



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0029075

(43) 공개일자 2015년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 1/21* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0107734

(22) 출원일자 2013년09월09일

심사청구일자 2013년09월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

윤원석

서울 용산구 청파로 213, 이안프리미어 608호 (문배동)

김철용

서울 송파구 올림픽로 269번지 롯데캐슬골드 102-2201

채양석

서울 서초구 서초중앙로 200, 21동 302호 (서초동, 삼풍아파트)

(74) 대리인

김순용

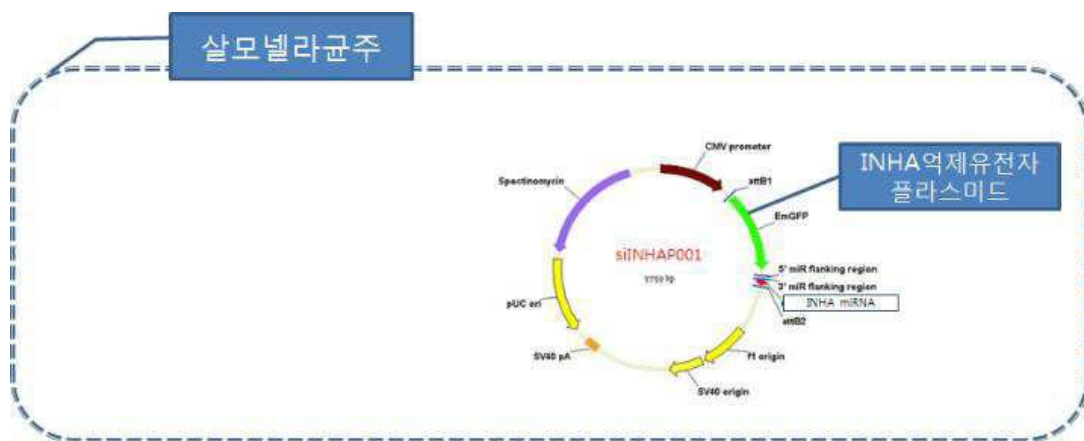
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 인히빈 알파 siRNA를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암제 조성물

### (57) 요약

본 발명은 인히빈 알파(inhibin alpha) 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 구성에 의하면 암 억제 내지 항암면역반응을 유도하여 부작용을 최소화하면서 암을 치료할 수 있다.

대표도 - 도3a



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

인히빈 알파(inhibin alpha) 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 siRNA를 전사하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항 기재의 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 암의 종류는 피부암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

### 청구항 5

인히빈 알파 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하며 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 함유하는 항암제 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 인히빈 알파 siRNA(Inhibin alpha siRNA)를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 항암면역을 증진시킬 수 있는 인히빈 알파 siRNA를 발현할 수 있는 벡터를 포함하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

국내의 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 암은 고령화로 인해 더욱 증가하는 추세에 있다. 현재 항암요법은 외과수술과 화학요법과 방사선요법이 주로 사용된다.

[0003]

특히 외과수술을 제외하고 화학요법 및 방사선요법의 경우 다양한 제제와 방사선 등이 사용되지만 그들의 적용은 인체가 감당할 수 있는 범위에 한정된다. 이들 화학요법 및 방사선요법의 제한적인 적용은 동물시험에서 아무리 우수한 효능을 보일지라도 임상에서 그 효과를 상쇄시키며 적용범위를 제한하고 효능을 제한하는 단점이 있기 때문이다. 이는 항암제 내성을 가진 암세포의 출현 또는 각각의 요법의 세포독성에 기인한 부작용으로 말미암는다.

[0004]

예를 들어 시스플라틴(cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum; CDDP))은 가장 효과적인 암 치료제로서, 현재 임상에서 사용되고 있는 30여 종의 항암제 중 가장 유용한 약제의 하나로 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁 경부암 등의 암에 약효가 있는 것으로 알려져 있다(Teni Boulikas, Oncology Reports, 10:1663-1682, 2003). 그러나, 최근에는 시스플라틴 내성을 가진 암들이 많이 보고되고 있어, 현재 이런 내성을 가진 암 세포들이 문제시되고 암 치료 후 재발의 위험이 있기 때문에 시스플라틴과 다른 화학물질과의 복합요법 또는 시스플라틴과 세포 내 발현 단백질의 조절에 의한 치료의 연구가 활발히 진행중인 실정이다(Tito Fojo, Oncogene, 22: 7512-7523, 2003).

[0005]

또한, 방사선요법은 적당한 양의 방사선을 환부에 조사(照射)함으로써 인체에 발생하는 각종 암을 치료하는 항암요법인데, 이러한 방사선요법은 인체의 조혈기능을 저하시키고 면역계를 억제시켜 암 치료의 효율성을 낮추는

문제점이 있다. 나아가 반복적인 방사선 조사로 인해 암세포가 저항성을 획득하게 되어 방사선요법에는 한계가 있다.

