



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086779
(43) 공개일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/66 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/11 (2022.01)
C12N 15/66 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0167440
(22) 출원일자 2022년12월05일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이규리
경상남도 진주시 사들로 13 904동 405호
박현호
경상남도 진주시 가호로 26 211동 1508호
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

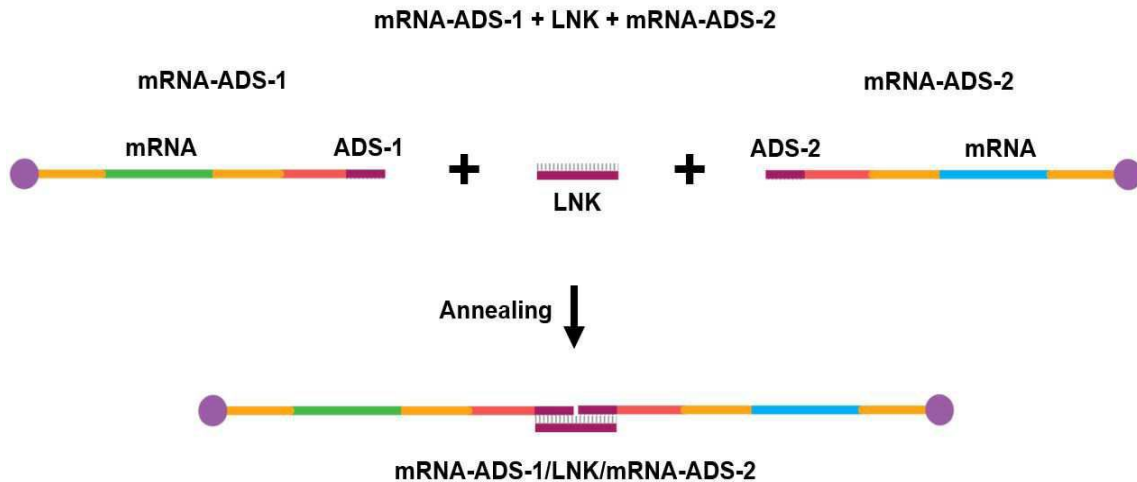
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 다중 단백질의 발현을 위한 신규 핵산 구조체

(57) 요약

본 발명은 복수의 단백질 발현 컨스트럭트가 각 말단에 결합된 추가 서열(additional sequence)의 혼성화 반응을 통해 단일 구조화되는 다중 단백질 발현용 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 상호간의 직접 혼성화 또는 동일한 링커 분자에 대한 동시 혼성화 반응을 하도록 설계된 임의의 추가 서열을 각 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 결합시키는 간단한 설계를 통해 복수의 목적 단백질을 단일 숙주세포 내에서 효율적으로 동시, 동량 발현시킬 수 있다. 본 발명은 특히 각 단백질 간 불균일한 발현 양상을 보이는 종래의 자가절단 펩타이드 발현 시스템의 단점을 극복하는 효율적인 다중 발현 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

C12N 2310/317 (2013.01)

C12N 2310/335 (2013.01)

C12N 2310/3519 (2013.01)

C12N 2830/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711148665
과제번호	2020R1C1C1007820
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	우수신진연구
연구과제명	다기능성 RNA 구조체를 이용한 항암 면역 치료제 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	경상국립대
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160382
과제번호	2022M3E5F1017743
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	감염병차세대백신기초원천핵심기술개발
연구과제명	mRNA 세부구조별 차별화된 수정전략이 도입된 신규 mRNA 구조체 플랫폼 기술 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경상국립대
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 분자:

- (a) 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제1 추가 서열(additional sequence, ADS)을 포함하는 제1 핵산 구조체; 및
- (b) 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 상기 제1 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제2 추가 서열을 포함하는 제2 핵산 구조체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 양 말단에 5'-UTR 및 3'-UTR이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 5'-UTR은 5'-cap이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 3'-UTR과 상기 추가 서열 사이에 20개 내지 400개의 염기를 포함하는 폴리(A) 서열을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

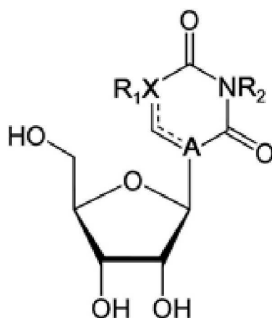
청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 제1 핵산 구조체 및 제2 핵산 구조체는 IVT(*in vitro* transcribed) mRNA인 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 IVT mRNA 중 우라실(U)의 전부 또는 일부가 하기 화학식 1로 표시되는 변형된 U(modified U)로 치환된 것을 특징으로 하는 RNA 분자:

화학식 1



상기 화학식에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_3 알킬 또는 C_1-C_3 알콕시이고, X 및 A는 탄소 또는 질소이며 서로 상이하고, --- 는 단일결합 또는 이중결합을 나타낸다.

청구항 7

다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 분자:

- (a) 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제1 추가 서열(additional sequence, ADS)을 포함하는 제1 핵산 구조체;
- (b) 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제2 추가 서열을 포함하는 제2 핵산 구조체; 및
- (c) 상기 제1 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제1 영역 및 상기 제2 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제2 영역을 포함하는 링커(linker).

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 제1 영역 및 제2 영역 중 어느 하나는 역위 염기(Inverted base)로 구성된 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 제1 영역 및 제2 영역은 5'-5' 역위결합(reversed linkage)에 의해 결합되는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

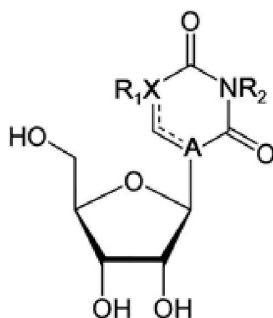
청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 제1 핵산 구조체 및 제2 핵산 구조체는 IVT(*in vitro* transcribed) mRNA인 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 IVT mRNA 중 우라실(U)의 전부 또는 일부가 하기 화학식 1로 표시되는 변형된 U(modified U)로 치환된 것을 특징으로 하는 RNA 분자:

화학식 1



상기 화학식에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_3 알킬 또는 C_1-C_3 알콕시이고, X 및 A는 탄소 또는 질소이며 서로 상이하고, --- 는 단일결합 또는 이중결합을 나타낸다.

청구항 12

다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 구조체:

- (a) 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- (b) 상기 핵산 구조체의 3' 말단에 위치하여 다른 핵산 구조체 또는 링커 서열과 혼성화될 수 있는 추가 서열 (additional sequence, ADS).

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 다중 단백질의 효율적인 동시, 동량 발현을 위하여 복수의 발현 컨스트럭트가 말단 서열의 혼성화를 통해 단일 구조화된 신규한 핵산 구조체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 단백질의 효율적인 대량 발현은 의약을 비롯한 다양한 기능적 단백질의 산업적 이용에 가장 기초가 되는 중요한 과정이다. 유전자 재조합 기술이 발전하면서 대장균 등의 원핵세포나 동물, 식물, 곤충 세포 등의 다양한 진핵 세포를 숙주세포로 이용하여 목적 단백질의 재조합적 대량 생산에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

- [0004] 복수의 목적 단백질을 숙주 세포 내에서 공발현시키는 기술은 세포의 효율적인 표현형 변경, 복수의 기능성 단백질의 동시 대량생산, 치료용 단백질을 유전자 형태로 전달하는 유전자 치료 기술 등에 필수적이며, 이러한 목적을 위해 지금까지 복수의 플라스미드를 순차적으로 공-형질도입하거나, IRES-기반 폴리시스트로닉 컨스트럭트 (polycistronic construct)를 이용하거나, 각 목적 단백질 도메인이 자가절단 펩타이드를 사이에 두고 결합된 융합 단백질 형태로 발현시키거나, 또는 유전자 전달체로서 복수개의 바이러스(예를 들어 렌티바이러스 등)를 공-감염(co-infection) 시키는 방법 등이 사용되어 왔다. 그러나 이러한 종래 기술은 각각의 유전자의 발현이 균일하지 못하고 각 목적 단백질 생산 효율을 조절하기 어려우며 자가 절단 과정에서 N-또는 C-말단이 변형됨으로서 단백질 고유의 생물학적 기능을 유지하지 못할 뿐 아니라 복수의 목적 단백질이 동시에 균일하게 생산되지 못하는 등의 문제점이 있어왔다. 이에, 복수의 단백질을 재조합적으로 동시, 동량 발현시키는 새로운 발현 시스템에 대한 개발 요구가 커지고 있다.

