



- (51) 국제특허분류:
C07H 15/04 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01) G01N 33/92 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004066
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 14일 (14.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0045395 2016년 4월 14일 (14.04.2016) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 채필석 (CHAE, Pil Seok); 15594 경기도 안산시 상록구 해양 1로 11, 608 동 202 호 (사동, 안산고잔 6 차푸르지오), Gyeonggi-do (KR). 에산무하매드 (EH-SAN, Muhammad); 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55, 제 1 공학관 232 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4-6 층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

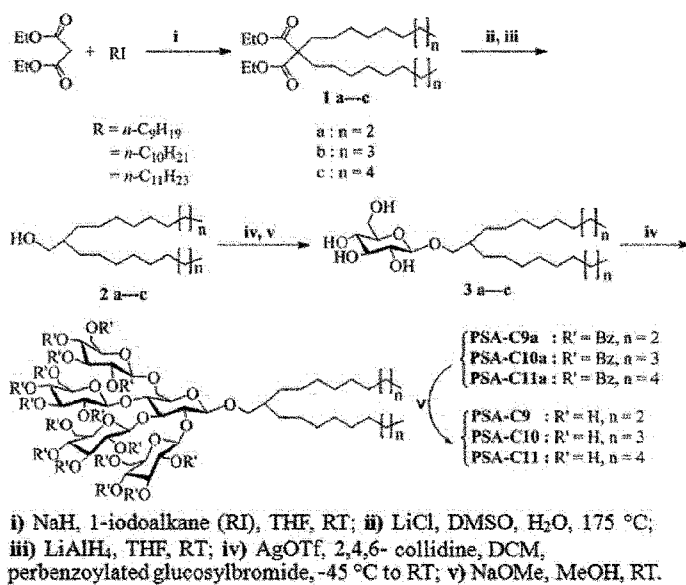
규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: AMPHIPHILIC COMPOUND HAVING NEW PENTASACCHARIDE HYDROPHILIC GROUP AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 새로운 오당류 친수성기를 가지는 양친매성 화합물 및 이의 활용



(57) Abstract: The present invention relates to an amphiphilic compound having a pentasaccharide hydrophilic group, a method for producing the same, and a method for extracting, solubilizing, stabilizing, crystallizing or analyzing a membrane protein and a membrane protein complex using the same. Particularly, since the compound has a high-density pentasaccharide hydrophilic group composed of five glucoses, the compound may have an excellent effect in crystallizing a membrane protein, and since the hydrophilic group has a novel structure used in an amphiphilic compound, the hydrophilic group may be applied to the development of various amphiphilic molecules.

(57) 요약서: 본 발명은 오당류 친수성기를 가지는 양친매성 화합물, 이의 제조방법 및 이를 이용하여 막단백질 및 막단백질 복합체의 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법에 관한 것이다. 특히, 상기 화합물은 5개의 글루코스로 이루어진 고밀도의 오당류 친수성기를 가지기 때문에, 막단백질 결정화에 있어서 탁월한 효과를 가질 수 있으며, 상기 친수성기는 양친매성 화합물에 사용되는 신규한 구조의 친수성기이기 때문에 다양한 양

친매성 분자 개발에 응용이 될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 새로운 오당류 친수성기를 가지는 양친매성 화합물 및 이의 활용

기술분야

- [1] 본 발명은 새롭게 개발한 오당류 친수성기를 가지는 양친매성 화합물, 이의 제조방법 및 이를 이용하여 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 막단백질(membrin proteins)은 생물학적 시스템에서 중요한 역할을 한다. 이 생체거대분자(bio-macromolecules)는 친수성 및 소수성 부분을 포함하므로, 막단백질을 지질 환경으로부터 추출하고, 수용액에서 용해화와 안정화시키기 위해서는 양친매성 분자가 필요하다.
- [3] 막단백질의 구조 분석을 위해서는 양질의 막단백질 결정을 얻어야 하는데 이를 위해서는 수용액에서의 막단백질의 구조적 안정성이 선행되어야 한다. 막단백질 연구에 사용되어 온 기존의 양친매성 분자들의 개수는 100가지 이상으로 다수가 존재하지만 그 중 5개 정도만 막단백질 구조 연구에 활발히 활용되어 왔다. 이 5개의 양쪽성 분자는 OG (n-octyl- β -D-glucopyranoside), NG (n-nonyl- β -D-glucopyranoside), DM (n-decyl- β -D-maltopyranoside), DDM (n-dodecyl- β -D-maltopyranoside), 및 LDAO (lauryldimethylamine-N-oxide)를 포함한다(비특허문헌 1, 비특허문헌 2). 하지만 이들 분자에 의해 둘러싸여 있는 많은 막단백질은 그 구조가 쉽게 변성되거나 응집되어 그 기능을 빠르게 상실하기 때문에 이 분자들을 활용한 막단백질의 기능 및 구조 연구에 상당한 제한점이 있다. 이는 종래의 분자들이 화학구조가 간단하여 충분히 다양한 특성을 나타내주지 못하기 때문이다.
- [4] 특히 막단백질 결정화를 위해서는 막단백질 안정화 능력이 뛰어나면서도 작은 복합체 형성이 중요한데 대부분의 전통적 물질들은 이 두가지 특성을 동시에 지닌 경우가 없다. 현재의 톨로씨는 막단백질 구조 분석에 한계가 있으며 앞으로의 연구는 구조적으로 덜 안정한 막단백질을 다룰 것이므로 막단백질 안정화에 뛰어나면서도 작은 복합체 형성 등 다양한 우수성을 지닌 양친매성 분자가 필요하다.
- [5] 이에 본 발명자들은 새로운 구조의 글루코즈 중심의 고밀도 친수성기를 가지는 양친매성 화합물을 개발하고, 상기 화합물의 막단백질 용해화, 안정화 및 결정화 효과가 우수함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [6] [비특허문헌]
- [7] (비특허문헌 1) S. Newstead et al., *Protein Sci.* 17 (2008) 466-472.
- [8] (비특허문헌 2) S. Newstead et al., *Mol. Membr. Biol.* 25 (2008) 631-638.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

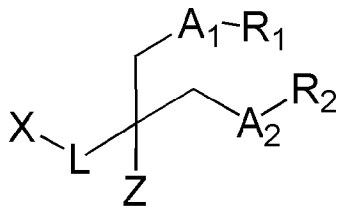
- [9] 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 막단백질의 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 이용하여 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 일 구체예는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[14] [화학식 1]

[15]



- [16] 상기 화학식 1에서,
- [17] 상기 L은 메틸렌기, 또는 직접결합일 수 있고;
- [18] 상기 A¹ 및 A²는 각각 메틸렌기, 또는 산소 원자일 수 있고;
- [19] 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고;
- [20] 상기 X는 산소로 연결된 글루코즈 중심의 가지친(branched) 오당류(pentasaccharide)일 수 있고; 그리고
- [21] 상기 Z는 수소 원자 또는 -CH₂-A³-R³이고, 상기 A³는 메틸렌기, 또는 산소 원자이고, 상기 R³은 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있다.
- [22] 상기 구체예에 따른 화합물은 오당류(penta-saccharide)를 친수성기(hydrophilic group)로 가질 수 있다.
- [23] 본 명세서에서 사용된 용어, "당류(saccharide)"는 탄수화물 중에서 비교적 분자가 작고, 물에 녹아서 단맛이 나는 화합물을 의미한다. 당류는 당을 구성하는 분자의 수에 따라 단당류, 이당류, 다당류로 구분된다.
- [24] 상기 구체예에서 사용된 당류는 글루코즈(glucose)를 친수성기의 중심으로 사용하고, 여기에 4개의 글루코스를 방사성 방향으로 연결하여 총 5개의 글루코스로 이루어진 오당류일 수 있다. 상기 하나의 중심 글루코스에 4개의 글루코스가 각각 글루코시딕 결합에 의해 직접 연결되거나 알킬렌

스페이서(alkylene spacer)에 의해 서로 연결될 수 있다.

- [25] 따라서 상기 화합물의 친수성기는 기존에 사용하지 않은 것으로 친수성 밀도가 높고, 기존의 양친매성 화합물과 구조적으로 차별될 수 있다. 또한, 당류 5개가 밀도 있게 연결되어 있어 친수성기의 크기를 크게 하면서도 길이의 증가를 최소화함으로써 막단백질과의 복합체 형성시 그 크기를 작게하였다. 상기 화합물과 막단백질과의 복합체의 크기가 작으면 양질의 막단백질 결정을 얻을 수 있다 (G. G. Prive, *Methods* 2007, 41, 388-397). 특히, 글루코사이드(glucoside)와 같은 작은 친수성기를 갖고 있는 양친매성 분자는 막단백질 결정화에 있어서 탁월한 효과를 가질 수 있다.
- [26] 또한, Z가 수소일 때, 상기 R¹ 및 R², 또는 Z가 -CH₂-A³-R³일 때, R¹ 내지 R³은 소수성기(hydrophobic group)로 작용할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따른 화합물은 친수성도와 소수성도의 밸런스(hydrophile-lipophile balance)를 최적으로 하기 위하여 두 개 또는 세 개의 알킬기를 소수성기로 도입하였다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에 따른 화합물은 알킬(alkyl) 또는 에터(ether) 링커(linker)에 의해 소수성기와 친수성기가 연결되어 있을 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 구체예들에 따른 화합물은 Z가 수소일 때, 상기 A¹ 및 A²가 메틸렌기(-CH₂-)인 알킬 링커를 가지거나, 상기 A¹ 및 A²가 산소 원자(O)인 에터(-O-) 링커를 가질 수 있다. 또한, Z가 -CH₂-A³-R³일 때, 상기 A¹ 내지 A³ 중 하나 이상은 독립적으로 메틸렌기 (-CH₂-), 또는 산소 원자일 수 있다.
- [28] 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 치환 또는 비치환된 C₅-C₁₅의 알킬기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 동일할 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다.
- [29] 또한, 구체적으로, 상기 L은 직접결합일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 L은 직접결합일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 치환 또는 비치환된 C₅-C₁₅의 알킬기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 동일할 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다.
- [30] 또한, 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³일 수 있고; 상기 A¹ 내지 A³ 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 내지 R³은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 R¹ 내지 R³은 동일할 수 있다. 보다 구체적으로,

상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 일 수 있고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R^1 내지 R^3 은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기일 수 있고; 그리고 상기 R^1 내지 R^3 은 동일할 수 있다.

[31] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSAs (Alkyl-based penta-saccharide amphiphiles)"로 명명하였다.

[32] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A^1 및 A^2 는 산소 원자이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSEs (Ether-based penta-saccharide amphiphiles)"로 명명하였다.

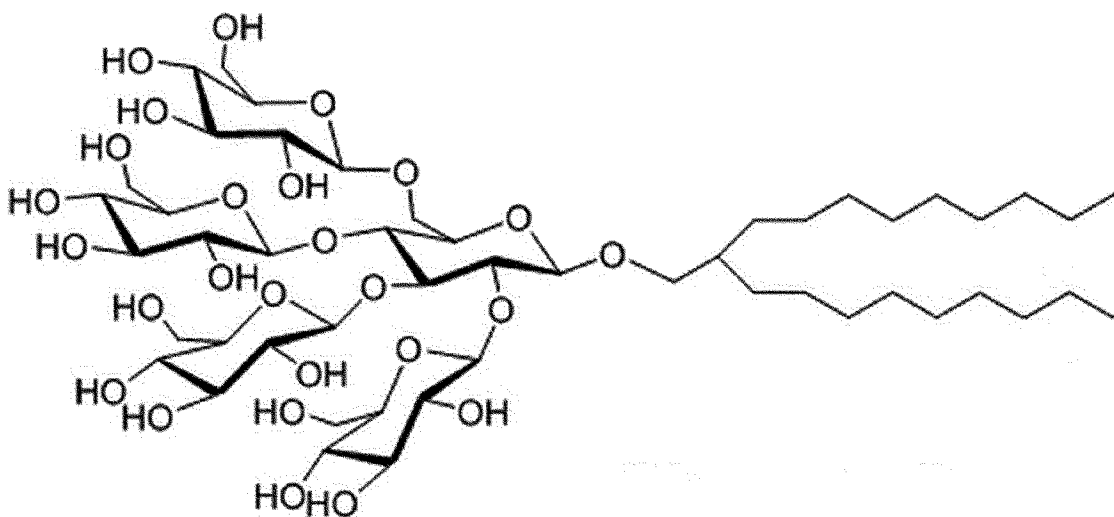
[33] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 이고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상이 산소원자인 화합물을 "TPSs (tripod penta-saccharide amphiphiles)"로 명명하였다.

[34] 상기 화합물은 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 2 내지 18 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[35] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 비치환된 C_7 의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSA-C9"로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

[36] [화학식 2]

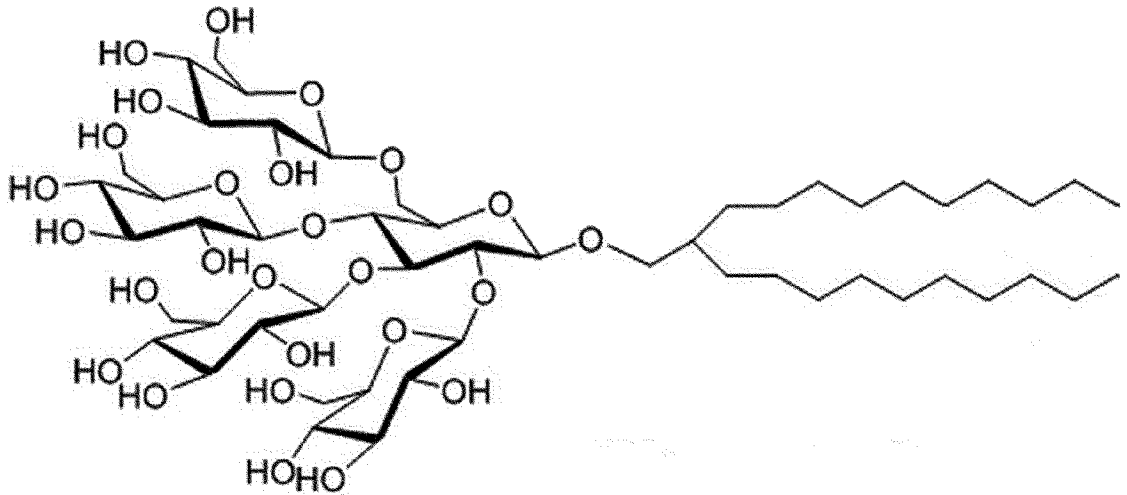
[37]



[38] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 비치환된 C_8 의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSA-C10"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다:

[39] [화학식 3]

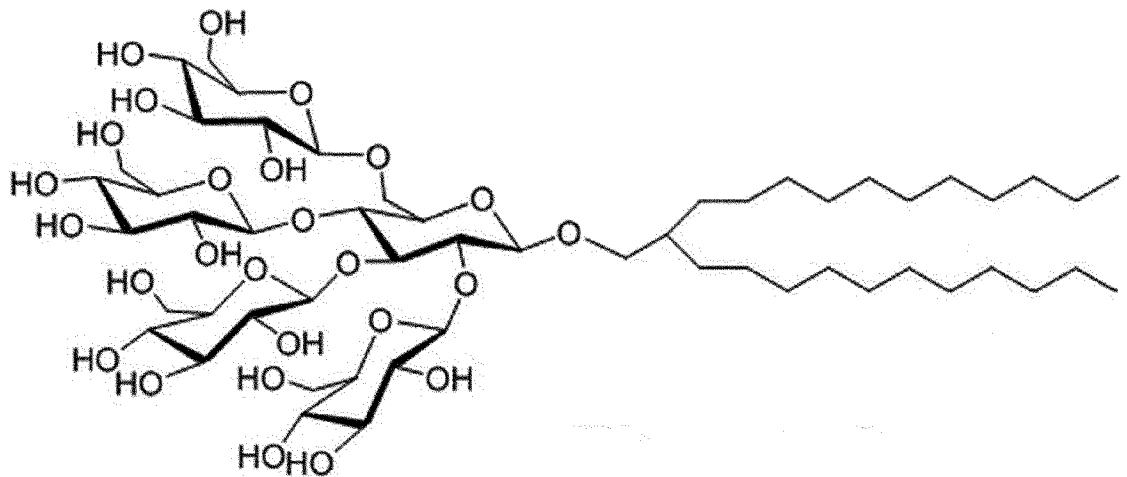
[40]



[41] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기이고; 상기 R¹ 및 R²는 비치환된 C₉의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSA-C11"로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물일 수 있다:

[42] [화학식 4]

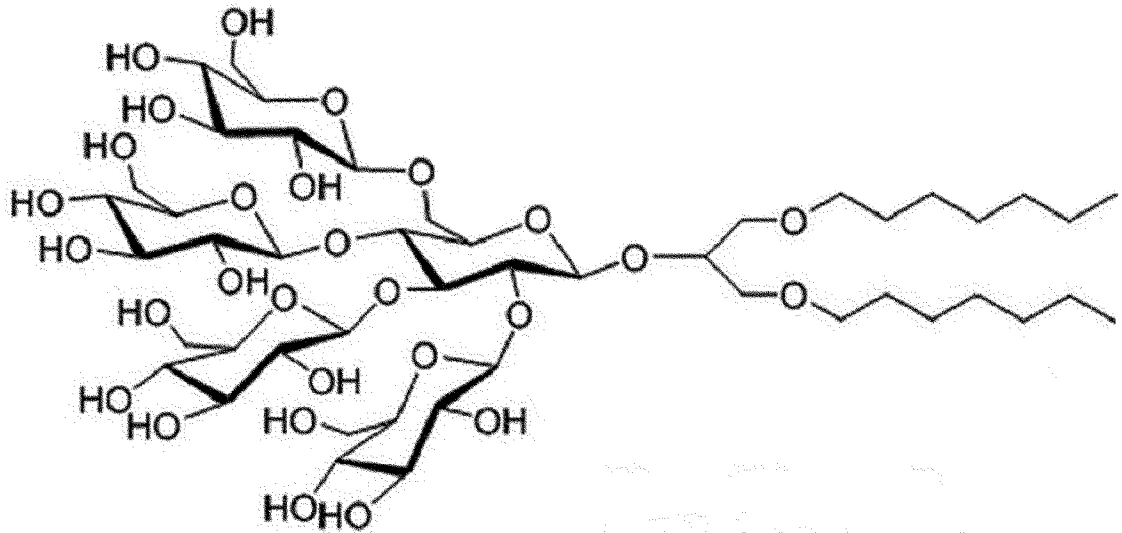
[43]



[44] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 그리고 상기 R¹ 및 R²는 비치환된 C₇의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSE-C7"로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 5로 표시되는 화합물일 수 있다:

[45] [화학식 5]

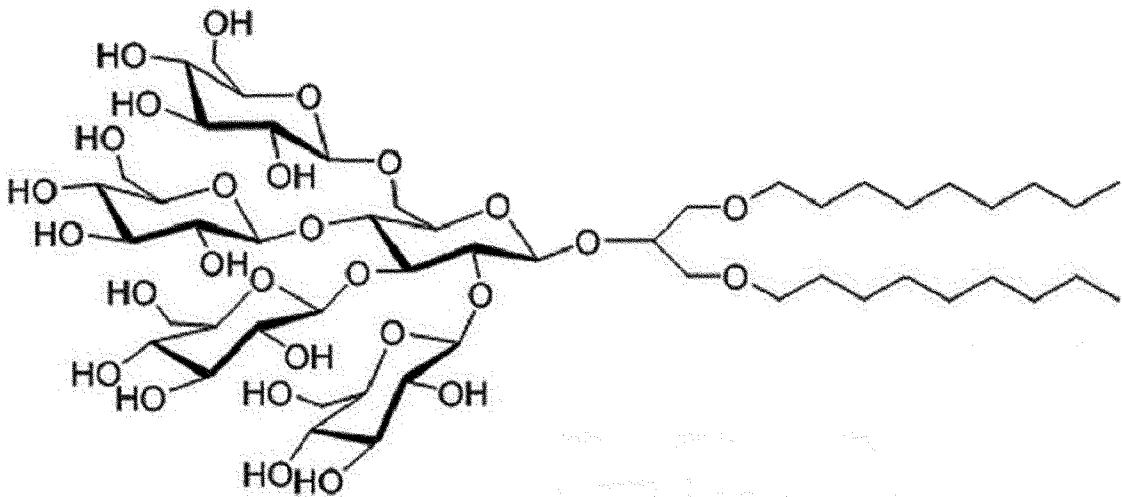
[46]



[47] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 그리고 상기 R¹ 및 R²는 비치환된 C₉의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSE-C9"로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물일 수 있다:

[48] [화학식 6]

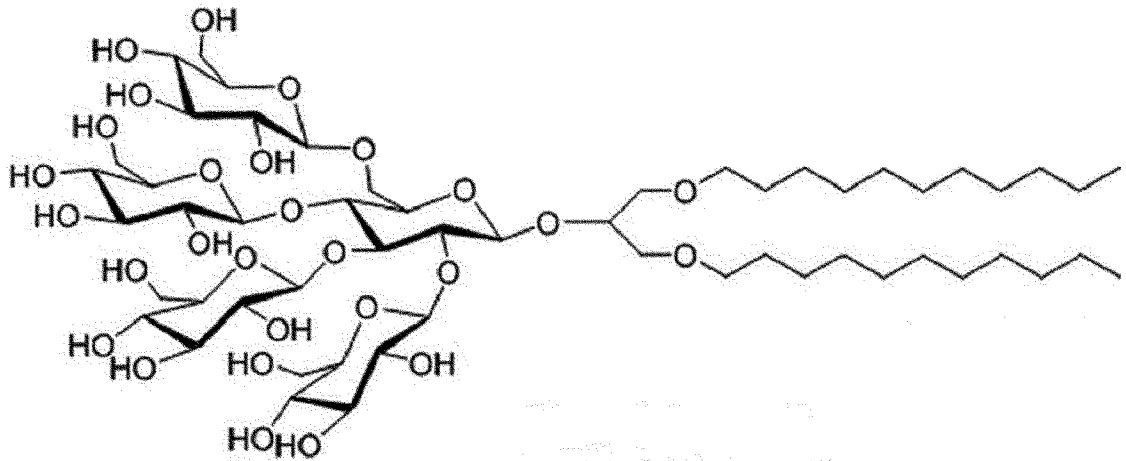
[49]



[50] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 그리고 상기 R¹ 및 R²는 비치환된 C₁₁의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSE-C11"로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 7로 표시되는 화합물일 수 있다:

[51] [화학식 7]

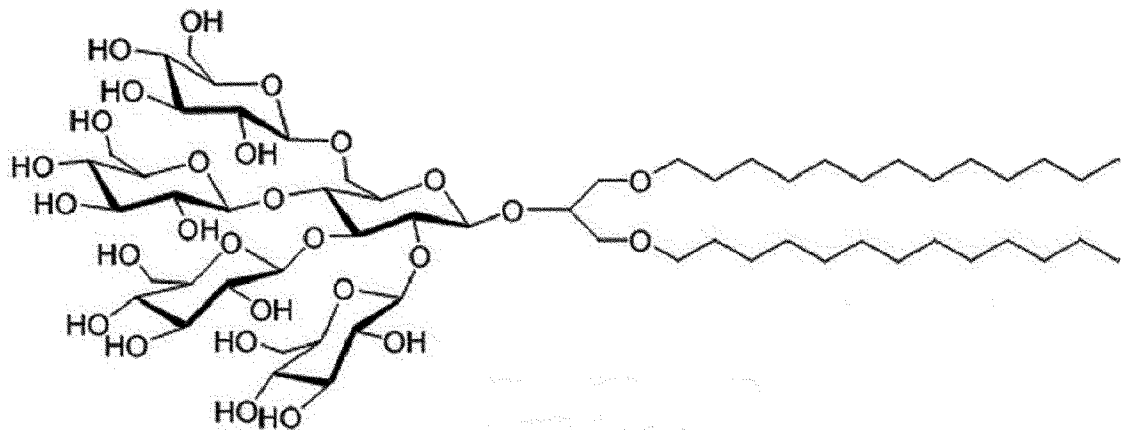
[52]



[53] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 그리고 상기 R¹ 및 R²는 비치환된 C₁₃의 알킬기이고; 상기 Z가 수소 원자인 화합물을 "PSE-C13"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물일 수 있다:

[54] [화학식 8]

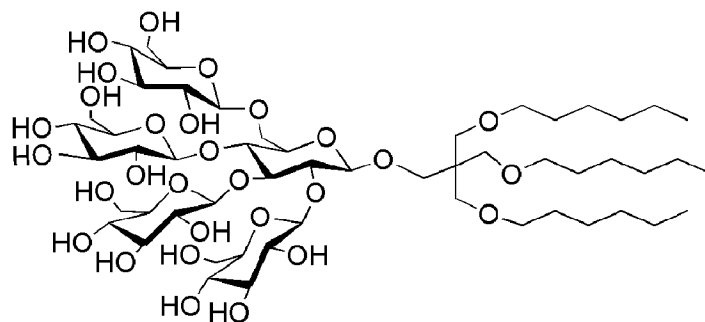
[55]



[56] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₆의 알킬기인 화합물을 "TPS-E6"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 9로 표시되는 화합물일 수 있다:

[57] [화학식 9]

[58]

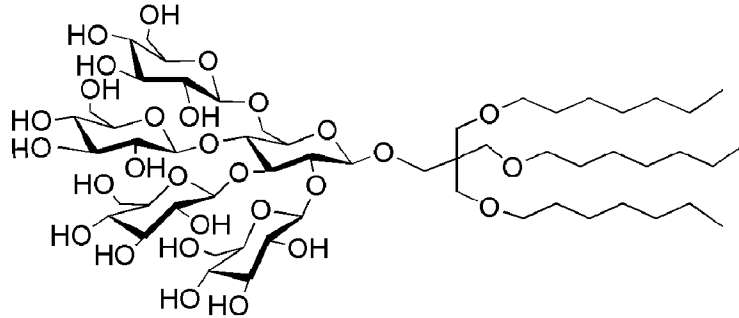


[59] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³

이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₇의 알킬기인 화합물을 "TPS-E7"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 10로 표시되는 화합물일 수 있다:

[60] [화학식 10]

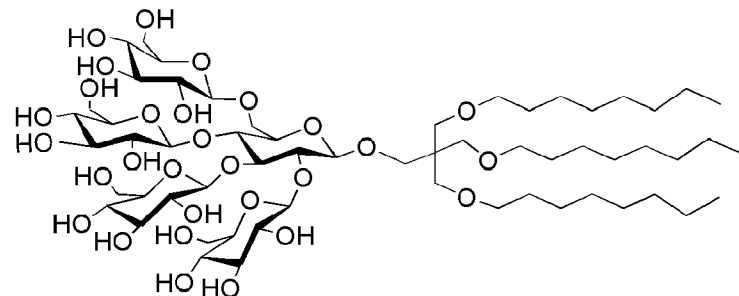
[61]



[62] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₆의 알킬기인 화합물을 "TPS-E8"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 11로 표시되는 화합물일 수 있다:

[63] [화학식 11]

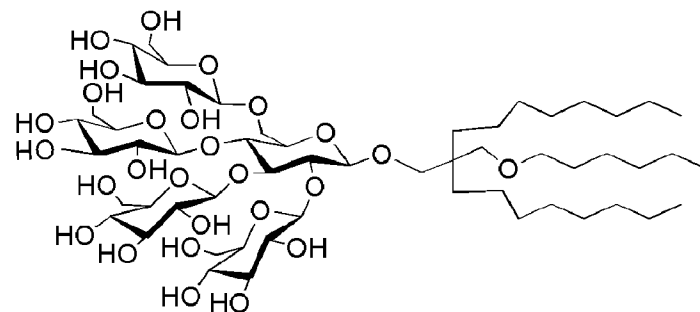
[64]



[65] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 및 A³은 메틸렌기이고 상기 A²는 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₆의 알킬기인 화합물을 "TPS-A6"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 12로 표시되는 화합물일 수 있다:

[66] [화학식 12]

[67]

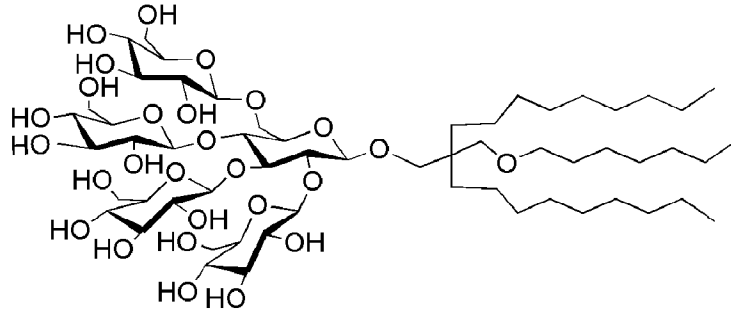


[68] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 및 A³은 메틸렌기이고 상기 A²는 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₇의 알킬기인 화합물을 "TPS-A7"으로 명명하였다. 따라서, 상기

화합물은 하기 화학식 13로 표시되는 화합물일 수 있다:

[69] [화학식 13]

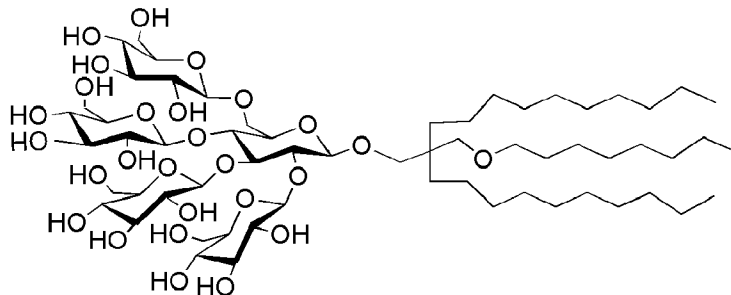
[70]



[71] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 이고; 상기 A^1 및 A^3 은 메틸렌기이고 상기 A^2 는 산소 원자이고; 상기 R^1 내지 R^3 은 비치환된 C_8 의 알킬기인 화합물을 "TPS-A8"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 14로 표시되는 화합물일 수 있다:

[72] [화학식 14]

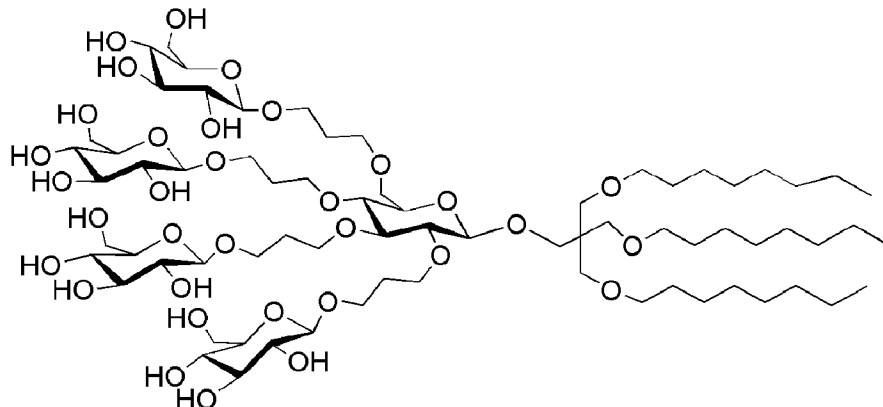
[73]



[74] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 이고; 상기 A^1 내지 A^3 은 산소 원자이고; 상기 R^1 내지 R^3 은 비치환된 C_8 의 알킬기이고; 그리고 X는 하나의 중심 글루코스(central glucose)에 4개의 글루코스가 각각 프로필렌 스페이서(propylene spacer)로 연결된 오당류인 화합물을 "TPS-E8L"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 15로 표시되는 화합물일 수 있다:

[75] [화학식 15]

[76]

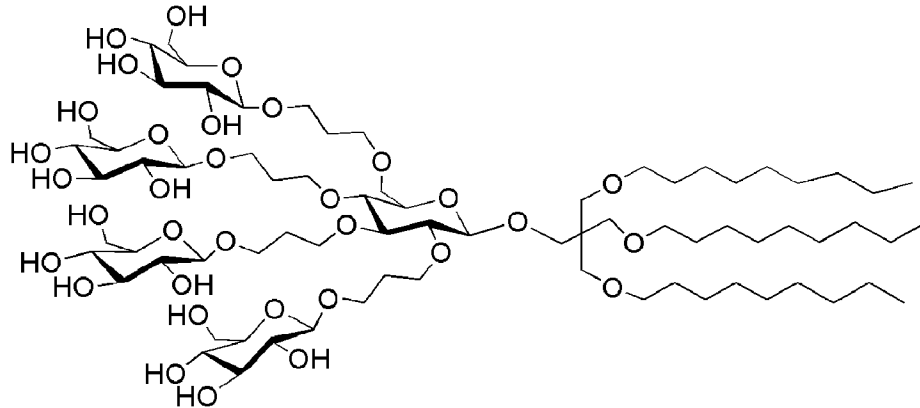


[77] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$

이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₉의 알킬기이고; 그리고 X는 하나의 중심 글루코스(central glucose)에 4개의 글루코스가 각각 프로필렌 스페이서(propylene spacer)로 연결된 오당류인 화합물을 "TPS-E9L"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 16로 표시되는 화합물일 수 있다:

[78] [화학식 16]

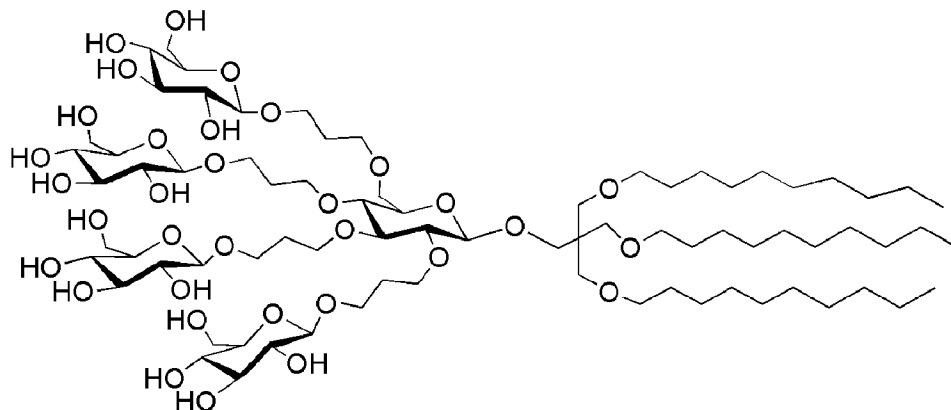
[79]



[80] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₁₀의 알킬기이고; 그리고 X는 하나의 중심 글루코스(central glucose)에 4개의 글루코스가 각각 프로필렌 스페이서(propylene spacer)로 연결된 오당류인 화합물을 "TPS-E10L"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 17로 표시되는 화합물일 수 있다:

[81] [화학식 17]

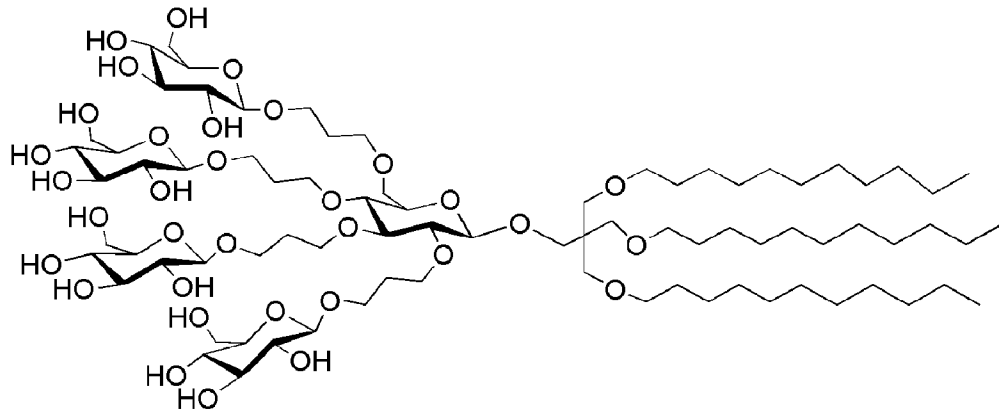
[82]



[83] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³은 산소 원자이고; 상기 R¹ 내지 R³은 비치환된 C₁₁의 알킬기이고; 그리고 X는 하나의 중심 글루코스(central glucose)에 4개의 글루코스가 각각 프로필렌 스페이서(propylene spacer)로 연결된 오당류인 화합물을 "TPS-E11L"으로 명명하였다. 따라서, 상기 화합물은 하기 화학식 18로 표시되는 화합물일 수 있다:

[84] [화학식 18]

[85]



[86] 본 발명의 다른 구체예에 따른 화합물은 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하기 위한 양친매성 분자일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[87] 본 명세서에서 사용된 용어, "양친매성 분자"란 한 분자 내에 소수성기와 친수성기가 존재하여 극성, 비극성 용매에 대해 2가지 성질 모두에 친화성을 갖는 분자를 의미한다. 계면활성제나 세포막에 존재하는 인지질 분자들은 한 끝에는 친수성기, 다른 끝에는 소수성기를 가진 분자로 양친매성을 갖고 수용액 중에서 미셀이나 리포솜을 형성하는 특징이 있다. 친수성기가 극성을 갖고 있으나 비극성기가 공존하기 때문에 이들의 양친매성 분자는 물에 잘 녹지 않는 경향이 있다. 그러나 농도가 어느 한계농도(임계 미셀 농도, CMC) 이상이 되면 소수성 상호작용에 의해 소수성기가 내부로 집합하여 친수성기가 표면에 오는 미셀이 생성되어 물에 대한 용해성이 증가한다.

[88] CMC를 측정하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, 당해 기술분야에서 널리 알려진 방법으로 사용할 수 있으며, 예를 들어 디페닐헥사트리엔(diphenylhexatriene; DPH)을 이용한 형광 염색 방법으로 측정할 수 있다.

[89] 본 발명의 일 구체예에 따른 화합물은 수용액에서 임계 미셀 농도(CMC)가 0.0001 내지 1.0 mM일 수 있으며, 구체적으로, 0.0005 내지 1.0 mM, 보다 구체적으로, 0.0005 내지 0.5 mM, 보다 더 구체적으로, 0.001 내지 0.5 mM, 예를 들어 0.001 내지 0.27 mM일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[90] 기존에 막단백질 연구에 주로 사용되고 있는 DDM의 경우 임계 미셀 농도가 0.170 mM인 것과 비교하여 본 구체예의 PSAs, PSEs 또는 TPSs는 DDM 보다 작은 CMC 값을 가졌다. 따라서, PSAs, PSEs 또는 TPSs는 적은 양으로도 미셀이 용이하게 형성되므로, 적은 양을 사용하여 막단백질을 효과적으로 연구 분석할 수 있어 DDM 보다 유리함을 확인할 수 있었다.

[91] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 상기 화합물을 포함하는 막단백질의 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석용 조성물을 제공한다.

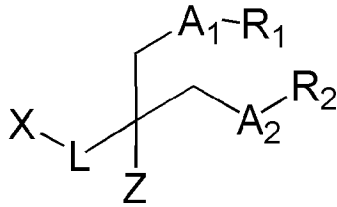
[92] 상기 조성물은 미셀, 리포솜, 에멀션 또는 나노입자의 제형인 것일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[93] 상기 미셀은 반지름이 2.0 nm 내지 70.0 nm일 수 있고, 구체적으로 2.0 nm 내지

45.0 nm일 수 있으며; 보다 구체적으로 본 발명의 실시예들에 따른 PSAs에 의해 형성된 미셀은 반지름이 2.0 nm 내지 4.0 nm일 수 있고, 예를 들어 2.5 내지 3.5 nm일 수 있으며; 보다 더 구체적으로 본 발명의 다른 실시예들에 따른 PSEs에 의해 형성된 미셀은 반지름이 2.0 nm 내지 30.0 nm일 수 있고, 예를 들어 2.6 nm 내지 15.0 nm일 수 있으며; 그리고 본 발명의 다른 실시예에 따른 TPSs에 의해 형성된 미셀은 반지름이 2.0 nm 내지 70.0 nm일 수 있고, 예를 들어 2.3 nm 내지 60.0 nm일 수 있으나 이에 제한하지 않는다.

