



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0105043  
(43) 공개일자 2018년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
A01K 67/027 (2013.01)  
G01N 33/5088 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0137774  
(22) 출원일자 2017년10월23일  
심사청구일자 2017년10월23일  
(30) 우선권주장  
1020170031617 2017년03월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
연세대학교 원주산학협력단  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1  
(72) 발명자  
이기중  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 211호  
황순재  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
남연정

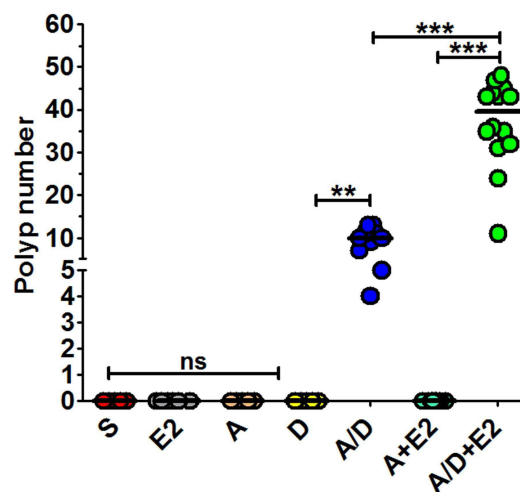
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법

### (57) 요약

본 발명은 인간의 장내 상재균, 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 및 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 유도된 대장용종 동물모델 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 인간의 장내 상재균으로 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주를 사용하여 기존의 대장용종 동물모델에 비하여 현저하게 높은 대장용종 발생 효율을 나타내는 동물모델을 규명하였으며, ETBF 균주로 유발되는 대장질환 기전 연구를 위한 마우스 모델을 새롭게 발명하였다는 점에서도 특징이 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A01K 2207/25 (2013.01)  
A01K 2227/105 (2013.01)  
A01K 2267/0331 (2013.01)

**박찬오**

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주  
캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실

(72) 발명자

**이창근**

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주  
캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실

**조민정**

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주  
캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1A02018088

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 Th17면역반응으로 촉진되는 대장용종 형성 wild-type 마우스 모델 개발을 통해 고염식과  
대장암 간에 상관관계 규명 및 병태생리적 메커니즘 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017H1A2A1045727

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌박사펠로우십

연구과제명 장독소성 박테로이디스 프라질리스균에 의해 유발되는 장염의 기전 및 면역세포의 역할 규  
명

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 1) 아зок시메탄(azoxymethane, AOM)을 동물에 투여하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 동물에 인간의 장내 상재균을 감염시키는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계의 동물에 덱스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)을 투여하는 단계;를 포함하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간의 장내 상재균은 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주인 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 ETBF는 장독소(*Bacteroides fragilis* toxin, BFT)를 생성하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 BFT는 BFT-1, BFT-2 및 BFT-3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 1) 단계 이후 동물에 클린다마이신(clindamycin) 및 겐타마이신(gentamicin)을 용해시킨 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 2) 단계는  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액을 동물에 투여하여 감염시키는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 3) 단계는 1~2% (w/v) 농도의 DSS를 동물에 투여하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계는 상기 1) 단계를 실시한 2일 이후 시작하여 12일 동안 진행하는 것을 특징으로 하고;

상기 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에 7일 동안 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에 상기 3) 단계를 5일 동안 실시하는 것을 특징으로 하고;

상기 3) 단계를 마친 후에 정제수를 16일 동안 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 3) 단계를 5일 동안 실시하는 것을 특징으로 하고;

상기 3) 단계를 마친 후에 정제수를 16일 동안 투여하는 단계는 1~3회 반복하는 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 동물은 Balb/c 마우스인 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 동물모델은 대장암 동물모델인 것을 특징으로 하는 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 13

엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(Enterotoxigenic Bacteroides fragilis, ETBF) 균주, 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 및 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 유도된 대장암 마우스 동물 모델.

## 청구항 14

- 1) 제13항에 따른 동물모델에 후보물질을 투여하는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계의 동물모델의 대장용종을 확인하는 단계;를 포함하는 대장암 치료용 약물 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간의 장내 상재균을 이용하여 대장용종의 형성 효율이 증가된 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 대장 용종(Colonic polyp)이란 대장 점막이 비정상적으로 자라 사마귀 모양의 혹으로 보이는 조직이 되어 장의 안쪽으로 돌출되어 있는 상태를 말한다. 흔히 암으로 발전할 가능성이 있는 종양성 용종과 암으로 발전할 가능성이 없는 비종양성 용종으로 나뉘는데, 종양성 용종에는 선종성 용종, 유암종, 악성용종 등이 있고, 대부분이 대장암과 아무 관련이 없는 비종양성 용종에는 과형성 용종, 용종양 점막, 과오종, 염증성 용종, 지방종 등이 있다.

[0003] 그 중 선종성 용종은 시간이 지나면 암으로 진행할 가능성이 높아 반드시 제거해야 한다. 선종성 용종의 위험한 정도는 그 크기와 현미경적 조직 소견에 따라 차이가 있는데 크기가 1 cm 이상이거나, 현미경 소견에서 융모형태의 세포를 많이 포함하는 경우, 세포가 덜 분화된 경우는 진행성 선종이라 부르고, 암으로 발전할 가능성이 매우 높다.

[0004] 유암종은 주로 직장에서 발견되며 크기가 커지면 다른 장기로 전이될 수 있어 악성종양으로 분류된다. 이러한 용종의 경우 제거하지 않으면 결국 악성으로 변할 수 있고, 결장과 직장의 벽을 뚫고 다른 곳으로 전이될 수 있다.

[0005] 이와 같이 대부분의 대장암은 이미 존재하고 있던 대장 안의 조직인 용종(Polyp)에서 발생된다고 할 수 있어, 대장용종과 매우 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 결장암과 직장암을 통틀어 대장암(Colorectal cancer, CRC)이라고 일컫는데, 대장암은 전 세계적으로 가장 흔한 암들 중 하나이면서 악성종양에 의한 주요 사망원인 4위에 해당하는 암이다. 대장암은 높은 열량의 섭취, 동물성 지방 섭취, 섬유소 섭취 부족, 비만 등이 원인이 되어 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 과거 대장암은 보통 서양에서 많이 발생했고 우리나라에서는 비교적 발생빈도가 낮은 암이었지만, 최근 우리나라의 식습관도 서구화됨에 따라 발생률이 두배 이상 높아졌다. 대장암은 모든 연령에서 발생할 수 있지만 대부분이 40대 이상의 중년에게 나타나고 연령이 증가할수록 위험이 높아진다는 점에서 노령인구가 폭발적으로 증가하고 있는 우리나라의 경우 대장암에 대한 관심이 날로 증가하고 있다.

[0007] 이에, 대장암 치료제나 발병 매커니즘에 관한 연구가 활발하게 이뤄지고 있으며, 그에 따라 대장용종 또는 대장암이 유도된 동물모델에 대한 활용도도 크게 증가하고 있다. 현재 보편적으로 사용되고 있는 대장암 동물모델로, 대장암 발암물질인 AOM을 처리하거나, 대장염 유발 물질인 DSS를 추가로 처리하여 대장암을 유발한 AOM/DSS 마우스가 알려져 있다(Cancer Sci. 94 (11): 965-73, 2003, 한국등록특허 제1474235호, 한국공개특허 제2014-0148122호).

[0008] 그러나, 상기 AOM/DSS-유도된 대장용종 또는 대장암 동물모델에서 대장용종의 형성 효율을 크게 증가시켜 보다 발전된 동물모델을 제조하려는 시도는 현재까지 보고되지 않았다.

## 선행기술문헌

## 특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1474235호  
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2014-0148122호

### 비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Tanaka T 등, Cancer Sci. 94 (11): 965-73, 2003

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 보다 정확한 대장용종 및 대장암 발생에 관한 연구와 대장질환 치료제의 스크리닝을 위한 동물모델 개발의 노력을 계속한 결과, 인간의 장내 상재균을 이용하는 경우, 기존의 AOM 및 DSS 화합물을 마우스에 처리하는 방법보다 대장용종의 발생율을 크게 증가시킬 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 인간의 장내 상재균, 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 및 덱스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 유도된 대장용종 동물모델 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 대장용종 동물모델에 후보물질을 투여하여 대장질환 치료용 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에서는 인간의 장내 상재균으로 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주를 사용하는 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물 모델의 제조방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결하였다.

#### 발명의 효과

- [0015] 본 발명은 기존의 AOM/DSS-유도된 대장용종 동물모델에 비하여 현저하게 높은 대장용종 발생 효율을 유도한다는 효과가 있으며, 그러한 점에서 본 발명에 따른 동물모델을 사용하여 대장용종 및 대장암 관련 연구를 수행하는 실험자가 보다 정확한 연구 결과를 도출할 수 있고 연구의 편의성이 증대된다는 장점이 있다. 또한, ETBF 균주로 유발되는 대장질환 촉진 기전 연구를 위한 마우스 모델을 새롭게 발명하였다는 점에서도 특징이 있다.

