



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0058247
(43) 공개일자 2020년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0143022

(22) 출원일자 2018년11월19일

심사청구일자 2018년11월19일

(71) 출원인

주식회사 엠디헬스케어

서울특별시 마포구 월드컵북로56길 9, 1303호(상암동, 우리기술빌딩)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김윤근

경기도 파주시 한빛로 70, 521동 203호 (야당동, 한빛마을 5단지 캐슬앤칸타빌)

문병인

서울특별시 양천구 안양천로 1071, 이대목동병원 유방갑상선암센터(목동)

안정진

서울특별시 양천구 안양천로 1071, 이대목동병원 유방갑상선암센터(목동)

(74) 대리인

이명진

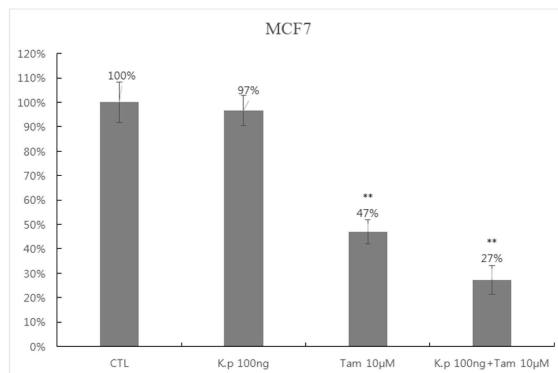
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 항암제 감수성 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 클랩시엘라 뉴모니아 유래 세포 및/또는 황색포도상구균 유래 세포를 유효 성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 세포의 항암제 감수성 증진 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 항암제의 감수성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 항암제에 대한 치료 효과를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항암제는 타목시펜, 토레미펜, 풀베스트란트, 디인돌리메탄, 엑스메스탄, 탈록시펜, 아로마타제 억제제(aromatase inhibitor), 시스플라틴, 독소루비신, 옥살리플라틴, 빈크리스틴, 젬시타빈, 5-FU, 안트라사이클린, 타산, 이리노테칸, 파클리탁셀, 에리블린, 및 도세탁셀로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 소포는 평균 직경이 10 내지 300 nm인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분리되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균의 배양액, 또는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균을 포함하는 식품에서 분리되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 항암제의 보조제.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 보조제는 항암제에 대한 치료 효과를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 보조제.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 항암제는 타목시펜, 토레미펜, 풀베스트란트, 디인돌리메탄, 엑스메스탄, 탈록시펜, 아로마타제 억제제(aromatase inhibitor), 시스플라틴, 독소루비신, 옥살리플라틴, 빈크리스틴, 젬시타빈, 5-FU, 안트라사이클린,

탁산, 이리노테칸, 파클리탁셀, 에리블린, 및 도세탁셀로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 보조제.

청구항 10

항암제, 및 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 조성물은 항암제에 대한 감수성을 증가시켜 치료 효과를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 소포는 평균 직경이 10 내지 300 nm인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분비되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 전립선암, 두경부암, 방광암, 결장암, 췌장암, 신장암, 골수암, 난소암, 자궁암, 멜라닌종, 뇌암 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 15

제 10 항에 있어서,

상기 항암제는 타목시펜, 토레미펜, 풀베스트란트, 디인돌리메탄, 엑스메스탄, 탈록시펜, 아로마타제 억제제(aromatase inhibitor), 시스플라틴, 독소루비신, 옥살리플라틴, 빈크리스틴, 젬시타빈, 5-FU, 안트라사이클린, 탁산, 이리노테칸, 파클리탁셀, 에리블린, 및 도세탁셀로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항암제 감수성 증진용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 클렙시엘라균 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 항암제 감수성 증진용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

약학 분야의 눈부신 발달로 여러 종류의 고성능 신약들이 활발히 개발되고 있으나, 여전히 세계적으로 암 발병 환자의 수는 해마다 증가되고 있는 추세이며, 국내에서도 2002 년도 한 해에만 그 수가 10 만 명에 이르고 있다. 그 중 유방암, 위암, 대장암, 난소암, 간암, 전립선암, 췌장암 및 폐암은 전 세계적으로 가장 높은 발병률을 보이고 있으며, 최근에는 지속적인 항암화학요법으로 인하여, 화학요법에 대한 내성을 가지는 암의 발병률 또는 재발률이 현저히 증가되고 있는 추세이다. 이로 인하여, 새로운 기작을 가지는 항암제에 대한 개발이 활발히 이루어지고 있으나, 실질적으로 사용될 수 있는 항암제의 종류는 극히 제한적이며, 이를 개발하기 위해서는 장기간의 연구가 요구되기 때문에 이로 인하여 신규 약물의 개발은 용이하지 아니하며, 따라서 일반적으로 약물의 치료 효율을 높이기 위하여 고농도의 약물 투여가 요구되며, 이로 인하여 심각한 부작용들이 발생하고 있는

실정이다.

- [0003] 상기로부터, 기존에 사용되고 있는 약물 치료에 대한 감수성을 증가시켜 치료 효율을 높이는 동시에 안정성을 가지는 약물이 개발된다면 다양한 암의 치료 효과를 높여 암의 재발, 전이, 내성 등을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 국내공개특허 10-2013-0086435

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 기존에 사용되고 있는 항암제에 대한 감수성을 증가시키는 클렙시엘라균 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 항암제에 대한 감수성 증진용 조성물, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

- [0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 및/또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 항암제의 감수성 증진용 조성물을 제공한다.

- [0008] 또한, 본 발명은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 및/또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 항암제의 보조제를 제공한다.

- [0009] 또한, 본 발명은 항암제와, 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 및/또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0010] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 병용 투여함으로써 항암제의 단독 투여보다 치료 효과를 향상시키는 것을 특징으로 한다.

- [0011] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 항암제는 바람직하게는 타목시펜, 토레미펜, 폴베스트란트, 디인돌리메탄, 엑스메스탄, 팔록시펜, 아로마타제 억제제(aromatase inhibitor), 시스플라틴, 독소루비신, 옥살리플라틴, 빈크리스틴, 젠티타민, 5-FU, 안트라사이클린, 탁산, 이리노테칸, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에리블린 등이나, 본 발명의 클렙시엘라 유래 소포에 의하여 치료 효과가 증가될 수 있는 항암제라면 이에 제한되지 않는다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 소포는 바람직하게는 평균 직경이 10 내지 300 nm일 수 있으나, 클렙시엘라 뉴모니아 유래 소포 또는 황색포도상구균 유래 소포라면 제한이 없다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분비되는 것일 수 있으나, 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균으로부터 분비 또는 분리된 것이라면 제한이 없다.

