

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 2일 (02.01.2020)

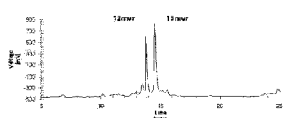


(10) 국제공개번호
WO 2020/004980 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/00* (2006.01) *C07K 1/06* (2006.01) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007823 공개:
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 27일 (27.06.2019) — 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0074111 2018년 6월 27일 (27.06.2018) KR
10-2019-0076555 2019년 6월 26일 (26.06.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 시선바이오머티리얼스 (SEASUN-BIO MATERIALS) [KR/KR]; 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-3, N517호, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 박희경 (PARK, Heekyung); 34034 대전시 유성구 용산2로 30, 103동 602호, Daejeon (KR). 홍인석 (HONG, In Seok); 30100 세종시 달빛로 109 406동 701호, Sejong-si (KR). 조균호 (JOE, Goon Ho); 34023 대전시 유성구 배울2로 42, 515동 705호, Daejeon (KR). 김용태 (KIM, Yongtae); 30063 세종시 마춤로 151 904동801호, Sejong-si (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (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, JO, 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

(54) Title: METHOD FOR PREPARING PNA OLIGOMER

(54) 발명의 명칭: PNA 올리고머의 제조방법



(57) Abstract: The present invention provides a method for preparing a PNA oligomer. More specifically, the present invention can prepare a PNA oligomer which is easily separable from byproducts through a simple and short process by using PNA dimers, PNA trimers or PNA tetramers, and which has extremely high yields and purity.

(57) 요약서: 본 발명은 PNA 올리고머의 제조방법을 제공하는 것으로, 보다 구체적으로, PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 단순하고 짧은 공정으로 부산물과 분리가 용이하며, 수율 및 순도가 극히 높은 PNA 올리고머를 제조할 수 있다.



WO 2020/004980 A1

명세서

발명의 명칭: PNA 올리고머의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 PNA 올리고머의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 핵산은 알려진 바와 같이 생물의 유전 정보를 담당하는 DNA 및 RNA이다.
- [3] 반면 펩티드 핵산(PNA)은 핵산의 당인산 골격을 N-(2-아미노에틸)글리신 골격으로 변환시킨 핵산이다.
- [4] DNA/RNA의 당인산 골격은 중성 조건에서 음전하를 띠고 있어 상보쇄(complementary chains)간의 정전기적인 반발이 있지만, PNA의 골격 구조(backbone structure)는 원래 전하를 가지지 않기 때문에, 정전기적인 반발이 없다.
- [5] 즉, PNA 주사슬이 실질적으로 전하를 전혀 가지지 않는데 이는 PNA의 매우 중요한 특징이며, 이러한 특징으로 인해, 천연 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 유도체가 사용되기 어려운 많은 용도에 이용될 수 있다.
- [6] 나아가 PNA는 천연 올리고뉴클레오타이드보다 높은 친화성으로 DNA 또는 RNA와 결합하며 천연 DNA에 비해 혈청 중에서 매우 안정적이라는 장점을 가진다.
- [7] 그러나 PNA의 활용에 대한 관심과 연구는 다양해지고 높아지고 있으나, PNA 올리고머의 합성방법에 대한 연구는 부진한 상태이다.
- [8] 통상적으로 PNA 올리고머의 합성 방법에는 고상(solid-phase) 펩티드 합성법을 이용하므로, PNA 단량체 유닛(unit)을 PNA의 골격 구조에 의해서 분류하면, Fmoc형 PNA 단량체 유닛과 Boc형 PNA 단량체 유닛의 2 종류가 분류될 수 있다.
- [9] Fmoc형 PNA 단량체 유닛의 합성 방법은 이미 확립되어 있으나, 대량생산이 용이하지 않을 뿐만 아니라, 낮은 수율 및 순도가 문제가 되고 있다.
- [10] 일례로 WO2005-009998 A1에 높은 수율로 용이하게 PNA를 합성할 수 있는 단량체를 공지하고 있으나, 다수의 공정으로 인해 대량생산에 있어서 경제적이지 못하다.
- [11] 따라서 목적하는 PNA를 단순한 공정으로 높은 순도 및 수율로 효율적으로 제조할 수 있는 PNA 올리고머의 제조방법이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

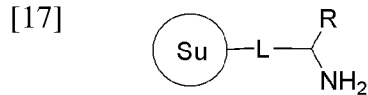
- [12] 본 발명은 공정단계를 획기적으로 줄여 매우 경제적인 동시에 놀랍도록 향상된 순도 및 수율로 목적하는 PNA 올리고머를 제조하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

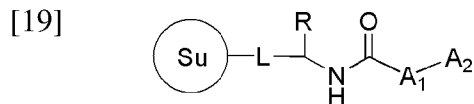
- [13] 본 발명은 단순한 공정으로 극히 향상된 순도 및 수율로 PNA 올리고머를

- 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것으로, 본 발명의 PNA 올리고머 제조방법은
- [14] a) 하기 화학식 1로 표시되는 구조체에 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체를 결합시켜 하기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체를 제조하는 단계 및
- [15] b) 상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체에 제2 PNA 이량체, 제 2 삼량체 PNA 또는 제2 사량체 PNA를 결합시켜 하기 화학식 4, 화학식 5 또는 화학식 6으로 표시되는 PNA 올리고머를 제조하는 단계를 포함한다.

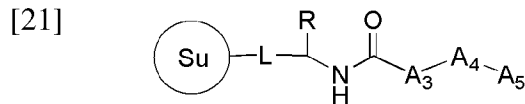
[16] [화학식 1]



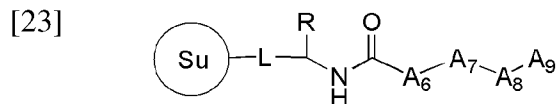
[18] [화학식 2]



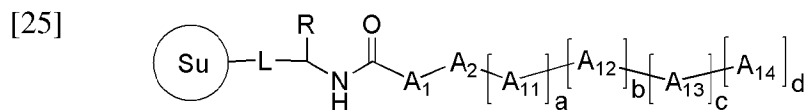
[20] [화학식 3]



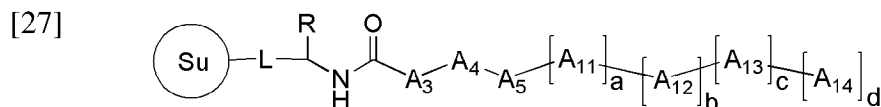
[22] [화학식 4]



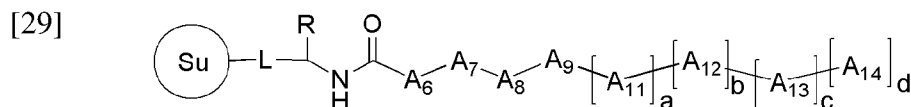
[24] [화학식 5]



[26] [화학식 6]



[28] [화학식 7]



[30] (상기 화학식 1 내지 7에서,

[31] Su는 지지체이며,

[32] L 및 R은 서로 독립적으로 하이드로카빌 또는 헤테로하이드로카빌이며;

[33] A₁ 내지 A₉ 및 A₁₁ 내지 A₁₄는 서로 독립적으로 서로 상이하거나 동일한 핵산염기를 포함하는 PNA 단량체이며;

[34] a 및 b는 서로 독립적으로 1의 정수이며, c 및 d는 서로 독립적으로 0 또는 1의

정수이다.)

- [35] 보다 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 A)상기 화학식 1로 표시되는 구조체에 아민기가 보호화된 제1 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제1 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제1 PNA 사량체를 결합시키는 생성물을 얻는 단계;
- [36] B)상기 단계에서 얻어진 생성물의 아민기를 탈보호화시켜 탈보호화된 아민 생성물을 제조하는 단계; 및
- [37] C)상기 탈보호화된 아민 생성물에 아민기가 보호화된 제2 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제2 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제2 PNA 사량체를 결합시키는 단계;를 포함한다.
- [38] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 B)단계 및 C)단계를 반복수행하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머는 4개 이상의 핵산염기를 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 실시예에 따른 제 1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체는 상기 화학식 1의 아민 작용기 1당량에 대해 2 내지 5당량이 사용될 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 *N,N,N',N'*-Tetramethyl- *O*-(1 *H* -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate(HBTU) 및 Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate(PyBop)를 이
- [41] 용한 커플링 반응으로 수행되는 것일 수 있으며, HBTU : PyBop의 사용량은 1: 1 내지 3의 당량비로 사용될 수 있다.
- [42] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 클로로화(C1-C4)알칸, DMF(Dimethylformamide), 및 DIEA(*N,N*-Diisopropylethylamine)의 혼합용매에서 수행되는 것일 수 있으며, 클로로화(C1-C4)알칸은 트리클로로메탄, 디클로로메탄, 클로로메탄, 1,1,2-트리클로로에탄, 1,1,1-트리클로로에탄 1,2-디클로로에탄, 1,1-디클로로에탄 및 클로로에탄에서 선택되는 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [43] 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합용매는 혼합용매 총중량에 대해 DIEA가 1 내지 10중량%로 포함되는 것일 수 있으며, 혼합용매는 클로로화(C1-C4)알칸 : DMF의 부피비가 1: 1 내지 2일 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체는 제2 PNA 이량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며, 상기 제1 PNA 삼량체는 제2 PNA 삼량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며, 상기 제1 PNA 사량체는 제2 사량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함할 수 있다.
- [45] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산염기는 아데닌, 시토신, 5-메틸시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 푸린, 2,6-디아미노푸린, N^4N^4 -에타노시토신, N^6N^6 -에타노-2,6-디아미노푸린, 5-(C3-C6)-알킬닐우라실, 5-(C3-C6)-알킬닐-시토신, 5-(1-프로파길아미노)우라실, 5-(1-프로파길아미노)시토신, 페녹사진,

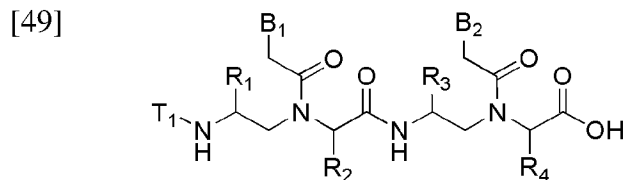
9-아미노에톡시페녹사진, 5-플루오로우라실, 슈도이소시토신, 5-(하이드록시메틸)우라실, 5-아미노우라실, 슈도우라실, 디하이드로우라실, 5-(C1-C6)-알킬우라실, 5-(C1-C6)-알킬-시토신, 5-(C2-C6)-알케닐시토신, 5-플루오로시토신, 5-클로로우라실, 5-클로로시토신, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 7-테아자아데닌, 7-테아자구아닌, 8-아자푸린, 7-테아자-7-치환된 푸린, 사이오우라실 또는 인공핵산염기일 수 있으나, 이에 한정이 있는 것은 아니다.

- [46] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산염기는 하나이상의 아민 보호기를 가지는 것일 수 있으며, 바람직한 아민 보호기는

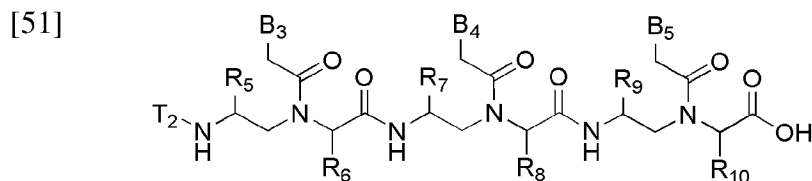
Fmoc(플루오레닐메톡시카보닐), Boc(3급-부틸옥시카보닐), Cbz(벤질옥시카보닐), Bhoc(Benzhydryloxycarbonyl), acetyl, benzoyl, benzyl, Carbamate, p-Methoxybenzyl, 3,4-Dimethoxybenzyl, p-methoxyphenyl, Tosyl, trichloroethyl chloroformate, Sulfonamides (Nosyl&Nps) 또는 isobutyryl일 수 있다.

- [47] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체 또는 제2 PNA 이량체는 하기 화학식 11로 표시되며, 제1 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 삼량체는 하기 화학식 12로 표시되며, 제1 PNA 사량체 또는 제2 PNA 사량체는 하기 화학식 13으로 표시될 수 있다.

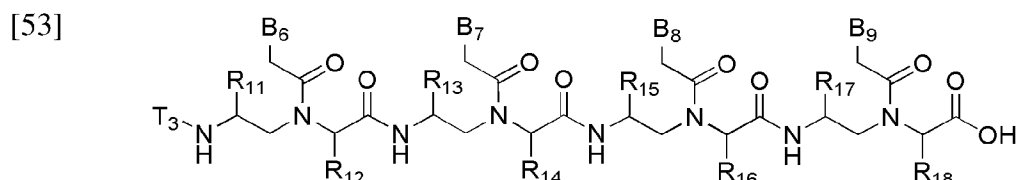
- [48] [화학식 11]



- [50] [화학식 12]



- [52] [화학식 13]



- [54] (상기 화학식 11 내지 13에서

- [55] R_1 내지 R_{18} 은 서로 독립적으로 수소, 아미노산의 잔기 또는 치환기를 가지는 아미노산 잔기이며;

- [56] T_1 내지 T_3 은 서로 독립적으로 아민 보호기이며;

- [57] B_1 내지 B_9 는 서로 독립적으로 아민 보호기를 포함하거나 포함하지 않은

핵산염기이다.)