#### 도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 실시예 2에 따른 실험 프로토콜을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 실시예 2에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.
- 도 3은 실시예 2에 따라 제조된 실험 대조군(AOM/DSS mouse)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.
- 도 4는 실시예 2에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)와 실험 대조군(AOM/DSS mouse)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.
- 도 5은 실시예 3에 따른 실험 프로토콜을 나타낸 그림이다.
- 도 6는 실시예 3에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.

도 7은 실시예 3에 따라 제조된 실험 비교군 중 AOM 및 DSS만 투여한 마우스(AOM/DSS mouse)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.

도 8은 실시예 3에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse; A/D+E2) 및 실험 비교군(S, E2, A, D, A/D 및 A+E2)의 대장 내 용종의 수를 비교한 그래프이다:

S: 장내 상재균(WT-ETBF), AOM 및 DSS를 투여하지 않은 마우스;

E2: WT-ETBF만 투여한 마우스;

A: AOM만 투여한 마우스;

D:DSS만 투여한 마우스;

A/D: AOM 및 DSS만 투여한 마우스;

A+E2: AOM 및 WT-ETBF만 투여한 마우스; 및

A/D+E2: WT-ETBF, AOM 및 DSS를 모두 투여한 마우스.

도 9는 실시예 3에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)와 실험 비교군 중 AOM 및 DSS만 투여한 마우스(AOM/DSS mouse)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.

도 10은 실시예 3에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)의 6주, 9주 및 12주 후 대장 사진(A) 및 대장 내 용종의 수를 비교한 그래프(B)이다.

도 11은 실시예 4에 따라 제조된 Balb/c 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS Balb/c mouse) 및 C57BL/6 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS C57BL/6 mouse)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.

도 12는 실시예 4에 따라 제조된 Balb/c 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS Balb/c mouse) 및 C57BL/6 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS C57BL/6 mouse)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.

도 13은 실시예 5에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(+E2, +rE2 및 +rN2) 및 대조군(A/D 및 S)의 대장 사진으로 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다:

+E2: WT-ETBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

+rE2: rETBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

+rN2: rNTBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

A/D: AOM 및 DSS만 투여한 마우스; 및

S: 장내 상재균(WT-ETBF, rETBF 또는 rNTBF), AOM 및 DSS를 투여하지 않은 마우스.

도 14는 실시예 5에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(+E2, +rE2 및 +rN2) 및 대조군(A/D 및 S)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.

도 15는 실시예 6에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(+E1, +E2 및 +E3) 및 대조군(+N 및 A/D)의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다:

+E1: BFT-1을 발현하는 WT-ETBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

+E2: BFT-2를 발현하는 WT-ETBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

+E3: BFT-3을 발현하는 WT-ETBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스;

+N: WT-NTBF, AOM 및 DSS를 투여한 마우스; 및

A/D: AOM 및 DSS만 투여한 마우스.

도 16은 실시예 6에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(+E1, +E2 및 +E3) 및 대조군(+N 및 A/D)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.

도 17은 실시예 7에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(WT-ETBF+AOM/1% (w/v) DDS mouse 및 WT-ETBF+AOM/2% (w/v) DDS mouse)의 대장 사진이다.

도 18은 실시예 7에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(WT-ETBF+AOM/1% (w/v) DDS mouse 및 WT-ETBF+AOM/2% (w/v) DDS mouse)의 대장 내 용종의 수(A)와 크기(B)를 비교한 그래프이다.

도 19는 실시예 7에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스 실험군(WT-ETBF+AOM/1% (w/v) DDS mouse 및 WT-ETBF+AOM/2% (w/v) DDS mouse)의 생존율을 비교한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 인간의 장내 상재균을 이용하여 대장용종의 형성 효율이 증가된 AOM/DSS-유도 대장용종 동물모델 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0018] 즉 본 발명은 인간의 장내 상재균, 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 및 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 유도된 대장용종 동물모델 및 대장암 동물모델, 이의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 상기 인간의 장내 상재균(intestinal bacteria)은 사람의 장관 내에 생후부터 형성된 세균총에 속하는 균주를 말하는 것으로, 균종으로는 박테로이데스, 유박테륨, 혐기성렌서균, 대장균, 유산간균 등이 있다. 그 중에서 본 발명에 사용되는 장내 상재균으로 박테로이데스(*Bacteroides*) 균속이 바람직하다.
- [0020] 박테로이데스 균속은 무산소성 그람음성 막대균으로서 탄수화물을 분해하고, 담즙에 내성이 있으며 주로 장에서 분리된다. 20종 이상의 균종이 있는데, 이 중에서 *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* 및 *B. ovatus*는 사람에서 주로 감염을 일으킨다. *B. fragilis* 중에는 장독소(*Bacteroides fragilis* enterotoxin, BFT), 예를 들어 BFT-1, BFT-2 또는 BFT-3를 생성하는 세균(enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF)이 있는데, 이들은 설사질환 환자의 변에서 처음 분리되었다. ETBF는 염증성 대장질환(inflammatory bowel disease, IBD) 환자의 변에서 정상인보다 더 높은 빈도로 검출됨이 보고된 바 있다(Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. Dig Dis Sci. 2004;49:1425-1432).
- [0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서 인간의 장내 상재균은 박테로이데스 균종 중에서도 상기 장내 독소형 박테로이데스 프라길리스(Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주가 가장 바람직하며, 상기 ETBF는 BFT-2를 생성하는 것이 가장 바람직하다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에서 본 발명에 따른 12주 동물모델로 정상적인 BFT-2를 생성하는 WT-ETBF(wild-type ETBF)로 감염시킨 마우스의 대장을 적출하여 대장용종의 형성 모습을 살펴본 결과, 비활성 돌연변이 BFT-2를 발현하여 분비하는 rNTBF로 감염시킨 마우스의 것과 비교하여 높은 대장용종 형성 효율을 보임을 확인할 수 있었다(도 13 및 도 14, 실시예 5-2 참조).
- [0023] 본 발명의 또 다른 실시예에서 본 발명에 따른 12주 동물모델로 BFT-2를 생성하는 WT-ETBF로 감염시킨 마우스의 대장을 적출하여 대장용종의 형성 모습을 살펴본 결과, BFT-1 또는 BFT-3를 생성하는 WT-ETBF로 감염시킨 마우스의 것과 비교하여 높은 대장용종 형성 효율을 보임을 확인할 수 있었다(도 15 및 도 16, 실시예 6-2 참조).
- [0024] 따라서, 본 발명은 장내 상재균을 이용하여 기존의 AOM/DSS-유도된 대장용종이나 대장암 동물 모델에 비하여 현저하게 높은 대장용종 발생 효율을 나타내는 동물모델을 제공하였을 뿐만 아니라, ETBF로 인하여 유발되는 대장질환의 발병 매커니즘 및 치료제 연구를 위한 동물모델을 새로이 규명하였다.
- [0025] 본 발명은 인간의 장내 상재균은 물론, 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 및 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS) 화합물을 함께 동물에 투여하여 대장용종 동물모델을 유도하는바, 기존에 알려진 AOM이나 DSS 처리 방법과는 달리 인간의 장내 상재균 투여 단계를 추가하여, 여러 단계를 특이적으로 조합한 대장용종의 형성효율이 극대화된 특유한 대장용종 및 대장암 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 구체적으로 1) 아зок시메탄(azoxymethane, AOM)을 동물에 투여하는 단계, 2) 상기 1) 단계의 동물에 인간의 장내 상재균을 감염시키는 단계 및 3) 상기 2) 단계의 동물에 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 1) 단계 이후 2) 단계를 실시하기 전에 1) 단계의 동물에 클린다마이신(clindamycin) 및 젠타마이신(gentamicin)과 같은 항생제 포함한 정제수를 마우스에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이때 클린다마이신은 100mg/L 용량으로, 젠타마이신은 300 mg/L 용량으로 정제수에 포함시킬 수 있다.
- [0028] 그리고, 상기 2) 단계는, 앞서 언급한 바와 같이, ETBF 균주를 사용할 수 있고, 1) 단계(AOM 투여)를 마친 7일 이후 실시할 수 있고, 구체적으로  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액 200  $\mu$ l를



동물에 구강접종 등의 방법으로 투여하여 감염시킬 수 있다. 상기  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액은 본 발명의 일실시예에 따라 제조할 수 있다(실시예 1 참조).

