(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0157153
(43) 공개일자 2024년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0053247
(22) 출원일자 2023년04월24일
심사청구일자 2023년04월24일

(71) 출원인
주식회사 엠바이옴쎄라퓨틱스
경기도 성남시 분당구 판교로289번길 20, 2동 5층 공동보육실(삼평동, 판교테크노밸리 스타트업 캠퍼스)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강세찬
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 414호
전혜린
서울특별시 용산구 독서당로34길 22, 2동 402호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
차준용

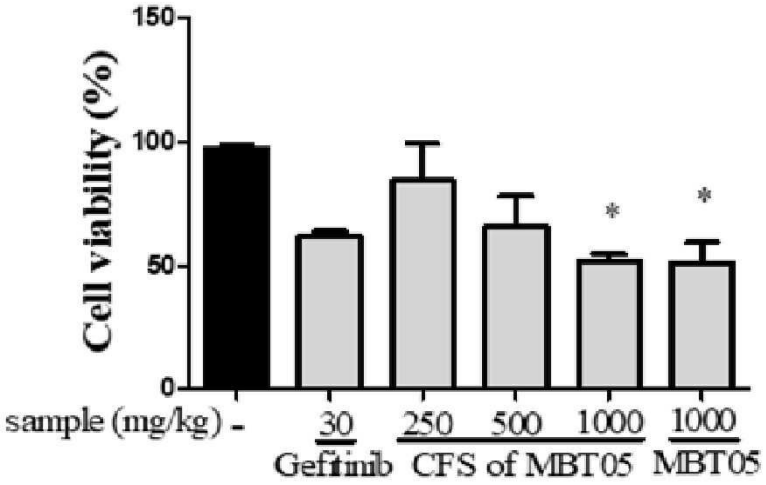
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 이를 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 수탁번호 KCCM 13252P로 기탁된 신규한 엔테로코커스 락티스(Enterococcus lactis) MBT05 균주에 관한 것으로, 상기 균주 배양액 또는 상기 균주 분말은 유방암 세포에 대하여 특이적으로 세포 사멸 효과를 나타내므로, 상기 균주 및 균주 배양액을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다. 특히, 상기 균주 및 균주 배양액은 에스트로겐 수용체 비의존성 유방암에 효과적인 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
C12R 2001/46 (2021.05)
(72) 발명자
이영근
경기도 수원시 영통구 영통로90번길 4-27, 109동 2003호
장진수
경기도 용인시 기흥구 마북로 210, 105동 1003호

권정은
경기도 화성시 영통로27번길 20, 405동 1702호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425174977
과제번호	S3316732
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	전략형
연구과제명	신규한 Enterococcus 균주를 이용한 폐암 치료 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 엠바이옴쎄라퓨틱스
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCCM 13252P로 기탁된 엔테로코커스 락티스(Enterococcus lactis) MBT05 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 16S rDNA가 서열번호 1로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 유방암 세포주에 대하여 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유방암 세포주는 MCF-7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제3항에 있어서,

에스트로겐 수용체 비의존성 유방암의 치료 및 예방에 효과적인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 균주는 유방암 세포에서 EGFR, RAF, ERK, caspase-9의 단백질 발현을 감소시키고, p-p53, cleaved-PARP의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 7

제1항 내지 제6항의 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항의 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 유방암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 식품은 음료, 식이 보충제, 크림상 식품, 디저트, 과자, 조미료, 레토르트 식품, 식육가공 식품 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 균주 배양액을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 균주 및 균주 배양액을 이용할 경우 유방암 세포의 사멸 및 증식 억제를 유도함으로서 항암제 시장의 새로운 치료 소재로서 진입이 가능하다.

