

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 1월 30일 (30.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/017698 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/47* (2006.01) *C07K 1/10* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008413
- (22) 국제출원일: 2012년 10월 16일 (16.10.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0082484 2012년 7월 27일 (27.07.2012) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 136-791 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김영수 (KIM, Young Soo); 446-561 경기도 용인시 기흥구 마북동 625 교동마을 현대필그린 아파트 108-302, Gyeonggi-do (KR). 최지원 (CHOI, Ji Won); 607-782 부산시 동래구 온천3동 반도보라스카이뷰 아파트 101-701, Busan (KR). 김혜연 (KIM, Hye Yun); 135-842 서울시 강남구 대치동 983-1 해암프리존빌라트 502호 80/6, Seoul (KR). 김동진 (KIM, Dong Jin); 139-780 서울시 노원구 공릉2동 태능 현대홈타운스위트 아파트 104-306, Seoul (KR). 전미진 (JEON, Mijin); 269-816 강원도 철원군 동송읍 이평리 730-5, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울시 서초구 바우피로 225 한마음빌딩 4층, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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.

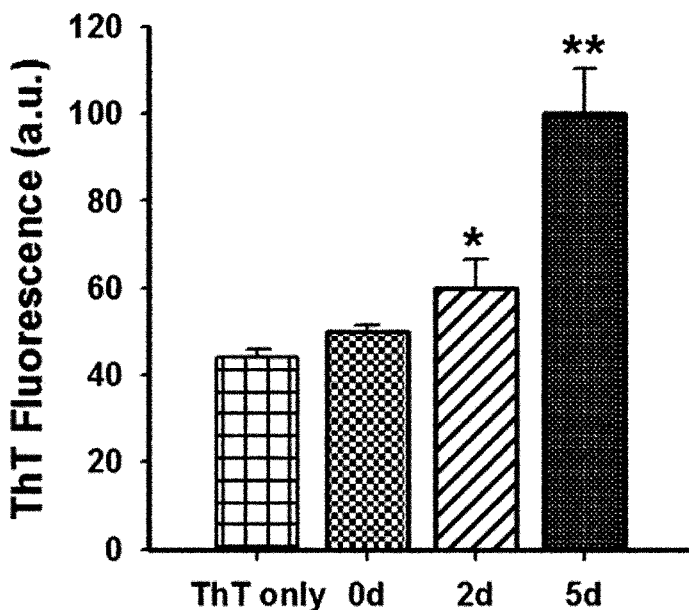
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HIGH-YIELD AND HIGH-PURITY AMYLOID-BETA PEPTIDE PRODUCTION METHOD

(54) 발명의 명칭: 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a high-yield and high-purity amyloid-beta peptide production method. When an amyloid-beta peptide is produced by means of the production method according to the present invention, it is possible to produce the peptide to a higher purity and in a higher yield than it is with amyloid-beta peptides produced by existing methods, and thus the present invention can advantageously be used in the development of therapeutic agents or preventive drugs for Alzheimer's disease which is the most common of degenerative brain disorders whose incidence is steadily increasing in societies with ageing populations.

(57) 요약서: 본 발명은 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 제조방법으로 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조하는 경우, 종래의 방법으로 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드보다 고순도 및 고수율로 단백질을 제조할 수 있으므로 인구 고령화 사회에서 발병률이 지속적으로 증가하는 추세인 퇴행성 뇌질환 중 가장 흔한 알츠하이머 병을 대처하는 치료제나 예방약의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.



규칙 4.17 에 의한 선언서:

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 서서히 진행되는 인지기능 저하와 행동장애를 임상적 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환이다. 이 질환의 주요한 신경병리 소견은 해마와 피질에 불용성의 두 가지 단백질이 응집하여 침착되는 것인데 신경세포 밖에는 아밀로이드-베타 단백질(amyloid beta protein, A β)로 구성된 노인판(senile plaque, SP)이 축적되거나, 신경세포 안에는 과인산화된 타우단백(hyperphosphorylated tau protein)으로 이루어진 신경섬유농축체(neurofibrillary tangle, NFT)가 축적됨이 확인되었다.
- [3] 그러나, 지난 십여년에 걸친 수많은 연구에도, AD의 원인과 발병기전은 아직도 완전히 밝혀지지 않고 있으며 최근까지 AD의 약물치료는 콜린성 가설(cholinergic hypothesis)에 근거한 치료제가 근간이 되고 있다. 이러한 치료적 접근법은 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민 등과 같은 가역성 콜린효소억제제(reversible acetylcholinesterase inhibitor, AChEI)에 의해 AChE를 억제하여 기억과 학습에 중요한 신경전달물질인 신경세포의 아세틸콜린(acetylcholine, Ach)의 농도를 일시적으로 상승시켜 치료 효과를 나타낸다.
- [4] 일련의 연구에 의하면 AChE가 비콜린성 효과를 통해 AD 발병기전에도 관여하고 있음을 시사해 주는데, 아밀로이드-베타 축적을 촉진시키거나 아밀로이드-베타를 불용성의 원섬유(fibril)로 변형시킨다. 그러나 AChEI는 질병의 진행 속도를 완화시키거나 정지시킬 수 없기 때문에 AD의 근본적 치료제가 될 수는 없다. 완전하지는 않지만 AD의 발병기전에 대한 이해가 진전되면서 발병기전에 근거한(mechanism-based) 새로운 치료제들이 개발되고 있다.
- [5] 특히, 유전성과 산발성 알츠하이머병의 공통 원인으로 아밀로이드-베타 펩타이드라는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아밀로이드-베타 펩타이드는 정상인의 경우에도 인체 곳곳에서 소량 만들어진다. 아밀로이드-베타 펩타이드가 신경세포를 보호하는 역할을 한다는 보고가 있지만 아직 정확한 기능은 밝혀지지 않았다. 정상인의 경우 아밀로이드-베타 펩타이드는 만들어진 후 빠르게 분해돼 인체 내에 쌓이지 않는다.
- [6] 그러나 알츠하이머병 환자의 뇌 조직을 살펴보면 아밀로이드-베타 펩타이드가

쌓여 뭉쳐 있는 형태가 보인다. 이를 ‘노인반’이라고 한다. 아밀로이드-베타 펩타이드가 비정상적으로 많이 생성돼 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 해마나 대뇌피질 같은 곳에 과다하게 쌓인 것이다.

