



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0173344
(43) 공개일자 2024년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)
A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0071803

(22) 출원일자 2024년05월31일

심사청구일자 2024년05월31일

(30) 우선권주장

1020230070783 2023년06월01일 대한민국(KR)

(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

박한수

서울특별시 강남구 일원로 120, 101동 1302호

김윤재

전라남도 장성군 남면 나노산단1로 58-7, 301호

(74) 대리인

이명진

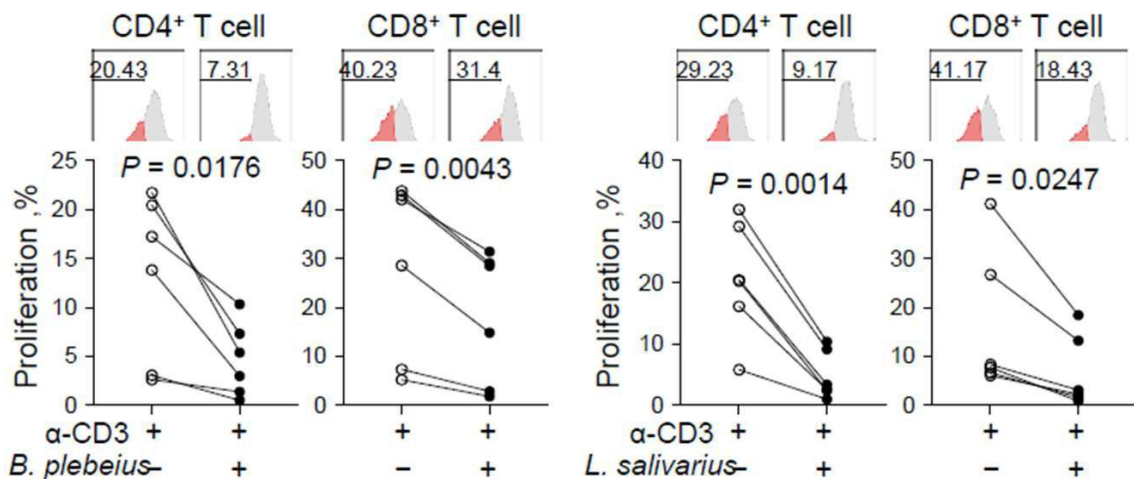
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 살리바리우스 또는 박테로이데스 플레비우스를 포함하는 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측용 바이오마커 및 이를 이용한 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 살리바리우스 또는 박테로이데스 플레비우스를 포함하는 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측용 바이오마커 및 이를 이용한 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측 방법에 관한 것으로서, 본 발명에서는 분변 미생물 이식술을 받은 면역항암제 치료 환자 코호트에서 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주로서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주를 선별하였다. 이에, 본 발명은 상기 균주를 검출함으로써 면역항암제 치료 반응성을 예측하거나 면역항암제 치료 후 예후를 예측하고 기존의 분변 미생물 이식술의 효율성을 확보할 수 있는 효과가 있다. 또한, 선별된 균주는 인간의 장내 존재하는 균주로서 치료 부작용이 낮아 안전성이 우수한바, 면역 활성 억제를 통한 자가면역질환 등의 치료 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도6a



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 면역항암제는 면역체크포인트 억제제, 면역세포 치료제, 및 면역바이러스 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 면역체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA4 억제제, LAG3 억제제, TIM3 억제제, 4-1BB 억제제, B7-H4 억제제, VISTA 억제제, KIR 억제제, 및 BTLA 억제제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 상기 미생물의 16S rRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2의 염기서열; 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 6

락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 교모세포종, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 교아종, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 9

제6항 또는 제7항의 조성물 및 설명서를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 키트.

청구항 10

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 대변, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인검체, 미세침세척액, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체, 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 면역항암제 치료 반응성이 낮을 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 13

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않을 것으로 예측하는

단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 15

락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 자가면역질환은 다발성 경화증, 염증성 장질환, 이식편대숙주질환, 천식, 아토피, 건선, 류마티스관절염, 및 전신홍반루푸스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 조성물은 면역 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 조성물은 T 세포의 증식을 억제하거나 T 세포의 인터페론 감마(IFN- γ) 분비를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스 또는 박테로이데스 플레비우스를 포함하는 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측용 바이오마커 및 이를 이용한 면역항암제 치료 반응성 및 예후 예측 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종래의 암 치료는 수술, 방사선 요법, 및 화학요법으로 최대한 암세포를 환자에게서 제거해 내는 방법이였다. 그러나 수술 및 방사선 요법은 비교적 초기 암으로 전이가 되지 않은 상황에서 완전히 암세포를 제거하였을 때 수행하여야 치료 효과가 있고, 화학요법은 광범위하게 암 치료에 사용할 수 있으나 대부분의 고형암에서 치료효율이 좋지 않고 여러 가지 부작용이 나타나는 단점이 있었다. 이러한 종래의 문제점을 개선하기 위해서, 최근에는 면역항암제를 이용한 면역 치료가 대두되고 있다.

[0004] 면역항암제 또는 면역항암 치료는 인체의 면역체계를 활성화시켜서 암세포와 싸우게 하는 치료법으로, 반응하는 환자군에서는 높은 완치율을 기대할 수 있어서 항암 치료의 새로운 패러다임을 제공하고 있다. 그러나, 면역항암제, 예를 들면, 항-PD-1/항-PD-L1의 실제 치료 성공률은 15-20 %에 불과하는 등 면역항암제에 대한 치료 반응성이 높지 않고, 암의 종류나 병기, 환자의 상태에 따라 차이가 크다. 또한, 면역항암제의 적용에 따라 증가된 면역세포들의 활성화와 분비 물질에 의해 정상세포들도 영향을 받을 수 있어서 부작용이 있을 수 있다.

[0005] 이에 따라, 면역항암 치료의 치료 반응성의 다양성을 고려하여, 면역항암제에 대한 치료 반응성을 예측할 수 있

는 바이오마커를 이용한 동반진단에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0006] 그러나, 면역항암제의 치료에 따른 비용 및 낮은 완치율 등을 고려하여, 환자에게 맞춤형 정밀 치료를 제공하기 위해 보다 정확하게 면역항암제의 치료 반응성을 예측할 수 있는 바이오마커 및 이를 이용한 동반 진단에 대한 요구가 여전히 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 면역항암제에 대하여 높은 치료 반응성을 가진 환자와 낮은 치료 반응성을 가진 환자의 장내 미생물 구성을 확인함으로써 면역항암제 치료 반응성 또는 예후를 예측할 수 있는 바이오마커를 선별하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2557472호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 면역항암제 치료를 받은 환자를 대상으로 분변 미생물 이식(FMT) 후 미생물 구성을 확인한 결과, FMT 이후에 임상적 특징을 확인하여 면역항암제 치료 반응성이 향상되는 환자에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주가 유의하게 감소하는 것을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 이에, 본 발명의 목적은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물 또는 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 키트 또는 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법 또는 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스

(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물을 제공한다.

- [0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 면역항암제는 면역체크포인트 억제제, 면역세포 치료제, 및 면역바이러스 치료제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 면역체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA4 억제제, LAG3 억제제, TIM3 억제제, 4-1BB 억제제, B7-H4 억제제, VISTA 억제제, KIR 억제제, 및 BTLA 억제제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 제제는 상기 미생물의 16S rRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2의 염기서열; 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 교모세포종, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 교아종, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 키트를 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물 및 설명서를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 대변, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세 침흡인검체, 미세침세척액, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체, 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법은 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 면역항암제 치료 반응성이 낮을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 자가면역질환은 다발성 경화증, 염증성 장질환, 이식편대숙주질환, 천식, 아토피, 건선, 류마티스관절염, 및 전신홍반루푸스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 면역 활성을 억제시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명이 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 T 세포의 증식을 억제하거나 T 세포의 인터페론 감마(IFN- γ) 분비를 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역항암제 치료 반응성 예측 용도를 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제의 면역항암제 치료 반응성 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0038] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0039] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물의 자가면역질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액의 자가면역질환 예방 또는 치료용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에서는 분변 미생물 이식술을 받은 면역항암제 치료 환자 코호트에서 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주로서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주를 선별하였다. 이에, 본 발명은 상기 균주를 검출함으로써 면역항암제 치료 반응성을 예측하거나 면역항암제 치료 후 예후를 예측하고 기존의 분변 미생물 이식술의 효율성을 확보할 수 있는 효과가 있다. 또한, 선별된 균주는 인간의 장내 존재하는 균주로서 치료 부작용이 낮아 안전성이 우수하며, 면역 활성 억제를 통한 자가면역질환 등의 치료 용도로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 임상 시험의 연구 디자인을 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 및 항 PD-(L)1 억제제의 병용 치료 과정을 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 이후 수혜자 R#1, R#2, 및 R#7의 미생물 구성을 베타 다양성 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4a 및 4b는 본 발명의 일 구현예에 따른 13명의 FMT 수혜자에 대하여 임상적 효능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4c 및 4d는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 D#1의 공여변을 이용한 1차 FMT(도 4c) 또는 D#5의 공여변을 이용한 2차 FMT(도 4d)를 수행한 후 알파태아단백(AFP) 수치를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4e는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 말초혈액의 전신 면역 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4f는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 종양미세환경에서의 면역 활성화를 확인한 결과를 나

타낸 도면이다.

도 4g는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 2차 FMT 후 면역 항진 효과에 따른 면역 관련 위염이 발생한 검사 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 속 수준에서의 미생물 풍부도 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5b는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서의 미생물 수 및 1차 FMT와 비교하여 2차 FMT 이후 감소한 미생물 수를 벤 다이어그램으로 나타낸 도면이다.

도 5c는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#7에서 1차 FMT 및 2차 FMT 후 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주의 풍부도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5d는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#6 및 R#7에서 면역항암제 치료에 대한 반응성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5e는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#6 및 R#7에서 *B. plebeius*의 풍부도를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5f는 본 발명의 일 구현예에 따른 FMT 수혜자 R#6 및 R#7에서 1차 FMT 및 2차 FMT 후 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 균주의 풍부도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6a는 본 발명의 일 구현예에 따른 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 T 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6b는 본 발명의 일 구현예에 따른 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 T 세포의 인터페론 감마 분비 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 독립적인 바이오마커 코호트 내에서 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 유무에 따른 생존율을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명의 일 실험예에서는 분변 미생물 이식(FMT) 후 미생물 구성을 확인한 결과, 수혜자 R#1, R#2, R#7이 공여자와 유사한 미생물 조성을 나타내는 것을 확인하였고(실험예 1 참조), 이 중에서 부분 반응을 보인 수혜자 R#7에서 면역항암제 투여에 대한 여러 가지 임상적 반응성을 확인한 결과, 공여자 D#1의 대변을 이용한 1차 FMT 이후에는 면역항암제 치료 반응성 증진 효과가 없었고, 공여자 D#5의 대변을 이용한 2차 FMT 이후에 면역항암제 치료 반응성이 향상되는 것을 알 수 있었다(실험예 2 참조).