- [0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 항생제가 포함된 정제수를 동물에 투여하는 단계는 1) 단계를 실시한 2일 이후 시작하여 12일 동안 진행할 수 있고, 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에는 아무것도 포함되어 있지 않은 순수한 정제수를 7일 동안 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 정제수를 동물에 음용하게 하는 방법으로 투여할 수 있다.
- [0030] 또한, 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에는 상기 3) 단계(DSS 투여)를 5일 동안 실시할 수 있고, 3) 단계를 마친 후에는 순수한 정제수를 16일 동안 투여하는 단계를 실시할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 3) 단계는 멸균된 1차 증류수를 용매로 하여 제조한 2% (w/v) 농도의 DSS 용액을 투여할 수 있다. 상기 단계를 모두 마치면 6주(42일)가 소요된다(도 1 및 실시예 2-1 참조).
- [0032] 본 발명의 일실시예에서 상기 단계를 통하여 제조된 본 발명에 따른 6주 동물모델인 마우스의 대장을 적출하여 대장용종의 모습을 살펴본 결과, 장내 상재균을 처리하지 않은 마우스의 것과 비교하여, 약 6~7배 정도 대장용종 형성 효율이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 2 내지 4, 실시예 2-2 참조).
- [0033] 특히, 기존의 대장용종 관련 동물모델로 AOM 및 DSS를 사용한 프로토콜의 경우, 실험에 유용할 정도의 충분한 크기의 용종을 얻으려면 10~13주 정도 소요되었다. 따라서 6주로 구성된 프로토콜은 거의 사용된 바 없었다. 그러나 본 발명의 경우, 6주 만으로도 충분한 크기와 많은 수의 대장용종이 발생된다는 점에서, 동물모델을 제조하기 위한 양육 기간을 대폭 감소시킬 수 있어 경제적이며 실험자 편의성이 크게 증가한다는 이점이 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시예를 살펴보면, 상기 방법에서와 같이 3) 단계(DSS 투여)를 5일 동안 실시하고 3) 단계를 마친 후에 순수한 정제수를 16일 동안 투여하는 단계를 실시함에 있어, 이러한 3) 단계(5일) 및 이후 정제수 투여 단계(16일)를 하나의 사이클로 하여, 마우스에 이를 1~3번 반복할 수 있다(총 21일~63일 소요). 3번 반복하게 되면, 마우스에 1) 단계(AOM 투여)를 실시한 날로부터 총 84일(12주)에 걸쳐 본 발명에 따른 동물모델을 제조할 수 있다(도 5 및 실시예 3-1 참조). 또한, 상기 DSS 용액은 1~2% (w/v) 농도로 투여할 수 있다.
- [0035] 상기 본 발명의 일실시예에서 본 발명에 따른 12주 동물모델인 마우스의 대장을 적출하여 대장용종의 형성 모습을 살펴본 결과, 장내 상재균을 처리하지 않은 마우스의 것과 비교하여, 약 3.5~4배 정도 높은 대장용종 형성 효율을 보임을 확인할 수 있었다(도 6 내지 9, 실시예 3-2 참조).
- [0036] 상기 본 발명의 일실시예에서 본 발명에 따른 12주 동물모델로 1% (w/v) 또는 2% (w/v) 농도의 DSS 용액을 투여한 마우스의 대장을 적출하여 대장용종의 형성 모습을 비교한 결과, 1% (w/v) 농도의 DSS 용액을 투여한 마우스와 2% (w/v) 농도의 DSS 용액을 투여한 마우스에서 대장용종 형성 효율은 유사하나, 1% (w/v) DSS 투여 마우스군의 생존율은 보다 우수함을 확인할 수 있었다(도 17 내지 19, 실시예 7-2 참조).
- [0037] 따라서, 본 발명에 따른 대장용종 동물모델은 기존의 동물모델과 비교하여, 월등히 뛰어난 용종 형성 효율을 가지며, 이로 인하여 같은 기간 동안 동물모델을 제조하더라도 훨씬 많은 수의 대장용종을 가진 동물모델을 완성할 수 있다. 이렇듯 본 발명은 장내 상재균 감염 단계를 추가하고, 각 단계를 특이적으로 조합하여 대장용종의 형성이 극대화된 동물모델을 제공한다. 본 발명에 따른 동물모델을 사용하여 대장용종 관련 연구를 수행할 경우, 대장용종의 증가 및 감소의 양상을 보다 정확하게 확인할 수 있을 것이며, 이로 인하여 실험자의 연구 편의성 및 실험 정확도를 증대시켜 줄 것이라고 기대된다.
- [0038] 본 발명에 따른 대장용종 동물모델은 대장암의 대부분이 장내 용종에서 비롯된다는 점에서 대장암 동물모델로도 사용될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 대장용종 관련 질환 및 대장암의 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 동물모델에 후보물질을 투여하는 단계 및 상기 단계를 거친 동물모델의 대장 내 용종을 확인하는 단계를 포함하는 대장질환, 특히 대장암 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 방법에서 후보물질을 처리한 동물모델은 이후 대장을 적출하여 대조군 동물모델의 대장과 대장용종의 형태, 수와 크기 등을 비교하여 후보물질의 치료 효과 여부를 확인할 수 있으며, 이를 통해 대장질환 치료용 약물을 스크리닝할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명에서 상기 동물은 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 기니피그 등 일 수 있으나, 마우스(Mus musculus)가 바람직하며, C57BL/6 등과 같은 마우스를 사용할 수도 있으나 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 Balb/c 마우스가 더욱 바람직하다. C57BL/6 마우스의 경우 외부 스트레스로 인한 종양 형성에 대하여 저항성이

강하다고 알려져 있는바, 외부 스트레스와 같은 인자에 대한 종양 형성과 관련한 보다 정확한 생체 반응을 얻을 수 있는 동물모델로서 Balb/c 마우스가 바람직하다(도 10 및 실시예 4-2 참조).

[0041] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만 상기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것이고 본 발명의 권리범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1>

[0043] ETBF 균주 용액의 제조

[0044] 마우스를 ETBF(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*) 균주로 감염시키기 위한 균액을 제조하기 위하여, 우선 BFT(*B. fragilis* toxin)로 BFT-2를 발현하는 WT(Wild type)-ETBF 균주(*B. fragilis* 86-5443-2-2)를  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 이 없는 PBS 용매로 용해시켜 200  $\mu\text{l}$  용량의 배양용액으로 만들었다. WT-ETBF 배양용액을 동결 튜브(cryotube) 안에 담아 초저온 냉장고(deep freezer)에서 얼렸다. 이후, 목면봉(Wood applicator)으로 표면을 긁은 다음, 면봉(applicator) 끝에 묻은 균액 고체 덩어리를 미리 만들어둔 BHIA(Brain heart infusion agar)에 배지에 발라 주었다. BHIA는 BHIA 1L를 기준으로 아가(Agar) 15 g/L, BHI 배지(media) 37 g, 효모 추출물(Yeast extract) 5 g, 시스테인(Cysteine) 0.5 g, 헤민(Hemin) 1 ml (final 농도: 5  $\mu\text{g/ml}$ )와 항생제(Gentamicin sulfate, 50 mg/ml; Clindamycin, 6 mg/ml)를 포함한다.

[0045] 항생제가 포함된 BHIA에 얼려진 WT-ETBF 균액을 스트리킹(streaking) 해준 다음에 혐기성 챔버(Anaerobic chamber)에 넣었다. 혐기성 팩(Anaerobic pack)(Mitsubishi) 봉지를 뜯어 챔버에 넣어 상태에서 뚜껑을 닫고, 배양기(37°C)에 넣어준 후 2일 동안 기다렸다. 2일의 배양기간이 끝난 뒤, 배양기에 균을 접종한 BHIA를 꺼내서 단일 콜로니(mono-colony)를 형성한 것을 확인한 후, 플라스틱 루프(plastic loop)를 이용하여 단일 콜로니를 취한 후에, BHIB(Brain heart infusion broth)에 접종시켰다. BHIB는 BHIB 1L를 기준으로 BHI 배지(media) 37 g, 효모 추출물(Yeast extract) 5 g, 시스테인(Cysteine) 0.5 g, 헤민(Hemin) 1 ml (final 농도: 5  $\mu\text{g/ml}$ )와 항생제(Gentamicin sulfate, 50 mg/ml; Clindamycin, 6 mg/ml)로 구성된다.

[0046] 즉, BHIA에서 자란 WT-ETBF 단일 콜로니를 BHIB에 접종시킨 후, 혐기성 챔버에 넣고 이틀 동안 배양기에 넣어두었다. WT-ETBF가 자란 BHIB는 broth가 탁해진 것을 확인하고 꺼냈다.

[0047] 24개의 미량 원심분리기 튜브에 균이 자란 broth를 1.5 ml씩 피펫(pipet)으로 분주한 다음에 튜브의 뚜껑을 닫아주고, 원심분리기 장비에 넣어 원심분리를 시켜주었다(12000 g, 30min, 20°C). 원심 분리가 끝난 뒤 튜브를 장비로부터 꺼내고 미생물을 다룰 수 있는 벤치(bench) 안에 튜브를 넣고, 생성된 펠렛(pellet) 이외에 상층액을 빈 코니칼 튜브(conical tube)에 덜었다.

