(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0042560
(43) 공개일자 2012년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/112 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0104286
(22) 출원일자 2010년10월25일
심사청구일자 2010년10월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
윤원석
서울특별시 용산구 청파로 213, 이안프리미어 608호 (문배동)
박용근
서울특별시 도봉구 도봉동 656 양우@ 101-802
(74) 대리인
김선애

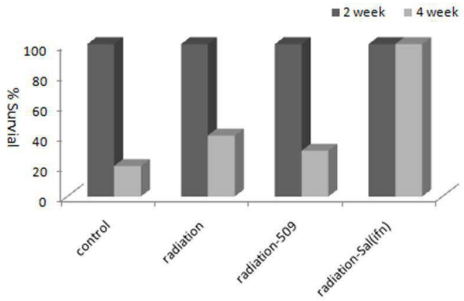
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **방사선병용치료의 효능을 증대시키는 인터페론-감마를 발현하는 살모넬라를 함유하는 바이오 방사선요법용 항암치료 보조제**

(57) 요 약

본 발명은 방사선요법과 병용되는, 인터페론감마(INF-)를 발현하는 발현벡터로 형질도입된 약독화된 살모넬라를 함유하는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제를 제공한다. 본 발명에 의하면, 인체 부작용을 줄이고 방사선 치료의 강도를 낮춰도 고효능을 유도할 수 있어 방사선병용치료의 효능을 극대화시킬 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도7b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A09022809010000100

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술진흥사업

연구과제명 방사선치료 및 화학요법의 효력증대를 위한 인터페론 감마 유전자를 발현하는 재조합 미생물을 이용하는 바이오칵테일요법의 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

방사선요법과 병용되는, 인터페론감마(INF-γ)를 발현하는 발현벡터로 형질도입된 약독화된 살모넬라를 함유하는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방사선 항암치료 보조제는 방사선 요법과 동시에 병용되는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방사선 항암치료 보조제는 피하주사로 투여되는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 방사선은 4G ~ 100G의 저준위방사선으로 10 ~ 15분 조사하는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 살모넬라는 10^3 ~ 10^9 cfu/100ul 으로 투여되는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 살모넬라는 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) BRD 509 균주인 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 방사선병용치료의 효능을 증대시키는 인터페론-감마를 발현하는 살모넬라를 함유하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 인체 부작용을 줄이고 방사선 치료의 강도를 낮춰도 고효능을 유도할 수 있어 방사선병용치료의 효능을 극대화시킬 수 있는 인터페론-감마를 발현하는 살모넬라를 함유하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방사선 치료는 수술, 항암약물치료와 함께 3대 암 치료법 중 하나로 (국내 30%, 미국 50%), 거의 모든 종류의 암을 치료할 수 있으나, 방사선 내성 및 저 산소 상태의 미세 환경 등으로 치료효과에 제한점을 내포하고 있어 방사선 민감제 및 방사면역치료제의 개발 등으로 방사선 치료효과를 극대화하는 치료법이 필요하다.

[0003] 현재 항암치료율의 향상을 위해 환자의 특성에 따라 여러 약물을 혼합하여 쓰는 개인 맞춤형 병용요법이 여러 국가에서 다양하게 연구되고 있다. 우리나라에서도 여러 병원에서 병용요법이 항암치료율을 높인다는 결과를 내놓고 있다. 서울 아산병원에서는 급성림프구성 백혈병치료에 기존 항암제와 글리벡을 함께 투여하여 완치율을 높였음을 보고하였다. 삼성의료원에서는 차세대 전략으로 바이오 병용요법을 산업적으로 추진하려고 셀트리온과 같은 바이오 항암제개발기업과 협력관계를 구축하는 추세이다. 이중 바이오항암제와 방사선치료와의 융합은 최근에 시도되는 기술로 방사선에 의해 효능이 저하되지 않는 생물항암제와 방사선치료와의 결합은 방사선치료 효

능을 월등히 증가시키고 동시에 적은 조사로도 높은 효능을 유도할 수 있는 기술로 고려되고 있다.

[0004] 따라서 방사선병용치료 및 항암치료에 활용할 수 있는 신기술인 바이오방사선치료에 이용할 수 있는 신조성물 또는 최근 개발되고 있는 현존 방사선치료의 효능을 항진시키면서 부작용을 낮출 수 있는 방사선치료용 생물학적 조성물에 대한 요구가 있어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 현존 방사선치료제는 우수한 효능에 비해서 기술적 한계로 인해 임상적용에 제한이 있는바, 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 현존 방사선치료의 효능을 항진시키면서 부작용을 낮출 수 있는 방사선치료용 생물학적 조성물로서 인터페론-감마를 발현하는 살모넬라를 함유하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 즉 본 발명은 기존의 방사선치료 및 방사선병용치료제와 혼합투여하여도 효력의 변화가 없고 오히려 그 효능을 증대시키는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 이를 통해 인체 부작용을 줄이고 방사선치료의 강도를 낮춰도 고효능을 유도할 수 있는 항암치료제를 개발에 기여하고 방사선피폭량의 한계로 적용증이 제한적인 방사선치료요법의 적용증 및 효능증대를 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 방사선요법과 병용되는, 인터페론감마(INF-γ)를 발현하는 발현벡터로 형질도입된 약독화된 살모넬라를 함유하는 것을 특징으로 하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제를 제공한다.

[0009] 본 발명자들은 방사선(항암)요법의 항암치료기법과 본 발명에 의한 인터페론감마를 발현하는 살모넬라 제제의 상호작용과 효능시험을 수행한 결과, 병용할 경우 길항작용을 유도하여서 방사선(항암)요법의 효과를 증대시킬 수 있는 것으로 나타났고, 본 발명의 항암치료 보조제의 효과가 기존 방사선(항암)요법과 경쟁관계가 아니어서 본 재조합 살모넬라 균주는 방사선요법과 병행하여 사용될 수 있는 것으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 상기 방사선 항암치료 보조제는 방사선 요법과 동시에 병용되는 것이 바람직하다. 병용 시 방사선 요법과 인터페론감마를 발현하는 살모넬라 균주를 각각 단독으로 처리하거나, 각각을 시간차를 두고 처치하는 것에 비해 항암효과가 매우 우수하다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 방사선 항암치료는 다양한 공지된 방사선요법을 포함하며, 예를 들어 X선 심부치료, 라듐요법, 코발트 60의 대량조사, 초고압방사선요법 및 방사성 동위원소 내용요법 등을 들 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0012] 상기 방사선 항암 치료시 4G ~ 100G의 저준위방사선으로 10 ~ 15분 조사하는 것을 특징으로 한다. 상기 범위에서 방사선 항암치료의 부작용을 최소화하면서 방사선에 의한 항암치료 효과와 본 발명에 의한 항암치료 보조제의 시너지 효과를 극대화할 수 있다. 상기 방사선 항암 치료시 1000G 미만의 방사선이 조사되어야 하며 이를 넘는 경우 살모넬라 균주에 이상이 발생한다.

