



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월13일
 (11) 등록번호 10-1808972
 (24) 등록일자 2017년12월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/00* (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61K 35/747* (2014.01)
A61K 8/99 (2017.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7011287
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월30일
 심사청구일자 2016년04월28일
- (85) 번역문제출일자 2016년04월28일
- (65) 공개번호 10-2016-0067893
- (43) 공개일자 2016년06월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2014/089882
- (87) 국제공개번호 WO 2015/067141
 국제공개일자 2015년05월14일
- (30) 우선권주장
 201310551661.9 2013년11월08일 중국(CN)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020020020544 A*
 KR1020030058497 A
 GenBank: AY959018.1, 2008.04.17.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005, vol. 102,
 no. 22, pp. 7952-7957.
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 쑤저우 오셀 바이오-팜 컴퍼니 리미티드
 중국, 지양수 215123, 쑤저우 인더스트리얼 파크
 쑤저우, 218 상호 스트리트, 에이3 빌딩, 스위트
 203
- (72) 발명자
 리우, 양
 중국, 지양수 215123, 쑤저우 인더스트리얼 파크
 쑤저우, 218 상호 스트리트, 에이3 빌딩, 메이 스
 스위트 203, 자오
- (74) 대리인
 특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 크리스파투스 및 이의 사용**

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 262-1 및 이를 포함하는 접종체와 이의 사용에 관한 것이다. 상기 락토바실러스 크리스파투스262-1은 락토바실러스속의 신규 균주이고, 중국미생물균종보존관리위원회일반미생물센터(CGMCC)에서 보존번호 CGMCC No. 6469으로 보존되어 있다. 특히 상기 락토바실러스 크리스

(뒷면에 계속)

대표도



과투스 262-1은 질 내에서 우세한 세균이고 산을 생산하는 능력과 H₂O₂를 생산하는 능력이 우수하며, 질 상피세포에 대한 접착능력이 좋고 세균성 질염과 각종 질 감염에 대한 현저한 저항성을 나타내며, 안전하고, 독성이 없으며, 안정성이 좋아 장기적으로 보존할 수 있다. 또한, 본 발명은 부인과 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조시 락토바실러스 크리스포투스 262-1의 용도 및 여성 케어 제품, 예를 들어 의료기기, 소독제품 또는 화장품에서의 사용에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)
A61K 8/99 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2035/115 (2013.01)
C12R 1/225 (2013.01)

(30) 우선권주장

201310551630.3 2013년11월08일 중국(CN)
 201310731833.0 2013년12월26일 중국(CN)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 262-1을 명칭으로 하고, 중국미생물균종보존관리위원회 일반미생물센터(China General Microbiological Culture Collection Center)에서 보존번호(preservation number)가 CGMCC No. 6469으로 보존되어 있으며, 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 이루어진 16SrDNA를 포함하는 분리된 락토바실러스 크리스파투스.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 포함하는 질 병원성 세균 억제용 향균 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 병원성 세균은 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 아토포비움균(*Atopobium vaginae*), 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 살모넬라균(*Salmonella*)을 포함하는 것을 특징으로 하는 향균 조성물.

청구항 5

제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 포함하는 질 질환(vaginal disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 질 질환은 칸디다 질염(vulvovaginal candidiasis), 트리코모나스증(trichomonas vaginitis), 노인성 질염(senile vaginitis), 비특이성 질 감염(non-specific vaginal infections) 또는 혼합형 질 감염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 질내 세균균 균형을 조절하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 질 상피세포에 대한 접착 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 포함하는 부인과 의료기기.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 의료기기는 질 확대경(colposcope), 부인과 자기 검사 질경(gynecological self-checking colposcopes), 질 확장기(vaginal dilators), 질경(vaginal speculums), 골반내 염증 질환에 대한 치료기구, 부인과 세척기(gynecological irrigator) 또는 부인과 외용 향균 장치를 포함하는 것을 특징으로 하는 부인과 의료기기.

청구항 11

제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 포함하는 부인과 소독제품.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 소독제품은 점막 소독제(mucosa disinfectant), 점막 소독연고, 부인과 소독 보호 패드(gynecological disinfection protection pad), 부인과 소독 티슈(gynecological disinfection tissue), 부인과 외용 항균젤, 부인과 외용 항균연고 또는 부인과 소독제를 포함하는 것을 특징으로 하는 부인과 소독제품.

청구항 13

제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 포함하는 여성 질 청결용 화장료 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 여성 질 청결액, 여성 질 청결크림, 여성 질 청결연고, 여성 질 청결마스크 또는 바디워시를 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 15

유효성분이 락토바실러스 크리스파투스 262-1인, 제1항에 따른 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 사용하여 제조된 접종제(inoculant).

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 접종제는 액체, 고체 또는 겔 상태인 것을 특징으로 하는 접종제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스속의 신규 균주 및 그의 사용에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 질 미세환경을 조절하고 질 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*) (BV병원균)을 억제하는 동시에 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 및 병원균을 억제하는 것에 아주 뚜렷한 효과가 있으며, 임상에서 가장 흔히 볼 수 있는 세균성 질염 결합 곰팡이 감염을 치료하는 약제와 일상 여성보건제품을 제조하는 것에서는 상당한 이점과 잠재력을 가지고 있는 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 건강한 여성의 질내에는 다양한 미생물이 존재하며 그들은 숙주 및 환경과 상호제한, 상호협조하면서 동적 평형 상태인 질 미세 생태계를 구성한다. 건강한 여성의 질내의 세균군은 주로 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) , 락토바실러스 젠сени(*Lactobacillus Jensenii*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)등을 포함하는 락토바실러스로 구성된다. 일반적인 상황에서 락토바실러스는 질을 보호할 수 있지만 락토바실러스가 우세한 미세 생태계의 혼란은 질염을 일으킬 수 있다.

[0003] 세균성질염(BV)의 발생 원인은, 질내 세균군의 불균형(dysbacteriosis)과 숙주 자체 질내의 락토바실러스의 감소로 인한 다른 조건성 병원미생물 예를 들어, 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*), 각종 혐기성 세균, 캄필로박터(*Campylobacter*) 및 비브리오균(*Vibrio*) 등의 대량 번식이다. 실제적으로 세균성 질염은 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*)류를 위주로 하는 혼합형 감염이다. 항생제를 사용하여 치료하는 것은 BV 증상을 잠시 완화시킬 수 있지만 원래 감소하고 있던 락토바실러스를 더 감소하게 하고 질 미세 생태계의 균형이 더 심하게 깨지며 세균성 질염을 반복적으로 일으킨다. 세균성 질염의 재발 억제 및 철저한 치료 방법은 부인과 의사들이 시급하게 해결해야 할 문제들이다.

[0004] 마찬가지로, 일상생활에서 여성의 질은 감염되기 쉽기 때문에 많은 여성들이 부인과 소독제품, 케어 제품(care product) 및 뷰티 케어 제품(beaty care product)을 사용하여 질환을 예방하고 위생을 유지하거나 조화(fit)를 유지한다. 그러나, 다양한 문제들이 여전히 자주 발생한다. 일반적인 상황에서 질 내에는 사람에게 유익한 간균(bacilli)이 많이 존재하며 그들은 질 표피세포에 저장되는 글리코젠을 젖산으로 분해시켜서 질내에 산도를 유지함으로써 병원균이 질내에서 번식하는 것을 억제하는 자연 방어 체계를 형성한다. 소독제를 사용하여 질을 씻거나 좌욕으로 담그하면 질의 방어기능을 손상시킬 수 있어 각종 병원균이 질내에서 대규모로 번식하게 되고 부인과 질병을 일으킬 수 있다. 외음부용 화장품의 사용도 상기와 같은 문제를 야기할 수 있다. 이런 화장품들을

잘 사용하면 몰라도 만약에 잘못 사용하면 세균이 번식할 온상이 쉽게 되어 질 간지러움을 초래하거나 염증이 생기거나 심지어 부인과 염증도 생길 수 있다.

[0005] 한편, 의료기기는 근대 과학기술의 제품으로 질환의 예방, 진단, 치료, 보건 및 회복하는 과정에서 이미 넓게 사용되며 현대 의학 분야에서 중요한 진단 수단이 되었다. 그러나 약제와 마찬가지로 의료기기의 사용도 설계, 재료, 임상응용 등의 요소들의 영향으로 인한 특정 위험성이 존재한다. 부인과 질환의 검사, 진단 및 치료 과정에서 검사 기기의 소재가 불합리적거나, 기기가 깨끗하지 않거나 또는 대상체(subject)가 과민성인 경우 감염을 쉽게 일으킬 수 있다. 따라서 부인과용 의료기기의 재료, 부품, 그리고 인체와 접촉하는 부분을 개선해서 기기의 생체적합성을 높이고 감염 확률을 낮추면서 검사 안전성을 확보하는 것은 매우 중요하다.

[0006] 건강한 여성의 질 내에는 여러 가지 락토바실러스가 존재하는데 그들은 개체 차이가 있고 락토바실러스의 각 균주는 병원균에 대한 저항능력 차이도 뚜렷하다. 락토바실러스 프로바이오틱스(lactobacillus probiotics)를 선택할 때, 락토바실러스의 종류, 산 생산 능력 및 H₂O₂ 생산 능력, 질 상피세포와의 접착 능력을 종합적으로 고려해야 하며, 락토바실러스의 질내 성공적인 정착(colonization)은 락토바실러스와 락토바실러스를 유효성분으로 하는 접종제(inoculant)들의 지속적인 작용의 바탕이 되고, 락토바실러스가 치료효과를 발휘하는 핵심 요소이기도 하다. 연구 결과들은 H₂O₂를 생산하는 락토바실러스는 건강한 여성 질 내에서 우위를 차지하는 세균이고 여성의 질이 병원균에 감염되는 것을 방지하는 중요한 요소라는 것을 보여준다. 또한, 락토바실러스가 대사하여 생산한 산과 일부 항균 물질도 다른 세균의 성장 번식을 효율적으로 억제할 수 있다. 현재 시판되는 제품은 중국 여성 질내에 우위를 차지하는 세균이 아니라서 정착 능력이 약하고 세균의 함량을 안정하게 유지시킬 수 없어 부인과 임상의 요구를 만족시키지 못한다.

[0007] 상기를 정리하면, 중국 여성 질의 건강에 유익한 세균균을 분리하여 선별하고 이와 관련된 약제, 헬스 케어 제품, 화장품 및 의료기기를 연구 및 개발하는 것은 중국 여성에게 희소식이 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 건강한 인체에서 선별하고, 활성적이고 안정한 생물학적 특성을 가지며, 강력한 세균 억제 능력을 갖는 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) 및 그의 사용을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명에서 제안된 기술적 해결 수단은 다음과 같다:

[0010] 중국미생물균종보존관리위원회일반기생물센터(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)에 보존되어 있으며, CGMCC No. 6469의 보존번호(기탁번호)를 갖는 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 262-1로 명명된 분리된 락토바실러스 크리스파투스를 제공한다.

[0011] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 중국 건강한 가임연령 여성의 질 분비물에서 선별하여 2012년 8월 22일에 중국미생물균종보존관리위원회일반기생물센터(CGMCC)에 기탁하였다. 기탁기관의 주소는 베이징시 차오양구 베이첸시루이하오위안3번, 중국과학원미생물연구소(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 3 of Courtyard No. 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing City)이다. 보존번호(기탁번호)는 CGMCC No. 6469이며 이 균주는 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*)로 분리 및 명명된다.

