

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0011745

(43) 공개일자 2022년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 7/06 (2006.01) C07K 1/107 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 7/06 (2013.01)  
C07K 1/107 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0001420(분할)  
(22) 출원일자 2022년01월05일  
심사청구일자 2022년01월05일  
(62) 원출원 특허 10-2019-0117352  
원출원일자 2019년09월24일  
심사청구일자 2019년09월24일

(71) 출원인  
이화여자대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)  
(72) 발명자  
조인호  
서울특별시 영등포구 당산로42길 13, 102동 1602호(당산동5가, 당산동1차 효성아파트)  
박정현  
서울특별시 서대문구 성산로14길 27-4, 일신빌라 101호  
(74) 대리인  
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 10 항

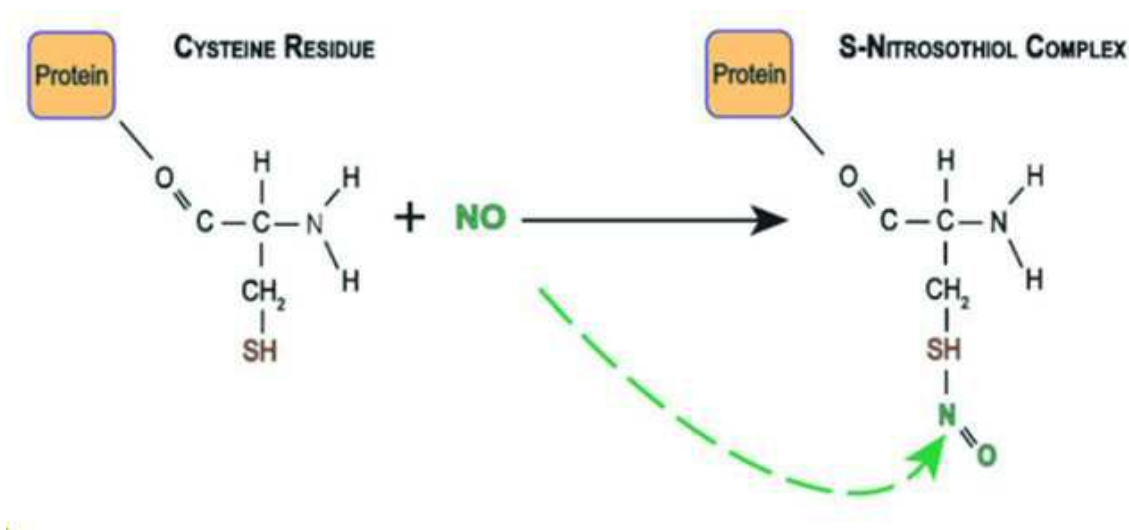
(54) 발명의 명칭 펩타이드 기반 일산화질소 공여체의 제조방법

## (57) 요약

본 발명은 8 mer 이상의 펩타이드의 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 펩타이드의 제조 방법에 의하면 간단한 제조 공정을 통해 고수율 및 고순도로 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 8-mer 이상의 펩타이드를 얻을 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114148
과제번호	2018R1A2B2002062
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포소기관에 직접 표적된 일산화질소에 의한 편도줄기세포의 성장과 분화 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345317255
과제번호	2017R1D1A1B03034131
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	핵 표적화된 일산화질소 전달 시스템 개발 및 핵 신호에서의 역할 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) N-말단에 시스테인이 결합된 10-mer 이상의 아미노산 서열을 가진 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계; (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하고,

상기 단계 (a)의 펩타이드는 펩타이드 N-말단 시스테인의 아미노기가 아세틸기로 보호되고, 펩타이드의 C-말단이 아미드화된 것이고,

상기 (a) 단계에서 물 및 아세트니트릴의 부피비는 1:15 내지 1:25이고,

상기 (b) 단계에서 t-BuNO<sub>2</sub>를 1:15 내지 1:30의 몰비로 적가하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 온도는 2 내지 6 °C인 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 온도는 4 °C인 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 물 및 아세트니트릴의 부피비는 1:17 내지 1:20인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 t-BuNO<sub>2</sub>를 1:20 또는 1:25의 몰비로 적가하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하고 교반하는 단계는 40분 내지 2시간 수행하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 펩타이드는 11-mer 이상의 길이를 가지는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 펩타이드를 수득하는 단계는 상기 반응물을 동결 건조하는 단계를 포함하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드는 일산화질소 공여체로 작용하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

**청구항 10**

(a) N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 펩타이드, 및 N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열 및 이의 C-말단에 연결된 적어도 1개에서 3개의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 펩타이드 중 선택된 어느 하나의 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계;