- [7] 축적된 아밀로이드-베타 펩타이드는 주변의 세포들에 염증반응을 일으킨다. 따라서 신경세포가 손상되고 점점 뇌의 정상적인 기능을 유지하는 신경회로망마저 훼손되기에 이른다. 게다가 축적된 아밀로이드-베타 펩타이드는 신경세포를 죽이는 신호 체계를 가동시키는 활성산소를 많이 만들어내는 것으로 밝혀졌다.
- [8] 뿐만 아니라, 아밀로이드-베타 펩타이드는 β -, γ -분해효소에 의해 절단되어진 아밀로이드 단백질 전구체(APP)에서 유래된 39-43개의 아미노산 잔기로 구성된 폴리펩타이드이다(Wilson CA, Doms RW, Lee VM-Y. Intracellular APP processing and A β production in Alzheimer's disease. J. Neuropath. Exp. Neurol. 1999; 58: 787-794). 이 단량체는 순차적으로 직접하여 화이버릴(fibril) 형태를 거치게 되면서 강한 신경 독성을 나타내게 된다(Forloni GE, Angeretti LN, Della Torre P, Salmona M. Amidation of β -amyloid peptide strongly reduced the amyloidogenic activity without alteration of neurotoxicity. J. Neurochem. 1997; 69: 2048-2054).
- [9] 이에, 여전히 아밀로이드-베타 펩타이드에 의한 세포독성 작용기전 및 알츠하이머병의 발병 연관성 등을 규명하기 위한 연구가 시급한 실정이며, 이를 위해서는 특히, 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드의 대량 공급이 요구된다(Hyde C, Johnson T, Owen D, Quibell M, Sheppard RC. Some 'difficult sequences' made easy. Int. J. Peptide Protein Res. 1994; 43: 431-440).
- [10] 종래 대한민국 공개특허 제2000-0006596호에서는 박테리아를 이용한 아밀로이드-베타 펩타이드의 대량 생산 방법에 대하여 개시하고 있으나, 박테리아의 형질전환 과정 시, 생산량이 절대적으로 적다는 단점이 있으며, 박테리아로부터 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드의 회수 과정이 복잡한 문제점이 있으며, 또한, 대한민국 등록특허 제10-0621354호에서는 유비퀴틴을 융합 파트너 단백질로 사용하여 미생물로부터 아밀로이드-베타 펩타이드를 융합단백질 형태로 대량 생산한 후 유비퀴틴 절단효소를 이용하여 아밀로이드-베타 펩타이드만을 분리하는 단계를 포함하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법에 대하여 개시하고 있으나, 융합 단백질로부터 아밀로이드-베타 펩타이드의 분리과정이 복잡한 문제점이 있다.
- [11] 한편, 종래 시판되고 있는 대부분의 아밀로이드-베타 펩타이드는 화학적 합성법, 예를 들면 고체상 합성법(solid-phase synthesis)의 의해 생산된 것으로, 고체상 유기합성에서의 메리필드 방법(Merrifield method)이 레진의 변형을 통한 화학반응의 완결과 목적화합물 정제의 용이함 때문에 고체상 유기합성이 주도적으로 사용되어 왔다. 그러나, 이질 반응 조건(heterogeneous reaction condition)에 의해 야기되는 느린 반응과 용해도 및 장시간 반응으로 인한 레진 분해 등 여러 문제점들이 노출되어 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여

- Oliver Kappe 그룹에서는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조시, 마이크로웨이브 가열법을 사용하는 방법(Bernadett Bacsá et. al., *J. Org. Chem.* 75, 2103-2106(2010))을 제시하고 있고, John D Wave 그룹에서는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조시, Fmoc 탈보호화 반응 용매로써, DBU를 사용하는 방법(ANNA K TICKLER et. al, *J. Peptide Sci.* 7, 488-494 (2001)) 등의 아밀로이드-베타 펩타이드의 Fmoc 고체상 펩타이드 합성 방법을 들 수 있다.
- [12] 상기 방법은 제약회사, 유효성분 제조업체, 대학 연구소 및 펩타이드 구매업체 등에서 보편적으로 사용되고 있는 실용적인 방법이나, 아밀로이드-베타 펩타이드를 고체상 펩타이드 합성법으로 합성할 경우, 합성과정에서 자가 직접이 일어나기 쉬워 폐닐알라닌 부분에서 결실이 빈번하게 발생하여 단백질 확보에 어려움이 생긴다. 이러한 문제점은 정제되지 않은 원래의 펩타이드의 정제과정에도 영향을 미쳐 결과적으로 수율을 낮게 하는 원인이 된다(Findeis MA, Musso GM, Arico-Muendel CC, Benjamin HW, Hundal AM, Lee JJ, Chin J, Kelley M, Wakefield J, Hayward NJ, Molineaux SM. Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization. *Biochemistry*. 1999 May 25;38(21):6791-800. Doig AJ. Peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2007 Sep;10(5):533-9).
- [13] 이외에도 합성과정 단계의 최적화와 생산수율 증가를 위한 많은 노력이 이루어지고는 있으나, 아밀로이드-베타 펩타이드의 고유한 특성인 불용성 및 응집성으로 인하여 생산수율은 저하되고 그에 따른 생산비용은 증가하는 등의 문제점이 있어, 앞서 기술한 문제점을 가지지 않으면서 효과적인 방법으로 실용적이고 효율적인 아밀로이드-베타 펩타이드의 합성법이 절실히 요구되고 있다.
- [14] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하고자 아미노산 커플링 시약 및 탈보호화 반응 용매의 조성을 변경하고, 결손이 일어나는 아미노산 부분에 2차 커플링 반응을 더 포함하여 수행함으로써, 고순도 및 고수율, g단위 이상의 대량의 아밀로이드-베타 펩타이드의 대량생산 방법을 제시하고, 본 발명을 완성하였다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 본 발명의 목적은 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻기 위한 신규한 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [17] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 목적을 달성하기 위한 수단으로서, (a) 커플링 시약 존재 하에 레진에 Fmoc-아미노산을 커플링 반응시켜 펩타이드를 제조하는 단계; (b) 탈보호화 시약을 사용하여 상기 단계 (a)에서 제조된

펩타이드의 보호기를 제거하여 비정제 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계;
 (c) 상기 단계 (b)에서 얻어진 펩타이드의 아미노산 서열 19번과 20번의
 Fmoc-Phe-OH를 2차 커플링 반응을 수행하여 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는
 단계;를 포함하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법이 제공된다.

- [18] 일 구현예에 따르면, (a) 커플링 시약으로서 디메틸설폭사이드/제1 용매의
 혼합용매를 포함하는 HBTU 용액을 사용하고, 레진에 Fmoc-아미노산을 커플링
 반응시켜 펩타이드를 제조하는 단계; (b) 탈보호 시약으로써,
 디메틸설폭사이드/제2 용매의 혼합용매를 포함하는 피페리딘 용액을 사용하고,
 상기 단계 (a)에서 제조된 펩타이드의 보호기를 제거하여 비정제
 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)에서 얻어진
 펩타이드의 아미노산 서열 19번과 20번의 Fmoc-Phe-OH를 2차 커플링 반응을
 수행하여 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계;를 포함하는 아밀로이드-베타
 펩타이드의 제조방법이 제공된다.

[19]

발명의 효과

- [20] 본 발명에 의한 제조방법으로 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조하는 경우,
 종래의 방법으로 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드보다 고순도 및 고수율로
 단백질을 제조할 수 있으므로 인구 고령화 사회에서 발병률이 지속적으로
 증가하는 추세인 퇴행성 뇌질환 중 가장 흔한 알츠하이머 병을 대처하는
 치료제나 예방약의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 HPLC 결과를 나타내는 도면이다.
 [22] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 질량분석 결과를 나타내는 도면이다.
 [23] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 아밀로이드-베타 피프릴 형성에 대한 ThT
 형광강도 활성검색 결과를 나타내는 도면이다.
 [24] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 아밀로이드-베타 피프릴 형성에 대한 TEM
 이미지를 나타내는 도면이다.
 [25] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 아밀로이드-베타 올리고모 형성에 대한
 전기영동 결과를 나타내는 도면이다.
 [26] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 아밀로이드-베타를 투여한 마우스에 대한
 Y자 미로 실험을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.
 [27] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 아밀로이드-베타를 투여한 마우스에 대한
 수동회피실험을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
 [29] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 커플링 시약 존재 하에 레진에
 Fmoc-아미노산을 커플링 반응시켜 펩타이드를 제조하는 단계; (b) 탈보호화

시약을 사용하여 상기 단계 (a)에서 제조된 펩타이드의 보호기를 제거하여 비정제 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)에서 얻어진 펩타이드의 아미노산 서열 19번과 20번의 Fmoc-Phe-OH를 2차 커플링 반응을 수행하여 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계;를 포함하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법이 제공된다.

