



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0056137
(43) 공개일자 2022년05월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/74 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0143484
(22) 출원일자 2021년10월26일
심사청구일자 2021년10월26일
- (30) 우선권주장
1020200140641 2020년10월27일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
- (72) 발명자
박숙련
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 204동 2102호
(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
- (74) 대리인
이명진

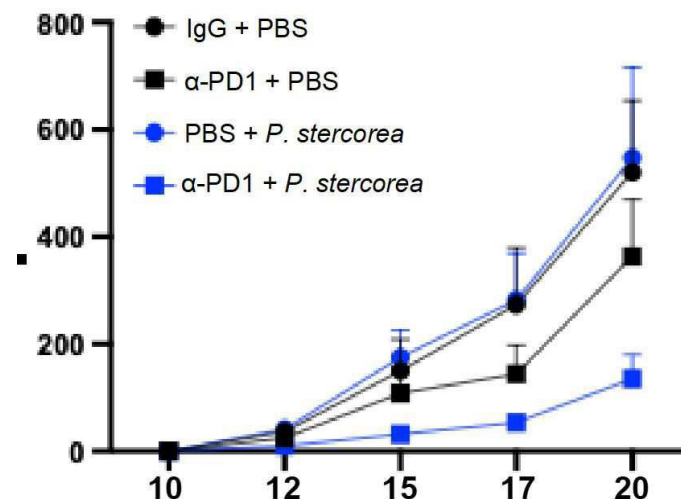
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 프레보텔라 스테코리아 균주의 암의 예방 또는 치료를 위한 응용

(57) 요약

본 발명은 프레보텔라 스테코리아(*Prevotella stercorea*) 균주의 암의 예방 또는 치료를 위한 응용 등에 관한 것으로, 본 발명자들은 프레보텔라 스테코리아 균주가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN- γ 분비를 증가시키며, 프레보텔라 스테코리아가 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시킴을 확인하였다. 따라서, 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 면역 증강용 및 면역관문 억제제의 항암 효과 증진 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465029899

과제번호 2019-1102

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 국립암센터

연구사업명 서울아산병원_연구사업

연구과제명 난치성 고형암에서 면역항암제 유효성 향상을 위한 병용요법으로서 인체 마이크로바

이음 기반 파마바이오텍스 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울아산병원

연구기간 2019.04.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주는 기탁번호 KCTC15079인 것을 특징으로 하는, 면역증강용 조성물.

청구항 3

프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주는 기탁번호 KCTC15079인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 효과 증진용 식품 조성물.

청구항 6

프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 면역관문 억제제는 PD-L1 억제제 또는 PD-1 억제제인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙(atenzolizumab), 아벨루맙(avelumab), 두발루맙(durvalumab), 엔바폴리맙(envalolimab), 코시벨리맙(cosibelimab), AUNP12, CA-170 및 BMS-986189로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 PD-1 억제제는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스탈리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제6항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제6항에 있어서,

상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 T 세포의 인터페론- γ (IFN- γ)의 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제6항에 있어서,

상기 암은 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 프레보텔라 스테르코리아(*Prevotella stercora*) 균주의 암의 예방 또는 치료를 위한 응용 등에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 1990년대 이후로 사망원인 제1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 암 환자로 진단되고 있고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 스트레스 및 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다.

[0004] 항암 치료에는 수술로 인한 종양조직 제거, 방사선치료, 화학적 치료, 그리고 면역항암 치료가 있다. 항암 치료에 사용되고있는 항암제들은 각 암종에 따라 다르게 적용이 되고 있다. 일반적으로 암 환자들에게 처방되고 있는 화학적 항암제들은 암세포를 포함한 일반 정상 세포의 생존 기전에도 영향을 줌으로써 환자들에게서 탈모, 발열, 설사, 발진, 그리고 면역력 저하 등의 부작용이 발생되고 있다. 이후, 암에 대한 유전적인 연구 등을 바탕으로 암의 특징적 유전적 변이에 의한 특이점을 억제하는 표적 항암제가 개발되어 기존의 화학항암제에 의해 발생하는 부작용은 많이 개선되었으나, 돌연변이가 매우 빠른 암세포가 표적 항암제의 항암제 내성을 유발하게 되어, 표적 항암제에 의한 지속적인 항암 효과를 100% 기대할 수 없다는 문제점이 있다. 최근에는 종양미세환경에 대한 연구가 활발히 이루어져 환자의 면역력을 조절하는 여러 면역관문에 대한 면역항암제가 개발되어 환자들의 치료제로서 사용되고 있다. 그 중, PD-1/PD-L1을 억제하는 면역항암제는 흑색종, 위암 그리고 폐암 등의 환자들에게 높은 치료 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역항암제는 종양미세환경 내에서 면역 세포들의 기능을 활성화함으로써 암세포의 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다. 그러나, 면역항암제 또한 모든 환자들에게서 동일한 항암 효과를 나타내지 못하고 있다.

