



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0082221
(43) 공개일자 2007년08월21일

(21) 출원번호 10-2006-0014764
(22) 출원일자 2006년02월15일
심사청구일자 2006년02월15일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 박용근
서울 도봉구 도봉동 한신아파트 122-1304
윤원석
서울 노원구 공릉1동 590-1 현대아파트 101-202

(74) 대리인 이문섭
윤여강

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 인터페론감마를 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는항암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항암효과를 유도하는 인터페론감마(Interferon gamma)단백질을 발현하는 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것으로, 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 인터페론감마단백질 벡터를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타내고 특히 대장암 및 피부암 등에 있어서도 훨씬 뛰어난 치료효과를 제공하는, 항암 치료 및 보조 예방제제와 관련한 의약산업상 매우 유용한 발명이다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

인터페론감마 발현벡터로 형질도입된 것을 특징으로 하는 약독화된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*).

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 인터페론 감마는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 1에 도시된 pGEM-T IFNg인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 약독화된 살모넬라 균주(숙주)는 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium*) BRD509인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 한국미생물보존센터에 기탁된 수탁번호 KCCM-10735P 인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5항중 어느 한 항에 따른 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암치료용 조성물.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 암의 종류는 피부암인 것을 특징으로 하는 항암치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항암효과를 유도하는 인터페론감마 단백질을 발현하는 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 인터페론감마 단백질 발현벡터를 형질도입함으로써 새로운 형질융합에 의해 항암효과가 증대된 살모넬라 균주 및 이를 함유하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.

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.

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 사라지지는 않았으며 단지 생쥐의 생명을 더욱 오래 연장시켜준 것에 불과한 한계가 있었다.

한편, 인터페론감마 단백질은 항바이러스작용, 항증식작용, 그리고 면역조절작용을 한다. 인터페론의 항바이러스 작용은 바이러스 감염치료에 이용되고, 항증식작용과 면역조절작용은 암의 치료에 이용된다. 많은 암 환자들이 항암화학요법(항암제치료)에서 실패하는 중대한 요인은 암세포가 항암제에 대해 저항수성(내성)을 갖게되기 때문이다. 따라서 암치료를 높으려면 항암제에 대한 감수성을 증가시키는 것이 중요하다. 항암제의 항종양 효과를 증가시키기 위해 다른 약물을 병용하는 연구가 진행되어 왔는데, 이러한 약물 중 대표적인 것이 인터페론이다.

이에 본 발명자는 상기와 같은 점을 감안하여, 현재 그 중앙억제 효과가 밝혀진 살모넬라와 상기 인터페론감마 유전자를 이용하여 더욱 뛰어난 항암효과를 나타내는 형질도입 살모넬라를 제작하고자 하였다. 특별히 항암효과가 기대되는 인터페론 감마 단백질을 발현하는 벡터를 살모넬라에 형질도입하고 상기 형질도입된 살모넬라를 생체내에 투여하게 되면, 살모넬라 자체의 항암효과와 더불어 살모넬라 안에서 생체내로 투여되는 인터페론감마 단백질에 의한 항암효과가 더해져 기존의 각각의 항암효과보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 보여줄 것으로 기대되었기 때문이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 항암효과를 유도하는 인터페론감마를 발현하는 살모넬라 균주를 제공하는데 있다.

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

발명의 구성

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인터페론감마 발현벡터로 형질도입된 것을 특징으로 하는 약독화된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 제공한다.

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.

본 발명에 있어서, 상기 약독화된 살모넬라 균주는 장티푸스 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.

장티푸스 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).

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 백신으로 사용하였다.

본 발명에 있어서, 상기 인터페론 감마를 코딩하는 유전자는 상용화된 어떤 인터페론 감마 발현 플라스미드로부터도 입수할 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 상기 인터페론 감마를 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 1에 도시된 pGEM-T IFNg인 것을 특징으로 한다.

본 발명에 있어서, 바람직하게는 한국미생물보존센터에 2005년 12월 28일자로 기탁된 KCCM-10735P인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 살모넬라 균주를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암치료용 조성물을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 암의 종류는 인터페론이 항암작용을 할 수 있는 어떤 암도 될 수 있으나, 바람직하게는 피부암인 것을 특징으로 한다.

