(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0124448
(43) 공개일자 2024년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0016484
(22) 출원일자 2023년02월08일
심사청구일자 2023년02월08일

(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

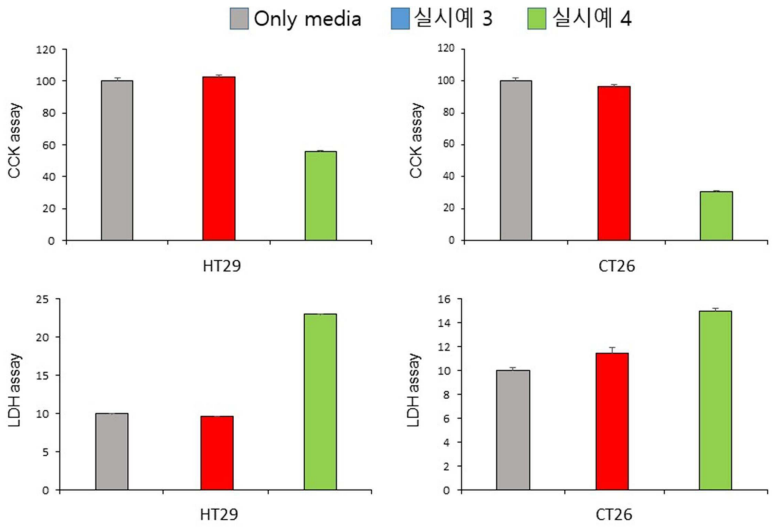
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **종양세포의 괴사를 유발하는 항암 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 종양세포에 표적화된 후 괴사를 유발하는 단백질을 분비하여 종양세포를 괴사시키는 한편 더욱 증가된 항암 면역 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항암 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물과 MLKL 단백질 또는 N-말단 서열을 포함하는 MLKL 단백질 단편을 암호화하는 유전자 구조물로 형질전환된 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4747 (2013.01)
C12N 1/205 (2021.05)
C12N 2830/002 (2013.01)
C12R 2001/42 (2021.05)

(72) 발명자
김솔비
대전광역시 유성구 상대복용로29번길 52, 101동 703호(상대동, 대전아이파크시티 1단지)
김은지
대전광역시 동구 계족로489번길 4-11, B동 201호(용전동, 태화빌리지)
한민주
충청북도 충주시 연수서편2길 11, 102동 3204호(연수동, 충주 센트럴 푸르지오)
오윤서
경기도 용인시 수지구 신수로 767, B동 1418호(동천동)

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 1711173147
과제번호 2022M3H4A1A03085355
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발
연구과제명 (2022M3H4A1A03076638) 종양 저산소증 표적 유전자 변형 박테리아 셔틀 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2022.04.21 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물과 MLKL 단백질 또는 N-말단 서열을 포함하는 MLKL 단백질 단편을 암호화하는 유전자 구조물로 형질전환된 살모넬라 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 flhDC 유전자는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 균주는 약독화 균주인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 MLKL 단백질 단편을 암호화하는 유전자는 서열번호 3의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 균주는 기탁번호 KCTC15291BP인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2의 살모넬라 균주를 포함하는 항암 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 균주는 수탁번호 KCTC15291BP인 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양세포에 표적화된 후 괴사를 유발하는 단백질을 분비하여 종양세포를 괴사시키는 한편 더욱 증가된 항암 면역 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항암 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 세포의 증식 활동이 멈추지 않아 주변 조직으로 파고들어 정상 세포를 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. 약독화된 살모넬라는 정상세포에 비해 종양 조직에서 10만배 이상 빠르게 증식하며, 정상세포에서는 24시간 이내에 대부분이 제거된다. 이에 약독화 살모넬라에 항암 특성을 갖는 물질을 발현할 수 있도록 형질전환한 균주들에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다.

[0005] 괴사(necrosis)는 종양세포를 사멸시키는 한편, 면역원성 반응을 초래할 수 있다. Aaes 등(Cell Rep 2016. 15:274-287)은 괴사성 암세포를 마우스에 주입하면, 수지상 세포의 성숙과 세포독성 T-세포의 교차감작(cross-priming)을 초래함을 보고하였다. MLKL(Mixed lineage kinase domain-like protein)은 괴사를 유발하는 유전자로 RIPK3(receptor-interacting protein kinase 3)에 의해 작동이 조절된다. MLKL은 4개의 나선 번들로 이루어진 N-말단과 유사 키나아제 영역인 C-말단이 두 개의 알파 나선으로 이루어진 중간영역으로 연결된 구조를 갖는다. RIPK3에 의해 C-말단이 인산화되면, N-말단이 활성화되어 세포막에 구멍을 내고 결국 괴사를 유발한다. 종양세포에서는 RIPK3의 억제에 의해 MLKL에 의한 괴사가 억제되는 것으로 알려져 있다. 이에 미국 공개특허 제2021-0121522호는 MLKL 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 항암 면역치료에 사용할 수 있음을 공개하였다.

[0006] 본 발명자들은 MLKL 단백질을 살모넬라에서 발현시켜, 종양세포에 표적화시키는 한편 상기 MLKL 단백질이 종양세포를 괴사시키고, 면역 유발 효과를 나타내도록 하는 것에 의해 더욱 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대하였다. 그러나, 기대와 달리 MLKL 단백질을 살모넬라 균주에서 발현시킨다고 하여도 그로 인한 괴사 및 면역 유도 효과를 얻을 수 없었다. 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 제2021-0121522호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Leschner 등, J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773.

