

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5635690号
(P5635690)

(45) 発行日 平成26年12月3日(2014. 12. 3)

(24) 登録日 平成26年10月24日(2014. 10. 24)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 35/74 (2006. 01)

A 6 1 K 35/74 D

A 6 1 K 9/127 (2006. 01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 31/616 (2006. 01)

A 6 1 K 31/616

請求項の数 11 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-518259 (P2013-518259)
 (86) (22) 出願日 平成23年6月30日(2011. 6. 30)
 (65) 公表番号 特表2013-530216 (P2013-530216A)
 (43) 公表日 平成25年7月25日(2013. 7. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/004821
 (87) 国際公開番号 W02012/002760
 (87) 国際公開日 平成24年1月5日(2012. 1. 5)
 審査請求日 平成25年1月23日(2013. 1. 23)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0065151
 (32) 優先日 平成23年6月30日(2011. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0063637
 (32) 優先日 平成22年7月1日(2010. 7. 1)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 509191159
 ポステック アカデミー- インダストリー
 ファウンデーション
 大韓民国, ギョンサンブクド 790
 -784, ポハン-シ, ナム-グ,
 ヒョジャードン, サン 31, ポハン
 ユニバーシティー オブ サイエンス
 アンド テクノロジー
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
 (72) 発明者 コ、ヨン スン
 大韓民国 ギョンサンブクド 790-
 751, ポハン-シ, ナム-グ, ジゴク-
 ドン, 4-1003 ギョス アパートメ
 ント

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌由来マイクロベシクルを用いた癌治療及び癌診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

形質転換された細菌由来マイクロベシクルを含む、癌治療用又は癌診断用薬学的組成物であって、前記の形質転換された細菌は、脂質多糖類の毒性が弱化されたグラム陰性菌またはリポタイコ酸の毒性が弱化されたグラム陽性菌である、組成物。

【請求項 2】

前記細菌は癌治療用又は癌診断用物質を発現したりまたは、前記物質を発現するように形質転換された細菌である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物は前記マイクロベシクルによる毒性を抑制させる薬物をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記薬物がポリミキシン B またはアスピリンである、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物は抗癌効能を増加させる薬物をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記薬物がアスピリン、T h 1 7 (T ヘルパー 1 7 細胞) 免疫反応を抑制する薬物、インターロイキン-6 の生成或いは活性を抑制する薬物、血管の生成を抑制する薬物、血管内皮細胞成長因子の生成或いは活性を抑制する薬物、血管内皮細胞成長因子受容体によるシグナル伝達を抑制する薬物、S T A T 3 (Signal transducer and activator of transc

10

20

ription)シグナル伝達を抑制する薬物、抗癌剤からなる群から選ばれるいずれかの一つである、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

癌治療用又は癌診断用マイクロベシクルを製造する方法であって、下記の段階を含む方法：

(a) 形質転換された細菌を含む懸濁液に薬物を添加し、前記形質転換された細菌と前記薬物を含む混合懸濁液を取得する段階であって、前記の形質転換された細菌は、脂質多糖類の毒性が弱化されたグラム陰性細菌またはリポタイコ酸の毒性が弱化されたグラム陽性菌である、段階及び

(b) 前記混合懸濁液から分泌される前記薬物が負荷されたシェディング(shedding)マイクロベシクルを分離する段階。

【請求項8】

癌治療用又は癌診断用細菌由来マイクロベシクルを製造する方法であって、下記の段階を含む方法：

(a) 形質転換された細菌の培養液から分泌されるシェディングマイクロベシクルを分離する段階であって、前記の形質転換された細菌は、脂質多糖類の毒性が弱化されたグラム陰性細菌またはリポタイコ酸の毒性が弱化されたグラム陽性菌である、段階、及び

(b) 前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に薬物を添加して培養する段階。

【請求項9】

前記マイクロベシクル又はシェディングマイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記薬物が負荷されたマイクロベシクル又はシェディングマイクロベシクルを分離する段階をさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記分離段階は密度構造、超遠心分離、濾過、透析及び自由流動電気泳動法よりなる群から選ばれた方法を用いて行われる、請求項7または8に記載の方法。

【請求項11】

癌細胞又は癌組織ヘターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを含む、癌治療用又は癌診断用薬学的組成物であって、前記の形質転換された細菌は、脂質多糖類の毒性が弱化されたグラム陰性細菌またはリポタイコ酸の毒性が弱化されたグラム陽性菌である、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌由来マイクロベシクルを用いて癌を治療及び／又は診断する方法、細菌由来マイクロベシクルの構成成分を用いて癌を治療する方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

1813年、Vautierは、自分の癌患者のうちガス壊疽(gas gangrene)に罹患している患者の癌が治る現象を最初報告した。以後、ガス壊疽がウェルシュ菌(Clostridium perfringenes)という嫌気性(anaerobic)細菌により発生するという事実が明らかになった。細菌で癌を治すことができるという概念に基づいて、ウェルシュ菌以外に、サルモネラ菌(Salmonella typhimurium)を含む多様な種の細菌を対象として研究が盛んに行われてきた。癌が成長して一定のサイズ(約1mm³)以上になると、周辺血管からの酸素供給が円滑に行われないことにより、癌組織の内部は低酸素症(Hypoxia)状態に落ちる。このような低酸素症状態の癌組織は、容易に嫌気性(anaerobic)細菌が生きて増殖することが可能な環境を提供し、細菌が持っている多様な毒素及び知られていない様々なメカニズムを介して周辺の癌細胞を攻撃して癌を壊死させる。細菌の抗癌効果を増進させるために、細菌で抗癌タンパク質を発現するように形質転換させる試み、或いは細菌を用いて、抗癌タンパク質遺伝子を持っているプラスミドを癌組織に伝達する試みが行われた。また、細菌の増殖及び細菌の毒素により生ずる副作用を緩和させるために、栄養要求性変異株(aux

10

20

30

40

50

otrophic mutant)、孢子(spore)、及び弱毒化(attenuated)細菌を用いて癌の治療に適用しようとする試みも行われた。ところが、このような努力にも拘らず、細菌を用いて抗癌治療を行おうとした試みは、癌組織だけでなく周辺及び重要正常臓器で細菌が増殖する問題点などがあった。

【0003】

細菌は、通称「バクテリア」を意味し、グラム陰性菌とグラム陽性菌を含む。今まで大腸菌(*Escherichia coli*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitides*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、及び赤痢菌(*Shigella Flexneri*)などのグラム陰性菌の細胞外膜からシェディング(shedding)マイクロベシクル(microvesicle)が自然に分泌されるものと知られている。前記グラム陰性菌から分泌されるシェディングマイクロベシクルは、外膜小胞(outer membrane vesicle)として知られており、球状を有し、リン脂質二重層からなっており、200~200nmのサイズを有し、リポ多糖類(lipopolysaccharide、LPS)だけでなく宿主の炎症反応を調節することが可能な外膜タンパク質(outer membrane protein)、脂質(lipids)、及び遺伝物質(DNA、RNA)などの多様な生物学的活性を有する物質を持っている。前記細菌由来シェディングマイクロベシクルは、同種間のタンパク質或いは遺伝物質の伝達、細胞シグナル伝達などの情報伝達体としての機能と競争的生物体の除去或いは細菌の生存増進に寄与し、それだけでなく宿主に毒素などを伝達することにより、細菌性疾患の病因現象を調節すると知られている。特に、重症敗血症で死亡した患者の血液からシェディングマイクロベシクルが発見されたという報告は、全身性炎症反応を特徴とする敗血症の病因において炎症の発生にシェディングマイクロベシクルが重要な役割を果たすことができることを示唆する。細菌由来シェディングマイクロベシクルが宿主細胞を刺激して炎症性サイトカイン(inflammatory cytokine)及び凝固誘導物質(coagulant)の分泌を誘導するという研究結果は、これを裏付ける。

【0004】

枯草菌(*Bacillus subtilis*)及び黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を含むグラム陽性菌もシェディングマイクロベシクルを分泌するという事実を本発明者が初めて解明したが、グラム陽性菌由来シェディングマイクロベシクルの構成成分や機能などに関する研究は初歩的な水準に止まっている。

【0005】

現在まで多様な種類の細菌から自然に分泌されるシェディングマイクロベシクルが観察、分離された。一般に、シェディングマイクロベシクルは、細菌培養液から濾過(filtration)と超遠心分離(ultracentrifugation)の方法によって分離されている。また、細菌にゲンタマイシン(gentamicin)などの抗生剤を処理してシェディングマイクロベシクルの生成を調節しうることが知られている。特に洗剤(detergent)を処理して作ったシェディングマイクロベシクルは、細菌性感染疾患中の一つである髄膜炎菌(*N.meningitidis*)の感染に対してワクチンとしての応用可能性が提起されている。しかし、上述の方法で製造することが可能な量には限界がある。

【0006】

癌と細菌との関連性があるにも拘らず、未だ癌の発生及び進行における細菌由来シェディングマイクロベシクルの役割に対する報告は全くない状態であり、特に細菌由来シェディングマイクロベシクルを癌の治療及び／又は診断に適用した事例は今まで報告されたことがない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者は、上述した従来の問題点を解決するために研究した結果、細菌又は形質転換された細菌に由来するマイクロベシクルが含まれた組成物を投与して癌の成長を効果的に抑制することができることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

そこで、本発明は、細菌由来マイクロベシクルを用いて癌を治療及び／又は診断する方

法、前記マイクロベシクルを用いて癌を治療するにあたってその副作用を減少させ且つ抗癌治療効能を増加させる方法、及び前記マイクロベシクルに疾病治療用又は診断用薬物を負荷(loading)して疾病を治療し或いは特異細胞又は組織に薬物を効率よく伝達する方法などを提供しようとする。

【0009】

ところが、本発明が解決しようとする技術的課題は上述した課題に制限されず、上述していない別の課題は以降の記載から当業者に明確に理解できるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の一側面によれば、細菌由来マイクロベシクルを含む癌治療及び／又は癌診断用薬学的組成物を提供する。本発明に使用される細菌は、自然に存在する細菌及び遺伝的に形質転換された細菌を含み、また、グラム陰性菌及びグラム陽性菌を含む。前記組成物は、前記マイクロベシクルの毒性を抑制する薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などをさらに含むことができる。

10

【0011】

前記ナノ粒子治療剤は、10nm～10μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(microvesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

【0012】

本発明の他の側面は、前記細菌由来マイクロベシクルを個体に投与する段階を含む、癌治療及び／又は癌診断方法を提供する。前記マイクロベシクルは、その副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などと併用／順次投与することができる。

20

【0013】

本発明の別の側面は、癌治療及び／又は癌診断用細菌由来マイクロベシクルを製造する方法を提供する。前記細菌由来マイクロベシクルの製造方法は、細菌から自然に分泌されるシェディングマイクロベシクル及び人工(artificial)マイクロベシクルを製造する方法を含む。

【0014】

前記癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクルの製造方法の一具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液に薬物を添加し、前記細菌又は形質転換された細菌と前記薬物を含む混合懸濁液を収得する段階、及び前記混合懸濁液から分泌される前記薬物が負荷されたシェディングマイクロベシクルを分離する段階。

30

【0015】

前記癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクルの製造方法の別の具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌の培養液から分泌されるシェディングマイクロベシクルを分離する段階、及び前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に薬物を添加して培養する段階。前記シェディングマイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記癌治療用又は癌診断用物質が負荷されたシェディングマイクロベシクルを分離する段階をさらに含むこともできる。

40

【0016】

前記癌治療用又は癌診断用人工マイクロベシクルの製造方法の一具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液に薬物を添加し、前記細菌又は形質転換された細菌と前記薬物を含む混合懸濁液を収得する段階、前記混合懸濁液を押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍－解凍、電気穿孔、機械的分解、及び化学物質処理よりなる群から選ばれた方法を用いて人工マイクロベシクルを製造する段階、及び前記人工マイクロベシクルを分離する段階。

【0017】

前記癌治療用又は癌診断用人工マイクロベシクルの製造方法の別の具現例として、下記

50

の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液を押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍－解凍、電気穿孔、機械的分解、及び化学物質処理よりなる群から選ばれた方法を用いて人工マイクロベシクルを製造する段階、前記人工マイクロベシクルを分離する段階、及び前記分離された人工マイクロベシクルを含む懸濁液に薬物を添加して培養する段階。前記人工マイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記癌治療用又は癌診断用物質が負荷された人工マイクロベシクルを分離する段階をさらに含むこともできる。

【0018】

前記方法で製造された癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクル又は人工マイクロベシクルは、抗生剤処理、紫外線曝露、ガンマ線曝露、及びフィルタリングよりなる群から選ばれた方法を用いてマイクロベシクルを殺菌する段階を含むこともできる。

10

【0019】

本発明の別の側面は、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む薬学的組成物を提供する。

【0020】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティング(targeting)されるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを含む、癌治療用又は癌診断用薬学的組成物を提供する。

【0021】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを含む、癌治療及び／又は癌診断用薬物を癌細胞又は癌組織に伝達する方法を提供する。

20

【0022】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを含む、癌治療及び／又は癌診断方法を提供する。

【0023】

本発明の別の側面は、疾病治療用及び／又は診断用物質が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む、疾病治療用及び／又は診断用物質伝達用組成物を提供する。

30

【0024】

本発明の別の側面は、疾病治療用及び／又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを使用することを特徴とする、疾病治療用及び／又は診断用薬物を伝達する方法を提供する。

【0025】

本発明の別の側面は、特定の細胞又は特定の組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、疾病治療用及び／又は疾病診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを特徴とする、疾病治療用及び／又は疾病診断用物質を特定の細胞又は特定の組織に伝達する方法を提供する。

【0026】

40

本発明の別の側面は、疾病治療用又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを標的細胞又は組織に伝達する段階を含む、疾病治療及び／又は診断方法を提供する。

【0027】

本発明の別の側面は、疾病治療用又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを用いた疾病診断用及び／又は治療用薬物伝達システムを提供する。

【0028】

本発明の別の側面は、疾病診断用物質が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む疾病診断用キットを提供する。

【0029】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうちタンパク質を含む癌

50

治療用方法を提供する。本発明に使用されるタンパク質は、グラム陰性菌及びグラム陽性菌に由来するタンパク質などを含む。前記方法は、前記マイクロベシクル由来構成成分の副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤及び細胞治療剤などをさらに含むことができる。

【0030】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち核酸を含む癌治療用方法を提供する。本発明に使用される核酸は、グラム陰性菌及びグラム陽性菌に由来する核酸などを含む。前記方法は、前記マイクロベシクル由来核酸の副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などをさらに含むことができる。

10

【0031】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち脂質を含む癌治療用方法を提供する。本発明に使用される脂質は、グラム陰性菌及びグラム陽性菌に由来する脂質などを含む。前記方法は、前記マイクロベシクル由来脂質の副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などをさらに含むことができる。

