

명세서

발명의 명칭: 류코노스톡 속 균주를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 김치로부터 분리된 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속 균주, 구체적으로는 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경 오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있으며, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있는 실정이다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[3]

- [4] 한편, 유산균은 인간과 동물의 구강, 장, 질, 분변, 그리고 김치와 같은 발효식품 등에 널리 분포하면서 사람과 동물의 건강과 밀접한 관련을 맺고 있다. 유산균은 정장작용, 유해균 억제, 면역조절, 혈중 콜레스테롤 저하, 항암 등 다양한 건강증진 효과를 나타내고 있다.

- [5] 현재, 한국공개특허 제10-2010-0013184호에서는 류코노스톡 메센테로이데스 균주의 항암 활성을 개시하고 있으나, 대장암에 대한 예방 또는 치료 효과에 대해서만 구체적 실시예를 기재하고 있을 뿐, 이 외의 암종에 대해서는 구체적인 실험예나 실시예가 기재된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 류코노스톡 속 균주를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [7] 또한 본 발명의 다른 목적은 류코노스톡 속 균주를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물 또는 식품 첨가제 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [8] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 류코노스톡 속 균주를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 이에, 본 발명자들은 김치로부터 암의 예방 및 치료 효과를 나타내는 유산균 균주를 찾고자 노력한 결과, 여러 암종에 항암 활성을 갖는 신규한 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속 균주를 분리, 동정하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [10]
- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 류코노스톡 속 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 류코노스톡 속 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물 또는 식품 첨가제 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 류코노스톡 속 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 가축의 암 예방 또는 개선용 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에 따른 류코노스톡 속 균주 또는 이의 배양물은 여러 암종에 대해 우수한 항암 활성을 나타내므로, 사람 또는 동물의 암의 치료, 예방 또는 개선 등의 용도를 위한 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명에 따른 조성물을 대장암 CT26 세포 이식 마우스에 1회 정맥 주사한 후 시간 경과에 따라 종양의 크기가 변화하는 것을 관찰한 종양의 사진을 나타낸 도이다.
- [16] 도 2는 본 발명에 따른 조성물을 대장암 CT26 세포 이식 마우스에 1회 정맥 주사한 후 시간 경과에 따라 종양 성장률을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [17] 도 3은 대장암 CT26, SW620 및 HCT116 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 성장률(cell viability assay)을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [18] 도 4는 췌장암 AsPC-1 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 성장률(cell viability assay)을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [19] 도 5는 방광암 T24 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 성장률(cell viability assay)을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [20] 도 6은 흑색종 B16-F10 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 성장률(cell viability assay)을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [21] 도 7은 정상 CCD986-sk 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 성장률(cell viability assay)을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.
- [22] 도 8은 대장암 MC38 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 전이(migration assay) 후 이미지를 촬영한 사진을 나타낸 도이다.
- [23] 도 9는 대장암 MC38 세포주에 본 발명에 따른 조성물을 처리하고 세포 전이(migration assay) 억제능을 측정한 그래프를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [24] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [25]
- [26] 본 발명의 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 암의 예방 또는 치료 효과를 가지며, 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [27] 본 발명의 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속 균주는 유산균 균주이다. 상기 류코노스톡 속 균주는 프로바이오틱스로서, 유산균의 일반적인 정장 효과 및 면역 증강 효과를 갖는다. 류코노스톡 속의 유산균이 정장 효과 면역 증강 효과를 갖는 것은 잘 알려진 사실이다.
- [28] 상기 류코노스톡 속 균주는 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 류코노스톡 카노섬(*Leuconostoc carnosum*), 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 류코노스톡 홀잡펠리(*Leuconostoc holzapfelli*) 또는 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*) 중 하나일 수 있다.
- [29] 본 발명의 실시예를 통해 김치로부터 분리된 류코노스톡 메센테로이데스 균주는 미생물의 동정 및 분류를 위한 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 서열번호 1(SEQ ID NO: 1)의 핵산서열을 갖는 것으로 나타났다.
- [30] 따라서, 서열번호 1(SEQ ID NO: 1)의 16S rRNA 염기서열을 갖는 본 발명의 미생물을 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1)로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2020년 04월 24일자로 기탁하였다(기탁번호 KCCM12701P).
- [31]
- [32] 상기 류코노스톡 균주는 MRS 액체배지에 0.1 내지 10% 접종하여 25 내지 37°C에서 4시간 내지 48시간 동안 배양하여 이용할 수 있다.
- [33] 상기 배양의 방법은 정치배양 방법이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [34]
- [35] 본 발명에 있어서, '프로바이오틱스(probiotics)'는 사람을 포함한 동물의 위장관 내에서 숙주의 장내 미생물 환경을 개선하여 숙주의 건강에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물'이라는 의미로 이해된다. 프로바이오틱스는 프로바이오틱 활성을 갖는 살아있는 미생물로 단일 또는 복합균주 형태로 사람이나 동물에 건조된 세포 형태나 발효산물 형태로 급여될 경우, 숙주의 장내 균총에 유익한 영향을 미칠 수 있다.
- [36] 상기 암은 방광암, 유방암, 흑색종양, 갑상선암, 부갑상선암, 인후암, 후두암, 식도암, 췌장암, 위암, 설암, 피부암, 뇌종양, 자궁암, 두드림암, 구강암, 신장암,

