



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0064602
(43) 공개일자 2023년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/715 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0055572(분할)
(22) 출원일자 2023년04월27일
심사청구일자 2023년04월27일
(62) 원출원 특허 10-2021-0010768
원출원일자 2021년01월26일
심사청구일자 2021년01월26일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
이효진
대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9(지족동)
전홍진
대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 301호(복수동, 삼익목화아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

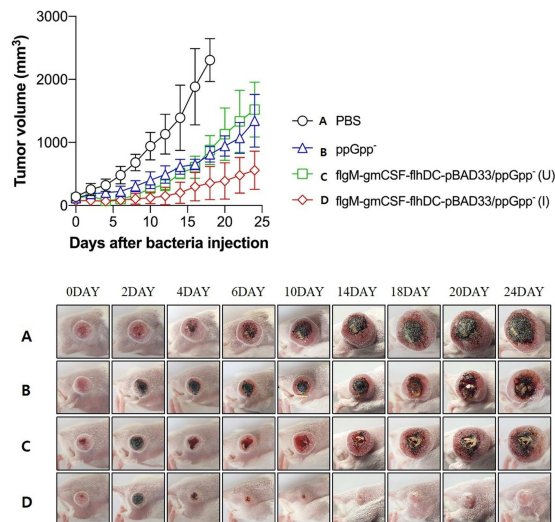
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 GM-CSF의 분비를 위한 발현벡터 및 이에 의해 형질전환된 항암 재조합 균주

(57) 요약

본 발명은 면역 유도능을 갖는 GM-CSF를 체내에서 분비할 수 있도록 하는 유전자 구조물과, 이에 의해 형질전환되어 체내에서 GM-CSF를 안정적으로 분비하는 것에 의해 항암 활성을 갖는 항암 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자가 연결되어 flgM과 GM-CSF의 융합단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물과 이에 의해 형질전환되어 체내에서 GM-CSF를 안정적으로 분비하는 것에 의해 항암 활성을 갖는 항암 균주에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/255 (2013.01)
C07K 14/7153 (2013.01)
C07K 2319/036 (2013.01)
C12N 2830/002 (2013.01)

(72) 발명자

정재호

광주광역시 서구 내방로240번길 10, 102동 1802호
 (쌍촌동, 현대아파트)

임대진

광주광역시 남구 광복마을3길 22-17(진월동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182622
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	25/100
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	25/100
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121766
과제번호	2018R1A5A2024181
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	복합암면역치료 연구센터
기 여 율	50/100
과제수행기관명	전남대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2025.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

항 시그마 팩터 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자가 연결되어 flgM과 GM-CSF의 융합단백질을 암호화하는 유전자 구조물이 pBad33 벡터에 함유된 재조합 발현벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 flgM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자는 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

서열번호 1로 구성된 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 하나에 있어서,

상기 유전자 구조물은 flhDC 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

청구항 1의 재조합 발현벡터에 의해 형질전환되어 flgM과 GM-CSF의 융합단백질을 분비하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 유전자 구조물은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 유전자 구조물은 flhDC 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 균주는 약독화 살모넬라 균주인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 약독화 살모넬라 균주는 ppGpp- 균주인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 10

청구항 5 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 의한 재조합 균주를 함유하는 암 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 유도능을 갖는 GM-CSF를 체내에서 분비할 수 있도록 하는 유전자 구조물과, 이에 의해 형질전환되어 체내에서 GM-CSF를 안정적으로 분비하는 것에 의해 항암 활성을 갖는 항암 균주에 관한 것이다.

배경 기술

[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 2007년부터 10년째 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(Vibrio cholera), 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 정맥 주사로 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 중앙 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 항암 치료는 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 면역활성화와 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] GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)는 대식세포, T세포, 비만세포, 자연살해세포, 내피세포 및 섬유아세포에 의해 분비되는 사이토카인이다. GM-CSF는 단핵구를 M1 type 대식세포로 분화하는 것을 유도하여 선천성 면역반응을 유도하는 한편, 수지상세포로 성숙시켜 CD8 T cell과 상호작용하도록 하여 후천성 면역반응을 유도하는 것에 의해 면역반응에 중추적인 역할을 담당한다. 박테리아에서 발현된 GM-CSF는 그 기능에 있어 생물학적 동등성이 입증되어 다양한 분야에 이용되고 있으나, 발현 후 박테리아 세포질 내의 GM-CSF를 정제하는 일련의 과정이 필요하다.

[0007] 일본등록특허 제6124460호는 암 특이항원과 GM-CSF를 포함하는 사이토카인의 융합단백질에 의해 암에 특이적으로 면역활성을 활성화시키는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제시하였다.

[0008] 암 특이항원 대신 살모넬라에 의해 표적화되어 GM-CSF를 발현하도록 한다면, GM-CSF의 항암활성에 더하여 살모넬라에 의한 면역활성화로부터 얻을 수 있는 항암 효과를 얻을 수 있기 때문에 항암 효과가 더욱 우수할 것으로 기대할 수 있다. 그러나 사전실험에 의하면 GM-CSF가 살모넬라 내에서 발현되는 경우 균주 자체가 사멸하기 때문에, 살모넬라의 항암 효과와 GM-CSF 발현에 의한 항암 효과를 동시에 발현하는 것은 기대하기 어려웠다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0852687호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1750007호
(특허문헌 0003) 일본 등록특허 제6124460호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Leschner 등, J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 형질전환된 균주를 사멸시키지 않으면서도, 면역 유도능을 갖는 GM-CSF를 체내에서 발현할 수 있도록 하는 유전자 구조물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 구조물에 의해 형질전환되어 안정적으로 GM-CSF를 발현하고 숙주의 체내로 분비하여 항암 활성을 나타내는 항암 제조합 균주를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 항암 균주를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 항 시그마 팩터 f1gM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자가 연결되어 f1gM과 GM-CSF의 융합단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 유전자 구조물에 관한 것이다. 이하에서는 f1gM과 GM-CSF의 융합단백질을 "f1gM-GMCSF"라 칭한다.
- [0015] 본 발명의 유전자 구조물은 균주에 형질전환하여, GM-CSF의 면역 유도능을 갖는 f1gM-GMCSF를 발현하여 세포 밖으로 분비시키도록 할 수 있다. 따라서 GM-CSF 발현에 따른 숙주 세포의 사멸을 방지할 수 있고, 균주의 세포질 내에 존재하는 GM-CSF를 정제하는 일련의 과정을 거치지 않고도 배양액으로부터 면역유도능을 갖는 융합단백질을 간편하게 수득할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 유전자 구조물에서 상기 f1gM 유전자와 GM-CSF 단백질을 암호화하는 유전자는 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결될 수 있다. 하기 실시예에서는 14개의 아미노산을 암호화하는 유전자 서열을 갖는 링커를 매개로 연결된 서열번호 1의 구조물을 예시하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자라면 링커의 길이나 서열을 적절하게 변형하는 것은 용이할 것이다.

