



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0146562
(43) 공개일자 2024년10월08일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/74</i> (2006.01) <i>A61K 35/74</i> (2015.01)
 <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 14/245</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/525</i> (2024.01) <i>C12N 1/36</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/74</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/74</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0038636
 (22) 출원일자 2024년03월20일
 심사청구일자 2024년03월20일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020230040223 2023년03월28일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 이효진
 대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9(지족동)
 전홍진
 대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 301호(복수동, 삼익목화아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 김원준</p> |
|--|--|

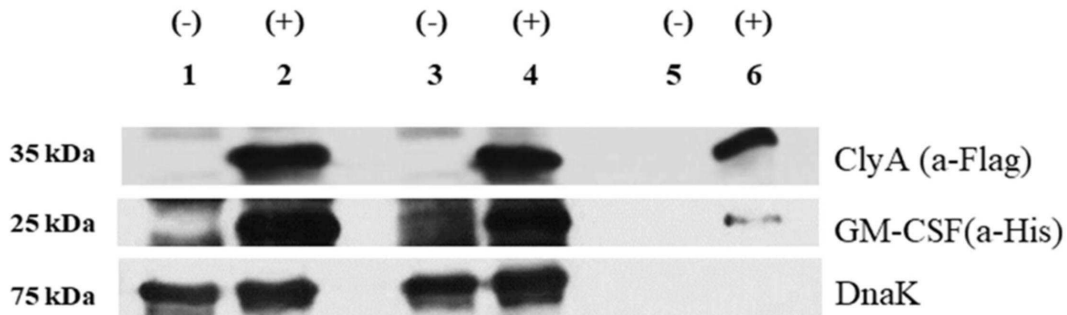
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **이중 단백질을 분비하는 항암 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물**

(57) 요약

본 발명은 동일 기작의 분비시스템에 의해 이중의 단백질을 분비할 때 상호 분비에 영향을 미치지 않으면서 효율적으로 이중 단백질을 분비할 수 있는 항암 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과, (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 이중 분비시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/245 (2013.01)
C07K 14/525 (2013.01)
C12N 1/36 (2013.01)
C07K 2319/036 (2013.01)
C12N 2830/002 (2013.01)

(72) 발명자

김솔비

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

김은지

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

한민주

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

강소라

대전광역시 서구 도안동로 123, 1709동 2502호 (도
 안동, 도안리슈빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	미부여
과제번호	HR20C0025040024
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과,
 (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어,
 이중 분비시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 균주는 약독화 살모넬라균, 대장균, 시겔라균, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물, 프로바이오틱스로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 각각 독립적으로 tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, 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 및 pflE 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 서로 다른 유도물질에 의해 작동되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자는 하나 이상의 태그가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 사이토카인 단백질은 TNF α , INF α , INF β , INF γ , IL-1 β , IL2, IL12 및 IL15로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항암 균주.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
상기 유전자 구조물은 f1hDC 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항 시그마 팩터 f1gM 유전자와 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자의 연결은 f1gM 유전자와 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자가 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 9

청구항 8에 있어서,
사이토카인 단백질은 TNFa인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 10

청구항 9에 있어서,
항 시그마 팩터 f1gM 유전자와 연결된 TNFa 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 구성된 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 11

청구항 10에 있어서,
상기 균주는 기탁번호 KCTC19174P인 균주인 것을 특징으로 하는 재조합 균주.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 의한 항암 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이중의 단백질을 분비할 때 상호 분비에 영향을 미치지 않으면서 효율적으로 이중 단백질을 분비할 수 있는 항암 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 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 2007년 이래 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.

[0004] 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. 이에 암에 표적화되어 면역을 활성화시키는 것에 의해 항암면역치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하였다. 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.

[0005] 약독화된 살모넬라는 독성 뿐 아니라 면역 유발능 역시 저하되기 때문에, 최근에는 면역활성을 증가시키거나 항암 효능을 갖는 각종 이펙터 물질들을 발현하도록 유전자 재조합된 균주들을 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 이루어지고 있다. 항암 활성화는 암세포에 세포독성을 나타내는 물질이 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포를 사멸시키는 경로와, 숙주의 선천성 또는 후천성 면역반응을 유도하여 암세포에 대항할 수 있도록 하는 경로에 의해 얻어질 수 있다. 따라서 암세포를 사멸시키는 물질과 면역반응을 유도하는 물질을 항암 균주가 발현하도록 하는 경우, 약독화된 항암 균주의 면역 유발능을 보완하여 상기 두 가지 경로 모두를 통하여 항암 활성을 유도할 수 있으므로, 암의 치료에 대한 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0006] 이펙터 물질을 발현하는 항암 균주가 항암 활성을 나타내기 위해서는, 많은 경우에 단순히 이펙터 물질을 발현하는 것에 그치지 않고 발현된 물질을 세포 밖으로 분비하여야 한다. 이에 본 발명자들은 암세포를 사멸시키는 ClyA와 단백구를 분화시키고 수지상세포로 성숙시켜 면역반응을 유도하는 GM-CSF를 동시에 분비할 수 있는 항암 균주와 이를 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 대해 2022년 10월 31일자로 특허출원 제10-2022-0142232호로 출원한 바 있다. ClyA(Cytolysin A) 단백질은 *E. coli*, 살모넬라 및 일부 장내 세균에 의해 발현되는 34 kDa 크기의 세포용해 단백질로, 멤브레인에 pore를 형성하여 타겟-세포를 사멸시킨다. 이러한 세포 사멸 특성을 이용하여 ClyA를 암세포에 표적화시킨 후 발현되도록 하여 암을 치료하려는 시도들이 진행되었다. 상기 균주에서는 한 가지 인두서에 의해 두 개의 단백질이 동시에 발현되므로 작동이 편리하고, 독립적인 분비 기작에 의해 작동하는 이중 분비시스템으로 ClyA와 GM-CSF가 분비되기 때문에 효율적인 분비가 가능하다는 장점이 있다. 그러나 하나의 인두서에 의해 이중 단백질의 발현을 동시에 조절하는 경우에는, 인두서의 제한적인 양으로 인해 하나의 단백질을 발현할 때에 비해 그 발현 효율이 저하될 수 밖에 없으며, 그에 따라 분비되는 양도 감소한다는 문제가 있었다. 또한 도 1에서 확인할 수 있듯이, 동시에 발현되는 단백질의 분비량 사이에 격차가 크며, 발현 비율을 조절하기 어려운 문제도 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허출원 제10-2022-0142232호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 서로 다른 기작으로 작동하는 이중 분비시스템을 탑재하여 각각의 분비에 영향을 미치지 않으므로 서로 다른 두 가지 유전자에 의해 발현되는 단백질을 동시에 또는 시차를 두어 효과적으로 분비할 수 있는 항암 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 암세포를 직접적으로 사멸시키는 단백질과 암세포에 대한 면역활성을 강화하는 단백질을 분비하여 항암 활성이 우수한 항암 균주를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다. 이하, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물과, (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 이중 분비시스템을 탑재한 것을 특징으로 하는 항암 균주에 관한 것이다.