[0012] CGMCC No. 6469의 보존번호를 갖는 상기 분리된 락토바실러스 크리스파투스 262-1에서 추출한 분리된 DNA 분자를 제공하며, 상기 DNA 분자의 염기서열은 BLAST 프로그램을 통해 서열 유사성을 비교 분석하였고, GenBank 데이터베이스의 락토바실러스 크리스파투스 염기서열과의 최고 상동성 수치는 98%를 초과한다.

[0013] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 질 병원성 세균을 억제하는 약제를 제조하는 과정에 사용된다.

[0014] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 질 질환(vaginal disease)을 예방 및/또는 치료하는 약제를 제조하는 과정에 사용된다.

[0015] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 질내 세균군 균형을 조절하는 약제를 제조하는 과정에 사용된다.

[0016] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 질 상피세포에 접착하는 기능을 가지는 약제를 제조하는 과정에 사용

된다.

- [0017] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 부인과 의료기기에 사용된다.
- [0018] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 부인과 소독제품에 사용된다.
- [0019] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 여성 질용 화장품에 사용된다.
- [0020] 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 262-1 균주는 중국 건강한 가임 연령 여성 질 분비물에서 선별되었다. 수많은 실험결과는 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 산 생산 능력과 H₂O₂ 생산 능력, 질 상피세포로의 정착 능력이 뛰어나므로 상기 질 병원균을 억제하는 약제, 질 질환을 예방 및/또는 치료하는 약제, 질 세균군 균형을 조절하는 약제, 질 상피세포에 정착하는 기능을 가지는 약제 및 부인과 헬스 케어 제품, 예를 들어 부인과 의료기기, 부인과 소독제품 및 여성 질용 화장품에 상기 균주가 가진 기능을 발휘할 수 있다.
- [0021] 상기 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 이용해서 제조한 접종제의 유효성분은 락토바실러스 크리스파투스 262-1이다.
- [0022] 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 유효성분으로 제조한 접종제는 액체, 고체 또는 겔 형태이고, 상기 고체 접종제는 캡슐, 정제 또는 분제 형태이다. 따라서, 상기 접종제는 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 동일하거나 유사한 용도를 갖는다.

발명의 효과

- [0023] 상기 기술방안을 채용하여 얻은 효과는 다음과 같다:
- [0024] (1) 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 장기적으로 보존할 수 있고 칸디다 질염, 임질, 바이러스성 질염 및 요로 감염 등을 포함하는 다양한 질 감염 및 세균성 질염에 저항성을 나타낼 수 있다. (2) 본 발명의 균주는 건강한 인체에서 직접적으로 수집되고, 활성적이며 안정적인 생물학적 특성을 가지고, 길들이기 (domestication) 및 회복(rejuvenation) 과정 없이 직접적으로 제조 공정에 투입할 수 있고, 4℃에서 6개월 보존한 후에도 동결건조된 분말 제제의 살아있는 세균의 생존률이 높다. (3) 본 발명의 균주와 접종제의 유효성분은 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*), 아토포비움균(*Atopobium vaginae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라균(*Salmonella*)을 억제하는 효과가 있고 시판되는 다른 균주와 비교하면 질 상피세포와 정착하는 능력, 영양류의 질내에 정착(colonization)하는 능력이 더 강하고, 부인과 의료기기, 부인과 소독제품 및 여성 질용 화장품에 커다란 사용 잠재력이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1a 및 1b는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 균락 형태(colonial morphology)의 정면도 및 후면도이다.
- 도 2는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 그람 염색 현미경검사 사진이다.
- 도 3a, 3b, 3c 및 3d는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 다른 배수로 확대한 전자현미경 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1 T0, T30 및 T50의 16SrDNA 유전자 PCR 증폭 산물의 전기영동도이다.
- 도 5는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 0분, 5분 및 10분 동안의 과산화수소 생산반응으로부터 취득된 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1 T0, T30 및 T50 각각의 균락 형태의 정면도 및 후면도이다.
- 도 7은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1 T0, T30 및 T50의 그람 염색 현미경검사 사진이다.
- 도 8은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1 T0, T30 및 T50의 0분, 5분 및 10분 동안의 과산화수소 생산반응으로부터 취득된 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1(좌) 및 락토바실러스 텔브릭키이(우)의 질내에 가드넬라균

(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 항균 효과를 나타낸 사진이다.

도 10은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 락토바실러스 텔브릭키이의 농도에 따른(OD₆₀₀은 각각 0.05, 0.1, 0.2 및 0.3) 아토포비움균에 대한 항균 효과를 나타내는 사진으로, 각 농도의 배양접시에서 우측 두 개는 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 항균 효과, 좌측 하나는 락토바실러스 텔브릭키이의 항균 효과를 보여 준다.

도 11은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1(좌)과 락토바실러스 텔브릭키이(우)의 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 항균 효과를 나타낸 사진이다.

도 12는 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 히말라야 원숭이(rhesus macaque)의 질내에 정착한 후 히말라야 원숭이 질내에 미생물군의 일부 균주의 16SrDNA 단편의 PCR 증폭 산물의 전기 영동도이다.

도 13은 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 정착 후 테스트된 동물체 내에서 검출된 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 양을 나타낸 것이며, 여기에서 세로축은 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 CFU 값이고, 가로축은 다양한 동물들의 5개 샘플링 시점을 나타내며, day 1은 정착한 후 첫 번째 날이며, 이러한 방식으로 날짜를 계산한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 보존 정보(preservation information)
- [0027] 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) 262-1은 2012년 8월 22일에 중국미생물균종보존관리위원회일반미생물센터(CG MCC)에 보존되었고 기탁기관 주소는 베이징시 차오양구 베이천시루이하오위안3번, 중국과학원미생물연구소(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 3 of Courtyard No. 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing City)이다. 이 균주의 보존등록번호(기탁번호)는 CG MCC No. 6469이며, 이 균주는 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 로 분류 및 명명되었다.
- [0028] 하기 실시예에서 사용하는 실험방법은 특별한 설명이 없는 경우에 모두 통상적인 방법이고 사용하는 재료, 시약 등은 특별한 설명 없는 경우 모두 상업적으로 이용가능한 것이다. T0, T30 및 T50은 각각 제0대, 제30대 및 제50대의 락토바실러스 크리스파투스를 나타낸다.
- [0029] 세균 배양 배지 제조:
- [0030] 1. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 선택 배양 배지(Rogosa SL) 제조:
- [0031] (1) 1.5 g/100ml 탈이온수에 한천가루를 용해하여 용액을 준비하고 밀봉한다;
- [0032] (2) 압력솥(pressure cooker)에 용액을 넣고 20분 동안 1.0 MPa 하에 스티밍(steaming)하며; 슈퍼-클린 벤치(super-clean bench)를 열어 20분 이상 자외선을 조사한다;
- [0033] (3) 압력솥에 압력이 없어졌을 때 한천용액을 꺼내고, 락토바실러스 크리스파투스 선택 배양 배지 (Rogosa SL Broth)를 5.97 g/100ml 한천용액에 첨가한다;
- [0034] (4) 빙초산을 0.132ml/100ml 한천용액에 첨가하고 밀봉한 후 전자레인지(micro-wave oven)에서 2.3분 동안 끓인다;
- [0035] (5) 배양 배지의 온도를 실온까지 내린 후 배양 배지를 배양 접시의 크기에 따라 배양 접시 당 10ml 또는 20ml의 양으로 붓는다; 그리고
- [0036] (6) 상기 단계 (3)-(5)는 슈퍼-클린 벤치에서 진행하고, 배양 배지를 한천 겔로 냉각시킨 후, 배양 배지의 이름과 제조 날짜를 표기하고, 추후 사용을 위해 4℃ 냉장고에 넣는다.
- [0037] 2. 브로스 고체 배지(MRS) 제조:
- [0038] (1) 1.59/100ml 탈이온수에 한천가루를 넣어 용액을 만든다;
- [0039] (2) MRS 브로스(Broth)를 17.91g/100ml 한천 용액에 넣고 고르게 섞는다;
- [0040] (3) 용액을 압력솥에 넣고 1.0 MPa에서 20분 동안 스티밍한다; 그리고

- [0041] (4) 상기 단계 (5) 및 (6)을 반복한다.
- [0042] 3. 브로스 액체 배지(MRS) 제조:
- [0043] (1) 17.91g/100ml의 비율로 MRS 브로스를 탈이온수에 넣는다;
- [0044] (2) 용액을 압력솥에 넣고 1.0MPa에서 20분 동안 스티밍한다; 그리고
- [0045] (3) 압력솥에 압력이 없어졌을 때 용액을 꺼내고, 튜브 당 1.0ml씩 EP 튜브에 나누어 넣은 후, 배양 배지의 이름과 제조 날짜를 표기하고 추후 사용을 위해 4℃ 냉장고에 넣는다.
- [0046] 4. 과산화수소(H₂O₂) 확인 배지 제조:
- [0047] (1) 브로스 고체 배지(MRS)의 제조 단계 (1) 내지 (4)를 반복한다;
- [0048] (2) 압력솥에 압력이 없어졌을 때 용액을 꺼내고 약간 냉각시킨 후 배지가 여전히 액체 상태일 때 수퍼-클린 벤치에서 TMB(최종농도 0.25 mg/ml)와 HRP(최종농도 0.01 mg/ml)를 넣고 고르게 혼합한다; 그리고
- [0049] (3) 배양 배지의 온도를 실온까지 내린 후 배양 접시에 붓고, 한천 겔로 냉각시킨 다음 배지 이름과 제조 날짜를 표기하고 추후 사용을 위해 4℃ 냉장고에 넣는다.

실시예 1

- [0050] 락토바실러스 크리스파투스 262-1 균(flora)의 분리, 접종, 정제 및 증균 배양
- [0051] I. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 분리 및 접종: 미국 BD사의 Port. A-Cd 시스템을 사용하여 샘플을 수집한다. 2개 무균 면봉으로 피시험자의 질내 측벽에 분비물 1/3을 채집하여 24시간 내에 다른 농도로 제조된 Rogosa SL 배양 배지가 있는 배양 접시에 접종하고 정보를 표기한다. 배양 접시는 혐기성균배양조의 CO₂ 생산 봉투(bag)에 둔 다음 37℃의 배양기에 48시간 이상 둔다.
- [0052] II. 락토바실러스 크리스파투스 262-1 균주의 정제 및 증균 배양: 균락의 서로 다른 형태(표면, 가장자리 등)와 크기에 따라 각각 계수하고 형태와 크기가 같은 것은 하나의 종류로 표기한다; 백금이(inoculating loop)로 단일 균락 중에 몇 종의 세균을 획득하고 '사선법(diagonal line method)'으로 MRS 고체 배지에 접종하여 분리 정제된 단일 균락을 수득한다; 세균용 이쑤시개(bacterium toothpick)로 MRS 고체 배지 상의 단일 균락 중에 몇 종의 세균을 수득하고, MRS 액체 배지에 접종한 다음 37℃의 배양기에 넣고 24시간 내지 72시간 동안 혐기성 배양한다. 신규 균주를 선별하여 이를 락토바실러스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*) 262-1로 명명하였다.

