

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155170

(43) 공개일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/0069 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0054687

(22) 출원일자 2022년05월03일

심사청구일자 2022년05월03일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

황병희

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 2701호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 23-1BL)

이유은

인천광역시 계양구 까치말로6번길 37, 101동 402호(작전동, 성웅산호타운)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

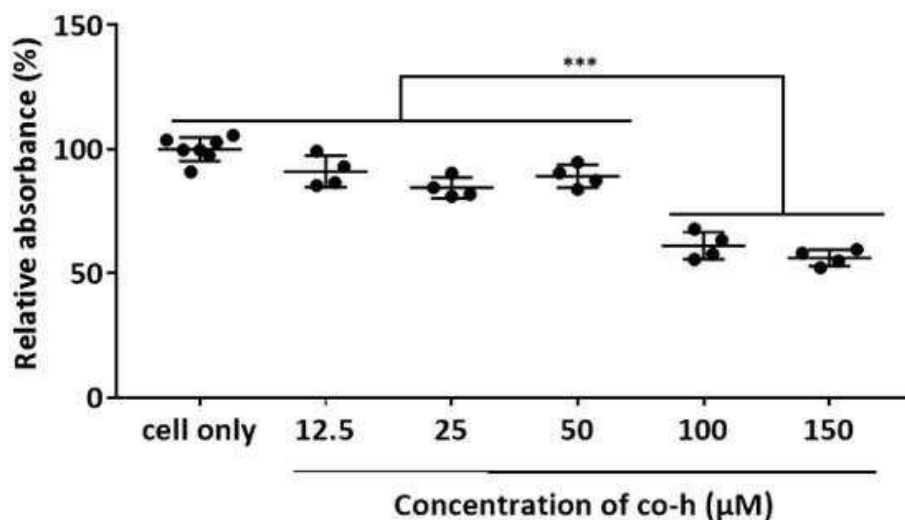
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 플라즈미드 매개 생물발광 공명에너지 전달 시스템 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트; 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터; 및 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 재조합 발현 벡터에 의한 생물발광 공명에너지 전달 시스템을 통해 항암 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 15/88 (2013.01)

C12Y 113/12005 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711158157

과제번호 2021R1F1A1049608

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 비바이러스 나노복합체 매개 크리스퍼 유전자가위 기반 다중 형질전환 암 면역치료
기술개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 인천대학교 산학협력단

연구기간 2021.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소(reactive oxygen species) 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 생물발광 단백질은 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase), 파이어플라이 루시페라아제(firefly luciferase), 메트리디아 루시페라아제(Metridia luciferase), 비브리오 피셔리 루시페라아제(vibrio fischeri luciferase), 비브리오 하웨이 루시페라아제(Vibrio haweyi luciferase), 비브리오 하베이 루시페라아제(Vibrio harveyi luciferase), 디노플라겔레이트 루시페라아제(dinoflagellate luciferase), 포토박테리아 루시페라아제(Photobacteria luciferase), 가우시아 루시페라아제(Gaussia luciferase) 및 시프리디아나 루시페라아제(Cypridiana luciferase)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 활성산소 생성 단백질은 킬러레드(KillerRed), SuperNova, miniSOG, SOPP(singlet oxygen photosensitizing protein), mKate2 및 킬러오렌지(KillerOrange)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자와 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자는 링커로 연결되는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 링커를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 유전자 컨스트럭트는 Kozak 서열을 추가적으로 더 포함하는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 Kozak 서열은 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 재조합 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리아 인공 염색체(BAC) 벡터 및 효모 인공 염색체(YAC)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 10

제 8 항 또는 제 9 항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 조성물은 S-R 펩타이드를 추가적으로 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 S-R 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 재조합 발현 벡터는 리포솜(liposome)에 의해 전달되는 것인, 조성물.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 암은 간암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성 폐암, 대장암, 전립선암, 췌장암, 위암, 식도암, 난소암, 골암, 선암종, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 뇌종양, 척수종양 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트; 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터; 및 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 광역학 치료(PDT, photodynamic therapy)는 항암 요법 중 하나로서 광감작제(PS, photosensitizer)를 주입하여 암조직에 광감작제가 축적되도록 유도한 후 특정 파장의 레이저를 처리하여 암세포만을 선택적으로 파괴하게 만드는 치료이다. 이는 레이저의 에너지가 광감작제가 있는 곳에서 화학적 반응을 유도하여 활성산소(ROS, reactive oxygen species)를 생성하고, 생성된 활성산소에 의해 암세포가 사멸되는 방법이다. 이러한 광역학 치료는 특정 파장의 빛에 의해 광화학 반응이 존재하는 암세포만 선택적으로 파괴시키는 방법이며, 정상 조직에는 거의 영향을 미치지 않으므로, 국소 치료에도 적합하며, 더 효율적이고, 기존 방사선 또는 화학요법과 같은 기존 항암 요법에 비해 부작용이 적다는 장점이 있다.