- [94] 미셀의 반지름을 측정하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, 당해 기술분야에서 널리 알려진 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 동적 광산란(dynamic light scattering; DLS) 실험을 이용해 측정할 수 있다.
- [95] 상기 미셀, 리포솜, 에멀션 또는 나노입자는 내부에 막단백질을 포함할 수 있다. 즉, 상기 미셀, 리포솜, 에멀션 또는 나노입자는 세포막 내부에 존재하는 막단백질을 추출하여 감싸안을 수 있다. 따라서, 상기 미셀에 의하여 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 것이 가능하다.
- [96] 상기 조성물은 막단백질의 추출, 용해화, 안정화 또는 분석에 도움이 될 수 있는 버퍼 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [97] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 1) 내지 6)의 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다:
- [98] 1) 디에틸 말론산염(diethyl malonate)에 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)을 첨가하여 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate)을 생성하는 단계;
- [99] 2) 상기 단계 1)의 생성물에 LiCl, DMSO 및 H₂O를 첨가하고 150~200°C로 가열한 후, LiAlH₄, THF를 첨가하여 디알킬화 모노올(dialkylated mono-ol)을 생성하는 단계;
- [100] 3) 상기 단계 2)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;
- [101] 4) 상기 단계 3)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;
- [102] 5) 상기 단계 4)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및
- [103] 6) 상기 단계 5)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계.
- [104] [화학식 1]

[105]



[106] 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 상기 Z는 수소 원자일 수 있고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류일 수 있다.

[107] 상기 구체예에 따른 제조 방법은 본 발명의 일 실시예에 따른 PSAs의 제조 방법일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[108] 본 구체예에서, 디에틸 말론산염(diethyl malonate)을 출발물질로 사용해서 6단계의 합성단계를 거쳐 간단한 방법으로 화합물을 합성할 수 있다. 이처럼 본 발명의 제조 방법에 의하면 화합물의 합성이 용이하므로, 막단백질 연구를 위한 화합물의 대량 생산이 가능하다.

[109] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 1) 내지 5)의 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다:

[110] 1) 에피클로로하이드린(Epichlorohydrin)에 NaOH 및 알코올을 첨가하여 알코올 유도체를 생성하는 단계;

[111] 2) 상기 단계 1)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;

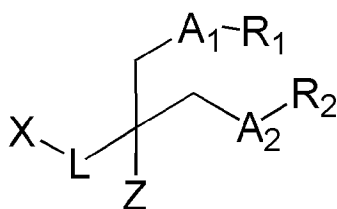
[112] 3) 상기 단계 2)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;

[113] 4) 상기 단계 3)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및

[114] 5) 상기 단계 4)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계.

[115] [화학식 1]

[116]



[117] 상기 L은 직접결합일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고;

상기 Z는 수소 원자일 수 있고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류일 수 있다.

[118] 상기 구체예에 따른 제조 방법은 본 발명의 다른 실시예에 따른 PSEs의 제조 방법일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[119] 본 구체예에서, 에피클로로하이드린(Epichlorohydrin)을 출발물질로 사용해서 5단계의 합성단계를 거쳐 간단한 방법으로 화합물을 합성할 수 있다. 이처럼 본 발명의 제조 방법에 의하면 화합물의 합성이 용이하므로, 막단백질 연구를 위한 화합물의 대량 생산이 가능하다.

[120] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 1) 내지 7)의 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다:

[121] 1) 디에틸 말론산염(diethyl malonate)에 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)을 첨가하여 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate)을 생성하는 단계;

[122] 2) 상기 단계 1)의 생성물에 LiAlH_4 , THF를 첨가하여 디알킬화 다이올(dialkylated diol)을 생성하는 단계;

[123] 3) 상기 단계 2)의 생성물에 1-브로모알케인(1-bromoalkane)을 첨가하여 알킬사슬을 추가하는 단계;

[124] 4) 상기 단계 3)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;

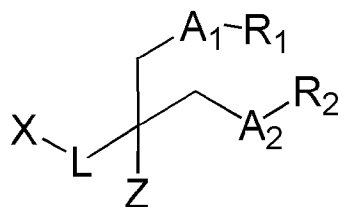
[125] 5) 상기 단계 4)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;

[126] 6) 상기 단계 5)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및

[127] 7) 상기 단계 6)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:

[128] [화학식 1]

[129]



[130] 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 일 수 있고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나는 산소 원자일 수 있고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R^1 내지 R^3 은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기이고; 상기 R^1 내지 R^3 은 동일할 수 있고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류일 수 있다.

[131] 상기 구체예에 따른 제조 방법은 본 발명의 다른 실시예에 따른 TPS-As의 제조

방법일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[132] 본 구체예에서, 디에틸 말론산염(diethyl malonate)을 출발물질로 사용해서 7단계의 합성단계를 거쳐 간단한 방법으로 화합물을 합성할 수 있다. 이처럼 본 발명의 제조 방법에 의하면 화합물의 합성이 용이하므로, 막단백질 연구를 위한 화합물의 대량 생산이 가능하다.

[133] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 1) 내지 6)의 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다:

[134] 1)

5,5-비스-브로모메틸-2,2-디메틸-[1,3]디옥산(5,5-bis-bromomethyl-2,2-dimethyl-[1,3]dioxane)을 시작 물질로 하여 디알킬화 다이올을 합성하는 단계;

[135] 2) 상기 단계 1)의 생성물에 1-브로모알케인(1-bromoalkane)을 첨가하여 알킬사슬을 추가하는 단계;

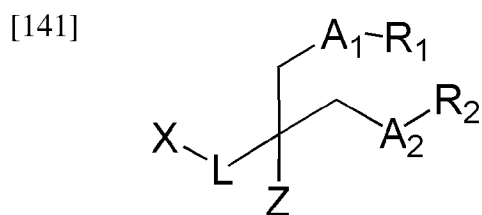
[136] 3) 상기 단계 2)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;

[137] 4) 상기 단계 3)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;

[138] 5) 상기 단계 4)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및

[139] 6) 상기 단계 5)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:

[140] [화학식 1]



[142] 상기 화학식 1에서,

[143] 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³일 수 있고; 상기 A¹ 내지 A³는 산소 원자일 수 있고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 내지 R³은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기일 수 있고; 상기 R¹ 내지 R³은 동일할 수 있고; 그리고 상기 X는 글루코스 중심의 가지친 오당류일 수 있다.

[144] 상기 구체예에 따른 제조 방법은 본 발명의 다른 실시예에 따른 TPS-Es의 제조 방법일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[145] 본 구체예에서,

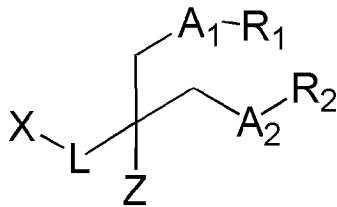
5,5-비스-브로모메틸-2,2-디메틸-[1,3]디옥산(5,5-bis-bromomethyl-2,2-dimethyl-[1,3]dioxane)을 출발물질로 사용해서 6단계의 합성단계를 거쳐 간단한 방법으로

화합물을 합성할 수 있다. 이처럼 본 발명의 제조 방법에 의하면 화합물의 합성이 용이하므로, 막단백질 연구를 위한 화합물의 대량 생산이 가능하다.

- [146] 또한, 본 발명의 또 다른 구체예는 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 수용액에서 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 막단백질에 처리하는 단계를 포함하는, 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법을 제공한다:

[147] [화학식 1]

[148]



- [149] 상기 화학식 1에서,
 [150] 상기 L은 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀의 알킬렌기, 또는 직접결합이 수 있고;
 [151] 상기 A¹ 및 A²는 각각 메틸렌기, 또는 산소 원자일 수 있고;
 [152] 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고;
 [153] 상기 X는 산소로 연결된 글루코즈 중심의 가지친(branched) 오당류(pentasaccharide)일 수 있고; 그리고
 [154] 상기 Z는 수소 원자 또는 -CH₂-A³-R³이고, 상기 A³는 메틸렌기, 또는 산소 원자이고, 상기 R³은 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있다.
 [155] 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 치환 또는 비치환된 C₅-C₁₅의 알킬기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 동일할 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다.
 [156] 또한, 구체적으로, 상기 L은 직접결합일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 L은 직접결합일 수 있고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 치환 또는 비치환된 C₅-C₁₅의 알킬기일 수 있고; 상기 R¹ 및 R²는 동일할 수 있고; 그리고 상기 Z는 수소 원자일 수 있다.

- [157] 또한, 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 일 수 있고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R^1 내지 R^3 은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기일 수 있고; 그리고 상기 R^1 내지 R^3 은 동일할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 L은 메틸렌기일 수 있고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 일 수 있고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기일 수 있고; 상기 R^1 내지 R^3 은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기일 수 있고; 그리고 상기 R^1 내지 R^3 은 동일할 수 있다.
- [158] 상기 화합물은 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 화학식 2 내지 18 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [159] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질"이란 세포막 지질이중층으로 이입되는 단백질 또는 당단백질의 총칭이다. 이는 세포막 전체 층을 관통하거나, 표층에 위치하거나, 세포막을 배접하는 등 여러 상태로 존재하고 있다. 막단백질의 예로 효소, 펩티드호르몬, 국소호르몬 등의 수용체, 당 등의 수용담체, 이온채널, 세포막 항원 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [160] 상기 막단백질은 세포막 지질이중층으로 이입되는 단백질 또는 당단백질이라면 어느 것이나 포함하며, 구체적으로 BOR1 (Boron transporter), LeuT (Leucine transporter), MelB (melibiose permease), $\beta_2\text{AR}$ (human β_2 adrenergic receptor), UapA (uric acid-xanthine/ H^+ symporter), 또는 이들의 2 이상의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [161] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질의 추출"이란 막단백질을 세포막(membrane)으로부터 분리하는 것을 의미한다.
- [162] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질의 용해화(solubilization)"란 물에 녹지 않는 막단백질을 수용액에서 양친매성 분자의 미셀에 녹아들도록 하는 것을 의미한다.
- [163] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질의 안정화(stabilization)"란 막단백질의 구조, 기능이 변하지 않도록 3차 또는 4차 구조를 안정하게 보존하는 것을 의미한다.
- [164] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질의 결정화(crystallization)"란 용액에서 막단백질의 결정을 형성하는 것을 의미한다.
- [165] 본 명세서에서 사용된 용어, "막단백질의 분석(analysis)"이란 막단백질의 구조 또는 기능을 분석하는 것을 의미한다. 상기 구체예에서, 막단백질의 분석은 공지의 방법을 이용할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 전자현미경(electron microscopy)을 이용하여 막단백질의 구조를 분석할 수 있다.
- [166] 양친매성 화합물의 친수성기는 막단백질 안정화에 매우 중요한 역할을 한다. 예를 들어, LDAO(lauryldimethylamine-*N*-oxide) 및 DDM(*n*-dodecyl- β -D-maltoside)은 도데실 사슬을 공통적으로 가지고 있으나, *N*-oxide 및

말토사이드(maltoside) 헤드(head) 그룹을 각각 함유한다(Newstead, S. 등, *Protein Sci.* 2008, 17, 466-472. 참조). 같은 꼬리(tail) 그룹의 존재에도 불구하고, 이 두 개의 양친매성 분자는 용액에서 막단백질을 안정화하는 능력 면에서 매우 다르다; LDAO는 안정화 능력이 다소 낮은 반면, DDM은 120개의 기존 양친매성 분자 중에서 가장 안정화 능력이 높은 것 중 하나이다. 이와 유사한 경향은 글루코사이드 (예를 들어, OG(*n*-octyl- β -D-glucopyranoside)) 및 말토사이드 (예를 들어, DM(*n*-decyl- β -D-maltoside) 및 DDM) 양친매성 분자의 비교에서도 찾을 수 있다; 말토사이드 양친매성 분자는 막단백질 안정화에서 글루코사이드 제제보다 일반적으로 우수하다. 막단백질 안정화에서 양친매성 분자 친수성기의 중요성에도 불구하고, 현재까지 새로운 친수성기를 가지는 양친매성 분자를 개발하기 위한 노력이 적었다. 새로운 제제인 **chobimalt**는 흥미로운 헤드 그룹인 직선 사당류를 함유하나, 이 제제는 기존 양친매성 분자가 존재할 때만 막단백질 안정화에 효과를 나타내었다. 반면, 본 발명에서 도입된 새로운 탄수화물-기반 친수성 그룹 (즉, 분지된 오당류)은 다분지 구조를 가지며, 이는 **chobimalt** 및 기존 양친매성 분자와 확연히 구별된다. 이 친수성 그룹은 중앙의 글루코스 중심에 4개의 글루코스 단위가 직접 또는 프로필렌 스페이서에 의해 부착됨에 의해 입체특이적으로 형성되었고, 이는 친수성기를 고밀도로 만들었다. 일반적으로, 이러한 고밀도 탄수화물은 제조하기 매우 어려우나, TPSs, PSAs 및 PSEs의 오당류 친수성 그룹은 4-6단계를 거쳐 전체 수율 40~60%로 제조가 가능하다. 이와 같은 친수성 그룹의 간단한 제조는 대규모로 제조할 수 있게 만들어 상용화에 유리하다. 새로운 제제 중에서, TPS-E8, TPS-E10L 및 PSE-C11은 가장 우수한 기존 양친매성 분자인 DDM에 비해 상대적으로 테스트한 모든 4개의 실험된 막단백질, 즉, BOR1 및 β_2 AR 와 같은 진행 막단백질을 포함하는 막단백질에 상당히 향상된 안정성을 부여하였다. 이러한 결과는 양친매성 분자 친수성기의 막단백질 안정화에 대한 중요성을 확인한 것이다. 이 새로운 분지된 오당류 친수성기는 미래의 새로운 양친매성 화합물 디자인에 이용될 수 있다.

- [167] 이 새로운 제제는 다양한 길이의 분지된 알킬 사슬을 가진다. 분지된 오당류 헤드 그룹의 높은 친수성도 때문에, 최적의 친수성-소수성 균형(hydrophile-lipophile balance, HLB)을 유지하기 위하여 큰 소수성기가 요구된다. 만약 분지된 것 대신 선형 알킬 사슬을 소수성기로 사용한다면 매우 긴 알킬 사슬을 가지는 양친매성 분자를 생성할 것이다. 부피가 큰 오당류 헤드 그룹과 균형을 맞추기 위하여 이론적으로는 C₂₀ 이상의 선형 알킬 사슬이 필요한 것으로 계산되었다. 그러나, 긴 선형의 알킬 사슬을 가지는 양친매성 분자는 막단백질 크기와의 매스매치로 막단백질의 안정성을 저해할 뿐 만 아니라 비효율적으로 큰 PDCs(Protein-detergent complexes)를 생성하기 때문에 막단백질 결정화에 적합하지 않을 수 있다. 게다가, 이러한 타입의 양친매성 분자의 제조를 위한 출발물질 (알코올/할라이드 유도체)은 상업적으로 구입이

불가능하거나 가능하다 하더라도 매우 비싸다. 반면에, 분지된 알킬 사슬을 함유하는 TPSs, PSAs 및 PSEs는 β_2 AR와 결정화에 매우 적합한 작은 PDCs를 형성하며, 이는 이 소수성기의 장점을 나타낸다. 분지된 알킬기는 또한 막단백질 용해화에 유리한 역할을 하는데, TPAs 연구에서 증명된 바와 같이 소수성기의 개수는 막단백질의 용해화 효율에 긴밀한 관계가 있다. 본 발명에서, 새로운 제제는 BOR1-GFP 융합 단백질 및 MelB_{st} 뿐만 아니라 β_2 AR도 세포막으로부터 효과적으로 추출 용해화하였다.

- [168] 본 발명의 일 실시예에 따른 TPS-E8, TPS-E10L 및 PSE-C11이 T4L- β_2 AR-Gs 또는 β_2 AR-Gs 복합체에 의해 예시된 바와 같이 막단백질 복합체를 안정화하고 시각화하는 데 우수하였다. 대부분의 막단백질이 다른 단백질과 어셈블리의 형태로 자신의 생물학적 역할을 발휘하는 바와 같이, 막단백질 복합체의 구조 및 기능적 연구는 매우 중요하지만, 매우 도전적이다. 이와 같은 어려움은 주로 이들 복합체의 4차 구조 보존과 연관되어 있다; 아주 적은 수의 양친매성 분자가 진행 단백질 복합체의 장기간 안정화에 적합한 것으로 알려져 있다. MNG-3는 복합체 안정화에 적합하나, 이 제제는 큰 PDCs를 형성하는 경향이 있다. 반면에, TPS-E8, TPS-E10L 및 PSE-C11은 작은 PDCs를 형성하는 경향이 있을 뿐만 아니라 막단백질 복합체의 구조 연구에 적합하다. 추가적으로, 새롭게 개발한 양친매성 분자는 막단백질의 본래 구조를 유지하는 데 MNG-3 보다 우수함을 나타내었다. 예를 들어, CMC+0.2 wt%의 양친매성 분자 농도에서, MNG-3에 용해화된 LeuT는 12일의 배양 동안 그 활성을 40%까지 잃은 반면, TPS-E8 및 PSE-C11은 같은 기간 동안에 트랜스포터 활성을 완전히 보존하였다. 하나의 양친매성 분자가 다양한 구조 및 특성을 가진 모든 막단백질에 대한 만능일 수 없기 때문에, 기존 양친매성 분자 및 다른 새로운 제제들과 구별되는 구조를 갖는 다양한 범위의 새로운 양친매성 분자의 개발이 막단백질 연구의 진보에 필수적이다.

- [169] 단백질 용해화 효율, 단백질 안정성 및 작은 PDCs와 같은 바람직한 계면활성제 특성은 종종 단일 분자 내에 서로 공존하지 않는다. 예를 들어, 높은 막단백질 용해화 효율을 갖는 LDAO는 DDM 보다 막단백질 안정화 효과가 덜 우수하나, DDM은 막단백질 추출에 있어 LDAO 보다 덜 효과적이다. PDC 크기와 관련하여, DDM은 큰 PDCs를 형성하는 경향이 있는데, 이는 이 양친매성 분자에 의해 준비된 표적 단백질이 종종 질이 좋지 않은 회절 결정(diffracting crystals)을 생산하는 이유이다. 반면에, LDAO는 작은 PDCs를 형성하는 경향이 있고, 그러므로 표적 단백질이 충분히 견고하여 이 양친매성 분자에서 구조적 붕괴없이 잘 견딜 수 있다면 막단백질 결정화 측면에서는 더욱 유리하다. 본 발명에서, 본 발명자들은 기존 양친매성 분자 (DDM) 보다 현저한 막단백질 용해화 및 안정화 효과를 나타내고 다양한 막단백질에 대하여 작은 PDCs를 형성하는 PSE-C11 (및 PSE-C13)을 확인하였다. 추가적으로, 본 발명은 PSE-C11과 TPS-E10L이 EM 분석을 통한 막단백질 (및 그 복합체)의 구조 연구에

적합함을 증명하였다. 그러므로, 이 제제들은 막단백질의 구조 및 기능 연구를 위한 도구로서 높은 잠재력을 가진다. 추가적으로, 여기서 도입된 양친매성 분자 친수성 및 소수성 그룹의 역할과 같은 분자 설계 원리는 추후 새로운 양친매성 화합물의 개발을 용이하게 할 것이다.

발명의 효과

- [170] 본 발명의 구체예들에 따른 분지된 오당류 친수성기를 가지는 양친매성 화합물을 이용하면 기존 화합물 대비 막단백질 또는 그 복합체를 수용액에서 장기간 안정적으로 보관할 수 있고, 막단백질의 용해화 능력이 뛰어나기 때문에, 이를 통해 막단백질 또는 그 복합체의 기능 및 구조 분석에 활용될 수 있다.
- [171] 막단백질 구조 및 기능 분석은 현 생물학 및 화학에서 가장 관심을 갖고 있는 분야 중 하나이며, 현재 개발되고 있는 신약의 절반 이상이 막단백질을 타겟으로 하고 있으므로, 신약 개발과 긴밀한 관계가 있는 단백질 구조 연구에 응용이 가능하다.
- [172] 구체적으로, 본 발명의 구체예들에 따른 화합물은 5개의 글루코스로 이루어진 고밀도의 친수성기를 가지기 때문에, 막단백질 결정화에 있어서 탁월한 효과를 가질 수 있으며, 상기 친수성기는 양친매성 화합물에 사용되는 신규한 구조의 친수성기이기 때문에 다양한 양친매성 분자 구조 개발에 응용이 될 수 있다.
- [173] 또한, 본 발명의 구체예들에 따른 화합물은 쉽게 구할 수 있는 출발물질로부터 비교적 간단한 방법으로 합성이 가능하므로, 막단백질 연구를 위한 화합물의 대량 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [174] 도 1는 본 발명의 실시예 1에 따른 PSAs의 합성스킴을 나타낸 도이다.
- [175] 도 2는 본 발명의 실시예들에 따른 PSAs의 화학 구조를 나타낸 도이다.
- [176] 도 3은 본 발명의 실시예 2에 따른 PSEs의 합성스킴을 나타낸 도이다.
- [177] 도 4는 본 발명의 실시예들에 따른 PSEs의 화학 구조를 나타낸 도이다.
- [178] 도 5는 본 발명의 실시예 3 및 4에 따른 TPS-Es 및 TPS-ELs의 합성 스킴 및 화학구조를 나타낸 도이다.
- [179] 도 6은 본 발명의 실시예 5에 따른 TPS-As의 합성 스킴 및 화학구조를 나타낸 도이다.
- [180] 도 7은 PSAs 또는 PSEs에 의해 형성된 미셀의 크기(D(diameter), nm) 분포도를 나타낸 도이다.
- [181] 도 8은 TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs)에 의해 형성된 미셀의 크기(D(diameter), nm) 분포도를 나타낸 도이다.
- [182] 도 9는 DDM과 비교하여 (a) PSA(PSA-C9, PSA-C10, PSA-C11) 또는 (b) PSEs(PSE-C9, PSA-C11, PSE-C13)에 용해화된 BOR1-GFP 단백질의 구조적 안정성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [183] 도 10은 (a) DDM 또는 (b) PSE-C11에 용해화된 BOR1-GFP 단백질을 각각의

온도(35, 40, 45 또는 50 °C)로 가열한 후, 단백질의 구조적 안정성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

- [184] 도 11은 (a) CMC+0.04 wt% 농도 또는 (b) CMC+0.2 wt% 농도로 사용된 PSAs 또는 PSEs에 의한 LeuT 단백질의 안정성을 SPA(scintillation proximity assay)를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [185] 도 12는 (a) CMC+0.04 wt% 농도 또는 (b) CMC+0.2 wt% 농도로 사용된 TPS-As 또는 TPS-Es에 의한 LeuT 단백질의 안정성을 SPA(scintillation proximity assay)를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [186] 도 13은 (a) CMC+0.04 wt% 농도 또는 (b) CMC+0.2 wt% 농도로 사용된 TPS-EL에 의한 LeuT 단백질의 안정성을 SPA(scintillation proximity assay)를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [187] 도 14는 각각의 온도(0, 45, 55 또는 65)에서 1.5 wt% PSAs 또는 PSEs에 의한 MelB 단백질의 추출 효율과 구조적 안정성을 SDS-PAGE와 웨스턴 면역블롯팅을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [188] 도 15는 고친화 작용제(agonist) BI (BI-167107)의 존재 하에 PSAs 및 PSEs에 용해된 mBBR- β_2 AR의 구조적 안정성을 측정한 bimane 형광 스펙트럼 결과이다.
- [189] 도 16은 Full 작용제 (Isopreoteranol, ISO) 존재 유무 또는 ISO와 G-단백질 조합에 따른 PSAs/PSEs 또는 DDM에 용해된 mBBR- β_2 AR 구조적 변화 및 그 구조적 안정성을 측정한 결과이다.
- [190] 도 17은 (a) DDM, PSAs 또는 PSEs에 의해 용해된 수용체(mBBR- β_2 AR) 활성도를 [3 H]-디하이드로알프레놀올 ([3 H]-DHA)의 결합에 의해 측정한 결과, (b) 이들 양친매성 분자들에 의해 형성된 β_2 AR 복합체의 크기를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 측정한 결과이다.
- [191] 도 18은 DDM, TPS-As, TPS-Es 또는 TPS-ELs 에 의해 용해된 수용체(β_2 AR)의 초기 활성도를 [3 H]-디하이드로알프레놀올 ([3 H]-DHA)의 결합에 의해 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [192] 도 19는 DDM, TPS-A8 및 TPS-E8에 의해 용해된 수용체(β_2 AR) 장기간 활성 유지여부를 [3 H]-디하이드로알프레놀올 ([3 H]-DHA)의 결합에 의해 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [193] 도 20은 (a) DDM, TPS-ELs에 의해 용해된 수용체(β_2 AR)의 장기간 활성 유지여부를 [3 H]-디하이드로알프레놀올 ([3 H]-DHA)의 결합에 의해 측정한 결과, (b) 이들 양친매성 분자들에 의해 형성된 β_2 AR 복합체의 크기를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 측정한 결과이다.
- [194] 도 21은 (a) DDM, (b) PSA-C11, (c) PSE-C11, 및 (d) PSE-C13로 정제된 β_2 AR의 음성 염색 EM 이미지이다.
- [195] 도 22는 1.0 wt% PSE-C11 또는 DDM을 이용하여 세포막으로부터 β_2 AR를 직접 추출하고, 용해된 수용체의 활성을 방사성표지된 리간드 [3 H]-DHA를 이용하여 측정한 결과이다.

- [196] 도 23은 1.0 wt%의 (a) DDM 또는 (b) PSE-C11을 이용하여 세포막으로부터 β_2 AR를 직접 추출하고 이를 양친매성 화합물을 포함하는 버퍼와 포함하지 않는 버퍼를 각각 사용하여 β_2 AR의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 결과, (c) PSE-C11로 용해화된 T4L- β_2 AR-G_s 복합체의 장기간 구조적 안정성을 PSE-C11이 포함된 버퍼를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다. 15일째 결과는 PSE-C11이 포함된 버퍼와 포함되지 않은 버퍼를 모두 사용하여 측정하였다.
- [197] 도 24는 PSE-C11에 의해 정제된 T4L- β_2 AR-G_s 복합체 단일입자의 raw EM 이미지 (a), 2D 분류 이미지(b)와 같은 배향을 갖는 대표적인 복합체의 클래스 평균 이미지 (c) 를 나타낸 도이다.
- [198] 도 25는 TPS-E10L에 의해 정제된 β_2 AR-G_s 복합체 단일입자의 raw EM 이미지 (a), 2D 분류 이미지(b)와 같은 배향을 갖는 대표적인 복합체의 클래스 평균 이미지 (c) 를 나타낸 도이다.
- [199] 도 26은 TPS-As/Es, MNG-3 또는 DDM에 의한 수용액에서의 UapA 열적안정성을 CPM 분석법을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다:
- [200] (a) TPS-As/Es, MNG-3 또는 DDM 농도가 CMC + 0.04 wt%; 및
- [201] (b) TPS-As/Es, MNG-3 또는 DDM 농도가 CMC + 0.2 wt%.
- [202] 도 27는 TPS-ELs, MNG-3 또는 DDM에 의한 수용액에서의 UapA 열적안정성을 CPM 분석법을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다:
- [203] (a) TPS-ELs, MNG-3 또는 DDM 농도가 CMC + 0.04 wt%; 및
- [204] (b) TPS-ELs, MNG-3 또는 DDM 농도가 CMC + 0.2 wt%.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [205] 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [206] <실시예 1> PSAs(Alkyl-based penta-saccharide amphiphiles)의 합성 방법
- [207] PSAs의 합성 스킴을 도 1에 나타내었다. 하기 <1-1> 내지 <1-5>의 합성 방법에 따라 PSAs(Alkyl-based penta-saccharide amphiphiles) 3종을 합성하여 도 2에 나타내었다.
- [208] <1-1> 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate)의 일반적인 합성 절차 (화합물 1a 내지 1c의 합성)
- [209] 이 반응은 본 발명자의 논문(P. S. Chae 등, *Nat. Methods* 2010, 7, 1003-1008.)에서 사용된 방법을 일부 수정하여 수행하였다.
- [210] 구체적으로, THF(Tetrahydrofuran)에 용해된 NaH (30mmol)를 0°C에서 THF (40 mL)에 용해된 디에틸 말론산염(diethyl malonate) (10 mmol) 용액에 첨가하고,

20분 동안 교반하였다. 1-아이오도알케인(1-iodoalkane) (25 mmol)을 첨가한 후에, 반응 혼합물을 48시간 동안 상온에서 교반한 다음, 차가운 포화 NH_4Cl 수용액을 첨가하여 반응을 끝내고, 디에틸 에터(diethyl ether)로 추출하였다. 유기층은 brine으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하였다. 용매의 완전한 증발 후에, 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane)으로 정제하여 오일성 액체의 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate) (화합물 1a 내지 1c)을 얻었다.

- [211] <1-2> 디알킬화 모노올(dialkylated mono-ol)의 일반적인 합성 절차 (화합물 2a 내지 2c의 합성)
- [212] DMSO에 용해된 디알킬화 말론산염 (1a-c; 6.9 mmol) 용액에 LiCl (15.2 mmol) 및 H_2O (7.7 mmol)을 첨가하였다. 혼합물은 12시간 동안 175°C 로 가열 한 다음 상온으로 식힌 후 H_2O 로 희석하였다. 이 혼합물을 디에틸 에터로 추출하여 얻은 유기층은 물 및 brine으로 세척하였고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하였다. 용매의 완전한 증발 후에, 잔여물을 THF (30 mL)에 녹인 후 LiAlH_4 (21.3 mmol)을 0°C 에서 천천히 첨가하였다. 혼합물은 4시간 동안 상온에서 교반하였고, 0°C 에서 MeOH, 물, 1N 수용성 HCl 용액을 연속적으로 첨가하여 반응을 종결하였고, 디에틸 에터로 두 번 추출하였다. 얻어진 유기층은 brine으로 세척하였고, 무수 Na_2SO_4 로 건조하였다. 반응 혼합물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane)로 정제하여 오일성 액체의 디알킬-함유 모노올(dialkyl-containing mono-ol) (화합물 2a 내지 2c)를 얻었다 (80 내지 86% 수율 (두 단계)).
- [213] <1-3> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 및 Zemplen의 조건 하에 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응을 위한 일반적인 절차 (화합물 3a 내지 3c의 합성)
- [214] 이 반응은 본 발명자의 논문(P.S. Chae 등, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 15645-15651)에서 사용된 방법을 일부 수정하여 수행하였다.
- [215] 구체적으로, 글리코실레이션 반응은 다음과 같이 수행하였다. 무수 CH_2Cl_2 (30mL)에 용해된 모노올 유도체 (화합물 2a 내지 2c), AgOTf (1.2 equiv.) 및 2,4,6-collidine (0.7 equiv.)의 혼합물을 -45°C 에서 교반하였다. 그리고 CH_2Cl_2 (30mL)에 용해된 페르벤조일레이티드 글루코실브로마이드(perbenzoylated glucosylbromide) (1.2 equiv.)를 상기 현탁액에 10분 동안 천천히 첨가한 후 반응 혼합물을 서서히 0°C 가 되도록 하였다. 반응 진행 정도는 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응의 완결 후에(TLC에 의해 측정됨), 피리딘(pyridine)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (30mL)로 희석하고, celite로 여과하였다. 여과물은 1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수용액 (30 mL), 0.1M HCl 수용액 (30 mL) 및 brine (30 mL)으로 연속적으로 세척하였다. 그리고 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 용매를 회전 증발기로 제거하였다.
- [216] 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응은 다음과 같이 수행하였다. 글리코실화 잔여물은 MeOH에 용해시키고, 그 후 0.5M NaOMe의 메탄올성

용액을 필요한 양만큼 처리하여 NaOMe의 최종 농도가 0.05M이 되도록 하였다. 반응 혼합물은 상온에서 6시간 동안 교반하였고, 그 후 Amberlite IR-120 (H⁺ form) resin으로 중성화시켰다. Resin은 여과에 의해 제거하였고, MeOH로 세척하였으며, 용매는 *in vacuo*에서 여과물로부터 제거하였다. 잔여물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/CH₂Cl₂)로 정제하여, 흰색 고체의 생산물(화합물 3a 내지 3c)을 얻었다 (수율 84 내지 88%(두 단계)).

- [217] <1-4> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 (PSA-C9a 내지 PSA-C11a의 합성)
- [218] 상기 실시예 1-3의 글리코실레이션 반응과 동일한 방법을 수행하여 화합물 3a 내지 3c로부터 PSA-C9a 내지 PSA-C11a를 제조하였다.
- [219] 구체적으로, 무수 CH₂Cl₂ (30mL)에 용해된 화합물(화합물 3a 내지 3c), AgOTf (4.5 equiv.) 및 2,4,6-collidine (2.0 equiv.)의 혼합물을 -45°C에서 교반하였다. 그리고 CH₂Cl₂ (30mL)에 용해된 페르벤조일레이티드 글루코실브로마이드(perbenzoylated glucosylbromide) (4.5 equiv.)를 상기 현탁액에 30분 동안 천천히 첨가한 후 반응 혼합물은 서서히 0°C가 되도록 하였다. 반응은 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응의 완결 후에(TLC에 의해 측정됨), 피리딘(pyridine)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물은 CH₂Cl₂ (30mL)로 희석하고, celite로 여과하였다. 여과물은 1M Na₂S₂O₃ 수용액 (30 mL), 0.1M HCl 수용액 (30 mL) 및 brine (30 mL)으로 연속적으로 세척하였다. 그리고 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조하고, 용매를 회전 증발기로 제거하였다.
- [220] <1-5> Zemplen의 조건 하에 데-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응 (PSA-C9 내지 PSA-C11의 합성)
- [221] 상기 실시예 1-3의 데-O-벤조일레이션 반응과 동일한 방법을 수행하여 PSA-C9a 내지 PSA-C11a로부터 PSA-C9 내지 PSA-C11을 제조하였다.
- [222] 구체적으로, 실시예 1-4의 글리코실화 잔여물은 MeOH에 용해시키고, 그 후 0.5M NaOMe의 메탄올성 용액을 필요한 양만큼 처리하여 NaOMe의 최종 농도가 0.05M이 되도록 하였다. 반응 혼합물은 상온에서 6시간 동안 교반하였고, 그 후 Amberlite IR-120 (H⁺ form) resin으로 중성화시켰다. Resin은 여과에 의해 제거하였고, MeOH로 세척하였으며, 용매는 *in vacuo*에서 여과물로부터 제거하였다. 잔여물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/CH₂Cl₂)로 정제하여, PSA-C9 내지 PSA-C11을 얻었다.
- [223] <제조예 1> PSA-C9의 합성
- [224] <1-1> 디에틸 2,2-디노닐말론산염(Diethyl 2,2-dinonylmalonate)(화합물 1a)의 합성
- [225] 상기 실시예 1-1의 디알킬화 디에틸말론산염의 일반적인 합성 절차에 따라, 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)으로 1-아이오도노네인(1-iodononane)을 사용하여 디에틸 2,2-디노닐말론산염(Diethyl 2,2-dinonylmalonate)(화합물 1a)을 90% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.16 (q, *J* = 8.0 Hz, 4H), 1.85 (q, *J* = 8.8 Hz, 4H), 1.30-1.21 (m, 28H), 1.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 8.0

- Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.3, 61.1, 57.7, 32.2, 32.1, 31.8, 30.0, 29.8, 29.7, 29.5, 24.0, 22.9, 14.3.
- [226] <1-2> 2-노닐운데칸-1-올(2-nonylundecan-1-ol)(화합물 2a)의 합성
- [227] 상기 실시예 1-2의 디알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-노닐운데칸-1-올(2-nonylundecan-1-ol)(화합물 2a)을 82%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.54 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.37-1.20 (m, 32H), 0.88 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 65.7, 40.5, 31.9, 30.9, 30.1, 29.6, 29.3, 26.9, 22.7, 14.1.
- [228] <1-3> 디메틸 2-노닐말론산염(Dimethyl 2-nonylmalonate) (화합물 3a)의 합성
- [229] 상기 실시예 1-3의 클리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 3a를 86% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.72-3.66 (m, 1H), 3.40-3.30 (m, 3H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.61 (br s, 1H), 1.38 (s, 2H), 1.30-1.26 (m, 30H), 0.90 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 78.1, 77.8, 75.1, 74.1, 71.6, 62.8, 39.6, 33.2, 32.3, 31.3, 30.9, 30.6, 27.9, 23.9, 14.7.
- [230] <1-4> PSA-C9a의 합성
- [231] 상기 실시예 1-4의 클리코실레이션 방법에 따라, PSA-C9a를 합성하였다. 수율: 75 %; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.20-7.61 (m, 30H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.43-7.18 (m, 46H), 5.95 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.90-5.81 (m, 3H), 5.80-5.70 (m, 2H), 5.60-5.45 (m, 6H), 4.99-4.80 (m, 5H), 4.72-4.62 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.60-4.50 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.92 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.82-3.75 (m, 3H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.39-3.32 (m, 1H), 3.12-3.01 (m, 1H), 2.91-2.88 (m, 1H), 2.71-2.65 (m, 1H), 1.32-1.10 (m, 32H), 0.84 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.7, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.6, 133.4, 133.3, 133.2, 133.0, 130.2, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.3, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.4, 100.5, 99.9, 99.8, 78.0, 75.9, 74.9, 73.2, 73.0, 72.8, 72.5, 72.4, 72.0, 71.8, 71.2, 70.6, 70.3, 70.0, 69.2, 38.3, 32.0, 31.2, 30.9, 30.5, 30.4, 30.0, 29.9, 29.8, 29.5, 27.0, 26.8, 22.7, 14.2.
- [232] <1-5> PSA-C9의 합성
- [233] 상기 실시예 1-5의 테-*O*-벤조일레이션 방법에 따라, PSA-C9를 합성하였다. 수율: 91 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.90-3.78 (m, 8H), 3.70-3.62 (m, 5H), 3.45-3.27 (m, 18H), 1.60 (br s, 1H), 1.39-1.20 (m, 32H), 0.90 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.7, 103.6, 103.3, 102.3, 81.7, 79.8, 78.3, 78.1, 77.8, 76.1, 75.9, 75.2, 75.1, 75.0, 74.5, 71.6, 63.1, 62.9, 62.5, 39.5, 33.2, 31.3, 30.9, 30.6, 28.0, 27.8, 23.8, 14.6; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{92}\text{O}_{26}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1131.5775,

found 1131.5778.

[234] <제조예 2> PSA-C10의 합성

[235] <2-1> 디에틸 2,2-디데실말론산염(Diethyl 2,2-didecylmalonate)(화합물 1b)의 합성

[236] 상기 실시예 1-1의 디알킬화 디에틸말론산염의 일반적인 합성 절차에 따라, 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)으로 1-아이오도데케인(1-iododecane)을 사용하여 디에틸 2,2-디데실말론산염(Diethyl 2,2-didecylmalonate)(화합물 1b)을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.16 (q, $J = 8.0$ Hz, 4H), 1.85 (q, $J = 8.8$ Hz, 4H), 1.30-1.21 (m, 32H), 1.16 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 0.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.3, 61.1, 57.7, 32.2, 32.1, 30.0, 29.8, 29.7, 29.5, 24.0, 22.9, 14.3.

