



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0085669

(43) 공개일자 2020년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0001602

(22) 출원일자 2020년01월06일

심사청구일자 2020년01월06일

(30) 우선권주장

1020190001882 2019년01월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이효진

대전광역시 유성구 은구비로 31, 510동 502호(지족동, 열매마을 아파트 5단지)

전홍진

대전광역시 유성구 진잠로42번길 88, 105동 1205호(원내동, 진잠타운아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

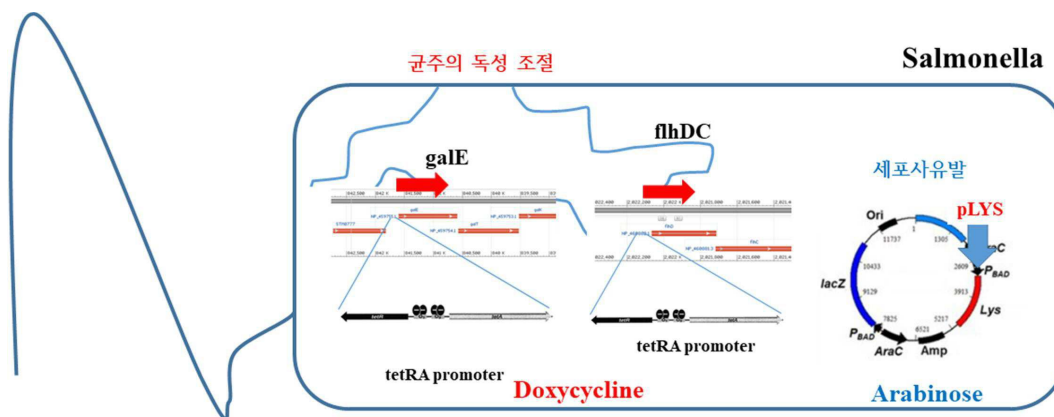
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 신규 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 면역 자극 효과가 크면서도 패혈증의 위험없이 안전하여 항암 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 신규 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 약독화 초래 유전자;와 (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 세포사 초래 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 약독화 및 세포사의 제어가 가능한 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2830/002 (2013.01)

C12N 2830/55 (2013.01)

(72) 발명자

김솔비

대전광역시 중구 문화로 266, 2동 503호(문화동)

주미나

대전광역시 중구 계백로1615번길 34, 111동 806호
(유천동, 현대아파트)

김나영

대전광역시 중구 충무로107번길 100, 112동 302호
(대흥동, 센트럴자이)

이명원

대전광역시 서구 관저서로 19, 107동 501호(
관저동, 관저더샵)

류혜원

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 305동 1604
호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

송익찬

대전광역시 중구 중앙로 45, 101동 504호(선화동,
센트럴뷰아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A5A2015385

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터사업

연구과제명 감염 제어 컨버전스 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

(A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 약독화 초래 유전자;와
(B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 세포사 초래 유전자;
를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어,
약독화 및 세포사의 제어가 가능한 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ프로모터, pRλ프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터, T7 프로모터, pBAD 프로모터, Tet 프로모터, trc 프로모터, pepT 프로모터, sulA 프로모터, pol 11(dinA) 프로모터, ruv 프로모터, uvrA 프로모터, uvrB 프로모터, uvrD 프로모터, umuDC 프로모터, lexA 프로모터, cea 프로모터, caa 프로모터, recN 프로모터, pagC 프로모터, hip 프로모터, ansB 프로모터 및 pflE 프로모터로 이루어진 군으로부터 각각 선택되며,

상기 약독화 초래 유전자는 제2 유도성 프로모터에 의해 간섭받지 않으며,

상기 세포사 초래 유전자는 제1 유도성 프로모터에 의해 간섭받지 않는 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 약독화 초래 유전자는 aroA, aroC, aroD, aroE, Rpur, htrA, ompR, ompF, ompC, galE, cya, crp, cyp, phoP, phoQ, rfaY, dksA, hupA, sipC, clpB, clpP, clpX, pab, nadA, pncB, pmi, rpsL, hemA, rfc, poxA, galU, cdt, pur, ssa, guaA, guaB, fliD, flgK, flgL, relA 및 spoT로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 기능상실을 유도하는 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 세포사 초래 유전자는 박테리오파지 유래의 lysin 또는 small RNA SdsR인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 균주는 기탁번호 KCTC18801P인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 살모넬라 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 조성물은,

(A) 상기 살모넬라 균주가 암 조직에 표적화될 때까지 약독화된 상태를 유지하며, 표적화 이후 야생형으로 전환 되도록 약제가 병용투여되며,

(B) 상기 야생형으로 전환된 30~60 시간 경과 후, 세포사를 유발할 수 있는 약제를 병용투여되는 것을 특징으로 하는 항암 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 자극 효과가 크면서도 패혈증의 위험없이 안전하여 항암 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 신규 살모넬라 균주 및 이를 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 세포의 증식 활동이 멈추지 않아 주변 조직으로 파고들어 정상세포를 파괴하는 것에 의해 결국에는 생명을 위협하는 질환이다. 노화에 따라 인체의 조절능력이 낮아지면서 암에 취약해지게 되어, 고령화 사회에서 암은 2007년부터 10년째 전체 사망원인 중 부동의 1위를 차지하며 2위인 심장질환 사망률의 2배를 넘어섰다.

[0003] 질병의 치료에 가장 효과적인 대응 체계는 면역력을 강화하는 것이나, 암세포는 외부 침입자가 아니기 때문에 인체의 면역반응을 유발하지 않고 회피한다. 특정 바이러스 또는 박테리아는 정상세포보다 암세포에 더 많이 감염되고, 감염된 박테리아가 면역세포의 공격대상이 될 수 있다. 이에 일부러 특정 바이러스 또는 박테리아를 감염시켜 인체 면역반응을 자극함으로써 암세포에 대항할 수 있도록 하는 항암치료 방법들이 제시되었다. 시겔라(Shigella), 콜레라균(Vibrio cholera), 병원성 대장균(pathogenic E. coli)과 같은 감염성 세균들은 장관의 세포에 침투할 뿐, 면역반응을 일으키는 중요한 기관인 간과 비장에는 도달하지 못한다. 이와 대조적으로 살모넬라균은 림프절을 통하여 비장과 간에 침투하여 전신 면역반응을 자극시킬 수 있다. 구체적으로, Leschner 등 (J. Mol. Med. 2010, 88, 763-773)은 CT26 종양을 갖는 마우스를 대상으로 형광을 나타내는 살모넬라균을 정맥 주사로 감염시킨 후, 시간에 따른 감염 경로를 추적하였다. 그 결과 감염 직후에는 마우스의 혈액을 통해 전신 이 감염된 것을 보여주었으며, 감염 20분 후에는 비장과 간에 살모넬라 균이 축적되었으며, 24시간 후에는 종양 조직에만 살모넬라균이 집중적으로 축적되어 있음을 관측하였다.

