(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0142662
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0036857
(22) 출원일자 2023년03월21일
심사청구일자 2023년03월21일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
광주과학기술원
광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
박숙련
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 204동 2102호
권미나
경기도 양평군 서종면 중미산로78번길 37-4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

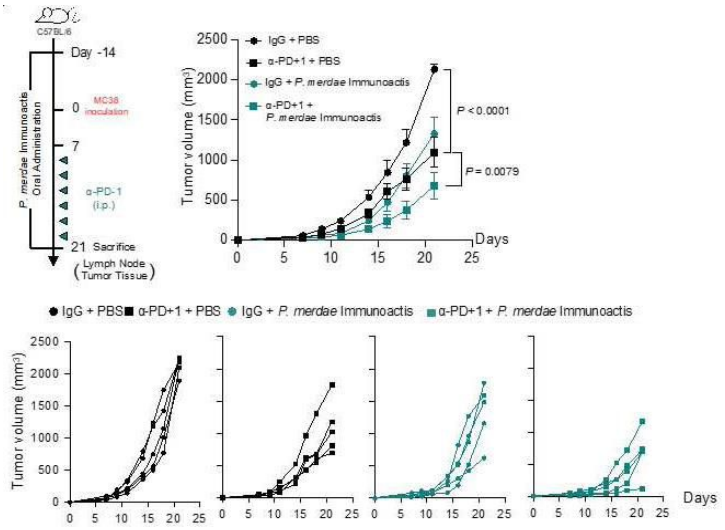
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명자들은 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 (기탁번호: KCTC 14922BP)가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN-γ 분비를 증가시키며, IFN-γ 또는 Cxc19 의 발현 또는 활성 수준을 증가시키고, Cc122의 발현 또는 활성 수준을 감소시킬 뿐만 아니라 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시킴을 확인하였다. 따라서, 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 면역 증강용 및 면역관문 억제제의 항암 효과 증진 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
박한수
서울특별시 강남구 일원로 120, 101동 1302호
김기현
경기도 성남시 중원구 광명로 103, 1048호

명 세 서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 14922BP로 수탁된 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 면역을 증강시키거나 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 4

제1항의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물.

청구항 5

제1항의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항암 효과 증진용 조성물은 항암제와 병용 처리되는 것을 특징으로 하는, 항암 효과 증진용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항암 효과 증진용 식품 조성물.

청구항 8

제1항의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

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

청구항 10

제9항에 있어서,

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

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 PD-1 억제제는 니볼루맙(nivolumab), 펨브롤리주맙(pembrolizumab), 세미플리맙(cemiplimab), 스파탈리주맙(spartalizumab), 캄렐리주맙(camrelizumab), 신틸리맙(sintilimab), 티슬렐리주맙(tislelizumab), 토리팔리맙(toripalimab), 도스탈리맙(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224, 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서,

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

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액은 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

(a) $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 증가시킴;

(b) T 세포의 인터페론-γ(IFN-γ)의 분비를 증가시킴;

(c) Inf-γ 또는 Cxcl9의 발현 또는 활성 수준을 증가시킴; 및

(b) Ccl22의 발현 또는 활성 수준을 감소시킴.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 암은 대장암, 유방암, 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, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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, 표적항암제에 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 면역 항암제는 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0053639호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주, 상기 균주 또는 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물, 및 항암 효과 증진용 조성물을 제공하는 것으로서, 본 발명자들은 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN-γ 분비를 증가시키며, 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시키는 것을 확인하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 기탁번호 KCTC 14922BP로 수탁된 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis) 균주를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으

로 포함하는, 항암 효과 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 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 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기탁번호 KCTC 14922BP로 수탁된 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis) 균주를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항암 효과 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항암 효과 증진용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 균주는 면역을 증강시키거나 항암제의 항암 효과를 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 항암 효과 증진용 약학적 조성물은 항암제와 병용 처리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 면역관문 억제제는 PD-L1 억제제 또는 PD-1 억제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 두발루맙(durvalumab), 엔바폴리맙(envafolimab), 코시벨리맙(cosibelimab), AUNP12, CA-170, 및 BMS-986189로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 PD-1 억제제는 니볼루맙(nivolumab), 펨브롤리주맙(pembrolizumab), 세미플리맙(cemiplimab), 스파탈리주맙(spartalizumab), 캄렐리주맙(camrelizumab), 신틸리맙(sintilimab), 티슬렐리주맙(tislelizumab), 토리팔리맙(toripalimab), 도스탈리맙(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224, 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액은 하기 특징 중 하나 이상을 만족할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0028] (a) $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 증가시킴;

[0029] (b) T 세포의 인터페론-γ(IFN-γ)의 분비를 증가시킴;

[0030] (c) Inf-γ 또는 Cxcl9의 발현 또는 활성 수준을 증가시킴; 및

[0031] (b) Ccl22의 발현 또는 활성 수준을 감소시킴.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 암은 대장암, 유방암, 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, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 증강 방법을 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 면역 증강 용도를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액의 면역 증강제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항암제의 항암 효과 증진 방법을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 항암제의 항암 효과 증진 용도를 제공한다.

[0038] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액의 항암제의 항암 효과 증진제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[0039] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물의 암 치료제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명자들은 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주(기탁번호: KCTC 14922BP)가 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN-γ 분비를 증가시키며, T 세포의 암 세포 살상 능력을 증가시키면서, 암 미세 환경에서의 IFN-γ 또는 Cxcl9 의 발현 또는 활성 수준을 증가시키고, Ccl22의 발현 또는 활성 수준을 감소시킬 뿐만 아니라 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시키는 것을 확인하였다. 따라서, 신규한 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액은 면역 증강용 및 면역관문 억제제의 항암 효과 증진 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액으로 처리하는 경우, $CD4^+$ T 세포의 증식 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액으로 처리하는 경우, $CD8^+$ T 세포의 증식 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액으로 처리된 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포에서 분비된 IFN-γ를 나타낸 것이다.

도 4는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 α-PD-1 항체의 병용이 결장암 종양의 성장을 감소시킴을 나타낸

것이다.