(비특허문헌 0002) Aaes 등, Cell Rep 2016. 15:274-287.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 살모넬라 균주의 특성으로 인하여 종양 부위에 표적화되어 항암 면역활성을 갖는 것과 동시에 MLKL 단백질의 특성으로 인한 종양세포의 괴사와 추가적인 면역유도 활성을 나타내는 살모넬라 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 변이 살모넬라 균주를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물과 MLKL 단백질 또는 N-말단 서열을 포함하는 MLKL 단백질 단편을 암호화하는 유전자 구조물로 형질전환된 살모넬라 균주에 관한 것이다.

[0012] 이하, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

[0013] MLKL 단백질 또는 그 단편은 괴사(necrosis)를 유발하는 단백질로, N-말단 서열이 실질적으로 괴사를 유도하는 역할을 한다. 그러나 살모넬라 균주에 MLKL 단백질만을 발현하도록 형질전환하는 경우에는 MLKL 단백질 발현에 의한 추가적인 효과를 나타내지 못하였다. 반면 플라젤린 오페론(operon) 유전자의 주된 조절자인 flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물로 함께 형질전환한 경우에는 살모넬라 균주에 비해 현저한 세포사멸 효과를 나타내어, 형질전환 균주가 MLKL에 의한 괴사를 유도함을 확인할 수 있었다.

[0014] 상기 flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있을 수 있다. "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터를 의미한다. 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결됨에 따라 MLKL 단백질 또는 그 단편의 발현에 의한 괴사를 제어할 수 있으므로, 항암 균주로 사용되는 경우 체내에서 종양 부위에 표적화된 후 유도물질에 의해 괴사가 일어나도록 제어할 수 있어 보다 안전하게 사용할 수 있다. 유도성 프로모터로는 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, 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 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 상기 flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물과 MLKL 단백질 또는 N-말단 서열을 포함하는 MLKL 단백질 단편을 암호화하는 유전자 구조물에 의한 형질전환은 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현 벡터를 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 칼슘 클로라이드법, 전기천공법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 상기 살모넬라 균주는 약독화 살모넬라 균주일 수 있다. "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. 살모넬라의 약독화 초래 유전자는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 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 기능 상실에 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.

[0017] 상기 MLKL 단백질은 전장 단백질 또는 괴사를 유발하는 N-말단을 포함하는 단편으로 N-말단이 포함되어 있다면 두 개의 알파나선으로 이루어진 중간영역이나, 유사 키나아제 영역인 C-말단 영역이 포함되지 않더라도 세포사멸을 유발하였으며, 오히려 중간영역과 C-말단 영역을 발현시키지 않는 서열번호 3의 유전자에 의해 발현된 MLKL 단백질 단편이 가장 우수한 세포사멸 능력을 나타내었다. flhDC 유전자를 포함하는 유전자 구조물로 형질전환되어 있으면서 서열번호 3의 유전자를 발현하는 약독화 살모넬라 균주의 예로서 하기 실시예에서 그 효능이 현저함을 확인한 H-mlkl-EGFPN1+flhDC-pBAD33amp / aroA aroD- 균주를, 2023년 01월 13일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC15291BP). 그러나, N-말단을 포함한 MLKL 단백질 단편을 발현할 수 있다면, 서열번호 3에 한정되는 것이 아님은 당연하다.

[0018] 본 발명의 살모넬라 균주는 체내에서 종양에 표적화되어 면역유도 활성을 갖는 것과 동시에, 종양세포를 괴사시키는 특성을 이용하여, 상기 살모넬라 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물로 이용할 수 있다. 본 발명의 살모넬라 균주는 MLKL 단백질 또는 그 단편에 의한 면역유도 활성을 추가로 갖기 때문에 변이되지 않은 살모

넬라 균주에 비해 면역 항암활성이 더욱 우수하다.

[0019] 상기 살모넬라 균주의 일예로는 수탁번호 KCTC15291BP의 균주를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것이 아님은 당연하다.

[0020] 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.

[0021] 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.

발명의 효과

[0022] 이상과 같이 본 발명의 살모넬라 균주에 의하면 체내에서 종양세포에 표적화된 후 면역유도 활성을 발휘하는 것과 함께 종양세포를 괴사시키므로 항암 면역치료에 보다 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 hMLKL full, hMLKL V2 및 hMLKL-S 유전자의 모식도.

도 2a는 hMLKL full의 유전자 서열을 보여주는 도면.

도 2b는 hMLKL V2의 유전자 서열을 보여주는 도면.

도 2c는 hMLKL-S의 유전자 서열을 보여주는 도면.

도 3은 pEGFP-N1 플라스미드의 개열지도.

도 4는 293T 세포에 대한 MLKL 또는 그 변이체의 세포독성을 보여주는 배양액의 현미경 사진과 LDH 검정 결과를 보여주는 그래프.

도 5는 대장암세포주에 대한 MLKL 변이체의 항암효과를 보여주는 그래프.

도 6은 다양한 암세포주에 대한 MLKL 변이체의 항암효과를 보여주는 그래프.

도 7은 형질전환 살모넬라 균주의 세포사멸 효과를 보여주는 그래프.

도 8은 형질전환 살모넬라 균주의 세포사멸 효과를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 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.

[0025] **[실시예]**

[0026] **실시예 1 : MLKL 유전자 구조물의 준비**

[0027] MLKL 유전자를 이용한 괴사를 유발하는 살모넬라 균주의 제작을 위하여 MLKL 유전자 구조물을 제작하였다. 유전자 구조물은 추후 종양세포 내에서 발현 및 괴사의 확인이 용이하도록 GFP 형광 단백질과 MLKL 단백질의 융합단백질 형태로 발현되도록 하였다.