(b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하고,

상기 단계 (a)의 펩타이드는 펩타이드 N-말단 시스테인의 아미노기가 아세틸기로 보호되고, 펩타이드의 C-말단이 아미드화된 것이고,

상기 (a) 단계에서 물 및 아세트니트릴의 부피비는 1:15 내지 1:25이고,

상기 (b) 단계에서 t-BuNO<sub>2</sub>를 1:15 내지 1:30의 물비로 적가하는 것인, N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 8 mer 이상의 펩타이드의 N-말단에 S-니트로실화 (S-nitrosylation)를 시켜 일산화질소 공여체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근 생화학 및 생리학 부문에서 일산화질소 (Nitric Oxide, NO)의 심혈관계, 호흡계, 소화계, 비뇨기계 및 신경계에서의 기능들이 속속 밝혀지면서 일산화질소에 대한 연구는 더욱 확대되고 있는 추세이다. 최근 연구에 의하면 체내에서 생성되는 일산화질소는 혈관확장, 신경전달, 혈관형성, 식균작용, 상처치료, 혈전생성방지, 심근 손상방지, 면역반응 등의 다양한 생리학적 반응에서 매우 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다. 일산화질소의 생리학적 역할의 중요성에 대한 발견으로 인하여 일산화질소를 물질 내에 안정적으로 저장하는 것뿐만 아니라 전달하고자 하는 부위에 정확하게 전달할 수 있는 방법에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 일산화질소를 저장 또는 전달할 수 있는 물질은 여러 가지가 보고되어 있다. 작은 단분자부터 덴드리머, 리포솜, 나노파티클, 탄소나노튜브, 다공성 입자, 마이셀에 이르기까지 일산화질소는 용도에 따라 다양한 물질에 저장될 수 있다.

[0004] 이러한 일산화질소를 전달하기 위해서 S-니트로소티올 등을 이용할 수 있다. 구조에 따라, 티올기는 일산화질소 (NO)의 운반체로서 작용하거나 NO에 공유 결합할 수 있다. 또한, 특정 분자는 NO 운반체 및 공유결합된 분자 둘다의 일부 특징을 가질 수 있다. 특정 SNO 제제는 호흡의 속도 및 깊이(호흡 조절), 환기-관류 매칭, 상기도 근육 긴장도 및 폐혈관 긴장도의 조절에 결정적인 신호전달체로서 작용한다.

[0005] 위와 같은 S-니트로소티올, 특히 시스테인에 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 시켜 아미노산을 개질시키는 방법이 일부 알려져 있다. S-Nitrosylation을 시스테인에 수행하기 위하여 NaNO<sub>2</sub>를 사용하거나 과량의 산화 질소 가스를 투여하거나 S-글루타치온을 사용하는 방법들이 알려져 있다. 그러나, 이러한 시스테인에 S-니트로실화 (S-nitrosylation)를 수행하는 방법들은 통상의 5mer 이하의 짧은 펩타이드에 S-니트로실화를 수행하는 것이거나 펩타이드 중간에 포함된 시스테인에 대하여 S-니트로실화를 수행하는 것에 불구하고 긴 펩타이드에 대해서 S-Nitrosylation을 수행하는 방법에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0006] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 8mer 이상의 긴 펩타이드에 대해서 N-말단에 S-니트로실화를 수행하는 기술을 개발하였고, 높은 수율 및 순도로 8-mer 이상의 펩타이드의 N-말단에 있는 시스테인에 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 시킴으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

## 해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 8-mer 이상의 긴 펩타이드에 대해서 N-말단에 S-니트로실화를 수행하기 위한 알려진 다양한 S-니트로실화 방법들에 대해 연구 개발을 수행하였으나, 알려진 대다수의 방법들로서는 합성 자체가 이루어지지 않음을 확인하였다. 이에 따라 각고의 노력 끝에 높은 수율 및 순도로 8-mer 이상의 긴 펩타이드의 N-말단의 시스테인의 티올기에 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 시킬 수 있는 적합한 용매 조건, 온도 조건, S-니트로실화에 적합한 질소원을 찾아 제조 공정을 완성시킴으로써 본원 발명을 완성하였다.
- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 (a) N-말단에 시스테인이 결합된 8-mer 이상의 아미노산 서열을 가진 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계; (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하는 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 (a) N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 펩타이드, 및 N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열 및 이의 C-말단에 연결된 적어도 1개에서 3개의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 펩타이드 중 선택된 어느 하나의 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계; (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하는 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법을 제공하는 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0010] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0011] 펩타이드를 기술하기 위해 사용되는 명명법은 통상적인 관행에 따른다. 비록 특별하게 나타내어지지 않더라도, 아미노- 및 카복실-말단기는 다르게 명시되지 않는 한 생리학적 pH 값으로 가정하는 형태이다. 아미노산 구조식에서, 각각의 잔기는 일반적으로 표준 3문자 또는 단일 문자 명칭으로 표시된다. 본원에 제시된 펩타이드의 아미노산 서열은 일반적으로 표준 단일 문자 기호를 사용하여 지정된다 (A, 알라닌; C, 시스테인; D, 아스파르트산; E, 글루탐산; F, 페닐알라닌; G, 글리신; H, 히스티딘; I, 이소류신; K, 리신; L, 류신; M, 메티오닌; N, 아스파라긴; P, 프롤린; Q, 글루타민; R, 아르기닌; S, 세린; T, 트레오닌; V, 발린; W, 트립토판; 및 Y, 티로신).
- [0012] 본 발명에서의 용어 "SNO" 또는 "S-NO"는 S기에 NO가 결합된 형태를 의미한다. 예컨대, C(SNO)는 시스테인의 티올기에 NO가 결합된 것을 의미한다.
- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, (a) N-말단에 시스테인이 결합된 8-mer 이상의 아미노산 서열을 가진 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계; (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하는 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명에 따른 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법에 의하면 간단한 제조 공정을 통해 고수율 및 고순도로 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 8-mer 이상의 펩타이드를 얻을 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "펩타이드"란 아미드 결합 (또는 펩타이드 결합)에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 합성된 것일 수 있고, 바람직하게는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관 내에서 합성된 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어 S-니트로실화(S-nitrosylation)은 아미노산 시스테인의 티올에 일산화질소를 공유결합적으로 첨가한 것을 의미한다.
- [0017] 예를 들어 아래 도 1과 같이 치환을 모식할 수 있다. N-말단의 시스테인 잔기 내 티올기에 NO가 치환됨으로써

S-니트로티올을 포함하는 펩타이드를 제조할 수 있다.