【0032】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち2種以上を含む癌治療用方法を提供する。前記方法は、前記マイクロベシクル由来構成成分の毒性を抑制する薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などをさらに含むことができる。

20

【0033】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうちタンパク質を再構成(reconstitution)したナノ粒子治療剤を製造して抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0034】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち核酸をナノ粒子治療剤に挿入して抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0035】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち脂質を再構成(reconstitution)したナノ粒子治療剤を製造して抗癌治療に使用する方法を提供する。

30

【0036】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち2種以上の構成成分を挿入又は再構成(reconstitution)したナノ粒子治療剤を製造して抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0037】

本発明の別の側面は、前記細菌由来マイクロベシクルの構成成分を個体に投与する段階を含む、癌治療方法を提供する。前記マイクロベシクルの構成成分は、その副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などと併用／順次投与することができる。

【0038】

前記ナノ粒子治療剤は、10 nm～10 μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(microvesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

40

【0039】

前記タンパク質は、細菌由来マイクロベシクルを構成する一つの要素であって、水溶性タンパク質、脂溶性タンパク質、又は膜タンパク質などを含むことができるが、これに限定されない。

【0040】

前記核酸は、細菌由来マイクロベシクルを構成する一つの要素であって、DNA又はRNAなどを含むことができるが、これに限定されない。

50

【発明の効果】

【0041】

本発明に係る前記細菌由来マイクロベシクルを使用することにより、既存の抗癌剤の副作用を減らして疾病治療過程における患者の苦痛及び不便を減らすことができる。

【0042】

既存の抗癌剤は、増殖する細胞に非特異的(non-specific)に作用して細胞毒性をもたらすことにより、深刻な毒性が問題となっており、既存の抗癌剤投与方法では癌細胞又は癌組織に特異的に薬物を伝達することができないため、癌が発生した臓器以外にも薬物が伝達されて深刻な副作用が問題となっている。最近、人口の高齢化に伴い、高齢者における癌の発生が大きな問題となっている。ところが、癌の成長をまともに制御しない免疫機能異常が癌の発生及び進行の重要な原因であるが、未だ癌の成長を効率よく抑制する防御メカニズムを向上させて癌を治療しようとする事例が希な実情である。

10

【0043】

本発明に係る細菌由来マイクロベシクルを用いて癌の成長を効率よく抑制することができる。癌血管、癌細胞又は癌組織へ誘導されるように標的誘導物質(targeting molecule)が負荷された細菌由来マイクロベシクル或いは形質転換された細菌に由来するマイクロベシクルを用いて、標的癌細胞又は癌組織にのみマイクロベシクルを特異的に伝達させることにより、マイクロベシクルによる副作用を最小化することができ、マイクロベシクルに抗癌剤や抗炎症剤などの薬物を含んで投与することにより、効能を極大化させるとともに副作用を最小化することができる。これに加えて、本発明は、細菌を遺伝的、化学的又は機械的方法などで処理してマイクロベシクルの毒性を減少させると共に、治療効能が増加したマイクロベシクルを製造することができる。

20

【0044】

また、本発明の細菌由来マイクロベシクルは、癌を治療すると同時に癌を診断することができるという利点がある。特に、標的の癌細胞又は癌組織へターゲティングされるように形質転換された細菌由来マイクロベシクルを使用し、或いは癌細胞及び癌組織へターゲティングされる物質を細菌由来マイクロベシクルに露出(display)させ、又は外部から感知することが可能な物質、例えば蛍光物質などを含むマイクロベシクルを使用すると、細菌由来マイクロベシクルが有する抗癌治療効果を得ることができるうえ、癌を同時に診断することができるという利点がある。

30

【0045】

また、本発明の細菌由来マイクロベシクルは、癌以外の疾病に対してもその治療用又は診断用物質を目的の細胞又は組織に特異的に伝達して疾病治療の効率を高め且つ診断を容易にすることに利用できる。

【0046】

また、本発明の細菌由来マイクロベシクルは、量産(mass production)が可能で、広い範疇の個体に適用することができる。

【0047】

また、細菌が発現する標的誘導物質、治療用物質、又は診断用物質は単一物質の精製過程なしで細菌由来マイクロベシクルの表面及び／又は内部に負荷することができ、負荷された物質は本来の機能を効果的に行うことができる。

40

【0048】

また、疾病治療用及び／又は診断用物質が負荷された本発明の細菌由来マイクロベシクル及びその製造方法は、*in vitro*及び／又は*in vivo*で治療及び／又は診断用、又は実験用として使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】グラム陰性菌の大腸菌から押出法によって人工マイクロベシクルを製造して透過電子顕微鏡で観察したイメージである。

【図2】大腸癌動物モデルにおけるグラム陰性菌の大腸菌由来シェディングマイクロベシ

50

クル(*E. coli* MV)による抗癌治療効果(tumor volume)を示すものである。

【図3】大腸癌動物モデルにおけるグラム陰性菌の緑膿菌由来シェディングマイクロベシクル(*P. aeruginosa* MV)による抗癌治療効果(tumor volume)を示すものである。

【図4】大腸癌動物モデルにおけるグラム陰性菌のサルモネラ菌由来シェディングマイクロベシクル(*S. enteritidis* MV)による抗癌治療効果(tumor volume)を示すものである。

【図5】大腸癌動物モデルにおけるグラム陽性菌のブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル(*S. aureus* MV)による抗癌治療効果(tumor volume)を示すものである。

【図6】大腸癌動物モデルにおけるグラム陽性菌のラクトバチルス菌由来シェディングマイクロベシクル(*L. acidophilus* MV)による抗癌治療効果(tumor volume)を示すものである。

10

【図7】野生型大腸菌(wild type)とリポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌(mutant)由来シェディングマイクロベシクル(*E. coli* MV)の抗癌治療効果(tumor volume)を大腸癌動物モデルで比較したものである。

【図8】野生型ブドウ球菌(wild type)とリポタイコ酸の毒性が弱化するように形質転換されたブドウ球菌(mutant)由来シェディングマイクロベシクル(*S. aureus* MV)の抗癌治療効果(tumor volume)を大腸癌動物モデルで比較したものである。

【図9】黒色腫転移癌動物モデルにおける、リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant *E. coli* MV)による抗癌治療効果(コロニーの数)を示すものである。

【図10】大腸癌動物モデルにおける、リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(MV)による抗癌治療効果に対するアスピリン(ASA)併用投与の効果を評価したものである。

20

【図11】緑色蛍光(DiO)で標識されたリポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant *E. coli* MV)にドキソルビシンを負荷した結果を示すものである。

【図12】ドキソルビシン(Doxo)を負荷したリポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(MV+Doxo)のマウス大腸癌26細胞株に対する抗癌効果を評価したものである。

【図13】大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(*E. coli* MV)による副作用(全身性炎症反応による死亡)の発生に対するポリミキシンB(PMB)効果を示すものである。

30

【図14】野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(wild type MV)とリポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant MV)による副作用(全身性炎症反応による死亡)発生の差異を比較したものである。

【図15】リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant *E. coli* MV)を静脈注射したときの血小板(platelet)数の変化を測定したものである。

【図16】リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant *E. coli* MV)を静脈注射したときのD-ダイマー(D-dimer)生成量を測定したものである。

【図17】リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant MV)を血液培地に分注して生育したときの赤血球の溶解現象を観察したものである。

40

【図18】野生型ブドウ球菌(wild type)由来シェディングマイクロベシクルとリポタイコ酸の毒性が弱化するように形質転換されたブドウ球菌(mutant)由来シェディングマイクロベシクル(*S. aureus* MV)による副作用(炎症細胞からIL-6分泌)発生の差異を比較したものである。

【図19】大腸癌動物モデルにおける、リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(MV)による副作用(全身性炎症反応の指標である抹消血液中の白血球の数(WBC count))の発生に対するアスピリン(ASA)併用投与の効果を示すものである。

50

【図20】大腸癌動物モデルにおける、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(mutant E. coli MV)を用いて100nmサイズの蛍光ビーズを癌組織へ伝達する効果を示すものである。

【図21】大腸癌動物モデルにおける、細菌由来シェディングマイクロベシクルの主要外膜タンパク質であるOmpAタンパク質(OmpA)による抗癌効果(tumor volume)を示すものである。

【図22】大腸癌動物モデルにおける、細菌由来シェディングマイクロベシクルの別の主要外膜タンパク質であるOmpF(OmpF-)が欠如している形質転換大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(E. coli MV)による抗癌効果(tumor volume)を野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクル(WT)の抗癌効果と比較して示すものである。

【図23】細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうちOmpAタンパク質をナノ粒子伝達体としてのリポソーム(liposome)に再構成(reconstitution)した後、リポソームにおけるOmpAを確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本発明は、細菌由来マイクロベシクルを含む、癌治療及び／又は診断用薬学的組成物を提供する。

【0051】

本発明に使用される細菌は、グラム陰性菌及びグラム陽性菌を含む。前記グラム陰性菌は大腸菌、緑膿菌及びサルモネラ菌などを含み、グラム陽性菌はブドウ球菌及びラクトバチルス菌などを含むが、これに限定されない。

【0052】

本発明における「細菌」は、自然に存在する細菌又は形質転換された細菌を含む。具体的に、前記形質転換された細菌は、前記マイクロベシクルの毒性が弱化するよう形質転換された細菌を含み、その例として内毒素(endotoxin)生成遺伝子変形細菌を挙げることができる。また、特異細胞又は組織へターゲティングされるよう形質転換された細菌を含み、その例として癌血管、癌組織又は癌細胞へターゲティングされるよう形質転換された細菌を挙げることができる。これに加えて、本発明で使用される細菌は、標的細胞の細胞膜と融合(fusion)するよう形質転換された細菌、疾病治療用及び／又は診断用物質が発現するよう形質転換された細菌、及び前記特定物質の抑制と特定物質の発現が同時に起こるよう形質転換された細菌などを含む。ところが、本発明の細菌由来マイクロベシクルを製造する細菌はこれに限定されない。

【0053】

前記細菌は、物質処理又は遺伝子導入によって形質転換されたものであってもよく、2回以上形質転換されたものであってもよい。

【0054】

前記本発明の一具現例において、前記細菌は、一つ以上の特定タンパク質の発現を抑制するよう形質転換されたものであってもよい。

【0055】

前記本発明の一具現例において、前記細菌は、細胞接着分子(cell adhesion molecule)、抗体、標的誘導(targeting)タンパク質、細胞膜融合(fusion)タンパク質、又はこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上を発現するよう形質転換されたものでありうるが、これに限定されない。

【0056】

本発明の「細菌由来マイクロベシクル」は、細菌から自然に分泌される「シェディングマイクロベシクル」、及び細菌から遺伝的、化学的又は機械的方法などを用いて人為的に製造された「人工マイクロベシクル」を含む。

【0057】

本発明の「細菌由来マイクロベシクル」は、由来する細菌の細胞膜成分からなる脂質二重膜によって内部と外部が区分され、細菌の細胞膜脂質(plasma membrane lipid)、細胞

10

20

30

40

50

膜タンパク質(plasma membrane protein)、核酸(nucleic acid)及び細菌成分などを持っており、元来細菌より大きさが小さいものを意味するが、これに限定されない。

【0058】

本発明のシェディングマイクロベシクルは、多様な方法によって得ることができ、その例を紹介すると、下記のとおりであるが、これに限定されない。

【0059】

(1) 細菌又は形質転換された細菌を培養し、その培養液を濾過及び超遠心分離してシェディングマイクロベシクルを得ることができる。

【0060】

(2) 細菌又は形質転換された細菌に洗剤を処理し、その培養液を濾過及び超遠心分離してシェディングマイクロベシクルを得ることができる。前記洗剤には制限がない。

10

【0061】

(3) 細菌又は形質転換された細菌に抗生剤を処理し、その培養液を濾過及び超遠心分離してシェディングマイクロベシクルを得ることができる。前記抗生剤は、制限がなく、ゲンタマイシン、アンピシリン(ampicillin)、カナマイシン(kanamycin)などを含む。

【0062】

本発明の人工マイクロベシクルは、細菌を含む懸濁液を押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍-解凍、電気穿孔、機械的分解、及び化学物質処理よりなる群から選ばれた方法を用いて製造することができるが、これに限定されない。

【0063】

20

本発明の一具現例において、前記細菌由来マイクロベシクルの膜が前記細菌の細胞膜以外の成分をさらに含むことができる。

【0064】

前記細胞膜以外の成分として、標的誘導物質、細胞膜融合物質(fusogen)、シクロデキストリン(cyclodextrin)、ポリエチレングリコール(polyethyleneglycol)などを含むことができる。また、前記細胞膜以外の成分は、多様な方法によって追加でき、細胞膜の化学的変形などを含む。

【0065】

例えば、前記細菌由来マイクロベシクルの膜成分がチオール基(—SH)又はアミン基(—NH₂)を用いた化学的方法で変形されたもの、或いは細菌由来マイクロベシクルにポリエチレングリコールを化学的に結合させることにより前記細菌由来マイクロベシクルの膜成分が化学的に変形されたものでありうる。

30

【0066】

本発明の細菌由来マイクロベシクルの製造の際に、前記細菌由来マイクロベシクルの膜成分を化学的に変形させる段階をさらに含むことができる。

【0067】

本発明の一具現例として、前記薬学的組成物は、前記マイクロベシクルによる毒性を抑制させる薬物をさらに含むことができる。また、前記薬物をマイクロベシクルに負荷することもできる。前記薬物は内毒素による毒性を抑制する薬物を含み、その例としてポリミキシン(polymyxin) Bを挙げることができる。

40

【0068】

本発明の別の具現例として、前記薬学的組成物は、抗癌効能を増加させる薬物をさらに含むことができる、また、前記薬物をマイクロベシクルに負荷することもできる。前記薬物は、Th17 (Tヘルパー17細胞)免疫反応を抑制する薬物、インターロイキン(interleukin、IL) - 6の生成或いは活性を抑制する薬物、血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)の生成或いは活性を抑制する薬物、STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)シグナル伝達を抑制する薬物、抗癌剤、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、癌治療のための細胞治療剤などを含む。Th17免疫反応を抑制する薬物の例としてはアスピリン(aspirin)を挙げることができ、VEGFの生成或いは活性を抑制する薬物の例としてはVEGF受容体によるシグナル伝

50

達を抑制する薬物を挙げることができる。抗癌剤を負荷したリポソームの例としてはDOXILを挙げることができる。

【0069】

前記ナノ粒子治療剤は、10nm～10μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(microvesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

