

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0107541

(43) 공개일자 2022년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0010296

(22) 출원일자 2021년01월25일

심사청구일자 2021년01월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임영희

서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호 (홍제동, 홍제한양아파트)

염지아

서울특별시 성북구 고려대로 30, 수산리빙텔 601호 (안암동2가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

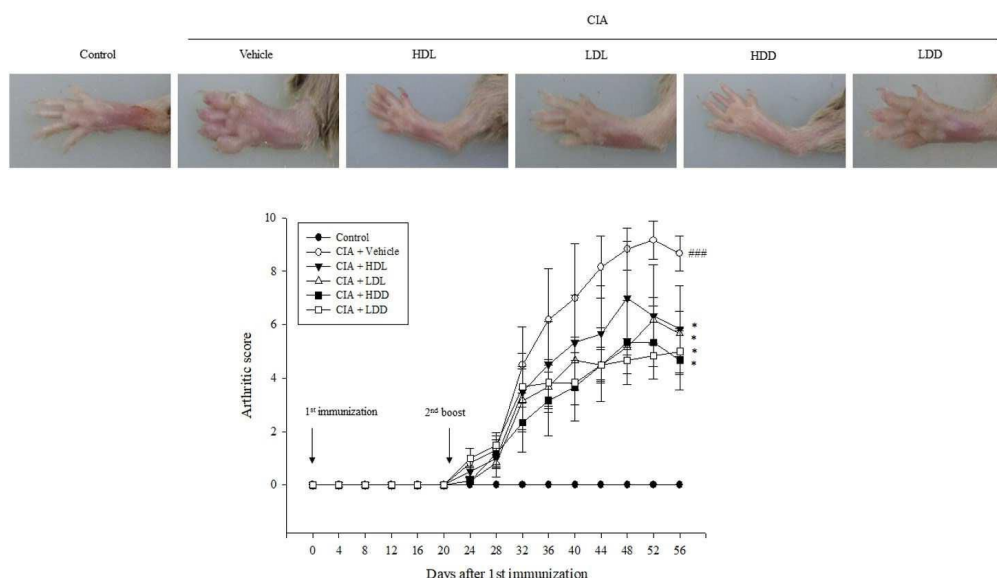
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방, 치료, 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) MJ2 균주를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 장기간 투여에도 안전하고, 파골세포 분화, 염증반응, 세포사멸, 항체 생성을 억제하면서 오토파지를 정상수준으로 회복시켜 자가면역질환인 류마티스 관절염의 예방, 치료, 및 개선을 위한 의약품, 의약부외용, 기능성 식품용 등 다양한 방법으로 이용될 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23Y 2320/25 (2013.01)

(72) 발명자

마성호

서울특별시 성북구 개운사길 83, 대흥빌딩 304호
(안암동5가)

임동준

서울특별시 성북구 한천로 588 (석관동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109321

과제번호 2019R1A2C108700312

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)(유형1-1)중견연구(연평균연구비 1억원 이내)

연구과제명 프로피오니박테리움 매개 과골세포 분화억제를 통한 류마티스 관절염 개선

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

프로피오니박테리움 프레우덴레키 (*Propionibacterium freudenreichii*) MJ2 (KCCM12272P), 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 함유하는 류마티스관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생균체는 배양배지에서 활성화시킨 MJ2 균주를 30~37℃의 혐기 조건에서 45~50 시간 동안 배양하고, 배양균액을 원심분리하여 수득된 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 사균체는 배양배지에서 활성화시킨 MJ2 균주를 30~37℃의 혐기 조건에서 45~50 시간 동안 배양하고, 열처리 후 수득되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 구강 투여용인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IL-10의 발현을 증가시켜 염증반응을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 파골세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IgG, IgG1, 및 IgG2a의 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포사멸(apoptosis)을 억제하고 오토파지(autophagy)를 정상수준으로 회복하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 생균을 1×10^6 내지 1×10^{10} CFU/mL 농도로 포함하고, 사균을 1×10^6 내지 1×10^{10} cells/mL 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 10

프로피오니박테리움 프레우텐레키 (*Propionibacterium freudenreichii*) MJ2 (KCCM12272P), 이의 배양액, 생균제, 사균제, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 함유하는 류마티스관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 식품은 기능성 식품이고,

상기 조성물은 생균을 1×10^6 내지 1×10^{10} CFU/mL 농도로 포함하고, 사균을 1×10^6 내지 1×10^{10} cells/mL 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우텐레키(*Propionibacterium freudenreichii*) MJ2 균주를 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 류마티스 관절염은 관절 활막의 지속적인 염증반응으로 인해 부종과 통증이 수반되며, 관절 연골의 파괴 및 뼈 손상이 일어나는 만성 전신성 염증성 자가면역질환이다. 대표적인 초기 증상으로 손, 발의 관절이 붓고 통증이 느껴지는 것이 있으며 아침에 관절이 뻣뻣해져 움직임이 힘들어지는 것이 있다. 또한, 관절 이외에 골다공증, 혈관염 및 장기 침범 등의 증상을 동반한다고 알려져 있다.
- [0004] 현재까지 류마티스 관절염 완치제는 개발되지 않았지만, 류마티스 관절염 치료약제로써 비스테로이드성 항염제, 면역억제제, 항류마티스제 등이 쓰이고 있다. 하지만 비스테로이드성 항염제는 통증을 완화시키는 효과를 보이지만 질병의 경과를 막지는 못하고 장기간 복용 시 위장 장애를 일으킬 수 있으며, TNF- α 억제제와 같은 면역억제제는 잠복 결핵과 같은 부작용이 나타날 수 있다.
- [0005] 따라서 상기 약물들을 대체할 수 있는, 류마티스 관절염 증상을 억제하면서 부작용이 적은 신규 치료제 개발이 필요한 실정이다.
- [0006] 최근 들어 유산균의 다양한 효과와 더불어, 유산균이 류마티스 관절염을 억제하는데 효과가 있다고 밝혀지고 있다. 콜라겐으로 관절염을 유도한 모델에서 *Lactobacillus helveticus*의 섭취가 관절염을 억제하는데 효과가 있었으며, 이 밖에 *L. reuteri*, *L. casei*, *L. rhamnosus* 또한 관절염을 완화시키는 효과를 보였다. 관련하여 미생물을 이용한 류마티스 관절염 치료제를 발굴하고자 하는 연구가 계속되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Food & Function, 2020;11(4), 3681-3694
- (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Journal of functional foods, 2015;13, 350-362

