



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0115865
(43) 공개일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/742 (2014.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/742 (2013.01)
A23L 1/3014 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0037097
(22) 출원일자 2016년03월28일
심사청구일자 2016년03월28일
(30) 우선권주장
1020150043006 2015년03월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박정규
대전광역시 서구 둔산로 223, 8동 103호(둔산동, 청솔아파트)
(74) 대리인
특허법인충정

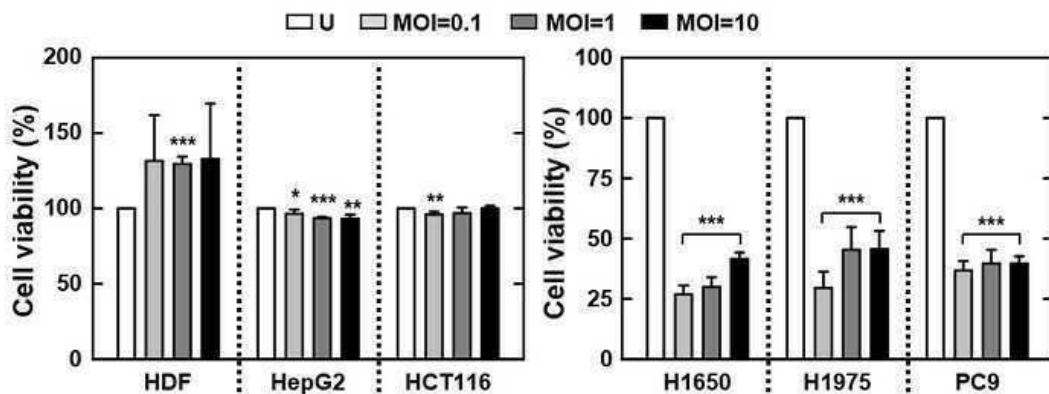
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 바실러스 서브틸리스를 함유하는 폐암 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스 CF5를 함유하는 폐암 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 CF5는 폐 종양세포 선택적 독성능을 나타내며, 종양세포 세포사멸사를 유도함으로써 폐암 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/48 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A2042148

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 한국발효식품 유래 아포형성 *Bacillus lentus*의 대장암세포 세포자멸사 유도기전

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는, 폐암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *바실러스 서브틸리스*는 청국장으로부터 추출된 것인, 폐암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *바실러스 서브틸리스*가 폐암세포의 세포자멸사를 유도하는 것인, 폐암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 폐의 편평상피암세포의 세포자멸사를 유도하는 것인, 폐암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 5

국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는, 폐암 예방 또는 개선용 식품 첨가제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *바실러스 서브틸리스*를 함유하는 폐암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐암은 폐에 생긴 악성 종양을 통틀어 말하는 것이며, 암세포가 기관지나 폐포에서 처음 발생한 원발성 폐암과 암세포가 다른 기관에서 생겨나 혈관이나 림프관을 타고 폐로 이동해 증식하여 발생한 전이성 폐암으로 나눌 수 있다. 일반적으로 폐암이라고 하는 원발성 폐암은 현미경학적으로 암세포의 형태에 따라 비소세포 폐암과 소세포 폐암으로 구분된다. 이와 같이 비소세포 폐암과 소세포 폐암을 구분하는 것은 임상적 경과와 치료 방법의 차이가 크기 때문이다. 비소세포 폐암은 조기에 진단되면 수술적 치료만으로도 완치를 기대할 수 있는 반면, 소세포 폐암은 대부분 진단 당시에 수술적 절제가 어려울 정도로 진행되어 있는 상태로 발견되는 경우가 많고 급속히 성장하며 전신 전이율이 높아서 수술보다는 항암 화학요법이나 방사선치료가 선택된다. 통상적으로 폐암이라고 하면 폐암의 약 80 내지 85%를 차지하는 비소세포 폐암을 의미하며, 이러한 비소세포 폐암은 편평상피암종, 선암종, 대세포암종 및 기타 폐암으로 세분된다.