[0028] 먼저, hMLKL의 전장 유전자에 해당하는 hMLKL full form과 함께, hMLKL의 중간 영역을 포함하지 않고 N-말단 영역과 C-말단 영역만을 발현하는 서열번호 2의 hMLKL V2 form은 (주)코스모진텍의 유전자 합성 서비스를 통하여 합성하였다. 합성된 유전자를 주형으로 하기 표 1의 주형과 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 hMLKL full, hMLKL V2 유전자와 함께, hMLKL의 N-말단 영역만을 발현하는 hMLKL-S 유전자의 insert DNA를 제조하였다. 표 2에는 프라이머의 서열을 기재하였다. 도 1은 hMLKL full, hMLKL V2 및 hMLKL-S 유전자의 모식도이며, 도 2a~

도 2c는 해당 서열을 보여준다. 도 2a~도 2c의 염기서열은 빨간색으로 표시된 flag tag의 염기서열과 검은색으로 표시된 mlkl 또는 그 단편을 암호화하는 염기서열 및 파란색으로 표시된 종결서열로 이루어진다.

표 1

[0029]

insert DNA	주형	f-프라이머	r-프라이머	서열번호
hMLKL full	hMLKL full form	H-MLKL-EcoR1-f	MLKL1-2-SMA1-R	서열번호 1
hMLKL V2	hMLKL v2 form	H-MLKL-EcoR1-f	MLKL1-2-SMA1-R	서열번호 2
hMLKL-S	hMLKL full form	H-MLKL-EcoR1-f	MLKL603-SMA1-R	서열번호 3

표 2

[0030]

프라이머	서열	서열번호
H-MLKL-EcoR1-f	gatcgatcgaattcatggactacaaagacgatgacgacaagcttg cggccgcaatggaaaatttgaagcatattatcaccc	서열번호 4
MLKL1-2-SMA1-R	ggcacccccggggcttaagctgctccttcttgatctccttgatttgct ct	서열번호 5
MLKL603-SMA1-R	ggcacccccggggcttcttagaaaaggtggagagtttctttaaga tttc	서열번호 6

[0031] 구체적인 PCR 조건은 다음과 같다; Qiagen system을 사용하여, 10x buffer 5 ㎕, 5x Q solution 10 ㎕, 2 mM dNTPs 7.5 ㎕, 20 μM의 각 프라이머 2.5 ㎕, Taq polymerase 1 ㎕, 100 ng/㎕ 주형 DNA 2 ㎕ 및 물 19.5 ㎕를 혼합한 후, 95℃ 5분과, 30회의 94℃ 30초, 50℃ 30초, 72℃ 1분 30초(hMLKL full은 1회, MLKL V2 및 MLKL-S는 2회 반복) 후 72℃ 10분의 조건에서 PCR을 진행하였다. PCR 산물은 PCR purification kit(㈜ Qiagen)으로 정제한 후, 1 ㎍의 PCR fragment와 EcoR1(㈜ 다카라) 및 Sma1(㈜ 다카라) 각각 10U을 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 PCR purification kit(㈜ Qiagen)로 정제하여 각각의 insert DNA를 완성하였다.

[0032] 충남대 임헌만 교수님으로부터 분양받은 pEGFP-N1 플라스미드(도 3)를 EcoR1 및 Sma1 각 10U을 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 PCR purification kit(㈜ Qiagen)으로 정제하여 vector DNA를 완성하였다.

[0033] 상기 방법에 의해 얻은 각각의 insert DNA를 vector DNA와 25℃에서 30분 ligation (㈜Invitrogen) 시킨 후 DH5a competent cell에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 LB kan 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 candidate 6개씩을 선별하여 EcoR1 및 Sma1 각 10U와 37℃에서 2시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 각각 1.5kb, 0.9 kb, 0.7 kb band를 확인하였다. Cosmogenetech에 해당 candidate의 염기서열 분석을 의뢰하여, 각 insert DNA의 삽입을 확인하였다. insert DNA가 hMLKL full, hMLKL V2 또는 hMLKL-S인 각각의 플라스미드를 MLKL-full-EGFPN1, MLKL-V2-EGFPN1, MLKL-Short-EGFPN1로 명명하였다.

[0034] **실시예 2 : MLKL 단백질 및 변이체의 항암효과 검정**

[0035] MLKL 및 그 변이체의 항암효과를 검정하기 위하여 실시예 1에서 제조된 각 플라스미드를 사용하여 293T 세포를 형질감염시켰다. 대조군으로는 pEGFP-N1 플라스미드를 사용하였다.

[0036] 293T 세포(한국세포주은행에서 분양)를 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(P/S)을 포함하는 DMEM(Dullbecco's modified Eagle's Medium) 배지에서 배양하여 사용하였다. 6-웰 플레이트에 상기 배양액을 2×10^5 세포/웰의 농도로 분주하고, 23시간 배양하였다. P/S를 포함하지 않는 배지로 교체하여 1시간 추가로 배양한 후, 실시예 1에서 제조한 플라스미드 2 ㎍과 lipofectamine 2000(LF2000, Invitron, 1168-027)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 형질감염(transfection)시켰다. 형질감염 6시간 후, 배지를 10% FBS(fetal bovine serum) 및 10% P/S를 포함하는 DMEM 배지로 교체하고 배양하였다. 배양 24시간 및 48시간 후, 제조자의 프로토콜에 따라 LDH 검정(DogenBio, EZ-LDH, DG-LDH500)을 실시하여 세포 사멸률을 측정하였다.

실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 평균값과 표준오차로 나타내었다.