실시예 2

- [0053] 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 확인 및 보존
- [0054] I. 배양 특성, 염색 현미경 검사(staining microscopic examination) 및 형태학 특징: 도 1에 나타난 바와 같이, 배양한 후 수득한 균락은 원형이고 가운데 부분이 회백색 가득하며 주변이 흩어지고 불규칙적이다; 이 균락의 순수한 배양물 도말은 그람 염색을 하였다; 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 그람 양성을 나타내고 단간균 형태(short-rod-shaped)이며, 연결되어 긴 사슬(long chain)을 형성할 수 있다; 도 3에 나타난 바와 같이, 전자현미경의 분석결과는 이 균주가 전자현미경 하에서 무포자(aseptuous), 무편모(atrichous)이고, 피막이 없으며(acapsular), 균주 크기는 26.824×6.667 μm라는 것을 나타낸다. 결과는 상기 분리된 균주가 예비적으로 락토바실러스속인 것으로 판단됨을 나타낸다.
- [0055] II. 16SrDNA 유전자 서열 확인: 세균의 게놈 DNA 추출 키트(extraction kit)를 이용하여 DNA를 추출하고 프라이머 쌍 8F (5'-AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3') 및 926R (5' -CCG TCAATT CCTTTR AGTTT-3')을 사용하여 PCR 증폭을 수행한다. 여기서, R은 G 또는 A이고, PCR 산물은 겔 전기영동하여 16SrDNA의 유전자 단편을 결정한다. 도 4의 컬럼 T0에 나타난 바와 같이, 만족할만한 결과로 950bp에서 명확하게 PCR 산물의 단일 밴드가 수득된다. 만족할만한 PCR 산물에 대해 정제 및 DNA 시퀀싱(sequencing)을 수행하고, Sanger 시퀀싱 방법을 사용하며, 시퀀싱 프라이머 쌍은 8F/926R이고, 시퀀싱 기기는 ABI3730이며, GenBank 데이터베이스의 BLAST 프로그램을 통해서 서열 유사성에 대한 비교분석을 수행하고, 98% 를 초과하는 최고의 상동성 수치에 따라 락토바실러스 종을 수득한다. 16SrDNA의 부분 서열은 SEQ ID NO: 1에 기재된 바와 같고, 8F 서열은 SEQ ID NO:4에 기재된 바와

같으며, 926R 서열은 SEQ ID NO:5에 기재된 바와 같다.

[0056] 3. 생리학적 및 생화학적 특징: 에스쿨린(esculin) 가수 분해시험, 메틸레드시험(MR시험), 보게스-프로스카우어(Voges-Proskauer) 시험(VP 시험), 인돌시험, TSI(triple sugar iron) 시험, Kligler disaccharide iron agar 시험, 요소분해효소시험, 페닐알라닌 탈아미노효소시험, 아미노산 탈카르복실화효소시험, 젤라틴 액화 시험, 나트륨 말론산 시험, 구연산염 시험, 질산환원 시험, 리트머스 밀크 시험 및 세균 운동성 시험을 통해 균주의 생리학적 및 생화학적 반응을 시험하였고, 수득된 결과는 다음과 같다. 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 에스쿨린을 분해하여 글루코스와 에스쿨레틴(Esculetin, aescinbe)을 생산하고, MR시험에서 양성반응을 보인 것은 글루코스를 대사하여 유기산을 생산한다는 것을 나타낸다. VP시험에서 음성반응을 보인 것은 글루코스를 대사하여 피루브산을 생산하지 않다는 것을 나타낸다. 인돌시험의 결과는 이 균이 펩톤의 트립토판을 분해하여 인돌을 생산하지 않다는 것을 나타낸다. TSI시험은 락토스와 글루코스를 대사하여 H₂S를 생산하지 않다는 것을 나타낸다. Kligler disaccharide iron 시험은 락토스를 대사하여 H₂S를 생산하지 않다는 것을 나타낸다. 요소분해효소시험, 페닐알라닌 탈아미노효소시험, 아미노산 탈카르복실화효소시험, 젤라틴액화시험에서 모두 음성반응을 보인 것은 이 균주가 요소분해효소, 페닐알라닌 탈아미노효소, 아미노산 탈카르복실화효소, 젤라틴분해효소를 생산하지 않다는 것을 나타낸다. 나트륨 말론산시험, 구연산염시험, 질산염환원시험에서 모두 음성반응을 보인 것은 이 균주가 나트륨 말론산을 탄소원으로 사용하지 않고, 구연산염을 질소원과 탄소원으로 이용하지 않으며, 질산염을 아질산염으로 환원시키지 않다는 것을 나타낸다. 리트머스 밀크 시험에서 이 균은 응고 없이 우유를 발효시킬 수 있다는 것이 관찰되었으며, 이는 이 균주가 키모신을 생산하지 않고 건강하게 자란다는 것을 나타낸다; 세균 운동성 시험은 음성반응을 나타냈다. 프랑스 Merieux사에서 생산하는 API 50 CHL 락토바실러스 동정 시스템을 이용하여 이 균주에 대해 생화학적 동정을 수행하였고 결과는 다음과 같다. 24시간 및 48시간에서 갈락토리핀(galactolipin), 글루코스, 프럭토스, 만노스, N-아세틸-글루코사민, 아미그달린(amygdalin), 알부틴(Arbutin), 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 말토스, 락토스, 수크로스 및 전분을 발효시키고 양성반응이 나온다. 글리세린, 에리스리톨(erythrite), D-아라비노스(arabinose), L-아라비노스, 리보스, D-자일로스, L-자일로스, 아도니톨(adonite), β-메틸-D-자일로사이드(xyloside), 소르보스, 람노스, 에보노사이드(evonoside), 이노시톨, 만니톨(mannitol), 소르비톨(sorbitol, sorbierite), β-메틸-D-만노사이드(mannoside), α-메틸-D-글루코사이드, 멜리비오스(melibiose), 시난트린(synanthrin), 멜레치토스(melezitose), 자일리톨, 게라니올, D-투라노스, D-릭소오스, D-타가토스, D-푸코스, L-푸코스, D-아라비톨(arabitol), L-아라비톨(arabitol), 글루콘산염, 2-케토(keto)-글루콘산염, 5-케토-글루콘산염이 발효되지 않고, 음성반응이 나온다; 트레할로스(trehalose), 고시포오스(gossypose) 및 글리코젠이 약한 양성반응이 나오고, 기질 블랭크(blank) 동안 음성반응이 나온다. 따라서, 생화학적 맵을 바탕으로 이 균주의 생화학적 특징은 락토바실러스 크리스파투스의 생화학적 특징에 부합하는 것으로 결정될 수 있다.

[0057] 4. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 보존

[0058] 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 2012년 8월 22일에 중국미생물균종보존관리위원회일반미생물센터(CG MCC)에 보존되었고 기탁기관 주소는 베이징시 차오양구 베이천시루이하오위안3번, 중국과학원미생물연구소(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 3 of Courtyard No. 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing City)이다. 이 균주의 보존번호(기탁번호)는 CG MCC No. 6469이며, 이 균주는 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*) 로 분류 및 명명되었다.

실시예 3

[0059] 락토바실러스 크리스파투스 262-1 대사산물 측정

[0060] I. 락토바실러스 크리스파투스 262-1 대사산물의 젖산 함량 측정: D-젖산 측정키트(detection kit)를 통해서 본 발명의 균주의 D-젖산 생산량을 측정하였고, 측정 결과는 6.213g/L이며; 센싱분석기를 통해서 L-젖산의 함량은 3.789g/L로 측정된다. 결과는 다음 표 1의 T0 그룹 데이터에 제시된다.

[0061] [표 1]

젖산 측정 결과

샘플	D-젖산 (g/L)	L-젖산 (g/L)
T0	6.213	3789
T30	6.334	3.330
T50	6.291	3.225

[0062]

[0063]

II. 락토바실러스 크리스파투스 262-1 대사산물의 과산화수소 함량 측정: MCGroarty 등의 과산화효소법을 통해 과산화수소 반정량 측정(semi-quantitative determination)을 수행한다. 분리 및 동정된 락토바실러스 크리스파투스는 MRS-TMB 플레이트에 접종된다. 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 후 플레이트를 꺼내고, 세균을 공기에 노출시킨다. H₂O₂를 생산하는 락토바실러스 균락의 색은 파란색이 되는 반면, H₂O₂를 생산하지 않는 락토바실러스 균락의 색은 변화하지 않을 것이다. 색의 변화 시간에 따라 H₂O₂에 대한 반정량을 수행한다. 결과는 도 5에 나타난 바와 같고, 5분에 균락은 약간 파란색을 나타내고 10분에 현저하게 많은 양의 파란색이 나타난다. 표 2에 기재된 판정 기준에 따라, 본 균주의 대사는 과산화수소를 생산하고, 반정량 수준이 +++이다.

[0064]

[표 2]

H₂O₂ 반정량 판정 기준

균락 변색 시간	H ₂ O ₂ 반정량 수준
< 10 분	+++
10-<20 분	++
20-30 분	+
>30 분 또는 변색 없음	-

[0065]

실시예 4

[0066]

항생제 감수성시험

[0067]

2010년 판 약전 제3부 미생태생균제품총론에서 항생제 감수성시험 요건에 따라, 한천-확산 페이퍼-디스크법 (agar-diffusion paper-disc method)을 사용하여 항생제에 대한 균주의 감수성을 측정하고, 억제영역의 크기에 따라 항생제에 대한 균주의 감수성 정도를 판단하며, 측정결과는 다음 표 3에 나타난 바와 같다. 약물감수성시험 디스크법의 세균 억제 범위의 해석 기준에 따라, 본 락토바실러스 크리스파투스 균주는 후라질(flagyl, 메트로니다졸(Metronidazole)), 겐타마이신(Gentamicin), 바시트라신(Bacitracin) 및 카나마이신(Kanamycin)에 대해 약물 내성을 나타내고, 암피실린(Ampicillin), 세프트리악손(Ceftriaxone), 클로로마이세틴(Chloromycetin), 클린다마이신(Clindamycin), 이미펜엠(Imipenem), 에리트로마이신, 피페라실린(Piperacillin), 테트라사이클린(Tetracycline), 아지트로마이신(Azithromycin), 아목시실린 및 반코마이신(Vancomycin)에 대해 감수성을 나타내며, 페니실린(Penicillin) 및 옥사실린(Oxacillin)에 대해 중간내성을 나타내는 것으로 판정한다.