본 발명의 상기 목적은 인터페론감마 단백질의 발현백터를 약독화된 살모넬라에 형질도입함으로써 본 발명의 살모넬라를 제작하고, 피부암 세포인 B16F10 암세포주를 이식한 C57/BL6 마우스 모델에 상기 형질도입 살모넬라를 투여하여, 그에 의한 항암효과를 FLT3 리간드를 포함하지 않는 다른 살모넬라 대조구에 의한 효과와 비교 분석하여 확인함으로써 달성하였다.

본 발명을 위해 사용된 살모넬라 균주는 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*) BRD 509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이며, 상기 균주내에 형질도입된 인터페론감마 단백질유전자를 포함하는 발현백터는 pGEM-T (PROMEGA, USA)로부터 골격으로 만들었다. 상기 pGEM T 백터는 PCR 산물의 클로닝을 위해 당업계에서 가장 많이 사용되는 시스템이다.

본 발명에서 항암효과를 유도하는 인터페론감마 단백질을 발현하는 살모넬라 균주는 당업계에서 통상 사용되는 형질도입 방법에 의해 제조 가능하며, 제조된 살모넬라는 암피실린 내성을 가진 살모넬라 균주로, 체내에 도입될 때 인터페론감마 단백질을 분비할 수 있다.

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.

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.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<실시예 1: 인터페론감마 단백질 발현백터의 제작>

백터는 다음과 같이 제조하였다. M45 epitope tag(MDRSRDRLPPFETETRIL) 은 아데노바이러스의 E4-6/7 단백질에서 유래한다. M45의 유전정보를 가지고 있는 플라스미드를 주형으로 epitope tag를 PCR로 증폭시킨다(forward primer, M45L-Xho I 5'-tctagaaccaccatgcatcgagtag-3'; reverse primer, M45R-SacI 5'-gagctcaggttccttcacaaagatcctc-3'). PCR로 얻은 이 DNA 단편을 pGEM T-easy 백터(PROMEGA, USA)의 Xho I 과 Sac I 부위에 클로닝 한다.

Lac 프로모터와 UK-1(wild type 살모넬라)을 이용하여 얻은 SipB 아미노산의 160 N말단부위 PCR 산물을 pGEM T-easy 백터에 클로닝 하였다. 그 다음에 이 클로닝 된 플라스미드를 제한효소 EcoRV와 BglII로 자른 후 프로모터의 C말단에 퓨전시킨다. Lac 프로모터-sipB를 포함하는 플라스미드를 제한효소 Spe I 과 BglII로 자른 후 아가로스 겔에 전기영동한 후 분리하여 M45 부위를 퓨전시킨다. 지금까지 과정으로 Lac프로모터-sipB160/M45의 플라스미드가 만들어진다.

그다음으로 전복대 사이토카인은행으로부터 분양받은 인터페론감마유전자가 포함된 플라스미드로(SERVICE NO. G25) 부터 PCR을 통해 인터페론 감마 유전자를 증폭시킨다(forward primer, IFNgF BglII 5'-cccagatctatgtgttactgccacggc-3'; reverse primer, IFNgR Xho I 5'-ccctcgagtcagcagcgactcctttt-3'). 이 PCR 산물과 Lac프로모터-sipB160/M45의 플라스미드를 제한효소 BglII와 Xho I 으로 자른 후 전기영동하여 분리한다. 그후 분리된 DNA 조각을 접합하여 클로닝한다. 이렇게 해서 Lac프로모터-sipB160aa/인터페론감마/M45 플라스미드가 제작된다. 도 1은 살모넬라 균주내에서 인터페론 단백질을 발현할수있게 만들어주는 백터의 모식도이다.

<실시예 2: 인터페론감마 단백질 발현백터를 포함하는 살모넬라균주의 제작>

먼저, 약독화된 살모넬라 균주 BRD509(*Salmonella typhimurium* BRD509)를 루리아 별테니(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. 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 μ L의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30 μ L(2 μ g)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 인터페론감마 단백질 분비 벡터 플라스미드인 pGEM-IFNg 벡터를 3 μ L(2 μ g) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다. 그 결과 얻어진 인터페론감마 단백질 발현 살모넬라를 2005년 12월 28일 한국미생물보존센터에 기탁하여 수탁번호 KCCM-10735P를 부여받았다.