- [58] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체, 제2 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체, 제2 PNA 삼량체, 제1 PNA 사량체 및 제2 PNA 사량체는 용액공정하 또는 고체상으로부터 제조될 수 있으며, 지지체는 메틸벤즈히드릴아민(MBHA), 폴리스틸렌을 클로로메틸화한 수지(Merrifield 수지), 4-히드록시벤질알코올로 변형된 Merrifield 수지(Wang 수지), Boc-아미노산-링커를 결합시킨 아미노메틸 수지(PAM 수지), N-Fmoc-N-메톡시-링커를 결합시킨 아미노메틸 수지(Weinreb 수지), 폴리스틸렌에 p-니트로벤조페논옥심을 결합시킨 수지(Oxime 수지) 또는 폴리스틸렌을 이용하여 트리틸화한 수지(Trityl 수지)일 수 있으나, 이에 한정이 있는 것은 아니다.
- [59] 본 발명의 일 실시예에 따른 제조방법은 제조된 PNA 올리고머의 핵산염기의 수가 n 인 경우 $n-1$ 및 $n-2$ 의 핵산염기의 수를 가지는 PNA 올리고머의 불순물이 존재하지 않는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [60] 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 사용하여 제조함으로써 PNA 단량체를 이용하여 제조하는 종래의 방법과 대비하여 보다 간단한 공정으로 PNA 올리고머의 제조가 가능할 뿐만 아니라 목적하는 PNA 올리고머를 보다 정확하게 제조할 수 있다.
- [61] 또한 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 단량체를 이용하여 제조하는 종래의 방법과 대비하여 보다 짧은 공정단계로 제조되며 부산물과의 분리가 매우 용이하여 제조되는 PNA 올리고머의 수율 및 순도가 극히 높다.
- [62] 또한 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 사용하여 제조함으로써 종래의 방법과 대비하여 매우 적은 양의 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 사용함으로써 매우 경제적이다.

도면의 간단한 설명

- [63] 도 1은 발명의 실시예 16에서 제조된 12mer crude PNA Oligomer와 15mer crude PNA oligomer의 혼합용액의 HPLC 결과를 나타낸 도면이다.
- [64] 도 2는 본 발명의 PNA 삼량체를 이용한 PNA 올리고머의 합성방법과 종래의 PNA 올리고머 합성방법을 비교하여 도식화한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [65] 이하 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법 및 이에 따라 제조된 PNA 올리고머에 대하여 상술하나, 이때 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [66] 본 명세서에 기재된 아미노산은 가장 넓은 의미로 사용되어, 천연 아미노산,

예를 들면 세린(Ser), 아스파라긴(Asn), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 알라닌(Ala), 티로신(Tyr), 글리신(Gly), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파라긴산(Asp), 글루타민산(Glu), 글루타민(Gln), 트레오닌(Thr), 시스테인(Cys), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp), 프롤린(Pro) 뿐 아니라, 아미노산 변이체 및 유도체와 같은 비천연 아미노산을 포함한다. 당업자라면, 이 넓은 정의를 고려하여, 본 명세서에 있어서의 아미노산으로서, 예를 들면 L-아미노산; D-아미노산; 아미노산 변이체 및 유도체 등의 화학 수식된 아미노산; 노르류신, β -알라닌, 오르니틴 등 생체 내에서 단백질의 구성재료가 되지 않는 아미노산; 및 당업자에게 공지된 아미노산의 특성을 갖는 화학적으로 합성된 화합물 등을 들 수 있는 것을 이해할 수 있을 것이다. 비천연 아미노산의 예로서, 트레오닌 유도체 A 외에, α -메틸아미노산(α -메틸알라닌 등), D-아미노산, 히스티딘 유사 아미노산(2-아미노-히스티딘, β -히드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘 및 α -메틸-히스티딘 등), 측쇄에 여분의 메틸렌을 갖는 아미노산(「호모」 아미노산) 및 측쇄 중의 카르복실산 관능기 아미노산이 설폰산기로 치환되는 아미노산(시스테인산 등)을 들 수 있다.

[67] 본 명세서에 기재된 「치환기를 가지는 아미노산 잔기」는 아미노산 잔기가 치환기를 가지는 것으로, 일례로 아세틸기로 치환된 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 리신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 발린, 트립토판, 또는 티로신을 포함할 수 있으며, 아미노산이 결합된 펩타이드일 수 있다.

[68] 본 발명에 기재된 「보호기」는 유기반응에서 특정한 작용기를 보호하기 위한 작용기로 유기합성분야의 당업자가 인식할 수 있는 범위의 작용기라면 모두 가능하며, 아민 보호기의 구체적인 일례로 Fmoc(플루오레닐메톡시카보닐), Boc(3급-부틸옥시카보닐), Cbz(벤질옥시카보닐), Bhoc, 알릴옥시카르보닐(Alloc), acetyl, benzoyl, benzyl, Carbamate, p-Methoxybenzyl, 3,4-Dimethoxybenzyl, p-methoxyphenyl, Tosyl, trichloroethyl chloroformate, Sulfonamides (Bts, Nosyl&Nps), isobutyryl 일 수 있다.

[69] 본 발명에 기재된 「하이드로카빌」 또는 「헤테로하이드로카빌」은 하이드로카본 또는 헤테로하이드로카본으로부터 유도되는 1개의 결합위치를 갖는 라디칼을 의미하며, 헤테로의 의미는 탄소가 O, S 및 N 원자로부터 선택되는 하나 이상의 헤테로 원자로 치환된 것을 의미한다.

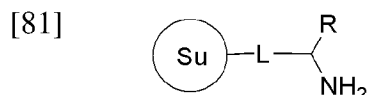
[70] 본 발명에 기재된 「클로로화알칸」은 알칸의 하나 이상의 수소가 클로로로 치환된 것을 의미하며, 알칸은 직쇄 또는 분쇄 형태를 모두 포함하며, 특별히 기재된 경우를 제외하고는 알칸은 1 내지 10개의 탄소원자 바람직하게는 1 내지 7 탄소원자, 보다 바람직하게는 1 내지 4의 탄소원자를 갖는다.

[71] 본 명세서에 기재된 「치환된」, 「치환기를 가지는」 및 치환체와 관련하여 별도의 기재가 없는 한, 본 발명의 임의로 치환된 치환체로는 할로젠,

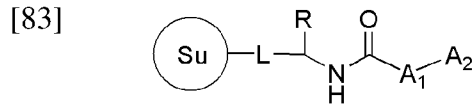
하이드록실, 카르복실산기, 니트로, 시아노, (저급)알킬, 할로알킬, 모노- 또는 디-알킬아미노, 알콕시, 티오알킬, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, $-\text{NO}_2$, $-\text{NR}_{a1}\text{R}_{b1}$, $-\text{NR}_{a1}\text{C}(=\text{O})\text{R}_{b1}$, $-\text{NR}_{a1}\text{C}(=\text{O})\text{NR}_{a1}\text{R}_{b1}$, $-\text{NR}_{a1}\text{C}(=\text{O})\text{OR}_{b1}$, $-\text{NR}_{a1}\text{SO}_2\text{R}_{b1}$, $-\text{OR}_{a1}$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_{a1}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_{a1}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_{a1}\text{R}_{b1}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_{a1}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_{a1}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_{a1}\text{R}_{b1}$, $-\text{NR}_{a1}\text{SO}_2\text{R}_{b1}$, $-\text{PO}_3\text{R}_{a1}$, $-\text{PO}(\text{OR}_{a1})(\text{OR}_{b1})$, $-\text{SO}_2\text{R}_{a1}$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}_{a1}$, $-\text{SO}(\text{NR}_{a1})\text{R}_{b1}$ (예를 들어, sulfoximine), $-\text{S}(\text{NR}_{a1})\text{R}_{b1}$ (예를 들어, sulfilimine) 및 $-\text{SR}_{a1}$ 가 이용될 수 있으며, 여기에서 R_{a1} 와 R_{b1} 는 같거나 다를 수 있으며, 서로 독립적으로 하이드로젠, 할로젠, 아미노, 알킬, 알콕시알킬, 할로알킬, 아릴 또는 헤테로사이클이고, 또는 부착된 질소원자와 같이 R_{a1} 와 R_{b1} 는 헤테로사이클 형태가 될 수 있다. 여기서 R_{a1} 와 R_{b1} 는 결합된 원자에 따라 복수 개일 수 있으며, 바람직하게 상기 알킬은 C_{1-6} 알킬일 수 있으며, 시클로알킬 및 헤테로시클로알킬은 C_{3-12} 일 수 있으며 아릴은 C_{6-12} 일 수 있으며, 헤테로사이클 및 헤테로아릴은 C_{3-12} 일 수 있다.

- [72] 본 발명에 기재된 PNA 단량체는 PNA 기본골격, 구체적으로 N-(2-아미노에틸)글리신(화합물 5) 또는 화합물 8의 N자리에 아민 보호기를 가지거나 가지지 않는 핵산염기를 포함한 것을 의미한다.
- [73] 본 발명에 기재된 PNA 이량체는 PNA의 기본골격인 N-(2-아미노에틸)글리신(화합물 5) 또는 화합물 8의 N자리에 핵산염기 결합된 PNA 단량체가 2개 연결된 것으로, PNA 이량체에 포함되는 핵산염기는 서로 상이하거나 동일할 수 있으며, 구체적으로 상기 화학식 11로 표시될 수 있다.
- [74] 본 발명에 기재된 PNA 삼량체는 PNA의 기본골격인 N-(2-아미노에틸)글리신(화합물 5) 또는 화합물 8의 N자리에 핵산염기가 결합된 PNA 단량체가 3개 연결된 것으로 PNA 삼량체에 포함되는 핵산염기는 서로 상이하거나 동일할 수 있으며, 구체적으로 상기 화학식 12로 표시될 수 있다.
- [75] 본 발명의 기재된 PNA 사량체 또한 PNA 삼량체와 마찬가지로 PNA 단량체가 4개 연결된 구조를 의미하며, 구체적으로 상기 화학식 13으로 표시될 수 있다.
- [76]
- [77] 본 발명은 높은 순도 및 수율로 PNA 올리고머를 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것으로, 본 발명의 PNA 올리고머 제조방법은
- [78] a) 상기 화학식 1로 표시되는 구조체에 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체를 결합시켜 상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체를 제조하는 단계 및
- [79] b) 상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체에 제2 PNA 이량체, 제 2 삼량체 PNA 또는 제2 사량체 PNA를 결합시켜 상기 화학식 4, 화학식 5 또는 화학식 6으로 표시되는 PNA 올리고머를 제조하는 단계를 포함한다.

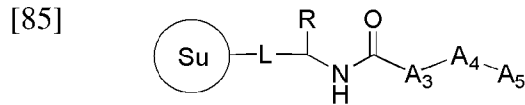
[80] [화학식 1]



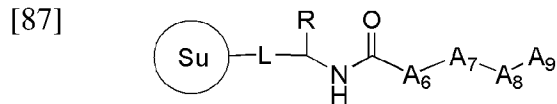
[82] [화학식 2]



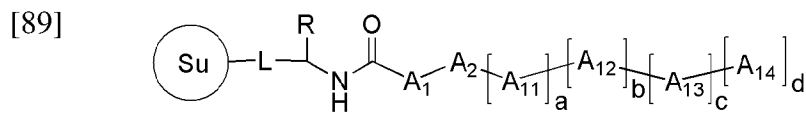
[84] [화학식 3]



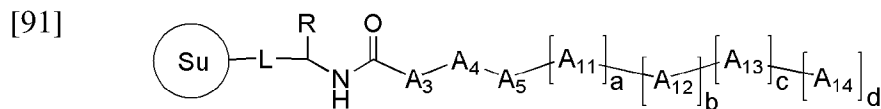
[86] [화학식 4]



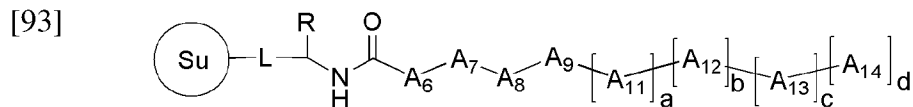
[88] [화학식 5]



[90] [화학식 6]



[92] [화학식 7]



[94] (상기 화학식 1 내지 7에서,

[95] Su는 지지체이며,

[96] L 및 R은 서로 독립적으로 하이드로카빌 또는 헤테로하이드로카빌이며;

[97] A₁ 내지 A₉ 및 A₁₁ 내지 A₁₄는 서로 독립적으로 서로 상이하거나 동일한 핵산염기를 포함하는 PNA 단량체이며

[98] a 및 b는 서로 독립적으로 1의 정수이며, c 및 d는 서로 독립적으로 0 또는 1의 정수이다.)

[99] 도 2에서 보이는 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 PNA 단량체를 이용하는 종래의 방법과 달리 보다 짧은 제조단계를 가져 매우 효율적이며, 분리정제도 매우 용이하여 제조된 PNA 올리고머의 순도가 매우 높다.

[100] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 용액공정으로 합성가능한 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 목적하는 n개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머 제조시 n-1개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머 또는 n-2개의 핵산염기를 가지는 PNA

올리고머가 부산물로 제조되지 않아 다른 부산물 등의 분순물로부터 분리가 매우 용이함에 따라 순도가 매우 높다.

