(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0015032
(43) 공개일자 2024년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 1/36* (2006.01)
C12R 1/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0096432
(22) 출원일자 2023년07월24일
심사청구일자 2023년07월24일
(30) 우선권주장
1020220092017 2022년07월25일 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
리앤목특허법인

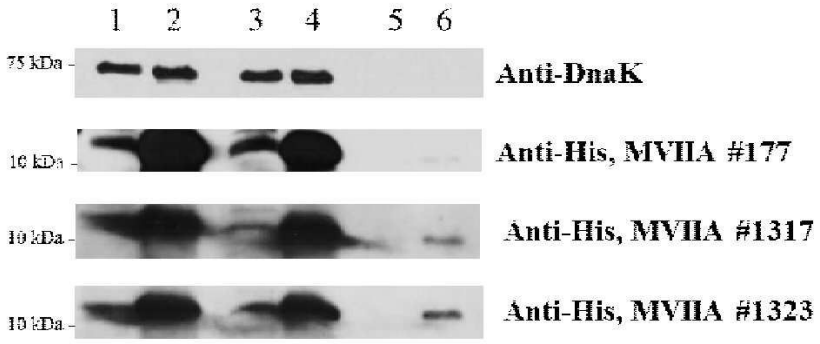
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **mvIIA의 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된약독화 살모넬라 균주**

(57) 요 약

mvIIA의 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주에 관한 것으로서, flgM 유전자; 및 mvIIA 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도4



Lane 2, 4, 6 Arabinose induction(final 0.2%)

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/195 (2013.01)
C07K 14/43504 (2013.01)
C12N 1/36 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
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 봉현로 366, 104동 1103호 (안림동, 충주2차 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 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465038556
과제번호 HR20C0025010023
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성 R&D
연구과제명 병원 기반 미래 선도형 K-MedStation 구축
기 여 율 1/3
과제수행기관명 삼성서울병원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711179694
과제번호 2022M3H4A1A03076638
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발
연구과제명 박테리아 셔틀 유도 나노소재 및 펩타이드 광원 기반차세대 항암 기술 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 한국과학기술연구원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로서, 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자는 동일 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 flgM 유전자, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 mvIIA 유전자, 및 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 flhDC 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 flgM 유전자 및 상기 mvIIA 유전자는 링커를 통하여 연결된 것인, 재조합 발현 벡터.

청구항 5

청구항 1의 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 asd, rcsB 및 galE의 유전자의 기능이 상실된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 mvIIA 단백질에 대한 분비능이 향상된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 수탁번호 KCTC15507BP로 수탁된 것인, 약독화 살모넬라 균주.

청구항 9

청구항 5의 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] mvIIA의 분비를 위한 재조합 발현 벡터 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주에 관한 것이다. 본 특허출원은 2022년 07년 25일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2022-0092017호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

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(Vibrioholera), 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 전신면역반응을 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 면역유도능 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, 공개특허 제10-2021-0123556호는 필라멘트 성장 조절로 면역반응을 유도하는 항암 살모넬라에 대해 게시하였다.

[0006] “오메가-코노톡신(ω-conotoxin)”은 바다원뿔달팽이의 일종인 *Conus* 속의 독에서 추출할 수 있으며, 아미드화된 C-말단과 4개의 고리형 시스테인 프레임 워크를 제공하도록 배열된 6개의 시스테인 잔기(C-C-CC-C-C)가 있는 24 내지 29개의 펩타이드로 구성된 단백질이다. 그중 오메가-코노톡신의 일종인 mvIIA는 통각 수용체의 N형 전위차 의존적 칼슘 채널(voltage-gated calcium channels: VGCC)을 억제하는 것으로 신경전달계를 마비하여 환자의 통증을 제거하는 진통제로 효과가 있는 것으로 알려져 있다. N-유형 VGCC는 유방암, 전립선암, 및 비소세포폐암(Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC)과 관련된 것으로 알려져있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주를 제조하고, 이의 우수한 암 치료 효과를 확인한 바, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 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 포함

하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 양상은 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로서, 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0010] 다른 양상은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주를 제공한다.

[0011] 또 다른 양상은 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로서, 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 재조합 발현 벡터를 제공할 수 있다.

[0013] 본 발명은 flgM 유전자 및 mvIIA 유전자가 직접 또는 링커를 통해 연결되어, flgM 및 mvIIA의 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 이하 본 명세서에서는 flgM 및 mvIIA의 융합단백질을 “flgM-mvIIA”라 한다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "flgM"은 박테리아의 3형 분비계에서 후기 편모 전사를 위해 필요한 RNA 중합효소를 동원하는 것을 담당하는 σ 인자를 억제하는 단백질 (또는 이러한 단백질을 암호화하는 유전자)을 지칭한다. 상기 "3형 분비계"는 그람 음성균에 발달된 병원성 물질 전달 시스템을 의미한다. 이는, 숙주의 세포막을 통과하여 직접 세포질로 병원성 활성 단백질을 주입하는 주사기 형태의 기구(Mota LJ et al, Ann Med.(2005);37(4):234-249)로서, 다중 단백질 복합 구조체이다. 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] 본 명세서에서 용어, "mvIIA"은 바다원뿔달팽이의 일종인 *Conus magus*의 독에서 추출한 25개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이다. mvIIA은 선택적인 N형 VGCC(Cav2.2) 차단제로 VGCC는 PNS 및 CNS에 분포하면서 칼슘 항상성 및 신경 전달 물질 및 호르몬 방출에 관여한다. mvIIA의 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI GeneBank에서 그 정보를 수득할 수 있다.