간암, 폐암, 결장암, 직장암 및 대장암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[37]

[38] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 류코노스톡 속 균주는 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결건조된 형태로 존재할 수도 있다. 또한, 류코노스톡 속 균주의 배양물이 유효성분일 수 있으며, 상기 배양물에는 생균 배양액 또는 사균 상등액이 포함될 수 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 유산균의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[39] 상기 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐 내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 정맥 내 주입방법으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[40] 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[41] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 활용될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[42] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[43] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은

주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

- [44] 나아가 해당 분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [45] 본 발명의 류코노스톡 속(*Leuconostoc*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물 또는 식품 첨가제 조성물로 이용될 수 있다.
- [46] 상기 식품 조성물은 건강기능식품의 형태일 수 있다.
- [47] 상기 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률에 따라 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미(제3조 제1호)하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것(동조 제2호)을 의미한다.
- [48] 상기 식품 조성물은 식품 첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [49] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 들을 들 수 있다.
- [50] 본 발명의 유효성분이 포함된 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 츄잉검, 잼류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해 우유, 가공유류, 산양유, 발효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유탕면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과실음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및 피자를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [51] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로

또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [52] 본 발명의 유효성분을 포함한 음료 조성물은 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, (예를 들어, 포도당, 과당 등); 디사카라이드, (예를 들어 말토스, 슈크로스 등); 및 폴리사카라이드, (예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등)과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [53] 또한, 본 발명의 류코노스톡 속(*Leuconostoc*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 가축의 암 예방 또는 개선용 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물로 이용될 수 있다.
- [54] 상기 조성물이 사료 첨가제로서 제조될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산등의 유기산이나 인산 나트륨, 인산 칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 사료로서 제조될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다.
- [55] 상기 사료 및 사료 첨가제는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 팽지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제 등을 더 포함할 수 있다.
- [56] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수전분, 락토오스, 슈크로오스, 쿡플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는

시럽제나 현탁액, 에멀전제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

- [57] 또한, 상기 사료 및 사료 첨가제는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제는 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물 식이에 적용할 수 있다.
- [59] 상기 포유류로서 돼지, 소, 말, 양, 토끼, 염소, 설치동물 및 실험용 설치동물인 쥐, 햄스터, 기니피그 뿐만 아니라, 애완동물(예: 개, 고양이) 등에게 사용할 수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있고, 상기 어류로서 잉어, 붕어 및 송어 등에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] 실시예 1. 균주의 분리 및 동정

- [62] 여러 종류의 김치 시료를 파쇄한 후, 김치액을 PBS(phosphate buffered saline)로 연속희석(serial dilution, $10^3 \sim 10^8$)하여 1차 젯산균 선택 배지인 MRS에 도말한 후 30°C 또는 37°C에서 각각 24시간 배양한다. 형성된 콜로니를 단일 콜로니로 분리한 뒤, 류코노스톡 선택 배지인 Phenylethyl alcohol sucrose agar 배지에 선상 도말하여 20°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 형성된 단일 콜로니를 수거하여 MRS 액체배지에 넣고 배양하였다. 24시간 배양한 배양액으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 16S rDNA 염기서열을 확인하기 위해, 얻어진 genomic DNA 산물은 마크로젠에 분석 의뢰하였다. 확인한 염기서열을 National Center for Biotechnology information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 유사도 분석하였고, 이 결과를 통해 최종적으로 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주로 명명하고, 한국미생물 보존센터에 2020년 4월 24일자로 기탁하였다.

[63]

[64] 실시예 2. 균주의 배양

- [65] 분리한 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 MRS 액체배지 30ml에 1% 접종하여 37°C에서 6시간 동안 정지배양 하였다. 배양 후, 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 배양액은 제거하고 균체는 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 3회 세척하여 남아 있는 배지 성분을 제거하였다.

