(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0013955
(43) 공개일자 2024년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/25* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0090611
(22) 출원일자 2022년07월21일
심사청구일자 2022년07월21일

(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
리앤목특허법인

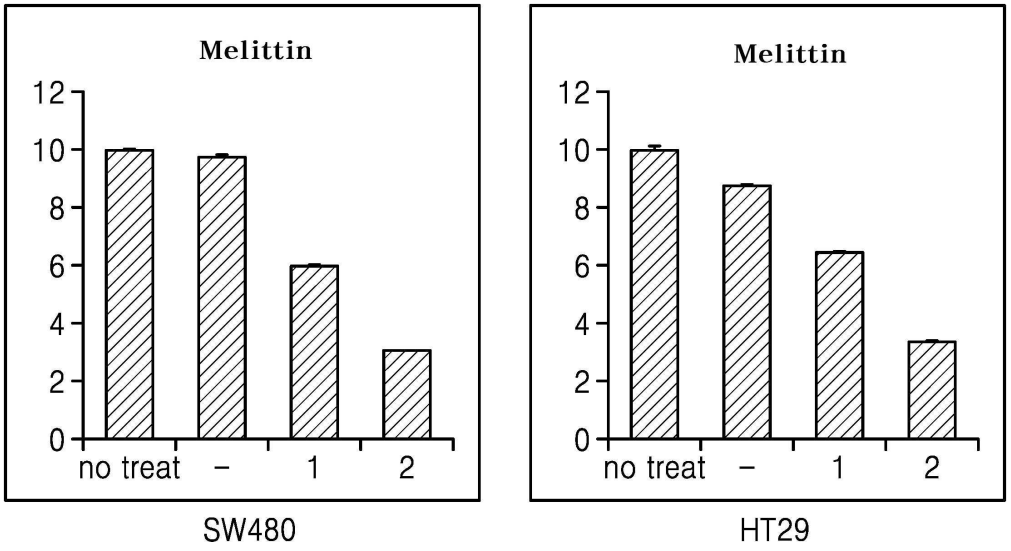
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **멜리틴 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주**

(57) 요 약

멜리틴의 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주에 관한 것으로서, flgM 유전자; 및 멜리틴 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물, 및 멜리틴의 분비능을 향상시킬 수 있는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/25 (2013.01)
C07K 14/43572 (2013.01)
C12N 1/20 (2021.05)
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 봉현로 366, 104동 1103호(안림동, 충주 2차 푸르지오)

이명원
세종특별자치시 보듬2로 43, 1503동 203호(도담동, 도램마을15단지)
강소라
대전광역시 서구 도안동로 123, 1709동 2502호(도안동, 도안리슈빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169233
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

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	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

flgM 유전자; 및 멜리틴 (melittin) 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 flgM 유전자 및 멜리틴 유전자는 링커를 통하여 연결된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 flhDC 유전자를 추가로 포함하는 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 aroA, aroC, aroD, aroE, asd, 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 기능이 상실된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 멜리틴에 대한 분비능이 향상된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 수탁번호 KCTC19012P로 수탁된 살모넬라 균주.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물.

청구항 8

flgM 유전자; 및 멜리틴 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 flgM 유전자 및 멜리틴 유전자는 링커를 통하여 연결된 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 flhDC 유전자를 추가로 포함하는 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 flgM 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 12

청구항 8에 있어서, 상기 멜리틴 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 발현 벡터.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 멜리틴의 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 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. 시겔라(Shigella), 콜레라균(Vibriocholera), 병원성 대장균(pathogenic E. coli)과 같은 감염성 세균들은 장관의 세포에 침투할 뿐, 면역반응을 일으키는 중요한 기관인 간과 비장에는 도달하지 못한다. 이와 대조적으로 살모넬라균은 림프절을 통하여 비장과 간에 침투하여 전신 면역반응을 자극시킬 수 있다. 구체적으로, 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.

[0004] 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. 그러나 약독화된 살모넬라는 생존성이 낮고 면역유발능 역시 저하될 뿐 아니라 돌연변이로 인하여 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환되어 패혈증을 일으킬 우려가 있다. 이에 더하여 연구개발자금의 부족 문제로 인하여 약독화된 살모넬라를 이용한 항암치료는 임상과정의 1단계에서 대부분 중단되거나 보류된 상태이다.

[0005] 살모넬라와 같은 박테리아를 이용한 암 치료에 동반되어 발생할 수 있는 패혈증의 유발은 극복해야 할 매우 중요한 문제이며, 이에 더하여 면역반응의 자극 역시 활발하게 이루어질 수 있어야 한다. 이에 약독화 및 면역 활성화와 함께 항암치료에 도움이 되는 물질들을 추가로 발현 또는 억제시킬 수 있는 균주들을 개발하고, 이를 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 주를 이루고 있다. 등록특허 제10-0852687호는 약독화된 살모넬라 균주 내에 종양괴사인자 알파단백질 벡터를 형질도입한 종양괴사인자 알파를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 대해 게시하였으며, 등록특허 제10-1750007호는 L-아스파라기나아제가 종양 사이트에서 선택적으로 발현될 수 있는 약독화 살모넬라 균주를 이용한 고형암 치료제에 대해 게시하였다.

[0006] 꿀벌독의 주성분인 "멜리틴 (Melittin)"은 26개의 아미노산으로 구성된 양친매성(amphipathic) 펩타이드이며 N-말단 영역에 소수성 아미노산의 분포와 C-말단 영역에 친수성 아미노산을 갖는다. 이러한 멜리틴의 구조를 통해 멜리틴은 기공 형성, 융합 및 소포형성과 같은 막-섭동(perturbing) 효과를 가지며, 암 세포의 표면이나 세포막을 뚫고 구멍을 만들어 암세포가 죽게 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 멜리틴의 세포막에 구멍을 뚫는 효과는

염증 반응을 일으키는 사이토카인의 방출을 촉진한다고 알려져 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 flgM 유전자 및 멜리틴을 암호화하는 유전자를 연결시킨 유전자 구조물 및 이를 포함하는 재조합 균주를 제조하고, flgM 유전자를 도입함에 따라 균주의 3형 분비계(Type 3 Secretion System)를 통한 flgM의 분비와 함께 멜리틴의 분비를 가능하게 함으로써 우수한 분비능 및 항암효과를 가지며, 균주의 암 표적화능을 통해 암 표적화 효과를 갖는 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0852687호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2021-0123556호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 우수한 항암효과를 보이는 멜리틴 단백질을 효과적으로 분비하기 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 인해 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 flgM 유전자; 및 멜리틴 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주를 제공하는 것이다.

