



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월15일
 (11) 등록번호 10-1747815
 (24) 등록일자 2017년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2014.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7004057
 (22) 출원일자(국제) 2010년11월29일
 심사청구일자 2015년09월18일
 (85) 번역문제출일자 2013년02월18일
 (65) 공개번호 10-2013-0132398
 (43) 공개일자 2013년12월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/MY2010/000307
 (87) 국제공개번호 WO 2012/074351
 국제공개일자 2012년06월07일
 (56) 선행기술조사문헌
 W02010117255 A1

(73) 특허권자
유니버시티 푸트라 말레이시아
 말레이시아 세랑고르 세르당 43400 유피엠
 (72) 발명자
푸, 후이 링
 말레이시아, 셀랑고르 43400, 세르당, 유니버시티
 푸트라 말레이시아, 팩컬티 오브 바이오테크놀로
 지 앤드 바이오펴쿨러 사이언시스, 디파트먼트 오브
 바이오프로세스 테크놀로지
로, 테크 츠웬
 말레이시아, 셀랑고르 43400, 세르당, 유니버시티
 푸트라 말레이시아, 팩컬티 오브 애그리컬처, 디
 파트먼트 오브 애니멀 사이언시스
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **중양 세포독성제 및 그 방법**

(57) 요약

본 발명은 부작용이 감소된 대사물을 기반으로 항중양 활성을 제공하는 신규한 항중양제를 개시한다. 더욱이, 상기 항중양제는 식품 제조에 사용되는, 프로바이오틱 락트산 박테리아인 매우 안전한 박테리아로 출발하여 제조된다.

(72) 발명자

추아, 리 운

말레이시아, 쉐랑고르 43400, 세르당, 유니버시티
푸트라 말레이시아, 패컬티 오브 바이오테크놀로지
앤드 바이오펴클러 사이언시스, 디파트먼트 오브
바이오프로세스 테크놀로지

알리펀, 놀자한 바누

말레이시아, 쉐랑고르 43400, 세르당, 유니버시티
푸트라 말레이시아, 패컬티 오브 바이오테크놀로지
앤드 바이오펴클러 사이언시스

압둘.라힘, 라하

말레이시아, 쉐랑고르 43400, 세르당, 유니버시티
푸트라 말레이시아, 패컬티 오브 바이오테크놀로지
앤드 바이오펴클러 사이언시스, 디파트먼트 오브
셀 앤드 몰클러 바이올로지

명세서

청구범위

청구항 1

BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11, RI11 및 그 조합으로 이루어진 균에서 선택된 락트산 박테리아 균주를 포함하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 박테리아 균주가 살아있는 형태로 존재하거나 또는 살아있지는 않지만 온전하게 존재하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 가 포유류에서 암의 증식을 억제하고 아포토시스를 유도할 수 있는 대사물을 제공하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 포유류가 인간인 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 대사물이 박테리오신 (bacteriocin)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 대사물이 항종양제인 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 항종양제가 영양소, 비타민, 유기산의 염 또는 이들의 조합으로 담지되는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 비타민이 비타민 B 인 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 유기산의 염이 포름산, 아세트산 및 락트산의 나트륨 염을 포함하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제 5 항에 있어서, 상기 대사물이 전체 완전 성장 배지 (complete growth media) 의 1% (v/v) 내지 50% (v/v) 의 범위로 존재하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제 6 항에 있어서, 상기 항종양제가 1% (v/v) 내지 50% (v/v) 의 농도를 가짐으로써 다양한 유형의 인간 암 세포에서의 생존력을 감소시키는 수단을 갖는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 인간 암 세포가 인간 유방암 세포주 MCF-7, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 자궁경부

암 세포주 HeLa, 인간 간암 세포주 Hep G2, 인간 백혈병 세포주 HL-60 및 K-562 및 그 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 13

제 6 항에 있어서, 상기 항종양제가 1% (v/v) 내지 50% (v/v) 의 농도를 가짐으로써 다양한 유형의 인간 암 세포에서 증식을 억제하는 수단을 갖는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 인간 암 세포가 인간 유방암 세포주 MCF-7, 인간 대장암 세포주 HT-29 및 그 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 락트산 박테리아 균주는 암 세포의 아포토시스 유도를 촉진하는 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 16

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 암인 것을 특징으로 하는, 종양의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 정의된 조성물을 포함하는 용기를 포함하는, 포유류에서의 암의 예방 또는 치료용 키트.

청구항 28

BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11, RI11 및 그 조합으로 이루어진 균에서 선택된 락트산 박테리아 균주를 포함하는, 종양 증상 개선용 식품.

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락트산 박테리아와 같은 그람-양성 박테리아로부터 수득되는 대사물의 항종양제로서의 용도에 관한 것이다. 물론, 본 발명은 또한 인간 세포에서의 종양 성장의 치료 및/또는 예방을 위한 방법도 개시한다.

배경 기술

[0002] 자연계에 널리 존재하는 락트산 박테리아는 글루코오스 또는 락토오스와 같은 탄수화물을 이용해 유기산을 생성하는 미생물이다 (von Wright, 2005). 락트산 박테리아는 오래 전부터 식품에 직접적으로 또는 간접적으로 이용되어 왔다. 인간의 장내 세균총에 대한 연구 결과로서, 건강한 인간의 위장관에서의 주된 락트산 박테리아는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 카세이 (*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 페르멘텀 (*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 플라타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 등임이 보고된 바 있다. 상기 락트산 박테리아는 위산 및 담즙에 대해 내성이다 (Balcazar, 2007). 현재, 락트산 박테리아는 전세계적으로 미생물 제제로서 또는 발효 제품의 살아있는 세포 제제 등으로 널리 사용되고 있다.

