(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0112302
(43) 공개일자 2010년10월19일

(51) Int. Cl.
C12N 5/07 (2010.01) *A61K 35/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12R 1/42* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0030749
(22) 출원일자 2009년04월09일
심사청구일자 2009년04월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
윤원석
서울특별시 노원구 중계본동 109-8 부강그린빌라 B-401
(74) 대리인
김선애

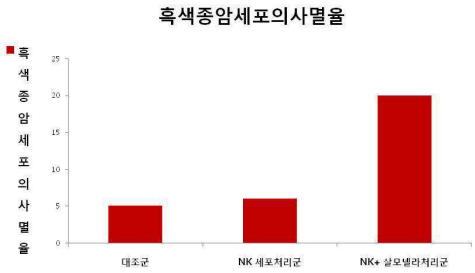
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 살모넬라 균주를 이용한 항암치료용 NK 세포의 활성화 방법

(57) 요 약

본 발명은 열처리된 살모넬라 균주를 처리하여 자연살해(NK) 세포를 활성화하여 항암효과를 증진시킬 수 있는 살모넬라 균주를 이용한 항암치료용 NK 세포의 활성화 방법 및 이를 이용하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기한 본 발명은, 부작용을 최소화하고 간편하고 경제적인 방법으로 항암효과를 증진시킬 수 있는 이점이 있어, 항암 치료 및 보조 예방제제와 관련한 의약산업에 있어서 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KRF-2007-313-E00156
부처명 한국학술진흥재단
연구관리전문기관
연구사업명 기초과학 하반기 단독
연구과제명 항암 유전자를 발현하는 재조합 살모넬라균을 이용한 항암효과연구
기여율
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2007년 12월 01일 ~ 2008년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

열처리된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 자연살해(NK) 세포에 처리하여 자연살해(NK) 세포를 활성화하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 PBS 현탁상태에서 60 - 110 ℃ 물중탕에서 5 - 20분간 가열하여 열처리된 것을 특징으로 하는 자연살해(NK) 세포를 활성화하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 살모넬라 균주는 살모넬라 티피뮤리움 BRD509인 것을 특징으로 하는 자연살해(NK) 세포를 활성화하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 열처리된 살모넬라 균주를 자연살해(NK) 세포 배지에 투여하고 공동 배양하여 자연살해(NK) 세포를 활성화하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 활성화되어 항암치료의 효능이 증대된 자연살해(NK) 세포.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 활성화된 자연살해(NK) 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 암은 피부암인 것을 특징으로 하는 항암 치료용 조성물.

청구항 8

열처리된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 처리하여 자연살해(NK) 세포의 IFN-감마 분비량을 증가시키는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 살모넬라 균주를 이용한 항암치료용 NK 세포의 활성화 방법 및 이를 이용하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 열처리된 살모넬라 균주를 처리하여 자연살해 세포(Natural Killer cell, 이하 NK 세포라고 함)를 활성화하여 항암효과를 증진시킬 수 있는 살모넬라 균주의 용도 및 이를 이용하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 살모넬라는 병원성 미생물로 대개의 경우 식중독을 일으키는 병원균이다. 하지만, 미국 예일대학 연구팀은 유러피언 암 잡지(European Journal of Cancer)에 발표한 논문에서 유전자를 조작한 살모넬라균과 방사선 요법을 병

행하여 사용함으로써 흑색종을 치료하는데 매우 성공적인 결과를 거두었다고 보고하였다(Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation.Journal of Cancer, 18, 23972402 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.

[0003] 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.

[0004] 나아가, 현재의 암 치료법들인 외과적 수술요법, 약물요법, 방사선치료법 등은 일시적으로 치료효과를 나타낼 수 있으나 내성, 재발 또는 여러 가지 부작용이 발생하는 문제점이 있어 많은 선진국들에서 항암제나 진단시약을 개발하기 위해 면역반응을 조절할 수 있는 면역치료법을 이용하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있으나, 암의 진단, 예방 및 치료법을 효율적으로 개발할 수 있는 면역세포치료법 개발은 아직 초기단계로 알려져 있다.

[0005] 자연살해 세포(NK 세포)는 혈액 내 백혈구의 일종으로 인간 골수에서 생성되며 암세포를 직접 파괴하는 면역세포로서, 병원균, 암, allogeneic 세포 등을 제거하는 선천성 면역 (innate immunity)에 관여하며, TNF-α, IFN-γ, IL-12 등의 사이토카인을 분비하여 적응성면역 (adaptive immunity)을 매개함으로써 암에 특이적인 기억형성을 조절하는 기능을 가지고 있으며 여러 암들에서 NK 세포의 기능 및 분화능력에 결함이 있는 것으로 보고되었다.