[0006] 이와 같은 항암치료에 있어서 화학요법 및 방사선요법의 부작용은 항암치료의 성공 여부를 떠나 환자의 삶의 질을 매우 열악하게 하고, 나아가서는 또 다른 치명적인 병인으로 작용할 수 있다.

[0007] 따라서 항암치료를 요하는 환자에 있어서, 그 부작용의 관리는 다른 질병과는 달리 항암요법 그 자체에 버금가는 중요성을 가지는 것이라 할 것이다.

[0008] 한편, 살모넬라는 병원성 미생물로 대개의 경우 식중독을 일으키는 병원균이다. 하지만 미국 예일대학 연구팀은 유러피언 암 잡지(European Journal of Cancer)에 발표한 논문에서 유전자를 조작한 살모넬라균과 방사선 요법을 병행하여 사용함으로써 흑색종을 치료하는데 매우 성공적인 결과를 거두었다고 보고하였다(Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation, Journal of Cancer, 18, 23972402 J. Platt.). 이들 연구팀은 이전에도 살모넬라균이 생쥐의 종양을 공격하는 특성을 지닌 것을 발견한 바 있는데, 살모넬라를 유전자 조작하면 종양을 공격하는 특성은 유지하면서 독성만 제거할 수 있으며, 상기 유전자 조작된 살모넬라의 주입을 통해 종양을 억제할 수 있다고 발표하였다. 현재 암세포를 공격하는 상기 박테리아는 미국과 유럽 등에서 사람을 대상으로 하는 임상실험에 들어가 있다.

[0009] 또한, 상기 논문내용에 따르면, 방사선 요법이나 살모넬라 요법을 단독으로 시행하는 경우에는 생쥐에서 종양 억제효과가 2-3주밖에 지속되지 않으나, 두 가지 방법을 병행하여 사용할 경우에는 그 효과가 2배로 증폭된다고 한다. 하지만 이 방법의 경우에도 종양이 완전히 사라지지는 않았으며 단지 생쥐의 생명을 더욱 오래 연장시켜 준 것에 불과한 한계가 있었다.

[0010] 본 발명자는 항암효과를 유도하는 인터페론감마(Interferon gamma) 단백질을 발현하는 살모넬라(Salmonella typhimurium) 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물(대한민국 특허 제10-0818144호(2008.03.31.)), 그리고 종양괴사인자 알파를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물(대한민국 특허 제10-0790376호(2008.01.02.)) 등 살모넬라 균주를 이용한 암 치료용 조성물에 대해 특허등록을 받은 바 있다. 또한, 본 발명자는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주 내에 진행세포에서 튜머 네크로시스 팩터 알파(TNF- $\alpha$ )를 발현할 수 있는 플라스미드를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 종래 TNF- $\alpha$ 를 자체 발현하는 살모넬라의 독성문제를 해결할 수 있는 TNF- $\alpha$ 를 발현하는 살모넬라 균주를 개발한 바 있다(대한민국 특허 제10-0852687호(2008.08.19.)).

[0011] 한편, 인히빈 알파(Inhibin alpha, 이하 INHA와 혼용하여 사용함) 단백질은 뇌하수체 FSH의 분비 억제제를 형성하는데 사용되며 이 단백질은 난소 간질 세포 (Gonadal stromal cell)의 증식억제에 관여하고 암 억제 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 혈청 내의 이 단백질의 농도는 granulosa cell 종양의 지표로 사용될 수도 있다. 하지만 전립선암에서 인히빈 알파 단백질은 억제되어 있으며 암세포에서 발현되어 있지 않으며 감지되지 않는다.

[0012] 인히빈 단백질과 관련하여 대한민국 특허 제10-1039996호 (2011.06.09)에는 KLF2(Kruppel-like factor2), LOC138225(OTTHUMP00000021439), GDF15(growth differentiation factor 15), 및 INHBE(inhibin, betaE)로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 조혈모세포로부터 거핵구 및 혈소판으로의 분화 여부를 탐지하기 위한 마커 검출용 조성물에 대해 기재되어 있다.

[0013] 그러나 아직까지 인히빈 알파의 피부암 및 직장암에서의 발현양상 및 인히빈 알파의 억제가 암세포의 기능에 미치는 영향은 보고되어 있지 않다.