종양 세포에 대한 발효된 우유 또는 락트산 박테리아의 세포독성 유효성에 대한 많은 보고가 있다. 예를 들어, 살아있는 락토바실러스 카세이의 매일 제공이 종양은 없고 2 개의 이상의 대장 종양을 제거한 적이 있는 398 명의 남성 및 여성에서 대장 종양의 이형을 억제하여, 락토바실러스 카세이 (*Lactobacillus casei*) 의 투여는 대장암의 발생을 예방할 수 있다 (Ishikawa et al, 2005). 락트산 박테리아는 탄수화물을 대사하고 그로써 락트산을 제공하는 박테리아이다. 이들 박테리아는 조건적 혐기성에 속하거나 또는 혐기성 조건 하에서 잘 증식하는 절대 혐기성에 속한다. 몇가지 통상 공지된 락트산 박테리아 속은, 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 비피도박테리아 (*Bifidobacteria*) 및 페디오코쿠스 (*Pediococcus*) 이다. 스트렙토코쿠스 속 미생물은 우유를 발효시켜 락트산을 생성해 부패 박테리아 또는 병원성 박테리아를 억제하는 정상 발효성 박테리아이다. 락토바실러스 속 미생물은 막대 모양의, 유제품 또는 식물 발효에서 광범위하게 나타나는 정상발효성 또는 이형발효성 박테리아이다. 쌍구균인 류코노스톡 속 미생물은 이형발효성 박테리아로, 식물 발효에 대부분 관여된다. 비피도박테리아 속 미생물은 아동의 건강에 유용한 L(+)락트산을 생성하는 절대 혐기성균이며, 호기성 조건 하에서는 생존하지 못한다 (Holzapfel et al, 2001).

[0003] 많은 화학 조성물이 항-종양제로서 보고된 바 있다. 그러나, 이들 조성물들은 종양 세포를 파괴할 뿐만 아니라, 정상 세포도 파괴한다. 대안적으로, 외과적 처치가 종양 조직 제거를 위해 일반적으로 실시된다. 그러나, 이는 그 방법이 종양 조직을 완전히 제거하지 않기 때문에 어려운 점이 있다. 어떤 요법이든 실제 조건에는 부작용이 있고, 최상의 결과를 완전히 제공하지는 않는 것으로 일컬어진다. 예를 들어, 화학요법은 네오-아주반트, 아주반트 및 구난 전락으로서 성공적으로 사용되어 오고 있다 (Carlson et al, 2006). 화학요법은 신속하게 분열하는 암 세포를 표적으로 하지만, 신속하게 분열하는 정상 세포에 대한 유해한 부작용이 있다. 이는 내피 독성, 면역억제, 점막염 및 탈모와 같은 화학요법의 가장 일반적인 부작용을 낳는다 (Mitchell, 2004; Mailloux et al, 2005). 더욱이, 통상적인 화학요법 약물의 이용은 암 세포에서 화학 내성을 야기하는 것으로 밝혀졌다 (Zhivotovsky and Orrenius, 2009). 이는 또한 방사선조사 및 생물학적 약제와의 동반 처리

요법으로 이용된다 (American Cancer Society, 2009). 화학요법에서 수술 및 방사선조사까지 수많은 진전에도 불구하고, 암 사망율은 여전히 많은 나라에서 사망 원인의 상위를 차지하고 있다 (WHO, 2009a). 따라서, 정상 세포에 대한 독성을 제한하면서 더 큰 효능을 가진 신규한 화학요법을 개발하는 것이 필요하다.

[0004] 식품은 연장되는 안녕의 근원이 된다는 기대감과 관련하여 장기간의 화학치료제보다는 건강 유지를 위한 자연적 방법을 이용하고자 하는 소비자의 희망사항은 프로바이오틱 시장이 신속하게 성장할 것이라는 추측을 뒷받침한다. 종합적인 조사로부터 얻은 결론은 식품, 식품 보조물 또는 약제학적 제제로서의 프로바이오틱 제제의 위상을 위해 필수적일 것이다 (Mercenier et al, 2002). 박테리옌은 락트산 박테리아로부터 단리되고, 그들은 항생제와 유사한 방식으로 다양한 병원체에 대해 저해 유효성을 나타낸다. 그러나, 박테리옌은 그의 합성, 작용 방식, 독성 및 내성 메커니즘의 측면에서 항생제와는 구분된다.

[0005] 인류에서의 암 치료를 위해 신규한 항종양 화합물이 지속적으로 필요하고, 신규 항암 화합물의 제조는 추가 연구를 위한 항종양제 개발의 중요한 특징이다. 그러한 화합물 제조를 위한 제조 프로세스에서 사용되는 신규 배양 균주도 똑같이 중요하다. 추가적으로, 특정 미생물에 의해 생산되는 대사물이 중요한 인간 병원성 박테리아 및 진균에 대해 항미생물 활성을 나타낼 뿐만 아니라 항바이러스 및 항종양 활성을 갖고 있다는 점이 결정된 바 있다 (Zhao et al., 2006; Wachsman et al, 199).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 부작용이 줄어든 대사물 기반으로 탁월한 항종양 활성을 갖고 있고 식품 제조에 사용되는 매우 안전한 박테리아로 출발하여 제조될 수 있는 신규한 항종양제를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 또다른 목적은 락트산 박테리아의 항암 효능 (암세포 성장 억제 및 아포토시스 유도) 의 측정 방법을 제공하고, 나아가 항암 효능이 있는 락트산 박테리아의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 개요

[0008] 따라서, 본 발명은 종양의 예방 또는 치료를 위한 락트산 박테리아 균주의 용도에 관한 것이고, 여기서 박테리아 균주는 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 이다 (박테리아 균주는 살아있는 형태이거나 또는 살아있지 않더라도 온전함). 더욱이, 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 은 포유류 (바람직하게는 인간) 에서 암의 증식을 억제하고 아포토시스를 유도할 수 있는 박테리옌과 같은 대사물을 생산하여 종양을 예방 또는 치료할 수 있다고 일컬어지고 있다. 특히, 상기 대사물은 항-종양제이고, 상기 대사물 (들)이 영양소, 비타민 (바람직하게는 비타민 B), 유기산의 염 (바람직하게는 포름산, 아세트산 및 락트산의 나트륨 염) 또는 이들의 조합으로 담지된다. 물론, 본 특별한 발명에 사용되는 대사물의 양은 전체 완전 성장 배지의 0% (v/v) 내지 50% (v/v) 범위이다. 이에 따라, 1% (v/v) 내지 50% (v/v) 의 농도를 제공함으로써 상기 항-종양제가 다양한 유형의 암 세포 (예를 들어, 인간 유방암 세포주 MCF-7, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 자궁경부암 세포주 HeLa, 인간 간암 세포주 Hep G2, 인간 백혈병 세포주 HL-60 및 K-562) 에서 생존력을 감소시키는 수단을 제공하는 것으로 일컬어진다. 추가로, 상기 항-종양제는 1% (v/v) 내지 50% (v/v) 의 농도를 가짐으로써 다양한 유형의 인간 암 세포에서 증식을 억제하는 수단을 제공한다. 또한, 본 발명은 암 세포의 아포토시스 유도를 촉진하는 락트산 박테리아 균주를 서술하는데, 여기서 상기 균주는 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 이다. 따라서, 본 발명은 암의 치료 또는 예방을 목적으로 하는 약물의 제조를 개시하는데, 여기서 상기 약물은 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주를 수단으로 제조된다. 사실, 항-종양제는 또한 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 로부터 유도되는 6 가지 유형의 대사물의 조합을 제공한다.

