



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월23일
(11) 등록번호 10-2125888
(24) 등록일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0130989
(22) 출원일자 2018년10월30일
심사청구일자 2018년10월30일
(65) 공개번호 10-2020-0048668
(43) 공개일자 2020년05월08일
(56) 선행기술조사문헌
US20050158820 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
서주원
경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84 (에버힐스)
이한기
경기도 용인시 처인구 한터로152번길 45 피렌체아파트, 104동 401호
(74) 대리인
임상엽, 권정기

전체 청구항 수 : 총 16 항

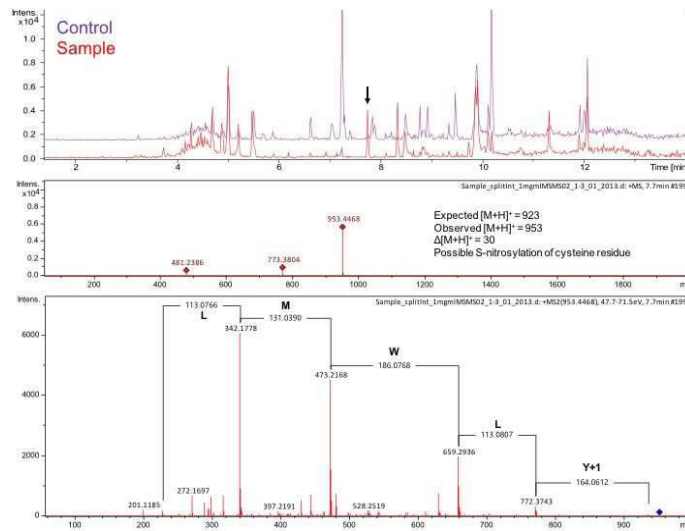
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 신규 고리형 펩티드, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 스플리트 인테인(Split intein) 플랫폼을 이용하여 생물학적 방법으로 제조된 항결핵 활성을 가진 신규 고리형 펩티드를 제공한다. 본 발명에 따른 신규 고리형 펩티드는 종래의 항결핵 활성을 갖는 고리형 펩티드와 매우 상이한 골격 아미노산 배열을 가진다. 본 발명에 따른 신규 고리형 펩티드는 다양한 내성 결핵에 적용될 수 있으며, 의약품 소재로 매우 유용하다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 31/06 (2018.01)
C07K 7/64 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
 KR1020180090113 A1
 J. Org. Chem., Vol. 83, pp.
 6664-6672(2018.05.24.)*
 J. Biol. Chem., Vol. 292, pp.
 15859-15869(2017.08.03.)
 ACS Infect. Dis., Vol. 4, pp.
 478-498(2018.02.21.)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01328402

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 Cyclic peptide 및 library 대량 생산 및 ClpC1을 표적으로 하는 신규 항결핵 후보물질 생

산

기여율 1/1

주관기관 명지대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

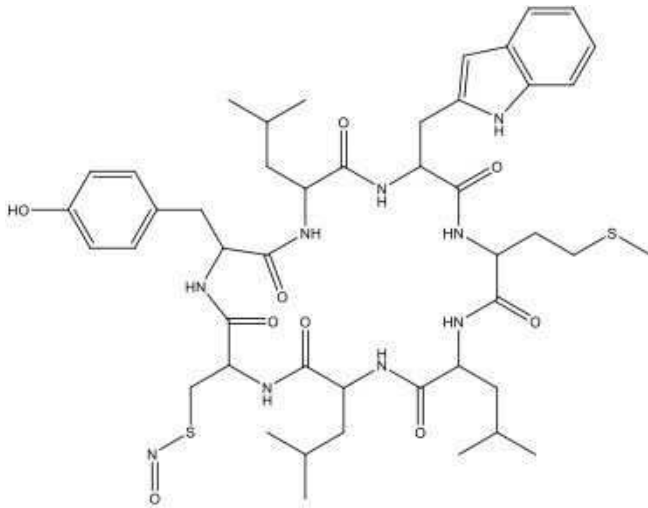
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 구조를 가지는 고리형 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 I]



청구항 2

스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기 서열로 이루어지고 상기 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기 서열로 이루어지고 상기 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 8

제5항에 있어서, 서열번호 5의 염기 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 9

스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드; 또는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터가 인간 이외의 생물 또는 세포에 도입된 것인, 형질전환체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기 서열로 이루어지고 상기 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 고리형 펩티드 발현용 재조합 벡터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

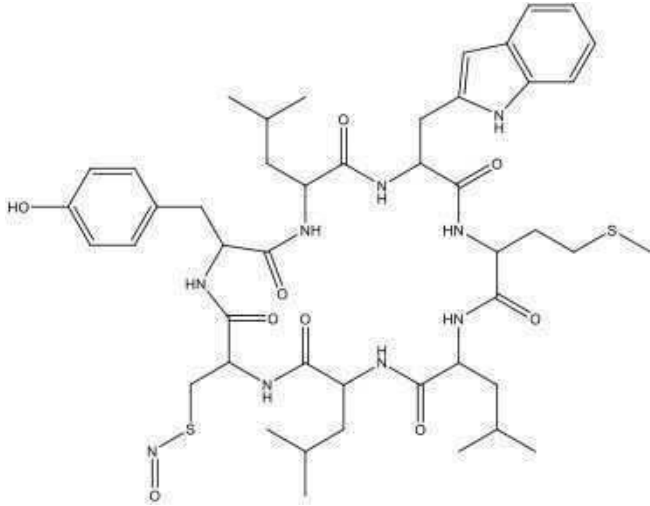
청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항의 형질전환체를 배양하여 재조합 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 상기 재조합 폴리뉴클레오티드가 발현된 형질전환체를 파쇄하고, 파쇄물로부터 고리형 펩티드를 분리하는 단계를 포함하는 고리형 펩티드의 제조방법.

청구항 14

하기 화학식 I의 구조를 가지는 고리형 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 I]



청구항 15

제14항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 결핵은 MDR 결핵 혹은 XDR 결핵인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 고리형 펩티드 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 항결핵 활성을 가지는 신규 고리형 펩티드, 스플리트 인테인(Split intein)을 이용하여 이를 제조하는 방법 및 이의 의약 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 펩티드 및 단백질은 구성물질이 아미노산이기 때문에 기존의 합성 화합물에 비해 독성이 매우 낮은 장점을 가지며 의약 소재로서 경제적 가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 그러나 선형 펩티드 또는 비고리형 단백질 의약 소재의 경우 인체 소화 기관을 거치면서 변성이 되거나 분해되는 등 구조적 안정성이 낮기 때문에 인체 내에서 약효가 발휘되지 않는 문제가 있다.

[0003] 한편, 고리형 펩티드는 선형 펩티드 또는 비고리형 단백질 의약 소재의 구조적 안정성 문제를 극복할 수 있는 차세대 의약 소재로서 산업계에서 널리 각광받고 있다. 고리형 펩티드를 생산하는 기술은 크게 화학적인 합성방법, 고리형 펩티드를 생산하는 미생물로부터 분리 및 정제하는 방법, 그리고 파지 디스플레이(Phage display) 방법이 있다. 이 중 화학적인 방법은 소수성이 높은 아미노산으로 구성된 펩티드를 고리화하는 것이 어렵다는 단점이 있다. 파지 디스플레이 방법은 이론적으로 거의 모든 종류의 고리형 펩티드를 생산할 수 있지만 고리형 구조를 생성하기 위한 이황화 결합(Disulfide bond)이 생체 내에서 쉽게 분해되기 때문에 구조적 안정성을 확보하는데 어려움이 있다. 또한, 미생물로부터 분리 및 정제하는 방법은 미생물 자체에 의해 생산하는 고리형 펩티드의 구조가 정해지기 때문에 신규 구조의 고리형 펩티드를 생산하는데 한계가 있다.

