(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0055953
(43) 공개일자 2011년05월26일

(51) Int. Cl.
A61K 39/112 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0112590
(22) 출원일자 2009년11월20일
심사청구일자 2009년11월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
윤원석
서울특별시 용산구 문배동 3-3 이안프리미어 608호
(74) 대리인
김선애

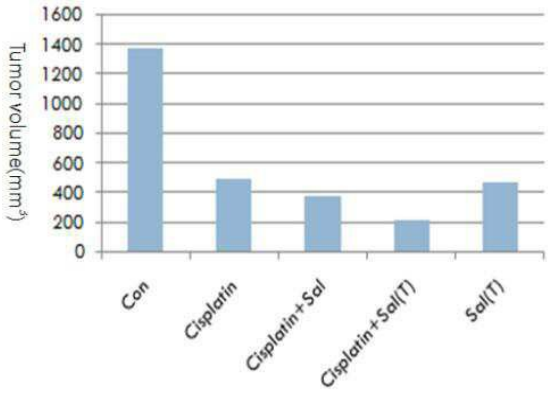
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제

(57) 요 약

본 발명은 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 화학요법제, 방사선요법 또는 면역세포치료제의 항암치료 효과를 증진시키며 항암요법의 부작용을 최소화할 수 있어 투여용량의 한계로 적용증이 제한적인 기존의 항암치료요법의 적용증 및 효능증대에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090228-0901-0000100

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술진흥사업

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

기여율

주관기관 한국보건산업진흥원

연구기간 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제.

청구항 2

항암제와 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴(ciplatin), 독소루비신(doxorubicin) 및 에토포사이드(etoposide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 항암치료 보조제.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 항암제의 용량은 1pg ~ 20 pg/100ul 으로 하고, 상기 항암치료 보조제의 용량은 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 으로 하는 것을 특징으로 하는 항암치료 보조제.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 암은 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁 경부암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 항암치료 보조제.

청구항 6

방사선요법과 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 방사선 항암치료 보조제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 방사선은 4G ~ 100G의 저준위방사선으로 10 ~ 15분 조사하는 것을 특징으로 하는 방사선 항암치료 보조제.

청구항 8

면역세포치료제와 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역세포치료제는 수지상세포 또는 림프구를 이용한 것을 특징으로 항암치료 보조제.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 면역세포치료제의 용량은 10^3 ~ 10^7 cell/100ul 으로 하고, 상기 항암치료 보조제의 용량은 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 으로 하는 것을 특징으로 하는 항암치료 보조제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 화학요법제, 방사선요법 또는 면역세포치료제의 효과를 증진시키며 항암요법의 부작용을 최소화할 수 있어 투여 용량의 한계로 적용증이 제한적인 기존의 항암치료요법의 적용증 및 효능증대에 기여할 수 있는 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 국내의 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 암은 고령화로 인해 더욱 증가하는 추세에 있다. 현재 항암요법은 외과수술과 화학요법과 방사선요법이 주로 사용된다.

[0003] 특히 외과수술을 제외하고 화학요법 및 방사선요법의 경우 다양한 제제와 방사선 등이 사용되지만 그들의 적용은 인체가 감당할 수 있는 범위에 한정된다. 이들 화학요법 및 방사선요법의 제한적인 적용은 동물시험에서 아무리 우수한 효능을 보일지라도 임상에서 그 효과를 상쇄시키며 적용범위를 제한하고 효능을 제한하는 단점이 있기 때문이다. 이는 항암제 내성을 가진 암세포의 출현 또는 각각의 요법의 세포독성에 기인한 부작용으로 말미암는다.