[0037] 도 4는 배양액의 현미경 사진과 LDH 검정 결과를 보여주는 그래프로, 제조예 1에서 제조된 플라스미드로 형질감염된 모든 세포들은 대조군에 비해 높은 세포사멸 효과를 보여주었다. 상세하게는 MLKL-full-EGFPN1이나 MLKL-V2-EGFPN1에 의해 형질감염된 세포에 비해 MLKL-Short-EGFPN1으로 형질감염된 세포의 세포사멸이 현저하여, MLKL 단백질의 변이체인 hMLKL-S의 세포사멸 효과가 가장 우수함을 확인하였다.

[0038] MLKL-Short-EGFPN1 플라스미드와 대조군으로 pEGFP-N1 플라스미드를 사용하여 293T 세포와 동일한 방법으로 인간 대장암세포주 HT-29, SW480, HCT116, SW620 및 인간 위암세포주 AGS, 인간 신장암세포주 ACHN, 마우스 흑색종 세포주 B16-F10을 American Type Culture Collection 구입하여 각각 형질감염시킨 후 LDH 검정에 의해 항암효과를 확인하였다. 도 5는 인간 대장암세포주에 대한 결과를 보여주는 그래프이며, 도 6은 기타 암세포주에 대한 결과를 보여주는 그래프이다. 도 5는 모든 대장암세포주에서 MLKL-Short-EGFPN1 플라스미드의 형질감염에 의해 유의한 세포사멸 효과를 보여주며, 특히 SW480 및 HT29 세포주에 대한 세포사멸 효과가 탁월하였다. 다른 암세포주에 대해서도 마찬가지로 세포사멸 효과를 나타내는 것을 도 6에서 볼 수 있다. 이로부터 MLKL-Short-EGFPN1 플라스미드가 세포사멸을 유도함을 확인할 수 있다.

[0039] **실시예 3 : 살모넬라 균주에 대한 형질감염 및 세포사멸 효과 관측**

[0040] 약독화 살모넬라 균주로 알려진 aroA aroD-가 결핍된 살모넬라 균주(한남대 이인수 교수님으로부터 분양)에 MLKL-Short-EGFPN1 플라스미드 또는 pEGFP-N1 플라스미드를 형질전환하여 H-mlkl-EGFPN1/aroA aroD- 균주와 EGFPN1/aroA aroD- 균주를 제작하였다.

[0041] 형질전환된 균주의 단일 콜로니를 LB kan 액체 배지에 각각 접종한 후 37℃에서 12-16 시간 진탕 배양하였다. 배양된 균주 200 ㎕를 취하여 8000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 버리고 PBS로 3회 세척한 후 세포사멸 효과를 평가하는 데 사용하였다.

[0042] 인간 대장암세포주 HT29 또는 CT26 세포를 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(P/S)을 포함하는 DMEM(Dullbecco's modified Eagle's Medium) 배지에서 배양하여 사용하였다. 6-웰 플레이트에 상기 배양액을 2×10^5 세포/웰의 농도로 분주하고, 23시간 배양하였다. P/S를 포함하지 않는 배지로 교체하여 1시간 추가로 배양한 후, 위에서 준비한 형질전환 균주의 배양액 200 ㎕를 첨가하여 암세포 : 형질전환 균주의 MOI가 1 : 500이 되도록 처리하였다. 2시간 후 gentamicin(sigma, G1397 50mg/ml)을 최종 농도가 100 ㎍/㎕가 되도록 처리한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이후, 배지를 10% FBS(fetal bovine serum) 및 10% P/S를 포함하는 DMEM 배지로 교체하고 배양하였다. 배양 48시간 후, 제조자의 프로토콜에 따라 LDH 검정(DogenBio, EZ-LDH, DG-LDH500) 및 CCK 검정(DogenBio, ez-500, EZ-Cytox)을 실시하고 그 결과를 도 7에 도시하였다.

[0043] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 형질전환된 균주는 대장암세포주에 대한 유의적인 세포사멸 효과를 나타내지 않았다.

[0044] **실시예 4 : 세포사멸능을 갖는 살모넬라 균주의 제작**

[0045] 실시예 3에서 제작한 형질전환 살모넬라 균주가 박토펙션에 의한 세포사멸 효과를 나타내지 않음에 따라, 추가적인 요소를 도입하였다. 실시예 3의 균주가 박토펙션의 효과를 나타내지 않는 이유가 종양세포 내로 침투하지 못하기 때문으로 가정하였다. 한편, 플라젤라 관련 마스터 조절자인 flhDC 유전자는 발현이 증가하면 박테리아의 접합 및 침투가 증가한다고 알려진 바 있다. 이에 암세포 내로 침투 능력을 증가시키기 위하여, flhDC 유전자를 클로닝하여 세포사멸능을 다시 검정하였다.

[0046] 공개특허 제10-2022-0107741호에서 구축한 플라스미드 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 plasmid (cm)를 주형으로 하여 하기 표 3의 프라이머를 사용하여 flhDC유전자가 포함된 PCR 산물을 얻었다. 표 3에서 밑줄 그은 부분은 제한효소 사이트를 표시한다. 구체적인 PCR 조건은 다음과 같다; Qiagen system을 사용하여, 10x buffer 5 ㎕, 5x Q solution 10 ㎕, 2 mM dNTPs 7.5 ㎕, 20 μM flhD-nhe1-f 프라이머 2.5 ㎕, 20 μM flhC-Sac1-r 프라이머 2.5 ㎕, Taq polymerase 1 ㎕, 10 ng/㎕ genomic DNA 2 ㎕ 및 물 19.5 ㎕를 혼합한 후, 95℃ 5분과, 30회의 94℃ 30초, 49℃ 30초, 72℃ 1분 반복과 그 후에 72℃ 10분의 조건에서 PCR을 진행하였다.