[0009] 그러나, 본 발명의 또다른 국면은 유효량의 하나 이상의 락트산 박테리아 균주 및 약제학적으로 허용되는 비히클을 함유하는 암 치료 또는 예방을 위한 조성물에 관한 것이고, 여기서 균주는 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 이다. 상기 조성물은 박테리옌 및 유기산 (포름산, 아세트산 및 락트산의 나트륨 염 포함) 과

같은 대사물을 포함하고, 추가로 영양소, 비타민 (바람직하게는 비타민 B), 및 유기산의 염 또는 이들의 조합을 포함하는 항-중양제를 포함하는 것으로 일컬어진다. 또한, 상기 조성물은 추가로 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 로부터 유도되는 6 가지 대사물의 조합을 포함한다.

[0010] 추가로, 본 발명은 또한 포유류 (인간) 에서 암세포의 아포토시스를 촉진하는 방법 및 상기 언급된 조성물 투여를 포함하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바람직하게는 포유류에서의 암 예방 또는 치료를 위한 키트를 제공하는데, 여기서 상기 키트는 상기 언급된 조성물을 포함하는 용기를 포함한다. 또한, 본 발명은 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주를 함유하는 항-중양 식품을 개시한다. 또한, 상기 식품은 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주로부터 유도되는 6 가지 대사물의 조합을 포함한다.

[0011] 도면의 간단한 설명

[0012] 본 발명은 오직 설명의 수단으로 제공되어 본 발명을 한정하지는 않는 하기 본원에 제공된 상세한 설명 및 첨부된 도면을 통해 완전히 이해될 것이고, 여기서:

[0013] 도 1 은 MCF-7 세포에 대한 락트산 박테리아의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 항-증식 유효성의 그래프이다. 동일한 열 내의 별표가 있는 실험의 값은 미처리 대조군과 유의하게 상이하다, $P < 0.05$.

[0014] 도 2 는 HT-29 세포에 대한 락트산 박테리아의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 항-증식 유효성의 그래프이다. 동일한 열 내의 별표가 있는 실험의 값은 미처리 대조군과 유의하게 상이하다, $P < 0.05$.

[0015] 도 3 은 MCF-7 세포에 대한 락트산 박테리아 대사물의 아포토시스 유도 그래프이다. 주석: "early apop" 는 초기 아포토시스 세포를 나타내고, "late apop" 는 후기 아포토시스 세포 및 괴사 세포를 나타낸다. T1: 미처리 대조군; T2: 처리군 (±는 표준 오차를 나타냄). 처리군은 미처리 대조군과 비교한다. 공통 윗 첨자의 동일한 열 내의 실험에서의 값들은 유의하게 상이하지 않다, $P > 0.05$.

[0016] 도 4 는 UL4 대사물로 처리된 MCF-7 세포의 형광 현미경사진이다. 패널 A: 24 시간, B: 48 시간 및 C: 72 시간. 락트산 박테리아 대사물에 대한 노출에 후속한 형태적 변화는 아포토시스의 전형이고, 여기서 $\uparrow a$ = 세포 수축, $\uparrow b$ = 막 기포형성, $\uparrow c$ = 아포토시스체 형성, 및 $\uparrow d$, 괴사 세포를 나타냄. (배율: 400×).

[0017] 도 5 는 TUNEL 검정에 의한 아포토시스 세포에서의 DNA 가닥 파손의 검출을 도시하는 2개-파라미터 산포도 (좌측 패널) 및 단일 파라미터 히스토그램 (우측 패널) 의 그래프이다. 패널 A: 72h 미처리 대조군; B: 72h UL4 대사물로 처리됨. 아포토시스 세포 (R4) 는 산포도에서는 매우 높은 빈도의 DNA 가닥 파손 (Y 축의 지수적인 비례에 주목) 을, 히스토그램에서는 M2 게이트를 특징으로 한다.

[0018] 도 6 은 BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit of Thailand 에 기탁된 락토바실러스 플란타룸 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주의 서열 목록이다.

[0019] 발명의 상세한 설명

[0020] 특히, 본 발명은 정상 세포에 대해서는 세포독성 유효성이 없는, 다양한 암 세포에 대한 말레이시아 식품으로부터 단리된 락트산 박테리아 균주, 락토바실러스 속 (*Lactobacillus* sp.) 의 대사물의 세포독성 유효성을 기술한다. 본 발명은 또한 인간 암 세포 상에서의 세포 사멸의 유도에 관한 것이다. 더욱 특별하게는, 본 발명은 대장 및 유방 암 세포의 증식 억제에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 인간 유방 암 세포 상의 아포토시스의 유도에 관한 것이다.

[0021] 본 발명이 락트산 박테리아의 항중양 유효성을 용이하게 측정하는 방법, 상기 방법에 의해 항중양 유효성을 가진 락트산 박테리아를 스크리닝하는 방법, 락트산 박테리아의 항염증 사이토카인 유효성을 용이하게 측정하는 방법 및 상기 방법을 이용해 항염증 사이토카인 억제 유효성을 가진 락트산 박테리아를 스크리닝하는 방법을 제공한다는 것이 증명되었다.

[0022] 상기 해법은 본 발명이 신규한 락토바실러스 속 미생물, 더욱 특별하게는 식품 공급원으로부터 단리된 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주를 포함하는 락토바실러스 플란타룸에 관한 것이라는 사실에 근거한다. 특히, 상기 균주들은 면역 증강, 항암 활성 및 그의 용도를 갖는 것으로 일컬어진다. 암 세포 생존력 감소, 암 세포의 증식 억제 및 인간 암 세포에서의 아포토시스 유도에 의한 그의 탁월한 항암 활성으로 인해, 본 발명의

I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주를 포함하는 락토바실러스 플란타룸은 기능 식품 산업 및 약제학적 제품에서 항암제, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 건강 보조 또는 기능성 식품과 같은 다양한 제품 제조용으로 유효하게 이용될 수 있다.