[0004] 예를 들어 시스플라틴[cisplatin(cis-diamminedichloroplatinum; CDDP)]은 가장 효과적인 암 치료제로서, 현재 임상에서 사용되고 있는 30여종의 항암제 중 가장 유용한 약제의 하나로 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁 경부암 등의 암에 약효가 있는 것으로 알려져 있다(Teni Boulikas, Oncology Reports, 10:1663-1682, 2003). 그러나, 최근에는 시스플라틴 내성을 가진 암들이 많이 보고되고 있어, 현재 이런 내성을 가진 암 세포들이 문제시 되고 암 치료 후 재발의 위험이 있기 때문에 시스플라틴과 다른 화학물질과의 복합요법 또는 시스플라틴과 세포 내 발현 단백질의 조절에 의한 치료의 연구가 활발히 진행중인 실정이다(Tito Fojo, Oncogene, 22: 7512-7523, 2003).

[0005] 또한, 방사선요법은 적당한 양의 방사선을 환부에 조사(照射)함으로써 인체에 발생하는 각종 암을 치료하는 항암요법인데, 이러한 방사선요법은 인체의 조혈기능을 저하시키고 면역계를 억제시켜 암 치료의 효율성을 낮추는 문제점이 있다. 나아가 반복적인 방사선 조사로 인해 암세포가 저항성을 획득하게 되어 방사선요법에는 한계가 있다.

[0006] 이와 같은 항암치료에 있어서 화학요법 및 방사선요법의 부작용은 항암치료의 성공 여부를 떠나 환자의 삶의 질을 매우 열악하게 하고, 나아가서는 또 다른 치명적인 병인으로 작용할 수 있다.

[0007] 상기 치명적인 부작용 중 하나는 골수의 억제를 들 수 있는데, 이로 인해 적혈구 감소에 의한 빈혈, 백혈구 감소에 의한 면역약화, 혈소판 감소에 의한 출혈위험 등이 발생할 수 있다. 또 다른 부작용은 간장 및 신장에 대한 부작용으로, 간에서의 항암제의 분해 배설이 저해되어 항암제의 다른 부작용들이 심하게 나타나는 경우도 많다. 우리 몸의 노폐물을 배설하는 장기인 신장기능이 항암제, 암화 또는 다른 요인에 의하여 떨어지면, 항암제의 배설이 늦추어져서 항암제의 부작용이 극대화되는 악순환이 되풀이 될 수 있고, 노폐물의 배설지연에 의한 요독증의 증상이 나타날 수도 있다. 또한, 항암 화학요법제 또는 방사선요법의 개개적인 특성에 따라 심장, 생식기관, 신경계에 영향을 끼치는 부작용도 다수 알려져 있다.

[0008] 따라서 항암치료를 요하는 환자에 있어서, 그 부작용의 관리는 다른 질병과는 달리 항암요법 그 자체에 버금가는 중요성을 가지는 것이라 할 것이다. 일반적인 경미한 구역, 구토 등에 대한 보조 치료제 외에는, 이들 화학요법 및 방사선요법 그리고 최근에 개발되고 있는 세포치료요법의 효능을 항진시키면서 항암요법의 부작용을 최소화하고, 광범위하게 사용할 수 있는 면역보조제 내지 강화제로 역할을 하는 생물학적 조성물을 포함하는 항암치료 보조제는 알려진 바가 없다.

