



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0033861
(43) 공개일자 2023년03월09일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0116782
(22) 출원일자 2021년09월02일
심사청구일자 2021년09월02일</p> | <p>(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)</p> <p>(72) 발명자
홍석만
경기도 성남시 분당구 중앙공원로 54, 216동 1902호(서현동, 시범단지우성아파트)</p> <p>오소영
서울특별시 서초구 잠원로 157, 120동 1001호(잠원동, 신반포16차아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인리체</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 DNA 매개 면역 증강 유도용 구아닌/시토신 기반 포스포로티오에이트 결합 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드

(57) 요약

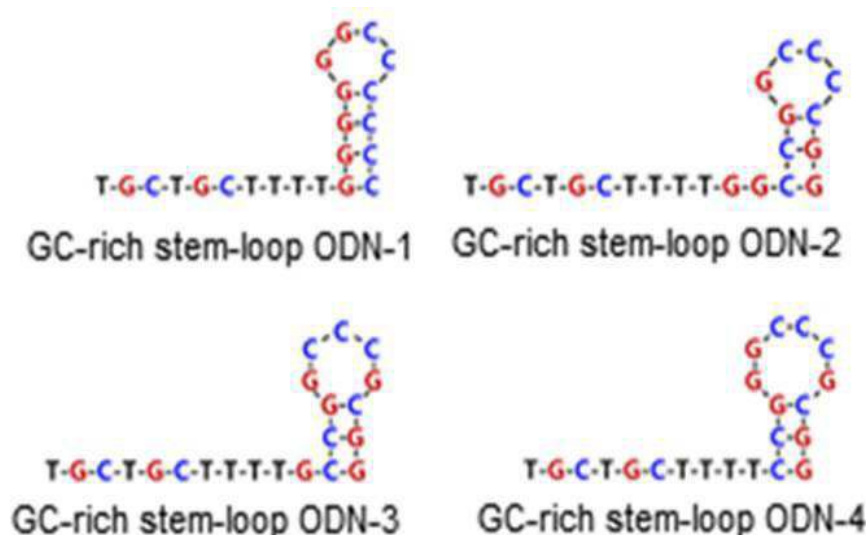
본 발명은 올리고데옥시뉴클레오타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 하기 식 1로 표시되고 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 가짐으로써, B1a 세포로부터 mtDNA의 분비를 유도하고, 수지상 세포 및 대식 세포에서 사이토카인의 발현과 NK 세포 및 NKT 세포의 활성을 증가시켜 면역 증강 효과가 있다.

[식 1]

TGCTGCTTTX

(식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고데옥시뉴클레오타이드이고, 상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임).

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/531 (2013.01)

박현정

경기도 안산시 단원구 와동공원로8길 54, 401호(와동)

(72) 발명자

이성원

충청남도 천안시 동남구 서부대로 252, 205동 706호(신방동, 신방동두레현대아파트2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111574
과제번호	2019R1A2C1009926
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	염증성 대장암 동물 모델을 통한 자연살해 수용체 발현 CD8+ T 세포의 항암면역 기

전 연구

기 여 율	2/4
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345332934
과제번호	2021R1I1A1A01054418
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	신규 자발적 전신 경화증 생쥐 모델을 통한 발병 기전 규명과 기능화 그래핀의 전신

경화증 조절 응용성 연구

기 여 율	1/4
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345333367
과제번호	2021R1I1A1A01051465
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	자연살해 T 세포의 Th2 면역반응 매개 자폐 스펙트럼 연관 행동발달 장애에 미치는

영향 및 조절 메커니즘 규명

기 여 율	1/4
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 식 1로 표시되고, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드:

[식 1]

TGCTGCTTTTX

(식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드이고,

상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임).

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 X는 1:0.5 내지 2.0 비율의 G와 C로 이루어진 9nt 내지 20nt 인, 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 X는 1:1 비율의 G와 C로 이루어진 12nt 인, 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나로 표시되는 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 5

청구항 1의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 면역 증강용 조성물.

청구항 6

청구항 1의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 방광암, 유방암, 유두상 신장세포암, 간 세포성암, 췌장 도관 선암, 육종 및 위 선암으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) 매개 면역 증강 유도용 구아닌/시토신 기반 포스포로티

[0001]

오에이트 결합 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 올리고데옥시뉴클레오타이드(oligodeoxynucleotide)는 엔도뉴클레아제(endonuclease)에 의한 분해에 저항성을 가지기 위해서 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합을 통해서 제조하여야 한다. 아데닌(A), 티민(T), 구아닌(G), 시토신(C) 염기들의 비율과 순서에 따라서 면역 조절 기능이 다양해지며, 비율과 순서의 변화 때문에 줄기-고리 (stem-loop)와 같은 구조를 갖출 수 있다. 따라서, 면역 증강 기능을 가진 후보 물질 선별은 매우 중요하며 이를 생체에 적용한다면 박테리아 또는 바이러스 감염 질환뿐만 아니라 암과 같은 면역 증강이 필요한 질환 치료제 개발로 이어질 것으로 여겨진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0558851호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 mtDNA 매개 면역 증강을 통한 암 예방 또는 치료용 구아닌/시토신 기반 포스포로티오에이트 결합 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 1. 하기 식 1로 표시되고, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드:
- [0009] [식 1]
- [0010] TGCTGCTTTX
- [0011] (식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고데옥시뉴클레오타이드이고,
- [0012] 상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임).
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 X는 1:0.5 내지 2.0 비율의 G와 C로 이루어진 9nt 내지 20nt인, 올리고데옥시뉴클레오타이드.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 X는 1:1 비율의 G와 C로 이루어진 12nt인, 올리고데옥시뉴클레오타이드.
- [0015] 4. 위 1에 있어서, 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나로 표시되는 올리고데옥시뉴클레오타이드.
- [0016] 5. 위 1의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 면역 증강용 조성물.
- [0017] 6. 위 1의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [0018] 7. 위 6에 있어서, 방광암, 유방암, 유두상 신장세포암, 간 세포성암, 췌장 도관 선암, 육종 및 위 선암으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 B1a 세포로부터 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA)의 분비를 유도하고, 수지상 세포 및 대식 세포에서 사이토카인의 발현과 NK 세포 및 NKT 세포의 활성을 증가시켜 면역