표 3

프라이머	서열	서열번호
flhD-nhe1-f	gatcgatcgctagcaggaggtttgatcctatgggaacaatgcatacatccgagttgct	서열번호 7
flhC-sac1-r	gatcgatcgagctcttaaacagcctgttcgatctgttcatccagcagtt	서열번호 8

[0047]

[0048] PCR 산물은 PCR purification kit(㈜ Qiagen)으로 정제한 후, 1 ㎍의 PCR fragment와 Nhe1 및 Sac1(㈜ 다카라) 각각 10U을 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 PCR purification kit(㈜ Qiagen)로 정제하여 insert DNA를 완성하였다.

[0049] 충남대 임헌만 교수님으로부터 분양받은 pBad33 amp Plasmid를 Nhe1과 Sac1(㈜ 다카라) 각각 10U을 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 PCR purification kit(㈜ Qiagen)으로 정제하여 vector DNA를 완성하였다.

[0050] 상기 방법에 의해 각각 얻은 insert DNA와 vector DNA를 25℃에서 30분 ligation(㈜Invitrogen) 시킨 후 DH5a competent cell에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 candidate 6개를 선별하여 Nhe1과 Sac1(㈜ 다카라)을 각각 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 1kb band를 확인하였다. Cosmogenetech에 해당 candidate의 염기서열 분석을 의뢰하여, flhDC 유전자의 삽입을 확인하고 flhDC pBAD33 amp 플라스미드를 확립하였다.

[0051] 실시예 3에서 제작한 H-mlkl-EGFPN1/aroA aroD- 균주에 flhDC pBAD33 amp 플라스미드를 형질전환하여 H-mlkl-EGFPN1+flhDC-pBAD33amp / aroA aroD- 균주를 제작하였다.

[0052] 제작된 살모넬라 균주를 사용하여 실시예 3과 동일한 방법에 의해 HT29 및 CT26 세포에 대한 세포사멸 효과를 CCK 검정 및 LDH 검정으로 확인하였다. 도 8은 그 결과를 보여주는 그래프이다. H-mlkl-EGFPN1+flhDC-pBAD33amp / aroA aroD- 균주는 CCK 검정 결과 HT29 세포와 CT26 세포의 세포사멸을 각각 150%, 160% 증가시킨 것을 확인할 수 있으며, LDH 검정에서는 사멸된 세포가 각각 200%, 150% 증가하였음을 보여준다.

[0053] 상기 결과는 H-mlkl-EGFPN1+flhDC-pBAD33amp / aroA aroD- 균주가 세포사멸을 유도하며, 괴사를 유발하는 것에 의해 암세포를 사멸시키는 데 탁월한 효과가 있음을 나타내는 것이다.

[0054] 이에 상기 균주를 H-mlkl-EGFPN1+flhDC-pBAD33amp / aroA aroD-로 명명하였으며, 2023년 01월 13일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC15291BP).

수탁번호

[0055]

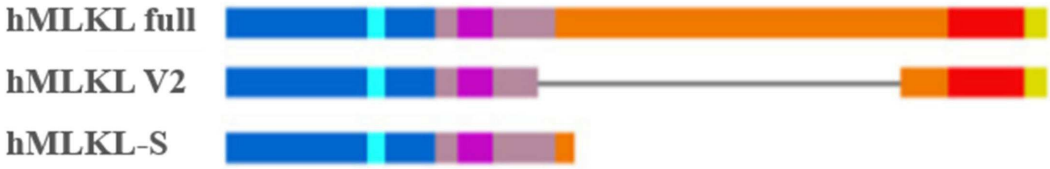
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15291BP

수탁일자 : 20230113

도면

도면1



도면2a

```
atggactaca aagacgatga cgacaagctt gcggccgcaa tggaaaattt gaagcatatt      60
atcacccttg gccaggtcat ccacaaacgg tgtgaagaga tgaaatactg caagaaacag     120
tgccggcgcc tgggccaccg cgtcctcggc ctgatcaagc ctctggagat gctccaggac     180
caaggaaaga ggagcgtgcc ctctgagaag ttaaccacag ccatgaaccg cttcaaggct     240
gccctggagg aggctaatgg ggagatagaa aagttcagca atagatccaa tatctgcagg     300
tttctaacag caagccagga caaaatactc ttcaaggacg tgaacaggaa gctgagtgat     360
gtctggaagg agctctcgct gttacttcag gttgagcaac gcatgcctgt ttcacccata     420
agccaaggag cgtcctgggc acaggaagat cagcaggatg cagacgaaga caggcgagct     480
ttccagatgc taagaagaga taatgaaaaa atagaagctt cactgagacg attagaaatc     540
aacatgaaag aaatcaagga aactttgagg cagtatttac caccaaaatg catgcaggag     600
atcccgcaag agcaaatcaa ggagatcaag aaggagcagc tttcaggatc cccgtggatt     660
ctgctaaggg aaaatgaagt cagcacactt tataaaggag aataccacag agctccagtg     720
gccataaaag tattcaaaaa actccaggct ggcagcattg caatagtgag gcagactttc     780
aataaggaga tcaaaaccat gaagaaattc gaatctccca acatcctgcg tatatttggg     840
atttgcattg atgaaacagt gactccgcct caattctcca ttgtcatgga gtactgtgaa     900
ctcgggaccc tgagggagct gttggatagg gaaaaagacc tcacacttgg caagcgcatg     960
gtcctagtcc tgggggcagc ccgaggccta taccggctac accattcaga agcacctgaa    1020
ctccacggaa aaatcagaag ctcaaacttc ctggtaactc aaggctacca agtgaagctt    1080
gcaggatttg agttgaggaa aacacagact tccatgagtt tgggaactac gagagaaaag    1140
acagacagag tcaaatctac agcatatctc tcacctcagg aactggaaga tgtattttat    1200
caatatgatg taaagtctga aatatacagc tttggaatcg tcctctggga aatcgccact    1260
ggagatatcc cgtttcaagg ctgtaattct gagaagatcc gcaagctggt ggctgtgaag    1320
cggcagcagg agccactggg tgaagactgc ccttcagagc tgcgggagat cattgatgag    1380
tgccgggccc atgatccctc tgtgcggccc tctgtggatg aaatcttaaa gaaactctcc    1440
acctttttcta agtag                                                    1455
```