[0009] 한편, 본 발명자들은 병원성이 없는 약독화된 살모넬라 균주내에 진핵세포에서 튜머 네크로시스 팩터 알파(TNF-α)를 발현할 수 있는 플라스미드를 형질도입함으로써 기존의 살모넬라보다 훨씬 더 우수한 항암효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 종래 TNF-α를 자체 발현하는 살모넬라의 독성문제를 해결할 수 있는 TNF-α를 발현하는 살모넬라 균주를 개발한 바 있다(대한민국 특허 제10-0852687호). 그러나 기존의 항암요법의 효능을 항진시키면서 항암요법의 부작용을 최소화할 수 있어 기존 항암요법의 적용증을 확대하는 동시에 항암제 개발에 기여할 수 있는 용도에 대해서는 밝혀진 바는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 화학요법 및 방사선요법 그리고 세포치료요법 등의 항암요법의 효능을 항진시키면서 항암요법의 부작용을 최소화하고, 광범위하게 사용할 수 있는 면역보조제 내지 강화제로 역할을 하는 TNF-α를 발현하는 살모넬라을 포함하는 항암치료 보조제를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은, 투여용량의 한계로 적용증이 제한적인 기존의 치료요법의 적용증 및 효능증대에 기여할 수 있는 항암치료 보조제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 인체에 대한 부작용을 줄이기 위해 약제를 저용량으로 투여해도 고용량의 효능을 유도할 수 있는 항암제 개발에 기여할 수 있는 항암치료 보조제를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0014] 상기한 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제를 제공한다. 본 발명자들은 TNF-α를 발현하는 살모넬라 균주에 대한 연구를 계속하여 TNF-α를 발현하는 살모넬라 균주의 항암기전이 TNF-α에 의한 직접적인 효과와 NK 세포(NK Cell) 활성화에 관련되어 있음을 밝혀내고(도 1 및 도 2 참조), 항암치료 보조제로 사용시 본 발명에 의한 살모넬라 균주는 면역보조제 내지 강화제로 역할을 하여 기존의 항암요법의 효능을 항진시키면서 항암요법의 부작용을 최소화할 수 있고, 광범위하게 사용할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0015] 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.

[0016] 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).

[0017] 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. 본 발명에 있어서, 상기 TNF-α를 코딩하는 유전자는 상용화된 어떤 TNF-α 알파발현 플라스미드부터도 입수할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 플라스미드는 TNF-α를 진핵세포 내에서 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 플라스미드도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 pcDNA3-TNF-α인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 있어서, 바람직하게는 한국미생물보존센터에 2006. 9. 26자로 기탁된 수탁번호 KCCM10782P인 것을 특징으로 하는 살모넬라 균주를 이용할 수 있다.

[0019] 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. 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.

[0020] 본 발명의 항암치료용 조성물은 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 500mg의 본 발명의 항암치료 보조제를 투여할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 항암제와 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제를 제공한다.

[0022] 상기 항암제는 이에 한정되는 것은 아니나, 시스플라틴(ciplatin), 독소루비신(doxorubicin) 및 에토포사이드(etoposide)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0023] 본 발명자들은 현재 항암제(화학요법제)로 시스플라틴(cisplatin)을 이용한 효능비교 및 본 발명에 의한 보조제를 동시 투약시 특성변화를 확인 결과, 병용할 경우 길항작용을 유도하여서 항암제(화학요법제)의 효과를 증대시킬 수 있는 것으로 나타났고, 본 제제의 효과가 기존 항암제(화학요법)와 경쟁관계가 아님이 확인되었다(도 3 참조).

[0024] 상기 항암제를 1pg ~ 20pg/100ul 용량(마우스 체중 20g당)으로 투여하고, 본 발명에 의한 항암치료 보조제를 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 용량으로 투여할 경우 항암제의 부작용을 최소화하면서 양 제제에 의한 항암 치료효과를 극대화할 수 있다. 이 용량은 인체 정상 유효용량(시스플라틴: 최대 0.48mg/mL(예. 240mg/500mL)농도로 1 ~ 8 시간에 걸쳐 투여한다)으로 환산할 경우 기존 제제의 절반의 농도로 같은 효과를 유발할 수 있는 것이다.

[0025] 본 발명에서 있어서, 상기 암은 이에 한정되는 것은 아니나, 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁 경부암 또는 유방암일 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 방사선요법과 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 방사선 항암치료 보조제를 제공한다.

[0027] 본 발명자들은 방사선(항암)요법의 항암치료기법과 본 발명에 의한 TNF-α를 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 확인되었다(도 4 참조).

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] 본 발명의 또 다른 태양에 의하면, 면역세포치료제와 병용되는, TNF-α를 발현하는 살모넬라를 포함하는 항암치료 보조제를 제공한다.