[0005] 한편, 인체의 장은 다양한 종류의 세균들의 공생 장소로 음식물의 소화에 따른 영양소 흡수 및 체내에 불필요한 물질을 체외로 배설하는 중요한 기능을 가진다. 또한 장내 세균에 의한 환경의 변화는 장 면역과 직결되며 이는 결국 체내 면역력에도 영향을 미친다. 이러한 장내 건강에 유익한 미생물들에 대한 연구가 수년간 지속되어 오면서 장내 미생물의 면역력 및 체내 대사 활동 관여에 대한 연구결과들이 전세계적으로 활발히 발표되고 있다. 프로바이오틱스(probiotics)는 살아있는 미생물체를 뜻하는 말로써 소화기관 내 불균형을 개선하고 유해균을 억제하며, 자연 방어 효과를 강화시켜 체내 면역 반응을 향상시키는 기능을 갖는다. 그동안 면역 기능 향상을 위한 프로바이오틱스의 기능 연구는 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 락토코커스 (*Lactococcus*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 등을 이용하여 종 (species)과 속 (genus)의 분류학적 형태에 따라 연구되어 왔다.

[0006] 그러나, 프레보텔라 스테르코리아 균주가 면역증강 효과를 통해 면역항암제의 효능을 증진시키는 점에 대해서는 알려진 바 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0053639호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 프레보텔라 스테르코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물 및 항암 효과 증진용 조성물을 제공하는 것으로서, 본 발명자들은 프레보텔라 스테르코리아 균주가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN- γ 분비를 증가시키며, 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진

시킴을 확인하였다.

- [0010] 이에, 본 발명의 목적은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주는 기탁번호 KCTC15079로 기탁된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항암 효과 증진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 면역관문 억제제는 PD-L1 억제제 또는 PD-1 억제제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 두발루맙(durvalumab), 엔바폴리맙(envalfolimab), 코시벨리맙(cosibelimab), AUNP12, CA-170 및 BMS-986189로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 PD-1 억제제는 니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 세미폴리맙(cemiplimab), 스파탈리주맙(spartalizumab), 캄렐리주맙(camrelizumab), 신틸리맙(sintilimab), 티슬렐리주맙(tislelizumab), 토리팔리맙(toripalimab), 도스타리맙(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 동시에 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 $CD4^{+}$ T 세포 및 $CD8^{+}$ T 세포의 증식을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 T 세포의 인터페론- γ (IFN- γ)의 분비를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 암은 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장

암, 수노관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 증강 방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 면역 증강 용도를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액의 면역 증강제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항암 효과 증진 방법을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 항암 효과 증진 용도를 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액의 항암 효과 증진제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제의 암 치료제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명자들은 프레보텔라 스테코리아 군주가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN- γ 분비를 증가시키며, 프레보텔라 스테코리아가 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시킴을 확인하였다. 따라서, 프레보텔라 스테코리아 군주 또는 이의 배양액을 면역 증강용 및 면역관문 억제제의 항암 효과 증진 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액으로 처리하는 경우, T 세포의 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액으로 처리하는 경우, CD4⁺ T 세포의 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액으로 처리하는 경우, CD8⁺ T 세포의 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액으로 처리된 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포에서 분비된 IFN- γ 를 나타낸 것이다.
- 도 5는 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액으로 처리된 CD8⁺ T 세포에서 분비된 IFN- γ 를 나타낸 것이다.
- 도 6은 프레보텔라 스테코리아 군주와 α -PD1 항체의 병용이 결장암 종양의 성장을 감소시킴을 나타낸 것이다.
- 도 7은 프레보텔라 스테코리아 군주와 α -PD1 항체의 병용이 비장 및 종양에서 CD8⁺ T 세포의 기억 T 세포 비율을 증가시킴을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 일 실시예에서는 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 처리한 경우, 균주 배양액에 농도 의존적으로 T 세포의 증식 정도가 유의미하게 증가하며, $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포의 증식 정도가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0042] 본 발명의 다른 실시예에서는 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 처리한 경우, $CD4^{+}$ T 세포 및 $CD8^{+}$ T 세포의 IFN- γ 분비가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 프레보텔라 스테코리아 균주와 PD-1 억제제의 병용 투여한 경우, 종양 성장 억제 효과가 현저히 우수하며, 장 세포와 종양침윤성림프구(TIL)에 있는 $CD8^{+}$ T 세포의 기억 T 세포 비율이 프레보텔라 스테코리아 균주 배양액과 PD-1 억제제의 병용에 따라 유의하게 증가함을 확인하였다.
- [0044] 따라서, 본 발명의 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 면역 증강 및 항암 효과 증진 용도로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 면역관문 억제제와의 시너지 효과를 기초로 면역관문 억제제 병용 항암 조성물로 제공된다.
- [0046] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0048] 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물 및 항암 효과 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주는 기탁번호 KCTC15079로 기탁된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에서 용어 '배양'이란 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서는 '발효'를 포함하는 개념이다.
- [0052] 본 발명에서, 상기 '프레보텔라 스테코리아'의 균체는 배양 배지로부터 수득된 생균 그 자체뿐만 아니라, 당업자에게 알려진 유산균에 대한 임의의 가공형태를 포함하는 것으로 예를 들어 균체 파쇄물, 건조물, 동결물 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명에서, 용어 '배양액'은 '발효액'을 포함하는 의미이며, 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리 하여 균주를 제거한 여액(원심분리한 상층액) 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 면역관문 억제제는 PD-L1 억제제 또는 PD-1 억제제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 PD-L1 억제제는 항 PD-L1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에서, 상기 PD-1 억제제는 항 PD-1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에서, 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맵(atezolizumab), 아벨루맵(avelumab), 두발루맵(durvalumab), 엔바폴리맵(enfavalimab), 코시벨리맵(cosibelimab), AUNP12, CA-170 및 BMS-986189로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에서, 상기 PD-1 억제제는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미폴리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스타릴리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 0.5 내지 10:1, 0.5