[237] <2-2> 2-데실도데칸-1-올(2-decyldodecan-1-ol)(화합물 2b)의 합성

[238] 상기 실시예 1-2의 디알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-데실도데칸-1-올(2-decyldodecan-1-ol)(화합물 2b)을 86%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.55 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.37-1.20 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 65.6, 40.5, 31.9, 30.9, 30.1, 29.7, 29.3, 26.9, 22.7, 14.0.

[239] <2-3> 화합물 3b의 합성

[240] 상기 실시예 1-3의 클리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 3b를 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.72-3.66 (m, 1H), 3.39-3.30 (m, 3H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.61 (br s, 1H), 1.38 (s, 2H), 1.30-1.26 (m, 34H), 0.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 78.1, 77.8, 75.1, 74.1, 71.6, 62.82, 39.6, 33.2, 32.3, 32.2, 31.3, 30.9, 30.9, 30.6, 27.9, 23.9, 14.7.

[241] <2-4> PSA-C10a의 합성

[242] 상기 실시예 1-4의 클리코실레이션 방법에 따라, PSA-C10a를 합성하였다. 수율: 75 %; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.20-7.61 (m, 30H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.43-7.18 (m, 46H), 5.95 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.90-5.81 (m, 3H), 5.80-5.70 (m, 2H), 5.60-5.45 (m, 6H), 4.99-4.80 (m, 5H), 4.72-4.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.60-4.50 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.92 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.82-3.75 (m, 3H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.39-3.32 (m, 1H), 3.12-3.01 (m, 1H), 2.91-2.88 (m, 1H), 2.71-2.65 (m, 1H), 1.32-1.09 (m, 36H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.7, 165.2, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.6, 133.4, 133.3, 133.2, 133.0, 130.2, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.3, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.4, 100.5, 99.9, 99.8, 78.0, 75.9, 74.9, 73.2, 73.0, 72.8, 72.5, 72.4, 72.0, 71.8, 71.2, 70.6, 70.3, 70.0, 69.2, 38.3, 32.0, 31.2, 30.9, 30.5, 30.3, 30.0, 29.9, 29.8, 29.5, 27.0, 26.8, 22.8, 14.2.

[243] <2-5> PSA-C10의 합성

[244] 상기 실시예 1-5의 테-*O*-벤조일레이션 방법에 따라, PSA-C10을 합성하였다. 수율: 92 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.90-3.78 (m, 8H), 3.70-3.61 (m, 5H), 3.45-3.26 (m, 18H), 1.60 (br s, 1H), 1.42-1.20 (m, 36H), 0.90 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.7, 103.6, 103.3, 102.3, 81.7, 79.8, 78.3, 78.1, 77.8, 76.1, 75.9, 75.2, 75.1, 75.0, 74.5, 71.6, 63.1, 62.9, 62.5, 39.5, 33.2, 31.3, 30.9, 30.6, 28.0, 27.8, 23.8, 14.6; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{96}\text{O}_{26}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1159.6088, found 1159.6086.

[245] <제조예 3> PSA-C11의 합성

[246] <3-1> 디에틸 2,2-디운데실말론산염(Diethyl 2,2-undecylmalonate)(화합물 1c)의 합성

[247] 상기 실시예 1-1의 디알킬화 디에틸말론산염의 일반적인 합성 절차에 따라, 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)으로 1-아이오도운데케인(1-iodoundecane)을 사용하여 디에틸 2,2-디운데실말론산염(Diethyl 2,2-diundecylmalonate)(화합물 1c)을 90% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.16 (q, J = 8.0 Hz, 4H), 1.85 (q, J = 8.8 Hz, 4H), 1.30-1.21 (m, 36H), 1.16 (t, J = 8.0 Hz, 6H), 0.87 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.2, 61.1, 57.7, 32.2, 32.1, 30.0, 29.8, 29.8, 29.5, 29.5, 24.1, 22.9, 14.3.

[248] <3-2> 2-운데실트리데칸-1-올(2-undecyltridecan-1-ol)(화합물 2c)의 합성

[249] 상기 실시예 1-2의 디알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-운데실트리데칸-1-올(2-undecyltridecan-1-ol)(화합물 2c)을 85%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.55 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.37-1.20 (m, 40H), 0.88 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 65.7, 40.6, 32.1, 31.1, 30.3, 29.9, 29.8, 29.5, 27.0, 22.8, 14.2.

[250] <3-3> 화합물 3c의 합성

[251] 상기 실시예 1-3의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 3c를 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.72-3.66 (m, 1H), 3.39-3.30 (m, 3H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.61 (br s, 1H), 1.38 (s, 2H), 1.30-1.26 (m, 38H), 0.89 (t, J = 8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 78.2, 77.8, 75.1, 74.1, 71.6, 62.8, 39.6, 33.2, 32.3, 32.2, 31.3, 31.0, 30.9, 30.9, 30.6, 27.9, 23.9, 14.7.

[252] <3-4> PSA-C11a의 합성

[253] 상기 실시예 1-4의 글리코실레이션 방법에 따라, PSA-C11a를 합성하였다. 수율: 72 %; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.20-7.61 (m, 30H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.45-7.20 (m, 46H), 5.95 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.90-5.81 (m, 3H), 5.80-5.70 (m, 2H), 5.60-5.45 (m, 6H), 4.99-4.80 (m, 5H), 4.72-4.62 (d, J = 8.0

Hz, 2H), 4.60-4.50 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.92 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.82-3.75 (m, 3H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.39-3.32 (m, 1H), 3.12-3.01 (m, 1H), 2.91-2.88 (m, 1H), 2.71-2.65 (m, 1H), 1.35-1.09 (m, 40H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.7, 165.2, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.6, 133.4, 133.3, 133.2, 133.0, 130.2, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.3, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.4, 100.5, 99.9, 99.8, 78.0, 75.9, 74.9, 73.2, 73.0, 72.8, 72.5, 72.4, 72.0, 71.8, 71.2, 70.6, 70.3, 70.0, 69.2, 38.3, 32.0, 31.2, 30.9, 30.5, 30.4, 30.0, 29.9, 29.8, 29.4, 27.0, 26.7, 22.8, 14.2.

[254] <3-5> PSA-C11의 합성

[255] 상기 실시예 1-5의 테-O-벤조일레이션 방법에 따라, PSA-C11을 합성하였다. 수율: 90 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.09 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.90-3.78 (m, 8H), 3.70-3.62 (m, 5H), 3.45-3.26 (m, 18H), 1.60 (br s, 1H), 1.42-1.20 (m, 40H), 0.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 103.6, 103.4, 102.4, 81.7, 79.8, 78.3, 78.1, 77.8, 76.1, 75.9, 75.2, 75.1, 75.0, 74.5, 71.7, 71.3, 69.6, 63.1, 62.9, 62.6, 39.5, 33.2, 31.3, 30.9, 30.6, 28.0, 27.8, 23.9, 14.6; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{54}\text{H}_{100}\text{O}_{26} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1187.6401, found 1187.6396.

[256] <실시예 2> PSEs(Ether-based penta-saccharide amphiphiles)의 합성

[257] PSAs의 합성 스킴을 도 3에 나타내었다. 하기 <2-1> 내지 <2-4>의 합성 방법에 따라 PSEs(Ether-based penta-saccharide amphiphiles) 3종을 합성하여 도 4에 나타내었다.

[258] <2-1> 알코올 유도체의 일반적인 합성 절차 (화합물 4a 내지 4d의 합성)

[259] 이 반응은 Atila, D. 등의 논문(*J. Coord. Chem.* 2009. 62, 3050-3059)에 기재된 방법을 일부 수정하여 수행하였다.

[260] 구체적으로, 에피클로로하이드린(Epichlorohydrin) (0.124 mmol)을 아르곤(argon) 하에 NaOH (0.25 mmol)과 함께 알코올 용액 (0.43 mmol)에 첨가하였다. 혼합물은 120°C에서 가열하였고, 동일 온도에서 16시간 동안 교반하였다. 상온으로 식힌 상태에서, 반응 혼합물을 40mL 증류수로 희석하고, 물층(aqueous phase)을 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 회전증발기로 건조하여 증발시켰다. 감압 증류에 의해 오일 잔여물로서 화합물 4a 내지 4d를 분리하였다.

[261] <2-2> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 및 Zemplen의 조건 하에 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응 (화합물 5a 내지 5d의 합성)

[262] 상기 실시예 1-3에 기재된 방법과 동일한 방법을 수행하여, 화합물 4a 내지 4c로부터 화합물 5a 내지 5d를 제조하였다.

[263] <2-3> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 (PSE-C7a 내지 PSE-C13a의 합성)

- [264] 상기 실시예 1-4에 기재된 방법과 동일한 방법을 수행하여, 화합물 5a 내지 5d로부터 PSE-C7a 내지 PSE-C13a를 합성하였다.
- [265] <2-4> Zemplen의 조건 하에 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응 (PSE-C7 내지 PSE-C13의 합성)
- [266] 상기 실시예 1-5에 기재된 방법과 동일한 방법을 수행하여, PSE-C7a 내지 PSE-C13a로부터 PSE-C7 내지 PSE-C13을 합성하였다.
- [267] <제조예 4> PSE-C7의 합성
- [268] <4-1> 1,3-비스(헵틸옥시)프로판-2-올(1,3-bis(heptyloxy)propan-2-ol)(화합물 4a)의 합성
- [269] 상기 실시예 1-1의 알코올 유도체의 일반적인 합성 절차에 따라, 알코올로 1-노난올(1-naptanol)을 사용하여 1,3-비스(헵틸옥시)프로판-2-올(1,3-bis(heptyloxy)propan-2-ol)(화합물 4a)을 80% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.95-3.92 (m, 1H), 3.46-3.43 (m, 8H), 2.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.57-1.54 (m, 4H), 1.30-1.26 (m, 16H), 0.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 71.9, 71.7, 69.5, 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 26.2, 22.7, 14.3.
- [270] <4-2> 화합물 5a의 합성
- [271] 상기 실시예 2-2의 글리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 5a를 합성하였다. 수율: 85 %; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.01 (quint, *J* = 8.0 Hz 1H), 3.87-3.82 (m, 1H), 3.60-3.56 (m, 4H), 3.52-3.46 (m, 4H), 3.35-3.20 (m, 4H), 3.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.40-1.25 (m, 16H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 104.1, 103.9, 80.1, 78.4, 78.2, 77.9, 75.2, 72.7, 71.9, 71.8, 71.5, 71.3, 71.1, 62.9, 33.2, 30.9, 30.8, 30.4, 27.4, 27.3, 23.8, 14.6.
- [272] <4-3> PSE-C7a의 합성
- [273] 상기 실시예 2-3의 글리코실레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C7a를 합성하였다. 수율: 80 %; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.16-7.98 (m, 26H), 7.80-7.70 (m, 4H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.50-7.18 (m, 46H), 5.92-5.81 (m, 3H), 5.73-5.61 (m, 5H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.44 (m, 2H), 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.96-4.71 (m, 3H), 4.69 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.65-4.58 (m, 3H), 4.52-4.39 (m, 4H), 4.23-3.96 (m, 6H), 3.83-3.76 (m, 3H), 3.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.52-3.23 (m, 8H), 3.15 (br s, 1H), 3.01 (br s, 1H), 1.71-1.62 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.40-1.18 (m, 16H), 0.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 166.0, 165.8, 165.7, 165.2, 165.1, 164.6, 164.5, 133.6, 133.4, 133.3, 133.1, 132.9, 130.2, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 100.5, 99.5, 99.3, 74.9, 73.4, 72.9, 72.8, 72.5, 72.2, 71.9, 71.2, 71.7, 71.6, 70.7, 70.3, 69.4, 63.8, 63.6, 62.9, 60.4, 53.6, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 26.2, 22.8, 14.3, 14.1.
- [274] <4-4> PSE-C7의 합성

- [275] 상기 실시예 2-4의 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C7를 합성하였다. 수율: 92 %; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.39-3.80 (m, 8H), 3.72-3.55 (m, 8H), 3.50-3.19 (m, 20H), 1.58 (m, 4H), 1.39-1.20 (m, 16H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 104.9, 103.7, 103.1, 102.6, 102.4, 81.8, 79.7, 78.2, 78.1, 78.0, 77.9, 77.8, 76.0, 75.9, 75.2, 75.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5, 71.1, 69.8, 63.0, 62.9, 62.6, 33.2, 30.9, 30.8, 30.4, 27.4, 23.8, 14.6.
- [276] <제조예 5> PSE-C9의 합성
- [277] <5-1> 1,3-비스(노닐옥시)프로판-2-올(1,3-bis(nonyloxy)propan-2-ol)(화합물 4b)의 합성
- [278] 상기 실시예 1-1의 알코올 유도체의 일반적인 합성 절차에 따라, 알코올로 1-노난올(1-nonanol)을 사용하여 1,3-비스(노닐옥시)프로판-2-올(1,3-bis(nonyloxy)propan-2-ol)(화합물 4b)을 77% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.95-3.93 (m, 1H), 3.47-3.43 (m, 8H), 2.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.57-1.54 (m, 4H), 1.30-1.26 (m, 24H), 0.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 71.9, 71.7, 70.0, 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.2, 22.7, 14.3.
- [279] <5-2> 화합물 5b의 합성
- [280] 상기 실시예 2-2의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 5b를 합성하였다. 수율: 86 %; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.01 (quint, *J* = 8.0 Hz 1H), 3.87-3.82 (m, 1H), 3.60-3.56 (m, 4H), 3.52-3.46 (m, 4H), 3.36-3.20 (m, 4H), 3.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.42-1.24 (m, 24H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 104.1, 103.9, 80.1, 78.4, 78.2, 77.9, 75.2, 72.7, 71.9, 71.8, 71.5, 71.3, 71.1, 62.9, 33.2, 30.9, 30.4, 27.4, 27.3, 23.8, 14.6.
- [281] <5-3> PSE-C9a의 합성
- [282] 상기 실시예 2-3의 글리코실레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C9a를 합성하였다. 수율: 82 %; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.16-7.98 (m, 26H), 7.80-7.70 (m, 4H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.50-7.18 (m, 46H), 5.91-5.81 (m, 3H), 5.73-5.61 (m, 5H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.48-5.44 (m, 2H), 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.96-4.71 (m, 3H), 4.69 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.65-4.56 (m, 3H), 4.52-4.39 (m, 4H), 4.23-3.96 (m, 6H), 3.83-3.76 (m, 3H), 3.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.52-3.23 (m, 8H), 3.15 (br s, 1H), 3.01 (br s, 1H), 1.71-1.62 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.40-1.17 (m, 24H), 0.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 166.0, 165.8, 165.7, 165.2, 165.1, 164.6, 164.5, 133.6, 133.4, 133.3, 133.1, 132.9, 130.2, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 100.5, 99.5, 99.3, 74.9, 73.4, 72.9, 72.8, 72.5, 72.2, 71.9, 71.7, 71.6,

- 71.2, 70.7, 70.3, 69.4, 63.8, 63.6, 62.9, 60.4, 53.6, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 26.2, 22.8, 14.3, 14.1.
- [283] <5-4> PSE-C9의 합성
- [284] 상기 실시예 2-4의 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C9를 합성하였다. 수율: 92 %; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.99-3.80 (m, 8H), 3.72-3.55 (m, 8H), 3.51-3.19 (m, 20H), 1.58 (m, 4H), 1.39-1.20 (m, 24H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 104.8, 103.7, 103.1, 102.6, 102.4, 81.8, 79.7, 78.2, 78.1, 78.0, 77.9, 77.8, 76.0, 75.9, 75.2, 75.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5, 71.1, 69.8, 63.0, 62.9, 62.6, 33.2, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.4, 23.8, 14.6; HRMS (EI): calcd. for C₅₁H₉₄O₂₈ [M+Na]⁺ 1177.5829, found 1177.5833.
- [285] <제조예 6> PSE-C11의 합성
- [286] <6-1> 1,3-비스(운데실옥시)프로판-2-올(1,3-bis(undecyloxy)propan-2-ol)(화합물 4c)의 합성
- [287] 상기 실시예 1-1의 알코올 유도체의 일반적인 합성 절차에 따라, 알코올로 1-운데칸올(1-undecanol)을 사용하여 1,3-비스(운데실옥시)프로판-2-올(1,3-bis(undecyloxy)propan-2-ol)(화합물 4c)을 77% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.95-3.93 (m, 1H), 3.43-3.40 (m, 8H), 2.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.57-1.54 (m, 4H), 1.32-1.25 (m, 32H), 0.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 71.9, 71.7, 69.5, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.7, 14.3.
- [288] <6-2> 화합물 5c의 합성
- [289] 상기 실시예 2-2의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 5c를 합성하였다. 수율: 86 %; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.99 (quint, *J* = 8.0 Hz 1H), 3.88-3.81 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 4H), 3.52-3.46 (m, 4H), 3.36-3.20 (m, 4H), 3.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.42-1.24 (m, 32H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 104.0, 103.9, 80.1, 79.9, 78.3, 78.2, 77.8, 75.1, 72.7, 71.9, 71.8, 71.5, 71.3, 71.1, 62.8, 33.2, 31.0, 30.9, 30.8, 30.4, 27.4, 27.3, 23.8, 14.7.
- [290] <6-3> PSE-C11a의 합성
- [291] 상기 실시예 2-3의 글리코실레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C11a를 합성하였다. 수율: 82 %; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.16-7.98 (m, 26H), 7.80-7.70 (m, 4H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.50-7.18 (m, 46H), 5.92-5.81 (m, 3H), 5.73-5.61 (m, 5H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.48-5.44 (m, 2H), 5.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.96-4.71 (m, 3H), 4.69 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.65-4.58 (m, 3H), 4.52-4.39 (m, 4H), 4.23-3.95 (m, 6H), 3.83-3.76 (m, 3H), 3.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.52-3.23 (m, 8H), 3.09 (br s, 1H), 3.01 (br s, 1H), 1.71-1.62 (m, 2H), 1.49-1.42 (m,

- 2H), 1.41-1.18 (m, 32H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.0, 165.8, 165.7, 165.2, 165.1, 164.6, 164.5, 133.6, 133.4, 133.3, 133.1, 132.9, 130.2, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 100.5, 99.5, 99.3, 74.9, 73.4, 72.9, 72.8, 72.5, 71.9, 71.2, 71.7, 71.6, 71.2, 70.7, 70.3, 69.4, 63.8, 63.6, 62.9, 60.4, 53.6, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 26.3, 26.2, 22.8, 14.3, 14.1.
- [292] <6-4> PSE-C11의 합성
- [293] 상기 실시예 2-4의 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C9를 합성하였다. 수율: 92 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 4.09 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.00-3.68 (m, 8H), 3.70-3.55 (m, 8H), 3.50-3.20 (m, 20H), 1.57 (m, 4H), 1.39-1.20 (m, 32H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 103.6, 103.1, 102.6, 102.4, 81.8, 79.7, 78.2, 78.1, 78.0, 77.9, 77.8, 76.0, 75.9, 75.2, 75.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5, 71.1, 69.8, 63.0, 62.9, 62.6, 33.2, 30.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.4, 23.8, 14.6; HRMS (ED): calcd. for $\text{C}_{55}\text{H}_{102}\text{O}_{28}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1233.6455, found 1233.6451.
- [294] <제조예 7> PSE-C13의 합성
- [295] <7-1>
1,3-비스(트리데실옥시)프로판-2-올(1,3-bis(tridecyloxy)propan-2-ol)(화합물 4d)의 합성
- [296] 상기 실시예 1-1의 알코올 유도체의 일반적인 합성 절차에 따라, 알코올로 1-트리데칸올(1-tridecanol)을 사용하여 1,3-비스(트리데실옥시)프로판-2-올(1,3-bis(tridecyloxy)propan-2-ol)(화합물 4d)을 75% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.95-3.92 (m, 1H), 3.45-3.40 (m, 8H), 2.47 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.57-1.54 (m, 4H), 1.32-1.25 (m, 40H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 71.9, 71.7, 70.0, 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.2, 22.9, 14.3.
- [297] <7-2> 화합물 5d의 합성
- [298] 상기 실시예 2-2의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, 화합물 5d를 합성하였다. 수율: 85 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.99 (quint, $J = 8.0$ Hz 1H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 4H), 3.52-3.46 (m, 4H), 3.36-3.20 (m, 4H), 3.18 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.42-1.24 (m, 40H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.0, 103.9, 80.1, 79.9, 78.3, 78.2, 77.8, 75.1, 72.7, 71.9, 71.8, 71.5, 71.3, 71.1, 62.8, 33.2, 31.0, 30.9, 30.8, 30.7, 27.5, 27.4, 27.3, 23.8, 14.7.
- [299] <7-3> PSE-C13a의 합성
- [300] 상기 실시예 2-3의 글리코실레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C13a를 합성하였다. 수율: 80 %; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H),

8.16-7.98 (m, 26H), 7.80-7.70 (m, 4H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.50-7.18 (m, 46H), 5.92-5.81 (m, 3H), 5.73-5.61 (m, 5H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.48-5.44 (m, 2H), 5.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.96-4.70 (m, 3H), 4.69 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.65-4.58 (m, 3H), 4.52-4.39 (m, 4H), 4.23-3.96 (m, 6H), 3.83-3.76 (m, 3H), 3.68 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.52-3.23 (m, 8H), 3.09 (br s, 1H), 3.01 (br s, 1H), 1.71-1.62 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.41-1.18 (m, 40H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.0, 165.8, 165.7, 165.2, 165.2, 165.1, 165.1, 164.6, 164.5, 133.6, 133.4, 133.3, 133.1, 132.9, 130.2, 129.9, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 100.5, 99.5, 99.3, 74.9, 73.4, 72.9, 72.8, 72.5, 71.9, 71.2, 71.7, 71.6, 71.2, 70.7, 70.3, 69.4, 63.8, 63.6, 62.9, 60.4, 53.6, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 26.3, 26.2, 22.8, 14.3. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{59}\text{H}_{110}\text{O}_{28} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1289.7081, found 1289.7078.

[301] <7-4> PSE-C13의 합성

[302] 상기 실시예 2-4의 테-O-벤조일레이션의 일반적인 절차에 따라, PSE-C13을 합성하였다. 수율: 90 %; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.08 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.03-3.80 (m, 8H), 3.72-3.55 (m, 8H), 3.50-3.19 (m, 20H), 1.58 (m, 4H), 1.39-1.20 (m, 40H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.9, 103.6, 103.1, 102.6, 102.4, 81.8, 79.7, 78.2, 78.1, 78.0, 77.9, 77.8, 76.0, 75.9, 75.2, 75.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.7, 71.6, 71.5, 71.1, 69.8, 63.0, 62.9, 62.6, 33.2, 31.1, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.5, 23.9, 14.6.

[303] <실시예 3> TPS-Es 및 TPS-ELs의 합성방법

[304] TPS-Es의 합성 스킴을 도 5에 나타내었다. 하기 <3-1> 내지 <3-4>의 합성 방법에 따라 TPS-Es 및 TPS-ELs(Tripod penta-saccharide amphiphiles) 7종을 합성하였다.

[305] <3-1> 다이알킬화 다이올(dialkylated diol)의 일반적인 합성 절차 (화합물 B의 합성, 도 5의 i 단계)

[306] 무수 2 목 플라스크에서, N_2 대기하에 0°C 에서 DMF에 NaH (0.17mmol)를 용해시킨 용액을 알코올 (17mmol)로 각각 처리하고 이를 실온에서 0.5시간 동안 교반 하였다. 반응 혼합물을 5,5-비스-(브로모메틸)-2,2-디메틸-[1,3]다이옥산(5,5-bis-(bromomethyl)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxane, 화합물 A) (4.3 mmol)의 첨가 후 120°C 로 가열하고, 15 시간 동안 보관하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 빙 냉수로 반응을 종료시키고 다이에틸 에터로 3회 추출하였다. 혼합된 유기층을 브린(brine)으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 다음 회전 증발기로 농축시켰다. 완전히 증발시킨 후, CH_2Cl_2 및 MeOH의 1:1 혼합물에 용해된 잔류물을 p-톨루엔 설폰산(p-TSA) 모노하이드레이트(촉매량)를 첨가하고 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 수용성 NaHCO_3 용액으로 중화시키고, 용매의 부피를 회전

증발기를 이용하여 감소시켰다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 및 H_2O 사이에 분배시켰다. 분리된 유기층을 브린(brine)으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 후, 진공에서 농축시켰다. 플래시 컬럼 크로마토그래피(EtOAc/헥산)에 의해 에터 포함 다이올 (B)을 백색 고체(92-94% (두 단계)) 형태로 얻었다.

- [307] <3-2> 트리알킬화 모노올(trialkylated mono-ol)의 일반적인 합성 절차 (화합물 C의 합성, 도 5의 ii 단계)
- [308] 건조상태에서, 아르콘으로 채운 2 목 플라스크에서, 건조 DMF에 NaH (212.0 mmol)이 교반된 용액을 건조 DMF에 다이올 유도체 (화합물 B) (212.0 mmol)가 용해된 용액으로 처리하였다. 20분 후, 1-브로모알칸 (RBr) (330.0 mmol)을 상기 혼합물에 첨가하고 온도를 100°C 까지 증가시켰다. 반응 혼합물을 동일한 온도에서 4시간 동안 둔 다음, 실온으로 냉각시키고 H_2O 로 반응을 종료시켰다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 2 회 추출하고, 브린(brine)으로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 반응 혼합물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc/헥산)로 정제하여 오일성 액체 (수율 85 내지 90%)로서 트리알킬 포함 모노올 (화합물 C)을 얻었다.
- [309] <3-3> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 및 Zemplen의 조건 하에 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응을 위한 일반적인 절차 (화합물 D의 합성, 도 5의 iii 및 iv 단계)
- [310] 이 반응은 본 발명자의 논문(P.S. Chae 등, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 15645-15651)에서 사용된 방법을 일부 수정하여 수행하였다.
- [311] 간략하게, 무수 CH_2Cl_2 (30mL)에 용해된 모노올 유도체 (화합물 C), AgOTf (1.2 또는 4.5 equiv.) 및 2,4,6-collidine (0.7 또는 2.0 equiv.)의 혼합물을 -45°C 에서 교반하였다. 그리고 CH_2Cl_2 (30mL)에 용해된 페르벤조일레이티드 글루코실브로마이드(perbenzoylated glucosylbromide) (1.2 또는 4.5 equiv.)를 30분에 걸쳐 캐놀라를 통해 용액으로 옮겼다. 상기 반응물을 1시간반동안 0°C 로 가온시켰다. 반응 진행 정도는 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응의 완결 후에(TLC에 의해 측정됨), 피리딘(pyridine)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 로 희석하고, celite로 여과하였다. 여과물은 1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수용액, 0.1M HCl 수용액 및 brine으로 연속적으로 세척하였다. 그리고 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 용매를 회전 증발기로 제거하였다. 글리코실화 잔여물은 MeOH에 용해시키고, 그 후 0.5M NaOMe의 메탄올성 용액을 필요한 양만큼 처리하여 NaOMe의 최종 농도가 0.05M이 되도록 하였다. 반응 혼합물은 상온에서 6시간 동안 교반하였고, 그 후 Amberlite IR-120 (H^+ form) resin으로 중성화시켰다. Resin은 여과에 의해 제거하였고, MeOH로 세척하였으며, 용매는 *in vacuo*에서 여과물로부터 제거하였다. 잔여물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/ CH_2Cl_2)로 정제하여, 흰색 고체의 생성물(화합물 D)을 얻었다 (수율 88 내지 90%(두 단계)).

- [312] <3-4> 알릴레이션(allylation) 및 하이드로보레이션(hydroboration)을 위한 일반적인 절차 (화합물 E의 합성, 도 5의 v 단계)
- [313] 건조 DMF (100 mL)에 용해된 화합물 D3 내지 D6(13.1 mmol)의 현탁액에 NaH (99 mmol) 및 알릴브로마이드 (96 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 0 °C의 얼음물로 반응을 종료시키고 CH₂Cl₂ (30 mL)를 첨가하였다. 유기상을 분리하고, 물 (3x) 및 브린 (2x)으로 연속적으로 세척하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 여과하고, 회전 증발기를 사용하여 농축시키고 고진공에서 밤새 건조시켰다. 이어서, 건조 THF (30 mL)에 용해된 알릴화된 생성물 (1.55 mmol)의 용액에 THF (28 mL, 14 mmol)에 용해된 0.5M 9-BBN-H 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 1시간반 동안 교반하였다. 과량의 시약은 얼음물을 첨가하여 제거하였다. 그 다음, 3M 수용성 NaOH (14 mL) 및 30 % H₂O₂ (14 mL)를 동시에 천천히 첨가하여 산화시킨 후, 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 K₂CO₃로 포화시키고 층을 분리시켰다. 수용성층을 EtOAc (3x)로 세척하고 혼합된 유기상을 농축시키고 플래시 크로마토그래피로 정제하여 목적 생성물 (화합물 E; 수율 75-80 % (두 단계))을 얻었다.
- [314] <제조예 8> TPS-E6의 합성
- [315] <8-1> 2,2-bis((hexyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B1)의 합성
- [316] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((hexyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 92%의 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.65 (d, *J* = 4.0 Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H), 2.85 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H), 1.56 (quin, *J* = 4.0 Hz, 4H), 1.38-1.21 (m, 12H), 0.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 72.1, 71.8, 44.7, 31.5, 29.4, 25.7, 22.5, 14.0.
- [317] <8-2> 3-(hexyloxy)-2,2-bis((hexyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C1)의 합성
- [318] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(hexyloxy)-2,2-bis((hexyloxy)methyl)propan-1-ol을 87%의 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.44 (s, 6H), 3.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H), 3.17 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 1.54 (quin, *J* = 4.0 Hz, 6H), 1.40-1.21 (m, 18H), 0.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.6, 29.5, 25.8, 22.6, 14.1.
- [319] <8-3> 화합물 D1의 합성
- [320] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D1을 88% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.85 (quint, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 18H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.0, 30.8, 27.2, 23.8, 14.6.
- [321] <8-4> TPS-E6a 의 합성

- [322] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E6a를 80% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.15-7.78 (m, 24H), 7.72-7.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.96 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.92-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.98-4.92 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.58-4.42 (m, 3H), 4.36-4.29 (m, 1H), 4.26-4.13 (m, 2H), 4.12-4.05 (m, 2H), 4.03-3.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.91-3.71 (m, 4H), 3.37-3.18 (m, 14H), 2.85 (br s, 1H), 2.75 (br s, 1H), 1.59-1.45 (m, 6H), 1.38-1.19 (m, 18H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.6, 165.2, 165.1, 164.9, 164.4, 133.4, 133.1, 130.1, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.7, 101.5, 99.9, 99.8, 74.9, 73.4, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.4, 71.6, 71.3, 70.6, 70.3, 70.2, 69.4, 68.8, 63.7, 63.5, 45.6, 31.8, 29.8, 26.0, 22.8, 14.2.
- [323] <8-5> TPS-E6 의 합성
- [324] 상기 실시예 3-3과 동일한 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E6을 94% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.38 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.25 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 4.12-3.95 (m, 3H), 3.90-3.82 (m, 6H), 3.75-3.59 (m, 6H), 3.46-3.18 (m, 28H), 1.60-1.51 (m, 6H), 1.40-1.28 (m, 18H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.7, 104.0, 103.4, 102.9, 102.6, 80.3, 80.2, 78.4, 78.0, 77.9, 77.8, 77.6, 76.0, 75.4, 75.2, 75.1, 72.5, 72.1, 71.7, 71.5, 71.3, 70.8, 70.2, 69.2, 63.3, 62.9, 62.7, 62.5, 46.8, 32.9, 30.8, 27.2, 23.8, 14.6; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{53}\text{H}_{98}\text{O}_{29} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1221.6091, observed 1221.6095.
- [325] <제조예 9> TPS-E7의 합성
- [326] <9-1> 2,2-bis((heptyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B2)의 합성
- [327] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((heptyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 92%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.56 (quin, $J = 4.0$ Hz, 4H), 1.38-1.21 (m, 16H), 0.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 72.2, 71.8, 44.7, 31.9, 29.6, 29.4, 26.3, 22.6, 14.0.
- [328] <9-2> 3-(heptyloxy)-2,2-bis((heptyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C2)의 합성
- [329] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(heptyloxy)-2,2-bis((heptyloxy)methyl)propan-1-ol을 90%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.44 (s, 6H), 3.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 3.17 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.54 (quin, $J = 4.0$ Hz, 6H), 1.40-1.21 (m, 18H), 0.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.6, 29.5, 25.8, 22.6, 14.1.

[330] <9-3> 화합물 D2의 합성

[331] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D2을 89% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.85 (quint, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 24H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 30.9, 30.4, 27.5, 23.8, 14.7.

[332] <9-4> TPS-E7a 의 합성

[333] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E7a를 78% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.15-7.78 (m, 24H), 7.72-7.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.96 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.92-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.98-4.91 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.59-4.42 (m, 3H), 4.36-4.29 (m, 1H), 4.26-4.13 (m, 2H), 4.12-4.05 (m, 2H), 4.03-3.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.91-3.71 (m, 4H), 3.37-3.18 (m, 14H), 2.85 (br s, 1H), 2.75 (br s, 1H), 1.59-1.45 (m, 6H), 1.40-1.18 (m, 24H), 0.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.6, 165.2, 165.1, 164.9, 164.4, 133.4, 133.1, 130.1, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.7, 101.5, 99.9, 99.8, 74.9, 73.4, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.4, 71.6, 71.3, 70.6, 70.3, 70.2, 69.4, 68.8, 63.7, 63.5, 45.6, 32.1, 29.9, 29.4, 26.3, 22.8, 14.3.

[334] <9-5> TPS-E7 의 합성

[335] 상기 실시예 3-3과 동일한 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E7을 92% 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.25 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.12-3.95 (m, 3H), 3.90-3.82 (m, 6H), 3.75-3.59 (m, 6H), 3.46-3.18 (m, 28H), 1.60-1.51 (m, 6H), 1.39-1.28 (m, 24H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 104.7, 104.0, 103.4, 102.9, 102.6, 80.3, 80.2, 78.4, 78.0, 77.9, 77.8, 77.6, 76.0, 75.4, 75.2, 75.1, 72.5, 72.1, 71.7, 71.5, 71.3, 70.8, 70.2, 69.2, 63.3, 62.9, 62.7, 62.5, 46.8, 33.1, 30.8, 30.4, 27.5, 23.8, 14.6; HRMS (EI): calcd. for C₅₆H₁₀₄O₂₉ [M+Na]⁺ 1263.6561, observed 1263.6556.

[336] <제조예 10> TPS-E8의 합성

[337] <10-1> 2,2-bis((octyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B3)의 합성

[338] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((octyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 94%의 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.65 (d, *J* = 4.0 Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, *J* = 8.0 Hz, 4H), 2.85 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H), 1.56 (quin, *J* = 4.0 Hz, 4H), 1.38-1.21 (m, 20H), 0.87 (t, *J* =

8.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 72.2, 71.8, 44.7, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 26.3, 22.8, 14.2.

[339] <10-2> 3-(octyloxy)-2,2-bis((octyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C3)의 합성

[340] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(octyloxy)-2,2-bis((octyloxy)methyl)propan-1-ol을 85%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.71 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.44 (s, 6H), 3.40 (t, J = 8.0 Hz, 6H), 3.21 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 1.54 (quin, J = 8.0 Hz, 6H), 1.40-1.21 (m, 30H), 0.87 (t, J = 8.0 Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.8, 29.6, 29.5, 29.1, 26.2, 22.6, 14.1.

[341] <10-3> 화합물 D3의 합성

[342] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D3을 90% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.85 (quint, J = 8.0 Hz 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 30H), 0.90 (t, J = 8.0 Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 30.9, 30.7, 30.6, 27.5, 23.9, 14.7.

[343] <10-4> TPS-E8a 의 합성

[344] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E8a를 76% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.15-7.78 (m, 24H), 7.72-7.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.96 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.92-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.98-4.92 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.59-4.41 (m, 3H), 4.36-4.29 (m, 1H), 4.26-4.13 (m, 2H), 4.12-4.05 (m, 2H), 4.03-3.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.91-3.71 (m, 4H), 3.37-3.18 (m, 14H), 2.85 (br s, 1H), 2.75 (br s, 1H), 1.59-1.45 (m, 6H), 1.40-1.19 (m, 30H), 0.84 (t, J = 8.0 Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.8, 165.6, 165.2, 165.1, 164.9, 164.4, 133.4, 133.1, 130.1, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.7, 101.5, 99.9, 99.8, 74.9, 73.4, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.4, 71.6, 71.3, 70.6, 70.3, 70.2, 69.4, 68.8, 63.7, 63.5, 45.6, 32.0, 29.9, 29.8, 26.4, 22.8, 14.3.

[345] <10-5> TPS-E8 의 합성

[346] 상기 실시예 3-3과 동일한 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E8을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.37 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 4.25 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.12-3.95 (m, 3H), 3.90-3.81 (m, 6H), 3.75-3.59 (m, 6H), 3.46-3.18 (m, 28H), 1.60-1.51 (m, 6H), 1.39-1.28 (m, 30H), 0.89 (t, J = 8.0 Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.7, 104.0, 103.4, 102.9, 102.6, 80.3, 80.2, 78.4,

78.0, 77.9, 77.8, 77.6, 76.0, 75.4, 75.2, 75.1, 72.5, 72.1, 71.7, 71.5, 71.3, 70.8, 70.2, 69.2, 63.3, 62.9, 62.7, 62.5, 46.9, 33.2, 30.9, 30.7, 30.6, 27.6, 23.9, 14.6; HRMS (EI): calcd. for $C_{59}H_{110}O_{29}$ $[M+Na]^+$ 1305.7030, observed 1305.7032.

[347] <제조예 11> TPS-E8L의 합성

[348] <11-1> 2,2-bis((octyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B3)의 합성

[349] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((octyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 94%의 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.56 (quin, $J = 4.0$ Hz, 4H), 1.38-1.21 (m, 20H), 0.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 72.2, 71.8, 44.7, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 26.3, 22.8, 14.2.

[350] <11-2> 3-(octyloxy)-2,2-bis((octyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C3)의 합성

[351] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(octyloxy)-2,2-bis((octyloxy)methyl)propan-1-ol을 85%의 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.44 (s, 6H), 3.40 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 3.21 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.54 (quin, $J = 8.0$ Hz, 6H), 1.40-1.21 (m, 30H), 0.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.8, 29.6, 29.5, 29.1, 26.2, 22.6, 14.1.

[352] <11-3> 화합물 D3의 합성

[353] 상기 실시예 3-3의 클리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D3을 90% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85 (quint, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 30H), 0.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 30.9, 30.7, 30.6, 27.5, 23.9, 14.7.

[354] <11-4> 화합물 E1의 합성

[355] 상기 실시예 3-4의 알릴레이션 및 하이드로보레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 E1을 80% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85-3.80 (m, 6H), 3.71-3.58 (m, 14H), 3.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 14H), 2.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.85-1.79 (m, 8H), 1.56-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 30H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.3, 86.1, 83.8, 79.4, 76.1, 72.6, 71.7, 71.1, 70.8, 70.7, 70.5, 70.0, 69.6, 60.4, 60.3, 60.2, 60.1, 46.6, 34.6, 34.4, 33.8, 33.2, 30.9, 30.8, 30.7, 27.6, 23.9, 14.8.