[0023] 따라서, I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주는 Department of Bioprocess Technology, Universiti Putra Malaysia 로부터 입수할 수 있다. 물론, 상기 균주들은 대사물을 생산할 수 있다. 상기 균주로부터 대사물 수득시, 대사물들은 새로운 범용 병에 이동되고, 대사물의 pH 는 수산화나트륨 (NaOH) 를 이용해 생리적 pH 까지 조정된다. 더욱이, 대사물들은 암 세포 상에 처리하기 전에 0.22 μ m 멤브레인 주사기 필터를 통해 여과시켰다. 이후에, 대사물을 사용할 때까지 4°C 로 유지했다.

[0024] 이론에 구애됨없이, 프로바이오틱 락트산 박테리아로부터 유도된 대사물들은 암 세포 생존력을 현저히 감소시키고, 암 세포의 증식을 억제하고, 인간 암 세포 상에서 아포토시스를 유도할 수 있는 것으로 여겨진다. 더욱 상세한 사항에 대해서는 본원의 실시예 참조하라.

[0025] 발명을 수행하기 위한 최선의 양태

[0026] 본 발명을 추가로 기술하기 전에, 본 발명은 기술되는 특별한 구현예에 의해 한정되지 않으며, 당연히 가변적일 수 있다는 점을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 오직 특별한 구현예의 기술을 목적으로 하는 것이고, 본 발명의 범위는 오직 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정되기 때문에, 제한을 의도로 하는 것이 아님을 이해해야 한다. 일개 범위의 값이 제공되었을 때, 문맥에서 명확하게 달리 기재하지 않으면 해당 범위의 상한 및 하한 사이에서 하한 단위의 십분한 것까지의 각각의 사잇값, 및 상기 언급한 범위 내의 임의의 여타 언급되거나 또는 사이에 있는 값도 본 발명에 속한다는 것을 이해해야 한다. 상기 더 작은 범위의 상한 및 하한은 해당하는 더 작은 범위에 독립적으로 포함되고, 또한 언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 배제되는 한계에 이르기까지 본 발명, 대상에 포함된다. 언급된 범위가 상한 및 하한의 한쪽 또는 양쪽을 포함할 때, 한계값을 포함해 그의 한쪽 또는 양쪽을 배제한 범위도 또한 본 발명에 포함된다.

[0027] 달리 정의되지 않으면, 본원에 사용된 모든 과학기술용어들은 본 발명이 속한 업계의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 또는 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수도 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 이제 기술된다. 본원에 언급된 모든 공개문헌들은 해당 공개문헌이 인용된 것과 연관된 방법 및/또는 재료의 개시 및 기술을 위해 본원에 참고문헌으로 포함된다. 본 명세서 및 첨부한 특허청구범위에서 사용된 대표 단수는 문맥상 명확하게 달리 언급하지 않는 한 복수 대상도 포함한다는 점에 유의해야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 실시예

[0029] 하기의 실시예는 본 발명의 사용 범위를 해설하려고 제공되고, 그의 범위를 한정하지 않는다. 개질 및 변경은 본 발명의 진의 또는 범위를 벗어나지 않고 행해질 수 있다. 본 발명의 시험 또는 실시를 위해 본 출원인이 발견한 것 이외의 방법 또는 동등한 제품을 이용할 수도 있지만, 재료 및 바람직한 방법이 기재된다. 본 발명의 문맥에서, 락트산 박테리아가 암의 아포토시스를 돕는 방법을 결정하기 위해, 인간 유방암 세포주 MCF-7, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 자궁경부암 세포주 HeLa, 인간 간암 세포주 Hep G2, 인간 백혈병 세포주 HL-60 및 K-562 상에서 시도가 실시되었다. 사용된 락트산 박테리아는 I-UL4, TL1, RS5, RG14, RG11 및 RI11 균주를 포함하는 락토바실러스 플란타룸으로 구성된다. 추가적으로, 상기 균주들은 항-종양제 또는 세포독성제로 작용하는 대사물을 생산한다. 물론, 본 발명에서 항-종양제 또는 세포독성제는 박테리옌, 영양소, 비타민, 유기산의 염에 의해 담지된다.

[0030] 대사물의 제조

[0031] i) 락토바실러스 속의 대사물은 새로운 범용 병에 옮기고, 대사물의 pH 는 NaOH 를 이용해 생리적 pH (7.2 내지 7.4) 로 조정했다. 대사물은 암 세포주 및 정상 세포주에 처리하기 전에 0.22 μ m 멤브레인 주사기 필터 (Milipore, USA) 를 통해 여과했다.

[0032] 세포주의 수득

[0033] i) 기관 The Animal Tissue Culture Laboratory of Universiti Putra Malaysia 에서 인간 유방암 세포주 MCF-7, 인간 대장암 세포주 HT-29, 인간 자궁경부암 세포주 HeLa, 인간 간암 세포주 Hep G2, 인간 백혈병 세포주

HL-60 및 K-562 를 제공했다. 정상 샘 상피의 모델로 사용된 비-악성 정상 샘 상피 세포 MCF-10A 는 American Type Culture Collection (ATCC) 로부터 입수했다. 모든 암 및 정상 세포주는 10% (v/v) 열-불활성화 우태아 혈청 및 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신으로 보충한 ATCC 권장 배지에서 유지했고, 37°C, 5% CO₂ 분위기에서 인큐베이션했다.

[0034] ii) 모든 동물 실험은 기관 Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Universiti Putra Malaysia 의 가이드라인에 따라 실시했다. 7 내지 8 주령의 수컷 ICR 마우스를 경추탈구로 희생시켰다. 절개 후 수득된 비장 및 흉선을 빙냉 PBS 로 2 내지 3 회 헹구고, PBS 에 담긴 와이어 메쉬 상에서 잘게 다졌다. 세포 현탁액은 와이어 메쉬를 이용해 여과해 임의의 세포 덩어리를 제거했다. 수득한 세포는 빙냉 PBS 로 2 내지 3 회 세척하고, 원심분리했다 (300×g 로 5 분간).