<실시예 3: 본 발명 형질도입 살모넬라 균주의 항암물질발현 확인>

제조된 인터페론 감마를 발현하는 살모넬라로부터 항암물질인 인터페론 감마 단백질이 분비되는 것을 ELISA법을 이용하여 확인하고자 하였다. 균주는 루리아 별테니(Luria Bertani) 3ml 배지에서 37℃ 각각배양하였다. 배양후에 세균을 5500rpm의 속도로 원심분리하였다. 상기 원심분리 후 바닥에 가라앉은 세균을 제외한 배양액만을 분리하여 수집하였다. 이수집된 배양액은 제조사의 지시에 따라 IFN-g Instant ELISA kit(Bender MedSystems, Austria)를 이용하여 인터페론감마 단백질의 분비를 확인하였다. 도 2는 제조된 형질도입 살모넬라로부터 인터페론 감마 단백질이 분비되는지를 확인하기 위해 배양후 세균을 제거한 배양액속의 단백질양을 ELISA기법으로 측정된결과를 수치로 표현한것이다. control=정상배지의 측정값(실험의 기준치), SALIFN-g=인터페론감마 단백질발현 살모넬라배양액, SAL509=살모넬라만 배양한 배양액.

<실시예 4: 본 발명 형질도입 살모넬라 균주의 항암효과 확인>

피부 암세포인 B16F10(한국세포주은행)를 PBS 용액 100 μ L에 10⁵ 세포만큼 포함되도록 희석한 후, 암발현 모델로 C57/BL6 마우스(SLC, Japan)를 선택하여 상기 희석액 100 μ L를 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 인터페론감마 단백질발현 살모넬라 균주를 배양하여 10⁶개의 콜로니를 PBS 용액 100 μ L에 희석하였다. 암발생 확인 후 1주일 되는 시점에 상기 PBS 용액을 C57/BL6 마우스의 암이식부위에 피하로 주사하였다. 이후 암세포의 크기변화 및 마우스의 생존률을 측정하여 본 발명 인터페론감마 발현 살모넬라 균주의 항암효과를 확인하였다. 이 때, 대조군으로 다른 쥐에는 PBS 용액만을 처리하였으며, 또 다른 쥐에는 인터페론감마 를 형질도입하지 않은 BRD509 살모넬라 균주를 처리하여 상기와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3a는 마우스에 melanoma (B16F10)암세포를 주입하여 피부암발생을 유도한후 각각의 살모넬라시료를 투여한후 암발생의 변화를 보여주는 도면이다. 도 3b는 도 3a의 암발생상태를 3주 4주 관찰후에 암의 크기를 측정하여 수치로 나타낸 도면이다. 도 3c는 도 3a의 암발생상태를 60일간관찰하여 암에서의 생존률을 수치로 표현한 도면이다. CONTROL=정상암발생마우스, SALIFN-g=인터페론감마 단백질발현 살모넬라처리 마우스, SAL509=살모넬라만 처리한 마우스.

도3a에서, 대조군은 어떤 살모넬라 균주도 처리하지 않고 오직 PBS 용액만 처리한 정상 암모델 쥐에서의 암발현 정도를 보여주며, 실험군SAL509는 인터페론감마 가 포함되지 않은 살모넬라 균주를 처리한 암모델 쥐에서의 암발현 모습을 나타내고 있다. 실험군SALIFN-g는 본 발명의 인터페론감마 발현 살모넬라 균주를 처리한 마우스로서, 피부가 벗겨진 부위가 관찰되는 상기 대조군 및 실험군SAL509 에서의 쥐모습과는 달리 암발현이 억제된 모습을 볼 수 있다. 또한, 도 3a에서의 암발현정도를 버니어캘리퍼스로 암의 가로, 세로 길이를 측정하여 부피로 환산한 도 3b를 보면, 4주까지 경과를 보면 본 발명의 인터페론감마 발현 살모넬라 균주로 처리한 실험군에서의 암부피는 약100mm³로 나타난 반면, PBS 용액 처리구와 BRD509 처리구에서의 암부피는 각각 약3200mm³ 이상 및 약 1200mm³ 정도로 나타나, 본 발명의 인터페론감마 발현 살모넬라 균주가 기존의 살모넬라에 비하여 훨씬 더 뛰어난 항암효과를 보임을 알 수 있었다.