증강에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 실시예에서 제조된 구아닌 및 시토신이 풍부한 올리고데옥시뉴클레오타이드(GC-rich ODN-1 내지 4)의 구조를 나타낸 것이다.
- 도 2는 GC-rich ODN에 포함된 GC 부위 내 G 및 C의 비율에 따른 헤어핀 구조 형성 여부를 확인한 결과이다.
- 도 3은 GC-rich ODN에 포함된 GC 부위의 서열 길이에 따른 헤어핀 구조 형성 여부를 확인한 결과이다.
- 도 4는 GC-rich ODN-1이 B 세포로부터 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA) 방출을 유도하는 것을 확인한 결과이다.
- 도 5는 GC-rich ODN-1의 자극에 의해 B1a 세포로부터 mtDNA 분비가 증가하는 것을 확인한 결과이다.
- 도 6은 GC-rich ODN-1의 자극에 의해 B1a 세포로부터 분비된 mtDNA가 CD4⁺ T 세포를 활성화하는 것을 확인한 결과이다.
- 도 7은 GC-rich ODN-1 내지 4의 GC 부위 헤어핀 구조의 고리 크기에 따른 mtDNA 분비 증가 정도를 비교한 결과이다.
- 도 8은 GC-rich ODN-1에 의한 mtDNA 분비가 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) 신호 의존적으로 증가함을 확인한 결과이다.
- 도 9는 GC-rich ODN-1의 수지상 세포 및 대식 세포의 인터루킨-12(interleukin-12) 발현 증가 및 NK 세포 및 NKT 세포의 활성화 증가 효과를 확인한 결과이다.
- 도 10은 GC-rich ODN-1,2 및 4의 GC 부위 헤어핀 구조의 고리 크기에 따른 수지상 세포 및 대식 세포의 인터루킨-12(interleukin-12) 발현 증가 및 NK 세포 및 NKT 세포의 활성화 증가 정도를 비교한 결과이다.
- 도 11은 환자의 B1a 세포 관련 유전자 및 mtDNA 유전자의 발현이 증가하는 경우 다양한 종류의 암 환자의 생존 가능성이 유의적으로 증가한다는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0025] 본 발명은 하기 식 1로 표시되고, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0026] [식 1]
- [0027] TGCTGCTTTX
- [0028] (식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드이고,
- [0029] 상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임)
- [0030] 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드는 포스포다이에스터(phosphodiester) 백본을 갖는 경우에 비해 핵산 분해 효소에 대한 저항성이 높아 올리고데옥시뉴클레오타이드의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있다.
- [0031] 헤어핀 구조는 단일 가닥의 RNA 또는 DNA의 서열 간의 결합으로 생긴 줄기 부분과 루프 형태를 하고 있는 고리 부분을 가진 구조로, 줄기-고리(stem-loop) 구조라고도 한다.
- [0032] 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 B1a 세포로부터 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA)의 분비를 유도하고, B1a 세포로부터 분비된 mtDNA는 CD4⁺ T 세포를 활성화한다. 또한, 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 리포폴리사카라이드(LPS, E. coli serotype 0111:B4, Sigma, L-2630) 자극 시 수지상 세포와 대식 세포에서 IL-12(Interleukin-12) 발현을 증가시키고, NK 세포 및 NKT 세포의 활성화와 IFN γ (Interferon- γ) 발

현을 증가시킨다. 따라서 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 면역 증강 효과를 나타낸다.

- [0033] 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드의 2차 구조는 헤어핀 구조를 포함한다. 본 발명자들은 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드의 헤어핀 구조에 포함된 고리 크기가 커질수록 mtDNA의 분비, 수지상 세포 및 대식 세포에서 사이토카인 발현 및 NK, NKT 세포의 활성을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 올리고데옥시뉴클레오타이드의 헤어핀 구조에 포함된 고리 크기가 증가할수록 올리고데옥시뉴클레오타이드의 면역 증강 효과는 증대된다.
- [0034] 본 발명의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 식 1의 서열 중 TGCTGCTTTT로 표시되는 부분은 X 부분을 안정화시키는 뼈대 (Backbone)에 해당하며 X 부분과는 다르게 면역 증강 효과에 직접적인 기여를 하지는 않는다. 하지만 TGCTGCTTTT로 표시되는 부분의 서열이 변경될 경우, X 부분의 면역 증강 효과에 부정적인 영향을 미칠 가능성을 배제할 수 없다. 그러므로 TGCTGCTTTT 서열은 mtDNA 의존적인 면역 증강 효과를 위한 구조적인 기본 틀로서 요구 된다.
- [0035] 본 발명자들은 상기 X가 약 1:1 비율의 G 및 C로 이루어진 9nt 이상의 올리고데옥시뉴클레오타이드인 경우, X로 표시되는 부분은 헤어핀 구조를 형성하는 것을 확인하였다. X의 길이는 예를 들면, 9nt 내지 50nt, 9nt 내지 20nt, 9nt 내지 16nt, 10nt 내지 15nt, 10nt 내지 14nt 또는 11nt 내지 13nt일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명자들은 상기 X가 길이 9 nt, 10 nt 또는 11nt의 G 및 C로 이루어지고, G 및 C의 비율이 1:0.5 내지 2.0 인 올리고데옥시뉴클레오타이드인 경우, X로 표시되는 부분은 헤어핀 구조를 형성하는 것을 확인하였다. X에서 G와 C의 비율은 예를 들면, 1:0.5 내지 2.0, 1:0.67 내지 1.5 또는 1:0.83 내지 1.2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 일 실시예에 따르면, X는 1:1 비율의 G와 C로 이루어진 12nt의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0038] 일 실시예에 따르면, 올리고데옥시뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나로 표시되는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- [0041] 면역 증강용 조성물은 하기 식 1로 표시되고, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0042] [식 1]
- [0043] TGCTGCTTTTX
- [0044] (식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고뉴 클레오타이드이고,
- [0045] 상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임)
- [0046] 포스포로티오에이트 백본, X의 길이, X 내 G와 C의 비율 및 헤어핀 구조는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 전술한 바와 같이, 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드는 Bla 세포로부터 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA)의 분비를 유도하여 CD4+ T 세포를 활성화한다. 그리고 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드는 리포폴리사카라이드 (LPS, E. coli serotype 0111:B4, Sigma, L-2630) 자극 시 수지상 세포와 대식 세포에서 IL-12(Interleukin-12) 발현과 NK 세포 및 NKT 세포의 활성 및 IFN γ (Interferon- γ) 발현을 증가시켜 면역 증강 용도로 이용할 수 있다.
- [0048] 면역 증강이란 항원에 대한 생체 방어능을 증진시키는 것으로, 구체적으로는 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역능을 상승시키는 것을 의미할 수 있고, 면역 증강의 기작은 제한되지 않는다.
- [0049] 면역 증강용 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함

된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 면역 증강용 조성물은 면역 증강용 약학 조성물로 이용할 수 있다. 이 경우 약학 조성물은 유효 성분으로써 상기 올리고데옥시헵타이드 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 본 발명의 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1 중량 % 내지 약 99.99 중량 %, 바람직하게는 약 90 중량% 내지 약 99.99 중량 %로 포함될 수 있으며, 상기 첨가제는 약 0.1 중량 % 내지 약 20 중량 %로 포함될 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고, 도고제, 로션, 연고 등을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 약학 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 약학 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.

[0051] 본 발명의 면역 증강용 조성물은 식품 첨가물로 이용할 수 있다. 이 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 대상이 되는 식품은 예를 들면, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 보조 식품류일 수 있으며, 구체적으로 유제품, 제과물, 조미료, 음료 및 드링크제, 스낵, 캔디류, 젤리류, 아이스크림 및 냉동용 디저트, 아침 곡물류, 영양바, 스낵바 초콜렛 제품, 가공 식품, 곡물 제품 및 파스타, 스프, 소스 및 드레싱, 과자 제품, 오일 및 지방 제품, 유제품 음료 (dairy drink) 및 우유 음료, 차, 두유 및 콩 유제품 (soy dairy-like product), 냉동식품, 조리 음식 및 대체 음식, 육류 제품, 치즈, 요구르트, 빵 및 롤빵, 케이크, 쿠키 및 크래커 등일 수 있다.

