

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 12월 5일 (05.12.2019) WIPO | PCT

WO 2019/231286 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/739 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)
A61K 38/19 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 38/21 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 35/744 (2014.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006601

(22) 국제출원일: 2019년 5월 31일 (31.05.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0063517 2018년 6월 1일 (01.06.2018) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 정대균 (CHUNG, Dae Kyun); 16800 경기도 용인시 수지구 이종무로169번길 11-12, Gyeonggi-do (KR). 김한근 (KIM, Hangeun); 16369 경기도 수원시 권선구 임북로 50, 109동 1204호, Gyeonggi-do (KR). 전보람 (JEON, Boram); 26155 강원도 정선군 고한읍 고한10길 30, 102동 1506호, Gangwon-do (KR). 장경옥 (JANG, Kyung Ok); 16710 경기도 수원시 영통구 청명로 8, 203호, Gyeonggi-do (KR). 김형은 (KIM, Hyeongeun); 15019 경기도 시흥시 함송로29번길 38, 202동 901호, Gyeonggi-do (KR). 안지은 (AHN, Jieun); 24209 강원도 춘천시 동면 소양강로 100, 109동 1402호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 하나 (HANA IP LAW FIRM); 06235 서울시 강남구 테헤란로 14길 5, 3층, Seoul (KR).

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

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

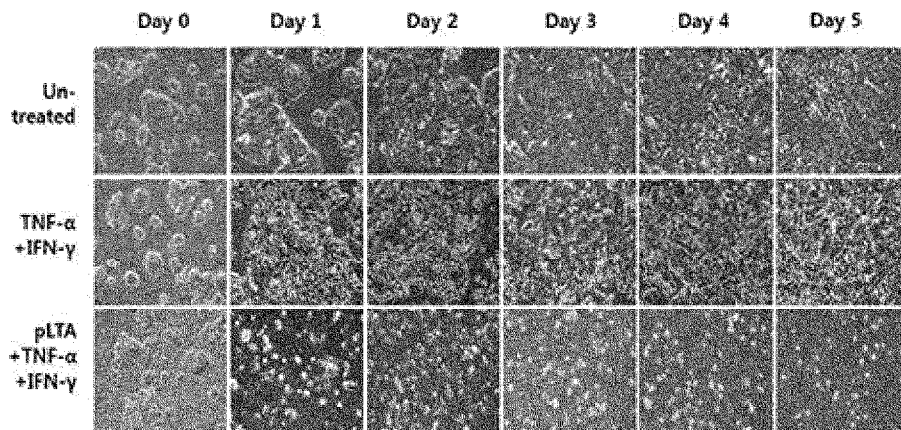
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: ANTI-CANCER COMPOSITION COMPRISING LIPOTEICHOIC ACID, TNF- α AND IFN- γ

(54) 발명의 명칭: 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 항암용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an anti-cancer composition comprising lipoteichoic acid, TNF- α , and IFN- γ .

(57) 요약서: 본 발명은 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.



WO 2019/231286 A1

명세서

발명의 명칭: 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 항암용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 대장암은 결장과 직장에 생기는 악성 종양을 말하며, 세계적으로 2000년 발생률(945,000명 신규 발생, 세계 전체 암의 9.4%)과 사망률(492,000명 사망, 전체 암중 7.9%)이 모든 암 중 세 번째로 높고, 성별로 비교해보면 남자와 여자에게서 비슷한 비율로 발생한다(남:여 1.1:1).
- [3] 대장암 발병은 환경적인 요소와 매우 밀접한 관련이 있다. 특히, 서구화된 식습관으로 인해 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 관련된 요인으로는 과도한 동물성 지방, 당분, 알코올 섭취와 섬유소, 항산화 비타민, 야채나 과일의 섭취 부족 등이 주요 원인으로 알려져 있다.
- [4] 특히 동물성 지방과 육류를 많이 섭취하면 채소나 곡물 등의 섬유질 식품 섭취와는 달리 대변 양이 적고 내용물이 대장을 통과하여 배설되는 시간이 많이 걸린다.
- [5] 또한 담즙산과 스테롤의 배설이 증가하며 대장 내에 존재하는 세균종의 구성에도 변화를 일으켜 이들 물질을 화학적으로 변화시키는 세균의 종류가 증가한다. 따라서 발암물질이 많이 생성되고 발암물질이 대장 내에 머물고 접촉하는 시간도 길어져서 대장암이 자주 발생하게 된다.
- [6] 대장암의 경우 혈관을 중심으로 많은 수의 세포들이 서로 덩어리진 형태로 성장하는 대표적인 고형암 세포로서 치료방법이 극히 제한적으로 완치가 어려운 암 중 하나이다.
- [7] 즉, 덩어리진 대장암 세포의 중심부까지 약물이 제대로 투과하지 못하기 때문에 대장암 세포를 완전히 제거하기란 쉬운 일이 아니다.
- [8] 현재 약물로써 대장암을 치료할 수 있는 방법은 거의 없는 실정이고, 수술요법이나 방사선요법 등과 같은 외과적인 치료만이 대장암을 치료하는 제한적인 방법이며, 또한 이러한 치료법으로는 대장암의 완치가 어렵다.
- [9] 따라서 많은 연구자가 대장암 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 방법을 개발함으로써 대장암 세포뿐만 아니라 대부분의 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기 위해서 많은 연구를 수행하고 있다.
- [10] 자가사멸(apoptosis)은 대부분의 항암제가 암세포의 증식억제 효과를 나타내는 중요한 작용기작으로, 세포 내부에 프로그램 된 신호를 따라 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 죽음이다.

- [11] 자가사멸은 생명체의 여러 정상적인 생리적 현상에서 쉽게 관찰된다. 예를 들면 자가사멸은 생명체의 초기 발생 단계에서 관찰되는 여러 형태적 변화과정과 면역계 또는 신경계의 기능적 자가 조직화과정에서 중요한 역할을 담당한다. 또한, 성인이 된 이후에도 조직 항상성 세포 수의 조절, 손상된 세포의 제거, 감염에 대한 방어 기작으로서 필수적으로 작용한다.
- [12] 자가사멸은 여러 질환들의 발병과정에도 깊이 관여하는데 비정상적인 자가사멸의 발생은 퇴행성뇌신경질환, 면역계 이상, 그리고 심장 혈관계질환 등의 원인이 될 수 있으며, 자가사멸의 비정상적인 억제는 암의 원인이 될 수 있다.
- [13] 자가사멸이 정상적인 조절과정에서 벗어나 비정상적으로 발행하거나 억제되어 나타나는 질병을 좀 더 자세히 살펴보면, p53, p16와 Bcl-2 등의 유전자의 이상 발현에 의해 유도되는 암들, HIV, Herpes 및 독감 바이러스들은 여러 감염증, 그리고 당뇨, 류마티스 관절염, 다발성 경화증과 근무력증 등과 같은 자가면역 질환들이 있다.
- [14] 이와 같이, 자가사멸은 생명체의 다양한 생리작용을 정상적으로 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 여러 질병의 발병과정에도 밀접한 관련이 있다.
- [15] 개체를 구성하는 각 세포의 자가사멸은 유전적으로 손상을 입은 세포나 분화 자극제에 의해 부적절한 분화의 유도에 의한 종양의 발달을 막기위해 이들 비정상적인 세포를 개체에서 제거하기 여러 수단, 즉 회복 불가능한 유전적 상처를 지닌 세포들을 개체에서 제거하기 위한 일반적인 수단이다.
- [16] 이 개념은 일반적으로 사용되는 항암제가 암세포의 증식억제와 연관된 자가사멸 과정을 통해 암세포 사멸을 유도한다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다.
- [17] 따라서 자가사멸 과정의 교란은 손상되거나 손상이 시작된 세포의 생존과 그들 세포의 성장을 유도하기 때문에 자가사멸의 억제는 암화 과정에서 중요한 역할을 한다. 아울러 암 예방 효과가 있는 물질들은 이러한 비정상적인 세포의 자가사멸을 유도하며, 이들에 의한 자가사멸의 유발은 최소한 그들의 암 예방 활성과 연관되어 있음이 보고되었다.
- [18] 종래의 대장암 치료제로는 카페시타빈(Capecitabine), 루코보린(Leucovorin) 및 이리노테칸(Irinotecan)이 알려져 있으나, 이들은 간부전, 위창공, 피부손상 등의 부작용이 발생할 수 있다.
- [19] 또한, 대장암의 치료 방법으로, 세포의 자가사멸에서 중요한 역할을 수행하는 유전자들 즉, Bcl-2 family, p53, Inhibitory apoptosis proteins(IAPs), caspases에 대한 치료용 약물 및 유전자 치료가 수행되나, 이러한 방법은 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 주는 문제가 있다.
- [20] 또한, 현재 연구되고 있는 물질들은 항암제와의 콤비네이션 테라피로 사용되고 있는데 이는 치료 효과를 증진시키는 결과를 보여주었지만 동시에 항암제에 대한 내성 발생 및 정상세포 사멸 등에 대한 문제점이 지적되고 있다.
- [21] 따라서 암세포 특이적인 사멸유도와 즉각적인 효과를 확인할 수 있는 새로운

방식의 치료방법의 개발이 시급하다.

- [22] 한편, 최근 연구에 의해 장내 세균의 조성을 조절함으로써 대장암의 발명을 줄일 수 있는 것이 밝혀지면서, 새로운 대장암 치료 방법으로 프로바이오틱스(Probiotics) 및 프리바이오틱스(Prebiotics)이 주목받고 있다. 프로바이오틱스와 프리바이오틱스는 락토바실러스(lactobacillus), 비피도박테리아(Bifidobacteria)와 같은 유용한 미생물의 장내 균수를 증가시키고, 반대로 유해 미생물의 수를 줄여준다.

- [23] 이러한 방법은 장내 염증반응을 억제하고 면역기능과 항암 활성을 강화시킴으로써 종양형성을 막을 수 있다. 또한, 프로바이오틱스는 육류에 포함되어 있는 발암인자와 결합하여 그 활성을 억제하고, β 같은 발암물질 전구체를 가수분해하는 박테리아 효소의 생성을 감소시킬 수 있다.

- [24] 따라서, 암세포에 특이적으로 작용하는 항암제의 개발이 대두되는 가운데, 본 발명자들은 유산균에서 유래한 리포테이코익산(Lipoteichoic acid)과 $\text{TNF-}\alpha$ 및 $\text{IFN-}\gamma$ 를 혼합한 조성물이 정상세포에 영향을 주지 않고, 암세포의 자가사멸을 유도하는 데에 주목하여, 이를 항암제의 소재로 활용하고자 하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [25] 본 발명은 기존의 항암제가 암세포뿐만 아니라 정상세포 사멸도 유도하는 문제를 해결하기 위해서, 암세포만 특이적으로 사멸하는 항암용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

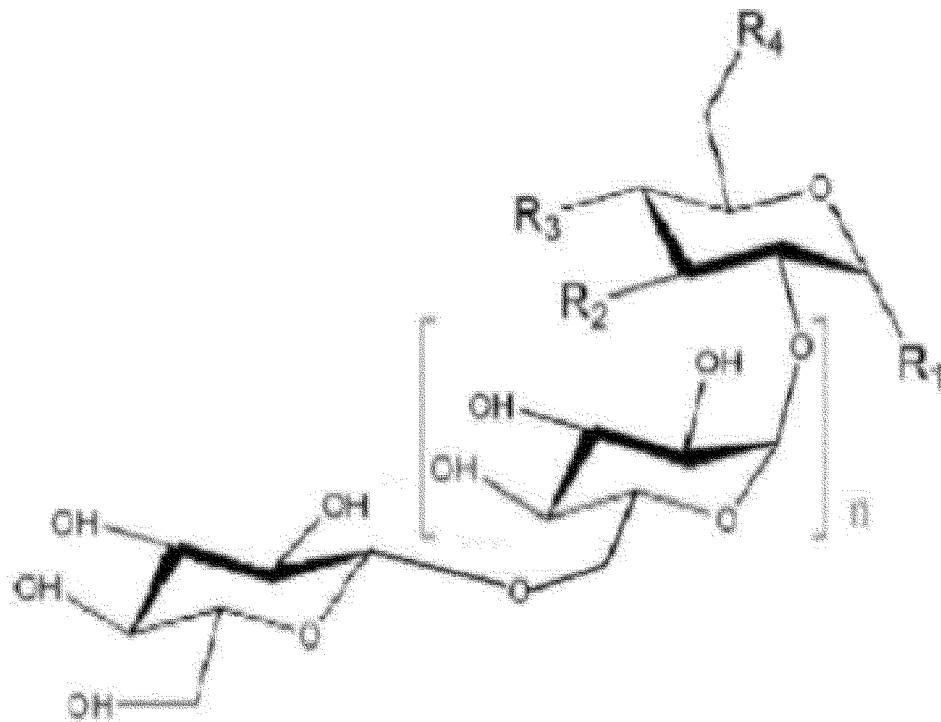
- [26] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 미생물 유래 물질, $\text{TNF-}\alpha$ 및 $\text{IFN-}\gamma$ 를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

- [27] 구체적으로, 상기 미생물 유래 물질은 미생물 파쇄체, 리포테이코익산, 리포테이코익산 유래의 당지질, 당지질 변이체 및 화학적으로 합성한 리포테이코익산 (Toll-Like Receptor 2 리간드)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있다.

