

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 8월 16일 (16.08.2018) WIPO | PCT

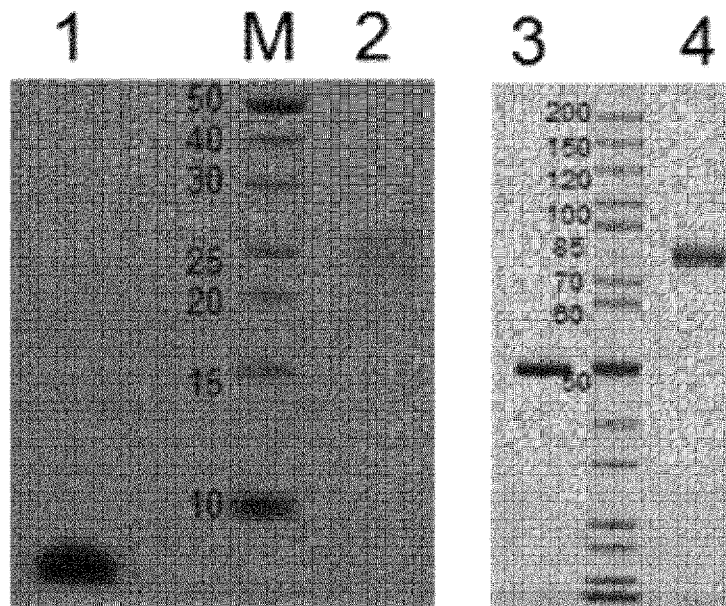


(10) 국제공개번호
WO 2018/147641 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 47/68 (2017.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/001660
- (22) 국제출원일: 2018년 2월 7일 (07.02.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0016916 2017년 2월 7일 (07.02.2017) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박수연 (PARK, Su Yeon); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 김대진 (KIM, Dae Jin); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정용규 (JUNG, Yong Gyu); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 윤현식 (YUN, Hyun Sik); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 리앤록 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, 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, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: NON-PEPTIDIC POLYMERIC LINKER COMPOUND, CONJUGATE COMPRISING SAME LINKER COMPOUND, AND METHODS FOR PREPARING SAME LINKER COMPOUND AND CONJUGATE

(54) 발명의 명칭: 비펩티드성 중합체 링커 화합물, 그 링커 화합물을 포함하는 결합체, 및 이들의 제조방법



(57) Abstract: One aspect of the present invention provides a compound in which a functional group capable of binding to a globulin Fc region or a physiologically active polypeptide is introduced at one end of a non-peptidic polymer and a functional group capable of a click reaction is introduced at the other end; a polypeptide conjugate in which a physiologically active polypeptide binds to one end of the compound; a physiologically active polypeptide conjugate in which a physiologically active polypeptide and an immunoglobulin Fc region bind to both ends thereof by using the compound as a linker; and methods for preparing the same compound, polypeptide conjugate, and physiologically active polypeptide conjugate.



WO 2018/147641 A1

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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명이 일 양상은 비펩티드성 중합체의 일 말단에 글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기가 도입되고, 다른 일 말단에 클리반응 가능한 작용기가 도입된 화합물; 생리활성 폴리펩티드가 상기 화합물의 일 말단에 결합된 폴리펩티드 연결체; 생리활성 폴리펩티드 및 면역 글로불린 Fc 영역이 상기 화합물을 링커로 하여 양 말단에 결합된, 생리활성 폴리펩티드 결합체; 및 이들의 제조방법을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 비펩티드성 중합체 링커 화합물, 그 링커 화합물을 포함하는 결합체, 및 이들의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 비펩티드성 중합체 화합물, 그 화합물을 포함하는 결합체, 및 이들의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 생리활성 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위한 링커로서 사용될 수 있는 비펩티드성 중합체 화합물, 그 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드가 연결된 결합체, 및 이들의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 단백질 약물은 인체에 투여 시 혈중 반감기가 짧아 약효를 유지하기 위해 자주 투여해야 하는 번거로움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로서 단백질 약물의 혈중 반감기를 증가시키기 위한 목적으로 폴리에틸렌 글리콜을 단백질 약물과 결합시키는 폐길화(pegylation)가 이용되고 있다. 이러한 폐길화에 의해 단백질 약물의 혈중 반감기가 증가될 뿐만 아니라, 단백질 약물의 항원성이 감소될 수도 있어 단백질 치료제 측면에서 널리 사용되고 있다.
- [3] 상기 폴리에틸렌 글리콜은 단백질 약물과 결합하는 작용기(functional group) 이외에도, 단백질 약물의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 면역 글로불린 Fc 영역을 결합하기 위한 작용기를 추가로 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 형태를 가져, 단백질 약물 및 면역 글로불린 Fc 영역을 결합하는 링커로서 사용될 수 있다. 또한, 단백질 약물 및 면역 글로불린 Fc 영역의 링커 화합물로서 상기 폴리에틸렌 글리콜 유도체 이외에도 생체 적합성을 갖는 다양한 비펩티드성 중합체가 단백질 약물과 함께 결합체를 형성할 수 있는 링커로서의 사용가능성이 제기된 바 있다(특허문헌 1).
- [4] 상기 비펩티드성 중합체는 단백질 약물 및 면역 글로불린 Fc와 결합하기 위해 양 말단에 각각 독립적으로 작용기로서 알데히드기, 프로피온 알데히드기, 부틸 알데히드기, 말레이미드(maleimide)기, 석신이미드(succinimide) 유도체(석시니미딜 프로피오네이트, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트) 등을 가질 수 있다.
- [5] 그런데, 상기 작용기는 단백질 약물과 결합시 결합을 원하는 단백질의 특정 아미노산 위치로의 반응에 있어서 반응에 투입된 전체 물질이 결합체로서 변환되지 못하는 이유로 결합체 제조 수율이 감소되는 단점이 있고, 일부 반응기의 경우는 혈중에서 안정성이 감소되는 단점이 있는 것으로 알려져 있다.
- [6] (특허문헌 1) 한국특허공개 2014-0018462

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 일 양상은 생리활성 폴리펩티드와 안정적으로 결합하여 생리활성 폴리펩티드의 혈중 반감기를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 높은 수율로 결합할 수 있는 비펩티드성 중합체 화합물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 일 양상은 생리활성 폴리펩티드가 상기 비펩티드성 중합체 화합물의 일 말단에 결합된, 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 일 양상은 생리활성 폴리펩티드 및 면역 글로불린 Fc 영역이 상기 비펩티드성 중합체 화합물의 양 말단에 결합된, 생리활성 폴리펩티드 결합체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 비펩티드성 중합체 화합물, 생리활성 폴리펩티드 연결체, 및 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 일 양상은
- [12] 비펩티드성 중합체의 일 말단에 면역 글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기가 도입되고, 다른 일 말단에 클릭반응 가능한 작용기가 도입된 화합물을 제공한다.
- [13] 상기 화합물은 하기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함한다:
- [14] [화학식 1]
- [15] R1-비펩티드성 중합체-X-R2
- [16] 상기 화학식 1에서,
- [17] R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀ 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;
- [18] 비펩티드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)), PLGA(poly(lactic-glycolic acid)), 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 및 다당류(polysaccharide)로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [19] X는 -(CH₂)_jNHCO- 또는 -(CH₂)_jNHCS- 이며, 여기에서 j는 0 내지 6의 정수이고;
- [20] R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고,
- [21] 여기에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고,
- [22] Z는 O 또는 S이고,
- [23] Y는 C₂-C₆알킬일, 시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는 디아릴헤테로시클로알킬일이고(여기서, 각각의

시클로알킨일은 3 내지 8개의 탄소원자를 갖고, 각각의 아릴은 5 내지 8개의 탄소원자를 가지며, 각각의 헤테로시클로알킨일은 3 내지 8개의 원자를 포함하고, 고리 원자 중 1 내지 3개에 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 포화된 고리이다),

- [24] k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며,
- [25] 상기 알킨일, 시클로알킨일, 아릴시클로알킨일, 디아릴시클로알킨일, 헤테로시클로알킨일, 또는 디아릴헤테로시클로알킨일은 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 알콕시카르보닐, 옥소, 또는 할로젠으로 치환 또는 비치환될 수 있다.
- [26] 본 발명의 다른 일 양상은
- [27] 비펩티드성 중합체의 일 말단에 클릭반응 가능한 작용기를 도입하는 단계; 및
- [28] 상기 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에 면역 글로불린 Fc 영역 혹은 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기를 도입하는 단계를 포함하는, 상기 본 발명의 일 양상에 따른 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 클릭반응 가능한 작용기에 생리활성 폴리펩티드가 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제공한다.
- [30] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 클릭반응 가능한 작용기에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 것인 면역글로불린 Fc 영역 연결체를 제공한다.
- [31] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 제공한다.

발명의 효과

- [32] 본 발명의 일 양상에 따른 화합물은 종래 링커 화합물에 비해 생리활성 폴리펩티드의 원하는 위치에 안정적으로 결합시킬 수 있을 뿐만 아니라, 결합체를 보다 높은 생산 수율과 안정성을 갖도록 형성시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 일 실시예에 따른 링커 화합물 6(MW=10000)의 1H NMR 결과이다.
- [34] 도 2는 일 실시예에 따른 링커 화합물 6(MW=5000)의 1H NMR 결과이다.
- [35] 도 3은 일 실시예에 따른 링커 화합물 6(MW=3400)의 1H NMR 결과이다.
- [36] 도 4는 일 실시예에 따른 링커 화합물 6(MW=2000)의 1H NMR 결과이다.
- [37] 도 5는 일 실시예에 따른 링커 화합물 9(MW=10000)의 1H NMR 결과이다.
- [38] 도 6은 일 실시예에 따른 링커 화합물 14(MW=10000)의 1H NMR 결과이다.
- [39] 도 7은 일 실시예에 따른 링커 화합물 16(MW=10000)의 1H NMR 결과이다.
- [40] 도 8은 링커 화합물 ALD-PEG 10K-DBCO의 질량 분석 결과이다.
- [41] 도 9는 링커 화합물 ALD-PEG 5K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

- [42] 도 10은 링커 화합물 ALD-PEG 3.4K-DBCO의 질량 분석 결과이다.
- [43] 도 11은 링커 화합물 ALD-PEG 2K-DBCO의 질량 분석 결과이다.
- [44] 도 12는 링커 화합물 PeALD-PEG 10K-BCN의 질량 분석 결과이다.
- [45] 도 13은 링커 화합물 PeALD-PEG 10K-DBCO의 질량 분석 결과이다.
- [46] 도 14는 링커 화합물 ALD-PEG 10K-BCN의 질량 분석 결과이다.
- [47] 도 15는 HMT211-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: HMT211-azido 펩티드, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) HMT211-azido-PEG, 3: 면역글로불린 Fc, 4: HMT211-azido와 면역글로불린 Fc를 ALD-PEG 10K-BCN 링커로 연결한 HMT211-azido-PEG-면역글로불린 FC 결합체.
- [48] 도 16은 GLP-2 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 비환원조건(non-reducing) SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: GLP-2 유사체, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) GLP-2 유사체, 3: 면역글로불린 Fc, 4: GLP-2 유사체-azido와 면역글로불린 Fc를 ALD-PEG 10K-DBCO 링커로 연결한 GLP-2 유사체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체.
- [49] 도 17은 글루카곤 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 비환원조건(non-reducing) SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: 글루카곤 유사체, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) 글루카곤 유사체, 3: 면역글로불린 Fc, 4: 글루카곤 유사체-azido와 면역글로불린 Fc를 PeAL-PEG 10K-BCN 링커로 연결한 글루카곤 유사체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [50] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 “약”의 의미를 포함하는 것으로 간주한다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.
- [52] 본 발명자들은 생리활성 폴리펩티드와 결합하여 생리활성 폴리펩티드의 생체 내 안정성을 높여 반감기를 높일 수 있는 링커 화합물을 개발하기 위해 연구한 결과, 생리활성 폴리펩티드와 보다 안정적으로 결합 가능한 링커 화합물을 개발하게 되었다.
- [53] 본 발명의 일 양상은 상기 링커 화합물로서, 비펩티드성 중합체의 일 말단에 면역 글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기가 도입되고, 다른 일 말단에 클릭반응 가능한 작용기가 도입된 화합물을 제공한다.
- [54] 본 명세서에서 “면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합

가능한 작용기”는 면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드의 임의의 부위의 아미노산의 작용기와 결합 가능한 작용기를 의미한다. 상기 “면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드의 임의의 부위의 아미노산의 작용기”에는 예를 들어 라이신의 아미노(-NH₂), 프롤린의 아민(-NH-), 시스테인의 티올(-SH) 등이 있다. 일 구체예에서, 면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기는 N 말단 아미노산, 라이신, 또는 시스테인의 작용기 (아민기, 아미노기, 또는 티올기)와 결합 가능한 작용기를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역 또는 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기는 예를 들어 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₃-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [55] 본 명세서에서 용어 “클릭반응 가능한 작용기”란 유기화학 분야에서 소위 클릭반응(click reaction)이라고 불리는 반응이 가능한 작용기를 의미하며, 상기 클릭반응은 알킨-아지드 또는 알킨-니트론 사이클로부가반응(cycloaddition), 티올-엔(thiol-ene) 클릭반응(Hoyle, Charles E. 등, 2010, "Thiol-Ene Click Chemistry". *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (9): 1540-1573), 디에노파일(dienophile) 및 디엔(diene)간의 디엘스 알더 반응(Diels-Alder reaction)(Houk et al, 2013, 135, 15642-15649), 이소니트릴과 테트라진과의 사이클로부가반응(Henning 등, 2011, "Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules", *Organic & Biomolecular Chemistry*. 9: 7303) 등이 있으며 이에 한정되지 않는다. 상기 알킨-아지드 또는 알킨-니트론 사이클로부가반응은 CuAAC(Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition), SPAAC(Strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition), 또는 SPANC(Strain-promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition)를 포함한다. 상기 클릭반응은 유기화학 분야에 널리 공지되어 있다.

- [56] 상기 “클릭반응 가능한 작용기”는 구체적으로, 알킨일, 디에닐(dienyl), 이소니트릴(isonitrile) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 알킨일은 선형 또는 분지형의 알킨일, 시클로알킨일, 아릴시클로알킨일, 디아릴시클로알킨일, 헤테로시클로알킨일, 아릴헤테로시클로알킨일, 또는 디아릴헤테로시클로알킨일을 포함한다. 상기 화합물의 일 말단에 존재하는 클릭반응 가능한 작용기는, 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 도입될 수 있는 아지드(azide) 또는 니트론(nitrone) 등의 작용기와 함께 클릭반응이 이루어질 수 있다.

- [57] 본 명세서에서 “작용기가 도입”된다는 것은 해당 작용기를 포함하는 임의의 결합 가능한 원자단이 결합된다는 것을 의미한다.

- [58] 본 명세서에서 “비펩티드성 중합체”란 생리활성 폴리펩티드와 결합하여 생리활성 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시킬 수 있으면서, 펩티드 구조를

갖지 않는 당해 기술분야에 공지된 임의의 중합체를 의미한다. 상기 비펩티드성 중합체는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(polylactic acid), PLGA(polylactic-glycolic acid), 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 및 다당류(polysaccharide)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [59] 본 명세서에서, 용어 “할로젠”은 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오도를 의미한다.
- [60] 상기 일 양상에 따른 화합물은 하기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 및 약제학적으로 허용 가능한 염에서 선택된 화합물을 포함한다:
- [61] [화학식 1]
- [62] R1-비펩티드성 중합체-X-R2
- [63] 상기 화학식 1에서,
- [64] R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀ 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;
- [65] 비펩티드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(polylactic acid), PLGA(polylactic-glycolic acid), 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 및 다당류(polysaccharide)로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [66] X는 -(CH₂)_jNHCO- 또는 -(CH₂)_jNHCS- 이며, 여기에서 j는 0 내지 6의 정수이고;
- [67] R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고,
- [68] 여기에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고,
- [69] Z는 O 또는 S이고,
- [70] Y는 C₂-C₆알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는 디아릴헤테로시클로알킬일이고(여기서, 각각의 시클로알킬일은 3 내지 8개의 탄소원자를 갖고, 각각의 아릴은 5 내지 8개의 탄소원자를 가지며, 각각의 헤테로시클로알킬일은 3 내지 8개의 원자를 포함하고, 고리 원자 중 1 내지 3개에 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 포화된 고리이다), 상기 k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며,
- [71] 상기 알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는 디아릴헤테로시클로알킬일은 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, 옥소, 또는 할로젠으로 치환

또는 비치환될 수 있다.

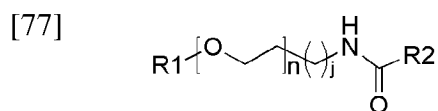
- [72] 상기 R1에서, 지방족 탄화수소 그룹은 선형 또는 분지형의 탄소수가 1 내지 20, 구체적으로는 1 내지 12, 보다 구체적으로는 1 내지 6인 알킬; 하나 이상의 탄소-탄소 이중결합을 함유하며 선형 또는 분지형이고, 탄소수가 2 내지 15, 구체적으로는 2 내지 12, 보다 구체적으로는 2 내지 6인 알켄일; 하나 이상의 탄소-탄소 삼중결합을 함유하며 선형 또는 분지형이고, 탄소수가 2 내지 15, 구체적으로는 2 내지 12, 보다 구체적으로는 2 내지 6인 알킨일을 포함한다. 상기 알킬은 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, 헥틸, 노닐, 및 데실로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 상기 알켄일은 예를 들어, 에테닐, 프로페닐, n-부테닐, 3-메틸부트-2-에닐, n-펜테닐, 옥테닐, 및 데세닐로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 상기 알킨일은 예를 들어, 에틴일, 프로피닐, 2-부티닐, 3-메틸부티닐, n-펜틴일, 및 데시닐로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 상기 알킬, 알켄일, 알킨일은 C₁-C₆ 알킬 및 할로젠으로 구성된 군에서 선택된 기로 치환 또는 비치환될 수 있다.

- [73] 상기 R1은 알데히드기를 포함하는 C₁-C₆ 지방족 탄화수소 그룹일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 R1은 알데히드기를 포함하는 C₁-C₆ 알킬 (즉, HC(O)-C₁₋₆ 알킬)이며, 예를 들어 n-펜탈알데히드(pentaldehyde), n-부티르알데히드(butyraldehyde), 프로피온 알데히드, 또는 아세트알데히드이다.

- [74] 상기 Y는 BCN(bicyclo[6.1.0]nonyne), DBCO(dibenzocyclooctyne), DIFO(difluorinated cyclooctyne), DIFO2, DIFO3, DIBO(dibenzoannulated cyclooctyne), BARAC(biarylazacyclooctynone), OCT(cyclooctyne), ALO(aryl-less cyclooctyne), MOFO(monofluorinated cyclooctyne), DIMAC(dimethoxyazacyclooctyne), TMDIBO(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO), COMBO(carboxymethylmonobenzocyclooctyne), PYRROC(pyrrolocyclooctyne), DIBAC(dibenzo-aza-cyclooctyne), TMTH(3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne), Sondheimer diyne, 및 S-DIBO(sulfonylated DIBO)로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [75] 일 구체예에서, 상기 화학식 1은 상기 비펩티드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 구조를 갖는 하기 화학식 1a의 구조를 가질 수 있다:

- [76] [화학식 1a]



- [78] 상기 화학식 1a에서,

- [79] n은 20 내지 1000, 구체적으로는 20 내지 500, 보다 구체적으로는 20 내지 250의 정수이고;

- [80] j는 0 내지 6의 정수, 구체적으로는 0 또는 2이고;

- [81] R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀

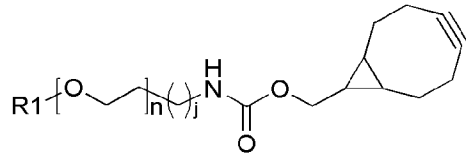
- 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;
- [82] R₂는 상기 R₂는 -(R₃)_k-(Z)_l-(R₄)_m-(CZ)_p-Y이고,
- [83] 여기에서 R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고,
- [84] Z는 O 또는 S이고,
- [85] Y는 BCN(bicyclo[6.1.0]nonyne), DBCO(dibenzocyclooctyne), DIFO(difluorinated cyclooctyne), DIFO₂, DIFO₃, DIBO(dibenzoannulated cyclooctyne), BARAC(biarylazacyclooctynone), OCT(cyclooctyne), ALO(aryl-less cyclooctyne), MOFO(monofluorinated cyclooctyne), DIMAC(dimethoxyazacyclooctyne), TMDIBO(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO), COMBO(carboxymethylmonobenzocyclooctyne), PYRROC(pyrrolocyclooctyne), DIBAC(dibenzo-aza-cyclooctyne), TMTH(3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne), Sondheimer diyne, 및 S-DIBO(sulfonylated DIBO)로 구성된 군에서 선택되고,
- [86] 상기 k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니다.
- [87] 상기 화학식 1 및 1a에서,
- [88] C₆-C₂₀아릴렌은 예를 들어, 벤젠, 바이페닐렌, 트라이페닐렌, 나프탈렌, 안트라센, 바이나프틸렌, 페난트렌, 파이렌, 다이하이드로파이렌, 크리센, 페릴렌, 테트라센, 펜타센, 벤즈파이렌, 플루오렌, 인덴, 인데노플루오렌, 스파이로바이플루오렌과 같은 아로마틱 그룹의 2가 형태일 수 있으며, 보다 구체적으로는 벤젠의 2가 형태일 수 있고,
- [89] C₅-C₂₀헤테로아릴렌은 예를 들어, 5원환(예: 피롤, 피라졸, 이미다졸, 1, 2, 3-트리아졸, 1,2,4-트리아졸, 테트라졸, 퓨란, 티오펜, 셀레노펜, 옥사졸, 아이속사졸, 1,2-티아졸, 1,3-티아졸, 1,2,3-옥사다리아졸, 1,2,4-옥사다리아졸, 1,2,5-옥사다리아졸, 1,3,4-옥사다리아졸, 1,2,3-티아다리아졸, 1,2,4-티아다리아졸, 1,2,5-티아다리아졸, 1,3,4-티아다리아졸); 6원환(예: 피리딘, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 1,3,5-트리아진, 1,2,4-트리아진, 1,2,3-트리아진, 1, 2, 4, 5-테트라진, 1,2,3,4-테트라진, 1,2,3,5-테트라진); 또는 융합된 그룹(예: 카바졸, 인돌, 아이소인돌, 인돌리진, 인다졸, 벤즈이미다졸, 벤조트리아졸, 푸린, 나프티이미다졸, 페난트르이미다졸, 피리드이미다졸, 피라진이미다졸, 퀴녹살린이미다졸, 벤즈옥사졸, 나프티옥사졸, 안트르옥사졸, 페난트르옥사졸, 아이속사졸, 벤조티아졸, 벤조퓨란, 아이소벤조퓨란, 다이벤조퓨란, 퀴놀린, 아이소퀴놀린, 프테리딘, 벤조-5,6-퀴놀린, 벤조-6,7-퀴놀린, 벤조-7,8-퀴놀린, 벤조아이소퀴놀린 아크리딘, 페노티아진, 펜옥사진, 벤조피리다진, 벤조피리미딘, 퀴녹살린, 펜아진, 나프티리딘,

아자카바졸, 벤조카볼린, 페난트리딘, 페난트릴린, 티에노 [2,3-b]티오펜, 티에노 [3,2-b]티오펜, 다이티에노티오펜, 다이티에노피리딘, 아이소벤조티오펜, 다이벤조티오펜, 벤조티아다리아조티오펜) 등과 같은 헤테로아로마틱 그룹의 2가 형태일 수 있다.

[90] 일 구체예에서, 화학식 1a는 하기 화학식 2a 내지 2n 중 어느 하나의 구조를 가질 수 있다:

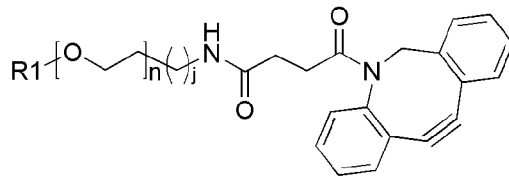
[91] [화학식 2a]

[92]



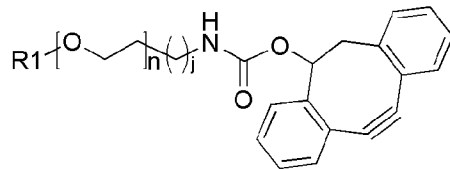
[93] [화학식 2b]

[94]



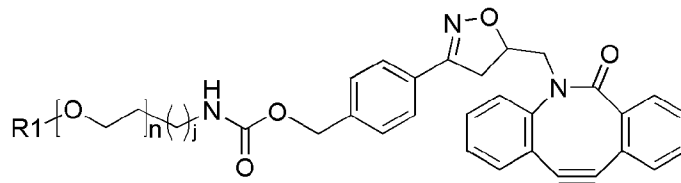
[95] [화학식 2c]

[96]



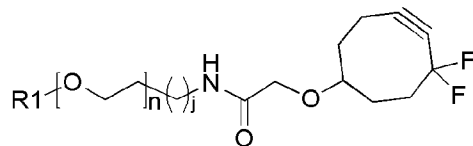
[97] [화학식 2d]

[98]



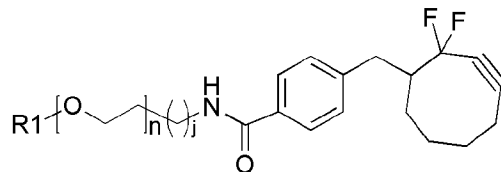
[99] [화학식 2e]

[100]



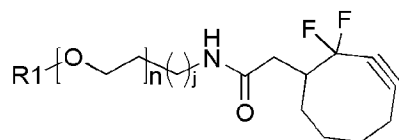
[101] [화학식 2f]

[102]



[103] [화학식 2g]

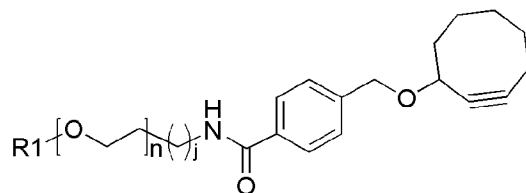
[104]



[105]

[화학식 2h]

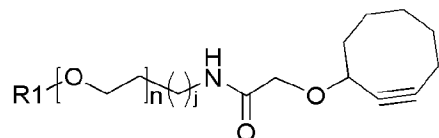
[106]



[107]

[화학식 2i]

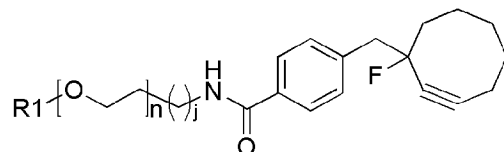
[108]



[109]

[화학식 2j]

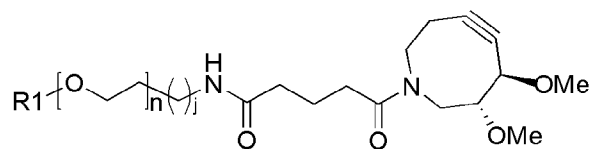
[110]



[111]

[화학식 2k]

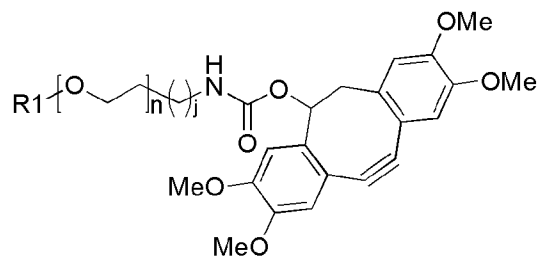
[112]



[113]

[화학식 2l]

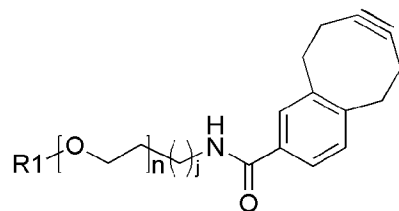
[114]



[115]

[화학식 2m]

[116]



[117]

[화학식 2n]

R1[OCH2CH2]n[CH2CH2]jNHCOOCCCC1=C(C(=O)OC(C)C)C(=O)OC(C)C2C1CCCCC2

[127] 상기 일 양상에 따른 화합물은 분자량이 0.1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 0.1 내지 50 kDa 범위, 보다 구체적으로 0.3 내지 10 kDa 범위인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [128] 본 발명의 다른 일 양상은,
 [129] 비펩티드성 중합체의 일 말단에 클릭반응 가능한 작용기를 도입하는 단계; 및
 [130] 상기 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에 면역 글로불린 Fc 영역 혹은 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기를 도입하는 단계를 포함하는, 상기 본 발명의 일 양상에 따른 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [131] 상기 제조방법의 상세는 본 발명의 일 양상에 따른 화합물에 대한 상기 설명이 그대로 적용될 수 있다.
- [132] 상기 제조방법은, 1) 비펩티드성 중합체의 일 말단에 아미노기(-NH₂)를 도입한 후, 상기 아미노기와 아미드 결합에 의해 비펩티드성 중합체의 일 말단에 R2를 도입하는 단계; 및
 [133] 2) 상기 R2가 도입된 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에 2,5-디옥소피롤리딘, 2,5-디옥소피롤린, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀ 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹을 도입하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 R2는 상기 화학식 1 또는 1a에서 정의한 바와 같다.
- [134] 일 구체예에서, 상기 단계 1)의 비펩티드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다.
- [135] 일 구체예에서, 상기 단계 1)의 비펩티드성 중합체는 분자량이 0.1 내지 100 kDa 범위, 구체적으로 0.1 내지 50 kDa 범위, 보다 구체적으로 0.3 내지 10 kDa 범위인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [136] 일 구체예에서, 상기 단계 2)는 상기 R2가 도입된 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에 알데히드기를 포함하는 C1-C6 지방족 탄화수소 그룹을 도입하는 단계일 수 있다.
- [137] 상기 비펩티드성 중합체의 일 말단에 클릭반응 가능한 작용기를 도입하는 방법 및 상기 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에 면역 글로불린 Fc 영역 혹은 생리활성 폴리펩티드와 결합 가능한 작용기를 도입하는 방법의 구체적인 반응조건은 유기화학 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 기술을 이용하여 적절히 수행할 수 있다.
- [138] 상기 제조방법은 상기 일 양상에 따른 화합물의 제조방법의 예시에 불과할 뿐이며, 상기 일 양상에 따른 화합물의 제조방법은 이에 한정되는 것은 아니고, 당해 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 적절히 변경할 수 있다.
- [139] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 클릭반응 가능한 작용기에 생리활성 폴리펩티드가 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제공한다.
- [140] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 클릭반응 가능한 작용기에 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 것인 면역글로불린 Fc 영역

연결체를 제공한다.

