



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0033171

(43) 공개일자 2022년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0115225

(22) 출원일자 2020년09월09일

심사청구일자 2020년09월09일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

임용범

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 226호(신촌동)

계만석

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 230호(신촌동)

(74) 대리인

특허법인충현

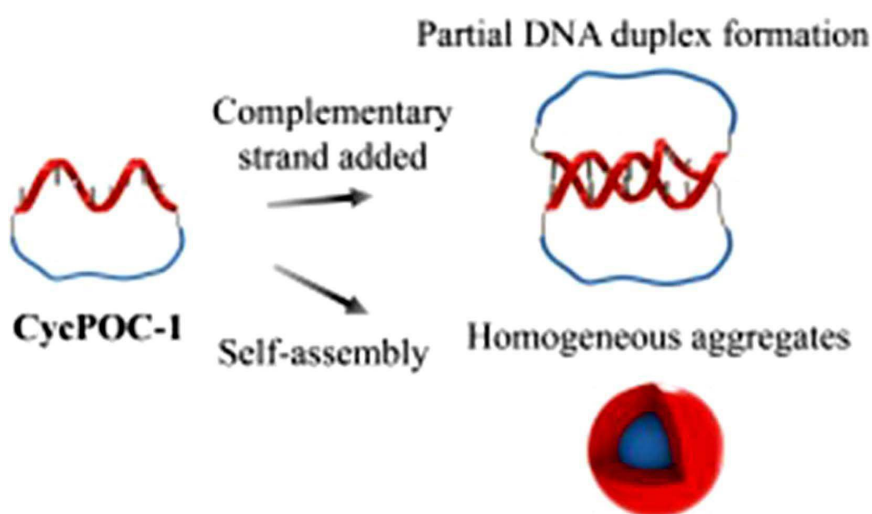
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 관한 것으로서, 본 발명의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 용액 상에서 구조적으로 안정적이며, 균일한 크기와 형태를 갖는 자기조립체를 형성할 수 있다. 이중 빌딩블록 구조인 자기조립성 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 효율적으로 제조할 수 있는 새로운 제조방법을 제공할 수 있다

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106040
과제번호	2020R1A2C2007578
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	펩타이드 합성고분자의 세포 내부 특이 자가조립
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

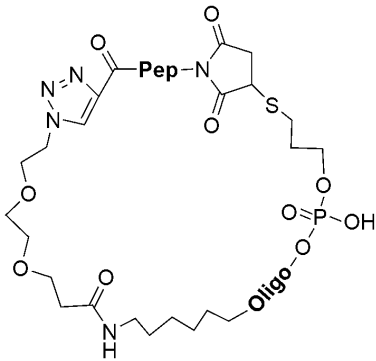
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체:

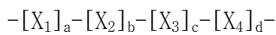
[화학식 1]



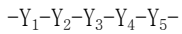
상기 화학식 1에서,

상기 Pep는 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로,

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 2 및 3에서,

상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이며,

상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 2에서,

상기 X_1 은 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)이고,

상기 X_2 는 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며,

상기 X_3 은 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며,

상기 X_4 는 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)인 것을 특징으로 하는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 서열번호 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서

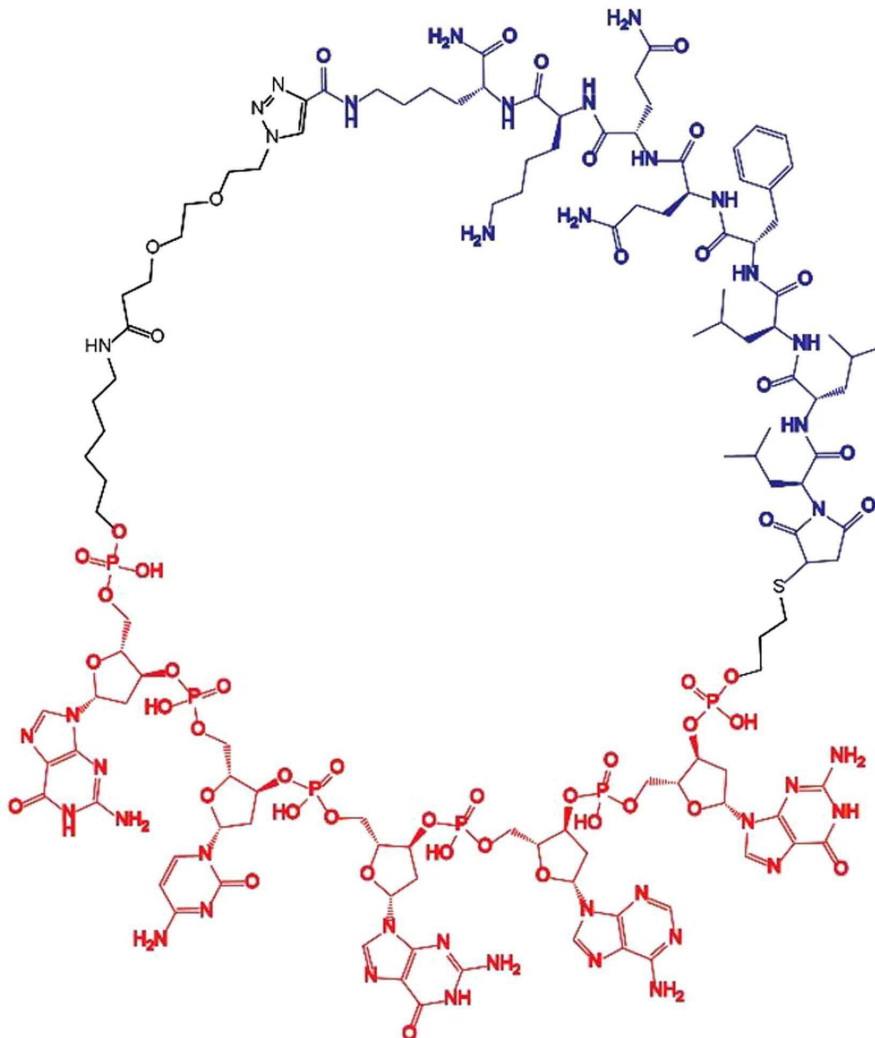
상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 5 내지 13 중에서 선택되는 어느 하나의 염기 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

청구항 5

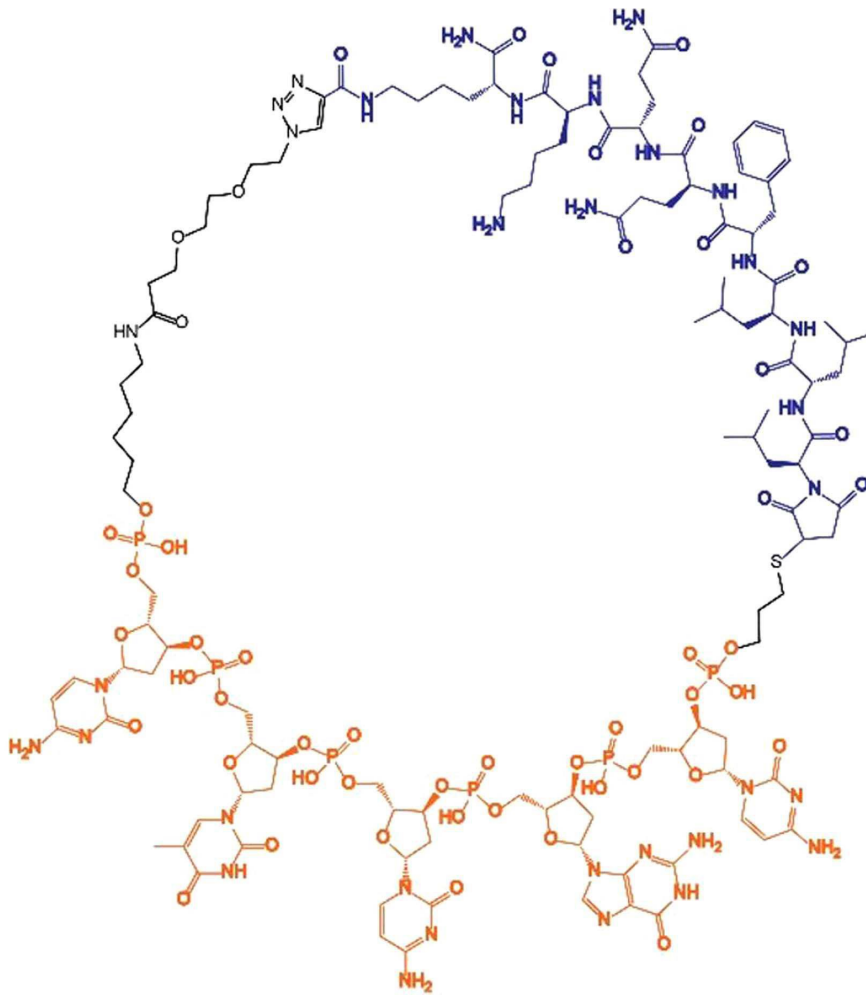
제1항에 있어서,

상기 복합체는 하기 화학식 4 또는 화학식 5로 표시되는 것을 특징으로 하는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 6

제1항에 있어서,

상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 용액 상에서 자기조립체를 형성하는 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

청구항 7

제1항에 따른 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체가 용액 상에서 자기조립되어 형성된 자기조립체.

청구항 8

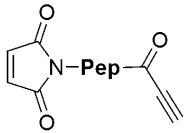
제7항에 있어서,

상기 자기조립체는 평균 직경 10 내지 30 nm의 구형 미셀 형태 또는 소낭 형태인 것을 특징으로 하는 자기조립체.

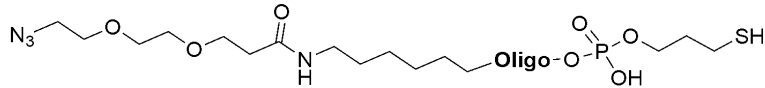
청구항 9

- 1) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드와 화학식 7로 표시되는 펩티드를 혼합하여 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 CuSO_4 , 아스코르브산 및 부탄올을 첨가하여 고리화하는 단계;를 포함하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

[화학식 6]

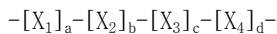


[화학식 7]

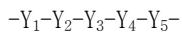


상기 Pep는 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로,

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 2 및 3에서,

상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.

상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는,

1-a) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 환원제를 처리하는 단계;를 통해 3' 말단에서 이황화 결합이 제거된 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드와 화학식 7로 표시되는 펩티드는 1 : 1 내지 4 몰비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 1) 단계에, 유기용매를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 유기용매는 에탄올, 메탄올, 이소프로필알콜, 부탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO), 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 헥산, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름 및 아세톤로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유기용매인 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 2) 단계에서,

상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체, CuSO_4 , 아스코르브산의 당량비는 1 : 2-4 : 5-7인 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 2) 단계는 불활성 분위기 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법.

청구항 16

제9항에 따라 제조된 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 구조적으로 안정한 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자의 고리화는 약물, 신소재 등의 개발에 있어서 많은 장점을 가지고 있다. 특히 고분자 및 펩티드 등의 고리화를 통해 자기조립 양상, 유리 전이온도 및 분해속도를 조절할 수 있다.

[0003] 이중 빌딩블록의 자기조립은 제어가 어렵지만, 복잡성 및 다양성 면에서 여러 장점을 얻을 수 있다. 이러한 측면에서 자기조립성 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(peptide-oligonucleotide conjugates, POCs)는 지난 수년간 관심을 받아왔고, 세포배양물질, 약물전달, 안티센스효과 및 나노입자 기능화에 다양한 활용 가능성을 나타냈다.

[0004] 그러나, 자기조립성 POCs를 합성하기 위해서는 다음과 같은 문제들이 있다. 첫째 핵산과 펩티드는 서열에 따라 완전히 다른 물리적, 화학적 성질(melting temperature, solubility 등)을 보이며, 이들의 화학적 합성법이 서로 호환이 되지 않는 문제가 있다. 예를 들어 DNA는 펩티드의 고체 합성법에서 사용되는 강한 산성환경을 버틸 수 없는 문제가 있다. 두번째 종래 DNA와 펩티드 합성과정은 DNA와 펩티드가 연결되는 동안에, 펩티드의 자기조립 특성이 억제되어야 하는데, 이를 제어하는 것은 거의 불가능하며, 제어되지 않으면 수율이 현저히 낮아지는 문제들이 있다. 상술한 바와 같이 해결해야할 장벽의 높이 때문에, POCs 합성방법의 개발은 아직도 지지부진한 실정이다.

[0005] Morr 연구진에 의해 1999년에 고리형 POCs의 합성방법이 처음 개발되었다. 이후, Bleczynski에 의해 단백질 표면과 특이적으로 상호작용할 수 있는 물질을 개발하기 위해 고리형 POCs 라이브러리(library) 연구가 진행된 바 있다. 상기 고리형 POCs 합성방법은 측쇄기(side chain)에 보호기(protecting group)를 갖지 않거나, 산성에 약하지 않은 보호기를 갖는 한정된 아미노산과 매우 짧은 DNA에만 적용이 가능하며, 공정이 복잡하고 민감하여 반복재현이 어렵고, 비용이 높으며, 수율이 낮다는 등 다양한 문제들이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허 제10-2016-0136695호

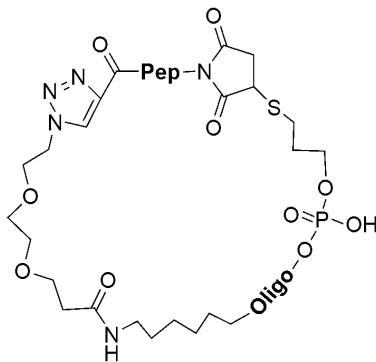
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 구조적 안정성과 DNA 이중 나선 결합력이 우수한 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체 및 이를 포함하는 자기조립체를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 대량으로 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법에 따라 제조된 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체 및 이의 적용가능한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 화학식 1로 표시되는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제공한다.
- [0011] [화학식 1]

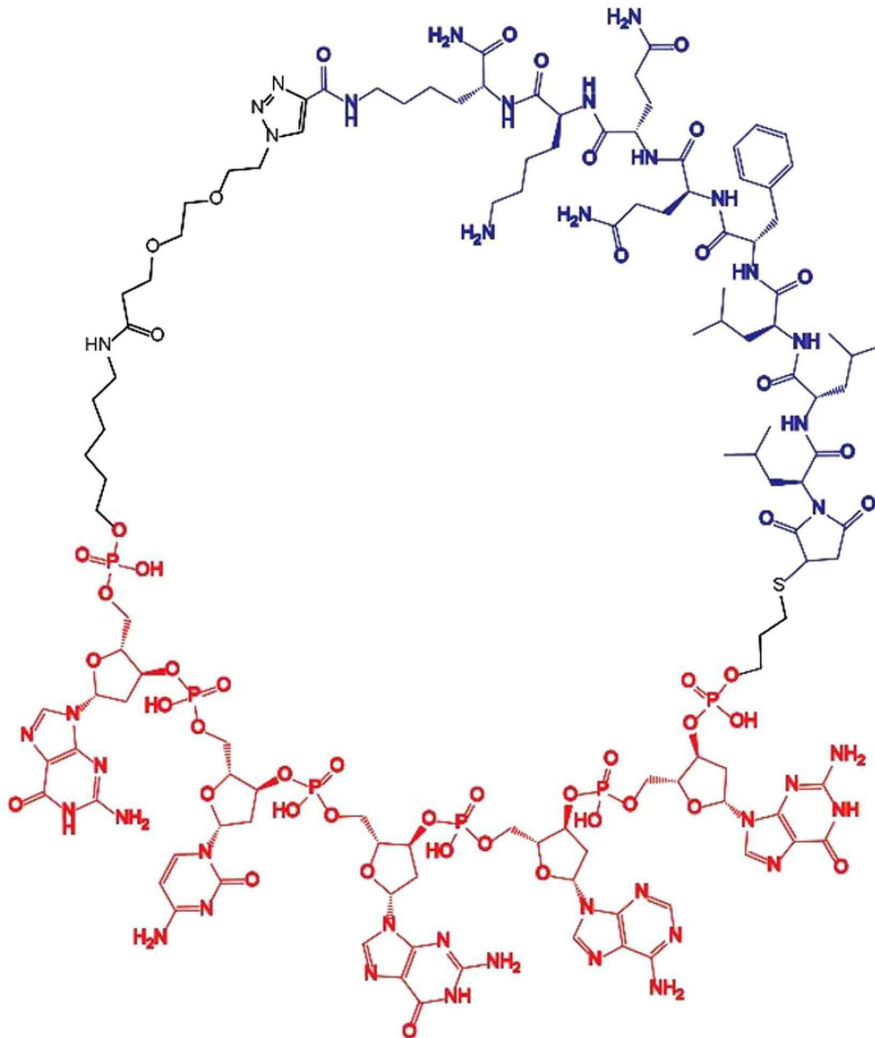


- [0012]
- [0013] 상기 화학식 1에서,
- [0014] 상기 Pep는 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 화학식 7로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로,
- [0015] [화학식 2]
- [0016] $-[X_1]_a-[X_2]_b-[X_3]_c-[X_4]_d-$
- [0017] [화학식 3]
- [0018] $-Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-$
- [0019] 상기 화학식 2 및 3에서,
- [0020] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.
- [0021] 상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 화학식 2에서 상기 X_1 은 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)이고, 상기 X_2 는 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_3 은 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_4 는 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)일 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 펩티드는 서열번호 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 5 내지 13 중에서 선택되는 어느 하나의 염기 서열로 표시되는 것일

수 있다.