- [28] 구체적으로, 상기 미생물은 그람양성균인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴연쇄상구균(*Streptococcus pneumoniae*), 장구균(*Enterococcus faecium*) 및 유산균으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 유산균 또는 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [29] 본 발명에서 상기 “미생물 파쇄체”는 미생물을 세제(detergent)로 처리하는 화학적 방법 또는 물리적 방법 등으로 파쇄하여 얻은 세포 용해물을 의미한다. 구체적으로, 상기 미생물 파쇄체는 미생물을 비드 밀(bead mills), 프레스(Presses), 소니케이터(Sonicator) 또는 마이크로플루다이저(Microfluidizer)를 사용하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [30] 본 발명에서 상기 리포테이코익산 유래의 당지질 또는 당지질 변이체는 알과 결합으로 연결된 이중 또는 삼중 핵소스의 C₁, C₃, C₄ 및 C₆번 위치 중 어느 한 곳 이상에 C₁₀ 내지 C₃₀의 포화 또는 불포화된 2 내지 6개의 아실 사슬이 결합되어 있는 당지질일 수 있다.
- [31] 이때 상기 핵소스는 글루코스, 갈락토스, 마노스 또는 프룩토스일 수 있으며, 바람직하게는 글루코스 또는 갈락토스일 수 있다.
- [32] 또한 상기 당지질은 하나 이상의 불포화된 아실 사슬을 포함하는 것이 바람직하다.
- [33] 구체적으로, 상기 당지질은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [34] [화학식 1]
- [35]



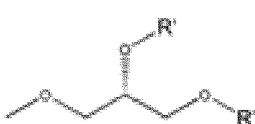
- [36] 상기 식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 하이드록시, , , 또는  일 수 있다. 이때

R'는 각각 독립적으로 C₁₀ 내지 C₃₀의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, 구체적으로는 C₁₄ 내지 C₂₆의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C₁₄ 내지 C₂₄의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C₁₄ 내지 C₂₂의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C₁₄ 내지 C₂₀의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C₁₄ 내지 C₁₈의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C₁₆ 내지 C₂₀의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C₁₆ 내지 C₁₈의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있다. n은 0 또는 1 일 수 있으며, C_m은 C₄ 내지 C₃₀의 알킬, 구체적으로는 C₆ 내지 C₂₆의 알킬 또는 C₁₀ 내지 C₂₄의 알킬일 수 있고,

상기 당지질 내 아실 사슬의 총 수는 2 내지 6, 구체적으로는 2 내지 4 또는 2 내지 3일 수 있다.

[37] 더욱 구체적으로, 상기 화학식 1에서 R_1 은  일 수 있다. 이때

R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 구체적으로는 C_{14} 내지 C_{26} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{24} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{22} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{16} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C_{16} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, R_2 내지 R_4 는 하이드록시일 수 있고, n 은 1이며, 1 내지 14개의 이중결합, 구체적으로는 1 내지 10개의 이중결합, 1 내지 8개의 이중결합, 1 내지 6개의 이중결합, 1 내지 4개의 이중결합, 1 내지 3개의 이중결합 또는 1 내지 2개의 이중결합을 갖는 아실 사슬을 하나 이상 포함할 수 있다.

[38] 또한 구체적으로, 상기 화학식 1에서 R_1 은  일 수 있고, 이때

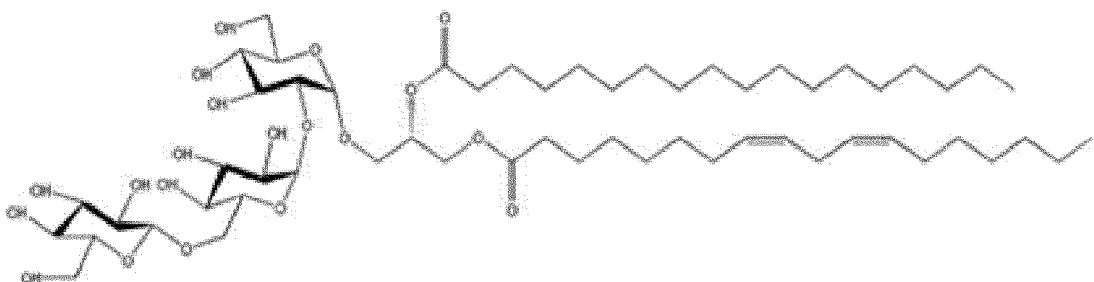
R_2 , R_3 또는 R_4 중 어느 하나는  이고, 나머지는 하이드록시일 수 있다.

이때 R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 구체적으로는 C_{14} 내지 C_{26} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{24} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{22} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{16} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C_{16} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, n 은 1이고, 1 내지 14개의 이중결합, 구체적으로는 1 내지 10개의 이중결합, 1 내지 8개의 이중결합, 1 내지 6개의 이중결합, 1 내지 4개의 이중결합, 1 내지 3개의 이중결합 또는 1 내지 2개의 이중결합을 갖는 아실 사슬을 하나 이상 포함할 수 있다.

[39] 예를 들어, 상기 화학식 1의 당지질은 하기 화학식 1-1 또는 화학식 1-2의 구조를 갖는 당지질일 수 있다.

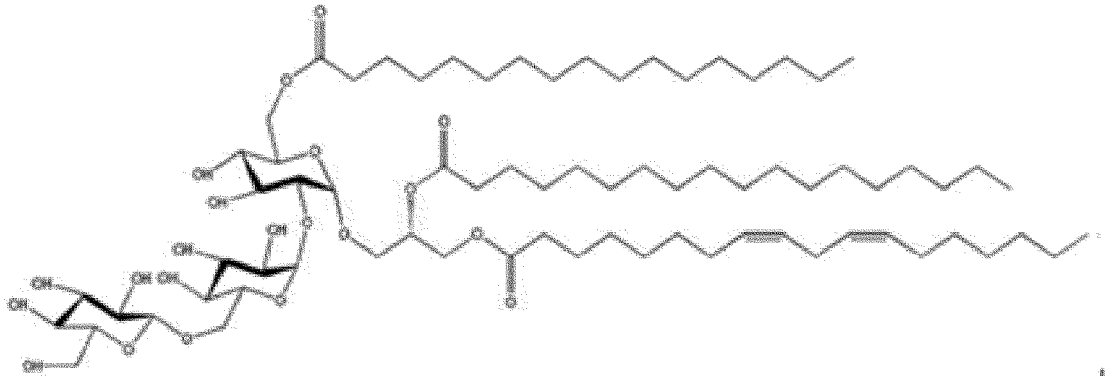
[40] [화학식 1-1]

[41]



[42] [화학식 1-2]

[43]

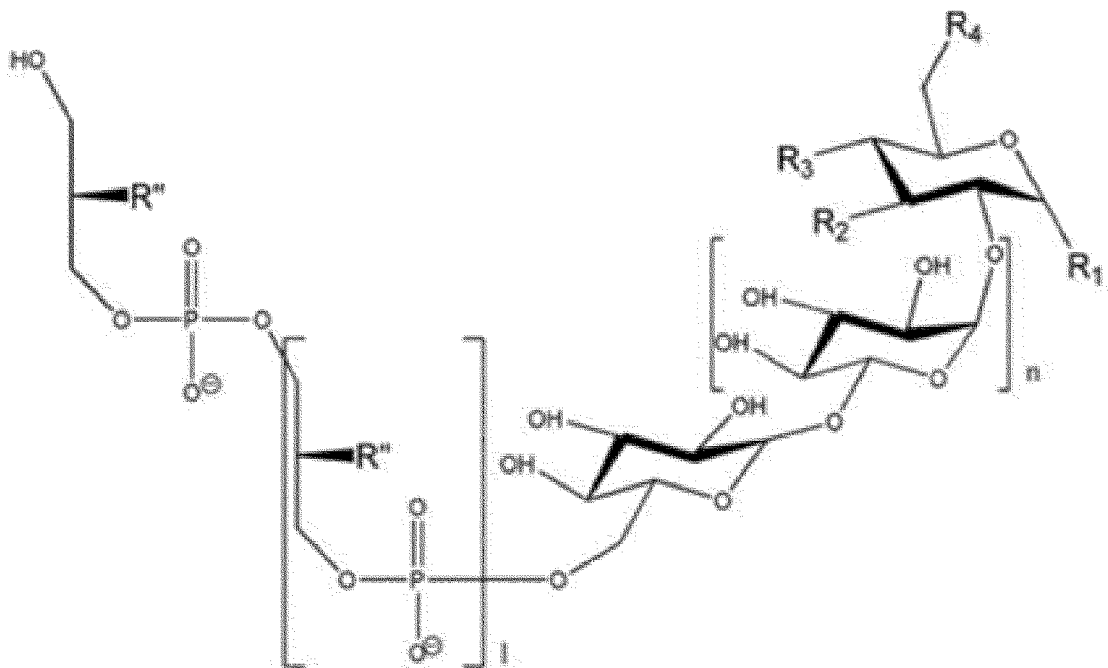


[44] 이 때 상기 화학식 1-1 또는 화학식 1-2에 나타난 이중결합의 위치는 달라질 수 있다.

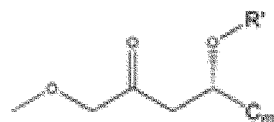
[45] 또한 구체적으로, 상기 당지질은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 당지질일 수 있다.

[46] [화학식 2]

[47]

[48] 상기 식에서, R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 하이드록시, $-O-R'$,

또는



일 수 있다. 이때

R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, 구체적으로는 C_{14} 내지 C_{26} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{24} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{22} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실

사슬, C_{16} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C_{16} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있다. R'' 는 각각 독립적으로 N-아세틸글루코사민, D-알라닌 또는 하이드록시일 수 있다. n 은 0 또는 1 이고, C_m 은 C_4 내지 C_{30} 의 알킬, 구체적으로는 C_6 내지 C_{26} 의 알킬 또는 C_{10} 내지 C_{24} 의 알킬일 수 있으며, 1은 0 내지 80, 구체적으로는 0 내지 60, 0 내지 40, 또는 0 내지 20일 수 있다. 상기 당지질 내 아실 사슬의 총 수는 2 내지 6, 구체적으로는 2 내지 4, 또는 2 내지 3일 수 있다.

[49] 구체적으로, 상기 화학식 2에 있어서, R_1 은  일 수 있다. 이때

R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 구체적으로는 C_{14} 내지 C_{26} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{24} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{22} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{16} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C_{16} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, R'' 는 각각 독립적으로 N-아세틸글루코사민, D-알라닌 또는 하이드록시일 수 있고, R_2 내지 R_4 는 하이드록시일 수 있다. n 은 1이고, 1은 0 내지 80, 구체적으로는 0 내지 60, 0 내지 40, 또는 0 내지 20일 수 있으며, 1 내지 14개의 이중결합, 구체적으로는 1 내지 10개의 이중결합, 1 내지 8개의 이중결합, 1 내지 6개의 이중결합, 1 내지 4개의 이중결합, 1 내지 3개의 이중결합 또는 1 내지 2개의 이중결합을 갖는 아실 사슬을 하나 이상 포함할 수 있다.

