



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0064561
(43) 공개일자 2023년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) C07K 14/535 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0142232

(22) 출원일자 2022년10월31일

심사청구일자 2022년10월31일

(30) 우선권주장

1020210146456 2021년10월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이효진

대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9(지족동)

전홍진

대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 301호(복수동, 삼익목화아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

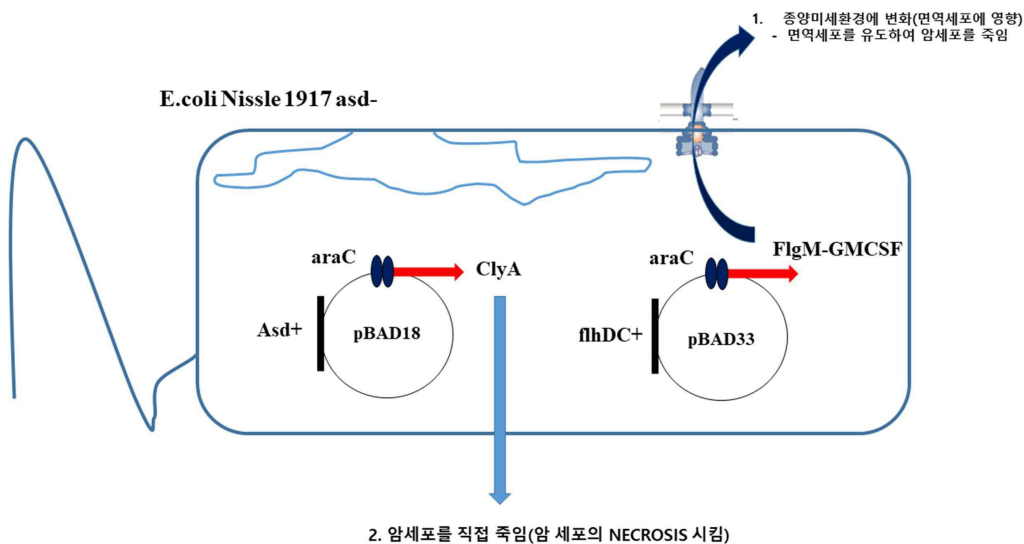
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 이중 분비 시스템을 탑재한 항암 균주

(57) 요약

본 발명은 서로 다른 기작으로 작동하는 이중 분비 시스템을 탑재하여 서로 른 두가지 유전자에 의해 발현되는 단백질을 동시에 분비할 수 있는 항암 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과, (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flhDC 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 이중 분비 시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항암 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/195 (2013.01)
C07K 14/535 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
A61K 2039/522 (2013.01)

김은지

대전광역시 동구 계족로489번길 4-11, B동 201호(용전동, 태화빌리지)

(72) 발명자

김솔비

대전광역시 유성구 상대북용로29번길 52, 101동 703호(상대동, 대전아이파크시티 1단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169233
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036177
과제번호	HR20C0025040022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711173552
과제번호	2022M3H4A1A03076638
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	박테리아 셔틀 유도 나노소재 및 펩타이드 광원 기반 차세대 항암 기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2022.04.21 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과,
 (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어,
 이중 분비 시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
 상기 균주는 약독화 살모넬라균, 대장균, 시겔라균, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물, 프로바이오틱스으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 3

청구항 2에 있어서,
 상기 균주는 *E. coli* Nissle 1917인 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 4

청구항 2에 있어서,
 상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 각각 독립적으로 tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ프로모터, pRλ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터, T7 프로모터, pBAD 프로모터, Tet 프로모터, trc 프로모터, pepT 프로모터, sulA 프로모터, pol11(dinA) 프로모터, ruv 프로모터, uvrA 프로모터, uvrB 프로모터, uvrD 프로모터, umuDC 프로모터, lexA 프로모터, cea 프로모터, caa 프로모터, recN 프로모터, pagC 프로모터, hip 프로모터, ansB 프로모터 및 pflE 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자는 하나 이상의 태그가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자의 연결은 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자가 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1로 구성된 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 균주는 ClyA(c-flag)-pBad18-asd + flhDC+flgM-(his)-GMCSF-pBad33 / *E. coli* Nissle 1917 asd-(KCTC19041P)인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유전자 구조물은 flhDC 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 의한 항암 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서로 다른 기작으로 작동하는 이중 분비시스템을 탑재하여 서로 다른 두가지 유전자에 의해 발현되는 단백질을 동시에 분비할 수 있는 항암 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

배경 기술

[0002] 암은 세포의 증식 활동이 멈추지 않아 주변 조직으로 파고들어 정상세포를 파괴하는 것에 의해 결국에는 생명을 위협하는 질환이다. 노화에 의해 인체의 조절능력이 낮아짐에 따라 암에 취약해지게 되어, 고령화 사회에서 암은 2007년 이래 전체 사망원인 중 부동의 1위를 차지하며 2위인 심장질환 사망률의 2배를 넘어섰다.

[0003] 질병의 치료에 가장 효과적인 대응 체계는 면역력을 강화하는 것이나, 암세포는 외부 침입자가 아니기 때문에 인체의 면역반응을 유발하지 않고 회피한다. 특정 바이러스 또는 박테리아는 정상세포보다 암세포에 더 많이 감염되고, 감염된 박테리아가 면역세포의 공격대상이 될 수 있다. 이에 일부러 특정 바이러스 또는 박테리아를 감염시켜 인체 면역반응을 자극함으로써 암세포에 대항할 수 있도록 하는 항암치료 방법들이 제시되었다.

[0004] Leschner 등(J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773)은 CT26 종양을 갖는 마우스를 대상으로 형광을 나타내는 살모넬라균을 정맥주사로 감염시킨 후, 시간에 따른 감염 경로를 추적하였다. 그 결과 감염 직후에는 마우스의 혈액을 통해 전신이 감염된 것을 보여주었으며, 감염 20분 후에는 비장과 간에 살모넬라균이 축적되었으며, 24시간 후에는 종양 조직에만 살모넬라균이 집중적으로 축적되어 있음을 관측하였다. 이에 암에 표적화되어 면역을 활성화시키는 것에 의해 항암면역치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하였다. 하지만 살모넬라균은 식중독을 유발하는 대표적인 균으로 감염에 의해 패혈증을 유발하여 생명을 위협할 수 있으므로 직접적으로 암 치료에 사용하기에는 병원성이 너무 강하다. 미국 예일대학 연구팀은 살모넬라를 유전자 조작하면 종양을 공격하는 특성은 유지하면서 독성만 제거하여 약독화할 수 있으며, 상기 약독화된 살모넬라의 주입을 통해 면역 자극을 유도하여 종양을 억제할 수 있다고 발표하였다. 이에 약독화 살모넬라에 항암 특성을 갖는 물질을 발현할 수 있도록 형질전환한 균주들에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 그러나 약독화된 살모넬라는 생존성이 낮고 면역유발능 역시 저하될 뿐 아니라 돌연변이로 인하여 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환되어 패혈증을 일

으킬 우려가 있어, 암 치료에 실제 사용되기 위해서는 해결되어야 할 매우 중요한 문제로 인식되고 있다.

