



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0065004
(43) 공개일자 2020년06월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2014.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61K 9/0031 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7010497
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월12일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년04월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/056956
- (87) 국제공개번호 WO 2019/053604
국제공개일자 2019년03월21일
- (30) 우선권주장
102017000101704 2017년09월12일 이탈리아(IT)

- (71) 출원인
소파 에스피에이
이탈리아 밀라노 로사 트레짜노 아이-20060 비아 피렌체 40
- (72) 발명자
비피 안드레아
이탈리아 24128 베르가모 (비지) 7썩 비아 밀라노
- (74) 대리인
유미특허법인

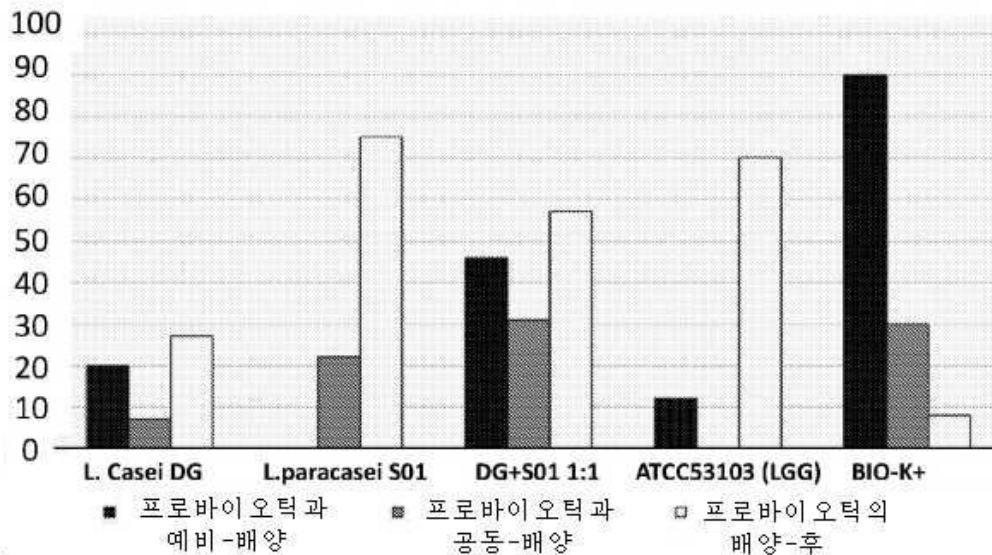
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **클로스트리듐 디피실리 감염을 치료하기 위한 새로운 용도**

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 특정 균주 및 이 균주를 포함하는 조성물의 클로스트리듐 디피실리 (*Clostridium difficile*) 감염, 바람직하게는 장 감염, 또는 소위 CD-관련 질환 (CDAD) 또는 CD 감염 (CDI)과 관련된/연관된 생리병리학적 병태의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

클로스트리듐 디피실리 (*Clostridium difficile*) 감염과 관련/연관된 생리병리학적 병태 및/또는 클로스트리듐 디피실리 감염에 의해 유발되는 생리병리학적 병태와 연관된 증상 및/또는 클로스트리듐 디피실리 감염에 의해 유발되는 조직학적 손상을 예방 및/또는 치료하는데 사용하기 위한, 락토바실러스 카세이 (*L. casei*) DG[®] 및/또는 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) LPC-S01 박테리아 균주(들) 또는 이들 균주(들)를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 클로스트리듐 디피실리 감염이 장 감염 (intestinal infection)인, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 클로스트리듐 디피실리 감염과 관련/연관된 생리병리학적 병태가 위막성 장염 (pseudomembranous enterocolitis), 위막성 대장염 (pseudomembranous colitis), 위막 비동반 대장염 (colitis without pseudomembranes), 전격성 대장염 (fulminant colitis), 독성 거대결장 및 장 천공을 동반한 대장염 (colitis with toxic megacolon and intestinal perforation), 항생제 관련 대장염 (colitis associated with antibiotics), 항생제 관련 설사 (diarrhea associated with antibiotics) 및 클로스트리듐 디피실리 감염 관련 설사 (diarrhea associated with *C. difficile* infection)로부터 선택되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감염/CDAD/CDI와 관련된 증상이 설사, 탈수, 위막성 대장염, 장병증, 독성 거대결장, 장 천공, 패혈증, 장 출혈 및 저칼륨혈증으로부터 선택되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 추가적인 미생물, 바람직하게는 박테리아, 바람직하게는 프로바이오틱 박테리아 및/또는 효모 및/또는 진균을 더 포함하는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 박테리아가 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 바실러스 (*Bacillus*), 프로피오니박테리움 (*Propionibacterium*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 락토코커스 (*Lactococcus*), 에어로코커스 (*Aerococcus*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*) 및 이들의 조합으로부터 선택되는 속에 속하고, 바람직하게는 상기 박테리아가 락토바실러스 및/또는 비피도박테리움 속에 속하는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물이 투여 (intake) 당 세포, 바람직하게는 박테리아 세포 10억개 내지 3000억개 (적절한 경우, 그 이상의 수), 더 바람직

하계는 500억개 내지 2500억개, 보다 더 바람직하게는 750억개 내지 1500억개 범위의 양으로 투여되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 균주 및/또는 조성물이 매일 적어도 1회 내지 2회으로 투여되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

경구 투여용으로, 바람직하게는 환제, 캡슐제, 정제, 과립 분말, 오퍼클러 (opercula), 구강 용해성 과립제 (orosoluble granules), 사세제 (sachets), 당 코팅 환제 (sugared coated pill) 또는 마실 수 있는 용기 (drinkable bottles) 형태; 또는 액체 형태, 바람직하게는 시럽 또는 음료 (drink)로 제형화되거나; 또는 식품, 바람직하게는 요거트, 치즈 또는 과일 주스에 첨가되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

국소 작용 (topical action), 바람직하게는 직장 투여에 의한 바람직하게는 관장제로서, 바람직하게는 변 세균 총 이식 (faecal microbiota transplantation)에 의해 국소 작용하도록 제형화되는, 박테리아 균주 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 특정 균주 및 이 균주를 포함하는 조성물의 클로스트리듐 디피실리 (*Clostridium difficile*) 감염, 바람직하게는 장 감염, 또는 소위 CD-관련 질환 (CDAD) 또는 CD 감염 (CDI)과 관련된/연관된 생리병리학적 병태의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 클로스트리듐 디피실리는 그람 양성, 혐기성, 포자-형성, 막대형의 박테리아로서, 자연계에 심토 및 애완동물의 장관에 널리 분포해 있다.

[0003] 이 미생물에 의한 오염은 또한 변-경구 경로를 통해 이루어지며; 특히 섭취된 포자가 위의 산 장벽으로부터 살아남아 결장에서 발아한다.

[0004] 클로스트리듐 디피실리는 인간의 경우 건강한 성인의 약 3%에서 장 공생 미생물 (saprophytic flora)의 구성 성분으로서 발견되며, 1살 미만의 유아에서는 더 많은 비율로 발견될 수 있다 (15-70%).

[0005] 클로스트리듐 디피실리는 통상적으로 어떠한 장애를 유발하진 않는다. 그러나, 특정 상황에서는 다양한 강도의 설사를 유발할 수 있으며, 이는 열뿐 아니라 신체적, 정신적 및 사회적 관점에서 인간의 건강 상태에 대한 전반적인 주요 장애를 수반할 수 있다. 실제, 설사는 구역질, 구토, 전신 병감 (general malaise), 통증, 복부 팽만 및 탈수와 같은 그외 주요 증상들도 동반한다.

