(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 2 월 16 일 (16.02.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/021016 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) *C12R 1/245* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005916

(22) 국제출원일: 2011 년 8 월 11 일 (11.08.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0077908 2010 년 8 월 12 일 (12.08.2010) KR

(72) 발명자; 겸
(71) 출원인 : **박진형 (PARK, Jin Hyoung)** [KR/KR]; 서울시 송파구 잠실 7 동 86 번지 아시아 선수촌 아파트 7 동 305 호, 138-797 Seoul (KR). **박기범 (PARK, Ki Beom)** [KR/KR]; 광주시 북구 오치동 공간아파트 101 동 1201 호, 500-130 Gwangju (KR). **김희정 (KIM, Hee Jeong)** [KR/KR]; 서울시 송파구 잠실동 86 아시아선수촌아파트 7-305, 138-797 Seoul (KR).

(74) 대리인: **이상문 (LEE, Sang Moon)** 등; 서울시 강남구 역삼동 746-1 화원빌딩 501 호, 135-925 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서와 별도로 규칙 13 의 2 에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13 의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

WO 2012/021016 A2

(54) **Title**: LACOBACILLUS STRAIN HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY AND ANTI-CANCER ACTIVITY COMPOSITION INCLUDING SAME AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭** : 항암 활성을 갖는 락토바실러스 균주 및 이를 활성성분으로 포함하는 항암 활성 조성물

(57) **Abstract**: The present invention was conceived from the discovery of anti-cancer activity in lactobacillus out of many types of bacteria isolated while observing food-derived fermentation strains having the ability to ferment lactobacillus in apples, and provides lactobacillus casei (accession no. KCCM11072) having anti-cancer activity and the anti-cancer activity composition including same as an active ingredient, which can be used as a medical supply or as a health supplement food.

(57) **요약서**: 본 발명은 사과 유산균 발효능을 갖는 식품 유래 발효 균주를 동정하던 중 분리된 여러 균 중 락토바실러스 균이 항암활성을 갖는 것으로 알게 되어 본 발명에 이르게 된 것으로서 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*) 및 이를 활성 성분으로 포함하여 의약품 내지 건강보조식품으로 사용될 수 있는 항암 활성 조성물을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 항암 활성을 갖는 락토바실러스 균주 및 이를 활성성분으로 포함하는 항암 활성 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 사과 유산균 발효능을 갖는 식품 유래 발효 균주를 동정하던 중 분리된 여러 균 중 락토바실러스 균이 항암활성을 갖는 것으로 알게 되어 본 발명에 이르게 된 것으로서 항암활성을 갖는 락토바실러스 균주 및 이를 활성성분으로 포함하는 항암제에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인체는 다양한 미생물들에 의해 장내 미생물 균총을 이루고 있다. 이러한 미생물 중에는 유산균 등과 같은 숙주 동물에 유용한 것으로 알려진 유익한 미생물뿐만 아니라 숙주에 직접적 또는 잠재적인 유해성을 나타내는 대장균, 살모넬라, 포도상구균 등의 미생물들도 존재한다.

[3] 인체는 스트레스 증가나 유해세균 감염 등의 외부 환경 변화에 따라 장내 미생물의 균총의 변화가 일어난다. 이런 장내 균총의 파괴는 유해 미생물들의 급격한 성장으로 이어져 숙주동물의 건강상태를 악화시키고 심할 경우 죽음으로까지 진행될 수 있다. 이러한 일이 발생하였을 경우 치료의 목적으로 항생제를 투여하나 이러한 항생제는 체외로 완전히 배설되지 않고 숙주 내에 잔존하며 지속적인 투여시 유해미생물들이 내성을 가지게 되므로 효과적인 치료를 할 수 없게 되는 상황이 발생하게 된다. 또한 현재는 항생제 오남용으로 인한 부작용이 문제시되고 있다.

[4] 이에 대한 대안으로 현재 유산균 프로바이오틱스에 대한 관심이 증대되고 있다. 프로바이오틱스는 인체 또는 기타 동물의 장내에 서식하는 유익한 미생물을 분리하여 제제화한 것으로 호기성균, 혐기성균, 유산균, 효모균들이 사용되고 있으나 주로 유산균들이 많이 이용되고 있다.

[5] 이러한 유산균 프로바이오틱스는 항생제 오남용으로 인해 발생할 수 있는 부작용을 일으키지 않고 장내 유해 미생물의 이상발효를 억제하여 안정된 장내 균총을 유지하며 유해 미생물의 감염으로 인한 질병을 사전에 억제할 수 있다. 또한 암 예방에 효과적인 항암효과도 있는 것으로 나타났다.