내지 9:1, 0.5 내지 8:1, 0.5 내지 7:1, 0.5 내지 6:1, 0.5 내지 10:1, 0.5 내지 5:1, 0.5 내지 4.5:1, 1 내지 10:1, 1 내지 9:1, 1 내지 8:1, 1 내지 7:1, 1 내지 6:1, 1 내지 5:1, 1 내지 4.5:1, 2 내지 10:1, 2 내지 9:1, 2 내지 8:1, 2 내지 7:1, 2 내지 6:1, 2 내지 5:1, 2 내지 4.5:1, 3 내지 10:1, 3 내지 9:1, 3 내지 8:1, 3 내지 7:1, 3 내지 6:1, 3 내지 5:1, 3 내지 4.5:1, 3.5 내지 4.5:1 또는 4:1의 부피비로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 상기 부피비로 개별적으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 상기 면역관문 억제제와 동시 또는 순차적으로 투여되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역관문 억제제와 혼합물의 형태로 하나의 용기 내에 존재하도록 제형화될 수 있고, 별개의 용기 내에 존재하여 동시 또는 순차적으로 투여되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역관문 억제제의 치료 전에 투여되는 것일 수도 있고, 면역관문 억제제의 치료 이후 2차 요법으로서 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명에서 사용되는 용어 "암"은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 세포 자살(apoptosis)의 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 의미한다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴(腫塊)를 형성할 수 있으며 체내의 정상적인 구조의 파괴나 변형을 유발할 수 있는데, 이러한 상태를 통칭하여 종양(tumor)이라고 한다. 일반적으로 종양은 양성 종양(benign tumor)과 악성 종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 악성 종양은 양성 종양에 비해 성장 속도가 매우 빠르며 주변 조직에 침윤하면서 전이(metastasis)가 일어나 생명을 위협하게 된다. 이러한 악성 종양을 통상적으로 "암(cancer)"이라 한다.

[0062] 본 발명에서, 상기 암은 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 신장 세포 암종, 신장골반 암종, CNS종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에서, "면역 증강"은 생체 내 면역시스템의 면역 반응 또는 활성을 증가시키는 것을 의미한다. 면역은 크게, 선천면역(innate immunity)과 획득면역(acquired immunity)으로 구분된다. 선천면역은 항원에 대해 특별한 기억 작용이 없이 비특이적으로 반응하여 항원의 침입으로부터 보호하는 기능을 한다. 상기 선천면역에는 피부, 점액 조직, 강산성의 위산, 혈액에 존재하는 보체(complement)등 많은 해부학적 방어 작용 및 생물학적 작용이 이에 속하며, 상기 선천면역을 담당하는 세포로 식균 작용을 하는 대식세포(macrophage)와 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte), 감염세포 및 암세포를 사멸시키는 자연살해세포(NK cell)등을 들 수 있다. 획득면역은 항원의 표식을 기억하는 기능을 의미하는 면역기억(immunological memory)을 비롯한 보다 강력한 면역 반응을 말하며 항원에 특이적이며 항원제시(antigen presentation) 과정을 통한 비자기항원의 인지를 필요로 한다.

[0064] 본 발명에서, "항암 효과 증진"은 항암제와 병용시 항암제의 종양 성장 억제 효과를 증진시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 면역관문 억제제인 항-PD-1 항체와 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 병용 투여한 결과, 결장암의 성장이 억제될 뿐만 아니라 기억 T 세포의 비율이 유의하게 증가함을 확인하였다(본 발명의 실시예 3 참조).

[0065] 본 발명의 프레보텔라 스테코리아 균주는 T 세포의 증식을 촉진하며, T 세포의 IFN- γ 분비 촉진 효과가 타 균주에 비해 월등히 우수하기 때문에 선천면역과 획득면역 기능을 증진시키는 효과가 있다.

[0066] 본 발명의 조성물 내의 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0067] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅

물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [0068] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0070] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0071] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+

염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스탄 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 핵사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 핵사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기체 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기체 (TG-95, MA, 57)와 같은 기체가 사용될 수 있다.

