



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월06일
(11) 등록번호 10-1654537
(24) 등록일자 2016년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) A61K 36/064 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7015981
(22) 출원일자(국제) 2008년12월12일
심사청구일자 2013년11월28일
(85) 번역문제출일자 2010년07월19일
(65) 공개번호 10-2011-0066118
(43) 공개일자 2011년06월16일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2008/001729
(87) 국제공개번호 WO 2009/103884
국제공개일자 2009년08월27일
(30) 우선권주장
0760377 2007년12월26일 프랑스(FR)
0801342 2008년03월12일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌
W02006021965 A1*
EP1693064 A
EP1481682 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
르샤프르 에 콩빠니
프랑스 75001 파리 뤼 에띠엔느 마르셀 41
위니베르시떼 도베르뉴 끌레르몽 1
프랑스 에프-63000 클레르몽-페랑 프랑수아 미테
랑 블러버드 49
위니베르시떼 뤼 드루아 에 드 라 샹뜨 뤼 킬르 2
프랑스, 에프-59800 킬르, 뤼 뵈뵈 뤼에, 42
(72) 발명자
시몽 장-뤽
프랑스 59000 솔페리노 266
베뉴드 조르쥬
프랑스 59700 마르끄 앙 바뢰 슈멩 데 다르 3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손창규, 김명한

전체 청구항 수 : 총 21 항

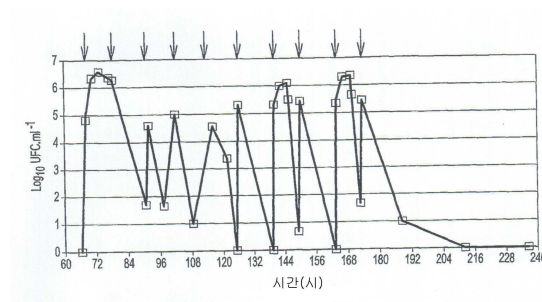
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 인간 및/또는 동물 영양을 위한 조성물, 이의 용도 및 효모균

(57) 요약

본 발명은 신규한 효모균 균주, 이들 균주로부터 얻은 효모균, 1 이상의 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 및/또는 식품 첨가제 및/또는 생균제 및/또는 기능성 식품 및/또는 영양성 및/또는 기능성 성분 및/또는 화장품 및/또는 약품 활성 성분으로서 특히 주목되는 효모균 유도체를 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 및/또는 동물 영양에서 이것의 용도 또는 염증 질환의 치료 또는 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

방드게르크코브 빠스칼

프랑스 59650 빌뇌브 다스크 아브뉴 뒤 골프 6

뿔랭 다니엘

프랑스 59242 땅뿔뢰브까리에 쟁 조세프 4

데스뢰모 뻬에르

프랑스 59700 마르끄 앙 바외 뤼 뒤 독뢰르 부레 33

다르퐁이-미쇼 아를레뜨

프랑스 63670 라 로제 블랑쉬 르 뿔랭 뒤 뻬세

시비농 아델린

프랑스 63000 글레르몽 페로 53 뤼 데 뵈니에르

명세서

청구범위

청구항 1

프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁된 사카로마이세스 세레비시아이 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주.

청구항 2

프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁된 사카로마이세스 세레비시아이 불라르디이 변종(*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) 균주.

청구항 3

프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁된 균주의 배양에 의해 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 효모균.

청구항 4

프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁된 균주의 배양에 의해 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 불라르디이 변종 효모균.

청구항 5

인간 또는 동물들을 위해 유도되는 식품 조성물 제조용 생균제로서 사용하기 위한, 제3항에 따른 효모균; 제4항에 따른 효모균; 및 효모균 추출물, 체벽 글루칸, 체벽 만노단백질, 효모균 지질 분획, 효모균 핵산 분획에서 선택되는 1 이상의 제3항 또는 제4항에 따른 효모균 유도체; 중 1 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 효모균이 건조 형태 또는 비건조 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 효모균이 순간 건조 또는 활성 건조 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 10^7 내지 6×10^{10} CFU의 효모균을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 1 mg 내지 10 g의 효모균 또는 효모균 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 식품 조성물은, 위장의 편안을 개선시키거나 또는 장내 플로라를 개선시키기 위하여 의도되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

경구 투여를 위한 형태로 제3항에 따른 효모균; 제4항에 따른 효모균; 및 효모균 추출물, 체벽 글루칸, 체벽 만노단백질, 효모균 지질 분획, 효모균 핵산 분획에서 선택되는 1 이상의 제3항 또는 제4항에 따른 효모균 유도체; 중 1 이상을 포함하는 키트.

청구항 19

제5항에 있어서, 10^8 내지 2×10^{10} CFU의 효모균을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

인간 또는 동물들을 위해 유도되고, 궤양성 대장염, 만성 소화 장애증, 크론병 및 출혈성 직장결장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 내장 질환, 내장 기능성 질환 또는 위장 질환의 치료 또는 예방; 또는 만성 염증성 장 질환, 식품 불내증, 과민성 대장 증후군, 및 배설 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 통각 과민성 상태로 나타나는 장 질환 또는 병리를 치료 또는 예방하기 위하여 의도되는 약물 제조용 생균제로서 사용하기 위한, 제3항에 따른 효모균; 제4항에 따른 효모균; 및 효모균 추출물, 체벽 글루칸, 체벽 만노단백질, 효모균 지질 분획, 효모균 핵산 분획에서 선택되는 1 이상의 제3항 또는 제4항에 따른 효모균 유도체; 중 1 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 효모균이 건조 형태 또는 비건조 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 효모균이 순간 건조 또는 활성 건조 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 10^7 내지 6×10^{10} CFU의 효모균을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 1 mg 내지 10 g의 효모균 또는 효모균 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 효모균은 10^7 내지 6×10^{10} CFU의 1일 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 29

제21항에 있어서, 상기 효모균 또는 효모균 유도체는 1 mg 내지 10 g의 1일 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 30

제21항에 있어서, 10^8 내지 2×10^{10} CFU의 효모균을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 31

제21항에 있어서, 상기 효모균은 10^8 내지 2×10^{10} CFU의 1일 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 및/또는 동물 영양 및 건강 분야에 관한 것이다.

