

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156740

(43) 공개일자 2024년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/52 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0053265

(22) 출원일자 2023년04월24일

심사청구일자 2024년02월14일

(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(복수

동, 삼익목화아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

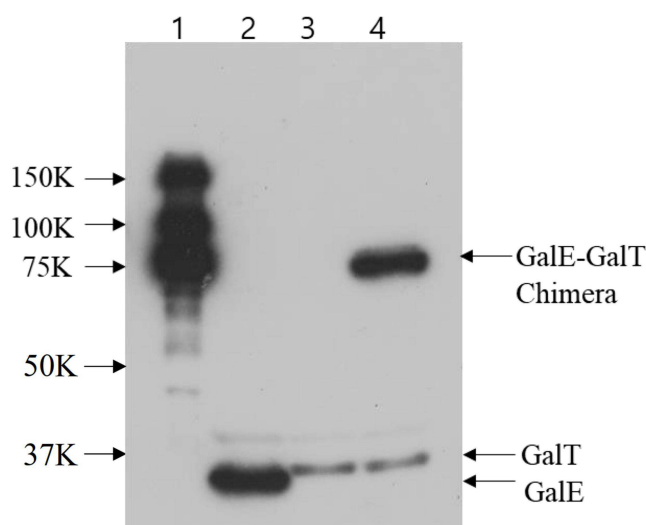
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 융합단백질과 이를 구성하는 다운스트림 단백질의 동시 발현을 위한 유전자 구조물

(57) 요약

본 발명은 융합단백질과 융합단백질을 구성하는 다운스트림 단백질을 함께 발현시키도록 설계된 유전자 구조물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) 업스트림 단백질을 암호화하며, 종결코돈이 센스코돈으로 치환된 제1 유전자; (B) 다운스트림 단백질을 암호화하는 제2 유전자; 및 (C) 제1 유전자와 제2 유전자를 연결하며, 샤페론-달가노 서열을 구성하는 링커 서열;을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합단백질과 이를 구성하는 다운스트림 단백질의 동시 발현을 위한 유전자 구조물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 15/74 (2013.01)

(72) 발명자

김솔비

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

김은지

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

한민주

충청북도 충주시 연수서편2길 11, 102동 3204호(연
수동, 충주 센트럴 푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182622
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 서플 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.04.21 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (A) 업스트림 단백질을 암호화하며, 종결코돈이 센스코돈으로 치환된 제1 유전자;
- (B) 다운스트림 단백질을 암호화하는 제2 유전자; 및
- (C) 제1 유전자와 제2 유전자를 연결하며, 샤인-달가노 서열을 구성하는 링커 서열;
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합단백질과 이를 구성하는 다운스트림 단백질의 동시 발현을 위한 유전자 구조물.

청구항 2

청구항 1의 유전자 구조물을 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

청구항 1의 유전자 구조물에 의해 형질전환된 재조합 균주.

청구항 4

청구항 3에 있어서,
상기 균주가 약독화 살모넬라인 균주.

청구항 5

청구항 4의 균주를 함유하는 항암 면역증강용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 융합단백질과 융합단백질을 구성하는 다운스트림 단백질을 함께 발현시키도록 설계된 유전자 구조물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아 유전자 조절의 특징은 오페론 내의 유전자 그룹에 의한 전사 개시 및 종결의 단일 과정에 의해 통합된 방식으로 이루어질 수 있다는 것이다. 갈락토스 오페론(*gal* 오페론)은 *galE*, *galT*, *galK*, *galM*의 네 가지 구조 유전자로 구성되어 있으며, 오페론의 시작 부분에서 시작된 전사가 세 개의 시스트론 접합부를 통해 계속되고 오페론의 끝에서 종료되기 때문에 5'-*galE-galT-galK-galM*-3' 구조의 전장 mRNA *galETKM*을 생성한다. 오페론은 또한 각 시스트론 접합부 즉, *galE-galT*, *galT-galK* 및 *galK-galM*의 접합부 바로 뒤를 3'-말단으로 하는 세 가지 추가 mRNA 중 *galE*, *galET* 및 *galETK*를 생성한다. 이와 같은 mRNA의 생성으로 인하여 프로모터에 가까운 유전자가 프로모터로부터 더 멀리 떨어진 유전자보다 더 많이 발현되는 "자연 극성(natural polarity)"이라고 칭하는 특성이 성립된다.

[0003] *gal*의 자연 극성은 전사 종결 인자 Rho에 의한 조기 전사 종결과 관련되어 있다. 이러한 발견은 *galE*, *galET* 및 *galETK*의 3'-말단이 각각의 시스트론 접합부(cistron junction)의 말단에서 Rho 의존적 전사종결에 의해 생성됨을 시사한다. 본 발명자는 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 7581-7586에 *galT*와 *galK*의 시스트론의 접합부에서 *gal* 전사체에 결합하는 sRNA Spot 42가 Rho 의존적 종결을 촉발하여 *galET* mRNA의 3'-말단을 유발한다는 것을 보고하였다.