- [101] 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1 내지 7에서 L은 치환되거나 비치환된 아릴렌, 알킬렌, 헤테로아릴렌 및 헤테로사이클로알킬렌 등일 수 있으며, 구체적인 일례로 C6-C12아릴렌, C1-C10알킬렌, C3-C12헤테로아릴렌 및 C3-C12헤테로사이클로알킬렌이며, 바람직하게 C6-C12아릴렌이며, 바람직한 구체적인 일례로 페닐렌이며, R은 치환되거나 비치환된 아릴, 알킬, 헤테로아릴 및 헤테로사이클로알킬렌이며, 바람직하게 C6-C12아릴, C1-C10알킬, C3-C12헤테로아릴 및 C3-C12헤테로사이클로알킬이며 보다 바람직하게 C1-C10알킬-C6-C12아릴이며, 일례로, 4-메틸페닐, 2,4-디메틸페닐 등 일 수 있다.
- [102] 바람직하게 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 A)상기 화학식 1로 표시되는 구조체에 아민기가 보호화된 제1 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제1 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제1 PNA 사량체를 결합시키는 생성물을 얻는 단계;
- [103] B)상기 단계에서 얻어진 생성물의 아민기를 탈보호화시켜 탈보호화된 아민 생성물을 제조하는 단계; 및
- [104] C)상기 탈보호화된 아민 생성물에 아민기가 보호화된 제2 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제2 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제2 PNA 사량체를 결합시키는 단계;를 포함한다.
- [105] 따라서 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 고상 상의 미반응 관능기인 아민을 무수 초산 등을 사용해서 아세틸화하는 캡핑단계를 수행하지 않아도 부산물이 적어 놀랍도록 높은 순도의 PNA 올리고머를 제조할 수 있다.
- [106] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA의 제조방법은 상기 B)단계 및 C)단계를 반복수행하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [107] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 종래의 방법과 달리 반응되지 않은 작용기를 보호하기 위한 capping단계가 필요하지 않아 제조단계를 획기적으로 줄일 수 있는 장점을 가져 대량생산이 가능하다.
- [108] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머는 목적하는 개수를 가지는 핵산염기를 용이하게 제조할 수 있으나, 바람직하게 4개 이상의 핵산염기를 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 4 내지 40개의 핵산염기를 포함할 수 있다.
- [109] 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체는 상기 화학식 1의 아민 작용기 1당량에 대해 2 내지 7당량이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 절단가능한 작용기 1당량에 대해 3 내지 5당량이 사용될 수 있다.
- [110] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 단량체를 이용하는 종래의 PNA 올리고머의 제조방법과 달리 PNA 이량체, PNA 삼량체

또는 PNA 사량체를 적은 당량을 사용함으로 매우 경제적이며, 상업적으로 적용에 유리하다.

[111] 구체적으로 종래의 PNA 단량체를 이용하는 PNA 올리고머의 제조방법에서는 지지체에 연결된 아민 작용기 1당량에 대하여 적어도 10당량 이상의 PNA 단량체를 사용하여야 PNA 올리고머를 제조가 가능하여 매우 비효율적이며, 비경제적이었으나, 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 사용함으로써 제조공정이 단축되는 동시에 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체의 사용량이 적고 제조되는 PNA 올리고머의 수율이 높아 매우 경제적이다.

[112] 본 발명의 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 커플링 반응으로 수행될 수 있다.

[113] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1 *H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate(HBTU) 및 Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate(PyBop)를 이용한 커플링 반응으로 수행되는 것일 수 있다. 본 발명은 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 커플링 시약으로, HBTU와 PyBop을 혼합하여 사용함으로써 커플링 되는 두 화합물의 반응성이 적절하게 조절되어, 커플링 반응에 있어 최적의 반응성을 유지하게 된다.

[114] 이러한 측면에서 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 HBTU : PyBop의 사용량은 1: 1 내지 3의 당량비로 사용될 수 있다.

[115] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 b)단계의 결합은 커플링 반응으로 수행되며, 이때 사용되는 용매는 클로로화(C1-C4)알칸, DMF(Dimethylformamide), 및 DIEA(*N,N*-Diisopropylethylamine)의 혼합용매일 수 있으며, 클로로화(C1-C4)알칸은 트리클로로메탄, 디클로로메탄, 클로로메탄, 1,1,2-트리클로로에탄, 1,1,1-트리클로로에탄 1,2-디클로로에탄, 1,1-디클로로에탄 및 클로로에탄에서 선택되는 하나 또는 둘 이상일 수 있다.

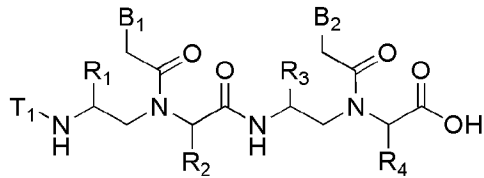
[116] 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합용매는 DMF, DIEA 및 클로로화알칸을 포함함으로써 커플링 반응시 반응물의 용해도가 적절하게 조절됨으로써 높은 수율 및 순도로 생성물을 얻을 수 있다.

[117] 나아가 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합용매는 DMF에 클로로화(C1-C4)알칸를 사용함으로써 지지체인 레진의 swelling효과가 놀랍도록 향상됨으로써 반응성이 증가된다.

[118] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합용매, 특히 DMF 및 DIEA에 (C1-C4)알칸을 포함함으로써 지지체인 레진의 입체 효과(steric effect)가 개선되고 용해도가 향상되어 반응성이 증가하며 이에 높은 순도로 생성물을 제조할 수 있다.

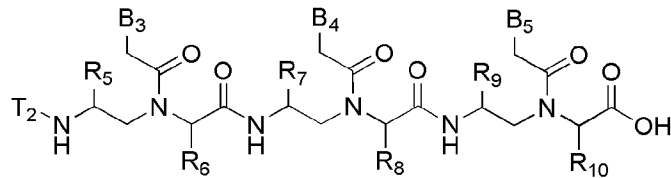
[119] 본 발명의 일 실시예에 따른 혼합용매는 용매 총중량에 대하여 DIEA가 1 내지 10중량%, 바람직하게 3 내지 7중량%로 포함되는 것일 수 있으며, 혼합용매는 클로로화(C1-C4)알칸 : DMF의 부피비가 1: 1 내지 2일 수 있다.

- [120] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체는 제2 PNA 이량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며, 제1 PNA 삼량체는 제2 PNA 삼량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며, 제1 PNA 사량체는 제2 사량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함할 수 있다.
- [121] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은 화학식 1로 표시되는 구조체에, 구체적으로는 지지체에 연결된 절단가능한 작용기인 아민 작용기에 제1 PNA 이량체를 결합시킨 후 상기 아민 작용기에 결합된 제1 PNA 이량체에 제2 PNA 이량체, 제2 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 사량체를 결합시켜 PNA 올리고머를 제조할 수도 있으며, 화학식 1로 표시되는 구조체에 연결된 아민 작용기에 제1 PNA 삼량체를 결합시킨 후 상기 아민 작용기에 결합된 제1 PNA 삼량체에 제2 PNA 이량체, 제2 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 사량체를 결합시켜 PNA 올리고머를 제조할 수도 있으며, 지지체에 연결된 절단가능한 작용기인 아민 작용기에 제1 PNA 사량체를 결합시킨 후 상기 아민 작용기에 결합된 제1 PNA 사량체에 제2 PNA 이량체, 제2 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 사량체를 결합시켜 PNA 올리고머를 제조할 수도 있다.
- [122] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산염기는 아데닌, 시토신, 5-메틸시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 푸린, 2,6-디아미노푸린, N⁴N⁴-에타노시토신, N⁶N⁶-에타노-2,6-디아미노푸린, 5-(C3-C6)-알킬닐우라실, 5-(C3-C6)-알킬닐-시토신, 5-(1-프로파길아미노)우라실, 5-(1-프로파길아미노)시토신, 페녹사진, 9-아미노페녹사진, 5-플루오로우라실, 슈도이소시토신, 5-(하이드록시메틸)우라실, 5-아미노우라실, 슈도우라실, 디하이드로우라실, 5-(C1-C6)-알킬우라실, 5-(C1-C6)-알킬-시토신, 5-(C2-C6)-알케닐시토신, 5-플루오로시토신, 5-클로로우라실, 5-클로로시토신, 5-브로모우라실, 5-브로모시토신, 7-테아자아데닌, 7-테아자구아닌, 8-아자푸린, 또는 7-테아자-7-치환된 푸린, 사이오우라실 또는 인공핵산염기일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [123] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산염기는 하나이상의 아민 보호기를 가지는 것일 수 있으며, 바람직한 아민 보호기는 Fmoc(플루오레닐메톡시카보닐), Boc(3급-부틸옥시카보닐), Cbz(벤질옥시카보닐), Bhoc(Benzhydryloxycarbonyl), acetyl, benzoyl, benzyl, Carbamate, p-Methoxybenzyl, 3,4-Dimethoxybenzyl, p-methoxyphenyl, Tosyl, trichloroethyl chloroformate, Sulfonamides (Nosyl&Nps) 또는 isobutyryl일 수 있다.
- [124] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체 또는 제2 PNA 이량체는 하기 화학식 11로 표시되며, 상기 제1 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 삼량체는 하기 화학식 12로 표시되며, 상기 제1 PNA 사량체 또는 제2 PNA 사량체는 하기 화학식 13으로 표시될 수 있다.
- [125] [화학식 11]
- [126]



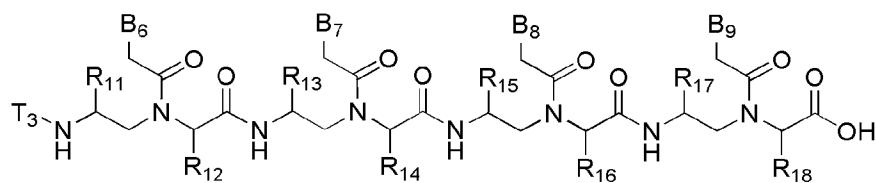
[127] [화학식 12]

[128]



[129] [화학식 13]

[130]



[131] (상기 화학식 11 내지 13에서

[132] R_1 내지 R_{18} 는 서로 독립적으로 수소, 아미노산의 잔기 또는 치환기를 가지는 아미노산 잔기이며;

[133] T_1 내지 T_3 은 서로 독립적으로 아민 보호기이며;

[134] B_1 내지 B_9 는 서로 독립적으로 아민 보호기를 포함하거나 포함하지 않은 헥산염기이다.)

[135] 보다 구체적으로 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머의 제조방법은

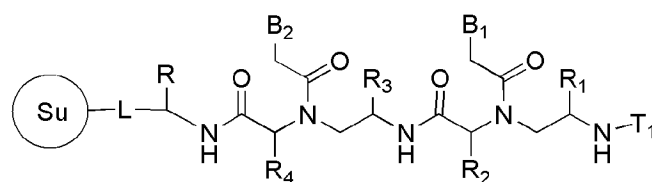
[136] A1)상기 화학식 1로 표시되는 구조체에 상기 화학식 11로 표시되는 제1 PNA 이량체, 상기 화학식 12로 표시되는 제1 PNA 삼량체 또는 상기 화학식 13으로 표시되는 제1 PNA 사량체를 결합시켜 하기 화학식 14 내지 화학식 16을 제조하는 단계;

[137] B1)상기 화학식 14 내지 화학식 16의 아민기를 탈보호화시켜 탈보호화된 아민 생성물을 제조하는 단계; 및

[138] C1)상기 탈보호화된 아민 생성물에 상기 화학식 11로 표시되는 제1 PNA 이량체, 상기 화학식 12로 표시되는 제1 PNA 삼량체 또는 상기 화학식 13으로 표시되는 제1 PNA 사량체를 반응시켜 PNA 올리고머를 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.

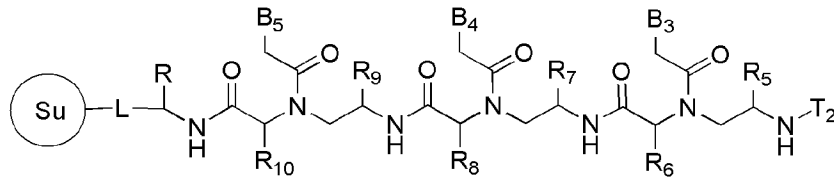
[139] [화학식 14]

[140]



[141] [화학식 15]

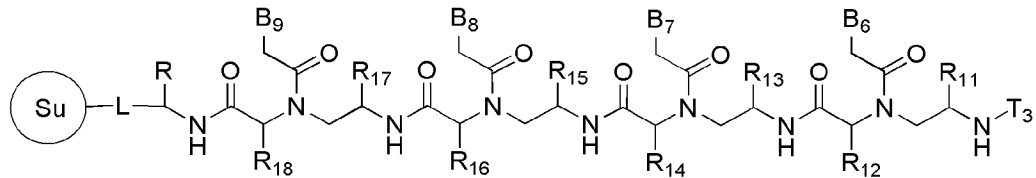
[142]



[143]

[화학식 16]

[144]



[145] (상기 화학식 14 내지 16에서

[146] L 및 R은 서로 독립적으로 하이드로카빌 또는 헤테로하이드로카빌이며;

[147] R₁ 내지 R₁₈은 서로 독립적으로 수소, 아미노산의 잔기 또는 치환기를 가지는 아미노산 잔기이며;[148] T₁ 내지 T₃은 서로 독립적으로 아민 보호기이며;[149] B₁ 내지 B₉는 서로 독립적으로 아민 보호기를 포함하거나 포함하지 않은 헥산염기이다.)

[150] 바람직하게 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 PNA 이량체, 제2 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체, 제2 PNA 삼량체, 제1 PNA 사량체 및 제2 PNA 사량체는 용액공정하 또는 고체상으로부터 제조될 수 있다.

