



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월28일
(11) 등록번호 10-0798996
(24) 등록일자 2008년01월22일

(51) Int. Cl.

A61K 35/76 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 31/409 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7007091

(22) 출원일자 2006년04월13일

심사청구일자 2006년04월18일

번역문제출일자 2006년04월13일

(65) 공개번호 10-2006-0096023

(43) 공개일자 2006년09월05일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/015220

국제출원일자 2004년10월15일

(87) 국제공개번호 WO 2005/037321

국제공개일자 2005년04월28일

(30) 우선권주장

JP-P-2003-00354983 2003년10월15일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

W09945783

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자

자이단호우진 신산교소우조우 겐큐키코

일본국 효고켄 코베시 슈오쿠 미나토지마미나미마치 1쵸메 5-2

(72) 발명자

하마다, 카츠유키

일본국 7900931 에히메 마츠야마시 니시이시이 1-1-8 니시이시이하이즈 406호

고토, 아키노부

일본국 6580056 효고 코베시 히가시나다쿠 미카게초 미카게시로노마에 1430 히스코트 미카게 시로노마에

시라카와, 토시로

일본국 6570068 효고 코베시 나다쿠 시노하라키타마치 2-8-5

(74) 대리인

이래호, 특허법인필앤온지

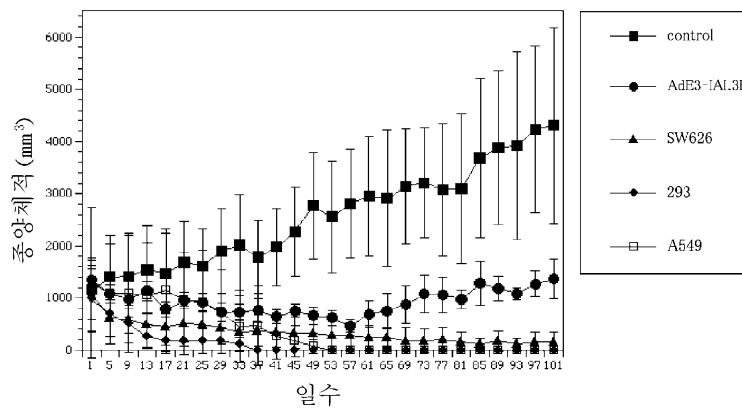
심사관 : 한정희

(54) 암 유전자 치료약

(57) 요약

본 발명의 암 유전자 치료약은, 생체의 CTL 반응을 유도하기 위해 투여되는 면역 처치용 바이러스와, 투여 전에 온콜리틱(oncolytic) 바이러스를 감염시켜 동바이러스를 생체의 종양 세포에 작용시키기 위한 캐리어 세포를 조합한 것이다. 캐리어 세포로는 예를 들면 A549 세포를 사용할 수 있다. 또한, 면역 처치용 바이러스로는 예를 들면 자외선 조사에 의해 불활성화된 비증식형 아데노 바이러스를, 온콜리틱 바이러스로는 예를 들면 종양 특이적 프로모터를 갖는 증식형 아데노 바이러스를, 각각 사용할 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

활성성분으로

비소세포성 폐암 세포주 A549 세포, 사람 태아 신장 유래 293 세포, 대장암 난소 전이주 SW626 세포, 자궁 경부 편평 상피암 HT-3 세포, 및 난소암 PA-1 세포로 구성된 군으로부터 선택된 사람 유래 암세포 또는 정상세포인 캐리어 세포 투여에 대한 생체의 세포독성 T 임파구 반응을 유도하기 위해 투여되는 아데노 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 HIV 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 렌티 바이러스; 레트로 바이러스; 레오 바이러스; 또는 수포성 구내염 바이러스(VSV)와,

투여 전에 상기 바이러스를 감염시켜, 상기 바이러스를 생체의 종양 세포에 작용시키기 위한 상기 캐리어 세포를

포함하는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이러스는 제1항에 기재된 바이러스의 DNA를 자외선 조사하여 불활성화한 바이러스인 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 캐리어 세포에 감염시키는 상기 바이러스는 난소암 특이적 항원 1A1.3B 프로모터, 베타-인간 코리옌 고나도트로핀(HCG) 프로모터, 편평세포암종 항원 1(SSCA1) 프로모터, 사이클로옥시게네이즈-2(COX-2) 프로모터, 및 전립선 특이적 항원(PSA) 프로모터로 구성된 군으로부터 선택된 프로모터를 갖는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

아테로 콜라겐을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

투여 전에 상기 캐리어 세포에 감염시키는 과립구, 대식세포-콜로니 자극인자 발현 벡터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,

황산 제일철, 구연산 제일철, 콘드로이틴 황산철, 및 함당산화철로 구성된 군으로부터 선택된 철제; 5-아미노레불린산, 헤마토프로피린, 및 포르피린으로 구성된 군으로부터 선택된 포르피린 화합물; 또는 이들의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 9

제1항에 있어서,

종양 면역에 위해 투여되는 난소암; 자궁 경부암; 피부암; 두경부암; 식도암; 폐암; 대장암, 췌장암, 간암 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택된 소화기 암; 신경아세포종; 뇌종양; 유방암; 정소암; 전립선암; 및 백혈병, 임파종 또는 다발성 골수종인 혈액성 악성종양으로 구성된 군으로부터 선택된 종양 세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암치료용 약제 키트.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 암 유전자 치료약 및 동치료약을 이용한 암 유전자 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 최근, 암치료에 관하여 유전자 치료가 주목받고 있으며, 지금까지도 여러 가지 유전자 치료법이 제안되어 임상 시험이 행해지고 있다. 이 중, 캐리어 세포를 사용한 유전자 치료에 대해서는, Freeman 등에 의해 임상 시험이 행해지고 있다. 이 유전자 치료는, 레트로 바이러스에 의해 HSV-tk 유전자를 도입한 난소암 세포 PA-1을 캐리어 세포에 사용하는 것으로서, 난소암 치료, 더 나아가서 악성 중피종 치료를 위한 임상 시험이 행해지고 있다(후술의 비특허 문헌 1·2 참조). 한편, Culver 등은, 캐리어 세포에 마우스 NIH-3T3 세포를 사용하여 뇌종양에 대

한 임상 시험을 행하고 있다(후술의 비특허 문헌 3 참조). 그러나, 사람으로의 암치료의 적용을 고려하면, 캐리어 세포로는 사람 유래 세포를 사용할 것이 요청된다.

- <3> 난소암 세포 PA-1을 캐리어 세포에 사용한 유전자 치료는, Coukos 등에 의해서도 행해지고 있다(후술의 비특허 문헌 4 참조). 이 유전자 치료는, 종양 세포에 있어서 특이적으로 증식하는 온콜리틱 바이러스(oncolytic virus)를 구축하고, 동바이러스를 캐리어 세포(프로듀서 세포)에 감염시킨 후, 이 캐리어 세포를 종양 부위에 투여하는 것이다. 온콜리틱 바이러스에는 단순 헤르페스 바이러스 1형(HSV-1)이 이용되어, 누드마우스의 난소암 복강 내 파종성 전이 모델에 대해 복강 내 투여하는 동물 실험이 행해지고 있다(후술의 특허 문헌 1·2 참조).
- <4> 그러나, 상기의 난소암 세포 PA-1은, 증식 능력이 높고 조작하기 쉬운 세포이지만, 세포질이 작아 망가지기 쉽다. 그 때문에, 레트로 바이러스에 의해 HSV-tk 유전자를 도입하여도 종양 부위에서의 HSV-tk 유전자 발현이 적어, Freeman 등의 임상 시험에서는 난소암 및 악성 중피종에 대한 충분한 항종양 효과가 얻어지지 않았다.
- <5> 온콜리틱 바이러스 HSV-1에 의한 암 유전자 치료에 있어서 캐리어 세포로서 PA-1을 사용했을 경우에도, 온콜리틱 바이러스 HSV-1의 단독 요법에 비해 현저한 항종양 효과는 얻어지지 않았다. 바이러스에 의한 암 유전자 치료의 문제점은, 혈중의 중화 항체에 의해 여러 차례 투여할 수 없는 점이다. PA-1을 사용했을 경우, 세포가 취약하고 바이러스 생산량도 적기 때문에, 세포간 상호 작용(cell to cell interaction)에 의해 표적 종양 세포에 감염하기 전에 세포가 망가져 버리거나, 또한 직접적으로 중화 항체에 의해 바이러스가 불활성화되어 항종양 효과를 얻을 수 없는 것 등을 생각할 수 있다.
- <6> 또한, 세포성 면역 유전자 치료의 임상 시험에 있어서, 환자 자신의 암 세포 혹은 섬유아세포(fibroblast)를 캐리어 세포로 사용하는 경우가 있지만, 이 경우 안정된 세포계가 얻어지기까지 시간이 걸려, 손 조작이 곤란하고, 또한 유전자 도입이 개체에 의해 차가 있어 일정하지 않기 때문에 안정된 효과를 얻는 것이 곤란하였다.
- <7> [비특허 문헌 1] Human Gene Therapy, 6, 927~939, 1995
- <8> [비특허 문헌 2] Human Gene Therapy, 9, 2641~2649, 1998
- <9> [비특허 문헌 3] Science, 256, 1550~1552, 1992
- <10> [비특허 문헌 4] Clinical Cancer Research, 5, 1523~1537, 1999
- <11> [특허 문헌 1] 국제 공개 제99/45783호 팜플렛
- <12> [특허 문헌 2] 국제 공개 제01/23004호 팜플렛

발명의 상세한 설명

- <13> <발명이 해결하려고 하는 과제>
- <14> 본 발명은, 이러한 종래의 문제점을 해결하기 위해 이루어진 것으로, 그 목적은, 온콜리틱 바이러스를 이용한 암 유전자 치료에 있어서, 강력한 항종양 효과를 얻을 수 있는 새로운 캐리어 세포를 발견하는 것, 또한 얻어진 캐리어 세포 등을 이용하여 극적인 항종양 효과를 얻을 수 있는 새로운 암 유전자 치료법을 확립하는 것, 및, 동치료법에 이용하는 새로운 암 유전자 치료약을 제공하는 것에 있다.
- <15> <과제를 해결하기 위한 수단>
- <16> 본 발명자는, 상기의 과제를 감안하여 예의 연구를 진행한 결과, (1) 캐리어 세포에 특정의 세포주를 사용함으로써, 종래의 캐리어 세포에 비해 강력한 항종양 효과를 얻을 수 있는 것, 또한 (2) 미리 바이러스를 투여하여 면역 처치를 실시한 후, 온콜리틱 바이러스를 감염시킨 캐리어 세포를 투여함으로써, 생체의 CTL 반응이 유도·야기되어 in vivo에 있어서 극적인 항종양 효과가 얻어지는 것 등을 발견하여, 본 발명을 완성하였다.
- <17> 즉, 본 발명의 암 유전자 치료약(환언하면, 암치료용 약제 키트)은, 캐리어 세포 투여에 대한 생체의 CTL 반응을 유도하기 위해 투여되는 면역 처치용 바이러스와, 투여 전에 온콜리틱 바이러스를 감염시켜 동바이러스를 생체의 종양 세포에 작용시키기 위한 캐리어 세포를 조합한 것이다.
- <18> 본 발명의 면역 처치용 바이러스 및 온콜리틱 바이러스는, 바람직하게는, 아데노 바이러스, 헤르페스 바이러스, HIV 바이러스 등의 렌티 바이러스, 레트로 바이러스, 레오 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 또는 그 외의 온콜리틱 바이러스로부터 선택된다. 이 중, 아데노 바이러스의 사용은, 후술하는 바와 같이 양호한 결과를

얻을 수 있기 때문에, 특히 바람직하다.

- <19> 또한 바람직하게는, 본 발명의 온콜리틱 바이러스는, 치료 대상의 암의 종류 등에 따라, 1A1.3B 프로모터 (1A1.3B 프로모터), 미드카인 프로모터, β -HCG 프로모터, SCCA1 프로모터, cox-2 프로모터, PSA 프로모터, 또는 그 외의 종양 특이적 프로모터를 갖는다. 또, 본 발명에 있어서 온콜리틱 바이러스는, 표적 종양 세포에 감염하여 증식할 수 있는 것이면 되며, 예를 들면 아데노 바이러스의 경우, 그 범주에는 야생형 아데노 바이러스가 포함된다. 그 외 온콜리틱 바이러스는, ONYX사의 E1B 유전자 결실(缺失)형의 온콜리틱 아데노 바이러스, 혹은, UAB 대학의 E1A 유전자의 일부 결손형의 Ad5- Δ 24 아데노 바이러스 등, 종양 특이적 프로모터를 갖지 않는 것이라도 무방하다.
- <20> 본 발명의 면역 처치용 바이러스에는, 비증식형의 것 및/또는 자외선 등으로 불활성화한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 자외선 등으로 불활성화함으로써, 면역 처치용 바이러스의 투여로부터 캐리어 세포 투여까지의 기간을 단기간으로 할 수 있다.
- <21> 본 발명의 캐리어 세포는, 바람직하게는, A549 세포, 293 세포, SW626 세포, HT-3 세포(HT-III 세포), 또는 그 외의 사람 유래의 암 세포 혹은 정상 세포로부터 선택되지만, 그 외, Cruce11사의 PER.C6 세포 등 시판되는 세포 라인을 사용하여도 된다. 상기 A549 세포, 293 세포, SW626 세포 및 HT-3 세포는, 후술하는 바와 같이 양호한 결과를 얻을 수 있었기 때문에, 캐리어 세포로서 보다 바람직하며, 또한 후술하는 바와 같이, 이들 세포 중에서도 A549 세포의 사용은 특히 바람직하다.
- <22> 본 발명의 암 유전자 치료약(암치료용 약제 키트)은, 면역 처치용 바이러스 및 캐리어 세포를 조합한 것, 혹은, 이것에 온콜리틱 바이러스를 더해 3자를 조합한 키트의 구성을 생각할 수 있지만, 하기 (1)~(4)의 물질 가운데 1 또는 2 이상의 물질을 더 구비한 것이라도 된다.
- <23> (1) 아테로 콜라겐
- <24> (2) 투여 전에 캐리어 세포에 감염시키는 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor:과립구·대식세포 콜로니 자극 인자) 발현 벡터
- <25> (3) 철제(鐵劑)
- <26> (4) 포르피린 화합물(예를 들면, 5-아미노레블린산(5-aminolevulinic acid:ALA))
- <27> 또한, 면역 처치용 바이러스의 투여와 함께, 혹은 그 전후에, 종양 면역을 위해 환자 유래의 종양 세포 또는 그것과 유사한 항원을 제시한다고 생각되는 일반적으로 입수 가능한 방사선 조사한 종양 세포를 투여하는 것이 바람직한데, 본 발명의 암 유전자 치료약은, 종양 면역을 위해 이러한 방사선 조사한 종양 세포를 구비한 것이어도 된다.
- <28> 본 발명의 암 유전자 치료 방법은, 캐리어 세포 투여에 대한 생체의 CTL 반응을 유도하기 위해 면역 처치용 바이러스를 사람에게 투여하고, 소정 기간 경과 후, 온콜리틱 바이러스를 감염시켜, 동바이러스를 종양 세포에 작용시키기 위한 캐리어 세포를 적어도 1회 사람에게 투여하는 것을 특징으로 한다.
- <29> 본 발명의 암 유전자 치료 방법에 있어서, 바람직하게는, 면역 처치용 바이러스 투여로부터 캐리어 세포 투여까지의 기간을, 대략 2주간 이상 13주간 이하(보다 바람직하게는, 3주간 이상 4주간 이하)로 한다. 또한 바람직하게는, (1) 면역 처치용 바이러스의 투여량을, 당해 바이러스에 대한 항체 음성의 환자에게는 대략 10^5 바이러스 입자 이상 10^{11} 바이러스 입자 이하로 하는 한편, 당해 바이러스에 대한 항체 양성의 환자에게는 대략 10^2 바이러스 입자 이상 10^7 바이러스 입자 이하로 하고, (2) 캐리어 세포에 의한 온콜리틱 바이러스의 1회의 투여량을, 대략 10^9 바이러스 입자 이상 10^{14} 바이러스 입자 이하로 하고, (3) 캐리어 세포에 대한 온콜리틱 바이러스의 감염량을, 대략 0.1 바이러스 입자/세포(viral particle/cell: 이하, 'vp/cell' 이라고 함) 이상 2000vp/cell 이하(보다 바람직하게는 5vp/cell 이상 500vp/cell 이하)로 한다.
- <30> 또한 본 발명의 암 유전자 치료 방법에 있어서, 하기 (1)~(5) 방법을 채용하는 것이 바람직하다.
- <31> (1) 종양 내 투여에 의해 캐리어 세포를 투여한다.
- <32> (2) 캐리어 세포와 함께, 아테로 콜라겐을 투여한다.
- <33> (3) 온콜리틱 바이러스뿐만 아니라, GM-CSF 발현 벡터를 감염시킨 캐리어 세포를 투여한다.

<34> (4) 캐리어 세포와 함께, 철제 및/또는 포르피린 화합물(예를 들면, 5-아미노레블린산(5-aminolevulinic acid:ALA))을 투여한다.

<35> (5) 면역 처치용 바이러스의 투여와 함께, 또는 그 전후에, 중앙 면역을 위해 중앙 세포를 투여한다.

<36> <발명의 효과>

<37> 본 발명의 암 유전자 치료약은, 미리 투여되는 면역 처치용 바이러스와 그 후에 투여되는 캐리어 세포의 2종류의 약제를 조합한 것으로서, 미리 아데노 바이러스 등의 바이러스 투여에 의해 면역 처치를 실시한 후, 온콜리틱 바이러스를 감염시킨 캐리어 세포를 투여함으로써, 동바이러스가 표적 중앙 세포에 감염하여 직접적인 항종양 효과를 가져오며, 또한 감염 표적 세포에 대해 생체의 CTL 반응이 유도되어 in vivo에 있어서 극적인 항종양 효과를 얻을 수 있다.

<38> 또한, 캐리어 세포에, in vitro 및 in vivo의 쌍방에 있어서 높은 항종양 효과가 인정된 A549 세포 등의 세포주를 사용함으로써, 종래의 캐리어 세포와 비교하여 강력한 항종양 효과를 얻을 수 있다.

실시예

<71> 이하, 본 발명의 일 실시 형태에 대해 설명한다.

<72> [1] 본 발명의 암 유전자 치료약에 사용하는 캐리어 세포 등

<73> 우선, 본 발명의 암 유전자 치료약에 사용하는 캐리어 세포에 대해 설명한다. 캐리어 세포는, 예를 들면 이하의 (1)~(4)의 세포로부터 선택할 수 있다.

<74> (1) A549 세포

<75> (2) 293 세포

<76> (3) SW626 세포

<77> (4) HT-3 세포(HT-III 세포)

<78> 도 1은 암 유전자 치료약에 이용하는 효과적인 캐리어 세포를 찾아내기 위해 본 발명자가 캐리어 세포의 선별을 행한 결과로서, 보다 구체적으로는, 각종 후보 세포주에 온콜리틱 바이러스를 감염시킨 암 유전자 치료약을 조제하여, 각각의 암 세포 증식 억제 효과를 조사한 결과를 나타내는 그래프이다. 온콜리틱 바이러스에는 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B(IAI.3B)를 사용하였다. 이 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B는 E1A 유전자 및 E3 유전자를 갖고, E1A 유전자의 상류에 종양 특이적 프로모터로서 난소암 특이적 1A1.3B 프로모터(IAI.3B 프로모터)를 갖는 아데노 바이러스이다. 이 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 각종 후보 세포주에 대해 500vp/cell로 2일간 감염시킨 후, 각 세포를 배양 2일째의 난소암 세포 HEY에 첨가하고, 배양 5일째에 상기 암 세포 HEY의 증식 억제 효과를 조사하였다.

<79> 도 1의 그래프 종축은, 각종 후보 세포주에 대해 50%의 증식 억제 효과(IC50)가 얻어지는 세포수를 나타내며, 세포수가 적은 세포주일수록 증식 억제 효과가 높게 된다. 도 1에 나타내는 바와 같이, 이번 조사한 암 세포주에서는 293 세포, A549 세포, SW626 세포, HT-3 세포(HT-III 세포)의 순서로 높은 증식 억제 효과를 나타냈다. 293 세포, A549 세포 및 SW626 세포는, 종래 캐리어 세포로서 사용되고 있던 PA-1 세포에 비해 대략 100배 정도의 높은 증식 억제 효과를 나타냈다. HT-3 세포에 대해서도, SW626 세포와 동일한 정도의 높은 증식 억제 효과를 나타냈다.