[356] <11-5> TPS-E8La의 합성

[357] 상기 실시예 3-3과 동일한 클리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E8La를 83% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.15-7.78 (m, 30H), 7.58-7.12 (m, 50H), 6.12-5.95 (m, 4H), 5.80-5.75 (m, 4H), 5.65-5.55 (m, 4H),

4.95-4.85 (m, 3H), 4.72-4.65 (m, 4H), 4.62-4.53 (m, 4H), 4.25-4.15 (m, 4H), 3.98-3.76 (m, 6H), 3.72-3.48 (m, 6H), 3.42-3.21 (m, 18H), 2.85 (br s, 2H), 2.65 (br s, 1H), 1.85-1.68 (m, 8H), 1.53-1.48 (m, 6H), 1.35-1.22 (m, 30H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.1, 165.8, 165.2, 165.1, 133.4, 133.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 101.4, 73.1, 72.1, 72.0, 71.5, 69.8, 69.5, 69.1, 68.0, 67.5, 63.2, 59.9, 45.3, 31.9, 30.4, 29.7, 29.5, 29.4, 26.3, 22.7, 14.2.

[358] <11-6> TPS-E8L의 합성

[359] 상기 실시예 3-3과 동일한 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E8L을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 4.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 4H), 3.92-3.80 (m, 10H), 3.73-3.55 (m, 17H), 3.42-3.15 (m, 32H), 1.92-1.80 (m, 8H), 1.55-1.50 (m, 6H), 1.41-1.25 (m, 30H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.5, 78.1, 77.9, 75.1, 72.6, 71.7, 70.5, 69.6, 68.1, 62.9, 46.6, 33.2, 31.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.6, 23.9, 14.7. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{71}\text{H}_{134}\text{O}_{33}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1537.8705, observed 1537.8701.

[360] <제조예 12> TPS-E9L의 합성

[361] <12-1> 2,2-bis((nonyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B4)의 합성

[362] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((nonyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 92%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.56 (quin, $J = 4.0$ Hz, 4H), 1.28-1.26 (m, 24H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 73.4, 72.2, 65.7, 44.6, 32.1, 29.8, 29.7, 29.5, 26.3, 22.9, 14.1.

[363] <12-2> 3-(nonyloxy)-2,2-bis((nonyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C4)의 합성

[364] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(nonyloxy)-2,2-bis((nonyloxy)methyl)propan-1-ol을 87%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.43 (s, 6H), 3.38 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 3.17 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.53 (quin, $J = 4.0$ Hz, 6H), 1.30-1.26 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.6, 29.5, 25.8, 22.6, 14.1.

[365] <12-3> 화합물 D4의 합성

[366] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D4을 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85 (quint, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 36H), 0.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 31.0, 30.9, 30.8, 30.7, 27.6, 23.9, 14.7.

[367] <12-4> 화합물 E2의 합성

[368] 상기 실시예 3-4의 알릴레이션 및 하이드로보레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 E2을 76% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85-3.80 (m, 6H), 3.71-3.58 (m, 14H), 3.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 14H), 2.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.85-1.79 (m, 8H), 1.56-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.3, 86.1, 83.7, 79.3, 76.1, 72.5, 71.6, 71.0, 70.8, 70.5, 70.0, 69.6, 60.4, 60.3, 60.2, 60.0, 46.6, 34.6, 34.4, 33.9, 32.8, 31.1, 31.0, 30.9, 30.8, 30.7, 30.2, 27.5, 23.9, 14.8.

[369] <12-5> TPS-E9La 의 합성

[370] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E9La를 84% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.15-7.78 (m, 30H), 7.58-7.12 (m, 50H), 6.12-5.95 (m, 4 H), 5.80-5.75 (m, 4H), 5.65-5.55 (m, 4H), 4.95-4.85 (m, 3H), 4.72-4.65 (m, 4H), 4.62-4.53 (m, 4H), 4.25-4.15 (m, 4H), 3.98-3.76 (m, 6H), 3.72-3.48 (m, 6H), 3.42-3.21 (m, 18H), 2.85 (br s, 2H), 2.65 (br s, 1H), 1.85-1.68 (m, 8H), 1.53-1.48 (m, 6H), 1.35-1.22 (m, 36H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.1, 165.8, 165.2, 165.1, 133.4, 133.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 101.5, 73.1, 72.1, 72.0, 71.5, 69.8, 69.5, 69.1, 68.0, 67.5, 63.2, 63.1, 59.9, 45.3, 32.0, 31.9, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.3, 22.7, 14.2.

[371] <12-6> TPS-E9L 의 합성

[372] 상기 실시예 3-3과 동일한 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E9L을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 4.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 4H), 3.92-3.80 (m, 10H), 3.73-3.55 (m, 17H), 3.42-3.15 (m, 32H), 1.92-1.80 (m, 8H), 1.55-1.50 (m, 6H), 1.41-1.25 (m, 36H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.5, 78.1, 77.9, 75.1, 72.6, 71.7, 70.5, 69.6, 68.1, 62.9, 46.6, 33.2, 31.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.6, 23.9, 14.7; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{74}\text{H}_{140}\text{O}_{33} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1579.9175, observed 1579.9180.

[373] <제조예 13> TPS-E10L의 합성

[374] <13-1> 2,2-bis((decyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B5)의 합성

[375] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((decyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 92%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, $J = 4.0$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.56 (quin, $J = 4.0$ Hz, 4H), 1.28-1.26 (m, 28H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 73.4, 72.2, 65.7, 44.6, 32.1, 29.8, 29.7, 29.5, 26.2, 22.9, 14.1.

[376] <13-2> 3-(decyloxy)-2,2-bis((decyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C5)의 합성

[377] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라,

3-(decyloxy)-2,2-bis((decyloxy)methyl)propan-1-ol을 90%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.44 (s, 6H), 3.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 3.17 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.52 (quin, $J = 8.0$ Hz, 6H), 1.28-1.26 (m, 42H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 71.6, 71.3, 66.3, 44.7, 31.8, 29.6, 29.1, 26.1, 22.6, 14.1.

[378] <13-3> 화합물 D5의 합성

[379] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D5을 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85 (quint, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 42H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 30.1, 30.9, 30.8, 30.6, 27.5, 23.9, 14.7.

[380] <13-4> 화합물 E3의 합성

[381] 상기 실시예 3-4의 알릴레이션 및 하이드로보레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 E3을 76% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85-3.80 (m, 6H), 3.71-3.58 (m, 14H), 3.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 14H), 2.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.85-1.79 (m, 8H), 1.56-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 42H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.3, 86.0, 83.7, 79.3, 76.1, 72.5, 71.6, 71.0, 70.8, 70.5, 70.0, 69.6, 60.4, 60.3, 60.2, 60.0, 46.6, 34.6, 34.4, 33.8, 33.3, 31.1, 31.0, 30.9, 30.8, 30.7, 27.6, 23.9, 14.8.

[382] <13-5> TPS-E10La의 합성

[383] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E10La를 84% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.15-7.78 (m, 30H), 7.58-7.12 (m, 50H), 6.12-5.95 (m, 4H), 5.80-5.75 (m, 4H), 5.65-5.55 (m, 4H), 4.95-4.85 (m, 3H), 4.72-4.65 (m, 4H), 4.62-4.53 (m, 4H), 4.25-4.15 (m, 4H), 3.98-3.76 (m, 6H), 3.72-3.48 (m, 6H), 3.42-3.21 (m, 18H), 2.85 (br s, 2H), 2.65 (br s, 1H), 1.85-1.68 (m, 8H), 1.53-1.48 (m, 6H), 1.35-1.22 (m, 42H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.1, 165.8, 165.2, 165.1, 133.4, 133.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 101.4, 73.1, 72.1, 72.0, 71.5, 69.8, 69.5, 69.1, 68.0, 67.5, 63.2, 63.1, 59.9, 45.3, 32.0, 31.9, 30.4, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.3, 22.7, 14.2.

[384] <13-6> TPS-E10L의 합성

[385] 상기 실시예 3-3과 동일한 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E10L을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 4.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 4H), 3.92-3.80 (m, 10H), 3.73-3.55 (m, 17H), 3.42-3.15 (m, 32H), 1.92-1.80 (m, 8H), 1.55-1.50 (m, 6H), 1.41-1.25 (m, 42H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.5,

78.1, 77.9, 75.1, 72.6, 71.7, 70.5, 69.6, 68.1, 62.9, 46.6, 33.2, 31.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.6, 23.9, 14.7; HRMS (EI): calcd. for $C_{77}H_{146}O_{33}$ $[M+Na]^+$ 1621.9644, observed 1621.9640.

[386] <제조예 14> TPS-E11L의 합성

[387] <14-1> 2,2-bis((undecyloxy)methyl)propane-1,3-diol(화합물 B6)의 합성

[388] 상기 실시예 3-1의 다이알킬화 다이올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2,2-bis((undecyloxy)methyl)propane-1,3-diol을 94%의 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.65 (d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 3.51 (s, 4H), 3.42 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 2.85 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.56 (quin, $J = 4.0$ Hz, 4H), 1.28-1.25 (m, 32H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 73.5, 72.3, 65.7, 44.6, 32.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 26.3, 22.8, 22.9, 14.1.

[389] <14-2> 3-(undecyloxy)-2,2-bis((undecyloxy)methyl)propan-1-ol (화합물 C6)의 합성

[390] 상기 실시예 3-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 3-(undecyloxy)-2,2-bis((undecyloxy)methyl)propan-1-ol을 85%의 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.43 (s, 6H), 3.38 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 3.16 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.53 (quin, $J = 8.0$ Hz, 6H), 1.28-1.26 (m, 48H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 71.7, 71.4, 62.9, 45.1, 32.1, 29.9, 29.7, 29.5, 26.4, 22.7, 14.2.

[391] <14-3> 화합물 D6의 합성

[392] 상기 실시예 3-3의 글리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 D6을 88% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85 (quint, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 12H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.59-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 48H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.5, 78.1, 77.9, 75.2, 72.6, 71.6, 70.6, 70.5, 62.8, 46.7, 33.2, 30.1, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.5, 23.9, 14.7.

[393] <14-4> 화합물 E4의 합성

[394] 상기 실시예 3-4의 알릴레이션 및 하이드로보레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 E4을 75% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.85-3.80 (m, 6H), 3.71-3.58 (m, 14H), 3.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.45-3.36 (m, 14H), 2.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 1.85-1.79 (m, 8H), 1.56-1.50 (m, 6H), 1.40-1.22 (m, 48H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.3, 86.1, 83.7, 79.3, 76.1, 72.5, 71.6, 71.0, 70.8, 70.5, 70.0, 69.6, 60.4, 60.3, 60.2, 60.0, 46.6, 34.6, 34.4, 33.8, 33.3, 31.1, 31.0, 30.9, 30.8, 30.7, 27.6, 23.9, 14.8.

[395] <14-5> TPS-E11La의 합성

[396] 상기 실시예 3-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E11La를 82% 수율로 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.15-7.78 (m,

30H), 7.58-7.12 (m, 50H), 6.12-5.95 (m, 4 H), 5.80-5.75 (m, 4H), 5.65-5.55 (m, 4H), 4.95-4.85 (m, 3H), 4.72-4.65 (m, 4H), 4.62-4.53 (m, 4H), 4.25-4.15 (m, 4H), 3.98-3.76 (m, 6H), 3.72-3.48 (m, 6H), 3.42-3.21 (m, 18H), 2.85 (br s, 2H), 2.65 (br s, 1H), 1.85-1.68 (m, 8H), 1.53-1.48 (m, 6H), 1.35-1.22 (m, 48H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.1, 165.8, 165.2, 165.1, 133.4, 133.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 101.4, 73.1, 72.1, 72.0, 71.5, 69.9, 69.8, 69.5, 69.1, 68.0, 67.5, 63.2, 63.1, 59.9, 45.3, 32.2, 32.0, 31.9, 30.4, 29.8, 28.7, 29.5, 29.4, 26.3, 22.8, 14.2.

[397] <14-6> TPS-E11L 의 합성

[398] 상기 실시예 3-3과 동일한 데-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-E11L을 92% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 4.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 4H), 3.92-3.80 (m, 10H), 3.73-3.55 (m, 17H), 3.42-3.15 (m, 32H), 1.92-1.80 (m, 8H), 1.55-1.50 (m, 6H), 1.41-1.25 (m, 48H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.5, 78.1, 77.9, 75.1, 72.6, 71.7, 70.5, 69.6, 68.1, 62.9, 46.6, 33.2, 31.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 27.6, 23.9, 14.7; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{80}\text{H}_{152}\text{O}_{33}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1664.0114, observed 1664.0107.

[399] <실시예 4> TPS-As의 합성방법

[400] TPS-As의 합성 스킴을 도 6에 나타내었다. 하기 <4-1> 내지 <4-5>의 합성 방법에 따라 TPSs-As(Tripod penta-saccharide amphiphiles) 3종을 합성하였다.

[401] <4-1> 다이알킬레이션 및 환원의 일반적인 합성 절차(화합물 F의 합성, 도 6의 i 및 ii 단계)

[402] 이 반응은 본 발명자의 논문(P.S. Chae 등, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 15645-15651)에서 사용된 방법을 일부 수정하여 수행하였다. THF에 용해된 NaH (21mmol)를 0°C에서 THF에 용해된 디에틸 말론산염(diethyl malonate) (6.9 mmol) 용액에 처리하고, 20분 동안 교반하였다. 이어서, 1-요오도알칸 (RI) (2.6 당량)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온에서 48 시간 동안 교반하고, 얼음-냉각된 포화 NH_4Cl 을 첨가하여 반응을 종료시키고, 디에틸 에터로 2회 추출 하였다. 유기층을 브린(brine)으로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 용매를 완전히 증발시킨 후, 0 °C에서 THF에 용해된 잔류물에 LiAlH_4 (14.0 mmol)를 천천히 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하고, 0 °C에서 MeOH, 물 및 1N HCl 수용액을 연속적으로 처리하여 반응을 종료시킨 다음, 디에틸 에터로 2회 추출 하였다. 혼합된 유기층을 브린으로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 잔여물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/헥산)로 정제하여 알킬 포함 다이올 (화합물 F)을 백색 고체 (수율 90 내지 92% (두 단계))형태로 얻었다.

[403] <4-2> 트리알킬화 모노올(trialkylated mono-ol)의 일반적인 합성 절차 (화합물 G의 합성, 도 6의 iii 단계)

- [404] 건조상태에서, 아르곤으로 채운 2 목 플라스크에서, 건조 DMF에 NaH (212.0 mmol)이 교반된 용액을 건조 DMF에 다이올 유도체 (화합물 F) (212.0 mmol)가 용해된 용액으로 처리하였다. 20분 후, 1-브로모 알칸 (RBr) (330.0 mmol)을 상기 혼합물에 첨가하고 온도를 100 °C까지 증가시켰다. 반응 혼합물을 동일한 온도에서 4시간 동안 둔 다음, 실온으로 냉각시키고 H₂O로 반응을 종료시켰다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂로 2 회 추출하고, 브린(brine)으로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 반응 혼합물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/헥산)로 정제하여 오일성 액체 (85 내지 90%)로서 트리알킬 포함 모노올 (화합물 G)을 얻었다.
- [405] <4-3> 글리코실레이션(glycosylation) 반응 및 Zemplen의 조건 하에 테-O-벤조일레이션(de-O-benzoylation) 반응을 위한 일반적인 절차 (화합물 H의 합성, 도 6 의 iv 및 v 단계)
- [406] 이 반응은 본 발명자의 논문(P.S. Chae 등, *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 15645-15651)에서 사용된 방법을 일부 수정하여 수행하였다.
- [407] 간략하게, 무수 CH₂Cl₂ (30mL)에 용해된 모노올 유도체 (화합물 C), AgOTf (1.2 또는 4.5 equiv.) 및 2,4,6-collidine (0.7 또는 2.0 equiv.)의 혼합물을 -45°C에서 교반하였다. 그리고 CH₂Cl₂ (30mL)에 용해된 페르벤조일레이티드 글루코실브로마이드(perbenzoylated glucosylbromide) (1.2 또는 4.5 equiv.)를 30분에 걸쳐 캐뉼라를 통해 용액으로 옮겼다. 상기 반응물을 1시간반동안 0°C로 가온시켰다. 반응 진행 정도는 TLC에 의해 모니터링하였다. 반응의 완결 후에(TLC에 의해 측정됨), 피리딘(pyridine)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물은 CH₂Cl₂로 희석하고, celite로 여과하였다. 여과물은 1M Na₂S₂O₃ 수용액, 0.1M HCl 수용액 및 brine으로 연속적으로 세척하였다. 그리고 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조하고, 용매를 회전 증발기로 제거하였다. 글리코실화 잔여물은 MeOH에 용해시키고, 그 후 0.5M NaOMe의 메탄올성 용액을 필요한 양만큼 처리하여 NaOMe의 최종 농도가 0.05M이 되도록 하였다. 반응 혼합물은 상온에서 6시간 동안 교반하였고, 그 후 Amberlite IR-120 (H⁺ form) resin으로 중성화시켰다. Resin은 여과에 의해 제거하였고, MeOH로 세척하였으며, 용매는 *in vacuo*에서 여과물로부터 제거하였다. 잔여물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/CH₂Cl₂)로 정제하여, 흰색 고체의 생성물(화합물 D)을 얻었다 (수율 88 내지 90%(두 단계)).
- [408] <제조예 15> TPS-A6의 합성
- [409] <15-1> 2,2-dihexyl-propane-1,3-diol (화합물 F1)의 합성
- [410] 상기 실시예 4-1의 다이알킬레이션 및 환원의 일반적인 절차에 따라, 2,2-dihexyl-propane-1,3-diol 을 92%의 수율로 제조하였다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.57 (s, 4H), 2.28 (s, 2H), 1.38-1.08 (m, 20H), 0.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 69.5, 41.2, 32.0, 31.1, 30.5, 29.9, 23.1, 22.9, 14.3.
- [411] <15-2> 2-(butoxymethyl)-2-hexyloctan-1-ol (화합물 G1)의 합성

- [412] 상기 실시예 4-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-(butoxymethyl)-2-hexyloctan-1-ol 을 90%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.10 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.54 (quin, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.40-1.19 (m, 22H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 79.0, 71.7, 70.2, 40.8, 32.0, 31.8, 31.5, 30.4, 23.0, 22.8, 19.5, 14.2, 14.0.
- [413] <15-3> 화합물 H1의 합성
- [414] 상기 실시예 4-3의 글리코실레이션 및 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 H1을 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.75-3.67 (m, 1H), 3.39-3.20 (m, 10H), 1.56-1.50 (m, 2H), 1.40-1.22 (m, 22H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.4, 78.2, 77.9, 75.3, 74.3, 73.8, 72.1, 71.8, 62.9, 42.2, 33.1, 32.5, 31.4, 23.9, 23.8, 20.7, 14.6, 14.4.
- [415] <15-4> TPS-A6a 의 합성
- [416] 상기 실시예 4-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A6a를 80% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.15-7.80 (m, 24H), 7.72-6.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.91-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.98-4.92 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.58-4.42 (m, 1H), 4.41-4.39 (m, 2H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.29-4.06 (m, 5H), 3.72-3.39 (m, 4H), 3.65 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.29-3.26 (br s, 1H), 3.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.08 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.75 (br s, 1H), 2.63 (br s, 1H), 1.56-1.50 (m, 2H), 1.40-1.15 (m, 22H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.6, 165.3, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.4, 133.2, 133.1, 130.1, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 99.9, 73.4, 72.8, 72.6, 72.3, 71.8, 71.4, 71.2, 70.4, 63.7, 41.0, 32.2, 32.1, 32.0, 30.5, 30.4, 26.1, 23.0, 22.9, 22.6, 19.6, 14.3, 14.2.
- [417] <15-5> TPS-A6 의 합성
- [418] 상기 실시예 4-3과 동일한 데-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A6을 94% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.24 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.91-3.85 (m, 2H), 3.87-3.82 (m, 5H), 3.68-3.63 (m, 6H), 3.48-3.19 (m, 22H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.38-1.18 (m, 22H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 103.8, 103.3, 103.0, 102.5, 78.4, 78.1, 78.0, 77.8, 77.7, 76.1, 76.0, 75.3, 75.1, 75.0, 74.2, 74.0, 72.2, 71.7, 71.5, 71.4, 69.4, 63.4, 62.9, 62.8, 62.5, 42.3, 33.2, 33.1, 32.3, 32.2, 31.4, 23.8, 20.7, 14.6, 14.5; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{90}\text{O}_{27} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1133.5567, observed 1133.5564.

- [419] <제조예 16> TPS-A7의 합성
- [420] <16-1> 2,2-diheptyl-propane-1,3-diol (화합물 F2)의 합성
- [421] 상기 실시예 4-1의 다이알킬레이션 및 환원의 일반적인 절차에 따라, 2,2-diheptyl-propane-1,3-diol 을 92%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.57 (s, 4H), 2.28 (s, 2H), 1.38-1.08 (m, 24H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 69.5, 41.2, 32.1, 30.8, 29.8, 29.5, 23.1, 22.9, 14.3.
- [422] <16-2> 2-heptyl-2-((pentyloxy)methyl)nonan-1-ol (화합물 G2)의 합성
- [423] 상기 실시예 4-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-heptyl-2-((pentyloxy)methyl)nonan-1-ol 을 90%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.10 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.55 (quin, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.40-1.19 (m, 28H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 79.1, 72.0, 70.3, 40.8, 32.1, 31.8, 31.5, 30.7, 29.7, 29.5, 26.0, 23.1, 22.8, 14.3, 14.1.
- [424] <16-3> 화합물 H2의 합성
- [425] 상기 실시예 4-3의 글리코실레이션 및 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 H2을 88% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 8.0$ Hz 1H), 3.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.75-3.67 (m, 1H), 3.39-3.20 (m, 10H), 1.54-1.51 (m, 2H), 1.40-1.22 (m, 28H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.4, 78.2, 77.9, 75.2, 74.3, 73.8, 72.3, 71.7, 62.9, 42.2, 33.2, 32.4, 31.7, 30.6, 30.5, 29.9, 23.9, 23.8, 23.7, 14.8, 14.7.
- [426] <16-4> TPS-A7a 의 합성
- [427] 상기 실시예 4-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A7a를 82% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.15-7.80 (m, 24H), 7.72-6.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.91-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.98-4.92 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.58-4.42 (m, 1H), 4.41-4.39 (m, 2H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.29-4.06 (m, 5H), 3.72-3.39 (m, 4H), 3.65 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.29-3.26 (br s, 1H), 3.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.08 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.75 (br s, 1H), 2.63 (br s, 1H), 1.56-1.50 (m, 2H), 1.40-1.15 (m, 28H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.6, 165.3, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.4, 133.2, 133.1, 130.1, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 99.9, 73.4, 72.8, 72.6, 72.3, 71.8, 71.4, 71.2, 70.4, 63.7, 41.0, 32.1, 30.8, 30.7, 29.9, 29.7, 29.6, 26.1, 22.8, 22.7, 14.3, 14.2.
- [428] <16-5> TPS-A7 의 합성
- [429] 상기 실시예 4-3과 동일한 테-*O*-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A7을 94% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.93 (d, $J = 8.0$

Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.24 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.91-3.85 (m, 2H), 3.87-3.82 (m, 5H), 3.68-3.63 (m, 6H), 3.48-3.19 (m, 22H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.38-1.18 (m, 28H), 0.85 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 103.8, 103.3, 103.0, 102.5, 78.4, 78.1, 78.0, 77.8, 77.7, 76.1, 76.0, 75.3, 75.1, 75.0, 74.2, 74.0, 72.2, 71.7, 71.5, 71.4, 69.4, 63.4, 62.9, 62.8, 62.5, 42.3, 33.2, 33.1, 32.2, 32.1, 31.7, 30.6, 30.5, 27.9, 24.1, 23.7, 14.6, 14.5; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{96}\text{O}_{27}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1175.6037, observed 1175.6033.

[430] <제조예 17> TPS-A8의 합성

[431] <17-1> 2,2-dioctyl-propane-1,3-diol (화합물 F3)의 합성

[432] 상기 실시예 4-1의 다이알킬레이션 및 환원의 일반적인 절차에 따라, 2,2-dioctyl-propane-1,3-diol 을 90%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.57 (s, 4H), 2.28 (s, 2H), 1.38-1.08 (m, 28H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 69.5, 41.2, 32.1, 30.9, 30.8, 29.8, 29.5, 23.1, 22.9, 14.3.

[433] <17-2> 2-((hexyloxy)methyl)-2-octyldecan-1-ol (화합물 G3)의 합성

[434] 상기 실시예 4-2의 트리알킬화 모노올의 일반적인 합성 절차에 따라, 2-((hexyloxy)methyl)-2-octyldecan-1-ol 을 88%의 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.10 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.54 (quin, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.40-1.19 (m, 34H), 0.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 79.1, 72.0, 70.3, 40.8, 32.1, 31.8, 31.5, 30.7, 29.7, 29.5, 26.0, 23.1, 22.9, 22.8, 14.3, 14.2.

[435] <17-3> 화합물 H3의 합성

[436] 상기 실시예 4-3의 글리코실레이션 및 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, 화합물 H3을 86% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.75-3.67 (m, 1H), 3.39-3.20 (m, 10H), 1.54-1.50 (m, 2H), 1.40-1.22 (m, 34H), 0.89 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 105.4, 78.2, 77.9, 75.3, 74.3, 73.8, 72.4, 71.8, 62.9, 42.2, 33.2, 32.5, 31.8, 30.9, 30.8, 30.6, 27.3, 24.0, 23.9, 23.8, 23.7, 14.8, 14.7.

[437] <17-4> TPS-A8a 의 합성

[438] 상기 실시예 4-3과 동일한 글리코실레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A8a를 78% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.15-7.80 (m, 24H), 7.72-6.67 (m, 5H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.58-7.12 (m, 46H), 5.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.91-5.82 (m, 3H), 5.71-5.69 (m, 2H), 5.61-5.42 (m, 6H), 5.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.98-4.92 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 2H), 4.77-4.65 (m, 2H), 4.58-4.42 (m, 1H), 4.41-4.39 (m, 2H), 4.38-4.36 (m, 1H), 4.29-4.06 (m, 5H), 3.72-3.39 (m, 4H), 3.65 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.41-3.35 (m, 2H), 3.29-3.26 (br s, 1H), 3.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.08 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.75 (br s,

1H), 2.63 (br s, 1H), 1.56-1.50 (m, 2H), 1.40-1.15 (m, 34H), 0.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 166.2, 166.1, 166.0, 165.9, 165.6, 165.3, 165.2, 165.1, 164.9, 164.5, 164.4, 133.4, 133.2, 133.1, 130.1, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 101.6, 99.9, 73.4, 72.8, 72.6, 72.3, 71.8, 71.4, 71.2, 70.4, 63.7, 41.0, 32.2, 32.1, 31.9, 30.8, 30.7, 29.9, 29.7, 29.6, 26.1, 22.8, 22.6, 14.3, 14.2.

[439] <17-5> TPS-A8 의 합성

[440] 상기 실시예 4-3과 동일한 테-O-벤조일레이션의 일반적인 합성 절차에 따라, TPS-A8을 93% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 4.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.24 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.91-3.85 (m, 2H), 3.87-3.82 (m, 5H), 3.68-3.63 (m, 6H), 3.48-3.19 (m, 22H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.38-1.18 (m, 34H), 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 104.8, 103.8, 103.3, 103.0, 102.5, 78.4, 78.1, 78.0, 77.8, 77.7, 76.1, 76.0, 75.3, 75.1, 75.0, 74.2, 74.0, 72.2, 71.7, 71.5, 71.4, 69.4, 63.4, 62.9, 62.8, 62.5, 42.3, 33.2, 33.0, 32.3, 32.2, 31.7, 30.9, 30.8, 30.6, 30.5, 29.9, 23.8, 23.7, 14.6, 14.5; HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{55}\text{H}_{102}\text{O}_{27} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 1217.6506, observed 1217.6509.

[441] <실시예 5> PSAs 및 PSEs의 특성

[442] 상기 실시예 1의 합성 방법에 따라 합성된 제조예 1 내지 3의 PSAs; 상기 실시예 2의 합성 방법에 따라 합성된 제조예 4 내지 7의 PSEs; 상기 실시예 3의 합성 방법에 따라 합성된 제조예 8 내지 14의 TPS-Es과 TPS-ELs; 및 상기 실시예 4의 합성 방법에 따라 합성된 제조예 15 내지 17의 TPS-As의 특성을 확인하기 위하여, PSAs, PSEs 및 TPSs 의 임계미셀농도(critical micellar concentration; CMC) 및 형성된 미셀의 유체역학적 반지름(hydrodynamic radii; R_h)을 측정하였다.

[443] 구체적으로, 임계미셀농도(CMC)는 소수성 형광 염색, 디페닐헥사트리엔(diphenylhexatriene; DPH)을 이용하여 측정하였고, 1.0 wt% 농도의 각각의 제제에 의해 형성된 미셀의 유체역학적 반지름(R_h)은 동적 광산란(dynamic light scattering; DLS) 실험을 통해 측정하였다. 측정된 결과를 기존의 양친매성 분자(detergent)인 DDM과 비교하여 표 1에 나타내었다.

[444] [표1]

Detergent	M.W.	CMC (mM)	CMC (wt%)	R_h (nm)
PSA-C9	1109.3	~0.014	~0.0016	2.94±0.05
PSA-C10	1137.3	~0.009	~0.0010	3.10±0.05
PSA-C11	1165.4	~0.007	~0.0008	3.28±0.03
PSE-C7	1099.2	~0.27	~0.0300	2.66±0.04
PSE-C9	1155.3	~0.026	~0.0030	3.19±0.04
PSE-C11	1211.4	~0.004	~0.0005	3.46±0.05
PSE-C13	1267.5	~0.001	~0.0001	14.1±0.24
TPS-A6	1111.2	~0.07	~0.0078	2.4±0.05
TPS-A7	1153.3	~0.015	~0.0017	2.7±0.05
TPS-A8	1195.4	~0.007	~0.0008	9.1±0.6
TPS-E6	1199.3	~0.020	~0.0024	2.9±0.05
TPS-E7	1241.4	~0.012	~0.0015	13.0±0.8
TPS-E8	1283.5	~0.007	~0.0009	43.8±16.3
TPS-E8L	1515.8	~0.006	~0.0009	4.5±0.39
TPS-E9L	1557.9	~0.004	~0.0006	4.6±0.18
TPS-E10L	1600.0	~0.002	~0.0003	4.8±0.34
TPS-E11L	1642.1	~0.001	~0.0002	40.6±4.4
DDM	510.1	~0.17	~0.0087	3.4±0.03

[445] PSAs, PSEs 및 TPSs의 CMC 값은 DDM 보다 훨씬 작았다. 따라서, PSAs, PSEs 및 TPSs는 적은 양으로도 미셀이 용이하게 형성되므로, DDM 보다 자가조립 경향성이 높음을 확인할 수 있었다. 또한, PSAs, PSEs 및 TPSs 모두 화합물의 알킬 사슬 길이가 증가함에 따라 CMC 값은 감소하였다. 이러한 경향은 양친매성 화합물의 소수성(hydrophobicity)이 CMC를 결정하는 데 중요한 요소라는 일반적인 개념과 일치하였다.

[446] PSAs, PSEs 또는 TPSs 에 의해 형성된 미셀의 크기는 2.4~60.1 nm로 범위가 넓었다. 화합물의 알킬 사슬 길이가 증가함에 따라 미셀의 크기는 증가하는 경향을 보였다. 가장 짧은 알킬 사슬을 갖는 PSE-C7은 가장 작은 미셀을 형성한 반면, 가장 긴 알킬 사슬을 갖는 PSE-C13은 가장 큰 미셀을 형성하였다. 양친매성 화합물 미셀 크기는 분자의 기하학과 강하게 상호관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 더 긴 알킬 사슬을 갖는 화합물은 원통형 모양을 가지므로 더 큰 미셀을 형성한다. PSA-C11, PSE-C9 및 PSE-C11의 미셀 크기는 DDM의 미셀

크기와 비슷하였다.

- [447] 아울러 TPS-As 및 TPS-Es에 있어서, 링커 영역(알킬 대 에터)의 작용기 변화는 적어도 부분적으로 상기 화합물간의 미셀 크기 차이의 원인이 되는 것으로 판단되었다. TPS-ELs에 의해 형성된 미셀의 크기는 TPS-Es에 의해 형성된 미셀의 크기보다 상대적으로 작았으며, 이는 TPS-ELs의 친수성 그룹이 TPS-As/Es의 친수성 그룹보다 기하학 적으로 훨씬 크게 때문에 상대적으로 작은 미셀 형성이 가능한 것으로 판단되었다
- [448] 한편, PSAs, PSEs 또는 TPSs 에 의해 형성된 미셀의 크기 분포를 DLS를 이용해 측정한 결과를 도 7 및 8에 나타내었다. 이 때 PSAs, PSEs 또는 TPSs는 각각 1.0 wt%로 사용되었다. 그 결과, PSAs 또는 PSEs의 미셀은 하나의 군집을 가져 균일성이 높은 것으로 측정되었다(도 7). 모든 TPS-As, TPS-Es 및 TPS-EL은 미셀의 수 평균 크기 분포에서 단일 집단임을 나타내었다(도 8).
- [449] 이러한 결과로부터 본 발명의 PSAs, PSEs 또는 TPSs는 DDM 보다 낮은 CMC 값을 가져 적은 양으로도 미셀이 용이하게 형성되므로 자가조립경향성이 DDM 보다 훨씬 크다는 것을 알 수 있었으며, PSA-C9, PSA-C10, PSA-C11, PSE-C9 및 PSE-C11의 미셀 크기는 DDM의 미셀 크기 보다 작거나 같아서 DDM과 유사하게 막단백질 연구에 유용할 것으로 확인되었다.
- [450] <실시에 6> BOR1(boron transporter) 막단백질을 이용한 PSAs 및 PSEs의 평가
- [451] BOR1(boron transporter) 막단백질을 이용하여 PSAs 및 PSEs의 막단백질 용해화 능력, 막단백질 구조 안정화 능력을 평가하는 실험을 하였다. BOR1은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리하였으며, 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*) FGY217 세포에서 C-말단 GFP 태그를 가지는 융합 단백질로서 발현되었다. 이 융합 단백질은 붕소 수송 활성을 보유하는 것으로 증명되었으므로, 막단백질의 구조 및 기능 분석 모두에 관련이 있다.
- [452] <6-1> PSAs 및 PSEs의 BOR1 막단백질 용해화 능력 평가
- [453] 양친매성 화합물 PSAs 및 PSEs의 BOR1(boron transporter) 막단백질 용해화(solubilization) 효율을 확인하기 위한 실험을 하였다.
- [454] 구체적으로, BOR1-GFP 융합 단백질을 함유하는 멤브레인에 기존 양친매성 화합물 (DDM), PSAs (PSA-C9, PSA-C10 및 PSA-C11), 또는 PSEs (PSE-C9, PSE-C11 및 PSE-C13) 1.0 wt%를 처리하였다. PSA-C9, PSA-C10 및 PSE-C9의 용해화 효율은 약 80%로 DDM과 비슷하였다. 특히, 중간 사슬 길이를 가지는 PSE-C11은 BOR1-GFP 단백질을 정량적으로 추출하였으며 (~100%), 따라서 PSE-C11이 BOR1-GFP의 용해화에 특히 유용함을 확인할 수 있었다.
- [455] <6-2> PSAs 및 PSEs의 BOR1 막단백질 구조 안정화 능력 평가
- [456] 수용액에서 PSAs 또는 PSEs에 의한 BOR1(boron transporter) 구조 안정성을 측정하는 실험을 하였다. 즉, 각각의 양친매성 화합물로 용해화된 BOR1 단백질을 가열하여 열 변성을 실시한 후, BOR1의 구조적 안정성을 형광 기반 크기 배제 크로마토그래피 (fluorescent-based size exclusion chromatography,

FSEC)를 이용하여 측정하였다.

- [457] 구체적으로, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 BOR1은 사카로마이세스 세레비제 FGY217 세포에서 C-말단 GFP 태그를 가지는 융합 단백질로서 발현되었다. 세포는 0.1% 글루코스로 보충된 URA-배지에서 성장되었다. 단백질 발현은 2% 갈락토오스의 첨가에 의해 유도되었고, 18시간 동안 20°C에서 배양하였다 (Drew, D. 등, *Nat. Protoc.* 2008, 3, 784-798. 참조). 세포를 수득하고, 멤브레인을 준비하기 위해 사용하였다 (Leung, J. 등, *Protein Expr. Purif.* 2010, 72, 139-146. 참조). BOR1-GFP 융합 단백질을 함유하는 멤브레인은 각각 1 wt% DDM, 1 wt% PSAs(PSA-C9, PSA-C10 또는 PSA-C11) 또는 1 wt% PSEs(PSE-C9, PSE-C11 또는 PSE-C13)로 보충된 PBS (pH 7.4)에 최종 전체 단백질 농도 2.8 mg/ml로 희석하였다. 희석된 샘플을 1시간 동안 4°C에서 교반(gentle rocking)하면서 배양하고, 비용해 물질을 14,000g에서 1시간 동안 4°C에서 원심분리하여 제거하였다. 용해된 단백질을 함유하는 상층액은 10분 동안 지정된 온도 (35, 40, 45 또는 50 °C)에서 배양하고, 강하게 응집된 단백질은 14,000g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하여 제거하였다. 상층액의 200 µl 부분표본을 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl 및 0.03% DDM으로 평형화된 Superose 6 10/300 컬럼에 주입하였다. 각각의 용리 분획물은 6.4 ml의 머무름 부피(retention volume)로부터 수집되어 (즉, 6.4ml의 통과액 후에), clear bottom 96-well plate에 200 µl 분획물로 수집되었다. 각 분획물의 GFP 형광은 470 nm의 여기(excitation) 파장 및 512 nm의 방출(emission) 파장을 이용하여 측정하였다.
- [458] 도 9는 DDM과 비교하여 PSA (PSA-C9, PSA-C10, PSA-C11)(도 9a) 또는 PSE (PSE-C9, PSE-C11, PSE-C13)(도 9b)에 용해화된 BOR1-GFP 단백질을 10분 동안 40°C에서 가열 한 후, 단백질의 구조적 안정성을 측정한 결과이다. 단백질의 구조적 안정성은 RFU (relative fluorescent units)으로 나타내었다. DDM으로 용해화된 단백질은 가열 후에 BOR1-GFP (분획물 번호 40)이 변성되어 RFUs가 비교적 낮았다. 용해화제로서 PSA-C10 및 PSA-C11를 사용했을 경우에는 DDM 및 PSA-C9와 비교하여 BOR1-GFP의 구조적 안정성에 있어 현저한 개선을 보여주었다. 이는 BOR1 단백질 안정성이 PSA-C10 및 PSA-C11에서 극적으로 향상되었음을 보여준다. 단백질 변성 및 응집을 예방하는 것에 관하여 PSA-C11은 PSA-C10 보다 조금 더 우수하였다(도 9a). PSE 제제 (PSE-C9, PSE-C11 그리고 PSE-13)를 사용했을 경우에는 가열 후에 BOR1-GFP 단백질의 구조 안정성이 DDM과 비교하여 크게 향상 되었음을 보여주었다. PSE의 효능 순서는 PSE-C11> PSE-C13> PSE-C9였다(도 9b). PSE-C11는 또한 가장 우수한 PSA인 PSA-C11 보다 안정화 능력이 더 우수하였고, 이는 중간 알킬 사슬 길이를 가지는 PSE-C11이 BOR1 단백질에 최적의 안정화제임을 가리킨다.
- [459] 도 10은 DDM(도 10a) 또는 PSE-C11(도 10b)에 용해화된 BOR1-GFP 단백질을 10분 동안 35, 40, 45 또는 50°C에서 가열 한 후, 단백질의 구조적 안정성을 측정한 결과이다. 이 결과는 두 번의 독립적인 실험의 대표 결과이다. DDM으로

용해화된 BOR1은 35°C 에서 10분의 배양 동안에 그 본래 상태를 완전히 유지하였다. 그러나, 온도가 40°C 또는 45°C로 증가하였을 때, DDM은 BOR1-GFP 단백질의 구조를 유지하는 데 실패하였고, 거의 완전한 변성/응집이 일어났다. 반면에, PSE-C11은 45°C로 가열 후에도 BOR1-GFP의 단분산성을 성공적으로 유지하였다. 이러한 결과는 새로운 양친매성 화합물, 특히 PSE-C11은 BOR1-GFP 단백질을 용해화시키는데 효과적일 뿐만 아니라, 이 융합 단백질의 열적안정성을 향상시키는데도 매우 훌륭함을 의미한다.

