(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0016042
(43) 공개일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/741 (2014.01) *A61K 35/745* (2014.01)
A61K 9/02 (2006.01) *A61P 15/02* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/741 (2013.01)
A61K 35/745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7034591
(22) 출원일자(국제) 2020년03월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2020/050380
(87) 국제공개번호 WO 2020/194319
국제공개일자 2020년10월01일
(30) 우선권주장
16/368,030 2019년03월28일 미국(US)
62/827,931 2019년04월02일 미국(US)

(71) 출원인
마이바이오틱스 파마 엘티디.
이스라엘, 7608804 레호보트, 2 이츠학 모다이 스트리트
(72) 발명자
다부쉬 데이비드
이스라엘, 7684100 미쉬마르 데이비드, 피.오 박스 182, 7에이 하마얀 스트리트
로즈너 도릿
이스라엘, 7051820 게데라, 79 벤 구리온 블러바드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

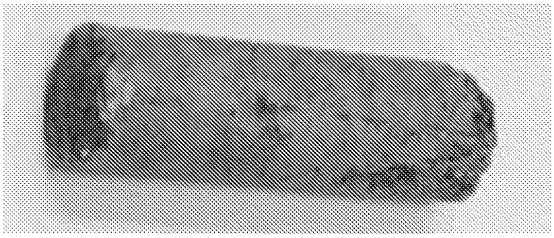
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **프로바이오틱 생물막 조성물 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 생물막 형태의 프로바이오틱 박테리아를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 여기서 생물막은 적어도 2개 박테리아 종을 포함한다. 본 발명의 조성물의 사용 방법, 및 이의 제조 방법이 추가로 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61K 9/02 (2013.01)
A61P 15/02 (2018.01)
A61P 31/04 (2018.01)
C12N 1/20 (2021.05)
C12N 1/205 (2021.05)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)
C12R 2001/225 (2021.05)
(72) 발명자
코헨 스테파니
이스라엘, 7772306 아쉬도드, 6/2 하르 아비탈 스트리트
엘리야후 힐라
이스라엘, 9728166 예루살렘, 4 테오도르 라비 스트리트

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 친유성 담체 및 *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 젠세니이*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아, 및 항생제 제제, pH 조정 제제, 또는 이들 둘 모두를 포함하는 제1 제제를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아 및 항생제 제제를 포함하는 상기 제1 제제가 상기 조성물 내에서 균질하게 분산되는, 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아가 상기 총 조성물의 10% 내지 50% (w/w)인, 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아가 입자에 부착되는, 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 입자가 씨드, MCC, 인산이칼슘, 다당, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 층을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 제2 층이 제2 친유성 담체, 제2 제제 또는 이들 둘 모두를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아의 방출이 상기 제2 제제의 방출보다 더 느린, 조성물.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 제1 제제 및 상기 제2 제제 중 어느 하나가 항생제인, 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 안정화제, 보존제, 윤활제, 점도 조정 제제, 완충 제제, 지방산, 및 이들의 조합을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아성 질증의 치료에서 사용을 위한, 조성물.

청구항 12

a. *파에칼리박테리움 프라우스니트지이* 그리고 *블라우티아 오베움*, *B1. 콕코이데스*, *박테로이데스 불가투스*, 및

*도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종;

b. *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 젠세니이*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종; 또는

c. *비피도박테리움 아돌레스센티스* 그리고 *Bif. 론굼 sub.론굼*, 및 *Bif. 브레베*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종

을 포함하는 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아

를 포함하는, 조성물.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 경구, 질, 직장, 및 국부로 이루어지는 군으로부터 선택된 전달 루트를 위하여 제형화된, 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 좌약의 형태인, 조성물.

청구항 15

필요로 하는 대상체에서 상기 상재균의 조절 방법으로서, 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에 투여하고, 이에 의해 상기 대상체에서 상기 상재균을 조절하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 상재균이 질 상재균, 창자 상재균, 또는 피부 상재균인, 방법.

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 조절이 상기 대상체의 상기 천연 상재균을 복원하는 단계인, 방법.

청구항 18

제 15 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 필요로 하는 대상체에서 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 장 및 대사 질환을 예방 또는 치료하기 위한, 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 장 및 대사 질환이 박테리아성 질증, 비뇨생식기 감염, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 결장직장암, 비만, 및 셀리악병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

a. 입자를 포함하는 성장 배지에 *L. 크리스파투스*를 접종시키는 단계;

b. *L. 크리스파투스*를 상기 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 단계 (a)로부터 *L. 크리스파투스*를 입자에 접종시키는 단계;

c. 단계 (b)의 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및

d. *L. 크리스파투스* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형성에 적당한 조건 하에서 단계 (c)의 상기 접종된 입자를 배양시키는 단계

를 포함하는, 제 1 항의 조성물의 제조 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가의 박테리아 종이 *L. 젠세니이*, *L. 가스세리*, 및 *L. 람노수스*로

이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 22

- 입자를 포함하는 성장 배지에 (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*로부터 선택된 제1 박테리아를 접종시키는 단계;

- 상기 제1 박테리아를 상기 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 상기 제1 박테리아를 상기 입자에 접종시키는 단계;

- 상기 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및

- (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*, 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형성에 적당한 조건 하에서 상기 접종된 입자를 배양시키는 단계

를 포함하는, 제 12 항의 조성물의 제조 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 제1 박테리아가 *L. 크리스파투스*인 경우 상기 적어도 하나의 추가의 박테리아 종이 *L. 젠세니이*, *L. 가스세리*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 상기 제1 박테리아가 *Bif. 아돌레스센티스*인 경우 상기 적어도 하나의 추가의 박테리아 종이 *Bif. 론굼 sub.론굼*, 및 *Bif. 브레베*로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 25

제 22 항에 있어서, 상기 제1 박테리아가 *F. 프라우스니트지이*인 경우 상기 적어도 하나의 추가의 박테리아 종이 *Bl. 오베움*, *Bl. 콕코이데스*. *Bac. 불가투스*, 및 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 제1 박테리아가 *F. 프라우스니트지이*이고 상기 접종 단계가 동시에 수행되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본원은 2019년 3월 28일 출원된 "PROBIOTIC BIOFILM SUPPOSITORIES" 명칭의 미국 특허 출원 번호 16/368,030, 및 2019년 4월 2일 출원된 "BIOFILM COMPOSITIONS AND METHODS OF PREPARING SAME" 명칭의 미국 가특허 출원 번호 62/827,931의 우선권을 주장하고, 이들의 내용 전체가 참고로 본원에 편입된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 프로바이오틱스 전달의 분야에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] **배경**

[0006] 건강한 미생물상(microbiota)은 넓은 스펙트럼의 병원균에 대한 내성, 필수 영양소의 생합성과 흡수, 그리고 건강한 창자 상피와 적절히 제어된 전신 면역성을 유지시키는 면역 자극을 포함하는 여러 이익을 숙주에게 제공하는 박테리아성 콜로니화를 필요로 한다. 장내 세균불균형이 발생하거나 공생이 파괴되는 경우에 미생물상 기능은 상실될 수 있거나 차질이 생길 수 있고, 그 결과, 병원균에 대한 증가된 감수성, 변경된 대사 프로파일, 또는 국소 또는 전신 염증 또는 자가면역성을 야기시킬 수 있는 전염증성 신호의 유도를 초래할 수 있다.

[0007] 비뇨생식기 감염 예컨대 효모 질염, 박테리아성 질증, 및 요로 감염은 매년 이환된 여성의 수의 면에서 여전히 주요 의료적 문제이다. 이들 질환은 생식 기관에 관련된 장기 및 조직에 영향을 미친다.

[0008] 40세 이하의 모든 여성의 경우, 미생물상은 락토바실러스에 의해 주로 나타나고, 여성의 비뇨생식기의 병리학적 합병증에서, 생물군집의 세균성 조성물은 락토바실러스 수의 감소 및 병원성 혐기성 미생물에 의한 대체를 특징으로 한다. 락토바실러스 감소를 특징으로 하는 질 상재균에서의 변화는 박테리아성 질증 증후군을 야기시키는 주요 인자인 것으로 보인다.

[0009] 항균 요법이 이들 감염 근절에 일반적으로 효과적이지만, 재발의 발생이 여전히 높다. 환자의 삶의 질은 영향받고, 많은 여성이 세균성 내성의 증가하는 발달로 인해 유효성이 감쇠되는 반복된 항균 제제의 주기에 의해 좌절된다.

[0010] 질 조직을 콜로니화시키는 능력을 가진 락토바실러스 균주의 정기 투여는 이러한 문제에 대한 대안적 해결책일 수 있다. 양쪽 항생제 및 프로바이오틱스의 치료를 병렬로 사용함으로써 기대되는 결과가 수득될 수 있음이 밝혀졌다.

[0011] 하부 생식기에서 가장 흔한 락토바실러스 sp.은 락토바실러스 이너스, 락토바실러스 크리스파투스, 락토바실러스 젠세니이 및 락토바실러스 가스세리이다. 최근에, 몇몇 연구는 락토바실러스가 생식기 감염을 예방하면서, 질 건강을 유지하는 중요한 역할에 관하여 지적하였다. 대장염에 관한 락토바실러스 크리스파투스의 유익한 효과가 또한 보고되었다.

[0012] 하지만, 시판되는 프로바이오틱스에서는 플랑크톤 분말 보충물 및 발효 식품 모두에서 건강 효과가 거의 나타나지 않고 직장 영역 또는 질 영역까지 생존가능한 박테리아를 직접적으로 전달하는 능력이 부족하다는 것이 수많은 연구에서 널리 확립된다.

[0013] 프로바이오틱스가 질 조건 하에서 생존가능하고, 성공적으로 콜로니화를 위해 질 상피 세포에 부착될 수 있는 질 좌약 제형이 필요하다. 게다가, 상기 제형이 치료에서 사용된 흔한 항생제에 저항성인 것이 중요하다.

발명의 내용

[0014] **개요**

[0015] 제1 양태에 따라, 제1 친유성 담체, *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 젠세니이*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아, 및 항생제 제제, pH 조정 제제, 또는 이들 둘 모두를 포함하는 제1 제제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0016] 또 다른 양태에 따라, (i) *파에칼리박테리움 프라우스니트지이* 그리고 *블라우티아 오베움*, *Bl. 콕코이데스*, *박테로이데스 불가투스*, 및 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종; (ii) *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 젠세니이*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종; 또는 (iii) *비피도박테리움 아돌레스센티스* 그리고 *Bif. 론굼 sub.론굼*, 및 *Bif. 브레베*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아를 포함하는 조성물이 제공된다;

[0017] 또 다른 양태에 따라, 필요로 하는 대상체에서 상재균의 조절 방법으로서, 대상체에게 본원에 개시된 조성물의 치료적 유효량을 투여하고, 이에 의해 대상체에서 상재균을 조절하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.

[0018] 또 다른 양태에 따라, 본원에 개시된 조성물의 제조 방법이 제공되고, 상기 방법은 (a) 입자를 포함하는 성장 배지에 *L. 크리스파투스*를 접종시키는 단계; (b) *L. 크리스파투스*를 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 단계 (a)로부터 *L. 크리스파투스*를 입자에 접종시키는 단계; (c) 단계 (b)의 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및 (d) *L. 크리스파투스* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막을 형성하기에 적당한 조건 하에서 단계 (c)의 접종된 입자를 배양시키는 단계를 포함한다.

[0019] 또 다른 양태에 따라,

[0020] - 입자를 포함하는 성장 배지에 (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*로부터 선택된 제1 박테리아를 접종시키는 단계;

[0021] - 제1 박테리아를 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 제1 박테리아를 입자에 접종시키는 단계;

[0022] - 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및

[0023] - (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*, 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형성하기에 적당한 조건 하에서 접종된 입자를 배양시키는 단계

[0024] 를 포함하는 본원에 개시된 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0025] 일부 구현예에서, 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아 그리고 항생제 제제를 포함하는 제1 제제는 조성물 내에서 균질하게 분산된다.

[0026] 일부 구현예에서, 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아는 총 조성물의 10% 내지 50% (w/w)이다.

[0027] 일부 구현예에서, 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아는 입자에 부착된다.

[0028] 일부 구현예에서, 입자는 씨드, MCC, 인산이칼슘, 다당, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0029] 일부 구현예에서, 조성물은 제2 층을 추가로 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 제2 층은 제2 친유성 담체, 제2 제제 또는 이들 둘 모두를 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아의 방출은 제2 제제의 방출보다 더 느리다.

[0032] 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 중 어느 하나는 항생제이다.

[0033] 일부 구현예에서, 조성물은 박테리아성 질증의 치료에서 사용하기 위한 것이다.

[0034] 일부 구현예에서, 조성물은 안정화제, 보존제, 윤활제, 점도 조정 제제, 완충 제제, 지방산, 및 이들의 조합을 추가로 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 조성물은 경구, 질, 직장, 및 국부로 이루어지는 군으로부터 선택된 전달 루트를 위하여 제형화된다.

[0036] 일부 구현예에서, 조성물은 좌약의 형태이다.

[0037] 일부 구현예에서, 상재균은 질 상재균, 창자 상재균, 또는 피부 상재균이다.

[0038] 일부 구현예에서, 본 방법은 필요로 하는 대상체에서 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 장 또는 대사 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것이다.

[0039] 일부 구현예에서, 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 장 및 대사 질환은 박테리아성 질증, 비뇨생식기 감염, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 결장직장암, 비만, 및 셀리악병으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0040] 일부 구현예에서, 대상체는 박테리아성 질증, 비뇨생식기 감염, 장내 세균불균형, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 또는 이들의 임의의 조합으로 이환되거나 발현할 위험에 처해 있다.

[0041] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *L. 크리스파투스*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *L. 젠세니이*, *L. 가스세리*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0042] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *Bif. 아돌레스센티스*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *Bif. 론굼 sub.론굼*, 및 *Bif. 브레베*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0043] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *F. 프라우스니트지이*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *Bl. 오베움*, *Bl. 콕코이데스*. *Bac. 불가투스*, 및 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0044] 일부 구현예에서, 제1 박테리아는 *F. 프라우스니트지이*이고 접종 단계는 동시에 수행된다.

[0045] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및/또는 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당업자 중 한명에 의해 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사한 또는 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 구현예의 실시 또는 테스팅에서 사용될 수 있어도, 예시적 방법 및/또는 물질은 아래 기재된다. 상충의

경우에, 정의를 포함하는, 특허 명세서가 지배할 것이다. 이 밖에도, 물질, 방법, 및 예는 단지 실례적이고 반드시 제한되기 위한 것이 아니다.

[0046] 추가 구현예 그리고 본 발명의 적용가능성의 전체 범위는 이후 주어진 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 하지만, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화 및 수정이 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이므로, 상세한 설명 및 구체적 실시예가, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내면서, 실례만의 방식으로 주어지는 것이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0047] **도면의 간단한 설명**

도 1a 내지 1g는 표 1에서 나타난 상이한 좌약 제형의 사진 (**도 1a 내지 1f**), 그리고 생물막 형태의 박테리아를 사용하여 생물막 내의 박테리아 성장을 최적화하기 위해 뿐만 아니라 생물막 형태의 박테리아 발달 단계를 평가하기 위해 수행된 실험적 설계 및 검정의 도표를 나타낸다. pH 내성 검정에서 pH 3.5의 사용은 여성 질에서 우세한 pH (pH 4-5)에 가까운 pH 값을 갖도록 결정하였다. 내성 검정에 대한 플랑크톤 박테리아의 감수성을 또한 결정하였고 결과는 이후에 생물막 형태의 박테리아 결과와 비교하였다. CFU, 콜로니 형성 단위 (**도 1g**).

도 2는 *L. 이너스*의 플랑크톤 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 3은 소-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 이너스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다. 호기성 및 혐기성 조건은 폭기 조건 (정적 대 진탕)으로서 또한 시험하였다.

도 4는 중간 규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 이너스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 5는 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 이너스* 박테리아의 항생제 내성의 막대 그래프를 나타낸다. '대조군'은 항생제에 노출되지 않았던 생물막 형태의 박테리아를 지칭한다. x-축에서 숫자는 μg/mL로 항생제 농도이다.

도 6은 *L. 젠세니이*의 플랑크톤 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 7은 2가지 교반 속도 (70 및 130 rpm)를 시험하는 동안 소-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 젠세니이* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 8은 2가지 교반 속도 (70 및 130 rpm)를 시험하는 동안 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 젠세니이* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 9는 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 젠세니이* 박테리아의 항생제 내성의 막대 그래프를 나타낸다. 'Ctrl'은 항생제에 노출되지 않았던 생물막 형태의 박테리아를 지칭한다. x-축에서 숫자는 μg/mL로 항생제 농도이다.

도 10은 *L. 크리스파투스*의 플랑크톤 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 11은 교반 및 비-교반 조건을 시험하는 동안 소-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 크리스파투스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 12는 중간 규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 크리스파투스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 13은 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 크리스파투스* 박테리아의 항생제 내성의 막대 그래프를 나타낸다. 'Ctrl'은 항생제에 노출되지 않았던 생물막 형태의 박테리아를 지칭한다. x-축에서 숫자는 μg/mL로 항생제 농도이다.

도 14는 *L. 가스세리*의 플랑크톤 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 15는 2가지 교반 속도 (70 및 130 rpm)를 시험하는 동안 소-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 가스세리* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 16은 중간 규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 가스세리* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 17은 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 이너스* 박테리아의 항생제 내성의 막대 그래프를 나타

낸다. 'Ctrl'은 항생제에 노출되지 않았던 생물막 형태의 박테리아를 지칭한다. x-축에서 숫자는 μg/mL로 항생제 농도이다.

도 18은 *L.람노수스*의 플랑크톤 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 19는 2가지 교반 속도 (70 및 130 rpm)를 시험하는 동안 소-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 람노수스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 20은 중간 규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 람노수스* 박테리아의 내산성의 막대 그래프를 나타낸다.

도 21은 중간-규모 설정에서 성장 이후 생물막 형태의 *L. 람노수스* 박테리아의 항생제 내성의 막대 그래프를 나타낸다. 'Ctrl'은 항생제에 노출되지 않았던 생물막 형태의 박테리아를 지칭한다. x-축에서 숫자는 μg/mL로 항생제 농도이다.

도 22는 2 개월 동안 좌약에서 생물막 형태의 박테리아 생존에 관한 크랜베리의 효과의 막대 그래프를 나타낸다. 'cran'은 크랜베리를 지칭하고; 'supp'는 좌약을 지칭한다.

도 23은 좌약에서 1 및 3 개월 후 생물막 형태의 습식- 및 건식- 박테리아의 생존의 막대 그래프를 나타낸다.

도 24는 생물막:부형제, 1:5 또는 1:10, 각각의 형태로 박테리아의 상이한 비를 함유하는 좌약에서 생물막 형태의 L. 플란타룸 박테리아의 생존의 막대 그래프를 나타낸다. 부형제는 2개 오일계 담체, 식물성 버터 및 코코아 버터로 구성하였다. 'supp'는 좌약을 지칭한다.

도 25는 생물막 형태의 L. 가스세리 박테리아의 성장에 관해 상이한 입자의 효과의 막대 그래프를 나타낸다.

도 26은 생물막 형태의 박테리아와 펜타사의 조합을 포함하는 좌약 제형의 안정성을 비교하는 막대 그래프를 나타낸다. 'supp A'는 L. 가스세리 및 L. 람노수스 생물막을 지칭한다. 'supp B'는 펜타사를 가진 L.가스세리 및 L. 람노수스 생물막을 지칭한다.

도 27은 공-배양 실험으로부터 수득된 경우에 L. 람노수스 (LRh), L. 젠세니이 (LJ) 및 L. 가스세리 (LG)의 콜로니 형태의 사진을 묘사한다. 박테리아 세포는 CFU 계수를 위하여 MRS 한천 플레이트에서 플레이팅하기 전에 와동에 의해 생물막으로부터 방출하였다.

도 28a 내지 28b는 박테리아 균주 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다. 박테리아성 개체군 성장 및 생물막 발달 (pH 내성)은 균주 성장 단독 및 함께 사이에서 비교하였다. 점선은 박테리아성 내성에 대하여 역치를 지칭하고; 이 지점 위에 생존하였던 박테리아성 개체군은 테스트된 처리에 저항성으로 간주된다. **(28a)**는 L. 람노수스 (LRh)와 균주 L. 젠세니이 (LJ)의 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다 **(28b)**는 L. 람노수스 (LRh)와 균주 L. 가스세리 (LG)의 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다.

도 29는 공-배양 실험으로부터 수득된 경우에 L. 람노수스 (LRh), L. 젠세니이 (LJ), L. 가스세리 (LG) 및 L. 크리스파투스 (LCr)의 콜로니 형태의 사진을 나타낸다. 박테리아 세포는 CFU 계수하기 위하여 MRS 한천 플레이트에서 플레이팅 전에 와동에 의해 생물막으로부터 방출하였다. 박테리아 콜로니의 이미지는 한천 플레이트로부터 채집하였다.

도 30a 내지 30b는 3개 또는 4개 박테리아 균주의 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다. 공-배양물 (현행 실험)에서 각 균주의 박테리아성 개체군 성장 및 생물막 발달 (pH 내성)은 그들의 성장 단독 (전자 실험)과 비교하였다. 점선은 박테리아성 내성에 대하여 역치를 지칭하고; 이 지점 위에 생존하였던 박테리아성 개체군은 테스트된 처리에 저항성으로 간주된다. **(30a)**는 L. 람노수스 (LRh), L. 젠세니이 (LJ) 및 L. 가스세리 (LG)의 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다 **(30b)**는 L. 람노수스 (LRh), L. 젠세니이 (LJ), L. 가스세리 (LG), 및 L. 크리스파투스 (LC)의 공-배양물의 막대 그래프를 나타낸다.

도 31은 다양한 입자 크기에 대한 L. 가스세리 (LG) 박테리아성 개체군의 친화도를 보여주는 막대 그래프를 나타낸다.

도 32a 내지 32c는 LCr **(32a)**, LG **(32b)**, 및 LJ **(32c)** 배양의 성장 및 발달 상태에 관해 상이한 pH 수준 및 동물계 및 비-동물계 성장 배지의 효과의 막대 그래프를 나타낸다.

도 33a 내지 33c는 *LG* **(33a)**, *LRh* **(33b)**, 및 *LCr* **(33c)** 박테리아성 개체군의 성장 및 발달 (pH 및 항생제 내성)에 관해 동물계 배지 및 비동물1 계 배지의 효과의 막대 그래프를 나타낸다. 점선은 박테리아성 내성에 대

하여 역치를 지칭하고; 이 지점 위에 생존하였던 박테리아성 개체군은 테스트된 처리에 대해 저항성으로 간주된다.

도 34는 *비피도박테리움 아돌레스센티스* (*BfA*)가 이의 성장 단독에 비교해서 *비피도박테리움 론굼 sub.론굼* (*BLL*) 및 *B. 브레베* (BfBr)로 공배양된 경우 72 시간 후에 개선된 성장을 갖는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

도 35는 *BfA*가 24 시간 및 72 시간의 성장 후 단독 성장과 비교해서 *BfBr*로 공배양된 경우 개선된 성장을 갖는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

도 36은 *BfA*가 *BLL*, *B. 아니말리스 (BB-12)*, 및 *BfBr*의 첨가 24 시간 전에 첨가되는 경우 더 높은 상대 존재량 (RA)을 갖는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다. *BfA*는 어느 한쪽 *BLL* 및 *BfBr* ('대조군')과 병렬로 또는 *BLL* 및 *BfBr* ('*BfA*에 대한 이점')의 첨가 24 시간 전에 첨가하였다.

도 37a 내지 37b는 다른 *비피도박테리움* 종 ('대조군')에 병렬로 이의 첨가에 비교해서 *BLL*, *BB-12* 및 *BfBr* ('*BfA*에 대한 이점')의 첨가 24 시간 전에 첨가되는 경우 *BfA* (~ 1 로그 차이)의 개선된 성장을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다. (**도 36**에서) 상대 존재량 값은 박테리아 카운트 (로그 척도)로 정상화된다.

도 38a 내지 38b는 다른 비피도박테리움 종 ('대조군')에 병렬로 이의 첨가에 비교해서 *BLL*, *BB-12* 및 *BfBr* ('*BfA*에 대한 이점')의 첨가 24 시간 전에 첨가되는 경우 *BfA* (~ 1 로그 차이)의 개선된 성장을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다. (**도 36**에서) 상대 존재량 값은 박테리아 카운트 (CFU/mL)로 정상화된다.

도 39는 *파에칼리바트세림 프라우스니트지이* (*FaP*)가 단독 성장에 비해, *블라우티아 오베움* (*B10*), *B1. 콕코이데스* (*B1C*) 또는 이들 둘 모두와 함께 공배양된 경우에 개선된 성장을 보여준다는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

도 40은 *FaP*가 단독 성장에 비해 *박테로이데스 불가투스* (*BaV*) 또는 BaV와 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스* (*DoF*) 둘 모두와 함께 공배양된 경우에 개선된 성장을 보여준다는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

도 41은 *FaP*가 어느 한쪽 *비피도박테리움 아돌레스센티스* (*BfA*) 또는 *박테로이데스 테타이오타오미크론* (*BaT*)와 함께 공배양된 경우에 개선된 성장을 보여준다는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

도 42는 *FaP*가 *박테로이데스 spp.* (우측 컬럼)으로 공배양되는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타내고, 분명한 이점은 유일한 *클로스트리디알레스 spp.* (좌측 컬럼)와 함께 공배양된 성장에 비교한 *FaP* 성장에서 관찰된다.

도 43a 내지 43b는 *FaP*가 72 시간의 성장 동안 플랑크톤 부분 **(43a)**에 비해 생물막 **(43b)**에서 더 높은 상대 존재량 (RA)을 갖는 것을 보여주는 수직 막대 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] **상세한 설명**

[0049] 일부 구현예에 따라, 본 발명은 생물막 형태의 적어도 하나의 박테리아를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0050] 일부 구현예에서, 생물막은 건조된 생물막 형태 또는 분말 생물막 형태이다. 일부 구현예에서, 생물막은 생물막 입자이다.

[0051] 본원에 사용된 경우에, 용어 "생물막 입자"는 생물막 형태 및 입자 형태의 박테리아 (예를 들면, 프로바이오틱 박테리아)를 지칭한다.

[0052] 일부 구현예에서, 조성물은 복수의 박테리아를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수는 1보다 큰 임의의 정수, 예를 들면, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6 등 또는 그 사이의 임의의 값 및 범위이다. 각 가능성은 본 발명의 별도 구현예를 대표한다.

[0053] 일부 구현예에서, 조성물 내에서 적어도 하나의 박테리아는 생물막을 생산한다. 일부 구현예에서, 조성물 내에서 모든 박테리아는 생물막을 생산한다.

[0054] 일부 구현예에서, 조성물은 플랑크톤 박테리아를 포함한다. 일부 구현예에서, 플랑크톤 박테리아는 생물막을 생산하지 않는다. 일부 구현예에서, 플랑크톤 박테리아는 박테리아를 생산하는 생물막에 비교시 소량의 생물막을

생산한다.