[0004] 결핵균은 인간과 다른 포유 동물에 결핵(TB) 질병을 일으키는 크고 복잡한 박테리아이다. 결핵은 사람의 호흡

경로에 의해 사람에게 전파되는 매우 전염성이 높은 질병이다. MDR-TB보균자 30만명과 HIV보균자들 중 110만 가지 경우를 포함하여 2009년에 940만건의 새로운 결핵 사례가 있었다[WHO 생명을 위한 행동- 결핵 없는 세상을 향해; 세계 보건기구 ; 제네바, 스위스, 2006]. MDR-TB(multi-drug resistant tuberculosis, 다제내성 결핵)는 최소한 6 개월 이상 2 년까지 연장된 치료 기간이 필요하다. XDR-TB(extensively drug resistant tuberculosis)의 세계적인 출현은 MDR M.결핵 균주(multi-drug resistant M.tuberculosis strains)중 6.6 %로 추정된다[WHO 생명을 위한 행동- 결핵 없는 세상을 향해; 세계 보건기구 ; 제네바, 스위스, 2006]. 루포마이신(Rufomycin)은 일라마이신(Ilamycin)으로도 알려져 있으며, 스트렙토마이세스 아트라투스(*Streptomyces atratus* ATCC 14046)에 의해 생산된다. 루포마이신(Rufomycin)은 7개의 아미노산 골격을 가진 고리형 펩티드로서, 항-결핵균 활성을 가진다. 그러나 루포마이신은 물에 거의 녹지 않기 때문에 치료제로서 인체에 적용하는데 매우 제한적이다. 이를 해결하기 위해 수용성이면서 동시에 항-결핵균 활성이 높은 루포마이신 유도체의 개발이 계속되어 왔다. 이러한 루포마이신 유도체의 개발을 위해 주로 루포마이신에 다양한 염을 추가하는 방법(미국등록특허 제3330725호) 또는 골격을 구성하는 아미노산에 다양한 치환기를 도입하는 방법(국제특허 공개공보 WO 00/78797) 등이 사용되었다. 또한, 리팜피신(Rifampicin)은 결핵을 포함한 세균 감염을 치료하는데 사용되는 항생제이다. 리팜피신은 1967년 도입되었는데, 결핵과 잠재성 뇌막염을 치료하기 위해 이소니아지드, 에탐부톨 및, 피라진아마이드와 같은 다른 항생제들과 병용되며, 결핵 치료를 위해서는 적어도 6개월 이상 매일 규칙적으로 중단 없이 복용해야 하며, 그렇지 못할 경우, 약에 대한 내성이 크게 증가한다. 리팜피신은 다른 약제와 함께 복용할 경우 어느 정도의 부작용을 초래할 수 있으며, 가장 심각한 부작용은 리팜피신의 간독성과 관련이 있다.

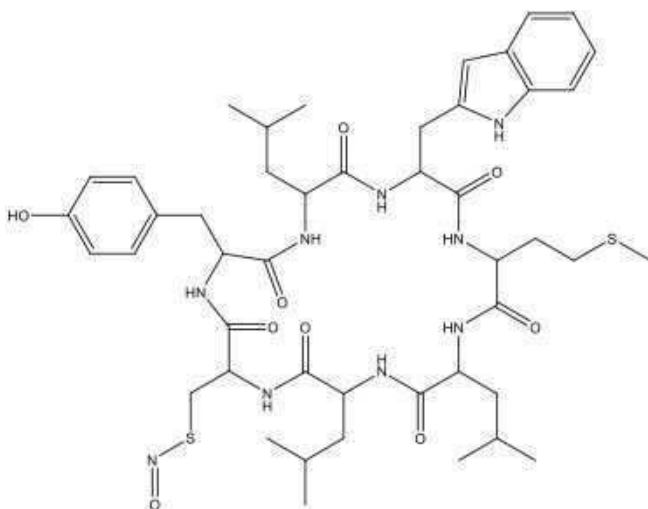
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 항결핵 활성을 갖는 신규 고리형 펩티드를 제공하는데 있다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 스플리트 인테인(Split intein)을 이용하여 신규 고리형 펩티드를 생물학적으로 생산하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 신규 고리형 펩티드의 의약 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 신규 고리형 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [0009] [화학식 I]



- [0010]
- [0011] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명의 일 예는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성되고, 고리형 펩티드 클로닝용 또는 발현용 재

도 5는 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하여 펩티드 발현을 유도하고, 배양한 세포의 과채 및 원심분리를 통해 수득한 상등액을 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피 칼럼에 의해 정제한 후 정제 산물을 SDS-PAGE(a) 및 Western blot(b)으로 분석한 결과이다.

도 6은 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하여 수득한 고리형 펩티드를 LC/MS/MS로 분석한 스펙트럼 결과이다.

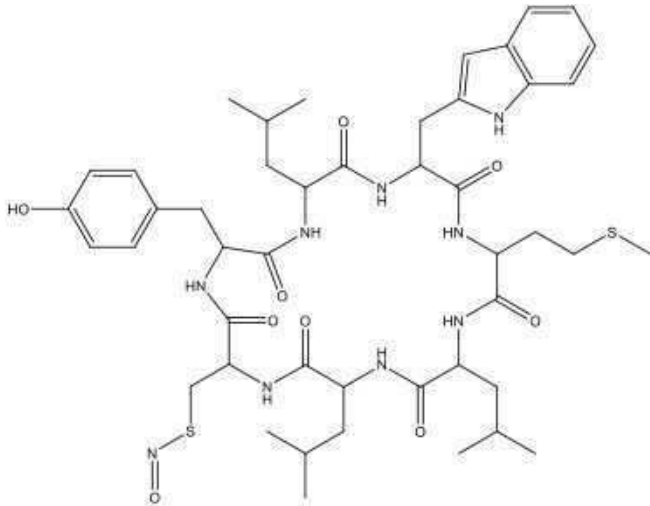
도 7은 본 발명에서 수득한 CYC_RUF extract 및 Control extract를 Preparative HPLC로 분획하였을 때의 피크 스펙트럼 결과이다.

도 8은 본 발명에서 수득한 CYC_RUF extract 및 Control extract를 Preparative HPLC로 분획하고, CYC_RUF extract에서만 특이적인 피크의 분획을 Analytical HPLC로 재분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어인 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 별다른 설명이 없는 한, 상호 호환되는 개념으로 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어인 "폴리뉴클레오티드"는 비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥영역의 혼합물인 RNA, 단일- 또는 이중 가닥, 또는 단일- 및 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명에서 폴리뉴클레오티드는 핵산 분자 또는 올리고뉴클레오티드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어인 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어인 "형질전환체"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 발현 벡터가 숙주 세포, 숙주 미생물, 숙주 식물, 숙주 곤충, 숙주 동물 등과 같은 숙주에 도입되어 형질전환된 생명체를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0032] 본 발명의 일 측면은 항결핵 활성을 갖는 신규 고리형 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 신규 고리형 펩티드는 하기 화학식 I의 구조를 가진다. 본 발명의 일 예에 따른 신규 고리형 펩티드는 종래의 항결핵 활성을 갖는 고리형 펩티드와 골격 아미노산 배열이 매우 상이하며, 구체적으로, 시스테인-류신-류신-메치오닌-트립토판-류신-티로신 아미노산 잔기 배열을 갖는다.

