



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0000956
(43) 공개일자 2020년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0073300
(22) 출원일자 2018년06월26일
심사청구일자 2018년06월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임영희
서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호(홍제동, 한양아파트)
마성호
서울특별시 성북구 개운사길 83, 304호(안암동5가)
염지아
서울특별시 성북구 인촌로 30, 601호(안암동2가)
(74) 대리인
특허법인 다해

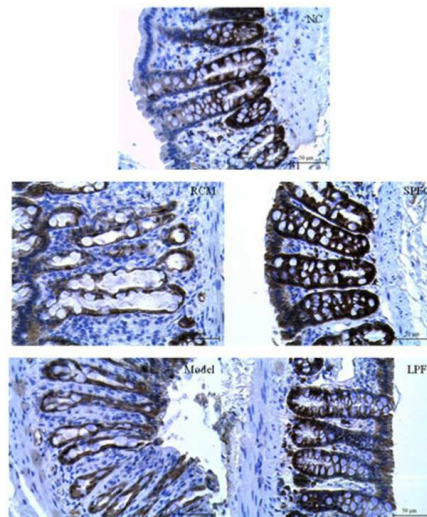
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 프로피오니박테리움 후레우텐레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 장질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 장경구투여가 가능하며, 독성 없이 장내 배상세포의 뮤신 생성을 촉진시켜 장내 점막층을 증강시키는 효과가 있는, 프로피오니박테리움 후레우텐레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

프로피오니박테리움 후레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키는 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키는 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)의 배양액인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터) 배양액은, 프로피오니박테리움 후레우텐레이키를 혐기성 조건 및 20~40℃의 온도범위에서 30~50시간동안 배양하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 뮤신(mucin) 생성을 유도하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 *MUC2* 유전자의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

프로피오니박테리움 후레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키는 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키는 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)의 배양액인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터) 배양액은, 프로피오니박테리움 후레우텐레이키를 혐기성 조건 및 20~40℃의 온도범위에서 30~50시간동안 배양하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 프로피오니박테리움 후레우텐레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 우리 몸을 방어하는 기전 중 하나인 염증 반응은 반드시 필요하나, 그 반응이 결핍되거나 과하지 않도록 조절하는 것은 더욱 중요하다. 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)은 대장 내 점막층에서 이뤄지는 면역 체계가 적절히 작동하지 못 하는 자가 면역 질환으로 분류되는데, 서구에서 잦게 발병하던 상황이, 현대에는 아시아에서도 발병률이 점차 증가 추세를 보이고 있다. 지금까지 연구된 바로는 앞서 기술된 면역 체계에의 문제 이외에도, 흡연이나 위생 수준, 산업화 등으로 인한 환경적인 요인과 더불어 돌연변이 유전자, 장내 균총 구성의

변화 등 염증성 장 질환을 일으키는 요인이 다양하다. 여러 요인들이 복합적으로 작용하기에 발병 원인과 기전은 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없고, 그에 따라 적합한 치료법이 제안되지 못하고 있다.

[0004] 이 때문에 차후에 명확한 치료법이 개발되기 전까지는 예방이 최선책일 것이며, 본 발명에서는 예방책 고안을 염증성 장 질환을 가진 환자들에게서 공통적으로 관찰된 특징에서 시작한다. 염증성 장 질환 발병 시 일반적으로 나타나는 가장 큰 특징 중 하나는 장내 점막층이 손상되는 점이다. 장내 점막층은 주로 뮤신이라는 당단백질로 구성되어 있는데, 장내 표피세포층의 배상세포에서 분비되는 물질이다. 배상세포에서 뮤신을 분비하도록 촉진하는 물질 중 대표적으로 알려진 것은 단쇄지방산 (Short chain fatty acids, SCFAs)으로, 프로피온산이 가장 효과적으로 뮤신 분비를 촉진한다는 결과가 제시되어 있다(Burger-van PASSEN et al., *Biochemical Journal*, 420, 211-219, 2009).

[0005] 한편, 프로피온산에 대해 명확한 세포 독성 연구 결과가 아직까지 제시된 바가 없으며, 경구 복용 시엔 프로피온산이 대장까지 도달하기 전에 간과 소장에서 많은 부분 흡수된다(Chmbers et al., *Gut microbiota*, 64(11):1744-54, 2015; Lin et al., *PLoS One.*, 7(4):e35240., 2012).

[0006] 이에, 본 발명자들은 독성이 없는 유용균주를 이용하여 장내 점막과피로 인한 장관염증의 유발을 개선할 수 있는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 찾고자 예의 노력한 결과, 프로피오니박테리움 후레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 경구 투여하면, 균의 부산물로 생산되는 프로피온산에 의한 뮤신 생성 촉진 효과와 염증 완화 효과가 현저하게 우수하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 장내 점막과피로 인한 장관염증의 유발을 개선하고 효과적인 장점막 재생효과를 보이는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 프로피오니박테리움 후레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 프로피오니박테리움 후레우텐레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물은 위를 지나 장까지 도달하여 장에 정착할 수 있으므로 경구투여가 가능하며, 독성 없이 장내 배상세포의 뮤신 생성을 촉진시켜 장내 점막층을 증강시키는 효과가 있어, 염증성 장질환을 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 *Propionibacterium freudenreichii*을 배양하는 배지 RCM과 배양액을 배상세포에 처리한 후, 세포 독성 효과를 측정한 결과이다.

도 2는 *Propionibacterium freudenreichii*을 배양하는 배지 RCM과 배양액을 배상세포에 처리한 후, 뮤신 단백질 합성 유전자인 *MUC2*의 발현변화를 측정한 실험 결과이다.

도 3은 *Propionibacterium freudenreichii*를 배양하는 배지 RCM과 배양액을 배양세포에 처리한 후, 뮤신 단백질을 MUC2의 발현 정도를 면역형광염색하여 비교 실험한 결과이다.