- [0014] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 및/또는 황색포도상구균의 배양액, 또는 클렙시엘라 뉴모니아 및/또는 황색포도상구균을 포함하는 식품, 또는 클렙시엘라 뉴모니아 및/또는 황색포도상구균을 가열 또는 초음파 등으로 사멸시킨 후에 획득된 상층액에서 분리될 수 있으며, 자연적으로 또는 인공적으로 분비된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0015] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 전립선암, 두경부암, 방광암, 결장암, 췌장암, 신장암, 골수암, 난소암, 자궁암, 멜라닌종, 뇌암, 갑상선암 등이나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 또한 본 발명은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 및/또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포와 항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 유래 소포 및/또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포와 항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 클렙시엘라 뉴모니아 유래 소포 또는 황색포도상구균 유래 소포는 단독으로 또는 혼합하여 사용할 경우 기존에 사용되고 있는 항암제에 대한 감수성을 효과적으로 증가시킬 수 있기 때문에, 다양한 암의 치료에 있어서 부작용들을 최소화하며 치료 효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 지속적인 항암화학요법으로 인한 내성 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포를 투과전자현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포의 암 세포 사멸 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포가 암 세포의 세포 주기에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포의 항암제의 감수성 향상 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포의 항암제 감수성 증진 효과 기작을 실시간 중합효소연쇄반응으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 클렙시엘라 유래 소포의 항암제 감수성 증진 효과 기작을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 황색포도상구균 유래 소포를 투과전자현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 황색포도상구균 유래 소포의 항암제의 감수성 향상 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 황색포도상구균 유래 소포의 항암제의 감수성 향상 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 황색포도상구균 유래 소포의 항암제 감수성 증진 효과 기작을 실시간 중합효소연쇄반응으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 황색포도상구균 유래 소포의 항암제 감수성 증진 효과 기작을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명에서는 클렙시엘라 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포는 암 세포의 생존과 관련된 신호 전달 기작을 억제하며 항암제에 대한 감수성을 증가시켜 기존의 항암제에 대한 치료 효과를 향상시키는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 클렙시엘라 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포는 항암제와의 병용 투여를 통한 암 치료 효과를 효과적으로 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0021] 본 명세서에 있어서, “소포(extracellular vesicle)”란 다양한 세균에서 분비되는 나노 크기의 막으로 된 구조물을 의미하며, 본 발명에서는 클렙시엘라 뉴모니아 또는 황색포도상구균으로부터 자연적으로 분비되거나, 인공적으로 생산된 막으로 된 모든 구조물을 총칭한다. 상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 및/또는 황색포도상구균

의 배양액 또는 클렙시엘라 뉴모니아 및/또는 황색포도상구균을 포함하는 식품에서 분리될 수 있으며, 자연적으로 또는 인공적으로 분비된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 소포는 클렙시엘라 뉴모니아 균체 및/또는 황색포도상구균 균체를 포함하는 배양액을 원심분리, 초고속 원심분리, 고압처리, 압출, 초음파분해, 세포용해, 균질화, 냉동-해동, 전기천공, 기계적 분해, 화학물질 처리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 및 모세관 전기영동으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 사용하여 분리할 수 있다. 또한, 불순물의 제거를 위한 세척, 수득된 소포의 농축 등의 과정을 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 본 명세서에 있어서, “감수성(sensitivity)”이란 항암제의 치료 효과를 개선 및/또는 향상시키는 것을 의미한다.

[0023] 본 명세서에 있어서, “보조제(adjutant)”란 주 약물, 즉, 항암제의 약효를 보조하여 치료 효과를 개선 및/또는 향상시키거나, 주 약물의 유해한 작용을 막거나 완화하는 목적으로 사용되는 보조 약물을 의미하며, 본 발명의 보조제는 클렙시엘라 뉴모니아 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포를 유효성분으로 포함하고 있다면 제한이 없다.

[0024] 본 명세서에 있어서, “예방(prevention)”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암 등의 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 본 명세서에 있어서, “치료(treatment)”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암 등의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 명세서에 있어서, “개선(improvement)”이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0028] 본 명세서에 있어서, “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0029] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면

으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[0033] 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.

[0035] [실시예]

[0036] **실시예 1: 클렙시엘라균 유래 소포의 분리**

[0037] 클렙시엘라균(*Klebsiella pneumonia*) 유래 소포(extracellular vesicle; EV)를 분리하기 위하여, 클렙시엘라균을 LB(Luria-Bertani) 배지에 접종하고 37 °C에서 200 rpm으로 24 시간 동안 배양하였다. 그리고 공극 크기가 0.45 μm인 Bottle Top Vacuum Filter(Corning)를 이용하여 세포가 제거된 상층액을 획득하였다. 획득된 상층액은 다시 0.22 μm Bottle Top Vacuum Filter(Corning)를 통과시켜 상층액에 남아있는 세포의 잔여물은 제거하고, 클렙시엘라균의 소포를 분리하였다. 분리된 소포는 JEM1011 투과전자현미경(TEM, JEOL)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0038] 도 1에 나타난 바와 같이, 클렙시엘라균의 배양액으로부터 분리된 소포의 평균 직경은 30 nm이며, 정상적으로 소포가 분리되었다는 것을 확인하였다.

[0040] **실시예 2: 클렙시엘라균 유래 소포의 항암제에 대한 감수성 증가 효과 확인**

[0041] **2.1. 클렙시엘라균 유래 소포의 항암 효과 여부 확인**

[0042] 클렙시엘라균 유래 소포의 항암 효과를 확인하기 위하여, 에스트로젠 수용체 양성 유방암 세포주(estrogen receptor positive breast cancer cell line)인 MCF7 세포를 5×10^5 세포가 되도록 10 % 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 첨가된 DMEM에 접종하고, 37 °C에서 24 시간 동안 배양한 후에, 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)으로 2 회 세척한 후에, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 클렙시엘라균의 소포가 10 ng/mL, 100 ng/mL, 및 1 μg/mL이 첨가된 새로운 배지로 교체 후 72 시간 동안 배양하였다. 대조군(CTL)으로는 증류수를 첨가하고 배양하였다. 그리고 트립판 블루 염색법으로 세포를 염색한 후에, Neubauer chamber를 이용하여 살아있는 세포의 수를 측정하고, 대조군의 살아있는 세포 수에 대한 백분율로서 상대 세포 생존율(relative cell survival)을 계산하였다. 통계적 유의성은 student's t-test로 검증하였으며, P 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0043] 도 2에 나타난 바와 같이, 클렙시엘라균의 소포는 유방암 세포주에서 생존율에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0045] **2.2. 클렙시엘라균 유래 소포의 세포 주기에 미치는 영향 확인**