【0070】

本発明における前記薬学的組成物は、有効成分以外に、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。すなわち、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、シクロデキストリン、デキストロース(dextrose)溶液、マルトデキストリン(maltodextrin)溶液、グリセロール(glycerol)、エタノール(ethanol)、リポソーム(liposome)及びこれらの成分のうち少なくとも1種を混合して使用することができ、必要に応じて他の通常の添加剤、例えば抗酸化剤、緩衝液などをさらに含むことができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び／又は潤滑剤をさらに添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などの注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒又は錠剤に製剤化することができる。ひいては、当該技術分野の適正方法で、或いはレミントンの文献(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)に開示されている方法を用いて各成分に応じて好ましく製剤化することができる。本発明の薬学組成物は、剤形に特別な制限はないが、注射剤又は吸入剤に製剤化することが好ましい。

【0071】

本発明の薬学的組成物の投与方法は、特に限定されるものではないが、目的する方法に応じて静脈内、皮下、腹腔内、吸入又は局所適用のように非経口投与又は経口投与することができる。投与量は患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄率、及び疾患の重症度などによってその範囲が異なる。1日投与量は、治療を必要とする個体に投与されることにより軽減した疾病状態に対する治療に十分な本発明の治療用物質の量を意味する。治療用物質の効果的な量は、特定の化合物、疾病状態及びその深深度、治療を必要とする個体によって異なる。これは当業者によって通常決定できる。非制限的例として、本発明に係る組成物の人体に対する投与量は、患者の年齢、体重、性別、投与形態、健康状態、及び疾患程度によって異なる。体重70kgの成人患者を基準とするとき、一般には0.1～1000mg/日、好ましくは1～500mg/日であり、一定の時間間隔で1日1回ないし数回に分けて投与することもできる。

【0072】

本発明の別の側面は、前記細菌由来マイクロベシクルを個体に投与する段階を含む、癌治療及び／又は癌診断方法を提供する。

【0073】

本発明において、「個体」とは、特定の疾患（例えば、癌、血管疾患、又は炎症性疾患など）の治療を必要とする対象を意味し、より具体的にはヒト又は非ヒトの霊長類、マウス、ラット、犬、猫、馬及び牛などの哺乳類を意味する。

【0074】

本発明における「癌」とは、正常な細胞死滅のバランスが崩れる場合、細胞が過剰増殖し且つ周辺組織に浸潤することができる特徴を持つ疾病群をいう。肺癌、喉頭癌、胃癌、大腸／直腸癌、肝癌、胆嚢癌、膵臓癌、乳癌、子宮頸癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌などの上皮細胞などに由来する癌腫(carcinoma)、骨肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、線維細胞肉腫などの結合組織細胞に由来する肉腫(sarcoma)、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫などの造血細胞に由来する血液癌、及び神経組織に発生する腫瘍などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

【0075】

本発明における「血管疾患」は、血管内或いは血管壁に代謝性、感染性、毒性又は免疫性原因によって血管内或いは血管壁に障害が発生する疾患群である。動脈硬化症（或いは粥状硬化症）、狭心症、急性心筋梗塞、脳卒中、血管性痴呆、その他の虚血性血管疾患な

どの代謝性血管疾患、敗血症、播種性血管内凝固(disseminated intravascular coagulation)、血栓／塞栓症、血管炎、糸球体腎炎、急性呼吸不全症候群、肺気腫などの感染性、毒性、又は免疫性血管疾患などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

【0076】

本発明における「炎症」は、体液が組織細胞の間に増加して現れる浮腫、血管拡張による充血、発熱物質と血管拡張による発熱、アラキドン酸(arachidonic acid)の代謝産物による疼痛現象などの症状又は症候として現われ、時間によって急性炎症、亜急性炎症、慢性炎症に分類することができ、病態生理によって感染性炎症、アレルギー性炎症、自己免疫性炎症、毒性炎症、代謝性炎症、外傷性炎症疾患に分類することができる。鼻炎、副鼻腔炎、中耳炎、鼻咽喉炎、喉頭炎、気管支炎、喘息、慢性閉鎖性肺疾患、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、肺線維化などの呼吸器系炎症疾患、口腔炎、食道炎、胃炎、消化性潰瘍、過敏成長症候群、炎症性腸疾患、胆嚢炎、胆道炎、膵臓炎、肝炎などの消化器系炎症疾患、アトピー皮膚炎、乾癬などの皮膚炎症疾患、心内膜炎、心筋炎、心嚢炎、血管炎、動脈硬化症、敗血症などの心血管系炎症疾患、甲状腺炎、副甲状腺炎、糖尿病などの内分泌系炎症疾患、糸球体腎炎、腎症、間質性腎炎、睾丸炎、卵巣炎、子宮内膜炎、膣炎などの泌尿生殖系炎症疾患、リウマチ性関節炎、脊椎関節病、骨関節炎、痛風、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、筋病、シェーグレン症候群、ベーチェット病、抗リン脂質症候群などの筋骨格系炎症疾患、血管性痴呆、アルツハイマー病、退行性脳疾患、うつ病、精神分裂症などの脳精神系炎症疾患などよりなる群から、本発明が治療しようとする標的が選択できるが、これに限定されない。

【0077】

前記本発明の方法で使用される細菌及び細菌由来マイクロベシクルは、前述したとおりである。

【0078】

本発明の一具現例として、前記方法は、前記マイクロベシクルの副作用を減少させるために、薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを使用することができる。

【0079】

前記細菌由来マイクロベシクルの副作用を減少させるためには、下記の多様な方法が使用できる。

【0080】

(1) 細菌の毒性が弱化するよう遺伝的に形質転換された細菌を用いてマイクロベシクルを製造することができる。例えば、宿主の炎症反応を媒介するリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された細菌(msbB mutant)、又はリポタイコ酸(lipoteichoic acid、LTA)の毒性が弱化するよう形質転換された細菌(LTA mutant)を用いてマイクロベシクルを製造することができる。

【0081】

(2) 内毒素の活性を抑制させる薬物を用いて細菌の毒性を減少させることができる。前記薬物の一例としてポリミキシンBを挙げることができる。前記薬物は細菌由来マイクロベシクルと併用投与してもよく、培養の際に薬物を処理した細菌からマイクロベシクルを製造することもできる。

【0082】

(3) 抗炎症及び／又は抗凝固作用をする薬物を用いて副作用を減少させることができる。前記薬物はアスピリンを含む。細菌由来マイクロベシクルとアスピリンを併用投与すると、細菌由来マイクロベシクルによる炎症反応、血液凝固反応などの副作用を防止することができる。また、培養の際に前記薬物を処理した細菌からマイクロベシクルを製造することもできる。

【0083】

(4) 前記マイクロベシクルの膜成分に化学的方法で変形を加えて使用することができる。例えば、前記マイクロベシクルの膜成分をチオール基又はアミン基を用いた化学的方

10

20

30

40

50

法で変形させて使用し、或いは前記マイクロベシクルにポリエチレングリコールを化学的方法で結合させることにより前記マイクロベシクルの膜成分を化学的に変形させて使用することができる。

【0084】

(5) 殺菌されたマイクロベシクルを使用することにより、生きている細菌の感染を防ぐことができる。例えば、紫外線及びガンマ線を用いた殺菌及びフィルタリングを用いた細菌の除去などを介して、殺菌されたマイクロベシクルを得ることができる。

【0085】

本発明の殺菌由来マイクロベシクルの副作用を減少させる方法は、前記例に限定されず、前記方法それぞれを単独で或いは組み合わせて使用することができる。

10

【0086】

本発明の別の具現例として、抗癌効能を増加させる薬物を負荷したマイクロベシクルを使用することができる。抗癌効能を増加させる薬物は前述したとおりである。

【0087】

また、前記方法の一具現例として、前記マイクロベシクルを個体に投与するとき、前記マイクロベシクルの副作用を減少させる薬物及び／又は抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などを併用投与することができる。

【0088】

前記ナノ粒子治療剤は、10 nm～10 μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(micro vesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

20

【0089】

本発明において、「負荷(loading)」は、必要な物質を細菌由来マイクロベシクルの表面に露出させるか或いは内部に内包(encapsulation)させることを意味するが、これに限定されない。

【0090】

本発明の別の側面は、癌治療及び／又は癌診断用細菌由来マイクロベシクルを製造する方法を提供する。前記細菌由来マイクロベシクルの製造方法は、細菌から自然に分泌されるシェディングマイクロベシクル、及び人工(artificial)マイクロベシクルを製造する方法を含む。

30

【0091】

前記癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクルの製造方法の一具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液に薬物を添加し、前記細菌又は形質転換された細菌と前記薬物を含む混合懸濁液を収得する段階、及び前記混合懸濁液から分泌される前記薬物が負荷されたシェディングマイクロベシクルを分離する段階。

【0092】

前記癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクルの製造方法の別の具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌の培養液から分泌されるシェディングマイクロベシクルを分離する段階；及び前記分離されたマイクロベシクルを含む懸濁液に薬物を添加して培養する段階。前記シェディングマイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記癌治療用又は癌診断用物質が負荷されたシェディングマイクロベシクルを分離する段階をさらに含むこともできる。

40

【0093】

前記癌治療用又は癌診断用人工マイクロベシクルの製造方法の一具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液に薬物を添加し、前記細菌又は形質転換された細菌と前記薬物を含む混合懸濁液を収得する段階；前記混合懸濁液を押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍－解凍、電気穿孔、機械的分解、及び化学物質処理よりなる群から選ばれた方法を用いて人工マイクロベシクルを製造する段階；及び前記人工マイクロベシクルを分離する段階。

50

【0094】

前記癌治療用又は癌診断用人工マイクロベシクルの製造方法の別の具現例として、下記の段階を含む方法を提供する：細菌又は形質転換された細菌を含む懸濁液を押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍－解凍、電気穿孔、機械的分解、及び化学物質処理よりなる群から選ばれた方法を用いて人工マイクロベシクルを製造する段階；前記人工マイクロベシクルを分離する段階；及び前記分離された人工マイクロベシクルを含む懸濁液に薬物を添加して培養する段階。前記人工マイクロベシクルが含まれた懸濁液から、前記癌治療用又は癌診断用物質が負荷された人工マイクロベシクルを分離する段階をさらに含むこともできる。

【0095】

前記方法で製造された癌治療用又は癌診断用シェディングマイクロベシクル又は人工マイクロベシクルは、抗生剤処理、紫外線曝露、ガンマ線曝露、及びフィルタリングよりなる群から選ばれた方法を用いてマイクロベシクルを殺菌する段階を含むこともできる。

【0096】

前記製造方法は、前記細菌より大きさが小さく、前記薬物が負荷されたマイクロベシクルを分離する段階をさらに含むことができる。

【0097】

前記分離段階は、密度勾配(density gradient)、超遠心分離(ultracentrifugation)、濾過(filtration)、透析(dialysis)、及び自由流動電気泳動法(free-flow electrophoresis)よりなる群から選ばれた方法を用いて行われ得る。

【0098】

また、前記本発明の製造方法は、前記細菌の細胞膜と比較してトポロジー(topology)が変形された膜を有するマイクロベシクルを除去する段階をさらに含むことができる。すなわち、マイクロベシクルを製造した後、目的に応じて元来細胞の細胞膜とトポロジーが同一のマイクロベシクルのみを選択して使用することができる。細胞膜タンパク質のうち細胞質ドメインを認知する抗体などの物質を用いて、この細胞質ドメインが外部に露出したマイクロベシクルを除去することができる。このようにすると、細胞膜の内外が入れ替わったマイクロベシクルは除去され、残ったマイクロベシクルの外部には元来細胞の細胞膜の外部に露出した細胞膜タンパク質のみが存在する。

【0099】

本発明の別の側面は、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む薬学的組成物を提供する。

【0100】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを含む、癌治療用又は癌診断用薬学的組成物を提供する。

【0101】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを含む、癌治療用及び／又は癌診断用薬物を癌細胞又は癌組織に伝達する方法を提供する。

【0102】

本発明の別の側面は、癌細胞又は癌組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、癌治療用及び／又は癌診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを含む、癌治療及び／又は癌診断方法を提供する。

【0103】

本発明の別の側面は、疾病治療用及び／又は診断用物質が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む、疾病治療用及び／又は診断用物質伝達用組成物を提供する。

【0104】

本発明の細菌由来マイクロベシクルに負荷される物質は、特に限定されず、例えば、治

10

20

30

40

50

療用及び／又は診断用物質であってもよく、前記細菌又は形質転換された細菌が発現している物質が負荷されてもよく、必要に応じて、前記細菌に由来せず且つ細菌の外部から準備された物質を負荷することもできるが、これに限定されない。すなわち、前記治療用及び／又は診断用物質は、前記細菌に由来するもの、及び細菌の外部から注入されたものなどを含む。また、負荷される物質は1つであってもよく、2つ以上であってもよい。また、前記物質は、細菌由来マイクロベシクルの表面に物理、化学、及び／又は生物学的方法で負荷することができるが、これに限定されない。

【0105】

前記治療及び／又は診断のための多様な物質を本発明の細菌由来マイクロベシクルに負荷する方法は、下記を含む。

10

【0106】

第一、治療及び／又は診断のための多様な物質を既に負荷した細菌からマイクロベシクルを製造する。例えば、治療及び／又は診断のための多様な物質を培養液に含ませて細菌を培養すると、前記物質が負荷された細菌を取得することができ、或いは電気穿孔法で細菌に物質を負荷することもできる。

【0107】

また、このような細菌から自然に分泌されるシェディングマイクロベシクル、又は超音波分解、押出、機械的分解などの方法で製造した人工マイクロベシクルには、前記物質が負荷されている。

【0108】

20

第二、細菌由来マイクロベシクルの製造過程において前記物質を細菌由来マイクロベシクルに負荷する。例えば、細菌が含まれた溶液に前記物質を添加した後、細菌よりサイズが小さいフィルターを通過させる押出法でマイクロベシクルを製造すると、マイクロベシクルに前記物質が負荷される。

【0109】

第三、シェディングマイクロベシクル又は人工マイクロベシクルを製造した後、前記物質を負荷することができる。例えば、電気穿孔方法で既に製造したシェディングマイクロベシクル又は人工マイクロベシクルに物質を負荷することができる。

【0110】

ところが、本発明で利用できる物質をマイクロベシクルに負荷する方法は、上述の例に限定されない。

30

【0111】

本発明に使用される治療用及び／又は診断用物質は、抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤(angiogenesis inhibitor)、ペプチド(peptide)、タンパク質(protein)、毒素(doxin)、核酸、ビーズ(bead)、マイクロ粒子(microparticle)及びナノ粒子(nanoparticle)よりなる群から選ばれる一つ以上でありうるが、これに限定されない。

【0112】

前記核酸は、DNA、RNA、アプタマー(aptamer)、LNA(locked nucleic acid)、PNA(peptide nucleic acid)、及びモルポリノ(morpholino)よりなる群から選ばれたものでありうるが、これに限定されない。