[0031] 본 발명에 있어서, 면역세포치료제는 암 환자로부터 채취한 시료를 이용하여 암세포를 살해할 수 있는 면역세포를 분화시키거나 면역세포수를 10억 배 이상으로 늘린 뒤 다시 암환자의 몸에 주입해 암의 성장을 늦추거나 암세포를 죽이는 차세대 항암치료 제제이다. 면역세포치료제는 종래 항암요법과 달리 부작용이 적기 때문에 항암요법의 하나의 수단으로 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포치료제에는 이에 한정되는 것은 아니나, 예를 들어 림프구 또는 수지상세포를 이용한 면역세포치료제 등이 있다. 상기 림프구를 이용한 세포치료는 암세포를 파괴하는 능력을 지닌 림프구를 이용해 그 기능을 강화하고 증폭시킨 세포를 체내에 투입해 암을 치료하는 것이다(활성화림프구 요법). 또한, 수지상세포를 이용하는 세포치료는 림프구에 정보 및 자극을 주는 기능을 수행하는 수지상세포를 이용하여 암을 치료하는 것이다(수지상세포 치료법: Induction of Anti-Tumor Activity with Dendritic Cells Loaded with Tumor Cell Lysates or Adenoviral Vector-Encoding Tumor-Associated Antigens Molecular Therapy (2005) 11, S110).

[0033] 이들 면역세포치료제는 항암제와의 병행 시에 항암제의 분화세포억제능력으로 말미암아 면역세포치료제에 사용되는 수지상세포 등의 면역세포의 기능을 약화시킬 수 있다. 이에 본 발명자들은 면역세포치료제와 재조합 살모넬라의 병행 투여 시에 효능시험 변화를 측정하여 보았다. 현존 면역세포치료제의 경우 항암 능력은 본 동물모델에서는 다소 적지만 본 발명에 의한 살모넬라와 병행투여 시 효능이 상승되며 두 요법 사이에 경쟁관계는 미미한 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0034] 특히, 면역세포치료제를 10^5 ~ 10^7 cell/100ul 용량으로 투여하고, 본 발명에 의한 항암치료 보조제를 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 용량으로 투여할 경우 양 제제에 의한 항암 치료효과를 극대화할 수 있다.

[0035]

효 과

[0036] 상술한 바와 같은 구성을 갖는 본 발명에 의한 본 발명에 의한 항암치료 보조제는 기존의 화학요법제, 방사선요법, 또는 면역세포치료제 등과 병용투여하여도 효능의 변화가 없고 오히려 그 효능을 증대시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

[0037] 또한, 투여용량의 한계로 적용증이 제한적인 기존의 항암 치료요법의 적용증 및 효능증대에도 기여할 수 있다.

[0038] 나아가 본 발명은 인체에 부작용을 줄이기 위해 약제를 저용량으로 투여해도 고용량의 효능을 유도할 수 있는 항암제 개발에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 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.

[0040] **실시예 1. TNF-α를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 유전자 발현벡터를 포함하는 살모넬라 균주의 제작**

[0041] 먼저, 약독화된 살모넬라 균주 BRD509(Salmonella typhimurium BRD509)를 루리아 벌테니(Luria Bertani) 배지에서 37℃ 배양하였다. 한국사이토카인 은행으로부터 TNF-α 분비 벡터 플라스미드, pcDNA3-TNF-α 벡터(ACCESSION NUMBER 21926)를 입수하였다. 상기 벡터는 Invitrogen사의 pcDNA3 모벡터의 CMV promoter하의 EcoRI (939) 부위와 XbaI (1653) 부위 사이에 TNF-α 유전자를 클로닝하여 제조되었다. 배양된 상기 살모넬라 균주에 상기 pcDNA3-TNF-α 벡터를 형질도입하기 위하여, 상기 살모넬라 균주를 다시 100mL의 양으로 24시간 배양한 후 파장 600nm의 광학흡광도(O.D.600) 및 0.7을 나타내는 배양농도에서 세균을 5500rpm의 속도로 원심분리하였다. 상기 원심분리 후 바닥에 가라앉은 세균만을 수집하여 배양부피와 동일한 부피의 차가운 증류수로 희석하였다. 상기 희석시킨 세균을 다시 상기와 동일한 방법으로 원심분리하여 2mL의 차가운 20% 글리세롤 증류수에 희석한 다음, 또 다시 원심분리의 과정을 거쳐 수득한 세균을 100㎕의 20% 글리세롤에 희석하였다. 상기 과정에 의해 얻어진 혼합액 중 30㎕(2㎍)를 미니원심분리용기에 넣고 여기에 TNF-α를 진핵세포에서 발현하는 플라스미드(plasmid)인 pcDNA3 벡터를 3㎕(2㎍) 가한 후, 275-325V의 전기로 형질도입을 유도하였다. 그 결과 얻어진 TNF-α를 발현하는 플라스미드(plasmid)를 포함하는 살모넬라(수탁번호 제KCCM-10782P호)를 살모넬라 균주로 이용하였다.

