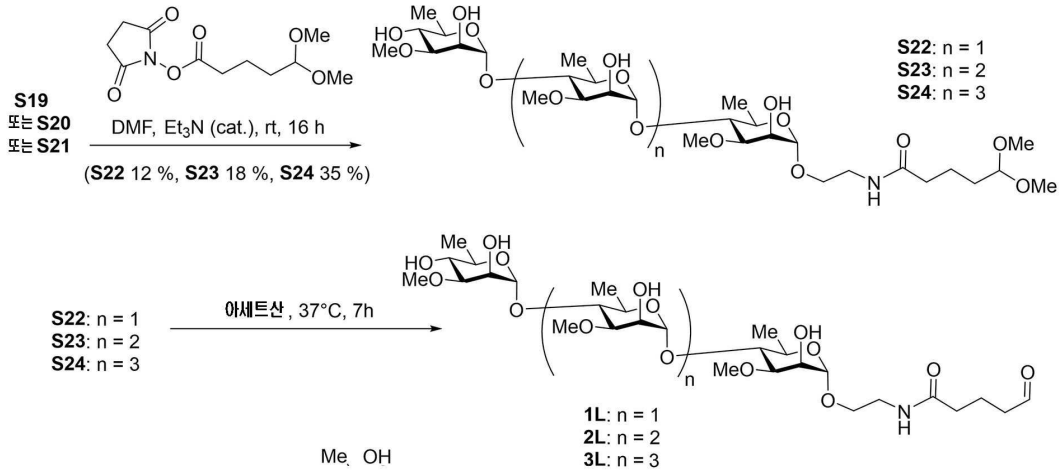
[0128] 특정 실시형태에서, 링커는 올리고사카라이드의 핸들에 있는 1차 아민기와 반응하기 위한 제1 에스테르기와, 운반체 분자에 있는 1차 아민기와 반응하기 위한 제2 에스테르기를 제공하는 이작용성 링커이다. 통상적인 링커는 아디프산 N-하이드록시숙신이미드 디에스테르 (SIDEA)이다. 한 측면에서, 링커는 활성화된 N-하이드록시숙신이미드와 헤미아세탈 보호 알데히드를 함유하는 2가 링커일 수 있는데, 이때 한쪽 말단이 올리고사카라이드의 핸들에 있는 1차 아민과 반응성이 있다.

[0129] 기타 적절한 기술들은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노보란, p-니트로벤조산, N-하이록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 활용한다. 이에 대한 여러가지 예들이 국제 특허 출원 공보 WO 98/42721에 기술되어 있다. 접합에는 카르보닐 링커를 수반할 수 있는데, 이 링커는 사카라이드의 자유 하이드록실기와 CDI의 반응에 의해 형성될 수 있으며 (문헌 [Bethell et al.] [43] 참조), 이후 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성한다. 여기에는 아노머 말단을 1차 하이드록실기로 환원하는 것, 상기 1차 하이드록실기를 선택적으로 보호/탈보호하는 것, 상기 1차 하이드록실기와 CDI를 반응시켜 CDI 카바메이트 중간체를 형성하는 것, 및 CDI 카바메이트 중간체를 단백질의 아미노기와 결합시키는 것이 포함될 수 있다.

[0130] 일부 예에서, 링커는 아노머 위치에서의 연결에 사용될 수 있다. 일부 예에서, 링커는 합성 과정 동안 초기에 배치할 수 있다. 링커는 디사카라이드, 트리사카라이드, 테트라사카라이드 또는 펜타사카라이드 상에 위치하거나, 또는 추가로 이러한 사카라이드들의 아세틸화된 형태 및 비아세틸화/아세틸화된 패턴에도 위치할 수 있다. 다른 예에서, 올리고사카라이드를 단백질과의 잠재적인 접합을 위한 임의의 연결 작용화에 연결시키는 것도 가능할 수 있다.

[0131] 한 측면에서, 아미노-PEG와 같은 링커 및 아지드 및 알데히드 보호기와 같은 작용기가 사용될 수 있다.

[0132] 한 예에서, 링커는 하기 과정에 따라 첨가될 수 있다:



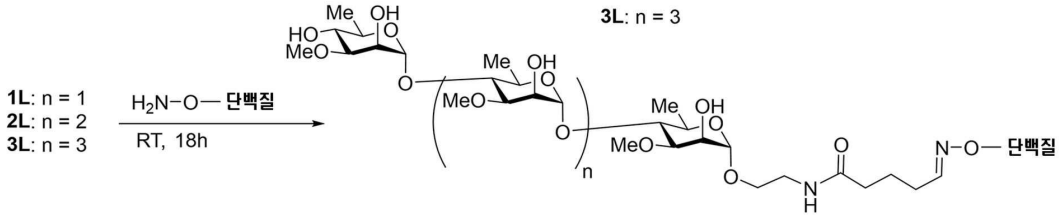
[0133]

[0134] ***접합체:*** 운반 단백질과의 접합은 면역원성을 향상시킬 수 있다. 적합한 단백질 부류로는 필리 (pili), 외막 단백질 및 병원성 박테리아의 배출된 독소; 이러한 독소의 비독성 또는 "변성 독소" 형태, 박테리아 독소와 항원적으로 유사한 비독성 단백질 (즉, 교차 반응성 물질 또는 CRM) 및 기타 단백질들이 포함된다. 한 측면에서, CRM197과 같은 CRM은 운반 단백질로 사용될 수 있다. CRM197은 디프테리아 독소 (DT)의 비독성 변종이다. 기타 적합한 운반 단백질로는 추가의 불활성된 박테리아 독소, 예컨대 DT, 디프테리아 변성 독소 단편 B (DTFB), DTBC8, TT (파상풍 독소) 또는 TT의 단편 C, 백일해 변성 독소, 콜레라 변성 독소, 대장균 LT (열에 불안정한 장독소), 대장균 ST (열에 안정한 장독소) 및 *녹농균* 단백질, 예컨대 녹농균의 외독소 A를 포함한다. 또한, 인간 혈청 알부민 (HSA)과 소 혈청 알부민 (BSA)도 포함된다. 다른 DT 돌연변이체들도 운반 단백질로 사용될 수 있는데, 여기에는 CRM176, CRM228, CRM45, CRM9, CRM45, CRM102, CRM103, CRM3201 및 CRM107이 포함된다. 또한, *클로스트리디움 퍼프린젠스 (Clostridium perfringens)* 외독소/변성 독소도 포함된다. 기타 적합한 박테리아 단백질에는 폐렴구균성 표면 단백질 A (PspA), 폐렴구균성 접착 단백질 (PsaA), 폐렴구균성 표면 단백질 BVH-3 및 BVH-11이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 또한, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 투구게 헤모시아닌 및 식물성 에데스틴을 비롯한 비포유류 공급원에서 얻은 면역원성 운반 단백질을 사용하는 것도 고려되고 있고, 바이러스성 단백질, 예컨대 B형 간염 표면/코어 항원; 로타바이러스 VP7 단백질과 호흡기 세포융합 바이러스 F 및 G 단백질을 사용하는 것도 고려되고 있다. 기타의 운반 단백질들은 해당 분야의 숙련자들에게 알려져 있다.

[0135] 글리칸 접합체는 공지된 결합 기술을 통해 제조될 수 있다. 본 발명의 올리고사카라이드는 상기 링커에 관해 논의된 화학을 사용하여, 직접적으로 운반 단백질에 접합되거나, 또는 핸들 및/또는 링커를 통해 운반 단백질에 접합되어 당접합체를 형성할 수 있다.

[0136] 글리칸과 운반체 사이의 접합은 다양한 시약들을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 접합은, 환원성 아민화에 의한 직접 공유 결합과 같이, 글리칸과 운반 단백질 사이에서 직접적으로 일어날 수 있다. 다르게는, 접합은 가교제를 사용하여 수행될 수도 있다.

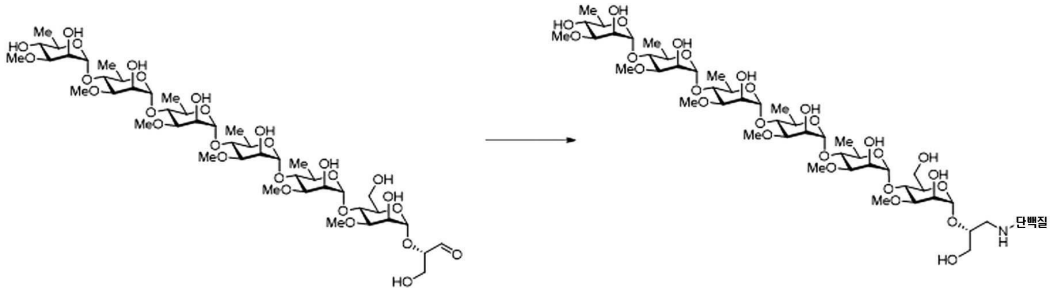
[0137] 한 예에서, 단백질은 하기에 따라 글리칸-핸들-링커 화합물에 접합될 수 있다:



[0138]

[0139] 단백질과 링커 접합의 추가 예를 아래에 나타내었다.

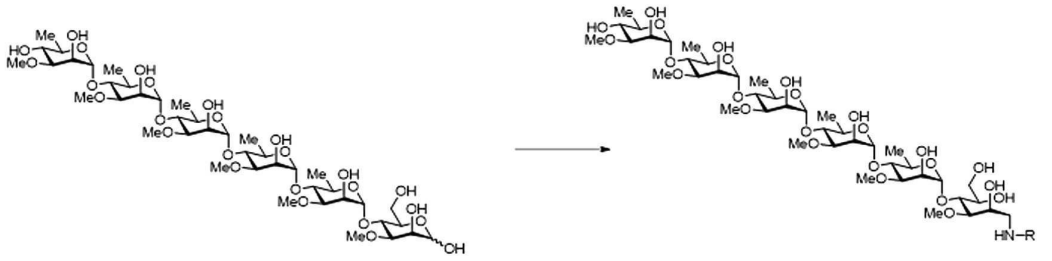
[0140] 일부 예에서, 항원은 *녹농균*으로부터 추출되어 변형된 천연 사카라이드 (OS2)로서, CRM, HSA, BSA 등과 같은 운반 단백질에 접합될 수 있다. 이 경우, 글리세르알데히드는 핸들로서 작용하고, 단백질은 환원성 아민화 반응을 통해 부착된다.



천연 사카라이드를 추출한 후, 환원성 아민화를 통해 단백질에 접합시킴 CRM, HSA, BSA 등과 같은 단백질

[0141]

[0142] 일부 예에서, 항원은 하기를 포함하거나 하기로 이루어진다:



천연 사카라이드를 추출한 후, 환원성 아민화를 통해 단백질에 접합시킴
R: 단백질 또는 링커의 아민을 사용한 직접적인 환원성 아민화

[0143]

[0144] 일부 예에서, 단백질을 이용한 헤미아세탈의 직접적인 환원성 아민화가 사용될 수 있다. 일부 예에서, 이는 합성 항원의 환원성 말단을 통해 달성된다. 일부 예에서, 링커는 먼저 핸들을 통해 사카라이드에 첨가되고, 공지된 연결 기술을 사용하여 부착된 링커에 접합시킬 수 있다.

[0145] 한 측면에서, 운반 단백질 또는 링커는 각각 운반 단백질 또는 링커의 아민과 직접적인 환원성 아민화를 통해 접합될 수 있다 (R은 단백질 또는 링커임). 다음은 그 예이다.



20 트리

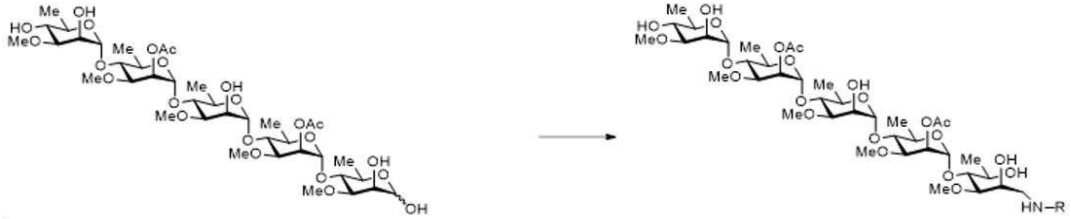
[0146]

[0147] 일부 예에서, 올리고사카라이드는 2-0에서 아세틸화될 수 있다.



[0148]

[0149] 다른 예에서, 아세틸화되지 않은 모노사카라이드와 아세틸화된 모노사카라이드를 조합하여 사용할 수도 있다. 다른 예에서, 3-0-메틸 람노스 아세틸화 및 비아세틸화가 번갈아 나타나는 패턴이 사용될 수 있다.



[0150]

[0151] 위에서 설명한 내용은 특정 화합물들을 예시하고는 있지만, 상기 화학은 본 발명의 다른 올리고사카라이드, 예

컨대 펜타사카라이드, 테트라사카라이드, 트리사카라이드 및 디사카라이드에도 적용된다.

[0152] **약제학적/백신 조성물**

[0153] 본 발명은 추가로, 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 및/또는 보조제와 함께, 본원에 기술된 임의의 글리칸(운반 단백질에 접합되거나 접합되지 않은 글리칸을 모두 포함)를 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나, 또는 다르게는 이로 이루어지는 조성물 (약제학적, 면역원성 및 백신 조성물을 포함함)을 제공한다.

[0154] 제제화는 당업계에서 인정된 방법들을 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 글리칸은 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 제제화되어 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예로는 물, 완충 식염수, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 덱스트로스 용액을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0155] 일부 측면에서, 접합체와 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 기재되어 있다. 일부 측면에서, 접합체, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 아주반트를 포함하는 조성물이 기재되어 있다.

[0156] 일부 예에서, 글리칸이 백신의 항원성 성분인 백신이 기술되어 있다.

[0157] 본원에 사용된 용어 "백신"이란 질병의 원인 물질, 그의 생성물 또는 합성 대체물로부터 제조되고, 해당 질병을 유발하지 않으면서도 항원으로 작용하도록 처리된, 항체의 생성을 자극하고/하거나 하나 또는 수개의 질병에 대한 면역성을 제공하는 데 사용되는 물질을 의미한다.

[0158] 백신은 일반적으로 질병 원인 물질과 유사하거나, 또는 질병 원인 물질을 약화시키거나 사멸시킨 형태로 제조된 항원을 포함한다. 예를 들어, 백신은 박테리아의 항원 하나 이상, 박테리아의 표면 단백질 하나 이상, 또는 박테리아의 막 성분 하나 이상을 포함할 수 있다. 백신은 예방적 (천연 또는 "야생형" 병원체에 의한 향후 감염 발생 위험을 감소시키거나 감염의 영향을 완화하기 위함)이거나, 또는 치료적 (예를 들어, 현재 연구 중인 질병이나 장애에 대한 백신)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에서 설명하는 백신은 예방용 백신이다. 일부 실시형태에서, 본원에서 설명하는 백신은 치료용 백신이다. 일부 실시형태에서, 백신은 예방적이면서 치료적일 수도 있다.

[0159] 분리된 항원을 사용하여 수행된 초기 연구들에서는 마우스와 토끼를 면역화시켜 단일클론 및 다클론 항체를 생성하는 데 사용되었던 접합체를 제조할 수 있었다. 다클론 항체들은 우리의 컬렉션에 있는 대부분의 *녹농균* 균주들을 인식할 수 있었고, 3개의 단일클론 항체들이 생성되었는데, 그 중 하나는 대부분의 녹농균 균주들에 대한 옵소닌 식세포 사멸 작용을 인식하여 이를 촉진할 수 있었다. 이 단일클론 항체는 임상 및 혈청형 균주를 포함하는 우리의 컬렉션의 대부분의 *녹농균* 균주들을 인식할 수 있었다.

[0160] 아주반트는 대상체에서 더 높은 면역 반응을 이끌어내는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 사용되는 아주반트는 항체트 역가에 영향을 미치는 능력에 기초하여 선택될 수 있다.

[0161] 본원에 사용되는 용어 "아주반트"는 특정 백신 항원과 함께 사용될때 항원 특이적 면역 반응을 가속화하거나, 연장하거나, 또는 강화하는 작용을 하는 임의의 물질을 의미한다. 아주반트는 약화되거나 사멸된 면역원에 함유되어 있는 자연 발생적인 성분일 수 있다. 예를 들어, 아주반트는 전세포, 단백질, 단백질 단편 또는 박테리아 세포의 지질막의 성분일 수 있다. 아주반트는 합성된 화합물일 수도 있다. 예를 들어, 아주반트는 알루미늄 염, 인지질 또는 그의 유도체일 수 있다.

[0162] 일반적으로, 아주반트가 첨가된 백신은 아주반트가 첨가되지 않은 백신에 비해 더 강력한 국소 면역 반응 뿐만 아니라, 전신 면역 반응을 유발하는 데 도움이 될 수 있다.

[0163] 일부 예에서, 면역 반응을 유도하는 방법은 아주반트를 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0164] 일부 예에서, 유중수 에멀젼이 아주반트로서 유용할 수 있다. 유중수 에멀전은 이동성 항원 저장소를 형성하여, 항원의 느린 방출을 촉진하며, 면역 성분들에 대한 항원 제시를 향상시키는 방식으로 작용할 수 있다. 프로인트 아주반트는 건조시킨 불활성화된 결핵균 입자를 포함하는 완전 프로인트 아주반트 (CFA)로서 사용될 수 있거나, 또는 그러한 입자가 없는 불완전 프로인트 아주반트 (IFA)로서 사용될 수도 있다. 다른 유중수계 아주반트로는 EMULSIGEN®을 포함할 수 있다. EMULSIGEN®은 동물성 성분들이 없는 마이크론 크기의 오일 방울을 포함하며, 단독으로 혹은 수산화알루미늄 및 CARBIGEN™을 포함하지만 이에 국한되지 않는 다른 아주반트들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0165] 다른 예에서, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드가 아주반트로서 사용될 수도 있다. 이러한 아주반트에는 CpG 올

리고데옥시뉴클레오타이드 (ODN)가 포함될 수 있다. CpG ODN은 톨유사 수용체 9 (TLR9)에 의해 인식되어, 강력한 면역자극 효과를 유도한다. C형 CpG ODN은 형질세포모양 수지상 세포 (pDC)와 B 세포 자극으로부터 강력한 IFN-α 생산 뿐만 아니라, T-헬퍼 (Tx) 세포로부터 IFN-ɣ 생산도 유도한다. CpG ODN 아주반트는 마우스에서 폐렴구균성 폴리사카라이드 (19F형 및 6B형) 특이적 IgG2a 및 IgG3를 현저히 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 또한, CpG ODN은 단백질 운반체 CRM197, 특히 CRM197 특이적 IgG2a 및 IgG3에 대한 항체 반응을 강화시킨다. 추가로, CpG-ODN과 함께 폐렴구균성 캡슐 폴리사카라이드 혈청형 14 (PPS14)를 노령 마우스에게 면역화시켰더니, IgG 항-PPS14 반응이 젊은 성인 수준으로 회복되는 것으로 나타났다. 본 발명에 따라 사용되는 CpG ODN에는 클래스 A, B 또는 C ODN이 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, ODN은 시판되어 이용가능한 임의의 것들, 예컨대 ODN-1585, ODN-1668, ODN-1826, ODN-2006, ODN-2007, ODN-2216, ODN-2336, ODN-2395 및/또는 ODN-M362를 포함할 수 있다. 경우에 따라서, ODN-2395를 사용할 수도 있다. ODN-2395는 인간과 마우스의 TLR9를 특이적으로 자극하는 클래스 C CpG ODN이다. 이러한 ODN은 포스포로티오에이트 백본과 CpG 회문형 모티프형 (palindromic motif)를 포함한다.

[0166] 일부 예에서, 본 개시내용에 따라 백신을 제조하는 과정에서, 글리칸은 면역원성 운반체 분자에 공유 결합되거나, 또는 다른 방법으로 접합된다. 통상적으로, 면역원성 운반체 분자는 단백질이나 폴리펩타이드이다.

[0167] 본원에 사용된 용어 "부형제" 또는 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 사용 전에 본 발명의 화합물 및/또는 조성물과 혼합되는 임의의 물질을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 부형제는 불활성으로, 주로 본 발명의 화합물 및/또는 조성물에 대한 담체, 희석제 또는 비히클로서 사용된다. 부형제는 생리학적으로 양립가능한 경우, 즉 동물 (적절하다면 인간 또는 비인간 동물 포함)에게 투여했을 때 부작용이나 부반응을 일으키지 않는 경우라면, 약제학적인 것이다.

[0168] 본원에 기술된 약제학적 조성물의 제제들은 약리학 분야에서 공지되어 있거나 이후 개발된 임의의 방법을 통해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법들은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분들과 결합시키는 단계가 포함된다.

[0169] 본 개시내용에 따른 약제학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 용량으로, 및/또는 다수의 단일 단위 용량으로 제조, 포장 및/또는 판매될 수 있다.

[0170] 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 부형제로는, 이에 제한되지는 않지만, 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 붕해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제 및/또는 오일을 포함한다. 이러한 부형제들은 선택적으로 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.

[0171] 희석제의 예로는, 이에 제한되지는 않지만, 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트륨, 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 가루 설탕 등, 및/또는 이들의 조합을 포함한다.

[0172] 본원에 기술된 백신은 바람직하게는 대상체에서 *녹농균*으로 인한 감염을 예방, 개선 및/또는 치료할 수 있다.

[0173] 본원에 사용된 "예방" 및 "~을 예방하는"이라는 용어에는 *녹농균* 감염의 재발, 확산 또는 발병을 예방하는 것이 포함된다. 본 개시내용은 완전한 예방에만 국한되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 예방에는 감염의 발병을 늦추거나 감염의 중증도를 감소시키는 것이 포함된다.

[0174] 본원에 사용된 용어 "치료", "~을 치료하다" 또는 "~을 치료하는"은 임상 결과를 비롯하여 유익하거나 바람직한 결과를 얻는 것을 의미한다. 유익하거나 바람직한 임상적 결과에는 하나 이상의 증상이나 상태의 완화 또는 개선, 질병 범위의 감소, 질병의 안정화 (즉, 악화되지 않음) 상태, 질병의 확산 방지, 질병 진행의 지연 또는 더딤, 질병 상태의 개선 또는 완화, 질병 재발의 감소, 및 감지될 수 있는지의 여부와는 관계없이, (부분적이든 전체적이든) 완화가 포함될 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다. "~을 치료하는"과 "치료"라는 말은 치료를 받지 않았을 경우에 예상되는 생존과 대비하여 생존을 연장하는 것을 의미할 수도 있다. 따라서, "~을 치료하다" 및 "~을 치료하는"이라는 용어들은 대상체 (예컨대, 환자)가 치유되고 질병이 근절되는 경우로만 한정되지 않는다. 오히려, 본 개시내용의 예에서는 증상을 완화하고/하거나 질병 진행을 지연시키는 치료도 고려하고 있다.

[0175] 질병 또는 장애 (예컨대, *녹농균* 감염)의 "증상"이란 용어는 질병을 나타내는 대상체가 경험하는 구조, 기능 또는 감각의 정상으로부터 벗어난 것 또는 임의의 병적 현상이다.

[0176] 본원에 사용된 용어 "개선" 또는 "~을 개선하다"는 이상 또는 증상을 비롯한 상태, 질병, 장애 또는 표현형의 감소, 완화 또는 제거를 의미한다.

[0177] *녹농균*은 면역억제되거나 면역 체계가 손상된 환자에 있어서 생명을 위협하는 다양한 감염을 유발하는 의미있는 기회감염성 병원체이다. *녹농균* 감염을 일으킬 위험이 있는 대상체로는 낭포성 섬유증 환자, 화상 환자, 중증 호중구 감소증 환자 (예컨대, 화학요법을 받는 암 환자) 및 호흡기 지원을 받는 중환자실 환자가 포함된다.

[0178] 본원에 설명된 백신은 기존의 다른 백신들과 동시에 투여될 수 있다.

[0179] 본원의 백신은 근육 내, 피하, 진피 내, 경구, 흡입, 비강 내, 직장 및 정맥 내 경로를 포함하는 임의의 모든 경로를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 정제, 캡슐 또는 액상 현탁액이나 에멀젼의 형태로 하는 것이 적합하다. 다르게는, 백신은 Dischaler® 또는 Turbohaler®를 사용하여 미세 분말이나 에어로졸 형태로 투여될 수도 있다. 비강 투여는 미세 분말이나 에어로졸 비강 스프레이 또는 변형된 Dischaler® 또는 Turbohaler®의 형태가 적합할 수 있다. 직장 투여는 좌제를 통해 이루어지는 것이 적절하다.

[0180] 백신의 면역보호량은 단회 용량 또는 다회의 용량으로 투여될 수 있다. 1회 이상의 용량을 투여하는 경우, 용량은 수일, 수주 또는 수개월의 간격으로 투여될 수 있다. 일부 예에서, 백신은 단회 용량으로, 또는 1회 이상의 추가 접종을 포함하는 다회 용량으로 투여될 수 있다.

[0181] 대상체에게 투여할 백신의 용량과 투여 방식은, 목적한 용도, 특정 항원, 아주반트 (존재하는 경우), 나이, 성별, 체중, 종, 전반적인 상태, 과거 병력 및/또는 치료, 및 투여 경로와 같은 요인들을 고려하여, 약학 및 수의학 분야의 숙련자들에게 익히 공지된 표준 기술에 따라 결정될 수 있다.

[0182] 일부 예에서, 치료적 유효량의 백신 또는 면역원성 조성물이 사용된다.

[0183] 치료적 유효량이란 특정 제제로 치료를 받고 있는 대상체에게 목적한 효과를 달성하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 이 양은 대상체에서 면역 반응을 유도하고/하거나 감염을 예방하는 데 유용한 백신의 양일 수 있다. 대상체에서 감염에 대한 저항성을 증가시키고, 감염을 예방, 개선 및/또는 치료하는 데 유용한 백신 (또는 면역원성 조성물)의 유효량은, 예를 들어 치료할 대상체, 치료 조성물의 투여 방식 및 기타 요인들에 따라 달라질 수 있다.

[0184] **항체**

[0185] 일부 예에서, 본원에 기술된 글리칸 항원에 특이적인 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0186] 일부 예에서, 특정 항원으로 숙주를 면역화함으로써 항체를 개발할 수 있다. 앞서 논의한 바와 같이, 이러한 면역 반응은 통상적으로 유기체가 이물질, 예컨대 항원 또는 항원의 일부에 대한 하나 이상의 항체를 생산하도록 유도한다. 경우에 따라서는, 하나 이상의 목적한 면역화 결과에 따라 면역화 방법이 변경될 수도 있다. 본원에 사용된 용어 "면역화 결과"는 면역화의 하나 이상의 목적한 효과를 의미한다. 그 예로는 높은 항체 역가 및/또는 관심대상 표적에 대한 항체 특이성 증가를 포함한다. 항체를 수집하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0187] 본원에 사용된 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되어, 특히 단일클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (예컨대, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 형성된 이중특이적 항체) 및 디아바디와 같은 항체 단편 (단, 이들은 목적한 생물학적 활성을 나타내야 함)을 포함하되 이에 국한되지 않는 다양한 실시형태들을 구체적으로 망라한다. 항체는 주로 아미노산 기반 분자이지만, 당 부분, 링커, 검출가능한 표지 등과 같은 하나 이상의 변형을 포함할 수도 있다.

[0188] 본원에 사용된 "단일클론 항체"라는 용어는, 실질적으로 동질한 세포 (또는 클론)의 개체군으로부터 얻은 항체, 즉 해당 개체군을 구성하는 개별 항체가 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭하되, 해당 단일클론 항체의 제조 과정 중에 발생할 수 있는 가능한 변이체들은 제외되며, 이러한 변이체들은 일반적으로 미량으로 존재한다. 일반적으로 서로 다른 결정기 (에피토프)들에 대하여 유도되는 서로 다른 항체들을 포함하는 다클론 항체 제제들과는 달리, 각 단일클론 항체는 해당 항원 상의 하나의 결정기에 대하여 유도된다.

[0189] 일부 예에서, 본원에 설명된 항체는 인간화될 수 있다.

[0190] 비인간 (예컨대, 쥐과) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수용자 항체의 초가변 영역의 잔기들이 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간 종, 예컨대 마우스, 랫트, 토끼 도는 비인간 영장류 항체의 초가변 영역의 잔기들 (공여자 항체)에 의해 대체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.

[0191] 본 발명의 방법은 이러한 방법에 사용되는 화합물 및/또는 조성물을 키트의 형태로 제공함으로써 편리하게 실시된다. 이러한 키트는 바람직하게는 본원에 설명된 조성물을 포함한다. 이러한 키트에는 사용설명서가 포함되어

있는 것이 바람직하다.

[0192] 본원에 기술된 본 발명을 보다 잘 이해하도록 돕기 위해, 하기 실시예를 제공한다. 이러한 실시예들은 단지 설명을 위한 것임을 이해해야 한다. 따라서, 본 실시예들은 어떠한 식으로든 본 발명의 범위를 한정해서는 안 된다.

[0193] **방법 및 용도**

[0194] 일반적으로, 본원에는 분리되거나 합성된 글리칸, 바람직하게는 *녹농균*으로부터 분리되거나 합성된 글리칸 항원, 보다 바람직하게는 당접합체 형태의 운반 단백질에 연결된, *녹농균*으로부터 분리되거나 합성된 글리칸 항원을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 면역 반응을 유도하는 방법이 기술되어 있다.

[0195] 일부 측면에서, 분리되거나 합성된 글리칸, 바람직하게는 *녹농균*으로부터 분리되거나 합성된 글리칸 항원, 보다 바람직하게는 당접합체 형태의 운반 단백질에 연결된, *녹농균*으로부터 분리되거나 합성된 글리칸 항원을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, *녹농균*에 감염된 대상체, *녹농균* 감염이 의심되는 대상체, 또는 녹농균 감염이 발병될 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0196] 일부 측면에서, 본 명세서에서 확인된 *녹농균*의 글리칸 항원에 특이적인 항체 또는 그의 유도체를 투여하는 단계를 포함하는, *녹농균*에 감염된 대상체, *녹농균* 감염이 의심되는 대상체, 또는 녹농균 감염이 발병될 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0197] 일반적으로, 본원에서는 *녹농균* 감염을 진단하거나 치료하기 위해 항체, 예컨대 본원에 기술된 단일클론 항체를 사용하는 방법이 기술되어 있다. 한 측면에서, 상기 항체는 본원에 기술된 1B1 MAb이다.

[0198] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 *녹농균* 감염의 치료에 사용될 수 있다.

[0199] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 *녹농균* 감염의 진단에 사용될 수 있다.

[0200] 한 측면에서, *녹농균* 감염을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.

[0201] 한 측면에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 시험 샘플을 접촉시키는 단계, 및 그에 대한 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는, 동물에서 *녹농균* 세균 감염을 진단하는 방법이 제공된다.

[0202] **실시예**

[0203] *녹농균*은 다양한 세포 표면 글리칸을 생성한다. 과거 연구들에서는 비교적 보존된 세포 표면 탄수화물로서 중성 D-람난 트리사카라이드 반복 단위로 구성된 통상적인 폴리사카라이드 (PS) 항원 (A-밴드 PS라고도 칭함)을 확인한 바 있다. 그러나, 본 발명자들은 과거에 확인되지 않았던 새로운 에피토프를 발견하였다. A-PS 제제에 대한 핵자기공명 (NMR) 스펙트럼과 화학 분석을 통해 여러 가지 추가의 성분들이 존재함을 밝혀냈다. 실제로, 탄수화물 항원은 A-밴드 PS의 비환원형 말단에 있는 면역원성 메틸화 람난 올리고사카라이드로 이루어져 있다. 분리된 항원을 사용하여 수행된 초기 연구들에서는 마우스와 토끼를 면역화시켜 단일클론 및 다클론 항체를 생성하는 데 사용되었던 접합체를 제조할 수 있었다. 다클론 항체들은 시험된 대부분의 *녹농균* 균주들을 인식할 수 있었고, 3개의 단일클론 항체들이 생성되었는데, 그 중 하나는 대부분의 녹농균 균주들에 대한 옵소닌 식세포 사멸 작용을 인식하여 이를 촉진할 수 있었다. 이 단일클론 항체는 임상 및 혈청형 균주를 포함하는 우리의 컬렉션의 모든 *녹농균* 균주들을 인식할 수 있었다. 말단 3-*O*-메틸 D-람난을 나타내는 합성 올리고사카라이드 (모노- 내지 펜타-)가 제조되었고, 트리사카라이드는 광범위 교차 반응성인 단일클론 항체가 인식하는 천연 항원을 효과적으로 모방하는 데 필요한 최소한의 에피토프로 확인되었다. 합성 펜타사카라이드와 운반 단백질의 접합체는 마우스에서 다클론 항체를 유도하였다. 이러한 항체들도 시험된 *녹농균* 균주들의 전세포를 인식할 수 있었는데, 이러한 사실은 합성 항원이 천연 항원을 효과적으로 모방할 수 있는 능력을 더 강조하는 것이다. 이러한 실험들은 이러한 새로운 항원들과 해당 항체들이 백신, 치료 표적 및 *녹농균*의 치료 방법으로서 유용함을 입증하는 것이다.

[표 1] 본 연구에 사용된 균주들에 관한 세부내용

종	균주	NRCC	혈청형	세부내용	공급원
녹농균	PAO1 BAA-47	6678	5	야생형	ATCC
	PAO1	6667	-	PAO1 (wzy ::Gm)	Lam lab
	PAO1	6668	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5457)	Lam lab
	PAO1	6669	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5458)	Lam lab
	PAO1	6670	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5459)	Lam lab
	5933	6954	1	33348	ATCC
	5934	6955	2	33349	ATCC
	5939	6956	6	33354	ATCC
	5943	6957	10	33357	ATCC
	5944	6958	11	33358	ATCC
	170003	6959	16	33363	ATCC
	5937	6960	5	33352	ATCC
	001S4-1	6944	-	임상 분리주	Sad lab
	003S-20	6945	-	임상 분리주	Sad lab
	003E-9	6946	-	임상 분리주	Sad lab
	004S-3	6947	-	임상 분리주	Sad lab
	004E-8	6948	-	임상 분리주	Sad lab
	006S3-1	6949	-	임상 분리주	Sad lab
	006S4-1	6950	-	임상 분리주	Sad lab
	009S-7	6951	-	임상 분리주	Sad lab
	014S-1	6952	-	임상 분리주	Sad lab
	014E-31	6953	-	임상 분리주	Sad lab
M.카타랄리스	*lgt2/lgt4*	6541	-	음성 대조군	Cox lab
N.메닌기티디스	8047 *lpt3*	6263	-	음성 대조군	Cox lab

[0204]

[0205] **실시예 1A: A-PS의 분리 및 산화**

[0206] A-밴드 말단 에피토프를 분리하기 위해 하기의 방법들이 사용되었다. LPS를 통해 분리하는 것 이외에도, 세포에서 직접 분리하였다. A-PS의 수율은, LPS에서 분리한 것에 비해 EDTA에서 추출한 것이 수율이 더 높았지만, EDTA 추출을 사용했을 경우에는 정제가 더 어려웠다.

[0207] A-밴드 PS는 아세트산 가수분해와 이후 크기 배제 크로마토그래피를 통해 PAO1 Wzy::Gm (밴드 B OPS가 결핍된 돌연변이체) LPS로부터 분리하였다. 그 후, PS 분획은 음이온 교환이나 역상 HPLC로 정제되었다. 수율은 대체로 낮은 100 mg의 LPS에서 A-PS 5 mg 정도였고, 출발 LPS 양이 많았어도 그에 비례적으로 증가하지 않았다.

[0208] 다르게는, EDTA를 이용해 동일한 돌연변이 세포로부터 A-PS를 추출하였다. 이 방법은 과거에 LPS 추출 방법으로서 보고되었던 바 있지만, 이 방법으로는 상당량의 LPS가 추출되지는 않았다. 상기 제제에서는 3가지 주요 성분들이 발견되었다: A-PS, 과거 설명된 구조를 갖는 *psl*-폴리사카라이드 [15], 및 고리형 인산화 글루칸 [16]. 고리형 글루칸 신호들은 전체 혼합물의 스펙트럼에서는 잘 보이지 않았지만, A-밴드와 *psl*-폴리사카라이드 이후에, 높은 염농도에서 용출된 분획에서 음이온 교환 분리 후 순수한 형태로 얻어졌다. 분리된 화합물들의 NMR 스펙트럼은 LPS의 지질이나 다른 성분들에 기인한 신호를 나타내지 않았다. 따라서, 밴드 A 람난의 적어도 일부가 과거 제안된 것처럼 LPS와 연결되지 않았다 [17]. A-PS의 수율은, LPS에서 분리한 것에 비해 EDTA에서 추출한 것이 수율이 훨씬 더 높았지만, EDTA 추출을 사용했을 경우에는 정제가 더 어려웠다.

[0209] A-PS는 역상 HPLC 컬럼이나 Sep-Pak C18 카트리지에서 정제되었는데, 이때 A-PS는 물에 완전히 보유되어 30% 메탄올로 용출될 수 있었다. NMR 스펙트럼에서 미미한 아노머 신호와 메틸 신호를 생성하는 성분들을 비롯한 A-PS의 모든 성분들은 함께 용출된다. 물-메탄올 구배 용출을 사용한 컬럼 C18 크로마토그래피에서, A-PS는 약 20% MeOH에서 시작하는 광범위한 메탄올 구배 영역에서 용출되었는데, 눈에 띄는 피크는 나타나지 않았다.

[0210] A-PS는 산성 성분들을 함유하고 있으며 음이온 교환 컬럼에 부분적으로 보유되어 있어, NaCl 구배로 여러 분획들로 용출되었다. 이러한 거동은 인산화로 인해 산성을 띄는 A-PS와 LPS 코어의 결합을 의미할 수 있다.

[0211] *녹농균 균주의 성장:* B-밴드 LPS가 결핍된 것으로 알려진 *녹농균* 균주 PAO1 (wzy::Gm) (NRCC 6667)을 성장시켜

A-밴드 폴리사카라이드 (PS)를 분리하였다. 동결된 스톡으로부터 100 μg mL^{-1}의 젠타마이신 설페이트를 획선도말한 (streaked) Difco 뇌심장 침출액 (Brain Heart Infusion, BHI) 아가 플레이트 1개를 37℃의 포르마 (Forma) 항온배양기에서 배양하였다. 7시간의 항온배양 후, 모든 플레이트 성장 물질들을 1.5 mL의 BHI 액체 배지에 현탁시키고 잘 볼텍싱하여 물질을 현탁시켰다. 100 mg L^{-1}의 젠타마이신 설페이트가 담긴 10개의 BHI 아가 플레이트에 상기 현탁 물질을 동일하게 접종하고, 하키 스틱 방법 (hockey stick method)을 사용하여 평판도말 (spread)한 후 37℃에서 항온배양하였다. 100 mg L^{-1} 젠타마이신 설페이트가 함유된 BHI 배지가 담긴 1L/4L 배플 플라스크 2개에 16시간의 항온배양 후 얻은 10개 플레이트의 배양액을 접종하였다. 플라스크들을 포르마 진탕 (Forma shaker) 항온배양기에서 37℃, 200 RPM으로 2시간 동안 항온배양하였다. A_{600nm}가 광학 밀도 2에 도달하면, 이들 플라스크 배양액을 사용하여 30L의 새로운 MBR (다중 생물반응기) 발효조에 100 mg L^{-1}의 젠타마이신 설페이트가 포함된 22L의 BHI 액체배지를 접종하였다. 용존 산소량은 필요에 따라 다양한 공기 흐름, 진탕 속도 및 산소 배합을 통해 15% 포화도로 조절하였다. 8 ¾시간 동안 성장시킨 후, 수확 때까지 온도를 10℃로 낮추었다. 22시간 후에, A_{600nm}는 13.4에 도달하였고, pH는 8.35였다. 밀리포어 접선 유동 펠리콘 수확 장치 (3 x 0.22 μ의 막)를 사용하여 상기 배양액을 4L로 농축시켰다. 농축된 세포 4L에 95% (w/v) 페놀 용액 90 ml를 첨가하여 세포들을 사멸시킨 후 10℃의 포르마 진탕 항온배양기에 넣고 175 RPM으로 4시간 동안 진탕하였다. PBS로 3번 세척한 후 물질의 생존력 검사를 실시하였다. 4L 농축액을 Sorval RC6+ 원심분리기에서 11K RPM으로 30분간 회전시켜 세포를 펠릿화하였다. 2767 g (습식 중량)의 젤라틴 형태의 질척한 펠릿을 수득하여 1L의 용기 3개에 분산시켰다. 한 용기를 11,000 RPM으로 30분간 추가로 회전시켜 최종 습식 중량 1,110 g이 되도록 하였다. 세포들을 동결 건조시켜 추후 사용을 위해 보관하였다.

[0212] **표 1**에 상세히 설명된 다른 여러 균주들도 본 연구에서 성장시켜 사용하였다. 모든 바이오매스는 상술한 접종 증강 및 성장 후 24L의 발효조에서 수확하였다.

