

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2017년 11월 16일 (16.11.2017) WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/196140 A2

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004974

(22) 국제출원일: 2017년 5월 12일 (12.05.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2016-0058402 2016년 5월 12일 (12.05.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 이뮤너스 (IMMUNUS CO., LTD.)
[KR/KR]; 37588 경상북도 포항시 북구 강량로128번길
17-10, 502호 (장성동, 진성팰리스), Gyeongsangbuk-do
(KR).

(72) 발명자: 백보람 (BECK, Bo Ram); 37594 경상북도 포
항시 북구 양덕남로 30-9 (장성동), Gyeongsangbuk-do

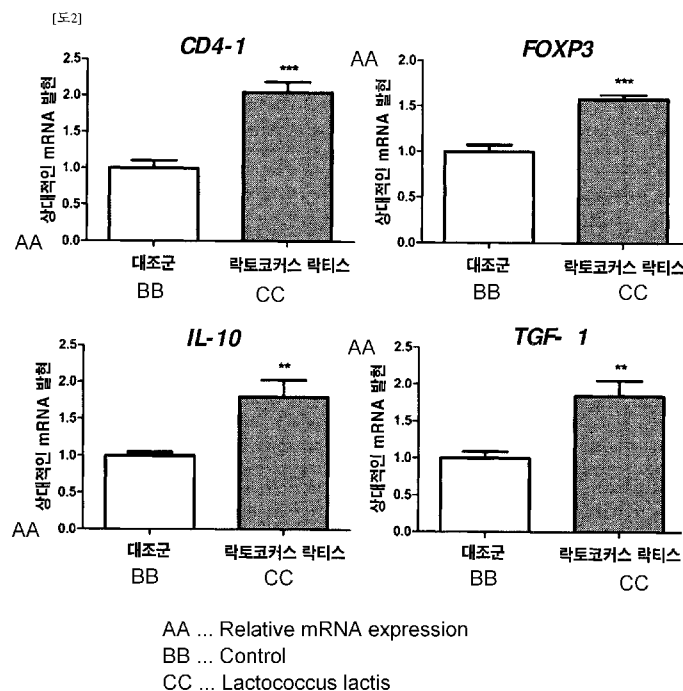
(KR). 송성규 (SONG, Seong Kyu); 37591 경상북도 포항
시 북구 양덕로 60, 111동 2402호 (양덕동, 풍림아이원
아파트), Gyeongsangbuk-do (KR). 빌헬름홀잡펠 (WIL-
HELM, Holzapfel); 37554 경상북도 포항시 북구 흥해
읍 한동로 558, 느헤미야홀동 314호, Gyeongsangbuk-do
(KR).

(74) 대리인: 특허법인 엠에이피에스 (MAPS INTELLEC-
TUAL PROPERTY LAW FIRM); 06239 서울특별시
강남구 테헤란로8길 37, 8층 (역삼동, 한동빌딩), Seoul
(KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA,

(54) Title: AQUACULTURE FUNCTIONAL FEEDSTUFF ADDITIVE COMPRISING *LACTOCOCCUS LACTIS* BFE920 STRAIN
INDUCING IMMUNOMODULATORY T-CELL.

(54) 발명의 명칭: 면역 조절 T 세포를 유도하는 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 포함하는 수산양식 기능성 사료 첨가제



(57) Abstract: The present invention relates to an aquaculture functional feedstuff additive comprising a *Lactococcus lactis* BFE920 strain that induces immunomodulatory T-cells and, more particularly, to an anti-inflammatory or immunopotentiating composition containing a *Lactococcus lactis* BFE920 strain as an effective ingredient and the use thereof. Having an anti-inflammatory or immunopotentiating effect, a composition including *Lactococcus lactis* BFE920 according to the present invention can be used as a feedstuff composition or additive capable of improving anti-inflammatory or immune activity in a subject.



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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 면역 조절 T 세포를 유도하는 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 포함하는 수산양식 기능성 사료첨가제에 관한 것으로, 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 유효성분으로 포함하는 항염증 또는 면역 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 락토코커스 락티스 BFE920를 포함하는 조성물이 항염증 또는 면역증진효과를 가지므로, 상기 조성물을 이용하면 개체의 항염증 또는 면역을 증진시킬 수 있는 사료 조성물 또는 사료 첨가제로써 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 면역 조절 T 세포를 유도하는 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 포함하는 수산양식 기능성 사료 첨가제

기술분야

- [1] 본 발명은 면역 조절 T 세포를 유도하는 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 포함하는 수산양식 기능성 사료첨가제에 관한 것으로, 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920 균주를 유효성분으로 포함하는 항염증 또는 면역증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 넙치는 한국 수산양식에서 가장 중요한 어종이다. 다만, 수산양식의 경우 제한된 공간에서 양식이 이루어지는 바, 집단 폐사 등의 우려가 존재한다. 특히, 에드워드 감염증은 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*) 균에 의해 유도되는 질병으로, 상기 에드워드시엘라 타르다는 세계적으로 담수어나 해산어에서 고수온, 수질악화, 부영양화와 같은 부적합한 환경 조건 아래에서 감염원(배설물, 물, 진흙)으로부터 물을 통하여 상피의 상처 또는 장을 통해 감염되어 심각한 전신성 세균성 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [3] 한편, 프로바이오틱스는 항생물질을 의미하는 항생제(antibiotics)와는 대립되는 어원적 의미를 가지는 것으로 장내의 미생물 균형에 도움을 주는 미생물 제제 또는 미생물 성분으로 정의되며, 대표적으로 락토바실러스균과 비피더스균 등의 유산균이 이에 해당한다. 또한, 프로바이오틱스는 사람과 동물에 대한 독성유전자를 보유하지 않고, 병원성 물질 또한 생산하지 않아 GRAS(generally recognized as safe)로 분류된다. 따라서, 안정성이 입증된 프로바이오틱스를 이용한 사료 첨가제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.
- [4] 일 예로, 국내공개특허 제10-2011-035554호는 신규한 바실러스 속 CMB L1 및 락토바실러스 속 CMB201의 혼합균주 및 이를 이용한 항암 및 면역증강용 식품 조성물 및 항균활성이 있는 미생물 제제를 개시하고 있으며, 국내등록특허 제10-0977407호는 동물의 주요 탐식세포인 호중구의 각종 활성을 증가시키고 병원성 세균의 공격접종에 대한 비특이적인 방어능을 증진시키는 자이고사카로마이세스 바일리(*Zygosaccharomyces bailii*)의 용균 추출물을 함유하는 동물용 면역증강제 및 사료첨가제를 개시하고 있다. 그러나, 프로바이오틱스를 이용한 사료첨가제의 실제 면역활성은 미비하여, 여전히 면역활성이 우수한 프로바이오틱스를 이용한 사료첨가제에 대한 연구가 필요한 실정이다.
- [5] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 항염증 및 면역증진 효과를 갖는 사료 첨가제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920(*Lactococcus lactis* BFE920)가 항염증 또는 조절 면역 T 세포활성, 장내 밀착 연접 활성이