[0014] 본 명세서에서 "flgM"은 박테리아의 3형 분비계에서 후기 편모 전사를 위해 필요한 RNA 중합효소를 동원하는 것을 담당하는 σ인자를 억제하는 단백질 (또는 이러한 단백질을 암호화하는 유전자)을 지칭한다. 본 명세서에서 "3형 분비계"는 그람 음성균에 발달된 병원성 물질 전달 방법으로, 숙주 세포막을 통과하여 직접 세포질로 병원성 활성 단백질을 주입하는 주사기 형태의 기구(Mota LJ et al, Ann Med.(2005);37(4):234-249)로 다중 단백질 복합구조체를 의미한다. 상기 3형 분비계에서, 세포막에 편모를 만들 수 있는 기본 구조인 후크(hook)-기저체(basal body)가 형성되는 동안, flgM 단백질은 세포질 내에 남아있으며, class III 유전자, 예를 들어 플라젤린 서브유닛 FliC 또는 고정자(stator) 단백질 MotAB의 전사를 방해하는 항-σ^{28} 인자로서 작용한다. 이후, 후크-기저체 구조 완성 후, 동시에 플라젤라 분비 시스템 내 기질 특이성의 변화가 일어나고, 이로 인해 flgM은 후크의 중앙통로를 통해 세포 밖으로 분비되고, 이후 세포 내에서는 σ^{28}-의존적 전사가 시작된다. 3형 분비계에서의 편모 형성 과정을 통한 flgM의 분비기작을 도 2에 나타내었다.

[0015] 구체적으로, 본 발명은 flgM 유전자와 분비하고자 하는 단백질인 멜리틴 유전자를 포함하는 유전적 구조물을 제작하여, 균주의 3형 분비계를 통한 flgM의 분비와 함께 멜리틴의 균주 외 분비를 가능하게 하였다.

[0016] 본 명세서에서, "멜리틴 (Melittin)"은 26개의 아미노산으로 구성된 양친매성(amphipathic) 펩타이드로서, 꿀벌 독의 주요성분을 구성하는 펩타이드이다. 상기 본원에 사용되는 용어 "꿀벌독(bee venom; BV)"은 꿀벌(Apismellifera)의 복부에서 생성되는 산성 및 염기성 분비물의 혼합물 로서 무색의 쓴 액체형태를 띠며, 그 주된 성분은 펩타이드인 멜리틴(melittin), 아파민(apamin) 및 비만세포 탈과립화(mast cell degranulating; MCD) 펩타이드 및 효소인 포스포리파아제 A2(phospholipase A2; PLA2) 등이며, 이외 여러 가지 미량의 성분을 포함한다. 따라서 본발명의 멜리틴은 꿀벌(Apis mellifera)의 봉독에서 분리되는 것일 수 있으나 이에 제한되지

않는다. 멜리틴은 N-말단 영역에 소수성 아미노산의 분포와 C-말단 영역에 친수성 아미노산을 갖는다. 이러한 멜리틴의 구조로 인해 멜리틴은 기공 형성, 융합 및 소포형성과 같은 막-섭동 효과를 가지며, 따라서 암 세포의 표면이나 세포막을 뚫고 구멍을 만들어 암세포를 사멸시킨다. 또한, 멜리틴은 암세포를 터뜨려 면역세포의 유도가 촉진되어 이차 항암면역반응을 유도하는 효과를 갖는다. 멜리틴 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI GeneBank에서 그 정보를 수득할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어, "유전자"는 최광의의 의미로 간주되어야 하며, 구조 단백질 또는 조절 단백질을 암호화할 수 있다. 이때, 조절 단백질은 전사인자, 열 충격단백질 또는 DNA/RNA 복제, 전사 및/또는 번역에 관여하는 단백질을 포함할 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 용어, "형질전환"은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있으며 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다. 일 실시예에 따르면, flgM 유전자 및 분비하고자 하는 단백질인 멜리틴 유전자가 포함된 재조합 발현 벡터를 제작하여, 이로 살모넬라 균주를 형질전환함으로써, 단지 멜리틴의 발현에 그치는 것이 아니라, 세포 외로 멜리틴이 분비되도록 조절할 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어, "약독화"는 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, 상기 약독화 살모넬라 균주는 aroA, aroC, aroD, aroE, asd, 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 기능이 상실된 것일 수 있다. 생체 내 적용 시 야생형으로의 환원을 방지하고, 독성을 더욱 약화시키기 위하여 상기 유전자 중 둘 이상의 유전자 기능을 상실시킬 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 약독화 살모넬라 균주는 aroA, aroD 및 asd 유전자가 상실된 살모넬라 균주일 수 있다.

[0020] 상기 약독화 살모넬라 균주는 종양 부위에 표적화되어 면역 반응을 유도하는 것에 의해 항암 활성을 갖는다. 한편, 본 발명의 재조합 발현 벡터로 형질전환하는 경우, 상기 살모넬라 균주는 종양 부위에 표적화되고, 멜리틴, 예를 들어, flgM-멜리틴 융합 단백질에 대한 분비능이 향상되어, 더욱 강력한 항암 활성을 나타낼 수 있다.

[0021] 일 구체예에서, 상기 flgM 유전자와 멜리틴 유전자는 링커를 통하여 연결될 수 있다. 본 명세서에서 "링커"란 관심있는 단백질에 이종성 도메인(domain)을 연결하는 데 사용된 폴리펩타이드 사슬을 지칭하며, 일 구체예에서, 상기 링커는 예를 들어, $(G_lS_m)_n$(l, m 및 n은 각각 ≥ 2), $(G_lS_m)_n$-H_p-$(G_lS_m)_n$ (l, m 및 n은 각각 ≥ 1, H ≥ 6), $(G_4S)_a(EAAAK)_b(G_4S)_a$(a, b는 1 내지 4의 정수), $(G_4S)_p(EAAAK)_q$(p, q는 1 내지 4의 정수), $(EAAAK)_x(G_4S)_y$(x, y는 1 내지 4의 정수), A(EAAAK)$_4$ALEA(EAAAK)$_4$A, $(GSSGGS)_i$(i는 1 내지 4의 정수), KESGSVSSEQLAQFRSLD, EGKSSGSGSESKST, GSAGSAAGSGEF, $(EAAAK)_k$(k는 1 내지 5의 정수), CRRRRRREAEAC, GGGGGGGG, GGGGGG, AEAAAKEAAAAKA, PAPAP, VSQTSKLTRAETVFPDV, PLGLWA, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, RRRRRRRR, 및 GSSGGSGSSGGSGGGDEADGSRGSQKAGVDE로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 링커는 예를 들어, 10 내지 16-mer의 펩타이드 링커 일 수 있으며, 상기 펩타이드의 길이는 10 내지 15-mer, 10 내지 14-mer, 10 내지 13-mer, 10 내지 12-mer, 10 내지 11-mer, 12 내지 16-mer, 12 내지 15-merm, 12 내지 14-mer, 12 내지 13-mer, 13 내지 16-mer, 13 내지 15-merm, 또는 13 내지 14-mer의 펩타이드 링커 일 수 있다. 상기 링커의 길이는 일 실시예에 따른 살모넬라 균주의 flgM-멜리틴 융합 단백질 분비 수준에 영향을 미칠 수 있다.

[0023] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 멜리틴의 분비능이 향상된 것일 수 있다. 일 구체예에서 아라비노스(arabinose) 유도 프로모터를 포함하는 벡터로 약독화 살모넬라 균주를 형질전환하여 아라비노스 존재 하에 멜리틴의 발현을 조절하고 제3형 분비계의 flgM를 사용하여 멜리틴 단백질이 균주 외로 효과적으로 분비될 수 있도록 할 수 있다.