배 경 기 술

[0002] 암을 포함한 각종 성인병은 식생활 습관의 변화와 평균 수명의 연장으로 증가 추세에 있으며, 이에 따른 치료제 개발 연구가 활발히 진행 중이다. 이 중 암은 세계적으로 심장 질환 다음으로 높은 사망률을 가진 질병으로 최근 국내 사망률 순위를 구성비로 보면 암으로 인한 사망률이 매우 높다. 이러한 암의 치료에는 외과적 수술 이외에도 화학요법, 방사선 요법 등이 널리 사용되었으나, 이런 치료요법은 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미쳐 소화기관과 골수 조직의 손상, 탈모, 면역력 저하 등 여러 부작용을 일으키는 단점이 있다. 또한 암 확진 후 전이가 된 경우가 많아서 이미 암으로 발전한 후에는 각종 물리적, 화학적 요법을 동원하여도 완전한 치료가 어렵다.

[0003] 특히 유방암의 치료는 주로 외과적 수술, 방사선 치료, 또는 화학요법 중에서 한 가지 또는 이들을 조합하여 이루어지고 있다. 그런데, 유방 절제 수술은 여성들에게 상실에 따른 심리적 충격을 주어 우울감과 대인기피증에 따른 신경정신과 진료가 요구되는 부작용이 있다. 방사선 치료는 작게는 피부나 식도의 염증을 발생시키며, 폐렴, 심근 손상, 림프부종과 같은 부작용을 동반하는 단점이 있다. 항암제를 이용한 화학요법은 환자들이 거부반응 없이 치료에 응하는 장점이 있으며, 외과적 수술 전후의 보조 요법으로 사용됨으로 항암제 개발을 위한 노력이 꾸준하게 이루어지고 있다.

[0004] 유방암에서는 HER2의 활성이 암세포의 증식을 유도하고, 재발에 관여하며, 예후에 좋지 않은 영향을 준다는 것이 알려져 HER2에 대한 항체인 허셉틴을 사용하기도 한다. 그러나 허셉틴은 비교적 고가이며 심장에 손상을 주는 것으로 보고되어 있다. 더구나, HER2는 과발현된 환자에 한하여 효과를 보이고 있다.

[0005] 이렇듯, 지금까지 이용되고 있는 항암제들은 폐경기 이후의 환자에게 치료 효과를 보이든지, 에스트로젠 수용체 또는 HER2를 발현하는 유방암의 경우에 효과적이든지, 사용 기간을 한정해야 한다는 한계를 가지고 있다. 더불어, 정상 세포에 부작용을 나타내거나 심장에 대한 부작용을 나타내는 단점을 내포하고 있어 유방암에 대한 새로운 항암제 개발은 계속 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1980525호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 균주 배양액을 유효성분으로 함유하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 수탁번호 KCCM 13252P로 기탁된 엔테로코커스 락티스(Enterococcus lactis) MBT05 균주를 제공한다.

[0009] 상기 균주는 16S rDNA가 서열번호 1로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0010] 상기 균주는 유방암 세포주에 대하여 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0011] 상기 유방암 세포주는 MCF-7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주인 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 균주는 에스트로겐 수용체 비의존성 유방암의 치료 및 예방에 효과적인 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 균주는 유방암 세포에서 EGFR, RAF, ERK, caspase-9의 단백질 발현을 감소시키고, p-p53, cleaved-PARP의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 균주, 또는 상기 균주의 배양액을 유효 성분으로 포함하는 유방암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 식품은 음료, 식이 보충제, 크림상 식품, 디저트, 과자, 조미료, 레토르트 식품, 식육가공 식품 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 상기 균주 배양액은 유방암 세포주에 처리하였을 때 높은 항암 활성을 나타내어, 상기 균주 및 상기 균주 배양액은 유방암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 유방암 세포주인 MCF-7 세포주와 MDA-MB-231 세포주에 대한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액의 MTT 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 유방암 세포주인 MCF-7 세포주와 MDA-MB-231 세포주에 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액을 처리한 경우 유방암 세포주에서의 유전자 발현 양상을 확인한 그래프이다.

도 3은 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포주에 대한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말의 유방암 관련 단백질 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말에 대한 hollow fiber assay 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명자들은 우수한 암 치료 또는 예방 효과를 갖는 균주를 발굴하기 위해 연구한 결과, 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주가 우수한 항암 효과를 갖는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0020] 이에 본 발명은 수탁번호 KCCM 13252P로 기탁된 엔테로코커스 락티스(Enterococcus lactis) MBT05 균주를 제공한다.