<80> 또한, 상기의 293 세포, A549 세포, SW626 세포 및 HT-3 세포에 온콜리틱 아데노 바이러스를 감염시킨 암 유전자 치료약을 조제하여, 각 치료약에 대해, 충분한 양의 항아데노 바이러스 중화 항체 존재하(Ab(+))에서의, 암 세포 증식 억제 효과를 검토하였다. 그 결과, 도 4에 나타내는 바와 같이, 항체 존재하에서도, 상기 4종의 세포를 캐리어 세포로 이용한 암 유전자 치료약은 모두 강한 암 세포 증식 억제 효과를 나타냈다. 종래, 바이러스에 의한 암 유전자 치료는, 항체 생산에 의해 여러 차례 투여할 수 없는 것이 난점이 되어 있었지만, 상기 4종의 세포를 캐리어 세포에 이용했을 경우는, 항체 존재하에도 불구하고 in vitro에 있어서 강력한 증식 억제 효과를 얻을 수 있었다. 또, 도 4에 나타내는 바와 같이, 상기 4종류의 세포 가운데, A549 세포를 캐리어 세포에 이용했을 경우에 가장 강력한 증식 억제 효과를 나타냈다. 즉, 충분한 양의 항아데노 바이러스 중화 항체 존재하에 아데노 바이러스 감염 A549 세포를 투여하면, 표적 암 세포의 증식은 항체 존재하에도 불구하고 거의 완전하게 억제되었다.

- <81> 또한, 직경 10 내지 15mm의 거대한 누드마우스 피하 종양 모델을 이용한 in vivo의 실험에 있어서도, 상기의 A549 세포, 293 세포 및 SW626 세포를 캐리어 세포에 이용했을 경우는 강력한 항종양 효과를 나타냈다(도 5 및 도 6 참조). 한편, 이들 실험의 상세는 후술의 실시예에서 설명한다.
- <82> 이와 같이, 온콜리틱 바이러스를 캐리어 세포에 감염시켜 얻어지는 암 유전자 치료약에 있어서, 캐리어 세포에 A549 세포, 293 세포, SW626 세포, HT-3 세포 중 어느 하나를 사용함으로써 높은 항종양 효과를 얻을 수 있다.
- <83> 상기 4종의 세포에 대해 설명하면, A549 세포는 비소세포성 폐암 세포주로서, 그 상세에 대해서는 예를 들면 논문 Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, J. Natl. Cancer Inst., 51: 1417~1423, 1973. 등에 기재되어 있다. 293 세포는 사람 태아 신장 유래 세포로서, 아데노 바이러스 생산 세포로서 시험 연구에 많이 이용되고 있는 세포주이다. 293 세포에 대해서는 예를 들면 논문 Xie QW, et al. Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4891~4896, 1996. 등에 설명이 있다. SW626 세포는, 대장암 난소 전이주로서, 그 상세에 대해서는 예를 들면 논문 Fogh J, et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209~214, 1977. 등에 기재되어 있다. HT-3 세포는, 자궁 경부 편평 상피 암 세포로서, 그 상세에 대해서는 예를 들면 논문 Fogh J, et al. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209~214, 1977. 등에 기재되어 있다. 이들 4종의 세포주는 모두 ATCC(American Type Culture Collection) 등의 세포 보존 기관으로부터 입수 가능하고, 그 외 시판되고 있는 것을 사용하여도 된다.
- <84> A549 세포는, (1) 고역가(高力價)의 온콜리틱 아데노 바이러스를 생산하며, 매우 단단한 세포로 취급하기 쉽다, (2) 항아데노 바이러스 항체 존재하에서 암 세포의 증식을 가장 강력하게 억제한다, (3) 아데노 바이러스 등의 바이러스가 감염되면 A549 세포는 유래가 type II의 폐포(肺胞) 상피 세포이기 때문에 분비 과립을 방출하여, 이 성질이 암치료에 있어서 유리하게 작용한다고 생각된다, (4) 아데노 바이러스에 감염된 후도 A549 세포는 CTL에 의한 살세포 효과를 받기 어렵다는, 등 캐리어 세포로서 사용하는 경우에 많은 이점을 갖고 있다. 따라서, 상기 4종의 세포 가운데, A549 세포의 사용은 특히 바람직하다.
- <85> 또한, 캐리어 세포로서 복수의 종류의 세포를 병용하여도 된다. 후술의 실시예에서는, 캐리어 세포에 A549 세포와 293 세포를 병용함으로써 강력한 암치료 효과가 인정되었다. 이와 같이, 복수의 종류의 세포를 병용했을 경우는, 각 세포의 특징, 이점을 암치료에 이용할 수 있어 바람직하다. 예를 들면, SW626 세포는, 접착(adhere)하는데 비교적 시간을 필요로 하기 때문에, 복강 내 투여하면 국소에만 머물지 않고 주위 전체로 확산하여, 난소암 등의 복강 내 치료에 적합하다고 생각된다. 또한, SW626 세포는, 바이러스 생산량의 피크가 A549 세포나 293 세포 등보다 늦고, 작용 시간이 비교적 길다는 특징을 갖고 있다.
- <86> 전술한 바와 같이, 캐리어 세포는 상기 4종의 세포(즉, A549 세포, 293 세포, SW626 세포, HT-3 세포)를 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 캐리어 세포로서 이용 가능한 세포는 상기 4종의 세포에 한정되는 것이 아니라, 다른 세포, 예를 들면, PA-1 세포(특히 헤르페스 바이러스를 온콜리틱 바이러스에 사용하는 경우 등), 섬유아세포(fibroblast), 그 외의 사람 유래의 암 세포 혹은 정상 세포, 환자 유래의 암 세포 등을 캐리어 세포에 사용하여도 된다.
- <87> 본 발명의 암 유전자 치료약에 있어서, 상기 캐리어 세포에 감염시키는 온콜리틱 바이러스로서는, 종래 유전자 도입에 이용되는 바이러스 벡터를 사용할 수 있어, 아데노 바이러스, 아데노 수반 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 1형(HSV-1), 단순 헤르페스 바이러스 2형(HSV-2), HIV 바이러스(에이즈 바이러스) 등의 렌티 바이러스나 마우스 백혈병 바이러스 등의 레트로 바이러스, 레오 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 등이 예시되며, 그 외의 온콜리틱 바이러스라도 된다. 온콜리틱 바이러스는, 증식형 바이러스 벡터로서 표적의 종양 세포 또는 종양 조직에 있어서 특이적으로 증식하도록 바이러스 유전자를 개변하여, 표적 세포를 용해·살상하는 cell lysis 작용을 갖는 것이면 되며, 예를 들면 아데노 바이러스의 경우, 그 증식에 필요한 E1A 또는 E1B 영역을 갖는 것이면 된다.
- <88> 본 발명의 암 유전자 치료약은, 거의 모든 악성 종양에 적용할 수 있으며, 치료 대상이 되는 암의 종류는 난소암, 편평 상피암(자궁 경부암, 피부암, 두경부암, 식도암, 폐암 등), 소화기암(대장암, 췌장암, 간암, 위암 등), 신경아세포종, 뇌종양, 유방암, 정소암, 전립선암 등이 예시된다. 또한, 아데노 바이러스 34, 35형 등 혈액 세포에도 감염 가능한 바이러스를 사용함으로써, 본 발명의 암 유전자 치료약은 혈액성 악성 종양에도 적용

가능하다.

- <89> 치료 대상이 되는 암의 종류에 따라, 온콜리틱 바이러스에 도입하는 종양 특이적 프로모터의 종류를 선택하면 된다. 예를 들면, 난소암에 대해서는 1A1.3B 프로모터, 뇌종양, 악성 신경교종 등에 대해서는 미드카인 프로모터, 정소암에 대해서는 β -HCG 프로모터, 편평 상피암에 대해서는 SCCA1 프로모터 및 SCCA2 프로모터, 대장암에 대해서는 CEA 프로모터, 전립선암에 대해서는 PSA 프로모터, 간암에 대해서는 AFP 프로모터를 사용할 수 있다. 물론, 다른 공지의 종양 특이적 프로모터, 예를 들면, 여러 가지의 악성 종양에 대해 프로모터 활성을 발휘하고 넓은 작용 스펙트럼을 갖는 cox-2 프로모터나, 그 외 오스테오칼신 프로모터 등의 각종 암 특이성 프로모터를 사용하여도 된다. 상기 미드카인 프로모터에 대해서는, 뇌종양, 악성 신경교종 외 여러 가지의 악성 종양에 대해 사용 가능하며, 이 점에 있어서 cox-2 프로모터와 마찬가지로 넓은 작용 스펙트럼을 갖는다.
- <90> 사용하는 각 프로모터 서열의 길이 등에 대해서는, 종양 특이적 프로모터 활성이 얻어지는 한에서 특별히 한정되는 것은 아니다. 상기 1A1.3B 프로모터는, 국제 공개 제03/025190호 팜플렛 및 문헌 Cancer Research 63, 2506~2512, 2003의 기재에 따라 설계·조제하여, 바이러스 게놈에 삽입할 수 있다. 상기의 미드카인 프로모터, β -HCG 프로모터, SCCA1 프로모터에 대해서는, 각각, 국제 공개 제02/10368호 팜플렛, 국제 공개 제01/90344호 팜플렛, 국제 공개 제00/60068호 팜플렛의 기재에 따라 설계·조제하여, 바이러스 게놈에 삽입할 수 있다.
- <91> 상기 SCCA1 프로모터에 대해서는, 논문 Biochimica et Biophysica Acta 91522(2001) 1~8, Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter, Katsuyuki Hamada, Hiroto Shinomiya, Yoshihiro Asano, Toshimasa Kihana, Mari Iwamoto, Yasushi Hanakawa, Koji Hashimoto, Susumu Hirose, Satoru Kyo, Masaharu Ito에도 상세히 설명되어 있다.
- <92> 예를 들면, 온콜리틱 아데노 바이러스를 제작하는 경우, 아데노 바이러스의 증식에 필수인 유전자인 초기 유전자 E1A 또는 E1B의 상류에 종양 특이적 프로모터를 삽입하거나, 혹은, 초기 유전자 E1A 또는 E1B 프로모터와 치환함으로써 구축할 수 있다. HSV-1, HSV-2, 레트로 바이러스, 레오 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV) 등, 아데노 바이러스 이외의 바이러스를 사용하는 경우도, 마찬가지로 바이러스의 증식에 필요한 유전자의 상류에 종양 특이적 프로모터를 삽입하거나, 혹은, 당해 유전자의 프로모터와 치환함으로써 구축할 수 있다.
- <93> 무엇보다, 온콜리틱 바이러스는, 표적의 종양 세포 또는 종양 조직에 있어서 특이적으로 증식하는 성질을 갖는 한, 반드시 종양 특이적 프로모터를 갖는 것이 아니라도 무방하다. 예를 들면, ONYX사의 E1B 유전자 결실형의 온콜리틱 아데노 바이러스, 혹은, UAB 대학의 E1A 유전자의 일부 결손형의 Ad5- Δ 24 아데노 바이러스 등, 종양 특이적 프로모터를 갖지 않는 온콜리틱 바이러스를 사용할 수도 있다. 또한, 온콜리틱 바이러스로서 야생형 아데노 바이러스, 혹은, 그 일부 유전자를 결실시킨 것을 사용하여도 된다.
- <94> 온콜리틱 바이러스를 캐리어 세포에 감염시키는 방법은, 통상의 방법에 따라 행하면 되며 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 캐리어 세포를 디쉬에 뿌리고, 이것에 온콜리틱 바이러스를 모든 세포에 감염 가능한 양 첨가하여, 95% O₂, 5% CO₂, 37℃, 소 태아 혈청 FCS(-), RPMI 배지(培地)의 조건하에서 6시간 내지 36시간 정도 배양하여 감염시키는 방법이 간편하다. 후술의 실시예에 있어서는, A549 세포, SW626 세포, HT-3 세포는 이 방법으로 배양하여 온콜리틱 바이러스를 감염시켰지만, 293 세포에 관해서는 FCS(+) 10%, DMEM 배지의 조건하에서 배양하여 온콜리틱 바이러스를 감염시켰다. 한편, 소 태아 혈청 FCS는 3 내지 6시간 감염의 경우는 FCS(-)의 조건으로, 그 이상의 시간 감염시키는 경우는 3 내지 6시간 FCS(-) 상태로 두고 후에 FCS 10%를 더하면 된다.
- <95> 캐리어 세포에 대한 온콜리틱 바이러스의 감염량 및 감염 시간은, 치료 대상의 종양의 크기·종류, 캐리어 세포의 종류·투여량, 사용하는 온콜리틱 바이러스의 종류, 본 유전자 치료약의 투여 방법 등에 따라 최적의 양과 시간을 선택하면 된다. 특별히 한정되지 않지만, 일례로서 캐리어 세포에 A549 세포를 사용했을 경우, 복강 내 투여에서는 약 5 내지 250vp/cell로 대략 6 내지 24시간, 종양 내 투여에서는 약 5 내지 500vp/cell로 대략 12 내지 24시간, SW626 세포의 경우, 복강 내 투여에서는 약 250 내지 2000vp/cell로 대략 6 내지 24시간, 종양 내 투여에서는 약 100 내지 500vp/cell로 대략 12 내지 24시간, 293 세포의 경우, 종양 내 투여에서는 약 5 내지 50vp/cell로 대략 12 내지 24시간, 복강 내 투여에서는 약 0.1 내지 10vp/cell로 대략 6 내지 24시간으로 설정할 수 있다. 이와 같이 캐리어 세포의 종류, 투여 방법에 따라 감염량·감염 시간도 상이하지만, 상기의 예에서는 복강 내 투여시는 약 0.1 내지 2000vp/cell로 대략 6 내지 24시간, 종양 내 투여시는 약 5 내지 500vp/cell로 대략 12 내지 24시간의 범위에서 각각 감염량·감염 시간을 설정할 수 있다.
- <96> 캐리어 세포에 온콜리틱 바이러스를 감염시켜 바이러스 감염 캐리어 세포를 조제하는 경우, 사용시까지는 온콜리틱 바이러스를 감염시키지 않는 상태로 캐리어 세포를 보존해 두어도 된다. 한편, 온콜리틱 바이러스를 감염

시키고 방사선 조사한 캐리어 세포를 동결하여, 이것을 의료 현장에서 해동하여 사용하는 제품 형태로 하는 경우는, 바이러스 감염시킨 캐리어 세포를 보존해 두는 것이 바람직하다. 캐리어 세포의 보존은, 예를 들면 액체 질소 내 혹은 -150℃ 정도의 온도에서 보존할 수 있다. 한편, 온콜리틱 바이러스는, 예를 들면 -80℃ 정도의 온도에서 보존할 수 있다.

<97> 사용시에는, 상기 방법에 의해 온콜리틱 바이러스를 캐리어 세포에 감염시켜 얻어진 바이러스 감염 캐리어 세포를, 이것을 그대로 혹은 관용적인 의약 제제 담체와 함께, 사람(또는 마우스, 래트 등의 실험 동물)에게 투여할 수 있다. 후술하는 바와 같이, 캐리어 세포 투여시에, 아테로 콜라겐, 철제, 포르피린 화합물 가운데, 1 또는 2 이상을 조합하여 캐리어 세포와 동시에 투여하는 것은 바람직하다. 또한, CTL 반응을 높이기 위해, 캐리어 세포에 온콜리틱 바이러스뿐만 아니라 GM-CSF 발현 벡터도 감염시켜, 말하자면 바이러스 벡터를 더불어 감염시킨 캐리어 세포를 투여하는 것은 바람직하다.

<98> 캐리어 세포는, 후술의 면역 처치용 바이러스를 투여하고 나서 소정 기간 경과 후에 투여한다. 캐리어 세포에 암 세포를 이용할 때에는, 바이러스 감염 전 또는 감염 후에 방사선 조사하는 것이 바람직하다. 후술의 실시예에서는, 캐리어 세포에 A549 세포, SW626 세포, HT-3 세포를 사용했을 경우, 이들 세포를 누드마우스에 투여하기 전에 각각 120 내지 400Gy, 20 내지 40Gy, 20 내지 40Gy로 방사선 조사를 행하였다. A549 세포에 대한 방사선의 조사량에 대해 검토한 결과, 120Gy 이상이면 세포의 증식은 관찰되지 않았기 때문에(도 29), 조사량은 120Gy 이상 600Gy 이하(보다 바람직하게는 150Gy 이상 400Gy 이하) 정도로 설정하는 것이 바람직하다.

<99> 캐리어 세포는 비경구제로서 투여하는 것이 바람직하지만, 경구제로서 사용할 수 있는 가능성도 있다. 비경구제로서의 투여는, in vivo법, ex vivo법 중 어느 것이라도 된다. in vivo법의 경우, 종양의 크기·종류, 증상의 정도, 환자의 연령, 체중 등에 따라 용량(환언하면, 바이러스 감염 캐리어 세포의 투여량)을 조절하고, 예를 들면, 정맥 주사, 점적(点滴) 정맥 주사, 종양 내 주사, 복강 주사와 같은 강내(腔內) 주사 등에 의해 투여할 수 있지만, 캐리어 세포는 종양 내 주사의 방법에 의해 투여하는 것이 바람직하다. 이러한 주사제는 통상의 방법에 따라 제조되며 희석제로서 일반적으로 생리 식염수, 세포 배양액 등을 이용할 수 있다. 또한 필요에 따라, 살균제, 방부제, 안정제 등 장화제(張化劑), 무통화제 등을 더해도 된다. 이들 제제 중의 바이러스 감염 캐리어 세포의 배합량은 특별히 한정되는 것이 아니라 임의로 설정할 수 있다.

<100> 물론, 상기의 바이러스 감염 캐리어 세포는, 수회에 걸쳐 환자에게 투여해도 되고, 복수 회의 코스로 나누어 1 코스당의 투여 횟수, 투여 간격 등을 임의로 설정하여도 된다.

<101> 상기와 같이, 바이러스 감염 캐리어 세포의 투여량은 종양의 크기·종류, 증상의 정도, 환자의 연령, 체중 등에 따라 결정하면 되지만, 통상의 경우, 1회의 캐리어 세포의 투여량을 대략 10^7 세포수 이상 10^{10} 세포수 이하로, 캐리어 세포에 의한 온콜리틱 바이러스의 1회의 투여량을 대략 10^9 바이러스 입자 이상 10^{14} 바이러스 입자 이하로 설정할 수 있다.

<102> 캐리어 세포의 종류는 치료 대상의 암의 종류 등에 따라 적절하게 선택하여도 된다. 또한, 유전자 재조합 기술에 의해 캐리어 세포를 개변하여, 예를 들면 표적 종양 세포와 결합하기 쉬워지도록 캐리어 세포의 세포 표면에 인위적으로 특정 단백질 등을 발현시켜도 되고, 캐리어 세포에 센다이 바이러스를 감염시키는 등의 처치를 행해도 된다.

<103> 온콜리틱 바이러스는, 세포간 상호 작용(cell to cell interaction)에 의해 캐리어 세포로부터 표적 종양 세포로 감염되고 종양 세포 내에서 특이적으로 증식하여, 종양 세포를 용해·살상하는 cell lysis 작용을 발휘할 수 있다. 바이러스에 의한 암 유전자 치료는, 항체 생산에 의해 여러 차례 투여할 수 없는 것이 난점이었지만, 캐리어 세포를 이용하면 세포간 상호 작용에 의해 표적 종양 세포에 직접적으로 감염이 성립함으로써 여러 차례 투여가 가능해져, 강력한 항종양 효과를 기대할 수 있다.

<104> [2] 본 발명의 암 유전자 치료약과 그 바람직한 사용예

<105> 본 발명의 암 유전자 치료약은, 캐리어 세포 투여에 대한 생체의 CTL 반응을 유도하기 위해 투여되는 면역 처치용 바이러스와, 온콜리틱 바이러스를 감염시켜, 동바이러스를 생체의 종양 세포에 작용시키기 위한 캐리어 세포를 조합한 것, 즉, 미리 투여되는 면역 처치용 바이러스와 그 후에 투여되는 캐리어 세포의 2종류의 약제를 조합한 것으로서, 미리 아테노 바이러스 등의 바이러스 투여에 의해 면역 처치(사전 면역(이뮤니제이션))를 실시한 후, 온콜리틱 바이러스를 감염시킨 캐리어 세포를 투여함으로써, 생체의 CTL 반응이 유도·야기되어 in vivo에 있어서 극적인 항종양 효과를 얻을 수 있다.