[0033] [화학식 I]



[0034]

[0035]

본 발명에서 약학적으로 허용가능한 염으로는 제약 분야에서 통상적으로 사용되는 공지의 다양한 염이 선택될 수 있으며, 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만테르산, 프로피온산 (propionic acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딘산 등을 사용할 수 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0037]

본 발명의 일 측면은 신규 고리형 펩티드를 제조하기 위한 생물학적 기술에 관한 것으로서, 구체적인 카테고리 로 고리형 펩티드 클로닝용 또는 발현용 재조합 벡터의 제작에 사용되거나 고리형 펩티드 생산용 형질전환체의 제작에 사용되는 재조합 폴리뉴클레오티드, 고리형 펩티드 클로닝용 또는 발현용 재조합 벡터, 고리형 펩티드 생산용 형질전환체, 형질전환체를 이용한 고리형 펩티드의 제조방법을 포함한다. 본 발명의 일 예에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 것이다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 고리형 펩티드 발현용 재조합 벡터는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 고리형 펩티드 생산용 형질전환체는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드; 또는 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 연결되어 구성된 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 고리형 펩티드 발현용 재조합 벡터가 도입된 것이다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 고리형 펩티드의 제조방법은 상기 고리형 펩티드 생산용 형질전환체를 배양하여 재조합 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 상기 재조합 폴리뉴클레오티드가 발현된 형질전환체를 파쇄하고, 파쇄물로부터 고리형 펩티드를 분리하는 단계를 포함한다.

[0038] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 본 발명의 신규 고리형 펩티드를 구성하는 아미노산 잔기들의 배열에 해당한다. 본 발명에서 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 비번역된 서열(예를 들어, 인트론)을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, cDNA). 펩티드가 코딩되는 정보는 코돈을 사용하여 구체화된다. 전형적으로, 아미노산 서열은 유니버설 유전자 코드를 사용하여 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된다. "코돈"은 폴리펩티드 사슬에서 아미노산 서열을 결정하는 뉴클레오티드의 트리플렛(triplet)을 나타낸다. 대부분의 유기체는 단백질 또는 단백질 전구체인 이들의 폴리펩티드를 제조하는데 20 또는 21개 아미노산을 이용한다. DNA에는 4개의 가능한 뉴클레오티드인 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C) 및 티민 (T)이 존재하기 때문에, 20개 아미노산과 말단 시그널을 코딩할 수 있는 64개의 가능한 트리플렛이 존재한다. 이러한 중복성으로 인해, 대부분의 아미노산은 1개 이상의 트리플렛에 의해 코딩된다. 이에 따라, 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 영향을 주지 않으면서 뉴클레오티드 서열의 변화를 허용할 수 있고, 이를 "코돈 축퇴성(codon degeneracy)"에 의한 "침묵 변이"라 한다. 본 발명에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진다.

[0039] 본 발명에 따른 신규 고리형 펩티드를 제조하기 위한 생물학적 기술은 스플리트 인테인(Split intein)에 의한 아미노산 잔기의 고리화에 기초한다. 인테인(intein)은 단백질 스플라이싱(protein splicing) 과정에서 자기 자신을 잘라내고 펩티드 결합을 통해 나머지 부분인 엑스테인(Extein)을 결합시킬 수 있는 단백질의 세그먼트이다. 인테인은 크게 라지 인테인(Large intein)과 미니 인테인(Mini intein)으로 분류되며, 라지 인테인은 호밍 엔도뉴클라아제 도메인(homing endonuclease domain, HEG)을 포함하는 반면, 미니 인테인에는 호밍 엔도뉴클라아제 도메인이 존재하지 않는다. 또한, 인테인은 C-말단 도메인과 N-말단 도메인으로 불리는 2개 단편으로 존재할 수 있으며, 상기 2개의 인테인 단편은 2개로 분리되어 전사 및 번역되는 유전자에 의해 암호화된다. 이러한 인테인을 스플리트 인테인(Split intein)이라고 부르며, 다양한 시아노박테리아(cyanobacteria) 및 고세균(archaea)에서 확인되었다[Caspi et al, Mol Microbiol. 50: 1569-1577 (2003); Choi J. et al, J Mol Biol. 556: 1093-1106 (2006.); Dassa B. et al, Biochemistry. 46:322-330 (2007.); Liu X. and Yang J., J Biol Chem. 275:26315-26318 (2003); Wu H. et al, Proc Natl Acad Sci USA. 95:9226-9231 (1998.); and Zettler J. et al, FEBS Letters. 553:909-914 (2009)]. 전 세계적으로 약 600여 개의 인테인이 목록화되어 있고, 이 중 5% 미만이 스플리트 인테인이며, 대부분의 스플리트 인테인은 시아노박테리아의 스플리트 DnaE 인테인으로 알려진 패밀리에 속한다. 본 발명에서 사용하는 스플리트 인테인은 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 공지의 다양한 스플리트 인테인에서 선택될 수 있다. 본 발명은 사용 가능한 스플리트 인테인과 관련하여 국제특허 공개공보 WO 2013/045632, 국제특허 공개공보 WO 2014/004336, 국제특허 공개공보 WO 2017/132580, [Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43, No. 13, 6450-6458] 등에 개시된 내용을 참조한다. 본 발명에서 스플리트 인테인과 관련하여, 상기 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기 서열로 이루어지고 상기 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어지는 것이 바람직하다. 서열번호 3의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드와 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드는 각각 스플리트 인테인 Npu DnaE의 C-말단 도메인 및 N-말단 도메인을 코딩하는 유전자이다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 숙주 세포로 염기의 클로닝 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말한다. 본 발명에서 벡터는 외래 DNA 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위 (replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위 (예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기를 도입하기 위한 바이러스 및 비 바이러스 매개물을 포함한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 또한 미니구형 DNA를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 벡터는 박테리아 DNA 서열을 갖지 않는 플라스미드일 수 있다. CpG 영역에서 풍부한 박테리아 DNA 서열의 제거는 전이유전자 발현 사일런싱을 감소시키고 플라스미드 DNA 벡터로부터 보다 지속적인 발현을 가져오기 위해 행해지고 있다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어인 "벡터"는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty)와 같은 트랜스포존[Izsvak et al. J. Mol. Biol. 302:93-102 (2000)], 또는 인공 염색체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클라아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 고리형 펩티드의 골격 아미노산 배

열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있고, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)가 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어인 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코딩하는 유전자, 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는 조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는 데 충분한 프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 본 발명에 따른 발현 벡터는 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함할 수 있다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오티드 상의 폴리뉴클레오티드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보솜 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보솜 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 발현 벡터는 예를 들어 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119); 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5); 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50); λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP); 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus) 또는 백신시아 바이러스(Vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스; 배큘로바이러스(Baculovirus)와 같은 곤충 바이러스를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 발현 벡터는 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 필요에 따라 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 발현 벡터가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서 고리형 펩티드의 골격 아미노산 배열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 제작시 pET29b 벡터를 사용하였다. 또한, 상기 태그(tag) 서열이 포함된 발현 벡터에 의해 목적 단백질들이 발현되는 경우 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 검출되거나 정제될 수 있다. 예를 들어 태그(tag)로 글루타민-S-트랜스퍼라제가 발현 벡터에 포함된 경우에는 단백질의 검출 또는 정제시 이 효소의 기질인 글루타민을 이용할 수 있고, 태그로 헥사히스티딘(His₆)이 발현 벡터에 포함된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 검출하거나 회수할 수 있다. 본 발명의 일 예에 따른 재조합 벡터에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드의 기술적 특징은 재조합 폴리뉴클레오티드에서 설명한 내용을 참조한다. 본 발명의 일 예에 따른 재조합 벡터는 바람직하게는 도 3의 개별 지도(Cleavage map)를 가지며, 더 바람직하게는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진다.

