

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 9월 16일 (16.09.2021) WIPO | PCT

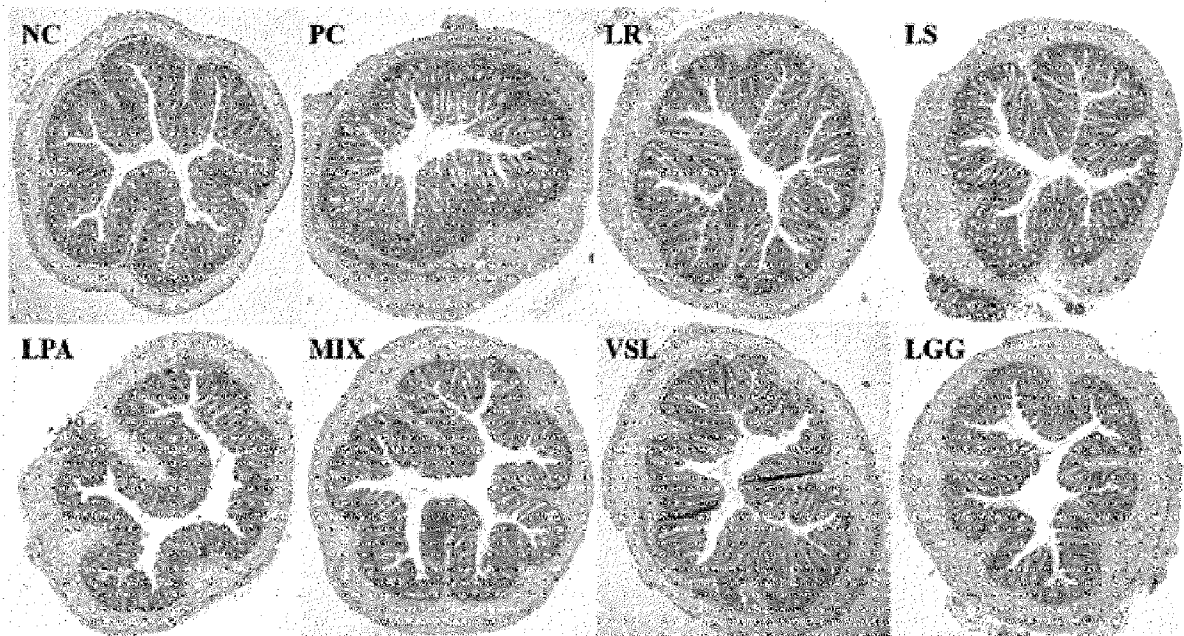


(10) 국제공개번호
WO 2021/182829 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 1/20* (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61K 35/74 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/002857
- (22) 국제출원일: 2021년 3월 9일 (09.03.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0029448 2020년 3월 10일 (10.03.2020) KR
- (71) 출원인: 주식회사 종근당바이오 (CKD BIO CORPORATION) [KR/KR]; 03742 서울시 서대문구 충정로 8, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 허철성 (HUH, Chul Sung); 16909 경기도 용인시 기흥구 용구대로 2394번길 27, 106동 901호, Gyeonggi-do (KR). 박현준 (PARK, Hyunjoon); 26467 강원도 원주시 혁신로 92, 407동 901호, Gangwon-do (KR). 여소영 (YEO, Soyoung); 12273 경기도 남양주시 와부읍 덕소로 180, 119동 601호, Gyeonggi-do (KR). 최인석 (CHOI, In-Suk); 06701 서울시 서초구 남부순환로 2183, 101동 1105호, Seoul (KR). 김병국 (KIM, Byoung-Kook); 08048 서울시 양천구 신정로7길 76, 202동 1207호, Seoul (KR). 주재량 (CHU, Jaeryang); 07257 서울시 영등포구 국회대로 34길 12, 3층, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 공병욱 (KONG, Byung Wook); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

(54) Title: LACTOBACILLUS RHAMNOSUS STRAIN HAVING INTESTINAL IMMUNOMODULATORY FUNCTION AND PREVENTIVE OR THERAPEUTIC ACTIVITY FOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

(54) 발명의 명칭: 장관 면역조절 기능과 염증성 장 질환의 예방 또는 치료 활성을 갖는 락토바실러스 람노서스 균주



(57) Abstract: The present invention relates to a novel *Lactobacillus rhamnosus* LDTM7511 strain (Accession No: KCTC 18735P) and a composition for the prevention, amelioration, or treatment of inflammatory bowel disease, the composition comprising same as an active ingredient. It has been experimentally confirmed that the *Lactobacillus rhamnosus* LDTM7511 strain of the present invention has resistance to an intestinal stress environment as probiotics, and has antibacterial and anti-inflammatory activities, and thus can be effectively used to prevent, ameliorate, or treat inflammatory bowel disease.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/182829 A1

ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주(수탁번호 KCTC 18735P) 및 이를 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주는 프로바이오틱스로서 장내 스트레스 환경에 대한 내성을 보유하고 있으며, 항균 및 항염증 활성을 가지는 것을 실험적으로 확인하였는바, 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 장관 면역조절 기능과 염증성 장 질환의 예방 또는 치료 활성을 갖는 락토바실러스 람노시스 균주

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2020년 3월 10일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0029448호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 신규한 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주(수탁번호 KCTC 18735P), 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 염증성 장 질환은 특발성 질환으로 소화기관에 만성 및 재발성 염증과 장 점막 조직에 손상이 유발되는 질환이다. 통상적으로 크론병(Crohn's disease, CD)과 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)을 염증성 장 질환으로 명명하며, 그 원인은 명확히 밝혀지지 않았지만 유전적 소견, 면역과 환경적 요인 및 일부 미생물(병원균)에 의해 발병한다고 제시되고 있다.
- [5] 보다 구체적으로는, 장벽의 면역 기능 이상 또는 장내 환경적 항원의 침입으로 인한 염증성 사이토카인의 증가와 병원균 감염 등으로 인한 장내 세균총의 장내 불균형(dysbiosis)이 주요한 원인으로 제시되고 있다. 특히 장내 세균의 다양성이 저하되고 특정 공생 세균인 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 중 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)의 과잉 증식 및 부착, 및 침습성 대장균(AIEC)과 마이코박테리움(*Mycobacterium*)과 같은 특정 병원균의 감염에 의해 장내 불균형이 야기되는 것으로 알려져 있다.
- [6] 또한, 유전적으로는 NOD2/CARD15 유전자의 변이와 염증성 사이토카인 IL-23R 유전자의 변이에 의해 발생하는 것으로 밝혀져 있으며, 환경적으로는 위생가설과 흡연 및 서구화된 식이습관에 의한 것으로 알려져 있다.
- [7] 이러한 염증성 장 질환의 치료에는 염증을 억제하고 증상을 호전시키는데 초점을 맞춘 항염증제의 일종인 메살라민(Mesalazine 또는 5-aminosalicylic acid)이 1차 치료제로 주로 사용된다. 메살라민에 불응할 경우 항생제를 투여하며, 크론병 및 궤양성 대장염의 증상이 급성으로 악화될 경우에는 스테로이드 약제를 투여하기도 한다. 그러나 이러한 약제에 대해 효과가 없는 환자가 20-40%에 달하며, 소아나 청소년 환자에게는 약물 사용이 제한적이고 약물에 대한 부작용과 지속적인 효능에 대해서는 의견이 분분한 실정이다.
- [8] 한편, 유산균의 항균 효과 및 체내 면역 조절 작용을 통한 염증성 질환 완화

효과가 확인되면서, 유산균을 이용한 대장염 예방 또는 증상을 개선하고자 하는 연구들이 수행되었다.

- [9] 특히 프로바이오틱스 유산균은 병원성 세균의 장내 부착을 방지하고, 젖산, 박테리옌과 같은 자체 항균 물질을 생산하여 병원성 세균의 침입을 막는다. 이러한 병원성 미생물에 의해 장내 불균형(dysbiosis)이 일어난 장내 균총을 조절하여 숙주의 특정 기관에 영향을 미칠 수 있으며, 장내 균총과 장 점막 간 상호작용에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 장 점막 부착능과 점액질 분비량, 뮤신(mucin)과 같은 방어물질의 생성 및 장 점막의 밀착 연결 보전(tight junction integrity)을 증가시켜 장 점막의 기능을 개선시킬 수 있다.
- [10] 프로바이오틱스 미생물의 잠재적 효과가 기대되지만, 아직까지 프로바이오틱스에 대한 작용 기작이 명확하지 않으며, 추가적인 연구 결과가 요구되고 있다. 특히, 염증성 장 질환과 같이 명확히 밝혀지지 않은 질환에 대해서는 다양한 원인들을 통합적으로 해결할 수 있는 조성물의 개발이 요구되고 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 향후 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도의 식품 및 의약품으로 응용이 가능한 프로바이오틱스 균주를 개발하고자 하였다. 그 결과, 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주의 항균 및 항염증 효과 등을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [13] 따라서, 본 발명의 목적은 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 장 질환의 치료방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주의 염증성 장 질환의 치료 용도를 제공하는 것이다.

[18]

과제 해결 수단

- [19] 본 발명자들은 향후 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도의 식품 및

의약품으로 응용이 가능한 프로바이오틱스 균주를 개발하고자 하였다. 그 결과, 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주의 항균 및 항염증 효과 등을 규명하였다.

- [20] 본 발명은 수탁번호 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [21] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [22]
- [23] 본 발명의 일 양태는 수탁번호 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주에 관한 것이다.
- [24] 상기 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주는 SEQ ID NO: 1의 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [25] 상기 SEQ ID NO: 1의 염기서열은 공시 균주인 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) NBRC 3425와 99%의 상동성을 가지고, 양 균주간 1%의 상이성이 인정되어 신규한 균주로 판명되었다.
- [26] 상기 수득된 신규한 균주를 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주로 명명하고, 2018년 10월 31일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 18735P를 부여받았다.
- [27] 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주는 분변 시료로부터 분리 및 동정하여 얻을 수 있으며, 상기 균주의 균체 성상은 다음과 같다:
- [28] [그람 양성 막대모양 간균의 형태로, 유백색의 콜로니를 형성하며, 카탈레이즈 음성이다. 통성 헤테로발효 균종이며, 혐기 조건하에서 D-아라비노오스, 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 덄시톨, 만니톨, 소르비톨, N-아세틸 글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 트레할로오스, 멜레지토오스, β -겐티오비오스, D-타가토오스, L-푸코오스 및 글루코네이트의 등의 탄소원을 에너지원으로 사용한다.]
- [29] 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주는 염증성 장 질환의 원인균에 대한 항균 활성을 가진다.
- [30] 본 명세서에서 "염증성 장 질환(inflammatory bowel disease; IBD)"은 위장관 내에 만성적인 염증을 유발하는 질환으로, 복통, 발열, 설사, 하혈 등의 증상을 수반하는 질환을 의미한다.
- [31] 상기 염증성 장 질환은 크론병(Crohn's disease, CD), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC) 및/또는 베체트장염(intestinal Behet's disease)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [32] 상기 염증성 장 질환의 원인균은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*), 헬리코박터

파이로리(*Helicobacter pylori*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 및/또는 에세케리아 콜라이(*Escherichia coli*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주는 살아 있는 프로바이오틱스로서 장내의 스트레스 환경에 내성을 가지고 있으며, 용혈 활성이 없고, 장내에서 식품의 단백질 성분에 의해 발생하는 유해 생체 아민을 생성하지 않는다. 또한, EFSA의 기준에 부합하는 항생제 감수성이 확인되어 안전성이 확보되었으며, 우수한 항염증 효과가 확인되었다.

[34]

[35] 본 발명의 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[36] 상기 조성물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주 및/또는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.

[37] 상기 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주는 SEQ ID NO: 2의 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[38] 상기 SEQ ID NO: 2의 염기서열은 공시 균주인 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) FC7과 99%의 상동성을 가지고, 양 균주 간 1%의 상이성이 인정되어 신규한 균주로 판명되었다.

[39] 상기 수득된 신규한 균주를 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주로 명명하고, 2018년 10월 31일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 18734P를 부여받았다.

[40] 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주는 분변 시료로부터 분리 및 동정하여 얻을 수 있으며, 상기 균주의 균체 성상은 다음과 같다:

[41] [그람 양성 막대모양 간균의 형태로, 유백색의 콜로니를 형성하며, 카탈레이즈 음성이다. 통성 헤테로발효 균종이며, 혐기 조건하에서 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 만니톨, 소르비톨, α -메틸-D-글루코사이드, N-아세틸 글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 말토오스, 락토오스, 사카로오스, 트레할로오스, 이눌린, 멜레지토오스, D-투라노오스, D-타가토오스, 글루코네이트 등의 탄소원을 에너지원으로 사용한다.]

[42] 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주는

- 염증성 장 질환의 원인균에 대한 항균 활성을 가진다.
- [43] 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주는 SEQ ID NO: 3의 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [44] 상기 SEQ ID NO: 3의 염기서열은 공시 균주인 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) NBRC 15893과 99%의 상동성을 가지고, 양 균주 간 1%의 상이성이 인정되어 신규한 균주로 판명되었다.
- [45] 상기 수득된 신규한 균주를 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주로 명명하고, 2018년 10월 31일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 18736P를 부여받았다.
- [46] 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주는 오징어 젓갈 시료로부터 분리 및 동정하여 얻을 수 있으며, 상기 균주의 균체 성상은 다음과 같다:
- [47] [그람 양성 막대모양 간균의 형태로, 유백색의 콜로니를 형성하며, 카탈레이즈 음성이다. 통성 헤테로발효 균종이며, 혐기 조건하에서 L-아라비노오스, 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, N-아세틸 글루코사민, 에스쿨린, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스, 펠리비오스, 사카로오스, 트레할로오스 및 글루코네이트의 등의 탄소원을 에너지원으로 사용한다.]
- [48] 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주는 염증성 장 질환의 원인균에 대한 항균 활성을 가진다.
- [49] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 살아 있는 프로바이오틱스로서 장내의 스트레스 환경에 내성을 가지고 있으며, 용혈 활성이 없고, 장내에서 식품의 단백질 성분에 의해 발생하는 유해 생체 아민을 생성하지 않는다. 또한, EFSA의 기준에 부합하는 항생제 감수성이 확인되어 안전성이 확보되었으며, 우수한 항염증 효과가 확인되었다.
- [50] 또한, 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 이를 혼합하여 복합 균주로 사용하였을 때, 과도한 염증반응을 효과적으로 억제시킬 뿐만 아니라, 장내 미생물 개선 효과가 우수함이 확인되었다.
- [51]
- [52] 본 발명의 또 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [53] 상기 조성물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411

균주 및/또는 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LD7601 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.

[54]

[55] 본 발명의 상기 각 조성물은 유효성분인 상기 균주, 이의 배양물, 상기 균주를 단리 및/또는 정제한 균체 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체의 추출물, 배양물 상층액, 이들의 농축액, 농축물, 건조물, 또한 필요에 따라서 희석액, 희석물 등이며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함할 수 있다.

[56] 상기 균주의 배양법, 추출법, 분리법, 농축법, 건조법, 희석법 등은 특별히 한정되지 않는다.

[57] 상기 균주를 배양하기 위한 배지로는 통상적으로 탈지유, 황이, 카제인 등의 우유 단백질, 당류, 효모 엑기스 등을 포함하고 있으며, 배양 방법으로는 일반적인 각종 호기적 또는 혐기적인 방법을 적당히 사용할 수 있다.

[58] 상기 균주를 배양한 후에는 필요에 따라서 배양물이나 그 상층액을 농축, 건조, 희석 등을 할 수도 있다.

[59] 또한, 원심분리법이나 막분리법을 사용하여 배양물의 상층액과 균체를 분리하여 균체를 농축한 상태로 회수할 수도 있다. 그리고 균체에 초음파 처리나 효소 처리 등을 행하여 균체 내의 성분을 추출하거나, 배양물이나 그 상층액, 균체나 그 추출물 등을 건조할 수도 있다. 이들은 본 발명의 상기 조성물의 유효 성분으로서 사용할 수 있다.

[60] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[61] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[62] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 활택제, 결합제,

계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 붕해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리에틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨카복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리딘, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을 희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.

- [63] 상기 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균되거나 또는 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [64] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [65] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 상기 유산균뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 상기 첨가성분은 예컨대 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상기 탄수화물로는 모노사카라이드(예를 들어, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예를 들어 말토스, 수크로스, 올리고당 등) 및 폴리사카라이드(예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [67] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 상기 균주 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액 또는 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [68] 본 발명의 식품 조성물은 식품, 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food

- additives) 등의 모든 천연소재의 가공 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [69] 예를 들면, 건강식품으로는 상기 유산균 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 요거트, 발효유, 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등 본 발명의 유산균을 첨가하여 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 유산균을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [70] 상기 균주 및 이를 포함하는 조성물의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.
- [71]
- [72] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 락토바실러스 랍노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 대상체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [73] 본 명세서에서 사용된 용어, "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적, 또는 예방적 유효량을 상기 대상 질환을 겪거나, 겪을 가능성이 있는 대상체(개체)에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [74] 상기 조성물의 "치료적 유효량"은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다.
- [75] 또한, 본 명세서에서 사용된 용어, "대상체(개체)"는 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 및 붉은털 원숭이 등을 포함하는 포유류이다. 가장 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [76]
- [77] 본 발명의 상기 염증성 장 질환의 예방, 또는 치료방법은, 본 발명의 일 양태인 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [78]

발명의 효과

[79] 본 발명은 신규한 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주(수탁번호 KCTC 18735P) 및 이를 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주는 프로바이오틱스로서 장내 스트레스 환경에 대한 내성을 보유하고 있으며, 항균 및 항염증 활성을 가지는 것을 실험적으로 확인하였는바, 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[80]

도면의 간단한 설명

[81] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 점막 장벽 기능 보호 효과를 확인한 결과이다.

[82] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 과도한 염증반응 억제 효과를 확인하기 위하여 병변(장 길이 및 비장 무게)을 확인한 결과이다.

[83] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 과도한 염증반응 억제 효과를 확인하기 위하여 염증 지표로 제시되고 있는 단백질 발현을 확인한 결과이다.

[84] 도 4a 내지 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 과도한 염증반응 억제 효과를 확인하기 위하여 염증성 사이토카인 유전자 발현을 확인한 결과이다. (4a: IFN- γ , 4b: IL-1 β , 및 4c: IL-6)

[85] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 장내 유해 효소 활성을 확인한 결과이다.

[86] 도 6a 내지 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 알파 다양성(Alpha-diversity)을 통해 장내 미생물 변화를 확인한 결과이다. (6a: Observed, 6b: Chaol, 6c: Shannon, 및 6d: InvSimpson)

[87] 도 7a 및 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 베타 다양성(Beta-diversity)을 통해 장내 미생물 변화를 확인한 결과이다.