증가시키고, 장내 투과율을 감소시키며, 병원균인 에드워드시엘라 타르다의 감염에 따른 넓치의 생존율을 증가시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 하나의 목적은 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 균주를 유효성분으로 포함하는 항염증 또는 면역 증진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 하나의 목적은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 에드워드 감염증의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 하나의 목적은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 하나의 목적은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자들은 항염증 및 면역증진 효과를 나타내는 유용한 프로바이오틱스를 찾고자 다양한 연구를 수행하던 중, 락토코커스 락티스 BFE920(*Lactococcus lactis* BFE920)를 넓치에 식이한 결과, 항염증 또는 조절 면역 T 세포활성, 장내 밀착 연결 활성이 증가하고, 장내 투과율이 감소함을 확인하였다. 또한, 병원균인 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)이 감염된 넓치에 락토코커스 락티스 BFE920를 식이한 결과, 장내 투과율이 감소하고 이에 따라 넓치의 생존율을 증가함을 확인하여, 락토코커스 락티스 BFE920 균주가 어류의 항염증 또는 면역증진을 위하여 사용될 수 있음을 규명하였다. 락토코커스 락티스 BFE920 균주가 항염증 또는 면역증진 효과를 나타내는 것은 지금까지 전혀 알려지지 않았고, 본 발명자에 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.
- [12] 상기 과제를 해결하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 락토코커스 락티스 균주를 유효성분으로 포함하는 항염증 또는 면역 증진용 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명에서 사용된 용어 "락토코커스(*Lactococcus*)"는 일명 젖산균이라 불리는 스트렙토코커스 그룹 N1 속(genus *Streptococcus* Group N1)에 포함되는 락트산(젖산) 박테리아 속 균주이다. 글루코스 발효의 주된 또는 유일한 생산물, 구체적으로 락트산을 생산하는 호모퍼멘터(homofermentor)로 알려져 있다. 이들 균주는 치즈, 요구르트 등의 발효 유제품을 생산하는 낙농산업에 널리 사용되고 있다.

- [14] 상기 "락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)"는 상기 락토코커스 종에 속하는 락트산(젖산) 박테리아 속 균주의 하나로, 산업적 유제품 즉, 치즈, 발효우유, 또는 유산 카제인의 생산에 이용될 수 있고, 프로바이오틱스로써 사용될 수 있다.
- [15] 본 발명에 있어서, 상기 락토코커스 락티스는 기탁번호 KCCM11383P로 기탁된 락토코커스 락티스 BFE920 균주일 수 있다.
- [16] 본 발명에서 사용된 용어 "락토코커스 락티스 BFE920(*Lactococcus lactis* BFE920)"은 그램-양성균으로, 콩나물에서 분리된 락토코커스 락티스 균주를 의미하며, 연쇄상구균류에 대해 강한 항균활성을 가짐이 알려져 있다.
- [17] 본 발명에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 *IL-10*, *CD4-1*, *FOXP3*, *TGF-β* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증가시킬 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에서, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 48시간 및 72시간 경과시 장내 *CD4-1*, *IL-10*, *FOXP3* 또는 *TGF-β* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 48시간 및 72시간 경과시 *CD4-1*, *IL-10*, *FOXP3* 또는 *TGF-β* 유전자의 상대적인 mRNA 발현이 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 상기의 상대적인 mRNA 발현량이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 1). 또한, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이 한 후, 장내 *IL-10*, *CD4-1*, *FOXP3*, *TGF-β*의 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 상기의 상대적인 mRNA 발현량이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 2). 따라서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920이 면역 조절 T 세포의 활성을 증가시켜 면역 증진 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [19] 본 발명에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 밀착연접 활성을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 *occludin* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증가시킬 수 있다.
- [20] 상기 밀착연접은 밀봉 기능을 담당하는 세포 연접을 의미하는 것으로, 밀착연접 활성이 증가되는 경우, 이웃하는 세포끼리 원형질막이 밀착, 폐쇄되어 수용성 분자들이 세포 틈 사이로 누출되지 않는 효과를 나타낸다. 상기 밀착연접은 클라우딘(claudin)과 오클루딘(occludin) 단백질이 사슬 형태로 배열되어 두 세포 사이를 밀봉함으로써 연결될 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 실시예에서, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 장내 *occludin* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 발현량이 증가함을 확인하여 상기 락토코커스 락티스 BFE920이 장내 밀착 연접 활성을 증가시킴을 알 수 있었다(도 3).
- [22] 본 발명에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 장 내 투과율을 감소시킬 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 실시예에서, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안

식이한 후 장내 투과율을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 투과율이 감소함을 확인하여 락토코커스 락티스 BFE920이 장내 투과율을 감소시킴을 알 수 있었다(도 4). 또한, occludin 유전자의 상대적인 mRNA 발현의 증가에 따른 밀착연접 활성이 증가함을 확인하였으므로, 락토코커스 락티스 BFE920이 밀착연접을 증가시켜 장내 투과율이 감소됨을 알 수 있었다.

- [24] 본 발명에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 병원균 감염시 증가된 장내 투과율을 감소시킬 수 있다.
- [25] 상기 병원균은 구체적으로 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 장내 투과율을 증가시키는 일반적인 병원균일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에서 넓치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 에드워드시엘라 타르다를 경구감염시켜 장내 투과율을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고, 에드워드시엘라 타르다만을 경구감염시킨 대조군에 비해 장내 투과율이 감소함을 확인하여, 락토코커스 락티스 BFE920이 장내막 기능 개선효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 5).
- [27] 본 발명에서 사용된 용어 "항염증"은 염증을 억제하는 작용을 의미하고, 본 발명에서 사용된 용어 "면역증진"은 생체 내 압, 염증 등 다양한 질환에 대한 신체 방어기전을 보강하는 모든 현상을 의미한다.
- [28] 본 발명에 있어서, 상기 면역 증진은 면역조절 T 세포 활성 증가로 유도되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역 증진은 *IL-10*, *CD4-1*, *FOXP3* 또는 *TGF-β* 유전자의 상대적인 mRNA 발현의 증가로 확인할 수 있다.
- [29] 상기 면역조절 T 세포는 크게 기원에 따라 natural regulatory T 세포와 adaptive regulatory T 세포로 구분될 수 있다. natural regulatory T 세포의 경우, thymus로부터 유도되어 높은 수준의 CD25와 cytotoxic T lymphocyte(CTLA4)나 glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein(GITR)과 같은 공동-신호전달 물질 및 foxp3를 발현하고 있다. adaptive regulatory T 세포의 경우, IL-10 및 TGF-β와 같은 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다. 또한, 면역조절 T 세포는 CD4 및 CD25이 발현되어 있으므로, 상기 *IL-10*, *CD4-1*, *FOXP3* 또는 *TGF-β* 유전자의 상대적인 mRNA 발현의 증가를 통해 면역 증진활성을 확인할 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 실시예에서, 넓치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하고 48시간 및 72시간 경과시 또는 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후, 장내 *IL-10*의 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군과 비교하여 상대적인 mRNA 발현량이 유의하게 증가함을 확인하여, 상기 락토코커스 락티스 BFE920이 항염증 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 1 및 도 2).