[0005] 시겔라(*Shigella*), 콜레라균(*Vibrio cholera*), 대장균(*E. coli*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 같은 균주들은 살모넬라균과 마찬가지로 장관의 세포에 침투하며 암세포에 표적화되는 특성을 지닌다. 이들 균주는 병원성이 낮기 때문에 패혈증에 대한 우려없이 안전하게 사용할 수 있다는 장점이 있다. 이에 암을 진단하거나, 항암치료에 도움이 되는 물질들을 발현 또는 억제시킬 수 있는 균주들을 개발하고, 이를 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 이루어지고 있다.

[0006] 일 예로, 등록특허 제10-2110993호는 클레브시엘라 아에로제네스 균주를 유효성분으로 포함하는 암 진단, 예방 또는 치료용 조성물을 제시하였다. 그러나 이들 균주는 살모넬라균과는 달리 면역반응을 일으키는 중요한 기관인 간과 비장에는 도달하지 못하여 전신면역 유발 효과가 다소 낮다는 단점이 있다.

[0007] *E. coli* Nissle (EcN)은 1917년에 알프레드 니슬(Alfred Nissle, 1874-1965) 박사에 의해 발견되었는데, 100여 년 간의 다양한 안전성 시험을 통해서 장 독소(Shiga toxins, Heat-stable ant heat-labile toxins), 세포독소, 침윤성, 병원성 점착인자, 용혈액, 혈청 내성, 항생제 내성 유전자 등이 없음이 밝혀져 있다. 이 균주의 비병원성은 유전자 단위까지 해독이 되어있어 다양한 용도로 안전하게 활용되고 있다.

[0008] ClyA(Cytolysin A) 단백질은 *E. coli*, 살모넬라 및 일부 장내 세균에 의해 발현되는 34 kDa 크기의 세포용해 단백질로, 멤브레인에 pore를 형성하여 타겟-세포를 사멸시킨다. 이러한 세포 사멸 특성을 이용하여 ClyA를 암세포에 표적화시킨 후 발현되도록 하여 암을 치료하려는 시도들이 진행되었다.

[0009] GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)는 대식세포, T세포, 비만세포, 자연살해세포, 내피세포 및 섬유아세포에 의해 분비되는 사이토카인이다. GM-CSF는 단핵구를 M1 type 대식세포로 분화하는 것을 유도하여 선천성 면역반응을 유도하는 한편, 수지상세포로 성숙시켜 CD8 T cell과 상호작용하도록 하여 후천성 면역반응을 유도하는 것에 의해 면역반응에 중추적인 역할을 담당한다. 박테리아에서 발현된 GM-CSF는 그 기능에 있어 생물학적 동등성이 입증되어 다양한 분야에 이용되고 있으나, 발현 후 박테리아 세포질 내의 GM-CSF를 정제하는 일련의 과정이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-2110993호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 서로 다른 기작으로 작동하는 이중 분비 시스템을 탑재하여 각각의 분비에 영향을 미치지 않으므로 서로 다른 두가지 유전자에 의해 발현되는 단백질을 동시에 분비할 수 있는 항암 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 항암 균주를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과, (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 이중 분비 시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 항암 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0016] 이상과 같이 본 발명의 항암 균주에 의하면, 이중 분비 시스템을 탑재하여 세포 용해 단백질로 암세포 사멸효과를 나타내는 ClyA 단백질을, 면역을 활성화시키는 CM-CSF 단백질을 암세포에 표적화된 후 동시에 분비할 수 있어 항암 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 항암 균주가 대장균이나 비피도 박테리움과 같은 병원성이 낮은 균주인 경우, 종래 상기 균주는 면역 유발 효과가 낮다는 단점을 보완하여 안전하면서도 효과적으로 항암 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 실시예에 의한 항암 균주의 모식도.

도 2a는 본 발명의 실시예에서 사용된 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 plasmid의 개념적인 맵, 도 2b 및 도 2c는 각각 본 발명의 실시예에서 제작된 ClyA-flag의 염기서열 및 구축된 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ plasmid의 개념적 맵.

도 3은 본 발명의 실시예에 의한 이중형질전환체에서 단백질 발현을 보여주는 웨스턴 블랏 결과 사진.

도 4는 본 발명의 실시예에 의한 이중형질전환체 배양액의 상층액에 의한 대식세포 형태변화를 보여주는 현미경 사진.

도 5는 본 발명의 실시예에 의한 이중형질전환체 배양액의 상층액에 의한 대식세포의 단백질 발현을 보여주는 웨스턴 블랏 결과 사진.

도 6은 본 발명의 실시예에 의한 이중형질전환체 배양액의 상층액 처리가 암 세포에 미치는 영향을 보여주는 현미경 사진.

도 7은 본 발명의 실시예에 의한 이중형질전환체 배양액의 상층액에 의한 암세포의 사멸효과를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다. 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

[0020] 전술한 바와 같이 본 발명은 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과, (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 이중 분비 시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주에 관한 것이다.

[0021] 상기 균주는 감염 시 암에 표적화되는 것으로서, 대장균이나 약독화 살모넬라균, 시겔라, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물(유익균), 프로바이오틱스를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하기 실시예에서는 *E. coli* Nissle (EcN)를 균주로 선택하였다.

[0022] 본 발명에서 "약독화"란 살아있는 병원체의 독성을 인위적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극하여 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 예를 들면, 살모넬라의 약독화 초래 유전자는 당업계에 잘 알려져 있으며, aroA, aroC, aroD, aroE, Rpur, htrA, ompR, ompF, ompC, galE, cya, crp, cyp, phoP, phoQ, rfaY, dksA, hupA, sipC, clpB, clpP, clpX, pab, nadA, pncB, pmi, rpsL, hemA, rfc, poxA, galU, cdt, pur, ssa, guaA, guaB,fliD, flgK, flgL, relA 및 spoT로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 기능상실에 의해 달성될 수 있다. 생체 내 적용 시 야생형으로의 환원을 방지하고, 독성을 더욱 약화시키기 위하여 상기 유전자 중 둘 이상의 유전자 기능을 상실시킬 수 있다.