[0004] 그러나, 광역학 치료에 사용되고 있는 광감작제가 주로 화학물질이고, 생체 내에서 분해가 느리고 혈액에 축적되기 때문에 독성이 있고, 이로 인해 간 포르피린증(hepatic porphyria) 및 신부전(renal failure)을 유발할 수 있고, 햇빛에 의한 심한 통증 또는 광피부병(photo-dermatosis)을 유발할 수 있다는 문제점을 있다. 또한, 광감작제는 용해도가 낮아 제형화가 어렵다는 단점을 가진다. 더불어, 광감작제 활성화에 사용되는 빛은 조사 시 피부로 1.2 cm 까지만 침투되는 문제가 있으며, 빛을 조사하는데 사용되는 기구 역시 복잡하고 고가라는 문제점이 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 도너 단백질로서 레닐라 루시페라제 단백질을 코딩하는 유전자 및 어셉터 단백질로서 킬러 레드 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용(BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 플라스미드 벡터를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2020-0078127호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트가 포함된 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터는 기질의 존재 하에 도너 단백질에 의해 생물발광을 방출하고 어셉터 단백질에 의해 방출된 생물발광 공명에너지로부터 활성산소(ROS)가 생성됨으로써 생성된 활성산소에 의해 암세포를 선택적으로 사멸시키는 효과가 있어, 항암 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 pBRET-LP 복합체의 크기 및 제타 전위를 동적 광산란법(DLS, dynamic light scattering)를 통해 측정한 결과이다.

도 2a는 pBRET 벡터의 농도에 따라 형질전환 효율을 측정한 결과이고 (RFU: Relative Fluorescence Unit; 및 *** $P < 0.001$), 2b는 N:P 비율에 따라 형질전환 효율을 측정한 결과이고 (RFU: Relative Fluorescence Unit; 및 *** $P < 0.001$), 2c는 HEK29T 세포에서 발현되는 킬러레드(KR) 단백질의 형광을 fluorescence cell counter 을 통해 분석한 결과이다.

도 3은 pBRET-LP 복합체로 형질전환된 HEK293T 세포에 2.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M 및 150 μ M의 코엘렌 테라진-h를 72시간 동안 처리한 후 세포생존율을 측정한 결과이다 (n = 8; cell only, n = 4; 및 *** $P < 0.001$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자; 및 활성산소(reactive oxygen species) 생성 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 제공한다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 생물발광 단백질은 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase), 파이어플라이 루시페라아제(firefly luciferase), 메트리디아 루시페라아제(Metridia luciferase), 비브리오 피셔리 루시페라아제(vibrio fischeri luciferase), 비브리오 하웨이 루시페라아제(Vibrio haweyi luciferase), 비브리오 하베이 루시페라아제(Vibrio harveyi luciferase), 디노플라젤레이트 루시페라아제(dinoflagellate luciferase), 포토 박테리아 루시페라제(Photobacteria luciferase), 가우시아 루시페라제(Gaussia luciferase) 및 시프리디아나 루시페라제(Cypridiana luciferase)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 있고, 바람직하게는 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 레닐라 루시페라아제 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나, 서열번호 1의 염기서열과 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 가지는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 활성산소 생성 단백질은 킬러레드(KillerRed), SuperNova, miniSOG, SOPP(singlet oxygen photosensitizing protein), mKate2 및 킬러오렌지(KillerOrange)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 킬러레드(KillerRed)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 킬러레드(KillerRed) 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나, 서열번호 2의 염기서열과 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 가지는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자와 활성산소 생성 단백질을 코딩하는 유전자는 링커로 연결되는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 링커는 글리신(glycine), 알라닌(alanine), 이소루신(isoleucine), 발린(valine), 글루타민산(glutamic acid), 아스파라진(asparagine), 시스테인(cysteine), 라이신(lysine), 메티오닌

(methionine), 세린(serine), 트레오닌(threonine), 루신(leucine), 글루타민(glutamine) 및 페닐알라닌(phenylalanine)으로 이루어지는 아미노산 군에서 선택된 2-100개의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드이다.

- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 링커는 바람직하게는 (GGGGS)_n, (G)_n, (EAAAK)_n, A(EAAAK)_nLEA(EAAAK)_nA, PAPAP, (Ala-Pro)_n, LE 및 disulfide으로 이루어진 군에서 선택되는 폴리펩타이드인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 GGG인 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 링커를 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 Kozak 서열을 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 Kozak 서열은 단백질 번역 개시 부위(protein translation initiation site)로 기능하는 것이고, 생물발광 단백질을 코딩하는 유전자의 상류(upstream)에 삽입되는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 Kozak 서열은 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 유전자 컨스트럭트를 포함하는 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 용어, "재조합 발현 벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0032] 본 발명의 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 유전자의 전사조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어, 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산염기 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산염기 서열의 전사 및 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 합성생물학 및 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 RNA와 효소 등을 사용한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리아 인공 염색체(BAC) 벡터 및 효모 인공 염색체(YAC)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 플라스미드 벡터인 pBRET 벡터로서, 다음의 유전자를 순서대로 포함한다: 5' - CMV enhancer - CMV promoter - Kozak - Rluc8.6 - Linker - KillerRed - SV40 poly(A) signal - T7 terminator - 3'.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터를 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 S-R 펩타이드를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 S-R 펩타이드(SV40-Poly R)는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 리포솜(liposome)에 의해 전달되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 치료 대상 질병인 암(cancer)은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적 특성, 주위 조직에 침투하는 침윤적 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다.
- [0039] 상기 암은 간암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 폐암, 비소세포성 폐암, 대장암, 전립선암, 췌장암, 위암, 식도암, 난소암, 골암, 선암종, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 뇌종양, 척수종양 및 혈액암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 항암용 약학 조성물 형태로 제공된다.
- [0041] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무동화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 약학 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 있다. 나아가, 연

고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0043] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 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.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0046] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1. 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터의 제작

[0051] 본 발명자들은 생물발광 공명에너지 전달(BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 시스템을 통한 광역학 치료(PDT)를 위한 재조합 발현 벡터(pBRET)를 제작하였다. 재조합 발현 벡터는 pTwist CMV 벡터를 이용하여, 생물발광 공명에너지 전달 시스템의 도너(donor) 단백질로서 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase) 단백질을 코딩하는 유전자를 도입하였고, 어셉터(acceptor) 단백질로서 킬러레드(KillerRed) 단백질을 코딩하는 유전자를 도입하였다. 또한, 상기 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase 8.6, Rluc8.6) 단백질을 코딩하는 유전자와 킬러레드(KillerRed) 단백질을 코딩하는 유전자를 링커로 연결하였고, 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase) 단백질을 코딩하는 유전자의 상류(upstream)에는 단백질 번역 개시 부위(protein translation initiation site)로 기능하는 Kozak 서열을 도입하였다.

[0052] 본 발명의 재조합 발현 벡터인 pBRET 벡터는 다음의 유전자를 포함한다: 5' - CMV enhancer - CMV promoter - Kozak - Rluc8.6 - Linker - KillerRed - SV40 poly(A) signal - T7 terminator - 3'.

[0054] 실시예 2. 생물발광 공명에너지 전달용 재조합 발현 벡터가 포함된 pBRET-LP 복합체의 제작 및 특성 분석

[0055] 본 발명의 pBRET 벡터는 리포솜(liposome)을 통해 표적 세포로 전달하였고, 형질전환 효율을 증가시키기 위해 NLS(nuclear localization sequence) 및 CPP(cell-penetrating peptide) 서열을 가지는 S-R 펩타이드를 함께 처리하였다. 즉, pBRET 벡터, S-R 펩타이드 및 리포솜은 복합체(pBRET-LP)를 형성하도록 하였으며, 형성된 pBRET-LP 복합체를 표적 세포로 전달하도록 제작하였다.