- [0018] 본 발명에 따른 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법은 (a) N-말단에 시스테인이 결합된 8-mer 이상의 아미노산 서열을 가진 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계;를 포함한다.
- [0019] 본 발명에 따른 펩타이드 서열은 N-말단에 시스테인 서열을 포함하면서 8-mer 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드이다. 펩타이드는 예컨대, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는 펩타이드이다.
- [0020] 본 발명에 따른 펩타이드 서열은 바람직하게 N-말단 및 C-말단이 보호기로 보호된 것일 수 있다. 예컨대, N-말단 또는 C-말단은 통상의 보호기로 Fmoc, 트리틸 (trityl, Trt), tert-부틸옥시카보닐 (t-Boc), t-부틸 (t-Bu), 아세틸, -NH<sub>2</sub> 등으로 보호될 수 있다. 바람직하게 본 발명에 따른 펩타이드는 펩타이드 N-말단 시스테인의 아미노기가 아세틸기로 보호되고, 펩타이드의 C-말단이 아마이드화된 것일 수 있다. 즉, 위와 같이 N-말단 및 C-말단을 보호기로 치환하거나 보호함으로써 반응 시에 펩타이드가 분해되거나 부차적인 반응이 일어나는 것을 방지할 수 있다. 이러한 펩타이드 서열은 용매로 물 및 아세트니트릴의 혼합 용매 하에 녹여서 반응을 수행한다. 물 및 아세트니트릴의 혼합 용매는 1:15 내지 1:25 부피비, 바람직하게 1:17 내지 1:20, 보다 바람직하게 약 1:19로 혼합한 혼합 용매이다. 이러한 물 및 아세트니트릴의 혼합 용매만이 8-mer 이상의 아미노산 서열을 가진 펩타이드의 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)을 수행하기에 적합한 용매 조건을 제공할 수 있다. 위 범위를 넘어 물의 농도가 높아지거나 다른 용매에 반응하였을 경우, 원하는 반응 수행이 어려운바, 상기 부피비의 물 및 아세트니트릴의 혼합 용매의 사용이 바람직하다.
- [0021] 위 단계에서 용매의 온도는 0 내지 10 °C, 바람직하게 2 내지 6 °C, 보다 바람직하게 약 4°C의 조건이 바람직하다. 이러한 온도 조건은 t-BuNO<sub>2</sub>과의 반응에 적절한 온도 조건을 제공한다. 이러한 모든 단계는 암조건에서 수행하는 것이 가장 바람직하다.
- [0022] 본 발명에 따른 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법은 (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계;를 포함한다.
- [0023] 본 발명에 따른 펩타이드와 t-BuNO<sub>2</sub>의 몰비는 1:15 내지 1:30 바람직하게 1:17 내지 1:28, 보다 바람직하게 1:19 내지 1:26인 것이 바람직하다. 본 발명의 실시시양태에 따르면 상기 몰비는 1:20일 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에 따르면 상기 몰비는 1:25일 수 있다.
- [0024] 이러한 범위 내에서 펩타이드의 N-말단의 시스테인의 S기에 NO를 치환시키기 용이하다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 적가 방법을 이용하여야만 반응이 원활하게 잘 이루어지고 높은 수율 및 순도로 원하는 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드를 제공할 수 있다.
- [0025] t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하고 교반하는 단계는 30분 내지 3시간, 보다 바람직하게 40분 내지 2시간, 보다 더 바람직하게 약 1시간 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 짧은 시간 내에도 빠르게 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 수행하고 고수율로 원하는 펩타이드를 수득할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법은 (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함한다.
- [0027] 본 발명에 따르면, 상기 (b) 단계의 반응물을 건조시켜 최종 원하는 수득물을 얻을 수 있다. 바람직하게 통상의 알려진 방법을 이용하여, 예컨대 동결 건조 단계 등을 통해 원하는 펩타이드만을 수득할 수 있다.
- [0028] 상기 제조된 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드는 일산화질소 공여체로 작용하는 것일 수 있다. 즉, 일산화질소 방출능을 가짐으로써 다양한 용도로 이용될 수 있다. 이러한 본 발명은 최초로 일산화질소 공여체를 펩타이드 기반으로 제조한 것이다.
- [0029] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 양태는, (a) N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 펩타이드, 및 N-말단에 시스테인이 결합된 서열번호 1의 아미노산 서열 및 이의 C-말단에 연결된 적어도 1개에서 3개의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 펩타이드 중 선택된 어느 하나의 펩타이드를 물 및 아세트니트릴을 포함하는 용매에 녹여 0 내지 10 °C로 냉각하는 단계;



