

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 6월 2일 (02.06.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/085280 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 47/42* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/012807
- (22) 국제출원일: 2015년 11월 27일 (27.11.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0168937 2014년 11월 28일 (28.11.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 유재훈 (YU, Jaehoon); 16902 경기도 용인시 기흥구 보정로 88, 103-301, Gyeonggi-do (KR). 현순실 (HYUN, Soonsil); 05271 서울시 강동구 상암로 67길 22, 302호, Seoul (KR). 이연 (LEE, Yan); 08826 서울시 관악구 관악로 1, 122E-405, Seoul (KR). 이선주 (LEE, Seonju); 27816 충청북도 진천군 이월면 중미로 111-11, Chungcheongbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123, 11층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

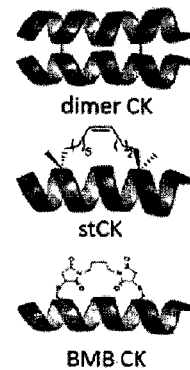
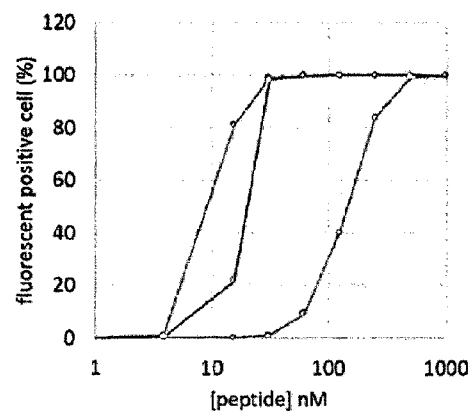
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: CELL PENETRATING STAPLED PEPTIDE, MANUFACTURING METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 세포 투과성 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 그 용도

[도2]



(57) Abstract: The present invention relates to a stapled peptide, a manufacturing method therefor, and a use thereof and, in particular, to an amphipathic alpha-helix stapled peptide including hydrophobic amino acid and hydrophilic amino acid, a manufacturing method therefor, and a use thereof for delivering an active substance into a cell.

(57) 요약서: 본 발명은 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 소수성 아미노산 및 친수성 아미노산을 포함하는 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 이의 세포 내 활성물질 전달 용도에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 세포 투과성 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 소수성 아미노산 및 친수성 아미노산을 포함하는 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 이의 세포 내 활성물질 전달 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 세포 투과 펩타이드 (cell penetrating peptide; CPP) 중 대표적인 예는 TAT 펩타이드, penetratin 펩타이드, 또는 인공적으로 제조한 알지닌이 7-9개 연결된 펩타이드 등이 대표적으로 알려져 있다. 이들의 특징은 알지닌이 풍부하여 세포 표면의 음하전 된 물질을 잘 인식하면서 endocytosis의 기작으로 세포 내로 들어가는 것으로 알려져 있다.
- [4] 이러한 세포 투과 펩타이드는 세포 투과가 불가능한 단백질, 핵산과 같은 분자량이 큰 물질의 전달이나 소분자라 하더라도 세포 내 전달이 어려운 물질들을 세포내 전달하는 데 이용되어 왔다. 그러나, 이와 같은 기존 펩타이드는 충분한 세포 투과능을 보이기 위해서는 마이크로몰 농도를 필요로 한다. 이는 세포 투과성 펩타이드의 제조에서 세포에 전달하고자 하는 물질의 세포 투과능을 높이기 위해 공유결합을 이용한 컨주게이션에 필요한 물질이라는 면에서, 그 효율이 충분치 못하다. 세포내에 전달할 단백질이나 소분자 등의 생리활성 물질들은 마이크로몰 보다 더 낮은 농도에서 그 역할을 하는 경우가 대부분이기 때문이다. 따라서, 세포 투과 펩타이드가 좀 더 낮은 농도에서 좋은 효율성을 가지고 세포 내로 투과하는 기술에 대한 노력들이 계속 진행 중이다.
- [5] 최근, 생리활성 단백질의 일부분인 펩타이드를 스테이플 펩타이드로 만들어 그 생리활성을 조절하고자 하는 노력이 이루어지고 있는 상황이다. 이와 같은 생리활성 조절을 위한 스테이플 펩타이드는 대부분 소수성 아미노산으로 이루어져 있다. 이는 단백질-단백질간 상호 작용에서 중요하게 역할을 하고있는 아미노산이 주로 소수성 작용기로 이루어져 있기 때문이다.
- [6] 또한, 최근, 본 출원의 발명자들은 친수성 및 소수성 아미노산을 포함하는 양면성 알파나선 펩타이드의 두 개 이상의 특정 아미노산 위치에 공유결합 연결부위를 포함하는 펩타이드 다합체를 제조한 바 있다 (PCT/KR2014/009778). 이를 세포 투과 펩타이드로 이용될 수 있음을 확인하였다. 특히, PCT/KR2014/009778에서 본 출원의 발명자들은 양면성 펩타이드의 일부 소수성

잔기에 루신 대신 시스틴을 두 분자 도입하여 이를 두 개의 다이설파이드 결합으로 묶은 이합체 펩타이드를 제조하였다. 이와 같은 이합체 펩타이드들은 알파나선이 대폭적으로 증가되었고 화학적으로 안정하면서 세포 투과능력이 기존의 CPP에 비해 500 배 정도 증가된 세포 투과 능력을 가지고 있음을 확인하였다.

[7] 그러나, 하나의 펩타이드가 16개의 아미노산 잔기를 가지고 있다면, 이합체는 32개의 아미노산으로 구성된 펩타이드가 되므로, 스테이플링된 펩타이드를 제조하여 이합체 펩타이드의 세포 투과 능력과 비교하여 보는 것은 좀 더 우수한 세포 투과 펩타이드를 개발하기 위해 필요한 일이다.

[8] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 스테이플링된 펩타이드를 통해, 화학적 안정성이 유지되면서도, 펩타이드 모노머로서 세포 투과능력이 향상된 세포 투과 펩타이드를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] 발명의 요약

[11] 본 발명의 목적은 아미노산의 개수가 기존의 세포 투과 펩타이드에 비해 적으면서도, 효율적으로 세포 투과가 가능한 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드, 이의 제조방법 및 그 용도를 제공하는 데 있다.

[12] 본 발명은 소수성 아미노산 및 친수성 아미노산을 포함하는 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드로, 펩타이드를 구성하는 적어도 2개 이상의 아미노산이 서로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드를 제공한다. 이 때, 상기 아미노산은 알지닌, 라이신 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 친수성 아미노산을 포함하거나, 루신, 발린, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신 및 이소루신으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소수성 아미노산을 포함할 수 있다.

[13] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 스테이플 펩타이드의 제조방법을 제공한다: 이중결합을 포함하는 화합물로 기능기화된 아미노산을 복수개 제조하는 단계; 및 상기 아미노산을 특정 위치에 배열시켜 이중결합을 포함하는 화합물 사이의 반응에 의해 적어도 2개 이상의 아미노산을 서로 연결시키는 단계.

[14] 본 발명은 또한, 상기 스테이플 펩타이드 및 생물학적 활성물질을 포함하는 세포 내 활성물질 전달을 위한 조성물을 제공한다.

[15]

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 알파나선형의 양면성 스테이플 펩타이드의 예로 stCK의 화학구조이다.

[17] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 이량체의 알파나선형 양면성 펩타이드, 스테이플 펩타이드, BMB linker로 연결된 펩타이드의 세포 투과능을 유세포

- 분석기를 이용하여 보인 결과 (좌) 및 그 구조를 나타낸 모식도(우)이다.
- [18] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 각 스테이플 펩타이드의 helical wheel representation 모식도 및 그 시퀀스이다.
- [19] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 이량체의 알파나선형 양면성 펩타이드, 스테이플 펩타이드의 세포 투과능을 모두 같은 농도 (16 nM)에서 유세포 분석기를 이용하여 보인 결과이다.
- [20] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 스테이플 펩타이드의 제조 과정을 나타내는 모식도이다.
- [21] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 BMB linker를 연결한 펩타이드의 제조 과정을 나타내는 모식도이다.
- [22] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 스테이플 펩타이드 (stCK)의 HPLC 확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [23] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 스테이플 펩타이드 (stCK)의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [24] 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 5-TAMRA 라벨링된 스테이플 펩타이드의 HPLC 확인 결과를 나타낸 그래프이다. 도 9a는 5-TAMRA labeled stAK, 도 9b는 5-TAMRA labeled stBK, 도 9c는 5-TAMRA labeled stCK, 도 9d는 5-TAMRA labeled stDK, 도 9e는 5-TAMRA labeled stEK의 HPLC 확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [25] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 5-TAMRA 라벨링된 스테이플 펩타이드의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 10a는 5-TAMRA labeled stAK, 도 10b는 5-TAMRA labeled stBK, 도 10c는 5-TAMRA labeled stCK, 도 10d는 5-TAMRA labeled stDK, 도 10e는 5-TAMRA labeled stEK의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [26] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 BMB linker 연결 펩타이드 (BMB CK)의 HPLC 확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 12은 본 발명의 일 실시예에 따른 BMB linker 연결 펩타이드 (BMB CK)의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 His 포함 스테이플 펩타이드 (LKH stEK)의 HPLC확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 14은 본 발명의 일 실시예에 따른 Cys 포함 스테이플 펩타이드(Cys stEK)의 HPLC확인 결과를 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 15은 본 발명의 일 실시예에 따른 His 포함 스테이플 펩타이드 (LKH stEK)의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 Cys 포함 스테이플 펩타이드 (LKH stEK)의 질량을 MALDI-TOF로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 스테이플 펩타이드 (stEK)를 이용하여 siRNA의 전달을 적용한 예로, 현광현미경을 이용해 siRNA의 전달을 확인한

결과이다.

- [33] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 His 포함 스테이플 펩타이드를 이용하여 siRNA의 전달의 적용한 예로 타겟 RNA의 발현양을 RT-PCR 실험으로 확인한 결과이다.

[34]

- [35] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [36] 일 관점에서, 본 발명은 소수성 아미노산 및 친수성 아미노산을 포함하는 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드로, 펩타이드를 구성하는 적어도 2개 이상의 아미노산이 서로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드에 관한 것이다.

- [37] 본 발명에서 사용되는 스테이플 펩타이드는 펩타이드를 구성하는 영역이 내부에서 또는 영역간 연결되는 것을 의미한다. 하나의 실시예에서, 알파나선의 화학적 안정성을 높이기 위해 알파나선의 i 위치와 i+4 위치 (또는 i+7, i+11 위치)를 여러 공유결합적 방법을 이용하여 스테이플링할 수 있다. 구체적으로, i, i+3, i+4, i+7, i+8, i+10 및 i+11 (i는 정수)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 아미노산을 스테이플링할 수 있다. 공유결합을 통해 아미노산을 스테이플링할 수 있으며, 이를 통해 세포 투과 능력도 향상될 수 있다. 경우에 따라서, i, i+3, i+4, i+7, i+8, i+10 및 i+11 (i는 정수)로 이루어진 군에서 선택된 둘 이상의 아미노산 위치를 스테이플링할 수 있다.

- [38] 대표적으로는 두 아미노산은 이황화 결합, 탄소-탄소 이중결합, 또는 아미드 결합을 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 두 아미노산 위치 사이에 disulfide의 도입, metathesis 반응을 통한 탄소-탄소 이중결합의 도입, 아미드 결합의 도입, 마이클반응에 의한 짧은 링커의 도입 등의 방법이 있다. 이와 같은 스테이플링을 통해 원하는 화학적 안정성뿐 만이 아니라 세포 투과능력이 향상된 세포 투과 펩타이드를 제조할 수 있다는 가능성이 높아지고 있다.

- [39] 펩타이드가 알파나선형인 경우, 사이클링 구조의 화합물이 적어도 2개 이상의 아미노산을 연결할 수 있다. 사이클링의 크기는 알파나선형 펩타이드의 아미노산 개수에 따라 달라질 수 있다. 또한, 상기 스테이플은 하나 이상 또는 복수개로 포함될 수도 있다.