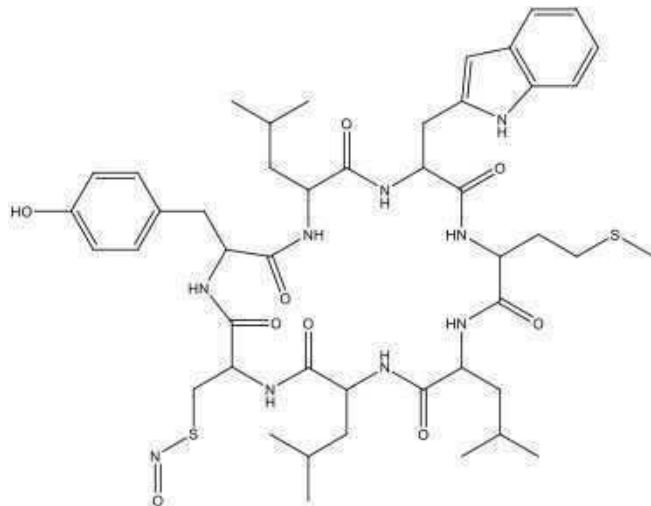
[0041] 본 발명의 일 예에 따른 형질전환체는 전술한 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 전술한 재조합 벡터가 도입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 재조합 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 재조합 발현 벡터를 통해 숙주에 도입되고, 숙주를 형질전환시킨다. 상기 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation), 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 재조합 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 영양 배지에서 배양하면 목적 단백질을 대량으로 제조할 수 있고, 분리도 가능하다. 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절하여야 한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질

전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 숙주 세포로 에셰리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 주지의 원핵 숙주들이 사용될 수 있고, 바람직하게는 대장균이 사용될 수 있다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 유도인자인 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 재조합적으로 생산된 목적 단백질은 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 상기 목적 단백질이 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 음과처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deucher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어, 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 용매 추출, 전기영동, 원심분리, 겔 여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 면역흡착 친화성 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따른 신규 고리형 펩티드는 형질 전환체를 배양하고, 배양액을 원심분리하여 상등액을 수득하고, 상등액에 메틸 클로라이드 등과 같은 유기용매를 첨가하여 분배하고, 유기용매 분배층을 분리한 후 유기용매를 제거함으로써 수득할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 예에 따른 형질전환체에서 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 스플리트 인테인의 C-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드 및 스플리트 인테인의 N-말단 도메인에 해당하는 폴리뉴클레오티드의 기술적 특징은 재조합 폴리뉴클레오티드에서 설명한 내용을 참조한다. 본 발명의 일 예에 따른 형질전환체에서 숙주 세포에 도입되는 재조합 벡터는 도 3의 개열 지도(Cleavage map)를 가지며, 더 바람직하게는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진다.

[0044] 본 발명의 일 측면은 신규 고리형 펩티드의 의약 용도에 관한 것이다. 본 발명의 일 예는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 고리형 펩티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0045] [화학식 I]



[0046]

[0047] 본 발명의 일 예에 따른 결핵 예방 또는 치료용 조성물이 적용될 수 있는 결핵의 종류는 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 MDR 결핵 또는은 XDR 결핵 등이 있다. MDR 결핵(Multidrug-resistant tuberculosis, 다제내성 결핵)은 결핵 치료에 가장 중요한 약제인 아이소니아지드(Isoniazid)과 리팜핀(Rifampicin)에 모두 내성인 결핵을 말한다. XDR 결핵(extensively drug-resistant tuberculosis, 광범위내성 결핵)은 플로로퀴놀론(fluoroquinolone)에 대한 항생제 중 적어도 한 가지와 항결핵 주사제(amikacin, kanamycin, capreomycin) 중 적어도 한 가지에 동시에 추가적인 내성을 보이는 결핵을 말한다. 본 발명의 일 예에 결핵 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분인 신규 고리형 펩티드는 종래의 항결핵 활성을 가지는 고리형 펩티드와 매우 상이한 골격 아미노산 배열을 가지므로 다양한 내성 결핵에 적용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 예에 따른 결핵 예방 또는 치료용 조성물에서, 유효성분인 신규 고리형 펩티드의 함량은 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 신규 고리형 펩티드의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5-50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 신규 고리형 펩티드 외에 항결핵 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분을 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 mg/kg이고, 더 바람직하게는 1 내지 2000 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1회 투여량은 혈장 내에서 유효성분의 농도가 1 내지 50 µg/ml, 바람직하게는 5~25 µg/ml가 되게 조절될 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0053] **1. 스플리트 인테인(Split intein) 기반 고리형 펩티드 발현용 재조합 벡터 및 이를 이용한 신규 고리형 펩티드의 생산**

[0054] (1) *Nostoc punctiforme* PCC73102(Npu)로부터 DNA polymerase III(DnaE) intein 유전자의 스플리트(Split) α subunit 합성

[0055] Bioneer Company(Korea)에 의뢰하여 *Nostoc punctiforme* PCC73102 (Npu)로부터 전장 스플리트(Split) DnaE intein 유전자(Npu_DnaE)를 합성하였다. Npu_DnaE는 102개의 아미노산 잔기를 가진 N-말단 스플리트 인테인(Npu_DnaE_N)과 36개의 아미노산 잔기를 가진 C-말단 스플리트 인테인(Npu_DnaE_C)으로 구성된다. 고리형 펩티드를 생산하기 위하여, Npu_DnaE_N과 Npu_DnaE_C로 이루어진 스플리트 Npu_DnaE 유전자의 2개 부분은 (Npu_DnaE_C)-(고리화될 목적 펩티드 서열)-(Npu_DnaE_N)으로 배열되었다.

[0056] [Npu_DnaE의 전장 아미노산 서열]

[CLS YET E I L T V E Y G L L P I G K I V E K R I E C T V Y S V D N N G N I Y T Q P V A Q W H D R G E Q E V F E Y C L
 E D G S L I R A T K D H K F M T V D G Q M L P I D E I F E R E L D L M R V D N L P N M I K I A T R K Y L G K Q N V Y
 D I G V E R D H N F A L K N G F I A S N

[0057]

[0058] * Npu_DnaE_N part: normal letter

[0059] * **Npu_DnaE_C part: bold letter**

[0061] [Npu_DnaE의 전장 DNA 염기 서열]

```
TGTTTAAGCT ATGAAACGGA AATATTGACA GTAGAATATG GATTATTACC GATTGGTAAA
ATTGTAGAAA AGCGCATCGA ATGTA CTGTT TATAGCGTTG ATAATAATGG AAATATTTAT
ACACAACCTG TAGCACAATG GCACGATCGC GGAGAACAAG AGGIGTTTGA GTATTGTTTG
GAAGATGGTT CATTGATTG GCAACAAA GACCATAAGT TTATGACTGT TGATGGTCAA
ATGTTGCCAA TTGATGAAAT ATTTGAACGT GAATTGGATT TGATGCGGGT TGATAATTTG
CCGAATATGA TCAAAATAGC CACACGTAAA TATTTAGGCA AACAAAATGT CTATGACATT
GGAGTTGAGC GCGACCATAA TTTTGCCTC AAAAAATGGCT TCATAGCTTC TAAT
```

[0063] * Npu_DnaE_N part: normal letter

[0064] * **Npu_DnaE_C part: bold letter**

[0066] (2) 오버랩 신장 PCR(overlap extension PCR)을 이용한 목적 펩티드를 가진 스플리드 Npu DnaE 인테인의 제작

[0067] 고리화될 목적 펩티드는 아래와 같이 7개의 아미노산 잔기로 이루어진다. 오버랩 신장 PCR(overlap extension PCR) 방법을 이용하여 목적 펩티드를 코딩(Coding) 하는 DNA 염기 서열을 Npu_DnaE_C 염기 서열 및 Npu_DnaE_N 염기 서열 사이에 삽입하였다. 이전에 제작한 2개의 PCR 산물인 Npu_DnaE_C-CLLMWLY과 CLLMWLY-Npu_DnaE_N의 오버랩 신장 PCR(overlap extension PCR)에 의해 전장 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N DNA 단편을 수득하였다.

[0068] * 목적 펩티드 아미노산 서열 : CLLMWLY (1-letter 약어)

[0069] * 목적 펩티드 DNA 염기 서열 : TGC CTG TTG ATG TGG CTG TAT

[0070] 오버랩 신장 PCR(overlap extension PCR) 수행시 사용한 프라이머들의 종류와 염기서열 정보는 아래의 표 1과 같다.