[0004] 하지만 살모넬라균은 식중독을 유발하는 대표적인 균으로 감염에 의해 패혈증을 유발하여 생명을 위협할 수 있으므로 직접적으로 암 치료에 사용하기에는 병원성이 너무 강하다. 미국 예일대학 연구팀은 살모넬라를 유전자 조작하면 종양을 공격하는 특성은 유지하면서 독성만 제거하여 약독화할 수 있으며, 상기 약독화된 살모넬라의 주입을 통해 종양을 억제할 수 있다고 발표하였다. 그러나 약독화된 살모넬라는 생존성이 낮고 면역유발능 역시 저하될 뿐 아니라 돌연변이로 인하여 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환되어 패혈증을 일으킬 우려가 있다. 이에 더하여 연구개발자금의 부족 문제로 인하여 약독화된 살모넬라를 이용한 항암치료는 임상과정의 1단계에서 대부분 중단되거나 보류된 상태이다.

[0005] 살모넬라와 같은 박테리아를 이용한 암 치료에 동반되어 발생할 수 있는 패혈증의 유발은 극복해야 할 매우 중요한 문제이며, 이에 더하여 면역반응의 자극 역시 활발하게 이루어질 수 있어야 한다. 이에 약독화 및 면역활성화와 함께 항암치료에 도움이 되는 물질들을 추가로 발현 또는 억제시킬 수 있는 균주들을 개발하고, 이를 항암치료에 이용하고자 하는 연구들이 이루어졌다. 등록특허 제10-0852687호는 약독화된 살모넬라 균주내에 종양 괴사인자 알파단백질 백터를 형질도입한 종양괴사인자 알파를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 대해 개시하였으며, 등록특허 제10-1544602호는 인히빈 알파 shRNA를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 대해 개시하였다. 등록특허 제10-1750007호는 L-아스파라기나아제가 종양 사이트에서 선택적으로 발현될 수 있는 약독화 살모넬라 균주를 이용한 고형암 치료제에 대해 개시하였다.

[0006] 그러나 상기와 같은 살모넬라 균주들은 항암 물질의 발현에 의해 항암 활성을 추가적으로 보완하기는 하였으나, 약독화된 살모넬라의 낮은 생존성과 약독화 균주가 야생형 살모넬라로 전환될 위험성은 여전히 지니고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0852687호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1544602호
(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1750007호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 생체 면역에 활성화를 하는 면역 자극 효과가 우수하면서 패혈증 유발 우려없이 항암치료에 사용할 수 있는 신규 살모넬라 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 균주를 이용한 항암 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 약독화 초래 유전자;와 (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 세포사 초래 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 약독화 및 세포사의 제어가 가능한 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 살모넬라 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0012] 이상과 같이 본 발명에 의한 살모넬라 균주에 의하면 살모넬라 균주의 약독화 및 세포사를 임의로 조절할 수 있으므로, 암 부위에 균주가 표적화되었을 때 살모넬라 균주를 야생형으로 전환시킬 수 있어 면역치료 효능이 우수할 뿐 아니라 살모넬라 균주에 세포사를 유발하여 이차면역을 유도할 수 있으므로 항암 면역 효과를 극대화할 수 있다.

[0013] 또한 본 발명의 살모넬라 균주는 세포사의 유발에 의해 제거가 가능하므로 패혈증으로 인한 우려없이 안전하게 항암 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 살모넬라 균주의 모식도.

도 2는 본 발명의 일실시예에 의한 galE 유전자의 제어를 위한 유전자 구조물 및 이의 제작과정을 보여주는 모식도.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 galE 유전자의 발현이 tetracycline에 의해 조절됨을 보여주는 사진.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 fliHDC 유전자의 발현이 억제됨을 보여주는 사진.

도 5는 본 발명의 일실시예에 의한 이중돌연변이 약독화 균주에서 galE 및 fliHDC 유전자의 발현이 tetracycline에 의해 조절됨을 보여주는 사진.

도 6은 본 발명의 일실시예에 의한 살모넬라 균주에서 arabinose에 의해 세포사가 유도됨을 보여주는 사진.

도 7은 본 발명의 일실시예에 의한 살모넬라 균주의 약독화 및 야생형 균주의 세포사 잔여물이 THP-1 세포에 미치는 영향을 보여주는 현미경 사진.

도 8은 본 발명의 일실시예에 의한 살모넬라 균주의 야생형 균주의 세포사 잔여물에 의한 THP-1 세포 변형 형태

를 보여주는 현미경 사진.

도 9는 본 발명의 일실시예에 의한 살모넬라 균주의 약독화 및 야생형 균주의 세포사 잔여물에 의한 면역유도 기능을 보여주는 웨스턴블랏 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 전술한 바와 같이, (A) 제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 약독화 초래 유전자;와 (B) 제2 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 세포사 초래 유전자;를 포함하는 유전자 구조물에 의해 형질전환되어, 약독화 및 세포사의 제어가 가능한 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주에 관한 것이다.
- [0016] 본 명세서에서 "유도성 프로모터"란 유도물질에 의해 연결된 유전자의 작동을 스위칭할 수 있는 프로모터를 의미한다. 상기 제1 유도성 프로모터와 제2 유도성 프로모터는 tac 프로모터, lac프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA프로모터, SP6 프로머터, trp 프로모터, T7 프로모터, pBAD 프로모터, Tet 프로모터, trc 프로모터, pepT 프로모터, sulA 프로모터, pol 11(dinA) 프로모터, ruv 프로모터, uvrA 프로모터, uvrB 프로모터, uvrD 프로모터, umuDC 프로모터, lexA 프로모터, cea 프로모터, caa 프로모터, recN 프로모터, pagC 프로모터, hip 프로모터, ansB 프로모터 및 pflE 프로모터로 이루어진 군으로부터 각각 선택될 수 있다. 이때, 상기 약독화 초래 유전자는 제2 유도성 프로모터에 의해 간섭받지 않으며, 상기 세포사 초래 유전자는 제1 유도성 프로모터에 의해 간섭받지 않아 약독화 초래 유전자와 세포사 초래 유전자를 독립적으로 제어할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 명세서에서 "약독화"란 살아있는 병원체의 독성을 인위적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 면역 체계만을 자극하여 면역성을 유도하는 것을 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 "제1 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 약독화 초래 유전자"는 유도물질의 존재 시에 살모넬라 균주의 약독화를 초래하거나, 혹은 유도물질의 부재 시에 살모넬라 균주의 약독화를 초래하거나 어떠한 방식이어도 무관하다. 상기 약독화 초래 유전자는 aroA, aroC, aroD, aroE, Rpur, htrA, ompR, ompF, ompC, galE, cya, crp, cyp, phoP, phoQ, rfaY, dksA, hupA, sipC, clpB, clpP, clpX, pab, nadA, pncB, pmi, rpsL, hemA, rfc, poxA, galU, cdt, pur, ssa, guaA, guaB, flhD, flgK, flgL, relA 및 spoT로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 기능상실을 유도하는 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 약독화 유전자인 AroA 유전자 앞에 유도성 프로모터인 tetRA 프로모터를 삽입하여 독시사이클린에 의해 해당 유전자를 스위칭할 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 "세포사"란 살모넬라의 사멸을 유도하는 것으로, 살모넬라의 생존에 필수적인 요소를 생산하지 못하게 억제하거나 살모넬라의 증식을 억제하는 요소를 발현시키는 것에 의해 사멸을 유도할 수 있다.
- [0020] 상기 세포사 초래 유전자는 박테리오파지 유래의 lysin 유전자 또는 small RNA SdsR 유전자인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 박테리오파지 유래의 lysin 유전자 또는 sam11 RNA SdsR는 과발현에 의해 세포사를 유발한다. 예를 들어, 제2 유도성 프로모터에 SdsR의 과발현을 유도하는 유전자를 pBAD 프로모터에 작동가능하도록 연결하여, 필요에 따라 아라비노스에 의해 세포사를 유도하여 살모넬라 균주의 사멸을 유도할 수 있다.
- [0022] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명의 살모넬라 균주의 제작에 대해 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0023] 구체적인 실시예로, 제1 유도성 프로모터로 tetRA 프로모터를, 약독화 초래 유전자로 galE 및 flhDC 유전자를 사용하였으며, 제2 유도성 프로모터로 pBAD 프로모터를 세포사 초래 유전자로 iEPS5 유전자를 포함하는 유전자 구조물로 형질전환된 살모넬라 균주를 제작하였다(도 1).
- [0024] **약독화 스위칭 돌연변이 균주**
- [0025] galE는 세포벽에서의 당화(glycosylation)에 관여하여 지질다당류(LPS, lypopolysaccharide)를 생성하는 주요한 유전자로, galE가 녹아웃된 균주는 약독화되는 것이 알려져 있다. flhDC는 플라젤라(flagella) 관련 유전자로 flhDC 유전자가 녹아웃되면 살모넬라의 운동성을 상실하여 약독화를 나타낸다. galE와 flhDC 각각의 녹아웃이 약독화를 초래하기는 하지만 보다 확실한 약독화를 위하여 galE와 flhDC 유전자를 모두 녹아웃시켜 약독화가