[0013] 상기 살모넬라 균주는 이에 한정되는 것은 아니나, 10^3 ~ 10^9 cfu/100ul 으로 투여하는 것이 바람직하다. 상기 용량으로 투여하는 것이 항암제의 부작용을 최소화하면서 양 요법에 의한 항암 치료 시너지 효과를 극대화할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 균주는 장티푸스를 유발하는 group D Salmonella에 속하는 병원균으로서, 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 없애기 위하여 약독화된(attenuated) 살모넬라 균주를 사용한다.

[0015] 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, 정상인에게 투여 시 일정 기간 후 쉽게 사라져 버리게 되고 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 장티프스 예방용 백신으로는 이미 당업계에 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).

[0016] 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 B의 유전자를 변형시켜서 균주의 대사에 비정상이 일어나게 만들었으며, 이로 인한 약독화 결과를 이용해서 본 발명에서 사용하였다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 인터페론감마를 코딩하는 유전자는 상용화된 어떤 인터페론감마 발현 플라스미드부터도 입수할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 인터페론감마를 진핵세포 내에서 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 1a에 도시된 pGEM-T INFg인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 있어서, 바람직하게는 한국미생물보존센터에 2005. 12. 28자로 기탁된 수탁번호 KCCM-10735P의 살모넬라 균주를 이용할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 암은 이에 한정되는 것은 아니나, 대장암, 폐암, 유방암, 자궁암, 피부암, 전립선암, 고환암, 난소암, 두경부암, 방광암, 위암, 또는 자궁 경부암일 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 항암치료 보조제는 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. 본 발명에 의한 바이오방사선요법용 항암치료 보조제는 피하주사로 투여되는 것이 바람직하다. 상기 보조제는 또한 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0021] 본 발명의 바이오방사선요법용 항암치료 보조제는 항암 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.

[0022] 본 발명의 바이오방사선요법용 항암치료 보조제는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료학적으로 유효한(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 병용되는 항암요법의 종류, 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 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 항암치료 보조제를 투여할 수 있다.

[0023] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다.

[0024] (1) 재조합 미생물균주의 제작 및 평가

[0025] 본 발명에 사용된 균주는 살모넬라 타이피뮤리움 BDR509 균주이다 (Hoiseth, S. K., and B. A. D. Stocker. 1981. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. Nature (London) 291:238-239.). 살모넬라 타이피뮤리움 균주는 마우스에서 인간의 살모넬라 타이피 균주에 의한 병리학적인 결과와 유사한 병증을 유도하는 균주이다. 또한 균주는 마우스에서 맹독성을 띄는 균주의 약독화된 균주로 알려져 있다. 본 발명자들은 이 균주의 aroA, aroD 결실 vaccine strain으로 살모넬라 타이피뮤리움 BDR509를 사용하여 인터페론감마를 분비하는 약물전달 미생물체를 제작하였다(도 1a 및 도 1b).

[0026] 본 발명에서는 인체감염균주인 살모넬라 타이피의 검증된 약독화된 균주인 S.typhi 21 균주를 사용해도 재조합 유전자발현 균주를 생산할 수 있다. 그러나 살모넬라 타이피 균주의 경우 마우스가 저항성을 나타내는 균주로 알려져 있다. 곧 마우스가 살모넬라 타이피의 감염에 내성을 가지고 있어서 효능 및 기전에 대한 작용평가를 수행하기에 곤란한 점이 있어서 살모넬라 타이피뮤리움 균주를 시험모델로 설정하였다. 또한, 살모넬라 타이피 균

은 약독화 되었다 하더라도 인체에 치명적인 균의 특성을 지니고 있고 법정 전염병의 파생균주로 향후 제기될 독성의 부작용을 무시할 수 없다. 따라서 본 발명에서는 인체에는 설사 이외의 부작용이 없는 살모넬라 타이피뮤리움 균주가 실험자나 실제 응용에 있어 보다 효과적인 균주로 선정될 수 있다. 실제 본 발명의 재조합 균주는 아니지만 전단계의 연구로 약독화된 살모넬라균주만의 항암효과 임상시험이 일본 등지에서 수행되었다. 이들의 연구에서도 살모넬라 타이피 균주가 아닌 살모넬라 타이피뮤리움 균주가 사용되었다(Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase-TAPET-CD, VNP20029 : Hum Gene Ther. 2001 Aug 10;12(12):1594-6).

[0027] 본 미생물의 경우 사이토카인을 분비하거나 또는 사이토카인을 캡슐화하여 저장하는 기능을 가진다. 본 미생물은 암을 추적할수 있으며 암세포에 선택적으로 부착되어 약물을 전달하는 기능을 수행하였다(도 2).

[0028] (2) 재조합 미생물 균주의 세포수준에서의 제제의 효능시험법 설계

[0029] 본 발명자들은 이와 더불어 세포주 수준에서 유전자 발현 미생물의 세포상해효과를 시험할 때 미생물균주가 세포배지에서 배양됨으로 말미암은 실험의 제한성을 극복하기 위해서 유전자발현 미생물을 투여한 후 항생제를 투여하는 방식 등을 이용하여 미생물자체의 배양을 억제하고 암세포주에 상해효과를 측정할 수 있는 지 시험하였다(도 3a ~ 도 3c).

[0030] 세포수준에서의 유전자 전달 살모넬라를 이용한 효능시험은 다음과 같이 수행하였다. 마우스 유래 암세포주인 B16F10 murine melanoma cell 10^6 수의 세포를 배양기구에 배양한 후 이에 유전자 전달 살모넬라 균주를 10^6cfu로 투여한 후 이에 대한 살상효과를 현미경 관찰과 LDH 발현에 근거한 세포상해효과검사를 실시하여 평가하였다.

[0031] 시험결과와 같이 약물을 전달하는 미생물체에 의해 암세포가 선택적으로 살상되었다. 재조합 살모넬라 균주에 의해 암세포의 살상효과의 기전을 살펴보기 위해서 FLICA Assay 기법에 따라 apoptosis를 측정하였다. 그 결과 정상 살모넬라와 달리 유전자전달 살모넬라의 경우 확연히 apoptosis를 유발함을 확인하였다. 추가적으로 이런 효과가 체내에 미치는 영향을 확인하기 위해 체내에 사이토카인의 분비양을 측정하였다. 그 결과 인터페론을 분비하는 미생물전달체에 의해 체내에 미생물 자체의 자극보다 더 많은 양의 인터페론이 분비유도될 수 있음을 확인하였다(도 4).

[0032] (3) 동물시험에서의 제제의 효능평가

[0033] ① 제제의 투여용량별 효능평가

[0034] 실험동물수준에서 유전자 발현 미생물균주의 효능시험을 평가하기 위해서 본 발명자들은 각종 암세포주들을 수집하고 배양하여 적합한 암 효능시험모델을 적용하였다. 본 발명자들은 재조합 유전자 발현 미생물의 동물시험모델로 1차적으로 마우스를 대상으로 하여 마우스에서 평가할 수 있는 대장암, 폐암, 유방암, 자궁암, 피부암, 전립선 암세포주를 수집 배양하였다. 사용된 세포주는 16F10, B16F1, B16F10B6 murine melanoma, RENCA Kidney tumor, EL-4 T Cell lymphoma, TC-1 Cervical tumor, CT-26 Colon cancer, 4T-1 Brest cancer, TRAMP-2 prostate cancer이다. 배양된 암세포주를 마우스에 이식할 수 있도록 마우스와 세포주를 준비하여 마우스에 암세포주를 이식한 후 재조합 유전자 발현 미생물을 피하 주사하여 효능시험을 수행하였다.