[0055] 일부 구현예에서, 조성물은 박테리아를 생산하는 생물막 및 플랑크톤 박테리아를 포함하고, 여기서 플랑크톤 박테리아는 박테리아를 생산하는 생물막에 의해 생산된 생물막 아래에, 생물막 위에, 또는 생물막 내에 점착, 포착, 병합 또는 포매된다.

[0056] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 생물막 형태의 프로바이오틱 박테리아는 생물막 형태의 박테리아 및 플랑크톤 박테리아의 혼합물을 포함한다.

[0057] **생물막 조성물**

[0058] 일부 구현예에 따라, 제1 친유성 담체, *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 젠세니이*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아, 및 항생제 제제, pH 조정 제제, 또는 이들 둘 모두를 포함하는 제1 제제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0059] 일부 구현예에서, 건조된 생물막 형태의 공-배양된 프로바이오틱 박테리아 그리고 항생제 제제를 포함하는 제1 제제는 조성물 내에서 균질하게 분산된다.

[0060] 일부 구현예에 따라, 조성물은 *파에칼리박테리움 프라우스니트지이* 그리고 *블라우티아 오베움*, *Bl. 콕코이데스*, *박테로이데스 불가투스*, *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형태의 박테리아를 포함한다.

[0061] 일부 구현예에 따라, 조성물은 *락토바실러스 크리스파투스* 그리고 *L. 가스세리*, *L. 이너스*, *L. 젠세니이*, *L. 람노수스*, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형태의 박테리아를 포함한다.

[0062] 일부 구현예에 따라, 조성물은 *비피도박테리움 아돌레스센티스* 그리고 *Bif. 론굼 sub.론굼*, *Bif 브레베* 및 이들의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막 형태의 박테리아를 포함한다.

[0063] 본원에 사용된 경우에, 용어 "프로바이오틱"은 다른 미생물의 성장을 또한 자극시킬 수 있는 유익한 또는 요구된 박테리아 균주, 특히 유익한 특성을 가진 것들 (예컨대 질 상재균 및 창자 상재균의 것들)을 지칭한다.

[0064] 일부 구현예에서, 생물막은 질 미소상재균에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다. 일부 구현예에서, 질 미소상재균에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주는 프로바이오틱 박테리아이다.

[0065] 일부 구현예에서, 생물막은 창자 미소상재균에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다. 일부 구현예에서, 창자 미소상재균에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주는 프로바이오틱 박테리아이다.

[0066] 일부 구현예에서, 생물막은 결장에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다. 일부 구현예에서, 생물막은 위장에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다. 일부 구현예에서, 생물막은 소장에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아는 *락토바실러스*, *비피도박테리움*, *사카로마이세스*, *엔테로콕쿠스*, *스트렙토콕쿠스*, *파에칼리박테리움*, *페디오콕쿠스*, *류코노스톡*, *바실러스*, *에스케리치아 콜리* 속, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0068] 창자-유래된 균주의 비제한적인 예는 *락토바실러스 람노수스 GG* (LGG), *스트렙토콕쿠스 써모필루스*, *락토바실러스 아시도필루스*, *비피도박테리움 락티스*, *비피도박테리움 브레베*, *비피도박테리움 론굼*, *비피도박테리움 인판티스*, *엔테로콕쿠스 파에시움*, *락토바실러스 플란타룸*, *락토바실러스 람노수스*, *프로피오니박테리움 푸루덴레이치이*, *비피도박테리움 브레베*, *락토바실러스 레우테리*, *락토바실러스 살리바리우스*, *비피도박테리움 인판티스*, *스트렙토콕쿠스 써모필레스*, 및 *파에칼리박테리움 프라우스니트지이*를 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, 생물막은 적어도 하나의 *락토바실러스* 박테리아 균주를 포함한다. *락토바실러스*의 비제한적인 예는 *락토바실러스 크리스파투스*, *락토바실러스 가스세리*, *락토바실러스 이너스*, *락토바실러스 젠세니이*, *락토바실러스 람노수스*, *락토바실러스 락토바실러스 람노수스 GG*, *락토바실러스 아시도필루스*, *락토바실러스 플란타룸*, *락토바실러스 파라카세이*, *락토바실러스 델브루엑키이 ssp. 불가리쿠스*를 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 프로바이오틱 박테리아는 질 조직을 콜로니화시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 프로바이오틱 박테리아는 플랑크톤 형태로 제공되는 유사한 박테리아에 비교해서 질 조직 콜로니화에서 더욱 능숙하다. 콜로

니화의 개선의 정도는, 투여로부터 예정된 시기 후, 플랑크톤 프로바이오틱 박테리아계 좌약으로 치료되는 대조군 조직에 비교해서 생물막 입자계 좌약으로 치료된 조직으로부터 샘플에서 박테리아의 수량에서 증가로서 측정될 수 있다.

[0071] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 박테리아는 전체가 참고로 본원에 편입된 PCT/IB2016/000933 및 PCT/IL2017/050587에서 개시된 경우에 방법을 사용하여 생성된다.

[0072] 일 구현예에서, 본원에 제공된 생물막을 생성하기 위한 하나 이상의 박테리아는 건강한 포유동물로부터 수득된다. 일 구현예에서, 박테리아는 동물 기증자로부터 수득된다. 일 구현예에서, 기증자는 그들의 건강 상태 및 영양 습관에 대하여 스크리닝될 수 있다. 일 구현예에서, 박테리아는 박테리아 균주에서 유래된다. 일부 구현예에서, 박테리아는 저장된 박테리아 균주에서 유래된다. 일부 구현예에서, 복수의 박테리아는 냉동된 박테리아 균주에서 유래된다. 일부 구현예에서, 박테리아는 냉동된 생물막에서 유래된다. 일부 구현예에서, 박테리아는 동결건조된 박테리아 균주에서 유래된다.

[0073] 일 구현예에서, 생물막은 저장된 미생물상 샘플에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다. 일 구현예에서, 생물막은 박테리아성 콜로니에서 유래된 적어도 하나의 박테리아 균주를 포함한다.

[0074] 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^4 내지 10^{15}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^4 내지 10^{14}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^4 내지 10^{13}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^4 내지 10^{12}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^5 내지 10^{15}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^5 내지 10^{14}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^5 내지 10^{13}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^5 내지 10^{12}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^6 내지 10^{15}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^6 내지 10^{14}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^6 내지 10^{13}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^6 내지 10^{12}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^7 내지 10^{15}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^7 내지 10^{14}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^7 내지 10^{13}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^7 내지 10^{12}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^8 내지 10^{15}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^8 내지 10^{14}이다. 일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^8 내지 10^{13}이다.일부 구현예에 따라, 조성물의 CFU는 10^8 내지 10^{12}이다.

[0075] 일부 구현예에 따라, 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 10^4 내지 10^{15} CFU의 양으로 조성물에서 존재한다. 일부 구현예에 따라, 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 10^8 내지 10^{12} CFU의 양으로 조성물에서 존재한다.

[0076] 일 양태에 따라, 락토바실러스 크리스파투스 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종의 비는 1:100000 - 100000:1, 1:10000 - 10000:1, 1:1000 - 100:1, 1:100 - 1000:1, 및 1:100 - 100:1로부터 선택된다.

[0077] 일부 구현예에 따라, 생물막은 내산성, 항생제-내성, 온도 내성, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 속성을 갖는다.

[0078] 일부 구현예에서, 조성물은 (i) 항생제 제제를 포함하는 제1 제제; (ii) 제1 친유성 담체, (iii) pH 조정 제제, 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아는 제1 친유성 담체, 제1 제제, 또는 이들의 임의의 조합 내에서 균질하게 분산되고, 이에 의해 제1 층을 형성한다.

[0080] ***친유성 담체***

[0081] 일부 구현예에 따라, 본 발명은 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아 및 제1 친유성 담체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아는 총 조성물의 10% 내지 50% (w/w)이다.

[0082] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아는 총 조성물의 12% 내지 50% (w/w), 15% 내지 50% (w/w), 20% 내지 50% (w/w), 12% 내지 48% (w/w), 12% 내지 15% (w/w), 12% 내지 42% (w/w), 12% 내지 40% (w/w), 15% 내지 48% (w/w), 15% 내지 40% (w/w), 20% 내지 50% (w/w), 20% 내지 48% (w/w), 20% 내지 45%

(w/w), 또는 20% 내지 40% (w/w)이다.

[0083] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 실온에서 고체이고 적어도 25℃의 융점을 각각 독립적으로 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 실온에서 고체이고, 그 사이 임의의 값을 포함하는, 적어도 26℃, 적어도 27℃, 적어도 28℃, 적어도 29℃, 적어도 30℃, 적어도 31℃, 또는 적어도 32 ℃의 융점을 특징으로 한다.

[0084] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 25℃ 내지 60℃의 범위에서 융점을 각각 독립적으로 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 그 사이 임의의 범위를 포함하는, 27℃ 내지 60℃, 30℃ 내지 60℃, 25℃ 내지 58℃, 25℃ 내지 55C, 27℃ 내지 58℃, 또는 27℃ 내지 55℃의 범위에서 융점을 각각 독립적으로 갖는다.

[0085] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 40% 초과의 포화 함량을 가진 하나 이상의 지방산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는, 그 사이 임의의 값을 포함하는, 41% 초과, 45% 초과, 48% 초과, 또는 50% 초과의 포화 함량을 가진 하나 이상의 지방산을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 하나 이상의 수소화된 지방을 포함한다.

[0087] 본원에 사용된 경우에 용어 "수소화된 지방"은 화학적으로 변경된 지방산을 지칭한다. 일반적으로, 수소화된 지방은 화학 구조가 변화되어 고체 지방이 된 오일이다.

[0088] 일부 구현예에서, 제2 친유성 담체는 제1 친유성 담체보다 적어도 5℃, 적어도 6℃, 적어도 7℃, 적어도 10℃, 적어도 12℃, 또는 적어도 15℃, 더 높은 융점을 갖는다.

[0089] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체는 제2 친유성 담체보다 적어도 5℃, 적어도 6℃, 적어도 7℃, 적어도 10℃, 적어도 12℃, 또는 적어도 15℃, 더 높은 융점을 갖는다.

[0090] 일부 구현예에서, 조성물의 융점은 수소화된 지방의 비를 제어함으로써 제어된다. 일부 구현예에서, 프로바이오틱 박테리아의 방출 시간은 조성물의 융점에 의해 제어된다. 일부 구현예에서, 제1 제제의 방출 시간은 조성물의 융점에 의해 제어된다. 일부 구현예에서, 제2의 방출 시간은 조성물의 융점에 의해 제어된다.

[0091] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아의 방출은 제2 제제의 방출보다 더 느리다.

[0092] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 카카오 버터, 팜유, 식물 왁스, 식물성 왁스, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 식물성 기원의 원료에서 유래된 지방산을 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 부형제는 알코올 예컨대 글리세롤, 폴리글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜과 지방산의 에스테르화에 의해, 그리고 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜과 식물성 오일 및 지방의 알코올분해에 의해 수득된다.

[0095] ***제제***

[0096] 일부 구현예에서, 조성물은 생물막 형태의 프로바이오틱 박테리아 친유성 담체 및 제1 제제를 제1 층의 형태로 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 제2 제제를 포함하는 제2 층을 추가로 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 중 어느 하나는 프로바이오틱 박테리아를 콜로니화하기 위하여 질 조직의 수용성을 개선시키는 제제이다. 예를 들어, 프로바이오틱 박테리아를 콜로니화하기 위하여 질 조직의 수용성을 개선시킬 수 있는 제제는 pH 조정제일 수 있다. 그러한 경우에 친유성 담체는 질 조직에서 국소 pH를 감소시키는데 충분한 pH 조정제의 양을 방출시키는데 사용된다. 바람직하게는, 질 pH는 본 발명의 프로바이오틱 박테리아의 콜로니화에 최적인 약 4로 조정되어야 한다. 일부 구현예에서, pH 조정제는 합성일 수 있다. 일부 구현예에서 pH 조정제는 천연-생물제일 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 중 어느 하나는 pH 조정 제제이다. 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 중 어느 하나는 4로 pH를 조정할 수 있는 pH 조정 제제이다.

[0099] 본 발명에 따른 pH 조정 제제의 비제한적인 예는 중탄산나트륨, 아스코르브산, 시트르산, 아세트산, 푸마르산, 프로피온산, 말산, 숙신산, 글루콘산, 타르타르산, 락트산, 붕산 및 크랜베리 추출물이다.

[0100] 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제 중 어느 하나는 항생제이다.

[0101] 일부 구현예에서, 항생제는 박테리아성 질증의 치료에 사용된 임의의 항생제이다. 항생제의 비제한적인 예는 메트로니다졸 (Flagyl), 클린다마이신 (Cleocin), 및 메트로니다졸을 포함한다.

[0102] 일부 구현예에서, 항생제는 먼저 방출된다. 일부 구현예에서, 프로바이오틱 박테리아는 항생제의 방출 후에 방출된다.

[0103] 일부 구현예에서, 조성물은 안정화제, 보존제, 윤활제, 점도 조정 제제, 완충 제제, 지방산, 및 이들의 조합을 추가로 포함한다.

[0104] 당업자는 담체 및 제제의 순서가 다양한 구현예에서 변경될 수 있다는 것 그리고 명칭 "제1 친유성 담체", "제1 제제" 및 "제2 친유성 담체", "제2 제제"가 참조의 편의를 위하여 본원에 사용된다는 것을 인식할 것이다. 가령, 일부 구현예에서 제2 제제는 제1 층 내의 생물막 형태의 프로바이오틱 박테리아 및 하나 이상의 친유성 담체와 혼합되도록 선택될 수 있다. 당업자는 다양한 시스템이 2개 초과 친유성 담체 또는 제제를 포함할 수 있다는 것을 추가로 인식할 것이다.

[0105] ***입자***

[0106] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 프로바이오틱 박테리아가 입자에 부착된다.

[0107] 일부 구현예에서, 입자의 평균 직경은 50 마이크로미터 내지 1,500 마이크로미터 (μm)의 범위이다. 일부 구현예에서, 입자의 평균 직경은 50 μm 내지 1,200 μm, 50 μm 내지 1,100 μm, 50 μm 내지 1,000 μm, 55 μm 내지 1,200 μm, 55 μm 내지 1,000 μm, 57 μm 내지 1,200 μm, 또는 60 μm 내지 1000 μm의 범위이고 , 그 사이 임의의 범위를 포함한다. 각 가능성은 본 발명의 별도 구현예를 대표한다.

[0108] 일부 구현예에서, 입자는 MCC, 인산이칼슘 (DCP), 씨드, 다당 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0109] 일부 구현예에서, 씨드는 크랜베리, 패션푸르츠, 허브, 귀리 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0110] 본원에 사용된 경우에, 용어 "다당"은, 글리코시드성 결합을 통해 서로에 결합되는 단량체성 단당으로부터 만들어진 임의의 탄수화물 중합체를 포괄한다.

[0111] 일부 구현예에서, 다당은 알기네이트를 포함하거나 상기로 이루어진다.

[0112] 일부 구현예에서, 입자는 식품 등급 입자를 포함하거나 상기로 이루어진다.

[0113] 일부 구현예에서, 식품 등급 입자는 다당, 지방 결정, 단백질, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하거나 상기로 이루어진다.

[0114] 일부 구현예에서, 지방 결정을 포함하는 식품 등급 입자는 글리세롤 모노올레에이트, 글리세릴 스테아릴 시트레이트, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0115] 일부 구현예에서, 다당을 포함하는 식품 등급 입자는 옥수수 전분, 전분 나노결정, 셀룰로스 나노결정, 미소결정성 셀룰로스, 나노- 또는 메틸 셀룰로스, 키틴, 키토산, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0116] 일부 구현예에서, 단백질을 포함하는 식품 등급 입자는 β-락토글로불린, 락토페린, 락토페린-다당, 소 혈청 알부민, 젤라틴, 분리 대두 단백질, 완두 단백질, 제인, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0117] 일부 구현예에서, 식품 등급 입자는 플라보노이드 (틸리로시드), 왁스, 쉘락-크산탄 검, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다.

[0118] 일부 구현예에 따라, 본원에 기재된 조성물에서 입자는 생물막 형성을 위하여 적응되거나, 구성되거나 형성에 적당하다.

[0119] 일부 구현예에서, 조성물은 질 투여를 위하여 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 직장 투여를 위하여 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 질 투여 및 직장 투여를 위하여 제형화된다.

[0120] ***조성물의 사용***

[0121] 일부 구현예에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체의 질을 콜로니화하도록 적응된다. 일부 구현예에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 직장을 콜로니화하도록 적응된다.

[0122] 일부 구현예에서, 조성물은 질증, 예를 들면 박테리아성 질증의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0123] 일부 구현예에서, 조성물은 비뇨생식기 감염, 장내 세균불균형, 또는 이들 둘 모두의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0124] 일부 구현예에서, 조성물은 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0125] 본원에 사용된 경우에, 용어 "장내 세균불균형 관련된 병태 또는 질환"은, 유기체의 조직 또는 바디의 세균성 상재균의 불균형을 특징으로 하는 임의의 질환 또는 그와 연관된 병태 또는 증상을 지칭한다.

[0126] 일부 구현예에서, 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 질환은 박테리아성 질증, 비뇨생식기 감염, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 및 크론병으로부터 선택된다.

[0127] 일부 구현예에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 효모 질염, 바이러스성 감염, 진균성 감염, 박테리아성 질증, 요로 감염 또는 이들의 임의의 조합의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0128] 일부 구현예에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체의 표적 부위에서 박테리아성 조성물의 조정, 또는 천연 질 상재균, 창자 상재균, 또는 이들 둘 모두의 복원에 사용하기 위한 것이다.

[0129] 일부 구현예에서, 대상체에서 박테리아성 조성물의 조정이라 함은 대상체에서 원치않는 박테리아의 감소 또는 제거를 지칭한다.

[0130] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아는 대상체에 대해 개인맞춤형으로 된다.

[0131] 일부 구현예에서, 조성물은 치료받아야 되는 대상체의 프로파일 (예를 들면, 개인화된 치료)에 따라 결정 또는 제조된다.

[0132] 일부 구현예에서, 조성물은 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 아시도필루스, 락토바실러스 델브루엑키이 subsp. 불가리쿠스, 비피도박테리움 브레베, 비피도박테리움 론굼, 및 파에칼리박테리움 프라우스니트지이로부터 선택된 하나 이상의 균주를 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 조성물은 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 아시도필루스, 락토바실러스 델브루엑키이 subsp. 불가리쿠스, 비피도박테리움 브레베, 비피도박테리움 론굼, 및 파에칼리박테리움 프라우스니트지이로부터 선택된 하나 이상의 균주를 포함하는 항-염증성 조성물이다.

[0134] 일부 구현예에서, 조성물은 질 투여를 위하여 제형화된다.

[0135] 일부 구현예에서, 조성물은 직장 투여를 위하여 제형화된다.

[0136] 일부 구현예에서, 조성물은 좌약의 형태로 제공된다.

[0137] 일부 구현예에서, 조성물은 질 좌약, 크림, 정제, 캡슐, 연고, 젤 또는 마이크로캡슐의 형태로 제공된다.

[0138] 일부 구현예에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 본원 전체에 기재된 바와 같은 임의의 질환, 의료적 병태, 또는 장애와 연관된 의료적 병태를 치료하기 위하여 투여될 수 있다.

[0139] 일부 구현예에서, 치료는 항생제 치료와 조합된다.

[0140] 일부 구현예에서, 치료는 예방성으로, 즉, 항생제 치료 후이다.

[0141] 일부 구현예에서, 질 조직은 좌약의 투여에 앞서 콜로니화 제제로 사전-치료되고, 여기서 사전-치료는 프로바이오틱 박테리아를 콜로니화하기 위하여 질 조직의 수용성을 개선시킨다.

[0142] ***방법***

[0143] 일부 구현예에 따라, 대상체에게 본원에 개시하는 조성물의 치료적 유효량을 투여하고, 이에 의해 대상체에서 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 질환을 예방 또는 치료하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 장내 세균불균형 관련된 병태 또는 질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

[0144] 일부 구현예에 따라, 대상체에게 본원에 개시된 조성물의 치료적 유효량을 투여하고, 이에 의해 대상체에서 천연 상재균을 복원하는 단계를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 천연 상재균을 복원하는 방법이 제공된다.

[0145] 일부 구현예에서, 대상체는 박테리아성 질증, 비뇨생식기 감염, 장내 세균불균형, 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 또는 이들의 임의의 조합으로 이환되거나 발현할 위험에 처해 있다.

[0146] 일부 구현예에 따라, 본 발명은, 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서, 비뇨생식기 감염, 장내 세균불균형, 또는 이들 모두를 치료하는 또는 상기의 위험을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0147] 일부 구현예에 따라, 본 발명은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 궤양성 대장염, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 또는 이들의 임의의 조합을 치료하는 또는 상기의 위험을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0148] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아의 방출은 친유성 담체 및 제제에 의해 제어된다.

[0149] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아의 방출은 친유성 담체의 용융 온도에 의해 제어된다. 일부 구현예에서, 친유성 담체의 상이한 혼합물은 조성물의 용융 온도를 미세조정하기 위해 사용될 수 있다.

[0150] ***생산 방법***

[0151] 일부 구현예에 따라, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 생산하는 공정을 제공한다.

[0152] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물을 제조하는 방법으로서, (a) 입자를 포함하는 성장 배지에 *L. 크리스파투스*를 접종시키는 단계; (b) *L. 크리스파투스*를 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 단계 (a)로부터의 *L. 크리스파투스*를 입자에 접종시키는 단계; (c) 단계 (b)의 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및 (d) *L. 크리스파투스* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막을 형성하기에 적당한 조건 하에서 단계 (c)의 접종된 입자를 배양시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0153] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *L. 젠세니이*, *L. 가스세리*, 및 *L. 람노수스*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0154] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물을 제조하는 방법은

[0155] - 입자를 포함하는 성장 배지에 (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*로부터 선택된 제1 박테리아를 접종시키는 단계;

[0156] - 제1 박테리아를 입자에 부착시키기에 적당한 조건 하에서 제1 박테리아를 입자에 접종시키는 단계;

[0157] - 입자에 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 접종시키는 단계; 및

[0158] - (i) *L. 크리스파투스*; (ii) *Bif. 아돌레스센티스*; 또는 (iii) *F. 프라우스니트지이*, 및 적어도 하나의 추가의 박테리아 종을 포함하는 생물막을 형성하기에 적당한 조건 하에서 접종된 입자를 배양시키는 단계

[0159] 를 포함한다.

[0160] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *L. 크리스파투스*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *L. 젠세니이*, *L. 가스세리*, 및 *L. 람노수스*로부터 선택된다.

[0161] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *Bif. 아돌레스센티스*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *Bif. 론굼 sub.론굼*, 및 *Bif. 브레베*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0162] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *F. 프라우스니트지이*인 경우 적어도 하나의 추가의 박테리아 종은 *Bl. 오베움*, *Bl. 콕코이데스*. *Bac. 불가투스*, 및 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0163] 일부 구현예에서, 제1 박테리아가 *F. 프라우스니트지이*인 경우 접종 단계는 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, 동시에라 함은 입자가 *F. 프라우스니트지이* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아로 동일한 시간에 접종되는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 동시에라 함은 입자가 그 사이 추가의 단계 없이 *F. 프라우스니트지이* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아로 접종되는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 동시에라 함은 입자가 그 사이 인큐베이션 시간 없이 *F. 프라우스니트지이* 및 적어도 하나의 추가의 박테리아로 접종되는 것을 지칭한다.

[0164] 일부 구현예에서, 본 발명은, (i) 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아를 제1 친유성 담체, 및 임의로 제1 제제와 혼합시키고, 이에 의해 혼합물을 형성하는 단계 및 (ii) 혼합물을 제1 가열 온도로 가열시키

는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 생산하는 방법 또는 공정을 제공한다.

[0165] 일부 구현예에서, 본 공정은 (iii) 제2 친유성 담체 및 제2 제제를 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0166] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아 및 제1 친유성 담체의 비는 1:1 내지 1:10, 1:2 내지 1:10, 1:5 내지 1:10, 1:1 내지 1:9, 1:1 내지 1:5의 범위이고 그 사이의 임의의 범위를 포함한다.

[0167] 일부 구현예에서, 생물막 형태의 적어도 하나의 프로바이오틱 박테리아 및 제1 제제의 비는 1:0.1 내지 10:1, 1:0.5 내지 10:1, 1:1 내지 10:1, 1:2 내지 10:1, 1:0.1 내지 9:1, 1:0.1 내지 8:1, 1:0.1 내지 1:1, 1:0.1 내지 2:1의 범위이고 그 사이의 임의의 범위를 포함한다.

[0168] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는, 그 사이 임의의 값을 포함하는, 40% 초과, 41% 초과, 45% 초과, 48% 초과, 또는 50% 초과의 포화 함량을 가진 하나 이상의 지방산을 포함한다.

[0169] 일부 구현예에서, 제1 친유성 담체 및 제2 친유성 담체는 하나 이상의 수소화된 지방을 포함한다.

[0170] 일부 구현예에서, 가열 온도는 하나 이상의 수소화된 지방의 용융 온도에 따라 결정된다.

[0171] ***일반***

[0172] 본원에 사용된 경우에 용어 "약"은 ± 10 %를 지칭한다.

[0173] 용어들 "포함하다", "포함하는", "포함한다", "포함한", "갖는" 및 그들의 활용형은 "비제한적으로 포함한"을 의미한다.

[0174] 용어 "으로 이루어지는은 "비제한적으로 포함한"을 의미한다.

[0175] 용어 "으로 본질적으로 이루어지는"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가의 구성성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있지만, 추가의 구성성분, 단계 및/또는 부분이 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적 및 신규 특징을 물질적으로 변경시키지 않는 경우만을 의미한다.

[0176] 단어 "예시적"은 "예, 사례 또는 실례의 역할을 하는"을 의미하기 위해 본원에 사용된다. "예시적"으로서 기재된 임의의 구현예는 반드시 다른 구현예보다 바람직하거나 유리한 것으로 해석되지 않아야 하고/거나 다른 구현예로부터 속성의 편입을 배제하지 않아야 한다.

[0177] 단어 "임의로"는 "일부 구현예에서 제공되고 다른 구현예에서 제공되지 않는"을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 본 발명의 임의의 특정한 구현예는 상기 속성들이 상충하지 않는 한 복수의 "임의적" 속성을 포함할 수 있다.

[0178] 본원에 사용된 경우에, 단수 형태 "한", "하나" 및 "상기"는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수의 지시물을 포함한다. 예를 들어, 용어 "한 화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은, 이들의 혼합물을 포함한, 복수의 화합물을 포함할 수 있다.

[0179] 본원 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 구현예는 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식으로의 설명은 단지 편리성 및 간결성을 위한 것으로 이해되어야 하고 본 발명의 범위에 엄격하게 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 따라서, 범위의 설명은 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라 그 범위 내에서 개별 숫자 값을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 범위 예컨대 1 내지 6의 설명은 하위범위 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 뿐만 아니라 그 범위 내에서 개별 숫자, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이것은 범위의 폭과 무관하게 적용한다.