[0078] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0079] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0082] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0083] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0084] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0085] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0086] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0088] 또한, 본 발명은 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용, 또는 항암 효과 증진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0089] 본 발명의 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 상기 프레보텔라 스테코리아 균주 또는 이의 배양액은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0090] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0091] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.
- [0092] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0094] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0096] 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.
- [0098] **[실시예]**
- [0099] **실험예 1. 실험 방법**

[0100] **실험예 1-1. 마우스 준비**

[0101] 모든 동물 실험은 광주과학기술원(GIST)의 동물 관리 및 사용 위원회에서 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다. 본 연구에 사용된 모든 동물은 연구 프로토콜의 승인된 정책에 따라 유지 및 취급하였다. 군주 투여에 할당된 마우스의 수는 결장암 종양 크기, 사이토카인 및 면역 세포 프로파일링을 포함하여 통계적 결과를 제공하기에 충분하였다. 모든 *in vivo* 연구는 맹검이 아니었으며, 프레보텔라 스테코리아(*P. stercorea*, KTCT 15079) 군주를 투여하기 전에 각 그룹에 대해 마우스를 무작위로 선택하였다. 야생형 C57B6/N(암컷) 마우스는 Orient Bio에서 제공받았다.

[0103] **실험예 1-2. 프레보텔라 스테코리아 군주 배양 상층액의 준비**

[0104] 프레보텔라 스테코리아 KTCT 15079는 다음 조성으로 만들어진 배지에서 배양하였다. 액체 배지는 뇌심장침출 배지 (37g/1L), 0.05% L-시스테인 HCl (0.5g/1L), 0.5% 효모 추출물 (5g/1L), 1% 헤민스톡 (10ml/1L), 0.02% 비타민 K1 (0.2ml/1L)을 포함하였다. 헤민스톡(sigma, 51280)은 0.5 mg/mL, 비타민 K1 스톡(sigma, 95271)은 0.1mL/20mL의 농도로 사용하였다. 배양된 군주는 OD600 = 2-4일 때 사용하였다.

[0105] *In vitro* 세포 실험에 사용된 배양 상층액은 배양된 군주가 OD600 = 2-4일 때, 군주 배양액 1mL을 RPMI 배지 10mL에 접종하여 하루 동안 배양하여 그 상층액을 분리함으로써 사용하였다. 해당 배양 상층액은 사람의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 분리한 면역 세포의 배양액에 1, 5 또는 10%(v/v)로 처리하였으며, 3일동안 배양하였다.

[0106] *In vivo* 동물 실험에 사용한 군주를 수득하기 위하여, 배양된 군주가 OD600 = 2-4일 때, 6000rpm에서 5분간 원심분리하여 군주 pellet 형태로 분리하였다. 분리된 군주는 PBS로 희석하여 OD600 = 4로 맞춰 사용하였다. 해당 군주는 6일/1주 주기로 쥐에 200mL씩 경구 투여 하였다.

[0108] **실험예 1-3. 결장암 종양 모델 마우스 준비 및 종양 성장 측정**

[0109] 동계(syngeneic) 종양 마우스 모델의 경우, 암컷 C57B6/N 마우스(야생형, 6주령)에 종양 접종 2주 전부터 프레보텔라 스테코리아 군주를 PBS로 희석하여 OD600 = 4로 맞춰 6일/1주 주기로 200mL씩 경구 투여하였으며, 실험 기간 내내 투여를 지속하였다. 종양 마우스 모델은 암컷 C57B6/N 마우스에 2×10^5 MC38 결장암 세포를 피하 주사하여 제작하였다. 종양의 크기는 실험이 끝날 때까지 주 3회 측정하였고, 종양의 부피는 길이 $\times$ 너비 $^2 \times 0.5$ 로 계산하였다(단위:mm ^{3}). 종양 세포의 접종 후, 종양 마우스 모델은 3일, 7일, 10일, 14일, 17일 및 21일 쯤에 PBS 중 항-PD-1 단일클론 항체(mAb; 클론 RMP1-14, BioXCell)를 1kg 당 2mg로 복강내 주사하였다.

[0111] **실험예 1-4. 인간 T 세포 분석**

[0112] 군주에 대한 인간 T 세포의 반응을 분석하였다. 혈액 샘플은 한국 GIST에서 사전 동의하에 건강한 기증자로부터 수집되었다. 본 연구는 기관 검토 위원회(20192009-BR-48-02-04)의 승인을 받았다. 말초혈액단핵세포(PBMC)는 Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare Life Sciences) 밀도 구배 원심분리를 사용하여 정제되었다. 실험을 위해 KCTC에서 *P. stercorea*, *Bacteroides plebeius*, *Ligilactobacillus salivarius*를 구입하였다. 각 군주는 제조 업체의 지침에 따라 배양되었다. 자가 CD4 $^+$ 또는 CD8 $^+$ T 세포는 음성 면역자기 선택 키트를 사용하여 나머지 PBMC에서 분리하였으며, RPMI 1640, 10% 인간 AB $^+$ 혈청, 1% 2mM 글루타민, 1 ml 당 20 IU의 IL-2, 1,000 IU/ml의 과립구-대식세포 집락 자극 인자(Miltenyi Biotec), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco/Invitrogen), 및 50 μ g/ml 젠타마이신(Gibco/Invitrogen)을 포함하는 웰에 5×10^4 개의 세포로 현탁하였다. 그런 다음 자가 CD4 $^+$ 또는 CD8 $^+$ T 세포를 CFSE(Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Thermo)로 염색하였다. 염색된 자가 CD4 $^+$ 또는 CD8 $^+$ T 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^4 개 세포로 분배한 다음 단독으로, 또는 *P. stercorea*, *B. plebeius* 또는 *L. salivarius*의 상층액을 처리하여 5% CO $_2$, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 2시간 동안 최종 농도의 10%로 배양하였다.