도 5는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 α-PD-1 항체의 병용이 Inf-γ Cxcl9, 및 Ccl22의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 6은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 α-PD-1 항체의 병용이 $CD4^+$ T 세포, $CD4^+CD44^+CD62L^-$ T 세포($CD4^+$ 효과기 T 세포), 및 TNF-α^+ 세포의 개체군을 증가시킴을 나타낸 것이다.

도 7은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 α-PD-1 항체의 병용이 $CD8^+$ T 세포, $CD8^+CD44^+CD62L^-$ T 세포, 및 $PD\text{-}1^+CD8^+$ T 세포의 개체군을 증가시킴을 나타낸 것이다.

도 8은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주의 세포독성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명의 일 실시예에서는 anti-PD-1 치료에 반응한 환자로부터 분리한 균주를 동정한 결과, 공시 균주인 *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119와 같은 종 (species)이며 다른 계통 (strain)인 신규한 균주인 것을 확인하고, 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis) 로 명명하였다 (실시예 1 참조).

[0047] 본 발명의 다른 실시예에서는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액을 처리한 경우, 균주 배양액에 의해 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식이 유의하게 촉진되며, T 세포에서 IFN-γ 분비가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다 (실시예 3 참조).

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 PD-1 억제제를 병용 투여한 경우, 종양 성장 억제 효과가 현저히 우수함을 확인하였다 (실시예 4 참조).

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주와 PD-1 억제제를 병용 투여한 경우, 마우스의 종양 조직에서 Inf-γ 및 Cxcl9의 발현이 증가하고 Ccl22의 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, 병용 투여로 인하여 $CD4^+$ T 세포, $CD4^+CD44^+CD62L^-$ T 세포 ($CD4^+$ 효과기 T 세포), TNF-α^+ 세포, $CD8^+$ T 세포, $CD8^+CD44^+CD62L^-$ T 세포, 및 $PD\text{-}1^+CD8^+$ T 세포의 개체군이 증가하는 것을 확인하였다 (실시예 5 참조).

[0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 OT-1 T 세포에 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액을 처리할 경우, 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액을 처리한 Ovalbumin-pulsed T 세포가 MC38 결장암 세포를 더 잘 사멸시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 따라서, 본 발명의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 배양액은 면역 증강 및 항암 효과 증진 용도로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 면역관문 억제제와의 시너지 효과를 기초로 면역관문 억제제 병용 항암 조성물로 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0053] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0055] 본 발명은 기탁번호 KCTC 14922BP로 수탁된 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis) 균주를 제공한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 균주를 동정하기 위해 전장 유전체 및 16S rRNA 서열을 분석한 결과, 상기 균주는 16S rRNA가 서열번호 1의 염기서열로 암호화된 것으로 확인되었다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 균주는 공시 균주인 *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119와 유사도가 97.82 %로 *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119와 같은 종이며 다른 계통인 신규한 균주로 판명되었다.

[0057] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스(*Prevotella merdae* Immunoactis)로 명명하고, 2022년 3월 24일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 14922BP를 부여받았다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 균주는 T 세포의 증식을 증가시키고, T 세포의 IFN-γ 분비를 증가시키며, IFN-γ 또는 Cxcl9 의 발현 또는 활성 수준을 증가시키고, Ccl22의 발현 또는 활성 수준을 감소시킬 뿐만 아니

라 면역관문 억제제의 항암 효능을 증진시킬 수 있는바, 면역을 증강시키거나 항암 효과를 증진시키는 것을 특징으로 한다.

[0059] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물; 항암 효과 증진용 약학적 조성물; 또는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명에서, '면역 증강'은 생체 내 면역시스템의 면역 반응 또는 활성을 증가시키는 것을 의미하며, 면역은 크게, 선천면역(innate immunity)과 획득면역(acquired immunity)으로 구분된다. 선천면역은 항원에 대해 특별한 기억 작용 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(polymorpho nuclear 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.

[0062] 본 발명의 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주는 T 세포의 증식을 촉진하며, T 세포의 IFN-γ 분비 촉진 효과가 우수하기 때문에 선천면역과 획득면역 기능을 증진시키는 효과가 있다.

[0063] 본 발명에서, '항암 효과 증진'은 항암제와 병용시 항암제의 항암 효과 일예로, 항암제의 종양 성장 억제 효과를 증진시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 면역관문 억제제인 항-PD-1 항체와 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 배양 상층액을 병용 투여한 결과, 결장암의 성장이 억제될 뿐만 아니라 T 세포의 비율이 유의하게 증가함을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0064] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 항암 효과 증진용 약학적 조성물은 항암제와 병용 처리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴(Cisplatin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 파클리탁셀(Paclitaxel), 독소루비신(Doxorubicin), 도노루비신(Daunorubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 액티노마이신 D(Actinomycin D), 테니포사이드(Teniposide), 에토포사이드(Etoposide), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 에피루비신(epirubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 다우노마이신(daunomycin), 면역관문 억제제, 및 미토마이신-C(mitomycin-C)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0066] 본 발명에서 사용되는 용어 '배양'이란 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서는 '발효'를 포함하는 개념이다.

[0067] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스의 균체는 배양 배지로부터 수득된 생균 그 자체뿐만 아니라, 당업자에게 알려진 유산균에 대한 임의의 가공형태, 예를 들어 균체 파쇄물, 건조물, 동결물 등을 모두 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 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 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 본 발명에서, 상기 면역관문 억제제는 PD-L1 억제제 또는 PD-1 억제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 본 발명에서, 상기 PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 두발루맙(durvalumab), 엔바폴리맙(envafolimab), 코시벨리맙(cosibelimab), AUNP12, CA-170, 및 BMS-986189로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명에서, 상기 PD-1 억제제는 항-PD-1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PD-1 억제제는 니볼루맙(nivolumab), 펨브롤리주맙(pembrolizumab), 세미플리맙(cemiplimab), 스파탈리주맙(spartalizumab),

캄렐리주맙(camrelizumab), 신틸리맙(sintilimab), 티슬렐리주맙(tislelizumab), 토리팔리맙(toripalimab), 도스탈리맙(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224, 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 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 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 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제는 상기 부피비로 개별적으로 투여될 수 있다.