- [30] 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 커플링 시약으로서 디메틸설폭사이드/제1 용매의 혼합용매를 포함하는 HBTU 용액을 사용하고, 레진에 아밀로이드-베타 펩타이드(1-40)의 아미노산 시퀀스(sequence) 순서대로 Fmoc-아미노산을 커플링 반응시켜 Fmoc 보호된 펩타이드를 제조할 수 있다.
- [31] 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)에 있어서, 커플링 시약으로서 HBTU 용액 내 디메틸설폭사이드/제1 용매의 혼합용매는 디메틸설폭사이드 : 제1 용매를 1 : 2-4의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 1 : 3의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 또는 디메틸설폭사이드를 사용하지 않는 경우에는 아미노산의 용해도가 떨어져 커플링 반응 시 수율이 낮아지는 단점이 있을 수 있다(실험예 1 참조).
- [32] 또 다른 구현예에 따르면, HBTU 용액은 0.1-1.0 M로 제조하여 사용하는 것이 순도 및 수율 극대화에 도움이 된다.
- [33] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제1 용매는 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-다이옥세인, 메탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 또는 이의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [34] 또 다른 구현예에 따르면, 특히 HBTU 용액이 0.1-1.0 M 범위인 경우에는 디메틸포름아미드를 사용하는 것이 바람직하며, 이 경우에 2차 커플링 반응의 전환율을 향상시킬 수 있다는 점을 확인하였다.
- [35] 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 탈보호 시약으로서 디메틸설폭사이드/제2 용매의 혼합용매를 포함하는 피페리딘 용액을 사용하고, 상기 단계 (a)에서 제조된 펩타이드의 보호기를 제거하는 탈보호화 반응을 수행하여 비정제 아밀로이드-베타 펩타이드를 제조할 수 있다.
- [36] 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)에서, 탈보호 시약으로서 디메틸설폭사이드/제2 용매의 혼합용매는 1 : 2-4의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 1 : 3의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 또는 디메틸설폭사이드를 사용하지 않는 경우에는 아밀로이드-베타 펩타이드의 특징인 자가 직접(올리고머, 피브릴 형성)이 일어나는 것을 막기 어려우며, 탈보호화 반응 후 아밀로이드-베타 펩타이드의 수율이 낮아지는 문제점이 있을 수 있다.
- [37] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제2 용매는 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-다이옥세인, 메탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종

또는 이의 혼합물을 사용할 수 있다.

- [38] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 HBTU 용액이 0.1-1.0 M 범위인 경우에는, 상기 제2 용매로서 디메틸포름아미드를 사용하는 것이 바람직하고, 상기 탈보호 시약은 피페리딘/디메틸설폭사이드/제2 용매를 1-3 : 1-3 : 2-5의 부피비로 혼합하여 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 특히, 상기 (a) 단계에서 HBTU 용액이 0.1-1.0 M 범위이고, 상기 제2 용매로서 디메틸포름아미드를 사용하며, 상기 탈보호 시약은 피페리딘/디메틸설폭사이드/제2 용매를 1-3 : 1-3 : 2-5의 부피비를 갖는 경우에, 2차 커플링 반응의 전환율을 더욱 크게 향상시킬 수 있다는 점을 확인하였다.
- [39] 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)는 상기 단계 (b)에서 얻어진 펩타이드의 아미노산 서열 19번 및 20번 위치의 결손에 따른 아미노산의 보정을 위해 Fmoc-Phe-OH를 이용하여 2차 커플링 반응을 수행하여 고수율 및 고순도의 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계이다.
- [40] 종래 아밀로이드-베타 펩타이드 제조 시, 커플링 반응의 수행 후 탈보호화 반응을 수행하였으나, 자가 집적에 의한 페닐알라닌 19번 및 20번의 결실이 빈번히 확인되었으며, 수율이 저하되는 문제점이 있어 왔다. 반면, 본 발명에서는 상기 결실이 잘 일어나는 부분에서 2차 커플링 반응을 수행함으로써, 아밀로이드-베타 펩타이드의 수율을 크게 (몇 구현예에 있어서는 약 2배 정도) 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [41] 본 발명에 따라 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드를 마우스에 투여한 결과, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타가 알츠하이머형 치매를 유발시킨 마우스의 기억력 손상을 가져온다는 것을 확인하였다(실험예 5 참조).
- [42] 따라서, 본 발명에 의한 제조방법으로 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조하는 경우, 종래의 방법으로 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드보다 고순도 및 고수율로 단백질을 제조할 수 있으므로 인구 고령화 사회에서 발병률이 지속적으로 증가하는 추세인 퇴행성 뇌질환 중 가장 흔한 알츠하이머 병을 대처하는 치료제나 예방약의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

[43]

발명의 실시를 위한 형태

- [44] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[45] <실시예 1> 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조-A

- [46] Fmoc-Val-OH를 DCM(8 mL)에 완전히 녹인 후, DIC(620 μ L)를 첨가하고, 15분 동안 진탕기에서 활성화시켰다. 그 다음 상기 혼합물에 DMAP(0.2036 g)을 녹인 후, 상기 커플링 각테일을 용해된 카트리지에서 부풀어 오른 레진에 옮겨 1시간 동안 진탕하여 대칭 무수 커플링반응을 수행하였다. 아미드 커플링의 잔여물은

DIEA(696 ml)에 녹인 0.5 M HBTU 용액(1:3 DMSO/DMF, v/v) 8 ml에 Fmoc-보호된 아미노산을 녹인 후, 활성화시키고, 30분 동안 레진과 커플링 반응시켰다. 그 다음 각각 반응과정 동안 펩타이드-기반 레진을 DMF, DCM 및 DMF(각각 20 초 동안) 물로 세척하였다. 상기 Fmoc-보호기를 20 % 피페리딘 용액(1:1:3 피페리딘/DMSO/DMF, v/v/v)으로 2회 진탕하여 제거하였다(10 분, 각 5분씩 DMF로 세척).

- [47] 상기 F-moc 보호기가 제거된 펩타이드의 페닐알라닌-19 및 페닐알라닌-20 잔여물을 0.5 M HBTU 용액(8 ml) 내에서 탈보호화 반응 없이, 30분 동안 진탕한 후, 상기 첫번째 페닐알라닌 커플링 반응에서 얻은 펩타이드를 4.4 mmol의 활성화된 Fmoc-Phe-OH와 함께 커플링 반응을 수행하였다. TFA 분해 전에, 펩타이드-기반 레진을 DCM으로 세척하고, 감압하에 보관하였다. 상기 펩타이드는 TFA/아니솔/TIS(95:2.5:2.5, v/v/v) 내의 레진으로부터 상온에서 2시간 이상 진탕하여 효과적으로 분리하였다.

- [48] 상기 TFA를 감압농축기를 이용하여 완전히 제거한 후, 상기 펩타이드에 디에틸에테르 45 ml를 처리하고, 10 분 동안 원심분리하였다(2 회). 침전된 백색의 펩타이드를 25% 아세토니트릴 수용액(0.1% TFA)에 녹인 후, 동결건조하여 백색 고체 분말의 펩타이드 아밀로이드-베타 펩타이드(1-40)를 얻었다(4.005 g).

- [49] <비교예 1> 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조-B

- [50] Fmoc-Val-OH를 DCM(8 ml)에 완전히 녹인 후, DIC(620 μ l)를 첨가하고, 15분 동안 진탕기에서 활성화시켰다. 그 다음 상기 혼합물에 DMAP(0.2036 g)을 녹인 후, 상기 커플링 각테일을 용해된 카트리지에서 부풀어 오른 레진에 옮겨 1시간 동안 진탕하였다. 아미드 커플링의 잔여물은 DIEA(696 ml)에 녹인 0.5 M HBTU 용액(in DMF) 8 ml에 Fmoc-보호된 아미노산을 녹이고 활성화시킨 후, 30분 동안 레진과 커플링 반응시켰다. 그 다음 각각 반응과정 동안 펩타이드-기반 레진을 DMF, DCM 및 DMF(각각 20 초 동안) 물로 세척하였다. 상기 Fmoc-보호기를 20 % 피페리딘 용액(1:4 피페리딘/DMF, v/v)으로 2회 진탕하여 제거하여(10 분, 각 5분씩 DMF로 세척) 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻었다.