- [0017] 발현 효율을 향상시키기 위하여 본 발명의 유전자 구조물의 전단에는 샤인-달가노(shine-dalgarno) 서열을 배치할 수 있다. 또한 본 발명의 유전자 구조물을 벡터에 도입할 수 있도록 전단과 후단에 적절한 제한효소를 배치할 수 있음은 당연하다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 유전자 구조물을 함유하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명에서 "벡터"는 적합한 숙주내에서 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.
- [0019] 아울러, 본 발명은 상기 유전자 구조물에 의해 형질전환되어 융합단백질 flgM-GMCSF를 분비하는 재조합 균주에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 균주는 상기 유전자 구조물을 함유하는 재조합 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.
- [0020] 본 발명의 상기 재조합 균주는 flgM의 분비시스템이 작동하여 단순히 세포 내에서 본 발명의 유전자 구조물이 암호화하는 flgM-GMCSF를 발현하는 것에 그치지 않고, 세포 외로 분비하는 것을 특징으로 한다. 이러한 특징으로 인하여 세포 내에 발현된 GM-CSF로 인하여 균주가 사멸되지 않고 안정적이고 지속적으로 융합단백질을 발현/분비할 수 있으며, 또한 분비된 융합단백질은 GM-CSF의 면역 유도능을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 균주를 이용하면 면역유도능을 갖는 융합단백질을 박테리아 세포질로부터 분리/정제하는 복잡한 일련의 과정을 거치지 않고, 배양액으로부터 간편하게 수득할 수 있다.
- [0021] 이에, 본 발명은 또한 상기 유전자 구조물에 의해 암호화되는 flgM과 GM-CSF의 융합단백질 flgM-GMCSF를 제공한다. 본 발명의 융합단백질은 해당 유전자 구조물의 서열에 따라 flgM과 GM-CSF가 직접적으로 연결되어 있을 수도, 링커를 매개로 연결되어 있을 수도 있다.
- [0022] 본 발명의 재조합 균주는 flgM-GMCSF를 생산하기 위한 균주로 사용될 수도 있으나, 그 자체로 사용하여 생체 내에서 flgM-GMCSF를 분비하도록 하여, GM-CSF가 치료 효과를 나타내는, 예를 들어 암을 포함하는 질병의 치료에 사용될 수 있다. 이때 사용되는 균주로는 인체에 무해한 것으로, flgM-GMCSF를 분비할 수 있는 것이라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있으며, 예를 들면 대장균이나 약독화 살모넬라균, 시겔라, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물(유익균), 프로바이오틱스 등을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 균주에서 상기 유전자 구조물은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터로, 예를 들어 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.
- [0024] 특히 본 발명의 균주는 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. 살모넬라의 약독화 초래 유전자는 당업계에 잘 알려져 있으며, aroA, aroC, aroD, aroE, 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 기능상실에 의해 달성될 수 있다. 생체 내 적용 시 야생형으로의 환원을 방지하고, 독성을 더욱 약화시키기 위하여 상기 유전자 중 둘 이상의 유전자 기능을 상실시킬 수 있다.
- [0025] 본 발명의 재조합 균주를 형질전환시키는 유전자 구조물에는 flhDC 유전자가 포함되어 있는 것이 바람직하다. flhDC 유전자는 플라젤린 오페론(operon) 유전자의 주된 조절자로 flgM 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 상기 유전자 구조물에 flhDC 유전자를 포함시킨 결과, flgM-GMCSF의 발현량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0026] 약독화 살모넬라 균주는 종양 부위에 표적화되어 면역 반응을 유도하는 것에 의해 항암활성을 갖는 것이 알려져 있다. 따라서 본 발명의 유전자 구조물로 형질전환하는 경우, 종양 부위에 표적화되어 flgM-GMCSF 융합단백질

을 분비하므로 종양 부위에서 약독화 살모넬라에 의한 항암활성과 GM-CSF에 의한 항암활성을 동시에 유도하므로 더욱 강력한 항암 활성을 나타낸다.

[0027] 하기 실시예에서는 서열번호 1로 이루어진 유전자 구조물이 형질전환된 경우에는, ppGpp- 약독화 살모넬라에서 f1gM-GMCSF 융합단백질의 분비능이 가장 우수하였다. 그러나 링커의 서열이나 길이에 따라 최적의 약독화 살모넬라는 달라질 수 있으며, 이를 선별하는 것은 당업자에게는 용이할 것이다. 상기 약독화 살모넬라를 형질전환시키는 유전자 구조물에 f1hDC 유전자가 포함된 경우, 균주의 f1gM-GMCSF의 분비량이 현저히 증가함을 확인할 수 있었으며 이에 하기 실시예에서 f1gM-GMCSF의 분비능이 가장 우수하였던 균주를 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp-로 명명하였으며, 2021년 01월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC14455BP).

[0028] 본 발명은 또한 상기 재조합 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 상기 재조합 균주가 약독화 살모넬라 균주이고, 유도성 프로모터가 함유된 경우에는, 균주의 투여 후 상기 균주가 암 조직에 표적화 되면 상기 유도성 프로모터의 작동을 유도하는 약물을 투여하여 균주로부터 f1gM-GMCSF 융합단백질의 분비를 유도하는 방식으로 사용될 수 있다.