[0006] 임상 영역에서, 클로스트리듐 디피실리는, 직장과 S상 결장에 만연한 다소 광범위한 괴사를 특징으로 하며 종종 과다 설사를 동반하는, 위막성 대장염 (pseudomembranous colitis)으로서 정의되는, 중증 대장염 형태에 주로 원인이 되는 것으로 알려져 있다.

[0007] 이와 관련하여 문제의 원인은 장독성원성 (enterotoxigenic)으로 규명된 수종의 클로스트리듐 디피실리 특정 균주로서, 장독소 A 및/또는 세포독소 B를 생산할 수 있기 때문이다. 이들 독소는 장 점막에 내재화되어, 장 세포의 세포 사멸을 유발한다.

[0008] 조직학적 손상 스펙트럼은 결장 내강의 염증성 침윤과 관련된 특발성 상피 괴사를 특징으로 하는 타입 I 형태에서부터 광범위하게 퍼진 상피 괴사 및 뮤신, 호중구, 파이버린 및 세포 과편으로 구성된 회색을 띠는 위막으로

덜인 케양 (이에, 용어 위막성 대장염)을 특징으로 하는 타입 III 형태에까지 다양한다.

- [0009] 장의 클로스트리듐 디피실리 감염의 중증도는 다양하다. 증상은 실제 경증에서부터 과다 설사 (1일 당 장액성 설사 최대 10 L)에 이르는 범위일 수 있으며, 독성 거대결장 (toxic megacolon), 장 천공, 저칼륨혈증, 장 출혈 및 패혈증을 동반할 수 있다. 설사는 열, 구역질, 식욕부진, 전신 병감, 통증, 복부 팽만 및 탈수를 동반할 수 있다. 설사는 점액, 혈액 및 열성일 수 있다. 유아는 대개 무증상 보균자이다. 실제, 군락화가 장 세균총의 미성숙시 유리한 것으로 보이지만, 병리학적으로 진행되지 못하는 것은 여전히 미성숙 상태인 장 세포의 수용체에 의 독소 결합 불능이 그 이유이다.
- [0010] 감염은 흔히 공격적인 항생제 요법에 이어 드러나며, 병원 환경에서 매우 흔하게 퍼져있다. 설사는 항생제 요법의 일반적인 부작용으로, 치료가 끝나 약물을 중단하면 장애는 일반적으로 해소된다. 그러나, 클로스트리듐의 경우, 다른 증상들이 동반된, 설사가 완화 또는 개선되는 징후는 나타나지 않는다.
- [0011] 클로스트리듐 디피실리 감염의 위험 인자로 하기를 들 수 있다:
- [0012]
 - 항생제, 특히 광범위 항생제 (즉, 다양한 유형의 박테리아를 제거할 수 있는 항생제)의 사용, 또한 장기간 사용 또는 항생제-내성 감염을 치유하기 위한 여러가지 항생제의 조합 사용;
- [0013]
 - 병원 입원 또는 기타 치료 시설에 체류 필요성;
- [0014]
 - 소화기계 수술;
- [0015]
 - 장을 포함한 복부 수술;
- [0016]
 - 유치원, 유아 학교 또는 요양소에 체류;
- [0017]
 - 결장 문제, 예를 들어 과민성 장 증후군 또는 결장직장 암;
- [0018]
 - 신장 문제;
- [0019]
 - (당뇨병 또는 약물로 인한) 면역 시스템 약화;
- [0020]
 - 프로톤 펌프 저해제 또는 통상적으로 감염에 대해 방어를 제공하는 위의 산성도를 낮출 수 있는 기타 약물 복용;
- [0021]
 - 기존 클로스트리듐 디피실리 감염 병력;
- [0022]
 - 65세 이상.
- [0023] 임의 경우에 감염 치료에는 항생제, 특히 이러한 특정 박테리아를 타겟팅하는 항생제를 사용하여야 한다.
- [0024] 앞서 언급한 바와 같이, 클로스트리듐 디피실리 감염의 대부분이, 다수의 사람들이 항생제를 복용하고 서로 근접 접촉하는, 예를 들어, 병원 및 요양 시설과 같은 환경에서 발생한다. 중증 클로스트리듐 디피실리 감염의 치사율은, 병원 환경에서 질병 전파를 막기 위해 필수적인 예방학적 조치들을 적용하여야 할 만큼 심각하진 않다.
- [0025] 최근 수년간 다양한 사례들이 대변 이식 방법 (fecal transplantation method)으로 성공적으로 치료된 바 있다.
- [0026] 프로바이오틱스에 의존하는 방법이, 병원체에 대한 경쟁적인 저해, 상재균의 안정화 및 예를 들어 로타바이러스 감염과 관련된 증가된 장 투과성의 약화를 통해, 클로스트리듐 디피실리에 의해 정확하게 유발된 설사를 포함하여, 대부분 타입의 설사를 예방/치료하는데 효과적인 것으로 입증되었다.
- [0027] 전술한 바에 비추어, 클로스트리듐 디피실리 감염, 바람직하게는 장 감염과 관련된/연관된 생리병리학적 병태들을 치유하거나 또는 이와 관련된 증상을 완화할 수 있는 새로운 및/또는 대안적인 치료학적 해법이 절실하게 요구되고 있다.
- 발명의 내용**
- [0028] 본 출원인은 전술한 필요성에 대한 해결책으로서 박테리아 및/또는 효모 및/또는 기타 미생물에 기반한 프로바이오틱스의 용도를 발굴하게 되었다. 특히, 본 해법은 락토바실러스 및/또는 비피도박테리움 속에 속하는 박테리아, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 종 박테리아의 용도를 제안한다.
- [0029] 실제, 상세히 후술한 바와 같이 프로바이오틱스의 사용 결과로서, 클로스트리듐 디피실리의 저해가 관찰되며, 시험관내 대체 검사 (displacement test)로부터 모두 명백해진다.

도면의 간단한 설명

[0030] 본 발명은 임의의 제한적인 특징을 가지는 것으로 의도되지 않는 후술한 도면 및 실시예를 참조하여 아래에서 상세하게 설명될 것이다.

특히:

- 도 1A는 경쟁적인 부착 검사의 결과, 즉 진핵생물 세포를 프로바이오틱스 및 병원체와 함께 공동-배양한 결과를 나타낸 것이다. 보다 구체적으로, 도는 HT29 세포와 CDIF 및 다양한 검사 프로바이오틱스를 공동-배양한 후, 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF 부착율을 그래프로 나타낸 것이다. 도 1B는 부착성 병원체의 제거 검사 결과, 즉 진핵생물 세포에 병원체를 전처리한 다음 프로바이오틱스와 함께 배양한 결과를 나타낸 것이다. 보다 구체적으로, 도는 진핵생물 세포에 CDIF를 기회 감염시킨 후 HT29 세포를 여러가지 검사 프로바이오틱스와 공동-배양하였을 때 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF 부착율을 그래프로 나타낸 것이다.