[0073] 또한, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 PD-1 억제제는 0.1 내지 10:1, 0.1 내지 9:1, 0.1 내지 8:1, 0.1 내지 7:1, 0.1 내지 6:1, 또는 0.1 내지 5:1의 부피비로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액은 상기 면역관문 억제제와 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역관문 억제제와 혼합물의 형태로 하나의 용기 내에 존재하도록 제형화될 수 있고, 별개의 용기 내에 존재하여 동시에 또는 순차적으로 투여되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 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.

[0075] 본 발명에서, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액은 하기 특징 중 하나 이상을 만족할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0076] (a) $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 증가시킴;

[0077] (b) T 세포의 인터페론-γ(IFN-γ)의 분비를 증가시킴;

[0078] (c) Inf-γ 또는 Cxcl9의 발현 또는 활성 수준을 증가시킴; 및

[0079] (b) Ccl22의 발현 또는 활성 수준을 감소시킴.

[0080] 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.

[0081] 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, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 암은 결장암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본 발명의 조성물 내의 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 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 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제

를 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.

[0084] 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, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 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, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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.

[0086] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0087] 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, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 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, 폴리에칠렌글리콜 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0089] 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.

[0090] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0091] 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.

[0092] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩 톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0093] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 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), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0094] 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.

[0095] 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, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0096] 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 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0097] 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.

[0098] 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.

[0099] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0100] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역 증강 방법을 제공한다.

[0101] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 면역 증강 용도를 제공한다.

[0102] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액의 면역 증강제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[0103] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항암 효과 증진 방법을 제공한다.

[0104] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 항암 효과 증진 용도를 제공한다.

[0105] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액의 항암 효과 증진제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[0106] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0107] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0108] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물의 암 치료제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[0109] 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.

[0110] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0111] 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.

[0113] 또한, 본 발명은 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주(기탁번호: KCTC 14922BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용, 또는 항암 효과 증진용 식품 조성물을 제공하며, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0114] 본 발명의 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 균주 또는 이의 배양액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 상기 프레보텔라 멀대 이뮤노액티스 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.

[0115] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 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.

[0116] 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, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 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.

[0117] 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 과일쥬스, 과일쥬스 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.

[0118] 본 발명에서, “건강기능식품”이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 비만의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0119] 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0121] 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.

[0122] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0124] **[실시예]**

[0125] **실시예 1. *Prevotella merdae* Immunoactis 균주 분리 및 동정**

[0126] *Prevotella merdae* Immunoactis (*P. merdae* Immunoactis)는 anti-PD-1 치료에 반응한 1명의 환자로부터 분리하였다. anti-PD-1 치료에 반응한 1명의 환자의 분변을 PBS에 희석한 후, 0.5% 효모 추출물(#212750, BD Bioscience), 0.05% L-시스테인-HCl(#C7880, Sigma-Aldrich), 0.0005% 헤민(hemin, ##51280, Sigma-Aldrich), 0.0001% 비타민 K1(#95271, Sigma-Aldrich), 0.01% 카나마이신(kanamycin, #HKA01, Rd-tech), 5% defibrinated sheep blood(#S1876, KisanBio)가 보충된 BHI(brain heart infusion) agar 배지(#237500, BD Bioscience)에 도말하였다. 혐기배양기(GasPak 100 system, #260626, BD)에서 37 ℃에서 48시간 배양하였다. 무작위로 콜로니를 선택한 후, 종 특이적 PCR을 사용하여 *P. merdae* Immunoactis를 분리하였다.

[0127] 분리한 *P. merdae* Immunoactis 의 전장 유전체 분석을 위해, *P. merdae* Immunoactis 의 pellet에서 genomic DNA를 추출하여 시퀀싱을 진행하였다. 구체적으로, genomic DNA로부터 TruSeq Nano DNA sample prep kit (Illumina)을 사용하여 library를 제작하고 시퀀싱을 진행하였다. 시퀀싱한 파일은 FastQC (version 0.11.8)를 이용하여 quality를 확인하고, Bbduk (version 38.34)을 이용하여 quality가 낮은 시퀀싱 read를 제거하였다. Unicycler (version 0.4.9b)를 이용하여 전장 유전체 assembly를 제작하고, OrthoANI (version 0.93.1)로 *Prevotella stercorea* DSM 18206 및 *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119 와 전장 유전체의 유사도를 확인 및 비교하여 균주 동정을 진행하였다. 그 결과, *P. merdae* Immunoactis는 *Prevotella merdae stercorea* DSM 18206와 유사도가 78.40 %이고, *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119와 유사도가 97.41 %로 가장 높았으며, *Prevotella merdae sp.* Marseille-P4119와 같은 species이며 다른 strain인 것으로 판명되었다.

[0128] 또한, 분리한 *P. merdae* Immunoactis 의 16S rRNA 서열을 확인하기 위하여, 전장 유전체 분석을 통해 얻은 contigs에서 Prokka로 genome annotation을 진행하였다. 16S rRNA region (partial)에 해당하는 contig를 확인한 결과, *P. merdae* Immunoactis 의 16S rRNA는 서열번호 1의 염기서열로 암호화된 것을 확인할 수 있었다.

표 1

	서열(5' → 3')
16S rRNA (서열번호 1)	AAGGATGGGGATGCGTCTGATTAGCTTGTTGGCGGGGTAACGGCCCAC CAAGGCGACGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGG AACTGAGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATA TTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGAAG ACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGGATAAAGTGAGCC ACGTGTGGCTTATTGCAGGTACCGTATGAATAAGGACCGGCTAATTCC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTT ATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGCCGTTTGTTAAGCGTGTTGTGAAAT GTCGGGGCTCAACCTGGGCATTGCAGCGCGAACTGGCAGACTTGAGTG CGCGGGAAGTAGGCGGAATTCGTCGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATA TGACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTGTAGCGTAACTGA CGCTGAAGCTCGAAAGCGTGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCGGTAAACGATGGATGCTCGCTGTTTGCGTCTGACGTAAG CGGCCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCA ACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAA CATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAA CTGCAGGCGAACGATTCAGAGATGATGAGGCCCTTCGGGGCGCCTGTG GAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTA AGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTGCTCTCAGTTGCCATCGGTTAAAG CCGGGCACTCTGTGAGGACTGCCTCCGCAAGGAGTGAGGAAGGTGGGG ATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTT ACAATGGCATGTACAGAAAGCTG