- <106> 실제로 면역 기능이 정상적인 syngenic 모델 마우스를 사용한 실험에 있어서, 본 발명의 암 유전자 치료약은 극적인 항종양 효과를 나타냈다. 상세히는 후술하지만, (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에 난소암 세포 OVHM을 피하 이식하고, 그 후, 난소암 특이적 프로모터를 도입한 온콜리틱 아데노 바이러스를 감염시킨 캐리어 세포(A549 세포)를 국소 주사한 결과, 3개월 전에 미리 아데노 바이러스(Ad-β-gal)에 의해 면역 처치를 실시한 마우스에서는, 투여 개시 후 3 내지 4일에 분명한 항종양 효과를 나타내며, 9일 후에 종양은 완전하게 소실되고 림프절 전이도 소실되었다(도 7 및 도 18 이하 참조).
- <107> 이와 같이, 항체 생산이 있음에도 불구하고 오히려 면역력이 있는 마우스에서 보다 강력하고 극적인 항종양 효과가 얻어진 것은, 면역 처치용 아데노 바이러스의 투여에 의해 생체의 CTL 반응(세포 장애성 T세포를 통한 세포 장애 활성화)이 유도·야기되었기 때문으로 생각된다. 즉, 종래의 바이러스에 의한 암 유전자 치료는, 항체 생산에 의해 여러 차례 투여할 수 없는 것이 난점이었지만, 본 발명의 암 유전자 치료약은, 생체의 면역 기구를 이용하여 바이러스가 감염된 표적 종양 세포를 공격시킴으로써, 오히려 이것을 무기로 바꾸는 것이라고 할 수 있다.
- <108> 면역 처치용 바이러스와 온콜리틱 바이러스는 동일 종류의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 면역 처치용 바이러스에는 비증식형의 것 및/또는 불활성화한 것을 사용하는 것이 바람직하고, 비증식형의 것을 다시 자외선 조사 등에 의해 DNA를 파괴하여 불활성화한 것이 보다 바람직하다. 예를 들면, 면역 처치용 바이러스에 아데노 바이러스를 사용하는 경우는, E1 영역이 결실된 것 및/또는 자외선 조사에 의해 DNA를 파괴하여 불활성화한 것을 사용하면 된다. 이와 같이, 면역 처치용 바이러스에는, 증식형 바이러스를 자외선 조사 등에 의해 불활성화한 것을 사용하여도 된다.
- <109> 후술의 실시예에서는, 면역 처치용 바이러스로서, E1 영역이 결실되어 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터의 제어하에 β-galactosidase(β-gal)를 코딩하는 LacZ 유전자가 조합된 아데노 바이러스(Ad-β-gal)를 사용하였다. 물론, 면역 처치용 바이러스로서는 이것으로 한정되는 것이 아니라, 증식형 아데노 바이러스를 자외선(UV)으로 불활성화한 것이라도 되며, 또한, LacZ 유전자 외 어떤 유전자도 조합되어 있지 않고 polyA 서열만의 비증식형 아데노 바이러스(Ad-polyA)를 자외선 조사에 의해 불활성화하여 사용하는 것이 바람직하다.
- <110> 본 발명의 암 유전자 치료약에 있어서, 면역 처치용 바이러스의 투여량은 환자의 바이러스에 대한 항체값, 종양의 크기·종류, 증상의 정도, 환자의 연령, 체중 등에 따라 적절하게 선택하면 되지만, 바이러스에 대한 항체가 양성인지 음성인지에 따라 투여량을 변경하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 면역 처치용 바이러스 및 온콜리틱 바이러스에 타입 5의 아데노 바이러스를 사용하는 경우, 당해 아데노 바이러스에 대한 항체 음성(-)의 환자에게는 면역 처치용 바이러스의 투여량을 대략 10^5 바이러스 입자 이상 10^{11} 바이러스 입자 이하로 하는 한편, 당해 아데노 바이러스에 대한 항체 양성(+)의 환자에게는 면역 처치용 바이러스의 투여량을 대략 10^2 바이러스 입자 이상 10^7 바이러스 입자 이하로 한다. 면역 처치용 바이러스의 투여 방법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 피내 주사 또는 피하 주사의 방법에 의해 투여하는 것이 바람직하다.
- <111> 한편, 실험 등으로 마우스, 래트 등의 동물에 대해 본 발명의 암 유전자 치료약을 투여하는 경우는, 체중차를 고려하여 사람에 투여하는 경우의 대략 1000분의 1의 양으로 각 약제의 투여량을 설정하면 된다.
- <112> 면역 처치용 바이러스 투여로부터 캐리어 세포 투여까지의 기간은 대략 2주 이상 3개월 이하로 설정할 수 있지만, 가능한 한 단기간인 것이 바람직하다. 후술의 실시예에서는, 면역 처치용 바이러스(아데노 바이러스)를 자외선 조사에 의해 불활성화함으로써, 상기 기간을 3주 이상 4주 이하 정도로 단축할 수 있게 되었다.
- <113> 바이러스 감염 캐리어 세포의 투여량 등에 대해서는 전술하였지만, 캐리어 세포에 의한 온콜리틱 바이러스의 1회의 투여량을 대략 10^9 바이러스 입자 이상 10^{14} 바이러스 입자 이하로, 캐리어 세포에 대한 온콜리틱 바이러스의 감염량을, 대략 0.1vp/cell 이상 2000vp/cell 이하(보다 바람직하게는 5vp/cell 이상 500vp/cell 이하, 한층 더 바람직하게는 150vp/cell 이상 400vp/cell 이하)로 설정할 수 있다.
- <114> 면역 처치용 바이러스의 투여와 함께 또는 그 전후에, 종양 면역을 위한 종양 세포(암 세포)를 투여하는 것이 바람직하다. 즉, 면역 처치용 바이러스에 의한 이뮤니제이션시, 또는 그 전후에, 종양 세포에 의한 백시네이션을 행하는(미리 방사선, 에탄올, 포르말린 등을 처리한 종양 세포를 투여함으로써, 치료 대상의 종양 세포에 대한 생체의 면역 응답을 높이도록 함) 것은 바람직하다.
- <115> 상기 백시네이션(종양 면역)에 사용하는 종양 세포로서는, 환자 유래의 종양 세포가 바람직하지만, 그것과 유사

한 항원을 제시한다고 생각되는 일반적으로 입수 가능한 종양 세포를 사용하여도 된다. 후술의 실시예에서는, 난소암(OVHM)에 대한 치료 효과를 조사하는 실험에서, 치료 대상의 종양 세포와는 종류가 상이한 종양 세포(편평 상피 암 세포 SCC7이나 폐암 세포 A549 세포)를 종양 면역에 사용했을 경우에도, 양호한 암치료 효과가 인정되었다.

<116> 상기 백시네이션(종양 면역)에 있어서, 종양 세포의 투여량은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 대략 10^5 세포수 이상 10^{10} 세포수 이하로 설정할 수 있다. 종양 세포에의 방사선의 조사량은, 120Gy 이상 600Gy 이하 (보다 바람직하게는 200Gy 이상 500Gy 이하) 정도로 설정하는 것이 바람직하고, 종양 세포의 투여 방법은 피내 주사 또는 피하 주사의 방법에 의해 투여하는 것이 바람직하다.

<117> 또한, 치료 대상의 암에서의 바이러스 생산량을 높이기 위해, 철제의 투여 및/또는 포르피린 화합물의 투여를 행하여도 된다. 포르피린 화합물로서는, 5-아미노레블린산(5-aminolevulinic acid:ALA), 헤마토포르피린(hematoporphyrin), 포토피린(photofrin) 등이 예시된다. 철제로서는, 경구제로서 황산 제일철($FeSO_4$), 구연산 제일철, 정맥 주사용 철제로서 콘드로이틴 황산철, 합당산화철(含糖酸化鐵)이 예시된다. 투여 방법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 본 발명의 암 유전자 치료약과 함께 주사제 혹은 경구제로서 투여하는 것이 바람직하다.

<118> 실제로, 철제(Fe) 및/또는 5-아미노레블린산(ALA)을 투여함으로써, 온콜리틱 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 암 세포 증식 억제 효과를 현저하게 향진할 수 있었다(도 15 내지 17 및 도 28 참조).

<119> 캐리어 세포와 함께, 아테로 콜라겐(콜라겐의 텔로펩타이드 결합만을 펩신 처리 등으로 절단하여 분자량을 작게 함으로써 수용성으로 한 것)을 투여하는 것도 바람직하다. 후술의 실시예에 기술하는 바와 같이, 아테로 콜라겐을 캐리어 세포와 동시 투여했을 경우는, 부작용에 의한 사망률이 격감하였다(도 24). 이것은 아테로 콜라겐에 의해 온콜리틱 아데노 바이러스의 확산이 억제됨과 동시에 항아데노 바이러스 항체에 대한 블럭이 생겼기 때문이라고 생각된다.

<120> 따라서, 아테로 콜라겐을 캐리어 세포와 동시 투여함으로써 부작용을 억제하여 온콜리틱 바이러스의 고투여가 가능하게 된다. 아테로 콜라겐은 시판품(예를 들면, 주식회사 코켄(高研)의 제품)을 사용하여도 되고, 혹은, 콜라겐을 펩신 처리하는 등으로 제조한 것을 사용하여도 된다. 아테로 콜라겐은 캐리어 세포와 함께 주사액에 혼합하여 투여하는 것이 바람직하고, 약액 중 농도 0.01 내지 3.0%(w/v) 정도로 충분히 효과를 발휘한다고 생각된다(후술의 실시예에서는, 약액 중 0.1 내지 0.2%의 저농도에서도 충분히 효과가 인정되었다).

<121> 또한 전술한 바와 같이, 면역 반응을 높이기 위해, 캐리어 세포에 온콜리틱 바이러스뿐만 아니라 GM-CSF 발현 벡터도 감염시켜, 말하자면 바이러스 벡터를 더블로 감염시킨 캐리어 세포를 투여하는 것은 바람직하다(혹은, 양 벡터를 각각 개별적으로 감염시킨 캐리어 세포를 동시에 투여하는 방법으로 하여도 된다).

<122> GM-CSF 발현 벡터에는, 온콜리틱 바이러스와 동일 종류의 바이러스 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 온콜리틱 바이러스에 아데노 바이러스를 사용하는 경우, GM-CSF 발현 벡터에는 E1 영역이 결실되고, GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor:과립구·대식세포 콜로니 자극 인자)를 코딩하는 GM-CSF 유전자가 조합된 아데노 바이러스를 사용할 수 있다.

<123> 또한, 이와 같이 바이러스 벡터를 캐리어 세포에 감염시키는 경우는, 온콜리틱 바이러스 및 GM-CSF 발현 벡터의 양자를 합친 감염량을, 대략 5 바이러스 입자/세포 이상 2000 바이러스 입자/세포 이하로 한다.

<124> 실제로 GM-CSF 발현 벡터를 사용함으로써, 매우 뛰어난 암치료 효과가 인정되었다(도 27).

<125> 그 외, GM-CSF 발현 벡터를 사용하는 대신에, GM-CSF 단백질을 캐리어 세포와 함께 주사액에 혼합하거나, 혹은 경정맥적(經靜脈的)으로 전신 투여하는 방법도 생각할 수 있다.

<126> 본 발명의 암 유전자 치료약의 사용 방법은, 물론, 전술한 방법으로 한정되는 것이 아니라, 여러 가지 사용예를 생각할 수 있다. 예를 들면, 온콜리틱 바이러스의 감염력을 높이기 위해, 본 발명의 암 유전자 치료약을 다른 항암제 혹은 방사선 조사 등과 병용하여도 된다.

<127> 본 발명의 암 유전자 치료약의 매우 적합한 사용예에 대해, (1) 면역 처치용 바이러스에 대한 항체가 음성인 환자의 경우와 (2) 동항체가 양성인 환자의 경우로 나누어 설명한다.

<128> 상기 (1)의 경우, 면역 처치용 바이러스에는, 예를 들면, 전술의 비증식형 아데노 바이러스를 자외선 조사에 의해 불활성화하여 사용한다. 투여량은 대략 10^5 vp에서 10^{11} vp 정도로 한다. 면역 처치용 바이러스의 투여와 함께,

종양 면역을 위해 200Gy 정도에서 방사선 처리한 환자 유래의 종양 세포(암 세포)를 대략 10^5 개에서 10^{10} 개 투여한다. 면역 처치용 바이러스 및 종양 세포의 투여 방법은 피내 주사 또는 피하 주사로 한다.

<129> 면역 처치용 바이러스 및 종양 세포의 투여로부터 대략 3 내지 4주 후에, 캐리어 세포를 종양 내 주사로 투여한다. 캐리어 세포의 투여량은, 예를 들면 1회에 대해, 1×10^7 개 내지 1×10^{10} 개 정도로 한다. 캐리어 세포에는 A549 세포를 사용하여, 150Gy에서 400Gy 정도에서 방사선 처리한 후 투여한다. 온콜리틱 바이러스 및 GM-CSF 발현 벡터에는 아데노 바이러스를 사용하고, 캐리어 세포에는 각각 250vp/cell 정도, 5 내지 20vp/cell 정도 감염시킨다. 주사액에는 액중 농도 대략 0.1 내지 0.2%가 되도록 아테로 콜라겐을 혼합하여 투여한다. 또한 동시에, 철(Fe)을 40 내지 100mg 정도 정맥 주사한다. 혹은, 동시에, ALA를 2 내지 2000mg 종양 내에 투여한다.

<130> 이상을 1회로 하여 캐리어 세포 등을 1 내지 6회 투여한다. 복수 회 투여하는 경우는 연일 혹은 2, 3일 간격으로 투여한다.

<131> 환자가 항체 양성인 상기 (2)의 경우, 면역 처치용 바이러스의 투여량을 대략 10^5 vp 이하로 하는 이외는, 상기 (1)과 마찬가지로 본 발명의 암 유전자 치료약을 투여하면 된다.

<132> 본 발명의 암 유전자 치료약의 구체적인 예로서는, (1) 면역 처치용 바이러스와 캐리어 세포를 조합한 것, (2) 캐리어 세포에 감염시키는 온콜리틱 바이러스를 더 조합한 것, (3) 상기 (1) 또는 (2)의 조합에 아테로 콜라겐을 더 조합한 것, (4) 상기 (1)~(3)의 조합에 GM-CSF 발현 벡터를 더 조합한 것, (5) 상기 (1)~(4)의 조합에 바이러스 생산량을 높이기 위한 철제 및/또는 포르피린 화합물을 더 조합한 것, (6) 상기 (1)~(5)의 조합에 종양 면역을 위해 투여되는 종양 세포를 더 조합한 것, (7) 상기 (1)~(6)의 조합에 보존, 감염·배양, 의약 제제의 조제 등에 필요한 화합물(시약, 완충액, 효소 등), 또는 용기(반응용, 감염·배양용, 보존용 등) 등을 조합한 것을 들 수 있다.

<133> <실시예>

<134> 이하, 도면을 참조하면서 본 발명의 실시예에 대해 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<135> [제1 실시예: 캐리어 세포의 선별과 항체 존재하에서의 항종양 효과]

<136> 기존의 암 세포주 가운데, 캐리어 세포로서 강력한 암 세포 증식 억제 효과를 발휘하는 세포주를 선별하기 위해, 이하의 실험을 행하였다.

<137> 캐리어 세포에 감염시키는 온콜리틱 바이러스에는, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B(IA1.3B)를 사용하였다. 이 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B는 E1A 유전자 및 E3 유전자를 갖고, E1A 유전자의 상류에 종양 특이적 프로모터로서 난소암 특이적 IA1.3B 프로모터(IA1.3B 프로모터)를 갖는 아데노 바이러스이다. 이 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 여러 가지의 캐리어 세포에 대해 500vp/cell로 2일간 감염시킨 후, 동캐리어 세포를 배양 2일째의 난소암 세포주 HEY에 더하고 배양 5일째에 동세포주 HEY의 in vitro 증식 억제 효과를 조사하였다.

<138> 상기 실험 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1의 그래프의 종축은 각 세포주에 대해 50%의 증식 억제 효과(IC50)가 얻어지는 세포수를 나타내며, 세포수가 적은 세포주일수록 증식 억제 효과가 높게 된다. 도 1에 나타내는 바와 같이, 이번에 조사한 암 세포주에서는 293 세포, A549 세포, SW626 세포, HT-3(HT-III 세포) 세포의 순서로 높은 항종양 효과를 나타냈다. 293 세포, A549 세포 및 SW626 세포는, 종래 캐리어 세포로서 사용되고 있던 PA-1 세포에 비해, 대략 100배 정도의 높은 증식 억제 효과를 나타냈다. HT-3 세포에 대해서도, SW626 세포와 동일한 정도의 높은 증식 억제 효과를 나타냈다.

<139> 다음으로, 온콜리틱 바이러스 단독인 경우와 캐리어 세포를 이용했을 경우에서, 바이러스 항체 존재 하, 증식 억제 효과가 어떻게 변화하는지를 조사하였다. 캐리어 세포에는 293 세포를 이용하여, 이 293 세포에 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 2일간 감염시켜, 얻어진 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B 감염 293 세포 및 그 세포 상청(上清)(AdE3-1A1.3B 293 cell+SUP)을, 항아데노 바이러스 항체 존재 하 12웰 플레이트에 투여하였다. 각 웰에는 전일에 5만개 정도의 난소암 세포주 HEY가 뿌려져 있다. 항아데노 바이러스 항체로는, 600배의 항체값을 갖는 것을 여러 가지 항체값으로 희석하여 이용하였다. 마찬가지로, 온콜리틱 바이러스 단독의 경우로서, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 항아데노 바이러스 항체 존재 하, 1웰 1000vp/cell로 12웰 플레이트에 투여하였다. 그리고, 각각의 경우에서 배양 5일째에 암 세포(HEY 세포)의 증식 억제 효과를 조사하였다.

<140> 상기 실험 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2의 그래프의 종축은, 50%의 증식 억제 효과(IC50)가 얻어질 때의 항아

데노 바이러스 항체의 희석도를 나타낸다. 즉, 293 세포를 이용했을 경우는 5배 정도의 희석(120배의 항체값)에서도 50%의 증식 억제 효과를 얻을 수 있고, 아데노 바이러스 단독인 경우는 600배 정도의 희석(1배의 항체값)에 의해 50%의 증식 억제 효과를 얻을 수 있었다. 이와 같이, 캐리어 세포를 이용했을 경우는, 항체값이 높은 조건하에서도 증식 억제 효과를 발휘하는 것이 나타났다.

<141> 마찬가지로, 항아데노 바이러스 항체 존재 하, HEY 세포에 대한 증식 억제 효과를 (1) 아데노 바이러스 감염 293 세포 상청과 세포 성분(AdE3-1A13B 293 cell+SUPT), (2) 아데노 바이러스를 포함하는 세포 상청(AdE3-1A13B, SUPT), (3) 아데노 바이러스를 포함하는 세포 상청을 0.2 μ m의 필터로 처리한 것(AdE3-1A13B, SUPT, filter), (4) 아데노 바이러스 단독(AdE3-1 A13B)의 각각의 경우에 대해 조사하였다. 그 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3의 그래프의 종축은, 50%의 증식 억제 효과(IC50)가 얻어질 때의 항아데노 바이러스 항체의 희석도를 나타낸다. 도 3에 나타내는 바와 같이, 캐리어 세포(293 세포)를 이용했을 경우에, 다른 경우와 비교하여 보다 강력한 항종양 효과를 얻을 수 있었다.

<142> 또한 상기와 마찬가지로의 실험으로, 293 세포, A549 세포, SW626 세포, HT-3 세포의 각 캐리어 세포에 대해, 600배의 항체값을 갖는 항아데노 바이러스 항체 존재하(Ab(+)), 또는 비존재하(Ab(-))에서의, 암 세포주 HEY 세포에 대한 증식 억제 효과를 검토하였다. 그 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4의 그래프의 종축은 배양 5일째의 암 세포수를 나타낸다. 도 4에 나타내는 바와 같이, 상기 4종류의 세포 가운데, A549 세포를 캐리어 세포에 이용했을 경우에 가장 강력한 증식 억제 효과를 나타냈다. 즉, 충분한 양의 항아데노 바이러스 중화 항체 존재하에 아데노 바이러스 감염 A549 세포를 투여하면, 표적 암 세포의 증식은 항체 존재하에도 불구하고 거의 완전하게 억제되었다. 다른 3종류의 세포에 대해서도, 항체 존재 하, 충분한 증식 억제 효과를 얻을 수 있었다.

