



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123764
(43) 공개일자 2024년08월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2015.01) A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0018241
- (22) 출원일자 2024년02월06일
심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장
1020230015764 2023년02월06일 대한민국(KR)
1020230025194 2023년02월24일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
주식회사 지아이바이옴
경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동 1567호(상대원동, 성남에스케이브이1타워)
- 주식회사 지아이셀
경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 비동 1553호(상대원동, 성남에스케이브이1타워)
- (72) 발명자
장명호
서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호
- 양보기
서울특별시 송파구 위례광장로 230, 201동 1502호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인더웨이브

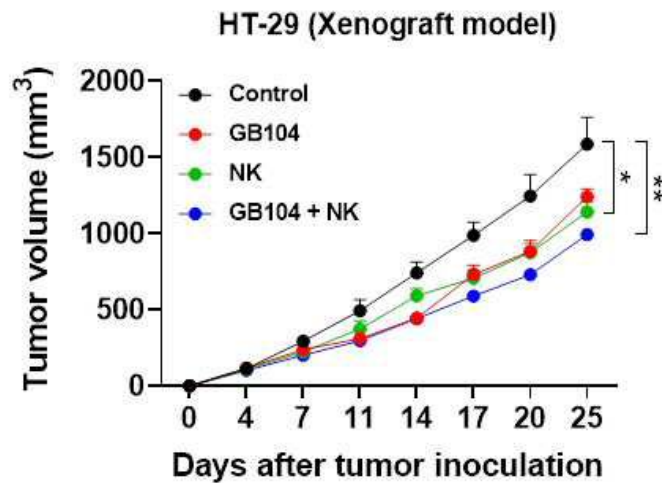
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 플란타룸 균주 및 면역세포의 병용 요법을 이용한 암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

락토바실러스 플란타룸 균주 및 면역세포를 병용 투여하는 암 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 락토바실러스 플란타룸 균주, 또는 상기 균주의 배양액은 암세포의 증식을 억제하거나 암세포의 사멸을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 자연살해세포와 병용 투여할 경우, 암세포 및 종양의 증식 억제에 대해 시너지 효과가 나타나 약학적 조성물 또는 건강기능식품의 형태로 암 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A61K 35/17 (2023.05)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

A23V 2250/206 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김아람

경기도 남양주시 송산로307번길 22, 5207동 301호

홍천표

경기도 성남시 수정구 위례순환로 220

고동우

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 6동 1406호

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는

상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1 활성물질은 면역세포의 활성을 유도하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC14107BP로 기탁된 균주인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 균주는 자연적으로 일어난 락토바실러스 플란타룸 균주의 돌연변이를 포함하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 면역세포는 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 존재 하에서 배양된 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 면역세포는 자연살해세포(Natural killer cell, NK cells)인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 제1 활성물질 및 제2 활성물질은 동시, 순차적 또는 역순으로 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제1 활성물질은 경구 투여되고, 제2 활성물질은 비경구 투여(parenteral administration)되는 것인 암 예방 또는 개선용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제1 활성물질은 경구 투여되고, 제2 활성물질은 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 담도암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 침샘암, 흑색종, 방광암, 신장암, 혈액암, 식도암, 두경부암, 피부암, 소장암, 항문암, 결장암, 직장암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 대장암은 상행결장, 횡행결장, 하행결장, S자 결장 및 직장 점막으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나의 부위에서 발생하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하고, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 면역세포와 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC14107BP로 기탁된 균주인 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 면역세포는 자연살해세포(Natural killer cell, NK cells)인 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물 및 면역세포는 경구 투여, 정맥투여 복강 투여 또는 피하 투여되는 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 16

청구항 12에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 경구 투여되고, 면역세포는 비경구 투여(parenteral administration)되는 것인 암 예방 또는 개선용 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 12에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 경구 투여되고, 면역세포는 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 담도암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 침샘암, 흑색종, 방광암, 신장암, 혈액암, 식도암, 두경부암, 피부암, 소장암, 항문암, 결장암, 직장암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 락토바실러스 플란타룸 균주 및 면역세포를 포함하는 병용 요법을 이용한 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종래의 암 치료는 환자의 신생물 세포를 제거하기 위한 화학요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 방사선 치료의 조

합을 수반한다. 암 화학요법은 바람직하게는 제제가 환자의 정상 세포를 죽이는 것보다 빠르게 복제중인 세포를 죽이는 약물의 사용에 기반한다. 중앙 종괴를 제거하기 위해 수술이 이용되지만, 일단 암이 전이되고 나면 영향력이 거의 없다. 방사선은 오직 국재화된 영역에서만 효율적이다. 이러한 모든 접근법은 상당한 단점과 감염에 대한 감수성 증가와 같은 부가적인 위험성을 드러낸다.

[0003] 이러한 문제점을 개선하기 위하여, 최근 질병에 대한 치료의 유효성을 증진시키는 병용요법이 대두되고 있다. 병용요법은 2 개 또는 그 이상의 약물 또는 방법을 동시에 또는 비교적 빨리 연속적으로 사용하는 것이다. 병용요법에서 사용된 2 개 또는 그 이상의 치료방법의 부작용은 상가적이거나, 상가적인 것보다 작을 수 있는 반면에 치료학적 효과는 상가적이거나, 상가적인 것보다 더 클 수 있다. 병용 투여시 각 성분이 병용 투여될 때 발생하는 효과는 단일 성분으로서 단독으로 투여될 때 발생하는 효과의 합보다 더 큰 상승작용을 기대할 수 있다. 따라서, 단일 성분을 이용한 치료의 효과를 상승적(synergistic)으로 증가시킬 수 있는 항암 병용 요법의 개발의 필요한 실정이다.

[0004] 자연살해세포는 세포 표면에 여러 수용체를 발현하는데 이들 수용체는 세포 흡착, 세포 살해능력의 활성화, 또는 세포 살해능력의 억제에 관여한다. 하지만, 정상인의 체내에 존재하는 대부분의 자연살해세포는 비활성화 상태로 존재한다. 따라서, 암을 제거하기 위해서는 활성화된 자연살해세포가 필요하다. 또한, 암환자의 체내에 존재하는 자연살해세포의 경우, 암세포의 면역회피 기전에 의해 자연살해세포의 기능적 결함이 존재한다. 따라서, 자연살해세포를 치료제로서 이용하기 위해서는 자연살해세포를 활성화시키는 것이 매우 중요하다.

[0005] 이에, 본 발명자는 락토바실러스 플란타룸 균주, 또는 상기 균주의 배양액 등과 자연살해세포를 병용투여하여 자연살해세포의 활성을 유도하고, 암세포 및 종양의 증식 억제 시너지 효과가 나타나는 항암 병용 요법을 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하고, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 자연살해세포와 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 자연살해세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 자연살해세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용투여 되는 암 예방 또는 개선용 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질을 그를 필요한 개체에 투여하는 단계; 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 그를 필요한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 암의 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus*

plantarum) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용 투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 일 양상은 항암활성, 예를 들면 대장암에 대한 항암 활성을 갖는 락토바실러스 속 균주, 구체적으로 락토바실러스 플란타룸 GB104 균주를 제공한다.
- [0013] 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 자연계에 널리 분포하는 호기성 또는 통성 혐기성의 그람 양성 간균 속 미생물이다. 락토바실러스 속에 속하는 미생물에는 락토바실러스 플란타룸, 사케이 등이 있다. 본 발명자들은 항암 효과가 우수한 새로운 균주를 개발하기 위해 연구한 결과, 항암 후보 균주로서 *Lactobacillus plantarum* GB104를 선별하였다. 상기 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2020년 1월 14일자로 기탁번호 KCTC14107BP로 기탁되었다. 상기 균주는 프로바이오틱 균주에 해당하며, 인체에 무해하며, 부작용 없이 사용될 수 있다.
- [0014] 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 리모시락토바실러스(*Limosilactobacillus*) 또는 락티플랜티바실러스(*Lactiplantibacillus*)로 명칭이 변경되었으며, 본 명세서에서 변경된 균주명을 상호 호환적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락티플랜티바실러스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*)으로 균주명이 변경되었다.
- [0015] 본 명세서에서 용어, "*Lactobacillus plantarum* GB104"는 *L. Plantarum* GB104 균주 또는 락토바실러스 플란타룸 GB104 균주(기탁번호: KCTC14107BP)로 병용 기재될 수 있다.
- [0016] 일 구체예에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC14107BP로 기탁된 균주일 수 있다.
- [0017] 일 구체예에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 16S rRNA유전자를 포함하는 균주일 수 있다.
- [0018] 일 구체예에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 16S rRNA 또는 이와 뉴클레오타이드 서열 동일성이 97%이상인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 16s rRNA를 가지는 균주일 수 있다. 구체적으로, 본 명세서의 서열번호 1로 이루어진 뉴클레오타이드 서열과 적어도 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9% 또는 100%의 상동성을 가진다.
- [0019] 일 구체예에 있어서, 상기 균주는 생균, 사균 또는 균주를 파쇄하여 얻은 세포질 분획물(cytoplasmic fraction)일 수 있으며, 바람직하게는 생균일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, '프로바이오틱스(probiotics)'는 사람을 포함한 동물의 위장관 내에서 숙주의 장내 미생물 환경을 개선하여 숙주의 장내 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물이라는 의미로 이해된다. 프로바이오틱스는 프로바이오틱 활성을 갖는 살아있는 미생물로 단일 또는 복합균주 형태로 사람이나 동물에 건조된 세포 형태나 발효산물 형태로 급여될 경우, 숙주의 장내 균총에 유익한 영향을 미칠 수 있다.
- [0021] 일 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제1 활성물질 또는 제2 활성물질은 각각 제2 활성물질 또는 제1 활성물질과 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "배양물"은 "배양 상층액", "배양물 상등액", "조건 배양액" 또는 "조정 배지"와 호환적으로 사용될 수 있고, 락토바실러스 속 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는 상기 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 전체 배지를 의미할 수 있다. 상기 배양물은 프로바이오틱스 균주를 공지의 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하며, 상기 산물은 균주 자체가 포함되거나 포함되지 않을 수 있다. 상기 배지는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 MRS 액체 배지, GAM 액체 배지, MRS 한천 배지, GAM 한천 배지, BL 한천 배지 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 "파쇄물(lysate)"는 "용해물"과 호환적으로 사용될 수 있고, 이는 깨진 락토바실러스 플란타룸과 같은 미생물의 세포의 수성 배지의 용액 또는 현탁액을 의미한다. 세포 용해물은, 예를 들어 DNA, RNA,