- [40] 특히, 본 발명의 일 실시예에서 상기 펩타이드 중 하나 이상의 아미노산이 이중결합 포함 화합물로 기능기화될 수 있다. 예를 들어, 이중결합 포함 화합물 사이의 폐환 복분해(ring-closing metathesis)를 통해 생성된 링 구조에 의해 아미노산이 연결될 수 있다. 이 때, 상기 기능기화된 아미노산은 알케닐 측쇄로 치환된 아미노산일 수 있다. 상기 알케닐은 펜테닐기, 헥세닐기, 헵테닐기, 옥테닐기, 노네닐기, 데세닐기, 운데케닐기, 및 도데케닐기로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [41] 상기 펩타이드를 구성하는 아미노산은 양면성을 나타내면서도 알파나선형 구조를 유지할 수 있도록 하는 것이면 그 종류가 제한되는 것은 아니나, 예를

들어 상기 친수성 아미노산은 알지닌, 라이신 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 상기 소수성 아미노산은 루신, 발린, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신 및 이소루신으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [42] 구체적으로, 본 발명에서는 라이신 및 류신으로 이루어진 양면성 알파나선형 펩타이드를 스테이플 펩타이드로 제조하여 기존에 알려진 스테이플 되지 않은 펩타이드 및 이미 알려진 세포 투과성 펩타이드와 세포 투과 능력을 비교하여, 본 발명에 따른 스테이플 펩타이드가 우수한 세포 투과 능력을 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [43] 경우에 따라서, 상기 펩타이드는 세포 내 전달의 효율성을 높이기 위해서 히스티딘을 포함할 수 있다. 세포내 전달 후 세포 질로의 전달 과정 (endosomal escape)에 히스티딘이 작용할 수 있다. 상기 히스티딘은 펩타이드 중 라이신 위치에 예를 들어 3개 포함될 수 있다. 라이신 위치에 포함되거나, 1개 이상 포함되는 경우 펩타이드의 세포 내 전달 효율성이 향상될 수 있다.
- [44] 또 다른 경우에 따라서, 상기 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단에 시스테인을 추가로 포함할 수 있다. 상기 시스테인의 위치에 따라 전달하고자 하는 물질에 대한 전달 효율이 달라질 수 있다. 예를 들어, 이는 전달하고자 하는 물질의 특성에 따라 달라질 수 있다. 전달 물질이 전기적 음성을 가지는 물질인 경우 시스테인이 N-말단에 위치함으로써 펩타이드의 알파 나선도가 증가되고, 이에 따라 물질의 전달 효율이 증가할 수 있다. 전달 물질이 전기적 양성을 가지는 물질인 경우 시스테인이 C-말단에 위치함으로써 펩타이드의 알파 나선도 증가로 전달 효율이 증가할 수 있다.
- [45] 추가적으로, N-말단 또는 C-말단에 추가된 시스테인과 펩타이드 사이에 별도의 링커를 도입할 수도 있다. 상기 링커의 형태는 복수개 예를 들어 하나 내지 세 개의 글리신 또는 알라닌을 포함하는 것일 수 있다. 링커의 길이 또는 종류에 따라 펩타이드의 물성 또는 전달 효율이 달라질 수 있으며, 링커의 길이에 따른 펩타이드의 물성 또는 전달 효율은 전달하고자 하는 물질에 따라 달라질 수 있다.
- [46] 상기 펩타이드에 포함되는 아미노산의 수는 안정한 2차 구조인 알파나선 구조를 형성할 수 있다면 제한되지 않으나, 예를 들어 5-20개의 아미노산을 포함할 수 있다. 본 출원의 발명자들은 세포 투과 펩타이드에 비해 상대적으로 적은 개수의 아미노산을 가지면서도 (예를 들어, 16개의 아미노산으로 이루어짐) 이전에 개발된 24-32개의 아미노산을 가지는 CPP와 비교하여 세포 투과능력이 손색이 없음을 확인하였다. 이를 통해, 경제적으로도 활용도가 높은 세포 투과 펩타이드를 제조할 수 있게 된다.
- [47] 친수성 아미노산의 아민기를 알파나선형 펩타이드의 한 면으로 모으기 위해, 친수성 아미노산이 한 개 내지 세 개씩 교대로 배열되어 있을 수 있으며, 나머지 서열은 소수성 아미노산이 한 개 내지 세 개씩 배열될 수 있다. 예를 들어, 상기

친수성 및 소수성 아미노산 각각이 한 개 내지 세 개씩 교대로 배열되어, 양면성 펩타이드 중 i+3 혹은 i+4 위치에 적어도 하나는 i 위치와 같은 극성을 지니는 아미노산을 포함할 수 있다.

- [48] 구체적으로, 스테이플 펩타이드는 다음 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있으며, 이들은 metathesis 반응을 통한 탄소-탄소 이중결합을 도입하여 제조된 스테이플 펩타이드이다. 아래 서열에서 R8는 (R)-2-(7'-옥테닐)알라닌, S5는 (S)-2-(4'-펜테닐)알라닌을 의미한다.

[49] R₈KKLLKLS₅KKLLKLAG (서열번호 1)

[50] LKKR₈LKLLKKS₅LKLAG (서열번호 2)

[51] LKKLR₈KLLKKLS₅KLAG (서열번호 3)

[52] LKKLLKR₈LKKLLKS₅AG (서열번호 4)

[53] LKKLLKLR₈KKLLKLS₅G (서열번호 5)

[54] LKKLLKLLR₈KLLKLS₅ (서열번호 6)

[55] LKHLHLR₈KHLKLS₅G (서열번호 7)

[56] CLKLLKLR₈KKLLKLS₅G (서열번호 8).

- [57] 본 발명에 따른 스테이플 펩타이드는 세포 투과능이 우수하여 최소 농도로 사용하는 경우에도 목적하는 세포 투과능을 확보할 수 있다. 이를 통해, 우수한 세포 전달능을 나타낼 뿐 아니라, 낮은 농도의 생물학적 활성물질을 사용하여도 목적하는 효과를 획득할 수 있다.

- [58] 저농도 (low nM)에서도 효율적으로 세포 투과능력을 가지는 펩타이드 다합체가 이미 발명자들에 의해 제조된 바 있다. 그러나, 이들 펩타이드 다합체는 24-32개 정도의 아미노산을 포함한다. 세포 투과 능력이 펩타이드를 구성하는 아미노산의 숫자 (또는 길이)에 비례하여 늘어나는 것은 아니므로, 지금까지 본 발명자가 얻었던 세포 투과 펩타이드에 비해 상대적으로 적은 개수의 아미노산을 가지면서도 (16개의 아미노산으로 이루어짐) 세포 투과능력이 24-32개의 아미노산을 가지는 CPP와 비교하여 손색이 없다면 경제적으로도 활용도가 높은 세포 투과 펩타이드를 제조할 수 있게 된다. 결과적으로, 세포 내 활성물질 전달 용도로 적은 개수의 아미노산을 함유한 세포 투과성 펩타이드를 제공하는 데 있다.

- [59] 지금까지 본 발명자들의 연구 결과에 의해, 세포 투과 펩타이드가 가질 수 있는 일반적인 성질에 대한 연구 결과, 알파나선도를 높이는 것이 세포 투과 능력과 밀접한 연관 관계가 있다는 결론을 얻었다 (물론 높은 알파나선이 세포 투과 능력의 필요 충분조건은 아니다). 본 발명은 발명자가 시도한 양면성 펩타이드의 상기 양면성 알파나선형 펩타이드를 스테이플 펩타이드 형태로 제조하여, 세포 투과능을 높이려 한다.

- [60] 이를 바탕으로, 다른 관점에서 본 발명은 상기 스테이플 펩타이드 및 생물학적 활성물질을 포함하는 세포 내 활성물질 전달을 위한 조성물에 관한 것이다.

- [61] 상기 생물학적 활성물질은 일종의 짐 (cargo)으로, 세포막 투과 도메인에

결합되어 세포 내로 전달됨으로써 생체 내의 모든 생리 현상을 조절하는 생물학적 활성 또는 기능을 조절하는 물질일 수 있으며, 예를 들어 DNA, RNA, siRNA, 압타머, 단백질, 항체 또는 세포독성 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [62] 추가적으로 생물학적 활성 또는 기능을 조절하는 물질 또는 기타 전달체를 결합시킬 수 있으며, 이 때 펩타이드와 생물학적 활성 또는 기능을 조절하는 물질 또는 기타 전달체가 복합체 구조를 형성할 수 있다. 상기 물질 또는 전달체는 예를 들어, 스테이플 펩타이드와의 비공유성 결합 또는 공유성 결합을 통해 연결될 수 있다. 상기 비공유성 결합은 예를 들어, 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용 및 양이온-파이 상호작용으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 공유성 결합은 분해성 또는 비분해성 결합일 수 있으며, 상기 분해성 결합은 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합일 수 있고, 비분해성 결합은 아마이드 결합 또는 포스페이트 결합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 상기 세포독성 화합물의 경우 펩타이드와 정전기적 결합 또는 host-guest 결합 등 비공유성 결합을 형성하여 연결될 수 있으며, 예를 들어 doxorubicin, Methotrexate, Paclitaxel, Cisplatin, Bleomycin, taxol, berberine 또는 curcumin일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 또는 항체의 경우 세포 내 특정 타겟에 특이적으로 결합하는 어떠한 형태의 약물이라도 포함할 수 있으며, N-말단 또는 C-말단에 융합되는 형태로 도입할 수 있다.
- [64] 하나의 실시예에서, 상기 생물학적 활성물질은 세포 내 특정 타겟으로 전달된다면 함량은 제한되지 않으나, 최대의 효과를 나타내는 범위로 포함될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 생물학적 활성물질 및 스테이플 펩타이드는 1:1 내지 1:100의 몰비, 예를 들어 1:2 내지 1:100의 몰비, 특히 1:2 내지 1:50의 몰비로 포함될 수 있다. 특히, 특정 몰비 예를 들어 1:50의 몰비에서 siRNA의 농도가 더 낮아지는 조건에서도 목적하는 타겟 유전자가 상당히 저해됨을 확인하였다.
- [65] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 스테이플 펩타이드의 제조방법에 관한 것이다: 이중결합을 포함하는 화합물로 기능기화 아미노산을 복수개 제조하는 단계; 및 상기 아미노산을 특정 위치에 배열시켜 이중결합을 포함하는 화합물 사이의 반응에 의해 적어도 2개 이상의 아미노산을 서로 연결시키는 단계.
- [66] 상기 기능기화는 앞서 언급한 사이클링을 형성하여 2개 이상의 링을 연결할 수 있도록 하는 구조라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 알케닐 측쇄를 가지는 아미노산을 특정 위치에 배열시켜 사이클링을 통해 연결된 스테이플 펩타이드를 제조할 수 있다. 앞서 설명된 본 발명에 따른 각 구성은 제조방법에서도 동일하게 적용될 수 있다.

[67]

[68] 실시예

[69] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 게 있어서 자명할 것이다.

[70]

[71] 실시예 1 : 스테이플 펩타이드의 제조

[72] 류신과 라이신으로 이루어진 알파나선형 펩타이드를 소수성면의 아미노산 중 i, i+7 위치로 이루어진 두 아미노산을 선택하여 i 위치에는 (R)-2-(7'-octenyl)alanine으로, i+7 위치에는 (S)-2-(4'-pentenyl)alanine을 치환하여 ring closure metathesis 방법을 통해 하이드로카본 스테이플 펩타이드를 제조하였다 (도 3). 아래의 표 1은 각 아미노산의 서열과 그 이름을 나타낸다.

[73]

[74] [표1]

이름	서열 ^a	서열번호
stAK	R ₈ KKLLKLS ₅ KKLLKLAG	1
stBK	LKKR ₈ LKLLKKS ₅ LKLAG	2
stCK	LKKLR ₈ KLLKKLS ₅ KLAG	3
stDK	LKKLLKR ₈ LKKLLKS ₅ AG	4
stEK	LKKLLKLR ₈ KKLLKLS ₅ G	5
stFK	LKKLLKLLR ₈ KLLKLS ₅	6
LKH stEK	LKHLLHLR ₈ KHLLKLS ₅ G	7
Cys stEK	CLKKLLKLR ₈ KKLLKLS ₅ G	8

[75]

[76] ^aR₈ ; (R)-2-(7'-octenyl)alanine, S₅ ; (S)-2-(4'-pentenyl)alanine, 1-7 펩타이드는 C-말단에 amide, N-말단에 acetyl기를 포함하고, 8 펩타이드는 C-말단에 amide, N-말단에 amine을 포함함.

[77] 각 스테이플 펩타이드의 제조는 도 5와 같이 ring closure metathesis (RCM) 방법을 따른다. 스테이플이 되지 않은 unstapled 펩타이드는 standard Fmoc peptide synthesis 방법에 따라 합성하였고, RCM 단계에서는 앞서 보인 참고문헌에 따라 진행하였다. 간략하게, N-말단에 Fmoc 보호기가 있는 상태에서 펩타이드가 달려있는 레진 (30 μmol)을 이염화탄소와 이염화아세틸렌에 각각 1분간 3번씩 씻어주었다. 그후 이염화아세틸렌에 6 mM 농도로 녹인 Grubb's first generation catalyst 1 mL를 위의 레진에 처리하여 상온에서 2 시간 질소 가스로

bubbling하면서 반응하였다. 이와 같은 반응을 한 번 더 진행하여 반응을 완결하였고, 그 후 acetyl 작용기를 부착하거나, 5-TAMRA 형광을 부착하는 반응을 진행한 후 스테이플 펩타이드를 레진에서 분리하여 HPLC로 분리하였다. His 혹은 Cys를 포함하는 스테이플 펩타이드도 위와 동일한 방법으로 합성하였고, 각각 분리된 펩타이드의 HPLC trace는 도 7, 9, 13, 14와 같다.