[0129]

[0131] **실시예 2. *Prevotella merdae* Immunoactis 균주 분석 시료 준비**

[0132] 상기 실시예 1에서 분리한 *Prevotella merdae* Immunoactis 는 혐기성 조건에서 37℃에서 성장시켰다. 혐기성 조건을 유지하기 위해, 혐기배양기(Oxoid)에 anaeropack(#A-06, MGC)을 추가하였다. *P. merdae* Immunoactis 는 0.5% 효모 추출물(#212750, BD Bioscience), 0.05% L-시스테인·HCl(#C7880, Merck), 0.005% 헤민(hemin, #H9039, Sigma-Aldrich), 및 0.0001% 비타민 K1(#95271, Sigma-Aldrich)가 보충된 BHI(brain heart infusion) 배지(#237500, BD Bioscience)를 멸균하여 성장시켰다. 밤새 배양한 박테리아 배양물 2mL를 8mL의 RPMI 1640 배지(#10-040-CV, Corning)에 접종(inoculation)하여 박테리아를 2일 동안 성장시켰다. RPMI 배양물을 6,000rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 0.2μm 주사기 필터(#17823-K, Sartorius)로 여과하였다. 상층액의 1mL 소분 용액(aliquot)을 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다. 그 후, *P. merdae* Immunoactis 배양물을 6,000rpm에서 5분 동안 원심분리한 뒤, 상층액을 버리고 펠렛(pellet)을 PBS에 재현탁하였다. 재현탁 용액의 600nm(OD_{600})에서의 광학 밀도는 OD_{600}= 6으로 조정하였다.

[0134] **실시예 3. T 세포 증식 및 활성화 분석**

[0135] *P. merdae* Immunoactis 의 면역 관련 효과를 확인하기 위해 *P. merdae* Immunoactis 의 배양 상층액을 인간 T 세포에 처리하였다. 구체적으로, 인간 T 세포는 인간 혈액 샘플에서 분리하였다. 먼저, 한국 광주과학기술원(이하, GIST)에 사전 동의를 받아 건강한 20대 기증자로부터 40-50mL의 혈액 샘플을 수집하였다. 그런 다음, Ficoll® Paque Plus(#GE17-1440-02, Merck)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵세포(PBMC; peripheral blood mononuclear cell)를 분리하였다. 다음으로, $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포는 각각 $CD4^+$ T 세포 분리 키트(#130-096-533, Miltenyi biotec) 및 $CD8^+$ T 세포 분리 키트(#130-096-495, Miltenyi biotec)를 사용하여 분리하였다. 분리된 T 세포를 10% FBS(#92916754, MP biomedicals), 1% 페니실린-스트렙토마이신(#15140-

122, Thermo Fisher Scientific), 1×NEAA(#11140-050, Thermo Fisher Scientific), 200mM HEPES(#15630-080, Thermo Fisher Scientific), 2mM 소듐 피루베이트(Sodium pyruvate), 2mM L-글루타민(#25030-081, Thermo Fisher Scientific), 및 1×2-메르캅토에탄올(2-Mercaptoethanol, #21985-023, Thermo Fisher Scientific)이 보충된 RPMI 1640 배지(#10-040-CV, Corning)에 재현탁하였다. 그런 다음, 분리된 T 세포를 CFSE(#C34554, Thermo Fisher Scientific)로 37℃, 5% CO_2 대기에서 30분 동안 염색하였다. 96-웰 무처리 플레이트(#32096, SPL)를 웰당 0.2mg α-CD3e 항체(#100340, Biolegend)로 사전 코팅하고, 4℃에서 밤새 배양하였다. CFSE로 염색된 T 세포를 96-웰 사전 코팅된 플레이트(#32096, SPL)에 웰당 2×10^5개로 분주하고, 단독으로 또는 10% *P. merdae* Immunoactis 배양 상층액과 함께 37℃, 5% CO_2 대기에서 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후, T 세포를 수확하고 FACS 완충액(PBS + 10% FBS + 2mM EDTA)으로 세척하였다. 염색한 세포는 CANTO II(BD Bioscience) 및 BDFACS Diva 소프트웨어 v.8.0.2(BD Bioscience)로 분석하였고, 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어(v.10, TreeStar)를 사용하여 수행하였다.

[0136] 그 결과, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, *P. merdae* Immunoactis 배양 상층액과 α-CD3e 항체의 병용 처리는 α-CD3e 항체를 단독으로 처리한 경우에 비해 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 유의하게 촉진시켰다.

[0137] 또한, 배양된 T 세포의 상층액을 수확하고, ELISA에 사용하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 그 후, 제조사의 프로토콜(#88-7316-88, Thermo Fisher Scientific)에 따라 인간 IFN-γ ELISA 키트를 사용하여 IFN-γ 수준을 측정하였다.

[0138] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, α-CD3e 항체를 단독으로 처리한 경우보다 α-CD3e 항체와 *P. merdae* Immunoactis 배양 상층액을 병용 처리한 경우, IFN-γ 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0140] **실시예 4. *P. merdae* Immunoactis 투여에 따른 α-PD-1의 종양 억제에 대한 상승 효과**