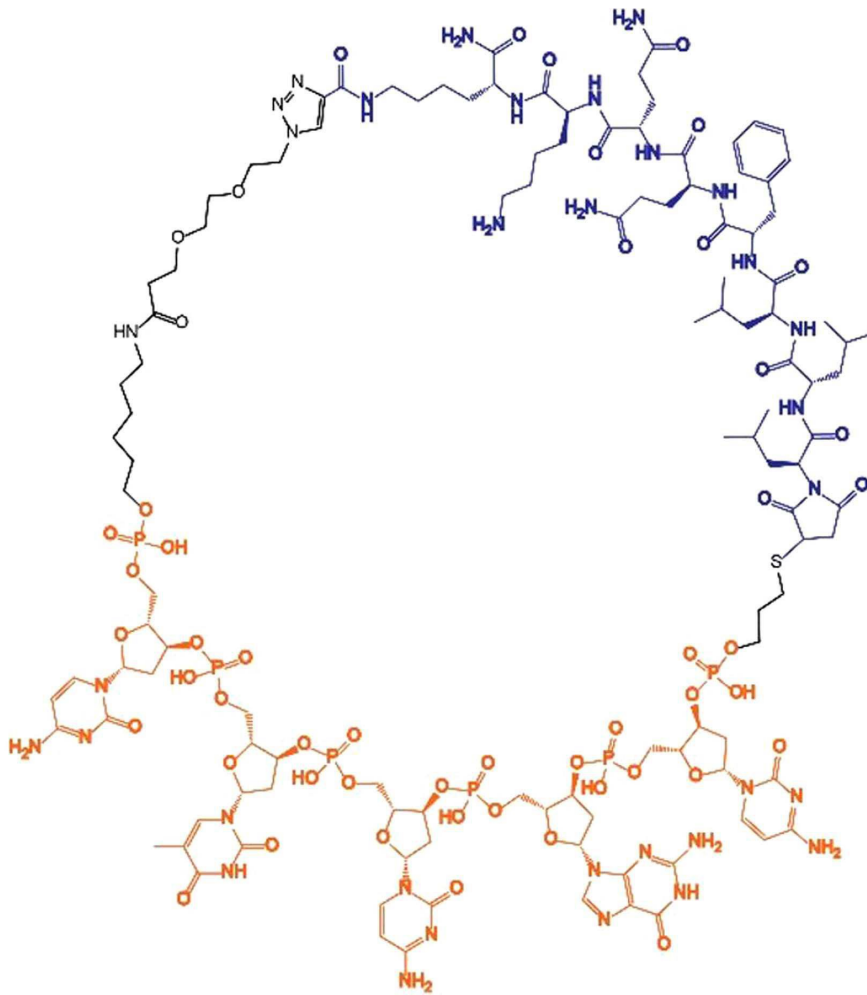
[0025] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 복합체는 하기 화학식 4 또는 화학식 5로 표시되는 것일 수 있다.

[0026] [화학식 4]



[0027]

[0028] [화학식 5]



[0029]

[0030] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 용액 상에서 자기조립체를 형성하는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체가 용액 상에서 자기조립되어 형성된 자기조립체를 제공한다.

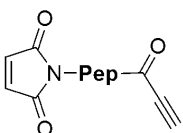
[0032] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 자기조립체는 평균 직경 10 내지 30 nm의 구형 미셀 형태 또는 소낭 형태일 수 있다.

[0033] 본 발명은 상기 다른 과제를 달성하기 위하여, 하기 단계를 포함하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0034] 1) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드와 화학식 7로 표시되는 펩티드를 혼합하여 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조하는 단계; 및

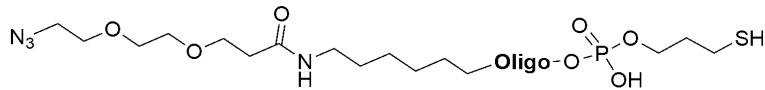
[0035] 2) 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 CuSO_4 , 아스코르브산 및 부탄올을 첨가하여 고리화하는 단계;를 포함한다.

[0036] [화학식 6]



[0037]

[0038] [화학식 7]



[0039]

[0040] 상기 화학식 6, 7에서,

[0041] 상기 Pep는 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로,

[0042] [화학식 2]

[0043] $-[X_1]_a-[X_2]_b-[X_3]_c-[X_4]_d-$

[0044] [화학식 3]

[0045] $-Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-$

[0046] 상기 화학식 2 및 3에서,

[0047] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.

[0048] 상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

[0049] 상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는, 1-a) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 DTT(dithiothreitol)를 처리하는 단계;를 통해 3' 말단에서 이황화 결합이 제거된 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드와 화학식 7로 표시되는 펩티드는 1 : 1-4 몰비로 혼합된 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 1) 단계에, 유기용매를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 유기용매는 에탄올, 메탄올, 이소프로필알콜, 부탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO), 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 헥산, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름 및 아세톤로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유기용매일 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 2) 단계에서, 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체, CuSO_4 , 아스코르브산의 당량비는 1 : 2-4 : 5-7 일 수 있다.

[0054] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 2) 단계는 불활성 분위기 하에서 수행될 수 있다.

[0055] 본 발명은 상기 또 다른 과제를 달성하기 위하여, 상기 제조방법으로 제조된 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제공한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명은 펩티드와 올리고뉴클레오타이드를 활용한 이중 빌딩블록의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체, 이를 포함하는 자기조립체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 특히, 이중 빌딩블록 구조인 자기조립성 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 효율적으로 제조할 수 있는 새로운 제조방법을 제공할 수 있다. 상술한 제조방법은 구조적으로 안정화된 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 저비용, 고수율 및 고순도로 제조할 수 있다.

[0057] 본 발명의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 용액 상에서 구조적으로 안정적이며, 균일한 크기와 형태를 갖는 자기조립체를 형성할 수 있다. 또한, 본 발명의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 안정적인 자기조립체의 형성을 통해, 상보적 서열을 갖는 대상물질에 특이적인 이중나선 형성 능력을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 자기조립체는 활성물질을 안정적으로 운반하는 전달체로 활용할 수 있으며, 상기 활성물질에 따라 다양한 질환의 치료 또는 검출 등에 다양하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 본 발명에 따른 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 자기조립체 구조 및 DNA 이중나선 형성 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 자기조립체 구조 및 DNA 이중나선 형성 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명에 따른 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 합성과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명에 따른 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 합성과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 5는 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1(적색 그래프) 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1(흑색 그래프)에 대한 RP-HPLC 결과 그래프이다.

도 6은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이다.

도 7은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이다.

도 8은 α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이다.

도 9는 α -키모트립신으로 처리된 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이다.

도 10은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 단편 구조를 도시한 것이다.

도 11은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1 및 α -키모트립신으로 처리된 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 단편 구조를 도시한 것이다.

도 12는 DNA-1, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 CD 스펙트럼이다.

도 13은 제조예 1로부터 제조된 Pep-1, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 CD 스펙트럼에서 동일한 DNA-1 농도의 스펙트럼을 뺀 결과 그래프이다.

도 14는 온도에 따른 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex)의 CD 스펙트럼이다.

도 15는 온도에 따른 LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex)의 CD 스펙트럼이다.

도 16은 온도에 따른 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)의 CD 스펙트럼이다.

도 17은 온도별 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex), LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)의 CD 스펙트럼 중에서 254 nm에서의 CD 값을 도시한 그래프이다.

도 18은 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex), LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)을 형광분석법으로 측정한 결과이다.

도 19는 온도에 따른 제조예 3으로부터 제조된 LinPOC-2에 대한 CD 스펙트럼이다.

도 20은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 자기조립의 AFM 이미지이다.

도 21은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 자기조립 AFM 이미지이다.

도 22는 자기조립된 L-duplex에 대한 AFM 이미지이다.

도 23은 자기조립된 L-duplex에 대한 AFM 이미지이다.

도 24는 자기조립된 C-duplex에 대한 AFM 이미지이다.

도 25는 자기조립된 C-duplex에 대한 AFM 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059]

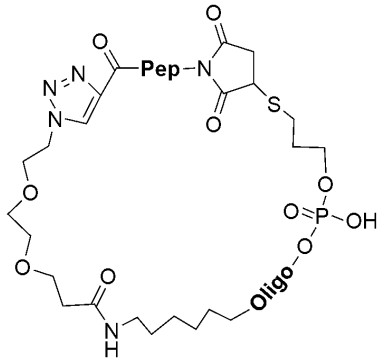
이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0060]

본 발명의 일 측면은 화학식 1로 표시되는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 관한 것이다. 본 발명의 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 올리고뉴클레오타이드와 펩티드를 포함하고, 상

기 올리고뉴클레오타이드와 펩티드는 티올-말레이미드 반응 및 구리-촉매화 아지드-알킨 고리화 첨가반응(cycloaddition)을 통해 결합하므로, 펩티드와 올리고뉴클레오타이드는 구조나 서열에 얽매이지 않으면서, 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 효율적으로 제조 및 제공할 수 있다는 장점을 갖는다.

[0061] [화학식 1]



[0062] 상기 화학식 1에서,

[0063] 상기 Pep는 하기 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0064] [화학식 2]

[0065] $-[X_1]_a-[X_2]_b-[X_3]_c-[X_4]_d-$

[0066] [화학식 3]

[0067] $-Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-$

[0068] 상기 화학식 2 및 3에서,

[0069] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.

[0070] 상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

[0071] 상기 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 4 내지 16 개, 바람직하게는 4 내지 10개, 더욱 바람직하게는 5 내지 8개, 가장 바람직하게는 7개의 아미노산으로 이루어진 펩티드;와 5개의 염기로 이루어진 올리고뉴클레오타이드;로 구성된 복합체일 수 있다. 상기 펩티드의 아미노산 개수가 상기 하한치 미만이거나 상기 상한치를 초과할 경우에는 고리형 구조를 형성할 수 없거나, 복합체 제조 자체가 어려워질 가능성이 높아진다.

[0072] 상기 화학식 2에서, 상기 X_1 은 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)이고, 상기 X_2 는 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_3 은 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_4 는 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)일 수 있다.

[0073] 상기 화학식 2에서 a, b, c 및 d는 해당하는 아미노산(X_1 , X_2 , X_3 및 X_4)이 각각 a, b, c, d개 결합된 것을 의미하는 것이고, 구체적으로 X_1 의 아미노산이 a개, X_2 의 아미노산이 b개 존재하는 것을 의미한다.

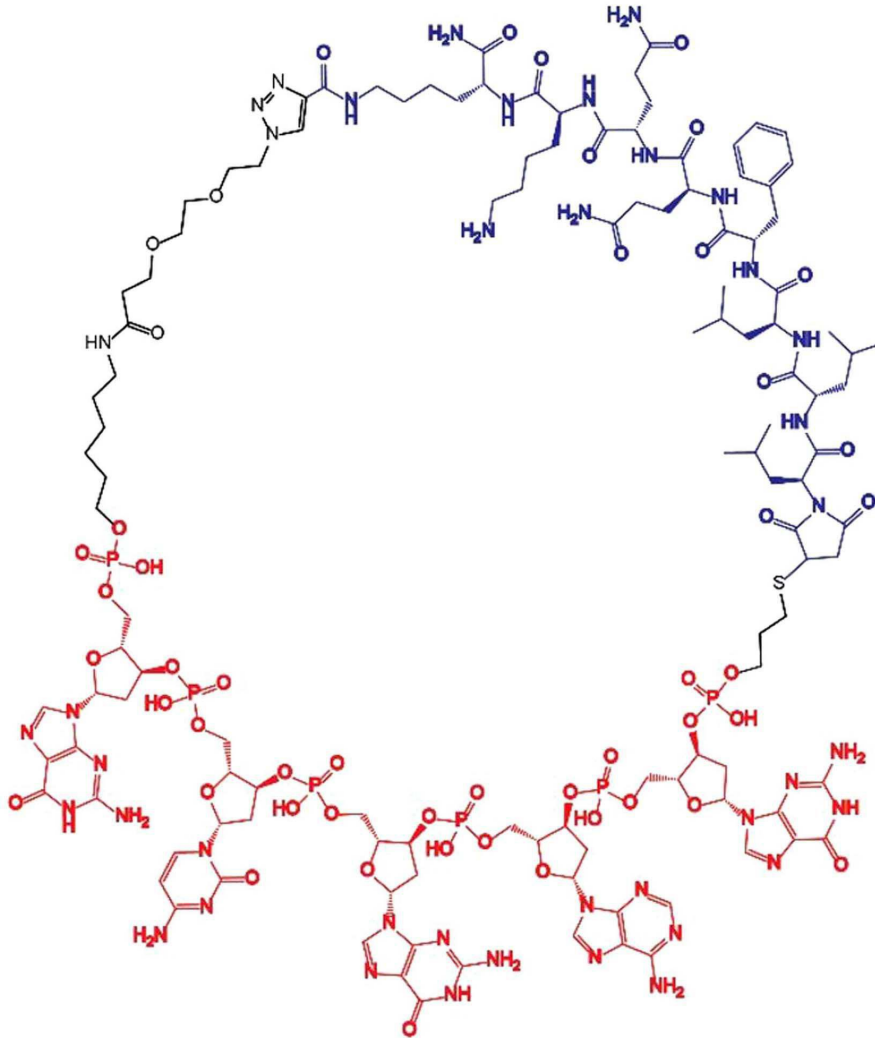
[0074] 상기 화학식 2에서 상기 a, b, c 및 d는 각각 독립적으로 1 내지 4 중에서 어느 하나의 정수일 수 있고, 바람직하게 a 및 d는 각각 독립적으로 2 내지 3 중에서 어느 하나의 정수이고, b 및 c는 각각 독립적으로 1 내지 2 중에서 어느 하나의 정수일 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 a, b, c 및 d의 합이 7 내지 9인 것일 수 있는데, 이를 위해 a 및 d 중에서 어느 하나가 3이면, 나머지 하나는 2인 것일 수 있다.

