

명세서

개질된 미토콘드리아 및 이의 용도

5 기술분야

본 발명은 미토콘드리아를 개질시킬 수 있는 융합 단백질, 상기 융합 단백질에 의해 개질된 미토콘드리아 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

10 배경기술

미토콘드리아는 세포 내 에너지 공급원인 아데노신 트라이포스페이트(ATP)의 합성 및 조절에 관여하는 진핵세포의 세포 소기관이다. 미토콘드리아는 생체 내 다양한 대사 경로, 예를 들어, 세포 신호처리, 세포 분화, 세포 사멸 뿐만 아니라, 세포 주기 및 세포 성장의 제어와 연관이 있다. 미토콘드리아는 자신의 유전체를 보유하고 있으며, 세포의 에너지 대사에 중추적 역할을 하는 소기관이다. 미토콘드리아는 전자 전달 및 산화적 인산화 과정을 통해 에너지를 생산하며, 세포사멸 신호 전달 경로에 관여하는 등 중요한 역할을 한다.

미토콘드리아의 기능 저하에 의한 에너지 생산 감소는 다양한 질병을 유발하는 것으로 보고된 바 있다. 미토콘드리아 유전체 및 단백질의 변이에 따라 전자전달연쇄반응의 기능이 저하될 경우, ATP 생산 감소, 활성산소 과다 생성, 칼슘 조절 기능의 저하 등이 일어나게 된다. 이러한 경우 미토콘드리아의 막 투과성에 변화가 일어나 세포사멸의 기능이 비정상적으로 일어나게 되고 이에 따른 암 및 난치성 질환이 야기될 수 있다.

이와 같이 미토콘드리아 기능 이상에 의해 발생하는 인간 질병으로는 미토콘드리아 관련 유전병(Wallace DC 1999), 당뇨병(Maechler P 2001), 심장질환(Sorescu D 2002), 파킨슨병이나 알츠하이머병 등과 같은 노인성 치매(Lin MT 2006), 그리고 각종 암의 발생(Petros JA, 2005)과 암전이(Ishikawa K, 2008) 등이 보고된 바 있다. 또한, 200여종 이상의 다양한 암에서 공통적으로 발견되는 특징은 세포사멸(apoptosis) 기능의 손상, 염증반응의 증가, 그리고 비정상적인 대사 작용의 증가로 이루어졌다. 이러한 모든 과정들은 미토콘드리아의 기능과

밀접한 관계를 가지고 있어 암과 미토콘드리아의 상관관계가 주목을 받고 있다.

한편, 정상세포의 경우는 전자전달계 과정을 통하여 글루코즈 한 분자당 36개의 ATP를 생산하지만 암세포의 경우는 정상세포와는 달리 충분한 산소 조건 하에서도 해당작용(aerobic glycolysis)을 통해 글루코즈 한 분자당 2개의 ATP를 5 생산하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 암세포가 정상세포와 달리, 에너지 측면에서 비효율적인 해당 과정을 이용하는 이유는 빠른 세포 증식을 위해 필요한 아미노산, 지질, 핵산 등을 생산하기 위한 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 암세포는 정상 세포에 비해 산소 요구량이 적으며 많은 양의 젖산이 생산되는 것으로 알려져 있다.

10 따라서, 암세포 내에서 일어나는 비정상적인 대사에 의한 암 미세환경의 조성 변화, 기능에 이상이 생긴 미토콘드리아에 의한 세포사멸의 억제와 염증반응의 증가 및 암세포 내의 정상적이지 않은 대사반응은 암 증식에 있어 매우 중요한 역할을 한다. 그러므로 이러한 특징을 이용하여 대사관련 항암제를 개발하는 것은 기존 항암제의 부작용과 경제성 문제를 해결할 수 있는 좋은 방안이 될 15 수 있을 것이다.

세포내 존재하는 미토콘드리아를 분리하여 체외에서 세포에 처리하거나 체내에 주입할 경우 미토콘드리아는 세포안으로 들어가는 현상이 알려져 있다. 그러나, 이러한 현상을 이용하여 세포로부터 분리된 정상적인 미토콘드리아를 체 20 내에 주입하여 미토콘드리아 기능 이상으로 인해 발생하는 질환들에 대한 치료를 하거나, 특히, 미토콘드리아를 전달체로 이용하여 특정 단백질을 세포에 효과적으로 전달함으로써 질환들을 치료할 가능성이 있는데 이에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

기술적 과제

25 본 발명의 목적은 다양한 약리 효과를 나타낼 수 있는 단백질을 효과적으로 세포 내로 전달할 수 있는 수단으로 미토콘드리아가 이용될 수 있다는 점을 보임으로써, 효과적인 단백질 전달 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 약물을 효과적으로 전달하기 위한 재조합 단백질을 제공하며, 이를 이용하여 제작된 개질된 미토콘드리아를 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 개질된 미토 30 콘드리아를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한

다.

과제 해결 수단

상기 과제를 해결하기 위하여, 외래 단백질이 미토콘드리아의 외막에 결합된 개질된 미토콘드리아를 제공한다. 또한, 상기 개질된 미토콘드리아를 제조하기 위하여, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드 및 약리 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 또한, 항체 또는 이의 단편 및 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

10 발명의 효과

외래 단백질이 결합된 미토콘드리아를 인체에 투여할 경우, 외래 단백질이 효과적으로 세포 내로 전달될 수 있다. 또한, 세포 내로 전달된 약리 활성 단백질에 의해 세포의 손상된 기능을 복구할 수 있다. 뿐만 아니라, 약리 활성 단백질을 포함하는 외래 단백질이 결합된 미토콘드리아가 세포 내로 전달될 경우, 세포 내에서 약리 활성 단백질은 미토콘드리아로부터 해리되어 유용한 역할을 기대할 수 있다. 아울러, 항체 단편을 포함하는 개질된 미토콘드리아는 타겟되는 세포에 효과적으로 전달될 수 있다. 특히, 암 조직의 표면에 존재하는 단백질을 타겟으로 하는 항체의 단편이 미토콘드리아의 표면에 결합된 경우, 암세포 내로 개질된 미토콘드리아가 효과적으로 전달될 수 있다. 따라서, 개질된 미토콘드리아의 도입에 의해, 세포의 손상된 전자전달계가 회복될 뿐 아니라, 개질된 미토콘드리아에 결합되어 있는 약리 활성 단백질에 의해 다양한 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 pTA-p53 제조하는 방법을 도식화한 것이다.
 도 2는 pET15b-UB-p53 벡터를 제조하는 방법을 도식화한 것이다.
 도 3은 대장균에서 UB-p53 단백질의 발현을 나타낸 것이다.
 도 4는 pET11C-TOM70-UB-p53 벡터를 제조하는 방법을 도식화한 것이다.
 도 5는 대장균에서 TOM70-UB-p53 단백질의 발현을 나타낸 것이다.
 도 6은 pET11C-TOM70-(GGGS)3-UB-p53 벡터를 제조하는 방법을 도식화한

것이다.

도 7은 대장균에서 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

5 도 8은 pET11C-TOM70-(GGGGS)3-p53 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 9는 대장균에서 TOM70-(GGGGS)3-p53 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 10은 pET15b-UB-p53-TOM7 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 11은 대장균에서 UB-p53-TOM7 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 12는 pCMV-p53-myc/His 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

10 도 13은 형질전환된 CHO에서 p53-myc/His 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 14는 TOM70-(GGGGS)3-p53 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

도 15는 정제된 TOM70-(GGGGS)3-p53 단백질을 나타낸 것이다.

도 16은 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

15 도 17은 정제된 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 단백질을 나타낸 것이다.

도 18은 UB-p53 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

도 19는 정제된 UB-p53 단백질을 나타낸 것이다.

도 20은 UB-p53-TOM7 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

도 21은 정제된 UB-p53-TOM7 단백질을 나타낸 것이다.

20 도 22는 pTA-GranzymeB 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 23은 pET11C-TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 24는 대장균에서 TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

25 도 25는 pET15b-UB-GranzymeB-TOM7 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 26은 대장균에서 UB-GranzymeB-TOM7 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 27은 TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB 단백질의 정제 결과를 나타낸 것이다.

30 도 28은 정제된 TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB 단백질을 나타낸 것이다.

도 29는 pTA-RKIP 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 30은 pET11C-TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 31은 대장균에서 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 32는 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질의 정제 결과를 나타낸 것이다.

도 33은 정제된 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질을 나타낸 것이다.

도 34는 pTA-PTEN 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 35는 pET11C-TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 36은 대장균에서 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 37은 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질의 정제 결과를 나타낸 것이다.

도 38은 정제된 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질을 나타낸 것이다.

도 39는 UB-GFP-TOM7 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

도 40은 정제된 UB-GFP-TOM7 단백질을 나타낸 것이다.

도 41은 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP 단백질을 정제한 후 이를 확인한 것이다.

도 42는 정제된 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP 단백질을 나타낸 것이다.

도 43은 pET15b-UB-scFvHER2-TOM7 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 44는 대장균에서 UB-scFvHER2-TOM7 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 45는 pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 46은 형질전환된 CHO에서 scFvHER2-TOM7-myc/His 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 47은 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질의 정제 결과를 나타낸 것이다.

도 48은 정제된 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질을 나타낸 것이다.

도 49는 pET15b-UB-scFvMEL-TOM7 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 50은 대장균에서 UB-scFvMEL-TOM7 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 51은 pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

다.

도 52는 형질전환된 CHO에서 scFvMEL-TOM7-myc/His 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 53은 pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His 벡터를 제조하는 방법을 나타낸 것이다.

도 54는 형질전환된 CHO에서 scFvPD-L1-TOM7-myc/His 단백질의 발현을 나타낸 것이다.

도 55는 형광 단백질이 미토콘드리아 외막에 결합되었는지를 확인한 도면이다. 이때 미토콘드리아는 MitoTracker CMXRos로 염색을 하여 붉은색을 나타내고 TOM70-UB-GFP는 초록색을 나타낸다. 두가지가 겹치는 부분은 노랑색을 나타낸다. 이때, 55a의 배율은 200배이며, 55b의 배율은 600배이다.

도 56은 웨스턴블롯 분석법을 이용한 외래 미토콘드리아 외막에 결합한 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-p53과 UB-p53-TOM7을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 57은 외래 미토콘드리아의 분리 후, 미토콘드리아를 세포 내로 주입 후 미토콘드리아의 농도에 따른 세포 내 주입 정도를 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 58은 정상 미토콘드리아가 피부암 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 59는 정상 미토콘드리아가 피부암 세포의 활성산소종(ROS) 생성 억제에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 60은 정상 미토콘드리아가 약제 내성에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 61은 정상 미토콘드리아가 세포 내 항산화 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 62는 정상 미토콘드리아가 암세포 전이(metastasis)에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 63은 외래 미토콘드리아 외막에 재조합 단백질 p53의 탑재 및 세포 내 주입 확인 방법을 도식화한 것이다.

도 64는 외래 미토콘드리아 외막에 재조합 단백질 p53이 탑재된 것과 p53이 세포 내로 주입된 것을 확인한 것이다. 이때 배율은 200배이다.

도 65는 외래 미토콘드리아 외막에 재조합 단백질 p53이 탑재된 것과 p53이 세포 내로 주입된 것을 확인한 것이다. 이때 배율은 600배이다.

도 66은 위암세포주를 이용한 세포 내 주입된 p53이 탑재된 개질된 미토콘드리아의 세포사멸 능력 확인 방법을 도식화한 것이다.

5 도 67a는 TUNEL assay를 통한 위암세포 내 주입된 p53이 탑재된 개질된 미토콘드리아의 세포사멸 능력을 확인한 것이다. 이때 배율은 600배이다.

도 67b는 형광 측정을 통한 위암세포 내 주입된 p53이 탑재된 개질된 미토콘드리아의 세포사멸 능력을 확인한 것이다.

도 68은 MDA-MB-231 cell에서 RKIP이 탑재된 개질된 미토콘드리아에 의한 암세포 전이 억제 효과를 확인한 것이다.

도 69는 암세포 표적용 단쇄가변영역(ScFv, single chain variable fragment) 항체가 세포 내에서 발현된 것을 확인한 것이다.

도 70은 면역세포화학법(immunocytochemistry, ICC) 실험법을 이용한 암세포 표적용 단쇄가변영역(scFv, single chain variable fragment) 항체의 발현 및 세포 내에 존재하는 미토콘드리아와 결합된 것을 확인한 것이다. 이때 배율은 200배이다.

도 71은 면역세포화학법 실험법을 이용한 암세포 표적용 단쇄가변영역(scFv, single chain variable fragment) 항체의 발현 및 세포 내에 존재하는 미토콘드리아와 결합된 것을 확인한 것이다. 이때 배율은 600배이다.

20 도 72는 암세포 표적용 단쇄가변영역 항체가 결합된 미토콘드리아가 위암세포주에 주입되는 효과를 비교한 것이다.

도 73은 개질된 미토콘드리아를 이용한 동물 실험 스케줄을 도식화한 것이다.

도 74는 종양 조직이 육안 상 증가한 것을 관찰한 사진이다.

25 도 75는 미토콘드리아 및 개질된 미토콘드리아를 투여 후 마우스의 체중의 변화를 확인한 것이다.

도 76은 미토콘드리아 및 개질된 미토콘드리아를 투여 후 종양 사이즈를 확인한 것이다.

도 77은 TOM-UB-p53 단백질을 탑재한 개질된 미토콘드리아가 A431 세포의 증식 억제에 효과적임을 확인한 것이다.

도 78은 분리된 미토콘드리아의 기능을 ATP 함량으로 확인한 것이다.

도 79는 분리된 미토콘드리아의 기능을 막 전위(Membrane potential)로 확인한 것이다.

도 80은 분리된 미토콘드리아의 손상 정도를 미토콘드리아 ROS(mROS production)를 측정하여 확인한 것이다.

도 81a는 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질의 구조와 TOM70, TOM20 또는 OM45의 N 말단 영역의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 81b는 TOM5, TOM7, Fis1, VAMP1B, Cytb5, BCL-2 또는 BCL-X의 C 말단 영역의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 82는 외막 앵커링 펩티드와 유비퀴틴 사이에 링커의 존재 유무에 따라 목적 단백질의 해리 여부를 확인한 것이다.

도 83은 개질된 미토콘드리아에 결합된 목적 단백질이 세포 내에서 미토콘드리아로부터 떨어져 나옴을 확인한 것이다.

15 발명의 실시를 위한 최선의 형태

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하도록 한다.

본 발명의 일 측면은 외래 단백질이 미토콘드리아의 외막에 결합된 개질된 미토콘드리아를 제공한다.

상기 미토콘드리아는 포유동물로부터 수득된 것일 수 있으며, 인간으로부터 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 미토콘드리아는 세포 또는 조직으로부터 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 미토콘드리아는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포로부터 수득된 것일 수 있다. 또한, 상기 미토콘드리아는 미토콘드리아의 생물학적 활성이 정상인 세포로부터 수득된 정상적인 미토콘드리아일 수 있다. 또한, 상기 미토콘드리아는 체외에서 배양된 것일 수 있다.

또한, 상기 미토콘드리아는 자가(autologous), 동종(allogenic) 또는 이종(xenogenic)으로부터 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, 자가 미토콘드리아는 동일 개체의 조직 또는 세포로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다. 또한, 동종 미토콘드리아는 개체와 같은 종에 속하면서 대립유전자에 대해서는 다른 유전자형을 가지는 개체로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다. 또한, 이종 미토콘드리아는 개체와 다른 종에 속하는 개체로부터 수득된 미토콘드리아를 의미한다.