[0141] *P. merdae* Immunoactis 의 항암 효과를 알아보기 위해, 마우스에 MC38 결장암 세포를 접종하고, α-PD-1을 투여하여 동계 마우스 실험을 수행하였다. 구체적으로, 모든 동물 실험은 GIST 기관 동물 관리 및 사용 위원회(GIST-2021-096)에서 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다. 이 연구에 사용된 모든 동물은 연구 프로토콜의 승인된 정책에 따라 유지 및 취급하였다. MC38 결장암 세포 (#EZH204, Kerafast)는 10% 열-불활성화 FBS (#92916754, MP biomedicals), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Thermo Fisher Scientific)이 보충된 DMEM (#11965-118, Thermo Fisher Scientific)에서 5% CO_2, 37℃ 조건으로 유지하였다. 그 후, MC38 세포를 70-80% 컨플루언시에서 계대 배양하였다. 동계 종양 모델의 경우, 7주령 암컷 C57B6/N 마우스 (Orientbio)에 2×10^5 MC38 결장암 세포를 피하 주사하여 준비하였다 (0일차). 실험 종료 전까지 매주 3회 종양 크기를 측정하고, 종양 부피를 길이×너비^2×0.5로 계산하였다. PBS (Phosphate buffered saline, #10010-049, Thermo Fisher Scientific) 및 분리한 *P. merdae* Immunoactis (OD_{600} = 6, 200㎕)를 종양 접종 14일 전 (-14일차)부터 시작하여 주 6일 동안 경구 투여하고, 종양 접종 후 3주 동안 계속하였다 (23일차). 병용 요법을 조사하기 위하여, 종양 접종 후 7, 9, 11, 14, 16, 및 18일차에 2mg/kg의 IgG isotype (클론 2A3, #BE0089, BioXCell) 및 2mg/kg의 α-PD-1 mAb (클론 RMP1-14, #BE0146, BioXCell)를 복강 내 주사하였다. PBS 및 IgG isotype은 각각 박테리아 투여 및 α-PD-1 mAb 주사에 대한 대조군으로 사용하였다.

[0142] 실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, *P. merdae* Immunoactis 및 α-PD-1의 병용 투여는 α-PD-1 단독 투여와 비교하여 종양 성장을 현저하게 억제하였다.

[0144] **실시예 5. *P. merdae* Immunoactis 투여에 따른 α-PD-1의 향상된 면역 활성 및 종양 환경으로의 침투 효과**

[0145] 면역 체계에 대한 *P. merdae* Immunoactis 의 역할을 입증하기 위해, 2mg/kg의 α-PD-1, 및 OD_{600}=600, 200㎕의 *P. merdae* Immunoactis 를 투여한 종양 마우스 모델의 종양에서 면역 관련 유전자의 발현 및 면역 세포 집단을 프로파일링 하였다.

[0146] 구체적으로, 림프절 및 종양 조직은 MC38 세포 접종 후 21일차에 마우스로부터 분리하였다. 그 후, 5가지 면역 세포 유형[T 세포, NK 세포, 수지상 세포(DC; Dendritic cell), 조절 T 세포(T_{reg}; Regulatory T cell) 및 대식

세포]을 분석하였다. 림프절을 1mL PBS(#10010-049, Thermo Fisher Scientific)로 70μm 세포 여과기(#352350, Falcon)에서 분쇄하고, 림프구를 수확한 후 PBS로 세척하고 세포 수를 계산하였다. 종양 조직을 작은 조각으로 자른 후, 5mL 해리 배지로 옮기고 37℃에서 40분 동안 배양하였다. 종양 해리 배지 (Tumor dissociation media)는 2.5mg/ml 콜라게나아제 유형 1 (#17100-017, Thermo Fisher Scientific), 1.5mg/ml 콜라게나아제 유형 2 (#17101-015, Thermo Fisher Scientific), 1mg/ml 콜라게나제 유형 4 (#17104-019, Thermo Fisher Scientific), 50μg/ml DNase 유형 1 (#10104159001, Merck) 및 0.25mg/ml 히알루로니다제 유형 IV-S (#H3884, Merck)로 보충된 T 세포 배지를 이용하여 제조하였다. 해리 후, 샘플을 원심분리하고 상층액을 버린 후, 세포를 5mL 1RBC 용해 완충액 (#420301, Biolegend)에 재현탁하고 실온에서 10분 동안 배양하였다. 샘플을 70μm 세포 여과기를 통해 여과하고 세포 수를 계산하였다. Fc 수용체를 차단하기 위해, 이 샘플을 항-마우스 CD16/CD32 (Biolegned, #101330)와 함께 실온에서 10분 동안 배양하였다. Fc 차단 후, 항체 혼합물을 표면 마커 염색을 위한 샘플에 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. T_{reg} 및 대식세포의 경우, 고정/투과성 버퍼 세트 (BioLegend, #424401)를 사용하여 샘플을 고정 및 투과화하고, 마커 내 염색을 위해 Ab 내 혼합물을 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 염색된 세포는 CANTO II (BD Bioscience) 및 BDFACS Diva 소프트웨어 v.8.0.2(BD Bioscience)로 분석하였고, 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어(v.10, TreeStar)를 사용하여 수행하였다. 또한, 각 세포 유형에서 사용한 염색 마커는 다음과 같다:

[0147] T 세포: CD45 (#103116, Biolegend), CD3 (#100218, Biolegend), CD4 (#100422, Biolegend), CD8a (#563068, BD Bioscience), CD44 (#563970, BD Bioscience), CD62L (#104412, Biolegend), 및 PD-1 (#109104, Biolegend);

[0148] NK 세포: CD45 (#103116, Biolegend), CD3 (#100218, Biolegend), NK1.1 (#550627, BD Bioscience), 및 NKG2A (#11-5896-82, eBioscience);

[0149] DC: CD11c (#562782, BD Bioscience), CD11b (#566416, BD Bioscience), 및 B220 (#103224, Biolegend);

[0150] T_{reg}: CD45 (#103116, Biolegend), CD3 (#100218, Biolegend), CD4 (#100422, Biolegend), CD8a (#563068, BD Bioscience), CD25 (#101910, Biolegend), Foxp3 (#562996, BD Bioscience), 및 IFN-g (#163503, Biolegend);

[0151] 대식세포: CD45 (#103116, Biolegend), CD11b (#566416, BD Bioscience), F4/80 (#565411, Biolegend), 및 TNF-α (#506308, Biolegend).

[0152] 실험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, α-PD-1을 단독 투여한 마우스 종양 조직에 비하여, *P. merdae* Immunoactis 와 α-PD-1을 병용 투여한 마우스의 종양 조직에서 *Inf-γ* 및 *Cxcl9*의 발현이 증가된 반면 *Ccl22*의 발현은 감소한 것으로 나타났다. *Inf-γ* 은 선천성 및 후천성 면역에 중요한 사이토카인이며, *Cxcl9*은 백혈구의 분화 및 증식을 촉진하는 등의 역할을 하는 케모카인 중 하나이다. 또한, Ccl22의 발현이 억제되면 T_{reg}의 축적이 억제되어 항종양 효과가 생길 수 있다.