- [141] 본 명세서에서 용어 "생리활성 폴리펩티드 연결체"는 생리활성 폴리펩티드와 상기 일 양상에 따른 화합물이 결합된 구조물을 의미하고, "면역글로불린 Fc 영역 연결체"는 면역글로불린 Fc 영역과 상기 일 양상에 따른 화합물이 결합된 구조물을 의미하며, 상기 결합은 공유결합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이하에서는, 생리활성 폴리펩티드 연결체 또는 면역글로불린 Fc 영역 연결체를 포괄해서 "생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역 연결체"라고 부르기도 한다.
- [142] 상기 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역 연결체는, 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물의 작용기 Y를 통해 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역이 화학식 1, 또는 1a의 화합물에 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역 연결체를 포함한다.
- [143] 상기 클릭반응 가능한 작용기, 구체적으로는 상기 화학식 1의 작용기 Y에 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역을 결합시키기 위해 상기 생리활성 폴리펩티드에 작용기 Y와 클릭반응이 가능한 작용기를 도입한 다음 클릭반응에 의해 상기 연결체를 형성시킬 수 있다. 상기 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 도입될 수 있는 클릭반응이 가능한 작용기는 예를 들어 아지드 또는 니트론 등일 수 있다. 상기 아지드 또는 니트론을 상기 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 도입하기 위해, 아지드 또는 니트론이 결합된 아미노산을 상기 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 아미노산간의 펩티드 결합으로 결합시킬 수 있다. 상기 아지드 또는 니트론이 결합된 아미노산은 직접 제조할 수도 있으며, 상업적으로 입수할 수도 있다. 일 구체예에서, 아지도라이신(N_3 -라이신)을 상기 생리활성 폴리펩티드에 아미드 결합으로 결합시킬 수 있으며, 상기 아지도라이신은 상업적으로 입수 가능하다(Sigma Aldrich, Fmoc-azidolysine). 일 구체예에서, 아지도라이신(N_3 -라이신)을 상기 생리활성 폴리펩티드의 C 말단에 아미드 결합으로 결합시킬 수 있다.
- [144] 다른 구체예에서, 상기 아지드 또는 니트론을 별도의 아미노산 없이 직접 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역 내에 존재하는 아미노산을 통해 결합시킬 수도 있으며, 이를 위해 상기 아지드 또는 니트론을 결합시키고자 하는 아미노산과 결합 가능한 작용기를 상기 아지드 또는 니트론에 결합시킨 다음 결합시킬 수도 있다. 예를 들어, N-히드로석신이미딜 아지드(예: NHS-azide, NHS-PEG4-azide)를 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역과 반응시켜 직접 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역 내에 존재하는 아미노산(예: 라이신, N 말단 아미노산)을 통해 결합시킬 수도 있다.
- [145] 다른 구체예에서, 상기 아지드 또는 니트론을 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 추가 또는 치환된 아미노산을 통해 결합시킬 수도 있으며, 이를 위해 상기 아지드 또는 니트론을 결합시키고자 하는 아미노산을

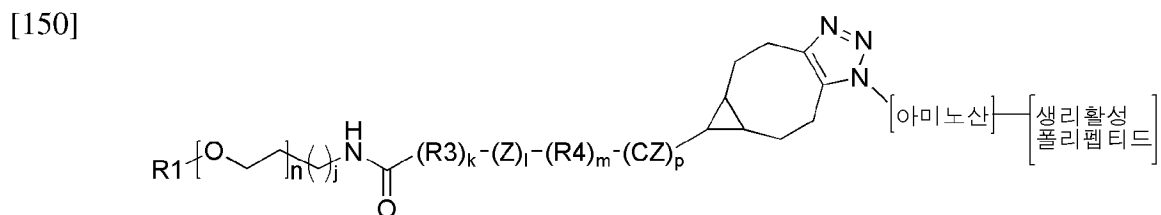
생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 추가 또는 치환한 다음, 추가 또는 치환된 아미노산과 결합 가능한 작용기를 상기 아지드 또는 니트론에 결합시킨 다음 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역에 라이신을 추가 또는 치환하고, N-히드로석신이미딜 아지드(예: NHS-azide, NHS-PEG4-azide)를 상기 추가 또는 치환된 라이신을 통해 결합시킬 수도 있다.

[146] 상기 아지드 또는 니트론 등이 도입된 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역은 상기 일 양상에 따른 링커 화합물의 일 말단의 클릭반응 가능한 작용기, 예를 들어 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물의 작용기 Y와 함께 클릭반응에 의한 환부가반응에 의해 트리아졸(아지드와 Y의 에틴일렌기 -C≡C-와의 반응 시) 또는 이속사졸리딘(니트론과 Y의 에틴일렌기 -C≡C-와의 반응 시) 등을 형성함으로써 상기 링커 화합물과 연결될 수 있다. 구체적인 제조방법의 조건은 당업자가 공지된 지식을 이용하여 적절히 결정할 수 있다.

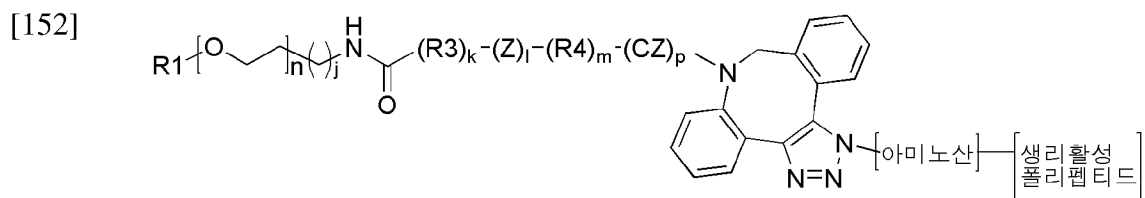
[147] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체는 생리활성 폴리펩티드에 아지드기가 도입된 다음, 상기 아지드기와 화학식 1, 또는 1a의 화합물의 작용기 Y의 에틴일렌기가 서로 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응(cycloaddition)에 의해 1,2,3-트리아졸을 형성함으로써 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체일 수 있다.

[148] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체는 하기 화학식 3a 내지 3l 중 어느 하나의 화학식을 가질 수 있다:

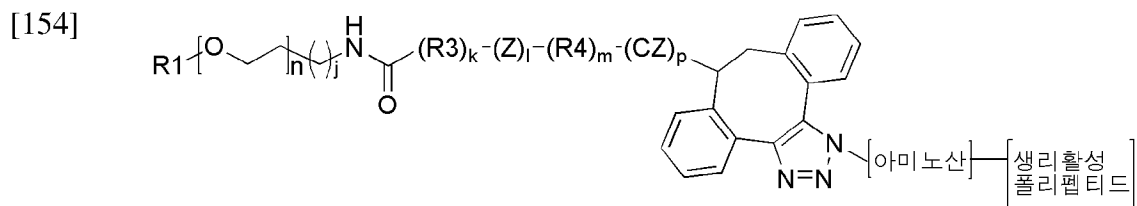
[149] [화학식 3a]



[151] [화학식 3b]

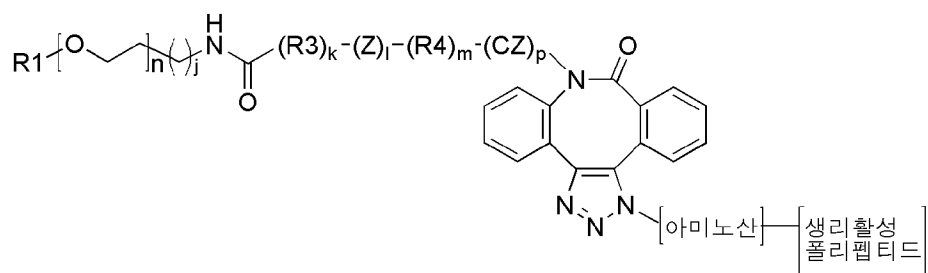


[153] [화학식 3c]



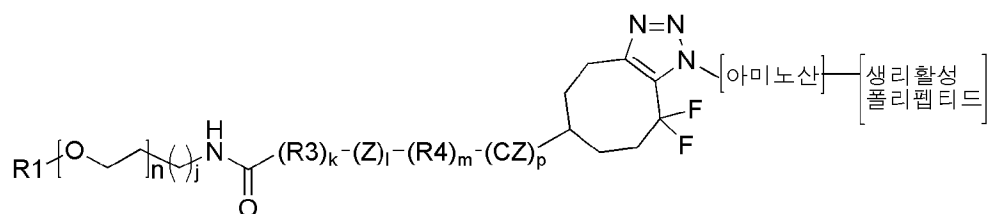
[155] [화학식 3d]

[156]



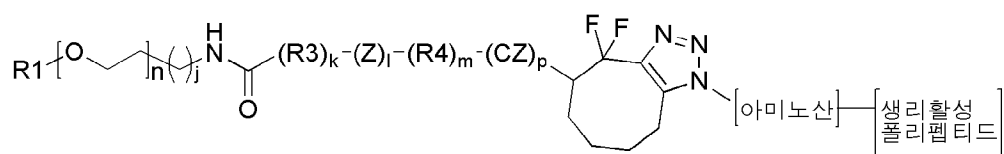
[157] [화학식 3e]

[158]



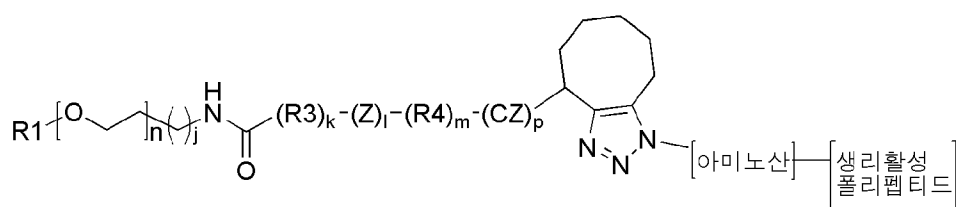
[159] [화학식 3f]

[160]



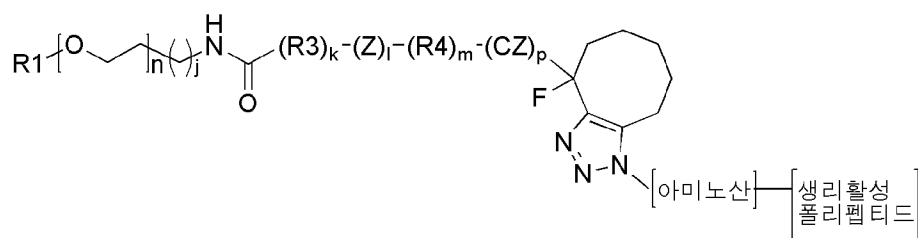
[161] [화학식 3g]

[162]



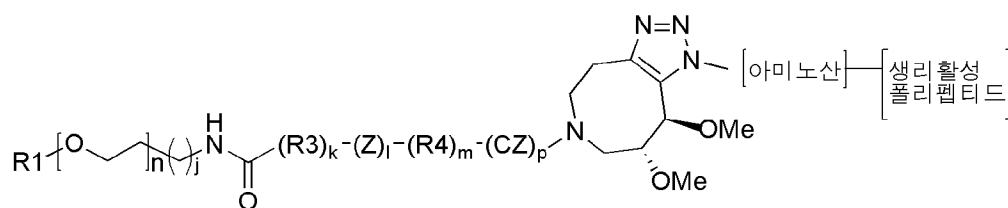
[163] [화학식 3h]

[164]



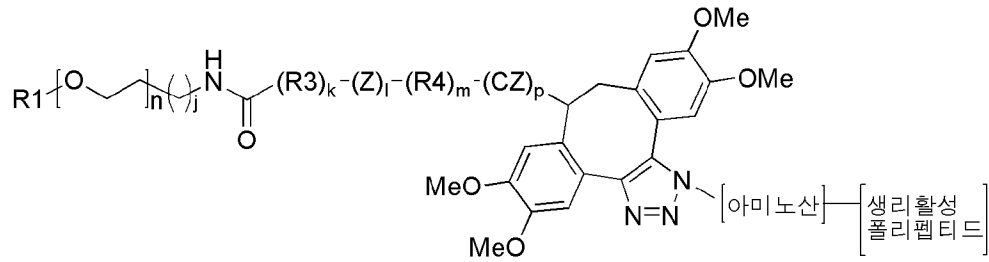
[165] [화학식 3i]

[166]



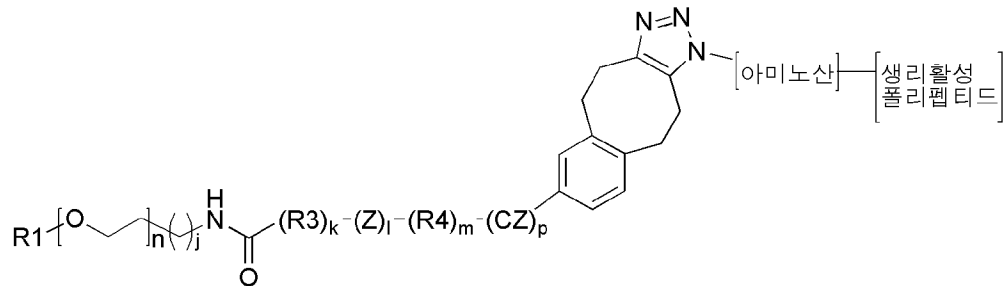
[167] [화학식 3j]

[168]



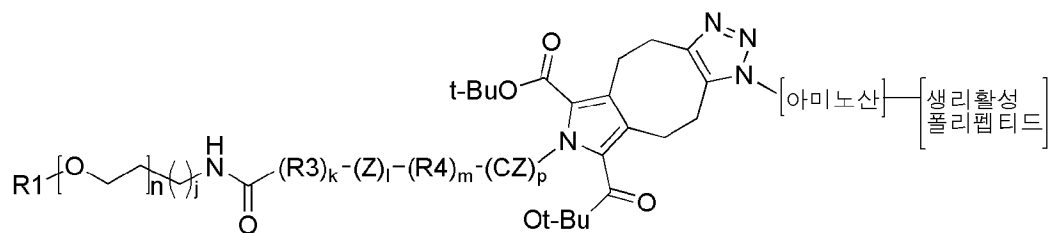
[169] [화학식 3k]

[170]



[171] [화학식 3l]

[172]



[173] 상기 화학식 3a 내지 3l에서, R1, R3, R4, Z, j, k, l, m, n, 및 p는 상기 화학식 1a에서 정의한 바와 같고;

[174] [아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이다.

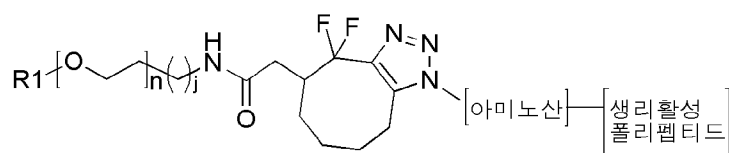
[175] 일 구체예에서, 상기 화학식 3a 내지 3l의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 3a 내지 3l의 트리아졸 질소가 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결될 수 있다.

[176] 다른 구체예에서, 상기 화학식 3a 내지 3l의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 N 말단 아미노산에서 알파-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 3a 내지 3l의 트리아졸 질소가 상기 N 말단 아미노산의 알파 탄소에 연결될 수 있다.

[177] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체는 하기 화학식 4a 내지 4n 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체일 수 있다:

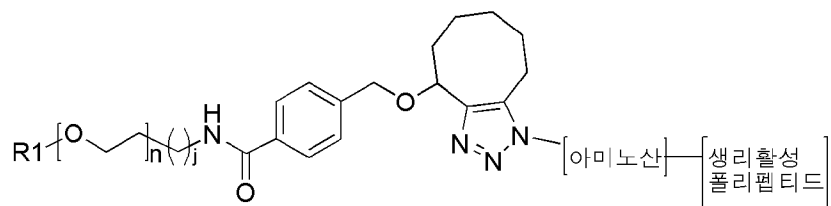
[178] [화학식 4a]

[179]



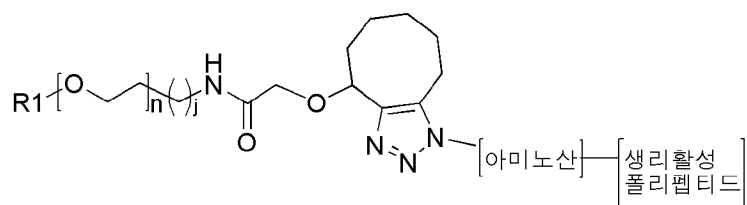
[192] [화학식 4h]

[193]



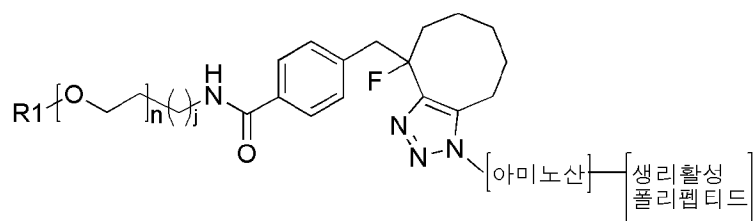
[194] [화학식 4i]

[195]



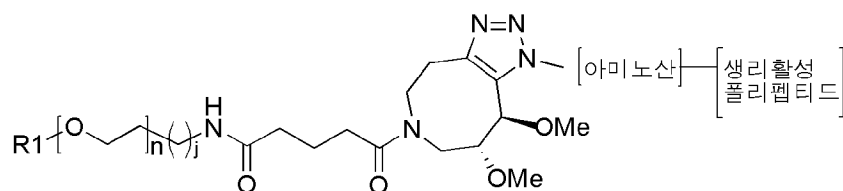
[196] [화학식 4j]

[197]



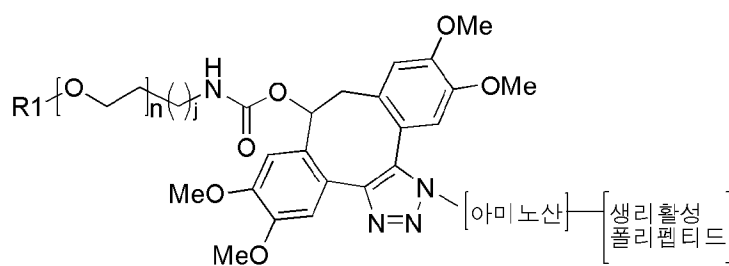
[198] [화학식 4k]

[199]



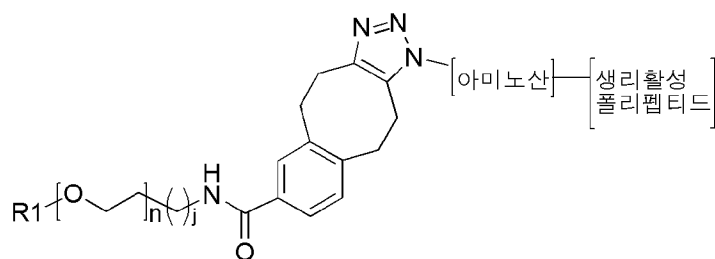
[200] [화학식 4l]

[201]



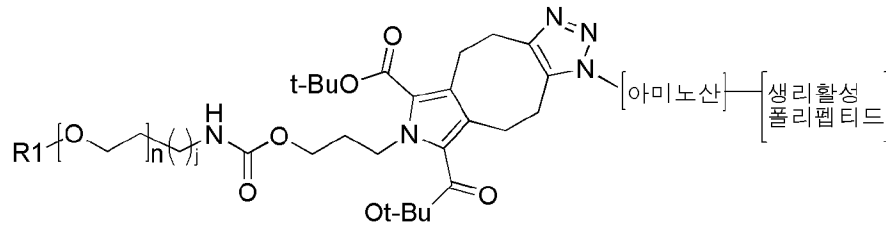
[202] [화학식 4m]

[203]



[204] [화학식 4n]

[205]



[206] 상기 화학식 4a 내지 4n에서,

[207] R1, j, 및 n은 상기 화학식 1a에서 정의한 바와 같고,

[208] [아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이다.

[209] 일 구체예에서, 상기 화학식 4a 내지 4n의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 4a 내지 4n의 트리아졸 질소가 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결될 수 있다.

[210] 다른 구체예에서, 상기 화학식 4a 내지 4n의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 N 말단 아미노산에서 알파-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 4a 내지 4n의 트리아졸 질소가 상기 N 말단 아미노산의 알파 탄소에 연결될 수 있다.

[211] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 작용기 R1을 통해 생리활성 폴리펩티드가 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제공한다.

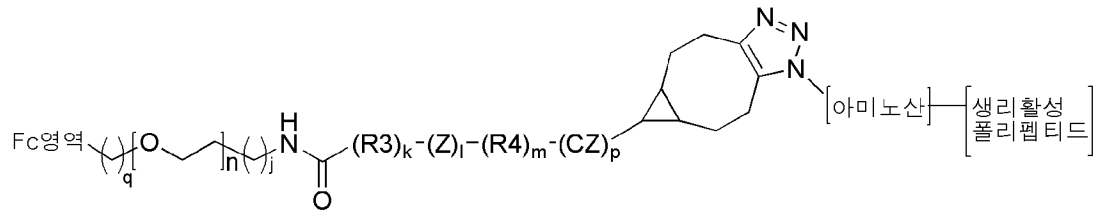
[212] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 작용기 R1을 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 것인 면역글로불린 Fc 영역 연결체를 제공한다.

[213] 상기 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역은 임의의 부위의 아미노산이, 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물의 R1의 작용기와 공유결합이 이루어질 수 있다. 구체적으로는, 2,5-디옥소피롤리딘, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₃-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹인 R1이 생리활성 폴리펩티드 또는 면역글로불린 Fc 영역의 임의의 부위의 아미노산의 작용기(예: 라이신의 아미노(-NH₂), 프롤린의 아민(-NH-), 시스테인의 티올(-SH) 등), 보다 구체적으로는 N 말단의 아미노산의 작용기와 공유결합될 수 있다. 일 구체예에서, 생리활성 폴리펩티드의 N 말단이 아민기 또는 아미노기를 가질 경우, 알데히드 작용기를 포함하는 R1과 환원적 아민화 반응에 의해 공유결합이 이루어질 수 있다. 본 명세서에서, 용어 “환원적 아민화 반응”이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드(즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 이민을 생성한 다음,

환원반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하며, 당해 기술분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.

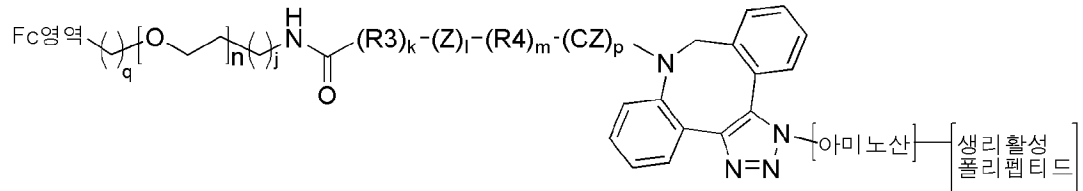
- [214] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 일 양상에 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 제공한다.
- [215] 본 명세서에서 용어 "생리활성 폴리펩티드 결합체"는 생리활성 폴리펩티드와 면역글로불린 Fc 영역이 상기 일 양상에 따른 화합물을 링커로 하여 하나의 물질로 결합된 구조물을 의미하며, 상기 결합은 공유결합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [216] 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 포함한다.
- [217] 생리활성 폴리펩티드 결합체는, 상기 생리활성 폴리펩티드가 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물을 포함한 링커 화합물의 양 말단 중 임의의 일 말단에 결합되고, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물을 포함한 링커 화합물의 다른 일 말단에 결합될 수 있다
- [218] 상기 결합체에서, 생리활성 폴리펩티드가 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물을 포함한 링커 화합물의 임의의 말단에 결합하는 방식은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 작용기 Y를 통해 또는 R1을 통해 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체에서 설명한 바와 같은 방식에 따라 결합할 수 있다.
- [219] 상기 결합체에서, 면역글로불린 Fc 영역이 상기 화학식 1, 또는 1a의 화합물을 포함한 링커 화합물의 임의의 말단에 결합하는 방식은 상기 일 양상에 따른 화합물의 일 말단의 작용기 Y를 통해 또는 R1을 통해 상기 면역글로불린 Fc 영역 연결체에서 설명한 바와 같은 방식에 따라 결합할 수 있다.
- [220] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 생리활성 폴리펩티드에 아지드기가 도입된 다음, 상기 아지드기와 화학식 1의 R2의 에틴일렌기가 서로 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응에 의해 1,2,3-트리아졸을 형성함으로써 연결되고, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산이 화학식 1의 화합물의 R1과 공유 결합에 의해 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 생리활성 폴리펩티드에 아지드기가 도입된 다음, 상기 아지드기와 화학식 1의 R2의 에틴일렌기가 서로 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응에 의해 1,2,3-트리아졸을 형성함으로써 연결되고, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 N 말단의 프롤린이 상기 화학식 1의 R1과 환원적 아민화 반응에 의해 아민 결합이 이루어진 생리활성 폴리펩티드 결합체일 수 있다.
- [221] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 하기 화학식 5a 내지 5l 중 어느 하나의 구조식을 가진 생리활성 폴리펩티드 결합체일 수 있다:
- [222] [화학식 5a]

[223]



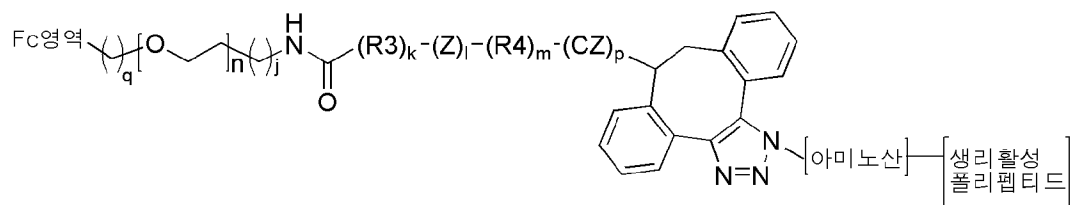
[224] [화학식 5b]

[225]



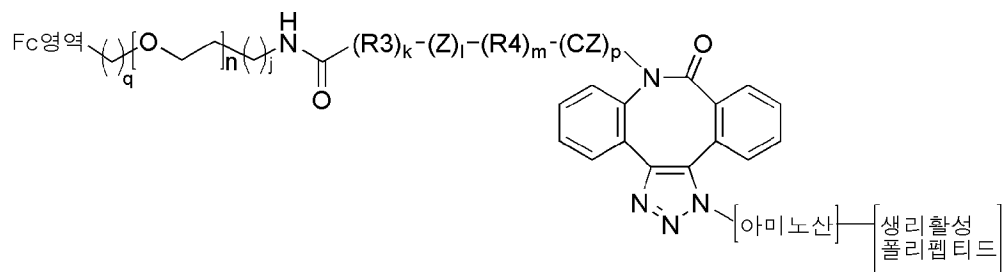
[226] [화학식 5c]

[227]



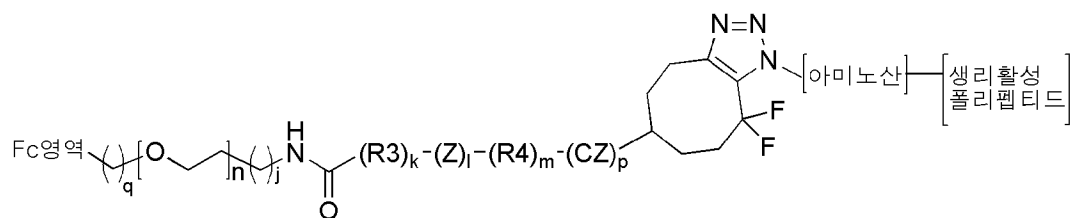
[228] [화학식 5d]

[229]



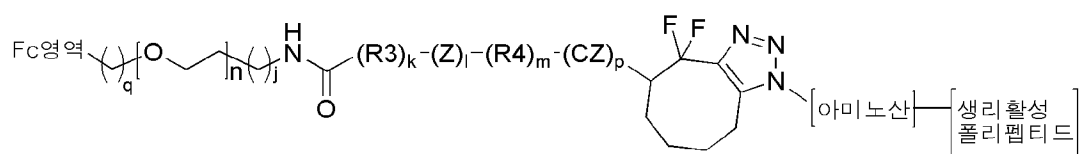
[230] [화학식 5e]

[231]



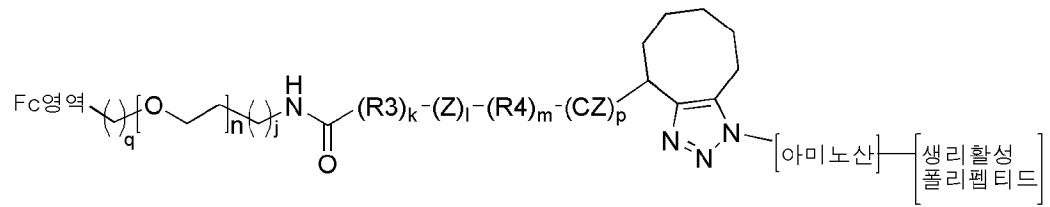
[232] [화학식 5f]

[233]



[234] [화학식 5g]

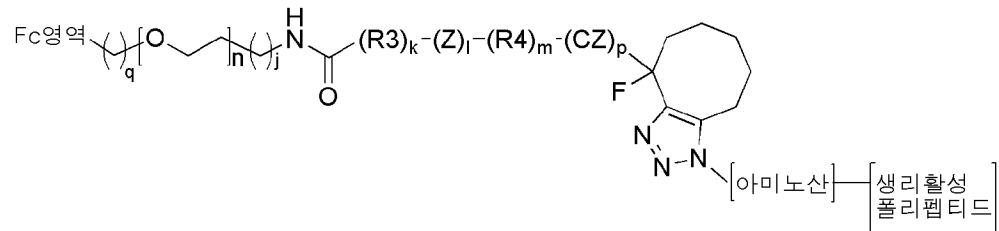
[235]



[236]

[화학식 5h]

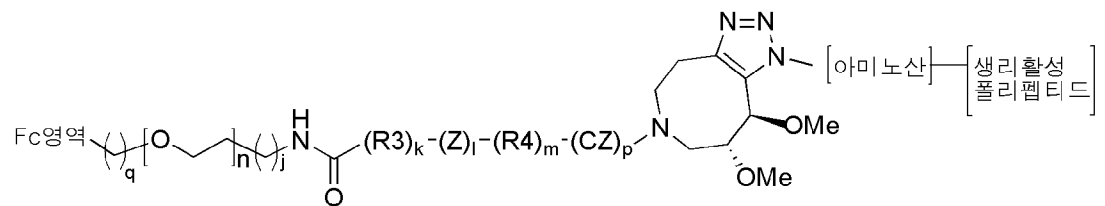
[237]



[238]

[화학식 5i]

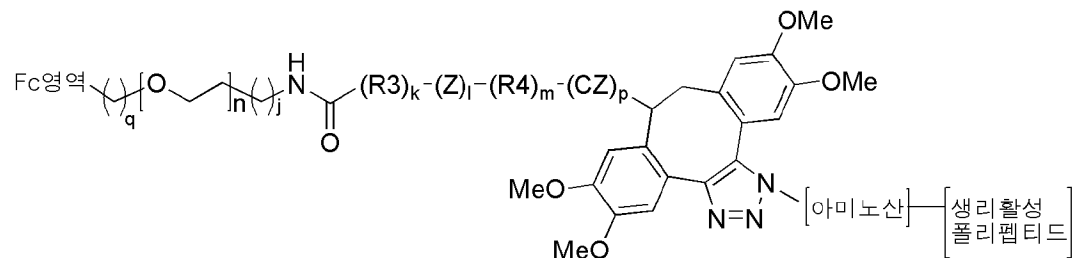
[239]



[240]

[화학식 5j]

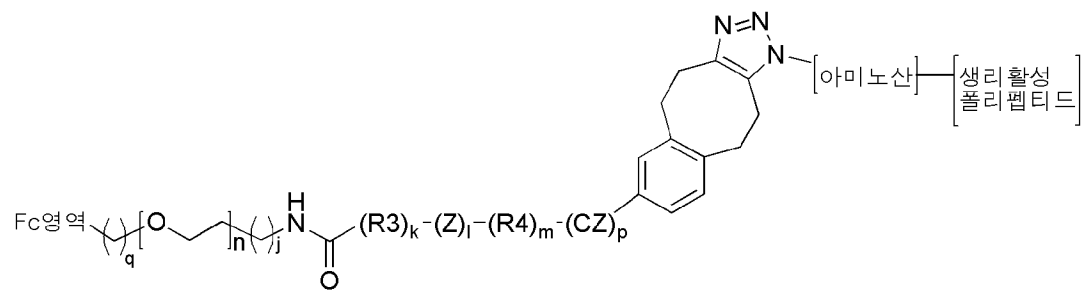
[241]



[242]

[화학식 5k]

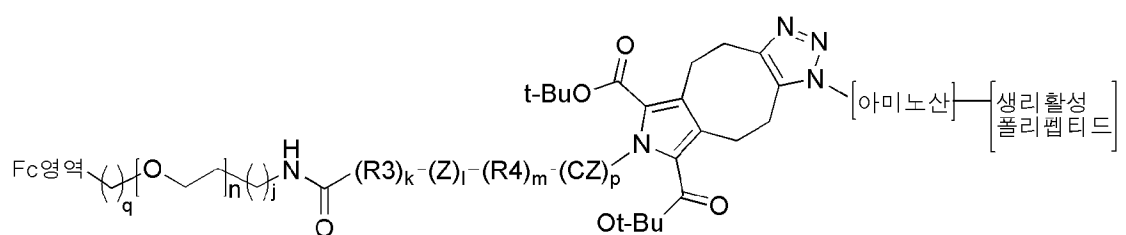
[243]



[244]

[화학식 5l]

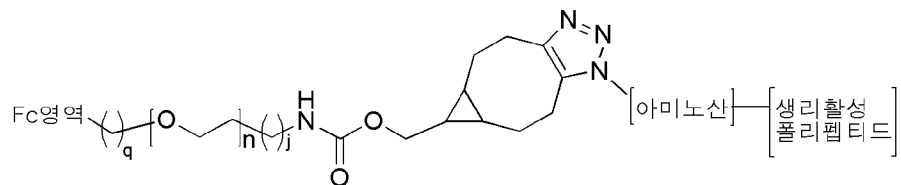
[245]