[0003] 특히, 폐암은 19세기까지만 해도 드문 질환이었으나, 20세기 들어 흡연이 보편화되면서 급격히 증가하기 시작하여, 서양에서는 남성과 여성 모두에서 가장 많이 발생하는 악성 종양이 되었고 우리나라에서도 폐암 발생이 가

파르게 상승하여 위암에 이어 발병률 2위의 암질환이다. 이러한 발생빈도의 증가는 흡연뿐 아니라 대기오염 및 산업공해의 증가 등에 기인한다. 또한 폐암은 다른 암에 비해 치료가 어려워 발병률은 1위가 아니나, 사망자는 암환자 중 가장 많은 것으로 알려져 있다. 완치의 기준인 5년 생존률이 15%에 지나지 않는다.

[0004] 이러한 폐암의 치료방법은 병기에 따라 다르며 통상적으로 수술적 제거, 방사선치료, 항암화학요법 등의 치료방법이 있으며, 폐암의 종류에 따라서도 적용가능한 치료 방법이 상이하며, 일반적으로 수술적 치료와 항암화학요법 및 방사선 치료법을 병행한다.

[0005] 이같은 폐암이 초기에 진단될 경우에는 상기 항암화학요법 및 방사선 치료 등을 통해 회복될 수 있으나, 일정 수준으로 병증이 악화된 경우에는 수술을 통해 병변을 제거하고 약물치료 및 방사선 치료등을 통한 치료를 수행하게 되는데, 아직까지는 폐암의 치료에 사용될 수 있도록 공인된 약물은 이레사 등을 비롯한 몇가지로 제한되어 있어 환자에게 적합한 치료를 수행하기 어렵고, 이들 치료제는 무시할 수 없는 수준의 부작용을 나타낸다는 단점이 있어, 수술 이후의 치료성공률이 저조한 실정이다.

[0006] 이러한 단점을 극복하기 위하여, 부작용을 줄일 수 있는 복합 천연물로부터 유래된 치료제를 개발하려는 노력이 계속되고 있다. 예를 들어, 대한민국 등록특허 제10-1360233호에서는 생약 추출물을 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대해 개시하고 있다. 그러나, 이들 천연물 유래 치료제는 치료효과가 우수하지 못하다는 근본적인 단점이 해소되지 않고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 우수한 폐암 치료 효과를 가지는 동시에 종래의 화학요법에 사용되던 약물이 가지던 부작용 및 내성 등의 단점을 해결할 수 있는 폐암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 보다 안전하면서도 효과적으로 폐암을 치료할 수 있는 제제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 우리나라의 전통 발효식품인 청국장으로부터 추출한 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)가 폐암세포에 대해 특이적인 세포독성을 가진다는 사실을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서는 폐암 예방 및 치료 후보물질로서의 *바실러스 서브틸리스*의 활용성을 평가하고, *바실러스 서브틸리스* CF5를 함유하는 폐암 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 상기 목적을 달성하기 위하여, 본원의 제 1 측면은 본 발명은 우리나라 전통 발효식품으로부터 분리된 신규한 균주로서 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0012] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 *바실러스 서브틸리스*는 청국장으로부터 추출된 것일 수 있다.

[0013] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 *바실러스 서브틸리스*가 폐암세포의 세포자멸사를 유도하는 것일 수 있다.

[0014] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 *바실러스 서브틸리스*가 폐의 편평상피암세포의 세포자멸사를 유도하는 것일 수 있다.

[0015] 본원의 제 2 측면은, 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 개선용 식품 첨가제 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 폐암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 유효성분인 *바실러스 서브틸리스* CF5는 정상세포 및 다른 종류의 암 세포에는 영향을 주지 않으면서, 폐 종양세포에 선택적인 세포독성을 나타낸다. 특히, *바실러스 서*