[0053] 본 발명은 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0054] 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 하기 식 1로 표시되고, 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 백본을 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 포함한다.

[0055] [식 1]

[0056] TGCTGCTTTTX

[0057] (식 중, X는 구아닌(G)과 시토신(C)으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드이고,

[0058] 상기 X는 헤어핀 구조를 이루는 것임)

[0059] 포스포로티오에이트 백본 및 헤어핀 구조는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 전술한 바와 같이, 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드는 B1a 세포로부터 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA)의 분비를 유도하여 CD4+ T 세포를 활성화한다. 그리고 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드는 리포폴리사카라이드 (LPS, E. coli serotype 0111:B4, Sigma, L-2630) 자극 시 수지상 세포와 대식 세포에서 IL-12(Interleukin-12) 발현과 NK 세포 및 NKT 세포의 활성화 및 IFN γ (Interferon- γ) 발현을 증가시킨다. 또한, 본 발명자들은 B1a 세포 관련 유전자 및 mtDNA 유전자의 발현이 증가하는 경우 다양한 종류의 암 환자의 생존 가능성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 올리고데옥시뉴클레오타이드는 암 예방 또는 치료 용도로 이용할 수 있다.

[0061] 암은 B1a 세포의 활성화 및 mtDNA 분비의 증가에 의해 예방 또는 치료 효과가 기대되는 것이라면 제한되지 않고, 예를 들면, 방광암, 유방암, 유두상 신장세포암, 간 세포성암, 췌장 도관 선암, 육종 및 위 선암으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.

[0062] 용어 "예방"은 전체 예방 뿐만 아니라 병태의 발병 또는 재발병의 가능성의 경미한, 실질적인 또는 큰 감소를 포함하여 예방될 병태 또는 재발생 또는 재발하는 병태의 발병 가능성의 임의의 정도의 감소를 초래하는 예방적

조치를 지칭하고, 가능성 감소의 정도는 적어도 경미한 감소이다.

- [0063] 용어 "치료"는 치유뿐만 아니라 경미한 완화, 실질적인 완화, 주요 완화를 포함하는 임의의 정도의 완화를 포함하여 치료될 병태를 앓고 있는 대상체 또는 환자에게 유리한 효과를 초래하는 처치를 지칭하고, 완화 정도는 적어도 경미한 완화이다.
- [0064] 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로스, 텍스트린, 말토텍스트린, 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 있으나, 이에 제한되지 않는다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면 활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며 이에 제한되지는 않으나, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0067] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 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.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 약학적 조성물에서 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 1 내지 6000 mg, 바람직하게는 60 내지 600 mg을 1회 또는 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0071] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0073] 실시예

[0074] 1. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리(헤어핀) 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)의 제조 및 구조 확인

[0075] 본 발명자들은 하기 표 1의 구아닌/시토신 기반의 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드(GC-rich ODN)를 제조하였다.

표 1

[0076]

명칭	서열	서열번호
ODN-1	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCC	1
ODN-2	TGCTGCTTTTGGCCGGCCCCGG	2
ODN-3	TGCTGCTTTTGGCCGGCCCCGG	3
ODN-4	TGCTGCTTTTCCGGGGCCCCGG	4

[0077]

고리의 길이를 조절하기 위해 GC로 연결되어 있는 11번째 염기부터 22번째 염기까지 12개의 염기 서열의 G와 C의 비율을 1:1로 일정하게 유지한 뒤에 순서만을 바꿔 줄기와 고리의 크기를 변화시켰다. 또한 구조 예측 프로그램(The mfold web server)를 이용하여 2차 구조를 분석하여 단일 줄기-고리 형태를 띠며 최소값의 자유 에너지(G)를 갖는 서열 중에 고리 크기는 고정되고 줄기의 크기가 증가된 서열 또는 줄기 크기는 고정되고 고리의 크기가 증가된 서열을 선별하였다. 본 실시예에서 제조된 GC-rich ODN-1 내지 4의 구조는 도 1에 나타난 바와 같이, 줄기-고리(stem-loop) 구조를 갖는다.

[0078]

추가적으로, GC 비율의 변화에 따른 줄기-고리 구조 형성 가능성을 구조 예측 프로그램(The mfold web server)을 통해 확인하였다. 위 ODN-1 내지 4의 1번째부터 10번째 염기 서열을 공통으로 포함하되, GC 부위(11번째 이후의 염기 서열)의 G와 C의 비율을 변화시키며 줄기-고리 구조를 형성하는 ODN 서열을 확인하였다. 각 ODN의 서열은 하기 표 2에 나타났다. 도 2에 나타난 바와 같이, G와 C의 비율이 1:0.5 내지 2.0인 경우 ODN이 줄기-고리 구조를 형성하는 것을 확인하였다.

표 2

[0079]

GC 부위의 G:C ratio	서열	서열번호
1:0.33	TGCTGCTTTTGGGGGGCC	5
1:0.5	TGCTGCTTTTGGGGGGCCC	6
1:0.67	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCC	7
1:0.83	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	8
1:1(ODN-1)	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	1
1:1.2	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	9
1:1.5	TGCTGCTTTTGGGGCCCCC	10
1:2.0	TGCTGCTTTTGGGCCCCC	11
1:3.0	TGCTGCTTTTGCCCCC	12

[0080]

또한, GC 서열 길이 변화에 따른 줄기-고리 구조 형성 가능성을 구조 예측 프로그램(The mfold web server)을 통해 확인하였다. 위 ODN-1 내지 4의 1번째부터 10번째 염기 서열을 공통으로 포함하되, GC 부위(11번째 이후의 염기 서열)의 길이를 변화시키며 줄기-고리 구조를 형성하는 ODN 서열을 확인하였다. 각 ODN의 서열은 하기 표 3에 나타났다. 도 3에 나타난 바와 같이, GC 부위의 서열 길이가 9 이상인 경우 모두 줄기-고리 구조를 형성하는 것을 확인하였다.

표 3

[0081]

GC 부위의 서열 길이	서열	서열번호
8	TGCTGCTTTTGGGGCCCC	13
9	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCC	14
10	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	15
11	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	16
12(ODN-1)	TGCTGCTTTTGGGGGGCCCCC	1
13	TGCTGCTTTTGGGGGGGGCCCCC	17
14	TGCTGCTTTTGGGGGGGGCCCCC	18
15	TGCTGCTTTTGGGGGGGGCCCCC	19
16	TGCTGCTTTTGGGGGGGGGGCCCCC	20

[0082] 2. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)에 의한 복강 면역 세포의 mtDNA(미토콘드리아 DNA, mitochondrial DNA) 분비 유도

[0083] 복강에서 분리한 면역 세포를 RPMI 배양액과 함께 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1과 6시간 공동 배양 후, 배양 상층액에 존재하는 DNA의 양을 측정한 결과, 처리군에서 그 양이 증가함을 확인하였다(도 4A). 또한, 상층액을 이용하여 genomic DNA 유전자(β -actin)와 mtDNA 유전자(ND1)에 대한 프라이머(표 4)를 이용하여 PCR(중합 효소 연쇄 반응)을 실시한 결과, 증가된 DNA는 mtDNA라는 것을 확인하였다(도 4B 내지 도 4C). 그리고 이러한 mtDNA는 CD19를 발현하는 B 세포에서 분비되는 것을 확인하였다(도 4D).