[0046] 클렙시엘라균 유래 소포가 세포 주기(cell cycle) 및 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시예 2.1과 동일한 방법으로 MCF7 세포에 클렙시엘라균 유래 소포를 투여하고 배양한 후에 100 μg/mL의 RNase A(Sigma-Aldrich)를 처리하고 37 °C에서 90 분 동안 추가 배양하였다. 그리고 25 μg/mL의 propidium iodide(PI) 용액을 이용하여 세포를 염색한 후에 FACS Calibur™ system(BD Bioscience)을 이용하여 세포 주기를 측정하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0047] 도 3에 나타난 바와 같이, 클렙시엘라균 유래 소포는 유방암 세포의 세포 주기에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0049] **2.3. 클렙시엘라균 유래 소포의 항암제에 대한 감수성 증가 효과 확인**

[0050] 클렙시엘라균 유래 소포의 항암제에 대한 감수성 증가 효과를 확인하기 위하여, MCF7 세포를 5×10^5 세포가 되

도록 10 % 우태아혈청이 첨가된 DMEM에 접종하고, 37 °C에서 24 시간 동안 배양한 후에, 인산염완충용액으로 2 회 세척한 후에, 클렙시엘라균 유래 소포 100 ng/mL과 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해되어 있는 타목시펜(tamoxifen; Tam)을 10 μM의 농도가 되도록 새로운 배지에 첨가한 후에 72 시간 동안 배양하였다. 음성 대조군(CTL)으로는 증류수를 첨가하였으며, 양성 대조군으로는 클렙시엘라균 유래 소포 100 ng/mL을 첨가한 대조군(K.p)과 타목시펜 10 μM을 첨가한 대조군(Tam)을 배양하였다. 그리고 실시예 2.1과 동일한 방법으로 상대 세포 생존율을 계산하였다. 통계적 유의성은 student's t-test로 검증하였으며, P 값이 0.01 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0051] 도 4에 나타난 바와 같이, 타목시펜과 클렙시엘라균 유래 소포를 병용 투여한 경우에 세포 생존율이 30 % 이하로 유의성 있게 감소된 것을 확인하였다.

[0053] 상기 결과들을 통하여, 클렙시엘라균 유래 소포는 단독으로는 유방암의 생존율 및/또는 세포 주기에 영향을 미치지 않지만, 유방암의 항암제에 대한 감수성을 증가시켜 유방암의 치료 효과를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 실시예 3: 클렙시엘라균 유래 소포의 항암제 감수성 증가 기작 확인

[0056] 3.1. Real-time PCR 실험

[0057] 클렙시엘라균 유래 소포가 유방암에서 항암제 감수성을 증가시키는 기작을 확인하기 위하여, 암 세포의 세포주기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 사이클린 D1(cyclin D1; CCND1), 사이클린 D2(cyclin D2; CCND2), 사이클린 E1(cyclin E1; CCNE1), 사이클린 E2(cyclin E2; CCNE2), 사이클린 A1(cyclin A1; CCNA1), 사이클린 A2(cyclin A2; CCNA2), 사이클린 B1(cyclin B1; CCNB1), 사이클린 B2(cyclin B2; CCNB2), p21(CDKN1A), 및 p27(CDKN1B)의 mRNA 발현량을 확인하였다. 또한, 염증 매개체로 알려져 있는 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor; TNF)의 mRNA 발현량을 확인하였다. 보다 자세하게는, MCF7 세포를 실시예 2.3과 동일한 방법으로 배양 및 처리한 후에 RNA isolation kit(QIAGEN)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 그리고 추출한 RNA를 주형으로 이용하여 표 1의 프라이머 세트와 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 실시하였다. 실시간 중합효소연쇄반응은 CFX96 Real-time PCR detection system(BIO-RAD)을 이용하여 실시하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0058] [표 1]

Gene	Primers (5' to 3')	서열번호
CCND1	CTCTGTGCCACAGATGTGAAG	1
	GAGGCAGTCCGGGTCACAC	2
CCND2	TGTGTGCCACCGACTTTAAG	3
	TTGAGACAATCCACGTCTGTG	4
CCNE1	AGGTTTCAGGGTATCAGTGGTG	5
	GCTTTGTCCAGCAAATCCAAG	6
CCNE2	CTGGCTTTTAGAGGTATGTGAAG	7
	AGCATAGATTTCTCAAGTTTGG	8
CCNA1	CTAAGTACGTAGCAGAGCTG	9
	GTTTCTGGCCAAAAGTGCTTG	10
CCNA2	GGACAAAGCTGGCCTGAATC	11
	GGAGAGAAACACCATGATACTTTG	12
CCNB1	ATAATGGTGAATGGACACCAACTC	13
	ATACTTGTCTTGACAGTCATGTG	14
CCNB2	AGCTGGAGGTTTTGCAGTC	15
	CGGGAAACTGGCTGAACCTG	16
p21	ACCATGTGGACCTGTCACTG	17
	TGGAGTGGTAGAAATCTGTCATG	18
p27	GACCTGCAACCGACGATTC	19
	TATTCTTAATTCGAGCTGTTACG	20
TNF	AGGCAGTCAGATCATCTTCTC	21
	CTGATGGCACCACCAGCTG	22

[0059]

[0060] 도 5에 나타난 바와 같이, 타목시펜과 소포를 함께 투여한 실험군에서 사이클린 E2의 발현량이 유의성 있게 감소되는 것을 확인하였다. 사이클린 E2의 과발현은 항암제에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이를 통하여 클렙시엘라균 유래 소포가 항암제에 대한 저항성을 감소시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 3.2. 웨스턴 블롯팅 실험