[0024] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 flhDC 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 flhDC 유전

자는 플라젤린 오페론 (operon) 유전자의 주된 조절자로 flgM 유전자의 발현을 조절할 수 있으며, 이에 상기 유전자 구조물에 flhDC 유전자를 포함시킬 경우, flgM-멜리틴의 발현량 또는 분비량을 증진시키는데 기여할 수 있다.

[0025] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 수탁번호 KCTC19012P로 수탁된 살모넬라 균주일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 약독화 살모넬라 균주는 flgM 유전자-링커-멜리틴-flhDC 유전자 구조물을 포함하는 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환되었으며, 상기 유전자 구조물은 멜리틴 고유의 항암 활성을 유지한 채, 약독화 살모넬라 균주의 flgM-멜리틴의 분비능을 향상시킬 수 있었다. 따라서, 일 실시예에 따른 형질전환된 약독화 살모넬라 균주는 암의 치료를 위한 유효 성분으로 활용할 수 있다.

[0027] 다른 양상은, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물 또는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 하기 항암용 약학적 조성물에 언급된 용어 또는 요소 중 상기 약독화 살모넬라 균주에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기한 바와 같다.

[0029] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "암 (cancer)" 은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적 (aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적 (invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적 (metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 상기 암은 예를 들어, 고형암일 수 있으며, 바람직하게는 살모넬라 균주의 암 표적화능이 발휘될 수 있는 암 조직 또는 암 세포를 포함하는 종양이라면, 비제한적으로 확장 적용될 수 있다. 예를 들어 상기 암의 종류로는 췌장암, 대장암, 결장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 자궁암, 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것 아니다.

[0030] 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.

[0031] 본 명세서에서 “약학적으로 허용 가능한 담체”는 투여되는 특정 조성물에 따라 부분적으로 결정될 뿐만 아니라, 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 따라 부분적으로 결정될 수 있다. 따라서, 상기 조성물의 적합한 제형이 매우 다양하며, 예를 들어, 조성물은 비경구(즉, 근육내, 피내, 또는 피하) 투여 또는 비인두(즉, 비강내) 투여를 위해 제형화될 수 있다. 일반적으로, 비경구 투여용 제형은 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 유화액을 포함한다. 비수성 용매의 예시는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물유, 및 올레산에틸과 같은 주사용 유기 에스테르이다. 수성 담체는 염수 및 완충된 매질을 비롯하여 물, 알코올/수성 용액, 유화액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 비경구용 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로스(Ringer's dextrose), 덱스트로스와 염화나트륨, 락테이트화 링거(lactated Ringer's), 또는 고정유를 포함할 수 있다. 방부제 및 기타 첨가물은 또한 예를 들어, 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 및 불활성 가스 등으로 존재할 수 있다.

[0032] 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.

[0034] 또 다른 양상은, flgM 유전자; 및 멜리틴 유전자를 포함하는 유전적 구조물 또는 flgM 유전자; 및 멜리틴 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0035] 하기 유전적 구조물 또는 재조합 발현 벡터에 언급된 용어 또는 요소 중 상기 약독화 살모넬라 균주 및 항암용 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기한 바와 같다.

[0036] 본 명세서에서 용어, "유전적 구조물"은 목적하는 단백질의 유전 정보를 포함하는 집합체, 기능적 단위체, 또는 컨스트럭트를 지칭하며, 이는 최광의로 해석될 수 있다. 상기 유전적 구조물은 본 발명의 목적상, 약독화된 살모넬라 균주로부터 flgM-멜리틴 융합 단백질의 분비를 증진시키기 위한 것으로서, 예를 들어, flgM 유전자, 10 내지 16 mer의 펩타이드 링커, 및 멜리틴 유전자가 작동가능하게 연결된 DNA 인서트를 지칭하는 것일 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 용어, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리뉴클레오타이드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리뉴클레오타이드를 코딩하는 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 상기 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 또는 박테리오파지일 수 있다. 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있다. 선택 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 마커는 암피실린(ampicillin), 네오마이신(neomycin), 퓨로마이신(puromycin), 히그로마이신(hygromycin) 및 제오신(zeocin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 선택 마커일 수 있다. 상기 벡터는 복제원점, 프로모터 등 복제 및/또는 카피수 조절에 관여하는 유전자를 포함할 수 있고, 제한효소 부위 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0038] 일 구체예에서, 상기 재조합 발현벡터는 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다. 본 명세서에서 "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터로, 예를 들어 ara 프로모터, tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ프로모터, pRλ프로모터, 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 또는 pflE 프로모터 일 수 있다.

[0039] 본 명세서에서 "작동 가능하게 연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의하여 영향을 받도록 단일 핵산 단편 상에서 뉴클레오티드 서열들이 연결된 것을 나타낼 수 있다. 일 구체예에서, flgM-멜리틴 단백질을 발현시키기 위해 pBAD18 asd 플라스미드를 벡터로 사용하여 ara 프로모터에 작동 가능하게 유전자가 연결된 flgM-(linker)-melittin-pBAD18의 재조합 발현벡터를 확립하였다. 상기 asd 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0040] 일 구체예에서, 상기 멜리틴의 발현 효율을 향상시키기 위해 본 발명의 유전적 구조물 전단에 샤인-달가노(Shine-dalgarno) 서열이 삽입될 수 있다. 또한, 본 발명의 유전적 구조물을 벡터에 도입할 수 있도록 본 발명의 유전적 구조물 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있다.

[0041] 일 구체예에서, 상기 flgM 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것 일 수 있고, 및/또는 상기 멜리틴 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 재조합 발현 벡터는 flhDC 유전자를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 flhDC 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0042] 본 명세서에서, “변이체 (variants)”는 참조 엔터티(entity)(예컨대, 야생형 서열)와 상당한 구조적 동일성을 나타내지만 하나 이상에서 참조 엔터티와 구조적으로 상이한 엔터티를 지칭한다. 특정 엔터티가 참조 엔터티의 "변이체"로 적절하게 여겨지는지 여부는 참조 엔티티와의 구조적 또는 기능적 동일성의 정도를 기초로 한다. 임의의 생물학적 또는 화학적 참조 엔터티는 특정한 고유의 구조적 요소를 갖으며, 상기 변이체는, 정의상, 하나 이상의 그러한 고유의 구조적 요소를 공유하는 별개의 화학적 엔터티를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 선형 또는 3차원 공간에서 서로에 대해 지정된 위치를 갖는 복수의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는 고유의 서열 요소를 가질 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열의 하나 이상의 차이 및/또는 폴리뉴클레오티드 백본에 공유 결합된 화학적 모이어티(예를 들어, 탄수화물, 지질 등)의 하나 이상의 차이로 인해 참조 폴리뉴클레오티드와 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 변이체는 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의, 참조 폴리뉴클레오티드와의 전체 서열 동일성을 나타낸다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따른 약독화 살모넬라 균주는 flgM 유전자-링커-멜리틴-flhDC 유전자 구조물을 포함하는 재조합 발현벡터에 의해 형질전환되었으며, 이를 통해, 높은 수준의 멜리틴의 발현 및 분비를 유도할 수 있다. 따라서, 일 양상에 따른 재조합 발현 벡터, 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암용 약학적 조성물

은 암을 치료하는데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 3형 분비계를 이용한 flgM-melittin 단백질 분비 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 3형 분비계 내에서 편모 형성 과정을 통한 flgM의 분비 기작을 간략하게 나타낸 도이다.