- [31] 본 발명의 일 실시예에서, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 48시간 및 72시간 경과시 장내 CD4-1, IL-10, FOXP3 또는 TGF- β 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 48시간 및 72시간 경과시 CD4-1, IL-10, FOXP3 또는 TGF- β 유전자의 상대적인 mRNA 발현이 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 상기의 상대적인 mRNA 발현량이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 1). 또한, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이 한 후, 장내 IL-10, CD4-1, FOXP3, TGF- β 의 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군에 비해 상기의 상대적인 mRNA 발현량이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 2). 따라서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920이 면역 조절 T 세포의 활성을 증가시켜 면역 증진 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [32] 본 발명에 있어서, 상기 항염증 또는 면역 증진은 장 내에서 유도되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물일 수 있다.
- [34] 본 발명에서 사용된 용어 "사료"는 대상생물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.
- [35] 본 발명에서 사용된 용어 "사료첨가제"는 대상생물의 생산성 향상이나 건강을 증진시키기 위해서 사료에 첨가되는 물질을 의미한다.
- [36] 본 발명에서는 락토코커스 락티스 BFE920을 포함하는 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물을 사용하여 대상생물의 항염증 활성 또는 면역증진 활성을 나타낼 수 있다.
- [37] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 본 발명의 락토코커스 락티스 BFE920 또는 이의 배양물은 20 내지 90wt% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 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 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다.
- [38] 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 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 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [39] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 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 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 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. 액체담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀전제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.
- [40] 상기 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 주로 구성되어 있다.
- [41] 또한, 상기 사료 첨가제 및 사료는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 침투,분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.
- [42] 다른 하나의 양태로, 본 발명은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [43] 본 발명에 있어서, 상기 어류는 뱀장어, 넙치(광어), 조피볼락, 우럭, 감성돔, 참돔, 능성어, 숭어, 농어, 전어, 고등어, 전갱이 또는 쥐치로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 어류일 수 있다.
- [44] 본 발명에서 사용된 용어 "에드워드 감염증"는 장내 세균과에 속하는 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*) 균에 의해서 발병하는 어류질환을 의미하는 것으로, 주로 고수온기인 초여름에서 가을까지 발생하고, 단기간에 대량폐사를 유발하지는 않지만, 장기간에 걸쳐 폐사를 가져올 수 있다. 상기 에드워드 감염증은 한국 수산양식에서 가장 중요한 어종인 넙치의 양식 산업에 큰 경제적 손실을 가져올 수 있다. 에드워드 감염증에 감염된 넙치는 복부팽만과 탈장이 특징적인 증상으로 나타나며, 복수에 혈액이 섞여있거나 유상으로 농이 관찰되고, 간은 갈색으로 고름집이 형성되며, 간, 신장은 비대하고 수막염을 수반할 수 있다.
- [45] 상기 에드워드시엘라 타르다는 그람음성 세균이고, 온도 14 °C 내지 45 °C, pH 4.0 내지 pH 10.0, 및 염화나트륨 0 내지 4 % 와 같이 넓은 생존 범위를 갖으며, 조건성 병원체이므로 완전히 제거하거나 감염을 철저히 예방하기 어려운 특징을 갖는다. 에드워드시엘라 타르다는 세계적으로 담수어나 해산어에서 고수온, 수질악화, 부영양화와 같은 부적합한 환경 조건 아래에서 감염원

(배설물, 물, 진흙)으로부터 물을 통하여 상피의 상처 또는 장을 통해 감염되어 심각한 전신성 세균성 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.

- [46] 본 발명에 일 실시예에서 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 에드워드시엘라 타르다를 감염시켜 생존율을 측정한 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고, 에드워드시엘라 타르다만을 감염시킨 대조군에 비해 생존율이 유의하게 증가됨을 확인하였다. 따라서, 락토코커스 락티스 BFE920이 에드워드시엘라 타르다로 유도되는 증상 및 폐사를 지연시키고 에드워드 감염증에 치료에 효과적임을 알 수 있었다(도 6).
- [47] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 상기 락토코커스 락티스 BFE920을 포함하는 조성물의 투여로 에드워드 감염증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [48] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 상기 락토코커스 락티스 BFE920을 포함하는 조성물의 투여로 에드워드 감염증이 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [49] 상기 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 유회제 등 당업계에서 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [50] 또한, 본 발명의 약학조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 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 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [51] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유회제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61(tween 61), 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[52] 한편, 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 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 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[53] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 구체적으로 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 달라질 수 있으므로, 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[54] 다른 하나의 양태로, 본 발명은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[55] 상기 락토코커스 락티스 BFE920, 어류, 에드워드 감염증, 예방 또는 사료에 대한 정의는 상기한 바와 같다.

[56] 본 발명에서 사용된 용어 "개선"은 상기 락토코커스 락티스 BFE920을 포함하는 조성물의 투여로 에드워드 감염증 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[57] 다른 하나의 양태로, 본 발명은 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 에드워드 감염증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[58] 상기 에드워드 감염증, 어류, 예방 또는 치료에 대한 정의는 상기한 바와 같다.

[59] 본 발명에서 사용된 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 어류에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로 경구투여일 수 있다.

[60] 다른 하나의 양태로, 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는 어류의 에드워드드 감염증 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[61] 상기 락토코커스 락티스 BFE920, 어류, 에드워드드 감염증, 예방, 개선 또는 사료 첨가제에 대한 정의는 상기한 바와 같다.