[0035] 효능시험의 살모넬라는 재조합 약독화 살모넬라 1.9 x 10^{5-9} CFU를 phosphate-buffered saline (containing 0.01% gelatin) 50㎕에 현탁(suspension)하여 준비하였다. 신규 약독화 살모넬라의 실험들에 사용될 암세포주로는 B16F10 마우스의 흑색종(melanoma) 암세포주로 결정하였다. 이 암세포는 성장속도가 매우 빠른 암세포로 이식하여 암을 유발시킬 때 1달 이내에 사망하기 시작하는 강력한 암종이다. 본 발명에 의해 제조된 살모넬라 제제들은 이들 피부암종에 대해 1차적으로 효력을 검증하고자 하였다. 먼저 암을 유발하기 위해서 10^5 세포를 6-7주령의 C57BL6 마우스에 피하이식하였다. 이후 1주일째부터 각 용량의 살모넬라 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 생존율 및 암의 크기 측정을 통해 평가하였다. 그 결과 용량에 비례하여 암억제가 이루어짐을 확인하였고, 이는 효능이 재조합 균주에 기인함을 제시하여 주었다(도 5 참조).

[0036] ② 제제의 투여경로별 효능평가

[0037] 본 발명에 의한 재조합 살모넬라들의 경로별 효과에 대한 평가실험으로 자궁암에 걸린 마우스를 대상으로 선별

된 균주를 투입하여 효과를 시험하였다. 투여경로는 경구투여(ORAL), 피하주사(SC), 복강투여(IP), 정맥주사(IV)의 방법으로 수행하였다. 그러나 본 발명의 균주의 경우 복강투여(IP) 및 정맥주사(IV)의 경우 효능유도 용량에서 치사되는 결과를 보여서 독성 균주의 경우 복강이나 정맥주사는 보다 심도 높은 고려가 필요하다고 할 것이다. 본 결과는 투여경로를 바꾸어도 유사한 항암효과가 발생한다는 것과 동시에 피하주사가 경구투여보다 우수한 결과를 유도할 수 있음을 제시한다(도 6 참조).

[0038] (4) 재조합 인터페론감마 발현 살모넬라 균주와 방사선치료요법과의 병행치료 효과평가

[0039] 본 발명에 의한 재조합 인터페론감마 발현 살모넬라 균주를 바이오방사선요법기술의 개발을 위해 방사선치료의 병용치료용 생물제로서의 효능을 평가하였다. 이는 생물의약품이 방사선치료와 병용하였을 때의 효능변화 및 효능억제 현상이 유도되는지를 확인하고자 함이다.

[0040] 살모넬라 균주에 대한 방사선의 효과는 미미하여 1000G 이상의 방사선이 조사될 때에 박테리아의 이상이 유도된다고 알려져 있다. 방사선의 치료의 경우 먼저 4G의 저준위방사선 조사장치(원자력의학원, 서울 공릉동)을 사용하여 10분 조사하는 방법으로 항암효과를 유도하였다.

[0041] 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 살모넬라 균주에 의해 방사선 치료의 효능을 억제하지 않아 방사선 치료와 병행하여 사용될 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 본 발명에 의한 재조합 살모넬라 균주의 경우 살모넬라형 항암제의 효과와 방사선의 효과가 합쳐져 항암효능이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다(도 7a 및 도 7b).

[0042] 본 발명자들은 연구용 방사선조사장비가 아닌 원자력의학원(서울)의 도움을 얻어 인체에 조사하는 방사선치료장비를 동물에 적용하여 본 발명에 의한 인터페론감마를 발현하는 살모넬라의 병용효과를 확인하고자 하였다.

[0043] 그 결과 방사선과 미생물항암제의 병행치료 칵테일요법은 임상방사선치료장비를 사용하여 시험할 경우에 생존율에 있어서 드라마틱한 효능을 보여주었다. 즉, 방사선치료만으로 얻을 수 없는 효능을 본 발명에 의한 미생물항암제와 병용하여 월등히 향상시킬 수 있었으며, 생존율에 있어서 60% 이상 증가하는 것이 확인되었다(도 7a ~ 도 8 참조).

발명의 효과

[0044] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 인터페론-감마를 발현하는 살모넬라를 함유하는 바이오방사선요법용 항암치료 보조제는 방사선요법 병행시 매우 탁월할 항암효과를 나타내어, 인체 부작용을 줄이고 방사선 치료의 강도를 낮춰도 고효능을 유도할 수 있어 방사선병용치료의 효능을 극대화시킬 수 있다.

[0045] 따라서, 본 발명은 현재 방사선피폭량의 한계로 적용증이 제한적인 방사선치료요법의 적용증 및 효능증대에 기여할 수 있는 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 인터페론감마 단백질을 발현하는 플라스미드의 개략적인 모식도 및 *S. typhimurium*의 배양 상층액에 분비된 SipB/IFN-γ 융합 단백질을 확인한 결과를 나타낸 도면이다. Lane 1: *S. typhimurium*, lane 2: *S. typhimurium* without SipB, lane 3: *S. typhimurium* with secretion plasmid vector, lane 4: *S. typhimurium*with SipB/LLO secretion plasmid (LLO protein was used as a control for gene expression), lane 5: *S. typhimurium* with SipB/IFN-γ secretion plasmid.

도 2는 본 발명에 의한 인터페론감마 유전자 전달 살모넬라의 암특이적 분포시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 3a ~ 도 3c는 피부암 모델에서의 본 발명에 의한 재조합 미생물 균주의 효능시험 결과를 나타낸 도면이다. PBS, *S. typhimurium alone*, *S.typhimurium*(vec): 대조군 벡터만 포함된 *S. typhimurium*, *S.typhimurium*(IFN-γ): 인터페론감마를 발현하는 *S. typhimurium*.

도 4는 본 발명의 인터페론감마 발현 미생물 균주에 의한 체내면역인터페론의 증가를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명에 의한 인터페론감마 발현 미생물 균주의 투여용량별 효능평가 시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명에 의한 인터페론감마 발현 미생물 균주의 투여경로별 효능평가 시험 결과를 나타낸다.

도 7a 및 도 7b는 본 발명에 의한 인터페론감마 발현 미생물 균주의 방사선치료와의 병용 치료시 효능평가 결과를 암크기 및 생존율로 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명에 의한 인터페론감마 발현 미생물 균주의 방사선치료와의 병용 치료시 시너지 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 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.

[0048] **<실시예 1 : 인터페론감마 단백질 발현 벡터를 포함하는 살모넬라세균의 제작>**

[0049] 벡터는 다음과 같이 제조하였다. M45 epitope tag(MDRSRDRLPPFETETRIL) 은 아데노바이러스의 E4-6/7 단백질에서 유래한다. M45의 유전정보를 가지고 있는 플라스미드를 주형으로 epitope tag을 PCR로 증폭시켰다(forward primer, M45L-Xho I 5'-tctagaaccaccatggatcggagtag-3'(서열번호 1); reverse primer, M45R-SacI 5'-gagctcaggttccttcacaaagatcctc-3'(서열번호 2)). PCR로 얻은 이 DNA 단편을 pGEM T-easy 벡터(PROMEGA, USA)의 Xho I 과 Sac I 부위에 클로닝하였다.