도 3은 flgM-melittin-flhDC-pBAD18 플라스미드의 개열지도를 나타낸 도이다.

도 4는 일 실시예에 따른 flgM-linker-melittin-flhDC-pBAD18 플라스미드를 사용하여 형질전환된 약독화 살모넬라 균주의 단백질 분비 수준을 확인한 결과이다. 1 및 2 레인은. flgM-linker-melittin-flhDC pBAD18 플라스미드로 형질전환된 균주(flgM-linker-melittin-flhDC pBAD18 /aroA aro D asd-)를 4시간 동안 성장시킨 군이고, 3 및 4 레인은 상기 균주를 6시간 동안 균주를 성장시킨 군이며, 2 및 4 레인은 1 및 3 레인과 달리, 아라비노스를 처리하여 발현을 유도한 군이다.

도 5는 사용한 링커의 종류에 따른 flgM-melittin 발현 및 분비 수준을 확인한 결과이다. 1 레인은 서열번호 5의 링커를 사용하며 2 및 3 레인과 달리 아라비노스를 처리하지 않은 군이며, 2 레인은 서열번호 4의 링커를 사용한 군이고, 3 레인은 서열번호 5의 링커를 사용한 군이다.

도 6은 HT-29 및 SW480 인체 대장암 세포주에서 CCK assay를 통해 세포사멸을 확인한 결과이다. (-)는 아라비노스를 처리하지 않은 군, (1)은 서열번호 4의 링커를 적용한 군, (2)는 서열번호 5의 링커를 적용한 군의 결과이다.

도 7은 HT-29 및 SW480 인체 대장암 세포주에서 LDH assay를 통해 세포사멸을 확인한 결과이다. (-)는 아라비노스를 처리하지 않은 군, (1)은 서열번호 4의 링커를 적용한 군, (2)는 서열번호 5의 링커를 적용한 군의 결과이다.

도 8은 분비된 flgM-melittin 사용하여 in vitro에서 마우스 유방암 세포주에 처리하여 항암효과를 확인한 결과이다. 도 8(a)는 아무것도 처리하지 않은 군의 결과이고, 도 8(b)는 아라비노스를 처리하지 않은 군의 결과이며, 도 8(c)는 아라비노스를 처리하여 발현을 유도한 실험군의 결과이다.

도 9는 4T1 마우스 유방암 세포주에서 CCK assay를 통해 세포사멸을 확인한 결과이다. 아라비노스를 처리하지 않은 군(-)과 아라비노스를 처리한 군(+)의 결과이다.

도 10은 CT26 마우스 대장암 세포주에서 CCK assay를 통해 세포사멸을 확인한 결과이다. 아라비노스를 처리하지 않은 군(-)과 아라비노스를 처리한 군(+)의 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1 : 멜리틴 분비를 위한 플라스미드의 제작**

[0048] **1-1. flgM 유전자 및 melittin 유전자가 연결된 유전적 구조물의 제작**

[0049] 야생형 살모넬라의 flgM DNA 서열(flgM anti-sigma-28 factor FlgM [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2] Gene ID: 1252690, Locus tagSTM1172 NC_003197.2 (1257036..1257341, complement))과, melittin에 대한 코돈 최적화를 통해 수득한 DNA 서열을 연결시켜, 일 실시예에 따른 유전적 구조물 제작하였다. 구체적으로, 상기 flgM DNA 서열 및 melittin DNA 서열은 링커를 통하여 연결시켰고, flgM 유전자의 발현을 높이기 위해, flgM 유전자 앞에 14개의 샤인-달가노(shine dalgarno) 서열 (AGGAGGTTTGACCT)을 삽입하였다, 또한, 클로닝을 위해 맨 앞에는 Nhe I site를 삽입하고, melittin의 종결 코돈 뒤에는 Sac I site를 삽입하였다. 한편, 본 실시예에서 주요한 구조물의 유전 정보는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0050]

명명	서열 정보	서열 번호
flgM	atgagcattgaccgtacctcacctttgaaacccgttagcactgtccagacgcgcgaaaccagcg acacgccggtacaaaaaacgcgtcaggaaaaaacgtccgccgcgacgagcgccagcgtaacgtt aagcgacgcgcaagcgaagctcatgcagccaggcgtcagcgacattaatatggaacgcgtcgaa gcattaaaaacggctatccgtaacggtgagttaaaaatggatacgggaaaaatagcagactcgc tcattcgcgaggcgcagagctacttacagagtaaaaaa	1
melittin	ggcatcggtgcggttttgaaggtattaacgacgggtcttccggctttaattagttggattaaac gtaagcggcagcag	2
linker 1	ggcggcagcagccatcaccatcaccatcacagcagcggcggccgcgtgaaacgccgcgtgaaac gccgcgtgaaacgc	4
linker 2	ggcggcagcagccatcaccatcaccatcacagcagcggcggc	5

[0051] 이후, 상기 flgM-melittin에 대한 구조물을 Nhe I 과 Sac I 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시키고, 이의 반응 산물을 전기영동한 뒤, Gel extraction kit로 400bp DNA를 확인하여 flgM-melittin insert DNA, 즉, flgM-melittin에 대한 유전적 구조물을 수득하였다 (flgM-linker1-melittin: 서열 번호 6, flgM-linker2-melittin: 서열번호 7).

[0053] **1-2. flhDC 유전자를 포함하는 유전적 구조물의 제작**

[0054] 야생형 살모넬라 LT2의 genomic DNA를 주형으로 하기 표 2의 flhD-sac1-F 및 flhC-Sal1-r 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 flhDC 유전자가 포함된 PCR 산물을 얻었으며, 구체적인 PCR 조건은 다음과 같다; 10x buffer 5㎕, 5xQ solution 10 ㎕, 2 mM dNTPs 7.5 ㎕, 20 ㎕ flhD-sac1-f 프라이머 2.5㎕, 20㎕ flhC-Sal1-r 프라이머 2.5 ㎕, Taq polymerase 1 ㎕, 10 ng/㎕ genomic DNA2 ㎕ 및 물 19.5 ㎕을 혼합하여 Qiagen system을 사용하여, 95℃ 5분과, 30회의 94℃ 30초, 49℃ 30초, 72℃ 1분 반복과 그 후에 72℃ 10분의 조건에서 PCR을 진행하였다. PCR purification kit로 정제한 PCR fragment 1㎍과 sacI과 SalI을 각각 10U를 37℃에서 2시간 반응시키고, 상기 반응 산물을 PCR purification kit로 정제하여 서열번호 3의 flhDC insert DNA를 제작하였다.