- [0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Zahra Assur et al. Methods Mol Biol. 801:173-187(2012)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 동일한 숙주 세포 내에서 복수의 단백질의 발현 시간과 발현량을 균질화할 수 있는 효율적인 다중 발현 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 복수의 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 혼성

화를 통한 구조체화(structuralization)에 이용될 수 있는 추가 서열(additional sequence)을 결합시키는 간단한 조작만으로도 복수의 목적 단백질을 숙주 세포 내에서 동등한 수준으로 동시에 발현시킬 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 다중 단백질 발현용 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 분자를 제공한다:

[0014] (a) 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제1 추가 서열(additional sequence, ADS)을 포함하는 제1 핵산 구조체; 및

[0015] (b) 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 상기 제1 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제2 추가 서열을 포함하는 제2 핵산 구조체.

[0016] 본 발명자들은 복수의 단백질을 재조합적으로 동시, 동량을 발현시키는 효율적인 다중 발현 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 각 목적 단백질에 대한 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 i) 서로 직접 혼성화되거나; 또는 ii) 동일한 링커 분자에 동시에 혼성화될 수 있는 추가 서열을 결합시킬 경우, 각 발현 컨스트럭트가 추가 서열의 혼성화 반응을 통해 하나의 핵산 구조체를 형성함으로써 숙주세포 내에서 복수의 단백질을 동등한 수준으로 동시에 발현시킬 수 있음을 발견하였다.

[0017] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자의 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드로서 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0018] 본 구현예를 설명하면서 사용되는 용어 “추가 서열(additional sequence)”은 목적 단백질의 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 결합된 임의의 서열로서, 또 다른 목적 단백질의 발현 컨스트럭트의 추가 서열과 상보적인 서열을 가짐으로써 혼성화를 통해 다중 단백질 발현을 위한 단일 핵산분자로의 구조체화(structuralization)를 유도할 수 있는 서열을 의미한다.

[0019] 본 명세서에서 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건 하에서 본 발명의 제1 추가 서열이 제2 추가 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 이에 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우 뿐 아니라 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우를 포괄하는 의미이다. 본 명세서에서 “실질적으로 상보적인 서열”이라 함은 완전히 일치되는 서열뿐 아니라 타겟 서열에 어닐링하여 서열 특이적 혼성화가 일어날 수 있는 범위 내에서 타겟 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0020] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 양 말단에 5'-UTR 및 3'-UTR이 결합되어 있다.

[0021] 보다 구체적으로는, 상기 5'-UTR은 5'-cap이 결합되어 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 “UTR(untranslated region)”은 mRNA 내에서 목적 단백질을 암호화하는 코딩 서열의 양 말단에 결합된 비번역 부위를 의미하며, 코딩 서열의 업스트림에 존재하는 5'-UTR 및 다운스트림에 존재하는 3'-UTR이 있다. 용어 “5' -cap”은 5'-UTR에 연결되어 eIF4E(eukaryote translation initiation factor 4E)와 결합함으로써 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA에 결합시켜 mRNA의 5' 시작 부위로부터 단백질 합성을 개시하는 역할을 할 뿐 아니라 핵산 분해효소로부터 mRNA를 보호하는 역할을 하는 mRNA의 구성요소를 의미한다.

[0023] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 핵산 구조체는 상기 3'-UTR과 상기 추가 서열 사이에 20개 내지 400개의 염기를 포함하는 폴리(A) 서열을 추가적으로 포함한다.

[0024] 본 명세서에서 용어 “폴리(A) 서열”, “폴리아데닌 서열” 또는 “폴리 A 테일(poly(A) tail)”은 RNA 분자의 3' 말단에 위치하여 효소에 의한 분해로부터 RNA 분자를 보호하는 아데닌-반복 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

본 발명의 핵산 분자가 이중 가닥 형태의 디옥시리보뉴클레오타이드인 경우 “폴리(A) 서열”은 “폴리 (dA:dT)”로 표현될 수 있다.

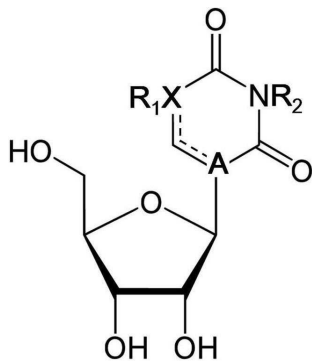
[0025] 보다 구체적으로는, 본 발명의 폴리(A) 서열은 20개 내지 300개의 염기를 포함하고, 보다 더 구체적으로는 25개 내지 200개의 염기를 포함하며, 보다 더 구체적으로는 25개 내지 150개의 염기를 포함하고, 가장 구체적으로는 30개 내지 120개의 염기를 포함한다.

[0026] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제1 핵산 구조체 및 제2 핵산 구조체는 IVT(*in vitro* transcribed) mRNA이다.

[0027] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 IVT mRNA는 변형 뉴클레오사이드(modified nucleoside)를 하나 이상 포함할 수 있다. 변이 뉴클레오사이드는 예를 들어 N1-메틸슈도우리딘(N1-methylpseudouridine), 슈도우리딘(pseudouridine), 2-티오우리딘(2-thiouridine), 5-메틸우리딘(5-methyluridine), 5-메틸시티딘(5-methylcytidine) 및 5-메톡시우리딘(5-methoxyuridine)을 포함하나, 이에 제한되지 않고 mRNA 분자의 번역원성을 감소시킬 수 있다고 당업계에 알려진 어떠한 변형 뉴클레오사이드라도 적용될 수 있다.

[0028] 보다 구체적으로는, 상기 IVT mRNA 중 우라실(U)의 전부 또는 일부가 하기 화학식 1로 표시되는 변형된 U(modified U)로 치환된다:

[0029] 화학식 1



[0030]

[0031] 상기 화학식에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_3 알킬 또는 C_1-C_3 알콕시이고, X 및 A는 탄소 또는 질소이며 서로 상이하고, $\equiv$ 는 단일결합 또는 이중결합을 나타낸다.

[0032] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C_1-C_3 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C_1-C_3 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0033] 본 명세서에서 용어 “알콕시”는 알코올에서 수소가 제거되어 형성된 라디칼을 의미하며, C_1-C_3 알콕시가 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0034] 옥텟 규칙(octet rule)에 의할 때, X 또는 A가 질소인 경우, X 또는 A가 각각 참여하는 결합인 $\equiv$ 가 단일결합임은 자명하다.

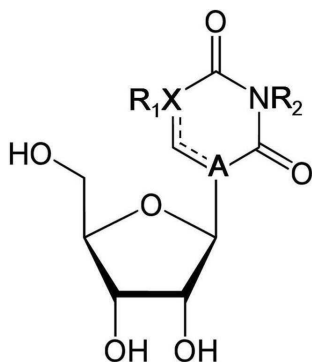
[0035] 본 발명의 구체적인 일 구현예에 따르면, 상기 화학식에서 X는 질소이고 A는 탄소이며 R_1 및 R_2 는 수소이다. X는 질소이고 A는 탄소이며 R_1 및 R_2 가 수소인 화학식 1 화합물은 슈도우리딘(pseudouridine)이다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식에서 X는 질소이고 A는 탄소이며 R_1 은 C_1 알킬(메틸)이고 R_2 는 수소이다. X는 질소이고 A는 탄소이며 R_1 및 R_2 는 수소인 화학식 1 화합물은 N1-메틸-슈도우리딘(N1-methylpseudouridine)이다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식에서 X는 탄소이고, A는 질소이며, R_1 은 C_1 알콕시(메톡시)이고, R_2 는 수소이다. X는 탄소, A는 질소, R_1 은 메톡시, R_2 는 수소인 화학식 1 화합물은 5-메톡시우리딘(5-methoxyuridine)이다.

- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 분자를 제공한다:
- [0040] (a) 제1 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제1 추가 서열(additional sequence, ADS)을 포함하는 제1 핵산 구조체;
- [0041] (b) 제2 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 3' 말단에 임의의 제2 추가 서열을 포함하는 제2 핵산 구조체; 및
- [0042] (c) 상기 제1 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제1 영역 및 상기 제2 추가 서열과 상보적으로 혼성화될 수 있는 제2 영역을 포함하는 링커(linker).
- [0043] 본 구현예를 설명하면서 사용되는 용어 “추가 서열(additional sequence)”은 목적 단백질의 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 결합된 임의의 서열로서, 링커 서열의 일부(예를 들어 제1 영역)와 상보적인 서열을 가져 이와 혼성화됨으로써 해당 링커 서열의 다른 일부(예를 들어 제2 영역)와 혼성화될 수 있는 제2의 추가 서열이 결합된 제2의 발현 컨스트럭트와 단일 핵산분자로의 구조체화(structuralization)를 유도할 수 있는 서열을 의미한다.
- [0044] 본 명세서에서 용어 “링커(linker)”는 제1 추가 서열과 혼성화될 수 있는 제1 영역 및 제2 추가 서열과 혼성화될 수 있는 제2 영역이 선형으로 연결됨으로서 제1 핵산 구조체와 제2 핵산 구조체가 간접적인 어닐링을 통해 단일 분자로 구조체화되도록 가교 역할을 하는 핵산 분자를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제1 영역 및 제2 영역 중 어느 하나는 역위 염기(inverted base)로 구성된다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “역위 염기(inverted base)”는 정상적인 염기 구조와 대칭구조를 가져 올리고뉴클레오타이드 내의 인접한 염기와 5' -3' 결합이 아닌 5' -5' 또는 3' -3' 역위 결합(reversed linkage)을 형성하는 변이 염기를 의미한다.
- [0047] 보다 구체적으로는, 상기 제1 영역 및 제2 영역은 5'-5' 역위결합(reversed linkage)에 의해 결합된다.
- [0048] 본 발명의 역위 염기를 이용할 경우 예를 들어 3' → 5' 방향으로 시작된 올리고뉴클레오타이드가 5'-5' 역위결합에 의해 정상 염기로 구성된 서열과 연결된 후, 일반적인 5' → 3' 방향으로 종료될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 제 8 항에 있어서, 상기 제1 핵산 구조체 및 제2 핵산 구조체는 IVT(*in vitro* transcribed) mRNA이다.
- [0050] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 IVT mRNA 중 우라실(U)의 전부 또는 일부가 하기 화학식 1로 표시되는 변형된 U(modified U)로 치환된다:

[0051] 화학식 1



- [0052]
- [0053] 본 발명에서 이용될 수 있는 변형 우라실 염기에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 다중 단백질 발현용 핵산 구조체를 제공한다:

- [0056] (a) 목적 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- [0057] (b) 상기 핵산 구조체의 3' 말단에 위치하여 다른 핵산 구조체 또는 링커 서열과 혼성화될 수 있는 추가 서열 (additional sequence, ADS).
- [0058] 본 발명에서 이용되는 추가 서열 및 링커 서열에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0059] 본 구현예를 설명하면서 사용되는 용어 “추가 서열(additional sequence)”은 또 다른 단백질 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 결합된 추가 서열과 직접 혼성화되거나 가교 역할을 하는 링커 서열과 혼성화되는, 전술한 2가지 양태의 추가 서열을 모두 포괄하는 의미이다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0062] (a) 본 발명은 복수의 단백질 발현 컨스트럭트가 각 말단에 결합된 추가 서열(additional sequence)의 혼성화 반응을 통해 단일 구조화되는 다중 단백질 발현용 핵산 분자를 제공한다.
- [0063] (b) 본 발명은 상호간의 직접 혼성화 또는 동일한 링커 분자에 대한 동시 혼성화 반응을 하도록 설계된 임의의 추가 서열을 각 발현 컨스트럭트의 3' 말단에 결합시키는 간단한 설계를 통해 복수의 목적 단백질을 단일 숙주 세포 내에서 효율적으로 동시, 동량 발현시킬 수 있다.
- [0064] (c) 본 발명은 특히 각 단백질 간 불균일한 발현 양상을 보이는 종래의 자가절단 펩타이드 발현 시스템의 단점을 극복하는 효율적인 다중 발현 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 T7 프로모터를 포함하는 플라스미드 벡터로부터 증폭된 후 3' 말단에 혼성화를 위한 추가 서열 (additional sequence)이 결합된 본 발명의 IVT(*in vitro* transcribed) mRNA 구조의 구조를 도식화한 그림이다.
- 도 2는 본 발명에 사용된 링커(링커) 구조를 보여주는 그림으로, 상기 링커에 포함된 역위 염기(Inverted base) 구조(도 2a), 역위 염기 서열과 정상 염기(regular base) 서열이 5'-5' 역위결합(reversed linkage)에 의해 결합된 링커 구조(도 2b), 상기 링커를 매개로 하여 혼성화됨으로써 형성된(링커-비의존성 구조체화) mRNA-ADS-1/ LNK/ mRNA-ADS-2의 구조(도 2c) 및 전기영동을 통해 혼성화 결과물을 확인한 젤 이미지(도 2d)를 각각 보여주는 그림이다.
- 도 3은 링커 없이 2 분자의 IVT mRNA의 추가 서열 간 직접 혼성화가 일어남으로서 형성된(링커-비의존성 구조체화) mRNA-ADS/mRNA-ADS-C의 구조(도 3a) 및 전기영동을 통해 혼성화 결과물을 확인한 젤 이미지(도 3b)를 각각 보여주는 그림이다.
- 도 4는 완충액 내 염(salt) 농도에 따른 본 발명의 IVT mRNA의 합성 수율을 측정한 결과를 보여준다.
- 도 5는 mRNA 농도에 따른 본 발명의 IVT mRNA의 합성 수율을 측정한 결과를 보여준다.
- 도 6은 Poly(A) 테일의 길이에 따른 본 발명의 IVT mRNA의 합성 수율을 측정한 결과를 보여준다.
- 도 7은 추가 서열(additional sequence, ADS)의 길이에 따른 본 발명의 IVT mRNA의 합성 수율을 측정한 결과를 보여준다.
- 도 8은 링커-의존성 구조체 및 링커-비의존성 구조체의 각 수율을 비교한 결과를 보여주는 그림이다.
- 도 9는 본 발명의 IVT mRNA의 세포 내 단백질 발현 효율을 조사하기 위해 인 비트로 루시퍼라제 어세이를 수행한 결과를 나타낸다.
- 도 10은 본 발명의 IVT mRNA의 세포 내 단백질 발현 효율을 조사하기 위해 RFP(Red Fluorescent protein) 발현을 측정한 FACS 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0069] 실시예**[0070] 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체의 제작**

[0071] IVT mRNA는 일반적으로 5' 말단부터 3' 말단까지 순서대로 5' cap, 5' UTR, ORF, 3' UTR, poly(A) 테일로 이루어진다. 본 발명에서 제안하는 구조체는 상기 일반적인 IVT mRNA 구조체의 3' 말단에 추가 서열(additional sequence)이 도입된 형태로서, 이러한 추가 서열은 임의의 서열로, 또 다른 추가 서열과 상보적으로 혼성화하거나, 링커와 혼성화될 수 있는 서열이다. T7 프로모터를 포함하며 5' UTR, ORF, 3' UTR이 클로닝되어 있는 플라즈미드 벡터에 적절한 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행함으로써 본 발명의 IVT mRNA 구조체의 제작에 필요한 DNA 주형을 수득하였다(도 1). 원하는 길이의 poly(A) 테일과 추가 서열 도입을 위해서 다양한 종류의 역방향 프라이머를 설계하였다.