[0002] 더 구체적으로 본 발명은 신규한 효모균 균주 및 상기 신규한 균주로부터 얻어지는 신규한 효모균에 관한 것이다. 이들 효모균은 특히 소화관의 편안(comfort) 및/또는 인간 또는 동물 소화관 질환의 예방 및/또는 치료에 특히 유용하다.

배경 기술

[0003] 예컨대 WO 2006/021965호에 개시된 바와 같이 다수의 미생물이 이미 인간 소화관에서의 그 이로운 적용 및 영양적 이점에 대하여 문헌에 개시되었다.

[0004] 이들 미생물은 보통 충분한 양으로 투여될 때 보건 상의 이점을 갖는 숙주를 제공할 수 있는 살아 있는 미생물에 해당하는 생균제라는 용어로 지칭된다(joint FAO/WHO Expert Consultation Probiotics in food, FAO Food and nutrition paper Nr85, ISBN 92-5-105513-0).

[0005] 미생물의 경구 투여로부터 얻어지는 이점은 사용되는 미생물 균주 뿐만 아니라 그 투여 형태에 따라 매우 크게 달라진다. 동일한 종에서, 사용되는 균주에 따라, 예컨대 병원성 균주(예컨대 장-독성 또는 장-출혈성 유형) 및 Nissle 1917 균주와 같은 유익한 균주 양쪽으로 발견될 수 있는 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*) 종에서와 같이, 관찰되는 효과가 실제로 매우 변동적이어서, 때로는 유익하고, 때로는 부정적이거나 중립적이다(M. de Vrese; P.R. Marteau. *Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea*, 2007, J. Nutr., 137(3 Suppl. 2), 803S-811S). 따라서, 주어진 균주에 대하여 이러한 균주의 투여로부터 인간 보건 상의 이점이 예상될 수 있을지 예측하는 것도 그 가능한 이점의 성질 또는 그 강도를 예측하는 것도 현재 불가능하다.

[0006] 특히 효모균 및 유산균 중에서, 일정 수의 미생물 균주가 이미 위장관에 대한 특정의 이로운 효과에 대하여 확인되었다. 그럼에도 불구하고, 위장관에 대한 완전한 이로운 작용을 얻는 것은 상이한 성질의 몇몇 균주의 동시 투여를 종종 필요로 한다(I. Goktepe; V.K. Juneja; M. Ahmedna (eds.) *Probiotics in Food Safety and Human Health* 2006, CRC Taylor & Francis, ISBN I-57444-514-6).

[0007] 또한, 다수의 미생물, 특히 유산균이 염증 유발 작용을 갖는 것으로 관찰되었다. 이러한 염증 유발 효과는 예컨대 자가 면역 질환 또는 면역 결핍에서 특히 유해하고 바람직하지 않은 것으로 나타날 수 있다.

[0008] 효모균 및/또는 효모균 유도체의 특정 분획이 소화관에 대한 이로운 효과에 대하여 개시되었다.

- [0009] 따라서, 효모균에서 유도되는 만노단백질이 병원의 부착(adhesion)을 억제하는 효과에 대하여 개시되었다. 또한, 효모균의 체벽은 섬유 효과에 대하여 개시되었다. 그러나, 다수의 사카로마이세스 세레비시아이(*Saccharomyces cerevisiae*) 효모균 균주가 존재하지만, 이들이 모두 이로운 효과 또는 동일한 효과를 갖는 것은 아니다.
- [0010] 또한, 사용되는 균주 및 투여되는 효모균 형태에 따라, 효과도 매우 다양할 수 있다.
- [0011] 또한, 특정 병리 또는 부전에 대하여 또는 물리적 및 정신적 일반 보건 상태에 대하여 예방적으로 및/또는 치료적으로 보건상 이로운 효과를 발휘할 수 있는 미생물의 신규한 균주를 얻을 필요가 늘 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁된 사카로마이세스 세레비시아이(*Saccharomyces cerevisiae*)의 신규한 균주, 및 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁된 사카로마이세스 세레비시아이 불라르디이 변종(*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*)의 신규한 균주이다.
- [0013] 본 발명의 목적은 또한 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁된 균주로부터 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 효모균, 및 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁된 균주로부터 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 불라르디이 변종 효모균이다.
- [0014] 본 발명의 또다른 목적은 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁된 균주로부터 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 및/또는 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁된 균주로부터 얻은 사카로마이세스 세레비시아이 불라르디이 변종 효모균 및/또는 효모균 추출물, 체벽 추출물(wall derivative), 체벽 글루칸(parietal glucan), 체벽 만노단백질(parietal mannoprotein), 효모균 지질 분획, 효모균 핵산(RNA, DNA) 분획에서 선택되는 1 이상의 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 유도체를 포함하는 조성물이다.
- [0015] 본 발명의 또다른 목적은 인간 및/또는 동물을 위해 의도되는 식품 보충제 및/또는 생균제 및/또는 기능성 식품 및/또는 영양성 및/또는 기능성 성분 및/또는 화장품 및/또는 약품 활성 성분의 제조를 위한 상기 조성물의 용도이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 위장관의 편안을 개선시키고 및/또는 장내 플로라(intestinal flora)를 개선시키기 위하여 의도되는 식품 조성물의 제조를 위한 앞서 정의된 바와 같은 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명의 목적은 또한 내장 질환, 내장 기능성 질환 또는 위장 질환의 치료 및/또는 예방을 위하여 의도되는 약물의 제조를 위한 앞서 정의된 바와 같은 조성물의 용도이다.
- [0018] 본 발명의 목적은 통각 과민(hyperalgesia)의 상태로 나타나는 장 질환 또는 병리를 치료 및/또는 예방하기 위하여 의도되는 약물의 제조를 위한 앞에서 정의한 바와 같은 조성물의 용도이다.
- [0019] 끝으로, 본 발명의 마지막 목적은 경구 투여에 적당한 형태로 앞서 정의한 바와 같은 1 이상의 효모균 및/또는 1 이상의 효모균 유도체를 포함하는 키트이다.
- [0020] 부다페스트 조약에 따라 본 출원인이 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터(파리 파스퇴르 연구소)에 기탁 번호 CNCM I-3856으로 기탁한 균주는 간결의 목적에서 "ScProI"라 부르기로 한다.
- [0021] 또한, 부다페스트 조약에 따라 본 출원인이 프랑스 국립 미생물 배양 수집 센터(파리 파스퇴르 연구소)에 기탁 번호 CNCM I-3799로 기탁한 균주는 간결의 목적에서 "SCBI"라 지칭하기로 한다.
- [0022] 끝으로, 간결의 목적에서, 효모균 추출물, 체벽 유도체, 체벽 글루칸, 체벽 만노단백질, 효모균 지질 분획, 효모균 핵산(RNA, DNA) 분획 및 이들의 혼합물에서 선택되는 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 유도체는 "유도체"라 지칭하기로 한다.
- [0023] 생균제는 충분한 양으로 통합될 때 종래의 영양 효과를 넘어서 보건, 편안 및 건강에 긍정적인 효과를 주는 살아있는 미생물을 지칭하는 의미이다.
- [0024] 영양 식품 또는 영양기능성 식품 또는 건강기능성 식품 또는 화장품은 생리학적 기능을 개선시킬 수 있거나 또