[0035] ii) 기관 Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Universiti Putra Malaysia 의 가이드라인 및 승인 하에, 건강한 인간 지원자 (25 내지 30 세) 로부터 약 10 ml 의 혈액을 무균적으로 뽑아 (정맥 천자), 보존용의 프리 헤파린 튜브에 옮겼다. 응고방지된 혈액을 동일한 부피의 pH 7.5 포스페이트 완충 식염수 (PBS) 로 희석하고, Ficoll-Paque Plus 상에 서서히 층을 이루게 했다. 혼합물을 400×g 로 40 분간 18 내지 20°C 에서 스윙 버킷 로터 (swinging bucket rotor) 에서 원심분리했다. 말초혈 단핵구 세포 (PBMC) 를 Ficoll-혈장 접면으로부터 수집하고, PBS 로 2 회 세척했다. 마우스 비장세포, 흉선세포 및 인간 PBMC 의 세포 펠렛을 밀도 5 × 10⁵ 세포/ml 로 완전 성장 배지에 재현탁시켰다.

[0036] **암세포의 생존력, 증식 및 아포토시스 유도 측정**

[0037] i) 세포 생존력에 대한 지역에서 단리한 락토바실러스 속의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 유효성을 Mosmann (1983) 에 따른 MTT 검정을 이용해 평가했다. 세포를 평판 96-웰 플레이트에 밀도 1×10⁴ 세포/웰로 24 h 동안, 처리 전에 [대조군 세포, 대사물은 0% (v/v)] 또는 대사물 농축물을 2-배씩 희석한 것의 존재 하에 [50 % (v/v) 내지 0.5 % (v/v)] 플레이팅했다. 인큐베이션 각각 24 h, 48 h 및 72 h 후, 20 μl 의 MTT 용액 (PBS 중 5 mg/ml) 을 각 웰에 첨가하고, 암실에서 4 h 동안 37°C 및 5% CO₂ 분위기 조건 하에 인큐베이션했다. 결과로서 수득한 포르마잔 결정을 100 μl 의 DMSO 에 용해시켰다. 기준 파장을 630 nm 로 한 570 nm 에서의 흡광도 (A) 는 μ Quanl ELIZA 검독기 (Biotek EL340, USA) 를 이용해 기록했다. 세포 생존력의 백분율을 (A_{시료-A블랭크})/(A_{대조군-A블랭크})×100% 로 산출했다. 모든 실험은 각 실험마다 3 개씩의 시료를 이용해 3 회 독립적인 실험에서 수행했고, 50% 저해 농도 (IC₅₀) 값을 결정했다.

[0038] 표 1. 72h 의 인큐베이션 후 다양한 암 세포주 및 정상 세포 상에서 50% 억제 ((IC₅₀ 값) 를 보이는 락토바실러스 속의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 농도.

락토바실러스 속으로부터 유도된 대사물의 IC ₅₀ 값						
세포의 유형	UL4	TL1	RS5	RG14	RG11	RI11
암 세포주						
MCF-7 세포	10	13	21	20	16	16
HeLa	20	18	24	20	N.D.	18
Hep G2	22	22	27	22	N.D.	N.D.
HT-29	N.D.	N.D.	28	22	N.D.	N.D.
K-562	10	5	5	5	5	5
HL-60	5	5	9	10	1	1
정상 세포						
MCF-10A	26	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
인간 PBMC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
마우스 비장세포	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
마우스 흉선세포	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

주석: IC₅₀ 값, 처리된 세포의 세포 생존력의 50% 억제를 유발하는 대사물의 % (v/v). N.D., 50% (v/v) 의 농도까지는 IC₅₀ 값이 검출되지 않음.

[0039]

[0040]

iii) 세포를 96-웰 플레이트에 5×10^3 세포/웰로 시딩했다. 배지를 24h 후 흡출시키고, 각각 24 h, 48 h 및 72 h 동안 연구하기 위한 시험 추출물을 포함하는 새로운 배지로 교체했다. 추가의 과정은 제조사의 프로토콜에 따라 실시되었다. 방사활성 [³H] 티미딘 혼입 검정에 대한 대안으로서의 BrdU ELISA 시스템을 이용해, 후속하여 세포를 BrdU 와 함께 10 μM 의 최종 농도까지 2 내지 24 h 동안 다시 인큐베이션했다. 배지를 각 웰로부터 흡출시켰다. 세포가 고정되고, 투과가능하게 되고 DNA 변성되는 고정/변성 용액을 첨가하여 혼입된 BrdU 에 항체가 결합하도록 했다. 항-BrdU 항체를 각 웰에 첨가하고, 1 h 동안 인큐베이션하여 혼입된 BrdU 에 결합하게 했다. 결합되지 않은 항체를 이어서 세척해 버리고, 검출기 항체에 결합하는 고추냉이 퍼옥시다아제-컨쥬게이션된 염소 항-마우스를 첨가했다. 정지 용액을 각 웰에 첨가한 후, 착색된 반응 생성물을 분광계 (Biotek EL340, USA) 를 이용해 450 nm (기준 파장 540 nm) 에서 각 웰의 흡광도를 측정해 정량했다.

[0041]

iv) 아포토시스 세포의 지표들 중 하나가 포스파티딜세린 (PS) 의 외재화이다. 원칙적으로, 아넥신 V 는 세포 표면 포스파티딜세린을 검출하는 반면, PI 는 면역기능이 제대로 발휘되지 못하는 세포막이 있는 세포 DNA 를 염색한다. 이는 초기 아포토시스 세포 (아넥신 V⁺/PI⁻) 및 후기 아포토시스 및 괴사 세포 (아넥신 V⁺/PI⁺) 로부터 살아있는 세포 (아넥신 V⁻/PI⁻) 를 구분할 수 있게 해 준다. 본 연구에서, 세포 사멸의 방식은 BD Biosciences Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit MCF-7 를 이용해 시험했고, 세포를 2.5×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 조직 배양 플레이트에 시딩하여, 밤새 부착되도록 하고, 후속하여 24, 48 및 72 h 동안 처리했다. 처리 종결시, 탈착되고 트립신처리된 세포를 펠렛으로 가라앉히고, 결합 완충액에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 아넥신 V-FITC 및 PI 를 이용해 15 분간 암실에서 염색하고, 최종 부피 500 μl 까지 결합 완충액을 이용해 희석하고, 유세포 분석을 후속했다. 시료 당 총 10,000 회의 이벤트가 필요했다 (Vermes et al, 1995). FACS-Calibur 유세포분석기 (BD Biosciences, USA) 상에서 데이터 획득 및 분석을 수행했다. 결과는 최소 3 회의 독립적 실험에서의 평균 ± SEM 로 나타낸다.