[0046] 본 발명의 다른 실험예에서는 FMT의 치료효과를 담당하는 원인균을 확인한 결과, 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주가 수혜자 R#7에서 2차 FMT 공여자보다 1차 FMT 공여자에서 많으면서 R#7 환자에 2차 FMT 이후보다 1차 FMT 때 유의미하게 많았던 균주로 확인되었다. 이에, *B. plebeius* 균주는 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주임을 알 수 있었다. 또한, 2차 FMT 이후 R#7 환자에서보다 면역항암제 치료 반응성이 향상되지 않은 R#6 환자에게서 많은 균주를 분석해 본 결과, 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 균주가 선별되었고, 이는 R#6 환자가 원래 가지고 있던 균주였으며 FMT 이후에도 지속되거나 증가하였고, 면역항암제 치료 반응성 증진 효과가 없던 R#7 환자의 1차 FMT 때 존재하던 균주였기 때문에 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주임을 알 수 있었다(실험예 3 참조).

[0047] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 면역 억제 활성을 확인한 결과, *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주 배양액을 처리한 경우, CD4 T 세포/CD8 T 세포 모두 증식이 억제되는 것을 확인하였으며, *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주 배양액을 처리한 경우, 대조군 대비 유의미하게 IFN- γ 농도가 감소하는 것을 확인하여, *B. plebeius* 균주 및 *L. salivarius* 균주가 숙주의 면역 활성을 억제할 수 있음을 확인하였다(실험예 4 참조).

[0048] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주 유무에 따른 생존율을 확인한 결과, *B. plebeius* 균주 및 *L. salivarius*가 없는 환자 그룹에서 전체생존기간(Overall survival, OS)이 유의미하게 긴 것을 확인하였다(실험예 5 참조).

- [0050] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0052] 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0054] 본 발명에 있어서, “락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*)” 미생물은 당업계에 공지된 것 또는 당업계에 공지된 유전체 분석 수단에 의해 *Lactobacillus salivarius* species로 판정(분류)되는 박테리아라면 그 구체적 균주(strain)가 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 있어서, “박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)” 미생물은 당업계에 공지된 것 또는 당업계에 공지된 유전체 분석 수단에 의해 *Bacteroides plebeius* species로 판정(분류)되는 박테리아라면 그 구체적 균주(strain)가 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 미생물의 16S rRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 및 압타머로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, “프라이머”는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 본 발명에서 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머가 한쌍(세트)으로 제공될 수 있다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부 또는/및 생성물 양의 증가 현상 여부를 통해 본 발명에서 면역항암제 치료 반응성을 판정(예측)할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서, “16S rRNA”는 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 모든 종에 공통적인 보존 영역(conserved region)과 특정 종을 분류할 수 있는 초가변 영역(hypervariable region)이 존재하므로 염기서열분석을 통하여 미생물을 동정할 수 있다. 특히 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종 간에는 다양성이 나타나므로 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 유용하게 동정할 수 있다. 또한 16S rDNA는 16S rRNA를 코딩하는 유전자이므로, 16S rDNA를 활용하여 미생물을 동정할 수도 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 살리바리우스의 16S rRNA는 NCBI Reference Sequence: NR_028725.2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_028725.2)의 서열로 이루어지거나 상기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 박테로이데스 플레비우스의 16S rRNA는 GenBank: AB200217.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB200217>)의 서열로 이루어지거나 상기 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 상기 락토바실러스 살리바리우스 및 박테로이데스 플레비우스에 특이적으로 존재하는 16S rRNA 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 의미한다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 살리바리우스에 대한 프라이머 쌍은 5'-AGCGCAGACGGGTCGTTAAG-3' (forward, 서열번호 1) 및 5'-TCACATCAGACTAAAGACCGC-3' (reverse, 서열번호 2)로 이루어지거나 이를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 박테로이데스 플레비우스에 대한 프라이머 쌍은 5'-AGCGCAGACGGGTCGTTAAG-3' (forward, 서열번호 3) 및 5'-GTGTGCTGCCTTCGCAATCG-3' (reverse, 서열번호 4)로 이루어지거나 이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에서 용어 “프로브”는 표적 핵산의 서열을 가지고, 상보적 염기쌍에 의해 이중 구조를 형성하는, 통상적

으로 표지화된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프로브는 표적 서열의 지역에 해당하는, 바람직하게는 30개 이상의 뉴클레오타이드 및 일부 경우에, 50개 이상 뉴클레오타이드로 이루어진 "혼성화 지역"을 포함할 것이다. "상응하는"은 지정된 핵산과 동일하거나 상보적인 것을 의미한다. 프로브는, 바람직하게는, PCR을 준비하는데 사용된 서열(들)에 상보적인 서열을 함유하지 않을 수 있다. 일반적으로, 프로브의 3' 말단은 프라이머 신장 생성물 속으로 프로브의 일체화를 억제하도록 "차단될" 것이다. "차단"은 비-상보적 염기를 사용하거나 비오틴, 인산염기 또는 형광체와 같은 화학적 모이어티를 선택된 모이어티에 따라, 표지에 부착된 핵산의 후속 탐지 또는 포획을 위한 표지로서 작용함으로써 이중 목적을 만족시킬 수 있는 염기 뉴클레오타이드의 3' 하이드록실기에 첨가함으로써, 얻을 수 있다. 차단은 3'-OH를 제거하거나 다이데옥시뉴클레오타이드와 같은 3'-OH가 없는 뉴클레오타이드를 사용함으로써 성취될 수 있다.

[0064] 본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산, 특히 표적 핵산 상의 연속 서열에 하이브리드화됨으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드로서 정의된다. 본 발명에서 유사하게 기능하는 비-자연 발생적인 단량체 또는 그의 부분을 포함하는 변형된 또는 치환된 올리고머를 포함한다. 치환된 올리고머의 혼입은 세포 흡수 증대 또는 뉴클레아제 내성 증가를 비롯한 인자에 기초하며, 당업계에 공지된 바와 같이 선택될 수 있다. 전체 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 일부분이 치환된 올리고머를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이들의 표적에 대한 친화성을 증가 시 키고 표적 서열의 미스매치 (mismatch)에 대한 내성을 제공하도록 당업계에 공지된 방법으로 변형된 올리고머 모방체, 예를 들어 펩티드 핵산(PNA) 및 고정(locked) 핵산(LNA)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 천연형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 포스포로디 티오에이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 메틸포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 포스포르아미데이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, H-포스포네이트형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 트리에스테르형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 알파-아노머형 올리고데옥시리보뉴클레오타이드, 펩티드 핵산, 그의 인조 핵산 및 핵산-변형된 화합물을 포함한, 변형된 올리고뉴클레오타이드 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드의 길이는 특별히 제한되지 아니하나, 바람직하게는 6 내지 100 염기일 수 있고, 보다 바람직하게는 8 내지 60 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드는 당해 기술 분야에서 사용되는 통상의 방법에 따라 생체 내 (in vivo)에서 합성되거나, 시험관 내 (in vitro)에서 합성되어 생체 내로 투여될 수 있다. 생체 내에서 안티센스 RNA를 합성하는 방법의 비제한적인 예로 다중 클로닝 부위(Multi-cloning site; MCS)의 기원 (origin)이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 방법을 들 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 RNA를 합성하는 방법의 비제한적인 예로 RNA 중합효소 I를 이용하는 방법을 들 수 있다.

[0066] 본 발명에 있어서, "미생물에 특이적인 항체" 또는 "미생물에 대한 항체"는 목적하는 미생물(박테리아)의 항원성 부위(또는 다른 개체와 구별되는 마커 단백질 등)에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 항체는 미생물(박테리아)의 항원성 부위(또는 항원성 물질)에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 본 발명의 목적상 항체의 중쇄와 경쇄의 아미노산 서열이 실질적으로 동일한 항체의 집단인 단일클론 항체인 것이 바람직할 수 있다.

[0067] 상기한 바와 같은 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.

[0068] 본 발명에 있어서, "압타머(aptamer)"는 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA를 말한다. 압타머는 특정 물질에 대한 친화도가 매우 높고 안정하고, 비교적 단순한 방법으로 합성할 수 있으며, 결합력을 높이기 위해 다양한 변형이 가능하고, 세포, 단백질, 및 작은 유기물질까지도 표적물질이 될 수 있기 때문에, 그 특이성 및 안정성이 이미 개발되어 있는 항체에 비해 매우 높은 특징이 있다. 이에 제한되지 않으나, 일례로 압타머는 당업계에 공지된 바와 같이 규정된 이차 및 삼차 구조, 예컨대 스템-루프구조로 접혀지는 15-50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 압타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 표적 분자와 결합할 수 있다. 또한, 압타머는 다수의 리보뉴클레오타이드 단위, 데옥시리보뉴클레오타이드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오타이드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 압타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명에 있어서, "면역항체"는 인체가 가지고 있는 고유의 면역계를 강화시켜 암에 대한항력을 높여 주는

약물을 의미한다. 면역항암제는 환자 스스로의 면역 강화를 통해 치료를 한다는 점에서 부작용이 적고 암 환자의 삶의 질을 높이고 생존기간도 대폭 연장되는 효과가 있다. 면역항암제는 면역체계의 특이성(specificity), 기억능력(memory), 적응력(adaptiveness)을 증강시킴으로써 항암효과를 나타낸다. 면역항암제는 예컨대 면역 체크포인트 차단(immune checkpoint blockade, ICB)을 위한 제제, 면역세포 치료제, 면역바이러스 치료제, 치료용 항체, 또는 면역 체크포인트 인핸서(immune checkpoint enhancer) 등을 포함하며, 이의 종류에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단을 위한 제제, 즉 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)는 기존의 면역치료제(사이토카인 치료제, 항암백신 등)와는 달리 암세포와 T 세포의 결합 부위에 결합하여 면역회피 신호를 차단함으로써 면역학적 시냅스가 형성되지 못하게 하고 이에 따라 면역회피 방해를 받지 않는 T 세포가 암세포를 파괴하는 기전을 가지고 있다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA4 억제제, LAG3 억제제, TIM3 억제제, 4-1BB 억제제, B7-H4 억제제, VISTA 억제제, KIR 억제제, 및 BTLA 억제제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 예컨대 니볼루맙(Nivolumab), 아테졸리주맙(Atezolizumab), 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 두발루맙(Duvalumab), 아벨루맙(Avelumab), 이필리무맙(Ipilimumab), 또는 트레멜리무맙(Tremelimumab) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명에 있어서, “검출”은 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 미생물을 검출하는 것은 미생물의 여부를 측정하는 것(즉, 존재 유무를 측정하는 것), 또는 상기 미생물의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 미생물 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 교모세포종, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 교아종, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 또한, 본 발명은 상기 면역항암제 치료 반응성 예측용 조성물 및 설명서를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측용 키트를 제공한다.