[0016] 일 구체예에 따르면, 본 발명은 flgM 유전자와 분비하고자 하는 단백질인 mvIIA 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하여, 균주의 3형 분비계를 통한 flgM의 분비와 함께 mvIIA의 균주 외 분비를 가능하게 하였다.

[0017] 본 명세서에서 용어, “flhDC”은 플라젤린 오페론 (operon) 유전자의 주된 조절자로 flgM 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 발현 벡터에 flhDC 유전자를 포함시킬 경우, flgM-mvIIA의 발현량 또는 분비량을 증진시키는데 기여할 수 있다.

[0018] 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.

[0019] 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-mvIIA 융합 단백질의 분비를 증진시키기 위한 것으로서, 예를 들어, flgM 유전자, 링커 유전자, 및 mvIIA 유전자가 작동가능하게 연결된 DNA insert를 지칭하는 것일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서

열, 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.

[0021] 본 명세서에서 용어 “폴리뉴클레오티드”는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있는데, 상기 DNA는 cDNA 및 합성 DNA를 포함한다. DNA는 단일 가닥이거나 이중 가닥일 수 있다. 만약 단일 가닥이라면, 이는 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티센스) 가닥일 수 있고, 상기 코딩 서열은, 유전적 코드의 축퇴성(degeneracy) 또는 중복성(redundancy)의 결과로서, 동일한 폴리펩타이드를 인코딩할 수 있다.

[0022] 상기 폴리뉴클레오티드는 또한 본 명세서에 기술된 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포함할 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체는 폴리뉴클레오티드의 자연적으로 발생하는 대립(allelic) 변이체 또는 폴리뉴클레오티드의 비-자연적으로 발생하는 변이체일 수 있다. 대립 변이체는, 인코딩(암호화)되는 폴리뉴클레오티드의 기능을 실질적으로 변경하지 않는, 하나 이상의 뉴클레오티드들의 치환, 결실, 또는 부가를 가질 수 있는 폴리염기서열의 교대(alternate) 형태이다. 단일 아미노산이 하나 이상의 뉴클레오티드 코돈에 의해 인코딩될 수 있고 상기 폴리뉴클레오티드가 동일한 펩타이드를 암호화하는 교대 폴리뉴클레오티드를 제조하도록 용이하게 변형될 수 있음이 당업계에 잘 알려져 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 발현 벡터가 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자를 모두 포함함으로써, flgM-mvIIA의 발현량 또는 분비량을 증진시키는데 기여할 수 있다. 예를 들어, 상기 재조합 발현 벡터는 flgM 유전자; 및 mvIIA 유전자에 더하여 flhDC 유전자를 추가로 포함함으로써, flgM-mvIIA의 발현능 또는 분비능이 증진된 것일 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "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.

[0025] 본 명세서에서 "작동 가능하게 연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의하여 영향을 받도록 단일 핵산 단편 상에서 뉴클레오티드 서열들이 연결된 것을 나타낼 수 있다.

[0026] 일 구체예에서, 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자는 동일 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 프로모터는 ara 프로모터 일 수 있다.

[0027] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 상기 flgM 유전자; mvIIA 유전자; 및 flhDC 유전자가 동일한 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절됨에 따라, flgM-mvIIA의 발현능 또는 분비능이 증진된 것일 수 있다.

[0028] 일 구체예에서, 상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 flgM 유전자, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 mvIIA 유전자, 및 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지는 flhDC 유전자를 포함할 수 있다.

[0029] 일 구체예에서, 상기 flgM 유전자 및 상기 mvIIA 유전자는 링커를 통하여 연결될 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "링커"란 관심있는 단백질에 이종성 도메인(domain)을 연결하는 데 사용된 폴리펩타이드 사슬 또는 이를 암호화하는 유전자를 지칭한다. 상기 링커 펩타이드는 2 내지 50개의 아미노산 길이, 예를 들어, 2 내지 40개, 2 내지 30개, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 2 내지 10개, 2 내지 5개, 5 내지 50개, 5 내지 40개, 5 내지 30개, 5 내지 20개, 5 내지 15개, 또는 5 내지 10개의 아미노산 길이일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 링커 펩타이드는 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, GGSSHHHHHHSSGG, 및 GSSGGSGSSGGSGGGDEADGSRGSQKAGVDE로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 링커 펩타이드는 GGSSHHHHHHSSGG 일 수 있다.

[0031] 다른 양상은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된, 약독화 살모넬라 균주를 제공할 수 있다. 상기 약독화 살모넬라 균주에서, 언급된 용어 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.

[0032] 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.

[0033] 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, rcsB, 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. 상기 약독화 살모넬라 균주는 종양 부위에 표적화되어 면역 반응을 유도하는 것에 의해 항암 활성을 갖는다.

[0034] 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주는 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환됨으로써, flgM-mvIIA의 발현 및 분비 수준이 현저히 증진되었음을 확인하였으며, 이를 통해 상기 살모넬라 균주를 포함하는 제제를 개체에 투여한 경우, 우수한 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0035] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 asd, rcsB 및 galE 유전자가 상실된 살모넬라 균주일 수 있다. 더욱 구체적으로, 약독화 살모넬라 균주는 aroA, 및 aroD의 유전자의 기능도 추가로 상실되어 aroA, aroD, asd, rcsB 및 galE 유전자가 상실된 살모넬라 균주일 수 있다.