되도록 하였으며, tetRA 프로모터를 두 유전자 앞에 각각 삽입하여 doxycycline과 같은 인두서에 의해 galE와 flhDC의 발현을 조절할 수 있도록 하였다.

[0026] galE 돌연변이 gal::tetRA

[0027] 먼저 tetRA 프로모터에 의해 galE 유전자의 발현을 조절할 수 있는 살모넬라 돌연변이 gal::tetRA를 γ red recombination과 tetRA replacement system을 이용하여 구축하였다. 도 2는 gal::tetRA의 구조 및 제작 공정을 보여주는 모식도이다.

[0028] 구체적으로 tetRA 유전자가 포함된 살모넬라 균주 TH3847의 genomic DNA(충남대학교 임현만 교수님께 분양받음)를 주형으로, 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 galE 영역에 tetRA가 삽입된 PCR 산물을 얻었다. 10x buffer 5 μ l, 5x Q solution 10 μ l, 2 mM dNTPs 7.5 μ l, 20 μ M gal tetR 프라이머 2.5 μ l, 20 μ M gal tetA 프라이머 2.5 μ l, Taq polymerase 1 μ l, 10 ng/ μ l genomic DNA 2 μ l 및 물 19.5 μ l을 혼합하여 Qiagen system을 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 5분과, 30회의 94 $^{\circ}$ C 30초, 49 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 2분 및 72 $^{\circ}$ C 10분 사이클을 반복하였다.

[0029] 상기 PCR에 의해 얻어진 산물을 전기천공에 의해 pKD46/LT2(충남대학교 임현만 교수님께 분양받음)에 형질도입하고, tetracycline 12.5 μ g/ml를 함유하는 LB 아가 배지에 접종하여 tetracycline 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. tetRA 요소의 삽입은 Cosmogenetech에 의뢰하여 서열분석으로 확인하였다.

표 1

[0030]

geltetR	ctgcttgctatgctcggtatcggtgcttaaattctggattaagaccactttcacatt	서열번호 1
geltetA	tactctcataattcgctccgtaagcctatggatgaataactaagcacttgctctctg	서열번호 2

[0031] MacConkey 배지는 종래 lactose의 검출에 사용되어 왔으나, gal operon 대조균을 사용한 사전실험에서 galactose의 검출에도 사용될 수 있음을 확인하고, MacConkey에 galactose가 포함된 배지를 이용하여 gal::tetRA의 스위칭이 정상적으로 작동하는 지 확인하였다. galactose가 포함된 MacConkey 배지에 살모넬라 균을 희석 접종하면, galE 유전자가 작동하는 경우에는 galactose의 분해가 가능하므로 배지의 색상이 붉은 색을 띠지만, galactose 분해가 안되는 경우에는 배지의 색상이 무색을 나타낸다.

[0032] 먼저 0.5% galactose가 포함된 MacConkey 배지와 0.5% galactose와 tetracycline(1 μ g/mg)이 포함된 MacConkey 배지를 준비한 후, 위에서 준비한 gal::tetRA 균주를 각각 배지에 희석 접종하고 12시간 배양하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 사진으로, tetracycline이 없는 배지에서는 galE 유전자가 발현되지 않아 무색으로 남아있으나(좌), tetracycline이 있는 경우 tetRA 프로모터에 의해 galE 유전자가 발현되어 galactose를 분해하는 것에 의해 붉은색을 나타내었다(우). 이것으로 tetRA 프로모터에 의해 galE 유전자의 발현을 스위칭할 수 있음을 확인하였다.

[0033] flhDC 돌연변이 TH3730

[0034] flhD 유전자 앞에 tetRA 유전자가 삽입되어 테트라사이클린이나 독시사이클린에 의해 flhDC 유전자의 발현이 조절되는 살모넬라 돌연변이 TH3730을 미국 유타대의 Hughes KT로부터 분양받았다(Mol Microbiol. 2000 Sep 37(5):1220-31)

[0035] TH3730의 콜로니가 주변으로 퍼지는 반경에 의해 플라젤라에 의한 운동능력을 확인하였다. 이를 위하여 야생형 살모넬라인 LT2 균주와 각각의 돌연변이 균주인 ppGpp-균주, rfaH-균주, araA-균주, KST0560 균주 및 TH3730 균주를 1% bactotryptone, 0.5% NaCl, 0.3% bacto-agar를 포함하는 아가 배지에서 배양하였다. 도 4는 그 결과를 보여주는 사진으로, 야생형 균주는 모두 정도의 차이는 있으나 운동성을 보여준 반면, 별도의 인두서가 없는 배지에서 TH3730은 운동성이 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

[0036] galE 및 flhDC의 이중 돌연변이된 약독화 균주

[0037] P22 박테리오파지를 이용한 형질도입에 의해 galE와 flhDC가 이중 도입된 돌연변이 균주를 제작하였다.

[0038] 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 진탕배양한 gal::tetRA 돌연변이 균주 0.2 ml에 P22 broth(0.2 % glucose, 1 % EX50 salts,

P22 stock $\sim 10^{11}$ /ml) 2 ml를 넣고, 37°C에서 9시간 배양하였다. 원심분리에 의해 상층액을 분리한 후, 상층액에 클로로포름을 처리하여 돌연변이가 포함된 P22 lysate를 제작하였다.