[0014] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 제10-0818144호(2008.03.31.)  
 (특허문헌 0002) 대한민국 특허 제10-0790376호(2008.01.02.)  
 (특허문헌 0003) 대한민국 특허 제10-0852687호(2008.08.19.)  
 (특허문헌 0004) 대한민국 특허 제10-1039996호 (2011.06.09)

### 비특허문헌

- [0016] (비특허문헌 0001) Mellor SL et al., Loss of the expression and localization of inhibin alpha-subunit in high grade prostate cancer. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Mar;83(3):969-75.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0017] 본 발명자들은 인히빈 알파 단백질의 과발현과 암 발생과의 관련성을 확인하고, 암 억제 내지 항암면역증진을 위해 인히빈 알파 유전자를 억제하는 sRNA를 이용하고자 하였다.
- [0018] 따라서 본 발명의 목적은 인히빈 알파 유전자를 억제하여 암 억제 내지 항암면역반응을 유도하는 인히빈 알파 sRNA를 발현하는 살모넬라 균주를 제공하는 데 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은 상기 살모넬라 균주를 함유하는 항암제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

#### 과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 인히빈 알파(inhibin alpha) 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 인히빈 알파 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하며 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 함유하는 항암제 조성물을 제공한다.
- [0024] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.
- [0025] 본 발명에서는 인히빈 알파 단백질의 과발현과 암의 발생이 관련되어 있음을 확인하고(도 1 및 도 2 참조) 암 억제와 항암면역반응 증진을 위해서 살모넬라 균주에 siRNA를 발현하도록 기능성 미생물을 설계하였다.
- [0026] 따라서 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 인히빈 알파(inhibin alpha) 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 제공한다.
- [0027] 작은 RNA(small RNA: 이하 "sRNA"라 칭함)는 생체 내에서 유전자 발현을 조절하는 역할을 하는 17 내지 25 뉴클레오티드(nucleotide: 이하 "nt"라 칭함) 정도 길이의 리보핵산을 말한다. sRNA는 그 생성되는 방식에 따라 크게 마이크로RNA(microRNA: 이하 "miRNA"라 칭함)와 작은 간섭 RNA(small interfering RNA: 이하 "siRNA"라 칭함)로 분류된다. miRNA는 부분적으로 이중나선을 이루는 헤어핀 RNA(hairpin RNA)로부터 생성되며, siRNA는

긴 이중가닥 RNA(double strand RNA: 이하 "dsRNA"라 칭함)으로부터 유래한다. 일반적으로 생체 내의 여러 조절과정에서 중요한 역할을 하는 sRNA는 miRNA이며, 실험 기술적으로 특정 유전자의 발현을 조절하는데 사용되는 sRNA는 siRNA로 분류된다.

[0028] miRNA는 19-25 nt 길이의 단일 가닥 RNA(single strand RNA: 이하 "ssRNA"라 칭함) 분자로서 내재적(endogenous) 헤어핀-구조 전사체(hairpin-shaped transcript)(Bartel, D.P., Cell 116:281-297, 2004; Kim, V.N., Mol. Cells. 19:1-15, 2005)에 의해 생성된다. miRNA는 표적 mRNA의 3' 비번역 영역(UTRs)에 상보적으로 결합하여 전사 후 유전자 억압자(post-transcriptional gene suppressor)로서 작용하며, 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도함으로써 표적 유전자를 억제한다. miRNA는 발전(development), 분화, 증식, 세포사멸 및 신진대사(metabolism)와 같은 다양한 과정에서 중요한 역할을 한다. 이러한 과정들은 가끔 종양 형성 동안 교란되며, 많은 miRNA들이 인간 암에서 낮게 유지되는 것으로 볼 때, miRNA는 종양 형성에서 역할을 하는 것으로 보인다. miRNA와 암 사이의 강한 연관이 최근 증명되어 암 생물학 분야에서 새로운 연구 분야로 떠오르고 있으며(Esquela-kerscher, A. and Slack, F.J., Nat. Rev. Cancer 6(4):259-269, 2006), miRNA의 발현은 발달과 세포 분화 과정 중에 극적으로 변화하고, miRNA의 프로파일(profiling)은 발달 계통과 질병 단계에서 믿을만한 결과들을 보여주었다(Lu, J. et al., Nature 435:834-838, 2005). 또한 miRNA 기능에 대한 조절 네트워크에 대한 이전 분석을 통해 상기 분자들이 어떻게 생성되며 조절되는지 이해할 수 있었다(Kim, V.N. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:376-385, 2005).

[0029] siRNA(small interfering RNA)는 특정 mRNA의 절단을 통하여 RNA 간섭을 유도할 수 있는 짧은 이중가닥 RNA를 말한다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중가닥 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 쌍을 이루는 염기 길이는 바람직하게 50 내지 80 염기일 수 있다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNA 간섭 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평할 말단 또는 돌출 말단 모두 가능하다. 침착 말단 구조는 3' 말단 돌출 구조와 5' 말단 돌출 구조 모두 가능하다.