[0021] 상기 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주는 유방암 세포에 대하여 우수한 암세포 증식억제 효과를 가지며, 상기 유방암 세포주는 MCF-7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 MDA-MB-231 세포주는 에스트로겐 비의존성 유방암세포이고, MCF-7 세포주는 에스트로겐 의존성 유방암 세포이다.

[0022] 또한 상기 상기 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액은 MCF-7 세포주 또는 MDA-MB-231 세포주에서 SHC1과 PI3K 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, 상기 균주 배양액은 MCF-7 세포주보다는 MDA-MB-231 세포주에 대하여 상기 SHC1 및 PI3K 유전자의 발현 억제율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 균주 배양액을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 및 균주 배양액을 유효성분으로 함유하는 유방암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0025] 바람직하게는, 상기 균주 및 균주 배양액은 유방암 세포의 증식을 억제하여 유방암 세포 생존율을 감소시킬 수 있다.

[0026] 바람직하게는, 상기 균주 및 균주 배양액은 유방암 세포의 SHC1과 PI3K 유전자 발현을 억제하여 암세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 바람직하게는, 상기 암은 고형암일 수 있으며, 상기 고형암은 유방암이다.

[0028] 본 발명에서 “균주 배양액”은 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주를 TSB 배지에 37℃ 170rpm 환경에서 48h~72h 동안 배양한 것을 원심분리기 (3,000 rpm, 20분, 상온)를 이용하여 균주를 분리한 상등액을 의미한다.

[0029] 본 발명에서 “균주 분말”은 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주를 TSB 배지에 37℃ 170rpm 환경에서 48h~72h 동안 배양한 것을 원심분리기 (3,000 rpm, 20분, 상온)를 이용하여 균주를 분리한 후 동결건조 한 것을 의미한다.

[0030] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐 피롤리돈(PVP:polyvinyl pyrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메칠셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linkedpolyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메칠셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulosesodium), 베타-싸이크로덱스트린(β-cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메칠(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향산프로필(propylp-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 유효한 양' 이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 염증성 질환의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 또한, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는" 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

[0034] 본 발명의 식품 조성물에는 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물 이외에, 본 발명의 효과를 방해하지 않는 것을 한도로 하여, 다른 배합 성분이 포함되어 있을 수 있다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물에 배합 가능한 성분으로서는, 예를 들면 설당, 트레할로스, 아세술팜 K, 자일리톨, 수크랄로스, 에리트리톨, 아스파탐, 물엿 등의 감미료; 카카오버터, 식물성 유지 등의 유지; 대두 레시틴 등의 유화제, 향료; 향료 제제; 밀크; 물 등을 들 수 있다.

[0036] 본 발명의 식품 조성물의 형상에 대해서는 특별히 제한되지 않고, 분말상, 입상, 침상, 플레이트상 등 중 어느 것이든 좋고, 사용되는 식품의 종류에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은, 필요에 따라 파쇄, 분쇄, 정립 등의 처리에 제공하여 원하는 형상으로 성형된다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 제조시에

압출 조립에 의해 성형할 수도 있다.

[0037] 상기 식품은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 포함하는 각종 형태의 식품일 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 구체적 식품 형태는 음료, 식이 보충제, 크림상 식품, 디저트, 과자, 조미료, 레토르트 식품, 식육가공 식품, 어묵 식품, 계란가공 식품, 통조림 또는 통포장 식품, 빵, 빙과, 대두가공 식품, 쌀밥식품, 및 스프 등이 있다.

[0038] 이하, 본 발명에서 사용되는 식품 형태에 대하여 상술한다.

[0039] 본 발명의 식품은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물 중 어느 것을 포함하는 것이든 상관없다.