- [51] <실험예 1> 순도 비교

- [52] 상기 실시예 1 및 비교예 1에서 얻어진 아밀로이드-베타 펩타이드의 순도를 비교하기 위하여 RP-HPLC 및 고성능 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 하기 실험을 수행하였다.

- [53] (1) 역상 고성능 액체크로마토그래피(Reversed-phase high-performance liquid chromatography)

- [54] RP-HPLC(Agilent Technologies HPLC) Gemini 5 μ m C₆-페닐 150×4.60 mm column을 사용하여 수행하였다. 상기 실시예 1 및 비교예 1 각각의 아밀로이드-베타 펩타이드의 파우더 0.1 mg을 50% 아세토나이트릴 1 ml에 녹였다. 상기 아밀로이드-베타 펩타이드 용액을 기울기 용액 A(증류수와 혼합된

0.1% TFA)와 용액 B(아세토나이트릴과 혼합된 0.09% TFA)를 40분 동안 5 내지 95%의 농도구배로 용액을 흘려주고, 파장은 230 nm, 유속은 1 ml/min으로 측정하였다.

[55] **결과**

[56] 본 발명에 따른 실시예의 RP-HPLC 측정결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 순수 아밀로이드-베타 펩타이드 면적(area)을 계산하여 종래의 아밀로이드-베타 펩타이드 합성법(비교예 1)의 순도가 49.08%로 확인되었으나, 본 발명에 따른 실시예 1의 아밀로이드-베타 펩타이드의 순도는 84.14%로 매우 우수한 것으로 확인되었다(도 1 참조).

[57] **(2) 고성능 MALDI-TOF 질량 분석(High resolution MALDI-TOF mass spectroscopy)**

[58] 본 발명에 따른 실시예 1 및 비교예 1의 아밀로이드-베타 펩타이드 분말을 50 % 아세토니트릴 수용액(0.1 % TFA)에 녹여서 측정하였고, 외부 표준단백질(5.7-1.7 kDa)로 보정되었다.

[59] **결과**

[60] 고성능 MALDI-TOF 질량 분석결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드는 반사스펙트럼(reflector) 및 포지티브 모드(0-10 kDa, scan)에서 질량값이 4329.86 Da으로 측정되었다(도 2 참조).

[61] **<실험예 2> 아밀로이드-베타 펩타이드의 피브릴 형성 형광강도 분석**

[62] 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드의 피브릴 형성 여부를 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[63] 상기 실시예 1에서 얻은 아밀로이드-베타 펩타이드 파우더를 DMSO에 용해시켜 5 mM 농도로 저장 용액(stock solution)을 제조한 후, -80 °C에 보관하였다. 상기 아밀로이드-베타 펩타이드를 증류수 완충용액(DW buffer)을 사용하여 100배 희석한 후, 밀봉하여 37 °C에서 응집을 유도하기 위해 배양하였다(0일, 2일 및 5일). 5일 후, 준비된 아밀로이드-베타 펩타이드 시료(0, 3 및 5일 동안 배양된 시료) 각각을 96웰 플레이트(half-area 96-well black plate)에 파종하고, 5 µM ThT 용액(pH 8.5 글리신 완충용액 내 5 µM ThT)을 첨가하고, 10분동안 어두운 곳에서 약하게 진탕하여 혼합하였다. ThT 형광 세기는 485 nm(발광(emission) 파장)에서 플렉스스테이션 3 멀티-레벨 리더기(FlexStation3 multi-label reader(Molecular Device, CA, USA))로 측정하였다. 그 결과를 하기 표 1 및 도 3에 나타내었다.

[64] 표 1

[Table 1]

구분	ThT 형광강도(fluorescence)(a.u.)
0일	49.94
2일	59.95
5일	98.14
대조군(용매처리군)	44.16

[65] 표 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드는 시간이 지남에 따라 아밀로이드-베타 펩타이드가 포함되지 않은 대조군(약 44 a.u.)에 비해 ThT 형광강도가 약 50 a.u. 에서 98 a.u.로 높아지는 것으로 확인되었고, 이에 따라, 아밀로이드-베타 펩타이드에 대한 피브릴 형성이 확인되었다(도 3 참조).

[66] <실험예 3> 아밀로이드-베타 펩타이드의 피브릴 형성 이미징 분석

[67] 아밀로이드-베타 펩타이드 피브릴 형성 여부를 형태학적으로 관찰하기 위해 투과 전자 현미경(transmission electron microscopic, TEM)으로 분석하였다. 상기 실험예 2와 동일한 농도로 증류수 완충용액으로 희석하여 0일, 2일 및 5일 동안 상온에서 배양(incubation)하여 필립스 CM-30 투과전자현미경(Philips CM-30 transmission electron microscope)를 이용하여 관찰하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[68] 결과

[69] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드가 머리카락이 뒤엉킨 것 같은 구조로 시간이 지남에 따라 피브릴을 형성하며 길이와 양이 늘어남을 확인하였다.

[70] <실험예 4> 단백질 전기영동법을 이용한 올리고머 집적량 측정

[71] 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드의 피브릴 형성의 중간 단계인 올리고머 양을 측정하기 위하여 하기 SDS-PAGE 단백질 전기영동법을 이용하여 하기 실험을 수행하였다.

[72] 아밀로이드-베타 펩타이드를 증류수 완충용액에 혼합하여 반응시킨 용액에 APS(Ammonium Persulfate)와 Ru(II)(트리스(2,2'-바이피리딜)디클로로루테늄(II))를 첨가한 후, 빛에 노출시켰다. APS와 Ru(II)를 첨가하고 빛을 주면, 2차 구조가 영구적으로 고정되어, SDS용액에서도 구조 유지가 가능하다. 상기 과정을 통해 크로스-링크(Cross-linking)된 반응액을 1.0 mm 두께의 16.5 % 트리스-트리신 겔(Criterion™ PrecastGel, BIO-RAD)에 전기영동 시켰다. 전기영동 후, 겔을 실버염색(silver staining kit-Amersham Biosciences)하여 밴드를 관찰하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[73] 결과

[74] 도 5에 나타낸 바와 같이, 전기영동 결과, 시간이 지날수록 아밀로이드-베타

펩타이드의 크기가 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 올리고머가 형성이 되었으며, 피브릴로 진행되는 양이 증가함을 나타낸다.

[75] 이때, 아밀로이드-베타 펩타이드 단량체(monomer)의 크기는 약 4.3 kDa에 해당하는 것으로 확인되었고, 전기영동 결과 중 제일 아래에 보이는 밴드는 모노머이고, 제일 위에 보이는 밴드는 피브릴(225kDa)이며 중간에 보이는 밴드는 올리고머이다.

[76] <실험예 5> in vivo 아밀로이드-베타 펩타이드에 따른 뇌신경세포의 손상 여부 측정

[77] 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 펩타이드로 인한 뇌신경세포의 손상 여부를 측정하기 위하여 생체 내(in vivo) 행동반응 실험을 수행하였다.

[78] 상기 행동반응 실험으로는 Y자형 미로 실험(Y-maze task)과 수동회피실험(Passive avoidance task)을 수행하였다. 상기 Y자형 미로 실험은 단기작업 기억(working memory)을 측정하기 위해 고안되었으며, 수동회피실험은 기억력을 검사하기 위한 널리 알려진 방법이다.