[0030] sRNA에 의한 유전자 침묵 기작(gene silencing mechanism)인 RNAi 현상은 포유동물 시스템에서 효과적인 유전자 연구 수단으로 사용되고 있다. 효과적이며 안정한 유전자 녹다운(knockdown)은 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA: 이하 "shRNA"라 칭함)로 발현하여 작은 간섭 RNA(siRNA)로 프로세스 되면서 일어난다. 최근 RNAi 기술의 비약적인 진전은 자연적 miRNA 유전자를 모방한 shRNA 발현 카세트를 제작하면서 이루어졌다(Dickins, R.A., et al., Nat. Genet. 37:1289-1295, 2005; Silva, J.M. et al., Nat. Genet. 37:1281-1288, 2005; Zeng, Y., et al., Mol. Cell 9:1327-1333, 2002). RNA 폴리머라아제 II 프로모터에 의해 조정되는 miRNA를 기초한 shRNA는 동물 모델 같은 배양 세포 내에서 효과적이며 안정적으로 유전자 침묵(gene silencing) 조절을 유도한다.

[0031] 상기 miRNA는 화학합성에 의해 루프 및 스템으로 구성된 헤어핀 구조의 단일가닥 RNA (shRNA, short hairpin RNA) 또는 이중가닥 RNA(siRNA, small intefering RNA)로 합성될 수 있으며, 상기 miRNA를 코딩하는 DNA 서열을 siRNA 발현용 바이러스 또는 플라스미드 벡터에 삽입하여 제조한 재조합 벡터로 플라스미드 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 상기 발현벡터는 siRNA 발현에 효율적인 프로모터를 포함하는데, 상기 프로모터는 RNA polymerase II 또는 RNA polymerase III에 의해 인식되는 것이 바람직하며, U6 프로모터 또는 H1 프로모터일 수 있다. 상기와 같은 siRNA 발현벡터는 이에 제한되는 것은 아니며 pSilencer (Ambion, Inc.), pSiEx (Novagen, Inc.), siXpress (Takara Bio, Inc.) 및 pBLOCK-iT™ (Invitrogen, Inc.) 및 SilenCircle™ (Allele) 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR 벡터를 사용하였다.

[0032] 본 발명의 인간 인히빈 알파(inhibin alpha) 유전자의 siRNA는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열과 이와 상보적인 서열을 포함하는 이중가닥 siRNA일 수 있다.

[0033] 본 발명의 siRNA는 그 활성을 저하시키지 않는 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 그 조합을 갖는 변형체를 포함한다. 이러한 변형체는 상기한 siRNA의 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으며, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는다.

[0034] 본 발명의 siRNA는 직접 화학적으로 합성하거나(Sui G 등, (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5515-5520), 인비트로 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR 등, (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian celss, Science 296: 550-553) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.

[0035] 본 발명의 siRNA는 두 가닥의 RNA가 쌍을 이루어 이중가닥 siRNA를 형성하고 있는 형태일 수도 있고, 플라스미

드게 shRNA 벡터와 PCR 발현카세트 등에 의한 트랜스펙션에 이용될 수 있도록 짧은 헤어핀을 갖는 구조로 변형된 형태일 수도 있다.

- [0036] 본 발명의 살모넬라 균주는 장티푸스를 유발하는 group D Salmonella에 속하는 병원균으로서, 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위해 약독화된(attenuated) 살모넬라 균주를 사용하였다. 상기 약독화된 살모넬라 균주는 장티푸스 예방용 약독화 백신인 것을 특징으로 한다. 상기 "약독화(attenuation)"란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 만든 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 면역 체계를 자극하여 면역성을 유도하는 것을 의미한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 살모넬라 균주는 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*) BRD509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이다.
- [0038] 본 발명에 따른 miRNA 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결(operably linked)" 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합할 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 상기 siRNA를 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝 사이트를 가지고 있는 어떠한 발현벡터도 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 균주 내에 형질도입된 siRNA를 분비하는 발현벡터를 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR (INVITROGEN, USA) 벡터에 인히빈 알파 miRNA 서열을 추가하여 제조하였다(도 3 참조).
- [0040] 본 발명에서 항암효과를 유도하는 인히빈 알파 siRNA를 발현하는 살모넬라 균주는 당업계에서 통상 사용되는 형질도입방법에 의해 제조 가능하며, 제조된 살모넬라는 스펙티노마이신(Spectinomycin) 내성을 가진 살모넬라 균주로, 체내에 도입될 때 인히빈 알파 siRNA를 분비할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인히빈 알파 유전자를 억제시키는 siRNA를 발현하는 재조합 벡터를 약독화된 살모넬라 균주에 형질도입 함으로써 본 발명의 살모넬라를 제작하고, 암을 유발시킨 마우스 모델에 상기 형질도입된 살모넬라를 투여함으로써 그에 의한 암의 예방 및 치료효과를 형질도입시키지 않은 대조군 살모넬라 자체에 의한 효과와 비교분석하여 확인하였다. 분석 결과, 도 4a ~ 6b에 나타난 바와 같이, 형질도입시키지 않은 살모넬라만을 투여한 경우 또는 PBS 용액만 처리한 경우와 달리 본 발명에 의한 인히빈 알파 siRNA를 발현하는 재조합 벡터를 형질도입시킨 살모넬라를 투여한 경우 암 치료하는 효과가 나타남을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 인히빈 알파 유전자의 발현을 억제하는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 함유하는 항암제 조성물을 제공한다.
- [0044] 암 발생시 인히빈 알파 단백질의 과발현되므로, 인히빈 알파 유전자의 발현을 억제하는 작은 간섭 RNA(siRNA)를 전사하며 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 이용하여 인히빈 알파의 발현을 억제함으로써, 암의 치료효과를 도모할 수 있다. 상기 siRNA 및 재조합 발현벡터는 상술한 바와 같으므로 상세한 설명은 생략한다.
- [0045] 본 발명에 있어, 암의 종류는 특별한 제한은 없으나, 바람직하게 피부암 또는 대장암일 수 있다.