- 도 2A는 부착 배제 검사 (adhesion exclusion test) 결과를 나타낸 것이다 (진핵생물 세포에 프로바이오틱스 BIOK+를 전처리한 다음 병원체와 함께 배양). 보다 구체적으로, 도는 HT29-MTX 세포를 프로바이오틱스 검사 제품 Bio-K+와 접촉시켜 사전-자극한 후 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF 부착율을 그래프로 나타낸 것이다. 도 2B는 경쟁적인 부착 검사 결과 (진핵생물 세포를 프로바이오틱스 및 병원체와 함께 공동-배양)를 나타낸 것이다. 보다 구체적으로, 도는 HT29-MTX 세포를 CDIF 및 프로바이오틱스 검사 제품 Bio-K+와 공동-배양하였을 때의 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF 부착율을 그래프로 나타낸 것이다. 도 2C는 부착성 병원체 제거 검사 결과 (진핵생물 세포에 병원체를 전처리한 다음 프로바이오틱스와 함께 배양)를 나타낸 것이다. 보다 구체적으로, 도는 진핵생물 세포에 CDIF를 기회 감염시킨 후 HT29 세포를 여러가지 검사 프로바이오틱스와 배양하였을 때의 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF 부착율을 그래프로 나타낸 것이다.

- 도 3은 클로스트리듐 디피실리 감염에 대해 나타낸, 특정 프로바이오틱스 예들로 수행된 검사 결과를 Bio-K+로 알려진 시판 제품과 비교한 비교 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본원에서, "프로바이오틱"은 2001년에 FAO 및 WHO에 의해 공동 소집된 전문가 그룹에 의해 공식화된 것이다: "적당 투여시 숙주에 건강적인 혜택을 제공하는 살아있는 미생물". 구체적으로, 이들 2가지 기관의 정의를 실질적으로 반영하여, 이탈리아 보건부에서는 "충분한 양으로 섭취하였을 때 신체에 유익한 기능을 발휘할 수 있는 것으로 입증된 미생물"로서 프로바이오틱스를 정의하였다.

[0032] 클로스트리듐 디피실리 (이하, CD)는, 다양한 수준의 중증도를 특징으로 할 수 있는, CD-관련 질환 (CDAD) 또는 CD 감염 (CDI)로 알려진 다양한 타입의 감염 또는 이와 관련된 질환/병태에 대해 임상적으로 원인이 되는 박테리아이다.

[0033] 실제, 감염은 경증의 설사로 나타날 수 있지만, 위막성 대장염, 독성 거대결장 및 장 천공이 나타날 수도 있다. 감염이 병원성이 더 강한 새로운 박테리아 균주에 의해 이루어진다면, 사망 위험성과 연관된, 중증의 임상 증상들이 더욱 빈번하게 발생한다.

[0034] CD 감염은 전형적으로 병원 기원이며, 매우 빈번하게 나타나며 전염병 특징을 가진다.

[0035] 본 발명의 제1 측면은 클로스트리듐 디피실리 감염, 바람직하게는, 장 감염 또는 소위 CD-관련 질환 (CDAD) 또는 CD 감염 (CDI)과 관련된/연관된 생리병리학적 병태를 예방 및/또는 치료하는데 사용하기 위한 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 또는 이들 균주(들)를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0036] 클로스트리듐 디피실리와 관련된 상기한 질환은 바람직하게는 위막성 장염 (pseudomembranous enterocolitis), 위막성 대장염 (pseudomembranous colitis), 위막 비동반 대장염 (colitis without pseudomembranes), 전격성 대장염 (fulminant colitis), 독성 거대결장 및 장 천공을 동반한 대장염 (colitis with toxic megacolon and intestinal perforation), 항생제 관련 대장염 (colitis associated with antibiotics), 항생제 관련 설사 (diarrhea associated with antibiotics) 및 클로스트리듐 디피실리 감염 관련 설사 (diarrhea associated

with *C. difficile* infection)이다.

- [0037] 이들 2종의 균주는 SOFAR S.p.A. 사에서 분리하여 기탁하였다. 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] (락토바실러스 파라카세이 CNCM I-1572)는 파리 파스티르 연구소의 국립 미생물 배양물 콜렉션 (*National Collection of Cultures of Micro-organisms*)에 CNCM I-1572로 기탁되었다. 이 균주는 처음에 락토바실러스 카세이 DG 서브.카세이로 명명되었다. 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01은 DSMZ에 기탁번호 DSM 26760으로 기탁되었다.
- [0038] 본원에 언급되는 클로스트리듐 디피실리 균주는 바람직하게는 장독소성 (enterotoxigenic)으로 정의된 것이며, 즉 예를 들어 세포독소 B 및/또는 장독소 A와 같은 장독소/세포독소를 생산할 수 있는 것으로 정의된 것이다. 보다 넓은 의미에서, 독소를 생산하지 않고 병원성이 아닌 클로스트리듐 디피실리 균주, 그리고 고-병원성 (hypervirulent), 항생제 내성 및 포자 과-생산체 (hyper-producers of spores)인 신생 클로스트리듐 디피실리 균주 역시 고려될 것이다.
- [0039] 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 또는 이의 조성물의 투여는, 바람직하게는, 상기한 감염/CDAD/CDI 및/또는 CD 감염과 관련된 증상 또는 CD-관련된 질환에 의해 유발되는 조직학적 손상을 완화 및/또는 치료 및/또는 치유하는데 효과적이다.
- [0040] 실제, CD에 의해 유발되는 감염/관련 질환은 여러가지 수준의 중증도를 특징으로 할 수 있다. 감염은 경도의 설사와 같이 나타날 수 있지만, 또한 예를 들어 단백질 소실성 장병증 (protein-losing enteropathy) 및 재발성 설사와 같은 복부 병증 (abdominal situation), 및 예를 들어 균혈증 및 비장 농양과 같은 장 이외의 병증을 초래하게 될 수도 있다. 감염이 신생 병원성 박테리아 균주에 의해 이루어진 경우, 모두 사망 위험과 관련있는, 탈수, 저칼륨혈증, 패혈증 쇼크, 위막성 대장염, 독성 거대결장 및 장 천공과 같은 중증의 임상 증상들이 더 빈번하게 발생한다.
- [0041] 따라서, 본 발명의 바람직한 측면에서, 이러한 감염/CDAD/CDI와 관련된 증상들은 설사, 탈수, 위막성 대장염, 장병증, 독성 거대결장, 장 천공, 패혈증, 장 출혈 및 저칼륨혈증으로부터 선택된다.
- [0042] 조직학적 손상은 바람직하게는 타입 I 및/또는 타입 III이다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 측면에서, 조성물은 미생물, 바람직하게는 박테리아, 바람직하게는 프로바이오틱 박테리아 및/또는 효모 및/또는 진균을 더 포함한다.
- [0044] 이러한 박테리아는 바람직하게는 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*), 바실러스 (*Bacillus*), 프로피오니박테리움 (*Propionibacterium*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 락토코커스 (*Lactococcus*), 에어로코커스 (*Aerococcus*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*) 및 이들의 조합으로부터 선택되는 속에 속하며, 더 바람직하게는 박테리아는 락토바실러스 및/또는 비피도박테리움 속에 속한다.
- [0045] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 락토바실러스 속의 박테리아는 다음과 같은 종들 중 하나 이상에 속한다: 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 액시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 람노수스 (*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 아밀로리티쿠스 (*Lactobacillus amylolyticus*), 락토바실러스 알리멘타리우스 (*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 아비아리에스 (*Lactobacillus aviaries*), 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 부크네리 (*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 카세이 (*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 셀로비오수스 (*Lactobacillus cellobiosus*), 락토바실러스 코리니포르미스 (*Lactobacillus coryniformis*), 락토바실러스 크리스파투스 (*Lactobacillus crispatus*), 락토바실러스 쿠르바투스 (*Lactobacillus curvatus*), 락토바실러스 델브루키이 (*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 파르시미니스 (*Lactobacillus farciminis*), 락토바실러스 페멘툼 (*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 갈리나룸 (*Lactobacillus gallinarum*), 락토바실러스 가세리 (*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스 (*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 힐가르디이 (*Lactobacillus hilgardii*), 락토바실러스 존스니 (*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 케피라노팍시엔스 (*Lactobacillus kefiranofaciens*), 락토바실러스 케피리 (*Lactobacillus kefiri*), 락토바실러스 무코사 (*Lactobacillus mucosae*), 락토바실러스 파니스 (*Lactobacillus panis*), 락토바실러스 콜리노이데스 (*Lactobacillus collinoides*), 락토바실러스 파라플란타룸 (*Lactobacillus paraplantarum*), 락토바실러스 펜토수스 (*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 폰티스 (*Lactobacillus pontis*), 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 사케이 (*Lactobacillus*