브틸리스 CF5는 현재 임상에서 사용되고 있는 폐암 표적치료제인 엘로티닙(Erlotinib) 및 게피티닙(Gefitinib) 등에 대해서도 강한 저항성을 보이는 상피세포 폐암에 대해 현저히 높은 수준의 세포독성을 나타냄으로써 폐암 치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) CF5에 의한 폐 종양세포 선택적 독성능 측정(MTT assay) 결과이다.
- 도 2는 폐암세포주에서의 바실러스 서브틸리스 CF5에 의한 세포자멸사 기전을 분석하기 위한 웨스턴 블로팅 분석 결과이다.
- 도 3a는 상피세포 폐암 세포주에 대한 바실러스 서브틸리스 CF5의 세포독성을 나타내는 그래프이다.
- 도 3b는 상피세포 폐암 세포주에 대한 바실러스 서브틸리스 표준균주의 세포독성을 나타내는 그래프이다.
- 도 4a 및 4b는 바실러스 서브틸리스 CF5의 동정 결과를 보여주는 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0021] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0023] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A, B, 또는, A 및 B"를 의미한다.
- [0026] 이하, 본 발명의 폐암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 폐암 예방 또는 개선용 식품 첨가제 조성물에 대하여 구현예 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 상기 목적을 달성하기 위하여, 본원의 제 1 측면은 본 발명은 우리나라 전통 발효식품으로부터 분리된 신규한 균주로서 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0029] 암의 치료를 위해 암을 표적으로 하는 세균을 사용하는 경우, 상기 세균은 암세포에 직접 접촉하거나 또는 세포 독성물질을 전달함으로써 암을 치료할 수 있다. 암 덩어리는 조직 간질압력이 높아 항암제의 전달에 문제점이 있다는 것이 알려진 바 있으나, 세균은 암세포 증식과 같은 염증반응이 있는 곳으로 침습하고 증식하여 암세포를 죽일 수 있는 특성이 있다. 또한 치료 후에는 항생제를 이용해 사용한 세균을 쉽게 제거할 수 있는 장점이 있다.
- [0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 바실러스 서브틸리스는 청국장으로부터 추출된 것일 수 있다. 바실러스 서브

틸리스의 추출은 당업계에서 일반적으로 수행되는 미생물의 분리 및 동정 방법에 따라 제한 없이 수행될 수 있다.

- [0031] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 *바실러스 서브틸리스*가 폐암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 것일 수 있다. 즉, 본원의 *바실러스 서브틸리스*는 폐암세포의 세포자멸사에 관련된 유전자 및/또는 단백질의 발현을 촉발시킴으로써 폐암세포들이 세포자멸사 단계에 들어가도록 유도할 수 있다. 구체적으로, 본원의 *바실러스 서브틸리스*를 폐암세포에 적용시 캐스페이즈 3 및 9, 절단된 PARP, Bax, 및 시토크롬 c의 발현이 증가되고 Bcl-2의 발현이 감소된다는 것이 웨스턴 블로팅에 의해 확인되어, 본원의 *바실러스 서브틸리스*가 폐암세포의 세포자멸사를 유도한다는 사실이 구체적으로 증명된 바 있으며, 상기 나열한 단백질 외에도 세포자멸사에 관련된 유전자 및/또는 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있다.
- [0032] 특히, 본원의 *바실러스 서브틸리스*는 mTOR 경로를 억제함으로써 폐암세포의 세포자멸사를 촉발한다.
- [0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 *바실러스 서브틸리스*가 폐의 편평상피암세포의 세포자멸사를 유도하는 것일 수 있다. 폐의 상피암세포는 종래의 화학요법에 사용되는 약물들에 강한 저항성을 가져 치료가 매우 어려운 것으로 알려져 있으나, 본원의 *바실러스 서브틸리스*는 특히 폐의 상피암세포에 대한 우수한 세포독성을 가지기 때문에, 우수한 항암 효과를 기대할 수 있다.
- [0034] 본원의 폐암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 약제학적 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0035] 상기 약제학적 조성물은 바람직하게는 경구 제형으로 제제화될 수 있으며, 예를 들어 액제, 현탁제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 또는 엑스제와 같은 경구 투여용 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 각각의 제형으로 제제화시, 각각의 제형의 제조에 필요한 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 부가하여 제조할 수 있다.
- [0036] 대표적으로 경구 투여용 제형으로 제제화시 상기 담체로서 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 및 항산화제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0037] 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 가능하며, 구체적으로 희석제로는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필셀룰로오스가 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산나트륨, 폴라크틸린칼륨, 또는 크로스포비돈, 감미제로는 백당, 과당, 솔비톨, 또는 아스파탐, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 베타-사이클로덱스트린, 백납, 또는 잔탄검, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 또는 솔빈산칼륨이 바람직할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋구기 위하여, 매실향, 레몬향, 파인애플향, 허브향 등의 천연향료, 천연과즙, 클로로필린, 플라보노이드 등의 천연색소, 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕과 같은 감미성분, 또는 구연산, 구연산 나트륨과 같은 산미제를 혼합하여 사용할 수도 있다. 이러한 제제화 방법 및 제제화시 필요한 담체 및 첨가제에 대해서는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세하게 기재되어 있다.
- [0039] 본원의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약제학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0042] 본원의 제 2 측면은, 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁된 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*)를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 개선용 식품 첨가제 조성물을 제공할 수 있다.
- [0043] 즉, 본원의 *바실러스 서브틸리스*는 식품 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다. 상기 식품 조성물은 산제, 과