[0075] 또한, 본 발명은 상기 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 조성물 및 설명서를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0076] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 미생물의 존재 수준을 검출하는 제제를 포함함으로써, 면역항암제 치료 반응성을 예측하거나 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후를 예측할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 제제 외에도 이들의 측정 또는 검출 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 이때, 상기 미생물의 존재 수준을 측정하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 작용시킬 수 있으며, 각 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 미생물의 존재 수준을 검출하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 제제를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역항암제 치료 반응성 예측 용도를 제공한다.

- [0079] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제의 면역항암제 치료 반응성 예측용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0081] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성 예측 방법을 제공한다.
- [0083] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0084] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측 방법을 제공한다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 상기 장내 미생물은 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브를 이용하여 각 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 상기 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양은 역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semiQuantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 디지털 PCR(Digital PCR), 액적 디지털 PCR(Droplet Digital PCR), 인 시투 하이브리드화(in situ hybridization), 형광 인 시투 하이브리드화(FISH), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(Southern blotting), RNA 염기서열분석(RNA sequencing) DNA 칩(chip) 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본 발명에 있어서, “피검체”는 면역항암제 치료를 받고자 하는 암 환자 또는 면역항암제 치료를 받은 암 환자 모두를 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 대변, 소변, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 미세침세척액, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예 또는 실험예에 따르면 대변일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법 또는 면역항암제 치료 반응성 예측 방법은 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 면역항암제 치료 반응성이 낮을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 대조군은 면역항암제 치료 반응성이 높은 암 환자로서, 면역항암제 치료 후 완전 반응(complete response, CR) 또는 부분 반응(partial response, PR)을 나타내는 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 면역항암제 치료 반응성 예측을 위한 정보제공방법 또는 면역항암제 치료 반응성 예측 방법은 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 낮거나 검출되지 않을 경우 면역항암제 치료 반응성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 대조군은 면역항암제 치료 반응성이 낮은 암 환자로서, 면역항암제 치료 후 진행성 병변(progressive disease, PD) 또는 안정 병변(stable disease, SD)을 나타내는 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법 또는 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측 방법은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레

비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 대조군은 면역항암제 치료 후 예후가 좋은 암 환자로서, 면역항암제 치료 후 완전 반응(complete response, CR) 또는 부분 반응(partial response, PR)을 나타내는 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본 발명에 있어서, 상기 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측을 위한 정보제공방법 또는 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후 예측 방법은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 낮거나 검출되지 않을 경우 암 환자의 면역항암제 치료 후 예후가 좋을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 대조군은 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않은 암 환자로서, 면역항암제 치료 후 진행성 병변(progressive disease, PD) 또는 안정 병변(stable disease, SD)을 나타내는 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0092] 본 발명에 있어서, “예후 예측”이란 암 환자의 면역항암제 치료 후 앞으로의 종양 반응 또는 암의 경과를 예측하는 것으로서, 암의 전이, 재발 또는 전이성 재발의 확률 등을 상기 미생물 수준을 통해 예측하는 것을 의미한다.

[0093] 또한, 본 발명은 면역항암제 치료 반응성이 낮을 것으로 의심되는 피검체 또는 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않을 것으로 의심되는 피검체와 대조군에서 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 수를 측정된 후, 이 수준 차이가 (2배 이상으로) 증가한 경우 면역항암제 치료 반응성이 낮은 피검체 또는 면역항암제 치료 후 예후가 좋지 않은 피검체임을 가리키는 것으로 보는, 면역항암제 치료 반응성 예측 또는 면역항암제 치료 후 예후 예측에 대한 감수성이 높은 피검체인지 결정/분석하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0094] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 단계; 및 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 또는 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)의 수가 대조군에 비해 높을 경우, 상기 대조군으로부터 분변 미생물 이식술을 받는 단계를 포함하는, 면역항암제 치료 반응성을 향상시키는 방법 또는 면역 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0095] 본 발명에 있어서, 상기 분변 미생물 이식술의 횟수에는 제한이 없으며, 예컨대, 1회 내지 4회, 1회 내지 3회, 1회 내지 2회일 수 있다. 상기 대조군으로부터 분변 미생물 이식술을 받는 단계는 락토바실러스 살리바리우스 또는 박테로이데스 플레비우스의 수를 감소시키는 단계일 수 있다.

[0096] 본 발명에 있어서, 상기 면역항암제 치료 반응성을 향상시키는 방법 또는 면역 활성을 증가시키는 방법에서의 대조군은 면역항암제 치료 반응성이 높은 암 환자 또는 면역항암제 치료 후 예후가 좋은 암 환자로서, 면역항암제 치료 후 완전 반응(complete response, CR) 또는 부분 반응(partial response, PR)을 나타내는 환자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0098] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0099] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)는 사람의 장내에 존재하는 미생물로서 사람의 분변 시료에서 분리되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 것 또는 당업계에 공지된 유전체 분석 수단에 의해 *Lactobacillus salivarius* species 및 *Bacteroides plebeius* species로 판정(분류)되는 박테리아라면 이의 유래는 제한되지 않는다.

[0100] 본 발명에 있어서, 상기 자가면역질환은 인체 내부의 면역계가 외부 항원이 아닌 내부의 정상세포를 공격하여 생기는 질병으로서, 다발성 경화증, 염증성 장질환, 이식편대숙주질환, 천식, 아토피, 건선, 류마티스관절염, 및 전신홍반루푸스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0101] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 면역 활성을 억제시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 T 세포의 증식을 억제하거나 T 세포의 인터페론 감마(IFN- γ) 분비를 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0104] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물의 자가면역질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0105] 또한, 본 발명은 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 및 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 또는 이의 배양액의 자가면역질환 예방 또는 치료용 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0106] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0107] 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, 실하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0108] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0109] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0110] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 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, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제가 사용될

수 있다.

- [0111] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [0112] 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.
- [0113] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [0114] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [0115] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스틴산 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 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [0116] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 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), 좌제기체 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기체 (TG-95, MA, 57)와 같은 기체가 사용될 수 있다.
- [0117] 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), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0118] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0119] 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.

- [0120] 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.
- [0121] 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, 불점막 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.
- [0122] 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.
- [0123] 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 포유류를 의미한다.
- [0124] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 “투여”란 개체에 주사하거나 섭취시키는 것은 물론, 도포하는 것도 포함하는 개념이다.
- [0125] 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 의미한다.

- [0127] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0129] **[실시예]**

[0130] **실시예 1. 전향적 연구를 위한 임상 시험 디자인**

- [0131] 본 발명은 면역항암제로서 항PD-(L)1 억제제에 불응성인 진행성 고형암 환자를 대상으로 분변 미생물 이식 (fecal microbiota transplantation, FMT)과 항PD-(L)1 억제제를 병용한 전향적, 단일군, 단일센터 연구 (NCT04264975)를 통한 임상 시험을 진행하였다. 이러한 임상 시험의 연구 디자인을 도식화하여 도 1에 나타내었다.

[0133] **실시예 2. 분변 미생물 이식(FMT)의 공여자 및 수혜자의 선별**

- [0134] 분변 미생물 이식의 공여자(donor)는 다음과 같은 기준으로 선별하였다:

- [0135] -연령 ≥ 19세
- [0136] -조직학적으로 확인된 고형 종양(간세포암종의 경우 AASLD(American association for the study of liver diseases)에 따라 임상적으로 확인된 진단도 허용됨)을 가진
- [0137] -절제 불가능하거나 전이성인 고형 종양에 대한 항PD-(L)1 단독요법으로 RECIST v1.1에 따라 적어도 6개월 동안 지속적인 완전 반응 또는 부분 반응이 지속됨
- [0138] -동시 전염성 질병 없음
- [0139] -인간면역결핍바이러스 또는 기타 바이러스 감염 등 감염성 질환에 대한 병력이나 위험 행동특성이 없으며, 최근 6개월 이내에 풍토성 설사병이 있는 국가 또는 여행자 설사 위험이 높은 국가를 여행한 적이 없음
- [0140] -염증성 장 질환을 포함한 만성 위장 질환의 병력이 없음

- [0141] -알려진 수혜자 알레르기가 있는 알레르겐을 최근 섭취한 적이 없음
- [0142] -혈청학적 검사와 대변 선별 검사를 통과한 공여자만이 FMT 이식용 대변 샘플을 기증하기에 적합한 것으로 간주 됨
- [0144] 또한, 분변 미생물 이식의 수혜자(recipient)는 다음과 같은 기준으로 선별하였다:
- [0145] -연령 $\geq$ 19세
- [0146] -ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행도 상태: 0-2
- [0147] -조직학적으로 확인된 고형 종양(간세포암종의 경우 AASLD에 따라 임상적으로 확인된 진단도 허용됨)을 가짐
- [0148] -절제 불가능하거나 전이성인 고형 종양에 대한 항PD-(L)1 기반 치료(단독요법 또는 병용요법) 중 질병 진행이 확인됨
- [0149] -RECIST v1.1에 따라 적어도 하나의 측정 가능한 병변을 가짐
- [0150] -연구 시작 전 3년 이내에 다른 활성 악성 종양의 병력이 없음(완치적으로 치료된 비흑색종 피부암, 표재성 방광암, 또는 전립선, 자궁 경부, 유방, 또는 위의 상피내 암종은 예외)
- [0151] -전신 치료가 필요한 활성 자가면역 질환의 병력이 없음
- [0152] -면역억제제 또는 활동성 감염(active infection)이 필요한 동시 발생조건이 없음
- [0153] -대장내시경 검사에 대한 금기 사항이 없음