- [246] 상기 화학식 5a 내지 5l에서,
 [247] R3, R4, Z, j, k, l, m, n, 및 p는 상기 화학식 1a에서 정의한 바와 같고;
 [248] [아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이고;
 [249] q는 1 내지 6의 정수이다.
 [250] 일 구체예에서, 상기 화학식 5a 내지 5l의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 5a 내지 5l의 트리아졸 질소가 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결될 수 있다.
 [251] 다른 구체예에서, 상기 화학식 5a 내지 5l의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 N 말단 아미노산에서 알파-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 5a 내지 5l의 트리아졸 질소가 상기 N 말단 아미노산의 알파 탄소에 연결될 수 있다.
 [252] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 하기 화학식 6a 내지 6n 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체일 수 있다:

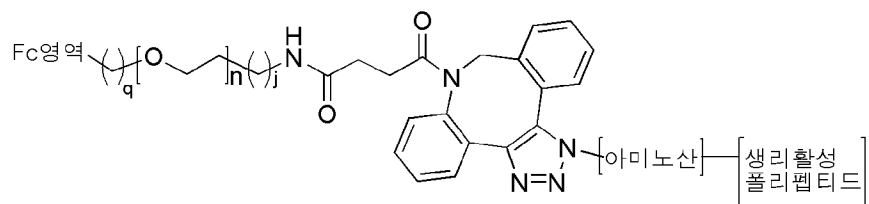
[253] [화학식 6a]

[254]



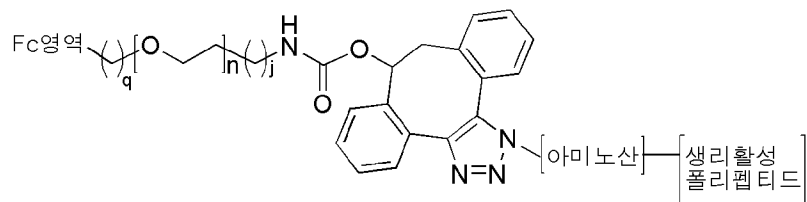
[255] [화학식 6b]

[256]



[257] [화학식 6c]

[258]

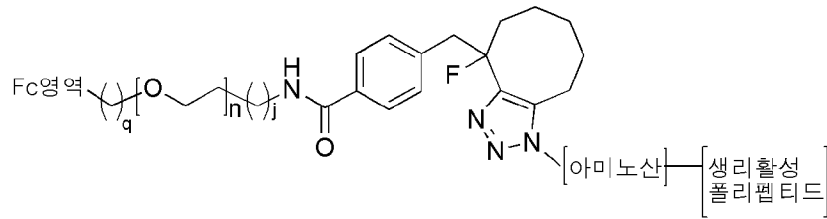


[259] [화학식 6d]

$$\text{Fc-영역} \left(\text{CH}_2 \right)_q \left[\text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_2 \right]_n \left(\text{CH}_2 \right)_j \text{NH} \text{C}(=\text{O}) \text{O} \text{CH}_2 \text{C}_6\text{H}_4 \text{CH}(\text{N}=\text{O}) \text{CH}_2 \text{N} \left(\text{C}_6\text{H}_4 \right)_2 \text{C}(=\text{O}) \text{N} \left(\text{N}=\text{N} \right) \text{N} \left[\text{아미노산} \right] \text{생리활성 폴리펩티드}$$
$$\text{Fc영역}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{F}_2-\text{[아미노산]}-\text{[생리활성 폴리펩티드]}$$
$$\text{Fc영역} \left(\text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \right)_n \left(\text{CH}_2 \right)_j \text{NH} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C}_8\text{H}_6\text{F}_2 \text{---} \text{N}_3 \text{---} [\text{아미노산}] \text{---} [\text{생리활성 폴리펩티드}]$$
[illegible]
$$\text{Fc영역} \left(\text{O} \left(\text{CH}_2 \right)_n \left(\text{CH}_2 \right)_q \right) \text{NH} \text{C}(=\text{O}) \text{C}_6\text{H}_4 \text{CH}_2 \text{O} \text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2 \text{N} \left[\text{아미노산} \right] \left[\text{생리활성 폴리펩티드} \right]$$
$$\text{Fc영역} \left(\text{---} \right)_q \left[\text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---} \right]_n \left(\text{---} \right)_j \text{NH---C(=O)---CH}_2\text{---O---} \left[\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_4 \right] \text{---[아미노산]---[생리활성 폴리펩티드]}$$

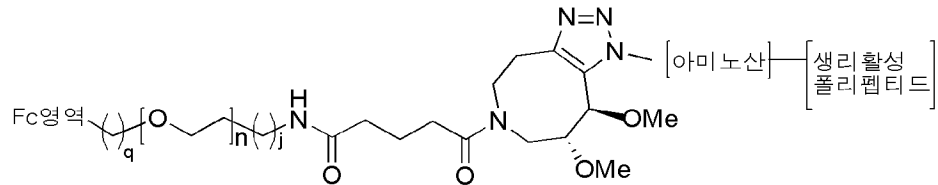
[271] [화학식 6j]

[272]



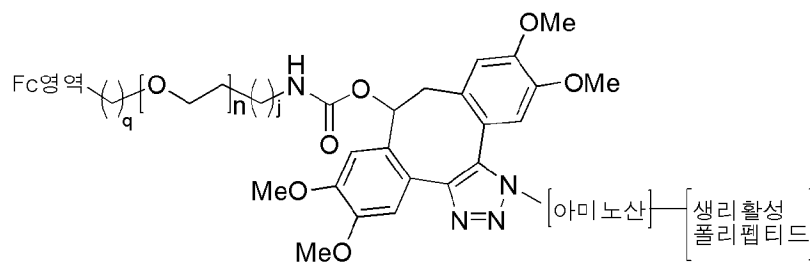
[273] [화학식 6k]

[274]



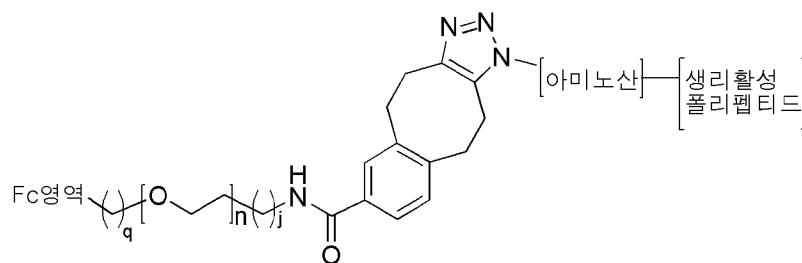
[275] [화학식 6l]

[276]



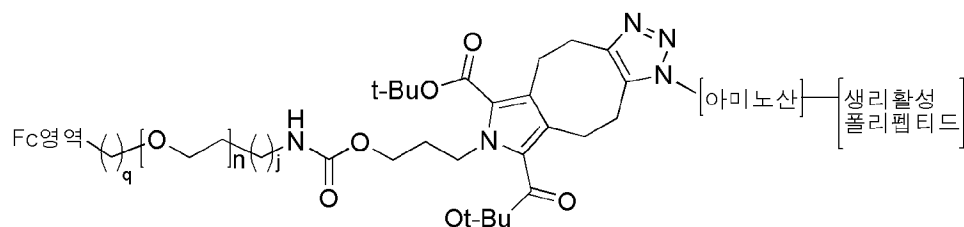
[277] [화학식 6m]

[278]



[279] [화학식 6n]

[280]



[281] 상기 화학식 6a 내지 6n에서,

[282] j, 및 n은 상기 화학식 1a에서 정의한 바와 같고;

[283] [아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이고;

[284] q는 1 내지 6의 정수이다.

[285] 일 구체예에서, 상기 화학식 6a 내지 6n의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한

부분으로서, 상기 화학식 6a 내지 6n의 트리아졸 질소가 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결될 수 있다.

- [286] 다른 구체예에서, 상기 화학식 6a 내지 6n의 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 N 말단 아미노산에서 알파-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 6a 내지 6n의 트리아졸 질소가 상기 N 말단 아미노산의 알파 탄소에 연결될 수 있다.
- [287] 본 명세서에서, 용어 “생리활성 폴리펩티드”란 생체 내에서, 특히 인체 내에서 생리활성을 나타내는 폴리펩티드 구조를 갖는 임의의 물질을 의미하며, 해당 폴리펩티드의 생리활성을 갖는 폴리펩티드의 전구물질(precursors), 유사체(analogs), 유도체(derivatives), 단편(fragments) 또는 변이체(variants) 등도 포함되는 개념이다.
- [288] 상기 생리활성 폴리펩티드는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 인슐린 분비 펩티드, 뉴로펩티드 (neuropeptide), 뇌하수체 호르몬, 항-비만 펩티드, 항-바이러스 펩티드, 생리활성을 갖는 비천연형 펩티드 유도체, 구조 단백질, 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [289] 상기 생리활성 폴리펩티드는 예를 들어, 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin), 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(cretins)(예: 펩티드 YY(PYY)), 지방(adipose)에서 분비되는 아디포킨류(adipokines)(예: 렙틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디폴린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)), 뇌 분비 뉴로펩티드류(neuropeptides)(예: 키스펙틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)), 근육분비 펩티드 혹은 단백질류(예: 이리신(Irisin), 미오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 무스클린(musclin)), 혈관작용장펩티드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩티드(natriuretic peptide), 소마토스타틴, NPY(neuropeptide Y), GLP-1(Glucagon-like peptide-1), GLP-2(Glucagon-like peptide-2), 엑센딘-4(Exendin-4), 옥신토모듈린(Oxyntomodulin), 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor), 안지오텐신, 브래디키닌, 칼시토닌, 부신피질 자극호르몬(Corticotropin), 엘레도이신(Eleodoisin), 옥시토신(Oxytocin), 바소프레신(vasopressin), 황체 형성호르몬, 황체 자극호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 여포 자극호르몬, 부갑상선 호르몬, 씨크레틴(secretin), 세르모레린(Sermorelin), 인간 성장호르몬(hGH), 성장호르몬 방출 펩티드, 콜로니 자극인자(GCSF)류, 인터페론(IFN)류, 인터페론 수용체, 인터루킨(Interleukin)류, 인터루킨 수용체, 인터루킨 결합 단백질, 프로락틴 방출 펩티드, 오렉신(Orexin), 갑상선 방출 펩티드, 콜레시스토키닌(Cholecystokinin), 가스트린억제 펩티드, 칼모듈린, 가스트린 유리 펩티드(Gastric releasing peptide), 모틸린(Motilin),

관활성장관펩티드(Vasoactiveintestinal peptide), 심방나트륨이뇨 펩티드(Atrial natriuretic peptide; ANP), B형 나트륨이뇨 펩티드(B-type natriuretic peptide; BNP), C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic peptide; CNP), 뉴로키닌(Neurokinin) A, 뉴로메딘(Neuromedin), 레닌(Renin), 엔도텔린(Endothelin), 사라포톡신 펩티드(Sarafotoxin peptide), 카르소모르핀 펩티드(Carsomorphin peptide), 데모르핀(Dermorphin), 디노르핀(Dynorphin), 엔도르핀(Endorphin), 엔케팔린(Enkepalin), 종양괴사인자, 종양괴사인자 수용체, 유로키나아제 수용체, 종양억제인자, 콜라게나제 억제제, 티모포이에틴(Thymopoietin), 티물린(Thymulin), 티모펜틴(Thymopentin), 티모신(Tymosin), 흉선 체액성 인자(Thymichumoral factor), 아드레노모듈린(Adrenomodullin), 알라토스타틴(Allatostatin), 아밀로이드 베타-프로테인 단편(Amyloid beta-proteinfragment), 항균성 펩티드, 항산화제 펩티드, 봄베신(Bombesin), 오스테오칼신(Osteocalcin), CART 펩티드, E-셀렉틴(E-selectin), ICAM-1, VCAM-1, 류코카인(Leucokine), 크링글-5(Kringle-5), 라미닌(Laminin), 인히빈(Inhibin), 갈라닌(Galanin), 피브로넥틴(Fibronectin), 판크레아스타틴(Pancreastatin), 푸제온(Fuzeon), 글루카곤-유사 펩티드, 옥신토모듈린, 지프로테인 관련수용체(Gprotein-coupled receptor), 효소류, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성인자, 마크로파지 펩티드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림프독소, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩티드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩티드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 신경 성장인자, 릴렉신, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 체장 폴리펩티드, 가스트린 방출 펩티드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토펜, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편, 적혈구 증식인자, 백혈구 증식인자, 및 이들의 유사체(analogs)로 이루어진 군으로부터 선택될 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[290] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드는 그 종류를 제한하지 않으며, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2017-116205 A1에 공개된 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중활성체(triple agonist); 국제공개공보 WO 2017-003191 A1에 공개된 글루카곤 유사체(analog) 등을 포함할 수 있다.

[291] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드는 GLP-2 유사체를 포함할 수 있다.

예를 들어, 상기 GLP-2 유사체는 천연형 GLP-2의 C-말단에 티올 그룹(예를 들어, 시스테인)이 도입되고, 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환되고, N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소가 제거된 것인 GLP-2 유사체; 천연형 GLP-2의 C-말단에 아민 그룹(예를 들어, 라이신)이 도입되고, 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환되고, N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소가 제거된 것인 GLP-2 유사체; 천연형 GLP-2의 C-말단에 아민 그룹(예를 들어, 라이신)이 도입되고, 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환되고, 30번째 아미노산인 라이신이 알지닌으로 치환되고, N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소가 제거된 것인 GLP-2 유사체; 천연형 GLP-2의 C-말단에 아지드 그룹(예를 들어, 아지도 라이신)이 도입되고, 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환되고, N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소가 제거된 것인 GLP-2 유사체 등을 포함할 수 있다.

- [292] 본 명세서에서, 용어 "면역글로불린 Fc 영역"은 면역글로불린 내에서 항원에 결합하고 많은 서열상 변이를 가지는 가변영역을 제외한 고정서열을 가지는 부분을 의미하며, 해당 부분은 보체계를 활성화시키고 태반을 통과하는 능력을 부여하거나 각종 면역관련 세포가 가지는 수용체에 대한 리간드로 작용하는 등의 이펙터 기능을 가지는 것을 특징으로 하며, "면역글로불린 불변영역"과 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [293] 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역 1(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) 부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역 1(CL1)을 포함한 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) 1개 또는 2개 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)과의 조합, 또는 6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다.
- [294] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체(mutant)를 포함할 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "아미노산 서열 유도체"란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을

위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.

- [295] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc 영역에서 N 말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N 말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능(effector function)을 없애기 위해 보체결합부위, 예를 들면 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체의 제조방법은 국제특허공개 WO 97/34631, 국제특허공개 WO 96/32478 등을 참조할 수 있다.
- [296] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [297] 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체는 면역글로불린 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체일 수 있다. 상기 Fc 면역글로불린 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형일 수도 있고, 또는 이들의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pFc 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pFc를 분리할 수 있다.
- [298] 일 구체예에서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다.
- [299] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 따라서, 약물의

캐리어로서의 본래 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다.

- [300] 본 명세서에서, 용어 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"란 효소로 당을 제거한 면역글로불린 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 구체적으로는 대장균에서 생산하여 당쇄화 되지 않은 면역글로불린 Fc 영역을 의미한다.
- [301] 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아피그 등의 동물기원일 수 있으며, 구체적으로는 인간 기원일 수 있다.
- [302] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 구체적으로는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 구체적으로는 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.
- [303] 본 명세서에서, 상기 용어 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩티드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩티드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [304] 본 명세서에서, 상기 용어 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 상기 하이브리드는 여러 형태의 하이브리드가 가능하며, 즉 IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하고, 선택적으로 힌지를 포함할 수 있다.
- [305] 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고, 이 이들의 조합 또는 이들의 하이브리드가 면역글로불린 Fc 영역으로서 이용될 수 있다. 면역글로불린 Fc 영역은 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.
- [306] 일 구체예에서, 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비당쇄화된 Fc 영역일 수 있다. 인간 유래의 Fc 영역은, 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역반응을 일으킬 수 있는 비인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.
- [307] 본 발명의 다른 일 양상은
- [308] 생리활성 폴리펩티드에 아지드기를 도입시키는 단계;
- [309] 상기 아지드기와 하기 화학식 1의 화합물의 R2의 에틴일렌기($-C\equiv C-$)를 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응시켜 1,2,3-트리아졸을 형성시킴으로써 결합시키는 단계; 및
- [310] 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산을 상기 화학식 1의 화합물의 R1과

공유결합시키는 단계를 포함하는,

- [311] 화학식 1의 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조방법을 제공한다:
- [312] [화학식 1]
- [313] R1-비펩티드성 중합체-X-R2
- [314] 상기 화학식 1에서,
- [315] R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀ 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;
- [316] X는 -(CH₂)_jNHCO- 또는 -(CH₂)_jNHCS- 이며, 여기에서 j는 0 내지 6의 정수이고;
- [317] R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고, 여기에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고, Z는 O 또는 S이고,
- [318] Y는 C₂-C₆알킨일, 시클로알킨일, 바이시클로알킨일, 아릴시클로알킨일, 디아릴시클로알킨일, 헤테로시클로알킨일, 또는 디아릴헤테로시클로알킨일이고(여기서, 각각의 시클로알킨일은 3 내지 8개의 탄소원자를 갖고, 각각의 아릴은 5 내지 8개의 탄소원자를 가지며, 각각의 헤테로시클로알킨일은 3 내지 8개의 원자를 포함하고, 고리 원자 중 1 내지 3개에 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 포화된 고리이다),
- [319] k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며,
- [320] 상기 알킨일, 시클로알킨일, 바이시클로알킨일, 아릴시클로알킨일, 디아릴시클로알킨일, 헤테로시클로알킨일, 또는 디아릴헤테로시클로알킨일은 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, 옥소, 또는 할로젠으로 치환 또는 비치환될 수 있다.
- [321] 상기 제조방법의 상세는 상기 본 발명의 일 양상에 따른 생리활성 폴리펩티드 결합체에 대한 상기 설명이 그대로 적용될 수 있다.
- [322] 상기 생리활성 폴리펩티드에 아지드기를 도입하는 방법은 유기 화학 분야에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.
- [323] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드의 C 말단 위치의 아미노산을 라이신으로 치환시키고, 치환된 라이신 위치에 아지드기를 도입할 수 있다.
- [324] 일 구체예에서, 상기 생리활성 폴리펩티드의 C 말단에 아지도라이신(N₃-라이신)을 결합시킬 수 있다.
- [325] 상기 아지드기와 하기 화학식 1의 화합물의 R2의 에틴일렌기의 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응은, R2의 구조에 따라 유기화학분야에 널리 공지된 CuAAC(Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) 또는 SPAAC(Strain-promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) 반응에 따라 환부가반응이 수행될 수 있다. 상기 R2의 Y가 C₂-C₆알킨일일 경우 1가 구리 촉매의 존재 하에

반응시키는 CuAAC에 따라 클릭반응을 수행할 수 있으며, 상기 R2의 Y가 시클로알킨일, 아릴시클로알킨일, 헤테로시클로알킨일, 아릴헤테로시클로알킨일, 디아릴시클로알킨일, 또는 디아릴헤테로시클로알킨일 등의 환 구조일 경우 경우, 1가 구리 촉매의 부재 하에서 반응시키는 SPAAC 반응에 따라 환부가반응이 수행될 수 있다.

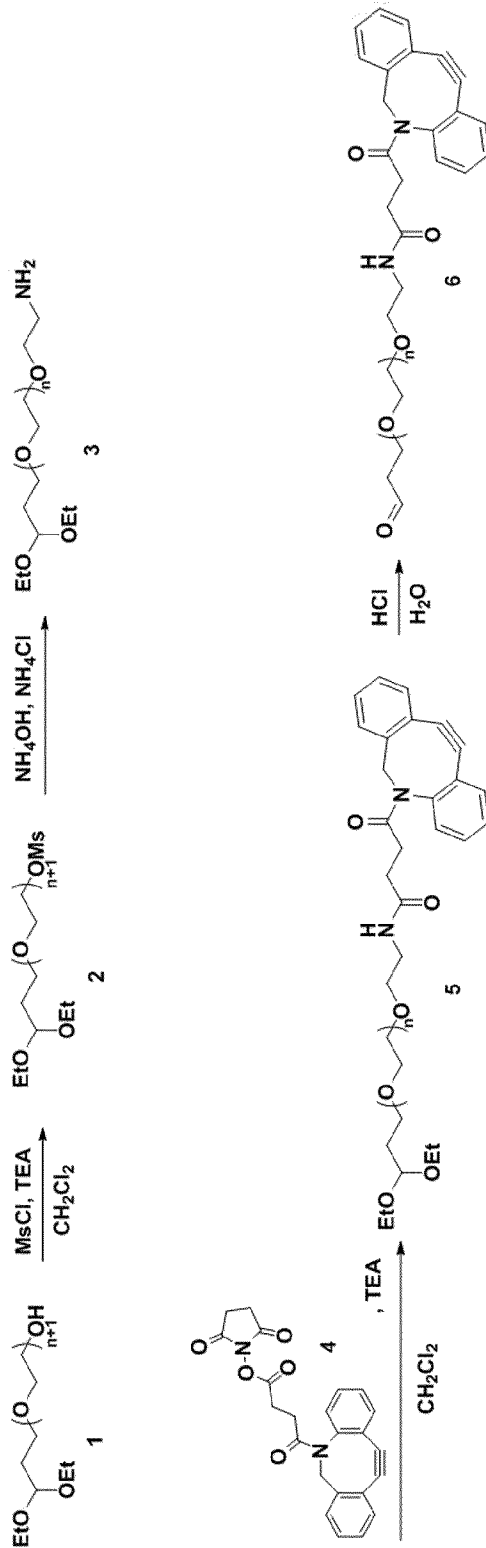
- [326] 상기 생리활성 폴리펩티드의 아지드기와 화학식 1의 화합물의 R2의 에틴일렌기의 클릭반응 단계에서, 생리활성 폴리펩티드와 화학식 1의 화합물의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20의 범위에서 선택되는 비율일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 생리활성 폴리펩티드와 화학식 1의 화합물의 반응 몰비는 1:2 내지 1:20일 수 있다.
- [327] 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산을 상기 화학식 1의 화합물의 R1과 공유결합시키는 단계에서는, 2,5-디옥소피롤리딘, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₃-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹인 R1이 면역글로불린 Fc 영역의 N 말단의 아미노산의 아민기, 아미노기, 또는 티올기와 같은 작용기와 공유결합될 수 있다. 일 구체예에서, 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산의 아민기 또는 아미노기는 알데히드 작용기를 포함하는 R1과 환원적 아민화 반응에 의해 공유결합이 이루어질 수 있다. 일 구체예에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 N 말단의 아미노산을 화학식 1의 화합물의 R1과 공유결합시킬 수 있다.
- [328] 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산을 상기 화학식 1의 화합물의 R1과 공유결합시키는 단계에서, 생리활성 폴리펩티드와 결합된 화학식 1의 화합물과 면역글로불린 Fc의 반응 몰비는 1:1 내지 1:20의 범위에서 선택되는 비율일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 생리활성 폴리펩티드와 결합된 화학식 1의 화합물과 면역글로불린 Fc의 반응 몰비는 1:2 내지 1:20일 수 있다.
- [329] 본 발명의 또 다른 일 양상은, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 및 약제학적으로 허용 가능한 염에서 선택된 화합물을, 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제조하기 위해 사용하는 방법을 제공한다. 즉, 상기 화학식 1의 화합물 등을 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제조하기 위한 용도를 제공한다.
- [330] 본 발명의 또 다른 일 양상은, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 및 약제학적으로 허용 가능한 염에서 선택된 화합물을, 생리활성 폴리펩티드 접합체를 제조하기 위해 링커로서 사용하는 방법을 제공한다. 즉, 상기 화학식 1의 화합물 등을 생리활성 폴리펩티드 결합체를 제조하기 위한 링커로서의 용도를 제공한다.
- [331]
- [332] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들

실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[333]

[334] 실시예 1: 링커 화합물의 제조 (1)

[335]



[336]

[337] 1-1: 화합물 2(MW=10000)의 제조

[338] 반응 용기에 화합물 1(MW=10000) 20g과 디클로로메탄 60mL를 투입하였다. 반응온도를 10°C 이하로 유지하면서 트리에틸아민 1.11g과 메탄설폰닐클로라이드 1.15g을 첨가한 후 실온에서 3시간동안 교반하였다. 반응 완결 후 물 100mL와 디클로로메탄 40mL를 투입하고 5분동안 교반하였다. 유기층을 분리한 후 물층에 다시 디클로로메탄 100mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기층을 모아 물 100mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 20mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 300mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (2)(MW=10000) 17.2g을 얻었다.

[339]

[340] 1-2: 화합물 3(MW=10000)의 제조

[341] 반응 용기에 암모니아 수용액 200mL와 염화암모늄 20g을 투입하였다. 화합물 2(MW=10000) 10g을 첨가한 후 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 완결 후 디클로로메탄 200mL를 투입하고 5분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리한 후 물 층에 다시 디클로로메탄 200mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기 층을 모아 물 200mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 10mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 150mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (3)(MW=10000) 8.5g을 얻었다.

[342]

[343] 1-3: 화합물 5(MW=10000)의 제조

[344] 반응 용기에 화합물 3(MW=10000) 1.66g과 디클로로메탄 17mL를 투입하였다. 화합물 4 200mg, 트리에틸아민 50mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 35mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (35mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 수 층을 분리하고 디클로로메탄 35mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (5)(MW=10000) 1.0g을 얻었다.

[345]

[346] 1-4: 화합물 6(MW=10000)의 제조

[347] 반응 용기에 화합물 5(MW=10000) 0.8g과 증류수 14.4mL를 투입하였다. 0.1N HCl 1.6mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을

확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 1mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 15mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (6) (MW=10000) 498mg을 얻었다. 화합물 6(MW=10000)은 ALD-PEG 10K-DBCO로 명명하였다. 도 1은 링커 화합물 6(MW=10000)의 ^1H NMR 결과이다. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.51 (d, 1H), 7.38-7.25 (m, 6H), 6.11 (br s, 1H), 5.14 (d, 1H), 3.85-3.43 (m, 915H), 3.31 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.67 (t, 2H), 2.45 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.93 (m, 1H).

[348]

[349] 실시예 2: 링커 화합물의 제조 (2)

[350] 2-1: 화합물 2(MW=5000)의 제조

[351] 반응 용기에 화합물 1(MW=5000) 20g과 디클로로메탄 60mL를 투입하였다. 반응온도를 10°C 이하로 유지하면서 트리에틸아민 2.23g과 메탄설폰닐클로라이드 2.29g을 첨가한 후 실온에서 3시간동안 교반하였다. 반응 완결 후 물 100mL와 디클로로메탄 40mL를 투입하고 5분동안 교반하였다. 유기층을 분리한 후 물층에 다시 디클로로메탄 100mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기층을 모아 물 100mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 20mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 300mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (2)(MW=5000) 16.2g을 얻었다.

[352]

[353] 2-2: 화합물 3(MW=5000)의 제조

[354] 반응 용기에 암모니아 수용액 200mL와 염화암모늄 20g을 투입하였다. 화합물 2(MW=5000) 10g을 첨가한 후 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 완결 후 디클로로메탄 200mL를 투입하고 5분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리한 후 물 층에 다시 디클로로메탄 200mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기 층을 모아 물 200mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 10mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 150mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (3)(MW=5000) 8.1g을 얻었다.

[355]

[356] 2-3: 화합물 5(MW=5000)의 제조

[357] 반응 용기에 화합물 3(MW=5000) 2g과 디클로로메탄 20mL를 투입하였다. 화합물 4 483mg, 트리에틸아민 122mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다.

반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (5) (MW=5000) 1.2g을 얻었다.

[358]

[359] 2-4: 화합물 6(MW=5000)의 제조

[360] 반응 용기에 화합물 5(MW=10000) 0.8g과 증류수 14.4mL를 투입하였다. 0.1N HCl 1.6mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 1mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 15mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (6)(MW=5000) 500mg을 얻었다. 화합물 6(MW=5000)은 ALD-PEG 5K-DBCO로 명명하였다. 도 2는 링커 화합물 6(MW=5000)의 ¹H NMR 결과이다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 7.66 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.40-7.25 (m, 6H), 6.10 (br s, 1H), 5.13 (d, 1H), 3.82-3.41 (m, 459H), 3.32 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.67 (t, 2H), 2.45 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.92 (m, 1H).

[361]

[362] 실시예 3: 링커 화합물의 제조 (3)[363] 3-1: 화합물 2(MW=3400)의 제조

[364] 반응 용기에 화합물 1(MW=3400) 20g과 디클로로메탄 60mL를 투입하였다. 반응온도를 10°C 이하로 유지하면서 트리에틸아민 3.27g과 메탄설포닐클로라이드 3.37g을 첨가한 후 실온에서 3시간동안 교반하였다. 반응 완결 후 물 100mL와 디클로로메탄 40mL를 투입하고 5분동안 교반하였다. 유기층을 분리한 후 물층에 다시 디클로로메탄 100mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기층을 모아 물 100mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 40mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 400mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (2)(MW=3400) 17.1g을 얻었다.

[365]

[366] 3-2: 화합물 3(MW=3400)의 제조

[367] 반응 용기에 암모니아 수용액 200mL와 염화암모늄 20g을 투입하였다. 화합물 2(MW=3400) 10g을 첨가한 후 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 완결 후

디클로로메탄 200mL를 투입하고 5분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리한 후 물 층에 다시 디클로로메탄 200mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기 층을 모아 증류수 200mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 20mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 200mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (3)(MW=3400) 8.7g을 얻었다.

[368]

[369] 3-3: 화합물 5(MW=3400)의 제조

[370] 반응 용기에 화합물 3(MW=3400) 1.7g과 디클로로메탄 17mL를 투입하였다. 화합물 4 604mg, 트리에틸아민 152mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 35mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (35mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 35mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 3.5mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 35mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (5)(MW=3400) 1.1g을 얻었다.

[371]

[372] 3-4: 화합물 6(MW=3400)의 제조

[373] 반응 용기에 화합물 5(MW=10000) 0.9g과 증류수 16.2mL를 투입하였다. 0.1N HCl 1.8mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 20mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (6)(MW=3400) 590mg을 얻었다. 화합물 6(MW=5000)은 ALD-PEG 3.4K-DBCO로 명명하였다. 도 3은 링커 화합물 6(MW=3400)의 ¹H NMR 결과이다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.77 (s, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.38-7.24 (m, 6H), 6.11 (br s, 1H), 5.13 (d, 1H), 3.80-3.39 (m, 315H), 3.32 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.66 (t, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.92 (m, 1H).

[374]

[375] 실시예 4: 링커 화합물의 제조 (4)[376] 4-1: 화합물 2(MW=2000)의 제조

[377] 반응 용기에 화합물 1(MW=2000) 29.3g과 디클로로메탄 90mL를 투입하였다. 반응온도를 10°C 이하로 유지하면서 트리에틸아민 8.2g과 메탄설포닐클로라이드 8.4g을 첨가한 후 실온에서 3시간동안 교반하였다. 반응

완결 후 물 150mL와 디클로로메탄 60mL를 투입하고 5분동안 교반하였다. 유기층을 분리한 후 물층에 다시 디클로로메탄 150mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기층을 모아 물 150mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 30mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 900mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (2)(MW=2000) 23.0g을 얻었다.

[378]

[379] 4-2: 화합물 3(MW=2000)의 제조

[380] 반응 용기에 암모니아 수용액 200mL와 염화암모늄 20g을 투입하였다. 화합물 2(MW=2000) 10g을 첨가한 후 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 완결 후 디클로로메탄 200mL를 투입하고 5분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리한 후 물 층에 다시 디클로로메탄 200mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기 층을 모아 증류수 200mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 10mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 300mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (3)(MW=2000) 8.1g을 얻었다.

[381]

[382] 4-3: 화합물 5(MW=2000)의 제조

[383] 반응 용기에 화합물 3(MW=2000) 1.5g과 디클로로메탄 15mL를 투입하였다. 화합물 4 905mg, 트리에틸아민 228mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 60mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (5)(MW=2000) 1.0g을 얻었다.