도 4는 *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 대장염 모델라트에 공급한 후, 병 발병 정도 (Disease activity index)를 평가한 실험 결과이다.

도 5는 *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 대장염 모델라트에 공급한 후, 대장의 손상 개선 정도를 H&E 염색을 통해 비교/평가한 실험 결과이다.

도 6은 *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 대장염 모델라트에 공급한 후, 대장의 손상 개선 정도를 표피층 손상, crypt 구조 붕괴, 염증 세포 침습의 3가지 기준에 의거하여 평가한 결과이다.

도 7은 *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 대장염 모델라트에 공급한 후, 면역 조직 화학 염색을 통해 MUC2 단백질을 발현량을 비교/평가한 실험 결과이다.

도 8은 *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 대장염모델라트에 공급한 후, MUC2 단백질을 발현량을 프로그램을 통해 수치화한 결과이다.

도 9는 *Propionibacterium freudenreichii* 생균을 대장염 모델라트에 투여한 후, 배변물 내 *Propionibacterium freudenreichii* 생균을 정량화한 결과이다.

도 10은 *Propionibacterium freudenreichii*에 의한 대장염모델라트의 질병 발병 정도를 확인하기 위하여, 대장염모델라트에 균 배양액을 투여한 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명에서는 GRAS (Generally recognized as safe)로 알려진 *Propionibacterium freudenreichii*를 경구 투여하여 SD-rat의 장에 안착시킨 후, 균의 부산물로 생산되는 프로피온산에 의한 뮤신 생성 촉진 효과와 염증 완화 효과를 확인하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서, 상기 배양액은 프로피오니박테리움 후레우덴레이키를 배양 배지에서 배양하여 수용한 배양액, 농축 배양액, 배양액 건조물, 배양 여과액, 농축 배양 여과액, 또는 배양 여과액의 건조물을 의미하는 것으로 상기 균주를 포함하는 것, 배양한 후 균주를 제거한 배양여액일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키는 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키는 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터)의 배양액인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)(한국미생물보존센터) 배양액은, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키를 혐기성 조건 및 20~40℃의 온도범위에서 30~50시간동안 배양하여 수득되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 배양 시 사용할 수 있는 배지의 종류는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, RCM (Reinforced Clostridial Medium) 배지를 사용할 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 배양 시 상기 균주가 접종된 배지의 10 내지 100배 부피로 신선한 배지를 추가하여 1 내지 5시간 더 배양할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서, 상기와 같은 배양으로 얻어진 배양액을 원심분리하여 균주를 제거한 후 얻어진 상등액을 사용할 수 있고, 필요에 따라서는 상기 상등액을 여과하여 얻어진 여과액을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 경구 투여하면, 균의 부산물로 생산되는 프로피온산에 의한 뮤신 생성 촉진 효과와 염증 완화 효과가 현저하게 우수하다는 것을 확인하였다.

- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 뮤신(mucin) 생성을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 *MUC2* 유전자의 발현을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, *MUC2* 단백질의 발현을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, 장질환은 장점막 파괴에 따른 장관염증이 발생한 모든 질병을 포함한다.
- [0031] 본 발명에서, 용어 '예방'은, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 함유하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는, 상기 프로피오니박테리움 후레우텐레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 함유하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, *Propionibacterium freudenreichii*의 장 내 뮤신 생성 촉진 효과를 확인하기에 앞서 *in vitro* 상에서 배상세포 LS174T cell line (American Type Culture Collection, USA)를 이용하여 균 배양액에 대한 세포 독성 시험과 뮤신 생성 촉진 실험을 진행하였고, 생균과 균 배양액을 투여한 래트에게 5% DSS (Dextran sodium sulfate)로 대장염을 유도하여, 뮤신 생성 시험 및 항염증 효과 시험을 수행하였다. 그 결과, 장내 배상세포에 *P. freudenreichii* 배양액을 처리하였을 때, 세포 독성이 없으며(도 1), *MUC2* 유전자 및 *MUC2* 단백질 발현량이 대조군에 비해 유의하게 높고(도 2 및 도 3), 질병 발병 정도(DAI) 수치 변화량이 낮으며(도 4), 대장염모델래트의 뮤신 분비량이 회복한다는 것을 확인하였고(도 5, 도 6, 도 7 및 도 8), *P. freudenreichii* 균이 장내 정착한다는 것을 확인하여, 경구투여 가능성을 확인하였다(도 9).
- [0033] 따라서, 본 발명의 *Propionibacterium freudenreichii*를 함유하는 염증성 장질환 약학 조성물은 뮤신 생성을 촉진하여, 장 점막 보호 및 증강 효과에 의해 장관염증을 개선시킨다는 것을 확인하였다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 조성물뿐만 아니라, 항염증 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 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 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0037] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.2 mg 내지 17 mg을 매일 또는 격일로 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0038] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0039] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 유산균 프로피오니박테리움 후레우텐레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P) 배양액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제

등이 포함될 수 있다.

- [0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결 건조 제제, 좌제 등이 포함된다.
- [0041] 비수성용제, 현탁 용제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명은 다른 관점에서, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키(*Propionibacterium freudenreichii*), 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키는 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P)인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키는 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P) (한국미생물보존센터)의 배양액인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P) (한국미생물보존센터) 배양액은, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키를 혐기성 조건 및 20~40℃의 온도범위에서 30~50시간동안 배양하여 수득되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Behcet's disease), 장결핵(intestinal tuberculosis) 및 장염(enteritis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, "개선"은 본 발명의 식품 조성물을 이용하여 염증성 장질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 유산균 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P) (한국미생물보존센터) 배양액이 첨가되는 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 가공 식품 및 건강 기능 식품을 모두 포함한다.
- [0048] 본 발명에 따른 식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 필수 성분이 지시된 비율로 상기 화합물을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를들어, 포도당, 과당; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아추출물, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 g 내지 10 g이다.
- [0049] 본 발명에서, 프로피오니박테리움 후레우덴레이키, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 첨가제일 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 식품 첨가제는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 첨가 비율은 제한되지 않으나, 본 발명의 리놀레산 100 중량부당 0.1 내지 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0051] 본 발명의 프로피오니박테리움 후레우덴레이키 MJ2 (*Propionibacterium freudenreichii* KCCM12272P) (한국미생물보존센터) 배양액은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로 건강기능식품 내 본 발명의 조성물의 양은 전체 식품 중량부당 0.1 내지 90 중량부로 할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의

경우에 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] **실시예 1: *Propionibacterium freudenreichii*의 생균, 사균 및 배양 상등액 준비**

[0056] 본 발명에서 사용한 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 (KCCM12272P)는 한국미생물보존센터에 기탁한 균을 사용하였다.