- [0030] (b) t-BuNO<sub>2</sub>를 적가하여 교반하는 단계; 및
- [0031] (c) 상기 (b) 단계의 반응물로부터 N-말단에 S-니트로실화(S-nitrosylation)된 펩타이드를 수득하는 단계;를 포함하는 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0032] 본 발명에서 서열번호 1의 아미노산 서열은 CGRKKRRQRRR 서열이며, 즉, N-말단에 시스테인 서열을 포함하면서 세포 투과의 특성을 지닌 펩타이드(CPP)일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 서열번호 2의 아미노산 서열은 PKKKRKV이며, nuclear localization sequence(NLS)로 작용할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 상기 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법에서 사용되는 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열인 펩타이드일 수 있다. 또한, 이에 적어도 하나, 두 개 또는 세 개의 서열번호 2의 서열이 더 첨가된 펩타이드 서열일 수 있다. 즉, 이러한 서열은 하기 서열번호 3 내지 5로 기재한 서열 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0035] 서열번호 3: CGRKKRRQRRRPKKKKRKV
- [0036] 서열번호 4: CGRKKRRQRRRPKKKKRKVPKKKKRKV
- [0037] 서열번호 5: CGRKKRRQRRRPKKKKRKVPKKKKRKVPKKKKRKV
- [0038] 이러한 서열들은 세포 투과 및/또는 핵 표적 서열을 포함함으로써 질소를 핵 내로 원활하게 전달할 수 있는 특징을 지닌다. 즉, 본원 발명의 제조 방법은 세포 투과 및 핵 표적능을 지닌 아미노산 서열에 활성성분으로 일산화질소를 N-말단의 시스테인에 붙이는 방법으로, 위 제조된 펩타이드는 일산화질소를 세포투과성 및 핵 내 일산화질소 전달 기능을 보유하도록 변형된 것이다. 이러한 방법은 본원 발명에 따른 긴 펩타이드의 서열을 이용하면서, 일산화질소를 핵 내로 전달할 수 있는 서열 합성을 이루었다는 점에서 우수한 합성 방법에 해당한다.
- [0039] 상기 (a), (b) 및 (c) 단계는 앞서 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법이 동일 유사하게 적용될 수 있다.
- [0040] 이에 따라 본 발명은 상기 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 제조 방법에 의해 제조된 변형된 펩타이드를 제공한다.