[384]

[385] 4-4: 화합물 6(MW=2000)의 제조

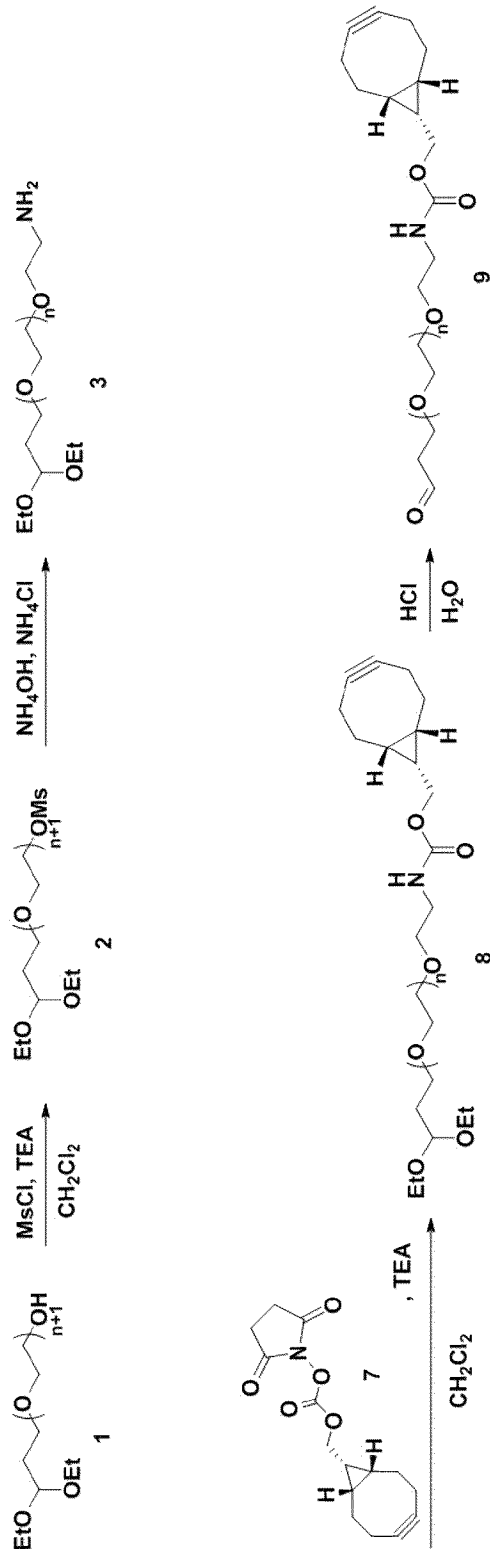
[386] 반응 용기에 화합물 5(MW=10000) 0.65g과 증류수 12.6mL를 투입하였다. 0.1N HCl 1.6mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 1mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (6)(MW=2000) 410mg을 얻었다.

화합물 6(MW=2000)은 ALD-PEG 2K-DBCO로 명명하였다. 도 4는 링커 화합물 6(MW=2000)의 ^1H NMR 결과이다. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.51 (d, 1H), 7.38-7.24 (m, 6H), 6.11 (br s, 1H), 5.13 (d, 1H), 3.82-3.37 (m, 187H), 3.32 (m, 2H), 2.67 (m, 1H), 2.67 (t, 2H), 2.45 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.93 (m, 1H).

[387]

[388] 실시예 5: 링커 화합물의 제조 (5)

[389]



[390]

[391] 5-1: 화합물 2(MW=10000)의 제조

[392] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여 화합물 2(MW=10000)를 얻었다.

[393]

- [394] 5-2: 화합물 3(MW=10000)의 제조
- [395] 상기 실시예 1-2와 동일한 방법을 수행하여 화합물 3(MW=10000)을 얻었다.
- [396]
- [397] 5-3: 화합물 8(MW=10000)의 제조
- [398] 반응 용기에 화합물 3(MW=10000) 1.76g과 디클로로메탄 17mL를 투입하였다. 화합물 7 154mg, 트리에틸아민 54mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 증류수 35mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (35mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 35mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (8)(MW=10000) 1.0g을 얻었다.
- [399]
- [400] 5-4: 화합물 9(MW=10000)의 제조
- [401] 반응 용기에 화합물 5(MW=10000) 0.4g과 증류수 7.2mL를 투입하였다. 0.1N HCl 0.8mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 10mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 1mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 15mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (9)(MW=10000) 260mg을 얻었다. 화합물 9(MW=10000)은 ALD-PEG 10K-BCN으로 명명하였다. 도 5는 링커 화합물 9(MW=10000)의 ¹H NMR 결과이다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 5.23 (br s, 1H), 4.13 (d, 2H), 3.81-3.41 (m, 914H), 3.36 (m, 2H), 2.67 (t, 2H), 2.26-2.18 (m, 6H), 1.57 (m, 2H), 1.35 (m, 1H), 0.93 (m, 2H).
- [402]
- [403] 실시예 6: 링커 화합물의 제조 (6)
- [404] 6-1: 화합물 2(MW=5000)의 제조
- [405] 상기 실시예 2-1과 동일한 방법을 수행하여 화합물 2(MW=5000)를 얻었다.
- [406]
- [407] 6-2: 화합물 3(MW=5000)의 제조
- [408] 상기 실시예 2-2와 동일한 방법을 수행하여 화합물 3(MW=5000)을 얻었다.
- [409]
- [410] 6-3: 화합물 8(MW=5000)의 제조
- [411] 반응 용기에 화합물 3(MW=5000) 3g과 디클로로메탄 30mL를 투입하였다. 화합물 7 524mg, 트리에틸아민 182mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다.

에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 3mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 45mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (8) (MW=5000) 2.0g을 얻었다.

[412]

[413] 6-4: 화합물 9(MW=5000)의 제조

[414] 반응 용기에 화합물 5(MW=5000) 1.7g과 증류수 30.6mL를 투입하였다. 0.1N HCl 3.4mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 34mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (9)(MW=5000) 1.25g을 얻었다. 화합물 9(MW=5000)은 ALD-PEG 5K-BCN으로 명명하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 5.26 (br s, 1H), 4.15 (d, 2H), 3.81-3.41 (m, 458H), 3.36 (m, 2H), 2.68 (t, 2H), 2.26-2.18 (m, 6H), 1.57 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 0.93 (m, 2H).

[415]

[416] 실시예 7: 링커 화합물의 제조 (7)[417] 7-1: 화합물 2(MW=3400)의 제조

[418] 상기 실시예 3-1과 동일한 방법을 수행하여 화합물 2(MW=3400)를 얻었다.

[419]

[420] 7-2: 화합물 3(MW=3400)의 제조

[421] 상기 실시예 3-2와 동일한 방법을 수행하여 화합물 3(MW=3400)을 얻었다.

[422]

[423] 7-3: 화합물 8(MW=3400)의 제조

[424] 반응 용기에 화합물 3(MW=3400) 2.5g과 디클로로메탄 50mL를 투입하였다. 화합물 7 643mg, 트리에틸아민 223mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 50mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (50mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 50mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 5mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 50mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (8) (MW=3400) 1.4g을 얻었다.

[425]

[426] 7-4: 화합물 9(MW=3400)의 제조

[427] 반응 용기에 화합물 **5**(MW=3400) 1g과 증류수 18mL를 투입하였다. 0.1N HCl 2mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 20mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 **(9)**(MW=3400) 630mg을 얻었다. 화합물 **9**(MW=3400)은 ALD-PEG 3.4K-BCN으로 명명하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 5.26 (br s, 1H), 4.15 (d, 2H), 3.81-3.41 (m, 314H), 3.36 (m, 2H), 2.68 (t, 2H), 2.26-2.18 (m, 6H), 1.57 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 0.93 (m, 2H).

[428]

[429] 실시예 **8**: 링커 화합물의 제조 **(8)**

[430] 8-1: 화합물 **2**(MW=2000)의 제조

[431] 상기 실시예 4-1과 동일한 방법을 수행하여 화합물 **2**(MW=2000)를 얻었다.

[432]

[433] 8-2: 화합물 **3**(MW=2000)의 제조

[434] 상기 실시예 4-2와 동일한 방법을 수행하여 화합물 **3**(MW=2000)을 얻었다.

[435]

[436] 8-3: 화합물 **8**(MW=2000)의 제조

[437] 반응 용기에 화합물 **3**(MW=2000) 1.5g과 디클로로메탄 30mL를 투입하였다. 화합물 **7** 655mg, 트리에틸아민 230mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 3mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 90mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 **(8)** (MW=2000) 900mg을 얻었다.

[438]

[439] 8-4: 화합물 **9**(MW=2000)의 제조

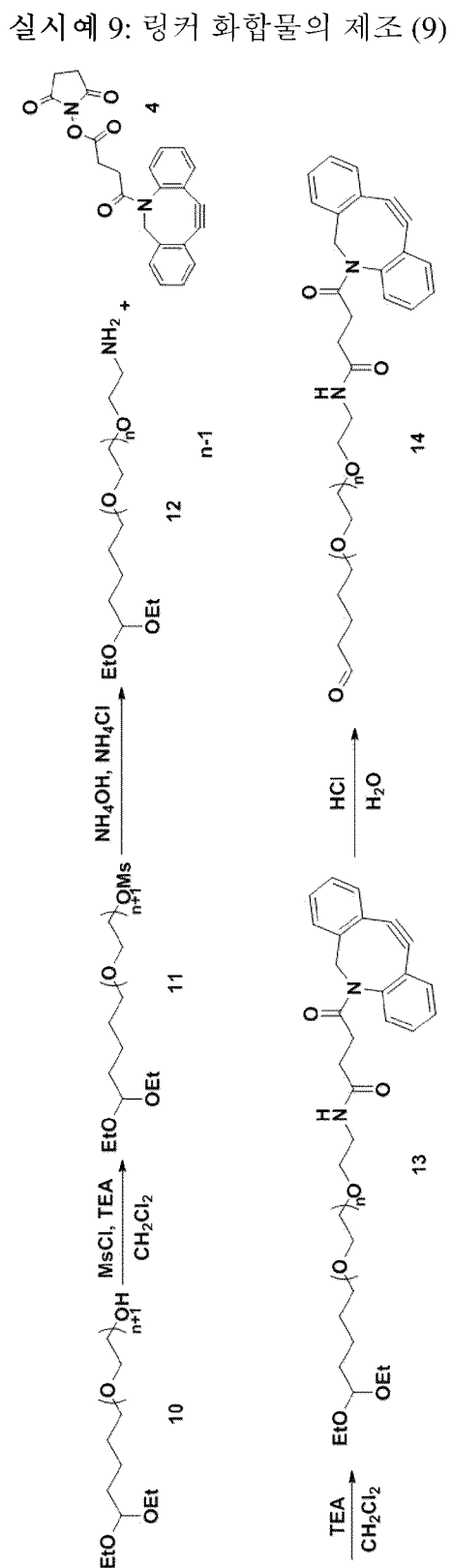
[440] 반응 용기에 화합물 **5**(MW=2000) 0.8g과 증류수 14.4mL를 투입하였다. 0.1N HCl 1.6mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을 확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 20mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 60mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 **(9)**(MW=2000) 549mg을 얻었다. 화합물 **9**(MW=2000)은 ALD-PEG 2K-BCN으로 명명하였다. ¹H NMR (CDCl₃,

400MHz) δ 9.78 (s, 1H), 5.26 (br s, 1H), 4.15 (d, 2H), 3.81-3.41 (m, 186H), 3.36 (m, 2H), 2.68 (t, 2H), 2.26-2.18 (m, 6H), 1.57 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 0.93 (m, 2H).

[441]

[442]

[443]



[444]

[445] 9-1: 화합물 11(MW=10000)의 제조

[446] 반응 용기에 화합물 **10**(MW=10000) 27.7g과 디클로로메탄 83mL를 투입하였다. 반응온도를 10°C 이하로 유지하면서 트리에틸아민 1.54g과 메탄설폰닐클로라이드 1.59g을 첨가한 후 실온에서 3시간동안 교반하였다. 반응 완결 후 물 140mL와 디클로로메탄 57mL를 투입하고 5분동안 교반하였다. 유기층을 분리한 후 물층에 다시 디클로로메탄 140mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기층을 모아 물 140mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 30mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 450mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (**11**)(MW=10000) 25.5g을 얻었다.

[447]

[448] 9-2: 화합물 12(MW=10000)의 제조

[449] 반응 용기에 암모니아 수용액 200mL와 염화암모늄 20g을 투입하였다. 화합물 **11**(MW=10000) 10g을 첨가한 후 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 완결 후 디클로로메탄 200mL를 투입하고 5분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리한 후 물 층에 다시 디클로로메탄 200mL를 투입하여 추가 추출하였다. 유기 층을 모아 증류수 200mL로 세척 후 황산마그네슘으로 건조시키고 여과하여 남은 여액을 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 10mL를 첨가하여 용해시킨 후 메틸 t-부틸에테르 150mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 실온에서 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (**12**)(MW=10000) 8.1g을 얻었다.

[450]

[451] 9-3: 화합물 13(MW=10000)의 제조

[452] 반응 용기에 화합물 **12**(MW=10000) 3g과 디클로로메탄 30mL를 투입하였다. 화합물 **4** 362mg, 트리에틸아민 91mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다. 에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고 디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 3mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 45mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (**13**)(MW=10000) 1.7g을 얻었다.

[453]

[454] 9-4: 화합물 14(MW=10000)의 제조

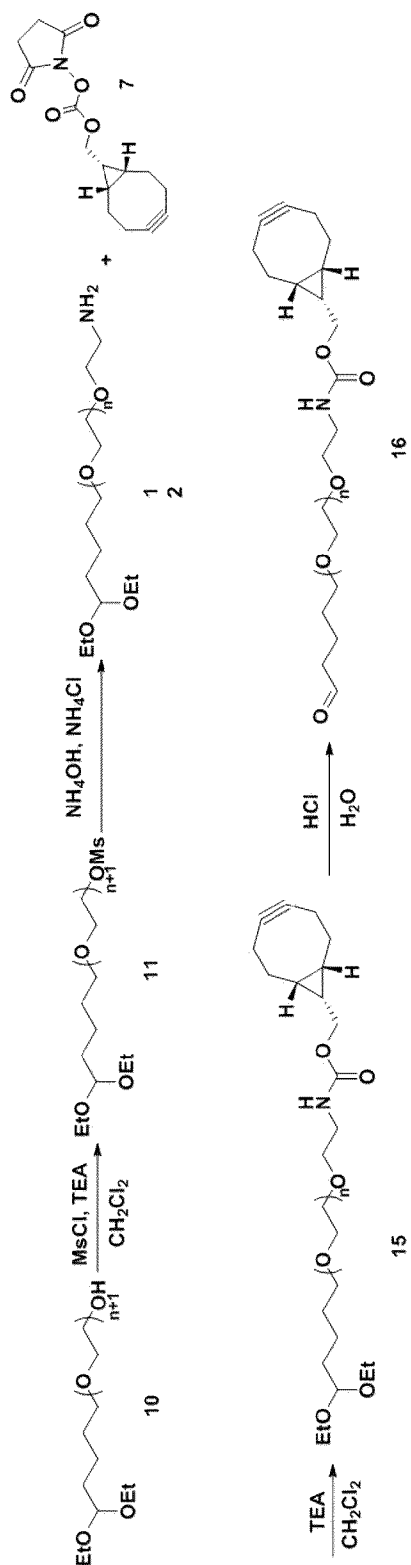
[455] 반응 용기에 화합물 **5**(MW=10000) 1.6g과 증류수 28.8mL를 투입하였다. 0.1N HCl 3.2mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을

확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄 32mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르 30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (14) (MW=10000) 1.2g을 얻었다. 화합물 14(MW=10000)는 PeAL-PEG 10K-DBCO로 명명하였다. 도 6은 링커 화합물 14(MW=10000)의 ¹H NMR 결과이다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.75 (s, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.51 (d, 1H), 7.37-7.19 (m, 6H), 6.11 (br s, 1H), 5.12 (d, 1H), 3.85-3.42 (m, 915H), 3.32 (m, 2H), 2.80 (m, 1H), 2.47-2.41 (m, 3H), 2.16 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.61 (m, 2H).

[456]

[457] 실시예 10: 링커 화합물의 제조 (10)

[458]



[459]

[460] 10-1: 화합물 11(MW=10000)의 제조

[461] 상기 실시예 9-1과 동일한 방법을 수행하여 화합물 11(MW=10000)을 얻었다.

[462]

[463] 10-2: 화합물 12(MW=10000)의 제조

[464] 상기 실시예 9-2와 동일한 방법을 수행하여 화합물 12(MW=10000)를 얻었다.

[465]

[466] 10-3: 화합물 15(MW=10000)의 제조[467] 반응 용기에 화합물 **12**(MW=10000) 3g과 디클로로메탄 30mL를 투입하였다.화합물 **7** 262mg, 트리에틸아민 91mg을 첨가한 후 실온에서 3시간 교반하였다.

반응 완결 후 용매를 감압 증류하고 물 30mL를 투입하여 용해시켰다.

에틸아세테이트 (30mL x 3)를 투입하여 5분 교반 후 물층을 분리하고

디클로로메탄 30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 유기 층을 황산마그네슘으로

건조하고 여과하여 감압 증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 3mL를 투입하여

녹인 후 메틸 t-부틸에테르 45mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을

여과하고 메틸 t-부틸에테르로 세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (**15**)(MW=10000) 1.6g을 얻었다.

[468]

[469] 10-4: 화합물 16(MW=10000)의 제조[470] 반응 용기에 화합물 **5**(MW=10000) 1.5g과 증류수 27mL를 투입하였다. 0.1N

HCl 3mL를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 NMR을 이용하여 반응 완결을

확인하였다. 반응 액을 5%(w/v) 중조 수용액으로 중화하고 디클로로메탄

30mL를 이용하여 2회 추출하였다. 황산마그네슘으로 건조하고 여과하여 감압

증류하였다. 농축액에 디클로로메탄 2mL를 투입하여 녹인 후 메틸 t-부틸에테르

30mL를 20분 동안 적가하였다. 생성된 결정을 여과하고 메틸 t-부틸에테르로

세척한 후 질소 건조하여 목적화합물인 화합물 (**16**) (MW=10000) 1.1g을 얻었다.

화합물 16(MW=10000)는 PeAL-PEG 10K-BCN으로 명명하였다. 도 7은 링커

화합물 16(MW=10000)의 ¹H NMR 결과이다. ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.75 (s,

1H), 5.20 (br s, 1H), 4.12 (d, 2H), 3.85-3.44 (m, 914H), 3.36 (m, 2H), 2.45 (t, 2H),

2.28-2.16 (m, 6H), 1.70 (m, 2H), 1.62-1.59 (m, 4H), 1.18 (m, 1H), 0.93 (m, 2H).

[471]

[472] 실험예 1: 링커 화합물의 질량 분석

[473] 상기 실시예에서 제조한 링커 화합물에 대하여 말디토프(MALDI-TOF)

질량분석기를 사용하여 질량 분석을 수행하였다. 그 결과는 폴리툴

소프트웨어(Polytool software)를 사용하여 분석하였다.

[474] 도 8은 링커 화합물 ALD-PEG 10K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

[475] 도 9는 링커 화합물 ALD-PEG 5K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

[476] 도 10은 링커 화합물 ALD-PEG 3.4K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

[477] 도 11은 링커 화합물 ALD-PEG 2K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

[478] 도 12는 링커 화합물 PeALD-PEG 10K-BCN의 질량 분석 결과이다.

[479] 도 13은 링커 화합물 PeALD-PEG 10K-DBCO의 질량 분석 결과이다.

[480] 도 14는 링커 화합물 ALD-PEG 10K-BCN의 질량 분석 결과이다.

[481]

[482] 실시예 11: 생리활성 폴리펩티드 연결체의 제조 (1)

[483] 실시예 5의 ALD-PEG 10K-BCN 링커에 생리활성 폴리펩티드를 결합시켜 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제조하였다.

[484] 구체적으로, 생리활성 폴리펩티드는 WO 2017/116205 A1에 서열번호 42로 개시된 글루카곤, GLP-1 및 GIP 수용체 모두에 활성을 갖는 삼중활성체(Triple agonist)를 사용하였다. 상기 삼중활성체의 C 말단 위치의 아미노산을 라이신으로 치환하고, 라이신 위치에 아지드기를 도입하여 아지드기가 도입된 삼중활성체를 제조하였으며, 이를 HMT211-azido로 명명하였다.

[485] 상기 제조된 HMT211-azido 분말을 10%(v/v) 10 mM HCl에 용해시킨 후, HMT211-azido와 실시예 5의 ALD-PEG 10K-BCN 링커의 몰비가 1:5가 되도록 하여 HMT211-azido의 최종 농도를 5 mg/ml로 하여 4°C에서 약 2시간 반응시켰다. 이때 반응은 50mM 구연산 나트륨 완충액 (pH 7.5)으로 60%(v/v) 아이소프로판올의 혼합 용매에서 반응 시켰다.

[486] 반응액은 구연산 나트륨 (Sodium Phosphate) (pH 3.0), 45%(v/v) EtOH가 포함된 버퍼와 KCl 농도 구배를 이용한 SP-HP(GE Healthcare) 컬럼을 사용하여 정제하였다. 그 결과, 모노 폐길화된(mono-PEGylated) HMT211-azido-PEG를 수득하였다.

[487]

[488] 실시예 12: 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조 (1)

[489] 다음으로, 상기 실시예 11에서 정제된 모노 폐길화된(mono-PEGylated) HMT211-azido-PEG와 면역글로불린 Fc의 몰비가 1:4가 되도록 하고, 최종 농도를 10 mg/ml로 하여 25°C에서 15시간 반응시켰다. 이때 반응액은 10mM 인산화칼륨 (potassium Phosphate) (pH 6.0)과 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[490] 반응이 종결된 후 반응액은 Tris-HCl (pH 7.5) 버퍼와 NaCl 농도 구배를 이용하여 S.15Q (GE, 미국) 컬럼에 적용하여, HMT211-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 정제하였다.

[491] 용출된 HMT211-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체는 SDS-PAGE를 사용하여 분석하여 순도를 확인하였다.

[492] 도 15는 HMT211-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: HMT211-azido 펩티드, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) HMT211-azido-PEG, 3: 면역글로불린 Fc, 4: HMT211-azido와 면역글로불린 Fc를 ALD-PEG 10K-BCN 링커로 연결한 HMT211-azido-PEG-면역글로불린 FC 결합체.

[493] 도 15에 나타난 바와 같이, 실시예 5에 따른 링커 화합물을 사용하면 생리활성 폴리펩티드와 면역글로불린 Fc가 양 말단에 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 높은 수율로 얻을 수 있음을 확인하였다.

[494]

[495] 실시예 13: 생리활성 폴리펩티드 연결체의 제조 (2)

[496] 실시예 1의 ALD-PEG 10K-DBCO 링커에 생리활성 폴리펩티드를 결합시켜 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제조하였다.

[497] 구체적으로, 생리활성 폴리펩티드는 GLP-2의 C 말단에 아지도 라이신이 도입된 GLP-2 유도체-azido를 사용하였다. 예시적으로, 본 실시예에서 GLP-2 유도체-azido는 천연형 GLP-2에서 C 말단에 아지도 라이신이 도입되고, 2번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환되고, N 말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소가 제거된 것을 사용하였다.

[498] 실시예 1의 ALD-PEG 10K-DBCO (10kDa)를 상기 GLP-2 유도체-azido에 폐길화시키기 위하여, 상기 GLP-2 유도체-azido 분말 : ALD-PEG 10K-DBCO의 물 비율이 1:5가 되도록 GLP-2 유도체-azido의 농도를 5 mg/ml로 하여 4°C에서 약 4시간 반응시켰다. 이때 반응은 50mM 인산 나트륨 완충액 (pH 7.5) 로 60%(v/v) 아이소프로판올의 혼합 용매에서 반응 시켰다.

[499] 반응액은 비스-트리스 (Bis-Tris) (pH 6.2)와 염화나트륨 (sodium chloride) 농도 구배를 이용한 Q Sepharose High Performance (GE Healthcare, 미국) 컬럼을 적용하여 정제하였다. 그 결과, SDS-PAGE 분석을 통해 모노 폐길화된 (mono-PEGylated) GLP-2 유도체-azido-PEG가 정제되었음을 확인하였다(도 16).

[500]

[501] 실시예 14: 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조 (2)

[502] 다음으로, 상기 실시예 13의 방법에서 정제된 모노 폐길화된 (mono-PEGylated) GLP-2 유사체-azido-PEG와 면역글로불린 Fc의 물비가 1:4가 되도록 하고, 최종 농도를 10 mg/ml로 하여 2~8°C에서 12~18시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100mM 인산칼륨 (Potassium Phosphate), 20%(v/v) 이소프로판올 (isopropanol) (pH 6.0)에 환원제인 20mM 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride(NaCNBH3))가 첨가된 환경하에서 수행되었다.

[503] 반응이 종결된 후 반응액은 염화나트륨 (sodium chloride)와 트리스 (Tris) (pH 7.5), 이소프로판올 버퍼의 농도 구배를 이용하여 Butyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, 미국) 컬럼에 적용하여, GLP-2 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 정제하였다.

[504] 용출된 GLP-2 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체는 SDS-PAGE를 사용하여 분석하여 순도를 확인하였다.

[505] 도 16은 GLP-2 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 비환원조건(non-reducing) SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: GLP-2 유사체, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) GLP-2 유사체, 3: 면역글로불린 Fc, 4: GLP-2 유사체-azido와 면역글로불린 Fc를 ALD-PEG 10K-DBCO 링커로 연결한 GLP-2 유사체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체.

[506] 도 16에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에 따른 링커 화합물을 사용하면 생리활성

폴리펩티드와 면역글로불린 Fc가 양 말단에 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 높은 수율로 얻을 수 있음을 확인하였다.

[507]

[508] 실시예 15: 생리활성 폴리펩티드 연결체의 제조 (3)

[509] 실시예 10의 PeAL-PEG 10K-BCN 링커에 생리활성 폴리펩티드를 결합시켜 생리활성 폴리펩티드 연결체를 제조하였다.

[510] 구체적으로, 생리활성 폴리펩티드는 WO 2017/003191 A1에 서열번호 37로 개시된 글루카곤 유사체를 사용하였다. 상기 글루카곤 유사체의 C 말단 위치의 아미노산을 라이신으로 치환하고, 라이신 위치에 아지드기를 도입하여 아지드기가 도입된 글루카곤 유사체를 제조하였으며, 이를 글루카곤 유사체-azido로 명명하였다.

[511] 실시예 10의 PeAL-PEG 10K-BCN (10kDa)를 상기 글루카곤 유사체-azido에 폐길화시키기 위하여, 상기 글루카곤 유사체-azido : PeAL-PEG 10K-BCN의 물 비율이 1:5가 되도록 글루카곤 유사체-azido의 농도를 5 mg/ml로 하여 4°C에서 약 4시간 반응시켰다. 이때 반응은 50mM 인산 나트륨 완충액 (pH 7.5)로 60%(v/v) 아이소프로판올과 20%(v/v) DMSO의 혼합 용매에서 반응 시켰다.

[512] 반응액은 구연산 나트륨 (sodium citrate) (pH 3.0)와 45%(v/v) 에탄올 (Ethanol)이 포함된 염화칼륨 (potassium chloride) 농도 구배를 이용한 SP Sepharose High Performance (GE Healthcare, 미국) 컬럼을 적용하여 정제하였다. 그 결과, SDS-PAGE 분석을 통해 모노 폐길화된 (mono-PEGylated) 글루카곤 유사체-azido-PEG가 정제되었음을 확인하였다(도 17).

[513]

[514] 실시예 16: 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조 (3)

[515] 다음으로, 상기 실시예 15의 방법에서 정제된 모노 폐길화된 (mono-PEGylated) 글루카곤 유사체-azido-PEG와 면역글로불린 Fc의 물비가 1:4가 되도록 하고, 최종 농도를 10 mg/ml로 하여 2~8°C에서 12~18시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100mM 인산칼륨 (Potassium Phosphate), 20%(v/v) 이소프로판올 (isopropanol) (pH 6.0)에 환원제인 20mM 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride(NaCNBH3))가 첨가된 환경하에서 수행되었다.

[516] 반응이 종결된 후 반응액은 트리스 (Tris) (pH 7.5)가 포함된 완충액과 염화나트륨 (sodium chloride)의 농도 구배를 이용하여 Source 15Q (GE Healthcare, 미국) 컬럼에 적용하여, 글루카곤 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 정제하였다.

[517] 용출된 글루카곤 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체는 SDS-PAGE를 사용하여 분석하여 순도를 확인하였다.

[518] 도 17은 글루카곤 유사체-azido-PEG-면역글로불린 Fc 결합체에 대한 비환원조건(non-reducing) SDS-PAGE 순도 분석 결과이다. M: Marker, 1: 글루카곤 유사체, 2: 모노 폐길화된(mono-PEGylated) 글루카곤 유사체, 3:

면역글로불린 Fc, 4: 글루카곤 유사체-azido와 면역글로불린 Fc를 PeAL-PEG 10K-BCN 링커로 연결한 글루카곤 유사체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체.

[519] 도 17에 나타낸 바와 같이, 실시예 10에 따른 링커 화합물을 사용하면 생리활성 폴리펩티드와 면역글로불린 Fc가 양 말단에 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체를 높은 수율로 얻을 수 있음을 확인하였다.

[520]

[521] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 상기 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1의 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물, 및 약제학적으로 허용 가능한 염에서 선택된 화합물:

[화학식 1]

R1-비펩티드성 중합체-X-R2

상기 화학식 1에서,

R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;

비펩티드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)), PLGA(poly(lactic-glycolic acid)), 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산, 및 다당류(polysaccharide)로 구성된 군으로부터 선택되고; X는 -(CH₂)_jNHCO- 또는 -(CH₂)_jNHCS- 이며, 여기에서 j는 0 내지 6의 정수이고;

R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고,

여기에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고,

Z는 O 또는 S이고,

Y는 C₂-C₆알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는

디아릴헤테로시클로알킬일이고(여기서, 각각의 시클로알킬일은 3 내지 8개의 탄소원자를 갖고, 각각의 아릴은 5 내지 8개의 탄소원자를 가지며, 각각의 헤테로시클로알킬일은 3 내지 8개의 원자를 포함하고, 고리 원자 중 1 내지 3개에 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 포화된 고리이다),

k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며,

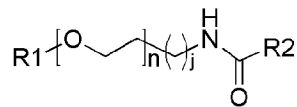
상기 알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는

디아릴헤테로시클로알킬일은 C₁-C₆알킬, C₁-C₆알콕시, C₁-C₆알콕시카르보닐, 옥소, 또는 할로젠으로 치환 또는 비치환될 수 있다.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 R1은 알데히드기를 포함하는 C₁-C₆ 지방족

탄화수소 그룹인 것인 화합물.

- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 Y는 BCN(bicyclo[6.1.0]nonyne), DBCO(dibenzocyclooctyne), DIFO(difluorinated cyclooctyne), DIFO2, DIFO3, DIBO(dibenzoannulated cyclooctyne), BARAC(biarylazacyclooctynone), OCT(cyclooctyne), ALO(aryl-less cyclooctyne), MOFO(monofluorinated cyclooctyne), DIMAC(dimethoxyazacyclooctyne), TMDIBO(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO), COMBO(carboxymethylmonobenzocyclooctyne), PYRROC(pyrrolocyclooctyne), DIBAC(dibenzo-aza-cyclooctyne), TMTH(3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne), Sondheimer diyne, 및 S-DIBO(sulfonylated DIBO)로 구성된 군에서 선택되는 것인 화합물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1은 하기 화학식 1a인 것인 화합물:
- [화학식 1a]



상기 화학식 1a에서,

n은 20 내지 1000의 정수이고;

j는 0 내지 6의 정수이고;

R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;

R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고,

여기에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀

헤테로아릴렌이고,

Z는 O 또는 S이고,

Y는 BCN(bicyclo[6.1.0]nonyne), DBCO(dibenzocyclooctyne),

DIFO(difluorinated cyclooctyne), DIFO2, DIFO3, DIBO(dibenzoannulated cyclooctyne), BARAC(biarylazacyclooctynone), OCT(cyclooctyne),

ALO(aryl-less cyclooctyne), MOFO(monofluorinated cyclooctyne), DIMAC(dimethoxyazacyclooctyne), TMDIBO(2,3,6,7-tetramethoxy-DIBO),

COMBO(carboxymethylmonobenzocyclooctyne),

PYRROC(pyrrolocyclooctyne), DIBAC(dibenzo-aza-cyclooctyne),

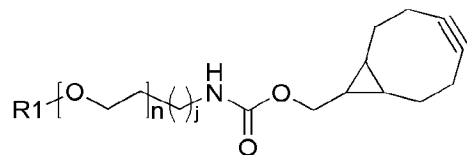
TMTH(3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne), Sondheimer diyne, 및

S-DIBO(sulfonylated DIBO)로 구성된 군에서 선택되고,

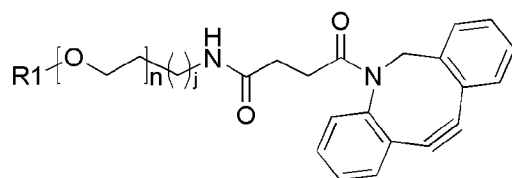
k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니다.