[88] 도 8a 및 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 분류학적 분류(Taxonomic classification)를 통해 장내 미생물 변화를 확인한 결과이다.

[89] 도 9a 내지 9e는 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 디퍼렌셜 어빈던스(Differential abundance)를 통해 장내 미생물 변화를 확인한 결과이다. (9a: LR vs PC, 9b: LPA vs PC, 9c: LS vs PC, 9d: MIX vs PC, 및 9e: LGG vs PC)

[90] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 유산균의 장내 미생물 개선 효과를 확인하기 위하여 단쇄지방산(butyrate) 농도를 확인한 결과이다.

[91]

발명의 실시를 위한 형태

- [92] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [93]
- [94] **실시예 1: 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511의 분리 및 동정**
- [95] **1-1. *L. rhamnosus* LDTM7511의 동정**
- [96] 염증성 장 질환의 예방 또는 치료 용도로 활용 가능한 미생물을 분리하기 위하여, 영유아의 분변에서 시료를 채취하여 0.85%(w/v) NaCl 용액에 현탁하고 십진희석 후 0.2% 소듐 아자이드(sodium azide)를 첨가한 MRS(de Man Rogosa, and Sharpe, BD difco, USA) 고체 배지에 도말하였다. 도말 된 균주를 37°C에서 48시간 동안 5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂의 대기 조성으로 혐기 배양한 다음 순수 분리하였다. 최종 분리된 균주는 16S rRNA gene 영역을 증폭하여 염기서열을 분석하여 동정하였다.
- [97]
- [98] **1-2. *L. rhamnosus* LDTM7511의 당 대사 특성 확인**
- [99] 상기 실시예 1-1에서 분리된 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주에 대하여 API CHL50 키트(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 당 대사 특성을 확인하였다.
- [100] 하기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주는 D-아라비노오스, 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 덱시톨, 만니톨, 소르비톨, N-아세틸 글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 트레할로오스, 멜레지토오스, β-젠티오비오스, D-타가토오스, L-푸코오스 및 글루코네이트의 당을 이용하는 것을 알 수 있었다.

[101] [표1]

기질	반응	기질	반응
Blank	-	에스쿨린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리트ρί톨	-	셀로비오스	+
D-아라비노오스	+	말토오스	-
L-아라비노오스	-	락토오스	-
리보오스	w	멜리비오스	-
D-자일로스	-	사카로오스	-
L-자일로스	-	트레할로오스	+
안도니톨	-	이눌린	-
β -메틸-자일로사이드	-	멜레지토오스	+
갈락토오스	+	D-라피노오스	-
D-글루코오스	+	아미돈	-
D-프럭토오스	+	글리코젠	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르비오스	-	β -젠티오비오스	+
람노오스	-	D-투라노오스	-
덜시톨	+	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	+
만니톨	+	D-푸코오스	-
소르비톨	+	L-푸코오스	+
α -메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α -메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸 글루코사민	+	글루코네이트	w
아미그달린	+	2-케토-글루코네이트	-

알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-
-----	---	-------------	---

[102] **1-3. *L. rhamnosus* LDTM7511의 효소 활성 확인**

[103] 상기 실시예 1-1에서 분리된 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주에 대하여 API ZYM 키트(BioMerieux)를 이용하여 효소 활성을 확인하였다.

[104] 보다 구체적으로, 37°C에서 18시간 동안 배양한 균주를 원심분리(15,000rpm, 8min, 4°C)하여 균체를 회수하고 1XPBS로 2회 세척한 뒤, 0.85% NaCl 용액을 이용하여 흡광도(600nm) 약 1.0으로 희석하였다. API ZYM 스트립 각 큐플에 균액을 점종한 후, 37°C에서 호기 배양하였다. 4시간 뒤 각 큐플에 ZYM A, B 시약을 차례대로 한 방울씩 떨어뜨리고, 5분 후에 나타나는 색의 강도에 따라 0~5로 점수를 기록하였으며, 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[105]

[106] [표2]

기질	반응	기질	반응
Blank	0	나프톨-AS-BI-포스포하이드롤 레이스	1
알칼리포스파타제	1	α -갈락토시다아제	0
에스테레이스 (C4)	2	β -갈락토시다아제	5
에스테레이스 리파아제 (C8)	0	β -글루쿠로니다아제	0
류신 아릴아미다제	5	α -글루코시다아제	0
발린 아릴아미다제	5	β -글루코시다아제	2
크리스틴 아릴아미다제	0	N-아세틸- β -글루코사미니다아제	0
트립신	0	α -만노시다아제	0
α -키모트립신	0	α -푸코시다아제	1
산성포스파타아제	2		

[107]

[108] **실시예 2: 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411의 분리 및 동정**

[109] **2-1. *L. paracasei* LDTM7411의 동정**

[110] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 미생물을 분리하고, 최종 분리된 균주는 16S rRNA gene 영역을 증폭하여 염기서열을 분석하여 동정하였다.

[111]

[112] **2-2. *L. paracasei* LDTM7411의 당 대사 특성 확인**

- [113] 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 당 대사 특성을 확인하였다.
- [114] 하기 표 3에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주는 D 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 만니톨, 소르비톨, α -메틸-D-글루코사이드, N-아세틸 글루코사민, 아미그달린, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 말토오스, 락토오스, 사카로오스, 트레할로오스, 이눌린, 멜레지토오스, D-투라노오스, D-타가토오스 및 글루코네이트의 당을 이용하는 것을 알 수 있었다.
- [115]

[116] [표3]

기질	반응	기질	반응
Blank	-	에스쿨린	+
글리세롤	-	살리신	+
에리트ρί톨	-	셀로비오스	-
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	-	락토오스	+
리보오스	+	멜리비오스	-
D-자일로스	-	사카로오스	+
L-자일로스	-	트레할로오스	+
안도니톨	-	이눌린	+
β -메틸-자일로사이드	-	멜레지토오스	+
갈락토오스	+	D-라피노오스	-
D-글루코오스	+	아미돈	-
D-프럭토오스	+	글리코젠	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르비오스	-	β -젠티오비오스	-
람노오스	-	D-투라노오스	+
덜시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	+
만니톨	+	D-푸코오스	-
소르비톨	+	L-푸코오스	-
α -메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α -메틸-D-글루코사이드	w	L-아라비톨	-
N-아세틸 글루코사민	+	글루코네이트	w
아미그달린	w	2-케토-글루코네이트	-

알부틴	+	5-케토-글루코네이트	-
-----	---	-------------	---

[117]

[118] **2-3. *L. paracasei* LDTM7411의 효소 활성 확인**

[119] 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 효소 활성을 확인하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[120]

[121] [표4]

기질	반응	기질	반응
Blank	0	나프톨-AS-BI-포스포하이드롤 레이스	1
알칼리포스파타제	1	α -갈락토시다아제	0
에스테레이스 (C4)	1	β -갈락토시다아제	1
에스테레이스 리파아제 (C8)	0	β -글루쿠로니다아제	0
류신 아릴아미다제	5	α -글루코시다아제	3
발린 아릴아미다제	4	β -글루코시다아제	0
크리스틴 아릴아미다제	1	N-아세틸- β -글루코사미니다아제	0
트립신	0	α -만노시다아제	0
α -키모트립신	0	α -푸코시다아제	0
산성포스파타아제	1		

[122]

[123] **실시예 3: 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601의 분리 및 동정**[124] **3-1. *L. sakei* LDTM7601의 동정**

[125] 영유아의 분변 대신 한국 전통시장에서 구입한 오징어 젓갈에서 시료를 채취한 것을 제외하고, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 미생물을 분리하고, 최종 분리된 균주는 16S rRNA gene 영역을 증폭하여 염기서열을 분석하여 동정하였다.

[126]

[127] **3-2. *L. sakei* LDTM7601의 당 대사 특성 확인**

[128] 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 당 대사 특성을 확인하였다.

[129] 하기 표 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 L-아라비노오스, 리보오스, 갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, N-아세틸 글루코사민, 에스쿨린, 셀로비오스, 말토오스, 락토오스,

멜리비오스, 사카로오스, 트레할로오스 및 글루코네이트의 당을 이용하는 것을 알 수 있었다.

[130]

[131] [표5]

기질	반응	기질	반응
Blank	-	에스쿨린	+
글리세롤	-	살리신	-
에리트ρί톨	-	셀로비오스	w
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	w
리보오스	+	멜리비오스	+
D-자일로스	-	사카로오스	+
L-자일로스	-	트레할로오스	+
안도니톨	-	이눌린	-
β -메틸-자일로사이드	-	멜레지토오스	-
갈락토오스	+	D-라피노오스	-
D-글루코오스	+	아미돈	-
D-프럭토오스	+	글리코젠	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	β -겐티오비오스	-
람노오스	-	D-투라노오스	-
덜시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	-	D-푸코오스	-
소르비톨	-	L-푸코오스	-
α -메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α -메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸 글루코사민	+	글루코네이트	w
아미그달린	-	2-케토-글루코네이트	-

알부틴	-	5-케토-글루코네이트	-
-----	---	-------------	---

[132]

[133] **3-3. *L. sakei* LDTM7601의 효소 활성 확인**

[134] 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 효소 활성을 확인하였으며, 그 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[135]

[136] [표6]

기질	반응	기질	반응
Blank	0	나프톨-AS-BI-포스포하이드롤 레이스	2
알칼리포스파타제	0	α -갈락토시다아제	1
에스테레이스 (C4)	0	β -갈락토시다아제	0
에스테레이스 리파아제 (C8)	0	β -글루쿠로니다아제	0
류신 아릴아미다제	5	α -글루코시다아제	0
발린 아릴아미다제	4	β -글루코시다아제	0
크리스틴 아릴아미다제	0	N-아세틸- β -글루코사미니다아제	0
트립신	0	α -만노시다아제	0
α -키모트립신	0	α -푸코시다아제	0
산성포스파타아제	2		

[137]

[138] **실시예 4: 유산균의 안전성 평가**[139] **4-1. 용혈 활성 여부 확인**[140] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 안전성을 평가하기 위하여, 용혈 활성(γ -hemolysis) 여부를 확인하였다. 이때, 양성 대조군으로는 β -hemolysis 활성을 갖는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923(American Type Culture Collection, USA)을 사용하였다.

[141] 보다 구체적으로, 5%(v/v)의 양 탈섬유소 혈액(Defibrinated Sheep Blood)이 첨가된 혈액 고체 배지(MB-B1005-P50, (주)기산바이오)를 사용하였고, 각 균을 도말하여 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양 후 클리어 존(clear zone)의 생성 유무를 확인하였다. 결과는 하기 표 7에 나타내었다.

[142]

[143] [표7]

균주	γ -hemolysis (+; 양성, -; 음성)
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	-
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	-
<i>L. sakei</i> LDTM7601	-

[144]

[145] 표 7에서 확인할 수 있듯이, 양성 대조균인 스탕필로코커스 아우레우스 ATCC25923 균주는 클리어 존을 생성하였으나, 본 발명의 유산균인 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 모두 클리어 존을 생성하지 않았다.

[146] 따라서, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 용혈 활성이 없음을 알 수 있었다.

[147]

[148] 4-2. 생체 아민 생성 여부 확인

[149] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 안전성을 평가하기 위하여, 생체 아민 생성 여부를 확인하였다. 이때, 양성 대조균으로는 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*) ATCC29212(American Type Culture Collection)를 사용하였다.

[150] 보다 구체적으로, 브로모크레졸 퍼플(bromocresol purple)을 포함하는 탈탄산효소 배지(pH 5.3)(Sigma-aldrich, USA)에 생체 아민의 전구체인 히스티딘 모노하이드로클로라이드(histidine monohydrochloride), 티로신 유리 염기(tyrosine free base), 오르니틴 모노하이드로클로라이드(ornithine monohydrochloride) 및 라이신 모노하이드로클로라이드(lysine monohydrochloride)(각, Sigma-aldrich, USA)를 첨가하여 고체 배지를 제조하고, 상기 선별 균주들을 각각 도말하여 37°C에서 4일 동안 혐기 배양 후 배지가 알칼리 성분에 의해 보라색으로 변색되는지 확인하였다. 결과는 하기 표 8에 나타내었다.

[151]

[152] [표8]

균주	decarboxylase (+; 양성, -; 음성)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	+
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	-
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	-
<i>L. sakei</i> LDTM7601	-

[153]

[154] 표 8에서 확인할 수 있듯이, 양성 대조균인 엔테로코커스 페칼리스 ATCC29212 균주는 알칼리 성분에 의해 보라색으로 변색되었으나, 본 발명의 유산균인 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 모두 변색되지 않았다.

[155] 따라서, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 생체 아민을 생성하지 않음을 알 수 있었다.

[156]

[157] 4-3. 항생제 내성 여부 확인

[158] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 안전성을 평가하기 위하여, 항생제 내성 여부를 확인하였다. 항생제 내성 실험은 특정 항생제의 농도가 1/2씩 희석된 15개의 농도로 구성된 M.I.C. Evaluator Strips(Oxoid, Cambridge, UK)을 사용하여 확인하였으며, 유럽 식품안전청(European Food Safety Authority; EFSA, 2012), 동물 영양학 과학 위원회(Scientific Committee on Animal Nutrition; SCAN, 2002), 임상 검사 표준을 위한 국가 위원회(National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2010) 및 microbiological breakpoints(mg/l)(Danielsen and Wind, 2003) 기준을 함께 적용하여 평가하였다.

[159]

[160] [표9]

항생제	농도 $\mu\text{g/ml}$	항생제 분류
Penicillin (PEN)	32 - 0.002	Penicillin
Ampicillin (AMP)	256 - 0.015	Penicillin
Gentamicin (GEN)	256 - 0.015	Aminoglycoside
Tetracycline (TET)	256 - 0.015	Tetracycline
Erythromycin (ERY)	256 - 0.015	Macrolides
Clindamycin (CLI)	256 - 0.015	Lincosamides
Vancomycin (VAN)	256 - 0.015	Glycopeptides

[161]

[162] 총 7종의 항생제를 상기 표 9와 같은 농도로 사용하였고, 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노시스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 최소 저해 농도(Minimum inhibitory concentrations, MICs) 확인을 위한 배지로 LAB susceptibility medium(LSM, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol.71(12). pp. 8982-8986)을 사용하였다. 항생제 내성 유무는 LSM 배지에 각 유산균을 도말한 후 항생제 스트립(Strip)을 올려 37°C 호기 조건에서 24시간 동안 배양하여 확인하였다. 결과는 하기 표 10에 나타내었다.

[163]

[164] [표 10]

		AM P	VA N	GE N	ERY	CLI	TET	PEN
Lactobacillus spp. breakpoints (mg/l)								
EFSA (2012)	obligate homofermentative	1	2	16	1	1	4	
	obligate heterofermentative	2	n.r.	16	1	1	8	
	facultative heterofermentative	4	n.r.	16	1	1	8	
	<i>L. rhamnosus</i>	4	n.r.	16	1	1	8	
	<i>L. casei /paracasei</i>	4	n.r.	32	1	1	4	
Bifidobacterium spp. breakpoints (mg/l)								
EFSA (2012)		2	2	64	1	1	8	
French breakpoints (2005)			> 16				> 8	> 16
EUCAST (2017)		> 8	> 2	-	IE	> 4		
Strain		AM P	VA N	GE N	ERY	CLI	TET	PEN
<i>L. paracasei</i> LDTM7411		1	> 256	8	0.06	0.06	1	0.5
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511		4	> 256	8	2	1	4	0.5
<i>L. sakei</i> LDTM7601		2	32	8	0.03 5	0.01	4	1
n.r.: not required								

[165]

[166] 표 10에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 유산균인 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 7종의 항생제에 대해 EFSA, EUCAST, French breakpoints의 항생제 내성 기준 이하의 내성을 나타내었다.

[167]

[168] 따라서, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스

파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 항생제 내성에 대한 우려가 없는 안전한 균주임을 알 수 있었다.

[169]

[170] 실시예 5: 장내 적합성 평가

[171] 5-1. 소화액 내성 여부 확인

[172] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 장내 적합성을 평가하기 위하여, 사람의 장내 환경을 구현한 인공 소화액에 대한 내성 여부를 확인하였다. 이때, 대조군으로는 대장 질환에 효과적인 상업용 균주로 알려진 락토바실러스 람노서스 GG(*L. rhamnosus* GG, LGG)(American Type Culture Collection)를 사용하였으며, 하기 표 11에 나타낸 바와 같이, 인공 소화액 물질과 소화 효소를 포함한 4가지 합성액(synthetic juice)을 이용하였다(Appl. Microbiol Biotechnol, 2016, Vol. 100(23), pp. 10043-10054).

[173]

[174] [표 11]

	Inorganic solution	Organic solution	Digestive constituents	Incubation factors
saliva juice(Mouth)	KCl 89.6 g l ⁻¹ NaCl 175.3 g l ⁻¹ KSCN 20 g l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 88.8 g l ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 57 g l ⁻¹ NaOH 40 g l ⁻¹	urea 25 g l ⁻¹	α -amylase Uric acid Mucin	Initial pH: 6.5±0.2 Incubation 5 min
gastric juice(Stomach)	KCl 89.6 g l ⁻¹ NaCl 175.3 g l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 88.8 g l ⁻¹ NH ₄ Cl 30.6 g l ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2 g l ⁻¹ HCl 37% g g ⁻¹	urea 25 g l ⁻¹ glucose 65 g l ⁻¹ glucuronic acid 2 g l ⁻¹ glucoseamine-hydrochloride 33 g l ⁻¹	Bovine serum albumin Pepsin Mucin	Total pH: 3.5±0.2 Incubation 1.5 h
duodenal&bile juice(Intestine)	KCl 89.6 g l ⁻¹ NaCl 175.3 g l ⁻¹ NaHCO ₃ 84.7 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 8 g l ⁻¹ MgCl ₂ 5 g l ⁻¹ HCl 37% g g ⁻¹ KCl 89.6 g l ⁻¹ NaCl 175.3 g l ⁻¹ NaHCO ₃ 84.7 g l ⁻¹ HCl 37% g g ⁻¹ CaCl ₂ ·2H ₂ O 44.4 g l ⁻¹	urea 50 g l ⁻¹	Bovine serum albumin Pancreatin Lipase Bile bovine	Total pH: 6.9±0.2 Incubation 2 h

[175]

[176]

보다 구체적으로, MRS 액체배지에 밤새도록 배양한 각각의 유산균주 배양물 7ml(약 5.0X10⁸ CFU/ml)를 원심분리(4,000rpm, 10 min, 4°C)하여 균체를 회수하고 1XPBS로 세척하였다. 균체를 3ml의 saliva juice로 현탁한 후 5분 동안 상온에서 배양하고, 6ml의 gastric juice를 첨가하여 37°C에서 혐기 배양하였다. 90분 후 6ml의 duodenal&bile juice, 3ml의 bile juice 및 1ml의 NaHCO₃를 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 혐기 배양하였다. 각 0, 1.5, 3.5시간에 샘플을 100μl씩 회수하여 10배 단계 희석한 후 MRS 또는 0.05% L-cysteine hydrochloride MRS 고체 배지에서 생균수를 측정하고, 0시간 대비 3.5시간의 균수 생존율을

산출하였다. 결과는 하기 표 12에 나타내었다.