[0048] 고착화된 펠렛은 쉽게 바닥에서 떨어지지 않으므로, 500  $\mu\text{l}$  용량의  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 이 없는 PBS를 피펫팅(pipetting)하여 2개의 튜브 안에 존재하는 2개의 펠렛을 1개의 튜브로 농축하였다. 농축된 12개의 미량 원심분리기 튜브 안에 담긴 총 6 ml WT-ETBF 균 농축액을 50ml 코니칼 튜브 안으로 옮긴 다음에 뚜껑을 닫아주고, 이렇게 균액을 완성하면, 3시간 안에 동물에 감염시켜 주었다. 위 방법으로 ETBF 균액을 만들면, 균의 농도는 평균적으로  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도로 만들어진다.

[0049] <실시예 2>

[0050] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(6주)의 제조와 효과 확인

[0051] <2-1> 6주간의 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델

[0052] 아зок시메탄(Azoxymethane, AOM) 및 DSS(Dextran sulfate sodium)으로 유도된 대장용종 동물모델을 제조하고, 본 발명에 따른 제조방법이 용종 형성 효율을 향상시키는지 확인하기 위하여, 6주간 본 발명에 따른 동물모델(실험군)로 장내 상재균 및 AOM, DSS를 투여하여 대장용종을 발생시킨 마우스를 제조하였고, 대조군으로 AOM 및 DSS 만을 투여한 마우스를 제조하였다.

[0053] 본 발명에 따른 실험군의 제조는 하기 방법으로 진행하였고, 대조군은 하기의 방법에서 장내 상재균인 ETBF 감

염만을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

- [0054] 8~10주령 Female Balb/c 마우스를 주문하여, 동물 시설에서 1주 동안 유지시켜 준 후에, 정제된 아зок시메탄 (Azoxymethane, AOM)(Sigma-aldrich)을  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  없는 PBS(Phosphate buffered saline)에 용해하여 10 mg/kg 농도의 용액으로 제조한다. AOM 용액(solution) 200  $\mu\text{l}$ 을 1 ml 시린지(syringe)를 이용하여 마우스 복강에 주사한다. 주사 전에 마우스 복강은 70% 알코올로 소독해 주었다.
- [0055] AOM 용액을 마우스에 복강주사 시킨 날로부터 2일 후, 기존의 음수였던 멸균된 1차 증류수(autoclaved 1' DW)를 항생제(Gentamicin sulfate, 300 mg/liter; Clindamycin, 100 mg/liter)가 포함된 멸균된 1차 증류수로 교체해 주고 12일간 음용하게 하였다. 그리고 그 이후에는 아무것도 포함되지 않은 순수한 멸균된 1차 증류수는 7일간 음용시켰다.
- [0056] AOM 복강주사를 시켜준 7일 뒤에는 상기 실시예 1에서 제조한  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도의 WT-ETBF 균주(*B. fragilis* 86-5443-2-2)의 균액 200  $\mu\text{l}$ 를 존대(Inoculation needle)를 이용하여 구강접종 하였다. 위 방법에서 사용된 WT-ETBF 균주는 항생제인 클린다마이신(clindamycin) (HOSPIRA) 및 겐타마이신(gentamicin) (Cellgro)에 자연 내성 성질을 가지고 있다.
- [0057] 상기 순수한 멸균된 1차 증류수를 7일간 음용시킨 후, 즉 실험 시작일로부터 21일이 지난 후에, 텍스트란 설페이트 소듐(Dextran sulfate sodium, DSS)(MP biochemical)을 멸균된 1차 증류수를 용매로 하여 2% (w/v) 농도의 DSS 용액으로 만든 다음 이를 5일간 투여하였다. 그 이후에는 아무것도 용해되지 않은 멸균된 1차 증류수를 16일 동안 투여하였다. 마우스에게 사료는 Harlan 2018s 사료로 처음부터 끝까지 부족하지 않도록 충분히 공급 해주었다.
- [0058] 이후, 즉 AOM 용액을 복강주사한지 42일 쯤 되는 날, 마우스를  $\text{CO}_2$ 를 이용하여 안락사 시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.
- [0059] <2-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(6주)의 대장용종 확인
- [0060] 상기 <2-1>에서 제조한 실험군 및 대조군 마우스에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 실험군으로서 본 발명에 따라 장내 상재균인 ETBF 균주와 AOM 및 DSS를 모두 처리한 마우스의 경우 도 2에서와 같이 수많은 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 대조군으로서 AOM 및 DSS 약물만 처리한 마우스에서는 도 3에서와 같이 대장용종이 그다지 발견되지 않았다.
- [0061] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수와 사이즈를 구체적으로 기록한 결과, 도 4에서와 같이, 대조군인 AOM 및 DSS만을 처리한 마우스에서는 대장용종의 개수의 중간값이 5인 반면, 본 발명에 따라 ETBF를 함께 처리한 마우스에서는 중간값이 35 정도임을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 마우스에서 약 6~7배 정도 더 많이 용종이 형성됨을 알 수 있으며 용종의 크기 또한 대조군에 비하여 더 크다.
- [0062] <실시예 3>
- [0063] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)의 제조와 효과 확인
- [0064] <3-1> 12주간의 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델 제조
- [0065] 아зок시메탄(Azoxymethane, AOM) 및 DSS(Dextran sulfate sodium)으로 유도된 대장용종 동물모델을 제조하고, 본 발명에 따른 제조방법이 용종 형성 효율을 향상시키는지 확인하기 위하여, 12주간 본 발명에 따른 동물모델(실험군)로 장내 상재균 및 AOM, DSS를 투여하여 대장용종을 발생시킨 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse; A/D+E2)를 제조하였고, 비교군으로 장내 상재균, AOM 및 DSS를 투여하지 않은 마우스(S), 장내 상재균만 투여한 마우스(E2), AOM만 투여한 마우스(A), DSS만 투여한 마우스(D), AOM 및 DSS만 투여한 마우스(A/D) 및 AOM 및 장내 상재균만 투여한 마우스(A+E2)를 제조하였다. 본 발명에 따른 실험군의 제조는 하기 방법으로 진행하였다.
- [0066] 또한, 하기의 방법에서 비교군으로 장내 상재균, AOM 및 DSS를 투여하지 않은 마우스(S)는 장내 상재균인 WT-ETBF 감염, AOM 및 DSS 투여를 제외하고, 장내 상재균만 투여한 마우스(E2)는 AOM 및 DSS 투여를 제외하고, AOM만 투여한 마우스(A)는 WT-ETBF 감염 및 DSS 투여를 제외하고, DSS만 투여한 마우스(D)는 WT-ETBF 감염 및 AOM

투여를 제외하고, AOM 및 DSS 만을 투여한 마우스(A/D)는 WT-ETBF 감염만을 제외하고, AOM 및 장내 상재균만 투여한 마우스(A+E2)는 DSS 투여만을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

[0067] 8~10주령 Female Balb/c 마우스 주문하여, 동물 시설에서 1주 동안 유지시켜 준 후에, 정제된 아зок시메탄(Azoxymethane, AOM)(Sigma-aldrich)을  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  없는 PBS(Phosphate buffered saline)에 용해하여 10 mg/kg 농도의 용액으로 제조하였다. AOM 용액(solution) 200  $\mu\text{l}$ 을 1 ml 시린지(syringe)를 이용하여 마우스 복강에 주사하였다. 주사 전에 마우스 복강은 70% 알코올로 소독해 주었다.

[0068] AOM 용액을 마우스에 복강주사 시킨 날로부터 2일 후, 기존의 음수였던 멸균된 1차 증류수(autoclaved 1' DW)를 항생제(Gentamicin sulfate, 300 mg/liter; Clindamycin, 100 mg/liter)가 포함된 멸균된 1차 증류수로 교체해 주어 12일간 음용하게 하였다. 그리고 그 이후에는 아무것도 포함되지 않은 순수한 멸균된 1차 증류수는 7일간 음용시켰다.

[0069] AOM 복강주사를 시켜준 7일 뒤에는 상기 실시예 1에서 제조한  $1 \times 10^{8-9}$  CFU(colony forming unit)/ml 농도의 WT-ETBF 균주(*B. fragilis* 86-5443-2-2)의 균액 200  $\mu\text{l}$ 를 존대(Inoculation needle)를 이용하여 구강접종 하였다. 위 방법에서 사용된 WT-ETBF 균주는 항생제인 클린다마이신(clindamycin) (HOSPIRA) 및 젠타마이신(gentamicin) (Cellgro)에 자연 내성 성질을 가지고 있다.

[0070] 상기 순수한 멸균된 1차 증류수를 7일간 음용시킨 후, 즉 실험 시작일로부터 21일이 지난 후에, 하기 사이클(cycle)을 3번 반복하였다. 마우스에게 사료는 Harlan 2018s 사료로 처음부터 끝까지 부족하지 않도록 충분히 공급해주었다.

[0071] ● 1 사이클(cycle): 덱스트란 설페이트 소듐(Dextran sulfate sodium, DSS)(MP biochemical)을 멸균된 1차 증류수를 용매로 하여 2% (w/v) 농도의 DSS 용액으로 만든 다음 이를 5일간 투여하였다. 이후 아무것도 용해되지 않은 멸균된 1차 증류수를 16일 동안 투여하였다. 1 사이클은 총 21일로 구성된다.