[0013] 상기 균주는 감염 시 암에 표적화되는 것으로서, 대장균이나 약독화 살모넬라균, 시겔라, 아시네토박터균, 녹농균, 리스테리아, 클로스트리디움 또는 장내미생물(유익균), 프로바이오틱스를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 살모넬라 균주는 면역유도 활성이 우수하지만, 그대로 사용하기에는 병원성이 너무 강하기 때문에 약독화 살모넬라 균주를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 "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. 예를 들면, 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 균으로부터 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.

[0015] 본 명세서에서 "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터를 의미한다. 상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 각각 독립적으로 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 및 pflE 프로모터로 이루어진 균으로부터 각각 선택될 수 있다.

[0016] 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 동일한 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 할 수 있다. 이 경우, 한 가지 유도물질만 처리하는 것에 의해 이중 분비시스템이 동시에 작동되도록 할 수 있으므로 보다 간편하게 사용할 수 있다는 장점이 있다. 혹은, 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터가 서로 다른 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 하여도 무방하다. 이 경우에는 이중 분비시스템을 하나씩 순차적으로 스위칭할 수 있어 ClyA와 사이토카인의 발현 및 분비의 정도를 각각 상황에 따라 제어할 수 있다는 장점이 있다.

[0017] 상기 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자에는 하나 이상의 태그가 결합되도록 할 수 있다. 태그는 ClyA 단백질의 항암 활성에 영향을 미치지 않음을 하기 실시예에서 확인하였다. ClyA 단백질에 태그가 결합된 경우 검출이 용이하도록, 예를 들어 형광물질로 표지하는 것에 의해 암 부위에 표적화된 후 ClyA 단백질이 정상적으로 분비되고 있는 지, ClyA 단백질의 분비가 체내에서 얼마나 지속되는 지를 용이하게 확인할 수 있다. 또한 균주가 암에 표적화되는 특성을 이용하여, 암의 치료 뿐 아니라 암 크기가 줄어드는 지를 동시에 확인하여 치료과정을 추적하는 데에도 이용될 수 있다. 하기 실시예에서는 ClyA 단백질을 암호화하는 유전자와 flag tag가 결합된 서열번호 1의 ClyA-flag를 사용하였으나, 이외에도 예를 들면, His tag, Myc tag, HA tag, GST tag 등이 결합되도록 할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] ClyA 단백질을 암호화하는 유전자에 결합된 태그는 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터가 서로 다른 유도물질에 의해 작동이 스위칭되도록 한 경우 추가적인 유용성을 갖는다. 즉, 상기 항암 균주가 암 부위에 표적화한 후 먼저 제1 유도물질을 처리하는 것에 의해 제1 유도성 프로모터가 작동되도록 스위칭하여 항암 효과를 갖는 ClyA 단백질을 분비시킬 수 있다. 분비된 ClyA는 세포용해 활성으로 항암 효과를 나타낼 뿐 아니라, 이를 검출하는 것에 의해 암 부위에 표적화가 이루어진 것을 확인할 수 있다. 이후 제2 유도물질을 처리하여 제2 유

도성 프로모터가 작동되도록 스위칭하여 GM-CSF 단백질을 분비시키며 추가적인 면역항암효과를 나타내도록 할 수 있다. 이러한 순서 또는 반대의 순서 또는 동시 처리 등 여건에 따라 다양한 방법으로 본 발명의 항암 군주를 사용할 수 있다.

[0019] 사이토카인은 면역세포로부터 분비되는 5~20 kDa의 작은 단백질로, pmol/L 정도의 낮은 농도에서 특정 수용체와 결합하여 면역반응에 관여한다. 본 발명에서 상기 사이토카인 단백질은 특히 면역조절 기능을 갖는 인터루킨(IL, interleukin), 림포카인(limpokine), 인터페론(IFN, interferon), 종양괴사인자(TNF, tumor necrosis factor)일 수 있다. 구체적으로는 예를 들어 TNF α , INF α , INF β , INF γ , IL-1 β , IL2, IL12 및 IL15일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 연결된 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자는 flgM과 사이토카인의 융합단백질(이하에서는 "flgM-사이토카인"이라 칭한다)을 암호화하는 것을 특징으로 하며, 상기 유전자를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환된 군주는 면역 유도능을 갖는 flgM-사이토카인을 세포 밖으로 분비시킨다. 따라서 발현된 사이토카인으로 인하여 군주가 사멸되지 않고 안정적이고 지속적으로 융합 단백질을 발현/분비할 수 있으며, 분비된 융합단백질은 사이토카인의 면역 유도능을 유지하여 면역항암효과를 나타낸다. 또한 flgM-사이토카인 단백질의 분비는 플라젤라 분비시스템에 의해 분비되는 것으로, ClyA와는 독립적인 분비시스템에 의해 분비되므로 ClyA와 동시에 발현 및 분비가 유도된다고 하더라도 분비 효율이 저하되지 않는다. 또한 분비된 ClyA 단백질은 암세포를 직접적으로 사멸시키고, flgM-사이토카인 단백질은 중앙 미세환경의 면역세포에 영향을 미쳐 면역반응을 유발하는 것에 의해 이중 기작으로 항암 효능을 나타낸다.

[0021] 본 발명의 제조합 군주를 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-사이토카인의 발현량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(데이터 미도시).

[0022] 상기 항 시그마 팩터 flgM 유전자와 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자의 연결은 flgM 유전자와 사이토카인 단백질을 암호화하는 유전자가 직접 결합되어 있거나, 혹은 링커를 통하여 연결될 수 있다. 예를 들어, 14개의 아미노산을 암호화하는 유전자 서열을 갖는 링커를 매개로 연결된 서열번호 2의 유전자를 사용할 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자라면 링커의 길이나 서열을 적절하게 변형하는 것은 용이할 것이다. 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.