[460] 이러한 결과로부터 PSAs 및 PSEs는 BOR1 용해화 능력이 매우 우수할 뿐만 아니라, 높은 온도에서도 BOR1 구조 안정화 능력이 우수하므로, 막단백질을 추출하거나 안정화시키는 데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[461] <실시에 7> LeuT (leucine transporter) 막단백질을 이용한 PSAs, PSEs 및 TPSs의 막단백질 안정화 능력 평가

[462] PSAs, PSEs 또는 TPSs (TPS-A/E/ELs)에 의한 LeuT (leucine transporter) 단백질의 안정화 능력을 측정하는 실험을 하였다. DDM으로 정제된 LeuT를 각각의 양친매성 화합물 함유 용액과 혼합하였고, 그 후 실온에서 12일 동안 배양하였다. LeuT 단백질 활성도를 리간드($[^3\text{H}]$ -Leu)를 활용한 SPA (scintillation proximity assay)에 의해 측정하였으며, PSAs, PSEs, TPSs 또는 DDM의 농도는 (a) CMC + 0.04 wt%, 또는 (b) CMC + 0.2 wt%를 사용하였다.

[463] 구체적으로, LeuT 안정성 측정 실험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기실시에 6의 결과에 따라, PSAs 및 PSEs 양친매성 화합물로는 PSA-C9를 제외하고, PSA-C10, PSA-C11, PSE-C9, PSE-C11, PSE-C13을 선택하여 사용하였고, TPS-As, TPS-Es 및 TPS-EL을 사용하여, G.Deckert 등의 논문(*Nature* 1998, 392, 353-358.)에 게재된 방법에 따라, 아퀴팩스 에오리쿠스(*Aquifex aeolicus*)로부터 와일드 타입 LeuT (leucine transporter)의 정제를 수행하였다. LeuT는 C-말단 8xHis-태그된 트랜스포터를 암호화하는 pET16b로 형질전환된 *E. coli* C41(DE3)에서 발현되었다 (발현 플라스미드는 Dr E. Gouaux, Vollum Institute, Portland, Oregon, USA에 의해 제공받음). 요약하면, LeuT를 함유하는 박테리아 멤브레인을 1.0 wt% DDM으로 처리한 후에, 단백질을 Ni^{2+} -NTA resin (Life Technologies, Denmark)에 결합시켰다. 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM NaCl, 199 mM KCl, 0.05 % DDM 및 300 mM 이미다졸로 resin 결합된 LeuT를 용출시켰다. 그 다음, 약 1.5 mg/ml 단백질 스톡(stock)을, DDM 및 이미다졸이 없으나 TPS-As, TPS-Es, TPS-ELs, PSAs/PSEs (PSA-C10, PSA-C11, PSE-C9, PSE-C11 및 PSE-C13) 또는 DDM (대조군)을 최종 농도가 CMC + 0.04 wt% 또는 CMC + 0.2 wt%가 되도록 보충한 동등한 버퍼에 10배 희석하였다. 단백질 샘플은 상온에 저장하고, 지정된 시간에 원심분리하였다. 단백질 활성은 SPA (scintillation proximity assay) (M. Quick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104, 3603-3608.)를 이용하여 $[^3\text{H}]$ -Leu 결합을 측정하였다. 요약하면, SPA는 450 mM NaCl 및 각각의 테스트 화합물을 함유하는 버퍼에 녹아 있는 5 μL 의 각각의 단백질 샘플로 분석을

수행하였다. 20 nM [^3H]-Leu 및 copper chelate (His-Tag) YSi beads (둘 모두 PerkinElmer, Denmark로부터 구매함)의 존재 하에 SPA 반응을 수행하였다. [^3H]-Leu 결합은 MicroBeta liquid scintillation counter (PerkinElmer)를 이용하여 측정하였다.

- [464] 도 11에 나타난 결과와 같이, 테스트한 PSAs 및 PSEs는 모두 두 가지 농도에서 DDM 보다 우수한 LeuT 단백질 안정화 능력을 나타냈다. 구체적으로, CMC+0.04 wt% 농도에서, 모든 실험된 PSAs는 LeuT 활성을 유지하는 데 DDM 보다 더욱 효과적이었고, PSA-C11은 PSA-C10보다 더 우수하였다. PSE-C9는 PSEs 중 가장 덜 효과적이었으나, 가장 우수한 PSA인 PSA-C11과 비슷하였다. 특히, PSE-C11 및 PSE-C13은 다른 테스트 화합물 및 DDM 보다도 현저하게 우수하였다. PSE-C11 및 PSE-C13에 의해 용해화된 LeuT는 12일 배양 동안에 어떤 감지할만한 단백질 활성의 감소도 관찰되지 않았다 (도 11a). 또한, 양친매성 분자의 농도를 CMC+0.2 wt%로 증가시켰을 때도 이와 유사한 경향이 관찰되었다. 특히, PSE-C11에 용해된 단백질은 12일 후에 100% 트랜스포터 활성을 유지하고 있음은 주목할 만 하다(도 11b).

- [465] 이러한 결과로부터 평가된 모든 PSAs 및 PSEs가 DDM과 비교하여 LeuT의 활성을 유지하는 데 더 우수하며, PSEs가 PSAs 보다 전체적으로 우수한 성능을 가짐을 알 수 있었다. 특히, PSE-C11은 낮은 농도 및 높은 농도 모두에서 트랜스포터 활성을 유지하는 데 최적이었고, 이는 BOR1-GFP 융합 단백질에서 관찰된 결과와 일치하였다.

- [466] 또한, 도 12 및 도 13에 나타난 결과와 같이, TPS-A6을 제외한 모든 테스트된 양친매성 화합물은 DDM보다 실질적으로 우수하였다. TPS-As 및 TPS-Es 중에서 TPS-E8의 성능이 가장 우수하고 트랜스포터가 TPS-E8에 가용화되었을 때, 트랜스포터 활성이 12일 배양 과정동안 온전히 유지되었다(도 12). 트랜스포터의 안정성을 유지하는 능력은 양친매성 화합물의 알킬 사슬 길이가 증가함에 따라 향상되었다(도 12). 또한 양친매성 화합물 농도를 CMC + 0.2 wt%로 증가시키더라도 비슷한 경향을 나타내었다(도 12). TPS-ELs의 경우에는 TPS-As/Es의 활성과 비교하여 전반적으로 감소된 경향을 보였다(도 13). 양친매성 화합물의 친수성기의 중요성은 TPS-E8 및 TPS-E8L의 비교에서 발견되었다. 이 두 화합물은 비슷한 친수성기과 함께 동일한 알킬사슬 및 링커를 공유하지만 TPS-E8은 TPS-E8L보다 우수하였다. 이는 TPS-E8는 친수성기에 프로필 스페이서가 없기 때문에 LeuT 안정성을 유지하는 것이 TPS-E8L보다 유리하다고 판단되었다. 종합적으로, TPS-Es, 특히 TPS-E7 및 TPS-E8이 트랜스포터의 장기간 기질 결합 유지 능력에 있어서 TPS-As 및 TPS-ELs보다 우수하였다.

- [467] <실시예 8> MelB(*Salmonella typhimurium* melibiose permease) 막단백질을 이용한 PSAs 및 PSEs의 막단백질 용해화 및 안정화 능력 평가

- [468] PSAs 또는 PSEs에 의한 MelB_{st}(*Salmonella typhimurium* melibiose permease)

단백질의 추출 효율(용해화 능력)과 구조적 안정성을 측정하는 실험을 하였다. MelB 단백질을 PSAs, PSEs 또는 DDM을 사용하여 추출 후, 추출된 단백질의 양과 그 구조적 안정성을 SDS-PAGE와 웨스턴 면역블롯팅(Western immunoblotting)을 통해 정량적으로 분석하였다. 1.5 wt% 양친매성 화합물의 농도하에서 4개의 온도 (0, 45, 55 또는 65)로 90분 동안 단백질을 추출함으로써 양친매성 화합물의 단백질 추출 효율과 열적 안정화 능력 두 가지 성능을 동시에 평가하였다.

- [469] 구체적으로, 본 발명자의 2013년 논문(P. S. Chae, et al., *Chemistry*. 2013, 19, 15645-15651.)에 기재된 방법에 따라, C-말단에 10-His tag를 가지는 wild-type MelB를 암호화하는 플라스미드 pK95AHB/WT MelB_{st}/CH10 및 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*) DW2 세포 (melB 및 lacZY)를 이용하여 단백질(MelB_{st})을 생산했다. A. S. Ethayathulla 등의 논문(*Nat. Commun.* 2014, 5, 3009)에 기재된 방법에 따라 세포 성장 및 멤브레인 준비를 수행했다. 단백질 분석은 Micro BCA 키트 (Thermo Scientific, Rockford, IL)로 수행했다. 용해화(solubilization)/안정성(stability)을 측정하기 위하여, MelB_{st}를 함유하는 멤브레인 샘플 (최종 막단백질 농도는 10 mg/mL)을 용해화 버퍼 (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% 글리세롤 및 20 mM melibiose) 및 1.5% (w/v) DDM, PSAs(PSA-C11) 또는 PSEs(PSE-C9, PSE-C11, PSE-C13)와 함께 혼합하였다. 추출물을 4개의 다른 온도(0, 45, 55 및 65)에서 90분 동안 배양했다. 45분 동안 4 에서 TLA-100 rotor를 이용하여 Beckman Optima™ MAX 초원심분리기로 355,590g에서 초원심분리하여 비용해 분획물을 제거하였다. 20 μ g 단백질을 SDS-15% PAGE에 의해 분리하였다. 그 다음 Penta-His-HRP 항체 (Qiagen, Germantown, MD)로 면역블로팅하였다. SDS-PAGE 및 면역블로팅 후에, 용해된 MelB의 양을 정량화하였고, 대조군에서 측정된 전체 MelB의 퍼센티지로서 나타내었다.
- [470] 도 14에 나타난 결과와 같이, PSA-C11, PSE-C9, PSE-C11는 0°C에서 DDM만큼 효율적으로 MelB를 추출하였다. 45°C 에서도 이와 유사하였다. 그러나, 배양 온도를 55°C 로 증가시켰을 때, DDM과 PSAs 및 PSEs 사이에 급격한 차이가 관찰되었다. 이 온도에서 DDM에 용해된 MelB은 모두 용액내에서 사라져 버린 반면, 새로운 양친매성 분자 (PSA-C11, PSE-C11 및 PSE-C13)에 의해 둘러싸인 MelB은 모두 용액속에 용해된 상태를 잘 유지하였는데, 이는 이 새로운 양친매성 분자 내 MelB 단백질의 향상된 안정성을 나타낸다. 65°C 에서 배양하였을 때, 오직 PSE-C11만이 적은 양의 용해된 MelB를 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 PSAs 및 PSEs는 DDM 보다 MelB 단백질 안정화 능력이 우수하고, MelB 단백질 추출 효율이 매우 우수함을 확인할 수 있었다. 특히, MelB에 대하여 테스트된 새로운 양친매성 화합물 중에 PSE-C11가 가장 우수하였고, 이는 BOR1 및 LeuT에서 얻은 결과와 일치하였다.
- [471] <실시예 9> β_2 AR(인간 β_2 아드레날린 수용체) 막단백질을 이용한 TPSs, PSAs

및 PSEs의 평가

- [472] TPSSs, PSAs 및 PSEs에 의한 인간 β_2 아드레날린성 수용체 (β_2 AR), G-단백질 연결 수용체(GPCR) 구조 안정성과 단백질 복합체의 크기를 측정하는 실험을 하였다. BOR1, LeuT 및 MelB로 얻은 결과에 기초하여, 테스트 화합물로서 TPSSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-EL), PSA-C11, PSE-C11 및 PSE-C13을 선택하여 사용하였다.
- [473] <9-1> 고친화 아고니스트(agonist) BI (BI-167107)의 존재 하에 PSAs 및 PSEs에 용해된 mBBR- β_2 AR(monobromobimane 표지된 β_2 AR)의 구조적 안정성 평가
- [474] 높은 친화력의 작용제(agonist) BI (BI-167107)의 존재 하에 PSAs 및 PSEs에 용해된 mBBR- β_2 AR(monobromobimane 표지된 β_2 AR)의 구조적 안정성을 평가하는 실험을 하였다.
- [475] 구체적으로, TM6(transmembrane helix 6) 근처의 국부적인 구조적 변화에 의해 유도된 형광 스펙트럼의 변화를 측정하기 위해 mBBR(monobromobimane)-표지된 β_2 AR (주로 Cys265에 표지됨)를 이용하였다 (Yao, X. 등, *Nat. Chem. Biol.* 2006, 2, 417-422. 참조). 0.1 wt% DDM에 0.5 μ M로 용해된 0.5 μ l BI(agonist)-결합된 mBBR- β_2 AR는 500 μ l의 0.1 wt% 새로운 양친매성 화합물 버퍼 (PSA-C11, PSE-C11 및 PSE-C13)로 희석되었다. 30분 동안 단백질 샘플을 배양한 후에, mBBR 스펙트럼을 측정하였고, 0.1 wt% DDM에 녹아있는 mBBR-표지된 수용체의 스펙트럼과 비교하였다. Bimane 형광을 위해 370nm 여기(excitation) 파장을 사용하였고, 방출(emission) 스펙트럼은 430 내지 510 nm에서 1-nm 단위에서 0.5 nm s⁻¹로 Spex FluoroMax-3 분광기(Jobin Yvon Inc.)를 이용하여 측정하였고, 광자계수 모드 설정은 4-nm 방출 대역폭 통과로 하였다. DDM에 용해된 mBBR-표지된 β_2 AR을 양성대조군으로 사용하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 대표 결과이다.
- [476] 도 15에 나타난 바와 같이, PSE-C13에 용해된 수용체가 DDM의 그것과 다소 다른 bimane 형광 스펙트럼을 보였으나, PSA-C11 및 PSE-C11에서 얻은 스펙트럼들은 DDM에 용해된 수용체로부터 얻은 것과 매우 유사하였다. 이러한 결과는 BI (BI-167107)의 존재하에서 PSA-C11 및 PSE-C11로 용해화된 β_2 AR의 구조적 형태가 DDM에 녹아있는 수용체와 매우 흡사함을 알 수 있다.
- [477] <9-2> Full agonist (ISO) 존재 유무 또는 ISO와 G-단백질 조합에 따른 PSAs/PSEs와 DDM에 의한 mBBR- β_2 AR 구조적 변화 및 그 구조적 안정성 평가
- [478] Full agonist (Isoprenalolol, ISO) 존재 유무 또는 ISO와 G-단백질 조합에 따른 PSAs/PSEs와 DDM에 의한 mBBR- β_2 AR 구조적 변화 및 그 구조적 안정성을 측정하는 실험을 하였다. 수용체의 완전한 활성을 위해서는 full agonist(예를 들어, BI)와 G_s-단백질의 결합이 동시에 필요하다는 것은 잘 알려져 있다(Rasmussen, S. G. F. 등, *Nature* 2011, 469, 175-180. 참조).
- [479] 구체적으로, G 단백질 커플링 실험은 다음과 같은 방법을 이용했다. 50 μ M의 비리간드 mBBR-라벨된 수용체 0.5 μ l을 500 μ l의 0.1 wt% 양친매성 화합물

버퍼로 15분 동안 상온에서 희석시켰다. 이 희석물은 50nM의 최종 수용체 농도를 생산하였다. 2 μ M 이소프레오테레놀 (Isopreoteranol, ISO)을 이 용액에 첨가하고, 다시 15분 동안 배양하였다. 250 nM G_s-단백질을 추가적으로 첨가한 후에, 단백질 샘플을 다시 20분 동안 상온에서 인큐베이션하였다. Bimane 형광은 370nm 여기(excitation) 파장을 사용하였고, 방출(emission) 스펙트럼은 430 내지 510 nm에서 1-nm 단위에서 0.5 nm s⁻¹로 Spex FluoroMax-3 분광기(Jobin Yvon Inc.)를 이용하여 측정하였고, 광자계수 모드 설정은 4-nm 방출 대역폭 통과로 하였다. 같은 실험을 0.1 wt% DDM을 사용하여 반복하였는데 이는 양성대조군으로 사용하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 대표 결과이다.

[480] 도 16에 나타난 결과와 같이, full agonist인 이소프레오테레놀 (ISO)이 존재할 때, PSA-C11 또는 PSE-C11에 의해 용해된 수용체는 DDM에 의해 용해된 수용체의 스펙트럼과 유사했으며, 이는 ISO 존재하에 수용체가 부분적인 활성을 띠고 있음을 의미한다. 그리고 G-단백질을 추가했을 시에는 β_2 AR의 bimane 형광 스펙트럼에서 추가적인 변화를 관찰할 수 있었는데 이는 수용체의 구조가 부분활성에서 완전활성 상태로 변화했음을 의미한다. 이와 같은 구조적인 변화는 형광세기의 감소와 최대 방출 파장의 적색 편이(red-shift)를 통해 확인할 수 있다.

[481] 이 결과는 PSA-C11 또는 PSE-C11이 G-단백질 커플링에 의한 수용체 활성화에 잘 기능하고 있음을 나타내며, PSA-C11 또는 PSE-C11에 용해된 β_2 AR의 구조가 세포막에 존재하는 수용체와 비슷한 양상으로 거동함을 시사한다.

[482] <9-3> 방사성 리간드 결합 시험을 이용한 mBBr- β_2 AR의 리간드(DHA) 결합 활성 측정

[483] PSAs 또는 PSEs에 의해 용해된 수용체(mBBr- β_2 AR) 활성도를 [³H]-디하이드로알프레놀올 ([³H]-DHA)의 결합에 의해 측정하여 막단백질 안정화 능력을 평가하였다.

[484] 구체적으로, 방사성 리간드 결합 시험은 다음과 같은 방법을 이용하였다. 0.1 wt% DDM으로 정제된 β_2 AR는 약 10 mg/ml로 농축하였다 (대략 200 μ M). DDM으로 정제된 β_2 AR는 0.2 wt%의 DDM, PSA 또는 PSE에 용해된 0.5 mg/ml BSA로 보충된 10nM [³H]-DHA(dihydroalprenolol)을 함유하는 마스터 결합 혼합물을 제조하기 위해 사용되었다. 0.2 pmol에서 양친매성 화합물로 정제된 수용체의 활성은 4일의 배양 동안 규칙적인 간격으로 모니터하였다. 단백질 샘플은 먼저 2일 동안 아이스(ice)에서 배양하였고, 그 후 2일 동안 상온으로 이동시켰다. 수용체활성은 용해된 방사성리간드 결합 검정에 의해 측정되었다. DDM 또는 새로운 제제 (PSA-C11, PSE-C11 또는 PSE-C13)으로 정제된 수용체는 10 nM의 [³H]-DHA로 30분 동안 상온에서 배양했다. 혼합물을 G-50 컬럼에 로딩하고, 통과액을 1ml 바인딩 버퍼 (0.5 mg/ml BSA 및 20XCMC 양친매성 화합물로 보충된 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl)로 수집하고, 그리고 15 ml 섬광 유체(scintillation fluid)로 채웠다. 수용체-결합된 [³H]-DHA는 섬광 카운터

(Beckman)으로 측정했다. [^3H]-DHA의 비특이적 결합은 같은 결합 반응에서 1 μM 의 alprenolol (Sigma)를 첨가함으로써 측정하였다. [^3H]-DHA의 결합도는 컬럼 그래프로 측정되었다.

- [485] 도 17a에 나타난 결과와 같이, DDM, PSA-C11, PSE-C11 또는 PSE-C13으로 정제된 모든 수용체들은 0°C에서 첫 번째 2일 배양 동안 최초 활성을 잘 유지하였다. PSE-C11 또는 PSE-C13으로 용해된 수용체는 DDM으로 용해된 단백질 보다 최초 활성이 더 높음을 주목할 필요가 있다. 배양 온도를 상온으로 증가시켰을 때, 수용체 활성을 유지하는 데 있어서 DDM과 새로운 양친매성 분자 사이에 분명한 차이가 관찰되었다. 새로운 양친매성 화합물에 용해된 β_2 AR는 모두 DDM에 용해된 단백질 보다 2~3배 높은 활성을 나타내었다. 새로운 양친매성 화합물중에서는 PSE-C11이 가장 우수하였고, 그 다음으로 PSE-C13, PSA-C11 순이었다.
- [486] <9-4> TPSs의 β_2 AR 막단백질 구조 안정화 능력 평가
- [487] TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs)에 의한 인간 β_2 아드레날린성 수용체 (β_2 AR), G-단백질 연결 수용체(GPCR) 구조 안정성을 측정하는 실험을 하였다. 즉, DDM으로 정제된 수용체는 CHS (cholesteryl hemisuccinate) 없이 각각의 TPSs 만을 함유하는 버퍼 용액 또는 CHS와 DDM을 함유하는 버퍼 용액으로 희석시켰다. 최종 화합물 농도는 CMC+0.2wt%이었으며, 수용체의 리간드 결합 특성은 [^3H]-디하이드로알프레놀올 ([^3H]-DHA)의 결합에 의해 측정하였다.
- [488] 구체적으로, 방사성 리간드 결합 시험은 다음과 같은 방법을 이용하였다. β_2 AR는 0.1% DDM을 사용하여 정제하였으며 (D. M. Rosenbaum 등, *Science*, 2007, 318, 1266-1273.), 약 10 mg/ml (약 200 μM)로 최종 농축하였다. DDM으로 정제된 β_2 AR를 사용하여 0.2% 양친매성 화합물 (DDM 또는 TPSs)에서 0.5 mg/ml BSA로 보충된 10 nM [^3H]-Dihydroalprenolol (DHA)를 함유하는 마스터 결합 혼합물을 제조하였다. 양친매성 화합물로 정제된 수용체의 활성은 3-5일의 배양 동안 규칙적인 간격으로 모니터하였다. DDM 또는 TPSs로 정제된 수용체는 상온에서 30분 동안 10 nM의 [^3H]-DHA와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물을 G-50 컬럼에 로딩하고, 통과액을 1 ml 바인딩 버퍼 (0.5 mg/ml BSA 및 20xCMC 각각의 양친매성 화합물로 보충된 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl)로 수집하고, 그리고 15 ml 섬광 유체(scintillation fluid)로 채웠다. 수용체-결합된 [^3H]-DHA는 섬광 카운터 (Beckman)로 측정했다. [^3H]-DHA의 결합도는 컬럼 그래프로 나타내었다.
- [489] 그 결과, TPS-As/Es에 있어서, TPS-Es의 수용체 안정화 능력이 동일한 알킬 사슬 길이 (예: TPS-E7 대 TPS-A7)를 갖는 TPS-As보다 실질적으로 더 우수하였고, 그 중 TPS-E8이 가장 우수하였다 (도 18a). 또한, 상기 화합물의 효과는 알킬 사슬 길이가 증가함에 따라 크게 증가하였다. TPS-ELs에 있어서, TPS-E8L, TPS-E9L, TPS-E10L 및 TPS-E11L에 용해된 수용체는 모두 DDM과 유사한 수용체 활성을 나타내었다 (도 18b). 이러한 초기 수용체 활성 결과를

바탕으로 추가적인 평가를 위해 우수한 4 종(TPS-E8, TPS-E9L, TPS-E10L 및 TPS-E11L)을 선정하였고 수용체의 리간드 결합 활성을 실온에서 3 일 또는 5 일 동안 일정한 간격으로 측정하였다. 그 결과, DDM-가용화 수용체는 높은 초기 활성을 나타내지만, 시간이 지남에 따라 활성이 급속히 상실되었다. 그러나 TPS-E8, TPS-E9L, TPS-E10L 및 TPS-E11L에 가용화된 수용체의 장기간 활성 유지 능력을 평가하였을 때, 그 결과는 DDM 보다 현저히 우수하였고 CHS포함된 DDM보다도 우수하였다. CHS는 수용체의 표면에 결합하여 그 안정성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 특히, TPS-E10L은 5일 배양 후에도 ~90 % 초기 수용체 활성을 유지할만큼 우수하였다 (도 19 및 도 20a).

- [490] <9-5> PSAs 및 PSEs에 의해 형성된 β_2 AR 복합체의 크기 측정
- [491] PSAs 및 PSEs에 의해 형성된 β_2 AR 복합체의 크기를 측정하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 실험을 하였다.
- [492] 구체적으로, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 실험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 0.1 wt% DDM에 용해된 β_2 AR를 2 mM CaCl_2 의 존재 하에 M1 Flag column에 로딩하고, DDM/PSA/PSE 버퍼 (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2 wt% 양친매성 화합물)로 컬럼을 세척하였다. 수용체는 5 mM EDTA 및 0.2 mg/ml free Flag 펩타이드와 함께 20XCMC DDM/PSA/PSE로 용리하였다. 용리액은 0.5 ml/min에서 superdex-200 10/300 GL column (GE healthcare)에 적용하고, 280 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 러닝(running) 버퍼는 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 20XCMC의 각 양친매성 화합물(DDM, PSA-C11, PSE-C11 및 PSE-C13)을 함유하였다.
- [493] 도 17b에 나타난 바와 같이, 모든 양친매성 화합물들은 수용체와 균일한 복합체(PDCs)를 형성하였고, 이 PDCs는 DDM에 의해 생성된 PDCs 보다 구별되게 작았다.
- [494] <9-6> PSAs 및 PSEs를 이용한 β_2 AR의 전자현미경(EM) 분석
- [495] 다음으로 PSAs 및 PSEs를 이용하여 β_2 AR의 전자현미경(Electron microscopy, EM) 분석을 하였다.
- [496] 구체적으로, 전자현미경(EM) 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 기존의 음성 염색 프로토콜을 이용하여 샘플을 제조하였다 (Peisley, A. 등, *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 1335, 29-38 (2015) 참조). 요약하면, DDM 또는 새로운 양친매성 화합물(PSA-C11, PSE-C11 및 PSE-C13)로 정제된 3 μL 의 β_2 AR를 글로 방전(glow-discharged) 탄소 코팅 그리드에 피펫팅하고, 1%(w/v) 우라닐 포름산염(uranyl formate)으로 염색하였다. 이미징은 상온에서 Morgagni 268(D) transmission electron microscope (FEI Company)로 100kV에서 작동하여 수행하였다. 이미지는 Orius SC200W CCD 카메라 (Gatan Inc.)로 30,416X 배율로 기록하였다.
- [497] 도 21은 DDM (도 21a), PSA-C11 (도 21b), PSE-C11 (도 21c), 및 PSE-C13 (도

21d)로 정제된 β_2 AR의 negative staining EM 이미지이다. DDM에 녹아있는 수용체의 이미지에서는 응집된 단백질을 많이 볼 수 있었다. PSE-C13에 용해된 수용체에서도 응집된 단백질을 볼 수 있었으나 그 양이 적었으며, PSA-C11과 PSE-C11에 용해된 수용체의 경우는 응집된 단백질이 거의 관찰되지 않았다. 따라서 PSAs 및 PSEs를 전자현미경을 통한 막단백질의 구조 연구에 활용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[498] <9-7> PSE-C11의 β_2 AR 추출 용해화 효율 평가

[499] 테스트된 PSAs/PSEs 중에 가장 우수한 PSE-C11을 세포막으로부터 β_2 AR를 직접 추출하기 위해 이용하였다. 수용체는 1.0 wt% PSE-C11 또는 DDM으로 처리하였고, 그 후 PSE-C11 또는 DDM에 의해 용해된 수용체의 활성을 방사성표지된 리간드 [3 H]-DHA를 이용하여 측정하였다.

[500] 구체적으로, 세포막으로부터 수용체 추출 용해화 시험은 다음과 같이 수행하였다. 10ml PSE-C11 양친매성 화합물 버퍼 (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1.0 wt% PSE-C11)을 β_2 AR를 발현하는 1 gram insect cell (Sf9) 세포 펠릿에 첨가하였다. 혼합물은 1시간 동안 용해화를 위해 교반하였다. 12,000g으로 20분 동안 원심분리한 후, 상층액을 수집하고 2mM CaCl_2 의 존재 하에 M1 Flag column에 로딩하였다. 컬럼은 PSE-C11 버퍼 (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2 wt% 양친매성 화합물)로 세척하였다. 수용체는 20XCMC PSE-C11, 5 mM EDTA 및 0.2 mg/ml free Flag 펩타이드 내에서 용리하였다. DDM 또는 PSE-C11에 의해 용해화되고 정제된 수용체 활성은 0.2 pmol β_2 AR을 10 mM의 [3 H]-DHA와 함께 각각의 양친매성 화합물과 30분 동안 상온에서 인큐베이션한 후에 측정하였다. 다음 절차는 실시예 9-3과 동일한 방법으로 수행하였다. 각각의 측정은 3번 수행하였다. 20XCMC PSE-C11 또는 20XCMC DDM에 용해된 수용체는 또한 양친매성 화합물 (PSE-C11 또는 DDM)이 없는 버퍼(20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl) 하에서도 SEC에 적용하였다.

[501] 도 22는 용해화 시험 결과를 나타낸 것이다. PSE-C11에 의해 추출된 수용체는 DDM에 추출된 단백질보다 더 높은 활성도를 나타내었는데, 이 결과로부터 이 양친매성 화합물이 GPCR 용해화에 있어서 DDM의 대체제가 될 수 있음을 확인하였다.

[502] 도 23은 양친매성 화합물 (PSE-C11 또는 DDM)을 사용하여 세포막으로 수용체 추출 후 양친매성 화합물이 없는 버퍼를 사용하여 SEC 실험을 한 결과를 나타낸 것이다. 이 실험에서 DDM에 용해된 수용체의 경우에는 단백질에 해당하는 피크가 관찰되지 않았는데, 이는 DDM으로 정제된 수용체가 이 실험 과정 동안에 완전히 변성/응집되었음을 나타낸다(도 23a). 반면에, PSE-C11로 정제된 수용체는 양친매성이 포함되지 않는 버퍼를 사용했음에도 분명한 단분산 피크를 나타내었다(도 23b). 이 피크는 양친매성 화합물을 함유하는 버퍼를 사용하여 분석된 단백질에서 얻어진 것과 거의 동일하였다. 그러므로, 이 양친매성 분자에서 수용체의 안정성이 잘 유지되며, 이는 이 양친매성 분자의

강한 결합 친화도 및 수용체로부터의 PSE-C11의 느린 분리 속도 때문에 기인하는 것으로 판단된다. PSE-C11의 이러한 특징은 PSE-C11-단백질 복합체로부터 잉여의 미셀을 제거하는데 활용될 수 있고, 이는 많은 막단백질 구조 연구에 중요하다.

- [503] <9-8> T4L- β_2 AR-G_s 또는 β_2 AR-G_s 복합체에서의 PSE-C11 또는 TPS-E10L의 평가
- [504] T4L- β_2 AR-G_s 또는 β_2 AR-G_s 복합체를 이용하여 PSE-C11 또는 TPS-E10L의 복합체 정제 및 안정성 측정, 전자현미경(EM) 분석을 수행하였다.
- [505] 구체적으로, PSE-C11 또는 TPS-E10L 내 T4L- β_2 AR-G_s 또는 β_2 AR-G_s 복합체의 정제 및 안정성 측정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 0.1 wt% DDM에 용해된 100 μ M T4L- β_2 AR는 120 μ M G_s 헤테로트리머(heterotrimer)와 30분 동안 상온에서 혼합하였다. 0.5 유닛 apyrase (NEB) 및 2 mM MgCl₂를 복합체 형성을 위하여 1시간 동안 가하였다. 1 wt% PSE-C11 또는 TPS-E10L을 각각 혼합물에 추가적으로 첨가하여 0.8% 최종 농도가 되도록 하였고, 30분 동안 인큐베이션하여 DDM에서 PSE-C11 또는 TPS-E10L로 양친매성 화합물 교환을 시작하였다. 단백질 용액은 M1 Flag column에 로딩하였고, 순차적인 버퍼로 세척하였는데, 이 때 다른 물비의 0.1% DDM 버퍼에서 0.5% PSE-C11 또는 TPS-E10L 버퍼로 완전한 양친매성 화합물 교환이 이루어지게 하였으며, 최종적으로 0.05% (100xCMC) PSE-C11 또는 TPS-E10L 버퍼로 용리하였다. 겔 여과를 수행하여 러닝(running) 버퍼 (20mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.005% PSE-C11 또는 TPS-E10L, 1 μ M BI, 100 μ M TCEP)로 T4L- β_2 AR-G_s 복합체를 정제하였다. PSE-C11 또는 TPS-E10L 내의 β_2 AR-G_s 복합체의 안정성을 측정하기 위하여, 분석 겔 여과를 상기 같은 제형의 러닝 버퍼로 12 시간, 1일, 3일, 7일, 15일에 수행하였다. 15일 배양 후, 분석 겔 여과는 PSE-C11 또는 TPS-E10L 제제가 없는 상기와 동일한 제형을 가지는 양친매성 화합물 프리 버퍼를 이용하여 수행하였다.
- [506] 또한, PSE-C11 내 T4L- β_2 AR-G_s 또는 β_2 AR-G_s 복합체의 negative staining EM 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. T4L- β_2 AR-G_s 또는 β_2 AR-G_s 는 기존의 음성 염색 프로토콜을 이용하여 전자현미경을 위한 샘플을 제조하였고 (Peisley, A. 등, *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 1335, 29-38 (2015) 참조), 상온에서 Tecnai T12 전자현미경으로 120kV에서 작동하여 수행하였다. 이미지는 Gatan US4000 CCD 카메라로 71,138x 배율에서 ~1.5 μ m의 디포커스 값으로 기록하였다.
- [507] 도 23c 및 도 20b에 나타난 바와 같이, β_2 AR-G_s 복합체의 안정성에서 PSE-C11 또는 TPS-E10L의 현저한 효과를 확인할 수 있었다. 상기 화합물 각각 15일 및 7일 동안의 인큐베이션에도 복합체의 분리가 전혀 관찰되지 않았기 때문이다. 종래 연구에서 DDM으로 정제된 T4L- β_2 AR-G_s 복합체가 4°C에서 오직 2일 인큐베이션 후에도 상당한 복합체 분리를 관찰되었음을 보고한 바 있다. 게다가, 양친매성 화합물이 없는 버퍼를 용리액으로 사용하였을 때 조차도, PSE-C11에

용해된 복합체는 온전히 안정한 것으로 관찰되었다.

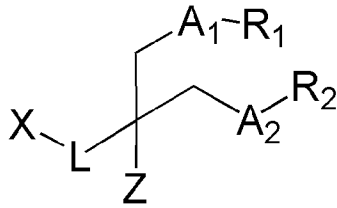
- [508] 도 24 및 25은 PSE-C11 및 TPS-E10L에 의해 정제된 복합체의 EM 분석 결과이다. Negative staining EM 이미지는 응집이나 변성이 없는 높은 단분산성을 나타내었다. 2D 분류화(classification)와 입자 평균화 (particle averaging) 방법을 사용하여 이미지를 분석했을 때 이 복합체를 구성하는 각각의 도메인들 (β_2AR , G_{as} 와 $G_{\beta n}$)을 잘 구별할 수 있었다. 여기서 관찰된 복합체의 구조는 MNG-3에 의해 용해된 복합체로부터 얻어진 것과 완전히 동일한 것이다. 따라서, 이 PSE-C11 또는 TPS-E10L은 쉽게 분리되는 막단백질 복합체의 이미지화 및 결정화에 성공적으로 사용될 수 있음을 시사한다.
- [509] <실시예 10> TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs)의 UapA 막단백질 구조 안정화 능력 평가
- [510] TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs)에 의한 아스페르길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*)로부터 분리된 UapA(uric acid-xanthine/ H^+ symporter)의 구조 안정성을 측정하는 실험을 하였다. UapA의 구조적 안정성은 sulfhydryl-specific fluorophore, N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide(CPM)을 사용하여 평가되었다.
- [511] 구체적으로, UapAG411V₁₋₁₁(이하 'UapA'라고 함)은 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*) FGY217 균주에서 GFP 융합으로 발현되었고, 샘플 버퍼 (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.03 % DDM, 1 mM xanthine)로 분리하였다. 상기 트랜스포터를 100 kDa 분자량 차단 필터 (Millipore)를 사용하여 약 10 mg/ml로 농축시켰다. 트랜스포터를 TPS-As (TPS-A6, TPS-A7 또는 TPS-A8), TPS-Es (TPS-E6, TPS-E7 또는 TPS-E8), TPS-ELs (TPS-E8L, TPS-E9L, TPS-E10L 또는 TPS-E11L), MNG-3 또는 DDM(대조군) 중 하나를 포함하는 a Greiner 96-웰 플레이트에서 CMC + 0.04 wt% 또는 CMC + 0.2 wt% 농도의 버퍼와 1: 150 비율로 희석하였다. DMSO (Sigma)에 저장된 CPM 염료 (Invitrogen)를 염료 완충액 (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.03 % DDM, 5 mM EDTA)으로 희석시켰다. 희석된 염료 용액 3 μ l를 개별 단백질 샘플에 첨가하였다. 반응 혼합물을 40 °C에서 120분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 중에, 형광 방출 강도는 387 및 463 nm의 흥분 및 방출 파장에서 각각 설정된 마이크로 플레이트 분광 형광 측정기를 사용하여 모니터링되었다. 형광 강도의 최대값을 사용하여 인큐베이션 기간 동안 접힌 트랜스포터의 상대적인 백분율을 계산하였다. GraphPad Prism을 사용하여 접힌 트랜스포터의 상대적인 양을 시간에 따라 도시하였다.
- [512] 도 26 및 27에 나타난 결과와 같이, TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs) 모두 DDM과 비교하여 측정된 모든 농도에서 UapA 단백질을 접힘상태를 유지하는 능력이 우수함을 확인하였다. 특히, TPS-As/Es 중 TPS-E8이 가장 우수하였고(도 26), TPS-ELs 중 TPS-E11L 이 고농도(CMC +0.2 wt%)에서 가장 우수한 효과를 보여줌을 확인하였다(도 27).