[0072] 마지막 3번째 사이클이 끝나는 날, 즉 AOM 용액을 복강주사한지 84일 째 되는 날에 마우스를  $\text{CO}_2$ 를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

[0073] 또한, 1번째 사이클이 끝나는 날, 즉 AOM 용액을 복강주사한지 42일 째 되는 날, 및 2번째 사이클이 끝나는 날, 즉 AOM 용액을 복강주사한지 63일 째 되는 날에 마우스를 무작위로 선별하고  $\text{CO}_2$ 를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

#### [0074] <3-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)의 대장용종 확인

[0075] 상기 <3-1>에서 제조한 실험군 및 대조군 마우스에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 실험군으로서 본 발명에 따라 장내 상재균인 WT-ETBF 균주와 AOM 및 DSS를 모두 처리한 마우스(WT-ETBF+AOM/DSS mouse)의 경우 도 6에서와 같이 굉장히 많은 수의 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 비교군으로서 AOM 및 DSS 약물만 처리한 마우스(AOM/DSS mouse)에서는 도 7에서와 같이 대장용종이 드문드문 발견되었다.

[0076] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수 및 크기를 구체적으로 기록한 결과, 도 8 및 도 9에서와 같이, 비교군 중 WT-ETBF, AOM 및 DSS 무처리 마우스(S), WT-ETBF, AOM 또는 DSS만 처리한 마우스(즉, E2, A 및 D), 및 WT-ETBF 및 AOM만 처리한 마우스(A+E2)에서는 대장용종이 발견되지 않았고, AOM 및 DSS만 처리한 마우스(A/D) 및 본 발명에 따라 WT-ETBF를 함께 처리한 마우스(A/D+E2)에서 대장용종이 발견되었다. 또한, AOM 및 DSS 만을 처리한 마우스(A/D)에서는 대장용종의 개수의 중간값이 10인 반면, 본 발명에 따라 WT-ETBF를 함께 처리한 마우스(A/D+E2)에서는 중간값이 40 정도임을 알 수 있었다. 즉, 본 발명에 따른 마우스에서 약 3.5~4배 정도 더 많이 용종이 형성되었다. 용종의 크기 또한 AOM 및 DSS 만을 처리한 마우스(A/D)에 비하여 현저하게 큼을 확인할 수 있었다.

[0077]

#### [0078] <3-3> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(6주/9주/12주)의 대장용종 확인

[0079] 상기 <3-1>에서 제조한 실험군의 6주, 9주 및 12주 마우스에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과 도 10에서와 같이 실험군으로서 본 발명에 따라 장내 상재균인 WT-ETBF 균주와 AOM 및 DSS



를 모두 처리한 마우스에 DSS를 투여하는 사이클이 1 사이클 끝난 후 대장용종의 개수의 중간값이 13으로 나타나, 1번째 사이클이 끝난 후 즉각적으로 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 또한, 사이클을 반복할수록 대장용종의 개수의 중간값이 증가함을 알 수 있었다.

[0080] <실시예 4>

[0081] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 마우스 종이 상이한 동물모델의 제조와 효과 확인

[0082] <4-1> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 마우스 종이 상이한 동물모델 제조

[0083] 본 발명에 따른 제조방법이 마우스 종에 따라 용종 형성 효율의 차이가 있는지 확인하기 위하여, 12주간 본 발명에 따른 동물모델로 2 종의 마우스 모델을 이용하여 상기 <3-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델을 제조하였다.

[0084] 2 종의 마우스 모델로 8~10주령 Female Balb/c 마우스와 8~10주령 Female C57BL/6 마우스를 이용하였다.

[0085] 본 발명에 따른 동물모델로 Balb/c 마우스 모델은 상기 <3-1>에서 제조한 마우스를 이용하였다.

[0086] 또한, 본 발명에 따른 동물모델로 C57BL/6 마우스 마우스 모델은 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 마우스로 8~10주령 Female C57BL/6 마우스를 이용한 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

[0087] AOM 용액을 복강주사한지 84일째 되는 날에 각 마우스를 CO<sub>2</sub>를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

[0088] <4-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 마우스 종이 상이한 동물모델의 대장용종 확인

[0089] 상기 <4-1>에서 제조한 마우스에서 적출한 대장에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 도 11에서와 같이 본 발명에 따른 동물모델로 Balb/c 마우스의 경우 굉장히 많은 수의 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 본 발명에 따른 동물모델로서 C57BL/6 마우스에서는 대장용종이 드문드문 발견되었다.

[0090] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수와 사이즈를 구체적으로 기록한 결과, 도 12에서와 같이, 동물모델로서 C57BL/6 마우스에서는 대장용종의 개수의 중간값이 14인 반면, Balb/c 마우스에서는 대장용종의 개수의 중간값이 36임을 알 수 있었다. 용종의 크기 또한 C57BL/6 마우스에 비하여 Balb/c 마우스에서 현저하게 큼을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델로서 Balb/c 마우스가 적합함을 확인할 수 있었다.

[0091] <실시예 5>

[0092] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 활성 또는 비활성 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 제조 및 효과 확인

[0093] <5-1> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 활성 또는 비활성 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 제조

[0094] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서 장내 상재균이 발현하는 장독소의 효과를 확인하기 위하여, 12주간 본 발명에 따른 동물모델로 BFT-2를 발현하는 WT-ETBF 균주, 재조합을 통해 활성화된 BFT-2를 발현하는 WT-NTBF(nontoxigenic wild-type *B. fragilis*) 균주(rETBF 균주) 또는 재조합을 통해 비활성화된 돌연변이 BFT-2를 발현하는 WT-NTBF 균주(rNTBF 균주)를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(실험군)을 제조하였다.

[0095] 구체적으로, rETBF 균주를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+rE2)을 제조하기 위해, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 활성화된 BFT 유전자를 포함하는 플라스미드로 재조합된 *B. fragilis* NCTC 9343 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하여 rETBF 균주의 균액을 획득하였다. 그 다음, 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주의 균액 대신 상기 획득한 rETBF 균주의 균액을 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

- [0096] rNTBF 균주를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+rN2)을 제조하기 위해, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* H352Y 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하여 rNTBF 균주의 균액을 획득하였다. 그 다음, 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주의 균액 대신 상기 획득한 rNTBF 균주의 균액을 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.
- [0097] WT-ETBF 균주를 감염시켜 제조한, 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+E2)로는 상기 <3-1>에서 제조한 마우스를 이용하였다.
- [0098] 또한, 대조군으로 상기 <3-1>에서 제조한, WT-ETBF, AOM 및 DSS 무처리 마우스(S)와 AOM 및 DSS만 처리한 마우스(A/D)를 이용하였다.
- [0099] AOM 용액을 복강주사한지 84일째 되는 날에 각 마우스를 CO<sub>2</sub>를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.
- [0100] <5-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 활성 또는 비활성 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 대장용종 확인
- [0101] 상기 <5-1>에서 제조한 마우스에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 도 13에서와 같이 BTF-2를 발현하는 장내 상재균을 투여한 마우스 군으로 +E2군 및 +rE2군의 경우 많은 수의 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 실험군 중 +rN2군 및 대조군 중 A/D군에서는 대장용종이 드문드문 발견되었다.
- [0102] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수와 사이즈를 구체적으로 기록한 결과, 도 14에서와 같이, +E2군 및 +rE2군의 경우 A/D군에 비하여 대장용종의 개수의 중간값이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 용종의 크기 또한 A/D군에 비하여 +E2군 및 +rE2군에서 현저하게 큼을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 장내 상재균에서 분비하는 장독소가 대장용종의 형성을 촉진함을 확인할 수 있었다.
- [0103] <실시예 6>
- [0104] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)에서 상이한 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 제조 및 효과 확인
- [0105] <6-1> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 상이한 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 제조
- [0106] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서 장내 상재균이 발현하는 장독소 형태에 따른 효과를 확인하기 위하여, 12주간 본 발명에 따른 동물모델로 BFT-1을 발현하는 WT-ETBF 균주, BFT-2를 발현하는 WT-ETBF 균주 또는 BFT-3을 발현하는 WT-ETBF 균주를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(실험군)을 제조하였다.
- [0107] 구체적으로, BFT-1을 발현하는 WT-ETBF 균주를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+E1)을 제조하기 위해, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* VPI 13784 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하여 BFT-1을 발현하는 WT-ETBF 균주의 균액을 획득하였다. 그 다음, 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주의 균액 대신 상기 BFT-1을 발현하는 WT-ETBF 균주의 균액을 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.
- [0108] BFT-3을 발현하는 WT-ETBF 균주를 감염시켜 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+E3)을 제조하기 위해, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* Korea 570 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하여 BFT-3을 발현하는 WT-ETBF 균주의 균액을 획득하였다. 그 다음, 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주의 균액 대신 상기 BFT-3을 발현하는 WT-ETBF 균주의 균액을 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.
- [0109] BFT-2를 발현하는 WT-ETBF 균주를 감염시켜 제조한, 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델(+E2)은 상기 <3-1>에서 제조한 마우스를 이용하였다.
- [0110] 대조군으로 상기 <3-1>에서 제조한, AOM 및 DSS만 처리한 마우스(A/D)와 BFT의 발현이 결핍된 *B. fragilis* 균주인 WT-NTBF 균주의 균액을 처리한 마우스(+N)을 이용하였다. 상기 +N 마우스 군을 제조하기 위해, 상기 <실시예

1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* NCTC 9343 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하여 WT-NTBF 균주의 균액을 획득하였고, 상기 <3-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 마우스에 투여하였다.