[78] 분리된 펩타이드는 MALDI-TOF 질량분석기로 확인하였고, 그 결과는 도 8, 10, 15, 16과 같다. Ac stCK : MS $[M+H]^+$: 1927.4 (calcd) 1928.7 (obsd). 5-TAMRA stAK : MS $[M+H]^+$: 2298.5 (calcd) 2299.6 (obsd). 5-TAMRA stBK : MS $[M+H]^+$: 2298.5 (calcd) 2298.2 (obsd). 5-TAMRA stCK : MS $[M+H]^+$: 2298.5 (calcd) 2297.7 (obsd). 5-TAMRA stDK : MS $[M+H]^+$: 2298.5 (calcd) 2298.1 (obsd). 5-TAMRA stEK : MS $[M+H]^+$: 2340.6 (calcd) 2340.3 (obsd). LKH stEK : $[M+H]^+$: 1996.32 (calcd), 1997.29 (obsd). Cys stEK $[M+H]^+$: 2030.43 (calcd), 2030.75 (obsd).

[79] 스테이플 펩타이드의 대조군으로 BMB linker로 연결된 펩타이드를 제조하였다 (도 6). 이 펩타이드의 아미노산 시퀀스는 stCK와 유사하며, R8과 S5를 시스테인으로 치환하였다. N-말단에 5-TAMRA를 표지한 5-TAMRA-BMB CK는 위의 시스테인을 포함하는 펩타이드와 1,4-bis(maleimido)butane (BMB)를 동량 가하여 PBS 버퍼 (pH 7.4) 조건에서 반응하여 얻어졌다. 각각 분리된 펩타이드의 HPLC trace는 도 11과 같다. 분리된 펩타이드는 MALDI-TOF 질량분석기로 확인하였고, 그 결과는 도 12와 같다.

[80]

[81] 실시예 2 : 유세포 분석기를 이용한 세포 투과능 확인

[82] 5-TAMRA가 표지된 스테이플 펩타이드 5종, 선행 특허에서 얻어진 양면성 알파나선형의 이량체 펩타이드 (dimer CK), BMB linker로 연결된 펩타이드 (BMB CK)를 HeLa 세포 (human cervical cancer cell line)와 각각의 농도에서 인큐베이션하였다. 유세포 분석기 (FACS, fluorescence activated cell sorting) 실험 결과 (도 2, 4), 형광 양성세포의 백분율은 분석에 사용된 모든 농도에서 세포 투과능은 다음 순서로 증가함을 보여준다 (도 2): BMB CK < stCK < dimer CK.

[83] 스테이플 펩타이드(예, stCK)에 형광물질인 5-tetramethylrhodamine (5-TAMRA)를 부착하고 그 세포 투과능을 측정한 결과 약 30 nM에서 90% 이상의 세포에서 펩타이드를 포함하고 있음이 확인되었다 (도 2).

[84] PCT/KR2014/009778에 기재된 바와 같이 알파나선형의 양면성 이량체 펩타이드(dimer CK)는 약 10 nM에서 대부분의 세포가 펩타이드를 보유하고 있음을 확인하였고, 본 발명에서의 스테이플 펩타이드 (stCK)는 약 30 nM에서 동일한 효율을 보이고 있다.

[85] 서로 다른 위치의 스테이플 펩타이드를 동일한 농도 (16 nM)에서 그 세포 투과능을 확인한 결과 st-AK < st-BK < st-CK < st-DK < st-EK의 순서로 형광 양성인 세포의 비율이 증가하고 있음을 확인하였다. 이는 스테이플 펩타이드의

hydrocarbon linker의 위치 및 아미노산의 시퀀스에 따라서 세포 투과능에 영향을 미침을 보이고 있다 (도 4).

- [86] 반면, 1,4-bis(maleimido)butane (BMB) linker로 동일한 아미노산 위치에 연결하여 알파나선도를 높인 펩타이드의 경우는 500 nM에 이르러야 동일한 효율을 보이고 있다. 이는 제한된 conformation에 의해 세포내로 투과될 때의 세포막 혹은 세포막에 존재하는 단백질과의 조우 과정에서 이루어지는 상호작용에서 entropy의 상쇄를 보상받을 수 있을 것이라는 가정 및 높은 알파나선도가 세포 투과능에 기여하는 점 이외에도 linker 부분이 세포 투과능에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 확인되었다. 여기서는 BMB와 같은 친수성의 linker보다는 hydrocarbon으로 이루어진 스테이플 펩타이드의 linker가 세포 투과능에 기여하는 면이 많다고 할 수 있다.

[87]

- [88] 실시예 3 :현광 현미경을 이용한 siRNA 전달 효과 확인

- [89] HeLa cell (1.0×10^4 cells/well)을 8 well Lab-tek chamber slide (Thermo Scientific)에 키운 후 다음날 아래와 같은 조건에서 transfection하였다. DY-547이 표지된 siRNA (siGLO, GE life sciences)을 스테이플 펩타이드 stEK와 PBS 버퍼 조건, 상온에서 30분간 둔 후 OptiMEM media 배지와 섞어 24 시간 동안 세포와 같이 배양한 후 PBS 버퍼로 두번 씻어주었다. 그 후 형광 현미경 (Confocal LSM 710 system, Zeiss)으로 원하는 파장의 형광 필터를 사용하여 이미지를 관찰하고, 그 이미지를 저장한 결과이다. Positive control로 사용된 Dharmafect I 시약의 경우에서와 같이 stEK가 siRNA와의 몰비율로 2:1 혹은 10:1일 때에도 siRNA의 전달이 펩타이드에 의해 효율적으로 이루어지고 있음을 알 수 있다.

[90]

- [91] 실시예 4 :real time qPCR을 이용한 펩타이드의 siRNA 전달 효과 확인

- [92] HeLa cell (5×10^4 cells/well)을 24 well plate에 키운 후 다음날 His을 포함하는 스테이플 펩타이드인 LKH stEK를 이용하여 siRNA인 siGenome (GE Life Sciences)를 이용하여 타겟 유전자의 발현양을 확인하였다. siRNA의 농도를 50 nM로 유지하고 도 18a에서 보이는 바와 같이 비율로 혼합하였고, 이 농도에서 24 시간 동안 세포와 같이 배양한 후 타겟 mRNA의 발현양을 확인하였다. 도 18의 a에서 보이는 바와 같이 CPP인 LKH stEK가 siRNA와의 몰비율이 1:50일 때 가장 효과적인 타겟유전자 저해 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 도 18b에서와 같이 동일한 비율인 1:50일 때, siRNA의 농도가 더 낮아지는 조건에서도 타겟 유전자의 저해현상이 상당량 보이는 것으로 확인되었다.

- [93] 이를 통해, 본 발명에 따른 라이신과 류신으로 이루어진 알파나선형의 양면성 펩타이드의 경우 스테이플 펩타이드에서 다른 펩타이드 유도체에 비해 월등히 좋은 세포 투과능을 가지고 있다.

[94]

산업상 이용가능성

[95] 본 발명에 따른 알파나선형의 양면성의 스테이플 펩타이드는 높은 세포 투과능을 보유하여, 세포 내에 여러 생리활성 물질을 세포내로 효과적으로 전달할 수 있다.

[96]

[97] 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

[98]

서열목록 Free Text

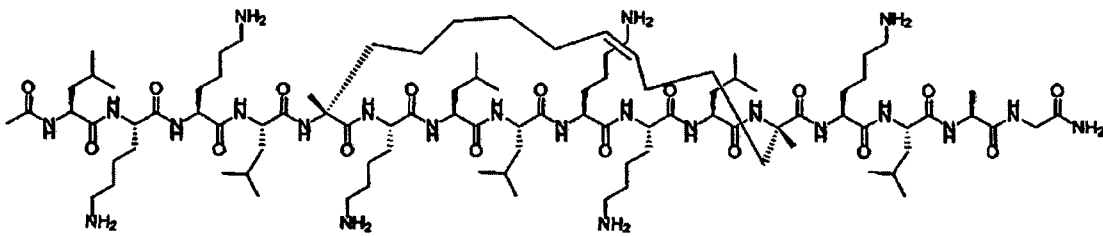
[99] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

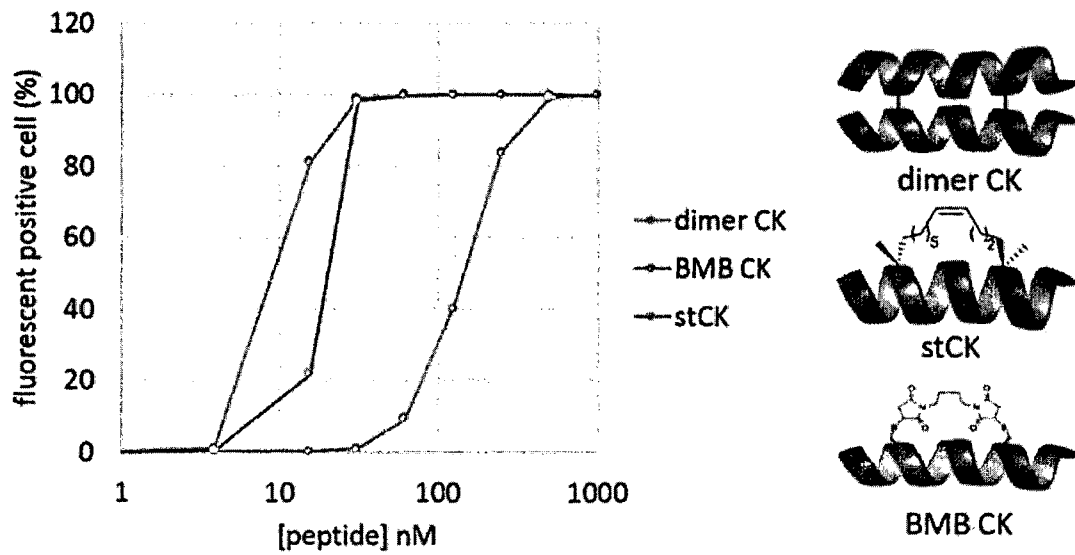
- [청구항 1] 소수성 아미노산 및 친수성 아미노산을 포함하는 양면성의 알파나선형 스테이플 펩타이드로, 펩타이드를 구성하는 적어도 2개 이상의 아미노산이 서로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 $i, i+3, i+4, i+7, i+8, i+10$ 및 $i+11$ (i 는 정수)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 아미노산이 연결되는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 아미노산은 이황화 결합, 탄소-탄소 이중결합, 또는 아마이드 결합을 통해 연결되는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드 중 하나 이상의 아미노산이 이중결합 포함 화합물로 기능기화된 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 이중결합 포함 화합물 사이의 폐환 복분해(ring-closing metathesis)를 통해 생성된 링에 의해 아미노산이 연결되는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 기능기화된 아미노산은 알케닐 측쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 알지닌, 라이신 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 친수성 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 루신, 발린, 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신 및 이소루신으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소수성 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드 중 친수성 및 소수성 아미노산 각각이 한 개 내지 세 개씩 교대로 배열되어 있는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 히스티딘을 필수적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단에 시스테인을 추가로 포함하는