[0029] 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.

[0030] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있다. 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.

발명의 효과

[0031] 이상과 같이 본 발명의 유전자 구조물은 균주에 형질전환되어 GM-CSF 단백질의 면역 유도능을 유지하면서 세포 외로 분비되는 f1gM-GMCSF 융합단백질을 세포 외로 안정적으로 분비할 수 있도록 하므로, GM-CSF를 분리/정제하지 않고 형질전환된 균주를 사용하여 체내에서 면역 유도능을 발휘할 수 있도록 할 수 있다.

[0032] 더 나아가, 본 발명의 유전자 구조물에 의해 형질전환된 약독화 살모넬라 균주는 암 부위에 표적화되는 살모넬라 균주의 특성에 의해 암 조직에서 GM-CSF를 분비하여 면역을 유도하는 한편 살모넬라 자체의 면역 유도능에 의해 더욱 우수한 항암 활성을 나타내므로 항암 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 GM-CSF 분비를 위한 플라스미드 제작을 위하여 디자인된 DNA의 염기 서열을 보여주는 도면.
- 도 2는 f1gM-gmCSF-pBAD33 플라스미드의 개열지도.
- 도 3은 f1gM-gmCSF-pBAD33 플라스미드로 형질전환된 약독화 살모넬라 균주의 배양액 중 f1gM-GMCSF를 검출하기 위한 전기영동 사진.
- 도 4는 f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 균주에 의해 분비된 f1gM-GMCSF의 면역 유도능을 보여주는 현미경 관측 이미지.
- 도 5는 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33 플라스미드의 개열지도.
- 도 6은 f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp-와 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp-
- 도 7은 종양 마우스 모델에서 f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp-와 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- 균주의 종양 성장 억제 효능을 보여주는 그래프.
- 도 8은 종양 마우스 모델에서 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- 균주의 종양 성장 억제 효능을 보여주는 그래프 및 사진.
- 도 9는 종양 마우스 모델에서 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- 균주에 의한 생존율 및 체중의 변화를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 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.
- [0035] [실시예]
- [0036] 실시예 1 : GM-CSF 분비를 위한 플라스미드의 제작
- [0037] 기저체와 후크를 통해 세포 밖으로 분비되는 flgM 단백질이 GM-CSF를 융합시킨 플라스미드를 제작하였다.
- [0038] 먼저 flgM과 GM-CSF의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 유전자를 디자인하였다. 야생형 살모넬라의 flgM DNA 염기서열(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))을 Recombinant Murine GM-CSF의 아미노산 서열((주)Pepro Tech 315-03 Accession Number: P01587 Gene ID: 12981)을 살모넬라 코돈 최적화를 통하여 변환한 DNA 서열과 링커를 통해 결합하였다. 링커는 6개의 히스티딘의 앞뒤로 각각 4개의 아미노산이 발현되도록 구성하였다. flgM 유전자의 발현을 높이기 위해, flgM 유전자 앞에 14개의 샤인-달가노노(shine dalgarno) 서열을 삽입하였으며, 클로닝을 위해 맨 앞에는 NheI site를 삽입하고, GM-CSF의 종결 코돈 뒤에는 HindIII site를 삽입하였다. 도 1은 상기 과정을 통해 디자인된 염기서열을 보여준다. 해당서열의 유전자 합성을 (주)코스모진텍에 의뢰하여 합성하였다. 이 중 제한효소 사이트 및 샤인-달가노노 서열을 제외한 서열이 융합단백질 flgM-GMCSF를 암호화하는 flgM-GMCSF 유전자(서열번호 1)에 해당한다.
- [0039] 합성한 flgM-GMCSF를 NheI(쥬다카라)과 HindIII(쥬 다카라) 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 전기영동하고 Gel extraction kit(Qiagen)로 700 bp의 DNA를 추출하여 flgM-GMCSF insert DNA를 얻었다.
- [0040] pBad18, pBad24 또는 pBad33 플라스미드와 NheI 및 HindIII 효소 각각 10U를 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 반응산물을 PCR purification kit(Qiagen)로 정제하여 각각의 벡터 DNA를 얻었다. 각 벡터 DNA를 flgM-GMCSF insert와 25℃에서 30분간 ligation(Invitron)시키고, DH5a 컴피턴트 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 LB amp 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 candidate 6개를 선별하여 NheI 및 HindIII 각 10 U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 700 bp band의 생성을 확인하였다.
- [0041] 이 중 pBad18 및 pBad24 벡터에 도입된 플라스미드는 이후 약독화 살모넬라 균주에 도입 시 항생제가 없는 배지에서는 48시간 이후 플라스미드가 소멸되었으며, pBad33 벡터를 사용한 플라스미드만이 항생제가 없이도 약독화 살모넬라 균주에서도 계속 유지되었다. 이에 pBad33을 사용하여 제작된 플라스미드에 대해 Cosmogenetech에 해당 candidate의 염기서열 분석을 의뢰하여, 서열번호 1의 유전자의 삽입을 확인하고 flgM-GMCSF 분비를 위한 플라스미드(flgM-gmCSF-pBAD33)로 확립하였다. 도 2는 flgM-gmCSF-pBAD33 플라스미드의 개열지도를 나타낸다.
- [0042] 실시예 2 : flgM-GMCSF를 분비하는 약독화 살모넬라 균주 제작
- [0043] 1) flgM-gmCSF-pBAD33에 의한 약독화 살모넬라 균주의 형질전환 및 flgM-GMCSF의 분비 확인
- [0044] 실시예 1에서 제조된 flgM-gmCSF-pBAD33 플라스미드를 사용하여 약독화 살모넬라 균주를 형질전환하고, flgM-GMCSF의 분비를 확인하였다. 약독화 살모넬라 균주로는, ppGpp-(전남대 정재호 교수로부터 분양), aro A-(한남대 이인수 교수로부터 분양), 및 galE f1hDC-(자체 제작, KCTC14455BP) 균주를 사용하였다.
- [0045] 형질전환된 각 균주의 단일 콜론을 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 처리하고, 37℃에서 5시간 추가로 진탕배양시켰다. 비교를 위해서 대조균은 아라비노스를 처리하지 않고 동일 조건에서 진탕배양시켰다. 배양액을 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리하고, 0.2 μm 필터로 여과하여 균을 완전히 제거하였다.
- [0046] 균이 제거된 상층액으로부터 웨스턴블랏을 통해 배양액 중 flgM-GMCSF의 양을 확인하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 전기영동 사진으로, 1, 3, 5, 7 레인은 아라비노스를 처리하지 않은 실험군이며, 2, 4, 6, 8 레인은