[0068] [표 3]

항생제 감수성시험 결과

항생제	페이퍼 함량/시트	T0			T30	T50
		억제영역 직경/mm	감수성 판정	참고 세균	억제대 직경/mm	억제대 직경/mm
암피실린 (Ampicillin)	10µg	24	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	24	25
세프트리악손 (ceftriaxone)	30µg	29	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	31	30
클로람페니콜 (Chloramphenicol)	30µg	35	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	36	35
클린다마이신 (Clindamycin)	2µg	35	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	37	36
이미펜엠 (Imipenem)	10µg	40	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	40	40
겐타마이신 (Gentamicin)	10µg	0	내성	\	0	0
에리트로마이신	15µg	36	감수성	연쇄상 구균	41	39
바시트라신 (Bacitracin)	0.04U	0	내성	\	0	0
페니실린 (Penicillin)	10IU	24	중간 내성	기타 연쇄상 구균	25	24
옥사실린 (Oxacillin)	1µg	9	중간 내성	폐렴 연쇄상구균	10	9
피페라실린 (Piperacillin)	100µg	35	감수성	기타 그람음성균	37	35
아목시실린	10µg	20	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	24	23
반코마이신 (Vancomycin)	30µg	26	감수성	기타 그람양성균	27	26
카나마이신 (Kanamycin)	30µg	0	내성	\	0	0
메트로니다졸 (Metronidazole)	5µg	0	내성	\	0	0
테트라사이클린 (Tetracycline)	30µg	38	감수성	헤모필루스 (hemophilus)	40	39
아지트로마이신 (Azithromycin)	15µg	31	감수성	\	31	30

주: 약물감수성 디스크 확산법은 병원성 세균에 대한 판정 기준만 있기 때문에 락토바실러스는 여기에 포함되지 않고, 기재된 판정 기준은 헤모필루스와 같은 세균을 판정하는 방법을 참고하여 감수성, 중간 내성, 약물 내성의 3 등급으로 설정된다.

[0069]

실시예 5

[0070]

독성시험

[0071]

쿤밍 쥐(SPF 수준) 5 마리를 시험하였다. 한 마리마다 복강(abdomen)에 0.3ml의 신선한 락토바실러스 크리스파투스 262-1 현탁액을 주사한다(쥐 한마리 당 1×10^9 CFU 이상). 2010년판 중국약전의 요건에 따라, 매일 쥐의 몸무게를 재고 주사하기 전과 후에 모든 쥐의 행동과 생리학적 변화를 관찰하고 기록한다. 그 결과 7일 내에 모든 쥐의 몸무게가 증가하고 뚜렷한 중독 증상, 이상 행동 또는 죽음이 발생하지 않았음을 확인하였다. 따라서, 이 균주는 무독성 균주인 것으로 판단된다.

실시예 6

[0072]

락토바실러스 크리스파투스 262-1의 계대 안정성(passage stability) 시험

[0073]

본 실시예에서는 제 30 세대(T30) 및 제 50 세대(T50) 동안 계대된 후 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 안정성을 성장 특성, 형태학, 생화학적 특성, 대사물질, 항생제 감수성, 유전 능력(hereditary capacity) 및 독성 시험 등과 같은 다양한 면에서 조사하였다.

[0074]

1. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 분리 및 정제, 균락 형태 관찰, 염색 현미경 검사 및 생화학적 특성의

검사방법은 실시예 1 및 실시예 2의 첫 번째 부분에 기재된 것과 같다. 그 결과 계대 후 균락 형태는 도 6에 나타난 바와 같고, 도 6으로부터 뚜렷한 변화는 발생하지 않음을 확인할 수 있으며, 이는 계대가 안정하다는 것을 나타낸다; 그람 염색은 그람 양성 바실러스로 나타났으며, 염색 현미경 검사 사진은 도 7에 나타난 바와 같다; 24시간 및 48시간에서의 생화학적 동정 결과는 다양한 세대의 생화학적 특성이 일정하고 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 생화학적 특성에 부합한다는 것을 보여준다.

[0075] II. 유전적 특성 분석: 실시예 2의 두 번째 부분의 실시방법과 동일하다. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 제 0 세대 (T0), 제 30 세대 (T30), 제 50 세대 (T50)의 균주에 대해 각각 16SrRNA 단편의 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 도 4에 나타난 바와 같이 전기영동으로 분석되었고, 도 4로부터 타겟 밴드는 명확하고 단일(single)하며, 크기는 약 950bp이고, 증폭은 정확하며, T0, T30, T50에 대한 3 가지 PCR 증폭 결과는 일정하다는 것을 확인할 수 있다. T0, T30, T50의 PCR 증폭 산물이 시퀀싱 되었고 서열은 각각 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3에 기재된 바와 같다. NCBI의 BLAST tool을 사용함으로써 GenBank 데이터베이스에서 결정된 서열과 공지된 서열 사이에 비교 분석이 수행되었고, 락토바실러스 크리스파투스로 결정되었다.

[0076] III. 대사산물 측정: 실시방법은 실시예 3과 동일하다. 젖산 측정결과는 표 1에 기재된 바와 같고, 과산화수소 측정결과는 도 8에 나타난 바와 같다. 도 8에서 균락의 각 세대는 5분 후 과산화색이 약간 나타나고, 10분 후 많은 양의 과산화색이 나타나며, 이는 균주가 대사하는 동안 과산화수소를 생산하고 반정량 수준이 +++ 라는 것을 입증한다.

[0077] IV. 항생제 감수성 시험: 실시방법은 실시예 4와 동일하며, 여기서 한천 확산 페이퍼 디스크 방법으로 항생제에 대한 균주의 감수성을 측정한다; 약물 감수성 시험 디스크 방법의 세균 억제 범위 해석 기준에 따라 메트로니다졸(Metronidazole), 겐타마이신(Gentamicin), 바시트라신(Bacitracin) 및 카나마이신(Kanamycin)에 대한 락토바실러스 크리스파투스의 약물 내성, 클로람페니콜(Chloramphenicol), 클린다마이신(Clindamycin), 이미펜엠(Imipenem), 에리트로마이신, 피페라실린(piperacillin), 테트라사이클린(tetracycline) 및 아지트로마이신(azithromycin)에 대한 락토바실러스 크리스파투스의 감수성, 암피실린(Ampicillin), 세프트리악손(Ceftriaxone), 페니실린(Penicillin), 옥사실린(Oxacillin), 아목시실린 및 반코마이신(Vancomycin)에 대한 락토바실러스 크리스파투스의 중간 내성이 측정되었다. 표 3을 참고한다.

[0078] V. 독성 시험: 실시방법은 실시예 5와 동일하며, 여기서 독성 시험은 락토바실러스 크리스파투스 262-1 균주의 T0, T30, T50 균주에 대해 쥐 복강내 주사법(mice intra-peritoneal injection method)으로 수행되고, 시험의 농도는 $>10^9$ CFU/mouse 이다. 결과는 다음과 같다: 시험된 모든 쥐는 7일 내에 중독증상이 없고, 몸무게가 모두 증가하였으며 죽은 동물은 없었다. 상기 결과를 바탕으로, 이 균주는 "Supplementary Instructions of Technique Requirements for New Drug Pharmacology and Toxicology Research"에 따라 무독성형 균주에 속한다.

[0079] 요약하면, 본 실시예는 MRS 배양 배지를 통해 다수의 계대 동안 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 배양하고, 형태학, 생화학, 대사산물 특성 및 유전적 특성, 약물 감수성 특성 및 독성 시험 등의 다양한 측면에서 락토바실러스 크리스파투스 262-1에 대한 계대 번식의 영향을 논의한다. 그 결과, MRS로 배양된 제 50 세대 내의 계대는 그의 형태학, 생화학, 유전적 특성, 대사산물 및 약물 감수성 특성에서 최초로 분리된 균주와 동일하고, 안정하다는 것을 확인하였다.

실시예 7

[0080] 락토바실러스 크리스파투스 262-1 균주의 약력학적 시험(pharmacodynamic experiments)

[0081] I. 락토바실러스 크리스파투스 262-1 균주 체외 항균 시험

[0082] (1) 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 락토바실러스 델브릭키의 체외(in vitro) 억제 실험은 다음과 같다: 37°C의 5% CO₂ 조건에서 밤새 배양한 락토바실러스 크리스파투스 262-1 5 μL와 락토바실러스 델브릭키 5 μL는 각각 MRS 한천 플레이트에 접종하여 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 배양하며; 100 μL의 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*)을 10ml BHI 액체 배지에 접종하고 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 배양하고; 50ml의 소프트 BHI 한천을 흡수시키고 2.5ml의 말 혈청과 1ml의 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*) 현탁액을 고르게 혼합한 후, 5ml의 혼합물을 흡수시키고 48시간 동안 배양한 락토바실러스 MRS 한천 플레이트에 평평하게 펴고 락토바실러스 MRS 한천 플레이트에 각각 번호를 매긴 후 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 락토바실러스의 주변에 억제영역이 나타날 때까지 배양한다. 결과는 도 9에 나

타난 바와 같고, 도 9의 왼쪽 사진은 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 억제영역 효과를 나타내고, 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 측정된 억제영역의 직경이 21.68mm임을 나타내며, 오른쪽 사진은 락토바실러스 델브릭키이의 억제영역 효과를 나타내고, 버니어 캘리퍼로 측정된 억제영역 직경이 19.32mm임을 나타낸다. 따라서, 이러한 결과는 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 억제 효과가 락토바실러스 델브릭키이의 억제 효과보다 좋다는 것을 나타낸다.

[0083] (2) 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 락토바실러스 델브릭키이의 체외(in vitro) 억제 실험은 다음과 같다: 37°C의 5% CO₂ 조건에서 밤새 배양한 락토바실러스 크리스파투스 262-1 5 μL와 락토바실러스 델브릭키이 5 μL를 각각 MRS 한천 플레이트에 접종하고 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 배양하며; 37°C의 혐기성 조건에서 배양된 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)은 농도가 다른 초기 세균 현탁액으로 제조되고, 초기 세균 현탁액의 OD₆₀₀ 값은 각각 0.05, 0.1, 0.2 및 0.3이다. 농도가 다른 아토포비움균(*Atopobium vaginae*) 현탁액을 담그고 콜롬비아혈액한천배양배지(Columbia blood agar culture medium)의 전체 표면에 균일하게 코팅하며; 배양된 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 락토바실러스 델브릭키이를 눌러서 천공시키고(punched), 핀셋으로 세균 덩어리(cake)를 꺼낸 다음, 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)으로 코팅한 콜롬비아혈액한천배양배지에 거꾸로 놓고 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 배양한 후 억제영역을 관찰하고 기록한다. 결과는 표 4와 도 10에 나타난 바와 같다. 결과는 도면 및 억제영역의 측정된 크기에 따라, 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 억제 효과가 락토바실러스 델브릭키이의 억제 효과보다 명백하게 훨씬 뛰어나다는 것을 보여준다; 아토포비움균(*Atopobium vaginae*) 농도의 증가에 따라, 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 억제 효과는 실질적으로 일정하고, 억제영역의 직경은 모두 약 20mm 정도이나; 락토바실러스 델브릭키이의 항균 능력은 아토포비움균(*Atopobium vaginae*)의 농도의 증가에 따라 감소된다.

[0084] [표 4]

억제영역 직경 (mm)

농도	락토바실러스 크리스파투스 262-1		락토바실러스 크리스파투스 262-1의 평균값	락토바실러스 델브릭키이
	1	2		
OD=0.05	20.20	21.52	20.86	16.24
OD=0.1	20.40	20.90	20.65	14.26
OD=0.2	22.26	21.86	22.06	14.34
OD=0.3	20.94	18.52	19.73	12.78

[0085] (3) 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스262-1과 락토바실러스 델브릭키이의 생체 외(in vitro) 억제 실험: 락토바실러스 크리스파투스 262-1 5 μL와 락토바실러스 델브릭키이 5 μL의 신선한 용액을 MRS 한천 배지에 접종한 후 37°C의 혐기성 조건에서 48시간 동안 배양하며; 100 μL의 신선한 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 현탁액을 5mL의 소프트 YM 한천(0.4%의 한천, 50°C의 수조)에 균일하게 혼합한 후 혼합물을 48시간 동안 배양한 락토바실러스 MRS 한천에 붓고 응고시킨 후에 37°C의 5% CO₂ 조건에서 락토바실러스 주변에 억제영역이 나타날 때까지 배양한다. 결과는 도 11에 나타난 바와 같다. 결과는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 억제영역이 뚜렷하고 명확하며, 이의 억제 효과가 락토바실러스 델브릭키이의 억제 효과보다 명백하게 더 좋다는 것을 나타낸다.