[0056] 상기 제작된 pBRET-LP 복합체의 크기 및 제타 전위(zeta potential)는 동적 광산란법(DLS, dynamic light

scattering)으로 측정하였다. 측정을 위해, 80 ng의 재조합 발현 벡터(pBRET)와 S-R 펩타이드는 N/P 비율 0 및 2.5로 하고, Opti-MEM 배지에 있는 0.2 μ L의 lipofectamine™ 2000과 pBRET-LP 복합체를 형성시켰다. 이후, 20 μ L의 pBRET-LP 복합체를 980 μ L의 Opti-MEM 배지에 희석하였다. 이후, 1 mL의 희석된 pBRET-LP 복합체는 크기 측정을 위해 큐벳(Ratiolab, Hessen, Germany)에 로딩하였고, 제타 전위 측정을 위해 크기 측정을 위해 일회용 Folded Capillary Zeta Cell(Malvern Panalytical, Ltd., Malvern, UK)에 로딩하였다. pBRET-LP 복합체의 크기 및 제타 전위는 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK)를 통해 측정하였다.

[0057] 그 결과, S-R 펩타이드가 포함된 pBRET-LP 복합체의 크기는 466.07 d.nm로서, S-R 펩타이드가 없는 복합체의 크기(429.67 d.nm)에 비해 더 큰 것을 확인하였다 (도 1 왼쪽 패널). 또한, S-R 펩타이드가 포함된 pBRET-LP 복합체의 제타 전위는 -6.12 mV로 확인되었고, S-R 펩타이드가 없는 복합체의 제타 전위는 -29.13 mV로 확인됨으로써 (도 1 오른쪽 패널), 복합체의 전하(charge)는 S-R 펩타이드의 첨가에 의해 중화되었음을 확인하였다.

[0059] 실시예 3. pBRET-LP 복합체의 형질전환 효율 최적화

[0060] 본 발명자들은 Arthur™ Novel fluorescence cell counter (NanoEntek, Seoul, South Korea)를 사용하여 pBRET-LP 복합체의 형질전환 효율을 향상시키기 위한 조건을 확인하였다. 간단히, HEK293T 세포는 96-well plate에 10% FBS가 첨가된 100 μ L의 DMEM 배지에 1.7×10^5 cells/well로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후, 100 μ L의 Opti-MEM 배지로 교체하고, 각 조건에서 형성된 pBRET-LP 복합체로 형질전환시켰다. pBRET 벡터의 농도는 N/P 비율 2.5로 하여 100 ng, 200 ng 및 400 ng에서 실험하였고, N/P 비율은 200 ng의 pBRET 농도에서 1, 2.5 및 5로 하여 실험하였다. 모든 결과는 세포만(cell only)의 평균을 100%로 정규화한 것과 동일한 방식으로 정규화하였다.

[0061] 그 결과, 100 ng, 200 ng 및 400 ng의 pBRET 벡터는 형질전환 효율이 각각 639%, 679.5% 및 648.3%인 것으로 측정됨으로써 (도 2a), 200 ng 농도에서 pBRET 벡터의 형질전환 효율이 가장 높은 것을 확인하였다. 또한, N/P 비율은 2.5에서 pBRET 벡터의 형질전환 효율이 가장 높은 것을 확인하였다 (도 2b).

[0062] 더불어, HEK29T 세포에서 발현되는 킬러레드(KR) 단백질의 형광을 fluorescence cell counter을 통해 분석하였다. 그 결과, 200 ng의 pBRET 벡터로 형질전환된 대부분의 세포에서 킬러레드(KR) 단백질의 형광이 관찰됨으로써 (도 2c), pBRET 벡터의 농도는 200 ng의 농도가 가장 적합한 것을 확인하였다.

[0064] 실시예 4. 생물발광 공명에너지 전달(BRET) 유도에 의한 세포사멸 효과

[0065] 본 발명의 pBRET 벡터에 포함된 도너 단백질인 레닐라 루시페라제 단백질은 기질인 코엘렌테라진-h(co-h, coelenterazine-h)에 의해 생물발광을 방출하고, 어셉터 단백질인 킬러레드 단백질이 생물발광 공명에너지를 활성산소(ROS, reactive oxygen species)로 전달하며, 생성된 활성산소에 의해 암세포가 사멸된다.