<143> 바이러스에 의한 암 유전자 치료는, 바이러스에 대한 중화 항체 생산에 의해 여러 차례 투여할 수 없는 것이 난점이었지만, 캐리어 세포를 이용함으로써, 세포간 상호 작용에 의해 표적 암 세포에 직접적으로 감염이 성립함으로써, 여러 차례 투여가 가능해진다. 또한, 캐리어 세포로서 상기 4종류의 세포를 이용함으로써, 강력한 항종양 효과를 얻을 수 있다.

<144> [제2 실시예: 누드마우스 피하 종양 모델에서의 in vivo 항종양 효과]

<145> 다음으로, 누드마우스 피하 종양 모델을 이용하여, 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 감염시킨 각 캐리어 세포의 in vivo 항종양 효과를 검토하였다. 실험에서는, 생후 5주의 누드마우스의 피하에 사람 난소암 세포 RMG-1을 이식하고, 4주 후, 직경 약 10 내지 15mm가 된 거대 종양에 대해 각 캐리어 세포를 6회 종양 내 주사하여, 종양 체적의 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 5의 그래프에 나타낸다. 그래프 중, 검은 사각형의 「control」은 PBS 완충액을 6회 종양 내 주사한 결과, 검은 원의 「AdE3-1A1.3B」는 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 마우스 1마리에 1 \times 10¹⁰ 바이러스 입자 투여한 결과, 검은 삼각형은 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 250vp/cell 감염시킨 SW626 세포를 마우스 1마리에 1 \times 10⁷개 투여한 결과, 검은 마름모는 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 25vp/cell 감염시킨 293 세포를 마우스 1마리에 1 \times 10⁷개 투여한 결과, 흰색 사각형은 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 마우스 1마리에 1 \times 10⁷개 투여한 결과이다. 도 5에 나타내는 바와 같이, 293 세포 및 A549 세포를 캐리어 세포에 이용했을 경우는, 투여 후 50일 경과하면, 직경 약 10 내지 15mm의 거대 종양이 완전하게 소퇴(消退)되었다. SW626 세포는 98%의 증식 억제 효과를 나타냈다.

<146> 상기와 마찬가지로의 실험을, 생후 5주의 누드마우스의 피하에 사람 난소암 세포 PA-1을 이식하여 행했다. 그 결과를 도 6에 나타낸다. 도 6에 나타내는 바와 같이, 293 세포 및 A549 세포를 캐리어 세포에 이용하면, 직경 약 10 내지 15mm의 거대 종양이 완전하게 소퇴되었다. SW626 세포는 5마리 중 4마리의 마우스에서 종양이 완전하게 소실되었다.

<147> [제3 실시예: 면역력이 있는 피하 종양 모델 마우스에서의 in vivo 항종양 효과]

<148> 다음으로, 면역 기능이 정상적인 (C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스를 이용하여 본 발명의 암 유전자 치료약의 in vivo 항종양 효과를 검토하였다. 본 실험에서는, (1) syngenic 모델 마우스에 대해 동종의 난소암 세포 OVHM을 피하 이식하고, 그 10일 후 이후 형성된 5 내지 10mm의 피하 종양에 대해, 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 250vp/cell 감염시킨 방사선 처리(방사선 치료) 후의 A549 세포를 6회 종양 내 투여했을 경우, (2) 생후 7주의 syngenic 모델 마우스를 면역 처치용 바이러스인 아데노 바이러스 투여에 의해 미리 면역하고, 그 3개월 후, 상기 (1)의 경우와 마찬가지로, 난소암 세포 OVHM을 피하 이식하여, 그 10일 후 이후, 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 250vp/cell 감염시킨 방사선 처리 후의 A549 세포를 6회 종양 내 투여했을 경우, (3) 컨트롤로서

PBS 완충액을 6회 종양 내 투여했을 경우의 각각의 경우에 대해 항종양 효과를 검토하였다.

- <149> 상기 실험 결과를 도 7의 그래프에 나타낸다. 그래프 중, 검은 사각형의 「control」은 상기 (3)의 컨트롤의 경우의 결과로서, 검은 원의 「Ad(-)→A549」는 상기 (1)의 면역 처치용 아데노 바이러스를 투여하지 않은 경우의 결과이고, 검은 삼각형의 「Ad(+)->A549」는 상기 (2)의 면역 처치용 아데노 바이러스를 투여했을 경우의 결과이다. 한편, 면역 처치용 아데노 바이러스에는, E1 유전자를 갖지 않는 비증식형의 아데노 바이러스를 사용하고, 보다 구체적으로는, CMV 프로모터의 하류에 LacZ 유전자가 삽입된 아데노 바이러스를 사용하였다. 도 7에 나타내는 바와 같이, 미리 아데노 바이러스에 의한 면역을 하지 않은 상기 (1)의 경우에는, 컨트롤에 비해 20%의 항종양 효과를 나타낸 것에 대해, 미리 아데노 바이러스에 의한 면역 처치를 실시한 상기 (2)의 경우에는, 투여 개시 후 3 내지 4일에 분명한 항종양 효과를 나타내고, 9일 후에 종양은 완전하게 소실되며 림프절 전이도 소실되었다. 이와 같이, 항체 생산이 있음에도 불구하고 오히려 면역력이 있는 마우스에서 보다 강력하고 극적인 항종양 효과가 얻어진 것은, 면역 처치용 아데노 바이러스의 투여에 의해 생체의 CTL 반응이 유도·야기되었기 때문이라고 생각된다.
- <150> 온콜리틱 아데노 바이러스는, 세포간 상호 작용에 의해 캐리어 세포로부터 표적 종양 세포로 감염되고 종양 세포 내에서 특이적으로 증식하여, 종양 세포를 용해·살상하는 cell lysis 작용을 발휘한다고 생각되는데, 본 발명의 암 유전자 치료약에 있어서는, 미리 면역 처치용 아데노 바이러스를 투여함으로써, 온콜리틱 아데노 바이러스에 감염된 표적 종양 세포를 배제하는 생체의 강한 CTL 반응이 유도되어, 아데노 바이러스 감염 종양 세포의 완전한 자연 배제가 유도된다고 생각된다.
- <151> 표적 종양 세포에의 아데노 바이러스의 감염 방법의 하나로서, 아데노 바이러스에 의한 세포 용해를 생각할 수 있다. 도 8은, A549 세포를 뿌린 웰에, 자외선 조사에 의해 불활성화한 아데노 바이러스를 1세포당 10000 바이러스 입자 투여하여, 하룻밤 배양 후, 현미경에 의해 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 도 8의 화살표에 나타내는 바와 같이, 아데노 바이러스의 투여에 의해 세포 용합이 일어나 다핵 세포가 산발적으로 발견되었다. 아데노 바이러스를 투여하지 않았던 A549 세포에서는, 이러한 변화는 관찰되지 않았다(도 9 참조).
- <152> 세포 용합 이외에 생각할 수 있는 감염 방법으로서, 캐리어 세포의 표적 세포에의 세포 접촉, 한층 더 국소적인 아데노 바이러스의 버스트 혹은 아데노 바이러스를 포함하는 캐리어 세포 fragment에 의한 표적 종양 세포에의 아데노 바이러스의 감염이 성립한다고 생각된다. 어떤 방법이든 아데노 바이러스에 감염된 표적 종양 세포에 있어서는, 종양 특이적 프로모터를 갖는 아데노 바이러스가 증가하여 강력한 면역원이 되어(혹은 아데노 바이러스에 감염된 표적 종양 세포가 갖는 암특이적 펩티드를 이차적으로 항원 인식함으로써), CTL 반응에 의해 종양 세포가 배제된다고 생각된다.
- <153> [제4 실시예: 미드카인 프로모터를 사용했을 경우의 항종양 효과]
- <154> 다음으로, 미드카인 프로모터를 사용했을 경우의 항종양 효과를 검토하였다. 도 10의 (a)는, 1 내지 21의 사람 수술 표본에서의 미드카인(MK) mRNA의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과이다. 도 10의 (a)에 나타내는 바와 같이, 신경교아종(glioblastoma), 미분화 성상세포종(anaplastic astrocytoma)과 같은 악성 신경교종(malignant glioma) 및 미만성 성상세포종(diffuse astrocytoma)에 있어서 미드카인 mRNA의 과잉 발현이 인정되었다. 이와 같이, 미드카인은 뇌종양 등 많은 암에 있어서 과잉 발현이 인정된다.
- <155> 도 10의 (b)는, 상기와 마찬가지로의 방법에 의해, 악성 신경교종의 4개의 세포주에서의 미드카인 mRNA의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과이다. 도 10의 (b)에 나타내는 바와 같이, 4개의 세포주 가운데, U87MG에서는 발현이 없고, U251MG, LN319, U373MG에서는 미드카인 mRNA의 과잉 발현이 인정되었다.
- <156> 도 10의 (c)는, 상기 각 세포주에서의 미드카인 단백질의 발현을 웨스턴 블롯 해석에 의해 검토한 결과로서, mRNA와 마찬가지로 U87MG에서는 발현이 없고, U251MG, LN319, U373MG에서는 미드카인 단백질의 과잉 발현이 인정되었다.
- <157> 다음으로, 미드카인의 프로모터 어세이를 행하였다. 실험에서는, 길이가 상이한 2개의 미드카인 프로모터(600 염기와 2300 염기)의 활성을 비교하였다. 각각의 프로모터의 하류에 루시페라아제 유전자가 삽입된 플라스미드(pGL3-MK600 및 pGL3-MK2300)를 상기 각 세포주에 도입하고, 각각의 루시페라아제 활성을 조사함으로써 프로모터 활성을 평가하였다. 그 결과, 도 11에 나타내는 바와 같이, 악성 신경교종의 세포주에서는, 길이 600 염기 쪽이 길이 2300 염기보다 높은 프로모터 활성을 나타냈다.
- <158> 도 12의 (a)는, 이번에 설계한, 미드카인 프로모터를 갖는 온콜리틱(세포 용해형) 아데노 바이러스의 구조를 모식적으로 나타내는 도면이다. 길이 600 염기 또는 2300 염기의 미드카인 프로모터는 552bp의 위치에

도입되었다.

- <159> 도 12의 (b)는, 3종류의 아데노 바이러스를 상기 각 세포주에 감염시켜, 각각의 세포주에서의 E1A 단백질의 발현을 웨스턴 블롯 해석에 의해 검토한 결과이다. 도 12의 (b)에 나타내는 바와 같이, 길이 600 염기의 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스(AdMK600)를 감염시켰을 경우, 미드카인을 발현하는 U251MG, LN319, U373MG에서만 아데노 바이러스의 E1A 단백질의 발현이 관찰되었다. 이에 비해, 야생형의 아데노 바이러스(AdWild)에서는 정상 뇌세포를 포함하는 모든 세포에서 E1A 단백질의 발현이 관찰되고, 컨트롤 바이러스인 AdLacZ에서는 어느 세포에서도 E1A 단백질의 발현이 관찰되지 않았다.
- <160> 도 13의 (a)는, 3종류의 아데노 바이러스에 의한 암 세포 증식 억제 효과를 비교 검토한 결과이다. 야생형의 아데노 바이러스(AdWild)에서는 모든 세포에 있어서 강한 증식 억제 효과를 나타냈지만, 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스(AdMK600 및 AdMK2300)에서는, 미드카인을 발현하는 U251MG, LN319, U373MG에서만 증식 억제 효과를 나타내며, 이들 값은 미드카인 mRNA의 발현량, 프로모터 활성과 잘 상관되었다. 또한, 길이 2300 염기의 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스 AdMK2300보다 AdMK600 쪽이 강한 증식 억제 효과를 나타냈다.
- <161> 도 13의 (b)는, 아데노 바이러스의 E3 영역의 증식 억제 효과에 미치는 영향을 검토한 결과로서, 도 13의 (b)에 나타내는 바와 같이, E3 영역이 있는 AdMK600에서는 E3 영역이 없는 아데노 바이러스(AdMK600-ΔE3)보다 10배 정도의 강한 증식 억제 효과를 나타냈다.
- <162> 도 13의 (c)는, 종양의 직경 5 내지 10mm 정도의 크기의 누드마우스 피하 이식 모델에서의 아데노 바이러스의 항종양 효과를 검토한 결과이다. 도면 중, 검은 마름모는 야생형의 아데노 바이러스 AdWild를 투여한 결과, 검은 사각형은 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스 AdMK600을 투여한 결과, 검은 삼각형은 LacZ 유전자가 삽입된 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 투여한 결과, 검은 원은 PBS 완충액만 투여한 결과이다. 도 13의 (c)에 나타내는 바와 같이, 미드카인을 발현하지 않는 U87MG에서는 야생형의 아데노 바이러스만 항종양 효과를 나타내고, 미드카인을 발현하는 U373MG에서는 AdMK600과 AdWild는 완전하게 종양의 소실을 초래하며, PBS 완충액만 주사한 컨트롤과 AdLacZ를 주사한 것의 사이에 큰 차이는 인정되지 않았다.
- <163> 또한, 상기 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스(Ad-MK600)를 캐리어 세포에 감염시켜, 당해 바이러스 감염 캐리어 세포의 항종양 효과를 Ad-MK600 단독 투여의 경우와 비교하였다. 실험에서는, 293 세포 및 A549 세포를 캐리어 세포로 사용하였다. 누드마우스 5주령에 상기 U373MG 세포를 이식하고, 3주 후에 10 내지 15mm의 거대 종양이 얻어진 다음, 바이러스 감염 캐리어 세포 또는 Ad-MK600만을 투여하여, 그 4주 후에 종양 체적의 크기를 비교하였다. 그 결과를 도 14에 나타낸다. 도면 중, 「Ad-MK600」은 Ad-MK600을 단독 투여한 결과, 「293」, 「A549」는 각각 293 세포, A549 세포를 캐리어 세포로 이용한 바이러스 감염 캐리어 세포를 투여한 결과이다. 도 14에 나타내는 바와 같이, 바이러스 감염 캐리어 세포를 투여했을 때는 완전하게 종양이 소실되었다. 한편, Ad-MK600을 단독 투여했을 때는 컨트롤(control)과의 차는 거의 인정되지 않았다.
- <164> 지금까지의 실험 결과로부터, 캐리어 세포로 A549 세포, 293 세포 등을 사용하고, 온콜리틱 바이러스로 1A1.3B 프로모터 또는 미드카인 프로모터를 갖는 아데노 바이러스를 사용함으로써, 실제로 난소암, 악성 신경교종에 대한 양호한 치료 효과가 인정되었다. 미드카인 프로모터는, 악성 신경교종 외 여러 가지의 악성 종양에 대해 사용 가능하고, 악성 신경교종 이외의 암치료에도 유효하다고 생각된다.
- <165> [제5 실시예: 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 증식 억제 효과에 대한 Fe 및 ALA의 영향]
- <166> 난소암 세포 HEY를 12well dish에 10000/well 뿌린 다음, 다음날에 FeSO₄를 50μg/ml, 5μg/ml, 0.5μg/ml, 0μg/ml의 각 농도로 넣고, 모든 well에 세포 장애형 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 넣어, 5일 후에 아데노 바이러스의 증식 억제 효과를 IC₅₀으로 평가하였다. 그 결과를 도 15에 나타낸다. 도면 중 종축은, 각 경우에서의 IC₅₀의 바이러스 투여량(vp/cell)을 상대적으로 나타내는 것이다. 도 15에 나타내는 바와 같이, FeSO₄ 50μg/ml 및 아데노 바이러스를 병용했을 경우에는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약 20배, FeSO₄ 5μg/ml 및 아데노 바이러스 병용에서는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약 8배의 증식 억제 효과를 나타냈다.
- <167> 다음으로, 난소암 세포주 HEY를 12well dish에 10000/well 뿌린 다음, 다음날에 5-aminolevulinic acid(ALA)를 50μg/ml, 5μg/ml, 0.5μg/ml, 0μg/ml의 각 농도로 넣고, 모든 well에 세포 장애형 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 넣어, 5일 후에 아데노 바이러스의 증식 억제 효과를 IC₅₀으로 평가하였다. 그 결과를 도 16에 나타낸다. 도면 중 종축은, 각 경우에서의 IC₅₀의 바이러스 투여량(vp/cell)을 상대적으로 나타내는 것이다. 도 16에 나타내는 바와 같이, ALA 50μg/ml 및 아데노 바이러스를 병용했을 경우에는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약

100배의 증식 억제 효과를 나타냈다.

- <168> 또한, 난소암 세포주 HEY를 12well dish에 10000/well 뿌린 다음, 다음날에 FeSO₄를 50 μ g/ml, 5 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0 μ g/ml의 각 농도로 넣고, 각 well에 세포 장애형 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B 및 5-aminolevulinic acid(ALA) 50 μ g/ml, 또는 컨트롤로서 아데노 바이러스 단독을 넣어, 5일 후에 아데노 바이러스의 증식 억제 효과를 IC₅₀으로 평가하였다. 그 결과를 도 17에 나타낸다. 도면 중 종축은, 각 경우에서의 IC₅₀의 바이러스 투여량(vp/cell)을 상대적으로 나타내는 것이다. 도 17에 나타내는 바와 같이, FeSO₄ 50 μ g/ml, ALA 50 μ g/ml 및 아데노 바이러스를 병용했을 경우에는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약 1000배의 증식 억제 효과를 나타내고, FeSO₄ 5 μ g/ml, ALA 50 μ g/ml 및 아데노 바이러스를 병용했을 경우에는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약 700배의 증식 억제 효과를 나타내며, FeSO₄ 0.5 μ g/ml, ALA 50 μ g/ml 및 아데노 바이러스를 병용했을 경우에는, 아데노 바이러스 단독에 비해 약 200배의 증식 억제 효과를 나타냈다.
- <169> 이상과 같이, ALA 및 Fe는 온콜리틱 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 증식 억제 효과를 현저하게 향상하는 것이 분명해졌다. 이유는, β -gal assay에 의해 아데노 바이러스의 감염 능력을 높이는 것, PFU assay에 의한 아데노 바이러스의 생산량의 증가에 의하는 것이 분명해져 있으며, ALA 및 Fe는 아데노 바이러스의 감염력을 높여 생산량을 증가시키는 것, 즉 아데노 바이러스의 암 세포 내로의 감염력 증가와 세포 내에서의 생산량 증가와 함께 항종양 효과를 현저하게 높이는 것이 분명해졌다.
- <170> ALA는 포르피린 대사물로 종래부터 암 세포에 투입되어 그 대사물인 protoporphyrin IX가 축적되기 쉬운 것이 알려져 있어, 이것이 광감작 작용을 가짐으로써 엑시머 다이 레이저(excimer dye laser)와 병용되어 표재성(表材性)암의 PDT 치료(photodynamic therapy)에 이용되어 왔다.
- <171> 상기 protoporphyrin IX는, Fe와 결합함으로써 heme로 되어 세포 내에서 cytochrome 등의 heme 단백질을 형성한다. 이 heme 단백질은, 세포 내 미토콘드리아에서 호흡기계에 관여하고 있으며 ATP 생산에 작용하여 단백질 합성에 관여한다. 이와 같이, heme 단백질은 아데노 바이러스 감염시의 아데노 바이러스 생산을 위한 단백질 합성에 관여하기 때문에, 이들 포르피린 대사가 향상하는 것은 아데노 바이러스 생산 증가로 연결될 가능성이 높다고 생각된다.
- <172> 따라서, 본 발명의 암 유전자 치료약, 암 유전자 치료 방법에 있어서, 이들 Fe 및/또는 ALA 등의 포르피린 화합물을 병용함으로써, 한층 더 치료 효과를 높이는 것을 기대할 수 있다. 즉, Fe 및/또는 ALA 등의 포르피린 화합물을 병용함으로써, 직접적인 항종양 효과의 증가, 나아가 항체 존재하의 감염 억제 상태에 있어서, 표적 세포의 아데노 바이러스 생산 증가에 의한 CTL response의 향진에 의해, syngenic mouse model에서 항종양 효과가 높아져 사람에게 있어서도 마찬가지로 양호한 항종양 효과를 나타낼 것으로 생각된다.
- <173> 또한, 온콜리틱 바이러스를 이용한 암 유전자 치료에 있어서, 캐리어 세포를 사용하지 않는 경우라도 Fe 및/또는 ALA 등의 포르피린 화합물을 병용함으로써, 치료 효과를 높이는 것을 기대할 수 있다.
- <174> [제6 실시예: 본 발명의 암 유전자 치료약에 의한 암치료법의 최적화의 검토]
- <175> 본 발명의 암 유전자 치료약에 의한 암치료법의 최적화를 도모하기 위해, 이하 일련의 실험을 행하였다.
- <176> 우선, 도 7에 나타내는 실험과 마찬가지로, 면역 기능이 정상적인 피하 종양 모델 마우스((C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스)를 이용하여, 본 발명의 암 유전자 치료약의 in vivo 항종양 효과를 검토하였다. 본 실험에서는, 생후 5주의 (C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스를 면역 처치용 바이러스의 투여에 의해 사전 면역하고, 그 12주 후, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1 \times 10⁶개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 상기 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 250vp/cell 감염시킨 A549 세포(Ad-A549)를 종양 내 투여하였다. 면역 처치용 바이러스에는, E1 유전자를 갖지 않는 비증식형의 아데노 바이러스를 사용하고, 보다 구체적으로는, CMV 프로모터의 하류에 LacZ 유전자가 삽입된 아데노 바이러스로서, 자외선 등에 의한 불활성화 처리를 행하지 않은 아데노 바이러스 Ad- β -gal을 사용하여, 이 Ad- β -gal을 마우스 1마리당 1 \times 10¹⁰ vp 이내 투여하였다. 또한, 캐리어 세포인 A549 세포는, 200Gy에서 방사선 처리 후, 마우스 1마리에 대해 1회당 5 \times 10⁶개, 합계 6회 종양 내 투여하였다.
- <177> 상기 실험 결과를 도 18의 (a), (b)에 나타낸다. 각 그래프 중, 「Ad- β -gal \rightarrow Ad-A549」는 상기 실험 결과로서, 「Ad-A549」는 캐리어 세포만 투여한 결과, 「Ad- β -gal」은 면역 처치용 바이러스는 투여하지 않고 치료로서 Ad- β -gal만 투여한 결과, 「control」은 PBS 완충액을 투여한 결과이다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다. (a)

의 그래프는 각 마우스의 종양 체적을 비교적 단기간 관찰한 결과이고, (b)의 그래프는 각 군 마우스의 생존율을 장기간 관찰한 결과이다. 이들 도면에 나타내는 바와 같이, 「Ad-β-gal→Ad-A549」에서는 강력한 in vivo 항종양 효과가 인정되었다.