[0063] 클렙시엘라균의 소포와 항암제를 동시 투여 시에 성장이 억제되는 이유가 신호 전달 물질에 의한 것인지 확인하기 위하여, 인산화된 AKT1/2/3, 인산화된 ERK(extracellular-regulated kinase) 및 P21 단백질의 발현량을 확인하였다. 보다 자세하게는, MCF7 세포를 실시예 2.3과 동일한 방법으로 배양 및 처리한 후에 200 μ L의 Lysis buffer(Cell Signaling Technology)를 이용하여 세포를 용해시킨 후에, Bio-Rad Protein Assay kit(Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다. 그리고 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE(Bio-Rad Laboratories)를 실시하여 단백질을 분리한 후에, 분리된 단백질을 HybondTM-ECL nitrocellulose membrane(Amersham Bioscience)으로 단백질을 이동시켰다. 그리고 anti-phospho-AKT1/2/3 rabbit 다클론 항체(1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-ERK mouse 단클론 항체(1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-anti-P21 mouse 단클론항체(1:1000, Santa Cruz Biotechnology), 및 anti- β mouse 단클론 항체(1:1000, Cell Signaling Technologies)를 처리한 후에, peroxidase-conjugated AffiniPure rabbit anti-mouse IgG antibody(1:2500; Jackson ImmunoResearch Laboratories) 또는 peroxidase-conjugated AffiniPure mouse anti-rabbit IgG(1:2500, Jackson ImmunoResearch Laboratories)을 처리하고 Enhanced chemiluminescence detection system(Amersham Bioscience)을 이용하여 단백질의 발현량을 관찰하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0064] 도 6에 나타난 바와 같이, 타목시펜과 소포를 함께 투여한 실험군에서는 유의성 있게 단독으로 타목시펜을 처리한 대조군과 비교하여 인산화된 AKT1/2/3, 인산화된 ERK 및 P21이 모두 감소된 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 클렙시엘라균의 소포는 암 세포의 생존과 관련된 ERK 신호전달 기작을 억제하여 항암제의 감수성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] 실시예 4: 황색포도상구균 유래 소포의 분리

[0067] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 소포(extracellular vesicle; EV)를 분리하기 위하여, 황색포도상구균을 LB(Luria-Bertani) 배지에 접종하고 37 °C에서 200 rpm으로 24 시간 동안 배양하였다. 그리고 공극 크기가 0.45 μ m인 Bottle Top Vacuum Filter(Corning)를 이용하여 세포가 제거된 상층액을 획득하였다. 획득된 상층액은 다시 0.22 μ m Bottle Top Vacuum Filter(Corning)를 통과시켜 상층액에 남아있는 세포의 잔여물은 제거하고, 황색포도상구균 유래 소포를 분리하였다. 분리된 소포는 JEM1011 투과전자현미경(TEM, JEOL)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0068] 도 7에 나타난 바와 같이, 황색포도상구균의 배양액으로부터 분리된 소포의 평균 직경은 30 nm이며, 정상적으로 소포가 분리되었다는 것을 확인하였다.

[0070] 실시예 5: 황색포도상구균 유래 소포의 항암제에 대한 감수성 증가 효과 확인

[0071] 황색포도상구균 유래 소포의 항암제에 대한 감수성 증가 효과를 확인하기 위하여, MCF7 세포 또는 BT474 세포를 5×10^5 세포가 되도록 10 % 우태아혈청이 첨가된 DMEM에 접종하고, 37 °C에서 24 시간 동안 배양한 후에, 인산염완충용액으로 2 회 세척한 후에, 황색포도상구균 유래 소포 1 μ g(A 1ug), 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해되어 있는 타목시펜(tamoxifen; Tam) 10 μ M(Tam 10uM), 또는 황색포도상구균 유래 소포 1 μ g과 타목시펜 10 μ M(A 1ug + Tam 10uM)을 새로운 배지에 첨가한 후에 72 시간 동안 배양하였다. 음성 대조군(CTL)으로는 증류수를 첨가하여 배양하였다. 그리고 실시예 2.1과 동일한 방법으로 상대 세포 생존율을 계산하였다. 통계적 유의성은 student's t-test로 검증하였으며, P 값이 0.01 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 확인하였다. 그 결과는 도 8 및 9에 나타내었다.

[0072] 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, MCF7 세포주 및 BT474 세포주 모두에서 타목시펜과 황색포도상구균 유래 소포를 병용 투여한 경우에 세포 생존율이 유의성 있게 감소된 것을 확인하였다.

[0074] **실시예 6: 황색포도상구균 유래 소포의 항암제 감수성 증가 기작 확인**

[0075] **6.1. Real-time PCR 실험**

[0076] 황색포도상구균 유래 소포가 항암제 감수성을 증가시키는 기작을 확인하기 위하여, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 실시간중합효소연쇄반응을 실시하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0077] 도 10에 나타난 바와 같이, 타목시펜과 소포를 함께 투여한 실험군(Tam+A)에서 사이클린 E2의 발현량은 유의성 있게 감소되었으며, TNF- α 의 발현량은 유의성 있게 증가시키는 것을 확인하였다. 사이클린 E2의 과발현은 항암제에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 알려져있으며, 이를 통하여 황색포도상구균 유래 소포가 항암제에 대한 저항성을 감소시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] **6.2. 웨스턴 블롯팅 실험**

[0080] 황색포도상구균 유래 소포와 항암제를 동시 투여 시에 성장이 억제되는 이유가 신호 전달 물질에 의한 것인지 확인하기 위하여, 실시예 3.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