[0023] 하기 실시예에서는 사이토카인으로 TNF α 와 ClyA를 각각 독시사이클린과 아라비노스에 의해 유도되도록 하여 약독화 살모넬라 군주에서 다른 추가적인 처리 없이 발현 및 분비되는 것을 확인하였다. ClyA C-termianl에 FLAG을 tagging 함에도 단백질의 활성화에는 변화가 없었으며, 분비된 단백질이 암세포를 용해하여 사멸시키는 것을 확인하였다. TNF α 를 사용한 융합단백질 flgM-TNF α 는 독시사이클린에 의해 유도되어 약독화 살모넬라 군주에서 발현되어 세포 외로 분비되고, 분비된 단백질에 의해 면역세포의 분화를 유도하여 면역반응을 향상시키는 것을 확인하였다. 상기 군주는 2024년 3월 12일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁번호 KCTC19174P로 기탁하였다.

[0024] 본 발명에 의해 이중 형질전환된 군주는 형질전환체에 도입된 plasmid origin이 다르므로 두 개의 플라스미드가 독립적으로 존재할 수 있으며, 각각의 플라스미드에 들어있는 ClyA와 flgM-사이토카인이 형질전환체 군주 밖으로 분비되는 기작이 다르기 때문에 상호간에 분비에 영향을 미치지 않아 flgM-사이토카인에 의한 중앙미세환경의 면역세포에의 영향, ClyA에 의한 암세포 직접 사멸 등 효능의 극대화가 가능하게 된다. 특히 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터를 다른 유도물질에 의해 작동되도록 스위칭하고, 상기 유도물질의 처리에 시차를 두는 것에 의해 분비 뿐 아니라 발현에도 상호간에 영향을 미치지 않도록 하여 효능을 더욱 향상시킬 수 있다.

[0025] 본 발명에서 형질전환 방법은 통상의 방법에 따르며, 예를 들어 칼슘 클로라이드 방법, 전기천공법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명은 또한 상기 항암 군주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 상기 군주의 투여 후 상기 군주가 암 조직에 표적화되면 상기 유도성 프로모터의 작동을 유도하는 약물을 투여하여 군주로부터 ClyA 단백질과 flgM-사이토카인 융합단백질의 분비를 동시에 또는 순차적으로 유도하는 방식으로 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물은 항암용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으

며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 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

- [0028] 이상과 같이 본 발명의 항암 군주에 의하면, 서로 다른 분비 기작을 갖는 이중 분비시스템을 탑재하여 세포 용해 단백질로 암세포 사멸효과를 나타내는 ClyA 단백질과, 면역을 활성화시키는 사이토카인 단백질을 암세포에 표적화된 후에 상호 분비에 영향을 미치지 않고 함께 분비할 수 있어 군주 자체의 면역 유도 활성과 함께 ClyA와 사이토카인에 의한 항암 효과를 유도할 수 있으므로 항암 효과를 극대화시킬 수 있다. 더하여 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터가 서로 다른 유도물질에 의해 시차를 두고 작동되도록 하는 경우에는, 분비뿐 아니라 ClyA와 사이토카인의 발현 역시 서로 영향을 미치지 않기 때문에 항암 효과를 더욱 향상시킬 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명의 항암 군주가 대장균이나 비피도 박테리움과 같은 병원성이 낮은 균주인 경우, 종래 상기 균주는 면역 유발 효과가 낮다는 단점을 보완하여 안전하면서도 효과적으로 항암 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 종래기술에서 하나의 인두서에 의해 발현되는 단백질의 분비량 차이를 보여주는 전기영동 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 의한 항암 군주의 모식도이다.
- 도 3a는 본 발명의 실시예에서 제작된 ClyA-flag의 염기서열이다.
- 도 3b는 본 발명의 실시예에서 제작된 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ 플라스미드의 개념적인 맵이다.
- 도 4a는 본 발명의 실시예에서 제작된 flgM-mTNFa의 염기서열이다.
- 도 4b는 본 발명의 실시예에서 제작된 tetR- flaM-mTNFa-flhDC- pBad33 cm 플라스미드의 개념적인 맵이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 의한 형질전환체에서 ClyA 및 mTNFa의 발현을 보여주는 웨스턴 블랏 결과 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에 의한 형질전환체 배양액의 상층액 처리가 암 세포 증식에 미치는 영향을 보여주는 현미경 사진이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예에 의한 형질전환체 배양액의 상층액 처리에 따른 CCK assay 및 LDH assay 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에 의한 형질전환체의 배양액의 상층액 처리에 의한 대식세포 형태변화를 보여주는 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하 첨부된 도면과 사전실험 및 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 사전 실험 및 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.
- [0032] [실시예]
- [0033] 실시예 1 : 약독화 살모넬라 #1237 균주의 제작
- [0034] aroA aroD rcsB asd- 돌연변이 살모넬라 균주(#1237 균주)를 만들기 위하여, 살모넬라 aroA aroD asd- 균주와 aroA aroD rcsB- 균주(한남대 이인수 교수로부터 분양)를 이용하여 P22 형질도입(transduction)을 수행하였다.
- [0035] 구체적으로, 37℃에서 16시간 진탕배양한 aroA aroD rcsB- 균주 0.2 ml에 2 ml의 P22 broth(0.2% glucose, 1% EX50 salts, P22 stock($\sim 10^{11}$ /ml))를 넣은 다음 37℃에서 9시간 배양하였다. 원심분리를 통해 상층액을 새로

운 튜브에 옮긴 다음 클로로포름을 처리하여 rcsB- 돌연변이가 포함된 rcsB- lysate(Kan^r)를 제작하였다.

[0036] 37℃에서 16시간 진탕배양한 0.1 ml aroA aroD asd⁻ 균주에 위에서 얻은 rcsB- lysate(Kan^r)를 1:1 부피비로 혼합하여, 상온(25 ℃)에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 PBS 용액에 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³의 비율로 희석하여 LB kan DAP plate에 도말하였다. LB kan dap+ plate에서 3~4회 계대 배양하여 aroA aroD rcsB asd⁻ 살모넬라 균주를 확립하고, 코스모진택에 의뢰하여 시퀀싱으로 확인하였다.

[0037] 실시예 2: 플라스미드의 준비

[0038] (1) ClyA 유전자를 가지는 플라스미드 클로닝

[0039] 대장균 MG1655 K-12(야생종)의 ClyA 유전자의 염기서열(NCBI)을 바탕으로 ClyA 유전자 전후에 클로닝을 위해 각각 NheI과 HindIII site를 삽입하고, C-terminal에 flag tag(붉은색)를 삽입하여 ClyA-flag를 합성하였다(서열번호 1). 이 과정은 전문업체(㈜코스모진택)의 유전자 합성 서비스를 통하여 이루어졌다. 제작된 ClyA-flag의 염기서열 정보를 도 3a에 도시하였다.