표 1

프라이머 구분	프라이머 염기서열(5' ---> 3')
Npu_DnaE_C_F	CCCCCC CATATG ATC AAA ATA GC C ACA CGT
Npu_DnaE_C_R_Peptide	ATA CAG CCA CAT CAA CAG GCA ATT AGA AGC TAT GAA GCC
Npu_DnaE_N_F_Peptide	TGC CTG TTG ATG TGG CTG TAT TGT TTA AGC T AT GAA ACG G
Npu_DnaE_N_R	CCCCCC CTCGAG ATT CGG CAA ATT ATC AAC

[0072] 후술하는 pET29b-His-TEV 재조합 벡터 속으로의 클로닝을 위해 상기 표 1에서 보이는 바와 같이 NdeI(CATATG) 및 XhoI(CTCGAG) 제한효소 부위(restriction site; bod 체로 표기함)가 Npu_DnaE_C_F 프라이머 및 Npu_DnaE_N_R 프라이머에 삽입되었다.

[0074] (3) pET29b-His-TEV 벡터의 제작

[0075] Novagen으로부터 구입한 pET29b 벡터를 수정하여 S tag 및 트롬빈 부위(thrombin site)를 제거하고 7xHis tag 및 발현시킬 단백질의 N-말단에 TEV 프로테아제 절단 부위(TEV protease cleavage site)를 삽입하여 pET29b-His-TEV 벡터를 제조하였다. 도 1은 본 발명에서 맞춤 제작한 pET29b-His-TEV 벡터의 지도 및 다클로닝 부위(multi-cloning site)를 나타낸 것이다.

[0077] (4) pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터의 제작

[0078] Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N의 증폭된 DNA 산물 및 pET29b-His-TEV 벡터를 CutSmart 버퍼 내에서 제한효소인 NdeI 및 XhoI(New England Biolabs)을 가지고 37°C에서 2 hr 동안 배양하여 완전히 소화(digestion)시켰다. 이후, 제한효소 처리된 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N 및 pET29b-His-TEV를 1:1의 비율로 혼합하고, 4°C에서 하룻밤동안 T4 ligase로 결찰시켜 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터를 제작하였다. pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터는 서열번호 5의 염기 서열로 이루어진다. 이후, 5µl의 결찰 혼합물을 NEB Turbo competent 세포에 형질전환 하였다.

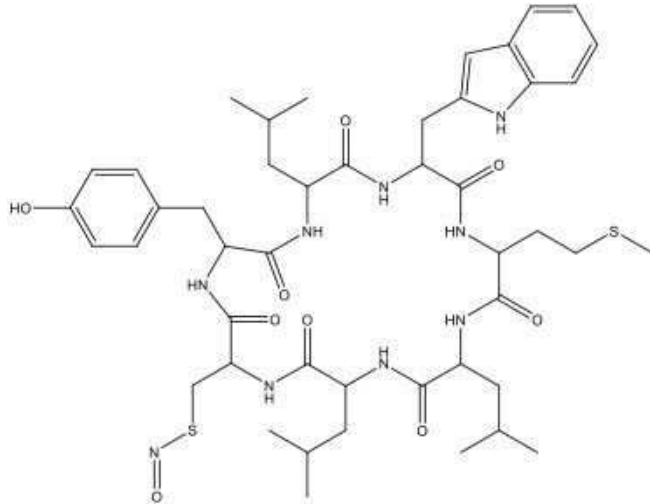
- [0079] 도 2는 pET29b-His-TEV 벡터 내에 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N을 삽입하는 과정에서 발생한 다양한 산물들을 Southern blot으로 분석한 결과이다. 도 2의 (a)는 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N의 PCT 산물들을 분석한 결과이다. 도 2의 (a)에서 라인 1은 Npu_DnaE_C-CLLMWLY를 나타내고, 라인 2는 CLLMWLY-Npu_DnaE_N을 나타내고, 라인 3은 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N을 나타낸다. 도 2의 (b)는 제한효소인 NdeI 및 XhoI로 처리된 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N 및 pET29b-His-TEV 벡터를 분석한 결과이다. 도 2의 (b)에서 'Vectors'는 pET29b-His-TEV 벡터를 나타내고, 'Inserts'는 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N을 나타낸다.
- [0080] 이후, NEB Turbo competent 세포를 37°C에서 12 hr 동안 배양하여 형질전환된 콜로니들을 선택하고, 플라스미드 추출 키트를 이용하여 복제된 플라스미드를 추출하였다. 이후, MacroGen(Korea)에 의뢰하여 추출된 플라스미드(plasmid)의 DNA 염기 서열을 측정하였다. 그 결과, pET29b-His-TEV 벡터 내에 Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N DNA 단편이 정확히 삽입된 것을 확인하였다. 도 3은 본 발명에서 제작한 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터의 개략적인 개열 지도이다. 도 4는 본 발명에서 제작한 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터의 DNA 염기 서열을 나타낸 것이다.
- [0082] (5) pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터를 이용한 신규 고리형 펩티드의 생산
- [0083] 복제된 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터를 E. coli Rosetta2(DE3) 세포에 형질전환 하였다. 이후, 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 5ml LB 배지에 형질전환된 세포를 접종하고 37°C에서 진탕 배양하였다. 이후, 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 500ml LB 배지에 5ml 배양액을 접종하고 OD₆₀₀에서의 값이 0.6이 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 이후, IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 배양액에 1mM의 농도가 되도록 첨가하여 펩티드 발현을 유도하고, 16°C에서 15 hr 동안 배양하였다. 이후, 세포 배양액을 원심분리하여 세포 펠렛을 수거하고, 수거한 세포 펠렛을 Lysis buffer(30mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 15mM Imidazole, 5mM β-mercaptoethanol)에 용해한 후 초음파로 파쇄하고, 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 이후, 수거한 상등액을 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피 칼럼에 통과시키고, 용출 버퍼(30mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 250mM Imidazole, 5mM β-mercaptoethanol)로 발현 산물을 용출하였다. 이후, 용출된 발현 산물을 SDS-PAGE 및 Western blot으로 분석하여 7xHis-TEV-Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N-6xHis 단백질, 스플리트 Npu_DnaE C-말단 도메인 및 스플리트 Npu_DnaE N-말단 도메인의 존재를 확인하였다.
- [0084] 도 5는 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하여 펩티드 발현을 유도하고, 배양한 세포의 파쇄 및 원심분리를 통해 수득한 상등액을 Ni²⁺ 친화성 크로마토그래피 칼럼에 의해 정제한 후 정제 산물을 SDS-PAGE(a) 및 Western blot(b)으로 분석한 결과이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 정제 산물에는 전장 7xHis-TEV-Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N-6xHis(~20kDa) 단백질뿐만 아니라 2개의 스플리트 DnaE intein 도메인에 해당하는 Npu_DnaE_N-6xHis(13kDa) 및 7xHis-TEV-Npu_DnaE_C(6.8kDa)가 존재하였다. 이러한 결과는 형질전환된 BL21(DE3) 세포에 의해 발현된 전장 7xHis-TEV-Npu_DnaE_C-CLLMWLY-Npu_DnaE_N-6xHis(~20kDa) 단백질이 스플라이싱(Splicing) 과정을 거쳐 3개의 단백질 조각인 7xHis-TEV-Npu_DnaE_C(6.8kDa), Npu_DnaE_N-6xHis(13kDa) 및 CLLMWLY 아미노산 서열로 이루어진 고리형 펩티드로 쪼개짐을 의미한다.
- [0086] **2. 신규 고리형 펩티드의 구조 분석**
- [0087] pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하여 펩티드 발현을 유도하고, 배양한 세포의 파쇄 및 원심분리를 통해 상등액을 수득하였다. 이후, 수득한 상등액에 동일 부피의 메틸렌클로라이드(Methylene chloride)를 첨가하고 유기용매 분배에 의한 추출을 수행하였다. 이후, 메틸렌클로라이드(Methylene chloride) 층을 분획하고 감압 증발을 통해 농축하고 농축물을 메탄올에 고형분 농도가 50 mg/ml가 되도록 용해하고 0.2 μm 시린지 필터로 여과하였다. 이후, 여과액의 고형분 최종 농도를 0.1 mg/ml로 조정하고 10 μg을 LC/MS/MS에 로딩하여 분석하였다.
- [0088] 또한, pET29b-His-TEV 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하고 동일한 과정을 거쳐 얻은 시료를 대조군(Control)으로 사용하였다.
- [0089] <분석 조건>
- [0090] * 유속 : 0.8 ml/min
- [0091] * 전개 용매 : 0~2 min은 5% 아세토니트릴, 2~13 min은 5~100% 구배 조건의 아세토니트릴, 13~15 min은 100%

아세토니트릴로 농도 구배를 함

[0092] 도 6은 pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하여 수득한 고리형 펩티드를 LC/MS/MS로 분석한 스펙트럼 결과이다. 도 6에서 대조군(Control)은 pET29b-His-TEV 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하고 수득한 시료이다.