[0036] 일 구체예에 따른 약독화 살모넬라 균주는, 약독화 유전자가 제2 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되는 것일 수 있다. 즉, 특정 유전자가 제2 유도성 프로모터에 의해 기능 상실이 조절되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 약독화 살모넬라 균주는 약독화 유전자 앞에 제2 유도성 프로모터를 추가로 포함하여 약독화가 스위칭되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 약독화 살모넬라 균주를 약독화된 상태로 개체 내에 주입하여 종양 부위에 표적화가 완료되면 상기 제2 유도성 프로모터의 작동에 의해 야생형(wild) 살모넬라로 돌려놓는 것에 의해 면역활성이 낮은 약독화 살모넬라에 비해 높은 면역활성을 유발하여 암 치료가 더욱 효과적으로 이루어질 수 있다.

[0037] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 galE 유전자가 상실된 것일 수 있으며, 상기 galE 유전자의 기능 상실은 tetRA 프로모터에 의해 스위칭되는 것일 수 있다. 따라서, 상기 약독화 살모넬라 균주를 약독화된 상태로 개체 내에 주입하여 종양 부위에 표적화시킨 후, doxycycline에 의해 상기 galE 유전자의 발현을 유도하여, 살모넬라 균주의 높은 면역 활성을 유발하는 것일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 galE 유전자의 기능 상실 조절을 galE:tetRA로 표현하였다.

[0038] 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주의 경우, asd, rcsB 및 galE 유전자의 기능이 상실된 것일 수 있으며, 이러한 약독화 살모넬라 균주는 우수한 flgM- mvIIA의 발현 또는 분비능을 나타냄을 확인하였다.

[0039] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 mvIIA 단백질에 대한 분비능이 향상된 것일 수 있다. 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주는 항암 또는 암세포 독성을 갖는 펩타이드 성분을 단지 발현하는 것에 그치지 않고, 표적 영역에서 상기 발현된 펩타이드 성분의 분비를 가능하게 한 것으로서, 표적 항암 치료제로서의 효능을 발휘할 수 있다.

[0040] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 mvIIA 단백질에 대한 분비능이 향상된 것일 수 있다.

[0041] 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 발현 벡터로 약독화 살모넬라 균주를 형질전환 시 아라비노스 존재 하에 mvIIA의 발현을 조절하고 제3형 분비계의 flgM를 사용하여 mvIIA 단백질이 균주 외로 효과적으로 분비될 수 있도록 할 수 있다. 또한, flhDC도 동일 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되어 세포 외로 분비되는 mvIIA의 발현량을 증가시킬 수 있다.

[0042] 일 구체예에서, 상기 약독화 살모넬라 균주는 수탁번호 KCTC15507BP로 수탁된 것인, 약독화 살모넬라 균주일 수 있다.

[0043] 또 다른 양상은, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물 또는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물에서, 언급된 용어 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.

[0044] 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 암을 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, 두경부암, 피부암, 자궁암, 및 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것 아니다.

[0045] 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 치료용 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.

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 또 다른 양상은, 상기 약독화 살모넬라 균주를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 암을 예방 또는 치료하기에 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0049] 상기 암을 예방 또는 치료하는 방법에 있어서, 언급된 용어 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.

[0050] 상기 개체는 포유동물일 수 있다. 상기 포유동물은 사람, 마우스, 랫트, 말, 개, 고양이, 소, 염소, 또는 돼지일 수 있다.

[0051] 상기 투여는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 예를 들어 점안 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피 패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있고, 구체적으로 점안 투여의 경로 등을 통해 목적하는 바에 따라 투여될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 용어, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "완화하는" 또는 "개선하는"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어는 치료 이익 및/또는 예방 이익을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유리한 또는 요망되는 결과를 수득하는 방법을 지칭한다. 치료 이익은 치료 하의 하나 이상의 질병, 질환 또는 증상의 임의의 치료적으로 유의미한 개선 또는 그에 대한 효과를 의미한다. 예방 이익에 있어서, 조성물은 특정 질병, 질환 또는 증상이 발생할

위험이 있는 대상체에게 또는 질병, 질환 또는 증상이 아직 나타나지 않을지라도, 질병의 하나 이상의 생리학적 증상을 보고하는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어, "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 유리한 또는 요망되는 결과를 야기하기에 충분한 작용제의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 병태, 대상체의 체중 및 연령, 병태의 중증도, 투여 방식 등 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 상기 용어는 본원에 기술된 영상화 방법 중 임의의 것에 의한 검출을 위한 이미지를 제공할 용량에 적용된다. 특정 용량은 선택된 특정 작용제, 뒤따르는 투여 요법, 그것이 다른 화합물과 병용하여 투여되는지 여부, 투여 시기, 영상화되는 조직 및 그것을 운반하는 신체 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.

발명의 효과

[0054] 일 양상에 따른 재조합 발현 벡터에 따르면, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주의 경우, flgM-mvIIA의 발현 및 분비가 현저하게 증진됨을 확인하였다.

[0055] 또한, 일 양상에 따른 재조합 발현 벡터에 따르면, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주를 포함하는 제제를 투여한 경우, 우수한 항암 효과 및 안정성을 나타냄을 확인하였다.

[0056] 따라서, 일 양상에 따른 재조합 발현 벡터, 및 이로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주는 항암 조성물의 유효 성분으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 3형 분비계를 이용한 flgM-mvIIA의 세포 외 분비 과정을 개략적으로 나타낸 도이다

도 2는 제3형 분비계에서의 편모 형성 과정을 이용한 flgM 분비 기작을 간략하게 나타낸 도이다.