40

【0113】

前記ナノ粒子は、酸化鉄、金、炭素ナノチューブ(carbon nanotube)又は磁気ビーズを含むナノ粒子でありうるが、これに限定されない。

【0114】

本発明の一具現例において、前記治療用及び／又は診断用物質が蛍光を放出する物質でありうるが、これに限定されない。例えば、前記蛍光を放出する物質が蛍光タンパク質又は量子ドット(quantum dot、Qdot)であってもよい。

【0115】

前記本発明の別の具現例において、前記治療用及び／又は診断用物質が一つ以上の抗癌剤であってもよい。

50

【0116】

本発明のマイクロベシクルは、特定の細胞又は組織などへのターゲッティングが可能なマイクロベシクルを含む。前記特定の組織は血管、癌又は炎症組織でありうるが、これに限定されない。

【0117】

本発明の別の側面は、疾病治療用及び／又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを使用することを特徴とする、疾病治療用及び／又は診断用薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などを伝達する方法を提供する。

【0118】

本発明の別の側面は、特定の細胞又は特定の組織へターゲッティングされるように形質転換された細菌に由来し、疾病治療用及び／又は疾病診断用薬物が負荷されたマイクロベシクルを使用することを特徴とする、疾病治療用及び／又は疾病診断用物質、疾病治療用及び／又は疾病診断用物質を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などを特定の細胞又は特定の組織に伝達する方法を提供する。

10

【0119】

前記ナノ粒子治療剤は、10 nm～10 µmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(micro vesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

【0120】

本発明のマイクロベシクルを用いて疾病治療用又は診断用物質、疾病治療用及び／又は疾病診断用物質を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などを標的細胞又は組織に伝達することが可能である。

20

【0121】

前記本発明の一具現例において、2種以上の前記治療用又は診断用物質を特異細胞又は組織に伝達することができる。

【0122】

例えば、前記マイクロベシクルに2種以上の前記治療用又は診断用物質が共に負荷されているものを用いて、2種以上の前記治療用又は診断用物質を伝達することができる。

【0123】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記治療用又は診断用物質が負荷されたマイクロベシクル、2種以上の前記治療用又は診断用物質が負荷されたマイクロベシクル、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上のマイクロベシクルを用いて前記治療用又は診断用物質を伝達することができる。例えば、前記2つ以上のマイクロベシクルを同時に投与することができる。

30

【0124】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記治療用又は診断用物質が負荷されたマイクロベシクル、2種以上の前記治療用又は診断用物質が負荷されたマイクロベシクル、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上のマイクロベシクルを順次投与して前記治療用又は診断用物質を伝達することができる。

【0125】

前記本発明の別の具現例において、1種以上の前記治療用又は診断用物質が負荷されたマイクロベシクルと1種以上の疾病治療用及び／又は疾病診断用物質を負荷したナノ粒子治療剤、又は疾病治療用細胞治療剤を組み合わせることで順次投与することができる。

40

【0126】

本発明の別の側面は、疾病治療用又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを標的細胞又は組織に伝達する段階を含む、疾病治療及び／又は診断方法を提供する。

【0127】

本発明の別の側面は、疾病治療用又は診断用薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルを用いた、疾病診断用及び／又は治療用薬物伝達システムを提供する。

【0128】

50

本発明の別の側面は、疾病診断用物質が負荷された細菌由来マイクロベシクルを含む、疾病診断用キット(kit)を提供する。前記疾病診断用物質は、診断に必要なプライマー(primer)、プローブ(probe)、アンチセンス(anti-sense)核酸及び抗体よりなる群から選択できる。

【0129】

[細菌由来マイクロベシクルを用いた物質伝達]

本発明では、特定の組織に誘導される細菌由来マイクロベシクルを使用し、或いは標的タンパク質を発現した形質転換細菌由来マイクロベシクルを使用することができる。これに加えて、前記細菌と形質転換細菌に標的細胞との細胞膜融合に必要な物質が発現するように形質転換された細菌由来マイクロベシクルを使用することができる。

10

【0130】

血液内に存在する単核球、リンパ球、好中球、好酸球、好塩球、血小板及び骨髄に由来する抑制細胞(myeloid derived suppressor cell)や、骨髄、血液及び脂肪組織に存在する幹細胞などは、癌及び炎症組織に誘導されるということが知られている。したがって、前記の免疫及び／炎症細胞と幹細胞などの細胞膜からなるマイクロベシクルは、癌及び炎症組織に誘導される。特定の細胞又は組織に特異的に発現した基質に選択的に結合するタンパク質を発現するように形質転換させた細菌由来マイクロベシクルは、特定の細胞又は組織に誘導される。このため、本発明では、このような細菌からマイクロベシクルを製造し、マイクロベシクルに治療及び／又は診断のための物質を負荷してこの物質を標的の細胞、組織又は血液に伝達する。

20

【0131】

血液内免疫／炎症細胞と幹細胞などが特定の組織へターゲティングされるとき、細胞膜に存在する多様な細胞膜タンパク質(plasma membrane protein)が関与する。例えば、単核球細胞の表面には、LFA-1(leukocyte function-associated antigen-1)、Mac-1(macrophage-1 antigen)などのインテグリン(integrin)を含む多様な細胞接着分子が存在する。これらの細胞接着分子は、血管細胞の表面に存在するICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)、VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)などの細胞接着分子と結合することができる。単核球は、LFA-1などの細胞接着分子を用いて、血管細胞の表面に発現したICAM-1などの細胞膜タンパク質と相互作用し、血管内皮細胞を通過して炎症組織及び癌組織に誘導される。

30

【0132】

細菌を形質転換して癌又は組織特異的細胞膜タンパク質を細菌由来マイクロベシクルの表面に発現させ、癌組織と炎症組織を含む多様な組織に誘導することができる。例えば、乳癌組織の細胞表面にはERBB2細胞膜タンパク質が過剰発現する。細菌の細胞膜を貫通して発現しているタンパク質と、ERBB2細胞膜タンパク質を認知することが可能な抗体とを融合させた融合タンパク質(fusion protein)を発現させるように形質転換した細菌由来マイクロベシクルは、乳癌組織に誘導される。また、大腸癌、膵臓癌、肺癌などで過剰発現する癌胎児性抗原(carcinoembryonic antigen、CEA)を認知する抗体と、細菌の細胞膜を貫通して発現しているタンパク質とを融合させた融合タンパク質が発現するように形質転換した細菌由来マイクロベシクルは、大腸癌、膵臓癌、肺癌組織に誘導される。

40

【0133】

細菌由来マイクロベシクルは、細胞膜タンパク質を始めとした細胞膜成分が元来細菌と類似し或いは事実上同一であるため、元来細菌が標的する同一の特定組織又は細胞に誘導される。必要な場合、マイクロベシクルを製造する過程で核酸分解酵素などを添加し、治療用又は診断用物質の伝達に必要な核酸などをマイクロベシクルの内部から除去することができる。

【0134】

[細菌由来マイクロベシクル及びその製造]

細菌由来マイクロベシクルは、伝達しようとする多様な治療用又は診断用物質を容易に

50

負荷させることができ、1種又は多種の物質を伝達することができるので、単独治療、併合治療、診断だけでなく、診断と治療の2つの目的で使用する診断—治療(theragnosis, pharmacodiagnosis)に利用することができる。この際、伝達しようとする多様な物質は、マイクロベシクルに内包されてマイクロベシクルの二重膜の内側に存在してもよく、細胞膜タンパク質のように前記物質の全部又は一部がマイクロベシクルの二重膜に埋め込まれているか組み込まれていてもよく、マイクロベシクルの表面に結合していてもよい。

【0135】

細菌由来人工マイクロベシクルは、既存のリボソームのように多様なサイズに容易に作ることができる。癌血管を介して癌組織にいずれの物質が伝達されるとき、一般に、100nm以上の物質はEPR(enhanced permeability and retention)効果によって癌組織に長らく止まることができる。よって、100nmより大きいマイクロベシクルに負荷された薬物は、癌組織に止まることが可能な時間が長くて薬物の効果を極大化することができるため、診断及び治療に有用である。また、肺組織は、その構造上、サイズ1μm以下の粒子のみが吸入を介して肺胞まで伝達できるので、サイズ1μm以下のマイクロベシクルに喘息などの治療のための炎症抑制剤などの物質を負荷して肺組織に効果的に薬物を伝達することができる。このように、マイクロベシクルは診断用又は治療用物質が必要な組織に応じて多様なサイズに製造できる。好ましくは、本発明のマイクロベシクルのサイズは10nm以上10μm以下である。

【0136】

本発明のマイクロベシクルに治療用及び／又は診断用物質を負荷して「個体」に投与するために、免疫抑制剤と共に使用することもできる。

【0137】

本発明において、全ての細菌からマイクロベシクルを製造することができ、例えば、特定の細胞又は組織などの標的ヘターゲッティングされるように形質転換された細菌から製造できる。特定の組織に物質を伝達するために、特定の組織ヘターゲッティングされる細菌又は形質転換された細菌由来マイクロベシクルを使用することができる。特定の組織に誘導されるタンパク質を過剰発現させた、又は非特異的ヘターゲッティングに関与するタンパク質の発現を減少させた、又はこれらを組み合わせた形質転換細菌由来マイクロベシクルは、血管、癌組織又は炎症組織へ効果的にヘターゲッティングされる。

【0138】

細菌の形質転換は、細菌に刺激を与えてタンパク質などの物質の発現を増加又は変化させる方法と、遺伝子導入によるタンパク質の発現増加又は発現抑制させる方法として、当業界における通常の方法を使用することができる。細菌に特定の刺激を与えてタンパク質発現の変化を誘導することができる。遺伝子導入による細菌の形質転換によって特定のタンパク質を発現又は抑制させることができる。特定のタンパク質の発現を増加させる方法は、プラスミドDNA、RNA又はファージ(phage)を用いることができ、電気穿孔、微量注射法(microinjection)、超音波誘導(ultrasound mediated)などの方法だけでなく、一般に知られている全ての方法を使用することができる。

【0139】

癌細胞、癌血管を含む癌組織又は炎症組織などに特異的に結合することが可能なタンパク質又は抗体を、細菌の表面に直接発現させるか或いは融合タンパク質として発現させ、該細菌からマイクロベシクルを製造することができる。また、治療用及び／又は診断用物質を発現する細菌又は発現するように形質転換された細菌からマイクロベシクルを製造することができる。また、前記組み合わせ物質を発現する或いは発現するように形質転換された細菌からもマイクロベシクルを製造することができる。特定タンパク質の発現を抑制させるために、アンチセンスRNA、LNA、PNAなどを用いることができる。ある細菌に由来するマイクロベシクルが2つの標的に誘導される場合、その細菌において1種又は多種の特定タンパク質の発現を抑制させて1種の標的への誘導を減少させて物質伝達の特異性を高めることができる。又は、2回以上形質転換した細菌を使用することもできる。例えば、1次形質転換した細菌を2次形質転換して使用することができる。しかし、本

発明の製造方法はこれらに限定されない。

【0140】

本発明に係る前記人工マイクロベシクルは、多様な機械的、電気的、化学的方法でも製造できる。浸透圧を用いた細胞溶解、電気穿孔、超音波分解、均質化、洗剤処理、冷凍－解凍、押出、機械的分解、化学物質処理などの方法を使用することができるが、本発明の製造方法はこれらに限定されない。例えば、細菌の入っている溶液に金属、セラミック、又は十分に硬いプラスチック球を入れて揺らし、細菌を機械的な方法で分解することもできる。押し出してマイクロベシクルを製造する場合には、孔径の大きいフィルターから孔径の小さいフィルターに細菌含有溶液を順次通して細菌が適正のサイズに碎かれるようにすることができる。例えば、孔径が $10\text{ }\mu\text{m}$ → $5\text{ }\mu\text{m}$ → $1\text{ }\mu\text{m}$ の順に小さくなるフィルター3つを順次用いてマイクロベシクルを製造することができる。

10

【0141】

[治療用又は診断用物質]

本発明では、細菌又は形質転換された細菌が発現している物質を使用し、或いは必要に応じて、前記細菌に由来せずかつ細菌の外部から準備された物質を使用することができるが、これに限定されない。

【0142】

本発明において、治療用又は診断用物質は、マイクロベシクルに負荷して使用し、或いは必要及び目的に応じてマイクロベシクルと併用して投与することができるが、これに限定されない。

20

【0143】

本発明において、治療用又は診断用物質は、単独で、或いはナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に負荷されてマイクロベシクルと併用して投与することができるが、これに限定されない。

【0144】

前記ナノ粒子治療剤は、 10 nm ～ $10\text{ }\mu\text{m}$ のサイズを有する粒子であって、リボソーム、デンドリマー、ポリマー、マイクロベシクルなどを含むことができるが、これに限定されない。

【0145】

本発明において、マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に負荷することが可能な細菌由来前記治療用又は診断用物質としては、当業界で通常使用されるタンパク質又はペプチド、核酸、脂質及び細菌代謝産物(metabolite)など、多様な種類の物質が制限なく使用できる。

30

【0146】

前記タンパク質又はペプチドは、VEGF、EGF(epidermal growth factor)などの成長因子、IL-1、IFN- γ (interferon-gamma)、IL-10などのサイトカイン(cytokine)類、各種抗体治療剤、受容体、蛍光タンパク質、及び多様なペプチド又はタンパク質を制限なく使用することができる。前記タンパク質又はペプチドは、細菌内に発現してもよく、細胞膜に露出してもよく、全体又は活性を示す部位が単独又は融合タンパク質の形で発現してもよい。特に、マイクロベシクルの表面に負荷されたタンパク質又はペプチドは、局所濃度(local concentration)が高いため、単独で存在する場合より活性が高いことがよく知られている。このようなタンパク質又はペプチドは、リガンド(ligand)として作用して細胞にシグナル伝達を行うことができ或いは多様なリガンドの機能の阻害に用いることができるが、これらの例に限定されない。

40

【0147】

本発明に係る前記マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に負荷することが可能な核酸として、DNA、miRNA(micro RNA)、siRNA(small interfering RNA)、アンチセンスRNA、センス(sense)RNAを使用することができるが、これに限定されない。このような核酸はセンス効果、アンチセンス効果、RNA干渉及びタンパク質の機能阻害などの目的で利用できる。

50

【0148】

本発明において、前記細菌に由来せず且つマイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に含ませることが可能な治療用又は診断用物質としては、当業界で通常使用される抗癌剤、抗炎症剤、血管新生阻害剤、ペプチド、タンパク質、毒素、核酸、ビーズ、マイクロ粒子及びナノ粒子など多様な種類の物質が制限なく使用できる。