[0004] 도 1은 *gal* 오페론의 구조를 보여주는 것으로, 각 시스트론의 개시 및 종결코돈을 P1 프로모터의 전사 개시 위치를 +1로 한 상대적인 위치를 나타내는 숫자로 표시하였다. 세 개의 시스트론 접합부에서 이전 시스트론의 종결코돈과 다음 시스트론의 개시코돈 사이의 거리는 10 뉴클레오타이드 미만이다. 예를 들어, 도 1의 하단에 도 시된 바와 같이 *gal* 오페론의 *galE-galT* 시스트론에서 *galE*의 종결코돈(빨간색)과 *galT*의 개시코돈(파란색)은 9 개의 뉴클레오타이드로 분리되어 있다. *galE-galT* 시스트론에서 *galT* 샤인-달가노(SD) 서열을 밑줄로 표시하였다. 종래 보고된 바에 따르면 Rho 의존적 전사 종결을 위해서는 Rho가 결합할 수 있는 최소 70개의 뉴클레오타이드가 필요하기 때문에, 10개 미만의 간격으로는 이전 시스트론의 번역 이후에 다음 시스트론의 번역이 이어질 경우 Rho가 mRNA에 결합하여 전사를 종료하기에 불충분하다. 따라서 전장 전사체의 말단으로부터 73개 뉴클레오타이드 업스트림에 있는 마지막 종결코돈에서의 번역 종료가 Rho 의존적 종결을 가능하게 하는 오페론의 말단 부분과 달리, 시스트론 접합부에서 RDT가 발생하는 원인은 불분명하다.

[0005] 본 발명자는 이전 연구에서 *galE*의 종결코돈을 센스코돈으로 변경한 돌연변이 *galE stop⁰*를 이용한 Rho 의존적 종결 기작에 대해 보고한 바 있다(mBio 2022 Volume 13 Issue 3 e01287-22). 상기 돌연변이에서 *galE* 번역은 *galT*의 종결코돈에서만 종료되어 키메라 GalE-GalT 단백질을 생성함을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

[0006] 최근 추가적인 분석에 의해 상기 돌연변이에서 *GalE*와 *GalT* 단백질의 상대적인 양을 각각 결정하여 비교하는 것에 의해, 예상하지 못한 발현 패턴을 확인하고 이를 균주 내에서 발현되는 단백질의 디자인에 활용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 7581-7586.

(비특허문헌 0002) *mbio* 2022 Volume 13 Issue 3 e01287-22.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생체 내 융합단백질의 발현 시 융합단백질과 함께 융합단백질을 구성하는 다운스트림 단백질을 함께 발현하도록 설계된 유전자 구조물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[0010] 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 업스트림 단백질을 암호화하며, 종결코돈이 센스코돈으로 치환된 제1 유전자; (B) 다운스트림 단백질을 암호화하는 제2 유전자; 및 (C) 제1 유전자와 제2 유전자를 연결하며, 샤인-달가노 서열을 구성하는 링커 서열;을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합단백질과 이를 구성하는 다운스트림 단백질의 동시 발현을 위한 유전자 구조물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명자들은 전사와 번역 기작에 관한 연구 과정에서, 상기 구조로 설계된 유전자 구조물의 단백질 발현을 검정한 결과 업스트림 단백질과 다운스트림 단백질이 융합된 형태의 융합단백질 뿐 아니라 다운스트림 단백질이

함께 발현되는 예상치 못한 결과를 확인하였다. 상기 유전자 구조물이 신약 개발에 유용한 도구로 활용될 수 있다. 예를 들어, 그 자체로 암에 표적화되어 항암 효과를 나타내는 살모넬라 균주를 추가로 특정 유전자 구조물을 발현하도록 하여 항암 효과를 더욱 증강시키는 것에 의한 암 치료에 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 업스트림 단백질에 의해 다운스트림 단백질이 세포투과성을 나타내도록 구성된 융합단백질이라면, 융합단백질의 형태로 다운스트림 단백질이 세포 밖으로 분비되어 작용하는 한편, 다운스트림 단백질만이 발현된 것은 세포 내에서 작동하도록 하여 세포 밖과 세포 내에서 동시에 작동하도록 할 수 있다.

[0013] 융합단백질 형태로의 발현을 위해 업스트림 단백질의 종결코돈은 센스코돈으로 치환되어야 한다. 다운스트림 단백질의 동시 발현을 위해 링커 서열은 샤인-달가노 서열을 구성할 수 있도록 디자인된다. 상기 샤인-달가노 서열은 링커 서열만으로 구성되거나, 혹은 제1 유전자의 종결코돈을 치환한 센스코돈의 적어도 일부와 링커 서열이 함께 샤인-달가노 서열을 구성할 수 있다. 또는 링커 서열과 제2 유전자의 개시코돈의 적어도 일부가 샤인-달가노 서열을 구성할 수도 있다.