sakei), 락토바실러스 살리바리우스 (*Lactobacillus salivarius*) 및 락토바실러스 산프란시센시스 (*Lactobacillus sanfranciscensis*).

[0046] 추가적인 바람직한 구현예에서, 락토바실러스 속에 속하는 박테리아는 락토바실러스 액시도필러스 CL1285 및/또는 락토바실러스 카세이 LBC80R 및/또는 락토바실러스 람노수스 CLR2 균주가 아니다.

[0047] 본 발명의 추가적인 구현예에서, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 또는 이들 균주(들)를 포함하는 조성물은, 락토바실러스 액시도필러스 CL1285 및/또는 락토바실러스 카세이 LBC80R 및/또는 락토바실러스 람노수스 CLR2 균주가 아닌, 락토바실러스 속에 속하는 박테리아 (와 조합하여 사용되며)를 더 포함한다.

[0048] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 비피도박테리움 속에 속하는 박테리아는 비피도박테리움 애니말리스 (*B. animalis*), 비피도박테리움 비피덤 (*B. bifidum*), 비피도박테리움 브레브 (*B. breve*), 비피도박테리움 인판티스 (*B. infantis*), 비피도박테리움 롱검 (*B. longum*), 비피도박테리움 아돌레센티스 (*B. adolescentis*), 비피도박테리움 카테놀라툼 (*B. catenulatum*), 비피도박테리움 안굴라툼 (*B. angulatum*), 비피도박테리움 아스테로이데스 (*B. asteroides*), 비피도박테리움 보움 (*B. boum*), 비피도박테리움 코에리눔 (*B. choerinum*), 비피도박테리움 코리네포르메 (*B. coryneforme*), 비피도박테리움 구니쿨리 (*B. cuniculi*), 비피도박테리움 덴티콜렌스 (*B. denticolens*), 비피도박테리움 덴티움 (*B. dentium*), 비피도박테리움 갈리툼 (*B. gallicum*), 비피도박테리움 갈리나툼 (*B. gallinarum*), 비피도박테리움 인디쿰 (*B. indicum*), 비피도박테리움 이노피나툼 (*B. inopinatum*), 비피도박테리움 락티스 (*B. lactis*), 비피도박테리움 마그눔 (*B. magnum*), 비피도박테리움 메리시쿰 (*B. merycicum*), 비피도박테리움 미니멈 (*B. minimum*), 비피도박테리움 슈도카테놀라툼 (*B. pseudocatenulatum*), 비피도박테리움 슈도롱검 (*B. pseudolongum*), 비피도박테리움 풀로룸 (*B. pullorum*), 비피도박테리움 루미난티움 (*B. ruminantium*), 비피도박테리움 사에쿨라레 (*B. saeculare*), 비피도박테리움 셉틸 (*B. subtilis*), 비피도박테리움 서마시도필럼 (*B. thermacidophilum*), 비피도박테리움 서모필러스 (*B. thermophilum*), 비피도박테리움 츠루미엔스 (*B. tsurumiense*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속하며; 더 바람직하게는 바실러스 클라우시이 (*Bacillus clausii*), 바실러스 셉틸리스 (*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아굴란트 (*Bacillus coagulans*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 할로두란스 (*Bacillus halodurans*), 바실러스 투링기엔시스 (*Bacillus thuringiensis*), 바실러스 인솔리투스 (*Bacillus insolitus*) 및 바실러스 마리누스 (*Bacillus marinus*)로부터 선택된다.

[0049] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 프로피오니박테리움 속의 박테리아는, 프로피오니박테리움 셔마니이 (*P. shermanii*), 프로피오니박테리움 아크네스 (*P. acnes*), 프로피오니박테리움 아우스트랄리엔스 (*P. australiense*), 프로피오니박테리움 아비덤 (*P. avidum*), 프로피오니박테리움 사이클로헥사니쿰 (*P. cyclohexanicum*), 프로피오니박테리움 프로이덴라이히 (*P. freudenreichii*), 프로피오니박테리움 그라놀로섬 (*P. granulosum*), 프로피오니박테리움 젠세니 (*P. jensenii*), 프로피오니박테리움 마이크로에어로필럼 (*P. microaerophilum*), 프로피오니박테리움 프로피오니쿰 (*P. propionicum*) 및 프로피오니박테리움 토에니이 (*P. thoenii*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속한다.

[0050] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 스트렙토코커스 속에 속하는 박테리아는 스트렙토코커스 서모필러스 (*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 살리바리우스 (*Streptococcus salivarius*), 스트렙토코커스 아갈락티애 (*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 안지노수스 (*Streptococcus anginosus*), 스트렙토코커스 보비스 (*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스 카니스 (*Streptococcus canis*), 스트렙토코커스 콘스텔라투스 (*Streptococcus constellatus*), 스트렙토코커스 다우네이 (*Streptococcus downei*), 스트렙토코커스 디스갈락티애 (*Streptococcus dysgalactiae*), 스트렙토코커스 에퀴누스 (*Streptococcus equinus*), 스트렙토코커스 페루스 (*Streptococcus ferus*), 스트렙토코커스 인판타리우스 (*Streptococcus infantarius*), 스트렙토코커스 이니아 (*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 인테르메디우스 (*Streptococcus intermedius*), 스트렙토코커스 밀레리 (*Streptococcus milleri*), 스트렙토코커스 미티스 (*Streptococcus mitis*), 스트렙토코커스 무탄스 (*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 오랄리스 (*Streptococcus oralis*), 스트렙토코커스 오리사티 (*Streptococcus orisratti*), 스트렙토코커스 파라상귀니스 (*Streptococcus parasanguinis*), 스트렙토코커스 페로리스 (*Streptococcus peroris*), 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 슈도뉴모니아 (*Streptococcus pseudopneumoniae*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 라티 (*Streptococcus rattii*), 스트렙토코커스 티구리누스 (*Streptococcus tigurinus*), 스트렙토코커스 상귀니스 (*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 소브리누스 (*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스

수이스 (*Streptococcus suis*), 스트렙토코커스 우베리스 (*Streptococcus uberis*), 스트렙토코커스 베스티블라리스 (*Streptococcus vestibularis*), 스트렙토코커스 비리단스 (*Streptococcus viridans*) 및 스트렙토코커스 주에피데미쿠스 (*Streptococcus zooepidemicus*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속한다.