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 류마티스관절염을 예방, 개선, 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 (*Propionibacterium freudenreichii*) MJ2 (KCCM12272P), 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2, 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 함유하는 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생균체는 배양배지에서 활성화시킨 MJ2 균주를 30~37℃의 혐기 조건에서 45~50 시간 동안 배양하고, 배양 균액을 원심분리하여 수득되는 것 일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 사균체는 배양배지에서 활성화시킨 MJ2 균주를 35~39℃의 혐기 조건에서 45~50 시간 동안 배양하고, 열처리 후 수득되는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 IL-10의 발현을 증가시켜 염증반응을 억제하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 파골세포의 분화를 억제하는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 IgG, IgG1, 및 IgG2a의 생성을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 세포사멸(apoptosis)을 억제하고 오토파지(autophagy)를 정상수준으로 회복하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{10} CFU/mL농도, 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^9 CFU/mL농도, 더욱 바람직하게는 1×10^8 CFU/mL 농도로 MJ2 생균체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 상기 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{10} cells/mL농도, 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^9 cells/mL농도, 더욱 바람직하게는 1×10^8 cells/mL 농도로 MJ2 사균체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 MJ2 생균체 및 사균체의 혼합일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 1일 1회 투여되는 것일 수 있으며, 구강 투여용일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2, 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 류마티스 관절염의 개선, 예방, 또는 치료 방법을 제공하며, 상기 투여는 구강 투여일 수 있으며, 상기 방법은 투여 단계 이후에 관절의 붓기 정도를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 MJ2 생균체 및/또는 사균체를 개체에 투여하는 것일 수 있고, 상기 MJ2 생균체 및/또는 사균체는 $10^6 \sim 10^{10}$ cells/day, 바람직하게는 $10^7 \sim 10^9$ cells/day, 더욱 바람직하게는 10^8 cells/day 투여하는 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 류마티스 관절염 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2, 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 조성물은 장기간 투여에도 안전하고, 파골세포 분화, 염증반응, 세포사멸 및 오토파지를 정상수준으로 회복하고, 항체 생성을 억제하여 자가면역질환인 류마티스 관절염의 예방, 치료, 및 개선을 위한 의약품, 의약부외용, 기능성 식품용 등 다양한 방면으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명 균주의 염증성 사이토카인 발현 억제를 나타낸 결과이다.
 도 2는 본 발명 균주의 파골세포 분화 인자 발현 억제를 나타낸 결과이다.
 도 3은 본 발명 균주의 파골세포 내 TRAP 활성 억제를 나타낸 결과이다.
 도 4는 본 발명 균주의 항염증성 사이토카인 발현 증가를 나타낸 결과이다.
 도 5는 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 관절염 질환지수를 나타낸 결과이다.
 도 6은 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 micro-CT 이미지(도 6a) 및 지표(도 6b)를 나타낸 결과이다.
 도 7은 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체를 측정된 결과이다.
 도 8은 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 염증성 사이토카인 발현량을 측정된 결과이다.
 도 9는 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 파골세포 분화 유전자 발현량을 측정된 결과이다.
 도 10은 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 세포사멸 단백질 발현량을 측정된 결과이다.
 도 11은 본 발명 균주를 경구 투여한 마우스 모델에서의 오토파지 단백질 발현량을 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 (*Propionibacterium freudenreichii*)는 치즈의 발효 연구에서 최초로 동정되어 주로 우유 및 유제품에서 확인할 수 있다. 최근 *P. freudenreichii*이 대장 표면에 부착하여 사이토카인 방출을 조절하여 대장염의 치료에 효과가 있음이 밝혀진바 있다.

[0032] 본 발명자들이 이용한 *P. freudenreichii*는 한국미생물보존센터에 기탁된 *P. freudenreichii* MJ2 strain(KCCM12272P)이다.

[0033] 본 발명자들은 *P. freudenreichii* MJ2 strain이 생체 외(in vitro)에서 항염증성 사이토카인 IL-10의 발현을 증가 효과와 동시에 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인하고, 콜라겐 유도 동물모델에서 MJ2 균주가 류마티스 관절염을 예방할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0034] 구체적으로, 본 발명자들은 Raw 264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도하였다. LPS와 함께 *P. freudenreichii* MJ2 사균을 다양한 농도로 처리하고 염증성 사이토카인(IL-6, TNF- α , IL-1 β , 및 MMP9)의 발현 수준을 확인한 결과, 1×10^7 cells/mL의 MJ2 사균을 처리한 그룹에서 유의한 사이토카인 발현 감소를 확인할 수 있었다(실시예 2).

[0035] 또한, 본 발명자들은 Raw 264.7 대식세포에 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하였고, RANKL과 함께 *P. freudenreichii* MJ2 사균을 다양한 농도로 처리하여 파골세포 분화 마커(MMP9, RANK, c-fos, NFATc1, Calcr, Ctsk)의 발현 수준을 확인한 결과, 1×10^6 cells/mL 및 1×10^7 cells/mL 농도의 MJ2 사균 처리시 파골세포 분화 마커의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터 MJ2 사균에서 파골세포 분화 억제 활성이 있음을 알 수 있었으며, 본 발명자들은 Tartrate-Resistant Acid Phosphate (TRAP) 염색법을 이용하여 MJ2 사균의 파골세포 분화 억제 활성을 재확인하였다(실시예 3).

[0036] 또한, 본 발명자들은 MJ2 사균이 파골세포 분화 억제와 함께 염증반응을 억제하는 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현을 증가시킴을 확인하였다(실시예 4).

- [0037] 이어서, 본 발명자들은 *In vitro* 에서 파골세포의 분화 억제 및 항염증 활성이 확인된 MJ2 사균이 경구투여 약물 또는 식품에 포함되어 류마티스 관절염을 예방할 수 있는지 확인하고자 하였다. 구체적으로 MJ2 생균과 사균을 저농도 또는 고농도로 3주간 마우스에 구강투여하고 콜라겐으로 관절염을 유도하고, 무릎 관절과 발에서의 관절염 증상을 관찰하고 CT 촬영 이미지 분석으로부터 MJ2 생균 및/또는 사균에서 관절염 증상이 경미함을 확인하였다(실시예 5-1 및 5-2).
- [0038] 또한, 본 발명자들은 혈청학적으로 자가면역질환인 류마티스 관절염 증상 정도를 확인하기 위하여 혈장 내의 각 IgG의 양을 측정된 결과, MJ2 투여군에서 콜라겐 항원 특이적 total IgG 항체 및 IgG2a 항체의 농도가 비투여군보다 현저하게 낮음을 확인할 수 있었다(실시예 5-3). 상기 결과로부터 MJ2 생균 및/또는 사균이 류마티스 관절염을 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [0039] 또한, 저농도의 MJ2 생균 또는 사균의 투여군에서 유의한 비장지수(spleen index) 감소를 확인할 수 있었으며, MJ2 사균 투여군에서 유의한 IL-6 발현 감소를 확인할 수 있었고, 생균 또는 사균 MJ2 투여군은 모든 농도에서 유의한 TNF- α 감소와 IL-10 증가를 확인할 수 있었으며, 특히 고농도 MJ2 사균 처리군에서 현저한 TNF- α 감소를 확인할 수 있었고, 저농도 MJ2 생균 처리군에서 현저한 IL-10 증가를 확인할 수 있었다(실시예 5-4). 상기 결과로부터, MJ2 생균 및/또는 사균이 염증반응을 억제하여 류마티스 관절염을 개선 및 치료할 수 있음을 알 수 있다.
- [0040] 또한, MJ2 생균 및 사균은 *in vivo*에서도 파골세포 분화를 억제할 수 있으며, 활막 주변의 세포의 세포사멸(apoptosis)을 감소시키고 오토파지(autophagy)를 정상수준으로 회복시킴을 알 수 있다(실시예 5-5 내지 실시예 5-7). 상기 결과로부터 MJ2 생균 및/또는 사균이 염증반응이 유도되는 활막 주변의 세포의 생존율을 증가시켜 류마티스 관절염의 진행을 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0041] 이에, 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우텐레키 MJ2, 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 함유하는 류마티스관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산, 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 “예방”이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 본 발명에서 “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0046] 본 발명에서 “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0048] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001

내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 류마티스 관절염의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 조절 또는 치료 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명에서 "개체"란 질병의 예방, 조절 또는 치료방법을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0051] 또한, 본 발명은 *P. freudenreichii* MJ2, 이의 배양액, 생균체, 사균체, 또는 이들의 혼합을 유효성분으로 포함하는, 류마티스 관절염 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 류마티스 관절염의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시 본 발명의 화합물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0052] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0053] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 내지 0.20 g, 바람직하게는 약 0.04 내지 0.10 g 이다.