[0046] 본 발명의 항암제 조성물은 약제로 이용되기 위해서 약학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있어 이를 참조할 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명의 항암제 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 "치료학적으로 유효한 양 (therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 예컨대, 성인 기준으로 1회  $10^5$  세포수 내지  $10^9$  세포수로 투여할 수 있다.

### 발명의 효과

[0048] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 인히빈 알파 siRNA를 발현하는 살모넬라 균주에 의하면 인히빈 알파 유전자를 억제하여 암세포에 대한 독성을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명에 의한 살모넬라 균주를 포함하는 항암제 조성물은 암 억제 내지 항암면역반응을 유도하여 기존의 살모넬라 균주보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타내고 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 살모넬라 균주에서 siRNA가 발현할 수 있도록 하여서 고가의 siRNA 합성비용을 줄이고 살모넬라 균주 자체의 암억제 효과와 siRNA의 항암면역효과를 이용하여 보다 효과적인 항암제를 제공할 수 있는 매우 유용한 발명이다.

### 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 피부암 환자의 인히빈 알파(Inhibin alpha) 단백질의 발현 정도를 면역조직화학염색법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 직장암 환자의 인히빈 알파(Inhibin alpha) 발현량을 정상 조직과 대비하고 환산하여 나타낸 도면이다.

도 3a는 본 발명에 의한 인히빈 알파(Inhibin alpha) 단백질을 억제하는 siRNA를 발현하는 살모넬라 균주의 모식도이다.

도 3b는 대식세포주(RAW264.7 CELL)에 정상 살모넬라(a), PBS 용액(b) 및 본 발명에 의한 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주(c)를 처리함으로써 나타난 대식세포주(RAW264.7 CELL)에서의 siRNA 벡터의 발현모습을 촬영한 사진이다.

도 4a는 피부암 세포주(B16F10)에서 인히빈 알파 siRNA 벡터를 포함한 살모넬라 균주에 의한 암의 살해효과를 투약 후 36시간 후에 촬영한 현미경 사진이다.

도 4b는 피부암 세포주(B16F10)에 대한 인히빈 알파 억제 살모넬라에 의한 암세포 억제효과를 나타내는 세포독성결과를 투약 후 36시간 후에 LDH ASSAY를 이용하여 환산하여 도표로 나타낸 것이다.

도 5는 피부암 세포주에서 인히빈 알파 siRNA 발현벡터를 포함한 살모넬라 균주에 의한 암의 살해효과 기전을 FLICA(Immunochemistry Co.ltd, USA) 방법을 사용하여 poly caspase 발현을 확인한 사진이다.

도 6a는 피부암을 유도한 마우스에서 인히빈 알파 siRNA 발현벡터를 포함한 살모넬라 균주에 의한 암의 억제효과를 보여주는 사진이다.

도 6b는 피부암을 유도한 마우스에서 인히빈 알파 siRNA 발현벡터를 포함한 살모넬라 균주에 의한 암의 억제효과를 암 부피로 환산하여 도표로 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

**<실시예 1: 임상환자 조직에서 인히빈 알파 단백질 발현의 확인>**

고대 안암병원 피부암 환자와 직장암 환자 약 20명을 선별하여 이들의 암조직에서 인히빈 알파 단백질의 발현 정도를 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)으로 검사하였다. 그 결과 피부암의 경우 90%이상 인히빈 알파가 암조직에서만 발현되었다(도 1). 환자군에서는 광범위하게 인히빈 알파 발현이 관찰되는 데 비해 대조군에서는 발현이 관찰되지 않았다. 직장암의 경우 정상조직대비 70%이상 과발현되었음을 확인하였다(도 2).