- <178> 다음으로, 면역 처치용 아데노 바이러스 투여로부터 캐리어 세포 투여까지의 투여 간격에 대해 검토를 행하였다. 본 실험은, 이 투여 간격을 여러 가지로 변경한 점, 및, 캐리어 세포인 A549 세포에 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 점 이외는, 도 18에 나타내는 실험과 마찬가지로 행하였다.
- <179> 상기 실험 결과를 도 19의 (a), (b)에 나타낸다. 각 그래프 중, 「2-4w」, 「5-9w」, 「10-15w」, 「16-22w」는 각각 상기 투여 간격을 2 내지 4주, 5 내지 9주, 10 내지 15주, 16 내지 22주의 사이로 설정한 실험 결과로서, 각 군의 마우스의 수는 n=5이다. 이들 도면에 나타내는 바와 같이, 상기 투여 간격을 10 내지 15주로 설정했을 때 가장 양호한 항종양 효과를 얻을 수 있었다. 본 실험과 같이, 불활성화 처리하지 않은 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용했을 경우에는, 당해 바이러스 투여 후 대략 10 내지 15주에서 T세포에 의한 CTL 반응이 증화 항체에 의한 감염 억제에 비해 우위가 된다고 생각된다.
- <180> 임상 응용을 고려하면, 상기 투여 간격은 단기간인 것이 바람직하다. 따라서, 불활성화 처리한 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용함으로써 상기 투여 간격을 짧게 할 수 없는지 검토하였다. 그 결과 도 20에 나타내는 바와 같이, 자외선(UV) 조사하여 불활성화 처리한 아데노 바이러스 UV-Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용했을 경우는, 상기 투여 간격을 4주 또는 3주로 설정했을 때에 양호한 항종양 효과를 얻을 수 있다는 것, 즉, 면역 처치용 바이러스를 불활성화 처리함으로써, 상기 투여 간격을 3 내지 4주 정도로 단축할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- <181> 상기 실험은, 불활성화 처리한 아데노 바이러스 UV-Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용한 점, 상기 UV-Ad-β-gal을 마우스 1마리당 1×10^7 vp 이내 투여한 점, 상기 투여 간격을 3주, 4주, 5주 또는 6주로 설정한 점, 및, 캐리어 세포인 A549 세포에 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 점 이외는, 도 18에 나타내는 실험과 마찬가지로 행하였다. 각 군의 마우스의 수는 n=10이다.
- <182> 도 21은, 상기 UV-Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용했을 경우의 당해 바이러스의 투여량에 대해 검토한 결과이다. 이 실험에서는, 상기 UV-Ad-β-gal의 투여량을 1×10^6 vp 내지 1×10^{11} vp의 범위에서 변경하였다. 또한, 상기 투여 간격은 6주로 설정하고, 그 이외는 도 20에 나타내는 실험과 마찬가지로 행하였다. 그 결과, UV-Ad-β-gal의 투여량 1×10^7 vp일 때에 가장 양호한 항종양 효과를 얻을 수 있었다(이 결과로부터, 도 20에 나타내는 실험에서는, UV-Ad-β-gal의 투여량을 1×10^7 vp로 설정하였다).
- <183> 도 22의 (a), (b)는, 종양 면역(tumor vaccination)의 효과를 검토한 결과이다. 상기 UV-Ad-β-gal을 마우스 1마리에 대해 1×10^7 vp 이내 투여하여, 그 10일 후에 종양 면역을 위해 방사선 조사한 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 이하 이식하였다. 동시에, 편평 상피 암 세포 SCC7 또는 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 이하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양을 형성한 마우스에 AdE3-1A1.3B 감염 A549 세포를 5×10^6 개 종양 내에 6회 투여한 마우스(도면 중, 「OVHM-RT+Ad-β-gal→SCC7」, 「OVHM-RT+Ad-β-gal→OVHM」)에서는, 컨트롤(도면 중, 종양 면역 없이 SCC7 종양에 대해 캐리어 세포 치료한 「SCC7」, 종양 면역 없이 OVHM 종양에 대해 캐리어 세포 치료한 「OVHM」)에 비해 종양의 성장·증식은 현저하게 억제되고, 특히 방사선 조사한 OVHM에 의해 종양 면역하고 OVHM 종양 형성한 마우스에 캐리어 세포에 의한 치료를 행하면, 모든 마우스에 있어서 종양은 소실되고 재발은 인정되지 않았다.
- <184> 도 23은, 비소세포성 폐암 세포 A549 세포에 의한 종양 면역의 효과를 검토한 결과이다. 이 실험에서는, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 100vp/cell 감염시킨 방사선 처리 후의 A549 세포를 마우스 1마리에 대해 1×10^6 개 이하 이식하고, 그 40일 후에 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 이하 이식하였다. 이 마우스(도면 중, 「AdE3-1A1.3B-infected A549→OVHM」)에 있어서도, 컨트롤(도면 중, 종양 면역 없이 OVHM 종양 형성하고 캐리어 세포에 의한 치료를 행한 「OVHM」)에 비해 종양의 성장·증식은 현저하게 억제되어 생존율은 크게 개선되었다.
- <185> 이상의 결과로부터, 종류가 상이한 암 세포로 종양 면역을 행하여도 항종양 효과가 있는 것을 알 수 있었다.
- <186> 다음으로, 캐리어 세포와 함께 아테로 콜라겐을 투여했을 경우의 효과에 대해 검토하였다. 이 실험에서는, 생후 5 내지 10주의 (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 소정량 감염시킨 A549 세포를 5

$\times 10^6$ 개 투여하였지만, 이때 아테로 콜라겐을 혼합 주사하여 최종 농도를 0.1%로 하고, 아테노 바이러스 투여에 수반하는 부작용에 의한 사망률이 개선되는지의 여부를 조사하였다. 그 결과를 도 24에 나타낸다. 도면 중, 우측의 바는 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 또는 250vp/cell 감염시킨 A549 세포와 함께 아테로 콜라겐을 투여한 결과, 좌측 및 중앙의 바는 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 각각 5vp/cell, 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 투여한 결과(아테로 콜라겐은 혼합 주사하지 않음)이다. 도 24에 나타내는 바와 같이, 아테로 콜라겐을 동시 투여했을 경우는, 부작용에 의한 사망률이 격감하고 투여량도 증가시키는 것이 가능해졌다. 이는 아테로 콜라겐에 의해 아테노 바이러스의 확산이 억제됨과 동시에 항아테노 바이러스 중화 항체에 대한 블록이 생겼기 때문이라고 생각된다.

<187> 이상의 결과로부터, 아테로 콜라겐을 캐리어 세포와 동시 투여함으로써 부작용을 억제하고, 아테노 바이러스의 고용량의 투여가 가능하게 되는 것을 알 수 있었다.

<188> 다음으로, 불활성화 처리하지 않은 상기 아테노 바이러스 Ad- β -gal을 1, 2, 3회 투여하여, 부스터 효과(booster effect)에 의해 각각 혈중 항아테노 바이러스 항체가 증가한 마우스에서의 항종양 효과에 대해 검토하였다. 이 실험에서는, 생후 5주의 (C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스에 아테노 바이러스 Ad- β -gal을 1회, 2회 또는 3회 투여하고(각 회 3주 간격으로, 1회당 1×10^{10} vp 투여), 그 다음, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 방사선 처리 후의 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 캐리어 세포에는 A549 세포 단독, 또는, A549 세포와 293 세포를 혼합한 것을 사용하였다.

<189> A549 세포와 293 세포를 혼합한 것은, 마우스 1마리에 대해, 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 3.75×10^6 개, 및, 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 10vp/cell 감염시킨 293 세포를 3.75×10^6 개 종양 내 투여하고, 이것을 1회로 하여 합계 6회 종양 내 투여하였다. 그 결과를 도 25의 (a), (b)에 나타낸다. 또한, A549 세포 단독의 경우는 마우스 1마리에 대해, 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 7.5×10^6 개 종양 내 투여하고, 이를 1회로 하여 합계 6회 종양 내 투여하였다. 그 결과를 도 26의 (a), (b)에 나타낸다. 도 25 및 도 26에서, 「 $\times 1$ 」, 「 $\times 2$ 」, 「 $\times 3$ 」은 각각 아테노 바이러스 Ad- β -gal을 1회, 2회, 3회 투여한 결과이다. 이들 도면에 나타내는 바와 같이, 아테노 바이러스 Ad- β -gal의 수회 투여에 의해 항아테노 바이러스 항체 플러스의 마우스에 있어서도, 캐리어 세포에 의한 항종양 효과가 인정되었다. 또한 이번 실험에서는, A549 세포 단독에 비해 A549 세포와 293 세포를 혼합한 것을 캐리어 세포로 사용한 편이 성적이 양호하였다.

<190> 도 27의 (a), (b)는, 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B 뿐만 아니라, GM-CSF 발현 벡터를 감염시킨 캐리어 세포(A549 세포)를 투여하고, 이 캐리어 세포와 함께 아테로 콜라겐을 투여했을 경우의 in vivo 항종양 효과에 대해 검토한 결과이다. 이 실험에서는, 도 26에 나타내는 실험과 마찬가지로, 생후 5주의 (C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스에 아테노 바이러스 Ad- β -gal을 1회, 2회 또는 3회 투여하고(각 회 3주 간격으로 1회당 1×10^{10} vp 투여), 그 다음, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 방사선 처리 후의 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 단, 캐리어 세포(A549 세포)에는, 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킴과 동시에, GM-CSF 발현 벡터(아테노 바이러스의 E1 유전자를 결실한 부위에 CMV 프로모터의 하류에 GM-CSF 유전자를 삽입한 벡터)를 10vp/cell 감염시켰다. 이렇게 하여 조제한 방사선 처리 후의 A549 세포를 1회에 대해 7.5×10^6 개, 아테로 콜라겐(농도 0.1%)과 함께 종양 내 투여하여, 합계 3회($\times 3$) 종양 내 투여하였다.

<191> 도 27의 (a), (b)에 있어서, 「Ad- β -gal \rightarrow AdE3-1A1.3B+GMCSF」는 상기 실험 결과이고, 「Ad- β -gal \rightarrow AdE3-1A1.3B」는 아테노 바이러스 AdE3-1A1.3B만 50vp/cell 감염시킨 캐리어 세포(A549 세포)를 1회에 대해 7.5×10^6 개, 합계 6회($\times 6$) 종양 내 투여한 결과이다. 도 27의 (a), (b)에 나타내는 바와 같이, 「Ad- β -gal \rightarrow AdE3-1A1.3B+GMCSF」에서는, 3회 투여에도 불구하고 「AdE3-1A1.3B」 6회 투여에 비해, 아테노 바이러스 Ad- β -gal을 1회, 2회, 3회 투여했을 경우 모두 매우 강한 in vivo 항종양 효과가 인정되었다.

<192> 이상의 결과로부터, 캐리어 세포에 온콜리틱 아테노 바이러스뿐만 아니라, GM-CSF 발현 벡터도 감염시키는 것이, 암치료에 매우 유효하다는 것을 알 수 있었다.

<193> 도 28의 (a), (b)는, 캐리어 세포 투여시에 철제를 복강 내 투여했을 경우의 효과에 대해 검토한 결과이다. 이 실험에서는, 도 27에 나타내는 실험과 마찬가지로, 생후 5주의 (C57BL/6 \times C3/He)F1 마우스에 아테노 바이러스

Ad-β-gal을 1회, 2회 또는 3회 투여하고(각 회 3주 간격으로 1회당 1×10^{10} vp 투여), 그 다음, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 방사선 처리 후의 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 단, 캐리어 세포 투여시에, 철제로서 철 덩크트란(Fe-Dextran) 0.01mg을 복강 내 투여하였다. 캐리어 세포에는, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 사용하고, 1회에 대해 7.5×10^6 개, 합계 3회(×3) 종양 내 투여하였다(각 회 철제도 투여하였다).

<194> 도 28의 (a), (b)에 있어서, 「Ad-β-gal→AdE3-1A1.3B+Fe」는 상기 실험 결과이고, 「Ad-β-gal→AdE3-1A1.3B」는 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 캐리어 세포(A549 세포)를 1회에 대해 7.5×10^6 개, 합계 6회(×6) 종양 내 투여한 결과이다. 도 28의 (a), (b)에 나타내는 바와 같이, 「Ad-β-gal→AdE3-1A1.3B+Fe」에서는, 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1회, 2회, 3회 투여했을 경우 모두 캐리어 세포에 의한 치료는 3회에도 불구하고, AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포에 의한 6회의 치료에 비해 매우 강한 in vivo 항종양 효과가 인정되었다.

<195> 이상의 결과로부터, 캐리어 세포 투여시에 철제를 함께 투여하는 것은, 암치료에 매우 유효하다는 것을 알 수 있었다.

<196> 다음으로, 캐리어 세포 투여 전에 캐리어 세포에 대해 행하는 방사선 처리에 있어서 조사하는 선량에 대해 검토하였다. 실험에는, 생후 5주의 누드마우스를 사용하고, A549 세포를 상이한 선량으로 방사선 처리 후, 마우스 1마리당 1×10^7 개 피하 이식하여, 종양의 형성·성장을 관찰하였다. 그 결과를 도 29에 나타낸다. 도 29에 나타내는 바와 같이, 조사하는 선량을 120Gy 이상으로 함으로써, 종양의 형성·성장은 억제되었다.

<197> (C57BL/6×C3/He)F1 마우스를 사용한 실험에서, 캐리어 세포(A549 세포)를 상이한 선량으로 방사선 처리했을 경우의 항종양 효과에 대해 검토한 결과를 도 30에 나타낸다. 이 실험에서는, 생후 5주의 (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에 아데노 바이러스 UV-Ad-β-gal을 1×10^{10} vp 투여하고, 그 5주 후, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 선량 50Gy, 100Gy, 200Gy 또는 400Gy로 방사선 처리한 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 캐리어 세포로는 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 사용하고, 1회에 대해 7.5×10^6 개, 합계 6회 종양 내 투여하였다. 그 결과, 방사선 처리에 있어서 조사하는 선량은, 200Gy보다 400Gy 쪽이 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

<198> 도 31은, 캐리어 세포에 대한 온콜리틱 바이러스의 감염량에 대해 검토한 결과를 나타낸다. 이 실험에서는, 생후 5주의 (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1×10^{10} vp 투여하고, 그 4주 후, 난소암 세포 OVHM을 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하여, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 선량 250Gy로 방사선 처리한 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 또한, 캐리어 세포(A549 세포)에 대한 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 감염량을 100vp/cell, 250vp/cell 또는 500vp/cell 중 어느 하나로 하여, 1회에 대해 캐리어 세포를 7.5×10^6 개, 합계 6회 종양 내 투여하였다. 또한, 캐리어 세포 투여시에 아테로 콜라겐(농도 0.1%)을 함께 종양 내 투여하였다. 그 결과, 상기 감염량은 250vp/cell일 때에 가장 양호한 결과를 얻을 수 있고, 150 내지 400vp/cell 정도로 설정하면 양호하다는 것을 알 수 있었다.

<199> 도 32의 (a), (b)는, 도 31에 나타내는 실험과 마찬가지로의 실험에 있어서, 종양 면역의 효과를 검토한 결과이다. 이 실험에서는, 생후 5주의 (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에, 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1×10^{10} vp 투여하고, 그 4주 후에 종양 면역을 위해 선량 80Gy로 방사선 처리한 난소암 세포 OVHM-RT를 마우스 1마리당 1×10^6 개 피하 이식하였다. 또한 이 다음, 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 피하 이식하고, 5 내지 10mm의 종양 형성 후, 선량 250Gy로 방사선 처리한 캐리어 세포를 종양 내 투여하였다. 캐리어 세포로는, 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B를 50vp/cell 감염시킨 A549 세포를 사용하여, 1회에 대해 7.5×10^6 개, 합계 3회 종양 내 투여하였다. 또한, 캐리어 세포 투여시에 아테로 콜라겐(농도 0.1%)을 함께 종양 내 투여하였다. 그 결과, 종양 면역을 행한 마우스(도면 중, 「OVHM-RT→A549」)에서는, 종양 면역을 행하지 않은 마우스(도면 중, 「A549」)에 비해 종양의 성장·증식은 현저하게 억제되어 생존율은 크게 개선되었다.

<200> 이상의 결과로부터, 본 발명의 암 유전자 치료약의 사용시에, 종양 면역을 병용함으로써 양호한 항종양 효과를

얻을 수 있는 것을 알 수 있었다.