- [0023] 본 명세서에서 "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터를 의미한다. 상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 각각 독립적으로 tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터, T7 프로모터, pBAD 프로모터, Tet 프로모터, trc 프로모터, pepT 프로모터, sulA 프로모터, pol 11(dinA) 프로모터, ruv 프로모터, uvrA 프로모터, uvrB 프로모터, uvrD 프로모터, umuDC 프로모터, lexA 프로모터, cea 프로모터, caa 프로모터, recN 프로모터, pagC 프로모터, hip 프로모터, ansB 프로모터 및 pflE 프로모터로 이루어진 군으로부터 각각 선택될 수 있다. 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 동일한 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 할 수도 있으며, 한가지 유도물질만 처리하는 것에 의해 이중 분비 시스템이 동시에 작동되도록 할 수 있으므로 보다 간편하게 사용할 수 있다는 장점이 있다. 혹은, 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터가 서로 다른 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 하여도 무방하다. 이 경우에는 이중 분비 시스템을 하나씩 순차적으로 스위칭할 수 있어 보다 안전하게 사용할 수 있다는 장점이 있다.
- [0024] 상기 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자에는 하나 이상의 태그가 결합되도록 할 수 있다. 태그는 ClyA 단백질의 항암 활성에 영향을 미치지 않음을 하기 실시예에서 확인하였다. ClyA 단백질에 태그가 결합된 경우 검출이 용이하도록, 예를 들어 형광물질로 표지하는 것에 의해 암 부위에 표적화된 후 ClyA 단백질이 정상적으로 분비되고 있는 지, ClyA 단백질의 분비가 체내에서 얼마나 지속되는 지를 용이하게 확인할 수 있다. 또한 군주가 암에 표적화되는 특성을 이용하여, 암의 치료 뿐 아니라 암 크기가 줄어드는 지를 동시에 확인하여 치료과정을 추적하는 데에도 이용될 수 있다. 사용될 수 있는 태그로는 예를 들면, His tag, Flag tag, Myc tag, HA tag, GST tag 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] ClyA 단백질을 암호화하는 유전자에 결합된 태그는 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터가 서로 다른 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 한 경우 추가적인 유용성을 갖는다. 즉, 상기 항암 군주가 암 부위에 표적화한 후 먼저 제1 유도물질을 처리하는 것에 의해 제1 유도성 프로모터가 작동되도록 스위칭하여 항암 효과를 갖는 ClyA 단백질을 분비시킬 수 있다. 분비된 ClyA는 세포용해 활성으로 항암 효과를 나타낼 뿐 아니라, 이를 검출하는 것에 의해 암 부위에 표적화가 이루어진 것을 확인할 수 있다. 이후 제2 유도물질을 처리하여 제2 유도성 프로모터가 작동되도록 스위칭하여 GM-CSF 단백질을 분비시키며 추가적인 면역항암효과를 나타내도록 할 수 있다. 이러한 순서 또는 반대의 순서 또는 동시 처리 등 여건에 따라 다양한 방법으로 본 발명의 항암 군주를 사용할 수 있다.
- [0026] 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자는 flgM과 GM-CSF의 융합단백질(이하에서는 "flgM-GMCSF"라 칭한다)을 암호화하는 것을 특징으로 하며, 상기 유전자를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환된 군주는 GM-CSF의 면역 유도능을 갖는 flgM-GMCSF를 세포 밖으로 분비시킨다. 따라서 발현된 GM-CSF로 인하여 군주가 사멸되지 않고 안정적이고 지속적으로 융합 단백질을 발현/분비할 수 있으며, 분비된 융합 단백질은 GM-CSF의 면역 유도능을 유지하여 면역 항암 효과를 나타낸다.
- [0027] 상기 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자의 연결은 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자가 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결될 수 있다. 예를 들어, 14개의 아미노산을 암호화하는 유전자 서열을 갖는 링커를 매개로 연결된 서열번호 1의 유전자를 사용할 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자라면 링커의 길이나 서열을 적절하게 변형하는 것은 용이할 것이다.
- [0028] 발현 효율을 향상시키기 위하여 본 발명의 유전자 구조물의 전단에는 샤인-달가노(shine-dalgarno) 서열을 배치할 수 있다. 또한 본 발명의 유전자 구조물을 벡터에 도입할 수 있도록 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있음은 당연하다. 본 발명의 재조합 군주를 형질전환 시키는 유전자 구조물에는 flhDC 유전자가 포함되어 있는 것이 바람직하다. flhDC 유전자는 플라젤린 오페론(operon) 유전자의 주된 조절자로 flgM 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 상기 유전자 구조물에 flhDC 유전자를 포함시킨 결과, flgM-GMCSF의 발현량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0029] 본 발명에서 형질전환 방법은 통상의 방법에 따르며, 예를 들어 칼슘 클로라이드 방법, 전기천공법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 항암 군주에서는 각 유전자 구조물에 의해 발현된 ClyA 단백질과 flgM-GMCSF 단백질의 분비 기작이 다르므로, 즉, 이중 분비 시스템이 탑재되어 있으므로, 각각의 분비에 영향을 미치지 않는다. 또한 분비된 ClyA 단백질은 암세포를 직접적으로 사멸시키고, flgM-GMCSF 단백질은 종양 미세환경의 면역세포에 영향을 미쳐

면역반응을 유발하는 것에 의해 이중 기작으로 항암 효능을 나타낸다.

