



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월23일  
(11) 등록번호 10-1632896  
(24) 등록일자 2016년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61K 35/74 (2015.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 9/127 (2013.01)  
A61K 31/704 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0107483  
(22) 출원일자 2015년07월29일  
심사청구일자 2015년07월29일  
(56) 선행기술조사문헌  
논문2: Antimicro.Agents.Chemother.

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
경상대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
장규태  
대전광역시 유성구 과학로 125  
송봉석  
대전광역시 유성구 과학로 125  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
안소영

전체 청구항 수 : 총 5 항

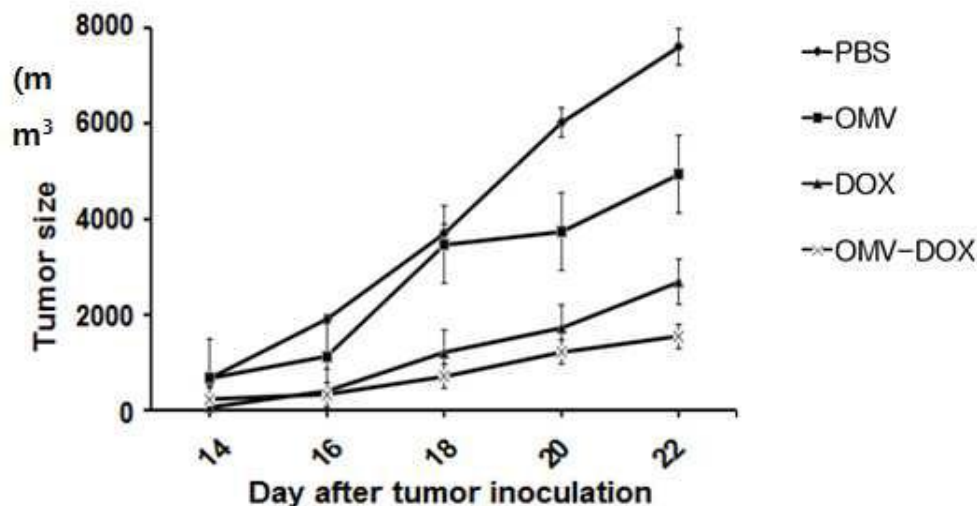
심사관 : 이수형

(54) 발명의 명칭 LPS가 결여된 아시네토박터 바우마니 유래 외막소포체를 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명의 LPS가 결여된 아시네토박터 바우마니 유래 외막소포체는 내독소로 작용할 가능성이 매우 낮아 안전하며, 그 자체로 우수한 항암 효과를 나타낸다. 또한 상기 외막소포체에 독소루비신을 포집시킬 수 있으며, 독소루비신이 포집된 상기 외막소포체는 더욱 우수한 항암 효과를 나타낸다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

**A61K 35/74** (2013.01)

(72) 발명자

**김영현**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이상래**

대전광역시 유성구 과학로 125

**허재원**

대전광역시 유성구 과학로 125

**김선욱**

대전광역시 유성구 과학로 125

**김지수**

대전광역시 유성구 과학로 125

**김상현**

충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 32,  
212동 601호

**이상호**

경상남도 진주시 대신로389번길 9

**김민정**

경상남도 사천시 한내4길 67 (별리동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM4241541

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 주요사업(2015-2018)

연구과제명 국가영장류센터사업

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

LPS가 결합된, 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주의 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 균주는 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 ATCC 19606 균주 또는 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 ATCC 17978 균주인 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암은 흑색종(melanoma)인 조성물.

#### 청구항 4

독소루비신(doxorubicin)이 포집된, 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주에서 분리한 LPS가 결합된 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 독소루비신은 상기 외막소포체에 대하여 1:1 내지 3:1의 중량비로 포집된 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 LPS가 결합된 아시네토박터 바우마니 유래 외막소포체를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 외막소포체(outer membrane vesicle, 이하 OMV)는 그람 음성 박테리아의 외막(Outer Membrane)에서 균체 외부로 분출되어 분비되는 20~200 나노미터 크기의 소포체(vesicle)로서, 그람음성 박테리아의 외막에 풍부하게 존재하는 지질다당류(lipopolysaccharide, 이하 LPS)와 외막단백질(outer membrane protein)들로 구성된 불용성 막으로 둘러 싸여진 내공(lumen)에 주로 주변세포질(periplasm)에 존재하던 수용성 단백질들이 내포되어 세포 외부로 분비된 천연 나노파티클이다.