[0057] 실험에 사용할 *Propionibacterium freudenreichii*의 생균, 사균 및 배양 상등액을 제조하기 위하여, 배지 RCM (Reinforced Clostridial Medium)에 3차례 이상 활성화시킨 균을 접종 후, GasPak (Franklin lakes, NJ, USA)을 이용해 혐기 환경을 조성하고 37℃에서 36 ~ 40시간 배양한다. 배양된 균액을 3,000 rpm에서 원심분리시켜 상등액은 pH 7.0 ± 0.1이 되도록 조절, 0.2 μm pore 크기의 필터 (Minisart®NML syringe filter 16534, Sartorius)에 여과하여 사용하였고, 원심분리로 모은 생균은 PBS (Phosphate-buffered saline)에 10⁸ CFU/ml이 되도록 희석하여 사용하였다.

[0059] **실시예 2: *Propionibacterium freudenreichii* 배양액의 장내 배상세포 독성 효과 확인**

[0060] 2-1. 장내 배상세포 배양 및 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액의 처리

[0061] 배상세포 (LS174T goblet cell)를 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 배지에 10% FBS (Fetal bovine serum), 100 units/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂-95% air 환경에서 배양하였다. 세포가 70 ~ 80%의 confluency를 이루면 0.25% trypsin을 이용해 세포를 떼어내고, 2.5 x 10⁵ cells/ml로 세포 수를 조절한 후, 96 well plate에 200 μl씩 seeding 하였다. 24시간 동안 안정화 시킨 후, RCM 배지와 준비된 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액을 총 세포 배양액의 10%로 처리하여 48시간 배양하였다.

[0063] 2-2. *Propionibacterium freudenreichii* 배양액의 배상세포 독성 효과 확인

[0064] 세포 배양액을 제거하고 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide)를 125 μg/ml로 처리하여 37℃, 1시간 배양하였다. 보라색 포마잔 결정이 확인되면, 상등액만 제거 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 100 μl 넣고, microplate reader를 이용해 540 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

[0065] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 RCM이나 균 배양액 모두 세포 독성이 없는 것을 알 수 있었다.

[0067] **실시예 3: *Propionibacterium freudenreichii* 배양액에 의한 *MUC2* 유전자 발현**

[0068] *MUC2* 유전자는 뮤신 단백질을 합성하는 유전자로, 균 배양액에 의한 유전자의 발현 변화를 mRNA 수준에서 측정하였다.

[0070] 3.1 장내 배상세포 배양 및 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액의 처리

[0071] 배상세포를 RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂-95% air 환경에서 배양하였다. 세포가 70 ~ 80%의 confluency를 이루면 0.25% trypsin을 이용해 세포를 떼어내고, 2.5 x 10⁵ cells/ml로 세포 수를 조절한 후, 6 well plate에 2 ml씩 seeding 하였다. 24시간 동안 안정화 시킨 후, RCM 배지와 준비된 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액을 총 세포 배양액의 10%로 처리하

여 48시간 배양하였다.

[0073] 3.2 mRNA 추출 및 발현량 측정

[0074] Trizol을 이용해 RNA를 추출하고, RevertAid First Strand cDNA kit (Thermo Scientific, USA)를 이용해 cDNA로 합성하여, Kapa SYBR Fast qPCR kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA) 시약과 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)를 이용해 real time PCR을 시행하였다. 사용된 primer의 sequence는 GAPDH (Sense(서열번호 1): 5' - GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT -3' , Antisense(서열번호 2): 5' - TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG -3'), MUC2 (Sense(서열번호 3):5' -ACC CGC ACT ATG TCA CCT TC -3' , Antisense(서열번호 4): 5' - GGA CAG GAC ACC TTG TCG TT -3')이다.

[0075] 음성 대조군의 유전자 발현량을 1로 기준하여 상대정량(2-deltadelta Ct method) 한 결과, 도 2의 결과와 같이, 균 배양액을 처리한 군의 MUC2 유전자 발현량이 음성 대조군이나 실험 대조군에 비해 유의하게 높음을 확인하였다.

[0077] 실시예 4: *Propionibacterium freudenreichii* 배양액에 의한 MUC2 단백질 발현

[0078] 4.1 장내 배상세포 배양 및 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액의 처리

[0079] 배상세포를 RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂-95% air 환경에서 배양하였다. 세포가 70 ~ 80%의 confluency를 이루면 0.25% trypsin을 이용해 세포를 떼어내고, 2.5 x 10⁵ cells/ml로 세포 수를 조절한 후, 12 well plate에 1 ml씩 seeding 하였다. 24시간 동안 안정화 시킨 후, RCM 배지와 준비된 *Propionibacterium freudenreichii* 배양액을 총 세포 배양액의 10%로 처리하여 48시간 배양하였다.

[0081] 4.2 면역형광염색 및 단백질 발현량 비교

[0082] 4% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후에 항체를 이용하여 염색하였다. 사용된 1차 항체는 anti-MUC2 (GTX100664, Genetex)이고, 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG, DyLight 488 (35553, Thermo Scientific)이다.