[청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 화학식 1a는 하기 화학식 2a 내지 2n 중 어느 하나인 것인 화합물:

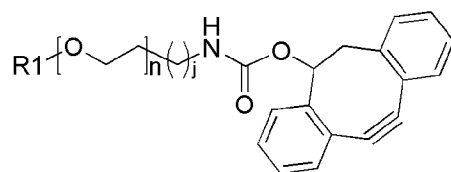
[화학식 2a]



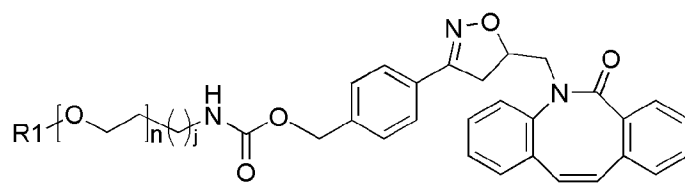
[화학식 2b]



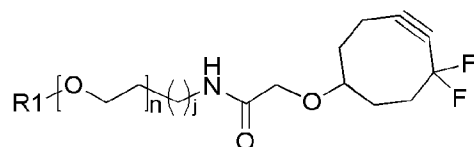
[화학식 2c]



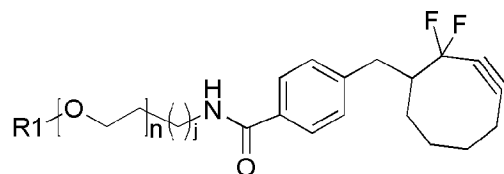
[화학식 2d]



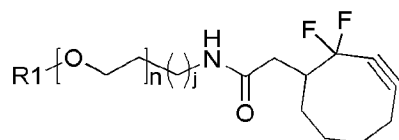
[화학식 2e]



[화학식 2f]



[화학식 2g]



R1[OCH2CH2]n[CH2CH2]jNC(=O)c1ccc(cc1)COc2c3ccccc3c(c2)C#C
$$\text{R1}[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n(\text{CH}_2)_j\text{NHCOCH}_2\text{O}[\text{C}_8\text{H}_{10}]$$
R1OCCnCCjNC(=O)c1ccc(cc1)C2(F)C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C24R1OCCn(C)CCNC(=O)CCCCC(=O)N1C#CC(OC)C(OC)CC1COC1=CC=C2C(=C1)C=C3C(=C2)C(=C4C(=C3)C(=C5C(=C4)C(=C6C(=C5)C(=C7C(=C6)C(=C8C(=C7)C(=C9C(=C8)C(=C10C(=C9)C(=C11C(=C10)C(=C12C(=C11)C(=C13C(=C12)C(=C14C(=C13)C(=C15C(=C14)C(=C16C(=C15)C(=C17C(=C16)C(=C18C(=C17)C(=C19C(=C18)C(=C20C(=C19)C(=C21C(=C20)C(=C22C(=C21)C(=C23C(=C22)C(=C24C(=C23)C(=C25C(=C24)C(=C26C(=C25)C(=C27C(=C26)C(=C28C(=C27)C(=C29C(=C28)C(=C30C(=C29)C(=C31C(=C30)C(=C32C(=C31)C(=C33C(=C32)C(=C34C(=C33)C(=C35C(=C34)C(=C36C(=C35)C(=C37C(=C36)C(=C38C(=C37)C(=C39C(=C38)C(=C40C(=C39)C(=C41C(=C40)C(=C42C(=C41)C(=C43C(=C42)C(=C44C(=C43)C(=C45C(=C44)C(=C46C(=C45)C(=C47C(=C46)C(=C48C(=C47)C(=C49C(=C48)C(=C50C(=C49)C(=C51C(=C50)C(=C52C(=C51)C(=C53C(=C52)C(=C54C(=C53)C(=C55C(=C54)C(=C56C(=C55)C(=C57C(=C56)C(=C58C(=C57)C(=C59C(=C58)C(=C60C(=C59)C(=C61C(=C60)C(=C62C(=C61)C(=C63C(=C62)C(=C64C(=C63)C(=C65C(=C64)C(=C66C(=C65)C(=C67C(=C66)C(=C68C(=C67)C(=C69C(=C68)C(=C70C(=C69)C(=C71C(=C70)C(=C72C(=C71)C(=C73C(=C72)C(=C74C(=C73)C(=C75C(=C74)C(=C76C(=C75)C(=C77C(=C76)C(=C78C(=C77)C(=C79C(=C78)C(=C80C(=C79)C(=C81C(=C80)C(=C82C(=C81)C(=C83C(=C82)C(=C84C(=C83)C(=C85C(=C84)C(=C86C(=C85)C(=C87C(=C86)C(=C88C(=C87)C(=C89C(=C88)C(=C90C(=C89)C(=C91C(=C90)C(=C92C(=C91)C(=C93C(=C92)C(=C94C(=C93)C(=C95C(=C94)C(=C96C(=C95)C(=C97C(=C96)C(=C98C(=C97)C(=C99C(=C98)C(=C100C(=C99)C(=C101C(=C100)C(=C102C(=C101)C(=C103C(=C102)C(=C104C(=C103)C(=C105C(=C104)C(=C106C(=C105)C(=C107C(=C106)C(=C108C(=C107)C(=C109C(=C108)C(=C110C(=C109)C(=C111C(=C110)C(=C112C(=C111)C(=C113C(=C112)C(=C114C(=C113)C(=C115C(=C114)C(=C116C(=C115)C(=C117C(=C116)C(=C118C(=C117)C(=C119C(=C118)C(=C120C(=C119)C(=C121C(=C120)C(=C122C(=C121)C(=C123C(=C122)C(=C124C(=C123)C(=C125C(=C124)C(=C126C(=C125)C(=C127C(=C126)C(=C128C(=C127)C(=C129C(=C128)C(=C130C(=C129)C(=C131C(=C130)C(=C132C(=C131)C(=C133C(=C132)C(=C134C(=C133)C(=C135C(=C134)C(=C136C(=C135)C(=C137C(=C136)C(=C138C(=C137)C(=C139C(=C138)C(=C140C(=C139)C(=C141C(=C140)C(=C142C(=C141)C(=C143C(=C142)C(=C144C(=C143)C(=C145C(=C144)C(=C146C(=C145)C(=C147C(=C146)C(=C148C(=C147)C(=C149C(=C148)C(=C150C(=C149)C(=C151C(=C150)C(=C152C(=C151)C(=C153C(=C152)C(=C154C(=C153)C(=C155C(=C154)C(=C156C(=C155)C(=C157C(=C156)C(=C158C(=C157)C(=C159C(=C158)C(=C160C(=C159)C(=C161C(=C160)C(=C162C(=C161)C(=C163C(=C162)C(=C164C(=C163)C(=C165C(=C164)C(=C166C(=C165)C(=C167C(=C166)C(=C168C(=C167)C(=C169C(=C168)C(=C170C(=C169)C(=C171C(=C170)C(=C172C(=C171)C(=C173C(=C172)C(=C174C(=C173)C(=C175C(=C174)C(=C176C(=C175)C(=C177C(=C176)C(=C178C(=C177)C(=C179C(=C178)C(=C180C(=C179)C(=C181C(=C180)C(=C182C(=C181)C(=C183C(=C182)C(=C184C(=C183)C(=C185C(=C184)C(=C186C(=C185)C(=C187C(=C186)C(=C188C(=C187)C(=C189C(=C188)C(=C190C(=C189)C(=C191C(=C190)C(=C192C(=C191)C(=C193C(=C192)C(=C194C(=C193)C(=C195C(=C194)C(=C196C(=C195)C(=C197C(=C196)C(=C198C(=C197)C(=C199C(=C198)C(=C200C(=C199)C(=C201C(=C200)C(=C202C(=C201)C(=C203C(=C202)C(=C204C(=C203)C(=C205C(=C204)C(=C206C(=C205)C(=C207C(=C206)C(=C208C(=C207)C(=C209C(=C208)C(=C210C(=C209)C(=C211C(=C210)C(=C212C(=C211)C(=C213C(=C212)C(=C214C(=C213)C(=C215C(=C214)C(=C216C(=C215)C(=C217C(=C216)C(=C218C(=C217)C(=C219C(=C218)C(=C220C(=C219)C(=C221C(=C220)C(=C222C(=C221)C(=C223C(=C222)C(=C224C(=C223)C(=C225C(=C224)C(=C226C(=C225)C(=C227C(=C226)C(=C228C(=C227)C(=C229C(=C228)C(=C230C(=C229)C(=C231C(=C230)C(=C232C(=C231)C(=C233C(=C232)C(=C234C(=C233)C(=C235C(=C234)C(=C236C(=C235)C(=C237C(=C236)C(=C238C(=C237)C(=C239C(=C238)C(=C240C(=C239)C(=C241C(=C240)C(=C242C(=C241)C(=C243C(=C242)C(=C244C(=C243)C(=C245C(=C244)C(=C246C(=C245)C(=C247C(=C246)C(=C248C(=C247)C(=C249C(=C248)C(=C250C(=C249)C(=C251C(=C250)C(=C252C(=C251)C(=C253C(=C252)C(=C254C(=C253)C(=C255C(=C254)C(=C256C(=C255)C(=C257C(=C256)C(=C258C(=C257)C(=C259C(=C258)C(=C260C(=C259)C(=C261C(=C260)C(=C262C(=C261)C(=C263C(=C262)C(=C264C(=C263)C(=C265C(=C264)C(=C266C(=C265)C(=C267C(=C266)C(=C268C(=C267)C(=C269C(=C268)C(=C270C(=C269)C(=C271C(=C270)C(=C272C(=C271)C(=C273C(=C272)C(=C274C(=C273)C(=C275C(=C274)C(=C276C(=C275)C(=C277C(=C276)C(=C278C(=C277)C(=C279C(=C278)C(=C280C(=C279)C(=C281C(=C280)C(=C282C(=C281)C(=C283C(=C282)C(=C284C(=C283)C(=C285C(=C284)C(=C286C(=C285)C(=C287C(=C286)C(=C288C(=C287)C(=R1[OCH2CH2]n[CH2CH2]jNC(=O)c1ccc2c(c1)C=CC=CC=C2R1[OCH2CH2]nNHC(=O)OCCCN1C(=O)c2ccccc2C1=O

상기 화학식 2a 내지 2n에서,

n은 20 내지 1000의 정수이고;

j는 0 내지 6의 정수이고;

R1은 알데히드기를 포함하는 C₁-C₆ 지방족 탄화수소 그룹이다.

[청구항 6] 비펩티드성 중합체의 일 말단에 아미노기(-NH₂)를 도입한 후, 상기 아미노기와의 아미드 결합에 의해 비펩티드성 중합체의 일 말단에 R2를 도입하는 단계로서, 상기 R2는 청구항 1에서 정의된 바와 같은 것인 단계; 및

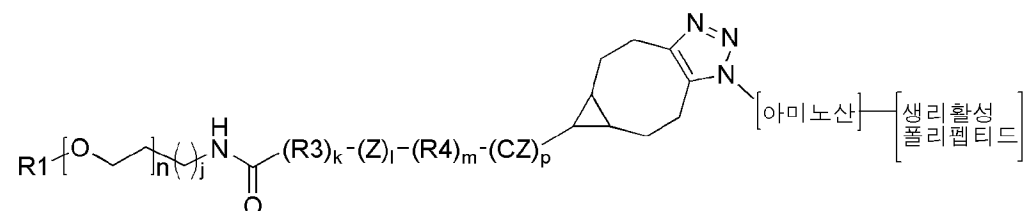
상기 R2가 도입된 비펩티드성 중합체의 다른 일 말단에

2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀ 아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹을 도입하는 단계를 포함하는, 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 따른 화합물의 제조방법.

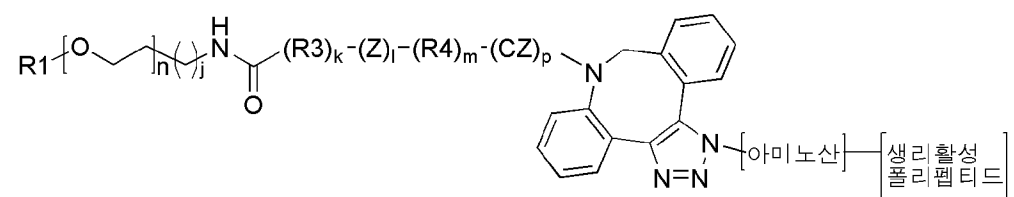
[청구항 7] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 따른 화합물에 작용기 Y를 통해 생리활성 폴리펩티드가 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

[청구항 8] 청구항 7에 있어서, 생리활성 폴리펩티드에 아지드기가 도입된 다음, 상기 아지드기와 화학식 1의 화합물의 작용기 Y의 에틴일렌기(-C≡C-)가 서로 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응(cycloaddition)에 의해 1,2,3-트리아졸을 형성함으로써 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

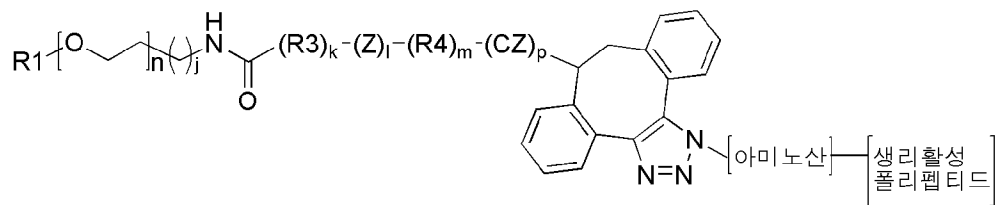
[청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체가 하기 화학식 3a 내지 3l 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체: [화학식 3a]



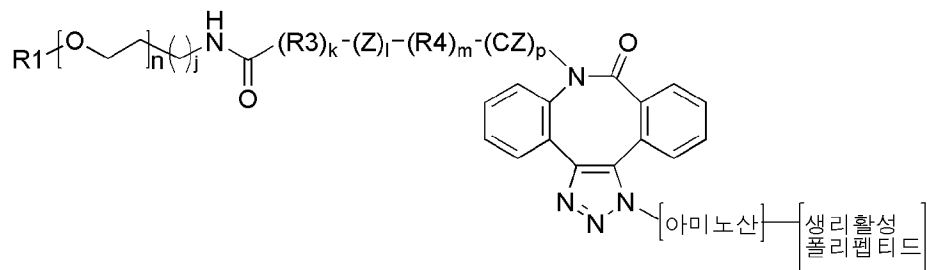
[화학식 3b]



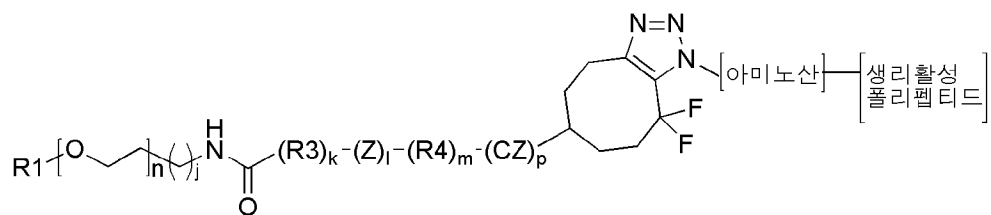
[화학식 3c]



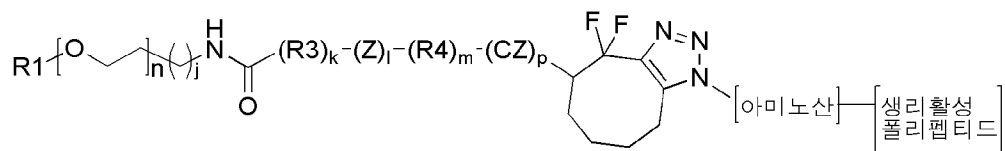
[화학식 3d]



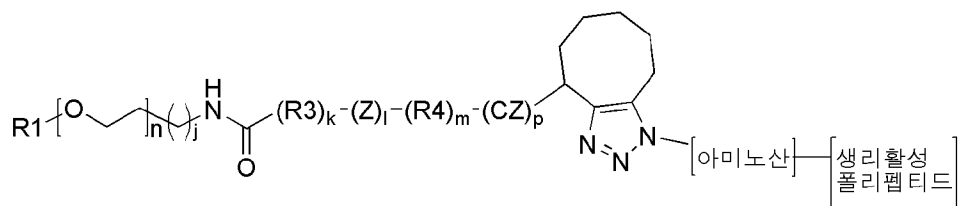
[화학식 3e]



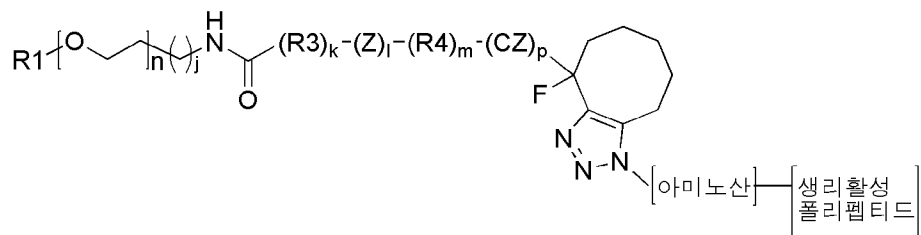
[화학식 3f]



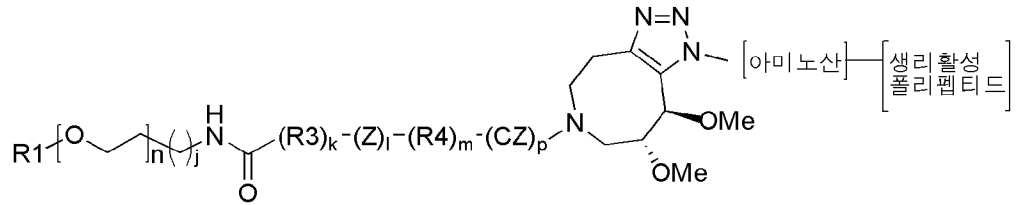
[화학식 3g]



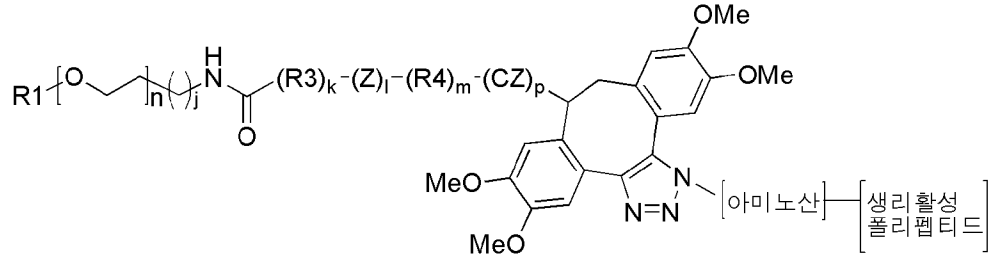
[화학식 3h]



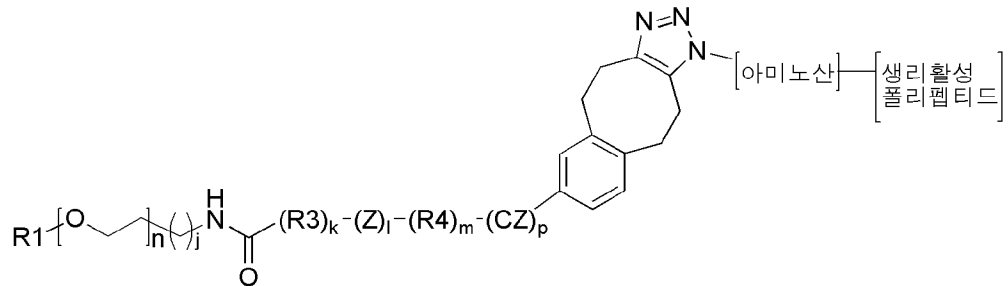
[화학식 3i]



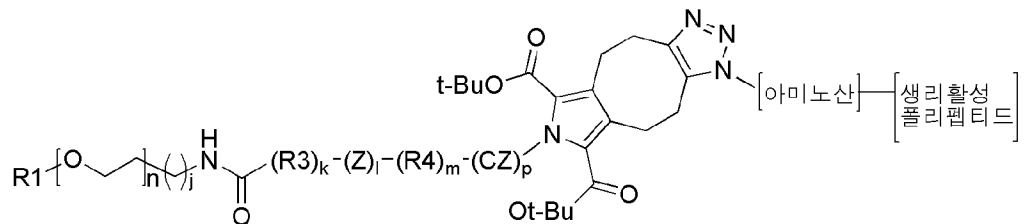
[화학식 3j]



[화학식 3k]



[화학식 3l]



상기 화학식 3a 내지 3l에서,

n은 20 내지 1000의 정수이고;

j는 0 내지 6의 정수이고;

R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;

R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀

헤테로아릴렌이고;

Z는 O 또는 S이고;

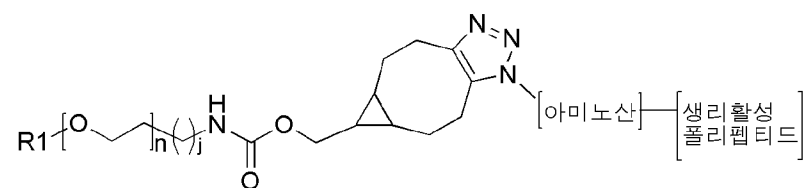
k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며;

[아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이다.

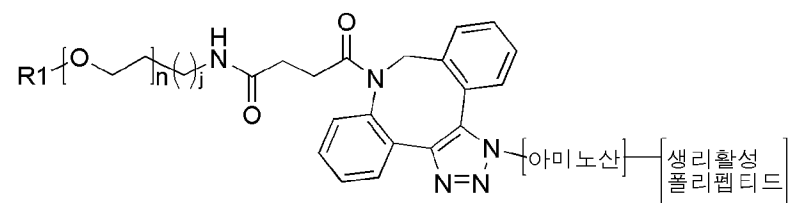
[청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 3a 내지 3l의 트리아졸 질소는 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결되어 있는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

[청구항 11] 청구항 7에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드 연결체는 하기 화학식 4a 내지 화학식 4n 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체:

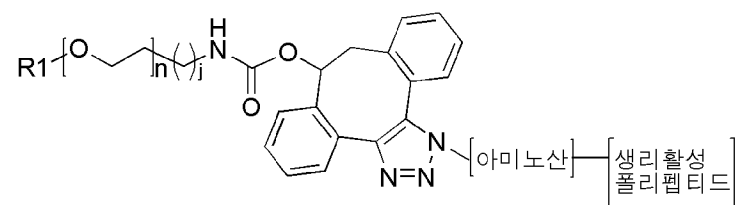
[화학식 4a]



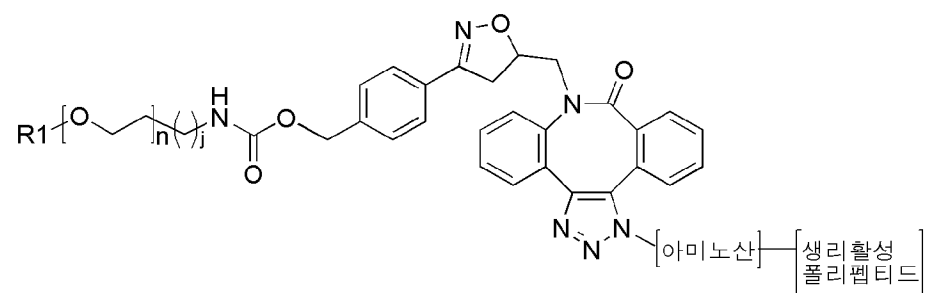
[화학식 4b]



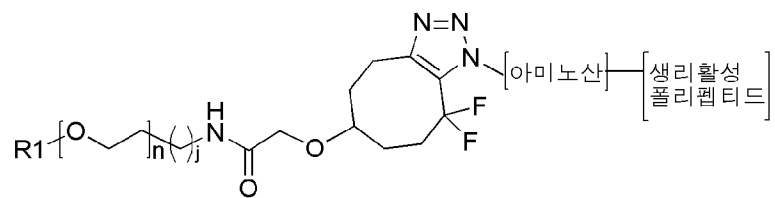
[화학식 4c]



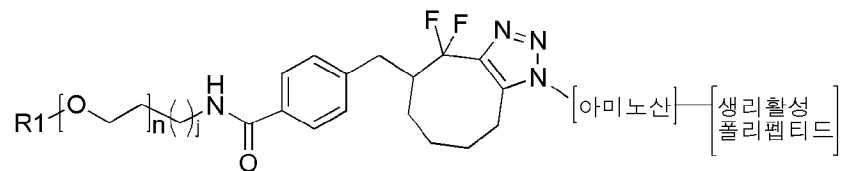
[화학식 4d]



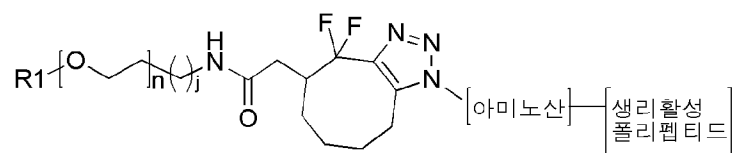
[화학식 4e]



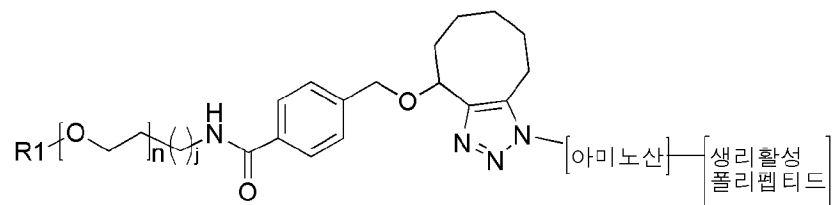
[화학식 4f]



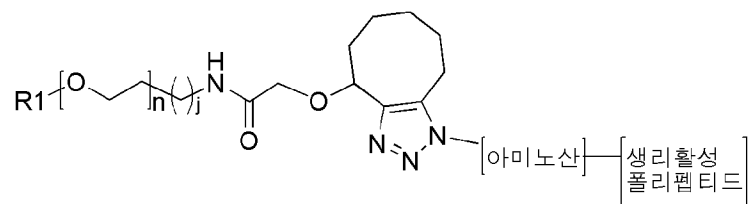
[화학식 4g]



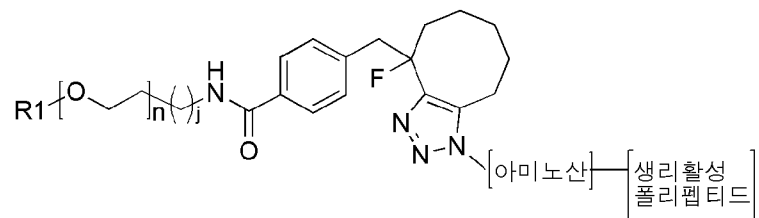
[화학식 4h]



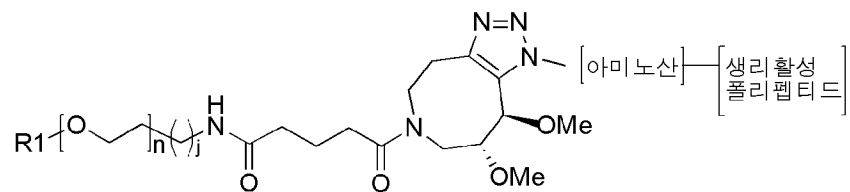
[화학식 4i]



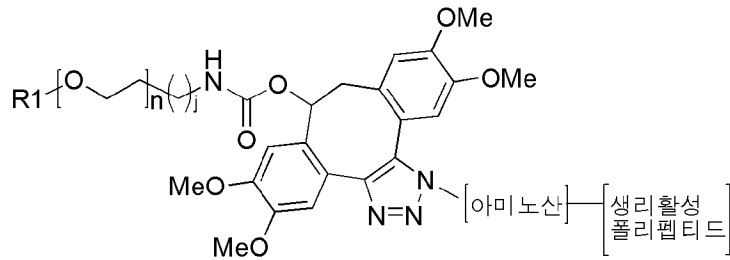
[화학식 4j]



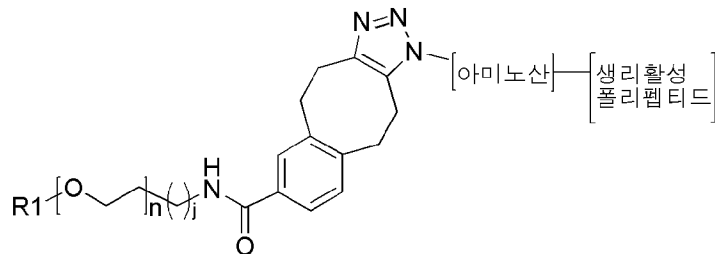
[화학식 4k]



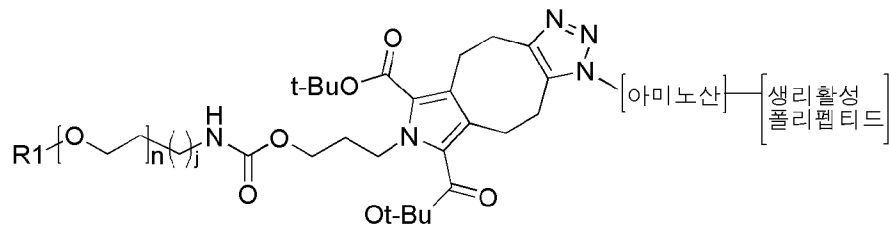
[화학식 4l]



[화학식 4m]



[화학식 4n]



상기 화학식 4a 내지 4n에서,
 n은 20 내지 1000의 정수이고;
 j는 0 내지 6의 정수이고;

R1은 알데히드기를 포함하는 C₁-C₆ 지방족 탄화수소 그룹이고;

[아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이다.

[청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 4a 내지 4n의 트리아졸 질소는 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결되어 있는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

[청구항 13] 청구항 7에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드가 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 인슐린 분비 펩티드, 뉴로펩티드(neuropeptide), 뇌하수체 호르몬, 항-비만 펩티드, 항-바이러스 펩티드 및 생리활성을 갖는 비천연형 펩티드 유도체, 구조단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

[청구항 14] 청구항 7에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드가 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin),

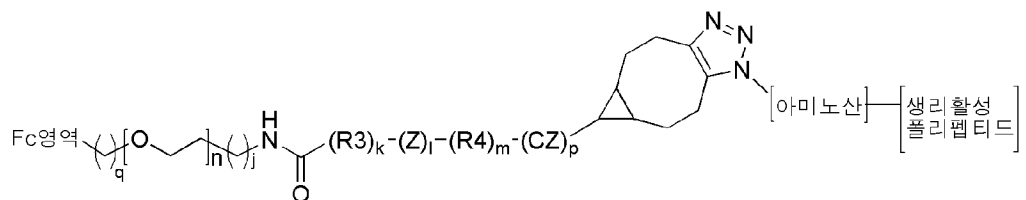
아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(incrētins), 지방(adipose)에서 분비되는 아디포킨류(adipokines), 뇌 분비 뉴로펩티드류(neuropeptides), 근육분비 펩티드 혹은 단백질류, 혈관작용장펩티드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩티드(natriuretic peptide), 소마토스타틴, NPY(neuropeptide Y), GLP-1(Glucagon-like peptide-1), GLP-2(Glucagon-like peptide-2), 엑센딘-4(Exendin-4), 옥신토모듈린(Oxyntomodulin), 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor), 안지오텐신, 브래디키닌, 칼시토닌, 부신피질 자극호르몬(Corticotropin), 엘레도이신(Eledoisin), 옥시토신(Oxytocin), 바소프레신(vasopressin), 황체 형성호르몬, 황체 자극호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 여포 자극호르몬, 부갑상선 호르몬, 쉰크레틴(secretin), 세르모레린(Sermorelin), 인간 성장호르몬(hGH), 성장호르몬 방출 펩티드, 콜로니 자극인자(GCSF)류, 인터페론(IFN)류, 인터페론 수용체, 인터루킨(Interleukin)류, 인터루킨 수용체, 인터루킨 결합 단백질, 프로락틴 방출 펩티드, 오렉신(Orexin), 갑상선 방출 펩티드, 콜레시스토키닌(Cholecystokinin), 가스트린억제 펩티드, 칼모듈린, 가스트린 유리 펩티드(Gastric releasing peptide), 모틸린(Motilin), 관활성장관펩티드(Vasoactiveintestinal peptide), 심방나트륨이뇨 펩티드(Atrial natriuretic peptide; ANP), B형 나트륨이뇨 펩티드(B-type natriuretic peptide; BNP), C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic peptide; CNP), 뉴로키닌(Neurokinin) A, 뉴로메딘(Neuromedin), 레닌(Renin), 엔도텔린(Endothelin), 사라포톡신 펩티드(Sarafotoxin peptide), 카르소모르핀 펩티드(Carsomorphin peptide), 데모르핀(Dermorphin), 디노르핀(Dynorphin), 엔도르핀(Endorphin), 엔케팔린(Enkephalin), 중양괴사인자, 중양괴사인자 수용체, 유로키나아제 수용체, 중양억제인자, 콜라게나제 억제제, 티모포이에틴(Thymopoietin), 티물린(Thymulin), 티모펜틴(Thymopentin), 티모신(Tymosin), 흉선 체액성 인자(Thymichumoral factor), 아드레노모듈린(Adrenomodullin), 알라토스타틴(Allatostatin), 아밀로이드 베타-프로테인 단편(Amyloid beta-protein fragment), 항균성 펩티드, 항산화제 펩티드, 봄베신(Bombesin), 오스테오칼신(Osteocalcin), CART 펩티드, E-셀렉틴(E-selectin), ICAM-1, VCAM-1, 류코카인(Leucokine), 크링글-5(Kringle-5), 라미닌(Laminin), 인히빈(Inhibin), 갈라닌(Galanin), 피브로넥틴(Fibronectin), 판크레아스타틴(Pancreastatin), 푸제온(Fuzeon), 글루카곤-유사 펩티드, 옥신토모듈린, 지프로테인 관련수용체(Gprotein-coupled receptor), 효소류, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩티드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민,

α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩티드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩티드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프타틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 신경 성장인자, 릴렉신, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 체장 폴리펩티드, 가스트린 방출 펩티드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편, 적혈구 증식인자, 백혈구 증식인자, 및 이들의 유사체(analog)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성 폴리펩티드 연결체.

