



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0070901
(43) 공개일자 2008년08월01일

(51) Int. Cl.

C12N 15/03 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0008721

(22) 출원일자 2007년01월29일

심사청구일자 2007년01월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

박용근

서울시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대
학 녹지 311호

윤원석

서울시 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대
학 녹지 311호

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 5 항

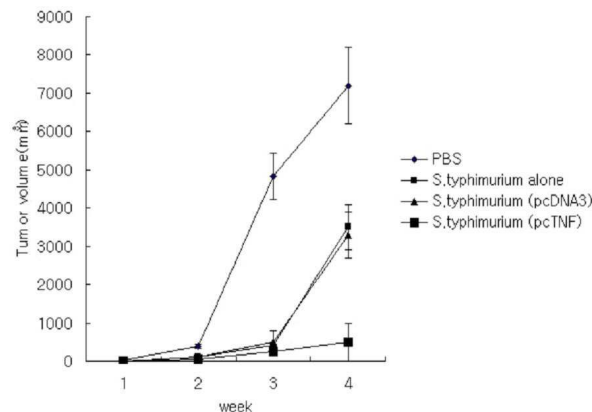
(54) 튜머 네크로시스 팩터 알파를 진핵세포에서 발현하는플라스미드를 포함하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하
는항암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항암효과를 유도하는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 생산하는 플라스미드 (plasmid)를 함유하는 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 진핵세포에서 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현할 수 있는 플라스미드를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 종래 튜머 네크로시스 팩터 알파를 자체 발현하는 살모넬라의 독성문제를 해결할 수 있으며, 동시에 상기 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)자체를 투여하기 어려운 암종, 특히 대장암 및 피부암 등에 있어서도 훨씬 뛰어난 치료효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 살모넬라 균주의 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)로 형질 도입됨을 특징으로 하는 살모넬라 균주(Salmonella typhimurium).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 플라스미드는 도 1에 도시된 pcDNA3-TNF- α 인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서, 한국미생물보존센터에 기탁된 수탁번호 KCCM10782P 인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 4

제 1항의 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암치료용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 암의 종류는 피부암을 특징으로 하는 항암치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 항암효과를 유도하는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드 (plasmid)를 포함하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 살모넬라 균주가 아닌 진핵세포에서 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 형질도입함으로써 새로운 형질융합에 의해 항암효과가 증대된 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <7> 살모넬라는 병원성 미생물로 대개의 경우 식중독을 일으키는 병원균이다. 하지만 최근 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. European Journal of Cancer, Volume 36, Issue 18, Pages 2397-2402 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 유럽의 세 곳에서 사람을 대상으로 하는 제1기 임상실험에 들어가 있다.
- <8> 한편, 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 사라지는 않았으며 단지 생쥐의 생명을 더욱 오래 연장시켜 준 것에 불과한 한계가 있었다.
- <9> 한편, 튜머 네크로시스 팩터(TNF)란 세균벽에서 나오는 내독소인 지다당체에 의해 T세포에서 분비되는 종양을 괴사시키는 물질을 말한다. 종양세포상의 TNF 수용체에 결합하면, 표적세포의 대사에 변화를 끼쳐서 상해한다. TNF는 대식세포에 작용하여 그 종양상해 활성을 증가하는 작용도 하며 혈관 내피세포에 작용하여 혈전을 형성시키게 한다. 현재까지 밝혀진 TNF는 α , β 의 두 종류가 있으며, 이들은 세포내의 특이적 수용체(receptor)들을 통해 신호를 전달하는 것으로 밝혀졌다. 두 종류 중 항암효과가 뚜렷한 것은 α type으로, 여러 자료를 통해 그 효과가 입증되었다.

<10> 본 출원인은 상기 튜머 네크로시스를 자체내에서 발현하는 살모넬라 균주 및이를 함유하는 항암 치료용 조성물을 개발하여 특허출원하였다(특허출원 제2006-0014769호, 미공개). 상기 특허출원은 살모넬라 자체의 항암효과와 더불어 살모넬라에서 분비되는 튜머 네크로시스 팩터 알파단백질에 의한 항암효과가 더해져 기존의 각각의 항암효과보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 보여주었으나, 이 경우 살모넬라에서 분비되는 튜머 네크로시스 팩터에 의하여 혈중의 튜머네크로시스 양이 급격히 증가되어 독성문제가 제기될 수 있다.