립제, 정제, 캡셀제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 엑스제와 같은 건강기능식품으로 제조될 수 있고, 치즈, 김치, 발효소시지, 발효생식제품과 같은 발효 제품으로 제조될 수 있으며, 음료, 이유식, 유제품, 차, 젤리 등의 일반 식품으로 제조될 수 있다.

[0044] 또한 상기 식품 조성물의 제조에 필요한 식품 첨가제 조성물로도 이용될 수 있다.

[0045] 본원의 *바실러스 서브틸리스*가 식품 조성물 또는 식품 첨가제 조성물로서 이용될 경우 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제와 함께 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제는 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 본원의 *바실러스 서브틸리스*를 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0047] 본원의 식품 조성물 또는 식품 첨가제 조성물은 유효성분으로 사용되는 *바실러스 서브틸리스* 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 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.

[0049] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[실시예]

[세포주 및 세포 배양]

[0054] 본 실시예에서는 청국장으로부터 추출 및 배양된 *바실러스 서브틸리스* CF5의 폐암세포에 대한 선택적 세포독성 확인 및 그 기전 분석을 위해 아래의 세포주들을 사용하였다:

[0055] (1) 정상 세포로서 피부 섬유아세포 HDF (인간 진피 섬유아세포)

[0056] (2) 암세포로서 HepG2 (인간 간암세포주), HCT116 (인간 대장암세포주), H1650 (전이 부위로부터 유래된 인간 폐암세포주), H1975 (인간 선암세포주: 비소세포성폐암세포), PC9 (인간 비소세포성 폐 상피암세포주)

[0058] 상기 *바실러스 서브틸리스* CF5는 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81019BP로 기탁되었다.

[0060] 본 실시예에서 사용된 HDF, HCT116, HepG2, H1650, H1975 및 PC9 세포주들은 ATCC (American Type Culture Collection)사로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양은 10% FBS, 페니실린 (100 units/ml), 스트렙토마이신 (100 μ g/ml)을 첨가한 DMEM을 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 수분 간의 트립신 처리 (0.05% 트립신, 0.02% EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium)로 세포를 떼어내어 실험시 지수기 (logarithmic phase)에 있도록 계대배양 하였고, 모든 실험에는 계대배양 15 번 이내의 세포를 사용하였다.

[0062] 종양세포에 대한 선택적 세포독성 시험: MTT 분석

[0063] 정상세포주 HDF, 대장암 세포주 HCT116, 간암세포주 HepG2, 폐암 세포주 H1650, H1975, PC9와 *바실러스 서브틸리스* CF5의 인 비트로 공배양을 통하여 *바실러스 서브틸리스*의 폐암세포 특이적 독성능을 관찰하였다 (도 1).

[0065] 정상세포주 (HDF), 대장암세포주 (HCT116), 간암세포주 (HepG2), 폐암세포주 (H1975, H1650 및 PC9)를 배양한 후에 *바실러스 서브틸리스* CF5를 각 조건 MOI=0.1, 1, 10 으로 처리하였다. 각 세포주를 72 시간동안 배양 후 MTT 분석으로 세포독성을 측정하였다. 각 세포주들의 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 이용하여 평가하였다. 즉 96 웰 口마이크로타이터 조직 배양 플레이트 (Falcon)에 HDF, HCT116, HepG2, H1650, H1975, PC9 세포를 1 내지 10×10^3 세포/웰로 플레이트팅하고, 균을 처리한 후 72 시간 동안 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 이들 세포를 PBS로 수회 세척하고 MTT (0.5 mg/ml) 용액으로 37°C에서 2 시간 반응시키고 상청액을 제거한 다음 DMSO로 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하였다.