- [513] 이러한 결과로부터 TPSs(TPS-As, TPS-Es 및 TPS-ELs)는 세포막으로부터 추출한 UapA를 수용액에서 구조적으로 안정한 상태로 유지하는 데 우수한 효과를 나타내므로, 막단백질을 안정화시키는 데 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

상기 L은 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 의 알킬렌기, 또는 직접결합이고;

상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기, 또는 산소 원자이고;

상기 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기,

치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기이고;

상기 X는 산소로 연결된 글루코즈 중심의 가지친(branched)

오당류(pentasaccharide)이고; 그리고

상기 Z는 수소 원자 또는 $-CH_2-A^3-R^3$ 이고, 상기 A^3 는 메틸렌기, 또는 산소

원자이고, 상기 R^3 는 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기,

치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기이다.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기이고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A^1 및 A^2 는 메틸렌기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 치환 또는 비치환된 C_5-C_{15} 의 알킬기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 동일하고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A^1 및 A^2 는 산소 원자이고; 상기 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기이고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

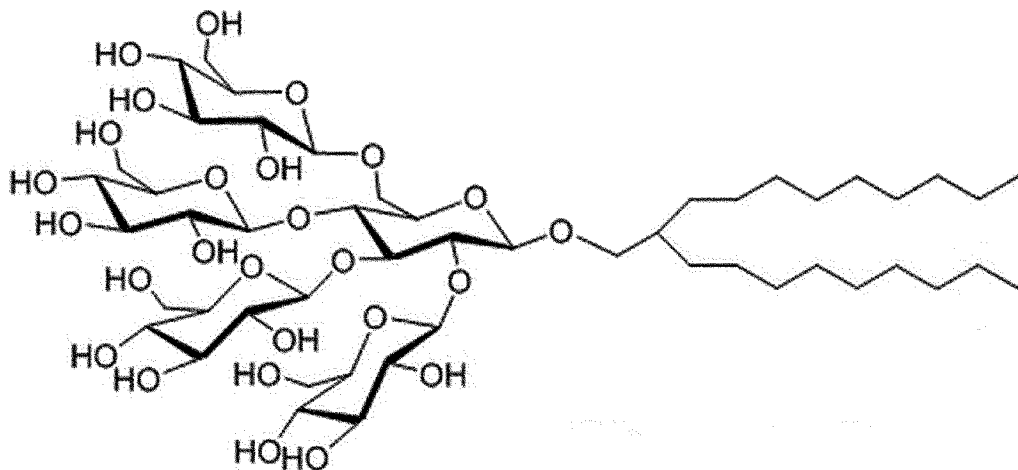
[청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A^1 및 A^2 는 산소 원자이고; 상기 R^1 및 R^2 는 치환 또는 비치환된 C_5-C_{15} 의 알킬기이고; 상기 R^1 및 R^2 는 동일하고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-CH_2-A^3-R^3$ 이고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기이고; 상기 R^1 내지 R^3 는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기, 치환

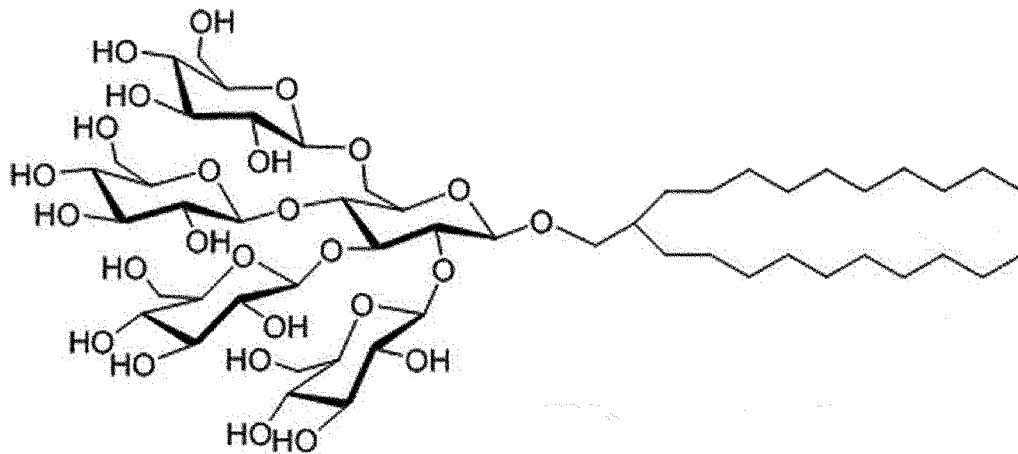
또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고; 그리고 상기 R¹ 내지 R³은 동일한 화합물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³ 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기이고; 상기 R¹ 내지 R³은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기이고; 그리고 상기 R¹ 내지 R³은 동일한 화합물.

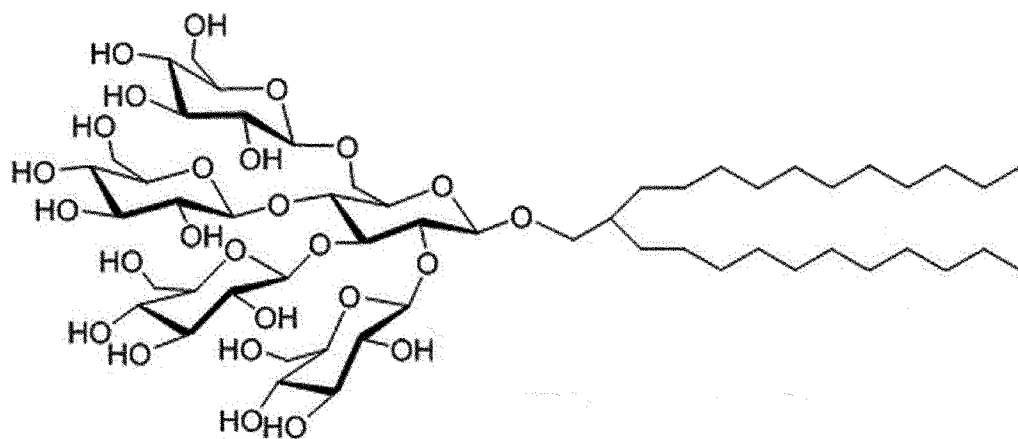
[청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 18 중 하나인 화합물:
[화학식 2]



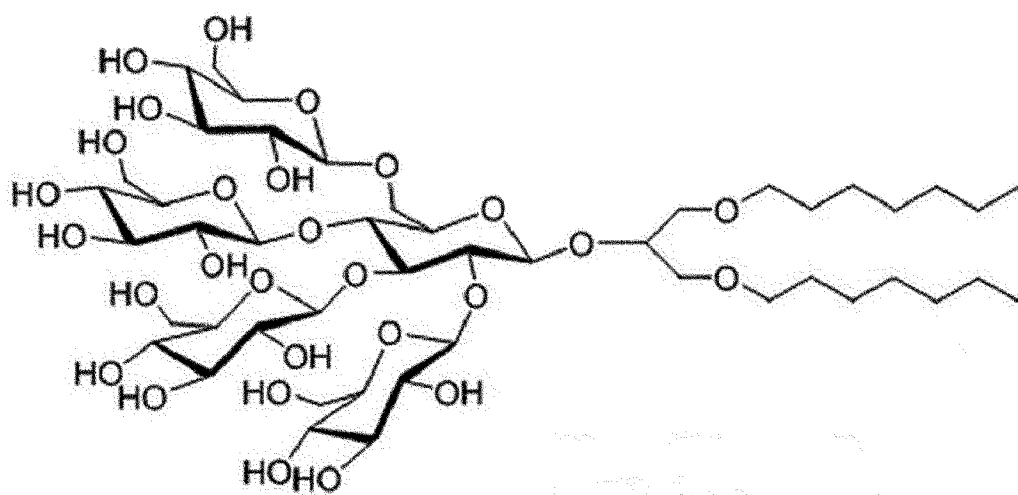
[화학식 3]



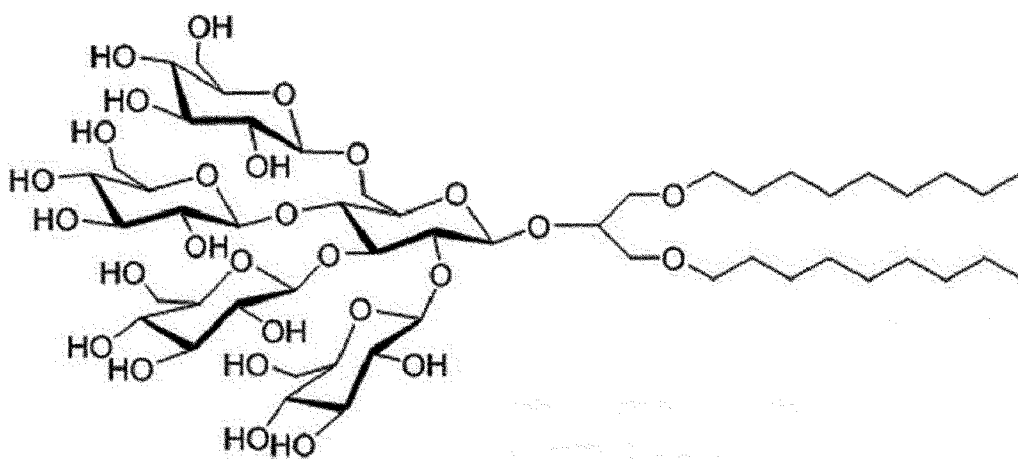
[화학식 4]



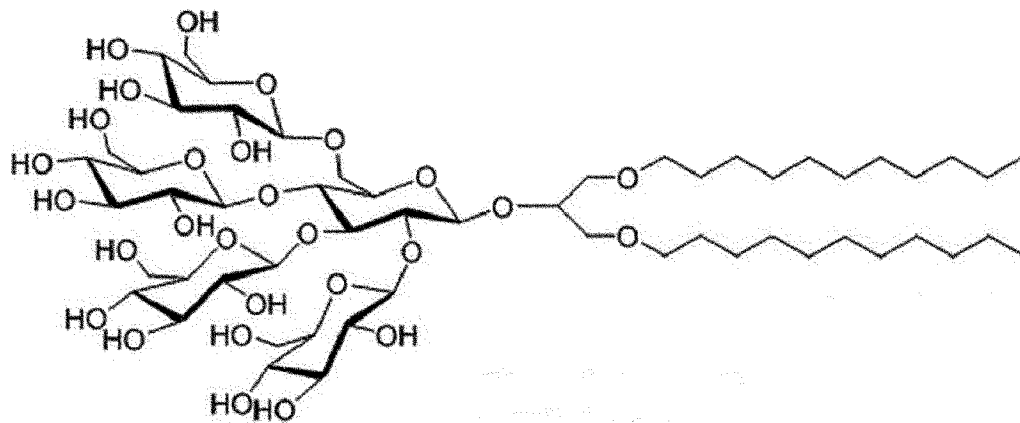
[화학식 5]



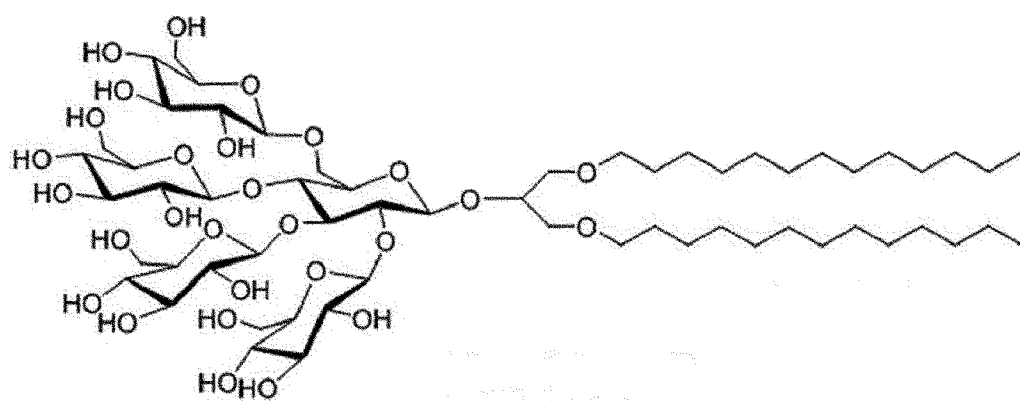
[화학식 6]



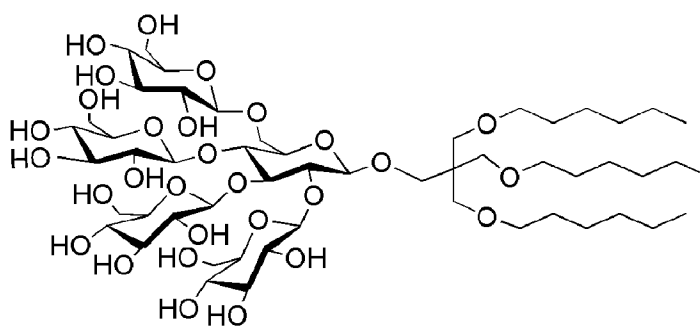
[화학식 7]



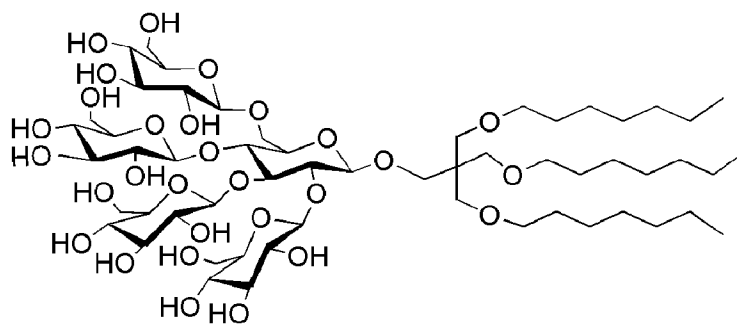
[화학식 8]



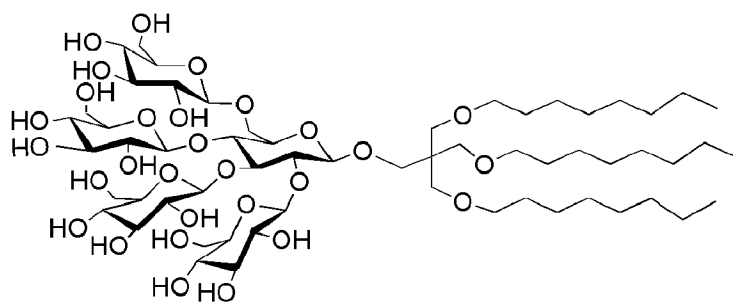
[화학식 9]



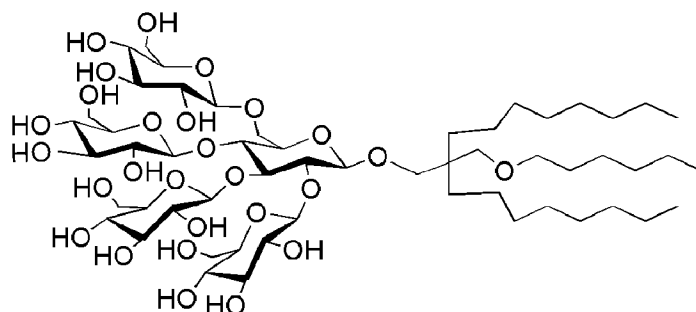
[화학식 10]



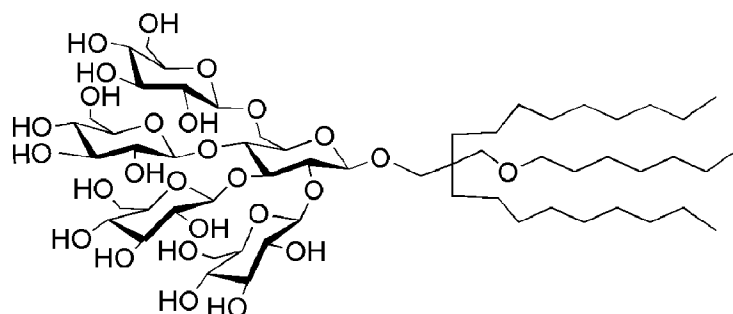
[화학식 11]



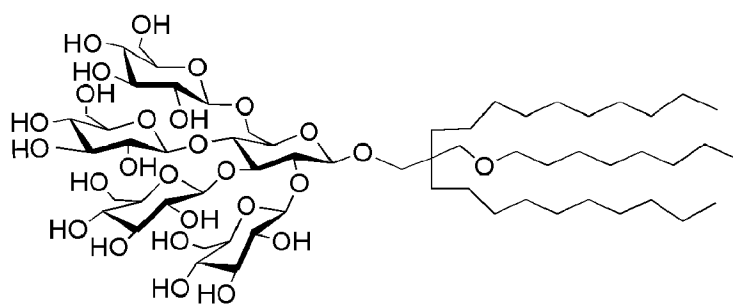
[화학식 12]



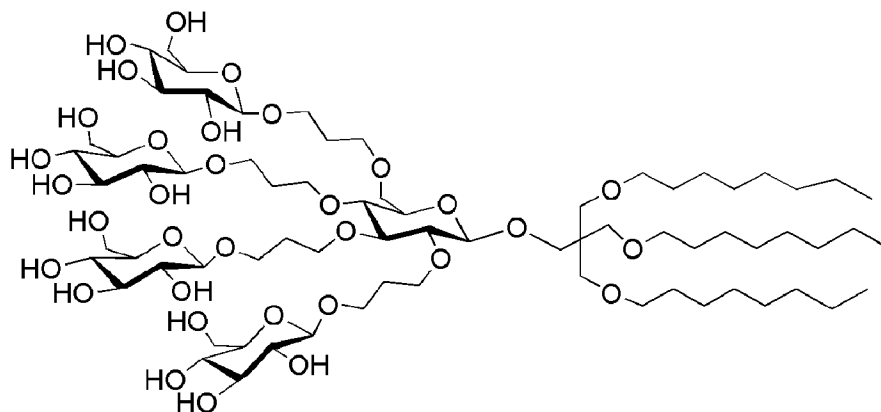
[화학식 13]



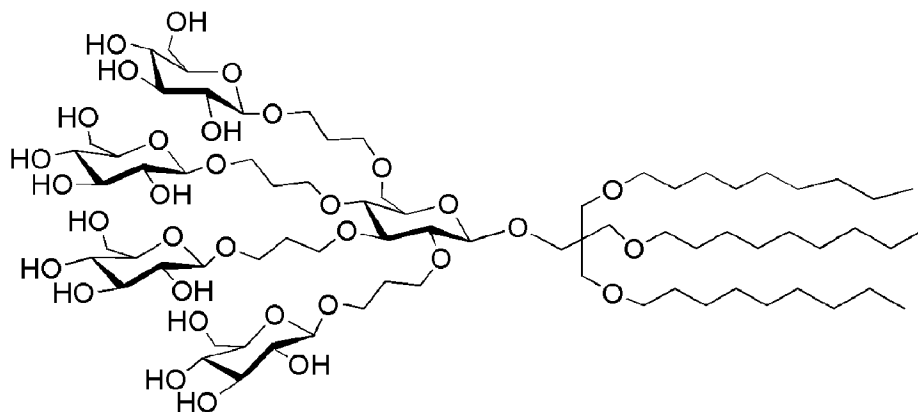
[화학식 14]



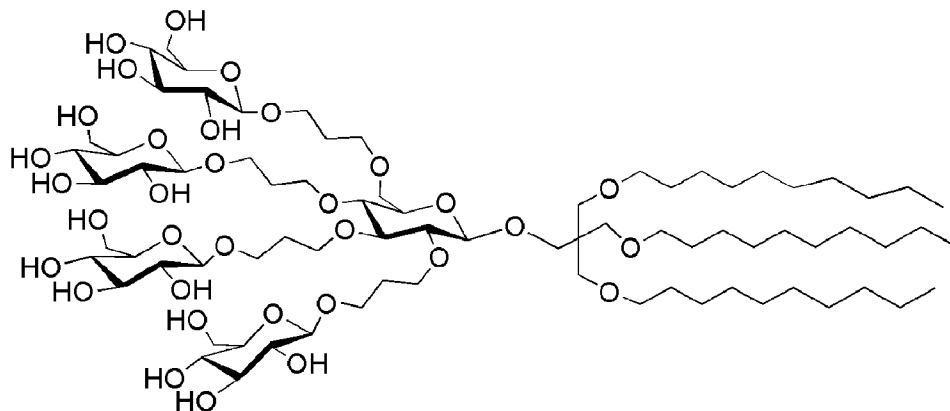
[화학식 15]



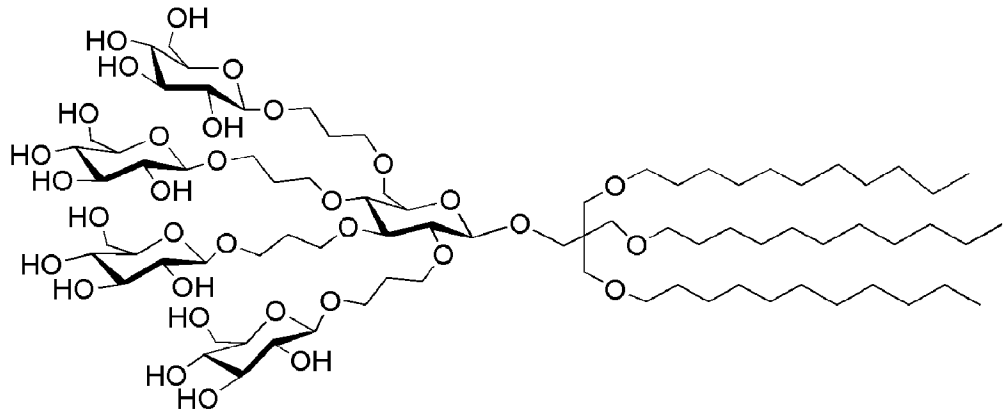
[화학식 16]



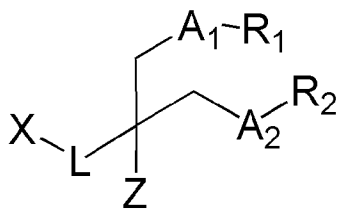
[화학식 17]



[화학식 18]



- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하기 위한 양친매성 분자인 화합물.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 수용액에서 임계 미셀 농도(CMC)가 0.0001 내지 0.1 mM인 화합물.
- [청구항 11] 제 1항에 따른 화합물을 포함하는 막단백질의 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석용 조성물.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 조성물은 미셀, 리포솜, 에멀션 또는 나노입자의 제형인 것인 조성물.
- [청구항 13] 1) 디에틸 말론산염(diethyl malonate)에 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)을 첨가하여 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate)을 생성하는 단계;
 2) 상기 단계 1)의 생성물에 LiCl, DMSO 및 H₂O를 첨가하고 150~200°C로 가열한 후, LiAlH₄, THF를 첨가하여 디알킬화 모노올(dialkylated mono-ol)을 생성하는 단계;
 3) 상기 단계 2)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;
 4) 상기 단계 3)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;
 5) 상기 단계 4)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및
 6) 상기 단계 5)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:
 [화학식 1]

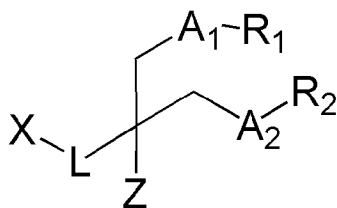


상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기이고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고; 상기 Z는 수소 원자이고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류이다.

[청구항 14]

- 1) 에피클로로하이드린(Epichlorohydrin)에 NaOH 및 알코올을 첨가하여 알코올 유도체를 생성하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;
- 4) 상기 단계 3)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및
- 5) 상기 단계 4)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:

[화학식 1]



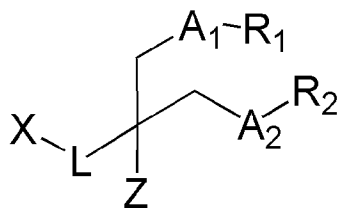
상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고; 상기 Z는 수소 원자이고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류이다.

[청구항 15]

- 1) 디에틸 말론산염(diethyl malonate)에 1-아이오도알케인(1-iodoalkane)을 첨가하여 디알킬화 디에틸말론산염(dialkylated diethylmalonate)을 생성하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 생성물에 LiAlH₄, THF를 첨가하여 디알킬화 다이올(dialkylated diol)을 생성하는 단계;

- 3) 상기 단계 2)의 생성물에 1-브로모알케인(1-bromoalkane)을 첨가하여 알킬사슬을 추가하는 단계;
- 4) 상기 단계 3)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;
- 5) 상기 단계 4)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;
- 6) 상기 단계 5)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및
- 7) 상기 단계 6)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:

[화학식 1]

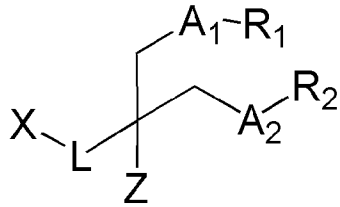


상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³ 중 하나는 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기이고; 상기 R¹ 내지 R³은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기이고; 상기 R¹ 내지 R³은 동일하고; 그리고 상기 X는 글루코스 중심의 가지친 오당류이다.

[청구항 16]

- 1) 5,5-비스-브로모메틸-2,2-디메틸-[1,3]디옥산(5,5-bis-bromomethyl-2,2-dimethyl-[1,3]dioxane)을 시작 물질로 하여 다알킬화 다이올을 합성하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 생성물에 1-브로모알케인(1-bromoalkane)을 첨가하여 알킬사슬을 추가하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스를 도입하는 단계;
- 4) 상기 단계 3)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;
- 5) 상기 단계 4)의 생성물에 글리코실레이션(glycosylation) 반응을 수행하여 보호기가 부착된 글루코스 4개를 부착시켜 오당류의 친수성기를 도입하는 단계; 및
- 6) 상기 단계 5)의 생성물에 탈보호기화(deprotection) 반응을 수행하여 O-벤조일기를 제거하는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법:

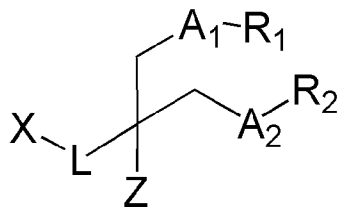
[화학식 1]



상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 -CH₂-A³-R³이고; 상기 A¹ 내지 A³는 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기이고; 상기 R¹ 내지 R³은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기이고; 상기 R¹ 내지 R³은 동일하고; 그리고 상기 X는 글루코즈 중심의 가지친 오당류이다.

[청구항 17] 수용액에서 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 막단백질에 처리하는 단계를 포함하는, 막단백질을 추출, 용해화, 안정화, 결정화 또는 분석하는 방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

상기 L은 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀의 알킬렌기, 또는 직접결합이고;

상기 A¹ 및 A²는 각각 메틸렌기, 또는 산소 원자이고;

상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기,

치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고;

상기 X는 산소로 연결된 글루코즈 중심의 가지친(branched)

오당류(pentasaccharide)이고; 그리고

상기 Z는 수소 원자 또는 -CH₂-A³-R³이고, 상기 A³는 메틸렌기, 또는 산소

원자이고, 상기 R³은 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기,

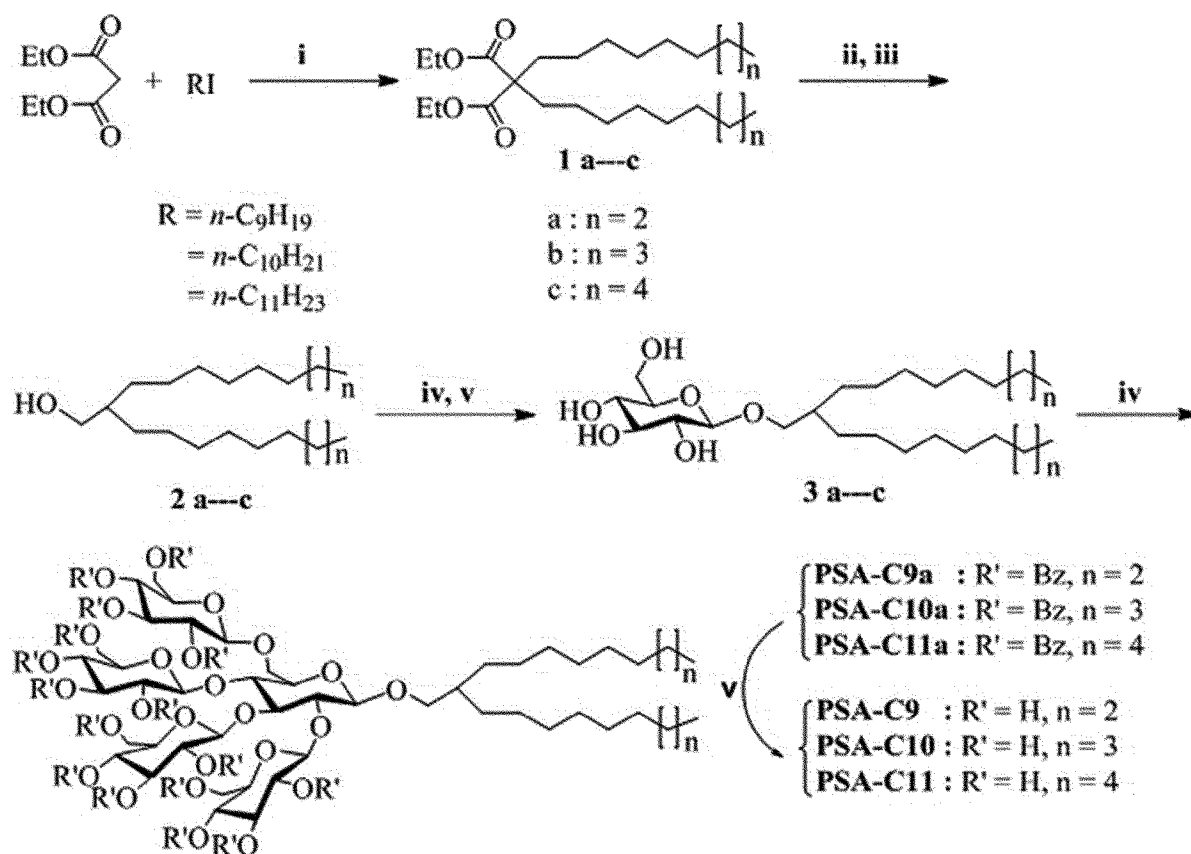
치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이다.

[청구항 18] 제 17항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 A¹ 및 A²는 메틸렌기이고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

[청구항 19] 제 17항에 있어서, 상기 L은 직접결합이고; 상기 A¹ 및 A²는 산소 원자이고; 상기 R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C₃-C₂₀의 아릴기이고; 그리고 상기 Z는 수소 원자인 화합물.

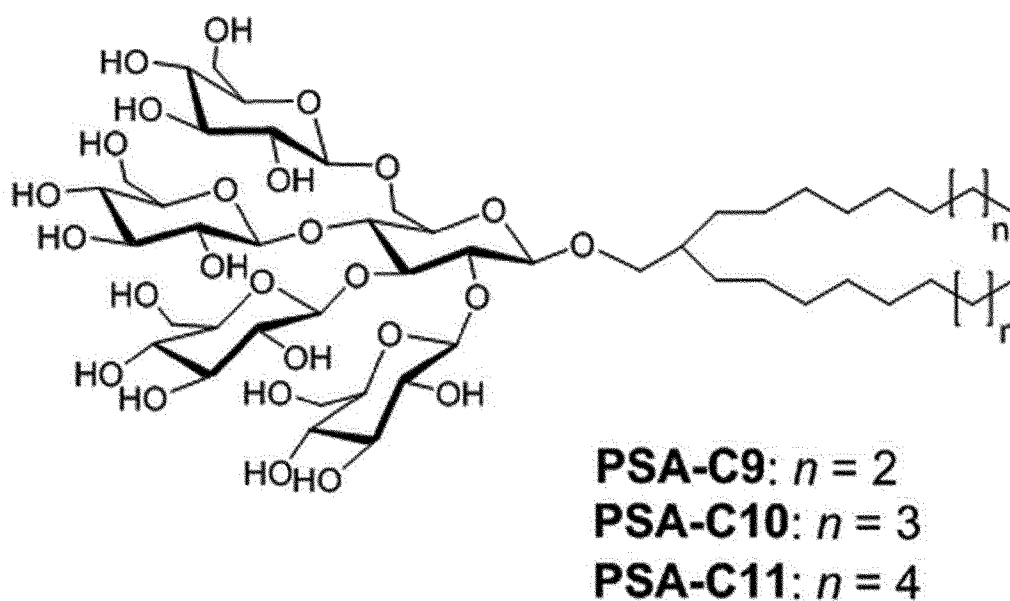
- [청구항 20] 제 17항에 있어서, 상기 L은 메틸렌기이고; 상기 Z는 $-\text{CH}_2-\text{A}^3-\text{R}^3$ 이고; 상기 A^1 내지 A^3 중 하나 이상은 산소 원자이고, 다른 것은 메틸렌기이고; 상기 R^1 내지 R^3 은 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 사이클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3-C_{20} 의 아릴기이고; 그리고 상기 R^1 내지 R^3 은 동일한 화합물.
- [청구항 21] 제 17항에 있어서, 상기 막단백질은 BOR1 (Boron transporter), LeuT (Leucine transporter), MelB (melibiose permease), $\beta_2\text{AR}$ (human β_2 adrenergic receptor), UapA (uric acid-xanthine/ H^+ symporter), 또는 이들의 2 이상의 조합인 방법.

[도1]

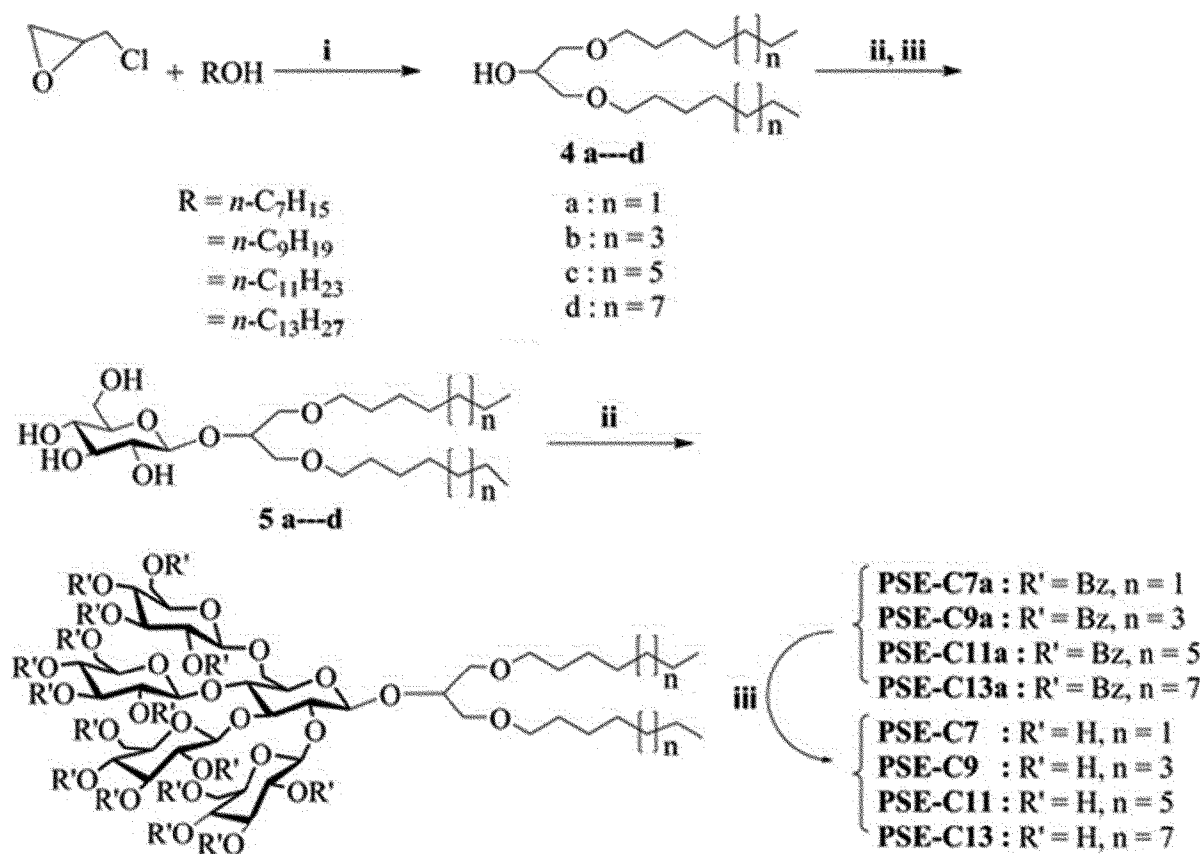


i) NaH, 1-iodoalkane (RI), THF, RT; **ii)** LiCl, DMSO, H₂O, 175 °C;
iii) LiAlH₄, THF, RT; **iv)** AgOTf, 2,4,6- collidine, DCM,
 perbenzoylated glucosylbromide, -45 °C to RT; **v)** NaOMe, MeOH, RT.

[도2]

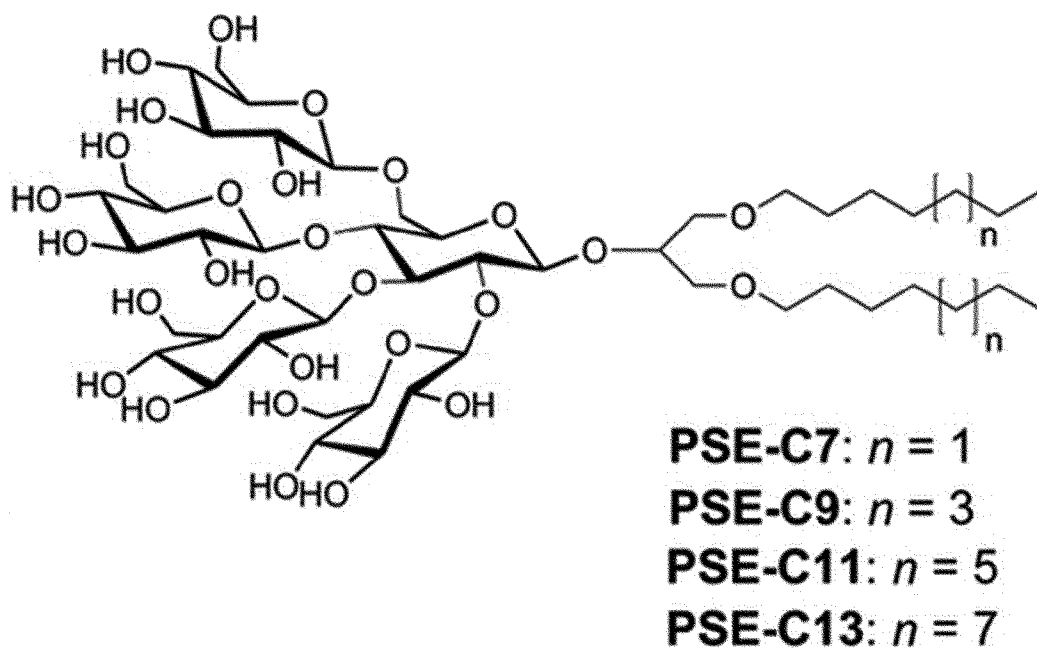


[도3]

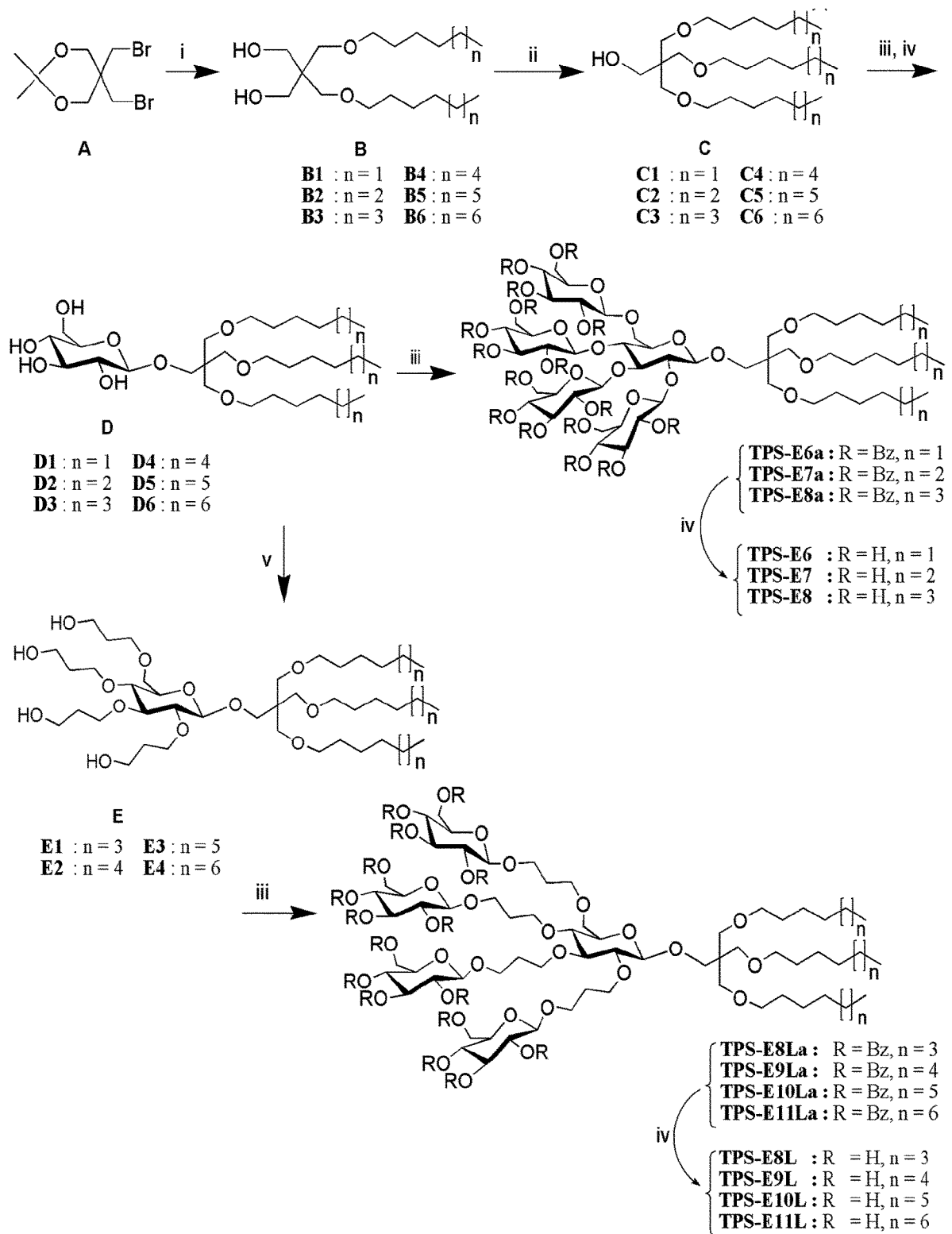


i) NaOH, ROH, 120 °C; ii) AgOTf, 2,4,6-collidine, DCM, perbenzoylated glucosylbromide, -45 °C to RT; iii) NaOMe, MeOH, RT.