[0042] **실시예 2. TNF-α 발현 살모넬라 제제의 체내효능의 기전평가**

[0043] TNF-α 발현 살모넬라 균주의 효능시험에 대한 증거자료로 기전에 대한 시험을 위해 본 발명자들은 유전자 결실 마우스를 이용하여 TNF-α 발현 살모넬라의 효능에 기여하는 생체 내 유효물질을 평가해보았다.

[0044] 사용한 방법은 MHC-I, MHC-II 등의 세포면역과 혈액성면역의 결실 마우스를 이용하여 효능에 기여하는 면역체계를 확인하고자 하였고 암세포 면역에 관여하는 주요 면역유전자 결실 마우스(NKT CELL-, CD8T CELL-, CD4T CELL-, IL-12-, IL-4-, TNF-, IFN-)를 사용하여 유전자 결실 마우스에 암을 이식한 후에 재조합 유전자 발현 살모넬라를 투여하여 효능을 평가해보았다(참고문헌: Tumor formation suppressed in γδT knock-out mice, Cancer Letters, Volume 153, Issues 1-2, 29 May 2000, Pages 63-66).

[0045] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 다른 지표보다 NK 세포(NK Cell)가 없는 마우스에 이식한 암 동물시험에서 TNF-α 발현 살모넬라의 효능이 저하됨을 확인할 수 있었다. 이는 TNF-α 발현 살모넬라의 기전에 NK 세포가 중

요한 영향을 미친다는 것을 말해주며 기타 결과를 통해 MHCII 의 유전자 결실마우스에서도 효능저하가 유도되기에 혈액성면역도 효능에 기여함을 제시하였다.

[0046] 나아가 본 발명자들은 NK 세포 활성화에 대한 TNF-α 발현 재조합 살모넬라의 기능을 확인하기 위하여, NK 세포를 분리하여 이들에 재조합 유전자 발현 살모넬라를 투여하였다. 이후 활성화에 대한 지표로 인터페론 감마를 분비하는 정도를 ELISA로 분석해 보았다(참고문헌: Shibayagi ELISA KIT protocol, Shibayaki.co.Japan).

[0047] 그 결과, TNF-α 발현 재조합 살모넬라에 의해서 NK 세포가 활성화 되었다. 이는 TNF-α 발현 살모넬라의 항암기전이 TNF-a 에 의한 직접적인 효과와 NK 세포 활성화에 관련되어 있음을 제시한다.

[0048] **실시예 3. 항암제(화학요법제)와 병용 투여시 본 발명에 의한 항암치료 보조제로서 TNF-α 발현 살모넬라 균주의 효능 평가**

[0049] 본 발명자들은 현재 사용중인 항암요법과 TNF-α 발현 살모넬라 균주의 효능 비교 연구를 수행하였다. 이는 기존 제품과의 경쟁력을 확인해줄 수 있는 시험이었으며 동시에 TNF-α 발현 살모넬라 균주 제제의 특성에 대한 정보를 제공해주는 자료가 되었다.