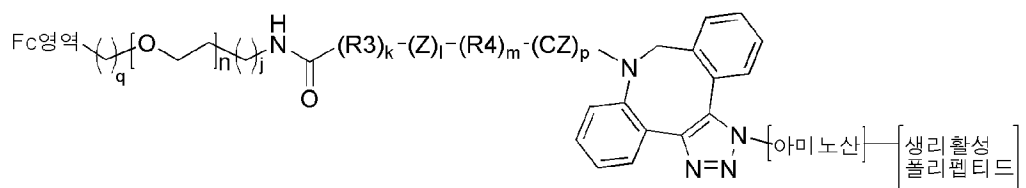
[청구항 15] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 따른 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 16] 청구항 15에 있어서, 생리활성 폴리펩티드에 아지드기가 도입된 다음, 상기 아지드기와 화학식 1의 화합물의 작용기 Y의 에틸일렌기가 클릭반응에 의한 환부가반응에 의해 1,2,3-트리아졸을 형성함으로써 결합되고, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 아미노산이 화학식 1의 화합물의 R1과 공유 결합에 의해 결합된 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

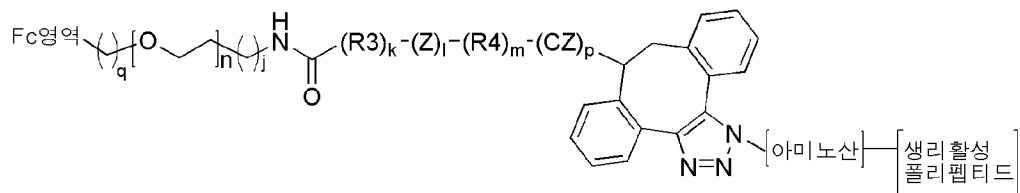
[청구항 17] 청구항 15에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 하기 화학식 5a 내지 5l 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체:
[화학식 5a]



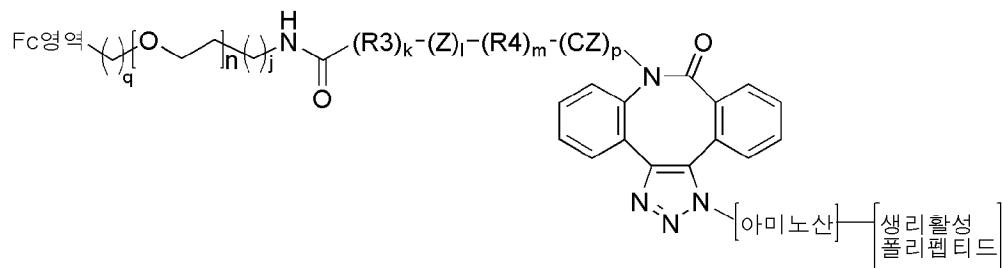
[화학식 5b]



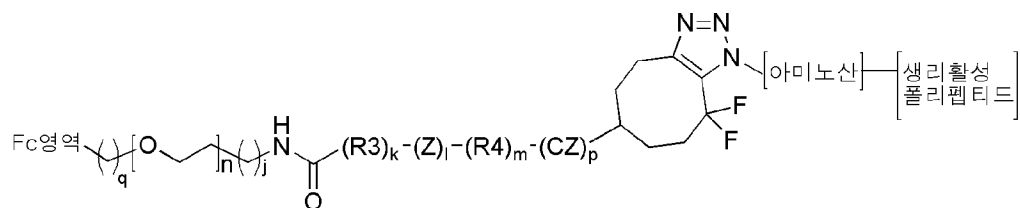
[화학식 5c]



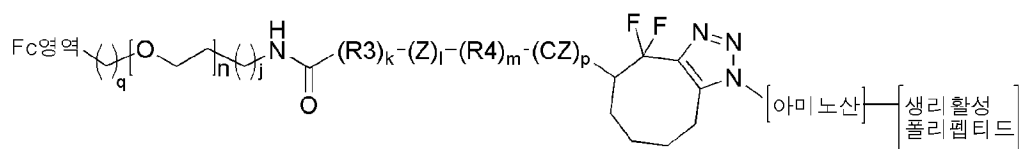
[화]학식 5d]



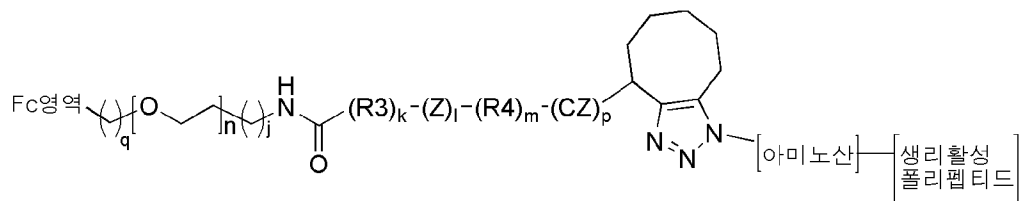
[화]학식 5e]



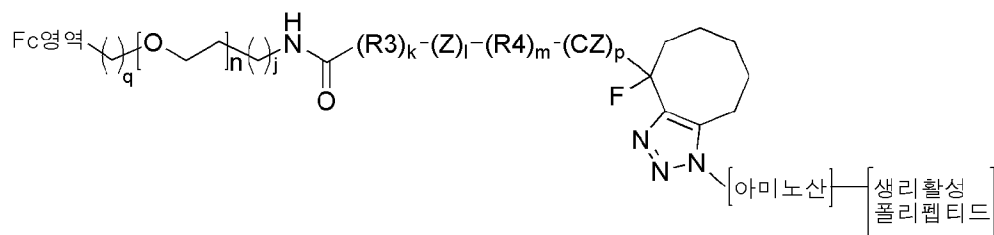
[화]학식 5f]



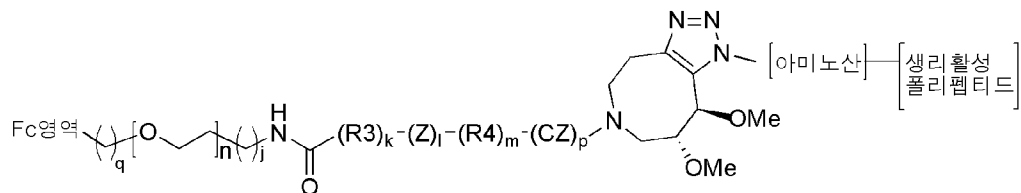
[화]학식 5g]



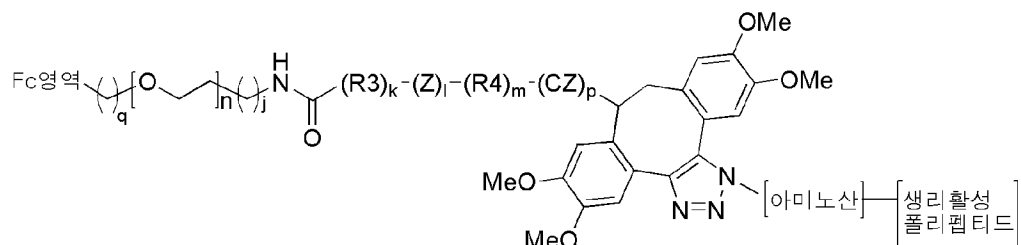
[화]학식 5h]



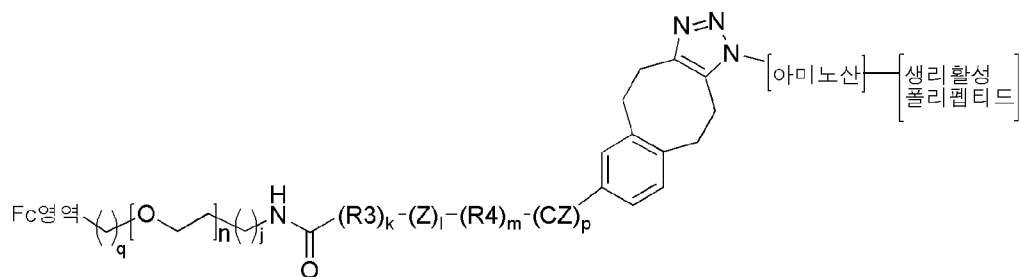
[화]학식 5i]



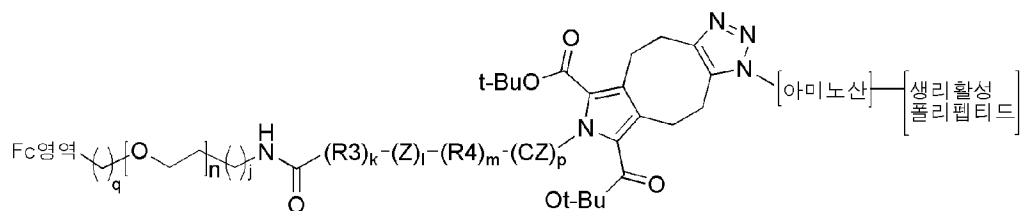
[화학식 5j]



[화학식 5k]



[화학식 5l]



상기 화학식 5a 내지 5l에서,

n은 20 내지 1000의 정수이고;

j는 0 내지 6의 정수이고;

R3 및 R4는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀ 헤테로아릴렌이고;

Z는 O 또는 S이고;

k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며;

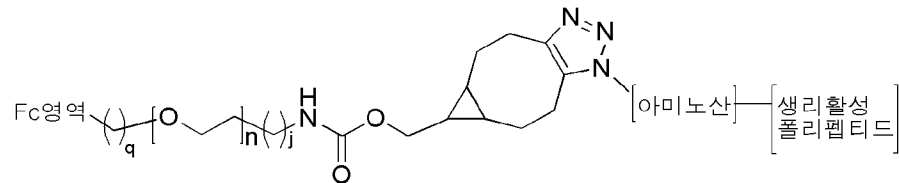
[아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된 아미노산이고;

q는 1 내지 6의 정수이다.

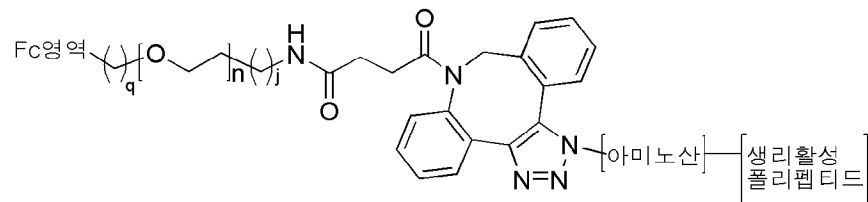
[청구항 18] 청구항 17에 있어서, 상기 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기 화학식 5a 내지 5l의 트리아졸 질소는 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에 연결되어 있는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 19] 청구항 15에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드 결합체는 하기 화학식 6a 내지 6n 중 어느 하나의 구조식을 갖는 것인 구조를 갖는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체:

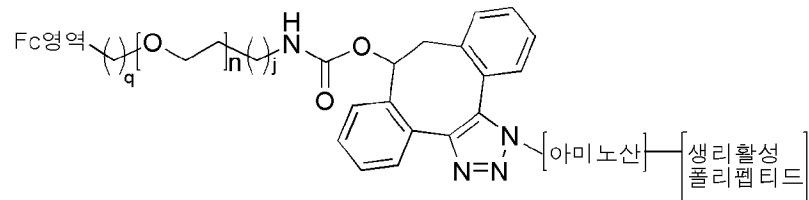
[화학식 6a]



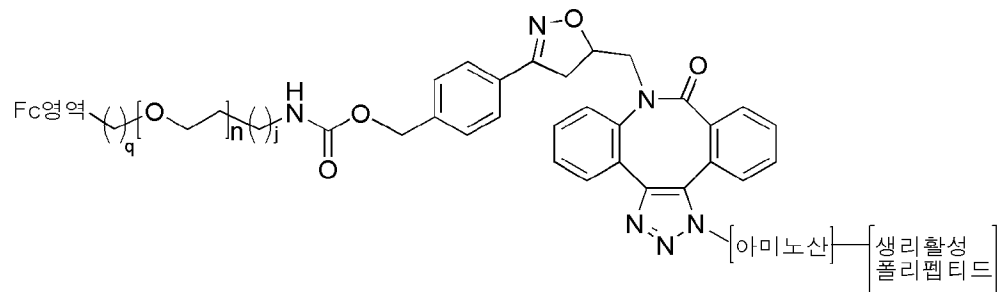
[화학식 6b]



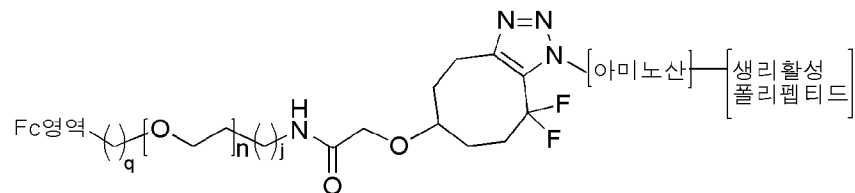
[화학식 6c]



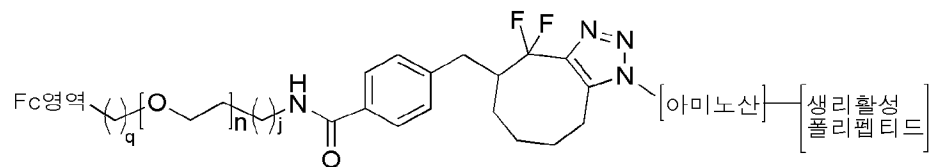
[화학식 6d]



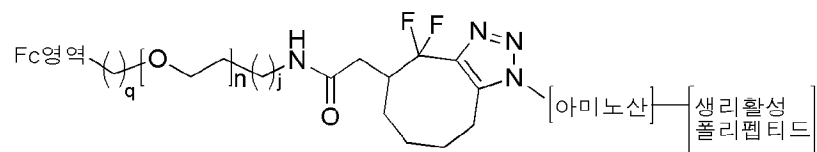
[화학식 6e]



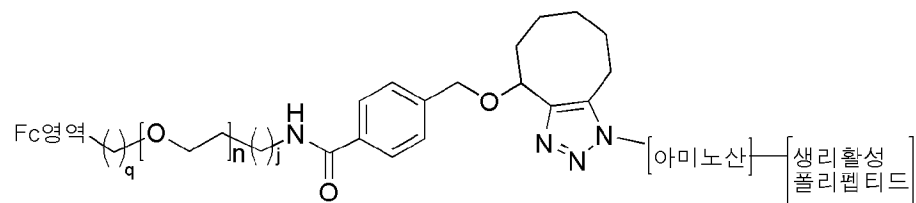
[화학식 6f]



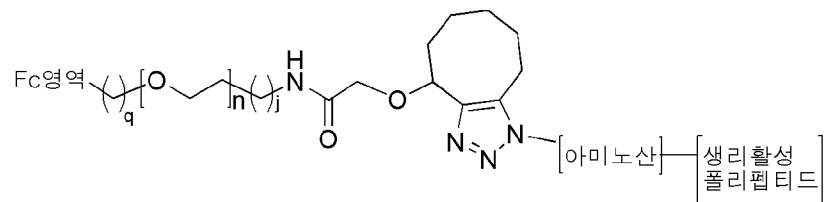
[화]학식 6g]



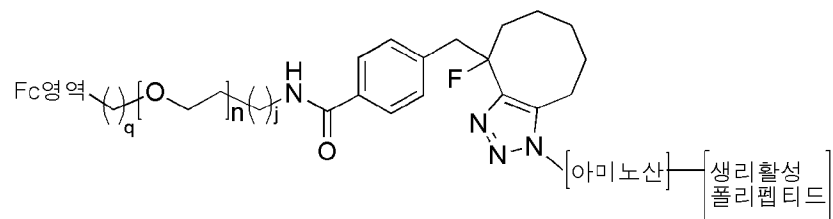
[화]학식 6h]



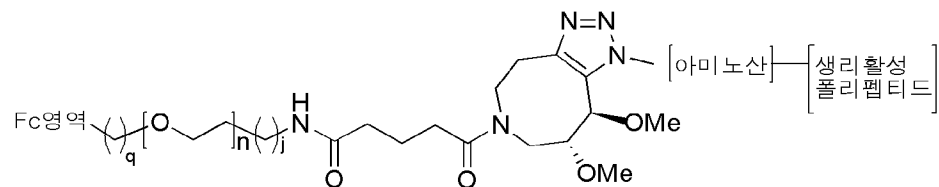
[화]학식 6i]



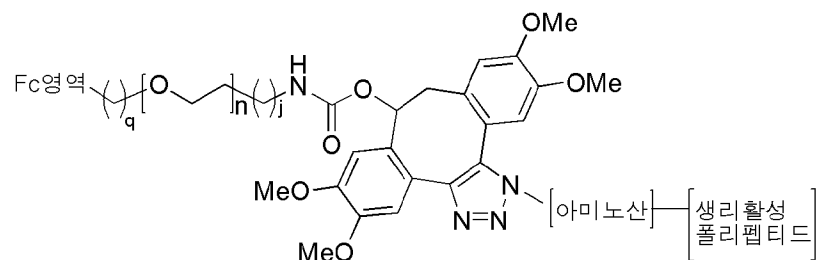
[화]학식 6j]



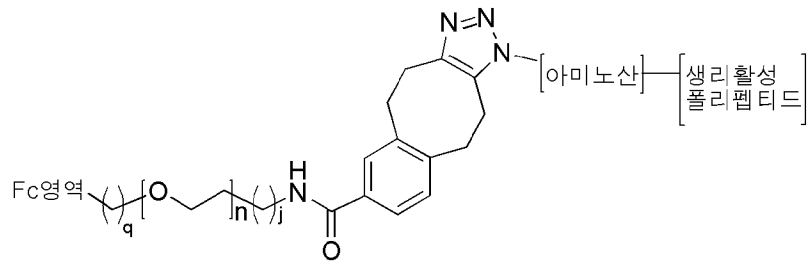
[화]학식 6k]



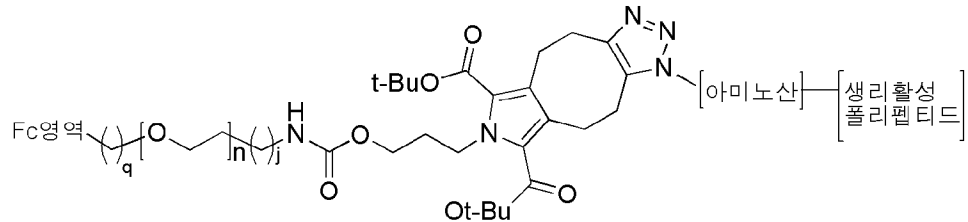
[화]학식 6l]



[화학식 6m]



[화학식 6n]



상기 화학식 6a 내지 6n에서,
 n은 20 내지 1000의 정수이고;
 j는 0 내지 6의 정수이고;

[아미노산]은 천연 상태의 상기 생리활성 폴리펩티드 서열을 구성하는
 아미노산 중 어느 하나이거나, 그에 속하지 않은 추가 또는 치환된
 아미노산이고;

q는 1 내지 6의 정수이다.

[청구항 20] 청구항 19에 있어서, 상기 [아미노산]은 상기 생리활성 폴리펩티드의
 천연 서열의 라이신 잔기 중 입실론-아미노기를 제외한 부분으로서, 상기
 화학식 6a 내지 6n의 트리아졸 질소는 상기 라이신 측쇄의 입실론 탄소에
 연결되어 있는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 21] 청구항 15에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드가 호르몬, 사이토카인,
 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 인슐린 분비 펩티드,
 뉴로펩티드(neuropeptide), 뇌하수체 호르몬, 항-비만 펩티드, 항-바이러스
 펩티드 및 생리활성을 갖는 비천연형 펩티드 유도체, 구조단백질, 리간드
 단백질 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성
 폴리펩티드 결합체.

[청구항 22] 청구항 15에 있어서, 상기 생리활성 폴리펩티드가 글루카곤, GIP(Gastric
 inhibitory polypeptide), 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin),
 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), 위나 장에서 혈당과
 체중을 조절하는 인크레틴류(cretins), 지방(adipose)에서 분비되는
 아디포킨류(adipokines), 뇌 분비 뉴로펩티드류(neuropeptides), 근육분비
 펩티드 혹은 단백질류, 혈관작용장펩티드(Vasoactive intestinal peptide),
 나트륨이뇨펩티드(natriuretic peptide), 소마토스타틴, NPY(neuropeptide
 Y), GLP-1(Glucagon-like peptide-1), GLP-2(Glucagon-like peptide-2),

엑센딘-4(Exendin-4), 옥신토모둘린(Oxyntomodulin),
 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor), 안지오텐신, 브래디키닌,
 칼시토닌, 부신피질 자극호르몬(Corticotropin), 엘레도이신(Eledoisin),
 옥시토신(Oxytocin), 바소프레신(vasopressin), 황체 형성호르몬, 황체
 자극호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 여포 자극호르몬, 부갑상선
 호르몬, 씨크레틴(secretin), 세르모레린(Sermorelin), 인간
 성장호르몬(hGH), 성장호르몬 방출 펩티드, 콜로니 자극인자(GCSF)류,
 인터페론(IFN)류, 인터페론 수용체, 인터루킨(Interleukin)류, 인터루킨
 수용체, 인터루킨 결합 단백질, 프로락틴 방출 펩티드, 오렉신(Orexin),
 갑상선 방출 펩티드, 콜레시스토키닌(Cholecystokinin), 가스트린억제
 펩티드, 칼모둘린, 가스트린 유리 펩티드(Gastric releasing peptide),
 모틸린(Motilin), 관활성장관펩티드(Vasoactiveintestinal peptide),
 심방나트륨이뇨 펩티드(Atrial natriuretic peptide; ANP), B형 나트륨이뇨
 펩티드(B-type natriuretic peptide; BNP), C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type
 natriuretic peptide; CNP), 뉴로키닌(Neurokinin) A, 뉴로메딘(Neuromedin),
 레닌(Renin), 엔도텔린(Endothelin), 사라포톡신 펩티드(Sarafotoxin
 peptide), 카르소모르핀 펩티드(Carsomorphin peptide),
 데모르핀(Dermorphin), 디노르핀(Dynorphin), 엔도르핀(Endorphin),
 엔케팔린(Enkepalin), 종양괴사인자, 종양괴사인자 수용체, 유로키나아제
 수용체, 종양억제인자, 콜라게나제 억제제, 티모포이에틴(Thymopoietin),
 티물린(Thymulin), 티모펜틴(Thymopentin), 티모신(Tymosin), 흉선 체액성
 인자(Thymichumoral factor), 아드레노모둘린(Adrenomodullin),
 알라토스타틴(Allatostatin), 아밀로이드 베타-프로테인 단편(Amyloid
 beta-proteinfragment), 항균성 펩티드, 항산화제 펩티드, 봄베신(Bombesin),
 오스테오칼신(Osteocalcin), CART 펩티드, E-셀렉틴(E-selectin), ICAM-1,
 VCAM-1, 류코카인(Leucokine), 크링글-5(Kringle-5), 라미닌(Laminin),
 인히빈(Inhibin), 갈라닌(Galanin), 피브로넥틴(Fibronectin),
 판크레아스타틴(Pancreastatin), 푸제온(Fuzeon), 글루카곤-유사 펩티드,
 옥신토모둘린, 지프로테인 관련수용체(Gprotein-coupled receptor), 효소류,
 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩티드, B
 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질,
 면역독소, 림포독소, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민,
 α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구
 생성인자, 안지오펜에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성
 펩티드, 트롬보모둘린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠
 활성화인자, 피브린-결합 펩티드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘,
 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제,
 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자,

안지오스타틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 신경 성장인자, 릴렉신, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 췌장 폴리펩티드, 가스트린 방출 펩티드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편, 적혈구 증식인자, 백혈구 증식인자, 및 이들의 유사체(analog)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 23] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 24] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 25] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지영역을 추가로 포함하는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 26] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)에 의한 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 27] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이들의 조합 및 이들의 하이브리드의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 28] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 29] 청구항 15에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 것인 생리활성 폴리펩티드 결합체.

[청구항 30] 생리활성 폴리펩티드에 아지드기를 도입시키는 단계;
상기 아지드기와 하기 화학식 1의 화합물의 R2의 에틴일렌기($-C\equiv C-$)를 클릭반응(click reaction)에 의한 환부가반응시켜 1,2,3-트리아졸을 형성시킴으로써 결합시키는 단계; 및
면역글로불린 Fc 영역의 아미노산을 상기 화학식 1의 화합물의 R1과 공유결합시키는 단계를 포함하는,
화학식 1의 화합물을 링커로 하여 생리활성 폴리펩티드 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 생리활성 폴리펩티드 결합체의 제조방법:

[화학식 1]

R1-비펩티드성 중합체-X-R2

상기 화학식 1에서,

R1은 2,5-디옥소피롤리디닐, 2,5-디옥소피롤릴, 알데히드, 말레이미드, C₆-C₂₀아릴디설파이드, C₅-C₂₀헤테로아릴디설파이드, 비닐술폰, 티올, 할로젠화 아세트아미드, 석시니미드, p-니트로페닐 카보네이트, 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기를 포함하는 지방족 탄화수소 그룹이고;

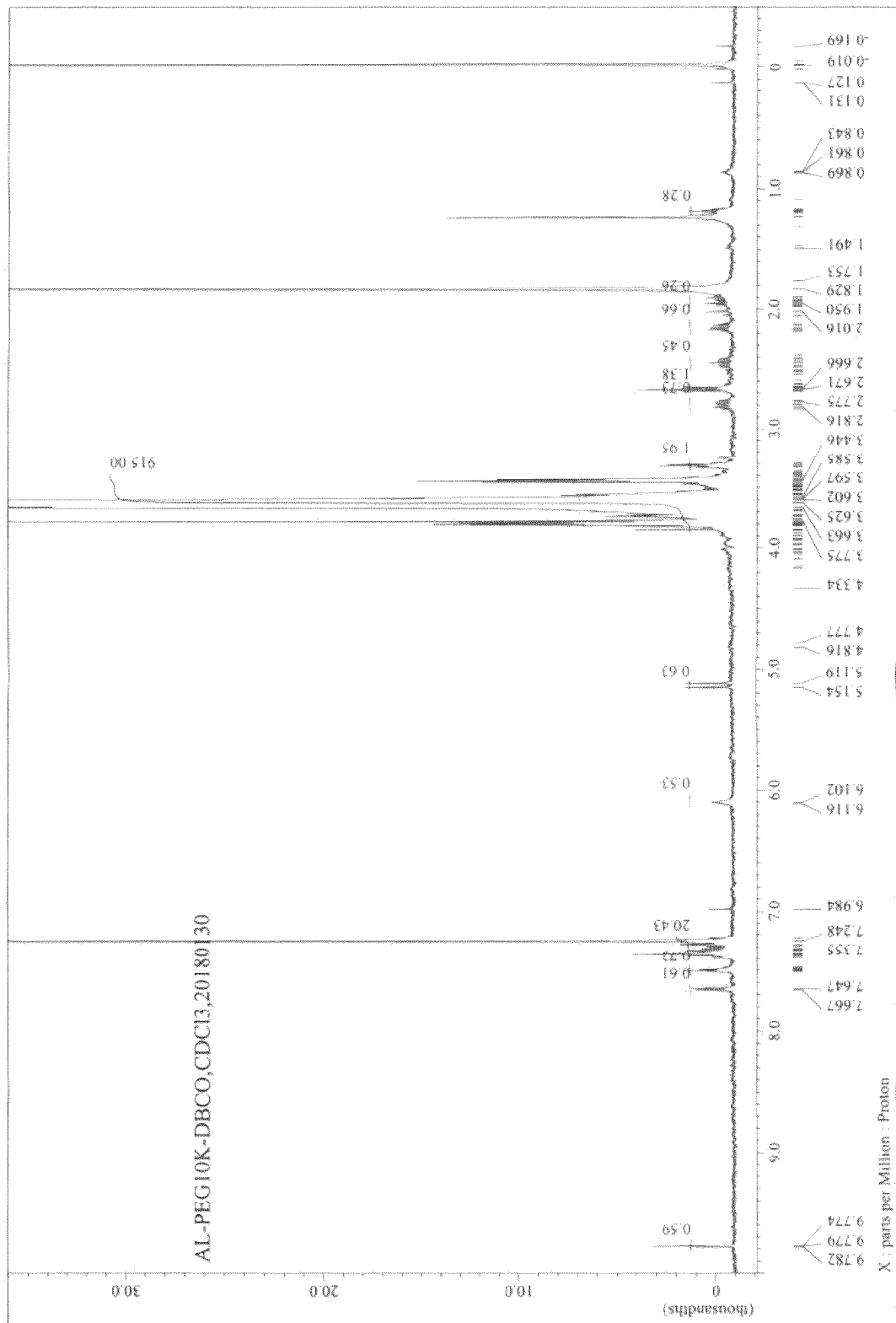
X는 -(CH₂)_jNHCO- 또는 -(CH₂)_jNHCS- 이며, 여기에서 j는 0 내지 6의 정수이고;

R2는 -(R3)_k-(Z)_l-(R4)_m-(CZ)_p-Y이고, 여기에서 R3 및 R4 는 각각 독립적으로 C₁-C₆알킬렌, C₆-C₂₀아릴렌, 또는 1 내지 3개의 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 C₅-C₂₀헤테로아릴렌이고, Z는 O 또는 S이고, Y는 C₂-C₆알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는 디아릴헤테로시클로알킬일이고(여기서, 각각의 시클로알킬일은 3 내지 8개의 탄소원자를 갖고, 각각의 아릴은 5 내지 8개의 탄소원자를 가지며, 각각의 헤테로시클로알킬일은 3 내지 8개의 원자를 포함하고, 고리 원자 중 1 내지 3개에 N, O, 및 S에서 선택된 헤테로 원자를 갖는 포화된 고리이다),

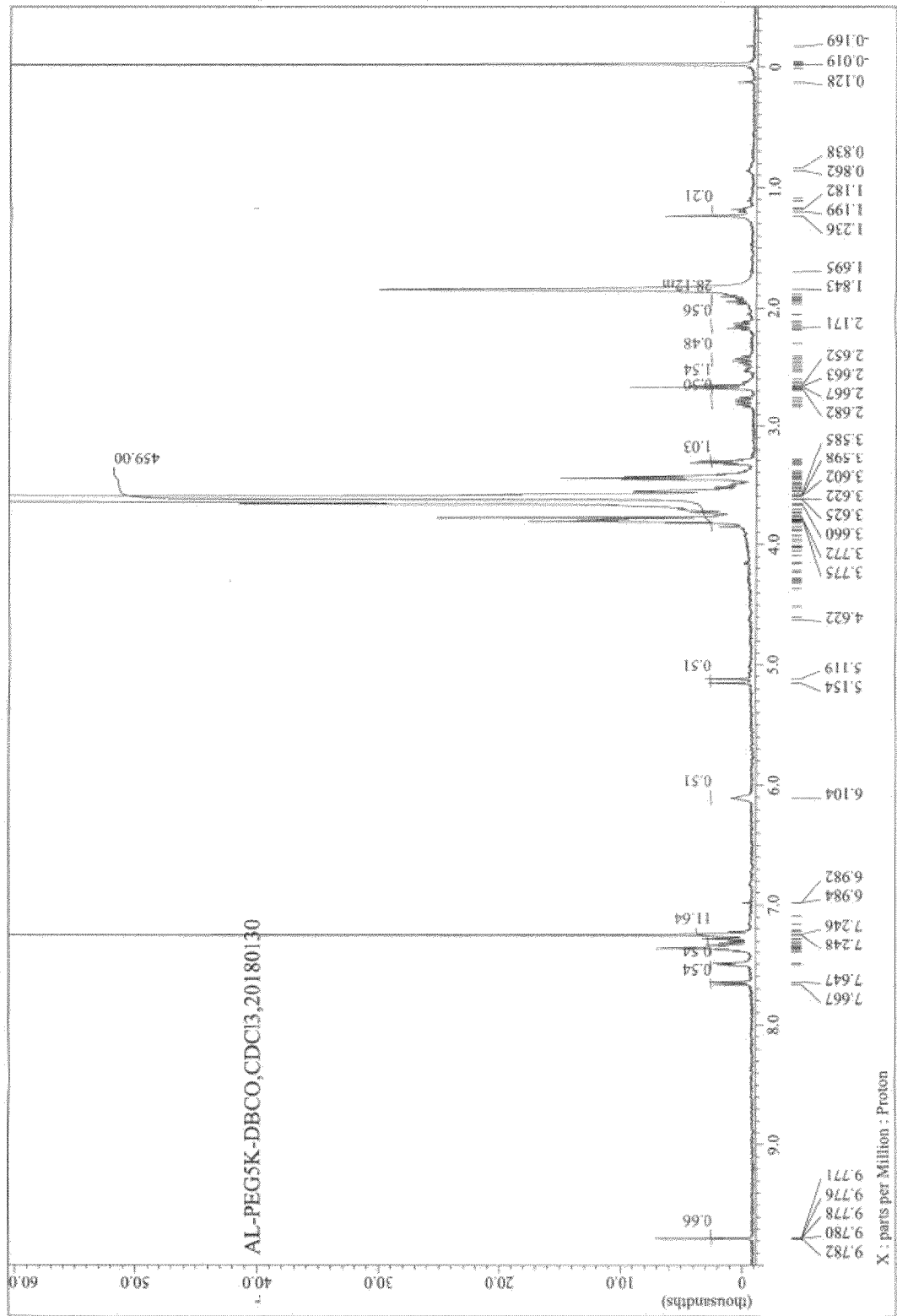
k, l, m 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, 모두가 동시에 0은 아니며,

상기 알킬일, 시클로알킬일, 바이시클로알킬일, 아릴시클로알킬일, 디아릴시클로알킬일, 헤테로시클로알킬일, 또는 디아릴헤테로시클로알킬일은 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, 옥소, 또는 할로젠으로 치환 또는 비치환될 수 있다.