[0040] 합성된 ClyA-flag 플라스미드를 NheI(쐐다카라)과 HindIII(쐐다카라)를 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 처리한 후 전기영동을 실시하였다. 전기영동 gel에서 약 1000bp의 DNA를 추출(Gel extraction kit : Qiagen)하여 ClyA Insert를 확보하였다.

[0041] pBad18 asd⁺ 플라스미드(충남대 임현만 교수 연구실로부터 분양)를 NheI(쐐다카라)과 HindIII(쐐다카라) 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시키고, 이어서 반응산물을 PCR purification kit(㈜Qiagen)로 정제하여 VECTOR DNA를 준비하였다.

[0042] 준비된 ClyA Insert와 VECTOR DNA를 25℃에서 30분 ligation(㈜Invitrogen) 시킨 다음 DH5a competent cell(충남대 임현만 교수 연구실로부터 분양)에 형질전환 시킨 후, LB amp(ampicillin 함유) 고체 배지에 도말하고 배양하여 콜로니를 배양하였다.

[0043] 배양된 콜로니 중 6개를 선별하여, LB amp(ampicillin 함유) 액체 배지에서 37℃에서 16시간 배양한 후, DNA를 추출하였다. 이후 NheI(쐐다카라)과 HindIII(쐐다카라) 각각 10U, 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동하여 1000bp band를 확인하고 염기서열을 분석(㈜코스모진택)하여 ClyA(C-flag)-pBad18-asd⁺ 플라스미드를 구축하였다. 구축된 ClyA(C-flag)-pBad18-asd⁺ 플라스미드의 개념적 맵을 도 3b에 도시하였다.

[0044] 참고로, asd 유전자는 효소인 aspartate-semialdehyde dehydrogenase를 암호화한다. 디아미노피메산(DAP)은 그람 음성균의 세포벽 합성에 필요한 peptidoglycan의 필수 성분으로 DAP가 없으면 asd⁻ 세균은 빠르게 죽게 된다. DAP는 포유류 조직에 존재하지 않기 때문에 asd⁻ 돌연변이 세균은 반드시 asd⁺ 플라스미드를 가져야만 살 수 있다. pBAD18 asd⁻ 플라스미드는 하루 정도 지나면 균체에서 소실되는데, 이를 방지하기 위해 pBad18 asd⁺ 플라스미드를 사용하였다.

[0045] (2) 아라비노스에 의해 발현되는 mTNFa 유전자를 가지는 플라스미드 클로닝

[0046] 출원번호 10-2021-0010768로 출원된 'GM-CSF의 분비를 위한 유전자 구조물 및 이에 의해 형질전환된 항암 재조합 균주'에 사용된 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 / ppGpp- (수탁번호 : KCTC14455BP)에서 통상의 방법으로 flgM-gmCSF-flhDC-pBad33 플라스미드 (cm)를 추출하여 flgM-GMCSF 분비에 사용되는 플라스미드를 확보하였다. 상기 플라스미드를 주형으로 NheI(쐐다카라)와 SacI(쐐다카라)를 각각 10U씩 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이후, Gel extraction kit(㈜Qiagen)로 반응산물로부터 6000 bp 정도의 DNA를 추출하여 VECTOR DNA를 얻었다.

[0047] 이와 별도로 (주)코스모진택의 유전자 합성 서비스를 통하여 flgM-mTNFa를 합성하였다(서열번호 2). 클로닝을 위해 N-말단에는 NheI 서열(GCTAGC)을, C-말단에는 SacI 서열(GAGCTC)을 삽입하였다. 제작된 flgM-mTNFa의 염기서열 정보를 도 4a에 도시하였다.

[0048] 합성된 flgM-mTNFa 플라스미드를 NheI(쐐다카라)과 SacI(쐐다카라)를 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시킨 후 반응산물을 PCR purification kit(㈜Qiagen)로 정제하여 insert DNA를 확보하였다.

[0049] 상기 VECTOR DNA와 flgM-mTNFa Insert를 25℃에서 30분 ligation(㈜Invitrogen) 시킨 다음 DH5a competent cell에 형질전환 시킨 후, LB cm 고체 배지에 도말하고 배양하여 콜로니를 배양하였다. 배양된 콜로니 중 6개를 선별하여, DNA를 추출하고 NheI(쐐다카라)과 SacI(쐐다카라) 각각 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동하여 약800bp band를 확인하고 염기서열을 분석(㈜코스모진택)하여 flhDC+ flgM-mTNFa pBad33 cm 플라스미드

를 확립하였다.

(3) 독시사이클린에 의해 발현되는 mTNFa 유전자를 가지는 플라스미드 클로닝

먼저 arabinose에 의해 발현이 유도되는 Vector를 doxycycline에 의해 유도되는 Vector로 변형하였다. 이를 위하여 (2)에서 추출한 f1gM-gmCSF-f1hDC-pBad33 플라스미드 (cm)를 ClaI(썩다카라)과 NheI(썩다카라)의 효소 각각 10U와 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응산물을 Gel extraction kit(썩Qiagen)를 사용하여 gel에서 1300 bp의 DNA를 추출하여 VECTOR DNA를 준비하였다.

insert로는 doxycycline에 유도되는 tetR repressor를 사용하였다. insert DNA를 얻기 위하여 등록특허 제10-2246740호에 사용된 Salmonella typhimurium LT2 Δ galE::tetRA, Δ f1hDC::Tn10 (KCTC18801P) 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하기 표 1의 프라이머쌍과 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 2X master mix(썩다카라)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 98℃ 3분, 98℃ 10초-55℃ 5초-72℃ 1분의 35 사이클, 72℃ 3분의 조건에서 수행하였다. PCR 산물을 ClaI(썩다카라)와 NheI(썩다카라) 각각 10U 사용하여 37℃에서 2시간 반응시키고, 이어서 반응산물을 PCR purification kit(썩Qiagen)로 정제하여 INSERT DNA를 완성하였다.

표 1

tetR-cla1-for	gatcgatcatcgatttaagaccactttcacatttaagtgttttcta	서열번호 3
tetR-nhe1-re	cataggatcaaacctctgctagcacttttctctatcactgatag	서열번호 4

각각 준비된 INSERT DNA와 VECTOR DNA를 25℃에서 30분 ligation(썩Invitrogen) 시킨 다음 DH5a competent cell에 형질전환 시킨 후, LB cm 고체 배지에 도말하고 배양하여 콜로니를 배양하였다. 배양된 콜로니 중 6개를 선별하여, LB cm(chloramphenicol 함유) 액체 배지에서 37℃에서 16시간 배양한 후, DNA를 추출하였다. 이 후 NheI(썩다카라)과 HindIII(썩다카라) 각각 10U를 사용하여, 37℃에서 2시간 반응시킨 후 전기영동하여 1.3 kbp band를 확인하고, 염기서열을 분석(썩코스모진텍)하여 f1hD + tetR-f1gM-GMCSF 플라스미드를 구축하였다. f1hD + tetR-f1gM-GMCSF 플라스미드를 주형으로 NheI(썩다카라)와 SacI(썩다카라)를 각각 10U씩 사용하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. Gel extraction kit(썩Qiagen)로 반응산물로부터 6000 bp 정도의 DNA를 추출하여 f1hDC + tetR- Pbad 33 VECTOR DNA를 얻었다.