[0039] 37°C에서 16시간 진탕배양한 TH3730 돌연변이 균주 0.1 ml와 P22 lysate를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하고, 상온(25°C)에서 1시간 반응시킨 후 PBS 용액에 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 의 비율로 희석하여 LB tetracycline plate에 도말한 후, 항생제 저항성을 갖는 클로니를 선별하였다. 선별된 클로니에 대해 MacConkey gal plate와 motility agar 배지를 사용하여 순차적으로 이중 돌연변이를 선별하고, Cosmogenetech에 의뢰하여 시퀀싱으로 확인하였다.

[0040] 도 5는 선별된 균주를 MacConkey gal plate(상)와 motility agar 배지(하)에 각각 획선 접종한 후 12시간 및 8시간 후 결과를 보여주는 사진으로, 'double'이 선별된 이중 돌연변이 균주에 대한 결과이다. 야생형인 LT2 균주는 항생제 저항성이 없으므로 tetracycline 존재하에서 사멸된 것을 확인할 수 있다. gal:tetRA 및 이중 돌연변이 균주는 tetracycline이 없는 경우에는 galactose 분해 활성을 나타내지 않았으며, tetracycline 존재하에서는 galE 유전자가 발현되어 galactose 분해 활성을 나타내었다. 또한 Th3730과 이중 돌연변이 균주는 tetracycline이 없는 경우에는 운동성을 나타내지 않았으나, tetracycline 존재하에서는 flhDC 유전자가 발현되어 운동성을 나타내었다. 이로부터 선별된 균주가 tetRA 프로모터에 의해 galE 및 flhDC 유전자를 스위칭할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0041] 본 실시예에 의한 균주는 tetRA에 의해 스위칭이 제어되므로, tetracycline 이외에도 doxycycline과 같이 tetRA의 인두서로 작동할 수 있는 것은 모두 스위칭에 사용할 수 있다. doxycycline은 tetracycline에 비해 약 1/10~1/100의 용량으로도 스위치 효과를 나타낼 수 있고, 반감기가 길어 인두서로 더 유용하다.

[0042] **약독화와 세포사 스위칭 돌연변이 균주**

[0043] 세포사 유발을 위해서 파지 lysis 유전자인 iEPS5 유전자가 pBAD18 프로모터에 연결된 플라스미드 pLYS(GenBank JG304023~5, 전남대 정재호 교수에게 분양받음)를 사용하였다. pLYS 플라스미드를 사용하여 위에서 제조한 이중 돌연변이 살모넬라 균주(이하, 'galE, flhDC 균주'라 함)와 전술한 방법과 동일한 공정에 의해 aroA와 galE 유전자가 tetRA 프로모터에 의해 제어되도록 한 이중 돌연변이 살모넬라 균주(이하, 'aroA, galE 균주'라 함)를 형질전환 시켰다. 형질전환된 균주는 arabinose가 인두서로 작용하여 파지의 lysis 유전자인 iEPSS가 발현되면 살모넬라 균주를 터뜨리기 때문에 살모넬라를 세포사시킬 수 있다.

[0044] 형질전환된 각각의 단일 콜로니를 LB ampicillin 액체 배지에서 접종하였다. 37°C에서 16시간 배양한 후, 흡광도(OD600)가 0.05가 되도록 희석하여 다시 배양하였다. 흡광도가 0.6~0.8이 되면, 배양액을 각각 두개로 나누고, 각 균주 배양액 중 하나에만 arabinose를 0.02%의 농도가 되도록 처리한 후 37°C에서 16시간 배양하였다. 도 6은 그 결과를 보여주는 사진으로, pLYS로 형질전환되었으나 배양액에 arabinose가 없는 경우에는 세포사가 일어나지 않으나, arabinose가 존재하는 경우에는 세포사가 일어난 것을 볼 수 있다.

[0045] 이에 상기에서 제작된 균주를 Salmonella typhimurium LT2 Δ galE::tetRA, Δ flhDC::Tn10로 명명하였으며, 2020년 01월 02일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC18801P).

[0046] 본 발명의 살모넬라 균주는 실시예를 들어 설명한 전술한 구성에 의해 약독화와 세포사를 원격으로 제어할 수 있어, 면역 유도 활성과 안전성을 모두 확보할 수 있는 것을 특징으로 한다. 명확한 원인과 메카니즘은 규명되지 않았으나, 살모넬라는 종양 부위에 표적화되는 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. 다양한 암종에 대하여 약독화 살모넬라를 쥐에 감염시킨 후 약 24시간이 지나면 거의 대부분의 살모넬라는 암에 표적화되어 암 조직에만 남게 된다. 따라서 본 발명의 살모넬라 균주를 약독화된 상태로 감염시킨 후 암에 표적화가 완료되면, 약독화 살모넬라를 제1 유도성 프로모터의 작동에 의해 야생형(wild type) 살모넬라로 돌려놓는 것에 의해 면역활성이 낮은 약독화 살모넬라에 비해 높은 면역활성을 유발하여 항암치료가 더욱 효과적으로 이루어질 수 있다.

[0047] 박테리아를 이용한 암 치료에 동반되어 발생할 수 있는 패혈증 등의 감염은 살모넬라를 이용한 항암치료에서 극복해야 할 가장 중요한 문제 중 하나이다. 약독화 균주를 사용한다고 하더라도, 야생형으로 전환되어 패혈증을 일으킬 수 있는 위험성이 내재되어 있다. 더욱이 암세포는 2~3주마다 교체되기 때문에 장기적인 면역반응을 유도하는데에는 적합하지 않다. 이에 본 발명에 의한 살모넬라 균주는 제2 유도성 프로모터의 작동에 의해 살모넬라 균주의 세포사를 유발하여 면역 유도활성이 높은 야생형 살모넬라 균주의 형태로 면역 반응을 유발한 후 살모넬라 균주의 사멸을 유도하므로 패혈증의 우려없이 안전하게 인체에 적용할 수 있다. 이에 더하여, 살모넬라 균주의 사멸 과정을 통해 분출된 살모넬라의 염색체 DNA와 세포 내 구성성분들이 2차 면역반응을 유발하여

면역에 의한 항암 효능을 더욱 향상시킬 수 있다.

[0048] 2차 면역반응 유발 효과를 실시예에서 제조한 균주로 확인하였다. KCTC18801P의 단일 클로니를 LB ampicillin 액체배지에 접종하고 37℃에서 16시간 배양하였다. 배양액의 흡광도(OD600)가 0.05가 되도록 희석한 후, 둘로 나누어 하나에만 doxycycline를 200 ng/ml의 농도로 첨가하여 흡광도(OD600)가 0.6이 될 때까지 배양하였다. 이 후 두 배양액에 모두 arabinose를 0.02%의 농도로 처리하여 37℃에서 4시간 배양하였다. 배양된 배지 1 ml를 취하여 8000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액의 원심분리를 3회 반복한 후, 0.22 μ m 필터로 여과하여 약독화된 살모넬라와 야생종 살모넬라가 터뜨려진 세포사 잔류물이 포함된 배지를 얻었다. 각각의 배지는 4℃에 보관하며 사용하였다.