[79] 준비

[80] 18-20g의 3주령 수컷 ICR 마우스(오리엔트바이오, 한국)를 각각 10마리씩 대조군과 실험군으로 나누고 대조군에는 증류수 완충용액을 투여하고, 실험군에는 아밀로이드-베타 10mM 농도로 저장 용액(stock solution)을 증류수에 100배 희석하여 5 μ l를 뇌실 내 주사(I.C.V)하고, 투여 후 6일째 Y자형 미로 실험을 수행하고, 7일째에 수동회피실험을 수행하였다.

[81] (1) Y자형 미로 실험(Y-maze task)

[82] Y자형 미로 장치는 검은 아크릴 판[가지 : 가로 8 cm, 세로 30 cm, 높이 14 cm]으로 제작한 Y자 모양의 사방이 막힌 미로로 구성이 되어 있으며 각 가지는 서로 120°의 일정한 각도로 배치되어 있다. 각각의 가지를 A, B, C 지역으로 정한 후 하나의 가지에 실험동물을 조심스럽게 놓고, 8분 동안 자유롭게 Y자형 미로를 움직이도록 한 다음 실험동물이 들어간 각 가지를 A, B, C로 기록하였다.

[83] 실험동물의 움직임을 교차횟수(alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때(A, B, C or B, A, C or C, A, B) 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차(spontaneous alteration)행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수(즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비이다. 상기 자발적 행위(spontaneous alteration)에 따라 공간지각 능력을 측정하였다. 그 결과를 하기 도 6에 나타내었다.

[84] 결과

[85] 도 6에 나타낸 바와 같이, 자발적 교차행동 측정결과, 대조군의 경우, 80.0 $\pm$ 1.8(%)로 확인되었으나, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타를 투여한 실험군은 64.7 $\pm$ 2.0(%)로 본 발명에 따른 실험군이 대조군에 비해 행동 능력이 유의한 감소를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 본 발명에 따른 아밀로이드-베타가 뇌신경세포에 손상을 주어 공간지각능력의 저하를 야기시킴을 나타낸다.

[86] **(2) 수동회피실험(Passive avoidance task)**

[87] 수동 회피 실험 측정기기의 형태는 내부가 두 개의 방으로 구성된 상자(shuttle box, 53cmW × 44cmH × 33cmD)로서 가운데에는 두 방 사이의 문역할을 하는 길로틴 문(guillotine door)이 있으며 한쪽 방에는 실험동물이 싫어하는 환경(light room)을 만들기 위해 매우 밝은 전구를 달고, 다른 한쪽 방에는 바닥(grid floor)전체에 전기쇼크(scrambled foot-shock)를 가할 수 있는 장치로 구성되어 있다.

[88] 시도 훈련(Training trial)은 Y자 미로 실험이 끝난 다음날부터 2틀을 수행하였다. 마우스를 1마리씩 빛이 있는 한쪽 방에 넣고 10초간의 탐색시간을 준 뒤, 길로틴 문이 열리면 조용하고 어두운 다른 방(dark room)에 도달시킨 후, 마우스가 어두운 방에 들어가면 자동적으로 길로틴 문이 닫히고, 전기쇼크를 가한다.

[89] 쇼크는 0.7mA의 전류를 3초간 통하게 하였으며 마우스가 발에 쇼크를 받은 후에 꺼내어 케이지에 다시 넣어둔다. 이러한 방법으로 각군마다 각각 10마리에 대하여 전기쇼크를 가하였다.

[90] 정제 훈련(Retention trial)은 상기 트레이닝을 받은 쥐에 대해 전기쇼크를 실시했을 때, 아밀로이드-베타에 의한 뇌신경세포 손상이 있으면 쥐가 전날의 쇼크를 기억하지 못하고 쇼크실로 잘 들어가게 된다. 따라서 도달시간이 짧을수록 수동회피의 학습과 기억효과가 떨어졌음을 나타낸다. 이 때, 쇼크실 도달시간 (step-through latency time)은 300초 (cut-off time)까지 측정하였다.

[91] **결과**

[92] 기억력의 정도를 확인하기 위하여 수동회피실험에서 쇼크실 도달시간(step-through latency time)을 측정한 결과, 대조군은 211±45.49(sec)으로 나타났고, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타를 투여한 실험군은 77±33.19(sec)로 실험군이 대조군에 비해 유의성있게 감소하므로 정상보다 기억력이 저하되는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 발명에 따라 제조된 아밀로이드-베타가 알츠하이머형 치매를 유발시킨 마우스의 기억력 손상을 가져온다는 것을 확인하였다.

[93]

산업상 이용가능성

[94] 따라서, 본 발명에 의한 제조한 아밀로이드-베타 펩타이드가 알츠하이머 연구에 있어서 실용성이 있음을 확인하였고, 종래의 방법으로 제조된 아밀로이드-베타 펩타이드보다 고순도 및 고수율로 단백질을 제조할 수 있으므로 인구 고령화 사회에서 발병률이 지속적으로 증가하는 추세인 퇴행성 뇌질환 중 가장 흔한 알츠하이머 병을 대처하는 치료제나 예방약의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법으로서;
 (a) 커플링 시약 존재 하에 레진에 Fmoc-아미노산을 커플링 반응시켜 펩타이드를 제조하는 단계,
 (b) 탈보호화 시약을 사용하여 상기 단계 (a)에서 제조된 펩타이드의 보호기를 제거하여 비정제 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계,
 (c) 상기 단계 (b)에서 얻어진 펩타이드의 아미노산 서열 19번과 20번의 Fmoc-Phe-OH를 2차 커플링 반응을 수행하여 아밀로이드-베타 펩타이드를 얻는 단계를 포함하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 커플링 시약은 디메틸설폭사이드/제1 용매의 혼합용매를 포함하는 HBTU 용액이고;
 상기 제1 용매는 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-다이옥세인, 메탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 1,1,1,3,3,3-헥사플로오로-2-프로판올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 또는 이의 혼합물인 것을 특징으로 하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 디메틸설폭사이드/제1 용매의 혼합용매는 디메틸설폭사이드 : 제1 용매의 혼합 부피비가 1 : 2-4인 것을 특징으로 하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 HBTU 용액의 농도가 0.1-1.0 M이고;
 상기 제1 용매는 디메틸포름아미드인 것을 특징으로 하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단계 (b)의 탈보호 시약은 디메틸설폭사이드/제2 용매의 혼합용매를 포함하는 피페리딘 용액이고;
 상기 제2 용매는 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-다이옥세인, 메탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 1,1,1,3,3,3-헥사플로오로-2-프로판올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 또는 이의 혼합물인 것을 특징으로 하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 디메틸설폭사이드/제2 용매의 혼합용매는 디메틸설폭사이드 : 제2 용매의 혼합 부피비가 1 : 2-4인 것을 특징으로 하는 아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 단계 (b)의 탈보호 시약은 피페리딘 :