도 3은 일 실시예에 따른 flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18-asd+ 플라스미드의 개열지도를 나타낸 도이다.

도 4는 일 실시예에 따른 flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18 플라스미드를 사용하여 형질전환된 약독화 살모넬라 균주의 단백질 분비 수준을 확인한 결과이다. 1, 2 레인은 전체 세포 배양액, 3, 4 레인은 펠렛, 및 5, 6 레인은 상층액에서 flgM-mvIIA 단백질 분비 수준을 확인한 결과이다.

도 5는 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA 융합 단백질의 활성을 평가한 것으로서, CT26 마우스 결장암 세포주에 대한 항종양 효과를 확인한 도이다.

도 6은 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA 융합 단백질의 활성을 평가한 것으로서, 인간 대장암 세포주에 대한 항종양 효과를 확인한 도이다.

도 7은 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA의 CCK assay를 통해 암 세포 사멸 수준을 마우스 결장암 세포주에 대한 항종양 효과를 확인한 그래프이다.

도 8은 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA의 CCK assay를 통해 암 세포 사멸 수준을 인간 대장암 세포주에 대한 항종양 효과를 확인한 그래프이다.

도 9는 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA의 LDH assay를 통해 암 세포 사멸 수준을 마우스 결장암 세포주에서 평가한 결과이다.

도 10은 일 실시예에 따른 약독화 살모넬라 균주로부터 분비된 flgM-mvIIA의 LDH assay를 통해 암 세포 사멸 수준을 인간 대장암 세포주에서 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **실시예 1: mvIIA 분비를 위한 플라스미드의 제조**

[0060] **1-1. insert DNA의 제조**

[0061] mvIIA 분비를 위한 플라스미드 제조를 위하여, flgM 유전자, 및 mvIIA 유전자가 연결된 유전적 구조물을 제조하였다.

[0062] 구체적으로, 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, mvIIA 에 대한 코돈 최적화(살모넬라)를 통해 수득한 DNA 서열을 연결시켜, 일 실시예에 따른 유전적 구조물을 제작하였다. mvIIA의 코돈 최적화를 위하여 mvIIA의 25개 아미노산을 DNA로 치환하였고 앞에 ATG와 끝에 TAA를 삽입하였다.

[0063] 구체적으로, 상기 flgM DNA 서열 및 mvIIA 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, mvIIA의 종결 코돈 뒤에는 Sac I site를 삽입하였다. 한편, 본 실시예에서 주요한 구조물의 유전 정보는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[0064] [표 1]

[0065]

명명	서열 정보	서열 번호
flgM	ATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGCGAAACCAGCG ACACGCCGGTACAAAAAACGCGTCAGGAAAAAACGTCCGCCGCGACGAGCGCCAGCGTAACGTT AAGCGACGCGCAAGCGAAGCTCATGCAGCCAGGCGTCAGCGACATTAATATGGAACGCGTCGAA GCATTAAAAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAAAAATGGATACGGGAAAAATAGCAGACTCGC TCATTCGCGAGGCGCAGAGCTACTTACAGAGTAAAAAA	1
mvIIA	ATGTGCAAAGGCAAAGGCGCGAAATGCAGCCGCCTGATGTATGATTGCTGCACCGGCAGCTGCC GCAGCGGCAAATGCTAA	2
linker	GGCGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACAGCAGCGGCGGC	4

[0066] 상기 구조물을 이용하여 ㈜바이오닉스 유전자 합성 서비스를 통하여 flgM-linker-mvIIA (서열 번호 5)의 유전적 구조물을 수득하였다.

[0067] 이후, flgM-linker-mvIIA를 NheI과 SacI의 효소를 각각 10U 사용하여 37도에서 2시간 반응시켰다. 상기 반응산물을 전기영동 한뒤, Gel extraction kit(㈜ Qiagen)로 약 500bp의 DNA를 확인하여 flgM-linker-mvIIA insert를 수득하였다.

[0068] 이후, flhDC insert DNA를 수득하기 위해, 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 얻었다. 구체적인 PCR 조건은 다음과 같다; 10x buffer 5㎕, 5xQ solution 10 ㎕, 2 mM dNTPs 7.5 ㎕, 20 ㎛M flhD-sac1-f 프라이머 2.5㎕, 20㎛M 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 flhDC insert DNA (서열번호 3)를 제작하였다.

[0069] [표 2]

[0070]

명명	서열 정보	서열 번호
flhD-Sac1-f	gatcgatcgagctcaggaggtttgatcctatgggaacaatgcatacatccgagttgct	6
flhC-Sal1-r	gatcgatcgtcgacttaaacagcctgttcgatctgttcatccagcagtt	7

[0071] **1-2. 플라스미드의 제조**

[0072] 이후, 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 8의 염기서열로 이루어질 수 있다. 이후, 각 벡터 DNA를 상기 flgM-linker-mvIIA insert DNA와 25℃에서 30분간 ligation시키고, DH5a 컴피턴트 세포에 형질전환시켰다. 이후, 상기 형질전환된 세포를 LB amp(ampicillin) 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 후보군 6개를 선별하여 Nhe I 및 Sac I 각각 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 약 500bp 밴드의 생성을 확인하였다. 또한, 상기 플라스미드에 대해 해당 후보군의 염기서열 분석을 실시하여, 상기 flgM, linker, 및 mvIIA 유전자의 삽입을 확인하였다.