[0003] OMV를 약학적으로 이용하기 위한 연구들에 대해서 보고된 있으나, 안전성 문제로 인하여 상용화가 제대로 이루어지지 않고 있다. OMV에 포함되어 있는 LPS는 toll-like receptor 4 (TLR4)-MD2를 자극하여 Th1 어주번트(adjuvant)로서 작용하여 선천성 면역반응을 유도하는 효과가 있으나, 일반적인 LPS는 TLR4를 자극하여 과량의 염증성 사이토카인 분비를 야기하는 내독소(endotoxin)로 작용하여 패혈증 쇼크와 유사한 증상을 일으킬 가능성이 있다. 또한 OMV를 전달체, 담체 등으로 이용하고자 하는 연구는 수행된 바 있으나, LPS 성분이 결합된 변형 OMV를 이용하여 약물전달체로 이용하였을 때 어떤 효과를 갖는지에 대해서는 밝혀지지 않았다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 공개번호 10-2012-0114872호(발명의 명칭: 아시네토박터 속 세균유래 세포밖 소포체 및 이의 용도)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 LPS가 결합된 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 유래 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물, 및 독소루비신이 포집된 상기 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LPS가 결합된, 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주의 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 아시네토박터 바우마니 감염은 중환자실 감염의 사망 원인 1위로 알려져 있다. 아시네토박터 바우마니는 인공호흡기 등을 통하여 감염되는데, 세포막 구조를 변화시켜 다제약내성을 가진 슈퍼박테리아가 되어 어떤 항생제에도 감수성을 보이지 않을 수 있다. 본 발명은 아시네토박터 바우마니에 항생제인 콜리스틴을 처리하면 LPS의 필수 구성성분인 리피드 A(lipid A)를 발현하는 유전자가 결손되는 돌연변이가 일어나 LPS가 결합된 외막소포체를 생산하는 균주가 된다는 점을 이용하였다. 본 발명의 외막소포체는 LPS가 결합되어 있기 때문에 내독성(endotoxicity)을 유발하지 않아 안전성이 매우 높다.

[0008] 본 발명에 있어서, 상기 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 균주는 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 ATCC 19606 균주 또는 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 ATCC 17978 균주일 수 있다. 바람직하게는 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 ATCC 17978 균주일 수 있다. 상기 균주는 리피드 A를 발현하는 유전자가 완전히 결손되어 추후 어떤 자극에 의하여 다시 돌연변이가 일어나 LPS를 포함하는 OMV를 생산할 가능성이 거의 없다.

[0009] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 암은 흑색종(melanoma)일 수 있다. 그러나 암의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0010] 또한 본 발명은 독소루비신이 포집된, LPS가 결합된 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 균주의 외막소포체를 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 독소루비신을 LPS가 결합된 콜리스틴 저항성 아시네토박터 바우마니 균주의 외막소포체와 혼합하는 방법으로 간단하고 편리하게 독소루비신을 외막소포체에 포집시킬 수 있다. 이와 같이 쉽게 제조할 수 있으므로 본 발명은 상용화가 용이할 것으로 기대된다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 독소루비신은 상기 외막소포체에 대하여 1:1 내지 3:1의 중량비, 바람직하게는 1:1 내지 2.5:1의 중량비, 보다 바람직하게는 2:1의 중량비로 포집시킬 수 있다. 그러나 중량비는 이에 제한되지 않는다.

[0012] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 외막소포체는 그 자체로 항암 효과를 갖는 동시에 독소루비신의 항암 효과를 더욱 증가시키는 효과를 갖는다.

[0013] 본 발명은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 비강, 피하, 국소, 직장, 경구, 안구내, 경피, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 투여 경로는 상기에 제한되지 않으며, 상황에 따라 적절한 투여 경로를 선택할 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물은 인간에 사용할 수 있고, 인간 외의 동물에 사용할 수도 있다. 상기 동물은 예를 들어 개, 고양이, 토끼, 소, 돼지, 닭, 오리 등의 가축이 될 수 있다. 그러나 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 대상체의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 조성물은 담체, 희석제, 부형제, 및 그 외의 통상적으로 사용되는 어쥬번트로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상을 더 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와

같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다.