[0113] 자가 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포를 5% CO_2 , $37^\circ C$ 조건에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후, 상층액을 수집하여 $-20^\circ C$ 에 보관하고 Human IFN- γ ELISA 키트(invitrogen)를 사용하여 IFN- γ 수준을 측정하였다. 배양된 자가 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포를 수집하고 PBS(인산염 완충 식염수)(Thermo)를 사용하여 두 번 세척하였다. $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증식을 유세포 분석으로 측정하였다.

[0115] 실험예 1-5. 유세포 분석

[0116] T 세포의 증식 효과를 확인하기 위하여, BDFACS Divassoftware v.8.0.2(BD Bioscience)를 사용하여 CANTO II(BD Bioscience)로 염색된 세포를 획득하였다. CFSE로 염색된 T 세포는 SSC(Side scatter) 및 FSC(Forward Scatter) 값으로 게이트되었다. 그런 다음 분리된 세포 영역을 FSC-H 및 FSC-A 값으로 게이트하여 단일 세포 집단을 찾았다. 단일 세포를 FITC로 측정하여 증식된 세포 집단을 관찰하였다. FlowJo 소프트웨어(v.10, TreeStar)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다.

[0117] 종양 내 면역 세포를 분리하기 위해 종양을 먼저 분해하였다. 해부된 종양을 작은 조각으로 자르고 2.5mg/ml 콜라게나아제 타입 1, 1.5mg/ml 콜라게나아제 타입 2, 1mg/ml 콜라게나아제 타입 4, 50 $\mu g/ml$ DNase 유형 1, 및 0.25mg/ml 히알루로니다제 타입 IV-S가 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco/Invitrogen)로 옮겼다. 샘플을 $37^\circ C$ 에서 50분 동안 인큐베이션한 다음 70 μm 세포 여과기(BD Bioscience)를 통해 여과하였다.

[0118] 비장은 RPMI 1640 배지에서 으깨고 RBC 용해 완충액(eBioscience)에서 배양하고 70 μm 세포 여과기를 통해 여과하였다. Fc 수용체를 차단하기 위해 비장, 및 종양 세포를 항-마우스 CD16/CD32(BD Bioscience)와 함께 $4^\circ C$ 에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 생존률 확인 및 표면 염색 후, 고정/투과성 버퍼 세트(BioLegend) 용액을 첨가하였다. 하기 항-마우스 항체가 비장 및 종양 면역 세포 프로파일링에 사용되었다: CD45 (1:100 dilution; BioLegend, 103116); CD3 (1:20 dilution; BioLegend, 100218); NK1.1 (1:100 dilution; BioLegend, 108708); CD49b (1:100 dilution; BioLegend, 108910); CD4 (1:100 dilution; BioLegend, 100422); CD25 (1:20 dilution; BioLegend, 101904); FOXP3 (1:20 dilution; Invitrogen, 17-5773-82); CD44 (1:100 dilution; BioLegend, 103008); CD62L (1:100 dilution; BioLegend, 104412); CD8a (1:25 dilution; BioLegend, 100706, spleen and tumour); CD8a (1:80dilution; BioLegend, 100712, intestine cytokine expression); IFN- γ (1:50 dilution; BioLegend, 505806); 및 IL-2 (1:200 dilution; BioLegend, 503820). 염색된 세포 획득은 BD FACSDiva 소프트웨어 v.8.0.2(BD Bioscience)를 사용하여 CANTO II(BD Bioscience)로 수행하고, 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어(v10, TreeStar)를 사용하여 수행하였다.

[0120] 실험예 1-6. 기억 T 세포 분석 방법

[0121] $CD8^+$ T 세포는 $CD3^+$, $CD45^+$ 및 $CD8^+$ 가 있는 마커에 의해 게이팅되었다. $CD8^+$ T 세포의 기억 T 세포는 $CD44^+$ 및 $CD62L^+$ 가 있는 추가 마커에 의해 게이팅되었다. 따라서 기억 T 세포/ $CD8^+$ T 세포의 비율은 $CD3^+$, $CD45^+$, $CD8^+$, $CD44^+$ 및 $CD62L^+$ 세포의 수 / $CD3^+$, $CD45^+$ 및 $CD8^+$ 세포수 비율로 확인하였다.