**<실시예 2: 인히빈 알파 miRNA를 갖는 유전자 발현벡터를 포함하는 살모넬라 균주의 제작>**

먼저, 약독화된 살모넬라 균주 BRD509(*Salmonella typhimurium* BRD509)를 루리아 벨테니(Luria Bertani) 배지에서 37℃ 배양하였다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 인히빈 알파 miRNA-TGCTGTTTCAGAGGTCCTGTGCATGAAGTTTGGCCACTGACTGACTTCATGCAGGACCTCTGAA; 서열번호 1) 발현벡터 플라스미드, pcDNA3 벡터를 형질도입하기 위하여, 상기 살모넬라 균주를 다시 100mL의 양으로 24시간 배양한 후 파장 600nm의 광학흡광도(O.D.600) 및 0.7을 나타내는 배양농도에서 세균을 5500rpm의 속도로 원심분리하였다. 상기 원심분리 후 바닥에 가라앉은 세균만을 수집하여 배양부피와 동일한 부피의 차가운 증류수로 희석하였다. 상기 희석시킨 세균을 다시 상기와 동일한 방법으로 원심분리하여 2mL의 차가운 20% 글리세롤 증류수에 희석한 다음, 또 다시 원심분리의 과정을 거쳐 수득한 세균을 100 $\mu$ L의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30 $\mu$ L(2 $\mu$ g)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 인히빈 알파 siRNA 발현 벡터 플라스미드인 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR 벡터를 3 $\mu$ L(2 $\mu$ g) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다(도 3a).

제작된 재조합 살모넬라 균주의 유전자 발현효과를 확인하기 위해서 대식세포주(Raw264.7 cell)에 대해서 10<sup>6</sup> 세포를 배양하고 이 세포주에 살모넬라 균주를 10<sup>8</sup> CFU의 농도로 첨가하여 1시간 배양 후에 새로운 배지로 교환하여 주어 3일간 배양하였다. 배양된 세포주에 대하여 유전자 발현이 유도될 경우 GFP 유전자가 발현되어 확인할 수 있게 설계되어 있어 배양된 세포주를 형광현미경하에서 관찰하여 siRNA 발현 살모넬라 균주의 효과를 확인하였다. 그 결과 도 3b에서와 같이 대조군들에 비해 인히빈 알파 siRNA발현 살모넬라 균주의 경우 GFP 가 발현되어 살모넬라에 의한 유전자 발현이 이루어짐을 확인할 수 있었다(도 3b).

**<실시예 3: 본 발명에 의한 형질도입 살모넬라 균주의 세포주에서의 항암효과 확인>**

피부 암세포인 B16F10(피부암세포주, 한국세포주은행)를 DMEM배지에서 배양하여 항암효과를 확인하기 위한 암세포주로 사용하였다. 100mm 배양접시에 약70% 세포가 배양되어있는 상태에서 상기 실시예 2에서 제작한 인히빈 siRNA 발현 살모넬라 균주를 배양하여 10<sup>6</sup>개의 콜로니를 PBS 용액 100 $\mu$ L에 희석하여 첨가하였다.

이후 24-36시간 후 배양 후 세포 독성을 현미경과 LDH 세포독성검출키트(Cell cytotoxicity assay, Promega, USA)를 사용하여 세포독성의 정도를 확인하였다(도 4a 및 도 4b). 또한 세포 독성기전을 확인을 위해 세포사멸 기전을 검사할 수 있는 FLICA 검사기법을 이용하여 상기 제조된 살모넬라를 각각 투여한 세포에서 시험하였다. 그 결과 세포독성이 apoptosis 기전에 의해 유도됨을 FLICA (Immunochemistry Co ltd, USA) 검사를 시행 후 poly caspase 발현이 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주를 처리한 세포주에서 붉은 형광으로 염색되는 것을 통해 확인되었다(도 5).

**<실시예 4 : 본 발명에 의한 형질도입 살모넬라 균주의 동물모델에서의 항암효과 확인>**

피부 암세포인 B16F10(피부암세포주, 한국세포주은행)를 PBS 용액 100 $\mu$ L에 10<sup>4</sup> 세포만큼 포함되도록 희석한 후, 암발현 모델로 C57/BL6 마우스(SLC, Japan)를 선택하여 상기 희석액 100 $\mu$ L를 마우스의 등 부위에 피하로 주사하여 암을 이식하였다. 주사한 지 7일 내지 10일 후 상기 암이식 부위에 상기 실시예 2에서 제작한 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주를 배양하여 10<sup>6</sup>개의 콜로니를 PBS 용액 100 $\mu$ L에 희석하여 암이식 1주일 되는 시점에 상기 PBS 용액을 C57/BL6 마우스의 암이식부위에 피하로 주사하였다. 이후 암세포의 크기변화 및 마우스의 생존

율을 측정하여 본 발명에 의한 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주의 항암효과를 확인하였다. 이때, 대조군으로 다른 쥐에는 PBS 용액만을 처리하였으며, 또 다른 쥐에는 인히빈 알파 siRNA를 형질도입하지 않은 BRD509 살모넬라 균주를 처리하여 상기와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0062]

그 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 피부암(B16F10)을 이용하여 만든 대장암모델 마우스에 본 발명에 의한 살모넬라 균주 투약 후 4주 후에 암 크기가 대조군 마우스에 비해 감소한 것을 알 수 있었다.