[0050] Lac 프로모터와 UK-1(wild type 살모넬라)을 이용하여 얻은 SipB 아미노산의 160 N말단부위 PCR 산물을 pGEMT-easy 벡터에 클로닝 하였다. 그 다음에 이 클로닝 된 플라스미드를 제한효소 EcoRV와 Bgl Ⅱ로 자른 후 프로모터의 C말단에 퓨전시켰다. Lac 프로모터-sipB를 포함하는 플라스미드를 제한효소 Spe I 과 Bgl Ⅱ로 자른 후 아가로즈 젤에 전기영동한 후 분리하여 M45 부위를 퓨전시켰다. 지금까지 과정으로 Lac프로모터-sipB160/M45의 플라스미드가 만들어졌다.

[0051] 그 다음으로 전북대 사이토카인은행으로부터 분양받은 인터페론감마 유전자가 포함된 플라스미드로(SERVICE NO.G25)부터 PCR을 통해 인터페론감마 유전자를 PCR을 통해 증폭시켰다(forward primer, IFNgF Bgl Ⅱ 5'-cccagatctatgtgttactgccacggc-3'(서열번호 3); reverse primer, IFNgR Xho I 5'-cccctcgagtcagcagcgactccttttt-3'(서열번호 4)). 이 PCR산물과 Lac프로모터-sipB160/M45의 플라스미드를 제한효소 Bgl Ⅱ와 Xho I 으로 자른 후 전기영동하여 분리하였다. 그후 분리된 DNA 조각을 접합하여 클로닝하였다. 이렇게 해서 Lac프로모터-sipB160aa/인터페론감마/M45 플라스미드가 제작되었다.

[0052] 벡터 제조 후, 약독화된 살모넬라 균주 BRD509(Salmonella typhimurium BRD509)를 루리아 벌테니(Luria Bertani) 배지에서 37℃ 배양하였다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 마우스의 인터페론 감마 유전자를 분비 벡터 플라스미드, pGEM-T 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.

[0053] 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㎕의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30㎕(2㎍)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 인터페론감마 단백질 분비 벡터 플라스미드인 pGEM-IFNg벡터를 3㎕(2㎍) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다. 그 결과 도 1a과 같은 벡터를 포함한 인터페론감마 단백질 발현 살모넬라를 제작하였다(수탁번호 KCCM-10735P).

[0054] 도 1b는 *S. typhimurium*의 배양 상층액에 분비된 SipB/IFN-γ 융합 단백질을 확인한 결과를 나타낸다. 키메릭 SipB 단백질(Chimeric SipB proteins)은 mAb로 검출되었다. 모든 키메릭 SipB 단백질이 안정적으로 발현되어 분비되는 것을 세균 전 용해물(whole bacterial lysates)의 culture supernatant munoblot analysis을 이용하여 확인하였다.

[0055] **<실시예 2 : 인터페론감마(IFN-gamma) 유전자 전달 살모넬라의 암특이적 분포시험>**

[0056] 인터페론감마(IFN-gamma) 유전자 전달 및 발현이 이루어질 경우 본 살모넬라의 암특이적 분포 및 잔존 여부, 기간에 대한 정보는 살모넬라를 이용한 유전자 전달법의 안전성을 평가하는데 중요한 시험이 된다.

[0057] 이를 시험하기 위해서 각각의 IFN-gamma 유전자전달 살모넬라를 각각의 경로로 용량별로 투여하여 이들의 체내 잔존 여부를 확인하는 시험을 수행하였다. 시험은 각각의 살모넬라 균주를 10^3- 10^9 의 농도별로 각각 Balb/C마우스에 각각의 경로별로 투여하였다. 경구투여법과 피하주사법, 혈관주사법등을 사용하여 살모넬라가 투여될 수 있는 경로별로 시행하였다. 살모넬라 투여후 이를 기초로 시기별로 1일, 3일, 7일, 14일, 25일 간격을 정해 마우스를 검시하였다. 암조직에서의 살모넬라 균주의 잔존여부를 확인하였다. 조직을 적출하여 세균배양을 통해 그 존재를 확인하였다.

[0058] 그 결과 도 2와 같이 각각의 투여경로에 상관없이 살모넬라 투여 후 7일부터 재조합 살모넬라균주가 다른 조직에는 분포되지 않고 암세포에 특이적으로 분포하였다. 각 실험은 3번씩 반복되었고 유사한 결과를 보였다.

[0059] **<실시예 3 : 피부암 모델에서의 재조합 미생물 균주의 효능 시험>**

[0060] 효능시험의 살모넬라는 재조합 약독화 살모넬라 10^{3-9} CFU를 phosphate-buffered saline (containing 0.01% gelatin) 50 ㎕에 현탁(suspension)하여 준비하였다. 신규 약독화 살모넬라의 실험들에 사용될 암세포주는 B16F10 마우스의 흑색종(melanoma) 암세포주를 이용하였다. 이 암세포는 성장속도가 매우 빠른 암세포를 이식하여 암을 시킬 때 1달 이내에 사망하기 시작하는 강력한 암종이다. 본 발명에 의해 제조된 살모넬라제제들은 이들 피부암종에 대해 1차적으로 효능을 검증하고자 하였다.

[0061] 먼저, 암을 유발하기 위해서 10^{3-7}세포를 6-7주령의 C57BL6마우스에 피하이식하였다. 이후 1주일째부터 각각의 살모넬라 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 생존율 및 암의 크기 측정을 통해 평가하였다. 살모넬라균주는 10^{3-7}의 농도로 각각 처리하여 용량별 효능비교 평가 시험을 하였다. 또한, 투여경로별 효과비교를 시행하였다. 투여 경로는 경구투여, 피하주사, 혈관주사법 등을 시도하여 경로별 효과를 비교 분석하였다. 살모넬라 제제를 처리 후 3일, 7일, 14일, 21일째에 안와채취법을 통해 혈청을 수집 원심분리(300rpm, 15min)하여 혈중 사이토카인의 변화양상을 Cytokine assay kit(Bender Medsystem, USA) 를 사용하여 분석하였다. 세포독성시험은 LDH assay(*Promega Notes Magazine Number 45, 1994, p.07*)를 이용해서 시행하였으며 제조사 Promega(USA)의 지시에 따라 시험하였다.

[0062] 그 결과 도 3a 내지 도 3c에 나타난 바와 같이 재조합 미생물균주의 암세포 독성효과가 유도 되었다. 추가적으로 재조합 살모넬라 균주에 의해 암세포의 살상효과의 기전을 살펴보기 위해서 FLICA Assay apoptosis 기법(FLICA™ Caspase Assay Kits, Amstad, P. A., G. Yu, G.L. Johnson, B.W. Lee, S. Dhawan and D.J.Phelps. 2001. Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. Biotechniques vol 31:608-614)에 따라 apoptosis를 측정하였다. 그 결과 정상 살모넬라와 달리 유전자 전달 살모넬라의 경우 확연히 apoptosis를 유발하는 것이 확인되었다.