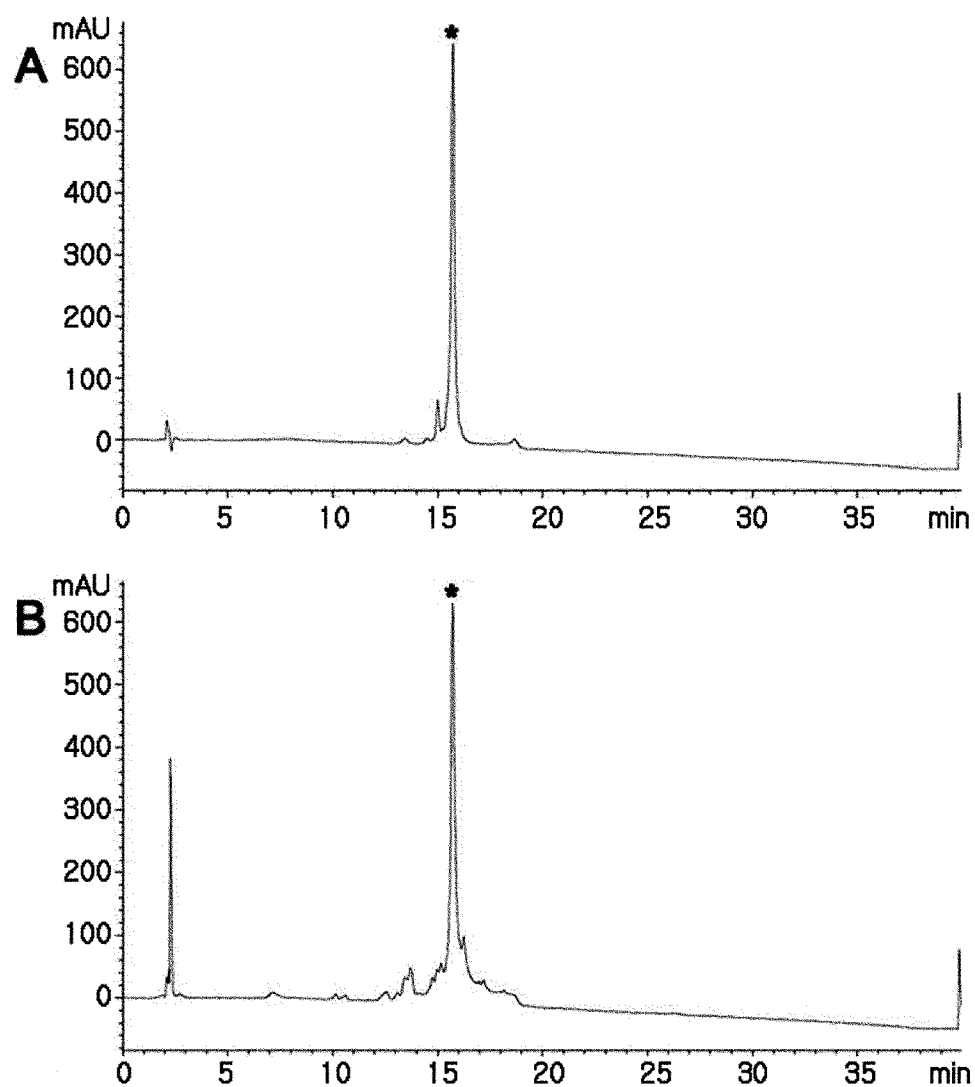
디메틸설펡사이드 : 제2 용매의 혼합 부피비가 1-3 : 1-3 : 2-5이고;
상기 제2 용매는 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름,
1,4-다이옥세인, 메탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및
1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로파놀로 이루어지는 군으로부터
선택되는 1종 또는 이의 혼합물인 것을 특징으로 하는
아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.

[청구항 8]

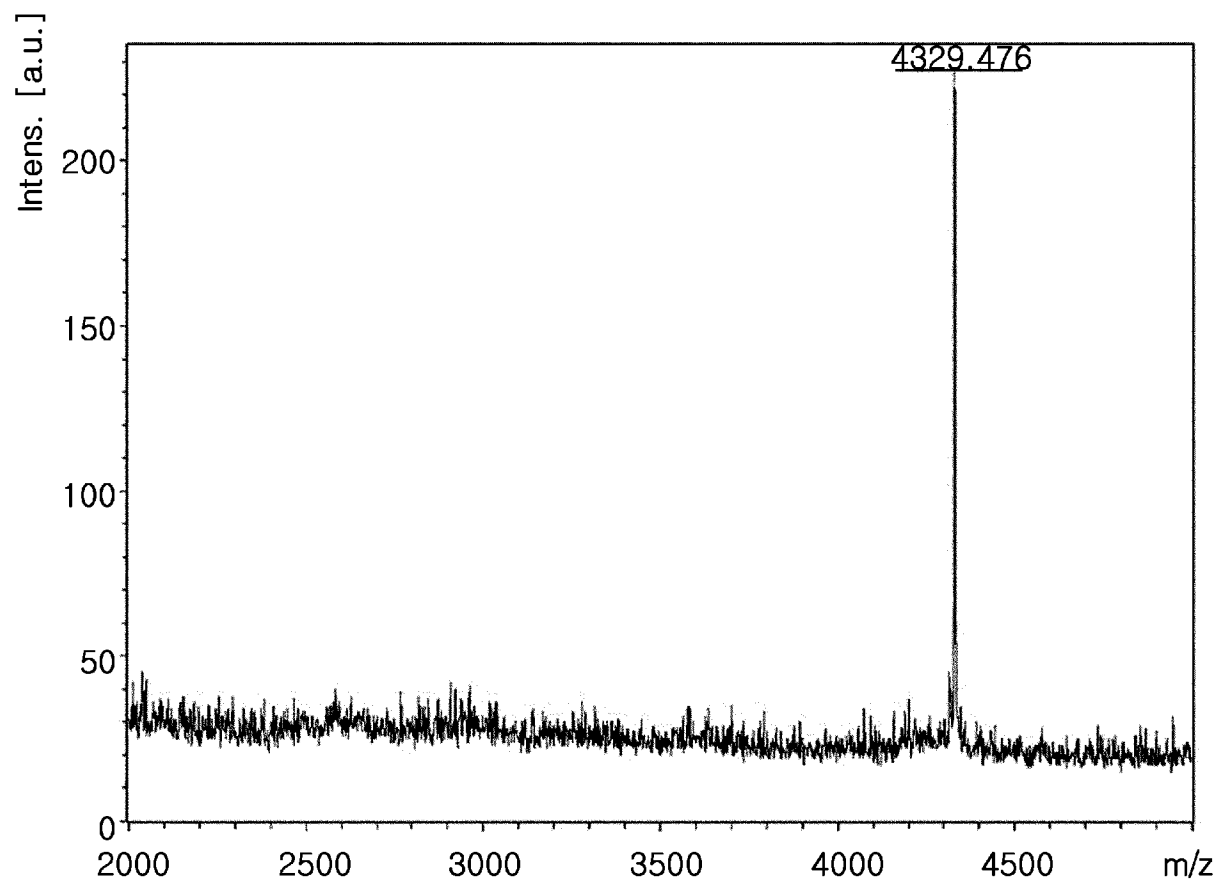
제7항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 HBTU 용액의 농도가 0.1-1.0
M이고;

상기 제2 용매는 디메틸포름아미드인 것을 특징으로 하는
아밀로이드-베타 펩타이드의 제조방법.