[0006] NK 세포를 이용한 기존의 암 치료요법으로는 인터루킨-2로 NK 세포를 활성화시켜 암세포에 대한 면역반응을 증진시키는 방법(참고문헌 : Tumor specific boosting of IL-2 induced NK activation by paraformaldehyde fixed tumor cells Sohita Dhillon* and Rajiv K. SaxenaImmunology Laboratory, School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, 110067, India Immunology Letters Volume 63, Issue 3, October 1998, Pages 153-158)과 일본 등지에서 알파갈락토세라마이드(α-galactoceramide) 성분 배양액 등이 이용되어 왔는데(참고문헌 : Tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide induce innate NKT and NK cell-dependent resistance to tumor implantation in mice. Shimizu K, Goto A, Fukui M, Taniguchi M, Fujii S.J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):2853-61.), 이러한 방법은 고가의 비용이 소요되며 부작용과 함께 개인에 따른 치료효과의 지속성, 내성 및 치료효과의 차이 등 많은 문제점을 가지고 있다고 알려져 있다. 특히 인터루킨-2로 NK 세포를 활성화하는 방법은 고농도(약 150ng/ml)의 인터루킨-2가 사용되어 강한 독성, 발열과 폐부종 그리고 쇼크의 유발 등의 문제점이 있었다. 이런 문제점들을 해결하기 위해 적은 농도의 인터루킨-2 사용 등과 관련한 연구들이 수행 중에 있으나 아직 만족할 만한 결과가 보고되어진 바가 없다.

[0007] 따라서 부작용을 최소화하며 경제적이며 효과적으로 항암효과를 증진시킬 수 있는 다양한 항암 치료제 개발방법 및 이를 이용하는 항암치료용 조성물 등에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점과 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 부작용을 최소화하며 경제적이며 효과적으로 NK 세포주의 항암효과를 증진시킬 수 있도록 살모넬라 균주를 처리하여 항암치료에 사용할 수 있는 NK 세포를 활성화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 상기 방법에 의해 항암치료의 효능이 증대된 NK 세포 및 이를 포함하는 항암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 열처리된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 NK 세포에 처리하여

NK 세포를 활성화하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 상기 방법에 의해 항암치료의 효능이 증대된 NK 세포 및 상기 NK 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 열처리된 살모넬라 균주를 처리하여 NK 세포의 IFN-감마(IFN-gamma)의 분비량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 열처리된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 NK 세포에 처리하여 NK 세포를 활성화하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명에서는 기존의 대부분의 연구들에서 이용한 성숙된 NK 세포와는 달리 살모넬라 균주를 처리한 NK 세포를 이용함으로써 항암효과를 증진시키는 세포치료제 개발에 기여할 수 있다.

[0017] 상기 살모넬라 균주는 병원성을 없애기 위해 열처리된 것으로, 열처리방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니다. 다만 상기 살모넬라 균주는 PBS 현탁상태에서 60 - 110 ℃ 물중탕에서 5 - 20분간 가열하여 열처리되는 것이 바람직하다. 상기 열처리 온도가 60℃ 보다 낮거나 가열시간이 5분 미만이면 살모넬라 균주의 병원성이 남아 있을 수 있고, 열처리 온도가 110℃ 보다 높거나 가열시간이 20분을 초과하면 NK 세포 활성화 효과가 낮아지게 된다.

[0018] 상기 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 균주는 장티푸스를 유발하는 group D Samlmonella에 속하는 병원균으로 암세포에 특히 잘 부착되는 것으로 알려져 있다.

[0019] 본 발명에서는 상기 살모넬라 균주의 병원성을 보다 확실하게 없애기 위해 약독화된 살모넬라 타이피뮤리움을 사용할 수 있다. 본 발명에서 "약독화"란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고, 정상인에 투여 시 일정 기간 후 쉽게 사라져 버리게 되는 것을 의미한다.

[0020] 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 균주(숙주)는 살모넬라 타이피뮤리움 BRD 509 균주로, 병원성이 없는 약독화된 균주이다(J Infect Dis. 1994 Dec;170(6):1508-17, Medeva사, London 에서 구입가능). 상기 균주의 약독화 방법은 aro A, aro B의 유전자를 변형시켜서 균주의 대사에 비정상이 일어나게 만들 수 있다.