[0213] *전세포의 EDTA 추출에 의한 A-PS의 분리:* 녹농균 균주 PAO1 (wzy::Gm) (NRCC 6667)의 건조 세포 20 g을 10% (w/v) 이나트륨 EDTA에서 25℃로 1시간 동안 교반하였다. 용액을 투석한 후, 아세트산을 최종 농도 10%로 첨가하여 핵산을 침전시켰다. 침전물을 원심분리로 제거하고, 용액을 투석하여 동결 건조시켰다. 상기 물질을 물에 용해시킨 후, 초원심분리하고, 생성된 맑은 용액을 Biogel P6 컬럼 상에서 분리하였다. 중합체 분획을 수집하여 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 분리하였다.

[0214] *LPS로부터 A-PS의 분리:* LPS는 균주 PAO1 (wzy::Gm) (NRCC 6667)의 녹농균 세포로부터 과거에 설명된 바와 같이 [14] 분리하였다. LPS (100 mg)를 2% 아세트산으로 가수분해하였다 (100℃, 2시간). 생성된 용액을 원심분리하여 침전물을 제거하고 Biogel P6 컬럼에서 분리하였다. 중합체 분획을 수집하여 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 분리하였다.

[0215] *과요오드산염 산화:* 위의 양 분리물에서 얻은 중합체 분획을 (한 번에 10 mg) 물 (2 mL)에 용해시킨 뒤 $NaIO_4$ (20 mg)를 첨가하였다. 상기 용액을 24시간 동안 암실에서 RT로 보관한 후, 에틸렌 글리콜 (0.2 mL)과 과량의 $NaBD_4$를 첨가하고, 상기 용액을 1시간 더 유지시킨 후, 0.2 mL의 AcOH로 중화시키고 Sephadex G-15 컬럼에서 탈염하였다. 생성물을 2% AcOH로 100℃에서 2시간 동안 가수분해하고, Sephadex G-15 컬럼으로 분리하여 OS1을 얻었다. OS1로부터 OS2를 제조하는 경우에도 유사한 방법을 따랐는데, OS1을 과요오드산염으로 산화시키고, 보로하이드라이드 환원 없이 에틸렌 글리콜로 반응을 완전히 종결시키며, Sephadex G-15 컬럼에서 정제하였다. OS1과 OS2의 구조들은 **도 1**에 나타내었다.

[0216] *겔 크로마토그래피:* 겔 크로마토그래피는 1% 아세트산 중에서 Sephadex G-15 컬럼 (1.5 x 60 cm) 또는 Biogel P6 컬럼 (2.5 x 60 cm)에서 수행하였고, 굴절률 검출기 (Gilson)로 모니터링하였다.

[0217] *음이온 교환 크로마토그래피:* 최대 50 mg의 샘플을 물에 포함된 HiTrap Q 컬럼 (Amersham, 각각 5 mL씩해서 함께 연결되어 있는 두 컬럼)에 분당 3 mL의 속도로 주입하고, 물로 5분간 세척한 다음, 1시간 동안 물에서 1M NaCl까지 선형 구배를 이용하여 용출시키고, UV는 220 nm에서 검출하며, 에탄올 중 5% H_2SO_4에 침지시키고 열풍총 (heat gun)으로 갈색 반점이 보일 때까지 가열하는 현상으로 실리카 TLC 판 상에서 반점 검사를 실시하였다. 탄수화물 양성 샘플들을 모아서 굴절률 검출기가 장착된 1% AcOH 중의 Sephadex G-15 컬럼 상에서 탈염하였다.

[0218] **실시예 1B: 녹농균 *(Pa)*의 A-밴드 람난 단부의 면역우성 에피토프의 구조적 특성분석**

[0219] *알디톨 아세테이트로서 중성 당 및 아미노 당의 측정:* 샘플 (0.2-1 mg)을 3M TFA (120℃, 3시간)로 가수분해하

고, 건조시키고, $NaBD_4$로 환원시키며, 0.5 mL의 AcOH로 과량의 시약을 제거하였다. 상기 용액을 통풍 하에 건조시키고, MeOH (1 mL)를 첨가한 후 2회 건조한 다음, 0.2 mL의 피리딘과 0.2 mL의 Ac_2O로 100℃에서 30분간 아세틸화하였다. 상기 반응 혼합물을 건조시킨 후, ITQ1100 이온 포집 검출기, 모세관 컬럼 HP-5 (160~260℃, 분당 4℃)를 장착한 Thermo Trace 1310 장비에서 GC-MS로 분석하였다.

[0220] *절대 배열:* 샘플들과 준비된 표준물 (~0.5 mg)에, (*R*)- 또는 (*RS*)-2-옥탄올 (0.2 mL)과 염화아세틸 (20 μL)을 RT에서 첨가하고, 밀폐된 바이알 (100℃, 2시간) 중에서 가열하였다. 상기 반응 혼합물을 통풍 건조시키고, 아세틸화 (0.2 mL의 피리딘과 0.2 mL의 Ac_2O, 100℃, 30분)하고, 건조한 다음 상술한 바와 같이 GC-MS로 분석하였다.

[0221] *NMR 분광법:* NMR 실험은 아세톤 내부 참조물질 (^{1}H의 경우 2.225 ppm, ^{13}C의 경우 31.45 ppm)을 사용하는 5 mm의 Z-그래디언트 프로브 (gradient probe)가 장착된 Bruker AVANCE III 600 MHz (^{1}H) 분광기에서 표준 맥동파 순서열 (standard pulse sequence)인 cosygpprqf (gCOSY), mlevphpr (TOCSY, 혼합 시간 120 ms), roesyphpr (ROESY, 혼합 시간 500 ms), hsqcedetgp (HSQC), hsqcetgpml (HSQC-TOCSY, 80 ms TOCSY 지연) 및 hmbcgplpndqf (HMBC, 100 ms 장거리 전달 지연)를 사용하여 수행하였다. 양성자-양성자 상관관계의 F2에서는 분해능은 <3 Hz/pt로 유지되었고, H-C 상관관계의 F2에서는 분해능이 <5 Hz/pt로 유지되었다. 스펙트럼은 Bruker Topspin 2.1 프로그램을 활용해 처리하여 분석하였다.

[0222] 모노사카라이드는 COSY, TOCSY 및 NOESY 교차 피크 패턴과 ^{13}C NMR 화학적 이동을 통해 확인되었다. 아미노기의 위치는 아민화된 탄소의 하이 필드 (high field) 신호 위치 (45-60 ppm에서 CH)로부터 결론지었다. 모노사카라이드들 간의 연결은 트랜스글리코시드 NOE와 HMBC의 상관관계를 통해 측정되었다.

[0223] *질량 분광법:* ESI MS는 Waters SQ Detector 2 장비를 사용하여 수득하였다. 샘플들을 0.1% TFA가 포함된 50% MeCN 중에 주입하였다.

[0224] *구조:* *녹농균* A-PS는 D-람노스 트리사카라이드 반복 단위로 구성된 주요 성분을 함유한다:

[0225] -2-α-Rha-3-α-Rha-3-α-Rha-
A B C
A-PS 반복 단위

[0226] A-PS 제제의 NMR 스펙트럼에는 반복 단위의 신호와 추가의 신호들이 포함되어 있다 (**도 2**). 일부 미미한 아노머 신호들은 이전에 3-*O*-메틸-람노스에 속하는 것으로 확인되었는데 [18], 이는 약 3.3 ppm에서 *O*-메틸기 신호를 나타내지만, 완전한 구조는 밝혀지지 않았다.

[0227] LPS로부터 EDTA 추출로 얻은 폴리사카라이드는 유사한 NMR 스펙트럼을 나타내었다. 미세한 차이는 있었지만, 스펙트럼의 복잡한 특성으로 인해서 이러한 미량의 성분들을 확인하여 A-PS의 실제 성분들과 불순물을 구별하는 것은 불가능하였다. A-PS는 추정상 LPS 코어와 연결되어 있으므로, LPS에서 얻은 A-PS에는 코어 성분들이 포함되어 있을 것으로 예상되었으나, 이들은 확실하게 확인되지는 않았다.

[0228] A-PS의 모노사카라이드 분석 (알디톨 아세테이트의 GC-MS) 결과, 주요 성분으로 Rha가 존재하고, 소량의 Man, Glc, 2-*O*-메틸-Rha, 3-*O*-메틸-Rha (다른 미량의 성분들보다 약 5~8배 많음), 2-*O*-메틸-Man 및 3-*O*-메틸-Man이 포함되어 있는 것으로 나타났다. 헵토스 유도체들은 검출되지 않았다.

[0229] A-PS의 과요오드산염 산화와 후속 NaBD4 환원, 약한 가수분해 및 Sephadex G-15 컬럼에서의 생성물 분리를 통해 예상했던 D-람난 산화 생성물인 α-D-Rha-3-α-D-Rha-2-Gro1*d* 및 올리고사카라이드 OS1가 분리되었다 (**도 1**). OS1은 NMR과 ESI-MS로 분석하였다. OS1의 2D NMR 스펙트럼의 해석 (**표 2**, **도 3**)을 통해 말단 3-*O*-메틸-α-Rha 잔기 (E)와, 4-치환된 3-O-메틸-α-Rha 잔기 (F)의 동종올리고머의 수개의 중복 스핀 시스템을 확인하였다. 이 올리고머의 잔기 수는 NMR 데이터에서는 명확하진 않았으나, MS를 통해 5개의 3-*O*-메틸-Rha 잔기가 존재함을 확인하였다 (**도 4**). 3-OMe 람난 올리고당 다음으로 OS1의 당 사슬에 있는 잔기는 3-*O*-메틸-α-Man (L)으로 표시되었는데, 이는 다시 1-중수소화된 에리스리톨 X의 *O*-2와 연결되었다. 3-*O*-메틸-Man은 *폐렴막대균 (K. pneumoniae)* O5 OPS를 표준물질의 공급원으로 사용하여 GC-MS (알디톨 아세테이트로 확인되었다 [19]. 에리스리톨은 4-치환된 헥소피라노스의 산화-환원에 의해서만 생성될 수 있다. 메틸기의 위치는 NOE 및 HMBC 데이터와, 메틸화 위치에서 ^{13}C 신호의 큰 다운필드 이동 (downfield shift)으로부터 추론하였다.

[표 2] A-PS 에서 분리한, OS1 및 자유 3-*O*-메틸-람노스에 대한 NMR 데이터 (δ, ppm, 500 MHz 25°C). 자유 Rha3Me 의 Me: 3.44/57.3 ppm.

	H/C-1	H/C-2	H/C-3	H/C-4	H/C-5	H/C-6
Rha3OMe E, 1	5.16	4.23	3.43	3.50	3.80	1.29
	102.4	67.3	80.6	71.8	70.6	17.7
Rha3OMe F, 1	5.15	4.21	3.58	3.59	3.89	1.33
	102.4	67.4	81.7	79.1	69.0	18.3
Man3OMe L, 1	5.12	4.24	3.67	3.83	3.83	3.78; 3.85
	99.8	67.3	81.9	73.8	72.9	67.1
테트리톨 X, 1	3.75; 3.87	3.79	3.90	3.63; 3.78		
	59.7	78.5	72.3	63.7		
자유 α-Rha3Me	5.15	4.17	3.48	3.47	3.88	1.27
	95.1	67.6	80.6	72.3	69.4	18.1
자유 β-Rha3Me	4.85	4.20	3.31	3.39	3.41	1.29
	94.8	68.1	83.0	72.0	73.2	18.1

[0230]

[0231] 녹농균 LPS에서 람노스의 두 이성질체가 모두 확인되었기 때문에 [20], 3-OMe 람노스의 절대 배열을 명확하게 결정하기 위해, D- 및 L-람노스 모노사카라이드의 합성 표준물질을 준비하였다. NMR 분석으로 이들 표준물질들의 진위성을 확인하였다 (**도 5a** 및 **5b**). OS1의 아세틸화 2-옥탄올 유도체의 GC-MS를 통해 3-*O*-메틸-Rha의 절대 D-배열을 합성 표준물질에서 얻은 동일한 유도체들과 비교하여 확인하였다 (**도 6**).

[0232] 화합물 OS1의 양성 모드 ESI MS는 1:1 비율로*m/z* 1117.8과 1122.6의 두 피크를 보였는데, 이는 Rha_5Man_1테트리톨-$1d_1Me_6$의 암모늄 및 나트륨 부가물에 해당하며, 정확한 질량은 1099.5로 계산되었다 (**도 4**). 따라서, OS1에는 1-4-결합으로 연결된 3-*O*-메틸-D-Rha의 5개의 잔기들이 포함되어 있다.

[0233] 유사한 올리고사카라이드가 이전에 제안되었으나 [18], 해당 연구에서는 3-*O*-메틸-α-Man 대신에 자일로스가 검출되었으며, 연결 위치들도 확인되지 않았다.

[0234] 온전한 A-PS의 NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 반복적인 람난 트리사카라이드 -A-B-C- 신호를 확인하였고 (데이터는 나타내지 않음), 전체 OS1에 상응하는 덜 강렬한 스핀 시스템과 2-*O*-메틸-Man (G)와 2-*O*-Me-Rha (H)로 확인되는 두 잔기 G와 H의 존재도 나타내었다 (**표 3**). 스펙트럼은 항상 녹농균 LPS 유래의 Glc인 것으로 추정되는, 말단 α-Glc (N, N')의 2개의 약한 스핀 시스템을 포함하고 있었지만, 이 잔기들은은 해석가능한 NOE를 생성하지 않았다.

[표 3] A-PS 에 대한 NMR 데이터 (δ, ppm, 600 MHz, 40°C). 메틸기: G, H: 3.47/59.7 ppm; E, F, L: 3.46/57.5 ppm.

[0235]

	H/C-1	H/C-2	H/C-3	H/C-4	H/C-5	H/C-6
Rha A	5.21	4.09	3.97	3.52	3.85	1.32
	102.1	79.4	71.2	73.6	70.5	18.0
Rha B	5.05	4.15	3.91	3.58	3.89	1.32
	103.5	71.2	79.1	72.8	70.5	18.0
Rha C	4.97	4.17	3.85	3.58	3.77	1.29
	103.3	71.2	79.3	72.8	70.7	18.0
Rha3OMe E	5.15	4.22	3.42	3.50	3.82	1.29
	102.5	67.5	80.8	72.0	69.1	18.0
Rha3OMe F	5.13	4.20	3.55	3.58	3.86	1.33
	102.5	67.6	81.9	79.3	69.0	18.0
Man3OMe L	5.27	4.28	3.62	3.85	3.78	3.78; 3.86
	102.5	67.4	81.8	73.9	73.3	62.2
Man M	5.23	4.03	3.94	3.85	3.74	3.78; 3.86
	102.6	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man K	5.21	4.01	3.94	3.85	3.74	3.78; 3.86
	102.5	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man D	5.25	4.02	3.94	3.85	3.74	3.78; 3.86
	102.5	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man2OMe G	5.37	3.66	3.96	3.76		
	99.4	83.1	71.2	75.6		
Rha2OMe H	5.20	3.68	4.02	3.55	3.83	1.33
	102.1	83.1	71.9	80.7		
α-Glc N	5.00	3.57	3.71	3.42	3.76	3.87
	99.2	72.7	74.5	70.8		
α-Glc N'	5.03					
	100.3					

[0236]

[0237] A-PS의 3-*O*-메틸-Man L은 α-Man M의 *O*-4에 연결되어 있으므로, OS 1의 에리스리톨 X는 산화된 Man M에서 유래하였다. α-Man의 수개의 스핀 시스템들이 존재했고, 이들은 2-*O*-메틸-Rha H 또는 2-*O*-메틸-Man G에 연결된, 트리사카라이드 -4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man- (M-K-D)를 형성한다. 다른 성분들은 확인할 수 없었기 때문에, 해당 사슬을 더 추적하는 것은 불가능했다. D-람난 트리사카라이드 반복 단위와 메틸화된 올리고사카라이드 간의 연결은 확인되지 않았다.

[0238] OS1의 모든 신호들이 A-PS와 OS1의 동일한 위치에 잔류하였기 때문에, 우리는 3-*O*-메틸-Rha의 올리고머가 A-PS 사슬의 비환원성 말단을 점유하였으며 그 말단 위치 덕분에 면역원성을 가질 수 있다고 결론지을 수 있다.

[0239] 본원에 설명된 바와 같이, A-밴드 PS의 비환원성 말단에 대한 상세한 구조가 결정되었고, 이 중합체는, 단지 중

성 람난 트리사카라이드 반복 단위를 포함하는 것이 아니라, 메틸 만노스 분자를 통해 중성 만노스 트리사카라이드에 연결된 3-*O*-메틸 람노스 잔기의 펜타사카라이드로 캡핑되어 있는 것으로 밝혀졌다. 중성 람난과의 연결 지점은 확립되지 않았지만, 3-*O*-메틸 Rha 잔기들에 대한 동일한 신호가 A-PS와 OS1에서 동일한 위치에 잔류하고 있다는 사실은, 3-*O*-메틸-Rha의 올리고머가 A-PS 사슬의 비환원성 말단을 점유하고 있음을 강력히 시사하는 것이다. A-PS 제조 과정에서 3-*O*-메틸 람노스 잔기들과 일치하는 신호들이 관찰되었던 바는 있으나, 본원에 설명된 구조적 단위를 명확히 밝혀냈던 사람은 아무도 없다던 [18, 21].

[0240] **실시예 2: 분리된 A-밴드 에피토프 (OS2)로 제조된 당접합체 (BSA-OS2 및 CRM-OS2)의 제조 및 면역학적 평가**

[0241] A-PS 말단에 특이적인 3개의 mAb가 확인되었으며, 예비 에피토프 매핑 연구에 따르면, 이들은 상기 말단 단위 내의 서로 다른 영역들을 인식하는 것으로 나타났다. 이러한 mAb들과, 이보다는 다소 덜하지만, A-PS 말단까지 유발된 다클론 혈청은, SBA 및 OPA 실험에서 *녹농균* 균주의 사멸을 촉진시킬 수 있었다. 중성 람난을 기반으로 한 합성 당접합체 백신을 활용하는 마카렌코 등 (Makarenko et al.)의 이전 연구에서는 *녹농균* 균주의 사멸을 촉진하는 것은 물론, 이들을 인식할 수 있는 항체를 유발시키지 못했다 [25]. 또한, 램 (Lam)의 실험실 연구에서는, 중성 람난에 특이적인 mAb N1F10이 *녹농균* 균주의 약 70%를 인식할 수 있었음을 관찰하였으나 [26], N1F10 또는 그의 scFv 유도체를 사용한 최근 연구에서는 어떠한 기능성도 나타내지 않았다 [27]. 이 보존된 항원의 핵심 영역이 과거 연구들에서는 간과되었을 수 있는 것으로 보이는데, 이에 본원에 설명된 예들은 A-PS의 메틸화된 단부 영역이 실제로 면역원성을 띄며 상기 면역 반응이 옵소닌 식세포 활성을 촉진할 수 있음을 입증하고 있다. 본원에 설명된 3가지 mAb 중 하나인 1B1은, 통상적으로 발견되는 독성 혈청형과 최근의 임상 분리주를 비롯하여, 시험된 대부분의 *녹농균* 균주가 그에 의해 인식되었기 때문에, 매우 보존된 에피토프를 인식하는 것으로 보인다. 본원에 설명된 다른 두 mAb인 3B8과 3C4는 1B1 mAb보다 더 특이적이며, 이들의 인식은 wt 혈청형 5 균주인 PAO1 BAA-47과 5937에 국한된다. 말단 메틸화된 펜타사카라이드를 기반으로 한 합성 올리고사카라이드를 이용한 연구를 통해 mAb 1B1의 특이성이 본원에 설명된 다른 mAb들과 비교했을 때 더 광범위하다는 것을 확인하였다. 합성 올리고사카라이드를 이용한 억제 ELISA 데이터는 mAb 1B1이 3-*O*-메틸 람난 트리사카라이드로 효과적으로 억제될 수 있음을 보여주었다. 우리의 컬렉션의 임상 분리주의 대부분과 *녹농균*으로 유발되는 질병의 대부분의 원인이 되는 ATCC 혈청형 균주를 인식하는, mAb 1B1의 광범위한 교차 반응성을 고려할 때, 본원에 설명된 합성 올리고사카라이드는 백신 항원으로서, 또는 광범위한 교차 반응성 치료제를 생성하는 수단으로서 잠재력이 있는 것으로 보인다.

[0242] A-PS 항원의 중요성은 이 분야에서 여전히 논의의 대상으로 남아 있지만, CF 폐에서 혈청형 특이적 O-항원이 더 이상 존재하지 않고 A-PS는 잔류하고 있다는 관찰은, A-PS 면역원성 단부 구조가 임상 틈새 시장에서 표적화할 수 있는 중요한 에피토프가 될 수 있음을 시사한다.

[0243] *접합체*: BSA 및 CRM 접합체는 과거 설명된 바와 같이 직접적인 환원성 아민화 표준 화학을 통해 제조하였다 [22]. 간략히 설명하면, 산화된 A-밴드 말단 에피토프 물질 (OS2) (4.5 mg 및 2 mg)을 각각 CRM (2.3 mg) 또는 BSA (1 mg)의 두 반응물의 용액을 물 중에서 혼합하여 반응시킨 후 동결건조하기 전에 실온에 두었다. 상기 동결건조된 물질을 100 mM의 $NaPO_4$10 mL에 용해한 다음, $NaCNBH_3$ (5 mg mL^{-1})을 첨가하여 생성된 용액을 실온 (RT)에서 16시간 동안 방치하였다. 접합체를 10 mM의 시트르산나트륨이 포함된 PBS에서 30 KDa 분자량 컷오프 스핀 컬럼에서 정제하였고, 상청액의 단백질을 분석하고 여과 멸균한 후 -20℃에서 동결시켰다. 과거 설명된 바와 같이 MALDI-MS로 일부 샘플을 조사하였다 [23].

[0244] *항-녹농균 A-밴드 말단 에피토프 항체의 생성: 녹농균* A-밴드 말단 에피토프를 표적으로 하는 항체를 생성하기 위해, 6마리의 Balb/C (6-8주)와 2마리의 뉴질랜드 흰토끼 (1.5-2 kg)에게 정제 및 산화된 말단 A-밴드 분자의 당접합체와 CRM을 운반 단백질로 하여 면역화하였다. 면역화는 이전에 설명된 바와 같이 일정을 잡아 아주반트도 첨가하였다 [22].

[0245] *mAb 제조*: 다클론 혈청에 면역화된 마우스를 대상으로 A-밴드 PS의 인식 여부에 대해 스크리닝을 실시하였고, 가장 높은 역가를 나타낸 마우스를 최종 i.v. 주사 후 융합 대상으로 선택하였다. 면역화된 마우스로부터 수확한 비장 세포의 융합, 하이브리도마 선택 및 고밀도 mAb 상청액의 성장과 정제를 위한 모든 조작들은 이전에 설명한 대로 수행하였다 [24].

[0246] *항-녹농균 A-밴드 말단 에피토프 mAb의 특성 분석*

[0247] *항체 가변 영역 시퀀싱:* 생성된 3가지의 mAb (1B1, 3C4 및 3B8)의 재배열된 가변 중쇄 (V_H)와 가변 경쇄 (V_L) 도메인을 인코딩하는 DNA 서열들은 이전에 설명한 바와 같이 Illumina MiSeq 앰플리콘 시퀀싱을 통해 밝혀졌다

[24]. 3개의 mAb의 V_H 및 VL 도메인에 대한 아미노산 서열들을 **표 4**에 제공하였다.

[표 4] 항체 서열

서열 번호	서열	설명
1	GFPFSDYY	1B1 VH CDR1
2	INGDGGTT	1B1 VH CDR2
3	VRGRRITGTGAIDY	1B1 VH CDR3
4	DVKLVESGGGLVKVGGSLKISCAAS**GFPFSDYY**MAWVG QTPEKRLELVAA**INGDGGTT**YYPDTVKGRFIISRDNAKNT LYLQMSSLRSEDTALYYC**VRGRRITGTGAIDY**WGQGTS VTVSS	1B1 VH
5	gacgtgaagctcgtggagtctgggggaggcttagtgaaggttggagggtccctaaaaatttcatgtgcagcctctggattccccttcagtgactattatatggcttgggttggccagactccagagaagaggctggagttggtcgcagccattaatggtgatggtggtaccacctactatccagacactgtgaagggccgattcatcatttccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggatacagccttgtattattgtgtaagagggagaaggataactggaactggggctatagactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca	1B1 VH 코딩 서열
6	SNISY	1B1 VL CDR1
-	GTS	1B1 VL CDR2
7	QIYHSYPYT	1B1 VL CDR3
8	QIFLTQSPVILSASPGEKVTMTCSAT**SNISY**MYRYQQKPGS SPKPWIYGTSNLASRVPARFSGSGS**GTS**YSLTISNMEAEDA ATYYC**QIYHSYPYT**FGGGTKLEIK	1B1 VL
9	caaatttttctcacccagtctccagttatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgccacctcaaatataagttacatgtacaggtaccagcagaagccaggatcctcacccaaaccctggatttatggcacatccaacctggcttctcgagtccctgctcgcttcagtggcagtggatctgggacctcttattctctcacaatcagcaacatggaggctgaagatgctgccactattactgccagatatatcatagttacccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaa	1B1 VL 코딩 서열
10	GYSFTDYN	3B8 VH CDR1
11	IDPYNGGT	3B8 VH CDR2
12	AKGGYRYDAWFAY	3B8 VH CDR3
13	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKAS**GYSFTDYN**MYWVK QSHGKSLEWVGY**IDPYNGGT**TYNQKFKGKATLTVDKSSS	3B8 VH

[0248]

	TAFMHLNSLTSEDSAVYYC**AKGGYRYDAWFAY**WGQGTLVTVSA	
14	gagatccagctgcagcagtctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaaggtatcctgcaaggcttctggttactcattcactgactacaacatgtactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtgggttggatatattgatccttacaatggtggtactacctacaaccagaagttcaagggcaaggccacattgactgttgacaagtcctccagcacagccttcatgcatctcaacagcctgacatctgaggactctgcagtctattactgtgcaaagggcggctataggtacgacgcctggtttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca	3B8 VH 코딩 서열
15	QSLENNNGNTY	3B8 VL CDR1
-	RVS	3B8 VL CDR2
16	LQVTHVPWT	3B8 VL CDR3
17	DAVMTQTPLSLPVSLGDHASISCRSS**QSLENNNGNTY**LNWYLQKPGQSPQLLIY**RVS**NRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**LQVTHVPWT**FGGGTKLEIK	3B8 VL
18	gatgctgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcacgcctccatcttcttgcaggtctagtcagagccttgaaaacaataatggaaacacctatttgaactggtacctccagaaaccaggccagtctccacagctcctgatctacagggtttccaaccgattttctggggtcctagacaggttcagtggtagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtttatttctgcctccaagttacacatgtcccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaa	3B8 VL 코딩 서열
19	GFTFTDYY	3C4 VH CDR1
20	IRNKANGYTT	3C4 VH CDR2
21	TRAIYYGYDGFAY	3C4 VH CDR3
22	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS**GFTFTDYY**MSWVRQPPGKALEWLGF**IRNKANGYTT**EYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMNTLRAEDSATYYC**TRAIYYGYDGFAY**WGQGTLVTVSA	3C4 VH
23	gaggtgaagctggtggagtctggaggaggcttggtacagcctgggggttctctgagactcctcctgtgcaacttctgggttcaccttcactgattactacatgagctgggtccgccagcctccaggaaaggcacttgagtggttgggttttattagaaacaaagctaatggttacacaacagagtacagtgcatctgtgaagggtcggttcaccatctccagagataattcccaaagcatcctctatcttcaaatgaacaccctgagagctgaggacagtgccacttattactgtacaagggccatctactatggttacgacgggtttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca	3C4 VH 코딩 서열
24	QSLENSNGNTY	3C4 VL CDR1
-	RVS	3C4 VL CDR2
25	LQVTHVPFT	3C4 VL CDR3
26	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS**QSLENSNGNTY**LNWYLQKPGQSPQLLIY**RVS**NRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC**LQVTHVPFT**FGSGTKLEIK	3C4 VL
27	gatgctgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatcttcttgcaggtctagtcagagccttgaaaacagtaatggaaacacctatttgaactggtacctccagaaaccaggccagtctccacagctcctgatctacagggtttccaaccgattttctggggtcctagacaggttcagtggtagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtttatttctgcctccaagttacacatgtcccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaa	3C4 VL 코딩 서열

[0249] *굵게 강조 표시된 부분은 CDR 서열의 위치를 나타냄.

[0250] *ELISA*: 항-녹농균 A-밴드 말단 에피토프 mAb 및 다클론 혈청의 BSA 접합체, 정제된 LPS 및 전세포에 대한 결합은 이전에 설명된 바와 같이 ELISA로 평가하였다 [24].

[0251] *mAb 경쟁 ELISA*: Nunc Maxisorp EIA 플레이트의 웰들을 PBS에 *녹농균* LPS 1 μg을 섞어 4℃에서 밤새 코팅한 후, 사용하기 전에 실온에 두었다. 플레이트들을 1% BSA-PBS로 RT에서 1시간 동안 차단시킨 후, 웰들을 PBS-T로 세척하였다. 하나의 mAb (1B1 또는 3B8)를 적정하여 해당 플레이트에 RT에서 1시간 동안 첨가하였다. PBS-T로 세척한 후, 두 번째 mAb (3C4)를 미리 한 농도로 첨가하여 RT에서 1시간 동안 항온배양하였다. PBS-T로 세척한 후, mAb 3C4에 특이적인 AP 표지된 염소 항-마우스 IgG2b (Southern Biotech)를 1% BSA-PBS 중에 1:250으로 희석하여 RT에서 1시간 동안 첨가하였다. 그런 다음, 상기 플레이트들을 PBS-T로 세척하고 포스파타제 기질 시스템 (Phosphatase Substrate System) (Kirkegaard and Perry Laboratories)으로 발색시켰다. 60분 후, 미량역가판 판독기를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0252] *mAb 억제 ELISA:* Nunc Maxisorp EIA 플레이트의 웰들을 PBS 중에 4℃에서 밤새 둔 *녹농균* LPS 또는 dH_2O 중에서 건조 오븐에서 하룻밤 동안 전세포를 사멸시킨 녹농균 1 μg으로 밤새 코팅한 후, 사용하기 전에 실온에

두었다. 플레이트들을 1% BSA-PBS로 RT에서 1시간 동안 차단시킨 후, 웰들을 PBS-T로 세척하였다. 차단 단계 동안, 억제를 설정하였다. LPS 또는 합성 올리고사카라이드를 1 mg/ml 또는 3 mg/ml로 튜브에 첨가한 후, 1% BSA-PBS로 단계 희석을 수행한 다음, 동일한 부피의 mAb (1B1, 3B8 또는 3C4)를 1% BSA-PBS 중에서 10 μg/ml의 일정한 농도로 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 1시간 동안 항온배양하였다. PBS-T로 상기 EIA 플레이트를 세척한 후, 혼합 튜브에서 100 μl를 상기 플레이트에 첨가하여 LPS로 코팅한 플레이트의 경우 실온에서 1시간 동안, 사멸된 전세포로 코팅한 플레이트의 경우 실온에서 3시간 동안 항온배양하였다. PBS-T로 세척한 후, mAb에 특이적인 AP 표지된 염소 항-마우스 Ig (Southern Biotech)를 1% BSA-PBS 중에 1:250으로 희석하여 RT에서 1시간 동안 첨가하였다. 그런 다음, 상기 플레이트들을 PBS-T로 세척하고 포스파타제 기질 시스템 (Kirkegaard and Perry Laboratories)으로 발색시켰다. 60분 후, 미량역가판 판독기를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0253] *혈청 살균 분석:* 선택된 *녹농균* 균주의 살균성 사멸을 촉진하는 다클론 혈청 및 mAb의 능력은 과거에 설명된 바와 같이 측정하였다 [22].

[0254] *옵소닌 식세포 검정:* 선택된 *녹농균* 균주의 옥소닌 식세포 사멸을 촉진하는 다클론 혈청 및 mAb의 능력은 과거에 설명된 바와 같이 측정하였다 [23].

[0255] *표면 플라스몬 공명 (SPR):* SPR 결합 분석은, 본질적으로는 과거에 설명된 바와 같이 [24], HBS-EP 러닝 완충액 (Cytiva Life Sciences, 캐나다 미시소가 소재) 중에서 Biacore T200 장비에서 25℃로 수행하였다. 간략히 설명하면, 약 13000 RU의 IgM (PA 1B1 및 대조군 Fn 4F1)을 10 mM 아세테이트 완충액 (pH 4.0, Cytiva) 중에서 CM7S 센서 칩에 아민 결합시켰다. 합성 올리고사카라이드는 HBS-EP 중에서 25 mM로 재구성하였고, 다수의 희석액을 준비하여 IgM 표면에 주입하였다. 접촉 시간은 60초였고, 해리 시간은 120초 (모노-, 디-) 또는 180초 (트리-, 테트라-, 펜타-)였다. 하기의 농도 범위로 주입하였다: 모노- (1 mM - 62.5 μM), 디- (200 μM - 12.5 μM) 및 트리-, 테트라- 및 펜타- (10 μM - 625 nM). *모락셀라 카타랄리스 (Moraxella catarrhalis)*의 올리고사카라이드인 Mcat lgt2/4를 대조군으로 사용하여 10 μM으로 주입하였다. 표면은 HBS-EP로 광범위하게 세척하여 재생시켰다. 참조 유동 세포를 차감한 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여 결합 동역학 및 친화도를 측정하거나, 또는 친화도는 정상 상태 분석을 통해 확인하였다.

[0256] **실시예 2: 결과**

[0257] *접합:* OS1의 환원성 말단 에리스리톨은 과요오드산염 산화를 통해 효과적으로 표적화시켜 접합을 위한 반응성 알데히드기를 생성하였다. 산화된 올리고사카라이드 OS2 (**도 7**)를 직접적인 환원성 아민화를 통해 운반 단백질인 BSA 및 CRM_{197}에 접합시켰으며, MALDI-MS 분석 결과 생성된 당접합체들은 각각 ~13 및 ~10 kDa의 접합된 탄수화물 (10-13개의 당 사슬/단백질)이 함유되어 있는 것으로 나타났다 (**도 8a** 내지 **8d**).

[0258] *면역화:* 실험에서 설명한 대로, 6마리의 마우스와 2마리의 토끼에게 CRM 당접합체를 1차 면역화와 2회의 추가의 면역화 전략을 사용하여 투여하였다. 최종 채혈된 혈청을 이용한 ELISA를 통해 보면, 두 동물 모두, BSA 접합체와 LPS에 대한 적정을 통해 입증된 바와 같이 접합된 올리고사카라이드로 혈청 전환되었음이 눈에 띈다 (**도 9a** 및 **9b**). 마우스는 LPS보다 BSA 접합체에 대해 더 강한 역가를 보였던 반면, 토끼는 두 항원 모두에 대해 광범위하게 비슷한 역가 곡선을 보였다.

[0259] *Mab 개발:* 당접합체 면역화 후 PAO1 LPS (NRCC 6667)에 대해 가장 좋은 역가를 보이는 마우스를 mAb 개발을 위해 선정하였고, 실험 부분에서 설명한 대로 마우스의 비장을 골수 세포주에 융합시켰다. 3가지의 mAb인 3C4 (IgG2b), 3B8 (IgM) 및 1B1 (IgM)가 얻어졌다. 이들 mAb의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 시퀀싱하였으며, 그 아미노산 서열은 **표 4**에 나타내었다. 각 mAb는 동종의 PAO1 (wzy::Gm) LPS를 인식할 수 있었으며, mAb 1B1의 경우, *녹농균*은 A-밴드 유전자좌 돌연변이체 PAO1 (wzy::Gm)(Δpa5457) and PAO1 (wzy::Gm)(Δpa5458)로부터 LPS를 정제하였다 (**도 10**). 이와 마찬가지로, 각 mAb는 wt 혈청형 5 균주인 PAO1 BAA-47 및 5937의 사멸된 전세포를 인식할 수 있었고, 다시 한번 LPS ELISA 데이터를 뒷받침하면, mAb 1B1은 A-밴드 유전자좌 돌연변이체 PAO1 (wzy::Gm)(Δpa5457), PAO1 (wzy::Gm)(Δpa5458) 및 PAO1 (wzy::Gm)(Δpa5459)의 사멸된 전세포와, 가장 흔히 발견되는 임상 혈청형에 해당하는 ATCC 유형의 균주들을 포함하는 하위군에 교차 반응했던 유일한 mAb였다 (**도 11a** 내지 **11c**). 이러한 거동은, 임상 분리주의 세트를 조사했을 때에도 반복되었으며 (**도 12**), mAb 1B1은 광범위한 교차 반응성을 나타냈다.

[0260] *SBA 및 OPA:* 초창기에는 다클론 토끼 혈청이 PAO1 wt *녹농균*의 혈청 살균 사멸을 촉진하는 능력을 설명하는 것에 집중되었다. 그러나, 다클론성 토끼 혈청에서는 사멸의 증거가 제한적으로 관찰되었다. 이후, 문헌 [8-10]에

서 *녹농균*에 대한 항혈청의 잠재적 기능을 설명하기 위해 OPA를 활용한다는 보고가 나오면서, 옥소닌 식세포 분석 (OPA)에 대한 연구가 집중적으로 이루어졌다. SBA와 유사하게, 우리는 토끼 혈청이 PAO1 O-항원 결핍 균주에 대한 옵소닌 식세포 활성을 촉진할 수 있다는 잠정적인 증거를 획득하였다. 그러나, mAb를 검사했을 때, PAO1 혈청형 5 균주인 PAO1 BAA-47 및 5937에 대해 높은 옵소닌 식세포 작용 역가가 관찰되었다 (**도 13a** 및 **13b**).

[0261] *mAb 에피토프 매핑:* 3-*O*-Me 람난 상에서 mAb가 서로 동일하거나 다르거나 중복되는 에피토프들을 인식하는지를 확인하기 위해, 예비 실험을 수행하였다. 경쟁 ELISA 연구에서는 mAb 1B1이 3C4에 비해 고유한 에피토프를 인식하는 반면, 3C4와 3B8은 유사하게 중복되는 에피토프들를 인식하는 것으로 나타났는데 (**도 14a** 및 **14b**), 이는 mAb 1B1이 mAb 3B8과 3C4에 비해 더 광범위한 균주의 하위군들을 인식할 수 있는 능력과 일치한다.

[0262] *합성 올리고사카라이드를 이용한 억제 ELISA:* mAb에 의해 인식되는 면역원성 에피토프를 더욱 상세히 특성 분석하기 위해, 3-*O*-메틸 D-람난 말단 단위의 모노- (D- 및 L-이성질체), 디- (링커 포함 및 미포함), 트리-, 테트라- 및 펜타-사카라이드를 나타내는 합성 올리고사카라이드들을 본원에 설명한 대로 제조하여 억제 ELISA 실험에서 조사하였다. 먼저, 이 실험은 3가지 mAb들이 인식하거나 인식하지 못하는 것으로 알려진 LPS 분자들을 사용하여 검증하였다. 이후, 합성 올리고사카라이드들을 억제제로 사용하여, 트리-, 테트라- 및 펜타-사카라이드가 mAb 1B1의 그의 표적 LPS 및 사멸된 전세포에 대한 결합을 억제하는 데 있어 효과적으로 동등하였음이 밝혀졌다 (**도 15a** 내지 **15f**). 디- 및 모노-사카라이드 (D-이성질체만 해당)에는 어느 정도 억제의 증거가 있긴 하였지만, 트리사카라이드와 더 큰 올리고사카라이드에서 관찰된 정도까지는 아니었다. L-모노사카라이드는 억제에 전혀 효과가 없었는데, 이는 D-이성질체가 3-*O*-메틸 람난의 람노스 당의 올바른 배열임을 확인시켜 주는 것이다. 합성 올리고사카라이드들 중 그 어느 것도 mAb 3C4 또는 3B8이 이들의 LPS 또는 사멸된 전세포 표적들에 결합하는 것을 억제하는 데 효과적이지 않았다. 이러한 결과들은, mAb 1B1이 말단 3-*O*-메틸 람난을 인식할 수 있음과, 트리사카라이드가 그 천연 구조를 효과적으로 모방하기에 충분할 수 있다는 점을 시사하는 앞선 데이터들과 일치한다.