[0050] 우선, 본 발명자들은 현재 항암제(화학요법제)로 시스플라틴(cisplatin)과의 효능비교를 시험하였다. 본 제제는 동아제약의 시스푸란을 100ul 투약하는 것과 TNF-α 발현 재조합 살모넬라와의 효능 비교 및 동시 투약했을 때의 특성변화를 확인하였다. 이때, TNF-a 발현 재조합 살모넬라는 10^3 ~ 10^6cfu/100ul 으로 PBS용액에 혼탁투여되었고 동시에 화학요법제는 복강내로 100ul 투여되었는데 피하주사 및 정맥주사도 가능하다.

[0051] 그 결과 도 3에 나타난 것과 같이 병용투여 시 길항작용을 유도하여서 화학요법제의 효과를 증대시킬 수 있음을 보여주었다. 이는 본 제제의 효과가 기존 화학요법과 경쟁관계가 아님을 제시하였다.

[0052] **실시예 4. 방사선요법과 병용 시 본 발명에 의한 항암치료 보조제로서 TNF-α 발현 살모넬라 균주의 효능 평가**

[0053] 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.

[0054] 이때 방사선은 10G의 세기로 10분 동안 조사되었고, 이때 살모넬라 균주는 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 용량으로 투여되었다.

[0055] 도 4에서 보여주는 결과는 본 재조합 살모넬라 균주의 경우 방사선(치료)요법과 병행하여 사용될 수 있고 방사선(치료)요법과 대등한 치료효과를 보여는 것으로 밝혀졌다. 방사선 치료의 경우 4G의 저준위방사선 조사장치(원자력연구소, 정읍)를 사용하여 10분 조사하는 방법으로 항암효과를 유도할 수 있었다. 살모넬라 균주에 대한 방사선의 효과는 미미하며, 1000G 이상의 방사선이 조사될 때에 살모넬라 균주의 이상이 유도된다.

[0056] **실시예 5. 면역세포치료제와 병용 투여 시 본 발명에 의한 항암치료 보조제로서 TNF-α 발현 살모넬라 균주의 효능 평가**

[0057] 면역세포치료제는 항암요법의 하나의 수단으로 고려되어 있다. 이들 면역세포치료제는 항암제와의 병행 시에 항암제의 분화세포억제능력으로 말미암아 면역세포치료제에 사용되는 수지상세포 등의 면역세포의 기능을 약화시킬 수 있다. 이에 본 발명자들은 면역세포치료제와 본 발명에 의한 재조합 살모넬라의 병행 투여 시에 효능시험 변화를 측정하여 보았다.

[0058] 상기 면역세포치료제는 10^5 ~ 10^7 cell/100ul 용량으로 이때 살모넬라 균주는 10^3 ~ 10^6 cfu/100ul 용량으로 투여되었다.

[0059] 도 5는 항암 면역세포치료제와의 병행효과 시험결과를 나타낸다. 도 5에 나타난 바와 같이, 현존 면역세포치료제의 경우 항암 능력은 본 동물모델에서는 다소 적지만 재조합 유전자 전달 살모넬라와 병행투여 시 효능이 상승되며 두 요법 사이에 경쟁관계는 미미한 것으로 나타났다.

[0060]

[0061] 결과적으로 도 3 내지 도 5에서 보듯이 각각의 항암치료법과 본 발명에 의한 TNF-α를 발현하는 살모넬라는 서로 경쟁관계에 있지 않고 동시 투약 시 서로의 효과를 상승시켜 줌을 확인할 수 있었다. 이는 살모넬라를 이용한 유전자 전달제제가 항암보조제로서의 유용성이 높다는 것을 보여준다. 또한, 박테리아를 이용한 유전자 전달제의 효능시험이 기존 항암요법과의 비교시험에도 통용될 수 있음을 제시하였다.

[0062] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 NK 세포 결손 마우스에 암을 이식한 후 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 투여하면 살모넬라의 효능이 저하되는 결과를 보인 도면이다.