단백질, 펩타이드, 탄수화물, 지질 등과 같은 거대 분자 및/또는 아미노산, 당, 지방산 등과 같은 미소분자, 또는 그의 분획을 포함한다. 또한, 상기 용해물은 매끈하거나 과립 구조일 수 있는 세포 잔해를 포함한다.

- [0024] 상기 배양액은 균주를 배양하여 수득된 배양액 자체, 그의 농축물, 또는 동결건조물 또는 배양액으로부터 균주를 제거하여 수득된 배양 상등액, 그의 농축물 또는 동결건조물을 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 배양액은 락토바실러스 플란타룸을 적절한 배지(예를 들면, MRS 평판 배지)에서 10°C초과 또는 40°C미만 중 어느 온도에서 일정시간, 예를 들면 4 내지 50시간 동안 배양하여 수득된 것일 수 있다.
- [0026] 일 구체예에 있어서, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균체, 배양물 및 파쇄물 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제1 활성물질은 항암 활성을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항암 활성은 종양의 발생을 지연 또는 종양의 성장 속도를 저해하는 활성일 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 항암활성은 종양 성장 억제 활성, 암세포의 세포 사멸 유도 활성, 항종양 면역에 관여하는 자연살해세포의 활성화 정도 및 수의 증가 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에서, 상기 항암활성은 대장암 세포주를 이식한 종양동물모델에 상기 락토바실러스 플란타룸 GB104 균주를 투여하였을 때, 상기 균주를 투여하지 않은 대조군에 비해 NK 세포(구체적으로, IFN- γ + NK세포 또는 Granzyme B+ NK세포)의 수가 현저하게 증가하는 효과를 포함한다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균체, 배양물 및 파쇄물 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제1 활성물질은 자연살해세포의 활성을 유도하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 활성물질은 NK세포의 활성화도 및 수를 증가시키는 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0030] 본 명세서의 용어, "면역세포"는 생물의 면역계의 일부로서 감염 또는 기타 질병에 면역기능을 제공하는 세포를 의미한다. 상기 면역 세포는 예를 들어, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 자연살해세포, B 세포 및/또는 T 세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 자연살해세포(Natural killer cells, NK cells)인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 면역세포는 동물에서 자연적으로 유래한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 세포 엔지니어링, 유전자 엔지니어링 등을 통해 제조된 면역세포, 예를 들어, CAR T 세포, CAR NK 세포 등을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 명세서의 용어, "자연살해세포(Natural killer cells, NK cells)"는 선천성 면역을 구성하는 주요 세포로, 감염된 세포 또는 비정상 세포의 표면에 있는 주요 조직적합 유전자 복합체(MHC)를 감지하고 사이토카인 방출을 유발하여 세포의 용해 또는 자연사멸을 유도한다. 상기 자연살해세포는 림프구의 일종으로 체내 골수, 비장, 말초 림프절 및 말초 혈액에 분포하며, 말초혈 림프구(peripheral blood lymphocyte)의 약 10% 정도를 차지하며, 선천성 면역반응에 중요한 역할을 한다(Ann Rev Immunol., 24: 257-286, 2006). 또한, 자연살해세포는 CD56 및 CD16이 양성이나, CD3에는 음성을 나타낸다. 자연살해세포가 세포를 살해하는 방법은 퍼포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme)을 포함하는 세포질과립의 배출을 통해 이루어진다. 자연살해세포는 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF 및 IL-10 등 다양한 사이토카인을 분비한다. 또한, 자연살해세포는 세포 표면에 여러 수용체를 발현하는데 이들 수용체는 세포 흡착, 세포 살해능력의 활성화, 또는 세포 살해능력의 억제에 관여한다. 하지만, 정상인의 체내에 존재하는 대부분의 자연살해세포는 비활성화 상태로 존재한다. 따라서, 암을 제거하기 위해서는 활성화된 자연살해세포가 필요하다. 또한, 암환자의 체내에 존재하는 자연살해세포의 경우, 암세포의 면역회피 기전에 의해 자연살해세포의 기능적 결함이 존재한다. 따라서, 자연살해세포를 치료제로서 이용하기 위해서는 자연살해세포를 활성화시키는 것이 매우 중요하다.
- [0032] 일 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 존재 하에서 배양된 것일 수 있다.
- [0033] 본 명세서의 용어, "IL-2" 또는 "인터루킨-2"는 달리 언급되지 않는 한, 포유동물, 예를 들어, 영장류(예, 인간) 및 설치류(예, 마우스 및 래트)를 포함하여 임의의 척추동물 공급원으로부터 수득한 임의의 야생형 IL-2를 의미한다. 상기 IL-2는 동물 세포에서 수득된 것일 수도 있으나, IL-2를 생산할 수 있는 재조합 세포로부터 수득된 것도 포함한다. 또한, 상기 IL-2는 야생형 IL-2 또는 이의 변이체일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서는 IL-2 혹은 이의 변이체를 총칭하여 "IL-2 단백질" 혹은 "IL-2 폴리펩티드"의 용어로 표현하기도 한다. IL-2, IL-2 단백질, IL-2 폴리펩티드, 및 IL-2 변이체는 예를 들어 IL-2 수용체(receptor)에 특이적으로 결합한다. 이 특이적인 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 확인할 수 있다. 상기 IL-2의 일 구체예는

서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 이때, 상기 IL-2는 성숙된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 성숙된 IL-2는 신호서열을 포함하지 않는 것일 수 있으며, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 이때, 상기 IL-2는 야생형 IL-2의 N-말단 또는 C-말단의 일부가 결실된(truncated) 단편을 포함하는 개념으로 이용될 수 있다. 또한, 상기 IL-2의 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 N 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 또한 상기 IL-2의 단편은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 단백질의 C 말단으로부터 연속적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.

[0035] 본 명세서의 용어, "IL-2 변이체"는 전장(full-length) IL-2 또는 상술한 IL-2의 단편의 아미노산 일부가 치환된 형태를 의미한다. 즉, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 또는 이의 단편과 다른 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나, 상기 IL-2 변이체는 야생형 IL-2와 동등하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 여기에서, "IL-2활성"은 예를 들어 IL-2 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 의미할 수 있으며, 이 특이적 결합은 당업자에게 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다.

[0036] 본 명세서의 용어, "CD80"은 "B7-1"로도 불리며, 수지상세포, 활성화된 B세포 및 단핵구에 존재하는 막단백질이다. CD80은 T 세포의 활성화와 생존에 필수적인 공자극 신호를 제공한다. CD80은 T 세포 표면에 존재하는 서로 다른 두 단백질인 CD28 및 CTLA-4에 대한 리간드로 알려져 있다. CD80은 288개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 구체적으로 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 "CD80 단백질"은 전장 CD80 또는 CD80 단편을 의미한다.

[0037] 본 명세서에서 사용하는 용어, "CD80 단편"이란, CD80의 절단형을 의미한다. 또한, 상기 CD80 단편은 CD80의 세포외도메인일 수 있다. CD80 단편의 일 구체예로는 CD80의 신호서열인 N-말단으로부터 1번째 내지 34번째의 아미노산이 제외된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 5의 35번째 내지 288번째의 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 5의 35번째 내지 232번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 5의 35번째 내지 139번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다. 또한, 상기 CD80 단편의 일 구체예는 서열번호 5의 142번째 내지 242번째 아미노산으로 구성된 단백질일 수 있다.

[0038] 상기 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체는 링커 혹은 캐리어(carrier)에 의해 결합된 것일 수 있다. 본 명세서에서 링커와 캐리어는 호환적으로 사용되기도 한다.

[0039] 상기 "IL-2", "IL-2 변이체", "CD80 단백질", "CD80 단편" 또는 "IL-2와 CD80이 연결된 구조" 등은 대한민국 특허출원 제10-2020-0155367호에 기재된 것을 포함할 수 있다. 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0040] 일 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 존재하에서 배양된 것으로, 골수(bone marrow), 제대혈(cord blood) 또는 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로부터 분리된 면역세포에 비하여 CD16 및 NKp46의 발현이 증가된 것일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 존재하에서 배양된 것으로 골수(bone marrow), 제대혈(cord blood) 또는 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로부터 분리된 면역세포에 비하여 그랜자임 B, 퍼포린 및 인터페론- γ 의 발현이 증가된 것일 수 있다.