[0180] 숫자 범위가 본원에 표시되는 모든 경우에서, 표시된 범위 내에서 임의의 인용된 숫자 (분수 또는 정수)를 포함함을 의미한다. 제1 표시 수와 제2 표시 수 어구 "사이의 범위/범위이다" 그리고 제1 표시 수 "부터" 제2 표시 수 "에 이르는 범위/범위이다"는 호환적으로 본원에 사용되고 제1 및 제2 표시된 수 그리고 그 사이 모든 분수 및 정수를 포함함을 의미한다.

[0181] 본원에 사용된 경우에 용어 "방법"은 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 실무자에 의해 공지된 방식, 수단, 기법 및 절차에 어느 한쪽 공지된, 또는 상기로부터 용이하게 개발된, 비제한적으로, 그들 방식, 수단, 기법 및 절차를 포함한 주어진 임무를 성취하기 위하여 방식, 수단, 기법 및 절차를 지칭한다.

[0182] 본원에 사용된 경우에, 용어 "치료"는 병태의 진행을 폐기, 실질적으로 억제, 둔화 또는 반전, 병태의 임상적

또는 심미적 증상을 실질적으로 호전 또는 병태의 임상적 또는 심미적 증상의 출현을 실질적으로 예방하는 것을 포함한다.

[0183] 본 발명의 특정 속성은 명확성을 위하여 별도 구현예로 기재되며, 하나의 구현예에서 조합으로 또한 제공될 수 있음이 인식된다. 반대로, 본 발명의 다양한 속성은 간결성을 위하여 하나의 구현예에서 기재되어 별도로 또는 임의의 적당한 하위-조합으로 제공되거나 또는 본 발명의 임의의 다른 기재된 구현예에서 적합하게 제공될 수 있다. 다양한 구현예에서 기재된 특정 속성은 구현예가 그들 요소 없이 효과를 나타낸다면, 그들 구현예의 필수적 속성으로 간주되지 않아야 한다.

[0184] 상기 서술된 경우에 그리고 아래 청구항 섹션에서 청구된 경우에 본 발명의 다양한 구현예 및 양태는 하기 실시예에서 실험적 뒷받침을 찾는다.

[0185] **실시예**

[0186] 일반적으로, 본원에 사용된 명칭, 및 본 발명에서 활용된 실험실 절차는 분자적, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기법을 포함한다. 상기 기법은 문헌에서 철저히 설명된다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 등, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 등, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 등. (eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에서 제시된 경우에 방법; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980) 참고; 이용가능한 면역검정은 특허 및 과학 문헌에서 폭넓게 기재되고, 예를 들어, 미국 특허 번호 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., 및 Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., 및 Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 및 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 등, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996) 참고; 이들 모두는 참고로 편입된다. 다른 일반 참고문헌은 본원 전체에 제공된다.

[0187] ***물질 및 방법***

[0188] *균주 및 배양 조건*

[0189] 본 연구에서 사용된 모든 균주는 ATCC 또는 DSMZ 중 어느 한 곳으로부터 구매하였다. 본 연구에서 사용된 균주는 *락토바실러스 크리스파투스* (DSM 20584), *락토바실러스 젠세니이* (DSM 20557), *락토바실러스 가스세리* (DSM), *락토바실러스 람노수스* (DSM/ATCC), *비피도박테리움 론굼 sub.론굼*, *비피도박테리움 브레베*, *비피도박테리움 아돌레스센티스*, *파에칼리박테리움 프라우스니트지이*, *블라우티아 오베움*, *블라우티아 콕코이데스*, *박테로이데스 불가투스*, *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스*, *박테로이데스 유니포르미스*, *루미노콕쿠스 그나부스*, *블라우티아 프로덕타*, *클로스트리듐 렙툼*, *클로스트리듐 (블라우티아) 콕코이데스*, 및 *블라우티아 (루미노콕쿠스) 오베움*이었다.

[0190] *L. 가스세리* 및 *L. 람노수스*는 산업적 생산 (NuCel by Procelys, France)을 위하여 맞춤화된 동물계 배지 (Himedia) 또는 비동물계 성장 배지에서 호기적으로 성장하였다.

[0191] *L. 젠센그피이* 및 *L. 크리스파투스*는 호기적으로 (90% N_2, 5%CO_2, 5% H_2 대기) 성장하였다. 혐기성 실험은 백트론 혐기성 워크스테이션에서 수행하였다.

[0192] *플랑크톤 배양*

[0193] 생물막 형태의 박테리아 내성 검정에 앞서, 플랑크톤 박테리아의 내산성 및 산도 및 항생제 내성을 결정하였다. 낮은 pH 검정의 경우, 특정 균주의 생물막에 있는 박테리아 수에 기반할 때 10^5 내지 10^9 콜로니 형성 단위(CFU)/mL를 달성하도록 질 박테리아의 밤새 배양물을 희석하였다. 생물막 형태의 박테리아에 대해 실시된 절차와 유사하게, 플랑크톤 박테리아를 37 ℃에서 1 시간 동안 상이한 산도에 노출하였다. 인큐베이션 종료시에 샘플을 원심분리 (최대 속도, 2 분)하였고 상청액을 제거하였다. 그 다음에, 박테리아 펠렛을 인산염 완충된 염수(PBS)×1에 재현탁한 다음 플레이팅하고 CFU 계수하였다.

[0194] 항생제 검정의 경우, 밤새 배양물을 0.13의 최적 시작 밀도 (OD)로 희석하였다. 100 μl의 배양물을 한천 플레이트에 균질하게 도말하였고 15 분 동안 방치하고 건조시킨 다음 항생제 MIC 스트립 (Himedia)을 적용하였다. 플레이트는 37 ℃에 24 시간 동안 인큐베이션한 다음에 최소 억제성 농도 (MIC) 값을 결정하였다.

[0195] *생물막 형태의 박테리아 배양*

[0196] *단일 균주 (단일배양)*

[0197] 락토바실러스 sp.의 배양은 글리세롤 원액 (12.5%)에서 시작하였고, 특정 균주에 기반하여, 호기성 또는 혐기성 조건에서 37 ℃, 150-180 rpm으로 밤새 인큐베이션하였다. 배양물은 최종 생물막 배양물에 대하여 0.05의 OD600으로 희석하였다. 생물막 형태의 박테리아 배양물은 이 전체가 참고로 본원에 편입되는, WO2016181228A2에서 기재된 경우에 수득하였다.

[0198] 생물막 형태의 박테리아를 연속 진탕하에 37 ℃에 성장시켰다. 생물막 형태의 박테리아의 모든 실험은 소-규모 (30 mL의 부피) 또는 중간-규모 (2 L의 발효조에서 250 mL 또는 500 mL의 부피)의 실험실-규모 생산에서 실시하였다. 생물막 형태의 박테리아 성장의 분석은 총 72 시간 동안 매 24 시간 인큐베이션마다 실시하였다. 배지는 매일 신선 배지로 교체하였고 생물막에서 박테리아 수를 정량하였다. 생존가능한 세포의 측정은 한천 플레이트에서 CFU를 계수함으로써 행해졌다. 추가적으로, 생물막 형태의 박테리아의 발달 단계는 생물막 형태의 박테리아를 극한 조건 예컨대 낮은 pH 및 항생제에 노출시킴으로써 테스트하였다 (추가 상세에 대하여 'pH 및 항생제 내성 검정' 섹션 참고). 독립-생활 박테리아를 능가하는 생물막 형태의 박테리아의 이점을 입증하기 위해 결과를 이후 플랑크톤 박테리아와 비교하였다.

[0199] 생물막 형태의 박테리아 성장을 위한 최상 조건을 수득하기 위해 몇몇 실험을 (상기 기재된 방법 이후) 실행하였다:

[0200] 교반 - 생물막 형태의 박테리아의 성장 및 발달 (pH에 대한 내성)을 정적 (교반 없음)과 연속 진탕 조건 (70-80 rpm) 사이에서 또는 (실험에 기반된) 2가지 교반 속도 70-80 rpm과 130 rpm 사이에서 비교하였다.

[0201] 인큐베이션 시간 - 생물막 형태의 박테리아의 성장 및 발달 (pH에 대한 내성)을 72 시간동안 매 24 시간마다 조사하였다.

[0202] 입자 크기 - 80 내지 1000 μM 범위 크기의 상이한 입자 상에서 생물막 형태의 박테리아 성장을 시험하였다: 미소결정성 셀룰로스 (MCC) (80 내지 150 μM), 미소결정성 셀룰로스: 인산이칼슘 (MCC:DCP) (1:1, ~100 μM), 크랜베리 (500 내지 600 μM), 알기네이트 (1,000 μM). 생물막 형태의 박테리아를 24 시간 동안 성장시켰고 그들의 성장 발달에 대하여 사정하였다.

[0203] 매트릭스:배지 비 - 24 시간 동안 생물막 형태의 박테리아 성장는 매트릭스 (MCC) 대 배지의 비의 함수로서 평가하였다. 매트릭스 대 배지의 하기 비는 비교하였다: 매트릭스는 배지로부터 어느 한쪽 2%, 5%, 10% 또는 20% 이었다.

[0204] 플랑크톤 박테리아의 첨가 후 교반 대 교반 없음 - 매트릭스에 대한 플랑크톤 박테리아, 그리고 생물막 성장의 형태로 후속적으로 박테리아의 부착에 관한 혼합의 효과는 시험하였다. 2개 조건은 실험의 개시에 플랑크톤 박테리아의 첨가 이후 비교하였다: 모든 실험 (24 시간 인큐베이션) 동안 연속 교반 대 첫 2시간에 (이 시간 동안 2회 10초의 부드러운 혼합과 별개로) 교반 없음 그리고 그 이후 실험의 끝까지 연속 교반.

[0205] *pH 및 항생제 내성 검정*

[0206] 배지-매트릭스 용액으로부터의 샘플을 시험관으로 이동하였고 그 다음 500 rpm으로 3 분 동안 실온에서 원심분리하였다. 후속적으로, 상청액을 폐기하였고, 펠렛을 PBS로 세정하여, 원심분리 동안 침전하였던 플랑크톤 박테

리아를 제거하였다. 샘플을 500 rpm으로 3 분 동안 실온에서 재차 원심분리하였다. 원심분리 이후, 상청액을 제거하였고 각 처리 (pH 또는 항생제)의 경우 생물막 형태의 박테리아 1 g을 사용하였다. pH 내성 검정의 경우, 생물막 형태의 박테리아는 37 ℃, 100 rpm에 1 시간 동안 상이한 산도: pH 2 및 3.5 (PBS ×1의 pH는, 2M HCl을 사용하여, 2 및 3.5, 각각으로 조정되었음)로 5 mL PBS에 1 시간 동안 노출하였다. 동일한 조건으로, 5 mL PBS 7 (주위 pH)에서 인큐베이션된 생물막 형태의 박테리아는 대조군으로서 적용하였다. 항생제 검정의 경우, 생물막 형태의 박테리아 1 gr을 항생제의 3개 순차적 농도에 노출하였으며, 상기 농도는 특정 균주의 MIC 값 훨씬 높았다. 생물막 형태의 박테리아는 37 ℃에 24 시간 동안 항생제를 포함하는 또는 항생제를 포함하지 않는 (후자는 대조군으로서 사용되었음) 5 mL 성장 배지에서 인큐베이션하였다.

[0207] 인큐베이션 종료에, 생물막 형태의 박테리아를 10 mL PBS x1로 세정하였다. 원심분리 (500 rpm, 3 분) 이후, 9 mL를 제거하였고 1mL 잔류 PBS 용액에 있는 생물막 형태의 박테리아를 고속으로 1.5 분 동안 와동시켜, 입자에 부착되었던 박테리아를 생물막으로부터 방출시켰다.

[0208] ***분석 방법***

[0209] 내성 검정 종료시에 CFU를 각결정하였다. 먼저, 일련의 희석을 실행하였고, 박테리아는 MRS 한천 플레이트에 3중으로 플레이팅하였다. 플레이트는 48 내지 72 시간 동안 균주 성장 조건 (상기 참고)에 기반한 호기성 또는 혐기성 조건으로 37 ℃로 인큐베이션한 후에 CFU 계수하였다.

[0210] ***실험 절차***

[0211] 박테리아 성장을 최적화시키기 위해 2개 유형의 실험 설계, 즉, 소-규모 실험과 중간-규모 실험을 실시하였다. 소-규모 실험으로부터 수득된 결과에 기반하여, 본 발명자들은 중간-규모 실험을 위한 조건을 정의한다. 간략한 절차: 생산된 박테리아성 개체군 성장 및 발달 상태는 72 시간의 총 인큐베이션 시간 동안 매 24 시간의 인큐베이션마다 시험하였다. 배지는 매일 신선 배지로 교체하였고 생물막 ㄴ내의 박테리아 수를 정량화하였다 (이후 pH 7 처리). 추가적으로, 입자에서 생물막의 형성 및 발달은 박테리아성 개체군을 극한 조건 예컨대 산성 pH (pH 3.5 및 2), 여성 질에서 우세한 pH (pH 4 5)에 가까운 pH 값, 및 항생제 (CB, 카베니실린; CIP, 시프로프록사신; VAN, 반코마이신; NVB, 노보비오신)에 노출시킴으로써 테스트하였다. pH 내성 검정은 매일 실행하였고, 항생제 검정은 48 시간 또는 72 시간의 인큐베이션 이후 수행하였다. 이들 검정으로부터의 결과는 독립-생활 박테리아를 능가하는 생산된 박테리아성 개체군 기술의 이점을 보여주기 위해 동일한 종의 플랑크톤 박테리아에 이후에 비교하였다. 추가적으로, 박테리아를 매트릭스에 더욱 양호하게 부착시키기 위해, 매트릭스를 가진 발효조에 플랑크톤 박테리아의 첨가 후 첫째 날에 발효조를 (1 시간 후 부드럽게 혼합하면서) 37℃로 2 시간 동안 정적 조건으로 유지하였다. 박테리아 수율의 ~ 1 로그 변화는 박테리아 플레이팅 및 CFU 계수의 기술적 오류 범위 내인 것으로 간주하였고 비-유의미한 차이로 설명하였다. 테스트된 박테리아 균주는 표 1에 나타난다.

[0212] 박테리아성 개체군을 생산한다

표 1. 테스트된 박테리아 균주

균주	유형	균주 수
락토바실러스 ***젠세니이***	혐기성	DSM 20557
락토바실러스 ***크리스파투스***	혐기성	DSM 20584
락토바실러스 ***이너스***	호기성	DSM 13335
락토바실러스 ***가스세리***	호기성	ATCC 33323
락토바실러스 ***람노수스***	호기성	

[0213]

[0214] ***박테리아 균주 공-배양***

[0215] 2개 이상의 박테리아 균주를 함께 공-배양했을 때, 균주를 입자:배지 혼합물에 따로 첨가하고 각 박테리아 균주를 혼합물에 첨가한 시점 사이에 현탁 시간을 가졌다. 혼합물에 박테리아 균주를 첨가한 후에 잘 혼합하였고,

30 분 내지 1 시간 후 또 다른 균주를 첨가하였다. 더 많은 박테리아 균주가 동일한 혼합물에서 공-배양되는 경우에는 상기 공정을 반복하였다. 박테리아의 첨가 순서는 혐기성/호기성 균주 또는 저속/고속-성장 균주에 기반하여 결정하였고, 이에 따라 혐기성 또는 저속-성장 균주는 호기성 또는 고속-성장 균주 전에 첨가하였다.

[0216] ***단일-배양***

[0217] 단일 균주

[0218] 실험에서 사용한 각 박테리아 균주의 배양은 -80 ℃ 원액 (5% DMSO)으로부터 시작하였고 밤새 혐기성 조건에서 37 ℃로 인큐베이션하였다. 달리 언급되지 않는 한, 최종 생물막 배양물을 위하여 배양물을 0.05 OD_{600} (*FaP*, 0.03)로 희석하였다. 각 실험에서 단일-배양물은 성장 배지 (*BfA*, 비피도박테리움 배지 또는 식품-등급+카제인; *FaP*, YCFAC 또는 RCM), 20% 단일-배양물 기술 입자 (MCC:DCP, 1:1) 및 밤새 배양한 플랑크톤 박테리아로 이루어진다. 단일-배양은 연속 진탕 조건 (소-규모, 80 rpm; 발효기, 300 rpm) 또는 정적 조건 (소-규모로만)으로 37 ℃에서 성장시켰다. 모든 실험은 혐기성 글로브 박스에서 거행되었지만, *비피도박테리움* spp.의 경우에는 성장 배지가 일반적으로 호기성이었고 *파에칼리박테리움*을 이용한 실험의 경우에는 혐기성이었다. 연속 진탕이 이용될 때, 용기를 정적 조건에서 먼저 5 시간 방치하여 박테리아를 매트릭스에 부착시켰다. 모든 단일-배양 실험은 소-규모 (50 또는 60 mL의 부피) 또는 발효 (3 L의 부피) 중 어느 하나의 실험실-규모 생산으로 실시하였다

[0219] 단일-배양 성장의 분석은 매 ~24 시간 인큐베이션마다 실시하였다. 각 날짜에 달리 언급되지 않는 한, 배지를 신선한 배지로 교체하였고 생물막 내의 박테리아 수를 정량화하였다. 생존가능한 세포의 측정은 한천 플레이트에서 CFU를 계수함으로써 행해졌다. 일부 경우에, 독립 생활 박테리아를 능가하는 단일-배양 기술의 이점을 입증하기 위해 결과를 플랑크톤 박테리아와 비교하였다.

[0220] *복수-박테리아의 조합*

[0221] 몇몇 박테리아 균주가 함께 공-배양될 때, 균주는 각 균주에 대하여 0.03 또는 0.05의 초기 OD에서 동시 첨가하였다. 시간이 테스트 파라미터인 경우에는 저속-성장 박테리아를 클러스터 내의 다른 종 24시간 이전에 첨가하였다. OD가 실험의 테스트 파라미터인 경우에는 저속-성장 박테리아를 클러스터 (초기 OD 0.5) 내의 다른 박테리아 종보다 10 배 더 많이 첨가하였다. 모든 다른 실험적 설정 및 분석은 단일 균주에 대하여 기재하였다.

[0222] *낙하 검정에 의한 박테리아 정량화*

[0223] 배지-매트릭스 용액으로부터의 샘플을 시험관으로 이동하였고 그 다음 500 rpm으로 3 분 동안 실온에서 원심분리하였다. 후속적으로, 상청액을 폐기하였고, 펠렛을 PBS로 세정하여, 원심분리 동안 침전하였던 플랑크톤 박테리아를 제거하였다. 샘플은 500 rpm으로 3 분 동안 실온에서 재차 원심분리하였다. 원심분리 이후, 상청액을 제거하였고 각 처리 (pH 또는 항생제)의 경우에 샘플 1 g을 사용하였다. 제3 세정은 10 mL PBS ×1로 행해졌다. 원심분리 (500 rpm, 3 분) 이후, 9 mL를 제거하였고 1 mL 잔류 PBS 용액에 있는 생물막은 고속으로 1.5 분 동안 와동시켜, 입자에 부착되었던 박테리아를 생물막으로부터 방출시켰다.

[0224] *분석 방법*

[0225] CFU를 결정하기 위해, 일련의 희석을 실행하였고, 박테리아는 특정 한천 플레이트에서 3중으로 플레이팅하였다. 플레이트를 48 내지 72 시간 동안 균주 성장 조건 (상기 참고)에 기반한 혐기성 조건에서 37 ℃로 인큐베이션한 후에 CFU 계수하였다.

[0226] 공-배양물 샘플을 공-배양물에 있는 각 박테리아 균주의 상대 존재량을 수득하기 위해 NGS 분석에 보냈다. 해당하는 경우에는, 하기 등식에 따라 상대 존재량 결과를 박테리아 카운트 (CFU/mL)로 정상화하였다:

[0227] "각 박테리아의 RA% * 총 박테리아 수 = 특정 종 박테리아 수".

[0228] **실시예 1**

[0229] **좌약 제형**

[0230] 좌약 제형은 약학적으로 허용가능한 부형제 (오일계 담체) 및/또는 프리바이오틱 제제 (예컨대, 크랜베리, 아스코르브산 및 항생제)에서 혼합된, 전술한 바와 같이 성장한 생물막 형태의 박테리아로 이루어진다. 사용된 생물막 형태의 박테리아는 생물막 형태의 동결건조된 (건식) 또는 습식 박테리아 중 하나이었다. 좌약 제형에서, 1:5 비의 식물성 (팜) 버터 및 코코아 버터를 50 내지 52 ℃에서 열 중탕하여 용융하였다.

[0231] 온도는 버터를 손상시키는 온도를 초과 (60 ℃ 초과)하지 않도록 면밀하게 모니터링하였다. 그 다음에, 2 내지 3 방울의 레시틴을 용융된 버터에 첨가하여 혼합물의 균질성을 도왔다. 혼합물을 25 ℃로 냉각하도록 방치한 다음, 생물막 (건식) 형태의 박테리아 및/또는 프리바이오틱 서브스턴스 (예컨대 크랜베리, 아스코르브산 등)를 왁스 (생물막 형태의 박테리아 및 프리바이오틱) 버터 각각에 박테리아의 상이한 할당량으로 첨가하였다. 이러한 최종 조성물을 30 ℃로 재가열하였고 질 좌약 주형에 부었다. 좌약은 사용까지 4 ℃에 저장하였다. 좌약의 용해를 모방하기 위해, 좌약을 인큐베이터에서 37 ℃로 놓았다. 결과를 **표 2** 및 **도 1a 내지 1f**에 요약한다.

표 2

좌약 제형:	오일	MCC	크랜베리	실례	용융 시간	좌약내 활성 %
2	Kahlwax 6240 4 g	700 mg	300 mg	**도 1a**	130 분	20%
3	코코아 버터 3.8 g 팜 버터 0.95 g	0.15 g	0.1 g	**도 1b**	15 분	5%
4	코코아 버터 4 g 팜 버터 1 g	700 mg	300 mg	**도 1c**	20 분	20%
5	코코아 버터 2.4 g 팜 버터 0.6 g	1.4 g	600 mg	**도 1d**	40 분	32%
6	코코아 버터 1.6 g 팜 버터 0.4 g	2.1 g	900 mg	**도 1e**	붕괴	60%
7	Kahlwax 6240 2 g 코코아 버터 1.15 g 팜 버터 0.85 g	700 mg	300 mg	**도 1f**	30 분	20%

[0232]

[0233] **실시예 2**

[0234] **박테리아 성장 최적화**

[0235] **실험 절차:** 생물막 형태의 박테리아의 적용은 소-규모 이어서 중간-규모 실험의 실험적 설계의 2개 유형으로 테스트하였다 (**도 1g**). 소-규모 실험으로부터 수득된 결과에 기반하여, 본 발명자들은 중간-규모 실험을 위한 조건을 한정한다. 절차 요약: 생물막 형태의 박테리아 성장 및 발달 상태를 총 72 시간 동안 매 24 시간 인큐베이션마다 시험하였다. 배지는 매일 신선 배지로 교체하였고 생물막 내의 박테리아 수를 정량화하였다 (이후 pH 7 처리). 추가적으로, 입자 상에서의 생물막의 형성 및 발달은 생물막 형태의 박테리아를 극한 조건 예컨대 산성 pH (pH 3.5 및 2) 및 항생제 (CB, 카베니실린; CIP, 시프로플록사신; VAN, 반코마이신; NVB, 노보비오신)에 노출시킴으로써 테스트하였다. pH 내성 검정을 매일 실행하였고 항생제 검정은 48시간 또는 72 시간의 인큐베이션 이후에 수행하였다. 이들 검정으로부터의 결과는 이후에 플랑크톤 박테리아와 비교하여, 독립-생활 박테리아를 능가하는 생물막 형태의 박테리아의 이점을 보여주었다.

[0236] 테스트된 각 박테리아 균주의 경우에 다음과 같은 결과가 제시된다:

[0237] - 플랑크톤 성장;

[0238] - 소-규모 설정에서 생물막 형태 박테리아의 성장의 최적화;

[0239] - 중간-규모 설정에서 생물막 형태 박테리아의 성장의 최적화.

[0240] 결과에 관한 설명에서, 박테리아 수율의 ~ 1 로그 변화는 박테리아 플레이팅 및 CFU 계수의 기술적 오류 범위에 있는 것으로 간주하고, 그에 따라 유의미하지 않은 차이로 설명된다.

[0241] 플랑크톤 박테리아는 pH 7에서 ~10^6 세포/mL의 알맞은 박테리아 수율을 생산하였다 (대조군, **도 2**). pH 3.5에서의 박테리아 수율은 대조군에 필적하였다. 하지만, 더 높은 산성 조건 (pH 2)에서 플랑크톤 박테리아는 생존하지 못했다. 최종적으로, 항생제에 대한 노출은 64 μg/mL의 CB 및 16 μg/mL의 NVB 및 VAN에 4 μg/mL의 MIC를 보여주었다 (**표 3**).

표 3. 플랑크톤 LI. 값에 대하여 상이한 항생제의 MIC는 μg/mL로 표현된다

[0242]

박테리아\ABX	CB	NVB	VAN
락토바실러스 이너스	64	16	4

[0243] ***생물막 형태의 락토바실러스 이너스 (LI) 박테리아 - 소-규모 실험***

[0244] 소-규모 실험으로부터의 결과는 적당하게 교반 (100 rpm)되는 호기성 조건에서 매트릭스와 함께 48 시간 인큐베이션한 후에 최고 박테리아 수율이 달성되었음을 보여주었다. 플랑크톤 박테리아에 반대로, 생물막 형태의 박테리아는 교반된 및 비-교반된 조건 각각에 대하여 생물막내 박테리아 성장이 1 내지 3.8 로그 감소하며 pH 2에서 생존하였다 (**도 3**). 하지만, 혐기성 조건에서 생물막 내의 박테리아는 플랑크톤 박테리아에 비해 낮은 pH에서의 이점을 보여주지 못했다.

[0245] ***생물막 형태의 LI 박테리아 - 중간-규모 실험***

[0246] 소-규모 실험으로부터 결과에 기반하여, 생물막내 LI의 성장에 이용된 조건은 적당하게 교반되는 호기성이었다. 여기에서, 박테리아 수율은 48시간에 비교할 때 매트릭스로 24 시간 및 72 시간 인큐베이션 후 약간 더 높은 것처럼 보인다. 생물막 형태의 박테리아는 산성 pH 처리 둘 모두에서 생존하였고 처리간에는 생존율의 유의미한 차이가 없었다 (**도 4**).