[0017] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 4000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 2000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 1일 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 외막소포체, 또는 독소루비신이 포집된 외막소포체를 0.001 내지 50 % 중량백분율로 포함할 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명은 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 암을 치료하는 의학의 제조를 위한 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.

### 발명의 효과

[0020] 본 발명의 LPS가 결여된 아시네토박터 바우마니 유래 외막소포체는 내독소로 작용할 가능성이 매우 낮아 안전하며, 그 자체로 우수한 항암 효과를 나타낸다. 또한 상기 외막소포체에 독소루비신을 포집시킬 수 있으며, 독소루비신이 포집된 상기 외막소포체는 더욱 우수한 항암 효과를 나타낸다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 OMV를 TEM으로 관찰한 결과이다.

도 2는 본 발명의 OMV가 리피드 A를 갖는지 여부를 SDS-페이지, 면역블롯, TLC로 각각 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 OMV의 단백질 발현 패턴을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 OMV의 NF- $\kappa$ B 발현 유도를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 OMV의 IL-6 및 TNF- $\alpha$  분비 유도를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 독소루비신이 포집된 OMV의 제조를 확인한 도이다.

도 7은 본 발명의 OMV 및 독소루비신이 포집된 OMV가 세포핵에 흡수되고 세포핵에 어떤 병변을 유발하지 않음을 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 8은 본 발명의 OMV 및 독소루비신이 포집된 OMV가 종양 크기에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0023] 실시예 1. 아시네토박터 바우마니로부터 OMV 분리 및 특성 확인

[0024] 1-1. OMV 분리 및 TEM 관찰

[0025] *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 균주를 모체로 사용하여 LPS가 결여된 변이주(mutant)를 제작하였다. 상기 균주는 LPS가 없어도 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다. LPS가 결여된 변이주의 선발 과정은 항생제인 콜리스틴(colistin) 선택배지 10 microgram/ml를 포함하는 LB 배지(USB)에 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978를 직접 도말 배양하여 37°C에서 24시간 이상 배양기에서 배양된 콜리스틴 저항성 변이주를 선발하여 신선한 배지로 옮겨 재분리 배양하였다. 이렇게 선발된 콜리스틴 저항성 변이주들 중에서 LPS의 생성 능력이 완전히 결여되어 LPS가 존재하지 않는 변이주 하나를 특정하여 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 col<sup>R</sup>-3, 이하 col<sup>R</sup>-3 변이주), 이 균주(col<sup>R</sup>-3 변이주)를 LPS가 결여된 변형 OMV를 생산하는 균주로 사용하였다.

[0026] 상기 col<sup>R</sup>-3 변이주 콜로니를 5 ml의 LB 배지를 포함하는 15 ml 튜브에 접종하고 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 상기 배양물을 3 L의 신선 LB 배지를 포함하는 5 L 플라스크에 첨가하고, 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 4°C에서 10000 rpm으로 15분간 원심분리하여 박테리아 세포를 제거하고, 상층액을 0.45  $\mu$ m 및 0.2  $\mu$ m hollow fiber membrane (GE Healthcare)을 사용하는 Quix-Stand Benchtop System (GE Healthcare)으로 농축하였다. 상기 시스템을 사용하면 분자량 100 kDa를 갖는 분자를 제거할 수 있다. 4°C에서 150,000 x g로 3시간 동

안 초원심분리(HITACH- P70AT)하여 OMV를 수집하고 PBS에 재현탁하였다. 2.5, 1.6, 및 0.6 M의 수크로스를 포함하는 3 ml 수크로스 경사를 OMV를 포함하는 PBS 현탁액에 첨가하고, 4℃에서 200,000 x g로 18시간 동안 초원심분리하였다. 한편 동일한 방법으로 모체 균주인 wild *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 균주(이하 모체 균주)로부터 OMV를 수득하였다.

[0027] 수득된 각 OMV를 TEM(투과 전자현미경)으로 관찰한 결과, 모체 균주 OMV와 Col<sup>R</sup>-3 변이주 OMV는 모두 100-200 nm 지름을 갖는 구형으로 나타났다. (도 1).