[6] 오늘날의 유산균 제제 건강보조식품은 앞에서 기술했던 유해 미생물 억제효과 이외에도 항암효과, 우수한 장내 정착능, 혈중 콜레스테롤 감소작용, 면역활성 증강작용 등의 기능을 필요로 한다. 유산균의 항암효과는 발암물질의 생성을 유도하는 암세포의 억제, 발암물질 및 발암성 물질이 되는 화학물질의 저해 등을 들 수 있다.

[7] 이러한 유산균을 지속적으로 섭취할 경우 결장 내의 유용 유산균 수를 증가시켜 세포 수준에서 항암 효과를 내는 물질을 생성함으로써 암세포의

증식을 억제한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 항암 활성이 뛰어난 유산균 균주를 확립함과 동시에 이를 이용하여 항암 활성을 갖는 의약품 또는 건강보조 식품을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 상기 해결하고자 하는 과제를 달성하기 위하여 본 발명은 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 제공한다.

[10] 상기 다른 기술적 과제 달성하기 위하여 본 발명은 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이를 활성 성분으로 포함하는 항암 활성 조성물을 제공한다.

[11] 상술한 본 발명에 따른 항암 활성 조성물에 있어서, 상기 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이가 생균 또는 사균 형태로 포함될 수 있으며, 이 항암 활성 조성물은 의약품 또는 건강보조식품으로 제조되어 유통 소비될 수 있다.

발명의 효과

[12] 본 발명자는 실험을 통하여 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)가 위암 및 대장암에 뛰어난 항암 효과를 가짐을 증명하였으며, 이를 미루어 다른 고형암에서도 우수한 효과를 보임을 알 수 있다. 따라서 이를 활성 성분으로 이용하면 부작용을 보이지 않으면서도 우수한 항암 활성을 갖는 의약품 내지 건강보조식품을 만들 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 본 발명에 따른 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 포함하는 시료의 위암세포(KATO-3)에 대한 MTT assay의 결과를 도시한 것이다.

[14] 도 2는 본 발명에 따른 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 포함하는 시료의 KATO-3 cells 위암세포사멸에 대한 면역 형광 결과를 도시한 것이다.

[15] 도 3은 본 발명에 따른 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 포함하는 시료의 KATO-3 위암세포에 대한 루시퍼라아제 어세이 결과를 도시한 것으로서 3x-kb는 NF-kB의 발현을, PG-13은 p53의 발현을 나타낸다.

[16] 도 4는 본 발명에 따른 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 포함하는 시료의 누드마우스에 이식된 위암에 대한 억제효능을 나타내는 도면이다.

[17] 도 5는 본 발명에 따른 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(

Latobacillus casei)를 포함하는 시료의 대장암세포(human colon cancer cell, HT-29)에 대한 MTT assay의 결과를 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[18] 이하 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하기로 한다.

[19] 본 발명은 사과 유산균 발효 능을 갖는 식품 유래 발효 균을 동정하던 중 분리된 여러 균 중 락토바실러스 균이 항암활성을 갖는 것으로 알게 되어 이 균주로서 확립하여 기탁번호 KCCM11072P로 기탁하여으며, 이 기탁 균주를 배양하여 항암 활성을 시험하기 위한 시료를 만들어서 위암과 대장암에 대하여 시험을 하였다.

[20] 이하 항암 활성 시험을 시료의 준비 및 위암 및 대장암에 대한 시험에 관하여 설명한다.

[21] **<항암 활성 시험을 위한 시료의 준비>**

[22] 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 MRS broth 배지(Difco사에서 조제하여 판매하는 배지)에서 24 시간 동한 37℃에서 배양한 후 4℃, 5,000 rpm에서 15 min간 원심분리 시켜 균체와 상등액을 분리하였다.

[23] 원심분리한 다음 균체에 해당하는 침전물을 균체 무게의 50배에 달하는 용량의 PBS 용액을 이용하여 세척한 다음 다시 원심분리는 방법으로 3회에 걸쳐 세척 및 원심분리를 하여 배양물이나 대사물에 의한 영향은 최소화한 균체 시료를 동결건조하여 시험에 이용하였다.

[24] 상기 배양 배지로서 MRS broth 배지를 사용하였으나 Tryptic soy broth 배지를 사용하여도 무방하다.

[25] **<위암에 대한 활성 시험>**

[26] **시험 방법**

[27] 1. MTT assay

[28] KATO-3(위암세포주)를 단세포 현탁액으로 만든 후 Hemacytometer를 사용하여 계수한 뒤 96well plate에 5 X 10^3개씩 넣고 24시간 동안 배양하였다. 세포가 안정적으로 plate에 부착된 것을 확인하고 시료를 증류수에 녹였으며 농도는 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml 로 처리하였고 24시간과 48시간에 조사하였다.