표 4

명칭	서열	서열번호
β -actin forward	5'-GTA TGG AAT CCT GTG GCA TC-3'	21
β -actin reverse	5'-AAG CAC TTG CGG TGC ACG AT-3'	22
ND1 forward	5'-AA TCG CCA TAG CCT TCC TAA CAT-3'	23
ND1 reverse	5'-GG CGT CTG CAA ATG GTT GTA A-3'	24

[0085] 3. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN) 자극에 의한 복강 B1a 세포에서의 mtDNA 분비 증가

[0086] 복강에서 분리한 면역 세포를 RPMI 배양액과 함께 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1과 6시간 공동 배양 후, B1a 세포($CD5^+CD19^{high}B220^{low}$), B1b 세포($CD5^+CD19^{high}B220^{low}$), B2 세포($CD5^+CD19^+B220^+$)에서 mtDNA의 분비를 유세포 측정 분석 방법을 통하여 조사하였다(도 5A). 실험 결과, 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN 자극에 의해서 B1a 세포의 mtDNA 분비가 증가함을 확인하였다(도 5).

[0087] 4. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)에 의해 분비된 B1a 세포 mtDNA의 면역 증강 확인

[0088] 복강에서 분리한 면역 세포를 RPMI 배양액과 함께 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1과 6시간 공동 배양 후, B1a 세포와 결합되어 상호 작용을 하는 $CD4^+$ T 세포에서 발현하는 활성화 마커($CD44$)의 발현을 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, B1a에서 분비된 mtDNA가 유의적으로 $CD4^+$ T 세포를 활성화하는 것을 확인하였다(도 6).

[0089] 5. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)의 변형을 통한 B1a 세포 mtDNA 분비 유도 최적화

[0090] 복강에서 분리한 면역 세포를 RPMI 배양액과 함께 줄기와 고리 구조를 변형시킨 위 1에서 제조한 다양한 ODN(ODN-1, 2, 3, 4)과 6시간 공동 배양 후, B1a 세포에서 분비하는 mtDNA를 SYTOX Green 염색을 통해서 측정하였다. 실험 결과, 고리의 크기가 커질수록 mtDNA의 분비를 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(도 7).

[0091] 6. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)의 변형을 통한 B1a 세포 mtDNA 분비 유도 TRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) 신호 의존성

[0092] 복강에서 분리한 면역 세포를 RPMI 배양액과 함께 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1과 6시간 공동 배양 하고, TRIF inhibitor를 처리 후 B1a 세포에서 mtDNA의 분비를 유세포 측정 분석 방법을 통하여 조사하였다.

[0093] 그 결과, 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN 자극에 의해서 B1a 세포의 mtDNA 분비가 TRIF 신호 의존적으로 증가함을 확인하였다(도 8).

[0094] 7. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)에 의해 분비된 B1a 세포 mtDNA의 면역 증강 시너지 효과 확인

[0095] IL12(YFP) 형광 reporter 생쥐의 복강에 그람 음성균 유래 lipopolysaccharide (LPS) (2ug) 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1 (20 ug)을 주사하였다. 16시간 뒤 비장 면역 세포에서 수지상 세포와 대식 세포의 IL12(YFP) 발현 정도를 조사하였다.

[0096] 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1만 처리한 군에서는 Vehicle을 주입한 군에 비해 IL12(YFP) 발현에서 유의적인 차이를 보이지 않았지만, LPS 단독 처리군에 비해 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN을 함께 처

리한 군에서 IL12(YFP) 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 9A 내지 도 9B).

- [0097] NK, NKT 세포의 활성화 마커(CD69)와 IFN γ 사이토카인 발현도 LPS 단독 처리군에 비해 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1을 함께 처리한 군에서 유의적으로 증가하였다(도 9C). LPS 유도 면역 반응에 있어서 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1의 면역 증강 시너지 효과는 mtDNA 의존적으로 일어남을 확인하였다(도 9D 내지 도 9E).
- [0098] 8. 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고데옥시뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)의 고리 크기 의존적 면역 증강 시너지 효과
- [0099] IL12(YFP) 형광 reporter 생쥐의 복강에 그람 음성균 유래 lipopolysaccharide (LPS) (2 μ g) 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1, 2, 4 (20 μ g)를 주사하였다. 16시간 뒤 비장 면역 세포에서 수지상 세포의 IL12(YFP) 발현 정도를 조사하였다.
- [0100] LPS 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-1를 처리한 군에 비해 LPS 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-2(줄기 크기 감소 ODN)을 처리한 군에서 IL12(YFP) 발현이 유의적이지 않지만 감소하는 경향성을 보였다. 하지만, LPS 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-2를 처리한 군에 비해 LPS 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN-4(고리 크기 증가)을 처리한 군에서 IL12(YFP) 발현이 유의적으로 증가하였다(도 10A 및 도 10B).
- [0101] NK, NKT 세포의 활성화 마커(CD69) 발현 또한 LPS 및 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN의 처리 시 ODN의 줄기 크기가 감소함에 따라 유의적이지 않지만 감소하는 경향성을 보였으며, ODN의 고리 크기가 증가함에 따라 CD69의 발현이 유의적으로 증가하였다(도 10C 및 도 10D).
- [0102] 9. 암 조직에서의 B1a 세포 관련 유전자 (CD19, CD5)와 mtDNA 유전자(ND1)의 복합적인 과발현과 암 환자 생존과의 관련성
- [0103] 동물 실험 결과에서 확인한 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN 자극에 의한 B1a 세포에서 분비된 mtDNA의 면역 증강 효과의 암 억제 가능성을 확인하기 위해서 online database인 Kaplan Meier(KM) Plotter(www.kmplot.com)를 이용하여 분석하였다.
- [0104] B1a 세포 관련 유전자(CD19, CD5)와 mtDNA 유전자(ND1) 조합의 발현과 다양한 암 환자의 생존 가능성 간의 상관성을 분석한 결과, CD19, CD5, ND1 조합의 과발현이 방광암, 유방암, 유두상 신장세포암, 간 세포성암, 췌장도관 선암, 육종, 위 선암 환자의 생존 가능성을 유의적으로 증가시킨다는 것을 확인하였다(도 11).
- [0105] 10. mtDNA 방출 유도성 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 올리고뉴클레오타이드 (GC-rich stem-loop ODN)와 기존의 면역 증강용 CpG-B ODN과의 비교
- [0106] mtDNA 방출 유도능의 구아닌/시토신 기반 줄기-고리 구조 ODN은 기존의 CpG-B ODN (Bioneer, Daejeon, Korea)과 비교하여 다음과 같은 차별성이 있다.
- [0107] CpG ODN 중에 가장 대표적인 CpG-B ODN는 CACGTT 또는 GTCGTT 서열과 같은 TLR9(Toll-like receptor 9) 자극 motif를 가지고 있지만, mtDNA 유도성 줄기-고리 구조 ODN은 이러한 서열을 가지고 있지 않기 때문에 여러 가지 면에서 CpG-B ODN과 차별성을 보인다. 예를 들면, CpG-B ODN는 수지상 세포, 대식 세포, B1a 세포 등 다양한 세포에 작용하는 것과는 달리 mtDNA 유도성 줄기-고리 구조 ODN은 B1a 세포에 특이적으로 작용한다. 또한 mtDNA 유도성 줄기-고리 구조 ODN은 면역 세포의 활성화와 ROS 발생을 유도하지 않으며, 톨 유사 수용체(toll-like receptor, TLR)에 의존적으로 작용하지 않는다는 면에서 차별점이 있다. 요약하자면, mtDNA 유도성 줄기-고리 구조 ODN은 mtDNA를 매개로 면역 증강을 유도한다는 점이 기존의 CpG ODN과 차별화 된 부분이다. 구체적인 차이점은 표 5에 기재되어 있다.