[0123] 실시예 1. 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액 처리에 따른 T 세포의 증식 증가 효과 확인

[0124] 암세포를 항원으로 기억하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포들은 암세포에 대한 면역력을 유지하는 데 있어 중요한 역할을 한다. 이에, 프레보텔라 스테코리아 균주가 T 세포의 증식에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0125] 도 1에 나타난 바와 같이, 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 처리한 경우, 균주 배양 상층액의 농도 의존적으로 T 세포의 증식 정도가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0126] 보다 구체적으로, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 10%(v/v) 농도로 처리한 경우, 다른 균주 처리와 비교해 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증식 정도가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0128] **실시예 2. 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액 처리에 따른 T 세포의 IFN- γ 분비 증가 효과 확인**

[0129] CD4를 포함하는 T세포는 항체 반응과 CD8을 발현하는 T세포의 역할을 돕고, IFN- γ 을 분비하여 염증 환경을 만들어 항암 면역이 원활히 이루어 질 수 있도록 한다. 이에, CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포가 프레보텔라 스테코리아 균주의 처리에 의해 IFN- γ 의 분비를 유도하는지 확인하였다. D1부터 D6까지 총 6명의 donor로부터 혈액 유래 PBMC를 분리하였으며, 해당 환자의 PBMC에서 CD8⁺ T cell을 분리하여 실험을 진행하였다.

[0130] 도 4에 나타난 바와 같이, 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 처리한 경우, CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 IFN- γ 분비가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0131] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, Z-score가 높을 수록 동일 피실험자(donor)의 CD8⁺ T cell이 분비한 IFN- γ 의 농도가 높은 것을 의미하므로, 프레보텔라 스테코리아 균주 배양 상층액을 10%(v/v) 농도로 처리한 CD8⁺ T 세포의 IFN- γ 분비가 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 한편, Bacteroides plebeius, Ligilactobacillus salivarius 균주 배양 상층액의 경우 IFN- γ 분비를 오히려 감소시키는 것을 확인하였다.

[0133] **실시예 3. 프레보텔라 스테코리아 균주와 PD-1 억제제의 병용에 따른 결장암 성장 억제 효과 확인**

[0134] 사이토카인 분비능에 미치는 영향 체내에서 비장(spleen)은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 담당하는 장기로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이다. 따라서 비장세포의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 특히 비장세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역지표로 사용된다. 이에 더하여, 기억(memory) T세포의 역할로 인해 항암 반응이 강화된다고 알려져 있으며, CD4 또는 CD8을 발현하는 암 침투 림프구들이 기억 T세포의 특성을 보이는 것으로 알려져 있다. 실험에 1-3에 기재된 방법으로 프레보텔라 스테코리아 균주와 PD-1 억제제를 병용 투여 하였다.

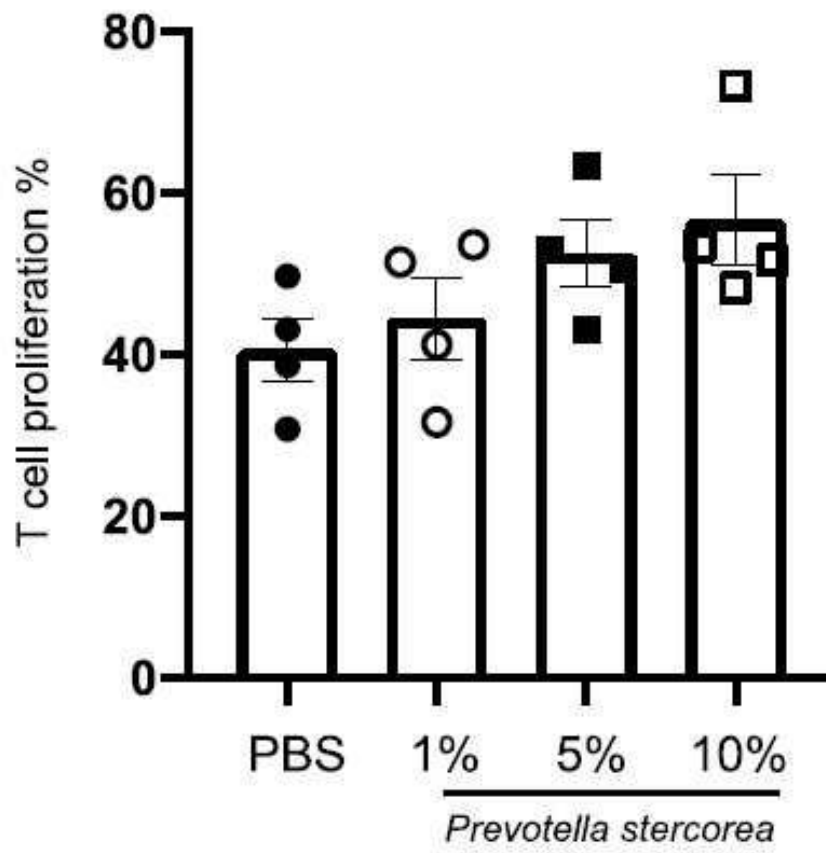
[0135] 도 6에 나타난 바와 같이, 프레보텔라 스테코리아 균주와 PD-1 억제제의 병용 투여한 경우, 종양 부피 성장 억제 효과가 현저히 우수함을 확인하였다. 이에 반해, IgG 음성대조군, PD-1 억제제 단독 투여군, 프레보텔라 스테코리아 균주 단독 투여군의 효과는 미미하였다.