구체적으로, 상기 체세포는 근육세포, 간세포, 신경세포, 섬유아세포, 상
 피세포, 지방세포, 골세포, 백혈구, 림프구, 혈소판 또는 점막세포일 수 있다.
 또한, 상기 생식세포는 감수분열과 체세포 분열을 하는 세포로서 정자 또는 난자
 일 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포, 성체줄기세포, 역분화줄기
 5 세포, 배아줄기세포, 골수줄기세포, 신경줄기세포, 운부줄기세포 및 조직 유래
 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 이때, 상기 중간
 엽줄기세포는 탯줄, 체대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로
 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

한편, 상기 미토콘드리아를 특정 세포로부터 분리하는 경우에는, 예를 들
 10 어, 특정 버퍼 용액을 사용하거나 전위차 및 자기장을 이용하는 등 공지된 다양
 한 방법을 통해 미토콘드리아를 분리할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어인 "외래 단백질"은 세포 내외에서 기능할 수
 있는 목적 단백질을 포함하는 것인 단백질을 의미한다. 이때, 외래 단백질은 미
 토콘드리아에 존재하지 않는 단백질로서, 재조합 단백질 일 수 있다. 구체적으
 15 로, 외래 단백질은 미토콘드리아 앵커링 펩티드 및 목적 단백질을 포함할 수 있
 다. 또한, 외래 단백질은 미토콘드리아 앵커링 펩티드 및 목적 단백질을 포함하
 는 재조합 융합 단백질 일 수 있다. 이때, 상기 외래 단백질은 미토콘드리아 앵
 커링 펩티드를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 미토콘드리아 앵커링 펩티드
 는 미토콘드리아 외막에 위치할 수 있는 펩티드일 수 있다. 따라서, 상기 외래
 20 단백질은 미토콘드리아 앵커링 펩티드에 의해 미토콘드리아의 외막에 결합될 수
 있다. 상기 미토콘드리아 앵커링 펩티드는 미토콘드리아의 막 단백질에 존재하는
 단백질의 N 말단 영역 또는 C 말단 영역을 포함하는 펩티드 일 수 있으며, 상기
 미토콘드리아의 외막 단백질에 존재하는 단백질의 N 말단 영역 또는 C 말단 영역
 은 미토콘드리아의 외막에 위치하는 것일 수 있다. 이때, 앵커링 펩티드는 미토
 25 콘드리아 시그널 서열을 더 포함할 수 있다.

상기 미토콘드리아의 막 단백질에 존재하는 단백질의 일 구체예로는
 TOM20, TOM70, OM45, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로
 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 특히, 상기 미토콘드리아 앵커링
 펩티드가 TOM20, TOM70 및 OM45로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래한
 30 경우에는, TOM20, TOM70 또는 OM45의 N 말단 영역을 포함할 수 있다. 상기 미토

콘드리아 앵커링 펩티드의 일 구체예로는 서열번호 75로 표시되는 효모 유래의 TOM70 이거나, 서열번호 76으로 표시되는 인간 유래의 TOM70 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 77로 표시되는 효모 유래의 TOM20이거나, 서열번호 78로 표시되는 인간 유래의 TOM20 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 79로 표시되는 효모 유래의 OM45 일 수 있다.

또한, 상기 미토콘드리아 앵커링 펩티드가 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나에서 유래한 경우에는, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 C 말단 영역을 포함할 수 있다. 상기 미토콘드리아 앵커링 펩티드의 일 구체예로는 서열번호 80으로 표시되는 효모 유래의 TOM5 이거나, 서열번호 81로 표시되는 인간 유래의 TOM5 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 82로 표시되는 효모 유래의 TOM7이거나, 서열번호 83으로 표시되는 인간 유래의 TOM7 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 84로 표시되는 효모 유래의 TOM22이거나, 서열번호 85로 표시되는 인간 유래의 TOM22 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 86으로 표시되는 효모 유래의 Fis1이거나, 서열번호 87로 표시되는 인간 유래의 Fis1 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 88로 표시되는 인간 유래의 Bcl-2 alpha 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 서열번호 89로 표시되는 효모 유래의 VAMP1이거나, 서열번호 90으로 표시되는 인간 유래의 VAMP1 일 수 있다.

이때, 외래 단백질에 포함된 세포 내외에서 기능할 수 있는 목적 단백질은 세포 내에서 활성을 나타내는 활성 단백질, 세포 내에 존재하는 단백질, 및 세포막에 존재하는 리셉터 또는 리간드에 결합능이 있는 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

상기 활성 단백질 또는 세포 내에 존재하는 단백질의 일 구체예로는 p53, 그랜자임 B(GranzymeB), Bax, Bak, PDCD5, E2F, AP-1(Jun/Fos), EGR-1, Retinoblastoma(RB), phosphatase and tensin homolog(PTEN), E-cadherin, Neurofibromin-2(NF-2), poly[ADP-ribose] synthase 1(PARP-1), BRCA-1, BRCA-2, Adenomatous polyposis coli(APC), Tumor necrosis factor receptor-associated factor(TRAF), RAF kinase inhibitory protein(RKIP), p16, KLF-10, LKB1, LHX6, C-RASSF, DKK-3PD1, Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc으로 이루어진 군에서 선택되

는 어느 하나 일 수 있다. 목적 단백질이 상기 군에서 선택될 경우에는, 상기 목적 단백질은 TOM20, TOM70 또는 OM45의 N 말단 영역을 포함하는 앵커링 펩티드에 결합될 수 있다.

이러한 융합 단백질은 하기의 순서로 결합된 것일 수 있다:

- 5 N 말단-TOM20, TOM70 또는 OM45의 N 말단 영역을 포함하는 앵커링 펩티드-목적 단백질-C 말단.

또한, 상기 외래 단백질은 미토콘드리아 앵커링 펩티드와 목적 단백질 사이에 진핵세포 내 단백질 분해 효소에 인식되는 아미노산 서열 또는 유비퀴틴 또는 이의 단편을 더 포함할 수 있다. 상기 진핵세포 내 단백질 분해 효소는 진핵
10 세포 내에 존재하는 단백질을 분해하는 효소를 의미한다. 이때, 외래 단백질은 상기 단백질을 분해하는 효소에 의해 인식되는 아미노산 서열을 포함하기 때문에, 미토콘드리아 외막에 결합된 외래 단백질은 세포 내에서 앵커링 펩티드와 목적 단백질로 분리될 수 있다.

이때, 상기 유비퀴틴 단편은 서열번호 71의 아미노산 서열의 C 말단 Gly-
15 Gly를 포함하며, C 말단으로부터 연속된 3 내지 75개의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 상기 외래 단백질은 목적 단백질과 유비퀴틴 또는 이의 단편 사이에 링커를 더 포함하는 것일 수 있다. 이때, 링커는 1개 내지 150개의 아미노산으로 구성되거나, 10개 내지 100개의 아미노산으로 구성되거나, 20개 내지 50개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 링커는 20
20 개의 아미노산 중에서 적절히 선택되어 이루어 질 수 있으며, 바람직하게는 글리신 및/또는 세린으로 이루어질 수 있다. 상기 링커의 일 구체예로는 글리신과 세린으로 구성된 5개 내지 50개의 아미노산 일 수 있다. 상기 링커의 일 구체예로는 (G4S) n 으로서, n 은 1 내지 10의 정수이며, n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다.

25 또한, 상기 세포막에 존재하는 리셉터 또는 리간드에 결합능이 있는 단백질은 종양 세포 표면에 존재하는 리셉터 또는 리간드일 수 있다. 이때, 상기 종양 세포 표면에 존재하는 리셉터 또는 리간드는 CD19, CD20, melanoma antigen E(MAGE), NY-ESO-1, carcinoembryonic antigen(CEA), mucin 1 cell surface associated(MUC-1), prostatic acid phosphatase(PAP), prostate specific
30 antigen(PSA), survivin, tyrosine related protein 1(tyrp1), tyrosine related

protein 1(tyrbp2), Brachyury, Mesothelin, Epidermal growth factor receptor(EGFR), human epidermal growth factor receptor 2(HER-2), ERBB2, Wilms tumor protein(WT1), FAP, EpCAM, PD-L1, ACPP, CPT1A, IFNG, CD274, FOLR1, EPCAM, ICAM2, NCAM1, LRRC4, UNC5H2 LILRB2, CEACAM, Nectin-3 및 이의
 5 조합으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

뿐만 아니라, 상기 세포막에 존재하는 리셉터 또는 리간드에 결합능이 있는 단백질은 상기 군에서 선택되는 어느 하나에 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 특히, 항체의 단편은 항체와 동일한 항원결정영역(CDR)을 가지는 단편
 10 을 의미한다. 구체적으로, Fab, scFv, F(ab')₂ 또는 이의 조합일 수 있다.

이러한 경우, 상기 목적 단백질은 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 C 말단 영역을 포함하는 앵커링 펩티드와 결합될 수 있으며, 이러한 외래 단백질은 하기의 순서로 결합된 것일 수 있다:

15 N 말단-목적 단백질-TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 C 말단 영역을 포함하는 앵커링 펩티드-C 말단.

또한, 상기 외래 단백질은 목적 단백질과 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 C 말단 영역
 20 사이 링커를 더 포함할 수 있다. 이때, 링커는 상술한 바와 같다. 이때, 목적 단백질, 활성 단백질, 세포 내에 존재하는 단백질 및 세포막에 존재하는 리셉터 또는 리간드에 결합능이 있는 단백질 등은 상술한 바와 같다.

상기 목적 단백질의 일 구체에는 특정 세포를 타겟팅 하는 항체 또는 이의 단편이 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군
 25 에서 선택되는 어느 하나의 C 말단 영역을 포함하는 앵커링 펩티드에 결합된 형태일 수 있다. 이러한 목적 단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아는 특정 타겟이 쉽게 도입될 수 있으므로, 미토콘드리아를 효율적으로 특정 세포에 들어가게 할 수 있다.

개질된 미토콘드리아의 일 구체예로는 하나 이상의 목적 단백질이 결합된
 30 형태일 수 있다. 구체적으로, p53을 포함하는 목적 단백질과 항-HER-2 항체 또는

이의 단편을 포함하는 목적 단백질이 결합된 형태를 가질 수 있다. 이러한 개질된 미토콘드리아는 HER-2를 발현하는 암 세포에 효과적으로 미토콘드리아를 전달할 수 있다. 또한, 상기 개질된 미토콘드리아에 결합된 p53에 의해 암 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있다.

- 5 개질된 미토콘드리아의 목적에 따라, 하나 이상의 활성 단백질을 포함한 목적 단백질을 제작하여 미토콘드리아에 결합시킬 수 있다. 또한, 타겟이 되는 세포에 따라 세포를 타겟팅 하는 목적 단백질은 다양하게 제작될 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면으로 상술한 개질된 미토콘드리아를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이때, 약학 조성물의 용도는 암 예방 또는 치료 10 를 위한 것일 수 있다. 이때, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막 모세포종, 두경부암, 침샘암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

구체적으로, 활성 단백질이 p53과 같이 종양 세포를 살해하거나 증식을 15 억제시키는 단백질이 미토콘드리아에 결합될 경우, p53이 결합된 개질된 미토콘드리아는 항암제로 사용될 수 있다. 또한, 암세포의 전이를 억제할 수 있는 RKIP과 같은 단백질이 미토콘드리아에 결합될 경우, RKIP이 결합된 개질된 미토콘드리아는 종양 전이 억제제로 사용될 수 있다. 암세포의 증식을 억제하거나 암세포 20 내의 인산화 반응을 제어하거나 암세포의 전이를 억제하는 단백질들인 그랜자임 B(GranzymeB), Bax, Bak, PDCD5, E2F, AP-1(Jun/Fos), EGR-1, Retinoblastoma(RB), phosphatase and tensin homolog(PTEN), E-cadherin, Neurofibromin-2(NF-2), poly[ADP-ribose] synthase 1(PARP-1), BRCA-1, BRCA-2, Adenomatous polyposis coli(APC), Tumor necrosis factor receptor-associated factor(TRAF), p16, KLF-10, LKB1, LHX6, C-RASSF, DKK-3PD1 및 이의 조합으로 25 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나가 미토콘드리아에 결합된 경우, 상기 활성 단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아는 항암제로 사용될 수 있다.

또한, 상기 약학 조성물에 대하여, 미토콘드리아는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함 30 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위로 미토콘드리아를 포함함으로써, 투여 시 미토콘드리아 용량 조절이 용이하고, 환자의 병증 개선 정도가

향상될 수 있다. 이때, 미토콘드리아의 용량은 상기 분리된 미토콘드리아의 막 단백질을 정량함으로써, 미토콘드리아를 정량할 수 있다. 구체적으로, 상기 분리된 미토콘드리아를 브래드포드 분석법(bradford protein assay)을 통해 정량할 수 있다(James D. McCully가 저술한 논문(J Vis Exp. 2014;(91): 51682.)).

5 또한 상기 약학 조성물에 대하여, 미토콘드리아에 결합하는 활성 단백질은 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 500 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 내지 450 $\mu\text{g/ml}$ 또는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위로 활성 단백질을 포함함으로써, 투여 시 활성 단백질 용량 조절이 용이하고, 환자의 병증 개선 정도가 향상될 수 있다.

10 또한 상기 약학 조성물에 대하여, 미토콘드리아를 특정 세포에 전달할 수 있게 하는 타겟팅 단백질은 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 500 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 내지 450 $\mu\text{g/ml}$ 또는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위로 타겟팅 단백질을 포함함으로써, 투여 시 타겟팅 단백질 용량 조절이 용이하고, 환자의 병증 개선 정도가 향상될 수 있다.

15 특히, 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은, 투여할 개체의 체중을 기준으로 1회 0.01 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 4 mg/kg 또는 0.25 mg/kg 내지 2.5 mg/kg 양의 미토콘드리아를 투여할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 즉, 상기 약학 조성물이 암조각이 존재하는 개체의 체중을 기준으로 상기 범위의 함량으로 개질된 미토콘드리아가 투여되는 것이 세포 활성 측면에서 가장 바람직
20 하다. 또한, 상기 약학 조성물은 1 내지 10회, 3 내지 8회 또는 5 내지 6회 투여할 수 있으며, 바람직하게는 5회 투여할 수 있다. 이때, 투여 간격은 1 내지 7일 또는 2 내지 5일 간격으로 할 수 있으며, 바람직하게는 3일 간격으로 투여할 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 암에 걸릴 수 있거나, 암을 앓고 있
25 는 인간 또는 다른 포유동물에 대하여 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 정맥 투여될 수 있는 주사제일 수 있고 또는 국소적으로 투여될 수 있는 주사제일 수 있으며, 바람직하게는 주사용 제제일 수 있다.

따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 주사제 처방의 유통에 따른 제품 안정성을 확보하기 위하여, 주사제로 사용 가능한 산수용액 또는 인산염 등의 완
30 충용액을 사용하여 pH를 조절함으로써, 물리적으로나 화학적으로 매우 안정한 주

사제로 제조될 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 주사용수를 포함할 수 있다. 상기 주사용수는 고형주사제의 용해나 수용성 주사제를 희석하기 위하여 만들어진 증류수로서, 글루코스 주사, 자일리톨 주사, D-만니톨 주사, 프룩토스 주사, 생리식염수, 텍스트란 40 주사, 텍스트란 70 주사, 아미노산 주사, 링거액, 락트산-링거액 또는 pH 3.5 내지 7.5 범위의 인산염 완충용액 또는 인산이수소나트륨-구연산 완충용액 등 일 수 있다.

또한, 본 발명의 약학 조성물은 안정화제 또는 용해보조제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안정화제는 나트륨 피로설파이트(sodium pyrosulfite) 또는 에틸렌 디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)일 수 있고, 용해보조제는 염산, 아세트산, 수산화나트륨, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨 또는 수산화칼륨일 수 있다.

또한, 본 발명은 전술한 약학 조성물을 개체의 정맥에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다. 여기서 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

본 발명의 일 측면은 활성 단백질을 포함하는 목적 단백질 및/또는 표적 타게팅 단백질을 포함하는 목적 단백질과 분리된 미토콘드리아를 혼합하는 단계를 포함하는 개질된 미토콘드리아를 제조하는 방법을 제공한다.