[0021] 또한 본 발명은 상기 본 발명에 따른 NK 세포의 활성화 방법에 의해 항암치료의 효능이 증대된 NK 세포 및 상기 NK 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 항암 치료용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 열처리된 살모넬라 균주를 처리하게 되면 NK 세포의 IFN-감마의 분비량을 증가시켜 항암 치료 효능이 증대된다(도 1 내지 도 3 참조). 보다 구체적으로 살펴보면 본 발명에 따라 NK 세포에 살모넬라 균주를 처리하면 IFN-감마의 분비량이 증가되어 항암사이토카인인 인터페론을 통해 암세포가 억제될 수 있으므로, 본 발명에 의해 살모넬라 균주를 이용하면 부작용을 최소화 하면서 NK 세포의 항암 효과를 간편하고 경제적으로 증진시킬 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 NK 세포를 함유하는 항암 치료용 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. 또한 상기 조성물은 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.

[0024] 본 발명의 항암 치료용 조성물은 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 "치료학적으로 유효한 양"은 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, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예컨대, 성인 기준으로 1회 10^5 세포수 내지 10^9 세포수의 본 발명의 NK 세포를 투여할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 암의 종류는 항암작용을 할 수 있는 어떤 암도 될 수 있으나, 바람직하게는 상기 암은

피부암인 것을 특징으로 한다.

효 과

[0026] 본 발명은 NK 세포를 간편하고 저렴하게 활성화 시키는 방법에 관한 것으로 열처리된 살모넬라 균주를 처리하여 NK 세포를 활성화하여 항암효과를 증대시킬 수 있는 효과를 도모할 수 있다. 따라서 본 발명은 NK 세포 치료제의 배양법 및 개발에 있어서 살모넬라 균주의 이용가능성이 있음을 확인해 주고, 본 발명의 배양법 및 조성물은 항암치료제 또는 보조제로 산업적 이용가능성이 큰 발명이라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 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.

[0028] **<실시예 1: NK 세포의 추출 및 배양>**

[0029] 6-7주령의 C57BL6 마우스로부터 비장을 분리하여 NK 세포를 얻었다. 본 발명에서 세포를 추출하고 배양한 방법은 다음과 같다. 마우스의 비장을 꺼내어 셀 그라인더(cell grinder)로 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 RPMI 배지 상태에서 1500rpm으로 원심분리후에 RBC lysing buffer(Sigma,USA) 10ml을 더하여 상온에서 10분간 반응후 1500rpm으로 원심분리후 3회 RPMI 배지 10ml로 교환하여 적혈구를 제거하였다. 이후 얻어진 단핵면역세포들에 대하여 anti-NK cell antibody를 사용하여 MACS System 하에서 NK 세포를 분리하였다.

[0030] 분리된 NK 세포는 10% FBS 를 포함하는 RPMI 배지에 넣어서 24시간 배양하며 이때 열처리한 살모넬라 타이피뮤리움 균주를 첨가하였다. 구체적으로 10^9 세포수의 살모넬라 균주를 PBS 현탁상태에서 100 ℃ 물중탕하여 10분간 가열하고, 이후 현탁액을 NK세포가 있는 RPMI 배지 1ml 당 10ul 농도로 첨가하여 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0031] 배지로부터 NK 세포를 수득하여 이를 PBS에 현탁하여 10^6 Cell 을 마우스 항암치료제로 사용하였다.

[0032] **<실시예 2: 살모넬라 균주를 첨가한 NK 세포의 활성화시험>**

[0033] NK 세포의 활성화를 측정하기 위해서 NK 세포를 분리한 후에 실시예 1과 같이 살모넬라 균주를 처리하였다.

[0034] 항암활성을 평가하기 위해서는 위 세포의 배양액중의 인터페론감마(IFN-gamma)의 양을 측정하여 살모넬라 균에 의한 NK 세포의 활성화를 측정하였고, 동물에서의 효능평가를 위해서는 B16F10 흑색종암세포가 10^6 세포개로 피하투여된 C57BL6 마우스에 배양된 NK 세포를 10^6 Cell 피하주사하여 효능을 평가하였다.

[0035] 그 결과 NK 세포로부터 IFN-감마의 분비량이 증가하였다(도 1 참조). 이는 항암사이토카인인 인터페론을 통해 암세포가 억제될 수 있고 살모넬라 균주에 의해서 NK 세포가 활성화 될 수 있음을 보여주는 결과이다.