[0136] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 비장 세포와 종양침윤성림프구(TIL)에 있는 CD8⁺ T 세포의 기억 T 세포 비율이 프레보텔라 스테코리아 균주와 PD-1 억제제의 병용에 따라 유의하게 증가함을 확인하였다.

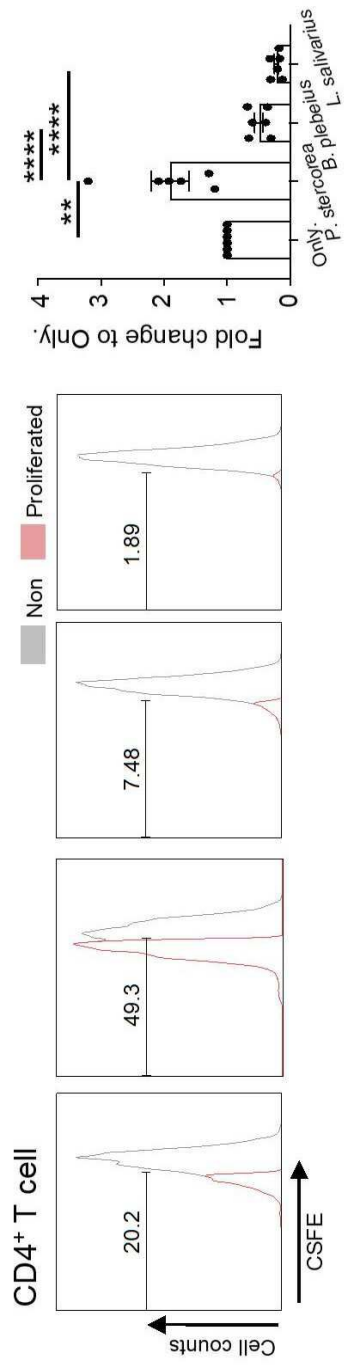
[0138] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