[0067] 측정 결과가 도 1에 나타나 있으며, *바실러스 서브틸리스* CF5에 의해 폐암 세포주인 H1650, H1975, PC9 세포는 MOI=0.1 부터 세포독성이 관찰되었으나 정상세포주인 HDF, 간암세포주인 HepG2와 대장암세포주인 HCT116 세포에서는 MOI=10으로 처리하였을 때에도 세포 독성이 거의 관찰되지 않았다. 따라서 *바실러스 서브틸리스* CF5는 정상세포를 비롯한 다른 세포에는 영향을 미치지 않는 폐암 세포 특이적인 세포독성을 가진다는 사실을 확인하였다.

[0069] *바실러스 서브틸리스* CF5에 의한 폐 종양세포 세포자멸사 기전 분석

[0070] *바실러스 서브틸리스* CF5에 의한 폐 종양세포에 대한 세포독성 기전을 분석하기 위해 아래의 분석들이 수행되었다:

[0071] (1) 세포자멸사(apoptosis) 또는 파이로토시스 분석, 캐스페이즈 활성화 분석(캐스페이즈-3, 8, 9, PARP), Bcl 패밀리(P-Bcl-2, Bcl-2, Bcl-XL, Bax), 미토콘드리아 막 시토크롬 C 방출 분석 (mitochondria, cytosol), 암세포 내에서의 반응성 산소 생성 분석

[0072] (2) EGFR (Epidermal Growth Factor) 신호전달 경로 발현, 암세포에서의 EGFR-TKIs 발현 분석 (PI3K, AKT, mTOR)

[0074] 폐암세포주에서의 *바실러스 서브틸리스* CF5에 의한 세포자멸사 기전을 분석하기 위하여, 선택적 세포독성이 가장 높게 나타난 전이 부위(metastatic site)로부터 얻은 H1650 세포주를 선택하여 실험하였다. *바실러스 서브틸리스* CF5에 의한 폐암 치료 기전을 연구하기 위하여 캐스페이즈-3, 8, 9 그리고 PARP 항체를 처리하였다. 캐스페이즈-3 및 9가 발현하였으며 *바실러스 서브틸리스* CF5 처리 시간이 증가함에 따라 PARP의 절단형(cleavage form)의 발현이 나타나는 것을 관찰하였다. 그러나, 캐스페이즈-8은 *바실러스 서브틸리스* CF5에 의한 경로에 의해 증가하지 않았다 (도 2).

[0075] *바실러스 서브틸리스* CF5에 의해 활성화된 내재적 경로(intrinsic pathway)는 전-세포자멸 물질인 Bax의 증가와 항-세포자멸 물질인 Bcl-2 단백질의 감소와 미토콘드리아에서 미토콘드리아막 포텐셜이 붕괴하면서 방출하는 시토크롬 Ccytochrome c를 확인함으로써 관찰하였다 (도 2).

[0077] *바실러스 서브틸리스* 표준균주와의 폐암에 대한 세포독성 비교

[0078] 현재 임상에서 쓰이는 폐암 표적치료제인 엘로티닙 또는 게피티닙은 비소세포폐암 등의 악성 종양에서 과잉발현되는 상피증식인자수용체(EGFR) 티로신인산화효소(TKI)에 대한 저해제이다. 본 실시예에서는 *바실러스 서브틸리스* 표준균주와의 세포독성 비교를 위해, 사람 폐의 편평상피세포암에서 분리한 폐암 상피세포 PC9, H1975, H1650 세포주를 사용하였다. 그 중 H1650 세포주는 EGFR TKI에 대한 강한 저항성을 보여 현행 항암치료제의 세

포사멸능이 미미하다고 알려져 있다.

[0080] 청국장에서 분리한 본원의 *바실러스 서브틸리스* CF5 균주와 생명공학연구원으로부터 분양받은 *바실러스 서브틸리스* 표준균주와의 세포독성능 측정실험 결과 본 연구자들이 동정한 *바실러스 서브틸리스* CF5 균주가 EGFR TKI 저항성을 보이는 H1650세포주에 대해 현저하게 높은 세포독성능을 보인다는 것을 확인하였다 (도 3a 및 3b).

[0082] 따라서, 본원의 *바실러스 서브틸리스* CF5의 폐암에 대한 세포독성은 일반적인 *바실러스 서브틸리스*의 특성이 아닌, 본원의 *바실러스 서브틸리스* CF5 균주만의 특성임을 확인하였다.