[0064] 도 2는 NK 세포 활성화에 대한 TNF-α를 발현하는 살모넬라의 기능을 확인하기 위하여, 분리된 NK 세포에 TNF-α를 발현하는 살모넬라를 투여한 후 활성화에 대한 지표로 인터페론 감마를 분비하는 정도를 분석한 결과를 보인 도면이다.

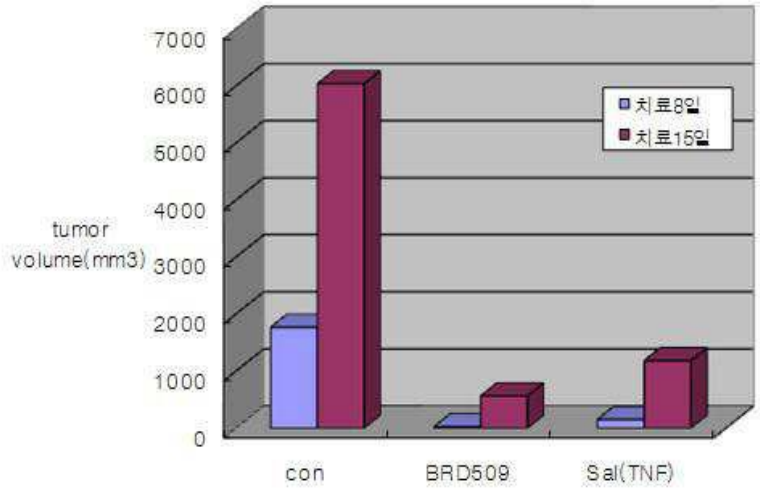
[0065] 도 3은 항암제(시스플라틴)과 재조합 살모넬라의 병행치료효과를 비교한 결과를 보인 도면이다.

[0066] 도 4는 방사선요법과 재조합 살모넬라의 병행치료효과를 비교한 결과를 보인 도면이다.

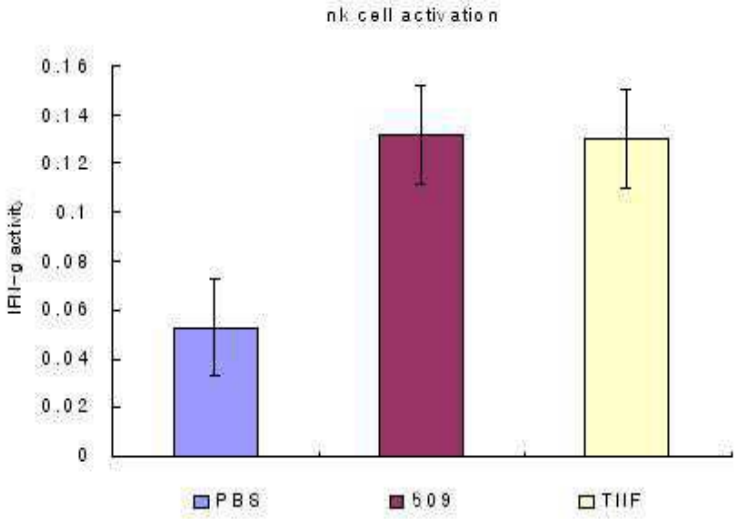
[0067] 도 5는 면역세포치료제와 재조합 살모넬라의 병행치료효과를 비교한 결과를 보인 도면이다.