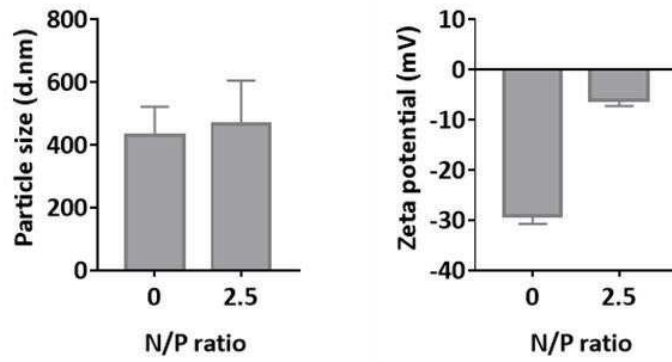
[0066] 이에 본 발명자들은 생물발광 공명에너지 전달 유도에 의한 세포사멸 효과를 최적화하기 위해, 기질의 처리 시간 및 농도를 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, pBRET-LP 복합체로 형질전환된 HEK293T 세포에 25 μ M의 코엘렌테라진-h를 각각 48시간 및 72시간 동안 처리한 후 WST-1 assay를 통해 세포생존율을 측정하였다. 또한, 2.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M 및 150 μ M의 코엘렌테라진-h를 72시간 동안 처리한 후 세포생존율을 측정하였다. 세포생존율은 D-Plus™ CCK cell viability assay kit를 이용하여 제조사의 지시에 따라 각 웰에 10 μ L의 CCK 용액을 넣고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양한 후, microplate reader (BioTek, VT, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 측정하였다.

[0067] 그 결과, 100 μ M 및 150 μ M의 코엘렌테라진-h이 처리된 그룹에서는 세포생존율이 각각 61% 및 56%로 유의하게 감소하였음을 확인하였다 (도 3).

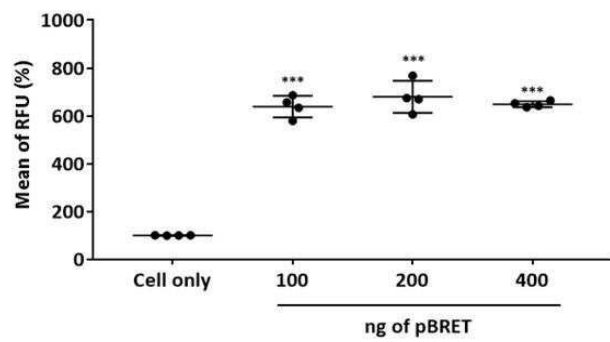
[0069] 상기 결과로부터, 본 발명의 pBRET 벡터는 pBRET-LP 복합체를 형성하여 높은 비율로 형질전환될 수 있고, 기질의 처리 하에 세포사멸을 유도할 수 있어, pBRET 벡터에 의한 생물발광 공명에너지 전달 시스템을 통해 항암 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