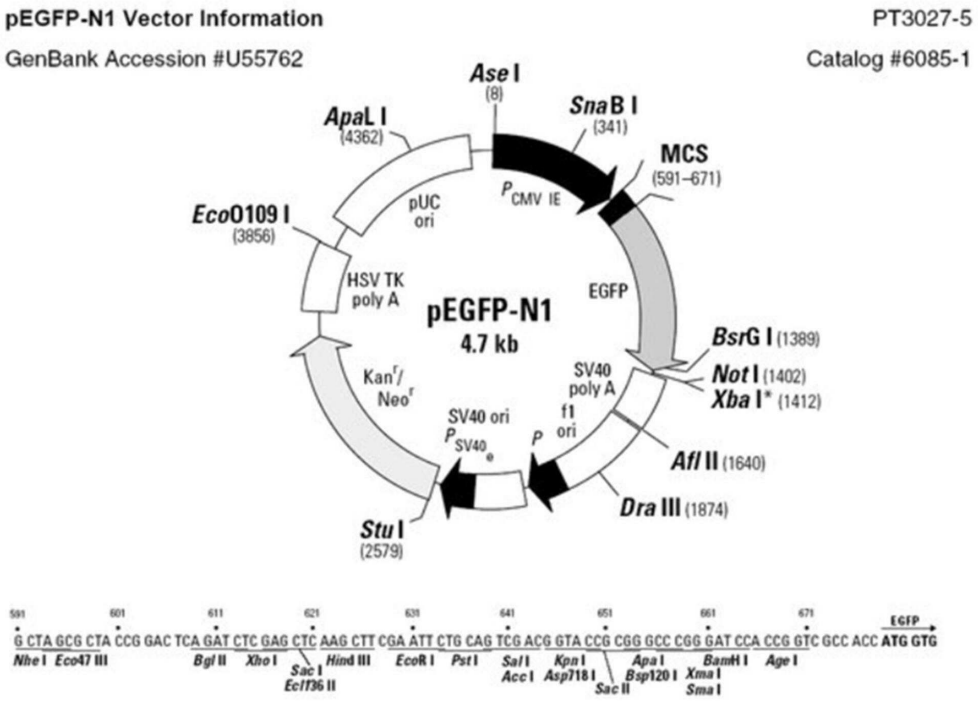
도면2b

```
atggactaca aagacgatga cgacaagctt gcggccgcaa tggaaaattt gaagcatatt      60
atcacccttg gccaggtcat ccacaaacgg tgtgaagaga tgaaatactg caagaaacag     120
tgccggcgcc tgggccaccg cgtcctcggc ctgatcaagc ctctggagat gctccaggac     180
caaggaaaga ggagcgtgcc ctctgagaag ttaaccacag ccatgaaccg cttcaaggct     240
gccctggagg aggctaatgg ggagatagaa aagttcagca atagatccaa tatctgcagg     300
tttctaacag caagccagga caaaatactc ttcaaggacg tgaacaggaa gctgagtgat     360
gtctggaagg agctctcgct gttacttcag gttgagcaac gcatgcctgt ttcacccata     420
agccaaggag cgtcctgggc acaggaagat cagcaggatg cagacgaaga caggcgagct     480
ttccagatgc taagaagaga taatgaaaaa atagaagctt cactgagacg attagaaatc     540
aacatgaaag aaatcaagga aactttgagg cagtctttgg aatcgtcctc tgggaaatcg     600
ccactggaga tatcccgttt caaggtgaag aatgtgaaga ctggctcagc cagtggctgt     660
aattctgaga agatccgcaa gctggtggct gtgaagcggc agcaggagcc actgggtgaa     720
gactgccctt cagagctgcg ggagatcatt gatgagtgcc gggcccatga tccctctgtg     780
cggccctctg tggatgaaat cttaaagaaa ctctccacct tttctaagta g              831
```