[0073] 이후, 상기 플라스미드 각각 1μg을 sacⅠ 및 SalⅠ 10U와 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 상기 반응산물을 PCR purification kit로 정제하여 벡터 DNA를 완성하였다. 이후, 각 벡터 DNA를 상기 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 sacⅠ 및 SalⅠ 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 band의 생성을 확인하였다. 해당 후보군의 염기서열 분석을 실시하여, flhDC 유전자의 삽입을 확인하였다.

[0074] 이를 통하여, flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18-asd+ 플라스미드를 제조하였다.

[0075] **실시예 2: flgM-mvIIA을 분비하는 약독화 살모넬라 균주 제조**

[0076] 상기 실시예 1에서 제조된 플라스미드를 사용하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전환시켰다. 약독화 살모넬라 균주의 후보군으로는 BRD509 asd-(#177), BRD509 asd galE:tetRA-(#1317), BRD509 asd rcsB galE:tetRA-(#1323) 균주를 사용하였으며 상기 균주들을 충남대로부터 분양받았다. BRD509 살모넬라 균주는 aroA 및 aroD의 유전자의 기능이 상실된 것이다. 이와 같이 형질전환된 균주의 유전자 및 균주의 정보는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

[0077] [표 3]

[0078]

	시험군	비교군 1	비교군 2
균주	#1323	#177	#1317

[0079] **실시예 3: 단백질 발현 및 분비능 확인**

[0080] 일 실시예에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주의 flgM-mvIIA의 발현 및 분비능을 확인하기 위해, 하기와 같은 방법으로 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏을 통해 측정하였다.

[0081] 상기 형질전환된 각 균주의 단일 콜로니를 LB amp 액체배지에 접종한 후 37℃에서 12-16시간 진탕배양하였다. 이후 신선한 LB amp 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/v)의 농도가 되도록 처리하여, 37℃에서 5시간 추가로 진탕배양시켰다.

[0082] 그 후, 전체 세포 배양액(Whole cell) (1,2 레인) 1ml과 또 다른 1ml 배양액을 원심분리한 후 펠렛(3, 4 레인)과 상층액(5, 6 레인)을 분리하여 시료를 준비하였다. 아라비노스를 0.2%(w/v)(final)의 농도로 처리하지 않은 것(1,3,5 레인)과 처리한 것(2,4,6 레인)으로 나누고, 상기 균주들을 배양 후 배양액을 8000rpm으로 원심분리한 후 각각의 시료를 준비하였다. 상층액은 다시 0.2um 필터링으로 균을 완전히 제거하고 나노셉(nanosep)(OD010C35 3K omega)를 이용하여 농축하였다. 각각 얻어진 시료 50μl를 SDS sample buffer와 혼합하여 100℃ 히팅 블록(heating block)에 5분간 변성시킨 후, 5분간 13000rpm 4℃에서 원심분리 하고 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동을 하였다. 겔은 PVDF (polyvinylidene fluoride)를 이용해 트랜스퍼하여 PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시키고 멤브레인을 블로킹 버퍼를 이용해 실온에서 1시간동안 블로킹을 하였다. 그 후에 1차 항체 anti-his tag(SB194b, SouthernBiotech)를 사용하였고, 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, 마우스 항-마우스-IgG (#7076s, Cell signaling, Danvers, MA, USA) 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 TBST로 10분 간격으로 세 번 세척하고, ECL 버퍼를 이용해 X-ray 필름에 감광한 후, 현상하여 각각의 단백질 발현량을 확인하였다.

[0083] 도 4에서, 2, 4, 및 6 레인은 아라비노스(최종 농도 0.2%(w/v))를 처리한 레인이며, 1,3 및 5 레인은 아라비노스를 처리하지 않은 레인이다. 또한, 1 및 2 레인은 전체 세포 배양액, 3 및 4는 펠렛, 및 5 및 6 레인은 상층액에 대한 결과이다.

[0084] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 아라비노스가 처리된 2, 4 및 6 레인은 아라비노스가 처리되지 않은 1, 3 및 5레인보다 동일 농도에서 다량의 양의 flgM- mvIIA이 발현되었다. 또한, #1323 균주에서 6 레인(상층액)에 가장 많은 flgM- mvIIA을 확인하였다. 더하여, anti-dnaK로 웨스턴 블랏을 수행한 경우에서는 전체 세포 배양액(1,2 레인)과 펠렛(3,4 레인)에서 아라비노스의 유무와는 상관없이 dnaK가 검출되었다. 반면에 상층액(5,6레인)에서는 dnak가 검출되지 않았다. dnaK는 Hsp70 familly에 속하는 분자 샤페론으로 세균 안에 도처에 골고루 분포되어 있는 것으로 dnaK가 상층액에서는 발견되지 않았다는 것은 해당 단백질인 flgM-mvIIA을 만드는 경우에 세포가 터지지 않으면서 flgM-mvIIA을 안정적으로 분비하는 균주임을 알 수 있었다.

[0085] 상기 결과를 통해, 아라비노스에 의해 flgM-mvIIA 발현이 조절되고, flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18-asd+/BRD509 asd rcsB galE:tetRA-(#1323) 균주가 세포를 터뜨리지 않으면서도 균주 세포 외 단백질 분비능이 가장 우수함을 확인하였다.

[0086] 이에, 본 발명자들은 시험균인 flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18-asd+/ BRD509 asd rcsB galE:tetRA-(#1323) 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2023년 7월 18일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC15507BP(S-flgM-MVIIA-flhDC-pBAD18-ASD+/#1323) 를 부여받았다.