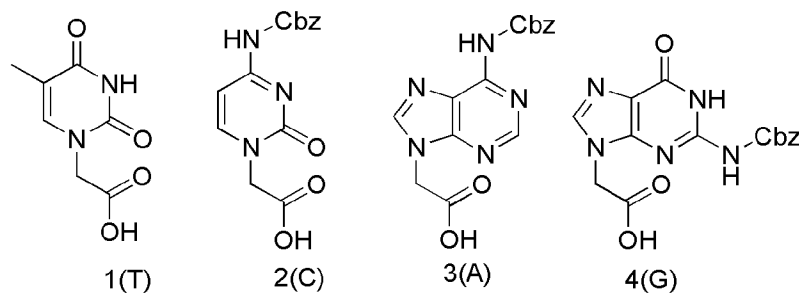
[151] 종래의 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 단량체를 이용함으로써 PNA 올리고머 제조할 시 분리가 용이하지 않아 PNA 올리고머의 순도가 낮고 제조공정이 길어지는 단점이 존재하나, 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 PNA 이량체, PNA 삼량체 또는 PNA 사량체를 이용함으로써 보다 간단한 공정으로 높은 순도의 PNA 올리고머를 제조할 수 있다. 그러나 PNA 오량체를 이용하여 PNA 올리고머를 제조할 시에는 용해도 측면에서 불리하여 제조가 어려운 단점이 있다.

[152] 본 발명의 일 실시예에 따른 지지체는 본 기술분야에서 사용될 수 있는 물질이면 모두 가능하며, 일례로 메틸벤즈히드릴아민(MBHA), 폴리스티렌을 클로로메틸화한 수지(Merrifield 수지), 4-히드록시벤질알코올로 변형된 Merrifield 수지(Wang 수지), Boc-아미노산-링커를 결합시킨 아미노메틸 수지(PAM 수지), N-Fmoc-N-메톡시-링커를 결합시킨 아미노메틸 수지(Weinreb 수지), 폴리스티렌에 p-니트로벤조페논옥심을 결합시킨 수지(Oxime 수지) 또는 폴리스티렌을 이용하여 트리틸화한 수지(Trityl 수지)일 수 있으며, 바람직하게 메틸벤즈히드릴아민 또는 트리틸 수지일 수 있다.

[153] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA 올리고머는 하기 조건에서의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 분석결과 60%이상의 순도를 가질 수 있으며, 바람직하게는 65%이상 보다 바람직하게는 70%이상일 수 있다.

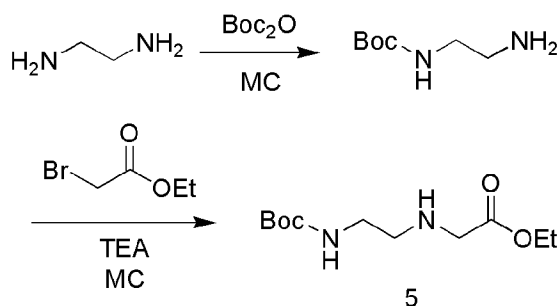
- [154] (전개용매: TFA 0.1% in Water, TFA 0.1% in MeCN, gradient condition)
- [155] UV 디텍터 260 nm, 컬럼 250mm*4.6mm)
- [156] 또한 본 발명의 PNA 올리고머의 제조방법은 capping 과정 없이 합성되며, 제조된 PNA 올리고머는 상기 조건에서의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 분석결과 60%이상, 바람직하게는 65%이상, 보다 바람직하게는 70%이상의 순도를 가지는 PNA 올리고머를 제공한다.
- [157]
- [158] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 하기의 실시예에 의하여 본 발명의 범주가 본 발명을 한정하는 것은 아니다.
- [159] 반응에 사용된 물질 유기용매는 Novabiochem, Alfa aesar, SAMCHUN CHEMICALS, Junsei chemicals co.,Ltd, DUKSAN reagents chemical 등에서 구입하여 사용하였으며 별도의 추가 정제없이 사용하였다. 합성된 화합물의 ¹H-NMR 분석은 상온에서 Bruker 400 또는 500 MHz를 사용하여 수행하였고 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump) 전개용매로 TFA 0.1%가 포함된 MeCN: TFA 0.1%가 포함된 물의 비율이 5:95인 용매를 사용하여 점차 전개용매의 비율을 변화시켜 TFA 0.1%가 포함된 MeCN: TFA 0.1%가 포함된 물의 비율을 20:80으로 20분동안 변화시키고 이후 10분동안은 TFA 0.1%가 포함된 MeCN: TFA 0.1%가 포함된 물의 비율이 95:5인 용매를 사용하여, column heater 60 °C 방법으로 분석하였다.
- [160] 하기 화합물 1 내지 4의 핵산 염기 또는 아민 보호기를 가지는 핵산염기는 한국등록특허 10-0464261과 동일한 방법으로 제조하였다.

[161]



[162] [제조예 1] 화합물 5(Boc-aeg-OEt)의 제조

[163]



[164] 500 mL 삼각플라스크에 11.0 g의 ethylenediamine(183 mmol)을 넣고 MC에 녹였다. 5.0 g의 Boc₂O(22.9 mmol)를 MC에 녹여 dropwise 하고, 상온에서 12시간

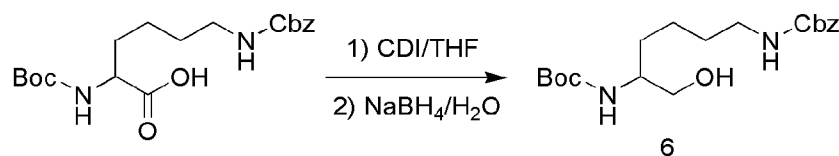
교반 하였다. TLC로 반응 종결 확인 후, 물을 넣어 MC층만 추출하여 sat. NaCl로 씻어주었다. Na_2SO_4 로 처리한 후, 여과하여 농축하였다. 농축한 용액에 MC를 넣고 6.4 mL의 triethylamine(45.8 mmol)을 첨가하였다. 2.4 mL의 ethyl bromoacetate(22.0 mmol)를 MC에 녹여 천천히 dropwise하고 상온에서 12시간 교반하였다. TLC로 반응 종결 확인 후 물을 넣고 MC층만 추출하였다. Na_2SO_4 로 물을 제거한 후, 농축하였고 silica-column chromatography(용리액: EA : Hex = 1 : 1 v/v)로 정제하여 투명한 오일 형태의 생성물인 화합물 5를 얻었다(3.79 g, 70%).

[165]

[166] [제조예 2] 화합물 8(Boc-Lys(Z)-OMe)의 제조

[167] 화합물 6의 제조

[168]

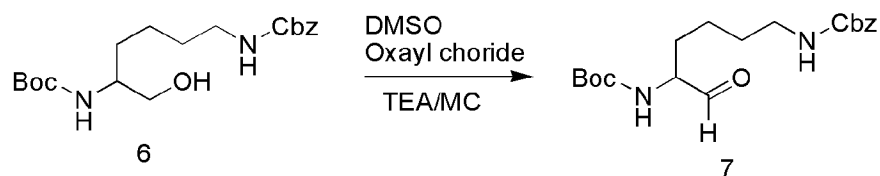


[169] 질소 하에서 250 mL 2 neck 둥근 바닥 플라스크에 5.40 g Boc-Lys(Z)-COOH(14.2 mmol)를 넣고 100 mL Dry THF에 녹였다. 9.21 g의 1,1'-Carbonyldiimidazole(56.8 mmol)을 한번에 넣고, 상온에서 10분동안 교반시켰다. 기포가 더 이상 발생하지 않을 때 0°C에서 2.68 g의 NaBH_4 (71.0 mmol)를 증류수 30 mL에 녹인 후 천천히 넣고, 30분간 교반시켰다. TLC로 반응 종결 확인 후 용매를 농축시켰다. 200 mL EA를 넣은 후 분별깔대기에 옮겨 1M HCl로 씻어준 후, 포화소금물로 씻어주고 Sodium sulfate로 물을 제거하여 농축시켰다. Silica-column chromatography(용리액 : EA : HEX = 1 : 1 v/v)로 정제하여 투명한 노란 오일형태의 생성물인 화합물 6을 얻었다(5.0 g, 96.2 %).

[170]

[171] 화합물 7의 제조

[172]



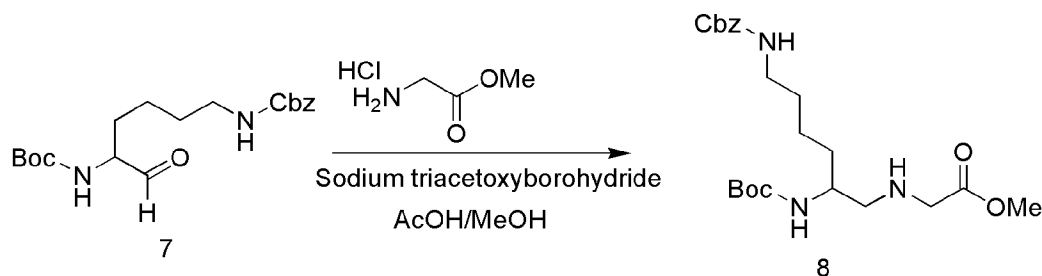
[173] 질소 하에 250 mL 2구 둥근 바닥 플라스크에 8.71 mL Oxalyl Chloride(17.4 mmol)를 syringe를 사용해 넣고, 20 mL Dry MC를 넣었다. NaCl과 얼음, Methanol을 이용해 -20°C로 온도를 5분간 떨어뜨렸고, 100 mL 둥근바닥플라스크에 2.47 mL dry DMSO(34.8 mmol)과 5 mL dry MC를 혼합한 용액을 방울방울 첨가하였다. 5분 후 5.80 g Boc-Lys(Cbz)-OH(15.8 mmol) dry MC 20 mL에 녹인 후 반응액에 첨가하였다. 15분 후, 15.2 mL DIEA(87.1 mmol)을 첨가한 후 5분간 교반시키고 ice bath를 제거하고 TLC를 확인(EA only, p-Anisaldehyde). 반응종결 후 NaHCO_3 로 씻어준 후 용매를 농축시켜 투명한 오일인 화합물 7을 얻었다(5.5 g, 95.3 %).

[174]

[175] 화합물 8의 제조

[176] 화합물 8은 FILBERT TOTSINGAN et. Al. CHIRALITY, 2009, 21, 245-253을 참고하여 동일한 방법으로 제조하였으며, 이로부터 화합물 8이 합성되었음을 확인하였다.

[177]



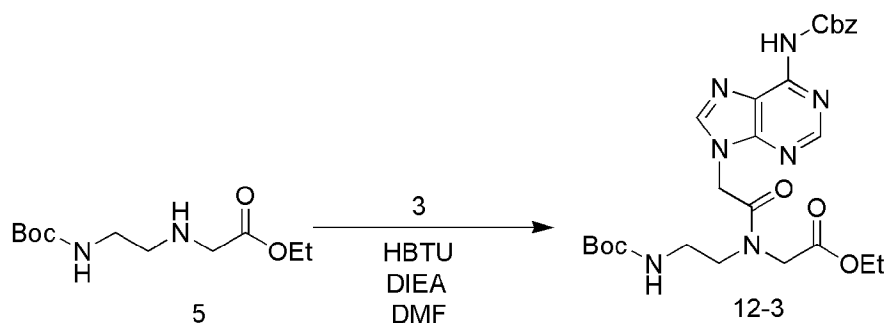
[178] 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 5.50 g의 Boc-Lys(Cbz)-CHO(15.1 mmol)을 넣고 Methanol 50.0 mL를 넣고, 2.84 g의 Gly-OMe(22.6 mmol)을 넣었다. 0°C에서 1.30 mL의 Acetic acid(22.6 mmol)과 3.94 mL의 N,N-Diisopropylethylamine(22.6 mmol)을 첨가 후, 9.60 g의 Sodium triacetoxyborohydride(45.3 mmol)을 넣고 0°C에서 2시간 교반 후 상온에서 overnight 교반하였다. TLC (전개액 : EAonly, p-anisaldehyde) 확인을 통해 시작물질 반응여부를 확인 후 종결 시 용액을 농축한 후, EA를 넣고 NaHCO₃로 씻어준 후 농축시켜 Silica-column chromatography(용리액 : EA : HEX = 1 : 1 v/v)로 정제하여 투명한 오일 형태의 생성물을 얻었다(4.5 g, 68.2 %).

[179]

[180] [실시예 1] PNA 단량체의 제조

[181] 화합물 12-3(Boc-aeg-A(Z)-OEt)의 제조

[182]



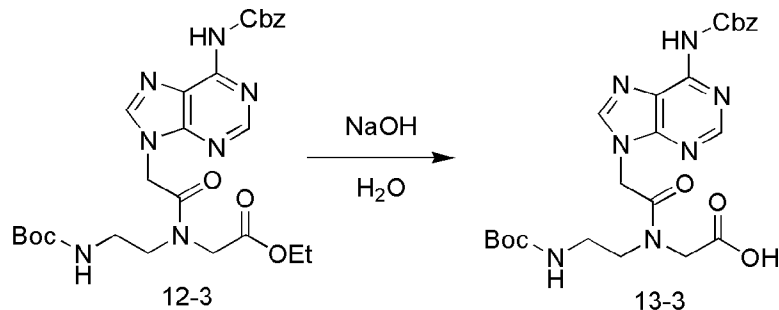
[183] 화합물 3, 4.67 g(14.3 mmol)를 dry N,N-dimethylformamide(DMF) 100 mL에 녹여주었다. N,N-Diisopropylethylamine(DIEA) 7.46 mL (42.8 mmol)를 넣고 HBTU[O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphate]] 6.49 g(17.1 mmol)을 가한 뒤, 화합물 5 3.51 g(14.2 mmol)을 넣었다. 약 1시간 정도 교반 후, TLC를 이용하여 반응 종결을 확인하고 DMF를 제거하였다. DMF가 제거된 잔여물에 Ethyl acetate(800mL)를 넣어주어 잔여물을 용해 시켜주었고, 분별깔데기를 이용하여 포화된 NaHCO₃과 포화소금물로 유기층을 씻어 주었다.