아라비노스를 처리한 실험군에서의 배양액에서 단백질의 검출 결과를 보여준다. 도 3에서 ppGpp- 살모넬라 균주에 flgM-gmCSF-pBAD33 플라스미드를 형질전환한 경우 다른 약독화 균주들에 비해 flgM-GMCSF가 분비능이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0047] 2) flgM-GMCSF의 면역 유도능 검증

[0048] 분비된 flgM-GMCSF 단백질이 GM-CSF와 동일한 면역 유도 활성이 있는 지 확인하기 위하여, 1)에서 flgM-GMCSF의 분비 확인을 위하여 제조한 배양액의 상층액을 사용하여 대식세포를 처리하고 그 변화를 관찰하였다. 구체적으로, 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포(한국세포주은행에서 분양)는 10% FBS와 1% streptomycin-penicillin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포를 2×10⁵ 셀/웰의 농도로 분주하고, PBS 완충액 또는 아라비노스를 처리하거나 처리하지 않은 flgM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 균주의 배양액 유래의 상층액을 200 μl 처리하고 24시간 추가로 배양한 후 200배 배율의 현미경으로 관찰하였다. 도 4의 (a)는 PBS 완충액만을 처리한 결과로 RAW264.7 세포가 분화되지 않아 동글동글한 모양을 나타낸다. 도 4의 (b)는 아라비노스를 처리하지 않은 균주 배양액의 상층액을 처리한 결과로, 대략 50% 정도의 세포들이 길쭉한 형태로 변형된 것을 확인할 수 있다. 이는 약독화 살모넬라 자체에서 분비된 물질에 의해 면역활성화가 유발되었기 때문으로 사료된다. 도 4의 (c)는 아라비노스를 처리한 균주 배양액의 상층액을 처리한 결과로, 대부분의 세포들이 별모양을 나타내어 M1 type 대식세포나 수지상세포로 분화되었음을 보여준다.

[0049] 상기 결과들로부터 flgM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 균주는 발현유도제의 처리에 의해 flgM-GMCSF가 발현되어 배양액으로 분비되며, 분비된 flgM-GMCSF 단백질은 GM-CSF와 마찬가지로 면역 유도 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[0050] 3) flgM-GMCSF 분비능을 강화시킨 약독화 살모넬라 균주의 제작

[0051] flgM의 발현은 flhDC의 발현에 의존적이므로, flhDC 유전자를 flgM-gmCSF-pBAD33 플라스미드에 클로닝하여 flgM-GMCSF의 발현을 강화시킬 수 있는 지 확인하였다.

[0052] 야생형 살모넬라 LT2의 genomic DNA를 주형으로 하기 표 1의 flhD-cla1-FOR 및 flhC-cla1-RE 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 flhDC 유전자가 포함된 PCR 산물을 얻었다. 구체적인 PCR 조건은 다음과 같다; 10x buffer 5 μl, 5x Q solution 10 μl, 2 mM dNTPs 7.5 μl, 20 μM flhD-cla1-FOR 프라이머 2.5 μl, 20 μM flhC-cla1-RE 프라이머 2.5 μl, Taq polymerase 1 μl, 10 ng/μl genomic DNA 2 μl 및 물 19.5 μl을 혼합하여 Qiagen system을 사용하여, 95℃ 5분과, 30회의 94℃ 30초, 49℃ 30초, 72℃ 1분 반복과 그 후에 72℃ 10분의 조건에서 PCR을 진행하였다. PCR purification kit(㈜ Qiagen)로 정제한 PCR fragment 1μg과 ClaI(㈜다카라) 10U를 37℃에서 2시간 반응시키고, 반응산물을 PCR purification kit(㈜ Qiagen)로 정제하여 insert DNA를 제작하였다.

표 1

flhD-cla1-FOR	tgctcatgtttgacagcttatcataggaggttg atcctatgggaacaatgcatacatccgagttgc ta	서열번호 2
flhC-cla1-RE	atttgacaggcacattatgcatcgaccgtttcg gttaaacagcctgttcgatctgtt	서열번호 3

[0054] 이와 별도로, 1)에서 제작한 flgM-gmCSF-pBAD33 플라스미드 1 μg을 ClaI(㈜다카라) 10U와 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 PCR purification kit(㈜Qiagen)로 정제하여 VECTOR DNA를 완성하였다.

[0055] 상기 방법에 의해 각각 얻은 insert DNA와 VECTOR DNA를 25℃에서 30분 ligation(㈜Invitrogen) 시킨 후 DH5a 컴피턴트 세포를 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 LB cm 고체 배지에 도말하고 37℃에서 배양하여 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니의 candidate 6개를 선별하여 ClaI(㈜다카라) 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동을 통해 1 kb band의 생성을 확인하였다. Cosmogenetech에 해당 candidate의 염기서열을 분석을 의뢰하여, flhDCA 유전자의 삽입을 확인하고 flgM-gmCSF-flhDC-pBAD33 플라스미드로 확립하였다.