[0040] 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물은 유방암의 예방 내지 개선 등의 용도에 유용하다. 따라서 각종 형태의 식품은 상기 용도를 목적으로 한 기능성 식품으로서도 제공할 수 있다. 즉, 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식품은 일반적인 식품 외에도, 특정 보건용 식품, 영양 보조 식품, 기능성 식품, 병자용 식품 등으로서 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식품은 유방암 환자를 위한 영양 보조 식품으로서 유용하다.

[0041] 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다. 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.

[0042] 이하, 본 발명에 의해 제공되는 구체적 식품 형태에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0043] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 음료를 제공한다. 본 발명의 음료의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 과즙 음료; 야채 쥬스; 스파클링 워터, 콜라, 과즙 함유 탄산음료, 진저에일, 사이다, 소다 등의 탄산음료; 스포츠 드링크 등의 청량 음료수; 커피, 커피 우유 등의 커피 음료; 홍차, 녹차, 우롱차 등의 차음료; 코코아; 유산균 음료; 우유, 과일 우유, 유산균 음료 등의 우유음료; 맥주, 소주, 위스키, 칵테일, 탄산음료를 탄 소주 등의 알코올 음료 등을 들 수 있다.

[0044] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식이 보충제를 제공한다. 본 발명의 식이 보충제의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 소프트겔, 정제, 분말제 등을 들 수 있다. 이들 중에서도, 바람직하게는 소프트겔을 들 수 있다. 소프트겔 및 분말제의 경우에는 그의 소정량을 캡슐에 수용된 상태로 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 소프트겔의 바람직한 하나의 실시양태로서는, 젤라틴, 물, 및 글리세린을 포함하는 소프트겔 중에, 에쿠올 함유 대두 배축 발효물 또는 그의 추출물을 첨가한 것이 예시된다. 또한, 소프트겔에는 상기 성분 외에 대두유, 밀랍, 레시틴, β-카로틴 등의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0045] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 크림상 식품을 제공한다. 본 발명의 크림상 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 휘프드 크림, 카스타드 크림, 버터 크림, 생크림, 커피 화이트너 등을 들 수 있다.

[0046] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 디저트를 제공한다. 본 발명의 디저트의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 요구르트, 젤리, 푸딩, 무스 등을 들 수 있다.

[0047] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 과자를 제공한다. 본 발명의 과자는 종별을 불문하며, 구운 과자나 찐 과자를 포함한 모든 과자가 포함된다. 본 발명의 과자로서, 구체적으로는 캔디, 엿, 카라멜, 프레첼, 타블렛, 껌, 초코렛, 쿠키, 콩과자, 웨하스, 치즈 크래커, 구미, 전병, 스하마(일본 과자의 일종), 건과자, 양갱, 만두, 고사리떡, 파운드 케이크, 애플파이 필링, 스낵 과자, 말린 떡과자 등이 예시된다.

[0048] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 조미료를 제공한다. 본 발명의 조미료의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 불고기 소스, 장어구이 소스, 오징어 진미의 조미료, 토마토 케첩, 맑은 장국, 액체 드레싱, 분말 드레싱, 참깨 소스, 시즈닝, 간장 등을 들 수 있다.

[0049] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 레토르트 식품을 제공한다. 본 발명의 레토르트 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 카레, 하이라이스 소스, 스튜, 미트 소스, 화이트 소스 등의 소스의 소; 중화풍 덮밥, 소고기 덮밥, 닭고기 계란 덮밥 등의 덮밥의 소; 마파두부의 소, 솥밥의 소 등의 조미료 재료 등을 들 수 있다.

[0050] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 식육가공 식품을 제공한다.] 본 발명의 식육가공 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 소시지(건조, 반건조, 볼로냐, 프랑크프루트, 비엔나, 스모크), 리버 페이스트, 베이컨, 숄더 베이컨, 햄, 햄버거, 미트볼 등을 들 수 있다.

[0051] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 통조림 또는 통포장 식품을 제공한다. 본 발명의 통조림 또는 통포장 식품의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 귤, 복숭아 등의 과일 통조림; 참치, 정어리 등의 해산물 통조림; 잼 등의 통조림; 스프 등의 통조림; 소스 등의 통조림 등이 예시된다.