유기층에 Sodium sulfate를 투입하여 유기층의 물을 10분간 건조 후 Sodium sulfate를 필터 하였다. 필터된 용매는 회전증발기를 이용하여 제거 하였다. Silica-column chromatography(용리액 : 5% MeOH/MC)로 정제하여 화합물 12-3을 얻었다(4.0 g, 50.4%).

[184]

[185] 화합물 13-3(Boc-aeg-A(Z)-OH)의 제조

[186]

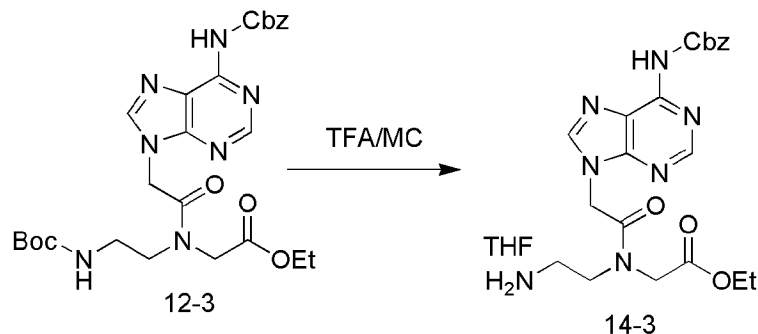


[187] 화합물 12-3, 4.80 g(8.64 mmol)을 1N-NaOH 45 mL에 녹여 30분간 교반 시킨 후, TLC(전개액 : 5 % MeOH/MC) 모니터링하여 반응을 종결 하였다. 0°C에서 1 M KHSO₄로 pH2~3까지 떨어뜨려 생성된 고체를 glass filter로 거르고, 물로 여러번 씻어준 후 P₂O₅에 건조시켜 흰색의 고체형태인 생성물인 13-3을 얻었다(4.30 g, 94.3 %).

[188]

[189] 화합물 14-3(NH₂-aeg-A(Z)-OEt)의 제조

[190]



[191] 화합물 12-3, 6.30 g(9.5 mmol)을 50% TFA/MC 50 mL에 녹인 후 TLC 모니터링하여 반응을 종결 하였다. 반응 종결 후, 0°C에서 과량의 diethyl ether에 용액을 적가하여 침전을 떨어뜨렸다. 여과 후 흰색 고체 형태의 생성물인 화합물 14-3을 얻었다(4.0 g, 90%).

[192]

[193] [실시예 2] PNA 단량체의 제조

[194] 실시예 1의 화합물 12-3의 제조에서 화합물 3 대신 화합물 1을 사용한 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하여 PNA 단량체 13-1(Boc-aeg-T-OH) 및 PNA 단량체 14-1(NH₂-aeg-T-OEt)을 제조하였다.

[195]

[196] [실시예 3] PNA 단량체의 제조

[197] 실시예 1의 화합물 12-3의 제조에서 화합물 3 대신 화합물 2 또는 4를 각각 사용한 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하여 PNA 단량체 13-2(Boc-aeg-C(Z)-OH), PNA 단량체 14-2(Boc-aeg-C(Z)-OH), PNA 단량체 13-4(Boc-aeg-G(Z)-OH) 및 PNA 단량체 14-4(NH₂-aeg-G(Z)-OEt)를 제조하였다.

[198]

[199] [실시예 4] PNA 단량체의 제조

[200] 실시예 1의 화합물 12-3의 제조에서 화합물 5 대신 화합물 8를 사용하고 화합물 3 대신 화합물 1을 사용한 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 실시하여 PNA 단량체 13-5(Boc-Lys(Z)-T-OH) 및 PNA 단량체 14-5(NH₂-Lys(Z)-T-OMe)을 제조하였다.

[201]

[202] [실시예 5] PNA 단량체의 제조

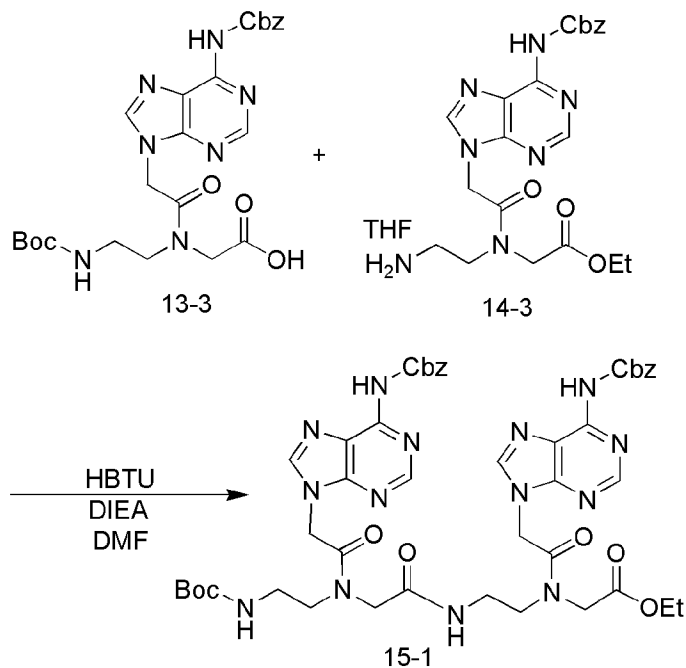
[203] 실시예 4에서 화합물 1 대신 화합물 2, 3 또는 4를 각각 사용한 것을 제외하고는 실시예 4와 동일하게 실시하여 PNA 단량체 13-6(Boc-Lys(Z)-C(Z)-OH), PNA 단량체 13-7(Boc-Lys(Z)-A(Z)-OH), PNA 단량체 13-8(Boc-Lys(Z)-G(Z)-OH), PNA 단량체 14-6(NH₂-Lys(Z)-C(Z)-OMe), PNA 단량체 14-7(NH₂-Lys(Z)-A(Z)-OMe) 및 PNA 단량체 14-8(NH₂-Lys(Z)-G(Z)-OMe)를 각각 제조하였다.

[204]

[205] [실시예 6] PNA 이량체 16-1(Boc-AA-OH)의 제조

[206] 화합물 15-1(Boc-A(Z)A(Z)-OEt)의 제조

[207]



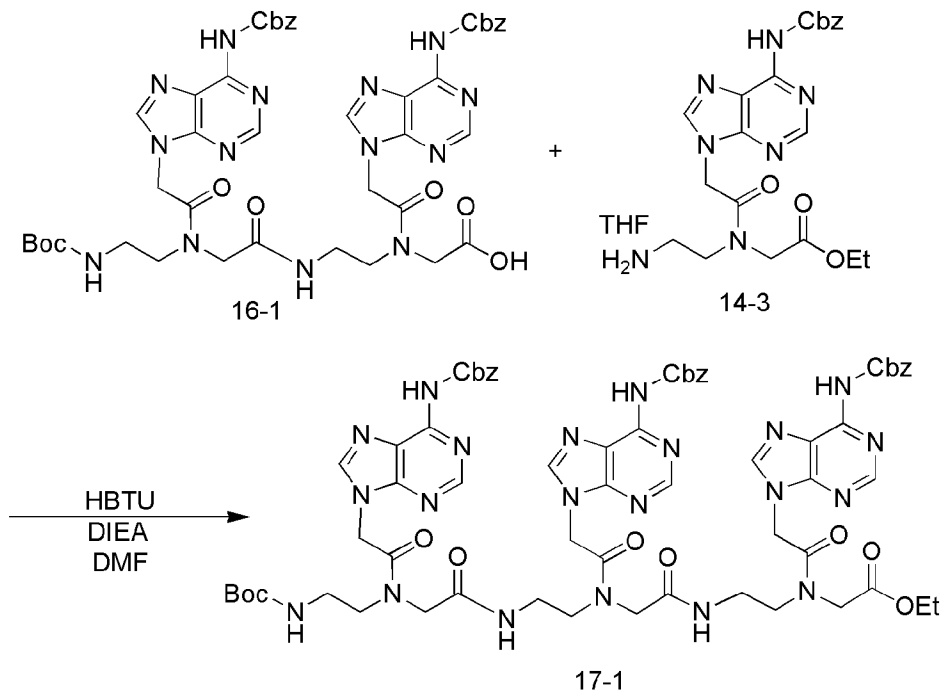
[208] 화합물 13-3, 1 g (1.9 mmol)을 DMF 15 mL 녹인 후 HBTU 0.791 g(0.0021 mol), DIEA 1.65 mL (0.0095 mol)를 투입하였다. 상온에서 10분간 교반 후 화합물 14-3,

[216]

[217] [실시예 8] PNA 삼량체의 제조

[218] 화합물 17-1의 제조

[219]

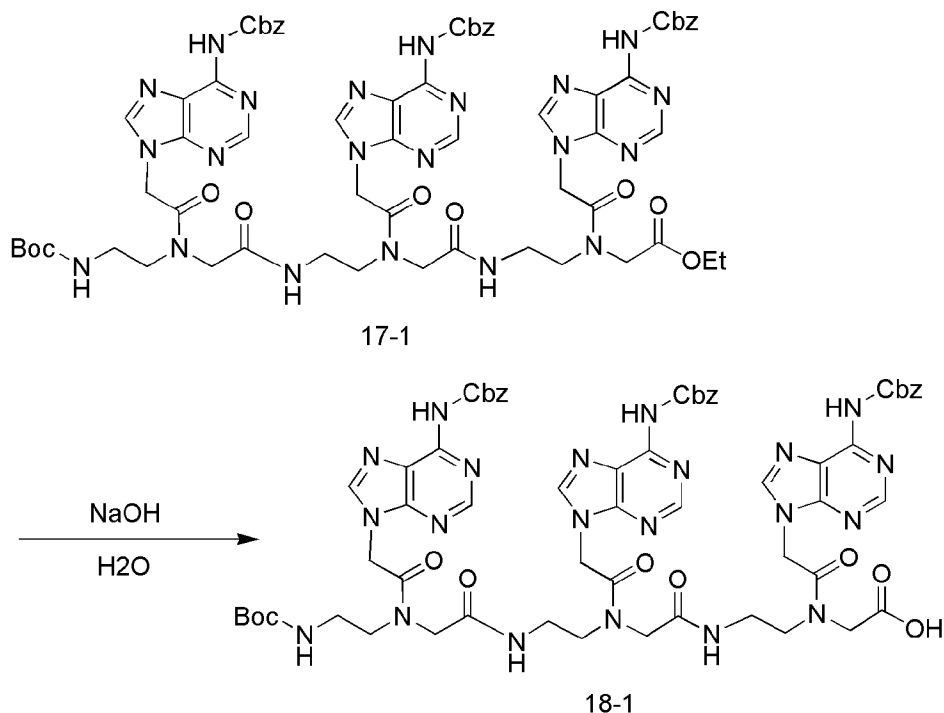


[220] Boc-A(Z)A(Z)-OEt(16-1) 1.56 g (1.7 mmol)을 DMF 15 mL 녹인 후 HBTU 0.695 g(1.8 mmol), DIEA 1.45 mL (9.5 mmol)를 투입하였다. 상온에서 10분간 교반 후 NH₂-aeg-A(Z)-OEt(14-3) 0.95 g(1.7 mmol)를 투입하여 3시간 동안 교반 하였다. TLC 모니터링 통하여 반응이 종료 되었음을 확인 후, 용매를 완전히 제거해 주었다. DMF가 제거된 잔여물에 DCM을 넣어주어 잔여물을 용해 시켜주었고, 분별깔데기를 이용하여 포화된 NaHCO₃ (500mL) 용액으로 2회 유기층을 씻어 주었다. 유기층에 sodium sulfate를 투입하여 유기층의 물을 10분간 건조 후 sodium sulfate를 필터 하였다. 필터된 용매를 제거 후 Silica-column chromatography로 정제하여 Boc-aeg-A(Z)A(Z)A(Z)-OEt(17-1)을 얻었다(yield:2.17g, 93.1 %).