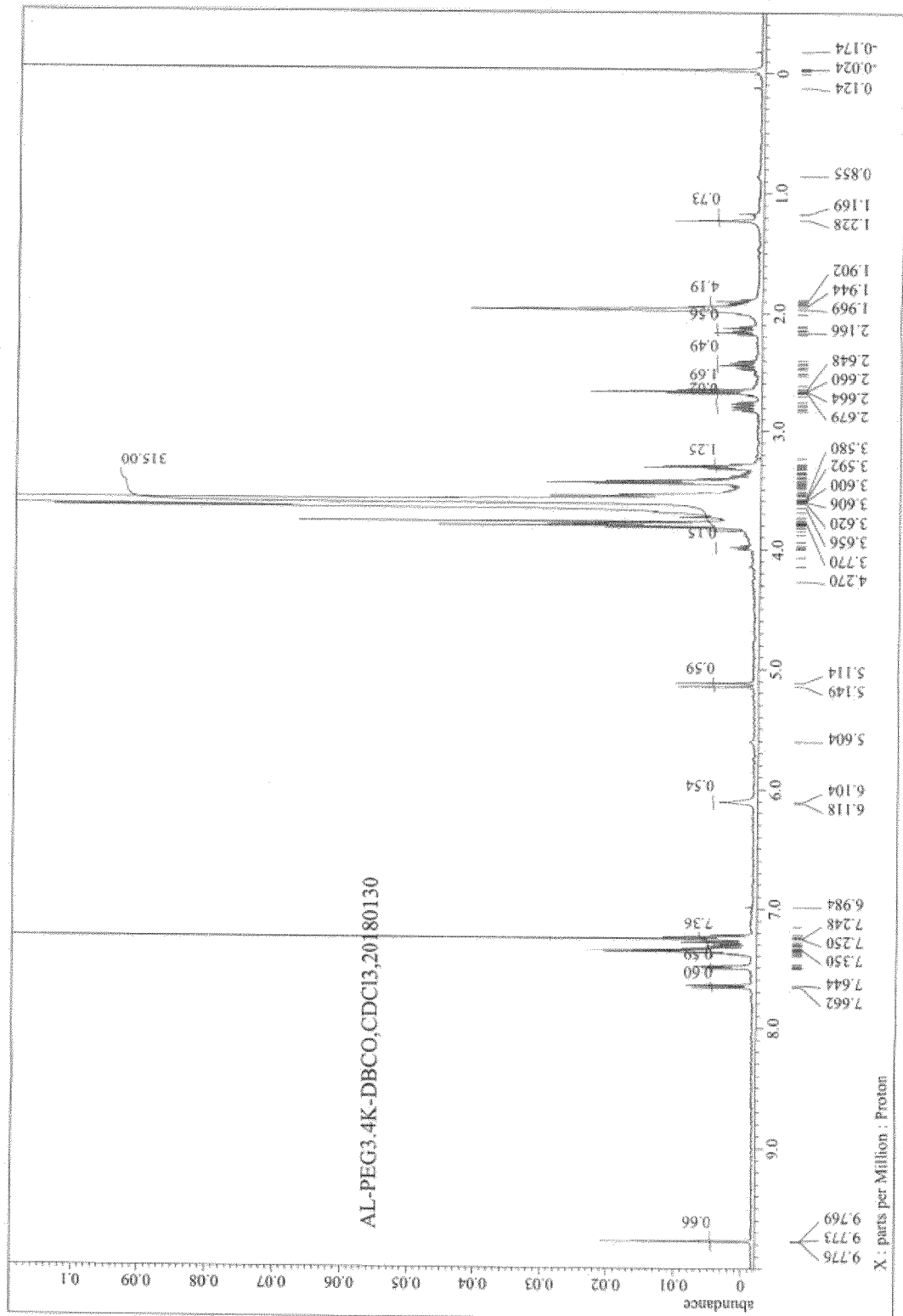
[도1]



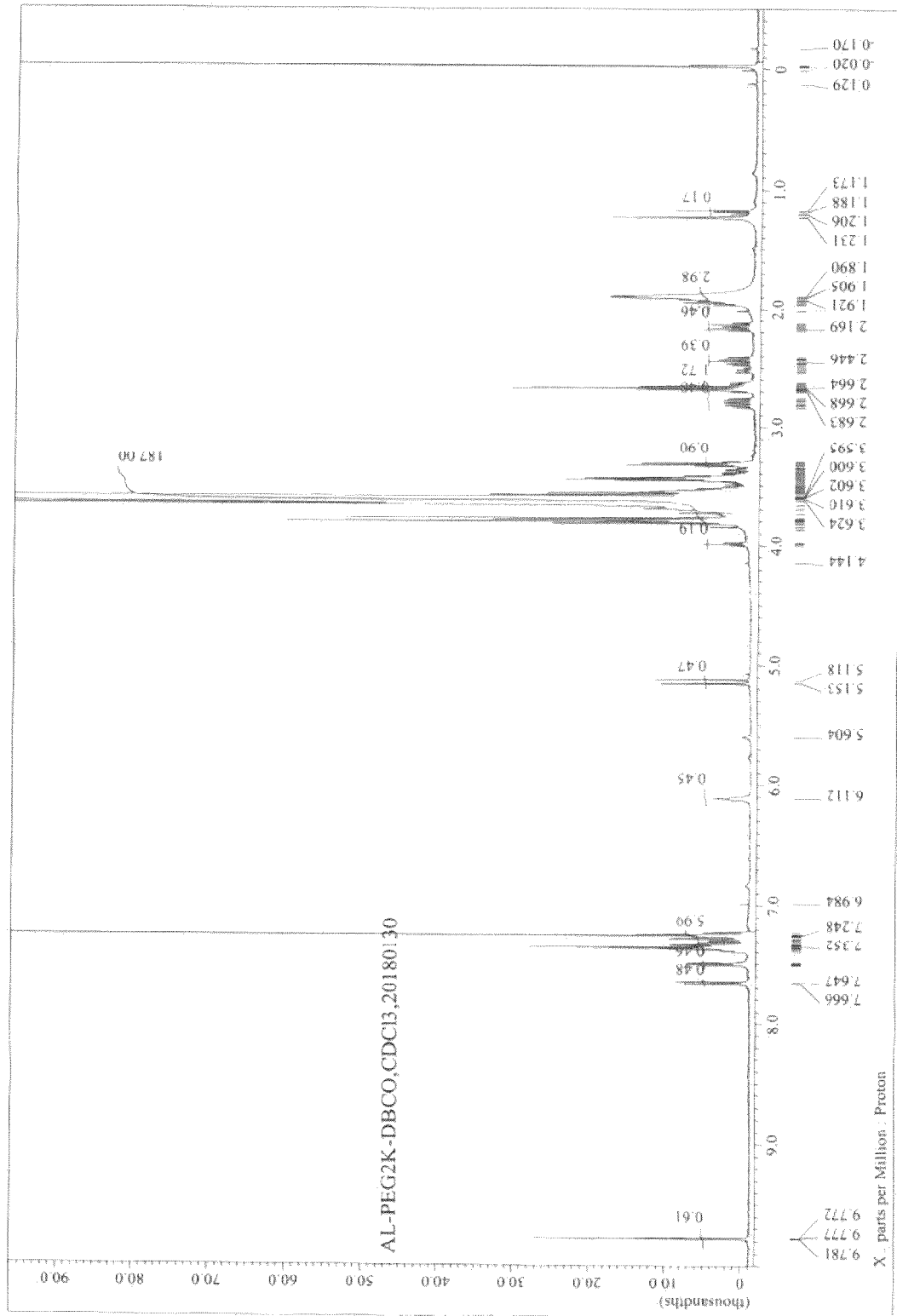
[도2]



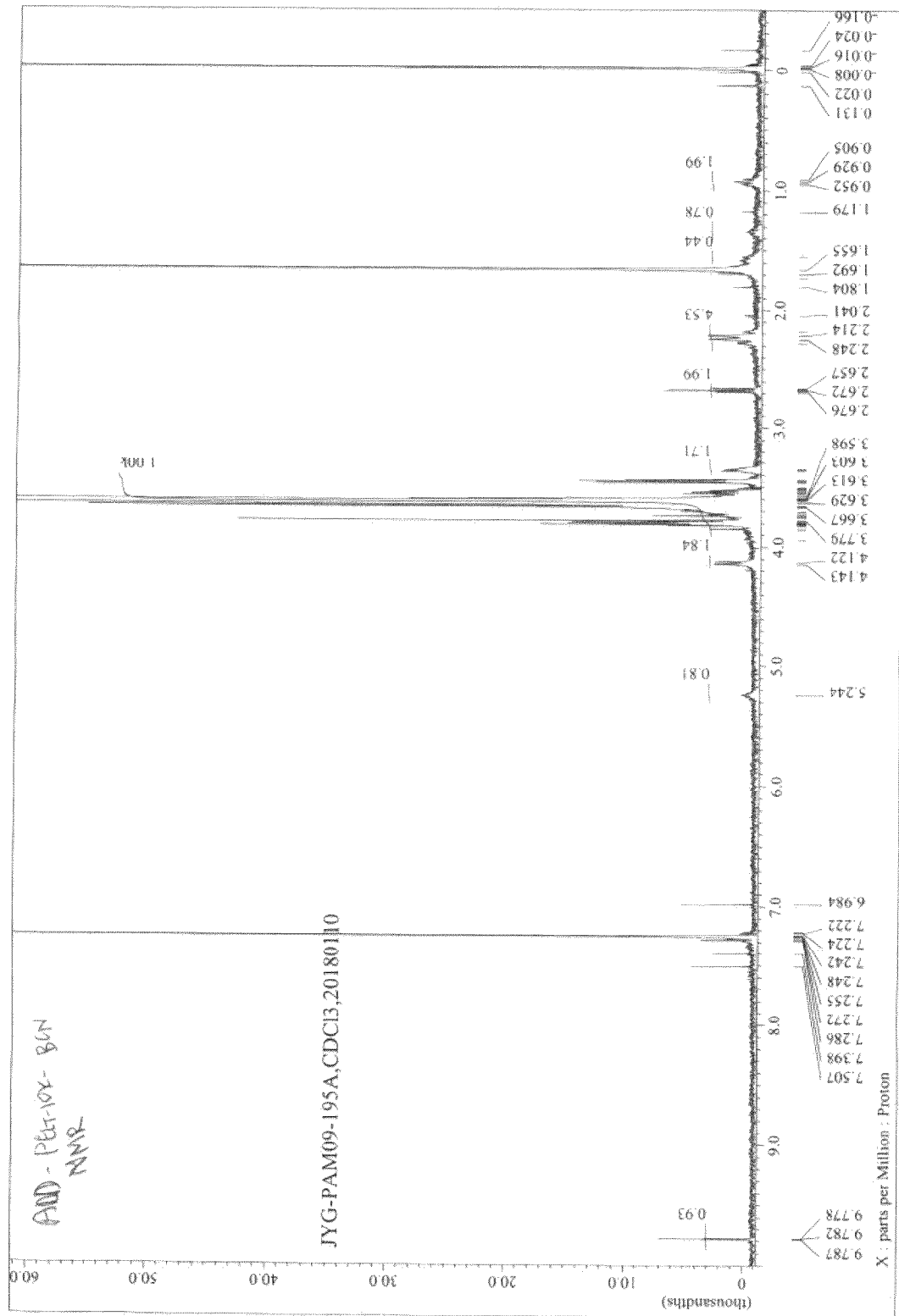
[도3]



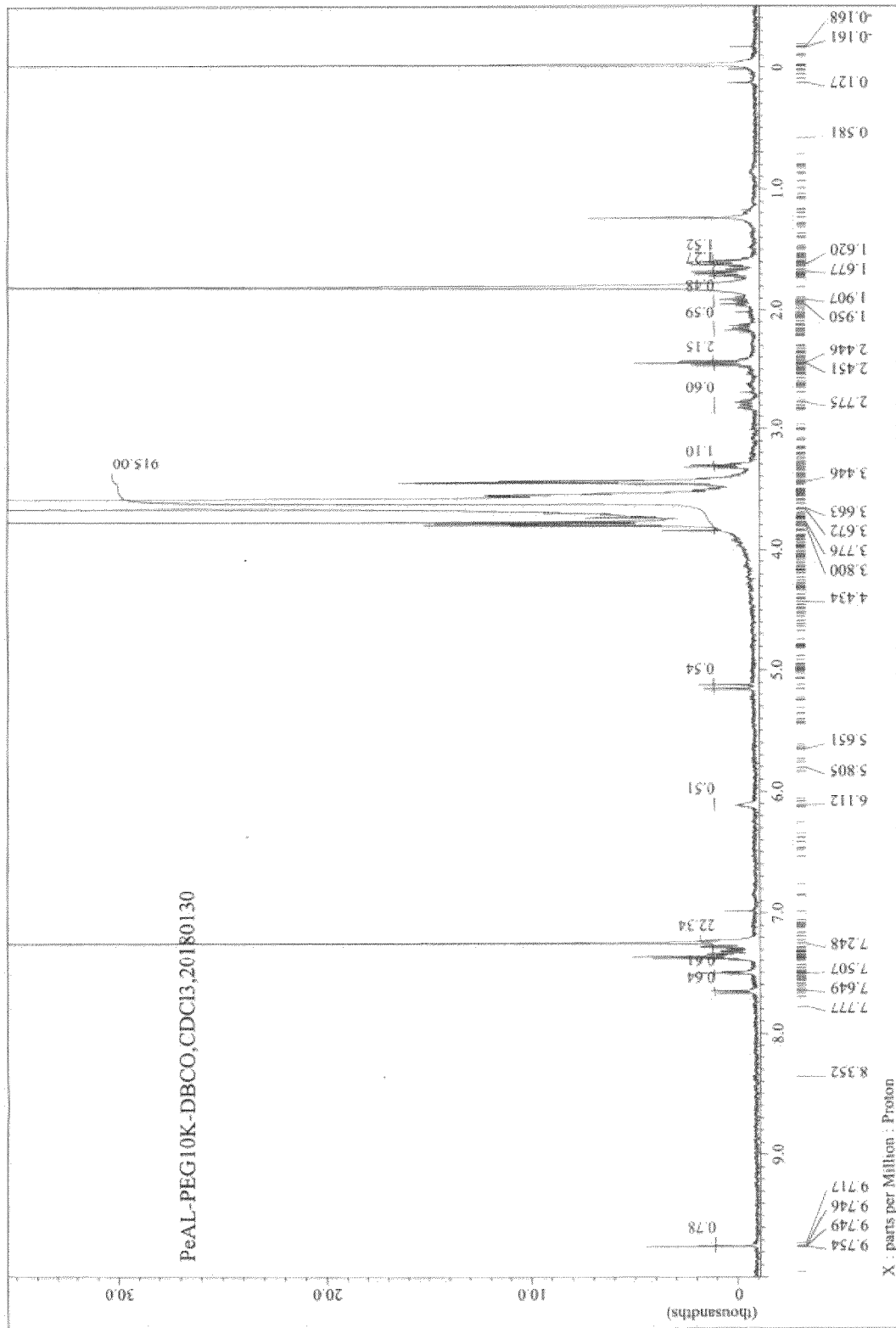
[도4]



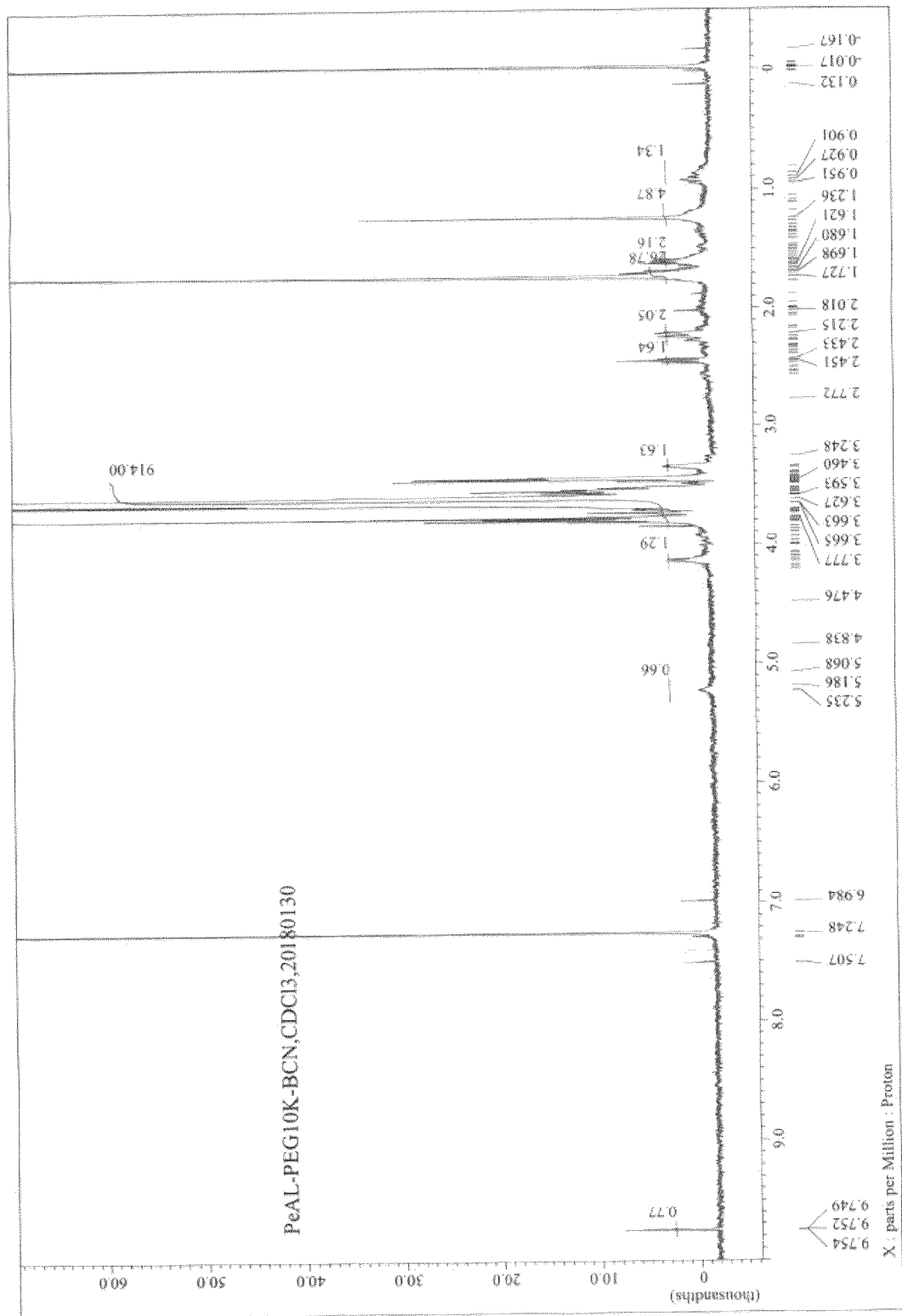
[도5]



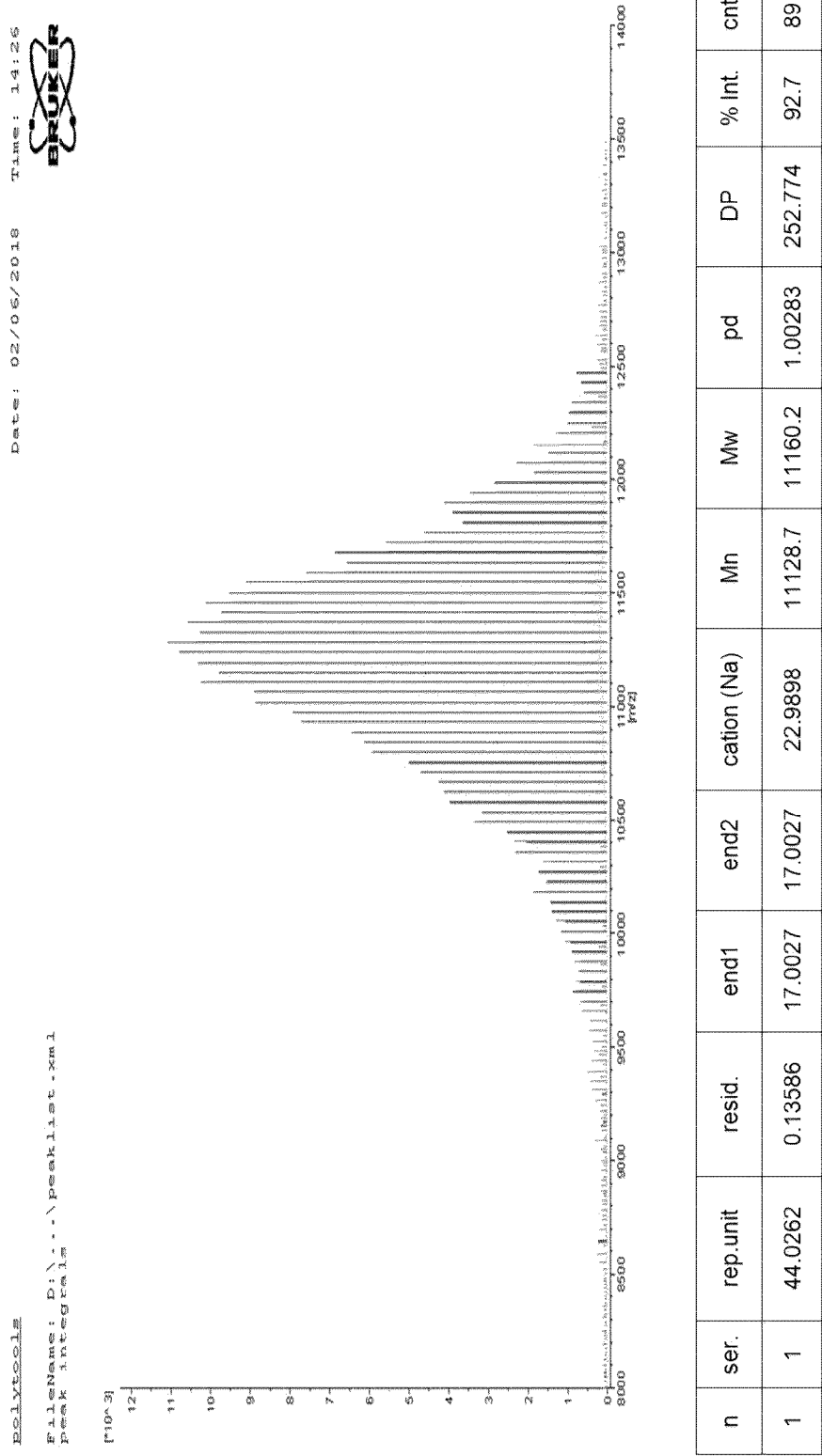
[도6]



[도7]

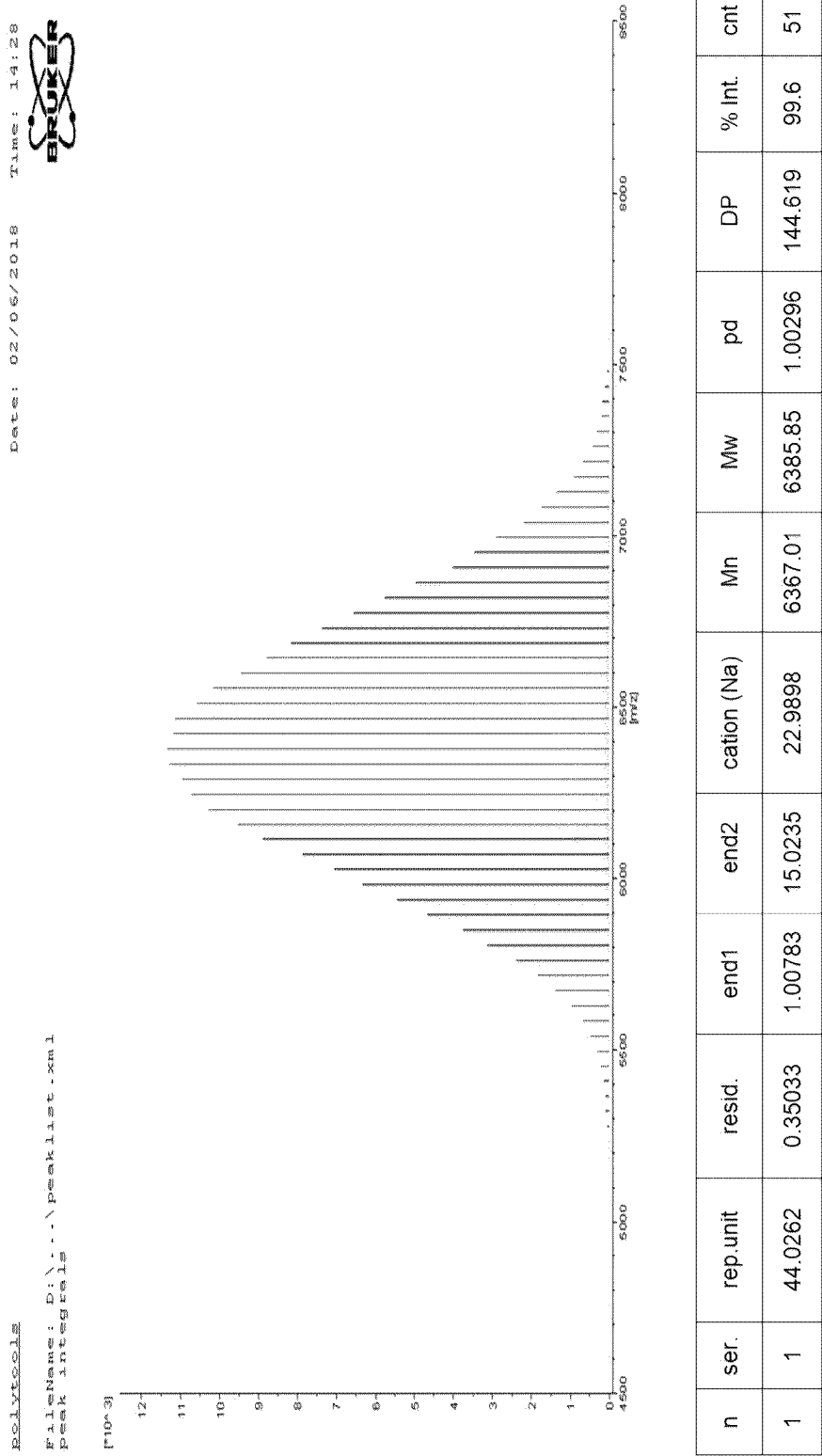


[도8]



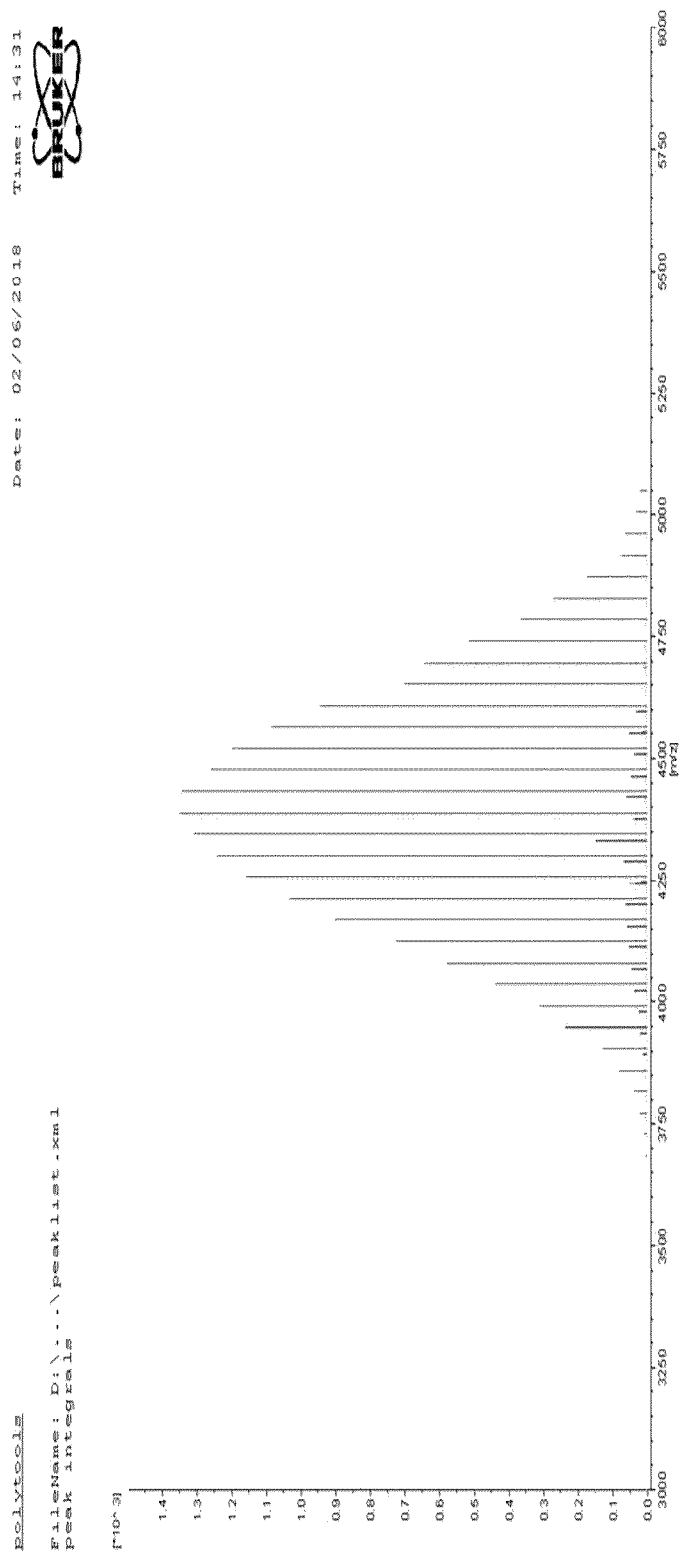
n	ser.	rep.unit	resid.	end1	end2	cation (Na)	Mn	Mw	pd	DP	% Int.	cnt
1	1	44.0262	0.13586	17.0027	17.0027	22.9898	11128.7	11160.2	1.00283	252.774	92.7	89