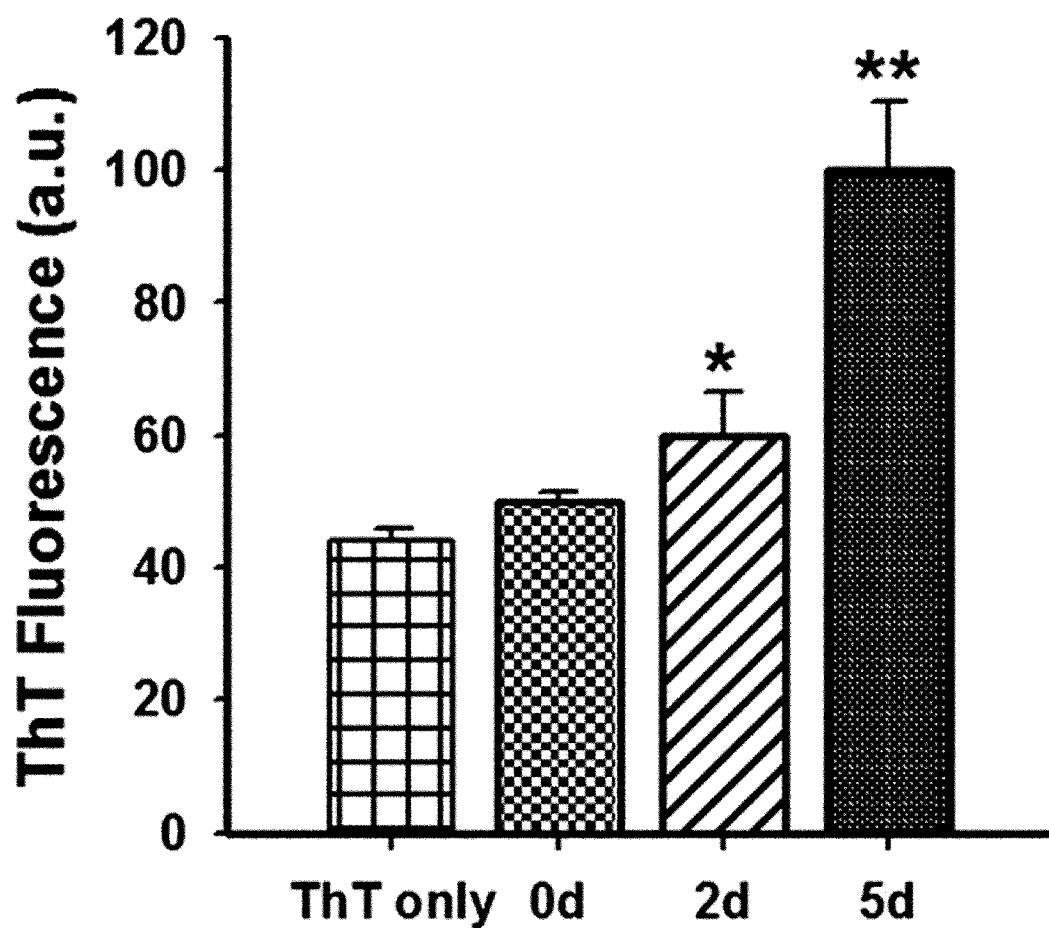
[Fig. 1]



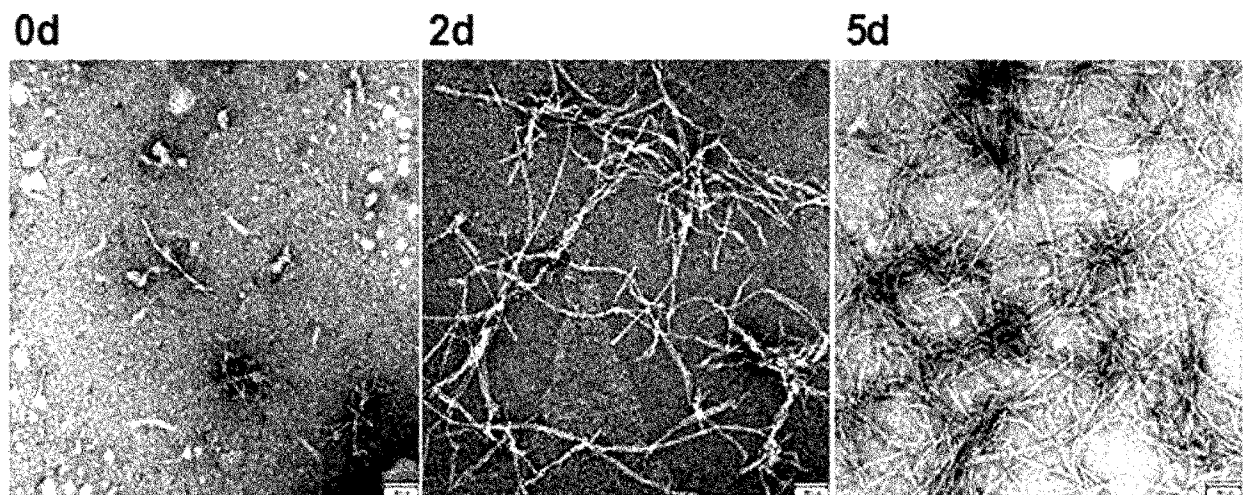
[Fig. 2]



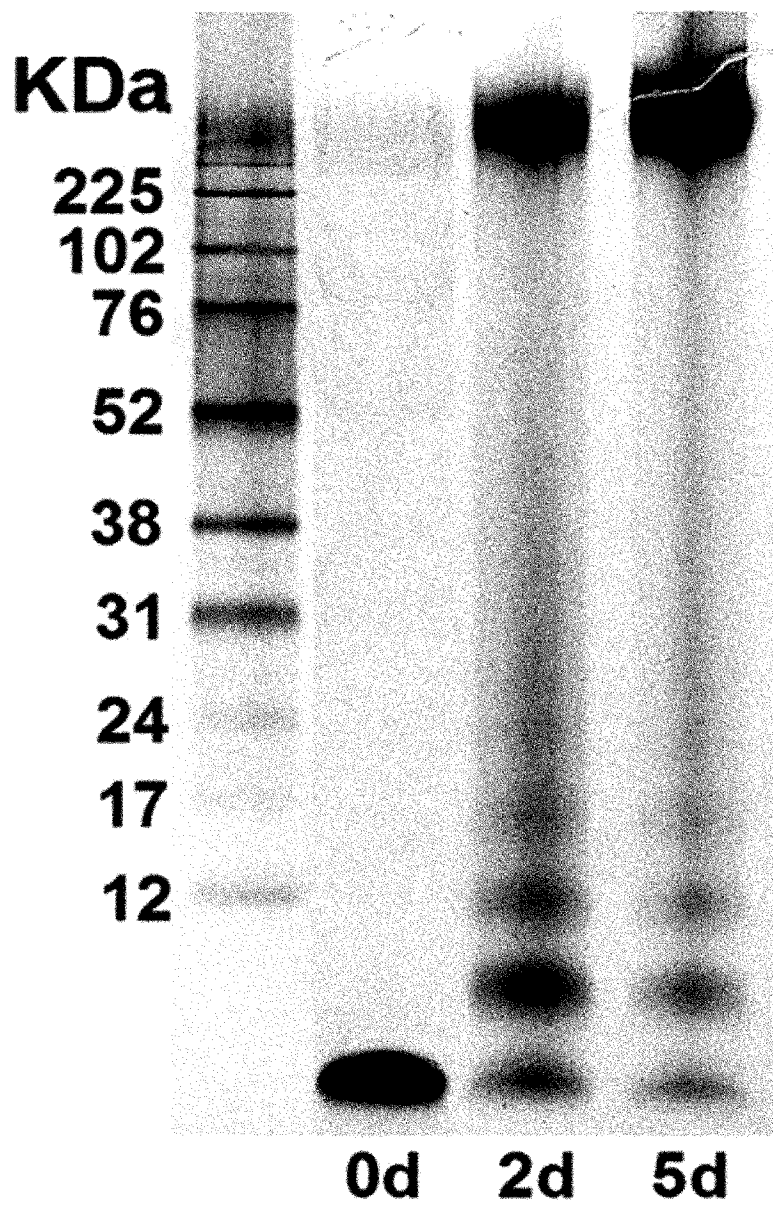
[Fig. 3]