[0093] 도 6의 스펙트럼 결과 및 충돌유도분열(collision induced fragmentation)에 의한 파편 재분석을 통해 아미노산 구조를 계산하였고, 그 결과 최종 발견된 고리형 펩티드는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 것으로 예측되었다.

[0094] [화학식 I]



[0095]

[0097] 3. 신규 고리형 펩티드의 항결핵 활성

[0098] (1) 분석 시료의 준비

[0099] pET29-CYC_RUF-Intein 재조합 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 500ml LB 배지에서 접종하고 OD₆₀₀에서의 값이 0.6이 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 이후, IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 배양액에 1mM의 농도가 되도록 첨가하여 펩티드 발현을 유도하고, 16°C에서 15 hr 동안 배양하였다. 이후, 세포 배양액을 원심분리하여 세포 펠렛을 수거하고, 수거한 세포 펠렛을 Lysis buffer(30mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 15mM Imidazole, 5mM β-mercaptoethanol)에 용해한 후 초음파로 파쇄하고, 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 이후, 수득한 상등액에 동일 부피의 메틸렌클로라이드(Methylene chloride)를 첨가하고 유기용매 분배에 의한 추출을 수행하였다. 이후, 메틸렌클로라이드(Methylene chloride) 층을 분획하고 감압 증발을 통해 농축하여 분석 시료 CYC_RUF extract를 준비하였다.

[0100] 또한, pET29b-His-TEV 벡터로 형질전환된 E. coli Rosetta2(DE3) 세포를 배양하고 동일한 과정을 거쳐 분석시료 Control extract를 준비하였다.

[0101] 또한, CYC_RUF extract를 Preparative HPLC로 분획하여 분리정제된 CYC_RUF에 해당하는 peak을 확보하였다. 도 7은 본 발명에서 수득한 CYC_RUF extract 및 Control extract를 Preparative HPLC로 분획하였을 때의 피크 스펙트럼 결과이다. CYC_RUF에 해당하는 peak의 확보를 위한 과학적 근거는 첫 번째, LC/MS/MS 실험 결과를 통해 acetonitrile 농도가 55-65%가 되는 구간에서 CYC_RUF에 해당하는 peak가 용출이 되었으며, 두 번째 실제로 Preparative HPLC를 실시하여 Control extract에서 측정되지 않고 CYC_RUF extract에서만 측정된 peak만을 선별하는 것이다.

[0102] Preparative HPLC를 통한 CYC_RUF 분리정제 조건은 다음과 같다.

[0103] <분석 조건>

[0104] 컬럼: YMC-Pack R&D C18 (250mm×20mm I.D., S-5 μm, 12 nm)

[0105] <전개 조건>

[0106] 0-20분: 5% acetonitrile with 0.1 % formic acid

- [0107] 20-70분: 5-95% acetonitrile with 0.1% formic acid의 농도구배
- [0108] 70-90분: 95% acetonitrile with 0.1% formic acid
- [0109] 유속: 14 ml/min
- [0110] 도 7에서 보이는 바와 같이 55-65% acetonitrile 농도 구간에 해당하는 peak를 확보했으며 그 구간에서 control extract와 다른 peak 3개가 CYC_RUF extract에서 관찰되었다. 그 후 확보된 분획(fraction)을 analytical HPLC를 통해 CYC_RUF를 재분석하였다. 도 8은 본 발명에서 수득한 CYC_RUF extract 및 Control extract를 Preparative HPLC로 분획하고, CYC_RUF extract에서만 특이적인 피크의 분획을 Analytical HPLC로 재분석한 결과이다.
- [0111] Analytical HPLC 분석 조건은 다음과 같다.
- [0112] <분석 조건>
- [0113] 컬럼: YMC-Triart C18 (250mm×4.6mm I.D., S-5 μm, 12 nm)
- [0114] <전개 조건>
- [0115] 0-90분: 5-95% acetonitrile with 0.1% formic acid의 농도구배
- [0116] 유속: 0.8 ml/min
- [0117] 그 결과, 도 8에서 보이는 바와 같이 50분에 용출되는 single peak를 최종 확인했으며 LC/MS/MS 분석결과, 이전과 동일한 결과를 보여 목적하는 CYC_RUF인 것을 최종 확인하였다.
- [0119] (2) 항결핵 활성 측정 방법
- [0120] 항결핵 활성 측정을 위한 시료는 위에서 준비한 CYC_RUF extract, Control extract 및 분리정제된 CYC-RUF이고, 항결핵 활성 치료를 위해 각 시료를 다이메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하여 사용하였다.
- [0121] 시료의 항결핵 활성을 평가하기 위해 Alamar Blue Assay를 이용하여 결핵균에 대한 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)를 측정하였다. 구체적으로, 항균 감수성 시험은 검정의 투명한 바닥을 가진 96- 웰 마이크로 플레이트(검은색 뷰 플레이트, Packard Instrument Company, Meriden, Conn.)에서 수행하여 배경 형광을 최소화하였다. 또한, 바깥 둘레 웰에 멸균수를 채워 실험 중 웰에서의 탈수를 방지하였다. 초기 약물 희석액을 다이메틸설폭사이드(DMSO) 또는 증류수로 제조하고, 이후 2배 희석을 마이크로 플레이트 안에서 0.1 ml의 7H9GC(Tween 80 포함하지 않음)로 수행하였다. BACTEC 12B - passaged 접종물을 초기에 7H9GC에서 1:2로 희석하고, 0.1 ml를 웰에 첨가하였다. 이후, H37Rv, H37Ra 및 M. avium 각각에 대해 플레이트 웰에서 1×10^6 , 2.5×10^6 및 3.25×10^5 CFU/ml의 세균 역가를 가지도록 결정하였다. 냉동 접종물을 초기에 BACTEC 12B 배지에서 1:20으로 희석한 후 7H9GC에서 1:50으로 희석하였다. 이후 희석액 0.1ml를 웰에 첨가하여 H37Rv 및 H37Ra에 대해 각각 최종 세균 역가가 2.0×10^5 및 5×10^4 CFU/ml가 되게 하였다. 약물만을 함유하는 웰은 화합물의 자가형광 (autofluorescence)을 검출하는데에 사용되었다. 추가적인 대조구는 세균(B)으로만 구성되거나 배지(M)로만 구성되었다. 플레이트를 37°C에서 배양하고, 배양 4일째에 10×alamarBlue 용액 (Alamar Biosciences / Accumed, Westlake, Ohio) 20μl 및 20% Tween 80 12.5μl를 하나의 B 웰 및 하나의 M 웰에 첨가하고 플레이트를 37°C에서 재배양하였다. 청색에서 분홍색으로의 색상 변화 및 50,000 이상의 형광 단위(fluorescence units, FU)를 판독하기 위해 웰을 12 hr 및 24 hr에서 관찰하였다. 530nm에서 여기하고 590nm에서 방출하는 바닥 판독 모드에서 Cytofluor II 마이크로 플레이트 형광계(PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.)로 형광을 측정하였다. B 웰이 24 hr까지 분홍색이 되면 전체 플레이트에 시약을 첨가하였다. 웰이 청색으로 유지되거나 50,000 이하의 형광 단위(FU)가 측정되는 경우 색상 변화가 발생할 때까지 추가적으로 M 웰 및 B 웰을 매일 시험하였고, 색상 변화가 발생할 때 시약을 남은 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 배양하고 시약 투여 후 24 hr에 결과를 기록하였다. 시각적인 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)를 색상 변화를 막는 최저 약물 농도로 정의하였다. 형광 MIC를 위해 3개의 M 웰 평균값을 가지고 모든 웰에 대해 배경 차감을 수행하였다. 백분율 억제 는 아래와 같이 정의되었다. 90% 이상의 억제를 나타내는 최저 약물 농도를 MIC로 간주하였다.