[0263] *SPR 분석:* SPR을 사용하여 1B1이 인식하는 최소 에피토프를 더욱 구체적으로 구분하고, 합성 올리고사카라이드들에 대한 친화도를 측정하였다 (**도 16** 및 **표 5**). 모노사카라이드에서 펜타사카라이드에 이르는 합성 탄수화물들을 IgM 1B1 및 관련 없는 IgM인 Fn 4F1의 고밀도 표면 위로 흘려 보냈다. 모노사카라이드의 경우, 최대 1 mM까지는 관찰가능한 결합이 감지되지 않았다. 디사카라이드는 빠른 결합 및 해리 속도로 1B1 표면에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났으며, 정상상태 친화도가K_D= 84 μM로 측정되었다. 트리-, 테트라- 및 펜타-사카라이드는 모두 1B1과 특이적으로 결합했으며, 디사카라이드에 비해 상당히 높은 친화도를 보였다 (각각 K_Ds = 1.42, 0.66 및 0.55 μM). 3가지의 합성 올리고사카라이드들 모두 측정가능한 동역학을 나타냈으며, 탄수화물-항체 상호작용에서 통상적으로 관찰되지 않는 느린 해리 속도가 특징이었다. 관찰된 R_{max} 값들은 이론상 R_{max}의 약 25%로서, 이는 허용가능한 1B1 IgM 표면 활성을 의미한다. 관련 없는 *M. 카타랄리스* 유래의 올리고사카라이드 Mcat lgt2/4 (886 Da)를 10 μM으로 주입했을 때, IgM 표면 어디에서도 관찰가능한 결합이 감지되지 않았다. 이러한 데이터를 종합해 보면, 테트라- 및 펜타-사카라이드의 경우 더 높은 1B1 결합 친화도가 관찰되었긴 하나, 트리사카라이드가 천연 구조를 모방하는 최소 항원 인식 도메인일 가능성이 높다.

[표 5] 합성 올리고사카라이드에 대한 SPR 유래의 1B1 결합 친화도.

올리고사카라이드	Theo R_{max} (RU)	Obs R_{max} (RU)	k_a (s^{-1})	k_d (M^{-1} s^{-1})	K_D (μM)
모노-	31	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		n.b	n.b.	n.b.	n.b.
디-	59	14	-	-	85.8[a]
		15	-	-	82.5[a]
트리-	87	21	1.28×10^4	1.76×10^{-2}	1.37
		21	1.23×10^4	1.79×10^{-2}	1.46
테트라-	115	28	5.69×10^3	3.72×10^{-3}	0.65
		29	5.26×10^3	3.48×10^{-3}	0.66
펜타-	142	34	3.43×10^3	1.86×10^{-3}	0.54
		34	5.43×10^3	1.90×10^{-3}	0.55

[a]정상 상태 친화도.

Theo R_{max}: 이론상 최대 결합 반응; Obs R_{max}: 관찰된 최대 결합 반응; n.b.: 결합은 관찰되지 않음.

[0264]

[0265] **실시예 3A - 3-O-메틸 람노스 올리고사카라이드의 합성**

[0266] 본 실시예에서는 대상 펜타사카라이드의 합성을 설명한다 (도 **22-24**의 반응식 1-3 참조). 3-*O*-D-람노스와 3-*O*-L-람노스를 합성하고 이들 각각의 아세틸화된 has-2-옥틸 글리코사이드로 유도체화하여 생성된 각 거울상 이성질체의 순도를 GC-MS를 통해 입증하였다. 중간체 티오글리코시드 공여체 **16**과 수용체 **17**의 대량 합성으로 디사카라이드 **18 디(di)**가 생성되었다. 벤질 탈보호 후, 새로운 수용체인 **19 디**가 얻어졌고, 추가적인 반복적인 글리코실화와 수소화 반응을 통해 최종적으로 **18 펜타 (penta)**가 얻어졌다. 전반적인 탈보호 후, 표적 펜타사카라이드의 합성 결과 D-만노스의 전체 수율은 1.0%였다. 또한, 추가의 접합체 백신 개발을 위한 방법을 개발하기 위해 디사카라이드에 아미노에틸 링커를 첨가하였다. 본 실시예에서 설명한 방법들은, 합성을 통해 충분한 양의 순수한 펜타사카라이드를 얻어 이 글리칸을 사용하여 *녹농균* 당접합체 백신 개발을 용이하게 할 수 있음을 보여준다.

[0267] 모든 화학물질들은 Aldrich, Fisher Scientific, Alpha Aeser 또는 Combi Blocks에서 구입하였다. 이들은 추가로 정제하지 않고 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian (^{1}H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, ^{31}P 200 MHz) 분광계 상에서 측정하였으며, 용매 잔류 신호($CDCl_3$, ^{1}H의 경우 7.26 ppm 및 ^{13}C의 경우 77.1 ppm, CD_3OD, ^{1}H의 경우 3.31 ppm 및 ^{13}C의 경우 49.0 ppm, D_2O, ^{1}H의 경우 4.79 ppm 및 ^{13}C의 경우 외부적으로 디옥산 (67.2 ppm)을 사용하였고, ^{31}P의 경우 85% H_3PO_4로 스펙트럼을 측정하기 전 별도의 실험에서 측정함)를 사용하여 기록하였다. 화합물 배정은 HMBC, COSY, HSQC 및 ^{13}C NMR과 같은 표준 2차원 NMR 실험들을 사용하여 확인하였다. CombiFlash® RF 시스템과 RediSep® RF 실리카 컬럼을 사용하여 화합물을 정제하였다. MS 데이터는 Waters의 SQ2 상에서 기록하였고, HRMS 데이터는 Agilent의 LC/MS Calibrant Mix를 내부 표준으로 사용하여 Waters의 Ultima 상에서 기록하였다.

[0268] *1,4-O-디벤질-2,3-O-이소프로필리덴-α-D-람노피라노시드* (**4**)

[0269] *1-O-벤질-2,3-O-이소프로필리덴-α-D-람노피라노시드* (9.70 g, 32.9 mmol)를 무수 DMF (200 mL)에 용해시키고 상기 용액을 0℃로 냉각시켰다.미네랄 오일 중 60% 수소화나트륨 (1.97 g, 49.3 mmol)을 나누어 첨가하고, 상기 용액을 질소 기체 하에 0℃에서 30분간 교반하였다.다음으로, 벤질 브로마이드 (4.70 mL, 39.5 mmol)를 적가하고, 상기 반응 혼합물을 1시간 동안 교반한 후 TLC로 반응이 완료됨을 확인하였다. 반응이 완료되면, Et_3N (8 mL)으로 반응을 완전히 종결시키고, 포화 NH_4Cl (500 mL)의 차가운 용액에 부었다. 생성물이 용액에서 침전되면, 이를 여과하고, 물로 세척한 후, 고진공 상태에서 밤새 건조시켜 베이지색의 고체인 생성물 **4** (12.6 g, 32.9 mmol, 100%)를 생성하였다.

Rf = 0.75, (EtOAc/헥산, 2/8) $[\alpha]_D^{25}$ 23.45 (*c* 0.22, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.26 (m, 10H, 2 x Bn), 5.05 (s, 1H, H1α), 4.89 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.6 Hz, CHA, OBn), 4.69 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.8 Hz, CHA, OBn), 4.64 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 11.6 Hz, CHB, OBn), 4.51 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 11.8 Hz, CHB, OBn), 4.29 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = 6.2 Hz, $J_{3,2}$ = 6.2 Hz, H3), 4.19 (d, 1H, $J_{2,3}$ = 5.8 Hz, H2), 3.80-3.73 (m, 1H, H5), 3.24 (dd, 1H, $J_{4,3}$ = 7.2 Hz, $J_{4,5}$ = 9.9 Hz, H4), 1.51, 1.36 (2 x s, 3H, CH_3), 1.29 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3 Hz, H6) ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 138.4, 137.2, 128.6 (x2), 128.4 (x2), 128.3 (x2), 128.1 (x2), 128.0, 127.7 (Bn), 109.3 ($C(CH_3)_2$), 96.3 (C1), 81.3 (C4), 78.7 (C3), 76.2 (C2), 73.1, 69.1 (2 x CH_2 (Bn), 64.8 (C5), 28.1, 26.4 (2 x CH_3), 17.9 (C6) $J_{C1, H1}$= 174 Hz, HRMS: *m/z* $C_{23}H_{28}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 407.1834; 측정치, 407.1828.

[0270]

[0271] *1,4-O-디벤질-α-D-람노피라노시드* (**5**)

[0272] 화합물 **4** (0.46 g, 1.21 mmol)를 80% (v/v) AcOH (8 mL)의 용액에 용해시키고 상기 용액을 60℃로 4시간 동안 가열하였다. 이후, 상기 용액을 감압 하에 증발시키고, 미정제 생성물을 CH_2Cl_2/헥산으로 결정화하여 흰색 결정인 **5** (395 mg, 1.15 mmol, 95%)를 생성하였다.

Rf = 0.6 (EtOAc/헥산, 7/3) $[\alpha]_D^{25}$ 1.49 (*c* 0.09, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.36-7.26 (m, 10H, 2x Bn), 4.86 (s, 1H, H1), 4.78-4.73 (m, 2H, CHA, CHB, OBn), 4.69 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.9 Hz, CHA, OBn), 4.51 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 11.9 Hz, CHB, OBn), 3.99-3.94 (m, 2H, H2, H3), 3.83-3.76 (m, 1H, H5), 3.37 (dd, 1H, $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 9.1 Hz, H4), 2.26 (d, 1H, $J_{OH,2}$ = 3.6 Hz, OH), 2.24 (d, 1H, $J_{OH,3}$ = 4.8 Hz, OH), 1.36 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3 Hz, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 138.3, 137.3, 128.7 (x2), 128.6 (x2), 128.1, 128.1 (x2), 128.0 (x2), 128.0, (Bn), 98.6 (C1), 81.8 (C4), 75.2 (CH_2, Bn), 71.6 (C3), 71.3 (C2), 69.2 (CH_2, Bn), 67.5 (C5), 18.1 (C6) $J_{C1, H1}$= 167 Hz LRMS *m/z* $C_{20}H_{24}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 367.4; 측정치, 367.3

[0273]

[0274] *1,4-디-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**6**)

[0275] 화합물 **5** (25.1 g, 72.9 mmol)를 톨루엔과 3회 공증발시킨 후 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 이후, **5**를 무수 톨루엔 (500 mL)에 용해시키고 질소 기체로 퍼징한 후, 산화디부틸틴 (IV) (21.8 g, 87.5 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 16시간 동안 환류 교반한 후, 실온으로 냉각하고 진공 하에 증발시켰다. 미정제 혼합물을 5시간 동안 고진공 상태에서 추가로 건조한 후, 500 mL의 무수 DMF 중에 다시 용해시켰다. 상기 혼합물을 질소 기체로 퍼징한 다음, 불화세슘 (16.5 g, 109 mmol)과 요오드메탄 (51.7 mL, 830.4 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 40℃에서 16시간 동안 질소 기체 하에 교반한 후, TLC로 반응의 완료를 확인하였다. 상기 반응 혼합물을 RT로 냉각시키고 EtOAc (300 mL)로 희석한 뒤, 물 (5 x 60 mL), 포화 $NaHCO_3$ (1 x 60 mL) 및 염수 (1 x 60 mL)로 세척하였다. 이후, 혼합된 유기층은 Na_2SO_4로 건조한 다음, 증발시키고 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 옅은색의 오일인 **6**을 생성하였다 (23.7 g, 66.3 mmol, 91% - 2단계).

Rf = 0.35 (EtOAc/헥산, 7/3) $[\alpha]_D^{25}$ 58.3 (*c* 0.43, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.26 (m, 10H, 2 x Bn), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.2 Hz, H1), 4.86 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.0 Hz, CHA, OBn), 4.71 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.8 Hz, CHA, OBn), 4.64 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 11.6 Hz, CHB, OBn), 4.47 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 11.0 Hz, CHB, OBn), 4.08 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 1.7 Hz, $J_{2,3}$ = 3.3 Hz, H2), 3.83-3.73 (m, 1H, H5), 3.61 (dd, 1H, $J_{3,2}$ = 3.4 Hz, $J_{3,4}$ = 9.1 Hz, H3), 3.49 (s, 3H, OMe), 3.39 (dd, 1H, $J_{4,3}$ = 9.4 Hz, $J_{4,5}$ = 9.4 Hz, H4), 2.43 (d, 1H, $J_{OH,3}$ = 2.0 Hz, OH), 1.31 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3 Hz, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 138.6, 137.3, 128.5 (x2), 128.5 (x2), 128.1 (x2), 128.1 (x2), 128.0, 127.8 (Bn), 98.3 (C1), 81.8 (C3), 80.0 (C4), 75.4, 69.2 (2 x CH_2 (Bn)), 68.0 (C2), 67.4 (C5), 57.5 (OCH_3), 18.0 (C6) $J_{C1, H1}$= 174 Hz HRMS: *m/z* $C_{21}H_{26}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 381.1672; 측정치, 381.1668.

[0276]

[0277] *3-O-메틸-D-람노스* (**D-모노사카라이드**)

[0278] *1-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (43.7 mg, 162.9 μmol)를 4M HCl과 MeCN의 16:10 (V:V) 용액 (10 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 80℃로 16시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 상기 용액을 증발시키고 섬광 크로마토그래피 (용출액: MeOH/CH_2Cl_2, 1/5)를 사용하여 백색 고체인 모노사카라이드백 (18.9 mg, 106.1 μmol, 65%)를 수득하였다.

Rf = 0.30, (EtOAc), ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.18 (d, 0.7H, $J_{1\alpha,2\alpha}$ = 1.6 Hz, H1α), 4.74 (d, 0.3H, $J_{1\beta,2\beta}$ = 1.0 Hz, H1β), 4.07 (dd, 0.7H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 0.7 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ = 2.9 Hz, H2β), 4.03 (dd, 0.7H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 0.9 Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 1.9 Hz, H2α), 3.89-3.83 (m, 0.7H, H5α), 3.50-3.48 (2 x s, 3H, OCH_3 α/β), 3.46 (dd, 0.7H, $J_{4\alpha,3\alpha}$ = 3.0 Hz, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = 9.4 Hz, H4α), 3.43-3.39 (m, 1H, H3α and H4β), 3.42-3.35 (m, 0.3H, H5β), 3.15 (dd, 1H, $J_{3\beta,2\beta}$ = 3.0 Hz, $J_{3\beta,4\beta}$ = 9.2 Hz, H3β), 1.34-1.25 (m, 3H, H6α / H6β). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ 95.7 (C1α), 95.4 (C1β), 84.5 (C3β), 81.8 (C3α), 73.0 (C4α), 72.4 (C4β), 71.1 (C5β), 69.2 (C5α), 69.0 (C2β), 68.8 (C2α), 57.3 (OCH_3 α), 57.2 (OCH_3 β), 18.1 (C6α), 18.1 (C6β). $J_{C1,\ H1\alpha}$= 172 Hz, $J_{C1,\ H1\beta}$= 161 Hz, HRMS: *m/z* $C_7H_{14}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 201.0739; 측정치, 201.0734. NMR

[0279] 스펙트럼은 도 5b에 나타냄.

[0280] *3-O-메틸-L-람노피라노스* (**L-모노사카라이드**)

[0281] *1,2-디-O-아세틸-3-O-메틸--람노피라노시드* **S9** (100 mg, 381 μmol)를 MeOH/H_2O/Et_3N (7/2/1)의 10 mL 용액에 용해시키고 상기 반응 혼합물을 RT에서 16시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 용액을 감압 하에 증발시키고 Dowex® Na^+를 통해 여과한 후, Sephadex® G-12 컬럼을 통해 여과하였다. 해당 생성물을 포함하는 분획들을 수집하여 증발시켜서 α/β 혼합물 (8/5)로서 투명한 오일인 **13** (37.5 mg, 210 μmol, 55%)을 수득하였다.

^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.06 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2\alpha}$ = 1.7 Hz, H1α), 4.87 (d, 0.2H, $J_{1\beta,2\beta}$ = 1.7 Hz, H1β), 4.05 (d, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 0.9 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ = 3.1 Hz, H2β), 4.01 (dd, 0.8H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 1.8Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 2.9 Hz, H2α), 3.83 (m, 0.8H, H5α), 3.48 (s, 0.6H, OCH_3β), 3.48 (s, 2.4H, OCH_3α), 3.44 (dd, 0.8H, , $J_{4\alpha,3\alpha}$ = $J_{4\alpha,5\alpha}$ = 9.6 Hz, H4α), 3.41-3.36 (m, 1H, H3α, H4β), 3.29 (m, 0.2H, H3β), 1.30 (d, 0.6H, $J_{6\beta,5\beta}$ = 6.1 Hz), 1.25 (d, 2.4H, $J_{6\alpha,5\alpha}$ = 6.1 Hz, H6α). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ 95.7 (C1α), 95.3 (C1β), 84.5 (C3β), 81.8 (C3α), 73.0 (C4α), 72.4 (C4β), 73.3 (C5β), 69.2 (C5α), 69.0 (C2β), 68.8 (C2α), 57.3 (OCH_3 α), 57.2 (OCH_3 β), 18.1 (C6α), 18.1 (C6β). $J_{C1,\ H1\alpha}$= 172 Hz, $J_{C1,\ H1\beta}$= 162 Hz. HRMS: *m/z* $C_7H_{14}NaO_5$ $[M+Na]^+$, 201.0733; 측정치,

[0282] 201.0735. NMR 스펙트럼은 도 5a에 나타냄.

[0283] *4-O-벤질-3-O-메틸-D-람노피라노스* (**14**)

[0284] 화합물 **6** (1.54 g, 4.30 mmol)을 4M HCl과 MeCN의 16:10 용액 (219 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 80℃로 3시간 동안 가열하였다. TLC 분석 결과, 상기 반응은 3시간 후에 완료된 것으로 나타났다. 그 후, 상기 용액을 증발시키고 섬광 크로마토그래피 (용출액: MeOH / CH_2Cl_2, 1/5)로 정제하여 α/β 혼합물 (6/5)로서 투명한 오일인 화합물 **14** (0.75 g, 2.80 mmol, 65%)를 수득하였다.

Rf = 0.25 (EtOAc/헥산, 1/1) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.36-7.27 (m, 5H, Bn), 5.25 (s, 1H, H1α), 4.85 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 11.1 Hz, CHA, OBn), 4.72 (s, 1H, H1β), 4.63 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 4.10-4.08 (m, 2H, H2α, H2β), 3.99-3.92 (m, 1H, H5α), 3.62 (dd, 1H, $J3\alpha_{,4\alpha}$ = 9.1 Hz, 3.3 Hz, H3α), 3.52, 3.50 (2 x s, 3H, OCH_3 α/β), 3.38 (dd, 1H, $J_{4\alpha,3\alpha}$ = 9.4 Hz, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = 9.4 Hz, H4α), 3.37-3.31 (m, 3H, H3β, H4β, H5β), 2.56 (br. s, 1H, OH), 2.46 (br. s, 1H, OH), 1.33 (d, 3H, $J_{6\beta,5\beta}$ = 5.7 Hz, H6β), 1.29 (d, 3H, $J_{6\alpha,5\alpha}$ = 5.7 Hz, H6α). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Bn), 93.9 (C1α), 93.8 (C1β), 83.8 (C3β), 81.3 (C3α), 79.8 (C4α), 79.3 (C4β), 75.2 (CH_2, Bn), 71.1 (C5β), 68.3 (C2α), 68.0 (C2β), 67.3 (C5α), 57.5 (OCH_3α), 57.4 (OCH_3β),18.0 (CH_3, C6α), 17.9 (CH_3, C6β). HRMS

[0285] *m/z* $C_{14}H_{20}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 291.1203; 측정치, 292.1205.

[0286] *p-톨릴 2-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-1-티오-D-람노피라노시드* (**16**)

[0287] 화합물 **15** (925 mg, 2.63 mmol)를 무수 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 질소 기체 하에서 0℃로 냉각시켰다. 다음으로, 티오크레졸 (456 mg, 3.67 mmol)을 첨가한 후, 트리플루오라이드 디에틸 에테레이트 (452.9 μL, 3.67 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 교반한 후, 반응이 완료되었다. 그 후, 상기 용액을 CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석하고, 물 (2 x 20 mL)과 포화 $NaHCO_3$ 용액 (1 x 20 mL)으로 세척하였다. 혼합된 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 후, 증발시키고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)를 사용하여 α/β 혼합물(5/2)로서 갈색 오일인 화합물 **16** (880 mg, 2.11 mmol, 80%)을 수득하였다.

Rf = 0.6 (EtOAc/헥산, 3/7) $[\alpha]_D^{25}$ 23.1 (*c* 2.1, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.43-7.28 (m, 7H, Bn / Stol), 7.20-7.10 (m, 2H, Stol), 5.71 (d, 0.5H, $J_{2\beta,3\beta}$ = 2.5 Hz, H2β), 5.56 (dd, 0.5H, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 1.6 Hz, 3.2 Hz, H2α), 5.35 (d, 0.5H, $J_{1\alpha,2\alpha}$ = 1.3 Hz, H1α), 4.92 (d, 0.5H, $J_{A\alpha,B\alpha}$ = 11.0 Hz, CHAα, OBn), 4.87 (d, 0.5H, $J_{A\beta,B\beta}$ = 11.0 Hz, CHAβ, OBn), 4.75 (s, 0.5H, H1β), 4.64 (d x 2, 1H, $J_{B\alpha,A\alpha}$ 및 $_{B\beta,A\beta}$ = 10.7 Hz, CHBα and CHBβ, OBn), 4.27-4.20 (m, 0.5H, H5α), 3.65 (dd, 1H, $J_{3\alpha,4\alpha}$ = 9.3 Hz, $J_{3\alpha,2\alpha}$ = 3.3 Hz, H3α), 3.47 (s, 1.5H, OCH_3α), 3.45 (s, 1.5H, OCH_3β), 3.45-3.42 (m, 0.5H, H4α), 3.40-3.34 (m, 1.5H, H3β, H4β, H5β), 2.34 (s, 1.5H, CH_3, STol β), 2.33 (s, 1.5H, CH_3, STol α), 2.23 (s, 1.5H, Ac β), 2.15 (s, 1.5H, Ac α), 1.40 (d, 1.5H, $J_{6\beta,5\beta}$ = 5.5 Hz, H6β), 1.35 (d, 1.5H, $J_{6\alpha,5\alpha}$ = 6.2 Hz, H6α). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.5 (COβ), 170.3 (COα), 138.6, 138.5, 138.1, 138.0, 132.3 (x2), 132.3 (x2), 130.2, 130.2, 129.9 (x2), 129.9, 129.1, 128.5 (x2), 128.5, 128.3, 128.1, 128.0 (x2), 127.8, 127.8, 125.4 (Ar), 86.5 (C1α), 85.8 (C1β), 84.0 (C3β), 80.5 (C3α), 80.4 (C4α), 79.3 (C4β), 76.1 (C5β), 75.4 (CH_2, Bn α, Bn β), 70.4 (C2α), 70.0 (C2β), 68.9 (C5α), 57.8 (OCH_3 β), 57.7 (OCH_3 α), 21.2 (CH_3, Stol β), 21.2 (CH_3, Stol α), 21.1 (Ac α), 20.9 (Ac β), 18.3 (C6β), 17.9 (C6α). $J_{C1,\,H1\alpha}$= 169 Hz, $J_{C1,\,H1\beta}$= 154

[0288] Hz, ESI-MS: *m/z* $C_{23}H_{28}NaO_5S$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 439.1550; 측정치, 439.1545.

[0289] *1,2-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**17**)

[0290] 화합물 **15** (450 mg, 1.28 mmol)를 10.0 mL의 MeOH에 용해시키고, 상기 용액에 탄소 상의 수산화팔라듐 (40 mg, 0.28 mmol)을 채웠다. 상기 용액에 수소 기체 풍선을 사용하여 5분간 버블링한 후, 수소 기체 분위기 하에 3시간 동안 교반한 다음, 반응을 완료하였다. 그 후, 상기 용액을 셀라이트로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 순수한 **17** (323 mg, 1.23 mmol, 96%)을 수득하였다.

Rf = 0.25 (EtOAc/헥산, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ -21.2 (*c* 3.4, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.96 (s, 1H, H1), 5.24 (d, 1H, $J_{2,1}$ = 2.0 Hz, H2), 3.76-3.67 (m, 1H, H5), 3.48 (dd, 1H, $J_{4,5}$ = 9.4 Hz, $J_{4,3}$ = 9.4 Hz, H4), 3.43 (dd, 1H, $J_{3,2}$ = 3.2 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, H3), 3.37 (s, 3H, OCH_3), 2.96 (br. s, 1H, OH), 2.08, 2.07 (2x s, 6H, CH_3), 1.28 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3, H6) ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 169.9, 168.5 (2x C=O), 91.2 (C1), 79.3 (C3), 71.1 (C4), 70.4 (C5), 66.4 (C2), 57.4 (OCH_3), 20.9, 20.7 (2x Ac), 17.7 (C6). $J_{C1,H1}$= 170 Hz, LRMS *m/z* $C_{11}H_{18}NaO_7$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 285.1; 측정치, 285.1.

[0291]

[0292] *2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**18 디**)

[0293] 화합물 **16** (615 mg, 1.48 mmol)과 **17** (323 mg, 1.23 mmol)을 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (20 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.6 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (406 mg, 1.80 mmol)를 첨가한 다음 트리플산 (20 μL, 226 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, 20 mL의 CH_2Cl_2로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 20 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ 용액 (1 x 20 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **18 디** (363 mg, 655 μmol, 53%)를 수득하였다.

Rf = 0.55 (EtOAc/헥산, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 183 (*c* 18.7, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40-7.16 (m, 5H, Bn), 6.02 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.7 Hz, H1), 5.39 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ = 1.9 Hz, 3.0 Hz, H2′), 5.31 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 1.7, 1.7 Hz, H2), 5.17 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 1.7 Hz, H1′), 4.92 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.65 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.88-3.81 (m, 1H, H5), 3.79-3.72 (m, 1H, H5′), 3.64-3.59 (m, 3H, H3, H3′, H4), 3.48, 3.45 (2 x s, 6H, OCH_3), 3.40 (dd, 1H, $J_{4',5'}$ = $J_{4',3'}$ = 9.5 Hz, H4′), 2.17, 2.16, 2.15 (3 x s, 9H, Ac), 1.35 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.2 Hz, H6′), 1.34 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.1 Hz, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.2, 170.0, 168.6 (3 x C=O), 138.5, 128.5 (x2), 128.1 (x2), 127.8 (Bn), 99.5 (C1′), 91.1 (C1), 80.0 (C4, C3′), 79.9 (C4′), 77.9 (C3), 75.5 (CH_2, Bn), 69.3 (C5′), 68.7 (C5), 68.6 (C2′), 66.9 (C2), 57.6, 57.6 (2x OCH_3), 21.2, 21.0, 20.9 (3 x Ac), 18.3 (C6), 18.0 (C6′). $J_{C1,H1}$= 173 Hz, $J_{C1',H1'}$= 179 Hz LRMS *m/z* $C_{27}H_{38}NaO_{12}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 577.2; 측정치, 577.9.

[0294]

[0295] *2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**19 디**)

[0296] 절차는 **17**과 동일하게 하였다. 화합물 **18 디** (363 mg, 655 μmol), 탄소상 수산화팔라듐 (40 mg, 285 μmol), MeOH (10 mL). 화합물 **19 디** (273 mg, 588 μmol, 92%)는 투명한 오일로서 분리되었다.

Rf = 0.2 (EtOAc/헥산, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 44 (*c* 4.3, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.93 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.6 Hz, H1), 5.31 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 1.9 Hz, $J_{2,3}$ = 2.8 Hz, H2′), 5.22 (m, 1H, H2), 5.09 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 1.7 Hz, H1′), 3.76-3.66 (m, 2H, H5, H5′), 3.54-3.51 (m, 2H, H3, H4), 3.44 (dd, 1H, $J_{4',5'}$ = 9.4 Hz, $J_{4',3'}$ = 9.4 Hz, H4′), 3.35, 3.34 (2 x s, 6H, OCH_3), 3.34-3.29 (m, 1H, H3′), 2.88 (br. s, 1H, OH), 2.08, 2.06, 2.05 (3 x s, 9H, Ac), 1.29-1.25 (m, 6H, H6′, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.0, 168.5 (3 x C=O), 99.7 (C1′), 91.0 (C1), 79.9 (C4), 79.4 (C3′), 77.5 (C3), 71.4 (C4′), 69.2 (C5′), 69.0 (C5), 67.4 (C2), 66.8 (C2′), 57.5, 57.2 (OCH_3), 21.0, 20.9, 20.8 (3 x Ac), 18.2 (C6), 17.5 (C6′). $J_{C1,H1}$= 173 Hz, $J_{C1',H1'}$ = 168 Hz LRMS *m/z* $C_{20}H_{32}NaO_{12}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 487.2; 측정치, 486.9.

[0297]

[0298] *2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**18 트리**)

[0299] 화합물 **16** (243 mg, 584 μmol)과 **19 디** (226 mg, 487 μmol)를 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (10 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.3 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (161 mg, 715 μmol)를 첨가한 다음 트리플산 (10 μL, 115 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, 20 mL의 CH_2Cl_2로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 10 mL) 및 포화 중탄산나트륨 용액 (1 x 10 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **18 트리** (254 mg, 336 μmol, 69%)를 수득하였다.

Rf = 0.55 (EtOAc/헥산, 1/1), $[\alpha]_D^{25}$ 157 (*c* 15, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.36-7.25 (m, 5H, Bn), 5.98 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.7 Hz, H1), 5.36-5.32 (*m,* 2H, H2′, H2″), 5.28 (m, 1H, H2), 5.11 (m, 2H, H1′, H1″), 4.87 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.62 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.85-3.78 (m, 1H, H5″), 3.78-3.70 (m, 2H, H5′, H5), 3.60-3.54 (m, 3H, H3′, H3″, H4), 3.54-3.47 (m, 2H, H3, H4′), 3.43 (s, 3H, OCH_3), 3.39 (s, 6H, OCH_3 x2), 3.36 (dd, 1H, $J_{4'',3''}$= 9.6 Hz, H4″), 2.12 (s, 6H, Ac x 2), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 1.31 (d, 3H, $J_{6'',5''}$ = 6.2 Hz, H6″), 1.30 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3 Hz, H6), 1.29 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.3 Hz, H6′). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.0, 169.9, 168.4 (C=O), 138.5, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.7 (Bn), 99.4 (C1′), 99.3 (C1″), 91.0 (C1), 79.9 (C4″), 79.9 (C3), 79.8 (C3′), 79.8 (C3″), 78.2 (C4′), 78.0 (C4), 75.3 (CH_2, Bn), 69.1 (C5), 68.6 (C2′), 68.4 (C2″), 67.8 (C5′), 67.8 (C5″), 66.7 (C2), 57.5 (OCH_3), 57.2 (OCH_3), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (Ac), 18.2 (C6″), 18.0 (C6′), 17.8 (C6) $J_{C1,H1}$ = 179 Hz, $J_{C1',H1'}$ = 179 Hz , $J_{C1'',H1''}$ = 179 Hz HRMS *m/z* $C_{36}H_{52}NaO_{17}$ $[M+Na]^+$에

[0300] 대한 계산치, 779.3102; 측정치, 779.3079.

[0301] *2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**19 트리**)

[0302] 절차는 **17**과 동일하게 하였다. 화합물 **18 트리** (228 mg, 301 μmol), 탄소상 수산화팔라듐 (40 mg, 285 μmol), MeOH (10 mL). 화합물 **19 트리** (195.5 mg, 293 μmol, 97%)는 투명한 오일로서 분리되었다.

Rf = 0.25 (EtOAc/헥산, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 118 (*c* 13.3, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.98 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.4 Hz, H1), 5.36-5.32 (*m,* 2H, H2′, H2″), 5.2 (m, 1H, H2), 5.14 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 0.9 Hz, H1′), 5.10 (d, 1H, $J_{1'',2''}$ = 1.2 Hz, H1″), 3.82-3.72 (m, 3H, H5, H5′, H5″), 3.58-3.52 (m, 3H, H3, H3′, H4′), 3.52-3.47 (m, 2H, H3″, H4″), 3.40, 3.39, 3.38 (3x s, 3H, OCH_3), 3.41-3.36 (m, 1H, H4), 2.48 (br. s, 1H, OH), 2.13 (s, 3H, Ac), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 1.35-1.29 (m, 9H, H6, H6′, H6″). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.1, 170.0, 168.5 (4x C=O), 99.6 (C1′), 99.5 (C1″), 91.1 (C1), 80.0 (C3″), 79.9 (C3), 79.4 (C3′), 78.1 (C4), 78.0 (C4′), 71.6 (C4″), 69.2 (C5), 68.9 (C5′), 67.9 (C5″), 67.8 (C2″), 67.4 (C2′), 66.8 (C2), 57.6, 57.3, 57.2 (3x OCH_3), 21.1 (x2), 21.0, 20.9 (4x Ac), 18.3 (C6″), 18.1 (C6′), 17.6 (C6). $J_{C1,H1}$ = 172 Hz, $J_{C1',H1'}$ = 171 Hz, $J_{C1'',H1''}$ = 171 Hz LRMS *m/z* $C_{29}H_{46}NaO_{17}$ $[M+Na]^+$에 대한

[0303] 계산치, 689.3; 측정치, 688.8.

[0304] *2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**18 테트라**)

[0305] 화합물 **16** (146 mg, 351 μmol)과 **19 트리** (195 mg, 293 μmol)를 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (10 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.2 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (96.5 mg, 429 μmol)를 첨가한 다음 트리플산 (5 μL, 57.5 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, 10 mL의 CH_2Cl_2로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 5 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ 용액 (1 x 5 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **18 테트라** (149.7 mg, 156 μmol, 53%)를 수득하였다.

Rf = 0.55 (EtOAc/헥산, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 54.7 (*c* 5.0, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.26 (m, 5H, Bn), 5.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.7 Hz, H1), 5.37-5.32 (*m,* 3H, H2′, H2″, H2‴), 5.28 (m, 1H, H2), 5.11 (*s,* 3H, H1′, H1″, H1‴), 4.86 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.62 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.85-3.71 (m, 4H, H5, H5′, H5″, H5‴), 3.61-3.53 (m, 4H, H3, H4, H4′, H4″), 3.53-3.49 (m, 3H, H3′, H3″, H3‴), 3.44, 3.40, 3.39, 3.38 (4 x s, 12H, OCH_3), 3.37-3.31 (*m,* 1H, H4‴), 2.13, 2.12 (2 x s, 6H, Ac), 2.11, 2.08, 2.07 (3 x s, 9H, Ac), 1.34 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.2 Hz, H6), 1.31 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.3 Hz, H6′), 1.30 (d, 3H, $J_{6'',5''}$ = 6.3 Hz, H6″), 1.28 (d, 3H, $J_{6''',5'''}$ = 6.3 Hz, H6‴). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.0, 170.0, 169.9, 168.5 (C=O), 138.5, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.8, (Bn), 99.5 (C1‴), 99.4 (C1″), 99.3 (C1′), 91.0 (C1), 80.0 (C3), 80.0 (C3′), 79.8 (C3″, C3‴ 및 C4‴), 78.3 (C4), 78.1 (C4′ 및 C4″), 75.4 (CH_2, Bn), 69.1 (C5), 68.6 (C2‴), 68.4 (C5‴), 67.9 (C2″), 67.8 (C2′), 67.7 (C5′), 67.7 (C5″), 66.8 (C2), 57.5, 57.5, 57.3, 57.2 (4 x OCH_3), 21.1, 21.0, 21.0, 21.0, 20.9 (5x Ac), 18.3 (C6), 18.1 (C6′), 18.1 (C6″), 18.0 (C6‴). $J_{C1,H1}$ = 185 Hz, $J_{C1',H1'}$ = 179 Hz, $J_{C1'',H1''}$ =179 Hz, $J_{C1''',H1'''}$ = 179 Hz,

[0306] HRMS *m/z* $C_{45}H_{66}NaO_{22}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 981.3943; 측정치, 981.3910.

[0307] *2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**19 테트라**)

[0308] 절차는 **17**과 동일하게 하였다. 화합물 **18 테트라** (110 mg, 114.7 μmol), 탄소상 수산화팔라듐 (20.0 mg, 143 μmol), MeOH (10 mL). 화합물 **19 테트라** (95.6 mg, 110.0 μmol, 96%)는 백색 고체로서 분리되었다.

[0309] ₩

[0310] *2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**18 펜타**)

[0311] 화합물 **16** (37.4 mg, 89.9 μmol)과 **19 테트라** (48.8 mg, 56.2 μmol)를 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (5 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 50 mg을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (24.7 mg, 109.8 μmol)를 첨가한 다음 트리플산 (10 μL, 113 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, 10 mL의 CH_2Cl_2로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 5 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ 용액 (1 x 5 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **18 펜타** (35.6 mg, 30.7 μmol, 55%)를 수득하였다.

Rf = 0.70 (EtOAc/헥산, 7/3) $[\alpha]_D^{25}$ 22.26 (*c* 1.75, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.36-7.26 (m, 5H, Bn), 5.98 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.5 Hz, H1), 5.35-5.31 (*m,* 4H, H2′, H2″, H2‴, H2⁗), 5.27 (*s*, 1H, H2), 5.10 (*s,* 4H, H1′, H1″, H1‴, H1⁗), 4.86 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.61 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.84-3.70 (m, 5H, H5, H5′, H5″, H5‴, H5⁗), 3.60-3.51 (m, 5H, H3, H4, H4′, H4″, H3⁗), 3.51-3.46 (m, 4H, H3′, H3″, H3‴, H4‴), 3.43, 3.39 (2 x s, 3H, OCH_3), 3.38 (s, 6H, OCH_3 x2), 3.37 (s, 3H, OCH_3), 3.37-3.31 (*m,* 1H, H4⁗), 2.12, 2.12, 2.11, 2.08 (4 x s, 12H, Ac), 2.07 (s, 6H, Ac x2), 1.36-1.26 (m, 15H, H6, H6′, H6″, H6‴, H6⁗). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.2, 170.1, 170.1, 170.0, 169.9, 168.5 (C=O), 138.5, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (Bn), 99.5 (C1‴), 99.4 (C1″), 99.4 (C1′), 99.3 (C1⁗), 91.0 (C1), 80.0 (C3⁗), 80.0 (C3), 79.9 (C3′), 79.9 (C3″, C3‴, C4⁗), 78.3 (C4), 78.3 (C4′), 78.2 (C4″), 78.1 (C4‴), 75.4 (CH_2, Bn), 69.1 (C5), 68.7 (C2⁗), 68.4 (C5⁗), 67.9 (C2″), 67.9 (C2‴), 67.8 (C2′), 67.8 (C5′), 67.7 (C5″, C5‴), 66.8 (C2), 57.5, 57.5, 57.3, 57.3, 57.2 (5 x OCH_3), 21.1, 21.1, 21.0, 21.0, 21.0, 20.9 (6x Ac), 18.3 (C6), 18.1 (C6′), 18.1 (C6″), 18.1 (C6‴), 17.9 (C6⁗) $J_{C1,H1}$ = 174 Hz, $J_{C1',H1'}$ = 177 Hz, $J_{C1'',H1''}$ =177 Hz, $J_{C1''',H1'''}$ = 177 Hz, $J_{C1'''',H1''''}$ = 177 Hz

[0312] HRMS *m/z* $C_{54}H_{80}NaO_{27}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 1183.4785; 측정치, 1180.4753.

[0313] *2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-1,2-O-디아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**19 펜타**)

[0314] 절차는 **17**과 동일하게 하였다. 화합물 **18 펜타** (35.0 mg, 30.1 μmol), 탄소상 수산화팔라듐 (15.0 mg, 105.0 μmol), MeOH (5 mL). 화합물 **19 펜타** (32.2 mg, 30.1 μmol, 100%)는 백색 고체로서 분리되었다.

Rf = 0.45 (EtOAc/헥산, 7/3) $[\alpha]_D^{25}$ 19.6 (*c* 1.66, CD_3OD) ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 5.97 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.4 Hz, H1), 5.34-5.29 (*m,* 4H, H2′, H2″, H2‴, H2⁗), 5.26 (*s*, 1H, H2), 5.12 (s, 1H, H1⁗), 5.09 (*s,* 3H, H1′, H1″, H1‴), 3.81-3.72 (m, 5H, H5, H5′, H5″, H5‴, H5⁗), 3.57-3.35 (m, 4H, H3, H4′, H4″, H4‴), 3.51-3.44 (m, 5H, H4, H4⁗, H3′, H3″, H3‴), 3.38 (2 x s, 3H, OCH_3), 3.37 (s, 6H, OCH_3), 3.36 (s, 3H, OCH_3 x2), 3.37-3.31 (*m,* 1H, H3⁗), 2.12, 2.12, 2.10, 2.08, 2.07 (4 x s, 12H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac x2), 1.35-1.25 (m, 15H, H6, H6′, H6″, H6‴, H6⁗). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 170.1 (x2), 170.1, 170.1, 170.0, 168.5 (C=O), 99.6 (C1⁗), 99.6 (C1″), 99.5 (C1′), 99.4 (C1‴), 91.1 (C1), 80.1 (C3″), 80.0 (C3′), 80.0 (C3), 79.9 (C3‴), 79.4 (C3⁗), 78.3 (C4′), 78.3 (C4″), 78.2 (C4‴), 78.1 (C4), 71.6 (C4⁗), 69.2 (C5), 68.9 (C5⁗), 68.0 (C2‴), 68.0 (C2″), 67.9 (C2⁗), 67.8 (C2′), 67.8 (C5′), 67.7 (C5″), 67.5 (C5‴), 66.8 (C2), 57.6, 57.3, 57.3, 57.3, 57.2 (5 x OCH_3), 21.1 (x2), 21.1, 21.0 (x2), 20.9 (6x Ac), 18.3 (C6), 18.2 (C6′, C6″, C6‴), 18.1 (C6⁗) LRMS *m/z* $C_{47}H_{74}NaO_{27}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 1093.4; 측정치, 1093.8.