[66]

[67] 실시예 3. 실험동물(마우스)의 조건

- [68] 실험에 사용된 실험동물은 수컷 5주령의 BALB/c 마우스(오리엔트바이오, 한국)를 공급받았고, 실내 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 습도 $55 \pm 15\%$ 가 유지되는 SPF 환경의 동물 사육실에서 1주일의 안정화 기간을 거쳐 실험기간 동안 사육하였다. 사료는 항생제가 첨가되지 않은 일반적인 펠렛 사료를 공급하였고, 물은 수시로

섭취할 수 있게 하였다. 종양 크기 변화의 관찰은 $3.14 \times (\text{길이} \times \text{높이} \times \text{넓이})/6$ 의 식을 사용하여 종양의 부피(mm^3)를 측정하여 진행하였다.

[69]

[70] 실시예 4. 대장암 CT26 세포 이식 마우스 모델에서의 항종양 효과 분석[71] 4-1. 세포 배양[72] CT26 대장암 세포는 한국세포주은행에서 구입하였고, DMEM 배지에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 첨가하여 5% CO_2 , 37°C 조건에서 배양하였다.

[73]

[74] 4-2. CT26 세포 이식 암 동물모델 제작[75] CT26 세포 이식 동물모델 제작을 위해서 6주령 BALB/c 마우스(18-21g)를 실험에 이용하였다. 배양한 대장암 세포 CT26은 1×10^5 cell을 수확(harvest)한 후, $50 \mu\text{l}$ 의 PBS에서 재부유하여 마우스의 오른쪽 대퇴부 피하에 주입하였다.

[76]

[77] 4-3. 항종양 효과 분석[78] 종양이 약 $80 \sim 100 \text{mm}^3$ 의 부피로 형성된 CT26 세포 이식 마우스의 꼬리에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1)을 정맥 내 주사하였다. PBS에 준비한 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 0.1ml (1×10^9 CFU)을 정맥 주사하였고, 대조군에는 PBS를 투여하였다. 시간 경과에 따라 CT26 세포 이식 마우스의 종양 크기의 변화를 육안으로 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.

[79] 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군(PBS)에 비해 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1을 투여한 그룹이 14일이 지난 후에 종양의 크기가 현저하게 줄어든 것을 관찰하였다.

[80] 또한, 시간 경과에 따른 CT26 세포 이식 마우스에서 종양의 부피 변화를 측정한 결과를 도 2에 나타내었다.

[81] 도 2에 나타난 바와 같이, CT26 세포 이식 마우스의 종양 크기가 대조군과 비교하였을 때 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1을 투여한 그룹에서 약 80% 정도 감소한 것을 확인하였다.

[82]

[83] 실시예 5. In vitro 항암 활성 효능 분석[84] 5-1. 세포주의 준비[85] 분리한 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주의 항암 활성 효과를 관찰하기 위해 Cell counting Kit-8을 이용하여 세포 성장률(cell viability assay)을 측정하였다. 항암 활성 효능실험에 사용된 세포는 대장암 CT26, SW620, HCT116 세포주, 췌장암 AsPC-1 세포주, 방광암 T24 세포주, 흑색종 B16-F10 세포주, 그리고 정상 피부 세포주인 CCD-986sk이다.

[86] SW620, H1650, AsPC-1, T24 세포주는 RPMI 배지에, CT26, HCT116, B16-F10

세포주는 DMEM 배지에, CCD-986sk 세포주는 IMDM 배지에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 첨가하여 5% CO₂ 37°C 조건에서 계대배양하여 성장기의 세포를 사용하여 실험하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA를 37°C 배양기에서 3분간 처리하여 세포를 탈착한 다음 DPBS로 2회 세척하였고, 각 세포가 96-well plate의 한 well당 80% 합류(confluency)가 되도록 준비하였다.

[87]

[88] **5-2. 세포 성장률(cell viability assay) 측정 결과**

[89] 본 발명은 대장암(3종), 췌장암(1종), 방광암(1종), 흑색종(1종) 세포 및 정상 피부 세포(1종)를 배양한 후 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장(cell viability)을 측정하였다.

[90] 세포 성장률(cell viability assay)은 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 각 세포에 MOI 1로 처리한 다음 72시간 동안 배양하였고, 배양 후 Cell counting Kit-8 시약을 처리하여 흡광도(OD 450nm)를 측정하였다. 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하지 않은 세포들의 흡광도를 100% 기준으로, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 세포의 성장률을 계산하였으며, 실험 결과를 하기에 기재하였다.