산업상 이용 가능성

<201> 이상과 같이, 본 발명의 암 유전자 치료약은, 거의 모든 악성 종양에 적용할 수 있어 난소암, 편평 상피암(자궁 경부암, 피부암, 두경부암, 식도암, 폐암 등), 소화기암(대장암, 췌장암, 간암, 위암 등), 신경아세포종, 뇌종양, 유방암, 정소암, 전립선암 등 각종 암에 대한 강력한 항종양 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <39> 도 1은 각종 세포주를 캐리어 세포로 이용했을 경우의 난소암 세포 HEY에 대한 증식 억제 효과를 IC50에서의 세포수로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <40> 도 2는 온콜리틱 바이러스 단독의 경우와 캐리어 세포를 이용했을 경우에서, 바이러스 항체 존재 하, 난소암 세포 HEY에 대한 증식 억제 효과를 IC50에서의 항아데노 바이러스 항체의 항체값으로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <41> 도 3은 온콜리틱 아데노 바이러스 감염 293 세포 등에 대해, 바이러스 항체 존재하의 난소암 세포 HEY에 대한 증식 억제 효과를 IC50에서의 항아데노 바이러스 항체의 항체값으로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <42> 도 4는 293 세포, A549 세포, SW626 세포, HT-3 세포의 각 캐리어 세포에 대해, 바이러스 항체 존재하의 난소암 세포 HEY에 대한 증식 억제 효과를 세포수로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <43> 도 5는 누드마우스의 피하에 사람 난소암 세포 RMG-1을 이식하여 형성된 10 내지 15mm의 거대 종양 모델을 이용하여, 온콜리틱 아데노 바이러스 감염 캐리어 세포의 in vivo 항종양 효과를 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <44> 도 6은 누드마우스의 피하에 사람 난소암 세포 PA-1을 이식하여 형성된 10 내지 15mm의 거대 종양 모델을 이용하여, 온콜리틱 아데노 바이러스 감염 캐리어 세포의 in vivo 항종양 효과를 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <45> 도 7은 면역 기능이 정상적인 피하 종양 모델 마우스((C57BL/6×C3/He)F1 마우스)를 이용하여 본 발명의 암 유전자 치료약의 in vivo 항종양 효과를 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <46> 도 8은 아데노 바이러스 투여에 의한 A549 세포의 세포 융합을 현미경에 의해 관찰한 도면이다.
- <47> 도 9는 컨트롤로서, 아데노 바이러스를 투여하지 않은 A549 세포를 현미경에 의해 관찰한 도면이다.
- <48> 도 10은, (a)는 1~21의 사람 수술 표본에서의 미드카인(MK) mRNA의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과, (b)는 마찬가지로의 방법에 의해 악성 신경교종(glioma)의 4개의 세포주에서의 미드카인 mRNA의 발현을 RT-PCR로 검토한 결과, (c)는 상기 각 세포주에서의 미드카인의 발현을 웨스턴 블롯 해석에 의해 검토한 결과이다.
- <49> 도 11은 길이가 상이한 2개의 미드카인 프로모터를 이용하여 상기 각 세포주에서의 프로모터 활성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <50> 도 12는, (a)는 이번에 설계한, 미드카인 프로모터를 갖는 온콜리틱 아데노 바이러스의 구조를 모식적으로 나타내는 도면이고, (b)는 3종류의 아데노 바이러스를 상기 각 세포주에 감염시켜 각각의 세포주에서의 E1A 단백질의 발현을 웨스턴 블롯 해석에 의해 검토한 결과이다.
- <51> 도 13은, (a)는 3종류의 아데노 바이러스에 의한 암 세포 증식 억제 효과를 비교 검토한 결과이고, (b)는 아데노 바이러스의 E3 영역의 증식 억제 효과에 미치는 영향을 검토한 결과이고, (c)는 직경 5mm의 누드마우스 피하 이식 모델에서의 아데노 바이러스의 항종양 효과를 검토한 결과이다.
- <52> 도 14는 미드카인 프로모터를 갖는 온콜리틱 바이러스를 캐리어 세포에 감염시켜, 당해 바이러스 감염 캐리어 세포의 직경 10 내지 15mm의 거대 종양에 대한 항종양 효과를 바이러스 단독 투여의 경우와 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <53> 도 15는 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 난소암 세포 PA-1에 대한 증식 억제 효과에 대한 Fe의 영향을 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <54> 도 16은 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 난소암 세포 PA-1에 대한 증식 억제 효과에 대한 ALA의 영향을 검토한

결과를 나타내는 그래프이다.

- <55> 도 17은 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B의 난소암 세포 PA-1에 대한 증식 억제 효과에 대한 Fe 및 ALA 양쪽 존재의 영향을 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <56> 도 18은, (a)는 면역 기능이 정상적인 피하 종양 모델 마우스((C57BL/6×C3/He)F1 마우스)를 이용하여, 본 발명의 암 유전자 치료약(면역 처치용 바이러스를 UV 처리하지 않은 경우)의 in vivo 항종양 효과를 검토한 결과이고, (b)는 이 실험에 제공된 각 마우스의 생존율을 장기간 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다.
- <57> 도 19는 면역 처치용 바이러스 투여로부터 캐리어 세포 투여까지의 투여 간격에 대해 검토를 행한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다.
- <58> 도 20은 UV로 불활성화 처리한 아데노 바이러스 UV-Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스로 사용함으로써, 상기 투여 간격을 짧게 할 수 있는지 검토한 결과를 나타내는 그래프(서바이벌·커브)이다.
- <59> 도 21은 상기 UV-Ad-β-gal을 면역 처치용 바이러스에 사용했을 경우의 당해 바이러스의 투여량에 대해 검토한 결과를 나타내는 그래프(종양 성장 커브)이다.
- <60> 도 22는 종양 면역의 효과를 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다. 도면 중, 컨트롤의 「SCC7」, 「OVHM」은 종양 면역을 행하지 않고, 편평 상피 암 세포 SCC7 또는 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 피하 이식하고 AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 투여한 마우스의 결과이다. 「OVHM-RT+Ad-β-gal→SCC7, OVHM」은, 방사선 조사한 OVHM에 의한 종양 면역 및 Ad-β-gal에 의한 아데노 바이러스에 대한 CTL을 유도한 후에, SCC7 혹은 OVHM의 피하 종양을 작성하여 AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 투여한 마우스의 결과이다.
- <61> 도 23은 비소세포성(非小細胞性) 폐암 세포 A549 세포에 의한 종양 면역의 효과를 검토한 결과를 나타내는 그래프(서바이벌·커브)이다. 각 군의 마우스의 수는 n=10이다. 도면 중, 컨트롤의 「OVHM」은 종양 면역을 행하지 않고, 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 피하 이식하고 AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 투여한 마우스의 결과이다. 도면 중 「AdE3-1A1.3B-infected A549→OVHM」은, AdE3-1A1.3B를 감염시켜 방사선 조사한 A549 세포를 10^6 개 피하에 면역하고, 난소암 세포 OVHM을 1×10^6 개 피하 이식하여 AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 투여한 마우스의 결과이다.
- <62> 도 24는 캐리어 세포와 함께 아테로 콜라겐을 투여했을 경우에, 부작용에 의한 사망률이 개선되는지의 여부를 조사한 결과를 나타내는 그래프이다. 도면 중, 팔호안의 N은 마우스의 수를 나타낸다.
- <63> 도 25는 UV로 불활성화 처리하지 않은 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1 내지 3회 투여하여, 항아데노 바이러스 항체 존재하에서의 항종양 효과에 대해 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 캐리어 세포에는 A549 세포와 293 세포를 혼합한 것을 사용하였다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다.
- <64> 도 26은 UV로 불활성화 처리하지 않은 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1 내지 3회 투여하여, 항아데노 바이러스 항체 존재하에서의 항종양 효과에 대해 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 캐리어 세포에는 A549 세포만 사용하였다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다.
- <65> 도 27은 아데노 바이러스 AdE3-1A1.3B 뿐만 아니라 GM-CSF 발현 벡터를 감염시킨 캐리어 세포(A549 세포)를 투여하고, 이 캐리어 세포와 함께 아테로 콜라겐을 투여했을 경우의 in vivo 항종양 효과에 대해 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 도면 중, 「Ad-β-gal」 앞의 「×1」, 「×2」, 「×3」은 각각 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1회, 2회, 3회 투여한 것을 나타낸다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다.
- <66> 도 28은 캐리어 세포 투여시에, 철제(鐵劑)를 복강 내 투여했을 경우의 in vivo 항종양 효과에 대해 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 도면 중, 「Ad-β-gal」 앞의 「×1」, 「×2」, 「×3」은 각각 아데노 바이러스 Ad-β-gal을 1회, 2회, 3회 투여한 것을 나타낸다. 각 군의 마우스의 수는 n=5이다.
- <67> 도 29는 캐리어 세포 A549에 대해 행하는 방사선 처리에서 조사하는 선량에 대해, 누드마우스를 이용하여 검토

한 결과를 나타내는 그래프이다.

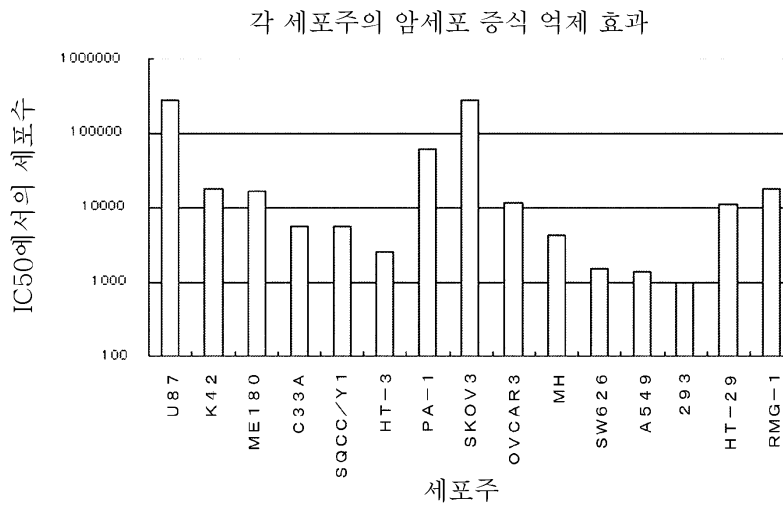
<68> 도 30은 (C57BL/6×C3/He)F1 마우스에 OVHM을 피하 이식한 실험에서, 캐리어 세포 A549를 상이한 선량으로 방사선 처리했을 경우의 항종양 효과에 대해 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.

<69> 도 31은 캐리어 세포 A549에 대한 온콜리틱 바이러스의 감염량에 대해 검토한 결과를 나타내는 그래프이다.

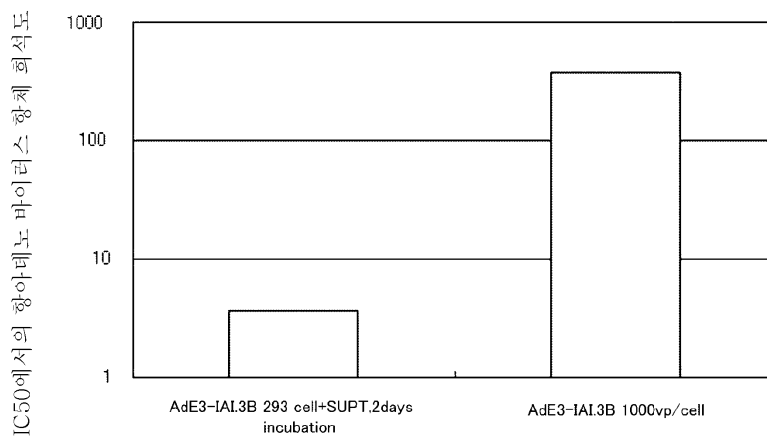
<70> 도 32는 난소암 세포 OVHM에 의한 종양 면역의 효과를 검토한 결과로서, (a)는 각 마우스의 종양 체적을 관찰한 결과, (b)는 각 군 마우스의 생존율을 관찰한 결과이다. 도면 중, 「A549」는 종양 면역 없이 AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 3회 투여한 마우스, 「OVHM-RT→A549」는 방사선 조사한 OVHM에 의한 종양 면역 후, AdE3-1A1.3B 감염 캐리어 세포 A549를 3회 투여한 마우스, 각 군의 마우스의 수는 n=5이다.