발명의 효과

이상 상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명이 제공하는 인터페론감마 발현 살모넬라 균주는 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 인터페론감마 단백질 발현 벡터를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타내고, 특히 인터페론감마만으로는 효과가 없는 암종, 특히 피부암 및 대장암에 있어서 훨씬 더 탁월한 치료효과를 제공하므로 항암 치료 및 보조 예방제제와 관련한 의약산업에 있어서 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

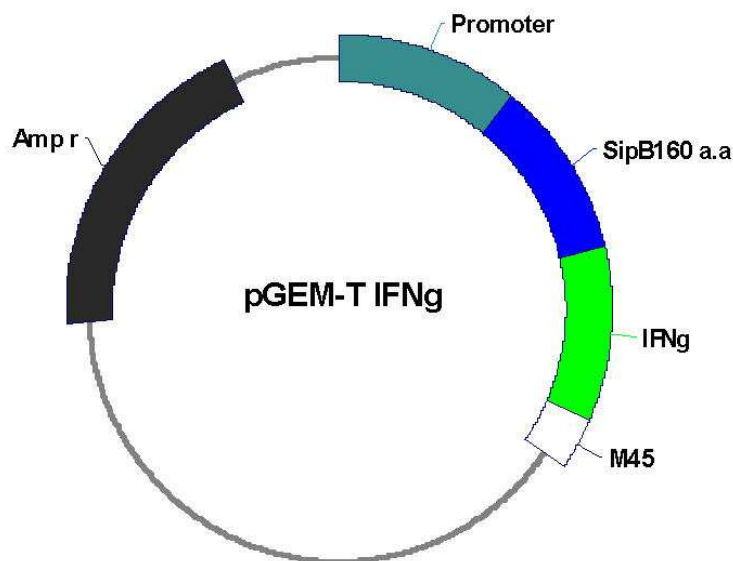
도 1은 인터페론감마를 발현하는 살모넬라를 제조하는데 사용하는 인터페론감마 단백질을 발현하는 pGEM-T IFNg 벡터이다.

도2는 인터페론감마를 발현하는 살모넬라로부터 분리된 인터페론감마 단백질을 배양액에서 검출한 결과를 보여주는 도면이다.

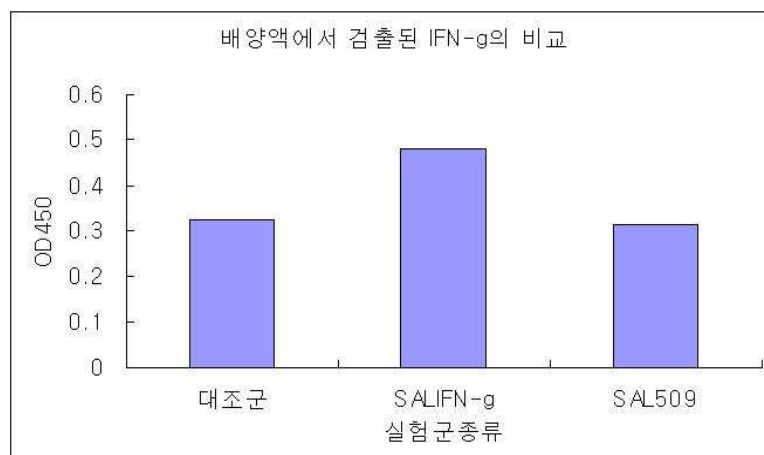
도3은 암이 유발된 마우스(C57BL/6)에서 증식된 피부암종 B16F10에 대하여 인터페론감마를 발현하는 살모넬라의 항암효과를 입증하는 도면이다.