<11> 본 발명자는 상기 독성 문제를 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 원핵세포인 살모넬라 균주에서는 발현하지 않고 살모넬라 균주가 파괴된 후 주위의 진핵세포에서 TNF를 발현하는 플라스미드를 사용했을 때 상기 문제를 해결할수 있는 점을 발견하였다. 종래 특허출원한 균주의 경우 미생물자체의 메커니즘을 이용하여 튜머네크로시스 팩터 알파 단백질을 발현하게 된다. 미생물 자체로도 사이토 카인이 발현이 된다. 하지만 본 발명의 균주에서는 진핵세포에서만 발현이 가능한 플라스미드를 살모넬라에 실어서 인체에 유전자를 도입하는 형태의 균주이다. 본 발명의 균주 자체로는 사이토카인을 만들지 못합니다. 이 균주가 인체에 들어가서 살모넬라가 터져 죽은 후에 그 안에서 진핵세포에서 발현하는 플라스미드가 빠져나와서 이들 플라스미드에 의한 사이토카인발현이 있어야 튜머네크로시스팩터 알파가 발현된다.

<12> 이런 두 균주의 외적인 차이는 체내에 튜머네크로시스팩터의 분비량의 차이를 가져오게 되어 도 3에서 보여지듯이 살모넬라를 치료제로 투여할때에 종래 균주보다 혈중의 튜머네크로시스양을 감소시키게 된다. 이는 튜머네크로시스팩터 알파를 임상적으로 적용하는데 가장 큰 문제점인 사이토카인의 과다분비에 의한 쇼크등의 부작용을 막아 줄 수 있을 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 따라서, 본 발명의 목적은 항암효과를 유도하는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid) 포함하는 살모넬라 균주를 제공하는데 있다.

<14> 본 발명의 다른 목적은 상기 살모넬라 균주를 함유하는 항암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<15> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 살모넬라 균주외의 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)로 형질도입됨을 특징으로 하는 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 제공한다.

<16> 본 발명에 있어서, 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 균주는 장티푸스를 유발하는 group D *Salmonella*에 속하는 병원균으로서, 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위하여 약독화된(attenuated) 살모넬라 균주를 사용하였다.

<17> 본 발명에 있어서, 상기 약독화된 살모넬라 균주는 장티프스 예방용 약독화 백신인 것을 특징으로 한다. 여기서, 약독화(attenuation)란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다.

<18> 장티프스 예방용 백신으로는 이미 당업계에서 주사제와 경구용 약독화 백신이 많이 개발되어 있다. 경구용 생백신 제조에 가장 많이 사용되는 약독화 살모넬라 균주는 galE gene에 변이가 있어 uridine diphosphate(UDP) galactose-4- epimerase를 지니지 못하는 변이주 Ty21a이다 (Levine MM, et al., Progress in vaccines against typhoid fever. Rev Infect Dis 11: 552-567, 1989).

<19> 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 살모넬라 균주(숙주)는 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) BRD 509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이다(J Infect Dis. 1994 Dec;170(6):1508-17, Medeva사, London으로 구입가능). 상기 균주의 약독화 방법은 aro A, aro B 의 유전자를 변형시켜서 균주의 대사에 비정상이 일어나게 만들었으며, 이로 인한 약독화 결과를 이용해서 본 발명에서 백신으로 사용하였다.

<20> 본 발명에 있어서, 상기 튜머네크로시스팩터 알파를 코딩하는 유전자는 상용화된 어떤 튜머네크로시스팩터 알파 발현 플라스미드부터도 입수할 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 한다.

<21> 본 발명에 있어서, 상기 플라스미드는 상기 튜머네크로시스팩터 알파를 진핵세포내에서 발현시킬 수 있는 프로

모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 플라스미드도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 1에 도시된 pcDNA3-TNF- α 인 것을 특징으로 한다.