[0111] AOM 용액을 복강주사한지 84일째 되는 날에 각 마우스를 CO<sub>2</sub>를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

[0112] <6-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 상이한 장독소를 발현하는 장내 상재균을 감염시킨 동물모델의 대장용종 확인

[0113] 상기 <6-1>에서 제조한 마우스에서 적출한 대장에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 도 15에서와 같이 BFT 종류에 상관없이 실험군의 경우 많은 수의 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 대조군에서는 대장용종이 드문드문 발견되었다.

[0114] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수와 사이즈를 구체적으로 기록한 결과, 도 16에서와 같이, +E2군의 경우 대장용종의 개수의 중간값이 가장 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 용종의 크기 또한 +E2 군에서 가장 큼을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 장내 상재균의 독소 중에서도 BFT-2가 대장용종의 형성을 촉진하는 효과가 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

[0115] <실시예 7>

[0116] 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 상이한 농도로 DSS를 투여한 동물모델의 제조 및 효과 확인

[0117] <7-1> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 상이한 농도로 DSS를 투여한 동물모델의 제조

[0118] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서 DSS 투여 농도에 따른 효과를 확인하기 위하여, 12주간 본 발명에 따른 동물 모델로 상이한 농도로 DSS를 투여하여 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델을 제조하였다.

[0119] 상이한 농도로 DSS를 투여하여 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물모델을 제조하기 위하여, 상기 <3-1>에 기재된 방법에서 DSS 투여 시 농도를 1% (w/v) 또는 2% (w/v)로 하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

[0120] AOM 용액을 복강주사한지 84일째 되는 날에 각 마우스를 CO<sub>2</sub>를 이용하여 안락사시켜주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

[0121] <7-2> 장내 상재균을 이용한 AOM/DSS 동물 모델(12주)로서 상이한 농도로 DSS를 투여한 동물모델의 대장용종 확인

[0122] 상기 <7-1>에서 제조한 마우스에서 적출한 대장에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 도 17에서와 같이 1% (w/v) 및 2% (w/v) DSS 투여 마우스 군 모두 많은 수의 대장용종이 발생했음을 확인할 수 있었다.

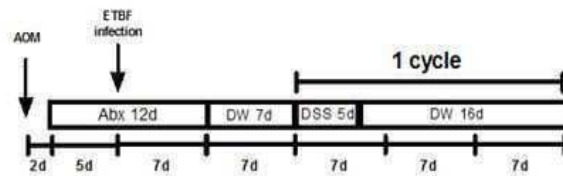
[0123] 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수와 사이즈를 구체적으로 기록한 결과, 도 18에서와 같이, 1% (w/v) 및 2% (w/v) DSS 투여 마우스 군의 대장용종의 개수의 중간값이 유사한 반면, 용종의 크기의 경우 2% (w/v) DSS 투여 마우스 군에서 보다 큼을 확인할 수 있었다.

[0124] 아울러, 2 그룹의 생존율을 확인한 결과, 도 19에서와 같이 2% (w/v) DSS 투여 마우스 군의 생존율은 70%인 반면, 1% (w/v) DSS 투여 마우스 군의 생존율은 100%인 것을 알 수 있었다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서 대장용종의 형성을 유도하면서 치사율을 줄이기 위한 DSS 투여 최적 농도는 1% (w/v)임을 확인할 수 있었다.

## 도면

### 도면1

#### Experimental protocol (6주)



• **Azoxy methane (AOM):**  
10mg/kg 농도로 마우스에 복강 투여 1회 (Sigma-Aldrich 제품사용)

• **ETBF infection:**  
1 x 10<sup>8</sup>-9 CFU/ml 농도로 균액 (200ul) 구강 내 감염  
사용한 ETBF 균주 *B. fragilis* 86-5443-2-2

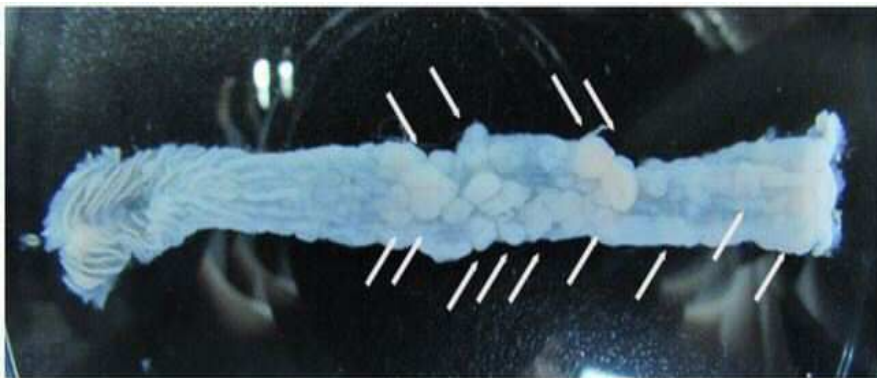
• **Dextran sulfate sodium (DSS):**  
2% (w/v) 농도로 autoclaved 1' DW를 용매로 DSS 용액을 만든 다음  
protocol에 명시된 대로 처리  
(MP biochemical회사 제품 사용)

• 사용된 마우스 strain 타입:  
Balb/c female (8-10주령) 사용

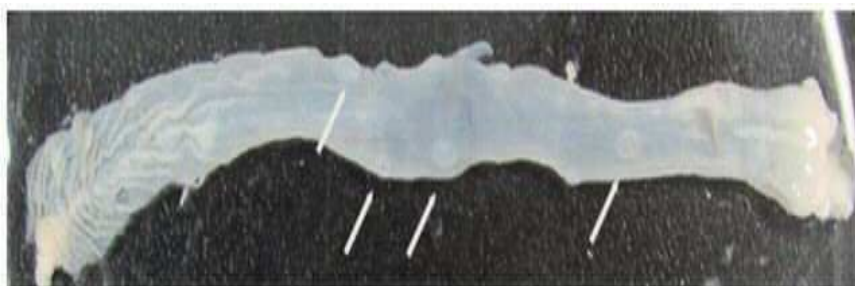
D; day, DW; distilled water  
Abx: clindamycin and gentamicin가 포함된  
항생제 물; **clindamycin (100 mg/liter) and  
gentamicin (300 mg/liter)**

\*기존 AOM/DSS 프로토콜 처리 그룹은  
위 프로토콜에서 ETBF 감염만 제외하고 나머  
지 과정은 동일하게 처리해준 그룹을 지칭

### 도면2

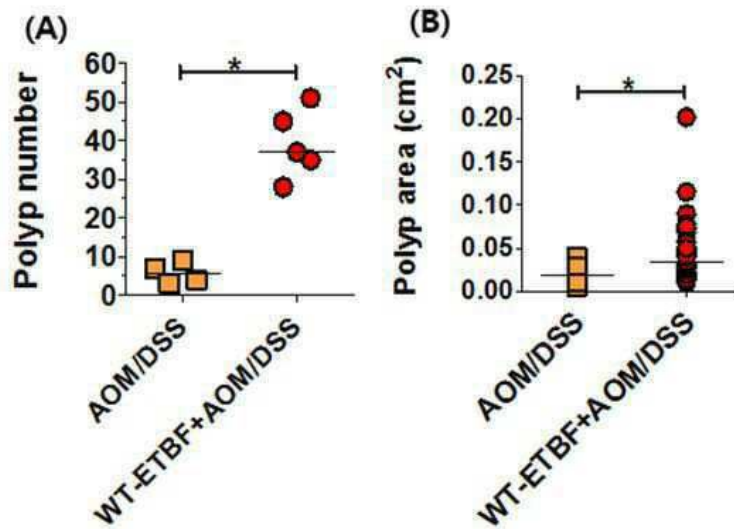


### 도면3



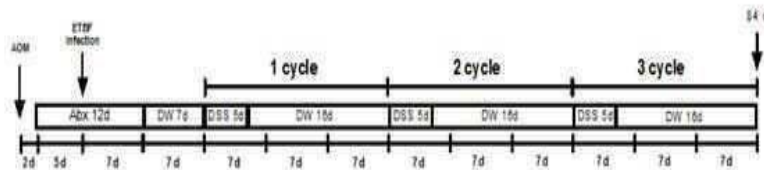


도면4



도면5

#### Experimental protocol (12주)



• Azoxymethane (AOM):  
10mg/kg 농도로 마우스에 복강 투여 1회 (Sigma-Aldrich 제품사용)