[0042] 일 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 자연살해세포(Natural killer cell, NK cells)인 것일 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 용어 "암"은 전형적으로 비정상적 또는 제어되지 않은 세포 성장의 특징을 가지는, 동물에서의 생리학적 상태를 의미한다. 암 및 암 병리는 예를 들어, 전이, 정상적으로 기능하는 주변 세포에 대한 간섭, 비정상 레벨에서 사이토카인 또는 다른 분비 산물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 증대, 종양 형성(neoplasia), 전암(premalignancy), 악성 종양(malignancy), 주위 또는 거리가 있는 조직 또는 기관, 예를 들어 림프절 침범(invansion) 등과 연관될 수 있다.

[0044] 상기 암은 자연살해세포능이 현저히 감소하여 세포면역기전이 억제되는 것으로 알려져 있고(kosin Medical

Journal Vol/18 No. 1 pp.36~42,2003), 특히 흑색종, 두경부암, 폐암, 난소암, 자궁암, 방광암, 전립선암, 간암, 췌장암, 식도암, 대장암 등에서는 자연살해세포의 활성이 감소된다는 보고가 있다(K.C.P.S. Vol. 14, No. 3 1998). 따라서 일 구체예에 따른 락토바실러스 플라타룸 균주를 이용하여 자연살해세포의 활성을 증가시키는 경우 암의 예방 또는 치료에 효과적일 수 있다.

- [0045] 상기 암은 위장관암(gastrointestinal cancer) 또는 비위장관암일 수 있다.
- [0046] 상기 위장관암은 식도, 위, 소장 또는 대장 등 위장관에 발생하는 악성 종양으로서, 상기 위장관암은 예를 들어 식도암, 담낭암, 간암, 담도암, 췌장암, 위암, 소장암, 대장암, 결장암, 항문암 및 직장암으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 일 예에서, 대장암일 수 있다.
- [0047] 상기 비위장관암은 위장관 또는 소화기관계 외의 기관에 발생하는 악성 종양을 제한 없이 포함하며, 예를 들어 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 신경모세포종, 망막모세포종, 폐암, 두경부암, 침샘암, 흑색종, 후두암, 전립선암, 유방암, 방광암, 신장암, 다발성골수종, 자궁경부암, 갑상선암, 난소암, 요도암, 피부암, 골육종, 교모세포종, 뇌종양 또는 림프종일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 일 구체예에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 담도암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 급성 골수성 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 침샘암, 흑색종, 방광암, 신장암, 혈액암, 식도암, 두경부암, 피부암, 소장암, 항문암, 결장암, 직장암 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 바람직하게는 간암, 대장암, 유방암, 신장암 및 폐암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 암은 대장암 또는 간암일 수 있다. 상기 대장암은 상행결장, 횡행결장, 하행결장, S자 결장 및 직장 점막으로부터 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 부위에 발생하는 악성종양을 포함한다. 상기 대장암은 선암, 림프종, 악성 유암종, 평활근육종, 카포시 육종 및 편평상피암으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 종류일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 간암은 간세포에서 기원한 간세포암종과 담관세포에서 기원한 담관세포 암종을 모두 포함한다. 예를 들어, 간세포암종, 담관상피암종, 간모세포종 및 혈관육종으로부터 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 종류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 구체예에 있어서, 상기 제1 활성물질은 락토바실러스 플라타룸 균주를 유효성분으로 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0049] 일 구체예에 있어서, 상기 제2 활성물질은 CD80 단백질 또는 이의 단편 및 IL-2 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 융합단백질의 존재하에서 배양된 자연살해세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0050] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 활성물질 및 제2 활성물질은 동시, 순차적 또는 역순으로 병용투여 되는 것일 수 있다. 예를 들어, 락토바실러스 플라타룸 균주와 자연살해세포는 독립적인 경로를 통해 투여되는 것을 특징으로 할 수 있다. 각각의 유효성분은 독립적으로 통상의 기술자에 의해 적합한 투여용법 및 용량으로 투여될 수 있다.
- [0051] 일 구체예에 있어서, 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질은 경구 투여, 정맥 투여 복강 투여 또는 피하 투여되는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 락토바실러스 플라타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 경구 투여되고, 면역세포는 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 활성물질은 경구 투여되고, 제2 활성물질은 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 면역세포는 약 1×10^1 cell 내지 약 1×10^{20} cell, 바람직하게는 약 1×10^2 cell 내지 약 1×10^{13} cell, 더욱 바람직하게는 약 1×10^4 cell 내지 약 1×10^{11} cell 로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 약 1×10^6 cell/head/200 μ l로 투여되었으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 일 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 본 발명의 조성물과 병용 투여되기 위해 별도의 제형으로 제조될 수 있다. 상기 면역세포는 이를 포함하는 주사제, 바람직하게는 정맥 투여 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 면역세포를 포함하는 별도의 조성물은 인간 또는 동물에 투여가능한 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 자연살해세포의 생존 또는 활성의 유지가 가능한 성

분을 추가로 분을 포함할 수 있다.

- [0055] 일 구체예에 있어서, 제1 활성물질을 포함하는 제1 경구제제, 및 제2 활성물질을 포함하는 제2 경구제제를 포함하고, 상기 제1, 및 2 경구제제는 경구 투여되는 것일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함"은 락토바실러스 속 균주, 상기 균주의 파쇄액, 배양액, 또는 이의 배양액의 추출물이 첨가되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 포물레이션(formulation)되는 것을 포함하는 의미이다.
- [0057] 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 용어 "병용 요법" 또는 "병용 투여" 또는 "병용하여(in combination)"는 적어도 2개의 별개의 치료제들을 사용한 임의 형태의 동시 또는 병행 치료를 지칭한다. 병용 요법의 성분들은 동시에, 순차적으로 또는 임의의 순서로 투여될 수 있다. 성분들은 상이한 복용량으로 또는 상이한 투여 빈도로 또는 상이한 경로를 통해 적절한 방식으로 투여될 수 있다.
- [0059] 구체적으로, 상기 병용 투여는 락토바실러스 플란타룸 균주 및 면역세포를 동시에 투여하거나, 락토바실러스 플란타룸 균주를 투여한 후 면역세포를 투여하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 병용 치료법은 예를 들어, 반응 정도, 반응 속도, 질병 진행까지의 기간 또는 생존 기간을 통해 측정된 효능이 병용 치료법의 성분 중 하나 또는 나머지를 통상적인 용량으로 투약하여 얻을 수 있는 효능보다 치료학적으로 우수하면 상승 효과를 제공할 수 있는 것으로 정의될 수 있다. 예를 들면, 상기 각각을 단독으로 사용하여 얻어지는 효능보다 치료학적으로 그 효능이 우수하면 병용 치료법의 효능은 상승적이다. 특히, 반응 정도, 반응 속도, 질병 진행까지의 기간 및 생존 데이터 중 하나 이상에 해를 주지 않으면서, 특히 반응 지속기간에 해를 주지 않고, 각 성분을 통상적인 용량으로 사용했을 때 발생하는 것보다, 문제가 되는 부작용이 줄고/줄거나 적으면서 락토바실러스 플란타룸 균주 및 자연살해세포의 통상적인 용량을 감소시킬 수 있으면 상승 효과가 존재하는 것으로 간주한다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 "동시에 투여되는"은 특별히 제한되지 않으며, 병용 요법의 성분들이 예를 들면 혼합물로서 또는 즉시 이어지는 순서로 실질적으로 동시에 투여되는 것을 의미한다.
- [0061] 본 명세서에서 용어 "순차적으로 투여되는"은 특별히 제한되지 않으며, 병용 요법의 성분들이 동시에 투여되지 않고, 투여 사이에 특정한 시간 간격을 두고 하나씩 차례로 또는 무리지어 투여됨을 의미한다. 시간 간격은 병용 요법의 성분들의 각각의 투여 사이에서 동일하거나 상이할 수 있으며, 예를 들면, 2분 내지 96시간, 1일 내지 7일 또는 1주, 2주 또는 3주의 범위에서 선택될 수 있다. 일반적으로, 투여 사이의 시간 간격은 수 분 내지 수 시간, 예를 들면 2분 내지 72시간, 30분 내지 24시간, 또는 1 내지 12시간 범위일 수 있다. 추가의 예는 24 내지 96시간, 12 내지 36시간, 8 내지 24시간, 및 6 내지 12시간 범위의 시간 간격을 포함한다.
- [0062] 본 명세서에서 용어 "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 질환 상태를 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0063] 본 명세서에서 용어 "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 질환 상태에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0064] 일 구체예에 따른 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%의 락토바실러스 플란타룸 균주를 포함할 수 있다. 또한, 락토바실러스 플란타룸 균주의 투여 용량은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다. 상기 균주는 치료적 유효량 또는 영양적으로 유효한 농도로 조성물에 포함되는데, 예를 들면, 상기 균주가 10^3 내지 10^{16} CFU/g, 10^3 내지 10^{15} CFU/g, 10^3 내지 10^{14} CFU/g, 10^3 내지 10^{13} CFU/g, 10^3 내지 10^{12} CFU/g, 10^4 내지 10^{16} CFU/g, 10^4 내지 10^{15} CFU/g, 10^4 내지 10^{14} CFU/g, 10^4 내지 10^{13} CFU/g, 10^4 내지 10^{12} CFU/g, 10^5 내지 10^{16} CFU/g, 10^5 내지 10^{15} CFU/g, 10^5 내지 10^{14} CFU/g, 10^5 내지 10^{13} CFU/g, 10^5 내지 10^{12} CFU/g, 10^6 내지 10^{13} CFU/g, 10^6 내지 10^{12} CFU/g, 10^7 내지 10^{13} CFU/g, 10^7 내지 10^{12} CFU/g, 10^8 내지 10^{13} CFU/g 또는 10^8 내지 10^{12} CFU/g 의 함량으로 포함되거나, 동등한 수의 생균 또는 사균의 배양물로 조성물에 포함될 수 있다. 구체적으로 성인 환자의 경우 1×10^3 내지 1×10^{16} CFU/g의 생균 또는 사균이 한 번 또는 여러 번에