- <22> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 한국미생물보존센터에 2006. 9. 26자로 기탁된 수탁번호 KCCM10782P 인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 제공한다.
- <23> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암치료용 조성물을 제공한다.
- <24> 본 발명에 있어서, 상기 암의 종류는 튜머네크로시스팩터가 항암작용을 할 수 있는 어떤 암도 될 수 있으나, 바람직하게는 피부암인 것을 특징으로 한다.
- <25> 본 발명의 상기 목적은 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid) 포함하는 유전자 발현백터를 약독화된 살모넬라에 형질도입함으로써 본 발명의 살모넬라를 제작하고, 피부암 세포인 B16F10 암세포주를 이식한 C57/BL6 마우스 모델에 상기 형질도입 살모넬라를 투여하여, 그에 의한 항암효과를 TNF- α 를 포함하지 않는 다른 살모넬라 대조군에 의한 효과와 비교 분석하여 확인함으로써 달성하였다.
- <26> 본 발명을 위해 사용된 살모넬라 균주는 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) BRD 509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이며, 상기 균주내에 형질도입된 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 발현백터는 pcDNA3-TNF- α 백터이다. 상기 pcDNA3-TNF- α 백터는 진핵세포에서 발현을 유도할 수 있는 CMV promoter를 가지고 있으며, TNF- α 유전자가 상기 CMV promoter하의 멀티클로닝사이트, 즉 EcoRI (939) 부위와 XbaI (1653) 부위 사이에 클로닝되어 있다.
- <27> 본 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드는 세포 살상능력이 있다고 알려져있으나 본 플라스미드만으로 암세포에 주입할때에 그 효과가 크게 기대되지 않았다. 플라스미드는 정상 상태로는 체내에서 발현되기 힘든 특성이 있기 때문이다.
- <28> 반면 본 발명자는 상기와 같은 점을 감안하여, 현재 그 종양억제 효과가 밝혀진 살모넬라와 상기 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 살모넬라라는 세균에 형질도입하였다.
- <29> 그리고 이를 백터로서 이용하여 더욱 뛰어난 항암효과를 나타내는 형질도입 살모넬라를 제작하였다. 특별히 항암효과가 기대되는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 살모넬라에 형질도입하고 상기 형질도입된 살모넬라를 생체내에 투여하게 되면, 살모넬라 자체의 항암효과와 더불어 살모넬라 안에서 생체내로 투여되는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)에 의한 항암효과가 더해져 기존의 각각의 항암효과보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 보여줄 것으로 기대되었기 때문이다.
- <30> 본 발명에서 항암효과를 유도하는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 포함하는 살모넬라 균주는 당업계에서 통상 사용되는 형질도입방법에 의해 제조 가능하며, 제조된 살모넬라는 암피실린 내성을 가진 살모넬라 균주로, 체내에 들어가서 인체의 면역체계에 의해 터져 죽은후에 그 안에서 진핵세포에서 발현하는 플라스미드가 빠져나와서 주변의 진핵세포에 형질도입된 후 발현되어 튜머네크로시스팩터 알파가 발현된다.
- <31> 본 발명의 항암치료용 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 인체에 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 또한 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 항암 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.
- <32> 본 발명의 항암치료용 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료학적으로 유효한 양 (therapeutically effective amount)"는 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예컨대, 성인기준으로 1회 1mg 내지 1000mg의 본 발명의 살모넬라 균주를 투여할 수 있다.
- <33> 이하, 본 발명의 구성을 실시예에 의하여 상세히 설명하나, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- <34> <실시예 1: 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 유전자 발현백터를 포함하는 살모넬라균주의 제작>