[0155] **실시예 3. FMT 및 항PD-(L)1 억제제의 병용 치료**

- [0156] 상기 실시예 2에 기재한 조건을 만족하는 수혜자를 대상으로 FMT 및 항 PD-(L)1 억제제의 병용 치료를 진행하였으며, 이의 과정을 도 2에 도식화하여 나타내었다.
- [0157] 구체적으로, 항-PD-(L)1 억제제 치료 동안 암이 진행한 절제불가능 또는 전이성 고형암 환자들(수혜자)을 대상으로 FMT+항-PD-(L)1 억제제 병용요법 임상시험을 수행하였는데, FMT를 위한 대변 공여자는 항-PD-(L)1 단독 치료에 최소 6개월 이상 완전 관해(완전 반응) 또는 부분 관해(부분 반응)를 유지하고 있는 절제불가능 또는 전이성 고형암 환자였다. 수혜자가 본래 가지고 있는 장 마이크로바이옴을 감소시키기 위해 FMT 시행 전 5일동안 경구 항생제(Augmentin® amoxicillin clavulanate; 625 mg 하루 세번) (D-5에서 D-1까지)를 복용하였고 FMT 시행 최소 12시간 전에 마지막 항생제 복용을 완료하였다. FMT는 대장내시경을 통해 시행되었고 병원의 프로토콜에 따라 대장내시경 전 장 준비를 시행하고, 해동된 공여자의 대변액을 대장내시경을 통해 수혜자의 장에 투여하였다. FMT 시행 다음날 수혜자들은 표준 용량의 항-PD-(L)1 억제제를 투여 받았고 항-PD-(L)1 억제제는 암 진행 혹은 견딜 수 없는 독성이 발생할 때까지 지속되었다. 종양 반응 평가 전 혹은 임상적 반응이 명확하지 않은 경우에 연구자 판단에 따라 이후 같은 혹은 다른 공여자의 대변을 이용한 추가적인 FMT 시행이 허용되었다. 종양 반응평가는 RECIST v1.1에 따라 6-8주마다 컴퓨터 단층촬영으로 수행되었다.
- [0158] 연구에 참여한 모든 수혜자에게 FMT와 함께 항 PD-1 억제제로서 3 mg/kg의 니볼루맵(nivolumab)을 정맥 투여 (intravenous injection, IV)로 2주마다 투여하였다. 13명의 수혜자에게 투여된 니볼루맵의 median(중앙값) 투여 횟수는 5 주기(한번 투여를 1 주기라고 함)이며 환자에 따라 1회 내지 27회 범위로 투여하였다. 13명의 수혜자 중 7명은 동일하거나 다른 공여자로부터 최소 2회 FMT를 받았으며, 그 중 4명은 2회, 2명은 3회, 1명은 4회를 받았다.
- [0159] 경구 항생제로 사용한 아목시실린/클라불란산(amoxicillin/clavulanate)은 1차 FMT 이전에만 투여하였다. 항-PD-(L)1 억제제를 표준 용량 및 일정으로 허용할 수 없는 독성 또는 질병 진행까지 계속하거나 제도입하였다.
- [0160] 종양 생검(tumor biopsy)은 FMT 전 1주 이내에, 1차 FMT의 경우 FMT 후 2주 이내에, 후속 FMT의 경우 FMT 후 4주 이내에 수행하였으며, 질병 진행 시 선택적 종양 생검을 수행하였다.

[0162] **실시예 4. 임상적 특징**

본 발명의 FMT의 수혜자(N=13)에서의 임상적 특징을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	N (%)		N (%)
Age, years	60 (38-76)	No. of prior therapies for metastatic disease	
Sex		2nd line	1 (7.7%)
Male	10 (76.9%)	3rd line	7 (53.8%)
Female	3 (23.1%)	≥4th line	5 (38.5%)
ECOG performance status		Best response to prior ICI before FMT*	
0	1 (7.7%)	CR	0 (0%)
1	2 (92.3%)	PR	5 (38.5%)
Types of cancer		SD	2 (15.4%)
Gastric adenocarcinoma (GC)	4 (30.8%)	PD	6 (46.2%)
Esophageal SqCC (ESCC)	5 (38.5%)	Time from prior ICI dose to first study ICI dose (days)	22 (16-98)
Hepatocellular carcinoma (HCC)	4(30.8%)	PD-L1 status	
Disease status		Positive	5 (38.5%)
Metastatic	13 (100%)	Negative	8 (61.5%)
Types of prior ICI		Tumor mutation burden (mut/Mb)	15.3 (10.9-28.1)
Nivolumab monotherapy	13 (100%)	Microsatellite status, MSS	13 (100%)

Data are median (range) or number (%). *Response was assessed using RECIST v1.1. ICI=immune checkpoint inhibitor; MSS=microsatellite stable.

또한, FMT의 공여자(N=6)에서의 임상적 특징을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	Age	Sex	Cancer type	Anti-PD-1	Response to anti-PD-1	DoR (months)	TMB (/Mb)*	MSI status	PD-L1 status	EBV status
Donor #1	78	Male	HCC	Pembrolizumab	CR	58.7+	9.4	MSS	TPS 0%, CPS 0	NA
Donor #2	66	Male	GC	Nivolumab	CR	72.7+	37.5	MSS	TPS 7%, CPS 7	negative
Donor #3	63	Male	HCC	Nivolumab	PR	7.9+	15.6	MSS	TPS 0%, CPS 0	NA
Donor #4	78	Male	ESCC	Nivolumab	PR	15.4+	10.9	MSS	TPS 0%, CPS 0	NA
Donor #5	62	Male	HCC	Nivolumab	CR	31.5+	NA	MSS	TPS 0%, CPS 0	NA
Donor #6	69	Male	HCC	Nivolumab	CR	25.7+	10.9	MSS	TPS 0%, CPS 0	NA

*In-house targeted NGS panel. Response was assessed using RECIST v1.1. DoR=duration of response; TMB=tumor mutation burden; MSI=microsatellite instability; MSS=microsatellite stable; TPS=tumor proportion score; CPS=combined positive score; EBV=Epstein-Barr virus; NA=not available.

이에 더하여, 상기 FMT의 수혜자에서 FMT 및 항 PD-(L)1 억제제의 병용 치료와 관련된 부작용을 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

부작용으로는 피부 발진(skin rash), 피부 가려움증(skin pruritus), 갑상선 기능 저하증(hypothyroidism), 부신 기능 저하증(adrenal insufficiency), 근육통(myalgia), 발열(fever), 및 위염(gastritis)이 나타났다.

표 3

	CTCAE v5.0, N (%)			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Skin rash	1 (7.7%)	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Skin pruritus	2 (15.4%)	3 (23.1%)	0 (0%)	-
Hypothyroidism	0 (0%)	2 (15.4%)*	0 (0%)	0 (0%)
Adrenal insufficiency	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Myalgia	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Fever	1 (7.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Gastritis	0 (0%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)

*One case was subclinical hypothyroidism with a TSH level >10 mIU/L.

[0171]

[실험예]

[0173]

실험예 1. 분변 미생물 이식(FMT) 후 미생물 구성 확인

[0174]

FMT 이후 대부분 수혜자의 미생물 구성을 베타 다양성(beta-diversity)(Bray-Curtis distance) 분석을 통해 확인한 결과, 수혜자의 미생물 구성이 상당한 변화를 겪었으며, 이 중, 수혜자 R#1, R#2, R#7은 도 3에 나타난 바와 같이 각각의 공여자와 매우 유사한 미생물 조성을 나타내었다.

[0175]

실험예 2. 임상적 효능(efficacy) 확인

[0177]

13명의 수혜자에 대하여 임상적 효능을 확인한 결과, 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이 수혜자 중 5명은 안정 병변(stable disease, SD)을 보였고, 1명(R#7)은 FMT 후 부분 반응(partial response, PR)을 달성하여 질병 통제율(disease control rate) 46.2 %(6/13) 및 객관적 반응률(objective response rate) 7.7 %를 기록하였다.

[0178]

이에, 부분 반응을 보인 FMT 수혜자 R#7에서 니볼루맵 투여에 대한 여러 가지 임상적 반응성을 확인하였다.

[0179]

2-1. 수혜자 R#7에서의 알파태아단백 수치 확인

[0181]

도 4c에 나타난 바와 같이, 수혜자 R#7(남성, 47세, 간세포암)에서 니볼루맵을 4 cycle로 투여 후 진행 병변(progressive disease, PD)을 보이는 수혜자에 공여자 D#1으로부터 1차 FMT를 수행하고 니볼루맵을 투여했을 때 암 진행이 계속되었으며, FMT를 수행하고 한달 후 알파태아단백(α -fetoprotein, AFP)이 증가한 것을 확인하였다.

[0182]

또한, 도 4d에 나타난 바와 같이, 상기 수혜자 R#7에서 1차 FMT 후 7주 후 공여자 D#5로부터 2차 FMT를 수행하고 니볼루맵을 투여한 후 2주 간격으로 2회 추가로 투여하였을 때 부분 반응(PR)을 나타내고, 2차 FMT를 수행하고 3달 후 AFP가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[0183]

이에, 수혜자 R#7 는 1차 FMT 이후에는 니볼루맵 치료 반응성 증진 효과가 없었고, 2차 FMT 이후에 니볼루맵 치료 반응성이 향상되는 것을 알 수 있었다.

[0184]

2-2. 수혜자 R#7에서 전신 면역 활성화 확인

[0186]

CyTOF(Cytometry by time of flight)를 이용한 질량세포분석을 진행하였다.

[0187]

[0188] 구체적으로, Maxpar Direct Immune Profiling Assay kit(Fluidigm)를 이용하여 환자들의 PBMC를 확보한 뒤, Human TruStain FcX(BioLegend)를 이용하여 면역세포의 Fc 수용체들을 blocking하였다. 이후, 마커들을 검출할 수 있는 항체들과 세포 구분을 위한 Cell ID Intercalator-Ir(Fluidigm)을 처리하여 배양하였다. 그런 다음 Helios mass cytometer(Fluidigm)를 이용하여 각 세포에서의 마커 발현을 통해서 면역세포 시스템의 변화를 확인하였다. 이 분석을 통해 FMT 수혜자 R#7에서 말초혈액의 전신 면역 변화를 평가하였다.

[0189] 그 결과, 도 4e에 나타난 바와 같이, 기준선과 비교하여 CD8+ T 세포 및 CD8+ 효과기 T 세포(effector T cell)는 2차 FMT 이후 증가한 반면 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)는 감소하는 것을 확인하였다. 도 4e에서 EM은 effector-memory, CM은 central-memory, TM은 terminal-memory, TE는 terminal-effector를 의미한다.

[0191] 2-3. 수혜자 R#7의 종양미세환경(TME)에서 면역 활성화 확인

[0192] Multiplex 면역조직화학(immunohistochemistry, IHC)을 통해 FMT 수혜자 R#7에서 종양미세환경(tumor microenvironment)에서의 면역 활성화를 확인하였다. 구체적으로, Formalin-fixed, paraffin-embedded(FFPE) 블록에서 두께 4 μ m의 절편 슬라이스를 자른 후, 이 슬라이드를 60 $^{\circ}$ C의 건조 오븐에서 최소 1시간 동안 가열하였다. 이후, Leica Bond Rx™ Automated Stainer(Leica Biosystems)를 사용하여 multiplex 면역형광 염색을 수행하였다. 항원 회수(Antigen retrieval), 블로킹(blocking), 항체 염색(antibody staining), 티라마이드 신호 증폭(tyramide signal amplification), 항체 제거(remove bound antibodies)의 과정을 여러 항원들에 대해서 수행하며 다중염색을 진행하였다.

[0193] 그 결과, 도 4f에 나타난 바와 같이 2차 FMT 후 4주차에 종양침윤 세포독성 T세포와 MHC-II+ M1 대식세포의 유의한 증가가 관찰되었으며, Treg 세포의 수는 지속적으로 낮게 유지되는 것을 확인하였다.

[0195] 2-4. 수혜자 R#7의 면역 관련 위염 확인

[0196] FMT 수혜자 R#7에서 2차 FMT 후 면역 활성화에 따른 면역 관련 위염이 발생한 결과를 상부내시경, 조직검사, 및 임상적으로 확인하여 도 4g에 나타내었다.