[0036] 동시에 살모넬라를 처리한 NK 세포를 실험배양용기의 B16F10 흑색암종 세포주에 처리하였을 때에 암세포주의 사멸율을 측정하였다. 세포사멸율은 프로메가(Promega, USA)상의 세포사멸시험키트(Cytotox96, Promega)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 정상 NK 세포를 투여하였을 때보다 본 발명에 따라 살모넬라를 처리한 NK 세포를 투여하였을 때 암세포주의 사멸율이 더 높았다. 이는 살모넬라 균주에 의한 NK 세포의 활성화로 인해 항암효과가 증대되었음을 나타내는 지표이다.

[0037] **<실시예 3: 살모넬라 균주로 활성화된 NK 세포의 항암 효과>**

[0038] 상기와 같이 살모넬라 균주를 통해 활성화된 NK 세포를 흑색종암이 유도된 마우스에 투여하여 암의 성장률과 마

우스의 생존율을 평가하였다.

[0039] 그 결과 암세포가 유도된 상태에서 정상 NK 세포보다 활성화된 NK 세포가 암세포의 억제효과가 더 많이 증가하는 결과(도 2)를 보여 주었다. 이는 살모넬라에 의해 활성화된 NK 세포가 항암효과가 발현될 수 있음을 의미하는 것이다.

[0040] 또한 본 발명의 살모넬라 균주에 의한 NK 세포 활성화의 효과를 보기 위해서 본 발명에서는 NK 세포와 실시예 1의 방식으로 살모넬라 균주를 첨가 배양한 NK 세포를 투여하여 동물체내에서의 효능의 비교도 평가하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 즉 도 3은 NK 세포와 실시예 1의 방식으로 살모넬라 균주를 첨가 배양한 NK 세포의 항암효능을 알아보기 위해, 흑색종이 유도된 마우스에 NK세포를 피하투여하여 버니어캘리퍼스로 암의 크기를 잰 후 암의 부피를 환산하여 도표로 나타낸 것이다. 그 결과 살모넬라 균주에 의해 활성화된 NK 세포의 항암효과가 NK 세포 처리군 또는 살모넬라 처리군에 비해 더 증대되는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 의한 살모넬라에 의한 NK 세포의 효능증대는 동물체내에서도 효과적으로 유도됨을 확인하였다.

[0041] 이상 상기 실시예를 통하여 명백히 알 수 있는 바와 같이, 본 발명은 열처리된 살모넬라 균주(*Salmonella typhimurium*)를 NK 세포에 처리하여 NK 세포를 간편하게 활성화시킬 수 있다. 따라서 기존의 IL-2 등의 사이토카인과 비교해 저렴한 비용으로 부작용을 최소화하면서 NK 세포 치료제를 만들 수 있는 방법을 제안한 발명이라 할 것이다. 따라서 본 발명은 항암 치료용 조성물을 이루는데 중요한 발명이 된다 할 것이다.

[0042] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

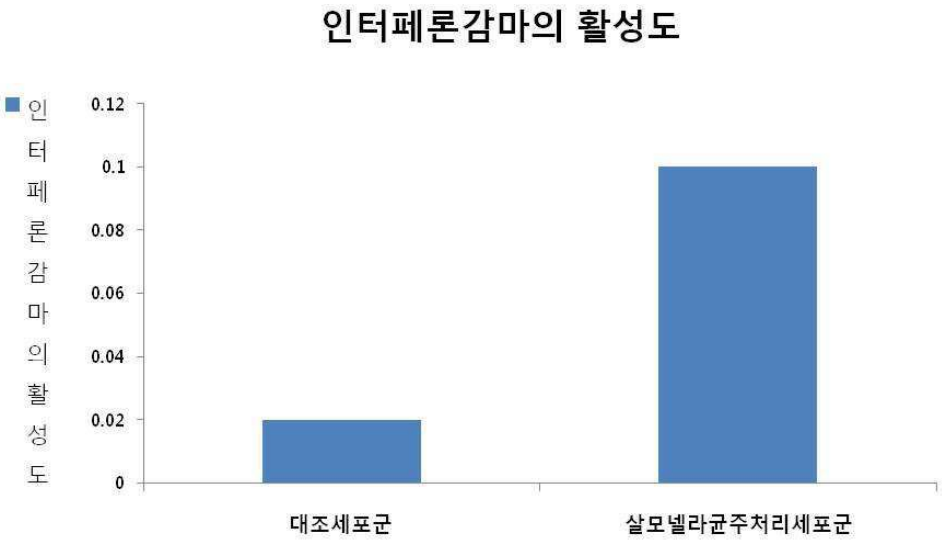
[0043] 도 1은 본 발명에 따른 살모넬라 균주에 의한 NK 세포의 활성을 IFN-γ 발현양으로 측정 비교한 결과를 나타내는 도면이다.