## [0028] 1-2. LPS 추출 및 염색

[0029] 1-1에서 수득된 OMV로부터 하기와 같은 방법으로 LPS를 추출하였다. 각 OMV를 2% SDS (Affymetrix), 4% 2-머캅토에탄올 (BIOSESANG), 10% 글리세롤(JUNSEI), 및 1 M Tris (pH 6.8)을 포함하는 용해 완충액 150  $\mu$ l에 용해시켰다. 상기 용해물을 10분간 100℃에서 가열하였다. 단백질을 소화를 위하여, 10  $\mu$ l의 용해 완충액에 용해된 20 mg의 프로티나제 K(Thermo Scientific)를 가열된 용해물에 첨가하고 60℃에서 60분간 배양하였다. 그 후 95% 페놀 (BIOSESANG)을 150  $\mu$ l 첨가하여 70℃에서 15분간 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 얼음에 10분간 두고, 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 LPS를 추출하였다.

[0030] 추출된 LPS를 5×SDS 완충액에 용해하고 10분간 가열한 후 10-20% SDS-PAGE 겔 (ATTO)에 로딩하였다. 분리된 LPS 밴드는 은 염색(silver staining)으로 가시화하였다. 도 2(A)의 좌측 도와 같이, 모체 균주의 OMV에서는 리피드 A 및 코어 올리고당의 밴드가 나타나나, Col<sup>R</sup>-3 변이주의 OMV에서는 이러한 밴드가 나타나지 않았다.

[0031] 또한 각 OMV에 대하여 항-리피드 A mAb를 사용하여 면역블롯팅을 수행하였다. 도 2(A)의 우측 도와 같이, 모체 균주의 OMV에서는 리피드 A가 확인되나, Col<sup>R</sup>-3 변이주의 OMV에서는 리피드 A가 확인되지 않았다.

[0032] 또한 각 OMV를 포함하는 시료를 100  $\mu$ l의 클로로포름-메탄올(4:1, v/v)에 용해하고, 1000 cpm의 시료를 실리카 겔 Gel 60 TLC 플레이트에 적용하고, 용매 클로로포름/피리딘/88% 포름산/물(50:50:16:5, v/v) 내에서 developing tank 내에서 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. TLC 플레이트를 건조시키고 이미지 분석기 (FLA-7000, FUJIFILM)로 가시화하였다. 도 2(B)와 같이, 모체 균주의 리피드 A(4번 라인)와 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 리피드 A(5번 라인)는 서로 구조가 상이하게 나타났다. 도 2(B)에서 1번 내지 3번 라인은 비교를 위한 것인데, 1번 라인은 *E.coli* W3110 균주의 OMV의 리피드 A이고, 2번 라인은 *Acinetobacter baumannii* 19606 균주의 리피드 A이고, 3번 라인은 리피드 A를 발현하지 않도록 형질전환시킨 *Acinetobacter baumannii* 19606 균주의 리피드 A이다. 도 2(B)에서 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 리피드 A(5번 라인)는 리피드 A를 발현하지 않도록 형질전환시킨 *Acinetobacter baumannii* 19606 균주의 리피드 A(3번 라인)와 유사한 구조를 갖는 것을 알 수 있다.

[0033] 따라서 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 OMV는 리피드 A를 생산하는 유전자가 결실되어 LPS가 결합된 OMV를 생산하는 것으로 확인되었다.

## [0034] 1-4. 단백질 패턴 분석

[0035] N-라우로일사르코신(N-lauroylsarcosine)으로 총 막 단백질을 구별 가용화시킴으로써 박테리아 세포의 OMV를 준비하였다. 총 단백질 막 분획을 1% (wt/vol) 소듐 라우릴 사르코신을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 재현탁하고 실온에서 30분간 배양하여 계면활성제에 용해되는 세포막 분획을 용해시켰다. 그 후, 용해되지 않은 외막 분획을 90분간 45,000 x g로 원심분리하여 분리하고, 외막 펠렛을 탈이온수로 2회 세척하였다. 정제된 OMV 및 외막 분획은 멸균임을 확인하였고 -20℃에서 보관하였다.

[0036] 모체 균주 및 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 외막 및 OMV를 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 분리하고 SDS-페이지로 가시화하였다(도 3(A)). 모체 균주(도면상에 'WT'로 표시)와 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 단백질 패턴은 거의 동일함을 확인하였다.