[0049] 인간 단핵구 세포주인 THP-1 세포를 페니실린 및 스트렙토마이신이 함유된 1% antibacterial antifungal solution(Gibco BRL Co., USA) 및 10% FBS(Gibco BRL Co., USA)이 함유된 RPMI 배지를 사용하여, 습도 95%, 온도 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배지에는 위에서 실시예의 균주를 사용하여 제작한 약독화 살모넬라 균주 및 야생종 살모넬라 균주의 세포사 잔류물을 THP-1 세포 2×10⁵개당 100 μ l씩 처리하여 배양하였다. 도 7은 48시간 배양 후의 THP-1 세포를 보여주는 현미경 사진(×200)이다. THP-1 세포는 동글동글한 모양에 떠다니는 성질이 있다. 약독화 세포주를 세포사시켜 처리한 경우에는 10 % 미만의 일부 세포에서만 약간의 변형이 관측되었으나, 야생형 세포주를 세포사시켜 처리한 경우에는 50% 이상의 세포들이 다양한 형태로 변형되어 바닥면에 부착된 것을 확인할 수 있었다. 도 8은 변형된 세포를 각 형태별로 구분한 것으로, A는 수지상 세포와 유사한 형태를, B는 대식세포와 유사한 형태를 C는 수지상 세포와 대식세포의 중간 형태를 나타낸다. 위의 결과는 약독화된 살모넬라 균주에 비해 야생형으로 환원된 살모넬라 균주가 더 효과적인 면역원으로 작용함을 증명한다.

[0050] 이를 웨스턴 블랏에 의해 추가로 분석하였다. 각각 약독화 및 야생형의 세포사된 살모넬라균을 처리하여 48시간 배양한 THP-1 세포를 PBS로 2번 세척하고 RIPA 버퍼로 세포를 용해시킨 후, 13000rpm, 20min, 4℃로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질을 정량하고 1 μ g/1 μ l의 농도로 SDS 샘플버퍼와 섞어 웨스턴 블랏을 위한 시료를 제작하였다. 제작한 시료를 100℃ heat block에 5min간 변성시킨후 13000rpm, 5min, 4℃ 원심분리를 하고 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였다. gel은 PVDF(polyvinylidene fluoride)를 이용해 전사하여 PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시켰으며, PVDF 멤브레인은 blocking 버퍼를 이용해 실온에서 1시간동안 블로킹을 한 후, 각각의 1차 항체 anti-rabbit NOS2 (#sc-8310; Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-rabbit Arginase-1 (#93668s, Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti-mouse CD80 (#sc-376012; Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-mouse CD38 (#sc-374650; Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-mouse CD83 (#sc-55535; Santa Cruz, Dallas, TX, USA), anti-rabbit GAPDH (#sc-25778; Santa Cruz, Dallas, TX, USA)를 넣어 4℃에서 16시간 반응시켰다. 반응 후 멤브레인을 TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20)로 10분 간격으로 세 번 세척한 후, HRP가 결합된 anti-rabbit(#7074s, Cell signaling, Danvers, MA, USA) 혹은 anti-mouse-IgG (#7076s, Cell signaling, Danvers, MA, USA) 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. TBST로 10분 간격으로 세 번 세척한 후, ECL 버퍼를 이용하여 X-ray 필름에 감광한 후, 현상하여 각각의 단백질 발현량을 확인하였다.

[0051] 도 9는 그 결과를 보여주는 사진으로 1은 KCTC18801P균주에 arabinose만을 처리하여 약독화된 균주를 세포사시킨 후 THF-1 세포에 처리한 것이고, 2는 doxycycline을 처리하여 야생형으로 환원시키고 arabinose를 처리하여 세포사시킨 후 THF-1 세포에 처리한 것이다. 도 9에서 확인할 수 있듯이, 매크로파지 마커인 NOS나 Arginase에 대해서는 1과 2 모두 유사한 발현량을 나타내어 매크로파지의 분극은 구별하기 어려웠다. 단백질, 수지상 세포 및 APCs의 마커인 CD80은 2의 발현이 훨씬 많아, 수지상 세포로의 2의 경우 수지상 세포로의 분화가 더 효과적으로 이루어졌음을 알 수 있다. 수지상 세포 마커인 CD38과 CD83의 발현 역시 2에서 우세하게 나타났다. 이로부터 야생종으로 환원시킨 살모넬라의 세포사 물질이 약독화 상태의 살모넬라를 세포사시켰을 때에 비해 면역유도 기능이 훨씬 우수하고, 수지상 세포로의 분화유도 능력도 탁월함을 확인할 수 있다.

[0052] 이에 본 발명은 상기 본 발명의 살모넬라 균주를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명의 조성물은 항암용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령, 성별 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적

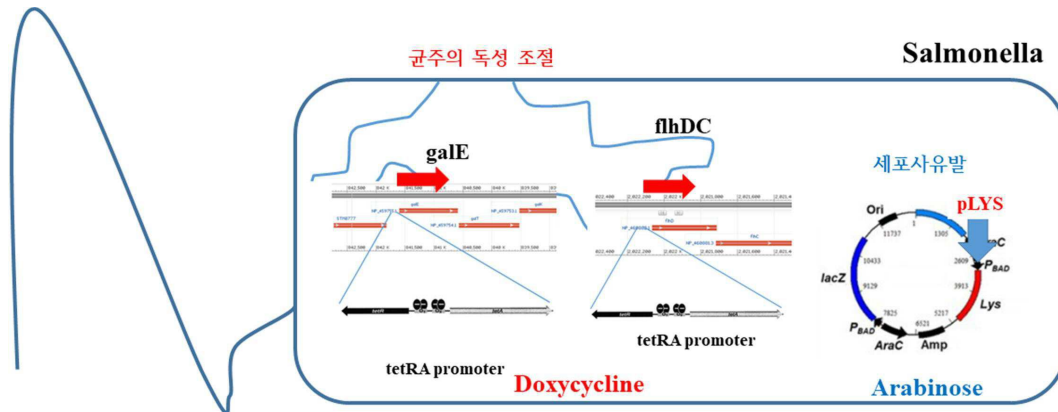
인 투여량은 0.001mg/kg · 일~10g/kg · 일이다.