[0083] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 균 배양액을 처리한 군에서의 MUC2 단백질 발현량이 음성 대조군이나 실험 대조군, 양성 대조군에 비해서 더욱 높게 발현됨을 확인하였다.

[0085] 실시예 5: *Propionibacterium freudenreichii*에 의한 대장염 모델래트의 질병 발병 정도 평가

[0086] 5.1 동물실험 및 *Propionibacterium freudenreichii*, 균 배양액 투여

[0087] 대장염 모델래트는 수컷 SD-rat 5주령 (147.50 ± 5.53 g)을 사용하였다 (코아텍, 한국). 사육 환경은 24 ± 1 °C, 습도 55%, 12 h-12 h 명암주기 하에, 음수와 사료에 자유로이 접근 가능하도록 하였으며, 고려대학교 동물윤리위원회 KUIACUC-2017-32 승인을 받아 동물실험을 진행하였다.

[0088] 실험동물들은 그룹 당 8마리씩 무작위로 5그룹에 배정되어, 3주간의 경구투여로 *Propionibacterium freudenreichii* 생균 (LPF)과 균 배양액 (supernatant of *P. freudenreichii* culture, SPFC)을 공급 받았으며, 경구투여 마지막 주차에는 음수에 녹인 5% DSS (Dextran sodium sulfate)를 공급하였다(도 10).

[0090] 5.2 *Propionibacterium freudenreichii*에 의한 대장염모델래트의 질병 발병 정도(disease activity index, DAI) 평가

[0091] 일반적으로 대장염이 발생/진행하게 되면, 체중이 감소함과 동시에 변이 묽어지고, 심해질 경우 장내 점막층이 심하게 손상되면서 혈흔이 함께 관찰된다. 따라서 질병 발병 정도의 측정은 체중 감소량과 변의 경도, 혈흔 정도 여부에 따라 각각을 평가하여 평균치를 비교하였다(표 1).

표 1

Score	Body weight loss	Stool consistency	Bleeding
0	None	Normal	None
1	1 - 5%	Soft but maintain morphology	A little bloodstain
2	5 - 10%	Soft	Apparent bloodstain on fecal pellets & rectum
3	10 - 20%	Very soft	
4	> 20%	Diarrhea	Gross bleeding

[0092]

[0093] 그 결과, 도 4의 결과처럼 5% DSS만을 공급한 모델 그룹과 5% DSS와 RCM 배지를 함께 공급한 RCM 그룹의 DAI 수치는 음성 대조군에 비해 유의하게 큰 폭으로 증가한 반면에, *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 균 배양액을 5% DSS와 함께 공급한 LPF 그룹과 SPFC 그룹의 DAI 수치는 각각의 실험 대조군 (모델 그룹, RCM 그룹)에 비해 그 변화량이 낮은 것을 확인하였다.

[0095] 실시예 6: *Propionibacterium freudenreichii*에 의한 대장염 모델래트의 대장 손상 정도 평가

[0096] 6.1 H&E 염색 및 대장 구조 손상 정도 평가

[0097] 실험동물 희생 즉 후에 대장 구조의 손상 정도를 확인하기 위해 조직 염색을 실시하였다. 원위 결장을 잘라 PBS로 씻은 후 10% 포르말린에 고정하고, 파라핀 블록을 제작하였다. 이를 마이크로톰을 이용해 조직절편을 제작하여 H&E 염색시키고 원위 결장의 구조와 염증 상태를 조직병리학적으로 평가하였다. 평가 항목은 장내 표층의 소실 정도와 crypt 구조 붕괴, 염증 세포 침습의 3가지 기준에 의거하여 평가하고 합산하여 그룹간 비교하였다(표 2).

표 2

Score	Surface epithelial	Crypt	Inflammatory cell
	Loss	Destruction	infiltration
0	Normal	Normal	Normal
1	Localized & mild	Localized & mild	Localized & mild
2	Localized & moderate	Localized & moderate	Localized & moderate
3	Extensive & moderate	Extensive & moderate	Extensive & moderate
4	Extensive & severe	Extensive & severe	Extensive & severe

[0099] 도 5는 염색 결과 사진이고, 도 6은 평가된 바를 점수로 환산하여 비교한 결과로, 대장염모델그룹과 RCM 그룹의 원위 결장 내 표층이 크게 소실되고, crypt 구조가 5% DSS에 의해 파괴되었으며, 염증 세포가 다수 침습했음이 관찰되었다. 반면, *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 제공받은 그룹의 원위 결장 상태가 비교적 음성 대조군과 비슷하게 보존됨을 확인하였다.

[0101] 실시예 7: *Propionibacterium freudenreichii*에 의한 대장염모델래트의 뮤신 분비량 측정

[0102] 실험동물 희생 즉 후에 대장 내 뮤신 분비량을 그룹 간 비교하기 위해 면역 조직 화학 염색을 실시하였다. 원위 결장을 잘라 PBS로 씻은 후 10% 포르말린에 고정하고, 파라핀 블록을 제작하였다. 이를 마이크로톰을 이용해 조직절편을 제작한 후, UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer kit (Thermo Scientific, USA)와 1차 항체 anti-MUC2 (sc-7314, Santa cruz)를 이용하여 대장 내 배상세포에 의해 발현된 MUC2 단백질을 염색하여 그룹간 비교를 진행하였다.

[0103] 도 7은 염색 결과 사진이고, 도 8은 프로그램을 이용해 발현된 MUC2 단백질 양을 정량화시킨 실험 결과이다. 대장염 모델그룹과 RCM 그룹의 뮤신 분비량은 음성 대조군에 비해 뮤신 발현이 감소됨을 확인하였으며, *Propionibacterium freudenreichii* 생균과 배양액을 제공받은 그룹의 뮤신 발현량은 각각의 실험 대조군에 비해

회복됨을 알 수 있었다.