발명의 효과

[62] 본 발명은 락토코커스 락티스 BFE920를 포함하는 조성물이 항염증 또는 면역증진효과를 가지므로, 상기 조성물을 이용하면 개체의 항염증 또는 면역을 증진시킬 수 있는 사료 조성물 또는 사료 첨가제로써 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[63] 도 1은 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920(*Lactococcus lactis* BFE920)을 식이 후 48시간 및 72시간 경과시 장내 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF-β1* 및 *FOXP3* 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현을 확인한 그래프이다.

[64] 도 2은 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이 후 장 내 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF-β1* 및 *FOXP3* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인한 그래프이다.

[65] 도 3는 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이 후 장 내 *occludin* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인한 그래프이다.

[66] 도 4는 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이 후 장 내 투과율을 확인한 그래프이다.

[67] 도 5은 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 다음날 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)를 경구감염시킨 후 72시간 경과시 장 내 투과율을 확인한 그래프이다.

[68] 도 6은 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 다음날 에드워드시엘라 타르다를 경구감염시킨 후 20일 동안 생존율을 확인한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[69] 이하, 하기 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[70] 실시예 1. 실험동물의 사육 및 식이

[71] 본 발명에 사용될 실험동물은 다음과 같이 사육시켰다.

- [72] 구체적으로, 넙치 (42.7 ± 1.61 g)는 300L의 해수가 담긴 어항에서 유지시켰고, 실험 진행 전, 7일 동안 18 °C에서 적응시켰다.
- [73] 또한, 락토코커스 락티스 BFE920(*Lactococcus lactis* BFE920)을 식이하지 않은 넙치군(대조군)과 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 넙치군(식이군)으로 나누어 상기 락토코커스 락티스 BFE920을 임의량(*ad libitum*)으로 하루에 두 번씩 식이하였다. 대조군의 경우, 상업적인 배합사료(EP, Flounder Bluechip; WOOSUNGFEEED Co. Ltd., Daejeon, Korea)를 식이하였고, 식이군은 10^7 CFU/g의 락토코커스 락티스 BFE920이 코팅된 배합사료를 식이하였다.
- [74] 실시예 2. 락토코커스 락티스 BFE920의 식이에 따라 유도되는 항염증 및 면역조절 T 세포의 활성화
- [75] 실시예 2.1: RNA 추출 및 cDNA 합성
- [76] 실시예 1의 식이군 및 대조군의 장에서 RNA 추출 및 cDNA를 합성하기 위하여, 넙치의 후장조직으로부터 RNA 추출한 후, 상기 RNA를 주형으로 cDNA를 합성하였다.
- [77] 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 넙치의 초기단계에서 항염증 활성화 및 면역조절 T 세포의 활성을 확인하기 위하여, 락토코커스 락티스 BFE920을 넙치에 식이한 후, 48시간 및 72시간 경과시에 해당하는 식이군 및 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군을 4마리씩 희생시켰다. 또한, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 넙치의 항염증 활성화 및 면역조절 T 세포의 활성을 확인하기 위하여는, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 식이군 및 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군을 3마리씩 희생시켰다.
- [78] 다음으로, 각 군의 후장조직을 750 mL RNAlater® (Life technology, USA) 용액이 포함된 1.5 mL 마이크로튜브에 넣어 후장조직 샘플을 제조한 후, 10 mg의 후장조직 샘플을 350 uL의 RLT buffer(AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit, Qiagen, USA)에 넣고, T10 basic handheld homogenizer (IKA®, 중국)을 사용하여 균질화시켰다. 상기 균질화된 용액은 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini KiT를 사용하여 RNA를 분리한 후, 상기 RNA를 주형으로 SuperScript® III reverse transcriptase (Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.
- [79] 실시예 2.2: 합성된 cDNA를 이용한 정량적 실시간 PCR 분석
- [80] 상기 식이군 및 대조군의 장에서 상대적인 mRNA 발현을 확인하기 위하여, 상기 실시예 3.1에 따라 합성된 cDNA를 주형으로 qRT-PCR을 수행하였다.
- [81] 구체적으로, 각 군의 넙치 조직으로부터 합성된 20 ng의 cDNA를 주형으로 프라이머를 사용하여 최종 반응량을 20 uL로 하여 증폭시켰고, 이때 사용한 기기는 Applied Biosystems 7500 PCR System (Life Technology, USA)를 사용하였다. PCR 사이클은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 먼저, 94 °C에서 10분 동안 변성(denaturation)시키고, 94 °C에서 15초 동안의 변성(denaturation), 62 °C에서 42초 동안의 결합(annealing) 및 연장(extension)을 포함하는 사이클을

40번 반복하였다. 이에 따른 qRT-PCR 결과는 대조군인 β -actin Δ CT를 이용한 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 방법으로 상대적인 mRNA 발현으로 나타내었다.

[82] 또한, 상기 qRT-PCR에 사용된 프라이머는 하기와 같다.

[83] [표1]

프라이머	서열(5'→3')	타겟 유전자
OF- β -actin-RT-F (서열번호 1)	TGCAGAAGGAGATCACAGCC	β -actin
OF- β -actin-RT-R (서열번호 2)	ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	β -actin
OF-CD4-1-RT-F (서열번호 3)	AGTGAGCACGGACAATGGAG	CD4-1
OF-CD4-1-RT-R (서열번호 4)	CACGATGACTGAAGCGATGC	CD4-1
OF-FOXP3-RT-F (서열번호 5)	CACACTGGGTTGAGGACAGG	FOXP3
OF-FOXP3-RT-R (서열번호 6)	AGCCATGCTGGGATAACTCC	FOXP3
OF-IL10-RT-F (서열번호 7)	GCCTCACGTGGAGTCCATACAGC	IL-10
OF-IL10-RT-R (서열번호 8)	GCTCGCCCATGGCTTTATATAGACC	IL-10
OF-TGF- β -RT-F (서열번호 9)	CAGCGAACACGAGCCAAACAC	TGF- β 1
OF-TGF- β -RT-R (서열번호 10)	TGTTCTGAGGGATGGACATGGTG	TGF- β 1

[84] 실시예 2.3: 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 초기단계에서 유도되는
항염증 및 면역 조절 T 세포의 활성화

[85] 납치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 초기단계에서 락토코커스 락티스 BFE920이 항염증 및 면역 조절 T 세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 락토코커스 락티스 BFE92 식이 후 48시간 및 72시간마다 식이군의 장에서 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인하고, 이를 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군과 비교하였다.

[86] 구체적으로, 실시예 2.1 및 실시예 2.2의 방법으로 후장조직을 추출하여 얻어진 RNA로 cDNA를 합성하고, 이를 주형으로, qRT-PCR을 수행하여, 각 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현을 확인하였다.