[91]

[92] 대장암 CT26, SW620 및 HCT116 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장률을 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.

[93] 도 3에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 CT26, SW620, HCT116 대장암 세포주의 세포 성장률이 각각 31.2%, 30.9%, 22.7% 감소하는 것을 확인함에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 균주가 대장암에 대해 우수한 항암 활성 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[94]

[95] 또한, 췌장암 AsPC-1 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장률을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

[96] 도 4에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 AsPC-1 췌장암 세포주의 세포 성장률이 58.1% 감소하는 것을 확인함에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 균주가 췌장암에 대해 우수한 항암 활성 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[97]

[98] 또한, 방광암 T24 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc*

mesenteroides LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장률을 측정한 결과를 도 5에 나타내었다.

- [99] 도 5에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 T24 방광암 세포주의 세포 성장률이 29.8% 감소하는 것을 확인함에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 균주가 방광암에 대해 우수한 항암 활성 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[100]

- [101] 또한, 흑색종 B16-F10 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장률을 측정한 결과를 도 6에 나타내었다.

- [102] 도 6에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 B16-F10 흑색종 세포주의 세포 성장률이 23.9% 감소하는 것을 확인함에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 균주가 흑색종에 대해 우수한 항암 활성 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[103]

- [104] 상기 실험과 대비하여 정상 피부 CCD-986sk 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 세포 성장률을 측정한 결과를 도 7에 나타내었다.

- [105] 도 7에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주는 CCD-986sk 정상 피부 세포주에 대해서는 독성을 보이지 않음을 확인할 수 있다.

[106]

- [107] 실시예 6. In vitro 전이 (migration assay) 억제 능력 확인

- [108] 6-1. 세포주의 준비

- [109] 분리한 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주의 전이 억제 능력을 확인하기 위해 대장암 세포주인 MC38을 이용하였다. 100mm 배양 접시에 MC38 세포가 2×10^6 cell이 되도록 준비한 후, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 MOI 1로 처리하여, 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후, PBS로 2번 세척하고 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 탈착하였다. Trans-well chamber membrane 바깥쪽을 10ug/ml fibronectin으로 미리 코팅하고, 탈착한 세포는 챔버(chamber) 안쪽에 넣어서 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 배양 후, PBS로 2회 세척하고 Diff Quik 용액으로 염색하였다. 충분히 건조를 한 후에 현미경으로 이미지를 촬영하여 세포수를 측정하여 전이율 결과를 산출하였다.

[110]

- [111] 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 후 대장암 MC38 세포가 전이된 후의 이미지를 촬영한 사진을 도

8에 나타내었다.

[112] 도 8에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB- LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 MC38 대장암 세포주가 대조군에 비해 챔버(chamber)를 통과하여 이동한 세포의 수가 감소되어있는 것을 확인하였다.

[113]

[114] 또한, 대장암 MC38 세포주에 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리하여 계산한 전이율을 도 9에 나타내었다.

[115] 도 9에 나타난 바와 같이, 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1(*Leuconostoc mesenteroides* LB-LM1) 균주를 처리한 MC38 대장암 세포주의 전이율이 27.5% 감소하는 것을 확인함에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 LB-LM1 균주가 대장암의 전이를 억제하는 효능이 우수함을 확인하였다.

[116]

[117] [수탁번호]

[118] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[119] 수탁번호 : KCCM12701P

[120] 수탁일자 : 20200424

[121]

0-1	Form PCT/RO/134 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 표시사항(PCT 규칙 13의 2) 0-1-1 우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	PCT-SAFE 버전 3.51.091.267 MT/FOP 20200401/0.20.5.24
0-2	국제출원번호	PCT/KR2021/001060
0-3	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	PCT21-0012-LISCURE

1	아래 표시된 사항은 발명의 설명 내의 아래 부분에서 언급된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것이다. 1-1 단락번호	12
1-3	기탁표시 1-3-1 기탁기관명 1-3-2 기탁기관 주소 1-3-3 기탁 일자 1-3-4 기탁 번호	KCCM 한국 미생물 배양소 대한민국 03641 서울시 서대문구 홍제내2가길 45(홍제동) 유림빌딩 3F 2020년 04월 24일 (24.04.2020) KCCM 12701P
1-5	표시사항은 다음 지정국을 위한 것이다.	모든 지정국

수리관청 전용

0-4	국제 출원서와 함께 이 서식을 수리하였다. 네 또는 아니오	
0-4-1	승인 사무관	

국제 사무국 전용

0-5	국제 사무국(IB)이 이 서식을 수리하였다.	
0-5-1	승인 사무관	