[50] 또한 구체적으로, 상기 화학식 2에 있어서, R_1 은  일 수 있고,

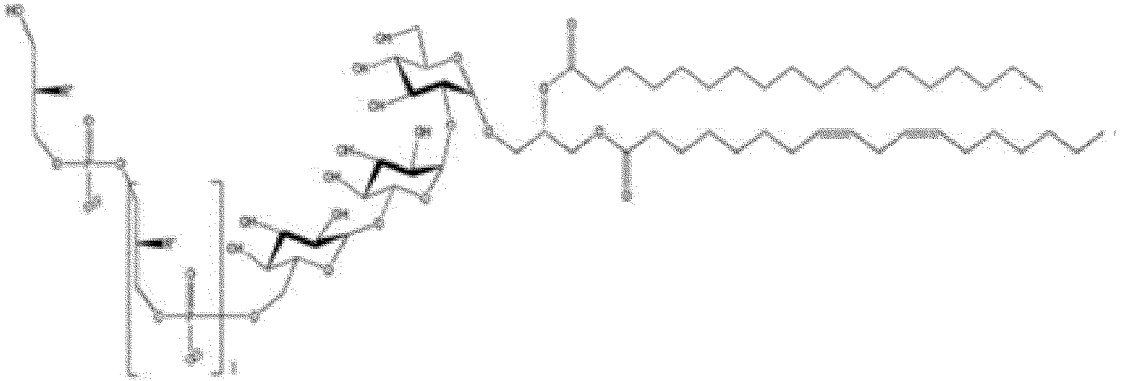
이때 R_2 , R_3 또는 R_4 중 어느 하나는  이고, 나머지는 하이드록시일

수 있다. 이때 R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 구체적으로는 C_{14} 내지 C_{26} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{24} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{22} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{14} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, C_{16} 내지 C_{20} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬, 또는 C_{16} 내지 C_{18} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬일 수 있으며, R'' 는 각각 독립적으로 N-아세틸글루코사민, D-알라닌 또는 하이드록시일 수 있다. n 은 1이고, 1은 0 내지 80, 구체적으로는 0 내지 60, 0 내지 40, 또는 0 내지 20일 수 있으며, 1 내지 14개의 이중결합, 구체적으로는 1 내지 10개의 이중결합, 1 내지 8개의 이중결합, 1 내지 6개의 이중결합, 1 내지 4개의 이중결합, 1 내지 3개의 이중결합 또는 1 내지 2개의 이중결합을 갖는 아실 사슬을 하나 이상 포함할 수 있다.

[51] 예를 들어, 상기 화학식 2는 하기 화학식 2-1 또는 화학식 2-2일 수 있다.

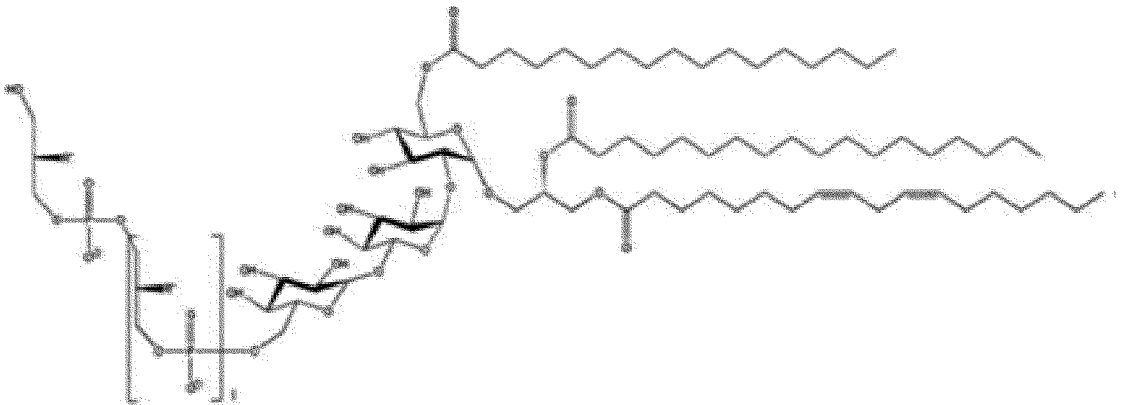
[52] [화학식 2-1]

[53]



[54] [화학식 2-2]

[55]



[56] 상기 식에서, R"는 각각 독립적으로 N-아세틸글루코사민, D-알라닌 또는 하이드록시일 수 있고, 1은 0 내지 80, 구체적으로는 0 내지 60, 0 내지 40 또는 0 내지 20일 수 있다.

[57] 또한 상기 화학식 2-1 또는 화학식 2-2에 나타난 이중결합의 위치는 달라질 수 있다.

[58] 상기 당지질의 구체적인 구조는 한국 등록특허 10-1242669호를 참고할 수 있으며 이를 적절히 변형하여 적용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59] 본 발명에서 상기 화학적으로 합성한 리포테이코익산은 pLS1일 수 있다. 상기 pLS1은 Toll-Like Receptor 2(TLR 2)의 리간드로 작용한다. TLR2는 특정 세포의 세포막에 존재하는 막 단백질로서, 이물질을 인식하여 면역계에 관여하는 세포에 신호를 전달한다. 본 발명에서 상기 pLS1은 다양한 미생물의 리포테이코익산 구조로부터 화학적으로 합성한 것일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[60] 본 발명에서 화학적으로 합성한 LTA에 관하여는 "Schmidt's anomeric O-alkylation method" (Schmidt et al., 1980. Synthesis of α - and β -glycopytanosides via 1-O-alkylation. Tetrahedron Lett. 21, 3565-3568) 및 "synthesis of lipoteichoic acid and derivatives"(Anthony et al., 2009, Microbial Glycobiology: Structures, Relevance

and Applications (pp.455-476). Elsevier Inc.)에 기술된 내용을 참고할 수 있으며, 필요에 따라 이를 적절히 변경하여 적용할 수 있다.

- [61] 상기 항암 효과는 본 발명의 조성물에 의해 암세포의 자가사멸을 유도하는 것을 의미하며, 상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암, 췌장암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있고, 구체적으로는 혈액암 또는 대장암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [62] 상기 리포테이코익산과 사이토카인 TNF- α 및 IFN- γ 는 세포 표면의 수용체에 결합한 후 신호전달 과정을 조절함으로써 24 내지 72 시간 내에 암세포의 자가사멸을 유도할 수 있다. 구체적으로, 상기 암세포의 자가사멸은 24시간 이내에 유도되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 상기 항암 효과는 특정 유전자에 대한 결핍(knock out)을 필요로 하지 않기 때문에 부작용이 종래의 항암제에 비해 적으며, 암 치료 기간을 단축시킬 수 있다.
- [64] 또한, 상기 리포테이코익산과 사이토카인 TNF- α 및 IFN- γ 은 정상 세포(primary cells)에서는 자가사멸을 유도하지 않기 때문에 종래의 항암제에 비해 부작용이 적다.
- [65] 본 발명에서 용어 “리포테이코익산(Lipoteichoic acid)”은 그람양성균의 세포벽 성분 중 하나를 의미하는 것으로서, 상기 리포테이코익산은 일반적으로 글루코스 또는 D-알라닌 치환체를 갖는 폴리인산글리세롤 및 당 단위와 지방산 사슬을 포함하는 당지질의 두 개의 구조체로 이루어져 있다.
- [66] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 리포테이코익산은 유산균의 세포벽에서 유래될 수 있고, 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus sp.*)일 수 있다.
- [67] 상기 락토바실러스 속은 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 또는 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명에서 용어 “TNF- α ” 및 “ γ ”는 면역세포에서 분비되는 사이토카인을 의미한다. 상기 IFN- γ 는 암세포의 자가사멸에 필요한 caspase 유전자의 발현을 증가시키고, 상기 TNF- α 는 caspase 단백질의 연속적인 활성을 유도한다.
- [69] 종래의 연구에서 상기 TNF- α 와 IFN- γ 처리에도 불구하고 완전한 세포 사멸을 보이지 않았는데, 이는 Bcl2와 같은 anti-apoptotic factor가 암세포의 자가사멸을 억제하기 때문이다.
- [70] 그러나 본 발명에서 상기 리포테이코익산은 anti-apoptotic factors의 발현 억제를 유도하여 TNF- α 와 IFN- γ 에 의한 세포의 자가사멸을 유도시킬 수 있다.
- [71] 상기 리포테이코익산에 의한 Bcl2의 발현 억제는 primary 세포주인 CCD18co에서는 발생하지 않으며, 그 결과 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 조합에 의한 세포 사멸이 정상세포에서는 발생하지 않는다.

- [72] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암용 조성물에서 TNF- α 및 IFN- γ 의 농도는 각각 1 ng/mL 이상일 수 있다.
- [73] 상기 TNF- α 및 IFN- γ 의 농도가 각각 1 ng/mL 미만인 경우 암세포의 자가사멸을 억제하는 효과가 구현되지 않을 수 있고, 대상체의 특성이나 건강 상태를 고려하여 각 성분의 농도 상한선을 결정할 수 있다.
- [74] 구체적으로, 상기 항암용 조성물은 상기 리포테이코익산을 50 μ g/mL 내지 200 μ g/mL 포함하고, 상기 TNF- α 및 IFN- γ 를 1 ng/mL 내지 10 ng/mL 포함할 수 있다.
- [75] 구체적으로, 상기 항암용 조성물은 상기 리포테이코익산을 70 μ g/mL 내지 150 μ g/mL 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 90 μ g/mL 내지 110 μ g/mL 포함할 수 있고, 가장 구체적으로는 상기 리포테이코익산을 100 μ g/mL로 포함할 수 있다.
- [76] 또한 구체적으로, 상기 항암용 조성물은 상기 TNF- α 를 1 ng/mL 내지 10 ng/mL 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 상기 TNF- α 를 3 ng/mL 내지 7 ng/mL 포함할 수 있고, 가장 구체적으로는 상기 TNF- α 를 5 ng/mL로 포함할 수 있다.
- [77] 또한 구체적으로, 상기 항암용 조성물은 상기 IFN- γ 를 1 ng/mL 내지 10 ng/mL 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 상기 IFN- γ 를 3 ng/mL 내지 7 ng/mL 포함할 수 있고, 가장 구체적으로는 상기 IFN- γ 를 5 ng/mL로 포함할 수 있다.
- [78] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 암 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [79] 상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암, 췌장암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있고, 구체적으로는 혈액암 또는 대장암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [80] 상기 “예방”은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 발암 증상이 상기 조성물을 사용하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.
- [81] 상기 “치료”는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다.
- [82] 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.
- [83] 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 전신 또는 국소 투여될 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.
- [84] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스,

솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [85] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [86] 경구 투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [87] 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있고, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [88] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.
- [89] 상기 조성물은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 약학적으로 유효한 양이 투여될 수 있으며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [90] 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [91] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 상기 암의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않는다. 예컨대, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체이나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한 없이 포함한다.
- [92] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 암 예방 및 개선용

건강기능식품에 관한 것이다.

- [93] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.
- [94] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.
- [95] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.
- [96] 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.
- [97] 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.
- [98] 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [99] 상기 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 상기 화합물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [100] 상기 환 형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [101] 상기 과립형태의 건강기능식품은 상기 화합물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

- [102] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.
- [103] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 항암 보조제 조성물에 관한 것이다.
- [104] 상기 "항암 보조제"는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제를 의미한다. 예컨대, 상기 항암 보조제는 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있다.
- [105] 다른 예로서, 농도 의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 항암 보조제로서 사용할 수 있다.
- [106] 상기 항암 보조제는 처리농도에 따라 항암제 또는 항암 보조제로서 사용할 수 있으며, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않는 처리농도 범위에서 항암 보조제로 사용할 수 있다.
- [107] 본 발명의 또 다른 측면은, 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.
- [108] 상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 는 개체에 동시적으로(simultaneous), 별도로(separate), 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있고, 상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 는 체내에서 공동 작용을 통해 항암 활성을 나타낼 수 있다.
- [109] 통상적으로 상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 는 조성물로서 개체에 동시에 투여되는 것이 일반적일 것이나, 시차를 두고 상기 각 유효성분이 인체에 투여되더라도 개별적으로 투여된 각 유효성분이 체내에서 동시에 작용함으로써 동등한 수준의 항암 활성을 구현할 수 있다.
- [110] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 임상적으로 사용되고 있는 암 치료용 항암제와 병용하여 투여될 수 있으며, 이 때 투여 방식은 동시적, 순차적 또는 별도로 이루어질 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [111] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [112] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해

적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [113] 본 발명의 항암용 조성물은 리포테이코익산, TNF- α 및 IFN- γ 이 타겟 세포에 작용함으로써, 암세포 특이적으로 자가사멸과 관련된 신호전달 체계를 활성화하기 때문에 기존의 항암제보다 부작용이 적다.
- [114] 특히, 리포테이코익산의 활성화 부위에 대한 유도체를 합성하여 항암 효과의 효율성을 높일 뿐만 아니라, 24시간 이내에 암세포가 사멸하기 때문에 항암 효과가 탁월하다.