이때, 목적 단백질 및 미토콘드리아는 적절한 비율로 혼합될 수 있다. 예를 들어 중량비를 기준으로 목적 단백질 : 미토콘드리아가 1 : 100 내지 100 : 1의 비율로 혼합될 수 있다. 구체적으로, 상기 비율은 1 : 10, 1 : 5, 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2 또는 1 : 1로 혼합될 수 있다. 또한, 10 : 1, 5 : 1, 4 : 1, 3 : 1 또는 2 : 1 일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 진핵세포에 주입하여 형질전환된 세포로부터 개질된 미토콘드리아를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 상술한 폴리뉴클레오타이드를 원핵세포, 또는 유비퀴틴 분해효소 또는 진핵세포 내 단백질 분해 효소가 없는 진핵세포에 형질전환 시키는 단계; 및 융합 단백질을 수득하는 단계를 포함하는 상술한 융합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 제조 방법은 상기 목적 단백질이 진핵세포내에 단백질 분해 효소에 인식되는 아미노산 서열 또는 유비퀴틴 또는 이

의 단편을 포함하지 않는 경우에 적합하다.

본 발명의 또 다른 측면으로, 목적 단백질을 원핵세포 또는 원핵세포 추출물을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 유비퀴틴 분해효소 또는 단백질 분해 효소가 없는 진핵세포 또는 진핵세포 세포추출물을 이용하여 개질된 미토콘드리아를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면으로 외래 단백질 전달 수단으로서 미토콘드리아의 용도를 제공한다. 구체적으로, 개질된 미토콘드리아는 세포 내외에서 기능할 수 있는 목적 단백질을 포함하는 외래 단백질의 세포 내외 전달 수단으로서 이용될 수 있다. 미토콘드리아는 효과적으로 세포에 도입될 수 있으며, 이러한 경우 세포에 전달을 원하는 외래 단백질을 효과적으로 세포 내로 전달할 수 있다. 이러한 경우 미토콘드리아는 효과적인 단백질 전달 시스템으로 이용될 수 있다. 목적 단백질은 상술한 바와 같다.

본 발명의 또 다른 일 측면은 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드 및 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 이때, 목적 단백질은 상술한 바와 같다.

본 명세서에서 사용된 용어 "미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드"는 미토콘드리아의 외막에 존재하는 단백질의 N 말단 또는 C 말단일 수 있다. 상기 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 미토콘드리아의 외막에 특이적으로 위치하게 하는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이때, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 본 발명에서 개시된 융합 단백질이 미토콘드리아의 외막에 부착되어 있을 수 있도록 한다. 이때, 상기 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 미토콘드리아 외막 타겟팅 펩티드와 동일한 의미로 사용될 수 있다.

그뿐 아니라, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 본 발명에서 개시된 융합 단백질이 미토콘드리아의 내부로 들어가지 않도록 한다. 미토콘드리아 외막에 존재하는 TOM(translocase of the outer membrane) complex는 아미노 말단에 미토콘드리아 표적 시퀀스와 단일 외막 앵커링(anchoring) 도메인을 가지고 있으며 카르복시 말단의 대부분은 세포질에 노출되어 있는 구조를 가지고 있을 수 있다 (도 81a). 미토콘드리아 외막에 존재하는 TOM(translocase of the outer membrane) complex는 카르복실 말단에 미토콘드리아 표적 시퀀스와 단일 외막 앵커링(anchoring) 도메인을 가지고 있으며 아미노 말단의 대부분은 세포질에 노출

되어 있는 구조를 가지고 있을 수도 있다(도 81b). 또한, 상기 미토콘드리아의 외막에 존재하는 단백질은 진핵 세포 내에 존재하는 미토콘드리아에 존재하는 단백질에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 효모, 동물세포, 또는 인간 세포 내에 존재하는 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질에서 선택될 수 있다.

5 이때, 미토콘드리아 외막에 존재하는 단백질의 일 구체에는 TOM20, TOM70, OM45, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나에서 선택되는 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 이때, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 TOM20, TOM70, OM45, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B에서 선택되는 어느 하나의 단백질의
10 단편일 수 있다. 이때, 상기 외막 앵커링 펩티드는 미토콘드리아 외막에 위치하는 TOM20, TOM70, OM45, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-x 및 VAMP1B의 N 말단 또는 C 말단의 폴리펩타이드 일 수 있다.

 특히, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드가 목적 단백질의 N 말단에 융합될 경우에는, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 TOM20, TOM70, OM45로 구성되
15 는 군에서 선택되는 단백질의 말단 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는 TOM20, TOM70, OM45로 구성되는 군에서 선택되는 단백질의 N 말단 서열일 수 있다. 상기 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드의 구체에는 상술한 바와 같다.

 또한, 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드가 목적 단백질의 C 말단에 융합될 경우에는, 외막 타겟팅 단백질은 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-X, 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 단백질의 말단 서열을 포함할 수 있
20 다. 바람직하게는 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-X, 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 단백질의 C 말단 서열일 수 있다. 상기 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드의 구체에는 상술한 바와 같다.

 본 명세서에서 사용된 용어 "활성 단백질"은 생리 활성을 나타내는 단백질 일 수 있다. 이러한 활성 단백질의 일 구체에는 손상된 암세포에 존재하는 기능이 저하된 단백질이거나 변형된 단백질 일 수 있다. 활성 단백질의 일 구체에는 세포의 활성을 증진시키는 단백질 일 수 있다. 이러한 활성 단백질의 구체에는 상술한 바와 같다.

 융합 단백질은 미토콘드리아 외막 타겟팅 단백질 및 목적 단백질이 N 말
30 단으로부터 C 말단으로 결합된 것일 수 있다. 이때, 미토콘드리아 외막 타겟팅

단백질 및 목적 단백질 사이에 유비퀴틴 프로테아제 특이 절단 부위(Glycin-Glycin)를 지나는 유비퀴틴 또는 이의 단편을 더 포함할 수 있다. 이때, 유비퀴틴 프로테아제에 의한 절단을 용이하게 하기 위하여 미토콘드리아 외막 타겟팅 단백질 및 유비퀴틴 단백질 사이에 친수성 및 극성 아미노산인 세린(Serine), 글리신(Glycine) 및 트레오닌(Threonine)이 포함된 링커를 더 포함할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "유비퀴틴"은 UB로도 불리우는 단백질 분해 과정에 참여하는 단백질을 의미한다. 유비퀴틴의 일 구체에는 인체내에 존재하는 유비퀴틴 혹은 효모에서 존재하는 유비퀴틴일 수 있다. 인체내에 존재하는 유비퀴틴은 76개의 아미노산으로 이루어져 있다. 이때, 유비퀴틴은 성숙형으로 이용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "성숙형(mature form)"이란 시그널 펩티드(signal peptide)가 제거된 형태의 단백질을 의미할 수 있다.

또한, 유비퀴틴 프로테아제 혹은 UBP(ubiquitin-specific protease)라고 불리우는 효소는 진핵 세포 내에 자연적으로 존재하며 세포 내에서 유비퀴틴의 C 말단 아미노산 글리신-글리신 부위를 절단하여 목적 단백질의 자연해리를 유도할 수 있다.

이때, 유비퀴틴의 단편은 유비퀴틴의 C 말단의 Gly-Gly 아미노산을 포함하며, C 말단으로부터 연속적으로 3 내지 75개의 아미노산을 포함할 수 있다. 구체적으로, 유비퀴틴의 단편의 일 구체에는 Arg-Gly-Gly일 수 있으며, Leu-Arg-Gly-Gly 일 수 있으며, Arg-Leu-Arg-Gly-Gly일 수 있으며, Leu-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly일 수 있다. 또한, 유비퀴틴의 단편은 서열번호 71의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

상기 미토콘드리아 외막 타겟팅 단백질 및 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 미토콘드리아 활성을 개질시키는 융합 단백질이라고 지칭할 수 있다. 이러한 융합 단백질은 하기의 구조 중 어느 하나를 가질 수 있다:

<구조식 1>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-목적 단백질-C 말단

<구조식 2>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-유비퀴틴 또는 이의 단편-목적 단백질-C 말단

<구조식 3>

N 말단-미토콘드리아 외막 타겟팅 펩티드-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-목적 단백질-C 말단

<구조식 4>

5 N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-목적 단백질-C 말단

<구조식 5>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-목적 단백질-C 말단

상기 구조식 1 내지 5에 있어서, 상기 외막 앵커링 펩티드는 TOM20, TOM70, OM45로 구성되는 군에서 선택되는 단백질의 말단 서열일 수 있으며, 상기 목적 단백질은 p53, 그랜자임 B(GranzymeB), Bax, Bak, PDCD5, E2F, AP-1(Jun/Fos), EGR-1, Retinoblastoma(RB), phosphatase and tensin homolog(PTEN), E-cadherin, Neurofibromin-2(NF-2), poly[ADP-ribose] synthase 1(PARP-1), BRCA-1, BRCA-2, Adenomatous polyposis coli(APC), Tumor necrosis factor receptor-associated factor(TRAF), RAF kinase inhibitory protein(RKIP), p16, KLF-10, LKB1, LHX6, C-RASSF 및 DKK-3PD1으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

이때, 링커 1 또는 2는 각각 1 내지 100개, 1 내지 80개, 1 내지 50개, 1 내지 30개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드일 수 있으며, 바람직하게는 세린, 글리신 또는 트레오닌이 단독 또는 조합으로 1 내지 30개로 구성된 폴리펩타이드일 수 있다. 또한 상기 링커 1 또는 2는 각각 5 내지 15개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드일 수 있으며 바람직하게는 세린, 글리신 또는 트레오닌이 단독 또는 조합으로 5 내지 15개로 구성된 폴리펩타이드일 수 있다. 링커의 일 구체예는(GGGGS)₃(서열번호 70)일 수 있다.

25 <구조식 6>

N 말단-목적 단백질-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 7>

N 말단-목적 단백질-유비퀴틴 또는 이의 단편-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

30 <구조식 8>

N 말단-목적 단백질-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 9>

5 N 말단-목적 단백질-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 10>

N 말단-목적 단백질-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-미토콘드리아 외막 타겟팅 펩티드-C 말단

상기 구조식 6 내지 10에 있어서, 상기 외막 앵커링 펩티드는 TOM5,
10 TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-X, 및 VAMP1B로 구성되는 군에서 선택되는
단백질의 말단 서열일 수 있으며, 상기 목적 단백질은 p53, 그랜자임
B(GranzymeB), Bax, Bak, PDCD5, E2F, AP-1(Jun/Fos), EGR-1,
Retinoblastoma(RB), phosphatase and tensin homolog(PTEN), E-cadherin,
Neurofibromin-2(NF-2), poly[ADP-ribose] synthase 1(PARP-1), BRCA-1, BRCA-2,
15 Adenomatous polyposis coli(APC), Tumor necrosis factor receptor-associated
factor(TRAF), RAF kinase inhibitory protein(RKIP), p16, KLF-10, LKB1, LHX6,
C-RASSF, DKK-3PD1, Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc으로 이루어진 군에서 선택되
는 어느 하나일 수 있다. 이때, 상기 링커 1 또는 2는 상술한 바와 같다.

본 발명의 일 측면은 상기 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드 및 목적 단
20 백질이 포함된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

또한, 본 발명의 일 측면은 상기 목적 단백질이 포함된 융합 단백질을 코
딩하는 폴리뉴클레오티드를 적재한 벡터를 제공한다.

또한, 본 발명의 일 측면은 상기 목적 단백질이 포함된 융합 단백질을 코
딩하는 폴리뉴클레오티드를 적재한 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다.

25 본 발명의 일 측면은 표적 타겟팅 단백질 및 미토콘드리아 외막 타겟팅
단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

이때, 상기 표적 타겟팅 단백질과 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드는 N
말단으로부터 C 말단으로 결합된 것일 수 있다. 이때, 상기 미토콘드리아 외막
앵커링 펩티드는 TOM20, TOM70, OM45, TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2,
30 Bcl-x 및 VAMP1B로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "표적"은 개질된 미토콘드리아가 전달되어야 하는 장소를 의미한다. 표적의 일 구체예는 암 세포일 수 있다. 구체적으로, 표적의 일 구체예는 암 세포 표면에 존재하는 바이오마커일 수 있다. 구체적으로, 상기 표적은 종양관련항원(TAA)일 수 있다. 이때, 상기 종양관련항원은 CD19, 5 CD20, melanoma antigen E(MAGE), NY-ESO-1, carcinoembryonic antigen(CEA), mucin 1 cell surface associated(MUC-1), prostatic acid phosphatase(PAP), prostate specific antigen(PSA), survivin, tyrosine related protein 1(tyrlp1), tyrosine related protein 1(tyrlp2), Brachyury, Mesothelin, Epidermal growth factor receptor(EGFR), human epidermal growth factor 10 receptor 2(HER-2), ERBB2, Wilms tumor protein(WT1), FAP, EpCAM, PD-L1, ACP, CPT1A, IFNG, CD274, FOLR1, EPCAM, ICAM2, NCAM1, LRRC4, UNC5H2 LILRB2, CEACAM, Nectin-3 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "표적 타겟팅 단백질"은 상술한 표적에 결합 15 할 수 있는 단백질 서열 일 수 있다. 이때, 표적 타겟팅 단백질의 일 구체예는 암 세포 표면에 존재하는 바이오마커에 결합하는 단백질일 수 있다. 이때, 암 세포 표면에 존재하는 바이오마커의 일 구체예는 ICAM2, NCAM1, LRRC4, UNC5H2 LILRB2, CEACAM, Nectin-3 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 표적 타겟팅 단백질은 상술한 외래 단백질에 포함될 수 있다.

20 상기 표적 타겟팅 단백질의 일 실시예는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 특히, 상기 종양관련항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 또한, 상기 항체의 단편은 Fab, Fab', scFv 및 F(ab)2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

상기 표적 타겟팅 단백질의 일 구체예로는 상피성장인자수용체인에 결합 25 할 수 있는 scFvHER일 수 있다. 또 다른 구체예로는 흑색종에 타겟팅 할 수 있는 scFvMEL 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 암세포 표면에 과발현되어 있는 PD-L1에 결합할 수 있는 scFvPD-L1 일 수 있다. 또 다른 구체예로는 암세포 표면에 과발현되어 있는 PDL-1에 결합할 수 있는 PD-1 일 수 있다.

본 발명의 일 측면은 표적 타겟팅 단백질 및 미토콘드리아 외막 타겟팅 30 단백질 사이에 유비퀴틴 또는 이의 단편을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 미토

콘드리아 표적 타겟팅 단백질 및 목적 단백질을 포함하는 융합 단백질을 미토콘드리아 활성을 개질시키는 융합 단백질이라고 지칭할 수 있다. 이러한 융합 단백질은 하기의 구조 중 어느 하나를 가질 수 있다:

<구조식 11>

5 N 말단-표적 타겟팅 단백질-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 12>

N 말단-표적 타겟팅 단백질-유비퀴틴 또는 이의 단편-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 13>

10 N 말단-표적 타겟팅 단백질-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

<구조식 14>

N 말단-표적 타겟팅 단백질-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-C 말단

15 <구조식 15>

N 말단-표적 타겟팅 단백질-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-미토콘드리아 외막 타겟팅 펩티드-C 말단

상기 구조식 11 내지 15에 있어서, 상기 외막 앵커링 펩티드는 TOM5, TOM6, TOM7, TOM22, Fis1, Bcl-2, Bcl-X, 및 VAMP1B로 구성되는 군에서 선택되는 단백질의 말단 서열일 수 있으며, 상기 표적 타겟팅 단백질은 종양관련항원인 CD19, CD20, melanoma antigen E(MAGE), NY-ESO-1, carcinoembryonic antigen(CEA), mucin 1 cell surface associated(MUC-1), prostatic acid phosphatase(PAP), prostate specific antigen(PSA), survivin, tyrosine related protein 1(tyrlp1), tyrosine related protein 1(tyrlp2), Brachyury, Mesothelin, Epidermal growth factor receptor(EGFR), human epidermal growth factor receptor 2(HER-2), ERBB2, Wilms tumor protein(WT1), FAP, EpCAM, PD-L1, ACP, CPT1A, IFNG, CD274, FOLR1, EPCAM, ICAM2, NCAM1, LRRC4, UNC5H2 LILRB2, CEACAM, Nectin-3 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 표적 타겟팅 단백질은 종양관련항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 이때, 상기 링커 1 또는 2 및

20

25

30

단백질 분해 효소에 의해 인식되는 아미노산 서열은 상술한 바와 같다.