【0149】

前記抗癌剤は、癌の成長及び転移を抑制させるために使用される全ての薬剤を総称する。大部分の抗癌剤は、癌細胞のDNAの複製、転写、翻訳過程を遮断する。本発明の治療用物質として使用できる抗癌剤の種類は特に限定されない。抗癌剤は、癌細胞の種類、抗癌剤の吸収速度（治療期間と抗癌剤の投与経路）、腫瘍の位置、腫瘍のサイズなど、抗癌剤選択の際に考慮する一般的な原則の下に選択できる。前記本発明で使用できる抗癌剤は、DNAアルキル化剤(DNA alkylating agent)としてのメクロレタミン(mechlorethamine)、クロラムブシル(chlorambucil)、フェニルアラニン(phenylalanine)、マスタード(mustard)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、イホスファミド(ifosfamide)、カルムスチン(carmustine: BCNU)、ロムスチン(lomustine: CCNU)、ストレプトゾトシン(streptozotocin)、ブスルファン(busulfan)、チオテパ(thiotepa)、シスプラチン(cisplatin)、及びカルボプラチン(carboplatin)などが使用でき、抗癌剤(anti-cancer antibiotics)としてのダクチノマイシン(dactinomycin: アクチノマイシンD(actinomycin D))、ドキシソルビシン(doxorubicin: アドリアマイシン(adriamycin))、エピルビシン(epirubicin)、イダルビシン(idarubicin)、ミトキサントロン(mitoxantrone)、プリカマイシン(plicamycin)、マイトマイシン(mitomycin)、及びCブレオマイシン(C bleomycin)などが使用でき、植物アルカロイドとしてのビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(vinblastine)、パクリタキセル(paclitaxel)、ドセタキセル(docetaxel)、ダウノルビシン(daunorubicin)、タクソール(taxol)、オンコビン(ovcovin)、プレドニゾン(prednisone)、シスプラチン(cisplatin)、ハーセプチン(herceptin)、リツキシマブ(rituximab)、エトポシド(etoposide)、テニポシド(teniposide)、トポテカン(topotecan)、及びイリドテカン(iridotecan)などよりなる群から選択できる。また、当業界で通常使用される放射性物質を用いることもできる。ところが、本発明で使用できる抗癌剤はこれらの例に限定されない。

【0150】

また、本発明のマイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に含まれ得る抗炎症剤は、デキサメタゾン(dexamethasone)、インドメタシン(indomethacin)、イブプロフェン(ibuprofen)、プロピオン酸クロベタゾール(clobetasol propionate)、酢酸ジフロラゾン(diflorasone diacetate)、プロピオン酸ハロベタゾール(halobetasol propionate)、アムシノニド(amcinonide)、フルオシノニド(flucicnonide)、フランカルボン酸モメタゾン(mometasone furoate)、デゾキシメタゾン(desoximetasone)、ジクロフェナク(diclofenac)、及びピロキシカム(piroxicam)などよりなる群から選択できるが、本発明で使用できる抗炎症剤はこれらの例に限定されない。

【0151】

前記血管新生阻害剤は、既存の血管から新しい血管が作られる過程を抑制するために使用される全ての薬剤を総称する。大部分の血管新生阻害剤は、癌の成長及び転移を抑制し、炎症反応を抑制することができる。本発明の治療用物質として使用できる血管新生阻害剤の種類は特に限定されない。

【0152】

本発明に係る前記マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に治療用又は診断用物質としてタンパク質又はペプチドを含ませることができる。例えば、RNAだけでなく、VEGF、EGFなどの成長因子、IL-1、IFN- γ 、IL-10などのサイトカイン類、各種抗体治療剤、多様なペプチド又はタンパク質、DNA以外に、癌の成長及び転移を抑制し且つ炎症反応を抑制することができる多様なタンパク質及びペプチドを制限なく使用することができる。

【0153】

本発明に係る前記マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に治療用又は診断用物質として毒素を含ませることができる。毒素は、多様な生物体に由来するもので、体内に吸収されたときに毒性を示しうるものを総称し、毒素を介して細胞死滅を誘導することができる。本発明の治療用物質として使用できる毒素の種類は特に限定されない。

【0154】

本発明に係る前記マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に負荷することが可能な核酸としてDNA、miRNA、siRNA、アンチセンスRNA、センスRNA、アプタマーを使用することができ、核酸類似体としてLNA、PNA、モルホリノなどを使用することができるが、これらに限定されない。このような核酸はセンス効果、アンチセンス効果、RNA干渉、及びタンパク質の機能阻害などの目的で利用できる。

10

【0155】

本発明において、蛍光タンパク質を暗号化(encode)する核酸又は多様な蛍光物質を負荷したマイクロベシクルを診断に利用することができる。特定の細胞又は組織を標的とするマイクロベシクルに、蛍光タンパク質を暗号化しているプラスミドDNAを負荷し、それを生体に注入すると、その標的細胞又は組織の存在を、蛍光タンパク質から放出される蛍光シグナルから分かることができる。また、特定の細胞又は組織を標的とするマイクロベシクルに、蛍光放出量子ドットを含む多様な蛍光物質を含ませ、それを生体に注入すると、その標的細胞又は組織の存在を蛍光シグナルから分かることができる。特定の標的細胞又は組織から発生する蛍光を診断に利用することができる。細胞死滅を誘導する蛍光放出量子ドットは治療目的でも利用することができる。

20

【0156】

マイクロベシクル又はナノ粒子治療剤及び細胞治療剤に負荷することが可能な他の治療用又は診断用物質の例として、蛍光物質以外に、他のマイクロ粒子又はナノ粒子を使用することができる。酸化鉄、金、炭素ナノチューブなどのマイクロ粒子又はナノ粒子を使用することができるが、これに限定されない。磁気ビーズなどのビーズをマイクロベシクルに負荷して使用することもできる。酸化鉄などの磁性粒子は磁気共鳴映像(magnetic resonance imaging: MRI)を得る造影剤として利用できる。ナノ粒子に結合した核酸や、ナノ粒子に結合したタンパク質なども使用することができ、診断に有用な放射性物質も使用することができる。

30

【0157】

本発明に係る前記マイクロベシクルを用いて2種以上の物質を伝達することができる。例えば、2種以上の物質を同時に負荷したマイクロベシクルを用いて2種以上の物質を伝達することができる。或いは、1種又は2種以上の物質が負荷されたマイクロベシクルを複数使用して2種以上の物質を伝達することができる。例えば、3種の物質を伝達する場合、各物質を含む第1、第2、第3マイクロベシクルを製造して使用することができる。第1、第2物質を含む第4マイクロベシクルと、第3物質を含む第5マイクロベシクルを準備し、第4、第5マイクロベシクルを用いて3種の物質を伝達することができる。第1、第2、第3マイクロベシクルを同時に投与してもよく、順次投与してもよい。第4、第5マイクロベシクルを同時に投与してもよく、順次投与してもよい。

40

【0158】

マイクロベシクルを他の分子又は他の細胞構成成分から分離するために、密度勾配、超遠心分離、濾過、透析、及び自由流動電気泳動法などの方法を使用することができるが、本発明の前記選別方法はこれらに限定されない。

【0159】

密度勾配は、密度の異なる物質を区分するときに最も多く使用される方法である。本発明のマイクロベシクルは、自由分子(free molecule)などと密度が区分されるため、密度勾配を介して分離することができる。この方法の具体的な例としてはフィコール(ficoll)、グリセロール、スクロース(sucrose)、オプティプレップ(OptiPrep™)などの密度勾配を使用することができるが、本発明の密度選別方法はこれらに限定されない。治療及び診

50

断のための分子が負荷されたマイクロベシクルと、治療及び診断のための分子が負荷されていないマイクロベシクルとの密度が互いに異なる性質を用いて、2種のマイクロベシクルを分離することができる。密度勾配は、遠心分離又は電気泳動(electrophoresis)などと共に使用することができる。マイクロベシクルを選別するために、ゲル濾過(gel filtration)又は限外濾過(ultrafiltration)を使用することもできる。サイズの小さい分子を除去するために、濾過の代わりに透析を使用することができる。この他にも、自由流動電気泳動法を使用することもできる。

【0160】

目的に応じて、サイズが一定な範囲にあるマイクロベシクルを選別して使用することができる。マイクロベシクルのサイズを選別する段階は、治療用又は診断用物質をマイクロベシクルに負荷する段階より先に行ってもよく、同時に行ってもよく、後で行ってもよい。

10

【0161】

本発明において、細胞膜の構成成分の一部が改質(modification)されたマイクロベシクルを製造して使用することもできる。例えば、別途準備した融合タンパク質と細菌との混合液からマイクロベシクルを製造し、融合タンパク質が表面に露出したマイクロベシクルを準備することができる。マイクロベシクルの表面にポリエチレングリコールを結合させてステルスマイクロベシクル(stealth-microvesicle)の製造が可能である。また、マイクロベシクルにシクロデキストリンを添加する場合、非特異的ターゲティングを減少させることができる。シクロデキストリンは、水溶性と脂溶性を同時に持っている物質であって、マイクロベシクルの表面に付いて脂質間の非特異的結合を阻害することができる。化学的にマイクロベシクルを改質して使用することもできる。例えば、細胞膜の表面にシステイン(cysteine)を含むタンパク質の部分が露出した細菌からマイクロベシクルを製造した後、システインのチオール基に化学的な方法で様々な分子を結合させてマイクロベシクルを改質することができる。また、細胞膜タンパク質に存在するアミン基に化学的な方法で様々な分子を結合させて改質することもできる。

20

【0162】

本発明は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分を個体に投与する段階を含む、癌治療方法を提供する。

【0163】

本発明に使用される細菌は、グラム陰性菌及びグラム陽性菌を含む。前記グラム陰性菌は大腸菌、緑膿菌及びサルモネラ菌を含み、グラム陽性菌はブドウ球菌及びラクトバチルス菌などを含むが、これに限定されない。

30

【0164】

本発明において、前記マイクロベシクルの構成成分がタンパク質、核酸及び脂質を含んでいるが、これに限定されない。

【0165】

前記本発明の一具現例において、タンパク質は、細菌由来マイクロベシクルを構成する一つの要素であって、水溶性タンパク質、脂溶性タンパク質、又は膜タンパク質などを含むことができるが、これに限定されない。

40

【0166】

前記本発明の一具現例において、膜タンパク質は、Omp A、Omp F、Omp C、Fla g e l l i nなどを含むことができるが、これに限定されない。

【0167】

前記本発明の一具現例において、核酸は、DNA又はRNAなどを含むことができるが、これに限定されない。

【0168】

前記本発明の一具現例において、前記タンパク質は、細胞接着分子(cell adhesion molecule)、抗体(antibody)、標的誘導(targeting)タンパク質、細胞膜融合(fusion)タンパク質、又はこれらの融合タンパク質よりなる群から選ばれる一つ以上と結合したものであ

50

りうるが、これに限定されない。

【0169】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうちタンパク質を再構成(reconstitution)したナノ粒子治療剤を製造して抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0170】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち核酸をナノ粒子治療剤に挿入して抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0171】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち脂質を再構成したナノ粒子治療剤を製造して抗癌治療に使用する方法を提供する。

10

【0172】

本発明の別の側面は、細菌由来マイクロベシクルの構成成分のうち2種以上の構成成分を挿入又は再構成(reconstitution)したナノ粒子治療剤を製造し、抗癌治療に使用する方法を提供する。

【0173】

前記ナノ粒子治療剤は、10 nm～10 μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(micro vesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

【0174】

本発明の一具現例において、前記細菌由来マイクロベシクルの構成成分は新しい成分をさらに含むことができる。

20

【0175】

前記成分として、シクロデキストリン(cyclodextrin)、ポリエチレングリコール(polyethyleneglycol)などを含むことができる。また、前記成分は多様な方法によって追加でき、化学的変形などを含む。

【0176】

本発明の別の具現例として、前記方法は、副作用を減少させる薬物又は抗癌効能を増加させる薬物をさらに含むことができる。前記副作用を減少させる薬物はアスピリンであってもよい。また、抗癌効能を増加させる薬物は、Th17 (Tヘルパー17細胞)免疫反応を抑制する薬物、インターロイキン(interleukin、IL)－6の生成或いは活性を抑制する薬物、血管内細胞成長因子(vascular endothelial growth factor、VEGF)の生成或いは活性を抑制する薬物、STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)シグナル伝達を抑制する薬物、抗癌剤を含む。Th17免疫反応を抑制する薬物の例としては、アスピリン(aspirin)を挙げることができる。VEGFの生成或いは活性を抑制する薬物の例としてはVEGF受容体によるシグナル伝達を抑制する薬物を挙げることができる。

30

【0177】

本発明の具現例として、前記マイクロベシクルの構成成分と共に、その副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、及び細胞治療剤などを併用／順次投与することができる。

40

【0178】

前記ナノ粒子治療剤は、10 nm～10 μmのサイズを有する粒子であって、リポソーム(liposome)、デンドリマー(dendrimer)、ポリマー(polymer)、マイクロベシクル(micro vesicle)などを含むことができるが、これに限定されない。

【0179】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記マイクロベシクル由来構成成分、2種以上の前記マイクロベシクル由来構成成分、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上の構成成分を同時に投与することができる。

【0180】

前記本発明の別の具現例において、1種の前記マイクロベシクル由来構成成分、2種以

50

上の前記マイクロベシクル由来構成成分、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上の構成成分を順次投与することができる。

【0181】

前記本発明の別の具現例において、1種のマイクロベシクル由来構成成分、2種以上の前記マイクロベシクル由来構成成分、及びこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた2つ以上の構成成分を、副作用を減少させる薬物、抗癌効能を増加させる薬物、薬物を負荷したナノ粒子治療剤、又は疾病治療用細胞治療剤と組み合わせて順次投与することができる。

【0182】

以下、本発明の理解を助けるために好適な実施例を提示する。ところが、下記の実施例は、本発明をより容易に理解させるために提供されるものに過ぎず、本発明の内容を限定するものではない。

【実施例】

【0183】

実施例1：押出法によるグラム陰性菌由来人工マイクロベシクルの製造及び特性分析
押出法を用いて人工的に細菌由来マイクロベシクルを製造した。

【0184】

本実験ではグラム陰性菌の大腸菌を使用した。具体的に、50 mLのLB培地に吸光度(600 nm)値が1.0となるまで培養した。培養された細菌を3,500×gで10分間遠心分離して培養液から細菌を分離した。分離された細菌はさらに生理食塩水(phosphate buffered saline、PBS)で懸濁した。

【0185】

前記懸濁溶液を、孔径10 µmのメンブランフィルター(membrane filter)に3回通し、さらに孔径5 µmのメンブランフィルターに3回通した後、孔径1 µmのメンブランフィルターに3回通した。容量5 mLの超遠心分離チューブにそれぞれ50%オプティブレップ1 mL、5%オプティブレップ1 mL、及びメンブランフィルターを通過した細菌懸濁液3 mLを順次仕込んだ。その後、150,000×gで3時間超遠心分離した。50%オプティブレップと5%オプティブレップとの間の層からマイクロベシクルを得た。