[0056] flgM-gmCSF-flhDC-pBAD33 플라스미드를 사용하여 ppGpp- 약독화 균주를 형질전환한 후, 1)과 동일한 방법에 의

해 f1gM-GMCSF 유전자의 분비를 웨스턴 블롯에 의해 확인하였다. 도 6의 1, 3 레인은 아라비노스를 처리하지 않은 군주의 배양액, 2, 4 레인은 아라비노스를 처리한 군주의 배양액에서 f1gM-GMCSF의 발현을 보여주는 전기영동 이미지이다. 아라비노스가 처리된 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- 군주의 배양액은 f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 군주의 배양액에 비해 동일 농도에서 훨씬 많은 양의 f1gM-GMCSF가 검출되어, 본 실시예의 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33 플라스미드로 형질전환된 ppGpp- 군주가 f1gM-gmCSF-pBAD33 플라스미드로 형질전환된 ppGpp- 군주에 비해 f1gM-GMCSF의 분비가 훨씬 우수함을 확인할 수 있다.

[0057] 상기 형질전환된 군주는 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- Salmonella로 명명하였으며, 2021년 01월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC14455BP).

[0058] **실시예 3 : 종양 마우스 모델에서의 항암 효능 평가**

[0059] 실험동물로는 오리엔트 바이오 (OrientBio) 에서 20g 내외의 6 주령 BALB/c 암컷 마우스를 구입하여 사용하였다. 승인된 프로토콜에 따라 모든 동물에 대한 관리 및 실험, 안락사가 수행되었다(CNU IACUC-H-2020-7).

[0060] 미국 세포주 은행(ATCC)으로부터 murine CT26 결장암종 세포를 구입하여 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 시험관 내 배양된 CT26 종양세포를 수거한 후, 20 μ l PBS에 현탁시킨 다음 1 $\times$ 10⁶개의 세포를 BALB/c 마우스의 우측 등에 피하 주사하여 종양세포를 이종 이식하였다. 종양세포의 이식 약 2주 후, 종양의 크기가 100mm³에 도달하면 실시예 2에서 제작한 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBAD33/ppGpp- 군주 또는 f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 군주를 PBS로 희석하여 약 5 $\times$ 10⁷ CFU/mice용량으로 꼬리 정맥을 통해 감염시켰다(0day). 대조군으로는 군주 대신 PBS 완충액만을 동량 주사하였으며, 비교군으로 약독화 군주인 ppGpp- 살모넬라 군주를 동일 농도로 감염시켰다. 형질전환된 군주에게는 군주의 투여 3일째부터 f1gM-GMCSF의 발현 유도를 위하여 40% L-아라비노스 100 μ l/mice를 매일 복강내 주사하였다. 이후 매일 일정한 시간을 정하여 마우스의 체중과 종양의 크기를 측정하여 기록하였다.

[0061] 종양의 부피는 (종양 길이 $\times$ 종양 폭 $\times$ 종양 높이)/2의 식에 의해 계산하였으며, 전남대학교 동물실험 윤리위원회의 지침에 따라 종양 부피가 1,500 mm³ 이상이면 안락사시켰다.

[0062] 도 7은 상기 실험 결과 종양의 크기를 도시한 그래프로, 기대한 바와 같이 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주는 종양의 성장을 현저하게 억제함을 보여준다. ppGpp- 군주 역시 항암활성을 나타내었는데, 이는 약독화 살모넬라 군주에 의한 면역유도에 의한 것으로 설명된다. f1gM-gmCSF-pBAD33/ppGpp- 군주 또한 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주 보다는 효과가 다소 적었지만, ppGpp- 군주에 비해서도 2배 정도의 강력한 항암활성을 나타내었다.

[0063] 도 8은 대조군과 비교군 및 아라비노스를 투여하지 않은 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주 처리군과 아라비노스 투여 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주 처리군의 종양의 성장을 비교하여 보여주는 그래프 및 사진이다. 아라비노스를 투여한 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주 처리군은 강력한 항암활성을 나타내었으나, 아라비노스를 처리하지 않은 f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주 처리군은 ppGpp- 살모넬라 군주 처리군과 유사한 종양 성장 양상을 나타내어, f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp- 군주의 항암 활성이 살모넬라 군주에 의한 항암 활성과 살모넬라 군주에 의해 발현되어 분비된 f1gM-GMCSF 단백질에 의한 것임을 확인할 수 있다.

[0064] 도 9는 살모넬라의 군주 감염 후 시간 경과에 따른 생존율과 체중의 변화를 보여주는 그래프로, 군주를 처리하지 않은 대조군의 마우스는 실험 23일 후 모든 마우스에서 종양의 부피가 1,500 mm³이 되었으며, 약독화 살모넬라 군주만을 감염시키거나 f1gM-GMCSF가 발현되지 않은 경우에는 30~40일 내에 종양이 기준 부피를 초과하였으나, f1gM-gmCSF-pBAD33-f1hDC/ppGpp-로 감염시키고 아라비노스를 처리한 경우에는 50일 이후에도 40%의 마우스에서 종양의 크기가 기준 이하를 유지하였다. 모든 살모넬라 처리군은 감염 직후 약간의 체중 감소가 관찰되었으나, 2일 이후 체중이 점차 증가하여 약 20일 이후에는 대조군과 체중 차이를 나타내지 않았다.