[29] 대조군(no treat 가 대조군임)과 각 농도별 처리를 세 번씩 세 그룹으로 반복 실험을 해주었다.

[30] 각 plate는 24시간 그리고 48시간 후 배양액과 MTT시약이 약 10:1의 비율이 되도록 MTT시약을 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. spectrophotometer로 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 9개 well의 평균 흡광도를 결과로 사용하였다.

[31] MTT assay에 사용된 시약은 DOJINDO사의 CCK-8(Cell counting kit-8)을 사용하였다.

[32] 2. Hoechst 33258 staining (Immunofluorescence image of KATO-3 cells)

[33] 형광염료인 Hoechst 33258(sigma)는 세포의 손상정도를 관찰하며, Living cell에서의 핵염색으로 apoptotic 세포와 non-apoptotic 세포를 구분할 수 있다.

[34] KATO-3 cell을 시료로 처리한 뒤 PBS로 세척하였고, cell을 고정시키기 위해 3.7% 포름알데히드(formaldehyde)로 실온에서 5분간 두었다.

[35] PBS로 1회 세척을 하고, Hoechst 2ug/ml의 농도를 배지에 첨가한 후 실온에서 10분 동안 배양하였다.

[36] UV filter를 이용하여 confocal로 관찰로 세포의 핵 및 morphology를 관찰하였다.

[37] 3. Dual Luciferase assay

[38] 특정 gene의 프로모터 부분을 luciferase가 있는 vector에 ligation시켜 그 프로모터가 활성화 되면 발광이 되는 원리로 본 실험에서는 유전자 수준에서 NF-kB와 p53의 활성이 어떻게 변하는지 확인하고자 luciferase assay를 하였다.

[39] 세포에 luciferase가 labeling된 3x-kB와 PG-13을 transfection시킨 후, 시료로 처리하였다. 이 실험은 promega의 dual luciferase assay kit를 사용하였다.

[40] Passive lysis buffer를 처리한 뒤 4℃에서 30분 동안 배양하였고 다시 실온에서 10분간 shaking incubator에 두었다. Luminometer로 luciferase와 renila luciferase(콘트롤임)의 발광정도를 측정하였고, luciferase/renila luciferase의 값을 결과로 사용하였다.

[41] 4. Xenograft assay

[42] 종양의 xenograft 실험을 위해 $5x10^7$ KATO3 세포를 누드마우스의 다리후면의 피하에 주입하였다. 19-21일 후 마우스를 희생하여 종양조직을 추출하였다. 실험처치는 종양이 평균 $60mm^3$으로 성장하였을 때 시작했다. 종양은 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS에서 고정하였고, hematoxylin 과 eosin으로 염색하였다. 동물실험은 한국기초과학지원연구원의 실험동물관리규정을 따라 진행하였다.

[43] **시험 결과**

[44] 1. MTT assay

[45] 시료의 세포사 유도능을 세포형태와 MTT assay에 대한 효과를 분석하여 측정하였다. 위상차 현미경하에서 위암세포(KATO-3)에 추출물을 처리 후 24시간과 48시간이 지난 다음 관찰하였으며, 그 결과를 도 1에 나타냈다.

[46] 도 1를 보면 시료의 500ug/ml의 농도가 위암세포(KATO-3)에 대한 IC_{50}임을 알 수 있다.

[47] 2. Hoechst 33258 staining (Immunofluorescence image of KATO-3 cells)

[48] 500ug/ml 농도의 시료로 처리한 후 KATO-3의 죽은 세포의 비율과 세포사의 형태는 Annexin V 염색법으로 측정하고 이어서 세포 갯수를 측정했다.

[49] Annexin V 염색법은 500 ug/ml 농도의 시료에 노출된 배지에서 사멸한 세포의 비율을 측정하는데 사용되었다.

[50] 형광현미경으로 관찰하면 Annexin V로 염색된 농축된 세포핵과 DNA 조각의

단편에 근거하여 세포가 사멸한 것을 확인할 수 있었는데, 그 결과를 도 2로 나타냈다.

[51] 첨부 도면 도 2를 보면 처리되지 않은 대조군에서 핵은 정상형태를 보인 반면500ug/ml 농도의 시료에 노출되어 48시간 동안 배양된 KATO-3 세포 배지에서는 세포 사멸형태의 핵이 나타났다.