<구조식 16>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-표적 타겟팅 단백질-C 말단

<구조식 17>

- 5 N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-유비퀴틴 또는 이의 단편-표적 타겟팅 단백질-C 말단

<구조식 18>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-표적 타겟팅 단백질-C 말단

- 10 <구조식 19>

N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-표적 타겟팅 단백질-C 말단

<구조식 20>

- 15 N 말단-미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드-링커 1-유비퀴틴 또는 이의 단편-링커 2-표적 타겟팅 단백질-C 말단

상기 구조식 16 내지 20에 있어서, 상기 외막 앵커링 펩티드는 TOM20, TOM70 및 OM45로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다. 또한, 상기 표적 타겟팅 단백질, 유비퀴틴 또는 이의 단편, 상기 링커 1 또는 2은 상술한 바와 같다.

- 20 본 발명의 일 측면은 상기 표적 타겟팅 단백질이 포함된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

또한, 본 발명의 일 측면은 상기 표적 타겟팅 단백질이 포함된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적재한 벡터를 제공한다.

- 25 또한, 본 발명의 일 측면은 상기 표적 타겟팅 단백질이 포함된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 적재한 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 이때, 상기 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 이때, 바람직하게 상기 진핵세포는 유비퀴틴을 분해하는 효소가 제거된 균주 일 수 있다.

- 30 또한, 본 발명의 일 측면은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 진핵세포에 주입하여 형질전환된 세포로부터 개질된 미토콘드리아를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

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

I. 미토콘드리아 외막 앵커링 펩티드, 링커, 유비퀴틴 및 목적 단백질을 포함한 융합 단백질의 제조

10

실시예 1. p53을 포함한 융합 단백질 제조

실시예 1.1. p53 유전자의 증폭

인간 유래 p53을 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, 인간 유래 상피
 세포로부터 총 RNA를 추출하여 이로부터 cDNA를 합성하였다. 구체적으로, 인간
 15 유래 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast cell)를 10% 혈청 배지에서 5%
 이산화탄소, 37℃ 조건하에서 배양하였다(1×10^6 cells). 이후, 배양액을
 제거하고 세포에 PBS 완충액을 첨가하여 2회 세척하고, 0.5 ml의 RNA
 추출액(Trizol reagent, Thermo Fisher Scientific)을 직접 가하였다. RNA
 추출물이 가해진 혼합물을 10분간 상온에서 방치한 후 0.1 ml의 클로로포름을
 20 첨가하여 15초간 교반한 뒤, 약 12,000 xg로 10분간 원심분리 하였다. 다음으로,
 분리된 상층액을 취하여 동일 부피의 이소프로필알콜을 첨가하고, 12,000 xg로
 10분간 다시 원심분리하였다. 이후, 액체를 제거하고, 75% 에탄올로 1회 세척을
 하고 상온에서 RNA를 건조시켰다.

RNAase가 없는 정제 증류수를 약 50 ul를 가하여 분광광도계를 이용하여
 25 RNA의 정량 및 순도를 측정하였다. cDNA를 합성하기 위해 정제된 총 RNA 2 ug에
 oligo dT와 결합 반응을 70℃에서 5분간 진행시켰다. 그후, 10X 역전사반응
 완충용액, 10 mM dNTP, RNAse 저해제 및 M-MLV 역전사효소(Enzynomics, Korea)를
 가하여 cDNA 합성반응을 42℃에서 60분간 수행하였다. 이후, 72℃에서 5분간
 가열하여 역전사효소를 불활성화시킨 다음, RNase H를 첨가하여 단일가닥의
 30 RNA를 제거하고, 이를 p53 유전자의 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용하였다.

인간 유래 진피 섬유아세포로부터 시그널 펩타이드 서열이 제거된 p53의 유전자를 얻기 위하여 아미노 말단 글루탐산을 시작으로 암호화하는 프라이머(T2p53)와 카르복실 말단을 암호화하는 프라이머(Xp53)를 합성한 다음, 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 서열은

5 아래 표 1에 기재한 바와 같다.

【표 1】

프라이머	서열	서열번호
T2p53	5'-AAA AAA CCG CGG TGG TGA GGA GCC GCA GTC AGA TCC TAG-3'	서열번호 1
Xp53	5'- AAA AAA CTC GAG TGA GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	서열번호 2

0.2 pmol T2p53 프라이머와 0.2 pmol Xp53 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃

10 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 40주기로 수행하였다. 반응 후에 증폭된 약 1.2 kbp의 DNA 절편을 1% 아가로스겔에서 전기 영동하여 분리한 다음, pGEM-T easy(Promega, USA) 벡터에 T4DNA 연결효소(ligase)를 이용하여 삽입하였다. 이렇게 얻어진 DNA들을 염기서열 분석한 결과, 인간 유래 p53 단백질을 암호화하는 cDNA를 획득하였음을 확인하였다. 획득된 p53 유전자를

15 pTA-p53 라고 명명하였으며 이의 염기서열은 서열번호 3의 염기 서열과 같다(도 1).

실시에 1.2. p53 대장균 발현 벡터 제조

실시에 1.2.1. pET15b-UB-p53 제조

20 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질을 제조하기 위하여 아래와 같은 발현벡터를 제조하였다. 유비퀴틴 유전자를 얻기 위하여 NdeUB 프라이머와 T2UB 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 2에 기재한 바와 같다.

【표 2】

프라이머	서열	서열번호
NdeUB	5'-GGA TTC CAT ATG CAA CTT TTC GTC AAA ACT CTA AC-3'	서열번호 4
T2UB	5'-ATG ACC ACC GCG GAG TCT CAA CAC CAA-3'	서열번호 5

0.2 pmol NdeUB 프라이머와 0.2 pmol T2UB 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25 주기로 수행하여 유비퀴틴(UB) 유전자를 수득하였다. 증폭된 유비퀴틴 유전자를 제한효소 NdeI과 SacII로 절단하고, 플라스미드 pTA-p53을 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하였다. 그 후, 2% 아가로스겔에 전기영동하여 각각 약 210 bp와 1,200 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 NdeI과 XhoI으로 절단된 pET15b 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET15b-UB-p53을 얻었다(도 2). 이때, UB-p53은 서열번호 6의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET15b-UB-p53을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에, 최종 1mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 약 60 kDa크기의 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 3의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 라인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시예 1.2.2. pET11C-TOM70-UB-p53 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70과 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질을 제조하기 위하여, TOM70과 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다. TOM70과 유비퀴틴 유전자를 얻기 위하여 NdeTOM70 프라이머, TOM70-AS 프라이머, TOM70UB-S 프라이머와 T2UB-AS 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 3에 기재한 바와 같다.

【표 3】

프라이머	서열	서열번호
NdeTOM70	5'-GAA TTC CAT ATG AAA AGT TTT ATA ACT CGG AAT AAA ACT GCA ATT TTC GCA ACT GTT GC -3'	서열번호 7
TOM70-AS	5'- GGT GCA TAC TAC TAT TAT CAAA CTT TTC GTC AAA ACT C-3'	서열번호 8
TOM70UB-S	5'- GGC TAC GT ATT TAT TTC CAA CTT TTC GTC AAA ACT C-3'	서열번호 9
T2UB-AS	5'- GGC ACC ACC GCG GAG TCT CAA CAC 3'	서열번호 10

TOM70 유전자를 얻기 위해 0.2 pmol NdeTOM70 프라이머 와 0.2 pmol TOM70-AS 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 TOM70 유전자를 수득하였다. 증폭된 DNA 단편을 N-TOM70이라 하였다. 상기 실시예 1.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-p53을 주형으로 하여 0.2 pmol TOM70UB-S 프라이머와 0.2 pmol T2UB-AS 프라이머를 넣고 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 UB 유전자를 수득하였다. 증폭된 DNA 단편을 C-UB라 하였다.

증폭된 DNA N-TOM70과 C-UB를 주형으로 하여 0.2 pmol NdeTOM70 프라이머, 0.2 pmol T2UB-AS 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 증폭된 TOM70이 융합된 유비퀴틴 유전자 TOM70-UB를 수득하였다.

증폭된 TOM70-UB 유전자를 제한효소 NdeI과 SacII으로 절단하고, 플라스미드 pTA-p53를 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 각각 330 bp와 1,500 bp의 DNA 단편을 얻었다. 그 후에 제한효소 NdeI과 SalI으로 절단된 pET11c 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11c-TOM70-UB-p53를 얻었다(도 4). 이때, TOM70-UB-p53은 서열번호 11의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET11c-TOM70-UB-p53을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 진탕배양기에서 배양하였다. 그 후, 세포밀도가 OD600에서 약 0.2
5 흡광도에 도달하는 시점에 최종 1 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 약 62 kDa 크기의 TOM70과 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질이 발현되었음을
10 확인하였다. 이때, 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시에 1.2.3. pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-p53 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70, 링커(GGGSGGGSGGGGS(서열번호 70))와 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질을 제조하기 위하여 TOM70, 링커,
15 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다. TOM70에 결합된 링커 유전자를 얻기 위하여 TOM70(G)3-AS 프라이머, (G)3UB-S 프라이머와 Xp53(noT) 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 4에 기재한 바와 같다.

20 【표 4】

프라이머	서열	서열번호
TOM70(G) ₃ -AS	5'-GCC CCC GGA TCC TCC ACC CCC GCT TCC GCC ACC TCC ATA ATA GT AGT ATG CAC CAA TAG -3'	서열번호 12
(G) ₃ UB-S	5'-GGT GGA GGA TCC GGG GGC GC GGA AGC CAA ATC-3'	서열번호 13
Xp53(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	서열번호 14

상기 실시에 1.2.2.에서 얻은 플라스미드 pET11c-TOM70-UB-p53을 주형으로 하여 0.2 pmol NdeTOM70 프라이머와 0.2 pmol TOM70(G)3-AS 프라이머를 넣고 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄
25 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로

수행하여 유전자 TOM70과 링커가 결합된 유전자 TOM70-G3를 수득하였다. 또한, 상기 실시예 1.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-p53를 주형으로 하여 0.2 pmol(G)3UB-S 프라이머와 0.2 pmol Xp53(noT) 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의

5 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다.

그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 유전자 유비퀴틴이 융합된 p53인 UB-p53을 수득하였다. 증폭된 TOM70-G3 유전자를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 절단하고, 증폭된 UB-p53 유전자를 BamHI과 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여

10 각각 100 bp 와 1,500 bp의 DNA 단편을 수득하였다. 그 후에 제한효소 NdeI과 SalI으로 절단된 pET11c 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53를 얻었다(도 6). 이때, TOM70-(GGGGS)3-UB-p53은 서열번호 15의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53을 사용하여 대장균 BL21(DE3)

15 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 암피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 1 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

20 대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 약 62 kDa크기의 TOM70, 링커, 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 p53 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을

25 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다

실시예 1.2.4. pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70과 링커(GGGGSGGGSGGGGS)가 융합된 형태의 p53 단백질을 제조하기 위하여, TOM70과 링커가 융합된 형태의 p53를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다. TOM70과 링커가 융합된 p53 유전자를

30 얻기 위하여 프라이머(B(G)3p53)를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표

5에 기재한 바와 같다.

【표 5】

프라이머	서열	서열번호
B(G) ₃ p53	5'-GGT GGA GGA TCC GGG GGC GGC GGA AGC GAG GAG CCG CAG TCA GAT CCT AGC -3'	서열번호 16

실시에 1.2.2.에서 얻은 플라스미드 pET11c-TOM70-UB-p53를 주형으로 하여 0.2 pmol NdeTOM70 프라이머와 0.2 pmol TOM70(G)3-AS 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 유전자 TOM70을 획득하였다. 증폭된 DNA 단편을 TOM70-G3라 하였다.

실시에 1.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-p53를 주형으로 하여 0.2 pmol B(G)₃p53 프라이머와 0.2 pmol Xp53(noT) 프라이머를 dNTP 0.2nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 G3-p53이라 하였다.

증폭된 DNA 단편 TOM70-G3을 NdeI과 BamHI으로 절단하고, DNA 단편 G3-p53을 제한효소 BamHI과 XhoI으로 절단하였다. 그 후, 2% 아가로스겔에서 전기영동하여 각각 약 150 bp 와 1300 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 NdeI과 SalI으로 절단된 pET11c 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53을 얻었다(도 8). 이때, TOM70-(GGGGS)3-p53은 서열번호 17의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 획득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 진탕배양기에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 1 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 획득한 다음, 세포를 파쇄한 후

SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, 약 60 kDa 크기의 TOM70이 융합된 형태의 p53 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시예 1.2.5. pET15b-UB-p53-TOM7

유비퀴틴, 미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 p53 단백질을 제조하기 위하여 유비퀴틴, p53 그리고 TOM의 순서로 융합된 형태의 p53를 발현시킬 수 있는 발현백터를 제조하였다. TOM7과 유비퀴틴이 융합된 p53 유전자를 얻기 위하여 Xp53(noT) 프라이머와 XTOM7 프라이머와 LTOM7 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 6에 기재한 바와 같다.

【표 6】

프라이머	서열	서열번호
Xp53(noT)	5'-AAA AAA CTC GAG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG -3'	서열번호 18
XTOM7	5'-AAA AAA CTC GAG ttt gcc att cgc tgg ggc ttt atc-3'	서열번호 19
LTOM7	5'-AAA AAA GTC GAC TTA TCC CCA AAG TAG GCT CAA AAC AG-3'	서열번호 20

실시예 1.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-p53을 주형으로 하여 0.2 pmol NdeUB 프라이머와 0.2 pmol Xp53(noT) 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25 주기로 수행하여 유전자 UB-p53을 수득하였다. 또한 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 0.2 pmol XTOM7 프라이머와 0.2 pmol LTOM7 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다.

그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 40주기로 수행하여 유전자 TOM7을 수득하였다. 증폭된 DNA 단편 UB-p53을 제한효소 NdeI과 XhoI으로 절단하고, 증폭된 TOM7 유전자를 XhoI과 SalI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 각각 약 1,500 bp 와 150 bp의

DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 NdeI과 XhoI으로 절단된 pET15b 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET15b-UB-p53-TOM7을 얻었다(도 10). 이때, UB-p53-TOM7은 서열번호 21의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET15b-UB-p53-TOM7을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 암피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 0.5 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, 약 60 kDa크기의 유비퀴틴과 TOM7이 융합된 형태의 p53 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시에 1.2.6. pCMV-p53-myc/His 제작

p53을 발현시킬 수 있는 동물세포용 발현벡터를 제조하였다. p53 유전자를 얻기 위하여 Rp53 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 7에 기재한 바와 같다.

【표 7】

프라이머	서열	서열번호
Rp53	5'-AAA AAA GAA TTC ATG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG -3'	서열번호 23

실시에 1.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET-UB-p53를 주형으로 하여 0.2 pmol Rp53 프라이머와 0.2 pmol Xp53(noT) 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25 주기로 수행하여 유전자 p53을 수득하였다.

증폭된 p53 유전자를 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔

전기영동하여 약 1,300 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 절단된 pcDNA3.1-myc/His A 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pCMV-p53-myc/His를 얻었다(도 12). 이때, p53-myc/His는 서열번호 23의 염기 서열로 표시하였다.