### 발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 펩타이드의 제조 방법에 의하면 간단한 제조 공정을 통해 고수율 및 고순도로 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 8-mer 이상의 펩타이드를 얻을 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 N-말단 시스테인에 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 수행하는 모식도를 간략하게 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 수행한 결과를 나타내는 LC/MS 분석 결과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에 따른 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 수행한 결과를 나타내는 LC/MS 분석 결과를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명에 따른 S-니트로실화(S-nitrosylation)를 수행한 결과를 나타내는 LC/MS 분석 결과를 나타낸다.
- 도 5은 s-nitrosoglutathione (GSNO)을 이용하여 시스테인에 S-nitrosylation을 수행하여, 합성이 이루어지지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 6는 NaNO<sub>2</sub>를 이용하여 N-말단의 γE 다음에 위치한 시스테인에 S-nitrosylation을 수행하여, 합성이 이루어지지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 7은 t-BuNO<sub>2</sub>를 DMSO 용매 조건 하에 이용하여 N-말단의 시스테인에 S-nitrosylation을 수행하여, 합성이 이루어지지 않음을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 8은 본 발명에 따른 펩타이드들의 일산화질소 방출을 NO sensor를 이용하여 측정한 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0044] **실시예 1. 펩타이드 합성 및 분리**
- [0045] 펩타이드를 합성하기 위하여, 일반적인 펩타이드 고상 합성법 (Wang C. Chan, Perter D. White, "Fmoc Solid phase peptide synthesis", Oxford)에 따라서 진행하였다. 보다 구체적으로, 자동합성기 (ASP48S, Pepton, Inc.)를 사용하여 Fmoc-SPPS (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl solid phase peptide synthesis) 방법을 이용하여 N-말단부터 하나씩 커플링 (coupling)하였다.
- [0046] 펩타이드 변이체 합성에 사용한 모든 단량체 원료는 N-말단이 Fmoc으로 보호되고, 잔기는 트리틸 (trityl, Trt), tert-부틸옥시카보닐 (t-Boc), t-부틸 (t-Bu) 등으로 보호된 아미노산을 사용하였다.
- [0047] 커플링제 (Coupling reagent)로는 HBTU (2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate / HOBt (Hydroxybenzotriazole) / NMM (N-Methylmorpholine)을 사용하였다.
- [0048] 또한 아래 사용되는 일부 펩타이드들에 대하여, 최종 peptide의 N-말단은 acetylation ( $-CH_3CO$ ) 시키고, C-말단은 amidation ( $-NH_2$ ) 시켜, 각각의 말단을 보호할 수 있도록 하였다.
- [0049] (1) 보호된 아미노산(8당량)과 커플링제 HBTU(8당량) / NMM(16당량)을 DMF (Dimethyl formamide)에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 반응시켰다. (2) Fmoc 제거는 20%(v/v) Piperidine / DMF를 가하여 상온에서 5분간 2회 반응하였다. 상기 (1)과 (2)의 반응을 반복적으로 하여 펩타이드를 만들었다.
- [0050] 이후, Resin 및 아미노산 보호기에서의 펩타이드 분리는 TFA (Trifluoroacetic acid) / EDT(1,2-ethanedithiol) / Thioanisole / TIS (Triisopropylsilane) /  $H_2O$  (혼합비(중량기준)= 90 / 2.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5)을 사용하여 분리하였다. 이렇게 얻어진 혼합 용액은 냉장 보관된 디에틸에테르 용매를 과량 처리함으로써 침전물을 생성시켰고, 얻어진 침전물을 원심 분리시켜 완전히 침전시킨 후 과량의 TFA, EDT, Thioanisole 및 TIS 등을 1차로 제거하였다. 동일한 절차를 2회 반복하여 고형화 시킨 침전물을 얻었다. 얻은 침전물을 C18 column (250mm  $\times$  22 mm, 10  $\mu$ m, Vydac Everest, USA)을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피 기기(Shimadzu Prominence HPLC, Japan)를 이용하여 0.1% (v/v) TFA를 포함하는 Water - Acetonitrile liner gradient (Acetonitrile 농도: 10~75%(v/v)) 방법으로 분리하였다. 정제된 펩타이드의 분자량은 LC/MS(Shimadzu LC/Mass-2020, Japan)로 확인하였고, 순수 정제된 분획물을 동결 건조시켜 백색 분말형태의 펩타이드를 얻었다.
- [0051] 위와 같은 방법을 통하여 하기 실험에 사용될 펩타이드들을 합성하였다.
- [0052] **실시예 2. 펩타이드의 N-말단에 S-nitrosylation을 통한 펩타이드 합성**
- [0053] **실시예 2-1. NO-CPP-0xNLS: Acetyl-C(SNO)GRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub> (서열번호 1)**
- [0054] 시스테인의 티올기에 니트로화 반응이 필요한 상기 펩타이드(서열번호 1) 30 mg 를 물과 아세트니트릴 (1:19 부피 비) 30 ml에 녹이고 4℃로 냉각한 후 t-BuNO<sub>2</sub> 100  $\mu$ l를 적가하여 60 분동안 교반하며 반응시켰다. 구체적으로 본 실시예에서 사용된 상기 펩타이드는 N-말단의 시스테인을 아세틸화하고 C-말단을 아미드화하여 말단을 보호한 것을 사용하였다. 모든 반응은 암막 조건 하에 수행되었으며, 반응 후에 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.
- [0055] 구체적으로, 합성된 펩타이드의 서열과 머무름 시간 및 분자량을 하기 및 도 2에 나타내었다.
- [0056] Rt= 8.392 분 (0.01%(v/v) TFA를 함유하는 5%(v/v) 내지 100%(v/v)의 DW/Acetonitrile로부터 20분에 걸쳐 다양한 농도구배); MS(ESI) 1568.8 m/e,  $[M+Na]^+$  = 1588
- [0057] 위 확인할 수 있는 바와 같이, 합성된 펩타이드의 정확한 질량값을 통해 N-말단에 S-nitrosylation이 이루어졌음을 확인하였다.
- [0058] **실시예 2-2. NO-CPP-1xNLS : Acetyl-C(SNO)GRKKRRQRRRPKKRKV-NH<sub>2</sub> (서열번호 3)**
- [0059] 시스테인의 티올기에 니트로화 반응이 필요한 상기 펩타이드(서열번호 3) 30 mg 를 물과 아세트니트릴 (1:19 부피 비) 30 ml에 녹이고 4℃로 냉각한 후 t-BuNO<sub>2</sub> 100  $\mu$ l를 적가하여 60 분동안 교반하며 반응시켰다. 구체적으로



로 본 실시예에서 사용된 상기 펩타이드는 N-말단의 시스테인을 아세틸화하고 C-말단을 아미드화하여 말단을 보호한 것을 사용하였다. 모든 반응은 암막 조건 하에 수행되었다. 그리고 나서, 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.

[0060] 구체적으로, 합성된 펩타이드의 서열과 머무름 시간 및 분자량을 하기 및 도 3에 나타내었다.

[0061] Rt= 6.158 분 (0.01%(v/v) TFA를 함유하는 5%(v/v) 내지 100%(v/v)의 DW/Acetonitrile로부터 20분에 걸쳐 다양한 농도구배); MS(ESI) 2433.4 m/e,  $[M+Na]^+$  = 2455

[0062] 위 확인할 수 있는 바와 같이, 합성된 펩타이드의 정확한 질량값을 통해 N-말단에 S-nitrosylation이 이루어졌음을 확인하였다.

[0063] **실시예 2-3. NO-CPP-2xNLS : Acetyl-C(SNO)GRKKRRQRRRPKKKRKVPKKRKV-NH2 (서열번호 4)**

[0064] 시스테인의 티올기에 니트로화 반응이 필요한 상기 펩타이드(서열번호 4) 30 mg 를 물과 아세토니트릴 (1:19 부피 비) 30 ml에 녹이고 4℃로 냉각한 후 t-BuNO<sub>2</sub> 100 μl를 적가하여 60 분동안 교반하며 반응시켰다. 구체적으로 본 실시예에서 사용된 상기 펩타이드는 N-말단의 시스테인을 아세틸화하고 C-말단을 아미드화하여 말단을 보호한 것을 사용하였다. 모든 반응은 암막 조건 하에 수행되었다. 그리고 나서, 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.