[52] 3. Dual Luciferase assay

[53] 시료의 위암세포의 사멸 과정을 매개하는 후속효과분자(p53 및 NF-kB 신호전달계)를 확인하고자 하였으며, 그 결과를 도 3에 나타냈다.

[54] NF-kB는 발암과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 핵심전사인자로서, 종양형성을 촉진하는 여러 중요한 신호전달경로를 조절하며 이것의 활성도 증가는 항세포자멸효과와 관련되어 있으며, p53 유전자는 DNA손상과 다른 자극에 대한 세포반응의 중심매개체이다

[55] 도 3의 결과를 보면 시료와 함께 배양하면 NF-kB 활성도가 두드러지게 증가하나 p53유전자 활성도에서 4-fold 이상의 감소하게 됨을 알 수 있었다.

[56] p53의 발현이 현저히 떨어진 것이 위암세포를 사멸시키는 원인임을 알 수 있었다.

[57] 4. Xenograft assay

[58] 위암세포에서 시료의 특정한 억제 역할을 밝혀내기 위해 우리는 KATO-3를 흉선이 없는 누드 생쥐에게 피하로 주사하였다. 생쥐는 무작위로 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 시료를 처치하고 또 다른 그룹은 생리식염수를 처치하였다.

[59] 결과에 대해서는 도 4로 나타냈으며, 도 4의 결과를 보면, 시료를 500ug/ml의 농도로 하여 피하 주사한 조직에서는 종양의 성장이 적었으나 생리식염수를 주사한 조직에서는 정상적으로 종양이 성장하였다. 이 결과는 시료가 종양 형성을 억제함을 더욱 뒷받침한다.

[60] 결론

[61] 1. 시료의 농도가 500ug/ml를 초과했을 때는 시험에 사용한 위암 세포가 죽어서 수축되고 분리됨을 알 수 있었다.

[62] 2. 시료로 처리되어 죽은 세포의 세포 사의 형태는 세포자멸사로 인한 것으로 확인되었다.

[63] 3. 시료는 누드 생쥐에 주사한 종양의 성장을 억제하였다.

[64]

[65] <대장암에 대한 활성 시험>

[66] 시험 재료

[67] 1. 대장암 세포 (human colon cancer cell, HT-29)

[68] 2. 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*)를 동결건조한 시료

[69] 3. MTT assay

[70] 시험 방법

[71] 1. 5.6 x 10^3 cells/ml로 세포준비 (1x10^3cells)

[72] 2. 180㎕씩 세포를 96 well에 loading

[73] 3. 동결건조 시료를 각각 0, 1, 0.1, 0.01, 0.001g/ml (in media)로 만든다.

[74] → 해당 well에 각각 20ul씩 처리한다. (0, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002g/200ul → well당 0, 0.1, 0.01, 0.0001, 0.00001g/ml 처리

[75] 4. 37 ℃에서 24, 48, 72시간 동안 incubation

[76] 5. 반응이 끝난 후 20㎕ (5mg/ml in PBS) MTT solution 첨가

[77] 6. 37 ℃에서 3시간동안 incubation

[78] 8. media 제거

[79] 9. DMSO 200㎕ loading

[80] 10. 37 ℃에서 30분동안 incubation

[81] 11. SpectraMax 190에서 570nm에서 흡광도 측정

[82] <u>시험 결과 및 결론</u>

[83] 대장암 세포 배양액 중에 시료를 다양한 농도(0, 0.1, 1, 10, 100ug/ml)로 투여 후 37℃에서 24, 48, 72시간 배양하여 대장암 세포의 생존정도 확인 (MTT assay, ; 3회 반복 실험) 그 결과를 도 5로 나타냈다.

[84] 첨부한 도 5를 보면, 암 세포에 0.1mg/ml 이하 저농도의 시료로 처리 72시간 후 농도 의존적으로 암세포 생존 저해 능(항암 효과)을 확인할 수 있다.

[85] [수탁번호]

[86] 기탁기관명 : Korea culture center of Microoranisms

[87] 수탁번호 : KCCM11072P

[88] 수탁일자 : 2010-03-12

[89]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호 FGNP0103	국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 ____4____ 쪽, _____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.
B. 기탁물의 확인 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐
기탁기관의 명칭 KCCM 한국 미생물 배양소 / Korean Culture Center of Microorganisms
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 대한민국 120-091 서울시 서대문구 홍제 1동 유림빌딩 361-221

기탁일자	기탁번호
2010. 03. 12	KCCM11072P

C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)

수리관청 사용란	국제사무국 사용란
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음
담당관	담당관