[0315]

[0316] *3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-D-람노피라노스* (**디사카라이드**)

[0317] 화합물 **18 디** (18 mg, 38.7 μmol)를 MeOH (5 mL)에 용해시키고 상기 반응 혼합물에 나트륨 금속 (1 mg)을 첨가하였다. 16시간 후, pH가 5가 될 때까지 렉신-H^+를 상기 혼합물에 첨가하였다. 이후, 상기 혼합물을 여과하고 증발시켜 추가의 정제없이 화합물 **디사카라이드**를 수득하였다 (13.1 mg, 38.7 μmol, 수율 100%).

Rf = 0.5 (MeOH/CH_2Cl_2, 1/5) ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.08 (d, 1H, $J_{1',2}$ = 1.8 Hz, H1′), 4.99 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2}$ = 1.7 Hz, H1α), 4.65 (d, 0.2H, $J_{1\beta,2}$ = 0.9 Hz, H1β), 4.04 (dd, 1H, $J_{2',1'}$ = 1.9 Hz, $J_{2',3'}$ = 3.1 Hz, H2′), 3.99 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 1.1 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ 3.9 Hz, H2β), 3.96 (dd, 0.8H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 1.9 Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 2.9 Hz, H2α), 3.82 (m, 0.8H, H5α), 3.68 (m, 1H, H5′), 3.51 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = 3.0 Hz, $J_{4\alpha,3\alpha}$= 9.3 Hz, H4α), 3.48 (m, 0.2H, H4β) 3.46 (dd, 0.8H, $J_{3\alpha,2\alpha}$ = 3.0 Hz, $J_{3\alpha,4\alpha}$ = 9.3 Hz, H3α), 3.42-3.40 (m, 4H, H4′ 및 OCH_3′), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 3.31 (m, 0.2H, H5β), 3.24 (dd, 1H, $J_{3',2'}$ = 3.2 Hz, $J_{3',4'}$ = 9.4 Hz, H3′), 3.23 (m, 0.2H, H3β), 1.34 (d, 0.6H, $J_{6\beta,5\beta}$ = 6.0 Hz, H6β) 1.24 (d, 2.4H, $J_{6\alpha,5\alpha}$ = 6.3 Hz, H6α), 1.20 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.4 Hz, H6′). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2 (C1′), 95.5 (C1α), 95.4 (C1β), 85.5 (C3β), 83.0 (C3α), 82.0 (C3′), 79.8 (C4α), 79.2 (C4β), 72.6 (C4′), 72.0 (C5β), 70.5 (C5′), 68.5 (C2α), 68.4 (C2β 및 C2′), 67.8 (C5α), 57.3 (OCH_3′), 56.7 (OCH_3α), 56.5 (OCH_3β), 18.8 (C6α 및 C6β), 17.9 (C6′). $J_{C1',H1'\alpha}$= 173 Hz, $J_{C1,H1\alpha}$= 172 Hz, $J_{C1,H1\beta}$= 165 Hz. NMR 스펙트럼은 도 17에 나타냄.

[0318]

[0319] *3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스* (**트리사카라이드**)

[0320] 화합물 **19 트리** (25 mg, 37.5 μmol)를 무수 MeOH 10 mL에 용해시키고, 상기 용액을 질소 기체 분위기 하에 교반하였다. 그런 다음, 나트륨 금속 (10.0 mg, 0.44 mmol)을 첨가하고 TLC에 의해 반응이 완료됨이 확인될 때까지 상기 반응 혼합물을 교반하였다. 그 후, 상기 용액을 렉신으로 중화시키고, 셀라이트로 여과한 후, 증발시켜 화합물 **트리사카라이드** (18.1 mg, 36.3 μmol, 97%)를 투명한 고체로서 수득하였다.

Rf = 0.45 (MeOH/CH_2Cl_2, 1/4) $[\alpha]_D^{25}$ 16.754 (*c* 1.4, MeOH) ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.16 (m, 2H, H1′ 및 H1″), 5.07 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2}$ = 1.6 Hz, H1α), 4.65 (d, 0.2H, $J_{1\beta,2}$ = 0.6 Hz, H1β), 4.12 (dd, 1H, $J_{2',1'}$ = 2.2 Hz, $J_{2',3'}$ = 2.6 Hz, H2′), 4.11 (dd, 1H, $J_{2'',1''}$ = 1.9 Hz, $J_{2'',3''}$ = 3.0 Hz, H2″), 4.07 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 0.9 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ 2.9 Hz, H2β), 4.04 (dd, 1H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 2.0 Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 2.8 Hz, H2α), 3.90 (m, 0.8H, H5α), 3.80 (m, 1H, H5′) 3.74 (m, 1H, H5″), 3.62 (dd, 1H, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = $J_{4\alpha,3\alpha}$= 9.2 Hz, H4′), 3.58 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = $J_{4\alpha,3\alpha}$= 9.3 Hz, H4α), 3.56-3.49 (m, 1H, H3α 및 H4β), 3.45 (m, 1H, H3′), 3.49-3.48 (m, 4H, OCH_3″, H4″), 3.46 (s, 3H, OCH_3′), 3.45 (s, 3H, OCH_3), 3.39 (m, 0.2H, H5β), 3.33-3.29 (dd, 1.2H, $J_{3'',2''}$ = 3.0 Hz, $J_{3'',4''}$ = 9.5 Hz, H3″ 및 H3β), 1.35 (d, 0.6H, $J_{6\beta,5\beta}$ = 6.0 Hz, H6β), 1.32 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.4 Hz, H6′), 1.29 (d, 2.4H, $J_{6\alpha,5\alpha}$ = 6.3 Hz, H6α), 1.28 (d, 3H, $J_{6'',5''}$ = 6.2 Hz, H6″). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2 (C1″), 103.2 (C1′), 95.5 (C1α), 95.4 (C1β), 85.4 (C3β), 83.1 (C3′), 82.9 (C3α), 82.0 (C3″), 80.0 (C4α), 79.4 (C4β), 79.3 (C4′), 72.6 (C4″), 71.9 (C5β), 70.5 (C5″), 69.0 (C5′), 68.6 (C2β), 68.5 (C2α), 68.3 (C2″), 68.0 (C2′), 67.7 (C5α), 57.3 (OCH_3″), 56.7 (OCH_3α), 57.6 (OCH_3′), 56.5 (OCH_3β), 18.8 (C6′ 및 C6β), 18.6 (C6α), 17.9 (C6″). $J_{C1',H1'\alpha}$= $J_{C1'',H1''}$= 173 Hz, $J_{C1\alpha,H1\alpha}$= 172 Hz, $J_{C1\beta,H1\beta}$= 163 Hz $J_{C1',H1'\alpha}$= 170 Hz LRMS *m/z* $C_{21}H_{38}NaO_{13}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 521.2; 측정치, 521.2. NMR 스펙트럼은 도 18에 나타냄.

[0321]

[0322] *3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스* (**테트라사카라이드**)

[0323] 화합물 **19 테트라** (22.6 mg, 26.0 μmol)를 무수 MeOH 10 mL에 용해시키고, 상기 용액을 질소 기체 분위기 하에 교반하였다. 그런 다음, 나트륨 금속 (10 mg, 0.44 mmol)을 첨가하고 TLC에 의해 반응이 완료됨이 확인될 때까지 상기 반응 혼합물을 교반하였다. 그 후, 상기 용액을 렉신-H^+ 수지로 중화시키고, 셀라이트로 여과한 후, 증발시켜 화합물 **테트라사카라이드** (15.9 mg, 24.1 μmol, 93%)를 투명한 고체로서 수득하였다.

Rf = 0.45 ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1/4) $[\alpha]_D^{25}$ 7.7 (*c* 0.63, MeOH) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.08 (m, 3H, H1′, H1″, H1‴), 5.00 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2}$ = 1.8 Hz, H1α), 4.66 (d, 0.2H, $J_{1\beta,2}$ = 0.8 Hz, H1β), 4.05 (m, 2H, $J_{2',1'}$ = 2.2 Hz, $J_{2',3'}$ = 2.6 Hz, H2′ 및 H2″), 4.04 (dd, 1H, $J_{2'',1''}$ = 1.9 Hz, $J_{2'',3''}$ = 3.0 Hz, H2‴), 4.01 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 0.8 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ 3.0 Hz, H2β), 3.96 (dd, 1H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 1.9 Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 2.8 Hz, H2α), 3.83 (m, 0.8H, H5α), 3.76-3.69 (m, 2H, H5′ 및 H5″), 3.67 (m, 1H, H5‴), 3.56-3.53(m, 2H, H4′ 및 H4″), 3.51 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = $J_{4\alpha,3\alpha}$= 9.3 Hz, H4α), 3.52-3.49 (m, 1H, H3α 및 H4β), 3.46 (dd, $J_{3',2'}$ = 3.0 Hz, $J_{3',4'}$ = 9.3 Hz, 1H, H3′), 3.42-3.40 (m, 4H, OCH_3‴, H4‴), 3.40-3.35 (s, 11H, OCH_3′, OCH_3″, OCH_3, H3″ 및 H3′), 3.33 (m, 0.2H, H5β), 3.25-3.22 (m, 1.2H, H3‴ 및 H3β), 1.28-1.21 (m, 9H, H6β, H6′, H6α 및 H6″), 1.20 (d, 3H, $J_{6''',5'''}$ = 6.2 Hz, H6‴). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2 (C1‴), 103.0 (C1″), 103.0 (C1′) 95.5 (C1α), 95.4 (C1β), 85.4 (C3β), 83.0 (C3′), 83.0 (C3″) 82.9 (C3α), 82.0 (C3‴), 80.0 (C4α), 79.7 (C4β), 79.4 (C4′), 79.2 (C4″), 72.6 (C4‴), 71.9 (C5β), 70.5 (C5‴), 69.0 (C5′), 68.9 (C5″), 68.6 (C2β), 68.2 (C2α), 68.3 (C2‴), 68.0 (C2′ 및 C2″), 67.7 (C5α), 57.3 (OCH_3‴), 56.7 (OCH_3α), 56.7 (OCH_3′), 56.6 (OCH_3″), 56.5 (OCH_3β), 18.8 (C6α), 18.7 (C6β), 18.5 (C6′ 및 C6″), 17.9 (C6‴). $J_{C1',\ H1'}$= $J_{C1'',\ H1''}$= $J_{C1''',\ H1'''}$= 173 Hz, $J_{C1\alpha,\ H1\alpha}$= 174 Hz, $J_{C1\ \beta,\ H1\beta}$= 162 Hz, LRMS *m/z* $C_{28}H_{50}NaO_{17}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 681.3; 측정치, 680.9. NMR 스펙트럼은 도 19에 나타냄.

[0324]

[0325] *3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스* (**펜타사카라이드**)

[0326] 화합물 **19 펜타** (33.1 mg, 30.9 μmol)를 무수 MeOH 10.0 mL에 용해시키고, 상기 용액을 질소 기체 분위기 하에 교반하였다. 그런 다음, 나트륨 금속 (10.0 mg, 0.44 mmol)을 첨가하고 TLC에 의해 반응이 완료됨이 확인될 때까지 상기 반응 혼합물을 교반하였다. 그 후, 상기 용액을 렉신으로 중화시키고, 셀라이트로 여과한 후, 증발시켜 화합물 **펜타사카라이드** (25.3 mg, 30.9 μmol, 100%)를 투명한 고체로서 수득하였다.

Rf = 0.45 ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1/4) $[\alpha]_D^{25}$ 12.6 (*c* 1.0, MeOH) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.12 (m, 4H, H1′, H1″, H1‴, H1⁗), 5.03 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2}$ = 1.8 Hz, H1α), 4.71 (s, 0.2H, H1β), 4.09 (m, 3H, H2′ 및 H2″, H2‴), 4.04 (dd, 1H, $J_{2'''',1''''}$ = 1.9 Hz, $J_{2'''',3''''}$ = 2.8 Hz, H2⁗), 4.05 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta}$ = 0.8 Hz, $J_{2\beta,3\beta}$ 2.8 Hz, H2β), 4.00 (dd, 1H, $J_{2\alpha,1\alpha}$ = 2.0 Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}$ = 2.6 Hz, H2α), 3.87 (m, 0.8H, H5α), 3.80-3.73 (m, 3H, H5′, H5″ 및 H5‴), 3.71 (dd, 1H, $J_{5'''',4''''}$ = 9.1 Hz, $J_{5'''',6''''}$ = 6.3 Hz, H5⁗), 3.60-3.56 (m, 3H, H4′, H4″, H4‴), 3.55 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha}$ = $J_{4\alpha,3\alpha}$= 9.3 Hz, H4α), 3.52-3.47 (m, 0.8H, H3α 및 H4β), 3.46-3.39 (m, 19.2H, OCH_3 x 5, H4⁗, H3′, H3″ 및 H3‴, H5β), 3.29 (m, 1.2H, H3β 및 H3⁗), 1.23-1.22 (m, 12H, H6β, H6′, H6α, H6″, H6‴), 1.24 (d, 3H, $J_{6'''',5''''}$ = 6.1 Hz, H6⁗). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ 103.2 (C1⁗), 103.1 (C1‴), 103.0 (C1″ 및 C1′), 95.5 (C1α), 95.3 (C1β), 85.3 (C3β), 83.0 (C3′), 83.0 (C3″), 83.0 (C3‴), 82.9 (C3α), 82.0 (C3⁗), 80.0 (C4α), 79.5 (C4β 및 C4′), 79.4 (C4″), 79.2 (C4‴), 72.6 (C4⁗) 71.9 (C5β), 70.5 (C5⁗), 69.0 (C5′), 69.0 (C5″), 68.9 (C5‴), 68.6 (C2β), 68.4 (C2α), 68.3 (C2⁗), 68.0 (C2′, C2″ 및 C2‴), 67.7 (C5α), 57.3 (OCH_3⁗), 56.7 (OCH_3α, OCH_3′, OCH_3″, OCH_3‴), 56.6 (OCH_3β), 18.8 (C6α), 18.6 (C6β, C6′, C6″ 및 C6‴), 17.9 (C6⁗). $J_{C1',\ H1'}$= $J_{C1'',\ H1''}$= $J_{C1''',\ H1'''}$= $J_{C1'''',\ H1''''}$= 173 Hz, $J_{C1\alpha,\ H1\alpha}$= 170 Hz, $J_{C1\ \beta,\ H1\beta}$= 160 Hz, LRMS *m/z* $C_{35}H_{62}NaO_{21}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 841.4; 측정치, 841.3. NMR 스펙트럼은 도 20에 나타냄.

[0327]

[0328] *2-[N-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**21**)

[0329] 화합물 **16** (46.4 mg, 111 μmol)과 *N*-boc-에탄올아민 (19 μL, 123 μmol)을 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (5 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.1 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (33.7 mg, 150 μmol)를 첨가한 다음 트리플산 (10 μL, 115 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, 10.0 mL의 염화메틸렌으로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 10 mL) 및 포화 중탄산나트륨 용액 (1 x 10 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **21** (42.0 mg, 88 μmol, 80 %)을 수득하였다.

[0330] Rf = 0.30 (EtOAc/헥산, 3/7) $[\alpha]_D^{25}$ 108.8 (*c* 22.5, $CHCl_3$) ^{1}H NMR α, (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.32 (m, 4H, Bn), 7.31-7.28 (m, 1H, Bn), 5.29 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 1.3 Hz, $J_{2,3}$ = 3.1 Hz, H2), 4.88 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.85 (br. s, 1H, NH), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.3 Hz, H1), 4.60 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.73-3.66 (m, 2H, H5 및 CHA, **CH₂**CH₂NHBoc), 3.63 (dd, 1H, $J_{3,2}$ = 3.4 Hz, $J_{3,4}$ = 9.4 Hz, H3), 3.50-3.44 (m, 1H, CHB, **CH₂**CH₂NHBoc), 3.44 (s, 3H, CH_3O), 3.39-3.32 (m, 2H, H4 및 CHA, CH_2**CH₂**NHBoc), 3.30-3.22 (m, 1H, CHB, CH_2**CH₂**NHBoc), 2.15 (s, 3H, Ac), 1.45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$, Boc), 1.32 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.3 Hz, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.5, 155.9 (C=O), 138.6, 128.5 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (Bn), 97.8 (C1), 80.1 (C4), 79.9 (C3), 79.5 (**C**C$(CH_3)_3$), 75.4 (CH_2, Bn), 68.6 (C2), 67.8 (C5), 67.3 (**C**H_2CH_2NHBoc), 57.6 (OCH_3), 40.3 (CH_2**C**H_2NHBoc), 28.5 (($CH_3)_3$, BOC), 21.1 (Ac), 18.0 (C6). HRMS *m/z* $C_{23}H_{35}NNaO_8$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 476.2255; 측정치, 476.2249.

[0331] *2-[N-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**22**)

[0332] 화합물 **21** (46 mg, 101.5 μmol)을 MeOH (5 mL)에 용해시키고, 탄소상 팔라듐 (40 mg, 0.38 mmol)으로 채웠다. 그런 다음, 상기 용액에 수소 기체 풍선을 사용하여 5분간 버블링한 후, 수소 기체 분위기 하의 실온에서 계속해서 교반하였다. 4시간 후, 상기 반응이 완료되었으면, 셀라이트로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 순수한 **22** (21.0 mg, 57.8 μmol, 62%)를 수득하였다.

[0333] Rf = 0.35 (EtOAc/헥산, 1/1), ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.30 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 1.8 Hz, $J_{2,3}$ = 3.1 Hz, H2), 4.78 (br. s, 1H, NH), 4.74 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.6 Hz, H1), 3.76-3.65 (m, 2H, H5 및 CHA, **CH₂**CH_2NHBoc), 3.53-3.43 (m, 3H, H3, H4 및 CHB, **CH₂**CH_2NHBoc), 3.41 (s, 3H, CH_3O), 3.39-3.26 (m, 2H, CH_2**CH₂**NHBoc), 2.34 (br. s, OH), 2.12 (s, 3H, Ac), 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$, Boc), 1.34 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.2 Hz, H6). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.3, 155.9 (C=O), 98.0 (C1), 79.4 (C4), 71.6 (C3), 68.3 (C2), 67.5 (C5), 67.2 (**C**H_2CH_2NHBoc), 57.3 (OCH_3), 40.2 (CH_2**C**H_2NHBoc), 28.4 (($CH_3)_3$, BOC), 20.9 (Ac), 17.7 (C6). HRMS *m/z* $C_{16}H_{29}NNaO_8$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 386.1791; 측정치, 386.1784.

[0334] *2-[N-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-O-아세틸-4-O-벤질-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-O-아세틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드* (**23**)

[0335] 화합물 **22** (21.0 mg, 57.8 μmol)와 **16** (28.9 mg, 69.4 μmol)을 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (5 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.1 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 질소 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (19.1 mg, 84.9 μmol)를 첨가한 다음 트리플산 (5.0 μL, 57.5 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (10 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 10 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ 용액 (1 x 10 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여

과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **23** (18 mg, 26.5 μmol, 47%)을 수득하였다. (Rf = 0.65 EtOAc/헥산 3/7).

^{1}H NMR α, (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.32 (m, 4H, Bn), 7.31-7.27 (m, 1H, Bn), 5.35 (m, 1H, H2′), 5.28 (m, 1H, H2), 5.12 (s, 1H, H1′), 4.88 (d, 1H, $J_{A,B}$ = 10.8 Hz, CHA, OBn), 4.83 (br. s, 1H, OH), 4.69 (s, 1H, H1), 4.62 (d, 1H, $J_{B,A}$ = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.85-3.77 (m, 1H, H5′), 3.75-3.68 (m, 1H, CHA, **CH**$_2$CH$_2$NHBoc), 3.66-3.61 (m, 1H, H5), 3.61-3.56 (m, 1H, H3′), 3.56-3.51 (m, 4H, H3 및 H4), 3.51-3.42 (m, 4H, CHB, **CH**$_2$CH$_2$NHBoc 및 CH_3O), 3.41-3.34 (m, 4H, H4′ 및 CH_3O), 3.33-3.24 (m, 2H, CH$_2$**CH**$_2$NHBoc), 3.30 (bs, 1H, NH) 2.13, 2.10 (2 x s, 6H, Ac x 2), 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$, Boc), 1.33-1.27 (m, 6H, H6 및 H6′). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4, 170.2 155.9 (C=O), 138.6, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (Bn), 99.4 (C1′), 97.8 (C1), 80.0 (C4′), 80.0 (C4), 79.9 (C3′), 79.6 (**C**$(CH_3)_3$), 78.3 (C3), 75.4 (CH_2, Bn), 68.7 (C2′), (C5′), 67.9 (C2), 67.3 (**C**H$_2$CH$_2$NHBoc), 67.1 (C5), 57.6 및 57.4 (OCH_3), 40.3 (CH$_2$**C**H$_2$NHBoc), 28.5 (($CH_3)_3$, BOC), 21.2 및 21.1 (Ac), 18.2 및 17.9 (C6 및 C6′). $J_{C1',\ H1'\alpha}$= 171 Hz, $J_{C1,\ H1\alpha}$= 168 Hz HRMS: *m/z* $C_{32}H_{49}NNaO_{13}$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 678.3102; 측정치, 678.3092. NMR 스펙트럼은 도 21에 나타냄.

[0336]

[0337] *2-아미노에틸-3-O-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-O-메틸-α-D-람노피라노스* (**링커 디사카라이드**)

[0338] 화합물 **23** (18 mg, 27 μmol)을 MeOH (2mL)에 용해시키고 PD/C (10 mg, 93 μmol)를 첨가한 후, 상기 혼합물을 수소 분위기 하에 풍선 압력을 이용하여 16시간 동안 교반하였다. 그 후, 상기 화합물을 MeOH (10 mL)로 희석하고, 셀라이트로 여과한 후 농축시켰다. 다음으로, 상기 농축물을 MeOH (2 mL)에 용해시키고 고체나트륨 (10 mg, 435 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 질소 분위기 하에 16시간 동안 교반한 후, pH가 5에 도달할 때까지 렉신-H^+ 수지를 첨가하였다. 상기 혼합물을 여과하고, 여과액을 농축시켰다. 그런 다음, 상기 화합물을 DCM (2 mL)에 용해시키고 TFA (160 μL)를 0℃에서 첨가하였다. 0℃에서 30분 후, DCM과 TFA 혼합물을 증발시켜 황색 오일인 링커 사카라이드를 수득하였다. (10.3 mg, 27 μmol, 수율 100%) (Rf = 0.12, DCM/MeOH/물/NH_4OH, 60/35/6/1)

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 5.16 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.6 Hz, H1′), 4.87 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1.7 Hz, H1), 4.23 (m, 2H, H2′ 및 H2) 3.97 (m, 1H, C**HA**CH$_2$NH$_2$), 3.80 (m, 2H, H5′ 및 H5), 3.70 (m, 1H, C**HB**CH$_2$NH$_2$), 3.64 (dd, 1H, $J_{3,2}$ = 3.3 Hz, $J_{3,4}$ = 9.2 Hz, H3), 3.58 (dd, 1H, $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 9.2 Hz, H4), 3.50 (dd, 1H, $J_{4',3'}$ = $J_{4',5'}$ = 9.6 Hz, H4′), 3.44 (s, 3H, OCH_3), 3.44 (s, 3H, OCH_3), 3.41 (dd, 1H, $J_{3',2'}$ = 3.3 Hz, $J_{3',4'}$ = 9.7 Hz, H3′), 3.27 (m, 2H, C**H**$_2$NH$_2$), 1.33 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 5.9 Hz, H6), 1.29 (d, 3H, $J_{6',5'}$ = 6.4 Hz, H6′). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O): δ 101.4 (C1′), 99.7 (C1), 80.5 (C3), 79.4 (C3′), 78.1 (C4), 70.6 (C4′), 69.5 (C5′), 67.2 (C5), 66.0 (C2′), 65.8 (C2), 63.4 (**C**H$_2$CH$_2$NH$_2$), 56.1 (2 x OCH_3), 39.0 (CH$_2$NH$_2$), 17.3 (C6), 16.5 (C6′). $J_{C1',\ H1'\alpha}$= 174 Hz, $J_{C1,\ H1\alpha}$= 173 Hz ESI-MS: *m/z* $C_{16}H_{32}NO_9$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 382.2072; 측정치, 382.2071.

[0339]

[0340] **실시예 3A: 결과 및 논의**

[0341] *3-O-메틸 D-람노스 합성:* D-람노스는 정크 등 (Zunk et. al.)과 기타 연구자들이 설명한 대로 [28-31] 약간의 변형을 가하여 처음으로 합성되었다 (**도 22**에 나타낸 반응식 1). D-만노스의 아세틸화 후 아노머 벤질화를 통해 2단계에 걸쳐 49% 수율로 1-*O*-벤질 유도체 **1**이 생성되었다. **1**의 조생성물 정제 및 나트륨 메톡시드 처리 후, C6에서 요오드화하여 우수한 수율로 요오드화물 **2**를 생성하였다. 수산화팔라듐과 수소 기체로 **2**를 환원시키면 100% 수율로 D-람노스 유도체 **3**이 생성되었다. ^{1}H NMR 스펙트럼의 1.28 ppm에서 이중항이 발견되어 C6에서 탈수산화 반응이 확인되었다. D-람노스 유도체 **3**의 2,3-*O*-아세토나이드 보호 후, *O*-4 벤질화에 의해 2단계 동안에

90% 수율로 **4**를 수득하였다. 아세토나이드 탈보호 후 디올 **5**를 수득하였다. 그 후, 산화디부틸틴 처리를 통한 선택적 3-*O* 메틸화 및 불화세슘과 요오드화메틸과의 반응으로 2단계에 걸쳐 우수한 수율 (91%)로 **6**을 수득하였다 [32]. *O*-메틸 단일항과 C3 간의 장거리 HMBC 결합을 통해 메틸의 위치선택적 도입이 확인되었다. 중간체 **6**의 전반적인 탈보호로 2단계에 걸쳐 59% 수율로 3-*O*-메틸 D-람노스 7을 수득하였다 (HRMS *m/z* $C_7H_{14}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 201.0739; 측정치, 201.0734).

[0342] *3-O-메틸 L-람노스의 합성:* 자연적으로 풍부하고 저렴한 L-람노스는 아세틸화 및 티오크레졸과의 반응 후 우수한 수율로 티오글리코사이드 공여체 **8**로 전환되었다 [31-36]. 젬플렌 (Zemplen) 조건 하의 탈아세틸화와 아세토나이드 보호 후 중간체 **9**를 수득하였다. 벤질화와 아세토나이드 탈보호로 매우 높은 수율의 디올의 **10**이 생성되었다. 산화디부틸틴을 사용하여 3-*O*를 선택적으로 메틸화한 다음, 불화세슘과 요오드화메틸로 처리하여 2단계에 걸쳐 55% 수율로 메틸화된 유도체 **11**을 생성하였다. 이전에 중간체 **6**에 대해 설명한 바와 같이, *O*-메틸 단일항과 C3 간의 강한 장거리 신호를 통해 해당 반응의 위치선택성을 확인하였다. 아세톤과 물에 *N*-브로모숙신이미드를 첨가하여 71% 수율로 헤미아세탈 **12**를 얻었다. 아세틸화에 이은 벤질 환원과 이후의 탈아세틸화로 3단계에 걸쳐 24% 수율로 3-*O*-메틸 L-람노스 **13**을 수득하였다 (HRMS *m/z* $C_7H_{14}NaO_5$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 201.0733; 측정치, 201.0735) (**도 23**에 나타낸 반응식 2).

[0343] *3-O-메틸 D-람노스 올리고사카라이드의 합성:* 현재 다루고 있는 순수한 D-거울상이성질체 중간체 **6**에 대해, HCl과 아세토니트릴 혼합물로 6의 아노머 탈보호를 통해 65% 수율로 헤미아세탈 **14**를 생성하였다. 그 후, **14**를 아세틸화한 후 티오크레졸과 BF_3OEt_2로 처리하여 우수한 수율로 공여체 **16**을 생성하였다. 그런 다음, 벤질화된 중간체 **15**를 수소화한 후 수용체 **17**을 우수한 수율 (96%)로 생성하였다. *N*-요오드숙신이미드와 트리플산으로 활성화된 **16**과 17 간의 후속 글리코실화 반응으로 53% 수율 (α의 경우만)의 디사카라이드 **18 디**가 생성되었다. H1'과 C4 간의 장거리 HMBC 신호도 결합을 추가로 확인시켜 주었다. 생성된 추가의 인접 C1', H1' 결합 상수 ($J_{C1', H1'}$ = 179 Hz)는 α-배열을 나타내며, 이는 과거의 문헌 데이터 [34]와 일치한다. ^{1}H NMR 스펙트럼 벤질 영역에서 신호가 나타나지 않는 것에서 알 수 있듯이, 디사카라이드 수용체 **19 디**는 벤질 탈보호 후 형성되었다. 반복적인 글리코실화 반응과 수소화 반응을 거쳐 최종적으로 펜타사카라이드 **18 펜타**가 수득되었다. 반응식 3 (**도 24**)에 나타난 바와 같이, 각각의 반복적인 글리코실화는 약간 더 적은 양의 각 올리고사카라이드를 생성하였다. 벤질 제거율은 지속적으로 높게 유지되어, 올리고사카라이드의 길이에 관계없이 수율(90-100%)이 유지되었다. 젬플렌 조건 하에 **19 펜타**의 최종적인 탈보호를 통해 D-만노스로부터 100% 수율과 1.0%의 전체 수율로 표적 펜타사카라이드 **1**을 수득하였다. 표적인 **19 디**, **19 트리** 및 **19 테트라**도 젬플렌 조건 하에서 탈보호시켜 화합물 **20 디, 20 트리** 및 **20 테트라**를 우수한 수율로 생성하였다.

[0344] *2-아미노에틸 핸들 글리코실화:* 단백질에 올리고사카라이드를 접합시켜 접합체 백신을 제조하기 위해, 통상적인 접근 방식은 핸들을 사용하여 올리고사카라이드의 환원성 말단을 글리코실화하는 것이다 [37, 38]. *N*-boc 에탄올아민을 이용한 중간체 **16**의 글리코실화를 통해 우수한 수율로 중간체 **21**이 생성되었다 (**도 25**에 나타낸 바와 같은 반응식 4). H1과 인접한 링커 CH_2 간의 장거리 HMBC 신호도 결합을 추가로 확인시켜 주었다. 상기 생성된 인접 C1, H1 결합 상수는 α-배열과 일치하였다 [34]. Pd/C를 이용한 벤질 탈보호로 62%의 수율로 화합물 **22**가 수득되었고; 화합물 **22**를 **16**으로 글리코실화하여 53%의 수율로 **23**을 얻었다. **23**의 전반적인 탈보호로 최종 표적인 **24**가 100% 수율로 생성되었다.

[0345] **실시예 4: HSA와의 *녹농균* 메틸화된 람난 합성 펜타*사카*라이드 접합체 (핸들 또는 링커 없음)**

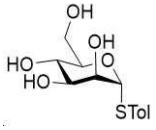
[0346] 물에 녹인 HSA 1.25 mg에 실시예 3에 따라 제조된 메틸화된 람난 합성 펜타사카라이드 5 mg (핸들 또는 링커 없음)을 20% 메탄올 300 μl에 첨가하였다. 그런 다음, 이것을 실온에 1시간 동안 놔둔 후 동결건조시켰다. 동결건조된 물질을 0.5 M 황산나트륨과 15 mg/ml의 시아노수소화붕소나트륨을 함유한 0.2M 붕산나트륨 300 μl에 즉시 용해시키고, 55℃에서 72시간 동안 방치하였다. Millipore 울트라-15 30K MWCO 스핀 컬럼을 사용하여 상기 샘플을 물로 전환하였다 (물로 3회 회전). 일부 샘플을 MALDI와 SDS-PAGE로 확인하였고, 나머지는 동결건조 (1.1 mg)하여 마우스 면역화에 사용될 때까지 -20℃에 보관하였다. 6마리의 Balb/C 마우스들을 아주반트를 첨가한 당접합체의 1차 면역화와 2회의 추가의 면역화 일정을 통해 면역화하였다. 2차 추가 접종 후의 혈청을 ELISA를 통해 LPS와 *녹농균*의 전세포에 대한 교차 반응성을 조사하였다.

[0347] SDS-PAGE는 HSA 분자와 접합체의 이동에서의 변화에 의해 접합을 나타내었다 (**도 26a** 및 **26b**). MALDI 분석 결과, 각 펜타사카라이드 단위가 872 amu이기 때문에 약 5 kDa의 질량 증가로 인해 약 6개의 펜타사카라이드가

HSA에 접합된 것으로 나타났다 (**도 27**). ELISA 분석 결과, 상기 유래된 혈청은 *녹농균*의 LPS (**도 28a** 내지 **28f**)와 사멸된 전세포 (**도 29**)를 인식하는 것으로 나타났는데, 이는 합성 펜타사카라이드의 당접합체가 전세포에서 정교화된 표적 *녹농균* 에피토프를 인식하는 데 필요한 반응을 달성할 수 있는 능력을 보여준 것이다.

[0348] **실시예 5: 핸들 및 선택적으로 링커를 갖는 3-O-메틸 트리-, 테트라- 및 펜타-람노스 올리고사카라이드의 합성**

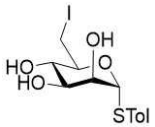
[0349] **도 30**을 참조한다. Boc로 보호된 아미노에틸 핸들은 티오톨루엔 중간체 **S8** (상기 **16**과 동일)에 84% 수율로 부착되었다. 그런 다음, 수소화 조건 하에 벤질 보호기 제거로 공여체 **S10** (상기 **22**와 동일)이 우수한 수율로 수득되었다. 티오톨루엔으로 보호된 **S8** (상기 **16과** 동일)을 사용한 반복적인 1,4 글리코실화에 이어서, 4-*O*-벤질 탈보호로 S11 (상기 **23**과 동일), **S13**, **S15** 및 **S17**이 생성되었다. **S13**, **S15** 및 **S17**의 정량적 4-*O*-벤질 탈보호와 나트륨 메톡시드를 사용한 탈아세틸화, 그리고 TFA를 사용한 Boc 탈보호로 **S19** (상기 **24**와 동일), **S20** 및 **S21**이 생성되었다. 상기 화합물들을 추가의 정제없이, 반-분취용 역상 정제 후에 활성화된 N-하이드록시숙신이미드와 헤미아세탈 보호된 알데히드를 함유하는 2가 링커와 접합시켰다 (반응식 5, **도 30** 참조).

[0350] 

[0351] *p*-톨릴 1-티오-α-D-만노피라노시드 (**S1**)

[0352] 2000 mL의 둥근 바닥 플라스크에, 아세틸화된 만노스 (142.5 g, 365.1 mmol)를 무수 CH_2Cl_2 800 mL에 녹인 후, 상기 용액을 N_2 분위기 하에 0℃로 냉각시켰다. 다음으로, 티오크레졸 (63.5 g, 511.0 mmol)을 첨가한 후, 삼불화붕소 디에틸 에테레이트 (63.1 mL, 511.0 mmol)를 첨가하고, 상기 용액을 실온에서 48시간 동안 교반하였는데, 이때 TLC로 반응 완료를 확인하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 물 (2 x 200 mL)과 $NaHCO_3$ (2 x 200 mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하여 Na_2SO_4로 건조시킨 후, 여과하고 감압 하에 증발시켰다. 그런 다음, 미정제 생성물을 무수 MeOH 1000 mL에 녹인 후 0℃로 냉각하였다. 그런 다음, 나트륨 금속 (0.873 g, 36.4 mmol)을 첨가하고, 상기 반응 혼합물을 반응이 완료되기 전까지 30시간 동안 RT에서 교반하였다. 상기 용액을 Dowex H^+로 중화시키고, 여과한 후, 증발시켰다. 그 후, 미정제 생성물을 물 (500 mL)에 녹인 후, CH_2Cl_2 (3 x 150 mL)로 추출하였다. 다음으로, 수층을 증발시켜 밝은 녹색 분말인 **S1**을 수득하였다 (96.86 g, 245 mmol, 2단계 동안 67%).

[0353] Rf = 0.65 ($MeOH/CH_2Cl_2$, 15/85, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 2.5 (*c* 0.16, MeOH) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.39 (d, 2H), 7.11 (d, 2H), 5.33 (s, 1H), 4.08-3.98 (m, 2H), 3.83-3.62 (m, 3H), 3.29 (s, 1H), 2.29 (s, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 138.9, 133.5 (2C), 132.1, 130.8 (2C), 90.8, 75.5, 73.7, 73.1, 68.7, 62.6, 21.1 ESI-MS: *m/z* $C_{13}H_{18}O_5NaS$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 309.0767; 측정치, 309.0769.

[0354] 

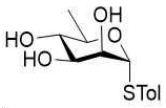
[0355] *p*-톨릴 6-요오드-1-티오-α-D-만노피라노시드 (**S2**)

[0356] 화합물 **S1** (96.86 g, 338.2 mmol)을 무수 THF (600 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 N_2 하에 60℃에서 환류시켰다. 다음으로, 트리페닐포스핀 (133.05 g, 507.3 mmol), 이미다졸 (46.04 g, 676.4 mmol) 및 I_2 (128.76 g, 507.3 mmol)를 서서히 첨가하였다. 요오드의 보라색이 지속되는 10분 후에 반응이 완료되었다. 그 후, 상기 용액을 실온까지 냉각시키고 감압 하에 농축하였다. 상기 미정제 혼합물을 에틸 아세테이트 (600 mL)에 녹인 후 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 150 mL)와 물(2 x 150 mL)로 세척하였다. 다음으로, 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후, 여과하고, 증발시키고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: $MeOH/CH_2Cl_2$, 1/5, V/V)로 정제하여 화합물 **S2**를 백색 고

체로서 수득하였다 (87.37 g, 220.5 mmol, 65%).

Rf = 0.65 (MeOH/CH_2Cl_2, 1/9, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ -2.1 (*c* 0.041, MeOH) ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.47 (d, 2H), 7.14 (d, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.93 (dd, 1H), 3.67-3.52 (m, 3H), 3.31 (s, 1H), 2.32 (s, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 138.9, 133.4 (2C), 132.2, 130.7 (2C), 91.0, 74.9, 73.8, 72.7, 72.6, 21.1, 6.0 ESI-MS: *m/z* $C_{13}H_{17}O_4INaS$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 418.9784; 측정치, 418.9786.

[0357]



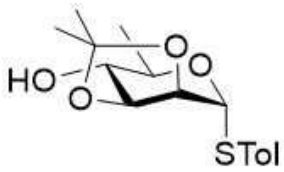
[0358]

[0359] *p*-톨릴 1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S3**)

[0360] 화합물 **S2** (1.76 g, 4.44 mmol)를 MeOH (30 mL)에 용해시키고 상기 용액에 $Pd(OH)_2$ (0.39 g, 2.76 mmol)를 채운 후, 상기 용액을 H_2로 버블링하였다. 다음으로, *N,N*-디이소프로필 에틸 아민 (1.8 mL, 10.3 mmol)을 첨가하고 상기 용액을 H_2 분위기 하에 6시간 동안 교반하여 반응을 완료하였다. 이후, 상기 용액을 셀라이트 패드로 여과하고, 증발시킨 뒤, 섬광 크로마토그래피 (용출액: MeOH/CH_2Cl_2, 1/5, V/V)로 정제하여 화합물 **S3**을 투명한 오일로 수득하였다 (0.65 g, 2.40 mmol, 54%).

Rf = 0.50 (MeOH/CH_2Cl_2, 1/9, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 0.91 (*c* 0.043, MeOH) ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.35 (d, 2H), 7.14 (d, 2H), 5.29 (s, 1H), 4.10-4.00 (m, 2H), 3.64 (dd, 1H), 3.45 (dd, 1H), 3.31 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.26 (d, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 138.8, 133.3 (2C), 132.2, 130.8 (2C), 90.6, 74.2, 73.8, 72.9, 72.6, 21.1, 17.8 ESI-MS: *m/z* $C_{13}H_{18}O_4NaS$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 293.0818; 측정치, 293.0818.