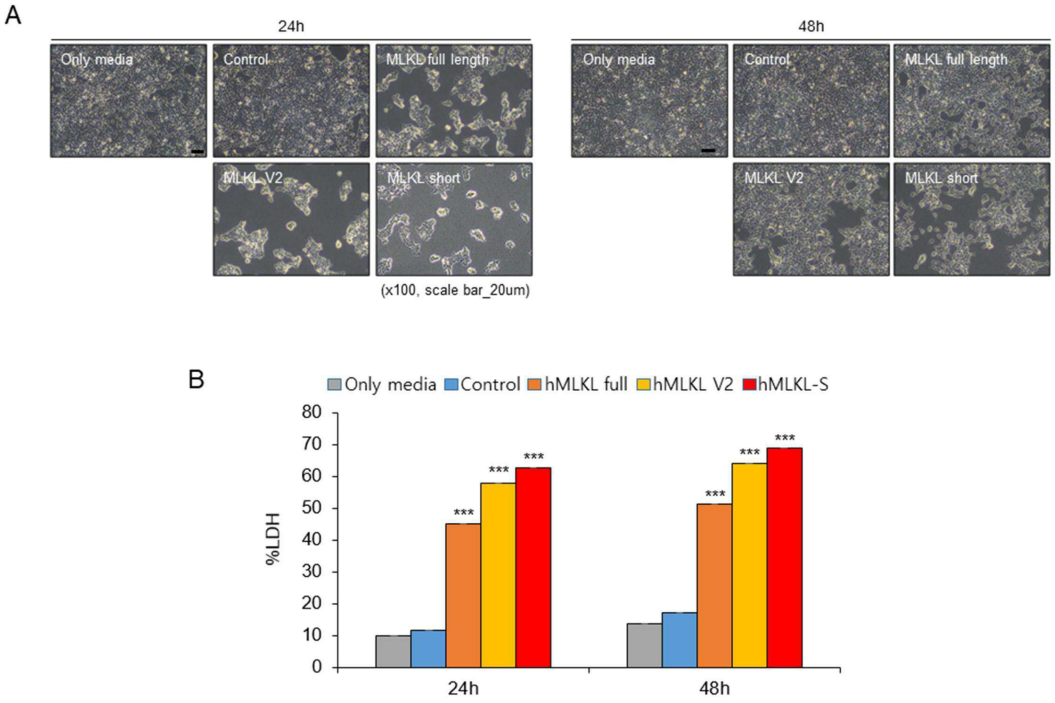
도면2c

```
atggactaca aagacgatga cgacaagctt gcggccgcaa tggaaaattt gaagcatatt      60
atcacccttg gccaggtcat ccacaaacgg tgtgaagaga tgaaatactg caagaaacag     120
tgccggcgcc tgggccaccg cgtcctcggc ctgatcaagc ctctggagat gctccaggac     180
caaggaaaga ggagcgtgcc ctctgagaag ttaaccacag ccatgaaccg cttcaaggct     240
gccctggagg aggctaatgg ggagatagaa aagttcagca atagatccaa tatctgcagg     300
tttctaacag caagccagga caaaatactc ttcaaggacg tgaacaggaa gctgagtgat     360
gtctggaagg agctctcgct gttacttcag gttgagcaac gcatgcctgt ttcacccata     420
agccaaggag cgtcctgggc acaggaagat cagcaggatg cagacgaaga caggcgagct     480
ttccagatgc taagaagaga taatgaaaaa atagaagctt cactgagacg attagaaatc     540
aacatgaaag aaatcaagga aactttgagg cagtatttac caccaaaatg catgcaggag     600
atcccgcaag agcaaatcaa ggagatcaag aaggagcagc tttaa                     645
```

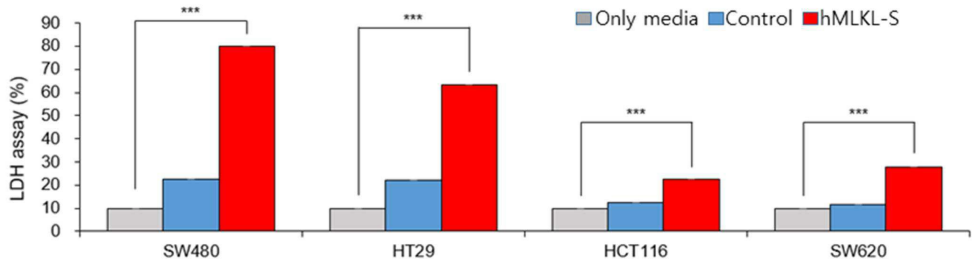
도면3


pEGFP-N1 Vector Information
PT3027-5
GenBank Accession #U55762
Catalog #6085-1
pEGFP-N1
4.7 kb
Ase I (8)
SnaB I (341)
MCS (591–671)
BsrG I (1389)
Not I (1402)
Xba I* (1412)
AflII (1640)
Dra III (1874)
Stu I (2579)
ApaL I (4362)
Eco0109 I (3856)
pUC ori
P CMV IE
EGFP
SV40 poly A
f1 ori
SV40 ori
HSV TK poly A
Kanr/ Neor
EGFP
ATG GTG
Nhe I Eco47 III
Bgl II
Xho I
Sac I Ecl136 II
Hind III
EcoR I
Pst I
Sal I Acc I
Kpn I Asp718 I
Sac II
Apa I Bsp120 I
BamH I Xma I Sma I
Age I

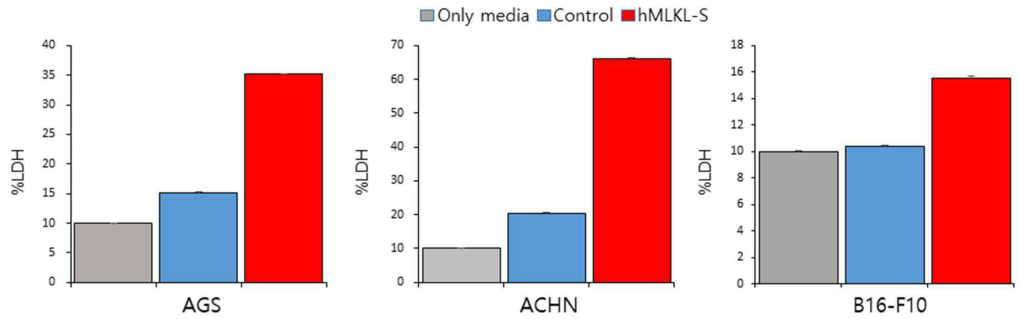
도면4


A
24h
48h
Only media
Control
MLKL full length
MLKL V2
MLKL short
(x100, scale bar_20um)
B
Only media
Control
hMLKL full
hMLKL V2
hMLKL-S
%LDH
24h
48h