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

청구범위

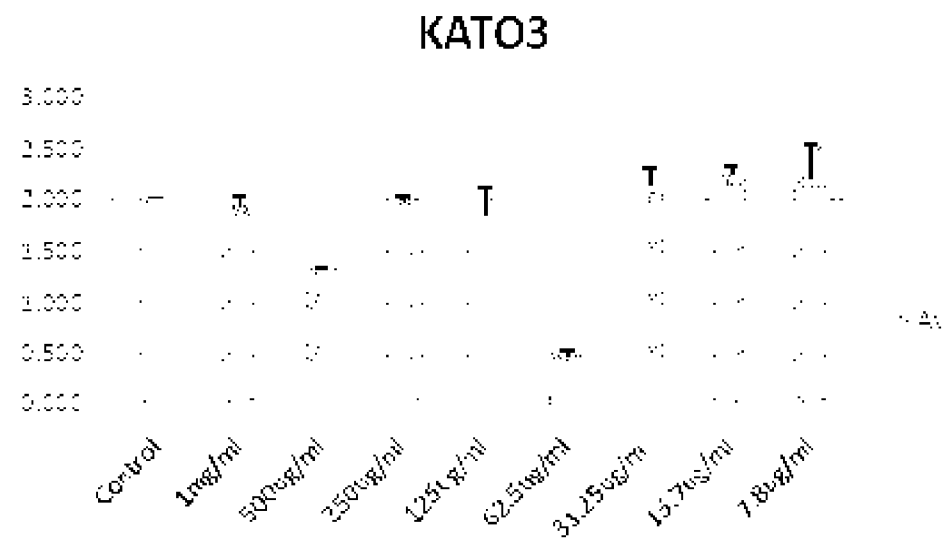
[청구항 1] 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이(*Latobacillus casei*).

[청구항 2] 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이를 활성 성분으로 포함하는 항암 활성 조성물.

[청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 항암 활성을 갖는 기탁번호 KCCM11072P 락토바실러스 카제이가 생균 또는 사균 형태로 포함되는 것을 특징으로 하는 항암 활성 조성물.

[청구항 4] 제 2항 또는 3항에 있어서, 상기 조성물이 의약품 또는 건강보조식품인 것을 특징으로 하는 항암 활성 조성물.

[Fig. 1]


KATO3
Control
1mg/ml
500ug/ml
250ug/ml
125ug/ml
62.5ug/ml
31.25ug/m
15.7ug/ml
7.8ug/ml

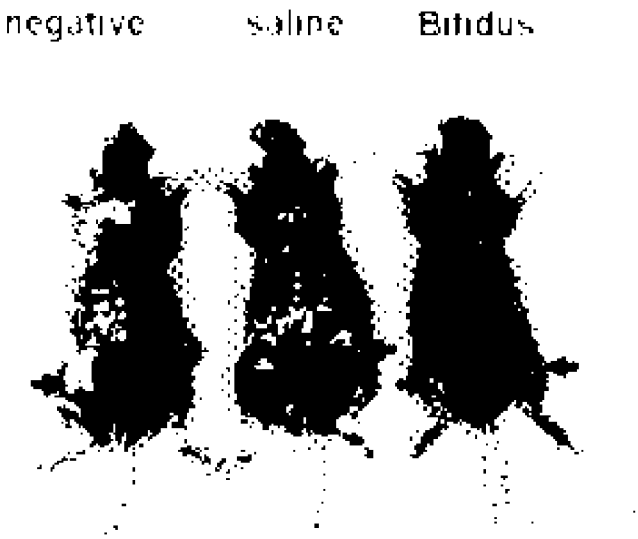
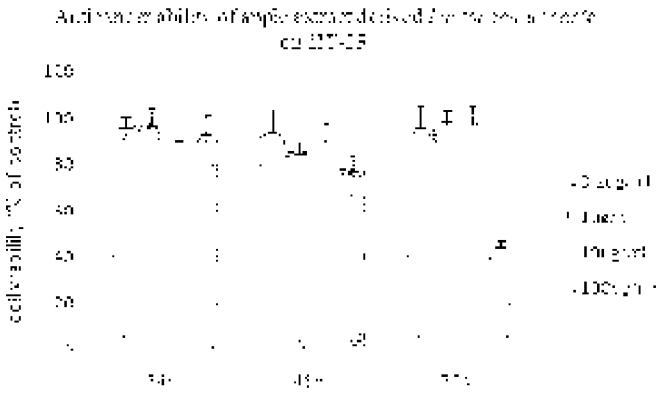
[Fig. 2]

KATO3-control(48h) KATO3-500ug/ml(48h)

Lactobacillus casei

[Fig. 3]

[Fig. 4]



[Fig. 5]