[0198] 실험예 3. FMT의 치료효과를 담당하는 원인균 확인

[0199] 3-1. 수혜자 R#7에서 속 수준에서의 풍부도 변화 확인

[0200] 16s rRNA sequencing을 통하여 환자 분변 메타게놈 분석을 진행하였고, QIIME2와 DADA2 tool을 사용하여 미생물 풍부도(Abundance)를 분석하였다. FMT 수혜자 R#7에서 속 수준에서의 미생물 풍부도 변화를 확인한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 공여자 D#1으로부터 이식된 1차 FMT 후에는 박테로이데스 속이 증가하고 프레보텔라 속이 감소하였으며, 공여자 D#5로부터 이식된 2차 FMT 후에는 박테로이데스 속이 감소하고 프레보텔라 속이 증가하는 것을 확인하였다.

[0202] 3-2. 수혜자 R#7에서 2차 FMT 이후 풍부도가 감소하는 미생물 확인

[0203] 수혜자 R#7에서 FMT 이후 미생물의 풍부도를 확인한 결과, 도 5b 및 하기 표 4에 나타난 바와 같이 1차 FMT와 비교하여 2차 FMT 이후 풍부도가 감소한 미생물은 73개였으며, 이 중 21개의 미생물군은 원래 R#7에 존재했으나 1차 FMT와 비교하여 2차 FMT 이후 크게 감소한 것을 알 수 있었다.

표 4

No.	Name	LefSe analysis (1st FMT > 2nd FMT)		Relative abundance in R7 baseline
		LDA score	P-value	
1	Bacteroides plebeius DSM 17135	5.061387	0.001040	21.112934
2	Bifidobacterium longum	4.461033	0.001040	0.542587
3	Bacteroides vulgatus	4.262785	0.009087	5.239117
4	Phascolarctobacterium succinatutens	4.244568	0.005770	0.012618
5	g__Roseburia;__	4.066425	0.043962	0.446688
6	g__Blautia;__	4.040936	0.025347	0.938801
7	Bacteroides stercoris ATCC 43183	4.039197	0.003650	0.280126
8	Faecalibacterium longum	4.034910	0.013906	8.522397
9	Faecalibacillus intestinalis	3.906048	0.000994	0.007571
10	Collinsella aerofaciens	3.663684	0.020855	0.540063
11	Ligilactobacillus salivarius	3.338701	0.006077	0.010095
12	Bacteroides xylanisolvens XB1A	3.281749	0.012513	0.065615
13	Bacteroides thetaiotaomicron	3.279202	0.037995	0.272555
14	g__Bacteroides;__	3.224612	0.003799	0.315457
15	Stenotrophomonas maltophilia	3.157466	0.006077	0.015142
16	Erysipelatoclostridium ramosum	2.992714	0.000049	0.022713
17	g__Pseudomonas;__	2.801149	0.006488	0.174132
18	Parasutterella excrementihominis	2.791501	0.000589	3.994953
19	Chryseobacterium gambrii	2.767977	0.001296	0.058044
20	Hungatella hathewayi	2.694359	0.003364	0.075710
21	Moraxella osloensis	2.643420	0.030871	0.035331

[0204]

[0206]

또한, 상기 실험예 2에서 확인한 바와 같이, FMT 코호트의 환자들 중에서 수혜자 R#7 는 1차 FMT 이후에는 면역항암제 치료 반응성 증진 효과가 없었고, 2차 FMT 이후에는 면역항암제 치료 반응성이 향상되었다. 이에, 2차 FMT 공여자보다 1차 FMT 공여자에서 많으면서 R#7환자에 2차 FMT 이후보다 1차 FMT 때 유의미하게 많았던 균주를 분석해 본 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이 박테로이데스 플레비우스(*Bacteroides plebeius*) 균주가 선별되었다.

[0207]

또한, *B. plebeius* 균주는 R#7 환자가 원래 가지고 있던 균주로서, 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주임을 알 수 있었다.

[0209]

3-3. 공여자 D#5로부터 FMT를 받은 수혜자에서의 반응 비교

[0210]

FMT 코호트의 환자들 중에서 수혜자 R#6 환자는 R#7 환자와 같은 공여자(D#5)로부터 2차 FMT를 받았다. R#6 및 R#7 환자에서 면역항암제 치료에 대한 반응성을 확인한 결과, 도 5d에 나타난 바와 같이 R#7 환자에서는 부분 반응(PR)이 지속되었지만 R#6 환자에서는 안정 병변(SD)이 짧게 지속되는 것을 확인하여, R#7 환자와 다르게 R#6 환자는 면역항암제 치료 반응성이 향상되지 않은 것을 확인하였다.

[0211]

또한, R#6 및 R#7 환자에서 *B. plebeius*의 풍부도를 비교한 결과, 도 5e에 나타난 바와 같이 R#7 환자에서는 2차 FMT 후 유의적으로 감소한 반면, R#6 환자의 경우 원래부터 풍부하지 않았으며 이는 1차 및 2차 FMT 후에도 증가하지 않았다.

[0212]

이에 더하여, QIIME2와 ANCOM(Analysis of Composition of Microbiomes) 분석법(Mandal, S., Van Treuren, W., White, R.A., Eggesbø M., Knight, R., and Peddada, S.D. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. Microbial ecology in health and disease 26, 27663.)을 이용하여 2차 FMT 이후 R#7 환자에서보다 R#6 환자에게서 많은 균주를 분석해 본 결과, 도 5f에 나타난 바와 같이 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 균주가 선별되었다. 상기 *L. salivarius* 균주는 R#6 환자가 원래 가지고 있던 균주였으며 FMT 이후에도 지속되거나 증가하였고, 면역항암제 치료 반응성 증진 효과가 없던 R#7 환자의 1차 FMT 때 존재하던 균주였기 때문에 면역항암제 치료 효과를 억제하는 균주임을 알 수 있었다.

[0214] **실험예 4. *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 면역 억제 활성 확인**

[0215] **4-1. T 세포 증식 억제 효과 확인**

[0216] *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주의 면역 억제 활성을 확인하기 위하여, T 세포와 균주 배양액을 공동 배양하여 T 세포의 증식 억제 활성을 유세포분석법을 이용하여 확인하였다.

[0217] 먼저, 사람의 혈액에서 Ficoll을 이용하여 말초 혈액 단핵세포(PBMC, peripheral blood mononuclear cell)를 분리한 뒤, RBC lysis buffer를 이용하여 남아있는 적혈구(RBC, Red blood cell)를 제거하였다. 이 후, CD4/CD8 T 세포 분리 키트(MACS kit)와 LS column을 이용하여 CD4 T 세포와 CD8 T 세포를 각각 분리하고, CFSE로 염색을 진행한 후, 각 세포를 96-웰 플레이트에 2×10^5 세포/200 μ l로 분주 및 균주 배양액을 처리하였다. 96-웰 플레이트는 T 세포 증식을 유도할 수 있는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 24시간 전에 미리 깔아둔 상태이며, 균주 배양액은 RPMI 배지에서 최소 12시간 배양한 뒤 수득하였으며, T 세포에 처리할 때는 최종 T 세포 배지 양의 10 %로 처리하였다. 72시간의 공동 배양 후, 각 웰의 T 세포들을 수득하여 유세포분석(flow cytometry)을 이용하여 CFSE의 형광을 검출하였다. T 세포가 증식을 많이 한 경우, 각각의 T세포의 형광의 세기는 낮아지게 된다. 즉, CFSE의 세기가 줄어들었다거나 피크(peak)가 낮은 값으로 이동하였다는 것은 T 세포의 증식이 진행되었음을 의미한다. 이러한 분석 방법을 이용하여 각 균주에 의한 T세포 분열 정도를 분석하였다.

[0218] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주 배양액을 처리한 경우, CD4 T 세포/CD8 T 세포 모두 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[0220] **4-2. T 세포의 인터페론 감마(IFN- γ) 분비 억제 효과 확인**

[0221] 상기 실험예 4-2의 방법으로 T 세포와 균주 배양액을 공동 배양한 공동 배양액을 수득하여 ELISA를 이용하여 T 세포가 분비한 인터페론감마(IFN- γ) 농도를 분석하였다. 공동배양액은 T 세포가 증식 및 활성화되면서 인터페론감마(IFN- γ)가 분비되어 있는 상태이므로, 이런 공동배양액 속의 인터페론감마(IFN- γ)를 검출할 수 있는 캡처(capture) 항체를 96-웰 플레이트에 코팅하고 공동배양액을 처리하여 상온에서 1시간동안 배양하여 인터페론감마(IFN- γ)와 캡처 항체의 결합을 유도하였다. 이후 세척 과정 및 2차 항체 염색, 세척 및 HRP 시약 염색의 과정을 거치고, 최종적으로 마이크로플레이트(microplate)를 이용하여 각 웰의 흡광도를 얻었다. 각 웰의 흡광도는 레퍼런스(정확한 농도를 알고있는 인터페론감마 처리 웰들)를 통해 인터페론감마의 농도값으로 변환하고 균주 간 인터페론감마 분비 유도량을 비교분석 하였다. 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주 배양액을 처리한 경우, 대조군 대비 유의미하게 IFN- γ 농도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0223] 이에, 상기 실험예 4-1 및 4-2를 통하여 *B. plebeius* 균주와 *L. salivarius* 균주가 숙주의 면역 활성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0225] **실험예 5. *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주 유무에 따른 생존율 확인**

[0226] 독립적인 바이오마커 코호트를 이용하여 *B. plebeius* 및 *L. salivarius* 균주의 유무에 따른 생존율을 분석하였다. 이용 가능한 기본 대변 샘플 및 면역 체크포인트 억제제(ICI) 치료 전 4주 이내에 항생제를 투여받지 않은 총 72명의 환자가 분석에 포함되었다. 이들의 임상 정보는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

	N (%)		N (%)
Age, years	60 (37-83)	Line of ICIs for metastatic disease	
Sex		2nd line	6 (8.3%)
Male	59 (81.9%)	3rd line	47 (65.3%)
Female	13 (18.1%)	≥4th line	19 (26.4%)
Types of cancer		No. of cycles of ICI administered	8 (1-47)
Gastric adenocarcinoma	27 (37.5%)	Best response to ICI	
Esophageal SqCC	23 (31.9%)	CR	2 (2.8%)
Hepatocellular carcinoma	22 (30.6%)	PR	8 (11.1%)
Disease status		SD	7 (9.7%)
Metastatic	72 (100%)	NonCR/nonPD	2 (2.8%)
Type of ICI		PD	53 (73.6%)
Nivolumab	72 (100%)		

Data are median (range) or number (%). *Response was assessed using RECIST v1.1. ICI=immune checkpoint inhibitor.