[0054] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0056] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0058] [실시예]

[0059] 실시예 1: *Propionibacterium freudenreichii* MJ2의 생균 및 사균 제조

[0060] 본 발명에서 사용한 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 (KCCM12272P)는 한국미생물보존센터에 기탁한 균을 사용하였다. *P. freudenreichii* MJ2는 경기도 김포 목장으로부터 조달한 raw milk에서 single colony를 3회 purification 하는 과정을 통해 후보균주를 선정한 뒤, 16s rDNA sequencing을 이용해 동정한 균을 기탁한 균주이다.

[0061] *Propionibacterium freudenreichii* MJ2의 생균 및 사균을 제조하기 위하여, 배지 RCM(Reinforced Clostridial Medium)에 3차레 이상 활성화시킨 균을 접종 후, GasPak (Franklin lakes, NJ, USA)을 이용해 혐기 환경을 조성하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 균액을 3,000 rpm에서 원심분리시켜 생균을 모으고, 생리식염수 (PBS, Phosphate-buffered saline)에 10^8 CFU/mL가 되도록 희석하여, 가열처리를 통해 사균을 제조하였다.

[0063] **실시예 2: *P. freudenreichii* MJ2 사균의 염증성 사이토카인 발현 억제능 측정**

[0064] 2-1. 대식세포(Macrophage) 배양 및 *P. freudenreichii* MJ2 사균의 처리

[0065] 대식세포(Macrophage) 세포주인 Raw 264.7 cell line을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 10% FBS (Fetal bovine serum), 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37℃ incubator에 5% CO₂-95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 약 80% confluent 하게 자라면 scraper를 이용하여 세포를 떼어내고, 2.5×10^5 cells/mL로 맞춘 후, 6 well에 2 mL씩 접종하였다. 37℃ incubator에서 하루 동안 안정화시킨 후, 100 ng/mL LPS (Lipopolysaccharides)와 *P. freudenreichii* MJ2 사균 (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cells/mL)을 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

[0067] 2-2. *P. freudenreichii* MJ2 사균의 염증성 사이토카인 발현 억제능 측정

[0068] 상기 실시예 2-1에서 LPS와 MJ2 사균을 처리하여 배양한 대식세포 배양 상등액을 제거하고 Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit(Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 전환시킨 후, DyNamo췌HS SYBR Green qPCR kit(FINZYMES, Finland) 시약으로 Applied Biosystems 7500(AppliedBiosystems, FosterCity, CA, USA) 기계를 사용하여 95℃에서 10분간 pre-heating한 후, 95℃에서 15초간, 60℃에서 15초간, 72℃에서 30초간 40회 사이클링 과정으로 Real-Time PCR을 진행하였다. 사용된 primers의 sequences는 하기 표 1과 같다.

표 1

유전자	Forward (5' -3')	Reverse (5' -3')
<i>GAPDH</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CACATTGGGGGTAGGAACAC
<i>IL-6</i>	TTTCTCCACGCAGGAGACTT	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
<i>TNF-α</i>	AAGATGGAGGAAGGGCAGTT	GATCCTGGAGGGAAGAGAC
<i>IL-1β</i>	CAGGCAGGCAGTATCACTCA	AGCTCATATGGGTCCGACAG
<i>MMP9</i>	GAAGGCAAACCTGTGTGTT	AGAGTACTGCTTGCCAGGA

[0070] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 one-way ANOVA를 통해 분석한 결과, *P. freudenreichii* MJ2 사균 1×10^7 cells/mL를 처리한 그룹이 LPS만 처리한 그룹에 비해 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-α, IL-1℃, 및 MMP9) 유전자들의 발현이 유의하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0072] **실시예 3: *P. freudenreichii* MJ2 사균의 파골세포(Osteoclast) 분화 억제능 측정**

[0073] 3-1. 파골세포 배양 및 *P. freudenreichii* MJ2 사균의 처리

[0074] 대식세포 세포주인 Raw 264.7 cell line에 50 ng/mL Receptor activator of nuclear factor kappa-℃ ligand (RANKL)을 4일간 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하였다. Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification(α-MEM) 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37℃ incubator에 5% CO₂-95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluent하게 자라면 scraper를 이용하여 세포를 떼어내고, 1×10^4 cells/mL로 맞춘 후, 12 well에 1 mL씩 접종하였다. 37℃ incubator에서 하루 동안 안정화시킨 후, RANKL과 *P. freudenreichii* MJ2 사균 (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 cells/mL)을 처리하여 4일 동

안 배양하였다.

[0076] 3-2. *P. freudenreichii* MJ2 사균의 파골세포 분화 인자 발현 억제능 측정

[0077] 상기 실시예 3-1에서 RANKL과 MJ2 사균을 처리하여 배양한 대식세포 배양 상등액을 제거하고 Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit를 이용하여 cDNA로 conversion한 후, DyNamo[®]HS SYBR Green qPCR kit 시약으로 Applied Biosystems 7500 기계를 사용하여 Real-Time PCR을 진행하였다. 사용된 primers의 sequences는 하기 표 2과 같다.

표 2

유전자	Forward (5' -3')	Reverse (5' -3')
<i>MMP9</i>	GAAGGCAAACCTGTGTGTT	AGAGTACTGCTTGCCAGGA
<i>RANK</i>	TGCAGCTCAACAAGGATACG	GAGCTGCAGACCACATCTGA
<i>c-fos</i>	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGAGTA
<i>NFATc1</i>	GGTGCTGTCTGGCCATAACT	GCGGAAAGGTGGTATCTCAA
<i>Calcr</i>	CGGACTTTGACACAGCAGAA	GTCACCTCTGGCAGCTAAG
<i>Ctsk</i>	CAGCTTCCCCAAGATGTGAT	AGCACCAACGAGAGGAGAAA
<i>OPG</i>	CTGCCTGGGAAGAAGATCAG	TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC
<i>RANKL</i>	AGCCGAGACTACGGCAAGTA	GCGCTCGAAAGTACAGGAAC

[0079] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 *P. freudenreichii* MJ2 사균 1×10^6 cells/mL와 1×10^7 cells/mL를 처리한 그룹이 RANKL만 처리한 그룹에 비해 파골세포 분화 관련 유전자들의 발현량이 유의하게 감소하였다.

[0081] 3-3. *P. freudenreichii* MJ2 사균의 파골세포 내 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 활성 억제능 측정

[0082] TRAP는 파골세포로 분화 중 발현되는 효소로 TRAP 염색을 통해 파골세포의 분화 정도를 확인할 수 있다. 이에, 상기 실시예 3-1에서 RANKL과 MJ2 사균을 처리하여 배양한 대식세포 배양 상등액을 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후 고정하였다. Premix된 기질인 NABP/FRVLB에 sodium tartrate를 넣어준 뒤, 해당 용액으로 파골세포의 TRAP을 37℃에서 30분간 염색하였다. 상등액을 제거하고 세포를 증류수로 세척한 후, 광학현미경을 통해 핵이 3개 이상인 파골세포를 관찰하였다. TRAP 활성을 측정하기 위해 고정된 세포를 sodium tartarate와 para-Nitrophenylphosphate (pNPP)가 포함된 citrate buffer에 배양한 후, reaction mixture를 NaOH를 통해 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 단백질 정량을 통해 보정하였다.

[0083] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 *P. freudenreichii* MJ2 사균을 처리한 그룹이 RANKL만 처리한 그룹에 비해 TRAP이 활성화된 파골세포의 수 및 TRAP 활성이 유의하게 감소하였다. 상기 결과로부터 *P. freudenreichii* MJ2 사균의 처리에 따라 파골세포 분화가 억제됨을 알 수 있다.