[0105] 실시예 8: *Propionibacterium freudenreichii*균의 장내 정착 측정

[0106] *Propionibacterium freudenreichii* 생균 (10^8 CFU/ml)를 실험동물에 경구투여한 후 7, 14, 21, 29일 후 분변 중 *Propionibacterium freudenreichii* 생균수를 측정하였다. 시험일에 채취한 분변을 생리식염수를 이용하여 1:3으로 희석하고 VELA배지(1.0% tryptone, 1.0% yeast extract, 2.1% sodium lactate (60% syrup), 0.025% K_2HPO_4 , 0.005% $MnSO_4$, 1.5% agar)에 도포 후 GasPak을 이용한 혐기적인 조건에서 30℃에서 6일간 배양 후 집락수를 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 분변으로부터 회수된 *Propionibacterium freudenreichii* 생균수를 측정한 결과로, 경구투여된 *Propionibacterium freudenreichii* 균이 장에 잘 정착되었음을 나타내었다.

[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0111]

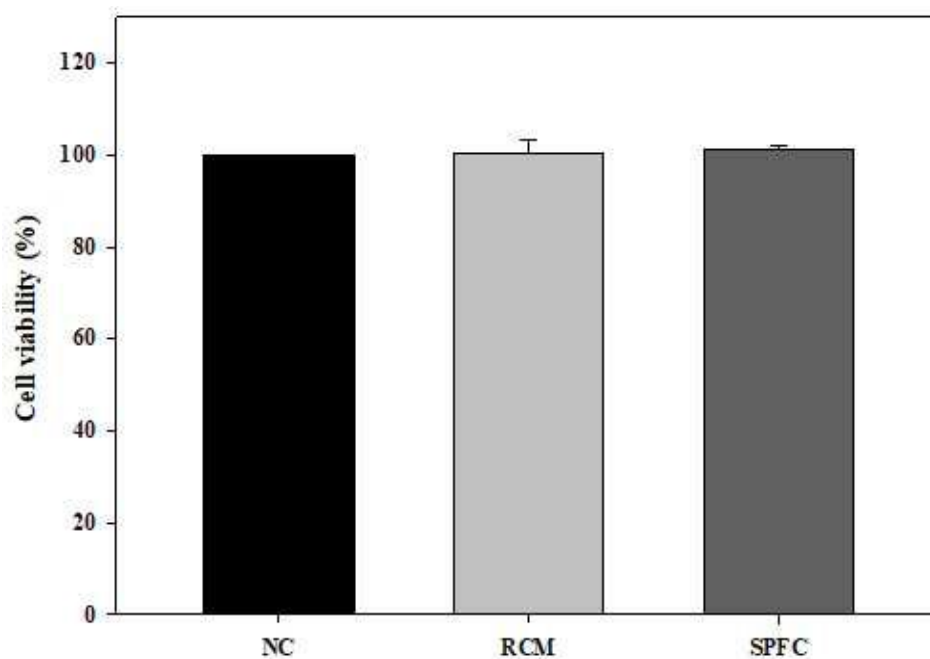
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12272P