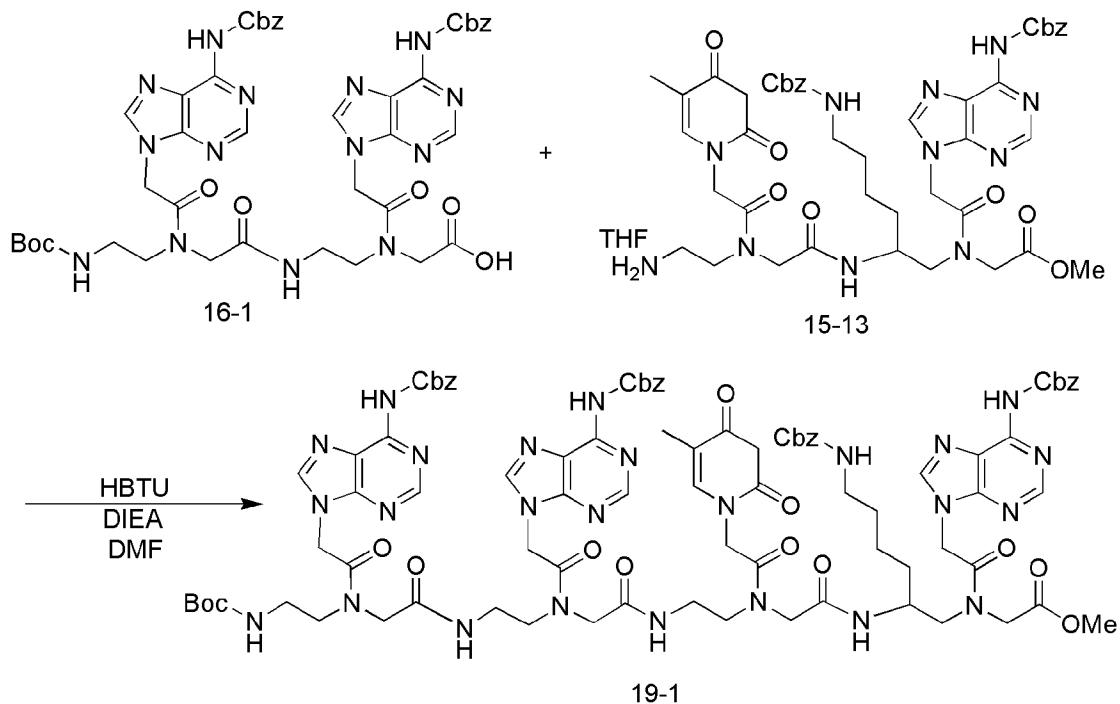
[221]

[222] 화합물 18-1(PNA 삼량체)의 제조

[223]



- [224] 화합물 17-3 1.5 g (1.1 mmol)을 1N-NaOH 30 mL 에 녹여 30분간 교반 시킨 후, TLC(전개액 : 10 % MeOH/MC) 모니터링하여 반응을 종결 하였다. 0°C에서 1 M KHSO₄로 pH2~3까지 떨어뜨려 생성된 고체를 glass filter로 거르고, 물로 여러번 씻어준 후 P₂O₅에 건조시켜 흰색의 화합물 18-1을 얻었다(1.35 g, 93.9 %).
- [225]
- [226] [실시예 9] PNA 삼량체의 제조
- [227] 실시예 8에서 화합물 16-1 및 화합물 14-3 대신에 상이한 PNA 이량체 및 PNA 단량체를 사용한 것을 제외하고는 실시예 11과 동일하게 실시하여 PNA 삼량체 18-2(Boc-TAT-OH), PNA 삼량체 18-3(Boc-ATC)-OH), PNA 삼량체 18-4(Boc-TCG-OH), PNA 삼량체 18-5(Boc-GGT-OH), PNA 삼량체 18-6(Boc-TCC-OH), PNA 삼량체 18-7(Boc- G"TG -OH), 18-8(Boc-ACA-OH), 18-9(Boc-TTA-OH), 18-10(Boc-G T"G-OH) 및 18-11(Boc-C "AT-OH) 를 제조하였다. 이때 Base"는 NH₂-γLys(Z)-base-OMe이다.
- [228]
- [229] [실시예 10] PNA 사량체의 제조
- [230] 화합물 19-1의 제조
- [231]

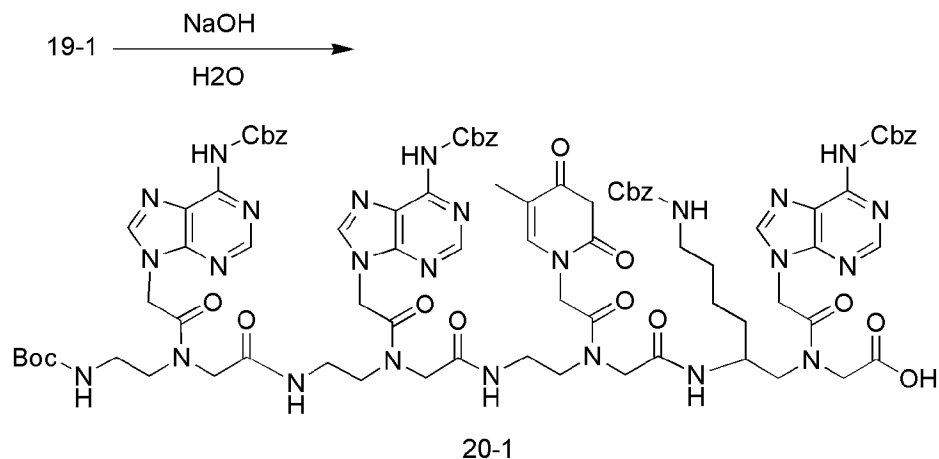


- [232] Boc-A(Z)A(Z)-OEt(16-1) 1.56 g (1.7 mmol)을 DMF 15 mL 녹인 후 HBTU 0.943 g(2.5 mmol) 및 DIEA 5.78 mL (33.2 mmol)를 투입하였다. 상온에서 10분간 교반 후 THF · NH₂-TA"-OMe (15-13) 1.7 g(1.7 mmol)를 투입하여 3시간 동안 교반 하였다. TLC 모니터링 통하여 반응이 종료 되었음을 확인 후, 용매를 완전히 제거해 주었다. DMF가 제거된 잔여물에 DCM을 넣어주어 잔여물을 용해 시켜주었고, 분별칼데기를 이용하여 포화된 NaHCO₃ (500mL) 용액으로 2회 유기층을 씻어 주었다. 유기층에 sodium sulfate를 투입하여 유기층의 물을 10분간 건조 후 sodium sulfate를 필터 하였다. 필터된 용매를 제거 후 Silica-column chromatography로 정제하여 Boc-aegA(Z)A(Z)-T-γLys(Z)A(Z)-OMe(19-1)을 얻었다(yield:2.1g, 68.7 %).

[233]

[234] 화합물 20-1의 제조

[235]



- [236] 화합물 19-1 2.1 g (1.1 mmol)을 1N-NaOH 10 mL 에 녹여 30분간 교반 시킨 후,

TLC(전개액 : 20 % MeOH/MC) 모니터링하여 반응을 종결 하였다. 0°C에서 1 M KHSO₄로 pH2~3까지 떨어뜨려 생성된 고체를 glass filter로 거르고, 물로 여러번 씻어준 후 P₂O₅에 건조시켜 화합물 19-2를 얻었다(1.9 g, 91.2 %).

[237]

[실시예 11] PNA 사량체의 제조

[239] 실시예 10에서 화합물 16-1 및 화합물 15-13 대신에 상이한 PNA 이량체를 사용한 것을 제외하고는 실시예 10과 동일하게 실시하여 PNA 사량체 20-2(Boc-G"TAO-OH) 및 PNA 사량체 20-3(Boc-AACC"-OH)를 제조하였다. 여기서 Base"는 NH₂-γLys(Z)-base-OMe이다.

[240]

[241] [실시예 12] PNA 삼량체 1를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-ATC TCG TAT-H)의 제조

[242] MBHA 레진(100-200 mesh, Novabiochem)을 DCM(1,2-디클로로에탄)에서 30분간 swelling 하였다. 5% DIEA/DMF 용액으로 Swelling 된 MBHA 레진의 아민기를 활성화(free amine)한 후 DMF로 3회 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 MBHA의 아민 작용기 1당량에 대해 3 당량의 PNA 삼량체(TAT)를 DMF 및 DCE(2:1 부피비)에 녹여 첨가한 후 HATU 및 PyBop(1:1 당량비)를 혼합용매 총중량에 대해 5중량%가 되도록 DIEA를 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하였다. 반응이 완료된 후 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거한 후 5% TFA/DCM 용액을 투입하여 Boc 보호기를 탈 보호화한 후 다시 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 상기와 동일하게 각각의 삼량체 TCG, ATC를 DMF 및 DCE(2:1 부피비)에 녹여 첨가한 후 HATU 및 PyBop(1:1 당량비)를 DIEA에 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하는 단계를 각각 반복하여 9개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.

[243] 이후 TFMSA/TFA/m-cresol (2:8:1) 용액을 투입하여 상온에서 2시간동안 탈레진화 반응을 진행한 후 반응용액을 여과하였다. 이후 TFA로 레진을 세척하고 여과액과 세척액을 합하고 여기에 Diethyl ether를 투입하여 탈레진된 올리고머를 침전시켰다. 원심분리를 이용하여 상층액을 제거하고 남은 침전물을 Diethyl ether로 세척하고 건조하여 9개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.

[244] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정하였다.

[245] 삼량체를 이용하여 9mer PNA 올리고 합성 시 Crude purity 91.98%로, 고순도의 PNA 올리고머를 합성 할 수 있음을 확인 할 수 있다.

[246]

[247] [비교예 1] PNA 단량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-ATC TCG TAT-H)의 제조

- [248] PNA 단량체를 이용한 PNA 올리고머 NH₂-ATC TCG TAT-H는 Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2002 Aug;Chapter 4:Unit 4.11. 과 동일한 방법으로 제조하였다.
- [249] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정한 결과, Crude purity 63.31%로, 본 발명의 실시예 12에서 제조된 PNA 올리고머와 대비하여 확연히 낮은 순도를 가짐을 알 수 있다.
- [250]
- [251] [실시예 13] PNA 삼량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-TAT ATC TCG TAT-H)의 제조
- [252] 실시예 12에서 PNA 삼량체의 종류를 달리한 것을 제외하고는 실시예 12와 동일하게 실시하여 목적하는 PNA 올리고머를 제조하였다.
- [253] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정하였다.
- [254] 삼량체를 이용하여 12mer PNA 올리고머 합성 시 Crude purity 80.01%로, 고순도의 PNA 올리고머를 합성 할 수 있음을 확인 할 수 있다.
- [255]
- [256] [비교예 2] PNA 단량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-TAT ATC TCG TAT-H)의 제조
- [257] 비교예 1에서 PNA 단량체의 종류를 달리한 것을 제외하고는 비교예 1과 동일하게 실시하여 목적하는 PNA 올리고머를 제조하였다.
- [258] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정하였으며, 그 결과 Crude purity 46.59%로, 본 발명의 실시예 13에서 제조된 PNA 올리고머와 대비하여 확연히 낮은 순도를 가짐을 알 수 있다.
- [259]
- [260] [실시예 14] PNA 삼량체 및 이량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-GGT-TCC-G"TG-CA-ACA-TC-H)의 제조
- [261] 실시예 12에서 PNA 삼량체 및 이량체의 종류를 달리한 것을 제외하고는 실시예 12와 동일하게 실시하여 목적하는 PNA 올리고머를 제조하였다.
- [262] 제조된 PNA 올리고머의 HPLC를 측정하였으며, 그 결과 Crude purity 71.5 %의 순도를 가짐을 알 수 있다.
- [263]
- [264] [실시예 15] PNA 삼량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-TCC TTA G T'G G T'G TCC-H)의 제조
- [265] 실시예 12에서 PNA 삼량체 및 이량체의 종류를 달리한 것을 제외하고는 실시예 12와 동일하게 실시하여 목적하는 PNA 올리고머를 제조하였다. 단 9mer 대신 12mer PNA 올리고머 합성한 후 반응액 일부를 취하여 탈레진화 반응을

진행하여 12mer PNA 올리고머를 제조하였고, 12mer PNA 올리고머의 일부는 PNA 삼량체를 이용하여 15mer PNA 올리고머를 제조하였다.

- [266] 각각 상기에서 제조된 12mer PNA 올리고머와 15mer PNA 올리고머 혼합용액을 이용하여 HPLC 분석을 실시하였다. 도 1에서 보이는 바와 같이 제조된 15 mer PNA 올리고머는 부산물인 12개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머와 보유시간(retention time)의 차이가 커 분리가 용이하기 때문에 대용량 합성시 정제가 용이함을 알 수 있다.
- [267] 즉, 본 발명의 삼량체를 이용한 PNA oligomer 합성시 발생될 수 있는 12mer PNA 부산물의 정제는 용이하지만, 단량체를 이용한 PNA oligomer 합성 시 발생될 수 있는 부산물인 14mer, 13mer oligomer의 정제는 용이하지 않음을 알 수 있다.
- [268]
- [269] [실시예 16] PNA 사량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AATA" G" TAA-H)의 제조
- [270] MBHA 레진(100-200 mesh, Novabiochem)을 DCM에서 30분간 swelling 하였다. 5% DIEA/DMF 용액으로 Swelling 된 MBHA 레진의 아민기를 활성화(free amine)한 후 DMF로 3회 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 3 당량의 PNA 사량체(G" TAA)를 DMF에 녹여 첨가한 후 HATU와 DIEA를 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하였다. 반응이 완료된 후 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거한 후 5% TFA/DCM 용액을 투입하여 Boc 보호기를 탈 보호화한 후 다시 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 사량체(AATA")를 DMF에 녹여 첨가한 후 HATU와 DIEA를 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하는 단계를 각각 반복하여 8개의 핵산염기(ATC TCG TAT)를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.
- [271] 이후 TFMSA/TFA/m-cresol (2:8:1) 용액을 투입하여 상온에서 2시간동안 탈레진화 반응을 진행한 후 반응용액을 여과하였다. 이후 TFA로 레진을 세척하고 여과액과 세척액을 합하고 여기에 Diethyl ether를 투입하여 탈레진된 올리고머를 침전시켰다. 원심분리를 이용하여 상층액을 제거하고 남은 침전물을 Diethyl ether로 세척하고 건조하여 8개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.
- [272] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정하였다.
- [273] 사량체를 이용하여 8mer PNA 올리고머는 Crude purity가 39.3%이었다.
- [274]
- [275] [실시예 17] PNA 사량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AATA" G" TAA-H)의 제조
- [276] 실시예 16에서 PNA 사량체를 녹인 용매를 DMF 대신 DMF(dimethylformamide) 및 DCE(1,2- Dichloroethylene)를 2:1의 부피비로 혼합한 용액에

DIEA(N,N-Diisopropylethylamine)를 첨가하여 DIEA가 5중량% 포함되도록 한 혼합용매를 사용한 것을 제외하고는 실시예 16과 동일하게 실시하여 8mer PNA 올리고머를 제조하였으며, 제조된 PNA 올리고머의 Crude purity가 61.8%이었다.