[0065] 구체적으로, 합성된 펩타이드의 서열과 머무름 시간 및 분자량을 하기 및 도 4에 나타내었다.

[0066] Rt= 5.983 분 (0.01%(v/v) TFA를 함유하는 5%(v/v) 내지 100%(v/v)의 DW/Acetonitrile로부터 20분에 걸쳐 다양한 농도구배); MS(ESI) 3298.0 m/e,  $[M+H]^+$  = 3319

[0067] 위 확인할 수 있는 바와 같이, 합성된 펩타이드의 정확한 질량값을 통해 N-말단에 S-nitrosylation이 이루어졌음을 확인하였다.

[0068] **비교예 1. s-nitrosoglutathione (GSNO)을 이용한 펩타이드 내 시스테인에 대한 S-nitrosylation**

[0069] 서열번호 6 (YGRKKRRQRRRIISNASCTTN) 10 mg의 펩타이드와 s-nitrosoglutathione (GSNO) 2 mg 을 37 °C에서 200 mM NaHCO<sub>3</sub> 버퍼 용매 조건 하에 첨가하여 Overnight 반응시켰다. 그리고 나서, 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.

[0070] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0071] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, S-nitrosylation이 이루어진 펩타이드의 질량이 2592으로 확인되어야 하나, 해당 피크는 확인되지 않아 합성이 이루어지 않았음을 확인하였다.

[0072] **비교예 2. NaNO<sub>2</sub>를 이용한 N-말단에 S-nitrosylation**

[0073] 서열번호 7 (CGYGRKKRRQRRR)의 펩타이드 10 mg 과 NaNO<sub>2</sub> 5 mg 을 상온에서 1M HCl 조건 하에 첨가하여 Overnight 반응시켰다. 모든 반응은 암막 조건 하에 수행되었다. 그리고 나서, 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.

[0074] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0075] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, S-nitrosylation이 이루어진 펩타이드의 질량이 1877으로 확인되어야 하나, 해당 피크는 확인되지 않아 합성이 이루어지 않았음을 확인하였다.

[0076] **비교예 3. t-BuNO<sub>2</sub>를 이용한 N-말단에 S-nitrosylation**

[0077] 서열번호 8(CGRKKRRQRRRPQ)의 펩타이드 10 mg 과 t-BuNO<sub>2</sub> 20 μl 를 4 °C에서 DMSO 용매 조건 하에 첨가하여 Overnight 반응시켰다. 모든 반응은 암막 조건 하에 수행되었다. 그리고 나서, 동결 건조하여 미색의 분말 형태인 펩타이드를 얻었다.

[0078] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0079] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, S-nitrosylation이 이루어진 펩타이드의 질량이 1850으로 확인되어야 하나, 해당 피크는 확인되지 않아 합성이 이루어지 않았음을 확인하였다. 구체적으로, NO가 결합된 형태의 펩타

이드의 질량 값은  $(1850+1)/2 = 926$ 으로 나와야 하는데 실험결과 1871로 21 정도 더 큰 값이 Main으로 형성되어 합성이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다.

[0080] **실시예 3. S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 펩타이드의 NO 방출 확인**

[0081] 실온 상태의 PBS buffer (pH 7.4)에 용해된 50  $\mu$ M의 농도의 각각의 상기 실시예 2-1 내지 2-3에서 합성된 펩타이드들의 일산화질소 방출을 NO sensor (ISO-NOP, World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA)를 이용하여 측정하였다.

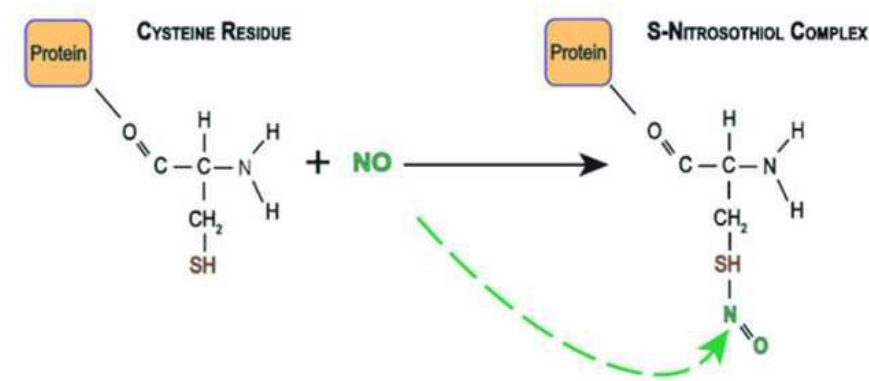
[0082] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0083] 도 8에서 확인되는 바와 같이 N-말단의 시스테인을 S-니트로실화(S-nitrosylation)시킨 본 발명에 따른 펩타이드들은 일산화질소를 방출함으로써 일산화질소 공여체로 우수한 효과를 나타내었다.