걸쳐서 나누어 투여될 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg(체중)당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는 경구, 설하, 비경구 (예를 들어, 피하, 근육내, 동맥내, 복강내, 경막내, 또는 정맥내), 직장, 국소 (경피 포함), 흡입, 및 주사, 또는 이식성 장치 또는 물질의 삽입을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다. 일 실시예에 따르면 상기 조성물은 사멸화 건조 균주를 포함하며, 1회 1g 내지 10g, 0.5g 내지 1.5g, 2.5g 내지 3.5g, 또는 4.5g 내지 5.5g 투여 가능하고, 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 용어 "치료적 유효량"은 연구자, 의사 또는 기타 임상가가 얻고자 하는 환자에서의 생물학적 또는 의학적 반응 또는 원하는 치료 효과를 도출하게 되는 본 발명의 방법 및 용도를 위한 자연살해세포 또는 본 발명의 방법 및 용도를 위한 자연살해세포를 포함하는 제약 조성물의 양을 의미한다. 자연살해세포의 치료적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성 및 체중, 그리고 개체에서 원하는 반응을 도출하는 자연살해세포의 능력과 같은 인자들에 따라 가변적일 수 있다. 치료적 유효량은 치료적으로 유의한 효과가 어떠한 독성이거나 유해한 효과도 증가하는 양이기도 하다.

[0066] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 완충의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면 활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자 (biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다.

[0067] 일 구체예에 따른 약학적 조성물이 주사에 적당한 제형으로 조제되는 경우에는, 락토바실러스 속 균체가 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해 또는 분산되어 있거나 또는 용해 또는 분산되어 있는 용액 상태로 동결된 것일 수 있다.

[0068] 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[0069] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 명세서에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0070] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 활성물질의 항암 활성은 제2 활성물질과 병용투여시에 더욱 효과적일 수 있다.

[0071] 일 실시예에서, 마우스 대장암 세포주를 이식한 중앙동물모델에 상기 락토바실러스 플란타륨 GB104 균주 및 면역세포를 병용 투여하였을 경우, 락토바실러스 플란타륨 GB104 균주 단독투여 하였을 경우 대비 상승된 항암 효과를 나타냈다. 구체적으로, 대장암 종양의 성장 및 진행을 억제하는 효과를 확인하였다. 평균적으로 대조군에 비해 GB104 및 면역세포를 병용투여한 실험군에서 종양의 부피가 10% 내지 90%로 감소하는 효과를 보였다.

- [0072] 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하고, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 면역세포와 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0073] 상기 "균주", "제1 활성물질", "면역세포", "자연살해세포", "제2 활성물질", "항암 활성", 및 "병용 투여"는 전술한 바와 같다.
- [0074] 일 구체예에 있어서, 식품 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [0075] 일 구체예에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물 및 면역세포는 경구 투여, 정맥투여 복강 투여 또는 피하 투여되는 것 일 수 있다.
- [0076] 일 구체예에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 경구 투여되고, 면역세포는 비경구 투여(parenteral administration)되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 이들의 혼합물은 경구 투여되고, 면역세포는 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것일 수 있다.
- [0077] 일 구체예에 있어서, 상기 건강기능식품은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0078] 본 명세서에서 용어 "식품학적으로 허용 가능한"은 상기 화합물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0079] 본 명세서에서 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.
- [0080] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0081] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0082] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0083] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0084] 상기 외에도, 일 양상에 따른 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연

풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0085] 상기 건강기능식품은 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 기존의 다른 건강기능식품과 혼합되어 제공될 수 있고, 상기 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 종래에 알려져 있는 대사질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품, 기존의 건강기능식품 또는 새롭게 개발되는 건강기능식품일 수 있다.

[0086] 상기 건강기능식품이 암의 예방 또는 개선 효과를 가지는 다른 건강기능식품을 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0087] 상기 암 예방 또는 개선용 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0088] 본 명세서의 조성물은 식품 보조제(food supplements)로 간주될 수 있다. 식이 보충제(dietary supplement) 또는 영양 보충제(nutritional supplement)로도 알려진 식품 보조제는 또 다른 특정 의약품(pharmaceutical product)으로 간주될 수 있다. 이것은 식단을 보충하기 위한 용도로 준비된 것이며, 정상적인 식단에서 섭취가 되지 않거나 충분한 양으로 섭취되지 않을 수 있는 영양소(nutrients) 또는 유익한 성분(beneficial ingredients)을 제공하기 위한 것이다. 대부분 식품 보조제는 식품으로 간주되지만 때로는 약물(drugs), 천연 건강제품(natural health products) 또는 건강기능식품 (nutraceutical products)으로 간주된다. 본 발명의 의미에서, 식품 보조제는 건강기능식품을 포함한다. 식품 보조제는 일반적으로 처방전 없이(without prescription) 카운터에서 판매된다. 식품 보조제가 알약(pill) 또는 캡슐(capsule) 형태를 채택하는 경우, 의약품에 사용되는 동일한 첨가제(excipients)를 포함한다. 그러나 식품 보조제는 일부 영양소로 강화된 식품형태(예: 유아용 조제분유)를 채택할 수도 있다. 따라서, 특정실시에에서, 본 발명의 조성물은 식품 보조제(food supplement)이다.

[0089] 본 발명에 따른 조성물은 그대로 투여되거나 또는 적절한 식용 액체 또는 고체와 혼합되어 투여되거나 또는 정제(tablets), 알약(pills), 캡슐(capsules), 로젠지(lozenges), 과립(granules), 분말 (powders), 현탁액(suspensions), 사첵(sachets), 시럽(syrups)의 형태 또는 단위용량(unit dose)의 형태로 동결 건조(freeze-dried)될 수 있다. 또한 투여 전 함께 제공된 별도의 액체 용기(separate liquid container)에 혼합되어지는 동결 건조된 조성물의 단일용량(monodoses)의 형태일 수 있다.

[0090] 본 발명의 조성물은 유아의 경우 우유제품과 같은 다양한 식용식품 및 식품에 포함될 수도 있다. 본 문서에서 사용된 "식용식품(edible product)"이라는 용어는 광범위한 의미에서 어떠한 형태이든, 동물에 의해 섭취될 수 있는 임의의 형태의 제품을 포함한다(예를 들어, 제품은 감각기관에 의해 받아들여질 수 있는 제품). "식품(food product)"이라는 용어는 체내에 영양지원(nutritional support)을 공급하는 식용제품으로 이해된다. 특히, 흥미로운 식품은 식품보조제(food supplements)와 유아용 조제분유(infant formulas)이다. 식품은 바람직하게는, 귀리가루죽(oatmeal gruel), 젖산발효식품(lactic acid fermented foods), 저항성 전분(resistant starch), 식이섬유(dietary fibers), 탄수화물(carbohydrates), 단백질(proteins) 그리고 당화단백질(glycosylated proteins)과 같은 담체 물질(carrier material)을 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명의 박테리아 세포는 유아용 제조분유를 구성하기 위해 곡물(cereals) 또는 분유(powdered milk)와 같은 다른 성분과 균질화된다.

[0091] 또 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균체, 배양물 및 파쇄물의 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제2 활성물질이 병용투여 되는 것인 암 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[0092] 또 다른 양상은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 또는 상기 균체, 배양물 및 파쇄물의 추출물로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제1 활성물질 및 면역세포를 포함하는 제2 활성물질을 유효성분으로 포함하거나; 또는 상기 제1 활성물질을 유효성분으로 포함하고, 상기 제2 활성물질이 병용투여 되는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

[0093] 상기 "균주", "제1 활성물질", "면역세포", "자연살해세포", "제2 활성물질", "항암 활성", 및 "병용 투여"는 전술한 바와 같다.