수탁번호

[0065]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC14455BP

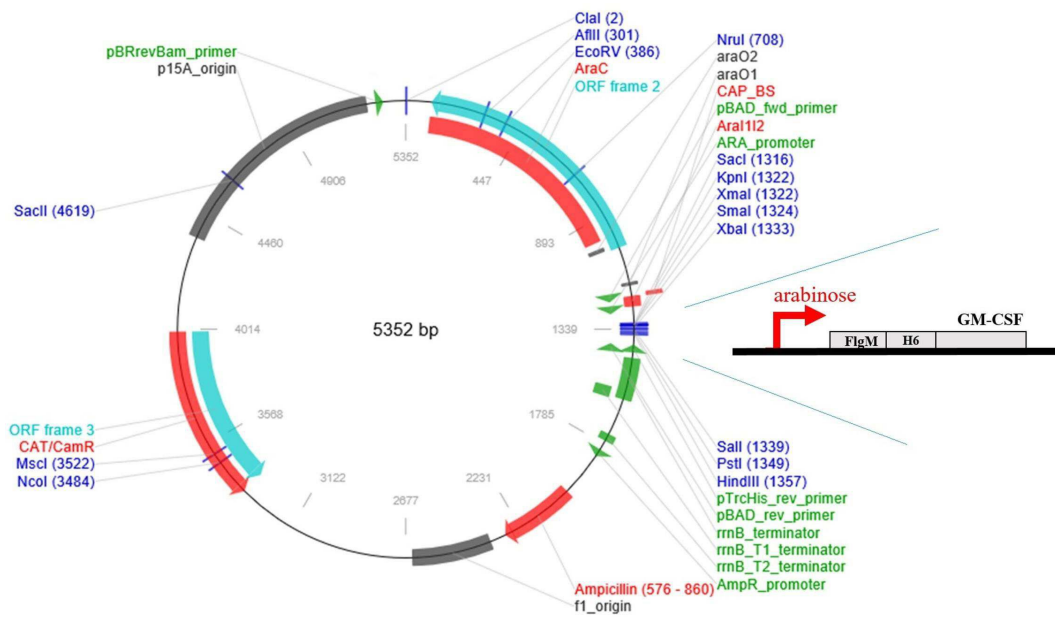
수탁일자 : 20210119

도면

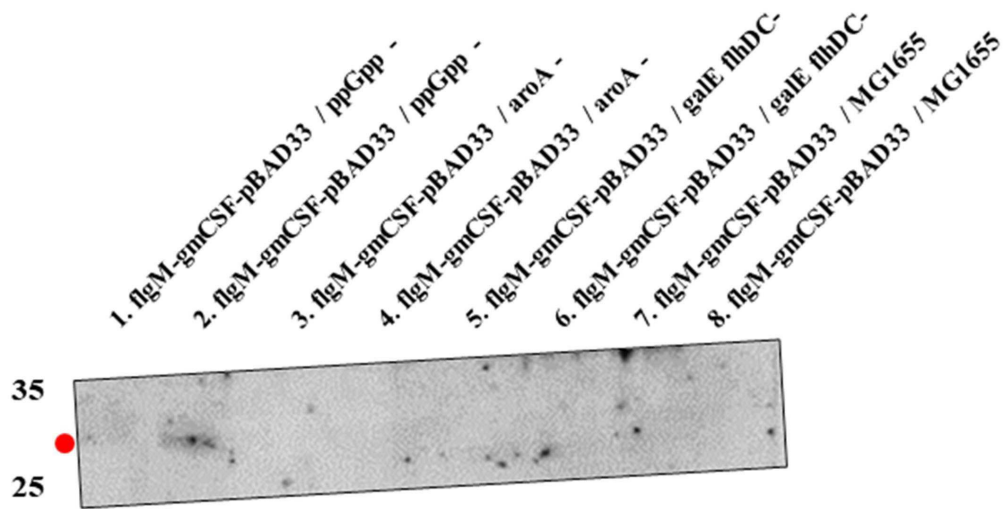
도면1

GCTAGCAGGAGGTTTGACCT
 ATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAAACCCGTTAGCACTGTCCAGACGCGCGAA
 ACCAGCGACACGCCGTACAAAAACGCGTCAGGAAAAACGTCCGCCGCGACGA
 GCGCCAGCGTAACGTTAAGCGACGCGCAAGCGAAGCTCATGCAGCCAGGCGTCAGC
 GACATTAATATGGAACGCGTCGAAGCATTAAAAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAA
 AAATGGATACGGGAAAAATAGCAGACTCGCTCATTGCGGAGGCGCAGAGCTACTTAC
 AGAGTAAAAAAGGCGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACAGCAGCGGCGGCATG
 GCGCCGACCCGAGCCCGATTACCGTGACCCGCCCGTGGAAACATGTGGAAGCGATT
 AAAGAAGCGCTGAACCTGCTGGATGATATGCCGGTGACCCTGAACGAAGAAGTGGA
 AGTGGTGAGCAACGAATTTAGCTTTAAAAAACTGACCTGCGTGACAGCCCGCCTGAA
 AATTTTGAACAGGGCCTGCGCGGCAACTTTACCAAACCTGAAAGGCGCGCTGAACAT
 GACCGCGAGCTATTATCAGACCTATTGCCCGCCGACCCCGGAAACCGATTGCGAAAC
 CCAGGTGACCACCTATGCGGATTTTATTGATAGCCTGAAAACCTTTCTGACCGATATTC
 CGTTTGAATGCAAAAAACCGGTGCAGAAATAAAGCTT