[277]

[278] [실시예 18] 본 발명의 PNA 사량체, 삼량체 및 이량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AACC"/C"AT/T"A-H)의 제조

[279] MBHA 레진(100-200 mesh, Novabiochem)을 DCM에서 30분간 swelling 하였다. 5% DIEA/DMF 용액으로 Swelling 된 MBHA 레진의 아민기를 활성화(free amine)한 후 DMF로 3회 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 MBHA의 아민 작용기 1당량에 대해 3 당량의 PNA 이량체(T"A)를 DMF 및 DCE(2:1 부피비)에 녹여 첨가한 후 HATU 및 PyBop(1:1 당량비)를 혼합용매 총중량에 대해 5중량%가 되도록 DIEA를 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하였다. 반응이 완료된 후 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거한 후 5% TFA/DCM 용액을 투입하여 Boc 보호기를 탈 보호화한 후 다시 DMF로 3차례 세척하여 불순물을 제거하였다. 여기에 상기와 동일하게 삼량체(C"AT) 및 사량체 AACC" 각각을 DMF 및 DCE(2:1 부피비)에 녹여 첨가한 후 HATU 및 PyBop(1:1 당량비)를 DIEA에 투입하여 3시간 동안 상온에서 커플링 반응을 진행하는 단계를 각각 반복하여 9개의 핵산염기(ATC TCG TAT)를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.

[280] 이후 TFMSA/TFA/m-cresol (2:8:1) 용액을 투입하여 상온에서 2시간동안 탈레진화 반응을 진행한 후 반응용액을 여과하였다. 이후 TFA로 레진을 세척하고 여과액과 세척액을 합하고 여기에 Diethyl ether를 투입하여 탈레진된 올리고머를 침전시켰다. 원심분리를 이용하여 상층액을 제거하고 남은 침전물을 Diethyl ether로 세척하고 건조하여 9개의 핵산염기를 가지는 PNA 올리고머를 제조하였다.

[281] 제조된 crude PNA 올리고머의 HPLC(waters 1525 Binary hplc pump, 5% MeCN 20% for 20mins 95% for 30mins)로 Crude purity를 측정하였다.

[282] 사량체를 이용하여 8mer PNA 올리고머는 Crude purity가 33.8%이었다.

[283]

[284] [실시예 19] 본 발명의 PNA 4량체, 삼량체 및 이량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AACC"/C"AT/T"A-H)의 제조

[285] 실시예 18에서 커플링 시약을 PyBop(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 18과 동일하게 실시하여 9mer PNA 올리고머를 제조하였으며, 제조된 PNA 올리고머의 Crude purity가 70.9%이었다.

[286]

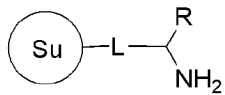
[287] [실시예 20] PNA 4량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AATA" G"TAA-H)의 제조

- [288] 실시예 18에서 커플링 시약을 *N,N,N',N'*-Tetramethyl- *O*-(1 *H* -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate(HBTU) 0.3당량 및 PyBop(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) 0.9당량을 사용한 것을 제외하고는 실시예 18과 동일하게 실시하여 9mer PNA 올리고머를 제조하였으며, 제조된 PNA 올리고머의 Crude purity가 76.3%이었다.
- [289]
- [290] [실시예 21] PNA 4량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AATA" G"TAH-H)의 제조
- [291] 실시예 18에서 커플링 시약을 *N,N,N',N'*-Tetramethyl- *O*-(1 *H* -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate(HBTU) 0.5당량 및 PyBop(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) 0.7당량을 사용한 것을 제외하고는 실시예 18과 동일하게 실시하여 8mer PNA 올리고머를 제조하였으며, 제조된 PNA 올리고머의 Crude purity가 88.3%이었다.
- [292]
- [293] [실시예 22] PNA 4량체를 이용한 PNA 올리고머(NH₂-AATA" G"TAH-H)의 제조
- [294] 실시예 18에서 커플링 시약으로 EDC((1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 18과 동일하게 실시하여 8mer PNA 올리고머를 제조하였으며, 제조된 PNA 올리고머의 Crude purity가 25 %이었다.
- [295] 실시예 16 및 17에서 보이는 바와 같이 클로로화(C1-C4)알칸, DMF, 및 DIEA의 혼합용매를 사용한 경우 보다 높은 순도로 PNA 올리고머를 얻을 수 있음을 알 수 있다.
- [296] 또한 실시예 18 내지 실시예 22에서 보이는 바와 같이 커플링 시약을 혼합하여 사용함으로써 얻어지는 PNA 올리고머의 순도가 높아짐을 알 수 있으며, 특히 HBTU : PyBop의 사용량은 1: 1 내지 3의 당량비로 사용함으로써 극히 높은 순도를 가진 PNA 올리고머를 제조할 수 있음을 알 수 있다.

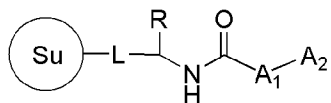
청구범위

- [청구항 1] a) 하기 화학식 1로 표시되는 구조체에 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체를 결합시켜 하기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체를 제조하는 단계 및
- b) 상기 화학식 2 내지 4로 표시되는 구조체에 제2 PNA 이량체, 제 2 삼량체 PNA 또는 제2 사량체 PNA를 결합시켜 하기 화학식 5, 화학식 6 또는 화학식 7로 표시되는 PNA 올리고머를 제조하는 단계를 포함하는 PNA 올리고머의 제조방법.

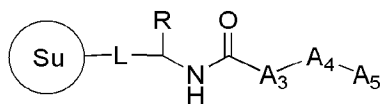
[화학식 1]



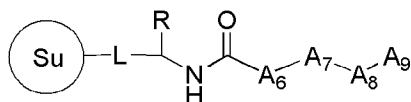
[화학식 2]



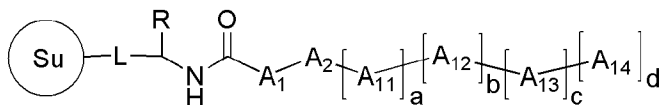
[화학식 3]



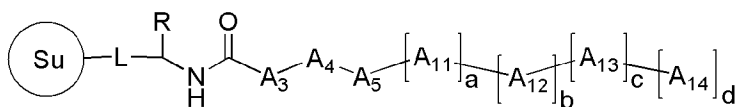
[화학식 4]



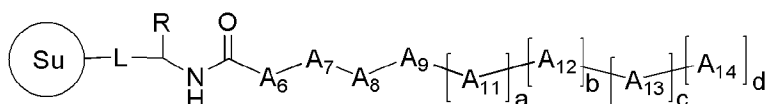
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



(상기 화학식 1 내지 7에서,

Su는 지지체이며,

L 및 R은 서로 독립적으로 하이드로카빌 또는 헤테로하이드로카빌이며;

A₁ 내지 A₉ 및 A₁₁ 내지 A₁₄는 서로 독립적으로 서로 상이하거나 동일한

핵산염기를 포함하는 PNA 단량체이며

a 및 b는 서로 독립적으로 1의 정수이며, c 및 d는 서로 독립적으로 0 또는 1의 정수이다.)

- [청구항 2] 제 1항에 있어서
상기 제조방법은
A)상기 화학식 1로 표시되는 구조체에 아민기가 보호화된 제1 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제1 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제1 PNA 사량체를 결합시켜 생성물을 얻는 단계;
B)상기 단계에서 얻어진 생성물의 아민기를 탈보호화시켜 탈보호화된 아민 생성물을 제조하는 단계; 및
C)상기 탈보호화된 아민 생성물에 아민기가 보호화된 제2 PNA 이량체, 아민기가 보호화된 제2 PNA 삼량체 또는 아민기가 보호화된 제2 PNA 사량체를 결합시키는 단계;를 포함하는 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서
상기 B)단계 및 C)단계를 반복수행하는 단계를 더 포함하는 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서
상기 PNA 올리고머는 4개 이상의 핵산염기를 포함하는 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서
상기 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체 또는 제1 PNA 사량체는 상기 화학식 1의 아민 작용기 1당량에 대해 2 내지 5당량이 사용되는 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서
상기 b)단계의 결합은 HBTU 및 PyBop를 이용한 커플링 반응으로 수행되는 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서
상기 HBTU : PyBop의 사용량은 1: 1 내지 3의 당량비로 사용되는 것인 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 b)단계의 결합은 클로로화(C1-C4)알칸, DMF, 및 DIEA의 혼합용매에서 수행되는 것인 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 클로로화(C1-C4)알칸은 트리클로로메탄, 디클로로메탄, 클로로메탄, 1,1,2-트리클로로에탄, 1,1,1-트리클로로에탄, 1,2-디클로로에탄, 1,1-디클로로에탄 및 클로로에탄에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 PNA 올리고머의 제조방법.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서,

상기 혼합용매는 혼합용매총중량에 대하여 DIEA가 1 내지 10중량%로 포함되는 것인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 혼합용액은 클로로화(C1-C4)알칸 : DMF의 부피비가 1: 1 내지 2인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 12] 제 1항에 있어서
상기 제1 PNA 이량체는 제2 PNA 이량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며,
상기 제1 PNA 삼량체는 제2 PNA 삼량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하며,
제1 PNA 사량체는 제2 사량체와 동일하거나 상이한 핵산염기를 포함하는 것인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 13] 제 12항에 있어서
상기 핵산염기는 아데닌, 시토신, 5-메틸시토신, 구아닌, 티민,우라실, 푸린, 2,6-디아미노푸린, N⁴N⁴-에타노시토신, N⁶N⁶-에타노-2,6-디아미노푸린, 5-(C3-C6)-알킬닐우라실, 5-(C3-C6)-알킬닐-시토신, 5-(1-프로파길아미노)우라실, 5-(1-프로파길아미노)시토신, 폐녹사진, 9-아미노에톡시폐녹사진, 5-플루오로우라실, 슈도이소시토신, 5-(하이드록시메틸)우라실, 5-아미노우라실, 슈도우라실, 디하이드로우라실, 5-(C1-C6)-알킬우라실, 5-(C1-C6)-알킬-시토신, 5-(C2-C6)-알케닐시토신, 5-플루오로시토신, 5-클로로우라실, 5-클로로시토신, 5-브로로우라실, 5-브로모시토신, 7-테아자아데닌, 7-테아자구아닌, 8-아자푸린, 7-테아자-7-치환된푸린, 사이오우라실 또는 인공핵산염기인 PNA 올리고머의 제조방법.

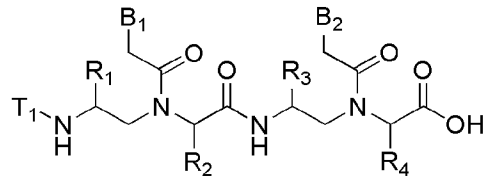
[청구항 14] 제 12항에 있어서
상기 핵산염기는 하나이상의 아민 보호기를 가지는 것인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 15] 제 13항에 있어서
상기 보호기는 플루오레닐메톡시카보닐, 3급-부틸옥시카보닐, 벤질옥시카보닐, Bhoc(Benzhydryloxycarbonyl), acetyl, benzoyl, benzyl, Carbamate, p-Methoxybenzyl, 3,4-Dimethoxybenzyl, p-methoxyphenyl, Tosyl, trichloroethyl chloroformate, Sulfonamides 또는 isobutyryl인 PNA 올리고머의 제조방법.

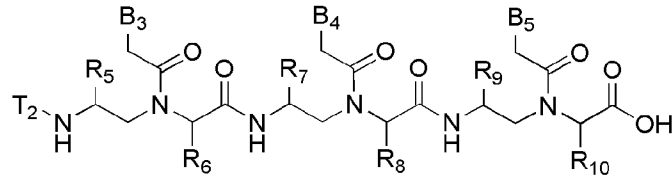
[청구항 16] 제 1항에 있어서
상기 제1 PNA 이량체 또는 제2 PNA 이량체는 하기 화학식 11로 표시되며,
상기 제1 PNA 삼량체 또는 제2 PNA 삼량체는 하기 화학식 12로 표시되며,

상기 제1 PNA 사량체 또는 제2 PNA 사량체는 하기 화학식 13으로 표시되는 PNA 올리고머의 제조방법.

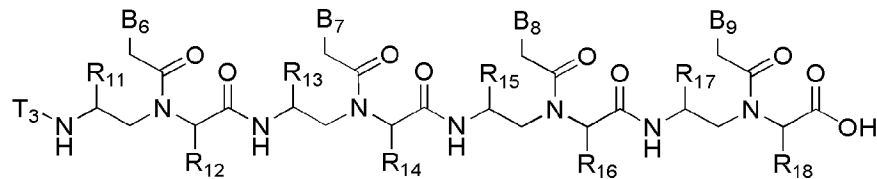
[화학식 11]



[화학식 12]



[화학식 13]



(상기 화학식 11 내지 13에서

R_1 내지 R_{18} 는 서로 독립적으로 수소, 아미노산의 잔기 또는 치환기를 가지는 아미노산 잔기이며;

T_1 내지 T_3 은 서로 독립적으로 아민 보호기이며;

B_1 내지 B_9 는 서로 독립적으로 아민 보호기를 포함하거나 포함하지 않은 핵산염기이다.)