【0186】

上述の方法によって人工的に製造したグラム陰性菌由来人工マイクロベシクルの特性を分析した。具体的に、前記グラム陰性菌由来人工マイクロベシクルをグロー放電炭素コート銅グリッド(glow-discharged carbon-coated copper grid)で3分間吸着させた。前記グリッドを蒸留水で洗浄した後、2%酢酸ウラニル(uranylacetate)で1分間染色(staining)し、しかる後に、JEM101(Jeol、日本)電子顕微鏡で観察し、その結果を図1に示した。図1の透過電子顕微鏡(transmission electron microscope、TEM)写真から分かるように、押出法を用いて人工的に製造した細菌由来マイクロベシクルは、脂質二重層からなっており、10~100 nmのサイズを有し、球状を示すものと確認された。

【0187】

実施例2：グラム陰性菌由来シェディングマイクロベシクルを用いたin vivo抗癌効能

本実験では、グラム陰性菌に自然に分泌されるシェディングマイクロベシクルを分離して使用した。グラム陰性菌としては大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌を使用した。具体的に、細菌を、100 mLのLB培地が入っている三角フラスコに接種し、37℃で6時間培養した後、その中の8 mLを600 mLのLB培地が入っている2 Lの三角フラスコに移し、37℃で5時間培養して吸光度(600 nm)値が1.5となるようにした。培養液を容量500 mLの高速遠心分離チューブ(high speed centrifuge tube)に入れた後、4℃で10,000×gで20分間遠心分離した。細菌を除去した上澄み液を孔径0.45 µmのメンブランフィルターに1回通した後、分子量100 kDa以下のタンパク質を除去することが可能なメンブランを装着したQuixstandシステムを用いて25倍濃

10

20

30

40

50

縮した。濃縮液を孔径0.22 μmのメンブランフィルターに通した後、容量70 mLの超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)に入れて4℃で150,000×gで3時間超遠心分離した。沈殿物をPBSで懸濁した後、細菌由来シェディングマイクロベシクルを得た。

【0188】

上述の方法によって大腸菌、緑膿菌及びサルモネラ菌由来のシェディングマイクロベシクルを取得した後、これを用いて本実験を行った。具体的に、マウス大腸癌26細胞株(mouse colon 26 cell line) 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週間後、PBS、前記細菌由来シェディングマイクロベシクル1 μg又は5 μgを含むPBS溶液100 μLを各実験群別に3匹のマウスに週2回ずつ尾静脈に注射し、大腸癌細胞投与23日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。

10

【0189】

前記大腸癌細胞を皮下接種した後、大腸癌組織のサイズを測定した結果を図2～図4に示す。PBSを投与した対照群に比べて、大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを投与した場合は用量依存的に大腸癌組織のサイズが減少し(図2参照)、緑膿菌由来シェディングマイクロベシクルを投与した場合も大腸癌組織のサイズが顕著に減少した(図3参照)。また、サルモネラ菌由来シェディングマイクロベシクルを投与した場合も大腸癌組織のサイズが減少した(図4参照)。

20

【0190】

実施例3：グラム陽性菌由来シェディングマイクロベシクルを用いたin vivo抗癌効能

本実験では、グラム陽性菌から自然に分泌されるシェディングマイクロベシクルを分離して使用した。グラム陽性菌としてはブドウ球菌と乳酸菌のラクトバチルス菌を使用した。具体的に、細菌を100 mLの栄養培地(nutrient broth)が入っている三角フラスコに接種し、37℃で6時間培養した後、その中の8 mLを600 mLの栄養培地が入っている2 Lの三角フラスコに移し、37℃で5時間培養して吸光度(600 nm)値が1.5となるようにした。培養液を容量500 mLの高速遠心分離チューブに入れた後、4℃で10,000×gで20分間遠心分離した。細菌を除去した上澄み液を孔径0.45 μmのメンブランフィルターに1回通した後、分子量100 kDa以下のタンパク質を除去することが可能なメンブランを装着したQuixstandシステムを用いて25倍濃縮した。濃縮液を孔径0.22 μmのメンブランフィルターに通した後、容量70 mLの超遠心分離チューブに入れて4℃で150,000×gで3時間超遠心分離した。沈殿物をPBSで懸濁した後、細菌由来シェディングマイクロベシクルを得た。

30

【0191】

上述の方法によって得たブドウ球菌とラクトバチルス菌由来のシェディングマイクロベシクルを用いて下記実験を行った。具体的に、マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週間後、PBS、前記細菌由来シェディングマイクロベシクル各10 μgを含むPBS溶液100 μLを各実験群別に3匹のマウスに週2回ずつ尾静脈に注射し、大腸癌細胞投与23日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。

40

【0192】

前記大腸癌細胞を皮下接種した後、大腸癌組織のサイズを測定した結果を図5及び図6に示す。図示の如く、対照群としてのPBS投与群に比べてブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル投与群で大腸癌組織のサイズが顕著に減少し(図5参照)、ラクトバチルス菌由来シェディングマイクロベシクル投与群でもPBS投与群に比べて大腸癌組織のサイズが顕著に減少した(図6参照)。

【0193】

実施例4：形質転換グラム陰性菌由来シェディングマイクロベシクルを用いたin v

50

i v o 抗癌効能

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された(msbB mutant)大腸菌を用いて実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを得た後、これを用いて下記実験を行った。

【0194】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週間後、PBS、野生型(wild type)大腸菌由来シェディングマイクロベシクル又はリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル1mgを含むPBS溶液100mLを各実験群別に3匹のマウスに週2回ずつ尾静脈に注射し、大腸癌細胞投与23日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。

10

【0195】

前記大腸癌細胞を皮下接種した後、大腸癌組織のサイズを測定した結果を図7に示した。図7に示すように、対照群としてのPBS投与群に比べてリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを投与する場合、対照群としてのPBS投与群だけでなく、野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクル投与群と比較しても大腸癌組織のサイズが顕著に減少した。

【0196】

実施例5：形質転換グラム陽性菌由来シェディングマイクロベシクルを用いた i n v i v o 抗癌効能

20

リポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換された(LTA mutant)ブドウ球菌を用いて実施例3の方法によってシェディングマイクロベシクルを得た後、これを用いて下記実験を行った。

【0197】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週間後、PBS、野生型ブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル又はリポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル10μgを含むPBS溶液100μLを各実験群別に3匹のマウスに週2回ずつ尾静脈に注射し、大腸癌細胞投与23日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。

30

【0198】

前記大腸癌細胞を皮下接種した後、大腸癌組織のサイズを測定した結果を図8に示した。図8に示すように、対照群としてのPBS投与群に比べてリポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクルを投与する場合、対照群としてのPBS投与群だけでなく、野生型ブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル投与群と比較しても大腸癌組織のサイズが顕著に減少した。

【0199】

実施例6：形質転換グラム陰性菌由来シェディングマイクロベシクルを用いた転移癌に対する i n v i v o 治療効果

40

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌を用いて実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを得た後、これを用いて下記実験を行った。

【0200】

マウス黒色腫(melanoma)細胞株としてのB16BL6細胞 1×10^5 細胞をマウスの尾静脈に注射した。3日後、PBS、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル1μgを含むPBS溶液100μLを各実験群別に3匹のマウスに10日間毎日尾静脈に注射した。黒色腫癌細胞投与14日後、マウスから肺を摘出し、肺に転移された黒色腫コロニー(colony)の数を測定した。

【0201】

50

図9は各条件当たり3匹のマウスにおいて肺に転移された黒色腫コロニーの数を測定して示すグラフである。図9に示すように、対照群としてのPBS投与群に比べてリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを投与する場合、肺組織に転移された黒色腫コロニーの数が効果的に減少することが分かる。

【0202】

実施例7：薬物併用投与による細菌由来シェディングマイクロベシクルによる抗癌効能
癌の発生における炎症の重要性が数世紀前から提起されてきた。最近、VEGF/IL-6、STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)シグナル伝達、Th17免疫反応などから生ずる炎症反応が癌の発生及び進行に重要であるという研究結果が注目を浴びている。アスピリン投与によって大腸癌の発生が減少するという報告があった。最近、本発明者は、アスピリンがTh17免疫反応による炎症反応を抑制するという事実を解明した。本実験では、細菌由来マイクロベシクルによる抗癌効能にTh17免疫反応を抑制する薬物を併用投与したときに抗癌効能が増加するかを評価した。本実験には、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌から実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを得た後、これを使用した。Th17免疫反応を抑制する薬物としてアスピリンを併用投与した。

10

【0203】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週間後、PBS、 18 mg/kg のアスピリンを含むPBS溶液、 $0.1 \mu\text{g}$ の前記細菌由来マイクロベシクルを含むPBS溶液、 $0.1 \mu\text{g}$ の前記細菌由来マイクロベシクルと 18 mg/kg のアスピリンを含むPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ を各実験群別に4匹のマウスに週2回ずつ尾静脈に注射し、大腸癌細胞投与23日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。

20

【0204】

前記大腸癌細胞を皮下接種した後、大腸癌組織のサイズを測定した結果を図10に示した。図10に示すように、アスピリン単独投与群は、PBS投与群に比べて大腸癌組織のサイズに差異がなかった。すなわち、アスピリンによる抗癌効能を観察することができなかった。ところが、リポ多糖類の毒性が弱化するよう系質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルとアスピリンを同時に投与した場合、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル単独投与群に比べて大腸癌組織のサイズが顕著に減少した。

30

【0205】

上記結果より、アスピリンなどのTh17免疫反応を抑制する薬物と併用投与する場合に本発明の細菌由来シェディングマイクロベシクルによる抗癌効能を増進させることができることが明白である。

【0206】

実施例8：グラム陰性菌由来シェディングマイクロベシクルへの抗癌剤薬物の負荷

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌を用いて実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを得た後、これを用いて下記実験を行った。

40

【0207】

実施例2の方法によって得たシェディングマイクロベシクルに 0.4 mg/mL 濃度のドキソルビシンを1:1の比率で混ぜて 4°C で12時間培養した。培養された溶液を 4°C で $150,000 \times g$ で3時間超高速遠心分離を行い、ドキソルビシンを負荷したシェディングマイクロベシクルと溶液内のシェディングマイクロベシクルに入っていないドキソルビシンを分離した。ドキソルビシンを負荷したシェディングマイクロベシクルに、緑色蛍光を帯び且つ脂質二重膜に挿入されて標識することが可能なDiO溶液を入れ、シェディングマイクロベシクルを緑色蛍光で標識した後、カバーガラスに付け、共焦点顕微鏡(confocal microscope)でドキソルビシンがシェディングマイクロベシクルに負荷されるかを確認した。その結果を図11に示した。

50

【0208】

図11に示すように、赤色蛍光のドキシソルピシンがいずれも緑色蛍光のシェディングマイクロベシクルに負荷されていることを確認した。上記結果より、細菌由来マイクロベシクルに疾病治療用又は診断用薬物を効果的に負荷することができることが分かる。

【0209】

実施例9：抗癌薬物が負荷された細菌由来マイクロベシクルの *in vitro* 抗癌効能

抗癌薬物を負荷した細菌由来マイクロベシクルが癌細胞へ抗癌薬物を伝達して細菌由来マイクロベシクルによる抗癌効能の増大に影響を与えるかを評価した。本実験では、抗癌薬物の一例としてドキシソルピシンを使用した。

10

【0210】

実施例8の方法によってドキシソルピシンが負荷されたりポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを製造し、下記実験に使用した。

【0211】

マウス大腸癌26細胞株 5×10^4 細胞を24ウェルプレートで一晩培養した。PBS、ドキシソルピシンを負荷していない前記細菌由来マイクロベシクルを含むPBS溶液、及びドキシソルピシンを負荷した前記細菌由来マイクロベシクルを含むPBS溶液1mLをそれぞれマウス大腸癌26細胞株に6時間処理した後、18時間追加培養した。生きているマウス大腸癌26細胞株の数を顕微鏡で計数し、その結果を図12に示した。

20

【0212】

図12から分かるように、ドキシソルピシンを負荷した前記細菌由来マイクロベシクルは、ドキシソルピシンを負荷しない前記細菌由来マイクロベシクルに比べて癌細胞の死滅効果が大きく現れることが分かる。

【0213】

上記結果より、抗癌薬物を負荷した前記細菌由来マイクロベシクルを処理したとき、細菌由来マイクロベシクルによる抗癌効果だけでなく、負荷された抗癌薬物による抗癌効果がさらに加わってさらに大きい抗癌効果を示すことができることが分かる。

【0214】

実施例10：細菌由来マイクロベシクルの副作用に対するリポ多糖類活性抑制剤の効果
細菌由来マイクロベシクルの副作用に関連して、マイクロベシクルの構成成分であるリポ多糖類が敗血症の発生に重要な役割を果たすものと知られている。よって、本発明者は、前記マイクロベシクルが含有しているリポ多糖類の活性を抑制させる薬物を処理してリポ多糖類による副作用に及ぼす影響を評価した。本実験では、リポ多糖類の活性を抑制する薬物の一例としてポリミキシン(polymyxin) Bを使用した。

30

【0215】

実施例2の方法によって大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを製造した。マウスの腹腔にPBS、25 μ gの大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含有しているPBS溶液、25 μ gの大腸菌由来シェディングマイクロベシクルと250 μ gのポリミキシンBを含有しているPBS溶液100 μ Lを各実験群別に注射した後、12時間間隔で120時間までマウスの生存率を観察した。その結果を図13に示した。

40

【0216】

図13から分かるように、25 μ gの大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含むPBS溶液に投与した場合、投与後120時間が経過した時点におけるマウスの生存率は10%であったが、25 μ gの大腸菌由来シェディングマイクロベシクルと250 μ gのポリミキシンBを含有しているPBS溶液を投与した場合、同一時点におけるマウスの生存率は55%であった。

【0217】

上記結果より、大腸菌由来マイクロベシクルによる副作用の発生だけでなく、前記マイクロベシクルに含有されたりポ多糖類の活性を抑制させる薬物を処理したとき、細菌由来

50

マイクロベシクルに含有されたリポ多糖類による副作用の発生が効果的に抑制できることが分かる。

【0218】

実施例11：野生型及び形質転換グラム陰性菌由来マイクロベシクルによる副作用の差異

細菌由来マイクロベシクルの副作用と関連して、マイクロベシクルの構成成分であるリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌に由来するマイクロベシクルを用いてリポ多糖類による副作用の発生に及ぼす影響を評価した。本実験では、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌の一例として *msbB mutant* を使用した。

10

【0219】

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌から、実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを分離して使用した。マウスの腹腔にPBS、25 µgの野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含有しているPBS溶液、25 µgのリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含有しているPBS溶液100 µLを各実験群別に注射した後、12時間間隔で120時間までマウスの生存率を観察した。その結果を図14に示した。

【0220】

図14から分かるように、25 µgの野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクル投与群の場合、投与後120時間が経過した時点におけるマウスの生存率は45%であったが、25 µgのリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル投与群は同一時点で65%の生存率を示した。