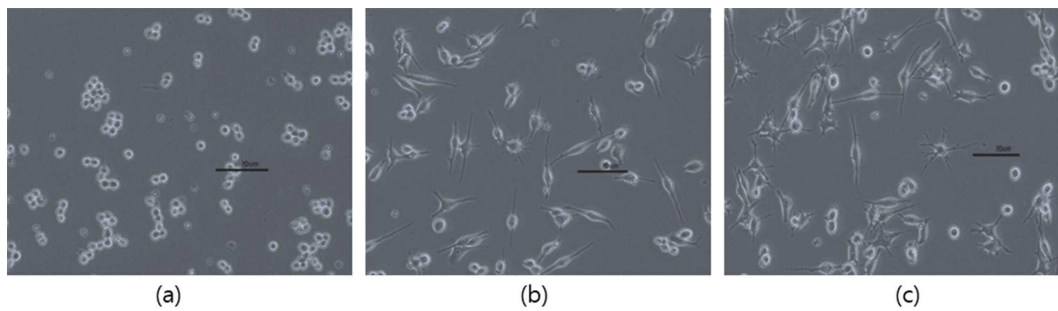
도면2



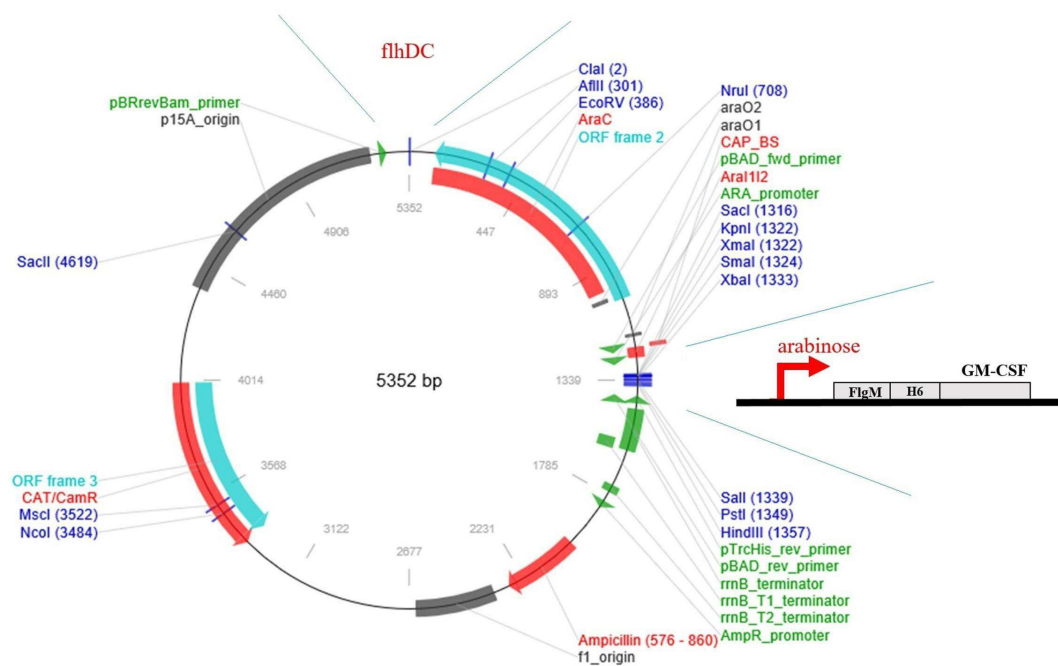
도면3



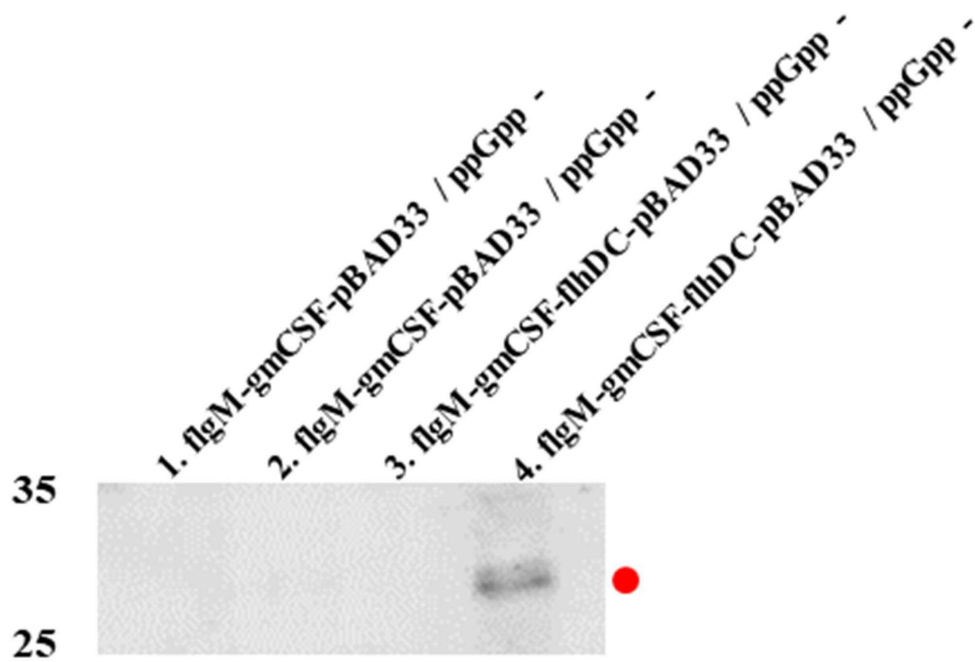
도면4



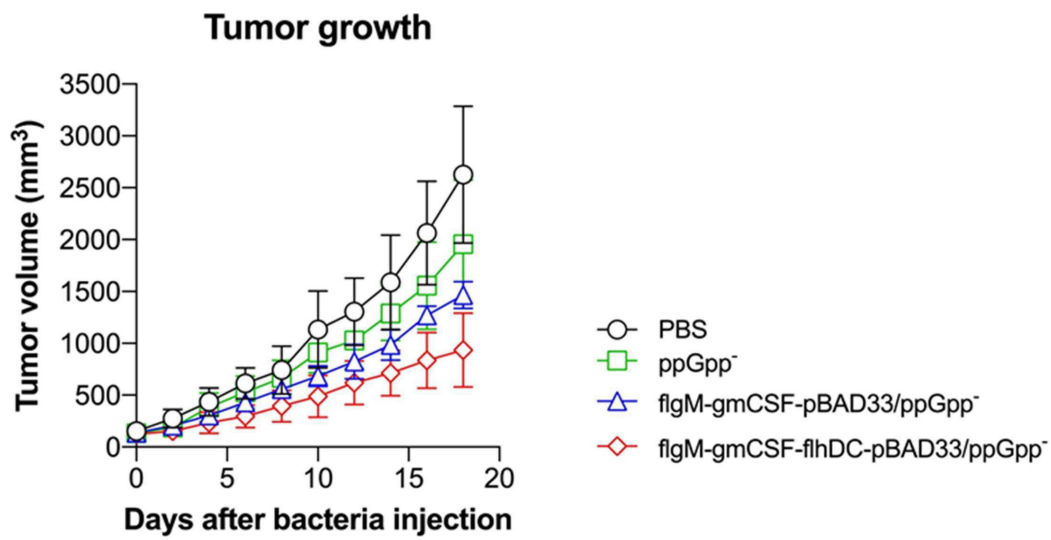
도면5