[0042]

v) MCF-7 세포를 6-웰 플레이트에서 UL4 대사물로 처리하고, 5% CO₂ 분위기 조건에서 37°C 로 24, 48 및 72 시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 각각 24, 48 및 72 시간 후, 배지 중 탈착된 세포를 수집하고, 다시 트립신처리된 부착 세포에 넣었다. 세포를 PBS 로 세척한 후, 10 μl 의 AO (100 μg/mL) 및 PI (100 μg/mL) 를 이용해 1:1 의 비율로 1 mL 세포 중에 인큐베이션하고, 200×g 에서 5 분간 원심분리했다. 상청액을 흡출시키

고, 50 μ l 의 잔여 상청액을 남겼다. 펠렛을 재현탁시키고, 10 μ l 의 세포 현탁액을 슬라이드 상에 적하하고, 커버 슬립으로 덮었다. 30 분 이내에, 슬라이드를 450-490 nm 의 여기 필터 및 배리어 필터 및 520 nm 의 롱패스 필터가 있는 형광 현미경 (Nikon FC-35DX, 일본) 에서 관찰했다. 살아있는 세포 (녹색의 온전한 세포), 아포토시스 세포 (응축되거나 또는 분절화된 핵이 있는 녹색의 찌그러진 세포), 및 후기 아포토시스 괴사 세포 (적색 세포) 의 백분율을 통계적으로 유의한 데이터에 대해 200 개를 초과하는 세포로부터 결정했다.

[0043] 24, 48 및 72 시간의 인큐베이션 기간 후 UL4 대사물로 처리한 세포를 수합했다. 탈착되고 트립신처리된 세포를 펠렛화시키고, 빙냉 80% 에탄올을 한방울씩 떨어뜨려 고정시키고, 분석할 때까지 (최소 2 시간) 4°C 에서 인큐베이션했다. 이어서, 세포를 다시 펠렛으로 만들고, PBS-BSA-Az-EDTA 완충액을 이용해 2 회 세척했다. 세포를 펄스-와류시켜 DNA 절편을 용출시켰다. DNA 분석을 위해, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 50 μ g/mL RNase A 및 2 μ g/mL PI 로 이루어진 PBS 완충액으로 세포를 염색했다. 상기 프로세스를 암실에서 실시했는데, 이는 PI 가 빛에 민감하기 때문이다. 세포를 30 분간 4°C 에서 인큐베이션하고, 이어서 기관 Animal Tissue Culture Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia 에 있는 FACS-Calibur 유세포분석기 (BD Biosciences, USA) 를 이용해 24 이내에 검독했다. 시료 당 일만 회 이벤트가 필요했다. 산출 전까지 DNA 도트 플롯에서 이중항 및 세포 찌꺼기는 제외했다. 세포 주기 분포는 CELLQuest Pro software (BD Biosciences, USA) 를 이용해 산출했다. 각 실험에 대해 3 개씩의 시료를 이용해 최소 3 회 실험을 반복했다.

[0044] 표 2. MCF-7 의 세포 주기 단계 분포에 대한 UL4 대사물의 유효성

	미처리 대조군 (%)	UL4 대사물 (%)
24 시간		
Sub- G₀/G₁	0.5 ± 0.3	1.7 ± 1.6
G₀/G₁	59.1 ± 3.1	64.5 ± 6.7
S	21.4 ± 4.2	16.4 ± 3.6
M	19.3 ± 1.6	17.6 ± 3.3
48 시간		
Sub- G₀/G₁	0.5 ± 0.2	14.3* ± 5.6
G₀/G₁	80.1 ± 6.2	62.7 ± 2.1
S	9.4 ± 3.7	13.7 ± 2.7
M	10.1 ± 2.6	9.7 ± 1.1

[0045]

72 시간

Sub- G₀/G₁	0.5 ± 0.1	9.5* ± 4.7
G₀/G₁	89.9 ± 1.4	70.2 ± 3.4
S	3.3 ± 0.4	9.9 ± 1.1
M	6.2 ± 1.5	10.1 ± 1.2

주: 상기 제시된 데이터 및 바아는 세포의 핵분율의 평균을 나타낸다. 오차 바아는 SEM 를 나타낸다. 동일한 열에 있는 별표가 있는 실험에서의 값은 유의하게 상이하다(P>0.05)

[0046]

[0047]

(vi) DNA 표지는 BD Biosciences APO-DIRECT Kit 를 이용해 실시했다. 세포를 6-웰 조직 배양 플레이트에 웰 당 2×10^5 세포로 시딩했다. 24 시간 후, 배지를 원하는 농도로 연구할 시험 추출물을 포함하는 신선한 배지로 교체했다. 추가의 과정은 제조사의 지시사항에 따라 수행했다. 인큐베이션 후, 떨어져 나온 트립신처리된 세포를 펠렛으로 만들고, PBS 중 1% (w/v) 파라포름알데히드 (pH 7.4) 에 농도 1 내지 2×10^6 세포/mL 로 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음에 30 내지 60 분간 위치시켰다. 이어서, 고정된 세포를 $300 \times g$ 로 5 분간 원심분리하여 수집하고, 상청액을 제거했다. 세포 펠렛을 5 mL 의 PBS 로 2 회 세척하고, 가볍게 와류시켜 튜브에 남은 PBS 중에 재현탁시켰다. 후속하여, 세포를 70% (v/v) 빙냉 에탄올에 재현탁시키고, 최소 30 분간 얼음에 둔 후, $-20^\circ C$ 에 저장했다. 적당한 저장 시간 (1 내지 7 일) 후, 세포 현탁액을 $300 \times g$ 에서 5 분간 원심분리하고, 70% v/v 에탄올을 흡출시켰다. 세포를 1 mL 의 세척 완충액으로 2 회 세척하고, 세포 펠렛을 50 μl 의 DNA 표지 용액에 재현탁시켰다.