상기 VECTOR DNA와 (2)에서 제조한 f1gM-mTNFa Insert를 25℃에서 30분 ligation(썩Invitrogen) 시킨 다음 DH5a competent cell에 형질전환 시킨 후, LB cm 고체 배지에 도말하고 배양하여 콜로니를 배양하였다. 배양된 콜로니 중 6개를 선별하여, DNA를 추출하고 NheI(썩다카라)과 SacI(썩다카라) 각각 10U와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 전기영동하여 약800bp band를 확인하고 염기서열을 분석(썩코스모진텍)하여 tetR-f1aM-mTNFa-f1hDC-pBad33 cm 플라스미드를 확립하였다. 상기 구축된 플라스미드의 개념적 맵을 도 4b에 도시하였다.

실시예 3: 형질전환체의 제작

실시예 2에서 준비한 ClyA(C-flag)-pBad18-asd+ 플라스미드와 tetR-f1aM-mTNFa-f1hDC-pBad33 cm 플라스미드를 실시예 1에서 제작한 1237 균주에 형질전환시키고, LB amp+cm 고체배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다. 해당 형질전환체는 #2216으로 명명하였으며, 제작된 형질전환체를 2024년 3월 12일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁번호 KCTC19174P로 기탁하였다.

실시예 4: 형질전환체의 분비 및 활성 평가

(1) ClyA와 mTNFa의 분비 확인

실시예 3에서 얻은 형질전환체 #2216의 single colony를 LB amp+cm 액체배지에 접종한 후 12-16시간 37℃(이하 배양온도는 동일) 진탕 배양기에서 배양하였다. 새로운 LB amp+cm 액체 배지에 OD₆₀₀이 0.05가 되도록 세포를 맞춰준 후 37℃에서 2시간 진탕배양하였다.

OD₆₀₀이 0.4-0.6일 때 doxycycline 100 ng/ml와 arabinose을 0.2%(final)를 처리한 처리구(+)와 처리하지 않은 대조구(-)로 구분하여 5시간 진탕 배양시킨 후, 시료를 수집하였다. 1 ml 배양액을 원심분리한 후 pellet과 supernatant(상층액)을 분리하여 시료를 준비하였으며, 상층액은 다시 0.2 μ m filtering으로 균을 완전히 제거

하고 pall사의 nanosep(OD010C35 3K omega)를 이용하여 농축하였다. 이와 별도로 전체 세포 배양액(Whole cell) 1 ml 시료를 준비하였다.

[0062] 각각 얻어진 시료 50 μ l를 사용하여 웨스턴 블랏에 의해 ClyA 단백질 및 mTNF α 의 발현량을 확인하였다. 도 5는 그 결과를 보여주는 것으로 형질전환 균주에서 arabinose와 doxycycline에 의해 ClyA 및 mTNF α 의 발현이 유도되며(Whole cell(3, 4 lane)과 pellet(5,6 lane)), 균주 밖으로 잘 분비됨(supernatant(1,2 lane))을 확인할 수 있다. 또한 동시 분비 시에도 ClyA와 mTNF α 의 분비 효율이 모두 우수함을 확인하였다.

[0063] (2) 세포 배양액의 암세포 사멸 활성 검정

[0064] 상기 (1)에서 얻어진 세포 배양액의 상층액을 대장암 종양 세포주에 처리하여 암세포 사멸 활성을 검정하였다. 대장암 종양 세포주로는 HT-29, SW480 및 CT26을 American Type Culture Collection으로부터 구입하여 사용하였다.

[0065] 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 세포를 성장시킨 인간 대장암 세포주 HT-29, SW480 또는 CT26을 cell이 2×10^5 개일 때, 위에서 얻어진 상층액을 각각 50배 농축하여 200 μ l씩 처리한 후 24시간 배양하였다.

[0066] 도 6은 배양액을 100배 배율의 현미경으로 관찰한 결과를 보여주는 것으로, 유도제(arabinose+doxycycline)를 처리하지 않은 상층액의 처리구(non-induction)에서는 균주를 처리하지 않은 대조구(PBS)에 비해 약 10% 정도 세포가 감소하여 균주 자체가 암세포 사멸 활성을 나타냄을 보여주었다. 균주에 추가로 유도제를 처리한 상층액의 처리구(induction)에서는 50% 이상의 세포 수가 감소하여 유도제를 처리한 상층액이 암 세포의 성장을 크게 저해하거나 암 세포를 사멸시킴을 확인할 수 있었다.

[0067] 세포 사멸 기작은 증식을 멈추거나 세포가 수축되고 DNA가 일정한 조각으로 분해되는 기작인 아포토시스(Apoptosis)와 세포가 붓고 막이 터지면서 내부의 구성 물질이 세포 외부로 방출되는 세포괴사(Necroptosis)가 있다. ClyA는 세포막에 pore를 형성하여 세포괴사를 야기하는 것으로 알려져 있다. 이에 상기 상층액 처리에 의한 세포 사멸이 분비된 ClyA에 의한 세포괴사에 기인한 것인지 추가로 확인하기 위해 CCK assay와 LDH assay를 수행하였다. CCK assay와 LDH assay는 각각 CCK assay : CCK : DogenBio (ez-500, EZ-Cytox), EZ-LDH Cell cytotoxicity assay kit(DG-LDH500, DoGEN)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였으며, 실험은 3회 반복으로 실시하였다.

[0068] 도 7의 (A)는 CCK assay 결과를 통해 세포 생존율을 정량적으로 보여주는 그래프로, 살모넬라 균주의 배양 상층액 자체도 대장암 세포 HT29와 CT26의 생존율을 저하시키며(non-induction), 유도제를 처리한 경우에는(induction) 모든 대장암 세포의 사멸 효과가 현저함을 보여준다. 또한 도 7의 (B)에 도시된 LDH assay 결과에서 유도제를 처리하지 않은 살모넬라 균주 자체는 대조구와 차이가 없어 세포 괴사를 유발하지 않음을 시사하였다. 이에 반해, 유도제 처리구에서는 대조구에 비해 LDH 방출이 1.5배, CT26의 경우 2배 이상 증가하여 암세포 사멸이 균주가 분비한 ClyA의 세포괴사에 의해 유도되었음을 확인할 수 있었다.