는 건강에 유리한 효과를 갖는 성분을 함유하는 식품을 의미한다.

- [0025] 식품 보충제는 보통의 식단을 보충하는 목적을 갖는 식품을 의미한다. 식품 보충제는 영양제 또는 소량으로 병용하여 또는 단독으로 복용시 영양적 또는 약리학적 효과를 갖는 기타 물질의 농축된 공급원이다.
- [0026] 특정 공급을 위해 의도되는 식품(DDAP)은 특히 유아, 걸음마를 배우는 아이, 스포츠 선수와 같은 정해진 인구 그룹을 위해 의도되는 영양을 목표로 하는 식품을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 언급되는 바와 같은 식품 조성물은 식품 보충제 또는 DDAP일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 균주는 많은 이점 및 특히 인간 소화관, 특히 소장 및 결장 뿐만 아니라 일반적으로 신체에 대하여 이로운 효과를 유도하는 능력이 본 출원인에 의하여 확인되었다.
- [0029] 실제로, 놀랍게도 효모균 ScProI 및/또는 SCBI 및/또는 유도체가 다수의 효모균 균주와 달리 항염증 작용을 유도할 수 있으며 임의의 염증 유발 효과를 갖지 않는 것으로 관찰되었다.
- [0030] 실제로, ScProI 및/또는 SCBI 효모균 및/또는 유도체는 항염증 신호에 동반되는 인터류킨 IL-10의 분비 증가를 유발한다. 또한, 락토바실리 유형의 박테리아성 생균제의 작용과는 달리, ScProI 및/또는 SCBI 균주 및/또는 유도체는 염증 유발성 시토킨 IL-12의 합성을 유도하지 않는다. 또한, TNF α 및 IFN γ 염증 유발성 시토킨의 생성이 박테리아성 생균제에 비하여 현저히 낮다. 또한, 테스트는 이 효모균 ScProI의 생체내 항염증 효과, 특히 대장의 염증의 반감 및 장 괴사의 3분의 1 감소를 입증할 수 있었다.
- [0031] 또한, ScProI 및/또는 SCBI 효모균 및/또는 유도체는 그 건조 형태로 그 생존성 또는 온전성에 대한 임의의 부정적인 충격 없이 위 장벽을 넘나들 수 있으며, 이 효모균은 보통 유발 환경에서 정착하지 않는다.
- [0032] 본 출원인은 최초로 특히 놀랍게도 ScProI 및/또는 SCBI 효모균 및/또는 유도체가 특히 살아 있는 래트 모델에서 통증에 대한 내성을 증가시킬 수 있음을 입증하였다.
- [0033] 이러한 이로운 효과들 외에, 이 ScProI 및/또는 SCBI 효모균 및/또는 유도체는 병원성 미생물 및 장에서 침윤성을 갖는 것들의 정착(colonization) 및/또는 침윤(invasion)을 억제할 수 있다. 이 효모균의 투여는 항생제에 대하여 내성인 장내 플로라 및 결장에서 엔테로박테리아(enterobacteria)의 감소를 유발한다.
- [0034] 특히, 이것은 칸디다 알비칸스(*Candida albican*)에 의한 장관 정착(intestinal colonization) 및 이 병원균에 의하여 유발 및 지속되는 염증에 대한 예방능 및 치료능을 보였다. 또한, 이 효모균은 병원성 균주 및/또는 크론병 환자로부터의 회장 생체 조직에서 분리한 에스케리치아 콜리 병원 유형의 침윤성을 갖는 것들의 부착력 및 침윤력에 대한 억제 효과를 가진다.
- [0035] 본 발명에 따르면, 이 ScProI 및/또는 SCBI 효모균 및/또는 유도체는 살아 있는 형태 또는 생존 가능한 형태로, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따르면 "살아 있는 형태" 또는 "살아 있는"은 대사가 활성 또는 재활성 또는 배가될 수 있는 효모균을 의미한다. 이것은 특히 건조(dry) 형태 또는 프레쉬(fresh) 형태의 효모균이다.
- [0037] 일반적으로, 프레쉬 형태의 효모균은 압착되거나 부서진 효모균으로서 존재한다. 이것은 또한 수성 상에 현탁된 효모균으로 존재할 수도 있는데 이것은 이후 효모균액으로서 언급된다. 이 경우, 효모균은 바람직하게는 캡슐화된다. 캡슐화 방법 및 상이한 유형의 캡슐은 당업자에게 널리 공지이다.
- [0038] 건조 효모균 형태 중에서, 순간 건조(instantaneous dry) 또는 활성 건조(active dry) 형태로 존재할 수 있는 효모균이 언급될 수 있다. 건조 효모균은 90% 이상, 바람직하게는 약 92% 내지 96% 범위의 건조 물질 수준을 갖는 임의의 효모균을 의미한다.
- [0039] 건조 효모균 중에서, 중간 습도를 갖는 고강도 동결 건조되거나 또는 되지 않은 효모균을 추가로 언급할 수 있다.
- [0040] 순간 건조 효모균은 주로 공업용 및 제빵용으로 의도된다. 식품 기준 시스템(제약, 알콜성 발효)을 기초로 하여 다른 용도 및 결과도 가능하다. 이러한 건조 효모균의 특성은 이것을 가루로 혼입시키기 전에 재수화할 필요가 없다는 것이다.
- [0041] 이것은 활성을 유지하면서 페이스트 제품(압착된 또는 액체의 효모균)을 건조한 얇은 버미첼리(vermicelli)로 변형시킬 수 있는 고온의 공기 구배의 작용에 의한 효모균의 탈수에서 유래한다. 제품을 안정하게 유지하기 위