[0153] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, α-PD-1을 단독 투여한 마우스 종양 조직에 비하여, *P. merdae* Immunoactis 와 α-PD-1을 병용 투여한 마우스의 종양 조직에서 $CD4^+$ T 세포, $CD4^+CD44^+CD62L^-$ T 세포 ($CD4^+$ 효과기 T 세포), TNF-α^+ 세포의 개체군이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, α-PD-1을 단독 투여한 마우스 종양 조직에 비하여, *P. merdae* Immunoactis 와 α-PD-1을 병용 투여한 마우스의 종양 조직에서 $CD8^+$ T 세포, $CD8^+CD44^+CD62L^-$ T 세포, $PD\text{-}1^+CD8^+$ T 세포의 개체군이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0155] 상기 결과로부터, α-PD-1과 *P. merdae* Immunoactis 을 병용 투여할 경우, PD-1 단독 투여한 경우보다 면역활성이 향상되고, 종양 환경으로 침투하는 활성이 강화되는 것을 알 수 있었다.

[0157] **실시예 6. *P. merdae* Immunoactis 의 세포독성 분석**

[0158] 세포독성 분석을 위해, OT-1 T 세포 (ovalbumin-specific $CD8^+$ T cell)를 사용하였다. 간략하게, OT-1 마우스 (#003831, C57BL/6-Tg[TcraTcrb]1100Mjb/J, The Jackson Laboratory)에서 비장을 분리하여 3mL PBS와 함께 70 μm cell strainer (#352350, Falcon)에서 분쇄하였다. 세포를 10 mL의 1RBC 용해 완충액 (#420301,

BioLegend)에 재현탁하고 실온에서 10분 동안 배양하였다. OT-1 T 세포는 $CD8^+$ T Cell Isolation Kit (#130-096-495, Miltenyi Biotec)를 사용하여 분리하였다. 분리한 OT-1 T 세포는 T 세포 배지에 재현탁하였다. 60mm 무처리 플레이트 (#32096, SPL)를 5mg 항-CD3e 항체 (#100340, BioLegend) 및 0.5mg 항-CD28 항체 (#102116, BioLegend)로 미리 코팅하고 4℃에서 밤새 배양하였다. 또한, OT-1 T 세포를 미리 코팅한 60mm 플레이트에 5% 박테리아 배양 상층액과 함께 $1\text{-}2\times10^6$ cell/well으로 분배하고 37℃, 5% CO_2 대기에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후, OT-1 T 세포를 Ova 처리된 MC38 결장암 세포와 함께 T 세포 배지에서 5:1 비율로 6시간 동안 공동 배양하였다. 그런 다음, 세포를 수확하고 FACS 완충액으로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 Annexin V-PI staining kit (#ALX-850-020-K101, Enzo Life Science)를 사용하여 염색하고 유세포 분석법을 사용하여 분석하였다. OT-1 T 세포와 공동 배양하기 전, MC38 결장암 세포는 오브알부민(323-339)(#01641, Merck)을 처리하여 37℃, 5% CO_2 대기에서 밤새 배양하였다.

[0159] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, *P. merdae* Immunoactis 배양 상층액을 처리한 Ovalbumin-pulsed T 세포가 MC38 결장암 세포를 더 잘 사멸시키는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, *P. merdae* Immunoactis 균주는 T 세포의 암 세포 살상 능력을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

[0161] 상기 진술한 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.

수탁번호

[0163]

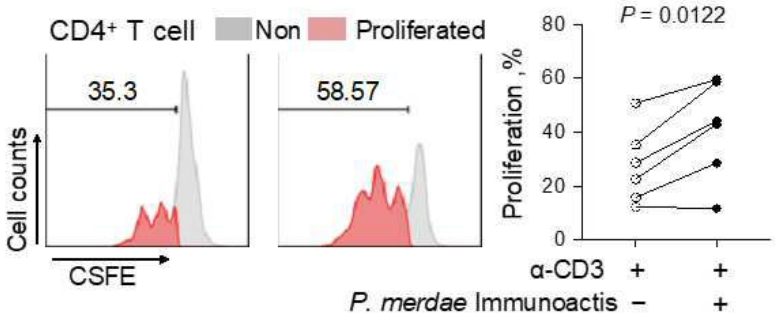
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14922BP