[0075] 상기 화학식 2로 표시되는 펩티드('Pep'라고도 한다)는 무작위 코일형태인 것으로, 서열번호 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 것일 수 있다.

[0077] 상기 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드('oligo'라고도 한다)는 서열번호 5 내지 13 중에서 선택되는 어느 하나의 염기 서열로 표시되는 것일 수 있는데, 바람직하게는 서열번호 5 또는 9로 표시되는 것일 수 있다.

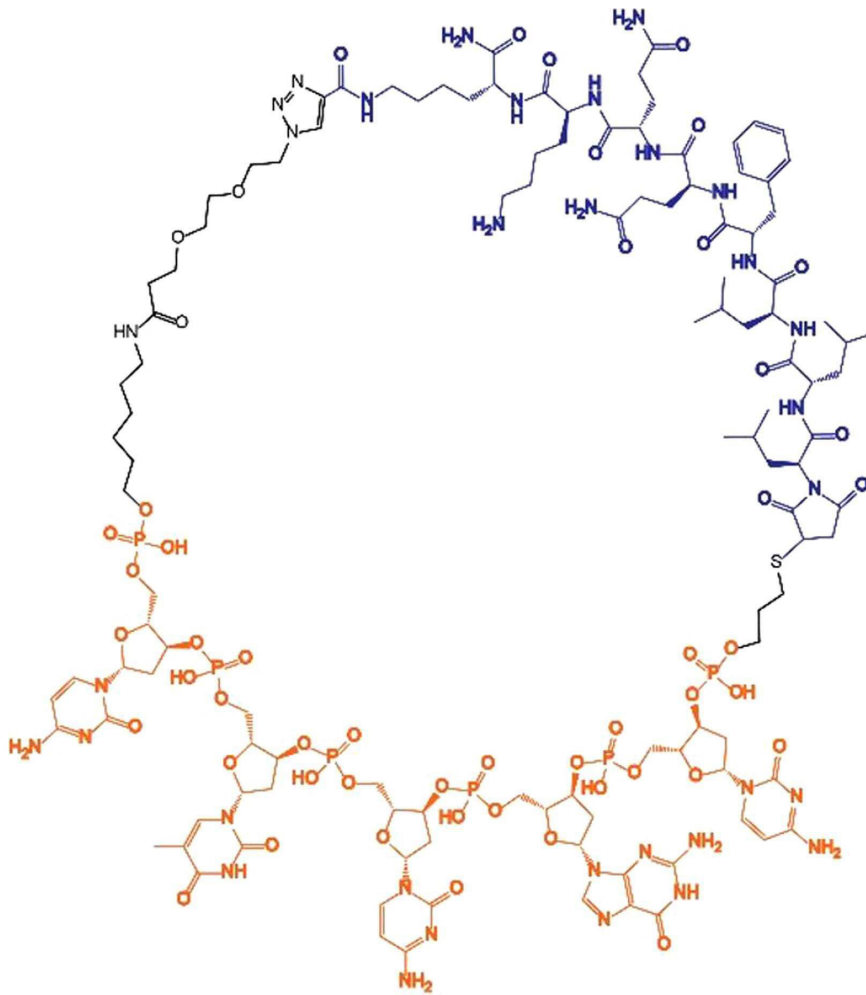
[0078] 상기 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 하기 화학식 4 또는 화학식 5로 표시되는 것일 수 있다.

[0079] [화학식 4]



[0080]

[0081] [화학식 5]



[0082]

[0083] 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체가 고리화됨에 따라, 전체 분자구조(conformation)에는 거의 영향이 없었으나, 자기조립 특성에는 많은 영향이 나타났다. 구체적으로 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 용액 상에서 자기조립체를 형성할 수 있는데, 상기 자기조립체는 평균 직경 10 내지 30 nm의 구형 미셀 형태 또는 소낭 형태인 것을 특징으로 한다(도 2). 이때, 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드와 상보적인 서열을 포함하는 핵산 분자와 이중나선을 형성하는 특성을 가지므로, 상보적 서열을 갖는 핵산 분자와 특이적으로 결합할 수 있다.

[0084] 이에 반해, 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체가 고리화되지 않은 선형의 경우에는, 섬유질의 원통형 미셀과 구형 미셀 형태가 혼재되어 있는 비균질 상태를 나타낸다(도 1).

[0085] 상기 자기조립체는 미셀 혹은 소낭 내부에 생물학적 활성물질을 담지할 수 있고, 이를 전달할 수 있으므로 전달체로써 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 올리고뉴클레오타이드와 상보적인 핵산 분자에 대한 특이적인 이중나선 형성 능력을 가지고 있으므로, 특정 핵산 분자에 대한 진단 또는 치료 또는 예방용 조성물 등으로 다양하게 적용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 일 측면은 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체가 용액 상에서 자기조립되어 형성된 자기조립체에 관한 것이다. 상기 자기조립체는 평균 직경 10 내지 30 nm의 구형 미셀 형태 또는 소낭 형태인 것으로, 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 상호작용을 통한 자기조립에 의해 형성되고, 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 존재하는 펩티드와 올리고뉴클레오타이드를 적절히 선택함으로써, 다양한 기능과 효과를 갖는 새로운 구조의 자기조립체를 제공할 수 있다. 게다가 대상 물질에 상보적인 특정 서열로 펩티드와 올리고뉴클레오타이드를 설계할 경우, 대상 물질에 대해 높은 선택성을 갖는 자기조립체를 얻을 수 있다.

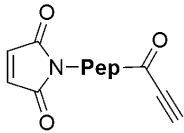
[0087] 그러므로, 이러한 본 발명의 자기조립체의 원리를 이용하여, 다양한 상호작용을 갖는 자기조립체를 제조 및 제공할 수 있고, 이를 전달체 또는 진단, 치료 또는 예방용 조성물이나 담체로 활용할 수 있다.

[0088] 본 발명의 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0089] 1) 화학식 6으로 표시되는 핵산과 화학식 7로 표시되는 펩티드를 혼합하여 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조하는 단계; 및

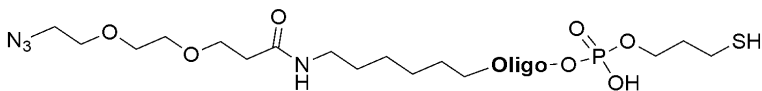
[0090] 2) 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 CuSO_4 , 아스코르브산 및 부탄올을 첨가하여 고리화하는 단계;를 포함한다.

[0091] [화학식 6]



[0092]

[0093] [화학식 7]



[0094]

[0095] 상기 화학식 6, 7에서,

[0096] 상기 Pep는 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0097] [화학식 2]

[0098] $-[X_1]_a-[X_2]_b-[X_3]_c-[X_4]_d-$

[0099] [화학식 3]

[0100] $-Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-$

[0101] 상기 화학식 2 및 3에서,

[0102] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.

[0103] 상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

[0104] 상기 화학식 2에서, 상기 X_1 은 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)이고, 상기 X_2 는 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_3 은 류신(L), 글루타민(Q) 또는 페닐알라닌(F)이며, 상기 X_4 는 라이신(K), 류신(L) 또는 글루타민(Q)일 수 있다.

[0105] 상기 화학식 2에서 a, b, c 및 d는 해당하는 아미노산(X_1 , X_2 , X_3 및 X_4)이 각각 a, b, c, d개 결합된 것을 의미하는 것이고, 구체적으로 X_1 의 아미노산이 a개, X_2 의 아미노산이 b개 존재하는 것을 의미한다.

[0106] 상기 화학식 2에서 상기 a, b, c 및 d는 각각 독립적으로 1 내지 4 중에서 어느 하나의 정수일 수 있고, 바람직하게 a 및 d는 각각 독립적으로 2 내지 3 중에서 어느 하나의 정수이고, b 및 c는 각각 독립적으로 1 내지 2 중에서 어느 하나의 정수일 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 a, b, c 및 d의 합이 7 내지 9인 것일 수 있는데, 이를 위해 a 및 d 중에서 어느 하나가 3이면, 나머지 하나는 2인 것일 수 있다.

[0107] 상기 화학식 2로 표시되는 펩티드('Pep'라고도 한다)는 서열번호 1 내지 4 중에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 것일 수 있다.

[0108] 상기 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드('oligo'라고도 한다)은 서열번호 5 내지 13 중에서 선택되는 어느 하나의 염기 서열로 표시되는 것일 수 있는데, 바람직하게는 서열번호 5 또는 9로 표시되는 것일 수 있다.

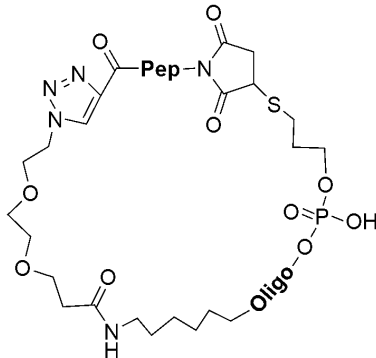
- [0109] 도 3, 4를 참고하여 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법을 보다 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0110] 먼저, 1) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드와 화학식 7로 표시되는 펩티드를 혼합하여 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조한다(도 3).
- [0111] 이때 상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는, 1-a) 화학식 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 환원제를 처리하는 단계;를 통해 3' 말단에서 이황화 결합이 제거된 것일 수 있다.
- [0112] 상기 환원제는 이황화 결합을 절단 혹은 제거할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 DTT(dithiothreitol), 2-Mercaptoethanol 및 TCEP(Tris(2-carboxyethyl) phosphine)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 환원제일 수 있고, 보다 바람직하게는 DTT(dithiothreitol)일 수 있다.
- [0113] 상기 1-a) 단계를 통해, 이황화 결합을 절단 혹은 제거함으로써, 화학식 7로 표시되는 펩티드의 말레이미드기와 결합할 수 있는 자유 티올기를 갖도록 할 수 있다.
- [0114] 상기 1-a) 단계는 1 내지 50 °C에서 10 내지 120 분 동안 수행될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 30 °C에서 30 내지 90 분 동안 수행될 수 있다.
- [0115] 또한, 상기 1) 단계의 화학식 6으로 표시되는 핵산과 화학식 7로 표시되는 펩티드는 1 : 1 내지 4 몰비로 혼합될 수 있고, 바람직하게는 1 : 1.5 내지 2.5 몰비일 수 있다. 만약 상기 하한치 미만인 경우 DNA와 펩티드의 결합 효율성이 떨어질 수 있으며, 상한치를 초과할 경우 펩티드의 자기조립 경향성이 너무 커져 무작위적인 응집이 발생하여 수율이 저하될 수 있다.
- [0116] 상기 1) 단계에, 유기용매를 더 포함할 수 있는데, 상기 유기용매는 상기 화학식 7로 표시되는 펩티드의 용해도를 증가시키면서 반응에는 영향을 미치지 않는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 에탄올, 메탄올, 이소프로필알콜, 부탄올, 디메틸설폭사이드(DMSO), 디메틸포름아미드(DMF), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 헥산, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름 및 아세톤으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유기용매일 수 있다.
- [0117] 상기 1) 단계를 통해서 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조하고, 다음 2) 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 CuSO_4 , 아스코르브산 및 부탄올을 첨가하여 고리화함으로써, 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 제조한다.
- [0118] 상기 2) 단계에서, 상기 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체, CuSO_4 , 아스코르브산의 당량비는 1 : 2-4 : 5-7 일 수 있다.
- [0119] 상기 2) 단계는 불활성 분위기 하에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0120] 최종적으로 3) 상기 2) 단계를 통해 합성된 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 분리 및 정제하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0121] 상기 분리 및 정제는 펩티드 분리 및 정제 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography), 여과(filtration) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 한외여과(Ultrafiltration), 양이온 교환 크로마토그래피(cation exchange chromatography) 및 RP-HPLC(Reverse phase-high performance liquid chromatography)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 분리 및 정제방법을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 RP-HPLC(Reverse phase-high performance liquid chromatography)(예를 들어, C4 역상(RP), C3 RP) 일 수 있다. 상기 RP-HPLC는 이온쌍 시약을 포함한 이동상으로 용출되는 방법일 수 있으며, 상기 이온쌍 시약은 피크 모양 및 유지 시간을 통제하기 위해서 아세토니트릴(acetonitrile) 또는 트리에틸암모늄 아세트산(triethylammonium acetate, TEAA)을 사용할 수 있다. 상기 이온쌍 시약은 증류수 중에 0.01 내지 1 M 트리에틸암모늄 아세트산을 포함한 것일 수 있다.
- [0122] 상술한 과정을 통해 상기 올리고뉴클레오타이드가 펩티드와 반응하여 복합체를 형성함으로써, 쉽게 훼손되는 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 향상시킬 수 있다. 즉 올리고뉴클레오타이드와 펩티드를 결합하여 고리형 구조의 복합체를 형성함으로써, 올리고뉴클레오타이드를 보호할 수 있다. 게다가 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 자발적으로 조립되어 자기조립체를 형성할 수 있다.
- [0123] 상술한 과정을 통해, 티올-말레이미드 반응과 구리-촉매화 아지드-알킨 고리화 첨가반응(cycloaddition)(CuAA

C)을 이용하여 자기조립성 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체를 간단한 공정을 통해 합성함으로써, 저비용, 고수율 및 고순도로 제공할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 자기조립성 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체의 제조방법은 수율이 90% 이상인 것으로, 본 발명의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-1)는 1번의 정제과정(HPLC)을 통해 90% 이상의 고수율을 달성할 수 있다는 장점을 갖는다.

[0124] 본 발명의 또 다른 측면은 제조된 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체에 관한 것이다.

[0125] 상기 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체는 화학식 1로 표시되는 자기조립 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체로, 이에 대한 설명은 상기에서 설명한 것과 실질적으로 동일하므로, 중복되는 설명은 생략하기로 한다.

[0126] [화학식 1]



[0127]

[0128] 상기 화학식 1에서,

[0129] 상기 Pep는 하기 화학식 2로 표시되는 펩티드이고, 상기 Oligo는 하기 화학식 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0130] [화학식 2]

[0131] $-[X_1]_a-[X_2]_b-[X_3]_c-[X_4]_d-$

[0132] [화학식 3]

[0133] $-Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-$

[0134] 상기 화학식 2 및 3에서,

[0135] 상기 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 각각 독립적으로 류신(L), 페닐알라닌(F), 글루타민(Q) 및 라이신(K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이고, a 내지 d는 1 또는 4 범위의 정수이다.

[0136] 상기 Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 및 Y_5 는 각각 독립적으로 디옥시아데노신 일인산, 디옥시구아노신 일인산, 디옥시티딘 일인산 및 디옥시사이티딘 일인산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오타이드이다.

[0137] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0138] **실험재료**

[0139] General Chemicals 및 Rink amide resin LL은 Merck(독일) 및 Fisher Scientific(미국)에서 구입하였다. 모든 아미노산과 커플링 시약은 AAPPTec(미국)에서 구입하였고, DNA(5'-azide-3'-thiol-modified)는 Bioneer(한국)에 의뢰하여 합성한 것을 사용하였다.