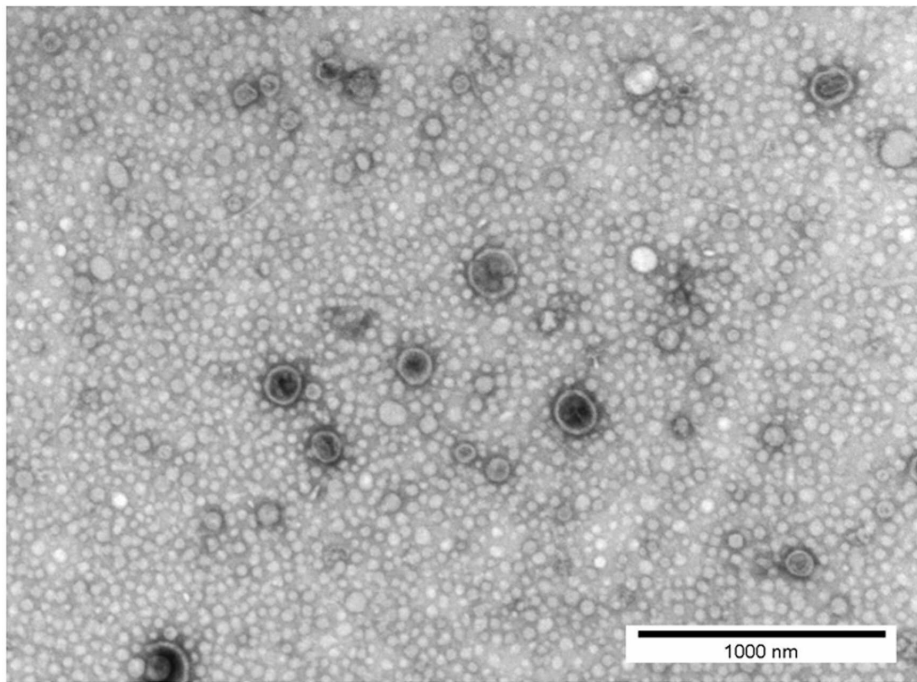
[0081] 도 11에 나타난 바와 같이, 타목시펜과 소포를 함께 투여한 실험군에서는 유의성 있게 단독으로 타목시펜을 처리한 대조군과 비교하여 인산화된 AKT1/2/3, 인산화된 ERK 및 P21이 모두 감소된 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 황색포도상구균의 소포는 암 세포의 생존과 관련된 ERK 신호전달 기작을 억제하여 항암제의 감수성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 클렙시엘라균 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포는 단독으로는 암 세포의 사멸에 영향을 미치지 않지만, 항암제와의 병용 투여 시에는 항암제의 감수성을 증가시켜 암 세포의 사멸을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 본 발명의 클렙시엘라균 유래 소포 및/또는 황색포도상구균 유래 소포는 항암제와의 병용 투여를 통하여 항암제 투여량을 감소시켜 부작용을 최소화하며 그 치료 효율을 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

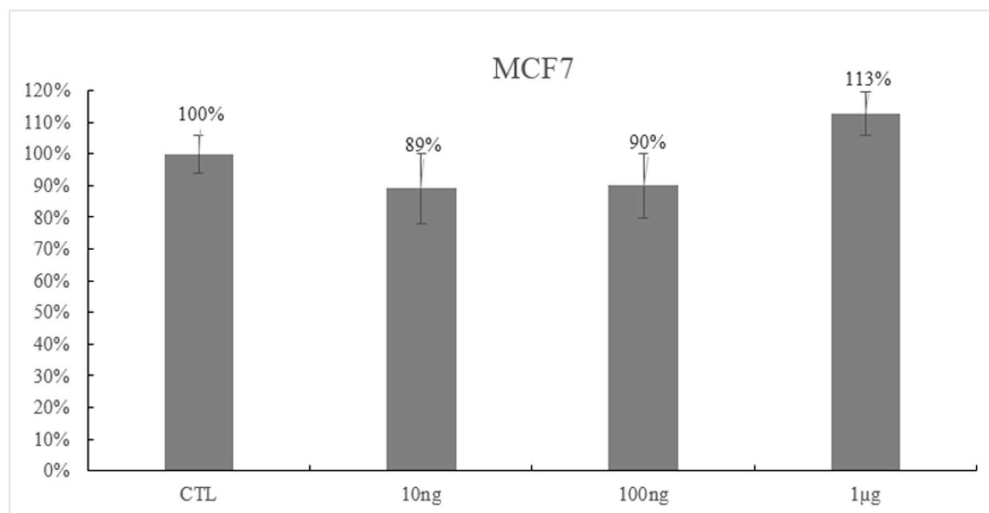
[0085] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