[0048]

60 분 인큐베이션 후, 세포를 1 mL 의 헹굼 완충액으로 2 회 헹구어내고, $300 \times g$ 에서 5 분간 원심분리하여 펠렛화시켰다. 세포 펠렛을 0.5 mL 의 PI/RNase 염색 완충액으로 염색했다. 세포를 어두운 곳에서 30 분간 RT 로 인큐베이션하고, CELLQuest Pro 소프트웨어를 이용하는 FACS-Calibur 유세포분석기에 의해 3 시간 내에 분석했다. 세포 이중항 (cell doublets) 으로는 시료 당 일만 회의 이벤트가 필요했고, 잔해는 산출 전에 DNA 도트 곡선에서 제외했다.

[0049]

결과는 평균 \pm S.E 로 나타냈고, 일반 선형 모형으로 분석했다. 통계적 분석은 Minitab Statistical Software 를 이용해 유의차 P<0.05 로 실시했다.

수탁번호

[0050]

기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36838

수탁일자 : 20090302

기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36839

수탁일자 : 20090302

기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36840

수탁일자 : 20090302

기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36841

수탁일자 : 20090302

기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36842

수탁일자 : 20090302

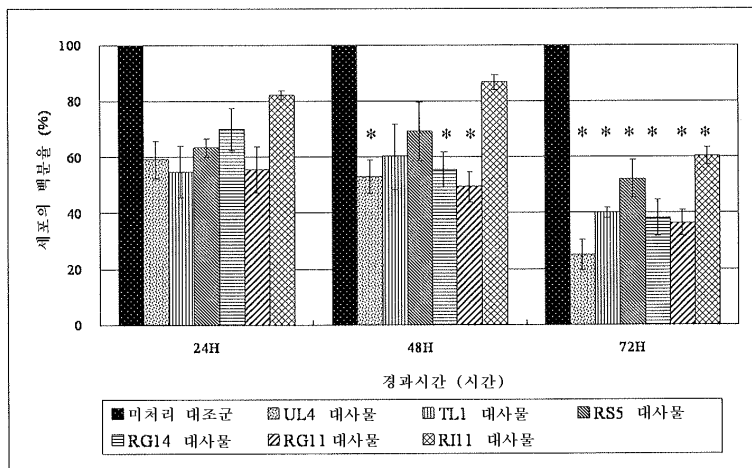
기탁기관명 : BIOTEC Culture Collection

수탁번호 : BCC36843

수탁일자 : 20090302

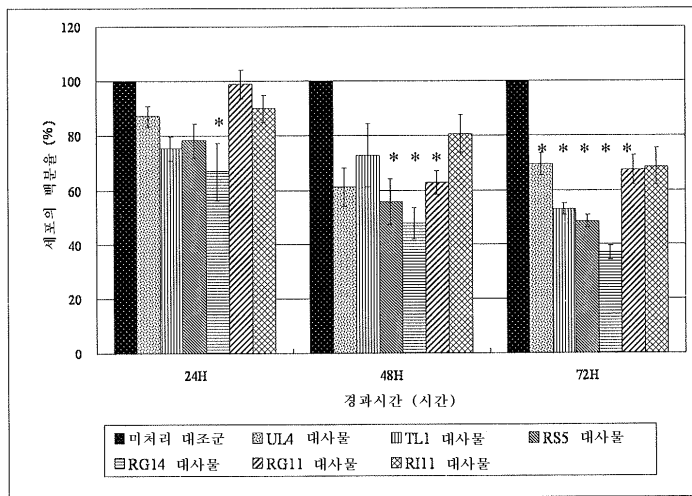
도면

도면1



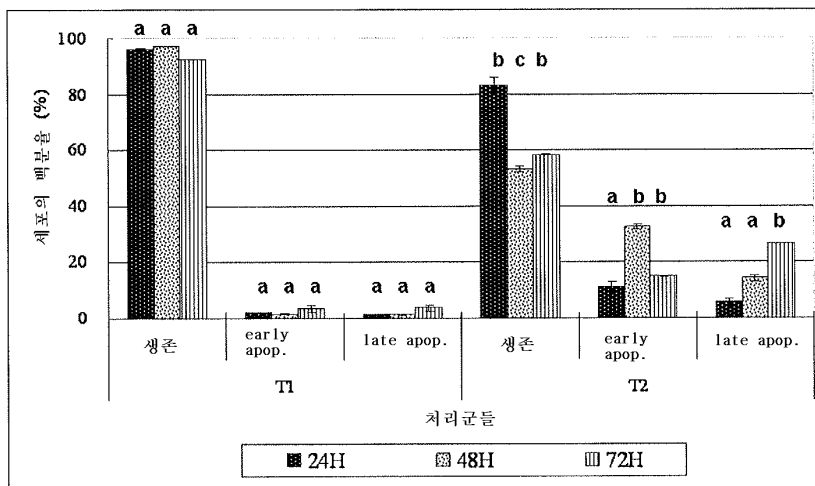
도 1: MCF-7 세포에 대한 락트산 박테리아의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 항-증식 효과.

도면2



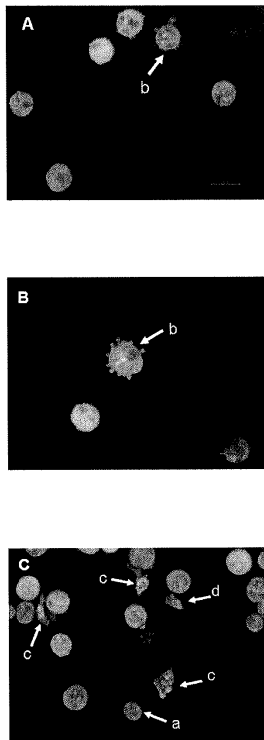
도 2: HT-29 세포에 대한 락트산 박테리아의 6 가지 균주로부터 유도된 대사물의 항-증식 효과.

도면3



도 3: MCF-7 세포 상에서의 락트산 박테리아 대사물의 아폽토시스 유도.