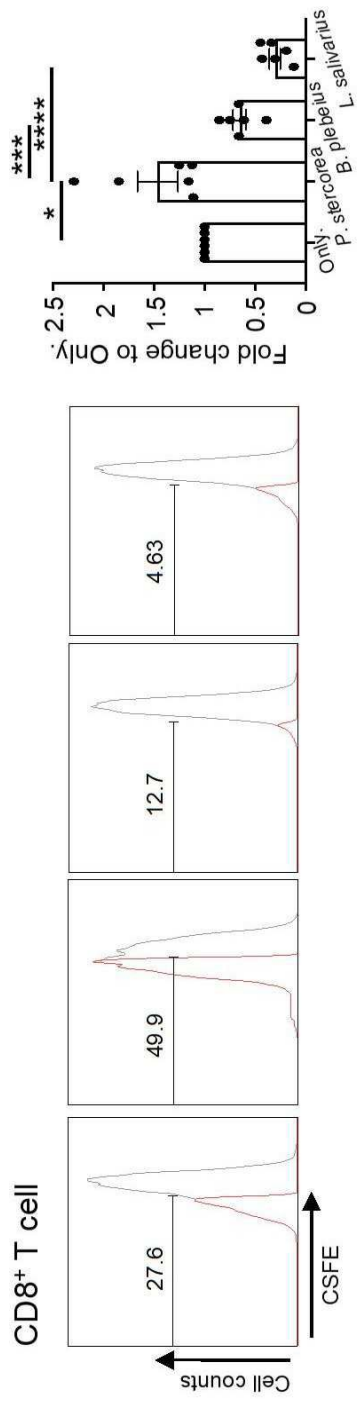
도면1



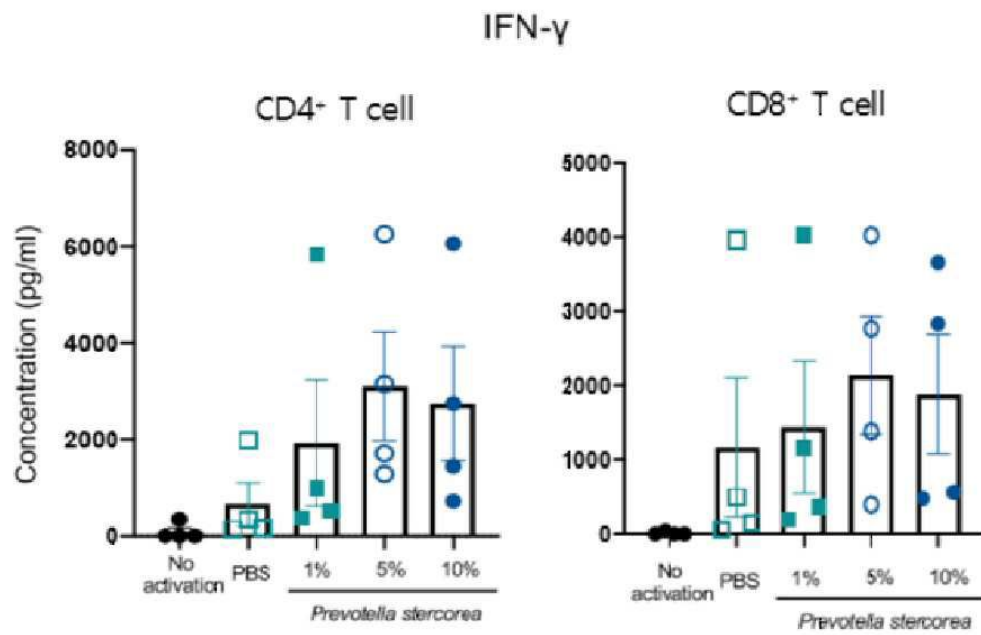
도면2



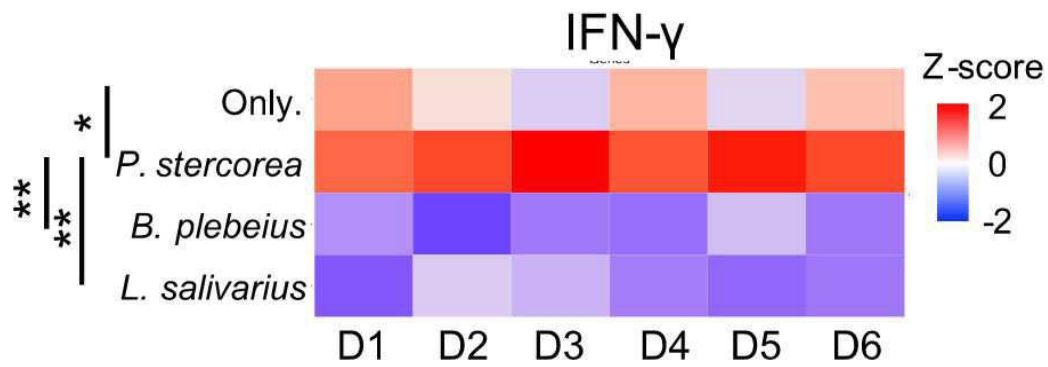
도면3



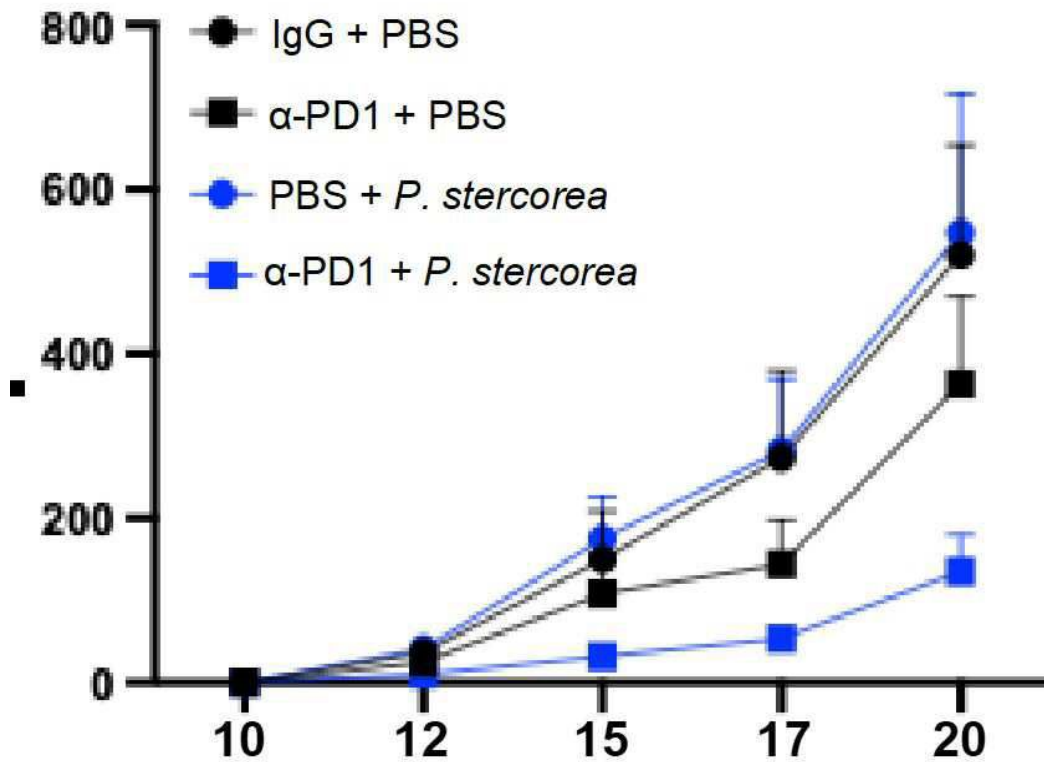
도면4



도면5



도면6



도면7