- [0031] 하기 실시예에서 ClyA 단백질이 다른 추가적 처리 없이 장내 미생물인 대장균 Nissle 1917 밖으로 잘 분비되는 것, ClyA C-terminal에 FLAG을 tagging 함에도 단백질의 활성에는 변화가 없다는 것, 분비된 단백질이 암세포를 용해하여 사멸시키고 면역세포를 더 잘 유도하는 것이 확인되었다.
- [0032] 또한 하기 실시예에서 flgM-GMCSF를 융합한 단백질이 Arabinose에 의해 유도되어 대장균 Nissle 1917 밖으로 잘 분비되는 것, 분비된 단백질의 기능이 GM-CSF와 동일한 것, 분비된 단백질이 면역세포를 유도하여 암세포를 잘 사멸시키는 것, pBad33 plasmid가 low copy plasmid로 세포 안에서 잘 유지되는 것 등이 확인되었다.
- [0033] 이러한 본 발명에 의하면, 형질전환체에 도입된 plasmid origin이 다르므로 두 개의 plasmid가 independent하게 존재할 수 있으며, 각각의 plasmid에 들어있는 flgM-GMCSF와 ClyA가 형질전환체 균주 밖으로 분비되는 기작이 다르기 때문에 상호간에 분비에 영향을 미치지 않아 flgM-GMCSF에 의한 종양미세환경의 면역세포에 영향, ClyA에 의한 암세포 직접 사멸 등 효능의 극대화가 가능하게 된다.
- [0034] 또한 필요에 따라 두 plasmid를 하나의 유도체 또는 개별 유도체로 발현을 유도할 수 있도록 함으로써 사용 환경에 따라 다양한 대응 전략을 선택할 수 있다.
- [0035] 또한 하기 실시예에서처럼 숙주 세포로 독성이 보장된 장내미생물인 대장균 *E. coli* Nissle 1917를 채택함으로써 안전성을 확보할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 또한 상기 항암 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 상기 균주의 투여 후 상기 균주가 암 조직에 표적화되면 상기 유도성 프로모터의 작동을 유도하는 약물을 투여하여 균주로부터 ClyA 단백질과 flgM-GMCSF 융합단백질의 분비를 동시에 또는 순차적으로 유도하는 방식으로 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 항암용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령, 성별 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg · 일~10g/kg · 일이다.
- [0038] [실시예]
- [0039] 1. 플라스미드 준비 및 형질전환체 제작
- [0040] (1) GM-CSF 유전자가 클로닝된 plasmid 확보
- [0041] 출원번호 10-2021-0010768로 출원된 'GM-CSF의 분비를 위한 유전자 구조물 및 이에 의해 형질전환된 항암 재조합 균주'에 사용된 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 / ppGpp- (수탁번호 : KCTC14455BP)에서 통상의 방법으로 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 plasmid (cm)를 추출하여 GM-CSF 분비에 사용되는 plasmid를 확보하였다. flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 plasmid의 개념적인 맵을 도 2a에 도시하였다.
- [0042] (2) ClyA 유전자를 가지는 플라스미드 클로닝
- [0043] 대장균 MG1655 K-12(야생종)의 clyA 유전자의 염기서열(NCBI)을 바탕으로 clyA 유전자 전후에 클로닝을 위해 각각 NheI과 HindIII site를 삽입하고, C-terminal에 flag tag(붉은색)를 삽입하여 ClyA-flag를 합성하였다(서열번호 2). 이 과정은 전문업체(㈜코스모진텍)의 유전자 합성 서비스를 통하여 이루어졌다. 제작된 ClyA-flag의 염기서열 정보를 도 2b에 도시하였다.
- [0044] 합성된 ClyA-flag plasmid를 NheI(㉠다카라)과 HindIII(㉠다카라)를 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 처리한 후 전기영동 실시하였다. 전기영동 gel에서 약 1000bp의 DNA를 추출(Gel extraction kit : Qiagen)하여 ClyA Insert를 확보하였다.
- [0045] pBad18 asd+ plasmid(충남대 임현만 교수 연구실로부터 분양)를 NheI(㉠다카라)과 HindIII(㉠다카라) 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시키고, 이어서 반응산물을 PCR purification kit(㉠Qiagen)으로 정제하여 VECTOR DNA를 준비하였다.
- [0046] 준비된 ClyA Insert와 VECTOR DNA를 25℃에서 30분 ligation(㉠Invitrogen) 시킨 다음 DH5a competent cell(충남대 임현만 교수 연구실로부터 분양)에 형질전환 시킨 후, LB amp(ampicillin 함유) 고체 배지에 도말하고 배

양하여 콜로니를 배양하였다.

[0047] 배양된 콜로니 중 6개를 선별하여, LB amp(ampicillin 함유) 액체 배지에서 37℃에서 16시간 배양한 후, DNA를 추출한다. 이후 NheI(쥘다카라)과 HindIII(쥘다카라) 각각 10U, 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동하여 1000bp band를 확인하고 염기서열을 분석(쥘코스모진텍)하여 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ plasmid를 구축하였다. 구축된 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ plasmid의 개념적 맵을 도 2c에 도시하였다.

[0048] 참고로, asd 유전자는 효소인 aspartate-semialdehyde dehydrogenase를 암호화한다. 디아미노피메산(DAP)은 그람 음성균의 세포벽 합성에 필요한 peptidoglycan의 필수 성분으로 DAP가 없으면 asd- 세균은 빠르게 죽게 된다. DAP는 포유류 조직에 존재하지 않기 때문에 asd- 돌연변이 세균은 반드시 asd+ 플라스미드를 가져야만 살 수 있다. pBAD18 asd- plasmid는 하루 정도 지나면 균체에서 소실되는데, 이를 방지하기 위해 *E. coli* Nissle 1917 asd- 균주에 pBAD18 asd+ plasmid를 사용하였다.

[0049] (3) 형질전환체 제작

[0050] *E. coli* Nissle 1917 asd- (충남대 임현만 교수님으로부터 분양)에 앞에서 확보한 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 plasmid와 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ plasmid를 동시에 형질전환 시키고 LB amp, cm(ampicillin, chloramphenicol) 고체배지에서 도말하여 ClyA(c-flag)-pBad18-asd + flhDC+flgM-(his)-GMCSF-pBad33 / *E. coli* Nissle 1917 asd- (이하 '이중형질전환체'라 약칭함)를 선별하였다. 제작된 이중형질전환체를 기탁하여 수탁번호 KCTC19041P를 부여받았다.

[0051] 2. 이중형질전환체의 특성 분석

[0052] (1) 단백질 분비 확인

[0053] 이중형질전환체 single colony를 LB amp, cm 액체 배지에 접종한 후 37℃(이하 배양온도는 동일), 12-16시간 진탕 배양기에서 배양한 후 새로운 LB amp, cm 액체 배지에 OD600 0.05로 세포를 맞춰준 후 37℃에서 2시간 진탕 배양하였다.

[0054] OD600 0.4-0.6 일 때 arabinose를 0.2%(final)의 농도로 처리하지 않은 대조구(-)와 처리한 처리구(+)로 구분하여 5시간 진탕 배양시킨 후, 샘플을 수집하였다.

[0055] 전체 세포 배양액(Whole cell) 1ml(1, 2 lane)과 또 다른 1ml 배양액을 원심분리한 후 pellet(3, 4 lane)과 supernatant 상층액(5, 6 lane)을 분리하여 시료를 준비하였다. 상층액은 다시 0.2um filtering으로 균을 완전히 제거하고 pall사의 nanosep(OD010C35 3K omega)를 이용하여 농축하였다.