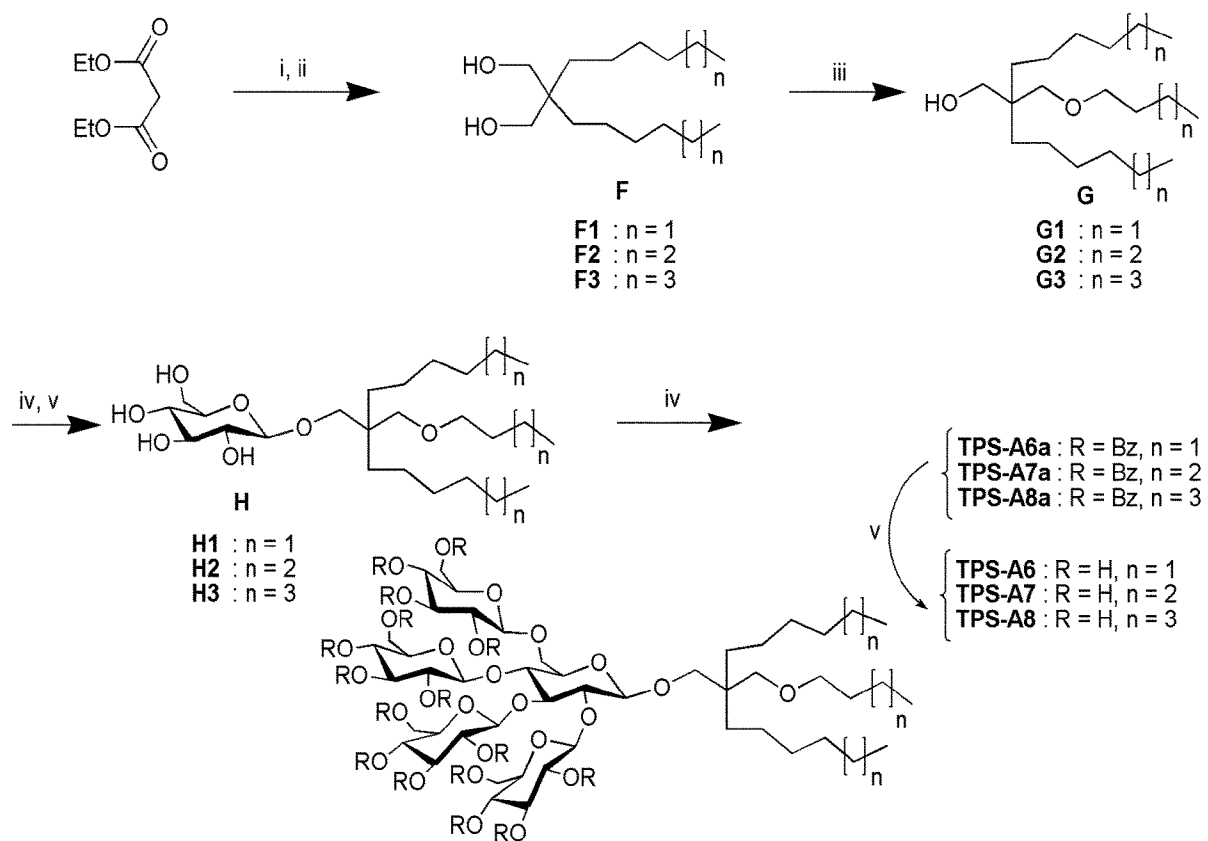
[도4]



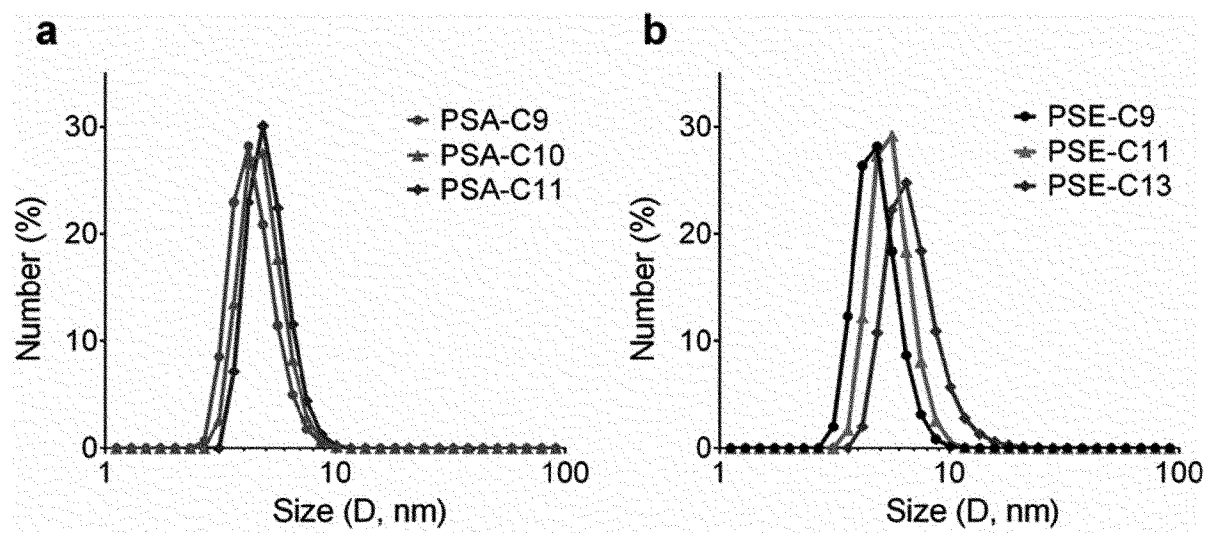
[도5]



[도6]

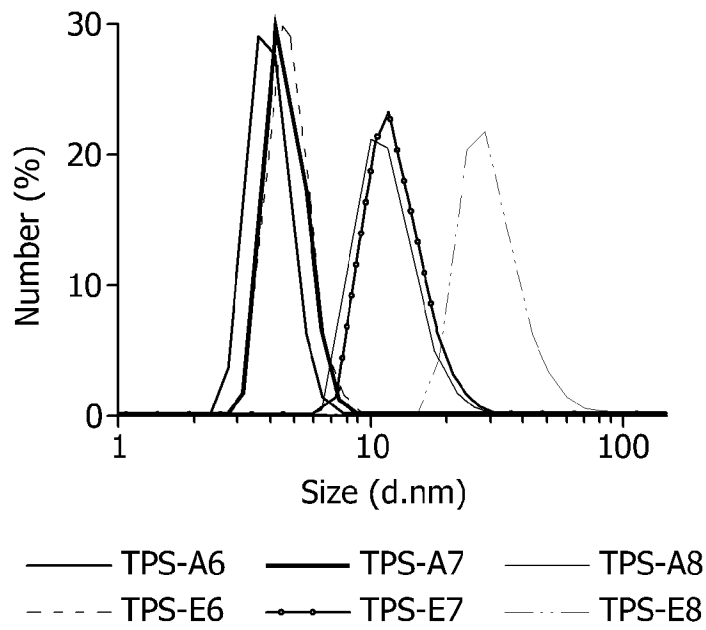


[도7]

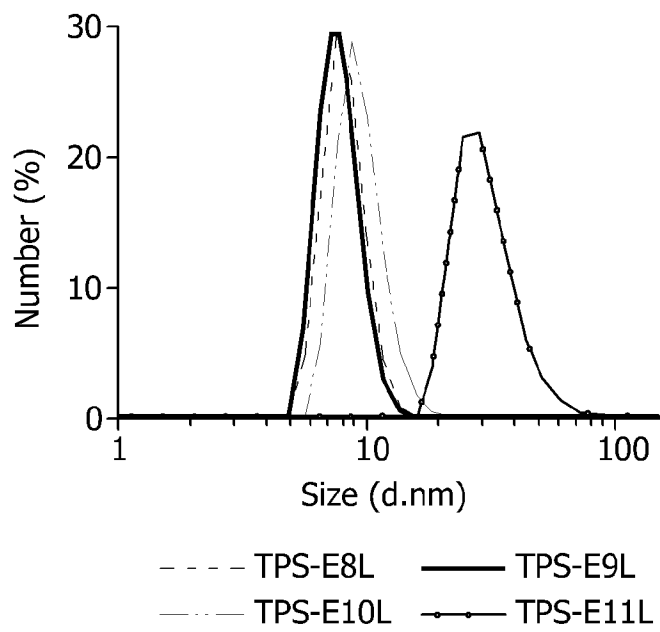


[도8]

a

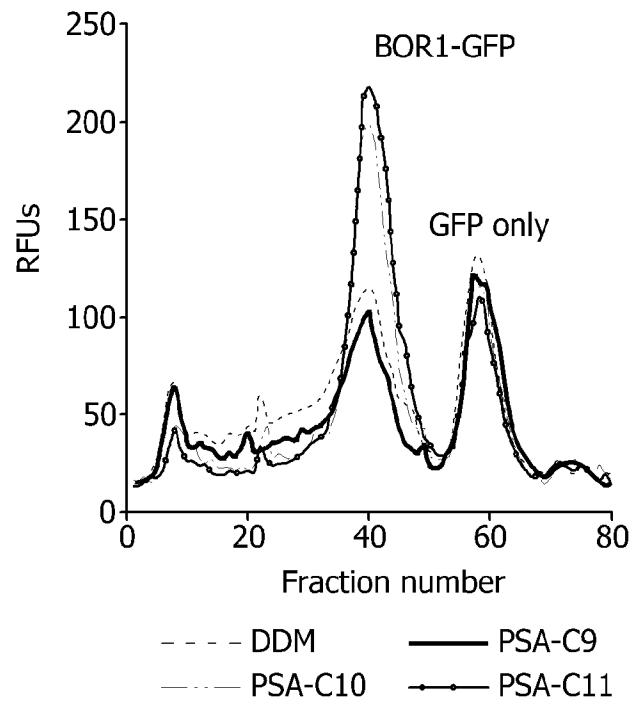


b

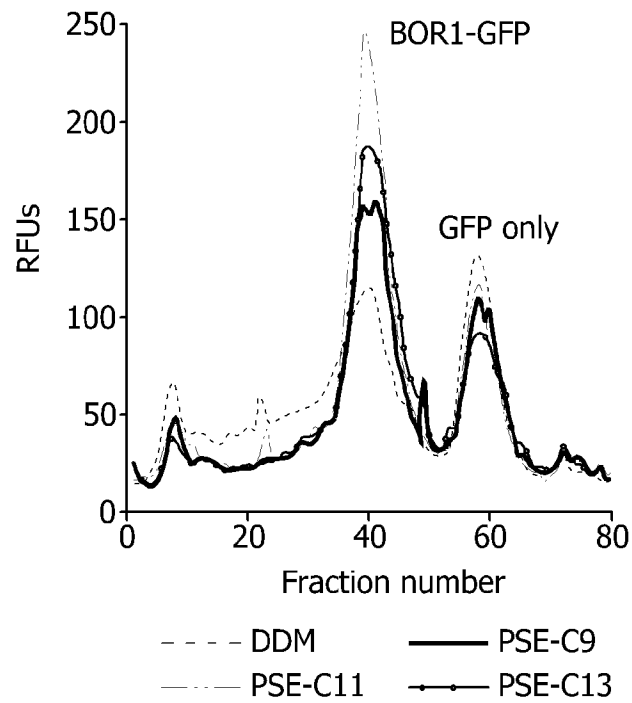


[도9]

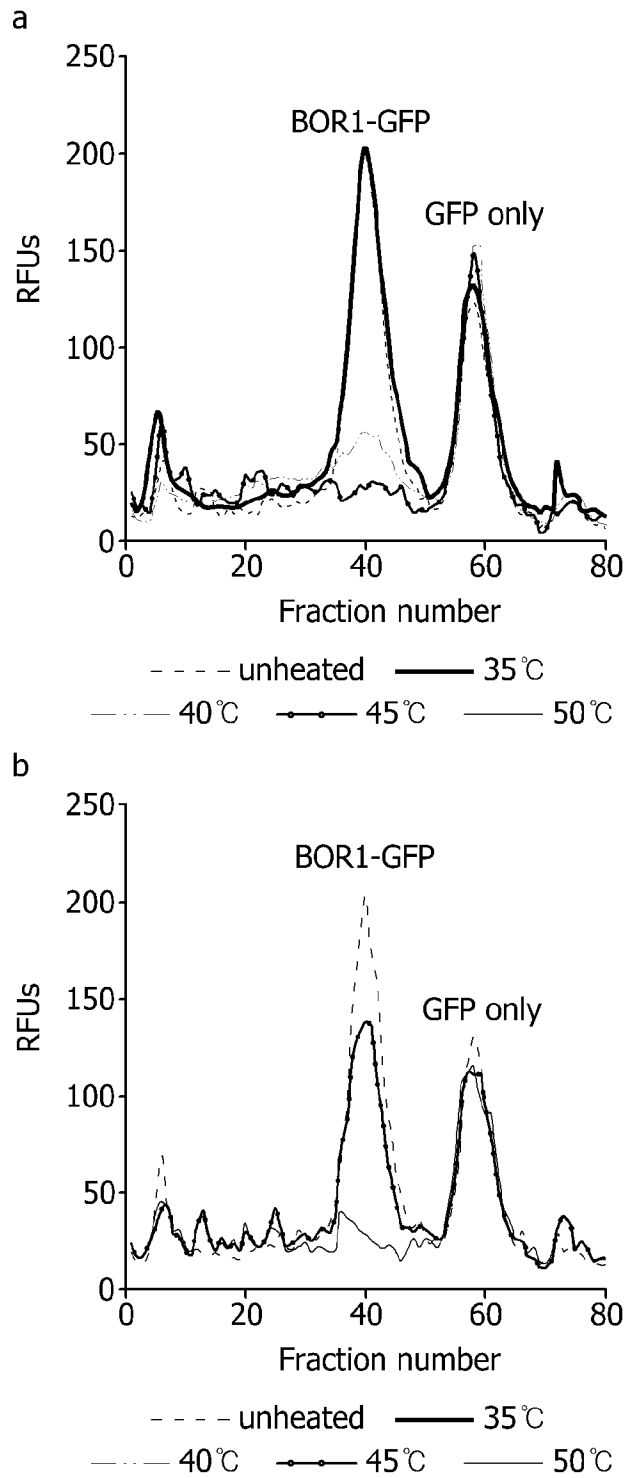
a



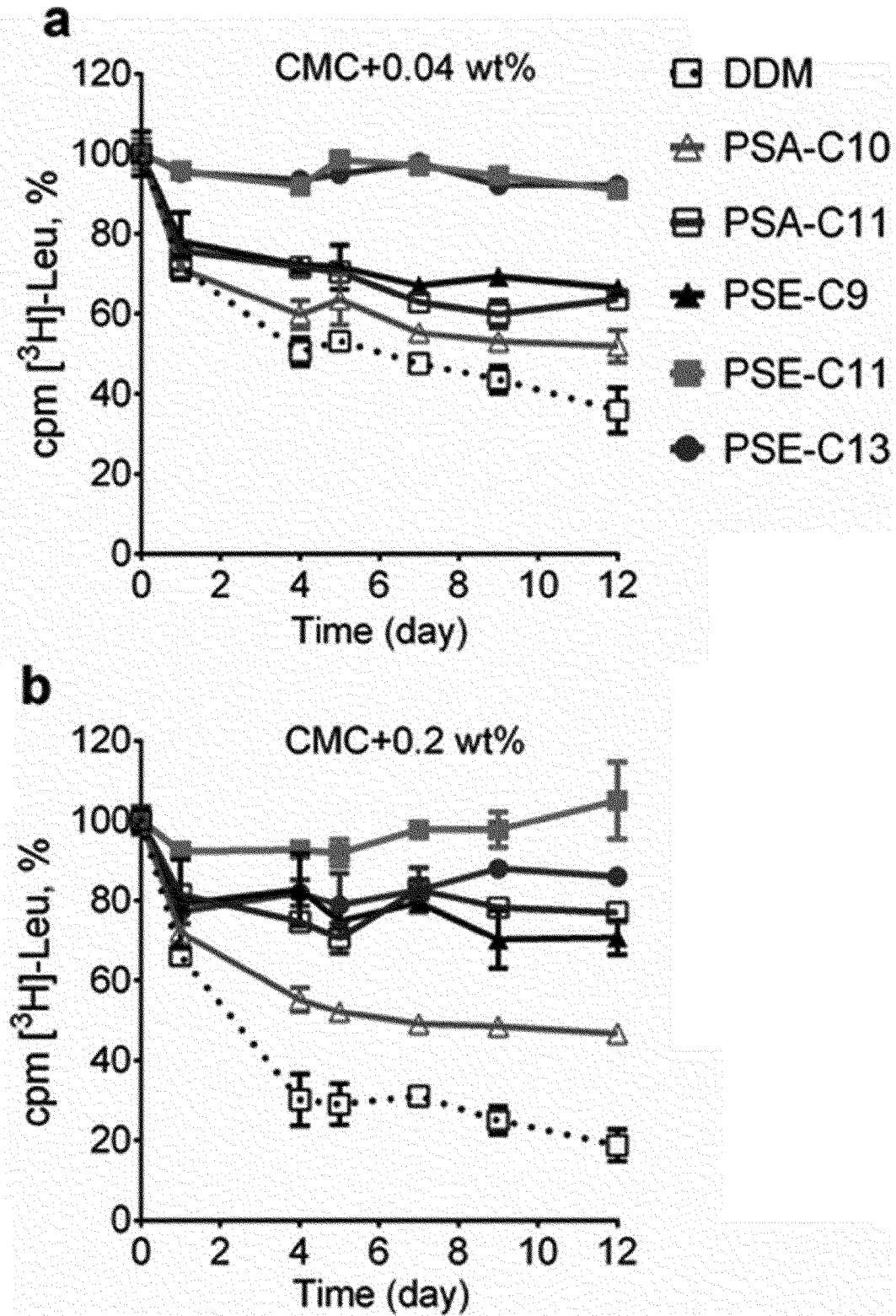
b



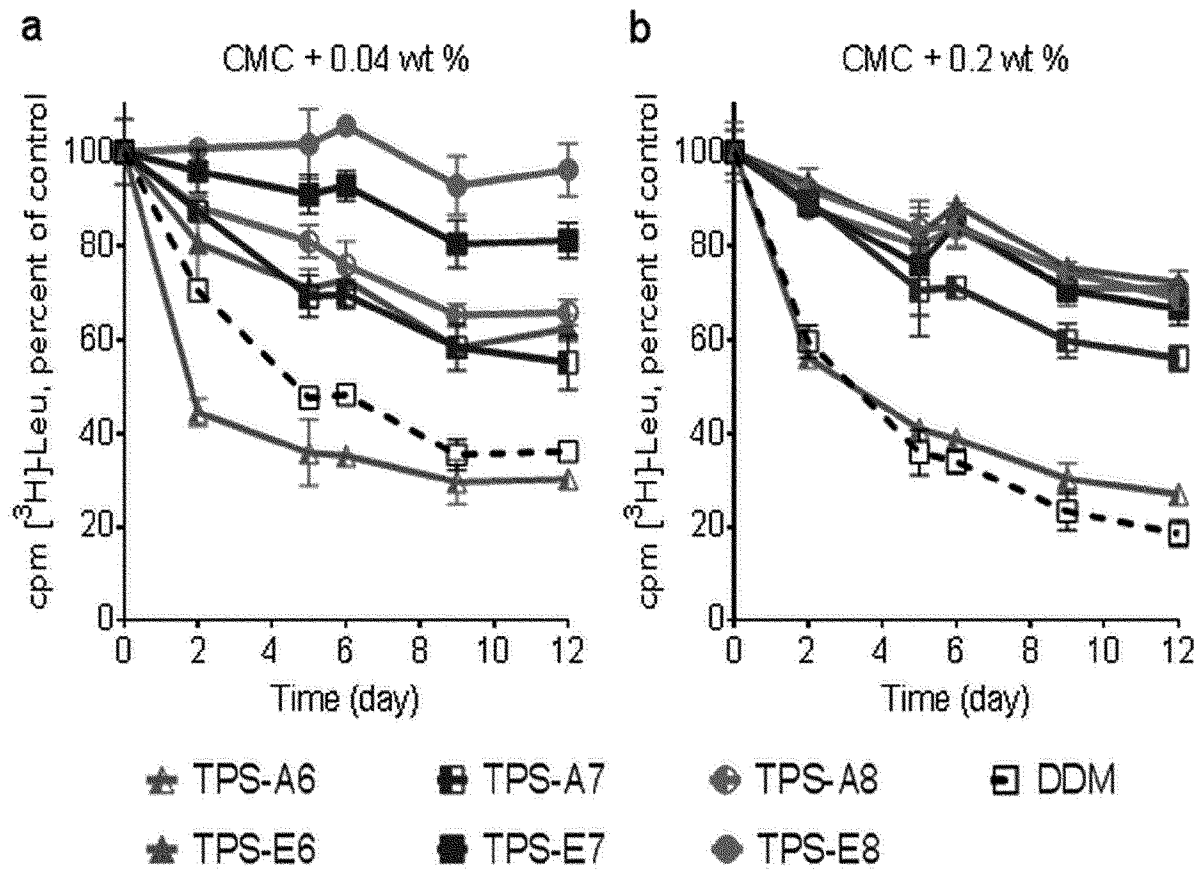
[도10]



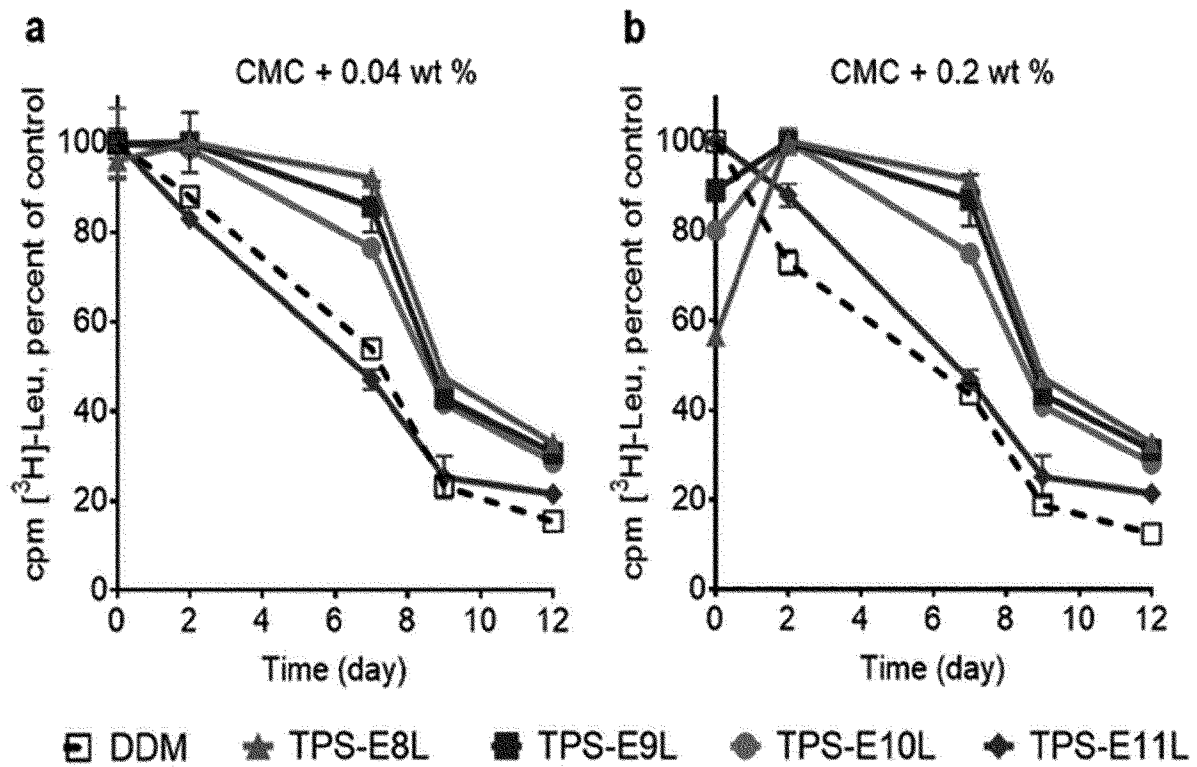
[도11]



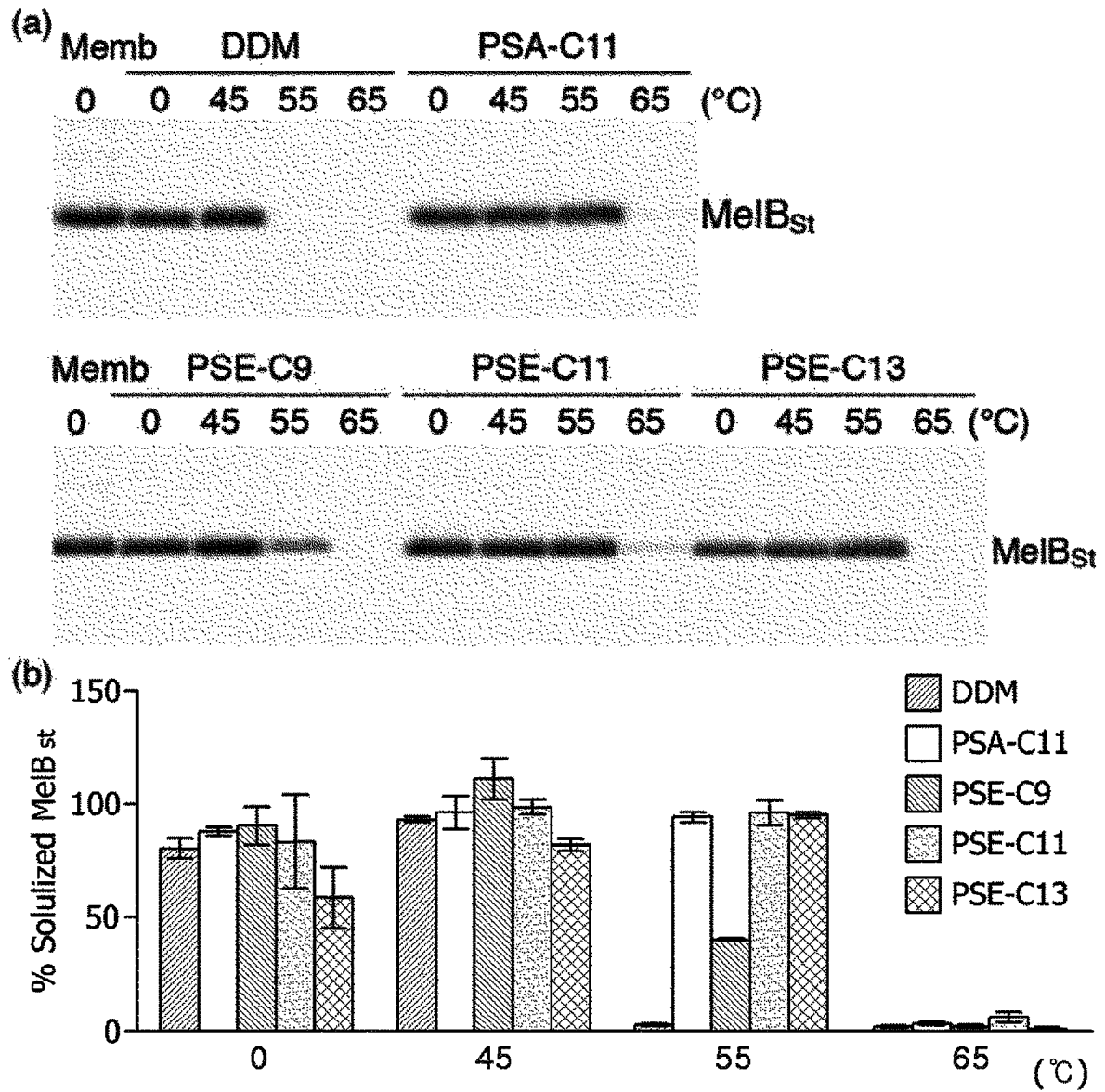
[도12]



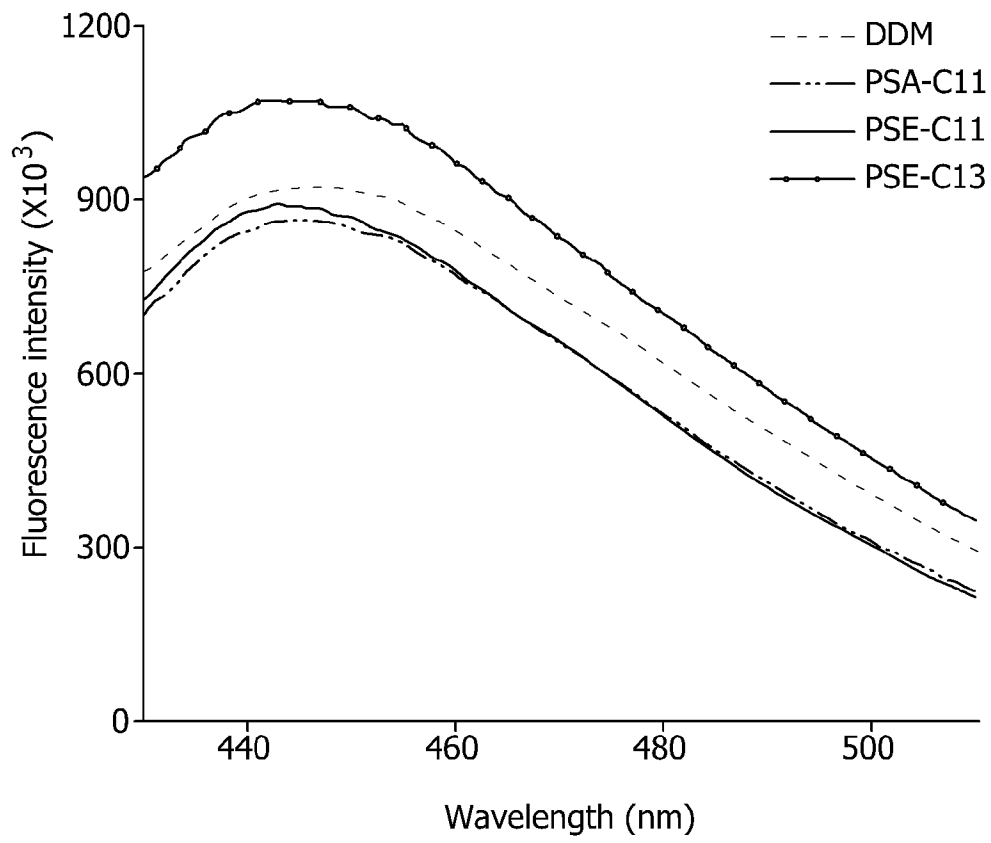
[도13]



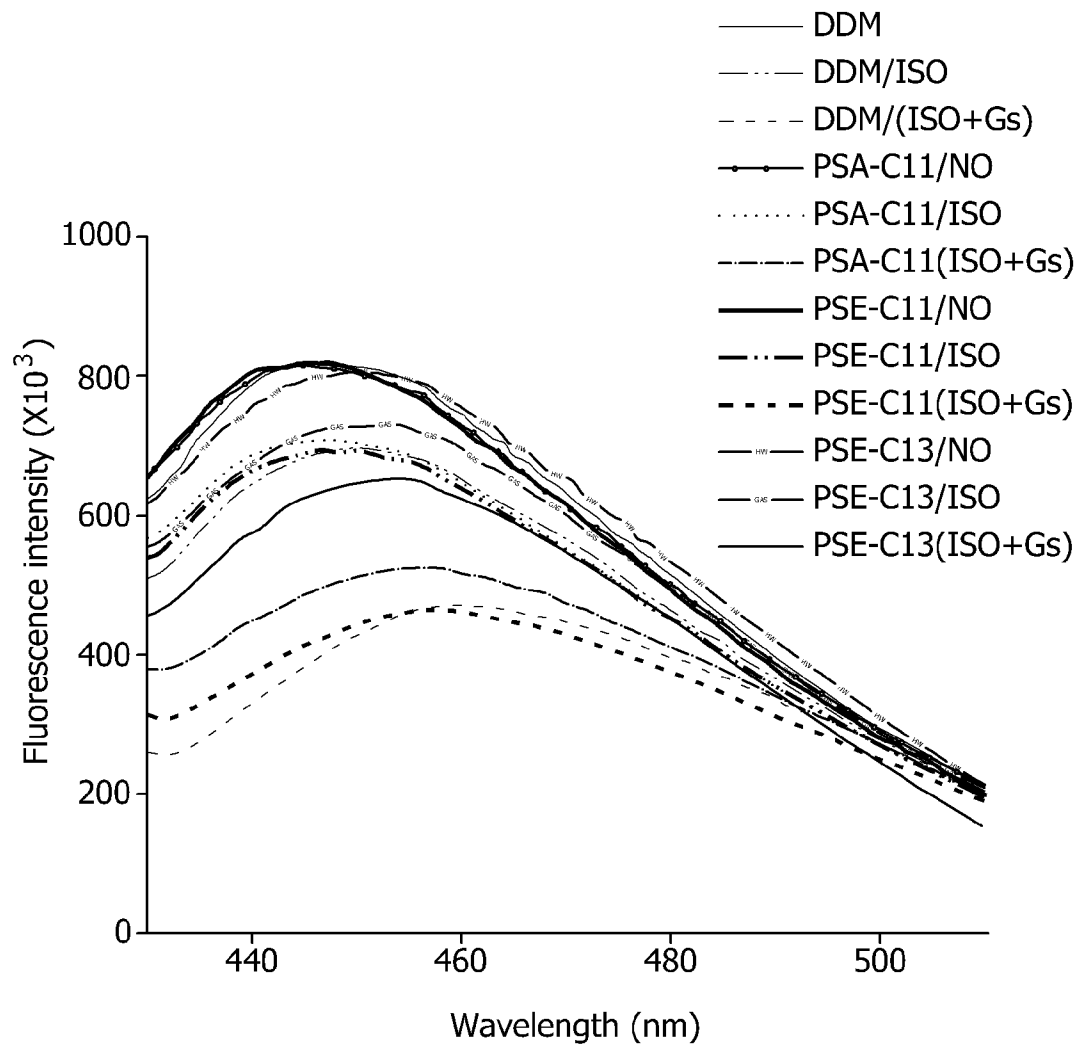
[도14]



[도15]

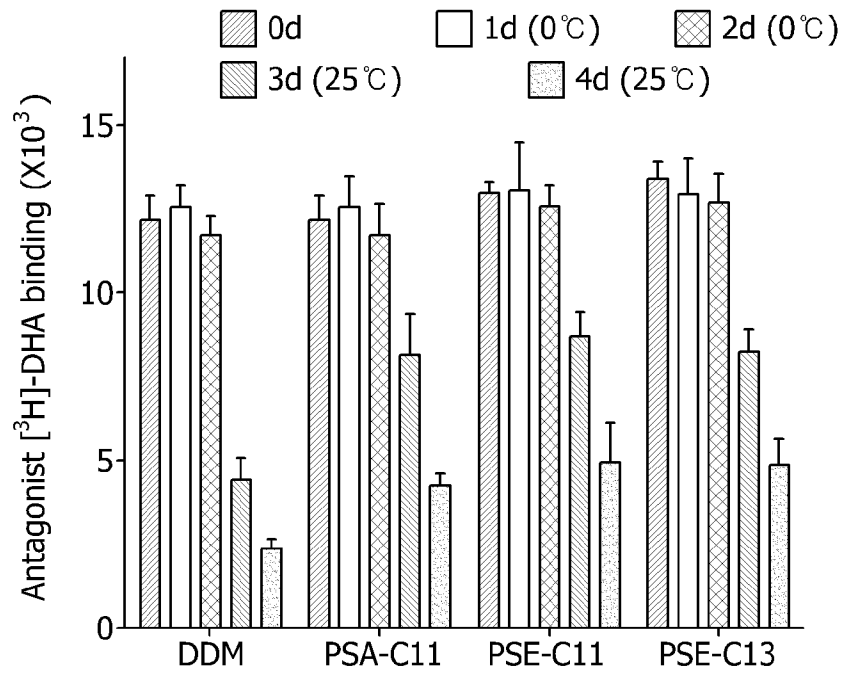


[도16]

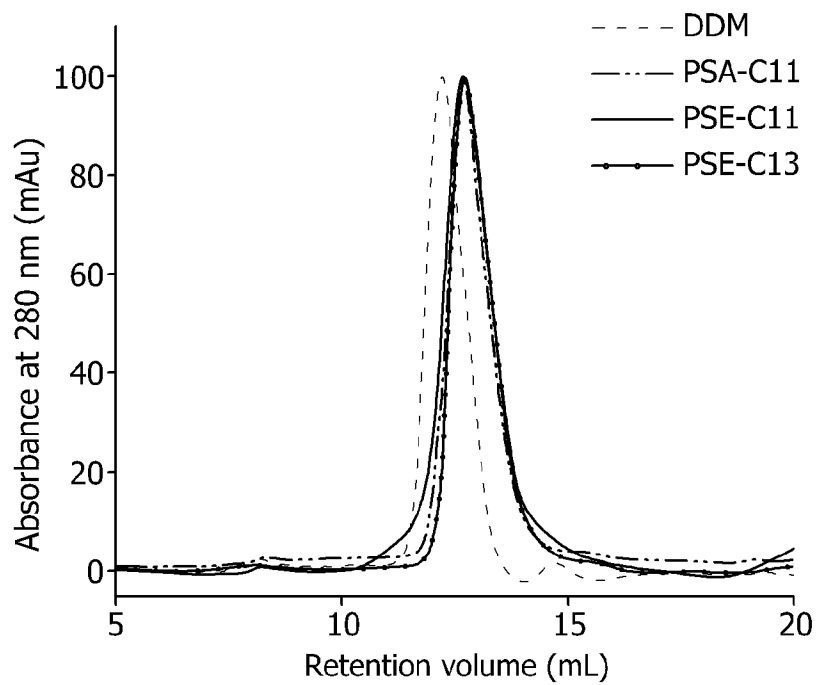


[도17]