- 5 플라스미드 pCMV-p53-myc/His을 사용하여 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였고 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다. 도 13에 나타난 바와 같이, 약 55 kDa크기의 p53 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를
- 10 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시한 후 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

실시에 1.3. p53이 포함된 용합 단백질 분리 및 정제

실시에 1.3.1. 대장균 유래 제조합 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질 분리 및

15 정제

제조합 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질을 발현하는 대장균 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37°C 조건에서 배양하였다. 그 후, 흡광도가 OD600에서 0.4에 도달할 때 0.5 mM IPTG를 첨가하여 4시간 동안 추가 진탕 배양하여 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질을 발현시켰다.

- 20 배양 종료 후 원심분리를 이용하여 세포를 회수하고, 회수된 세포는 PBS를 이용하여 1회 세척한 다음 PBS 용액을 이용하여 세포를 현탁시키고, 현탁된 세포는 소니케이터를 이용하여 파쇄공정을 수행하였다. 파쇄된 세포는 고속 원심분리기를 이용하여 원심분리 한 후 불용성 분획을 회수하고, 회수된 불용성 분획은 50 mM 트리스, 100 mM 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA) pH
- 25 8.0 용액을 이용하여 3회 세척하였다. 그 후, 6 M 구아니딘, 100 mM 소듐포스페이트, 10 mM 트리스 pH 8.0 용액에 녹여 0.45 μ m 필터를 이용해 필터한 후 미리 패킹된 니켈 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 1차 정제를 수행하였다.

- 30 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질이 포함된 용액을 로딩 후에 8 M 우레아, 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하여

결합하지 않는 불순물이 검출되지 않을 때까지 세척용액을 흘려주고, 8 M 우레아, 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하되, 이미다졸 농도를 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM로 변화를 주어 단백질을 용출하였다(도 14). 이때, 도 14의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 라인 3 내지 4는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 5 내지 7은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 8 내지 9는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 10 내지 11은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

니켈 크로마토그래피에서 회수한 용출용액을 삼투압의 원리를 이용하여 PBS로 용액교환을 하였다. 용액교환이 완료된 용출용액을 원심분리기를 이용하여 상등액을 회수하고, 회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 확인이 끝난 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질은 액체질소로 급랭하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 PBS 완충 용액에 투석 후 수득한 TOM70-(GGGS)3-p53 단백질을 나타낸 것이다.

실시에 1.3.2. 대장균 유래 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질 분리 및 정제
TOM70-(GGGS)3-UB-p53 재조합 단백질을 발현하는 대장균을 사용하여, 실시에 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질을 용출하였다(도 16). 이때, 도 16의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 라인 3은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 4 내지 7은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 8 내지 11은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM

Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백량을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 17에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질은 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때,
5 도 17의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 PBS 완충 용액에 투석 후 수득한 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질을 나타낸 것이다.

실시에 1.3.3. 대장균 유래 재조합 UB-p53 단백질 분리 및 정제

유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-p53 단백질을 발현하는 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37℃ 진탕 배양기에서 배양하여 흡광도가
10 OD600에서 0.4에 도달할 때 0.5 mM IPTG를 첨가하여 4시간 동안 추가 진탕 배양하여 유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-p53 단백질을 발현시켰다.

그 후, 실시에 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 UB-p53 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 UB-p53 단백질을 용출하였다(도 18). 이때, 도 18의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈
15 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 라인 3은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 4 내지 6은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 7 내지 9은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM
20 Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 10 내지 11은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백량을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 19에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 UB-p53 단백질을
25 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 19의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 PBS 완충용액에 투석한 후의 UB-p53 단백질을 나타낸 것이다.

실시에 1.3.4. 대장균 유래 UB-p53-TOM7 단백질 분리 및 정제

유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-p53-TOM7 단백질을 발현하는 대장균
30 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37℃ 조건에서 배양하여

흡광도가 OD600에서 0.4에 도달할 때 0.5 mM IPTG를 첨가하여 4시간 동안 추가 진탕 배양하여 유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-p53-TOM7 단백질을 발현시켰다.

그 후, 실시예 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 UB-p53-TOM7 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 UB-p53-TOM7 단백질을 용출하였다(도 20). 이때, 도 20의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 레인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 3은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/10mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 4는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 5 내지 7은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 8 내지 9은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 10 내지 11은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 21에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 UB-p53 단백질은 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 21의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 PBS 완충용액에 투석한 후의 UB-p53-TOM7 단백질을 나타낸 것이다.

20

실시예 2. GranzymeB를 포함한 융합 단백질의 제조

실시예 2.1. GranzymeB 유전자의 증폭

인간 유래 GranzymeB를 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, 인간 유래 자연살해세포로부터 총 RNA를 추출하여 이로부터 cDNA를 합성하였다. 구체적으로, 인간 유래 자연살해세포(human natural killer cell)를 10% 혈청 배지에서 5% 이산화탄소, 37℃ 조건하에서 배양하였다(1×10^6 cell). 이후, 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 RNA를 수득한 후, 이를 Granzyme B 유전자의 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용하였다.

인간 유래 자연살해세포로부터 시그널 펩타이드 서열이 제거된 GranzymeB의 유전자를 얻기 위하여 아미노 말단 이소류신을 시작으로 암호화하는

T2GZMB 프라이머와 카르복실 말단을 암호화하는 XGZMB(noT) 프라이머를 합성한 다음, 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 8에 기재한 바와 같다.

【표 8】

프라이머	서열	서열번호
T2GZMB	5'-AAA AAA CCG CGG TGG TAT CAT CGG GGG ACA TGA GGC ACA TGA GGC CAA GCC -3'	서열번호 24
XGZMB(noT)	5'-AAA AAA CTC GAG GTA GCG TTT CAT GGT TTT CTT TAT CC-3'	서열번호 25

5 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 0.2 pmol T2GZMB 프라이머와 0.2 pmol XGZMB(noT) 프라이머를 dNTP 0.2nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 40주기로 수행하였다. 반응 후에 증폭된 약 700 bp의 DNA 절편을 1%
10 아가로스겔에서 전기 영동하여 분리한 다음, pGEM-T easy(Promega, USA) 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하였다. 이렇게 얻어진 DNA들을 염기서열 분석한 결과, 인간 유래 GranzymeB 단백질을 암호화하는 cDNA를 획득하였음을 확인하였다. 획득된 GranzymeB 유전자를 pTA-GranzymeB 라고 명명하였으며, GranzymeB 유전자는 서열번호 26의 염기서열로 표시하였다(도 22).

15

실시예 2.2. GranzymeB 단백질 발현 벡터 제조

실시예 2.2.1. pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70, 링커(GGGSGGGSGGGGS)와 유비퀴틴이 융합된 형태의 GranzymeB 단백질을 제조하기 위하여 TOM70, 링커,
20 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 GranzymeB를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다.

실시예 2.1.에서 얻은 플라스미드 pTA-GranzymeB 유전자를 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 약 700 bp DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-(p53)
25 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB를 얻었다(서열번호 27)(도 23).

플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGGGS)3-UB-GranzymeB를 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37°C 진탕배양기에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2
5 흡광도에 도달하는 시점에, 최종 0.5 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 24에 나타난 바와 같이, 약 35kDa크기의 TOM70, 링커, 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 GranzymeB 단백질이
10 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 24의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시에 2.2.2. pET15b-UB-GranzymeB-TOM7 제조

15 유비퀴틴과 미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 GranzymeB 단백질을 제조하기 위하여 유비퀴틴, GranzymeB, TOM7의 순서로 융합된 형태의 GranzymeB 단백질을 발현시킬 수 있는 발현백터를 제조하였다.

실시에 2.1.에서 얻은 플라스미드 pTA-GranzymeB 유전자를 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 약 700 bp DNA 단편을
20 얻은 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET15b-UB-(p53)-TOM7 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET15b-UB-GranzymeB-TOM7을 얻었다(도 25). 이때, UB-GranzymeB-TOM7은 서열번호 28의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET15b-UB-Granzyme B-TOM7을 사용하여 대장균 BL21(DE3)
25 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37°C 조건에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 0.5 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

30 대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후

SDS-폴리아크릴아마이드에서 전기영동을 실시하였다. 도 26에 나타난 바와 같이, 약 35 kDa 크기의 유비퀴틴과 TOM7이 융합된 형태의 GranzymeB 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 26의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시예 2.3. 대장균 유래 재조합 TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 단백질의 분리 및 정제

실시예 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 단백질을 용출하였다(도 27). 이때, 도 27의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 레인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 3 내지 4는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 5 내지 7은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 8 내지 9은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 28에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 단백질을 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 28의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 PBS 완충용액에 투석한 후의 TOM70-(GGGS)3-UB-GranzymeB 단백질을 나타낸 것이다.

실시예 3. RKIP을 포함한 융합 단백질의 제조

실시예 3.1. RKIP 유전자의 증폭

인간 유래 RKIP(Raf Kinase Inhibitory Protein) 유전자를 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, 인간 유래 상피 세포로부터 총 RNA를 추출하여 이로부터 cDNA를 합성하였다. 인간 유래 진피 섬유아세포(human dermal

fibroblast cell)를 10% 혈청 배지에서 5% 이산화탄소 37℃ 조건하에서 배양하였다(1x10⁶ cell). 이후, 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 RNA를 수득한 후, 이를 RKIP 유전자의 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용하였다.

인간 유래 진피 섬유아세포로부터 시그널 펩타이드 서열이 제거된 RKIP의 유전자를 얻기 위하여 아미노 말단 프롤린을 시작으로 암호화하는 T2RKIP 프라이머와 카르복실 말단을 암호화하는 XRKIP(noT) 프라이머를 합성한 다음, 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 9에 기재한 바와 같다.

【표 9】

프라이머	서열	서열번호
T2RKIP	5'-AAA AAA CCG CGG TGG Tcc ggt gga cct cag caa gtg gtc-3'	서열번호 29
XRKIP(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG CTT CCC AGA CAG CTG CTC GTA CAG TTT GG-3'	서열번호 30

상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 주형으로 하여 0.2 pmol T2RKIP 프라이머와 0.2 pmol XRKIP(noT) 프라이머를 dNTP 0.2mM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 40주기로 수행하였다. 반응 후에 증폭된 약 560 bp의 DNA 절편을 1% 아가로스겔에서 전기 영동하여 분리한 다음, pGEM-T easy(Promega, USA) 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하였다. 이렇게 얻어진 DNA들을 염기서열 분석한 결과, 인간 유래 RKIP 단백질을 암호화하는 cDNA를 수득하였음을 확인하였다. 수득된 RKIP 유전자를 pTA-RKIP 라고 명명하였으며(도 29), RKIP의 염기서열은 서열번호 31의 염기 서열로 표시하였다.

실시예 3.2. RKIP 단백질 발현 벡터 제조

실시예 3.2.1. pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70, 링커(GGGSGGGSGGGGS)와 유비퀴틴이 융합된 형태의 RKIP 단백질을 제조하기 위하여 TOM70, 링커, 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 RKIP을 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다.

실시예 3.1.에서 얻은 플라스미드 pTA-RKIP 유전자를 제한효소 SacII와

XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔에서 전기영동하여 약 560bp DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-(p53)벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11-TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP을 얻었다(도 30). 이때, TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP은 서열번호 32의 염기
5 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 진탕배양기에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에
10 도달하는 시점에 최종 0.5 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드에서 전기영동을 실시하였다. 도 31에 나타난 바와 같이, 약 33kDa크기의 TOM70, 링커, 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 RKIP 단백질이
15 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 31의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

20 실시예 3.3. 대장균 유래 재조합 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질 분리 및 정제

재조합 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP을 발현하는 대장균 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37℃ 조건에서 배양하여 흡광도가 OD600에서 0.3에 도달할 때 냉장고에 넣어 배양액의 온도를 낮추고 배양기 온도를 18℃로
25 변경 후, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 하루 동안 추가 진탕 배양하여 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질을 발현시켰다.

그 후, 실시예 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP 단백질을 용출하였다(도 32). 이때, 도 32의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸
30 것이고, 레인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 레인

2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 3은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/10mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 4 내지 6은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 7 내지 8은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 9 내지 10은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/175mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 11 내지 13은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 14 내지 16은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

10 회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 33에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP 단백질은 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 33의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 PBS 완충용액에 투석한 후의 TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP 단백질을 나타낸 것이다.

15

실시에 4. PTEN을 포함한 융합 단백질의 제조

실시에 4.1. PTEN 유전자의 증폭

인간 유래 PTEN(Phosphatase and Tensin homolog)을 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, 인간 유래 상피 세포로부터 총 RNA를 추출하여 이로부터 cDNA를 합성하였다. 섬유아세포(human dermal fibroblast cell)를 10% 혈청 배지에서 5% 이산화탄소 37℃ 조건하에서 배양하였다(1x10⁶ cell). 이후, 실시에 1.1.과 동일한 방법으로 RNA를 수득한 후, 이를 PTEN 유전자의 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용하였다.

25 인간 유래 진피 섬유아세포로부터 시그널 펩타이드 서열이 제거된 PTEN의 유전자를 얻기 위하여 아미노 말단 트레오닌을 시작으로 암호화하는 T2PTEN 프라이머와 카르복실 말단을 암호화하는 XPTEN(noT) 프라이머를 합성한 다음, 상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 10에 기재한 바와 같다.

【표 10】

프라이머	서열	서열번호
T2PTEN	5'-AAA AAA CCG CGG TGG Tac agc cat cat caa aga gat cgt tag -3'	서열번호 33
XPTEN(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG GAC TTT TGT AAT TTG TGT ATG CTG -3'	서열번호 34

상기에서 제조된 cDNA를 주형으로 주형으로 하여 0.2 pmol T2PTEN 프라이머와 0.2 pmol XPTEN(noT) 프라이머를 dNTP 0.2nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 5 72℃ 1분의 증폭 반응을 40주기로 수행하였다. 반응 후에 증폭된 약 1,200 bp의 DNA 절편을 1% 아가로스겔에서 전기 영동하여 분리한 다음, pGEM-T easy(Promega, USA) 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하였다. 이렇게 얻어진 DNA들을 염기서열 분석한 결과, 인간 유래 RKIP단백질을 암호화하는 cDNA를 획득하였음을 확인하였다. 획득된 PTEN 유전자를 pTA-PTEN 라고 명명하였으며(도 34), PTEN의 10 염기서열은 서열번호 35의 염기 서열과 같다.

실시예 4.2. PTEN 단백질 발현 벡터 제조

실시예 4.2.1. pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM70, 링커(GGGSGGGSGGGGS)와 15 유비퀴틴이 융합된 형태의 PTEN 단백질을 제조하기 위하여 TOM70, 링커와, 그리고 유비퀴틴이 융합된 형태의 PTEN 유전자를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다.

실시예 4.1.에서 얻은 플라스미드 pTA-PTEN 유전자를 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 약 1,200 bp DNA 단편을 얻은 20 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-(p53) 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN을 얻었다(도 35). 이때, TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN은 서열번호 36의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET11c-TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 25 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 획득된 콜로니들을 LB 액상

배지에서 37℃ 조건에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 0.5 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후
 5 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 36에 나타난 바와 같이, 약 73 kDa 크기의 TOM70, 링커와 유비퀴틴이 융합된 형태의 PTEN 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 36의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸
 10 것이다.

실시에 4.3. 대장균 유래 재조합 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질 분리 및 정제

실시에 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN
 15 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질을 용출하였다(도 37). 이때, 도 37의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 레인 2는 니켈 친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 3은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/10mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.
 20 레인 4는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 5 내지 8은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 9 내지 10은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 11은 8M UREA/50mM Na-
 25 phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole 용액으로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 38에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질은 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 38의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 PBS
 30 완충용액에 투석한 후의 TOM70-(GGGS)3-UB-PTEN 단백질을 나타낸 것이다.