표 1

프라이머	서열
FP	TTGGACCCCTCGTACAGAAGCTAATACG
RP 30A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS21-1 30A	AAGCAAGCTGACCCCTGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS21-1C 30A	AAAACCTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS21-2 30A	AAGCGAGAACTAGACAAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS21-2C 30A	AAACTTGTCTAGTTTCTCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS46-1 30A	TGTTTGTGTGGTGTGGAGGATGGTGTGTGGGTACGCTGAGTCGTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA
RP-ADS46-2 30A	CTTGGGAGTCGTGGGAGTGTGGGTTAGGGTGGGTGTAGGAGTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA

[0074] 링커 의존성 mRNA 구조체의 제작

[0075] 본 발명의 mRNA 구조체는 상술한 IVT mRNA의 3' 말단에 결합된 추가 서열에 상보적으로 혼성화할 수 있는 서열을 가진 '링커(linker)' 올리고뉴클레오타이드를 경유하여 제2의 mRNA 구조체와 결합할 수 있다(도 2c). 링커 올리고뉴클레오타이드는 정상 염기(regular base)와 대칭적인 구조를 가지는 역위 염기(inverted base)를 포함하는데(도 2a), 이러한 역위 염기를 이용해서 올리고뉴클레오타이드를 만들면 3' 탄소를 시작점으로 하여 5' 탄소를 종료되는 핵산 분자 구조를 수득할 수 있으며, 정상 염기와 연결되는 부분에서는 5'-5' reversed linkage를 형성할 수 있다(도 2b). 본 발명의 링커는 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 순서대로 역위 염기 → 5'-5' reversed linkage → 정상 염기가 순차적으로 결합되어 있다. 아울러, 5' 시작점부터 5'-5' reversed linkage 전까지 배치된 역위 염기들은 제1 mRNA의 구조체의 3' 말단에 결합된 추가 서열과 상보적으로 혼성화할 수 있는 서열로 구성되어 있으며, 5'-5' reversed linkage 이후부터 3' 말단까지 배치된 정상 염기는 제2 mRNA 구조체의 추가 서열과 상보적으로 혼성화할 수 있는 서열로 구성됨으로서, 전체 링커 분자는 서로 상보적이지 않은 추가 서열을 가진 제1 및 제2 mRNA 구조체가 결합하는 데에 가교 역할을 하게 된다(도 2c).

[0076] 이를 확인하기 위해 서로 상보적이지 않은 추가 서열을 가진 2개의 mRNA 구조체(mRNA-ADS-1 및 mRNA-ADS-2) 및 ADS-1, ADS-2 양쪽 모두와 상보적으로 혼성화 할 수 있는 서열을 가진 링커를 제작한 뒤 mRNA-ADS-1, mRNA-ADS-2 및 링커를 같은 몰 농도로 혼합하고 어닐링을 유도하기 위해 혼합물의 온도를 65℃로 가열 후 5분 유지한 뒤 1℃/20초씩 온도를 감소시켜 700초에 걸쳐 30℃로 냉각하였다. 결과 확인을 위해서 GelRed로 예비-염색한

1% 아가로스 겔에 시료를 로딩 후 1X TAE 완충액, 100V 조건에서 30분 동안 겔 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 BIO-RAD Chemidoc Imaging System을 이용해서 겔 이미지를 획득하였다(도 2d).

[0078] 링커-비의존성 mRNA 구조체의 제작

[0079] 서로 상보적인 추가 서열을 가진 제1 및 제2 mRNA 구조체(mRNA-ADS 및 mRNA-ADS-C)를 제작하고 mRNA-ADS 및 mRNA-ADS-C를 같은 몰 농도로 혼합하고 어닐링을 유도하기 위해 혼합물을 65℃로 가열 후 5분간 유지한 뒤 1℃/20초씩 온도를 감소시켜 700초에 걸쳐 30℃로 냉각하였다. 결과 확인을 위해서 GelRed로 예비-염색한 1% 아가로스 겔에 시료를 로딩 후 1 x TAE 완충액, 100V 조건에서 30분 동안 겔 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 BIO-RAD Chemidoc Imaging System을 이용해서 겔 이미지를 획득하였다(도 3b).

[0081] 완충액 내 염 농도에 따른 수율의 비교

[0082] 본 발명의 mRNA 구조체의 수율 분석을 위해서 BIO-RAD Image Lab 6.1 프로그램을 이용하여 겔 이미지를 분석하였다(도 4). 겔 이미지 상 각각의 레인을 지정하고, 어닐링을 진행하지 않은 대조군 레인에서 어닐링 이전의 mRNA들의 밴드 위치를 확인하였다(도 4의 2번 및 3번 레인). 어닐링을 진행한 레인에서:

[0083] 1) 대조군 레인의 밴드 위치를 참고하여 구조체화 되지 않은 mRNA들의 밴드 위치를 확인한 뒤 밴드별 강도를 정량하고;

[0084] 2) 구조체화를 위해 사용한 mRNA 중 가장 길이가 긴 mRNA의 밴드 위치보다 상단에 분포하는 밴드 또는 smear는 구조체화된 결과물로 예측되므로, 가장 길이가 긴 mRNA의 밴드 상단 영역의 강도를 정량하였으며;

[0085] 3) 한 레인 안에서 전체 밴드 강도 값의 합계를 100%로 하고, 그 중 2)에서 계산한 강도 값의 비율을 구조체화(structuralization) 수율로 정의하였다.

[0086] 기본 반응은 1 x PBS 완충액, NaCl 135mM 조건에서 진행하였고, 반응 조건의 최적화를 위해서 NaCl 농도를 조절하여 실험을 진행하였다. 최초 농도인 NaCl 135mM 조건에서 36%의 수율을 보였고, NaCl 농도가 400mM, 600mM로 증가함에 따라 수율은 각각 49%, 55%로 증가하였다(도 4). 이를 통해 NaCl 농도 증가가 구조체화 수율 향상에 긍정적인 영향을 미침을 알 수 있었다. 단, 400mM를 초과하는 NaCl 농도에서는 구조체화 수율이 포화되는 경향을 보였으므로, 이후 추가 실험들을 위해서 1X PBS 완충액, NaCl 400mM 조건을 사용하였다.

[0088] mRNA 농도에 따른 수율의 비교

[0089] 기본 반응은 1X PBS 완충액, NaCl 400mM, mRNA 300nM 조건에서 진행하였으며, 반응 조건 최적화를 위해 mRNA 농도를 조절하였다. 최초 농도인 mRNA 300nM 조건에서 48%의 수율을 보였으며, mRNA 농도가 600nM, 1200nM, 1800nM, 2400nM으로 증가함에 따라 수율은 각각 55%, 68%, 71%, 76%로 변화함을 관찰함으로써 mRNA 농도 증가가 구조체화 수율에 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(도 5). 단, 1200nM를 초과하는 농도에서는 구조체화 수율이 포화되는 경향을 보였으므로, 이후 추가 실험들을 위해서는 1X PBS 완충액, NaCl 400mM, mRNA 1200nM 조건을 사용하였다.

[0091] Poly(A) 테일의 길이에 따른 수율의 비교

[0092] 1X PBS 완충액, NaCl 400mM, mRNA 1200nM 조건을 적용하였으며, Poly(A) 테일 길이가 각각 30A 및 120A인 mRNA의 구조체화 수율을 비교한 결과, 30A인 경우 68%, 120A인 경우 65%의 수율을 각각 보였다(도 6). 이를 통해 Poly(A) 길이는 구조체화 수율에 유의미한 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0094] 추가 서열(additional sequence)의 길이에 따른 수율의 비교

[0095] 1X PBS 완충액, NaCl 400mM, mRNA 1200nM 조건을 적용하였으며, 21nt의 추가 서열이 결합된 mRNA들을 연결하는 링커(LNK21)를 사용한 경우 및 46nt의 추가 서열이 결합된 mRNA들을 연결하는 링커(LNK46)를 사용한 경우의 구조체화 수율을 비교한 결과, LNK21을 사용한 경우 72%, LNK46을 사용한 경우 66%의 수율을 각각 보였다. 이를

통해 추가 서열 길이 변화는 구조체화 수율에 유의미한 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 7).