[0037] 또한 외막의 주요 단백질인 outer membrane protein(OmpA)을 확인하기 위하여, SDS-페이지를 5% 탈지유로 블로킹하고 rabbit anti-AbOmpA 면역 혈청과 함께 배양하였다. 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막 (Millipore)으로 170 mA에서 1시간 동안 전달하였다. 전달 후에, 1시간 동안 5% 탈지유 분말을 사용하여 1시간 동안 블로킹하였다. TBS-Tween20 완충액으로 수 회 세척한 후에, 막을 2시간 동안 항-AbOmpA 항혈청과 함께 배양하였다. TBS-Tween20 완충액으로 수 회 세척한 후 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 첨가하고 배양하고 5% 탈지

유 및 goat anti-rabbit pAb를 포함하는 TBS-Tween20 완충액으로 1시간 동안 컨주게이션하였다. 막에 전달된 단백질은 ECL 웨스턴 블롯 검출 시약(ELPIS)으로 검출하였다(도 3(B)). 모체 균주 및 Col<sup>R</sup>-3 변이주에서 모두 OmpA가 유사한 양으로 검출되었다.

## [0038] 실시예 2. 내독성 확인

[0039] LPS에 포함된 리피드 A는 과도한 사이토카인 분비를 유도하여 패혈증 쇼크와 유사한 내독성(endotoxicity)을 유발할 수 있다. 따라서 Col<sup>R</sup>-3 변이주가 사이토카인 분비를 유도하는지 여부를 하기와 같이 확인하였다.

### [0040] 2-1. NF- $\kappa$ B 발현 유도 확인

[0041] 먼저, 사이토카인 분비와 관련된 전사인자인 NF- $\kappa$ B 발현이 유도되는지 여부를 확인하였다. HEK-Blue<sup>TM</sup>-4 세포 (InvivoGen, USA)를 이용하여 LPS 자극에 의한 TLR4 활성화로 인한 NF- $\kappa$ B 유도를 정량하였다. SEAP의 발현은 NF- $\kappa$ B에 의해 유도될 수 있는 프로모터의 조절을 받으므로, SEAP의 발현과 NF- $\kappa$ B 발현은 서로 비례 관계에 있다. HEK-Blue<sup>TM</sup>-4 세포는 제오신(zeocin) 및 노르모신(normocin)을 함유하는 HEK-Blue<sup>TM</sup> 선택 배지에  $1 \times 10^5$  개/ml의 밀도로 180  $\mu$ l/웰의 부피로 접종하고, 96-웰 플랫-바텀 세포 배양 플레이트에 모체 균주 및 Col<sup>R</sup>-3 변이주를 10 pg/웰로 접종하고, 20-24시간 동안 배양하였다. 비색분석법으로, AP-특이적 크로모젠(QUANTI-Blue<sup>TM</sup>)을 이용하여 분광광도계를 사용하여 560 nm에서 SEAP 발현 정도를 측정하였다(도 4). 도 4에서 모체 균주(WT)보다 Col<sup>R</sup>-3 변이주가 SEAP 발현 유도 정도가 현저히 낮음을 알 수 있다. 즉, Col<sup>R</sup>-3 변이주는 NF- $\kappa$ B 발현을 유도하지 않음을 알 수 있다.

### [0042] 2-2. 전염증성 사이토카인 유도 확인

[0043] HUVEC 세포( $1 \times 10^4$  개/웰)를 96-웰 플랫-바텀 세포 배양 플레이트에 접종하고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>의 존재에서 배양하였다. 그 후 모체 균주 및 Col<sup>R</sup>-3 변이주를 5  $\mu$ g/웰로 처리하여 24시간 동안 상기 HUVEC 세포를 자극하였다. 각각에 대한 ELISA 키트(KOMA)를 사용하여 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6를 정량하고 각 시료를 450 nm에서 이반복적으로 판독하였다(도 5). 도 5에서 모체 균주(WT)보다 Col<sup>R</sup>-3 변이주가 TNF- $\alpha$  및 IL-6 유도 정도가 현저히 낮음을 알 수 있다.

## [0044] 실시예 3. 독소루비신 포집 OMV 제조

[0045] 실시예 1-1의 방법으로 준비한 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 OMV를 1시간 동안 37°C에서 Di-I (1, 1\_-dioctadecyl-3, 3, 3\_, 3\_-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Vybrant DiI cell labeling solution, life technologies<sup>TM</sup>) 100  $\mu$ l로 염색하고, PBS로 투석하여 정제하였다. 독소루비신 50  $\mu$ g을 상기 OMV와 혼합하여 OMV 내에 독소루비신을 포집시키고 투석에 의해 포집되지 않은 독소루비신을 제거하였다.