[0087] (4) 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라(*Salmonella*) 병원균에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1과 락토바실러스 델브릭키이의 생체 외 억제 효과

[0088] 연구방법: 락토바실러스 크리스파투스 262-1 5 μL와 락토바실러스 델브릭키이 5 μL의 신선한 용액을 MRS 한천 배지에 접종한 후 37°C의 5% CO₂ 조건에서 48시간 동안 혐기성으로 배양하며; 각각 100 μL의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라균(*Salmonella*) 및 대장균(*Escherichia coli*)의 신선한 현탁액을 5mL의 영양 한천 (0.4%의 한천, 50°C의 수조)에 균일하게 혼합하고; 혼합물을 48시간 동안 배양한 락토바실러스 MRS 한천 배지에 붓고 응고시킨 뒤에 37°C의 5% CO₂ 조건에서 락토바실러스 주변에 억제영역이 나타날 때까지 배양한다. 결과는 표 5에 나타난 바와 같다. 결과는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라균(*Salmonella*) 및 대장균(*Escherichia coli*) 병원균에 대한 락토바실러스 크리스파투스

262-1의 억제 효과가 모두 락토바실러스 델브릭키이의 억제 효과보다 더 뛰어나며; 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1 및 락토바실러스 델브릭키이의 억제 효과가 가장 명확하고, 억제영역의 직경은 모두 90mm 이상이다.

[0089] [표 5]

억제영역 직경(mm)

병원성 세균	락토바실러스 크리스파투스 262-1	락토바실러스 델브릭키이
대장균	50.0	43.0
황색포도알균	42.4	38.31
살모넬라균	51.33	48.10
녹농균	>90	>90

[0090]

[0091]

II. 세포 접착력에 대한 실험: 질 상피세포의 단층에 부착된 락토바실러스의 수에 따라 서로 다른 락토바실러스의 접착 능력을 측정한다. 방법은 다음의 단계를 포함한다: 인간 질 상피세포 Vk2/E6E7과 인간 자궁경부암 상피세포 HeLa를 수득하는 단계; 세포를 포어(pore) 당 450,000의 밀도로 12-포어 플레이트(12-well plate) 상에 접종하고 48시간 후에 VK2/E6E7에 의해 단층을 형성하는 단계; 각 포어마다 다른 수의 CFU로 상업적으로 이용가능한 락토바실러스 DJS와 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 각각 첨가한 후 4시간 동안 부착시키고 부착과정 동안 진동기(shaker)에서 부드럽게 진동하고 각 그룹을 2개의 유사 시험(parallel experiments)으로 각각 제공하는 단계; 부착이 끝난 후에 1 ml의 0.05% triton X-100으로 세포를 분해(splitting)하고 세균 현탁액으로 만들어 희석하고 100ul의 세균 현탁액을 각각 균일하게 MRS 한천 배지 플레이트에 접종하는 단계; 및 48시간 동안 혐기성 배양한 후에 각 플레이트의 클론 수를 계산하는 단계.

[0092]

결과는 다음과 같다: 4시간에 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 접착률은 각각 43.1%와 69.4%였고, 상업적으로 이용가능한 락토바실러스 DJS 균주의 접착률은 각각 29.2%와 26%였다; 따라서, 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 접착력은 상업적으로 이용가능한 동일한 종류의 락토바실러스 DJS 균주보다 더 높다.

[0093]

III. 히말라야 원숭이 질 정착 실험

[0094]

5마리의 건강한 동물을 선택하고 몸무게에 따라 층화 무작위 그룹화(stratified random grouping)를 수행하여 2마리의 대조군(동물 번호 1203, 1204)과 3 마리의 실험군(동물번호 3211, 3212, 3222)으로 2개의 그룹을 나누었고, 여기서 실험동물은 Suzhou Xishan ZhongKe Laboratory Animal Co., Ltd.에서 제공한 암컷 히말라야 원숭이 [Chinese-origin Rhesus macaque (*Macaca mulatta*)]이다. 실험방법은 다음의 단계를 포함한다.

[0095]

정착을 위한 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 제조: 정착량은 10^8 이 되도록 락토바실러스 크리스파투스262-1의 동결건조 분말을 칭량한다; 대조군은 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 첨가하지 않는 빈(blank) 동결건조된 애주번트(adjuvant)를 사용하고 무균 상태에서 각각 0.7mL의 MRS 액체 배지를 첨가하고 균일하게 혼합한 다음 질 투여 장치에 의해 흡수시키고 질내에 이식한다.

[0096]

정착 모델링(modeling) 및 샘플링(sampling): 정상적인 월경주기를 갖는 히말라야 원숭이의 월경이 끝난 후 관찰될 수 있고, 연속 5일 동안 질에 이지트로마이신 좌약(200 mg/마리)을 투여한 다음 또 다른 연속 5일 동안 모델링 세균(modeling bacteria)을 이식한다. 매주에 질 분비물의 색, 특징, 분비량을 검사하고 질 분비물의 pH 값을 측정함으로써 동물의 질을 관찰하고; 2개의 멸균 폴리에스테르 면봉을 가지고 하나는 질 분비물 청결도의 현미경 시험을 위해 사용하고 다른 하나는 세균군 분석을 위해 사용한다.

[0097]

질내 세균의 분리 및 정제 배양: 수집된 질 분비물은 2mL의 D-Hanks 완충용액에 진탕하고 인산염 완충용액으로 구배희석(gradient dilution)한 다음 콜롬비아혈액한천, 페닐에틸알콜혈액한천, MRS 한천 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 선택 한천 플레이트에 각각 코팅하고; 37°C의 혐기성 조건에서 24시간 내지 48시간 동안 배양하며; 단일 균락 형태 및 수량 용혈성(quantity haemolyticus)과 같은 정보를 기록하고 다시 콜롬비아혈액한천평판에 확선(relining)하여 정제된 균락을 얻고 생화학적 및 분자적 동정을 수행한다.

[0098]

분자생물학적 방법 동정(16SrDNA 유전자 서열분석): 상기 분리 및 정제된 균주에 대해 16SrDNA 서열 증폭, 시퀀싱 및 분석을 수행한다. 먼저, 백금이로 균주를 선택하고 50 μL의 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent를 포함하는 원심분리 튜브에 넣고 Dry Block Heater 내에 100°C 조건에서 15분 동안 분열시킨 후 -20°C에서 DNA 주형(template)으로 냉동 보존한다; 이후 일반적인 프라이머 쌍 8F/926R을 사용하여 각각 SEQ ID NO:

4 및 SEQ ID NO: 5의 서열을 갖는 16SrDNA 단편에 대해 증폭을 수행하고, 여기서 R은 G 또는 A이다; 50 μL의 PCR반응 시스템에 각 시약을 첨가한다. 각 시약의 이름과 용량은 5 μL의 10×PCR 버퍼, 1 μL의 dNTP(10 mM), 0.5 μL의 MgCl₂(50 mM), 0.2 μL의 Platinum Taq DNA Polymerase (5 U), 1 μL의 프라이머 8F(10 μM), 1 μL의 프라이머 926R(10 μM), 1 μL의 주형(50 ng/μL), 39.3 μL의 DNase/RNase-Free 탈이온수이다. 다음의 순서로 PCR 반응 조건이 설정된다: 94℃에서 2분 동안 예비-변성, 94℃에서 1분 동안 변성, 55℃에서 1분 동안 어닐링 (annealing), 72℃에서 2분 동안 연장 및 72℃에서 10분 동안 연장의 30 사이클로 이루어진 PCR 반응을 수행한다. 수득된 PCR 산물은 1% 아가로스 겔을 통해 전기영동한 후 자외선분석기(PCR 산물에 의해 제조된 로딩 용액은 이미 균주를 포함한다)로 테스트하고 수득된 데이터를 보존한다.

[0099] 16SrDNA 단편으로 확인된 PCR 증폭 산물은 겔 컷팅 회수방법으로 타겟 단편을 정제한 후 시퀀싱한다. 측정된 16SrDNA 유전자 서열에 대해 NCBI의 BLAST tool을 이용하여 GenBank 데이터베이스에 공지된 서열과 비교 분석을 수행하였다. 비교 상동성이 98%를 초과하면, 동일종으로 확인된다.

[0100] **실험결과 및 분석**

[0101] 질 점막 및 분비물의 일반 관찰: 이식한 후 매주 한번씩 관찰한 결과 모든 실험동물의 질 점막 분비물에 대해 탐지된 뚜렷한 이상은 없는 것으로 나타났다.

[0102] 질 분비물의 pH값 측정: 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 이식한 후, 실험군에서 대부분의 동물 질 분비물의 pH 값은 대조군보다 현저하게 낮고 이식하기 전과 비교하여 현저하게 감소한다. pH 값의 측정결과는 표 6에 나타난 바와 같다.

[0103] [표 6]

분비물의 pH 값 측정결과

동물 번호	그룹	처리 전	처리 후 및 이식 전	락토바실러스 크리스파투스 262-1의 이식을 중단한 후 제 1일	락토바실러스 크리스파투스 262-1의 이식을 중단한 후 제 8일	락토바실러스 크리스파투스 262-1의 이식을 중단한 후 제 15일	락토바실러스 크리스파투스 262-1의 이식을 중단한 후 제 22일	락토바실러스 크리스파투스 262-1의 이식을 중단한 후 제 29일
1203	대조군	7.0*	6.5	5.5	6.5	6.5*	6.1*	6.5
1204	대조군	4.4	7.0	7.0*	7.0	4.7	5.8*	7.0
3211	실험군	6.1	7.0*	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
3212	실험군	7.0	7.0	4.7	4.7	4.7	4.7	4.4
3222	실험군	5.0	5.0	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4

주: *표기한 부분은 동물에서 월경이 나타나는 것을 표시한다.

[0104]

[0105] 질 분비물 청결도: 이식하기 전 및 후와 비교하여 대조군 동물의 질내에 여러 가지 종류의 세균 양이 현저하게 증가한 반면 청결도가 감소되며; 실험군 동물은 락토바실러스 크리스파투스 262-1을 이식한 후 질 분비물의 청결도가 대조군보다 현저하게 좋다는 것을 보여준다. 그람-양성 바실러스 바기날리스(*Bacillus vaginalis*)의 다른 수를 볼 수 있고, 질 분비물 청결도는 대조군보다 현저하게 높다. 질 분비물 청결도의 측정결과는 표 7에 나타난 바와 같다.

[0106] [표 7]

질 분비물 청결도의 판정 결과

동물 번호	그룹	처리 전	처리 후 이식 전	락토 바실러스 크리스파 투스 262- 1의 이식 중단 후 제 1 일	락토 바실러스 크리스파 투스 262- 1의 이식 중단 후 제 8 일	락토 바실러스 크리스파 투스 262- 1의 이식 중단 후 제 15 일	락토 바실러스 크리스파 투스 262- 1의 이식 중단 후 제 22 일	락토 바실러스 크리스파 투스 262- 1의 이식 중단 후 제 29 일
1203	대조군	II*	II	II	II	II*	III*	III
1204	대조군	I	I	I*	II	III	II*	II
3211	실험군	II	I*	I	I	I	I	II
3212	실험군	I	I	I	I	II	I	I
3222	실험군	III	III	II	II	II	II	III

주 : *표기한 부분은 동물에서 월경이 나타나는 것을 표시한다.