[0227]

[0229]

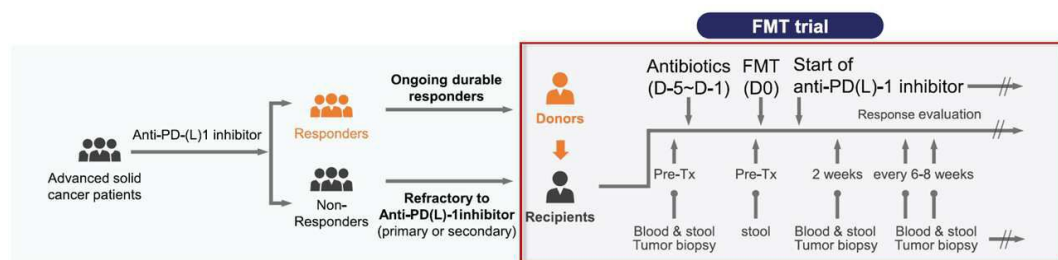
독립적인 바이오마커 코호트 내에서 상기 두 균주의 유무에 따른 생존율을 확인한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 *B. plebeius* 균주가 없는 환자 그룹에서 전체생존기간(Overall survival, OS)이 유의미하게 길다는 것을 확인하였고, *L. salivarius*는 존재의 유무에 따라서 유의미하게 전체생존기간에 차이가 있음을 확인하였다.

[0231]

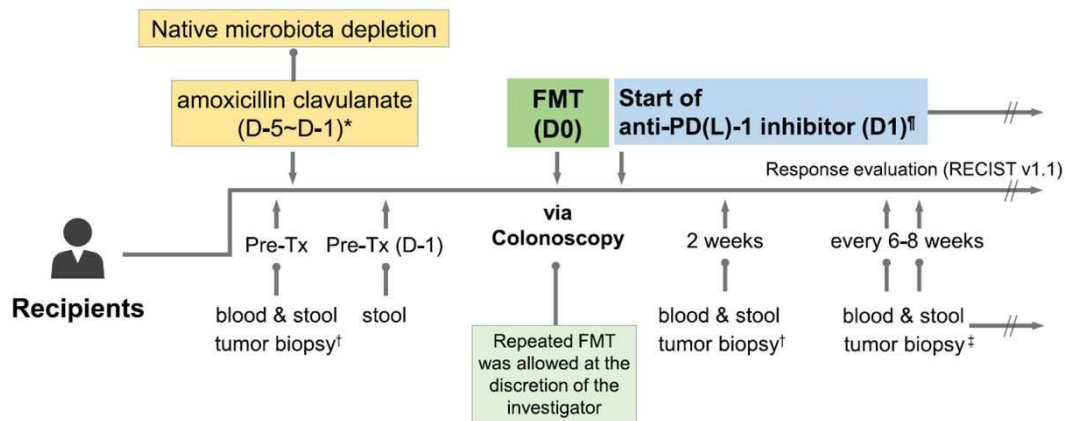
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

도면1



도면2



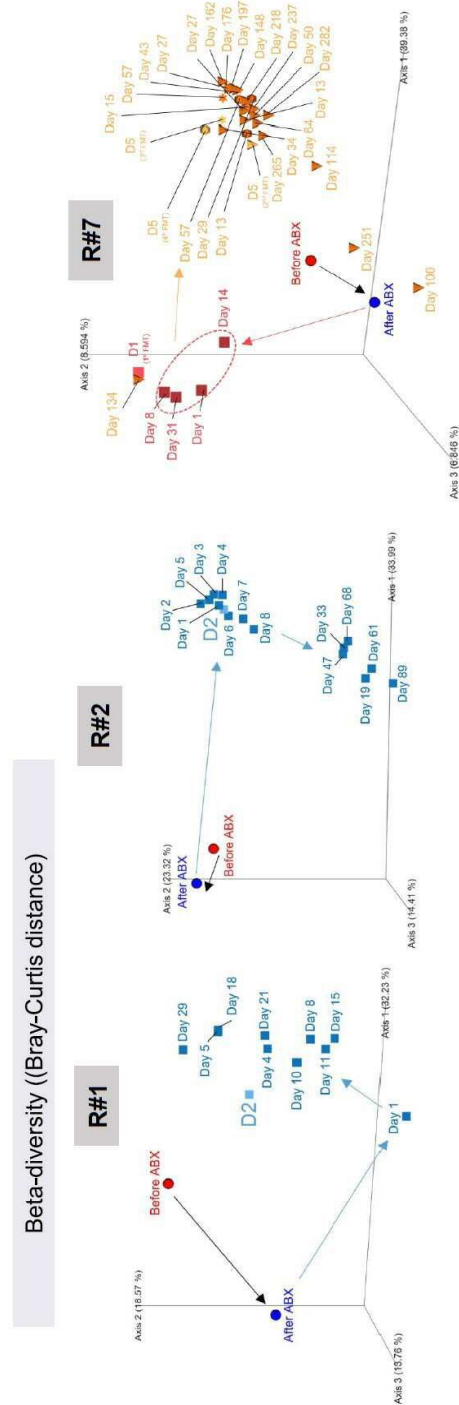
*Oral antibiotics was administered only prior to the 1st FMT.

†anti-PD-(L)1 inhibitor at a standard dose and schedule was continued or re-introduced until unacceptable toxicity or disease progression.

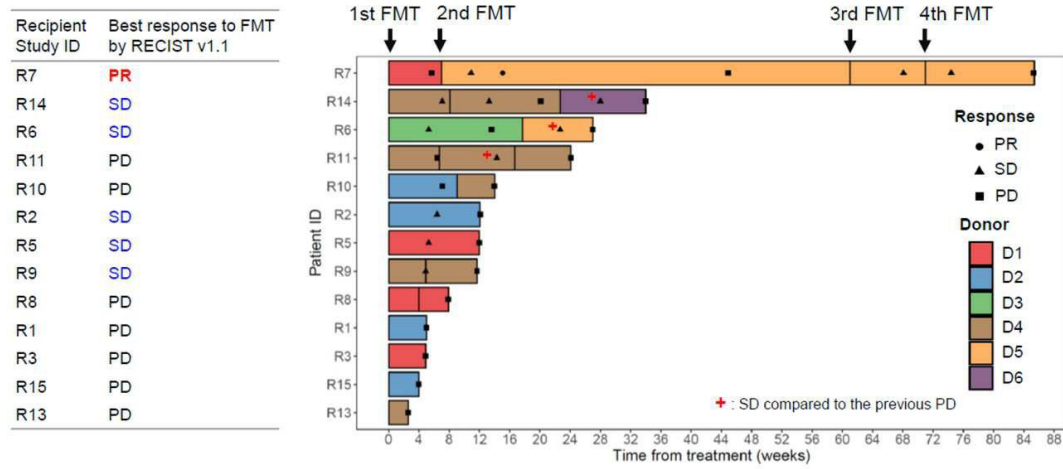
‡Tumor biopsy was conducted within one week before FMT and two weeks after FMT for the first FMT, and 4 weeks after FMT in case of subsequent FMT.

§Optional tumor biopsy was performed at disease progression.