[0085] 실시예 4: *P. freudenreichii* MJ2 사균의 Interleukin-10(IL-10) 발현 증가능 측정

[0086] IL-10은 대표적인 항염증성 사이토카인으로서 염증반응을 억제할뿐만 아니라 파골세포 분화의 주요인자인 Nuclear factor of activated T-cells c1(NFATc1)의 발현을 억제하여 파골세포의 분화를 막는다고 알려져있다. *P. freudenreichii* MJ2 사균에 의한 IL-10 발현량을 측정하기 위해 상등액을 취한 후, ELISA 방법을 실시하였다.

[0087] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 *P. freudenreichii* MJ2 사균 1×10^6 cells/mL과 1×10^7 cells/mL을 처리한 그룹이 RANKL만 처리한 그룹에 비해 IL-10 발현량이 유의하게 증가하였다.

[0089] 실시예 5: *P. freudenreichii* MJ2 사균의 류마티스 관절염 예방 효능 평가

[0090] 5-1. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서의 질환지수 평가

[0091] *P. freudenreichii* MJ2를 관절염 유도 전, 3주간 구강투여를 통해 DBA/1 마우스에 직접 주입하고 콜라겐으로 관절염을 유도하였다. 그룹은 PBS를 먹인 후 관절염을 유도하지 않은 그룹(Control), PBS를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(Vehicle), *P. freudenreichii* MJ2 생균 고농도 1×10^8 CFU/mL를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(High-dose Live; HDL), *P. freudenreichii* MJ2 생균 저농도 1×10^7 CFU/mL를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(Low-dose Live; LDL), *P. freudenreichii* MJ2 사균 고농도 1×10^8 cells/mL를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(High-dose Dead; HDD), *P. freudenreichii* MJ2 사균 저농도 1×10^7 cells/mL를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(Low-dose Dead; LDD)으로 나누었다. 관절염 유도는 제2형 Bovine collagen을 complete Freund's Adjuvant(CFA)와 1:1로 emulsion한 후, 꼬리 피내에 주사하여 첫 번째 면역(1st immunization)을 진행하고 3주 후 제2형 Bovine collagen을 incomplete Freund's Adjuvant(IFA)와 1:1로 emulsion한 후 꼬리 피내에 주사하여 두 번째 면역(2nd boost)을 유도하였다. 관절염을 유도한 후, 부어오르는 증상 및 염증이 심한 정도를 관절염 질환지수(Arthritic score) 기준에 따라 육안적으로 평가하여 점수를 나타내었다.

[0092] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 PBS를 투여하며 관절염을 유도한 그룹에서 가장 심한 관절염 증상이 나타났으며, *P. freudenreichii* MJ2 생균 및 사균을 투여하며 관절염을 유도한 그룹은 육안적으로 유의하게 관절염 증상 완화 효과를 보였다.

[0094] 5-2. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서의 micro-CT 이미지 분석

[0095] 육안적 평가 외에 마우스의 무릎 관절과 발 부위를 micro-CT로 촬영하여 3D 이미지로 변환하고 관찰하였다.

[0096] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 발 부위에서는 그룹간 뚜렷한 차이가 보이지 않았으나, 무릎 부위에서는 PBS를 투여하며 관절염을 유도한 그룹이 뼈가 얇아지고 관절의 변형 및 파괴가 크게 일어났으며 상대적으로 *P. freudenreichii* MJ2 생균 및 사균을 투여하며 관절염을 유도한 그룹은 관절염 증상 완화 효과를 보였다. micro-CT 이미지를 통해 얻은 지표들을 살펴보면 유의성이 상이하였으나, *P. freudenreichii* MJ2 사균 고농도 그룹은 모든 지표에서 유의한 결과를 나타냈다.

[0098] 5-3. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서의 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체 농도 측정

[0099] 마우스의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체 농도를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. Immunoplate에 mouse type II collagen을 4°C에서 코팅한 후, 상온에서 blocking 과정을 거치고 샘플과 Horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibody, anti-IgG1 antibody, anti-IgG2a antibody를 넣어 3시간 가량 반응시켰다. 3시간 후, 기질을 넣고 2N H₂SO₄를 통해 반응을 정지시켜 혈장 내의 각 IgG 항체 양을 측정하였다.

[0100] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 관절염 유발 시 혈액 내 콜라겐 항원 특이적 IgG 항체들의 생성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었으며, *P. freudenreichii* MJ2 생균 및 사균 투여 그룹에서는 콜라겐 항원 특이적 total IgG 항체 및 IgG2a 항체의 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0102] 5-4. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 *P. freudenreichii* MJ2의 항염증 효과 측정

[0103] 마우스의 비장을 분리하여 무게를 측정한 후, 해당 개체의 몸무게로 나누어 spleen index를 구하였다.

[0104] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 관절염 유발 시 spleen index 수치가 유의하게 높았으며, *P. freudenreichii* MJ2 생균 저농도 및 사균 저농도 그룹에서 spleen index 수치가 유의하게 낮았다.

[0105] 마우스의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고 혈장 내 대표적 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF- α 의 양을 ELISA 방법을 통해 측정하고, 마우스의 비장을 분쇄하여 대표적 항염증성 사이토카인인 IL-10의 양을 ELISA 방법을 통해 측정하였다.

[0106] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 류마티스 관절염을 유도한 그룹이 류마티스 관절염을 유도하지 않은 그룹에

비해 IL-6, TNF- α 의 양이 유의하게 증가하였으며, IL-6의 경우 *P. freudenreichii* MJ2 사균을 투여한 그룹에서 항염증성 효과를 보였고, TNF- α 의 경우 *P. freudenreichii* MJ2 생균 및 사균을 투여한 그룹에서 항염증성 효과를 보였다. IL-10의 경우, *P. freudenreichii* MJ2 사균 저농도를 제외한 그룹에서 모두 증가하는 경향을 보였다.

[0108] 5-5. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 *P. freudenreichii* MJ2의 파골세포 분화 인자 발현 억제능 측정

[0109] 마우스 뒷다리 부근의 활막 조직을 분쇄하여 Trizol을 이용하여 RNA를 분리하고 cDNA로 conversion한 후, real-time PCR을 실시하였다.

[0110] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 류마티스 관절염을 유도한 그룹이 류마티스 관절염을 유도하지 않은 그룹에 비해 파골세포 분화 관련 유전자인 *NFATc1*, *Cathepsin K(Ctsk)*, *Calcitonin receptor(Calcr)*, *Matrix metalloproteinase 9(MMP9)*의 발현량이 유의하게 증가했고, *P. freudenreichii* MJ2을 투여한 그룹들에서 이와 같은 유전자들의 발현량이 유의하게 감소하였다. 또한 파골세포의 분화를 억제하고 조골세포(Osteoblast)의 분화를 촉진하는 *Osteoprotegerin(OPG)/RANKL* 발현량 비율은 *P. freudenreichii* MJ2을 투여한 그룹들에서 유의하게 증가하였다.

[0112] 5-6. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 *P. freudenreichii* MJ2의 세포사멸(Apoptosis) 억제능 측정

[0113] 마우스 뒷다리 부근의 활막 조직을 분쇄하여 Bradford 방법을 통해 단백질 양을 정량하고 100℃에서 denaturation시켜 western blot을 실시하였다.

[0114] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 류마티스 관절염을 유도한 그룹이 류마티스 관절염을 유도하지 않은 그룹에 비해 Bax/Bcl2 ratio, Caspase-3 및 Cytochrome c의 발현량이 유의하게 높았으며, *P. freudenreichii* MJ2을 투여한 그룹들에서 이와 같은 단백질들의 발현량이 유의하게 감소하였다.