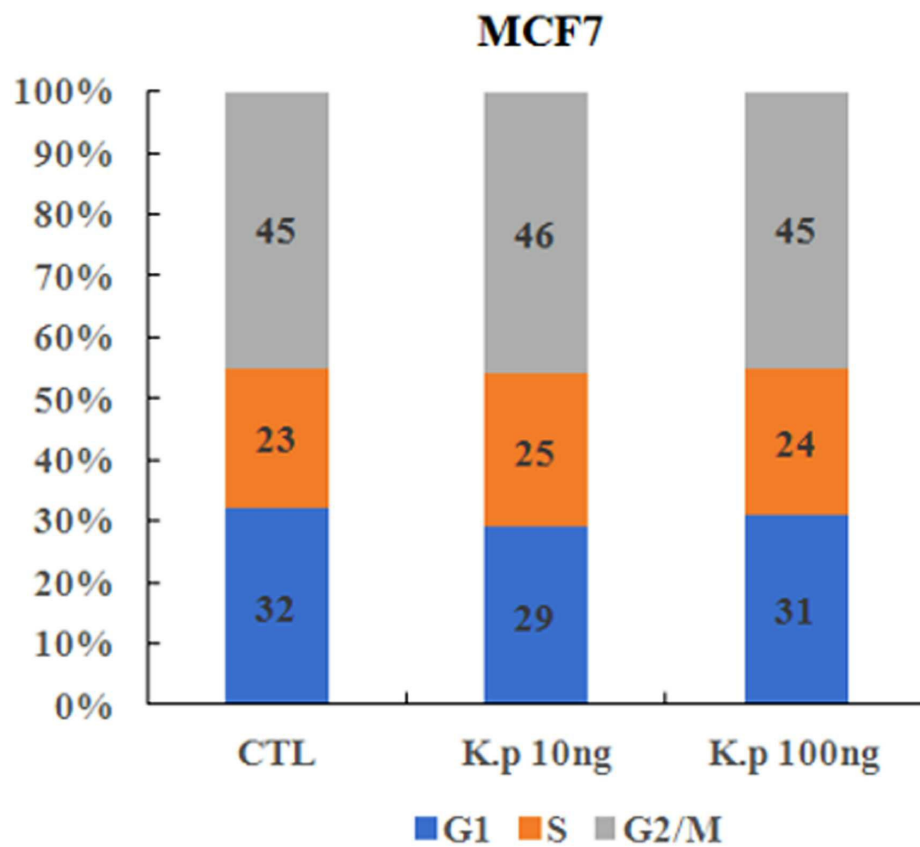
도면1



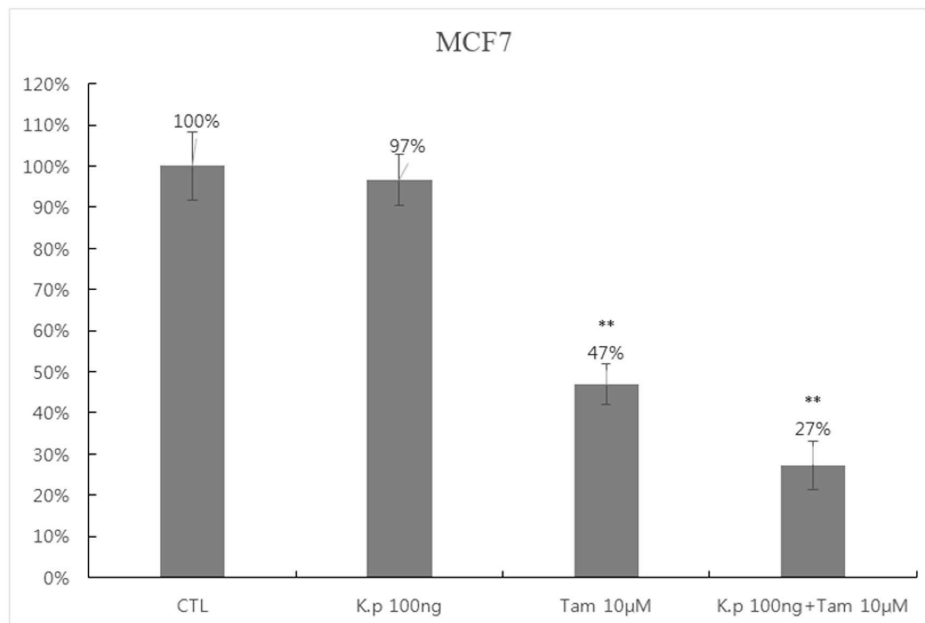
도면2



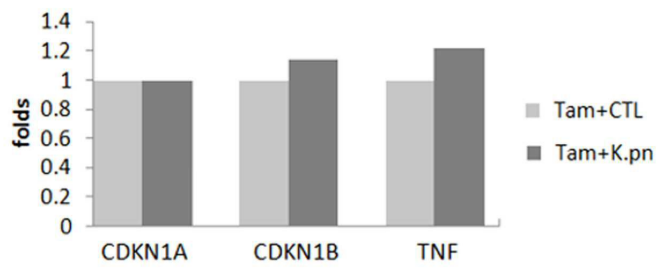
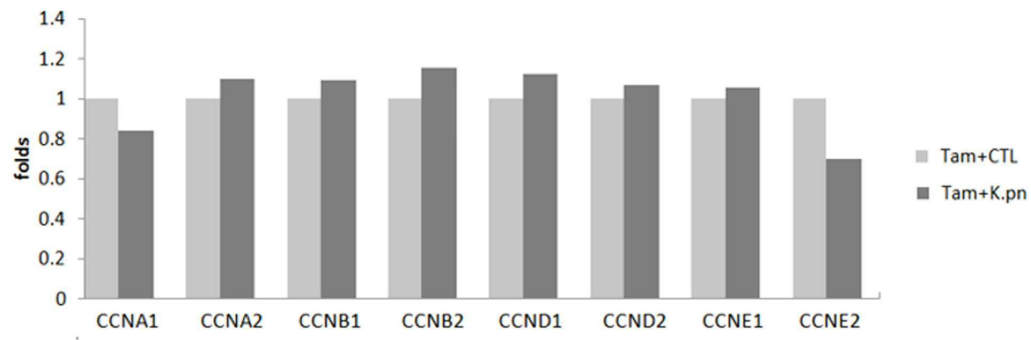
도면3



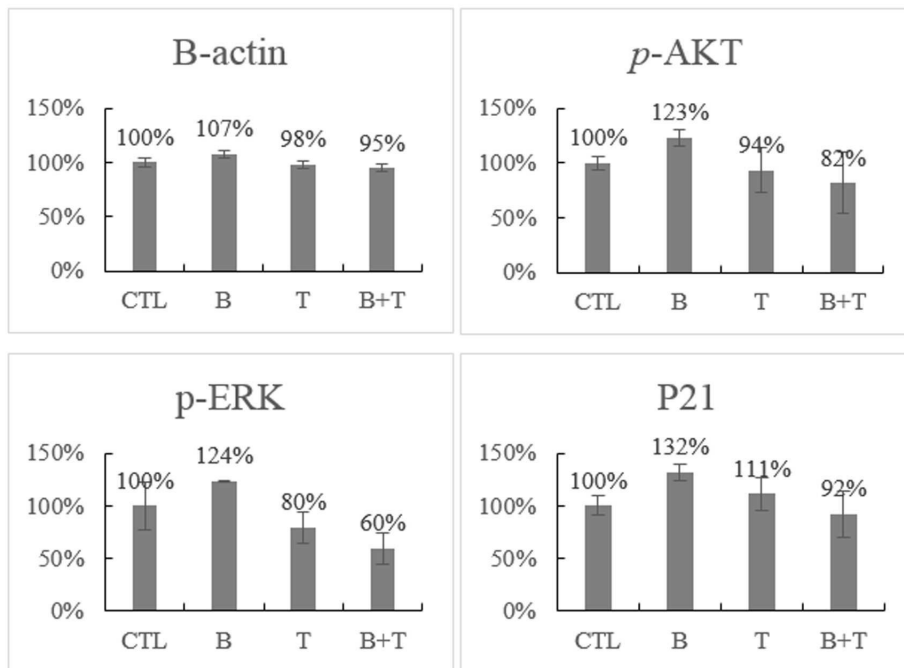
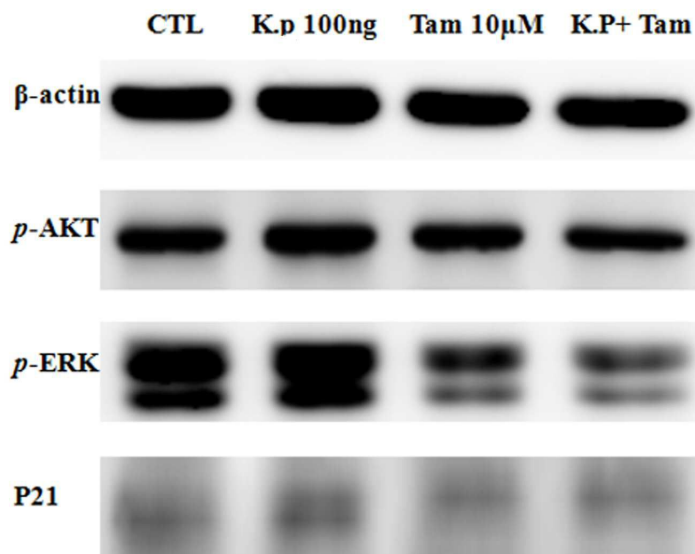
도면4