[0046] 독소루비신이 포집된 OMV는 적색 형광으로 관찰되며(도 6(A)), 로딩된 독소루비신의 농도에 비례하게 독소루비신이 포집된 OMV(이하 OMV-DOX)의 양 역시 증가함을 알 수 있다(도 6(B)).

[0047] 또한 흑색종 세포인 B16F10 세포를 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 5% CO<sub>2</sub>의 존재에서 37°C에서 배양하였다. 배양된 B16F10 세포는 독소루비신 포집 OMV 제조 전날 유리 커버슬립 상에  $5 \times 10^3$  개의 농도로 접종해 두었다. 상기 세포에 5  $\mu$ g의 OMV, OMV-DOX, 또는 독소루비신(DOX)를 처리하고 10분간 배양하였고, 그 후 PBS로 세포를 세척하고 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes)로 세포핵을 염색하였다. 그 후 630 X Zeiss 공초점 현미경으로 관찰하였다(도 7). 도 7에서 Di-I로 표지된 OMV(적색 형광) 및 OMV-DOX 모두 세포핵 내로 흡수됨을 알 수 있다. DOX와 마찬가지로, OMV-DOX 역시 세포핵에 어떤 손상을 가하지 않는 것으로 관찰되었다.

## [0048] 실시예 4. 항종양 활성

[0049] 실험동물윤리위원회의 가이드라인에 따라, 6주령 암컷 C57BL/6 마우스(KOATEC)를 사용하여 동물 연구를 수행하였다. 각 마우스의 옆구리에 피하로  $1 \times 10^5$  개의 B16F10 세포를 주사하였다. 14일 후에, 마우스를 4개 군으로 나누어 1개 군에는 PBS만을 투여하고(음성 대조군), 1개 군에는 각각 50  $\mu$ g의 OMV(OMV 단독 투여군), 1개 군에는 100  $\mu$ g의 독소루비신(독소루비신 단독 투여군), 1개 군에는 실시예 4에서 준비한 독소루비신이 포집된

OMV(OMV-DOX 투여군)(20  $\mu$ g의 OMV에 100  $\mu$ g의 독소루비신을 포집시킨 것)을 각각 꼬리정맥으로 투여하였다. 격일로 종양의 각 수직 지름을 측정하고 하기 공식에 대입하여 종양 성장을 계산하였다.

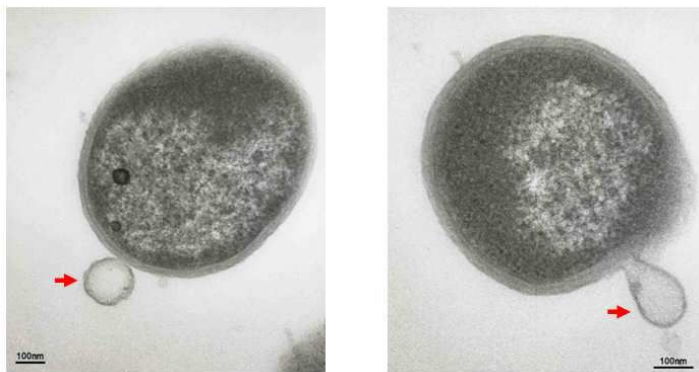
[0050] 부피 =  $(a \times b^2)/2$

[0051] (a는 major axis의 길이, b는 minor axis의 길이를 의미)