[87] 실험결과, 납치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 48시간 경과시 상기 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 증가됨을 확인하였고, 특히 *IL-10* 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현은 대조군과 비교하여 약 6배 이상 증가됨을 확인하였다(도 1).

[88] 또한, 납치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후, 72시간 경과시 *CD4-1*

유전자의 상대적인 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 약 2배, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자의 상대적인 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 약 3배 이상 증가됨을 확인하였다(도 1).

- [89] 따라서, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하여 장 내 상기 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자의 상대적인 mRNA 발현이 대조군에 비해 증가됨을 확인하여, 넙치에서 락토코커스 락티스 BFE920의 식이에 따라 항염증 및 면역 조절 T 세포의 활성화 증가가 유도됨을 알 수 있었다.

- [90] 실시예 2.4: 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후의 유도되는 항염증 및 면역조절 T 세포의 활성화

- [91] 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 락토코커스 락티스 BFE920이 항염증 및 면역 조절 T 세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.

- [92] 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후, 실시예 2.3의 방법으로 장 내 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인하고, 이를 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군과 비교하였다.

- [93] 실험결과, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 장내 *CD4-1*, *IL-10*, *TGF- β 1* 및 *FOXP3* 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 유의하게 증가함을 확인하였다(도 2).

- [94] 따라서, 상기 결과를 통해, 락토코커스 락티스 BFE920가 항염증 활성화 및 면역 조절 T 세포의 활성을 유도함을 알 수 있었다.

- [95] 실시예 3. 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후의 장내막 기능 개선

- [96] 실시예 3.1: 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후의 밀착연접 활성화

- [97] 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 락토코커스 락티스 BFE920이 장 내막에서 밀착연접 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.

- [98] 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후, 실시예 2.3의 방법으로 장 내 occludin 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인하고, 이를 락토코커스 락티스를 식이하지 않은 대조군과 비교하였다. 이때, 상기 occludin 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인하기 위하여, occludin 유전자에 대한 프라이머로 OF-OCLN-RT-F(5'-TCTTTGCTCTGAAGACCCGC-3', 서열번호 11) 및 OF-OCLN-RT-R(5'-ATTGTTACCCATGCCTCCA-3', 서열번호 12)를 이용하였고, 대조군인 β -actin Δ CT를 이용한 $2^{-\Delta CT}$ 방법으로 상대적인 mRNA 발현으로 나타내었다.

- [99] 실험 결과, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 장내 occludin 유전자에 대한 상대적인 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 유의하게 증가함을 확인하였다(도 3).

- [100] 따라서, 상기 결과를 통해, 넙치에서 락토코커스 락티스 BFE920가 장내 밀착

연접 활성을 증가시킴을 알 수 있었다.

[101] 실시예 3.2: 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 장내 투과율

[102] 넓치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후, 장 내막에서 밀착 연접 활성이 증가함을 확인하였으므로, 상기 활성을 통해 락토코커스 락티스 BFE920이 장내 투과율에 영향을 미치는지 확인하였다.

[103] 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 FITC-dex 4 kDa(fluorescein isothiocyanate-dextran 4,000 Da; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 장내 투과율을 확인하고, 이를 락토코커스 락티스 BFE920을 식이하지 않은 대조군과 비교하였다.

[104] 상기 장내 투과율 실험은 다음과 같이 수행하였다. 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 6시간 동안 굶기고 나서, 위관영양법(oral gavage)을 통해 500 mg/kg의 FITC- dex 4 kDa를 대조군 및 식이군의 4마리에 주입하였다. 한 시간 경과 후, 상기 넓치로부터 600 uL의 혈액 샘플을 1.5 mL 마이크로튜브에 수집하였다. 13000 rpm, 4 °C에서 10분 동안 상기 혈액 샘플을 원심분리하여 혈장 샘플을 얻었고, 1:1 비율로 인산 완충 용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 희석시켰다. 100 uL의 상기 희석된 혈장 샘플은 Corning™ Costar™ 96-well black solid plate (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)에 두었다. 각 샘플의 형광강도는 485 nm/535 nm 범위에서 VICTOR² D fluorometer를 사용하여 측정하였다.

[105] 실험 결과, 넓치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 장내 투과율은 2.30 ± 0.02 ug/mL로, 4.16 ± 0.23 ug/mL의 투과율을 나타내는 대조군과 비교하여 유의하게 낮음을 확인하였다(도 4).

[106] 따라서, 상기 결과를 통해서, 락토코커스 락티스 BFE920의 식이에 따라 장 내막에서 밀착 연접 활성이 증가하고 이에 의해 장내 투과율이 감소됨을 알 수 있었다.

[107] 실시예 3.3: 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)의 경구 감염에 따른 장내 투과율

[108] 에드워드시엘라 타르다는 lipopolisacchahride (LPS)를 가지는 그람음성 병원균이고, 장내에서 염증을 유발할 수 있는 능력을 가지고 있으므로, 병원균으로 선택하였고 상기 병원균의 감염에 따른 장내 투과율에 있어 락토코커스 락티스 BFE920이 미치는 영향을 확인하였다.

[109] 구체적으로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 다음날 상기 병원균을 감염시킨 후, 72시간 경과시에 FITC-dex 4 kDa을 사용하여 장내 투과율을 측정하였다. 한편, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고 다음날 상기 병원균을 감염시킨 넓치를 대조군으로 사용하였다.

[110] 상기 병원균인 에드워드시엘라 타르다의 감염은 다음과 같이 수행하였다. 먼저, 에드워드시엘라 타르다는 brain heart infusion(BHI) 배지(Beckton, Dickinson and Company, Sparks, USA)에서 30 °C, 200 rpm으로 교반하여 밤새도록

배양하였다. 식이 31일 경과시에 각 그룹마다 임의로 선택된 4마리의 넙치에 상기 밤새도록 배양시킨 에드워드시엘라 타르다($1 - 2 \times 10^5$ CFU/g fish)를 경구투여하여 감염시킨 후, 72시간 경과시에 상기 실시예 3.2의 방법으로 장내 투과율 실험을 수행하였다.

[111] 실험 결과, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하고, 다음날 에드워드시엘라 타르다를 경구로 감염시킨 후 72시간 경과시 식이군의 장내 투과율은 혈장 FITC-dex 4 kDa의 값이 2.35 ± 0.04 ug/mL로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고, 다음날 에드워드시엘라 타르다를 경구로 감염시킨 후 72시간 경과시 대조군의 장내 투과율(혈장 FITC-dex 4 kDa의 값: 14.98 ± 3.95 ug/mL)과 비교하여 감소됨을 확인하였다(도 5).