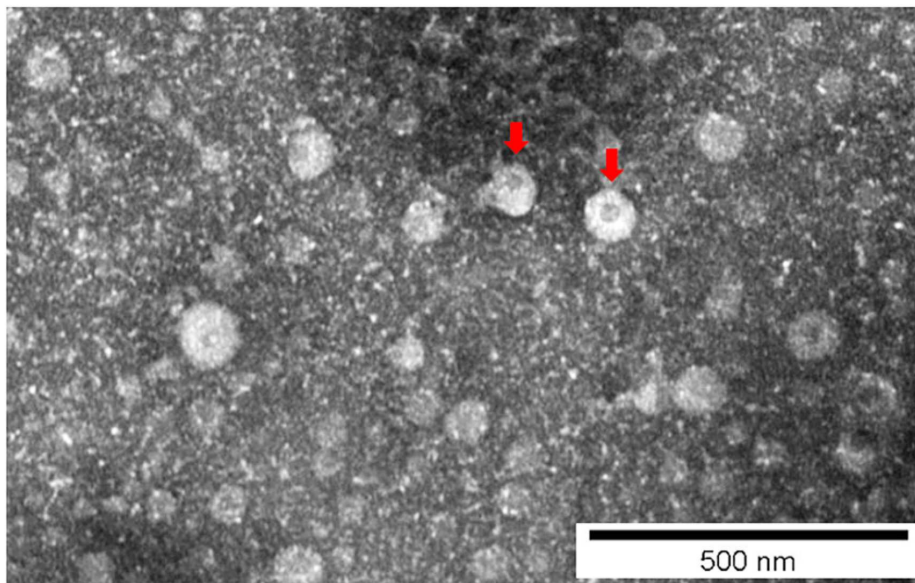
도면5



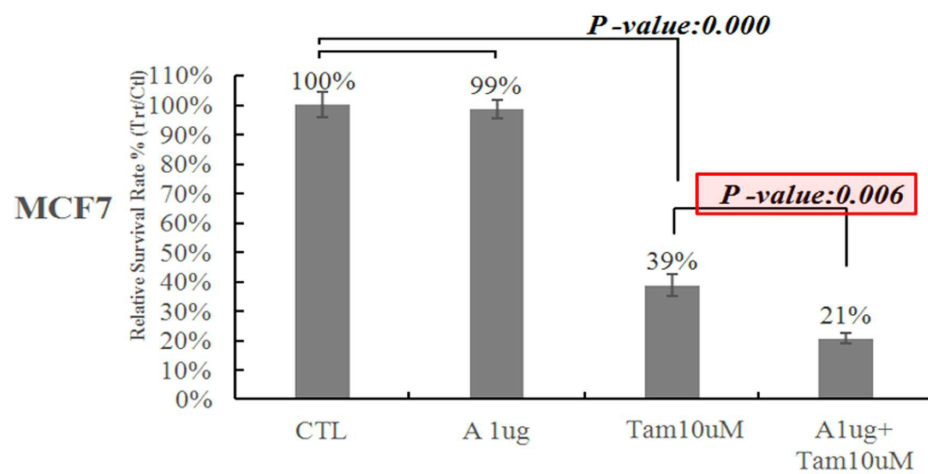
도면6



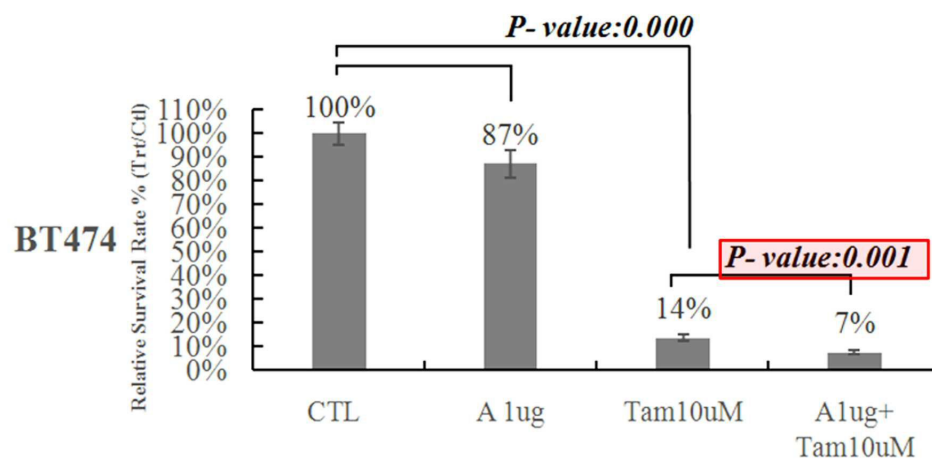
도면7



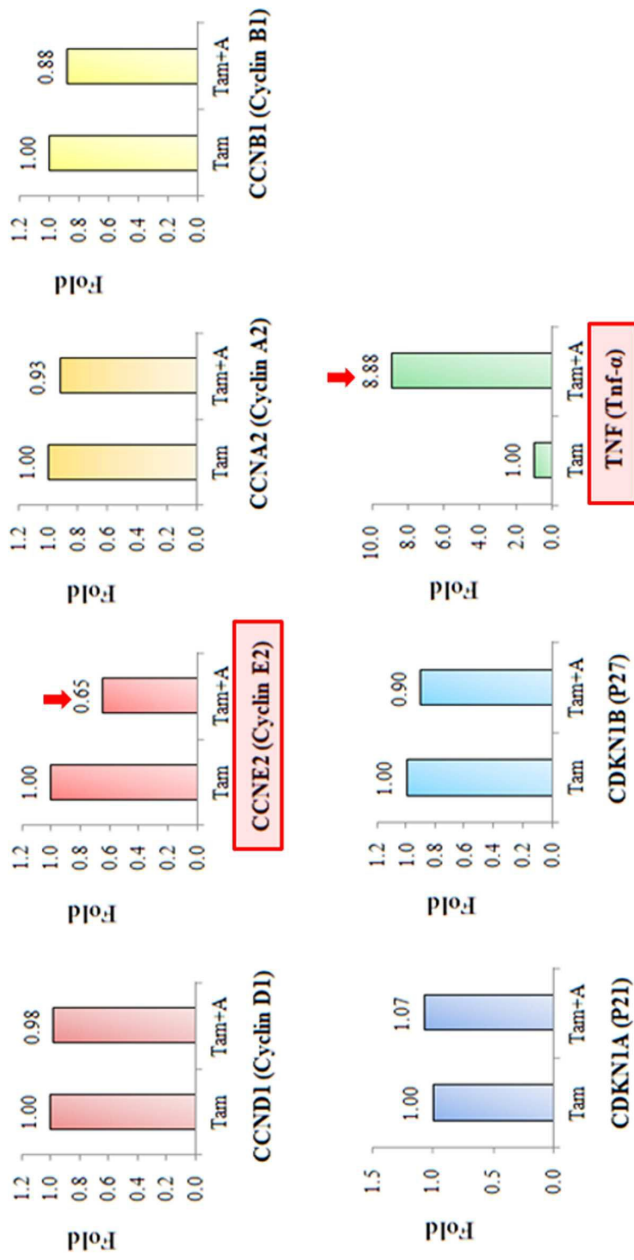
도면8



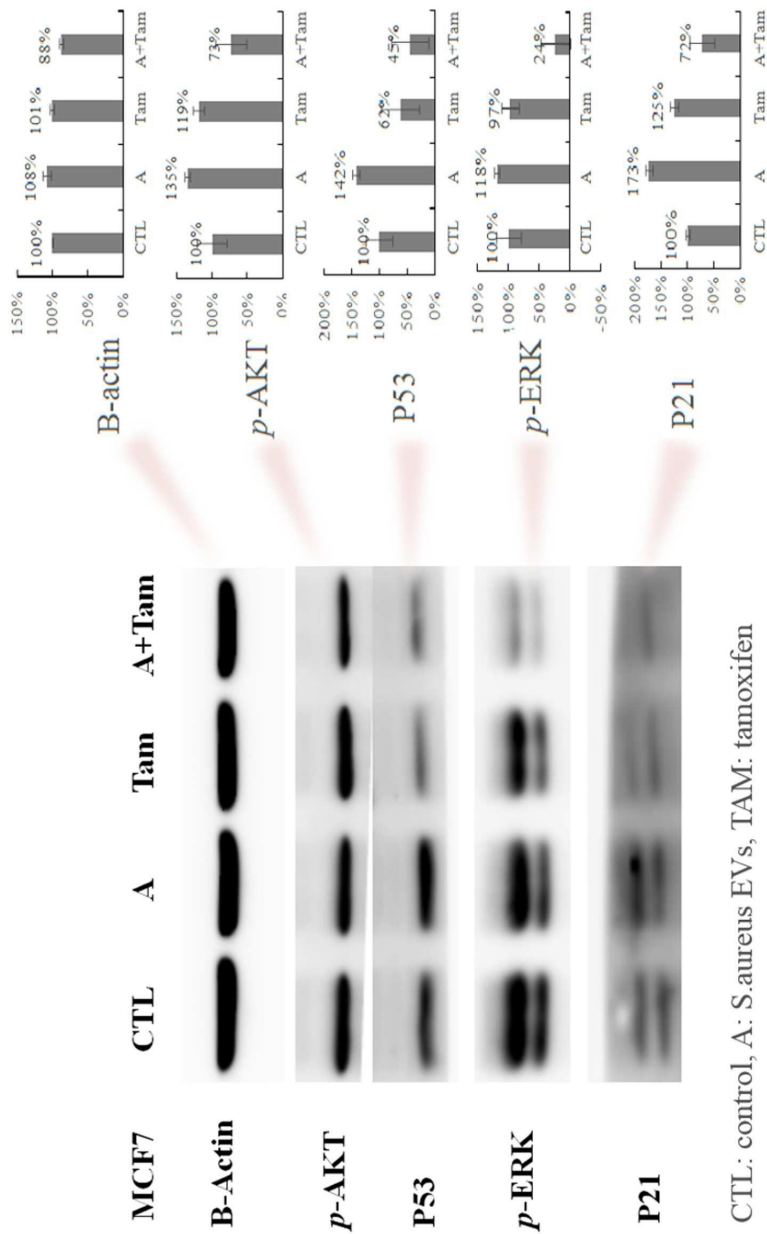
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> MD Healthcare Inc.
- <120> Composition for enhancing sensitivity of anti-cancer drug
- <130> MP18-193
- <160> 22
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> CCND1 forward primer

<400> 1

ctctgtgccacagatgtgaa g

21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCND1 reverse primer

<400> 2

gaggcagtcagggtcacac

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCND2 forward primer

<400> 3

tgtgtgccac cgactttaag

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCND2 reverse primer

<400> 4

ttgagacaat ccacgtctgt g

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCNE1 forward primer

<400> 5

aggtttcagg gtatcagtg tg

22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNE1 reverse primer
 <400> 6
 gctttgtcca gcaaatacaa g 21
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNE2 forward primer
 <400> 7
 ctggctttta gaggtatgtg aag 23
 <210> 8
 <211>
 > 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNE2 reverse primer
 <400> 8
 agcatagatt tcctcaagtt tgg 23
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNA1 forward primer
 <400> 9
 ctaagtacgt agcagagctg 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNA1 reverse primer
 <400> 10
 gtttctggcc aaaagtgtt g 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNA2 forward primer
 <400> 11
 ggacaaagct ggcctgaatc 20
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNA2 reverse primer
 <400> 12
 ggagagaaac accatgatac ttg 24
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNB1 forward primer
 <400> 13
 ataatggtga atggacacca actc 24
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNB1 reverse primer
 <400> 14
 atacttggtc ttgacagtca tgtg 24
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCNB2 forward primer
 <400> 15

agctggaggt ttgcagtc	19
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCNB2 reverse primer	
<400> 16	
cgggaaactg gctgaacctg	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p21 forward primer	
<400> 17	
accatgtgga cctgtcactg	20
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p21 reverse primer	
<400> 18	
tggagtggta gaaatctgtc atg	23
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> p27 forward primer	
<400> 19	
gacctgcaac cgacgattc	19
<210> 20	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> p27 reverse primer
 <400> 20
 tattcttaat tcgagctggtt tacg 24
 <210> 21
 <211> 21
 <212
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF forward primer
 <400> 21
 aggcagtcag atcatcttct c 21
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF reverse primer
 <400> 22
 ctgatggcac caccagctg 19