- 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 5-20개의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
다음 서열 중 어느 하나를 가지는 것을 특징으로 하는 스테이플 펩타이드:
R₈KKLLKLS₅KKLLKLAG (서열번호 1),
LKLR₈LKLLKKS₅LKLAG (서열번호 2),
LKKLR₈KLLKKLS₅KLAG (서열번호 3),
LKKLLKR₈LKKLLKS₅AG (서열번호 4),
LKKLLKLR₈KKLLKLS₅G (서열번호 5),
LKKLLKLLR₈KLLKLAS₅ (서열번호 6),
LKHLHLR₈KHLLKLS₅G (서열번호 7), 또는
CLKLLKLR₈KKLLKLS₅G (서열번호 8),
상기 서열에서 R₈는 (R)-2-(7'-옥테닐)알라닌, S₅는
(S)-2-(4'-펜테닐)알라닌을 의미한다.
- [청구항 14] 다음 단계를 포함하는 스테이플 펩타이드의 제조방법:
이중결합을 포함하는 화합물로 기능기화된 아미노산을 복수개 제조하는 단계; 및
상기 아미노산을 특정 위치에 배열시켜 이중결합을 포함하는 화합물 사이의 반응에 의해 적어도 2개 이상의 아미노산을 서로 연결시키는 단계.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
i, i+3, i+4, i+7, i+8, i+10 및 i+11 (i는 정수)로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 아미노산 위치에서 연결하는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 아미노산은 이중결합 포함 화합물 사이의 폐환 복분해(ring-closing metathesis)를 통해 생성된 링에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 기능기화된 아미노산은 알케닐 측쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 18] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 스테이플 펩타이드 및 생물학적 활성물질을 포함하는 세포 내 활성물질 전달을 위한 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 생물학적 활성물질은 DNA, RNA, siRNA, 압타머, 단백질, 항체 또는 저분자 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 생물학적 활성물질 및 스테이플 펩타이드는 1:2 내지 1:100의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

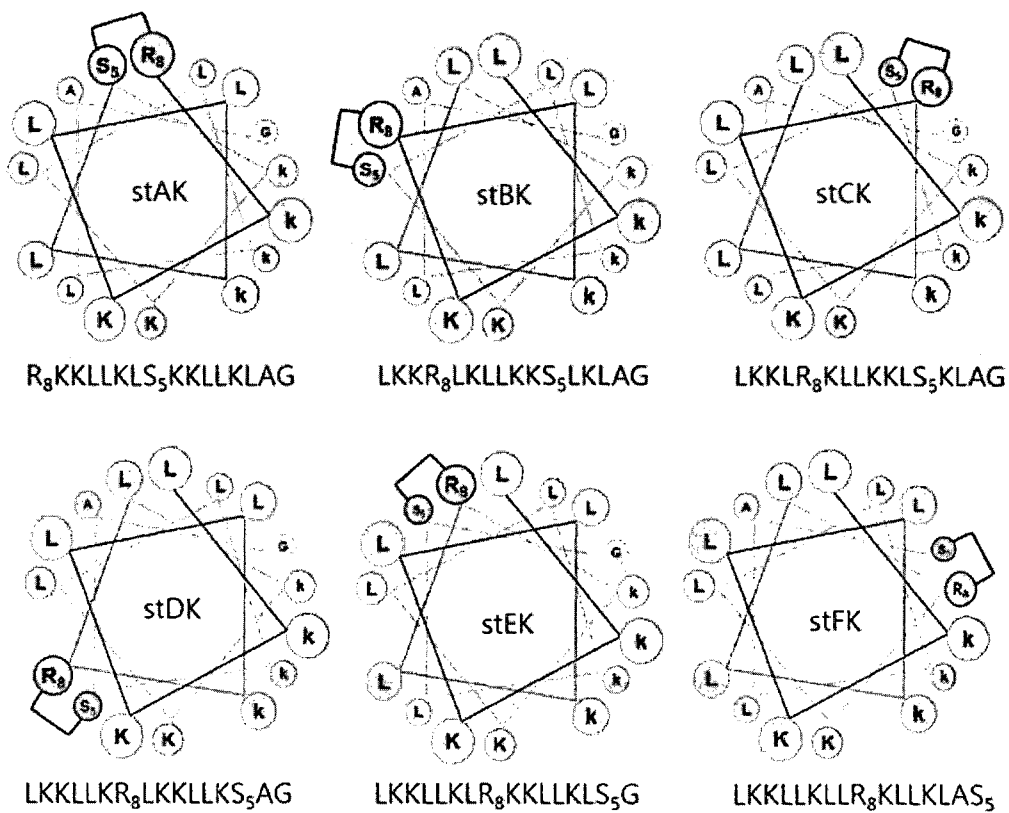
[도1]



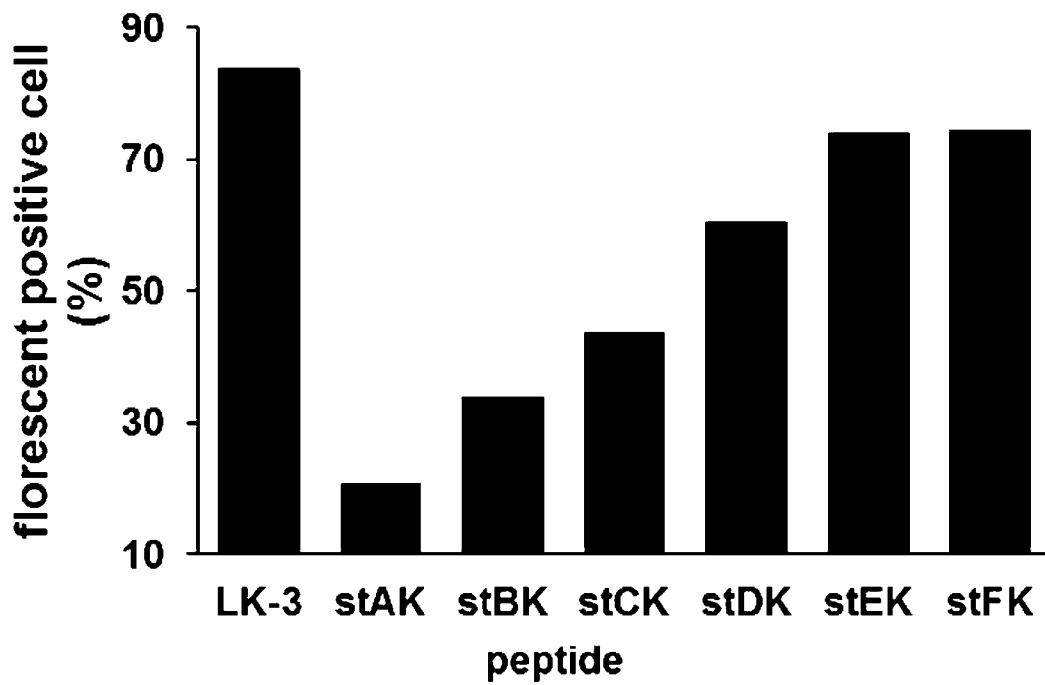
[도2]



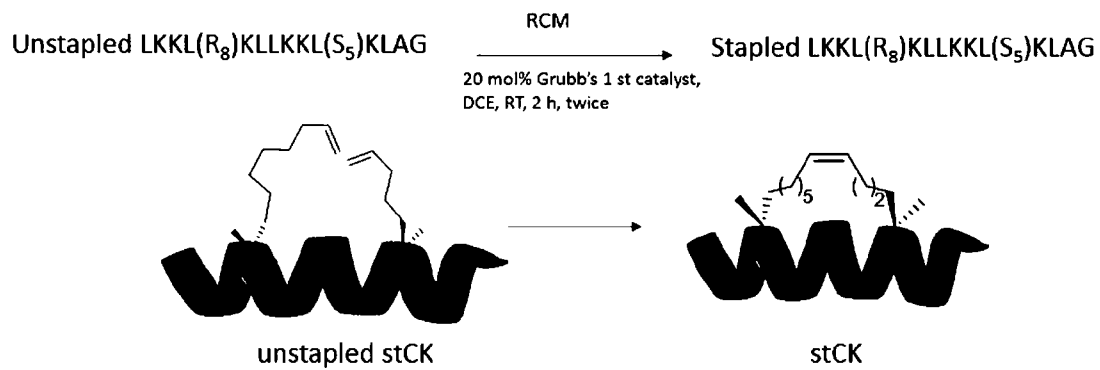
[도3]



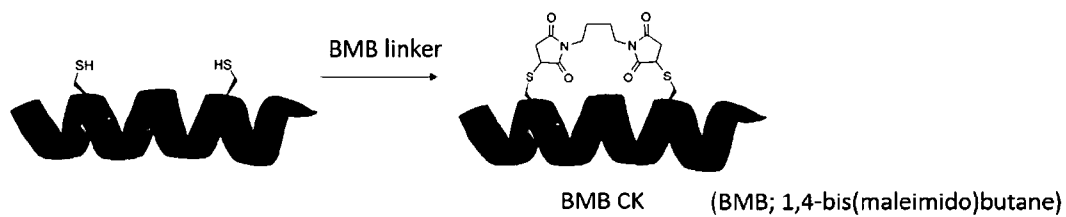
[도4]



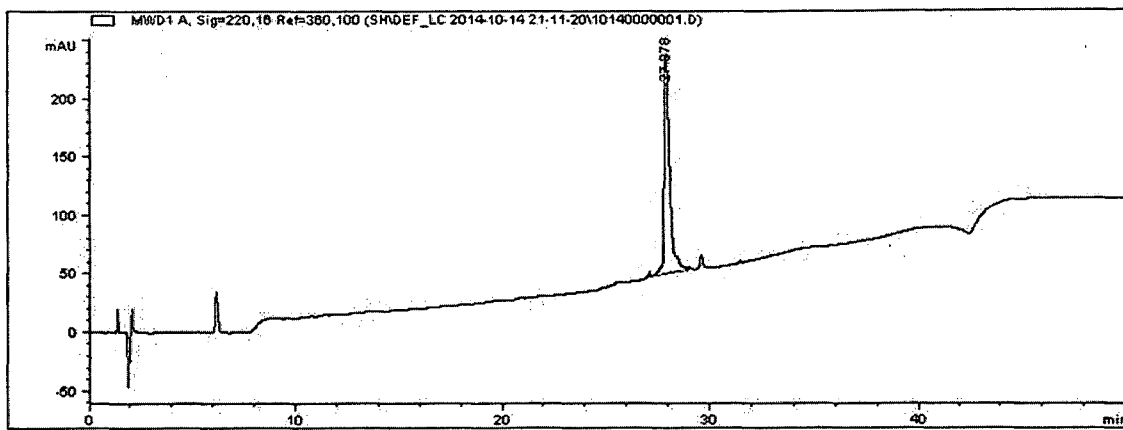
[도5]



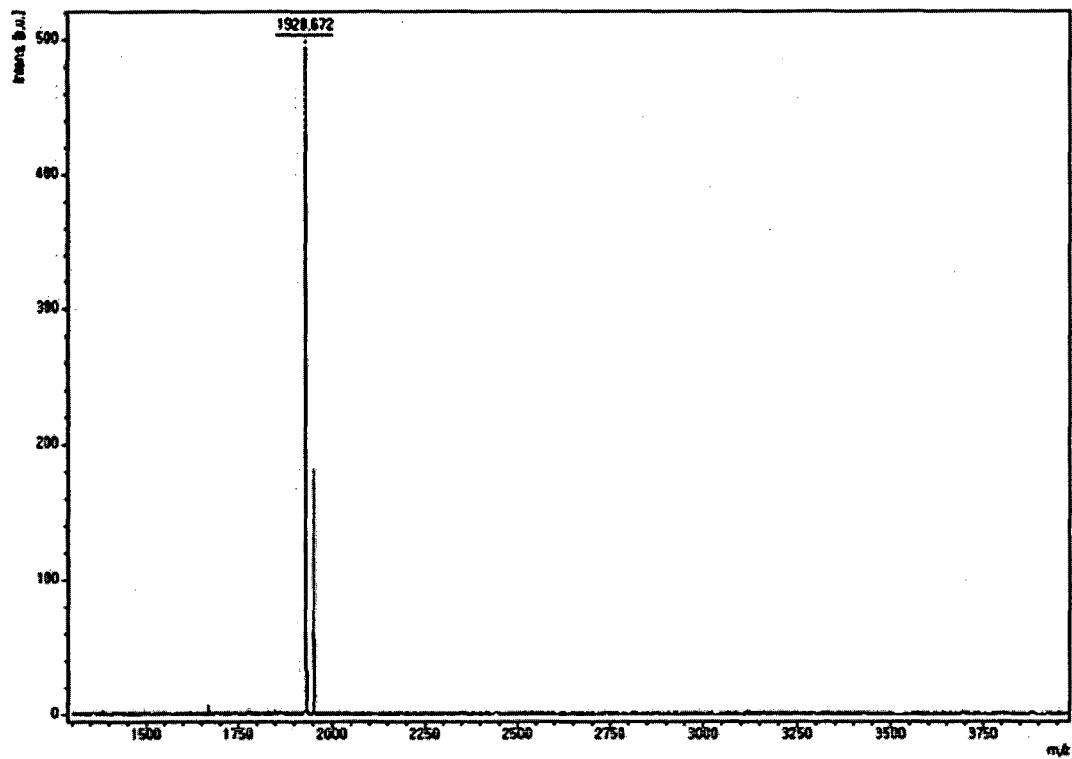
[도6]