• ETBF infection:  
1 x 10<sup>8-9</sup> CFU/ml 농도로 균액 (200ul) 구강 내 감염  
사용한 ETBF 균주 *B. fragilis* 86-5443-2-2

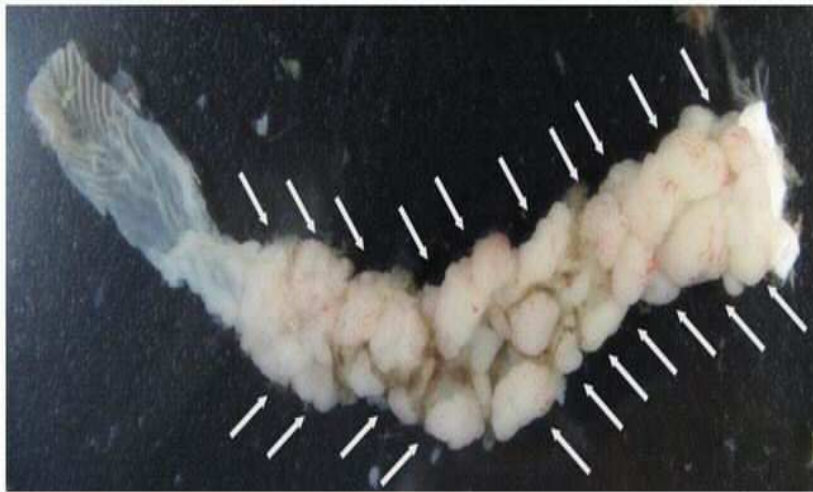
• Dextran sulfate sodium (DSS):  
2% (w/v) 농도로 autoclaved 1' DW를 용매로 DSS 용액을 만든 다음 protocol에 명시된 대로 처리  
(MP biochemical회사 제품 사용)

• 사용된 마우스 strain 타입:  
Balb/c female (8~10주령) 사용

D; day, DW; distilled water  
Abx: clindamycin and gentamicin가 포함된  
항생제 물: clindamycin (100 mg/liter) and  
gentamicin (300 mg/liter)