[0069] (3) 세포 배양액의 면역 유도 활성 검정

[0070] 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM에서 세포를 성장시킨 마우스 대식세포주 RAW264.7 세포(한국세포주은행에서 분양)를 cell이 2×10^5 개일 때, (1)에서 얻어진 배양액의 상층액을 각각 50배 농축하여 200 μ l씩 처리한 후 24시간 배양하였다.

[0071] 도 8은 배양 후 현미경으로 관찰한 이미지로, RAW264.7 cell은 균주를 처리하지 않은 경우(PBS)에는 분화되지 않아 둥글둥글한 모양이었다. 유도제를 처리하지 않은 상층액을 처리하면(non-induction) 약 10%의 세포들이 길쭉한 형태로 변형이 생겼다. 유도제를 처리한 상층액을 처리하면(induction) 50% 이상의 세포들이 길쭉하거나 별 모양으로 분화된 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 의한 (+)상층액에 의해 RAW264.7 cell이 형태학적으로 M1 type의 macrophage로 분화됨을 알 수 있다. 이것으로 본 발명에 의한 형질전환체에서 유도제 처리에 의해 분비된 flgM-mTNF α 가 TNF α 와 동일하게 면역 유도 활성이 있음을 나타낸다.

수탁번호

[0072]

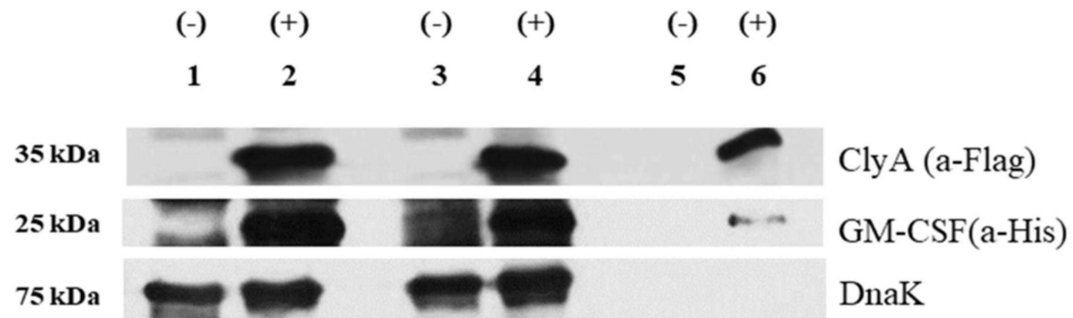
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19174P