[0107]

[0108]

히말라야 원숭이 질 미생물상(microflora): 1%의 아가로스 겔 전기영동법(garose gel electrophoresis)은 PCR 증폭 후 16SrDNA 단편의 산물에 대해 수행한다; 결과는 하나의 밴드가 대부분의 세균 균주에 의해 성공적으로 증폭되고 대부분 샘플의 16SrDNA 증폭 생성 밴드는 뚜렷하고 시퀀싱 요건을 만족한다는 것을 보여준다. 몇몇 균주에 대한 PCR 증폭 산물 전기영동은 도 12에 나타난 바와 같다. 마커는 DL2000이고 단편 크기는 하향순서로 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp이다. 분석은 16SrDNA 단편에 대한 크기가 약 950bp라는 것을 보여준다. 측정된 16SrDNA 유전자에 대해 NCBI의 BLAST tool을 사용하여 GenBank 데이터베이스에 공지된 서열과 비교 분석을 수행하였다. 만약 비교 상동성이 98% 이상이면, 동일종으로 확인한다.

[0109]

질내 세균군 분석을 통하여, 실험군의 전체 3마리 동물의 질 분비물에서 시험에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 발견되고, 시험에 대한 분리된 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 정보는 도 13에 나타난 바와 같다. 도 13에서 보여지는 바와 같이, 모든 실험동물의 질 분비물에서 시험에 대한 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 발견된다. 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 대부분은 정착 후 제8 일째 및 그 이후에 나타날 것이며, 이는 원칙을 만족한다. 더욱이, 수량이 10^7 개/면봉 이상이기 때문에 정착 효과는 매우 현저하다. 따라서, 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 초기 정착 수량이 10^8 일 때, 중국 히말라야 원숭이의 질내에 성공적으로 정착할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0110]

IV. 쥐의 질에서 칸디다 알비칸스 모델에 대한 영향

[0111]

락토바실러스와 칸디다 알비칸스를 이용하여 클리닝-등급(cleaning-grade) ICR 암컷 쥐의 질내에서 공생실험을 수행하고 칸디다 알비칸스에 대한 본 발명의 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 저항 효과를 관찰한다. 동물 모델링 후, 총 3일 동안 매일 1번씩에 질에 세균 현탁액과 질용 Daktarin 좌약을 주입한다.

[0112]

(1) 모델링 후, 제5일 및 제10일에 각각 질관주액(vaginal irrigation solution)을 꺼내고 칸디다 알비칸스와 락토바실러스 크리스파투스 262-1에 대해 균락 계수를 수행한다. 표 8을 참조한다.

[0113] [표 8]

모든 그룹의 관주액의 균락 계수 결과 ($\times 10^6$ cfu)

그룹	모델링 후 5 일		모델링 후 10 일	
	락토바실러스 크리스파투스 262-1 ($\times 10^6$ cfu)	칸디다 알비칸스 ($\times 10^6$ cfu)	락토바실러스 크리스파투스 262-1 ($\times 10^6$ cfu)	칸디다 알비칸스 ($\times 10^6$ cfu)
칸디다 알비칸스 + 락토바실러스 크리스파투스 262-1 ($\times 10^6$ cfu)	11.2	1.86	10.08	0.26
칸디다 알비칸스의 대조군	0	6.24	0	6.48
칸디다 알비칸스 + Daktarin 좌약군	0	0.42	0	0.36

[0114]

[0115] 결론: 3개의 실험군(칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스 262-1, 칸디다 알비칸스의 대조군, 칸디다 알비칸스+Daktarin 좌약군)의 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 수행된 박테리아 양이 분산 분석법으로 이루어지고, 결과는 첫 번째 기간 동안(5일), 칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스 262-1군과 칸디다 알비칸스 대조군에서 $P > 0.05$ 이고, 통계학적인 차이는 없었으며; 칸디다 알비칸스+Daktarin 좌약군, 칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스 262-1 및 칸디다 알비칸스의 대조군에서 $P < 0.05$ 이고, 통계학적인 차이가 있었고; 칸디다 알비칸스+Daktarin 좌약군 및 칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스 262-1군에서 $P = 0.033$ 이고, 통계학적인 차이도 있었다. 두 번째 기간 동안(10일), 칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스 262-1군과 칸디다 알비칸스+Daktarin좌약군 사이의 통계적인 차이가 없다는 것은 이 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 칸디다 알비칸스에 현저하게 저항하는 치료효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0116] (2) 실험 샘플 병리학적 단면(pathological section)에 대해 파오요드산 슈프염색(periodic acid schiff stain, PAS)을 수행하여 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 특이적 염색 결과를 관찰한다. 다음 표 9를 참조한다.

[0117] [표 9]

각 실험군에서 실험동물의

칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 질 감염 상태(개별 동물 기준)

실험군	샘플 수	PAS 특이적 염색* (균류 상태)			
		+++*	++	+	-
A. 칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)+락토바실러스 크리스파투스 262-1 그룹	10	0	5	3	2
B. 칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>) 대조군	10	7	3	0	0
D. 칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)+Daktarin 좌약 그룹	10	0	2	4	4

[0118]

[0119] 조직병리학 특이적 염색 결과는 칸디다 알비칸스+락토바실러스 크리스파투스262-1 그룹과 칸디다 알비칸스+Daktarin 좌약 그룹의 실험 결과가 유사하다는 것을 나타낸다. 본 실험 결과는 락토바실러스 크리스파투스 262-1이 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 야기되는 질 질환의 치료를 위한 보조 수단으로 사용될 수 있다는 것을 제시한다.

실시예 8

[0120] 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 동결건조 및 동결건조 분말의 안정성

[0121] 발효와 동결건조 조건에서 락토바실러스 크리스파투스 262-1의 생존율을 시험하기 위해 락토바실러스 크리스파

투스 262-1을 pH 6.0의 변형 MRS 배지에서 성장시키고, 1L의 BioFlo 110발효탱크 (New Brunswick Scientific)를 사용하여 발효한다. 정체기(stationary phase) 초기에 세균을 수집하고, 생균수는 $1.0\text{--}1.5 \times 10^9$ CFU/ml이며, 생균수는 총 세균 수의 90% 이상을 차지한다. 원심분리하여 세균을 수집하고, 인산염 버퍼로 세척한 후 동결 보호제(자일리톨, 아스코르브산염, α -토코페롤 및 인산염 버퍼 등을 포함)와 혼합한다. 그 다음에, 혼합물을 Virtis Advantage 동결 건조기에 두고 동결건조한다. 샘플은 -40°C 에서 1-20시간 동안 동결하고 다음에 -40°C 에서 2-60시간 동안 진공 건조한 후 25°C 에서 10-40시간 동안 건조한다. 동결건조 분말은 건조제를 포함하는 알루미늄 포일 백에 나누어 넣고 4°C 와 실온(25°C)에서 보관한다. 제0일, 제30일 및 제180일에 평판계수 및 CFU 측정을 통해 총 세균 수와 생균수를 각각 측정한다. 초기의 락토바실러스 크리스파투스 262-1은 동결건조 분말 그램(gram) 당 최고 340억 생균을 함유하고(3.4×10^{10} cfu/g), 4°C 에서 최적의 저장 안정성을 나타낸다. 표 10에 나타난 바와 같이 4°C 에서 6개월 동안 저장한 후에도 초기 생균수의 70.6%가 보존된다.

[0122] [표 10]

락토바실러스 크리스파투스 262-1 동결건조 분말 6 개월 안정성 시험 결과

[0123]

조건	총균수/ 동결건조 분말(g)	생균수/ 동결건조 분말(g)	생균 비율 / %
0 개월	8.5×10^{10}	3.4×10^{10}	40.0
1 개월, 4°C	8.4×10^{10}	3.1×10^{10}	36.9
1 개월, 실온	8.1×10^{10}	1.8×10^{10}	22.2
6 개월, 4°C	7.8×10^{10}	2.4×10^{10}	30.8
6 개월, 실온	4.0×10^{10}	5.8×10^9	14.5

실시예 9

[0124]

락토바실러스 크리스파투스 262-1 캡슐형 집중제의 제조

[0125]

제조 단계는 다음과 같다:

[0126]

(1) -70°C 의 동결된 액체 락토바실러스 크리스파투스 262-1 종자 또는 원종(original seed)을 30mL의 MRS 액체 배지에 접종하고, 37°C 의 5% CO_2 조건에서 24 시간 동안 배양한다;

[0127]

(2) 상기 (1)에서 적당량의 균액을 꺼내고 500ml의 발효 배양액에 첨가하여 37°C 의 5% CO_2 에서 24시간 동안 배양한다 ;

[0128]

(3) 50L의 발효탱크 내에 적당량의 발효 배양액을 첨가하고 20분 동안 고압 살균한다;

[0129]

(4) 균액을 발효탱크 내의 발효 배양액에 접종하고 초기 균액의 농도는 약 0.4의 OD_{600} 값으로 조절하고, pH 6.0, 37°C 에서 적당량의 질소를 첨가하고 약 8-10 시간 발효한다;

[0130]

(5) 발효산물을 원심분리하여 수집하고, 미생물동결보호액(microorganism lyophilized protective liquid)을 첨가하여 세균 현탁액을 제조한 후 세균 농도를 측정하고 $1.0\text{--}1.5 \times 10^9$ CFU/ml에서 조정한다; 그리고

[0131]

(6) 상기 세균 현탁액을 동결건조기의 동결 플레이트에 옮기고 동결건조기를 작동하여 48시간 진공 건조하고 건조가 완료된 후 세균 현탁액을 분쇄하여 캡슐에 채워 넣는다.

[0132]

구체적으로 실시할 때, 필요한 제품 용량에 따라 배양규모를 확대하거나 축소할 수 있다.

실시예 10

[0133]

락토바실러스 크리스파투스 262-1 액체형 집중제의 제조

[0134]

제조 단계는 실시예 9의 단계 (1)-(5)와 동일하다. 단, 실시예 9와 다른 점은 상기 단계 (5)에서 발효를 통해 수득된 배양액이 탱크로부터 배출되고, 바로 플라스틱 포장통이나 포장병을 사용하여 액체 제형으로 분배된다.

[0135]

락토바실러스 크리스파투스 262-1은 계대(passage)에서 안정하고, 형태학, 생화학적 특성, 유전적 특성, 대사 및 약물 감수성 특성이 각 세대에서 일정하며, 젖산과 과산화수소를 생산하여 질내에 미생태 균형을 유지하는데 기여하고; 무독성이며, 안전하고, 생체 적합성이 좋으며; 질내에 가드넬라균(*Gardnerella vaginalis*), 아토포비

움(*Atopobium vaginae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 및 병원성 세균 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라균(*Salmonella*)에 대한 억제 효과가 좋고; 질 내에 정착 능력이 강하고 정착한 뒤 질 내에 미세환경, 예를 들어 pH 및 청결도 등을 개선하는 효과가 좋으며, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 명확하게 억제할 수 있고 Daktarin 좌약의 치료효과와 유사하며, 이는 락토바실러스 크리스포투스가 칸디다 알비칸스로 인한 질 질환의 치료를 위한 보조 수단으로 사용될 수 있다는 것을 제시한다; 균주를 유효성분으로 제조한 점종제는 생균 비율이 높고, 안정성이 좋으며, 저장이 편리하다.