[0014] 본 발명의 유전자 구조물은 추후 벡터에 도입할 수 있도록 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있다. 또한 유전자 구조물의 작동을 제어하기 위하여 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. "유도성 프로모터"는 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭 할 수 있는 프로모터를 의미한다.

[0015] 본 발명은 또한 상기 유전자 구조물을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 본 발명의 유전자 구조물을 발현시킬 수 있도록 작동가능하게 연결된 DNA 제조물로, 플라스미드, 파지 입자 또는 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 본 발명의 명세서에서 플라스미드와 벡터는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 상기 발현 벡터는 유전자 구조물의 서열에 따라 효율이 높은 것을 선택하여 사용할 수 있음은 당연하다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 유전자 구조물에 의해 형질전환된 재조합 균주에 관한 것이다. 재조합 균주는 상기 유전자 구조물을 포함하는 발현 벡터를 사용하여 형질전환할 수 있다. 형질전환 방법은 통상의 방법에 따르며, 예를 들어 칼슘 클로라이드 방법, 전기천공법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 형질전환 균주는 유전자 구조물을 구성하는 융합단백질과 그 다운스트림 단백질을 함께 발현하는 것을 특징으로 한다. 상기 균주는 특히 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. 살모넬라 균주는 암에 표적화되어 항암 면역활성을 나타내며, 특히 다른 균주들과는 달리 림프절을 통하여 비장과 간에 침투하여 전신 면역반응을 자극할 수 있다.

[0017] 이에 본 발명은 특히 상기 균주를 함유하는 약학 조성물로 사용될 수 있다. 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.

발명의 효과

[0018] 이상과 같이 본 발명의 유전자 구조물 설계에 의하면 상기 유전자 구조물의 발현 시 업스트림 단백질과 다운스트림 단백질이 융합된 형태의 융합단백질 뿐 아니라, 다운스트림 단백질 자체가 함께 발현되기 때문에 이러한 특성을 이용하여 신약 개발 시 더욱 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 gal 오페론의 구조를 보여주는 모식도이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 사용된 플라스미드에서 his-tag의 삽입 위치를 보여주는 도면이다.

도 3은 본 발명의 유전자 구조물에서 융합단백질과 다운스트림 단백질이 함께 발현되는 것을 보여주는 웨스턴 블랏 결과 전기영동 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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.

[0021] [실시예]

[0022] 1. 실험 방법

[0023] 1) 플라스미드 구성

[0024] Gal 단백질의 웨스턴 블랏 분석을 위해, *gal* 오페론 DNA의 *galE* 및 *galT* 유전자의 개방형 판독 프레임(open reading frame) 말단에 "His-tag"를 프레임 내에 삽입하여 플라스미드 pGal-*galE*^{histag}, pGal-*galT*^{histag} 및 pGal-*galE* stop⁰-*galT*^{histag}를 제작하였다(도 2). 도 3에서 초록색으로 표시된 부분은 웨스턴 블랏 분석을 위해 *galE* 및 *galT* 말단에 도입된 6개의 연속적인 히스티딘 잔기를 나타낸다. mBio 2022 Volume 13 Issue 3 e01287-22에 기재된 방법에 의해 *galE* 종결코돈 돌연변이(TAA→AAA)를 포함하는 합성 프라이머를 사용하여 부위 특이적 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)을 하였다.

[0025] PCR 증폭을 통해 돌연변이를 포함하는 DNA 단편을 얻은 후, 생성된 PCR 단편을 *EcoRI* 및 *HindIII*로 소화한 다음, pGal-*galT*^{histag} 플라스미드에 결합하여 pGal-*galE* stop⁰-*galT*^{histag} 플라스미드를 생성하였다. 돌연변이와 삽입은 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0026] 2) 웨스턴 블랏 분석

[0027] 각 플라스미드를 보유한 MG1655Δ*gal* 균주를 M9-갈락토스에서 OD₆₀₀이 0.6이 될 때까지 배양하였다. 각 배양물의 조세포 용해물 5 μg에 함유된 단백질을 SDS-아크릴아미드 슬랩 겔 전기영동으로 분리하고 단백질 블랏터를 사용하여 니트로셀룰로오스 막에 블랏팅하였다. 블랏은 제조업체의 지침에 따라 His tag 항체(Merck)로 프로브하였다. 단백질 밴드의 상대적 밴드 강도는 네거티브 필름을 스캔한 후 ImageJ 소프트웨어(미국 NIH)로 측정하였다.