도면의 간단한 설명

- [115] 도 1은 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 세포에 따른 세포 사멸을 평가한 그래프이다. 혈액암 세포(THP-1) 및 대장암 세포(HT-29)는 암세포이고, 생쥐의 췌장에서 분리한 것(splenocytes), primary 세포주(fibroblast), primary 대장 세포(CCD18co)는 정상 세포이다.
- [116] 도 2는 발명의 일 실시예에 따른 시료의 구성에 따른 대장암 세포(HT-29)의 변화를 5일 동안 관찰한 이미지이다.
- [117] 도 3은 발명의 일 실시예에 따른 시료의 구성에 따른 TNF- α 및 IFN- γ 의 농도에 따른 대장암 세포(HT-29)의 사멸을 평가한 그래프이다.
- [118] 도 4는 발명의 일 실시예에 따라 리간드 농도에 따른 대장암 세포(HT-29)의 변화를 3일간 측정된 그래프이다.
- [119] 도 5는 발명의 일 실시예에 따라 다양한 리간드에 따른 대장암 세포(HT-29)의 사멸을 측정된 그래프이다.
- [120] 도 6은 발명의 일 실시예에 따라 미생물 유래 물질의 처리에 따른 대장암 세포(HT-29)의 사멸을 측정된 그래프이다.
- [121] 도 7은 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 의해 암세포의 자가사멸이 유도되었음을 DNA laddering으로 확인한 것이다.
- [122] 도 8은 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 의해 암세포의 자가사멸이 유도되었음을 Nucleus shrinking으로 확인한 것이다.
- [123] 도 9는 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 의해 암세포의 자가사멸이 유도되었음을 Tunnel assay를 통해 확인한 것이다.
- [124] 도 10은 CT-26 마우스 대장암 세포에 대한 항암 실험 이미지이다.
- [125] 도 11은 CT-26 마우스 대장암 세포에 대한 항암 실험 3주 후 암세포의 무게를 측정된 그래프이다.
- [126] 도 12는 CT-26 마우스 대장암 세포에 대한 항암 실험 3주 후 암세포의 크기를 측정된 그래프이다.
- [127] 도 13은 CT-26 마우스 대장암 세포에 대한 항암 실험 3주 후 적출한 암세포의 크기를 측정된 이미지이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [128] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [129] **제조예 1. 리포테이코익산(LTA) 및 LTA 유래 당지질의 분리**
- [130] 리포테이코익산(LTA)의 분리는 기존에 보고된 (Morath, S., A. Geyer, et al. 2001. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. J. Exp. Med. 193(3):393-7.) 방법을 참고하여 수행하였다. 100g의 세포 (wet weight)를 0.1 M 구연산나트륨 버퍼 (pH 4.7) 400 ml로 현탁 시킨 후 초음파 처리하여 세포를 파쇄하였다. 동량의 n-부탄올을 첨가하여 30분간 섞어준 후 원심분리를 통하여 LTA가 포함된 수용층을 분리하였다. 15% n-프로판올과 0.1 M 구연산나트륨 버퍼 (pH 4.7)를 첨가하여 LTA 절편을 분리한 후 반투과막을 이용하여 투석하였다. 이후 옥틸-세파로즈 컬럼 CL-4B (2.5 cm x 10 cm)을 이용한 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하였다. 15% n-프로판올과 0.1 M 아세트산나트륨 버퍼 (pH 4.7)가 포함된 버퍼 200 ml을 이용하여 컬럼을 세척한 후 300 ml의 용출 버퍼 (35% n-프로판올, 0.1 M 아세트산나트륨, pH 4.7)를 이용하여 LTA를 채집하였다. LTA가 포함된 절편은 다시 DEAE-세파로즈 이온교환크로마토그래피(1.5 cm x 10 cm)를 위하여 평형 버퍼 (30% n-프로판올, 0.1 M 아세테이트 버퍼, pH 4.7)를 첨가한 후 컬럼에 충전하였다.
- [131] 300 ml의 일련의 NaCl (0~1 M)이 포함된 평형 버퍼를 이용하여 LTA를 채집하였다.
- [132] LTA 유래 당지질의 분리는 30 mg의 intact LTA를 500ml의 98% (v/v) 아세트산 수용액에 녹인 후 30분간 초음파 처리하고 100°C에서 3시간 동안 가열함으로써 수행하였다. vacuum을 이용하여 용매를 제거시킨 후 클로로폼/메탄올/물 (1:1:0.9, v/v/v)을 이용하여 당지질을 분리하였다. 당지질은 유기층에서 추출하였다.
- [133] **제조예 2. 화학적 합성한 리포테이코익산(LTA)인 pLS1의 합성**
- [134] 화학적으로 합성한 리포테이코익산(LTA)로서 Toll-Like Receptor 2 리간드인 pLS1을 합성하였다. 구체적으로 pLS1의 합성은 "Schmidt's anomeric O-alkylation method" (Schmidt et al., 1980. Synthesis of α - and β -glycopytanoses via 1-O-alkylation. Tetrahedron Lett. 21, 3565-3568) 및 "Chemical synthesis of lipoteichoic acid and derivatives" (Anthony et al., 2009, Microbial Glycobiology : Structures, Relevance and Applications (pp.455-476). Elsevier Inc.)에 기술된 방법을 참고하여 수행하였다.
- [135] **실시예 1. 암세포 특이적 사멸 유도**
- [136] 본 발명 조성물의 암세포 특이적 사멸 유도를 확인하기 위해 다양한 세포에 조성물을 처리하고 세포 사멸정도를 측정하였다.
- [137] 사람으로부터 분리한 암세포주인 THP-1 (혈액암 세포), HT-29 (대장암 세포)와 primary 세포주인 fibroblast, primary 대장 세포인 CCD18co, 생쥐의 췌장에서

분리한 splenocytes에 대하여, 0 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 pLTA(유산균 *L. plantarum* K8의 세포벽으로부터 분리한 리포테이코익산)을 18시간 동안 전처리하였다.

[138] 10 ng/mL의 TNF- α 및 IFN- γ 를 24시간 동안 처리한 후, WST-1 Cell Proliferation Assay System(DoGenBio, Korea)을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 1).

[139] 도 1을 참조하면, 암세포주인 HT-29와 THP-1 세포의 경우 pLTA의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하였다. 그러나 암세포가 아닌 CCD18co(대장에서 분리한 primary cells), Fibroblasts(피부에서 분리한 섬유아세포) 및 Splenocytes에서 세포 사멸 효과는 나타나지 않았다.

[140] 상기 결과는 pLTA와 TNF- α /IFN- γ 처리에 의한 세포 사멸이 암세포, 특히 대장암세포와 혈액암세포에 특이적임을 시사한다.

[141] 실시예 2. 대장암 세포의 시간에 따른 사멸 유도

[142] 실시예 1의 암세포 특이적 사멸 과정을 시간대 별로 관찰하기 위해, HT-29 대장암 세포를 관찰하였다.

[143] HT-29 대장암 세포를 6 well plate에 seeding 한 후 10 ng/mL의 TNF- α 와 IFN- γ 를 처리한 실험군, 100 $\mu\text{g/mL}$ pLTA를 18 시간 전 처리한 후 10 ng/mL의 TNF- α 와 IFN- γ 를 제처리한 실험군, 아무것도 처리하지 않은 대조군으로 나누어 5일간 세포 사멸 정도를 관찰하였다(도 2).

[144] 도 2를 참조하면, 아무것도 처리하지 않은 대조군은 시간이 지남에 따라 세포의 수가 급격하게 증가하였다. TNF- α +IFN- γ 실험군의 경우 Day1과 Day2에서 세포 사멸이 관찰되었으나, Day3부터 암세포의 수가 증가하였다.

[145] 그러나 pLTA와 TNF- α /IFN- γ 실험군의 경우 Day1에서 대부분의 암세포가 사멸하였고 Day2부터 모든 암세포가 사멸하여 다시 증식하지 않았다.

[146] 상기 결과는 pLTA와 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 대장암 세포의 효과적인 사멸을 유도할 수 있다는 것을 의미한다.

[147] TNF- α +IFN- γ 의 경우 일부 암세포 사멸이 관찰되지만 시간이 지남에 따라 다시 증식하였다.

[148] 상기 결과는 TNF- α 와 IFN- γ 만을 이용한 암치료제가 실제 상용화 될 수 없음을 시사한다.

[149] 실시예 3. TNF- α +IFN- γ 처리농도에 의한 세포 사멸

[150] TNF- α +IFN- γ 의 처리 농도에 따른 항암 효과를 관찰하기 위해, HT-29 세포에서 실험하였다.

[151] 100 $\mu\text{g/mL}$ pLTA를 18 시간 전 처리 또는 전 처리하지 않은 HT-29 세포에 0 내지 10 ng/mL 농도의 TNF- α 와 IFN- γ 를 24시간 동안 처리한 후 WST-1용액을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 3).

[152] 도 3을 참조하면, pLTA의 전 처리 없이 TNF- α +IFN- γ 만을 처리한 경우 HT-29 세포 사멸은 5+5 (5 ng/mL TNF- α + 5 ng/mL IFN- γ)로부터 나타나기 시작하여 처리 농도가 증가함에 따라 세포 사멸도 증가하였다.

[153] 반면, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 pLTA를 18시간 동안 전 처리한 후 TNF- α +IFN- γ 를 처리할

경우 0.125+0.125로부터 약간의 세포 사멸이 보였고 유의성 있는 세포 사멸은 TNF- α +IFN- γ 농도 1+1에서 나타났다. 그러나 가장 이상적인 대장암 세포 사멸은 100 μ g/mL pLTA와 TNF- α /IFN- γ 5+5 ng/mL 이상을 처리할 경우이며, 이때 암 세포의 재성장이 관찰되지 않았다.

[154] 실시예 4. 리간드 처리 시간에 따른 세포 사멸

[155] 대장암 세포주인 HT-29 세포에 전 처리 없이 100 μ g/mL pLTA, 0.5 μ g/mL LPS, 10 ng/mL TNF- α , 10 ng/mL IFN- γ 를 조합하여 또는 개별적으로 처리하였다.

[156] 실험에 사용된 리간드의 자체 독성을 검증하기 위하여 지시된 농도의 리간드를 단독 처리하였다.

[157] 모든 실험에서 리간드 처리 24, 48, 72 시간 후 WST-1 용액을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 4).

[158] 도 4를 참조하면, 리간드 단독처리에 의한 세포 사멸은 3일째에 pLTA와 IFN- γ 에 의해 일부 관찰되었다.

[159] TNF- α +IFN- γ 를 처리한 경우 처리 1일째부터 나타나기 시작하여 3일째에 약 50%의 세포 사멸이 관찰되었다. LPS와 TNF- α +IFN- γ 를 동시 처리했을 때 유사한 수준의 세포 사멸이 관찰되었다.

[160] 또한 pLTA와 TNF- α (pLTA+T) 또는 IFN- γ 를 동시 처리했을 때에도 3일째에 약 50%의 세포 사멸이 관찰되었다.

[161] 반면, pLTA와 TNF- α +IFN- γ (pLTA+T+I)를 동시에 처리할 경우 1일째 약 45%, 2일째 75%, 3일째 약 95%의 세포 사멸이 관찰되었다.

[162] 상기 결과는 대장암 세포주인 HT-29 세포의 효과적인 사멸이 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 조합에 의해 발생됨을 시사한다.

[163] 실시예 5. 다양한 리간드에 의한 대장암 세포 사멸 측정

[164] 암세포 사멸에 대하여 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 의 조합이 특이적으로 작용하는 지를 알아보기 위하여 다양한 리간드의 전 처리 후 TNF- α +IFN- γ 재처리 의한 세포 사멸을 측정하였다.

[165] 리간드 aLTA(*S. aureus*의 세포벽으로부터 분리한 리포테이코익산), pLTA(*L. plantarum* 세포벽으로부터 분리한 리포테이코익산), LPS(그람음성세균의 내독소 세포벽 성분인 리포폴리사카라이드), MPLA(monophosphoryl lipid A), PGLPS(*Porphyromonas gingivalis*로부터 분리한 LPS), AALPS(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*로부터 분리한 LPS), fPGN(*Shigella flexneri*로부터 분리한 펩티도글리칸), P3C4(Pam3CSK4, 합성 TLR2 리간드), pPGN(*L. plantarum* 으로부터 분리한 펩티도글리칸)을 18시간동안 전 처리한 후 10 ng/mL의 TNF- α +IFN- γ 를 24 시간 동안 처리한 후 WST-1 용액을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 5).