- <35> 먼저, 약독화된 살모넬라 균주 BRD509(*Salmonella typhimurium* BRD509)를 루리아 벨테니(Luria Bertani) 배지에서 37℃ 배양하였다. 한국사이토카인 은행으로부터 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α) 분비 벡터 플라스미드, pcDNA3-TNF-α 벡터 (ACCESSION NUMBER 21926)를 입수하였다. 상기 벡터는 Invitrogen사의 pcDNA3 모벡터의 CMV promoter하의 EcoRI (939) 부위와 XbaI (1653) 부위 사이에 TNF-α 유전자를 클로닝하여 제조되었다. 도 1은 배양된 melanoma (B16F10)암종에 대한 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)의 개열지도이다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 상기 pcDNA3-TNF-α 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 100μL의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30μL(2μg)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)인 pcDNA3 벡터를 3μL(2μg) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다.
- <36> 그 결과 얻어진 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 살모넬라를 2006년 9월 26일 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 제KCCM-10782P호를 부여받았다.
- <37> <실시예 2: 본 발명 형질도입 살모넬라 균주의 항암효과 확인>
- <38> 피부 암세포인 B16F10(한국세포주은행)를 PBS 용액 100μL에 10⁵ 세포만큼 포함되도록 희석한 후, 암발현 모델로 C57/BL6 마우스(SLC, Japan)를 선택하여 상기 희석액 100μL를 마우스의 등 부위에 피하로 주사하여 암을 이식하였다. 주사한 지 7일 내지 10일 후 상기 암이식 부위에 암세포가 증식하는 것을 눈으로 확인할 수 있었으며, 버니어 캘리퍼스로 증식한 암의 가로, 세로 길이를 측정하여 암의 크기를 확인하였다. 상기 실시예 1에서 제작한 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 포함하는 살모넬라 균주(KCCM10782P)를 배양하여 10⁶ 개의 콜로니를 PBS 용액 100μL에 희석하였다. 암발생 확인 후 1주일 되는 시점에 상기 PBS 용액을 C57/BL6 마우스의 암이식부위에 피하로 주사하였다. 이후 암세포의 크기변화 및 마우스의 생존율을 측정하여 본 발명 TNF-α 발현 살모넬라 균주의 항암효과를 확인하였다. 이 때, 대조군으로 다른 쥐에는 PBS 용액만을 처리하였으며, 또 다른 쥐에는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 형질도입하지 않은 BRD509 살모넬라 균주를 처리하여 상기와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.
- <39> 도 2는 진핵세포에서 TNF-α를 발현하는 플라스미드에 의한 암세포살상효과를 나타낸다. 도 2의 시험은 TNF-α를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(pcDNA3-TNF-α)와 TNF-α가 없는 벡터플라스미드(pcDNA3)를 암세포주인 10⁵ 개의 B16F10세포에 2μg의 플라스미드를 Magnetofection Reagent(chemicell, USA)를 제조사의 지시에 따라 형질도입(transfection)하였다. 형질도입한 각각의 세포에 대하여 프로메가(Promega, USA)사의 세포사멸시험키트(Cytotox96, Promega)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각각 세포사멸정도를 측정하였다.
- <40> 도 3에서는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 살모넬라 균주를 처리한 암모델 쥐에서의 혈액중에서의 사이토 카인 발현양상을 검사하였다.
- <41> 각각의 실험균주를 투여하고 1주후에 각각의 마우스로부터 혈액을 수득하였다. 수득된 혈액은 3500RPM의 속도로 통상의 원심분리하여 상층액을 수득하여 이에 대해 사이토카인 ELISA Kit(TNF-α ELISA, Bendermedsystem)을 이용하여 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)의 발현양상을 비교해보았다. 그 결과 본 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 살모넬라 균주를 처리한 암모델 쥐에서의 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)의 발현이 대조군으로 사용한 정상 살모넬라와 사이토카인을 분비하지 않는 벡터만 가진 살모넬라(*S.typhimurium*(pcDNA3))를 투여할때에 거의 유사한 발현정도를 보여 주었고 이는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α) 분비로 말미암은 폐혈증과 같은 질환 발병위험을 본 발명의 살모넬라가 특별히 유도하지는 않음을 말해준다.
- <42> 도 4에서는 암발현 모습이 시간에 비례하여 성장을 보여주고 있다. 본 발명의 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 포함하는 살모넬라 균주를 처리한 마우스에서는 암발현정도를 버니어 캘리퍼스로 암의 가로, 세로 길이를 측정하여 부피로 환산해보면 상대적으로 정상적으로 발병한 마우스와 살모넬라만 주입한 마우스와 벡터만 포함하는 살모넬라를 주입한 마우스보다 현저하게 암이 억제될수 있음을 보여주었다. 또한 도 5에서는 도 4의 실험시에 마우스의 생존율을 표로 나타내었는데 본 발명균주가 50%정도의 생존율을 보여줌을 확인하였다. 이로 발명의 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF-α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를

포함하는 살모넬라 균주가 기존의 살모넬라에 비하여 훨씬 더 뛰어난 항암효과를 보임을 알 수 있었다.