[177] 소화액 내성(생존율, %)=

[178]

$$[\log(\text{CFU/ml}_{3.5\text{h}})/\log(\text{CFU/ml}_{0\text{h}})] \times 100$$

[179]

[180] [표12]

균주	소화액 내성(3.5시간 생존율, %)
<i>L. rhamnosus</i> GG	50
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	52.9
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	68
<i>L. sakei</i> LDTM7601	53.0

[181]

[182] 표 12에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 상업용 균주인 LGG(55.9%) 보다 약 3~18% 이상 우수한 소화액 내성을 보임을 알 수 있다.

[183]

[184] 5-2. 장 부착능

[185] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 장내 적합성을 평가하기 위하여, 코카시안 성인 대장에서 분리한 대장 선암종-유래 HT-29 세포주(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Korea)에서 장 부착능을 측정하였다. 이때, 대조군으로는 락토바실러스 람노서스 GG(LGG)를 사용하였다.

[186] 보다 구체적으로, HT-29 세포를 12-웰 플레이트에 접종(seeding)하여 단층(monolayer)이 될 때까지 약 4-7일 동안 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. HT-29 세포는 Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI 1640) 배지(Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 기본으로 하고, 10% 열 비활성화(heat-inactivated) FBS와 페니실린, 스트렙토마이신, Fungizone®(암포테리신 B, amphotericin B)를 첨가하여 사용하였다.

[187] 각각의 유산균주 배양액은 원심분리(15,000rpm, 10min, 4°C) 후 균체를 회수하여 1XPBS로 세척하고, 항생제가 첨가되지 않은 세포 배지에 흡광도(600nm)가 1.0이 되도록 희석하였다. 각 세포가 융합성(confluent)하게 자란 각 웰에 상기 유산균 시료를 1ml씩 접종하고, 90분 동안 37°C, 5% CO₂

조건으로 배양하였다. 각 웰은 1XPBS로 2회 세척하고 1ml의 0.005% Trypsin-EDTA(Gibco, USA)를 처리하여 세포를 떼어내었다. 십진 희석 후 drop plate(DP) 법으로 MRS 고체 배지(BD difco)에서 생균수를 계수하였다. 결과는 하기 표 13에 나타내었다.

[188] 장 부착능(%)=

[189]

$$[(\text{CFU/ml}_{90\text{min}})/(\text{CFU/ml}_{0\text{min}})] \times 100$$

[190]

[191] [표13]

균주	장 부착능(%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	3.82±0.13
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	3.88± 0.07
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	3.90± 0.26
<i>L. sakei</i> LDTM7601	4.68± 1.65

[192]

[193] 표 13에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 및 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주는 상업용 균주인 LGG(93.82±0.13%)와 비교하여 유사하거나 우수한 장 부착능을 보임을 알 수 있었다. 특히, 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 가장 우수한 장 부착능을 나타내었다.

[194]

[195] 실시예 6: 유산균 기능성 평가-1

[196] 6-1. 병원성균 억제능(정성적)

[197] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 병원성균 억제능을 정성적으로 평가하기 위하여, Agar-well diffusion assay(Int. J. Infect. Dis., 2004, Vol.(8), pp.39-45)를 수행하였다. 이때, 병원성균은 일반 식중독균인 *E. coli* K88(*E. c*), *S. aureus* ATCC 25923(*S. a*), *P. aeruginosa* PAO1(*P. a*), *E. faecalis* ATCC 29212(*E. f*), *L. innocua* ATCC 33090T(*L. i*)를 사용하였다.

[198] 보다 구체적으로, 각각 중탕한 TSA 또는 LB soft agar(bacto agar 0.8%)에 흡광도(600nm) 0.2로 희석한 병원성균을 접종하여 미리 제조해놓은 TSA(Tryptic Soy Agar, BD difco, USA) 또는 LB agar(Luria-Bertani agar, BD difco, USA)에 부어 건조하였다. 건조된 고체 배지에 일정한 위치에 구멍을 뚫어 각 유산균의 배양액을 100μl 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하고(overnight), 클리어 존(clear zone)의 크기를 ImageJ software(NIH, USA)를 사용하여 측정하였다.

결과는 하기 표 14에 나타내었다.

[199]

[200] [표14]

균주	Diameter of the zone of inhibition ^a				
	E. c	E. f	L. i	S. a	P. a
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	++	+++	+++	++	+
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	+	++	++	+	+
<i>L. sakei</i> LDTM7601	+	++	+++	+	+
^a +++ , > 1.8 cm; ++ , > 1.5~1.7 cm; + , < 1.5 cm; - , no clear zone					

[201]

[202] 표 14에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주 모두 병원성 균주 5종에 대하여 항균활성 양성반응을 나타내었다.

[203]

[204] **6-2. 병원성균 억제능(정량적)**

[205] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 병원성균 억제능을 정량적으로 평가하기 위하여, 염증성 대장염 유발 원인균으로 알려진 4종의 병원성균(하기 표 15 참조)을 지시균으로 하여 항균력을 확인하였다.

[206]

[207] [표15]

지시균	질병명
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 ^T (H. p)	크론병, 궤양성 대장염, 부정성 대장염
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559 ^T (C. c)	크론병, 궤양성 대장염, 부정성 대장염
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ATCC 19698 (MAP)	크론병, 궤양성 대장염
<i>Escherichia coli</i> K88 (E. c)	크론병, 궤양성 대장염

[208]

[209] <6-2-1. 지시균의 배양>

[210] 먼저, *M. paratuberculosis* ATCC 19698의 경우 배양배지는 Middlebrook 7H9 Broth Base(Sigma-Aldrich)를 정량 녹인 후 글리세롤(Glycerol)을 첨가하고, 121°C에서 10분 동안 멸균한 후 약 45°C로 배지를 식힌 후 Middlebrook ADC

growth supplement를 첨가하고 샘플 튜브(sample tube)에 분주하여 암 조건에서 2시간 동안 균현 후 사용하였다. 배지에 지시균을 도말하고 37°C에서 호기 조건으로 약 4-6주 동안 배양하였다.

- [211] 다음으로, *H. pylori* ATCC 43504T의 경우 배양배지는 하기 표 16의 조성으로 제조하여 사용하였다. 배지에 지시균을 도말하여 혐기성균 배양조(anaerobic jar)에 넣은 후 BD GasPak™ EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System을 이용하여 미호기성 대기 조성을 만들어 37°C, 72시간 동안 배양하였다.

[212]

[213] [표16]

Components	Concentrations (per 1 litre)
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g
Meat Peptic Digest	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Heart Pancreatic Digest	3.0 g
Corn Starch	1.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	13.5 g
Sheep blood	70 ml

[214]

- [215] 다음으로, *C. coli* ATCC 33559T의 경우 배양배지는 상기 표 16의 조성으로 제조하여 사용하였다. 배지에 지시균을 도말하여 혐기성균 배양조(anaerobic jar)에 넣은 후 BD GasPak™ EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System을 이용하여 미호기성 대기 조성을 만들어 37°C, 72시간 동안 배양하였다.마지막으로, *E. coli* K88의 경우 일반적인 LB 배지에 접종하고 37°C에서 밤새도록 배양하여 사용하였다.

- [216] 상기 모든 지시균은 실험을 위하여 최소 2회 계대배양 후 사용하였다.

[217]

[218] <6-2-2. 항균력 확인>

- [219] 각 유산균의 상등액을 채취하여 여과한 후 상기 지시균 희석액에 1:1의 비율로 섞은 후, BacTiter-Glo assay kit(Promega, Madison, WI)내의 ATP 시약을 첨가하여 5분간 배양 후 발광측정기(Luminometer)를 이용하여 발광도(Luminescence, RLU)를 측정하였다.

- [220] 한편, MAP는 두꺼운 세포벽으로 인해 용해 작업을 추가로 적용하였다(Complex Detection Methods. Iwa Publishing, London, UK, 2009, J. Environ. Sci. Health B, 2012 Vol.(47):736-741). 또한, MAP의 배가 시간(doubling

time)이 일반적으로 약 1시간인 것을 고려하여 6시간 동안 유산균주의 상등액과 공동 배양(co-culture) 하였다.

[221] 블랭크(blank) 물질로 PBS를 사용하였고, MRS 배지를 첨가한 그룹들을 음성 대조군(NC)으로 설정하였다. ATP 활성 감소의 기준은 음성 대조군으로 멸균된 MRS 배지만을 처리한 그룹보다 낮은 ATP를 보이는지 여부를 확인하여 판별하였다. 항균 활성은 하기 수식으로 계산하여 확인하였다. 결과는 하기 표 17에 나타내었다.

[222] 항균 활성(감소율, %)= $[1-(RLU_{\text{sample}}/RLU_{\text{NC}})] \times 100$

[223]

[224] [표17]

균주	항균력 (%)			
	H. p	C. c	MAP	E. c
<i>L. rhamnosus</i> GG	41.1	67.5	21.5	63.9
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	42.6	74.9	32.3	73.3
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	47.0	76.4	43.1	64.5
<i>L. sakei</i> LDTM7601	-	-	-	-

[225]

[226] 표 17에서 확인할 수 있듯이, 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주 및 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주의 MAP균에 대한 항균활성이 양성대조군인 LGG보다 약 11~22% 높은 억제능(감소율)을 보이는 것을 알 수 있었다.

[227]

[228] 6-3. 항염증 효과(NO 생성량 억제)

[229] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 항염증 효과를 평가하기 위하여, NO 생성 정량 분석(Nitric oxide production quantitative assay)을 수행하였다. 이때, 대조군으로는 락토바실러스 람노서스 GG(LGG)를 사용하였다.

[230] 한편, NO 정량은 그리스 반응(Griess reaction) 시약(Promega, USA)을 이용하여 NO²의 양을 총 3회 반복하여 측정하였고, 각 유산균은 희석하여 열처리한 후 매 실험 당일 제조하여 사용하였으며, RAW264.7 세포(한국생명공학연구원 생물자원센터)에 처리하기까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

[231] RAW264.7 세포에 염증 유도인자로 잘 알려진 LPS(Lipopolysaccharides from *E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich)가 첨가된 세포 배지를 넣고, 미리 준비한 열처리 유산균을 접종하였다. 양성 대조군에는 유산균 대신 1X PBS를 접종하고, 음성 대조군에는 LPS를 처리하지 않은 배지를 넣어주었다. 37°C, 5% CO₂ 조건으로

48시간 동안 배양한 후, 상등액을 채취하여 설명서에 따라 그리스 시약을 사용하여 NO 생성량을 측정하였다. 이때, NO 생성량은 아질산염(Nitrite) 표준 곡선을 이용하여 정량하였으며, 최종 결과 값은 양성 대조군 대비 NO의 생성 억제 정도의 차이를 배수변화도(Fold change)로 나타내었다. 결과는 하기 표 18에 나타내었다.

[232]

[233] [표18]

균주	Fold change	
	1차 실험	2차 실험
양성 대조군	1.00	1.00
음성 대조군	0.00	0.00
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.84	0.73
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	0.46	0.53
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	0.40	0.50
<i>L. sakei</i> LDTM7601	0.74	0.54
*Values were analyzed by one-way ANOVA (P<0.05)		

[234]

[235] 표 18에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주 모두 상업용 균주인 락토바실러스 람노서스 GG(LGG) 대비 높은 NO 생성 억제능을 보이는 것을 알 수 있었다.

[236]

[237] 6-4. 항염증 효과(염증성 사이토카인 생성량 억제)

[238] 본 발명의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 염증성 사이토카인 생성량을 측정하였다. 이때, 대조군으로는 락토바실러스 람노서스 GG(LGG)를 사용하였다.

[239] HT-29 세포주(KCTC)에 재조합 인간 TNF- α (PeproTech, USA)를 처리하고, 세포배양 배지에 현탁된 유산균을 접종하였다. 시료 내 IL-8의 양은 Human IL-8 ELISA MAXTM Deluxe kit(Biolegend, San Diego, USA)를 사용하여 측정하였다. 인간 IL-8 표준 용액의 측정값으로 도출한 표준 농도 곡선에 흡광도를 대입하여 IL-8의 농도(pg/ml)를 산출하였다. 결과는 하기 표 19에 나타내었다.

[240]

[241] [표19]

균주	IL-8 생성량 (pg/ml)	
	1차 실험	2차 실험
양성 대조균	748.1	1018.4
<i>L. rhamnosus</i> GG	425.5	357.8
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	384.2	336.9
<i>L. paracasei</i> LDTM7411	346.8	316.1
<i>L. sakei</i> LDTM7601	558.1	666.8
*Values were analyzed by one-way ANOVA (P<0.05)		

[242]

[243] 표 19에서 확인할 수 있듯이, 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주 및 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주가 상업용 균주인 락토바실러스 람노서스 GG(LGG) 대비 낮은 IL-8 생성능(IL-8의 분비 억제능)을 보이는 것을 알 수 있었다.

[244]

[245] 실시예 7: 유산균 기능성 평가-2(추가 실험 그룹의 확립)

[246] 상기 실시예 결과들에 따르면, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 모두 안전성이 우수(용혈 활성/생체 아민 생성/항생제 내성 여부 확인)함을 확인하였다.

[247] 또한, 특히 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 및 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 균주는 항균력(병원성균 억제능)이 매우 우수하였으며, 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주는 항균력이 높진 않았으나, 장 부착능이 우수한 균주임을 확인하였다.

[248] 이에, 다양한 프로바이오틱스의 기능성을 포함하도록 하기 위하여, 상기 3종의 유산균(락토바실러스 람노서스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)을 조합한 복합 균주 조성물을 추가로 확립하고, 각 유산균에 대한 후속 평가를 진행하였다.

[249]

[250] 후속 평가의 실험 그룹은 다음과 같다:

[251] 유산균의 투여 기간은 총 4주로, 염증 유도 물질로 사용되는 DSS(Dextran sulfate sodium) 처리 전 2주(유산균 정착기간), DSS 처리 1주(염증유도기간) 및 회복기간(Recovery period) 1주로 진행하였다(하기 표 20 참조). 이때, 대조군으로는 락토바실러스 람노서스 GG(LGG) 및 복합유산균 제품인 VSL#3를 사용하였다.

[252]

[253] [표20]

균주(표기)	경구 투여(10^9 cfu)	식수(ad libitum)		
		유산균 정착기간(약 14일)	염증유도기간(약 6일)	회복기간(약 6일)
음성 대조군(NC)	PBS+부형제	DW	DW	DW
DSS 대조군(PC)	PBS+부형제	DW	DSS 1.5%	DW
<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511 (LR)	<i>L. rhamnosus</i> LDTM7511	DW	DSS 1.5%	DW
<i>L. paracasei</i> LDTM7411 (LPA)	<i>L. paracasei</i> LDTM7411	DW	DSS 1.5%	DW
<i>L. sakei</i> LDTM7601 (LS)	<i>L. sakei</i> LDTM7601	DW	DSS 1.5%	DW
LR+LPA+LS (MIX)	LR+LPA+LS	DW	DSS 1.5%	DW
VSL#3 (VSL)	VSL#3	DW	DSS 1.5%	DW
<i>L. rhamnosus</i> GG (LGG)	<i>L. rhamnosus</i> GG	DW	DSS 1.5%	DW

[254]

[255] 실시예 8: 유산균 기능성 평가-2(점막 장벽 기능 보호 효과: 조직학적 손상 정도 평가)

[256] 회복기간 이후 마우스 장기를 적출하고, H&E 염색기법을 이용하여 마우스 대장의 조직학적 형태를 관찰하였다.

[257] 도 1에서 확인할 수 있듯이, DDS 대조군(PC)에서는 배상세포가 내장 쪽으로 드러나면서 음성 대조군(NC)에서 관찰되는 장 음와(crypt) 및 융모(villus)의 뚜렷한 경계가 사라지는 것을 확인하였다. 반면, 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX)은 이러한 형태의 구분이 좀 더 확실하였고, 장 상피세포 형태의 일부 손상이 보였으나 많은 배상세포가 관찰되었을 뿐 아니라, 염증 세포의 침윤이나 상피세포의 붕괴는 적게 관찰되었다.

[258] 이러한 결과는, 상기 3종의 유산균(락토바실러스 람노시스 LDTM7511, 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601)을 조합한 복합 균주 조성물의 투여가 DSS를 통해 유도된 장 점막의 손상과 손상된 상피세포의 회복 및 염증 완화를 유도할 수 있음을 시사한다.

[259]

[260] 실시예 9: 유산균 혼합액 기능성 평가-2(과도한 염증반응 억제 효과)

[261] 9-1. 병변 확인

[262] 먼저, 마우스의 체중 변화는 초기대비 약 5% 이내로 측정되었고(하기 표 21 참조), 이는 DSS 1.5% 농도로 8일 동안 투여 시 유의적인 체중 변화를 일으키지 않는다는 것을 의미한다.

[263]

[264] [표21]

	체중 변화(평균±평균의 표준오차)		
	Day 0	Day 6	Day 12
NC	19.91±0.28	20.13±0.26	19.18±0.21
PC	19.44±0.24	19.42±0.26	18.55±0.27
LR	19.84±0.27	19.89±0.24	19.21±0.26
LPA	19.44±0.32	19.37±0.35	19.21±0.51
LS	19.56±0.11	19.43±0.17	19.38±0.22
MIX	20.05±0.28	19.83±0.32	19.94±0.29
VSL	19.88±0.33	19.79±0.29	19.87±0.31
LGG	19.28±0.27	19.25±0.28	19.08±0.28

[265]

[266] 회복기간 이후 마우스 장기를 적출하여, DSS에 의한 대표적인 병변으로 알려진 장 길이(맹장부터 대장까지) 및 비장의 무게를 측정하였다.

[267] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 유산균(특히, LR 및 MIX)은 음성 대조군(NC)의 장 길이와 유의적으로 차이가 나타나지 않았다(도 2a). 비장의 무게 또한 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX) 모두 음성 대조군과 유의적으로 차이가 나타나지 않았다(도 2b).

[268] 이러한 결과로부터, 본 발명의 유산균이 DSS로 유도되는 장 염증의 증상을 완화시킴으로써, DSS 유도 장 염증의 대표적 증상인 짧은 장 길이의 회복을 유도하고 염증으로 인해 비대해진 비장의 크기를 감소시킴을 확인하였다.

[269]

[270] 9-2. 단백질 발현

[271] 염증유도기간 및 회복기간 후 각각 분변 샘플에서 DSS 마우스 대장염의

대표적인 염증 지표로 제시되고 있는 리포칼린-2(Lipocalin-2; Lcn-2)의 활성을 ELISA 기법으로 정량하였다.