- [0051] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 락토코커스 속에 속하는 박테리아는 락토코커스 중안젠시스 (*L. chungangensis*), 락토코커스 포르모센시스 (*L. formosensis*), 락토코커스 푸이젠시스 (*L. fujiensis*), 락토코커스 가르비에 (*L. garvieae*), 락토코커스 락티스 (*L. lactis*), 락토코커스 피슘 (*L. piscium*), 락토코커스 플란타룸 (*L. plantarum*), 락토코커스 라피노락티스 (*L. raffinolactis*), 락토코커스 타이와넨시스 (*L. taiwanensis*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속한다.
- [0052] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 에어로코커스 속에 속하는 박테리아는 에어로코커스 우리내 (*A. urinae*), 에어로코커스 상귀니콜라 (*A. sanguinicola*), 에어로코커스 크리스텐세니이 (*A. christensenii*), 에어로코커스 수이스 (*A. suis*), 에어로코커스 우리네이퀴 (*A. urinaeequi*) 및 에어로코커스 우리내어호미니스 (*A. urinaehominis*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속한다.
- [0053] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 엔테로코커스 속에 속하는 박테리아는 엔테로코커스 아비움 (*Enterococcus avium*), 엔테로코커스 두란스 (*Enterococcus durans*), 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 엔테로코커스 패슘 (*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 갈리나룸 (*Enterococcus gallinarum*), 엔테로코커스 헤모페록시두스 (*Enterococcus haemoperoxidus*), 엔테로코커스 히래 (*Enterococcus hirae*), 엔테로코커스 말로도라투스 (*Enterococcus malodoratus*), 엔테로코커스 모라비엔시스 (*Enterococcus moraviensis*), 엔테로코커스 문드티이 (*Enterococcus mundtii*), 엔테로코커스 슈도아비움 (*Enterococcus pseudoavium*), 엔테로코커스 라피노수스 (*Enterococcus raffinosus*) 및 엔테로코커스 솔리타리우스 (*Enterococcus solitarius*)로부터 선택되는 하나 이상의 종에 속한다.
- [0054] 본 발명의 추가적인 바람직한 측면에서, 사카로마이세스 속에 속하는 효모는 더 바람직하게는 사카로마이세스 세레비자에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 및/또는 사카로마이세스 보울라르디이 (*Saccharomyces boulardii*) 종의 효소이다.
- [0055] 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은 바람직하게는 생균이다. 후자의 경우, 제조되는 조성물은 또한 프로바이오틱으로서 정의할 수 있다.
- [0056] 다른 예로, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은 사균이거나 또는 간헐 멸균 처리 (tyndallization)된 것이다.
- [0057] 추가적인 구현예에서, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은 동결건조물 및/또는 추출물 형태이다.
- [0058] 후자의 경우, 제조되는 조성물 역시 파라프로바이오틱 (paraprobiotic)으로 정의할 수 있다.
- [0059] 다른 예로, 이러한 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은 박테리아 벽에 엑소폴리사카라이드 (exopolysaccharide)로서 존재하는 개별 구성 성분 또는 수종의 구성 성분들로서 존재할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 추가적인 구현예에서, 조성물은 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물에 의해 생산된 포스트바이오틱스 및/또는 임의의 다른 박테리아-유래 산물로서 정의되는 대사성 바이오산물 (metabolic bioproduct)을 더 포함한다.
- [0061] 따라서, 전술한 조성물은 또한 박테리아 벽의 구성 성분으로 알려진 또는 추정되는 포스트바이오틱 또는 파라프로바이오틱 또는 프로바이오틱으로서 정의될 수 있다.
- [0062] 일반적으로, 본 발명의 조성물에 추가적으로 포함되는 이러한 미생물은 EFSA의 QPS 리스트에 명시된 단일 미생물 또는 임의의 미생물 종들의 조합이다.
- [0063] 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은 위장 통과시 생존할 수 있으며, 따라서 살아서 대장에 도달할 수 있다.

- [0064] 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은, 존재하는 경우, 투여 당 세포, 바람직하게는 박테리아 세포 10억개 내지 3000억개 (필요에 따라서는 그 이상의 수), 더 바람직하게는 500억개 내지 2500억개, 심지어 더 바람직하게는 750억개 내지 1500억개 범위의 양으로 투여된다. 관장제 및/또는 변 이식 (fecal transplantaion)에 의해 적용되는 경우, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은, 존재한다면, 투여/적용 당 세포, 바람직하게는 박테리아 세포/프로바이오틱스/조성물을 1000억개 내지 3000억개, 더 바람직하게는 1500억개 내지 2000억개 범위의 양으로 투여된다.
- [0065] 바람직한 측면에서, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 추가적인 미생물은, 존재하는 경우, 바람직하게는 박테리아는 매일 적어도 1-2회로 투여된다.
- [0066] 본 발명에서 모든 투여 경로가 고려된다. 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 상기한 조성물의 투여는 바람직하게는 경구이며, 더 바람직하게는 환제, 캡슐제, 정제, 과립 분말, 경질 캡슐제 (hard-shelled capsules), 구강 용해성 과립제 (orally dissolving granules), 사세제 (sachets), 로젠지 (lozenges) 또는 마실 수 있는 바이얼 (drinkable vial) 형태이다.
- [0067] 다른 예로, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 상기한 조성물의 투여는 바람직하게는 액체 형태, 바람직하게는 시럽 또는 음료의 형태로 이루어진다.
- [0068] 다른 예로, 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 조성물의 투여는, 식품, 바람직하게는 요거트, 치즈 또는 과일 주스에의 첨가를 통해 이루어진다.
- [0069] 본 발명의 추가적인 측면은, 클로스트리듐 디피실리 감염, 바람직하게는 장 감염 또는 소의 CD-관련 질환 (CDAD) 또는 CD 감염 (CDI)과 관련된/연관된 생리병리학적 병태를 예방 및/또는 치료하는데 사용하기 위한, 프로바이오틱스, 바람직하게는 락토바실러스, 비피도박테리움, 바실러스, 프로피오니박테리움, 스트렙토코커스, 락토코커스, 에어로코커스, 엔테로코커스 및 이들의 조합으로부터 선택되는 속에 속하는 박테리아를 포함하는 프로바이오틱스, 또는 이들 프로바이오틱스를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 이들 프로바이오틱 또는 조성물은 국소적으로, 바람직하게는 직장 투여에 의해 바람직하게는 관장제로서, 바람직하게는 변 세균총 이식에 의해 작용을 발휘하는 방식으로 제형화된다.
- [0070] 박테리아는 바람직하게는 박테리아 균주 락토바실러스 카세이 DG[®] 및/또는 박테리아 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및/또는 진술한 조성물이다.
- [0071] 프로바이오틱스 또는 진술한 조성물의 제형은 프로바이오틱 및/또는 약제학적 제품 제조에 일반적으로 허용되는 부형제를 더 포함한다.
- [0072] 본 발명의 바람직한 측면에서, 프로바이오틱스 또는 조성물의 제형은 고화 방지제 (anti-caking agent), 바람직하게는 규소 다이옥사이드 및/또는 마그네슘 스테아레이트를 더 포함한다.
- [0073] 본 발명의 바람직한 측면에서, 조성물은 코팅제, 바람직하게는 젤라틴을 더 포함한다.
- [0074] 본 발명의 추가적인 구현예에서, 프로바이오틱스 또는 조성물의 제형은 비타민, 미량 원소, 바람직하게는 아연 또는 셀레늄, 효소 및/또는 프로바이오틱 물질, 바람직하게는 프럭토-올리고당 (FOS), 갈락토-올리고당 (GOS), 이눌린, 구아르 검 또는 이들의 조합을 더 포함한다.
- [0075] 본 발명의 바람직한 측면에서, 프로바이오틱스 또는 조성물의 제형은 추가적인 치료학적 방식, 바람직하게는 약리학적 또는 사회-행동 (socio-behavioral) 타입, 바람직하게는 식습관 (diet) 및/또는 건강한 생활방식과 조합 또는 병용될 수 있다.
- [0076] **실시예**
- [0077] 아래 실시예에서 사용된 병원체는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 입수가가능하였으며, 균주 클로스트리듐 디피실리 ATCC 43255 - VPI 10463에 속한다.
- [0078] 검사 균주는 다음과 같다:

- [0079] 1) 락토바실러스 카세이 DG[®] (락토바실러스 파라카세이 CNCM I-1572),
- [0080] 2) 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01; 및
- [0081] 3) 락토바실러스 카세이 DG[®]와 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01의 1:1 조합 (혼합물).
- [0082] 4) 락토바실러스 람노수스 ATCC53103 ("시판" 양성 대조군)
- [0083] 박테리아 균주를 Rogosa 아가 (락토바실러스 카세이 및 락토바실러스 파라카세이) 및 BHI (Brain Heart Infusion) (클로스트리듐 디피실리)에서 배양하였다.
- [0084] 락토바실러스 균주가 CDIF에 저해 활성을 발휘하는 능력을 검증하기 위한 목적.
- [0085] 프로바이오틱스가 장 상피 세포에 부착하는 능력을 검증하기 위한 부착 검사
- [0086] 점액을 생산할 수 있는 인간 장 상피 세포주의 예로서 HT29-MTX-E12 (ECACC)를 사용하였다. 구체적으로, 세포를 글루코스가 고 농도로 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 컨플루언트 단일층을 형성할 때까지 배양하였다. DMEM에는 10% 소 태아 혈청, 50 µg/ml 겐타마이신 설페이트 및 2 mM L-글루타민을 첨가하였다. 세포는 배양기에서 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 유지시켰다.
- [0087] 부착 검사 수행 전, 세포를 헵크의 평형 염 용액 (Hank's Balanced Salt Solution)으로 헵구고, 트립신 처리한 다음 재현탁하고 1회용 혈구계 (hemocytometer)를 사용해 수를 측정하여 멀티웰 플레이트에 기지 농도로 접종할 수 있게 하였다. 부착 검사를 수행하기 전에, 세포를 2일간 배양하여 컨플루언트 단일층을 형성시켰다.
- [0088] 부착 검사 당일, 사용된 배지는 제거하고, 단일층을 식염수액 (헵크의 평형 염 용액)으로 헵균 다음, 항생제 또는 글루타민 비-첨가 및 1% 소태아 혈청 첨가 DMEM 배지를 세포에 첨가하였다. 세포 단일층을 1시간 동안 37°C 및 5% CO₂에서 배양한 다음 박테리아와 접촉시켰다. 이러한 과정은 검사를 방해할 수 있는 어떠한 항생제의 잔류도 허용하지 않는다.
- [0089] 이후, 세포를 "감염"시켰으며, MOI (감염 다중도) 1:10 (세포:박테리아)이 관찰되었다.
- [0090] 컨플루언스에 도달한지 48시간 후, 세포를 헵구고, 감염 다중도 1:10 (MOI, 상피 세포:박테리아)로 시험 박테리아 균주 (단일 균주 또는 전술한 조합 균주들)가 함유된 DMEM에서 함께 배양하였다.
- [0091] 감염은 37°C에서 60분간 수행하였으며, 세포와의 접촉에 도움이 되도록 플레이트를 약간 교반하였다.
- [0092] 배양이 끝나면, 배양 배지는 버리고, 세포를 멸균 DMEM으로 세척하여 비-부착 박테리아는 제거하고, MRS 아가 배지 플레이트에 접종하여 37°C에서 혐기 배양한 연속 희석물을 이용한 생존가능한 미생물 카운트에 의해 부착 박테리아를 정량하였다.
- [0093] 부착 배제 검사 (배제 / 예비-배양)
- [0094] 웰 당 HT29 세포의 수가 결정되면, 락토바실러스 파라카세이 균주를 각각 그리고 1:1 비율 (혼합물)의 조합물로 첨가하였다.
- [0095] 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다.
- [0096] 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 세포는 멸균 배지로 세척하여 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하였다.
- [0097] 그런 후, CDIF (MOI 1:10)를 단일층에 첨가하고, 세포를 60분간 37°C에서 배양하였다.
- [0098] 배양 후, 배양 배지를 제거하고, 비-부착 박테리아를 멸균 배지로 세척하여 제거하였다.
- [0099] HT29 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 먼저 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음, 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 미생물 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다.
- [0100] 락토바실러스 파라카세이 균주와 예비-배양하지 않고 CDIF 단독을 접종한 HT29 세포를 양성 대조군으로 사용하였으며, 임의 박테리아와 함께 배양하지 않은 세포를 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.
- [0101] 경쟁적인 부착 검사 (경쟁 / 공동-배양)

- [0102] 웰 당 HT29-MTX 수를 결정한 후, 락토바실러스 파라카세이 균주 2종 (각각, 그리고 1:1 비율의 조합물)을 CDIF와 동시에 첨가하였다.
- [0103] 박테리아를 전체 MOI 1:10으로, 그리고 프로바이오틱:병원체 비율 1:1로 첨가하였다. 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다.
- [0104] 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 세포는 멸균 배지로 세척하여 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하였다.
- [0105] HT29 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 먼저 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 미생물 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다.
- [0106] CDIF 단독 접종된 HT29 세포를 양성 대조군으로 사용하였으며, 임의의 박테리아와 함께 배양하지 않은 세포를 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.
- [0107] 부착 박테리아 제거 검사 (대체 / 배양-후)
- [0108] 웰 당 HT29-MTX 세포 수를 결정한 후, CDIF를 첨가하였다 (MOI 1:10). 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다.
- [0109] 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 단일층에 부착되지 않은 박테리아는 멸균 배지로 반복 세척하여 제거하였다. 그런 후, 락토바실러스 파라카세이 균주 2종 (각각, 그리고 1:1 비율의 조합물)을 프로바이오틱:부착 병원체 비율 1:1로 동시에 첨가하였다.
- [0110] 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다. 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 세포는 멸균 배지로 세척하여 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하였다.
- [0111] 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 먼저 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 미생물 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다.
- [0112] CDIF 단독 접종된 HT29-MTX 세포를 양성 대조군으로 사용하였으며, 임의의 박테리아와 함께 배양하지 않은 세포를 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.
- [0113] 결과
- [0114] 결과를 도 1A 및 1B에 요약 개시하며, 하기와 같이 확인되었다:
- [0115] 1) 균주 락토바실러스 카세이 DG[®]는 세포를 병원체 단독과 배양한 경우와 비교해 CDIF의 부착율을 약 7% 직접 감소시키는 약한 수준의 감소력을 나타낸 반면, 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01은 CDIF를 경쟁적으로 배제하는데 더 높은 효과를 나타내었다 (부착율 22% 감소). 균주 혼합물은 저해 능력을 강화하여, CDIF의 부착율을 약 31% 감소시킬 수 있는 것으로 입증되었다 (도 1A).
- [0116] 2) 균주 락토바실러스 카세이 DG[®]는 세포를 병원체 단독과 배양한 경우와 비교해 CDIF의 부착율을 약 27% 감소시키는 중간 수준의 감소력을 나타낸 반면, 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01은 CDIF를 경쟁적으로 "제거"하는 유의한 효과를 나타내었다 (부착율 75% 감소) (도 1B).
- [0117] 실시예 2
- [0118] 본 실험의 균주를 동일한 목적으로 고안된 시판 제품과 비교하였다.
- [0119] 동일 균주에 사용한 병원체는 이전 실시예에서 사용된 것이다.
- [0120] 제품 Bio-K+는 락토바실러스 엑시도필러스 CL1285, 락토바실러스 카세이 LBC80R 및 락토바실러스 람노수스 CLR2의 혼합물을 98 g 용기 당 50,000,000,000 cfu의 공표된 농도로, 즉 공표된 농도 5.0×10^{10} CFU/98 g (5.1×10^8 CFU/g)으로 포함한다.
- [0121] 이 제품에 대해, 실제 락토바실러스 총 농도를 정량하기 위해, 선별 배지에서 (ISTISAN 방법 08/36) 십진법 카운트 (decimal count)를 수행하였다. 생 세포 및 생존가능한 세포의 농도는 1.2×10^9 CFU/g이었으며, 즉 계산