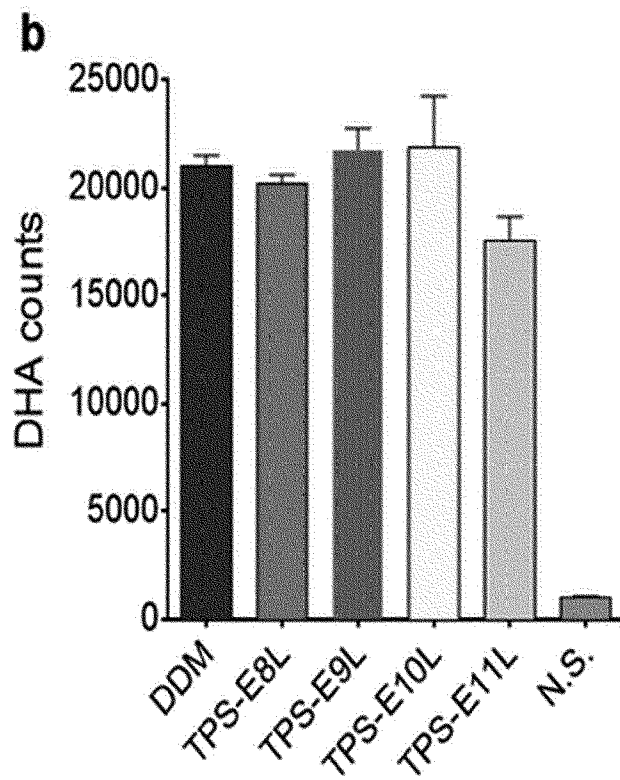
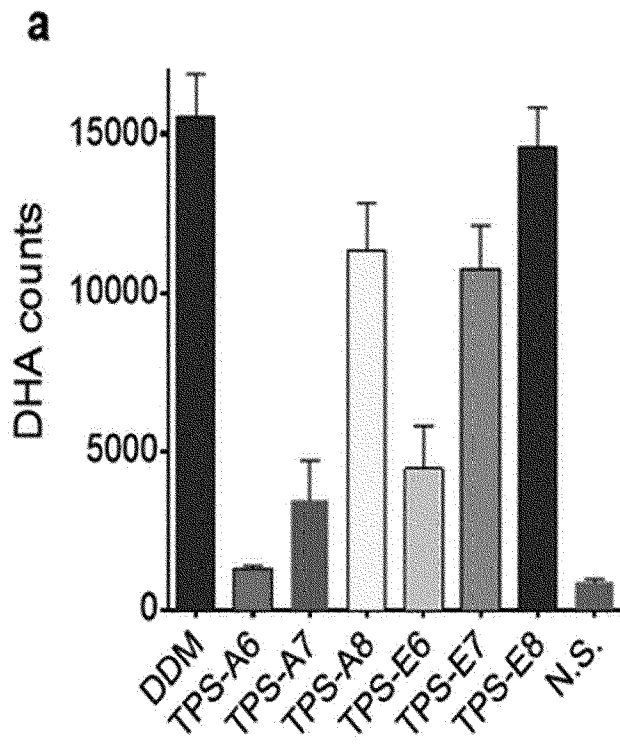
a



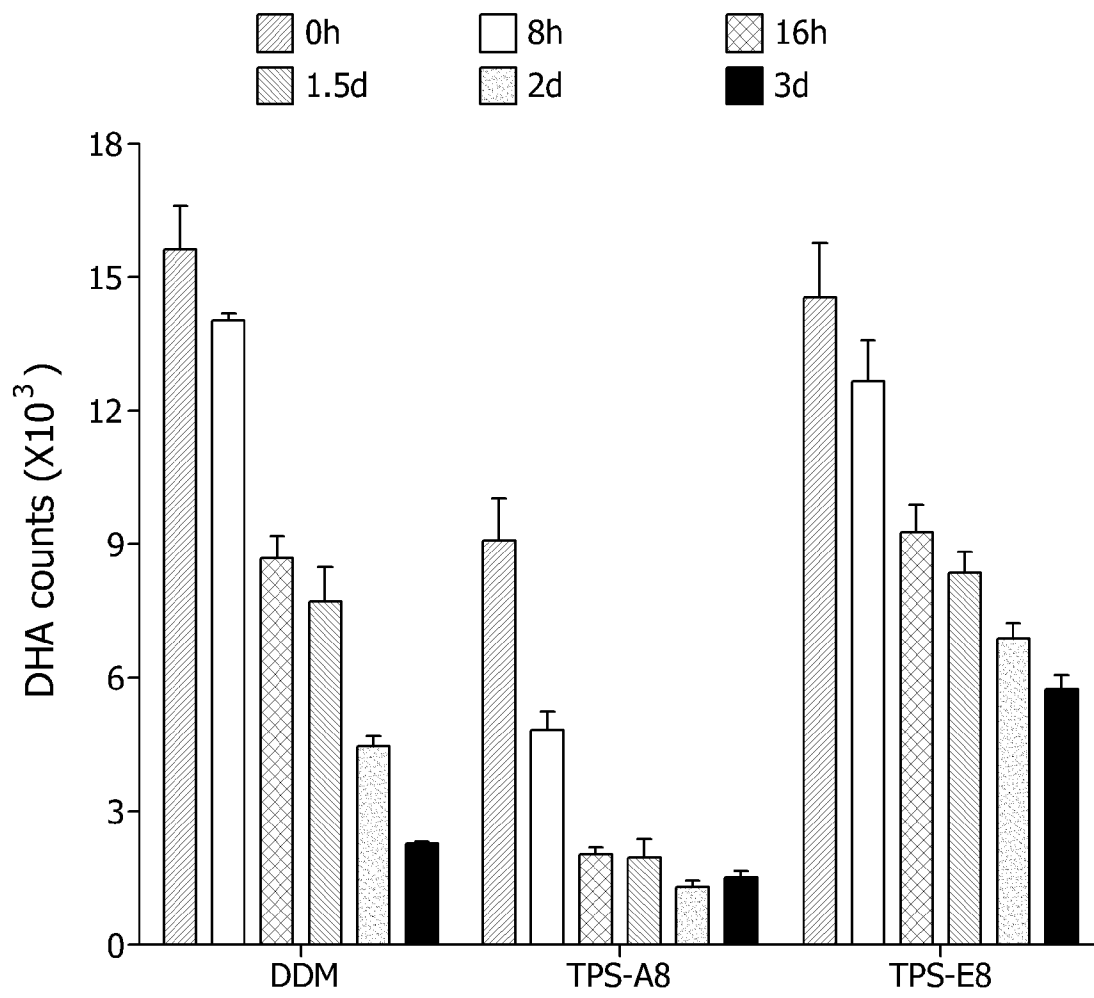
b



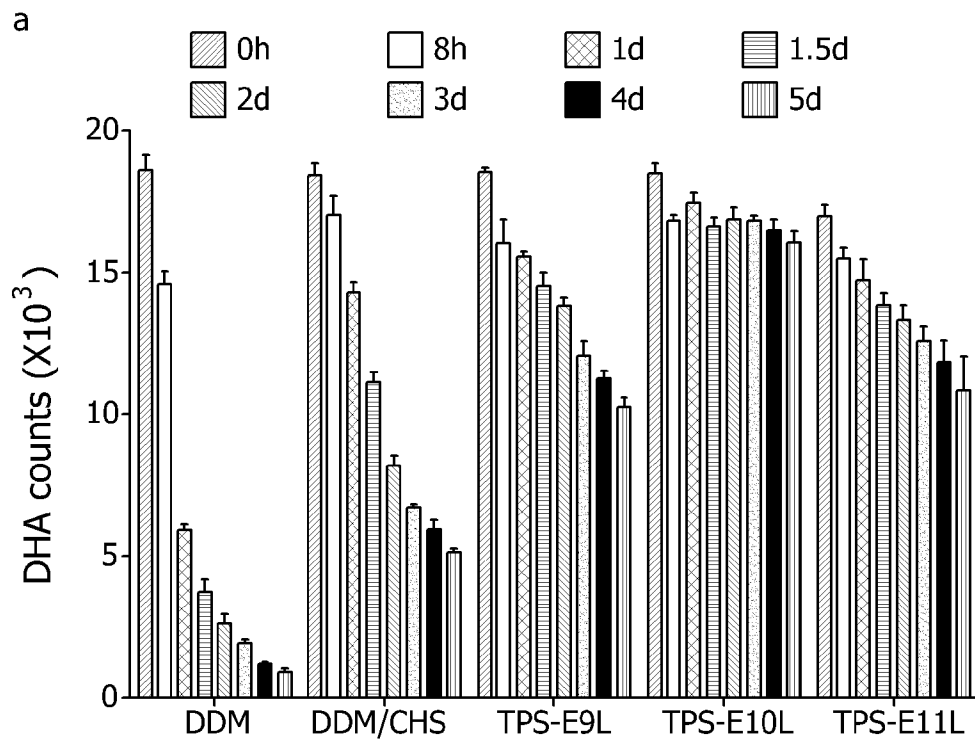
[도18]



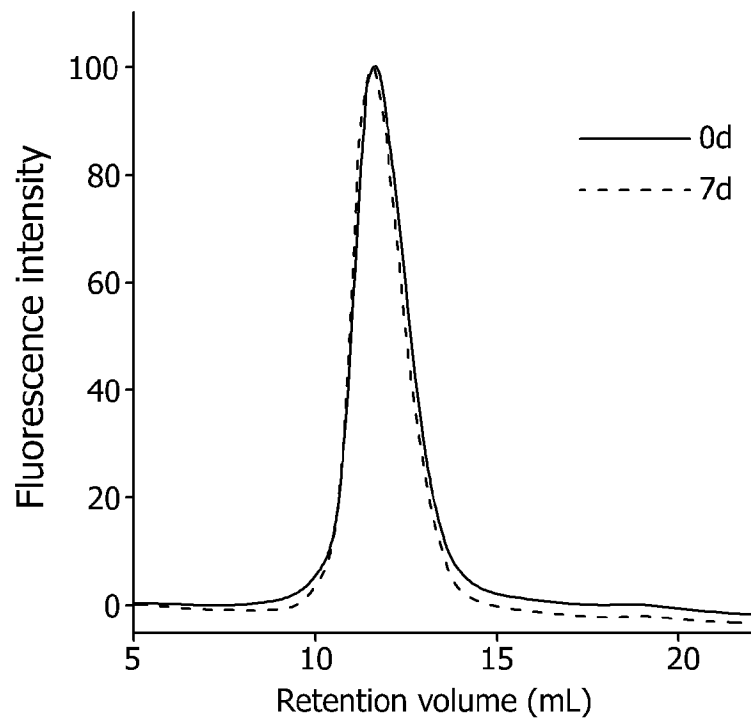
[도19]



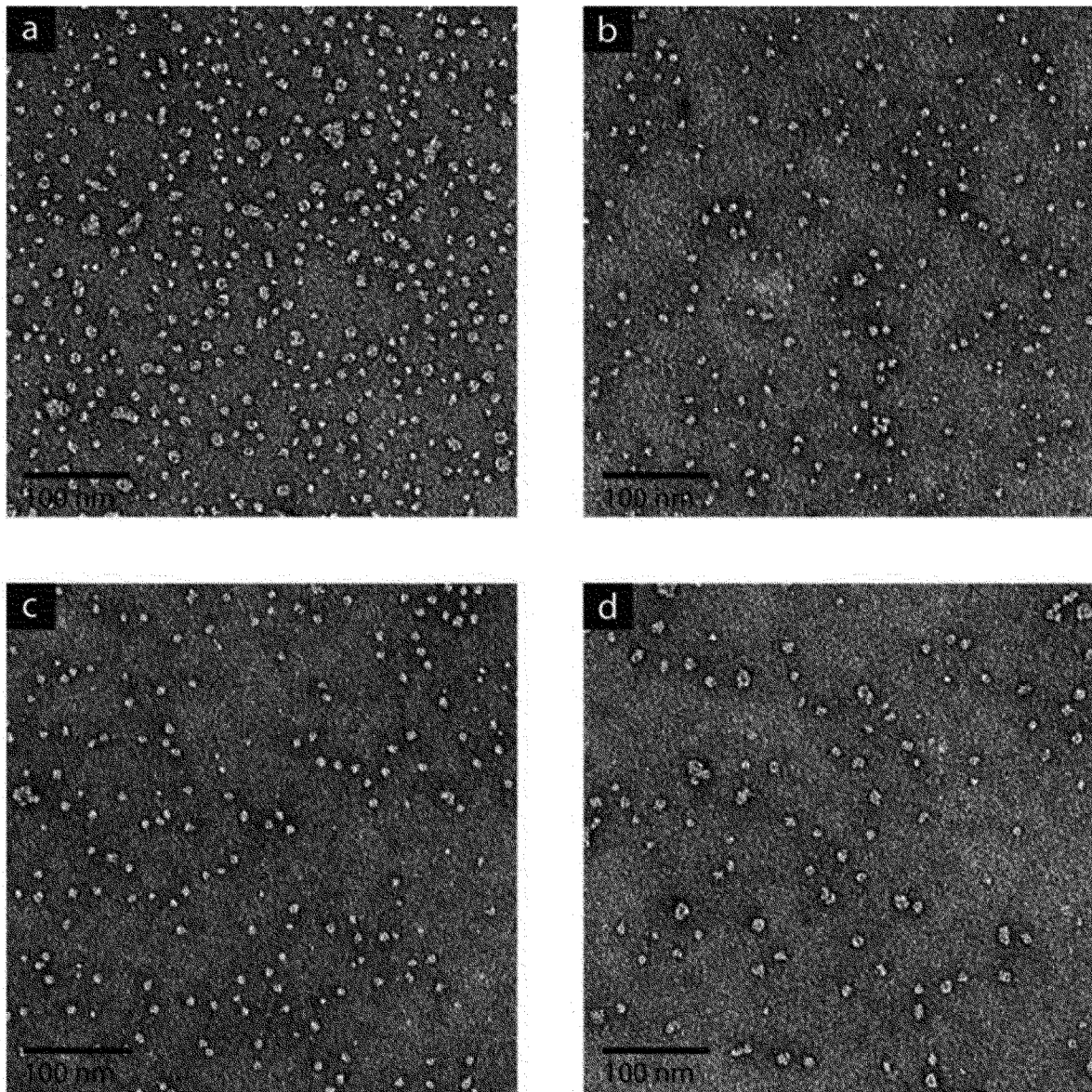
[도20]



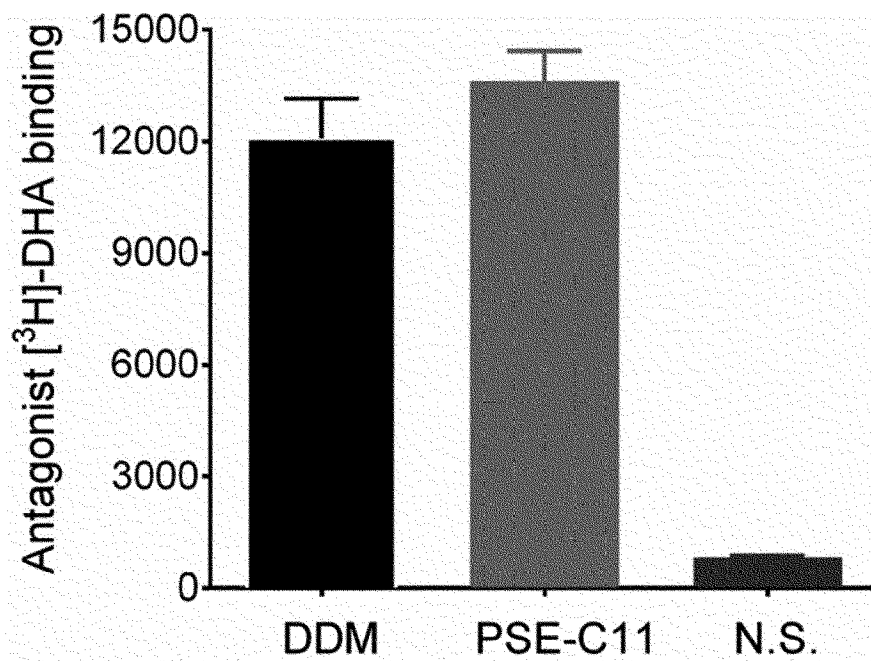
b



[도21]

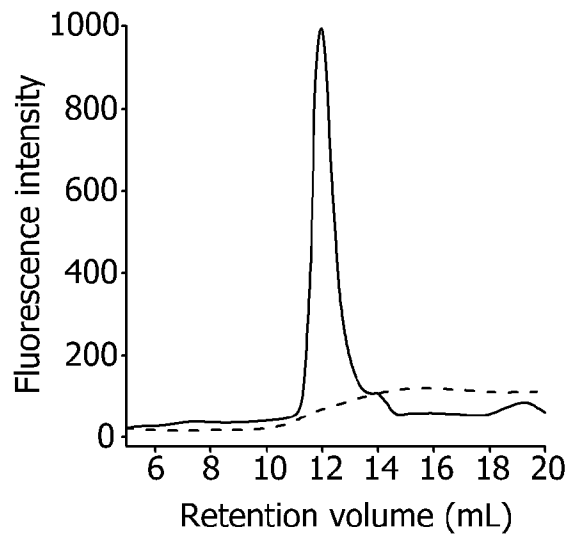


[도22]



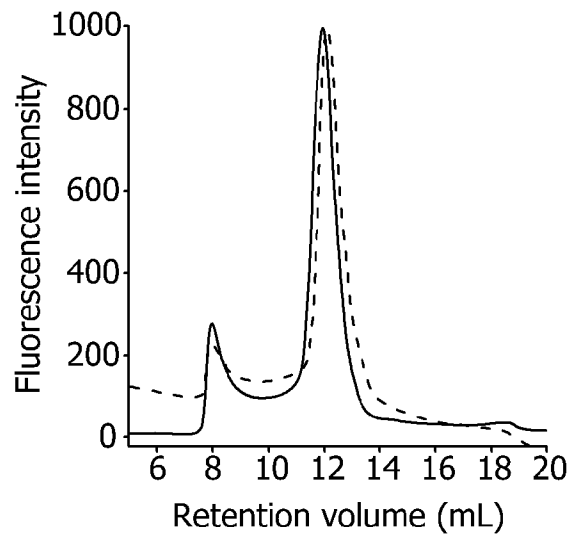
[도23]

a



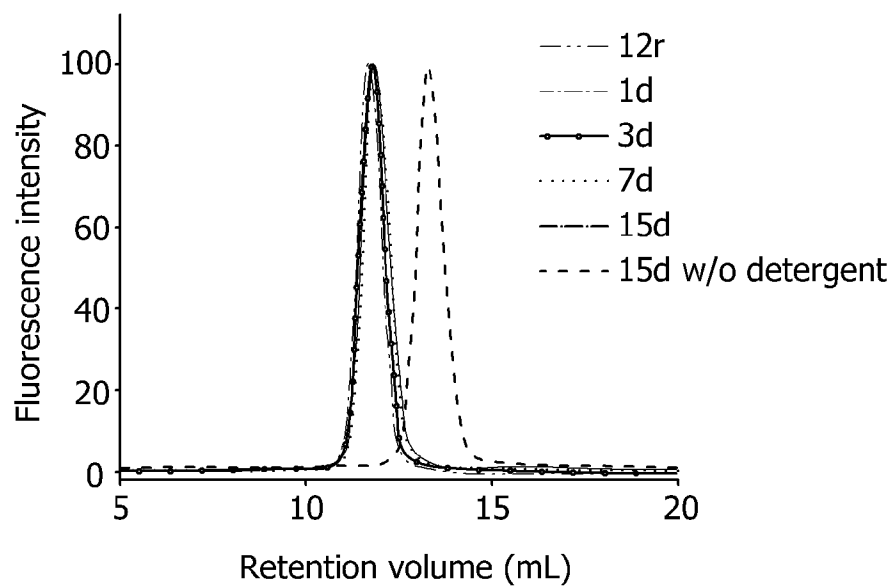
— DDM-purified β_2 AR
- - - Detergent-free

b

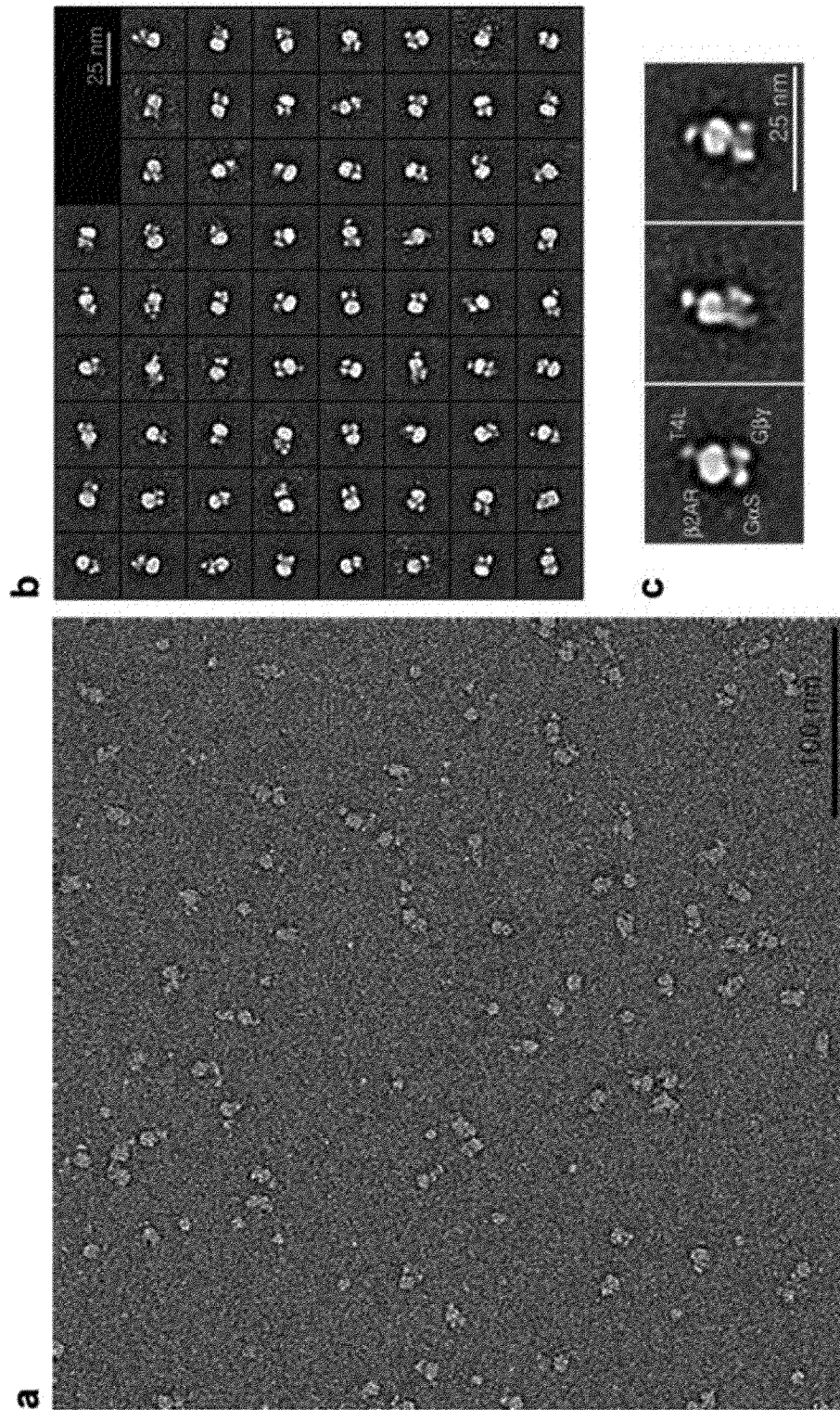


— PSE-C11 purified β_2 AR
- - - Detergent-free

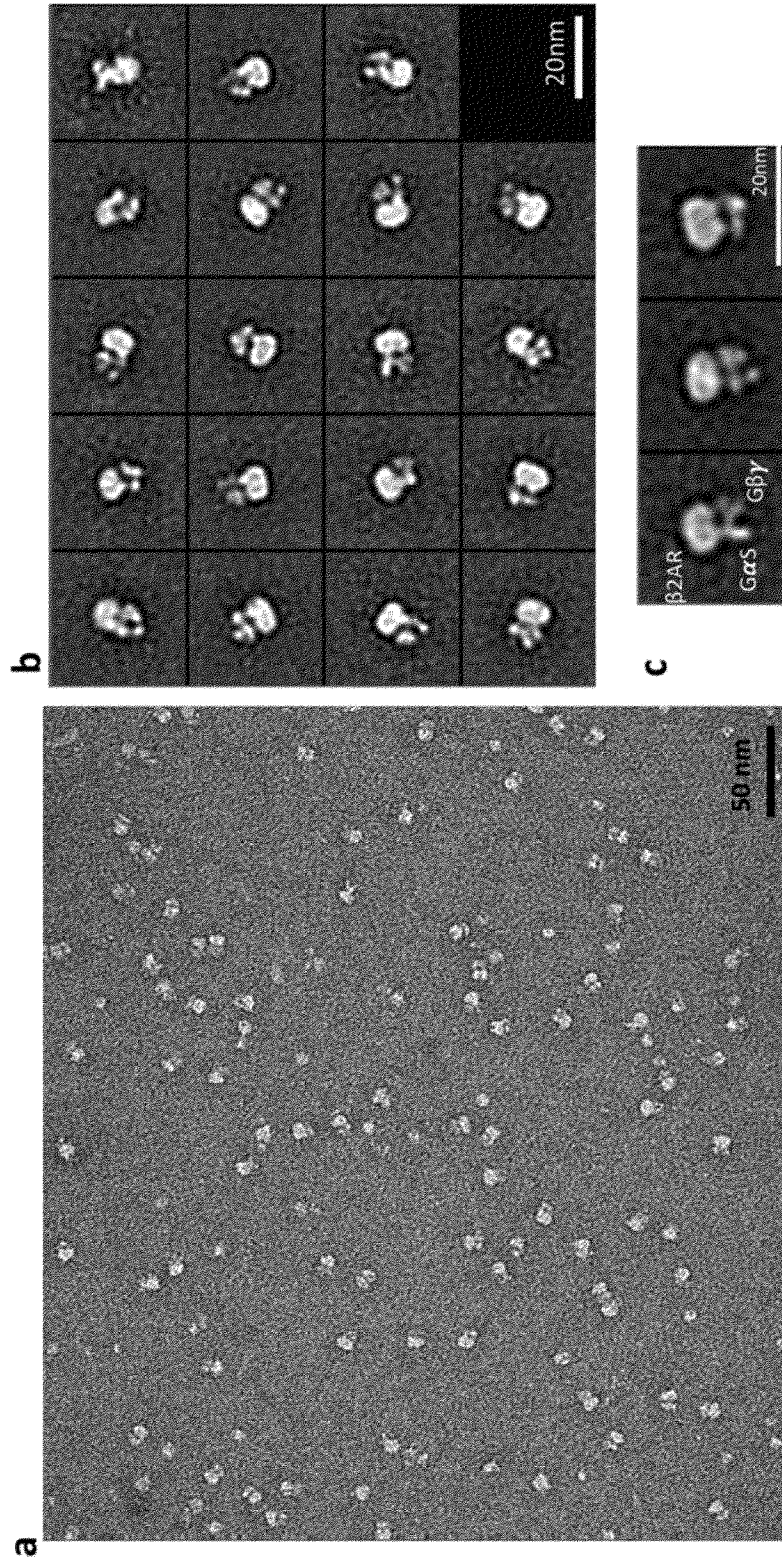
c



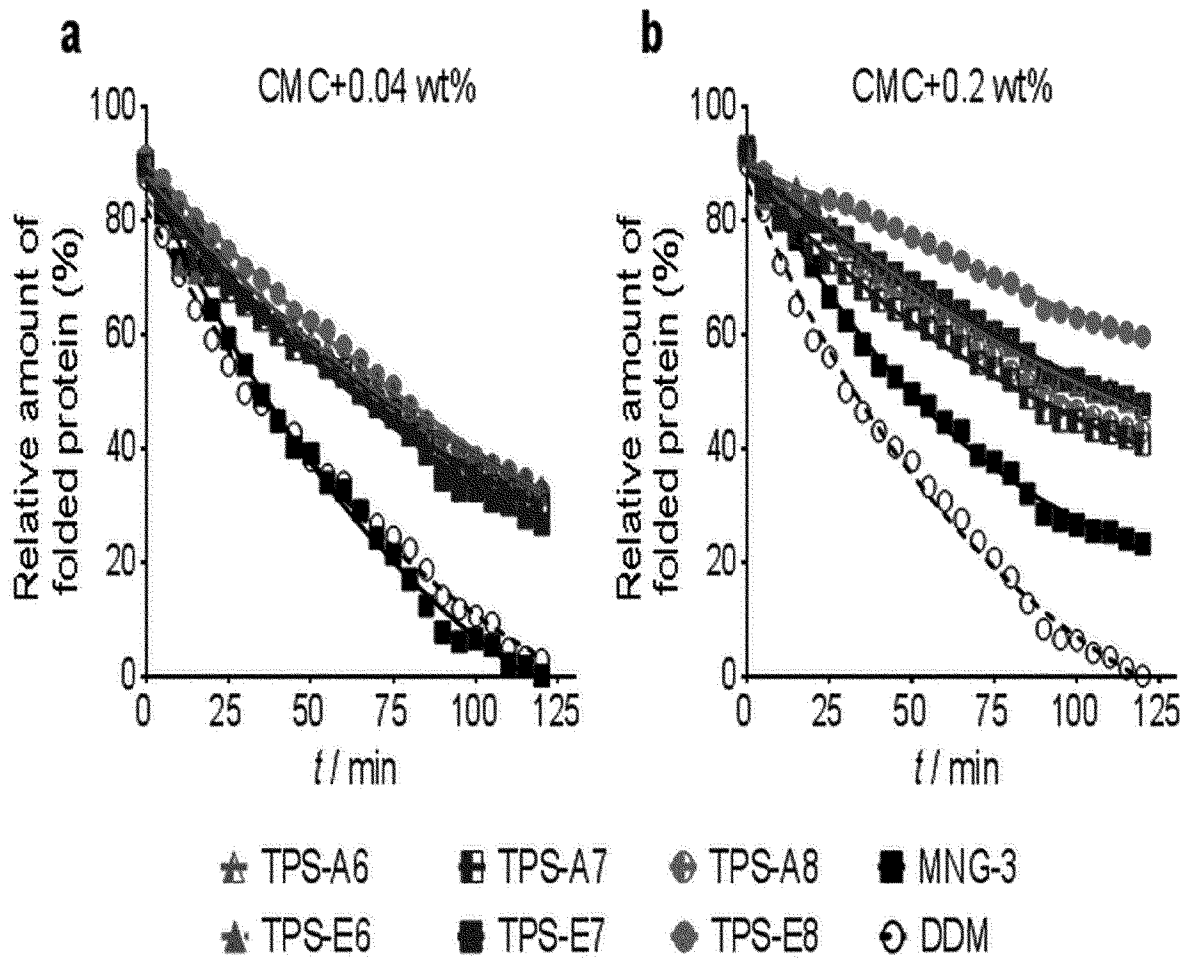
[도24]



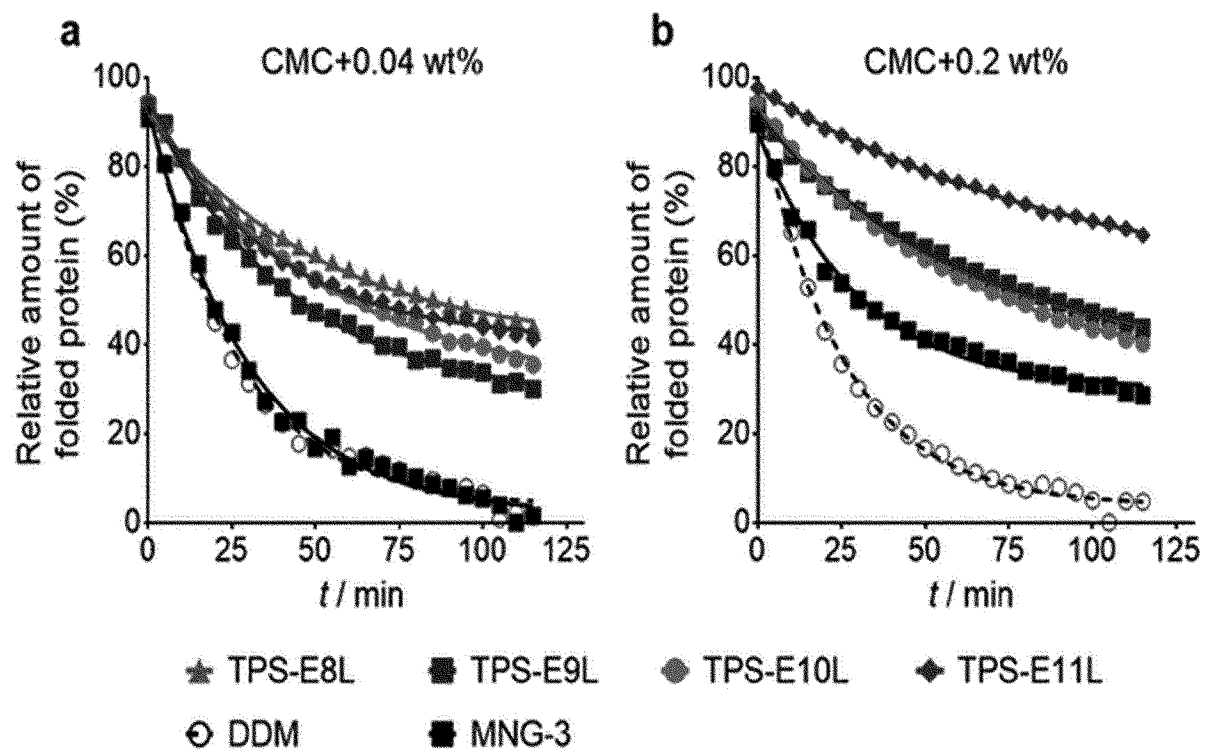
[도25]



[도26]



[도27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/04(2006.01)i, C07K 1/14(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H 15/04; A61K 39/39; A61K 47/26; C07K 1/14; G01N 33/68; G01N 33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN Express (Registry, Caplus), Google & Keywords: membrane protein, glucose, hydrophilicity, amphiphilic, dissolution, stability, crystal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MINAMIKAWA, H. et al., "Phase Behavior of Synthetic Phytanyl-Chained Glycolipid/Water Systems", <i>Langmuir</i> , 1997, vol. 13, no. 9, pages 2564-2571 See page 2565, left column, figure 1.	1-21
A	CHO, K. H. et al., "Hemifluorinated Maltose-Neopentyl Glycol (HF-MNG) Amphiphiles for Membrane Protein Stabilisation", <i>ChemBioChem</i> , 2013, vol. 14, pages 452-455 See page 453, diagram 1.	1-21
A	SONODA, Y. et al., "A Synthetic Glycosphingolipid-induced Antiproliferative Effect in Melanoma Cells is Associated with Suppression of FAK, Akt, and Erk Activation", <i>Biological & Pharmaceutical Bulletin</i> , 2008, vol. 31, no. 6, pages 1279-1283 See page 1280, figure 1.	1-21
A	MINAMIKAWA, H. et al., "Reverse Micellar Cubic Phase in a Phytanyl-Chained Glucolipid/Water System", <i>Langmuir</i> , 1998, vol. 14, no. 16, pages 4503-4509 See page 4504, left column, figure 1.	1-21
A	WO 2008-028667 A2 (HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR INFektionsFORSCHUNG GMBH.) 13 March 2008 See the entire document.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 JULY 2017 (18.07.2017)

Date of mailing of the international search report

19 JULY 2017 (19.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004066

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EHSAN, M. et al., "Highly Branched Pentasaccharide-Bearing Amphiphiles for Membrane Protein Studies", J. Am. Chem. Soc., 2016 [Electronic publishing: 11 March 2016], vol. 138, pages 3789-3796 See the entire document. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-21
X	EHSAN, M. et al., "Synthetic Amphiphiles Bearing a New Hydrophilic Group for Membrane Protein Study", Korean Chemical Society 115th Conference Poster Presentation, 2015, page 735 See the entire document. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004066

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-028667 A2	13/03/2008	AU 2007-294103 A1	13/03/2008
		AU 2007-294103 B2	13/02/2014
		CA 2661280 A1	13/03/2008
		EP 1897557 A1	12/03/2008
		EP 2059257 A2	20/05/2009
		EP 2059257 B1	16/03/2016
		US 2010-0015215 A1	21/01/2010
		US 8211463 B2	03/07/2012
		WO 2008-028667 A3	03/07/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07H 15/04(2006.01)i, C07K 1/14(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07H 15/04; A61K 39/39; A61K 47/26; C07K 1/14; G01N 33/68; G01N 33/92

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN Express(Registry, Caplus), Google & 키워드: 막단백질, 글루코즈, 친수성, 양친매성, 용해, 안정, 결정

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MINAMIKAWA, H. 등, "Phase Behavior of Synthetic Phytanyl-Chained Glycolipid/Water Systems", Langmuir, 1997, 제13권, 제9호, 페이지 2564-2571 페이지 2565, 왼쪽 컬럼, 도면 1 참조.	1-21
A	CHO, K. H. 등, "Hemifluorinated Maltose-Neopentyl Glycol (HF-MNG) Amphiphiles for Membrane Protein Stabilisation", ChemBioChem, 2013 제14권, 페이지 452-455 페이지 453, 도식 1 참조.	1-21
A	SONODA, Y. 등, "A synthetic glycosphingolipid-induced antiproliferative effect in melanoma cells is associated with suppression of FAK, Akt, and Erk activation", Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 제31권, 제6호, 페이지 1279-1283 페이지 1280, 도면 1 참조.	1-21
A	MINAMIKAWA, H. 등, "Reverse Micellar Cubic Phase in a Phytanyl-Chained Glucolipid/Water System", Langmuir, 1998, 제14권, 제16호, 페이지 4503-4509 페이지 4504, 왼쪽 컬럼, 도면 1 참조.	1-21
A	WO 2008-028667 A2 (HELMHOLTZ-ZENTRUM FUR INFektionsFORSCHUNG GMBH) 2008.03.13 전체 문헌 참조.	1-21

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 18일 (18.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 19일 (19.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	EHSAN, M. 등, “Highly Branched Pentasaccharide-Bearing Amphiphiles for Membrane Protein Studies”, J. Am. Chem. Soc., 2016 [전자공개: 2016.03.11], 제138권, 페이지 3789-3796 전체 문헌 참조. ※ 상기 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-21
X	EHSAN, M. 등, “Synthetic Amphiphiles Bearing a New Hydrophilic Group for Membrane Protein Study”, 대한화학회 제115회 학술발표회 포스터 발표, 2015, 페이지 735 전체 문헌 참조. ※ 상기 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-21

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2008-028667 A2

2008/03/13

AU 2007-294103 A1

2008/03/13

AU 2007-294103 B2

2014/02/13

CA 2661280 A1

2008/03/13

EP 1897557 A1

2008/03/12

EP 2059257 A2

2009/05/20

EP 2059257 B1

2016/03/16

US 2010-0015215 A1

2010/01/21

US 8211463 B2

2012/07/03

WO 2008-028667 A3

2008/07/03