발명의 효과

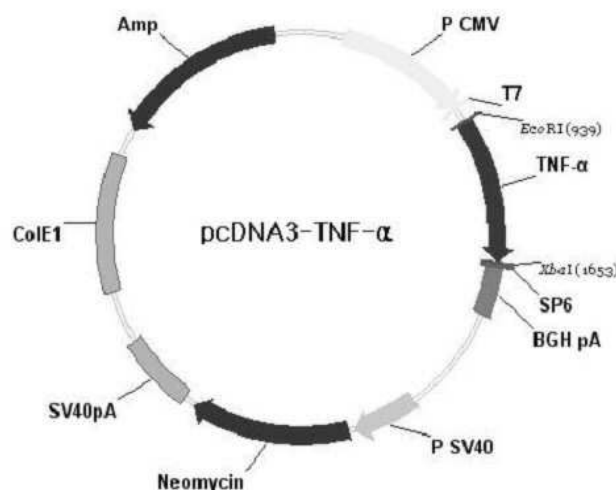
<43> 이상 상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명이 제공하는 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 살모넬라 균주는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타내고, 특히 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)의 독성문제로 항암제로 사용하기 어려운 암종, 특히 피부암 및 대장암에 있어서 안전하게 치료효과를 유발할수있는 가능성을 제공하므로 항암 치료 및 보조 예방제제와 관련한 의약산업에 있어서 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

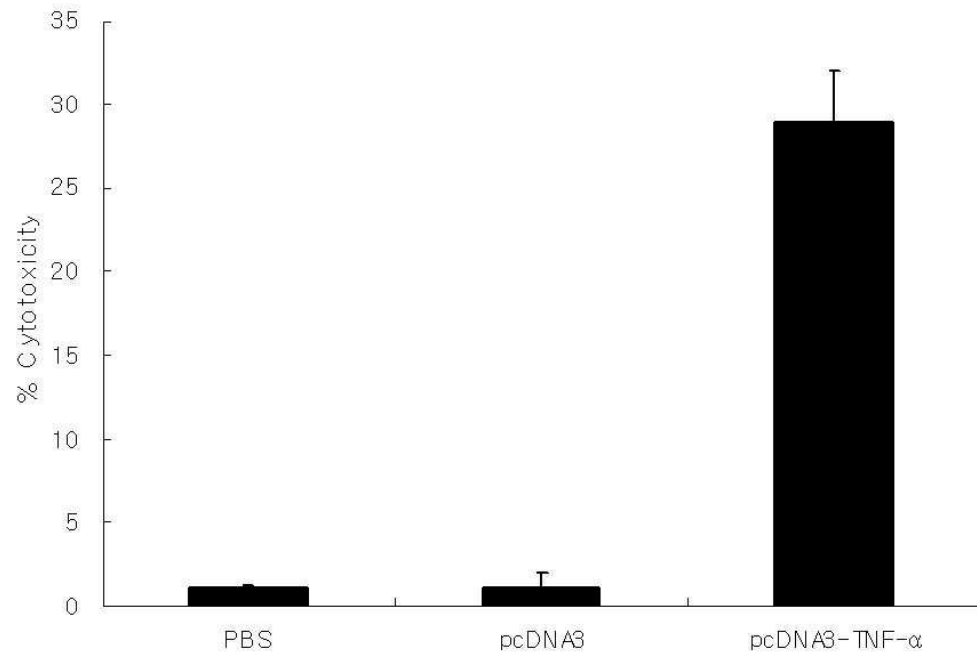
- <1> 도 1은 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드 (plasmid)인 pcDNA-TNF 의 벡터의 모식도이다.
- <2> 도 2는 피부암종 B16F10에 대하여 본 발명 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드 (plasmid) 를 처리함으로써 나타난 쥐의 피부암의 살상효과를 나타낸 도면이다.
- <3> 도 3은 암모델 마우스 C57/BL6에서 증식된 피부암종 B16F10에 대하여 PBS용액, BRD509 살모넬라, BRD509 살모넬라(벡터포함) 및 본 발명 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 함유 살모넬라 균주를 처리할때에 쥐의 체내에 TNF-alpha 의 발현량을 측정한 도면이다.
- <4> 도 4는 암모델 마우스 C57/BL6에서 증식된 피부암종 B16F10에 대하여 PBS용액, BRD509 살모넬라, BRD509 살모넬라(벡터포함) 및 본 발명 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 함유 살모넬라 균주를 처리할때에 암을 억제하는 정도의 크기를 나타낸 도면이다.
- <5> 도 5는 암모델 마우스 C57/BL6에서 증식된 피부암종 B16F10에 대하여 PBS용액, BRD509 살모넬라, BRD509 살모넬라(벡터포함) 및 본 발명 튜머 네크로시스 팩터 알파 (TNF- α)를 발현하는 플라스미드(plasmid) 함유 살모넬라 균주를 처리할때에 암에 대한 생존률의 기간을 나타낸 도면이다.