된 이론적인 농도의 약 2배였다.

[0122] 부착 배제 검사 (배제 / 예비-배양)

[0123] 웰 당 HT29 세포의 수를 결정한 후, 병원체/프로바이오틱 MOI 1:10으로 제품을 단일층에 첨가하였다. 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다. 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하기 위해 멸균 배지로 세척하였다. 그런 후, CDIF를 단일층 (MOI 1:10)에 첨가하고, 세포를 37°C에서 60분간 배양하였다.

[0124] 배양 완료 후, 배양 배지를 제거하고, 비-부착 박테리아는 멸균 배지로 헹구어 제거하였다. HT29 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 박테리아 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다.

[0125] 상기 제품과 예비-배양하지 않고 CDIF 단독을 접종한 HT29 세포 웰을 양성 대조군으로 사용하였고, 어떠한 박테리아와도 배양하지 않은 세포 웰을 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.

[0126] 경쟁적인 부착 검사 (경쟁 / 공동-배양)

[0127] 웰 당 HT29-MTX 세포의 수를 결정한 후, 제품을 CDIF와 동시에 첨가하였다. 박테리아는 MOI 1:10으로 첨가하였다. 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다. 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하기 위해 세포를 멸균 배지로 세척하였다. 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 박테리아 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다. CDIF 단독을 접종한 HT29 세포 웰을 양성 대조군으로 사용하였고, 어떠한 박테리아와도 배양하지 않은 세포 웰을 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.

[0128] 부착성 병원체의 제거 검사 (대체/배양 후)

[0129] 웰 당 HT29-MTX 세포의 수를 결정한 후, CDIF를 첨가하였다 (MOI 1:10). 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다.

[0130] 배양이 끝나면, 배지를 제거하고, 단일층에 부착되지 않은 박테리아는 멸균 배지로 반복 세척하여 제거하였다. 그런 후, 제품을 통상적으로 박테리아/세포 10:1의 비율로 첨가하였다. 박테리아를 60분간 약간 교반하면서 37°C에서 유지시킨 세포와 접촉된 상태로 두었다. 배양 완료 후, 배지를 제거하고, 단일층에 부착되지 않은 박테리아를 제거하기 위해 세포를 멸균 배지로 세척하였다. 세포에 부착된 CDIF를 정량하기 위해, 세포를 탈착시켜 세포용해 처리한 다음 클로스트리듐 디피실리 선별 아가에 접종하여 37°C에서 48-72시간 동안 혐기 배양한 후 생존가능한 박테리아 카운트에 의해 박테리아를 정량하였다. CDIF 단독을 접종한 HT29-MTX 세포 웰을 양성 대조군으로 사용하였고, 어떠한 박테리아와도 배양하지 않은 세포 웰을 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.

[0131] 결과

[0132] 도 2A에 나타낸 결과는 HT29-MTX 세포를 프로바이오틱 검사 제품과 접촉시켜 사전-자극한 후 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF의 부착율을 나타낸 것이다. 즉, 프로바이오틱스에 의한 자극이 없는 조건에서의 CDIF 부착율을 100%로 설정하고, 시험 균주의 저해 능력을 양성 대조군 대비 CDIF 부착율 감소 %로 나타내었다.

[0133] 알 수 있는 바와 같이, 검사 제품은 저해 능력을 강화함으로써, CDIF 부착율에 대해 90%에 해당하는 매우 높은 수준의 저해를 달성할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0134] 아울러, CDIF와의 공동-배양하는 경우 만일 존재한다면 프로바이오틱스에 의해 발휘되는 경쟁적인 저해 효과를 평가하기 위해, 세포주에 프로바이오틱스와 병원체를 동시 처리한 후 HT29-MTX 세포에 대한 CDIF의 부착율 감소 가능성을 검증하였다.

[0135] CDIF 단독을 접종한 HT29 세포 웰을 양성 대조군으로 사용하였고, 어떠한 박테리아와도 배양하지 않은 세포 웰을 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.

[0136] 도 2B에 나타낸 결과는 HT29-MTX 세포를 CDIF 및 여러가지 검사 프로바이오틱스와 공동-배양한 후 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF의 부착율을 나타낸 것이다. 앞서 언급한 바와 같이, 프로바이오틱스에 의한 비-자극 조건에서의 CDIF 부착율을 100%로 설정하고, 시험 균주의 저해 능력을 양성 대조군 대비 CDIF 부착

을 감소 %로 나타내었다.

- [0137] 알 수 있는 바와 같이, 검사 제품은 저해 능력을 강화함으로써, CDIF 부착율을 약 30% 감소시킬 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0138] 마지막으로, 세포주에 병원체를 전처리한 다음 비-부착성 병원체를 제거하고 프로바이오틱스와 후속 배양하였을 때, HT29-MTX 세포에 대한 CDIF의 부착 감소가 있는지를 검증하였다.
- [0139] CDIF 단독을 접종한 HT29 세포 웰을 양성 대조군으로 사용하였고, 어떠한 박테리아와도 배양하지 않은 세포 웰을 음성 대조군 (무균 검사)으로 사용하였다.
- [0140] 도 2C에 나타낸 결과는, 진핵생물 세포에 CDIF를 기회 감염시킨 다음, HT29 세포를 다양한 프로바이오틱 검사 제품과 함께 배양한 후 부착성 생 세포 및 생존가능한 세포의 %로서 CDIF의 부착성을 나타낸 것이다. 앞서 언급한 바와 같이, 프로바이오틱스 부재 조건에서의 CDIF 부착율을 100%로 설정하고, 시험 균주의 저해 능력을 양성 대조군 대비 CDIF 부착율 감소 %로 나타내었다.
- [0141] 알 수 있는 바와 같이, 제품은 저해 능력을 매우 약간 강화함으로써, CDIF 부착율을 약 8% 감소시키는 것으로 확인되었다.
- [0142] 아래 표는 3가지 검사 프로토콜에서 초기 병원체 로드 약 1.0×10^6 CFU 대비 2번의 연속 검사에서 취득된 CDIF 카운트 범위를 요약 개시한다.