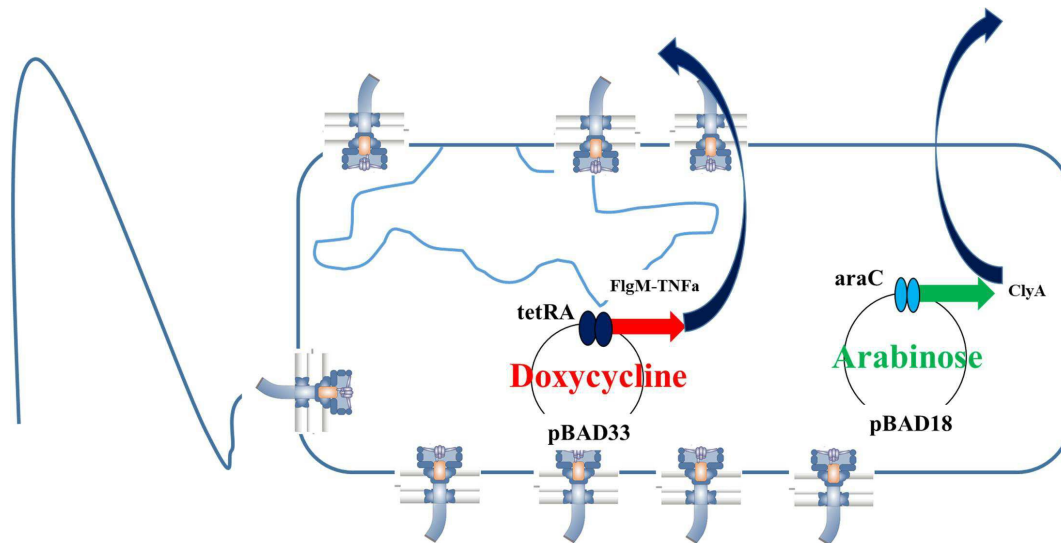
수탁일자 : 20240312

도면

도면1



도면2



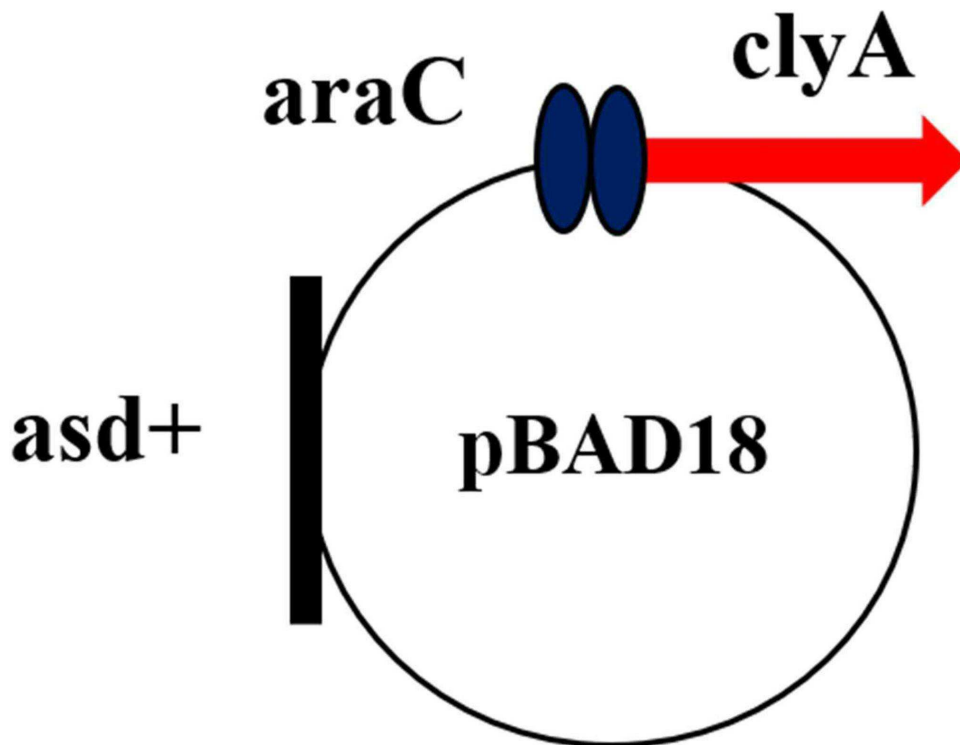
도면3a

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCT

Atgactgaaatcgttgcagataaaacggtagaagtagttaaaacgcaatcgaaaccgcagatggagcattagatct
ttataataaatatctcgatcaggtcatcccctggcagaccttgatgaaaccataaaagagttaagtcgctttaaac
aggagtattcacaggcagcctccgttttagtcggcgatattaaaccttacttatggatagccaggataagtat
gaagcaaccacaacagtgatgaatgggtggtgtggtggtgacgacgaattgctcgacggtatattttgctatttgatga
gtacaatgagaagaagcatccgccagaaagacattctcattaaggtactggatgacggcatcacgaagctgaatg
aagcgcaaaaatccctgctggtgaagctcacaagtttcaacaacgcttcgggaaactgctggcgtagatagccag
ttaaccaatgatttttcagaaaaaagcagctatttccagtcacaggtagataaaatcaggaaggaagcatatgccgg
tgccgcagccggtgctgctgccggtccatttggattaatcatttcctattctattgctgcgggcgtagttgaaggaa
aactgattccagaattgaagaacaagttaaaatctgtgcagaatttctttaccaccctgtctaacacggttaaacaa
gcgaataaagatatcgatgccgcaaatgaaattaaccaccgaaatagccgccatcggtgagataaaaacggaac
tgaacaaccagattctacgttgattatgatgatttaatgtttctttgctaaaagaagcggccaaaaaatgatta
acacctgtaatgagtatcagaaaagacacggtaaaaagacactctttgaggtacctgaagtc

GGCAGCGATTATAAAGATGATGATGATAAACTTGCCGCATAAaagctt

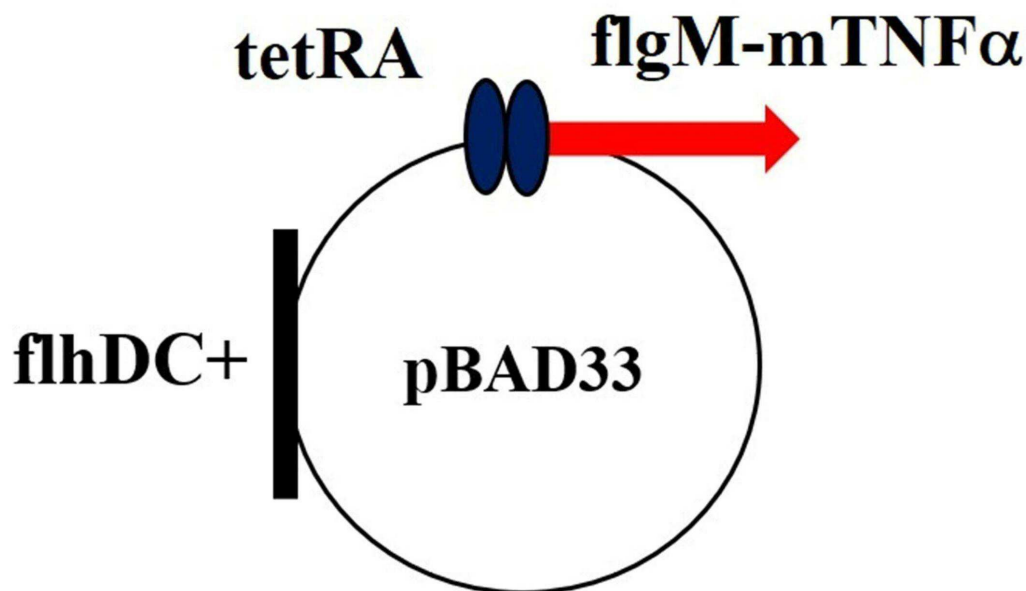
도면3b



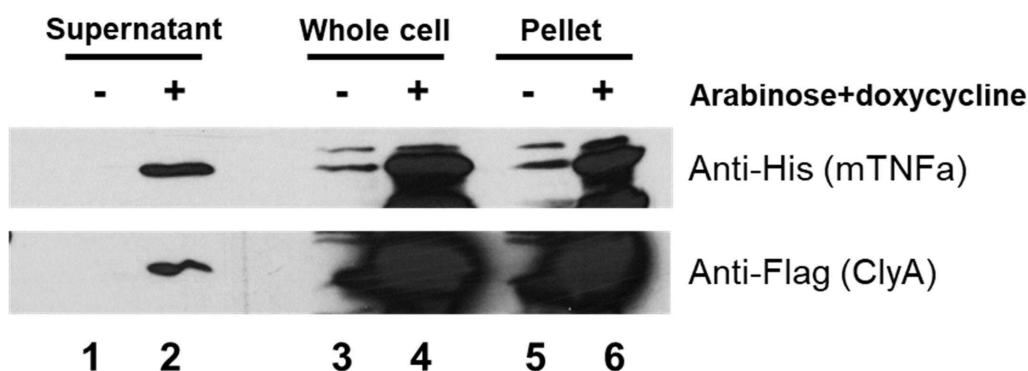
도면4a

GCTAGCAGGAGGTTTGATCCTATGAGCATTGACCGTACCTCACCTTTGAAACCCGTTAGCACTGTCCAGAC
GCGCGAAACCAGCGACACGCCGGTACAAAAAACGCGTCAGGAAAAAACGTCCGCCGCGACGAGCGCCAGCG
TAACGTTAAGCGACGCGCAAGCGAAGCTCATGCAGCCAGGCGTCAGCGACATTAATATGGAACGCGTCGAA
GCATTA AAAACGGCTATCCGTAACGGTGAGTTAAAAATGGATACGGGAAAAATAGCAGACTCGCTCATTG
CGAGGCGCAGAGCTACTTACAGAGTAAAAAAGCGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACAGCAGCGGCG
GCATGCTCCGTAGCAGCAGCCAGAATAGTAGCGATAAACCGGTTGCCCATGTTGTTGCAAATCATCAGGTT
GAAGAACAGCTGGAATGGCTGAGCCAGCGTGCAAATGCACTGCTGGCAAATGGTATGGATCTGAAAGATAA
TCAGCTGGTTGTTCCGGCCGATGGTCTGTATCTGGTTTATAGCCAGGTGCTGTTTAAAGGTCAGGGTTGTC
CGGATTATGTTCTGCTGACCCATACCGTTAGCCGTTTTGCCATTAGCTATCAGGAAAAAGTTAATCTGCTG
AGCGCAGTTAAAAGCCCGTGTCGAAAGATACCCCGGAAGGTGCCGAAGTAAACCGTGGTATGAACCGAT
TTATCTGGGTGGTGTGTTTTTCAGCTGGAAAAAGGTGATCAGCTGAGCGCAGAAGTTAATCTGCCGAAATATC
TGGATTTTGCAGAAAGCGGTCAGGTTTATTTTGGTGTATTGCACTGtaagagctc