도면

도면1



도면2

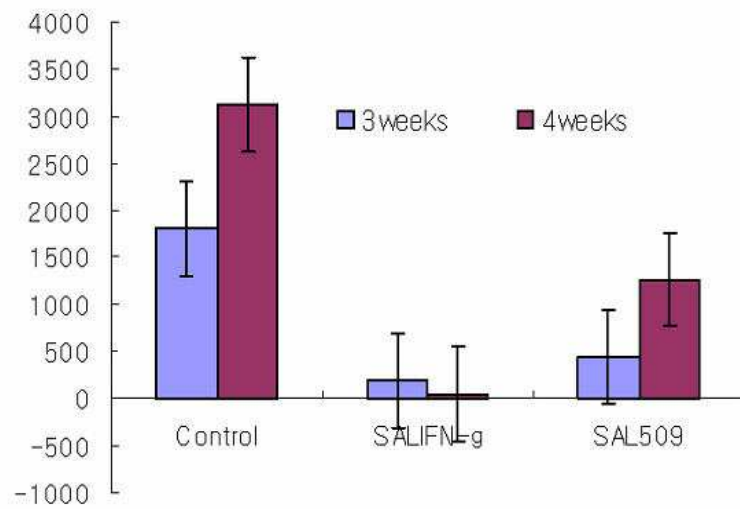


도면3a

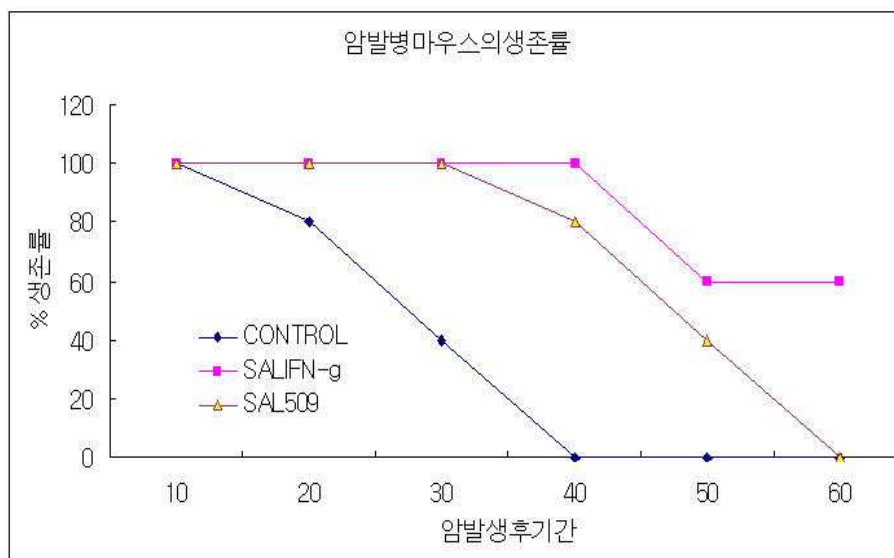


도면3b

암의부피 mm^3



도면3c



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> A bacterium salmonella expressing Interferon gamma protein and an antitumoral composition thereof

<130> PN060001

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Interferon gamma

<400> 1

Met Asn Ala Thr His Cys Ile Leu Ala Leu Gln Leu Phe Leu Met Ala
1 5 10 15

Val Ser Gly Cys Tyr Cys His Gly Thr Val Ile Glu Ser Leu Glu Ser
20 25 30

Leu Asn Asn Tyr Phe Asn Ser Ser Gly Ile Asp Val Glu Glu Lys Ser
35 40 45

Leu Phe Leu Asp Ile Trp Arg Asn Trp Gln Lys Asp Gly Asp Met Lys
50 55 60

Ile Leu Gln Ser Gln Ile Ile Ser Phe Tyr Leu Arg Leu Phe Glu Val
65 70 75 80

Leu Lys Asp Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn Ile Ser Val Ile Glu Ser
85 90 95

His Leu Ile Thr Thr Phe Phe Ser Asn Ser Lys Ala Lys Lys Asp Ala
100 105 110

Phe Met Ser Ile Ala Lys Phe Glu Val Asn Asn Pro Gln Val Gln Arg
115 120 125

Gln Ala Phe Asn Glu Leu Ile Arg Val Val His Gln Leu Leu Pro Glu
130 135 140

Ser Ser Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Arg Cys
145 150 155