- [272] 도 3에서 확인할 수 있듯이, Lcn-2의 경우 염증유도기간 후 본 발명의 유산균(특히, LR 및 MIX)은 비교적 낮은 수치의 경향성을 보였고(도 3a), 회복기간 후에도 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)는 유의적으로 낮은 수치를 유지하는 것을 알 수 있었다(도 3b).
- [273] 또한, 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 LDTM7411 및 락토바실러스 사케이 LDTM7601 균주(LPA 및 LS)의 경우도 염증유도기간 후에는 다소 높은 수치를 보였지만, 회복기간 후에는 30-50% 낮아진 수치를 나타냄을 알 수 있었다.
- [274] 이러한 결과는, 본 발명의 유산균이 DSS 마우스 염증 모델에서 예방뿐만 아니라 치료 단계에서도 효능이 있을 것을 시사한다.

[275]

[276] 9-3. 염증성 사이토카인 유전자 발현

- [277] 마우스 결장(colon) 조직으로부터 RNA를 추출하고 역전사하여 cDNA를 합성한 뒤, 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction)을 활용하여 결장 조직의 염증성 사이토카인 mRNA 발현량을 측정하였다.
- [278] 도 4a 내지 4c에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)는 모든 염증성 사이토카인의 발현을 가장 많이 하향 조절(down-regulation)시키는 것을 알 수 있었다.
- [279] 이러한 결과로부터, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)가 장 염증으로 인해 대장 조직 내에서 발현되는 염증성 사이토카인을 감소시킴을 확인하였다.

[280]

[281] 실시예 10: 유산균 혼합액 기능성 평가-2(장내 미생물 개선 효과)

[282] 10-1. 장내 유해 효소 활성

- [283] 마우스 맹장(cecum)에서 대장암 발생 가능성과 연관성이 있는 것으로 보고된 β -글루쿠로니다아제(β -glucuronidase) 및 트립토판아제(Tryptophanase)의 활성을 측정하였다. 마우스의 맹장 조직은 차가운 생리식염수에 넣어 파쇄한 뒤, 원심분리하여 상층액만 걸러 준비하였다.

- [284] β -글루쿠로니다아제 측정 방법은 아래와 같다:

p-니트로페닐- β -D-글루쿠로나이드(p-nitrophenyl- β -D-glucuronide), 인산화 완충용액(phosphate buffer), 맹장 상층액으로 구성된 반응 용액을 30분 간 37°C에서 인큐베이션한 후, 수산화나트륨을 넣어 반응을 종결한 뒤 원심분리를 통해 상층액만을 수집하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

- [285] 트립토판아제 측정 방법은 아래와 같다: 파이로인산염(pyrophosphate), 디소듐이디티에이수화물(disodium EDTA dehydrate), 소혈청알부민(bovine serum albumin), 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer) 등이 함유된 완충용액과 트립토판(tryptophan), 맹장 상층액을 포함한 반응 용액을 1시간 동안 37°C에서

인큐베이션하였다. 1시간 후, 발색시약을 첨가하여 반응을 종결한 뒤 원심분리를 통해 상층액만을 수집하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[286] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 음성 대조군(NC)과 DDS 대조군(PC) 간의 유의적인 활성 차이가 관찰되면서, 동시에 본 발명의 유산균(특히, MIX)에서 두 효소의 활성이 유의적으로 감소된 것을 알 수 있었다.

[287] 이러한 결과는, 본 발명의 유산균이 장내 유해 효소의 활성을 감소시켜, DSS를 통해 유도된 장 염증 증상 및 이로 인한 대장암 발병의 위험을 낮출 수 있음을 시사한다.

[288]

[289] 10-2. 장내 미생물 변화

[290] DSS 처리에 의한 장내 미생물 군집 불균형과 이에 대한 유산균주의 영향을 확인하기 위하여, 마우스 맹장에서 DNA를 추출하고, 16s V3-V4 부위(region)를 PCR로 증폭 후 인덱스 라이브러리(index library)를 구축하였고, Illumina Miseq platform으로 시퀀싱하였다. 그 다음, QIIME2를 이용하여 시퀀스를 역다중화(demultiplexing), 품질 관리(quality control; DADA2), 분류학상 배치(taxonomy assignment)하였고, 생성된 데이터는 R에서 Phyloseq, DESeq2, ggplot2 등의 패키지로 분석하였다. 시각화(visualization)는 R과 GraphPad를 이용하였고, 유의성 검정은 GraphPad의 ANOVA로 산출하였다.

[291]

[292] ① Alpha-diversity

[293] 도 6a 및 6b에서 확인할 수 있듯이, 종 풍부도(Richness)를 나타내는 지표인 Observed(도 6a) 및 Chaol(도 6b)은 동일한 경향성을 나타냈는데, 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX) 모두 전체적으로 종의 풍부도가 증가하는 경향성을 나타냈다. 특히, 본 발명의 복합 균주(MIX)의 경우 종의 풍부도가 가장 많이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[294] 또한, 도 6c 및 6d에서 확인할 수 있듯이, 종 다양성(Diversity)을 나타내는 지표인 Shannon(도 6c)은 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX) 모두 유의적으로 종의 다양성이 증가하는 경향성을 나타냈다. InvSimpson(도 6d) 또한 경향성이 Shannon과 유사하였고, 특히 본 발명의 락토바실러스 람노시스 LDTM7511 균주(LR) 및 복합 균주(MIX)가 가장 높은 종 다양성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[295]

[296] ② Beta-diversity

[297] 그룹 간 distance# Generalized UniFrac으로 서로 다른 그룹 간의 유사도(여사인된 미생물 군집 및 계통발생 기반)를 측정하였다. ordination은 NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)로 제시하였다.

[298] 도 7a에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 유산균(특히, LR 및 MIX)은 DSS 대조군(PC)과 겹치지 않는 뚜렷한 클러스터를 형성하는 것을 확인하였다.

- [299] 또한, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR) 내 샘플들(1~8번) 간의 유사도(계통수 기반)를 세부 분석하였다.
- [300] 도 7b에서 확인할 수 있듯이, 전체적으로 DSS 대조군(PC)과 계통적 유사성이 구분되어 있음을 알 수 있었다. 단일 균주의 형태로 투여하였음에도 PC와 구분되는 군집 다양성을 나타낸 것은 주목할 만한 점이라 할 수 있다.
- [301]
- [302] ③ Taxonomic classification
- [303] 각 그룹의 분류학적 분류(taxonomy classification)를 상대 존재비(relative abundance)로 환산하여 문(Phylum) 및 과(Family) 수준에서 나타내었다.
- [304] 도 8a 및 8b에서 확인할 수 있듯이, 각 그룹의 미생물 군집은 서로 다른 분포로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [305]
- [306] ④ Differential abundance
- [307] DESeq2 툴을 이용하여 실험 그룹 간 통계적으로 유의적 차이가 나는 미생물 군집을 선별하고 이를 분석하였다. 유산균 각각이 특이적으로 조절(modulation)하는 군집을 탐색하기 위해 DSS 대조군(PC)과 각각의 유산균을 1:1 비교하였으며, DESeq2에서 산출된 값들 중 Base Mean이 1.0 이상이면서 P-value 0.001 이하인 OTU에 대한 Log2 Fold 값을 분류하여 분석하였다.
- [308] 도 9a 내지 9d에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX) 모두 *Bifidobacterium* 속(genus)의 분포가 확인되었으며, 그 중 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)는 유의적으로 *Allobaculum* 속을 증가시킴을 알 수 있었다. 특히, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)와 LGG는 같은 *L. rhamnosus* 종임에도 불구하고, *Allobaculum* 및 *Bifidobacterium* 군집의 변화에 대한 서로 다른 영향을 나타내었다(도 9e).
- [309]
- [310] 이러한 결과로부터, 본 발명의 락토바실러스 람노서스 LDTM7511 균주(LR)가 DSS 대조군(PC)으로 변화된 장내 미생물 군집, 특히, *Allobaculum*과 *Bifidobacterium* 속을 명확하게 조절하는 것을 확인하였으며, 동일한 *L. rhamnosus* 임에도 불구하고 LGG와는 다른 양상으로 이를 조절함도 확인하였다.
- [311]
- [312] **10-3. 단쇄지방산**
- [313] 마우스 안락사 직전에 수거한 분변에서 가스크로마토그래피/질량분석기(gas chromatography/mass spectrometer)를 활용하여 단쇄지방산(butyrate)의 농도를 측정하였다.
- [314] 분석방법은 다음과 같다: 분변 시료를 파쇄하여 준비하고 유도체화 후 가스크로마토그래피/질량분석기 장비를 통해 분변 중 단쇄지방산의 농도를 정량하였다. 한편, 단쇄지방산의 고농도 상태는 대사 조절 장애(metabolic dysregulation)의 지표로써, 특히 장 투과성 및 장내 균총 불균형(dysbiosis)과

연관성이 있는 것으로 알려져 있다.

[315] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 유산균(LR, LPA, LS 및 MIX) 모두 DSS 대조군(PC) 대비 단쇄지방산 농도가 감소하는 경향성을 보였고, 특히 본 발명의 락토바실러스 람노시스 LDTM7511 균주(LR)에서 단쇄지방산 농도가 가장 낮은 농도로 측정되었다.

[316] DSS로 인해 유발된 장 염증 및 장 점막 손상이 장 투과성을 높이게 되는데, 이러한 결과는, 본 발명의 락토바실러스 람노시스 LDTM7511 균주가 이로 인한 단쇄지방산의 고농도 상태를 개선 및 회복시킬 수 있음을 시사한다.

[317]

[318] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[319] 수탁번호 : KCTC18735P

[320] 수탁일자 : 20181031

[321]

[322] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[323] 수탁번호 : KCTC18734P

[324] 수탁일자 : 20181031

[325]

[326] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[327] 수탁번호 : KCTC18736P

[328] 수탁일자 : 20181031

[329]

[330]

특허미생물 기탁증

2018 년 11 월 5 일

서울대학교 그린바이오과학기술연구원 허철성귀하

강원도 평창군 평창대로 1447

2018 년 10 월 31 일 제 6432호 귀하가 보관 기탁 신청

한 특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물 기탁번호 : KCTC18735P

2. 미생물의 명칭 : *Lactobacillus rhamnosus* LDTM7511

한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)

[331]

[332]

특허미생물 기탁증

2018 년 11 월 5 일

서울대학교 그린바이오과학기술연구원 허철성귀하

강원도 평창군 평창대로 1447

2018 년 10 월 31 일 제 6431호 귀하가 보관 기탁 신청

한 특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물 기탁번호 : KCTC18734P

2. 미생물의 명칭 : *Lactobacillus paracasei* LDTM7411

한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)



[333]

[334]

특허미생물 기탁증

2018 년 11 월 5 일

서울대학교 그린바이오과학기술연구원 허철성귀하

강원도 원주시 원창대로 1447

2018 년 10 월 31 일 제 6433호 귀하가 본관 기탁 신청

한 특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물 기탁번호 : KCTC18736P
2. 미생물의 명칭 : *Lactobacillus sakei*/LDTM7601

한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)

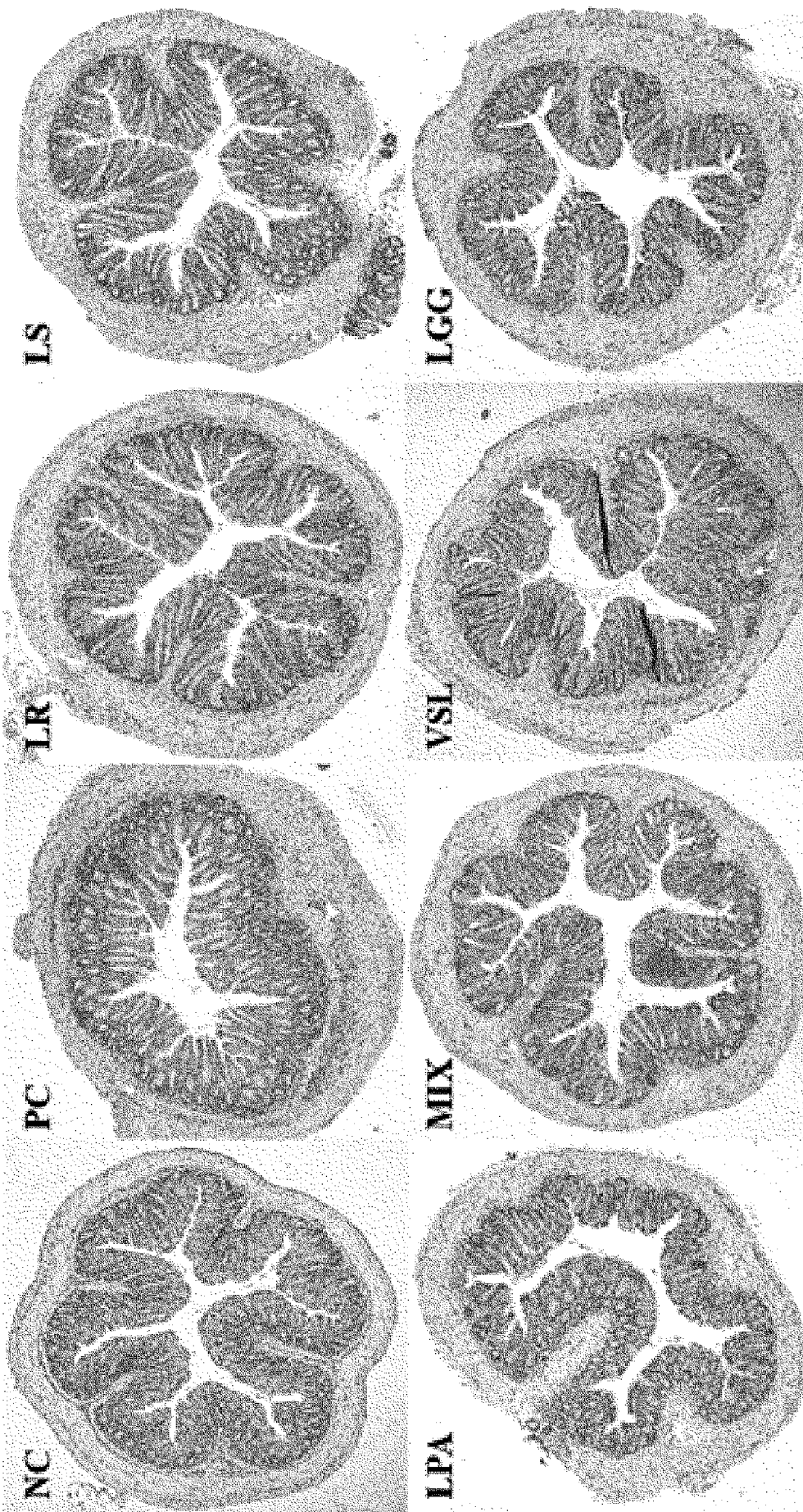


청구범위

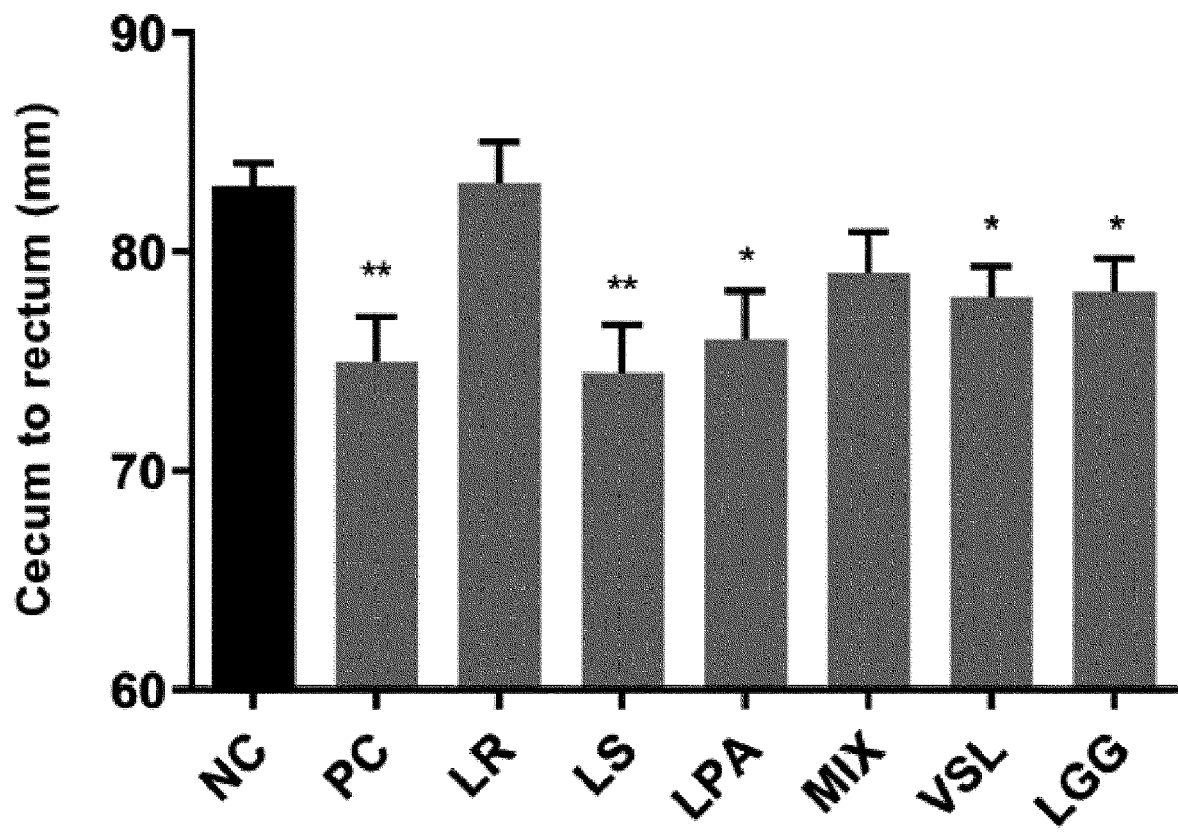
- [청구항 1] 수탁번호 KCTC 18735P의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 균주는 SEQ ID NO: 1의 16S rRNA 염기서열을 포함하는 것인, 균주.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 균주는 염증성 장 질환의 원인균에 대한 항균 활성을 갖는 것인, 균주.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 염증성 장 질환의 원인균은 마이코박테리움 파라투버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 및 에세케리아 콜라이(*Escherichia coli*)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 균주.
- [청구항 5] 제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병(Crohn's disease, CD), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC) 및 베체트장염(intestinal Behet's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 균주.
- [청구항 6] 제 1 항의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병(Crohn's disease, CD), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC) 및 베체트장염(intestinal Behet's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) LDTM7411 균주 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) LDTM7601 균주로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는

- 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제 9 항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병(Crohn's disease, CD), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC) 및 베체트장염(intestinal Behet's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 조성물.
- [청구항 12] 제 1 항의 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) LDTM7511 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료방법.