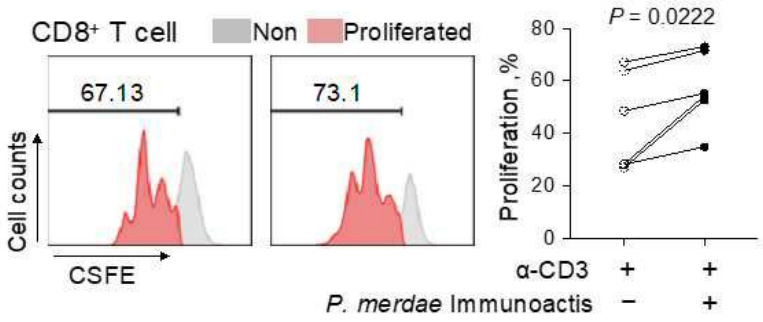
수탁일자 : 20220324

도면

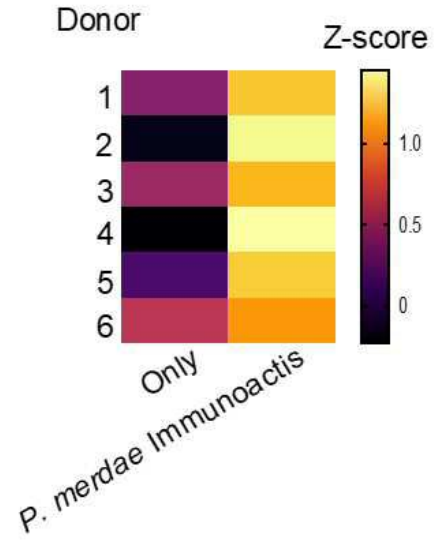
도면1



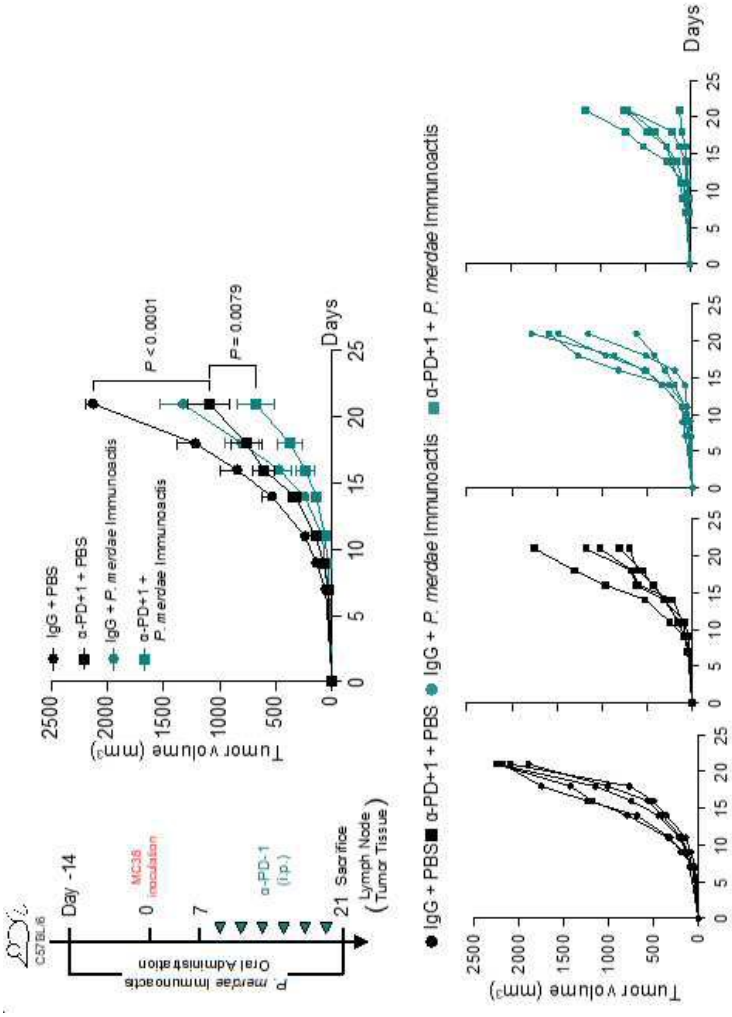
도면2


CD8+ T cell
Non
Proliferated
67.13
73.1
Cell counts
CSFE
P = 0.0222
Proliferation, %
80
60
40
20
0
α-CD3 + +
P. merdae Immunoactis − +

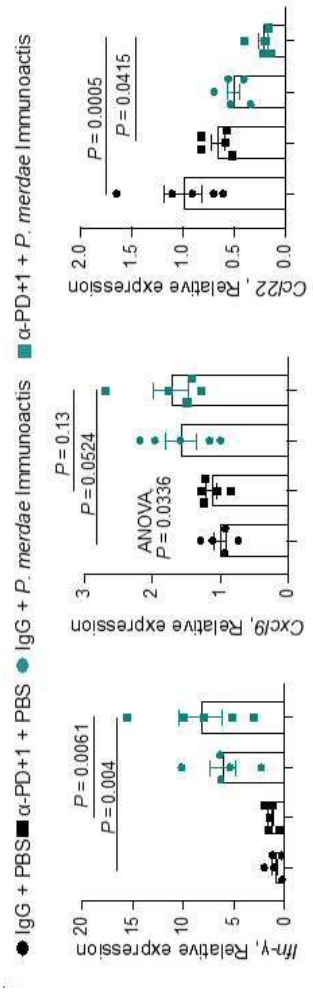
도면3


Donor
Z-score
1
2
3
4
5
6
1.0
0.5
0
Only
P. merdae Immunoactis

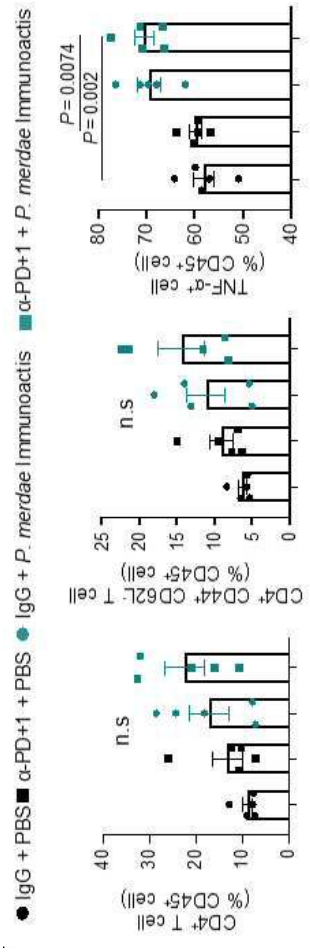
도면4


C57BL/6
Day -14
0
7
21 Sacrifice
(Lymph Node
Tumor Tissue)
MC38
inoculation
α-PD-1
(i.p.)
P. merdae Immunoactis
Oral Administration
IgG + PBS
α-PD+1 + PBS
IgG + P. merdae Immunoactis
α-PD+1 +
P. merdae Immunoactis
P < 0.0001
P = 0.0079
Tumor volume (mm3)
Days
IgG + PBS
α-PD+1 + PBS
IgG + P. merdae Immunoactis
α-PD+1 + P. merdae Immunoactis