[0056] 각각 얻어진 시료 50ul를 SDS 샘플버퍼와 섞어 웨스턴 블랏을 위한 샘플을 만들었다. 샘플을 100℃ heat block에 5min간 변성시킨 후 13000rpm, 5min, 4℃ 원심분리를 하고 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였다. gel은 PVDF (polyvinylidene fluoride)를 이용해 트랜스퍼하여 PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시켰다. 멤브레인을 blocking 버퍼를 이용해 실온에서 1시간동안 블로킹을 하였다. 이후에 flgM-gmCSF를 확인하기 위해 1차 항체 anti-his tag(SB194b, SouthernBiotech)를 사용하였고, ClyA를 확인하기 위하여 anti-flag tag(SAB4200071, Millipore), DnaK를 확인하기 위하여 anti-dnaK (ab69617, abcam)를 각각 1/1000으로 희석하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 이후 멤브레인을 TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20)로 10분 간격으로 세 번 세척한 후, mouse 것은 anti-mouse-IgG (#7076s, Cell signaling, Danvers, MA, USA) 2차 항체와 rat인 것은 anti-rat-IgG (#7077, Cell signaling, Danvers, MA, USA)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 TBST로 10분 간격으로 세 번 세척하고, ECL 버퍼를 이용해 X-ray 필름에 감광한 후, 현상하여 각각의 단백질 발현량을 확인하였다(도 3 참조).

[0057] 도 3에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 의한 이중형질전환체에서 ClyA와 flgM-GMCSF가 Arabinose에 의해 유도(Whole cell(1,2 lane)과 pellet(3,4 lane))되며, 이들이 균주 밖으로 잘 분비(5,6 lane)되었다.

[0058] 하지만 anti-dnaK로 웨스턴 블랏을 수행한 경우에는 Whole cell과 pellet에서 induction의 유무와는 상관없이 DnaK가 검출되었다. 반면에 상층액 그룹에서는 DnaK가 검출되지 않았다. DnaK는 Hsp70 family에 속하는 분자 샤페론으로 세균 안에 도처에 골고루 분포되어 있는데, Whole cell과 pellet에서는 DnaK가 발견된 반면 상층액(supernatant)에서는 발견되지 않았다는 것은 해당 단백질인 ClyA와 flgM-GMCSF를 만드는 경우에 세포가 터지지 않고 생존하면서 각각 ClyA와 flgM-GMCSF를 안정적으로 분비되는 것임을 보여주는 것이다.

[0059] (2) 분비된 flgM-GMCSF의 활성 TEST

- [0060] ① 대식세포에 상충액 처리
- [0061] 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% streptomycin-penicillin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.
- [0062] 이와 별도로, 이중형질전환체 single colony를 LB amp, cm 액체 배지에 접종한 후 37℃, 12-16시간 진탕 배양기에서 배양한 후 새로운 LB amp, cm 액체 배지에 OD600 0.05로 세포를 맞춰준 후 37℃에서 2시간 진탕배양하였다.
- [0063] OD600 0.4-0.6 일 때 arabinose을 0.2%(final)의 농도로 처리하지 않은 대조구(-)와 처리한 처리구(+)로 구분하여 5시간 진탕 배양시킨 후, 배양액을 3000rpm으로 원심분리하여 상충액을 분리하였다. 상충액을 다시 0.2um filtering로 균을 완전히 제거하여 '(-)상충액'과 '(+)상충액'을 준비하였다.
- [0064] 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 cell이 2×10^5 개 일 때, 위에서 얻어진 상충액을 200ul씩 처리한 후 24시간 배양하였다.
- [0065] ② 상충액 처리에 의한 대식세포의 형태학적 변화
- [0066] 배양 후 결과를 200배 배율의 현미경으로 관찰하였다(도 4 참조). 도 4에서 볼 수 있듯이, RAW264.7 cell은 분화 이전(1)에는 동글동글한 모양이었고, arabinose에 의해 발현을 시키지 않은 (-)상충액을 처리하면(2) 약간의 세포들이 길쭉한 형태로 변형이 생겼으며, arabinose에 의해 발현시킨 (+)상충액을 처리하면(3) 50% 이상의 세포들이 길쭉하거나 별 모양으로 분화된 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 의한 (+)상충액에 의해 RAW264.7 cell이 형태학적으로 M1 type의 macrophage로 분화됨을 알 수 있다. 이것으로 본 발명에 의한 이중형질전환체에서 만들어진 flgM-GMCSF는 GMCSF와 동일하게 면역 유도 활성이 있음이 확인되었다.
- [0067] ③ 상충액 처리에 의한 대식세포의 면역학적 변화
- [0068] 각각 (+) (-) 상충액을 처리하고 24시간을 배양한 RAW264.7 cell를 PBS로 2번 세척하고 RIPA 버퍼로 세포를 용해시킨 후, 13000rpm, 20min, 4℃로 원심분리하여 상충액을 얻었다. 정량한 상충액의 단백질을 1ug/1ul의 농도로 SDS 샘플버퍼와 혼합하고 100℃ heat block에 5min 간 변성시킨 후 13000rpm, 5min, 4℃ 원심분리하였다. 원심분리된 물질을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하고, gel은 PVDF (polyvinylidene fluoride)를 이용해 트랜스퍼하여 PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시켰다. 이어서 멤브레인은 blocking 버퍼를 이용해 실온에서 1시간동안 블로킹을 하고, 후에 각각의 anti-mouse CD80 (#sc-376012; Santa Cruz, Dallas, TX ,USA), anti-mouse CD86 (#sc-28347; Santa Cruz, Dallas, TX ,USA), anti-rabbit GAPDH (#sc-25778; Santa Cruz, Dallas, TX ,USA)를 넣어 4℃에서 16시간 반응시켰다. 그 다음 멤브레인을 TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20)로 10분 간격으로 세 번 세척한 후, HRP가 결합된 anti-rabbit(#7074s, Cell signaling, Danvers, MA ,USA) 혹은 anti-mouse-IgG (#7076s, Cell signaling, Danvers, MA ,USA) 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 멤브레인을 TBST로 10분 간격으로 세 번 세척 후, ECL 버퍼를 이용해 X-ray 필름에 감광하고 현상하여 각각의 단백질 발현량을 확인하였다.
- [0069] 도 5를 보면, M1 Macrophage marker로 알려진 CD80과 CD86의 발현량이 arabinose를 유도한 (+)상충액 처리구에서 유의미하게 증가하며, flgM-GMCSF에 의해 RAW264.7 세포가 M1 type으로 더욱 많이 분극화됨을 알 수 있다.
- [0070] 따라서 본 발명에 의한 이중형질전환체인 ClyA(c-flag)-pBad18-asd + flhDC+flgM-(his)-GMCSF-pBad33 / *E. coli* Nissle 1917 asd-에 의해 분비된 flgM-GMCSF는 정상적인 GMCSF와 동일 활성을 나타냄이 확인되었다. 이는, 앞서 ②에서의 결과와 함께 본 발명에 의한 이중형질전환체가 면역유도가 탁월한 균주임을 입증하는 것이다.
- [0071] (3) 분비된 ClyA의 활성 TEST
- [0072] ① 암세포주에 상충액 처리
- [0073] 이중형질전환체 single colony를 LB amp, cm 액체 배지에 접종한 후 37℃(이하 배양온도는 동일), 12-16시간 진탕 배양기에서 배양한 후 새로운 LB amp, cm 액체 배지에 OD600 0.05로 세포를 맞춰준 후 37℃에서 2시간 진탕 배양하였다.
- [0074] OD600 0.4-0.6 일 때 arabinose을 0.2%(final)의 농도로 처리하지 않은 대조구(-)와 처리한 처리구(+)로 구분하여 5시간 진탕 배양시킨 후, 배양액을 3000rpm으로 원심분리하여 상충액을 분리하였다. 상충액을 다시 0.2um