[0247] 마지막으로, 생물막 형태의 박테리아는 항생제에 대한 내성에 대하여 테스트하였다 (**도 5**). 생물막 형태의 박테리아는 플랑크톤 박테리아와 비교할 때 항생제의 3개 유형 모두에 대한 내성을 입증하였고, 최고 내성은 CB 항생제에서 관찰되었다. CB에 노출된 경우, 박테리아 수율은 심지어 24 시간 인큐베이션 후에도 항생제 농도에 의해 영향받지 않았거나 약간 영향받았다. VAN 및 NVB 항생제에 대한 생물막 형태의 박테리아 노출은 인큐베이션 일수(days) 사이에서 박테리아 성장의 유사한 경향을 보여주었다: ~4 로그의 초기 감소 후에, 농도를 증가시키더라도 박테리아 수는 유의미하게 변하지 않았다. 항생제 내성 데이터를 종합할 때, 48 시간 후에 본 발명자들이 항생제의 양 증가에 대해 생물막의 최고 내성을 수득하였던 것으로 보인다.

[0248] 결론적으로, 적용된 실험적 조건에 기반할 때 L. 이너스의 경우에 생물막 내의 최대 박테리아 수율은 10^7 내지 10^8이었다. 생물막 형태의 LI 박테리아는 산성 pH 및 항생제 둘 모두의 존재 하에서 양호하게 생존 및/또는 성장할 수 있었고, 따라서 생물막 형태의 박테리아 성능이 독립-생활 박테리아의 성능보다 우수하였음을 입증하였다.

[0249] ***L. 젠세니이 (LJ)***

[0250] **플랑크톤 LJ**

[0251] 플랑크톤 박테리아는 대조군 조건 (pH 7, **도 6**)에서 ~10^6 세포/mL의 박테리아 수율을 생산하였다. 대조군과 비교할 때 pH 3.5에서의 박테리아 수율에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, 플랑크톤 박테리아는 pH 2에 노출시 생존하지 못했다.

[0252] CB 및 NVB 및 VAN 항생제에 대한 플랑크톤 박테리아의 노출은 각각 8 μg/mL, 2 μg/mL 및 1.5 μg/mL의 MIC을 가진 항생제에 대하여 낮은 박테리아성 내성을 초래하였다. 하지만, 플랑크톤 박테리아는 CIP에 민감하지 않았고 이용된 항생제 농도와 무관하게 박테리아 세포의 완전 성장을 표시하였다 (**표 4**).

표 4. 플랑크톤 LJ 값에 대하여 상이한 항생제의 MIC 는 μg/mL 로 표현된다

박테리아\ABX	CB	NVB	VAN	CIP
락토바실러스 젠세니이	8	2	1.5	>256

[0253]

[0254] **생물막 형태의 LJ 박테리아 - 소-규모 실험**

[0255] 소-규모 실험적 설정에서 생물막 형태의 LJ 박테리아의 성장은 교반 조건 (70 rpm 및 130 rpm) 둘 모두에서 유사하였다 (**도 7**). 생물막 형태의 박테리아 성장이 시간 경과에 따라 감소하였다. 10^7 세포/mL의 최대 박테리아 수율은 24 시간의 인큐베이션 후에 관찰된 반면 인큐베이션의 셋째 날에는 최저 박테리아 수율 (~10^5 세포/mL)이 기록되었다. 생물막 형태의 박테리아가 pH 3.5에 노출되었을 때, 인큐베이션의 첫째 날을 제외하고는 대조군 (pH 7)과 비교하여 박테리아 수의 유의미한 차이가 없었다. 하지만, 생물막 형태의 박테리아는 최저 pH 처리 (pH 2)시에 생존하지 못했다. 일반적으로, 생물막 내의 박테리아의 성장은 그들의 독립-생활 형태와 유의미한 차이를 갖지 않았다. 교반을 수행하지 않은 경우에 생물막 (RD206) 형태의 박테리아의 수율이 더 양호하게 수득될 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 실험을 수행하였음을 주목해야 한다. 결과는 교반 조건 둘 모두에 비교하여 박테리아 성장의 ~1 로그 감소를 보여주었다.

[0256] 하기 중간-규모 실험에서, 어떠한 진탕 조건이 생물막 형태의 박테리아 성장에 있어 최상의 효과를 갖는지에 대한 결정적 결론이 없기 때문에 교반 조건 둘 모두를 테스트하였다. 더욱이, 중간-규모 실험의 설정이 산업에서 이용되는 성장 조건과 더 유사하기 때문에, 이들 2가지 교반 속도를 이러한 유형의 설정으로 또한 시험하기로 결정하였다.

[0257] ***생물막 형태의 LJ 박테리아 - 중간-규모 실험***

[0258] 소-규모 실험과 유사하게, 생물막내 박테리아 수율은 ~10^7 CFU/mL의 최대 성장에 도달하였지만, 인큐베이션의 모든 3 일 동안 성장은 안정을 유지하였다 (**도 8**). 게다가, 유의미한 차이는 2가지 교반 속도 사이에서 관찰되지 않았다.

[0259] 전자 실험과 상이하게, 인큐베이션의 처음 이틀의 마지막에 pH 3.5 (2 내지 2.3 로그에 노출 후에 CFU 카운트가 더 크게 감소된 것으로 관찰되었다 (**도 8**). pH 2에 대한 생물막 형태의 박테리아 내성이 테스트되었을 때, 생물막은 완전히 붕괴하였다 (**도 8**). 본 발명자들은 인큐베이션의 셋째 날에 pH 3.5에서 인큐베이션 후 세포의 사라짐이 기술적 오류 때문이었던 것으로 추측한다. 실제로, 하기 실험에서, 72 시간에 결과는 인큐베이션의 처음 이틀과 상이하지 않았다.

[0260] 다음에, 생물막 형태의 LJ 박테리아는 노출되어 항생제 농도를 증가시켰다 (**도 9**). 생물막 형태의 박테리아는 플랑크톤 세포에 비해 항생제에 대하여 높은 내성을 나타낸 반면, 적용된 농도는 플랑크톤 박테리아에 대한 MIC 값보다 훨씬 높았다. NVB 및 CB 둘 모두에서, 24시간 후 박테리아 성장이 초기 감소하였음에도 불구하고, 수율은 항생제 농도와 무관하게 안정적으로 유지되었다.

[0261] 요약하면, 생물막 형태의 박테리아가 산성 조건을 초래함에도 불구하고, 생물막 형태의 LJ 박테리아는 항생제에 노출되었던 경우 플랑크톤 박테리아보다 분명한 이점을 입증하였다.

[0262] 현행 실험에서 교반 조건에 차이가 없었더라도, 후반 실행되었던 실험은, 중간-규모 설정에서, 낮은 교반에 생물막 형태의 박테리아 성장에 대하여 더욱 양호한 결과를 생산하였다. 그러므로, 이러한 유형의 실험에서 생물막 형태의 LJ 박테리아를 위한 교반은 연속 70 내지 80 rpm으로 설정하였다. 추가적으로, 예비 실험은 첫째 날에, 매트릭스를 가진 발효조에 플랑크톤 박테리아의 첨가 후, 발효조가 (1 시간 후 부드럽게 혼합하면서) 37 ℃에 2 시간 동안, 정적 조건으로 유지되는 경우 생물막 형태의 박테리아 성장에 대하여 이점을 보여주었다. 본 단계는 박테리아를 매트릭스에 더욱 양호하게 부착시킬 수 있고, 사용되고 있는 중인 박테리아 균주와 무관하게, 모든 후속 실험에서 이용하였다.

[0263] ***L. 크리스파투스 (LCr)***

[0264] **플랑크톤 LCr**

[0265] 플랑크톤 LCr은 낮은 pH 처리에 노출시켰고 항생제 농도를 증가시켰던 경우 플랑크톤 LJ와 유사한 결과를 나타냈다 (**도 10**). pH 3.5에 대한 노출은 대조군 (pH 7)에 비교하여 박테리아 세포에 유의미하게 영향을 주지 않았고 반면에 pH 2에서 박테리아는 생존하지 못했다.

[0266] 플랑크톤 LCr이 항생제로 처리되었던 경우, 낮은 박테리아 내성은 4 μg/mL, 2 μg/mL 및 1.5 μg/mL, 각각의 MIC 값들로 CB, NVB 및 VAN에 대하여 관찰하였다 (**표 5**). 하지만, 플랑크톤 박테리아는 CIP에 민감하지 않았고 이용된 항생제 농도와 무관하게 박테리아 세포의 완전 성장을 표시하였다.

표 5. 플랑크톤 LCr 값에 대하여 상이한 항생제의 MIC 는 μg/mL 로 표현된다.

박테리아\ABX	CB	NVB	VAN	CIP
락토바실러스 크리스파투스	4	2	1.5	>256

[0267]

[0268] **생물막 형태의 LCr 박테리아 - 소-규모 실험**

[0269] 생물막 형태의 LCr 박테리아가 정기적으로 교반되었든 교반되지 않았든, LCr를 이용한 소-규모 실험은 5×10^5 세포/mL의 최대 박테리아 수율 및 ~10^4 세포/mL의 최저를 생산하였다 (**도 11**). 양쪽 처리에서, 생물막 형태의 박테리아 성장은 매트릭스에서 인큐베이션 3 일후 최고이었다. 놀랍게도, 알맞은 산성 조건 (pH 3.5) 하에서, 처리와 무관하게 박테리아 수율의 ~1 내지 2 로그 증가가 관찰되었다. 그럼에도 불구하고, pH 2에서 생물막내 박테리아의 수는 2 내지 4 로그만큼 감소되었거나 완전히 줄어들었다. 이러한 산성 조건에서의 생존으로부터 패턴이 결정될 수 없었고 pH 2에 대한 내성은 하기 중간-규모 실험에서 재-시험될 것이다.

[0270] 진탕 조건 둘 모두로부터의 결과가 유사함에도 불구하고, 교반된 경우 생물막 형태의 박테리아 성장은 pH 7 및 3.5 각각에서 약간 더 양호하게 성장 및 생존하는 것으로 보인다. 그러므로, 다음 실험에서 적당한 교반 (70-80 rpm)을 이용하였다.

[0271] ***생물막 형태의 LCr 박테리아 - 중간-규모 실험***

[0272] 생물막내 박테리아 수율은 소-규모 실험에 비교하여 중간-규모 실험에서 약간 더 높았다 (~1 내지 2 로그) (**도 12**). 하지만, pH 3.5에 노출될 때 생물막 형태의 박테리아 증가는 소-규모 실험적 설정에서 관찰된 것들에 필적할 정도였다. 최저 pH 처리에 노출된 경우에 생물막 형태의 LCr 박테리아의 높은 생존은 첫번째 및 세번째의 인큐베이션 후에 기록되었다. 실험 설정 둘 모두에서, 이러한 pH 처리에서 생물막 형태의 박테리아는 48시간 후에 소멸하였다.

[0273] 그 다음에, 생물막 형태의 LCr 박테리아의 항생제에 대한 내성이 조사하였다 (**도 13**). 생물막 형태의 LJ 박테리아와 유사하게, 생물막 형태의 LCr 박테리아는 CB 및 NVB에 대한 높은 내성을 보여주었으며, NOVO에 대한 노출 후에 생물막 형태의 LCr 박테리아의 성장이 약간 더 양호해졌다(1 로그).

[0274] 요약하면, 생물막 형태의 LCr 박테리아는 플랑크톤 비교물을 능가하는 낮은 pH 처리에 대한 적당한 이점 및 항생제에 대해 테스트된 경우의 큰 이점을 보여주었다. 게다가, 24 시간 및 72 시간의 인큐베이션 후 그리고 낮은 pH 처리에 노출 이후에 생물막 세포 수가 필적할 정도였다.

[0275] ***L. 가스세리 (LG)***

[0276] **플랑크톤 LG**

[0277] 산성 pH에 노출된 경우에 플랑크톤 LG의 결과는 플랑크톤 LI, LJ 및 LCr과 상이하였다 (**도 14**). pH 3.5에 대한 노출이 플랑크톤 LG의 수를 약간 감소시키는 반면, pH 2에서 인큐베이션은 매우 낮은 수의 박테리아 생존을 초래하였다.

[0278] 플랑크톤 LG가 항생제에 대한 민감성에 대하여 이후에 테스트되었을 때 (**표 6**), MIC 값은 확립하였고; LJ 및 LCr과 유사하게, 플랑크톤 LG는 CB, NVB 및 VAN (4 μg/mL, 2 μg/mL 및 1.5 μg/mL 각각)에 대하여 고도로 민

감한 반면, CIP 박테리아에 대하여는 완전 내성을 보여주었다.

표 6. 플랑크톤 LG 값에 대하여 상이한 항생제의 MIC는 μg/mL로 표현된다.

박테리아\ABX	CB	NVB	VAN	CIP
락토바실러스 가스세리	4	2	1.5	>256

[0279]

[0280] ***생물막 형태의 LG 박테리아 - 소-규모 실험***

[0281] 생물막 형태의 LCr 및 LJ 박테리아와 유사하게, 테스트한 2가지 진탕 속도간에 유의미한 차이가 관찰되지 않았다 (**도 15**). 최고 박테리아 수율은 10^7 세포/mL이었다. 48 시간에, 산성 pH에 노출 후 생물막 형태의 박테리아는 높은 생존력을 나타내었고; pH 3.5와 대조군 사이에서 생물막내 박테리아의 수는 차이나지 않은 반면에, pH 2에서 접종된 경우에 70 rpm 및 130 rpm 각각에서 박테리아의 1.3 및 1.6 로그 감소만이 있었다. 이러한 결과는 생물막 세포의 성능이 플랑크톤 세포의 성능보다 우수함을 나타내고, 여기에 후자에서 세포는 pH 2에서 완전히 소멸하였다.

[0282] ***생물막 형태의 LG 박테리아 - 중간-규모 실험***

[0283] 2가지 교반 조건이 비교될 때, 인큐베이션 시간과 무관하게 생물막-포매된 박테리아 세포 수의 유의미한 차이가 검출되지 않았다 (**도 16**). 더욱이, 양쪽 처리에서, 최저 pH 처리에 대한 노출 후에 생물막 세포의 높은 생존이 관찰하였다. 이러한 pH 처리에서 세포 생존력의 감소는 (130 rpm에서 48 시간 인큐베이션 후) 3.2 로그 이하이었다. 다른 실험에서 pH 2에서 상대적으로 큰 생존이 또한 관찰되었다 (**도 22 내지 24** 참고). pH 3.5에서, 생물막 형태의 LG 박테리아의 생존은 70 rpm에 비해 130 rpm에서 성장한 경우에 약간 더 양호한 것으로 보인다. 하지만, pH 2에서, 2가지 교반 속도 사이에서 생물막 형태의 박테리아의 생존에서 차이는 검출되지 않았다.

[0284] 나중 실험에서, 유사한 진탕 속도가 재차 테스트되었을 때, 생물막 형태의 LG 박테리아의 성장률은 더 낮은 속도에서 더욱 향상하였다 (결과는 나타내지 않음). 그래서, 본 프로젝트에서 전자 균주에 관하여, 혼합 속도는 향후 실험을 위해 70-80 rpm으로 선정하였다.

[0285] 생물막 형태의 LG 박테리아는 NVB 항생제의 존재 하에서 양호하게 생존하고 성장할 수 있었다 (**도 17**). 하지만, CB의 존재 하에서, 생물막 형태의 박테리아 생존은 이러한 항생제에 대한 노출 후에 성장하는 소수 콜로니만을 가지며 덜 뚜렷하였다. 유의미한 것으로 간주된 역치 아래인 생존된 콜로니의 수 (**도 17**; 점선).

[0286] 끝으로, 생물막 배양물의 형태로 LG 플랑크톤성 및 박테리아는 극한 조건에 대한 그들의 내성에 관련하여 성장의 2개 모드 사이 큰 차이를 보여주었다. 현탁된 박테리아보다 생물막 형태의 LG 박테리아의 이점은 그러므로 명백하다.

[0287] ***L. 람노수스 (LRh)***

[0288] ***플랑크톤 LRh***

[0289] 플랑크톤 LRh 세포는, 산도를 증가시키기 위해 노출된 경우, 본 프로젝트에서 기재되는 모든 박테리아 균주에 대한 유사한 반응을 보여주었고; pH 3.5에 노출된 생물막 형태의 박테리아와 대조군 샘플 사이 차이는 검출되지 않았고 반면에 세포는 pH 2에서 사라졌다 (**도 18**).

[0290] 본 프로젝트에서 사용된 다른 락토바실러스 sp.에 대한 유사한 반응은 LRh의 현탁된 세포가 CB 및 NVB 항생제 (4 및 2 μg/mL의 MIC 값; **표 7**)에 노출되었던 경우 또한 관찰하였다. 그럼에도 불구하고, CIP 및 VAN 항생제의 존재 하에서 접종된 경우, 그들의 반응은 다른 박테리아 균주와 반대이었고; 플랑크톤 LRh는 CIP (0.25 μg/mL)에 고도로 민감하였고 VAN (>256 μg/mL)에 완전히 저항성이었다.

표 7. 플랑크톤 LRh 값에 대하여 상이한 항생제의 MIC는 μg/mL로 표현된다.

박테리아\ABX	CB	NVB	VAN	CIP
락토바실러스 람노수스	4	2	>256	2

[0291]

[0292] ***생물막 형태의 LRh 박테리아 - 소-규모 실험***

[0293] 생물막-포매된 박테리아의 최대 수는 ~10^{10} CFU/mL이었다 (**도 19**). 전반적으로, 70 rpm을 경험하였던 생물막 형태의 LRh 박테리아의 성장은 130 rpm을 경험하였던 생물막 형태의 박테리아보다 약간 더 양호한 것처럼 보이고; 이것은 48 시간 (5.8 로그) 후 pH 2에서 그들의 높은 생존 그리고 인큐베이션의 셋째 날에 (pH 7에 비교하여) pH 3.5에서 그들의 약간 개선된 생존으로 발현하였다. 이 밖에도, 72 시간의 인큐베이션에 생물막-포매된 박테리아의 수에서 작은 감소가 있다.

[0294] 본 실험으로부터 결과에 기반하여, 다음 실험에서 이용된 교반은 ~70 내지 80 rpm이었다.

[0295] ***생물막 형태의 LRh 박테리아 - 중간-규모 실험***

[0296] 전자 소-규모 실험과 달리, 생물막-포매된 박테리아의 평균 수는 10^{7} CFU/mL를 초과하지 않았다 (**도 20**). 이러한 차이는 생물막 형태의 박테리아로부터 현탁된 박테리아의 분리를 개선하기 위해 프로토콜에서 포함되었던 추가의 세정 단계 때문이었다. 이러한 세정 단계는 그 다음 이 시점부터 모든 실험적 설계에서 이용하였다. 경시적으로, 생물막 형태의 LRh 박테리아의 성장률은 일정하게 잔류하였다. 하지만, 본 실험에서, 생물막 형태의 LRh 박테리아는 인큐베이션의 둘째 날의 끝에 낮은 pH 처리에 더욱 양호하게 저항하는 것으로 보이고; 2 이하 로그의 감소는 pH 2에서 관찰하였다.

[0297] 항생제의 존재 하에서, 생물막 형태의 LRh 박테리아는 CB 및 CIP에 노출된 경우 양호하게 생존 및 성장하였지만 NVB의 높은 농도 (128 및 256 μg/mL; MIC, 2 μg/mL **도 21**)에서 생존하지 못했다.

[0298] 생물막 형태의 LRh 박테리아는, 현탁된 플랑크톤 상대방이 완전히 사라진 농도에서, CB 및 CIP 항생제의 존재하에서 증가된 생존된 및 성장을 보여주었다.

[0299] **실시예 3**

[0300] **서포지토리에 제형의 평가**

[0301] 좌약의 제형은, 약학적으로 허용가능한 부형제 (오일계 담체) 및/또는 보충물에서 혼합된, 생물막 형태의 박테리아로 이루어진다. 생물막 형태의 박테리아는 (72 시간 인큐베이션의 끝에) 생물막 형태의 어느 한쪽 동결건조된 (건식) 분말로서 또는 습식 박테리아로서 사용하였다. 좌약에서 생물막 생존의 형태로 박테리아의 안정성 검정은, 6 개월의 지속기간 동안, 1개월 1회 수행하였다. 매월, 각 제형으로부터 1개 좌약은 PBS(×1)에서 용융하였고 박테리아는 CFU 계수를 위하여 플레이팅하였다 (분석적 방법 참고).

[0302] ***활성 구성성분 혼합물의 개선***

[0303] **첨가제**. 높은 질 pH는 질 병원균의 증가와 연관되고 질의 산도는 락토바실러스가 번성하기 위한 우호적인 환경을 창출하면서 혐기균 병원균의 콜로니화에 대해 보호적 기전인 것으로 오래 이해되어 왔다. (소규모의 부분으로서) 생물막 LP의 형태로 박테리아에서 상이한 첨가제 (크랜베리 및 아스코르브산)의 효과 시험. 여기에서, 본 발명자들은 2개 산성화 제제, 크랜베리 및 아스코르브산을 시험하였고, 여기에서 전자는 UTI 감염의 재발성 예방 및/또는 감소에서 역할을 갖는 것으로 또한 제안된다. 목표는 좌약 조성물에서 생물막 형태의 박테리아와 함께 이들 첨가제 중 1개를 첨가하는 것이다. 따라서, 생물막 생존 및 성장의 형태로 박테리아에 관한 그들의 효과는 테스트하였다. 생물막 형태의 LP 박테리아의 크랜베리 분말 (300 mg)에 대한 노출 이후, 생물막 생존 및/또는 성장의 형태로 박테리아에 관한 유의미한 효과는 기록되지 않았다 (**도 27**).

[0304] 흥미롭게, 크랜베리 분말이 생물막 형태의 동결건조된 박테리아와 함께 좌약에 포함되었던 경우, 박테리아성 생존에서의 향상은 크랜베리가 좌약에서 생략되었던 경우에 비교해서 관찰하였다 (1 내지 1.6 로그 더 높음; **도 22**). 이 밖에도, 샘플은 좌약에서 2개 개월 동안 안정적이었다 (**도 22**). 좌약에 아스코르브산 (AA; 비타민 C)의

첨가는 크랜베리의 첨가와 유사한 결과를 생산하였고; 1 내지 2 로그의 작은 감소만이 생물막 형태의 박테리아 성장에서 관찰하였다. 예상된 경우에, 양쪽 AA 및 크랜베리는 MRS 용액에서 초기 pH 값을 3.5 내지 4로 감소시켰다. AA의 첨가가 좌약에 대하여 더욱 균질한 혼합물을 제공하였기 때문에, 나중 실험에서 사용하도록 정해졌다.

[0305] 생물막 형태의 박테리아. 좌약에서 생물막 형태의 건식 박테리아 및 (72 시간 인큐베이션 후) 생물막 형태의 습식 박테리아의 생존은 조사하였다. 결과는 좌약에서 1 개월 후 생물막 형태의 건식 박테리아의 CFU 카운트가 T0 (1 로그 미만)에서 그들의 수와 유의미하게 상이하지 않았다는 것을 드러냈다. 하지만, 생물막 생존의 형태로 습식 박테리아에서 1.5 로그의 감소가 있었다. 3 개월 후, 하지만, LRh의 생물막 형태의 습식 박테리아는 완전히 소멸하였고 반면 좌약에서 생물막 형태의 건식 박테리아의 CFU 카운트는 안정하게 잔류하였다. 이러한 결과는 습도가 좌약에서 생물막 생존의 형태로 박테리아에 부정적으로 영향을 미쳤다는 것을 분명히 입증하고, 그러므로 생물막 분말의 형태로 건식 박테리아의 사용은 필수적이다 (**도 23**).

[0306] ***좌약 부형제 혼합물의 개선***

[0307] 소수의 작은 실험 후, 오일계 담체의 기본적 제형은 식물성 (팜) 버터 및 코코아 버터를, 1:5의 비, 각각으로 뿐만 아니라 혼합물의 균질성을 돕기 위해 몇 방울의 레시틴을 포함하였다. 다음에, 본 발명자들은 생물막 형태의 박테리아에 비교하여 오일계 담체의 부피를 감소시키는데 목표를 두었고, 그래서 좌약에서 생물막 형태의 박테리아의 수량을 증가시켰다. 생물막 형태의 박테리아 대 담체의 2개 비, 1:5 및 1:10, 각각은 테스트하였다 (**도 24**). 결과는 2개 비 사이 생물막 형태의 박테리아 성장에서 차이 없음을 보여주었고, 그래서 좌약 조성물에서 생물막 수량의 형태로 박테리아를 상승시켰다.

[0308] 보충물 예컨대 크랜베리 또는 비타민 C의 첨가는 생물막 형태의 박테리아 성장에 영향을 미치지 않았고 생물막 형태의 박테리아와 함께 그들의 투여는 각 단독의 투여보다 BV를 치료하는데 더욱 효과적일 수 있다.

[0309] ***입자 크기 및 입자에 대한 생물막 친화도의 형태로 박테리아***

[0310] 상이한 입자를 가진 LG 플랑크톤 세포의 24 시간 인큐베이션 후, 생물막 성장 및 발달의 형태로 LG 박테리아는 다음과 같이 미소결정성 셀룰로스: 인산이칼슘 (MCC:DCP)> MCC> 알기네이트> 크랜베리이었다. 이들 결과에 기반하여 본 발명자들은 양쪽 감소된 입자 크기 및 매트릭스의 유형의 조합이 생물막 성장 및 발달의 형태로 LG 박테리아에 긍정적으로 영향을 주었다는 것을 제안한다: (1) 입자 크기 - 더 작은-입자 크기 (더 높은 표면 대 부피 비)는 더 많은 박테리아를 입자 부피 당 부착시키게 할 수 있고, 그래서 생물막 형태의 박테리아 성장를 개선시킬 수 있다: 생물막 형태의 박테리아 성장는 알기네이트 비드 (1,000 μm)에 비교하여 MCC 또는 MCC:DCP 조합 (80 내지 150 μm)에서 향상되었음; (2) 매트릭스의 유형 - 본 발명자들은, 생물막 성장 및 형성에 특이적 매트릭스의 기여를 위하여, 임의의 특정한 이론에 구속되기를 바램 없이, 여기에서 2개 가능한 설명을 제안한다. 알기네이트가 크랜베리 2배 크기임에도 불구하고, 생물막 성장의 형태로 LG 박테리아는 알기네이트로 접종된 경우 더 높았다. 하나의 가정은 용액에서 크랜베리의 존재에 의해 유도되는 더 낮은 pH이고, 이는 생물막 형태의 박테리아 성장에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 또 다른 추측은 알기네이트가 생물막 형성에 중요한 것으로 나타났던 박테리아성 다당들 중 1개라는 사실에 기반된다. 또 다른 예는 MCC와 MCC:DCP 사이 LG 생물막 세포의 수에서 차이이다. 소수의 연구는 외인성 칼슘 이온이 생물막 형성을 촉진시킬 수 있다는 것을 보여주었고, 이 때문에 가용성 DCP 입자 (인산이칼슘) 및 후속적으로 칼슘 이온의 존재가 LG 생물막의 성장 및 발달을 향상시킬 수 있다.

[0311] **실시예 4**

[0312] **좌약 제형**

[0313] 직장/질 좌약으로서 펜타사 (항-염증성 제제)와 박테리아의 새로운 조합이 보여진다.