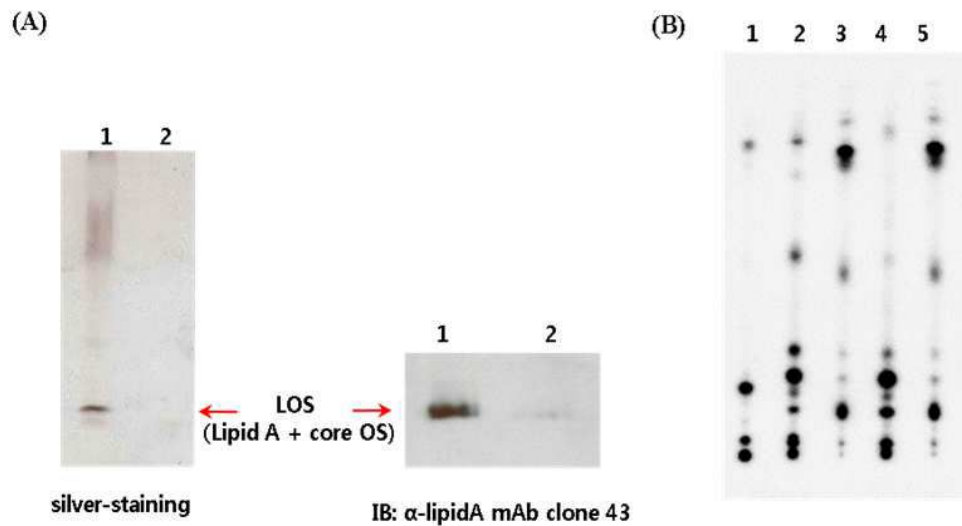
[0052] 결과는 도 8에 나타내었다. 도 8에서 음성 대조군과 비교하여 OMV 단독 투여군에서 종양 크기가 작게 나타나며, OMV-DOX 투여군에서는 OMV 단독 투여군 및 독소루비신 단독 투여군보다도 더욱 종양 크기가 작게 나타남을 알 수 있다. 상기 결과로부터 본 발명의 Col<sup>R</sup>-3 변이주의 OMV가 항종양 활성을 가지며, 항암제의 항종양 활성을 더욱 증가시키는 효과를 가짐을 알 수 있다.