[0094] 상기 개체는 암을 앓고 있는 개체일 수 있다. 또한 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0095] 상기 락토바실러스 플란타룸 GB104 균주 및 자연살해세포의 투여경로, 투여량 및 투여횟수는 환자의 상태 및 부작용의 유무에 따라 다양한 방법 및 양으로 대상에게 투여될 수 있고, 최적의 투여방법, 투여량 및 투여횟수는 통상의 기술자가 적절한 범위로 선택할 수 있다. 또한, 상기 유효성분 이외에 암 질환에 대하여 치료효과가 공지된 다른 약물(예를 들어, 상술한 자연살해세포) 또는 생리학적 활성물질과 병용하여 투여되거나, 다른 약물과의 조합 제제 형태로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

[0096] 락토바실러스 플란타룸 균주의 균체, 또는 상기 균주의 배양액은 암세포의 증식을 억제하거나 암세포의 사멸을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 면역세포와 병용 투여할 경우, 암세포 및 종양의 증식 억제에 대해 시너지 효과가 나타나 약학적 조성물 또는 건강기능식품의 형태로 암 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0097] 도 1은 일 구체예에 따른 자연살해세포의 표현형을 유세포분석기를 통해 분석한 그래프이다.
- 도 2은 일 구체예에 따른 GB104 균주의 투여에 따른 자연살해세포의 활성화 정도를 나타낸 면역조직화학염색 결과이다.
- 도 3는 일 구체예에 따른 GB104 균주의 투여에 따른 CD8+ 항종양면역 T세포 및 자연살해세포의 활성화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 동종이식된(syngeneic) MC-38 마우스 대장암종 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포의 병용투여 후 종양 부피를 측정하여 시너지 효과를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 동종이식된(syngeneic) MC-38 마우스 대장암종 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포의 단독투여 및 병용투여 후 종양 부피를 측정하여 비교 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 이종이식된(xenograft) HT-29 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포 병용투여에 따른 종양 성장 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예들은 다양한 변환을 가할 수 있는 바, 실시예들은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[0100] 실시예 1: 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) GB104 균주의 분리 및 동정

[0101] 락토바실러 플란타룸 GB104 균주의 분리 및 동정은 대한민국 특허출원 제10-2020-0186738호, 및 대한민국 특허출원 제10-2022-0080567호에 기재된 방법으로 수행하였다. 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0102] 간략하게, 락토바실러 플란타룸 GB104 건강검진을 목적으로 병원에 방문한 건강한 여성의 질 샘플로부터 분리하였다. 먼저, 질 내부 샘플을 면봉으로 채취하여 Rogosa SL(MRS) 평판 배지에 선조 집중하여 37℃의 혐기 챔버에서 48시간동안 배양하였다. 박테리아의 집락이 자라면 순수분리를 위해 단일 집락들을 새로운 MRS 평판배지에 계대배양을 하였다. 순수 분리된 후, MRS 배지를 이용하여 균주 배양을 하였다. 다음으로 상기 배양된 균주 중 지방 세포의 축적 억제 효과 및 세포 독성이 낮은 락토바실러스 플란타룸 GB104균주를 최종 선별하였다. 상기 최종 선별한 락토바실러스 플란타룸 GB104 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 타겟하는 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 얻은 16S rRNA 유전자 서열을 Sanger 서열분석 방법으로 분석하였고, 락토바실러스 플란타룸

GB104의 16S rRNA 서열을 서열번호 1로 나타내었다. 본 발명자들은 GB104균을 "락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) GB104" (기탁번호: KCTC 14107BP)로 명명하고 이를 한국생명공학 연구원 소재 한국 세포주은행 (Korean collection for type cultures, KCTC)에 2020년 1월 14일자에 기탁하였다. 또한, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 락티플랜티바실러스 플란타룸(*Lactiplantibacillus plantarum*)으로 균주명이 변경되었다. 이하의 실시예에서는 기존의 균주의 변경된 균주명을 상호 호환적으로 기재하였다.

[0104] 실시예 2: mGI101 또는 GI101의 제조

[0105] 인간 또는 마우스 CD80 단편, Fc 도메인 및 IL-2 변이체를 포함하는 융합단백질을 생산하기 위하여, 시그널 펩타이드, CD80 단편, 링커가 결합된 Ig 힌지, Fc 도메인, 링커 및 두 개의 아미노산이 치환된 IL-2 변이체 (R38A, F42A)를 N-말단으로부터 이 순서대로 포함하는 융합단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 ThermoFisher Scientific 사의 Invitrogen GeneArt Gene Synthesis 서비스를 통해 폴리뉴클레오티드를 합성하여 pcDNA3_4 벡터에 적재하였다. 상기 벡터를 CHO 세포(Expi-CHO™)에 도입하여 융합단백질을 발현시켰다. 벡터를 도입한 후 37°C 125 RPM, CO₂ 8%의 농도인 환경에서 7일 배양 후 배양액을 수거하여 형성된 이량체 융합단백질을 정제하였다. 일 구체에 있어서의 "mGI101" (서열번호 6) 또는 "GI101" (서열번호 7)로 명명된 이량체 융합단백질의 단량체는 표 1과 같다.

표 1

[0107]

| 성분 (component) | 아미노산 서열 (Amino acid sequence) | 서열번호 |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| mGI101 단량체 (monomer) | VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDR IYWQKHKVVLVSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLI IL GLVLSDRGTYS CVVQKKERGTVEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFS WLENGRELPGINTTISQDPESELYT ISSLDFNTTRNHTIKCLIKYGDHVSDFTWKPPEDPPDSGSG GGGSGGGSGGGSAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSAPTSSTTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYK NPKLTAML TAKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETT FMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSI I STL T | 6 |
| GI101단량체 (monomer) | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKMKMVL TMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVIL ALRPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFE IPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLS WLENGEELNAINTTVSQDPETEL YAVSSKLDNFNMTTNSFMC LIKYGHLRVNQTFNWNNTTKQEHFPDNGS GGGSGGGSGGGSAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSAPTSSTTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNY KNPKLTAML TAKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSET TFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSI I STL T | 7 |

[0109] 실시예 3 마우스 자연살해세포의 준비

[0110] 실시예 3-1. 마우스 골수 준비

[0111] 마우스 유래 자연살해세포 (Natural killer cells, NK cells)를 수득하고자 c57BL/6 마우스 (오리엔트바이오)에서 대퇴골과 비장(spleen)을 적출하였다. 적출한 대퇴골은 주변의 지방과 근육을 최대한 제거하여 70% 에탄올에 넣었다가 다시 5 mL의 PBS가 담겨 있는 50 mL 코니칼 튜브에 넣고 얼음에서 보관하였다. 적출한 비장(spleen)은 PBS가 담겨 있는 50 mL 코니칼 튜브에 옮긴 후 얼음에서 보관하였다. 새로운 50 mL 코니칼 튜브에 하기의 표 2에 기재된 바와 같이 조성된 FACS buffer A 5mL를 미리 넣어두고, 70 μm의 스트레이너를 겹쳐서 대퇴골용과 비장용을 각각 준비하였다.

표 2

| For 500 mL | Volume | Final Concentration |
|------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|
| FBS | 15 ml | 3% |
| 500 mM EDTA | 10 ml | 10 mM |
| 1M HEPES | 10 ml | 20 mM |
| 25 mg/ml PolymyxinB | 200 μ l | 10 μ g/ml |
| 10,000 U/ml Penicillin & 10,000 μ g/ml Streptomycin | 5 ml | 100 U/ml Penicillin &100 μ g/ml Streptomycin |
| 100 mM Sodium Pyruvate | 5 ml | 1 mM |
| PBS | 454.8 ml | |

[0113] 상기 준비한 70 μ m 스트레이너 위에 대퇴골 뼈 양쪽 부분을 자르고 10 mL의 FACS buffer A로 채워진 주사기에 1 mL 바늘을 뼈 구멍에 넣고 FACS buffer A를 흘려준 후 자른 조직 부분에도 FACS buffer A를 흘려주면서 골수를 수득하였다. 골수 수득 후, 4°C에서 1,300 rpm으로 10분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고, ACK lysis Buffer (Lonza, # BP10-548E)를 3 mL 넣어 세포 펠렛(pellet)과 섞어준 후 5분 동안 상온에 둔다. FACS buffer A를 47 mL 넣고 4°C에서 1,300 rpm으로 10분 동안 원심분리한다. 그 후, 상층액을 제거하고, 1 mL의 FACS buffer A로 풀어준 후 세포를 계수하였다. 70 μ m 스트레이너 위에 비장을 놓고 갈아낸 뒤, 조직 위에 FACS buffer A를 흘려주어 세포를 수득하였다. 세포 수득 후, 4°C에서 1,300 rpm으로 10분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고, ACK lysis Buffer (Lonza, # BP10-548E)를 3 mL 넣어 세포 펠렛(pellet)과 섞어준 후 5분 동안 상온에 둔다. FACS buffer A를 47 mL 넣고 4°C에서 1,300 rpm으로 10분 동안 원심분리한다. 그 후, 상층액을 제거하고, 1 mL의 FACS buffer A로 풀어준 후 세포를 계수하였다. 1 mL의 FACS buffer A로 풀어준 후 세포를 계수하였다.

[0115] 실시예 3-2: 자연살해세포의 분리 및 배양

[0116] 실시예 3-1에서 수득된 골수세포에 NK cell isolation Kit, mouse(Miltenyi biotec, #130-115-818)를 사용하여 다음과 같이 NK 세포(Natural killer cells, NK cells)만 분리한 뒤, 4°C에서 300 \times g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

[0117] 10⁷개의 세포 당 40 μ L의 MACS 버퍼를 첨가하여 세포 펠렛(pellet)을 풀어주고, 10⁷개의 세포 당 10 μ L의 NK Cell Biotin-Antibody Cocktail을 첨가하였다. 4°C에서 5분 동안 배양 후, 10⁷개의 세포 당 2 mL의 MACS buffer를 추가하고 4°C에서 300 \times g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 10⁷개의 세포 당 2 mL의 MACS buffer를 첨가하여 세척하고, 4°C에서 300 \times g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

[0118] 10⁷개의 세포 당 80 μ L의 MACS buffer를 추가한 후에, 10⁷개의 세포 당 20 μ L의 항-바이오틴 마이크로비드(anti-biotin microbead)를 분주하고 얼음에서 10분간 배양하였다. 항-바이오틴 마이크로비드와 섞은 세포 500 μ L를 LS column에 흘려주고 컬럼을 통과한 상층액을 수득하였다. 상기와 같은 과정을 되풀이하고 이를 4°C에서 300 \times g로 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

[0119] 하기 표 3에 기재된 바와 같이 조성된 GC-RPMI 배지 1 mL에 풀어서 세포를 계수하였다. 측정된 NK 세포수에 따라 1 \times 10⁶ cells/mL로 GC-RPMI 배지에 과종(seeding)한 후, 실시예 2의 방법으로 제조한 mGI101을 100 nM/mL의 농도로 처리하여 7일 동안 배양을 진행하였다.