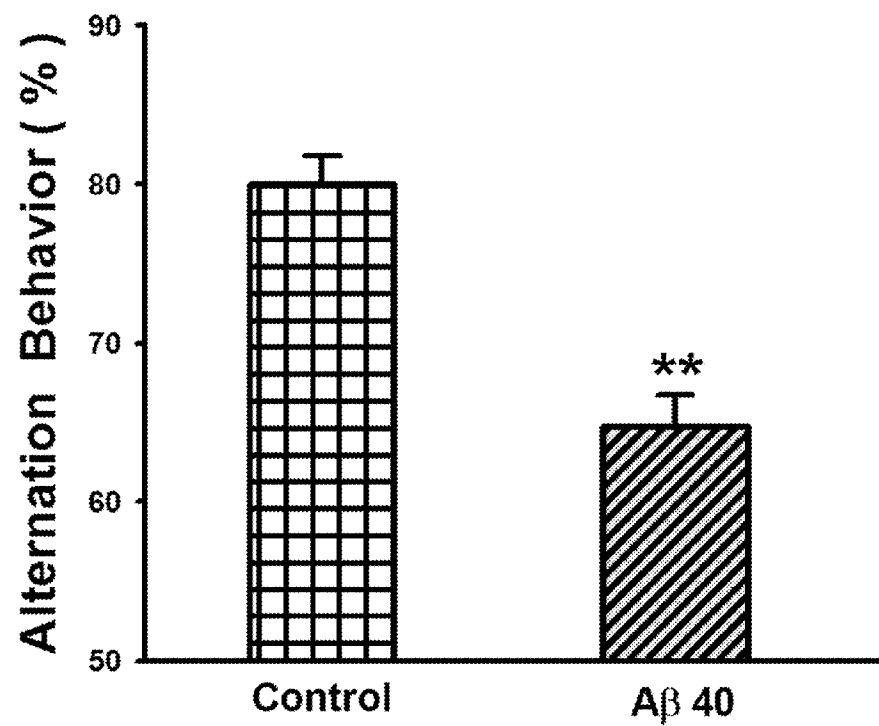
[Fig. 4]



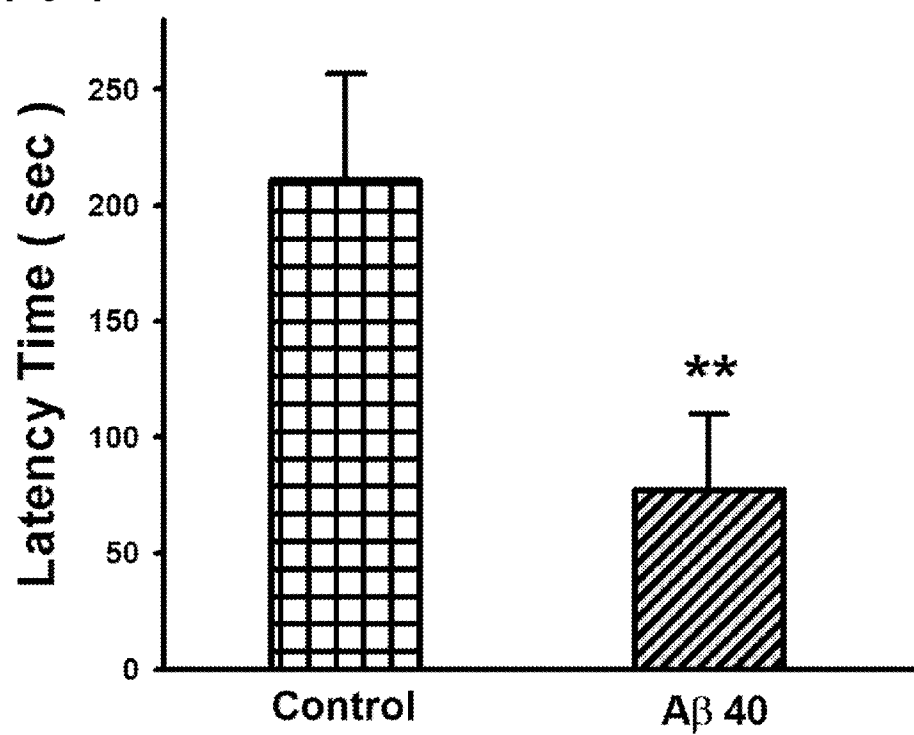
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008413**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/47(2006.01)i, C07K 1/10(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/47; A61K 49/00; A61K 38/00

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: amyloid beta peptide, coupling, Fmoc, deprotection, dimethylformamide, dichloromethane, dimethylsulfoxide, chloroform

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHOI, J. W. et al., Amyloid (16 July 2012) vol. 19, no. 3, pages 133-137 See abstract; page 134.	1-8
A	US 7803774 B2 (FINDEIS, M. A. et al.) 28 September 2010 See abstract; column 33.	1-8
A	KIM, Y. S. et al., The Journal of Organic Chemistry (2004) vol. 69, pages 7776-7778 See abstract; page 7777.	1-8
A	HYDE, C. et al., Journal of the Chemical Society, Chemical Communications (1992) pages 1573-1575 See abstract; page 1575.	1-8



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

21 MARCH 2013 (21.03.2013)

Date of mailing of the international search report

22 MARCH 2013 (22.03.2013)

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/KR2012/008413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7803774 B2	28.09.2010	AU 2000-37196 A1	21.09.2000
		AU 2000-37196 B2	12.05.2005
		CA 2362834 A1	08.09.2000
		CA 2362834 C	06.12.2005
		CN 1279053 C0	11.10.2006
		CN 1362967 A0	07.08.2002
		EP 1161449 A1	12.12.2001
		EP 1161449 B1	04.07.2007
		EP 1870419 A2	26.12.2007
		EP 1870419 A3	02.01.2008
		JP 2002-543043 A	17.12.2002
		JP 2011-121952 A	23.06.2011
		KR 10-0771712 B1	30.10.2007
		US 2003-0236197 A1	25.12.2003
		US 2005-0137128 A1	23.06.2005
		US 6610658 B1	26.08.2003
		US 6831066 B2	14.12.2004
		WO 00-52048 A1	08.09.2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/47(2006.01)i, C07K 1/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 14/47; A61K 49/00; A61K 38/00

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: 아밀로이드-베타 펩타이드, 커플링, Fmoc, 탈보호화, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드, 클로로포름

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CHOI, J. W. 외 3명, Amyloid (2012.07.16) 19권, 3호, 페이지 133-137 요약서; 페이지 134 참조.	1-8
A	US 7803774 B2 (FINDEIS, M. A. 외 3명) 2010.09.28 요약서; 컬럼 33 참조.	1-8
A	KIM, Y. S. 외 2명, The Journal of Organic Chemistry (2004) 69권, 페이지 7776-7778 요약서; 페이지 7777 참조.	1-8
A	HYDE, C. 외 2명, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications (1992) 페이지 1573-1575 요약서; 페이지 1575 참조.	1-8

☐ 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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후
에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신
규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 03월 21일 (21.03.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 03월 22일 (22.03.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

정재철
전화번호 82-42-481-3479



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 7803774 B2

2010.09.28

AU 2000-37196 A1

2000.09.21

AU 2000-37196 B2

2005.05.12

CA 2362834 A1

2000.09.08

CA 2362834 C

2005.12.06

CN 1279053 C0

2006.10.11

CN 1362967 A0

2002.08.07

EP 1161449 A1

2001.12.12

EP 1161449 B1

2007.07.04

EP 1870419 A2

2007.12.26

EP 1870419 A3

2008.01.02

JP 2002-543043 A

2002.12.17

JP 2011-121952 A

2011.06.23

KR 10-0771712 B1

2007.10.30

US 2003-0236197 A1

2003.12.25

US 2005-0137128 A1

2005.06.23

US 6610658 B1

2003.08.26

US 6831066 B2

2004.12.14

WO 00-52048 A1

2000.09.08