[0063] 도 3a는 B16F10 흑색종 암세포주에서 세균 침윤 비율(Bacterial invasion rates)을 나타내는데, 상대적 백분율 값은 재조합되지 않은 *S. typhimurium*에 대해 정규화되었다. 도 3b는 인비트로(*in vitro*)에서의 살모넬라 재조합 SipB/IFN-γ 단백질의 직접적인 흑색종 암세포주 살해 활성(killing activities)을 나타내는데, 이때 암세포주는 12시간 이하로 세균(microbe)과 배양되었다. 도 3c는 IFN-γ를 발현하는 *S. typhimurium*에 의한 암세포주의 apoptosis의 검출결과를 나타내는데, 죽은 세포의 비율이 처리 후 급격히 증가하였다. 결과는 대조군(*S. typhimurium* with control vector alone)과 비교되었다($P^* < 0.05$)

[0064] **<실시예 4 : 인터페론감마(IFN-gamma) 발현 미생물 균주에 의한 체내면역인터페론의 증가확인 시험>**

[0065] 5-7주령 된 female BALB/c mice(C57BL/6 mice)에게 미생물 균주를 투여(infection)하기 전 4시간 동안 물과 사료를 주지 않았다. 이후 투여(infection) 시 재조합 약독화 살모넬라 1.9 x 10^9 CFU 를 phosphate-buffered saline (containing 0.01% gelatin) 20㎕에 현탁하여 경구로 투여(administration)하고, 물과 사료는 면역(immunization) 후 30 분 후 부터 다시 공급하였다. 1 주 후에 주사(boosting) 한 후 2주차부터 1주 간격으로 혈액(blood)을 채취하였다.

[0066] 혈액 채취는 헤파린 처리 모세관(heparinized capillary)을 가지고 retro-orbital puncture method(Animal Models in Toxicology, Gad, Shayne Cox (EDT), Marcel Dekker Inc, 2007)로 실시하였다. 각 샘플은 4,000 x *g* 로 5분 동안 원심분리(centrifugation)하고 혈청(serum)은 전혈(whole-blood)로부터 수거하고 -20℃에 저장하였다.

[0067] 폴리스티렌 96-웰 플레이트(Polystyrene 96-well plates)에 정제된 PspA를 100 ng/well의 농도로 코팅(coating) 하고 37℃에서 1시간 이후 4℃에서 밤새 배양(overnight incubation) 하였다. 프리바인딩사이트(Free binding sites)는 blocking buffer (phosphate-buffered saline [pH 7.4], 0.1% Tween 20, and 1% bovine serum albumin) 로 블럭(block) 시켰다. 마우스(mouse) 각 그룹으로부터의 혈청들(sera)을 1:10 과 1:600으로 희석(dilution) 한 후, 희석된 샘플(diluted sample) 100-㎕를 각 플레이트 웰(plate well)에 2개씩(duplicate) 넣어주고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 플레이트(plates)는 biotinylated goat anti-mouse IgG로 처리(treat)하고 1 시간 후, 각 웰(well)은 *p*-nitrophenylphosphate와 substratestreptavidin-alkaline phosphatase conjugate로 develope하였다. Color development (absorbance)는 automated ELISA plate를 이용하여 405 nm에서 관찰하였다. 시험 결과 도 4와 같이 본 발명에 의한 미생물 조성물을 투여한 마우스의 체내에 인터페론감마의 발현양이 체내에 미생물 자체의 자극보다 더 많은 양으로 분비 유도될 수 있음을 확인하였다.

[0068] **<실시예 5 : 투여용량별 재조합 미생물의 효능평가 시험>**

[0069] 실시예 3과 같은 방법으로 암모델을 만든 후 재조합미생물의 투여 용량별 효능을 평가하였다.

[0070] 투여용량별로 살모넬라 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 생존율 및 암의 크기 측정을 통해 평가하였다. 보다 상세하게는 쥐에서 인터페론감마를 분비하는 *S. typhimurium*을 다양한 용량으로 피하접종하여 B16F10 암세포주의 성장 저해를 평가하였다. 각 그룹의 시험동물들은 인터페론감마를 발현하는 10^3 ~ 10^8 의 약독화된 살모넬라 및 *S. typhimurium*만으로 1주일 간격으로 각각 2회 피하접종되었다. 마우스들은 암이 감지될 때까지 매일 관찰되었고, 그 후 암의 직경을 마이크로캘리퍼스로 2일 마다 이차원적으로 측정하여 부피로 환산하였다. 대조군(PBS)과 비교되었다($P^* < 0.05$)

[0071] 그 결과 도 5와 같이 재조합 미생물균주의 용량의 비례하여 암억제가 이루어짐을 확인하였고 이는 효능이 재조합 균주에 기인함을 제시하여 주었다.

[0072] **<실시예 6 : 투여경로별 재조합 미생물의 효능평가 시험>**

[0073] 실시예 3과 같은 방법으로 암모델을 만든 후 재조합미생물의 투여 경로별 효능을 평가하였다.

[0074] 투여경로는 경구투여, 피하주사, 복강투여, 정맥주사의 방법으로 수행하였다. 투여경로별로 살모넬라 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 생존율 및 암의 크기 측정을 통해 평가하였다. 보다 상세하게는 쥐에서 인터페론감마를 분비하는 *S. typhimurium*을 경구투여, 피하주사, 복강투여, 정맥주사하여 B16F10 암세포주의 성장 저해를 평가하였다. 각 그룹의 시험동물들은 인터페론감마를 발현하는 10^3 ~ 10^8 의 약독화된 살모넬라로 1주일 간격으로 각각 2회 피하접종되었다. 마우스들은 암이 감지될 때까지 매일 관찰되었고, 그 후 암의 직경을 마이크로캘리퍼스로 2일 마다 이차원적으로 측정하여 부피로 환산하였다. 대조군(PBS)과 비교되었다($P^* < 0.05$)

[0075] 그 결과 도 6에서와 같이 다양한 경로로 재조합미생물이 투여되어도 효능이 유도될 수 있음을 제시하여 주었고, 피하주사가 경구투여보다 우수한 결과를 유도할 수 있음이 확인되었다.

[0076] **<실시예 7 : 방사선 병용치료효과 >**

[0077] 효능시험을 위해 재조합 약독화 바이오 항암 방사선 병용치료물질 10^3 - 10^9 cfu 를 phosphate-buffered saline (containing 0.01% gelatin) 50 ㎕에 현탁하여 준비하였다. 신규 약독화 바이오 항암 방사선 병용치료물질의 실험들은 B16F10 마우스의 흑색종(melanoma) 암 세포주를 이용하여 실시하였다. 이 암세포는 성장속도가 매우 빠른 암세포로 세포를 이식한 후 1달 이내에 개체가 사망하기 시작하는 강력한 암종이다. 본 발명에 의해

제조된 바이오 항암 방사선병용 치료물질제제들은 이들 피부암종에서 1차적으로 효능을 검증하고자 하였다.