[0052] 본 발명은 상기 균주, 균주 배양액(또는 분말) 또는 그의 추출물을 함유하는 빵을 제공한다. 본 발명의 빵의 종류에 대해서는 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면 식빵, 프랑스빵, 조리빵, 멜론빵, 팥빵, 크림빵, 잼빵, 롤빵, 크로와상 등을 들 수 있다.

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<균주의 분리 및 동정>**

[0057] 인체 분변을 수집하여 gifu anaerobic medium(GAM), trypticase soy agar(TSA), ethylene bromide agar(EMA), brain heart infusion(BHI), reinforced clostridial medium(RCM), Lactobacilli MRS(MRS) 6종의 배지에 도말하여 37도에서 24시간 동안 배양하면서 생성되는 colony의 형태와 색상을 기준으로 하여, 각각의 균주를 분리하였다. 상기 분리된 균주들은 cell cytotoxicity를 통하여 유방암세포에 사멸이 우수한 균주를 선정하였고, 선정된 균주를 규명하기 위하여, genomic DNA를 추출하였으며, 세균의 16s rRNA 부위를 특이적으로 증폭시키는 forward primer인 27F (5'-agagtttgatcMtggctcag-3')와 reverse primer인 1492R (5'-ggYtaccttg ttacgactt-3')를 사용하였다. PCR reaction mixture는 template 1 ㎕, 2X Taq PCR premix(QIAGEN) 10 ㎕, forward primer 2 ㎕(10 pmole/㎕), reverse primer 2 ㎕ (10 pmole/㎕), dDW 5 ㎕를 섞은 뒤 PCR을 수행하였다. PCR cycle은 94도에서 10초, 45도에서 20초, 72도에서 1분 동안 수행하였으며, PCR 과정은 30번 반복하였다. 또한, Pre-denaturation과정은 94도에서 2분 동안 수행하였고 post-elongation 과정은 72℃에서 5분 동안 수행하였으며, PCR 결과는 0.7% agarose gel에서 확인하였다. PCR product 정제는 QIAquick Gel Extraction kit를 사용하였으며, 균주동정을 위해 정제된 DNA를 Biofact사에 의뢰하여 sequencing 분석을 통하여, 최종 분리 균주는 Enterococcus lactis와 상동성을 나타내었으며, 이를 Enterococcus lactis MBT05로 명명하고 한국미생물보존센터에 2022년 10월 25일에 수탁번호 KCCM13252P로 기탁하였다.

[0058] <서열번호 1> 16S rDNA

[0059] GCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGA
TAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGA
GAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTG
ACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG
TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAA

GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC
GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCC
TAAGGGTGGG

[0061] **실시예 1: 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말 제조**

[0062] 신규한 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주는 TSB(tryptic soy) 배지에 접종한 후 37℃ 배양기에서 170 rpm 환경에서 48 내지 72시간 동안 배양하였으며, 배양 종료 후 원심분리기(3,000 rpm, 20분, 상온)를 이용하여 균주와 균주 배양액(상등액)을 분리한 후 각각의 분말로 제조하여 사용하였다.

[0064] **실시예 2 : 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액의 암세포 사멸 효과 확인**

[0065] 본 발명자는 다양한 균주의 유방암 세포 사멸 효과를 확인하고자 하였으며, 유방암 세포는 MCF-7 세포주와 MDA-MB-231 세포주를 선정하여 진행하였다. MCF-7 세포주와 MDA-MB-231 세포주는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, 세포 배양 배지로는 RPMI(5% FBS, 1% p/s)를 사용하였다. 세포주는 1*10^4 cell/well로 분주하여 37도, CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 각각의 균주 배양액 분말 시료를 100, 200, 500 ug/ml의 농도로 처리한 후 24시간 후에 MTT assay를 수행하였다.