[0063]

피부암 모델마우스의 암은 버니어 캘리퍼스로 가로, 세로 길이를 측정하여 암의 부피를 확인하였다. 도 6b에서, 첫 번째 막대는 어떤 살모넬라 균주도 처리하지 않고 오직 PBS 용액만 처리한 정상 암 모델 쥐에서의 암 발현 정도를 보여주고 있으며, 두 번째 막대는 대조군 플라스미드가 포함되지 않은 살모넬라 균주를 처리한 암 모델 쥐에서의 암 발현 정도를 나타내고 있다. 셋째 번 막대는 본 발명의 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주를 처리한 마우스의 암 크기로서 상기 PBS 용액 처리 모델 또는 플라스미드 대조군 살모넬라 처리 쥐와는 달리 암 발현이 억제된 것을 알 수 있다.

[0064]

상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명이 제공하는 인히빈 알파 siRNA 발현 살모넬라 균주는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 인히빈 알파 siRNA 발현 벡터를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타내고, 특히 인히빈 알파 siRNA 만을 투여할 때의 단점을 해결하며, 특히 피부암, 대장암 등에 있어서 훨씬 더 탁월한 치료효과를 제공하므로 항암 치료 및 보조 예방 제제와 관련한 의약산업에 있어서 매우 유용한 발명이다.

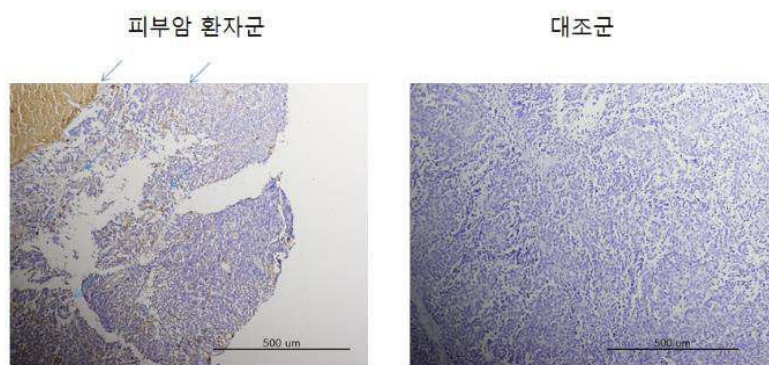
[0065]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

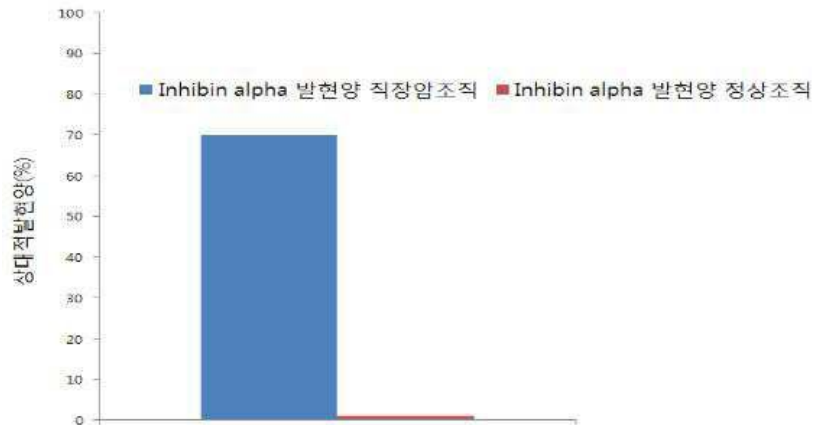
### 도면1

#### 고대안암병원 임상환자의 melanoma조직에서의 inha 발현 비교결과

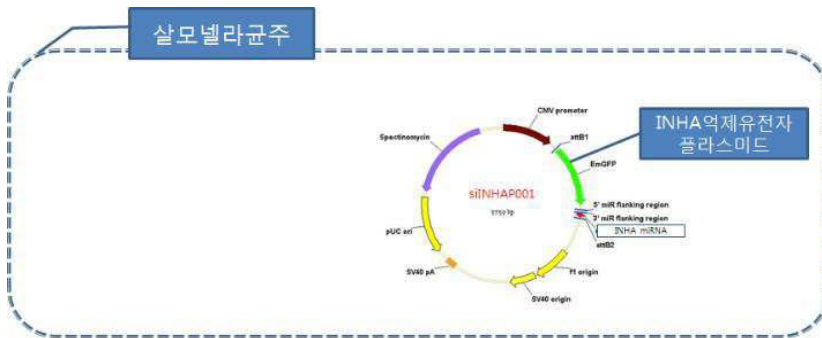


환자군에서는 광범위하게 inha 발현이 관찰되는데 비해 대조군에서는 발현이 관찰되지 않는다.