표 3

| For 500 mL | Volume | Final Concentration |
|------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------|
| FBS | 50 ml | 10% |
| 1M HEPES | 5 ml | 20 mM |
| 10,000 U/ml Penicillin & 10,000 μ g/ml Streptomycin | 5 ml | 100 U/ml Penicillin &100 μ g/ml Streptomycin |
| 50 mg/ml Gentamicin | 0.5 ml | 50 μ g/ml |
| 100 mM Sodium Pyruvate | 5 ml | 1 mM |

| | | |
|-------------------------|--------|-------|
| 55 mM 2-Mercaptoethanol | 0.5 ml | 55 μM |
| 100 mM NEAA | 5 ml | 1 mM |
| 200 mM L-Glutamine | 5 ml | 2 mM |
| RPMI | 424 ml | |

[0121] **실시예 3-3. 자연살해세포 순도 확인**

[0122] 실시예 3-2에서 분리 및 배양한 자연살해세포의 순도 및 활성화와 그랜자임, 퍼포린 및 인터페론감마의 분비능 분석을 위하여, 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 분석하였다.

[0123] 구체적으로, 자연살해세포를 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하여, 상층액을 제거하였다. 그 후, PBS에 3%(v/v) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 μg/ml PolymyxinB, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 1 mM Sodium pyruvate를 첨가하여 제조한 FACS 버퍼 1 ml을 넣어 세포 펠릿을 재현탁하였다. 그 후, 세포 계수기를 이용하여 2×10⁶ 세포수/ml이 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 96 well plate에 희석한 세포 용액을 100 μl씩 넣고, FACS 버퍼 100 μl을 넣은 후 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, FACS 버퍼 100 μl을 추가로 넣고 순도확인을 위해, 하기 표 4에 기재된 항체 FITC가 표지된 항-마우스 CD3 항체(FITC mouse anti-CD3 (Clone 17A2)), APC가 표지된 항-마우스 NK1.1 항체(APC mouse anti-NK1.1 (Clone PK136))를 처리하였다. 그 후, 20분간 4℃ 온도에서 반응시킨 후, 100 μl FACS 버퍼를 넣고, 300×g 조건에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 200 μl FACS 버퍼를 넣어 현탁한 후, 유세포 분석기를 이용하여 세포의 순도 및 표현형을 확인하였다.

[0124] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 분리한 자연살해세포의 비율(순도)은 98.5%로 확인되었다.

표 4

| | Target | Color | Clone | Producer | Cat# |
|------------------|--------|-------|-------|-----------|--------|
| Purity Marker | CD3 | FITC | 17A2 | Biolegend | 100204 |
| | NK1.1 | APC | PK136 | Biolegend | 108710 |

[0127] **실시예 3-4. 자연살해세포 활성화 확인**

[0128] 상기 실시예 3-2에서 분리 및 배양된 자연살해세포가 활성화 되었는지 확인하기 위해, 자연살해세포의 활성화마커를 분석하였다. 자연살해세포를 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하여, 상층액을 제거하였다. 그 후, PBS에 3%(v/v) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 μg/ml PolymyxinB, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 1 mM Sodium pyruvate를 첨가하여 제조한 FACS 버퍼 1 ml을 넣어 세포 펠릿을 재현탁하였다. 그 후, 세포 계수기를 이용하여 2×10⁶ 세포수/ml이 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 96 well plate에 희석한 세포 용액을 100 μl씩 넣고, FACS 버퍼 100 μl을 넣은 후 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, FACS 버퍼 100 μl을 추가로 넣고 활성화 분석을 위해 하기 표 5에 기재된 바와 같이, 항체 BV510가 표지된 항-마우스 CD16 항체(BV510 mouse anti-CD16 (Clone Ab9)), PE/cy7이 표지된 항-마우스 NKp46 항체(PE/cy7 mouse anti-NKp46 (Clone 27A1.4)), PE가 표지된 항-마우스 NKG2D 항체(PE mouse anti-NKG2D (Clone CX5)), PerCP/CY5.5가 표지된 항-마우스 CD244 항체(PerCP/CY5.5 mouse anti-CD244 (Clone m2B4(B6)458.1)), BV421가 표지된 항-마우스 CCR5 항체(BV421 mouse anti-CCR5 (Clone C34-3448)) 및 BV711가 표지된 항-마우스 CXCR4 항체(BV711 mouse anti-CXCR4 (Clone L276F12))를 처리하였다. 그 후, 20분간 4℃ 온도에서 반응시킨 후, 100 μl FACS 버퍼를 넣고, 300×g 조건에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 200 μl FACS 버퍼를 넣어 현탁한 후, 유세포 분석기를 이용하여 세포의 순도 및 표현형을 확인하였다.

[0129] 그 결과, 도 1에 나타나 바와 같이, 배양된 자연살해세포 중 CD16을 발현하는 자연살해세포의 비율이 92.3%, NKp46을 발현하는 자연살해세포의 비율이 96.8%, NKG2D를 발현하는 자연살해세포의 비율이 99.0%, CD244을 발현하는 자연살해세포의 비율이 98.3%, CCR5을 발현하는 자연살해세포의 비율이 89.7% 그리고 CXCR4을 발현하는 자연살해세포의 비율이 95.4% 것을 확인하였다.

표 5

[0130]

| | Target | Color | Clone | Producer | Cat# |
|-------------------|-----------|-------------|----------------|-----------|--------|
| Activation Marker | CD16/CD32 | BV510 | Ab9 | BD | 751688 |
| | NKp46 | PE/CY7 | 29A1.4 | Biologend | 137618 |
| | NKG2D | PE | CX5 | Biologend | 130208 |
| | CD244 | PerCP/cy5.5 | m2B4 (B6)458.1 | Biologend | 133513 |
| | CCR5 | BV421 | C34-3448 | BD | 743695 |
| | CXCR4 | BV711 | L276F12 | Biologend | 146517 |

[0132]

실시예 3-5. 자연살해세포의 그랜자임 B 및 퍼포린 분비능 확인

[0133]

상기 실시예 3-2에서 분리 및 배양된 자연살해세포의 그랜자임, 퍼포린 및 인터페론감마의 분비능 확인하기 위해, 세포내 염색(intracellular staining)을 통해 자연살해세포 내 그랜자임 B(Granzyme B), 퍼포린(Perforin), 인터페론감마 (Interferon γ)의 발현량을 측정하였다.

[0134]

자연살해세포를 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하여, 상층액을 제거하였다. 그 후, PBS에 3%(v/v) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 μ g/ml PolymyxinB, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 1 mM Sodium pyruvate를 첨가하여 제조한 FACS 버퍼 1 ml을 넣어 세포 펠릿을 재현탁하였다. 그 후, 세포 계수기를 이용하여 2×10^6 세포수/ml이 되도록 FACS 버퍼로 희석하였다. 96 well plate에 희석한 세포 용액을 100 μ l씩 넣고, FACS 버퍼 100 μ l을 넣은 후 300×g 조건에서 10분동안 원심분리하였다. Fix 및 Permeation을 위해 200 μ l BD Cytotfix/Cytoperm제 버퍼(perm/fixation buffer)를 넣어 현탁한 후 30분간 4°C온도에서 반응시킨다. FACS 버퍼 100 μ l을 추가로 넣고 300×g 조건에서 5분간 원심분리하였다. 하기 표 6에 기재된 PE/cy7이 표지된 항-마우스 그랜자임 B 항체(PE/cy7 anti-mouse Granzyme B (Clone NGZB)), PE가 표지된 항-마우스 퍼포린 항체(PE anti-mouse Perforin (Clone S16009A)) 및 FITC가 표지된 항-마우스 인터페론 γ 항체(FITC anti-mouse Interferon γ (Clone XMG1.2))를 처리하였다. 그 후, 20분간 4°C온도에서 반응시킨 후, 100 μ l FACS 버퍼를 넣고, 300×g 조건에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 200 μ l FACS 버퍼(fixation buffer)를 넣어 현탁한 후, 유세포 분석기를 이용하여 세포의 발현량을 확인하였다.

[0135]

그 결과, 도 1에 나타나 바와 같이, 배양된 자연살해세포 중 퍼포린을 함유하는 자연살해세포의 비율이 96.2%로 확인되었으며, 그랜자임 B를 함유하는 자연살해세포의 비율이 95.7%인 것을 확인하였고 인터페론 감마를 함유하는 자연살해세포의 비율이 91.3%인 것을 확인하였다.