20

【0221】

上記結果より、マイクロベシクルによる副作用を起こす物質中の一つであるリポ多糖類の生成に関連した遺伝子を変形させてリポ多糖類の活性を除去させた形質転換細菌由来マイクロベシクルを使用する場合、野生型細菌由来マイクロベシクルを使用することに比べてマイクロベシクルによる副作用を効果的に減少させることができることが分かる。

【0222】

実施例12：形質転換グラム陰性菌由来マイクロベシクルによる副作用の緩和

細菌由来マイクロベシクルを静脈注射する場合に発生する副作用に対する評価のために、本実験ではリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを使用した。また、静脈注射する場合に発生しうる副作用に対する一例として、血小板数の変化、血液凝固、及び溶血反応に対して評価した。

30

【0223】

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌から、実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを分離して使用した。

【0224】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週後、PBS又はリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル5 µgを含むPBS溶液100 µLを各実験群別に2匹のマウスの尾静脈に1回注射し、3時間又は6時間後にマウスの血液を採取した。

40

【0225】

血小板は、血液凝固に重要な役割を果たす固形成分の一つである。細菌由来マイクロベシクルを静脈注射する場合、血小板の数が変化するかを調べるために、下記の実験を行った。前記実験から得た血液を血小板希釈液 (Rees-Ecker液) に100倍希釈した後、血球計算器 (hemocytometer) に入れて10分間常温で培養して光学顕微鏡で血小板の数を測定した。その結果を図15に示した。

【0226】

図15に示すように、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルは、静脈注射の際に、血液凝固に重要な役割を果たす血小板

50

に影響を与えないことが分かる。

【0227】

繊維素溶解メカニズムを代表しかつ凝固メカニズムの活性化を反映する産物であるD-ダイマー(D-dimer)は、血管内凝固症を診断する重要な検査法の一つである。リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルによる血管内凝固現象を判別するために、下記の実験を行った。前記実験で採取した血液を1, 300×gで10分間遠心分離して血漿を得た。D-ダイマーを認知する捕獲抗体がコートされた96ウェルプレートに、得た血漿を3倍希釈して入れた後、過酸化酵素が接合されており且つD-ダイマーを認知する検出抗体を入れた。その後、BM-POD基質を入れて発色を誘導し、その結果を図16に示した。

10

【0228】

図16に示すように、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルは、静脈注射の際に、凝固メカニズムを活性化させないことが分かる。

【0229】

リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルによる赤血球の破壊現象を確認するために、下記の実験を行った。PBS、実施例2の方法で分離したリポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル1μg/mL又は2μg/mLを含むPBS溶液10μLを血液培地に点滴した後、12時間37℃で培養した。培養後の血液培地を図17に示した。

20

【0230】

図17に示すように、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルは、赤血球を破壊しないことが分かる。

【0231】

図15～図17に示すように、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを静脈注射によって投与する場合、血小板数の減少、血液凝固、及び溶血反応が血液内で発生しないことが分かる。よって、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された細菌由来マイクロベシクルを使用する場合、細菌由来マイクロベシクルによる副作用を効果的に減少させることができることが分かる。

【0232】

実施例13：野生型及び形質転換グラム陽性菌由来マイクロベシクルによる副作用の差異

30

細菌由来マイクロベシクルの副作用に関連して、グラム陽性菌由来マイクロベシクルの構成成分であるリポタイコ酸が免疫反応を介して炎症反応を誘導する重要な物質として知られている。よって、リポタイコ酸の合成関連遺伝子を除去した形質転換細菌由来マイクロベシクルを用いて、グラム陽性菌由来マイクロベシクルによる副作用の発生におけるリポタイコ酸の役割を評価した。本実験では、前記リポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌の一例として、細胞壁からリポタイコ酸成分を無くしたLTAmutantブドウ球菌を使用した。

【0233】

実施例3の方法によって、リポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌からシェディングマイクロベシクルを製造した。マウスの腹腔から分離したマクロファージ(2.5×10⁵ cells)にPBS、0.1μg/mLの野生型ブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクルを含有しているPBS溶液、0.1μg/mLのリポタイコ酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクルを含有しているPBS溶液をそれぞれ0.5mLずつ処理し、12時間後に細胞の条件培地を収得した後、500×gで5分間遠心分離した。

40

【0234】

IL-6捕獲抗体(capture antibody)がコートされた96ウェルプレートを準備し、ウェルプレートに1%BSA(bovine serum albumin)を100μL仕込んで1時間固定(blo

50

cking)した。得た条件培地を1/2希釈して仕込み、室温で2時間培養した後、ビオチン(biotin)が付いているIL-6に対する検出抗体(detection antibody)で2時間培養した。1%BSAで洗浄した後、ストレプトアビジン-POD(streptavidin-POD)で30分間培養し、BM-POD基質を入れて発色を誘導し、その結果を図18に示した。

【0235】

図18から分かるように、野生型ブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクル投与群の場合に比べてリポタイコン酸の毒性が弱化するよう形質転換されたブドウ球菌由来シェディングマイクロベシクルを投与した場合、IL-6の分泌量が減少した。

【0236】

上記結果より、マイクロベシクルによる副作用を起こす物質中の一つであるリポタイコン酸の遺伝子を変形させてリポタイコン酸の毒性が弱化するよう形質転換された細菌由来マイクロベシクルを使用する場合、野生型細菌由来マイクロベシクルを使用することに比べてマイクロベシクルの副作用を効果的に減少させることができることが分かる。

【0237】

実施例14：抗炎症及び／又は抗凝固作用をする薬物併用投与が細菌由来マイクロベシクルによる副作用に及ぼす効果

細菌由来マイクロベシクルを使用する場合に副作用の発生メカニズムに重要なことは、マイクロベシクルによる免疫反応で炎症性媒介体が分泌されて局所又は全身性炎症反応が発生し、これと同時にマイクロベシクルによる凝固(coagulation)作用により血管に血栓／塞栓(thromboembolism)又は播種性血管内凝固(disseminated intravascular coagulation)が発生することである。本実験では、細菌由来マイクロベシクルによる副作用を減少させる目的で抗炎症及び抗凝固作用をする薬物の一例としてアスピリンを用いて細菌由来マイクロベシクルによる副作用を評価した。

【0238】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌から、実施例2の方法によってシェディングマイクロベシクルを分離した。1週後、PBS、 18 mg/kg のアスピリンを含むPBS溶液、 $0.1 \mu\text{g}$ の前記細菌由来マイクロベシクルを含むPBS溶液、 $0.1 \mu\text{g}$ の前記細菌由来マイクロベシクルと 18 mg/kg のアスピリンを含むPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ を各実験群別に4匹のマウスの尾静脈に週2回ずつ注射し、5回目の静脈注射を行ってから6時間後に各実験群のマウスの目中的出血から血液 0.2 mL を採取して 50 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)入りの凝固防止用チューブに入れた。この中の血液 $10 \mu\text{L}$ と1%塩酸 $90 \mu\text{L}$ を混ぜ、常温で7分間保管した後、血球計算器に $10 \mu\text{L}$ を入れ、全身性炎症反応の指標中の一つである白血球の数を測定し、図19に示した。

【0239】

図19に示すように、アスピリン単独投与群の場合、PBS投与群に比べて白血球の数値には影響がなかったが、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来マイクロベシクルを投与した場合、PBS投与群に比べて白血球が減少した。ところが、前記リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来マイクロベシクル及びアスピリンを併用投与した場合、マイクロベシクルによって減少した白血球の数が元の状態に復帰することを観察することができる。

【0240】

上記結果より、抗炎症及び／又は抗凝固作用を有する薬物の併用投与で細菌由来マイクロベシクルによる副作用(白血球の減少)を効果的に減らすことができることが分かる。

【0241】

実施例15：細菌由来マイクロベシクルを用いた癌組織への薬物伝達

本実験では、リポ多糖類の毒性が弱化するよう形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを用いて、抗癌薬物だけでなく、多様なサイズの薬物伝達体及び細胞を癌組織に伝達することが可能な効率を増加させることができるかを評価した。

【0242】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射し、1週間生育した後、PBS又は実施例2の方法によって分離したリポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクル $5 \mu\text{g}$ を含むPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ を静脈注射で注入した。6時間後、サイズ 100nm の緑色蛍光のビーズをさらに静脈注射した後、5分間ビーズが十分に血液を介して個体に均一に分布するようにした。その後、マウスの血液をいずれもPBS溶液で置換し、血管内に存在する蛍光ビーズを除去した。大腸癌組織を採取して凍らした後、 $20 \mu\text{m}$ の厚さに癌組織を凍結切削し、細胞の核を $10 \mu\text{g/mL}$ 濃度のヘキスト溶液で染色した。共焦点顕微鏡で、癌組織内に存在する蛍光ビーズを観察し、その結果を図20に示した。

10

【0243】

図20に示すように、リポ多糖類の毒性が弱化するように形質転換された大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを処理したとき、サイズ 100nm の蛍光ビーズが癌組織内に存在することを確認することができ、対照群としてPBS溶液を処理した場合、蛍光ビーズが癌組織内に存在しないことが分った。

【0244】

上記結果より、細菌由来マイクロベシクルを先に注入した後、抗癌薬物又は抗癌薬物が負荷された数十～数百ナノメートルサイズの薬物伝達体を注入すると、単独で抗癌薬物又は薬物伝達体を注入した場合よりさらに効率よく癌組織へ伝達することができることを類推することができる。

20

【0245】

実施例16：細菌由来マイクロベシクルの主要構成成分中のOmpAの抗癌効果

グラム陰性菌の細胞外膜に最も多く存在する外膜タンパク質の一つであるOmpAは、シェディングマイクロベシクルにも最も多く存在していることを、本研究陣のタンパク質体の分析結果に基づいて確認することができた。よって、細菌由来マイクロベシクルの抗癌活性を媒介する因子として、シェディングマイクロベシクル外膜タンパク質の主要構成成分の一つであるOmpAに対して抗癌活性を評価した。

【0246】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週後、PBS又は 1mg の組み換えOmpAタンパク質を含むPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ を各実験群別に4匹ずつマウスの尾静脈に週2回ずつ注射し、大腸癌細胞投与21日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は、最も長い長さ(l)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = l \times s^2 / 2$ の公式で計算した。大腸癌組織のサイズを測定した結果を図21に示した。

30

【0247】

図21に示すように、対照群と比較して組み換えOmpAタンパク質を投与した実験群において大腸癌組織のサイズが顕著に減少していることを確認することができる。前記結果より、細菌由来シェディングマイクロベシクルの外膜に存在するOmpAタンパク質は、細菌由来シェディングマイクロベシクルの抗癌活性を媒介する主要構成成分であることが分かる。

40

【0248】

実施例17：OmpF外膜タンパク質が欠乏している形質転換細菌由来シェディングマイクロベシクルの抗癌活性

本研究陣で行った細菌由来シェディングマイクロベシクルのタンパク質体分析結果に基づいて、OmpAだけでなく、OmpF外膜タンパク質もグラム陰性群由来シェディングマイクロベシクルの主要構成成分であることを確認した。これにより、OmpF外膜タンパク質による細菌由来シェディングマイクロベシクルの抗癌活性を評価した。

【0249】

本実施例では、OmpFが欠如している形質転換大腸菌から実施例2の方法で分離されたシェディングマイクロベシクルを使用した。

50

【0250】

マウス大腸癌26細胞株 1×10^6 細胞をマウスの皮膚下に注射して生育した。1週後、PBS、又は $1 \mu\text{g}$ の野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含むPBS溶液、及び $1 \mu\text{g}$ のOmp Fが欠如している形質転換大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを含むPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ をマウスの尾静脈に週2回ずつ注射し、大腸癌細胞投与21日後、大腸癌組織のサイズを測定した。大腸癌組織の体積(V)は、最も長い長さ(1)とこれに垂直な長さ(s)を測定して $V = 1 \times s^2 / 2$ の公式で計算した。大腸癌組織のサイズを測定した結果を図22に示した。

【0251】

図22に示すように、Omp Fが欠如している形質転換大腸菌由来シェディングマイクロベシクルの場合は、野生型大腸菌由来シェディングマイクロベシクルを投与した場合は異なり、細菌由来シェディングマイクロベシクルの抗癌活性が阻害された。

10

【0252】

上記結果より、細菌由来シェディングマイクロベシクルの外膜に存在するOmp F外膜タンパク質が、実施例1にから確認されたOmp Aと共に細菌由来シェディングマイクロベシクルの抗癌活性に必要な主要構成成分であることが分かる。

【0253】

実施例18：リポソームにOmp A外膜タンパク質を再構成

リポソームを作るために、MPEG-DSPE(N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine sodium salt)、HSPC (fully hydrogenated soy phosphatidylcholine)、及びコレステロール(cholesterol)をそれぞれ 3.19 mg/mL 、 9.58 mg/mL 、 3.19 mg/mL の濃度でクロロホルム(chloroform)に溶かした後、3つの脂質を1:1:1の比率で混合した。その後、窒素ガスを用いてクロロホルムを除去し、薄いフィルム(thin film)を生成した。生成されたフィルムに尿素バッファ(urea buffer) (344 mM 尿素、 10 mM KCl、 10 mM HEPES (pH 7.0、 3 mM NaN_3))を仕込み、水浴超音波発生器(water bath sonicator)を用いて 56°C で1時間超音波分解を行った。前記溶液を孔径 $1 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターに5回通した後、孔径 400 nm のメンブランフィルターに5回通し、しかる後に、孔径 100 nm のメンブランフィルターに5回通してリポソームを生成した。

20

30

【0254】

先立って生成されたリポソーム 0.3 mL に $280 \mu\text{g}$ のOmp Aタンパク質を含んでいる尿素バッファ 0.7 mL を追加し、オクチル- β -D-グルコピラノシドが 1.1% となるように入れた。 37°C で2時間培養した後、尿素バッファを 15 mL 追加した。前記溶液を $100,000 \times g$ で1時間超遠心分離した。生成されたペレットを尿素バッファ 0.2 mL で懸濁した後、 50% オプティブレップ溶液を入れて最終 30% となるようにした。容量 5 mL の超遠心分離チューブ(ultracentrifuge tube)にそれぞれ 30% リポソーム懸濁液 2 mL 、 20% オプティブレップ 1 mL 、 5% オプティブレップ 1 mL を順次入れた。その後、 $100,000 \times g$ で2時間超遠心分離した。 20% オプティブレップと 5% オプティブレップとの間の層から、Omp Aが負荷されたリポソームを得た。