filtering로 균을 완전히 제거하였다.

- [0075] 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 세포를 성장시킨 인체 대장암 2종의 세포주 HT-29, SW480 (모두 American Type Culture Collection 구입)를 cell이 2×10^5 개 일 때, 위에서 얻어진 상층액을 각각 50배 농축하여 200ul씩 처리한 후 24시간 배양하였다.
- [0076] ② 상층액 처리에 의한 암 세포의 현미경 관찰
- [0077] 배양 후 결과를 100배 배율의 현미경으로 관찰하였다(도 6 참조). 도 6에서 볼 수 있듯이, Arabinose를 처리하지 않은 (-)상층액 처리구에는 아무것도 처리하지 않은 대조구(No treat)에 비해 5% 정도 세포가 비어 있지만, Arabinose를 처리한 (+)상층액 처리구에서는 세포의 30% 정도가 비어 있어 (+)상층액이 암 세포의 성장을 저해하거나 암 세포를 사멸시킴을 유추할 수 있다.
- [0078] 이로써 본 발명에 의한 이중형질전환체인 ClyA(c-flag)-pBad18-asd + flhDC+flgM-(his)-GMCSF-pBad33 / *E. coli* Nissle 1917 asd-에 의해 분비된 ClyA 단백질이 인체 대장암 2종의 세포주 HT-29, SW480 를 저해하거나 사멸시킴을 확인하였다.
- [0079] ③ 상층액 처리에 의한 암 세포의 사멸 확인
- [0080] 세포 사멸은 증식을 멈추거나 세포가 수축되고 DNA가 일정한 조각으로 분해되는 기작인 Apoptosis와 세포가 붓고 막이 터지면서 내부의 구성 물질이 세포 외부로 방출되는 Necroptosis가 있다. ClyA는 세포막에 PORE를 형성하여 세포를 용해시켜 죽이는 Necroptosis 작용을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0081] 위 (3)①에서 배양된 HT29, SW480 및 CT26 의 세포 사멸을 확인하기 위해 다음과 같이 CCK assay와 LDH assay(Necroptosis를 확인하는 실험)를 수행하고 그 결과를 도 7에 도표로 나타내었다.
- [0082] 먼저, No treat, (-)상층액 처리구(도면에서 'Arabinose-'), (+)상층액 처리구(도면에서 'Arabinose+')의 배양 상층액(암세포 배양 상층액)을 각각 취하여 각각 CCK assay : CCK : DogenBio (ez-500, EZ-Cytox), EZ-LDH Cell cytotoxicity assay kit(DG-LDH500, DoGEN)를 사용하여 세포사멸을 확인하였다.
- [0083] CCK assay를 위하여, 배양상층액 100ul를 96well plate에 옮기고 CCK solution 100ul를 추가하였다.
- [0084] LDH assay를 위해 배양상층액 10ul를 96well plate에 넣고 EZ-LDH Cell cytotoxicity solution 100ul를 더한 후 실온에서 30분간 반응시켰다.
- [0085] 각각을 Microplate reader를 사용하여 450nm 파장으로 측정하였다. 실험은 triplicate로 진행하였다.
- [0086] 도 7에서 볼 수 있듯이, CCK assay를 통해 No treat 또는 arabinose- 보다 arabinose+ 처리구에서 HT29, SW480 및 CT26 의 세포 사멸 효과가 뛰어난을 확인하였다. 또한 LDH assay에서 arabinose+ 처리구가 No treat 대조구보다 150% 정도 이상의 값을 확인함으로써 ClyA가 알려진대로 세포를 용해하여 죽이는(Necroptosis) 방식으로 세포사멸을 유도함도 확인되었다.
- [0087] 이러한 결과는 ClyA가 암세포를 직접적으로 용해하여 사멸시키는 효과와 더불어 용해되어 외부로 방출되는 암세포의 내부 구성물질이 면역세포를 자극해 2차 항암면역효과를 유도하는 효과를 나타냄을 보여주는 것이다.

수탁번호

[0088]

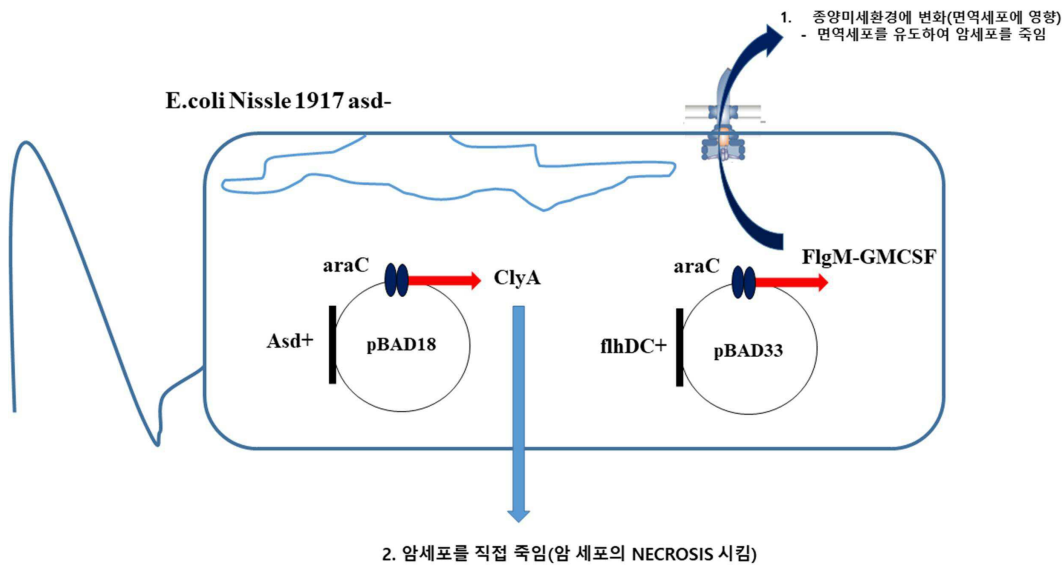
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19041P