표 6

[0136]

| | Target | Color | Clone | Producer | Cat# |
|---------------------|---------------|--------|---------|------------|------------|
| Cytotoxicity marker | IFN- γ | FITC | XMG1.2 | Invitrogen | 11-7311-82 |
| | Perforin | PE | S16009A | Biologend | 154306 |
| | GranzymeB | PE/cy7 | NGZB | Invitrogen | 25-8898-82 |

[0138]

실시예 4 인간 자연살해세포의 준비

[0139]

실시예 4-1: CD3-CD56+세포 수득

[0140]

CliniMACS PBS/EDTA buffer(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Cat#: 200-070-029)에 0.5%(v/v) HSA(human serum albumin)와 1 mM 농도의 EDTA를 추가한 CliniMACS 버퍼(pH 7.2)를 제조하였다. CliniMACS Prodigy장비(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Cat#200-075-301)에 leukopak, Reagent (CD3, CD56), infusion solution, rinsing solution, CliniMACS buffer을 연결한다. LP-3-56-separation 프로그램을 작동시켜 Leukopak(이화여대 목동병원)으로부터 NK세포를 수득하였다.

[0142] 실시예 4-2: 인간 자연살해세포의 배양

[0143] 상기 실시예 4-1에서 분리된 NK세포(CD3-CD56+)를 1×10^6 cells/mL로 culture bag에 과중하였다. NK세포 자극용 비드(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Cat# 130-094-483)는 최초 과중 시점에만 첨가하고, 과중 6일째부터 2일 간격으로 세포수를 확인하였다. 1×10^6 cells/mL의 농도를 유지하도록 하기 표4의 배지를 첨가하여 총 세포수가 12.6×10^8 cells 가 될 때까지 37.0°C, 5% CO2 조건하에 배양하였다. 이후 배양한 세포를 바이오리액터에 접종하였다. 0.7×10^6 cells/mL의 농도로 하기 표 7의 배지를 첨가하여 접종하고 pH, pO2, pCO2, 세포대사산물, 삼투압 등을 매일 측정하여 배양 공정을 관리하였다. 0.7×10^6 cells/mL가 되도록 하기 표4의 배지를 추가하고, 배양액이 50L를 도달할 경우 세포농도와 관계없이 총 세포수가 1.0×10^{11} cells 이상이 될 때까지 배양하였다.

표 7

[0144]

| 성분 (component) | 최종 함량 (final concentration) |
|--------------------|--------------------------------|
| NK MACS medium | - |
| NK MACS supplement | 1% |
| Human AB serum | 5% |
| GI101 | 50nM |
| Poloxamer 188 | 1g/L |

[0146] 실시예 4-3: 세포 회수 및 동결

[0147] 상기 실시예 4-2에서 배양한 세포를 Unifuge 장비(CARR biosystems)를 사용하여 회수하였다. 50L의 배양액을 세포와 washing buffer가 포함된 3L로 농축하였다. 농축된 세포 현탁액을 LOVO 장비(Fresenius Kabi)를 사용하여 500mL로 농축하였다. 이후 농축된 세포를 수득 후 하기 표 8의 동결제형을 조성에 맞게 추가하고, M1장비(Aseptic Technologies)를 사용하여 AT vial에 1×10^8 cells/mL의 농도로 충전하였다. 세포가 충전된 AT vial을 Controlled rate freezer (CRF, Thermofisher)에 넣고 동결을 진행하였다. 동결이 완료된 세포는 -160°C이하의 액체 질소탱크에 옮겨 보관하였다.

표 8

[0148]

| 성분 (component) | 최종 함량 (final concentration) |
|-------------------------|--------------------------------|
| Plasma Solution A | 72.75% |
| PEG | 2.25% |
| 20% Human Serum Albumin | 20% |
| DMSO | 5% |

[0150] 실험예 1 동종이식된 MC-38 대장암종 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주의 CD8⁺ 항종양면역 T세포 및 자연살해 세포의 활성화 확인

[0151] 대장암종 MC-38 동종이식(syngeneic) 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주의 투여에 의한 항 종양 면역에 관여하는 면역세포의 증가를 확인하였다.

[0152] 구체적으로, 6주령의 c57BL/6 mouse를 입고하여 1주일 순화 기간을 거쳐, 오른쪽 옆구리 주변을 제모 후 7주령에 실험을 진행하였다. Mouse의 오른쪽 옆구리에 c57BL/6 유래 대장암 세포주 MC-38을 한 마리 당 2×10^5 세포를 100 μL로 피하주사 함으로써 종양 모델을 확립하였다. 종양 세포 주입 5일차에 종양 크기가 일정한 범위 내에 해당하는 마우스만을 선택하여 각 그룹군의 종양 크기 평균값이 같도록 분류한 후, *L. Plantarum* GB104 균주

를 상기 동물 모델에 마우스 한 마리 당 1×10^9 CFU로 6일차부터 시험 종료 직전까지 매일 경구투여 하였다.

[0153] 이후에, 20일째에 GB104 균주의 투여에 따른 $CD8^+$ 항종양면역 T세포 및 자연살해세포의 활성화를 확인하였고, 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0154] 도 2는 일 구체예에 따른 GB104 균주의 투여에 따른 자연살해세포의 활성화 정도를 나타낸 면역조직화학염색 결과이다.

[0155] 도 3은 일 구체예에 따른 GB104 균주의 투여에 따른 $CD8^+$ 항종양면역 T세포 및 자연살해세포의 활성화를 나타낸 그래프이다.

[0156] 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, GB104 균주의 투여에 의해, 자연살해세포 및 T 세포의 활성화(세포 수)가 종양 세포에서 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 GB104 균주가 면역 세포(자연살해세포 및 T 세포)와 병용되었을 때 항암 효능을 상승시킬 수 있음을 의미한다.

[0158] **실험예 2: 동종이식된 MC-38 대장암종 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포의 병용투여에 따른 종양 성장 억제 효과 확인**

[0159] 대장암종 MC-38 동종이식(syngeneic) 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포 병용 투여에 의한 종양 치료 효과를 확인하였다.

[0160] 구체적으로, 5주령의 c57BL/6 마우스를 입고하여 1주일 순화 기간을 거쳐, 오른쪽 옆구리 주변을 제모 후 6주령에 실험을 진행하였다. 마우스의 오른쪽 옆구리에 c57BL/6 유래 대장암 세포주 MC-38을 한 마리당 2×10^5 세포/100 μ L로 피하주사 함으로써 종양 모델을 확립하였다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼(digital calliper)를 이용해 측정하여 Tumor volume (mm^3) = $(\text{width}^2 \times \text{length})/2$ 에 의해서 크기를 계산하였다. 종양 세포 주입 5일차에 종양 크기가 10-30 mm^3 범위 내에 해당하는 마우스만을 선택하여 각 그룹군을 무작위로 설정한 후, *L. Plantarum* GB104 균주를 상기 동물 모델에 마우스 한 마리 당 2×10^9 CFU로 5일차부터 시험 종료 직전까지 매일 경구투여 하였다. c57BL/6 마우스의 대퇴골과 비중(spleen)으로부터 실시예 3의 방법으로 자연살해세포를 분리 및 배양하여 종양 세포 주입 8, 15일차에 5×10^6 세포/200 μ L로 총 2번 정맥주사 하였고, GB104와 자연살해세포 병용투여에 따른 결과를 도 4에 나타내었다.

[0161] 도 4는 동종이식된 MC-38 마우스 대장암종 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포의 병용투여 후 종양 부피를 측정하여 시너지 효과를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0162] 도 5는 동종이식된 MC-38 마우스 대장암종 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포의 단독투여 및 병용투여 후 종양 부피를 측정하여 비교 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0163] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 음성대조군 (Control) 그룹과 비교하여 자연살해세포를 단독으로 투여한 그룹보다 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 그룹에서 시너지 현상에 의한 종양 크기의 유의성 있는 감소를 보임으로써, 항 종양 강화 효능을 확인하였다.

[0165] **실험예 3: 이종이식된 HT-29 대장암종 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포 병용투여에 따른 종양 성장 억제 효과 확인**

[0166] 면역결핍마우스를 이용한 대장암종 HT-29 이종이식(xenograft) 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포 병용 투여에 의한 종양 치료 효과를 확인하였다. 6주령의 NOG mouse를 입고하여 1주일 순화 기간을 거쳐, 오른쪽 옆구리 주변을 제모 후 7주령에 실험을 진행하였다. Mouse의 오른쪽 옆구리에 인체 유래 대장암 세포주 HT-29를 한 마리 당 5×10^6 세포/100 μ L로 피하주사 함으로써 종양 모델을 확립하였다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼(digital calliper)를 이용해 측정하여 Tumor volume (mm^3) = $(\text{width}^2 \times \text{length})/2$ 에 의해서 크기를 계산하였다. 종양 세포 주입 4일차에 각 그룹군의 종양 크기 평균이 100-110 mm^3 범위 내에 해당하도록 마우스를 무작위로 설정한 후, *L. Plantarum* GB104 균주를 상기 동물 모델에 마우스 한 마리 당 1×10^9 CFU로 4일차부터 시

험 종료 직전까지 매일 경구투여 하였다. 실시예 4의 방법으로 제조된 자연살해세포는 종양 세포 주입 4, 7, 11, 14, 18, 21일차에 1×10^7 세포/200 μ L로 총 6번 정맥주사 하였다.