[0078] 먼저 암을 유발하기 위해서 10^3 - 10^7 세포를 6 - 7주령의 C57BL6마우스(SLC, Japan)에 피하 이식하였다. 이후 1주일째부터 각각의 바이오 항암 방사선 병용치료물질 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 암의 크기 및 생존율 측정을 통해 평가하였다. 마우스들은 암이 감지될 때까지 매일 관찰되었고, 그 후 암의 직경을 마이크로캘리퍼스로 2일 마다 이차원적으로 측정하여 부피로 환산하였다. 대조군(PBS)과 비교되었다($P^* < 0.05$)

[0079] 바이오 항암 방사선 병용치료물질 균주는 10^3 - 10^7의 농도로 각각 처리하여 용량별 효능을 비교 평가하였다. 또한 투여경로별 효과를 비교 분석하였다. 투여 경로는 경구투여, 피하주사, 혈관주사법 등을 시도하여 경로별 효과를 비교 분석하였다. 바이오 항암 방사선병용치료물질 제제를 처리 후 3, 7, 14, 21일째에 안와채취법을 통해 혈청을 수집 원심분리 (300rpm, 15min)하여 혈중 사이토카인의 변화양상을 Cytokine assay kit를 사용하여 분석하였다.

[0080] 다음, 본 발명자들은 박테리아를 이용한 유전자전달의 기존 항암요법과의 병행투여 시 효능시험의 변화를 좀 더 추적하여 보았다. 본 시험을 위해서 방사선(치료)요법과 본 발명에 의한 살모넬라를 포함한 보조제의 상호작용과 효능시험을 수행하였다.

[0081] 방사선 치료의 경우 4G의 저준위방사선 조사장치(원자력의학원, 서울)를 사용하여 10분 조사하는 방법으로 항암효과를 유도할 수 있었다. 살모넬라 균주에 대한 방사선의 효과는 미미하며, 1000G 이상의 방사선이 조사될 때에 살모넬라 균주의 이상이 유도되었다.

[0082] 도 7a는 병원 방사선요법과 병용치료의 암 저해 결과를 암의 크기로 수치화하여 나타낸 도면이고, 도 7b는 병원 방사선요법과 병용치료 후 암에 대한 마우스 생존율을 보여주는 도면이다. 상기 도면들에 도시된 바와 같이, 살모넬라 균주 투여가 방사선 치료의 효능을 억제하지 않아 방사선(치료)요법과 대등한 치료효과를 보여주는 것으로 나타나 방사선 치료와 병행하여 사용될 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명에 의한 재조합 살모넬라 균주의 경우 살모넬라형 항암제의 효과와 방사선의 효과가 합쳐져 항암효능이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다. 특히, 방사선과 본 발명에 의한 미생물항암제의 병행치료 칵테일요법은 임상방사선 치료장비를 사용하여 시험할 경우에 4주까지 경과를 보면 생존율에 있어서 60% 이상 증가하는 것으로 나타나 드라마틱한 시너지 효능을 보여주었다(도 7b 참조).

[0083] **<실시예 8 : 방사선 병용치료에 있어 인터페론 감마 발현 살모넬라제제와 방사선치료의 시너지효과 비교>**

[0084] 방사선 치료의 보조제로서 인터페론 감마를 발현하는 살모넬라의 효과를 비교하기 위해서 방사선 치료와 살모넬라치료의 시너지 효과가 유발되는가를 비교해보았다.

[0085] 병용치료의 효과가 극대화되고 유의미해지기 위해서는 각각의 치료의 병용이 각각의 치료효과의 합보다 크게 유도되어야 시너지 효과가 유도되었다고 보며 이는 둘의 조합으로 새로운 효과가 유도된 것으로 판단되기 때문이다.

[0086] 이를 시험하기 위해 본 발명에 의한 재조합 약독화 바이오 항암 방사선 병용치료물질을 실시예 7의 방법으로 10^5 cfu 를 phosphate-buffered saline (containing 0.01% gelatin) 50 ㎕에 현탁하여 준비하였다. 신규 약독화 바이오 항암 방사선 병용치료물질의 실험들은 B16F10 마우스의 흑색종(melanoma) 암 세포주를 이용하여 실시하였다. 암을 유발은 B16F10 10^7 세포를 6 ~ 7주령의 C57BL6마우스에 피하 이식하였다. 이후 1주일째부터 각각의 바이오 항암 방사선 병용치료물질 균주를 투여하여 유전자 발현전달에 의한 항암효과를 생존율 및 암의 크기 측정을 통해 평가하였다. 바이오 항암 방사선 병용치료물질 균주는 10^5의 농도로 각각 처리하였다.

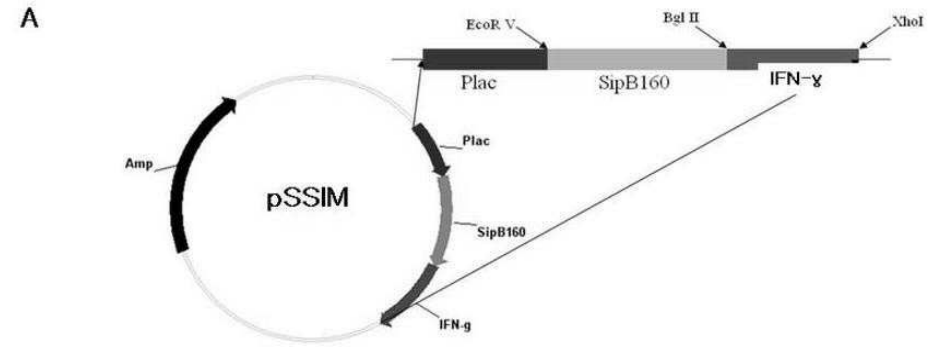
[0087] 이때 본 발명에 의한 재조합 약독화 살모넬라 균주를 방사선과 함께 동시에 조사한 것(radiation with sal(ifn))과 우선 방사선을 먼저 처리하고 1주 후에 재조합 약독화 살모넬라 균주를 투여한(radiation+sal(ifn)) 동물에서 유도되는 항암 비교 평가하였다. 마우스들은 암이 감지될 때까지 매일 관찰되었고, 그 후 암의 직경을 마이크로캘리퍼스로 2일 마다 이차원적으로 측정하여 부피로 환산하였다. 대조군(PBS)과 비교되었다($P^* < 0.05$)

[0088] 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 재조합 살모넬라 균주의 경우 방사선(치료)요법과 병행하여 사용될

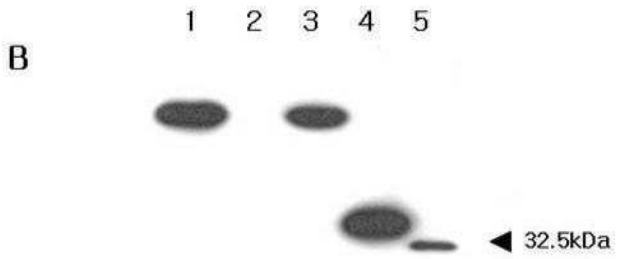
때에 각각의 치료를 더한 효과보다 우수한 항암효과가 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 두 개의 치료요법이 항암효과를 유도하기 어려운 수준의 농도로 치료할 때에, 각각의 요법에 의한 항암효과나 단순한 치료의 병합에 의한 항암효과보다 두 개의 요법을 동시 병용하였을 때 보다 우수한 치료효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