\*기존 AOM/DSS 프로토콜 처리 그룹은  
위 프로토콜에서 ETBF 감염만 제외하고 나머지  
과정은 동일하게 처리해준 그룹을 지칭

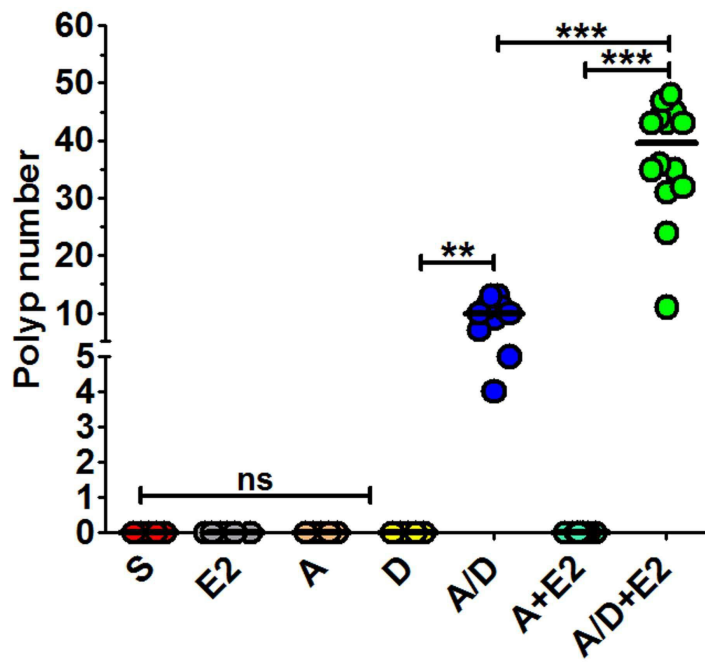
도면6



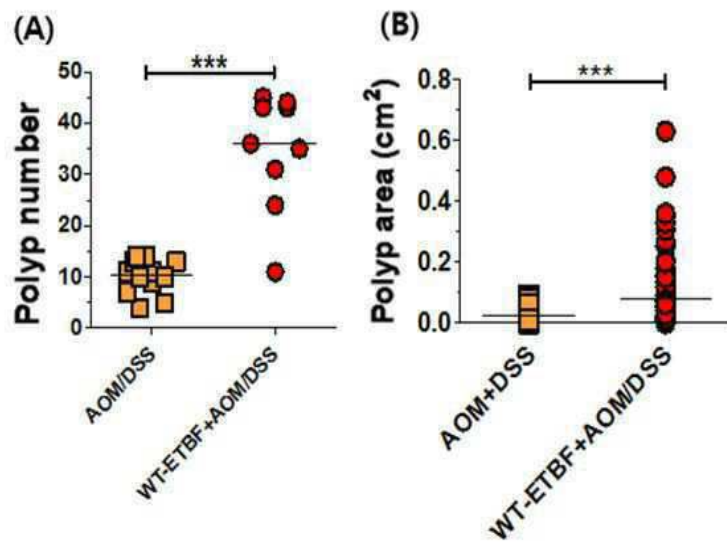
도면7



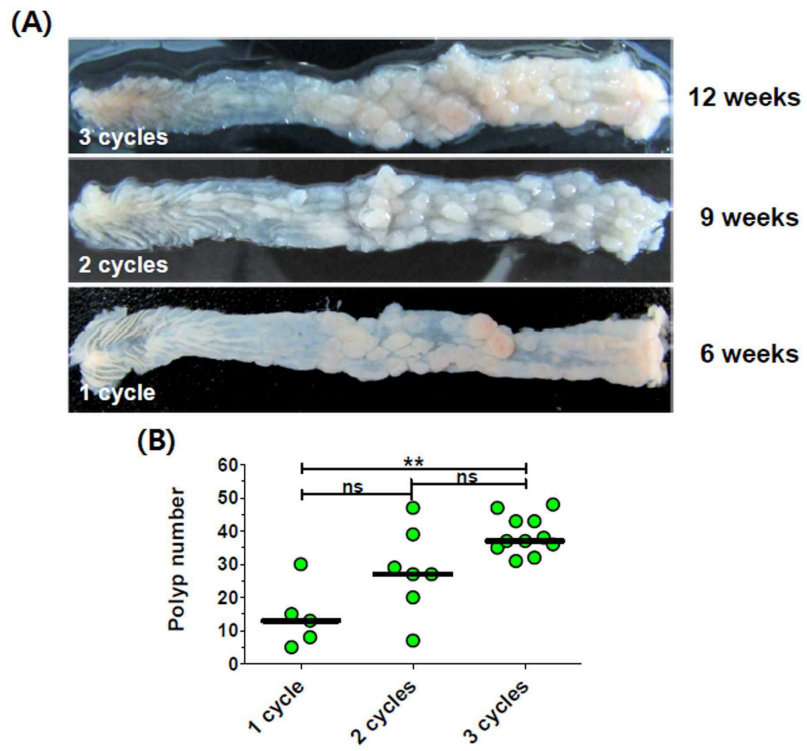
도면8



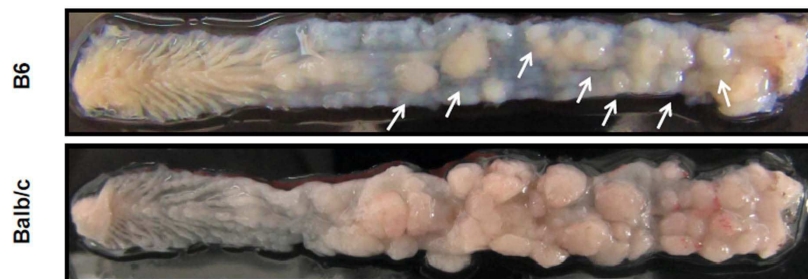
도면9



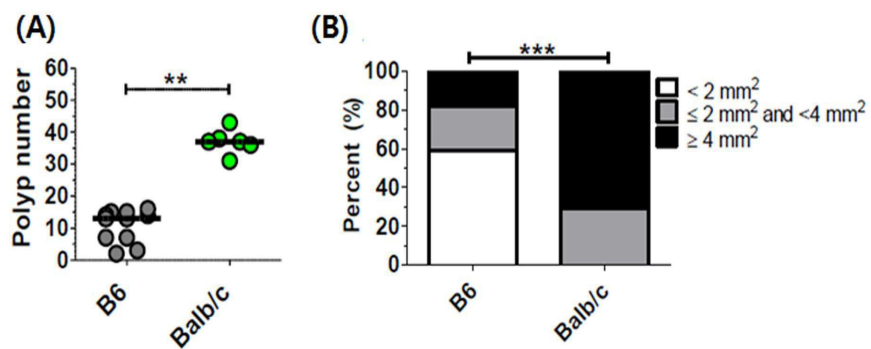
도면10



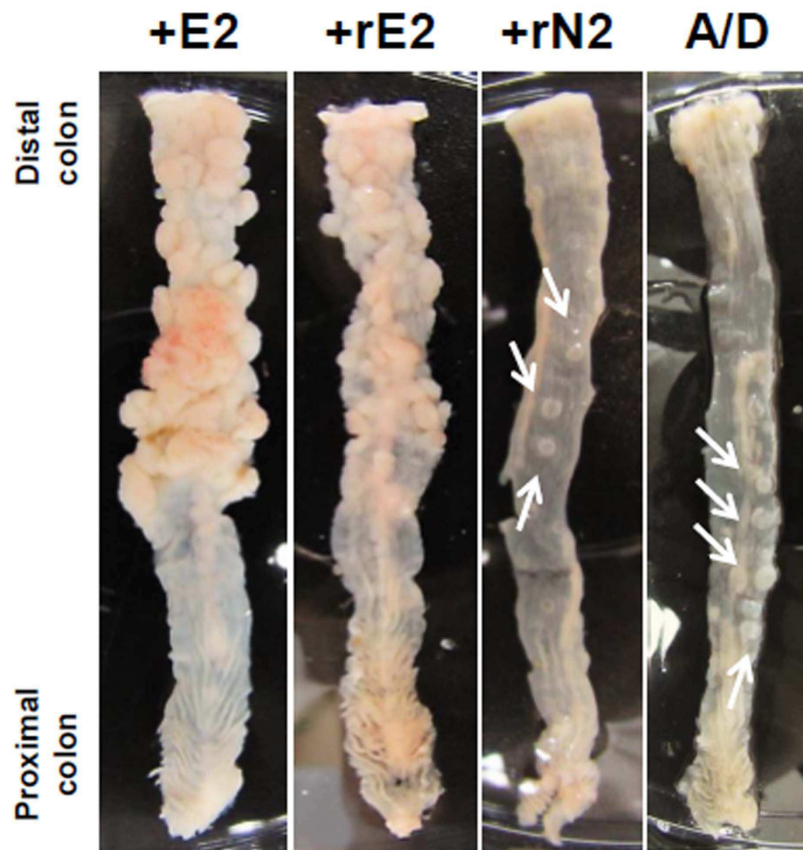
도면11



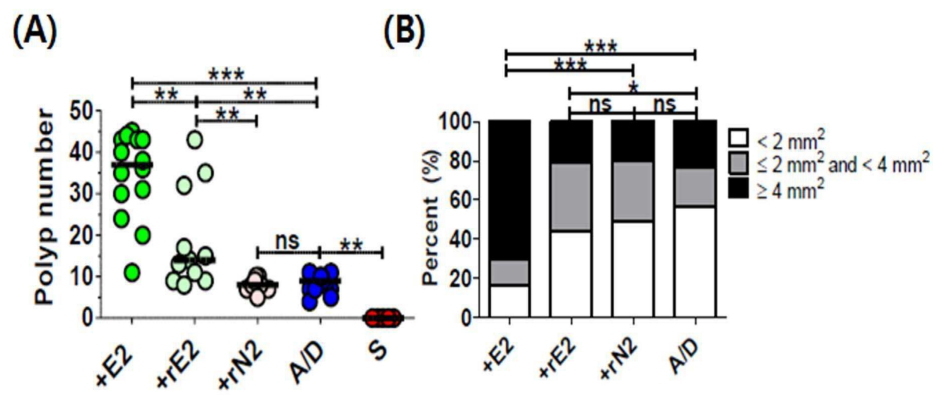
도면12



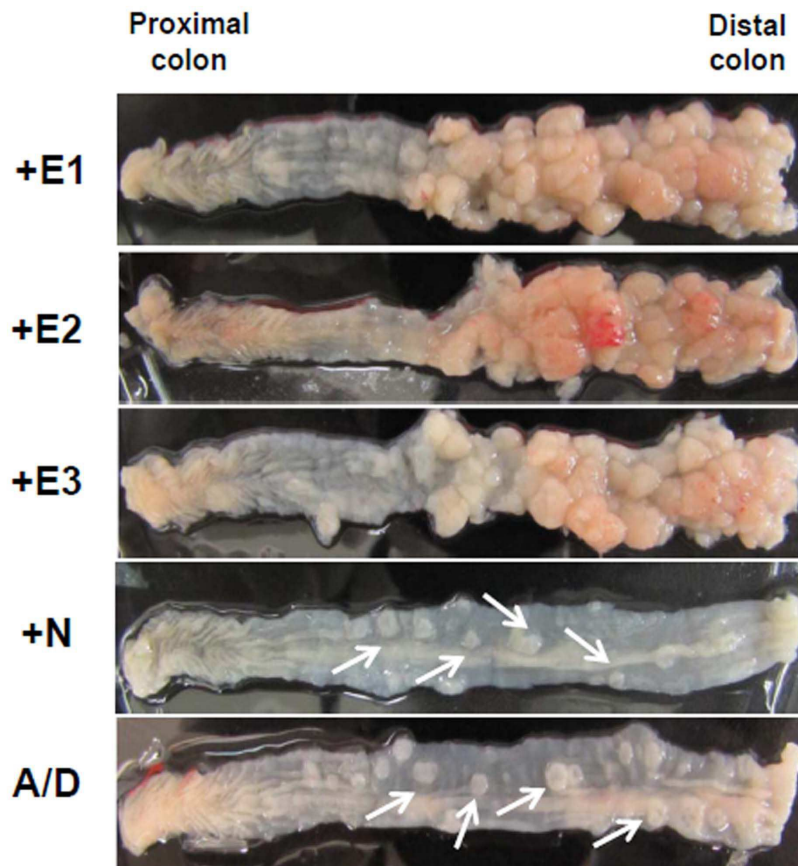
도면13



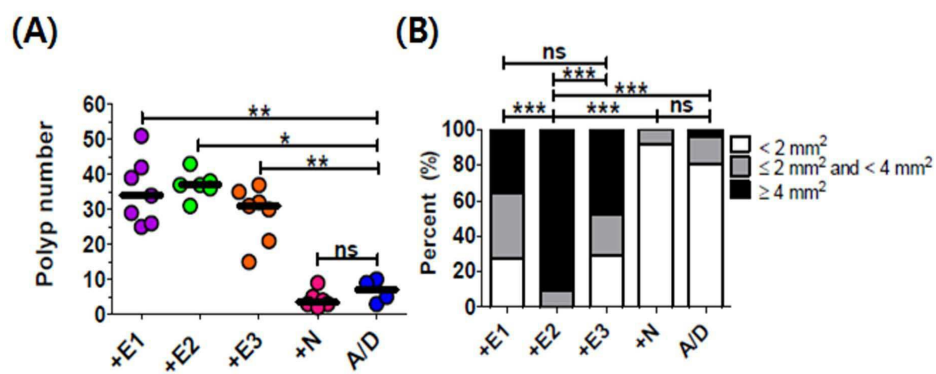
도면14



도면15

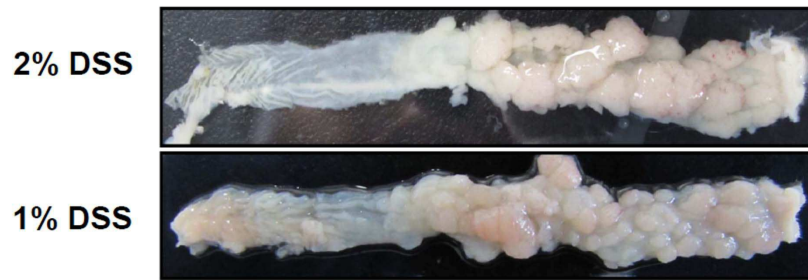


도면16

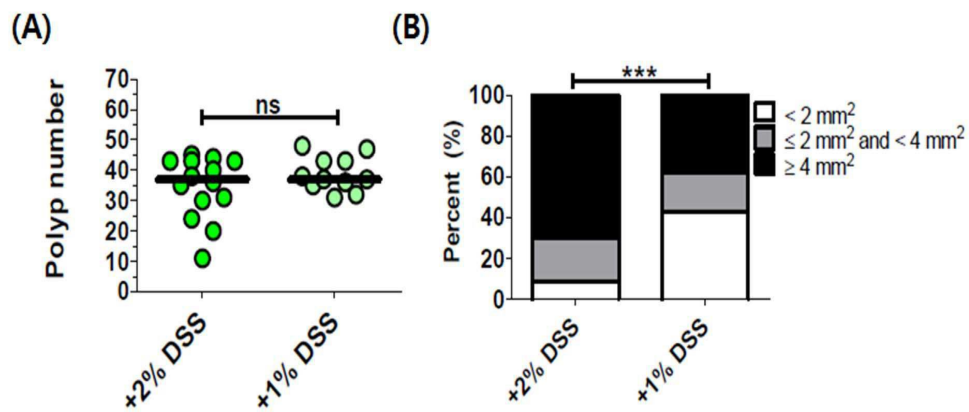




도면17



도면18



도면19