표 1

Bio-k+ 저해 활성	3종의 검사 범위
클로스트리듐 디피실리 단독	1.0×10^3 - 1.4×10^3
공동-배양 프로토콜	5.1×10^2 - 9.0×10^2
예비-배양 프로토콜	1.0×10^2 - 1.4×10^2
배양 후 프로토콜	8.0×10^2 - 1.1×10^3

[0144] 이전 실험의 대상이었던 균주 락토바실러스 카세이 DG[®], 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 및 이들 2가지 균주의 혼합물과 관련한 본 실험에서 취득된 결과를 비교한 바, 하기와 같은 프로파일을 도출할 수 있었다:

[0145] 부착 배제 검사 (진핵생물 세포를 프로바이오틱스로 전처리한 다음 병원체를 첨가하여 배양)

표 2

박테리아 균주/제품	CDIF 부착의 감소 %
락토바실러스 카세이 DG	20
락토바실러스 파라카세이 S01	0
DG + S01 1:1 혼합물	46
Bio-K+	90
락토바실러스 람노수스 ATCC53103	12

[0147] 경쟁적인 부착 검사 (진핵생물 세포를 프로바이오틱스 및 병원체와 함께 배양)

표 3

박테리아 균주/제품	CDIF 부착의 감소 %
락토바실러스 카세이 DG	7
락토바실러스 파라카세이 S01	22
DG + S01 1:1 혼합물	31
Bio-K+	30
락토바실러스 람노수스 ATCC53103	0

[0149] 부착 병원체 제거 검사 (진핵생물 세포에 병원체를 전처리한 다음 프로바이오틱과 배양)

표 4

박테리아 균주/제품	CDIF 부착의 감소 %
락토바실러스 카세이 DG	27
락토바실러스 파라카세이 S01	75
DG + S01 1:1 혼합물	57
Bio-K+	8
락토바실러스 람노수스 ATCC53103	70

[0151] 3개의 표에서 나타난 전체적인 결과는 다음과 같다:

[0152] 1) 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01이 가장 효과적이며; 특히 대체 검사에서, CDIF에 대해 가장 우수한 저해능을 나타내었다 (75%). 즉, 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01은, 병원체 CD가 세포에 부착되는 것을 방지하는 예방적인 기능만 수행하는 시판 검사 제품과는 다르게, 병원체가 부착된 후 작용하여 이를 제거하며; 이 경우, 시험 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01은 또한 병원체 CD가 이미 부착된 경우에도 작용하며;

[0153] 2) 락토바실러스 카세이 DG[®] + 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01의 1:1 조합은 세포주에 대한 CDIF의 부착능을 감소시키는데 있어 흥미로운 상승적인 효과를 나타내었다. 이 조합은 전처리 프로토콜 및 공동-배양 프로토콜에서 개개 균주들과 비교해 유의한 것으로 드러났으며, 대체 검사에서는 균주 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01이 2가지 프로바이오틱스의 조합 보다 더 효과적인 것으로 입증되었다.

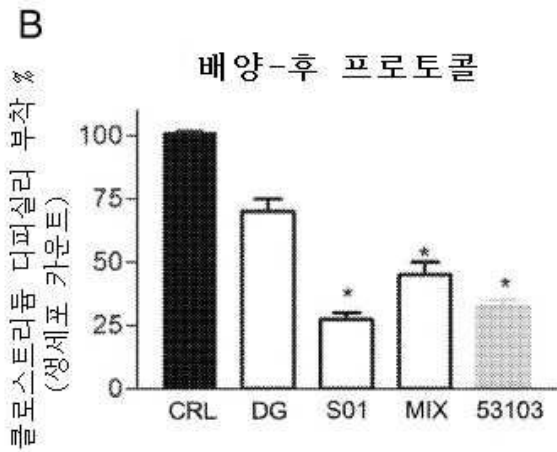
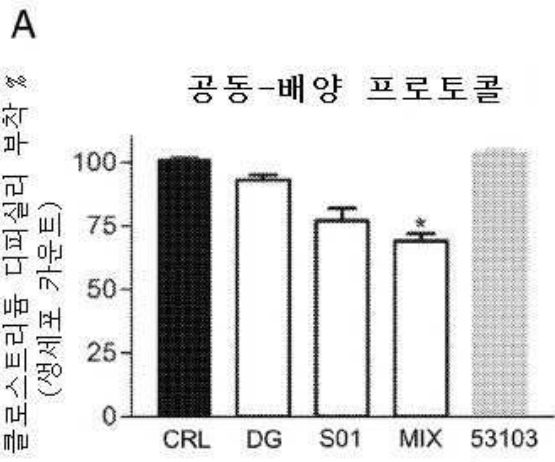
수탁번호

[0154] 기탁기관명 : DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
 수탁번호 : DSM26760
 수탁일자 : 20130111

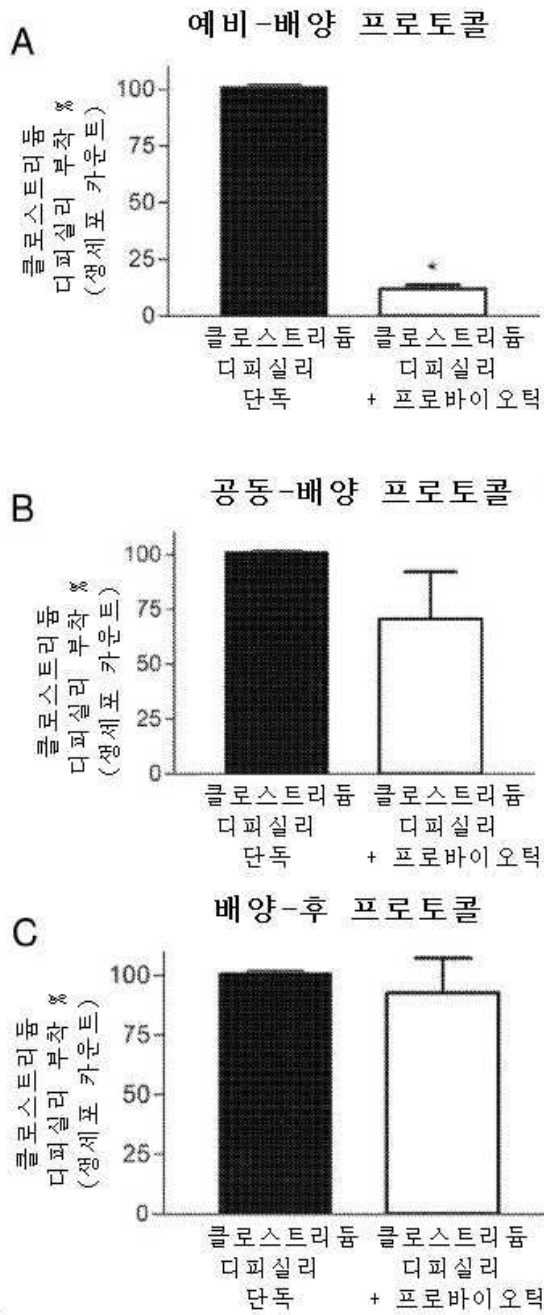
기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
 수탁번호 : I-1572
 수탁일자 : 19950505

도면

도면1



도면2



도면3