[0116] 5-7. 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 *P. freudenreichii* MJ2의 오토파지(Autophagy) 발현 측정

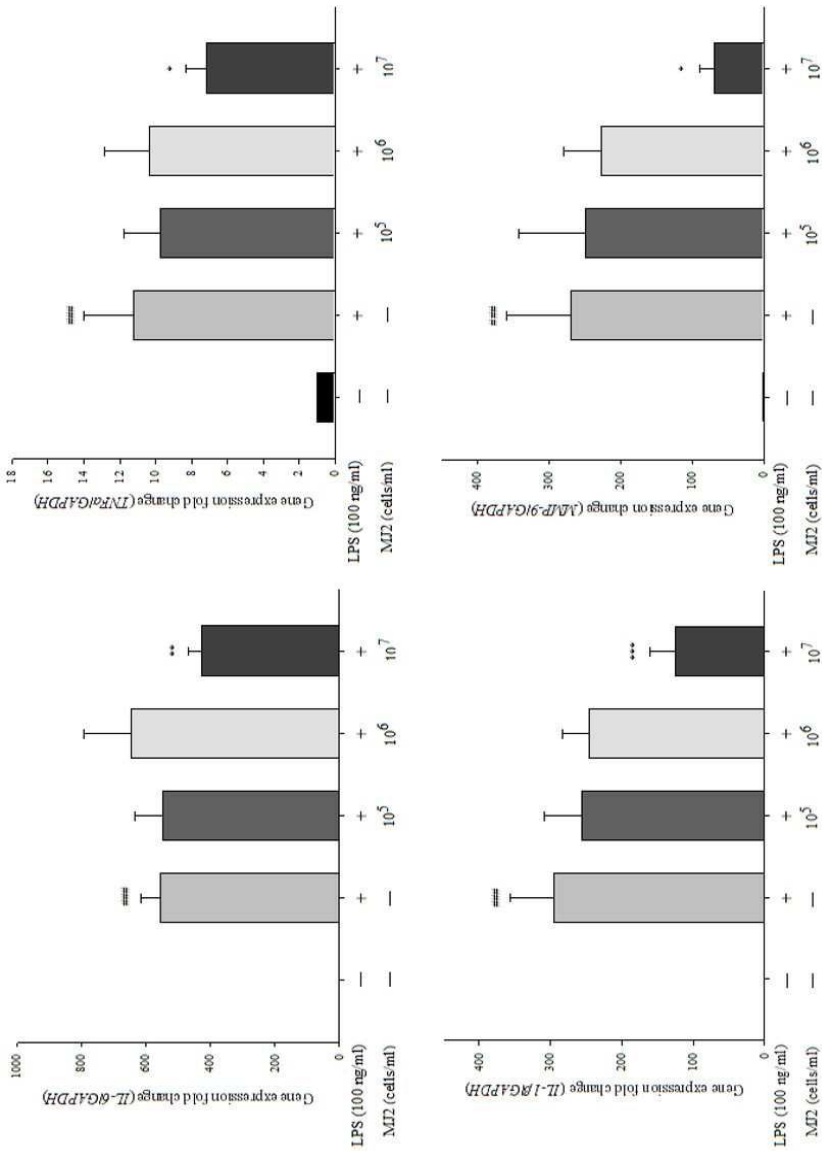
[0117] 마우스 뒷다리 부근의 활막 조직을 분쇄하여 Bradford 방법을 통해 단백질 양을 정량하고 100℃에서 denaturation시켜 오토파지 발현을 나타내는 대표적 인자인 LC3B의 발현량을 western blot을 통해 측정하였다.

[0118] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 류마티스 관절염을 유도한 그룹은 류마티스 관절염을 유도하지 않은 그룹에 비해 LC3B 발현량이 감소하였으며, *P. freudenreichii* MJ2을 투여한 그룹들에서 LC3B 발현량이 유의하게 증가하였다.

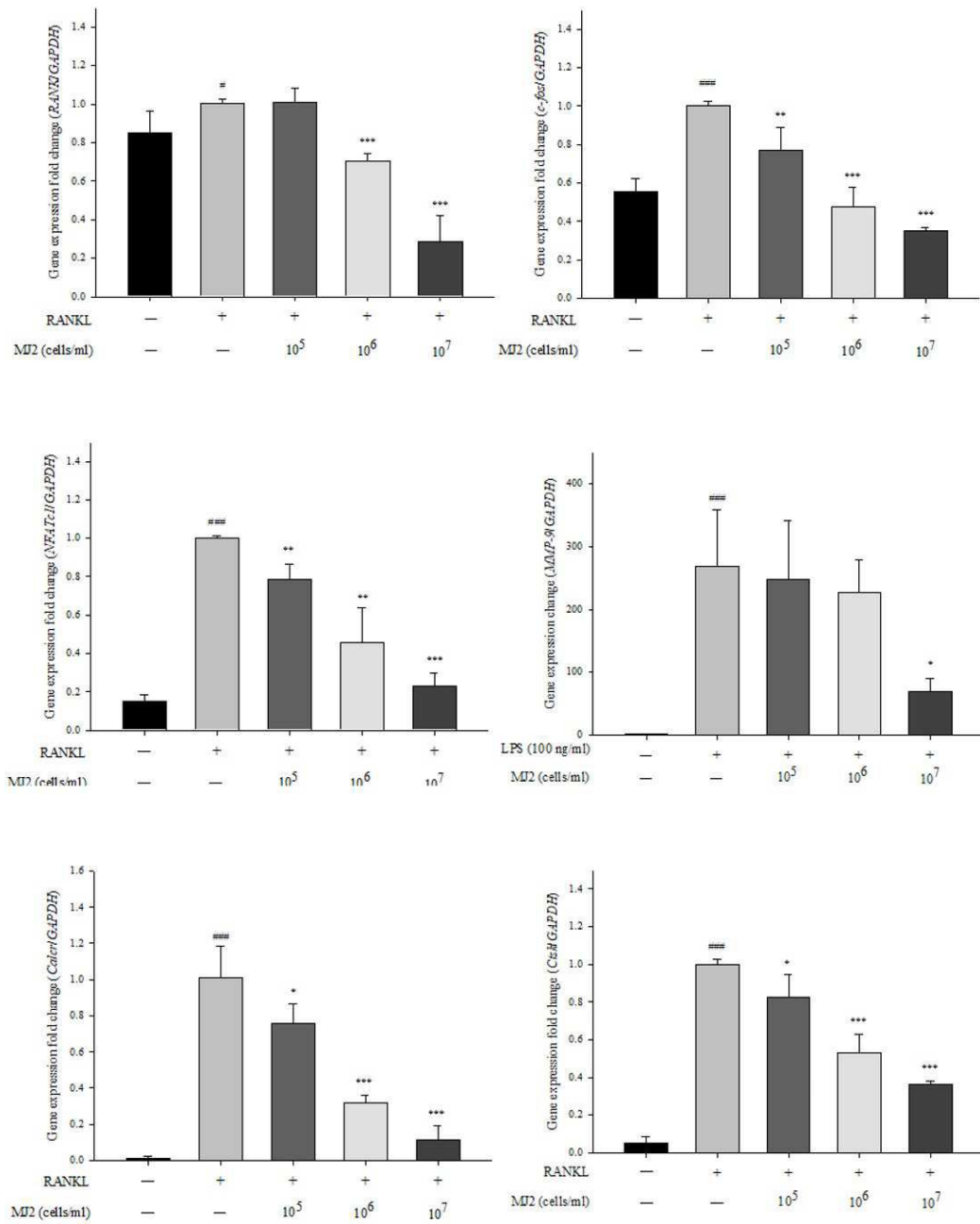
[0120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