[0361]

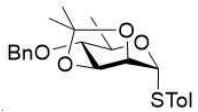


[0362]

[0363] *p*-톨릴 2,3-*O*-이소프로필리덴-1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S4**)

[0364] 화합물 **S3** (10.16 g, 37.6 mmol)을 무수 아세톤 250 mL에 용해시켰다. 상기 용액에, 2,2-디메톡시프로판 (8.29 mL, 67.6 mmol)과 p-톨루엔설폰산 일수화물 (0.71 g, 0.376 mmol)을 첨가하고, 상기 반응 혼합물을 RT에서 3시간 동안 교반한 후 반응을 완료하였다. 상기 용액을 감압 하에 증발시키고, 에틸 아세테이트 (300 mL)에 녹인 후, 포화 $NaHCO_3$ (2 x 100 mL)로 세척하였다. 혼합된 유기층을 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과한 후, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)으로 정제하여 화합물 **S4**를 백색 고체로서 수득하였다 (10.68 g, 34.4 mmol, 92%). 스펙트럼 데이터는 문헌 값들과 일치하였다.[1]

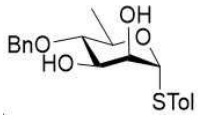
[0365]



[0366] *p*-톨릴 4-*O*-벤질-2,3-*O*-이소프로필리덴-1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S5**)

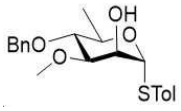
[0367] 화합물 **S4** (10.68 g, 34.4 mmol)를 무수 DMF (150 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 0℃로 냉각시켰다. 다음으로, NaH (2.06 g, 51.6 mmol)를 분할하여 첨가하고 상기 용액을 30분간 교반하였다. 벤질 브로마이드 (4.91 mL, 41.3 mmol)를 적가하고, 상기 용액을 RT에서 2시간 동안 교반하여 반응을 완료하였다. Et_3N (10 mL)을 첨가하여 상기 반응을 완전히 종결시킨 다음, 포화된 차가운 NH_4Cl (400 mL) 용액에 부었다. 상기 용액을 0℃에서 1시간 동안 교반한 후, 여과하였다. 고체들을 수집해 고진공 하에 건조시켜 베이지색 고체인을 **S5** (13.43 g,

33.5 mmol, 98%)를 수득하였다. 스펙트럼 데이터는 문헌 값들과 일치하였다.[2]

[0368] 

[0369] *p*-톨릴 4-*O*-벤질-1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S6**)

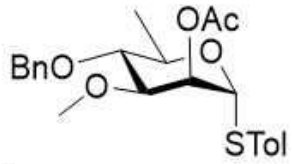
[0370] 화합물 **S5** (1.09 g, 2.72 mmol)를 AcOH의 80% (v/v) 용액 (10 mL)에 용해시키고 실온에서 밤새 교반하였다. 그런 다음, 상기 용액을 오일조에서 55℃로 3시간 동안 가열하여 반응을 완료시키도록 하였다. 그 후, 상기 용액을 감압 하에 증발시키고, 톨루엔 (4 x 30 mL)과 함께 공증발시켜 **S6** (909 mg, 2.52 mmol, 92%)을 투명한 오일로 수득하였다. 스펙트럼 데이터는 문헌 값들과 일치하였다.[2]

[0371] 

[0372] *p*-톨릴 4-O-벤질-3-O-메틸-1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S7**)

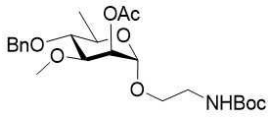
[0373] 화합물 **S6** (14.3 g, 39.7 mmol)을 톨루엔 (3 x 100 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 그런 다음, **S6**를 무수 톨루엔 (400 mL)에 용해시키고, N_2 기체로 퍼징한 후 산화디부틸틴 (IV) (11.85 g, 47.6 mmol)으로 채웠다. 이후, 상기 반응 혼합물을 16시간 동안 환류 교반하고, 실온으로 냉각한 후, 감압 하에 증발시켰다. 상기 미정제 주석 아세탈을 5시간 동안 고진공 상태로 두고, 무수 DMF (793 mL) 중에 용해시킨 후 N_2로 퍼징하였다. 불화세슘 (9.00 g, 59.6 mmol)과 요오드메탄 (28.15 mL, 396.6 mmol)을 첨가하고 상기 반응 혼합물을 N_2 하에 40℃에서 16시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 RT로 냉각하고, EtOAc (350 mL)로 희석한 후, 물 (5 x 150 mL), 포화 $NaHCO_3$ (150 mL) 및 염수 (150 mL)로 세척하였다. 이후, 혼합된 유기층은 Na_2SO_4로 건조한 다음, 증발시키고 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 **S7**을 투명한 오일 (10.87 g, 29.0 mmol, 73%)로 수득하였다.

[0374] Rf = 0.40 (EtOAc/헥산, 3/7, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 8.2 (*c* 0.38, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3Cl): δ 7.40-7.27 (m, 8H), 7.11 (d, 2H), 5.47 (d, 1H), 4.86 (d, 1H). 4.64 (d, 1H), 4.30 (dd, 1H), 4.20 (dq, 1H), 3.58 (dd, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.44 (dd, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.28 (br. s, 1H), 1.30 (d, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3Cl): δ 138.6. 137.8, 132.2 (2C), 130.4, 130.0 (2C), 128.6 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 87.6, 82.1, 80.2, 75.4, 69.5, 68.6, 57.6, 21.2, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{21}H_{26}O_4NaS$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 397.1444; 측정치, 397.1444.

[0375] 

[0376] *p*-톨릴 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-1-티오-α-D-람노피라노시드 (**S8** (상기 **16**과 동일))

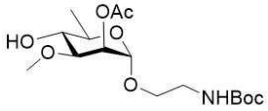
[0377] 화합물 **S7** (10.85 g, 29.0 mmol)을 아세트산 무수물 (20 mL)과 피리딘 (20 mL)에 용해시키고, 상기 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 그 후, 상기 용액을 감압 하에 증발시키고, 톨루엔 (5 x 30 mL)과 함께 공증발시켰다. 이어서, 상기 미정제 오일을 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S8** (10.77 g, 25.9 mmol, 89%)을 수득하였다. 스펙트럼 데이터는 문헌 값들과 일치하였다.[3]

[0378] 

[0379] 2-(*3급*-부틸옥시카보닐아미도)에틸 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S9** (상기 **21**과 동일))

[0380] 화합물 **S8** (46.4 mg, 0.11 mmol)과 *N*-boc-에탄올아민을 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 CH_2Cl_2 (5 mL)를 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.1 g을 첨가하고, 상기 반응 혼합물을 N_2 기체 분위기 하에 -78℃로 냉각시켰다. 다음으로, *N*-요오드숙신이미드 (33.7 mg, 0.12 mmol)를 첨가한 다음, 트리플산 (10.0 μL, 0.12 mmol)을 첨가하고, 상기 반응을 3시간 동안 교반하여 반응을 완료하였다. 상기 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (10 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 10 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ 용액 (10 mL)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S9** (42.0 mg, 0.093 mmol, 84%)를 수득하였다.

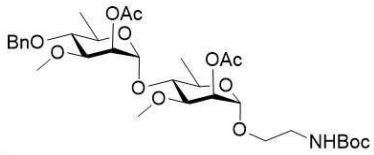
[0381] Rf = 0.55 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 108.8 (*c* 2.3, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.45-7.36 (m, 5H), 4.89 (d, 1H), 4.84 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.63 (dd, 1H), 3.49-3.44 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.36-3.30 (m, 1H), 3.35 (dd, 1H), 3.30-3.21 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 170.5, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.0 (2C), 127.8, 97.8, 80.1, 79.9, 75.4, 68.6, 67.8, 67.3, 57.6, 40.3, 28.5, 21.1, 18.0 ESI-MS: *m/z* $C_{23}H_{35}NO_8H$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 454.2435; 측정치, 454.2435.

[0382] 

[0383] 2-(*3급*-부틸옥시카보닐아미도)에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S10** (상기 **22**와 동일))

[0384] 탄소상의 수산화팔라듐 (1.00 g, 7.00 mmol)을 MeOH (20 mL)에 첨가하고, 상기 용액을 H_2로 30분간 버블링하였다. 다음으로, 화합물 **S9** (1.37 g, 3.02 mmol)를 첨가하고, 상기 용액을 RT에서 3시간 동안 H_2의 연속 유동 하에 교반하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 **S10** (1.07 g, 2.94 mmol, 98%)을 수득하였다.

[0385] Rf = 0.35 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 9.6 (*c* 0.28, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD): δ 5.29 (s, 1H), 4.78 (br. s, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.76-3.65 (m, 2H), 3.54-3.47 (m, 2H), 3.46 (dd, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.38-3.36 (m, 2H), 2.34 (br. s, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.33 (d, 3H) ^{1}H NMR (125 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD): δ 170.4, 155.9, 98.0, 79.5, 71.6, 68.3, 67.5, 67.2, 57.3, 40.3, 28.4, 20.9, 17.7 ESI-MS: *m/z* $C_{16}H_{29}NO_8H$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 364.1966; 측정치, 364.1963.

[0386] 

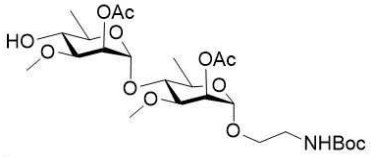
[0387] 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S11** (상기 **23**과 동일))

[0388] 화합물 **S10** (1.07 g, 2.93 mmol)과 **S8** (1.47 g, 3.53 mmol)을 톨루엔 (5 x 20 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 염화메틸렌 (50 mL)을 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.500 g을 첨가

하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 N_2의 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (1.13 g, 4.11 mmol)를 첨가한 다음, 트리플산 (0.50 mL, 5.66 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 100 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S11** (1.56 g, 2.38 mmol, 81%)을 수득하였다.

Rf = 0.65 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 66.8 (*c* 1.0, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.27 (m, 5H), 5.35 (dd, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.12 (d, 1H), 4.89 (d, 1H), 4.82 (br. s, 1H), 4.69 (d, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.86-3.77 (m, 1H), 3.75-3.66 (m, 1H), 3.66-3.55 (m, 1H), 3.55-3.45 (m, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.39-3.33 (m, 2H), 3.33-3.23 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 6H) ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.4, 170.2, 155.9, 138.6, 128.4 (2C), 128.0 (2C), 127.8, 99.4, 97.8, 80.1, 80.0, 79.9, 78.3, 75.4, 68.7, 68.5, 67.9, 67.3, 67.1, 57.6, 57.4, 40.3, 28.5, 21.2, 21.0, 18.2, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{32}H_{49}NNaO_{13}$ $[M+Na]^+$에

[0389] 대한 계산치, 678.3096; 측정치, 678.3092.

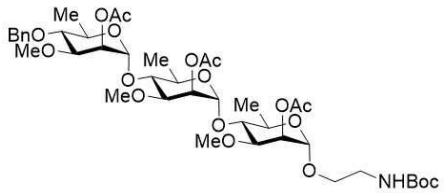
[0390] 

[0391] 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S12**)

[0392] 탄소상의 수산화팔라듐 (1.20 g, 8.55 mmol)을 MeOH (50 mL)에 첨가하고, 상기 용액을 H_2로 30분간 버블링하였다. 다음으로, 화합물 **S11** (1.71 g, 2.61 mmol)을 첨가하고, 상기 용액을 RT에서 3시간 동안 H_2의 연속 유동 하에 교반하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 **S12** (1.47 g, 2.59 mmol, 99%)를 수득하였다.

Rf = 0.20 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 1.07 (*c* 0.33, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.36 (dd, 1H), 5.31-5.26 (m, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.82 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.84-3.75 (m, 1H), 3.75-3.62 (m, 1H), 3.58-3.44 (m, 4H), 3.43-3.34 (m, 8H), 3.34-3.21 (m, 1H), 2.38 (br. s, 1H), 2.12-2.08 (m, 6H), 1.46 (s, 9H), 1.35-1.29 (m, 6H) ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 170.5, 170.2, 155.9, 99.8, 97.9, 80.1, 79.7, 79.5, 78.4, 77.4, 71.7, 69.0, 67.9, 67.5, 67.4, 67.2, 57.5, 57.3, 40.4, 28.6, 21.2, 21.1, 18.3, 17.7 ESI-MS: *m/z* $C_{32}H_{43}O_{13}NH$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 566.2807;

[0393] 측정치, 566.2788.

[0394] 

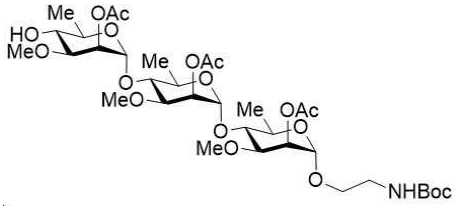
[0395] 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S13**)

[0396] 화합물 **S12** (1.46 g, 2.57 mmol)와 **S8** (1.29 g, 3.10 mmol)을 톨루엔 (5 x 20 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 염화메틸렌 (50 mL)을 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.400 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 N_2의 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (990.0 mg,

3.60 mmol)를 첨가한 다음, 트리플산 (0.40 mL, 4.52 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 100 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S13** (1.65 g, 1.92 mmol, 75%)을 수득하였다.

Rf = 0.45 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 2.0 (*c* 0.46, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.35 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.88 (d, 1H), 4.83 (br. s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.85-3.71 (m, 1H), 3.77-3.65 (m, 3H), 3.59 (dd, 1H), 3.56-3.45 (m, 5H), 3.44 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.38-3.33 (m, 2H), 3.32-3.26 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.33-1.30 (m, 6H), 1.28 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 170.4, 170.2, 170.1, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 127.8, 99.5, 97.9, 80.1, 80.0, 80.0, 78.7, 78.4, 75.5, 68.7, 68.5, 68.0, 67.9, 67.8, 67.3, 67.1, 57.6, 57.5, 57.3, 40.4, 28.5, 21.2, 21.1, 18.3, 18.1, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{41}H_{63}O_{18}NNa$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 880.3937; 측정치, 880.3943.

[0397]



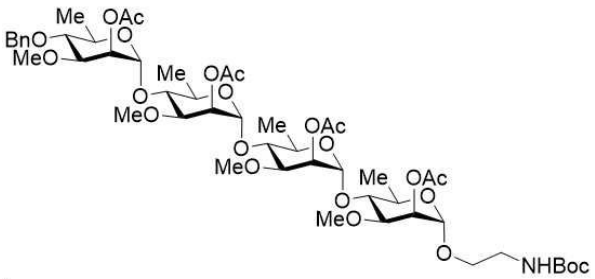
[0398]

[0399] 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S14**)

[0400] 탄소상의 수산화팔라듐 (807.0 mg, 5.67 mmol)을 MeOH (50 mL)에 첨가하고, 상기 용액을 H_2로 30분간 버블링하였다. 다음으로, 화합물 **S13** (1.65 g, 1.92 mmol)을 첨가하고, 상기 용액을 RT에서 3시간 동안 H_2의 연속 유동하에 교반하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 **S13** (1.57 g, 1.89 mmol, 98%)을 수득하였다.

Rf = 0.20 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 2.3 (*c* 0.51, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.40 (dd, 1H), 5.36 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.10 (d, 1H), 5.06 (d, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.81-3.75 (m, 2H), 3.75-3.71 (m, 1H), 3.69 (dd, 1H), 3.57 (dd, 1H), 3.53-3.45 (m, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.35-3.32 (m, 4H), 3.32-3.24 (m, 2H), 2.13-2.11 (m, 6H), 2.10 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.33-1.30 (m, 6H), 1.29 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 171.7 (2C), 171.6, 158.5, 101.0, 100.8, 98.7, 81.5, 81.3, 80.8, 80.4, 79.6, 72.9, 72.9, 70.8, 69.6, 69.3, 69.2, 69.0, 68.0, 67.5, 58.0, 57.7, 41.1, 28.9, 20.7, 18.6, 18.5, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{34}H_{57}O_{18}NNa$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 790.3468; 측정치, 790.3462.

[0401]



[0402]

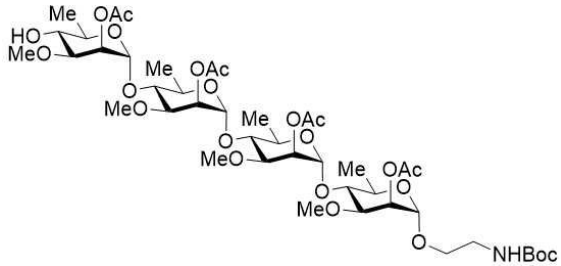
[0403] 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-

2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S15**)

[0404] 화합물 **S14** (1.45 g, 1.89 mmol)와 **S8** (943.9 mg, 2.27 mmol)을 톨루엔 (5 x 20 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 염화메틸렌 (50 mL)을 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.400 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 N_2의 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (727.0 mg, 2.64 mmol)를 첨가한 다음, 트리플산 (0.35 mL, 3.96 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 100 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S15** (1.49 g, 1.41 mmol, 74%)를 수득하였다.

Rf = 0.40 (EtOAc/헥산, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 1.7 (*c* 0.31, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.35 (s, 3H), 5.28 (s, 1H), 5.13-5.06 (m, 3H), 4.89 (d, 1H), 4.83 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.87-3.63 (m, 5H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.57-3.46 (m, 7H), 3.44 (s, 3H), 3.41-3.24 (m, 13H), 2.15-2.04 (m, 12 H), 1.46 (s, 9H), 1.35-1.26 (m, 12H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.3, 170.2, 170.1, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 99.6, 99.5, 97.9, 80.1, 80.0, 79.9, 79.7, 78.9, 78.4, 77.4, 75.5, 68.7, 68.5, 68.1, 68.0, 67.9, 67.8, 67.7, 67.3, 67.1, 40.4, 28.6, 21.3, 21.2, 18.4, 18.2, 18.1, 18.0 ESI-MS: *m/z* $C_{50}H_{77}NO_{23}H$ $[M+H]^+$에

[0405] 대한 계산치, 1060.4959; 측정치, 1060.4977.

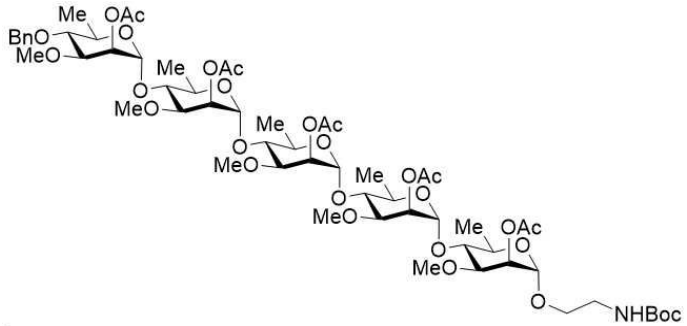
[0406] 

[0407] 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S16**)

[0408] 탄소상의 수산화팔라듐 (720.0 mg, 5.13 mmol)을 MeOH (50 mL)에 첨가하고, 상기 용액을 H_2로 30분간 버블링하였다. 다음으로, 화합물 **S15** (1.42 g, 1.34 mmol)를 첨가하고, 상기 용액을 RT에서 3시간 동안 H_2의 연속 유동하에 교반하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 **S16** (1.30 g, 1.34 mmol, 100%)을 수득하였다.

Rf = 0.15 (EtOAc/헥산, 3/2, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 3.4 (*c* 0.67, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.42 (dd, 1H), 5.40 (dd, 1H), 5.38 (dd, 1H), 5.33 (dd, 1H), 5.10 (d, 1H), 5.08 (d, 1H), 5.06 (d, 1H), 4.75 (d, 1H), 3.90-3.82 (m, 2H), 3.82-3.76 (m, 2H), 3.76-3.72 (m, 1H), 3.72-3.66 (dd, 1H), 3.62-3.55 (m, 2H), 3.55-3.46 (m, 4H), 3.46-3.43 (s, 3H), 3.43-3.36 (m, 11H), 3.33-3.22 (m, 2H), 2.14-2.11 (m, 9H), 2.11 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.36-1.31 (m, 9H), 1.30 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 171.7 (2C), 171.6 (2C), 158.5, 101.0, 100.9, 100.8, 98.7, 81.4, 81.3, 81.2, 80.9, 80.3, 80.2, 80.0, 79.6, 72.9, 70.7, 69.6, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.9, 68.0, 67.6, 58.0, 57.6, 41.1, 29.0, 20.7, 18.6, 18.5, 18.4, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{43}H_{71}O_{23}NNa$ $[M+Na]^+$에 대한

[0409] 계산치, 992.4309; 측정치, 992.4313.



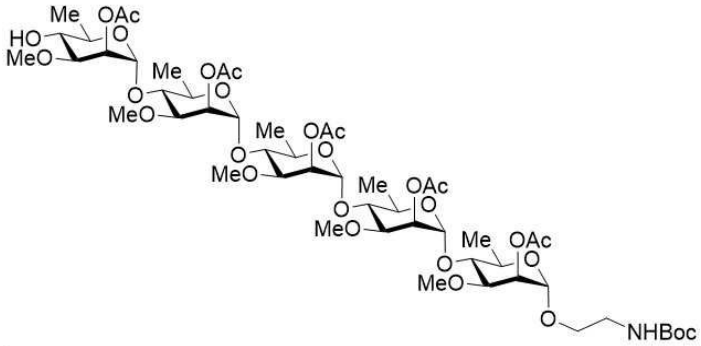
[0410]

[0411] 2-*O*-아세틸-4-*O*-벤질-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S17**)

[0412] 화합물 **S16** (878.9 mg, 0.91 mmol)과 **S8** (452.9 mg, 1.09 mmol)을 톨루엔 (5 x 20 mL)과 함께 공증발시키고 고진공 상태에서 밤새 건조시켰다. 무수 염화메틸렌 (50 mL)을 첨가한 다음, 활성화된 분말 3Å 분자체 0.200 g을 첨가하였다. 이후, 상기 반응 혼합물을 N_2의 분위기 하에 -78℃로 냉각시킨 뒤, *N*-요오드숙신이미드 (348.8 mg, 1.27 mmol)를 첨가한 다음, 트리플산 (0.15 mL, 1.70 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응이 완료되기 전에 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 부흐너 깔때기를 통해 여과하고, CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석한 뒤, 10% $Na_2S_2O_3$ (2 x 50 mL) 및 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조한 다음, 여과하고, 섬광 크로마토그래피 (용출액: EtOAc/헥산, V/V)로 정제하여 투명한 오일인 화합물 **S17** (693.0 mg, 0.55 mmol, 64%)를 수득하였다.

Rf = 0.50 (EtOAc/헥산, 3/2, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 1.5 (*c* 0.27, $CHCl_3$) ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.39-7.27 (m, 5H), 5.33 (s, 4H), 5.28 (s, 1H), 5.10 (s, 4H), 4.88 (d, 1H), 4.83 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.86-3.54 (m, 6H), 3.62-3.46 (m, 10H), 3.44 (s, 3H), 3.41-3.34 (m, 13H), 3.34-3.23 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.36-1.22 (m, 15H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 99.7, 99.6, 99.5, 99.4, 97.9, 80.1, 80.0, 79.9, 79.7, 78.8, 78.5, 78.3, 78.3, 77.4, 75.5, 68.7, 68.5, 68.0, 67.9, 67.8, 67.7, 67.3, 67.0, 57.6, 57.5, 57.4 (2C), 57.3, 40.4, 28.5, 21.2, 21.1, 18.4, 18.3, 18.2, 18.1, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{59}H_{91}O_{28}NH$ $[M+H]^+$에 대한 계산치,

[0413] 1262.5800; 측정치, 1262.5806.



[0414]

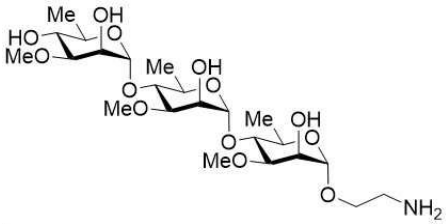
[0415] 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 2-*O*-아세틸-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S18**)

[0416] 탄소상의 수산화팔라듐 (300.0 mg, 2.14 mmol)을 MeOH (30 mL)에 첨가하고, 상기 용액을 H_2로 30분간 버블링하였다. 다음으로, 화합물 **S17** (623.3 mg, 0.49 mmol)를 첨가하고, 상기 용액을 RT에서 3시간 동안 H_2의 연속 유동 하에 교반하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 증발시켜 투명한 오일인 **S18** (537.0

mg, 0.46 mmol, 93%)을 수득하였다.

Rf = 0.25 (EtOAc/헥산, 3/2, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 0.12 (*c* 0.033, $CHCl_3$) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.44-5.41 (m, 3H), 5.39 (s, 1H), 5.34 (dd, 1H), 5.11 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 3.92-3.83 (m, 3H), 3.83-3.77 (m, 2H), 3.77-3.73 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H), 3.62-3.56 (m, 3H), 3.56-3.46 (m, 6H), 3.45 (3H), 3.45-3.38 (m, 15H), 3.34-3.24 (m, 2H), 2.14-2.12 (m, 12H), 2.11 (s, 3H), 1.52 (s, 9H), 1.36-1.32 (m, 12H), 1.31 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 171.7 (2C), 171.6 (3C), 158.4, 101.0, 100.8, 98.6, 81.4, 81.3, 81.2, 80.9, 80.3, 80.2, 81.1, 80.0, 79.6, 72.9, 70.7, 69.6, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.9, 68.0, 67.5, 58.0, 57.6, 41.1, 29.0, 20.7, 18.6, 18.5 (3C), 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{52}H_{85}O_{28}NNa$ $[M+Na]^+$에 대한 계산치, 1194.5150; 측정치, 1194.5153.

[0417]



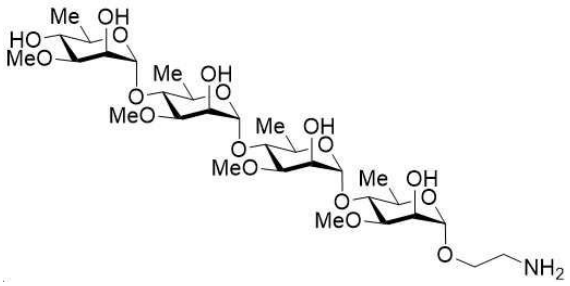
[0418]

[0419] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S19**)

[0420] 화합물 **S14** (755.0 mg, 0.98 mmol)를 MeOH (30.0 mL)에 용해시키고, 나트륨 금속 (15.0 mg, 0.65 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Dowex H^+로 중화시키고, 여과한 뒤 증발시켰다. 그런 다음, 상기 미정제 생성물을 CH_2Cl_2 (100 mL)와 트리플루오로아세트산 (5.8 mL)에 용해시키고, 실온에서 10분 동안 교반한 뒤, 감압 하에 증발시켜 베이지색 분말인 **S19** (532.4 mg, 0.98 mmol, 100%)를 수득하였다.

$[\alpha]_D^{25}$ 1.5 (*c* 0.52, CH_3OH) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.13 (s, 2H), 4.80 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 4.09 (s, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.80-3.74 (m, 2H), 3.67-3.51 (m, 4H), 3.52-3.45 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.41-3.35 (m, 1H), 3.29-3.24 (m, 1H), 3.25-3.15 (m, 2H), 1.32 (d, 3H), 1.30 (d, 3H), 1.26 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2, 103.1, 101.7, 83.1, 82.8, 82.0, 79.5, 79.3, 72.6, 70.5, 69.1, 68.7, 68.3, 68.0, 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6, 40.5, 18.7, 18.6, 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{23}H_{43}O_{13}NH$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 542.2807; 측정치, 542.2804.

[0421]



[0422]

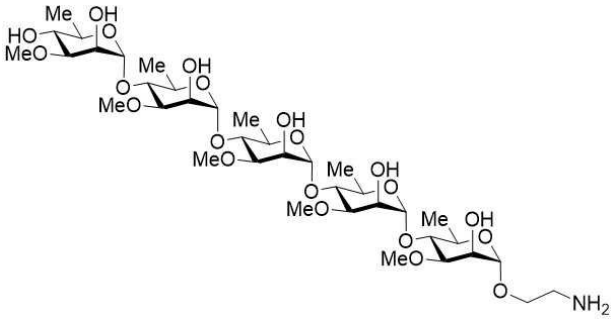
[0423] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (**S20**)

[0424] 화합물 **S16** (390 mg, 0.40 mmol)을 MeOH (30.0 mL)에 용해시키고, 나트륨 금속 (10 mg, 0.44 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Dowex H^+로 중화시키고, 여과한 뒤 증발시켰다. 그런 다음, 상기 미정제 생성물을 CH_2Cl_2 (50 mL)와 트리플루오로아세트산 (2.4 mL)에 용해시키고, 실온에서 10분 동

안 교반한 뒤, 감압 하에 증발시켜 베이지색 분말인 S20 (282.1 mg, 0.40 mmol, 100%)을 수득하였다.

$[\alpha]_D^{25}$ 1.1 (*c* 0.13, CH_3OH) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.14 (m, 3H), 4.81 (s, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.67-3.57 (m, 4H), 3.57-3.52 (m, 1H), 3.51-3.42 (m, 12H), 3.42-3.36 (m, 3H), 3.31-3.26 (m, 1H), 3.25-3.15 (m, 2H), 1.34 (d, 3H), 1.32-1.28 (m, 6H), 1.27 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2, 103.1, 103.0, 101.7, 83.1, 83.0, 82.8, 79.4, 79.3, 79.2, 72.6, 70.5, 69.1, 68.7, 68.4, 68.4, 68.0, 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6, 40.4, 18.7, 18.5 (2C), 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{30}H_{55}O_{17}NH$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 702.3543; 측정치, 702.3532.

[0425]



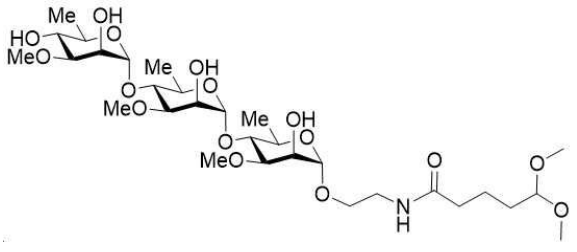
[0426]

[0427] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(3급-부톡시카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (S21)

[0428] 화합물 S18 (500 mg, 0.47 mmol)을 MeOH (30.0 mL)에 용해시키고, 나트륨 금속 (10 mg, 0.44 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Dowex H^+로 중화시키고, 여과한 뒤 증발시켰다. 그런 다음, 상기 미정제 생성물을 CH_2Cl_2 (50 mL)와 트리플루오로아세트산 (2.7 mL)에 용해시키고, 실온에서 10분 동안 교반한 뒤, 감압 하에 증발시켜 베이지색 분말인 S21 (402 mg, 0.47 mmol, 100%)을 수득하였다.

$[\alpha]_D^{25}$ 1.0 (*c* 0.26, CH_3OH) ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.15 (s, 4H), 4.80 (s, 1H), 4.14-4.12 (m, 1H), 4.12-4.08 (m, 4H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.81-3.74 (m, 3H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.67-3.58 (5H), 3.57-3.52 (dd, 1H), 3.50-3.38 (m, 19H), 3.31-3.28 (dd, 1H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.34 (d, 3H), 1.32-1.28 (m, 9H), 1.27 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 103.2, 103.1, 103.0 (2C), 101.7, 83.1 (3C), 82.8, 82.0, 79.4, 79.3, 79.2 (2C), 72.6, 70.5, 69.1 (2C), 68.7, 68.4, 67.4 (2C), 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6 (2C), 40.4, 18.7, 18.6 (3C), 17.9 ESI-MS: *m/z* $C_{37}H_{67}O_{21}NH$ $[M+H]^+$에 대한 계산치, 862.4278; 측정치, 862.4265.

[0429]



[0430]

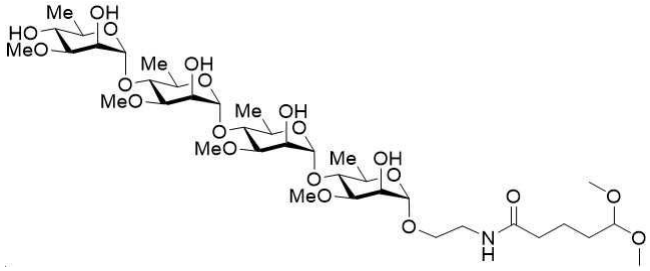
[0431] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (S22)

[0432] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5,5-디메톡시펜타노에이트 (239 mg, 0.92 mmol)를 무수 DMF (9.2 mL)에 용해시키고, 상기 용액에 화합물 S19 (50 mg, 92 μmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Et_3N 1방울을 첨가하여 반응을 완료시켰다. 샘플을 감압 하에 증발시키고 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증

발시켰다. 그 후, 상기 미정제 샘플을 H_2O (2 mL)에 현탁하고, $CHCl_3$ (5 x 1 mL)로 추출하였다. 수성층을 수집하여 증발시키고, HPLC (C-18, H_2O/MeOH)로 정제하여 백색 분말인 S22 (7.4 mg, 10.8 μmol, 12%)를 수득하였다.

^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.16-5.13 (m, 2H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 0.73H), 4.13-4.08 (m, 2H), 4.08-4.06 (m, 1H), 3.84-3.71 (m, 3.5H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.64-3.55 (m, 3H), 3.55-3.37 (m, 17H), 3.36-3.32 (m, 4H), 3.29 (dd, 1H), 2.26 (t, 1.6H), 1.73-1.60 (m, 3.3H), 1.33-1.25 (m, 9H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 176.2, 105.8, 103.2, 103.1, 101.3, 83.2, 83.1, 83.0, 82.0, 79.7, 79.2, 72.6, 70.5, 69.0, 68.3, 68.0, 67.6, 67.0, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1, 22.0, 18.7, 18.6, 17.8.

[0433]



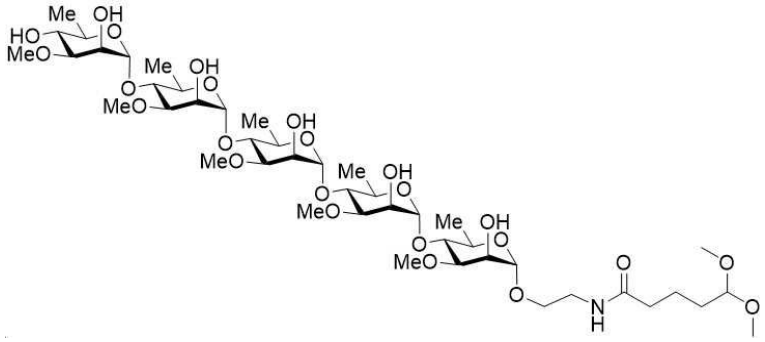
[0434]

[0435] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (S23)

[0436] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5,5-디메톡시펜타노에이트 (185 mg, 0.71 mmol)를 무수 DMF (7.1 mL)에 용해시키고, 상기 용액에 화합물 S20 (50.0 mg, 71.2 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Et_3N 1방울을 첨가하여 반응을 완료시켰다. 샘플을 감압 하에 증발시키고 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시켰다. 그 후, 상기 미정제 샘플을 H_2O (2 mL)에 현탁하고, $CHCl_3$ (5 x 1 mL)로 추출하였다. 수성층을 수집하여 증발시키고, HPLC (C-18, 용출액: H_2O/MeOH, V/V)로 정제하여 백색 분말인 S23 (11.0 mg, 13.0 μmol, 18%)을 수득하였다.

^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.16-5.13 (m, 3H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 1H), 4.13-4.09 (m, 3H), 4.07 (dd, 1H), 3.82-3.71 (m, 4H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.64-3.56 (m, 3H), 3.54-3.47 (m, 6H), 3.47-3.36 (m, 14H), 3.35-3.32 (m, 6H), 3.31 (dd, 1H), 2.26 (t, 2H), 1.72-1.61 (m, 4H), 1.34-1.25 (m, 12H) ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 176.0, 105.8, 103.2, 103.1, 103.0, 101.3, 83.1, 83.0, 82.9, 82.0, 79.8, 79.4, 79.2, 72.6, 70.5, 69.1, 69.0, 68.4, 68.3, 68.0, 67.7, 67.0, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1, 22.0, 18.7, 18.6 (2C), 17.9.

[0437]



[0438]

[0439] 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드-(1→4)-2-(2,2-디메톡시부틸카르보닐)아미노]에틸 3-*O*-메틸-α-D-람노피라노시드 (S24)

[0440] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 5,5-디메톡시펜타노에이트 (150 mg, 0.58 mmol)를 무수 DMF (5.8 mL)에 용해시키고, 상기 용액에 화합물 **S21** (50 mg, 58.0 μmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한 후, Et_3N 1방울을 첨가하여 반응을 완료시켰다. 샘플을 감압 하에 증발시키고 톨루엔 (5 x 10 mL)과 함께 공증발시켰다. 그 후, 상기 미정제 샘플을 H_2O (2 mL)에 현탁하고, $CHCl_3$ (5 x 1 mL)로 추출하였다. 수성층을 수집하여 증발시키고, HPLC (C-18, 용출액: H_2O/MeOH)로 정제하여 백색 분말인 **S24** (20.3 mg, 20.2 μmol, 35%)를 수득하였다.

^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.17-5.13 (m, 4H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 1H), 4.13-4.10 (m, 4H), 4.07 (dd, 1H), 3.82-3.71 (m, 5H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 4H), 3.52-3.38 (m, 22H), 3.36-3.33 (m, 7H), 3.31 (dd, 1H), 2.26 (t, 1H), 1.73-1.61 (m, 4H), 1.34-1.25 (m, 15H)

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ 176.0, 105.8, 103.2, 103.1, 101.3, 83.1, 83.0, 82.0, 79.8, 79.4, 79.2, 72.7, 70.5, 69.0 (2C), 68.3, 68.0 (2C), 67.6, 67.1, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1,

[0441] 22.0, 18.7, 18.6 (3C), 17.9.

[0442] **실시예 6: mAb 1B1에 대한 억제 ELISA에서 새로운 올리고사카라이드 링커의 스크리닝**

[0443] 링커가 부착된 올리고사카라이드 (실시예 5)는 메틸 람난 단부 에피토프를 효과적으로 모방하는 것으로 나타났다. PBS-Tween에서 10 ug/ml의 일정한 농도의 메틸 람난 단부에 대해 특이적인 것으로 이전에 확인된 1B1 mAb는, *녹농균* (Pa) PAO1 BAA-47 (wt) 리포폴리사카라이드 (LPS) (억제에 대한 양성 대조군)와 *N. 메닌기티디스* (Nm) *galE/lpt3* LPS (억제에 대한 음성 대조군)의 희석액 및 링커가 포함된 합성 올리고사카라이드 (**S19-21**)와 1:1의 비율로 항온배양시켰다. mAb 1B1의 최종 농도는 5 ug/ml이었다. Pa 및 Nm LPS와 합성 올리고사카라이드는 3 mg/ml (최종 1.5 mg/ml)의 농도에서 시작하여 적정하고, PBS-Tween 중에서 2배, 12배로 희석하였다. 상기 혼합물을 실온에서 1시간 동안 함께 항온배양한 다음, Pa wt LPS로 코팅된 ELISA 플레이트에 실온에서 1시간 동안 첨가하였다.

[0444] 억제 단계에서 모든 가용 1B1에 결합할 만큼 LPS/올리고사카라이드가 충분히 존재한다면, ELISA 플레이트에서 LPS에 결합할 수 있는 자유 1B1이 없게 되므로, ELISA에서 착색 반응이 일어나지 않는다. 그러나, LPS/올리고사카라이드가 항체에 결합하지 않거나, 또는 1B1 결합을 차단할 만큼 LPS/올리고사카라이드가 충분하지 않다면, ELISA에서 생성되는 색상의 강도는 PBS 단독으로 항온배양한 경우와 유사할 것이다.

[0445] **도 33**에 나타낸 바와 같이, Pa wt LPS는 1B1에 결합하여 이를 차단하기 때문에, LPS가 약 100 μg/ml로 희석될 때까지 ELISA에서는 색상이 나타나지 않는다. 관련 없는 Nm LPS는 1B1의 결합을 차단하지 않으며, PBS도 마찬가지이다.

[0446] 올리고사카라이드는 1B1 결합을 차단하는데, 테트라사카라이드와 펜타사카라이드는 유사한 방식으로 작용하여 약 5 μg/ml에서만 역가가 나타나는 반면, 트리사카라이드도 결합을 차단하지만 약 100 μg/ml에서 보다 일찍 역가가 나타난다.

[0447] 따라서, 이러한 결과는 앞서 제조된 올리고사카라이드 (링커 없음)의 데이터와 일치한다. 이러한 올리고사카라이드에 링커를 부가해도 올리고사카라이드의 형태는 변하지 않거나, 또는 올리고사카라이드가 mAb 1B1에 결합하여 차단하는 데 영향을 미치지도 않는다. 따라서, 링커가 있는 합성된 올리고사카라이드는 Pa에서 mAb 1B1이 인식하는 에피토프를 효과적으로 모방한다.

[0448] **실시예 7: 당접합체를 제조하기 위한, 활성화된 CRM (면역화용) 및 활성화된 BSA (스크리닝용)에 대한 올리고사카라이드 링커의 접합**

[0449] *CRM 및 BSA의 아미노옥시 활성화*: 먼저, 단백질의 라이신 (CRM 또는 BSA)을 200 mM 인산나트륨 완충액 (pH 7.4)에 10 mg/ml로 녹인 후 4℃로 냉각하여 활성화시켰다. 그런 다음, DMSO에 3 mg/ml로 용해시킨 브로모아세트산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르를 약 85배의 몰 과량으로 첨가하고 4℃에서 18시간 동안 방치하였다. 이어서, 브롬 활성화된 단백질은 amicon ultra-10 30K MWCO 스핀 컬럼을 물에 대해 (3회) 약 500 μl의 용량으로 사용하여 탈염하였다. 여기에 200 mM 인산나트륨 완충액 (pH 7.4) 500 μl를 첨가하여 4℃로 냉각하였다. 약 75배 몰 과량의 3-(아미노옥시)-1-프로판티올 염산염을 200 mM 인산나트륨 완충액 (pH 7.4)에 용해시킨 후 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 생성된 아미노옥시 활성화된 단백질은 amicon ultra-10 30K MWCO 스핀 컬럼을 물에 대해

(3회) 사용하여 탈염하였다. 활성화 수준은 MALDI MS로 측정하였다 (**표 6**).