[166] 도 5를 참조하면, 리간드와 TNF- α +IFN- γ 조합에 의한 대장암 세포 사멸은 그람양성세균의 리포테이코익산을 전처리한 경우에 관찰되었다.

[167] 리포테이코익산 이외의 LPS 또는 펩티도글리칸은 이러한 세포 사멸이

유도되지 않았다.

[168] TLR2의 리간드인 Pam3CSK4를 전 처리할 경우 TNF- α +IFN- γ 에 의한 암 세포 사멸이 발생하였다.

[169] 상기 결과는 다양한 박테리아 유래 리간드 중 LTA와 TLR2의 리간드만이 특이적으로 TNF- α +IFN- γ 와 함께 암세포 사멸을 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

[170] **실시예 6. 미생물 파쇄체 및 LTA로부터 분리한 당지질(glycolipid), 화학적 합성 LTA에 의한 대장암 세포 사멸 측정**

[171] 본 발명자는 다양한 미생물 파쇄체, LTA로부터 분리한 당지질(glycolipid) 및 화학적으로 합성한 LTA의 효능을 확인하기 위해, 다양한 물질의 전 처리 후 TNF- α +IFN- γ 재처리에 의한 세포 사멸을 측정하였다.

[172] 구체적으로, 유산균(*L. plantarum*)의 파쇄체(Lysate), aLTA(*S. aureus*의 세포벽으로부터 분리한 리포테이코익산), pLTA(*L. plantarum* 세포벽으로부터 분리한 리포테이코익산), Glycolipid(상기 LTA로부터 분리한 당지질) 및 pLS1(화학적 합성 LTA)를 18시간동안 전 처리한 후 10 ng/mL의 TNF- α + IFN- γ 를 24 시간 동안 처리한 후 WST-1 용액을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 6).

[173] 도 6을 참조하면 상기 실시예 5에서 확인한 바와 같이, 그람양성세균의 리포테이코익산과 TNF- α +IFN- γ 조합에 의해 대장암 세포 사멸이 일어남을 확인하였다.

[174] 또한, 유산균(*L. plantarum*)의 파쇄체(Lysate)도 상당한 수준의 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 화학적 합성 LTA인 pLS1을 처리한 경우도 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[175] 또한, 리포테이코익산으로부터 유래한 당지질은 리포테이코익산과 비슷한 수준의 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[176] 상기 결과는 LTA의 구조 중 당지질 부분만으로도 암세포 사멸을 유도할 수 있으며, LTA 유래의 화학적으로 합성된 화합물(pLS1) 등이 TNF- α +IFN- γ 와 함께 암세포 사멸을 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

[177] **실시예 7. Apoptosis에 의한 세포 사멸**

[178] pLTA와 TNF- α +IFN- γ 조합에 의한 대장암 세포 사멸이 Apoptosis에 의해 발생하는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[179] 대장암 세포주인 HT-29 세포에 100 μ g/mL의 pLTA를 18시간 동안 전 처리한 후 10 ng/mL의 TNF- α +IFN- γ 를 24 시간 동안 재처리 하였다.

[180] 대조군으로 100 μ g/mL의 pLTA만을 처리한 군과 10 ng/mL의 TNF- α +IFN- γ 만을 처리한 실험군을 사용하였다.

[181] TNF- α +IFN- γ (TI)만을 처리한 경우에도 Apoptosis가 증가하긴 했지만 pLTA와 TNF- α + IFN- γ 를 함께 처리할 경우 급격한 Apoptosis가 발생하는 것을 확인할 수 있다.

- [182] 도 7을 참조하면, 대표적인 Apoptosis의 증거인 DNA laddering이 pLTA와 TNF- α +IFN- γ (pLTI)에 의해 증가하였다.
- [183] 도 8을 참조하면, Nucleus shrinking이 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 에 의해 크게 증가하였다.
- [184] 도 9를 참조하면, Tunnel assay를 통해 Apoptosis가 진행되고 있는 세포가 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 에 의해 증가하였다.
- [185] 상기 결과는 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 에 의한 세포 사멸이 Apoptosis를 통해 발생하고 있음을 시사한다.
- [186] **실시예 8. 마우스 항암 실험**
- [187] 본 발명 조성물의 항암 효과를 확인하고자, Balb/c 마우스(n=3)에 마우스 대장암 세포주인 CT-26(5×10^5 cells/200 μ L)을 옆구리에 피하주사 하였다.
- [188] 2일 후부터 실험군에는 10 mg/kg의 pLTA를 피하 주사한 후 1일 뒤 50 μ g/kg의 TNF- α 와 IFN- γ 를 피하 주사하였다(pLTA+TNF- α +IFN- γ).
- [189] 2일 후 다시 pLTA와 TNF- α +IFN- γ 를 반복 주사하는 방법으로 3주간 실험을 수행하였다. 대조군은 PBS를 3일 간격으로 피하 주사하였다.
- [190] pLTA 군은 100 mg/kg의 pLTA만을 3일 간격으로, TNF- α +IFN- γ 군은 50 μ g/kg의 TNF- α +IFN- γ 만을 3일 간격으로 피하 주사하였다.
- [191] 도 10을 참조하면, Control 및 pLTA 단독 처리에 비해 TNF- α +IFN- γ 와 pLTA+TNF- α +IFN- γ 실험군의 암세포 성장이 억제되었다. 실험 마지막 날 쥐로부터 암세포를 분리하여 암세포의 무게와 크기를 측정하였다(도 11 및 12).
- [192] 대조군(control)에 비해 pLTA를 단독 처리했을 때 암세포의 성장이 일부 억제되었다.
- [193] 반면, TNF- α +IFN- γ 를 처리한 실험군의 경우 암세포의 무게 및 크기가 크게 감소하였는데, 이는 실험에 사용한 TNF- α +IFN- γ 의 농도가 다소 높았던 것으로 추정된다.
- [194] 또한, pLTA+TNF- α +IFN- γ 처리군의 경우 암세포의 성장이 가장 크게 억제되었다.
- [195] 도 13을 참조하면, pLTA와 TNF- α +IFN- γ 를 처리하지 않은 암세포의 경우 3주 후 크게 성장하였다.
- [196] 반면, pLTA와 TNF- α +IFN- γ 를 피하 주사한 암세포의 성장은 대조군에 비해 현저히 억제되었다. 특히, pLTA+TNF- α +IFN- γ 를 처리한 마우스 암세포의 성장이 가장 효과적으로 억제되었다.
- [197] 전술한 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로

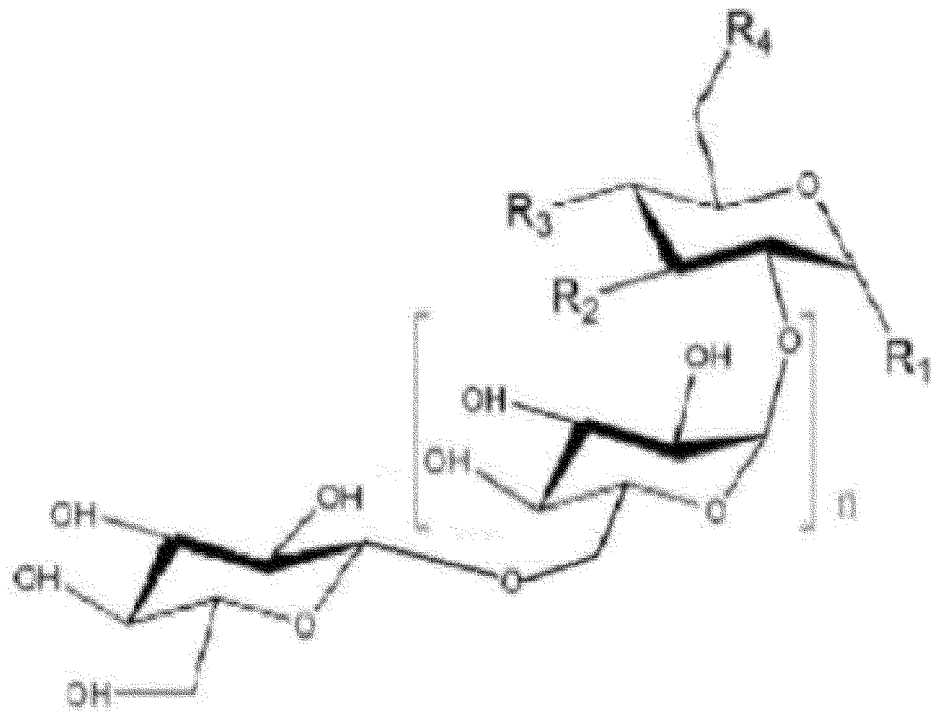
설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[198] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[199] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

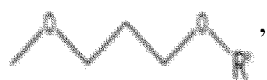
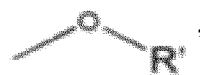
청구범위

- [청구항 1] 미생물 유래 물질, $\text{TNF-}\alpha$ 및 $\text{IFN-}\gamma$ 를 포함하는 항암용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 미생물 유래 물질은 미생물 파쇄체, 리포테이코익산,
리포테이코익산 유래의 당지질, 당지질 변이체 및 화학적으로 합성한
리포테이코익산 (Toll-Like Receptor 2 리간드)으로 이루어진 군에서 하나
이상 선택된 것인, 항암용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 리포테이코익산 유래의 당지질 또는 당지질 변이체는 하기 화학식 1
또는 2의 구조를 갖는 것인, 항암용 조성물.
- [화학식 1]

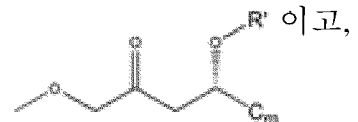


상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 하이드록시,



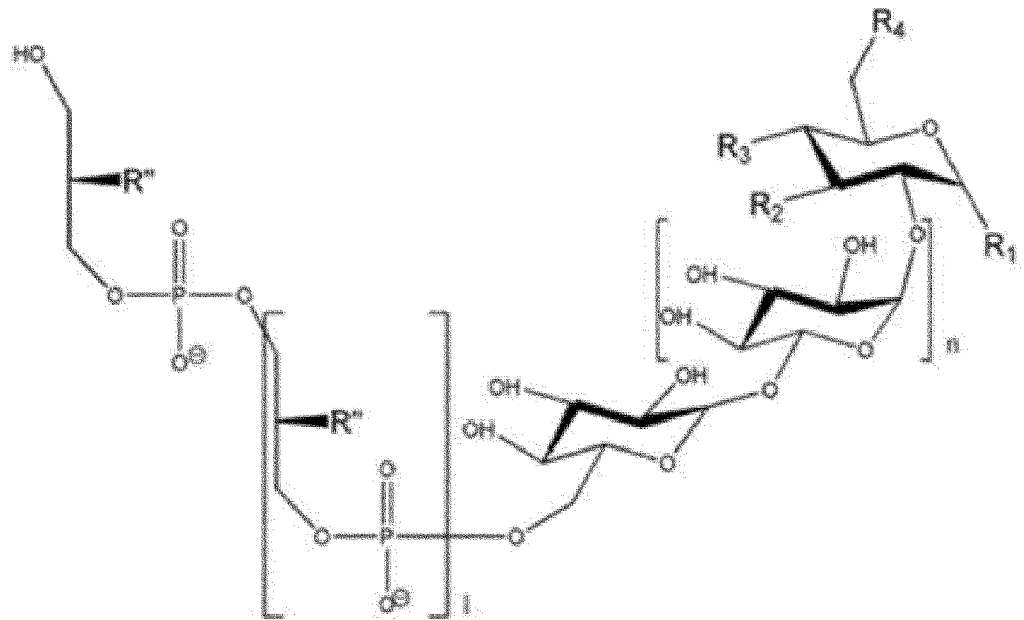
또는



이때 R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬이며,

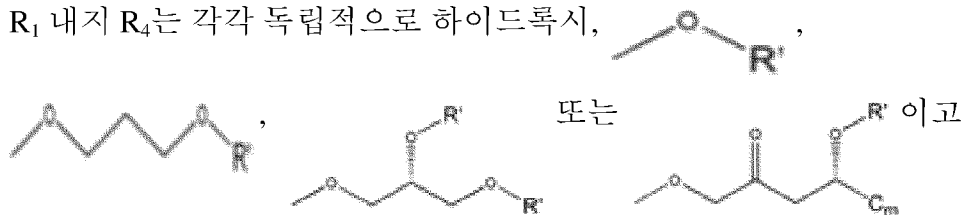
n 은 1 이고, C_m 은 C_4 내지 C_{30} 의 알킬이며, 상기 당지질 내 아실 사슬의 총 수는 2 내지 6이다.