[112] 따라서, 따라서, 상기 결과를 통해서, 병원균으로 유도되는 장내 투과율의 증가를 락토코커스 락티스 BFE920의 식이를 통해 회복시킴에 따라 락토코커스 락티스 BFE920이 장내막 기능 개선 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[113] 실시예 4. 에드워드시엘라 타르다 감염에 대한 질병 저항성

[114] 락토코커스 락티스 BFE920이 병원균인 에드워드시엘라 타르다 감염에 따른 질병 저항성에 미치는 영향을 확인하였다.

[115] 구체적으로, 넙치에 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 다음날 상기 병원균을 경구감염시킨 후 20일 동안의 생존율을 측정하였다. 한편, 상기 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고, 병원균을 감염시킨 넙치를 대조군으로 사용하였다.

[116] 에드워드시엘라 타르다의 감염은 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하고, 31일째에 각 그룹마다 임의로 선택된 20마리씩의 넙치에 경구투여하여 감염시켰다.

[117] 실험 결과, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이한 후 에드워드시엘라 타르다를 감염시킨 식이군의 20일 동안의 생존율은 70 %로, 락토코커스 락티스 BFE920을 30일 동안 식이하지 않고, 에드워드시엘라 타르다를 감염시킨 대조군의 생존율인 10 %과 비교하여, 유의하게 증가하였다(도 6).

[118] 따라서, 상기 결과를 통해서 넙치에서 락토코커스 락티스 BFE920의 식이를 통해 에드워드시엘라 타르다로 유도되는 증상 및 폐사가 지연되는 것을 알 수 있었다.

[119] 실시예 5. 통계 분석

[120] 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후 초기단계의 넙치를 이용한 qRT-PCR 결과는 two-way ANOVA with Bonferroni's posttest를 사용하였다. 락토코커스 락티 BFE920을 30일 동안 식이한 넙치를 이용한 qRT-PCR 결과 및 장내 투과율 실험 결과의 유효성 평가는 Graph Pad Prism 5 software를 사용하여 Turkey's multiple comparison test와 함께 two-tailed student's T-test 및 ANOVA(one-way analysis of variance)로 확인하였다. 락토코커스 락티스 BFE920을 식이한 후, 에드워드시엘라 타르다의 경구 감염에 따른 생존률은 생존곡선으로

나타내었고, 상기 생존곡선에 대한 유효성 평가는 Log-rank (Mantel-Cox) test을 통해 수행하였다.

- [121] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

- [122] [수탁번호]
[123] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
[124] 수탁번호 : KCCM11383P
[125] 수탁일자 : 20130221

[126]

출원인 또는 대리인
파일 참조번호
OP20170059KR

국제출원번호

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 발명의 설명 _2_ 쪽, _7_ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.

B. 기탁물의 확인 이의의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐

기탁기관의 명칭

KCCM 한국 미생물 배양소

기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함)

대한민국 03641 서울특별시 서대문구 홍제내2가길 45(홍제동)

기탁일자

2013년 2월 21일

기탁번호

KCCM11383P

C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐

D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)

E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)

하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)

수리관청 사용란

☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음

담당관

국제사무국 사용란

☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:

담당관

청구범위

- [청구항 1] 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 균주를 유효성분으로 포함하는, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스는 기탁번호 KCCM11383P로 기탁된 락토코커스 락티스 BFE920 균주인 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 *IL-10*, *CD4-1*, *FOXP3*, *TGF-β* 유전자의 mRNA 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 밀착연접 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 밀착연접 활성의 증가는 *occludin* 유전자의 mRNA 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 6] 제 2 항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 장 내 투과율을 감소시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 7] 제 2 항에 있어서, 상기 락토코커스 락티스 BFE920 균주는 병원균 감염시 증가된 장 내 투과율을 감소시키는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 병원균은 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)인 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 면역 증진은 면역조절 T 세포 활성 증가로 유도되는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 항염증 또는 면역 증진은 장 내에서 유도되는 것을 특징으로 하는 것인, 항염증 또는 면역 증진용 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물인 것인, 항염증 및 면역 증진용 조성물.
- [청구항 12] 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는, 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 치료용 약학

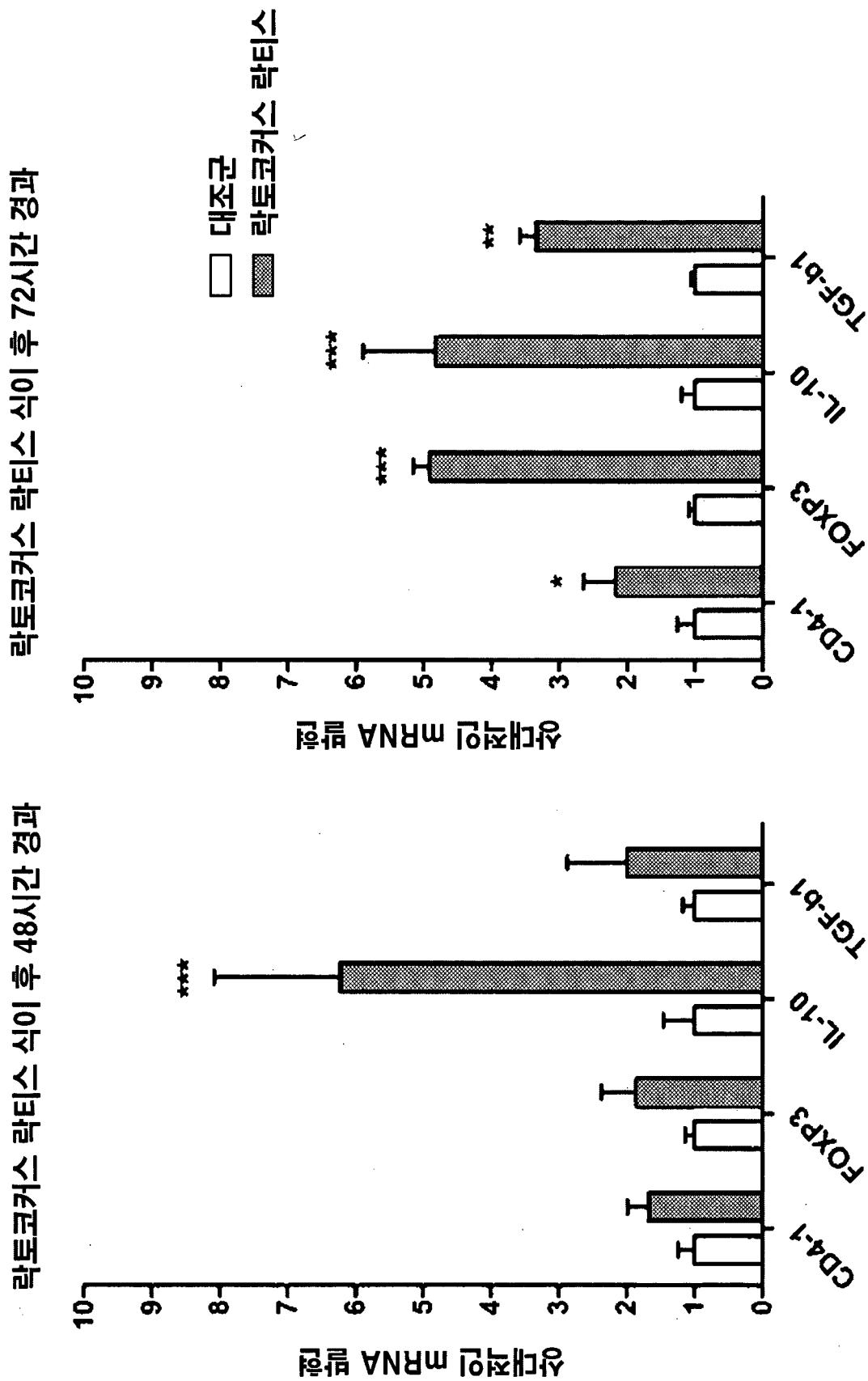
조성물.