하여, 이후 제품은 산소 없이 컨디셔닝되어야 한다.

- [0042] 활성 건조 효모균은 발효력을 보유하고 장기간 보존으로 제공되기 위하여 저온에서 건조되는 살아 있는 효모균이다. 이것은 소구체 형태이다.
- [0043] 이러한 효모균은 생존성을 보존하면서 페이스트 형태의 효모균을 건조 제품으로 변형시킬 수 있는 열 및 기계 활성의 공동 작용에 의하여 효모균을 탈수시켜 얻어진다.
- [0044] 선택된 활성 효모균은 바이오매스(살아있는 효모균 세포)의 유동층에서 건조 및 압출에 의하여 얻어진다. 이러한 활성 건조 효모균, 즉 고농도의 살아 있는 효모균 세포를 갖는 건조 효모균은 일반적으로 직경이 0.1 μm 내지 2.5 mm이고 H_2O 함량이 4~8 질량%인 과립으로서 존재한다.
- [0045] 이들 건조 형태는 프레쉬 형태에 비하여 더 양호한 위액 내성을 제공하고 본 발명에 따른 효모균의 이로인 효과를 최적화하는 장점이 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명에 따른 효모균은 활성 건조 효모균의 형태인 것이 선호된다.
- [0046] 일반적으로 염증 유발성 시토킨은 이후 특히 자가 면역 질환 또는 면역 결핍의 증례에서 다수의 임상적인 문제를 일으킬 수 있는 염증 기전을 자극한다고 인식되어 있다.
- [0047] 따라서, 본 발명에 따른 효모균은 만성이든 급성이든 설사 또는 변비와 관련이 있거나 없을 수 있는 장의 이상 또는 염증 질환의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0048] 제1 실시양태에서, 상기 이상 및 질환은 설사와 관련이 있거나 없다.
- [0049] 제2 실시양태에서, 상기 이상 및 질환은 설사와 관련이 없다. 특히 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 실질적으로 결장의 염증을 특징으로 하는 대장염의 예방 또는 치료에 유용할 수 있다.
- [0050] 특히, 이러한 효모균은 만성 염증성 장 질환(CIBD), 특히 궤양성 대장염, 출혈성 직장결장염, 만성 소화 장애증 또는 크론병의 예방 및/또는 치료에 잘 적용된다.
- [0051] 이들 질환은 특히 다발성 염증 캐스케이드가 동반되는 악화된 면역 반응을 특징으로 한다. 따라서, 생균제 및/또는 의료용 식품 및/또는 기능성 식품 및/또는 영양제 및/또는 화장품으로 이들 질환을 예방 또는 치료하는 범위 내에서, 염증 유발 효과가 가능한 약한 것이 중요하다.
- [0052] 따라서, 본 발명에 따른 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 이들 용도에 가장 특히 적합하다. 이 효모균은 몇가지 추가의 장점을 가진다.
- [0053] 첫번째는 이것이 통증에 대한 내성을 증대시키는 능력을 가진다는 것이다. 두번째는 특히 크론병에 대해서 이러한 효모균이 특히 E. 콜리(*E. Coli*) 병원성 균주 및/또는 이러한 질환을 앓고 있는 환자에서 유래하는 침윤성을 갖는 것의 부착력 및 침윤력을 억제할 수 있다는 것이다.
- [0054] 염증 반응은 모든 병원성 미생물의 침윤에 기인할 수 있다.
- [0055] 따라서, 본 발명에 따른 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 병원성 미생물 및/또는 침윤성을 갖는 것들, 박테리아와 같은 원핵 생물 또는 곰팡이와 같은 진핵 생물이 장에 정착하는 것으로 인한 위장 장애 또는 질환의 예방 또는 치료에 양호한 효과를 나타낸다.
- [0056] 위장 장애 또는 질환은 궤양성 대장염, 만성 소화 장애증, 크론병 및 출혈성 직장결장염과 같은 장의 만성 염증 질환일 수 있다.
- [0057] 또한, ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 통증에 대한 내성을 증대시킬 수 있고, 또한 통각 과민 상태를 특징으로 하는 장 질환 또는 이상의 예방적 또는 치료적 치료에 유리하다. 이상 또는 질환은 특히 만성적 내장 통증을 특징으로 하는 기능성 장 질환, 만성 염증성 장 질환(CIBD) 또는 식품 불내증(알레르기, 컨디셔닝 등)일 수 있다.
- [0058] 이것은 통각 과민 및 특히 그 형태(변비, 설사 또는 둘의 조합)와 무관하게 과민성 대장 증후군(IRS) 뿐만 아니라 임의의 배설 장애가 없는 기능적 복통(FAPS: 기능적 복통) 및 식품 불내성(food intolerance) 및 셀리악병과 관련된 통증과 같이 IRS의 범위에 들어가지 않는 만성 내장 통증의 예방적 또는 치료적 처치에 특히 적용된다.
- [0059] 따라서, ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체 또는 이것을 포함하는 임의의 조성물은 이러한 유형의 이상 또는 질환에 대한 경향 또는 민감성을 갖는 개체에서 예방적으로 또는 예컨대 앓는 동안 또는 장기에 걸쳐