[0066] 도 1을 참고하면, 466번 균주(엔테로코커스 락티스 MBT05 균주)가 MCF-7세포주와 MDA-MB-231 세포주 모두에서 가장 높은 사멸 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0068] **실시예 3 :유방암 세포에서 미생물 배양액에 의한 활성 유전자 비교**

[0069] 유방암에서 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액에 의한 항암 활성과 세포사멸과의 연관성을 분석하기 위해, MCF-7 세포와 MDA-MB-231 세포는 2*10^5 cells/well로 6 well plate에 분주하고, 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주를 농도별로 처리 한 후 24시간 동안 배양하였다.

[0070] 이후 상등액을 제거한 후 Trizol을 처리하여 세포를 harvest 하였다. 이후 RNA를 추출 한 후 1st cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 사용한 primer의 sequence는 아래와 같다.

[0071] [프라이머 서열]

[0072] Human_EGFR_F: TGCATACAGTFCCACCCAGAG

[0073] Human_EGFR_R: GCACACTGGATACAGTTAGTCTGGTC

[0074] Human_shc_F: CTATCCTFFFFAFFAFTAAC

[0075] Human_shc_R: GCAACATAGGCGACATACTC

[0076] Human_pi3k_F: GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG

[0077] Human_pi3k_R: GAGCATCCATGAAATCTGGTCGC

[0078] Human_β-actin_F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG

[0079] Human_ β-actin_R: TGTGTTGGGGTACAGGTCTTTG

[0080] 도 2를 참고하면, MDA-MB-231 세포주 및 MCF-7 세포주에 엔테로코커스 락티스 MBT05 배양액을 처리하였을 때 SHC1과 PI3K 유전자 발현이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 상기 균주 배양액은 MCF-7 세포주보다는 MDA-MB-231 세포주에 대하여 상기 SHC1 및 PI3K 유전자의 발현 억제율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 따라서, 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주는 MCF-7 세포주 및 MDA-MB-231 세포주에서 SHC-1과 PI3K 유전자의 발현을 억제하였으나, MCF-7 세포주보다는 MDA-MB-231 세포주에 특이적으로 작용하여 SHC-1과 PI3K 유전자의 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0083] **실시예 4 : 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액의 유방암 관련 단백질 발현 분석**

[0084] 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주에 의한 유방암 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 MDA-MB-231 세포주에서 EGFR, RAF, ERK, p53, caspase-9, PARP의 단백질 발현을 확인하였다. 항체는 Cell signinaling에서 구입하여 사용하였다.

[0085] MDA-MB-231 세포주를 3*10^5 cell/well로 6 well plate에 분주하고, 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 EGF 200 ng/ml을 처리 하여 24시간 동안 배양하였다.

[0086] 이후, 상등액을 제거하고 cold PBS로 세척한 후 cell lysis buffer를 이용하여 세포를 harvest 하였다. 15분 동안 4℃에서 반응시킨 후 12,000 rpm, 15분 동안 원심분리를 하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액은 BCA assay를 이용하여 단백질 정량을 수행하였으며, 50 μg의 농도로 protein을 정량하여 western blot을 수행하였고, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0087] 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말에 의하여 EGFR, RAF, ERK, caspase-9의 단백질 발현이 감소하고, p-p53, cleaved-PARP의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다.

[0088] 따라서, 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말에 의하여 유방암 세포의 cell proliferation, survival, cell cycle progression 조절됨으로서 유방암 치료 및 개선용 조성물로서 개발 가능성을 확인하였다.

[0090] **실시예 5 : 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액의 hollow fiber assay**

[0091] 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 및 균주 분말을 실험동물에 투여하였을 때, 유방암세포에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. balb/c nude 마우스에 MDA-MB-231세포를 배양하여 hollow fiber에 주입시킨 후, 이 hollow fiber를 마우스 등조직에 삽입하였다. 이후 각각의 시료를 농도별로 7일간 실험동물에 경구투여 하였다. 7일 이후 삽입된 hollow fiber를 분리하여, 세포 사멸효과를 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 양성대조군인 gefitinib을 투여하였을 때보다, 엔테로코커스 락티스 MBT05 균주 배양액 고농도 및 균주 분말을 경구투여하였을 때, 유의적으로 유방암세포가 사멸된 것을 관찰하였다.