[청구항 13] 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 포함하는 상기 약학 조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는, 에드워드 감염증 예방 또는 치료 방법.

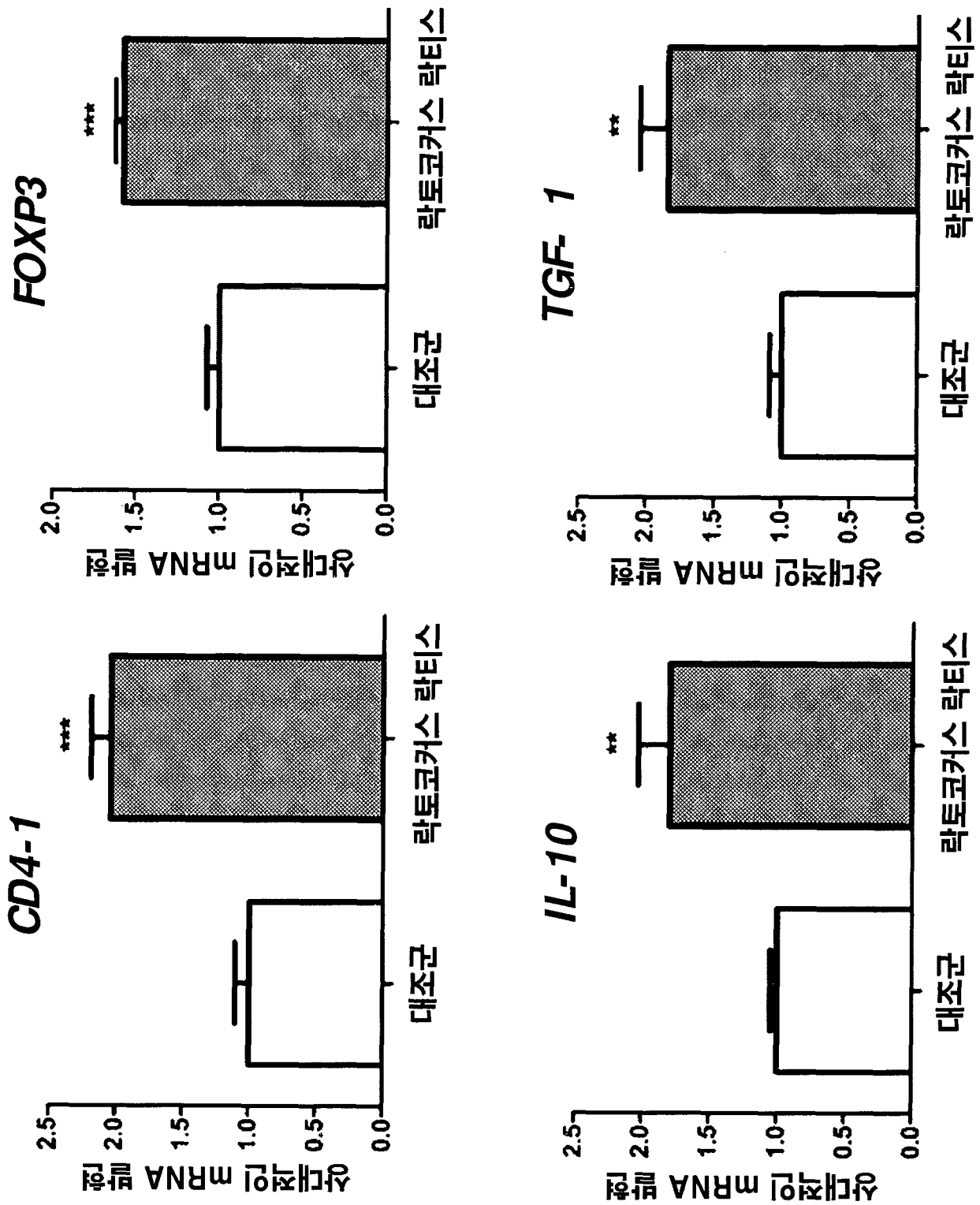
[청구항 14] 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는, 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 개선용 사료 조성물.

[청구항 15] 락토코커스 락티스 BFE920 균주(기탁번호: KCCM11383P)를 유효성분으로 포함하는, 어류의 에드워드 감염증 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물.