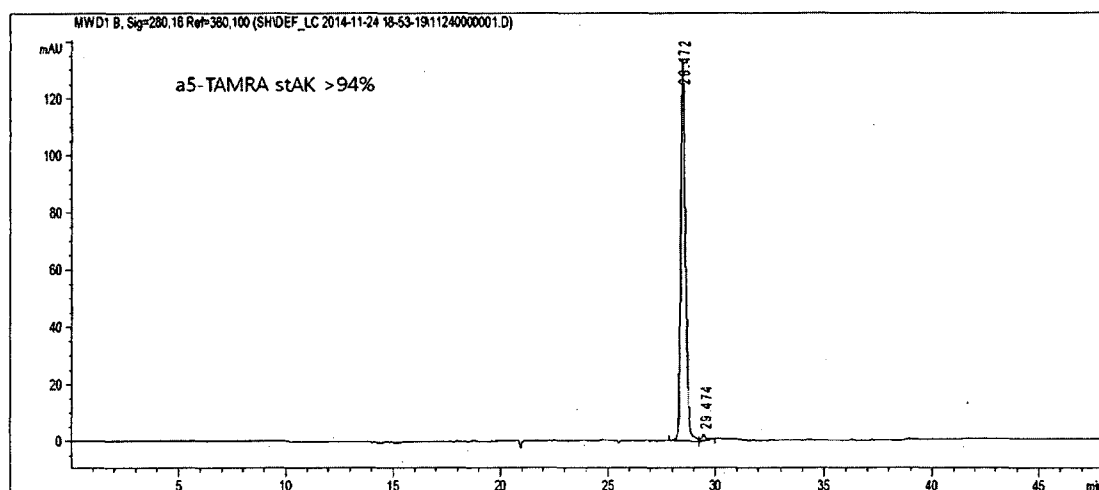
[도7]



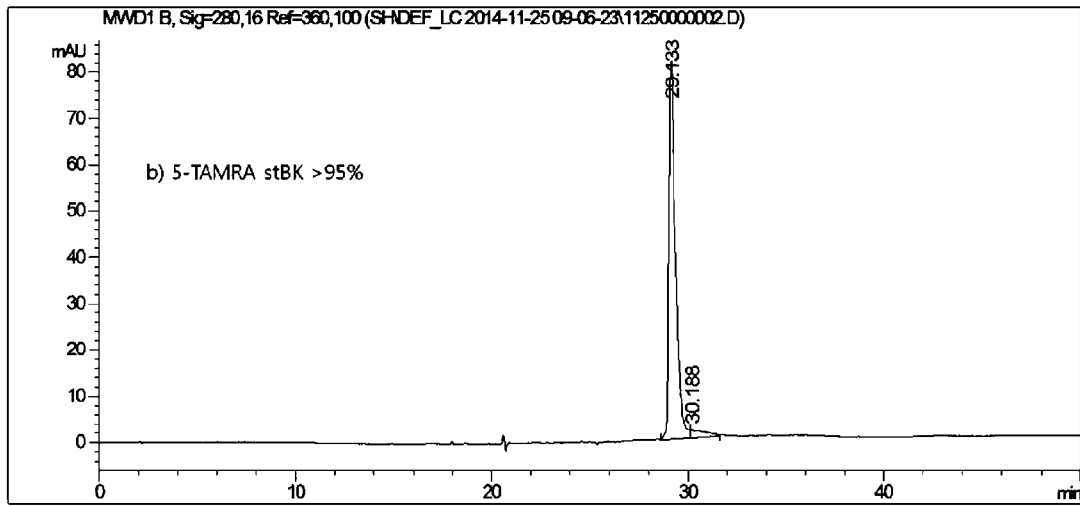
[도8]



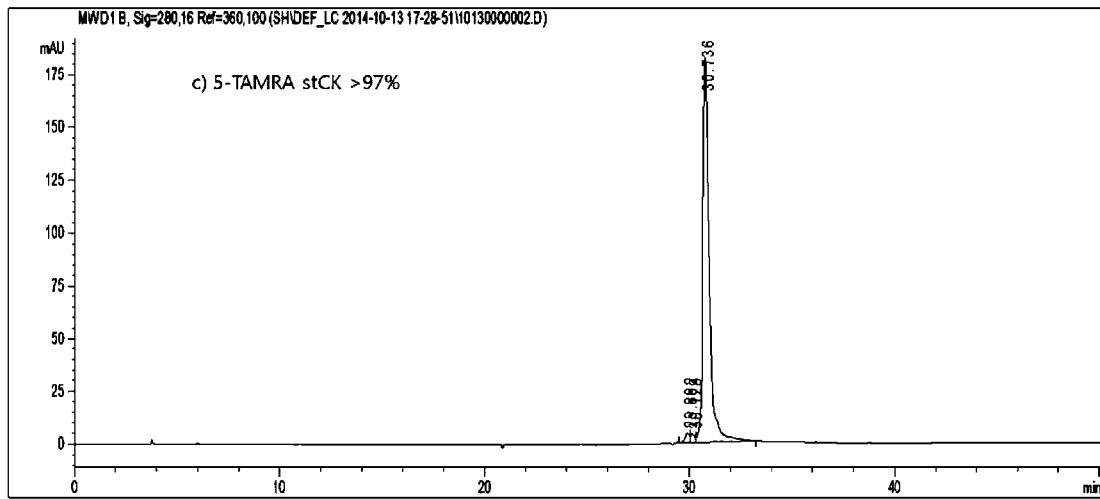
[도9a]



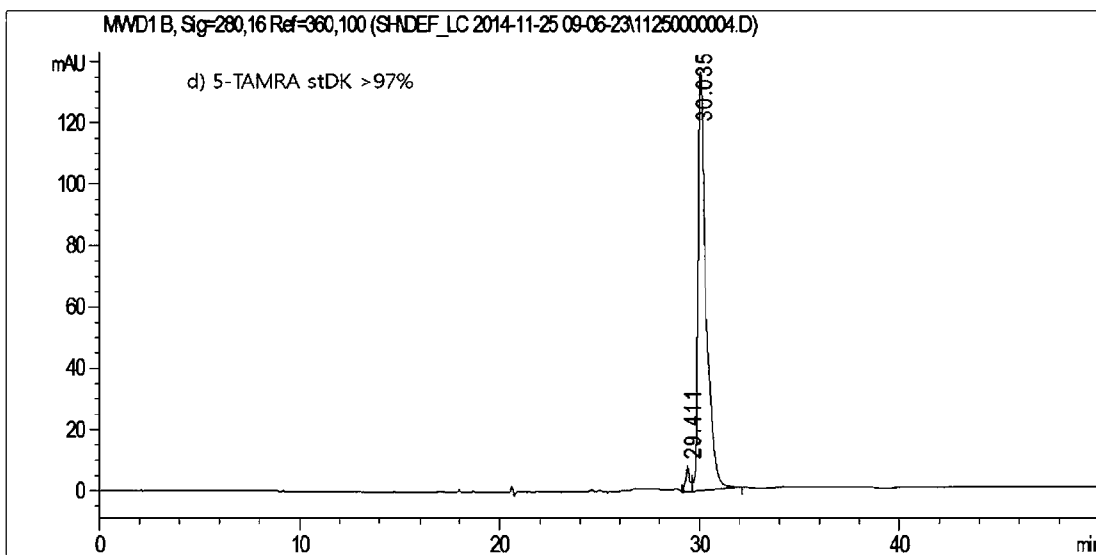
[도9b]



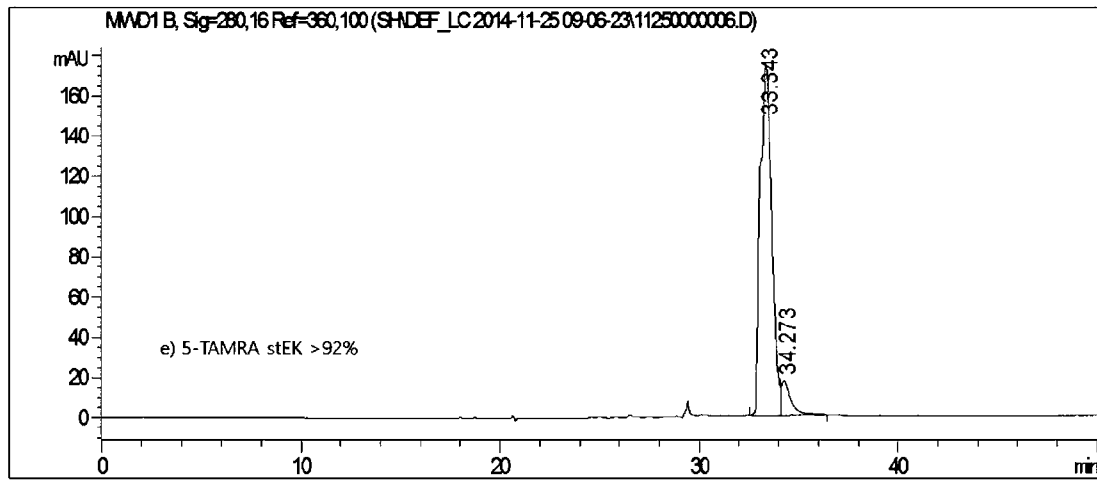
[도9c]



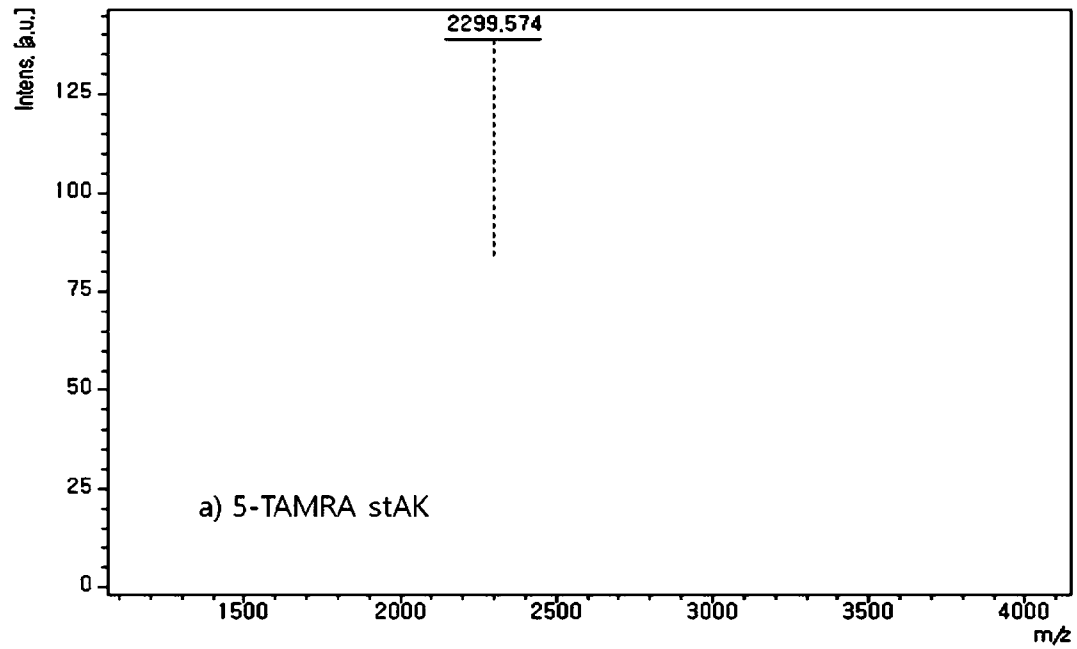
[도9d]