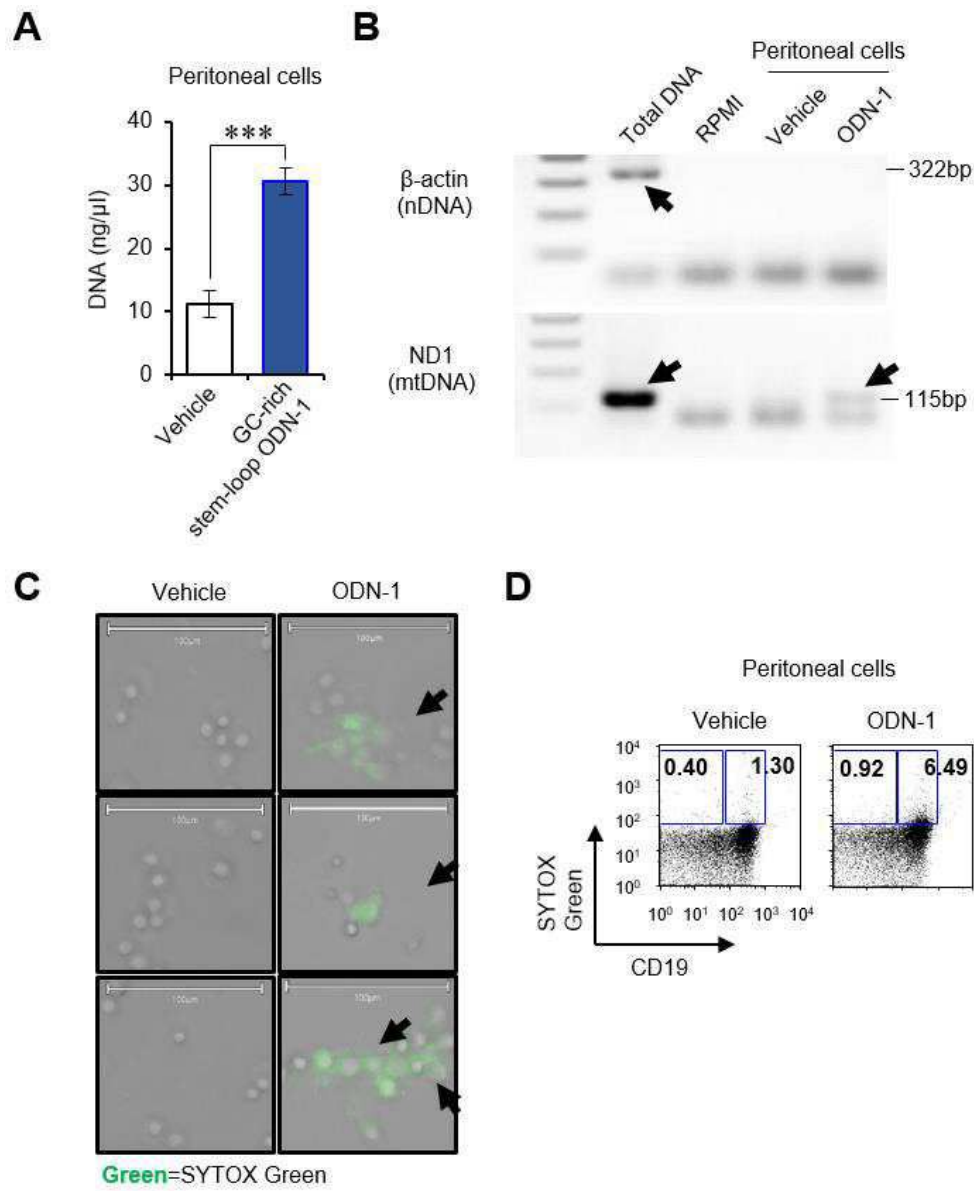
표 5

	mtDNA-releasing stem-loop ODN	CpG-B ODN
작용 세포	B1a 세포	다양한 면역세포
mtDNA 방출 유도	가능	불가능
면역 활성화 유도	불가능	가능
ROS 매개 세포자멸사(apoptosis) 유도	불가능	가능