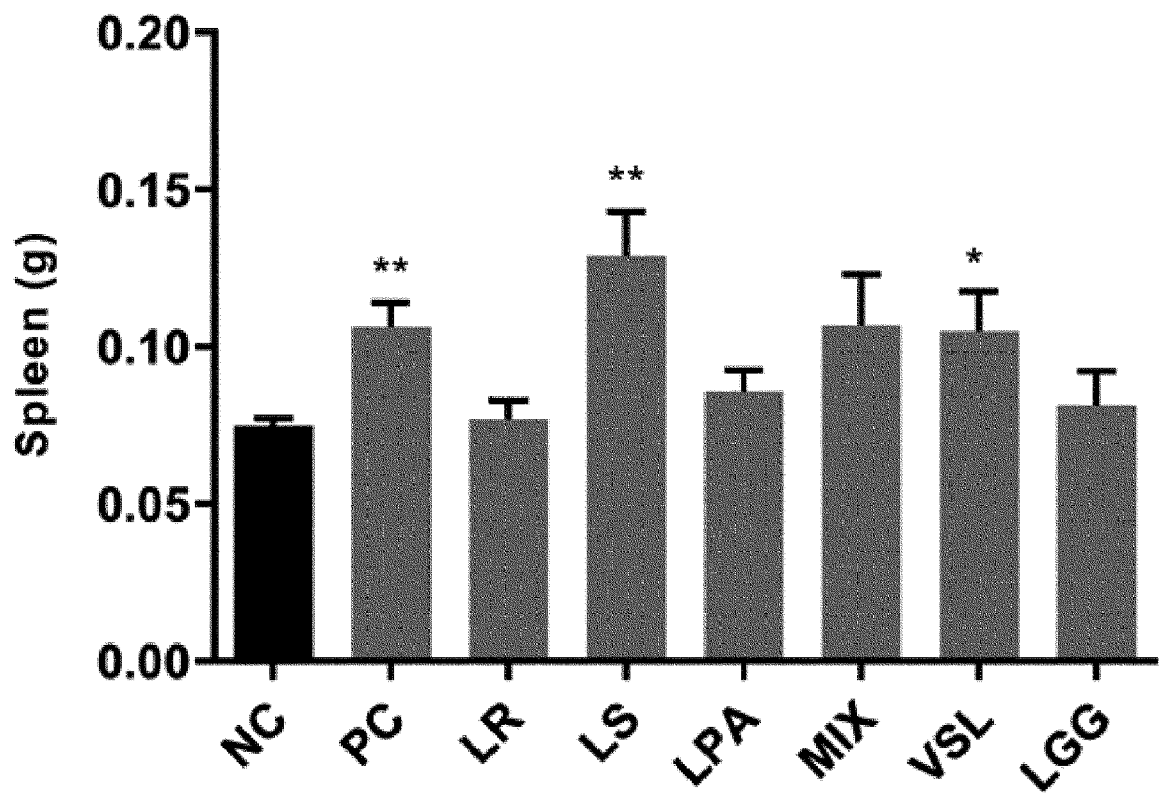
[도1]



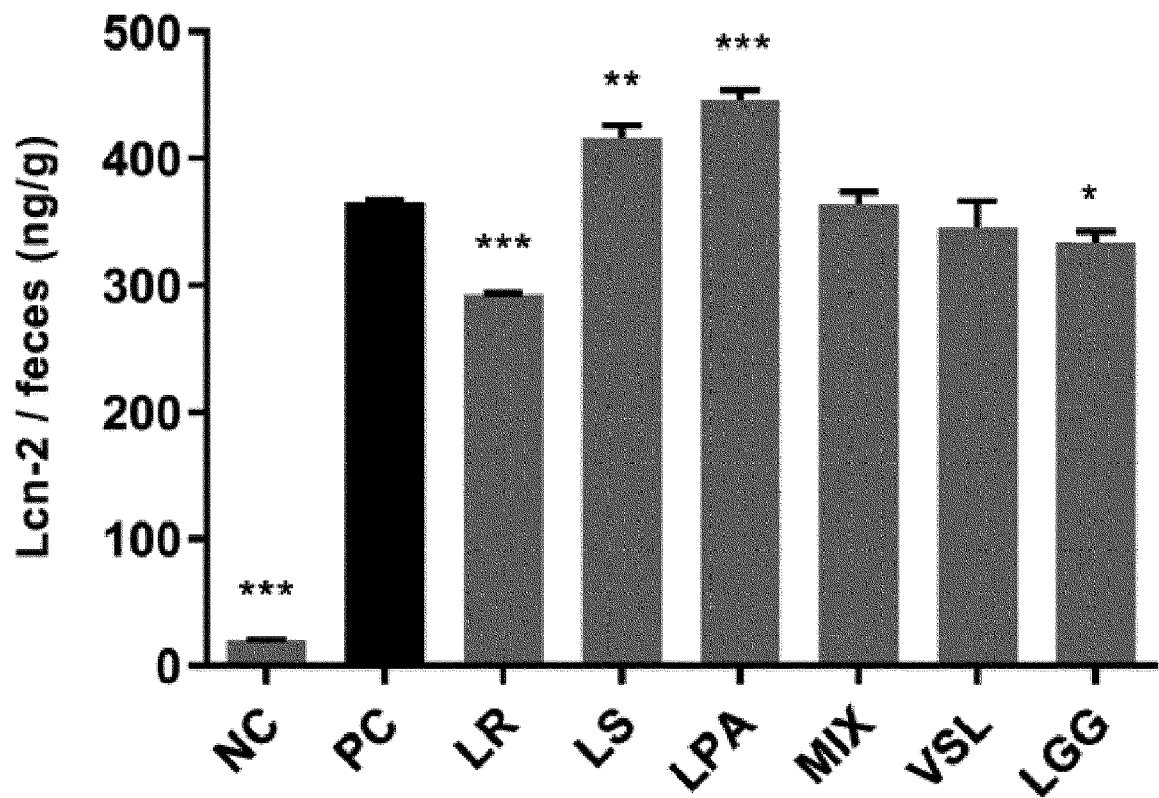
[도2a]



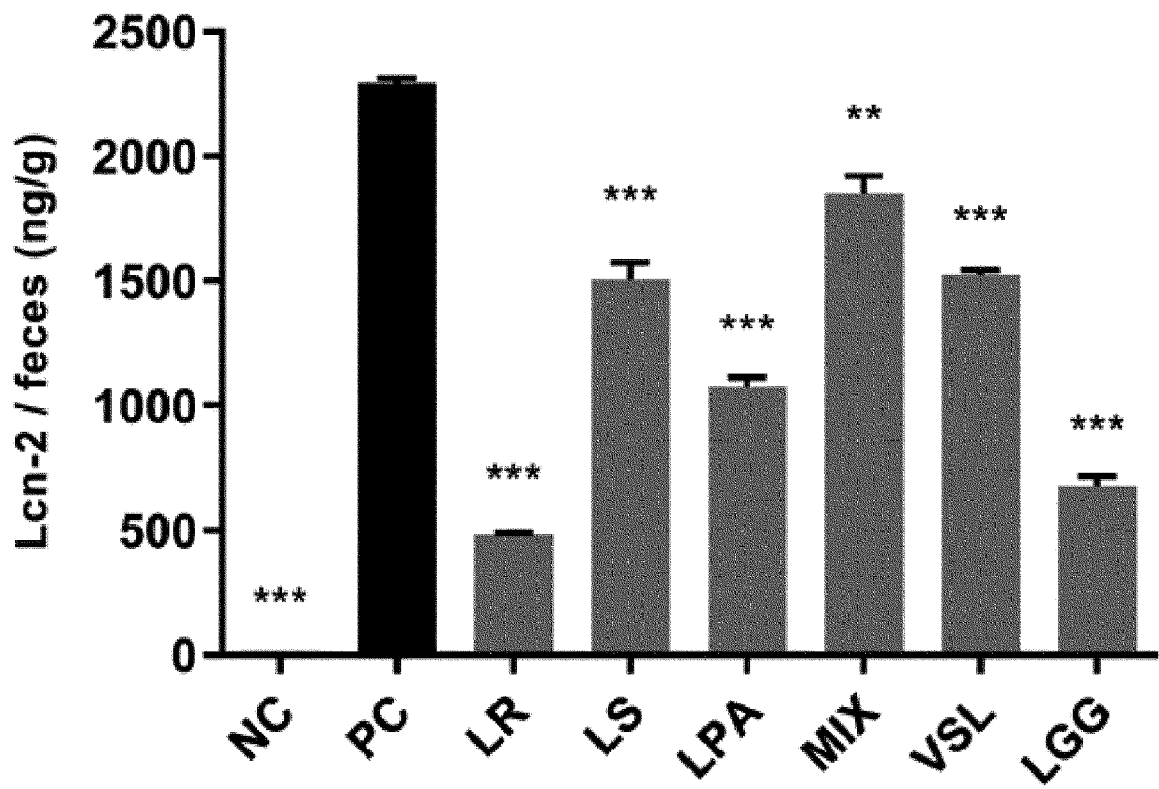
[도2b]



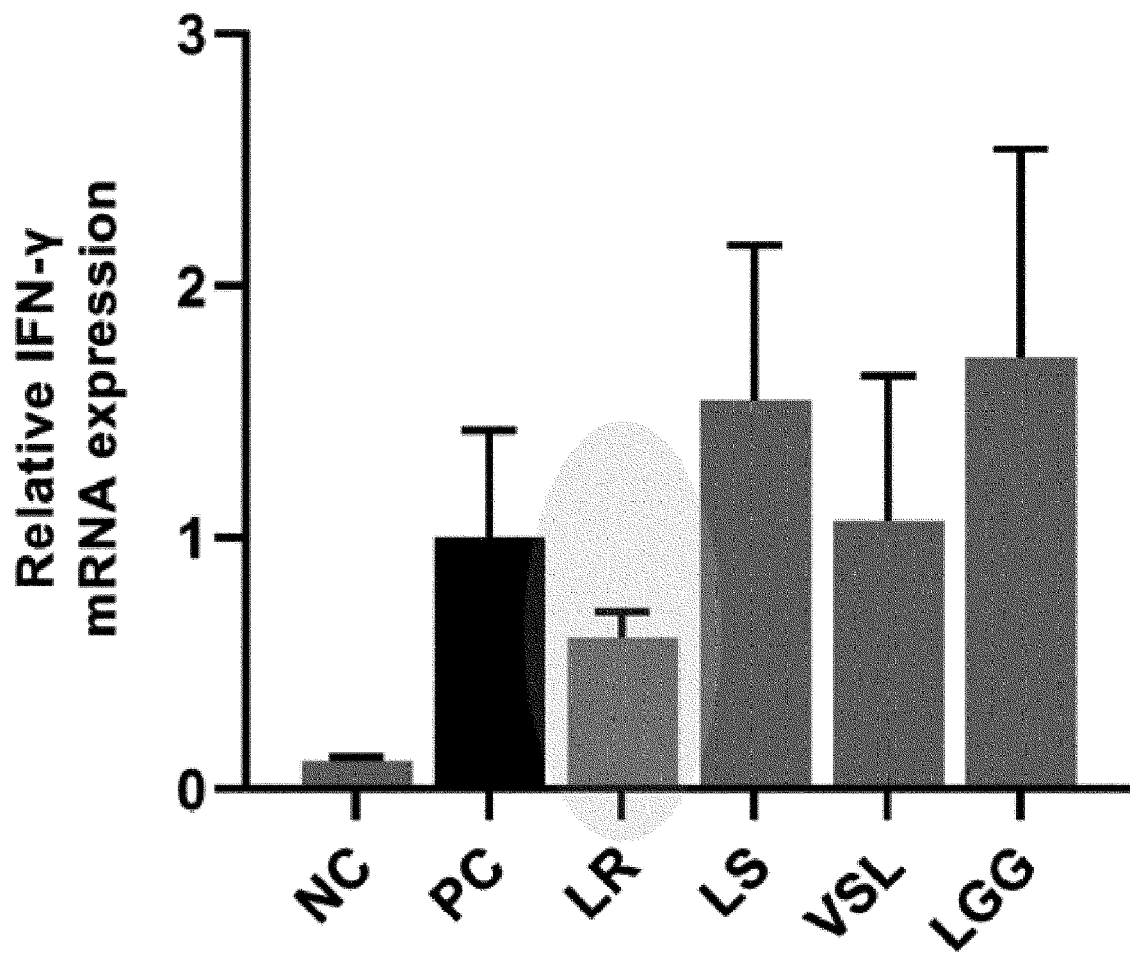
[도3a]



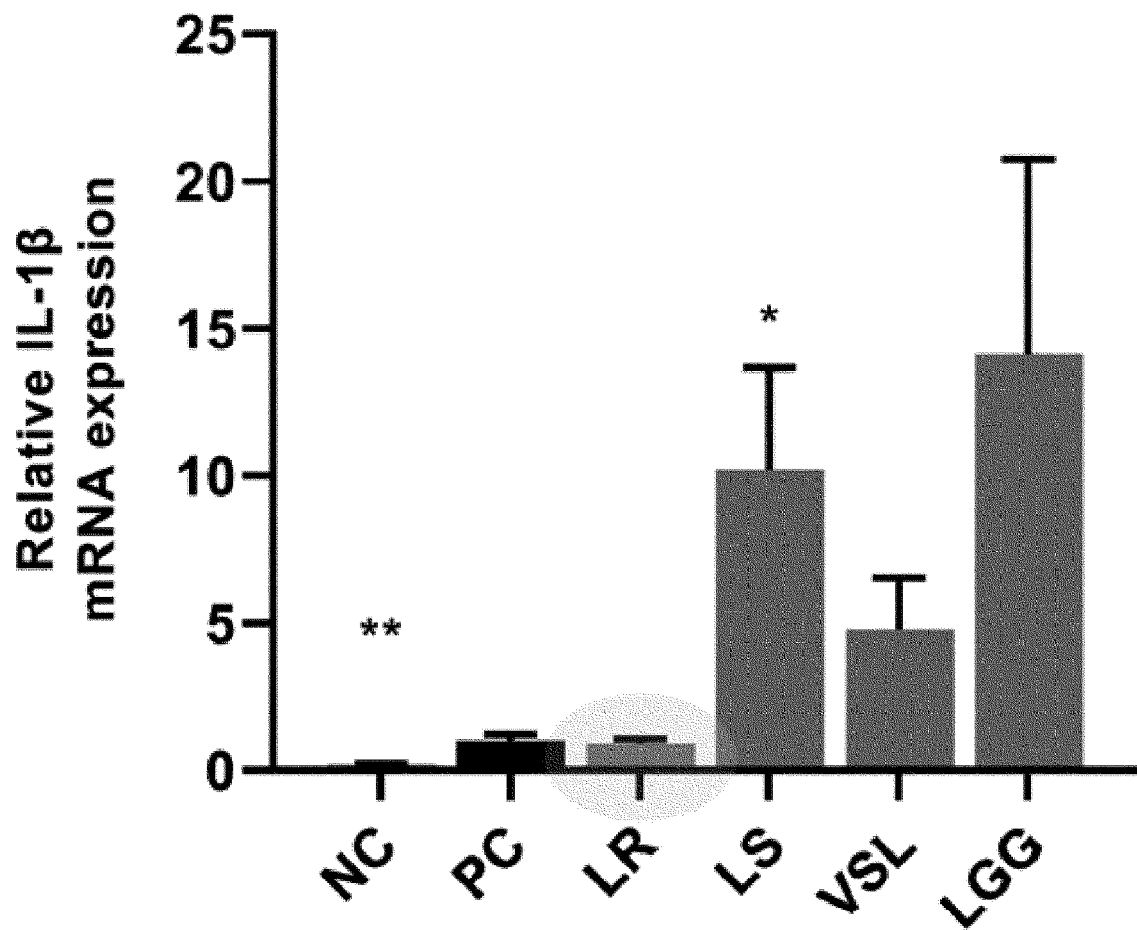
[도3b]



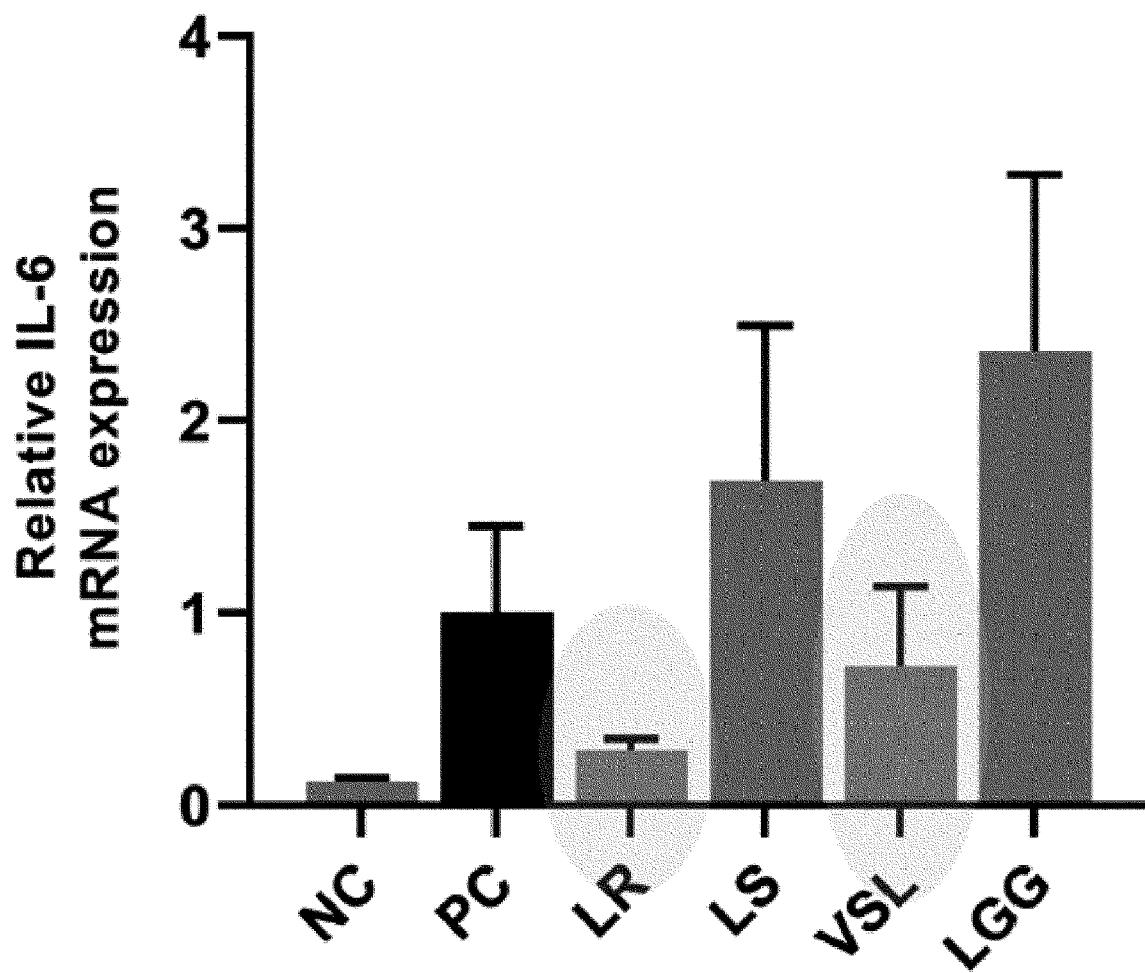
[도4a]