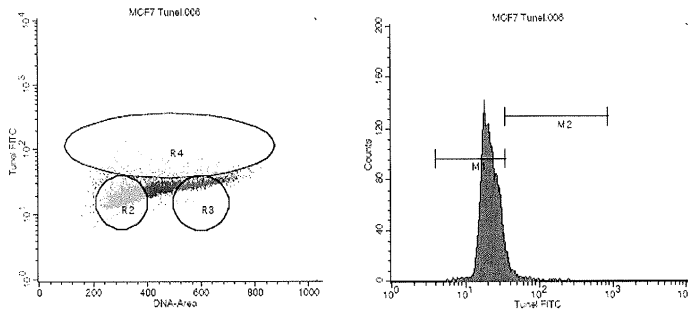
도면4



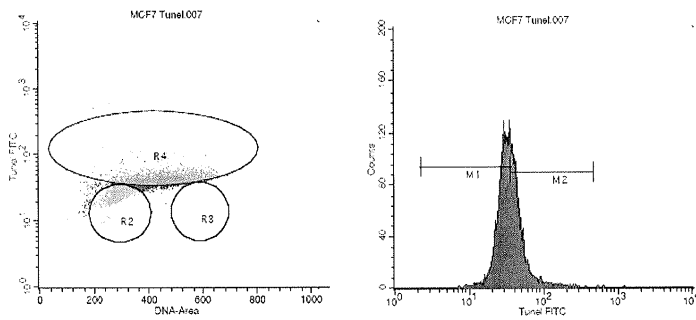
도 4: UL4 대사물로 처리된 MCF-7 세포의 형광 전자현미경사진. 패널 A: 24 시간, B: 48 시간 및 C: 72 시간. LAB 대사물에 대한 노출에 후속한 형태적 변화는 아포토시스의 전형이고, 여기서 ↑a = 세포 수축, ↑b = 막 기포형성, ↑c = 아포토시스체 형성, 및 ↑d, 피사 세포를 나타냄. (배율: 400 ×).

도면5

A



B



도 5: 2개-파라미터 산포도 (좌측 패널) 및 단일 파라미터 히스토그램 (우측 패널) 이 TUNEL 검정에 의한 아포토시스 세포에서의 DNA 가닥 파손의 검출을 도시함. 패널 A: 72h 미처리 대조군; B: 72h UL4 대사물로 처리됨. 아포토시스 세포 (R4) 는 산포도에서는 매우 높은 빈도의 DNA 가닥 파손 (Y 축의 지수적인 비례에 주목) 을, 히스토그램에서는 M2 게이트를 특징으로 함.

도면6a

도 6: 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 의 서열 목록

락토바실러스 플란타럼 균주 **RG14**

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtgga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaactgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaacctc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtgagaagaaggtt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt gtccggatt tattggcgt aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttaagtctg at 562

도면6b

락토바실러스 플란타럼 균주 **RI-11**

acgaactctg tattgattgg tgcttgcac atgatttaca tttgagtgag tggcgaactg 60
 gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccaaga gcgggggata acacctggaa acagatgcta 120
 ataccgcata acaactgga ccgcatggtc cgagcttga agatggcttc ggctatcact 180
 tttgatggt cccgcggcgt attagctaga tgggtgggta acggctcacc atggcaatga 240
 tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc 300
 tacgggaggc agcagtaggg aatctccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg 360
 cgtgagtgaa gaagggttc ggctcgtaaa actctgtgt taaagaaga catatctgag 420
 agtaactgtt caggtattga cggatttaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480
 agcccggtga atacgtagg tggcaagcgt gtccggatt attggcgta aagcgagcgc 540
 aggcggttt ttaagtctga t 561

도면6c

락토바실러스 플란타럼 균주 **RS5**

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac attgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacac gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcgt aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttaagtctg at 562

도면6d

락토바실러스 플란타럼 균주 **RG11**

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac attgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacac gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcgt aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttaagtctg at 562

도면6e

락토바실러스 플라타렘 균주 UL4

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
 gagnaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggat ttattggccg taaagcgagc 540
 gcaggcggtt ttttaagtct gat 563

도면6f

락토바실러스 플라타렘 균주 TL1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tcccgcggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420
 gagnaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggat ttattggcgt aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttttaagtctg at 562

서열목록

- <110> UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA
- <120> TUMOUR CYTOTOXIC AGENT AND METHODS THEREOF
- <130> SK/PCT0028/UPM/10
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 562
- <212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(562)
 <223> Lactobacillus plantarum strain RG14
 <400> 1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cgctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggg aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgcctggatt tattgggcgt aaagcgagcg 540
 cagccgggtt ttaagtctg at 562

<210> 2
 <211> 561
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(561)
 <223> Lactobacillus plantarum strain RI-11
 <400> 2

acgaactctg tattgattgg tgcttgcac atgatttaca tttgagtgag tggcgaactg 60
 gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata acacctgga aacagatgcta 120
 ataccgata acaacttggc ccgcatggc cgagcttga agatggcttc ggctatcact 180
 tttgatggc cccgcggcgt attagctaga tggggggta acggctcacc atggcaatga 240
 tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc 300

tacgggagc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatg agcaacgccg 360
 cgtgagtga gaagggttc ggctcgtaaa actctgttgt taaagaaga catatctgag 420
 agtaactgtt caggtattga cggtatata ccagaaagc acggctaact acgtgccagc 480
 agcccggtt atacgtagg ggcaagcgtt gtcctggatt attgggcgt aagcgagcgc 540

aggcggtttt ttaagtctga t 561

<210> 3

<211> 562

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(562)

<223> Lactobacillus plantarum strain RS5

<400> 3

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggtatcac 180

ttttgatgg tcccggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360

gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgtt ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccgatt tattggcgt aaagcgagcg 540

caggcggttt ttaagtctg at 562

<210> 4

<211> 562

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(562)

<223> Lactobacillus plantarum strain RG11

<400> 4

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggtatcac 180

ttttgatgg tcccggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggctg aaagcgagcg 540
 caggcggttt ttaagtctg at 562

<210> 5
 <211> 563
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(563)
 <223> Lactobacillus plantarum strain UL4
 <400> 5

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagaaggctt cggctatcac 180

ttttgatgg tcccgccggc tattagctag atggtaggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggat ttattggccg taaagcgagc 540
 gcaggcggtt ttttaagtct gat 562

<210> 6
 <211> 562
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(562)
 <223> Lactobacillus plantarum strain TL1
 <400> 6

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct	120
aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac	180
ttttggatgg tcccggcg tattagctag atggtgggt aacggctcac catggcaatg	240
atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc	300
ctacgggagg cagcagtagg gaatctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc	360
gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga	420
gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag	480
cagcccggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccgatt tattggcgt aaagcgagcg	540
caggcggttt ttaaagtctg at	562