실시에 5. 미토콘드리아 외막 단백질, 유비퀴틴 및 GFP를 포함한 융합 단백질의 제조

실시에 5.1. 대장균 유래 재조합 UB-GFP-TOM7 단백질 분리 및 정제

- 5 유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-GFP-TOM7 단백질을 발현하는 대장균 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37°C 조건에서 배양하여 흡광도가 OD600에서 0.3에 도달할 때 냉장고에 넣어 배양액의 온도를 낮추고 배양기 온도를 18°C로 변경 후 0.5 mM IPTG를 첨가하여 하루 동안 추가 진탕 배양하여 유비퀴틴이 융합된 성숙형 GFP-TOM7 단백질을 발현시켰다.
- 10 배양 종료 후 원심분리를 이용하여 세포를 회수하고, 회수된 세포는 PBS를 이용하여 1회 세척한 다음 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하여 세포를 현탁시키고, 현탁된 세포는 소니케이터를 이용하여 파쇄공정을 수행하였다. 파쇄된 세포는 고속 원심분리기를 이용하여 원심분리 한 후 상등액을 회수하고, 회수된 상등액은
- 15 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터한 후 미리 패킹된 니켈 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 1차 정제를 수행하였다.

- 유비퀴틴이 융합된 성숙형 UB-GFP-TOM7 단백질이 포함된 파쇄 용액을 로딩 후 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하여 결합하지 않는 불순물이 검출되지 않을 때까지 세척용액을 흘려주고 50
- 20 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하여 농도 구배에 따라 단백질을 용출하였다(도 39). 이때, 도 39의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인 2는 니켈친화수지에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 라인 3은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/20mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸
- 25 것이다. 라인 4는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/55mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 5는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/60mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 6은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/65mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 7은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/70mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 8은
- 30 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/75mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

레인 9는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/80mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 10은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/85mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 11은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/90mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 12는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/95mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 13은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 14는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/105mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

용출된 용액 속 이미다졸을 제거하기 위해 50 mM 소듐포스페이트 500 mM NaCl pH 8.0 용액에 삼투압의 원리를 이용하여 투석을 진행하였다(도 40). 확인된 최종 UB-GFP-TOM7 단백질은 액체질소에 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 40의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 융합 단백질 분획물을 혼합한 후 50mM Na-phosphate/500mM NaCl 용액에 투석한 후 수득한 단백질을 나타낸 것이다.

실시에 5.2. 대장균 유래 재조합 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP 단백질 분리 및 정제

재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP를 발현하는 대장균 BL21(DE3) 생산 균주를 LB 액상배지에 접종하고 37℃ 조건에서 배양하여 흡광도가 OD600에서 0.3에 도달할 때 냉장고에 넣어 배양액의 온도를 낮추고 배양기 온도를 18℃로 변경 후 0.5 mM IPTG를 첨가하여 하루 동안 추가 진탕 배양하여 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP를 발현시켰다.

배양 종료 후 원심분리를 이용하여 세포를 회수하고, 회수된 세포는 PBS를 이용하여 1회 세척한 다음 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을 이용하여 세포를 현탁시키고, 현탁된 세포는 소니케이터를 이용하여 파쇄공정을 수행하였다. 파쇄된 세포는 고속 원심분리기를 이용하여 원심분리 한 후 상등액을 회수하고, 회수된 상등액은 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터한 후 미리 패킹된 니켈 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 1차 정제를 수행하였다.

재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP가 포함된 파쇄 용액을 니켈수지가 담긴 칼럼에 로딩 후 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, pH

8.0 용액을 이용하여 결합하지 않는 불순물이 검출되지 않을 때까지 세척용액을
 흘려주고 50 mM 소듐포스페이트, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, pH 8.0 용액을
 이용하되, 이미다졸 농도를 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM로 변화를 주어
 단백질을 용출하였다(도 41). 이때, 도 41의 라인 M은 단백질 분자량 마커를
 5 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈 크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인
 2는 니켈 크로마토그래피에 결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 라인 3은 50mM
 Na-phosphate/500mM NaCl/20mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인
 4는 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸
 것이다. 라인 5 내지 8은 50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole로
 10 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 9내지 11은 50mM Na-phosphate/500mM
 NaCl/250mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 라인 12는 50mM Na-
 phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

니켈 크로마토그래피에서 회수한 용출용액을 삼투압의 원리를 이용하여
 PBS 완충용액으로 용액교환을 하였다. 용액교환 후 회수한 최종 단백질 TOM70-
 15 (GGGGS)3-UB-GFP를 단백질 정량 및 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 42에
 나타난 바와 같이 확인이 끝난 TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP 단백질은 액체질소에
 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 42의 라인 M은 단백질
 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 PBS 완충 용액에 투석 후 수득한 TOM70-
 (GGGGS)3-UB-GFP 단백질을 나타낸 것이다.

20

II. 미토콘드리아 외막 타겟팅 단백질 및 표적 타겟팅 단백질을 포함한 융합 단백질의 제조

실시예 6. scFvHER2를 포함한 융합 단백질의 제조

25 실시예 6.1. scFvHER2 유전자의 합성

인간 유래 scFvHER2를 재조합 단백질로 발현시키기 위하여,
 (주)바이오닉스에 gene 합성을 의뢰하여 수득된 scFvHER2 유전자를 pUC57-
 scFvHER2라고 명명하였으며 scFvHER2의 염기서열은 서열번호 37의 염기 서열과
 같다.

30

실시예 6.2. scFvHER2 단백질 발현 벡터 제조

실시예 6.2.1. pET15b-UB-scFvHER2-TOM7

유비퀴틴, 미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2 단백질을 제조하기 위하여 유비퀴틴, TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2 유전자를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다.

상기 실시예 6.1.에서 얻은 플라스미드 pUC57-scFvHER2 유전자를 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔 전기영동하여 약 750 bp DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET15b-UB-(p53)-TOM7 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET15b-UB-scFvHER2-TOM7을 얻었다(도 39). 이때, UB-scFvHER2-TOM7은 서열번호 38의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET15b-UB-scFvHER2-TOM7을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37°C 조건에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 1mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드에서 전기영동을 실시하였다. 도 44에 나타난 바와 같이, 약 35 kDa크기의 유비퀴틴과 TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 44의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

실시예 6.2.2. pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2 단백질을 제조하기 위하여 TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2를 발현시킬 수 있는 동물세포용 발현벡터를 제조하였다. TOM7과 scFvHER2 유전자를 얻기 위하여 RscFvHER2 프라이머와 XTOM7(noT) 프라이머를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 11에 기재한 바와 같다.

【표 11】

프라이머	서열	서열번호
RscFvHER2	5'-AAA AAA GAA TTC ATG GAA GTG CAA CTT GTT GAG AGT GG -3'	서열번호 39
XTOM7(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG TCC CCA AAG TAG GCT CAA AAC AG-3'	서열번호 40

실시에 6.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-scFvHER2-TOM7를 주형으로 하여 0.2 pmol 프라이머(RscFvHER2)와 0.2 pmol 프라이머(XTOM7(noT))를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 유전자 scFvHER2-TOM7을 수득하였다. 증폭된 scFvHER2-TOM7 유전자를 제한효소 EcoRI와 XhoI으로 절단하여 1% 아가로스겔 전기영동하여 각각 약 850 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 EcoRI와 XhoI으로 절단된 pcDNA3.1-myc/His A 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His을 얻었다(도 45).

이때, scFvHER2-TOM7-myc/His는 서열번호 41의 염기 서열로 표시하였다. 플라스미드 pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His을 사용하여 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였고 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다. 도 46에 나타난 바와 같이, 약 35 kDa크기의 TOM7이 융합된 형태의 scFvHER2 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 46의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하여 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

실시에 6.3. 대장균 유래 제조합 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질 분리 및 정제

실시에 1.3.1.의 방법과 동일한 과정으로 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질을 분리 및 정제하였다. 그 결과 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질을 용출하였다(도 47). 이때, 도 47의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 니켈 친화크로마토그래피 로딩 샘플을 나타낸 것이다. 라인 2는 니켈 친화수지에

결합하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 3은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/10mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 4 내지 5는 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/50mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 6 내지 8은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/100mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 9 내지 10은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/250mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다. 레인 11은 8M UREA/50mM Na-phosphate/500mM NaCl/500mM Imidazole로 용출한 결과를 나타낸 것이다.

회수된 용출용액의 단백질을 단백질 정량법으로 측정하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 도 48에 나타난 바와 같이, 확인이 끝난 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질을 액체질소로 급랭하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이때, 도 48의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 PBS 완충용액에 투석한 후의 UB-ScFvHER2-TOM7 단백질을 나타낸 것이다.

15 실시예 7. scFvMEL을 포함한 융합 단백질의 제조

실시예 7.1. scFvMEL 유전자의 합성

Melanoma에 대한 항체 단편으로서, 인간 유래 scFvMEL를 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, (주)바이오닉스에 유전자 합성을 의뢰하여 수득된 scFvMEL 유전자를 pUC57-scFvMEL 라고 명명하였으며, scFvMEL의 염기서열은 서열번호 20 42의 염기 서열과 같다.

실시예 7.2. scFvMEL 단백질 발현 벡터 제조

실시예 7.2.1. pET15b-UB-scFvMEL-TOM7 제조

유비퀴틴, 미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL 단백질을 제조하기 위하여 유비퀴틴, TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제조하였다.

실시예 7.1.에서 얻은 플라스미드 pUC57-scFvMEL 유전자를 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단하여 2% 아가로스겔에서 전기영동하여 약 750 bp DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 SacII와 XhoI으로 절단된 pET15b-UB-(p53)-TOM7 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pET15b-UB-scFvMEL-

TOM7을 얻었다(도 49). 이때, UB-scFvMEL-TOM7은 서열번호 43의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pET15b-UB-scFvMEL-TOM7을 사용하여 대장균 BL21(DE3) 균주를 형질전환시켰다. 그 후, 형질전환된 균주를 항생제 앰피실린이 첨가된 Luria-Bertani(LB) 고체배지에서 배양 후, 여기에서 수득된 콜로니들을 LB 액상 배지에서 37℃ 진탕배양기에서 배양하여 세포밀도가 OD600에서 약 0.2 흡광도에 도달하는 시점에 최종 1mM 농도가 되게 IPTG를 첨가한 후 약 4시간 더 진탕 배양을 실시하였다.

대장균 세포의 일부를 원심 분리하여 수득한 다음, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였다. 도 50에 나타난 바와 같이, 약 35kDa크기의 유비퀴틴과 TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 50의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 IPTG를 첨가한 뒤 4시간 후에 대장균 파쇄 후 원심분리한 침전물을 나타낸 것이고, 레인 2는 대장균 파쇄 후 원심분리한 상등액을 나타낸 것이다.

15 실시예 7.2.2. pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL 단백질을 제조하기 위하여 TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL를 발현시킬 수 있는 동물세포용 발현벡터를 제조하였다. TOM7과 scFvMEL 유전자를 얻기 위하여 프라이머(RscFvMEL)를 제조하였다. 각 프라이머의 서열은 아래 표 12에 기재한 바와 같다.

【표 12】

프라이머	서열	서열번호
RscFvMEL	5'- AAA AAA GAA TTC ATG AAA ACA AGT AAC CCA GGA GTG-3'	서열번호 44

실시예 6.2.1.에서 얻은 플라스미드 pET15b-UB-scFvMEL-TOM7을 주형으로 하여 0.2 pmol RscFvMEL 프라이머와 0.2 pmol XTOM7(noT) 프라이머를 dNTP 0.2 nM, 1x AccuPrime Taq DNA 중합효소 반응 완충용액(Invitrogen, USA) 및 1 unit의 AccuPrime Taq DNA 중합효소를 섞었다. 그 후, 중합효소 연쇄 반응 장치에서 95℃ 40초, 58℃ 30초, 72℃ 1분의 증폭 반응을 25주기로 수행하여 scFvMEL-TOM7을 수득하였다. 증폭된 scFvMEL-TOM7 유전자를 제한효소 EcoRI과

XhoI으로 절단하여 1% 아가로스겔 전기영동하여 각각 약 850 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 절단된 pcDNA3.1-myc/His A 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His을 얻었다(도 51). 이때, scFvMEL-TOM7-myc/His은 서열번호 45의 염기 서열로

5 표시하였다.

플라스미드 pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His을 사용하여 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였고 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다. 도 52에 나타난 바와 같이, 약 35 kDa크기의 TOM7이 융합된 형태의 scFvMEL

10 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 52의 레인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 레인 1은 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하여 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

15 실시예 8. scFvPD-L1를 포함한 융합 단백질의 제조

실시예 8.1. scFvPD-L1 유전자의 합성

인간 유래 scFvPD-L1를 재조합 단백질로 발현시키기 위하여, (주)바이오닉스에 gene 합성을 의뢰하여 수득된 scFvPD-L1 유전자를 pUC57-scFvPD-L1 라고 명명하였으며 이의 염기서열은 서열번호 46의 염기 서열과 같다.

20

실시예 8.2. scFvPD-L1 단백질 발현 벡터 제조

실시예 8.2.1. pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His 제조

미토콘드리아 외막에 결합하는 TOM7이 융합된 형태의 scFvPD-L1 단백질을 제조하기 위하여 TOM7이 융합된 형태의 scFvPD-L1를 발현시킬 수 있는

25 동물세포용 발현벡터를 제조하였다.

플라스미드 pUC57-scFvPD-L1를 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 절단하여 1% 아가로스겔에서 전기영동하여 약 760 bp의 DNA 단편을 얻은 후에 제한효소 EcoRI과 XhoI으로 절단된 pCMV-(scFvMEL)-TOM7-myc/His 벡터에 T4DNA 연결효소를 이용하여 삽입하여 플라스미드 pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His을 얻었다(도 53).

30 이때, scFvPD-L1-TOM7-myc/His은 서열번호 47의 염기 서열로 표시하였다.

플라스미드 pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His을 사용하여 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하였고 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다. 도 54에 나타난 바와 같이, 약 35 kDa크기의 TOM7이 융합된 형태의 scFvPD-L1 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이때, 도 54의 라인 M은 단백질 분자량 마커를 나타낸 것이고, 라인 1은 동물세포 CHO에 형질주입시키고, 세포를 파쇄한 후 SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 실시하여 anti-c-myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

10 III. 융합 단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아의 제조

실시예 9. 개질된 미토콘드리아의 제조

미토콘드리아 외막 결합부위와 융합된 형광단백질이 미토콘드리아의 외막에 결합하는지 여부를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저 미토콘드리아는 팻줄유래 중간엽줄기세포(UC-MSC)로부터 미토콘드리아를 원심분리 방법으로 분리하였다. 그 후에 MitoTracker CMXRos Red로 염색하였다. 상기에서 대장균으로부터 정제된 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-GFP와 혼합하여 상온에서 약 30여분 인큐베이션하였다.

그 후 원심분리하여 반응하지 않은 단백질을 제거하고 PBS 완충용액으로 2회 세척하였다. 이후 형광 현미경을 이용하여 미토콘드리아에 결합된 형태의 형광단백질을 관찰하였다. 대조군으로는 미토콘드리아 외막결합부위를 포함하지 않은 정제된 GFP 단백질을 사용하였다. 그 결과 미토콘드리아 외막 결합부위와 융합된 형광단백질(TOM70-(GGGS)3-UB-GFP)은 팻줄유래 중간엽줄기세포(UC-MSC) 미토콘드리아와 동일한 장소에 위치하고 있음을 확인할 수 있었다(도 55a, 도 25 55b).

실시예 10. 외래 미토콘드리아 외막에 재조합 단백질 p53 결합 능력 확인

팻줄유래 중간엽줄기세포로부터 원심분리 방법을 이용하여 분리된 미토콘드리아는 정제된 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 또는 UB-p53- 30 TOM7과 혼합하여 1:1 비율로 4℃에서 1시간 반응 조건으로 결합시켰다.

대조군으로는 단백질과 혼합하지 않은 미토콘드리아를 사용하였다. 미토콘드리아와 p53 간의 결합능력은 웨스턴 블롯(western blot) 실험 방법을 통해 확인하였다(도 56).