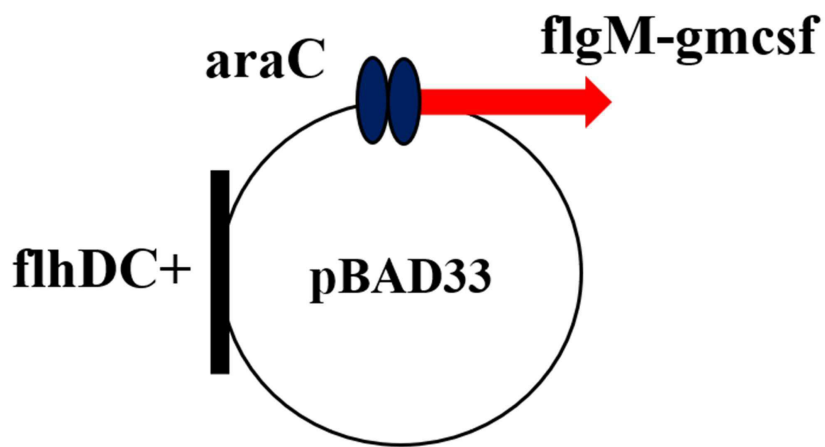
수탁일자 : 20221020

도면

도면1



도면2a



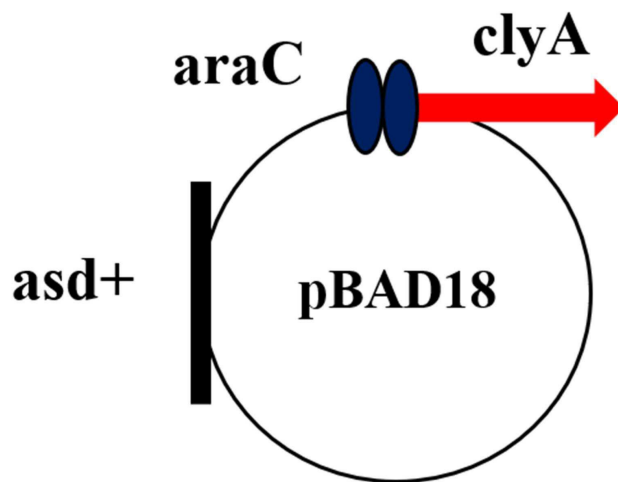
도면2b

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCT

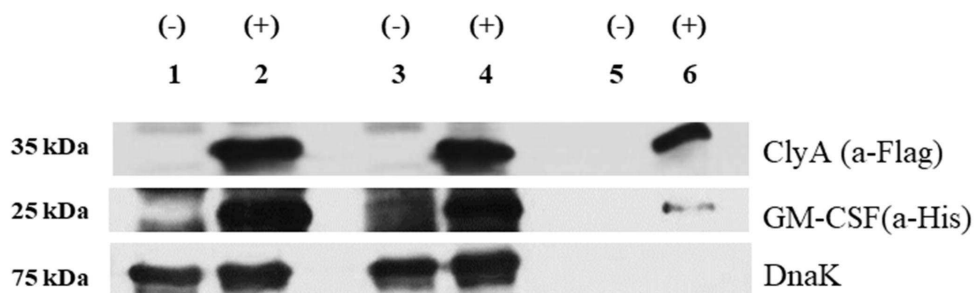
Atgactgaaatcgttgcagataaaacggtagaagtagttaaaacgcaatcgaaaccgcagatggagcattagatct
ttataataaatatctcgatcaggtcatcccctggcagaccttgatgaaccataaaagagttaagtcgctttaaac
aggagtattcacaggcagcctccgttttagtcggcgatattaaaccttacttatggatagccaggataagtat
gaagcaaccacaacagtgatgaatgggtgtggtgttgcgacgcaattgctcgacgtatattttgctatttgatga
gtacaatgagaagaagcatccgccagaaagacattctcattaaggtagtgacggcatcacgaagctgaatg
aagcgcaaaaatccctgctggtgaagctcacaagtttcaacaacgcttcgggaaactgctggcgtagatagccag
ttaaccaatgatttttcagaaaaagcagctatttccagtcacaggtagataaaatcaggaaggaagcatatgccgg
tgccgcagccggtgtcgtcgccggtccatttggattaatcatttcctattctattgctgcgggcgtagttgaaggaa
aactgattccagaattgaagaacaagttaaaatctgtgcagaatttctttaccacctgtctaacacggttaaaaca
gcgaataaagatatcgatgccgcaaatgaaattaaccaccgaaatagccgccatcggtgagataaaaacggaac
tgaacaaccagattctacgttgattatgatgatttaatgtttctttgctaaaagaagcgccaaaaaatgatta
acacctgtaatgagtatcagaaaagacacggtaaaaagacactctttgaggtacctgaagtc