[0314] 생물막 형태의 건식 박테리아를 가진 제형 A, 그리고 생물막 형태의 박테리아 및 펜타사의 조합을 가진, 제형 B인, 2개 제형은 비교하였다 (**표 8**).

표 8.

[0315]

	양	오일/지방	건식 박테리아	의약
A	3 단위	8 g	LG, LGG 0.5g 각	---
B	3 단위	8 g	LGG, LG 0.66g 각	펜타사 0.66g

[0316] 생물막 형태의 건식 박테리아와 펜타사의 조합이 테스트된 경우, 박테리아의 안정성은 유지하였다 (**도 26**). 동일한 것이 펜타사를 가진 플랑크톤 박테리아에 대하여 관찰하였다.

[0317] **실시예 5**

[0318] **공-배양된 생물막**

[0319] **2개 박테리아 균주의 공-배양**

[0320] LJ 및 LG는 혐기성/저속-성장 박테리아로 확인되었고 반면에 LRh는 호기성/고속-성장 박테리아로 확인되었다. LJ 또는 LG 플랑크톤 세포가 LRh로 공-접종된 경우, 이들은 균주의 첨가들 사이에 약 1 시간의 갭을 갖고 LRh에 앞서 첨가하였다. 단일배양물로서의 성장과 비교할 때, 생물막 성장 (1 로그의 최대) 및 발달 (pH에 대한 내성)에서 유의미한 차이가 없는 것으로 보고되었다 (**도 27**). 생물막-포매된 박테리아의 수는 10^6 내지 10^7 CFU/mL 이었다.

[0321] LRh-LG 공-배양물 실험으로부터 성과는 중간 규모 설정에서 실험을 반복함으로써 이후에 검증되었다. 이들 세트의 실험은 이들 2개 박테리아 균주 조합 (LJ & LRh 또는 LG & LRh)의 공-배양이 생물막에서 박테리아의 총수를 증가시키면서 입자의 수를 감소시키는데 분명한 이점을 나타냄을 입증하였다. 이것은 생물막 담체, 예를 들면, 좌약 또는 정제의 크기를 감소시키는 경우에 주요 이점이다.

[0322] **2개보다 많은 박테리아 균주의 공-배양**

[0323] 본 실험에서 본 발명자들은 하기 박테리아 조합: LRh-LJ-LG 또는 LRh-LJ-LG-LCr (이후 '조합-A' 및 '조합-B' 각각; 도 7)을 접종시켰다. LRh, LJ 및 LG가 함께 배양물인 경우, 각 균주에 대하여, 생물막내 박테리아의 수는 10^7 내지 10^8 CFU/mL이었다. 박테리아 균주는 FG1 브로스에서 접종하였고, 이 때문에 생물막 세포의 더 높은 수는 MRS로 행해졌던 전자 공-배양 실험에 비교하였다. pH 3.5에서, 모든 박테리아 균주는, 배양 시간과 무관하게, 높은 용인성을 나타냈다. 하지만, pH 3.5에 대한 LJ 박테리아성 개체군의 내성은 인큐베이션 시간에 따라 감소하였다. pH 2에서, LG 생존이 pH 3.5에서 이의 생존과 유의미하게 상이하지 않았던 반면, LJ 및 LRh는 불량한 생존율을 표시하였다. 이들 결과는 박테리아가 단독으로 성장되었던 경우 전자 실험으로부터 성과에 따랐다. 이들 결과는 이들 균주가 각각 다른 생물막 개체군을 억제 또는 억압하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0324] 제2 공-배양 혼합물인 조합-B로부터 LRh, LJ 및 LG 박테리아성 개체군은 조합-A에 비해 pH 3.5에 대한 내성 및 성장에서 차이 없음을 보여주었다. 하지만, LJ 및 LRh는 구체적으로 24 시간의 인큐베이션 후에 pH 2를 더욱 양호하게 견디는 것으로 보였다. LCr 박테리아성 개체군은, 다른 한편으로, 인큐베이션의 둘째 날에만 MRS 한천 플레이트에서 보였다. LCr 박테리아성 개체군의 높은 생존력은 LJ 박테리아성 개체군 (10^7 CFU/mL)과 유사하였다. 아마, MRS 한천 플레이트에서 LCr의 성장은 다른 박테리아 균주의 성장에 의해 억압하였다. (**도 29 내지 30**).

[0325] 다음에, 조합-B로부터 박테리아성 개체군은 비피도박테리움 한천 플레이트에서 또한 플레이팅하였다.

[0326] 종합하면, 양쪽 공-배양 조합에서, 박테리아성 개체군 성장 및 pH 내성에 관하여 최상 결과는 24 시간의 인큐베이션 후 수득하였다. 하지만, 낮은 pH 처리에서, 조합-B로부터 LRh, LG 및 LJ의 상대적으로 높은 생존은, LCr을 포함하였던, 박테리아 균주의 이러한 특이적 조합이 이들 박테리아성 개체군의 생물막 발달에 기여하였다는 것을 시사한다 (**도 29 내지 30**).

[0327] **공-배양의 순서:**

[0328] 인큐베이션의 개시에, 매트릭스:배지의 혼합물에 박테리아 첨가의 순서를 테스트하기 위해, 본 발명자들은 반대 조합 (제1 더 강한 것 및 그 다음 더 약한 것)와 더 약한 /저속-성장 균주 및 그 다음 더 강한/더 빠른-성장 균주의 첨가를 비교한다. 이것은 더 약한 균주에 의한 생물막의 형성에서 발효에 첨가된 균주의 순서에서 이익이 있는지를 보여준다.

[0329] 본 실험에서, LRh, LCr, LJ 및 LG의 박테리아성 배양물은, 하기 조정이 있는, 물질 및 방법 섹션에서 기재된 것과 유사하게 제조된다: 각 균주로부터 플랑크톤 박테리아가 성장 배지 및 매트릭스의 혼합물에 첨가되는 경우, 실험의 개시에, 각 균주는 이들 사이 0.5 내지 1 시간의 간격을 두고 차례로 첨가된다. 2개 처리가 있다:

[0330] 1) 혐기성/저속-성장 균주를 먼저 그리고 그 다음 호기성/더 빠른-성장 균주의 첨가, LCr→LJ→LG→LRh;

[0331] 2) 더 강한/더 빠른-성장 균주를 먼저 그리고 그 다음 저속 더 약한/저속-성장 균주의 첨가, LRh→LG→LJ→LCr.

[0332] 박테리아성 개체군 성장의 분석은 총 72 시간 동안 매 24 시간 인큐베이션마다 실시된다.

[0333] 공-배양물에서 성장되는 박테리아 균주는 단일배양물 성장에 비교되고 대사산물에서의 차이는 대사체학 기법을 사용하여 분석된다.

[0334] 어느 한쪽 공배양물로서 함께 또는 각 균주로서 별도로 성장된, LRh, LCr, LJ 및 LG의 박테리아성 개체군 배양물은 물질 및 방법 섹션에서 기재된 경우에 제조된다. 72 시간의 인큐베이션의 끝에, 박테리아성 개체군이 배양되는 성장 배지는 최대 속도로, 10 분 동안 원심분리되어 잔해 및 플랑크톤 박테리아를 제거한다. 상청액은 깨끗한 시험관으로 이동되고 재차 원심분리된다 (동일한 조건). 상청액은 대사의 분석까지 -80 ℃에 유지된다. 추가적으로, 단일배양물에 비교하여 공배양물 성장에서 성장 배지에 상이한 보충물 (예를 들어 탄수화물 예컨대 프룩토올리고당 및 미량 원소 예컨대 철)의 첨가의 효과는 조사된다.

[0335] **실시예 6**

[0336] **입자 크기 및 입자에 대한 박테리아성 친화도**

[0337] 상이한 입자를 가진 LG 플랑크톤 세포의 24 시간의 인큐베이션 후, LG 박테리아성 개체군 성장 및 발달은 다음과 같이 미소결정성 셀룰로스: 인산이칼슘 (MCC:DCP)> MCC> 알기네이트> 크랜베리이었다. 이들 결과에 기반하여 본 발명자들은 양쪽 감소된 입자 크기 및 매트릭스의 유형의 조합이 생물막 성장 및 발달의 형태로 LG 박테리아에 긍정적으로 영향을 주었다는 것을 제안한다: 1) 입자 크기 - 더 작은-입자 크기 (더 높은 표면 대 부피 비)는 더 많은 박테리아를 입자 부피 당 부착시키게 할 수 있고, 그래서 박테리아 개체군 성장을 개선시킬 수 있다: 박테리아성 개체군은 알기네이트 비드 (1,000 μm)에 비교하여 MCC 또는 MCC:DCP 조합 (80 내지 150 μm)에서 향상되었음; (2) 매트릭스의 유형 - 본 발명자들은, 생물막 성장 및 형성에 특이적 매트릭스의 기여를 위하여, 임의의 특정한 이론에 구속되기를 바램 없이, 여기에서 2개 가능한 설명을 제안한다. (**도 31**).

[0338] 알기네이트가 크랜베리 2배 크기임에도 불구하고, LG 박테리아 개체군 성장은 알기네이트로 접종된 경우 더 높았다. 또 다른 예는 MCC와 MCC:DCP 사이 LG 생물막 세포의 수에서 차이이다. 소수의 연구는 외인성 칼슘 이온이 생물막 형성을 촉진시킬 수 있다는 것을 보여주었고, 이 때문에 가용성 DCP 입자 (인산이칼슘) 및 후속적으로 칼슘 이온의 존재가 LG 생물막의 성장 및 발달을 향상시킬 수 있다.

[0339] **실시예 7**

[0340] **박테리아성 개체군 성장에 관한 동물 및 비-동물 배지의 효과**

[0341] LG, LRh, LCr 및 LJ의 박테리아성 개체군 성장 및 발달 상태에서 상이한 동물계 및 비-동물계 성장 배지의 효과는 사정하였다 (**도 32a 내지 32c**). 락토바실러스 sp.는 어느 한쪽 동물계 브로스 (이후 동물) 및/또는 비동물계 브로스 (이후 비-동물1 및 비-동물2)에서 성장하였다.

[0342] 제1 실험에서, 상이한 성장 배지에서 24 시간의 인큐베이션 후, LG 및 LCr의 박테리아성 개체군 성장 그리고 pH에 대한 그들의 내성은 다음과 같이 비-동물1 > 비-동물2>동물이었고 반면에 LJ는 비-동물1 = 비-동물2>동물인 성장 및 내성 패턴을 표시하였다 (**도 33a 내지 33c**). 본 실험에 기반하여, FG1 브로스는 중간-규모 설정에서 또는 상이한 균주로 테스트되어야 하는 선정의 배지이었다.

[0343] 다음 세트의 실험은, 동물 브로스에 비교에서, LRh, LG 및 LCr의 성장 및 생물막 발달에 관한 비-동물1 브로스의 효과를 평가하는데 사용하였다. 여기에서, 양쪽 내성 검정, pH 및 항생제는 테스트하였고, 이들 실험은 2개 실험적 설계 (소-규모 또는 중간-규모 설정; 도 12a 내지 c) 중 1개를 사용하여 실행하였다 전반적으로, 생존가

능한 생물막 세포의 수는 비-동물1 브로스에서 성장한 경우 더욱 두드러졌고; ~ 1 내지 2 로그의 증가는 모든 테스트된 박테리아 균주에 대하여 기록하였다. 그럼에도 불구하고, 잠시 양쪽 산성 pH 및 항생제의 존재 하에서 LG의 생존 및/또는 성장이 동물에 비교해서 비-동물1에 배양된 경우 실질적으로 더욱 양호하였다. pH 2 및 CB 항생제가 아닌, pH 3.5 및 NVB 항생제에 노출 후 LCr- 및 LRh- 포매된 생물막 세포의 수는 동물계 배지에서 접종에 비교된 비동물1계 배지에서 접종되었던 LCr에서 더 높았다. 이러한 결과는 생물막 세포 (pH 7)의 증가하는 양과 상관관계가 있었다. 종합하면, 비동물계 배지를 이용한 성장은 생물막에서 박테리아의 수 뿐만 아니라 생물막 발달에서 동물계 배지보다 분명한 이점을 보여주었다. 이것은 본원에서 테스트된 모든 질 박테리아에 대하여 기록하였다. (**도 33**).

[0344] **실시예 8**

[0345] **비피도박테리움 아돌레스센티스 단일- 대 공-배양물**

[0346] 본 발명자들은 *B. 브레베* 및 *B. 론굼 sub.론굼*을 이용한 이의 생물막 공배양물 성장에 비교된 단일배양물에서 *B. 아돌레스센티스* (*BfA*)의 성장능을 시험하였다. *BfA*는 이의 성장 단독에 비교해서 *BLL* 및 *BfBr*로 공배양된 경우 72 시간 후 개선된 성장을 보여주었다 (**도 34**). *BfA*는 이의 성장 단독에 비교해서 *BfBr*로 공배양된 경우 24 시간 및 72 시간 후 개선된 성장을 보여주었다 (**도 35**).

[0347] 본 발명자들은 첨가의 시간이 공배양물에서 *B. 아돌레스센티스* 성장을 개선시킬 수 있는지를 추가로 시험하였다. *BfA*는 어느 한쪽 *BLL* 및 *BfBr* ('대조군')과 병렬로 또는 BLL 및 BfBr ('BfA에 대한 이점')의 첨가 24 시간 전에 첨가하였다. *BfA*의 더 높은 상대 존재량은 *BLL*, *BB-12* 및 *BfBr*의 첨가 24 시간 앞서 첨가된 경우 관찰하였다 (**도 36**). *BfA* (~ 1 로그 차이)의 개선된 성장은 다른 *비피도박테리움* 종 (대조군; **도 37 내지 38**)에 병렬로 이의 첨가에 비교하여 *BLL*, *BB-12* 및 *BfBr* (BfA에 대한 이점)의 24 시간 앞서 첨가된 경우 관찰하였다.

[0348] **실시예 9**

[0349] **파에칼리바트세림 프라우스니트지이 단일- 대 공-배양물**

[0350] 본 발명자들은 *블라우티아 오베움 (B1O), 블라우티아 콕코이데스 (B1C)*, 또는 양쪽을 이용한 이의 생물막 공배양물 성장에 비교해서 단일배양물에서 *F. 프라우스니트지이* (*FaP*)의 성장능을 시험하였다. *FaP*는, 이의 성장 단독에 비교해서, 48 시간 동안 어느 한쪽 *B1O*, *B1C* 또는 양쪽으로 공배양된 경우 개선된 성장을 보여주었다 (**도 39**). *FaP*는, 이의 성장 단독에 비교해서, 어느 한쪽 *박테로이데스 불가투스* (*BaV*), 또는 *BaV* 및 *도레아 (유박테리움) 포르미시게네란스* (*DoF*)로 공배양된 경우 개선된 성장을 또한 보여주었다 (**도 40**).

[0351] 본 발명자들은 어느 한쪽 *B1P*, *BfA* 또는 *박테로이데스 테타이오타오미크론* (*BaT*)를 이용한 이의 성장에 비교해서 *FaP* 성장을 추가로 시험하였다. 또한, 본 발명자들은 이의 성장에 관한 *FaP*의 더 높은 초기 OD의 효과를 시험하였다. *FaP*는 48 시간 동안 어느 한쪽 *BfA* 또는 *BaT*로 공배양 경우 개선된 성장을 갖는 것으로 밝혀졌다 (**도 41**).

[0352] 본 발명자들은 *클로스트리디알레스* 및 *박테로이데스* 과로부터 소수의 종으로 공배양 경우 72 시간의 인큐베이션 동안 *FaP* 상대 존재량을 추가로 시험하였다. *FaP*가 박테로이데스 spp.로 공배양된 경우 분명한 이점은 *클로스트리디알레스* spp.만을 이용한 공배양물에서 이의 성장에 비교해서 관찰하였다 (**도 42**).

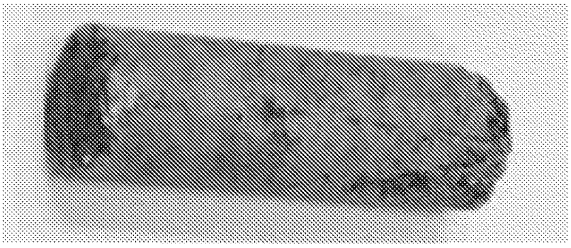
[0353] 추가로, 본 발명자들은 *클로스트리디알레스* 및 *박테로이데스* 과로부터 소수의 종으로 공배양 경우 72 시간의 인큐베이션 동안 플랑크톤 및 생물막 시기에서 *FaP* 상대 존재량을 시험하였다. *FaP*는 72 시간의 성장 동안 플랑크톤 형태 (**도 43a**)에 비교해서 생물막 (**도 43b**)에서 더 높은 상대 존재량을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0354] 본 발명이 이들의 특이적 구현예와 함께 기재되었어도, 많은 대안, 수정 및 변동이 당업자에게 명백할 것이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구항의 사상 및 넓은 범위 내에 해당하는 모든 상기 대안, 수정 및 변동을 포괄하기 위한 것이다.

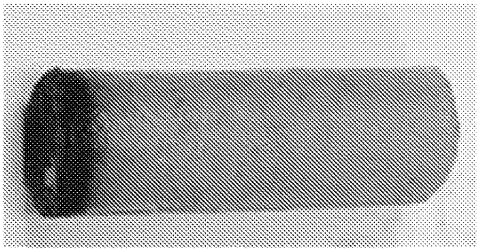
[0355] 본 명세서에서 언급된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은, 각 개별 공개, 특허 또는 특허 출원이 참고로 본원에 편입되도록 구체적이고 개별적으로 지시되는 바와 동일한 정도로, 명세서에 참고로 그들 전체가 본원에 편입된다. 이 밖에도, 본원에서 임의의 참고문헌의 인용 또는 식별은 상기 참고문헌이 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용가능하다는 인정으로서 해석되지 않아야 한다. 섹션 표제가 사용되는 정도로, 이들은 반드시 제한으로서 해석되지 않아야 한다.

도면

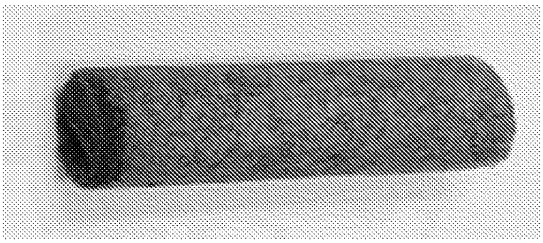
도면1a



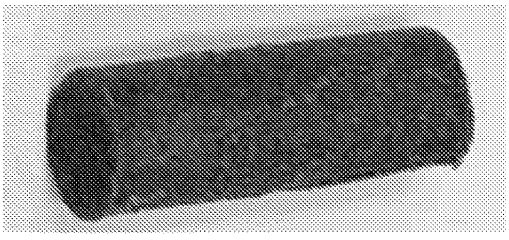
도면1b



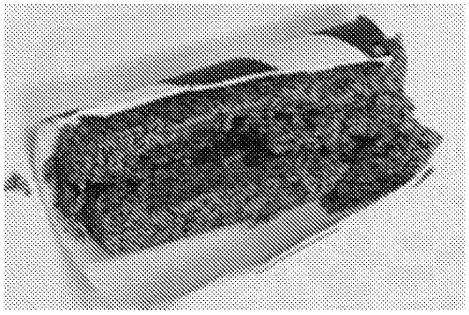
도면1c



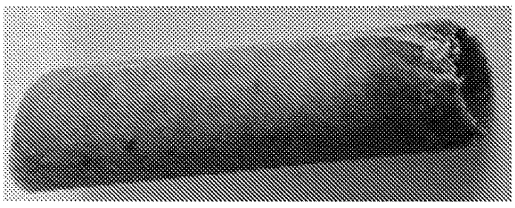
도면1d



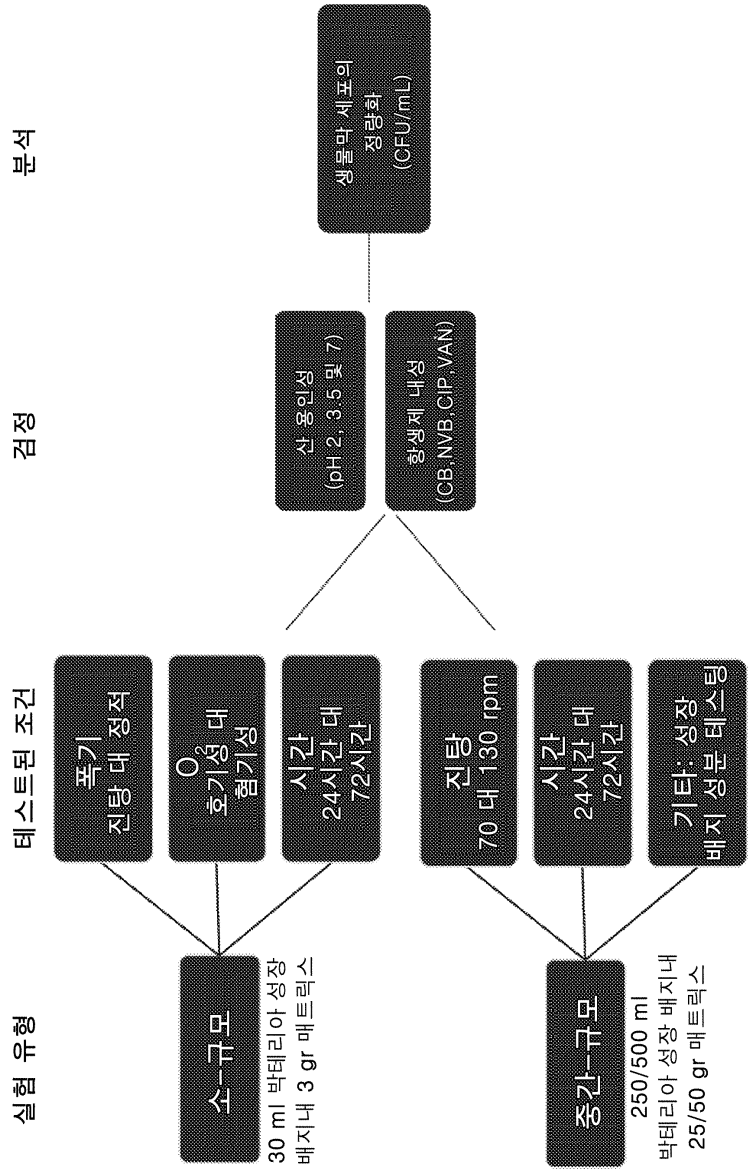
도면1e



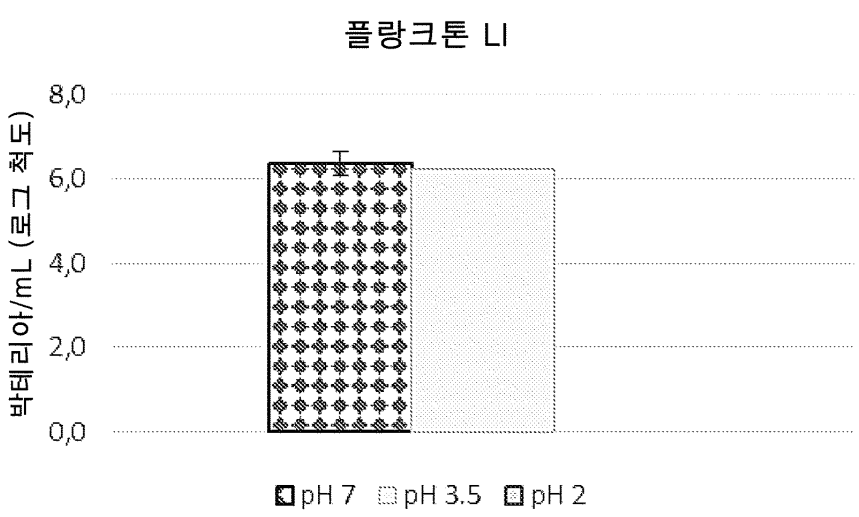
도면1f



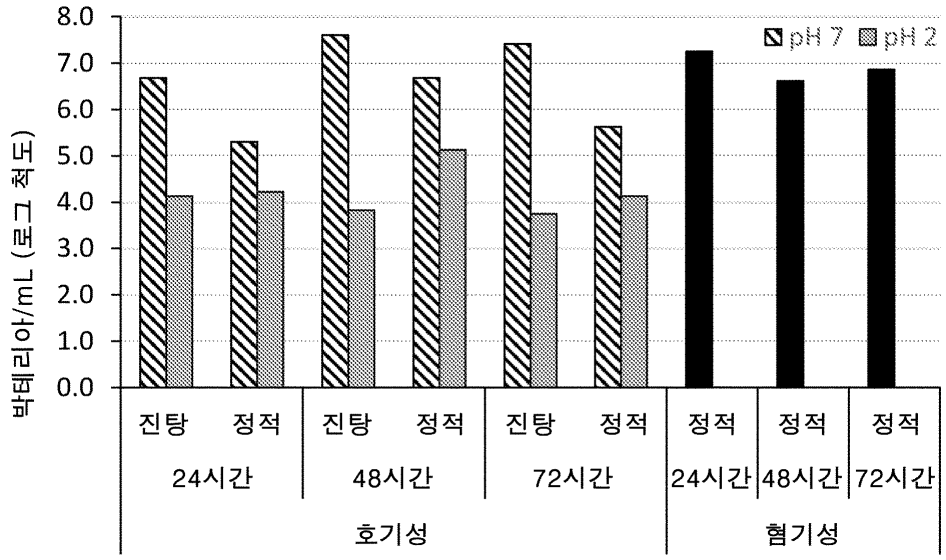
도면1g


분석
검정
테스트된 조건
실험 유형
생물막 세포의 정량화 (CFU/mL)
산 응인성 (pH 2, 3.5 및 7)
항생제 내성 (CB,NVB,CIP,VAN)
폭기 진탕 대 정적
O_2 호기성 대 혐기성
시간 24시간 대 72시간
진탕 70 대 130 rpm
시간 24시간 대 72시간
기타: 성장 배지 성분 테스팅
소-규모
30 ml 박테리아 성장 배지내 3 gr 매트릭스
중간-규모
250/500 ml 박테리아 성장 배지내 25/50 gr 매트릭스