[0450] *알데히드 기능성을 생성하기 위한 링커의 활성화*: **S22, S23 및 S24** 상의 링커를 활성 알데히드 기능으로 전환하기 위해, 올리고사카라이드 (**S22-24**)를 50% 아세트산에 3 mg/ml로 용해하고 37℃에서 7시간 동안 방치하였다. 상기 반응 혼합물이 냉각시킨 후 동결건조하였다.

[0451] *접합 및 접합체의 특성 분석*: 활성화된 올리고사카라이드 (트리-, 테트라- 또는 펜타-) 1 mg을 200 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6) 50 μl에 용해시킨 후, 활성화된 단백질에 0시간, 3시간 및 6시간째에 첨가하였다. 사용된 활성화 단백질의 양은 각 경우마다 조절하여 해당 단백질의 아미노옥시 하나당 올리고사카라이드의 몰수가 약 8배가 되도록 유지하였다. 상기 반응물을 실온에서 18시간 동안 방치하였다. 그런 다음, 상기 생성물을 PBS에 대해 amicon ultra-10 30K MWCO 스핀 컬럼을 사용하여 물(3회) 분리하고 4℃에서 보관하였다.

[0452] 활성화된 CRM의 아미노옥시기당 약 8배의 몰비를 나타내는 활성화된 각각 각올리고사카라이드 (트리-, 테트라-, 펜타-) 3 mg (트리- / 테트라- / 펜타-의 경우 각각 2.1 mg / 1.7 mg / 1.5 mg의 CRM-옥시)을 접합시켰다. 접합도는 MALDI M로 측정하였다 (**표 6**).

[표 6] CRM & BSA 접합체의 활성화 및 올리고사카라이드 로딩의 요약

접합체	아미노-옥시 활성화 (아미노-옥시 단백질의 수 #)	접합 (올리고/단백질의 수 #)
CRM-트리	15	10
CRM-테트라-	15	9
CRM-펜타	15	8
BSA-트리	20	6
BSA-테트라-	20	5
BSA-펜타-	20	6

[0453]

[0454] **실시예 8: 접합체를 이용한 마우스와 토끼의 면역화**

[0455] 6~8주령의 암컷 BALB/c 마우스에 복강내 주사로 3회 면역화하였다. 각 마우스는 각 시간대에 동일한 양의 올리고사카라이드 접합체와, SIGMA 아주반트 및 PBS 완충액을 투여받았다. 마우스들은 0일차에 1차 접종을 하였고, 21일차와 42일차에 추가 접종을 받았으며, 0일차, 35일차 및 56일차에 혈액 샘플을 채취하였다.

[0456] MRha3V 그룹의 각 마우스들은 28 ug의 CRM을 생성하는 3 ug의 트리사카라이드 접합체와 함께, 50% v/v SIGMA 아주반트와 PBS 완충액 총 100 ul를 복강 내로 투여받았다. MRha4V 그룹의 각 마우스들은 25.5 ug의 CRM을 생성하는 3 ug의 테트라사카라이드 접합체와 함께, 50% v/v SIGMA 아주반트와 PBS 완충액 총 100 ul를 복강 내로 투여받았다. 마지막으로, MRha5V 그룹의 각 마우스들은 23 ug의 CRM을 생성하는 3 ug의 펜타사카라이드와 함께, 50% v/v SIGMA 아주반트와 PBS 완충액 총 100 ul를 복강 내로 투여받았다. 턱밑 정맥 채취법을 통해 혈액 샘플을 채취하여 혈액 분리 후 약 100 ul의 혈청을 얻었다.

[0457] **실시예 9: 마우스 유래 혈청의 BSA-접합체와 LPS에 대한 스크리닝**

[0458] 1차 면역화와 2회의 추가의 면역화 일정을 받은 마우스의 개별 혈청을 대상으로 ELISA에서 BSA-올리고사카라이드 접합체와 Pa wt LPS를 인식하는 능력을 스크리닝하였다.

[0459] 모든 마우스들은 면역전 혈청 (**도 34a**)과 비교하여 ELISA에서 BSA-올리고사카라이드 접합체 (**도 35a-c**)를 인식하고, 면역전 혈청 (**도 34b**)과 비교하여 LPS (**도 35d**)에 대해 중간 정도의 반응을 보인 것에서 알 수 있듯이, 해당 접합체에 대해 우수한 IgM 반응을 나타냈다. 모든 마우스들은 면역전 혈청 (**도 36a**)과 비교하여 ELISA에서 BSA-올리고사카라이드 접합체 (**도 37a**)를 인식하는 것에서 알 수 있듯이, 해당 접합체에 대해 중간 정도의 IgG 반응을 나타냈다. 마찬가지로, 테트라- 및 펜타-사카라이드 접합체를 투여받은 모든 마우스들은 면역전 혈청 (**도 36b**)과 비교하여 ELISA에서 LPS (**도 37b**)를 인식하는 것에서 알 수 있듯이, 해당 접합체에 대해 중간 정도의 IgG 반응을 나타냈다. CRM-테트라사카라이드 및 펜타사카라이드 접합체로 면역화를 실시한 마우스들은 트리사카라이드 접합체를 투여받은 마우스에 비해 ELISA에서 Pa wt LPS에 대한 IgG 반응이 향상된 것으로 나타났기

때문에 (**도 37b**), 상기 마우스 데이터로부터, 천연 항원을 효과적으로 모방하는 데 필요한 올리고사카라이드의 최소 길이는 테트라사카라이드인 것으로 추정할 수 있다. **표 7**에 상세히 설명된 바와 같이 사멸된 전세포들을, 생성된 혈청에 의해 인식되는지 확인하기 위해 ELISA에서 스크리닝하였다.

[0460] **실시예 10: 토끼 유래 혈청의 BSA-접합체와 LPS에 대한 스크리닝**

[0461] 모든 토끼들은 면역전 혈청 (**도 38a**)과 비교하여 ELISA에서 BSA-올리고사카라이드 접합체를 인식하는 것에서 알 수 있듯이, 해당 접합체에 대해 우수한 면역 반응을 나타냈다. 마찬가지로, 모든 토끼들은 면역전 혈청 (**도 38b**)과 비교하여 ELISA에서 LPS를 인식하는 것에서 알 수 있듯이, 해당 접합체에 대해 우수한 면역 반응을 나타냈다. 모든 토끼들은 수개의 서로 다른 LPS 분자들을 인식할 수 있는 강력한 반응 (종료점 역가가 1:10,000 범위)을 나타냈다.

[0462] **실시예 11: 마우스 및 토끼 유래 혈청의 사멸된 전세포에 대한 스크리닝**

[0463] 야생형 균주, A-밴드 메틸 람난과 관련이 있는 것으로 생각되는 유전자 돌연변이가 있는 균주, 및 임상 환경에서 가장 흔하게 발견되는 혈청형 균주를 비롯한 다양한 *녹농균* 사멸 세포들 (**표 7**)에서 전세포 ELISA를 수행하였다.

[표 7] 전세포 ELISA 에서 스크리닝된 세포 목록.

[0464]

종	균주	NRCC #	혈청형	세부내용	공급원
녹농균	PAO1 BAA-47	6678	5	야생형	ATCC
	PAO1	6667	-	PAO1 (wzy ::Gm)	Lam lab
	PAO1	6668	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5457)	Lam lab
	PAO1	6669	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5458)	Lam lab
	PAO1	6670	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5459)	Lam lab
	5933	6954	1	33348	ATCC
	5934	6955	2	33349	ATCC
	5939	6956	6	33354	ATCC
	5943	6957	10	33357	ATCC
	5944	6958	11	33358	ATCC
	170003	6959	16	33363	ATCC
	5937	6960	5	33352	ATCC
	001S4-1	6944	-	임상 분리주	Sad lab
	003S-20	6945	-	임상 분리주	Sad lab
	003E-9	6946	-	임상 분리주	Sad lab
	004S-3	6947	-	임상 분리주	Sad lab
	004E-8	6948	-	임상 분리주	Sad lab
	006S3-1	6949	-	임상 분리주	Sad lab
	006S4-1	6950	-	임상 분리주	Sad lab
	009S-7	6951	-	임상 분리주	Sad lab
	014S-1	6952	-	임상 분리주	Sad lab
	014E-31	6953	-	임상 분리주	Sad lab
M. 카타랄리스	*lgt2/lgt4*	6541	-	음성 대조군	Cox lab
N. 메닌기티디스	8047 *lpt3*	6263	-	음성 대조군	Cox lab

[0465]

[0466] 올리고사카라이드 백신을 접종한 면역후 마우스 혈청은 **도 39a**에서 보듯이 세포를 인식하였다. 다시 한번, 트리사카라이드 접합체의 면역후 혈청은 테트라- 및 펜타-사카라이드 접합체가 유발한 명확한 반응에 비해 약한 반응을 보였는데, 이는 메틸 람난 단부 에피토프가 전세포의 맥락에서 볼 수 있고, 올리고사카라이드 접합체는 이 에피토프를 인식할 수 있는 면역 반응을 만들어낼 수 있음을 입증하는 것이다.

[0467] 면역 후 각 토끼 혈청은 **도 39b**에서 나타낸 바와 같이 세포를 인식하였는데, 이는 메틸 람난단부 에피토프가 전

세포의 맥락에서 볼 수 있고, 올리고사카라이드 접합체 (트리-, 테트라- 및 펜타-)는 이 에피토프를 인식할 수 있는 면역 반응을 만들어낼 수 있다는 것을 입증한다. 또한, 토끼 혈청을 우리 컬렉션 (**표 7**)의 다양한 임상 분리주들에 대해 스크리닝했을 때 (**도 39c**), 대부분의 균주들에 대해 다시 한번 우수한 교차 반응성이 관찰되었는데 이는 이 에피토프의 보존과, 올리고사카라이드 기반 접합체가 필요한 면역 반응을 만들어낼 수 있는 능력이 있음을 추가로 입증하는 것이다.

[0468] LPS와 BSA 접합체를 이용한 이전 데이터와 일관되게, 전세포 ELISA를 통해 적절한 반응을 촉진하는 데 필요한 올리고사카라이드의 길이로서 마우스에서 테트라사카라이드가 필요하다는 것을 확인하였다. 그러나, 토끼 유래 혈청은 모든 접합체들이 유사한 교차 반응성 반응을 유도할 수 있었기 때문에, 이와 동일한 최소 길이 요건을 나타내지 않았다.

[0469] 이러한 결과를 종합해 보면, 메틸 람난 A-밴드 단부 에피토프를 나타내는 적어도 합성 테트라- 및 펜타-사카라이드의 CRM 접합체들은 임상은 환경에서 가장 흔하게 접하는 혈청형을 나타내는 Pa wt LPS와 전세포를 인식하는 특이적 면역 반응을 유발할 수 있는 것으로 나타났는데, 이는 백신 면역원으로서 분리된 항원에 대한 실행가능한 대안으로서의 이들의 잠재력을 보여주는 것이다.

[0470] 본원에 기술된 특정 실시형태들은 단지 예시를 위한 것이다. 상기 특정 실시형태들에 대한 변경, 변형 및 변동은 당업자에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 청구범위는 본원에 기재된 특정 실시형태들에 의해 제한되어서는 안 되며, 전체적으로 명세서와 일관되는 방식으로 해석되어야 한다.

[0471] 본 명세서에 언급한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원들은 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자의 수준을 보여주며, 이들은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조에 의해 본원에 포함하는 것으로 명시된 바와 동일한 정도로 참조에 의해 본원에 포함된다.

[0472] 본 발명은 이와 같이 기술되어 있는 바, 본 발명이 다양한 방식으로 변경될 수 있음은 명백할 것이다. 이러한 변형들은 본 발명의 개념과 범위에서 벗어나는 것으로 간주되어서는 안 되며, 당업자에게 자명한 이러한 모든 변형들도 후술하는 청구항의 범위 내에 포함시키고자 한다.

[0473] **참고문헌**

[0474] 하기의 각 참고문헌들의 내용은 인용에 의해 그 전문이 본원에 포함된다.

1. Plackett, B., No money for new drugs, Nature 586 (2020) S50-S52.

2. Jansen, K.U., Anderson, A.S., The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance, Hum. Vaccines Immunother. 14 (2018) 2142-2149.

3. Grimwood et al., Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection, Hum. Vaccines Immunother. 11 (2015) 14-20.

4. Adlbrecht et al., Efficacy, immunogenicity, and safety of IC43 recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in mechanically ventilated intensive care patients-a randomized clinical trial, Crit. Care, 24 (2020) 74.

5. Merakou, C., Schaefers, M.M., Priebe, G.P., Progress toward the elusive *Pseudomonas aeruginosa* vaccine, Surg. Infect. 8 (2018) 757-768.

6. V. L. Campodónico et al., Efficacy of a conjugate vaccine containing polymannuronic acid and flagellin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice, Infect. Imun. 79 (2011) 3455-3464.

7. Hegerie et al., Development of a broad spectrum glycoconjugate vaccine to prevent wound and disseminated infections with *Klebsiella pneuoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, PLOS ONE (2018) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203143.

8. DiGiandomenico et al., Identification of broadly protective human antibodies to Pseudomonas aeruginosa exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. J Exp Med 209 (2012) 1273-1287

9. DiGiandomenico et al., A multifunctional bispecific antibody protects against Pseudomonas aeruginosa. Sci Transl Med 6 (2014) 262ra155

10. Horn et al., Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for Pseudomonas aeruginosa serotype IATS-O11. (2010) Antimicrob. Ag. Chemother. 54:2338-2344.

[0475]

11. Loos et al., Pre-clinical and phase I safety data for anti-Pseudomonas aeruginosa human monoclonal antibody AR-105. (2019) Open Forum Infect. Dis. 6: S307–S308.

12. AstraZeneca. 2019. AstraZeneca pipeline update. April 2020. https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/PDF/2020/q12020/Q1_2020_results_clinical_trials_appendix.pdf

13. Patel et al., An engineered bispecific DNA encoded IgG antibody protects against Pseudomonas aeruginosa in a pneumonia challenge model. (2017) Nat. Commun. 8: 637-648.

14. Dasgupta et al., Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of Pseudomonas aeruginosa derived from serotypes 03, 05, and 06. Infect. Immun (1994) 62:809-817

15. Byrd et al., Genetic and biochemical analyses of the Pseudomonas aeruginosa Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. Mol. Microbiol. (2009) 73:622-638

16. Sadovskaya et al., High-level antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated beta-(1->3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology 20 (2010) 895-904.

17. Knirel, Y. A. and Kocharova, N.A., Structure and properties of the common polysaccharide antigen of the bacterium Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry (Moscow) 60 (1995) 1499-1507.

18. Yokota et al., Characterization of a polysaccharide component of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa IID 1008 (ATCC 27584) as D-rhamnan. Eur.J.Biochem. 167 (1987) 203-209.

19. Vinogradov et al., Structures of lipopolysaccharides from Klebsiella pneumoniae. Eluicidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. J Biol Chem. (2002) 277:25070-25081.

20. Wang et al., Biosynthesis of the Common Polysaccharide Antigen of Pseudomonas aeruginosa PAO1: Characterization and Role of GDP-D-Rhamnose: GlcNAc/GalNAc-Diphosphate-Lipid α1,3-D-Rhamnosyltransferase WbpZ. J. Bacteriol. (2015) 197: 2012-2019.

21. Arsenault et al., Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of Pseudomonas aeruginosa strain PAO1. Can.J.Chem. 69 (1991) 1273-1280

[0476]

22. Cox et al., Investigating the candidacy of a capsular polysaccharide-based glycoconjugate as a vaccine to combat Haemophilus influenzae type a disease: a vaccine solution for an unmet public health need. Vaccine (2017) 35:6129-36.

23. St. Michael et al., Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugates to prevent disease caused by the dental pathogen Streptococcus mutans. Glycoconj. J. (2018) 35:53-64.

24. Cairns et al., Development and characterisation of mouse monoclonal antibodies specific for Clostridiodes (Clostridium) difficile lipoteichoic acid, utilising synthetic molecules to define a minimal epitope. ACS Chem. Biol. (2020) 15:1050-1058.

25. Makarenko et al., Immunological studies of an artificial antigen with specificity of a common polysaccharide antigen of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Imm. Med. Microbiol. (1993) 7:251-256.

26. Lam et al., Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. (1989) J. Clin. Microbiol. 27:962–967.

27. Richard et al., Antibody binding to the O-specific antigen of Pseudomonas aeruginosa O6 inhibits cell growth. Antimrob. Ag. Chemother. (2020) 64: e02168-19

28. Zunk, M. and Kiefel, M. J., An efficient synthesis of selectively functionalized d-rhamnose derivatives, Tetrahedron Lett., 52 (2011) 1296-1299.

29. Fauré et al., Practical synthesis of valuable d-rhamnoside building blocks for oligosaccharide synthesis, Tetrahedron. Lett. 48 (2007) 2385-2388.

30. Seepersaud et al., Ceric ammonium nitrate/acetic anhydride: A tunable system for the O-acetylation and mononitration of diversely protected carbohydates, Synth. Commun. 47 (2017) 853-871.

31. Blattner et al., Syntheses of oligomannosides in solution and on a soluble polymer support: a comparison, Carbohydr. Res. 341 (2006) 299-321.

32. Nagashima, N. and Ohno, M., An efficient O-monoalkylation of dimethyl l-tartrate via O-stannylene acetal with alkyl halides in the presence of cesium fluoride, Chem. Lett., 16 (1987) 141-144.

33. Leontein, K. and Lönhgren, J., Determination of the absolute configuration of sugars by gas-liquid chromatography of their acetylated 2-octyl glycosides, in : J. N. BeMiller, R. L. Whistler,

[0477]

D. H. Shaw (Eds.), Methods in Carbohydrate Chemistry, Stockholm, John Wiley & Sons, Inc., 1993, pp.87-89.
34. Wang, L. and Lowary, T. L., Synthesis of rhamnolipid derivatives containing ester isoteres, Org. Lett. 22 (2020) 9633-9637.
35. Domon, B. and Costello, C. E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragments in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, Glycoconjugate J, 5 (1988) 397-409.
36. Dass, C., Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007, pp. 17-26.
37. Crawford, C. J. and Oscarson, S., Convergent total synthesis of Cryptococcus neoformans serotype B capsule repeating motif, Carbohydr. Res. 497 (2020), https://doi.org/10.1016/j.carres.
38. Qin et al., Chemical synthesis of Pseudomonas aeruginosa O11 O-antigen trisaccharide based on neighboring electron-donating effect, J. Carbohydr. Chem. 39 (2020) 374-397.
39. X. Zhang, D. Wang, G. Jin, L. Wang, Z. Guo, G. Gu, Synthesis of a tetrasaccharide repeating unit of the exopolysaccharide from *Burkholderia multivorans*, J. Carb. Chem. 36 (2017) 189-204.
40. D. Wang, W. Zhuge, Z. Guo, G. Gu, Synthesis of a disaccharide repeating unit of the O-antigen from *Burkholderia ambifaria* and its oligomers, Carb. Res. 442 (2017) 41-51.
41. M. P. Jamshidi, C. Cairns, S. Chong, F. St. Micheal, E. V. Vinogradov, A. D. Cox, J. Sauvageau, Synthesis and Immunogenicity of a Methyl Rhamnan Pentasaccharide Conjugate from *Pseudomonas aeruginosa* A-Band Polysaccharide, ACS Infect. Dis. 8 (2022) 1347-1355.
42. Munneke S, Dangerfield EM, Stocker BL, Timmer MSM. The versatility of N-alkyl-methoxyamine bi-functional linkers for the preparation of glycoconjugates. Glycoconj J. 2017 Oct;34(5):633-642. doi: 10.1007/s10719-017-9785-4. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28725972.
43. Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218:509-18.

[0478]

도면

도면1

2-α-Rha-3-α-Rha-3-α-Rha- A-PS **반복 단위**
A B C

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-2- **테트리톨** *-1d* OS**1**
E F L X

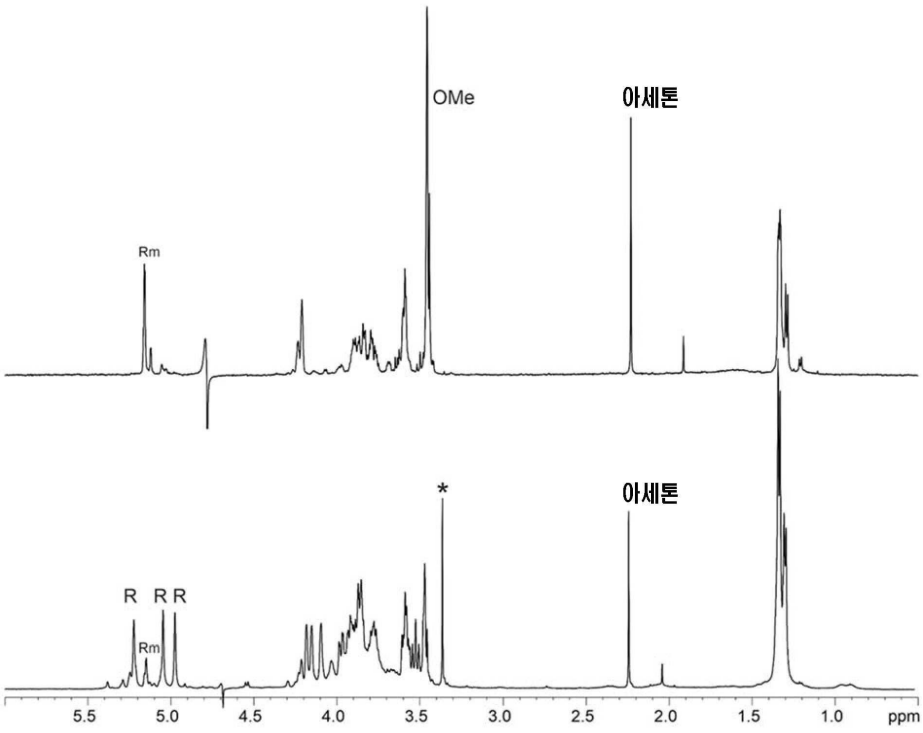
접합을 위해 이중 산화된 A-PS:

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-2- **글리세르알데히드** -3*d* OS**2**
E F L X

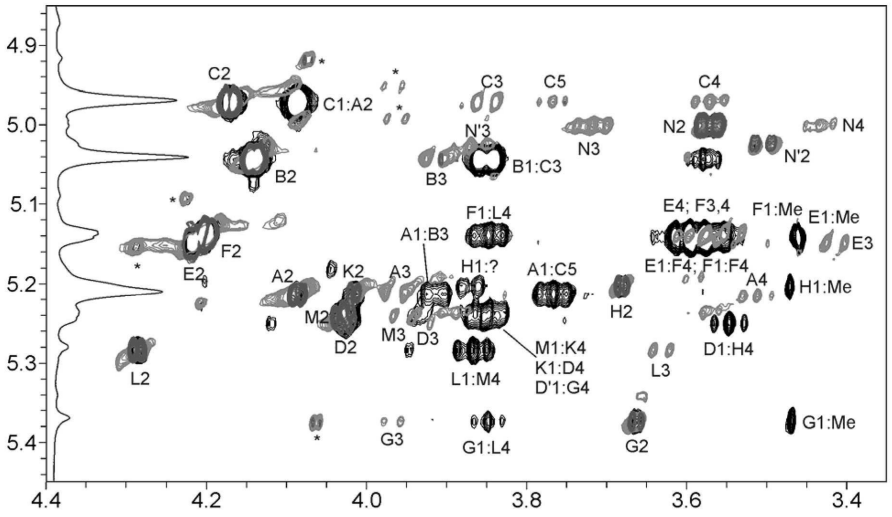
α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Rha2OMe A-PS1
E F L M K D H

α-Rha3OMe-4-(α-Rha3OMe-4-)$_4$-4-α-Man3OMe-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man-4-α-Man2OMe A-PS2
E F L M K D' G

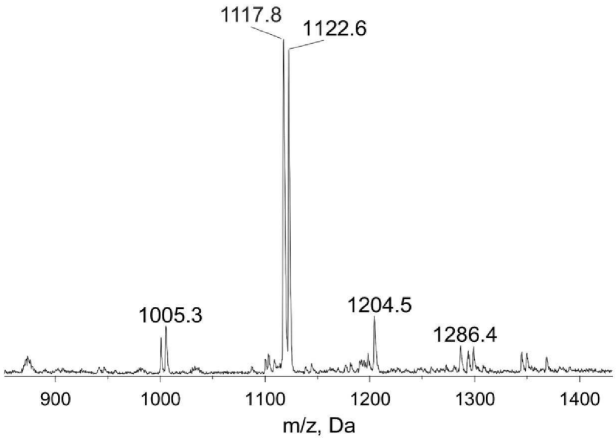
도면2


OMe
아세톤
Rm
*
아세톤
R R R
Rm
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm

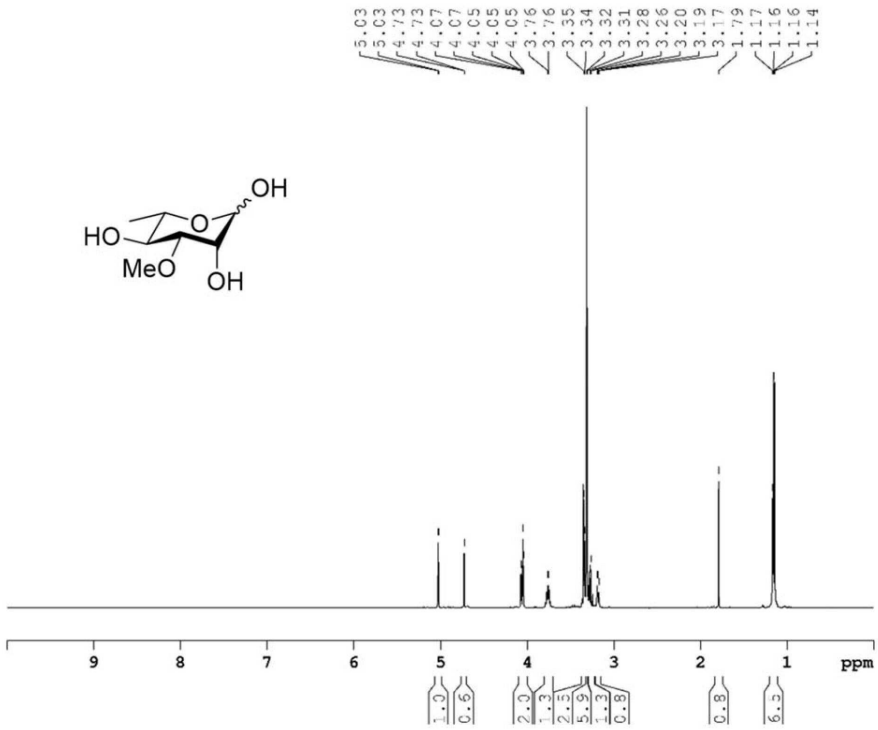
도면3


4.9
5.0
5.1
5.2
5.3
5.4
4.4
4.2
4.0
3.8
3.6
3.4
C2
C1:A2
B2
F2
E2
L2
C3
C5
N'3
N3
B3
B1:C3
F1:L4
A1:B3
H1:?
A1:C5
A2
K2
A3
M2
D2
M3
D3
M1:K4
K1:D4
D'1:G4
L1:M4
H2
L3
G3
G1:L4
G2
C4
N2
N4
N'2
E4; F3,4
F1:Me
E1:Me
E3
E1:F4; F1:F4
A4
H1:Me
D1:H4
G1:Me

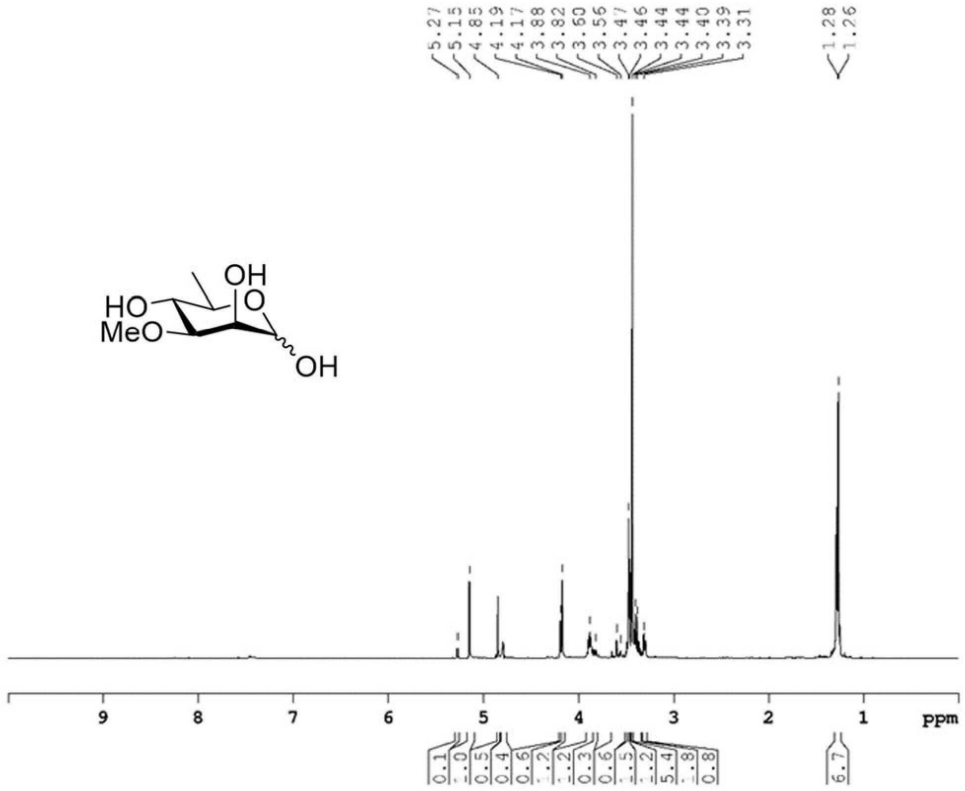
도면4


1117.8
1122.6
1005.3
1204.5
1286.4
900
1000
1100
1200
1300
1400
m/z, Da

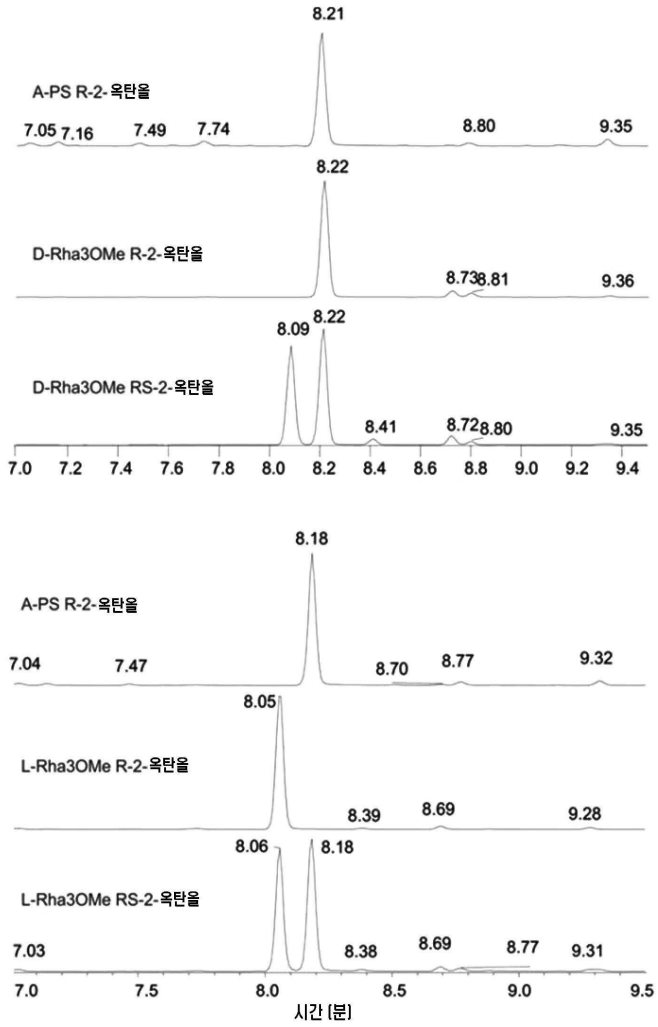
도면5a


5.03
5.03
4.73
4.73
4.07
4.07
4.05
4.05
4.05
3.76
3.35
3.34
3.32
3.31
3.28
3.26
3.20
3.19
3.17
1.79
1.17
1.16
1.16
1.14
OH
HO
O
MeO
OH
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
1.0
0.5
2.0
1.3
2.5
5.9
1.3
5.8
6.8
6.3

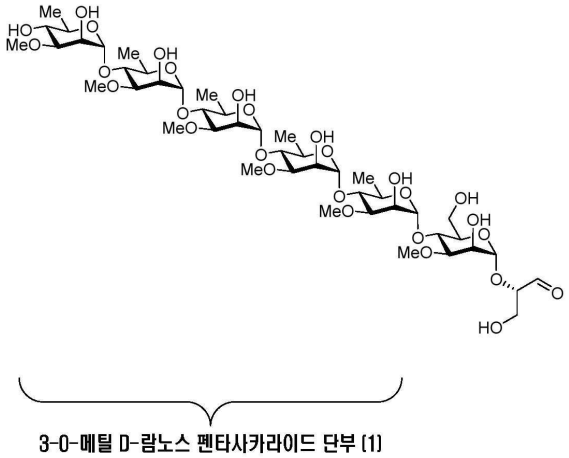
도면5b


5.27
5.15
4.85
4.19
4.17
3.88
3.82
3.60
3.56
3.47
3.46
3.44
3.44
3.40
3.39
3.31
1.28
1.26
OH
HO
O
MeO
OH
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
0.1
1.0
0.5
0.4
0.6
1.2
1.2
0.3
0.6
1.5
1.2
5.4
1.8
0.8
6.7

도면6

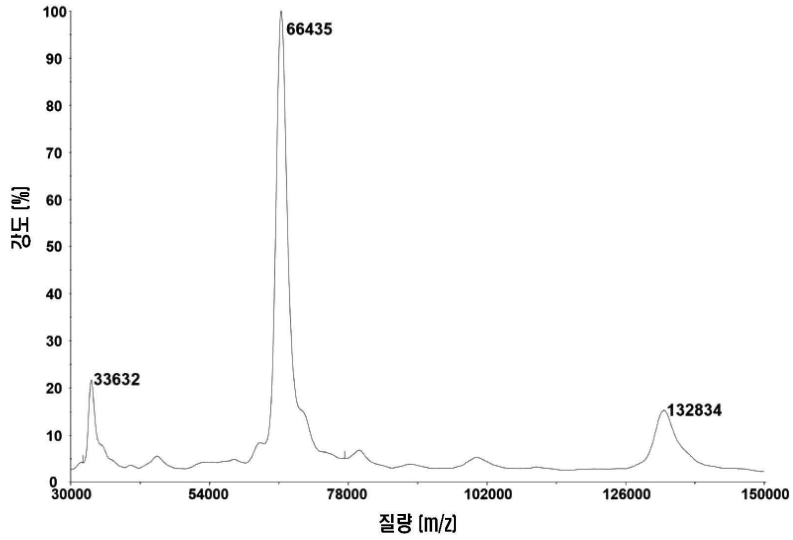


도면7

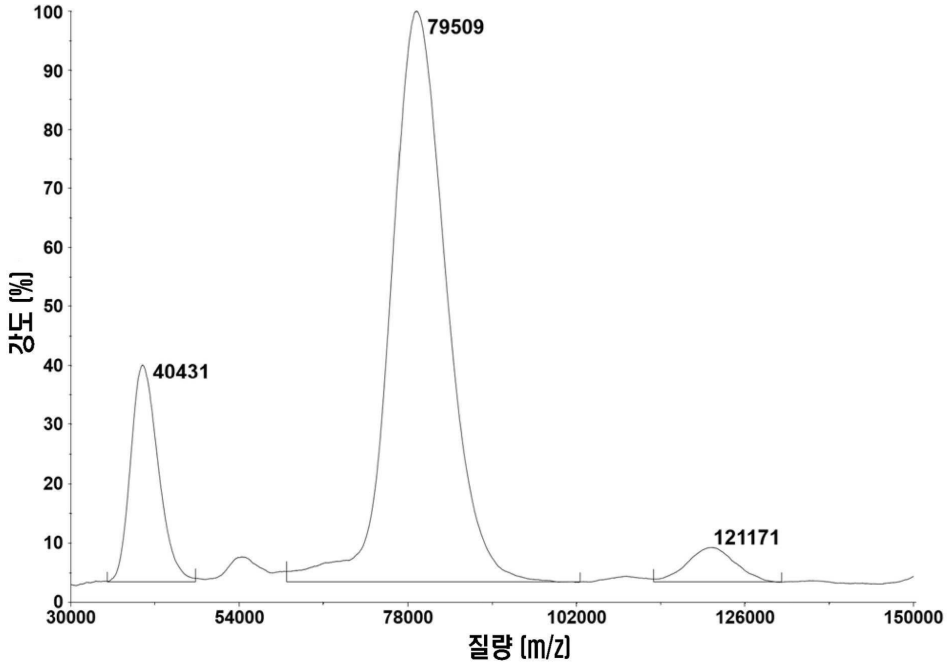


3-O-메틸 D-람노스 펜타사카라이드 단부 (1)

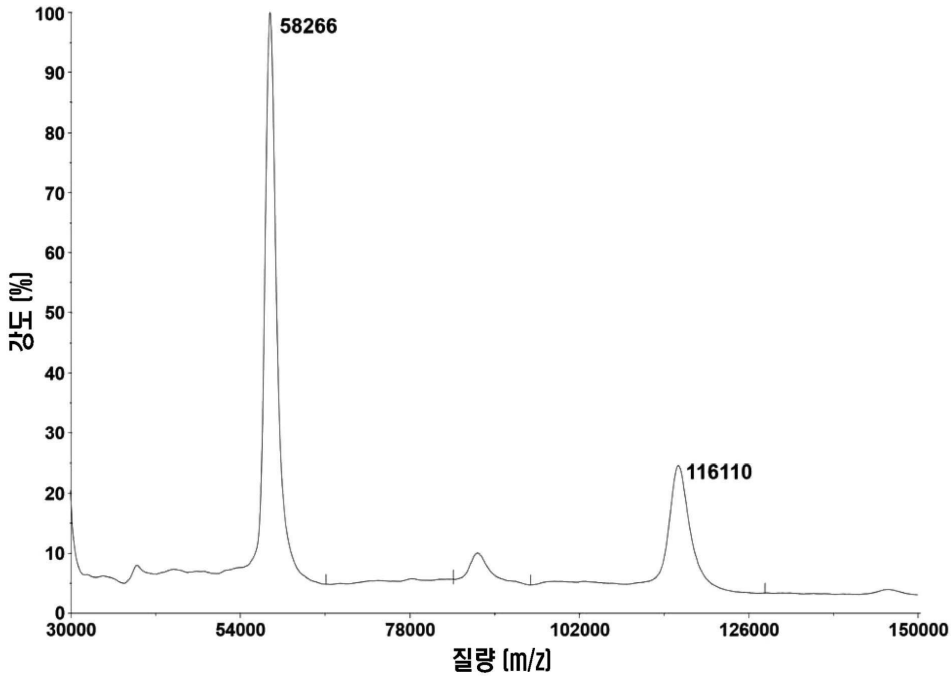
도면8a


66435
33632
132834
강도 [%]
질량 [m/z]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30000
54000
78000
102000
126000
150000

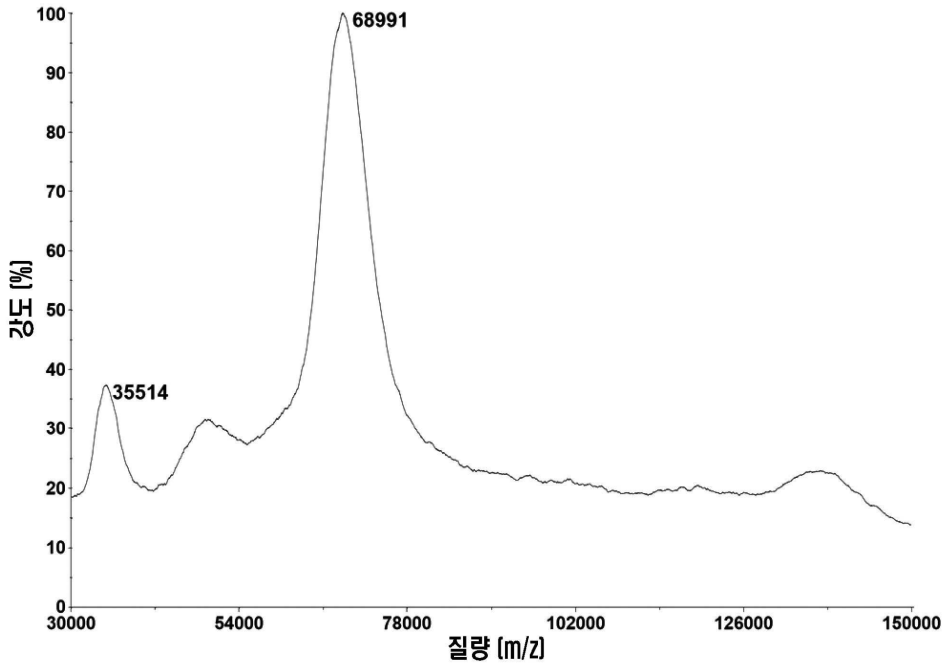
도면8b


79509
40431
121171
강도 [%]
질량 [m/z]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30000
54000
78000
102000
126000
150000