표 2

[0055]

명명	서열 정보	서열 번호
flhD-SAC1-f	gatcgatcgagctcaggaggtttgatcctatgggaacaatgcatacatccgagttgct	8
flhC-Sal1-r	gatcgatcgtcgacttaaacagcctgttcgatctgttcatccagcagtt	9

[0056] **1-3. flgM-linker-melittin-flhDC-pBAD18 플라스미드의 확립**

[0057] pBAD18 asd 플라스미드를 벡터로 사용하여, Nhe I 및 Sac I 효소 각각 10U를 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 상기 반응 산물을 PCR purification kit로 정제하여 각각의 벡터 DNA를 얻었다. 상기 플라스미드 내에 삽입된 asd 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어질 수 있다. 이후, 각 벡터 DNA를 실시예 1-1의 flgM-melittin insert DNA와 25℃에서 30분간 ligation시키고, DH5a 컴피턴트 세포에 형질전환시켰다. 이후, 상기 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 후보군 6개를 선별하여 Nhe I 및 Sac I 각각 10 U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 400bp 밴드의 생성을 확인하였다. 이후, pBAD18을 사용하여 제작된 플라스미드에 대해 해당 후보군의 염기서열 분석을 실시하여, 상기 flgM, linker1, linker2 및 melittin 유전자의 삽입을 확인하고, 일 실시예에 따른 flgM-linker1-melittin-pBAD18 플라스미드 및 flgM-linker2-melittin-pBAD18 플라스미드를 확립하였다.

[0058] 이후, 상기 제작한 flgM-linker1-melittin-pBAD18 플라스미드 또는 flgM-linker2-melittin-pBAD18 플라스미드 1㎍을 sac I 및 Sal I 10U와 37℃에서 2시간 반응시킨 후 반응산물을 PCR purification kit로 정제하여 벡터 DNA를 완성하였다. 이후, 각 벡터 DNA를 상기 실시예 1-2의 flhDC insert DNA와 25℃에서 30분 ligation 시킨 후 DH5a 컴피턴트 세포를 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 후보군 6개를 선별하여 sac I 및 Sal I 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 band의 생성을 확인하였다. 해당 후보군의 염기서열 분석을 실시하여,

flhDC 유전자의 삽입을 확인하고, 이를 통하여, 일 실시예에 따른 flgM-linker1-melittin-flhDC pBAD18 플라스미드 및 flgM-linker2-melittin-flhDC pBAD18 플라스미드를 확립하였다

[0060] **실시예 2 : flgM-melittin을 분비하는 약독화 살모넬라 균주 제작**

[0061] 상기 실시예 1에서 제조된 플라스미드를 사용하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전환시켰다. 약독화 살모넬라 균주로는 aro A aro D asd- 균주를 사용하였으며, 이를 통해 약독화 살모넬라 균주가 아라비노스에 의해 melittin의 발현을 조절하고 이를 세포 밖으로 분비하도록 조절하였다. 상기 형질전환된 각 균주의 단일 콜로니를 LB cm 액체배지에 접종한 후 37℃에서 12~16시간 진탕배양하였다. 이후 신선한 LB cm 액체배지에 OD600이 0.05가 되도록 희석한 후 37℃에서 2시간 진탕배양하였다. 진탕배양에 의해 OD600이 0.4~0.6이 되면 아라비노스(arabinose)를 0.2 w%의 농도가 되도록 처리하여, 37℃에서 5시간 추가로 진탕배양시켰다. 이후, 배양액을 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.2㎛ 필터로 여과하여 균을 완전히 제거하였다. 상기균이 제거된 상층액 50㎕를 SDS sample buffer와 혼합하여 100℃ 히팅 블록(heating block)에 5분간 변성시킨 후, 5분간 13000rpm 4℃에서 원심분리 하고 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동을 하였다. 1시간 30분 동안 100V로 전기영동 후 Coomassie Brilliant Blue G 250로 염색 후 증류수를 이용하여 탈색하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 이를 통해 배양액 중 flgM-melittin의 양을 확인하였으며 나타내었다 (도 4). 상기 도 4에서, 1 및 2 레인은. flgM-linker-melittin-flhDC pBAD18 플라스미드로 형질전환된 균주(flgM-linker-melittin-flhDC pBAD18 /aroA aro D asd-)를 4시간 동안 성장시킨 군이고, 3 및 4 레인은 상기 균주를 6시간 동안 균주를 성장시킨 군이며, 2 및 4 레인은 1 및 3 레인과 달리, 아라비노스를 처리하여 발현을 유도한 군이다.

[0062] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 아라비노스가 처리된 2 및 4 레인은 아라비노스가 처리되지 않은 1 및 3 레인보다 동일 농도에서 다량의 flgM-melittin이 분비되었음을 확인하였다. 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, 특정 링커가 적용된 3 레인에서의 flgM-melittin의 분비량은 2 레인에 비해 우수함을 확인하였다. 또한, 도 6 및 7에 나타낸 바와 같이, 특정 링커가 적용된 군에서 사멸한 세포의 수준이 높음을 확인하였다. 상기 결과로부터, 일 실시예 따른 flgM-linker2-melittin-flhDC-pBAD18 플라스미드로 형질전환된 균주는 우수한 melittin 분비능을 나타내며, 특히, 14mer 링커가 적용된 flgM-linker2-melittin-flhDC pBAD18/aroA aro D asd- 균주의 분비능 및 세포 사멸 효과는 매우 우수함을 알 수 있었다. 이에, 본 발명자들은 일 실시예에 따른 flgM-linker2-melittin-flhDC pBAD18 /aroA aro D asd-균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2022년 6월 24일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC19012P를 부여받았다 (S-flgM-melitin-pBAD18-ASD+/BRD509 asd-).

[0064] **실시예 3: in vitro 에서의 melittin의 항종양 효과 테스트**

[0065] **3-1. 분비된 flgM-melittin의 활성 평가**

[0066] 실시예 2에서 얻은 형질전환된 flgM-linker2-melittin-flhDC pBAD18/aroA aro D asd- 균주의 단일 콜로니를 LB cm 액체배지에 접종한 후 37℃에서 12~16시간 진탕배양하였다. 이후 신선한 LB cm 액체배지에 OD600이 0.05가 되도록 희석한 후 37℃에서 2시간 진탕배양하였다. 진탕배양에 의해 OD600이 0.4~0.6이 되면 아라비노스(arabinose)를 0.2 w%의 농도가 되도록 처리하여, 37℃에서 5시간 추가로 진탕배양시켰다. 비교를 위해서 아라비노스를 처리하지 않은 비교군을 동일 조건에서 진탕배양시켰다. 배양액을 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.2㎛ 필터로 여과하여 균을 완전히 제거하였다. 이를 통해 flgM-melittin 융합 단백질을 획득하였다.

[0067] 한편, 4T1 마우스 유방암 세포주를 구입하여 각각의 세포들을 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 세포를 성장시키고 세포 수가 2 X 10^5 개 일 때 6-well에 세포를 시딩(seeding)하였다. 24시간 후, 상기 과정을 통해 상층액으로부터 얻은 융합 단백질 200㎕를 처리하고, 이를 48시간 배양한 후 관찰하였다.

[0068] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 아라비노스를 처리하지 않은 비교군 (b)는 아무것도 처리하지 않은 대조군 (a)에 비해 약 5% 정도 세포 수준이 감소된 반면, 아라비노스를 처리하여 flgM-melittin의 발현 또는 분비를 유도한 실험군(c)에서는 50% 이상 세포 수준이 감소됨을 확인하였다.