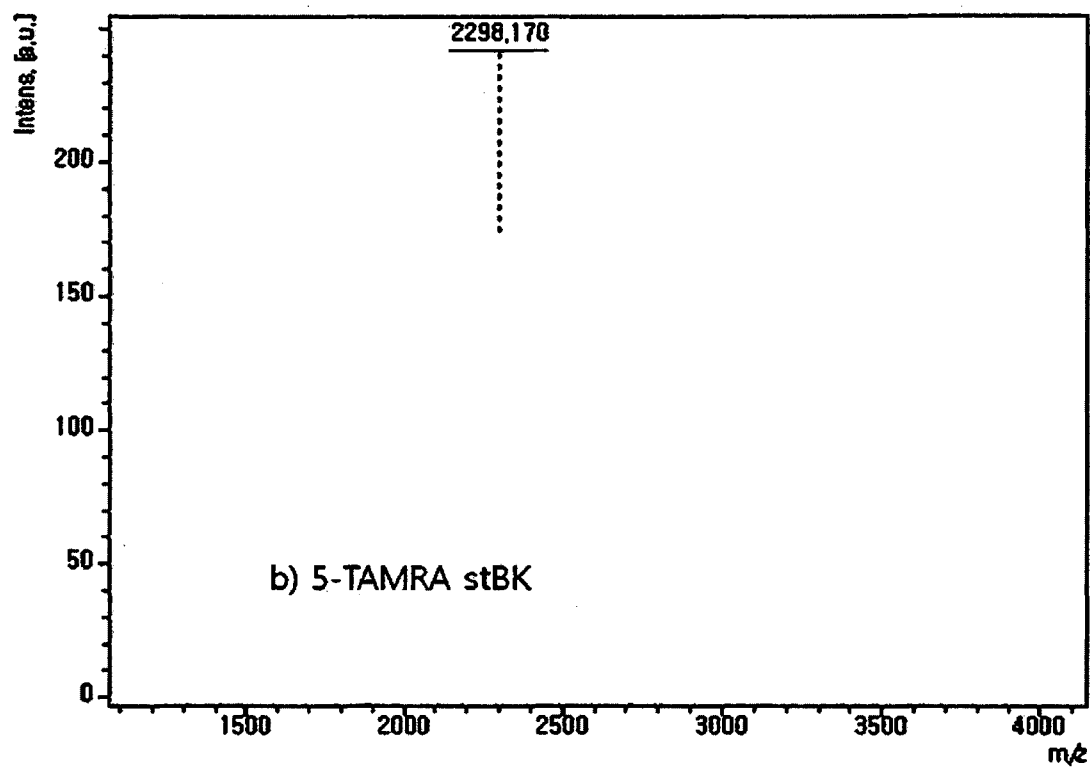
[도9e]



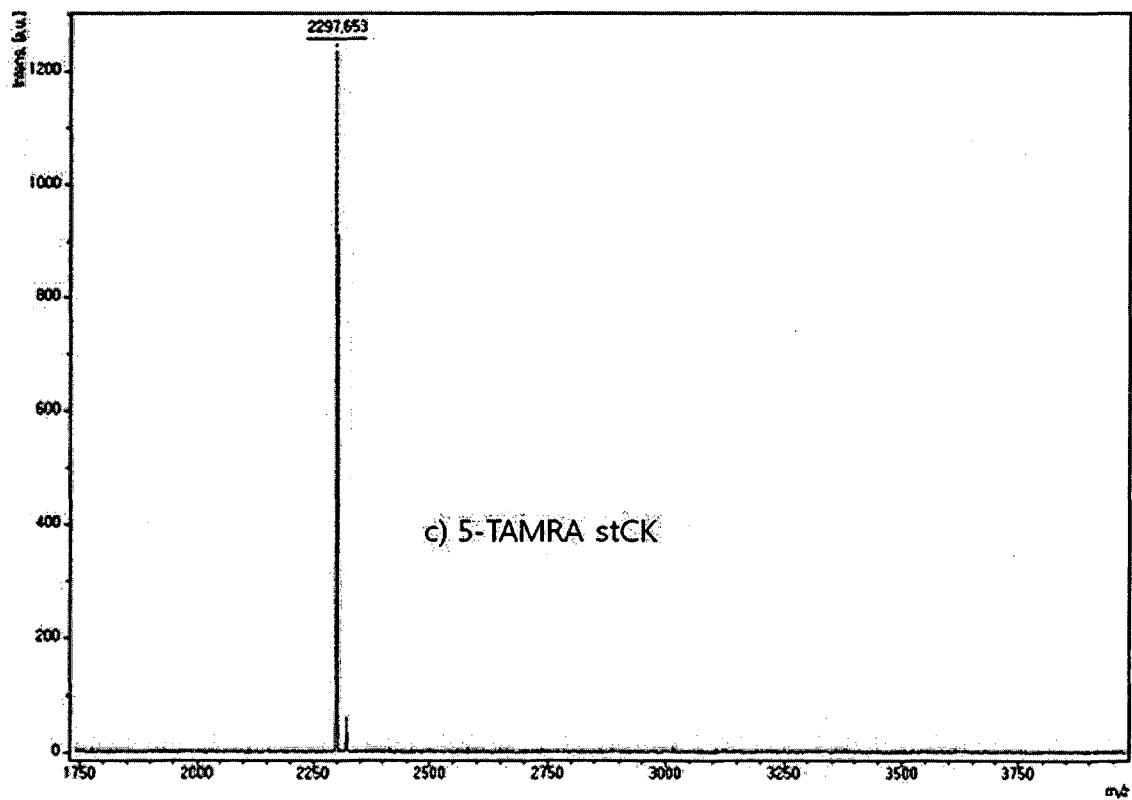
[도10a]



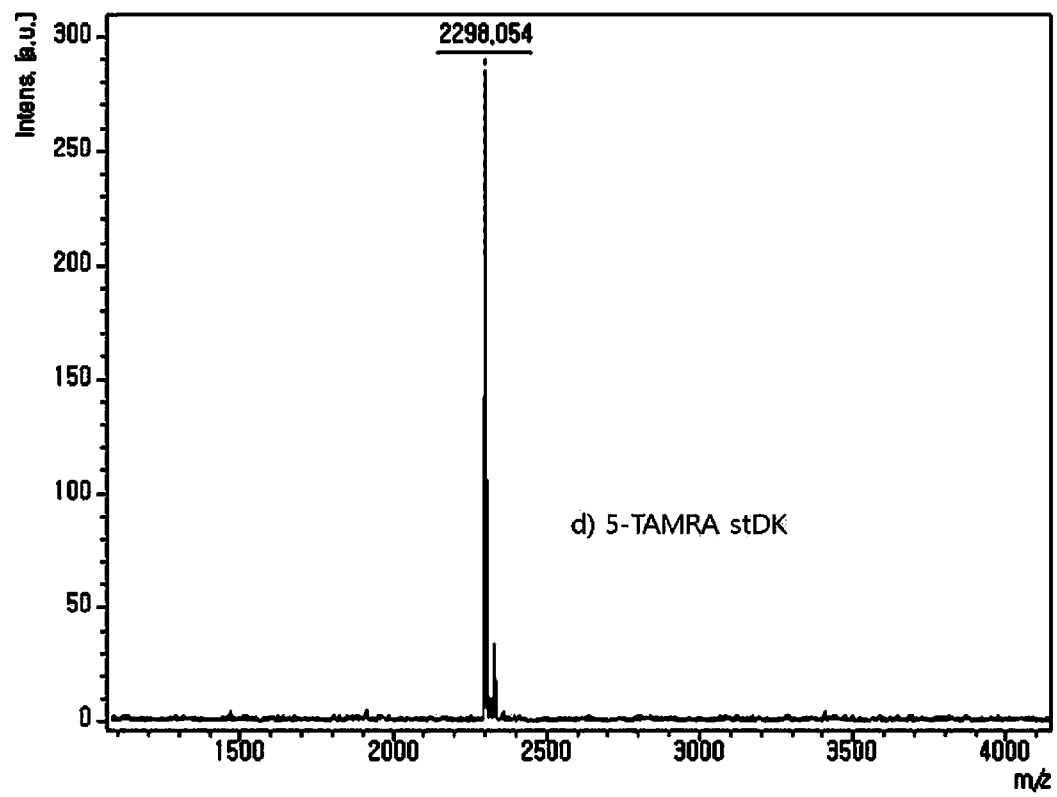
[도10b]



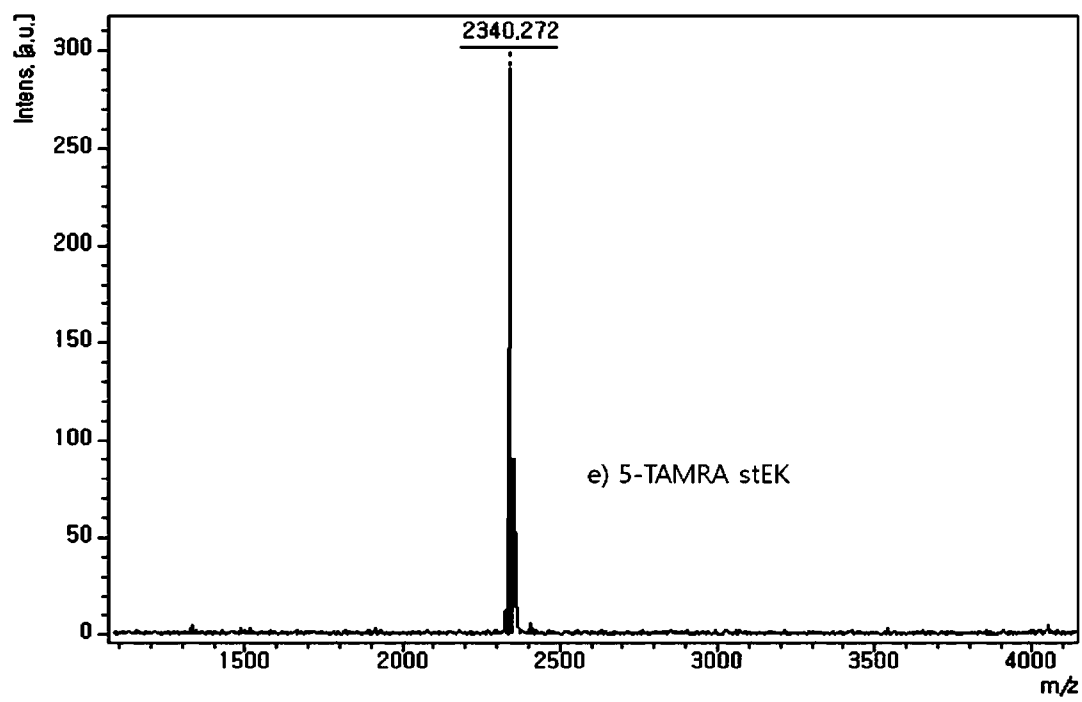
[도10c]



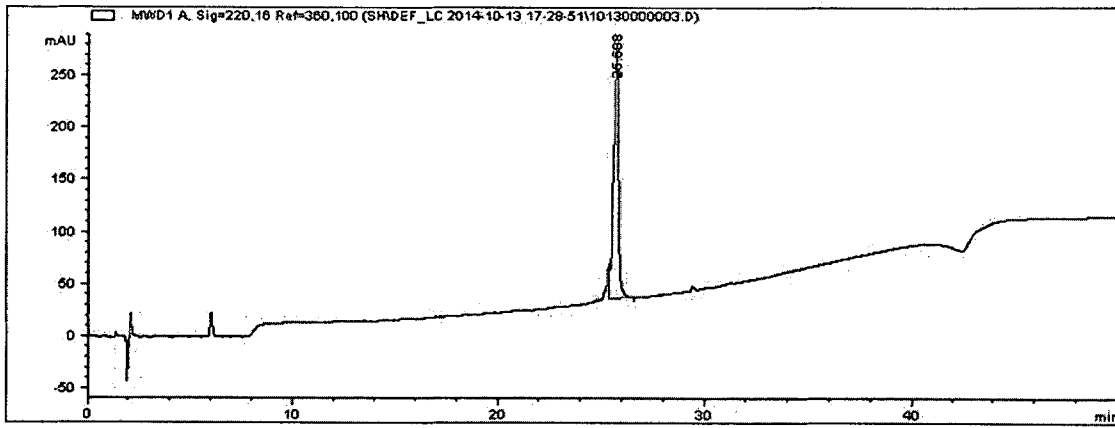
[도10d]



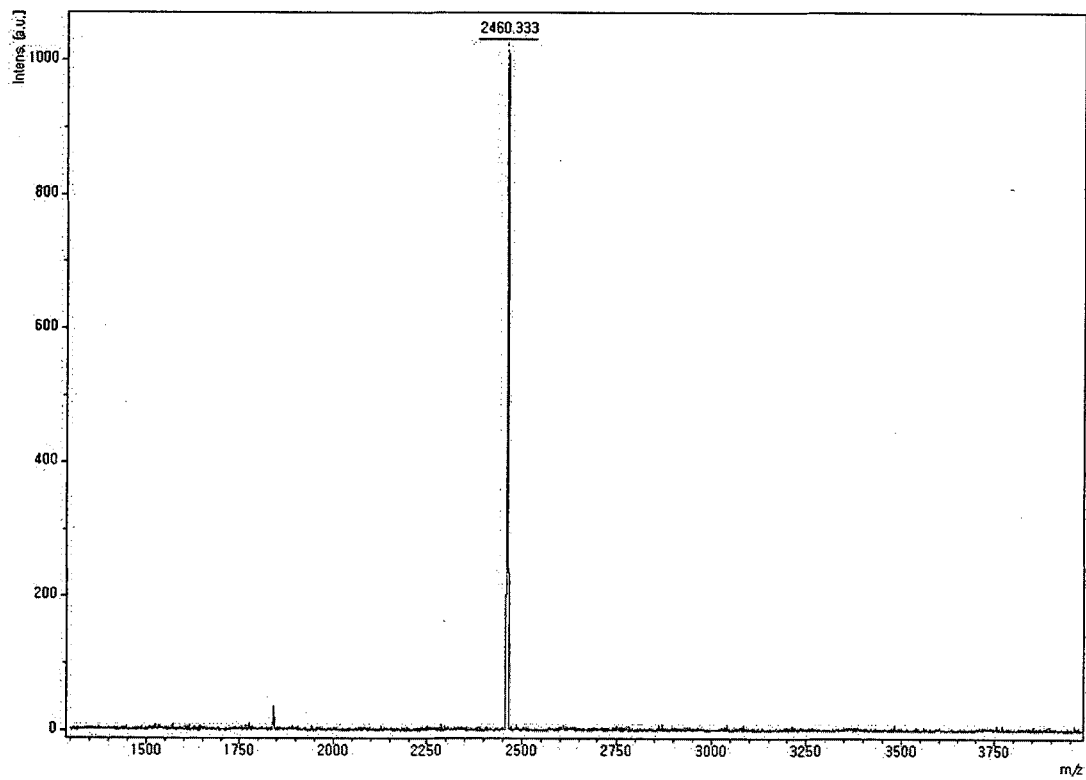
[도10e]