수탁번호

[0093]

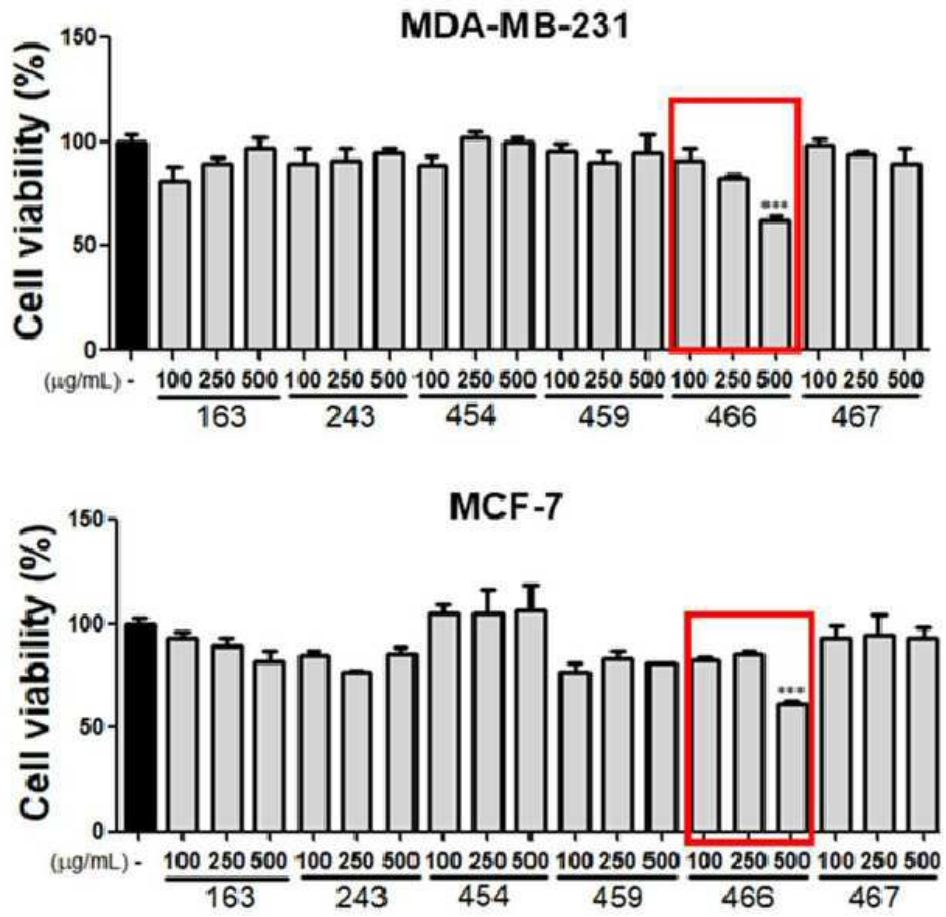
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13252P