도면

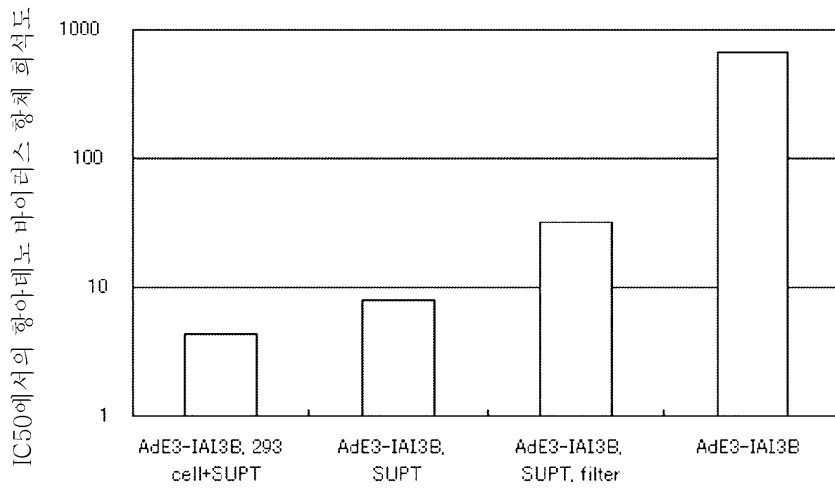
도면1



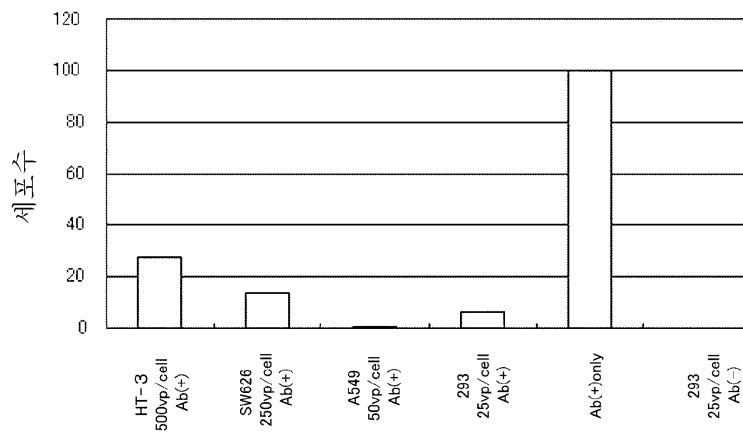
도면2



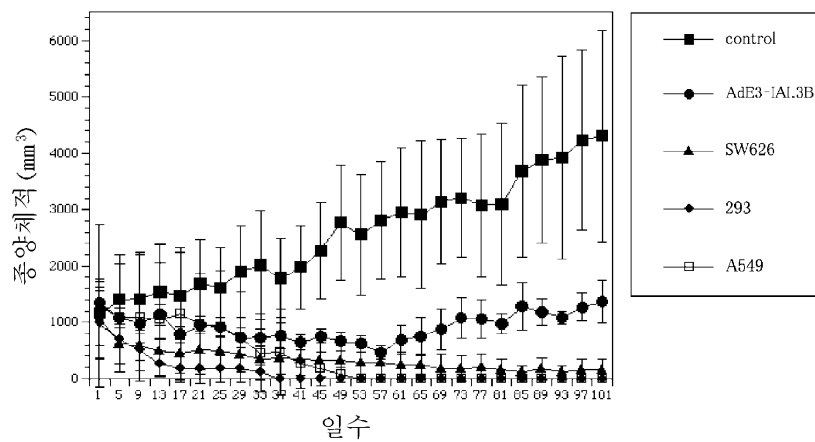
도면3



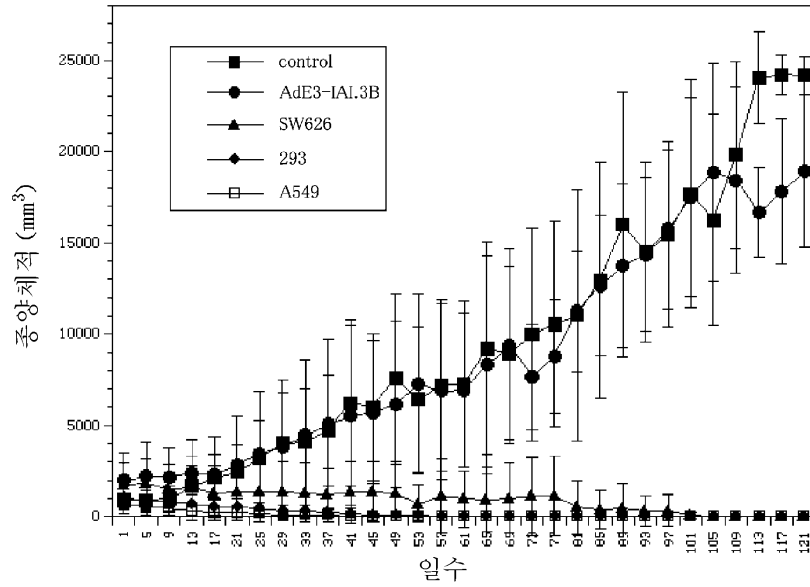
도면4



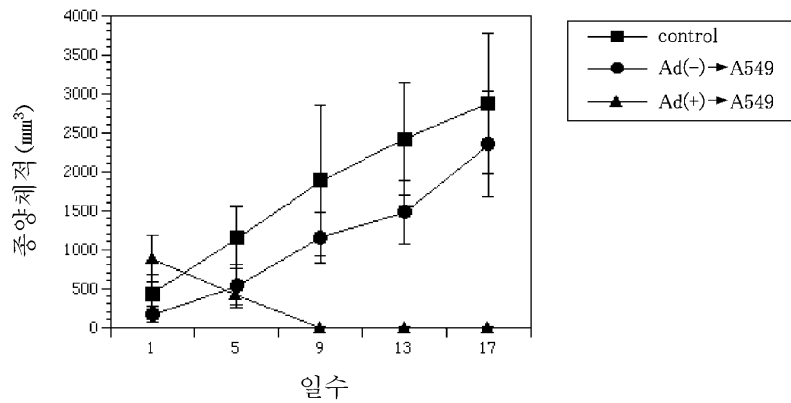
도면5



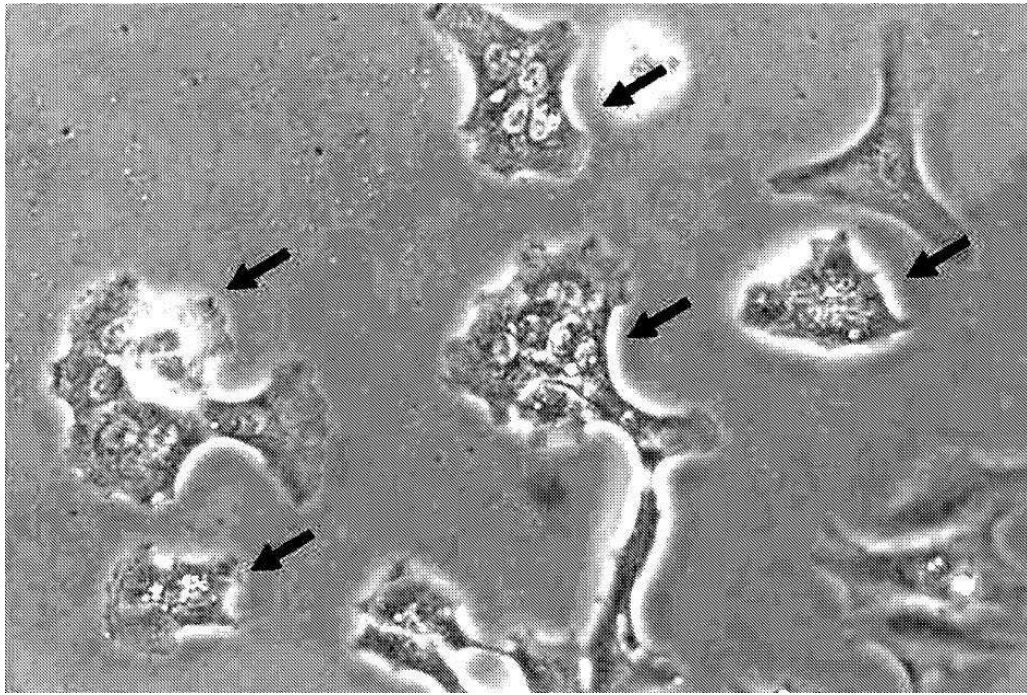
도면6



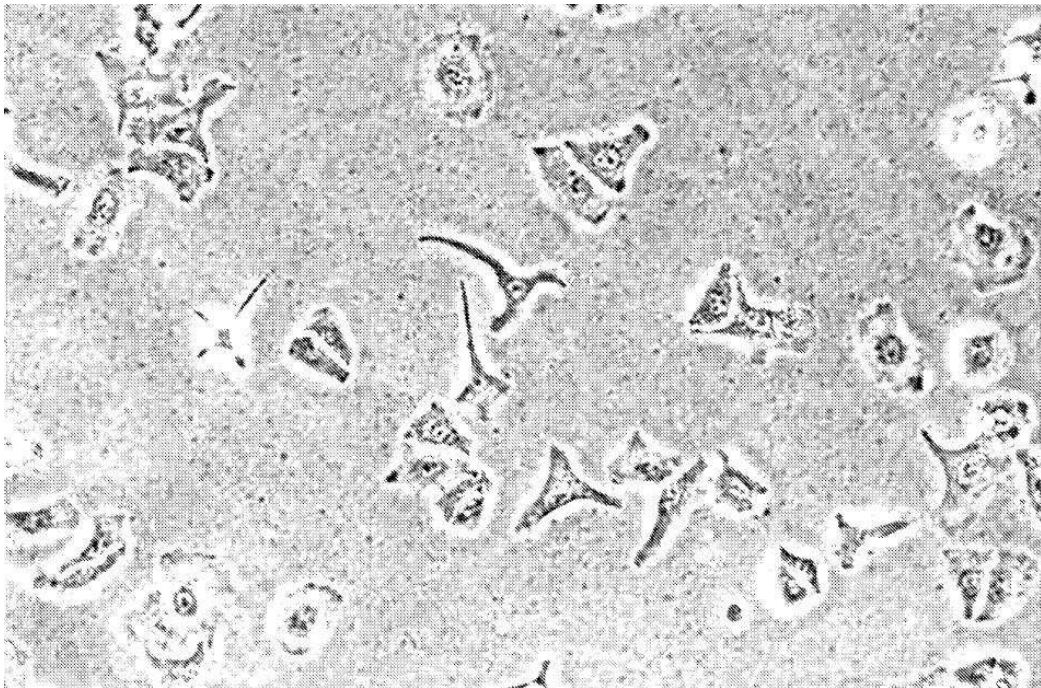
도면7



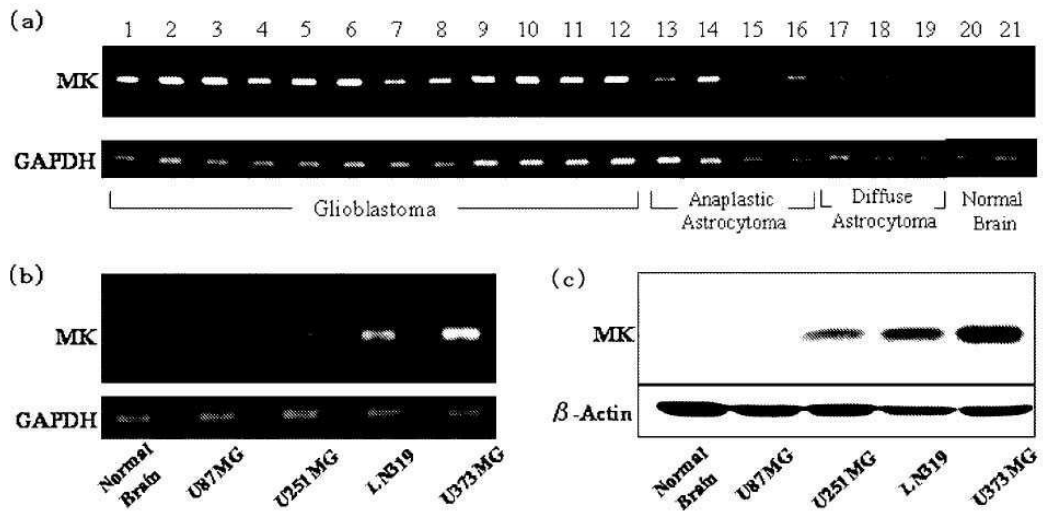
도면8



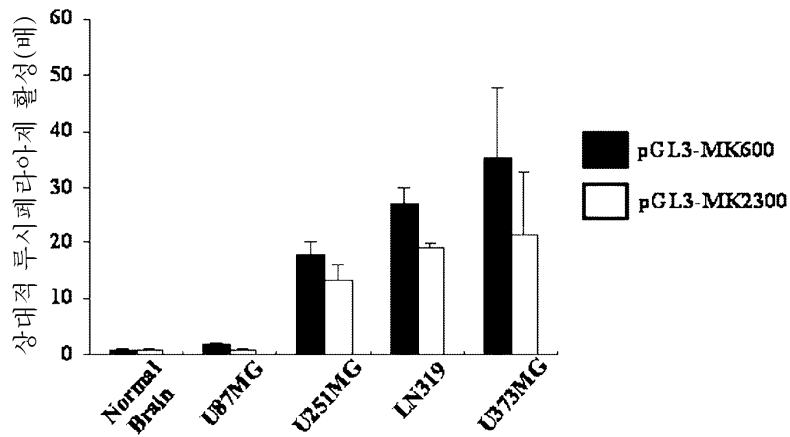
도면9



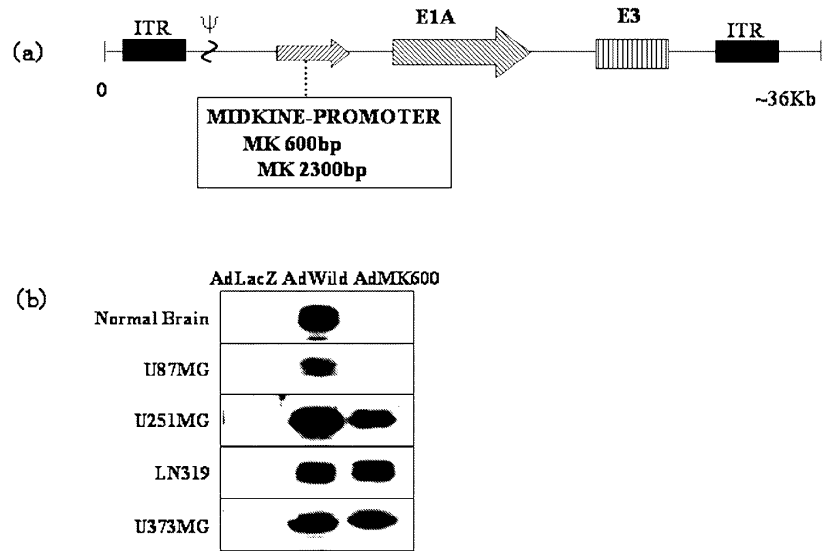
도면10



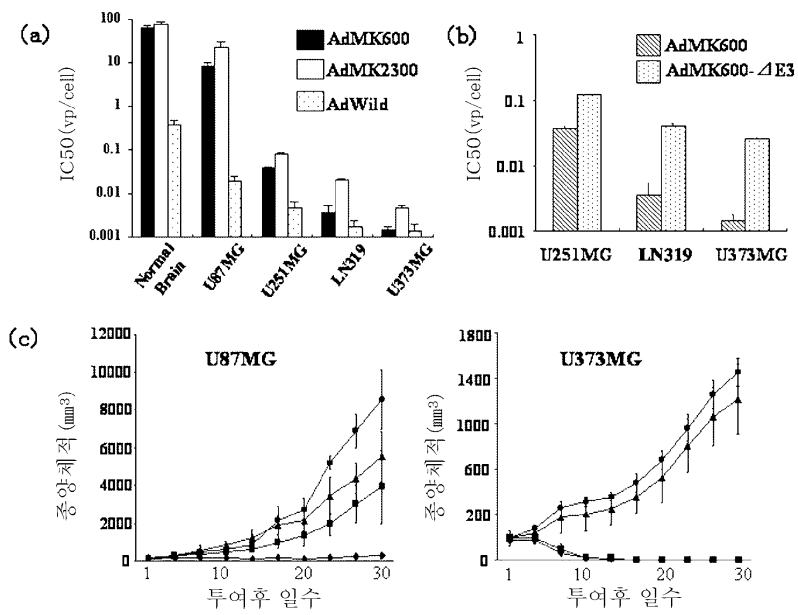
도면11



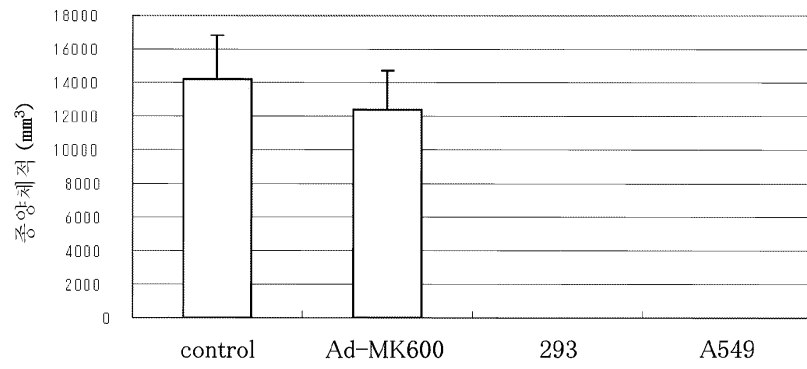
도면12



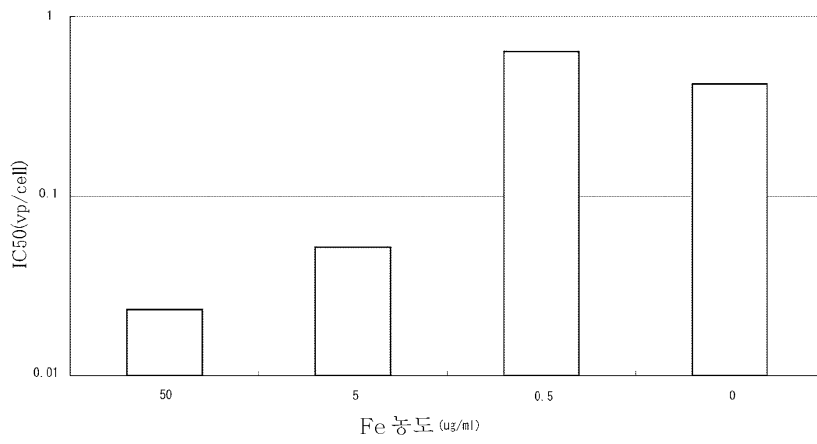
도면13



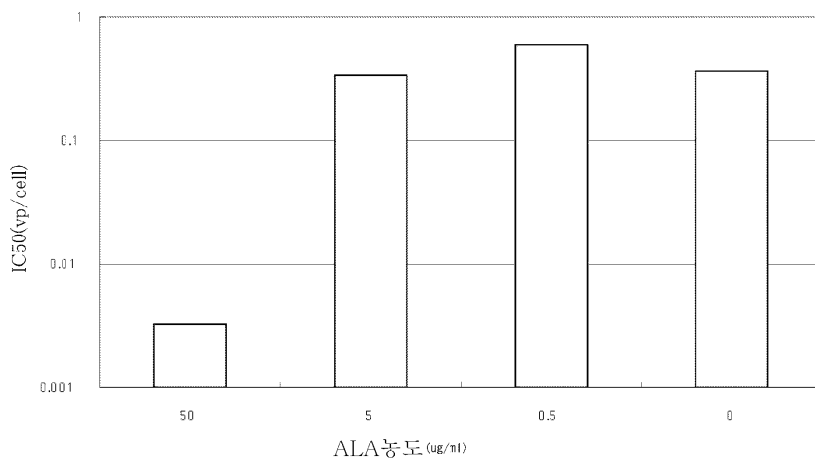
도면14



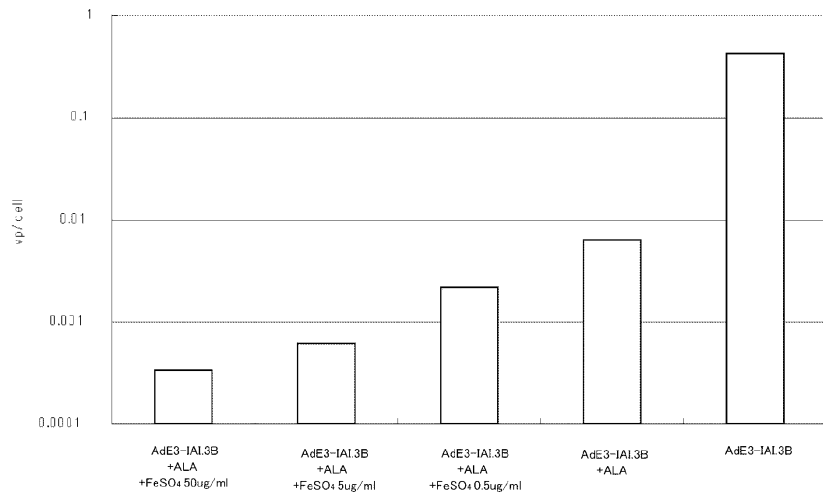
도면15



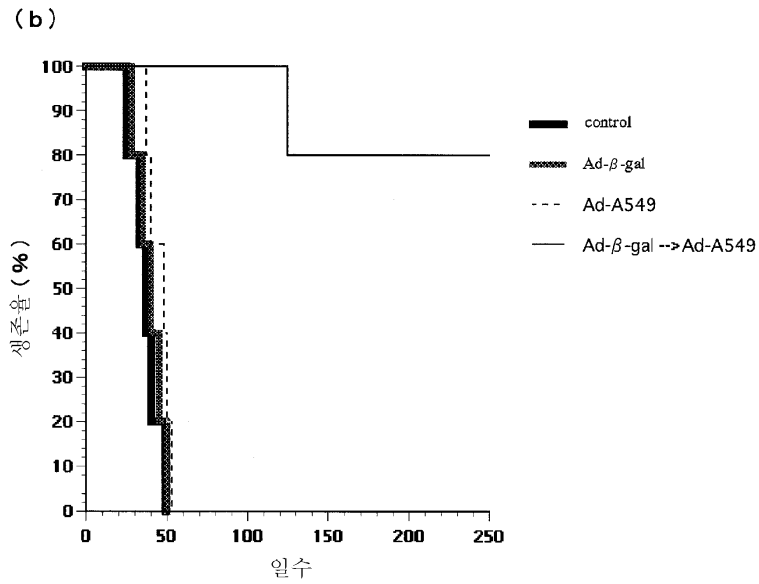
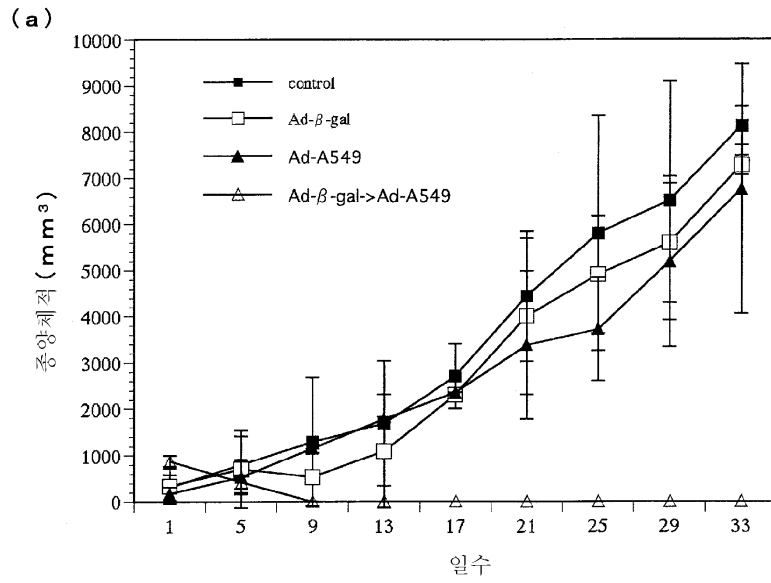
도면16