먼저 미토콘드리아와 p53 단백질의 결합 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심
5 분리하여 미토콘드리아 혹은 p53이 결합된 미토콘드리아를 침전물의 형태로 얻었다. 2회 PBS 세척 과정을 통해 미토콘드리아와 결합하지 않은 단백질을 제거하였고, 세척된 침전물은 단백질 전기 영동(SDS-PAGE) 후 웨스턴 블롯(Western Blot)을 수행하였다. 1차 항체로 rabbit anti-p53 항체를 사용하였고, 2차 항체로는 anti-rabbit IgG HRP 을 사용하였다. 단백질을
10 결합하지 않은 미토콘드리아 단독인 대조군과 비교해 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 또는 UB-p53-TOM7과 결합한 미토콘드리아 실험군에서 예상되는 분자량인 크기 60kDa와 동일한 위치에서 밴드를 확인하였다(도 56).

IV. 활성단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아의 활성 확인

15

실시예 11. 외래 미토콘드리아의 분리 및 세포 내 주입

탯줄유래 중간엽줄기세포(UC-MSC)로부터 미토콘드리아를 원심분리 방법을 이용하여 분리하였다. 분리된 미토콘드리아는 Mitotracker CMX Ros로 염색하였고, BCA 정량법으로 분리한 미토콘드리아의 농도 및 총 양을 확인하여 0ug, 1ug, 5ug,
20 10ug, 50ug, 100ug의 미토콘드리아를 원심분리 방법을 이용하여 위암 세포주인 SNU-484 세포 내로 주입하였다. 실험 결과 세포 내로 주입되는 미토콘드리아의 정도는 미토콘드리아 양에 농도의존적임을 형광현미경으로 확인하였다(도 57).

실시예 12. 정상 미토콘드리아가 암세포에 미치는 영향 확인

25 정상세포에서 유래된 미토콘드리아가 암세포의 증식과 ROS 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 미토콘드리아 공여세포로 간세포(WRL-68), 섬유아세포(fibroblast), 탯줄유래 중간엽줄기세포(UC-MSC)를 선정하였다. 상기 세포 세포로부터 원심분리 분획 방법으로 각각 미토콘드리아를 분리하였다. 미토콘드리아 수용세포로서 사용된
30 암세포는 피부표피암세포인 A431 세포주를 사용하였다. 이때, 원심력을 이용하여

피부표피암세포 내로 미토콘드리아를 농도별로 미토콘드리아를 전달하였다(특허 10-2017-0151526 참조).

- 5 도입 후, 24, 48, 72 시간 후에 피부표피암세포 증식과 활성산소(ROS) 생성을 관찰하였다. 그 결과 다양한 유래의 정상세포로부터 얻어진 미토콘드리아를 암세포에 주입한 경우에 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었고 또한 암세포 내 ROS 생산을 정상 미토콘드리아 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 58 및 도 59).

실시예 13. 정상 미토콘드리아가 약물내성에 미치는 영향 확인

- 10 정상세포에서 유래된 미토콘드리아가 암세포 내로 주입될 경우 암세포의 특징인 약제내성, 항산화유전자 발현 여부, 암전이(metastasis)에 어떠한 영향을 미치는지를 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 먼저, 미토콘드리아 공여세포로 정상 간세포(WRL-68)를 설정하고 이 세포로부터 원심분리 분획 방법으로 미토콘드리아를 분리하여 사용하였다. 미토콘드리아 수용세포로서 사용된
- 15 암세포로는 간암세포주인 HepG2 세포를 사용하였다. 원심력을 이용하여 간암세포 내로 농도별로 미토콘드리아를 전달한 후, 항암제인 Doxorubicin에 대한 약제내성을 관찰한 결과 미토콘드리아를 받은 암세포주의 경우 더 높은 약물민감도를 나타내었음을 확인하였다(도 60).

20 실시예 14. 정상 미토콘드리아가 항산화 효과에 미치는 영향 확인

정상세포에서 분리한 미토콘드리아를 농도별로 간암 세포주인 HepG2 세포에 주입함에 따라 암세포 내 항산화 단백질인 효소 catalase와 SOD-2(superoxide dismutase-2) 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 61).

25 실시예 15. 정상 미토콘드리아가 암세포 전이에 미치는 영향 확인

전이와 관련하여 EMT(Epithelial to mesenchymal transition)에 관여하는 유전자중 하나인 α -smooth muscle actin(α -SMA) 유전자의 발현 여부를 확인하였다. 이때, 미토콘드리아를 받은 간암세포의 경우 그렇지 않은 간암세포에 비해 미토콘드리아 농도 의존적으로 α -SMA 단백질의 발현이 현저하게 감소가

되어 있음을 알 수 있었다. 이와는 반대로 세포부착 단백질 중 하나인 E-cadherin 단백질의 경우는 미토콘드리아 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다(도 62). 이러한 암전이에 관여하는 것으로 알려진 단백질들의 변화는 암세포 내로 주입된 정상 미토콘드리아에 의해 이루어지는 것으로써 암세포의 전이(metastasis)에도 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 16. 외래 미토콘드리아 외막에 재조합 단백질 p53 탑재 및 세포 내 주입 확인

탯줄유래 중간엽줄기세포로부터 미토콘드리아를 원심분리 방법으로 분리한 후에 Mitotracker CMX Ros로 염색하였고, 정제된 재조합 단백질 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 또는 UB-p53-TOM7과 혼합하여 1:1 비율로 4℃에서 1시간 반응 조건으로 incubation 한 뒤 원심 분리하여 반응하지 않은 단백질을 제거한 뒤 완충용액 PBS로 2회 세척한 후 p53 단백질이 결합된 형태의 미토콘드리아를 원심분리 방법으로 위암세포주 SNU-484 세포 내로 주입하였다(도 63). 이때 대조군으로는 미토콘드리아를 사용하지 않은 그룹과 미토콘드리아 단독으로 사용한 그룹으로 설정하였다. 하루 배양 뒤, 면역세포화학법(Immunocytochemistry, ICC)을 이용하여 세포 내 주입된 외래 미토콘드리아에 탑재된 p53단백질을 형광현미경으로 관찰하였다.

1차 항체로는 rabbit anti-p53 항체를 사용하였고, 2차 항체로는 Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488을 사용하였다. 그 결과 외래 미토콘드리아(붉은색 염색)에 탑재된 TOM70-(GGGGS)3-UB-p53(녹색염색) 또는 UB-p53-TOM7(녹색염색) 단백질은 세포 내 주입 시 외래 미토콘드리아와 함께 주입된 세포 내 세포질에 위치함을 확인하였다(도 64, 200배율 및 도 65, 400배율). 이로써 재조합 단백질은 미토콘드리아를 매개로 하여 세포 내로 주입이 용이함을 알 수 있었다.

실시예 17. 암세포주에서 p53 탑재된 미토콘드리아의 활성 확인

실시예 17.1. 위암세포주를 이용한 세포 내 주입된 p53 탑재 외래 미토콘드리아의 세포사멸 능력 확인

탯줄유래 중간엽줄기세포로부터 원심분리 방법을 이용하여 분리된

미토콘드리아는 대장균으로부터 정제된 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 또는 UB-p53-TOM7과 혼합하여 1:1 비율로 4℃에서 1시간 반응 조건으로 결합시켰다. 대조군으로는 TOM70을 포함하지 않는 UB-p53 단백질과 유비퀴틴(ubiquitin)을 포함하지 않는 TOM70-(GGGS)3-p53을 사용하였다.

5 결합하지 않은 단백질은 원심분리 및 PBS 세척 과정으로 제거하였고, 단백질이 결합된 미토콘드리아는 p53 유전자의 변이로 인해 p53능력이 결여된 위암세포주 SNU-484에 원심 분리하여 주입되었다(도 66). 하루 배양 뒤, 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)로 1시간 고정화(Fixation)한 다음, permeabilization solution(0.1% Triton-X-100이 포함된 0.1% sodium citrate

10 버퍼, pH 7.4)을 이용하여 세포의 투과화를 유도하고 TUNEL solution(In situ cell death detection kit, TMR RED, Roche)으로 37℃에서 한 시간 반응시켰다.

TUNEL 분석법에서 핵산의 단편화(DNA fragmentation)가 일어난 부분은 붉은색으로 염색이 되며, 이는 세포사멸(apoptosis)이 일어남을 나타내는 것이다. 대조군과 비교하여 TOM70-(GGGS)3-ub-p53 또는 p53-TOM7이 결합된

15 미토콘드리아가 주입된 세포에서는 대조군과는 달리 붉은색으로 염색된 부분이 다량으로 확인되었으며, 이는 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 또는 UB-p53-TOM7이 결합된 미토콘드리아에 의해 세포사멸이 일어남을 나타낸 것이다. 특히 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 형태의 단백질이 결합된 미토콘드리아에서 더 많은 세포사멸이 일어남을 확인할 수 있었다(도 67a).

20

실시예 17.2. 루시페라제가 결합된 p53 탑재 외래 미토콘드리아의 세포사멸 능력 확인

상기 실시예 5.2.에서 얻은 미토콘드리아에 결합된 형태의 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질이 수용 세포 내로 전달이 된 후에 수용세포 내에서

25 전달된 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질의 생물학적 활성이 유지되는지 여부를 확인하기 위하여 리포터 유전자를 이용한 세포기반 분석을 수행하였다. p53 단백질은 전사인자(transcription factor)이므로 p53 전사인자가 결합할 수 있는 염기서열 RRRCWWGYYY(여기서 R은 G 또는 A를 나타내며, W는 A 또는 T를 나타내며, Y는 C 또는 T를 나타낸다)이 6번 반복되는 유전자를 다음과 같은 서열로 합성을

30 하였다. P53-promoter-S의 염기서열은 다음과 같고(5'-GGG CAT GCT CGG GCA TGC

CCG GGC ATG CTC GGG CAT GCC CGG GCA TGC TCG GGC ATG CCC-3')(서열번호 91),
 P53-promter-AS 의 염기서열은 다음과 같다(5'-GGG CAT GCC CGA GCA TGC CCG GGC
 ATG CCC GAG CAT GCC CGG GCA TGC CCG AGC ATG CCC-3')(서열번호 92).

합성한 유전자 P53-promter-S 5ug 과 합성한 유전자 P53-promter-AS
 5 5ug을 70°C에서 20분간 incubation 하여 이중나선 유전자의 합성을 촉진시킨
 뒤에 polynucleotide T4 kinase 효소를 이용하여 인산화 반응을 유도하였다.
 인산화가 유도된 이중나선 유전자는 제한효소 Sma I으로 절단된 pGL3 vector에
 삽입을 하여 p53 전사인자가 결합할 수 있는 염기서열(RRRCWWGYYY)이 6번 반복된
 유전자를 리포터 유전자인 루시퍼레이즈에 결합시킨 플라스미드 p6xp53-Luc를
 10 완성하였다. 플라스미드 p6xp53-Luc와 베타갈락토시데이즈 발현벡터인
 플라스미드 pRSVb-gal을 인간 신장세포인 HEK293 세포에 리포펙타민 방법으로
 형질전환 시켰다.

이후, 6시간 뒤에 미토콘드리아 10ug 과 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질
 5ug, 10ug, 20ug을 각각 결합시킨 결합물을 HEK293 세포에 처리하였다. 이때
 15 대조군으로는 PBS 또는 p53 단백질이 결합된 10 ug의 미토콘드리아를 각각
 사용하여 처리하였다. 이렇게 처리한 세포를 18시간동안 배양한 후에
 루시퍼레이즈 활성을 측정하여 분석하였으며 이때 형질전환의 효율성을 보정하기
 위하여 베타갈락토시데이즈의 활성을 측정하여 얻어진 값으로 나누어진
 루시퍼레이즈 값을 보정 루시퍼레이즈 값으로 결정하였다.

20 미토콘드리아 10 ug과 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질 5 ug, 10 ug 및 20
 ug을 각각 결합시킨 결합물을 처리한 세포에서 루시퍼레이즈 값이 증가하였음을
 확인할 수 있어 세포 내로 들어간 p53 단백질이 활성을 나타내고 있음을 확인할
 수 있었다(도 67b).

25 실시예 18. 세포 내 주입된 RKIP 탑재 외래 미토콘드리아의 암세포주 전이성 감소 능력 확인

땃줄유래 중간엽줄기세포로부터 원심분리 방법을 이용하여 분리된
 미토콘드리아는 정제된 재조합 단백질 TOM70-(GGGS)3-UB-RKIP과 혼합하여 1:1
 비율로 4°C에서 1시간 반응 조건으로 결합시켰다. 단백질이 결합된

미토콘드리아는 RKIP 단백질이 저하되어 전이 능력이 높아졌다고 알려진 유방암세포주 MDA-MB-231에 원심 분리하여 주입되었다.

암세포의 전이성(metastasis)의 능력을 확인하기 위해 transwell plate를 이용한 세포침투분석법(cell invasion assay)를 진행하였다. 8 μ m pore 크기의 transwell upper-chamber에 matrigel을 30분간 37°C에서 코팅하였다. 시험군으로 미토콘드리아 단독으로 주입된 MDA-MB-231 세포와 RKIP 단백질이 결합된 미토콘드리아가 주입된 MDA-MB-231 세포를 사용하였다. 각 세포를 1x10⁵ 세포수를 혈청이 없는 배지가 들어 있는 transwell upper chamber에 넣어주고, lower-chamber에는 10%의 우혈청이 포함된 배지를 넣어 주었다. 37°C에서 12시간 동안 배양 후, 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)로 1시간 고정화(Fixation)한 다음 1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 이용하여 matrigel을 통과한 세포를 염색하였다.

현미경으로 관찰 결과 upper-chamber의 아래 membrane에서 보라색으로 염색된 세포가 관찰되었고, 이는 세포의 전이(metastasis)가 일어난 과정이라고 할 수 있다. 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 미토콘드리아를 단독처리한 경우, 그리고 RKIP이 결합된 미토콘드리아를 처리한 실험군에서 보라색으로 염색된 세포의 수가 감소됨을 확인하였다. 무작위로 네 부분을 선택한 다음 염색된 세포의 수를 측정하여 도표로 나타내었다(도 68).

IV. 표적 타겟팅 단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아의 전달을 확인

실시예 19. 암세포 표적용 단쇄가변영역(ScFv, single chain variable fragment) 항체의 세포 내 발현 확인 및 세포 내 미토콘드리아와의 결합 확인

pCMV-ScFv-HER2-TOM7 또는 pCMV-ScFv-MEL-TOM7 또는 pCMV-ScFv-PD-L1-TOM7 를 동물세포에서 발현시키기 위해 해당 DNA를 Lipofectamine LTX and PLUS 또는 Lipofectamine 2000을 사용하여 CHO 세포에 형질주입(Transfection) 하였다. 대조군으로 GFP-TOM7 DNA를 사용하였다. 세포 내에서 발현되어 동일 세포 내의 미토콘드리아에 결합하는지 확인하기 위해 형질주입(Transfection)된 세포로부터 원심분리 방법을 이용하여 세포질(cytosol) 및 미토콘드리아를 분리하였고, BCA assay를 이용해 동일한 단백질량을 맞추어 준 다음 PAGE 전기 영동 후 웨스턴

블롯(Western Blot)으로 결과를 관찰하였다. 1차 항체로는 monoclonal c-myc antibody를 사용하였고, 2차 항체로는 Anti-mouse IgG HRP를 사용하였다.

ScFv-HER2-TOM7 또는 ScFv-MEL-TOM7 단백질들이 예상되는 35kDa의 크기에서 밴드를 확인하였고, 모두 미토콘드리아층에서 확인되는 것으로 보아
5 형질주입 되어 발현된 단백질들이 TOM7에 의해 세포 내 미토콘드리아와의 결합함을 예상할 수 있었다(도 69).