[0087] **실시예 4: in vitro 에서의 mvIIA의 세포 활성 평가**

[0088] **4-1. 결장암 세포주에서의 세포 활성 평가**

[0089] 실시예 3에서 얻은 형질전환된 flgM-linker-mvIIA-flhDC-pBAD18-asd+/ BRD509 asd rcsB galE:tetRA-(#1323) 균주의 단일 콜로니를 LB amp 액체배지에 접종한 후 37℃에서 12-16시간 진탕배양하였다. 이후 신선한 LB amp 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/v)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-mvIIA 융합 단백질을 획득하였다.

[0090] 한편, CT26 마우스 결장암 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.

[0091] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, CT26 세포주에서 아라비노스를 처리하지 않은 군 (-)은 PBS를 처리한 대조군에 비해 약 20% 정도 세포 수준이 감소된 반면, 아라비노스를 처리하여, flgM-mvIIA의 발현 또는 분비를 유도한 군(+)에서는 60% 이상 세포 수준이 감소됨을 확인하였다.

[0092] **4-2. 대장암 세포주에서의 세포 활성 평가**

[0093] 상기 실시예 4-1와 동일한 방식으로 SW480 및 HT29 인간 대장암 세포주에서 세포 활성을 평가하였다.

[0094] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, SW480 및 HT29 세포주 모두에서 아라비노스를 처리하지 않은 군 (-)은 PBS를 처리한 대조군에 비해 세포 수준이 약간 감소된 반면, 아라비노스를 처리하여, flgM-mvIIA의 발현 또는 분비를 유도한 군(+)에서는 약 40% 이상 세포 수준이 감소됨을 확인하였다.

[0095] **실시예 5: 암 세포 사멸 유도 효과 평가**

[0096] **5-1. 결장암 세포주에서의 암 세포 사멸 유도 평가**

[0097] 암 세포 사멸 유도에 대한 효과를 확인하기 위하여 상기 실시예 4의 배양액을 사용하여 CT26 및 MC38 마우스 결장암 세포주에 대한 CCK assay 및 LDH assay를 수행하였다. CCK assay(DogenBio:ez-500, EZ-Cytox)를 위해 상기 실시예 4의 배양액에 CCK solution을 50ul 처리한 뒤, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이 후, 상기 배양액의 상층액 100ul를 96well 플레이트에 옮기고 450nm microreader로 측정하였다. 본 실험은 신뢰성을 높이기 위해 triplicate로 진행하였다. 또한, LDH assay(DogenBio: EZ-LDH, DG-LDH500)를 위해 상기 배양한 세포주 상층액을 1000rpm에서 3분동안 원심분리하여 세포잔해를 제거하고 상층액 10ul과 LDH 용액 100ul를 혼합하여 실온에서 30분간 인큐베이션하고 450nm microreader로 측정하였다. CCK assay와 마찬가지로 실험은 triplicate로 진행하였다.

[0098] 그 결과, 도 7 및 도 9에 나타낸 바와 같이, CT26 및 MC38 세포주 모두에서 flgM-mvIIA의 발현 또는 분비를 유도한 군(+)은 비처리 또는 아라비노스를 처리하지 않은 군(-)과 비교하여, 세포가 터져 사멸한 세포의 수준이 높음을 확인하였다.

[0099] **5-2. 대장암 세포주에서의 암 세포 사멸 유도 평가**

[0100] 상기 실시예 5-1와 동일한 방식으로 SW480 인간 대장암 세포주에서 flgM-mvIIA의 암 세포 사멸 유도를 평가하였다.

[0101] 그 결과, 도 8 및 도 10에 나타낸 바와 같이, SW480 세포주 모두에서 flgM-mvIIA의 발현 또는 분비를 유도한 군

(+)은 비처리 또는 아라비노스를 처리하지 않은 군(-)과 비교하여, 세포가 터져 사멸한 세포의 수준이 높음을 확인하였다.

[0103] 상기 실시예 3 내지 실시예 5의 결과를 종합하면, 일 실시예에 따른 형질전환된 약독화 살모넬라 균주는 mvIIA 고유의 세포 사멸능을 지닌 채로, 유도성 프로모터에 의해 발현이 조절되면서 제3형 분비계인 flgM과의 연결된 특유의 구조를 통해 그 분비능이 강화된 것임을 실험적으로 입증한 것이다.

[0104] 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

[0105]

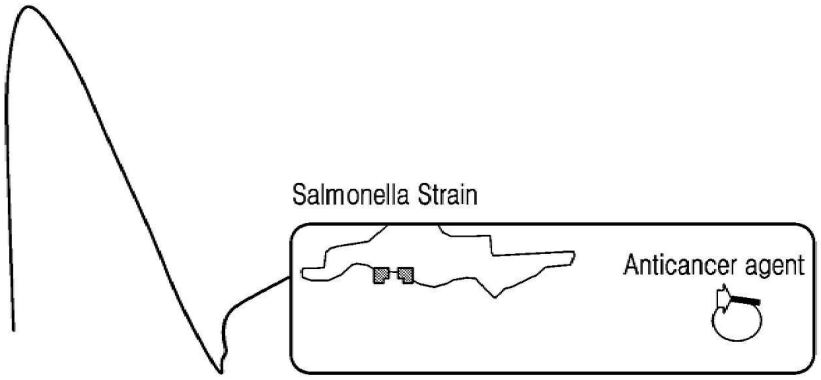
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15507BP