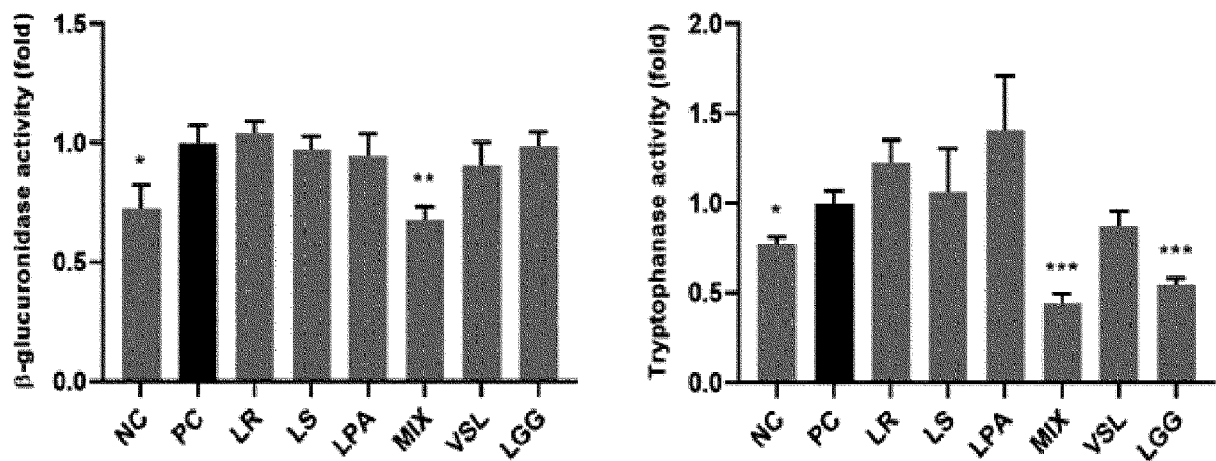
[도4b]



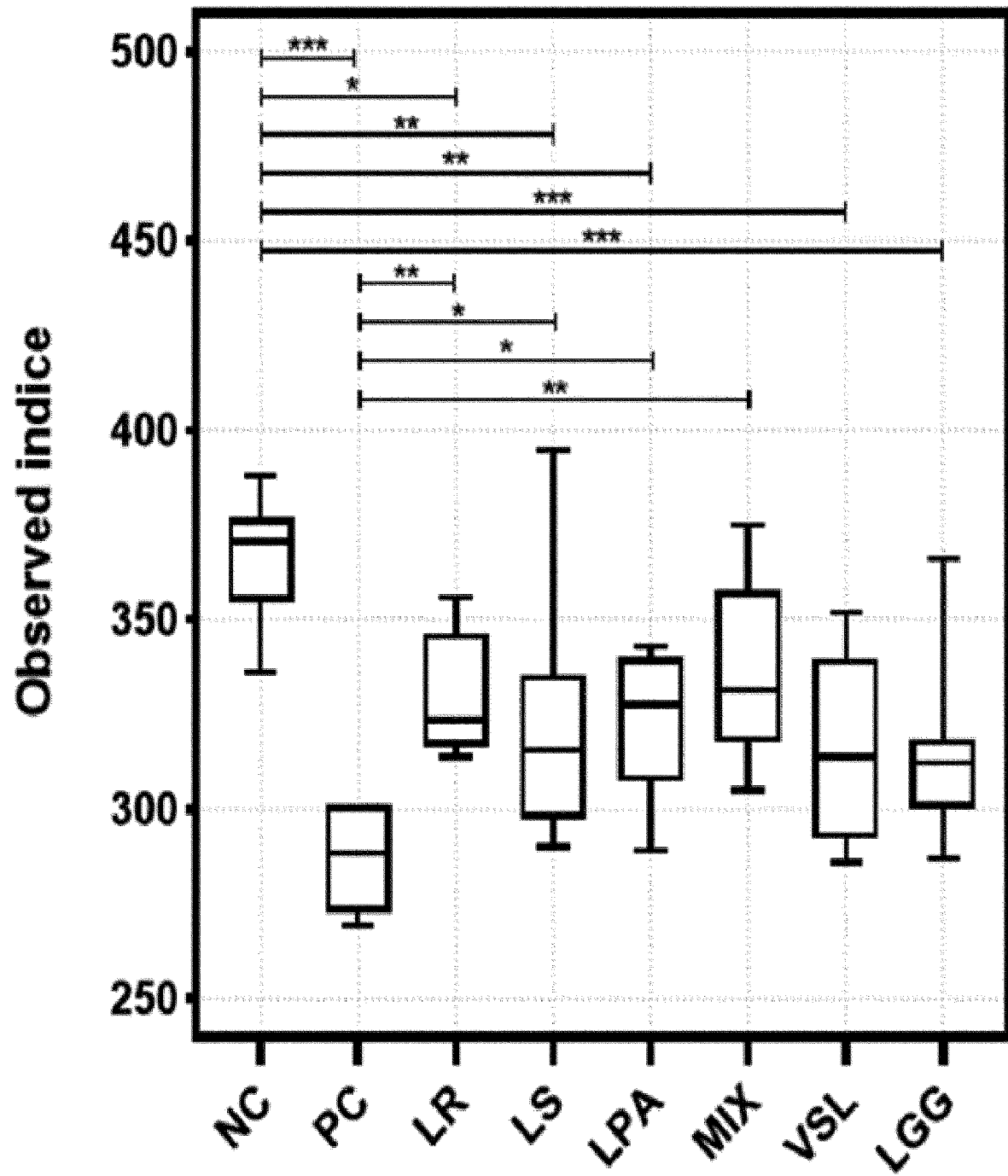
[도4c]



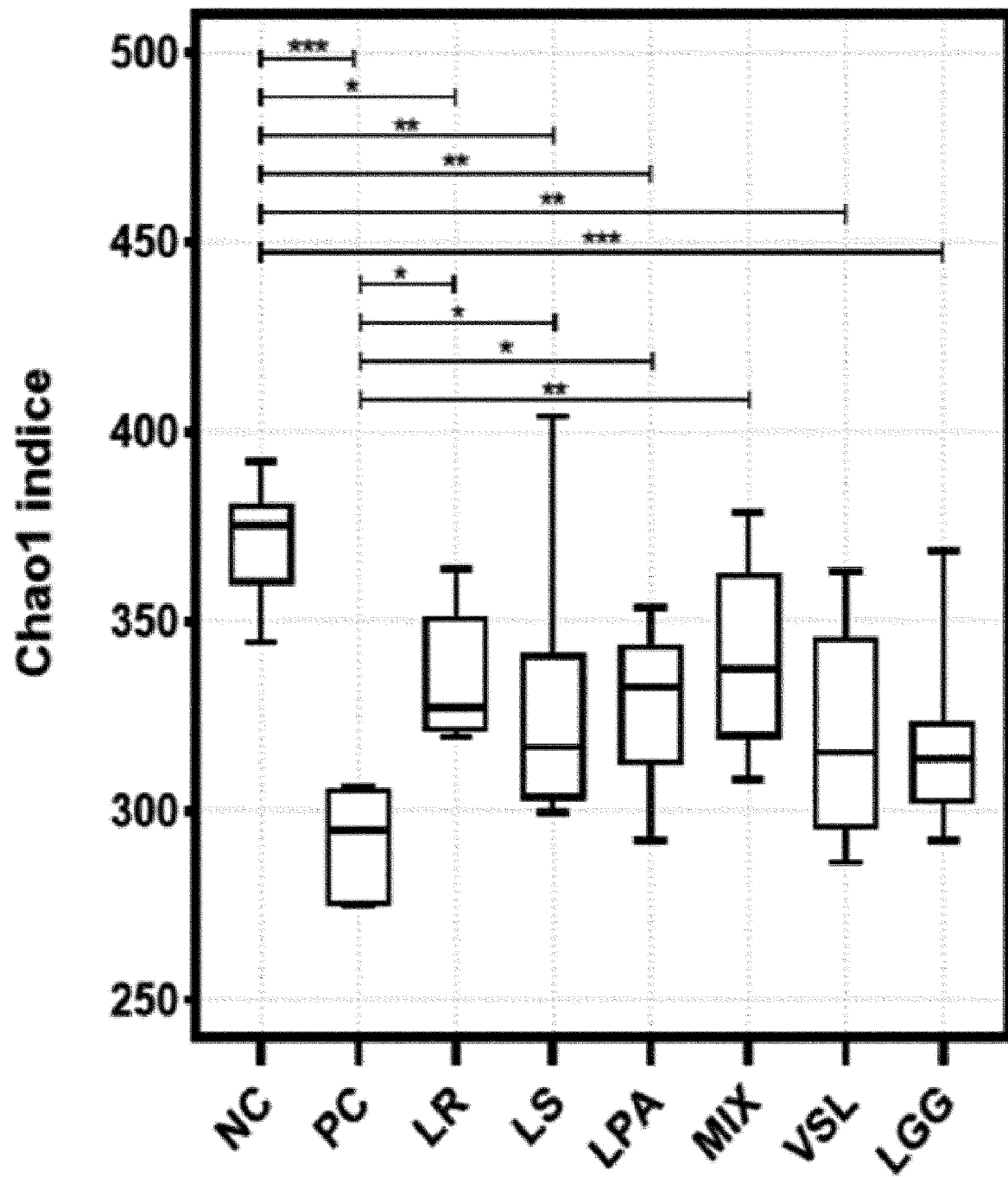
[도5]



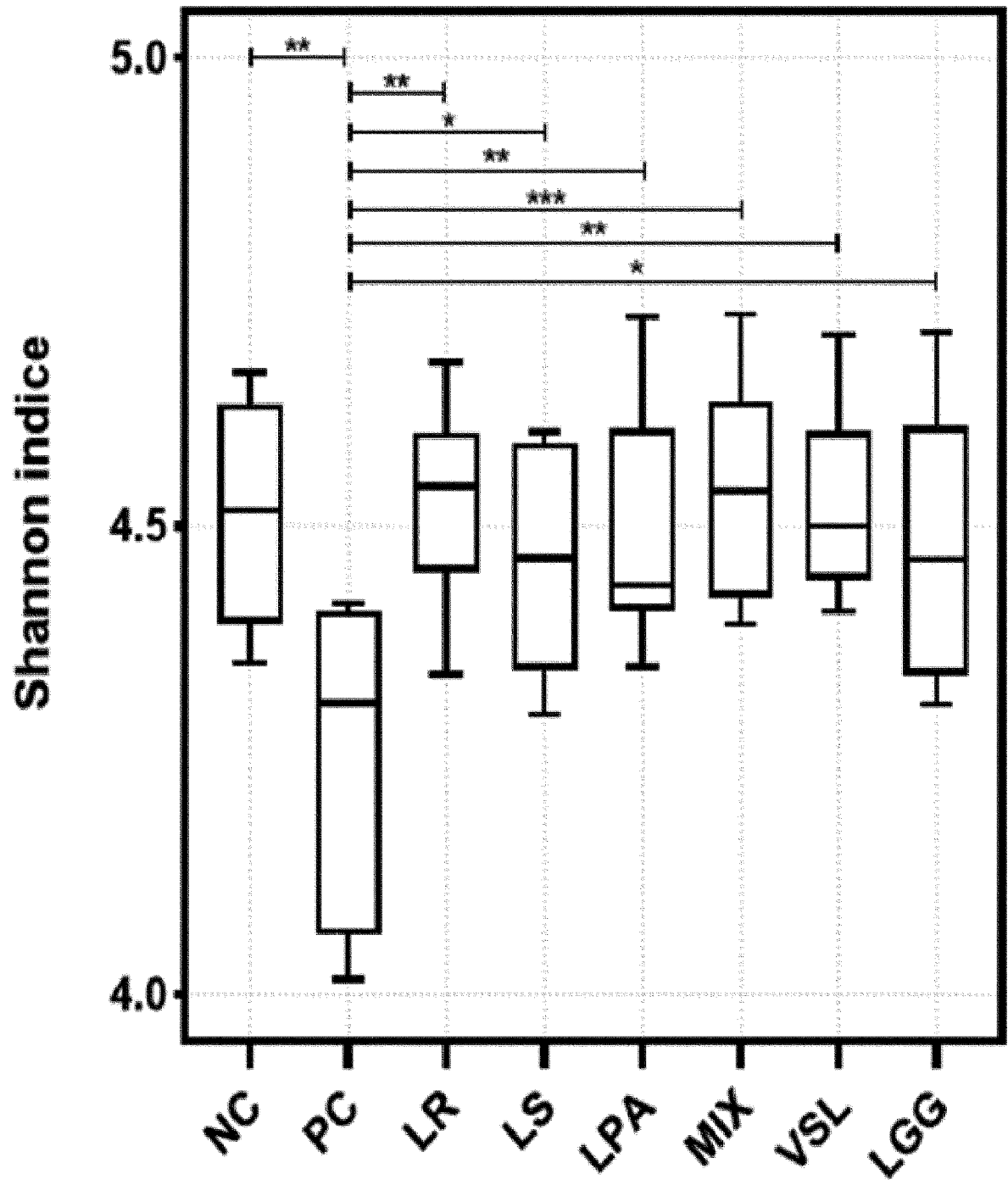
[도6a]



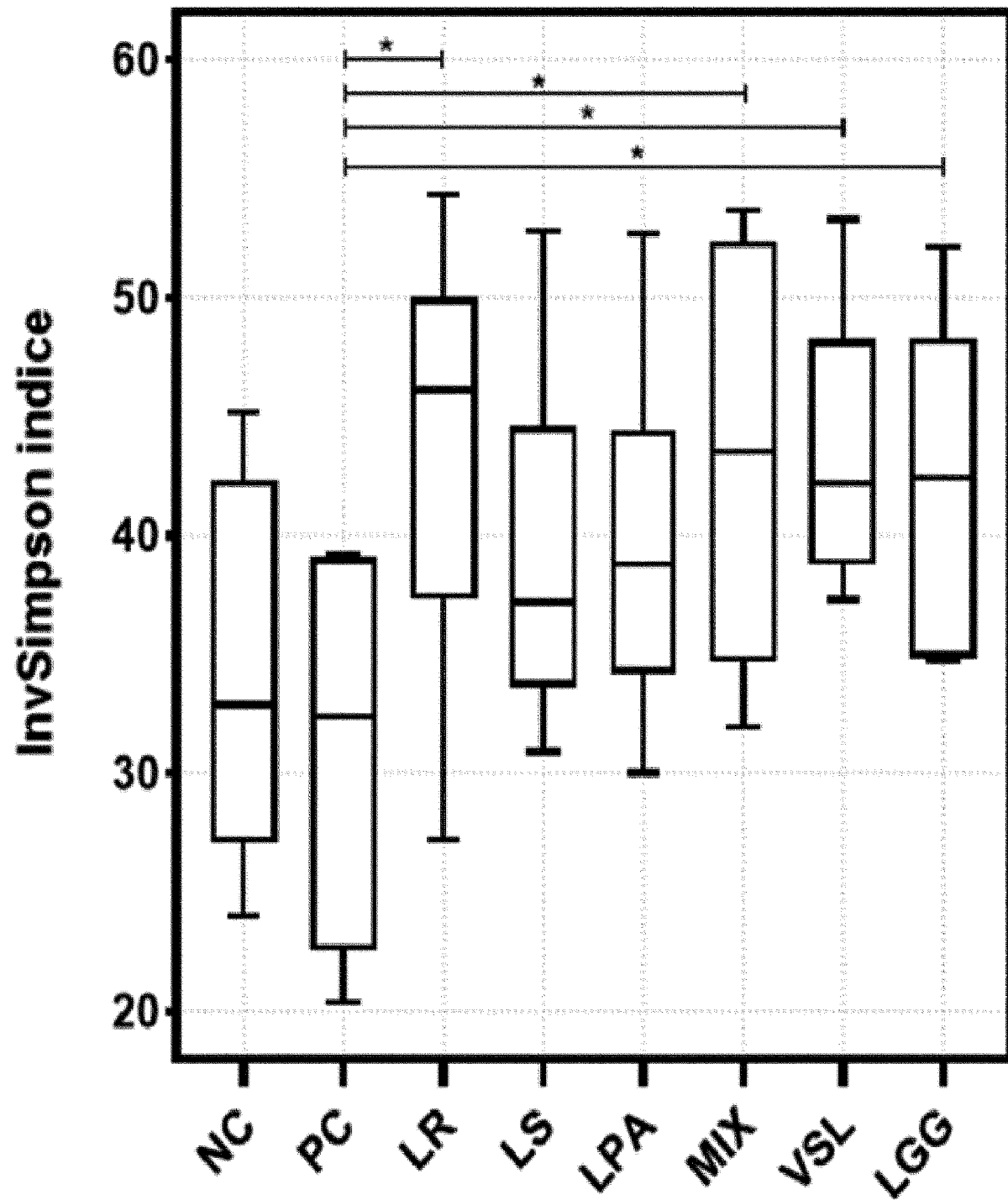
[도6b]