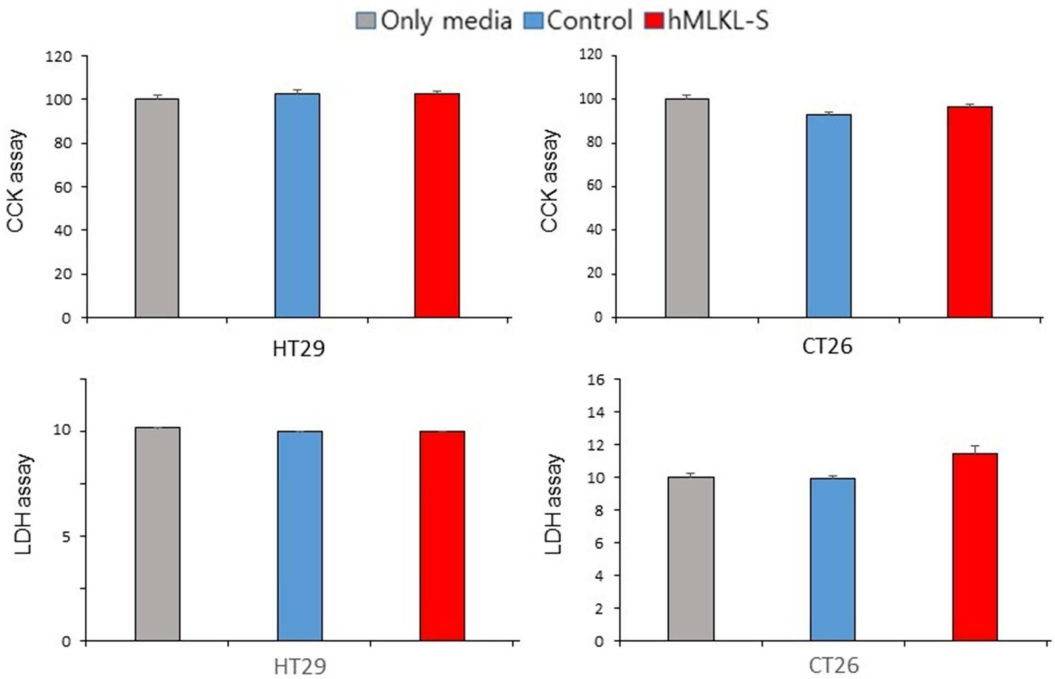
도면5


Only media
Control
hMLKL-S
LDH assay (%)
***
SW480
HT29
HCT116
SW620

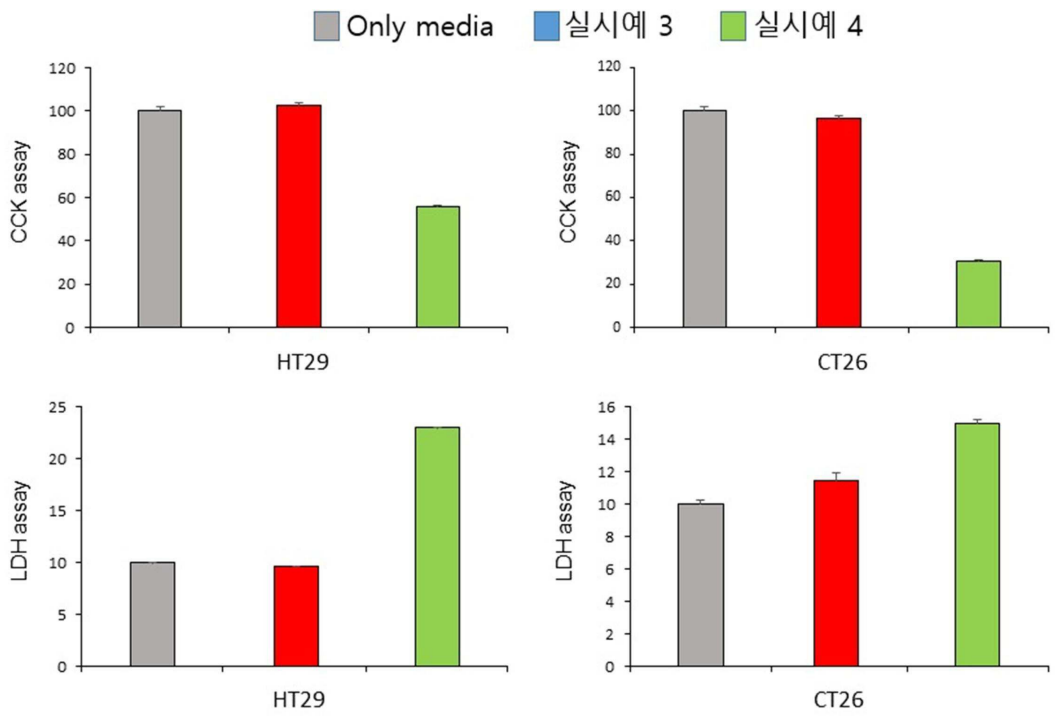
도면6


Only media
Control
hMLKL-S
%LDH
AGS
ACHN
B16-F10

도면7


Only media
Control
hMLKL-S
CCK assay
HT29
CT26
LDH assay
HT29
CT26

도면8



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.