## 도면

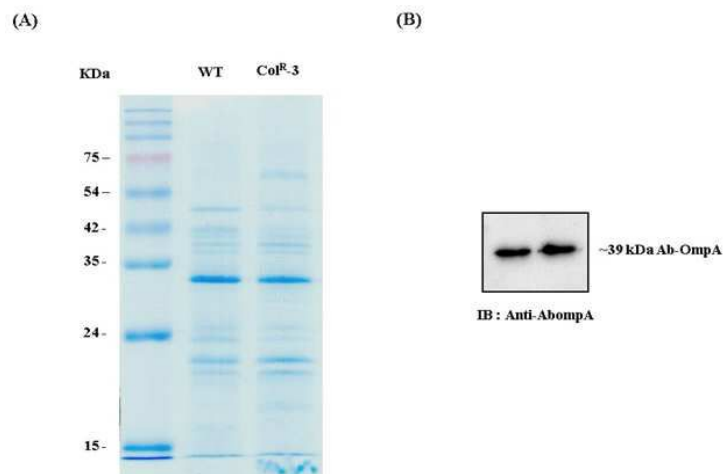
### 도면1



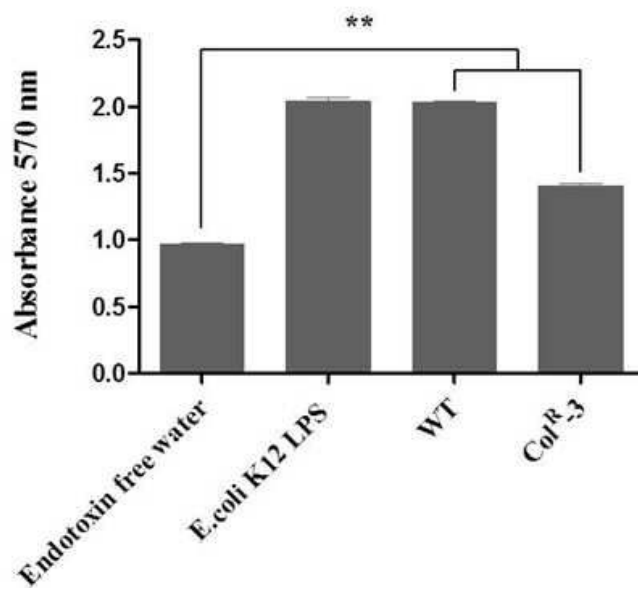
### 도면2



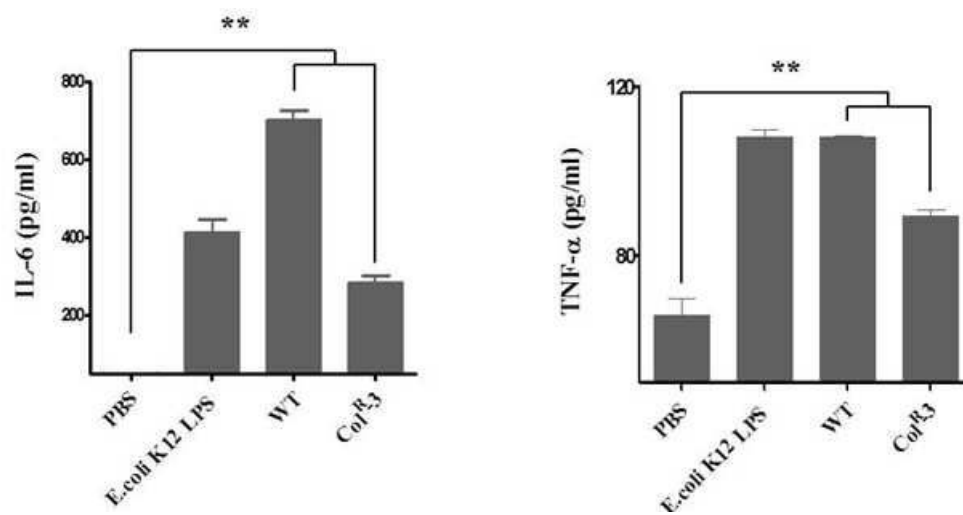
도면3



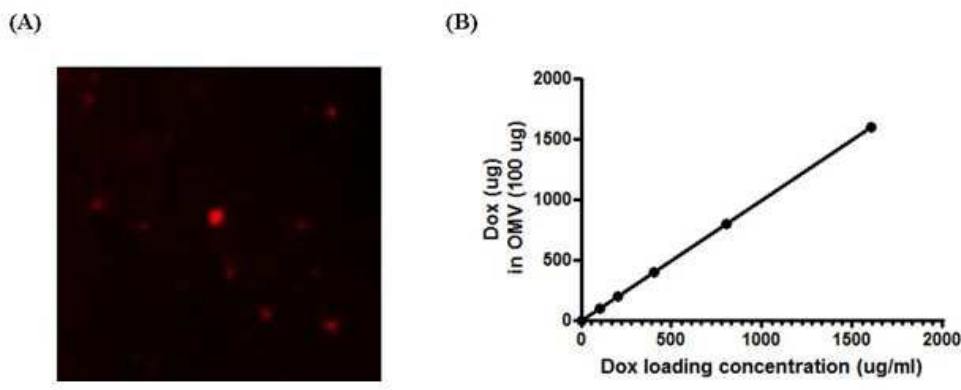
도면4



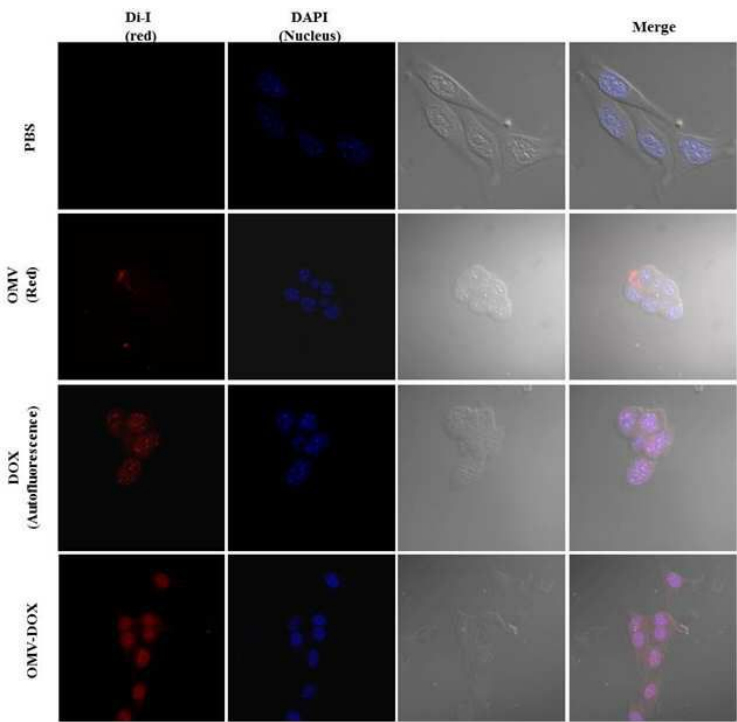
도면5



도면6



도면7



도면8