도면

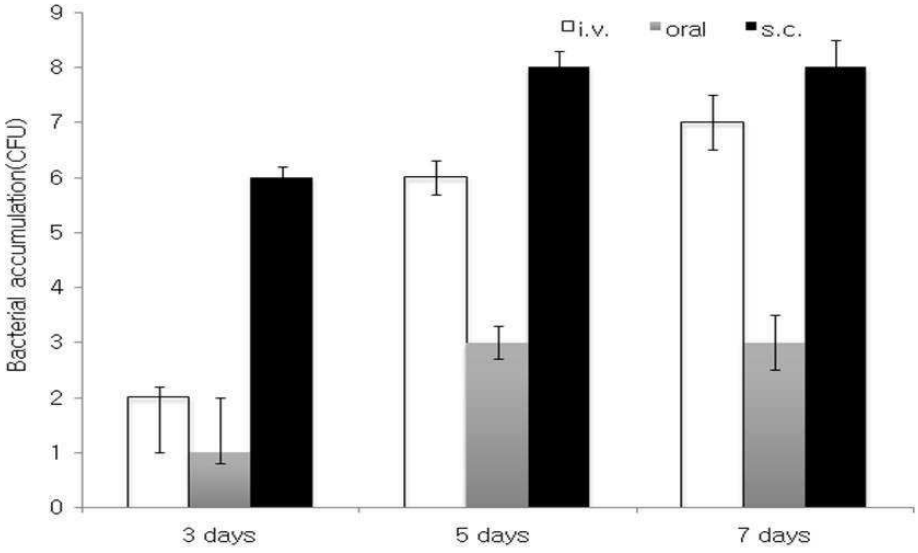
도면1a



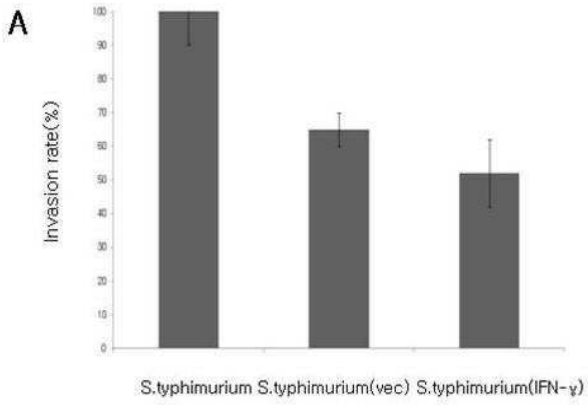
도면1b



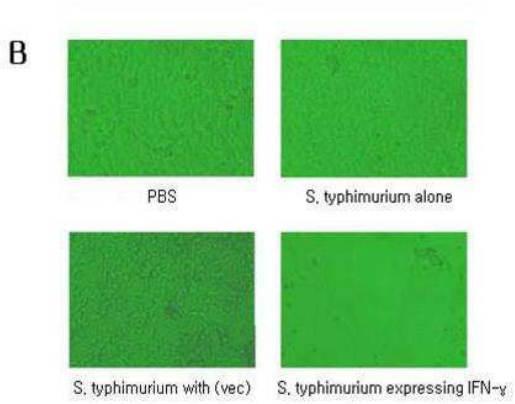
도면2


i.v.
oral
s.c.
Bacterial accumulation(CFU)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
3 days
5 days
7 days

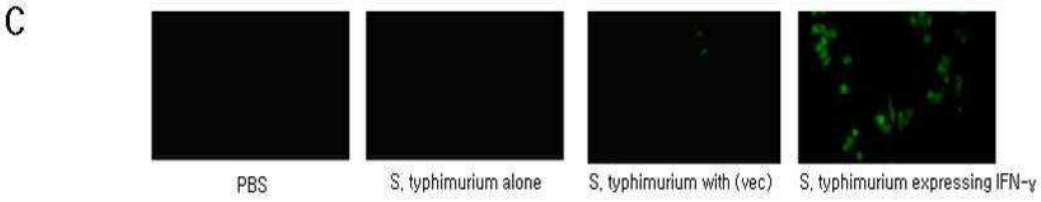
도면3a


A
Invasion rate(%)
S.typhimurium
S.typhimurium(vec)
S.typhimurium(IFN-γ)