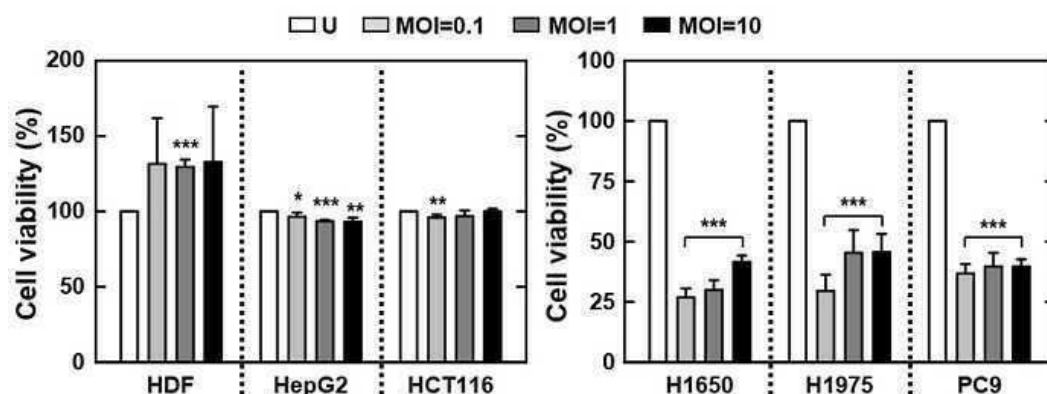
[0084] 본원의 *바실러스 서브틸리스* CF5 균주의 동정

[0085] 청국장에서부터 추출된 *바실러스* 종(*Bacillus* species)를 배양하여 Genomic DNA Prep Kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 사용하여 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭 (Biomtra, Gottingen, Germany)을 시행하였다. 사용된 프라이머 쌍은 순방향은 27F로 역방향은 1492R을 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 2 분간 예열 후에 열변성 (95℃, 1분), 결합 (45℃, 1분), 신장(72℃, 1.5분)의 순으로 30 사이클을 시행하였으며 72℃에서 10 분간 정지하였다. 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하고 Agarose gel extraction kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)에 넣어 *E. coli* DH5α 컴피턴트 세포 (competent cells)를 형질전환 하였다. 재조합 플라스미드를 정제하여 순방향 프라이머 T7과 역방향 프라이머 SP6를 이용하여 ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit와 ABI PRISM 377 Sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 플라스미드의 유전자 서열을 MacroGen Corporation (Seoul, Korea)에서 수행하였다. 염기서열 데이터의 상동성 검색을 BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)에 접속하여 수행한 결과 본 균주는 99.5%의 신뢰도로 *바실러스 서브틸리스* 종임이 밝혀졌다 (도 4a 및 4b).

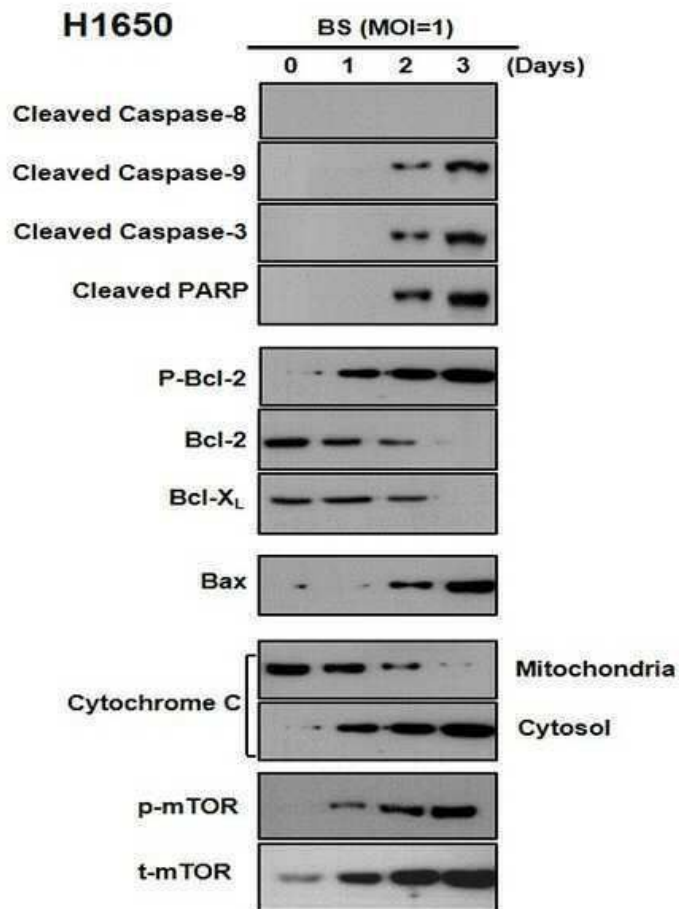
[0087] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