[0070] **3-2. 암 세포 사멸 유도 효과 평가**

[0071] 암 세포 사멸 유도에 대한 효과를 확인하기 위하여 4T1 마우스 유방암 세포주, HT-29 및 SW480 인체 대장암 세포주, 및 CT26 마우스 대장암 세포주를 구입하여 상기 실시예 3-1과 같이 배양액을 얻었고, 이를 사용하여 CCK assay 및 LDH assay를 수행하였다. CCK assay를 위해 상기 배양한 세포주 상층액 100ul를 96well 플레이트에 옮기고 CCK 용액 100ul를 추가한 후, 450nm microreader로 측정하였다. 본 실험은 신뢰성을 높이기 위해 triplicate로 진행하였다. 또한, LDH assay를 위해 상기 배양한 세포주 상층액을 1000rpm에서 3분동안 원심분리하여 세포잔해를 제거하고 상층액 10ul과 LDH 용액 100ul를 혼합하여 실온에서 30분간 인큐베이션하고 450nm microreader로 측정하였다. CCK assay 과 마찬가지로 실험은 triplicate로 진행하였다.

[0072] 그 결과, 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, flgM-melittin의 발현 또는 분비를 유도한 실험군(1,2)은 비처리 또는 아라비노스를 처리하지 않은 비교군(-)과 비교하여, 검출된 세포 활성 수준이 가장 낮고, 세포가 터져 사멸한 세포의 수준이 가장 높음을 확인하였다. 또한, 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, flgM-melittin의 발현 또는 분비를 유도한 실험군(+)은 비처리 또는 아라비노스를 처리하지 않은 비교군(-)과 비교하여, 세포가 터져 사멸한 세포의 수준이 가장 높음을 확인하였다. 상기의 실험 결과는, 일 실시예에 따른 형질전환된 약독화 살모넬라 균주는 melittin 고유의 세포 사멸능을 지닌 채로, 제3형 분비계인 flgM과의 연결된 특유의 구조를 통해 그 분비능이 강화된 것임을 실험적으로 입증한 것이다.

[0074] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0075]

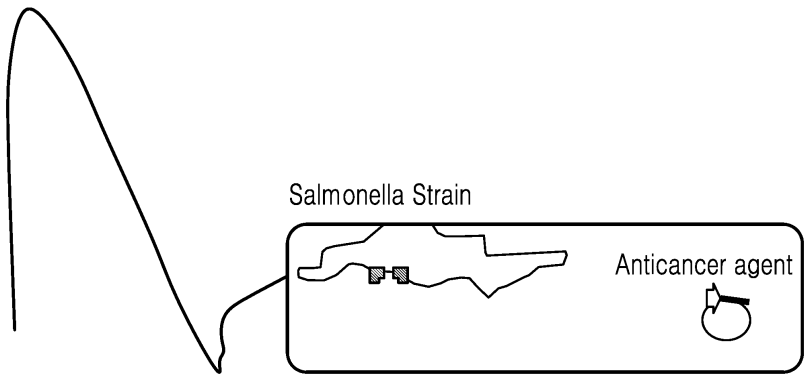
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC19012P