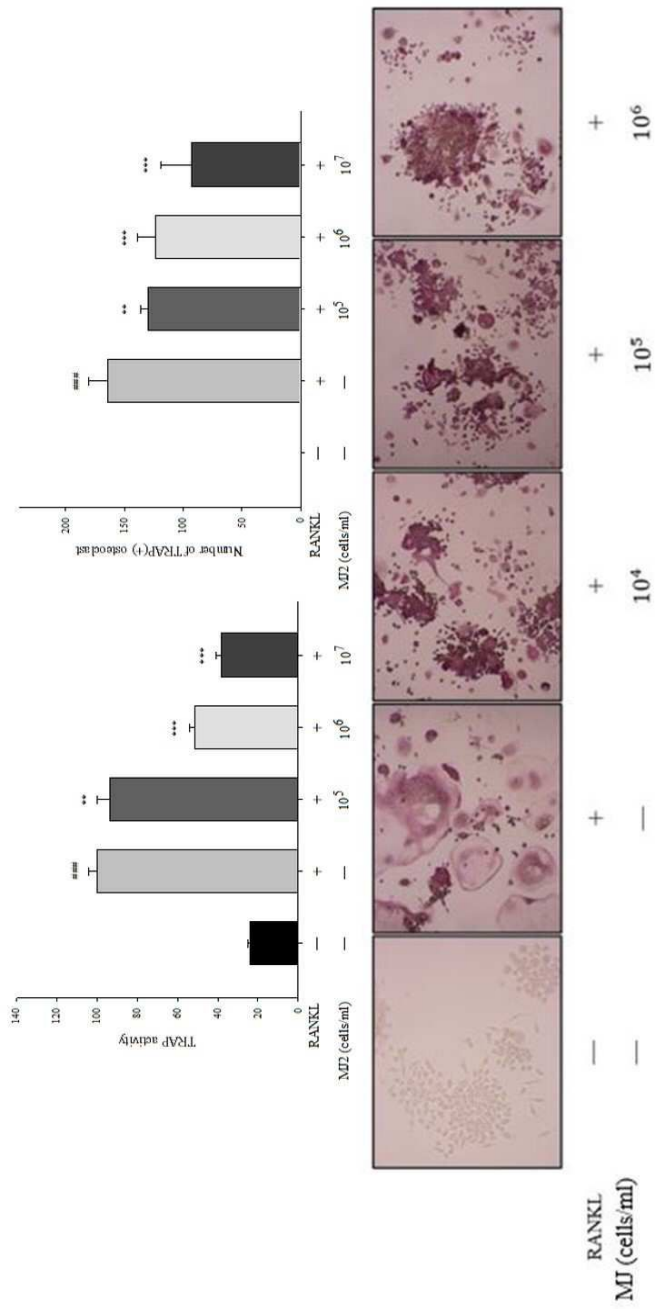
도면1



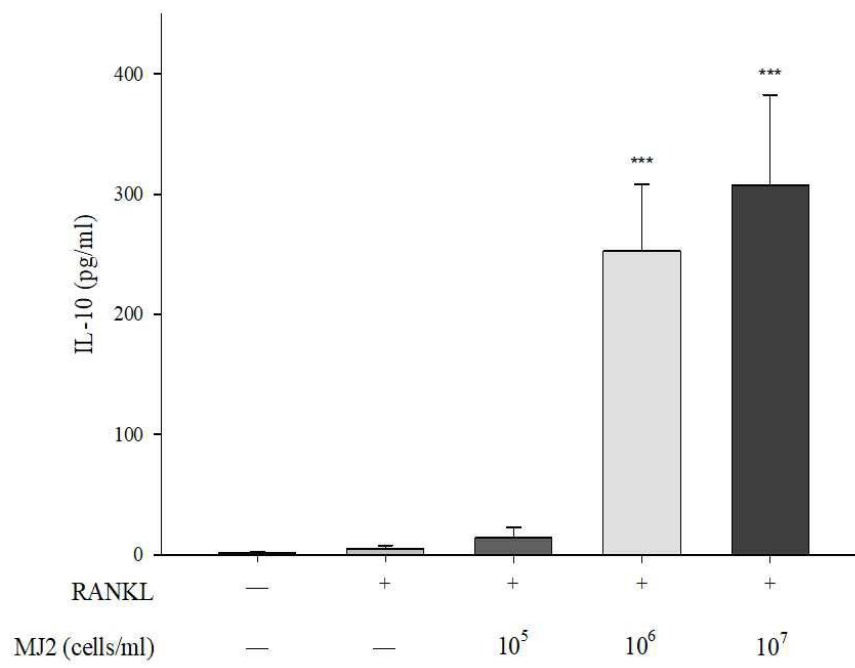
도면2



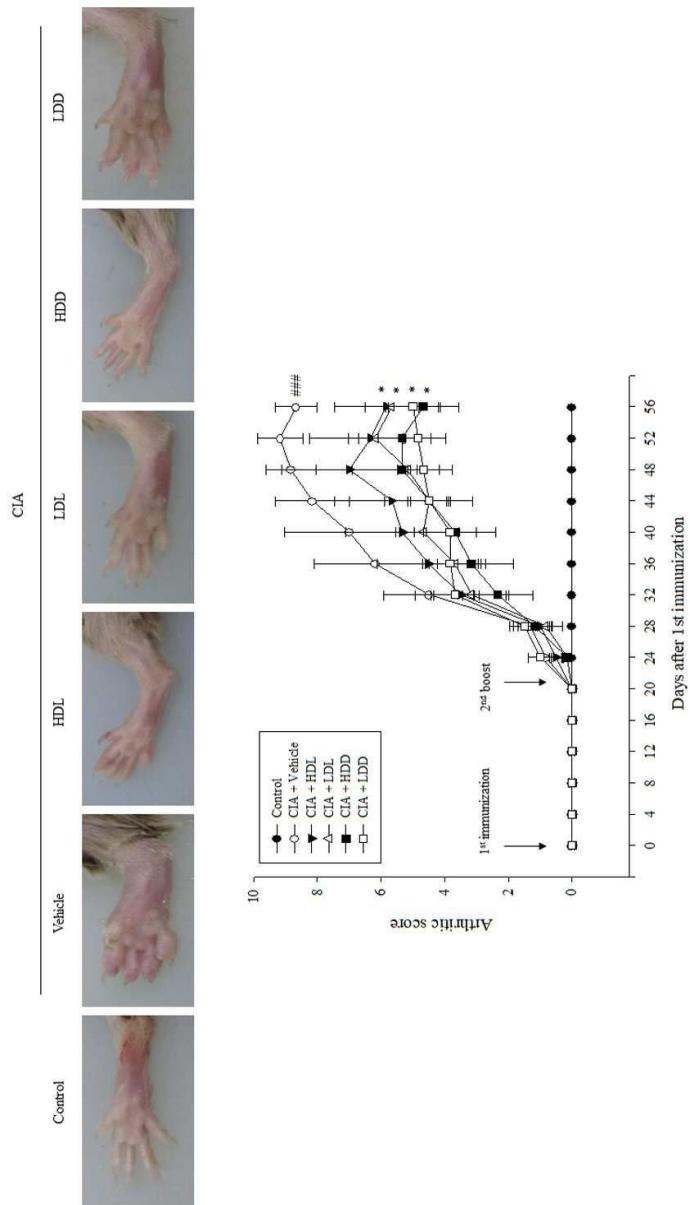
도면3