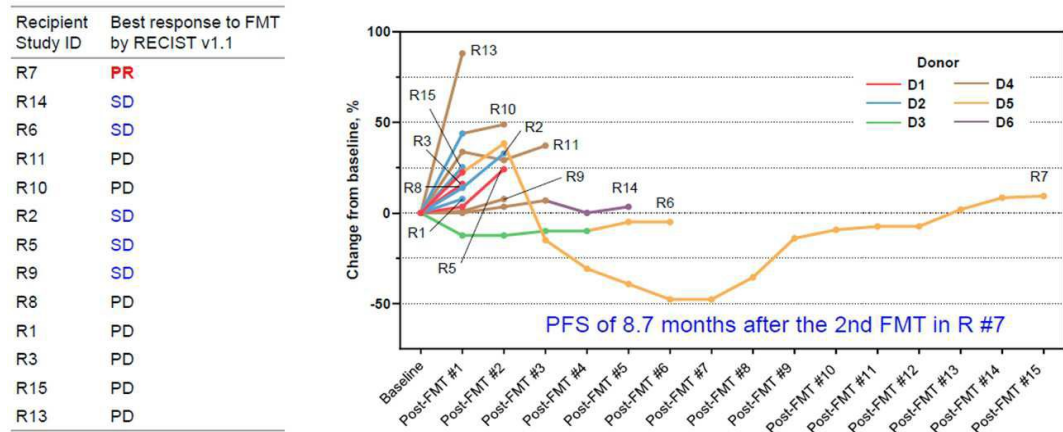
도면3



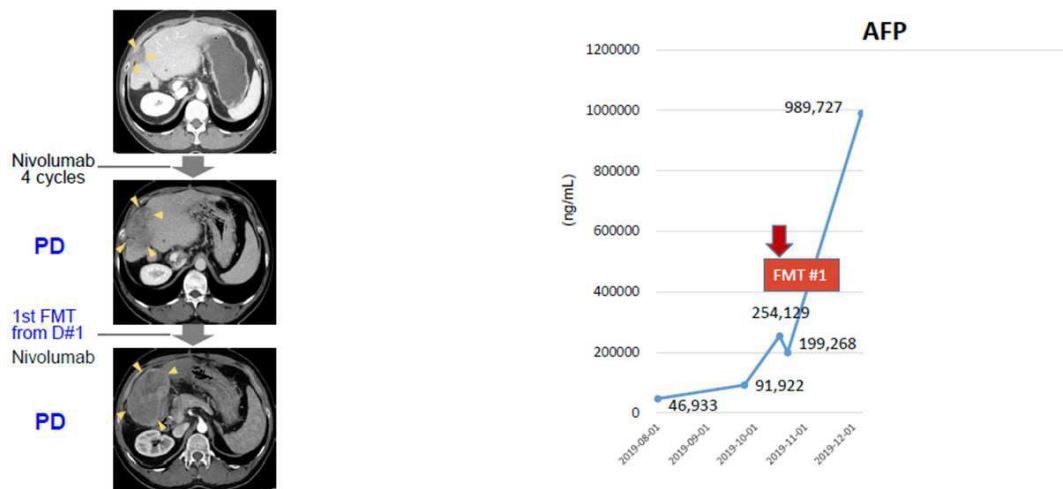
도면4a



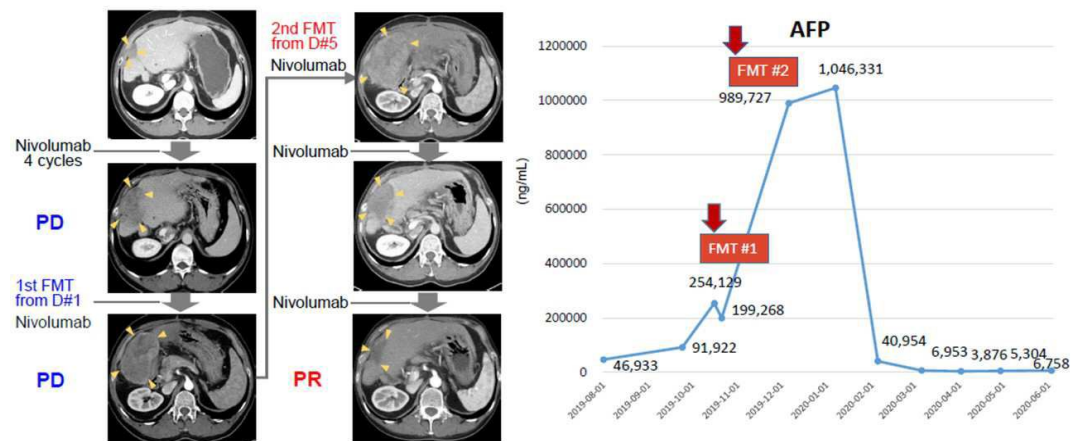
도면4b



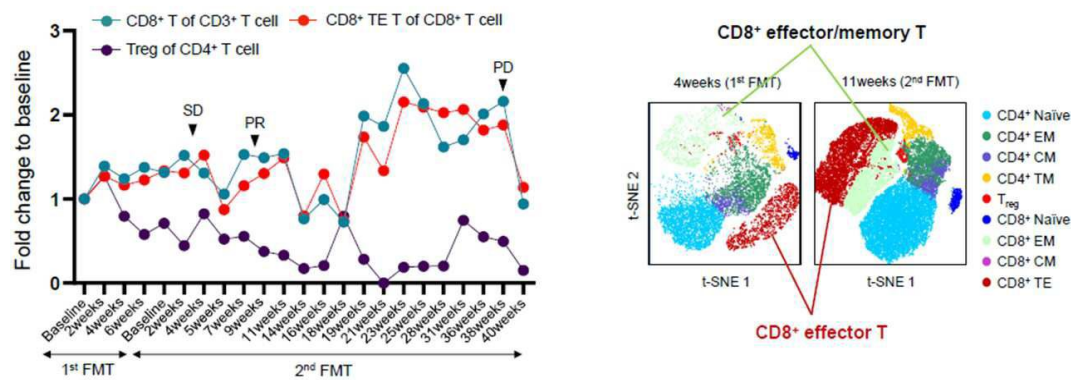
도면4c



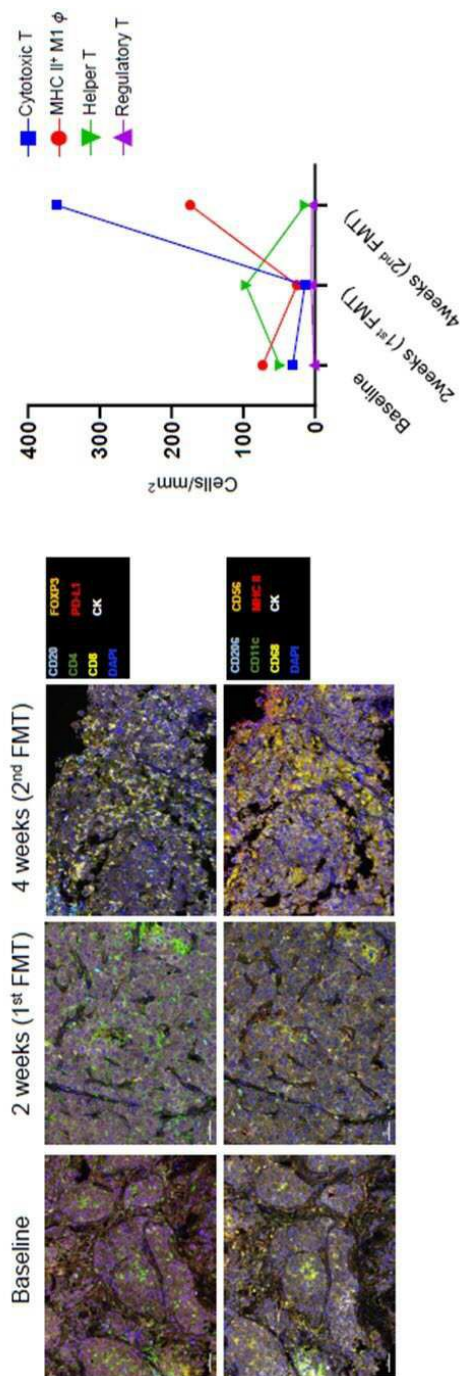
도면4d



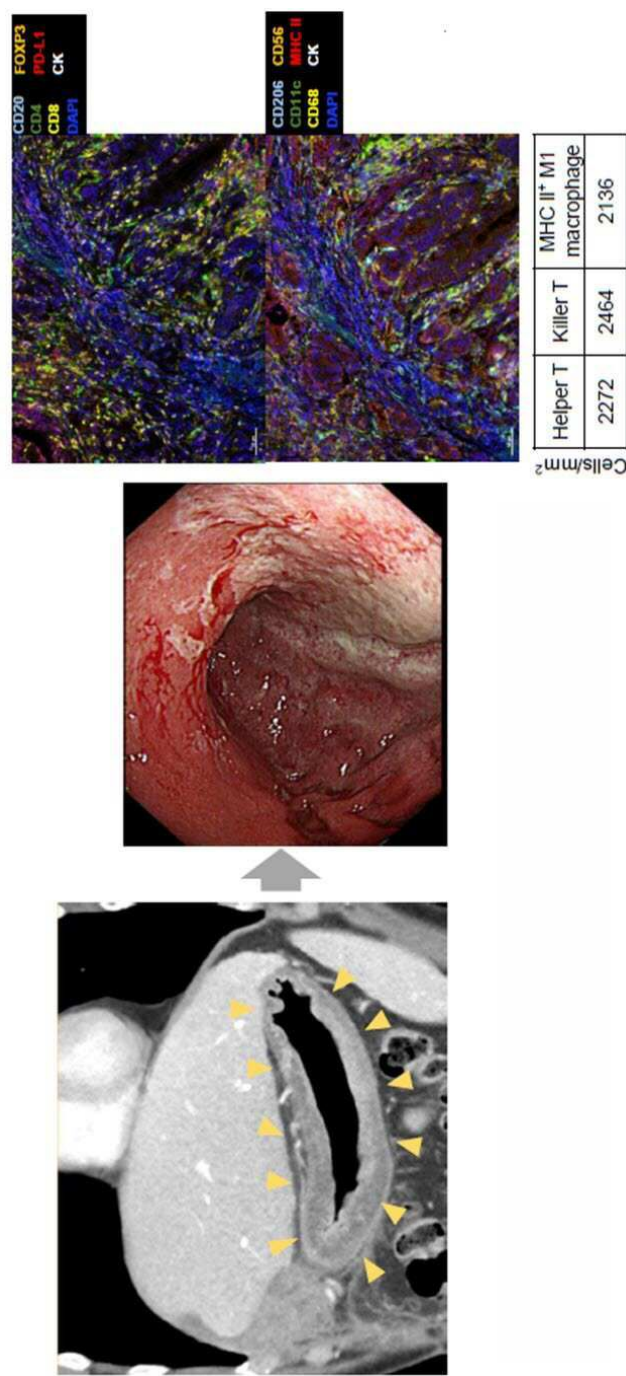
도면4e



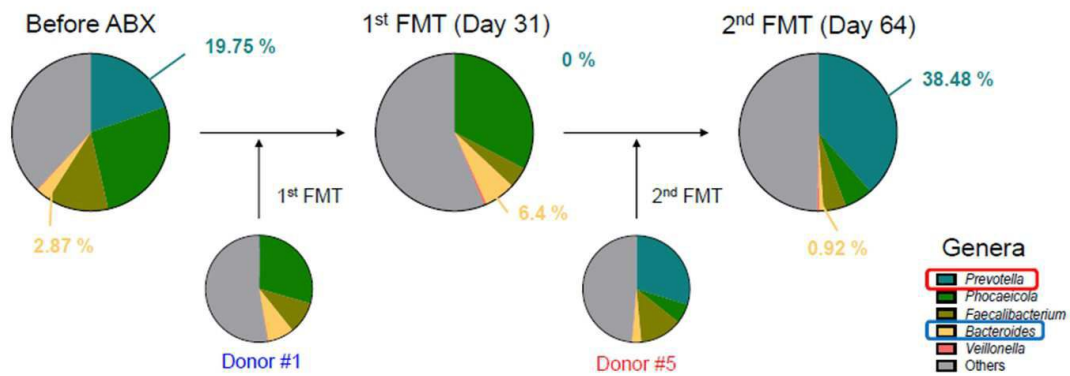
도면4f



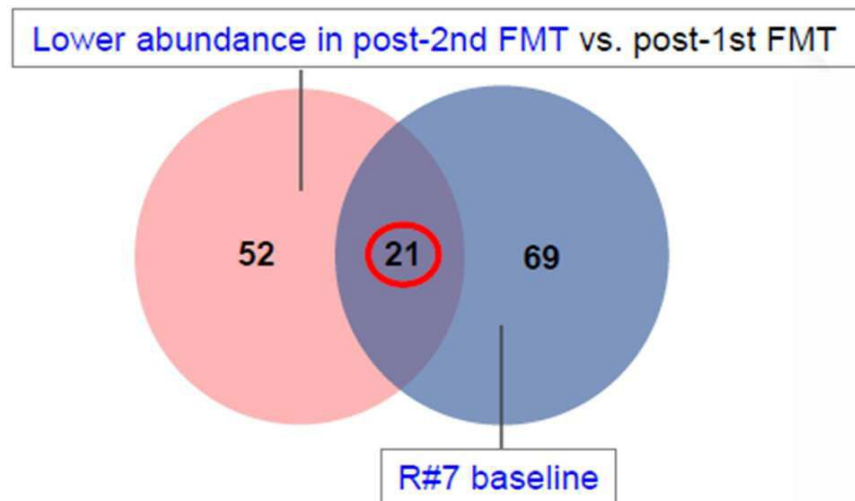
도면4g