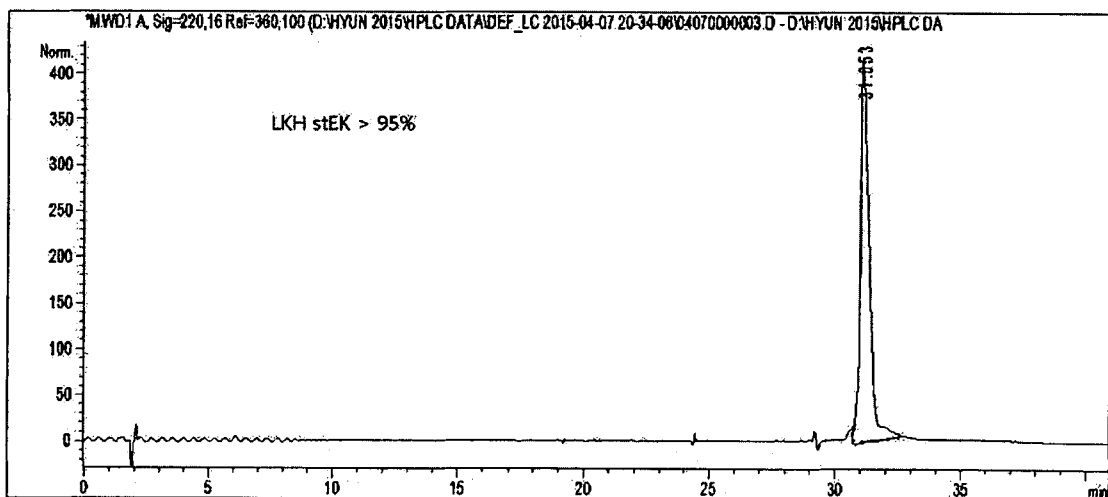
[도11]



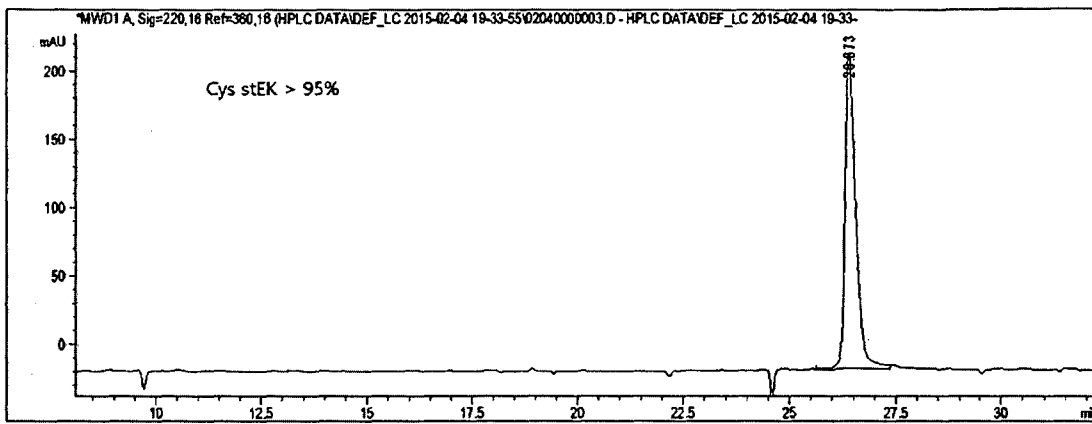
[도12]



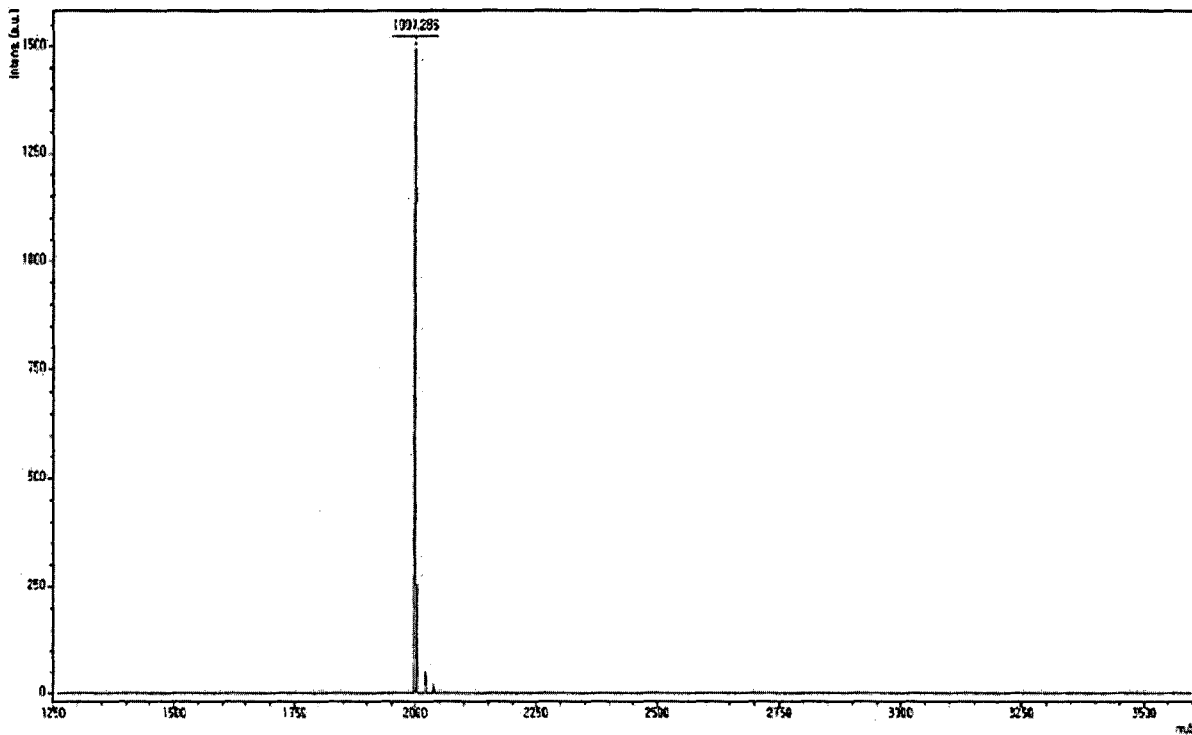
[도13]



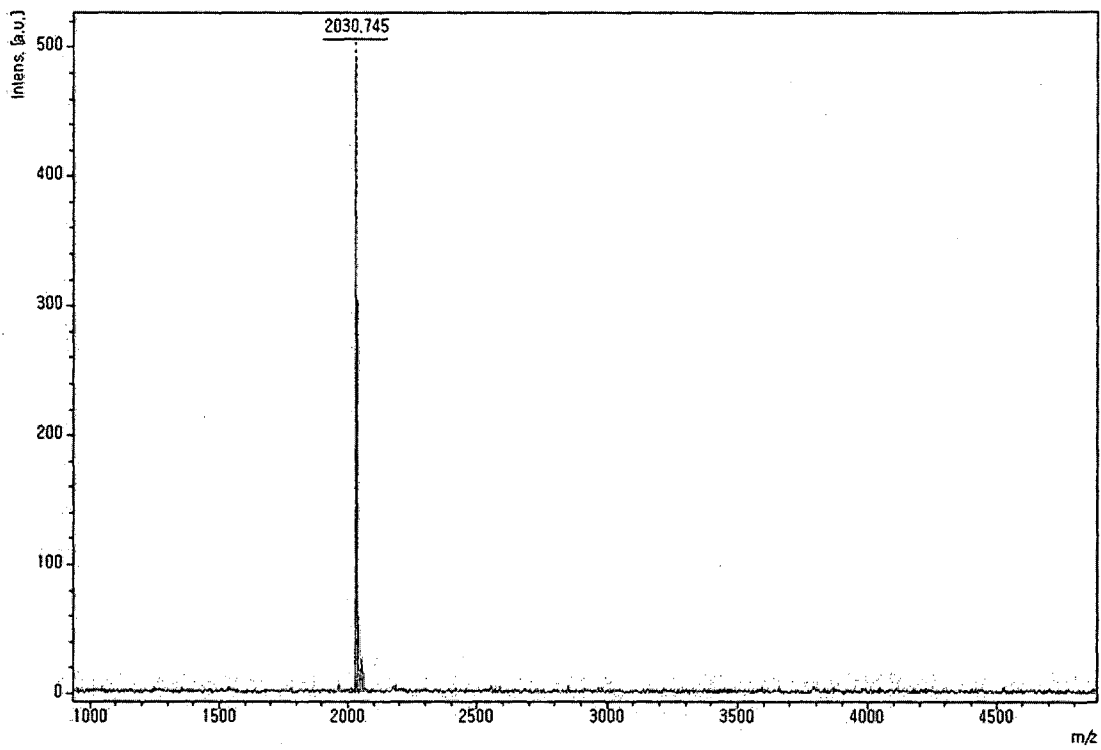
[도14]



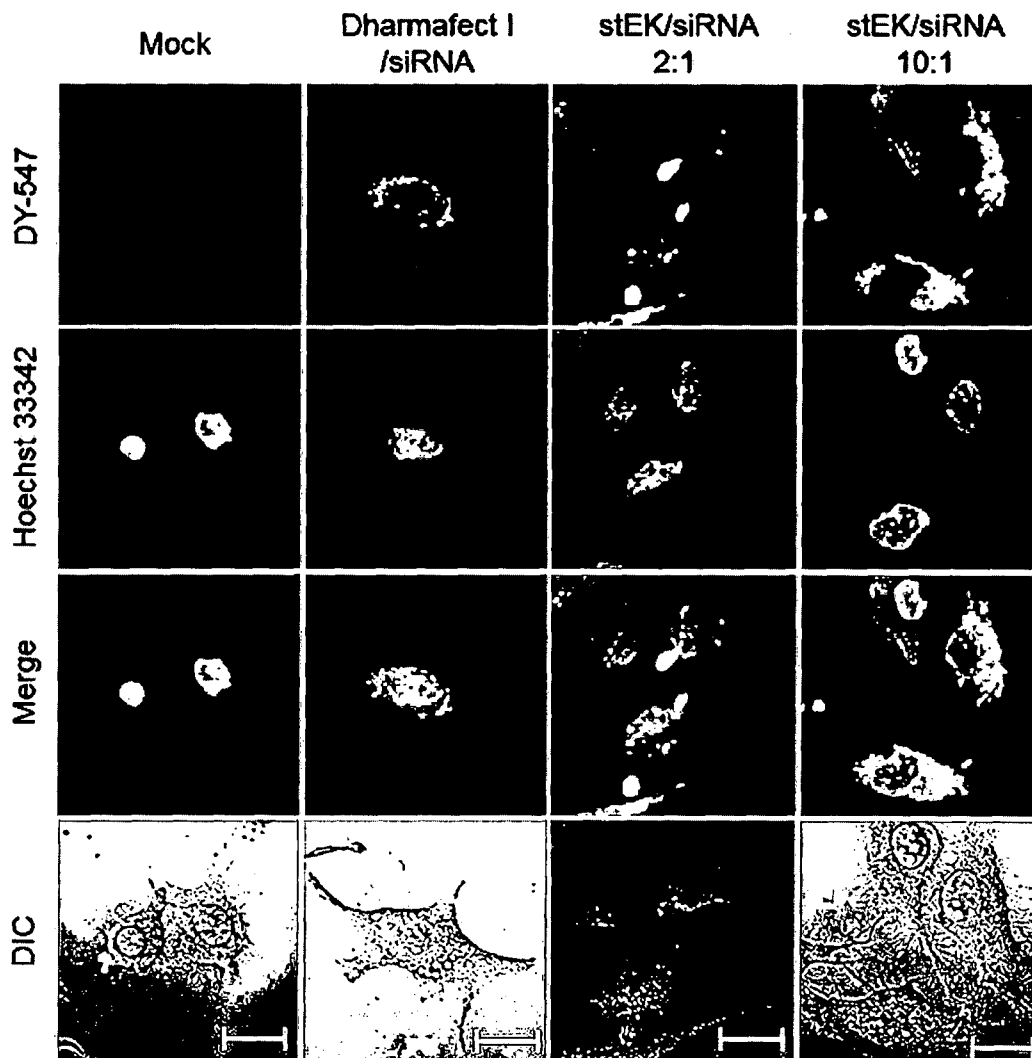
[도15]