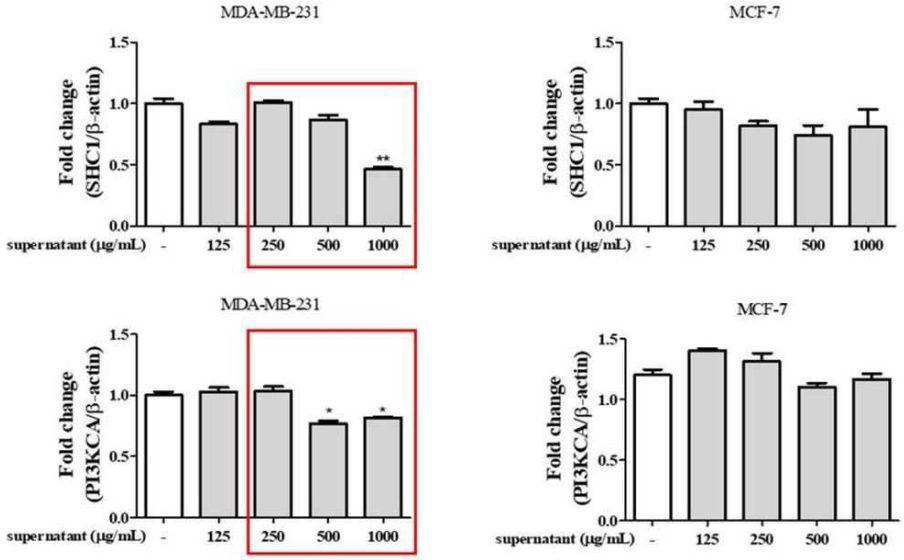
수탁일자 : 20221025

도면

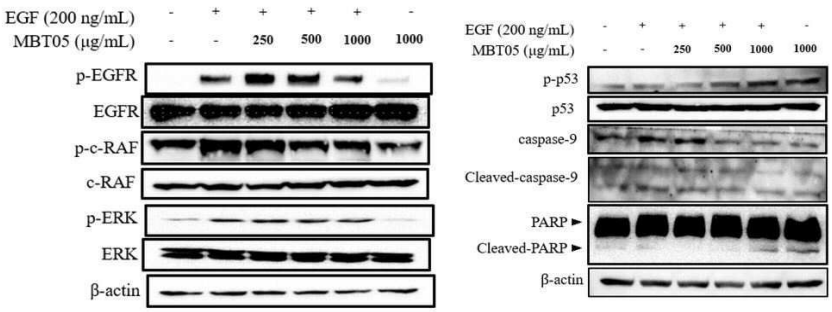
도면1


MDA-MB-231
Cell viability (%)
150
100
50
0
(μg/mL) -
100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500
163
243
454
459
466
467
***
MCF-7
Cell viability (%)
150
100
50
0
(μg/mL) -
100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500 100 250 500
163
243
454
459
466
467
***

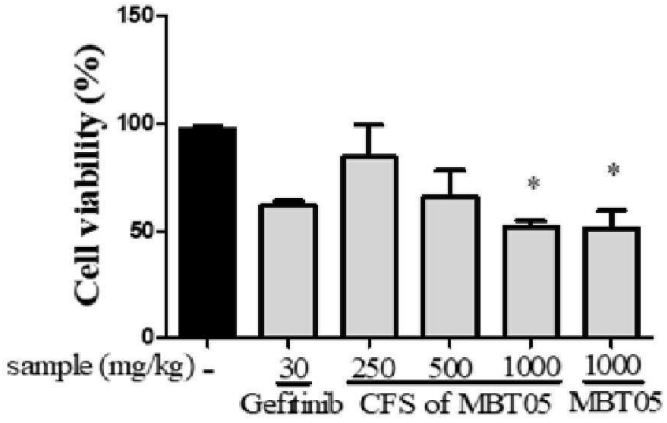
도면2


MDA-MB-231
Fold change (SHC1/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
supernatant (μg/mL) - 125 250 500 1000
**
MCF-7
Fold change (SHC1/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
supernatant (μg/mL) - 125 250 500 1000
MDA-MB-231
Fold change (PI3KCA/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
supernatant (μg/mL) - 125 250 500 1000
*
*
MCF-7
Fold change (PI3KCA/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
supernatant (μg/mL) - 125 250 500 1000

도면3


EGF (200 ng/mL) - + + + + -
MBT05 (μg/mL) - - 250 500 1000 1000
p-EGFR
EGFR
p-c-RAF
c-RAF
p-ERK
ERK
β-actin
EGF (200 ng/mL) - + + + + -
MBT05 (μg/mL) - - 250 500 1000 1000
p-p53
p53
caspase-9
Cleaved-caspase-9
PARP ►
Cleaved-PARP ►
β-actin

도면4


Cell viability (%)
150
100
50
0
*
*
sample (mg/kg) - 30 250 500 1000 1000
Gefitinib CFS of MBT05 MBT05

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.