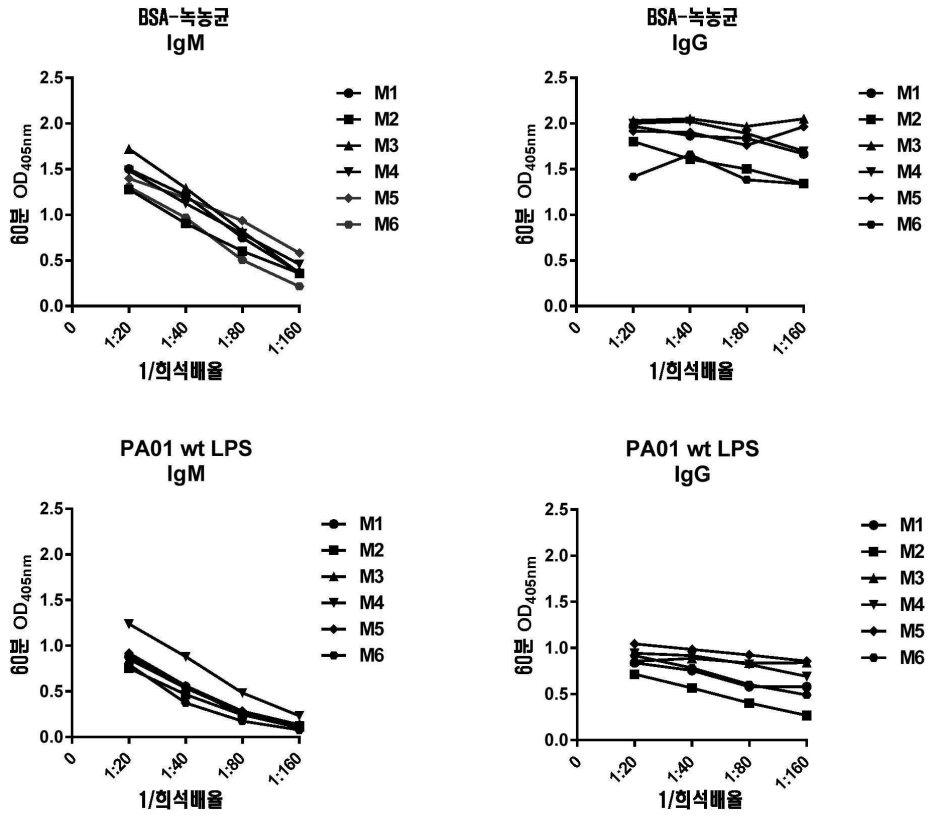
도면8c


58266
116110
강도 [%]
질량 [m/z]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30000
54000
78000
102000
126000
150000

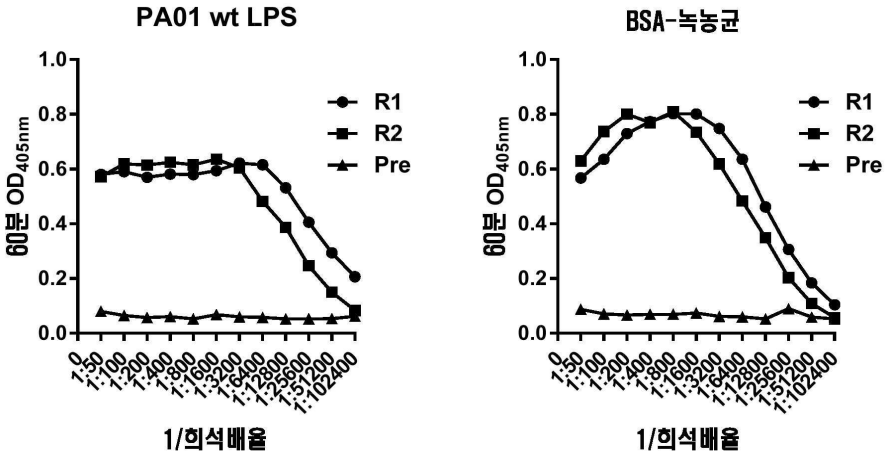
도면8d


68991
35514
강도 [%]
질량 [m/z]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30000
54000
78000
102000
126000
150000

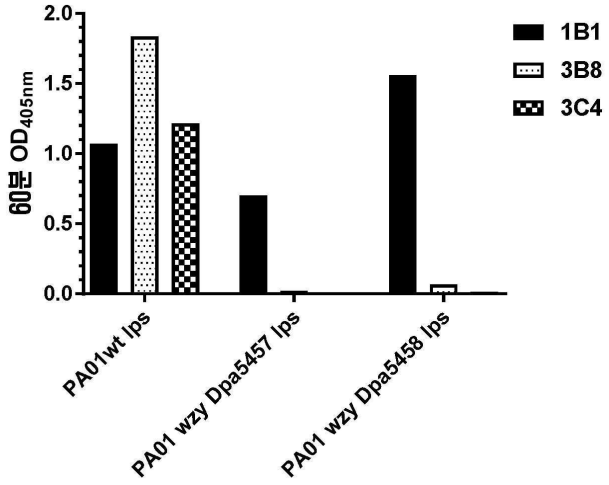
도면9a


BSA-녹농균
IgM
60분 OD405nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1:20
1:40
1:80
1:160
1/희석배율
M1
M2
M3
M4
M5
M6
BSA-녹농균
IgG
60분 OD405nm
1/희석배율
M1
M2
M3
M4
M5
M6
PA01 wt LPS
IgM
60분 OD405nm
1/희석배율
M1
M2
M3
M4
M5
M6
PA01 wt LPS
IgG
60분 OD405nm
1/희석배율
M1
M2
M3
M4
M5
M6

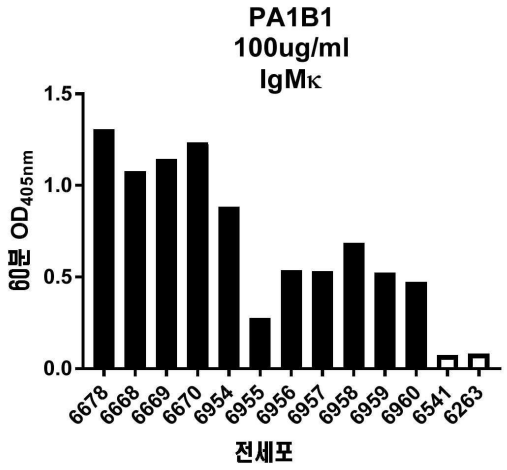
도면9b


PA01 wt LPS
60분 OD405nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1:50
1:100
1:200
1:400
1:800
1:1600
1:3200
1:6400
1:12800
1:25600
1:51200
1:102400
1/희석배율
R1
R2
Pre
BSA-녹농균
60분 OD405nm
1/희석배율
R1
R2
Pre

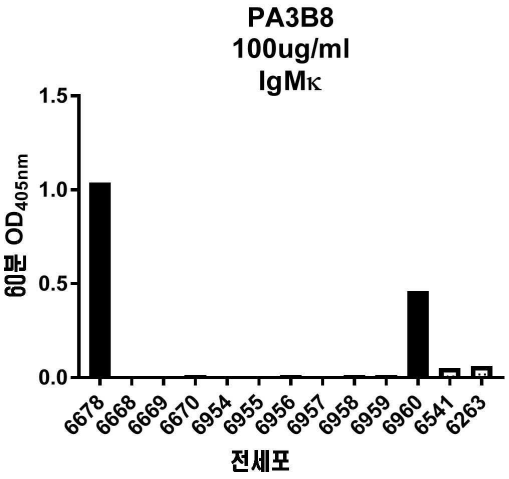
도면10



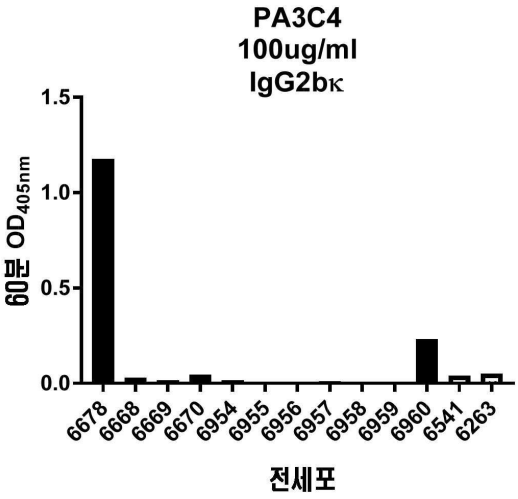
도면11a



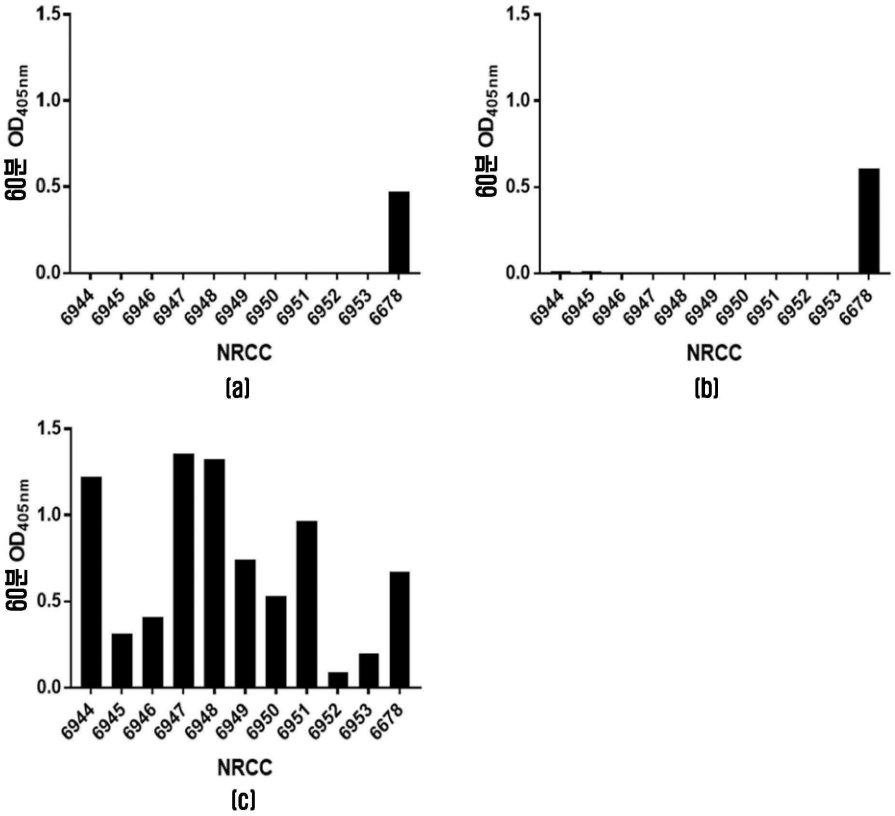
도면11b



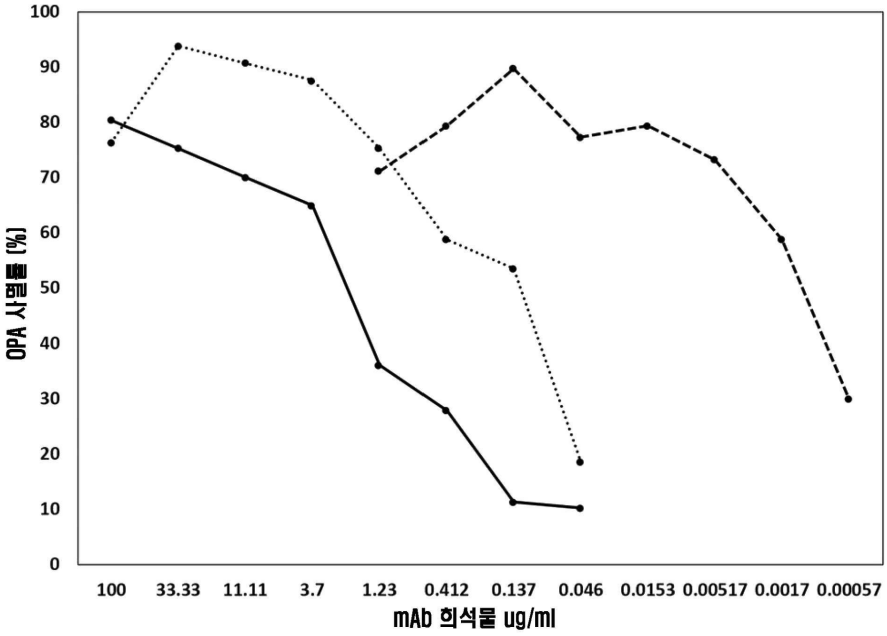
도면11c


PA3C4
100ug/ml
IgG2bκ
60분 OD405nm
1.5
1.0
0.5
0.0
6678
6668
6669
6670
6954
6955
6956
6957
6958
6959
6960
6541
6263
전세포

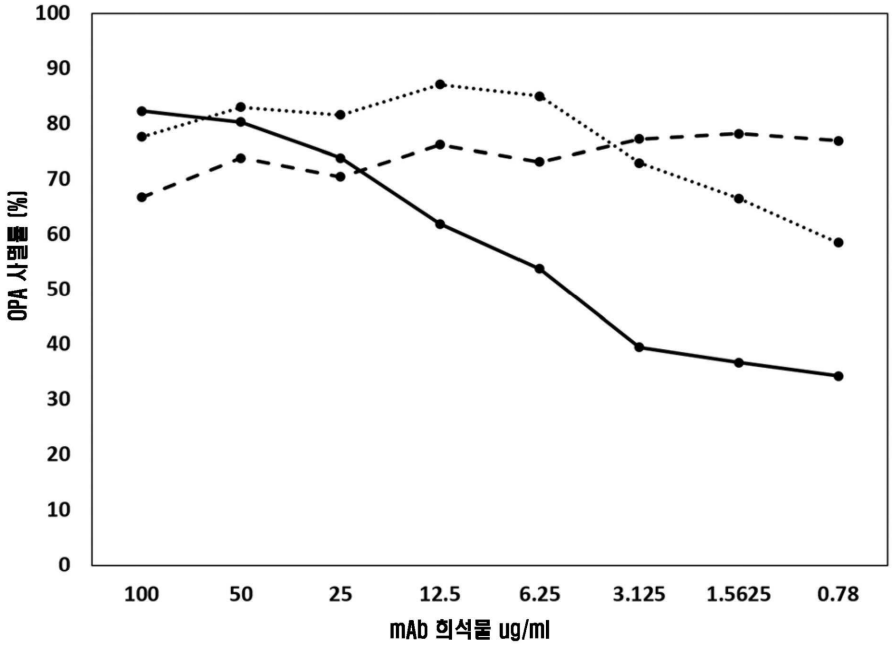
도면12


60분 OD405nm
1.5
1.0
0.5
0.0
6944
6945
6946
6947
6948
6949
6950
6951
6952
6953
6678
NRCC
(a)
(b)
(c)

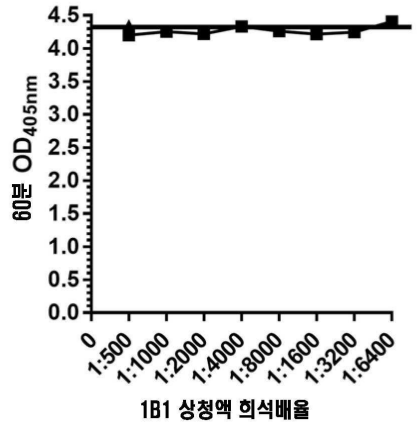
도면13a


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
OPA 사멸률 (%)
100
33.33
11.11
3.7
1.23
0.412
0.137
0.046
0.0153
0.00517
0.0017
0.00057
mAb 희석물 ug/ml

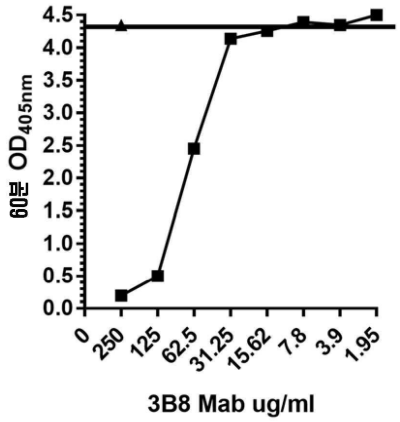
도면13b


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
OPA 사멸률 (%)
100
50
25
12.5
6.25
3.125
1.5625
0.78
mAb 희석물 ug/ml

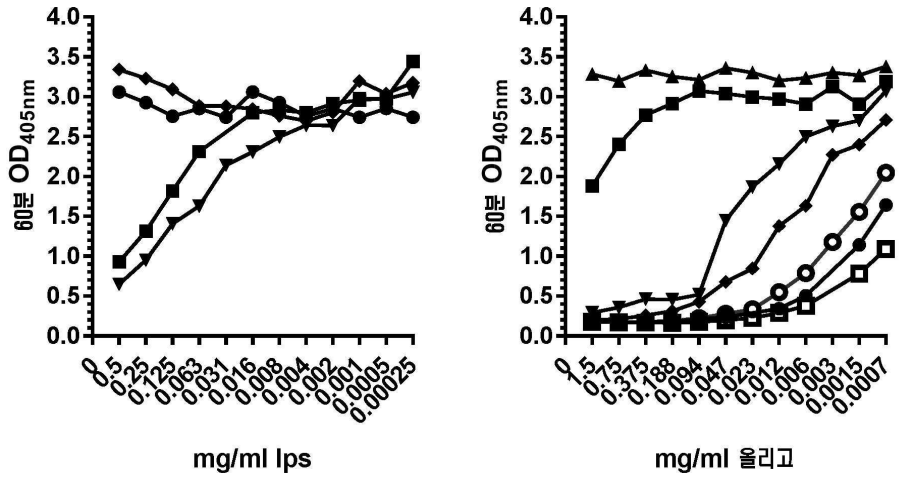
도면14a



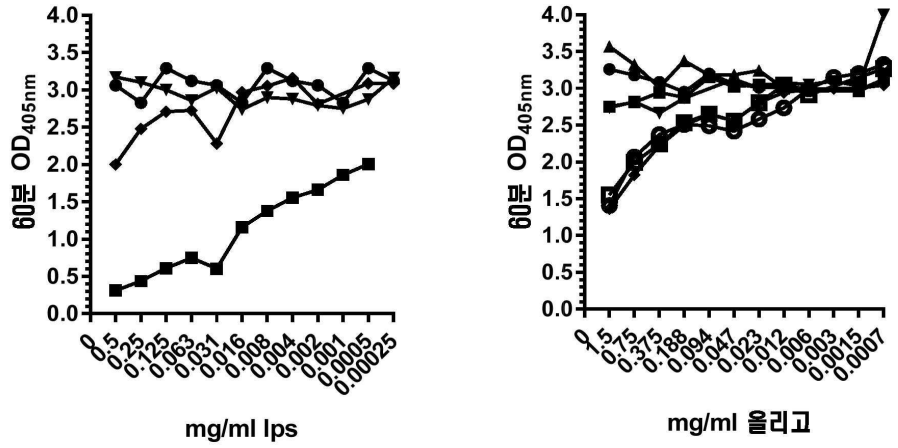
도면14b



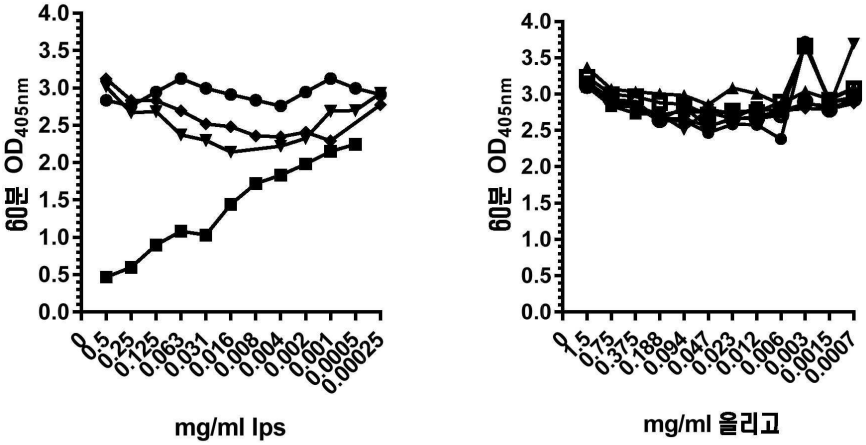
도면15a



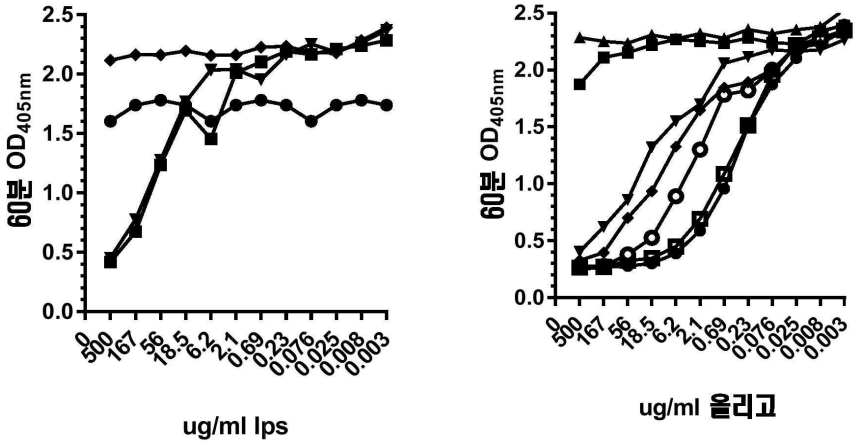
도면15b



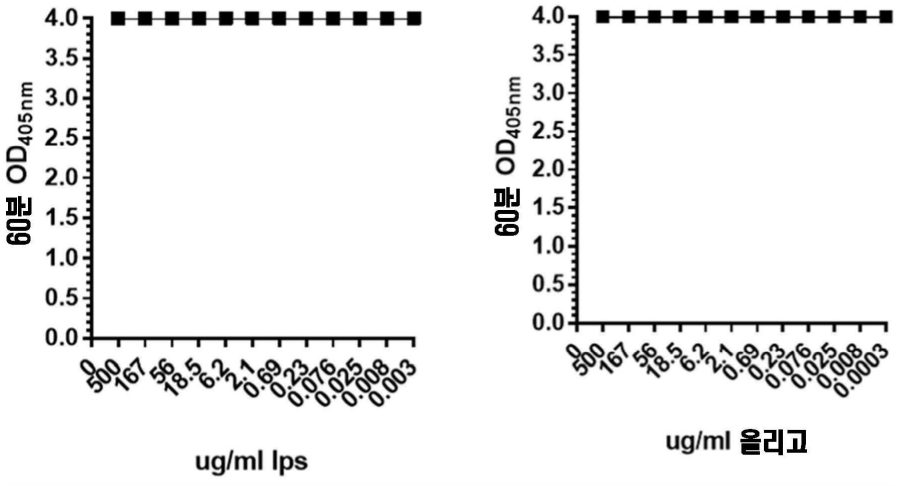
도면15c



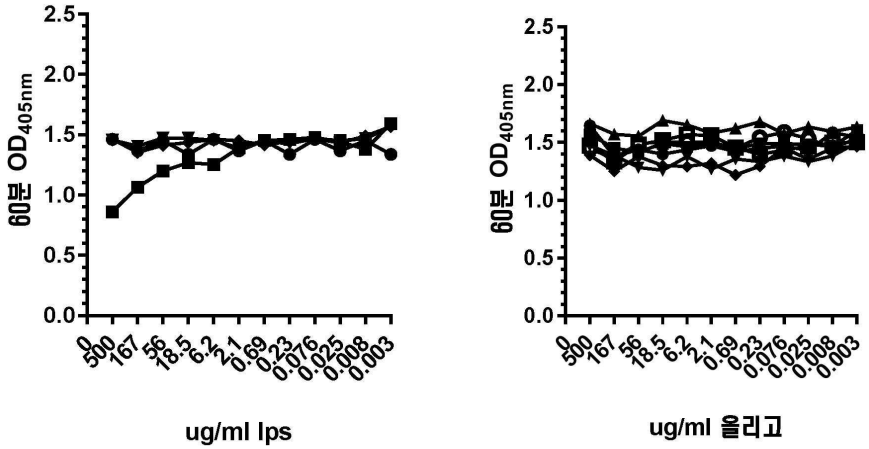
도면15d



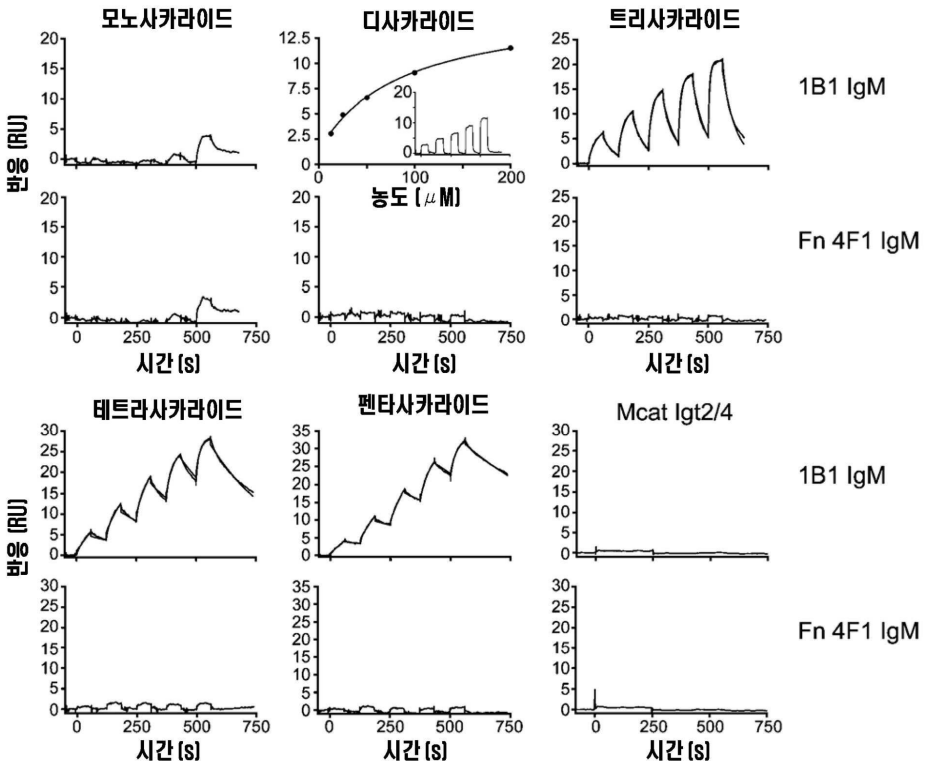
도면15e


60분 OD405nm
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
500
167
56
18.5
6.2
2.1
0.69
0.23
0.076
0.025
0.008
0.003
ug/ml lps
60분 OD405nm
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
500
167
56
18.5
6.2
2.1
0.69
0.23
0.076
0.025
0.008
0.0003
ug/ml 올리고

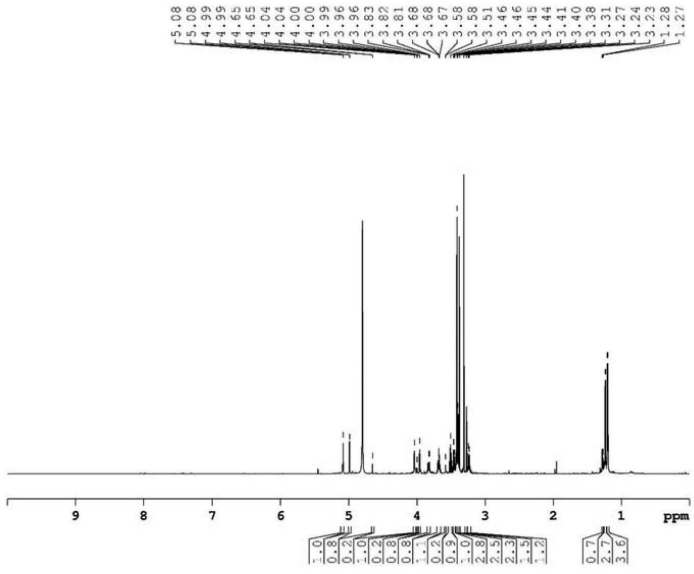
도면15f


60분 OD405nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
500
167
56
18.5
6.2
2.1
0.69
0.23
0.076
0.025
0.008
0.003
ug/ml lps
60분 OD405nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
500
167
56
18.5
6.2
2.1
0.69
0.23
0.076
0.025
0.008
0.003
ug/ml 올리고

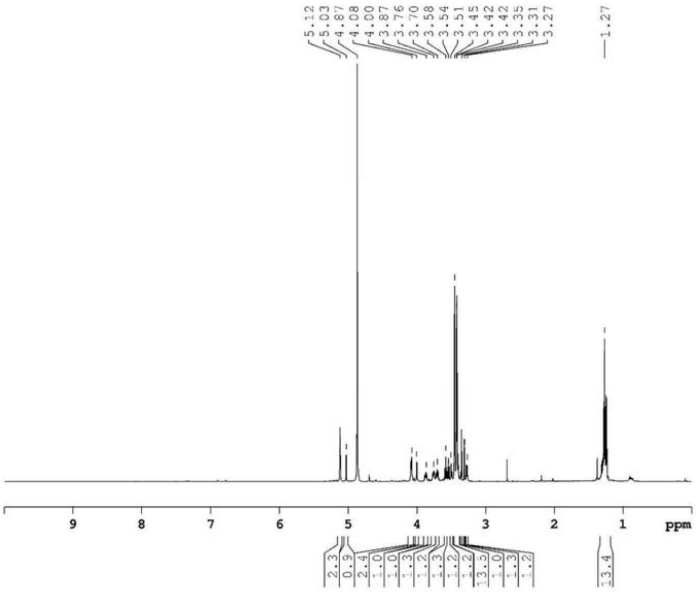
도면16


모노사카라이드
디사카라이드
트리사카라이드
1B1 IgM
Fn 4F1 IgM
반응 (RU)
농도 (μM)
시간 (s)
테트라사카라이드
펜타사카라이드
Mcat Igt2/4
1B1 IgM
Fn 4F1 IgM
반응 (RU)
시간 (s)

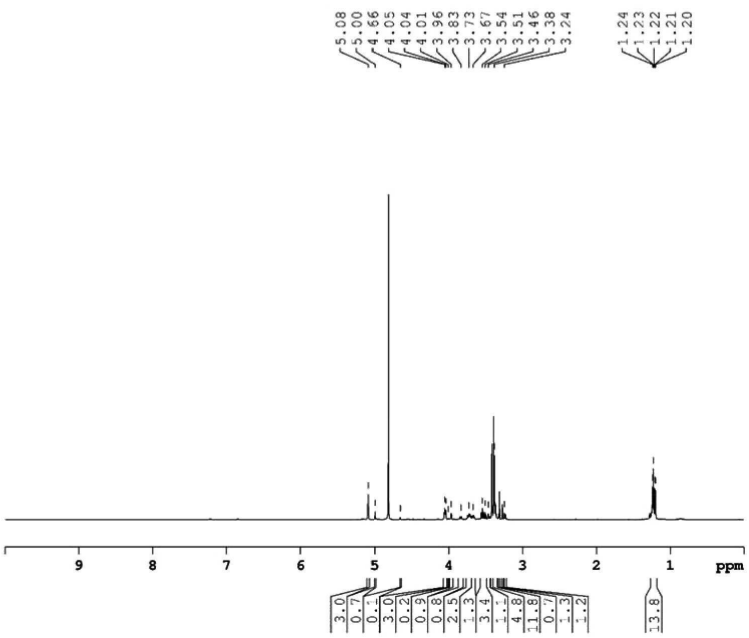
도면17


ppm

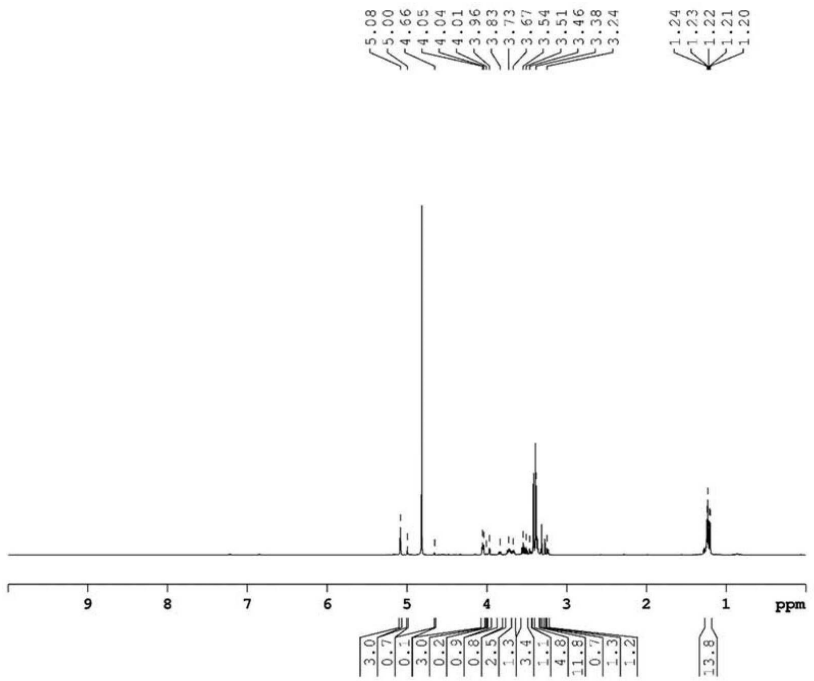
도면18


5.12
5.03
4.87
4.08
4.00
3.87
3.76
3.70
3.58
3.54
3.51
3.45
3.42
3.35
3.31
3.27
1.27
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
2.3
0.9
2.4
1.0
1.0
1.3
1.2
1.3
1.2
1.2
13.0
1.0
1.3
1.2
13.4

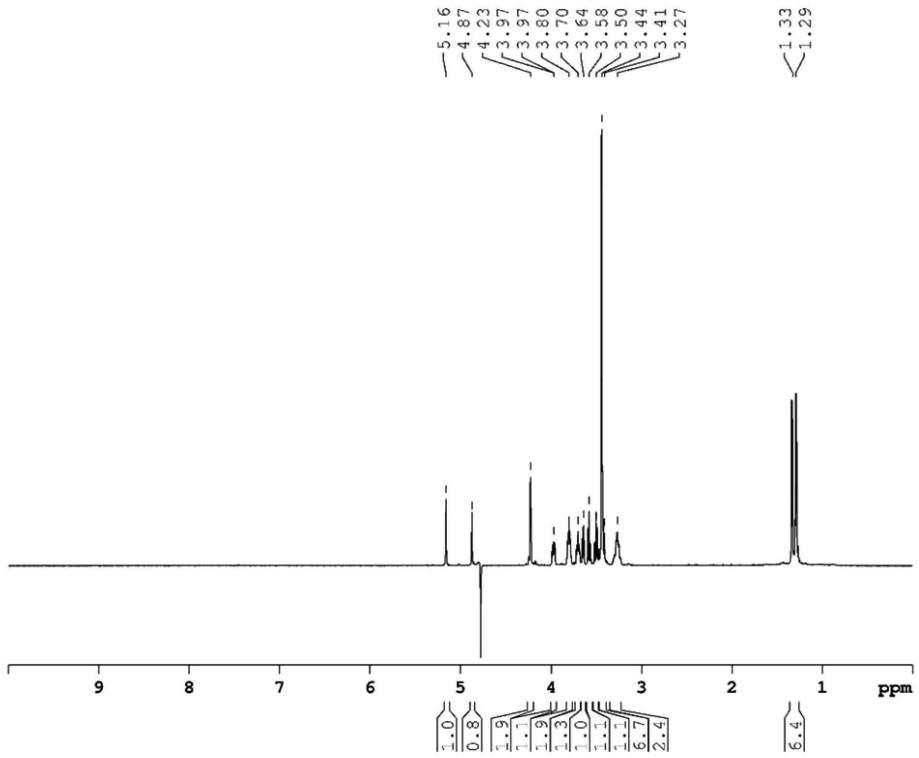
도면19


5.08
5.00
4.66
4.05
4.04
4.01
3.96
3.83
3.73
3.67
3.54
3.51
3.46
3.38
3.24
1.24
1.23
1.22
1.21
1.20
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
3.0
0.7
0.7
3.0
0.2
0.3
0.8
2.5
1.3
3.4
1.1
4.8
11.8
0.7
1.3
1.2
13.8

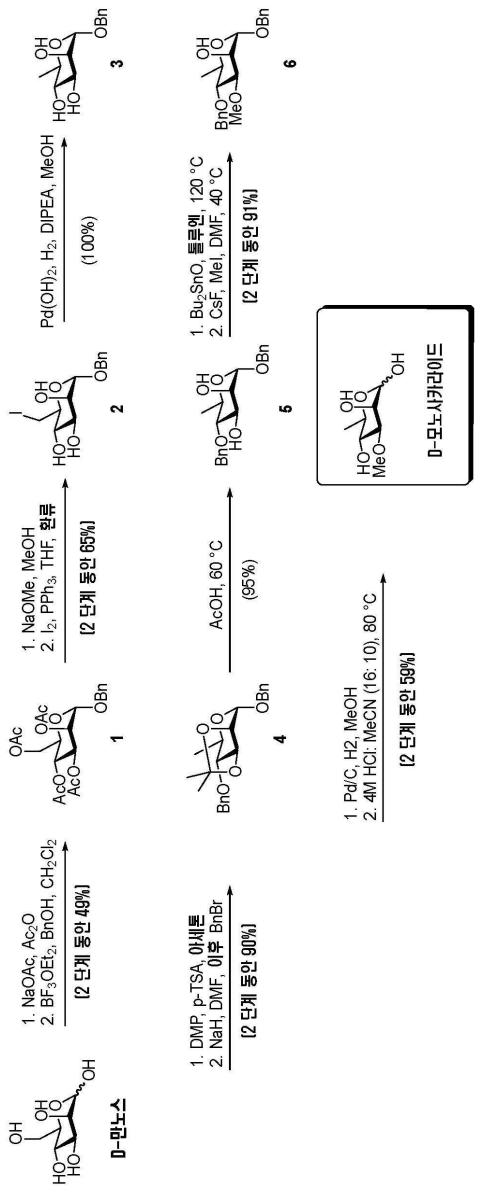
도면20


5.08
5.00
4.66
4.05
4.04
4.01
3.96
3.83
3.73
3.67
3.54
3.51
3.46
3.38
3.24
1.24
1.23
1.22
1.21
1.20
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
3.0
0.7
0.1
3.0
0.2
0.9
0.8
2.5
1.3
3.4
1.1
4.8
11.8
0.7
1.3
1.2
13.8

도면21

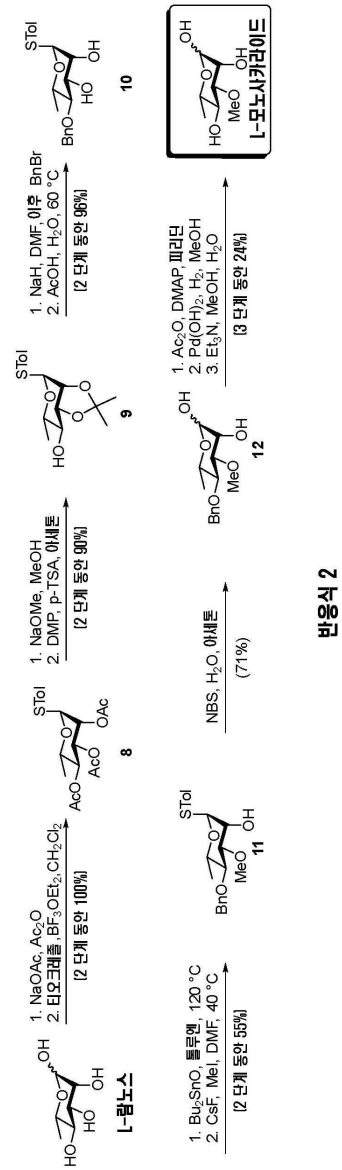

5.16
4.87
4.23
3.97
3.97
3.80
3.70
3.64
3.58
3.50
3.44
3.41
3.27
1.33
1.29
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
1.0
0.8
1.9
1.1
1.9
1.3
1.0
1.1
1.1
6.7
2.4
6.4