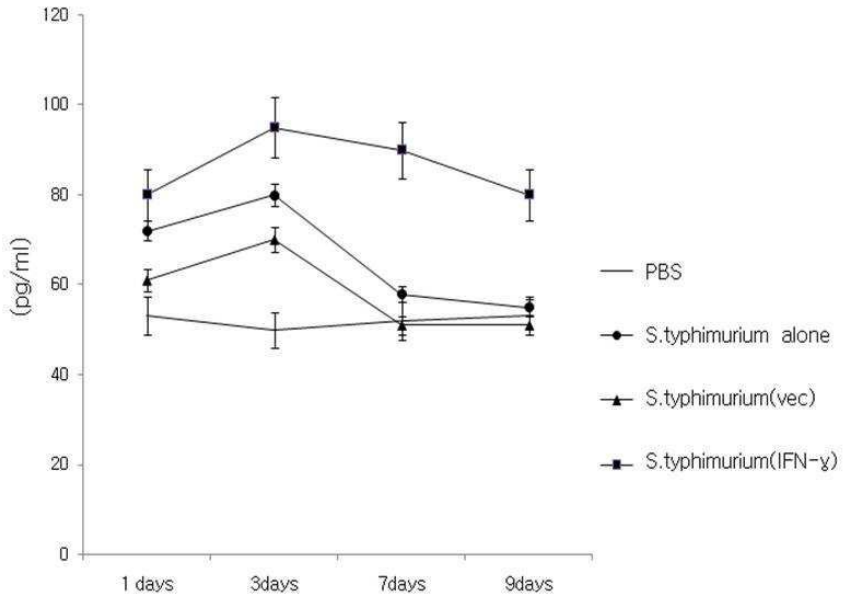
도면3b



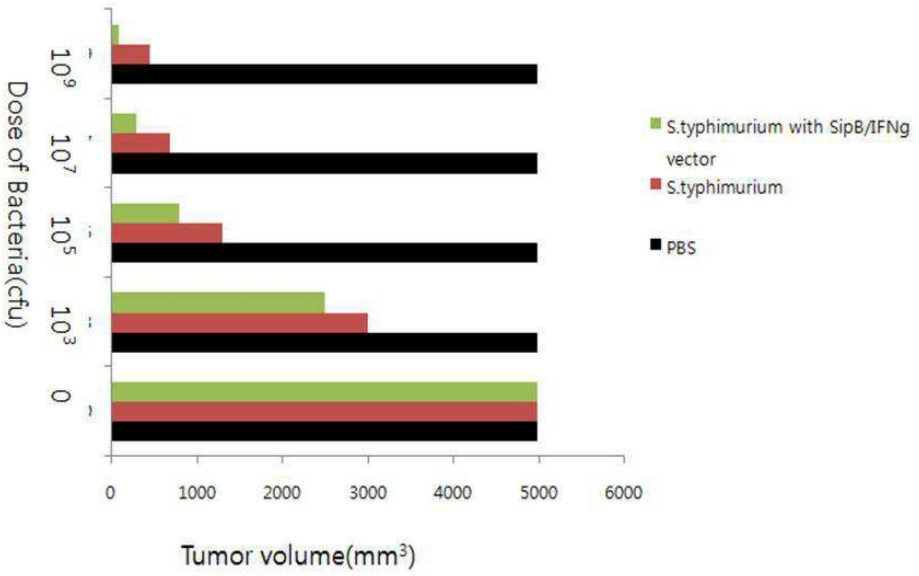
도면3c



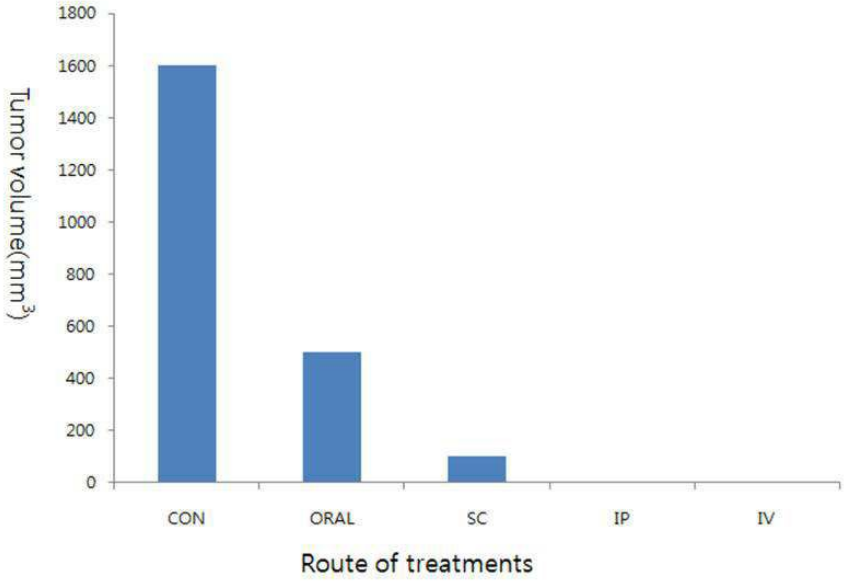
도면4



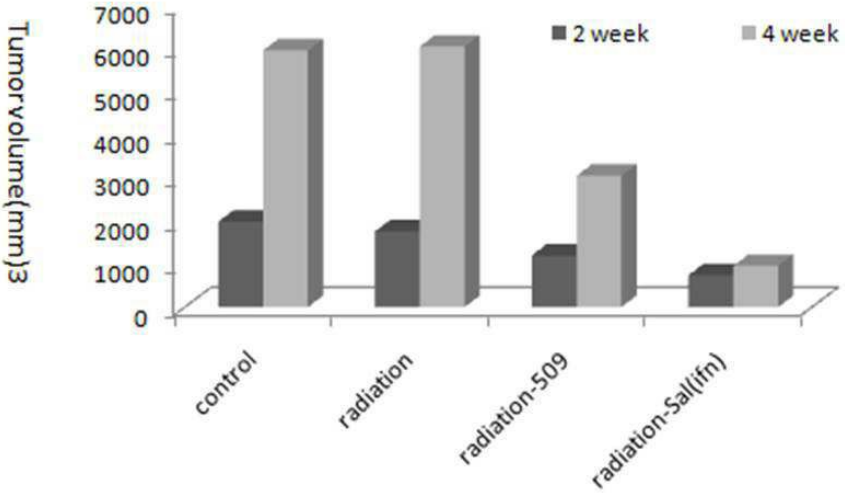
도면5


Dose of Bacteria(cfu)
10^9
10^7
10^5
10^3
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Tumor volume(mm3)
S.typhimurium with SipB/IFNg vector
S.typhimurium
PBS

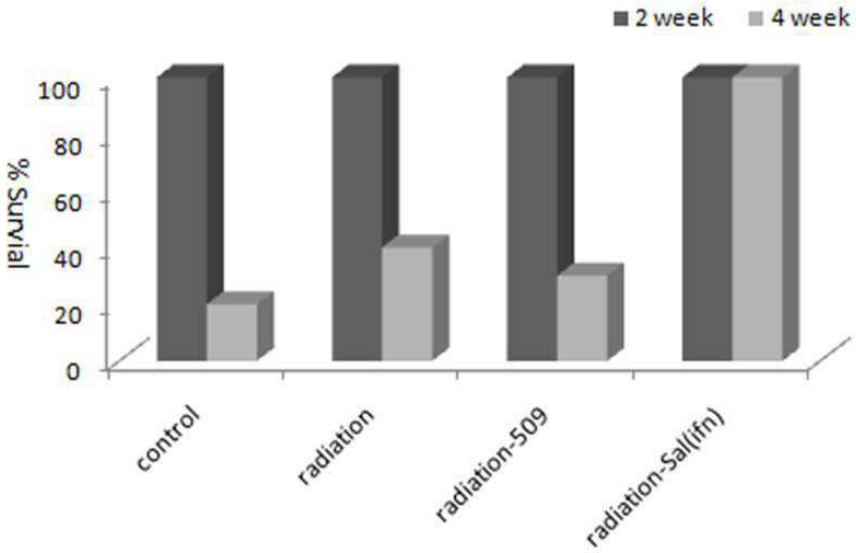
도면6


Tumor volume(mm3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CON
ORAL
SC
IP
IV
Route of treatments

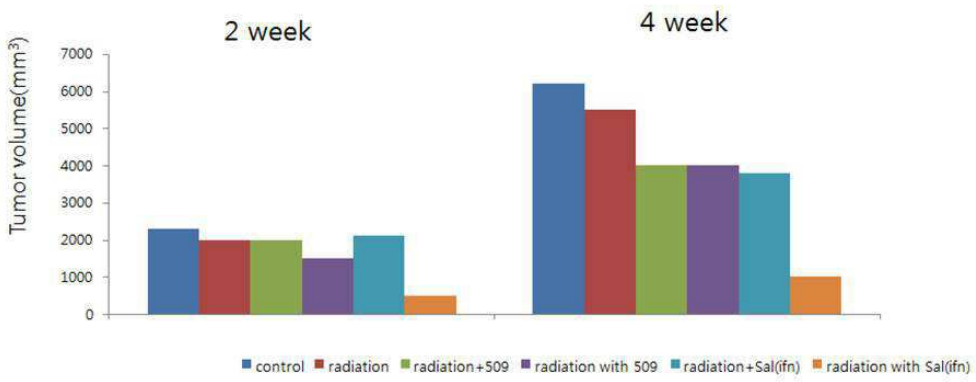
도면7a


Tumorvolume(mm)3
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
2 week
4 week
control
radiation
radiation-509
radiation-Sal(ifn)

도면7b


% Survial
100
80
60
40
20
0
2 week
4 week
control
radiation
radiation-509
radiation-Sal(ifn)

도면8



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Anti-cancer adjuvant comprising Salmonella typhimurium expressing IFN-gamma boosting therapeutic effects of combination treatment with radiation for bioradiotherapy

<130> P11-100813-01

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 1

tctagaacca ccatggatcg gagtag 26

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

gagctcaggt tccttcacaa agatcctc 28

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

cccagatcta tgtgttactg ccacggc 27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 4

cccctcgagt cagcagcgac tcctttt 27