[0097] 링커-의존성 및 비의존성 구조체화 수율

[0098] mRNA 2400nM, 1X PBS, 400mM NaCl 조건에서 링커-의존성 구조체화 결과 최대 76%의 구조체화 수율을 보였으며 (도 8a), mRNA 2400nM, 1X PBS, 400mM NaCl 조건에서 링커-비의존성 구조체화 결과 최대 75%의 구조체화 수율을 보여(도 8b) 제1 및 제2 mRNA 구조체가 결합하는 과정에서 링커의 사용 여부에 따른 유의한 수율 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[0100] 인 비트로 루시퍼라제 발현 분석

[0101] 새로운 구조체의 세포 내 단백질 발현 능력을 평가하기 위해 루시퍼라제 어세이를 수행하였다. IVT mRNA의 캡핑(capping)을 위해 ARCA(anti-reverse cap analogue)를 ARCA:GTP=4:1 비율로 적용하였으며, 일반적인 UTP를 대신하여 pUTP (pseudouridine triphosphate)를 사용하였고, 30개의 A로 이루어진 poly(A) 테일을 도입하였다. 96 웰-플레이트에 웰당 HEK293T 3.0×10^4 cells를 씨딩하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 사전-인큐베이션을 하였다. 시료 별로 총 mRNA 105ng (mRFP, mRFP-ADS46-1: 35ng/ mLuc, mLuc-ADS46-2: 70ng)을 형질도입하였다. mLuc, mLuc-ADS46-2를 단독으로 형질도입한 시료는 총 mRNA 양을 105ng로 맞추기 위해 35ng의 scramble mRNA를 함께 형질도입하였다(mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2, mRFP-P2A-Luc, mLuc-P2A-RFP: 105ng). 형질도입에 Lipofectamine 2000을 이용하였으며, 형질도입 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 인큐베이션한 뒤 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.

[0102] 본 발명의 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체와, 하나의 mRNA로 다중 단백질을 동시에 발현하기 위해 현재 널리 사용되는 2A 펩타이드의 단백질 발현 효율을 비교하고자 공지된 2A 펩타이드 중 porcine teschovirus-1 유래의 P2A를 사용하였다. 2A 펩타이드는 해당 서열이 포함된 mRNA가 번역되는 과정 중에, C-말단에 위치한 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 사이에서 리보솜이 펩타이드 결합 형성을 건너뛰어(리보솜 스킵핑) 해당 부위의 업스트림에 위치한 단백질과 다운스트림에 위치한 단백질이 분리(self-cleaving)되는 특성을 이용하여 2A 펩타이드의 업스트림과 다운스트림에 각각 원하는 단백질을 코딩하는 염기서열을 배치함으로써 다중 단백질 발현을 달성한다. 단, 2A 펩타이드는 다운스트림에 위치한 단백질이 업스트림에 위치한 단백질에 비해 적게 발현된다는 문제점이 보고된 바 있다.

[0103] 본 발명의 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체와의 효율 비교를 위해 ORF에 RFP-P2A-Luc 서열 및 Luc-P2A-RFP 서열이 삽입된 플라스미드 벡터들을 각각 클로닝하였다. 이 플라스미드 벡터들에 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행함으로써 IVT 주형을 생산하고, 이 IVT 주형을 이용하여 전사를 수행함으로써 원하는 mRNA를 생산하였다(mRFP-P2A-Luc, mLuc-P2A-RFP).

[0104] 링커(LNK46)를 이용해서 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 구조체화 한 본 발명의 구조체(mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2)의 루시퍼라제 발현 수준이 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 함께 형질도입한 경우(mRFP-ADS46-1 + mLuc-ADS46-2) 및 mLuc-ADS46-2 형질도입한 경우에 비해 높음을 확인하였다(도 9). 이러한 결과는 추가 서열과 DNA 올리고뉴클레오타이드 링커가 결합하여 형성된 DNA/RNA 하이브리드가 세포 내 RNase H에 의해 분해되어 mRNA 추가 서열이 제거됨으로서 추가 서열로 인해 저해되었던 mRNA의 단백질 발현이 회복된 결과로 추정된다.

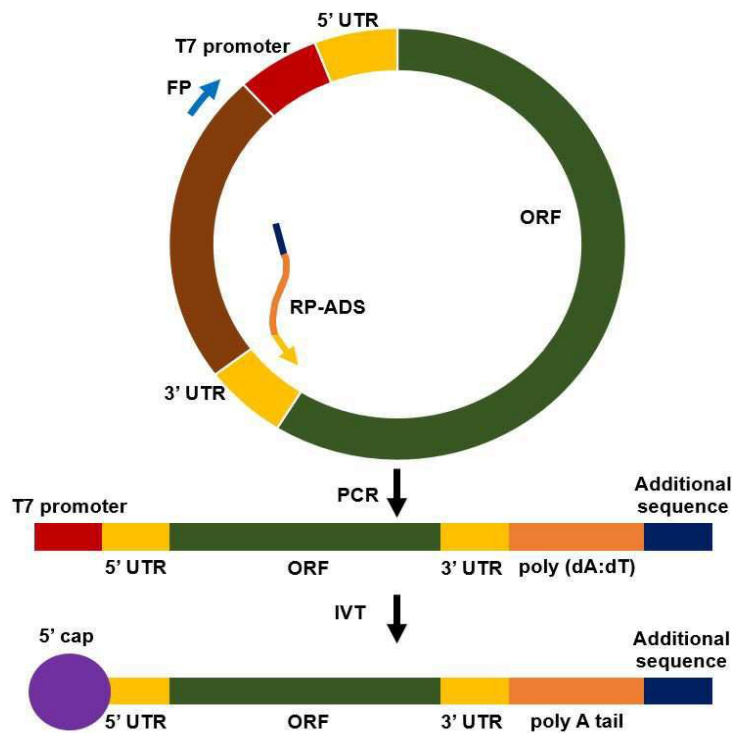
[0105] 링커(LNK46)를 이용해서 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 구조체화한 경우(mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2), P2A를 이용해서 업스트림의 RFP와 다운스트림의 Luc을 동시 발현한 경우(mRFP-P2A-Luc)에 비해 높은 루시퍼라제 발현 수준을 보였으며, P2A를 이용해서 업스트림의 Luc와 다운스트림의 RFP를 동시에 발현한 경우(mLuc-P2A-RFP)와 비교하면 동등한 루시퍼라제 발현 수준을 보였다(도 9). 이러한 결과를 통해 본 발명의 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체는 종래의 P2A 시스템 대비 동등 이상의 다중 단백질 발현 효율을 보일 뿐 아니라 업스트림과 다운스트림 위치에 따라 목적 단백질의 발현량이 불균등한 P2A의 단점을 효율적으로 극복함을 확인하였다.

[0107] 인 비트로 RFP 발현 분석

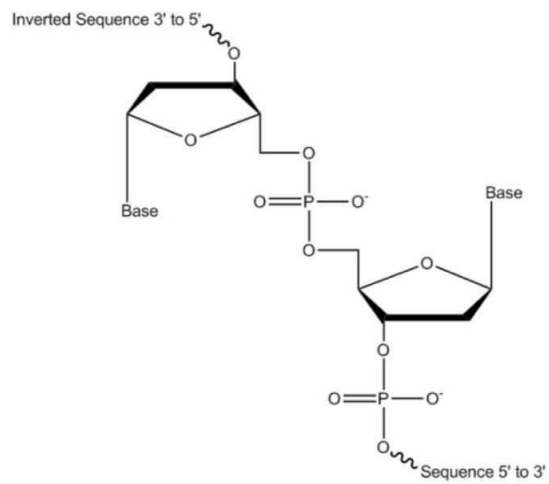
- [0108] 본 발명의 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체의 세포 내 단백질 발현 능력을 평가하기 FACS 분석을 통해 RFP(red fluorescent protein)의 발현을 측정하였다. IVT mRNA는 Capping을 위해 ARCA:GTP=4:1 비율로 ARCA cap을 사용하였으며, UTP를 대신하여 변이된 pUTP(pseudouridine triphosphate)를 적용하였고, 30개의 A로 이루어진 poly(A) 테일을 도입하였다. 12 웰-플레이트에 웰당 3.0×10^5 cells 밀도로 HEK293T를 씨딩하고 이후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 사전-인큐베이션을 하였다. 시료 별로 총 mRNA 1050ng (mLuc 700ng, mRFP 350ng)를 형질도입하였다. mRFP, mRFP-ADS46-1 단독 형질도입하는 시료는 총 mRNA 양을 1050ng로 맞추기 위해 700ng의 scramble mRNA를 함께 형질도입하였다(mLuc, mLuc-ADS46-2: 700ng/ mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2, mRFP-P2A-Luc, mLuc-P2A-RFP: 1050ng). Lipofectamine 2000을 이용하여 형질도입하였으며, 이후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 인큐베이션한 후 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.
- [0109] FACS를 통해 적색 형광을 측정한 결과, 링커(LNK46)를 이용해서 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 구조체화한 경우(mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2)가 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 함께 형질도입한 경우(mRFP-ADS46-1 + mLuc-ADS46-2) 및 mRFP-ADS46-1 단독 형질도입의 경우에 비하여 RFP 발현 수준이 높음을 확인하였다. 이 결과는 역시 mRNA-ADS에 포함된 추가 서열의 영향에 의해 저해되었던 단백질 발현이 상술한 과정을 통해 회복된 것으로 추정할 수 있다(도 10).
- [0110] 링커(LNK46)를 이용해서 mRFP-ADS46-1과 mLuc-ADS46-2를 구조체화한 경우(mRFP-ADS46-1/LNK46/mLuc-ADS46-2), P2A를 이용해서 업스트림의 RFP와 다운스트림의 Luc을 동시에 발현한 경우(mRFP-P2A-Luc) 및 P2A를 이용해서 업스트림의 Luc와 다운스트림의 RFP를 동시에 발현한 경우(mLuc-P2A-RFP) 모두에 비해 높은 RFP 발현 수준을 보임을 확인하였다(도 10). 이러한 결과는 루시퍼라제 어세이에서 도출한 결과와 일치하는 것으로, 본 발명의 다중 단백질 발현용 mRNA 구조체가 P2A 시스템 대비 동등 이상의 다중 단백질 발현 효율을 보임을 다시 한번 확인할 수 있었다.
- [0112] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