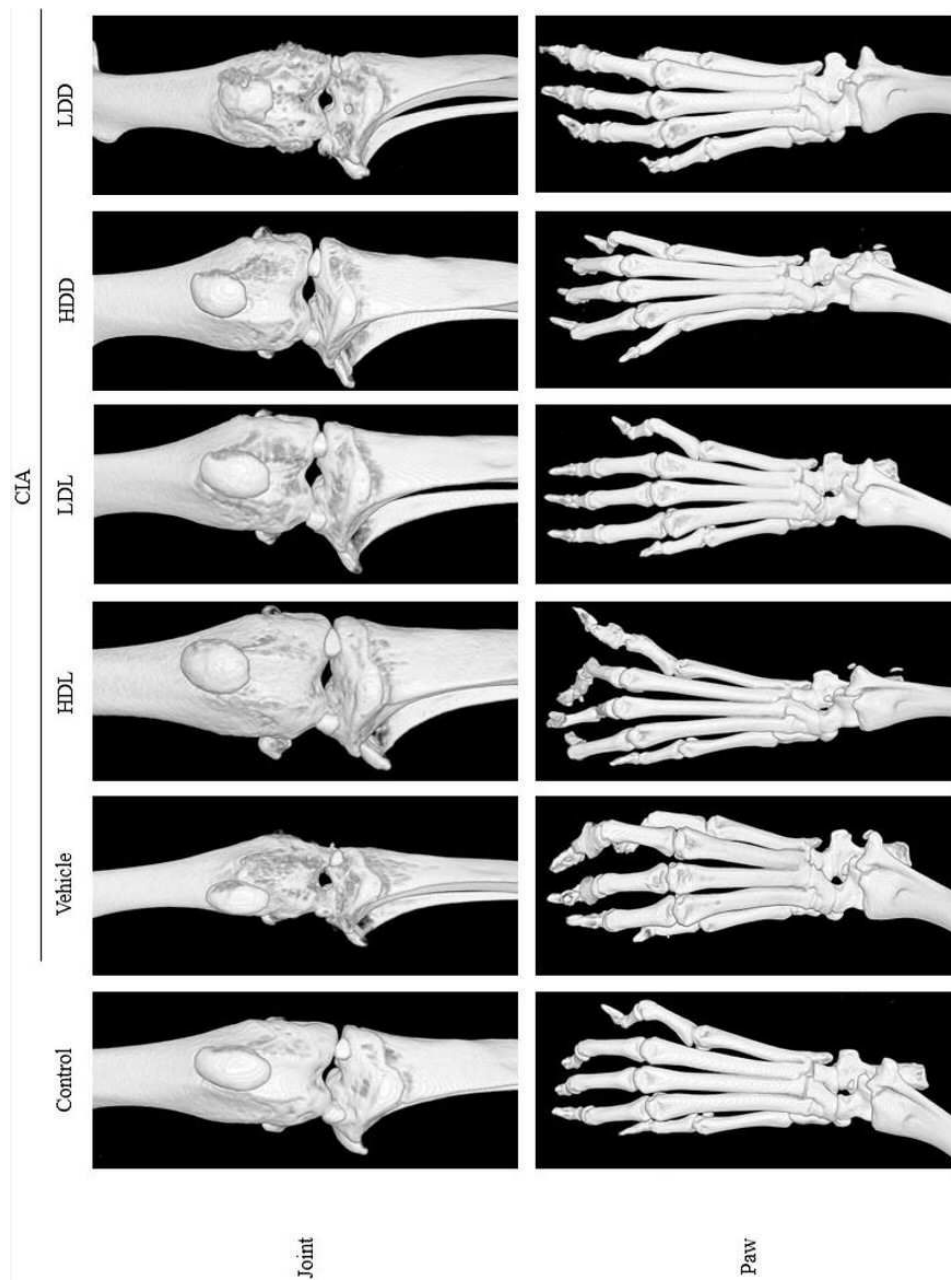
도면4



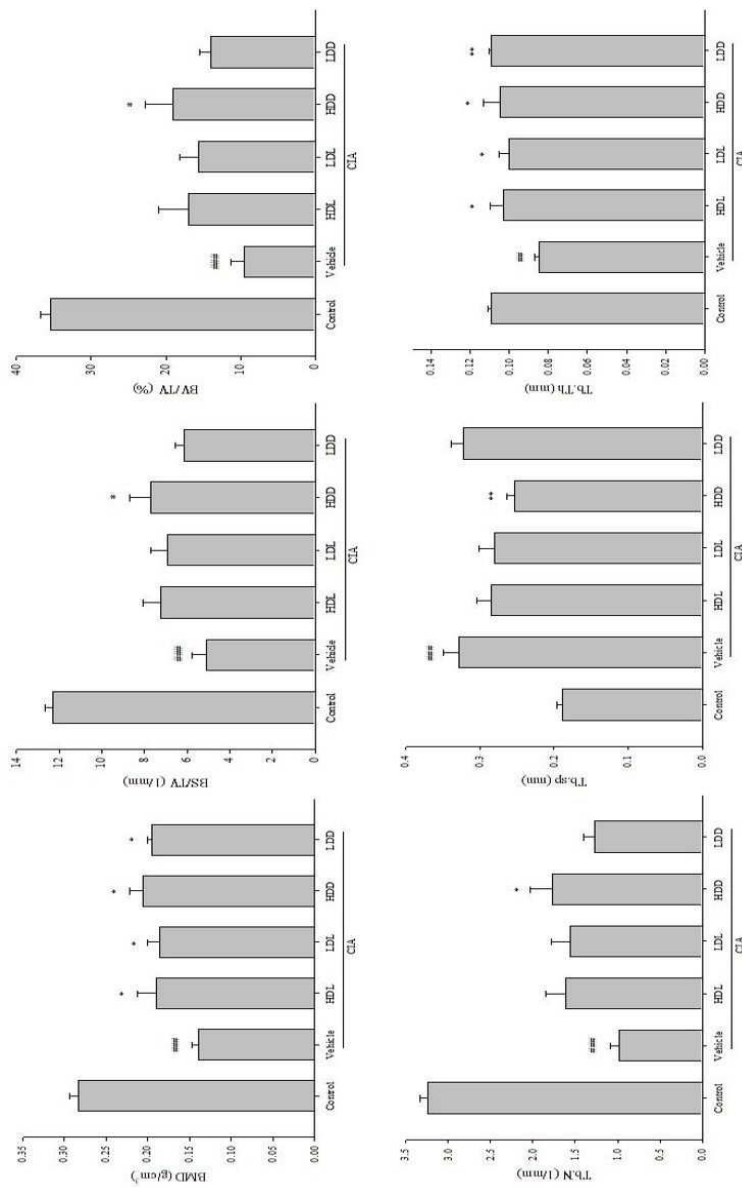
도면5



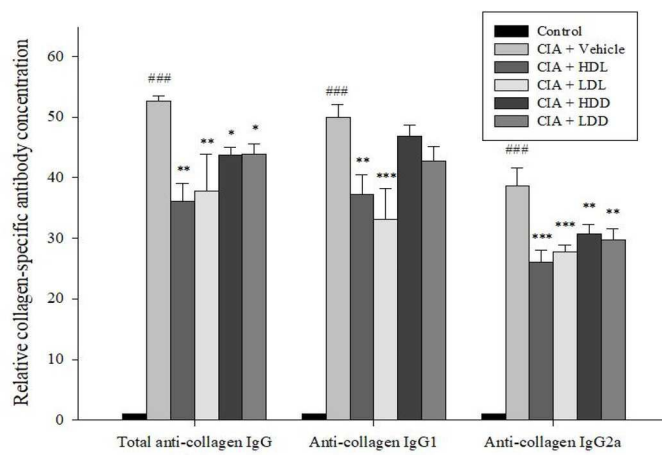
도면6a