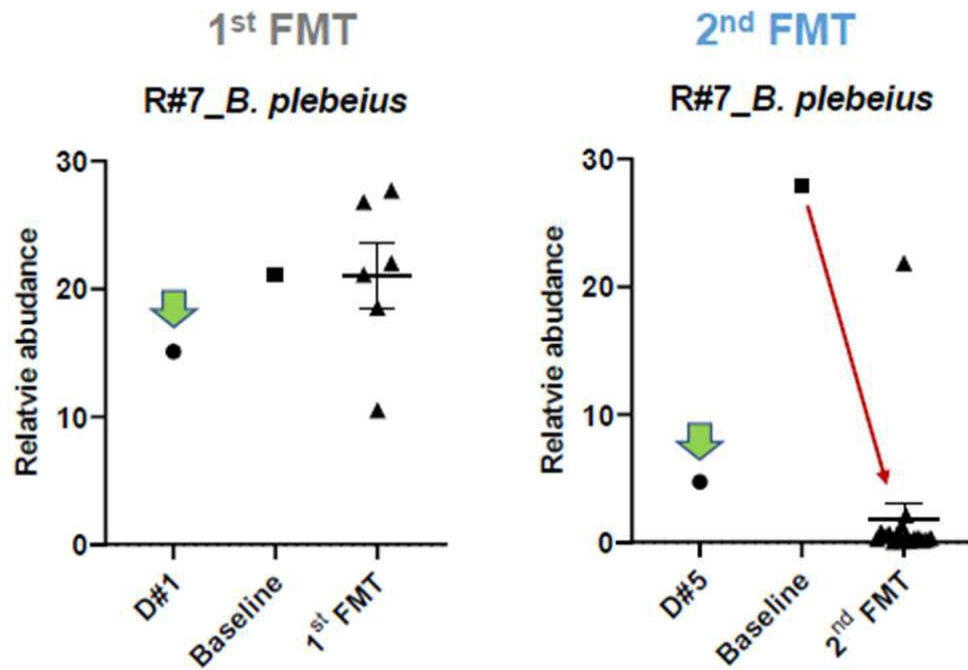
도면5a



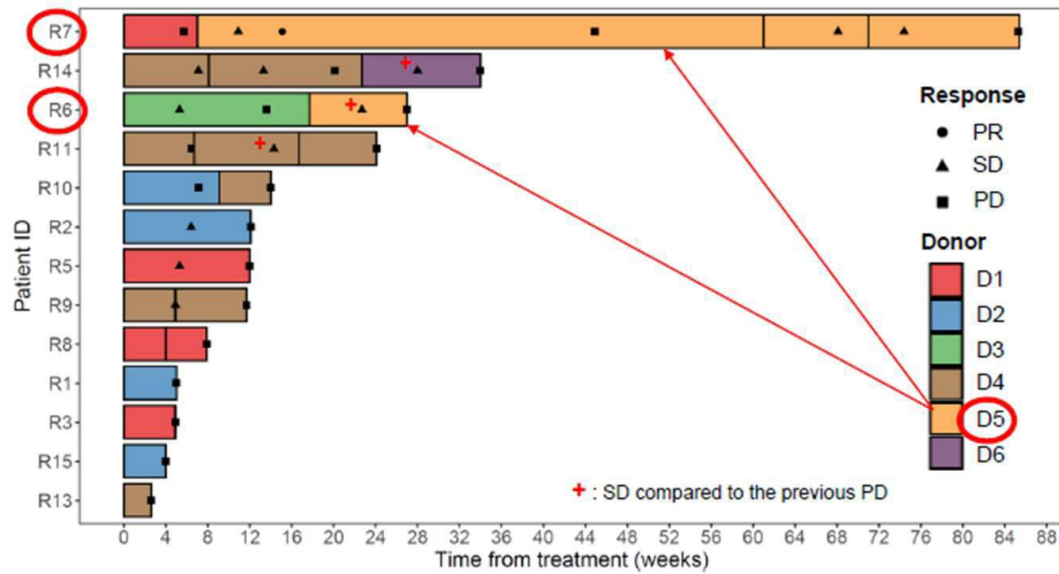
도면5b



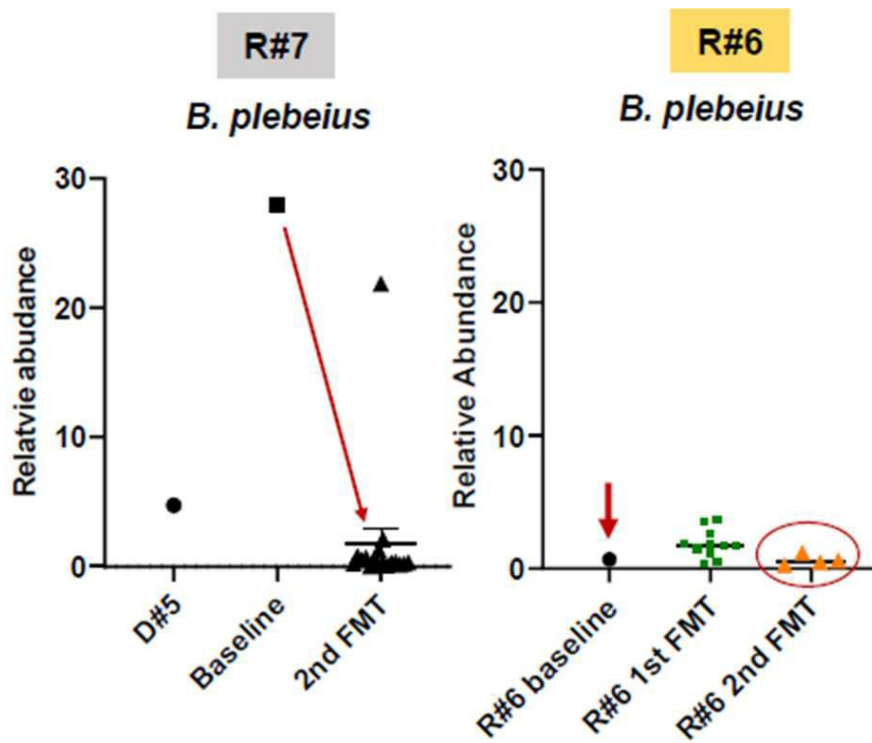
도면5c



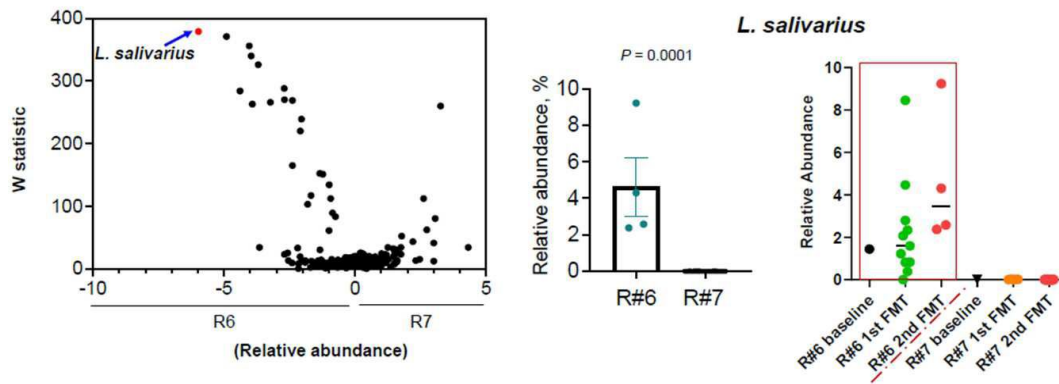
도면5d



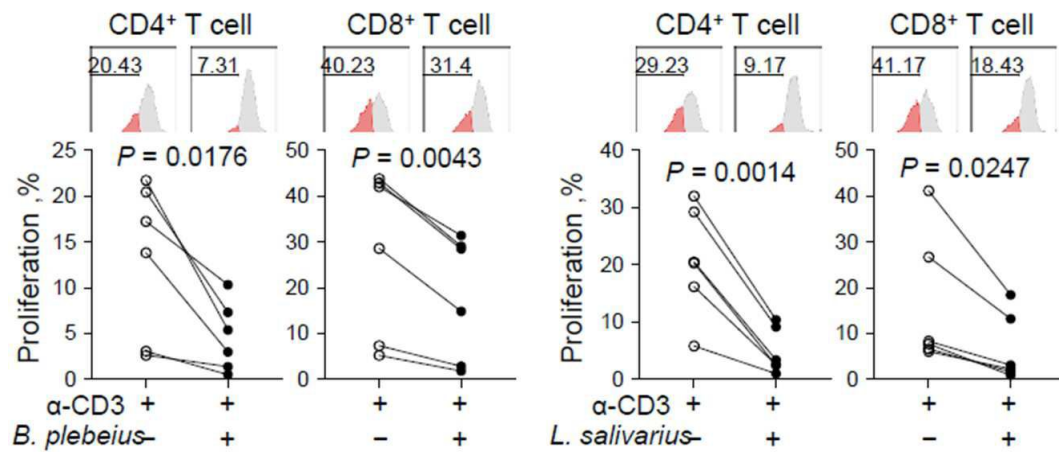
도면5e



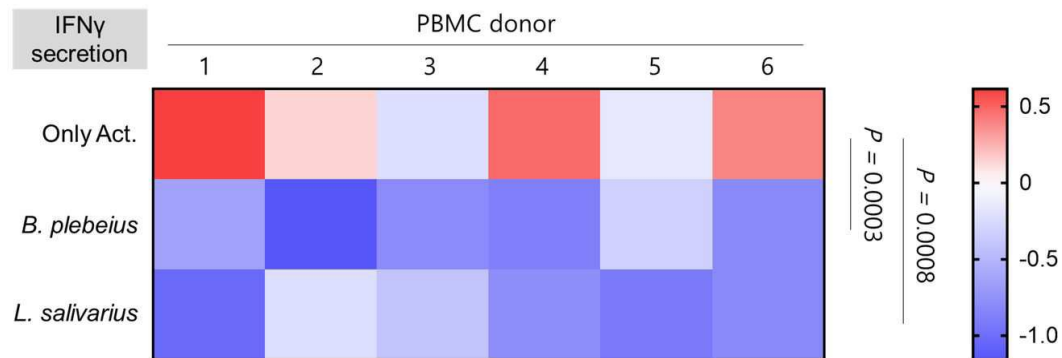
도면5f



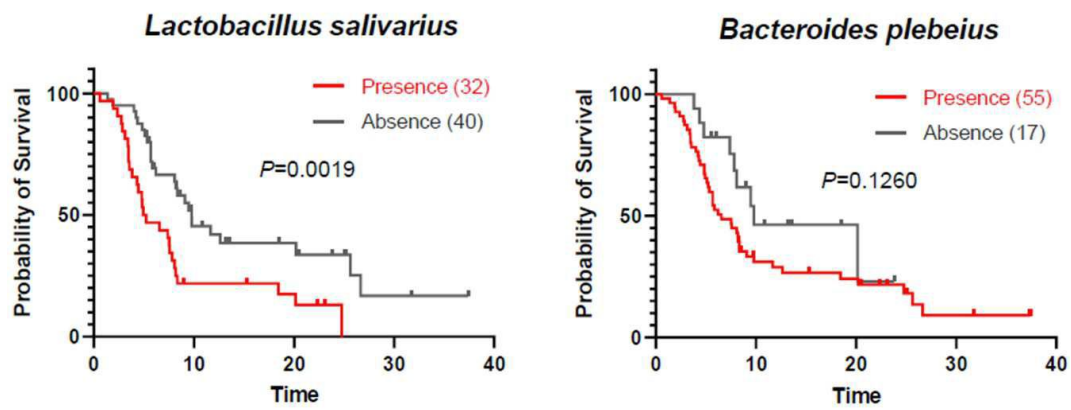
도면6a



도면6b



도면7



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.