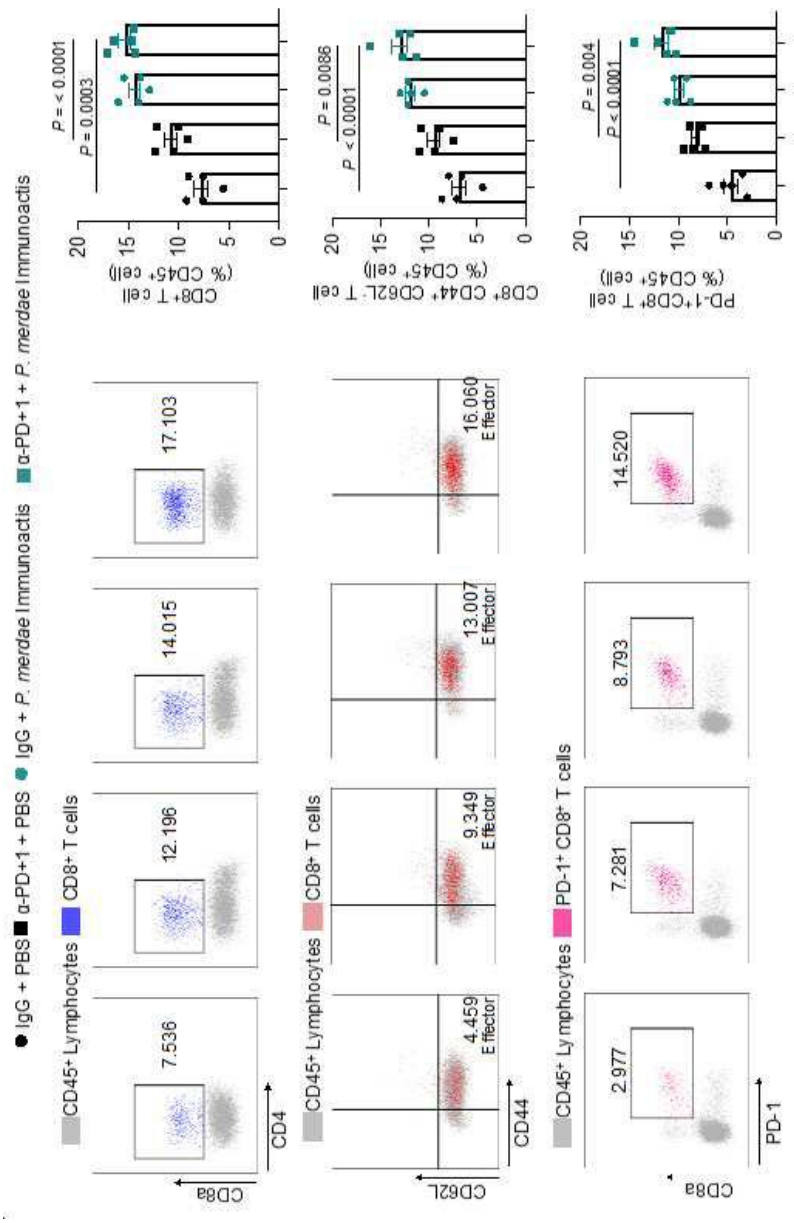
도면5


IgG + PBS
α-PD+1 + PBS
IgG + P. merdae Immunoactis
α-PD+1 + P. merdae Immunoactis
Ifn-γ, Relative expression
P = 0.0061
P = 0.004
Cxcl9, Relative expression
P = 0.13
P = 0.0524
ANOVA
P = 0.0336
Ccl22, Relative expression
P = 0.0005
P = 0.0415

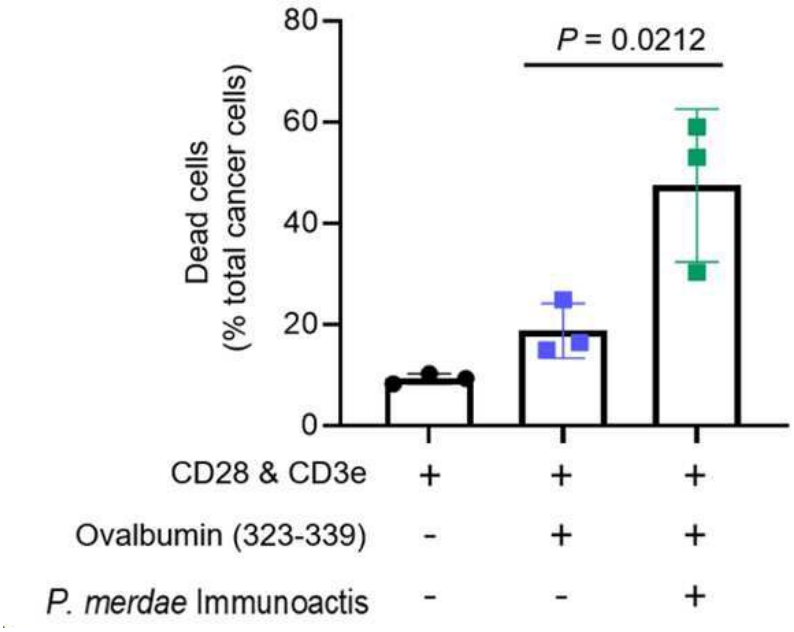
도면6


● IgG + PBS ■ α-PD+1 + PBS ● IgG + P. merdae Immunoactis ■ α-PD+1 + P. merdae Immunoactis
CD4+ T cell (% CD45+ cell)
n.s
CD4+ CD44+ CD62L- T cell (% CD45+ cell)
n.s
TNF-α+ cell (% CD45+ cell)
P= 0.002
P= 0.0074

도면7


● IgG + PBS ■ α-PD+1 + PBS ● IgG + P. merdae Immunoactis ■ α-PD+1 + P. merdae Immunoactis
CD45+ Lymphocytes
CD8+ T cells
7.536
12.196
14.015
17.103
CD8a
CD4
CD8+ T cell (% CD45+ cell)
P = < 0.0001
P = 0.0003
CD45+ Lymphocytes
CD8+ T cells
4.459
E ffector
9.349
E ffector
13.007
E ffector
16.060
E ffector
CD44
CD62L
CD8+ CD44+ CD62L- T cell (% CD45+ cell)
P = 0.0086
P < 0.0001
CD45+ Lymphocytes
PD-1+ CD8+ T cells
2.977
7.281
8.793
14.520
CD8a
PD-1
PD-1+CD8+ T cell (% CD45+ cell)
P = 0.004
P < 0.0001

도면8


P = 0.0212
Dead cells
(% total cancer cells)
80
60
40
20
0
CD28 & CD3e + + +
Ovalbumin (323-339) - + +
P. merdae Immunoactis - - +

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.