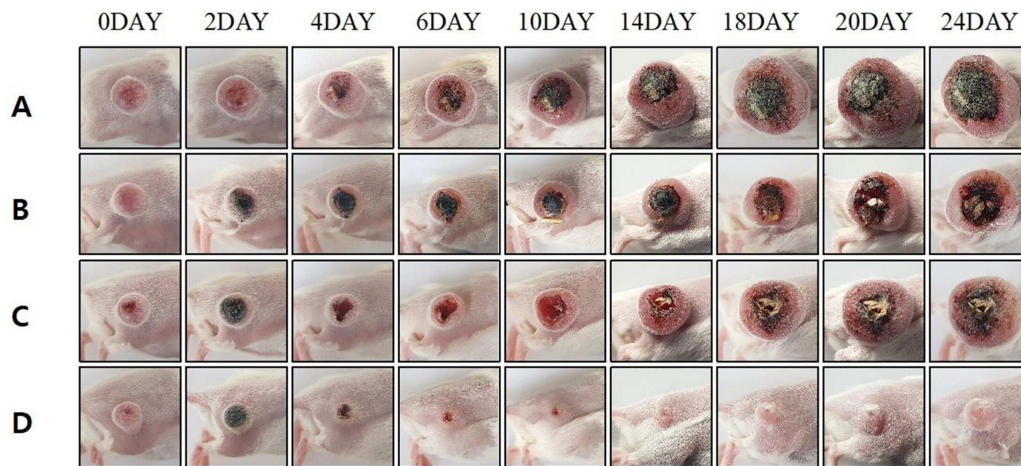
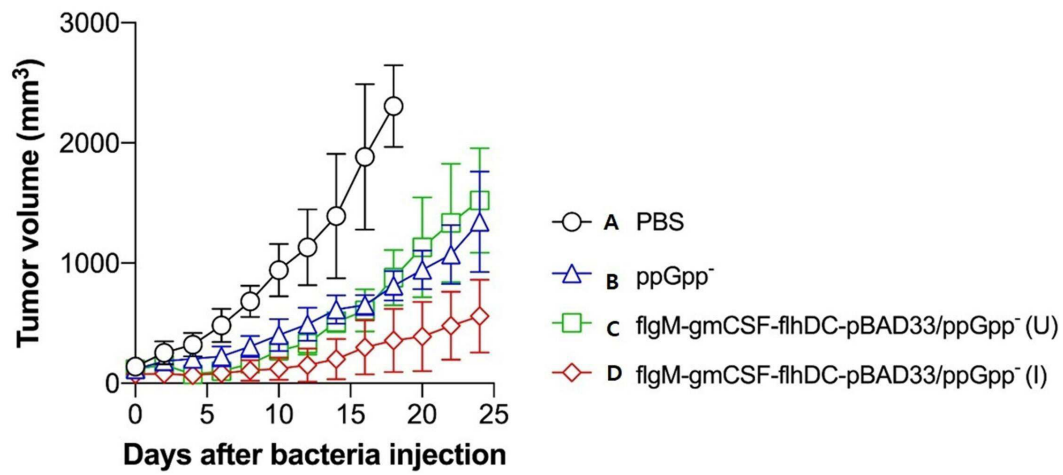
도면6



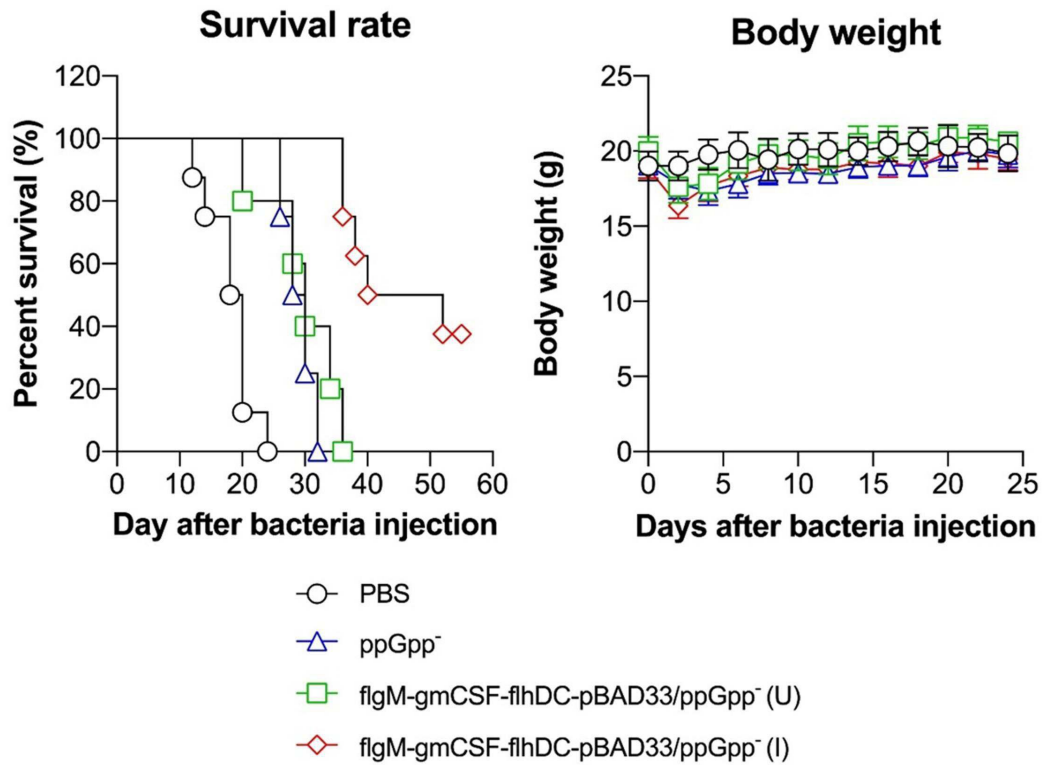
도면7



도면8



도면9



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.