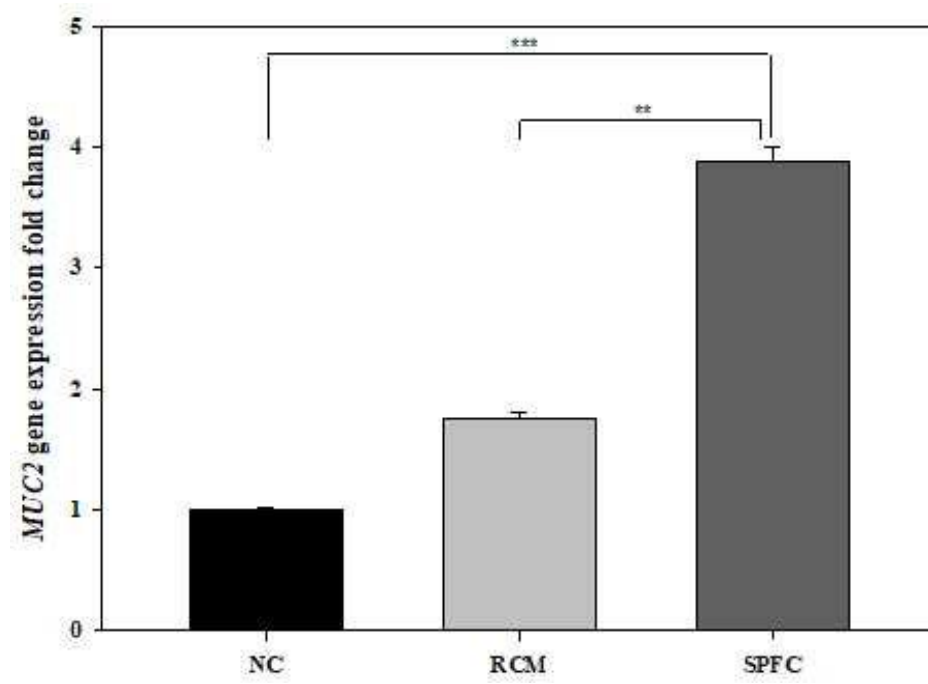
수탁일자 : 20180608

도면

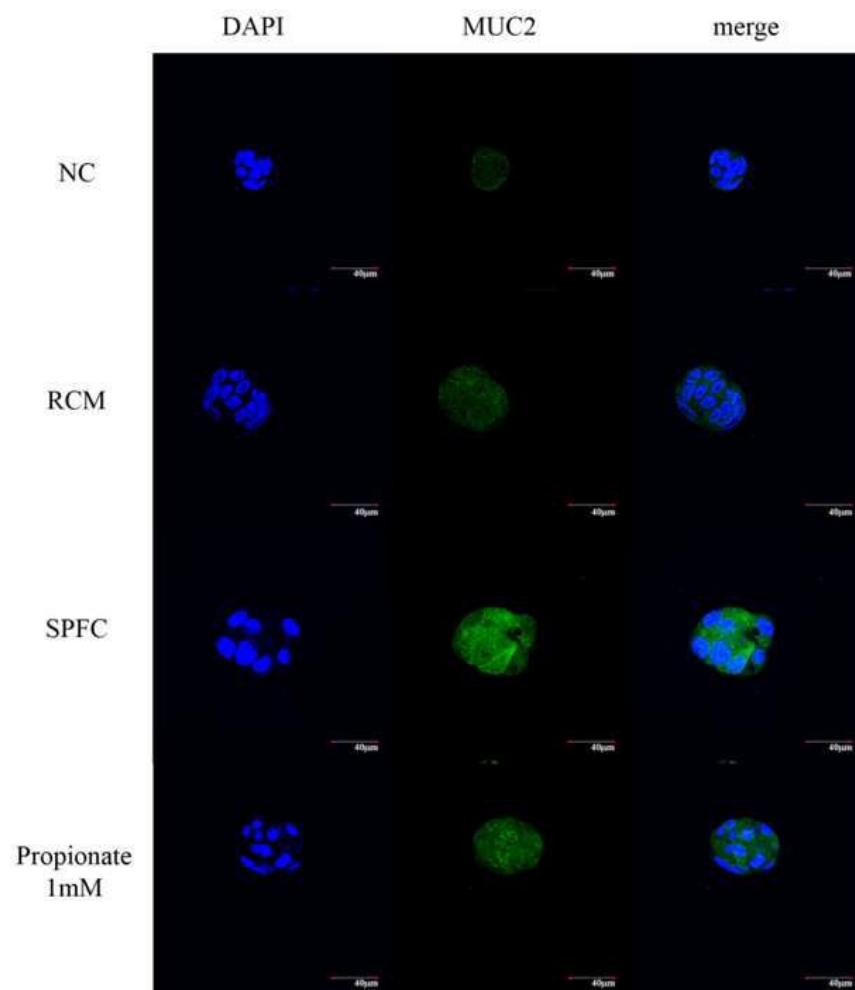
도면1



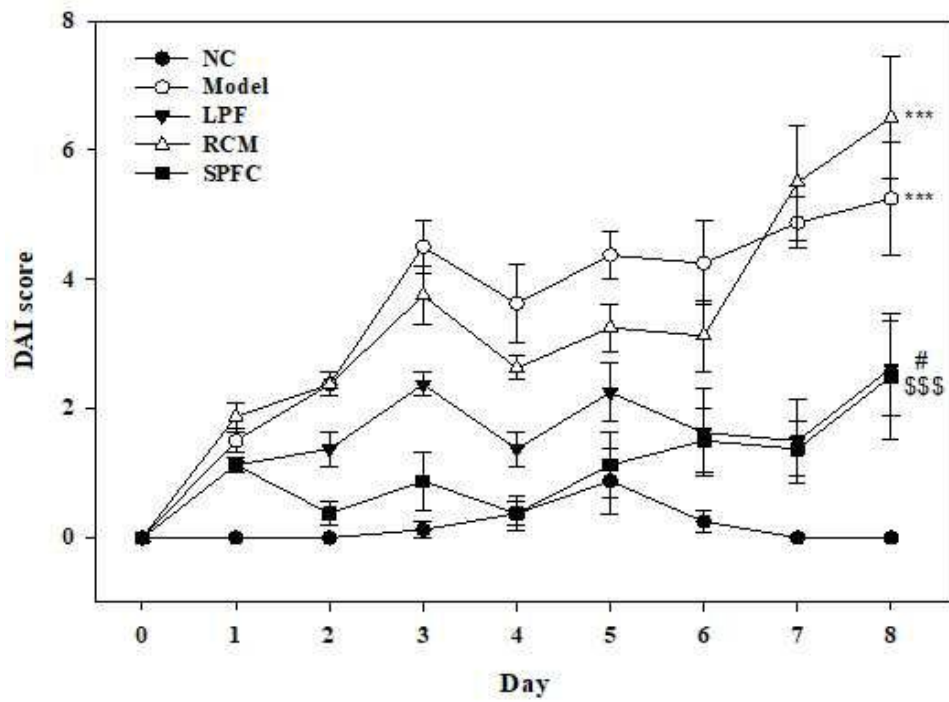
도면2



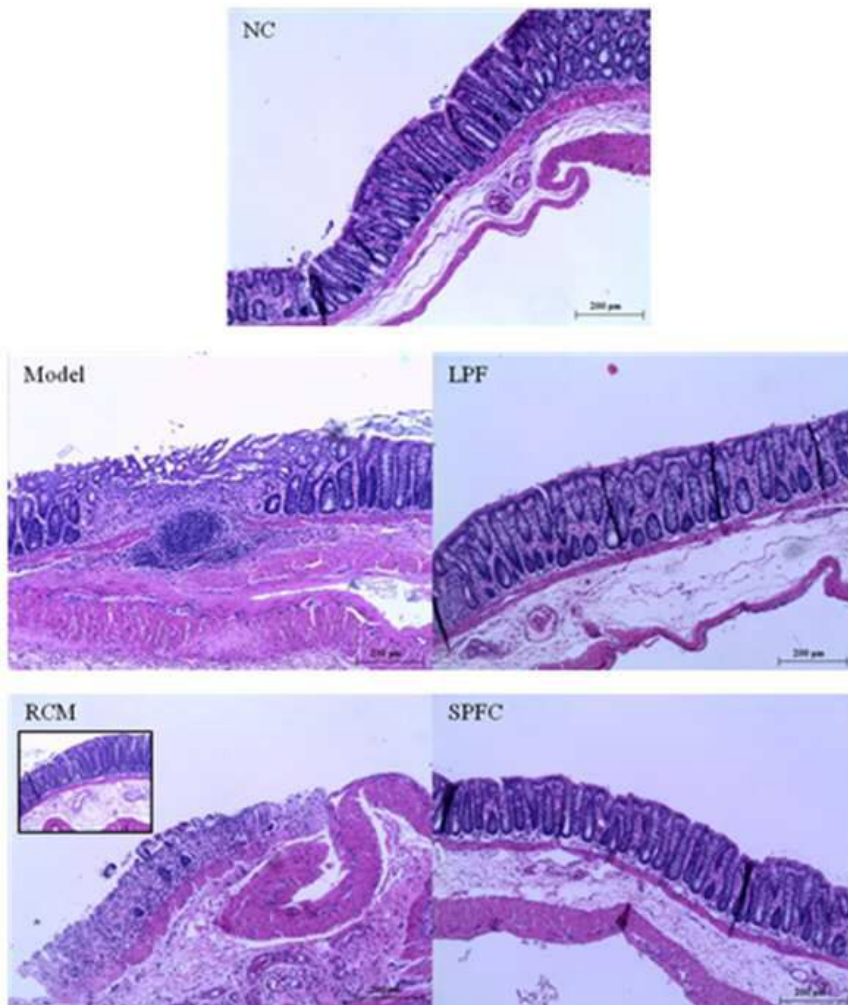
도면3



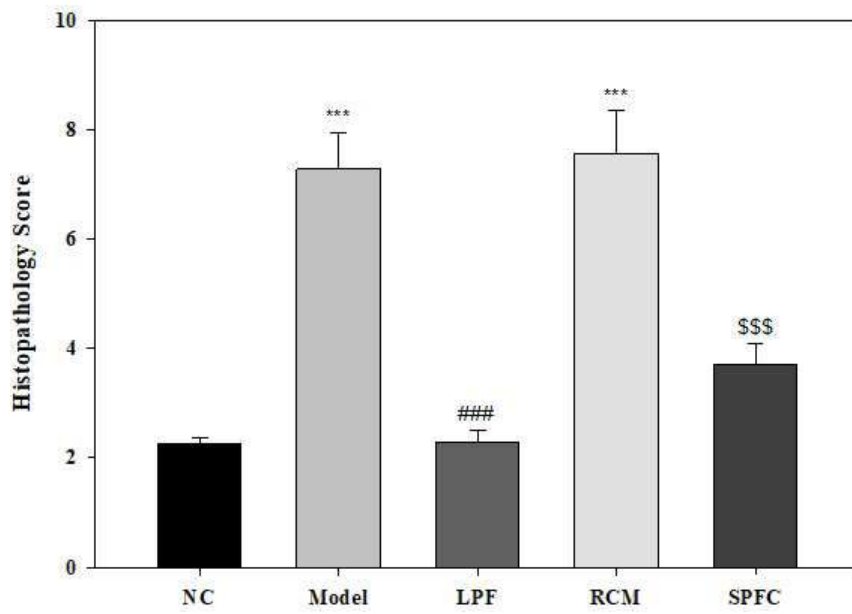
도면4



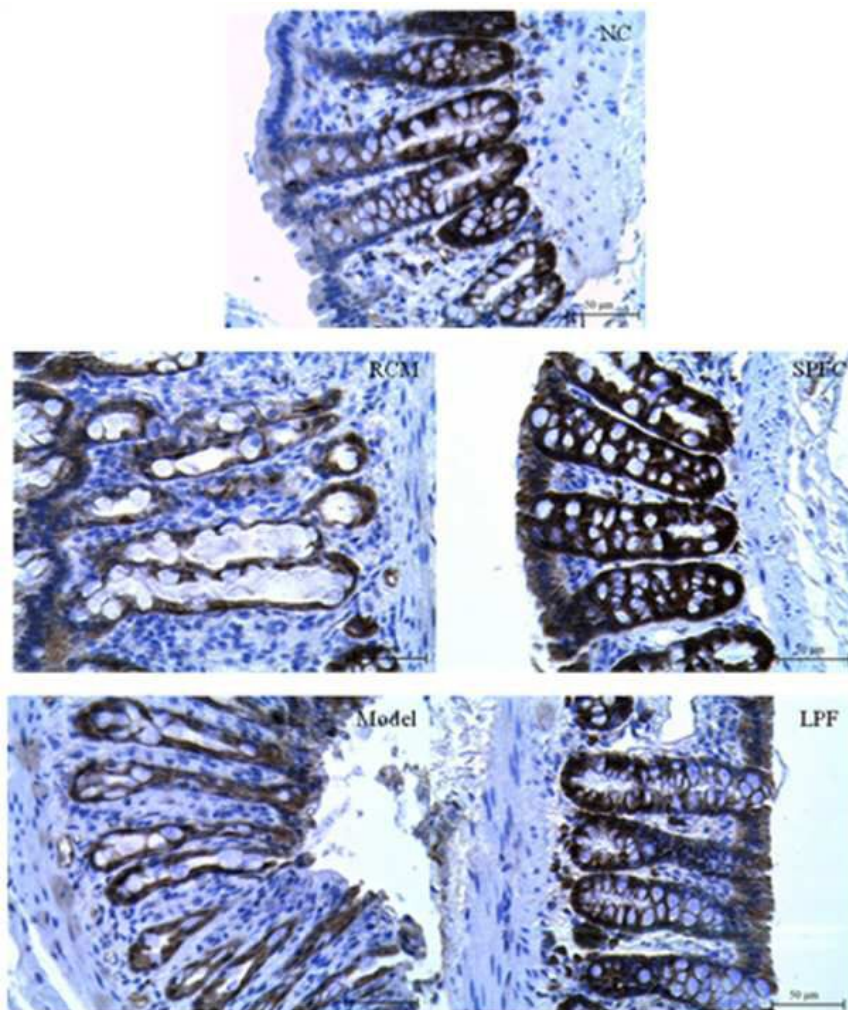
도면5



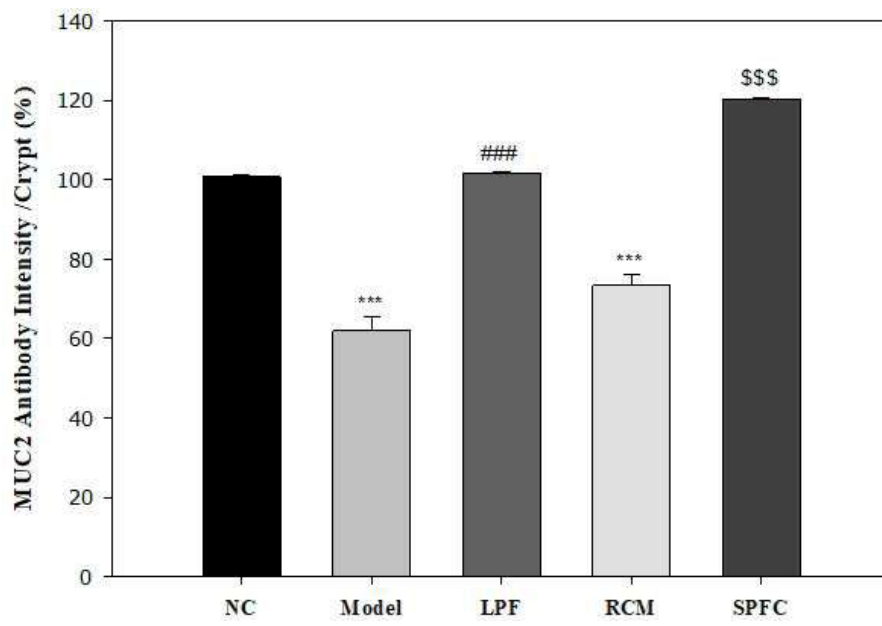
도면6



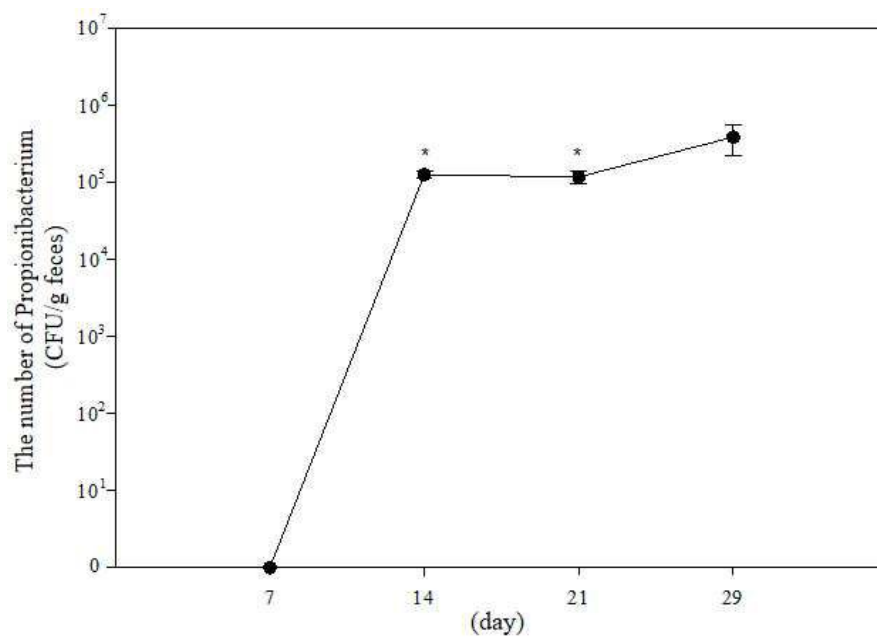