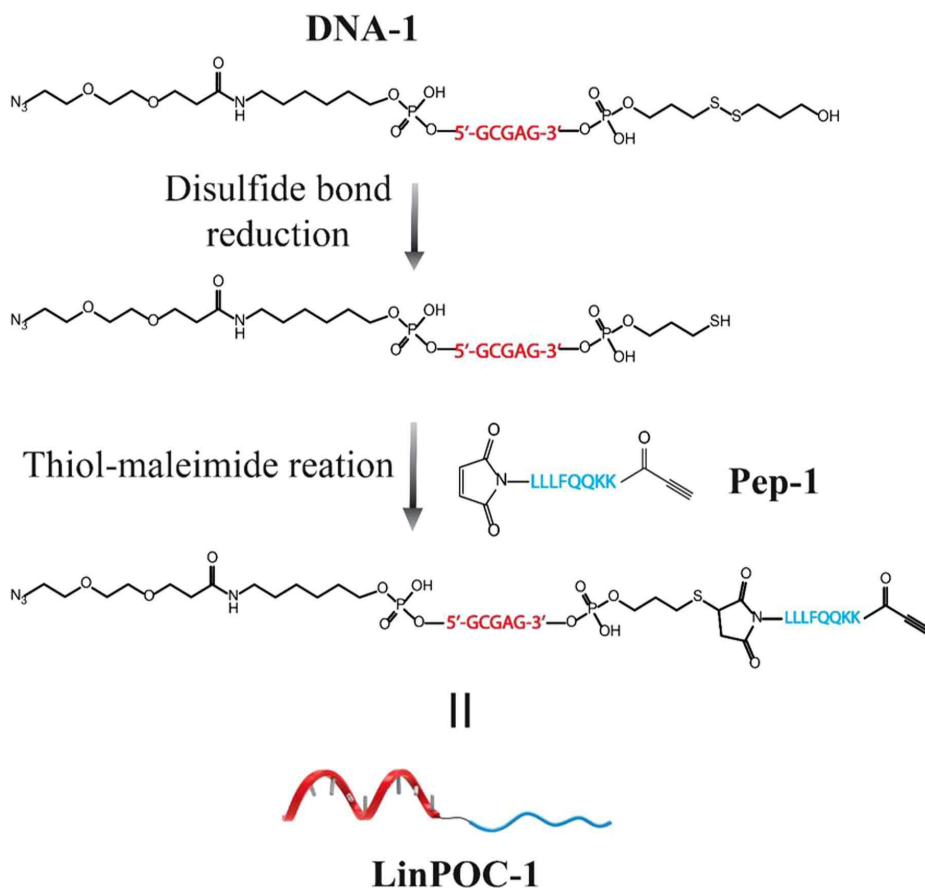
[0140] **제조예 1. 펩티드(Pep-1) 합성**

[0141] 상기 펩티드 AAFFQKK(Dde)(서열번호 1)는 표준 고체상 펩티드 합성 프로토콜에 따라 합성하였다. Fmoc(Fluorenylmethoxycarbonyl) 보호기는 20% 피페리딘(piperidine)이 용해된 N-methyl-2-pyrrolidone(NMP) 용액으로 15분 처리하여 탈보호하였다. 모든 아미노산은 HCTU(O-(1H-6-chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-

tetramethyluronium hexafluorophosphate) 4.5 equiv(relative to the resin)와 HOBt(1-hydroxybenzotriazole hydrate) 4.5 equiv 및 DIPEA(diisopropylethylamine) 10 equiv을 사용하여 20분 동안 커플링하였다. 아미노산은 커플링 5분 전에 미리 활성화한 후 사용하였다. 마지막 아미노산을 커플링한 후, 상기 Dde(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxacyclohexylidene)ethyl) 보호기를 Fmoc 보호기가 펩티드에 부착한 상태로, 1 M 하이드록시아민(hydroxylamine)과 0.75 M 이미다졸(imidazole)이 용해된 NMP 용액(3 ml)을 첨가하고 상온에서 밤새 교반하여 탈부착하였다. 상기 레진을 NMP와 MC(methylene chloride)로 세척하고, 다음으로 DIC(diisopropylcarbodiimide)(10 equiv)를 용해한 MC 커플링 시약을 사용하여 3시간 동안 프로피온산(propionic acid)(5 equiv) 커플링을 수행하였다. 레진을 다시 MC 및 NMP 용액으로 세척하고, 최종 Fmoc 보호기를 탈보호시킨 후, N-메톡시카보닐 말레이미드(N-methoxycarbonyl maleimide)(5 equiv)와 DIPEA(N,N-Diisopropylethylamine)(10 equiv)가 용해된 NMP를 레진에 첨가하여 밤새 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 상기 레진을 THF와 NMP로 세척하고 건조시켰다. 결사슬에 남아있는 보호기를 제거하고, 상기 레진에서 펩티드를 분리하기 위해, 절단카테일(TFA:증류수:TIS=95:2.5:2.5)을 첨가하고 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 TBME(tert-butyl methyl ether)를 사용하여 펩티드를 침전하였고, C4 컬럼을 사용한 RP-HPLC(Waters, USA)를 통해 정제하였다.

[0142] 제조예 2. 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(LinPOC-1) 제조

[0143] [반응식 1]



[0144]

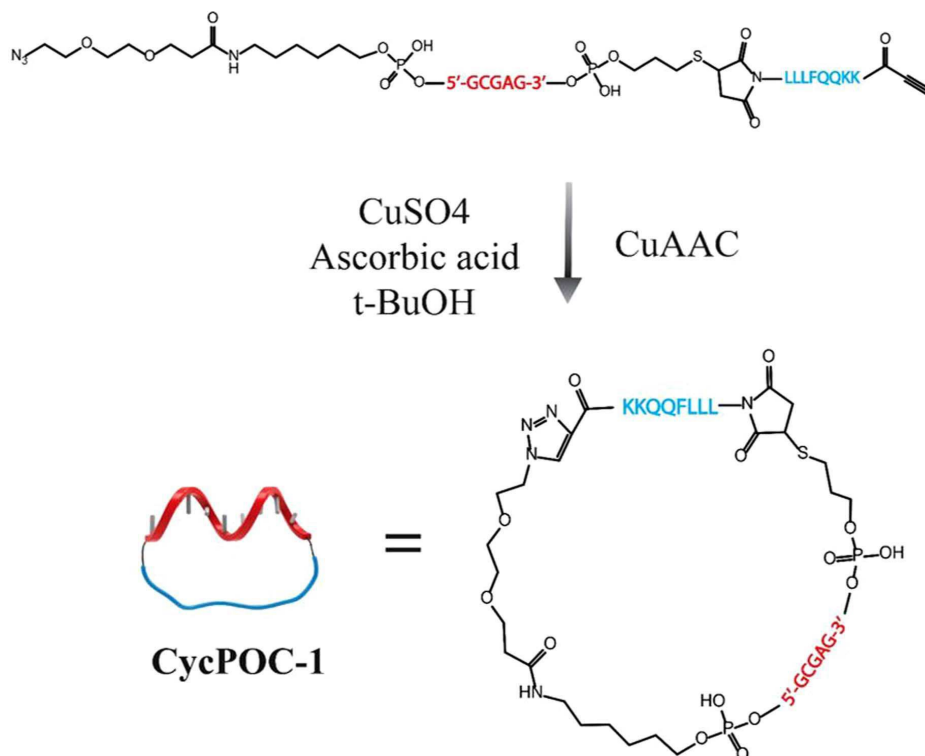
[0145] DNA-1은 GCGAG(서열번호 2)로 표시되며, 5'에는 아지드기가, 3'에는 이황화결합이 형성되어 있는 상태로 합성회사에 주문하여 제조된 것을 사용하였다. 상기 DNA-1(100 nmol)을 증류수에 분산시키고, DNA-1의 3' 말단에 이황화결합을 제거하기 위해 0.5 M DTT(dithiothreitol), 120 mM KPB의 혼합 용액(pH 7) 20 μ l를 처리하고 1시간 반응시켰다. 이후 EA(ethylacetate) 추출을 통해 DTT를 제거하였다. 제조예 1로부터 제조된 펩티드 분말(2 equiv, 200 nmol)을 DNA 용액에 넣어 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물에서 펩티드의 용해도를 증가시키기 위해 아세토니트릴(acetonitrile)(80 μ l)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 밤새 주위온도(ambient temperature)에서 교반한 후, 이온 페어링 시약(ion pairing reagent)인 TEAA를 사용하여 반분취(semipreparative) C4 컬럼으로 RP-HPLC를 진행하여 원하는 반응물을 분리시키고 MALDI-TOF MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)로 검정하였다.

[0146] **제조예 3. 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(LinPOC-2) 제조**

[0147] DNA는 CTCGC(서열번호 9)로 표시되며, 5'에는 아지드기가, 3'에는 이황화결합이 형성되어 있는 상태로 합성회사에 주문하여 제조된 것을 사용한 것을 제외하고 제조예 2와 모두 동일하게 하여 선형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(LinPOC-2)를 제조하였다.

[0148] **실시예 1. 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-1) 제조**

[0149] [반응식 2]



[0150]

[0151] 고리화를 위해, 정제하지 않은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1를 사용하였다.

[0152] 정제하지 않은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1(100 nmol)에 황산구리 5 수화물(100 mM 스톡 용액에서 3 μL) 3 equiv, 아스코르브산(ascorbic acid) 6 equiv(100 mM 스톡 용액에서 6 μL) 및 용매 400 μL (물 120 μL , MeCN 80 μL , t-부탄올 200 μL)를 첨가하였다. 이때, 라디칼에 의한 DNA 분해를 방지하기 위해 상기 반응은 불활성 분위기에서 수행되었고, 불활성 분위기를 위해 아르곤 가스(Ar)를 사용하여 O_2 를 제거하였다.

[0153] 다음, 상기 혼합물을 주위온도에서 밤새도록 방치하였다. 반응이 완료된 혼합물을 4 mL의 0.1 M TEAA(Triethylammonium acetate) 용액으로 희석하였다. 상기 혼합물로부터 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-1)를 정제하기 위해, 이온 페어링 시약인 0.1 M TEAA를 사용하여 RP-HPLC를 수행하여 원하는 생성물을 분리하였고, MALDI-TOF MS로 검증하였다. 그 결과 수율이 90% 이상인 것으로 확인되었다. 본 발명의 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-1)는 1번의 정제과정(HPLC)을 통해 90% 이상의 고수율을 달성하고 있음을 알 수 있다.

[0154] **실시예 2. 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-2) 제조**

[0155] 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 대신에 제조예 3으로부터 제조된 LinPOC-2를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 모두 동일하게 하여 고리형 펩티드-올리고뉴클레오타이드 복합체(CycPOC-2)를 제조하였다.

[0156] **실험예 1. LinPOC-1, CycPOC-1의 고리화 형성 여부 검증**

[0157] 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 형성유무를 RP-HPLC와 MALDI-TOF로 검증하였다. 또한, 고리화 형성 유무를 확인하기 위하여 서열 특이적 효소인 α -키모트립신(α -chymotrypsin)으로 처리한 후 MALDI-TOF로 분석하였다. 고리화 확인과정은 구체적으로 다음과 같다. 물에 10 mg/ml의 농도로 용해된 α -키모트립신 용액을 제조하고, 여기에 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-

1 용액에 α -키모트립신 용액의 농도가 1 mg/ml가 되도록 첨가한 후, 밤새 반응시킨 다음, 이를 MALDI-TOF로 분석하였다.

[0158] 도 5는 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1(적색 그래프) 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1(흑색 그래프)에 대한 RP-HPLC 결과 그래프이다.

[0159] 도 5에 나타난 바와 같이, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1은 효율적으로 펩티드와 올리고뉴클레오티드가 접합되어 복합체를 형성하고 있음을 알 수 있다. 본 발명의 화학식 2로 표시되는 펩티드는 높은 소수성과 자기조립 특성을 가지므로 수용액에서 낮은 용해도를 갖는데, 이를 해결하기 위하여 적정 유기용매의 적가를 통해 펩티드를 수용액 내에 어느 정도 용해되도록 해준다면 펩티드와 올리고뉴클레오티드의 결합반응을 통해 불량한 용해도 문제를 극복할 수 있음을 알 수 있다. 상기 유기용매로는 아세토니트릴(acetonitrile, MeCN)이 가장 바람직하다.

[0160] 또한, 티올-말레이미드 반응을 통해 선형의 POC를 형성하고, 이후 Cu(II) 촉매, 아스코르브산 및 t-부탄올을 혼합함으로써, 고리화 첨가반응시켜 고리형 POC를 제조하였다. 이는 도 5를 통해 확인할 수 있다.

[0161] 구체적으로 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1(적색 그래프)의 머무름 시간(retention time)(T_R = 32.1 분)과 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1(흑색 그래프)의 머무름 시간(retention time)(T_R = 31.4 분)이 서로 상이하며, 이러한 머무름 시간의 차이는 전반적인 형태가 상이함을 의미한다. 즉 선형 구조에서 고리형 구조로 성공적으로 변화하였음을 알 수 있다.

[0162] 도 6은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이며, 도 7은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이며, 도 8은 α -chymotrypsin으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이며, 도 9는 α -chymotrypsin으로 처리된 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 MALDI-TOF 스펙트럼이다. 도면에서 매트릭스(matrix)는 3-HPA(3-hydroxypicolinic acid)이다.

[0163] 도 6 및 7에 따르면, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1(3195 Da)과 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1(3192 Da)은 동일한 분자량을 갖는 것으로 확인되었다. 다만 머무름 시간의 경우, 간혹 오류를 갖고 있기 때문에 보다 정확한 측정을 위해, 방향족 아미노산의 C말단 쪽의 펩티드 결합을 분해하는 α -키모트립신을 사용한 다른 분석을 수행하였다.

[0164] 도 8 및 9에 따르면, α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1과 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1은 MALDI-TOF 스펙트럼에서 상이함을 확인하였다. α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1과 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1로부터 얻을 수 있는 각각의 단편 예상 구조와 분자량이 MALDI-TOF 스펙트럼의 결과와 일치함을 확인하였다.

[0165] α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1과 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 MALDI-TOF 스펙트럼을 비교하면, 서로 공통된 피크가 없음을 알 수 있다. 즉 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1은 고리화 구조를 성공적으로 형성하고 있음을 알 수 있다.

[0166] 도 10은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 α -키모트립신으로 처리된 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 단편 구조를 도시한 것이고, 도 11은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1 및 α -키모트립신으로 처리된 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 단편 구조를 도시한 것이다. 이에 따르면, 선형과 고리형 구조 차이로 인해, α -키모트립신의 처리를 통해 얻을 수 있는 단편의 구조가 상이함을 알 수 있고, 이는 MALDI-TOF 스펙트럼 결과를 통해서도 확인하였다(피크 상이함). 즉 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1은 고리형 구조를 성공적으로 형성하고 있음을 알 수 있다.

[0167] 실험예 2. LinPOC-1, CycPOC-1의 입체구조 분석

[0168] LinPOC-1, CycPOC-1의 입체구조를 분석하기 위하여 CD 분광법을 사용하였다. 상기 CD 분광법은 Peltier 온도 조절기가 구비된 Chiralscan circular dichroism spectrometer(Applied Photophysics., Ltd, UK)를 사용하여 수행하였다. CD 스펙트럼은 2 mm 경로길이(pathlength)를 갖는 큐벳(cuvette)을 사용한 190 nm 내지 300 nm를 기록하였다. 이때, 20 °C 하에서 LinPOC-1, CycPOC-1을 각각 증류수에 용해(20 μ M, 250 μ l)한 후 CD 분광법으로 분석하였다.

[0169] 도 12는 DNA-1, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 CD 스펙트럼이다.

[0170] 도 12에 따르면, 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 전체 CD 스펙트럼은 비

슷한 패턴을 나타내었다. 그러나 제조에 2로부터 제조된 LinPOC-1(204 nm) 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1(202 nm)의 최소값은 약간의 차이를 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 차이는 앞서 관찰한 HPLC 결과와 일치하는 것이다.

[0171] 도 13은 제조에 1로부터 제조된 Pep-1, 제조에 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 CD 스펙트럼에서 동일한 DNA-1 농도의 스펙트럼을 뺀 결과 그래프이다. 용매와 농도는 각 시료(물, 20 μ M)에 동일하게 사용하였다.