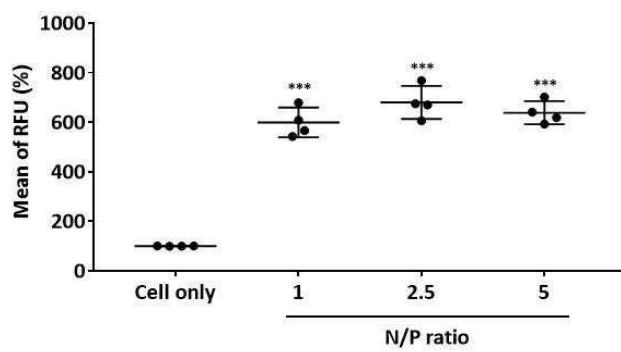
도면1



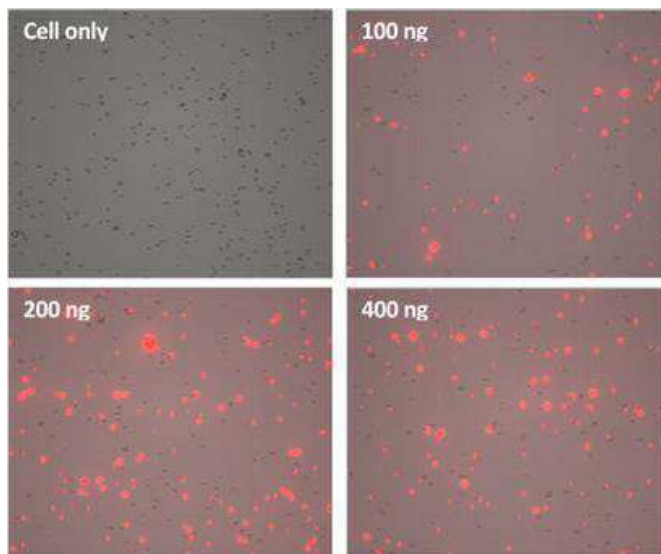
도면2a



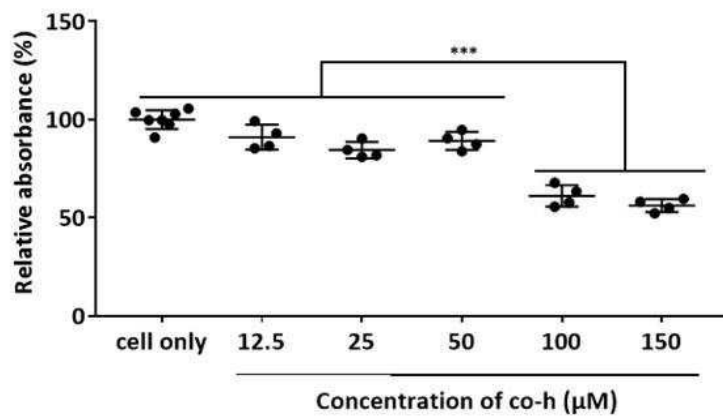
도면2b



도면2c



도면3



서열 목록

- <110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH and BUSINESS FOUNDATION
- <120> Plasmid-mediated protein bioluminescence resonance energy transfer system and use thereof
- <130> 1070988
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 933
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of Renilla luciferase

<400> 1

atggcttcca aggtgtacga ccccagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg	60
tgggctcgct gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag	120
aagcacgccg agaacgccgt gatttttctg catggtaacg ctacctccag ctacctgtgg	180
aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccggtg gctagatgca tcatccctga tctgatcgga	240
atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatcgcc tcctggatca ctacaagtac	300
ctcacgcgtt gggtcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac	360
tgggggagcg ctctggcctt tctactagcc tacgagcacc aagacaggat caaggccatc	420
gtccatatgg agagtgtcgt ggacgtgatc gagtccctgga tggggtggcc tgacatcgag	480
gaggagctgg cctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tgggtccttga gaataacttc	540
ttcgtcgaga cctgtttgcc aagcaagatc atcgcgaaac tggagcctga ggagtctcgt	600
gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggctaccct ctctggcct	660
cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac	720
aacgcctacc ttctggccag cgacgatctg cctaagctgt tcatcgagtc cgaccctggg	780
ttcttttcca acgtattgt cgagggagct aagaagtcc ctaacaccga gtctgtgaag	840
gtgaagggcc tccatttctt ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag	900
agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cag	933

<210> 2

<211> 771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of KillerRed

<400> 2

ctgtgctgta tgagaagaac caaacagggt gaaaagaatg atgaggacca aaagatctcc	60
gagggcggcc ccgccctgtt ccagagcgac atgaccttca aaatcttcat cgacggcgag	120
gtgaacggcc agaagttcac catcgtggcc gacggcagca gcaagttccc ccacggcgac	180
ttcaacgtgc acgccgtgtg cgagaccggc aagctgcca tgagctggaa gcccattctg	240
cacctgatcc agtacggcga gcccttcttc gcccgctacc ccgacggcat cagccatttc	300
gcccaggagt gcttccccga gggcctgagc atcgaccgca ccgtgcgctt cgagaacgac	360
ggcaccatga ccagccacca cacctacgag ctggacgaca cctgcgtggt gagccgcatc	420

accgtgaact gcgacggctt ccagcccgac ggccccatca tgcgcgacca gctgggtggac 480
atcctgcccc acgagaccca catgttcccc cacggcccca acgccgtgcg ccagctggcc 540
ttcatcggtt tcaccaccgc cgacggcggc ctgatgatgg gccacttcga cagcaagatg 600
accttcaacg gcagccgcgc catcgagatc cccggcccac atttcgtgac catcatcacc 660
aagcagatga gggacaccag cgacaagcgc gaccacgtgt gccagcgca ggtggcctac 720

gcccacacgc tgccccgcat caccagcgcc atcggtagcg acgaggatta a 771

<210> 3

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of Linker

<400> 3

ggcggagga 9

<210> 4

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of Kozak

<400> 4

gccacc 6

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of S-R peptide

<400> 5

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Cys Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg

20