[화학식 2]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 하이드록시,



이때 R' 는 각각 독립적으로 C_{10} 내지 C_{30} 의 포화 또는 불포화된 아실 사슬이며,

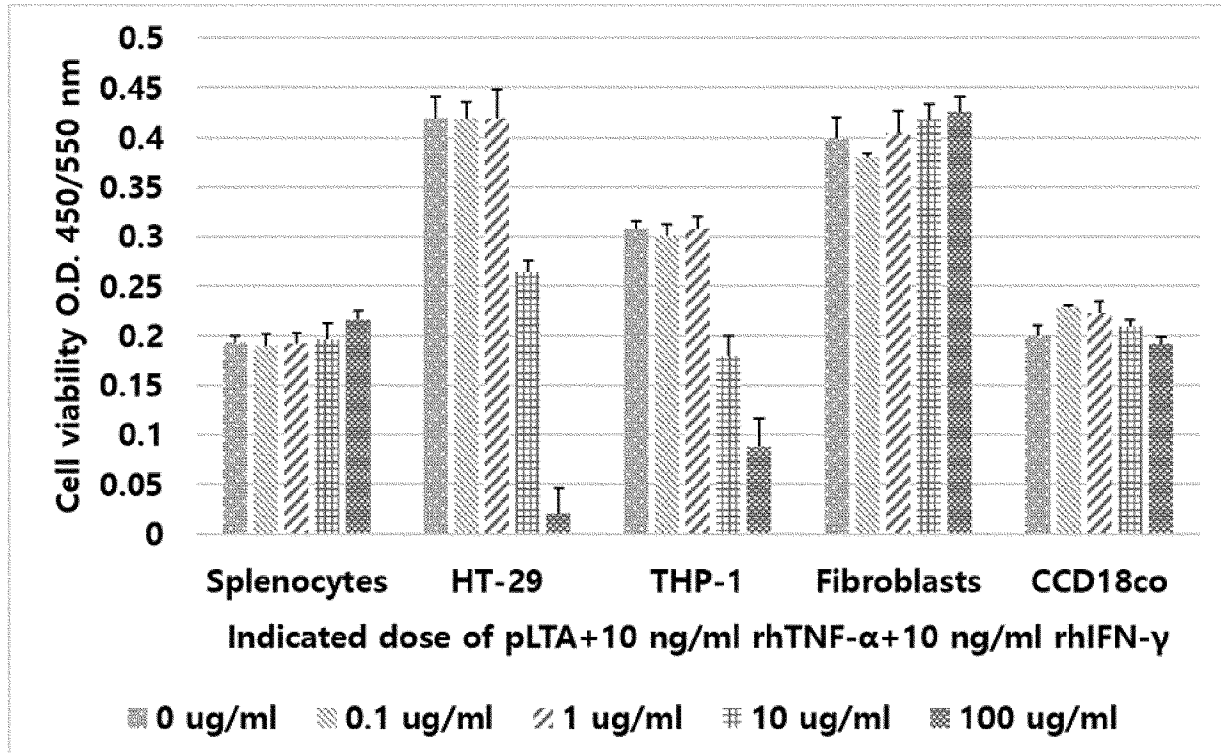
R'' 는 각각 독립적으로 N-아세틸글루코사민, D-알라닌 또는 하이드록시이고,

n 은 1 이며, C_m 은 C_4 내지 C_{30} 의 알킬이고, l 은 0 내지 80이며, 상기 당지질 내 아실 사슬의 총 수는 2 내지 6이다.

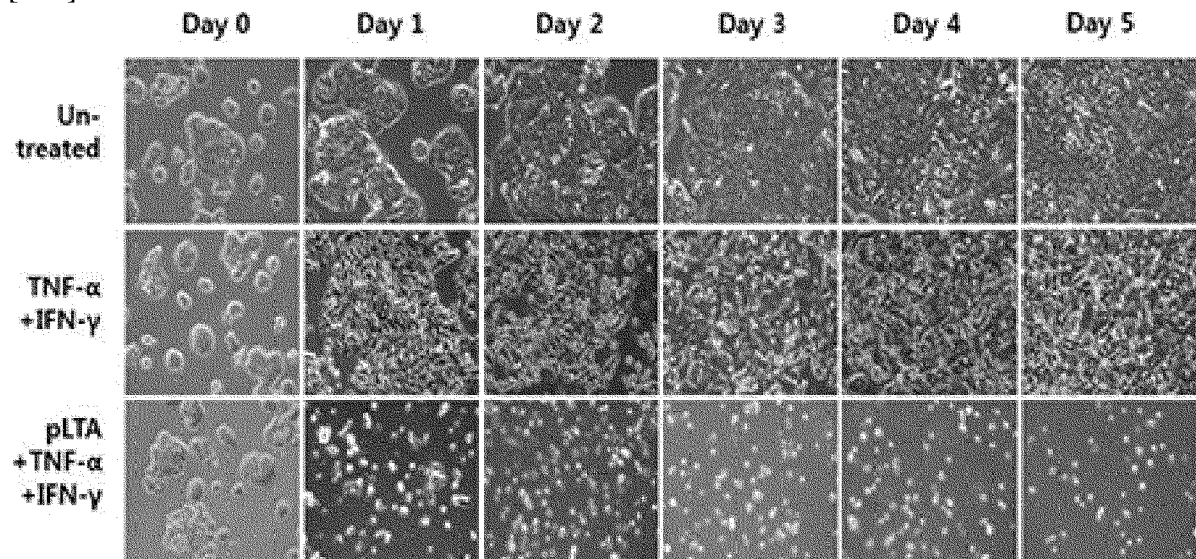
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
암세포의 자가사멸(apoptosis)을 24시간 이내에 유도하는 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 암은 간암, 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 직장암, 췌장암 및 혈액암으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 조성물.
- [청구항 6] 제2항에 있어서,
상기 미생물 유래 물질은 유산균의 세포벽에서 유래한 것인 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 $TNF-\alpha$ 및 $IFN-\gamma$ 의 농도는 각각 1 ng/mL 이상인 조성물.
- [청구항 8] 제2항에 있어서,
상기 리포테이코익산 50 μ g/mL 내지 200 μ g/mL, 상기 $TNF-\alpha$ 1 ng/mL 내지 10 ng/mL 및 $IFN-\gamma$ 1 ng/mL 내지 10 ng/mL를 포함하는 조성물.

- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 은 동시적으로(simultaneous),
별도로(separate), 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로
하는 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 은 체내에서 공동 작용을 통해
항암 활성을 나타내는 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는
치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암의 예방 또는
개선용 건강기능식품.
- [청구항 13] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 항암 보조제
조성물.
- [청구항 14] 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 를 개체에 투여하는 단계를 포함하는
암 치료 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 미생물 유래 물질, TNF- α 및 IFN- γ 를 개체에
동시적으로(simultaneous), 별도로(separate), 또는 순차적(sequential)으로
투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

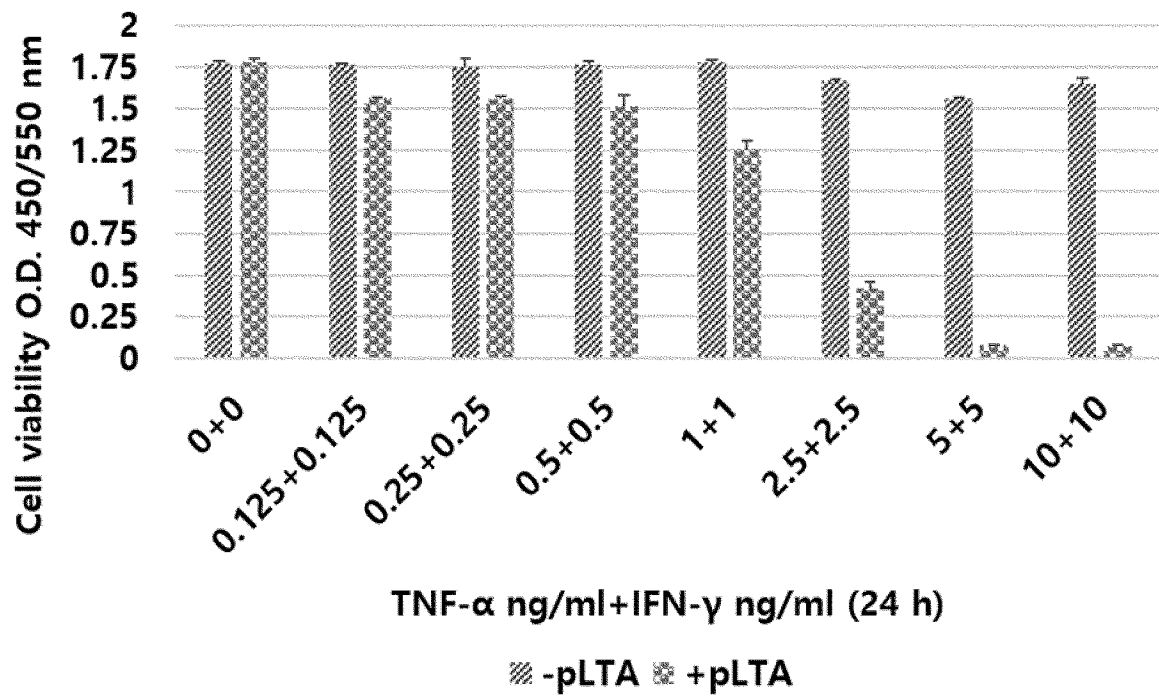
[도1]



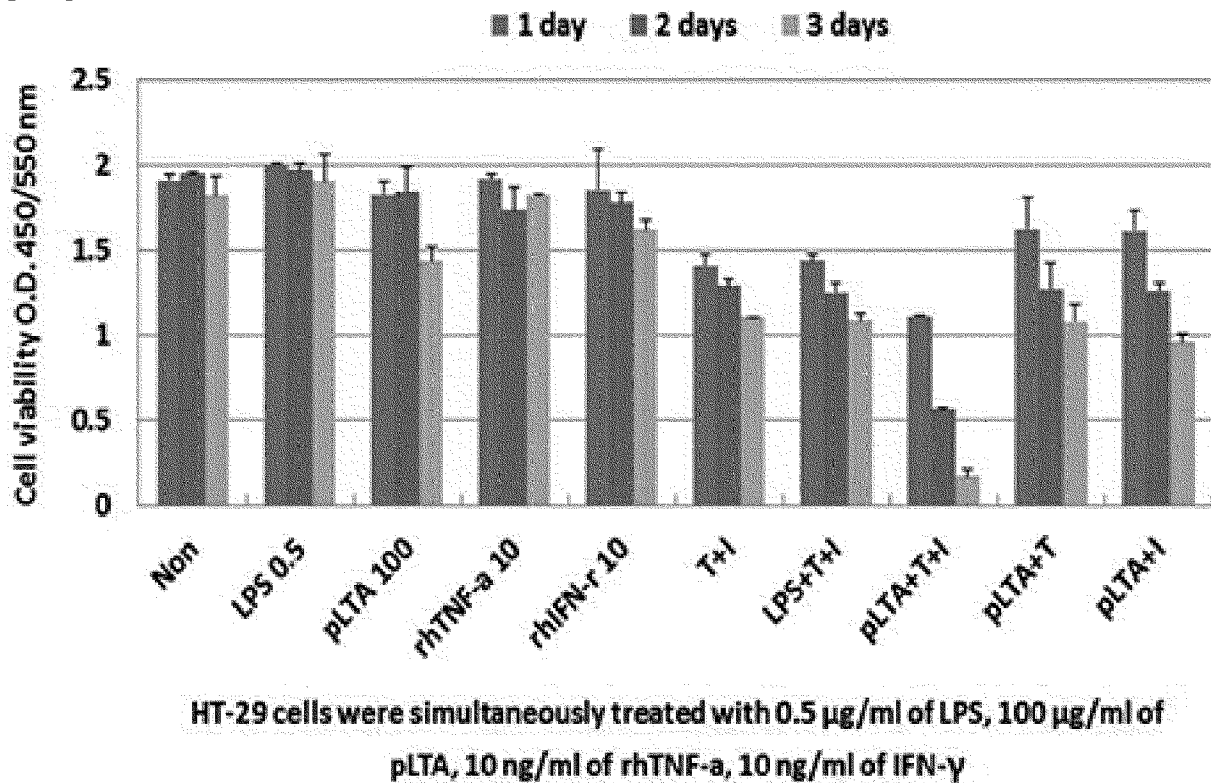
[도2]