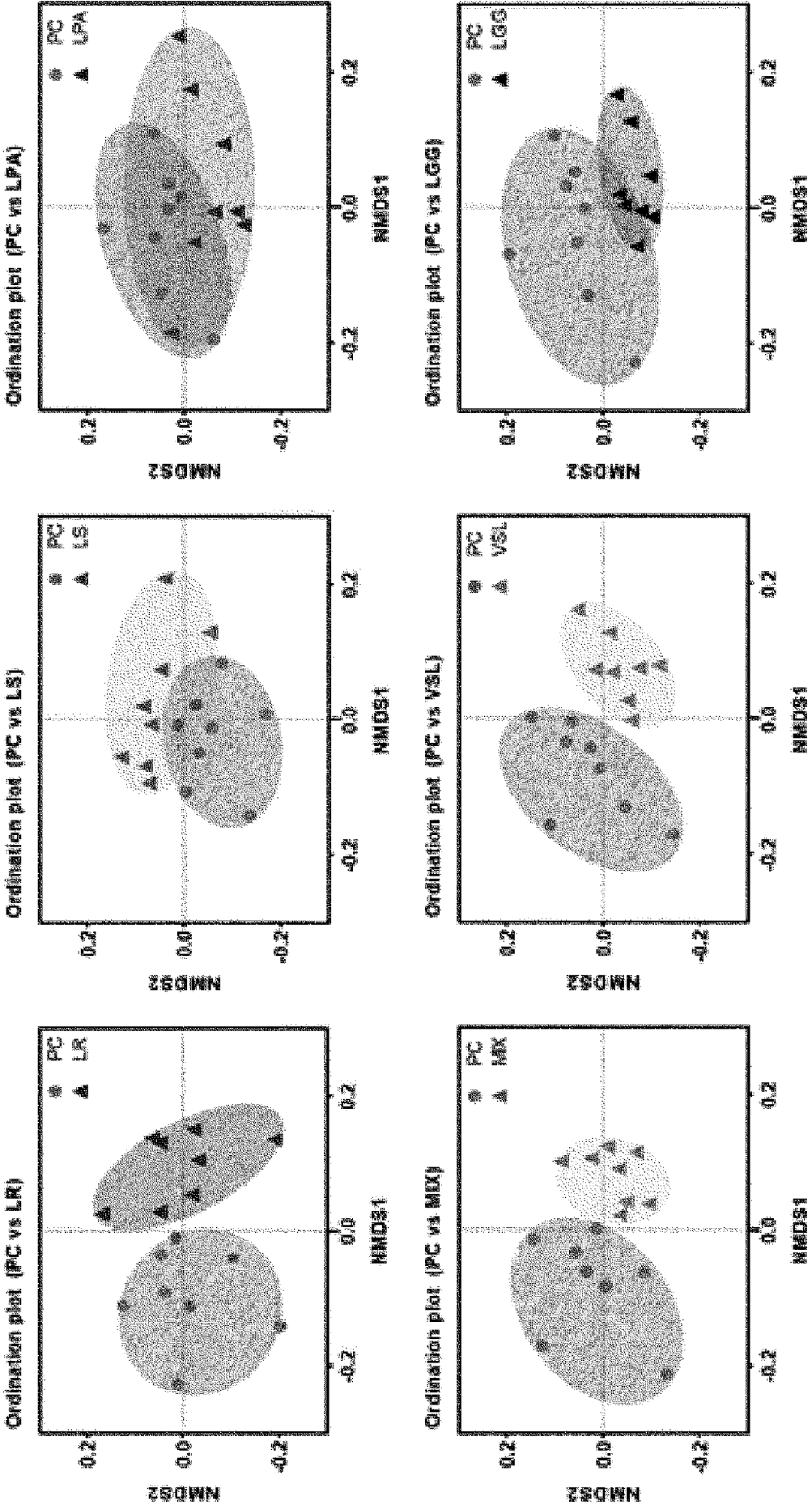
[도6c]



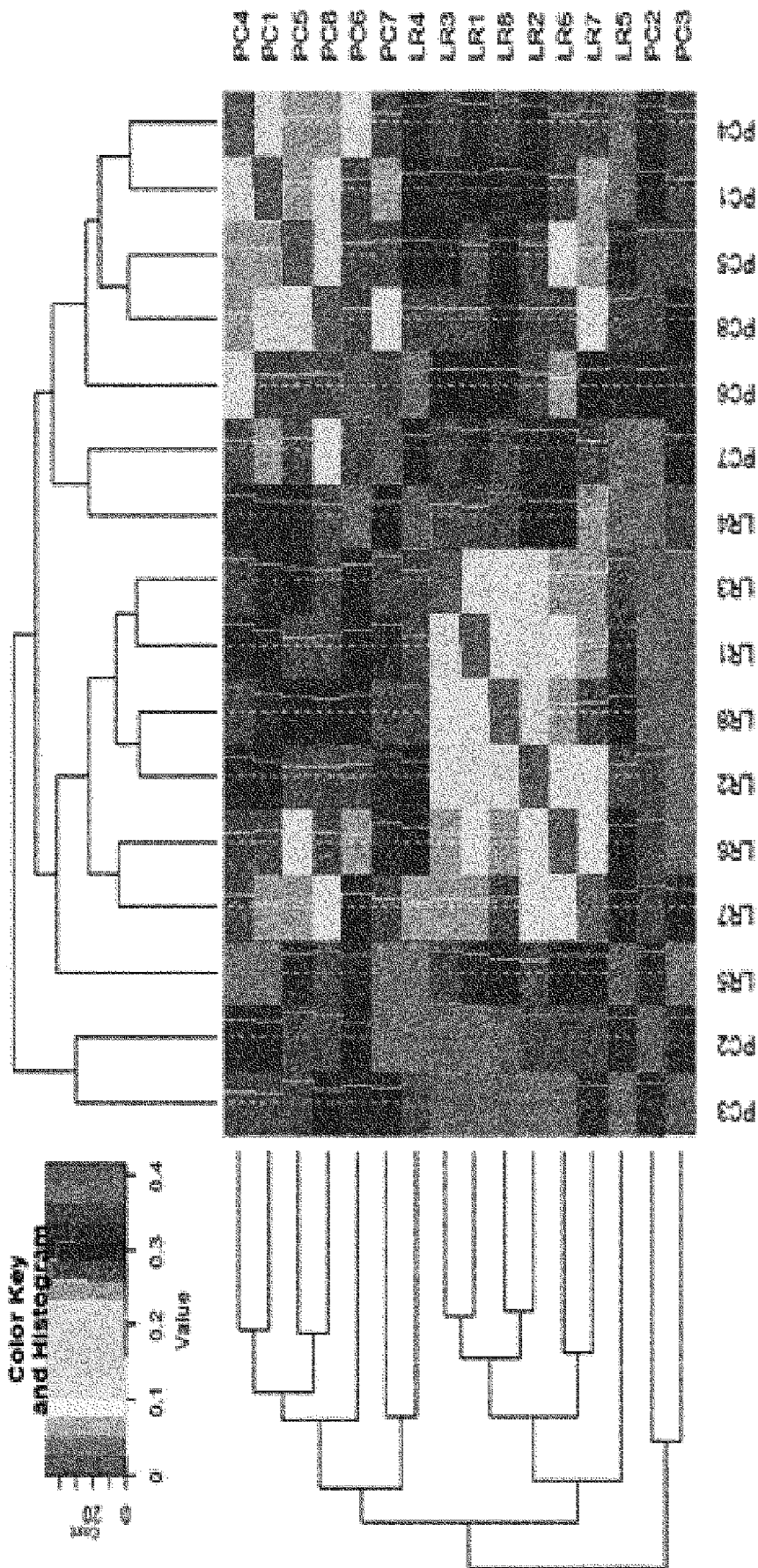
[도6d]



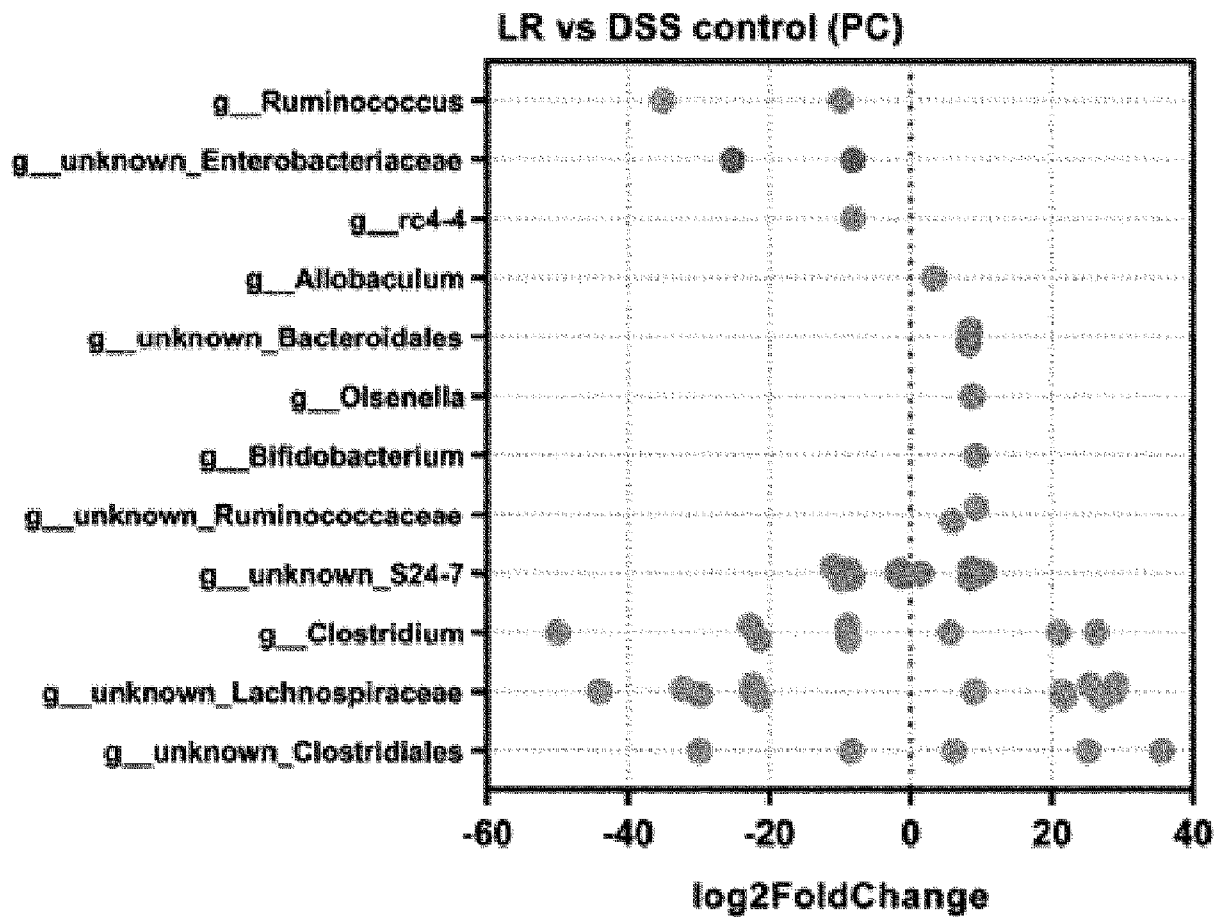
[도7a]



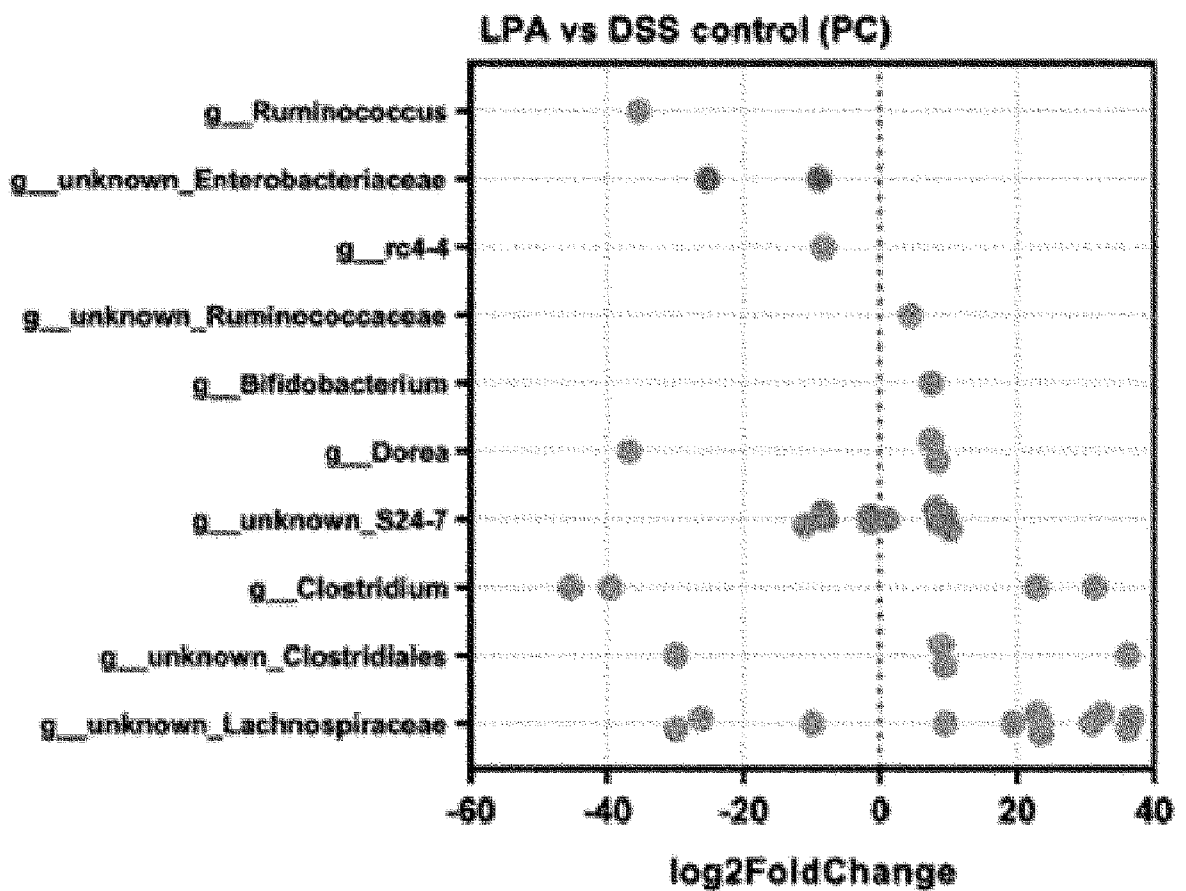
[도7b]



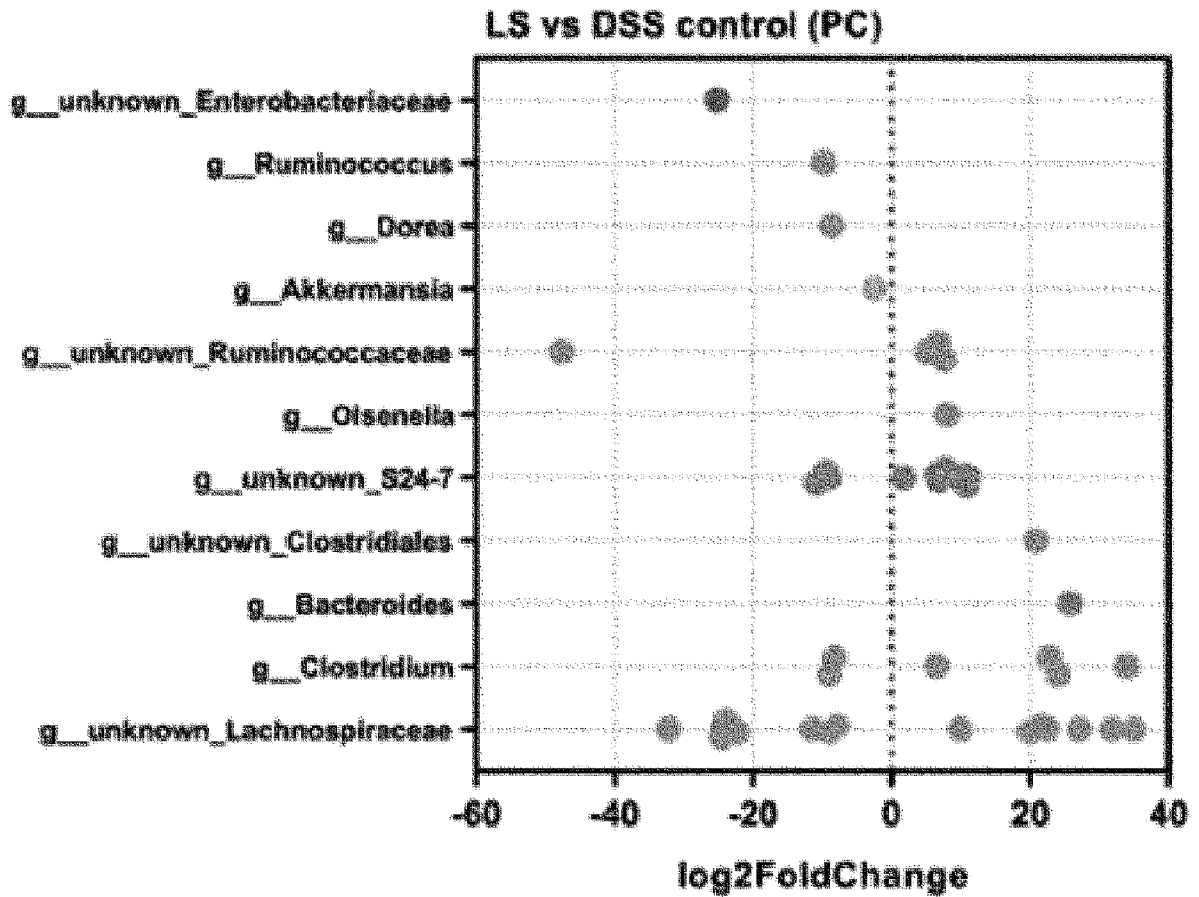
[도9a]



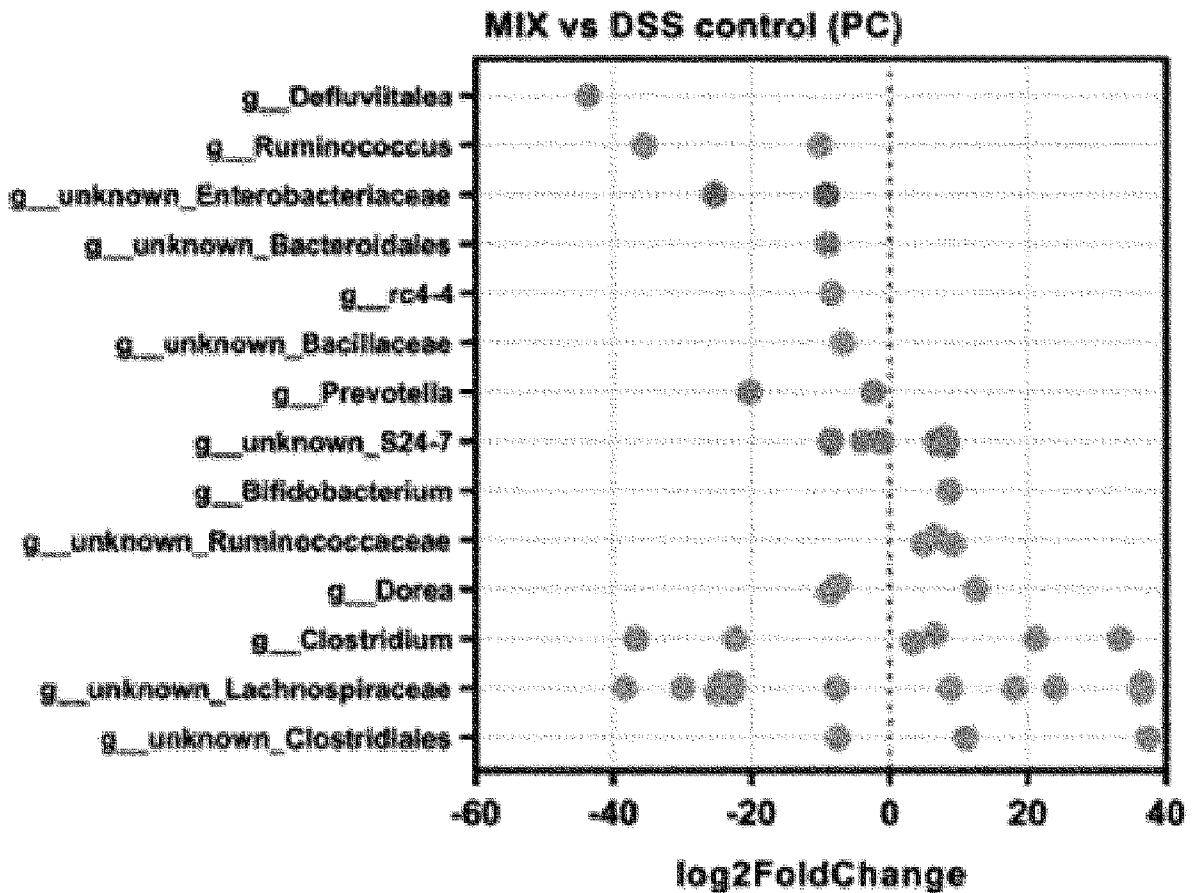
[도9b]