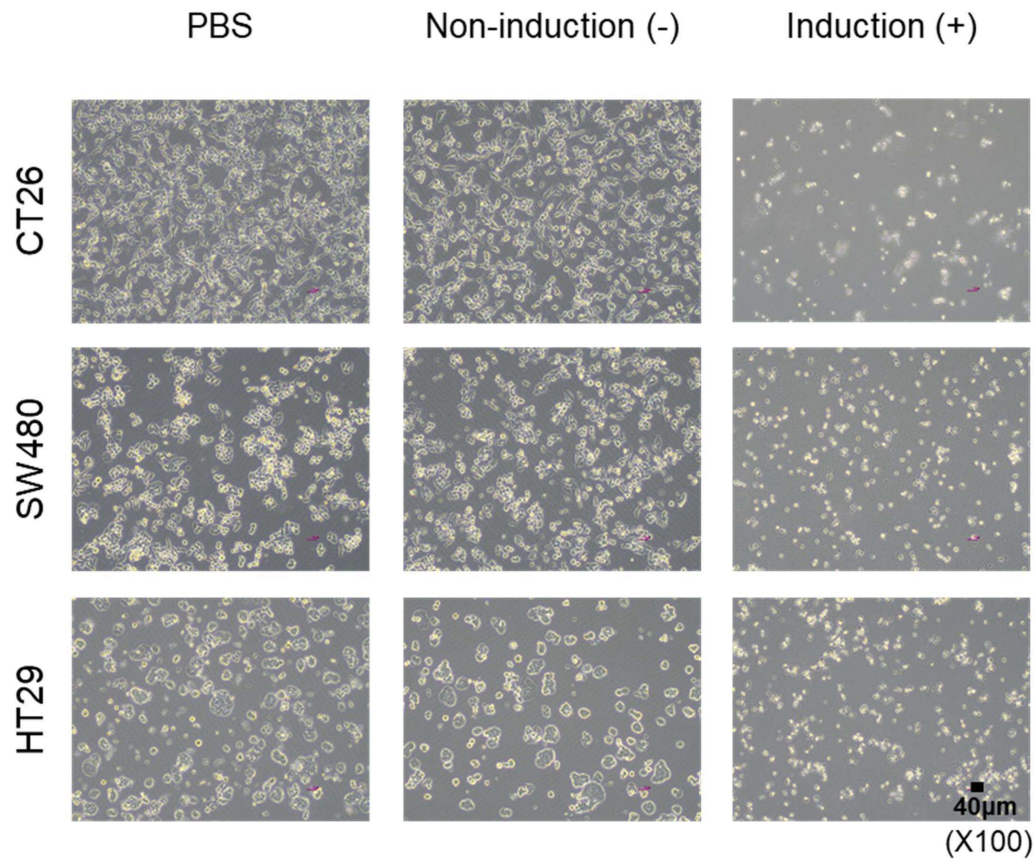
도면4b



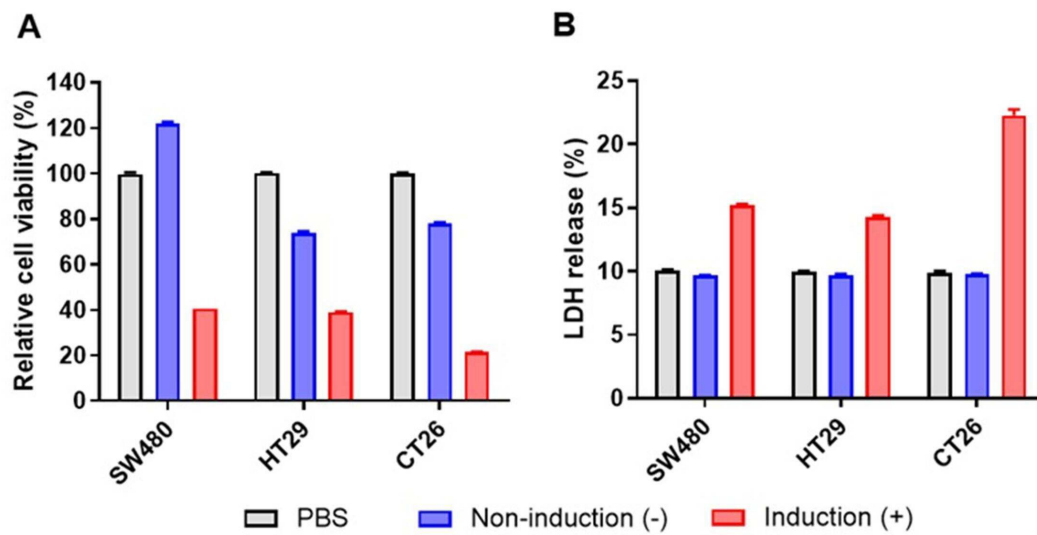
도면5



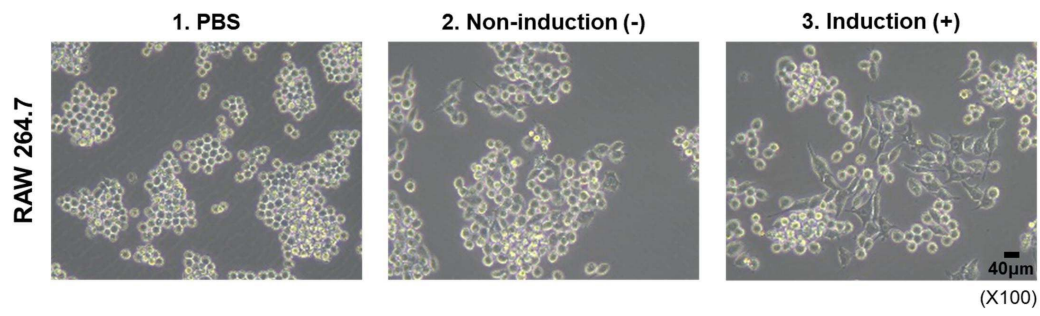
도면6



도면7



도면8



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.