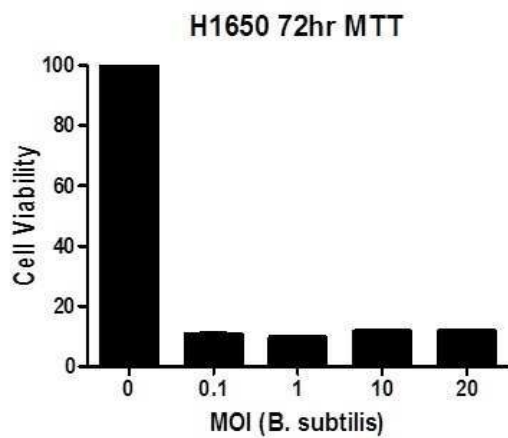
도면1



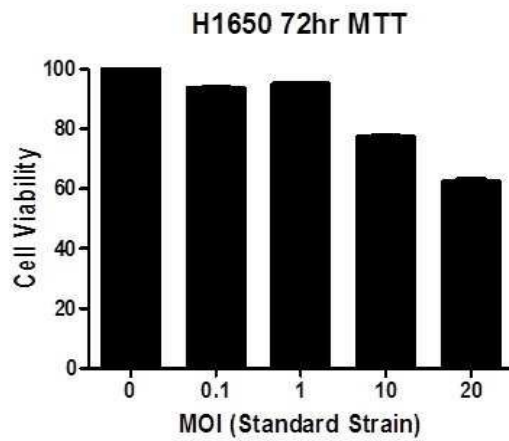
도면2



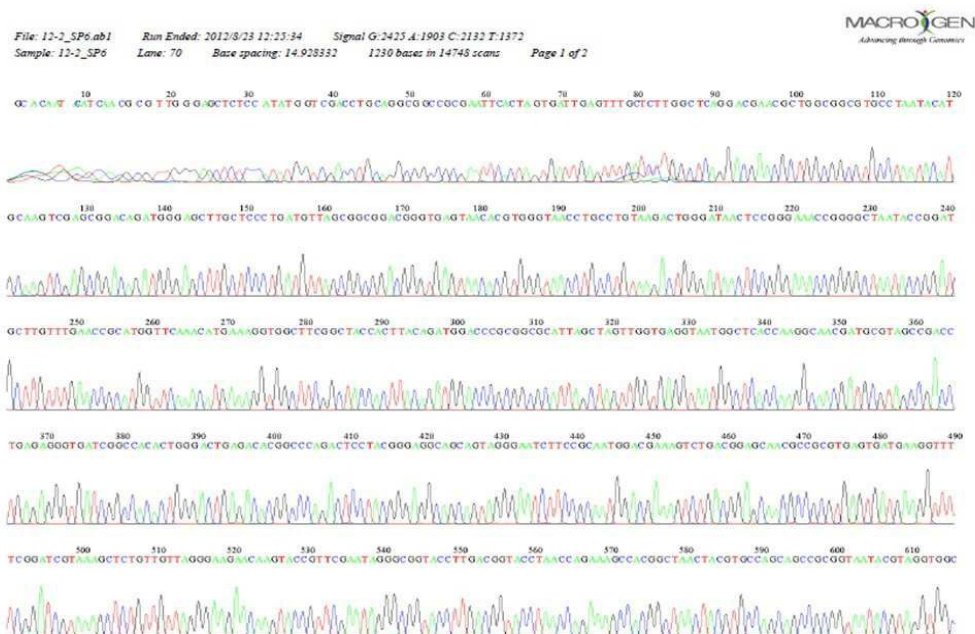
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