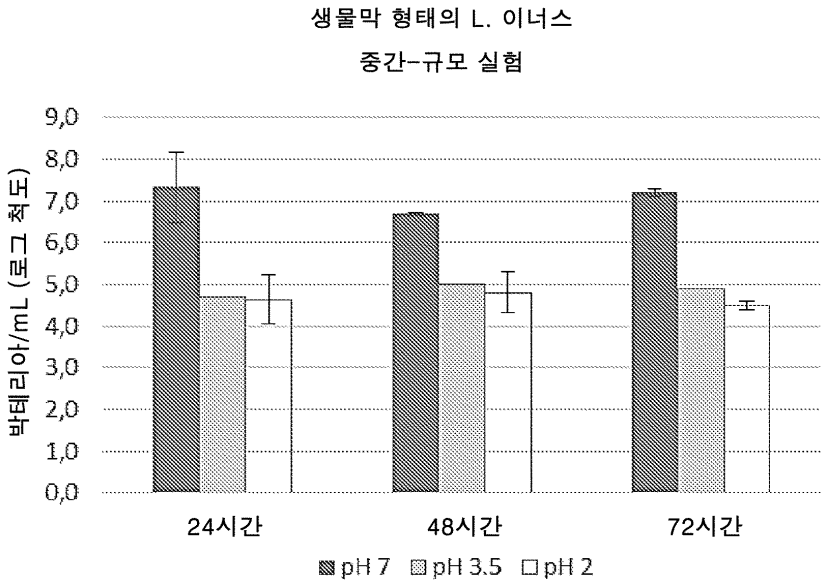
도면2


플랑크톤 LI
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
pH 7
pH 3.5
pH 2

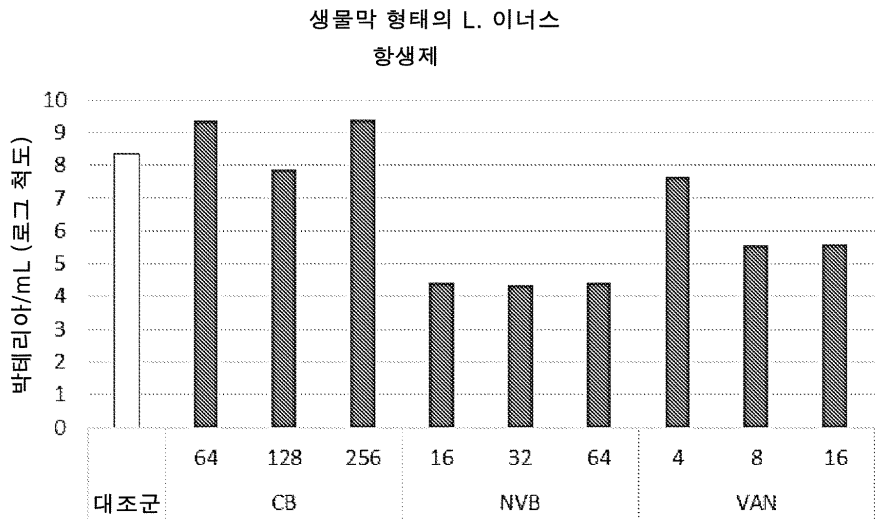
도면3


8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
박테리아/mL (로그 척도)
pH 7
pH 2
진탕
정적
24시간
48시간
72시간
호기성
혐기성

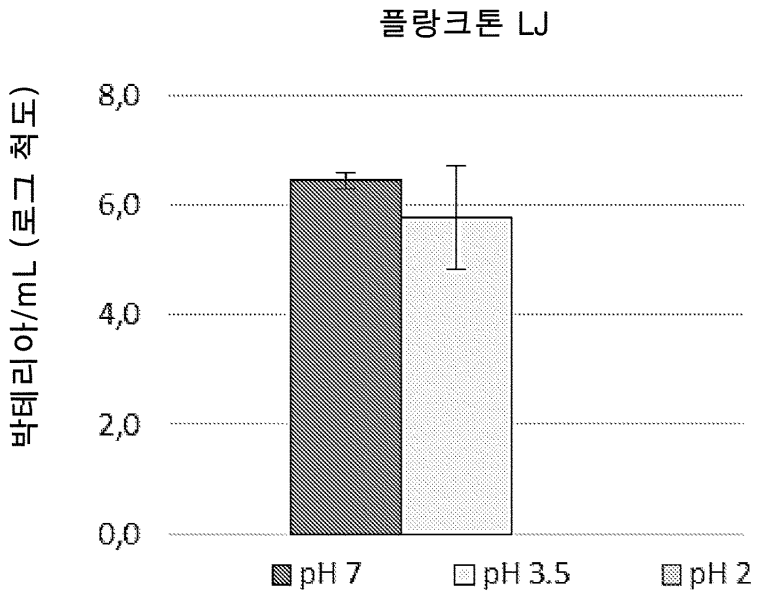
도면4


생물막 형태의 L. 이너스
중간-규모 실험
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
박테리아/mL (로그 척도)
24시간
48시간
72시간
pH 7
pH 3.5
pH 2

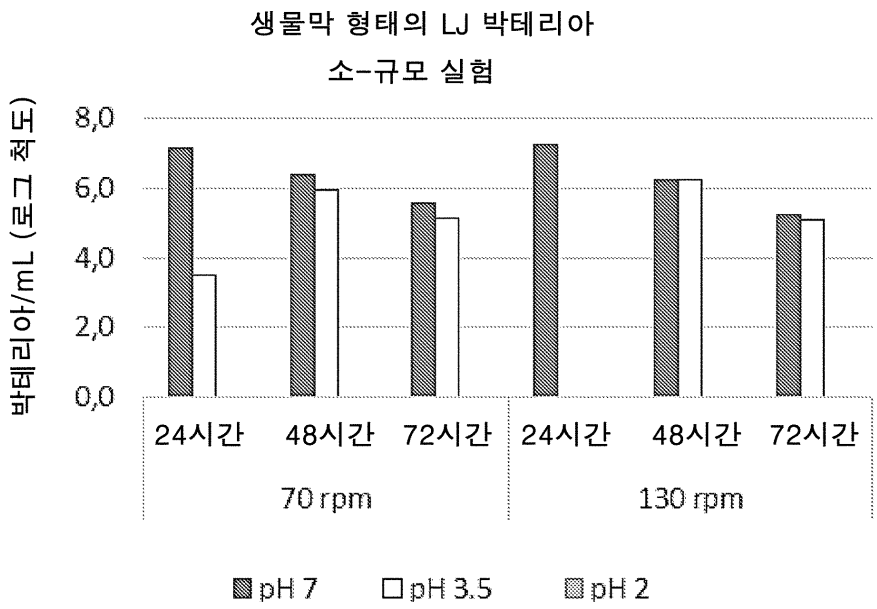
도면5


생물막 형태의 L. 이너스
항생제
박테리아/mL (로그 척도)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
64
128
256
16
32
64
4
8
16
대조군
CB
NVB
VAN

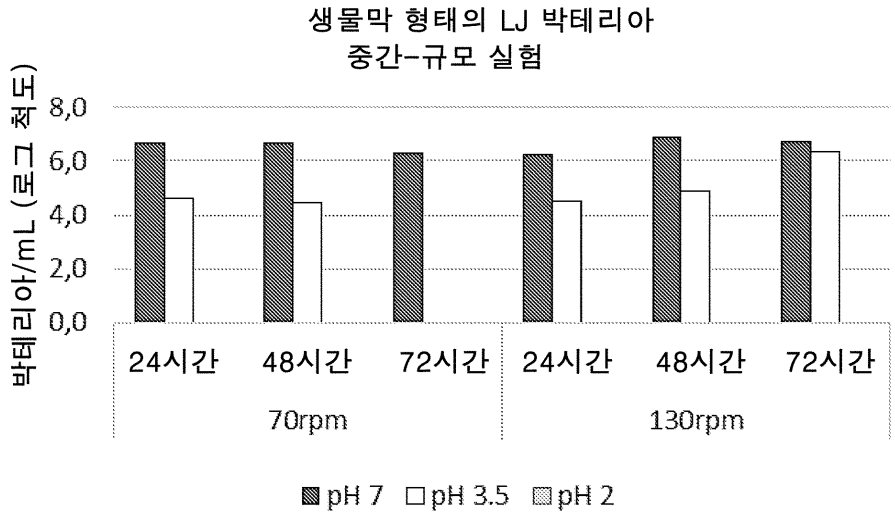
도면6


플랑크톤 LJ
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
pH 7
pH 3.5
pH 2

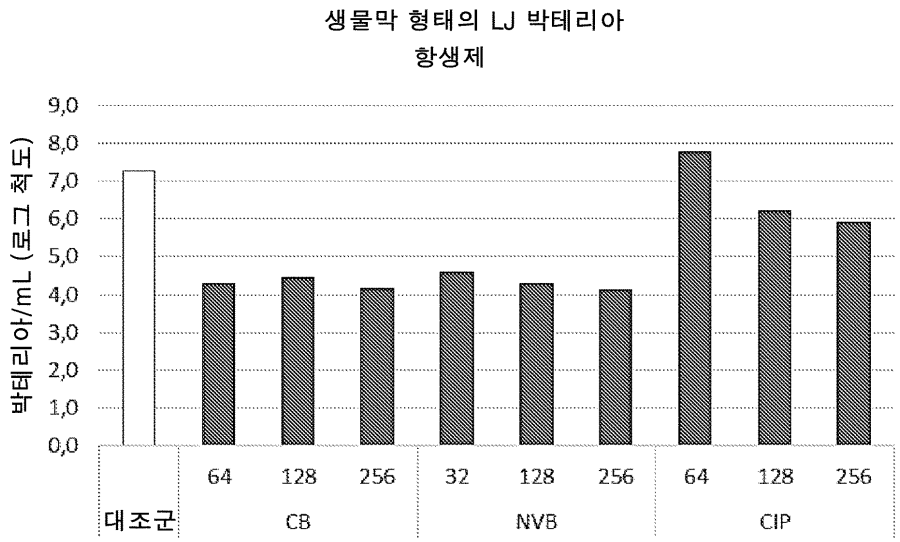
도면7


생물막 형태의 LJ 박테리아
소-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
24시간
48시간
72시간
24시간
48시간
72시간
70 rpm
130 rpm
pH 7
pH 3.5
pH 2

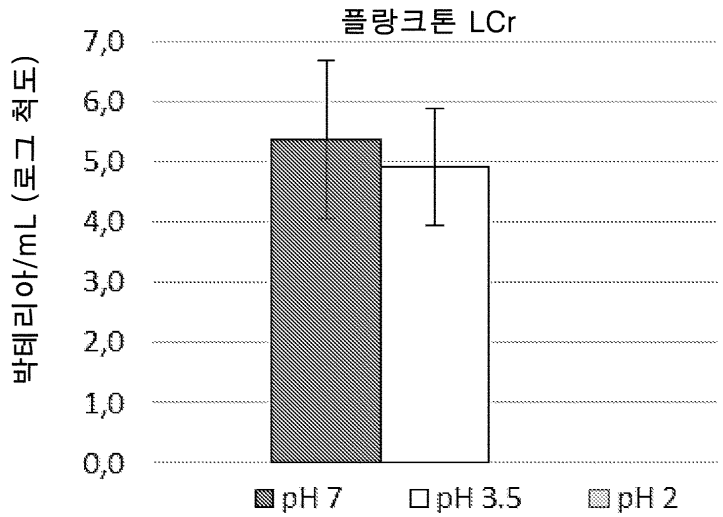
도면8


생물막 형태의 LJ 박테리아
중간-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
24시간
48시간
72시간
24시간
48시간
72시간
70rpm
130rpm
pH 7
pH 3.5
pH 2

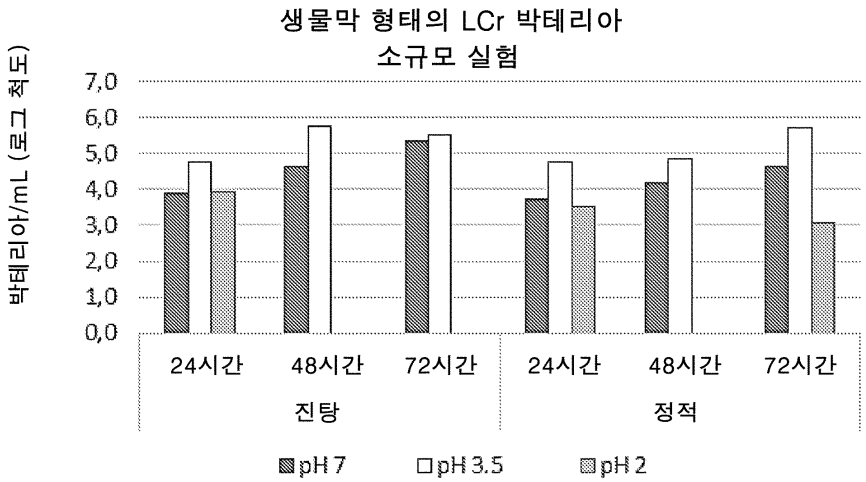
도면9



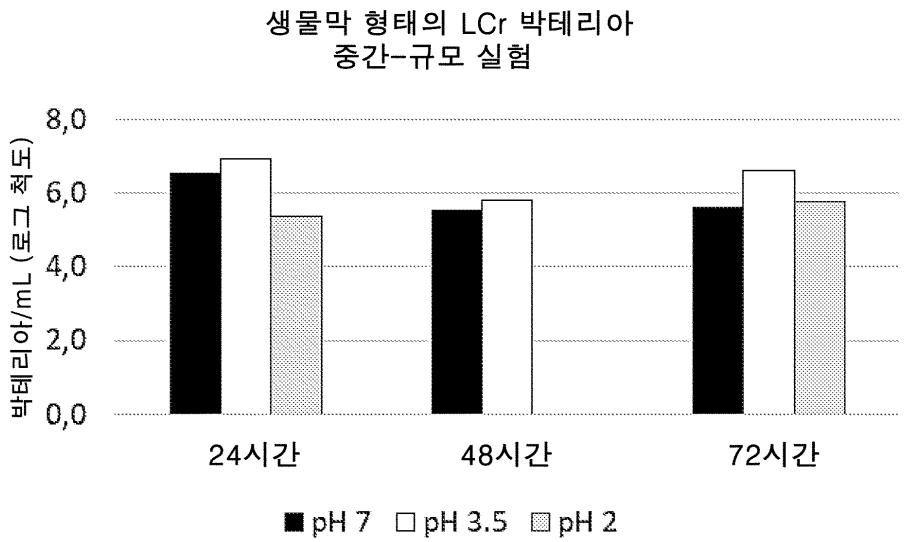
도면10



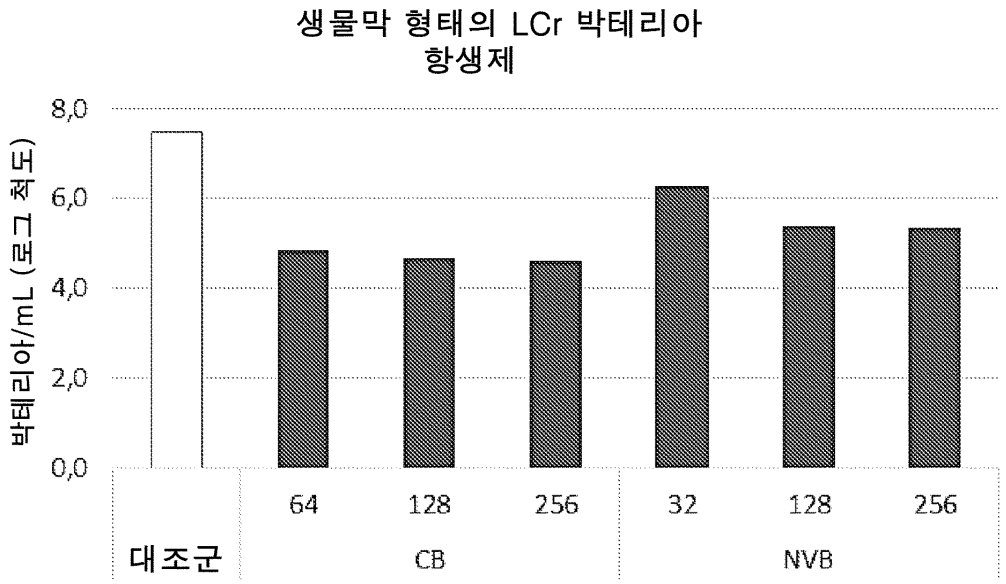
도면11



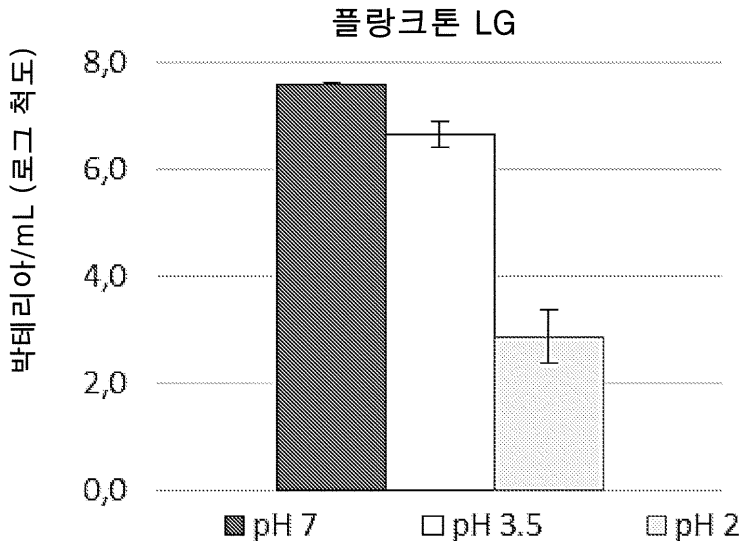
도면12


생물막 형태의 LCr 박테리아
중간-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
24시간
48시간
72시간
pH 7
pH 3.5
pH 2

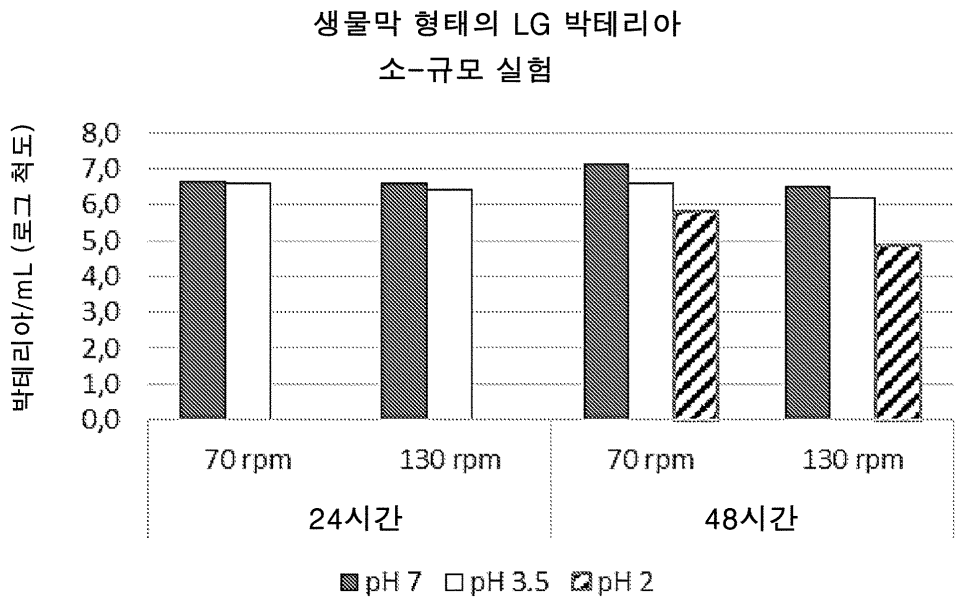
도면13


생물막 형태의 LCr 박테리아
항생제
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
64
128
256
32
128
256
대조군
CB
NVB

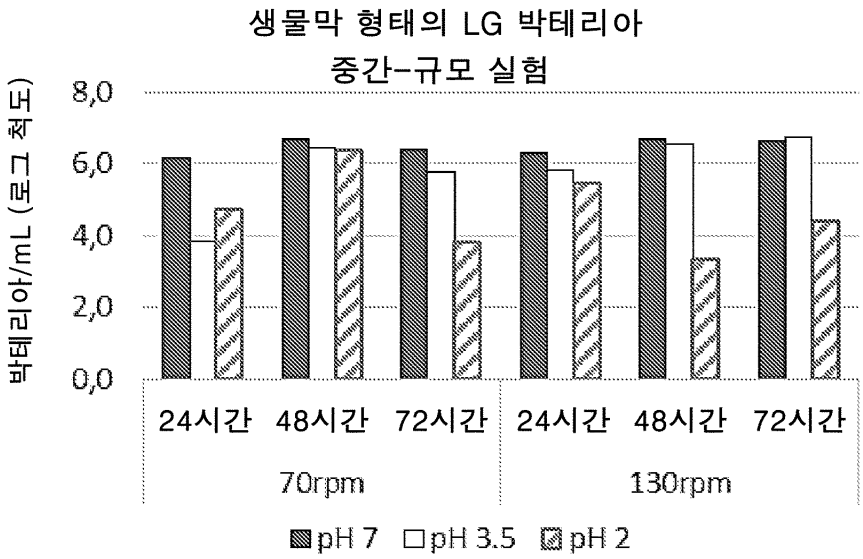
도면14


플랑크톤 LG
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
pH 7
pH 3.5
pH 2

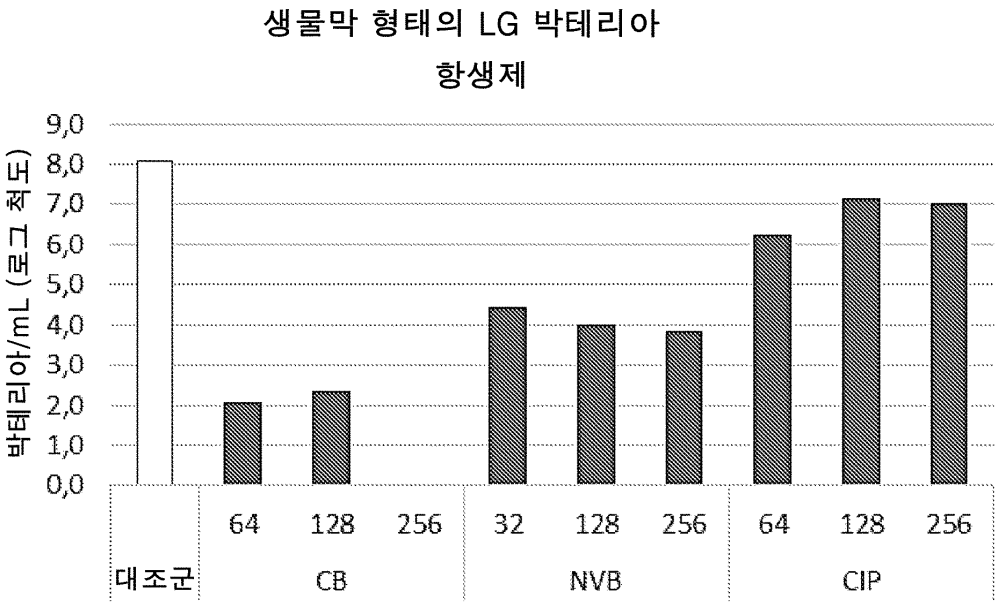
도면15


생물막 형태의 LG 박테리아
소-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
70 rpm
130 rpm
70 rpm
130 rpm
24시간
48시간
pH 7
pH 3.5
pH 2

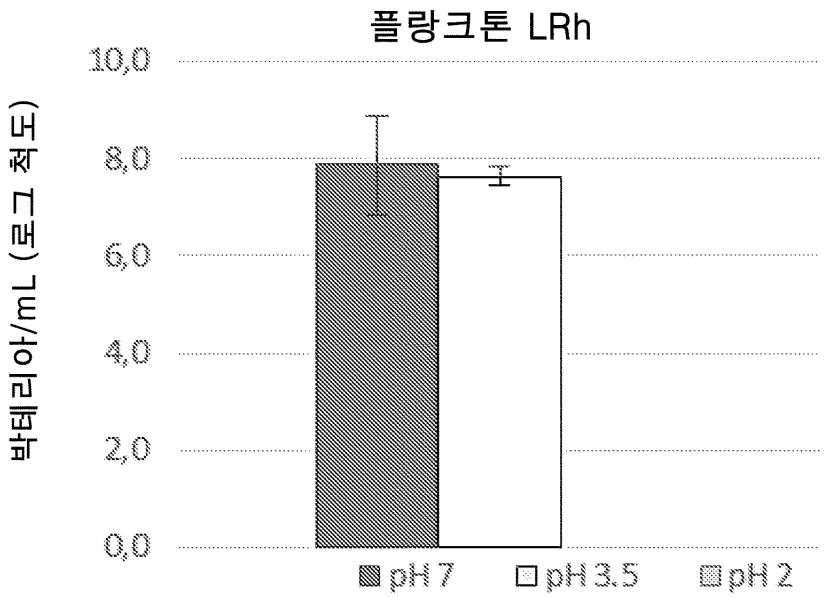
도면16


생물막 형태의 LG 박테리아
중간-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
24시간
48시간
72시간
24시간
48시간
72시간
70rpm
130rpm
pH 7
pH 3.5
pH 2

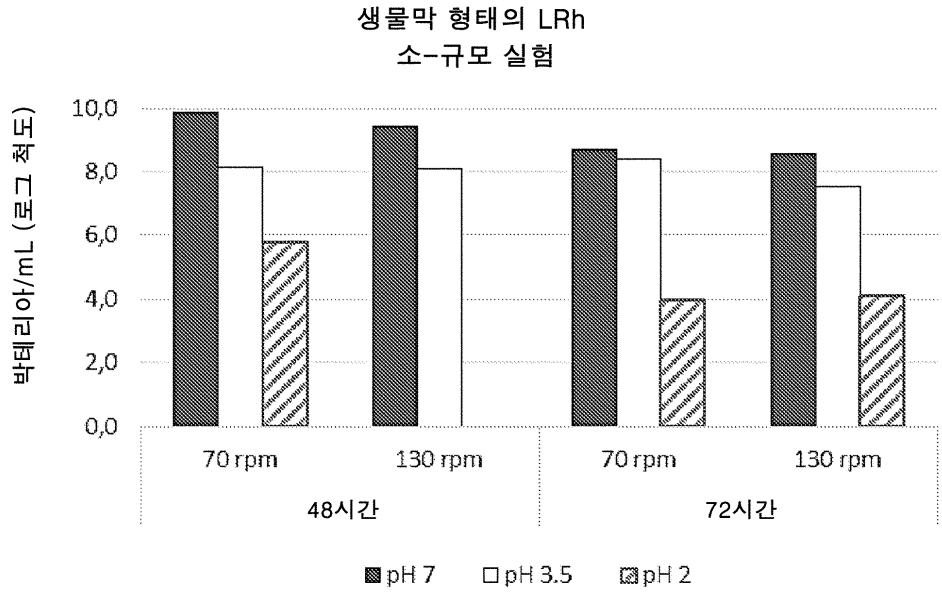
도면17


생물막 형태의 LG 박테리아
항생제
박테리아/mL (로그 척도)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
대조군
64
128
256
32
128
256
64
128
256
CB
NVB
CIP