40

【0255】

Omp Aタンパク質 200 ng とOmp Aを負荷したリポソーム $5 \mu\text{g}$ を準備した後、 $5 \times$ 負荷染色剤を最終的に $1 \times$ となるように仕込み、 100°C で5分間処理した。 12% ポリアクリルアミドゲルを準備し、サンプルを負荷した。 80 V で2時間電気泳動した後、 400 mA で2時間タンパク質をPVDFメンブランにトランスファーした。スキムミルク(skim milk)をPBSに 3% となるように溶かした後、メンブランを該溶液で常温で2時間ブロッキングした。Omp A抗体を 4°C で12時間処理した。PBSで2回洗浄した後、ペロキシダーゼが付いている二次抗体を室温で1時間処理した。PBSで30分洗浄した後、ECL基質で確認して図23に示した。

【0256】

50

図23に示すように、リポソームにOmpAが負荷されたことを確認した。OmpAタンパク質は、洗剤(detergent)と共に存在するため、変性(denaturation)された形で存在するが、リポソームに再構成される場合、フォールディング(folding)と変性(denaturation)された形で存在することを確認することができる。上記結果より、OmpAはリポソームに再構成できることを確認した。

【0257】

前述した本発明の説明は例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は本発明の技術的思想又は必須的な特徴を変更することなく様々な具体的形態に容易に変形可能であることを理解することができるであろう。よって、上述した実施例は全ての面で例示的なものに過ぎず、限定的なものではないと理解すべきである。

【産業上の利用可能性】

【0258】

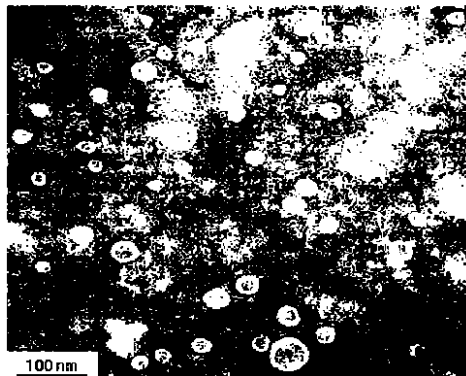
本発明の細菌由来マイクロベシクルは、癌を含む多様な疾病に対してその治療用又は診断用物質を目標の細胞又は組織に特異的に伝達して疾病治療の効率を高め且つ診断を容易にすることに利用できる。

【0259】

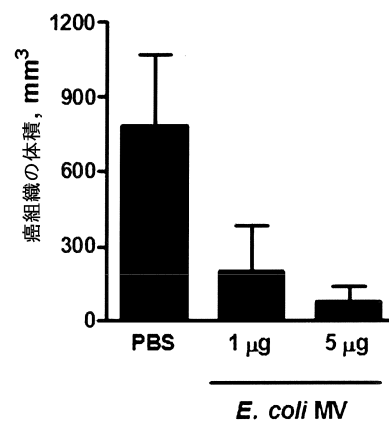
また、疾病治療用及び／又は診断用物質が負荷された本発明の細菌由来マイクロベシクル及びその製造方法は、*in vitro*及び／又は*in vivo*で治療及び／又は診断用、又は実験用として使用できる。

【図1】

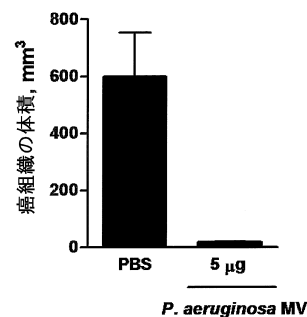
[Fig. 1]



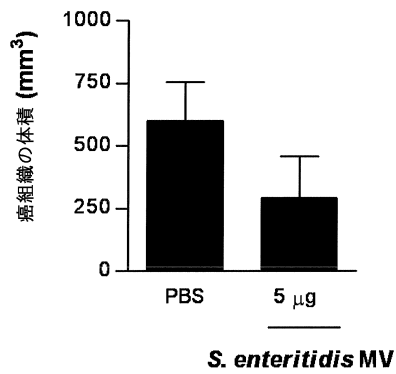
【図2】



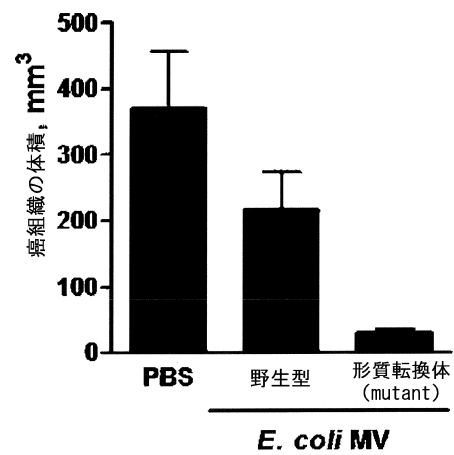
【図3】



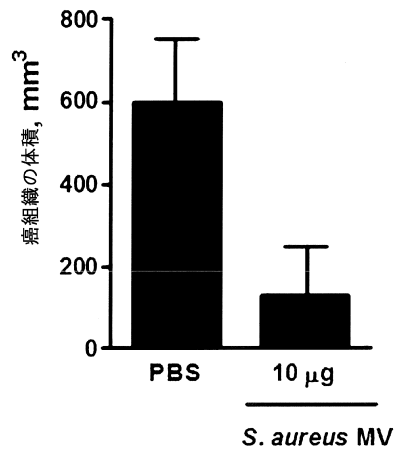
【図 4】



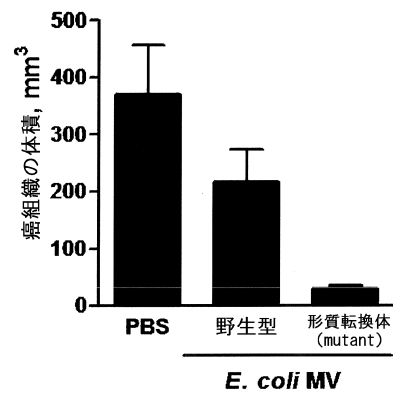
【図 6】



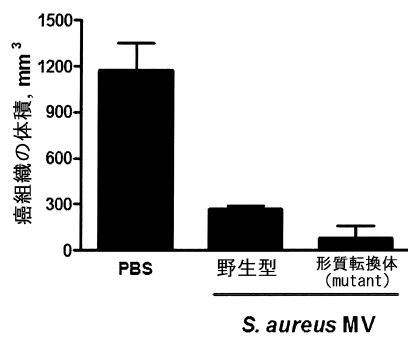
【図 5】



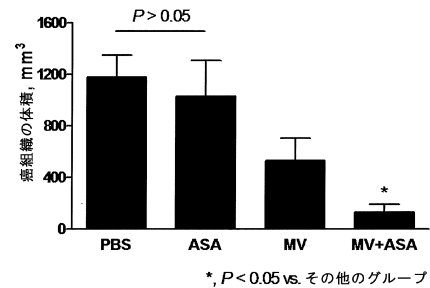
【図 7】



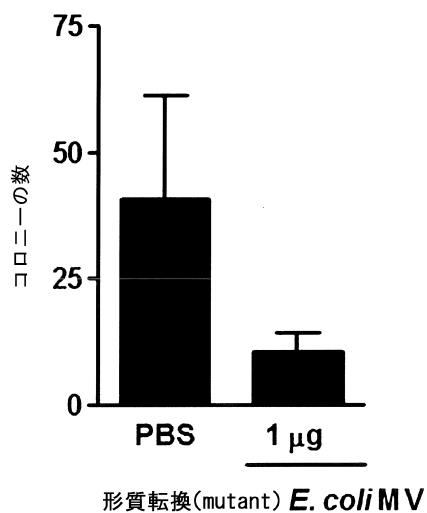
【図 8】



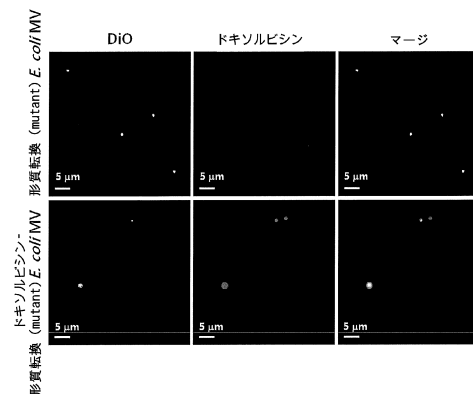
【図 10】



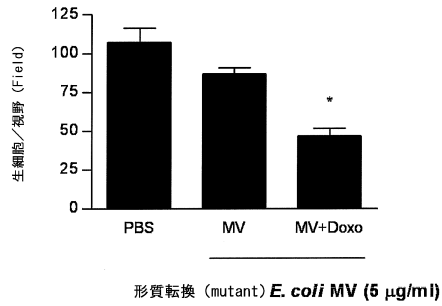
【図 9】



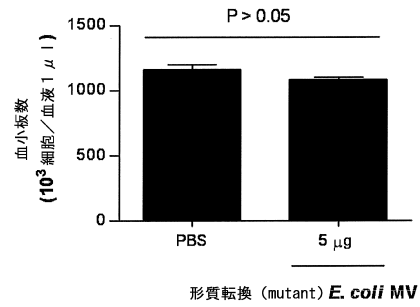
【図 11】



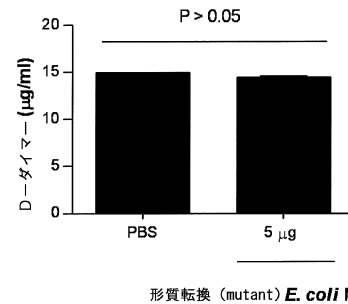
【図 12】

*, $P < 0.001$ vs. その他のグループ

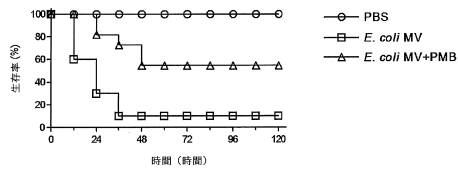
【図 15】



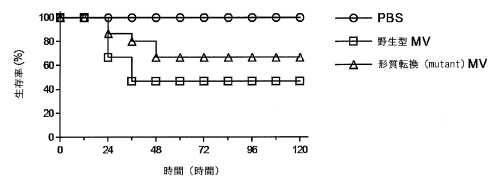
【図 16】



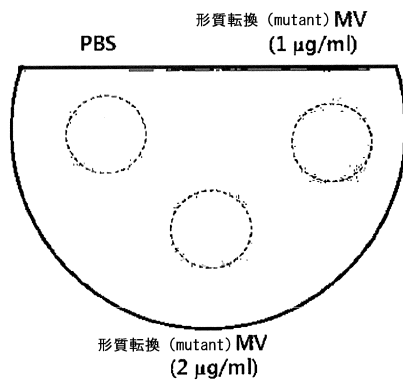
【図 13】



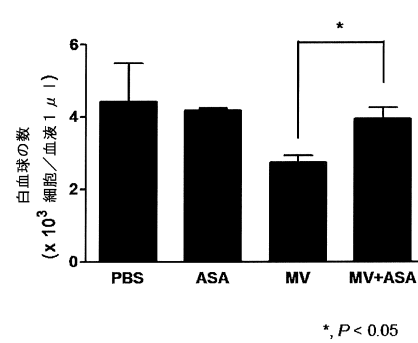
【図 14】



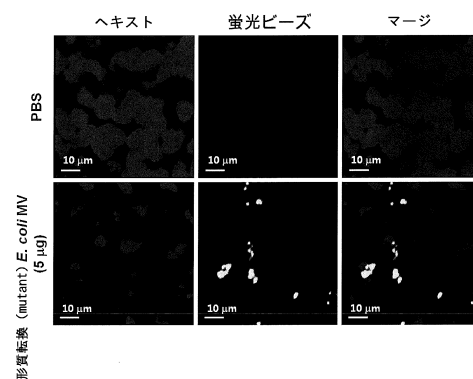
【図 17】



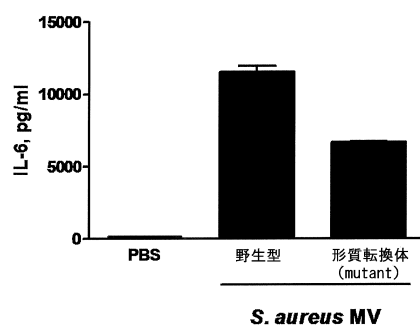
【図 19】



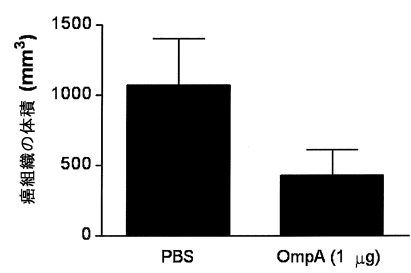
【図 20】



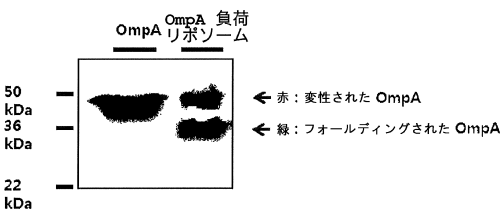
【図 18】



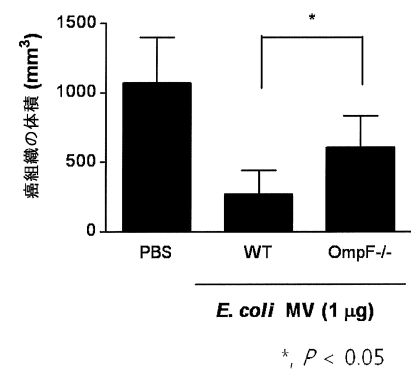
【図 2 1】



【図 2 3】



【図 2 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

- (72)発明者 キム、オ ヨン
大韓民国 ソウル 140-728、ヨンサン-グ、イチョン 1-ドン、214-1803 ハ
ンガラム アパートメント
- (72)発明者 チャン、ス チョル
大韓民国 ギョンサンブク-ド 757-913、イエチョン-グン、ガンチョン-ミョン、59
1 ヒョンネ-リ
- (72)発明者 ユン、チャン ミン
大韓民国 ギョンサンブク-ド 790-330、ポハン-シ、ナム-グ、ヒョジャ-ドン、7-
104 スンニ ヴィラ
- (72)発明者 キム、ヨン グン
大韓民国 ギョンサンブク-ド 790-751、ポハン-シ、ナム-グ、ジゴク-ドン、8-1
302 ギョス アパートメント

審査官 安居 拓哉

- (56)参考文献 特開平01-500752 (JP, A)
特開平10-076155 (JP, A)
特開平08-243378 (JP, A)
特表2006-503822 (JP, A)
特表2003-521494 (JP, A)
国際公開第2007/132790 (WO, A1)
国際公開第91/012813 (WO, A1)
Eun-Young Lee et al., Proteomics, 2009年, Vol. 9, 5425-5436
Radoslaw Spiewak and Jacek Dutkiewicz, Ann Agric Environ Med, 2008年, Vol. 15, 153
-161

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 35/74
A 6 1 K 39/00-44
A 6 1 K 9/00-72
A 6 1 K 47/00-48