[0136] 이러한 데이터는 락토바실러스 크리스포투스 262-1 또는 이를 이용하여 제조한 점종제를 외음부용 화장품이나 소독제품, 그리고 질과 접촉하는 관련 제품, 예를 들어 의료기기의 재료나 코팅에 첨가하면 락토바실러스 크리스포투스 262-1이 질 내 미세환경을 개선 및 조절하여 질 병원성 세균을 억제하는 작용을 발휘할 수 있다. 한편, 락토바실러스 크리스포투스 262-1은 생체 적합성이 좋고 안전하며 독성이 없기 때문에 여성 외음부의 위생과 보호 관리에 중요한 역할을 하고, 위생을 보장하면서 여성 건강에 도움이 될 수 있는 제품을 개발하는데 커다란 사용 잠재력을 갖는다.

수탁번호

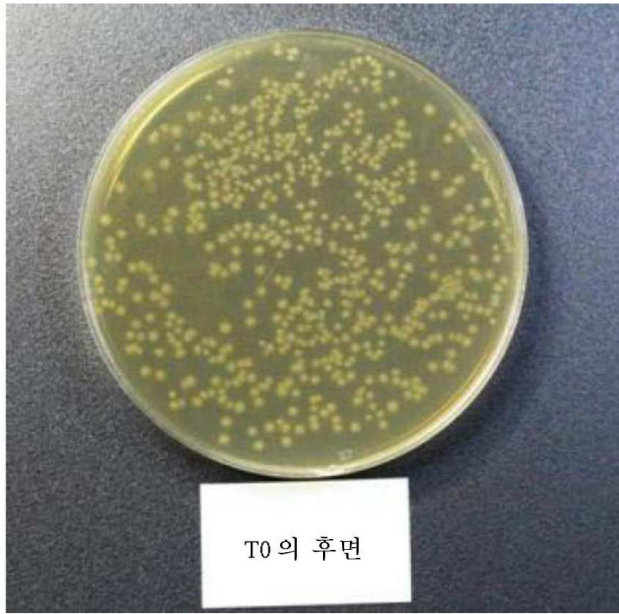
[0137] 기탁기관명 : 중국미생물균종보존관리위원회일반미생물센터
 수탁번호 : CGMCC6469
 수탁일자 : 20120822