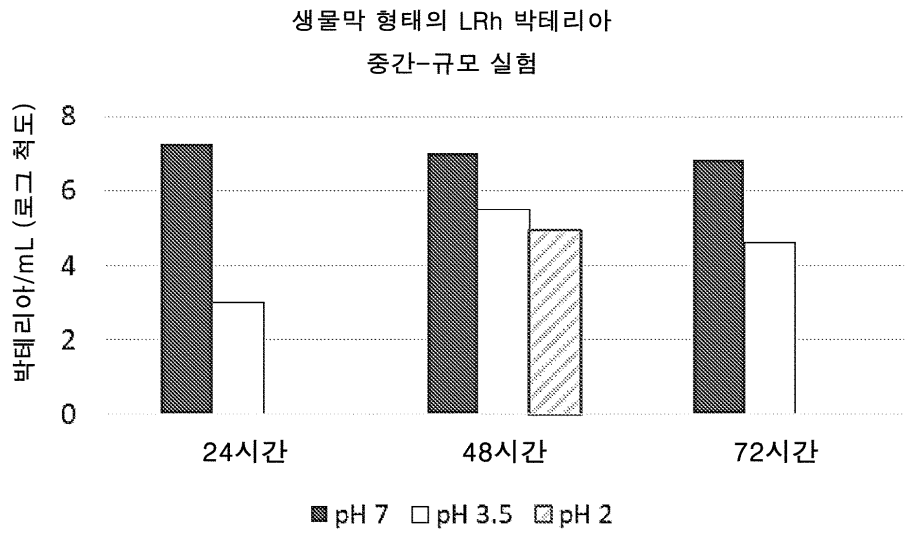
도면18


플랑크톤 LRh
박테리아/mL (로그 척도)
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
pH 7
pH 3.5
pH 2

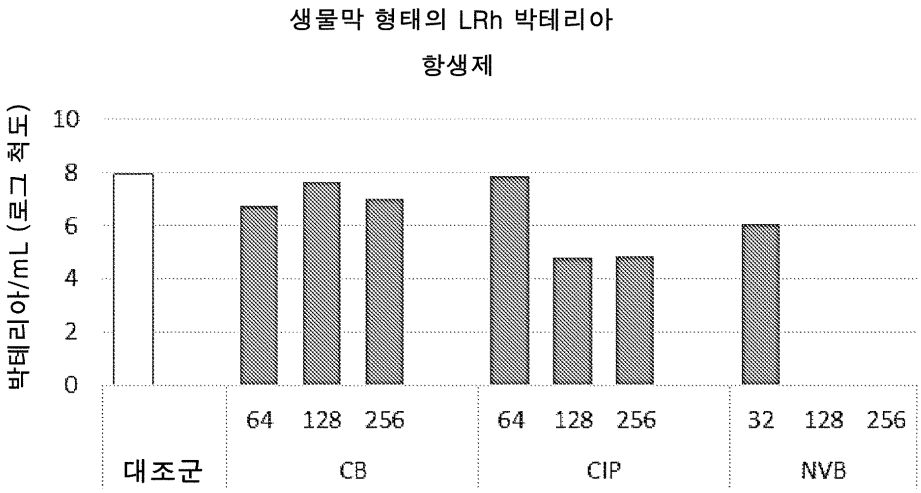
도면19


생물막 형태의 LRh
소-규모 실험
박테리아/mL (로그 척도)
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
70 rpm
130 rpm
70 rpm
130 rpm
48시간
72시간
pH 7
pH 3.5
pH 2

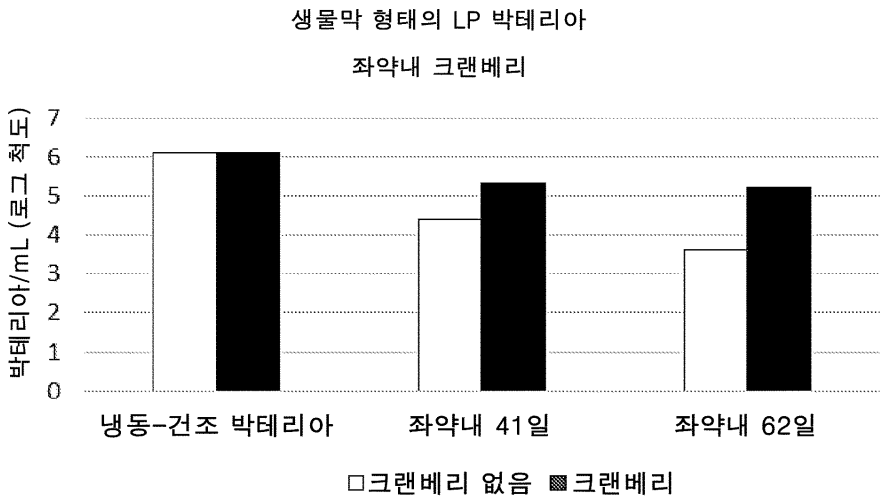
도면20



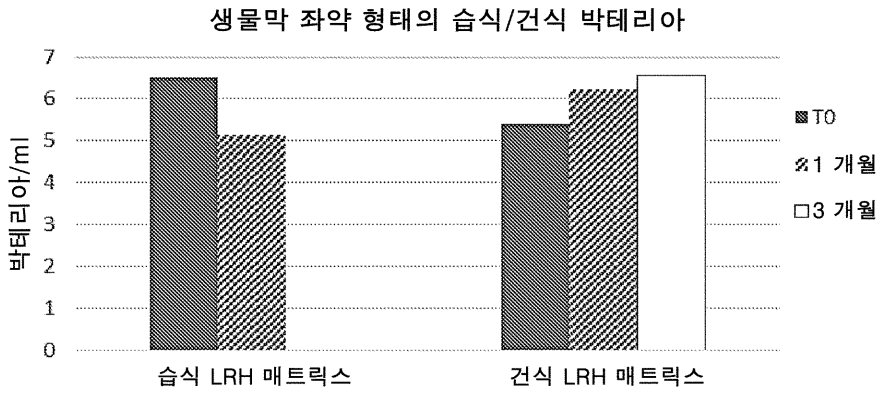
도면21



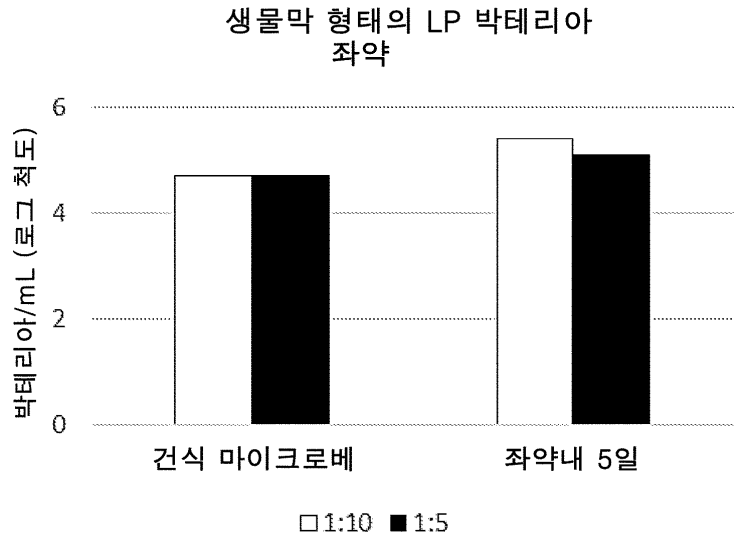
도면22



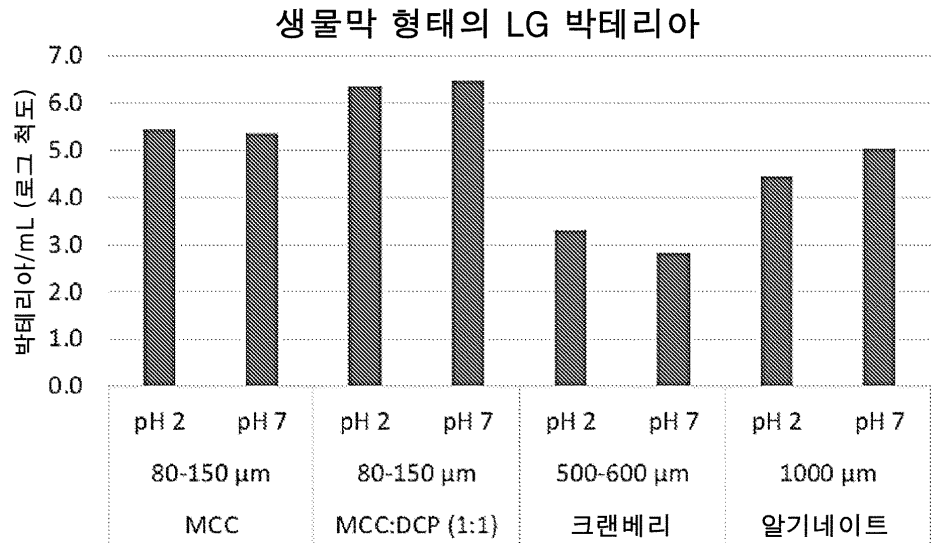
도면23



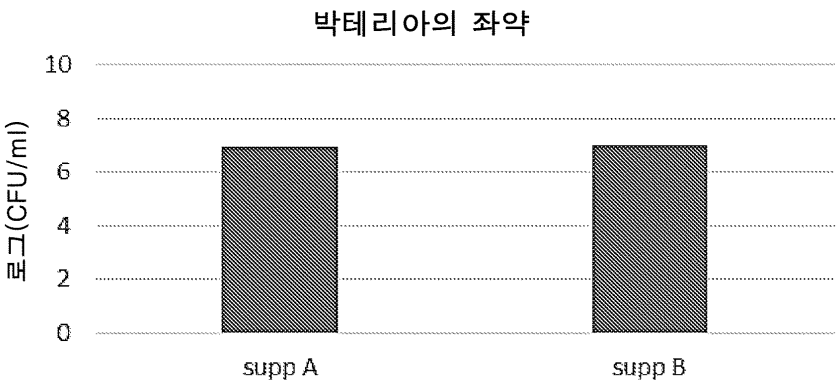
도면24



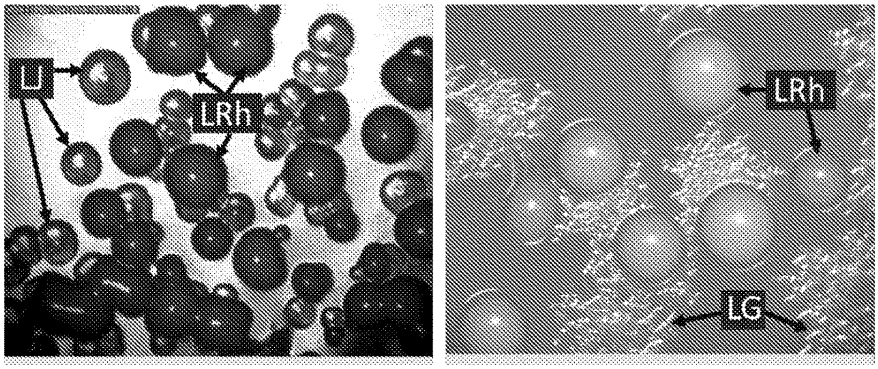
도면25



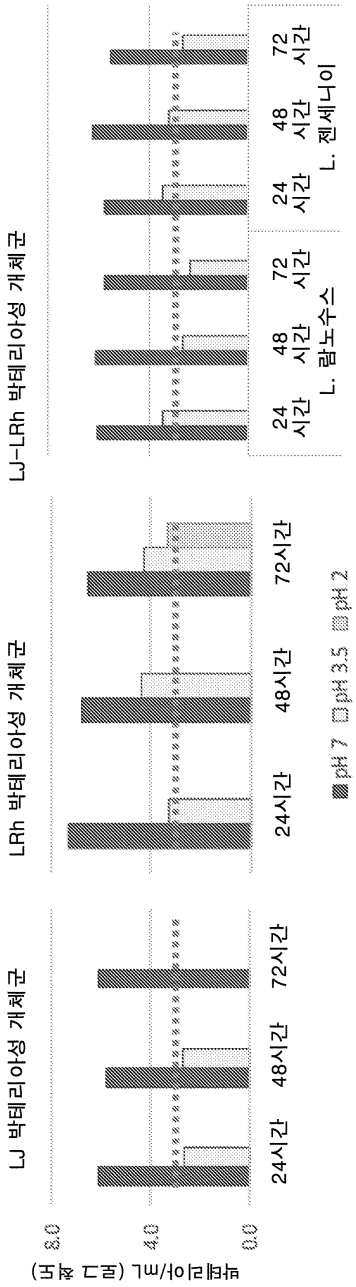
도면26



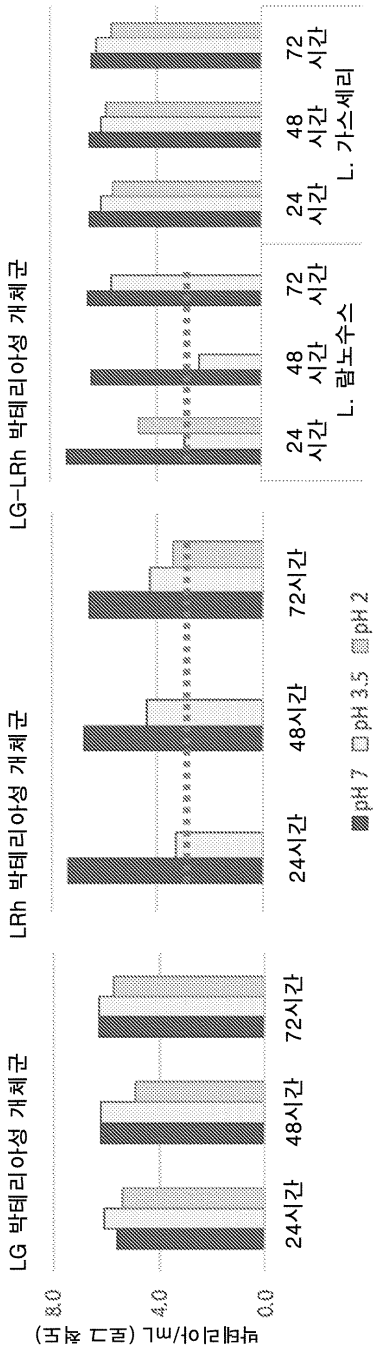
도면27



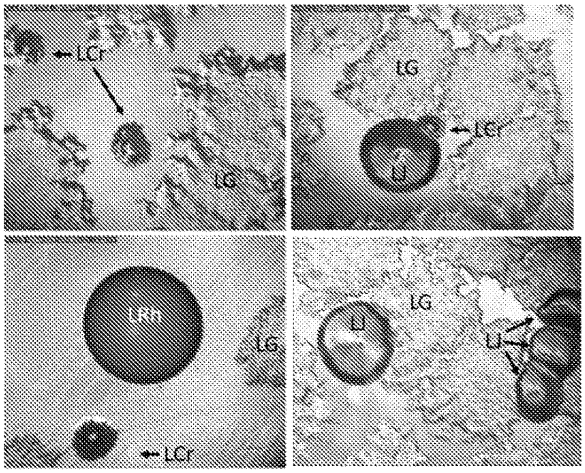
도면28a


LJ 박테리아성 개체군
LRh 박테리아성 개체군
LJ-LRh 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
8.0
4.0
0.0
24시간
48시간
72시간
pH 7
pH 3.5
pH 2
L. 람노수스
L. 젠세니이

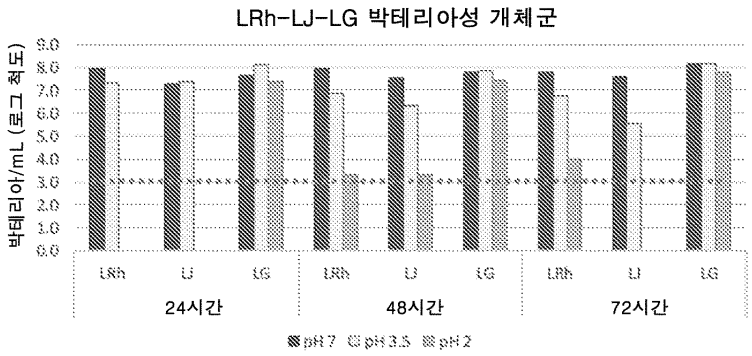
도면28b


박테리아/mL (로그 척도)
0.0
4.0
8.0
LG 박테리아성 개체군
LRh 박테리아성 개체군
LG-LRh 박테리아성 개체군
24시간
48시간
72시간
pH 7
pH 3.5
pH 2
L. 람노수스
L. 가스세리

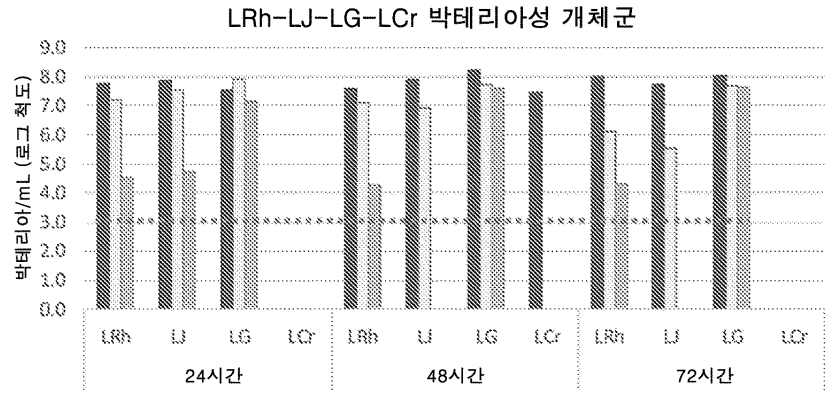
도면29



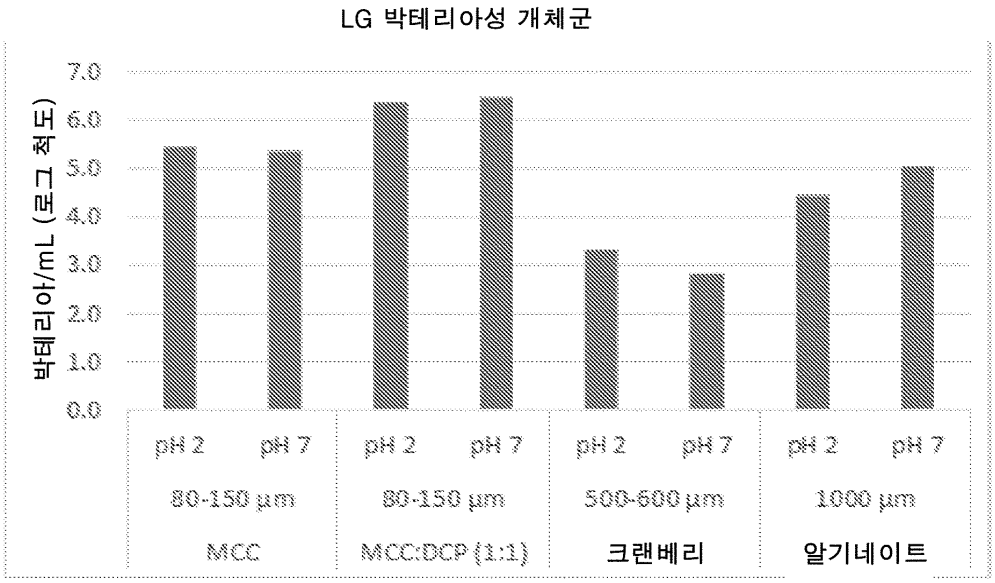
도면30a



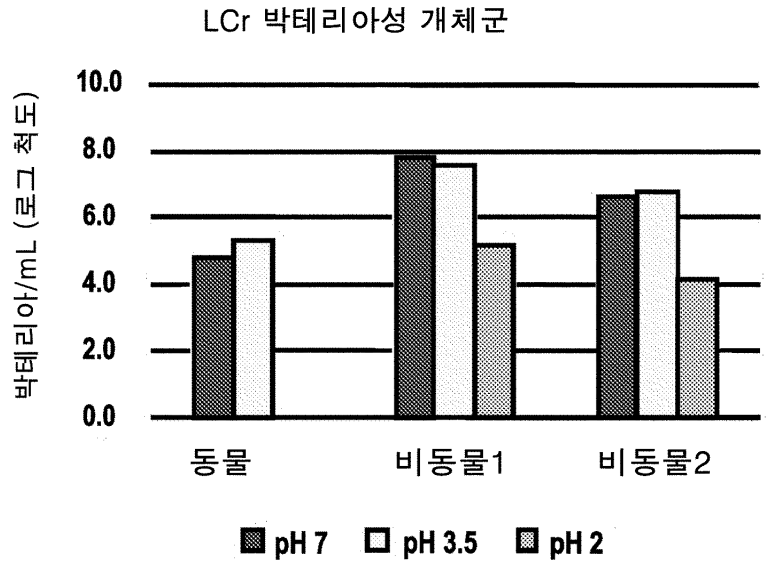
도면30b



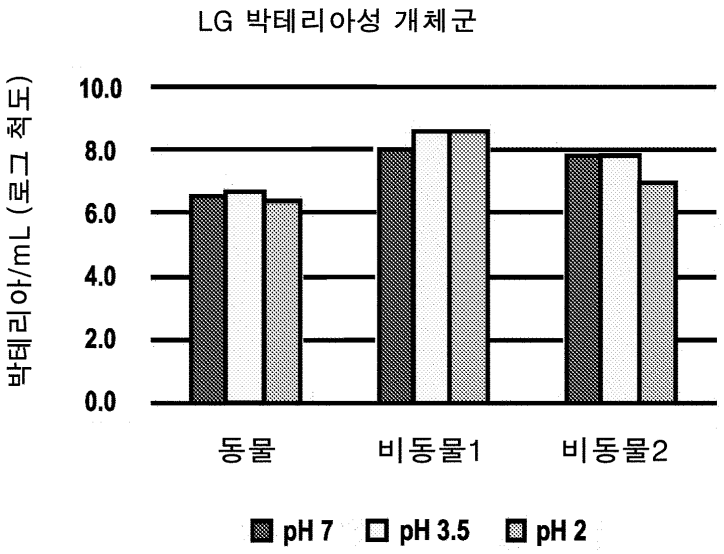
도면31


LG 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
pH 2
pH 7
80-150 μm
MCC
MCC:DCP (1:1)
크랜베리
500-600 μm
1000 μm
알기네이트

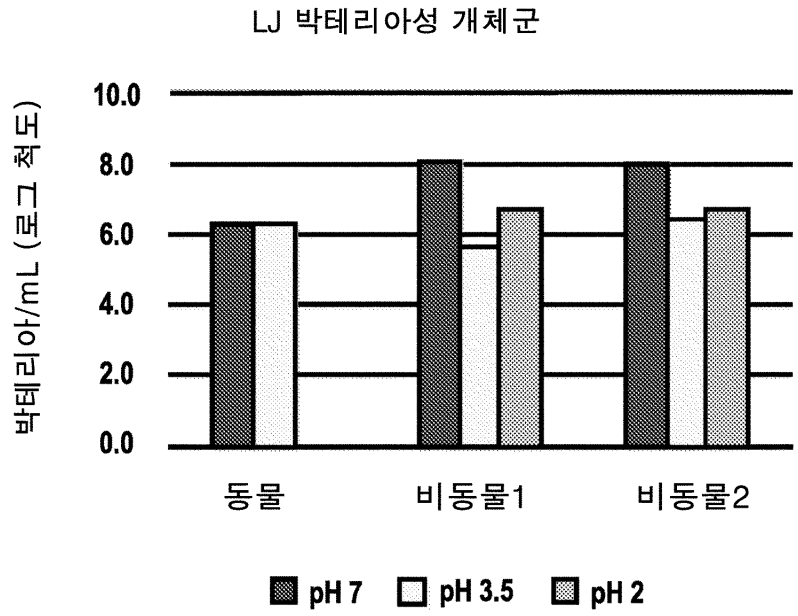
도면32a


LCr 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
동물
비동물1
비동물2
pH 7
pH 3.5
pH 2

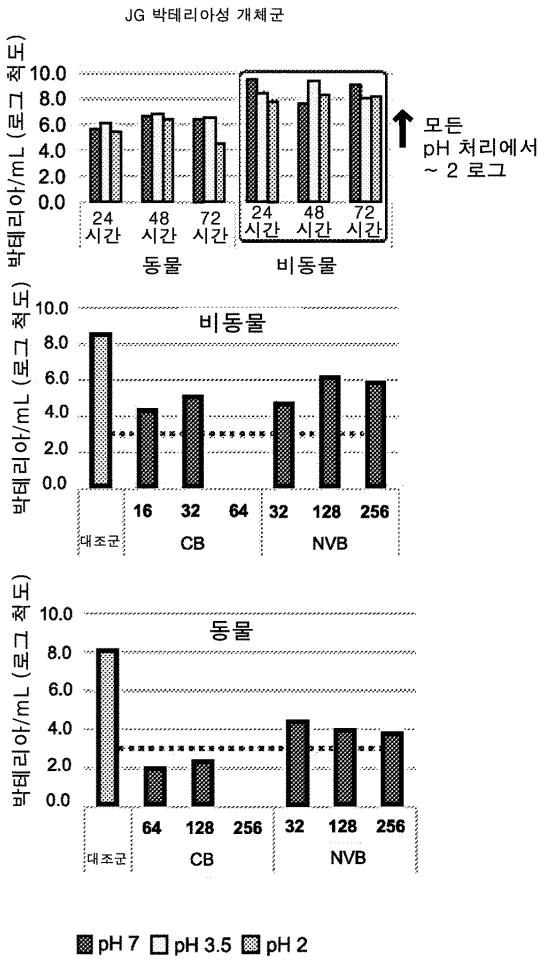
도면32b


LG 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
동물
비동물1
비동물2
pH 7
pH 3.5
pH 2

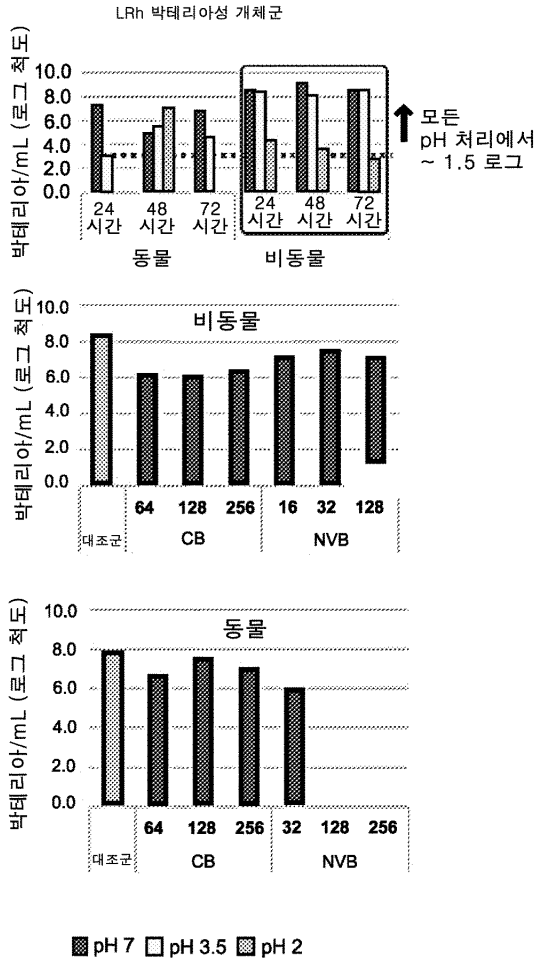
도면32c


LJ 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
동물
비동물1
비동물2
pH 7
pH 3.5
pH 2