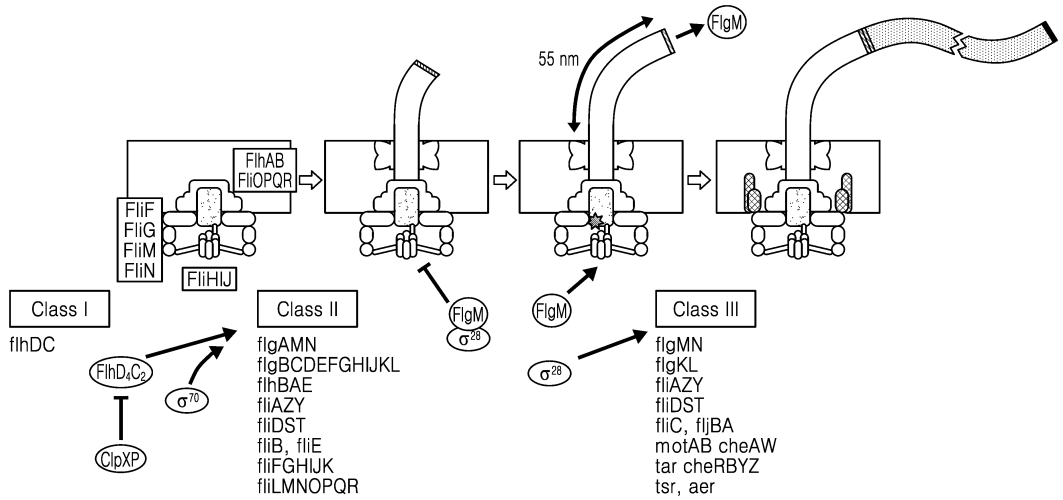
수탁일자 : 20220624

도면

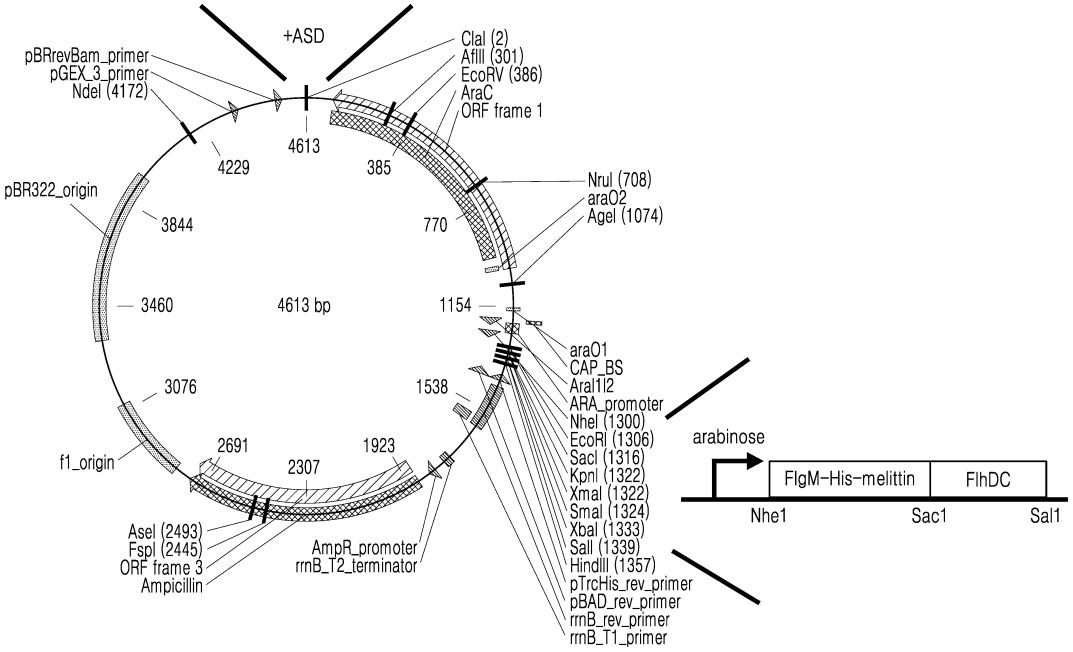
도면1



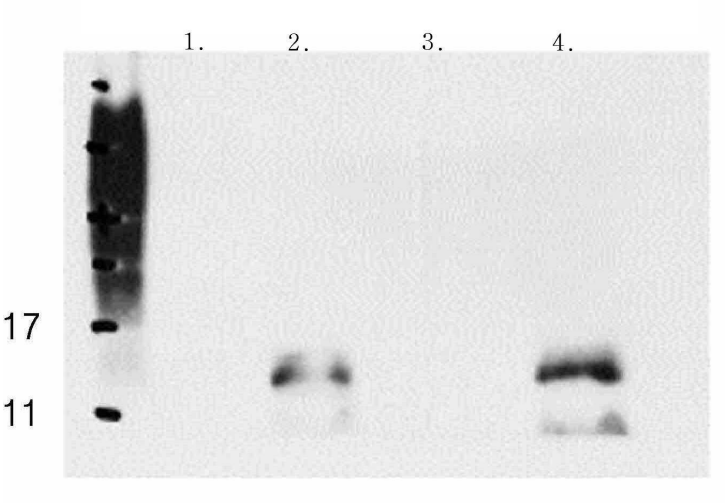
도면2


FlgM
55 nm
FlhAB
FliOPQR
FliF
FliG
FliM
FliN
FliHIJ
Class I
flhDC
FlhD4C2
σ70
ClpXP
Class II
flgAMN
flgBCDEFGHIJKL
flhBAE
fliAZY
fliDST
fliB, fliE
fliFGHIJK
fliLMNOPQR
FlgM
σ28
FlgM
σ28
Class III
flgMN
flgKL
fliAZY
fliDST
fliC, fljBA
motAB cheAW
tar cheRBYZ
tsr, aer

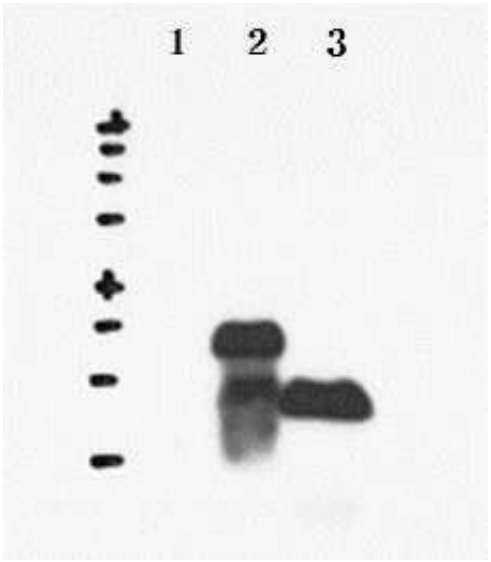
도면3


+ASD
pBRrevBam_primer
pGEX_3_primer
NdeI (4172)
4229
4613
385
ClaI (2)
AflII (301)
EcoRV (386)
AraC
ORF frame 1
NruI (708)
araO2
AgeI (1074)
770
pBR322_origin
3844
3460
4613 bp
1154
3076
1538
f1_origin
2691
2307
1923
AseI (2493)
FspI (2445)
ORF frame 3
Ampicillin
AmpR_promoter
rrnB_T2_terminator
araO1
CAP_BS
AraI1I2
ARA_promoter
NheI (1300)
EcoRI (1306)
SacI (1316)
KpnI (1322)
XmaI (1322)
SmaI (1324)
XbaI (1333)
SalI (1339)
HindIII (1357)
pTrcHis_rev_primer
pBAD_rev_primer
rrnB_rev_primer
rrnB_T1_primer
arabinose
FlgM-His-melittin
FlhDC
Nhe1
Sac1
Sal1