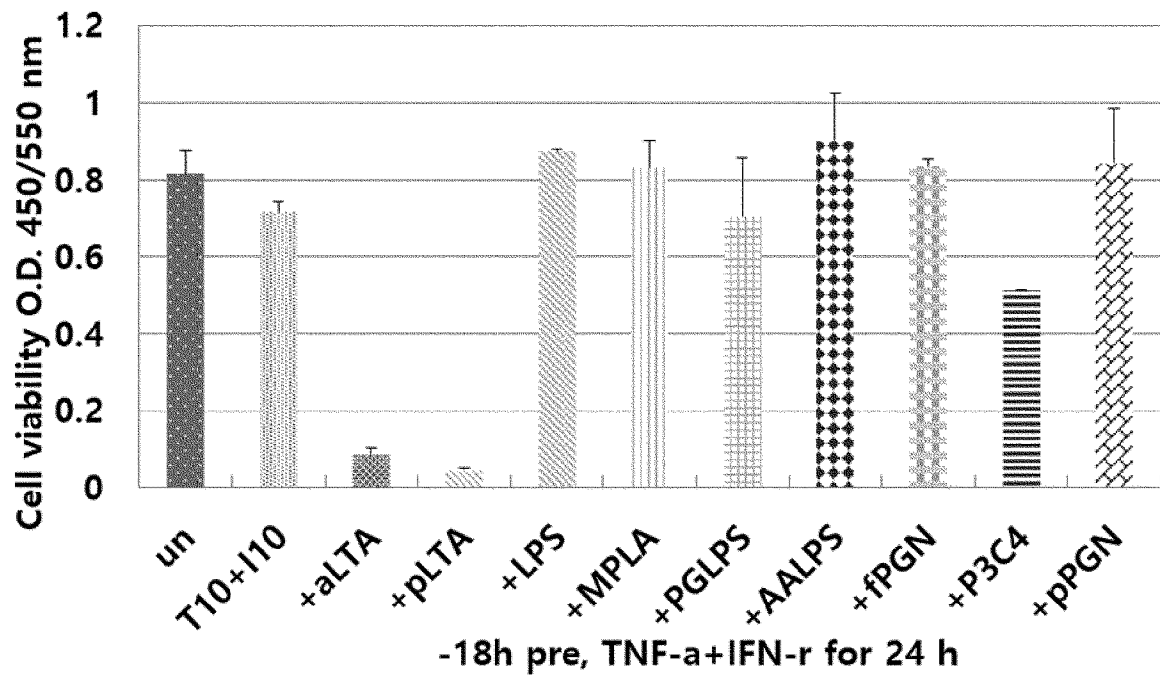
[도3]



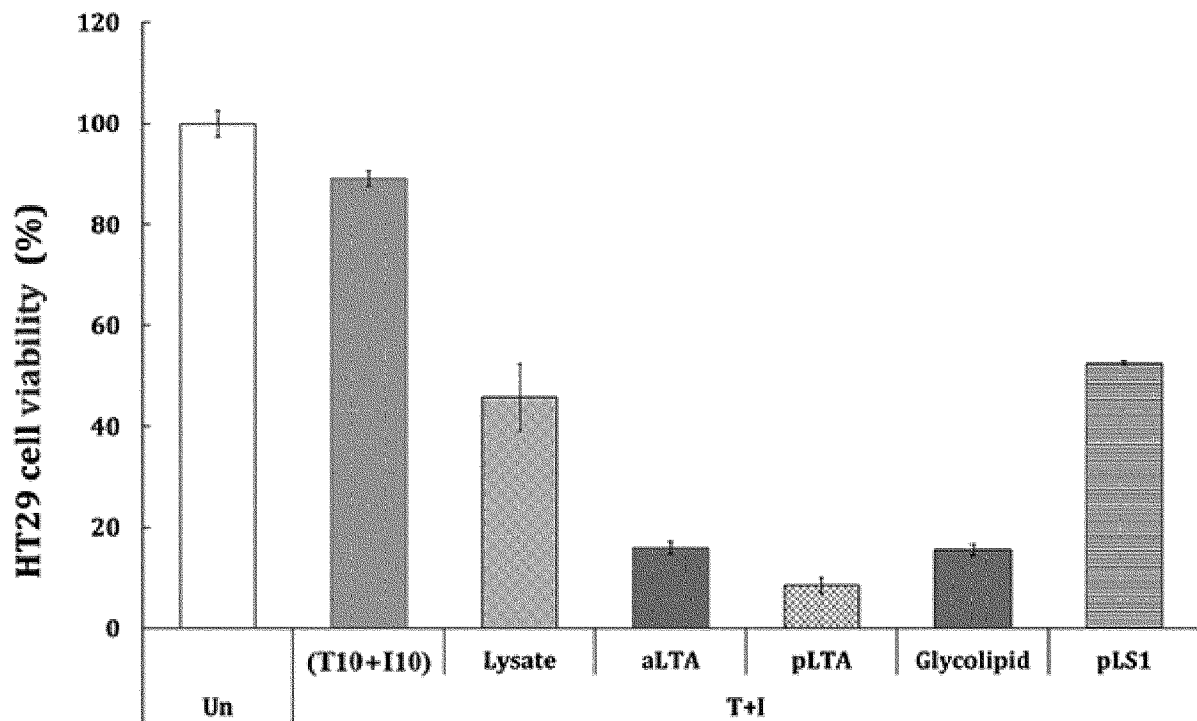
[도4]



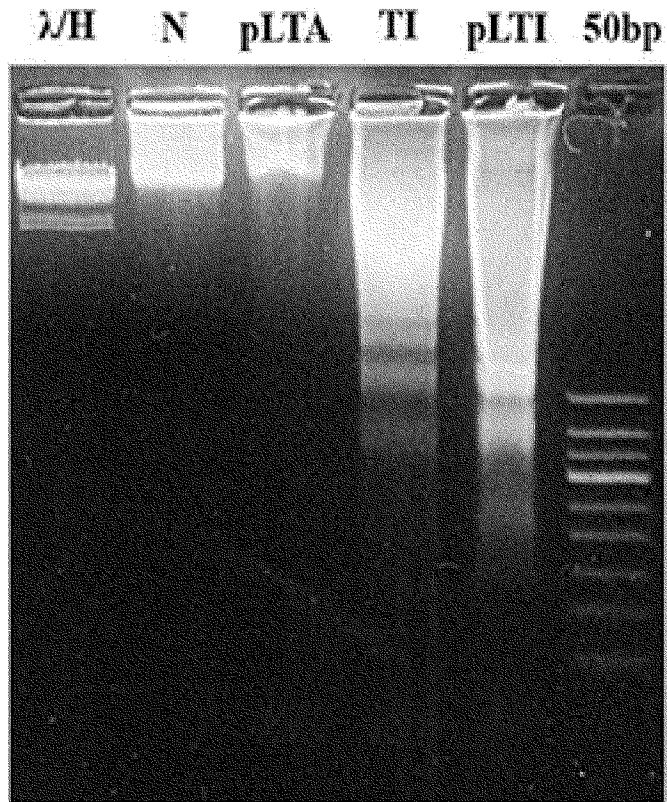
[도5]



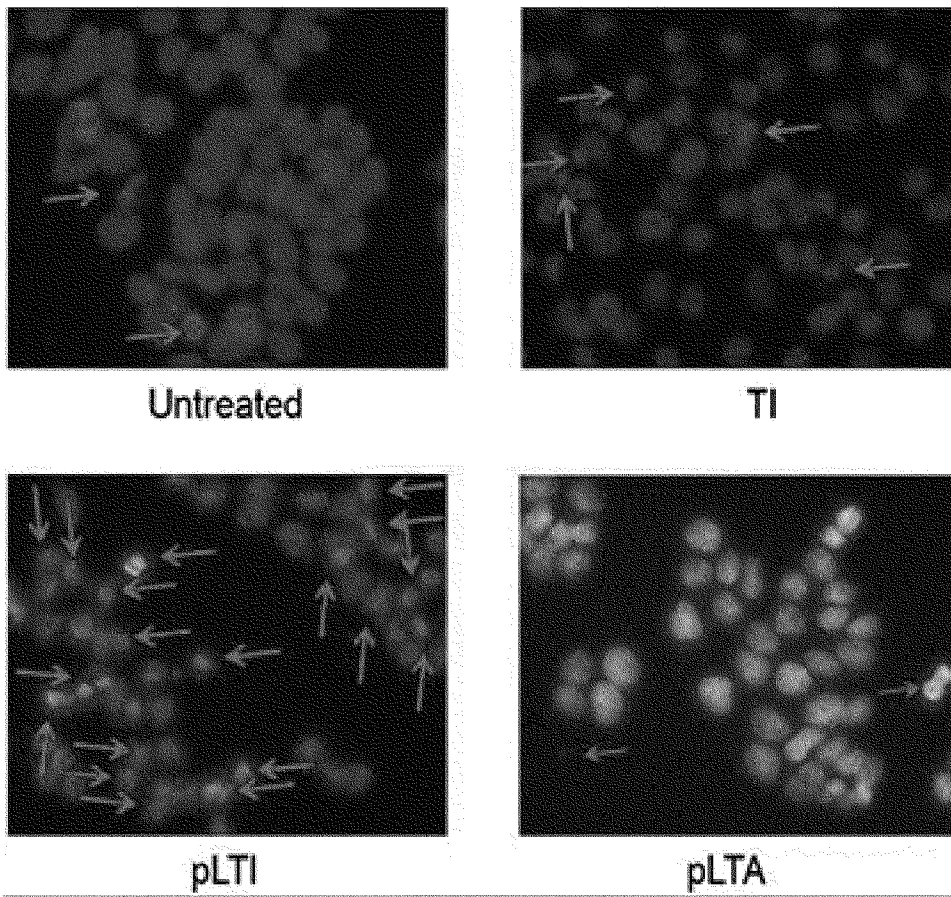
[도6]



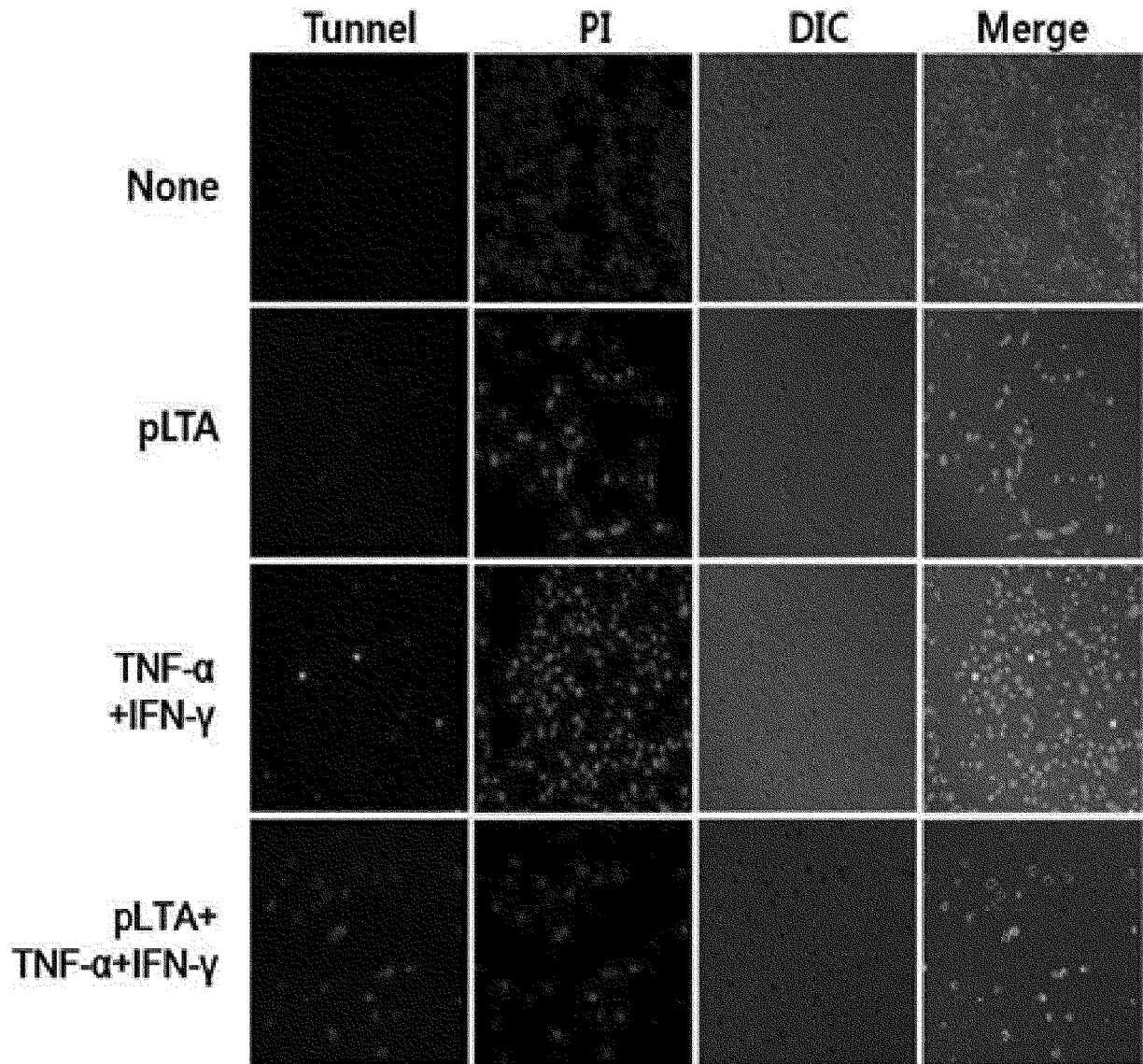
[도7]