[0172] 고리화의 경우, 종종 펩티드의 입체구조(conformation)에 변화를 줄 수 있기 때문에, 펩티드에 대한 CD 스펙트럼을 비교하고자 하였다. 이를 위해 제조에 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에 대한 CD 스펙트럼에서 DNA의 기여(contribution)를 없애고, 펩티드만의 입체구조(conformation)를 관찰하고자 하였다. 도 13에 나타난 바와 같이 제조에 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1에서 펩티드의 입체구조는 무작위 코일형태로 동일한 것으로 여겨지며, 즉 고리화가 펩티드 형태에는 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

[0173] 실험예 3. LinPOC-1, CycPOC-1의 DNA 이중나선 형성 능력(DNA duplex formation capability) 분석

[0174] CD 분광법과 형광 분광법을 사용하여 Watson-Crick 염기쌍에 의한 제조에 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 DNA 이중 형성 능력을 평가하였다.

[0175] 구체적으로, DNA-1(서열번호 5:GCGAG)와 상보적인 DNA-2(서열번호9:CTCGC)를 사용하여 제조에 3의 LinPOC-2, 실시예 2의 CycPOC-2를 제조하였다. 완충액에 서로 상보적인 대응물(DNA-1과 DNA-2, LinPOC-1과 LinPOC-2 및 CycPOC-1과 CycPOC-2)을 동일 물량으로 혼합하고, DNA 이중나선(DNA-only-duplex), L-duplex(LinPOC-1/LinPOC-2) 및 C-duplex(CycPOC-1/CycPOC-2)를 형성하기에 충분한 반응시간을 제공하였다.

[0176] 온도에 따른 CD 스펙트럼 변화를 분석하기 위하여, 동일 물량으로 혼합한 대응물(DNA-1과 DNA-2, LinPOC-1과 LinPOC-2 및 CycPOC-1과 CycPOC-2) 각각을 준비하고, 이를 10 mM Tris(150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 8)의 300 μ l에서 혼합하였다. 이후 상기 혼합물을 CD 조사를 이전에 밤새 배양하고, 상기 온도를 4 $^{\circ}$ C에서 54 $^{\circ}$ C까지 1분마다 1 $^{\circ}$ C씩 증가시키면서 CD 스펙트럼을 측정하였다.

[0177] 형광 분석법은 다음과 같이 수행하였다. CD 스펙트럼과 동일한 조건으로 시료를 준비하고, 물에 용해된 EtBr을 시료에 최종 농도 20 μ M까지 첨가한 후, 상기 혼합물을 형광 측정 전에 1 시간 동안 방치한 다음, 형광 스펙트럼을 측정하였다. 여기파장은 520 nm이고, 형광 스펙트럼은 550 nm에서 750 nm까지 분석하였다.

[0178] DNA의 입체구조 변화는 CD 스펙트럼 상에서 매우 민감하게 나타난다. 또한 DNA 이중나선(duplex)은 온도 증가에 따라 단일가닥으로 구조가 풀리는데, 이는 CD 스펙트럼에 변화를 야기한다. 따라서 온도변화에 따른 CD 스펙트럼 결과 변화를 통해 DNA 이중나선(duplex) 형성 정도를 분석하고자 하였다. 구체적으로 DNA 이중나선(duplex)을 완전히 형성하고 있다면, 온도가 증가할수록 CD 스펙트럼이 크게 변화할 것이고, DNA 이중나선(duplex)이 일부만 형성되어 있다면 CD 스펙트럼의 변화가 크지 않을 것이다.

[0179] 도 14는 온도에 따른 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex)의 CD 스펙트럼이고, 이에 따르면, DNA-1, DNA-2의 혼합에 의해 형성된 DNA 이중나선(DNA-only-duplex)은 208 nm 및 254 nm에서 음성밴드, 280 nm에서 양성밴드를 갖는 전형적인 B-구조임을 확인하였다.

[0180] 도 15는 온도에 따른 LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex)의 CD 스펙트럼이며, 도 16은 온도에 따른 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)의 CD 스펙트럼이다. 도 15 및 도 16에 따르면, LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)에 대한 CD 스펙트럼은 DNA 이중나선(DNA-only-duplex)과 거의 동일한 최소 및 최대값을 나타내었다. 즉 LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)은 B-형태가 존재함을 알 수 있다.

[0181] 다만, 온도가 증가함에 따라, CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)의 CD 스펙트럼(240 nm ~ 300 nm)은 낮은 변화가 나타났으나, LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex)의 CD 스펙트럼은 큰 변화를 나타냈다.

[0182] 도 17은 온도별 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex), LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)의 CD 스펙트럼 중에서 254 nm에서의 CD 값을 도시한 그래프로, 이에 따르면 C-duplex는 온도 변화에 따라 254nm에서 CD 값의 변화량이 L-duplex보다 낮았다. 이를 통해, C-duplex가 L-duplex보다 DNA 이중나선을 유의미하게 더 적게 형성함을 알 수 있다.

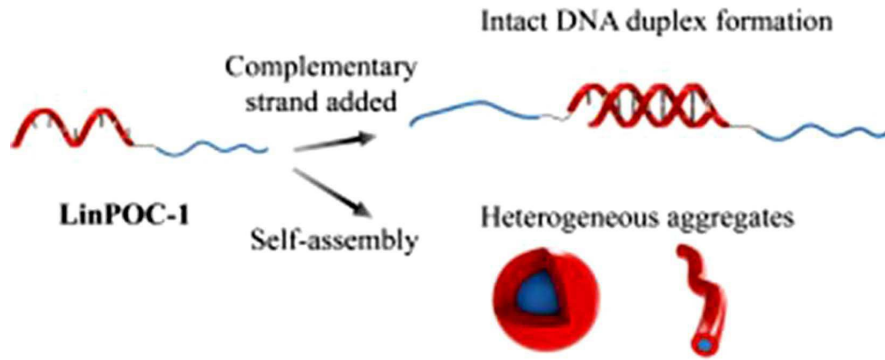
- [0183] 도 18은 DNA-1/DNA-2(DNA-only-duplex), LinPOC-1/LinPOC-2(L-duplex) 및 CycPOC-1/CycPOC-2(C-duplex)을 형광분석법으로 측정한 결과로, 이에 따르면 C-duplex는 L-duplex보다 EtBr의 형광이 더 적게 관찰됨을 확인하였다. 이는 도 17의 결과와 일치하는 것이다.
- [0184] 도 18의 형광강도는 DNA 염기쌍 사이에 EtBr이 삽입될 때 극적으로 증가하므로, 형광강도를 통해 DNA 이중나선(duplex)의 형성정도를 알 수 있다. 구체적으로 DNA 이중나선 형성정도가 증가할수록 EtBr의 형광 강도가 증가하고, DNA 이중나선(duplex)의 형성정도가 감소할수록 EtBr의 형광 강도가 낮아진다.
- [0185] C-duplex의 형광강도가 L-duplex의 형광강도보다 더 낮음을 확인한 바, C-duplex는 L-duplex 보다는 다소 낮으나, 우수한 DNA 이중나선(duplex) 형성 특성을 가지고 있음을 알 수 있다.
- [0186] 보다 정확한 비교를 위해, 단일가닥(single-stranded) POCs인 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 형광강도를 측정하였다. 그 결과 단일가닥(single-stranded)인 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1에서는 EtBr의 형광강도가 관찰되지 않았다. EtBr의 형광강도를 통해 DNA 이중나선 형성정도를 확인할 수 있음을 다시 한번 검증하였고, C-duplex는 L-duplex보다는 적으나 염기쌍 형성을 통한 이중나선을 효율적으로 형성하고 있음을 알 수 있다.
- [0187] 도 19는 온도에 따른 제조예 3으로부터 제조된 LinPOC-2에 대한 CD 스펙트럼이다. 상기 LinPOC-2 시료는 10 mM Tris 완충액(pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂)에 용해한 것을 사용하였다. 상기 LinPOC-2의 농도는 15 μ M이다.
- [0188] 도 19에 나타난 바와 같이 LinPOC-2 단독만 존재하는 경우에는 온도 증가에 따른 CD스펙트럼의 변화가 관찰되지 않음을 알 수 있다.
- [0189] **실험예 4. LinPOC-1, CycPOC-1의 자기조립 분석**
- [0190] 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1을 원자힘 현미경(AFM)으로 촬영하여 자기조립 여부를 확인하였다. 우선 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1를 각각 30 μ M 농도로 물에 용해하고, 초음파 처리한 후, 자기조립되도록 밤새 방치하였다. AFM 분석전에 LinPOC-1, CycPOC-1의 최종농도가 5 μ M이 되도록 각각 희석하였다. 새로 절단된 운모(mica) 상에 LinPOC-1, CycPOC-1을 로딩하고, 건조시켰다. AFM 이미지를 비접촉모드로 촬영하였다.
- [0191] 도 20은 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 자기조립의 AFM 이미지이고, 도 21은 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 자기조립 AFM 이미지이다.
- [0192] 도 20에 따르면 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 자기조립체는 구형 또는 섬유형태가 혼재되어 형성됨을 알 수 있다. 상기 구형 자기조립체와 섬유형 자기조립체의 평균 직경은 약 20 nm로 유사하였다. 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1의 모노머 평균 직경이 약 10 nm인 점을 고려하면 구형 자기조립체는 미셀형태이고, 섬유형 자기조립체는 원통형 미셀인 것으로 여겨진다.
- [0193] 도 21에 따르면 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1의 자기조립체는 구형 자기조립체만이 균질하게 형성되어 있음을 확인하였다. 이의 평균 직경은 약 22 nm로, LinPOC-1의 자기조립체보다 약간 더 크다.
- [0194] **실험예 5. LinPOC-1, CycPOC-1의 이중나선 자기조립 형성여부**
- [0195] 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1을 원자힘 현미경(AFM)으로 촬영하여 자기조립 여부를 확인하였다. 우선 제조예 2로부터 제조된 LinPOC-1 및 실시예 1로부터 제조된 CycPOC-1를 각각 30 μ M 농도로 증류수에 용해하고, 초음파 처리한 후, 자기조립되도록 밤새 방치하였다. AFM 분석전에 LinPOC-1, CycPOC-1의 최종농도가 5 μ M이 되도록 각각 희석하였다. 새로 절단된 운모(mica) 상에 LinPOC-1, CycPOC-1을 로딩하고, 건조시켰다.
- [0196] 이중나선(duplex)을 확인하기 위해, 상기 LinPOC-1(제조예 1)의 자기조립체 및 CycPOC-1(실시예 1)의 자기조립체가 포함된 독립적인 용액에 각각 상보적인 LinPOC-2(제조예 2)와 CycPOC-2(실시예 2)를 동일한 몰량으로 각각 혼합한 후, 상기 혼합물을 밤새 배양하여, L-duplex(LinPOC-1/LinPOC-2)와 C-duplex(CycPOC-1/CycPOC-2)를 제조하였다. 상기 L-duplex와 C-duplex를 각각 5 μ L 씩 채취하여, 새로 절단된 운모(mica) 상에 로딩하고, 건조시킨 뒤, AFM 이미지를 비접촉모드로 촬영하였다.
- [0197] 도 22 및 도 23은 자기조립된 L-duplex에 대한 AFM 이미지이고, 도 24 및 도 25는 자기조립된 C-duplex에 대한 AFM 이미지이다.

[0198]

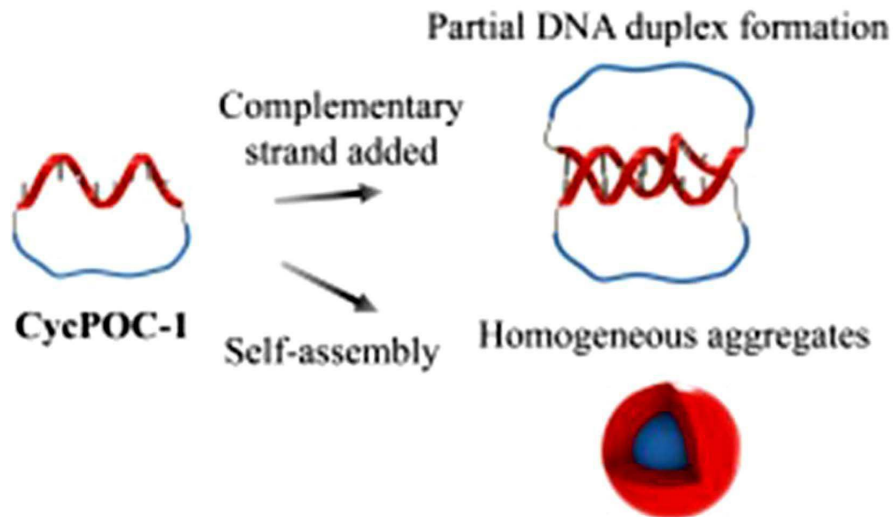
도 22 내지 도 25에 나타난 바와 같이, L-duplex는 고도로 조밀한 구조의 자기조립체를 형성한 반면, C-duplex는 느슨하고 덜 연관된 구조의 자기조립체를 형성하였다. 선형 또는 고리형의 입체구조로 인해 L-duplex와 C-duplex의 이중나선 형성에 차이가 생겼고, 이것이 L-duplex와 C-duplex의 자기조립에도 영향을 끼친 것으로 보인다.