[도9]



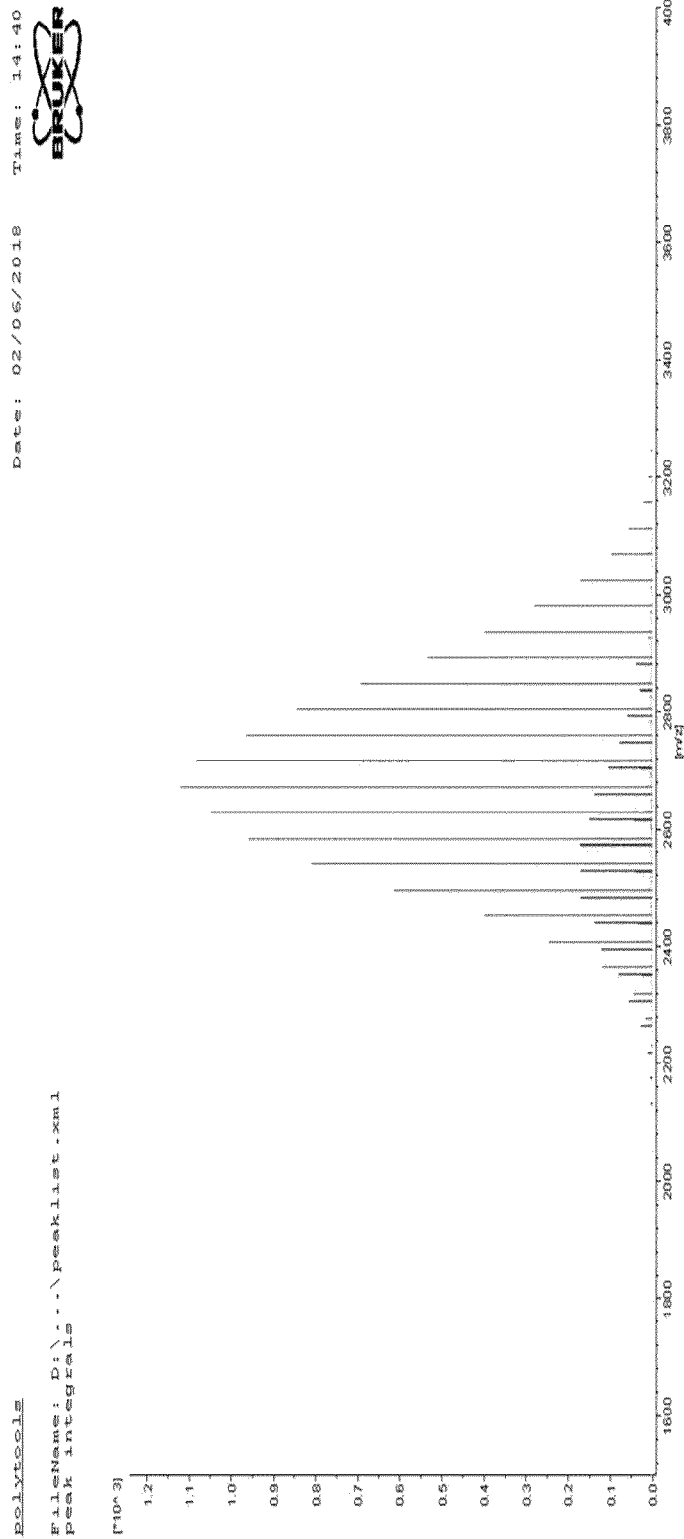
n	ser.	rep.unit	resid.	end1	end2	cation (Na)	Mn	Mw	pd	DP	% Int.	cnt
1	1	44.0262	0.35033	1.00783	15.0235	22.9898	6367.01	6385.85	1.00296	144.619	99.6	51

[도10]



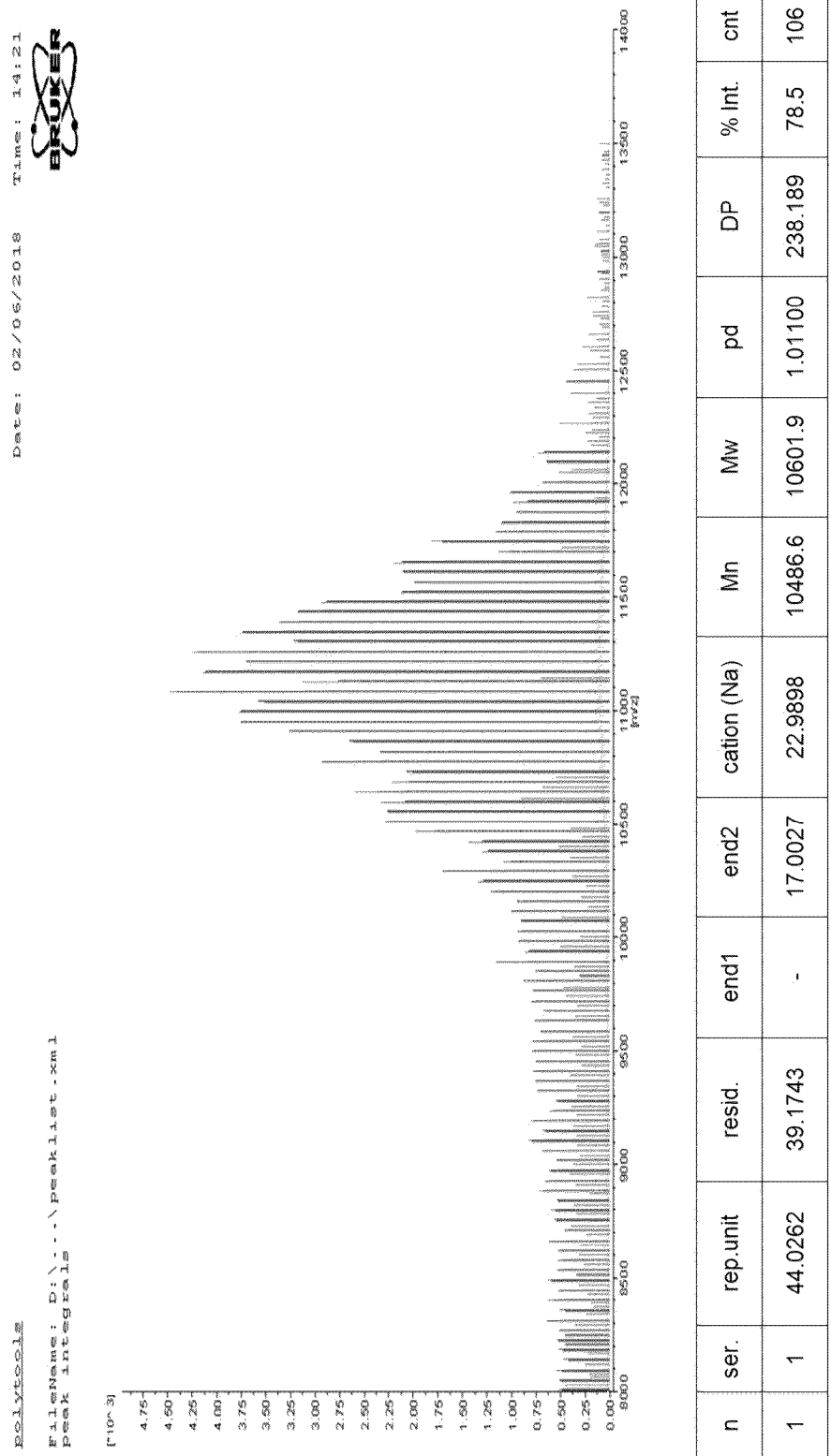
n	ser.	rep.unit	resid.	end1	end2	cation (Na)	Mn	Mw	pd	DP	% Int.	cnt
1	1	44.0262	21.9341	15.0235	15.0235	22.9898	4373.37	4385.12	1.00269	99.3356	95.5	32
2	2	44.0262	17.8026	-	-	-	4259.01	4266.33	1.00172	96.7380	3.3	17

[도 11]

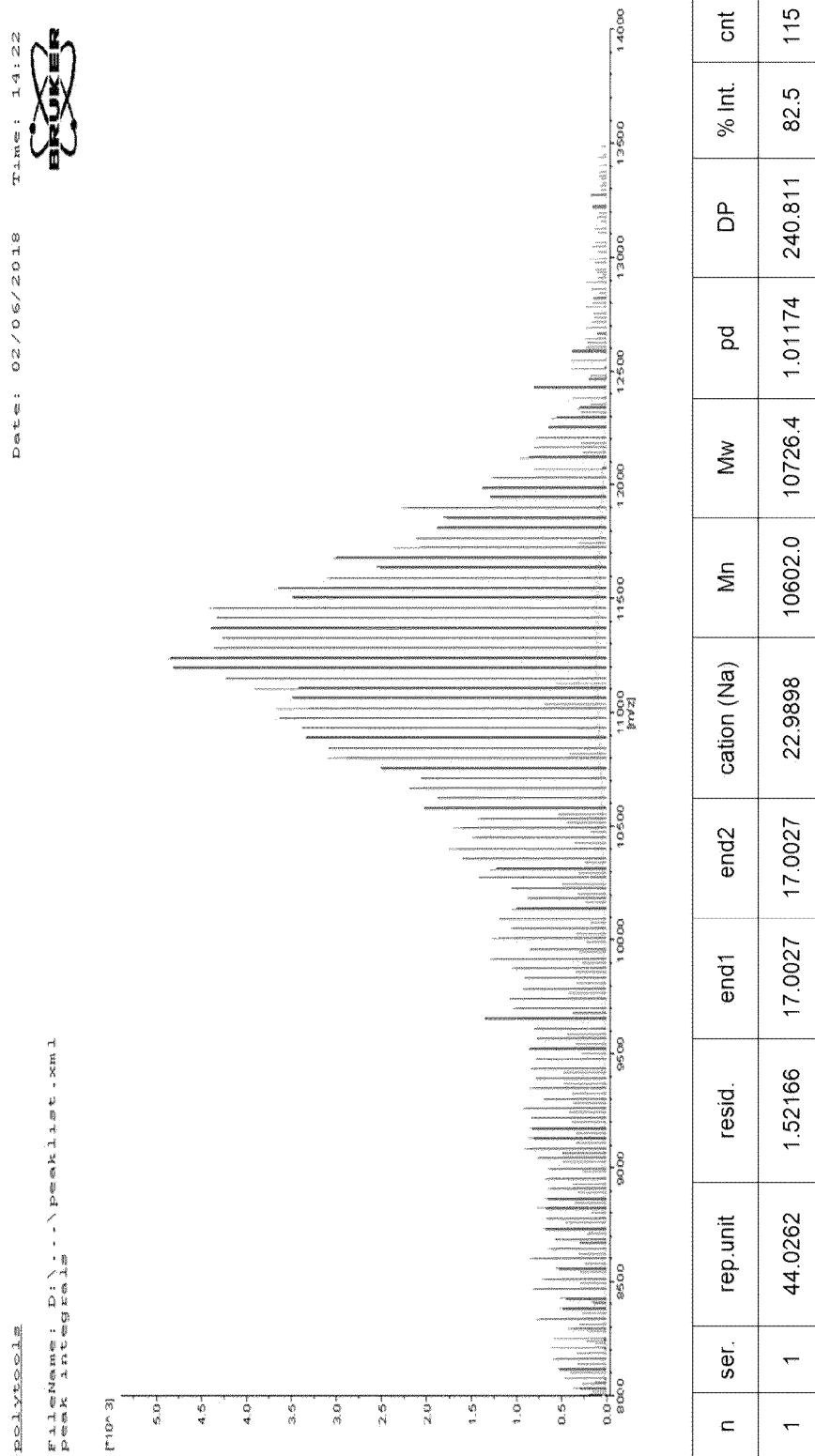


n	ser.	rep.unit	resid.	end1	end2	cation (Na)	Mn	Mw	pd	DP	% Int.	cnt
1	1	44.0262	21.7183	15.0235	15.0235	22.9898	2673.90	2683.69	1.00366	60.7343	84.7	24
2	2	44.0262	18.7531	-	-	-	2550.27	2559.14	1.00348	57.9262	12.2	18

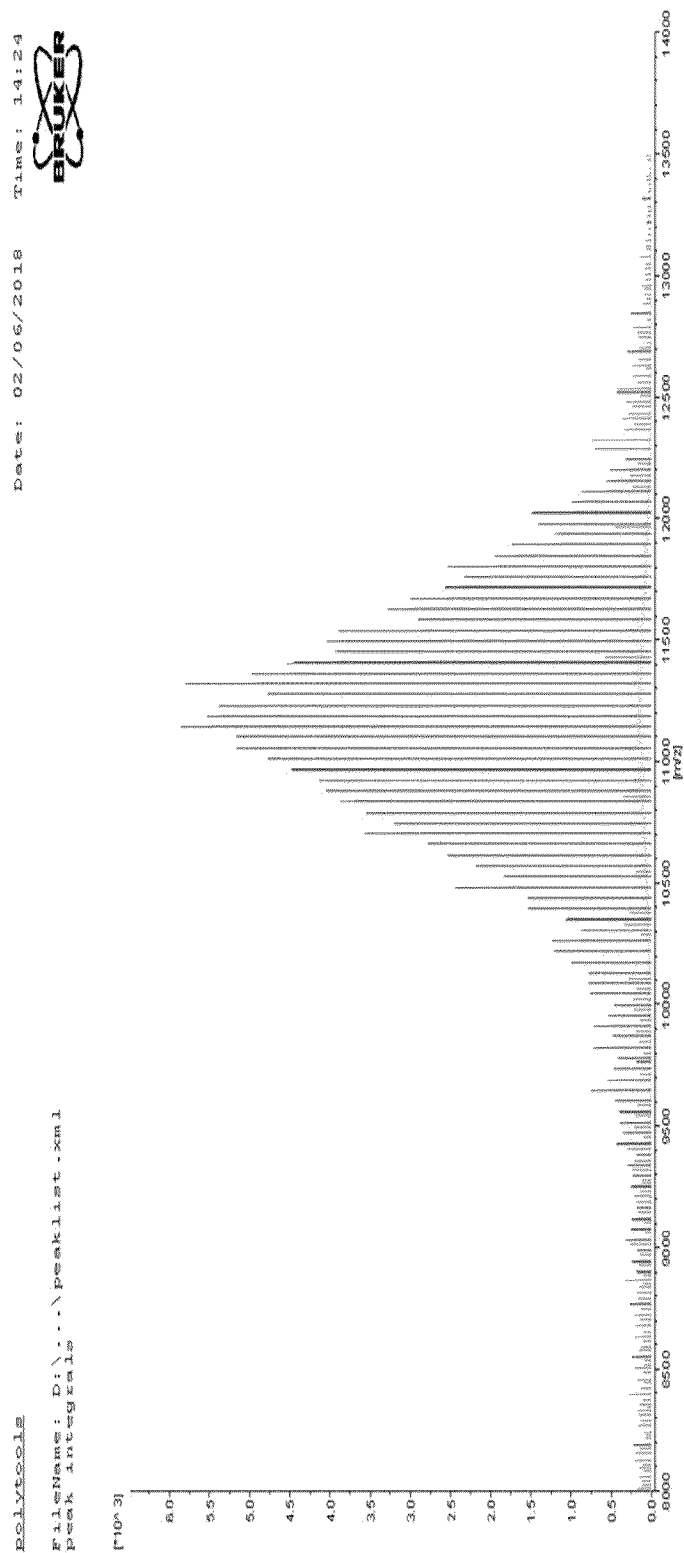
[도 12]



[도13]

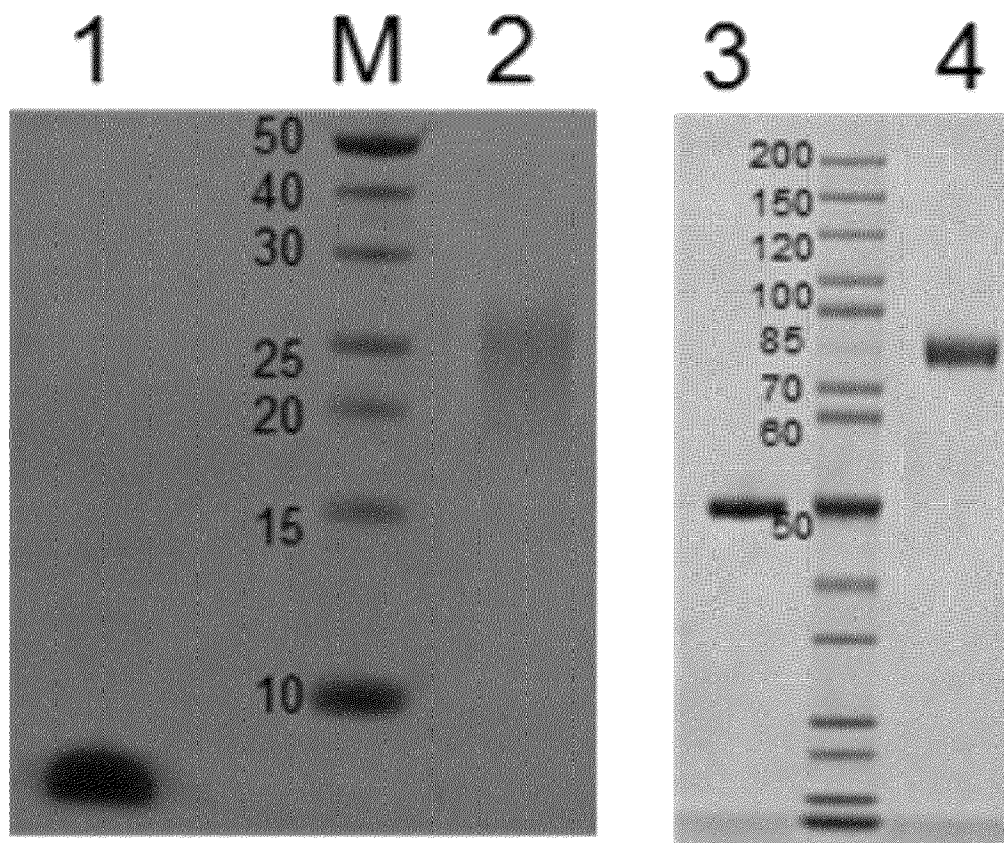


[도 14]

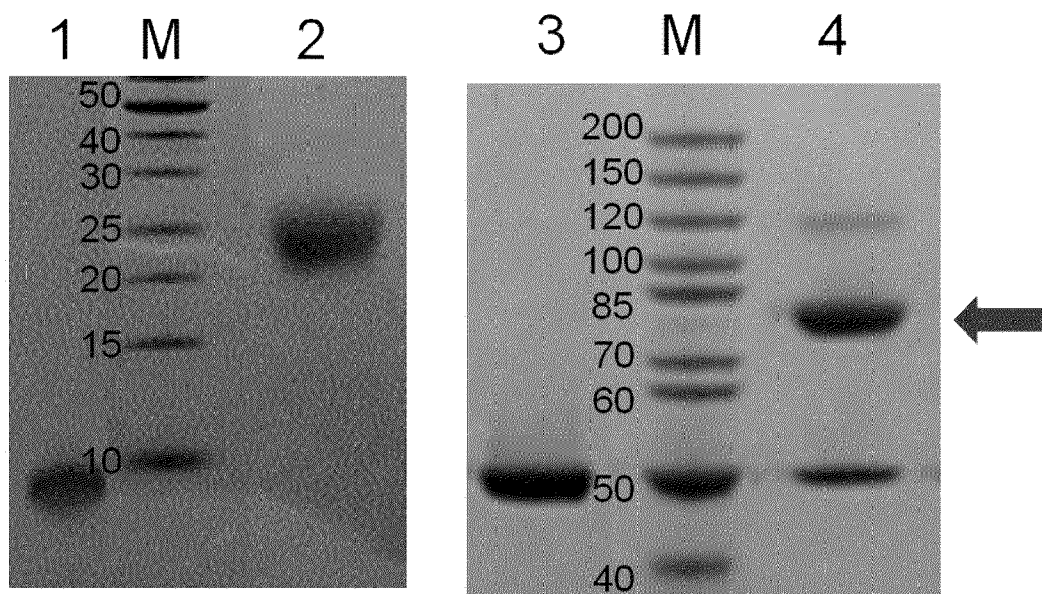


n	ser.	rep.unit	resid.	end1	end2	cation (Na)	Mn	Mw	pd	DP	% Int.	cnt
1	1	44.0262	40.3961	15.0235	15.0235	22.9898	11027.9	11060.9	1.00300	250.485	82.1	77

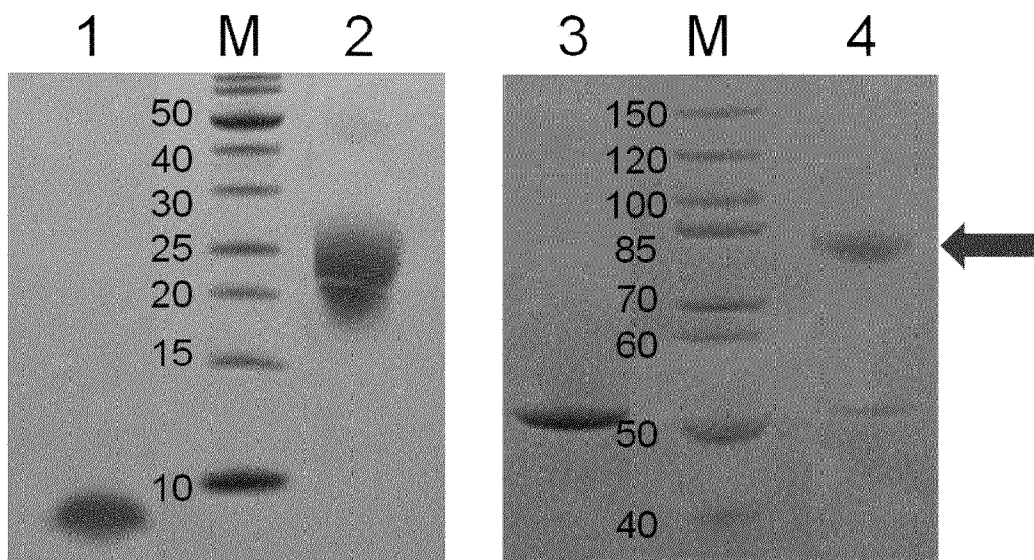
[도15]



[도16]



[도17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/001660

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/68(2017.01)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)

A61K 47/68; C07K 7/08; A61K 38/26; A61K 47/48

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, Caplus) & Keywords: conjugate, non-peptide polymer, click reaction, cycloaddition, alkyne, azide, immune globulin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLOMBO, M. et al., "Site-Specific Conjugation of ScFvs Antibodies to Nanoparticles by Bioorthogonal Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition", <i>Angewandte Chemie International Edition</i> , 2012, vol. 51, pages 496-499, Supporting Information, pages S1-S15 See abstract; page 497; formula 1; and Supporting Information, page S6.	1-14
Y		15-30
Y	KR 10-2015-0008012 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 21 January 2015 See claims 1-16.	15-30
X	US 2016-0194359 A1 (APELLIS PHARMACEUTICALS, INC.) 07 July 2016 See abstract; and paragraphs [0223]-[0235].	1-14
X	CHE HARUN, N. F. et al., "Artificial Control of Gene Silencing Activity Based on siRNA Conjugation with Polymeric Molecule Having Coil-globule Transition Behavior", <i>Bioconjugate Chemistry</i> , 2016, vol. 27, no. 9, pages 1961-1964, Supporting Information, pages 1-20 See abstract; figure 1; and Supporting Information, pages 11-12.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 08 MAY 2018 (08.05.2018)	Date of mailing of the international search report 08 MAY 2018 (08.05.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/001660

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIONG, K. et al., "Biomimetic Immuno-Magnetosomes for High-Performance Enrichment of Circulating Tumor Cells", Advanced Materials, 2016, vol. 28, pages 7929-7935 See abstract; and formula 1.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/001660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0008012 A	21/01/2015	AR 094904 A1	09/09/2015
		AR 096891 A1	03/02/2016
		AU 2014-221531 A1	27/08/2015
		AU 2014-221534 A1	20/08/2015
		AU 2014-287880 A1	11/02/2016
		CA 2899418 A1	04/09/2014
		CA 2901873 A1	04/09/2014
		CA 2918023 A1	15/01/2015
		CL 2015002330 A1	28/12/2015
		CN 104995206 A	21/10/2015
		CN 105229025 A	06/01/2016
		CN 105517578 A	20/04/2016
		EA 201690116 A1	29/07/2016
		EP 2963055 A1	06/01/2016
		EP 2963055 A4	19/10/2016
		EP 2963056 A1	06/01/2016
		EP 2963056 A4	07/06/2017
		EP 3020418 A1	18/05/2016
		EP 3020418 A4	11/01/2017
		HK 1211944 A1	03/06/2016
		HK 1217202 A1	30/12/2016
		HK 1223017 A1	21/07/2017
		HU 1600209 A2	30/05/2016
		IL 240714 A	29/10/2015
		IL 240717 A	29/10/2015
		JP 2016-510003 A	04/04/2016
		JP 2016-510004 A	04/04/2016
		JP 2016-529227 A	23/09/2016
		KR 10-2014-0106452 A	03/09/2014
		KR 10-2014-0106455 A	03/09/2014
		MX 2015009799 A	29/10/2015
		MX 2015010471 A	25/04/2016
		MX 2016000343 A	05/05/2016
		NO 20160175 A1	03/02/2016
		PE 14092015 A1	07/10/2015
		PH 12015501814 A1	07/12/2015
		PH 12015501815 A1	07/12/2015
		PH 12016500075 A1	18/04/2016
		RU 2015133462 A	31/03/2017
		RU 2015138536 A	03/04/2017
		SG 11201505615P A	29/09/2015
		SG 11201506095T A	29/09/2015
		TW 201513884 A	16/04/2015
		TW 201520224 A	01/06/2015
		US 2016-0000931 A1	07/01/2016
		US 2016-0008483 A1	14/01/2016
		US 2016-0158378 A1	09/06/2016
		WO 2014-133324 A1	04/09/2014
		WO 2014-133327 A1	04/09/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/001660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0194359 A1	07/07/2016	WO 2015-005748 A1	15/01/2015
		ZA 201507105 B	29/11/2017
		AU 2013-344462 A1	04/06/2015
		CA 2891673 A1	22/05/2014
		CN 105051057 A	11/11/2015
		EP 2920201 A2	23/09/2015
		HK 1215445 A1	26/08/2016
		HK 1217336 A1	06/01/2017
		IL 238852 A	30/06/2015
		JP 2016-505527 A	25/02/2016
		MX 2015006154 A	01/12/2015
		RU 2015119165 A	10/01/2017
		US 2016-0215020 A1	28/07/2016
		US 2017-283461 A1	05/10/2017
		WO 2014-078731 A2	22/05/2014
		WO 2014-078731 A3	31/07/2014
		WO 2014-078734 A2	22/05/2014
		WO 2014-078734 A3	31/07/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/68(2017.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/68; C07K 7/08; A61K 38/26; A61K 47/48

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, Caplus) & 키워드: 결합체, 비펩티드성 중합체, 클릭반응, 환부가반응, 알카인, 아자이드, 면역글로불린

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	COLOMBO, M. 등, "Site-Specific Conjugation of ScFvs Antibodies to Nanoparticles by Bioorthogonal Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition", Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51권, 페이지 496-499, 서포팅 인포메이션, 페이지 S1-S15 초록; 페이지 497; 도식 1; 및 서포팅 인포메이션, 페이지 S6 참조.	1-14
Y		15-30
Y	KR 10-2015-0008012 A (한미약품 주식회사) 2015.01.21 청구항 1-16 참조.	15-30
X	US 2016-0194359 A1 (APELLIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2016.07.07 요약; 및 단락 [0223]-[0235].	1-14
X	CHE HARUN, N. F. 등, "Artificial control of gene silencing activity based on siRNA conjugation with polymeric molecule having coil-globule transition behavior", Bioconjugate Chemistry, 2016, 27권, 9호, 페이지 1961-1964, 서포팅 인포메이션, 페이지 1-20 초록; 도면 1; 및 서포팅 인포메이션, 페이지 11-12 참조.	1-14

☒ 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

2018년 05월 08일 (08.05.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 05월 08일 (08.05.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

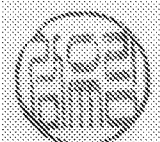
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	XIONG, K. 등, "Biomimetic Immuno-Magnetosomes for High-Performance Enrichment of Circulating Tumor Cells", Advanced Materials, 2016, 28권, 페이지 7929-7935 초록; 및 도식 1 참조.	1-14

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0008012 A	2015/01/21	AR 094904 A1	2015/09/09
		AR 096891 A1	2016/02/03
		AU 2014-221531 A1	2015/08/27
		AU 2014-221534 A1	2015/08/20
		AU 2014-287880 A1	2016/02/11
		CA 2899418 A1	2014/09/04
		CA 2901873 A1	2014/09/04
		CA 2918023 A1	2015/01/15
		CL 2015002330 A1	2015/12/28
		CN 104995206 A	2015/10/21
		CN 105229025 A	2016/01/06
		CN 105517578 A	2016/04/20
		EA 201690116 A1	2016/07/29
		EP 2963055 A1	2016/01/06
		EP 2963055 A4	2016/10/19
		EP 2963056 A1	2016/01/06
		EP 2963056 A4	2017/06/07
		EP 3020418 A1	2016/05/18
		EP 3020418 A4	2017/01/11
		HK 1211944 A1	2016/06/03
		HK 1217202 A1	2016/12/30
		HK 1223017 A1	2017/07/21
		HU 1600209 A2	2016/05/30
		IL 240714 A	2015/10/29
		IL 240717 A	2015/10/29
		JP 2016-510003 A	2016/04/04
		JP 2016-510004 A	2016/04/04
		JP 2016-529227 A	2016/09/23
		KR 10-2014-0106452 A	2014/09/03
		KR 10-2014-0106455 A	2014/09/03
		MX 2015009799 A	2015/10/29
		MX 2015010471 A	2016/04/25
		MX 2016000343 A	2016/05/05
		NO 20160175 A1	2016/02/03
		PE 14092015 A1	2015/10/07
		PH 12015501814 A1	2015/12/07
		PH 12015501815 A1	2015/12/07
		PH 12016500075 A1	2016/04/18
		RU 2015133462 A	2017/03/31
		RU 2015138536 A	2017/04/03
		SG 11201505615P A	2015/09/29
		SG 11201506095T A	2015/09/29
		TW 201513884 A	2015/04/16
		TW 201520224 A	2015/06/01
		US 2016-0000931 A1	2016/01/07
		US 2016-0008483 A1	2016/01/14
		US 2016-0158378 A1	2016/06/09
		WO 2014-133324 A1	2014/09/04
		WO 2014-133327 A1	2014/09/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2015-005748 A1 ZA 201507105 B	2015/01/15 2017/11/29
US 2016-0194359 A1	2016/07/07	AU 2013-344462 A1 CA 2891673 A1 CN 105051057 A EP 2920201 A2 HK 1215445 A1 HK 1217336 A1 IL 238852 A JP 2016-505527 A MX 2015006154 A RU 2015119165 A US 2016-0215020 A1 US 2017-283461 A1 WO 2014-078731 A2 WO 2014-078731 A3 WO 2014-078734 A2 WO 2014-078734 A3	2015/06/04 2014/05/22 2015/11/11 2015/09/23 2016/08/26 2017/01/06 2015/06/30 2016/02/25 2015/12/01 2017/01/10 2016/07/28 2017/10/05 2014/05/22 2014/07/31 2014/05/22 2014/07/31