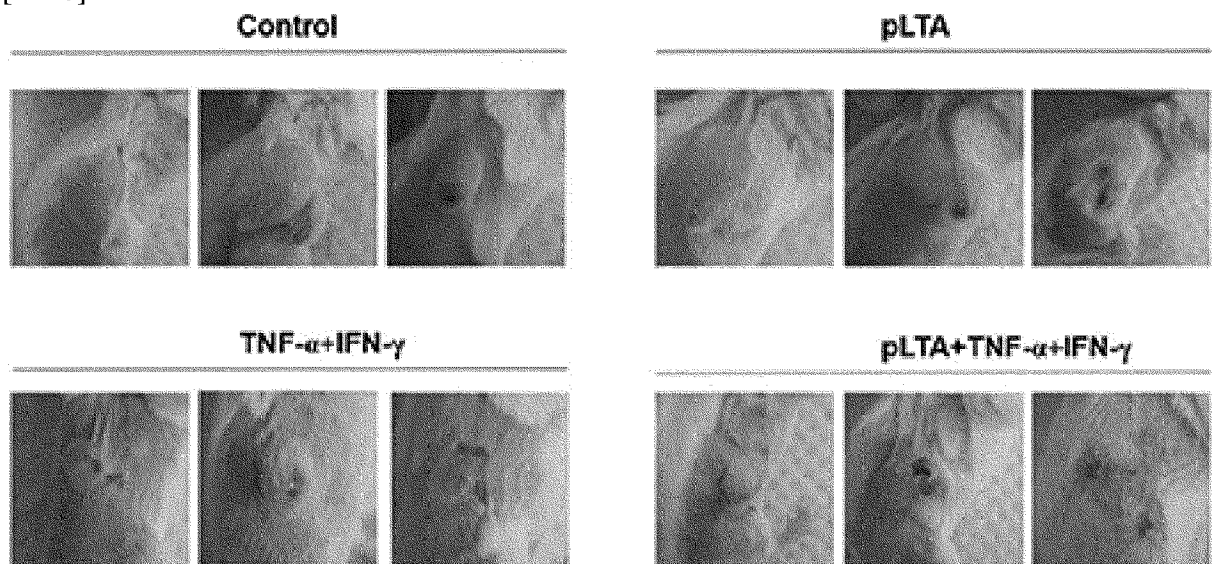
[도8]



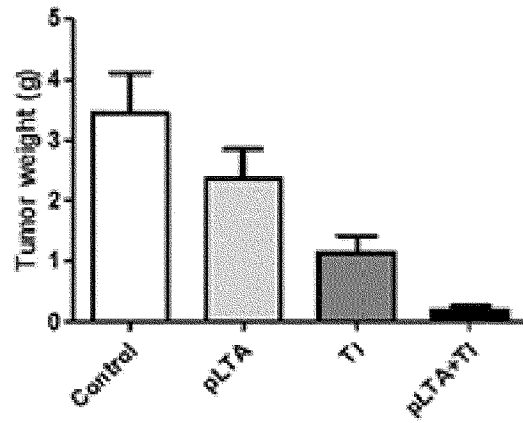
[도9]



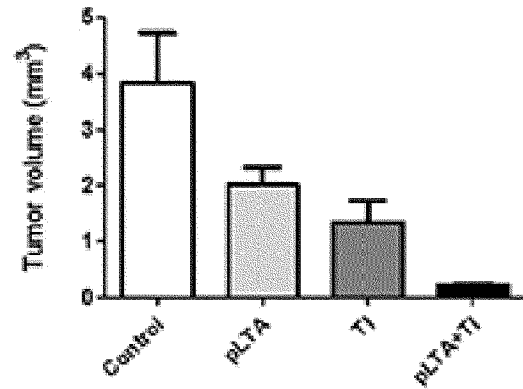
[도10]



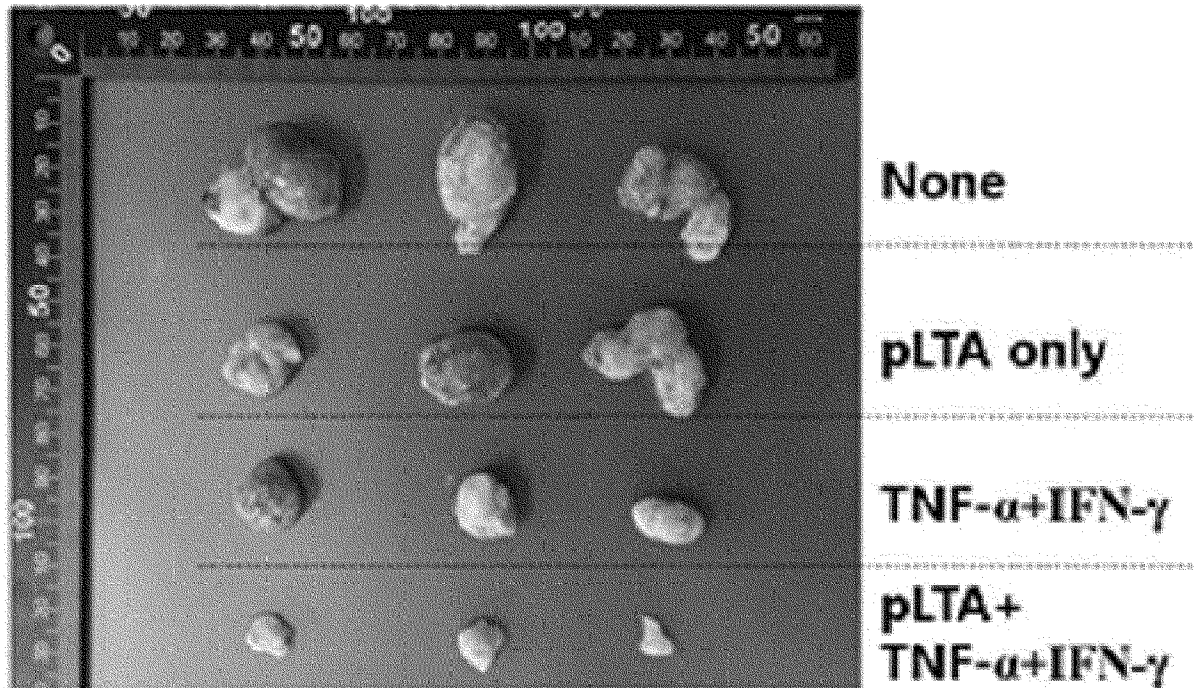
[도11]



[도12]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/739(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A23L 33/125(2016.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/739; A61K 31/045; A61K 31/66; A61K 31/70; A61K 39/12; C07H 15/04; C07H 15/203; A61K 38/19; A61K 38/21; A61K 35/744; A23L 33/125; A23L 33/135; A23L 33/18; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: lipoteichoic acid, TNF- α , IFN- γ , anticancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6214978 B1 (TRUOG, P. et al.) 10 April 2001 See columns 1, 2, 4-6; example 7; table 3.	1-13
Y	KOSHII, M. et al. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and/or interferon-gamma (IFN- γ), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. Clinical and Experimental Immunology. 1998, vol. 111, pages 211-218 See abstract; Results; Discussion; figure 4.	1-13
Y	KR 10-1242669 B1 (RNA INC.) 13 March 2013 See abstract; paragraphs [0019]-[0023], [0039]-[0043], [0052].	3
A	US 4678773 A (USAMI, H. et al.) 07 July 1987 See the entire document.	1-13
A	WO 2014-004385 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 03 January 2014 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)

Date of mailing of the international search report

24 SEPTEMBER 2019 (24.09.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006601

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14, 15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 and 15 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006601

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 6214978 B1	10/04/2001	CN 1173206 A	11/02/1998
		CN 1173206 C	02/07/2003
		EP 0807185 A1	19/11/1997
		EP 0807185 B1	12/06/2002
		EP 0807185 B9	11/12/2002
		JP 11-500901 A	26/01/1999
		JP 3638955 B2	13/04/2005
		US 6114161 A	05/09/2000
		WO 96-23896 A1	08/08/1996
KR 10-1242669 B1	13/03/2013	CN 102596980 A	18/07/2012
		EP 2471801 A2	04/07/2012
		JP 2013-502456 A	24/01/2013
		KR 10-2011-0021699 A	04/03/2011
		US 2012-0190634 A1	26/07/2012
		WO 2011-025286 A2	03/03/2011
		WO 2011-025286 A3	14/07/2011
US 4678773 A	07/07/1987	EP 0135820 A2	03/04/1985
		EP 0135820 A3	14/10/1987
		EP 0135820 B1	12/06/1991
		JP 0526769 B2	19/04/1993
		JP 60-048928 A	16/03/1985
		JP 60-048929 A	16/03/1985
WO 2014-004385 A2	03/01/2014	US 2015-0250864 A1	10/09/2015
		WO 2014-004385 A3	23/10/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/739(2006.01)i, A61K 38/19(2006.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A23L 33/125(2016.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/739; A61K 31/045; A61K 31/66; A61K 31/70; A61K 39/12; C07H 15/04; C07H 15/203; A61K 38/19; A61K 38/21; A61K 35/744; A23L 33/125; A23L 33/135; A23L 33/18; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 리포테이코익산(lipoteichoic acid), TNF- α , IFN- γ , 항암(anticancer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 6214978 B1 (TRUOG, P. 등) 2001.04.10 컬럼 1, 2, 4-6; 실시예 7; 표 3 참조.	1-13
Y	KOSHIJI, M. 등, "Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumour necrosis factor- α (TNF- α) and/or interferon- γ (IFN- γ), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression", Clinical and Experimental Immunology, 1998, 제111권, 페이지 211-218 초록; 결과; 고찰; 도면 4 참조.	1-13
Y	KR 10-1242669 B1 (주식회사 알엔에이) 2013.03.13 요약; 단락 [0019]-[0023], [0039]-[0043], [0052] 참조.	3
A	US 4678773 A (USAMI, H. 등) 1987.07.07 전체 문헌 참조.	1-13
A	WO 2014-004385 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2014.01.03 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 09월 24일 (24.09.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 09월 24일 (24.09.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 14, 15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14 및 15는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT
조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국
제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 6214978 B1	2001/04/10	CN 1173206 A CN 1173206 C EP 0807185 A1 EP 0807185 B1 EP 0807185 B9 JP 11-500901 A JP 3638955 B2 US 6114161 A WO 96-23896 A1	1998/02/11 2003/07/02 1997/11/19 2002/06/12 2002/12/11 1999/01/26 2005/04/13 2000/09/05 1996/08/08
KR 10-1242669 B1	2013/03/13	CN 102596980 A EP 2471801 A2 JP 2013-502456 A KR 10-2011-0021699 A US 2012-0190634 A1 WO 2011-025286 A2 WO 2011-025286 A3	2012/07/18 2012/07/04 2013/01/24 2011/03/04 2012/07/26 2011/03/03 2011/07/14
US 4678773 A	1987/07/07	EP 0135820 A2 EP 0135820 A3 EP 0135820 B1 JP 0526769 B2 JP 60-048928 A JP 60-048929 A	1985/04/03 1987/10/14 1991/06/12 1993/04/19 1985/03/16 1985/03/16
WO 2014-004385 A2	2014/01/03	US 2015-0250864 A1 WO 2014-004385 A3	2015/09/10 2014/10/23