치료적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 대상의 고통을 감소시킬 수 있고 이들 이상의 원인 또는 증상을 완화시킬 수 있다.

- [0060] 본 발명에 따른 이러한 효모균 및/또는 유도체가 통증, 염증 및 병원성 미생물 및/또는 침윤성을 갖는 것들에 미치는 효과의 결합은 특히 인간 또는 동물 위장관의 건강, 보전 및/또는 편안을 개선시킨다.
- [0061] 본 발명에 따른 조성물은 ScPro1 효모균 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 효모균 추출물, 체벽 유도체, 체벽 글루칸, 체벽 만노단백질, 효모균 지질 분획, 효모균 핵산(RNA, DNA) 분획에서 선택되는 1 이상의 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 유도체를 약 10^7 내지 6.10^{10} CFU, 바람직하게는 10^8 내지 2.10^{10} CFU, 또는 1 mg 내지 10 g, 바람직하게는 1 mg 내지 1 g의 양으로 포함할 수 있다. 이러한 양은 하루에 1 회 또는 수 회 복용되는 1일 양일 수 있다.
- [0062] ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 10^7 내지 6.10^{10} CFU(콜로니 형성 단위), 바람직하게는 10^8 내지 2.10^{10} CFU의 1일 용량으로 치료적 또는 비치료적 제품에 사용되는 것이 선호된다.
- [0063] 효모균 및/또는 유도체가 살아 있으나 생존 가능하지 않은 형태인 경우, 치료적 또는 비치료적 제품에서 유용한 1 일 용량은 바람직하게는 1 mg 내지 10 g, 바람직하게는 1 mg 내지 1 g일 수 있다. 효과적인 1 일 용량은 1회, 2회, 3회 또는 4회 복용으로 투여될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 효모균 및/또는 유도체 또는 이것을 포함하는 조성물은 바람직하게는 경구 투여된다. 이것은 1 이상의 증상이 경감 또는 억제됨을 의미하는 치료 유효량으로 투여될 수 있다.
- [0065] ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 인간 또는 동물의 식품 조성물에 포함될 수 있고 및/또는 경구 투여에 적당한 부형제 또는 담체와 함께 투여될 수 있다.
- [0066] 인간의 식품으로 의도되는 조성물은 액체, 페이스트 또는 고체일 수 있다. 특히, 조성물은 치즈, 버터, 요구르트 또는 크림과 같은 유제품, 과일 주스, 콤포트 또는 과일 젤리와 같은 과일 베이스 제품, 음료수, 예컨대 스낵, 비스킷 또는 기타 식품과 같은 고체 식품일 수 있다. 따라서, 조성물은 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체 및 식품 또는 음료수의 성분을 포함한다.
- [0067] *ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다. 약학 조성물은 경구 투여에 맞춰진다. 따라서, 이것은 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체 뿐만 아니라 약학 제제의 제조를 위한 공인된 부형제에서 선택되는 종래의 적당한 담체를 포함한다. 이것은 시럽 또는 피알(phial)과 같은 액체로서 또는 정제, 젤라틴 캡슐, 사세, 캡슐 또는 산제 또는 기타 적당한 생약 형태로서 조제될 수 있다.
- [0068] ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 또한 특히 더 완전한 예방 작용을 위해 다른 생균제 및/또는 다른 기능성 성분, 특히 박테리아 생균제와 함께 투여될 수 있다.
- [0069] 예로서, 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리아(*Bifidobacterium*), 페디오코쿠스(*Pediococcus*), 프로피오니박테리아(*Propionibacterium*) 또는 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속의 유산균을 언급할 수 있다.
- [0070] ScPro1 및/또는 SCB1 효모균 및/또는 유도체는 또한 항생제, 진통제, 지사제, 완하제 및 이들의 혼합물과 같은 다른 활성 성분과 함께 투여될 수 있다.
- [0071] 이제 본 발명을 제한이 아닌 예시로서 주어진 이하의 실시예 및 도면으로 예시하기로 한다.

과제의 해결 수단

- [0072] 본 발명은 신규한 효모균 균주, 이들 균주로부터 얻은 효모균, 1 이상의 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 및/또는 식품 첨가제 및/또는 생균제 및/또는 기능성 식품 및/또는 영양성 및/또는 기능성 성분 및/또는 화장품 및/또는 약품 활성 성분으로서 특히 주목되는 효모균 유도체를 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 및/또는 동물 영역에서 이것의 용도 또는 염증 질환의 치료 또는 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명에 따른 조성물은 이하의 장점을 가진다.