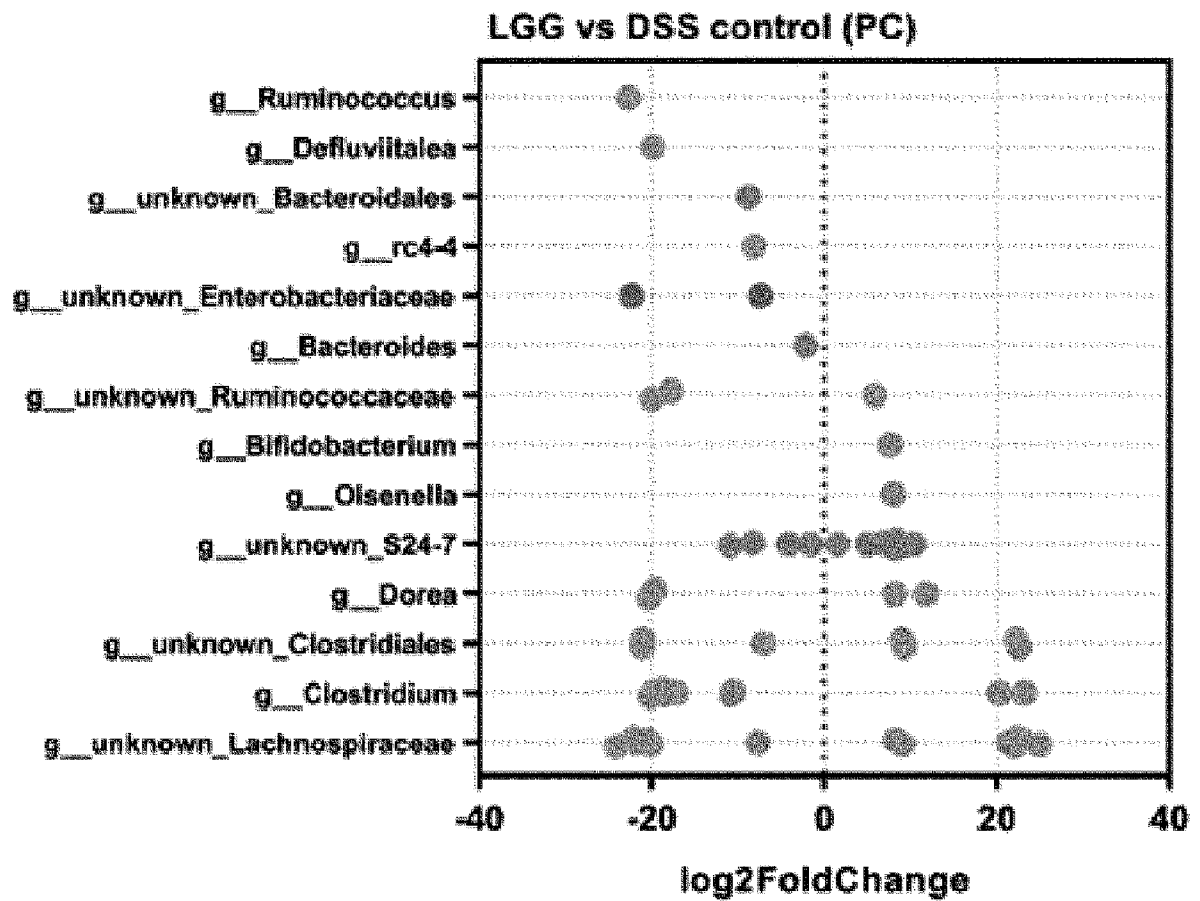
[도9c]



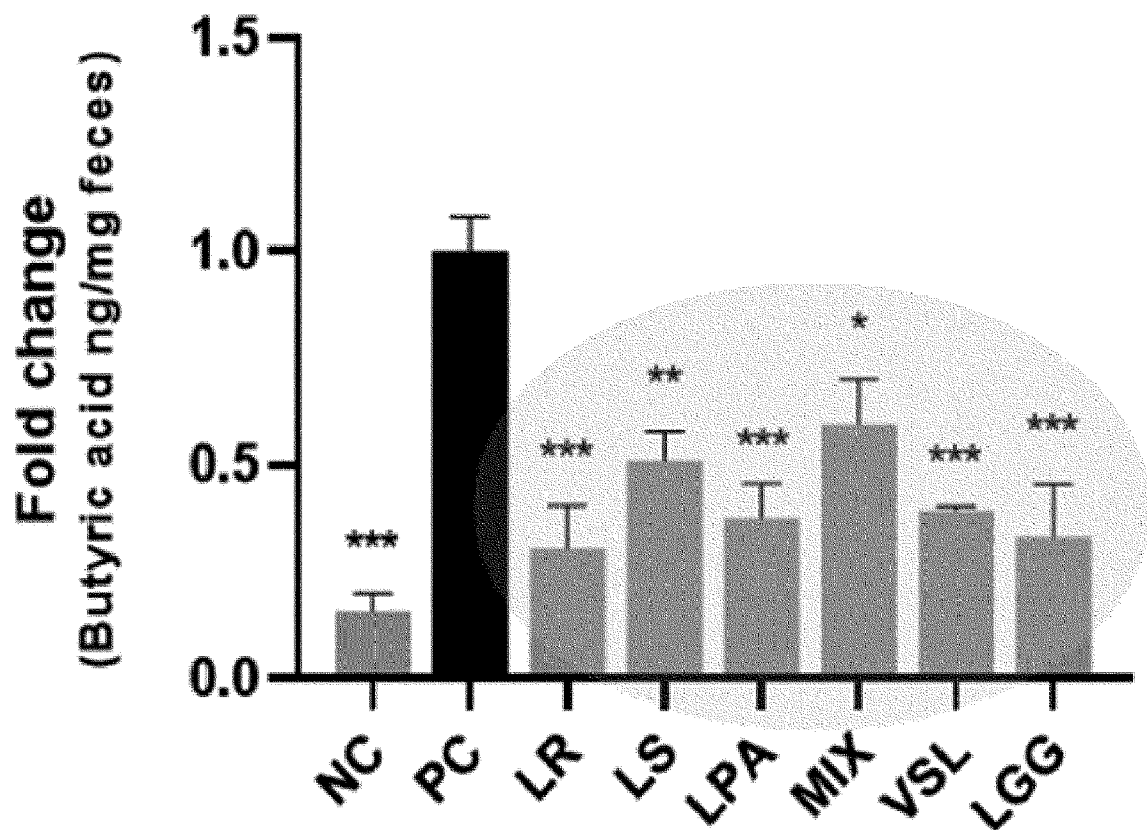
[도9d]



[도9e]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; C12R 1/225(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/00(2006.01); A61K 35/74(2006.01); G01N 33/569(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 장관 면역조절(intestinal immunomodulatory), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0019355 A (COMPAGNIE GERVAIS DANONE) 25 February 2011 (2011-02-25) See abstract; and claim 1.	1-11
A	CN 1982437 A (TONGYI ENTERPRISE (CHINA) INVESTMENT CO., LTD.) 20 June 2007 (2007-06-20) See claims 1-4.	1-11
A	CN 106754470 A (FEED RESEARCH INSTITUTE CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 31 May 2017 (2017-05-31) See abstract; and claim 1.	1-11
A	KR 10-2019-0111582 A (BIOELEVEN INC.) 02 October 2019 (2019-10-02) See entire document.	1-11
A	EP 2256498 A1 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER) 01 December 2010 (2010-12-01) See entire document.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2021

Date of mailing of the international search report

21 June 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002857**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2166461 B1 (CKD BIO CORPORATION et al.) 15 October 2020 (2020-10-15) See entire document. * Published patent of a priority application of the present PCT application.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002857

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002857

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/002857

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2011-0019355	A	25 February 2011	AR	070984	A1	19 May 2010
				BR	PI0909760	A2	25 August 2015
				CA	2718833	A1	08 October 2009
				CA	2718833	C	16 April 2019
				CL	2009000649	A1	07 August 2009
				CN	102016005	A	13 April 2011
				CN	102016005	B	22 May 2013
				EP	2268792	A2	05 January 2011
				EP	2268792	B1	13 May 2015
				ES	2544687	T3	02 September 2015
				FR	2928935	A1	25 September 2009
				FR	2928935	B1	25 September 2009
				JP	2011-515085	A	19 May 2011
				JP	5539953	B2	02 July 2014
				MX	2010010256	A	06 December 2010
				PL	2268792	T3	31 December 2015
				RU	2010142489	A	27 April 2012
				US	2011-0059058	A1	10 March 2011
				US	8697054	B2	15 April 2014
				WO	2009-122042	A2	08 October 2009
				WO	2009-122042	A3	26 November 2009
CN	1982437	A	20 June 2007	CN	100591756	C	24 February 2010
CN	106754470	A	31 May 2017	None			
KR	10-2019-0111582	A	02 October 2019	None			
EP	2256498	A1	01 December 2010	AT	376673	T	15 November 2007
				AU	2000-65383	A1	05 March 2001
				AU	2001-51396	A1	23 October 2001
				BR	0110317	A	08 July 2003
				BR	9608795	A	17 February 1999
				CA	2220451	A1	21 November 1996
				CA	2404889	A1	18 October 2001
				CA	2444548	A1	24 October 2002
				DE	60036871	T2	18 September 2008
				DK	1811303	T3	18 July 2011
				DK	2256498	T3	26 May 2015
				EP	0827402	A2	11 March 1998
				EP	1200828	A2	02 May 2002
				EP	1200828	B1	24 October 2007
				EP	1274449	A2	15 January 2003
				EP	1274449	B1	17 December 2008
				EP	1385476	A2	04 February 2004
				EP	1385476	B1	27 January 2021
				EP	1905446	A1	02 April 2008
				EP	2256498	B1	08 April 2015
				EP	2261664	A2	15 December 2010
				EP	2261664	A3	02 November 2011
				EP	2305213	A2	06 April 2011
				EP	2305213	A3	13 July 2011
				EP	2305213	B1	28 June 2017
				ES	2295045	T3	16 April 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/002857

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 11-505258 A	18 May 1999
		JP 2005-509588 A	14 April 2005
		JP 2009-102401 A	14 May 2009
		KR 10-0612050 B1	14 August 2006
		KR 10-1999-0014865 A	25 February 1999
		KR 10-2003-0025915 A	29 March 2003
		MX 9708858 A	30 August 1998
		US 2002-0039599 A1	04 April 2002
		US 2002-0094346 A1	18 July 2002
		US 2003-0031625 A1	13 February 2003
		US 2004-0180834 A1	16 September 2004
		US 2005-0008652 A1	13 January 2005
		US 2005-0014693 A1	20 January 2005
		US 2006-0029550 A1	09 February 2006
		US 2006-0147496 A1	06 July 2006
		US 2006-0193871 A1	31 August 2006
		US 2008-0014185 A1	17 January 2008
		US 2009-0012113 A1	08 January 2009
		US 2009-0325994 A1	31 December 2009
		US 2012-0263790 A1	18 October 2012
		US 2013-0177647 A1	11 July 2013
		US 2014-0206636 A1	24 July 2014
		US 5977175 A	02 November 1999
		US 6558708 B1	06 May 2003
		US 6562629 B1	13 May 2003
		US 7081239 B2	25 July 2006
		US 7244412 B2	17 July 2007
		US 7452857 B2	18 November 2008
		US 7615207 B2	10 November 2009
		US 7718608 B2	18 May 2010
		US 7736622 B2	15 June 2010
		US 8388935 B2	05 March 2013
		US 8562952 B2	22 October 2013
		US 9358276 B2	07 June 2016
		WO 01-11077 A2	15 February 2001
		WO 01-11077 A3	30 August 2001
		WO 01-11334 A2	15 February 2001
		WO 01-11334 A3	12 July 2001
		WO 2011-008588 A1	20 January 2011
		WO 96-36330 A2	21 November 1996
		WO 96-36330 A3	22 May 1997
KR 10-2166461	B1	15 October 2020	None

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)j; A61K 35/74(2006.01)j; A23L 33/135(2016.01)j; C12R 1/225(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/00(2006.01); A61K 35/74(2006.01); G01N 33/569(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 장관 면역조절(intestinal immunomodulatory), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0019355 A (쑹빠니 자베 다노노) 2011.02.25 요약; 청구항 1	1-11
A	CN 1982437 A (TONGYI ENTERPRISE (CHINA) INVESTMENT CO., LTD.) 2007.06.20 청구항 1-4	1-11
A	CN 106754470 A (FEED RESEARCH INSTITUTE CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 2017.05.31 요약; 청구항 1	1-11
A	KR 10-2019-0111582 A ((주)바이오일레븐) 2019.10.02 전체 문헌	1-11
A	EP 2256498 A1 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER) 2010.12.01 전체 문헌	1-11
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년06월21일(21.06.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년06월21일(21.06.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **12**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및
조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관
련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2166461 B1 (주식회사 종근당바이오 등) 2020.10.15 전체 문헌 * 본 PCT 출원의 우선권 출원의 등록 공보임	1-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0019355 A	2011/02/25	AR 070984 A1	2010/05/19
		BR PI0909760 A2	2015/08/25
		CA 2718833 A1	2009/10/08
		CA 2718833 C	2019/04/16
		CL 2009000649 A1	2009/08/07
		CN 102016005 A	2011/04/13
		CN 102016005 B	2013/05/22
		EP 2268792 A2	2011/01/05
		EP 2268792 B1	2015/05/13
		ES 2544687 T3	2015/09/02
		FR 2928935 A1	2009/09/25
		FR 2928935 B1	2009/09/25
		JP 2011-515085 A	2011/05/19
		JP 5539953 B2	2014/07/02
		MX 2010010256 A	2010/12/06
		PL 2268792 T3	2015/12/31
		RU 2010142489 A	2012/04/27
		US 2011-0059058 A1	2011/03/10
		US 8697054 B2	2014/04/15
		WO 2009-122042 A2	2009/10/08
		WO 2009-122042 A3	2009/11/26
CN 1982437 A	2007/06/20	CN 100591756 C	2010/02/24
CN 106754470 A	2017/05/31	없음	
KR 10-2019-0111582 A	2019/10/02	없음	
EP 2256498 A1	2010/12/01	AT 376673 T	2007/11/15
		AU 2000-65383 A1	2001/03/05
		AU 2001-51396 A1	2001/10/23
		BR 0110317 A	2003/07/08
		BR 9608795 A	1999/02/17
		CA 2220451 A1	1996/11/21
		CA 2404889 A1	2001/10/18
		CA 2444548 A1	2002/10/24
		DE 60036871 T2	2008/09/18
		DK 1811303 T3	2011/07/18
		DK 2256498 T3	2015/05/26
		EP 0827402 A2	1998/03/11
		EP 1200828 A2	2002/05/02
		EP 1200828 B1	2007/10/24
		EP 1274449 A2	2003/01/15
		EP 1274449 B1	2008/12/17
		EP 1385476 A2	2004/02/04
		EP 1385476 B1	2021/01/27
		EP 1905446 A1	2008/04/02
		EP 2256498 B1	2015/04/08
		EP 2261664 A2	2010/12/15
		EP 2261664 A3	2011/11/02
		EP 2305213 A2	2011/04/06
		EP 2305213 A3	2011/07/13
		EP 2305213 B1	2017/06/28

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		ES 2295045 T3	2008/04/16
		JP 11-505258 A	1999/05/18
		JP 2005-509588 A	2005/04/14
		JP 2009-102401 A	2009/05/14
		KR 10-0612050 B1	2006/08/14
		KR 10-1999-0014865 A	1999/02/25
		KR 10-2003-0025915 A	2003/03/29
		MX 9708858 A	1998/08/30
		US 2002-0039599 A1	2002/04/04
		US 2002-0094346 A1	2002/07/18
		US 2003-0031625 A1	2003/02/13
		US 2004-0180834 A1	2004/09/16
		US 2005-0008652 A1	2005/01/13
		US 2005-0014693 A1	2005/01/20
		US 2006-0029550 A1	2006/02/09
		US 2006-0147496 A1	2006/07/06
		US 2006-0193871 A1	2006/08/31
		US 2008-0014185 A1	2008/01/17
		US 2009-0012113 A1	2009/01/08
		US 2009-0325994 A1	2009/12/31
		US 2012-0263790 A1	2012/10/18
		US 2013-0177647 A1	2013/07/11
		US 2014-0206636 A1	2014/07/24
		US 5977175 A	1999/11/02
		US 6558708 B1	2003/05/06
		US 6562629 B1	2003/05/13
		US 7081239 B2	2006/07/25
		US 7244412 B2	2007/07/17
		US 7452857 B2	2008/11/18
		US 7615207 B2	2009/11/10
		US 7718608 B2	2010/05/18
		US 7736622 B2	2010/06/15
		US 8388935 B2	2013/03/05
		US 8562952 B2	2013/10/22
		US 9358276 B2	2016/06/07
		WO 01-11077 A2	2001/02/15
		WO 01-11077 A3	2001/08/30
		WO 01-11334 A2	2001/02/15
		WO 01-11334 A3	2001/07/12
		WO 2011-008588 A1	2011/01/20
		WO 96-36330 A2	1996/11/21
		WO 96-36330 A3	1997/05/22
KR 10-2166461 B1	2020/10/15	없음	