도면

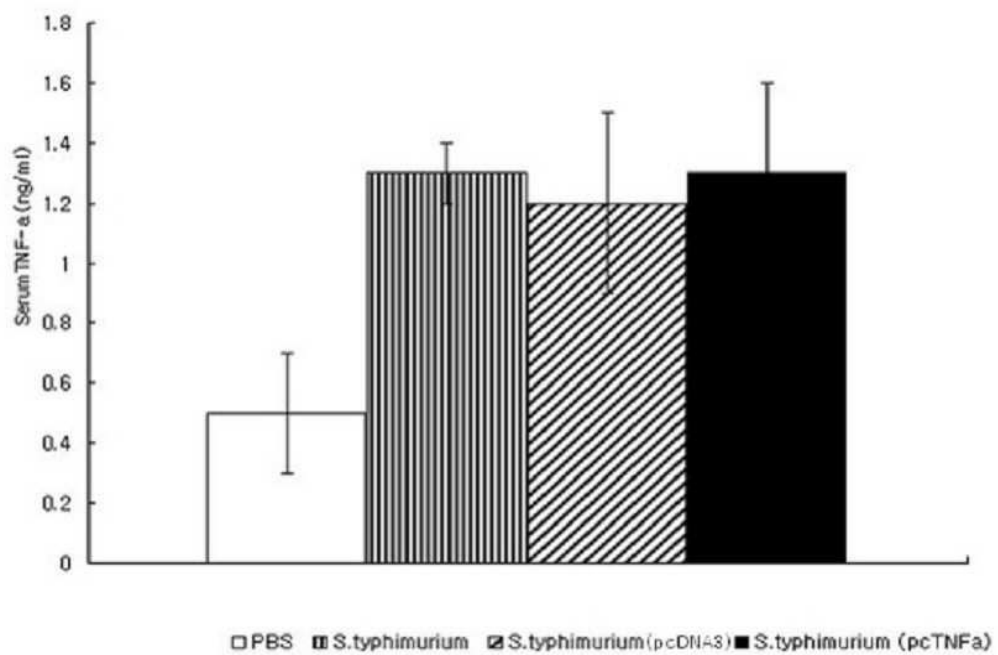
도면1



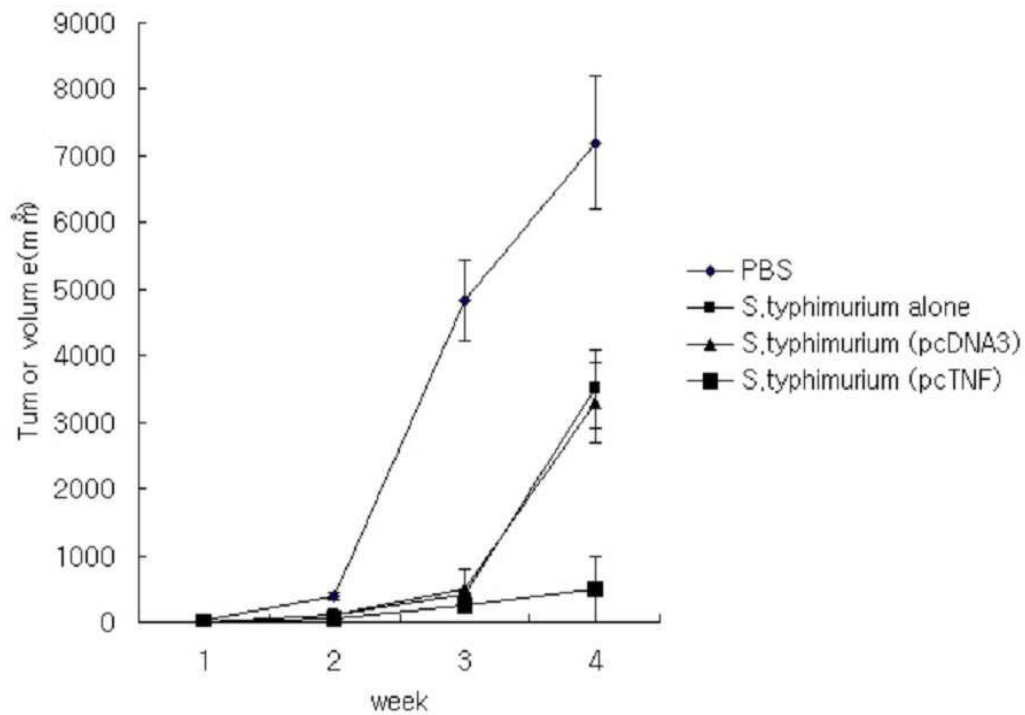
도면2



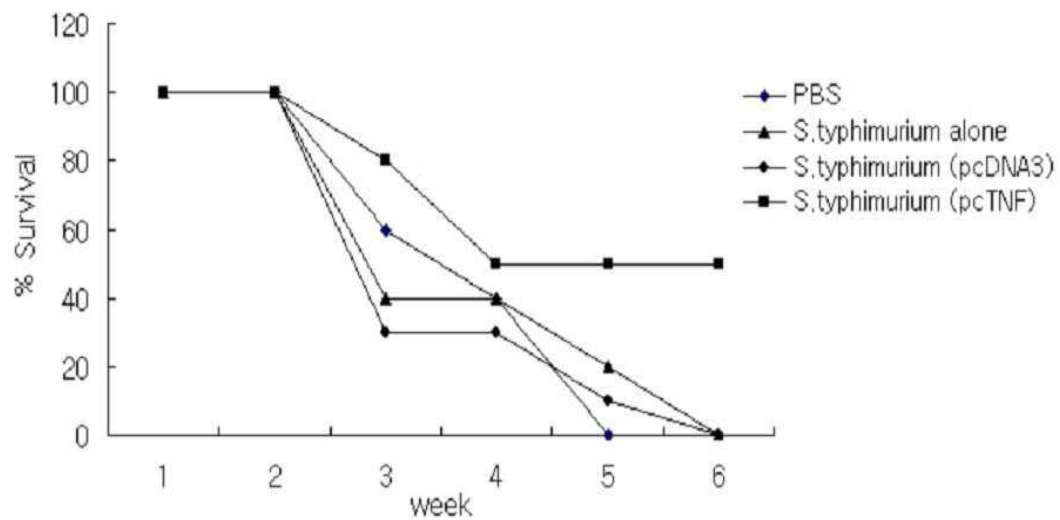
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
 <120> A bacterium salmonella harboring plasmid expressing TNF-alpha in eukaryotic cell and an antitumoral composition thereof

<130> PN060203

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TNFalpha

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe
50 55 60

Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu
65 70 75 80

Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
85 90 95

Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala
100 105 110

Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val
115 120 125

Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
130 135 140

Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg

145	150	155	160
Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys			
	165	170	175
Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp			
	180	185	190
Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp			
	195	200	205
Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu			
	210	215	220
Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu			
225	230	235	