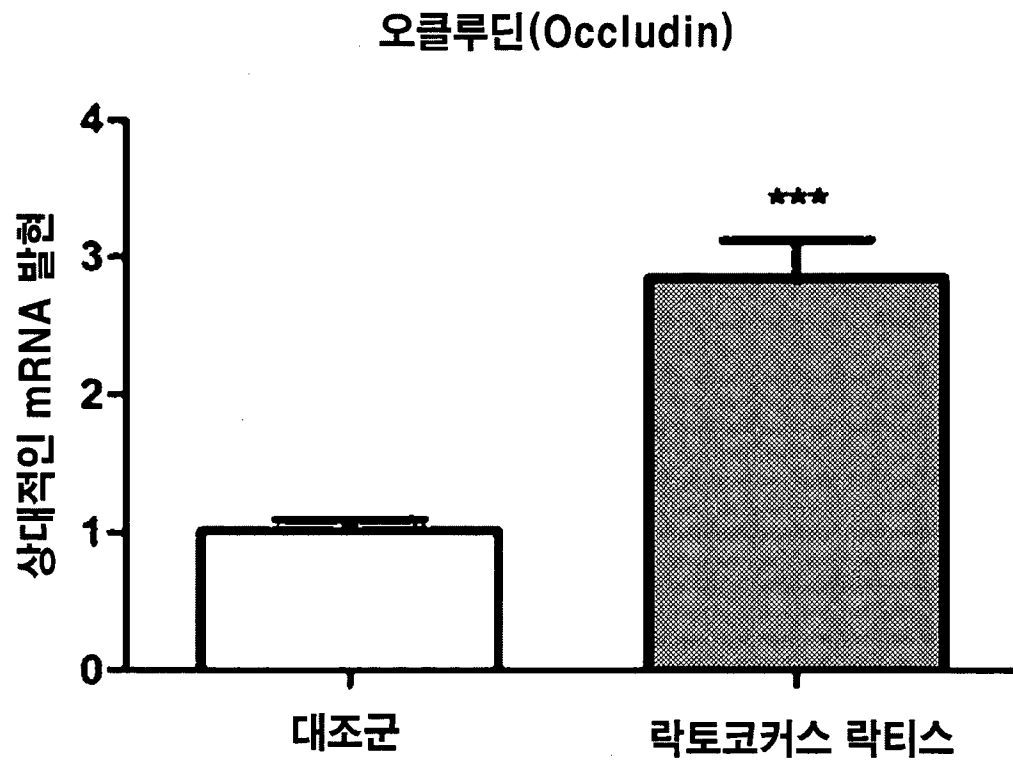
[도1]



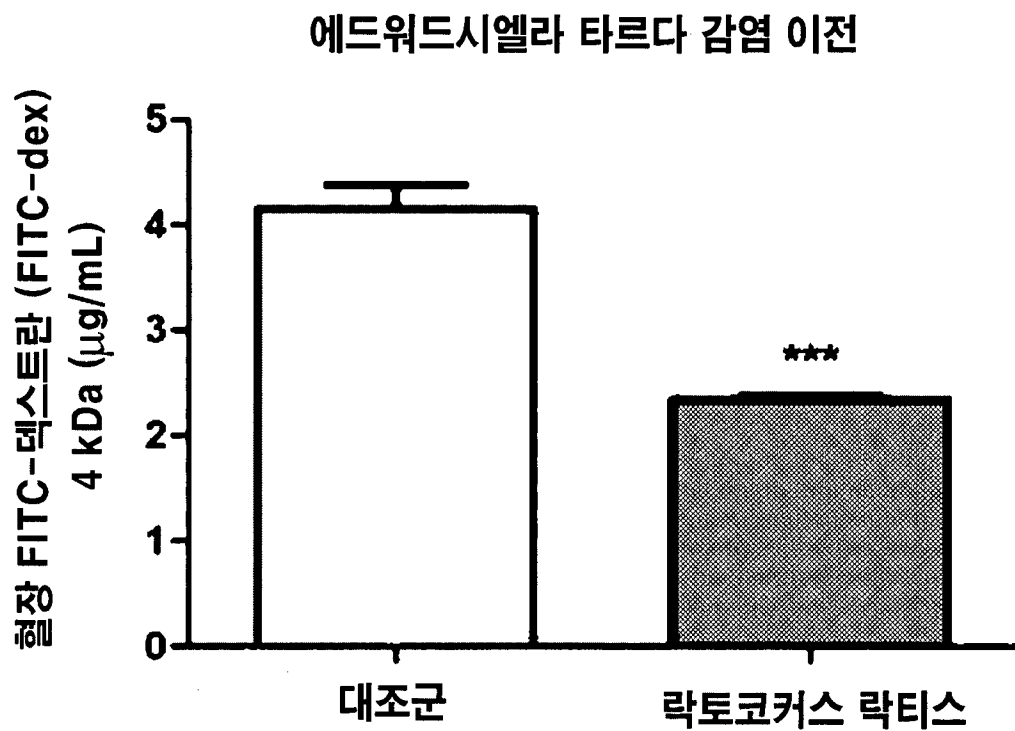
[도2]



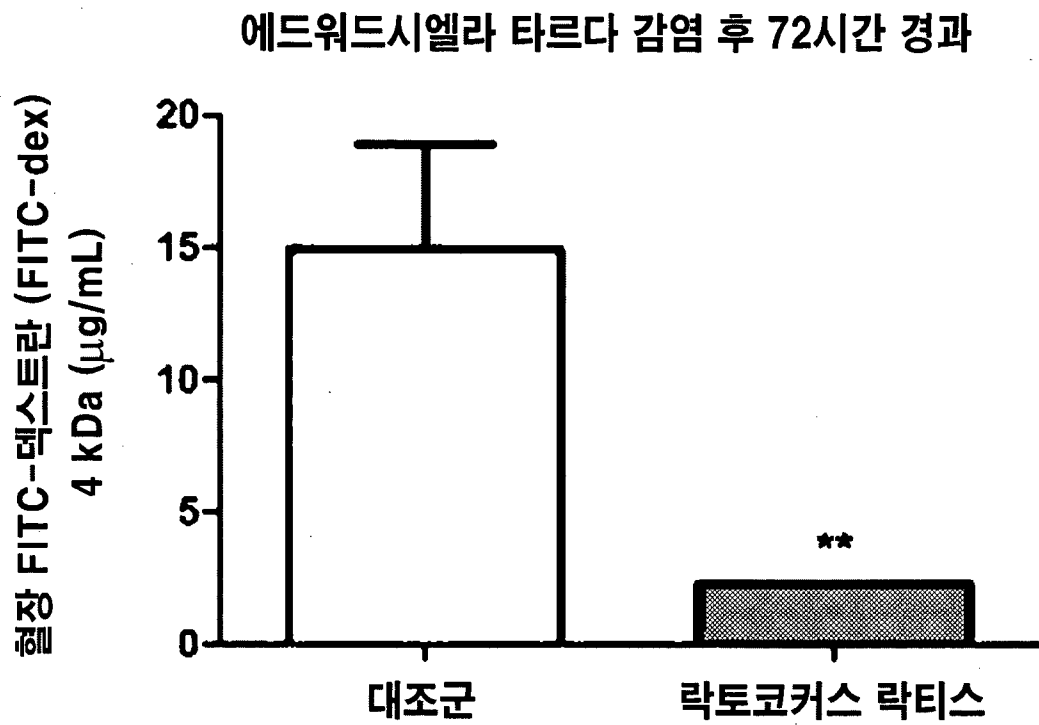
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