도면2



도면3a



도면3b

Inhibin alpha 에 대한 siRNA발현 재조합 살모넬라 균주에 의한 siRNA의 발현측정시험결과 (Western blotting)



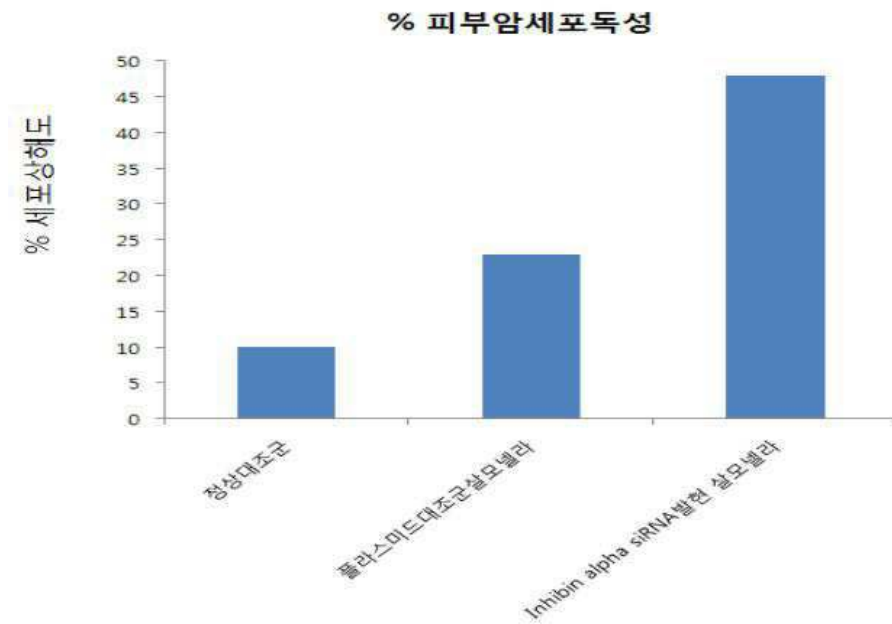
• siRNA발현의 지표인GFP 발현양

- ① 정상 살모넬라 대조군
- ② 플라스미드발현 대조군 살모넬라
- ③ Inhibin-α siRNA발현 살모넬라

도면4a



도면4b



도면5

Inhibin alpha 억제 siRNA발현 살모넬라 균주의 Melanoma 세포에 있어서의 세포사멸효과확인결과 (FLICA -POLYCASPASE 검출검사결과)

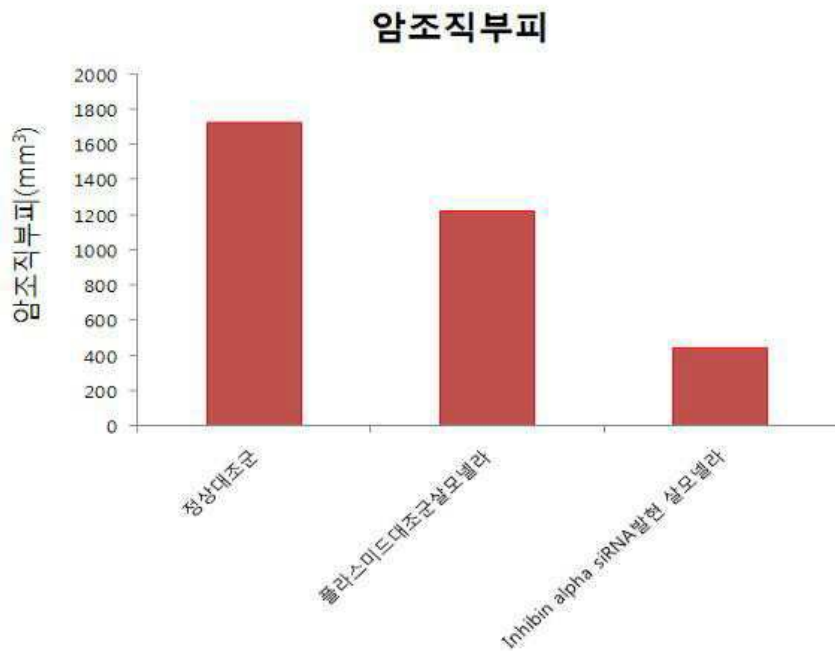


## 도면6a

피부암(B16F10)모델에서 암성장억제효과 (투약후 4주)



## 도면6b



## 서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> A bacterium salmonella harboring siRNA against Inhibin alpha and antitumoral composition thereof
- <130> P11-130716-02
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 64
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 1

tgctgttcag aggtcctgtg catgaagttt tggccactga ctgacttcac gcaggacctc

60

tgaa

64