도면

도면1a



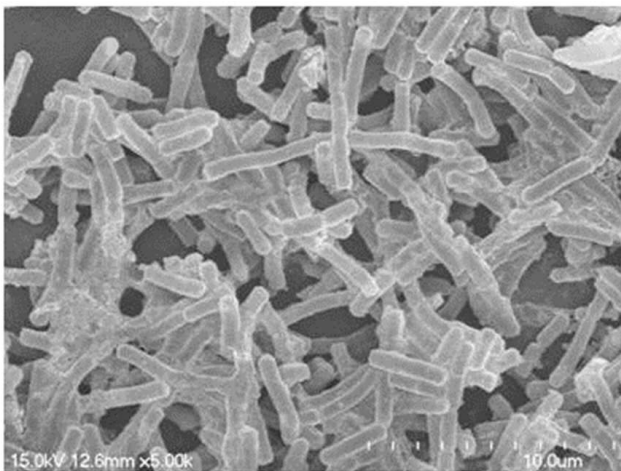
도면1b



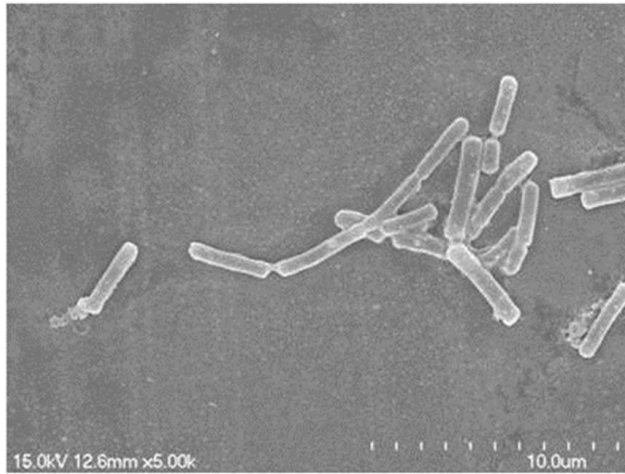
도면2



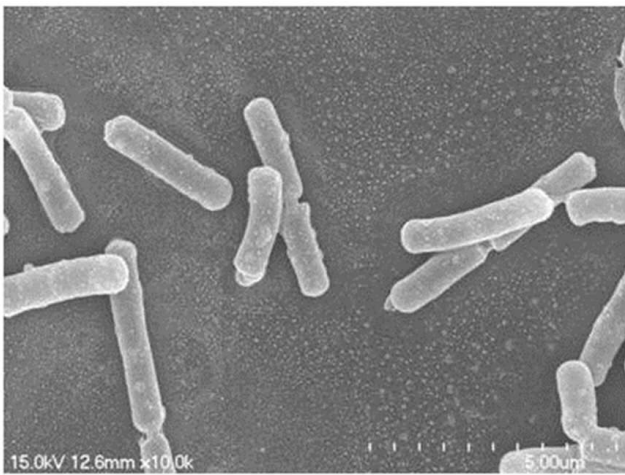
도면3a



도면3b



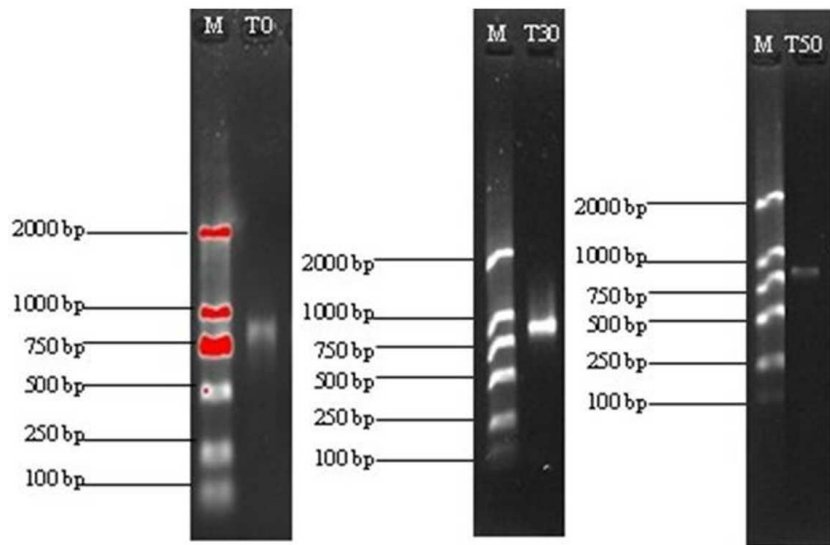
도면3c



도면3d



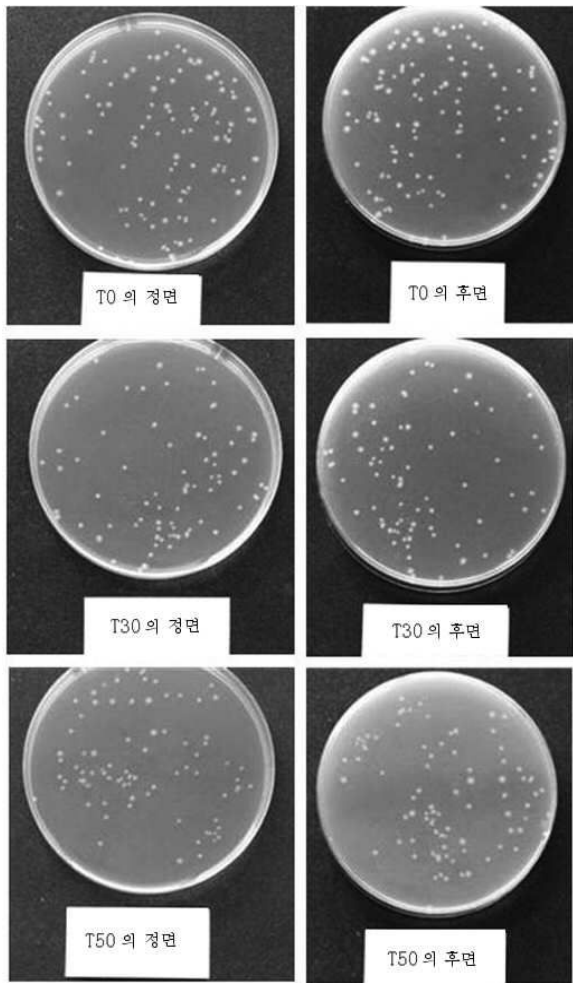
도면4



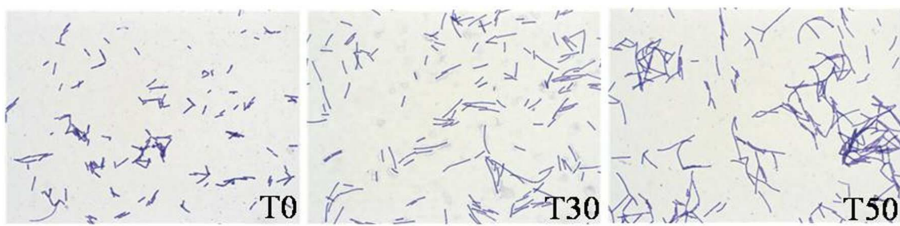
도면5



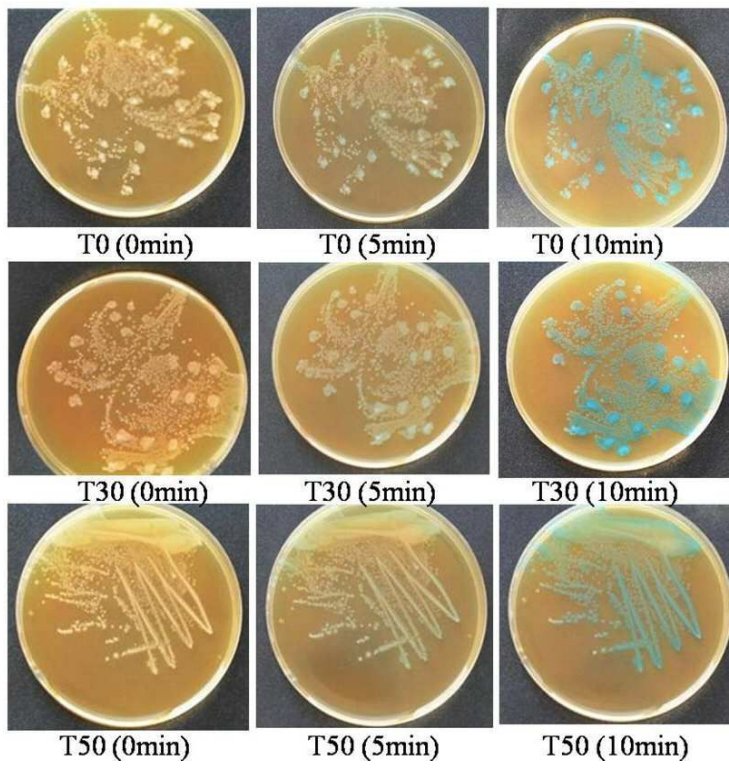
도면6



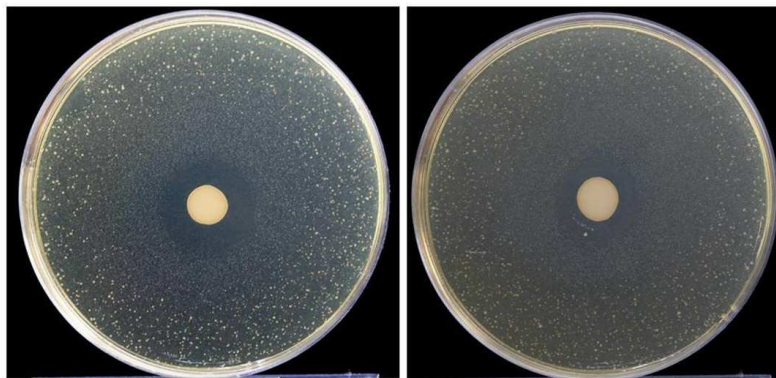
도면7



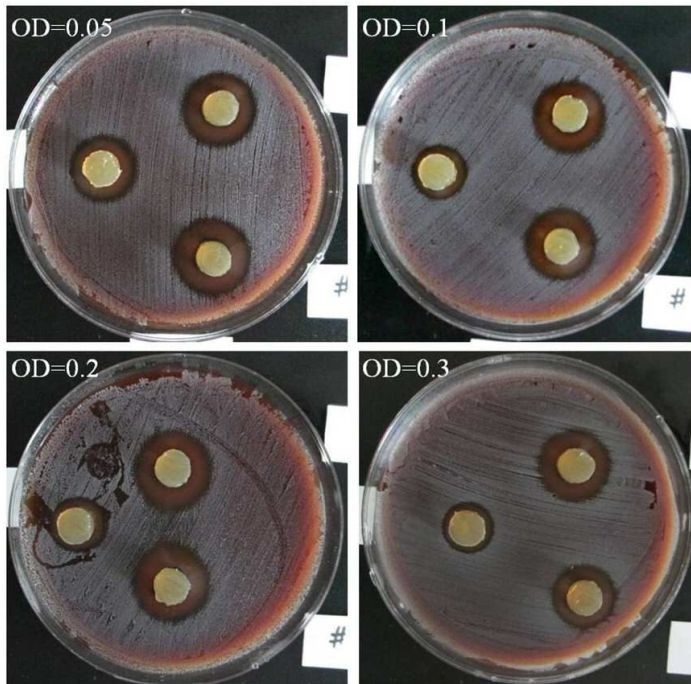
도면8



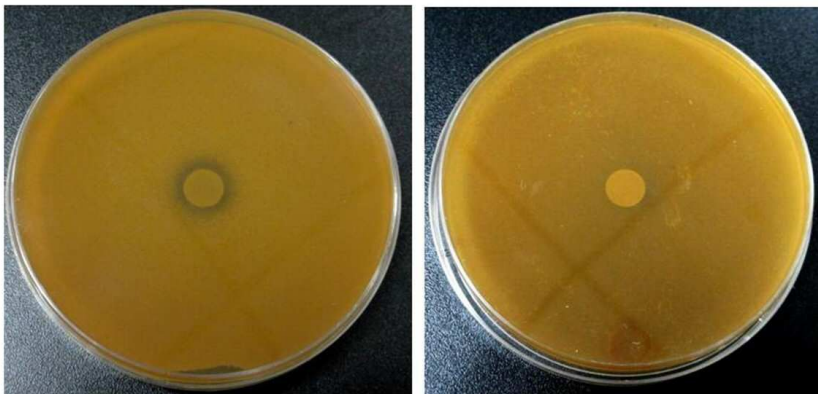
도면9



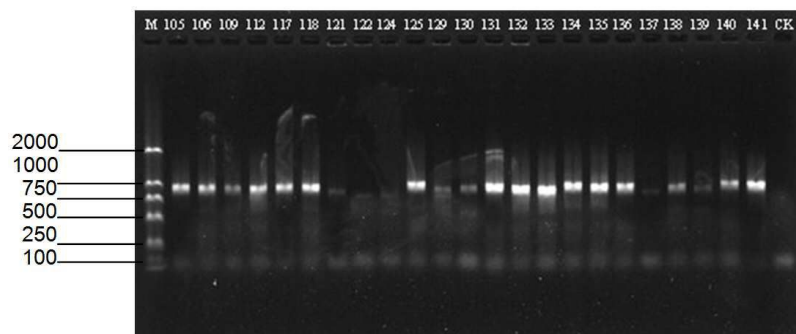
도면10



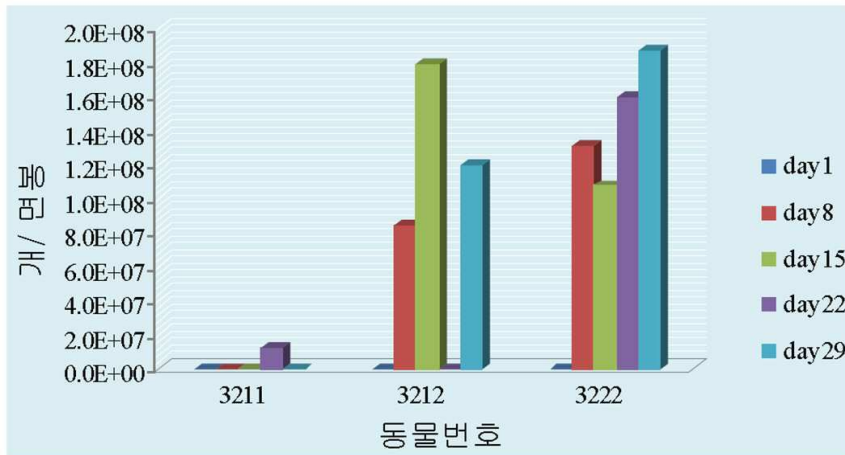
도면11



도면12



도면13



서열목록

- <110> Suzhou Oswkbio Biopharmaceutical Technology Co., Ltd.
 - <120> LACTOBACILLUS CRISPATUS AND APPLICATION THEREOF
 - <130> 1
 - <150> CN201310551661.9
 - <151> 2013-11-08
 - <150> CN201310551630.3
 - <151> 2013-11-08
 - <150> CN201310731833.0
 - <151> 2013-12-26
 - <160> 5
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 919
 - <212> DNA
 - <213> Lactobacillus Crispatus
 - <400> 1
- ```

cttgagt ttc aaccttg cgg tcgtactccc caggcggagt gcttaatgcg ttagctgcag 60
cactgagagg cggaaacctc ccaacactta gcactcatcg tttacggcat ggactaccag 120

ggtatcta at cctgttcgct acctatgctt tcgagcctca gcgtcagttg cagaccagag 180
agccgccttc gccactggtg ttcttcata tatctacgca ttccaccgct acacatggag 240
ttccactctc ctctttgca ctcaagaaaa acagtttccg atgcagttcc tcggttaagc 300
cgaggccttt cacatcagac ttattcttcc gctgcgctc gctttacgcc caataaatcc 360
ggacaacgct tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag cegtgacttt 420

```

ctggttgatt accgtcaaat aaaggccagt tactacctct atccttcttc accaacaaca 480  
 gagctttacg atccgaaaac cttcttcaact cacgcggcgt tgctccatca gacttgcgtc 540

catttgga gattccctac tgctgcctcc cgtaggagtt tgggccgtgt ctcagtccca 600  
 atgtggccga tcagtctctc aactcggcta tgcatcatcg ccttggtaag cctttacctt 660  
 accaactage taatgcaccg cggggccatc ccatagcgac agcttacgcc gccttttaaa 720  
 agctgatcat gcgatctgct ttcttatecg gtattagcac ctgtttccaa gtggatccc 780  
 agactatggg gcaggttccc cacgtgttac tcacccatcc gccgctcgct ttctaactg 840  
 cattaccgaa gtaaatctgt tagttccgct cgctcgactt gcatgtatta ggcacgccgc 900  
 cagcgttcgt cctgagcag 919

- <210> 2
- <211> 898
- <212> DNA
- <213> Lactobacillus Crispatus
- <400> 2

cgggcgggtg ctatactgca gtcgagcgag cggaactaac agatttactt cgtaatgac 60  
 gttaggaaaag cgagcggcgg atgggtgagt aacacgtggg gaacctgccc catagtctgg 120  
 gataaccactt ggaaacaggt gctaataaccg gataagaaag cagatcgcat gatcagcttt 180  
 taaaaggcgg cgtaagctgt cgctatggga tggccccgcg gtgcattagc tagttggtaa 240  
 ggtaaaggct taccaaggcg atgatgcata gccgagttga gagactgatc ggccacattg 300  
 ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga 360

cgcaagtctg atggagcaac gccgctgag tgaagaaggt tttcggatcg taaagctctg 420  
 ttgttggta agaaggatag aggtagtaac tggcctttat ttgacggtaa tcaaccagaa 480  
 agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaacatct aggtggcaag cgttgtccgg 540  
 atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg aagaataagt ctgatgtgaa agccctcggc 600  
 ttaaccgagg aactgcatcg gaaactgttt ttcttgagtg cagaagagga gagtggaact 660  
 ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata tggagaaca ccagtgccga aggccgctct 720  
 ctggtctgca actgacgctg aggcctgaaa gcatgggtag cgaacaggat tagatacct 780

ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttggga ggtttccgcc tctcagtgct 840  
 gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gactacgacc gcaaggttga actcaggg 898

- <210> 3
- <211> 897

<212> DNA

<213> Lactobacillus Crispatus

<400> 3

ccattcgctg ctataatgca gtcgagcgag cggaactaac agatttactt cggtaatgac 60

gtagtagaaag cgagcggcgg atgggtgagt aacacgtggg gaacctgccc catagtctgg 120

gataaccatt ggaacaggt gctaataaccg gataagaaag cagatcgcat gatcagcttt 180

taaaaggcgg cgtaagctgt cgctatggga tggccccgcg gtgcattagc tagttggtaa 240

ggtaaaggct taccaaggcg atgatgcata gccgagtga gagactgatc ggccacattg 300

ggactgagac acggcccaaa ctacctaggg aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga 360

cgcaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggt tttcggatcg taaagctctg 420

ttgttggtga agaaggatag aggtagtaac tggcctttat ttgacggtaa tcaaccagaa 480

agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg 540

atatttggg cgtaaagcga gcgcagggcg aagaataagt ctgatgtgaa agccctcggc 600

ttaaccgagg aactgcatcg gaaactgttt ttcttgagtg cagaagagga gagtggaact 660

ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga aggccgctct 720

ctggtctgca actgacgctg aggctcgaaa gcatgggtag cgaacaggat tagatacct 780

ggtagtccat gccgtaaagc atgagtgcta agtgttggga ggtttccgcc tctcagtct 840

gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gactacgacc gcaaggttga actcaga 897

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence 5'-3'

<400> 4

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence 5'-3'

<400> 5

ccgtcaattc cttrragttt 20