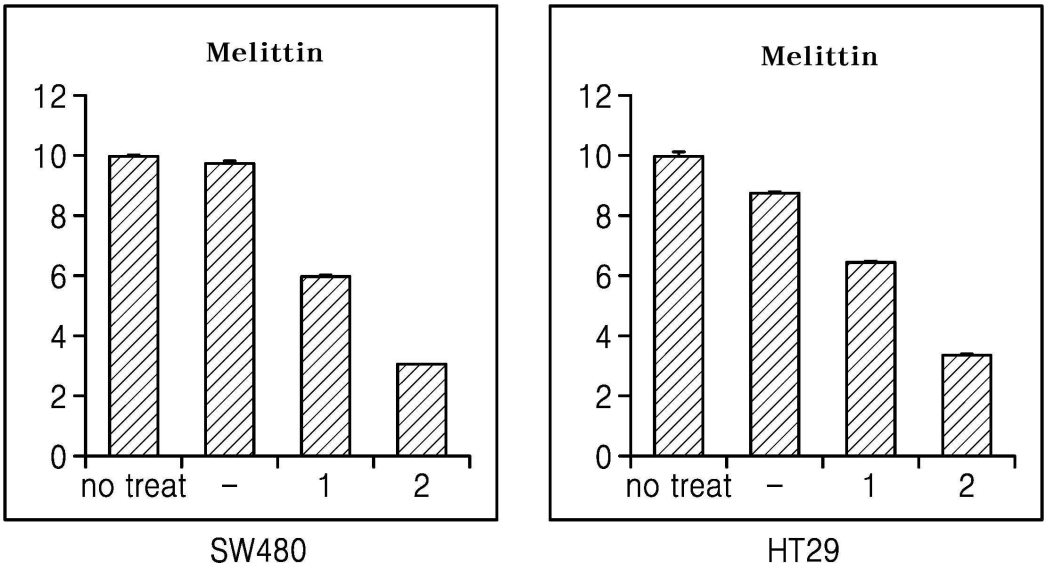
도면4



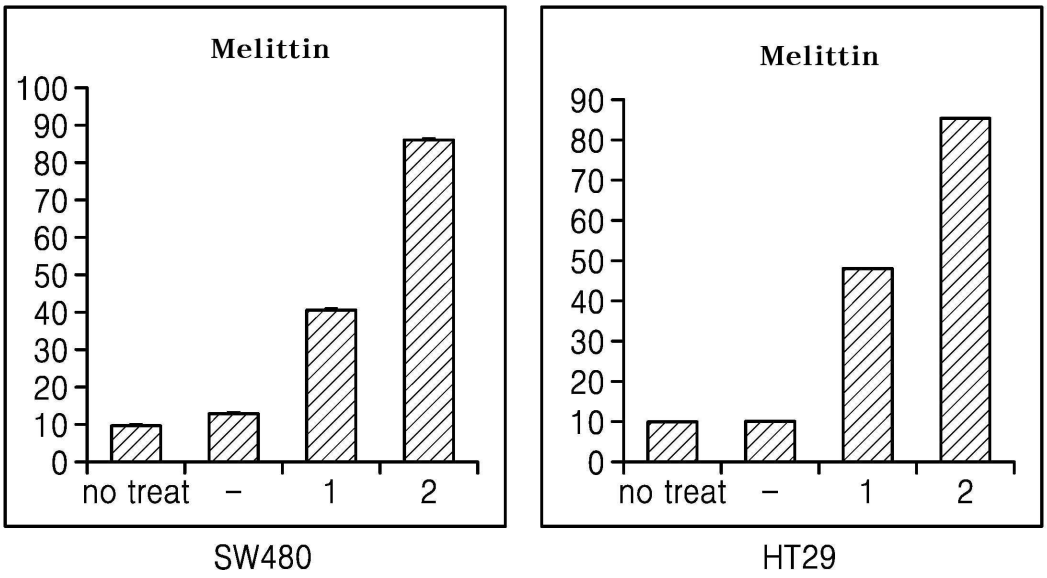
도면5



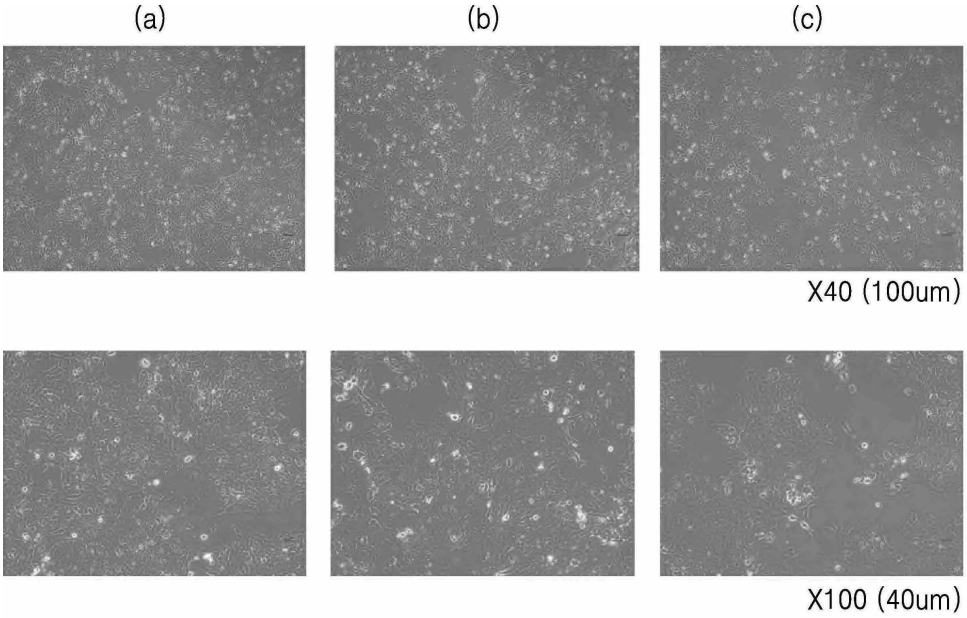
도면6


Melittin
12
10
8
6
4
2
0
no treat
–
1
2
SW480
Melittin
12
10
8
6
4
2
0
no treat
–
1
2
HT29

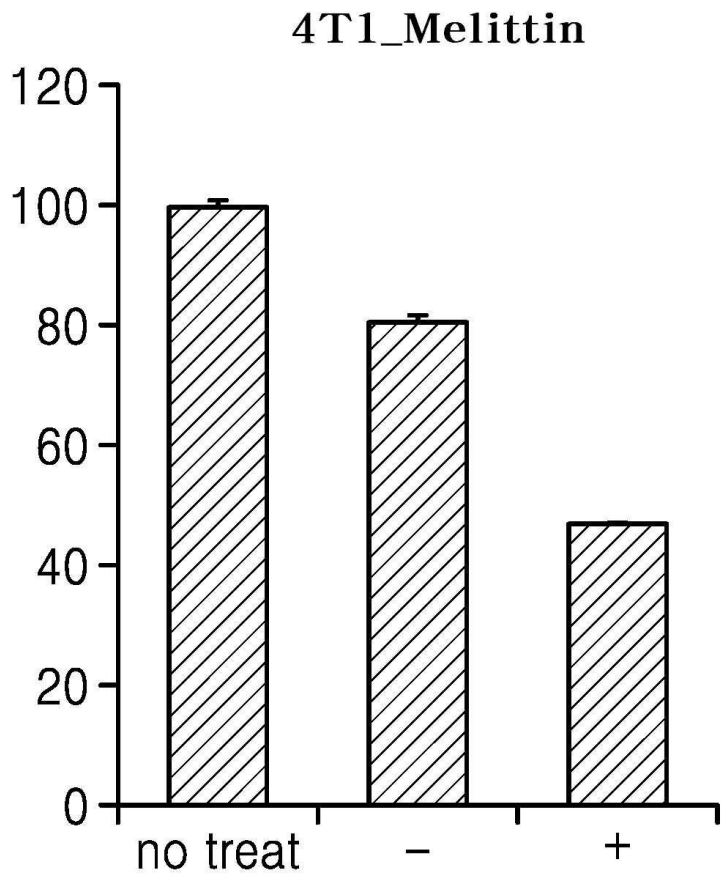
도면7


Melittin
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
no treat
–
1
2
SW480
Melittin
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
no treat
–
1
2
HT29

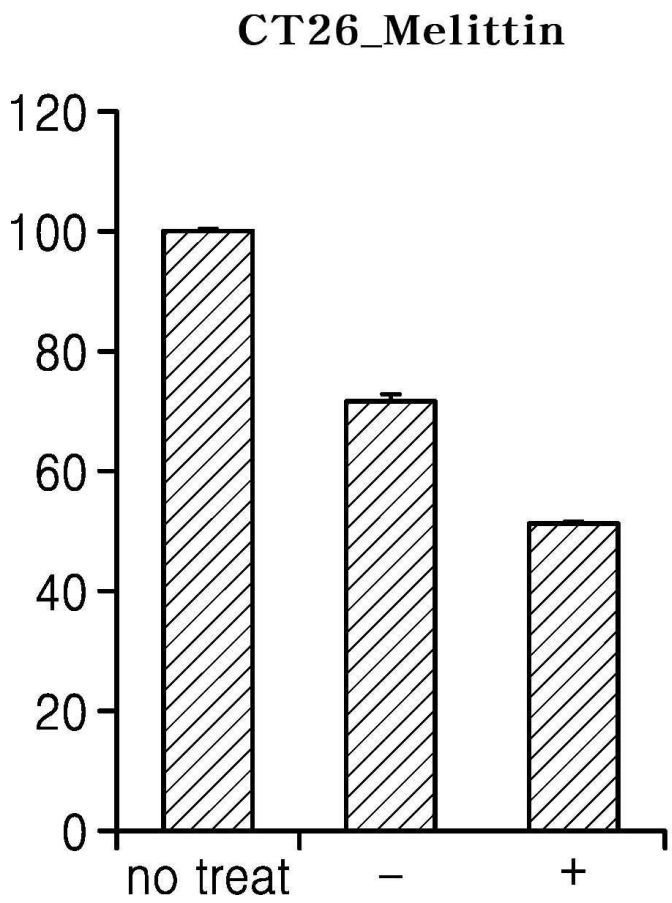
도면8


(a)
(b)
(c)
X40 (100um)
X100 (40um)

도면9


4T1_Melittin
120
100
80
60
40
20
0
no treat
–
+

도면10



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.