도면

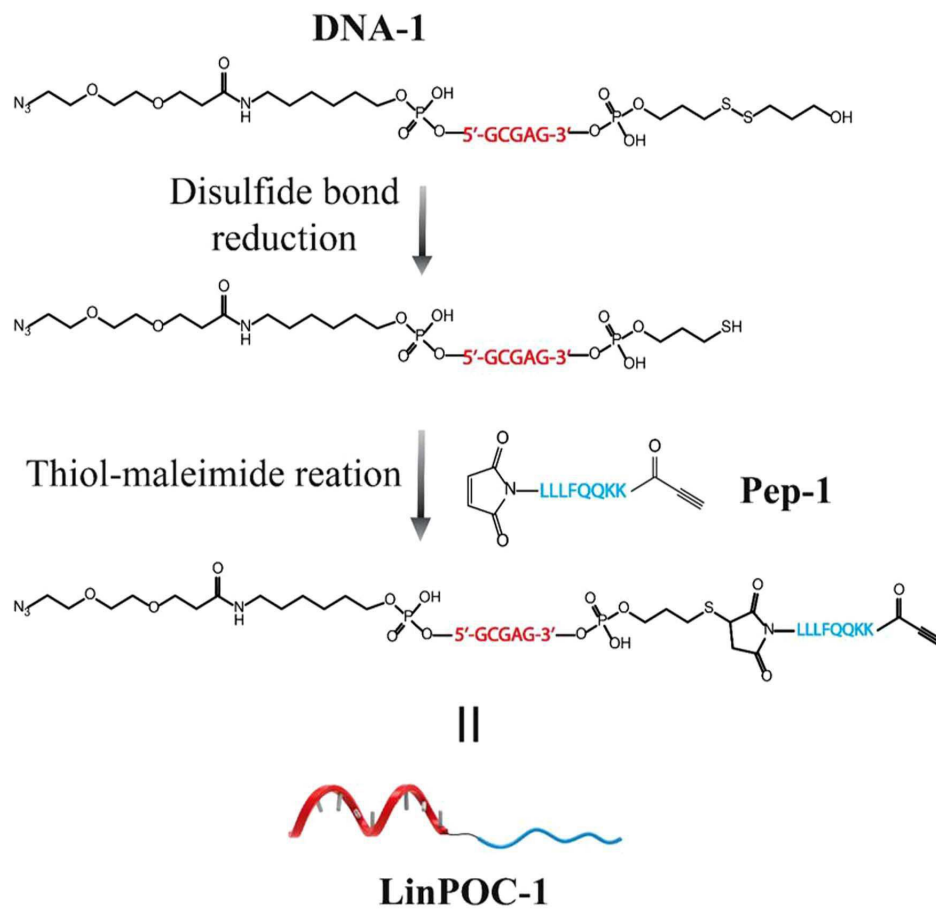
도면1



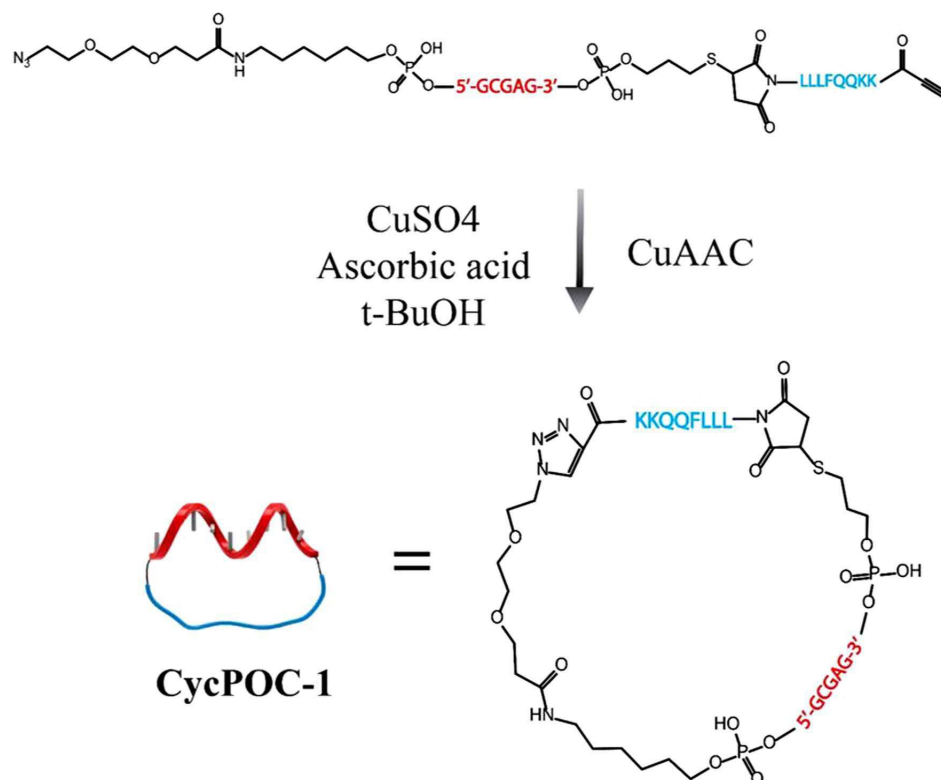
도면2



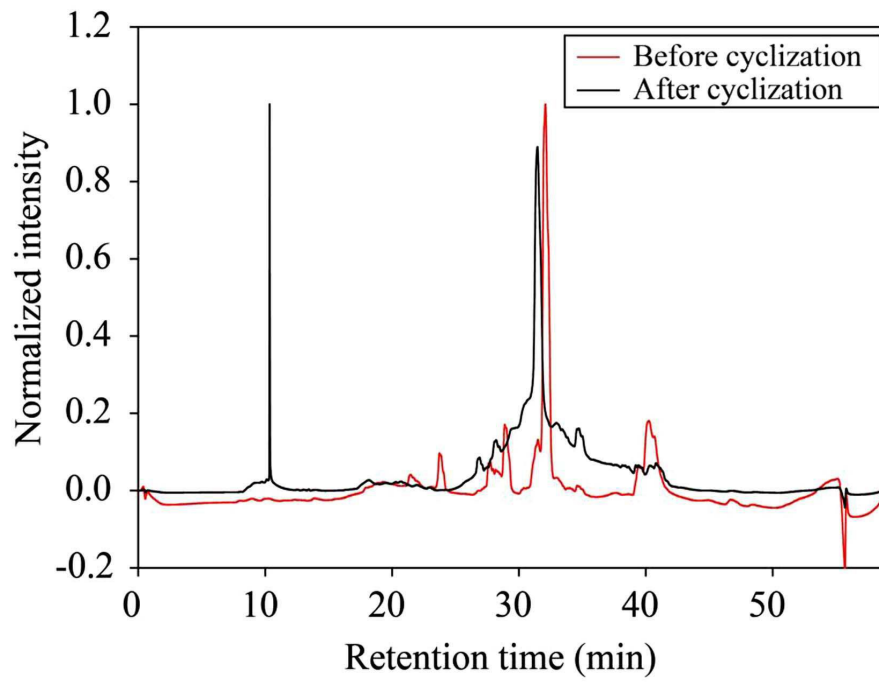
도면3



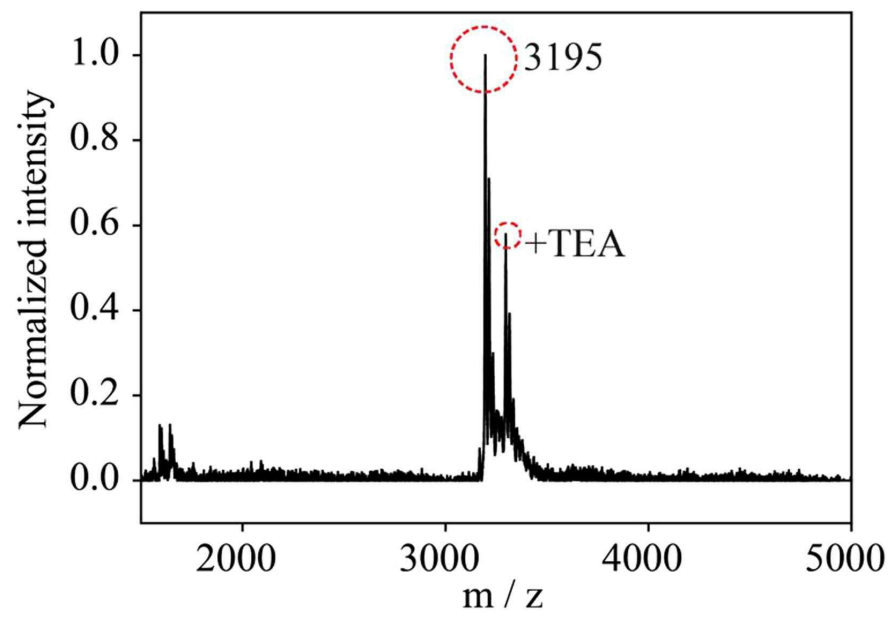
도면4



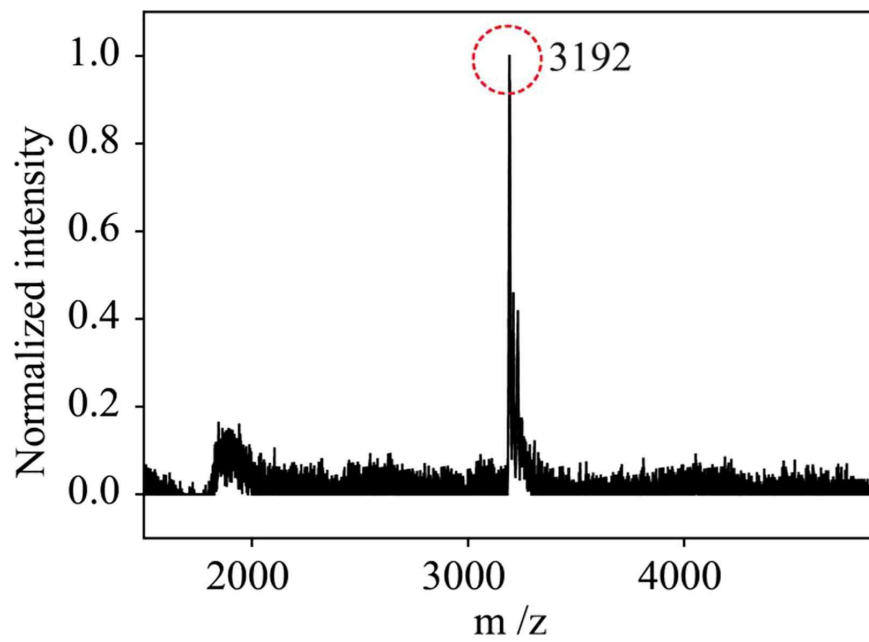
도면5



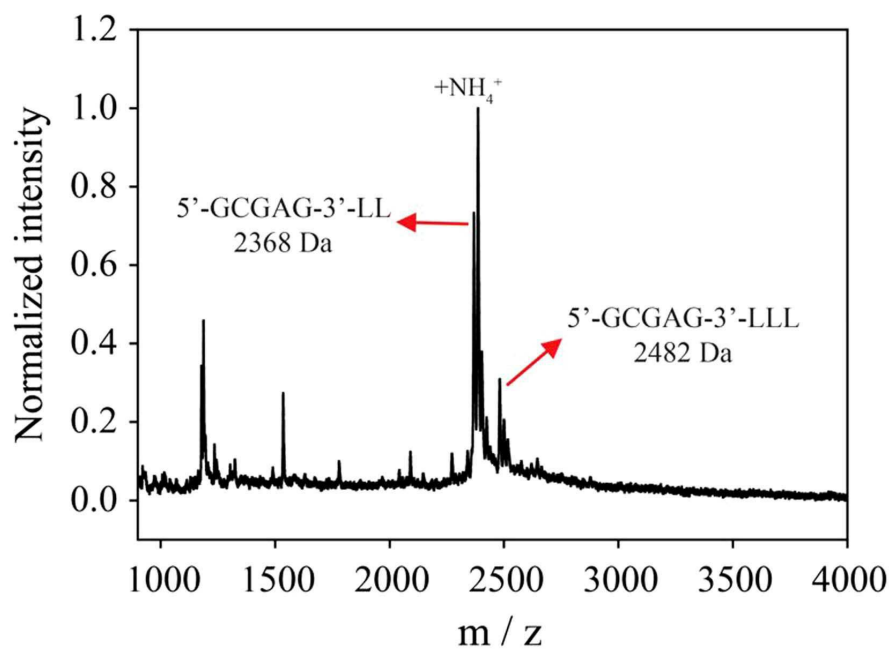
도면6



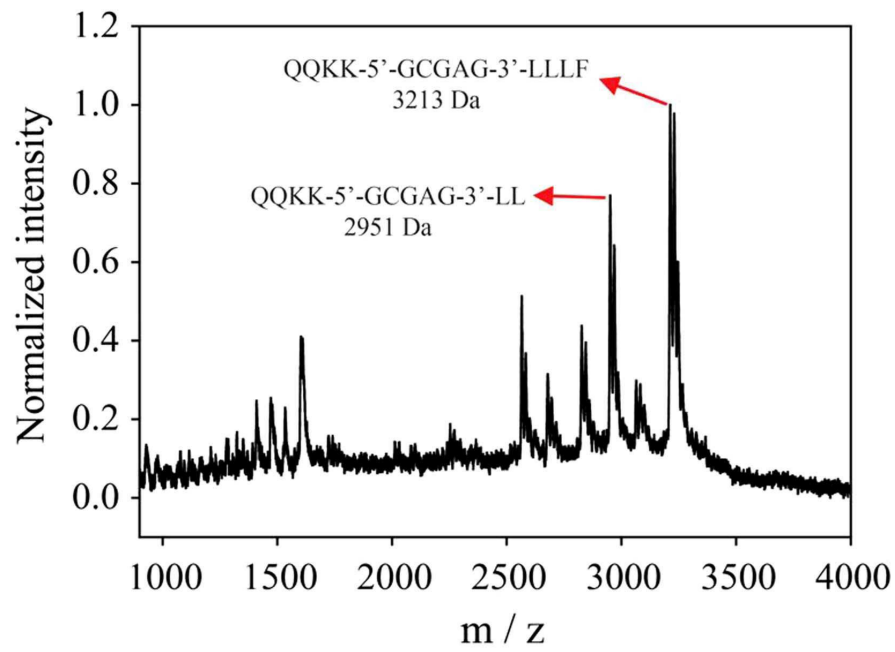
도면7



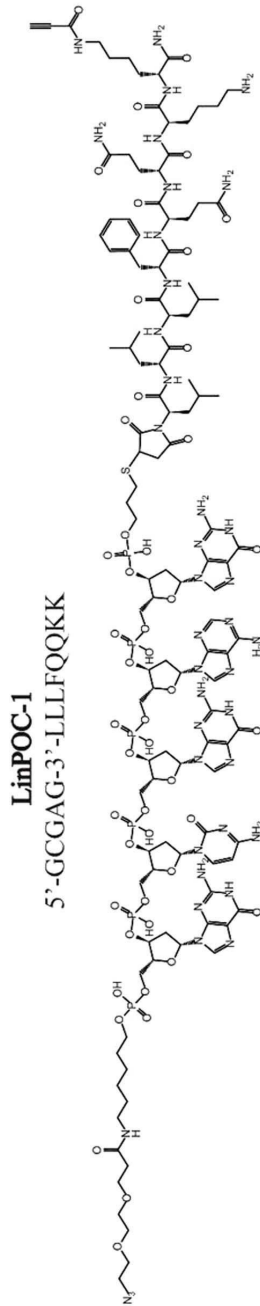
도면8



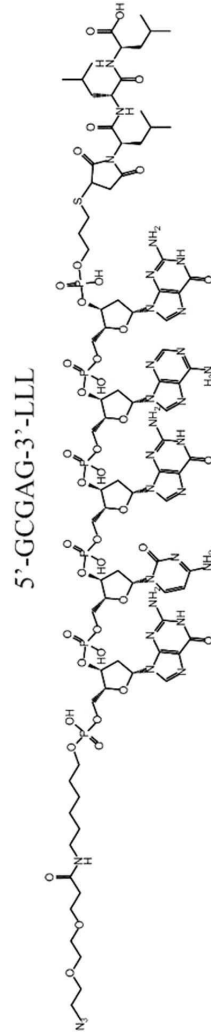
도면9



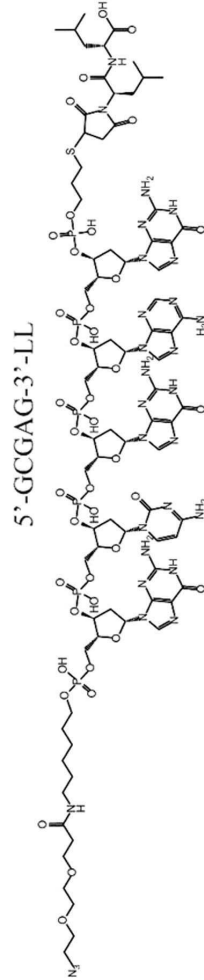
도면10



Molecular weight: 3194.89



Molecular weight: 2484.05



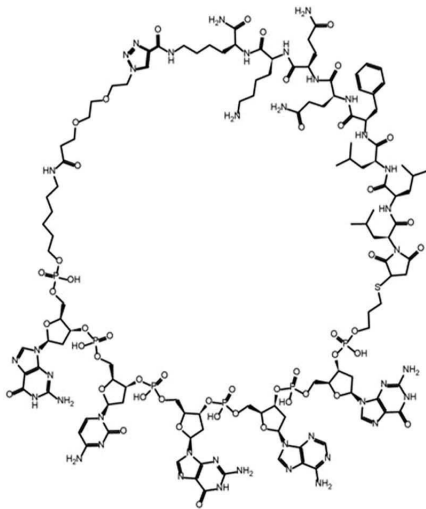
Molecular weight: 2370.89

도면11

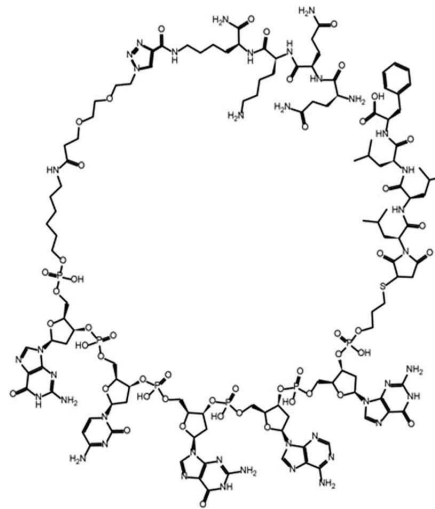
CycPOC-1

-5'-GCGAG-3'-LLLFQQKK-

QQKK-5'-GCGAG-3'-LLLF

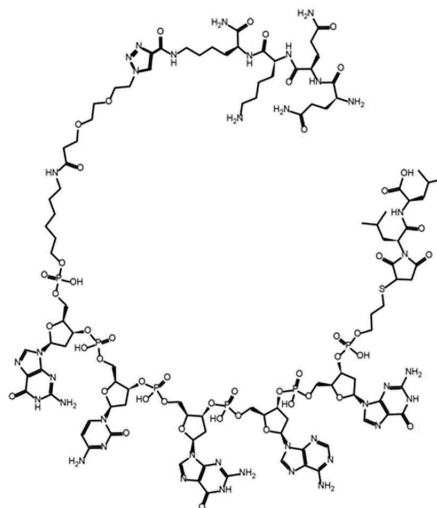


Molecular weight: 3194.89



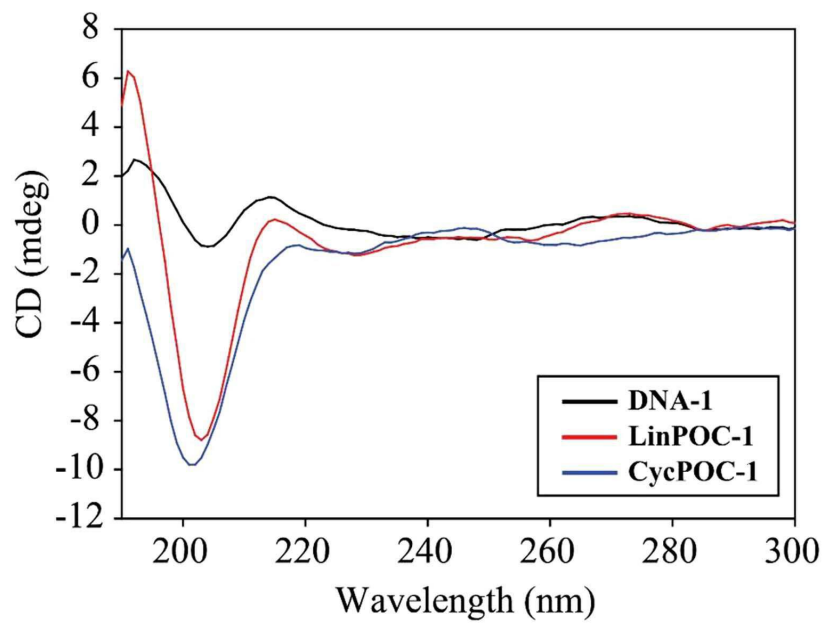
Molecular weight: 3212.9

QQKK-5'-GCGAG-3'-LLL

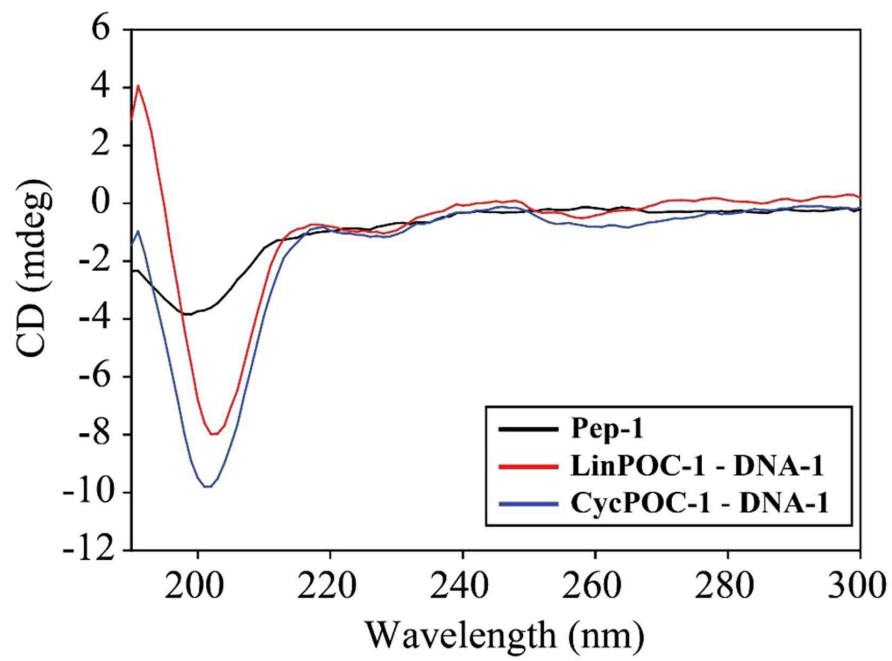


Molecular weight: 2952.57