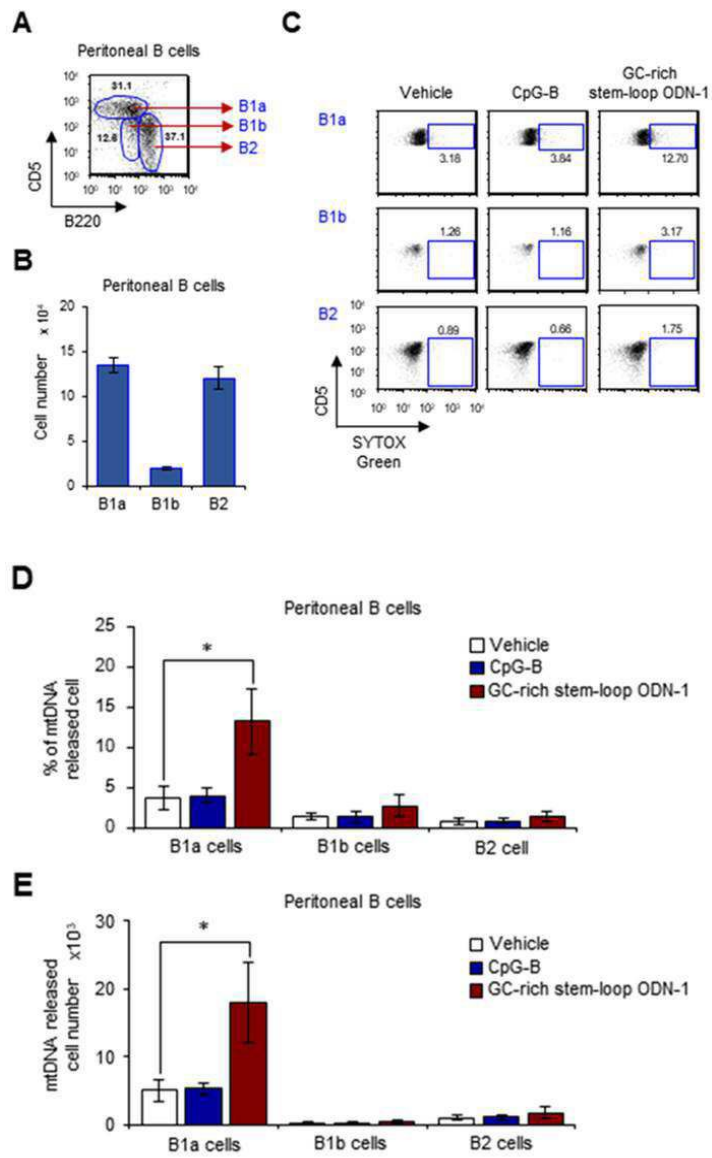
도면3

GC 서열 길이	8개	9개	10개	11개	12개
ODN 서열	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G
Stem loop 구조	GC 부위 Stem loop 구조 형성 가능				
GC 서열 길이	13개	14개	15개	16개	16개 이상
ODN 서열	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G	T-G-C-T-G-C-T-T-T-T-G-G-G-G-G-G-G-G-G-G
Stem loop 구조					모든 GC 부위 Stem loop 구조 형성