- [0167] 도 6은 이종이식된(xenograft) HT-29 모델에서 GB104 균주와 자연살해세포 병용투여에 따른 종양 성장 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0168] 도 6에 나타난 바와 같이, KRAS 야생형, BRAF^{V600E} 및 p53^{R273H} 돌연변이 유전자를 발현하는 HT-29 세포주를 이식한 종양 모델에서 음성대조군 (Control) 그룹과 비교하여 *L. Plantarum* GB104 또는 자연살해세포를 각각 단독으로 투여한 그룹보다 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 그룹에서 종양 크기의 감소가 더 유의미하게 나타남으로써, 병용 투여에 따른 강화된 항 종양 효능을 확인하였다.
- [0169] 한편, 상기 인체 유래 대장암 세포주 HT-29와 대장암 병인에 중요한 일부 유전자의 발현이 다른 양상을 나타내는 인체 유래 대장암 세포주 HCT116에서도 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 그룹에서 강화된 항 종양 효과를 나타내는지 확인하였다.
- [0170] 구체적으로, HCT116 세포는 KRAS^{G13D} 돌연변이, BRAF 및 p53 야생형 유전자를 발현하는 반면, HT-29 세포는 KRAS 야생형, BRAF^{V600E} 및 p53^{R273H} 돌연변이 유전자를 발현한다. 따라서 같은 대장암 세포주라고 하더라도 일부 유전자의 발현 양상 차이에 따라 각 세포마다 약물에 대한 반응도의 차이는 다르게 나타날 수 있다.
- [0171] HCT116 세포주를 이식한 종양 모델이라는 점을 제외하고 실험예 3의 방법과 동일한 방법으로, KRAS^{G13D} 돌연변이, BRAF 및 p53 야생형 유전자를 발현하는 HCT116 세포주를 이식한 종양 모델에서 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 경우의 항 종양 효과를 확인하였다. 그 결과, 음성대조군 (Control) 그룹과 비교하여 *L. Plantarum* GB104 또는 자연살해세포를 각각 단독으로 투여한 그룹보다 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 그룹에서 종양 크기의 감소가 더 유의미하게 나타남으로써, 병용 투여에 따른 강화된 항 종양 효능을 확인하였다.
- [0172] 이는 일부 유전자의 발현이 다른 인체 유래 대장암 세포주 HT-29 및 HCT116을 각각 이용하여 고도의 면역결핍 마우스에서 확립된 이종이식 종양 모델에서, 본 발명의 일 구체예인 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포를 병용 투여함에 따라 종양 치료 효과를 확인하였다. 이는 본 발명의 일 구체예인 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포를 병용 투여하는 경우, 유전자 발현 양상의 차이에 상관 없이 대장암에서 효과적인 항암치료 효과를 나타냄을 의미한다.
- [0174] **실험예 4: *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포 병용투여에 따른 종양 성장 억제 효과 확인**
- [0175] 면역결핍마우스를 이용한 간암, 유방암, 신장암, 폐암 이종이식 모델에서 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포의 병용 투여에 의한 종양 치료 효과를 확인하였다.
- [0176] 구체적으로, 다른 암종의 이종이식 모델에서 수행한 것만을 제외하고는 상기 실험예 4와 동일한 방법으로 *L. Plantarum* GB104 균주와 NK 세포 병용 투여에 의한 종양 치료 효과를 확인하였다.
- [0177] 그 결과, 상기 간암세포주, 대장암 세포주, 유방암세포주, 신장암세포주, 폐암 세포주를 이식한 종양 모델에서 음성대조군 (Control) 그룹과 비교하여 *L. Plantarum* GB104 또는 자연살해세포를 각각 단독으로 투여한 그룹보다 *L. Plantarum* GB104와 자연살해세포를 병용 투여한 그룹에서 종양 크기의 감소가 더 유의미하게 나타남으로써, 병용 투여에 따른 강화된 항 종양 효능을 확인하였다.
- [0178] 이는 본 발명의 일 구체예인 *L. Plantarum* GB104 균주와 자연살해세포를 병용 투여하는 경우, 간암, 유방암, 신장암 및 폐암에서 효과적인 항암치료 효과를 나타냄을 의미한다.
- [0180] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

수탁번호

[0182]

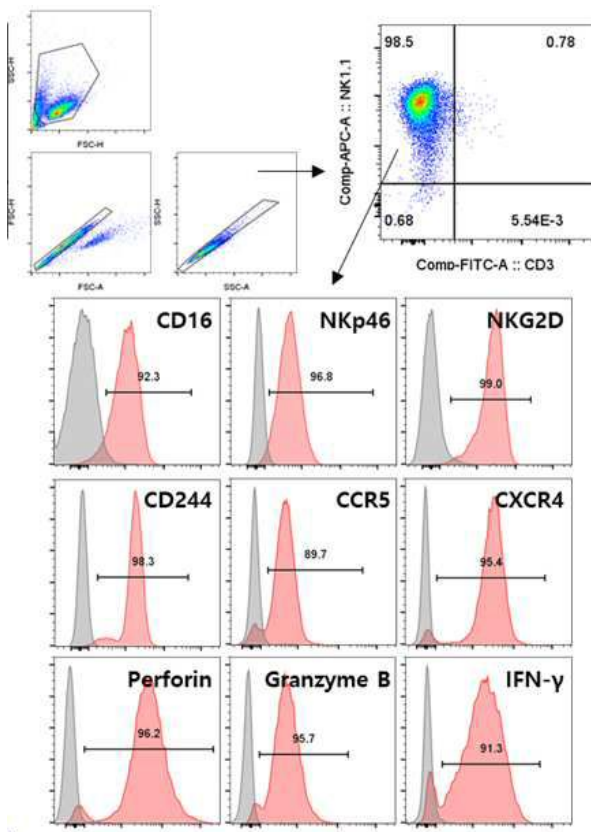
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC14107BP

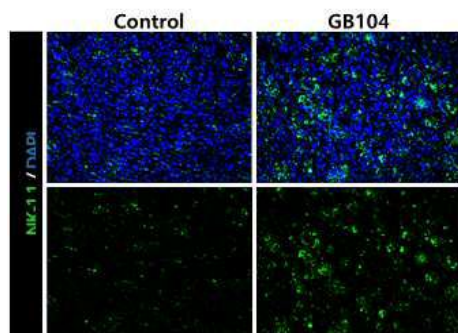
수탁일자 : 20200114

도면

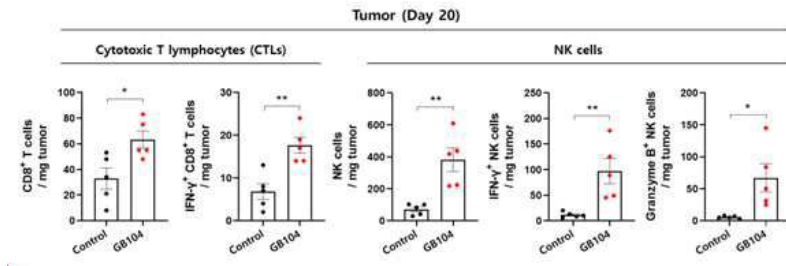
도면1



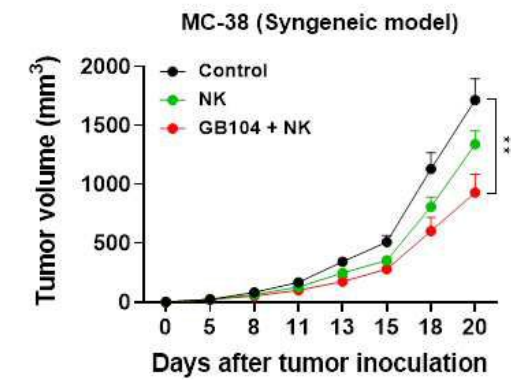
도면2



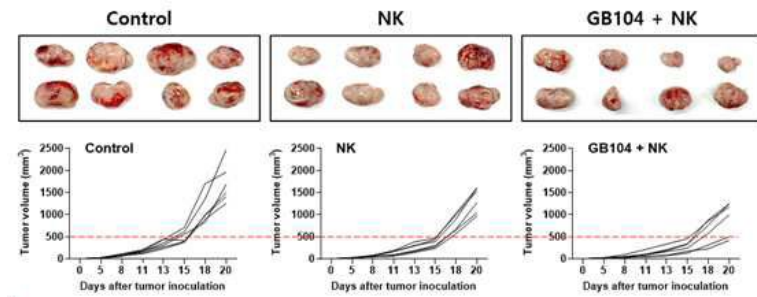
도면3



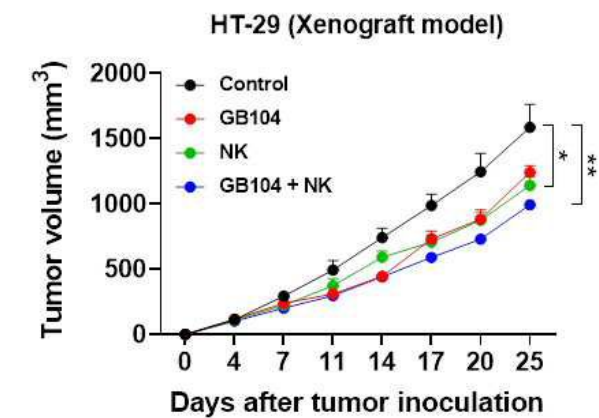
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.