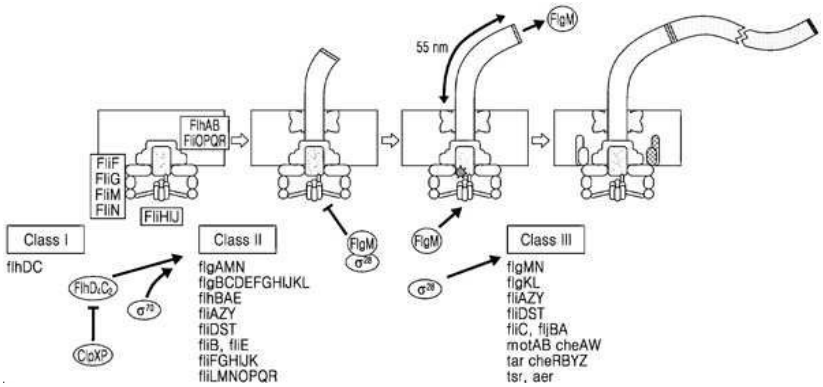
수탁일자 : 20230718

도면

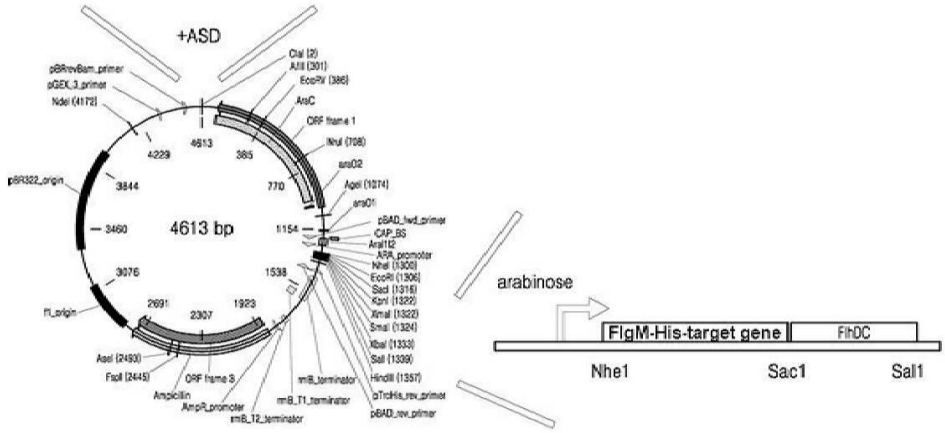
도면1



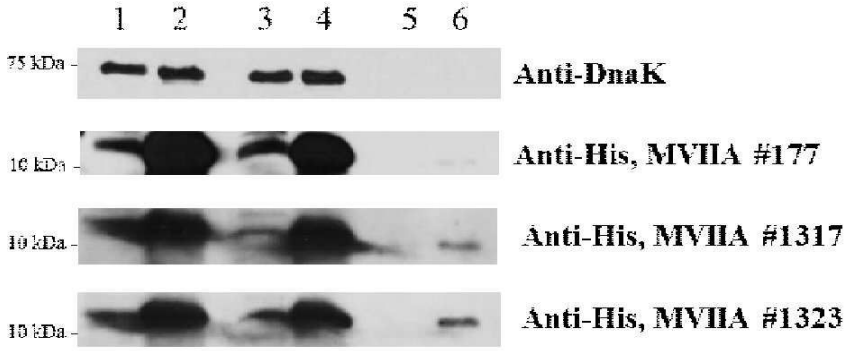
도면2



도면3

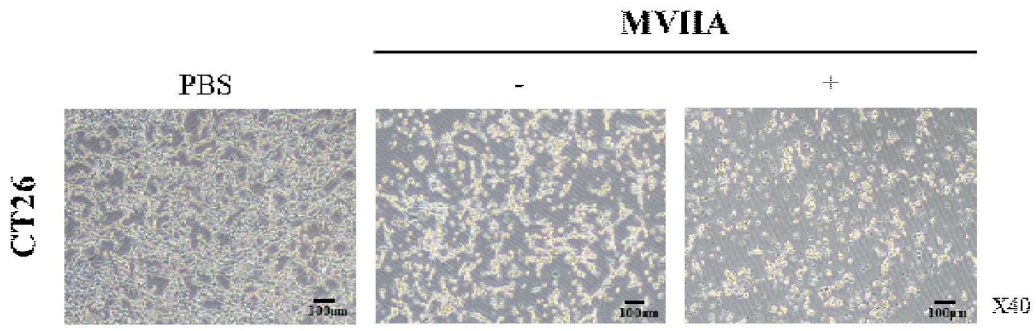


도면4

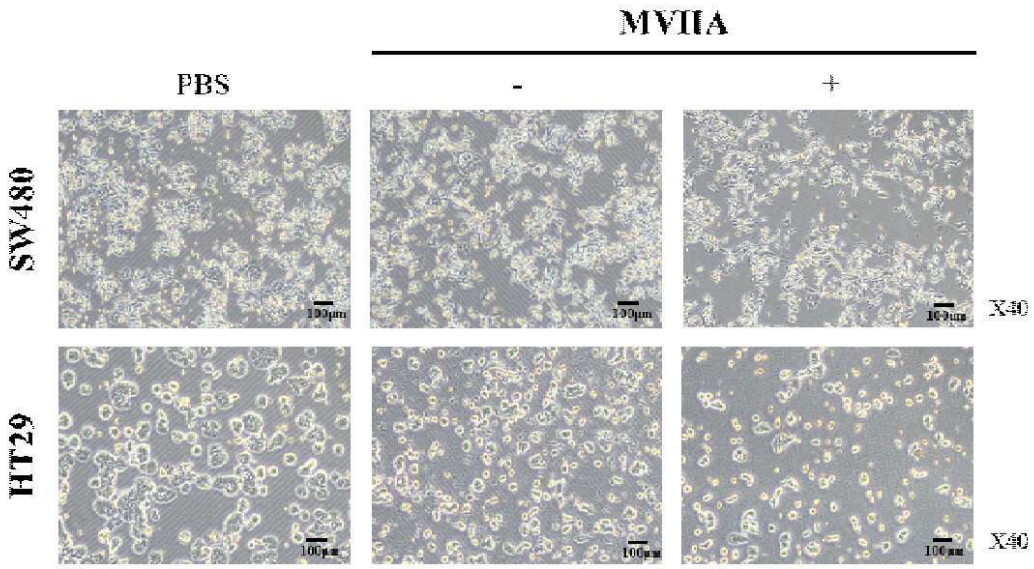


Lane 2, 4, 6 Arabinose induction(final 0.2%)

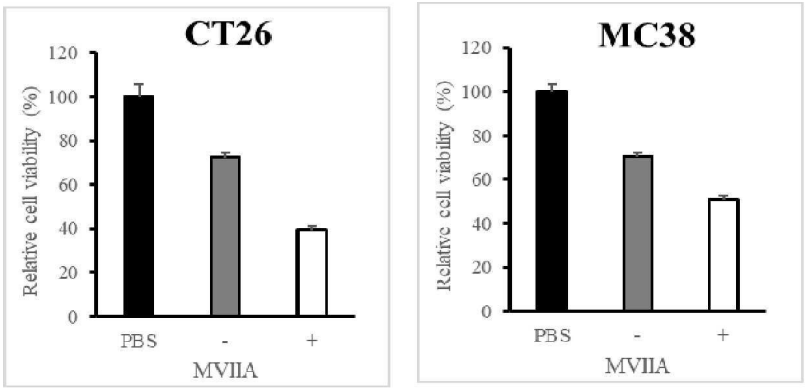
도면5



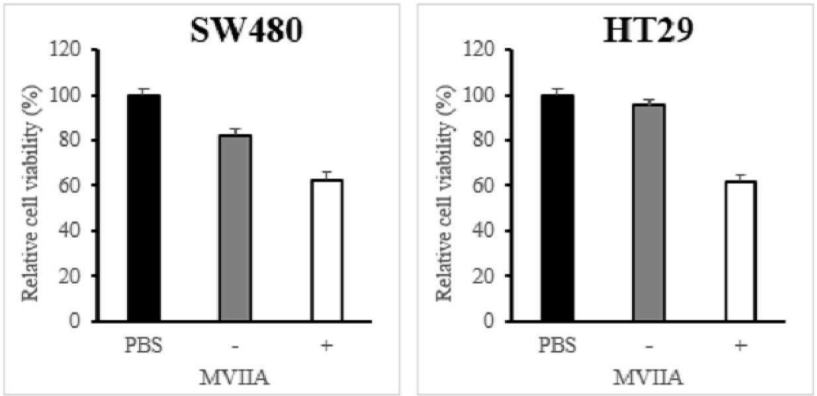
도면6


MVIIA
PBS
-
+
SW480
HT29
X40
X40

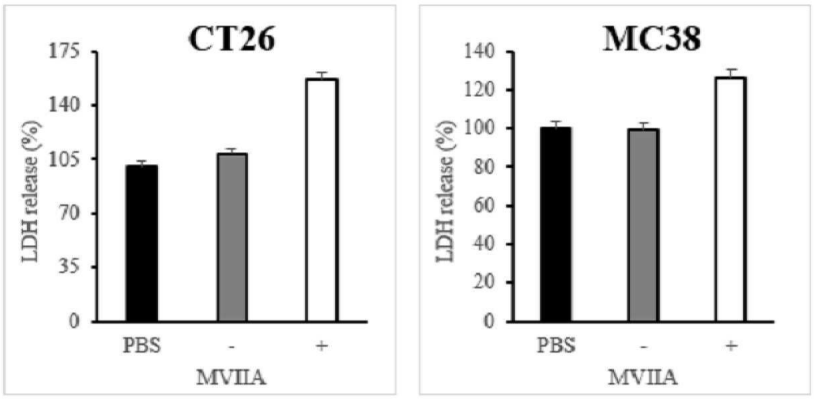
도면7


CT26
MC38
Relative cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
-
+
MVIIA

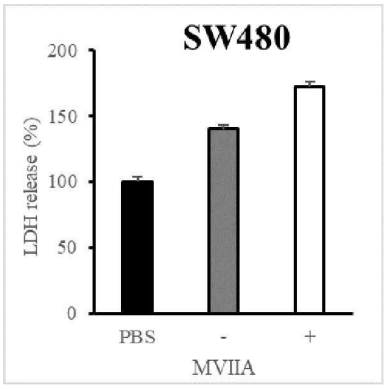
도면8


SW480
HT29
Relative cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
-
+
MVIIA

도면9


CT26
LDH release (%)
175
140
105
70
35
0
PBS
-
+
MVIIA
MC38
LDH release (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS
-
+
MVIIA

도면10


SW480
LDH release (%)
200
150
100
50
0
PBS
-
+
MVIIA

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.