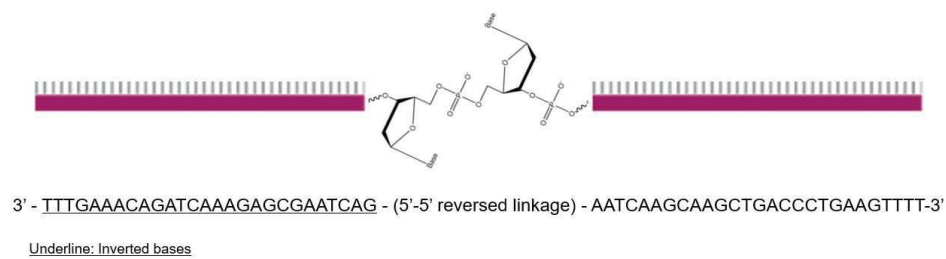
도면1



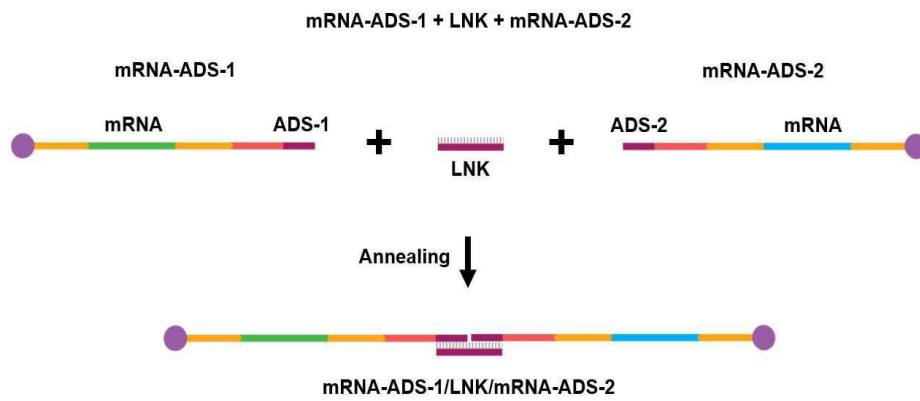
도면2a



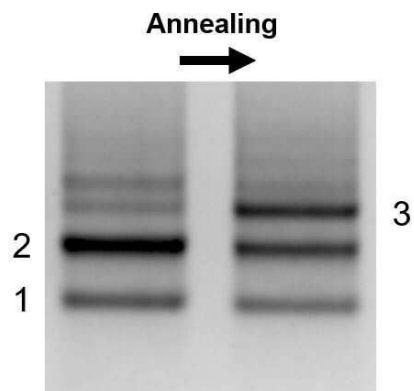
도면2b



도면2c

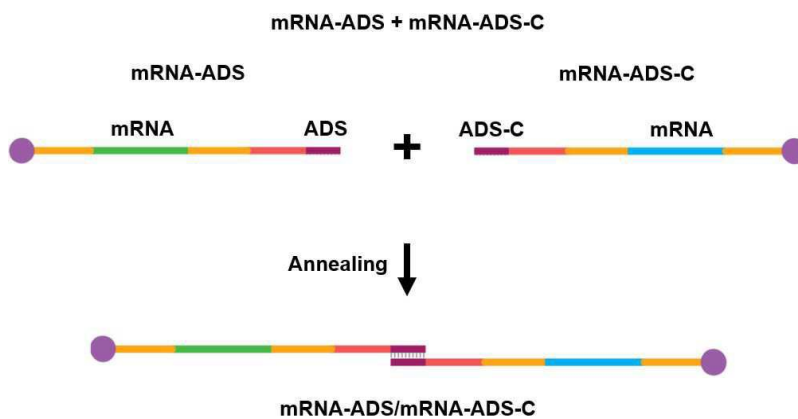


도면2d

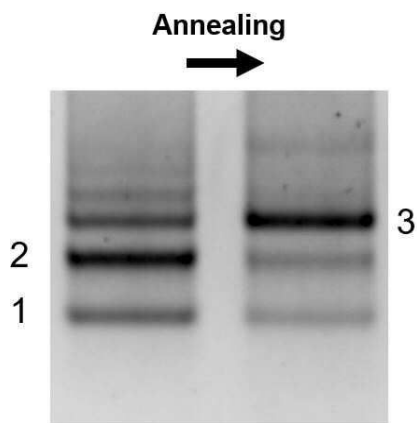


- 1: mRFP-ADS21-1
- 2: mLuc-ADS21-2
- 3: mRFP-ADS21-1/LNK21/mLuc-ADS21-2

도면3a

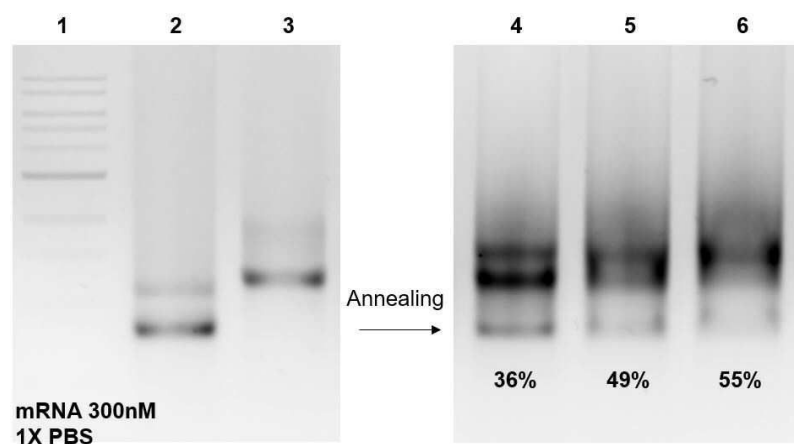


도면3b



1: mRFP-ADS21-1
2: mLuc-ADS21-1C
3: mRFP-ADS21-1/mLuc-ADS21-1C

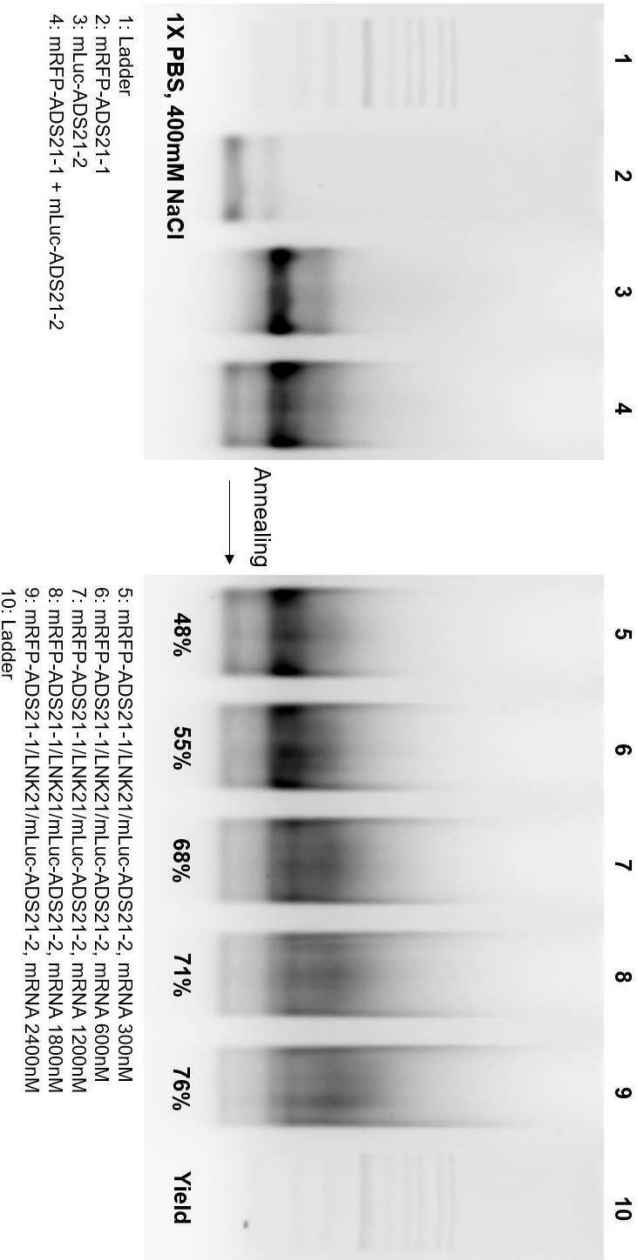
도면4



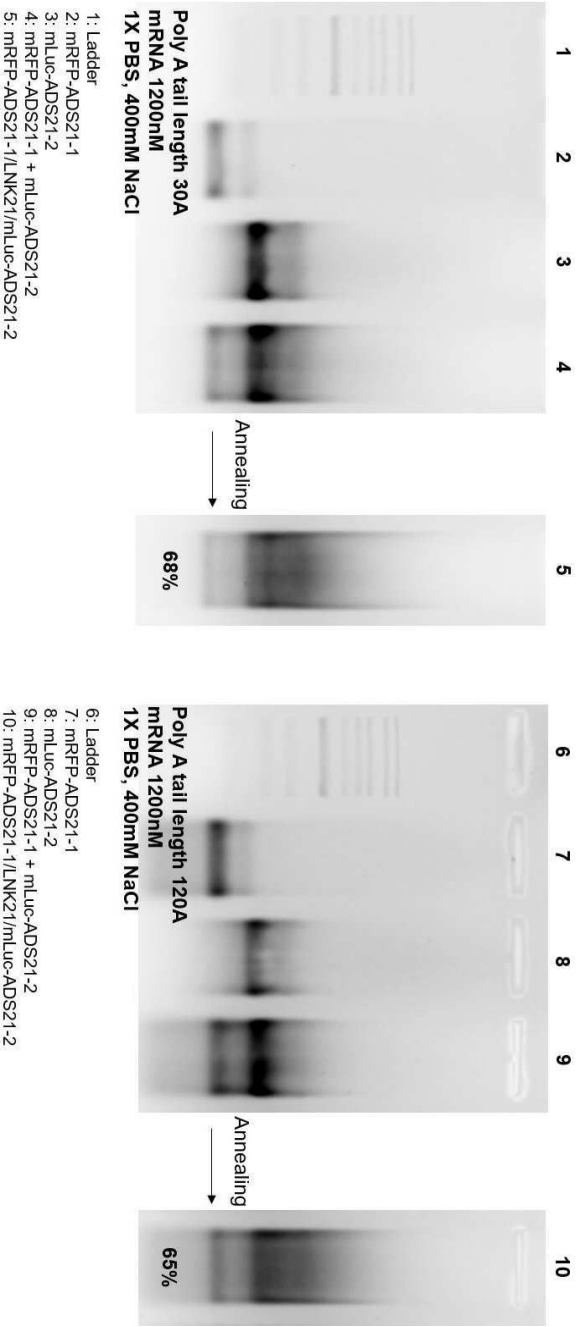
1: Ladder
2: mRFP-ADS21-1
3: mLuc-ADS21-2

4: mRFP-ADS21-1/LNK21/mLuc-ADS21-2, NaCl 135mM
5: mRFP-ADS21-1/LNK21/mLuc-ADS21-2, NaCl 400mM
6: mRFP-ADS21-1/LNK21/mLuc-ADS21-2, NaCl 600mM