도면4

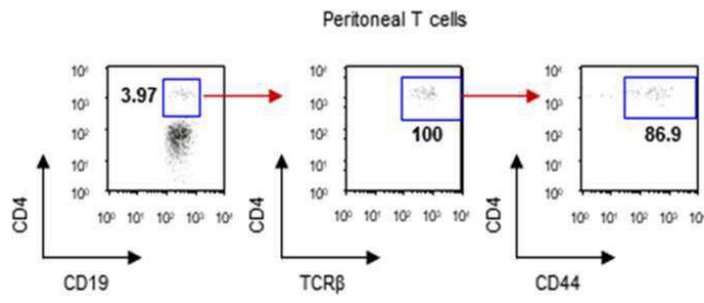


도면5

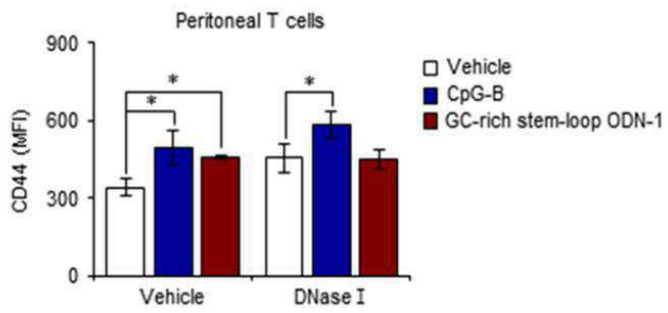


도면6

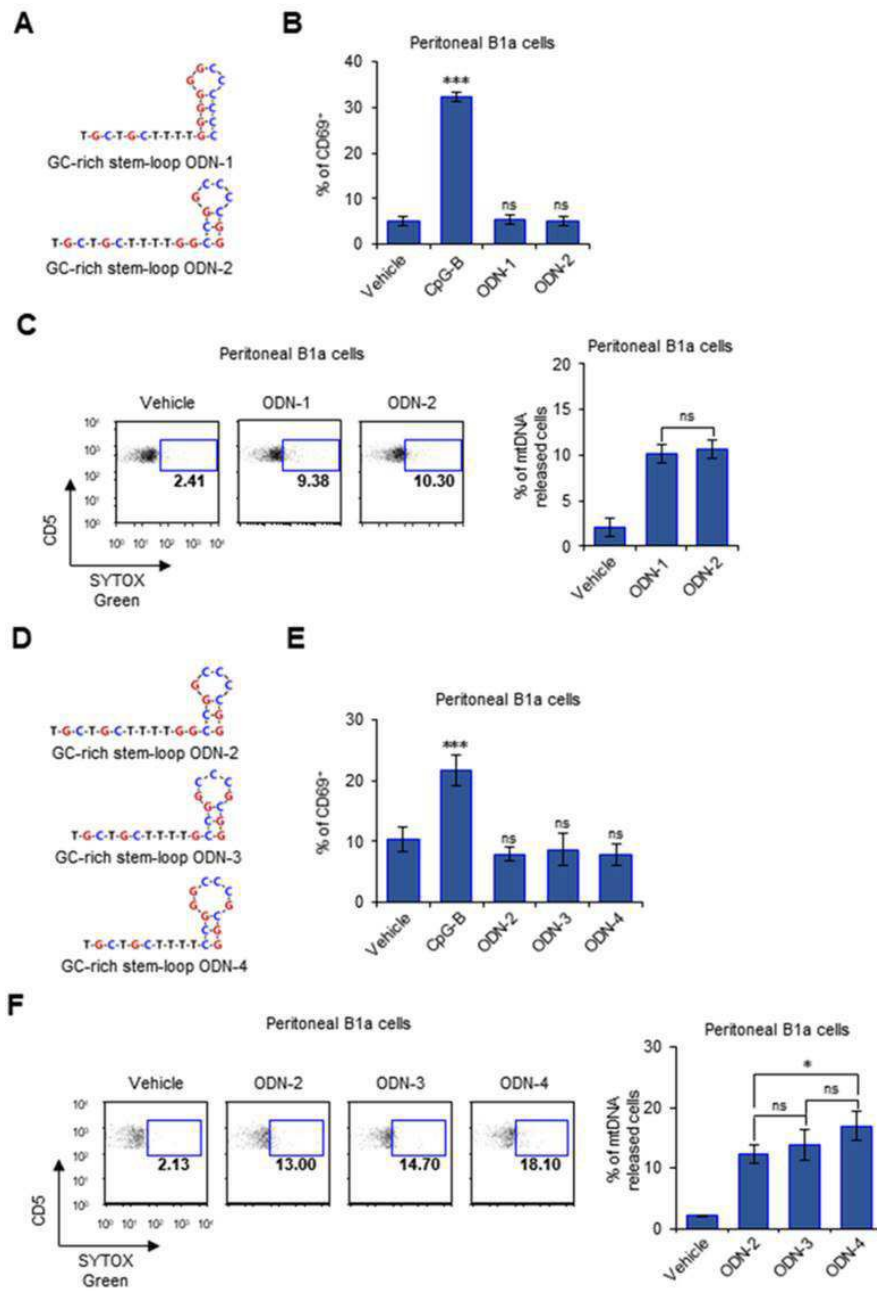
A



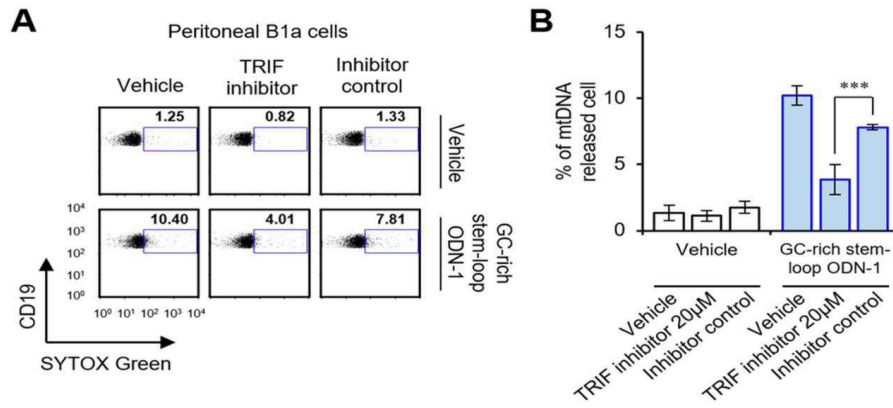
B



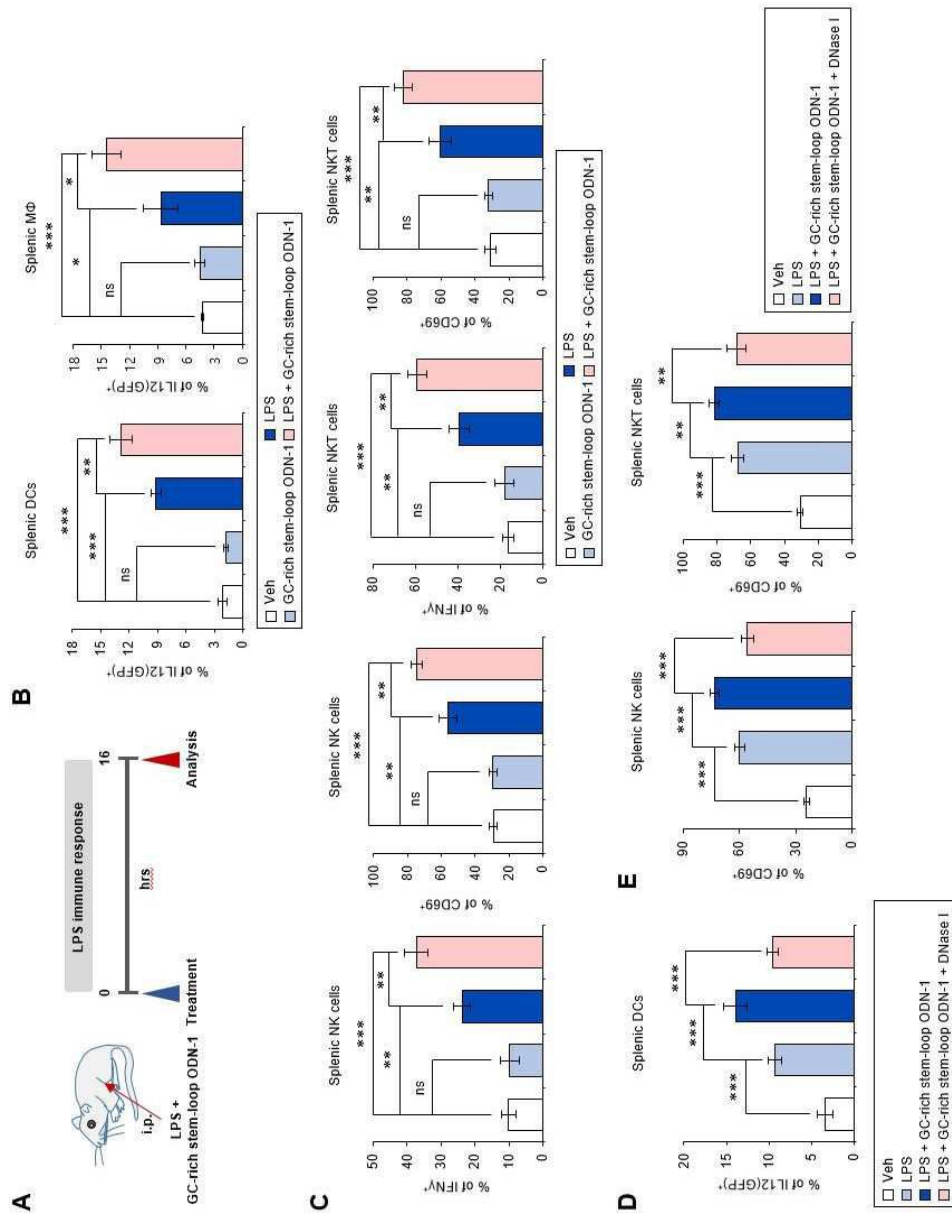
도면7



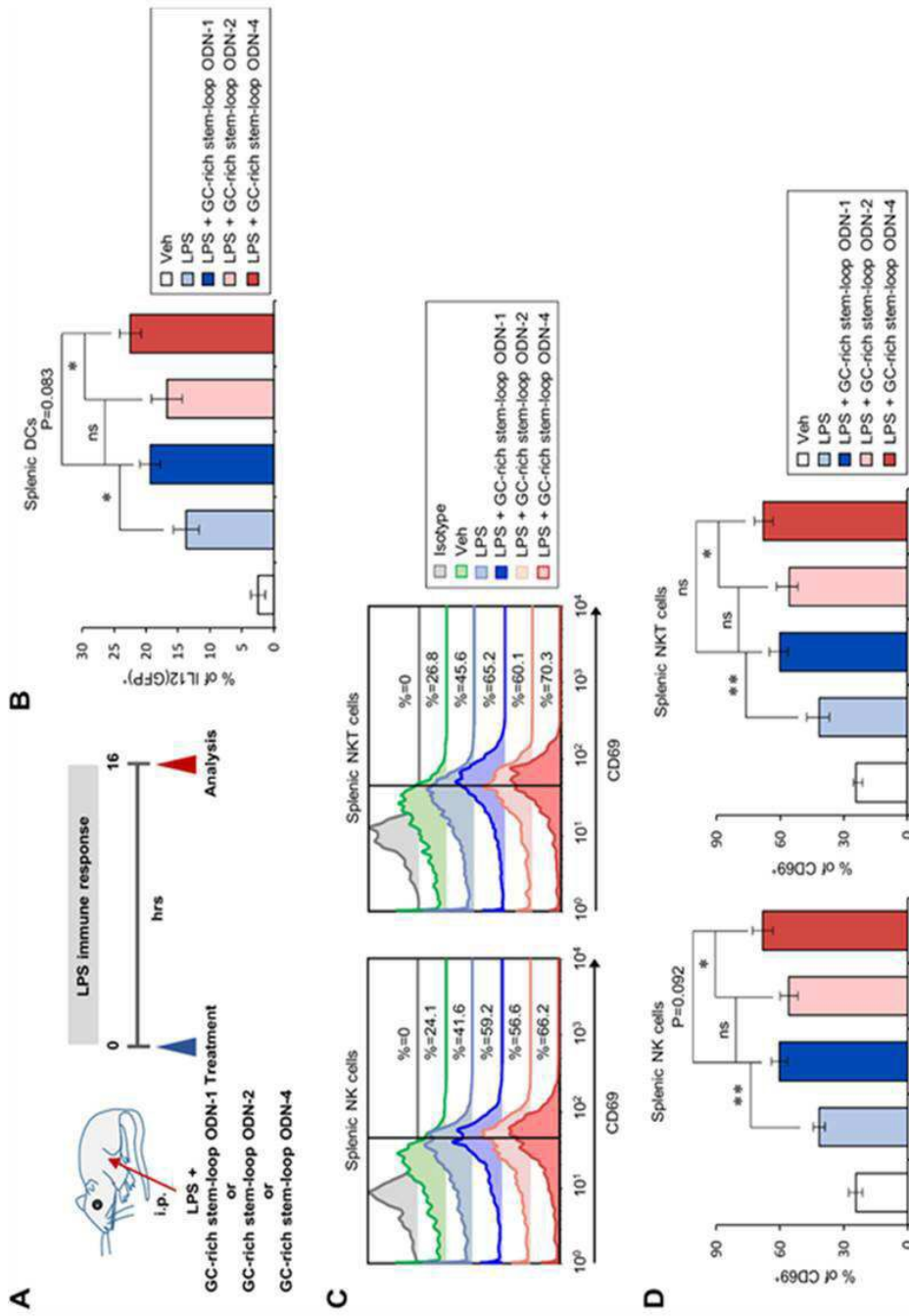
도면8



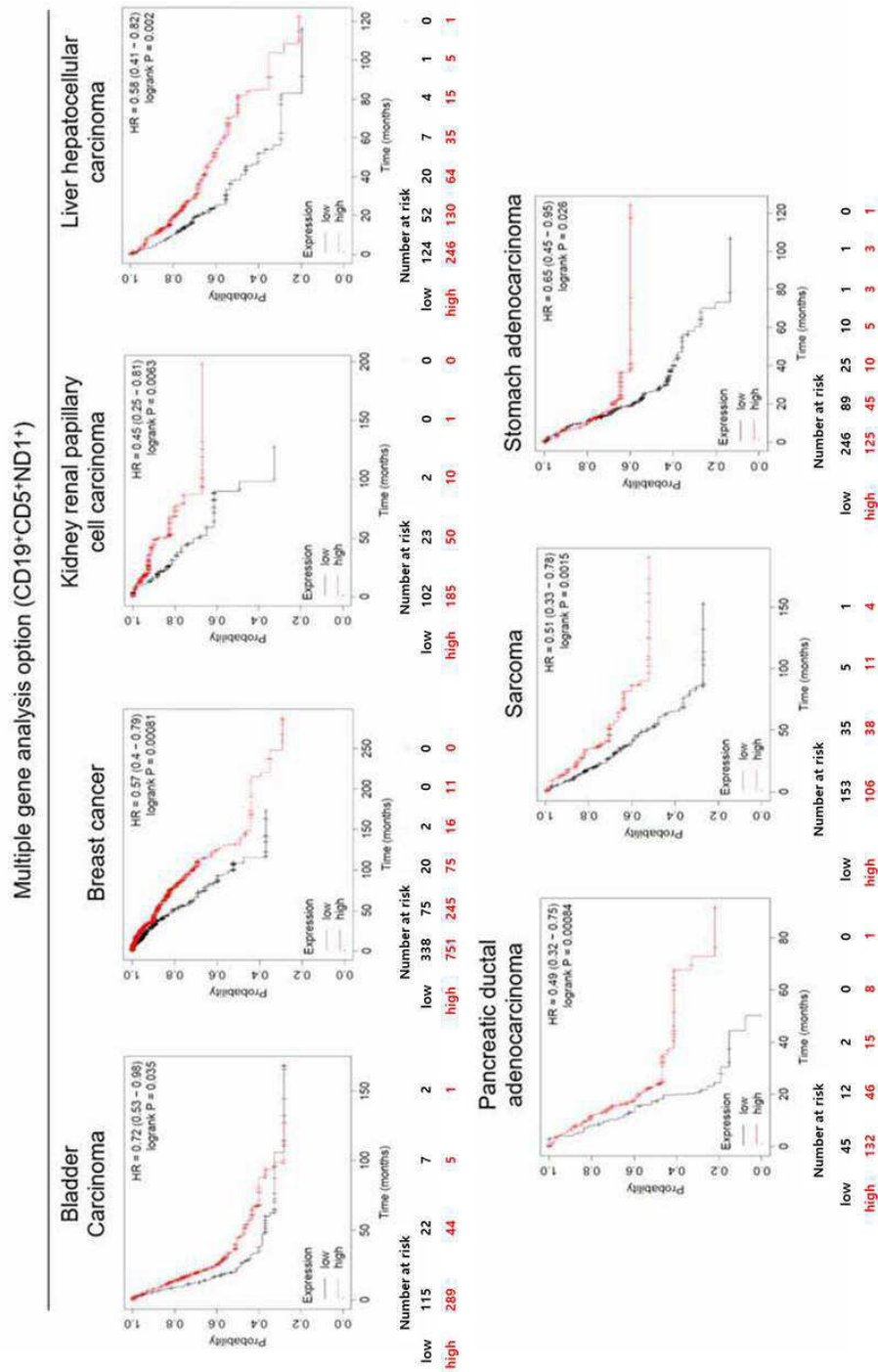
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Phosphorothioate linked guanine/cytosine-based stem-loop oligodeoxynucleotides for induction of mitochondrial DNA-dependent immune enhancement
- <130> 20P06041
- <160> 24

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ODN-1

<400> 1

tgctgctttt ggggggcccc cc 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ODN-2

<400> 2

tgctgctttt ggccggcccc gg 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ODN-3

<400> 3

tgctgctttt gccggcccgc gg 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ODN-4

<400> 4

tgctgctttt ccgggccgc gg 22

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	G:C=1:0.33	
<400>	5	
tgctgctttt	ggggggcc	18
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G:C=1:0.5	
<400>	6	
tgctgctttt	ggggggccc	19
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G:C=1:0.67	
<400>	7	
tgctgctttt	ggggggcccc	20
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G:C=1:0.83	
<400>	8	
tgctgctttt	ggggggcccc c	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G:C=1:1.2	
<400>	9	
tgctgctttt	ggggggcccc c	21
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> G:C=1:1.5

<400> 10

tgctgctttt ggggcccccc

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G:C=1:2.0

<400> 11

tgctgctttt gggcccccc

19

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G:C=1:3.0

<400> 12

tgctgctttt ggcccccc

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GC region: 8nt

<400> 13

tgctgctttt ggggcccc

18

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GC region: 9nt

<400> 14

tgctgctttt gggggcccc

19

<210> 15

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GC region: 10nt
 <400> 15
 tgctgctttt gggggccccc 20
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GC region: 11nt
 <400> 16

 tgctgctttt gggggccccc c 21
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GC region: 13nt
 <400> 17
 tgctgctttt gggggggccc ccc 23
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GC region: 14nt
 <400> 18
 tgctgctttt gggggggccc cccc 24
 <210> 19
 <211> 25
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GC region: 15nt
 <400> 19

tgctgctttt ggggggggcc ccccc	25
<210> 20	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GC region: 16nt	
<400> 20	
tgctgctttt ggggggggcc ccccc	26
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 21	
glatggaatc ctgtggcatc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 22	
aagcacttgc ggtgcacgat	20
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
aatcgccata gccttcctaa cat	23
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400> 24

ggcgtctgca aatggttgta a

21