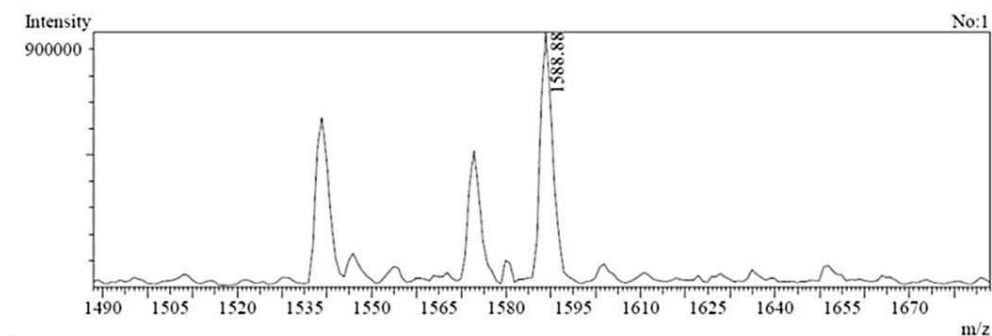
[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

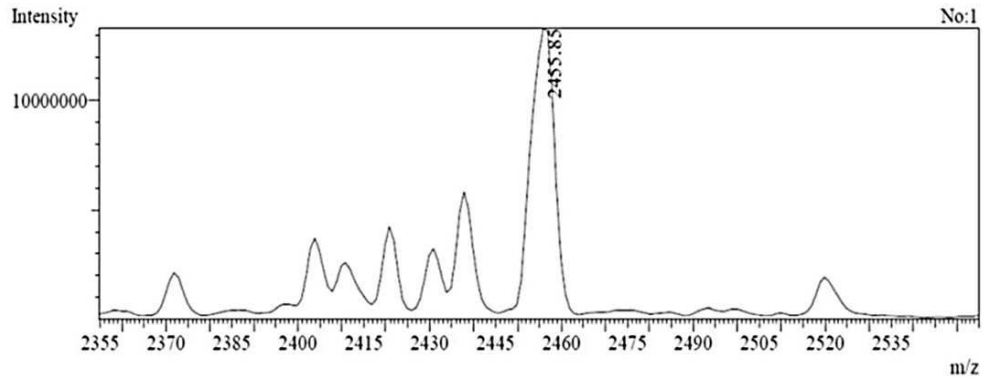
**도면1**



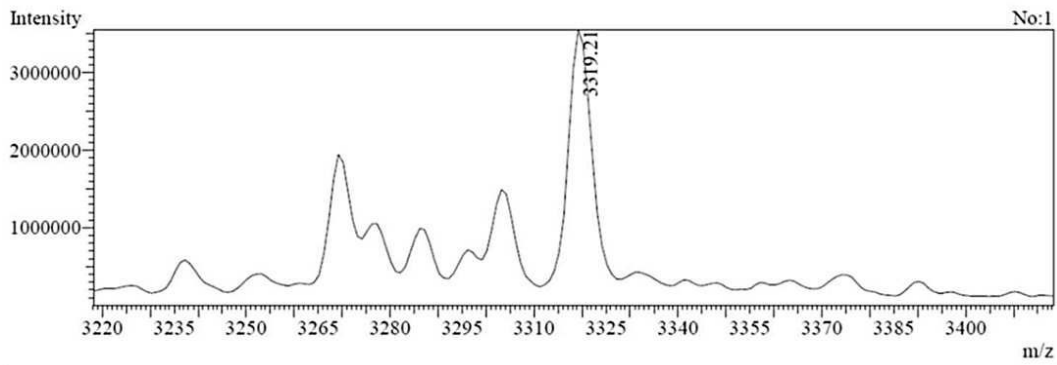
**도면2**



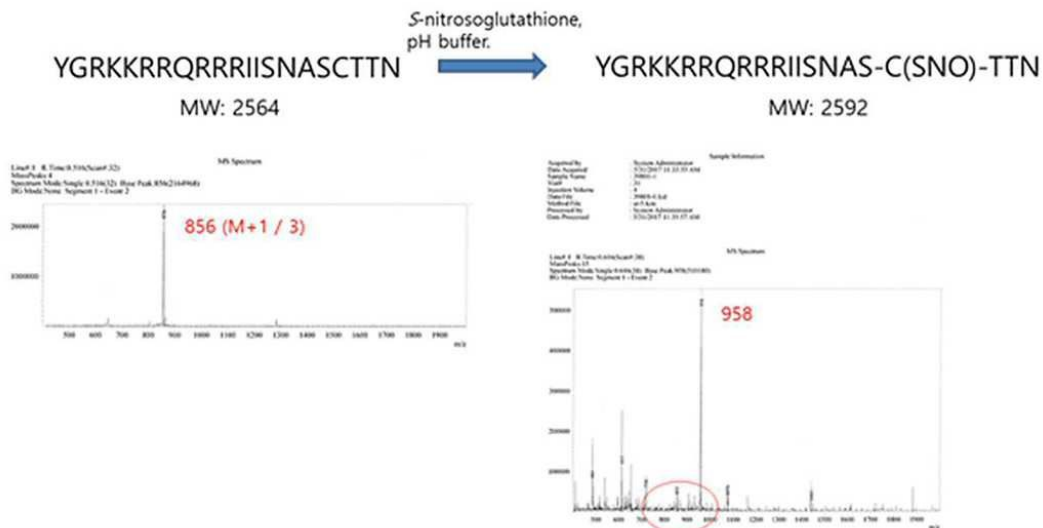
도면3



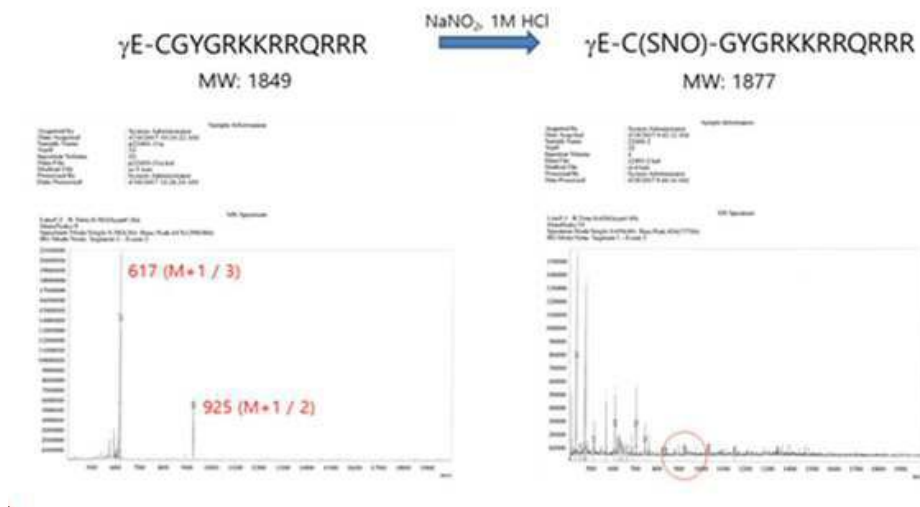
도면4



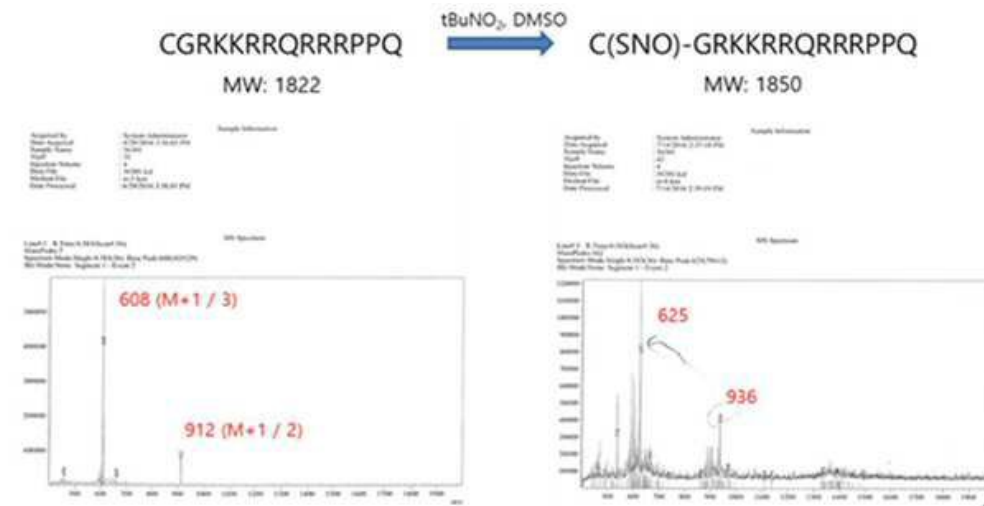
도면5



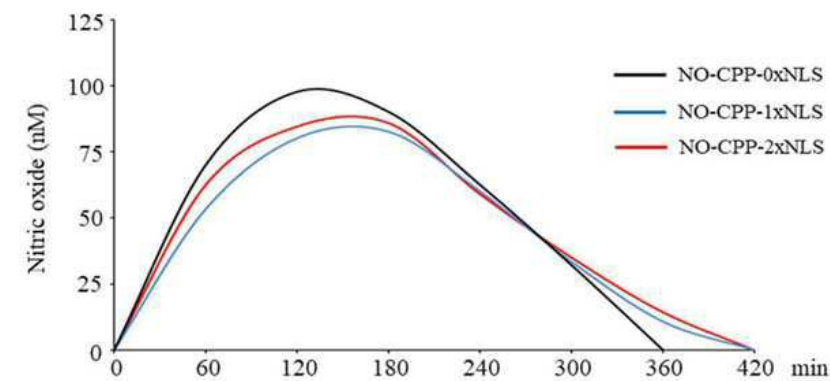
도면6



도면7



도면8



## 서열 목록

<110> EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Synthetic method of peptide-based nitric oxide donor

<130> P21072EWWUDA

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CPP

<400> 1

Cys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nuclear Localization Sequence

<400> 2

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CPP-1xNLS

<400> 3

Cys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Lys Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Val

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CPP-2xNLS

<400> 4

Cys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Lys Lys Lys Arg  
1 5 10 15

Lys Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
20 25

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CPP-3xNLS

<400> 5

Cys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Lys Lys Lys Arg  
1 5 10 15

Lys Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
20 25 30

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence1

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ile Ile Ser Asn Ala Ser  
1 5 10 15

Cys Thr Thr Asn  
20

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence2

<400> 7

Cys Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10



<210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequence3

<400> 8  
 Cys Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln  
 1 5 10