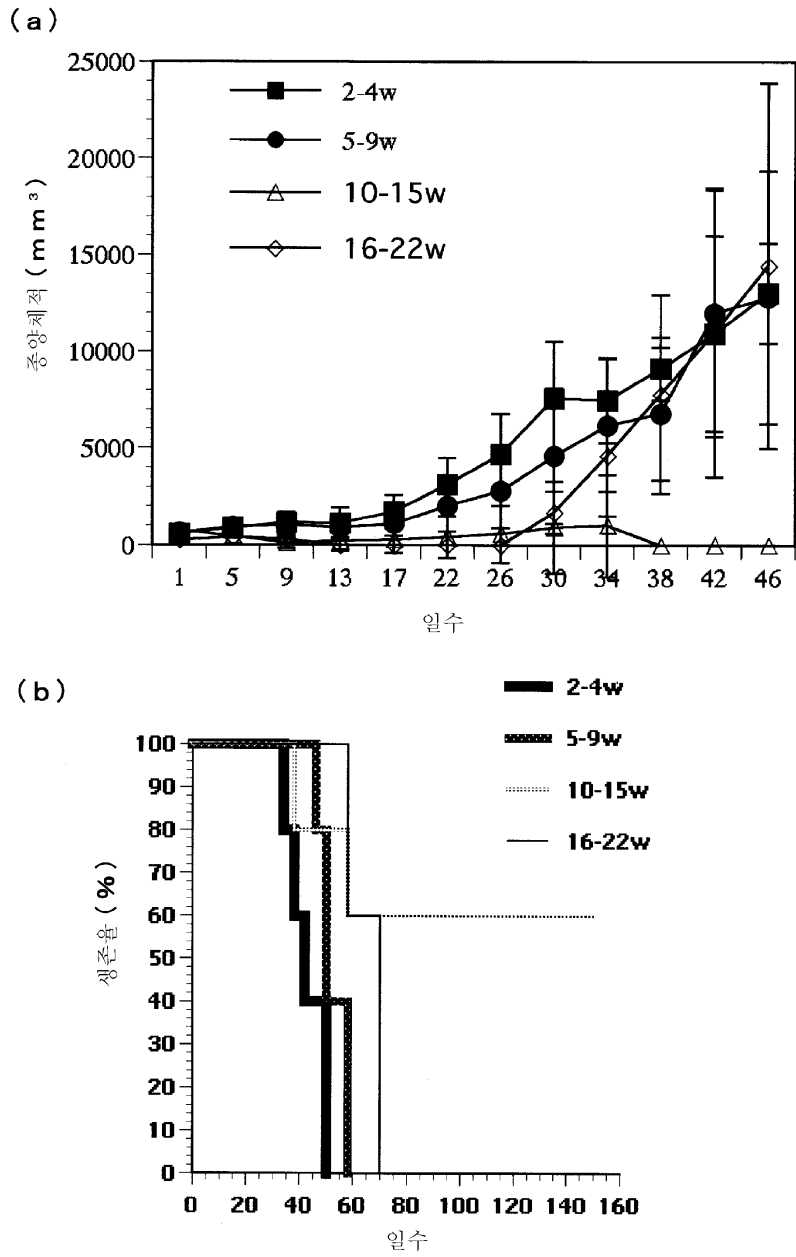
도면17



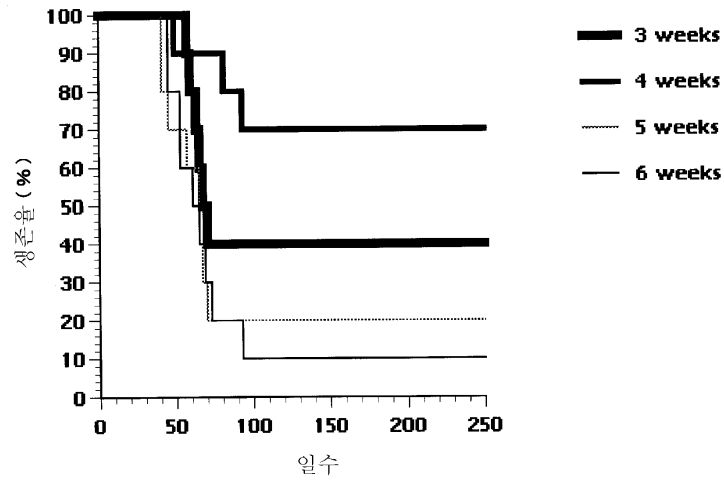
도면18



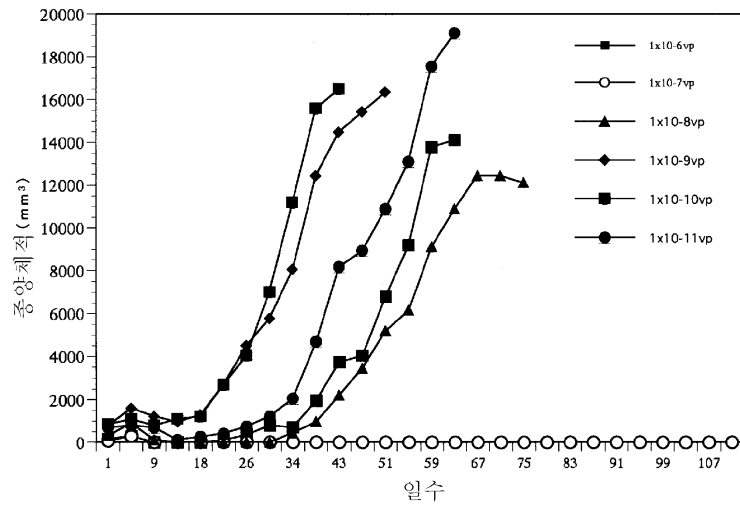
도면19



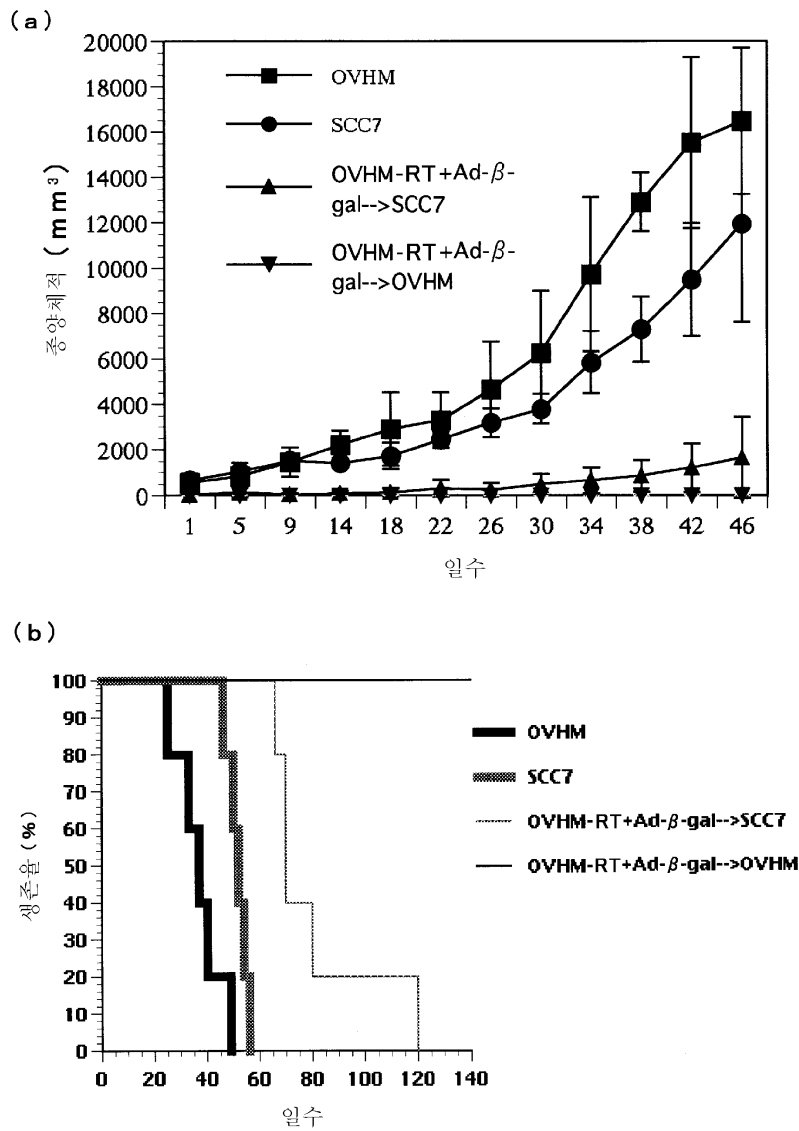
도면20



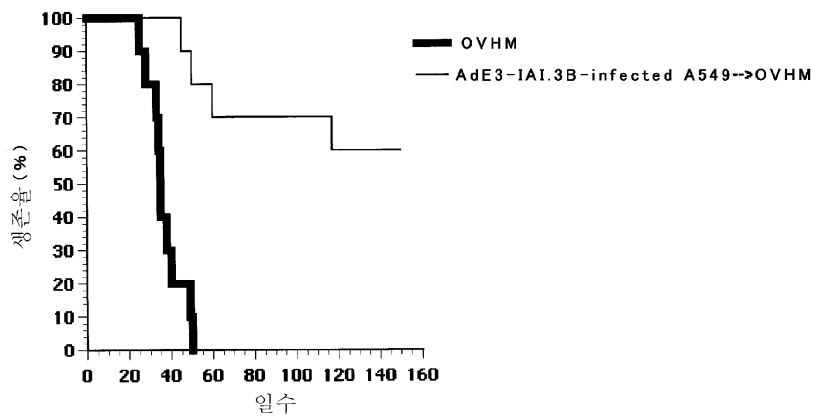
도면21



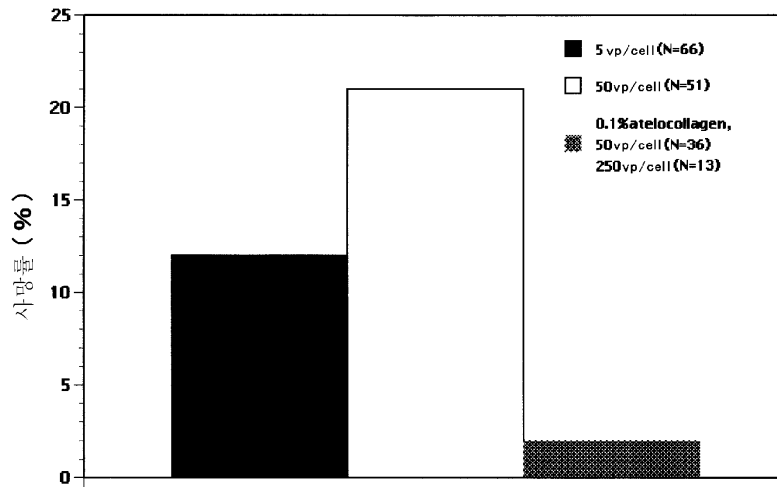
도면22



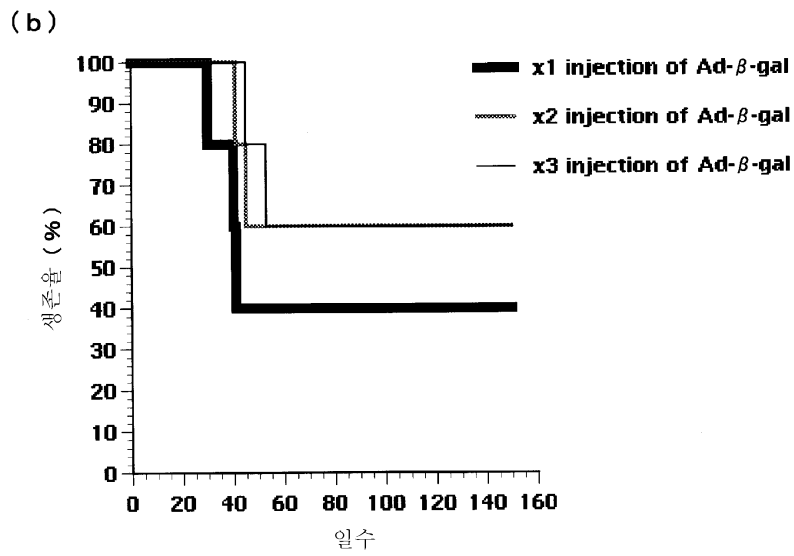
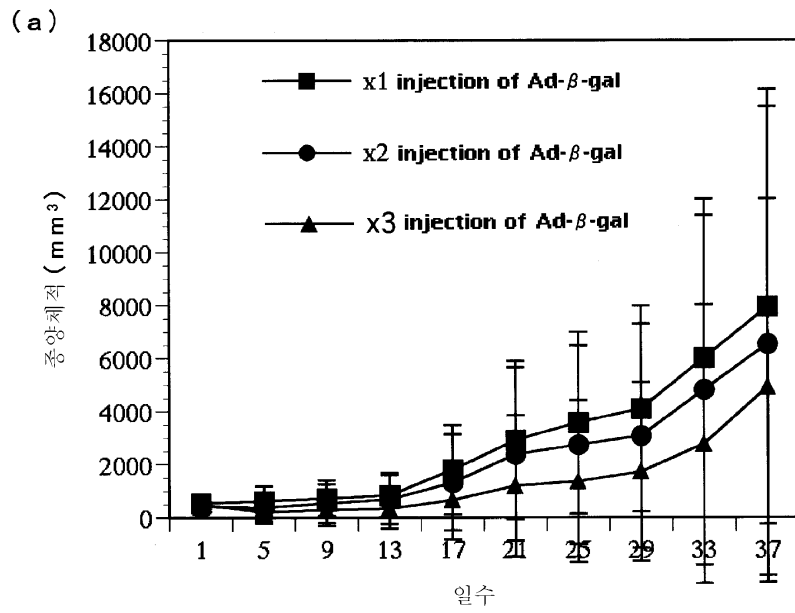
도면23



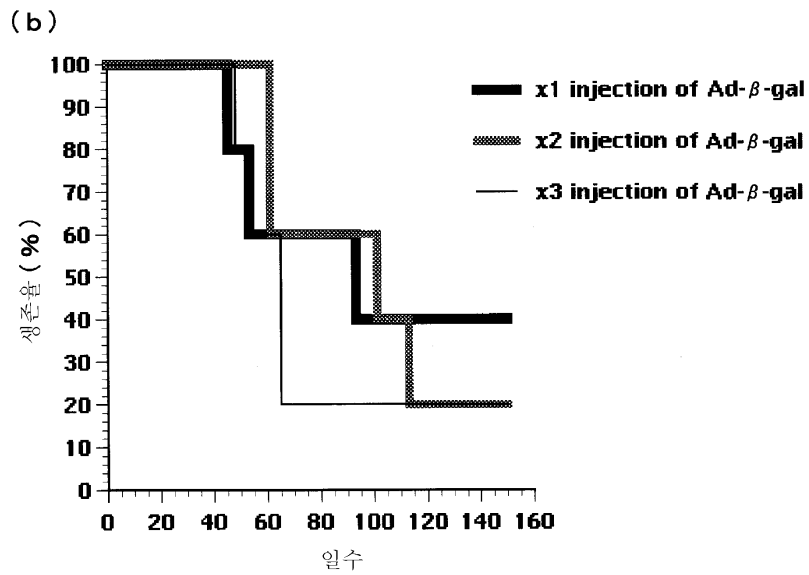
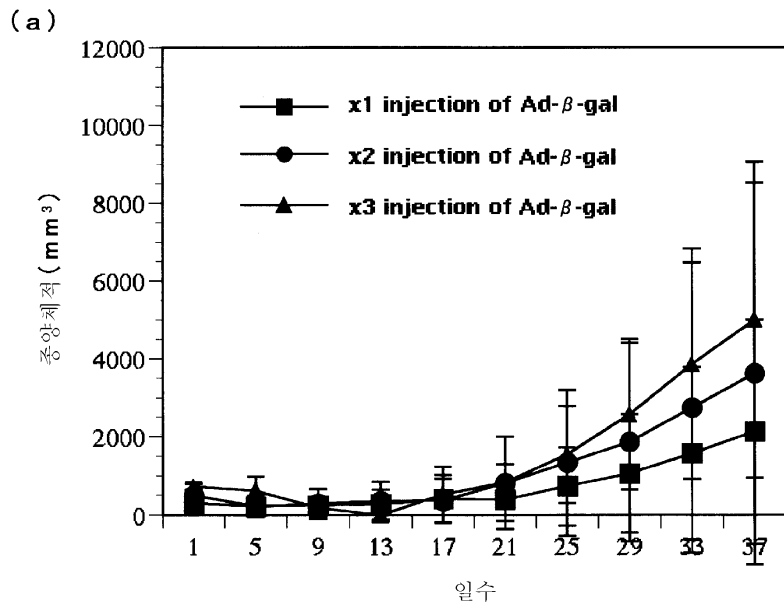
도면24



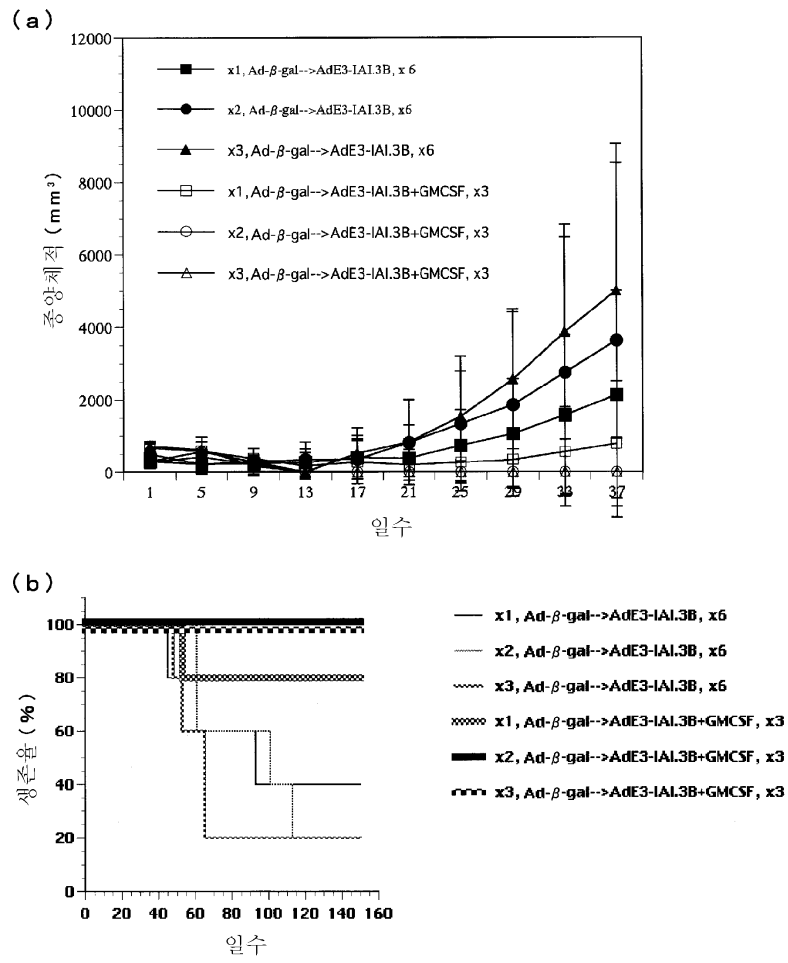
도면25



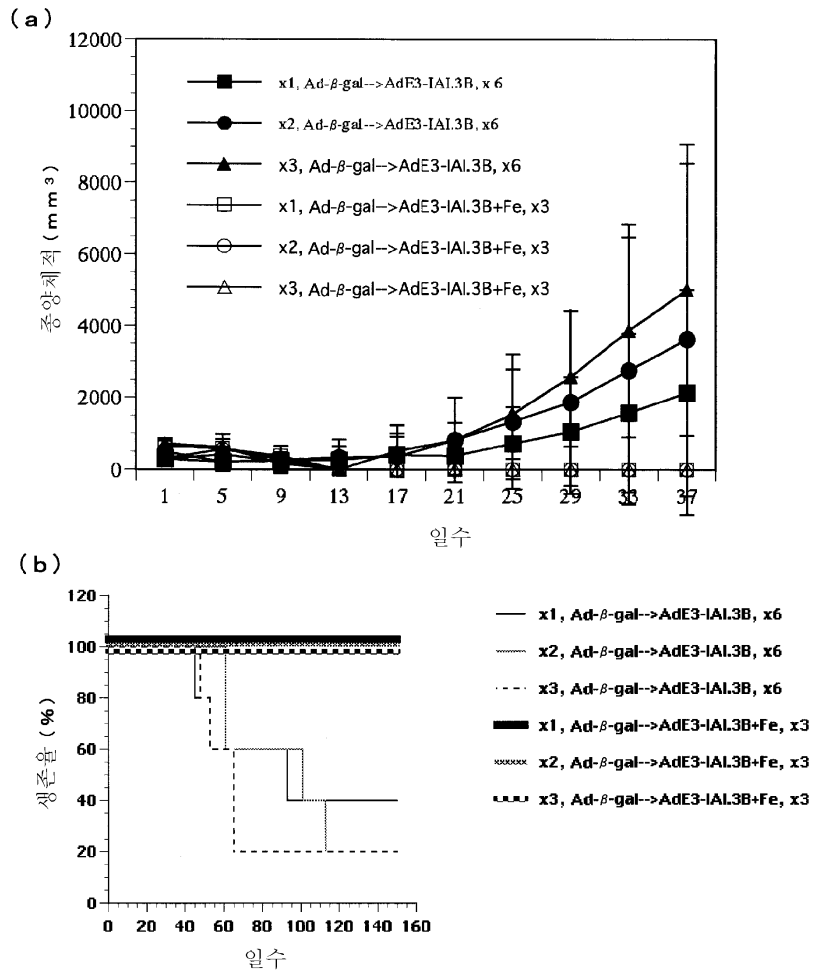
도면26



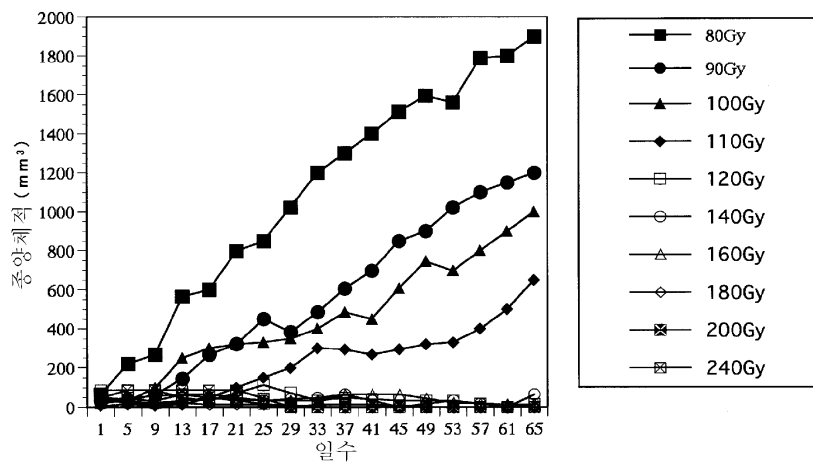
도면27



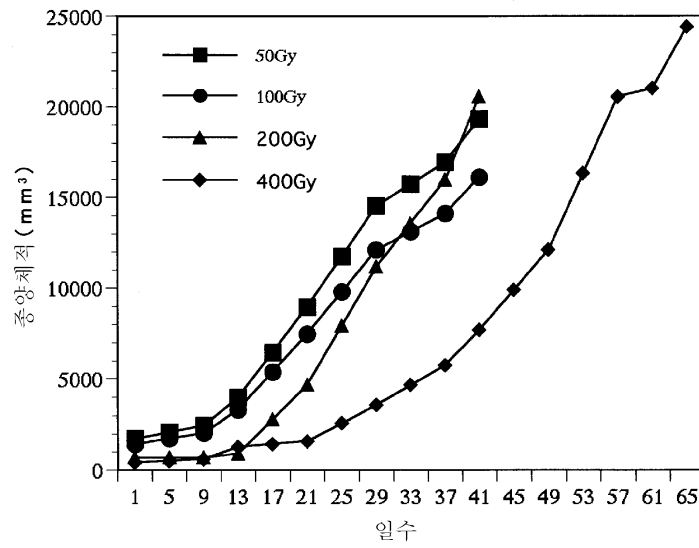
도면28



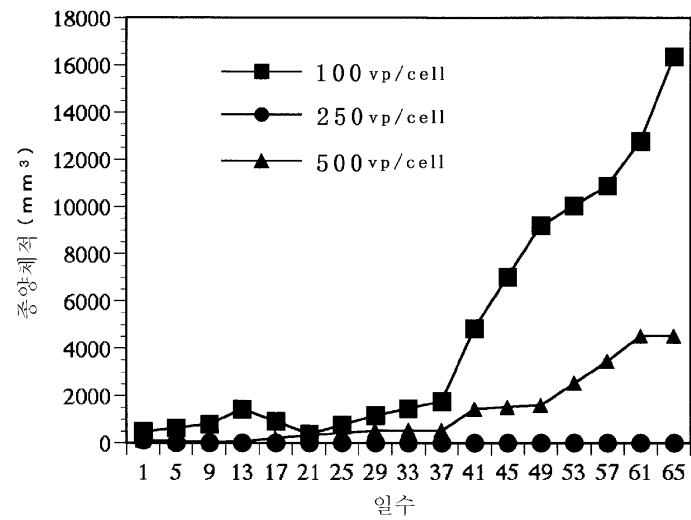
도면29



도면30



도면31



도면32