- [0074] - 특히 건조 상태에서 위 방어벽 통과시의 저항능 및 생존능(이것은 위장관에 대한 효과를 최대화할 수 있음);
- [0075] - 항염증 작용;
- [0076] - 임의의 염증 유발 효과가 없거나 매우 적음;
- [0077] - 내장 통증 감소능, 및 끝으로
- [0078] - 병원성 박테리아 및/또는 위장관, 특히 소장 및 결장에 대한 침윤성을 갖는 것들의 부착 및 정착을 방지하고 감소시키는 능력.
- [0079] 이 특정 조합을 갖는 이러한 신규한 조성물은 아직 개시되거나 확인된 바가 없다.
- [0080] 따라서, 이것은 매우 주목된다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1은 실시예 2에 따라 인간 결장을 자극하는 인공 소화 시스템에서 ScPro1 효모균의 생존을 모니터링한 것을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 2에 따라 ScPro1 효모균의 복통 유발 마이크로플로라에 대한 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3 및 4는 예방(도 3) 및 치료(도 4)에 해당하는 실시예 5의 실험 1 및 2를 위한 마우스 변에서 칸디다 알비 칸스의 세포수 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 전배양(pre-incubation) ScPro1 효모균의 양에 따른 인간 내장 상피 세포에 대한 에스케리치아 콜리 AIEC LF82 세포의 잉여 부착 퍼센트를 나타낸 것으로, 효모균 세포는 1 시간 동안 내장 상피 세포와 함께 항온 처리되었다. AIEC LF82 균주를 갖는 세포의 감염을 실시예 6에 따라 ScPro1 효모균 존재 하에 실시하였다.
- 도 6은 공동으로 항온처리하는 ScPro1 효모균의 양에 따라 인간 장 내피 세포에 대한 에스케리치아 콜리 AIEC LF82 세포의 잉여 부착 퍼센트를 나타낸 것으로, 효모균 세포와 에스케리치아 콜리 세포는 실시예 6에 따라 1 시간 동안 장 내피 세포와 동시에 항온 처리하였다.
- 도 7은 실시예 4에 따라 ScPro1 및 SCB1 효모균의 투여 후 거시적 Wallace 스코어에 따른 마우스의 내장의 염증 강도 추정을 나타낸 것이다.
- 도 8은 실시예 4에 따라 ScPro1 및 SCB1 효모균의 투여 후 조직학적 Ameho 스코어에 따른 마우스 내장의 내장 상피의 염증 강도 추정을 나타낸 것이다.
- 도 9는 실시예 4에 따라 단독으로 또는 병용하여 복용된 ScPro1 및 SCB1 효모균의 투여 후 거시적 Wallace 스코어에 따른 마우스 내장의 염증 강도 추정을 나타낸 것이다.
- 도 10은 실시예 4에 따라 단독으로 또는 병용하여 복용된 ScPro1 및 SCB1 효모균의 투여 후 조직학적 Ameho 스코어에 따른 마우스 내장 상피의 염증 강도 추정을 나타낸 것이다.
- 도 11은 실시예 7에 따라 본 발명에 따른 효모균 또는 유도체를 인간 내장 상피 세포와 접촉시킨 후 1 시간 및 3 시간에 IL-10 단백질 코딩 유전자의 mRNA 발현 수준을 나타낸 것이다.
- 도 12는 실시예 7에 따라 본 발명에 따른 효모균 또는 유도체를 인간 내장 상피 세포와 접촉시킨 후 1 시간 및 3 시간에 핵 수용체 PPAR α 코딩 유전자의 mRNA 발현 수준을 나타낸 것이다.
- 도 13은 실시예 7에 따라 본 발명에 따른 효모균 또는 유도체를 인간 내장 상피 세포와 접촉시킨 후 1 시간 및 3 시간에 IL-10 단백질 코딩 유전자의 mRNA 발현 조절을 나타낸 것이다.
- 도 14는 본 발명에 따른 효모균 및/또는 유도체 투여 후 마우스 내장 상피 세포에서 IL-10 단백질 코딩 유전자의 발현을 나타낸 것이다(실시예 4).
- 도 15는 본 발명에 따른 효모균 및/또는 유도체 투여 후 마우스 내장 상피 세포에서 핵 수용체 PPAR α 코딩 유전자의 발현을 나타낸 것이다(실시예 4).
- 도 16은 본 발명에 따른 효모균 및 유도체와의 접촉 후 크론병의 영향을 받거나 받지 않은 환자의 생체 조직에서 얻은 내장 세포에 의하여 pg/ml로 측정된 시토킨 IL-10의 분비량을 도식한 것이다(실시예 8).
- 도 17은 본 발명에 따른 효모균 및 유도체와의 접촉 후 크론병의 영향을 받거나 받지 않은 환자의 생체 조직에

서 얻은 내장 세포에 의하여 분비되고 pg/ml로 측정된 TNF- α 시토킨의 양을 도시한 것이다(실시예 8)

도 18은 ScPro1 효모균의 만노단백질 분획(EL 05 및 EL 06)에 대한 1형 필라의 결합능을 측정하기 위한 테스트의 결과를 도시한 것이다.

도 19a 및 19b는 각각 효모균의 농도를 증가시키면서 공배양(co-incubation)하는 동안 T84 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 평균 잉여 침윤 및 부착 퍼센트를 나타낸 것이다(실시예 6)- * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

도 20a 및 20b는 각각 EL05 효모균 만노단백질의 농도를 증가시키면서 공배양하는 동안 T84 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 평균 침윤 및 부착 퍼센트를 나타낸 것이다(실시예 6).

도 21a 및 21b는 각각 효모균의 농도를 증가시키면서 전배양하는 동안 T84 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 평균 잉여 침윤 및 부착 퍼센트를 나타낸 것이다(실시예 6) - * $p < 0.05$, 및 ** $p < 0.01$.