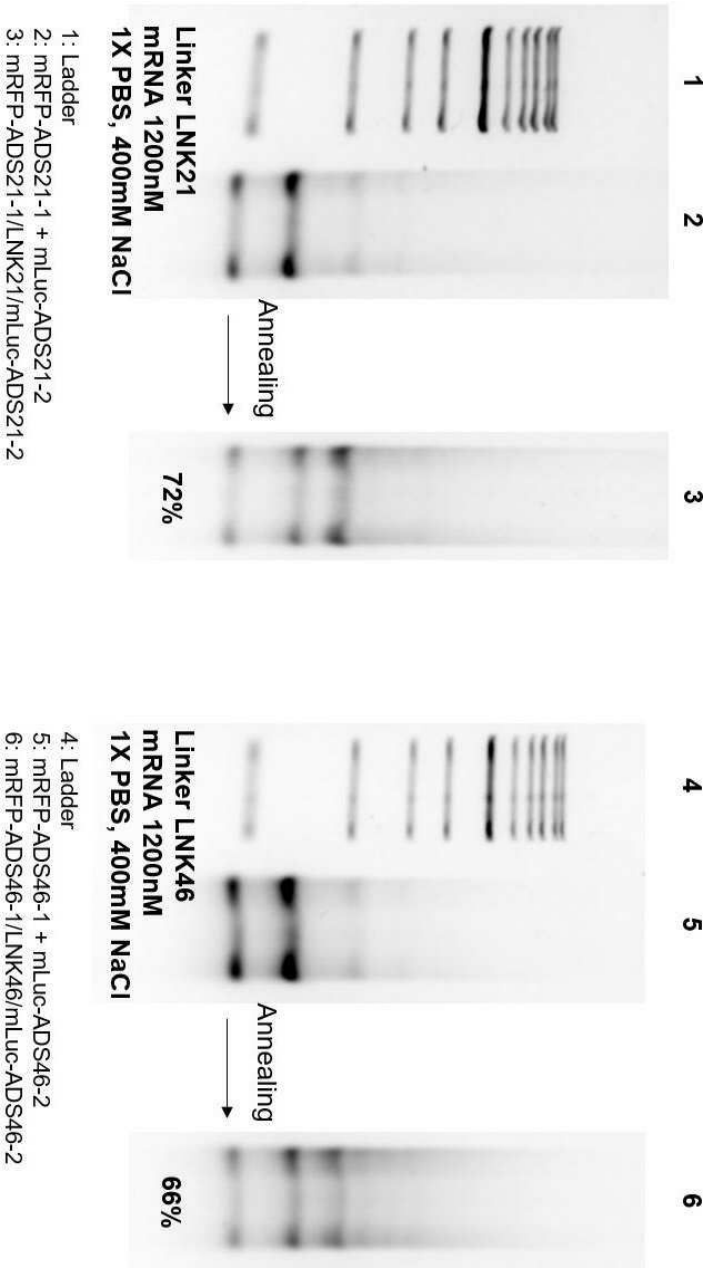
도면5



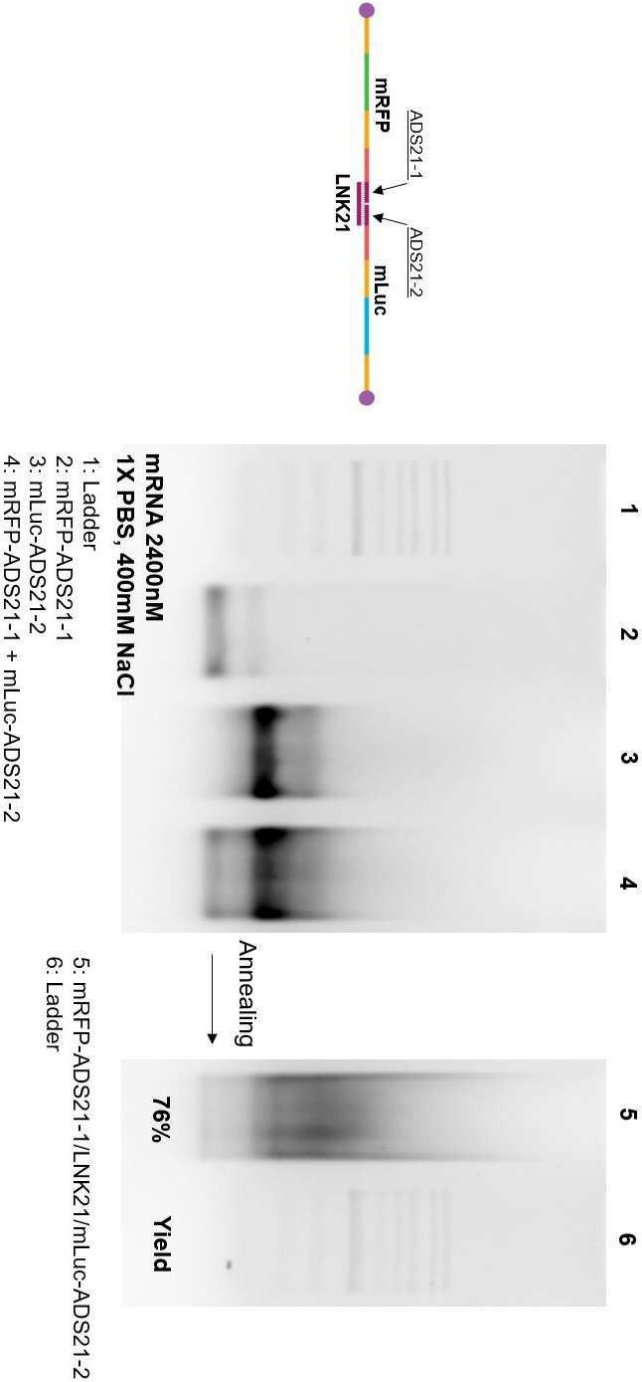
도면6



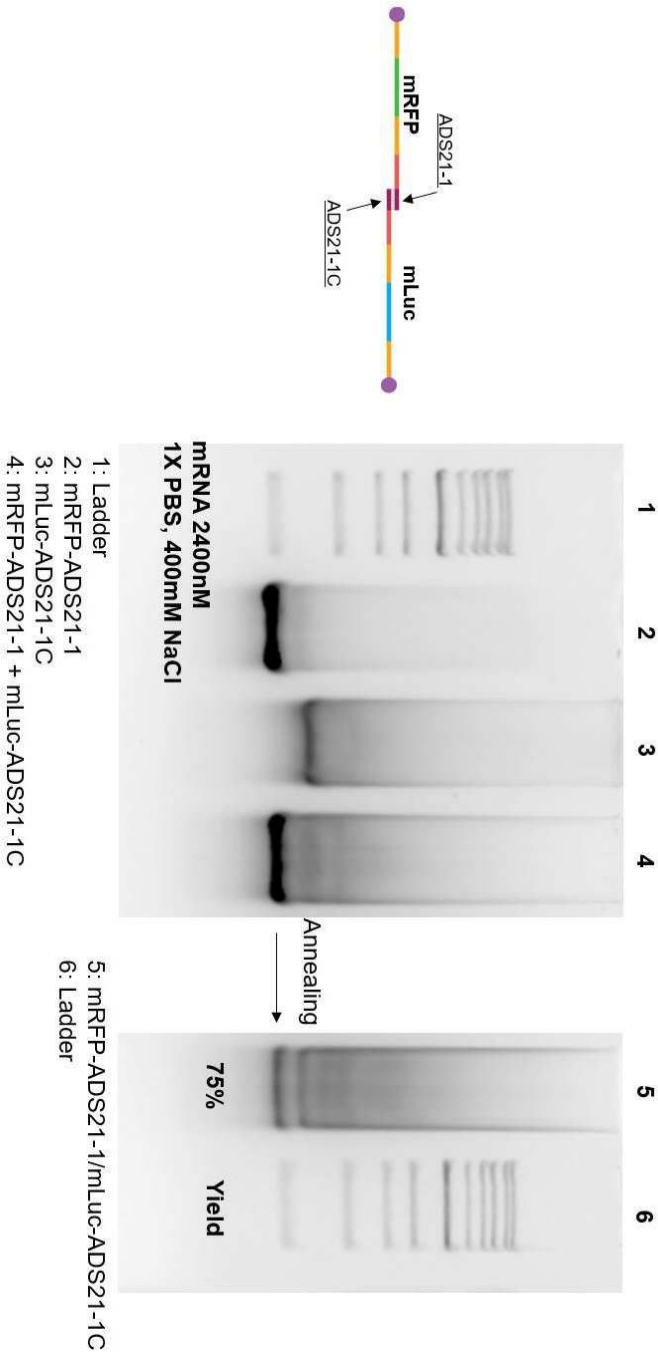
도면7