[0054]

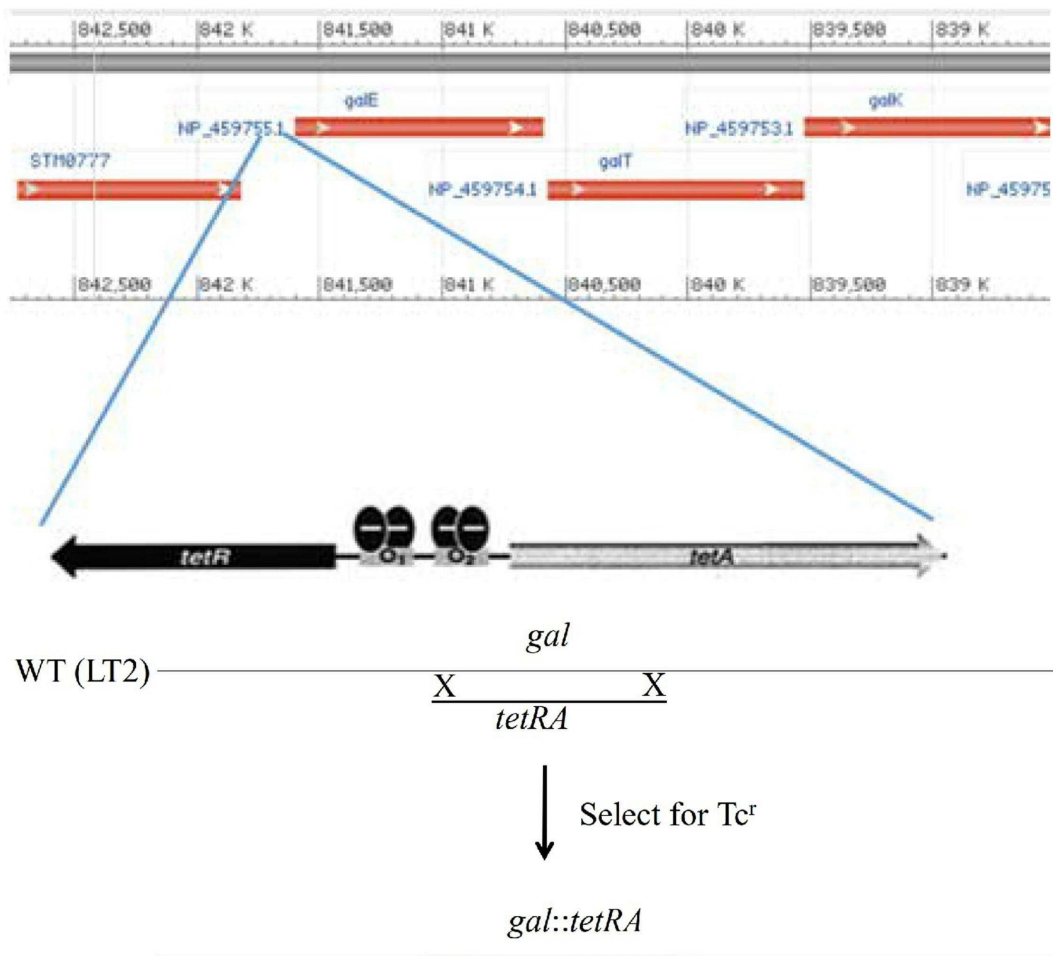
본 발명의 조성물이 효과적으로 효능을 발휘할 수 있도록 본 발명의 조성물 투여시에는, (A) 상기 살모넬라 균주가 암 조직에 표적화될 때까지 약독화된 상태를 유지하며, 표적화 이후 야생형으로 전환되도록 약제가 병용투여되며, (B) 상기 야생형으로 전환된 30~60 시간 경과 후, 세포사를 유발할 수 있는 약제를 병용투여되는 것이 바람직하다. "표적화될 때까지"는 각 암종에 따라 통상의 살모넬라 균주의 표적화에 소요되는 시간을 참작하여 결정할 수도 있으며, 혹은 표지된 살모넬라 균주를 사용하여 표적화를 추적할 수도 있다.