도면7



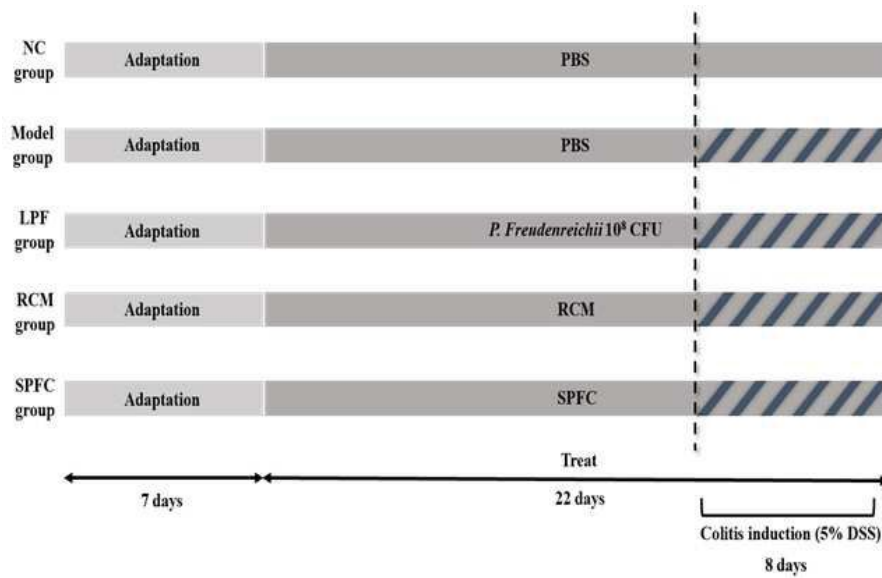
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Compositions for Treatment or Prevention of Intestinal Diseases
Comprising *Propionibacterium freudenreichii*, its culture broth or
heat-killed *Propionibacterium freudenreichii* as an active
ingredient
- <130> DHP18-317
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH primer Sense
- <400> 1
gagtcaacgg attgtcgt

20

- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH primer Antisense
- <400> 2

ttgatttttg aggatctcg	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MUC2 primer Sense	
<400> 3	
accgcacta tgtcaccttc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MUC2 primer Antisense	
<400> 4	
ggacaggaca ccttgtcggt	20