[0044] 도 2는 본 발명에 따른 살모넬라 균주에 의한 NK 세포의 활성을 B16F10 흑색종암의 사멸율로 비교한 결과를 나타내는 도면이다.

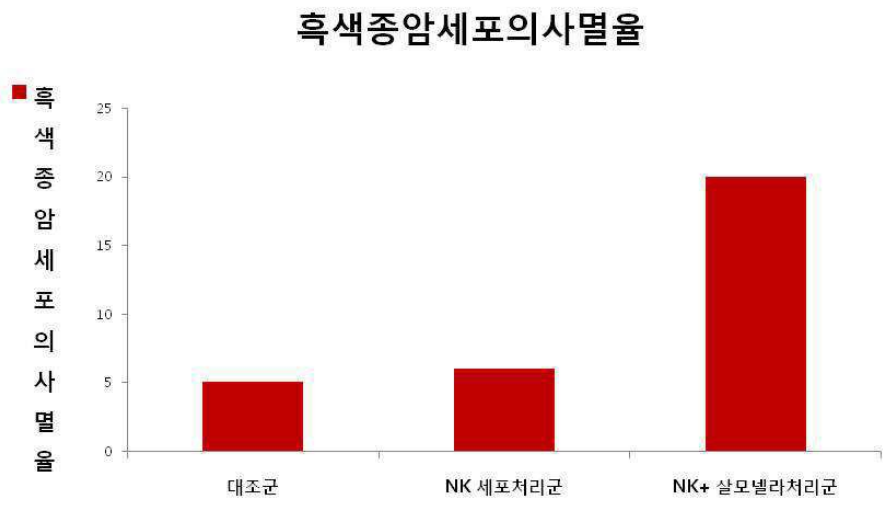
[0045] 도 3은 NK 세포와 살모넬라 균주로 처리된 NK 세포의 항암효능을 알아보기 위해, NK 세포와 살모넬라 균주를 처리한 NK세포를 흑색종이 유도된 마우스에 투여한 후 버니어캘리퍼스로 암의 크기를 잰 후 암의 부피를 환산하여 도표로 나타낸 것이다.

도면

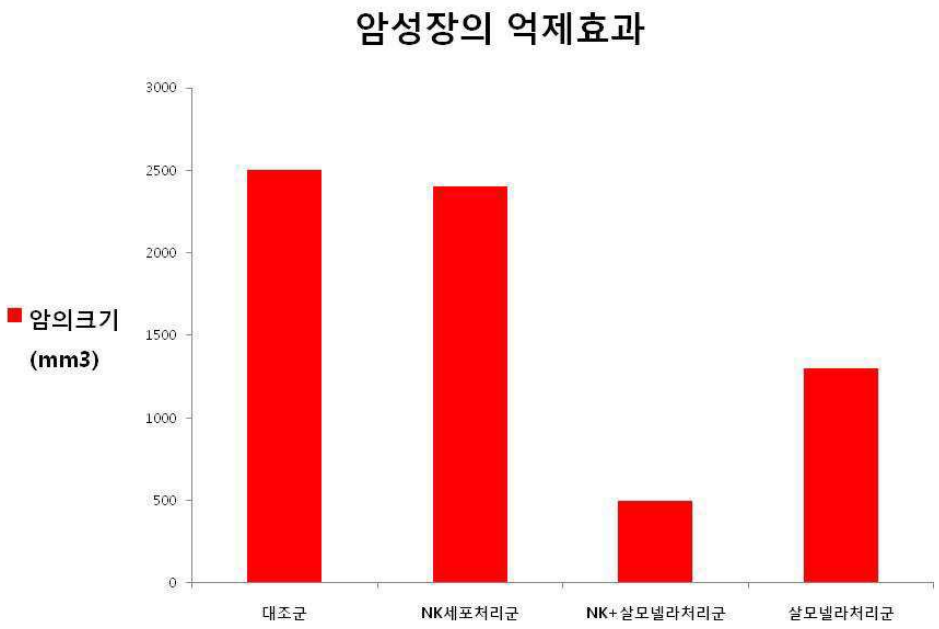
도면1


인터페론감마의 활성도
인터페론감마의활성도
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
대조세포군
살모넬라균주처리세포군

도면2


흑색종암세포의사멸율
흑색종암세포의사멸율
25
20
15
10
5
0
대조군
NK 세포처리군
NK+ 살모넬라처리군

도면3


암성장의 억제효과
암의크기 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
대조군
NK세포처리군
NK+살모넬라처리군
살모넬라처리군