도면

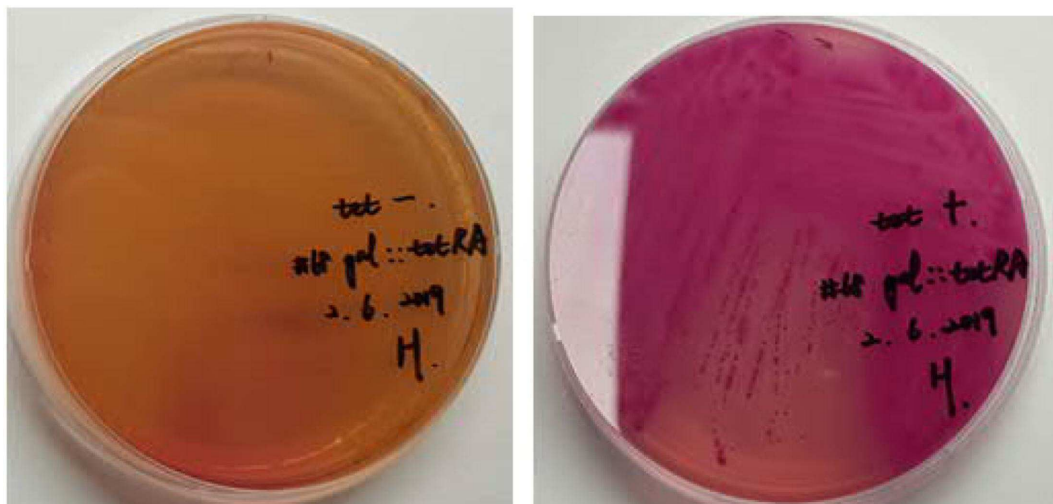
도면1



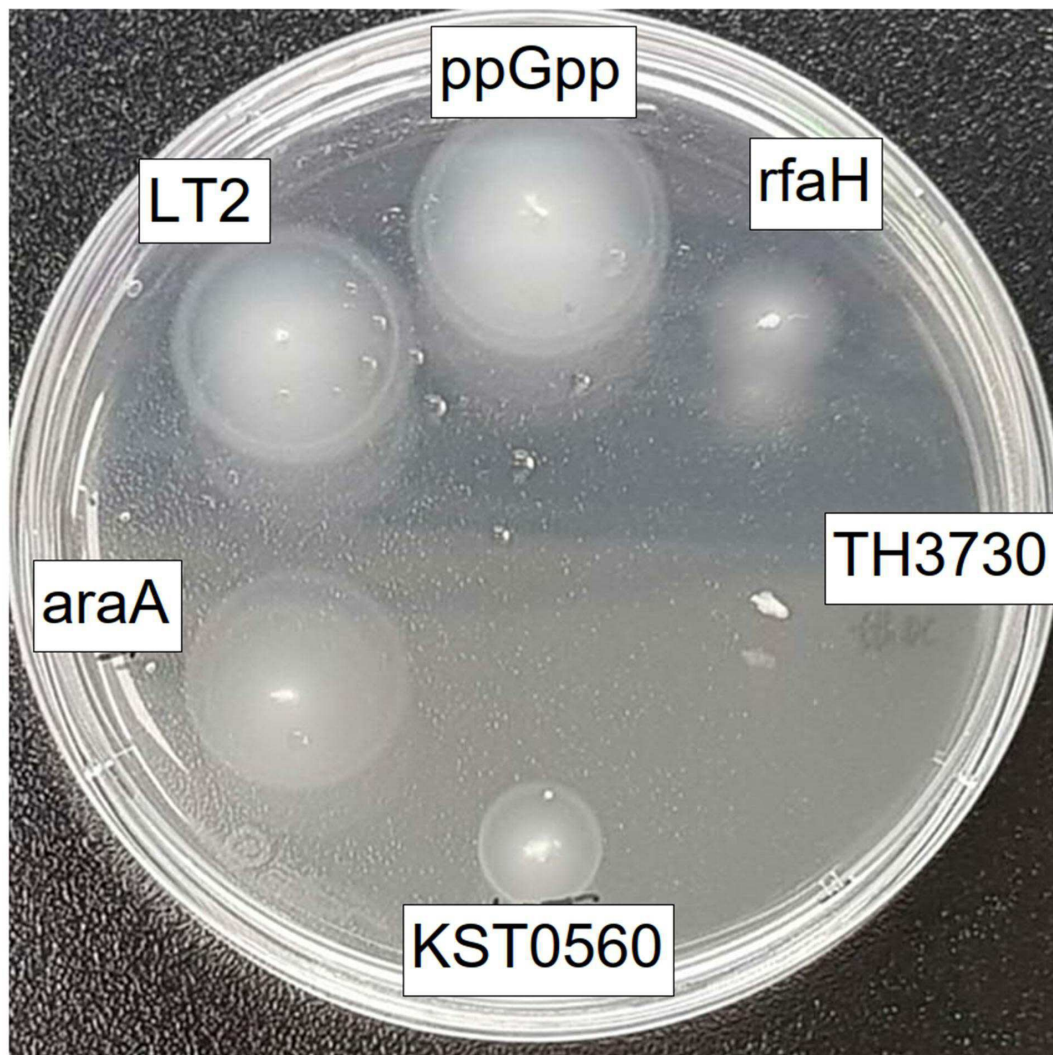
도면2



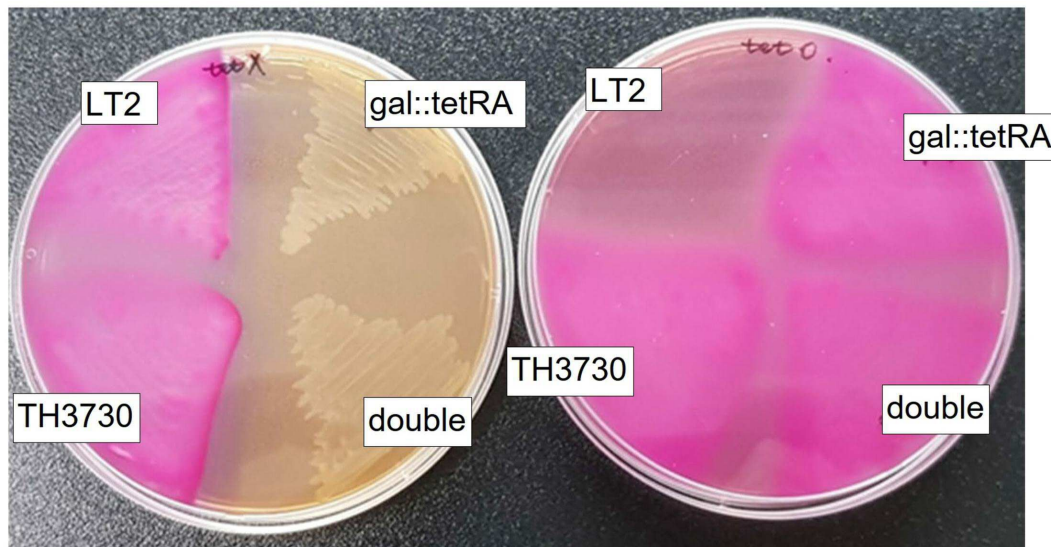
도면3



도면4

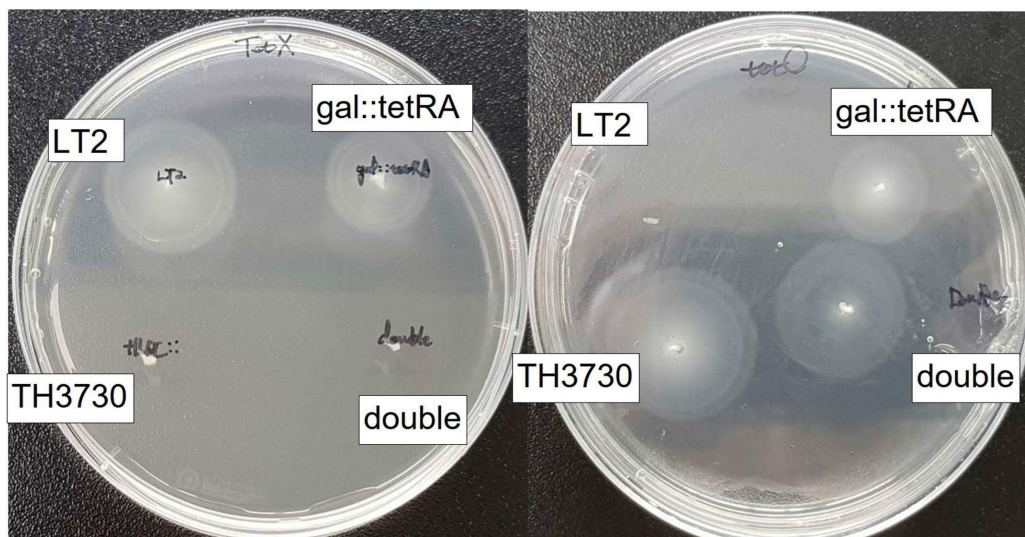


도면5

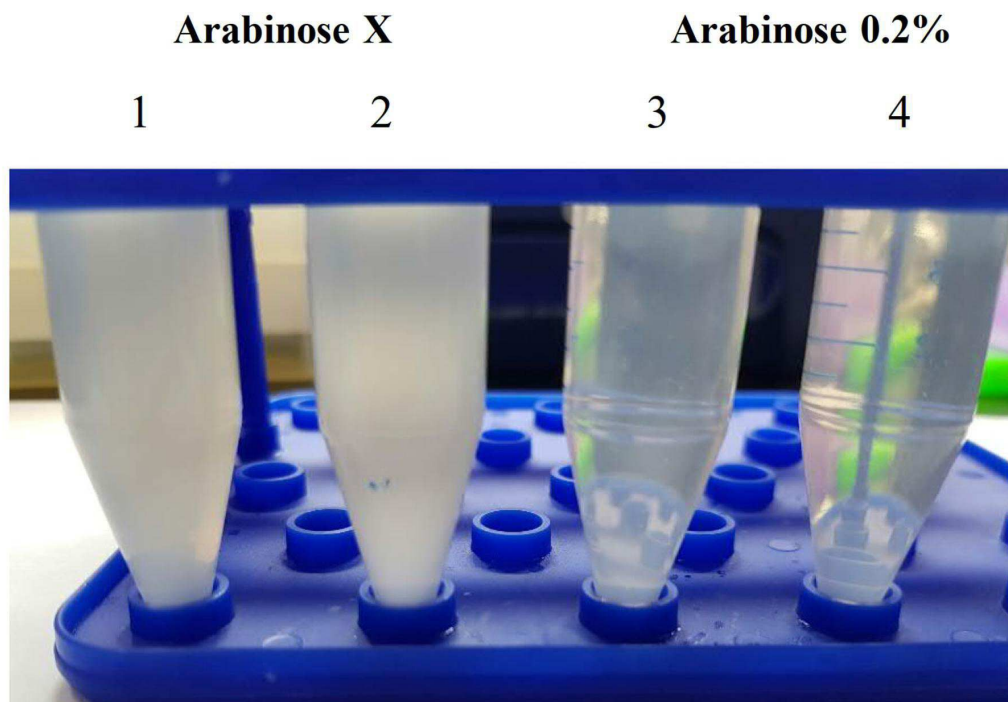


A. Tetracycline X

B. Tetracycline 1ug/ml

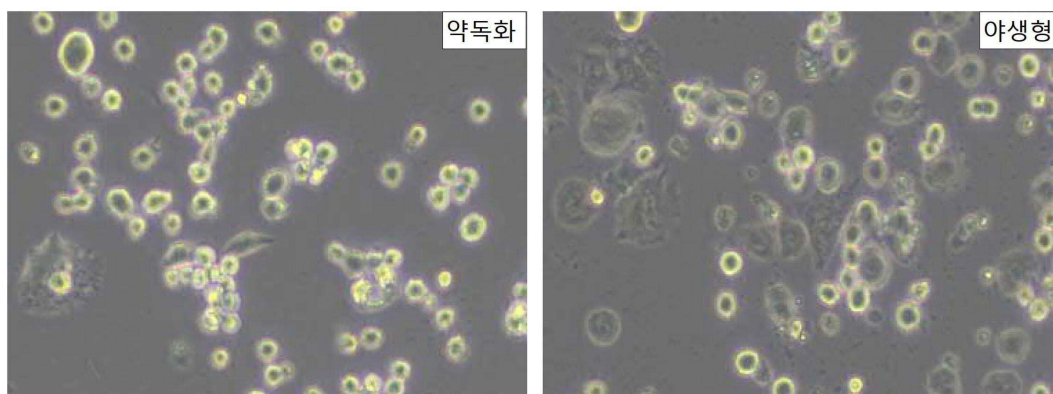


도면6

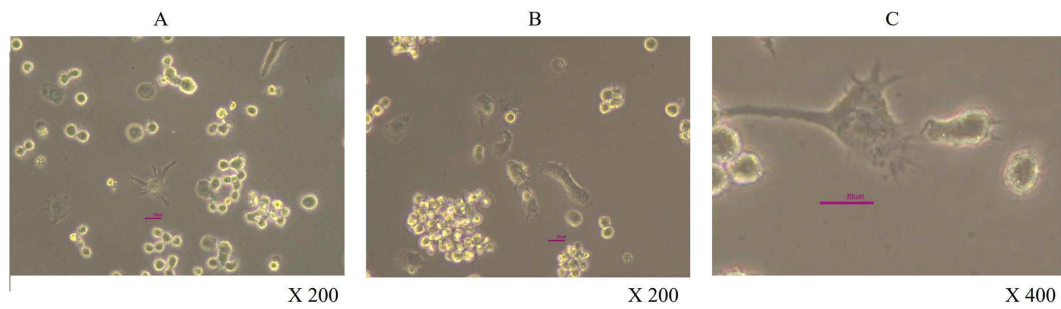


1. pLYS/*aroA*,*galE*(Arabinose X)
2. pLYS/*galE*,*flhDC*(Arabinose X)
3. pLYS/*aroA*,*galE*(Arabinose O)
4. pLYS/*galE*,*flhDC*(Arabinose O)