GGCAGCGATTATAAAGATGATGATGATAAACTTGCCGCATAAaagctt

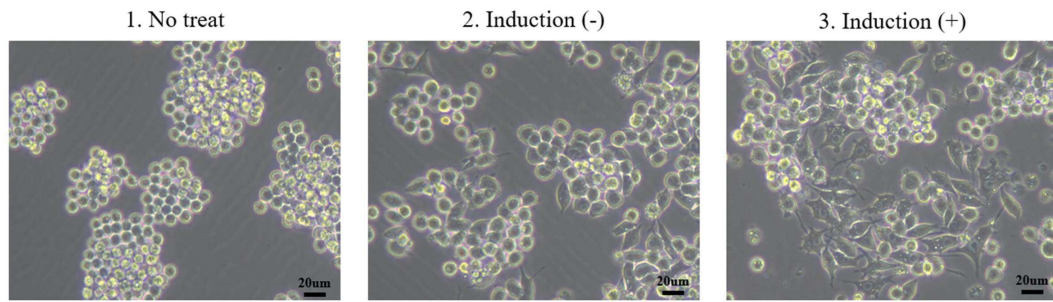
도면2c



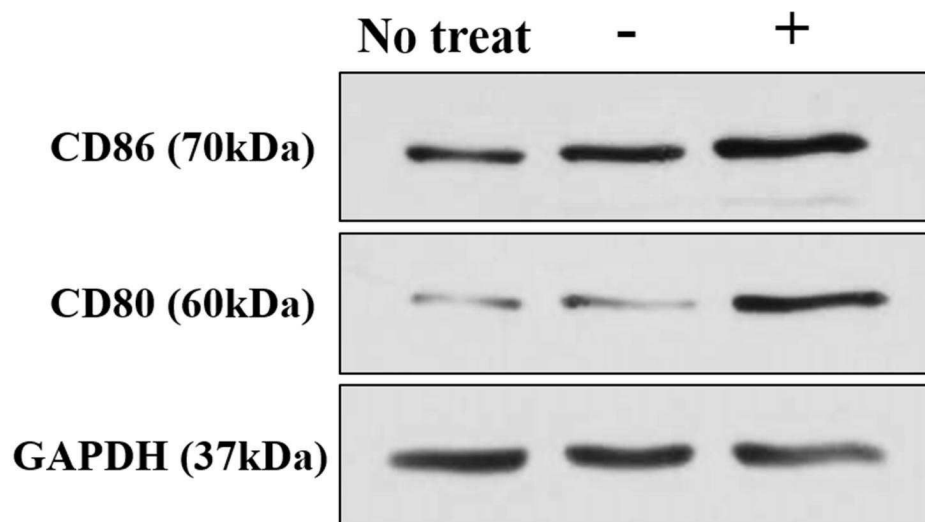
도면3



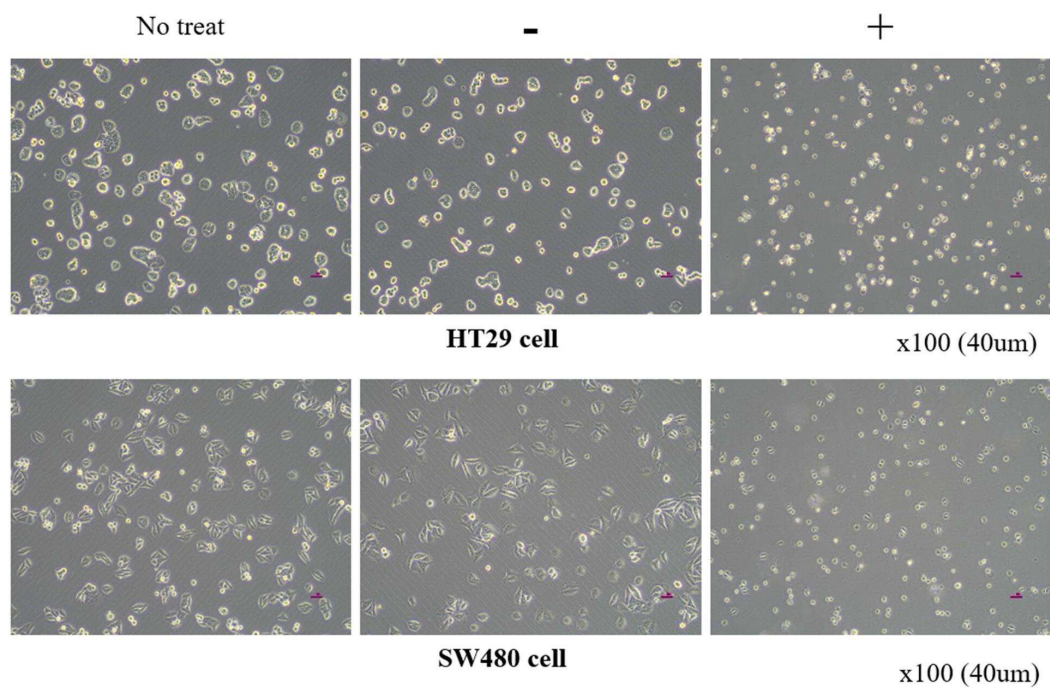
도면4



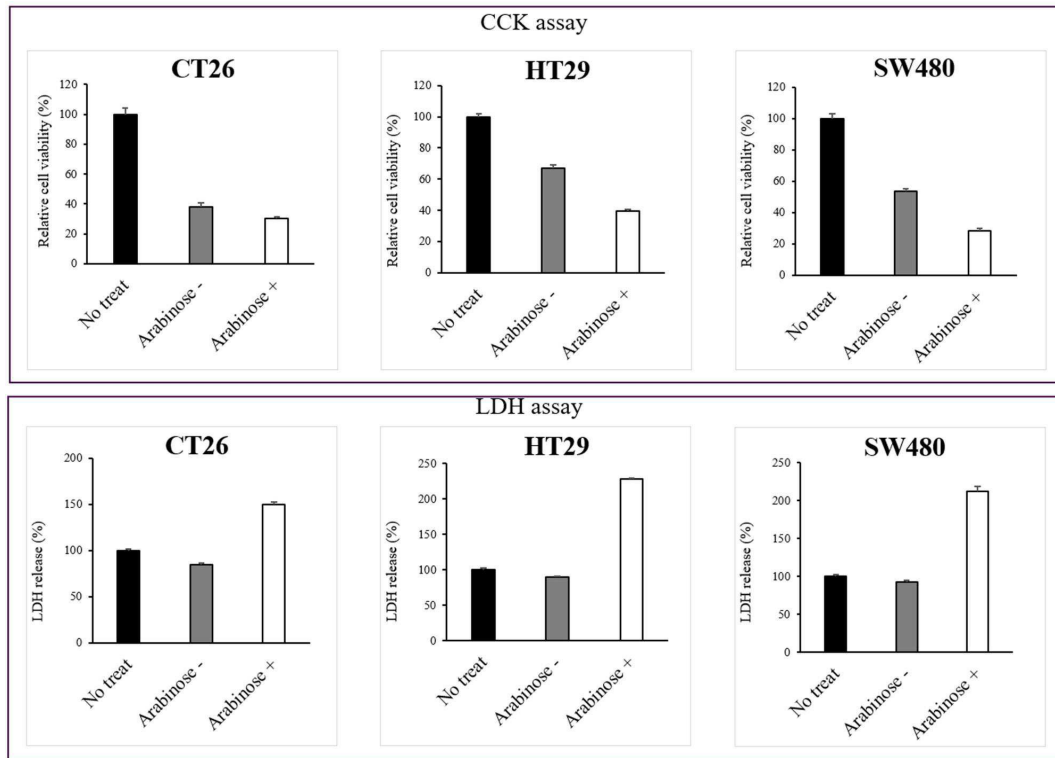
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.