[0028] 2. 결과

[0029] 발현된 단백질 분석

[0030] pGal-*galE*^{histag}, pGal-*galT*^{histag} 또는 pGal-*galE* stop⁰-*galT*^{histag}를 내인성 *gal* 오페론이 결여된 대장균 MG1655Δ *gal* 균주에 형질전환하고, Luria-Bertani broth에서 OD₆₀₀이 0.6이 될 때까지 배양하였다. His tag 항체를 사용한 웨스턴 블랏을 실시하여, 동일한 웨스턴 블랏에서 GalE와 GalT 단백질을 확인하는 것에 의해 각 형질전환체에서 GalE와 GalT 및 키메라 단백질 GalE-GalT의 상대적인 생성을 확인하였다.

[0031] 도 3은 그 결과를 보여주는 것으로, 2, 3, 4번 레인은 각각 pGal-*galE*^{histag}, pGal-*galT*^{histag} 및 pGal-*galE* stop⁰-*galT*^{histag} 플라스미드를 보유하는 균주의 결과를 나타낸다. 도 3에서 상대적인 밴드의 강도를 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

	GalE	GalE-GalT	GalT
pGal- <i>galE</i> ^{histag}	1.0	0.0	-
pGal- <i>galT</i> ^{histag}	-	0.0	0.23
pGal- <i>galE</i> stop ⁰ - <i>galT</i> ^{histag}	0.0	0.9	0.2

[0032]

[0033] 표 1 및 도 3의 결과에서 확인할 수 있듯이, *galE* stop⁰ 돌연변이는 예상 분자량 ~ 75 kDa의 GalE-GalT 키메라 단백질을 생산하였다. 이와 더불어 상기 돌연변이는 놀랍게도 GalT 단백질을 함께 생산하였다. 이는 *galE* stop⁰ 돌연변이에 독립적인 번역 개시 부위가 존재한다는 것을 시사한다. 즉, GalT 단백질은 샤퐀-달가노(SD) 서열을 사용하는 GalT 단백질의 신규 번역 개시에 의해 만들어진다.

[0034] 표 1에서 야생형 균주에서 GalE는 GalT보다 약 6배 더 많이 만들어져 gal 발현이 자연 극성을 나타내는 것을 보

여준다. *galE stop*⁰ 돌연변이에서 GalT는 야생형과 오차범위 5% 이내에서 거의 동일한 양으로 발현되었다. 이는 야생형 균주에서도 모든 GalT 단백질이 *galT*의 신규 번역 개시에 의해 만들어짐을 시사한다.

[0035]

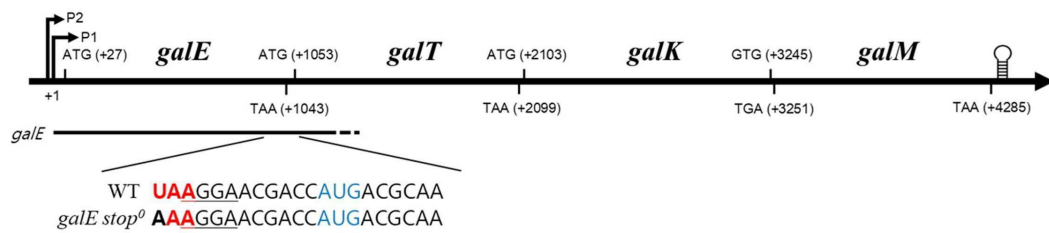
또한 *galE stop*⁰ 돌연변이에 의해 생성된 GalE-GalT 키메라 단백질과 야생형 균주에 의해 생성된 GalE 단백질의 양 역시 유사하였다. 돌연변이에서의 GalE-GalT 키메라 단백질과 야생형 균주에서의 GalE 단백질이 *galE*의 신규 번역 개시에 의해 만들어진다는 점을 고려하면, 이 결과는 *galE*의 샤인-달가노 서열에서 시작된 번역이 다음 종결코돈에서 종료됨을 시사한다.

[0036]

종합하면, *galE-galT* 시스템 접합부에서 *galE*의 번역 종료와 *galT*의 번역 개시가 독립적으로 발생하며, 이 두 과정은 상호 배타적으로 진행됨을 확인할 수 있다.

도면

도면1



도면2

pGal-*galE*^{histag}

CCCGATCACCACCACCACCACCACTAAGGAACGACCATGACGC ····· CGC-----GCA···GTGTAAGAA

pGal-*galT*^{histag}

CCCGAT-----TAAGGAACGACCATGACGC ····· CGCCACCACCACCACCACCACGCA···GTGTAAGAA

pGal-*galE stop*⁰-*galT*^{histag}

CCCGAT-----AAAGGAACGACCATGACGC ····· CGCCACCACCACCACCACCACGCA···GTGTAAGAA

도면3