도면22


D-만노스
1. NaOAc, Ac2O
2. BF3OEt2, BnOH, CH2Cl2
[2 단계 동안 49%]
1
1. NaOMe, MeOH
2. I2, PPh3, THF, 환류
[2 단계 동안 65%]
2
Pd(OH)2, H2, DIPEA, MeOH
(100%)
3
1. DMP, p-TSA, 아세톤
2. NaH, DMF, 이후 BnBr
[2 단계 동안 90%]
4
AcOH, 60 °C
(95%)
5
1. Bu2SnO, 톨루엔, 120 °C
2. CsF, MeI, DMF, 40 °C
[2 단계 동안 91%]
6
1. Pd/C, H2, MeOH
2. 4M HCl: MeCN (16: 10), 80 °C
[2 단계 동안 59%]
D-모노사카라이드

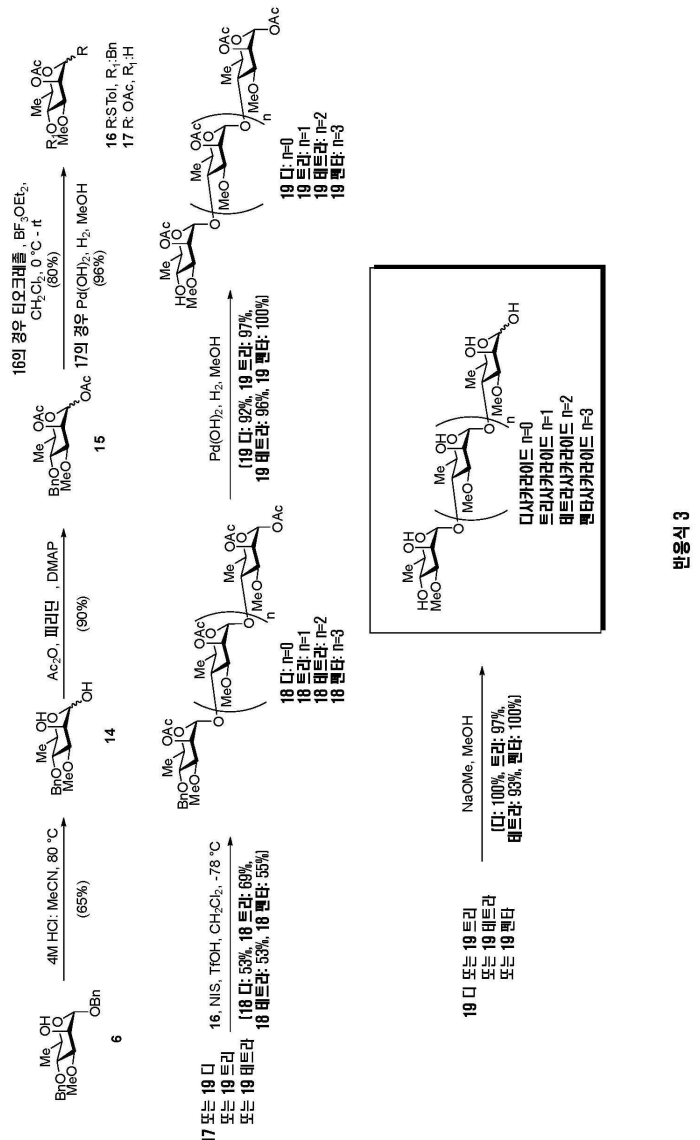
반응식 1

도면23


L-람노스
1. NaOAc, Ac2O
2. 타오크레졸, BF3·OEt2, CH2Cl2
(2 단계 동안 100%)
8
1. NaOMe, MeOH
2. DMP, p-TSA, 아세톤
(2 단계 동안 90%)
9
1. NaH, DMF, 이후 BnBr
2. AcOH, H2O, 60 °C
(2 단계 동안 96%)
10
L-모노사카라이드
1. Bu2SnO, 톨루엔, 120 °C
2. CsF, MeI, DMF, 40 °C
(2 단계 동안 55%)
11
NBS, H2O, 아세톤
(71%)
12
1. Ac2O, DMAP, 피리딘
2. Pd(OH)2, H2, MeOH
3. Et3N, MeOH, H2O
(3 단계 동안 24%)

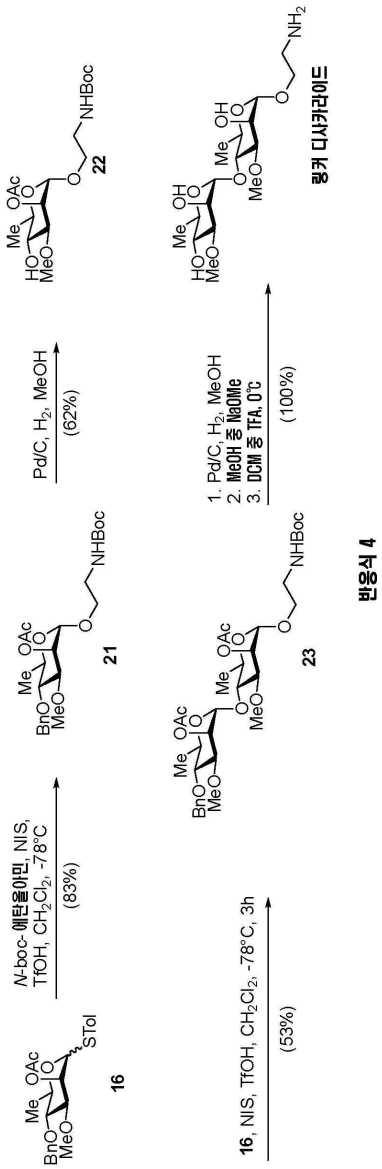
반응식 2

도면24


16의 경우 티오크레졸, BF3OEt2, CH2Cl2, 0 °C - rt (80%)
17의 경우 Pd(OH)2, H2, MeOH (96%)
16 R:STol, R1:Bn
17 R: OAc, R1:H
4M HCl: MeCN, 80 °C (65%)
Ac2O, 피리딘 , DMAP (90%)
16, NIS, TfOH, CH2Cl2, -78 °C
[18 디: 53%, 18 트리: 69%, 18 테트라: 58%, 18 펜타: 55%]
Pd(OH)2, H2, MeOH
[19 디: 92%, 19 트리: 97%, 19 테트라: 96%, 19 펜타: 100%]
18 디: n=0
18 트리: n=1
18 테트라: n=2
18 펜타: n=3
19 디: n=0
19 트리: n=1
19 테트라: n=2
19 펜타: n=3
NaOMe, MeOH
[디: 100%, 트리: 97%, 테트라: 93%, 펜타: 100%]
19 디 또는 19 트리
또는 19 테트라
또는 19 펜타
디사카라이드 n=0
트리사카라이드 n=1
테트라사카라이드 n=2
펜타사카라이드 n=3

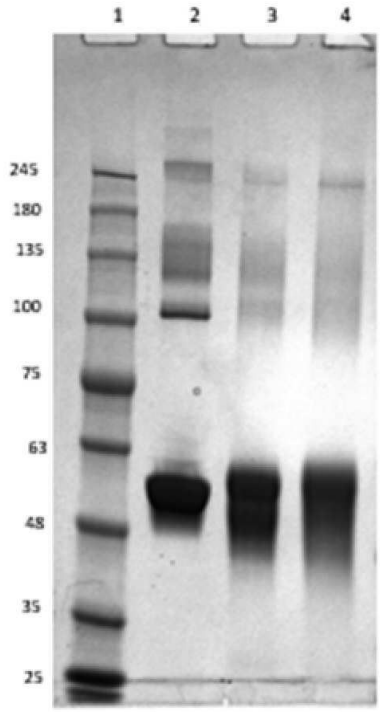
반응식 3

도면25

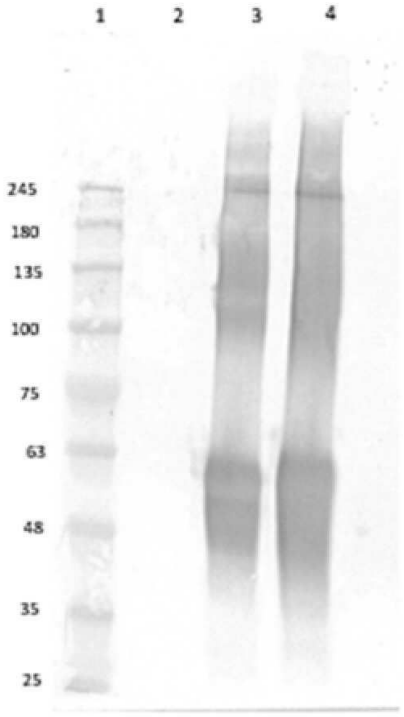

N-boc-에탄올아민, NIS,
TfOH, CH2Cl2, -78°C
(83%)
16, NIS, TfOH, CH2Cl2, -78°C, 3h
(53%)
Pd/C, H2, MeOH
(62%)
1. Pd/C, H2, MeOH
2. MeOH 중 NaOMe
3. DCM 중 TFA, 0°C
(100%)
16
21
22
23
링커 디사카라이드

반응식 4

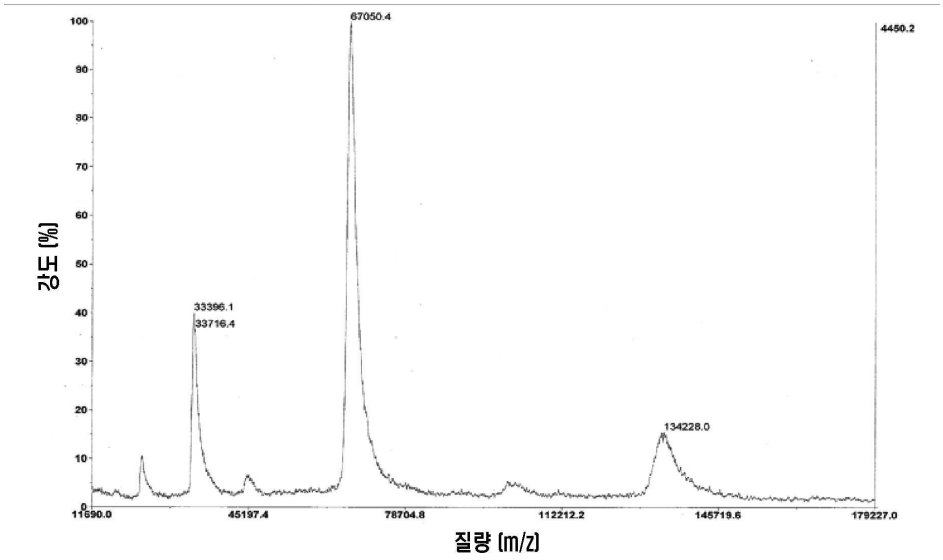
도면26a


1
2
3
4
245
180
135
100
75
63
48
35
25

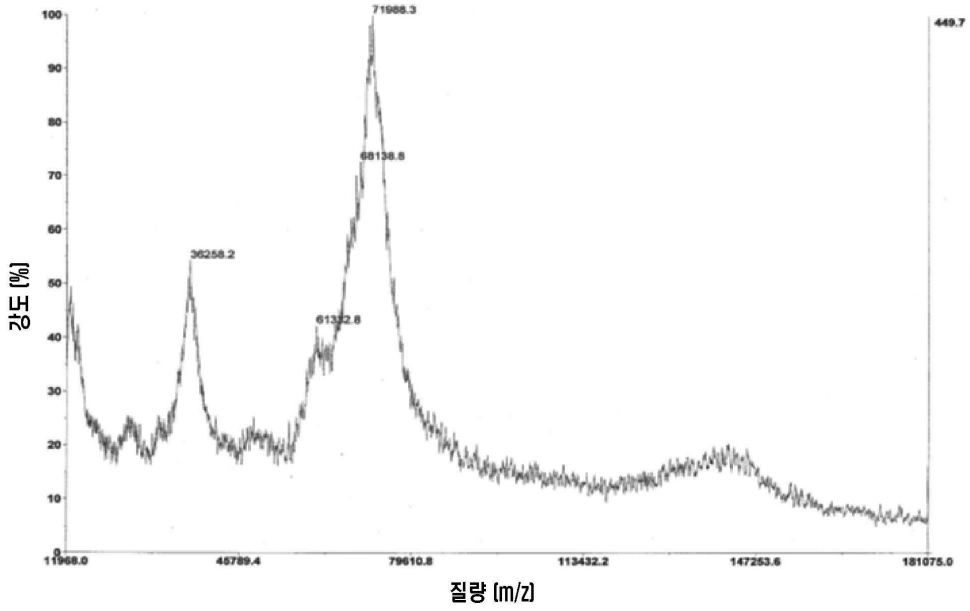
도면26b


1
2
3
4
245
180
135
100
75
63
48
35
25

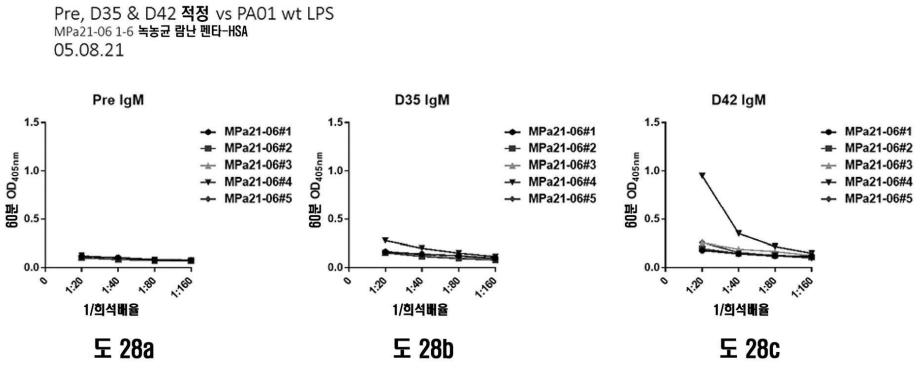
도면27a



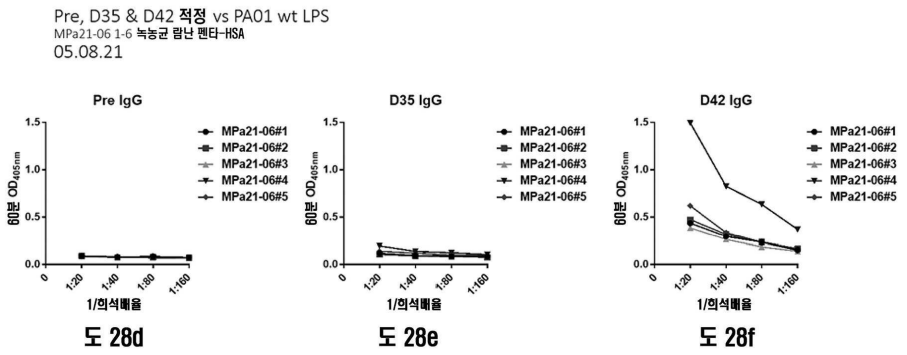
도면27b



도면28i

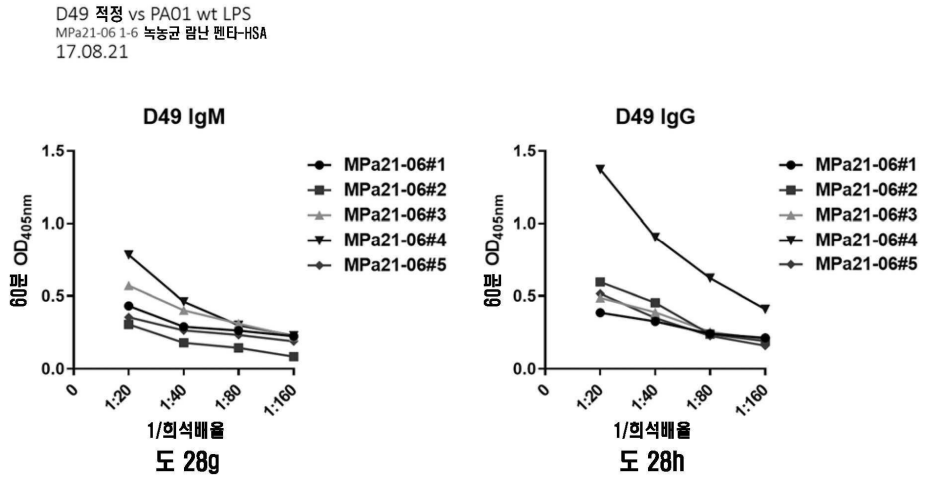


도면28ii



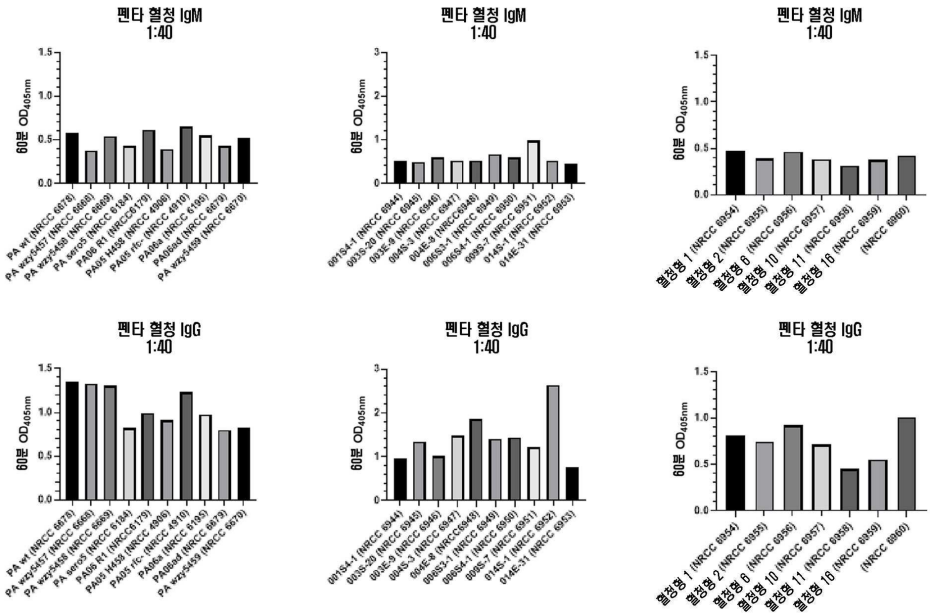
도 28d 도 28e 도 28f

도면28iii

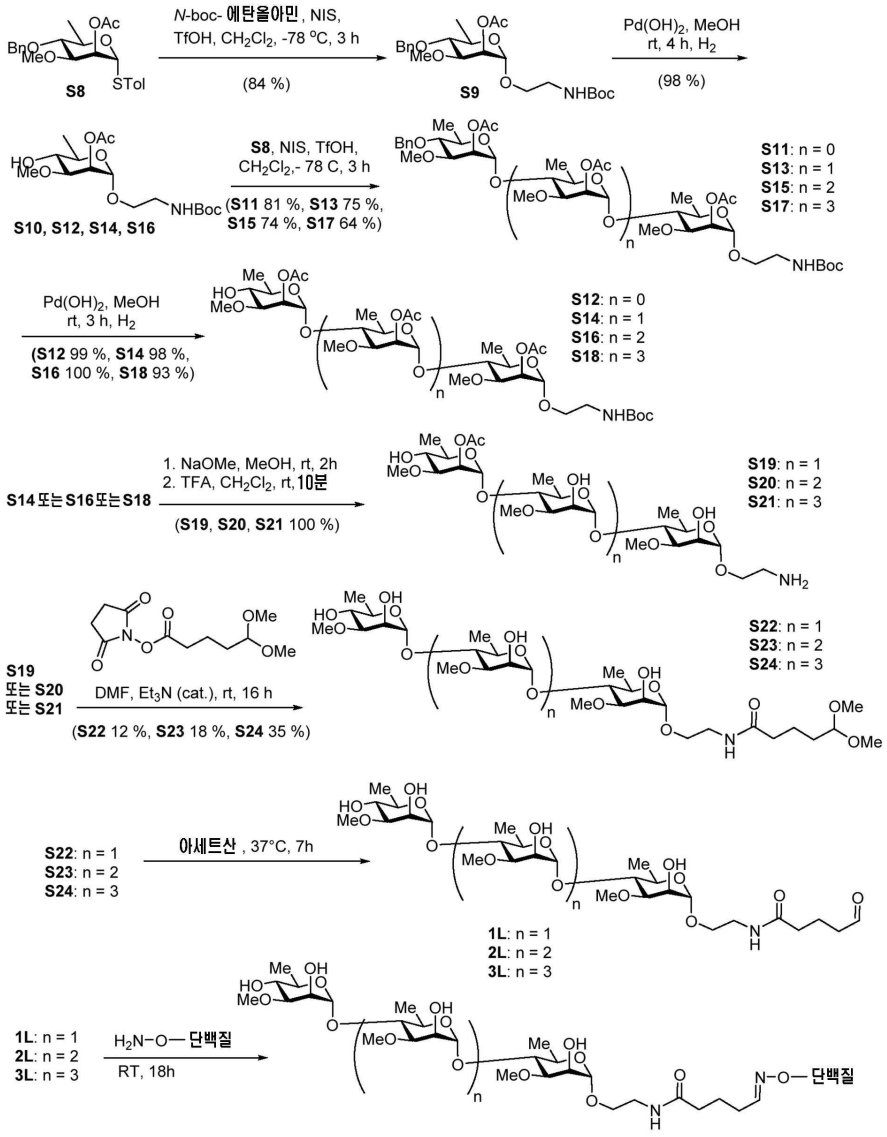


도 28g 도 28h

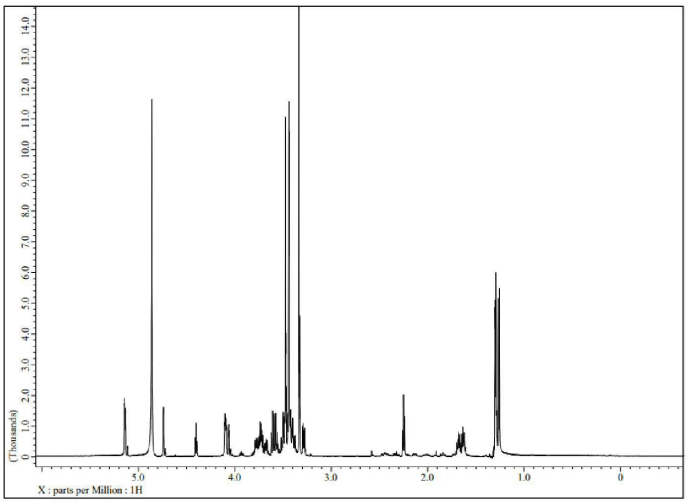
도면29



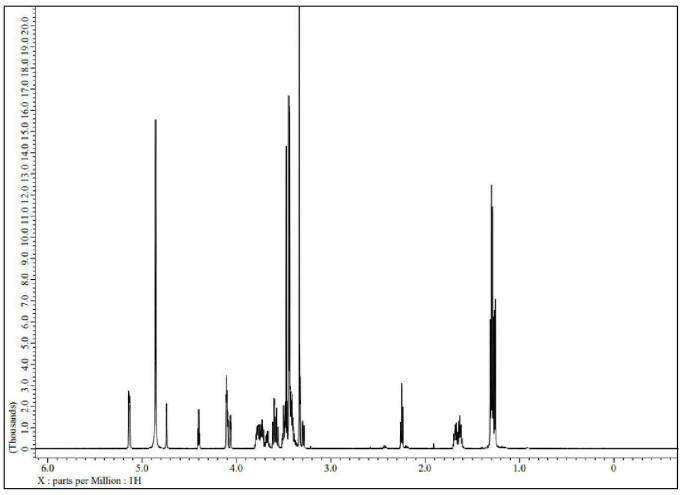
도면30


N-boc- 에탄올아민, NIS,
TfOH, CH2Cl2, -78 °C, 3 h
(84 %)
Pd(OH)2, MeOH
rt, 4 h, H2
(98 %)
S8
S9
S10, S12, S14, S16
S8, NIS, TfOH,
CH2Cl2,- 78 C, 3 h
(S11 81 %, S13 75 %,
S15 74 %, S17 64 %)
S11: n = 0
S13: n = 1
S15: n = 2
S17: n = 3
Pd(OH)2, MeOH
rt, 3 h, H2
(S12 99 %, S14 98 %,
S16 100 %, S18 93 %)
S12: n = 0
S14: n = 1
S16: n = 2
S18: n = 3
1. NaOMe, MeOH, rt, 2h
2. TFA, CH2Cl2, rt, 10분
S14 또는 S16 또는 S18
(S19, S20, S21 100 %)
S19: n = 1
S20: n = 2
S21: n = 3
S19
또는 S20
또는 S21
DMF, Et3N (cat.), rt, 16 h
(S22 12 %, S23 18 %, S24 35 %)
S22: n = 1
S23: n = 2
S24: n = 3
S22: n = 1
S23: n = 2
S24: n = 3
아세트산, 37°C, 7h
1L: n = 1
2L: n = 2
3L: n = 3
1L: n = 1
2L: n = 2
3L: n = 3
H2N–O—단백질
RT, 18h
N–O—단백질

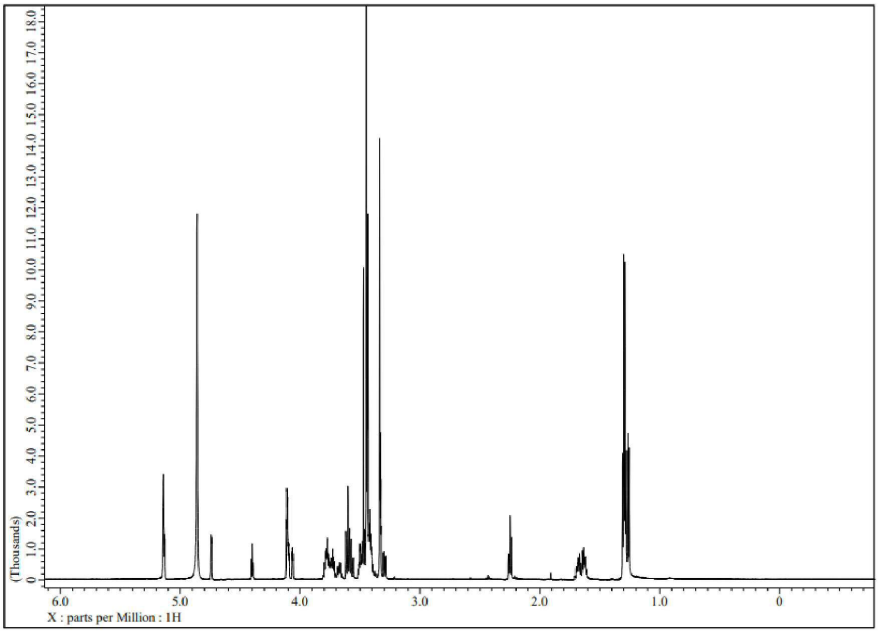
도면31a


(Thousands)
X : parts per Million : 1H

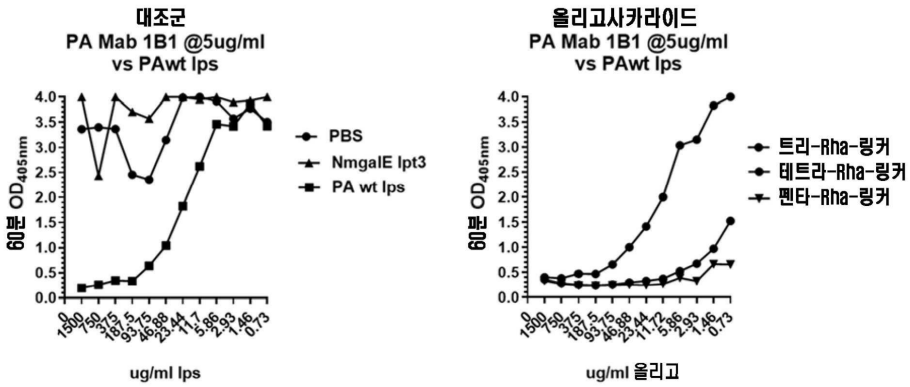
도면31b



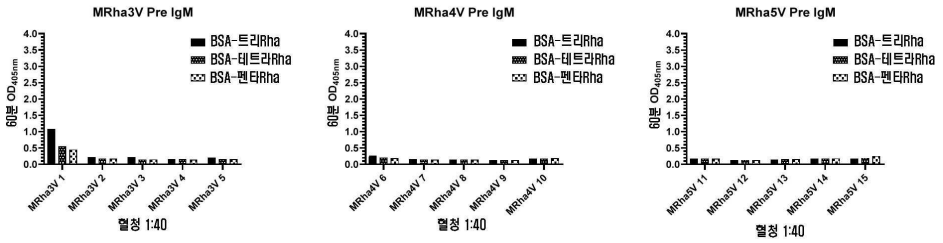
도면32



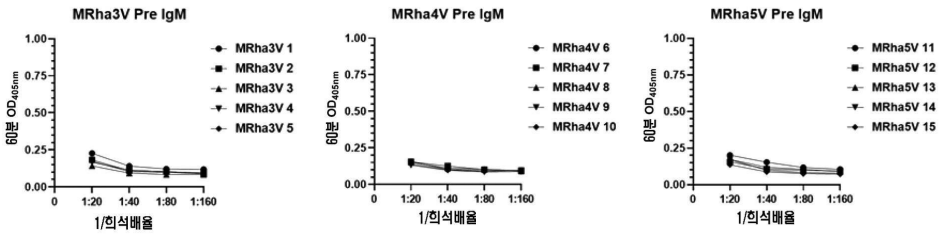
도면33



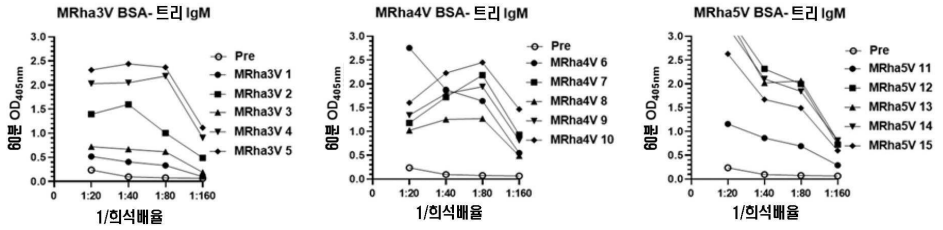
도면34a



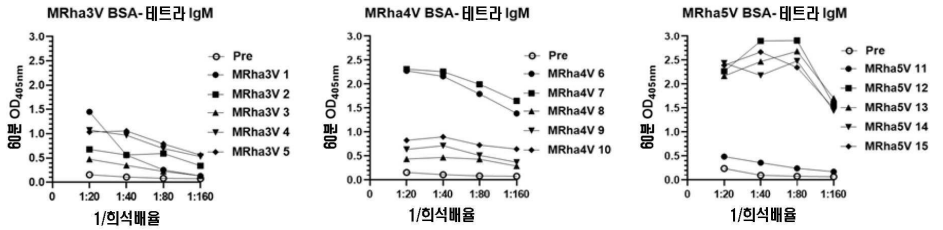
도면34b



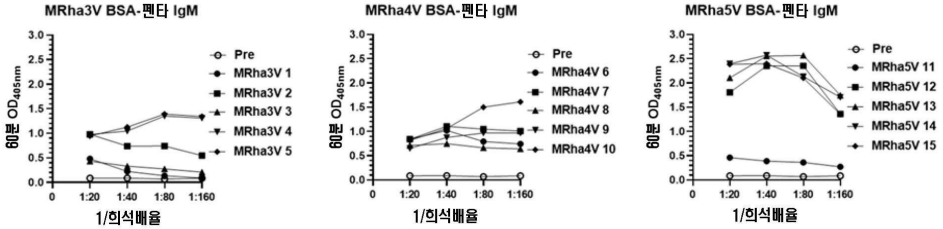
도면35a



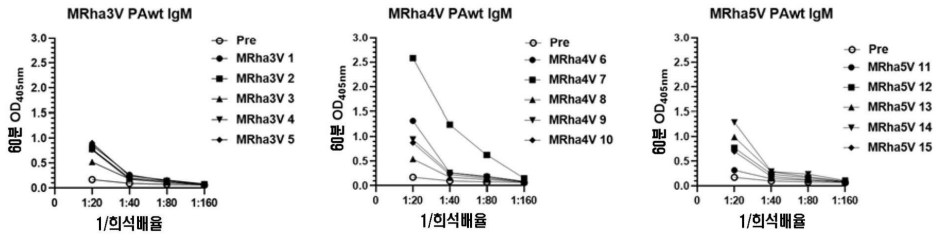
도면35b



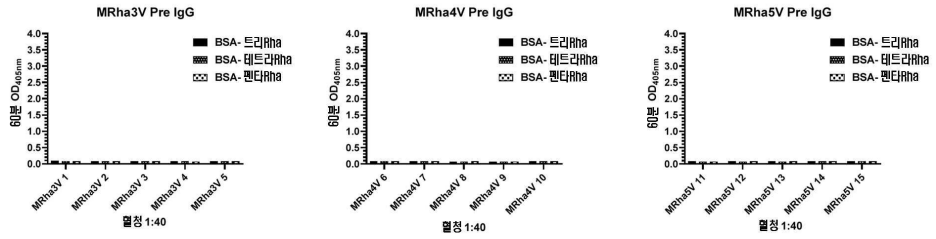
도면35c



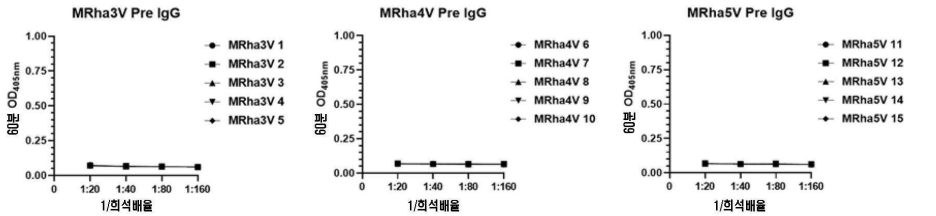
도면35d



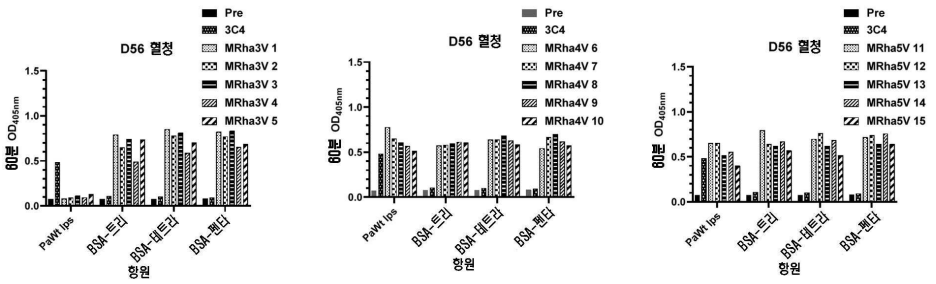
도면36a



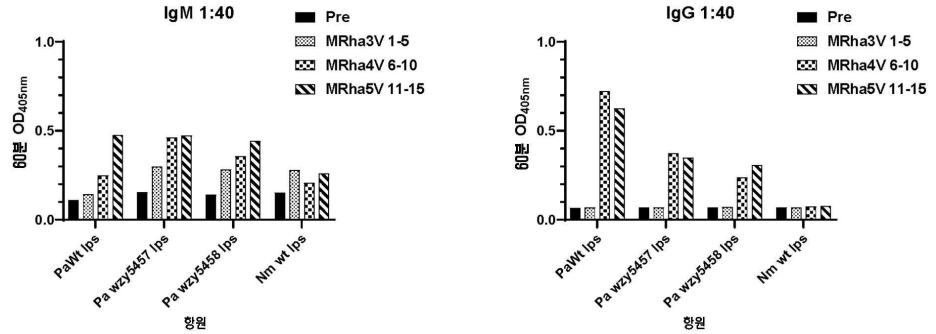
도면36b



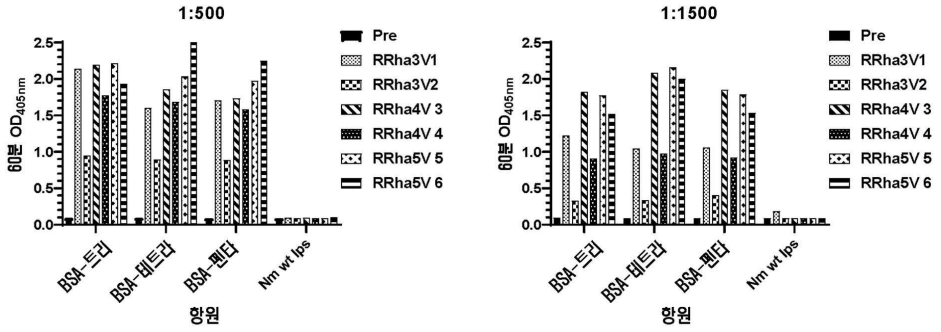
도면37a



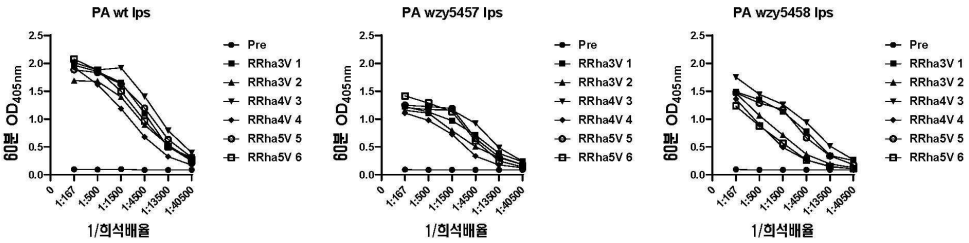
도면37b



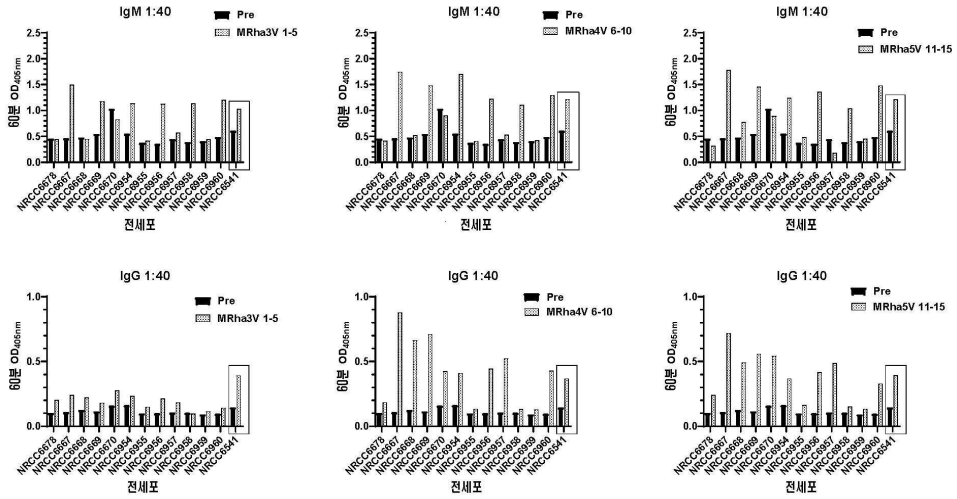
도면38a



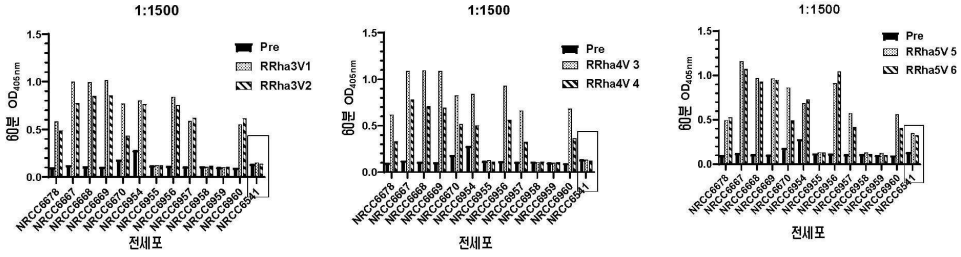
도면38b



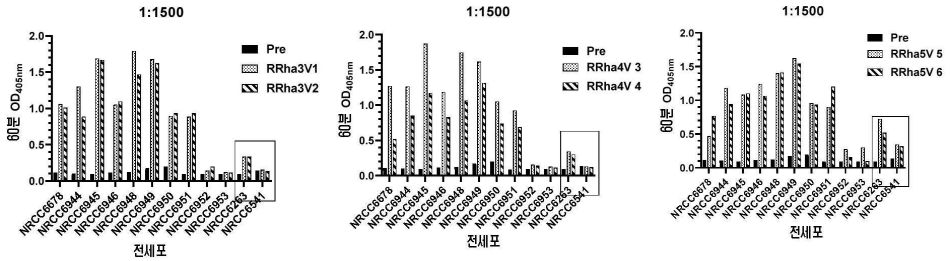
도면39a



도면39b



도면39c


1:1500
60분 OD405nm
Pre
RRha3V1
RRha3V2
NRCC6678
NRCC6944
NRCC6945
NRCC6946
NRCC6948
NRCC6949
NRCC6950
NRCC6951
NRCC6952
NRCC6953
NRCC6263
NRCC6541
전세포
1:1500
60분 OD405nm
Pre
RRha4V 3
RRha4V 4
전세포
1:1500
60분 OD405nm
Pre
RRha5V 5
RRha5V 6
전세포

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.