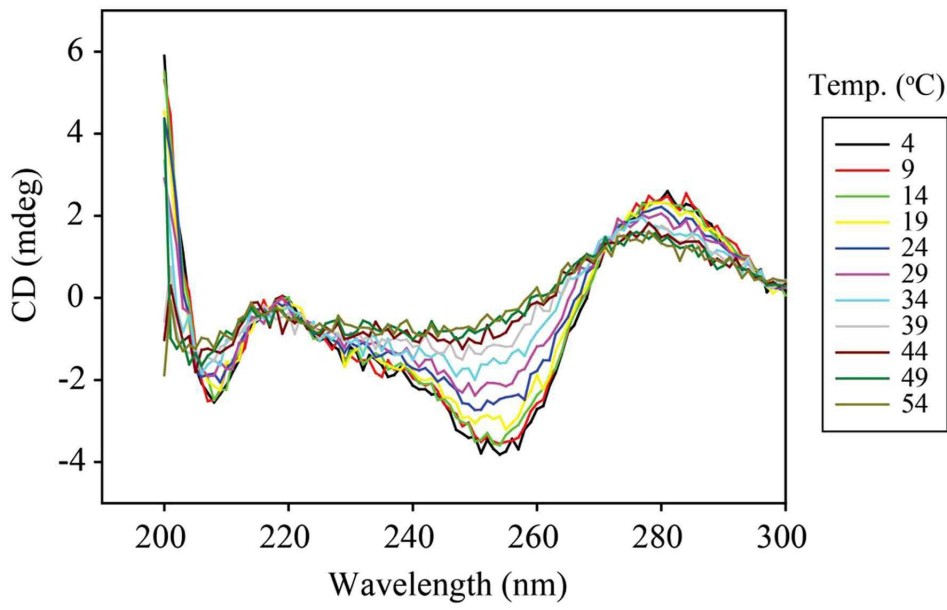
도면12



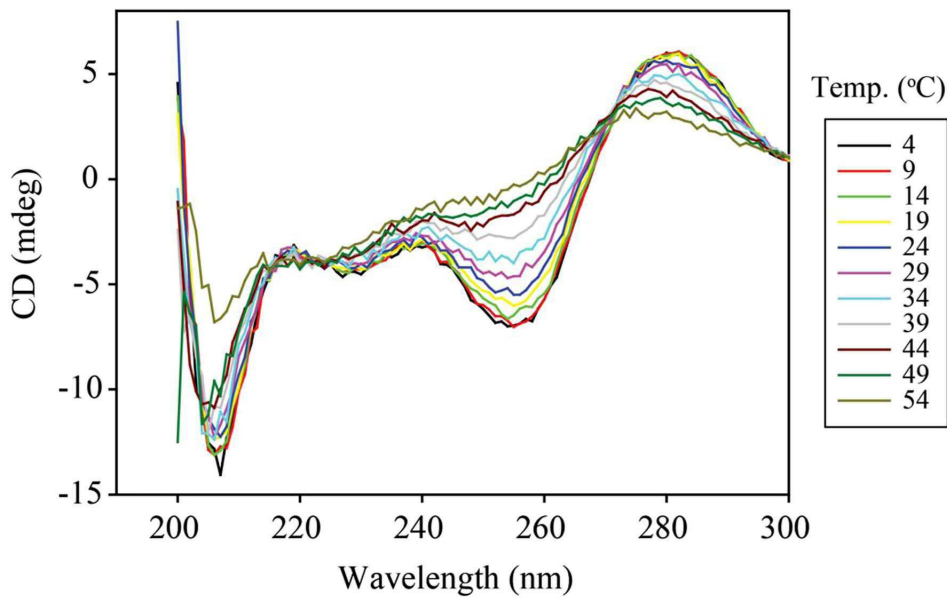
도면13



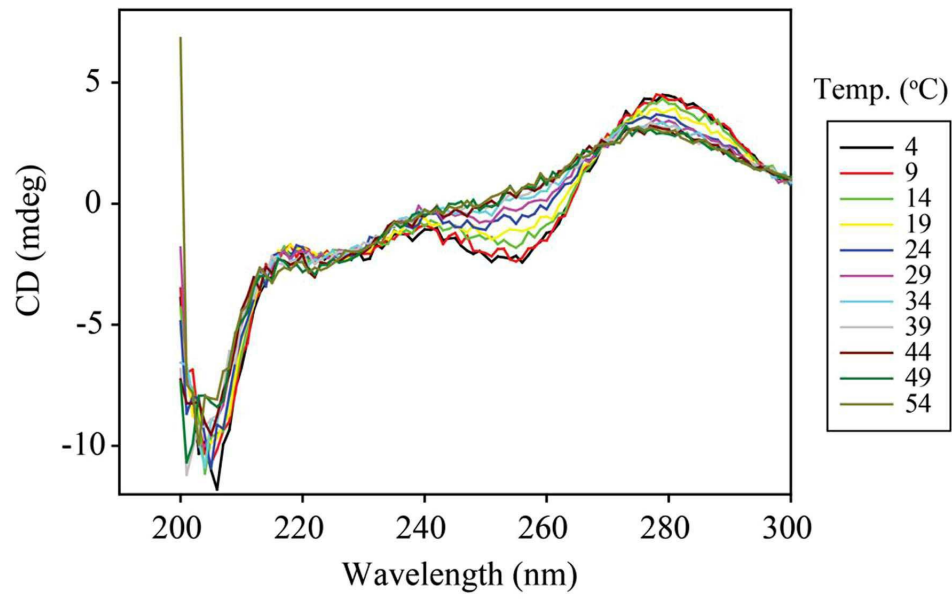
도면14



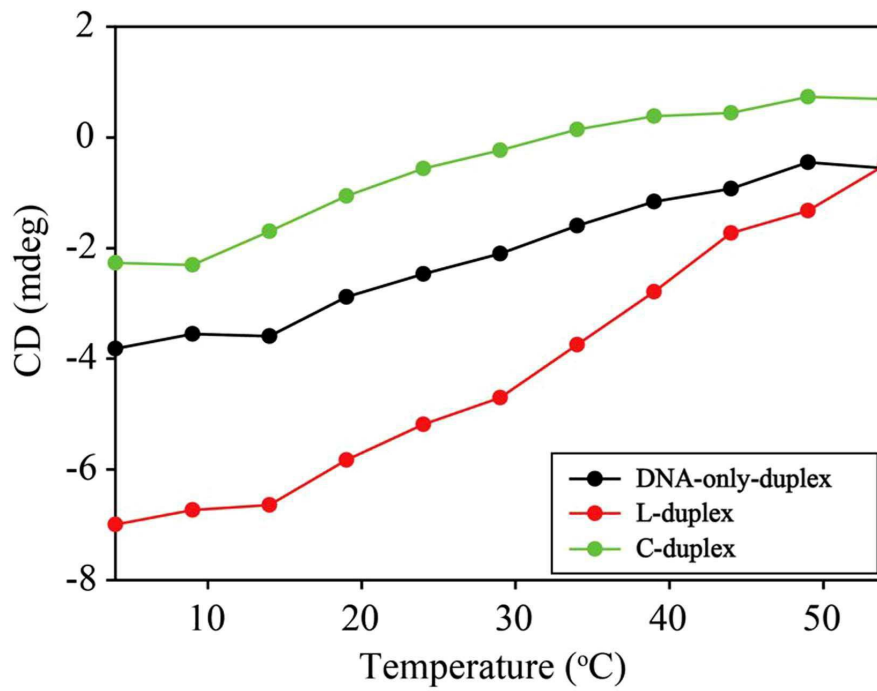
도면15



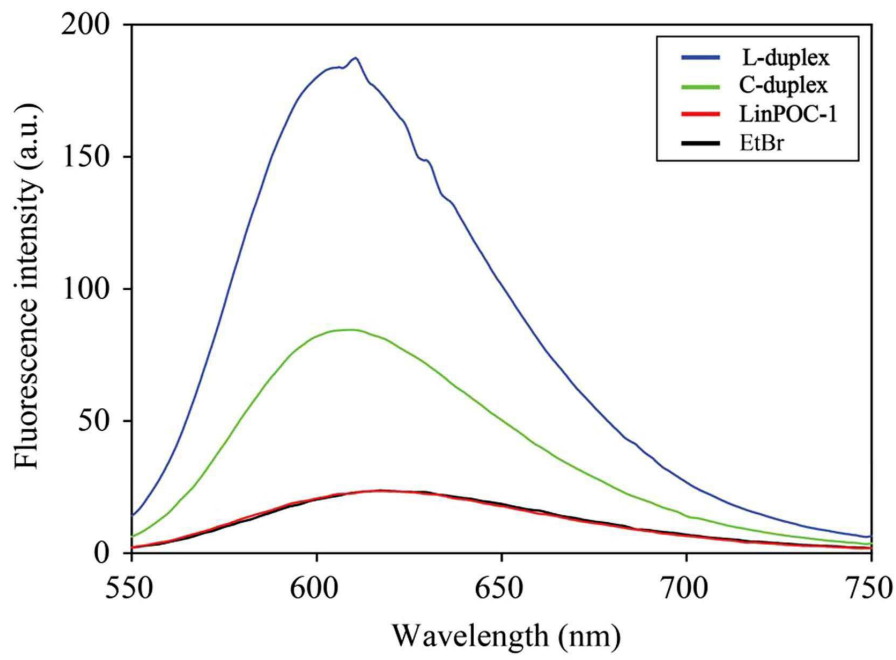
도면16



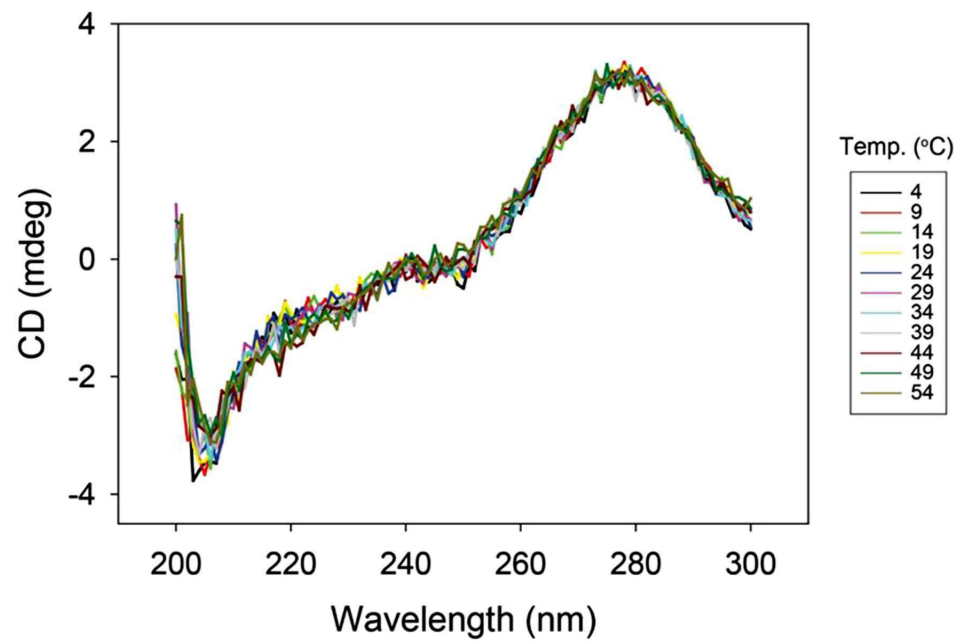
도면17



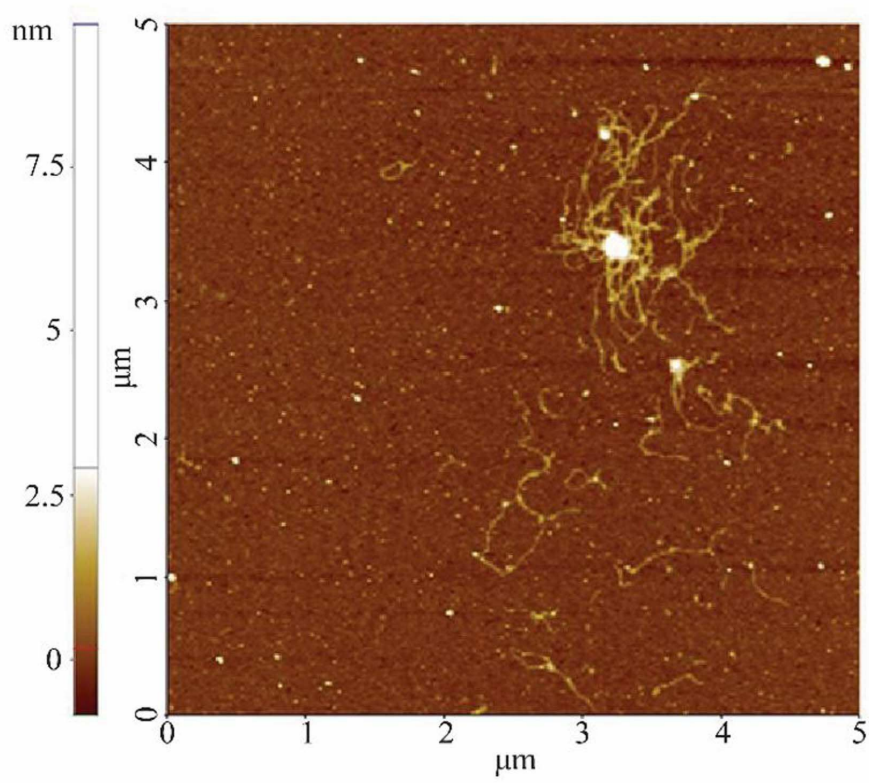
도면18



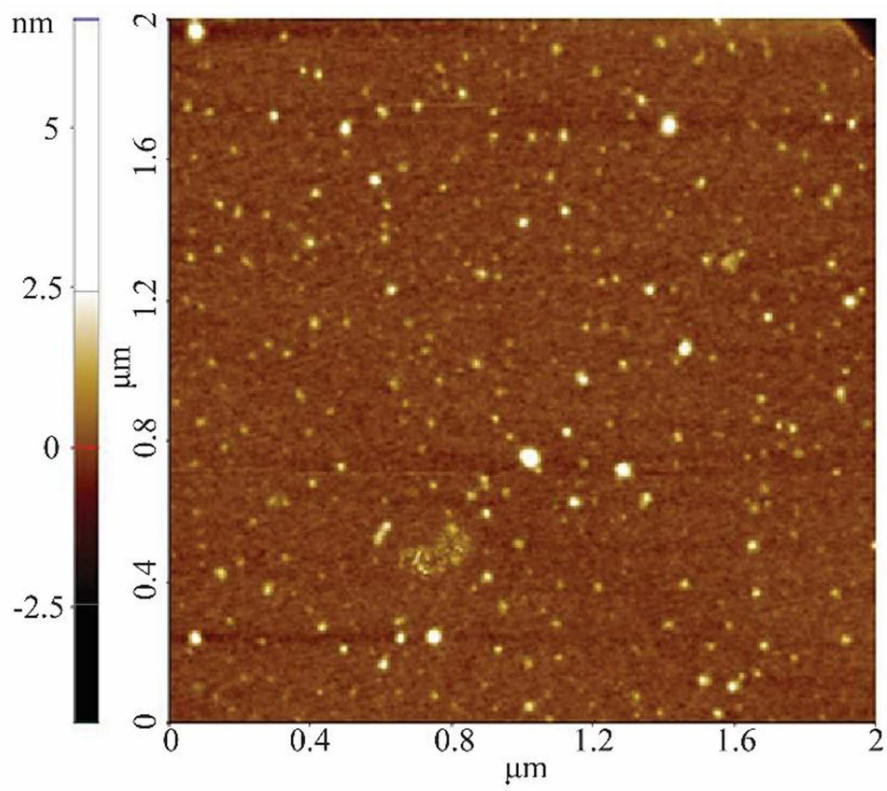
도면19



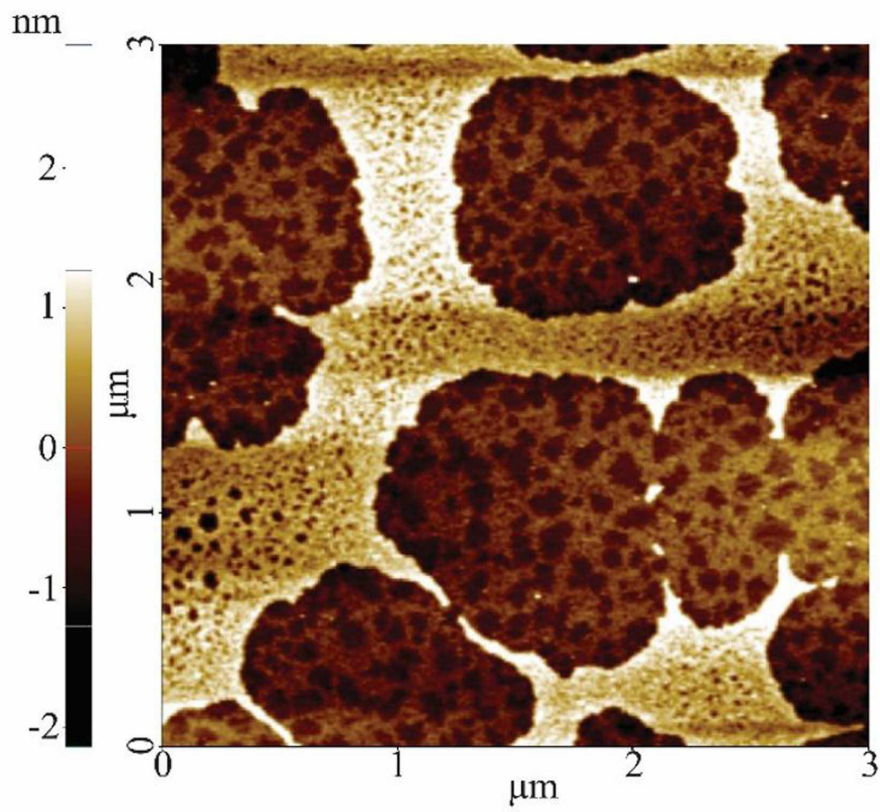
도면20



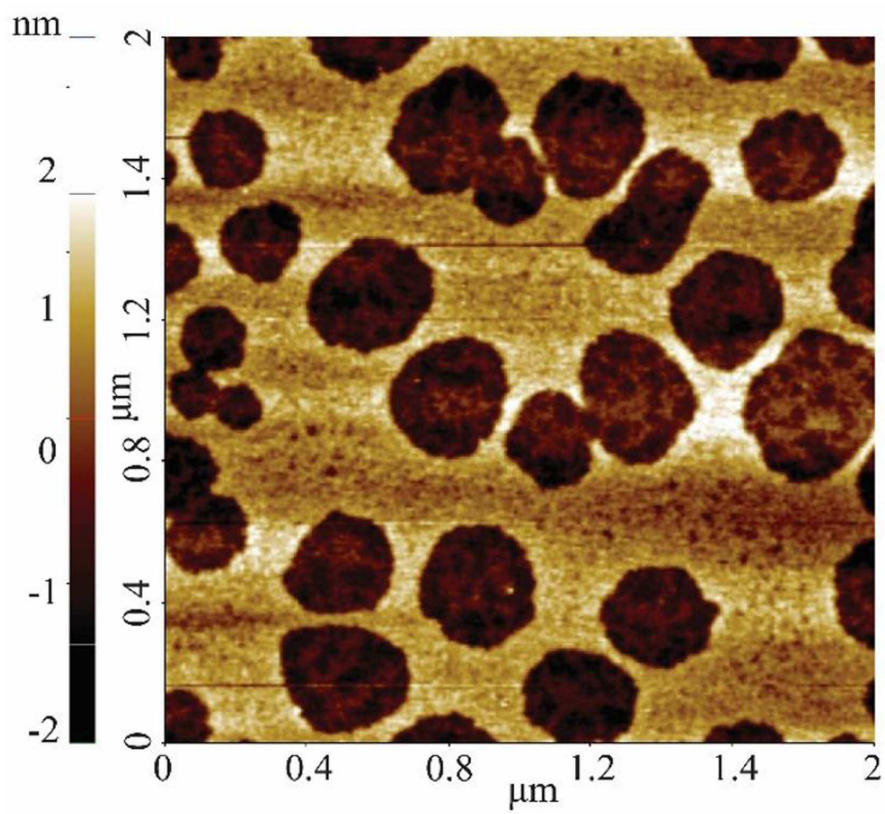
도면21



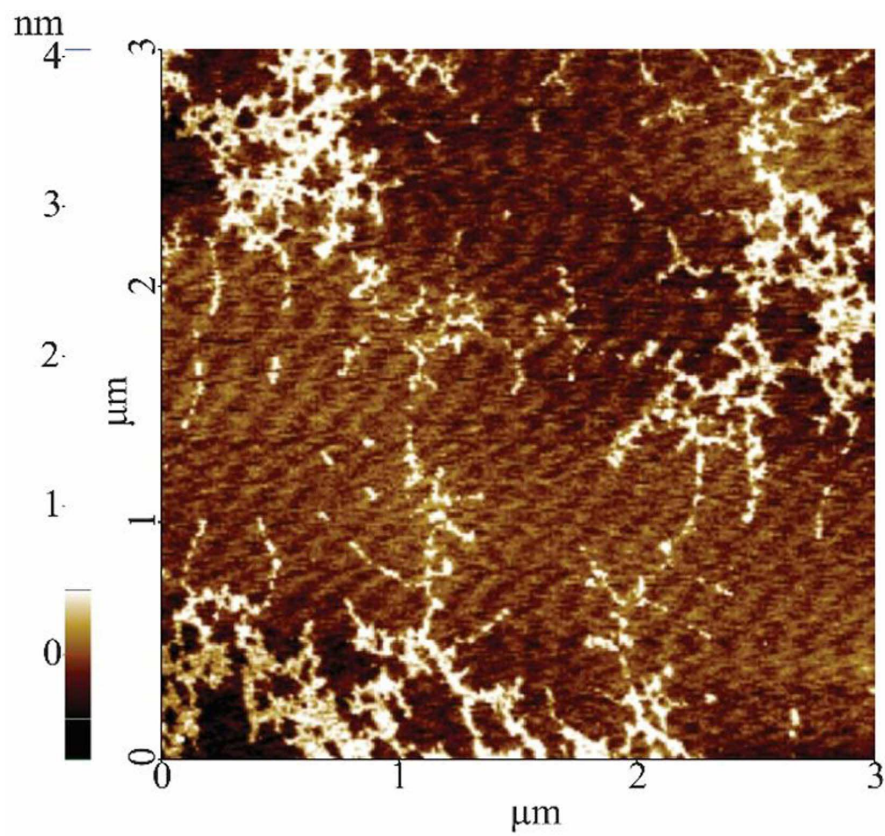
도면22



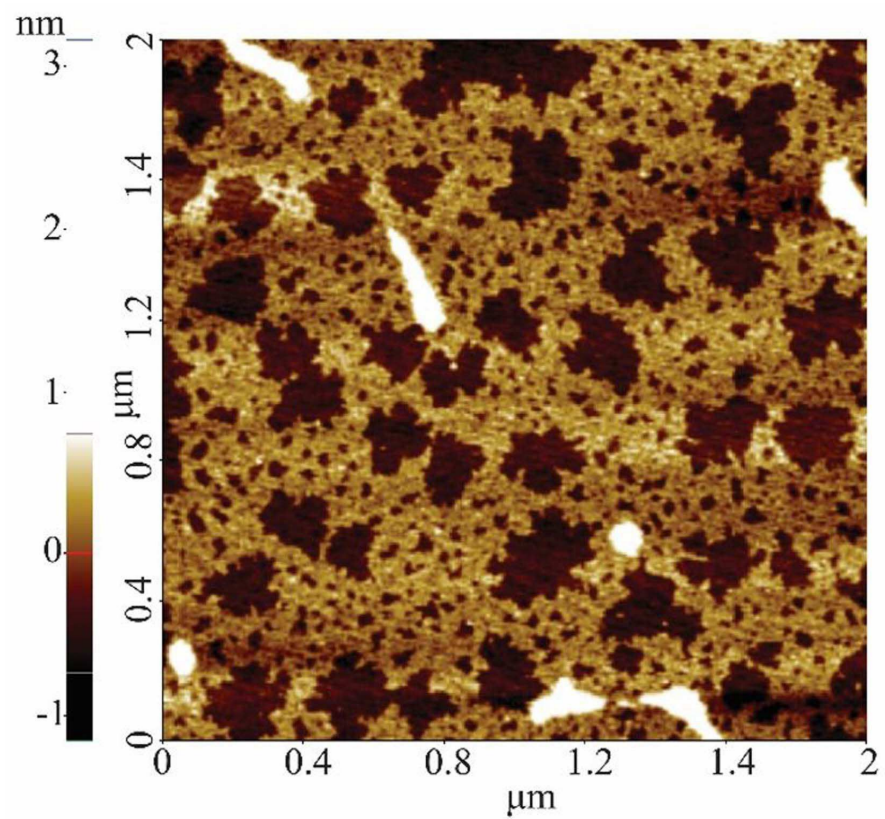
도면23



도면24



도면25



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Self-Assembling Cyclic Peptide-Oligonucleotide Conjugates and Manufacturing Method Thereof

<130> HPC9393

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 1

Leu Leu Leu Phe Gln Gln Lys Lys

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 2

Lys Lys Gln Gln Phe Leu Leu Leu

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 3

Gln Gln Phe Leu Leu Leu Lys Lys

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 4
Lys Lys Leu Leu Leu Phe Gln Gln

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> oligonucleotide

<400> 5

gcgag

5

<210> 6

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 6

gaggc

5

<210> 7

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 7

aggcg

5

<210>

> 8

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 8

cgagg

5

<210> 9

<211> 5

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide	
<400>	9	
ctcgc		5
<210>	10	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide	
<400>	10	
tcgcc		5
<210>	11	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide	
<400>	11	
cgcct		5
<210>	12	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide	
<400>	12	
gcctc		5
<210>	13	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oligonucleotide	
<400>	13	
cctcg		5