도면

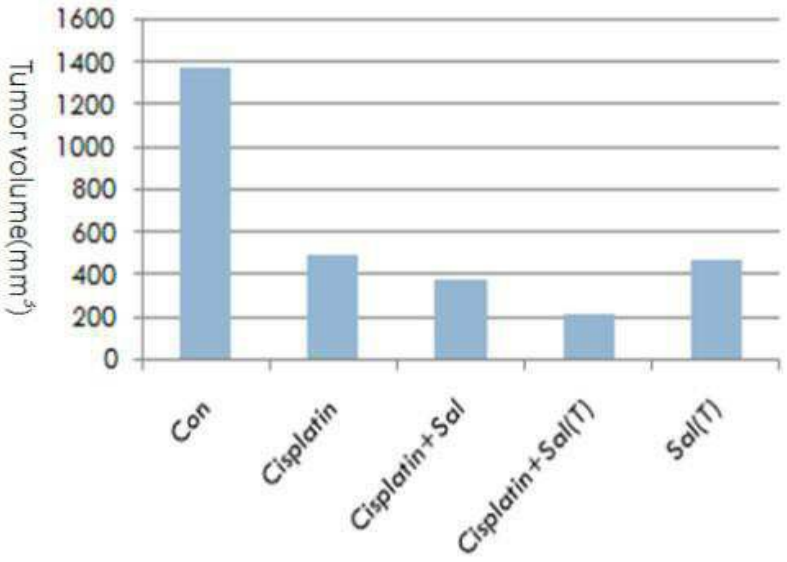
도면1



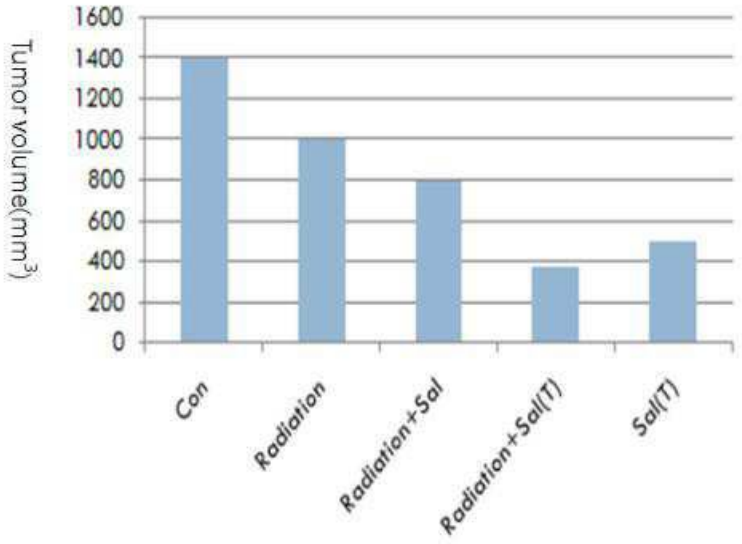
도면2


nk cell activation
IFN-g activity
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
PBS
509
TIIF

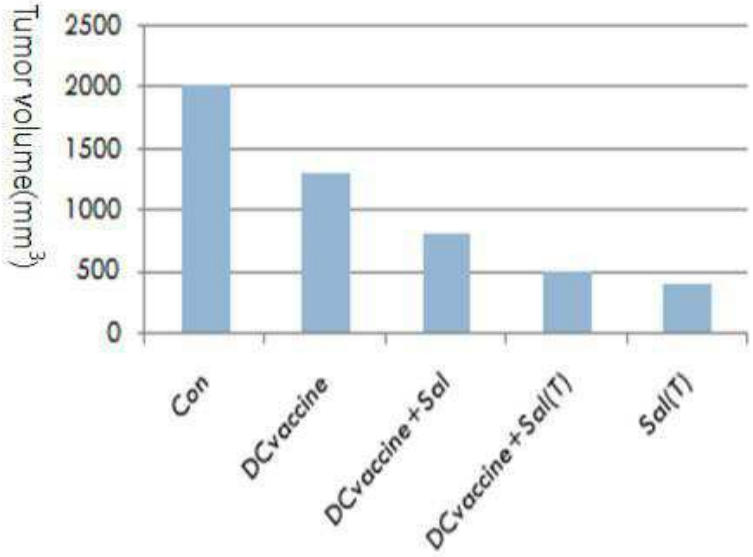
도면3


Tumor volume(mm3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Con
Cisplatin
Cisplatin+Sal
Cisplatin+Sal(T)
Sal(T)

도면4


Tumor volume(mm3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Con
Radiation
Radiation+Sal
Radiation+Sal(T)
Sal(T)

도면5


Tumor volume(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
Con
DCvaccine
DCvaccine+Sal
DCvaccine+Sal(T)
Sal(T)