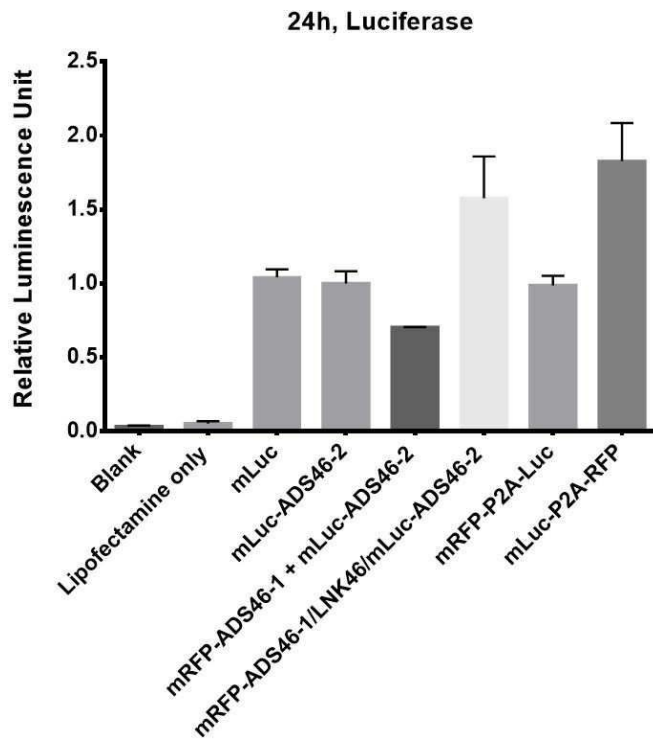
도면8a



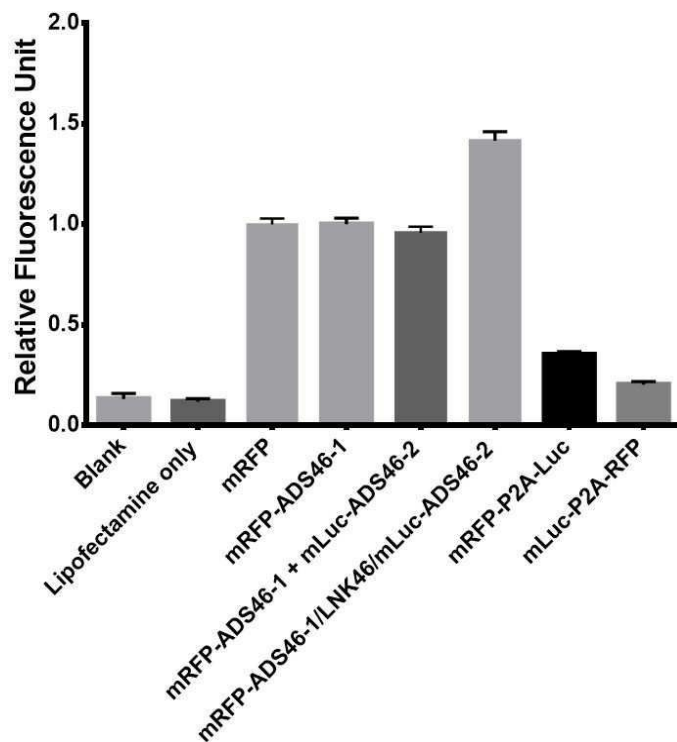
도면8b



도면9



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.