[0122]
$$Inhibition(\%) = (1 - \frac{\text{시험 웰의 } FU}{B \text{ 웰 3개의 평균 } FU}) \times 100$$

[0124] (3) 항결핵 활성 측정 결과

[0125] 하기 표 2에 CYC_RUF extract, Control extract, 분리정제된 CYC_RUF 및 루포마이신(Rufomycin)의 항결핵 활성 측정 결과를 나타내었다.

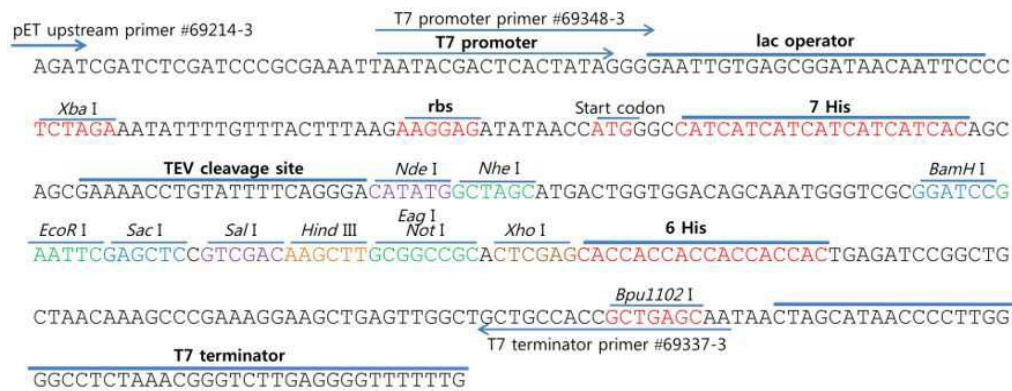
표 2

분석 시료	MIC($\mu\text{g/ml}$)
Control extract	> 10
CYC_RUF extract	7.27
분리정제된 CYC_RUF	0.92
루포마이신(Rufomycin)	0.019

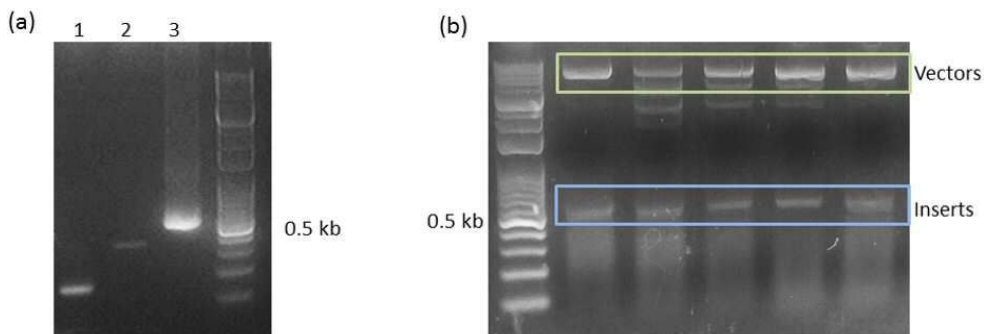
[0128] 이상에서와 같이 본 발명을 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