다음으로는 세포 내 발현된 표적용 단백질과 동일 세포 내 미토콘드리아와의 결합을 확인하기 위해 면역세포화학법(immunocytochemistry, ICC) 실험법을 이용하여 세포 내 발현된 ScFv-HER2-TOM7, ScFv-MEL-TOM7 또는
10 ScFv-PD-L1-TOM7 단백질을 형광현미경으로 관찰하였다. 1차 항체로는 monoclonal c-myc antibody를 사용하였고, 2차 항체로는 Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488을 사용하였다. 세포 내 미토콘드리아는 Mitotracker CMX Ros로 염색하였다. 결과적으로 발현된 ScFv-HER2-TOM7, ScFv-MEL-TOM7 또는 ScFv-PD-L1-TOM7 단백질들은 미토콘드리아와 colocalization 되어 세포 내에 있는 미토콘드리아와
15 결합하고 있을 확인하였다(도 70 및 도 71).

실시예 20. 암세포 표적용 단쇄가변영역 항체가 결합된 미토콘드리아의 분리 및 위암세포주에서의 미토콘드리아 주입 비교

pCMV-ScFv-HER2-TOM7 또는 pCMV-ScFv-PD-L1-TOM7가
20 형질주입(Transfection)된 CHO cell로부터 미토콘드리아를 분리하였다. 대조군으로는 형질 전환되지 않은 CHO 세포의 미토콘드리아를 분리하여 사용하였다. 각각으로부터 분리된 미토콘드리아는 Mitotracker CMX Ros로 염색되었다. 동일한 미토콘드리아의 양을 위암세포주인 SNU-484에 처리한 다음 다음날 형광현미경을 이용하여 세포 내 주입된 미토콘드리아의 정도를 비교
25 확인하였다. 대조군에 비해 ScFv-HER2-TOM7 또는 ScFv-PD-L1-TOM7 가 결합된 미토콘드리아가 대조군으로부터 얻은 미토콘드리아에 비해 암세포에 더 많이 주입됨을 확인할 수 있었다(도 72). 따라서 표적용 단백질이 결합된 미토콘드리아는 미토콘드리아 단독으로 사용할 때 암세포 내로 주입이 더 용이함을 알 수 있었다.

VI. 활성단백질이 결합된 개질된 미토콘드리아의 In vivo 활성 확인

실시에 21. Xenograft 모델 제작(SNU-484) 및 시험 물질 투여

실시에 21.1. 암세포 준비

5 실험 당일, 위암세포주 SNU-484 세포주는 마우스 한 마리당 5×10^6 cells가 되게 준비하였다. 세포의 배지를 제거한 뒤 PBS 를 첨가하여 세포를 세척하였다. Trypsin-EDTA 용액을 이용하여 세포를 떼어낸 뒤, 50 mL tube에 넣고 PBS완충용액으로 2회 세척을 한 후 PBS 20 mL을 넣어 세포수와 생존도를 측정하였다. 측정된 세포수를 기준으로 하여, 마리당 5×10^6 cells이 되도록
10 세포수를 맞추어 그룹 별로 나누어 준비하였다. 마리당 이식되는 볼륨은 100 μ L 동량으로 맞추어 주었다. 대조군으로서는 암세포 단독그룹으로서 100 μ L으로 준비하였다.

실시에 21.2. 시험 물질 준비

15 상기와 같이 제대혈 중간엽줄기세포로부터 분리된 미토콘드리아는 이식을 위해 단백질 농도를 기반으로 마리당 50 μ g에 맞추어 준비하였다. 미토콘드리아 단독 투여 그룹의 경우 미토콘드리아를 암세포가 섞여있는 100 μ L의 PBS와 잘 혼합하여 준비하였다. 개질된 미토콘드리아 그룹의 경우 암세포와 혼합하기 전,
에펜도르프 튜브에 준비된 미토콘드리아의 양과 1:1의 비율이 되는 농도로
20 TOM70-(GGGS)3-UB-p53 단백질을 같이 혼합하여, 상온에서 1시간 동안 두었다. 반응시간이 끝난 뒤, 10 분 동안 20,000 xg의 원심분리 후 상등액을 제거하고 단백질이 결합한 미토콘드리아(MT+TOM70-(GGGS)3-UB-p53) 펠렛을 수득하였다. PBS 완충용액을 이용하여 2회 세척을 한 후 p53 단백질이 결합된 미토콘드리아(MT+TOM70-(GGGS)3-UB-p53)는 암세포가 섞여 있는 100 μ L의 PBS와
25 잘 혼합하여 준비하였다.

실시에 21.3. 시험동물 준비 및 시험물질 이식

그룹별로 준비된 이식 시료는 PBS와 동량의 Matrigel(BD)를 넣고, 세포와 가볍게 섞어주어 마리 당 200 μ L의 시험물질을 준비하였다. 이때 모든 조작은

ice에서 진행하였다. 모델 제작을 위해, Balb/c nude mouse(Female, 7주령)을 라온바이오로부터 구입하였고, 암세포 이식을 위해 isoflurane으로 흡입 마취시킨 후, 알코올 솜으로 우측 등 부위(동물 기준)를 소독하였다. 그 후 주사액이 들어간 1 mL 주사기를 이용하여 실험동물의 우측 등부위의 피하에 200 μ L 투여하였다. 투여 후 동물의 무게 및 종양의 크기를 주당 2회 측정하였으며, 결과 분석은 3주까지 관찰하며 진행하였다(도73).

실시예 21.4. 종양 형성 확인

종양의 볼륨은 종양의 장축 및 단축길이를 측정한 후, 아래의 식에 적용하여 계산하였다.

<수학식 1>

$$\text{장축} \times \text{단축} \times \text{단축} \times 0.5 = \text{종양 volume(mm}^3\text{)}$$

실시예 21.5. 생리적, 형태적 변화 관찰

항암 후보물질 투여에 의한 마우스의 생리적, 형태적 변화를 관찰하기 위하여 암세포와 시험물질 투여시점부터 주 2회 체중 및 tumor size를 측정하여 변화를 관찰하였다(도 74).

마우스의 무게는 저울을 이용하여 측정하였으며, 주 2회 측정한 값을 이용하여 그룹별 변화를 분석하였다(도 75). 3주 동안의 몸무게의 변화는 미토콘드리아를 주입하지 않은 그룹, 미토콘드리아 단독으로 투여한 그룹, 20 개질된 미토콘드리아를 주입한 그룹 간에 큰 차이가 없었음을 확인하였다. 종양의 사이즈는 Caliper를 이용하여 종양의 장축(length) 및 단축(width) 길이를 측정한 후, 상기 수학식 1의 식에 적용하여 계산하였다. 주 2회 측정한 값을 이용하여 그룹별 변화를 분석하였다(도 76). 종양의 크기는 미토콘드리아를 25 처리하지 않은 그룹에서 시간이 지남에 따라 큰 폭으로 증가되는 반면에 미토콘드리아와 함께 투여한 마우스의 경우에는 종양의 크기가 시간이 지남에 따라 동화되는 것을 알 수 있었으며, 미토콘드리아 단독으로 투여한 그룹보다 p53 단백질이 탑재된 미토콘드리아의 경우 종양의 크기 증가가 현저히 낮아졌음을 확인할 수 있었다(도 76).

실시에 22. 개질된 미토콘드리아의 피부암 세포 증식 억제 효과 확인

상기에서 수득한 p53이 결합된 미토콘드리아를 피부암 세포종인 A431 세포에 원심분리 방법으로 전달 시킨 후 A431 세포의 증식을 관찰하였다. 이때 대조군으로는 생리식염수를 사용하였고, 대조시험군으로는 p53 단백질이 융합되지 않은 미토콘드리아 동량을 사용하였다. 대조군과 미토콘드리아만을 사용한 경우에 비해서 세포자살 유도 단백질인 p53 단백질을 탑재시킨 미토콘드리아가 A431 세포의 증식을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다(도 76).

10

V. 분리된 미토콘드리아의 활성 확인

실시에 23. 분리된 미토콘드리아 기능 확인: ATP content

랫줄 유래 줄기세포(UC-MSCs)로부터 세포 내 미토콘드리아를 분리하기 위해 주사기(syringe)를 이용하여 균질화를 시켜 세포를 깨준 뒤, 연속적인 원심분리를 통해 미토콘드리아를 수득하였다. 분리한 미토콘드리아의 기능(function)을 확인하기 위해, 분리된 미토콘드리아를 BCA assay를 통해 미토콘드리아 단백질 농도를 정량화하여 5 μ g의 미토콘드리아를 준비하였다. CellTiter-Glo luminescence kit(Promega, Madison, WI)를 이용하여 미토콘드리아 내 ATP의 양을 확인하였다.

준비된 미토콘드리아는 PBS 100 μ l에 섞어준 뒤 96 well plate에 준비하고, 대조군으로서 미토콘드리아가 포함되지 않은 PBS 100 μ l로 비교하였다. kit에 포함된 테스트용액을 동일하게 100 μ l 추가하여 2분간 교반기에서 반응시켜 잘 섞어준 뒤, 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 Luminescence microplate reader를 이용하여 ATP 양을 측정하였다. 대조군과 비교하여 미토콘드리아가 포함되었을 때 ATP 가 증가함을 확인하였고, 미토콘드리아의 기능을 확인할 수 있었다(도 78).

실시에 24. 분리된 미토콘드리아 기능 확인: 막 전위(Membrane potential)

분리된 미토콘드리아의 막 전위를 확인하기 위해, JC-1 dye(molecular probes, cat no.1743159) 염료를 사용하였다. 준비된 미토콘드리아는 PBS 50 μ l에 섞어준 뒤 96 well plate에 준비하고, 대조군으로서 미토콘드리아가 포함되지 않은 PBS(50 μ l) 군과 CCCP(R&D systems, CAS 555-60-2) 처리 군으로
 5 준비하였다. 미토콘드리아의 Ionophore인 CCCP는 미토콘드리아의 막전위(Membrane potential)를 탈분극(depolarization)시킴으로써 미토콘드리아의 기능을 저해한다. CCCP군은 50 μ M로 분리된 미토콘드리아와 10분간 실온에서 반응시켰다.

그 후 동일하게 JC-1 염료(2 μ M)와 반응시킨 뒤, 막 전위의 변화에 따라
 10 발생하는 농도에 따라 다른 스펙트럼을 가지는 성질을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 저농도에서는 monomer로 존재하며 녹색 형광을 띄고, 높은 농도에서는 염료가 응집(J-aggregate)되어 붉은색 형광을 나타낸다. 미토콘드리아의 막 전위는 붉은색 흡광도에 대한 녹색흡광도의 비율로 계산하여 분석하였다. 반응이 끝난 후, 형광 Microplate reader기를 이용하여
 15 미토콘드리아 막 전위를 측정 하였다(Monomer: Ex 485 / Em 530, J-aggregate: Ex 535 / Em 590). 그 결과는 도 79에 나타내었다.

실시에 25. mROS 생성 확인을 통해 분리된 미토콘드리아 손상 정도 확인

상기와 같이 준비된 5 μ g의 미토콘드리아의 손상(damage) 여부를
 20 확인하기 위해, 분리된 미토콘드리아 내 미토콘드리아성 활성 산소를 분석할 수 있는 MitoSOX red indicator(Invitrogen, cat no. M36008) 염료를 사용하였다. 준비된 미토콘드리아는 PBS 50 μ l에 섞어준 뒤 96 well plate에 준비하고, 대조군으로서 미토콘드리아가 포함되지 않은 PBS 50 μ l로 비교하였다. MitoSOX red 염료는 PBS 50 μ l에 섞어 10 μ M 농도가 되게 하고 96-well plate에 넣어준
 25 뒤(최종 농도 5 μ M 37°C, CO2 인큐베이터에서 20 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, Microplate reader 기를 이용하여 미토콘드리아 내 ROS 양을 측정하였다(Ex 510/ Em 580). 그 결과는 도 80에 나타내었다.

VI. 세포 외 및 세포 내에서 미토콘드리아 외막단백질에 결합된 목적

단백질의 해리 확인

실시예 26. 세포 외에서 미토콘드리아 외막단백질에 결합된 목적 단백질의 해리 확인

5 미토콘드리아와 결합된 활성단백질이 세포 내에 주입이 되었을 때 유리된 형태의 목적 단백질을 얻기 위하여 미토콘드리아 외막단백질과 목적 단백질 사이에 유비퀴틴 단백질을 삽입한 형태의 융합 단백질(TOM70-UB-p53 또는 TOM-UB-GFP)을 대장균으로부터 제조하였다. 유비퀴틴 서열이 유비퀴틴 절단효소인

10 UBP1에 의해 절단이 되는지 여부를 확인하기 위하여 재조합 융합 단백질 TOM70-UB-p53을 UBP1 효소와 37℃에서 1시간 동안 반응을 시켰다.

 그 후, SDS-PAGE 전기영동을 하여 분석을 한 결과 UBP1에 의해 융합 단백질로부터 유비퀴틴 단백질의 해리가 전혀 일어나지 않음을 확인하였다. 이는 구조상 미토콘드리아 외막 단백질의 간섭현상이라고 판단이 되어 미토콘드리아 외막 단백질과 유비퀴틴 단백질 사이에 아미노산 글리신과 세린으로 구성된 링커

15 단백질을 삽입하여 새로운 융합 단백질(TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 또는 TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP)을 대장균으로부터 정제하여 얻은 후 상기와 같이 UBP1 효소와 37℃에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 그 결과 예상대로 UBP1 효소에 의해 유비퀴틴의 3' 말단이 UBP1에 의해 절단이 되어 p53 단백질만이 해리된 것을 SDS-PAGE 전기영동을 통해 확인할 수 있었다(도 82).

20

실시예 26. 세포 내에서 미토콘드리아 외막단백질에 결합된 목적 단백질의 해리 확인

 상기 실시예에서 얻은 융합 단백질(TOM70-(GGGGS)3-UB-p53 또는 TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP)이 미토콘드리아와 결합된 상태로 세포 내에 들어 갔을 때 세포

25 내에 존재하는 유비퀴틴 절단효소에 의해 활성단백질이 해리되는지 여부를 관찰하였다. 먼저 제대혈 중간엽세포로부터 얻은 미토콘드리아와 융합 단백질 TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP 를 마이크로 튜브에서 1시간 반응하여 결합 시킨 후에 결합하지 않은 융합 단백질을 원심분리로 제거한 후 완충용액 PBS로 2회 세척하였다. 이 때 대조군으로는 유비퀴틴이 제거된 융합 단백질(TOM70-

30 (GGGGS)3-GFP)을 사용하였다.

- 이후 미토콘드리아와 결합된 단백질을 원심분리 방법으로 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포에 주입하였다. 하루 뒤에 MDA-MB-231 세포를 파쇄하여 차별화된 중력을 이용하여 미토콘드리아 부분과 세포질액 부분으로 각각 분획하였다. SDS-PAGE 전기영동과 웨스턴 블랏 분석으로 분석한 결과 유비퀴틴이 포함된 융합 단백질의 경우에는 미토콘드리아 외막단백질, 링커단백질, 그리고 유비퀴틴과 해리된 상태의 GFP 단백질이 대부분 세포질액(cytosol) 부분에서 검출이 되었음을 알 수 있었고, 유비퀴틴이 제거된 융합 단백질의 경우에는 미토콘드리아 외막단백질과 링커단백질이 결합된 상태의 GFP 단백질이 대부분 미토콘드리아 분획 부분에서 검출이 되었음을 알 수 있었다(도 83).
- 10 이로서 미토콘드리아에 결합된 미토콘드리아 외막단백질-링커-유비퀴틴-활성단백질은 세포 내로 주입이 될 경우 유비퀴틴과 활성단백질 연결부위가 절단이 되어 해리된 활성단백질이 세포질에 유리됨을 알 수 있었고, 이를 통해 유용 단백질을 세포 내로 효과적으로 전달하는 방법 중 하나로 미토콘드리아를 전달 매개체(delivery vehicle)로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.