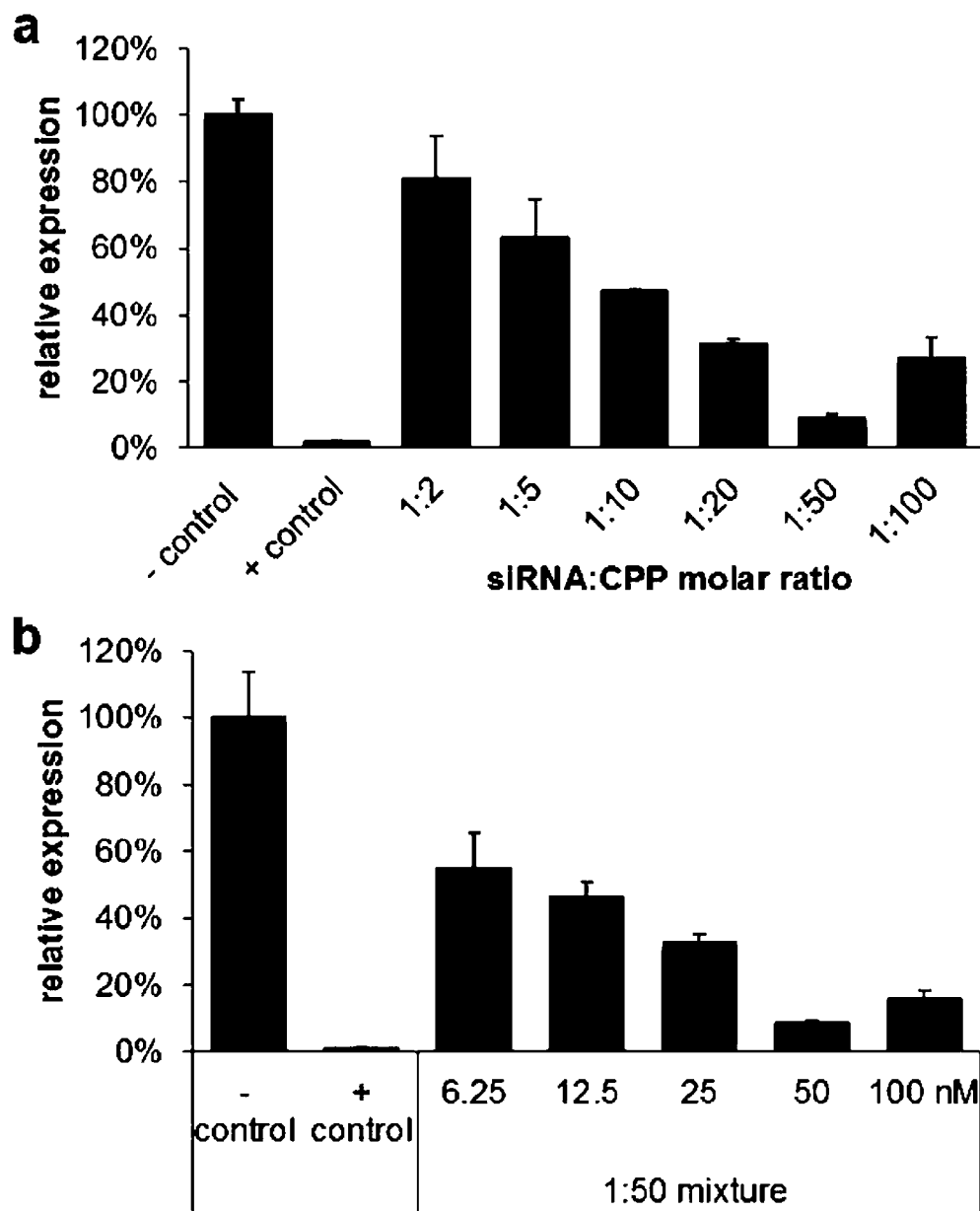
[도16]



[도17]



[도18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/012807**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 7/08(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 7/08; C07K 14/47; C12N 5/02; C07K 7/06; C07K 1/00; C07K 1/02; A61K 47/00; A61K 38/03; A61K 47/42

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) & Keywords: staple peptide, cell permeability, ring closure metathesis(ring closure metathesis, RCM)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM et al., "Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis" Nature Protocols, Vol. 6, No. 6, pp. 761-771 (2011) See abstract; figures 1-2; and pages 764-767.	1-12,14-17
Y		18-20
A		13
Y	WO 2013-150338 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 10 October 2013 See claims 1-18; and pages 3, 9-10.	18-20
A	CHU et al., "Towards understanding cell penetration by stapled peptides" Medicinal Chemical Communications, Vol. 6, pp. 111-119 (e-pub. 14 October 2014) See page 111; and figure 5.	1-20
A	JP 5122142 B2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC. et al.) 16 January 2013 See abstract; and claims 1-27.	1-20
A	JP 2010-505831 A (NEW YORK BLOOD CENTER, INC.) 25 February 2010 See the entire document.	1-20
A	US 2010-0093086 A1 (LIN et al.) 15 April 2010 See the entire document.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 FEBRUARY 2016 (23.02.2016)

Date of mailing of the international search report

26 FEBRUARY 2016 (26.02.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/012807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2013-150338 A1	10/10/2013	NONE	
JP 5122142 B2	16/01/2013	AU 2004-287884 A1	19/05/2005
		AU 2004-287884 B2	26/04/2012
		AU 2004-287884 C1	29/11/2012
		BR P10416258 A	09/01/2007
		CA 2544223 A1	19/05/2005
		CA 2830063 A1	19/05/2005
		CN 103467588 A	25/12/2013
		CN 1906209 A	31/01/2007
		DK 1680443 T3	16/12/2013
		DK 1680443 T5	02/02/2015
		EP 1680443 A2	19/07/2006
		EP 1680443 A4	24/09/2008
		EP 1680443 B1	04/09/2013
		EP 1680443 B9	03/09/2014
		EP 1997828 A2	03/12/2008
		EP 1997828 A3	10/12/2008
		EP 2332967 A1	15/06/2011
		EP 2332968 A1	15/06/2011
		ES 2437567 T3	13/01/2014
		HK 1089191 A1	10/01/2014
		IL 175152 A	30/11/2014
		IL 175152 D0	05/09/2006
		JP 2008-501623 A	24/01/2008
		JP 2012-116836 A	21/06/2012
		JP 2015-163608 A	10/09/2015
		PT 1680443 E	11/12/2013
		SI 1680443 T1	31/01/2014
		US 2005-0250680 A1	10/11/2005
		US 2009-0149630 A1	11/06/2009
		US 2009-0176964 A1	09/07/2009
		US 2012-082636 A1	05/04/2012
		US 2014-296160 A1	02/10/2014
		US 7723469 B2	25/05/2010
		US 8198405 B2	12/06/2012
		US 8796418 B2	05/08/2014
		WO 2005-044839 A2	19/05/2005
		WO 2005-044839 A3	28/07/2005
		ZA 200603565 A	27/12/2007
JP 2010-505831 A	25/02/2010	AU 2007-307254 A1	17/04/2008
		CA 2665186 A1	17/04/2008
		EP 2073829 A2	01/07/2009
		EP 2073829 A4	03/03/2010
		EP 2073829 B1	20/06/2012
		EP 2517720 A1	31/10/2012
		ES 2387827 T3	02/10/2012
		US 2010-0130430 A1	27/05/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/012807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0093086 A1	15/04/2010	US 8940864 B2	27/01/2015
		WO 2008-045238 A2	17/04/2008
		WO 2008-045238 A3	24/07/2008
		ZA 200901248 A	28/04/2010
		EP 2334317 A2	22/06/2011
		EP 2334317 A4	14/03/2012
		US 8586707 B2	19/11/2013
		WO 2010-033617 A2	25/03/2010
		WO 2010-033617 A3	23/09/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08; C07K 14/47; C12N 5/02; C07K 7/06; C07K 1/00; C07K 1/02; A61K 47/00; A61K 38/03; A61K 47/42

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 스테이플 펩타이드, 세포 투과능, 폐환 복분해(ring closure metathesis, RCM)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM 등, 'Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis' Nature Protocols, Vol.6, No.6, pp.761-771 (2011) 요약; 도면 1-2; 및 페이지 764-767 참조.	1-12,14-17
Y		18-20
A		13
Y	WO 2013-150338 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 2013.10.10 청구항 1-18; 및 페이지 3, 9-10 참조.	18-20
A	CHU 등, 'Towards understanding cell penetration by stapled peptides' Medicinal Chemical Communications, Vol.6, pp.111-119 (e-pub. 2014.10.14) 페이지 111; 및 도면 5 참조.	1-20
A	JP 5122142 B2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC. 등) 2013.01.16 요약; 및 청구항 1-27 참조.	1-20
A	JP 2010-505831 A (NEW YORK BLOOD CENTER, INC.) 2010.02.25 전체 문헌 참조.	1-20
A	US 2010-0093086 A1 (LIN 등) 2010.04.15 전체 문헌 참조.	1-20

☐ 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

2016년 02월 23일 (23.02.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 02월 26일 (26.02.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

특허청장

전화번호 +82-42-481-8116



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2013-150338 A1	2013/10/10	없음	
JP 5122142 B2	2013/01/16	AU 2004-287884 A1 AU 2004-287884 B2 AU 2004-287884 C1 BR PI0416258 A CA 2544223 A1 CA 2830063 A1 CN 103467588 A CN 1906209 A DK 1680443 T3 DK 1680443 T5 EP 1680443 A2 EP 1680443 A4 EP 1680443 B1 EP 1680443 B9 EP 1997828 A2 EP 1997828 A3 EP 2332967 A1 EP 2332968 A1 ES 2437567 T3 HK 1089191 A1 IL 175152 A IL 175152 D0 JP 2008-501623 A JP 2012-116836 A JP 2015-163608 A PT 1680443 E SI 1680443 T1 US 2005-0250680 A1 US 2009-0149630 A1 US 2009-0176964 A1 US 2012-082636 A1 US 2014-296160 A1 US 7723469 B2 US 8198405 B2 US 8796418 B2 WO 2005-044839 A2 WO 2005-044839 A3 ZA 200603565 A	2005/05/19 2012/04/26 2012/11/29 2007/01/09 2005/05/19 2005/05/19 2013/12/25 2007/01/31 2013/12/16 2015/02/02 2006/07/19 2008/09/24 2013/09/04 2014/09/03 2008/12/03 2008/12/10 2011/06/15 2011/06/15 2014/01/13 2014/01/10 2014/11/30 2006/09/05 2008/01/24 2012/06/21 2015/09/10 2013/12/11 2014/01/31 2005/11/10 2009/06/11 2009/07/09 2012/04/05 2014/10/02 2010/05/25 2012/06/12 2014/08/05 2005/05/19 2005/07/28 2007/12/27
JP 2010-505831 A	2010/02/25	AU 2007-307254 A1 CA 2665186 A1 EP 2073829 A2 EP 2073829 A4 EP 2073829 B1 EP 2517720 A1 ES 2387827 T3 US 2010-0130430 A1	2008/04/17 2008/04/17 2009/07/01 2010/03/03 2012/06/20 2012/10/31 2012/10/02 2010/05/27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 8940864 B2	2015/01/27
		WO 2008-045238 A2	2008/04/17
		WO 2008-045238 A3	2008/07/24
		ZA 200901248 A	2010/04/28
US 2010-0093086 A1	2010/04/15	EP 2334317 A2	2011/06/22
		EP 2334317 A4	2012/03/14
		US 8586707 B2	2013/11/19
		WO 2010-033617 A2	2010/03/25
		WO 2010-033617 A3	2010/09/23