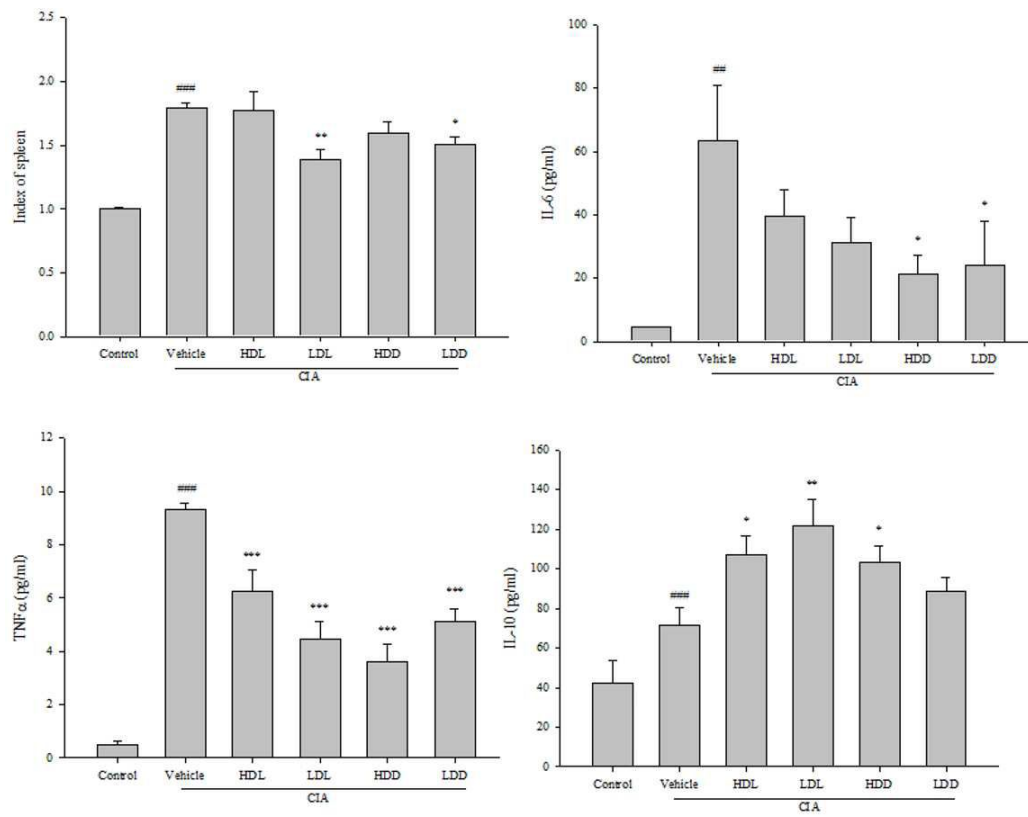
도면6b



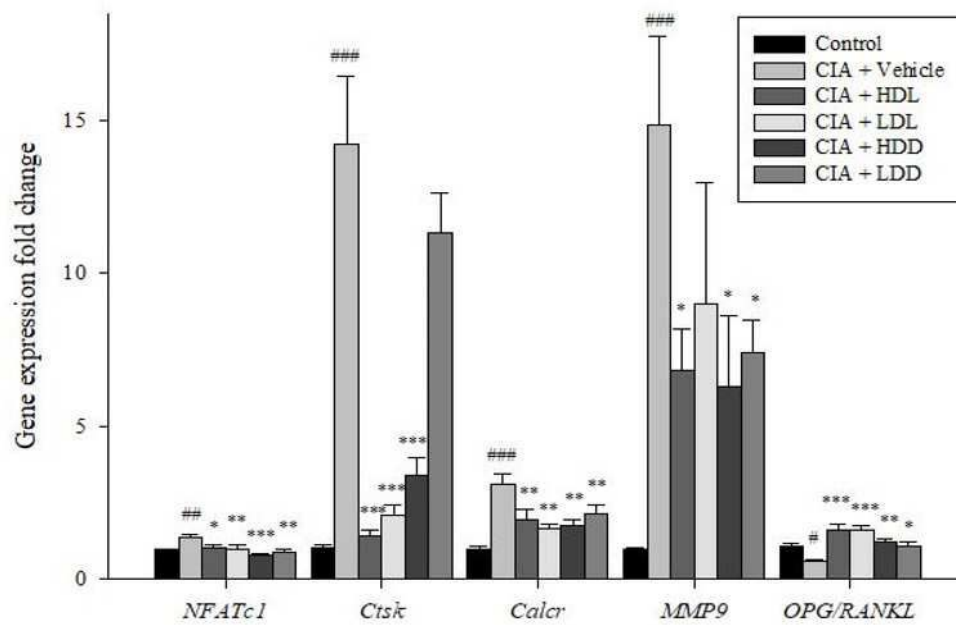
도면7



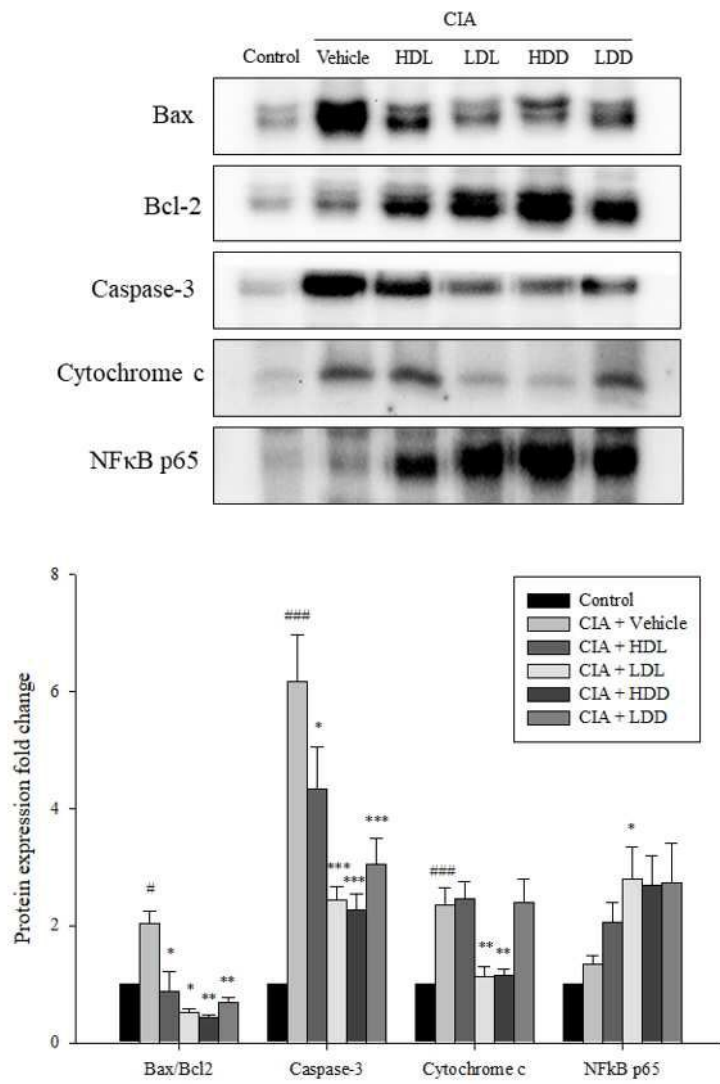
도면8



도면9



도면10



도면11