[청구항 17] 제 1항에 있어서

상기 제1 PNA 이량체, 제1 PNA 삼량체, 제2 PNA 삼량체, 제1 PNA 사량체 및 제2 PNA 사량체는 용액공정하 또는 고체상으로부터 제조된 것인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 18] 제 1항에 있어서

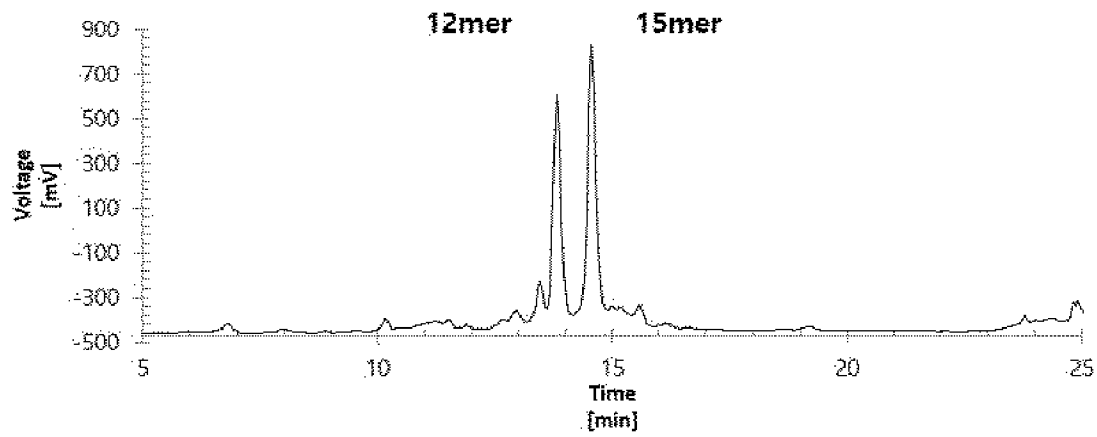
상기 지지체는 메틸벤즈히드릴아민, 폴리스틸렌을 클로로메틸화한 수지, 4-히드록시벤질알코올로 변형된 Merrifield 수지, Boc-아미노산-링커를 결합시킨 아미노메틸수지, N-Fmoc-N-메톡시-링커를 결합시킨 아미노메틸수지, 폴리스틸렌에 p-니트로벤조페논옥심을 결합시킨 수지 또는 폴리스틸렌을 이용하여 트리틸화한 수지인 PNA 올리고머의 제조방법.

[청구항 19] 제 1항에 있어서

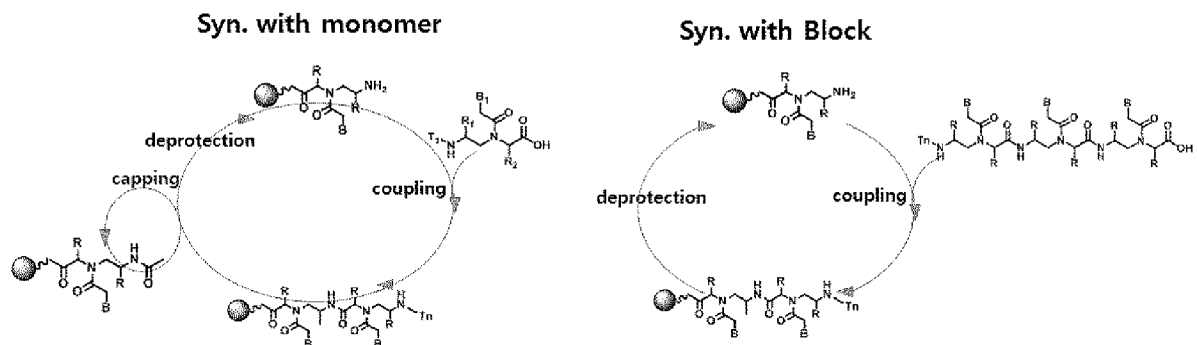
상기 제조방법은 제조된 PNA 올리고머의 핵산염기의 수가 n 인 경우 $n-1$ 및 $n-2$ 의 핵산염기의 수를 가지는 PNA 올리고머의 불순물이 존재하지

않는 것을 특징으로 하는 PNA 올리고머의 제조방법.

[도1]



[도2]



15mer 합성 예시: cycle number

Coupling cycle	Syn. with monomer (기존 제조공정)	Syn. with trimer (block 제조공정)
deprotection	x15	x5
coupling	x15	x5
capping	x15	-
resin cleavage	1	1
	46 step	11 step

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/007823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i, C07K 1/06(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)

C07K 14/00; C07D 417/12; C12Q 1/68; C07K 1/06

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 (Registry, Casreact) & Keywords: oligomer, peptide nucleic acid(PNA)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2003-0084444 A (PANAGENE INC.) 01 November 2003 See pages 38-9, 38-12, 38-13, 38-14, 38-19, 38-20; example 30; and claims 1, 3, 14; figure 1; and table 2.	1-19
A	US 2004-0137469 A1 (CASALE, R. A. et al.) 15 July 2004 See abstract; and claims 1-74.	1-19
A	PRITZ, S. et al. Modification of guanine residues in PNA-synthesis by PyBOP. Tetrahedron Letters. 2006, vol. 47, pages 5893-5896 See abstract; page 5893; and figures 1, 2.	1-19
A	XU, P. et al. Synthesis of PNA Monomers and Dimers by Ugi Four-Component Reaction. Synthesis. 2003, vol. 8, pages 1171-1176 See abstract; and formula 1.	1-19
A	CARTER, J. D. et al. Coupling Strategies for the Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates for Patterned Synthetic Biomaterialization. Journal of Nucleic Acids. 2011, vol. 2011, Article ID 926595, inner pages 1-8 See the entire document.	1-19



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

04 OCTOBER 2019 (04.10.2019)

Date of mailing of the international search report

04 OCTOBER 2019 (04.10.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007823

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2003-0084444 A	01/11/2003	AT 453631 T	15/01/2010
		AU 2003-223014 A1	10/11/2003
		CN 100347161 C	07/11/2007
		CN 1659153 A	24/08/2005
		DE 60330766 D1	11/02/2010
		DK 1501812 T3	22/03/2010
		DK 2174936 T3	04/11/2013
		EP 1501812 A1	02/02/2005
		EP 1501812 B1	30/12/2009
		EP 2174936 A1	14/04/2010
		EP 2174936 B1	04/09/2013
		JP 2005-536459 A	02/12/2005
		JP 2009-143937 A	02/07/2009
		JP 4417728 B2	17/02/2010
		JP 4927105 B2	09/05/2012
		KR 10-0555204 B1	03/03/2006
		KR 10-0633010 B1	11/10/2006
		KR 10-2004-0062611 A	07/07/2004
		US 2003-0225252 A1	04/12/2003
		US 2005-0250785 A1	10/11/2005
		US 2005-0250786 A1	10/11/2005
		US 2005-0283005 A1	22/12/2005
		US 2006-0003374 A1	05/01/2006
		US 2006-0008835 A1	12/01/2006
		US 2006-0030709 A1	09/02/2006
		US 6969766 B2	29/11/2005
		US 7125994 B2	24/10/2006
		US 7145006 B2	05/12/2006
		US 7179896 B2	20/02/2007
		US 7371859 B2	13/05/2008
		US 7371860 B2	13/05/2008
		US 7411065 B2	12/08/2008
		WO 03-091231 A1	06/11/2003
US 2004-0137469 A1	15/07/2004	AT 449103 T	15/12/2009
		AU 2003-273298 A1	29/03/2004
		AU 2003-273298 B2	06/03/2008
		CA 2495895 A1	18/03/2004
		DE 60330182 D1	31/12/2009
		DK 1575990 T3	25/01/2010
		EP 1575990 A2	21/09/2005
		EP 1575990 B1	18/11/2009
		EP 2161276 A2	10/03/2010
		EP 2161276 A3	26/05/2010
		JP 2006-517386 A	27/07/2006
		JP 2010-279375 A	16/12/2010
		JP 4588451 B2	01/12/2010
		US 2003-0098497 A1	29/05/2003
		US 2003-0102531 A1	05/06/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/007823

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2003-0132470 A1	17/07/2003
		US 2004-0046198 A1	11/03/2004
		US 2004-0089920 A1	13/05/2004
		US 2004-0101977 A1	27/05/2004
		US 2004-0129961 A1	08/07/2004
		US 2004-0142355 A1	22/07/2004
		US 2004-0232468 A1	25/11/2004
		US 2006-0194348 A1	31/08/2006
		US 2010-0190660 A1	29/07/2010
		US 6743643 B2	01/06/2004
		US 6781184 B2	24/08/2004
		US 6815223 B2	09/11/2004
		US 7064374 B2	20/06/2006
		US 7075134 B2	11/07/2006
		US 7187079 B2	06/03/2007
		US 7459318 B2	02/12/2008
		WO 03-049147 A2	12/06/2003
		WO 03-049147 A3	11/12/2003
		WO 2004-022578 A2	18/03/2004
		WO 2004-022578 A3	11/05/2006
		WO 2004-049441 A2	10/06/2004
		WO 2004-049441 A3	02/09/2004
		WO 2004-066307 A2	05/08/2004
		WO 2004-066307 A3	23/09/2004
		WO 2005-010891 A1	03/02/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/00(2006.01)i, C07K 1/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/00; C07D 417/12; C12Q 1/68; C07K 1/06

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 내부검색 시스템), STN (Registry, Casreact) & 키워드: 올리고머 (oligomer), 펩티드핵산 (PNA)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2003-0084444 A (주식회사 파나진) 2003.11.01 페이지 38-9, 38-12, 38-13, 38-14, 38-19, 38-20; 실시예 30; 및 청구항 1, 3, 14; 도면 1; 및 표 2 참조.	1-19
A	US 2004-0137469 A1 (CAsALE, R. A. 등) 2004.07.15 요약; 및 청구항 1-74 참조.	1-19
A	PRITZ, S. 등, "Modification of guanine residues in PNA-synthesis by PyBOP", Tetrahedron Letters, 2006, 47권, 페이지 5893-5896 초록; 페이지 5893; 및 도면 1, 2 참조.	1-19
A	XU, P. 등, "Synthesis of PNA monomers and dimers by Ugi four- component reaction", Synthesis, 2003, 8권, 페이지 1171-1176 초록; 및 도식 1 참조.	1-19
A	CARTER, J. D 등, "Coupling strategies for the synthesis of peptide- oligonucleotide conjugates for patterned synthetic biomineralization", Journal of Nucleic Acids, 2011, 2011권, 아티클 ID 926595, 내부 페이지 1-8 전문 참조.	1-19

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에
공개된 선출원 또는 특허 문헌“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일
또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지
않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된
문헌“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신
규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과
조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명
은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 04일 (04.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 04일 (04.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

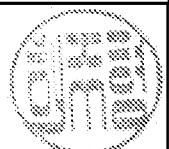
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2003-0084444 A	2003/11/01	AT 453631 T	2010/01/15
		AU 2003-223014 A1	2003/11/10
		CN 100347161 C	2007/11/07
		CN 1659153 A	2005/08/24
		DE 60330766 D1	2010/02/11
		DK 1501812 T3	2010/03/22
		DK 2174936 T3	2013/11/04
		EP 1501812 A1	2005/02/02
		EP 1501812 B1	2009/12/30
		EP 2174936 A1	2010/04/14
		EP 2174936 B1	2013/09/04
		JP 2005-536459 A	2005/12/02
		JP 2009-143937 A	2009/07/02
		JP 4417728 B2	2010/02/17
		JP 4927105 B2	2012/05/09
		KR 10-0555204 B1	2006/03/03
		KR 10-0633010 B1	2006/10/11
		KR 10-2004-0062611 A	2004/07/07
		US 2003-0225252 A1	2003/12/04
		US 2005-0250785 A1	2005/11/10
		US 2005-0250786 A1	2005/11/10
		US 2005-0283005 A1	2005/12/22
		US 2006-0003374 A1	2006/01/05
		US 2006-0008835 A1	2006/01/12
		US 2006-0030709 A1	2006/02/09
		US 6969766 B2	2005/11/29
		US 7125994 B2	2006/10/24
		US 7145006 B2	2006/12/05
		US 7179896 B2	2007/02/20
		US 7371859 B2	2008/05/13
		US 7371860 B2	2008/05/13
		US 7411065 B2	2008/08/12
		WO 03-091231 A1	2003/11/06
US 2004-0137469 A1	2004/07/15	AT 449103 T	2009/12/15
		AU 2003-273298 A1	2004/03/29
		AU 2003-273298 B2	2008/03/06
		CA 2495895 A1	2004/03/18
		DE 60330182 D1	2009/12/31
		DK 1575990 T3	2010/01/25
		EP 1575990 A2	2005/09/21
		EP 1575990 B1	2009/11/18
		EP 2161276 A2	2010/03/10
		EP 2161276 A3	2010/05/26
		JP 2006-517386 A	2006/07/27
		JP 2010-279375 A	2010/12/16
		JP 4588451 B2	2010/12/01
		US 2003-0098497 A1	2003/05/29
		US 2003-0102531 A1	2003/06/05

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2003-0132470 A1	2003/07/17
		US 2004-0046198 A1	2004/03/11
		US 2004-0089920 A1	2004/05/13
		US 2004-0101977 A1	2004/05/27
		US 2004-0129961 A1	2004/07/08
		US 2004-0142355 A1	2004/07/22
		US 2004-0232468 A1	2004/11/25
		US 2006-0194348 A1	2006/08/31
		US 2010-0190660 A1	2010/07/29
		US 6743643 B2	2004/06/01
		US 6781184 B2	2004/08/24
		US 6815223 B2	2004/11/09
		US 7064374 B2	2006/06/20
		US 7075134 B2	2006/07/11
		US 7187079 B2	2007/03/06
		US 7459318 B2	2008/12/02
		WO 03-049147 A2	2003/06/12
		WO 03-049147 A3	2003/12/11
		WO 2004-022578 A2	2004/03/18
		WO 2004-022578 A3	2006/05/11
		WO 2004-049441 A2	2004/06/10
		WO 2004-049441 A3	2004/09/02
		WO 2004-066307 A2	2004/08/05
		WO 2004-066307 A3	2004/09/23
		WO 2005-010891 A1	2005/02/03