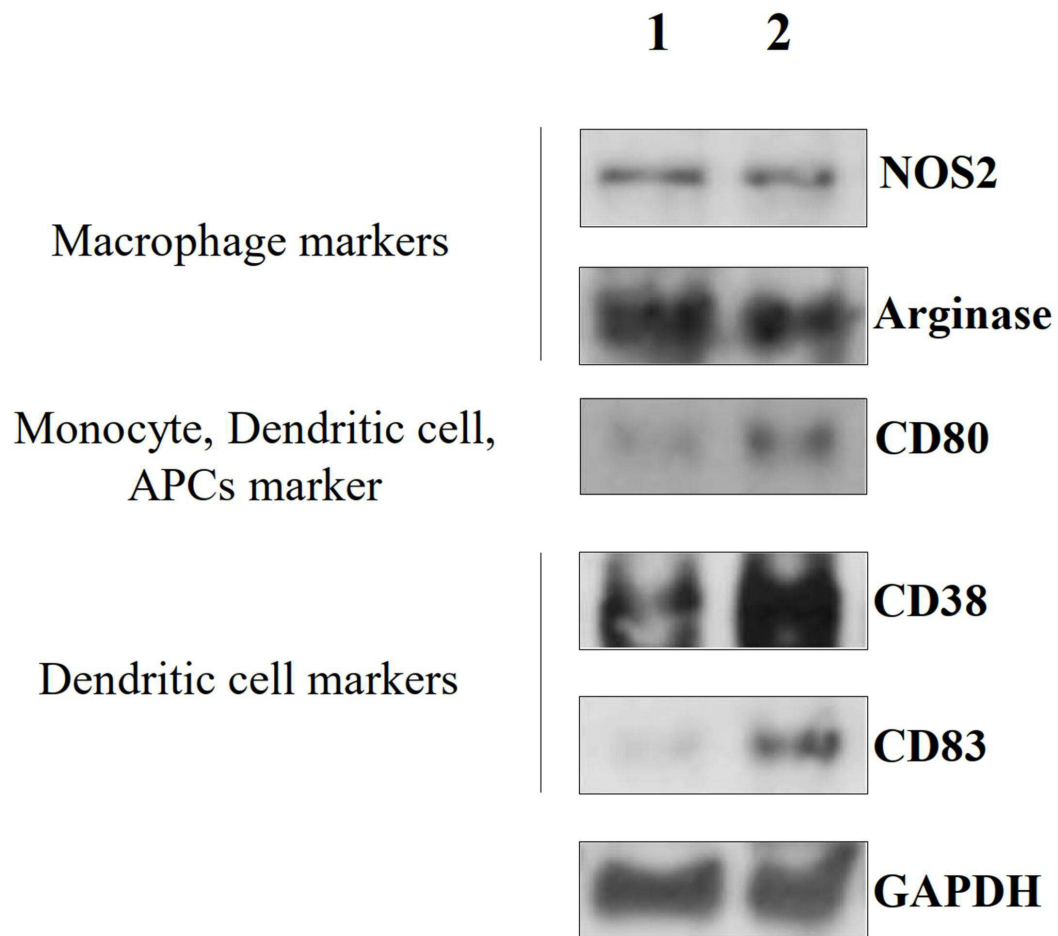
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Novel Anticancer Salmonella and Anticancer Composition Comprising the Salmonella
- <130> P0120-013
- <150> KR 10-2019-0001882
- <151> 2019-01-07
- <160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctgcttgcta tgctcggtat cgcgttgctt aaattctgga ttaagacca ctttcacatt 60

60

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tactctcata attcgctccg ttaagcctat ggtatggaat aactaagcac ttgtctcctg 60

60