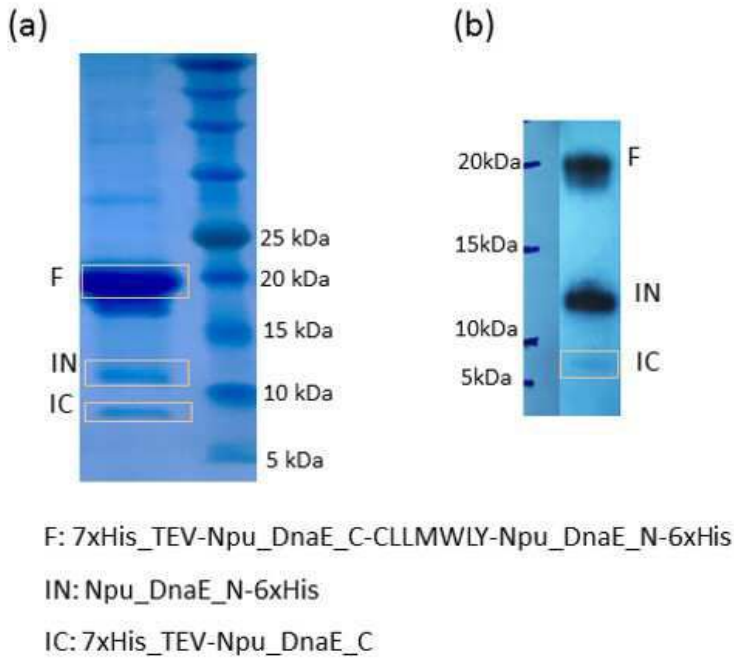
도면1



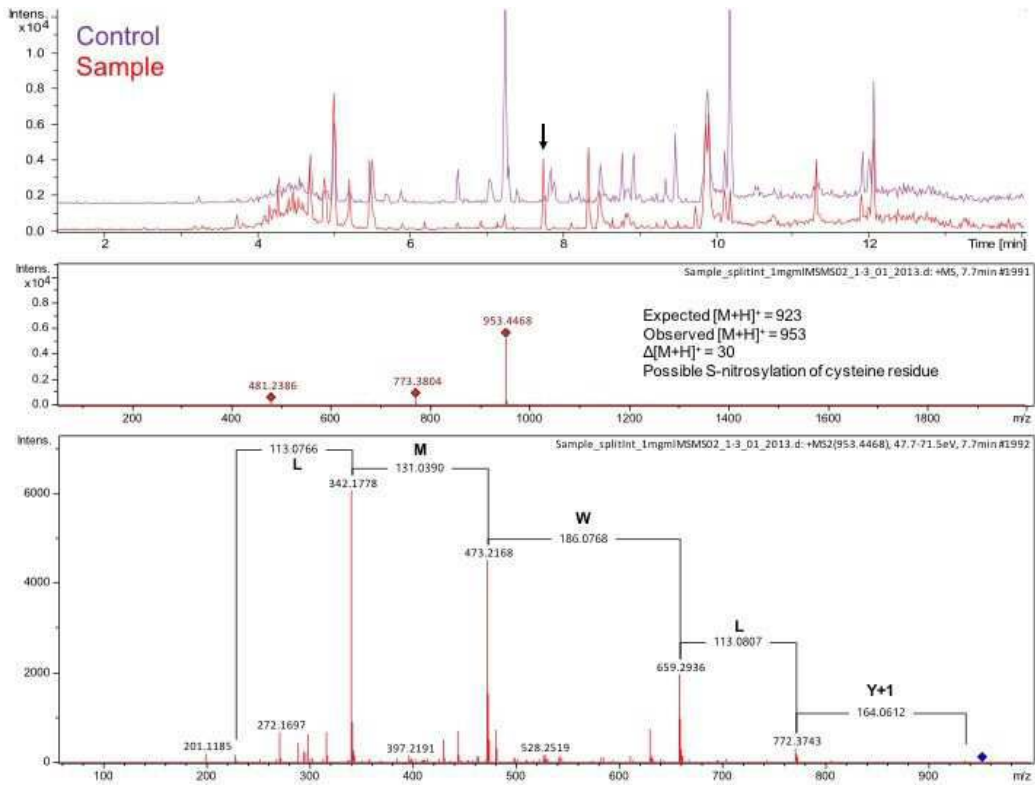
도면2



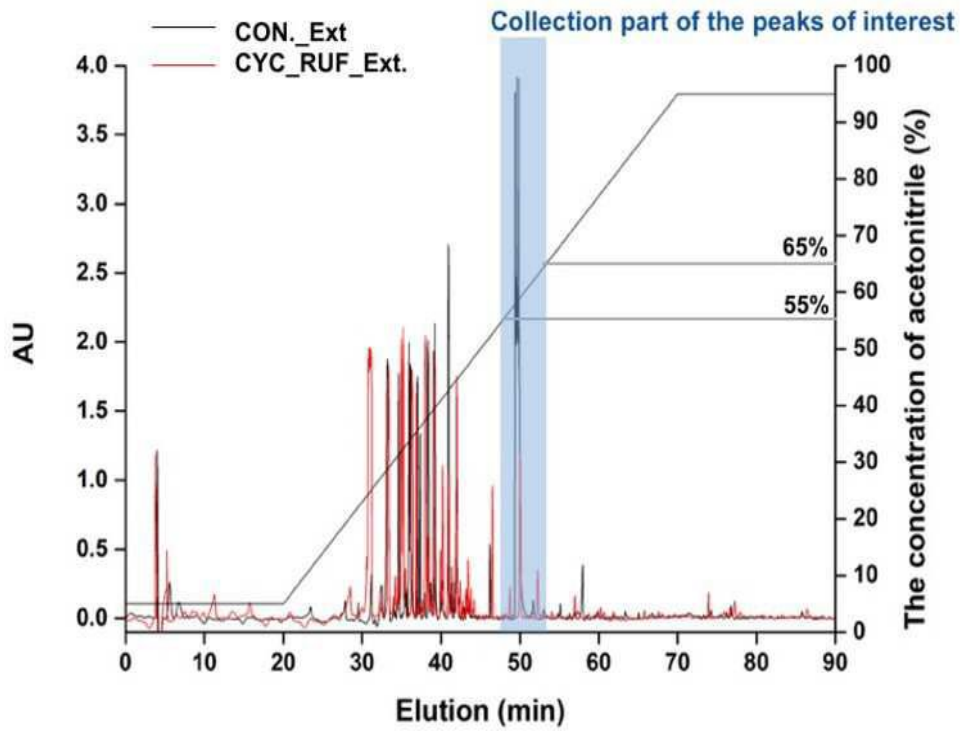
도면5



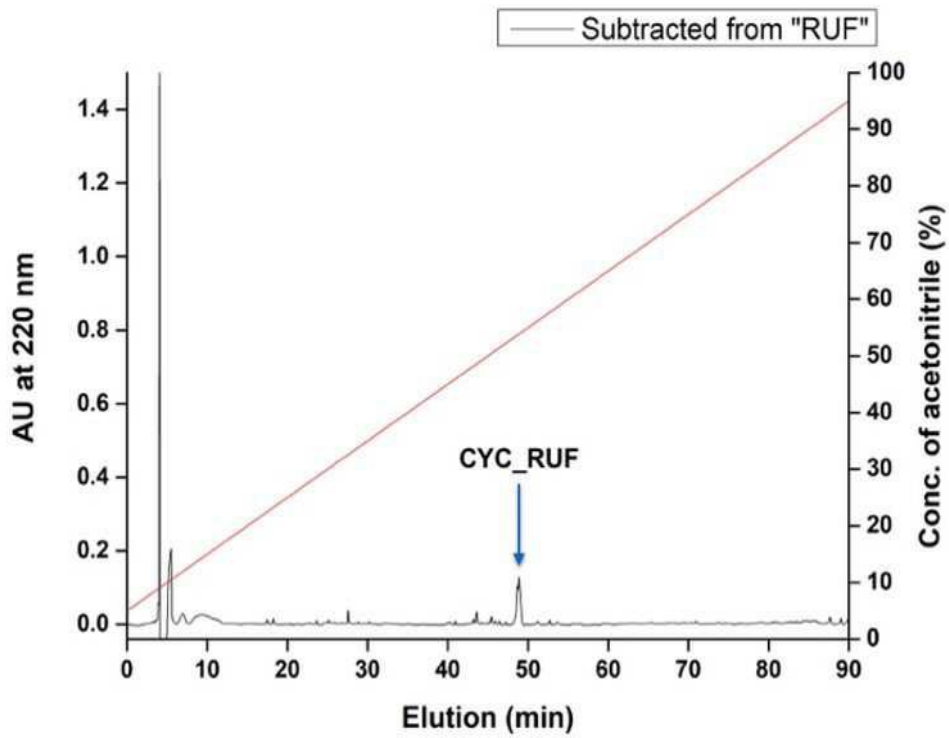
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Myongji University Industry and Academia Cooperation Foundation

<120> Novel cyclic peptide, manufacturing method of the same and use of the same

<130> ZDP-18-0349

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back bone amino acid of novel cyclic peptide

<400> 1

Cys Leu Leu Met Trp Leu Tyr

1 5

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Back bone gene of novel cyclic peptide

<400> 2

tgccctgttga tgggctgta t 21

<210> 3

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-termini domain gene of split intein Npu_DnaE

<400> 3

atgatcaaaa tagccacacg taaatattta ggcaaacaaa atgtctatga cattggagtt 60

gagcgcgacc ataattttgc actcaaaaat ggcttcatag ctttctaat 108

<210> 4

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-termini domain gene of split intein Npu_DnaE

<400> 4
 tgtttaagct atgaaacgga aatattgaca gtagaatatg gattattacc gatttgtaaa 60
 attgtagaaa agcgcacgca atgtactgtt tatagcgttg ataataatgg aatatattat 120
 acacaacctg tagcacaatg gcacgatcgc ggagaacaag aggtgtttga gtattgtttg 180
 gaagatggtt cattgattcg ggcaacaaaa gaccataagt ttatgactgt tgatggtcaa 240
 atgttgccaa ttgatgaaat atttgaacgt gaattggatt tgatgcggtg tgataatttg 300
 ccgaattaa 309

<210> 5

<211> 1081

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of recombinant vector pET29-CYC_RUF-Intein

<400> 5
 atgggccatc atcatcatca tcatcacagc agcgaaaacc tgtattttca gggacatag 60
 atcaaaatag ccacacgtaa atatttaggc aaacaaaatg tctatgacat tggagttgag 120
 cgcgaccata attttgact caaaaatggc ttcatagctt ctaattgcct gttgatgtgg 180
 ctgtattgtt taagctatga aacggaaata ttgacagtag aatatggatt attaccgatt 240
 ggtaaaattg tagaaaagcg catcgaatgt actgtttata gcgttgataa taatggaaat 300

 atttatacac aacctgtagc acaatggcac gatcgcgag aacaagaggt gtttgagtat 360
 tgtttggaag atggttcatt gattcgggca acaaaagacc ataagtttat gactgttgat 420
 ggtcaaatgt tgccaattga tgaatatatt gaacgtgaat tggatttgat gcgggttgat 480
 aatttgccga attaactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa 540
 gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt 600
 ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggattg 660
 gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcac taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcga 720

 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcccctcc tttcgtttc ttcccttct 780
 ttctcgccac gttcgccggc tttcccctgc aagctctaaa tcgggggctc ctttagggt 840
 tccgatttag tgetttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac 900
 gtagtgggcc atcgccctga tagacggatt ttcgcccttt gacgttgag tccacgttct 960
 ttaatagtgg actcttgctc caaactggaa caaacctcaa ccctatctcg gtctattctt 1020
 ttgatttata agggattttg ccgatttccg cctattggtt aaaaaatggg cttgatttaa 1080
 c 1081