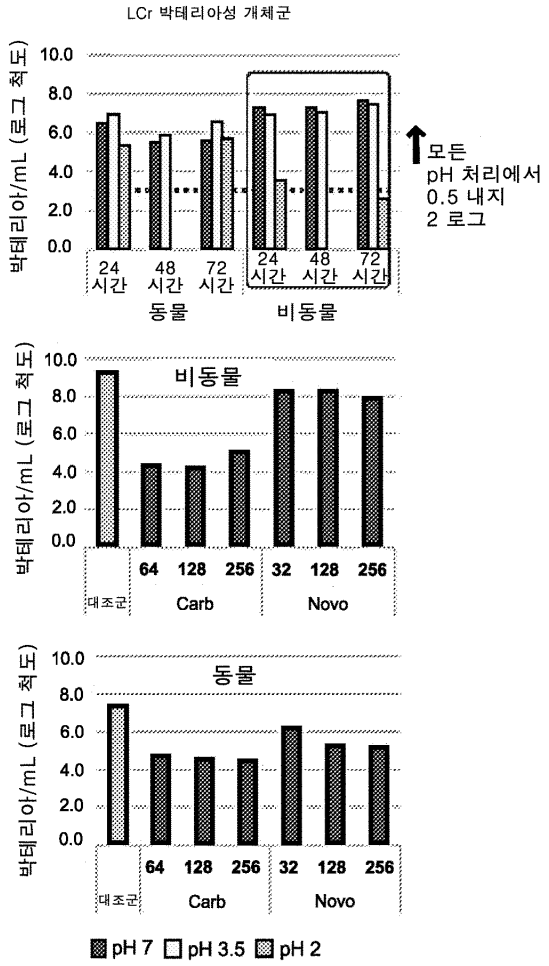
도면33a


JG 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
24 시간
48 시간
72 시간
동물
비동물
모든 pH 처리에서 ~ 2 로그
비동물
대조군
16
32
64
CB
32
128
256
NVB
동물
대조군
64
128
256
CB
32
128
256
NVB
pH 7
pH 3.5
pH 2

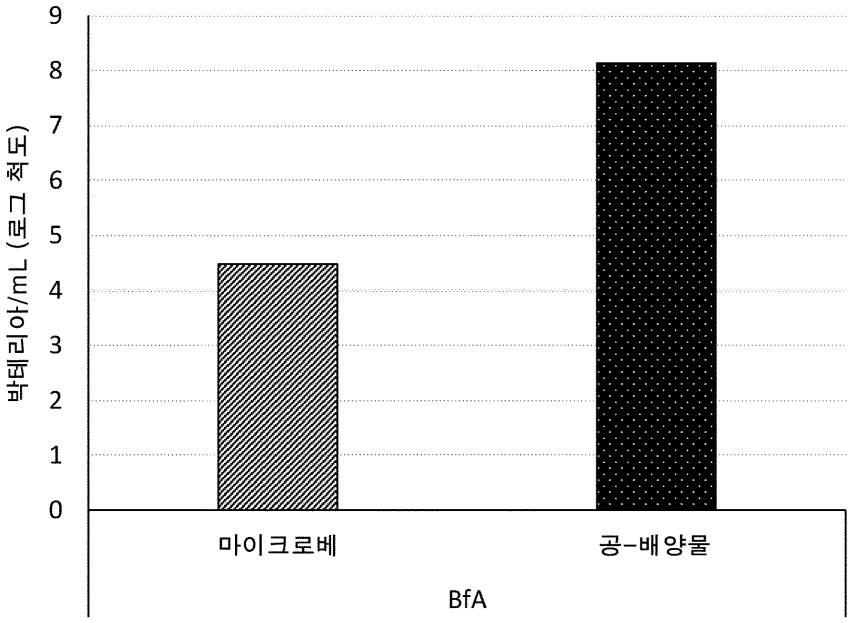
도면33b


LRh 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
24 시간
48 시간
72 시간
24 시간
48 시간
72 시간
동물
비동물
모든 pH 처리에서 ~ 1.5 로그
비동물
64
128
256
16
32
128
대조군
CB
NVB
동물
64
128
256
32
128
256
pH 7
pH 3.5
pH 2

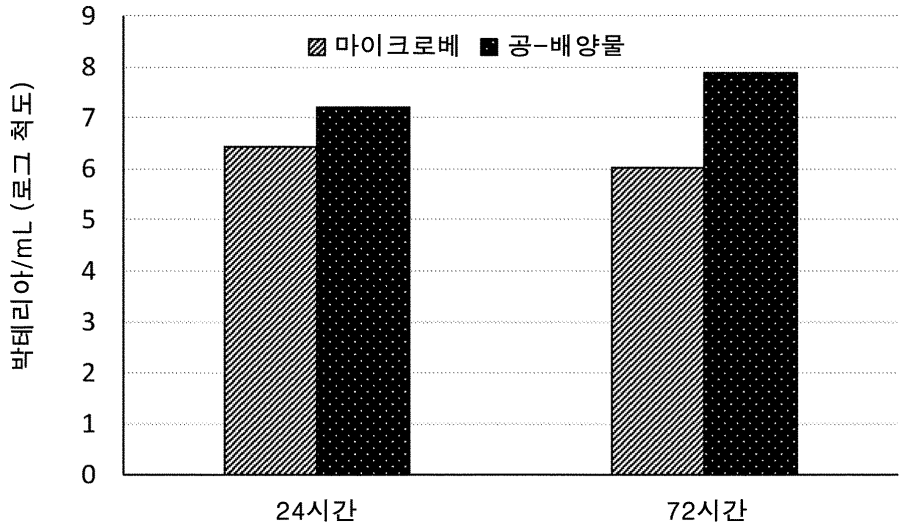
도면33c


LCr 박테리아성 개체군
박테리아/mL (로그 척도)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
24 시간
48 시간
72 시간
동물
비동물
모든 pH 처리에서 0.5 내지 2 로그
비동물
64
128
256
32
대조군
Carb
Novo
동물
pH 7
pH 3.5
pH 2

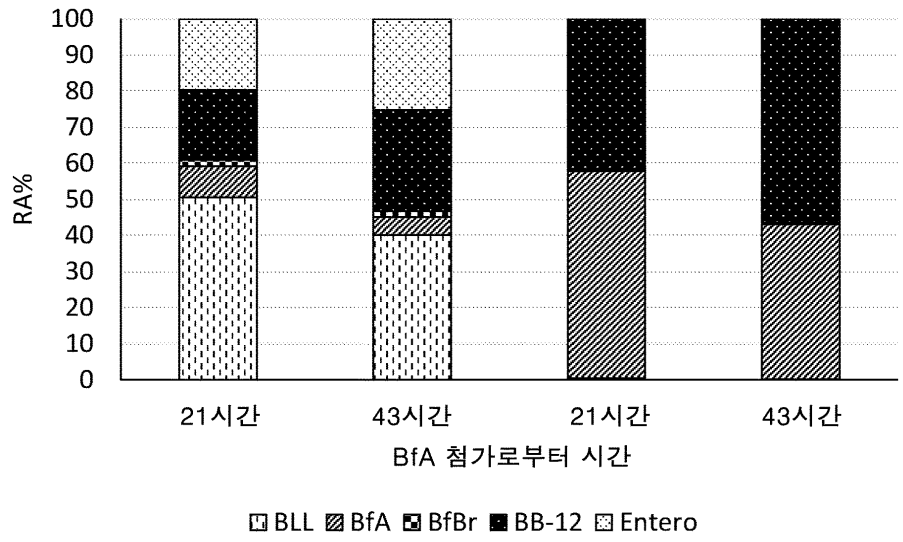
도면34


박테리아/mL (로그 척도)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
마이크로베
공-배양물
BfA

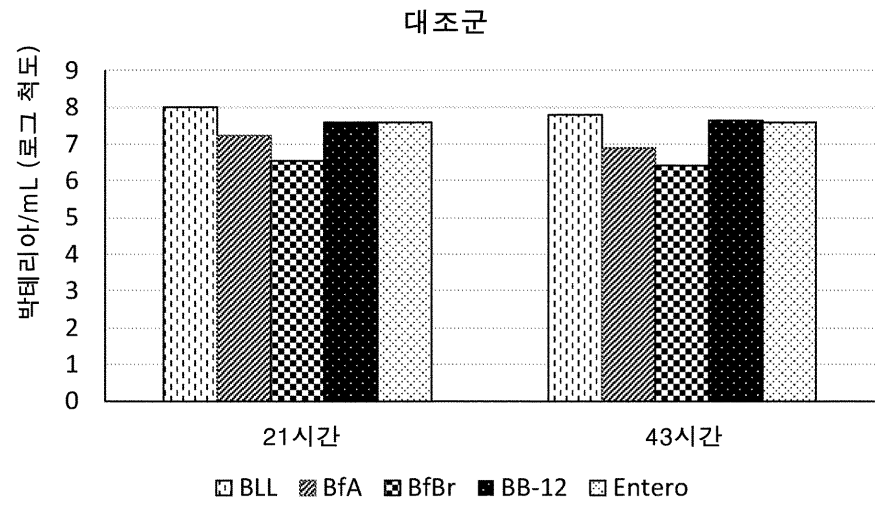
도면35



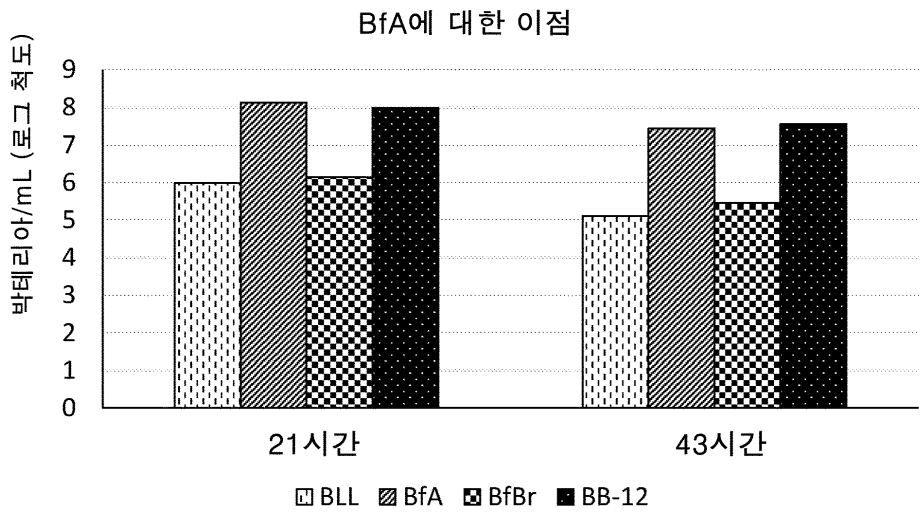
도면36



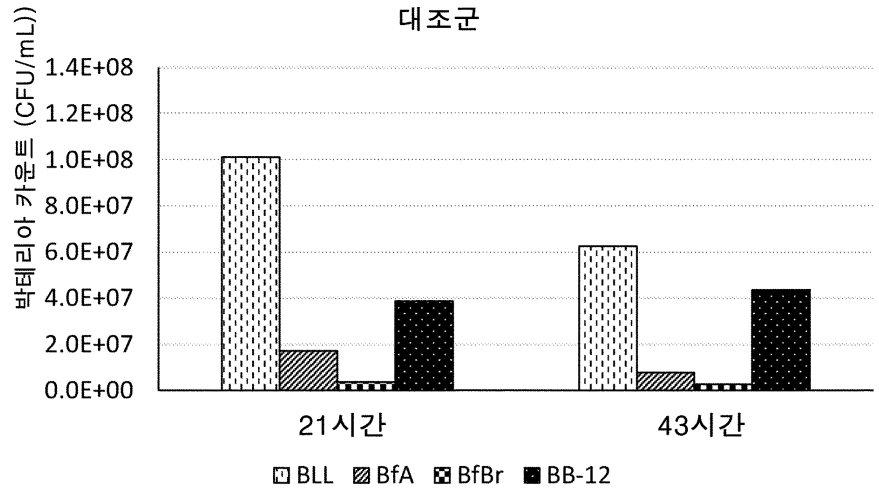
도면37a



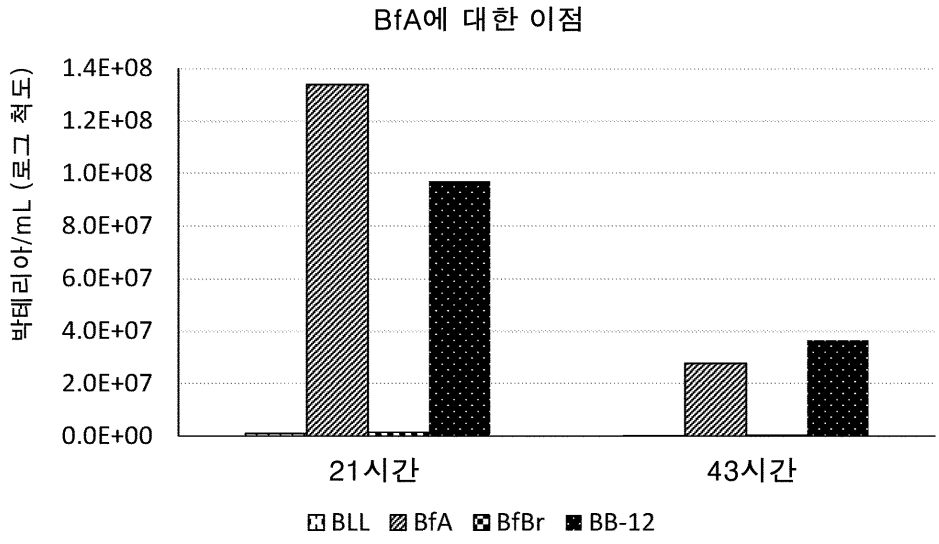
도면37b



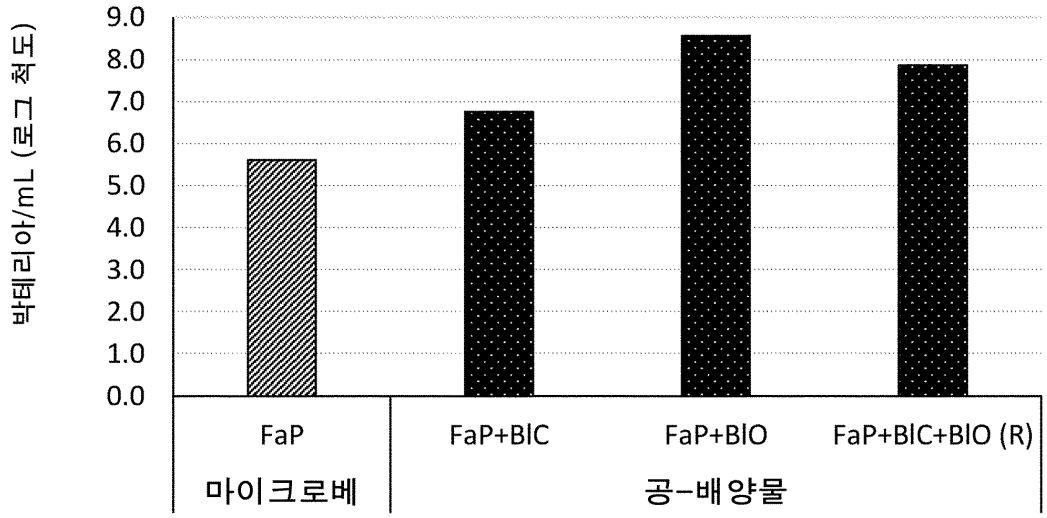
도면38a



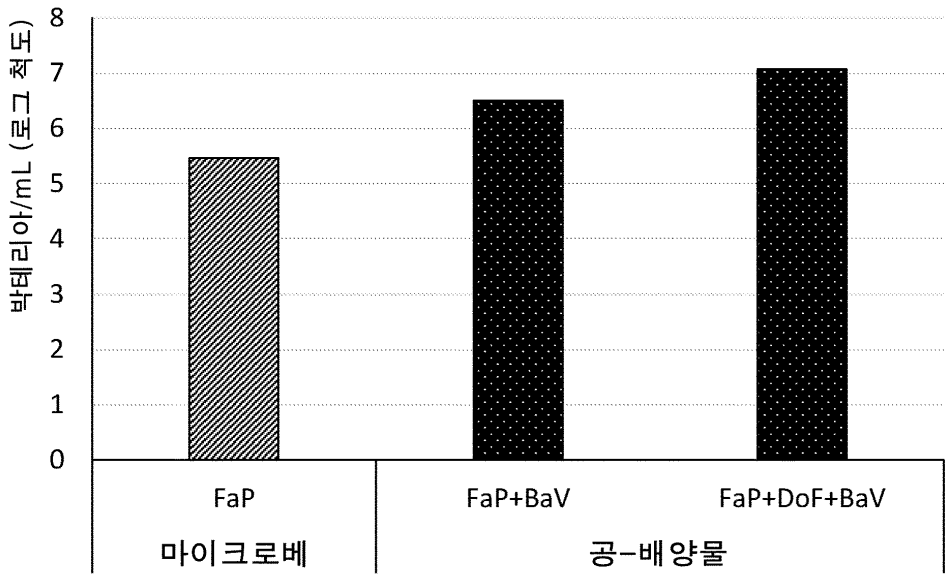
도면38b



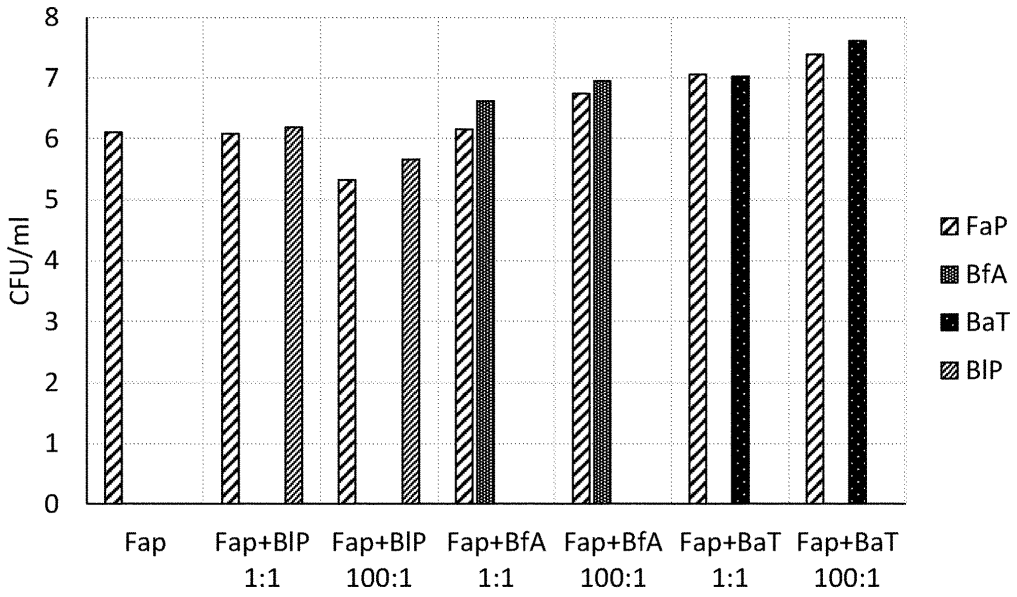
도면39


박테리아/mL (로그 척도)
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
FaP
FaP+BlC
FaP+BlO
FaP+BlC+BlO (R)
마이크로베
공-배양물

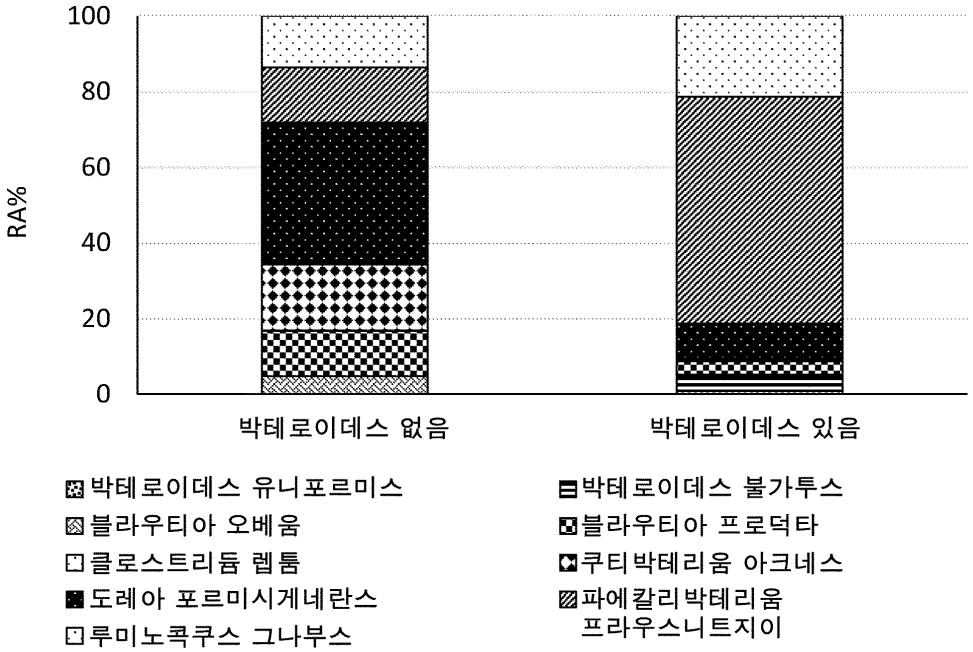
도면40


박테리아/mL (로그 척도)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
FaP
FaP+BaV
FaP+DoF+BaV
마이크로베
공-배양물

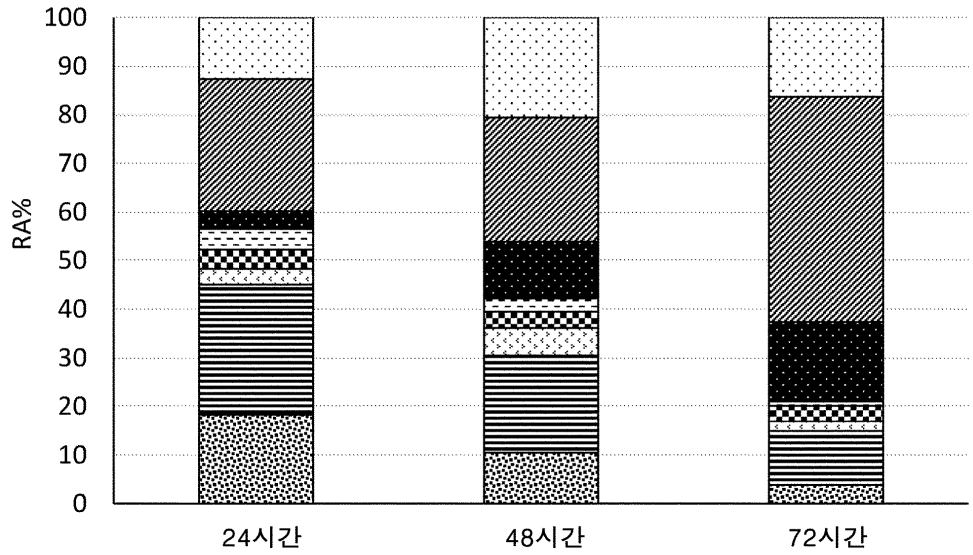
도면41


CFU/ml
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Fap
Fap+BlP 1:1
Fap+BlP 100:1
Fap+BfA 1:1
Fap+BfA 100:1
Fap+BaT 1:1
Fap+BaT 100:1
FaP
BfA
BaT
BlP

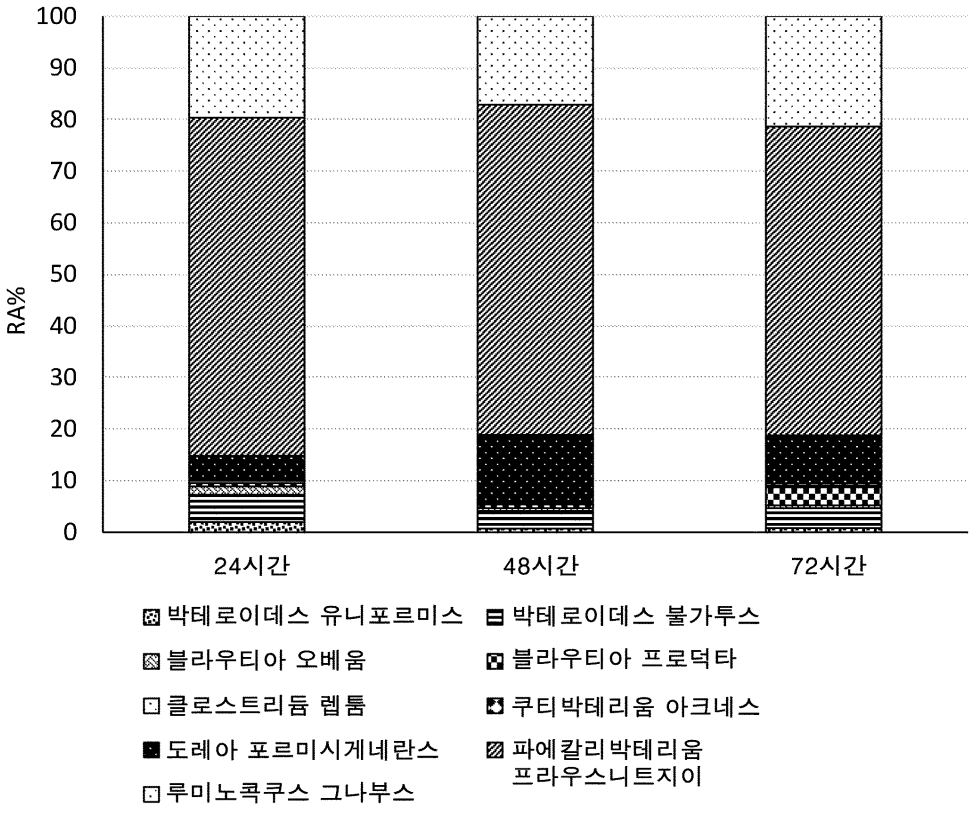
도면42


RA%
100
80
60
40
20
0
박테로이데스 없음
박테로이데스 있음
박테로이데스 유니포르미스
블라우티아 오베움
클로스트리듐 렙툼
도레아 포르미시게네란스
루미노콕쿠스 그나부스
박테로이데스 불가투스
블라우티아 프로덕타
쿠티박테리움 아크네스
파에칼리박테리움 프라우스니트지이

도면43a


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
RA%
24시간
48시간
72시간

도면43b


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
RA%
24시간
48시간
72시간
박테로이데스 유니포르미스
박테로이데스 불가투스
블라우티아 오베움
블라우티아 프로덕타
클로스트리듐 렙툼
쿠티박테리움 아크네스
도레아 포르미시게네란스
파에칼리박테리움 프라우스니트지이
루미노콕쿠스 그나부스