도 22a 및 22b는 각각 EL05 효모균 만노단백질의 농도를 증가시키면서 전배양하는 동안 T84 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 평균 침윤 및 부착 퍼센트를 나타낸 것이다(실시예 6) - * $p < 0.05$, 및 ** $p < 0.01$.

도 23은 순간 건조 효모균의 농도를 증가시키면서 전배양하는 동안 CHO-K1 및 CHO-K1/CEACAM6 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 평균 잉여 부착 퍼센트를 나타낸 것이다(실시예 6) - * $p < 0.05$, 및 ** $p < 0.01$.

도 24는 크론병의 영향을 받은 3 세포 샘플의 장세포의 브러쉬 보더에 대한 AIEC LF82 균주 또는 비염진모(non-piliated) LF82- $\delta fimH$ 돌연변이의 부착을 나타낸 것이다(예컨대 6).

도 25는 건강한 래트에서의 상이한 효모균에 대하여 상대적으로 통증 인지 역치(수은 mm로 측정)의 측정을 나타낸 것이다(실시예 9).

도 26은 내장 과민증을 갖는 래트에서의 상이한 효모균에 대하여 상대적으로 통증 인지 역치(수은 mm로 측정)의 측정을 나타낸 것이다(실시예 9).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예:

실시예 1: 인간의 장을 자극하는 인공 소화 환경에서 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균의 생존

위장관 전이 동안 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균의 사멸 연구

위장 전이 동안 테스트된 생존 가능한 효모균의 생존을 특히 연구함으로써 ScPro1 및/또는 SCB1 효모균을 인간 소화를 자극하는 인공 소화 환경에서 생체 테스트 및 연구하였다.

ScPro1에서 유래하는 활성 건조 효모균의 두 샘플 및 SCB1에서 유래하는 활성 건조 효모균의 두 샘플을 테스트 하였다.

두 샘플은 진공 실온에서 저장 시간이 6개월 미만 숙성 또는 2년 숙성으로 상이하였다.

* 실험 조건:

투석 및 흡수에 의하여 소화 생성물을 제거하여 공복인 건강한 인간 성인에서 액체 음식물(물)의 소화를 재현하는, 문헌으로부터 얻은 데이터로부터 확립된 실험 조건에 따라 TIM1(위 + 소장)이라 불리는 시스템에서 소화시켰다. 각 소화는 5 시간에 걸쳐 실시하였다. 모든 소화는 동일한 일반 조작 조건 하에서 실시하였다, 즉:

온도:

온도는 37℃였다.

위 배출 파라미터:

위 배출은 다음과 같이 기술되는 Elashoff 등에 의해 정의된 법칙(1982)에 따른다:

$$F = t \cdot 2e^{\{-(1/T)^b\}}$$

여기서, F는 전달되는 음식물의 분율을 나타내고, t는 시간이며, T는 음식물의 반배출 시간이고, b는 곡선의 양상을 나타내는 파라미터이다. 파라미터는 T = 15분, b = 1이다. 회장 배출 파라미터: 회장 배출은 변형된 Elashoff 법칙(소화 말기에 배출을 느리게 할 수 있는 파라미터 d의 도입,

- [0096] $F_m = F + d * t^3$)을 따른다.
- [0097] 파라미터는 $T = 150$ 분, $b = 2.4$, $d = -10^{-7}$ (도 2 참조)이다.
- [0098] pH 세트 값:
- [0099] 위(분/pH): 0/6.0; 10/3.2; 20/2.4; 40/1.8; 60/1.6; 90/1.5; 300/1.5
- [0100] 십이지장: 6.4
- [0101] 공장: 6.9
- [0102] 회장: 7.2
- [0103] 위 분비:
- [0104] HCl
- [0105] 펩신
- [0106] 리파제
- [0107] 장 분비:
- [0108] 소장의 세 부분에서 NaHCO_3
- [0109] 십이지장에서 담즙 추출물
- [0110] 십이지장에서 판크레아스 추출물
- [0111] 투석/흡수
- [0112] 혈액 투석기로 TIM1의 두 지점(공장 및 회장)에서 장내 유미즙(intestinal chyme)의 "소"분자를 제거하였다. 혈액의 혈장의 조성과 비슷한 조성의 식염수 용액에 대하여 연속적으로 장내 유미즙을 투석하였다. 투석물을 투석 백에 수집하였다.
- [0113] 테스트된 효모균의 생존을 모니터링하기 위하여 소화 동안 소화관의 상이한 지점에서 샘플을 취하였다.
- [0114] 효모균의 카운팅을 표준 미생물학적 방법에 따라 실시하고 1 시간에 걸쳐 축적된 회장 배출물 및 최종 잔류물에서 10, 20, 30 및 45 분에 위에서 취한 샘플에 대하여 실시하였다.
- [0115] 카운팅 방법은 다음과 같았다:
- [0116] 각 샘플을 무균 생리학 적 식염수(NaCl 8.5 g/L)로 10분의 1로 빠르게 연속 희석하였다. 이어서 0.1 ml의 각 희석물을 펠트리 접시(희석당 두 접시)에 분포된 겔로스 배지의 표면에 부착 및 분산시켰다. 접시를 35°C에서 48 시간 동안 항온처리한 다음 "콜로니-형성 단위"(CFU)의 카운팅을 진행하였다.
- [0117] 카운트 결과를 CFU/ml(미처리 데이터) 및 위 및 소장(준제시)에서 효모균의 생존율을 측정하기 위하여 처음 도입된 효모균에 대한 살아 있는 효모균의 퍼센트로 표현하였다.
- [0118] 하기 표는 위에서, 소화 5시간 후 회장 배출물 전체에서 및 소화 5시간 후 시스템 전체에서 각 군주에 대하여 얻어진 이론 생존율(100% 생존 가능할 경우) 및 실제 생존율을 요약한다.
- [0119] * 결과:

표 1

[0120]	소화된 생성물	도입된 효모균(CFU)	T = 45 분에서 위 배출물	T = 5 시간에서 회장 배출물	T = 5 시간에서 전체 생존
	Scpro1 배취 1	3.5×10^{10}	89%	100%	106%
	Scpro1 배취 2	2.0×10^{10}	88%	95%	106%
	SCB 1	1.5×10^{10}	83%	76%	81%

SCB 2	1.5×10^{10}	85%	69%	76%
-------	----------------------	-----	-----	-----

- [0121] * 결론
- [0122] 이들 결과는 실제로 ScPro1 및 SCB1 효모균에 대한 우수한 위장 생존을 입증한다.
- [0123] **실시예 2: 인간 장을 자극하는 인공 소화 환경에서 ScPro1 효모균의 생존**
- [0124] **복통 유발 발효 동안 ScPro1 효모균의 생존 및 장내 마이크로플로라에 미치는 영향**
- [0125] 특히 복통 유발 발효 동안 생존 가능한 테스트 효모균의 사멸 및 환경적 영향을 연구함으로써 활성 건조 형태의 ScPro1 효모균을 인간 소화를 자극하는 인공 소화 환경에서 시험관내 테스트 및 연구하였다.
- [0126] 복통 유발 발효는 플로라를 유지하기 위해 순차적으로 배지를 공급하면서 연속적으로 발효시키는 것이다. 이러한 배지는 주로 소화관의 상부에서 소화되지 않는 탄수화물 복합 화합물(전분, 펙틴, 셀룰로오스…), 다소 가수분해된 프로타이드 화합물 및 미신을 함유한다.
- [0127] 복통 유발 배지는 또한 순차적으로 발효기로부터 제거된다. 상기 배지를 가용성 발효 생성물을 연속적으로 제거할 수 있는 투석 시스템으로 커버한다.
- [0128] 투석물을 수집하여 단쇄 지방산(SCFA)을 분석한다. 배지는 특정 발효 가스에 의하여 발생된 혐기 환경에서 유지되며 -300 mV 미만의 산화환원 전위를 가진다. 끝으로, pH를 6의 설정값으로 제어한다.
- [0129] 각 소화는 결장에 플로라를 파종한 후 2~3일 이것을 안정화시키는 기간, 제품을 적어도 매일 첨가하면서 치료하는 기간(적어도 3 일) 및 3일 동안 치료를 중지하는 기간을 포함하였다.
- [0130] 각 실험에서, 이하의 파라미터를 따르고 및/또는 기록하였다:
- [0131] - 효모균의 생존성,
- [0132] - 상이한 호기성 및 혐기성 박테리아 군집의 발생,
- [0133] - 주요 발효 생성물의 발생(SCFA 및 가스),
- [0134] - 표준 효소 활성의 검출, 및
- [0135] *- 온도, pH 및 산화환원 전위.
- [0136] 30 ml의 복통 유발 배지(배양 배지 플러스 신선한 배설물의 플로라)에서 크립프 격막으로 폐쇄한 60 ml의 페니실린 플라스크에서 발효를 실시하였다. 상기 효모균 샘플을 30 ml의 배지에 첨가하였다.
- [0137] 복통 유발 배지는 한편으로 인산염 완충액 중의 신선한 변에서 유래하는 미생물 부유액 및 다른 한편으로 인공 결장에서 복통 유발 플로라를 배양하는 데 사용되는 일반적인 음식물로 이루어진다.
- [0138] 복통 유발 배지와 테스트할 생성물의 혼합 후, 플라스크를 막고 구부린다.
- [0139] 이들 모든 조작은 무산소 후드(산소를 포함하지 않는 가스 혼합물)에서 실시하였다. 플라스크를 24시간 동안 회전 항온처리기(37°C - 200 rpm)에 두었다.
- [0140] 각 생성물에 대하여, 테스트를 두 번 하였다. 또한, (임의의 생성물을 포함하지 않는) 4개의 대조군 플라스크를 동일한 조건 하에서 제조하였다. 두 플라스크를 즉시(초기) 처리하고 두 플라스크를 테스트 플라스크와 같이 항온처리하였다.
- [0141] 24 시간 후에 발효를 정지시킨 다음 플라스크를 처리하였다.
- [0142] **발효 가스의 제조:** 발효에 의하여 생성되는 가스의 부피를 Mariotte 시스템(페니실린 플라스크에 함유된 가압 가스에 의하여 움직인 물의 변위를 기준으로 측정하는 원리)으로 측정하였다. 이어서 플라스크 내에 존재하는 가스를 GPC로 분석하였다(H_2 , CO_2 , CH_4 , O_2).
- [0143] **단쇄 지방산의 제조:** 복통 유발 내용물의 최초 샘플 채취를 실시하였다. 이후 이것을 동결 건조하거나 또는 직접 처리하여 배양 상청액의 SCFA 농도(휘발성 단쇄 지방산)를 측정하였다. 이러한 분석은 GPC로 실시하였다. 추

적되는 대사산물은 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 이소부티르산, 발레르산, 이소발레르산, 카프로산, 이소카프로산 및 헵탄산이었다.

[0144] **미생물학적 분석:** 보통 유발 내용물의 제2 샘플 채취를 실시하고 직접 처리하여(환원 회석 배지에서 10분의 1까지 연속 회석) 총 혐기성 플로라, 호기-혐기 선택성 플로라 및 진균성 플로라를 카운팅하였다.

[0145] ScPro1 효모균의 생존에 관한 결과를 도 1에 나타낸다. 이 도면에서, 각각의 수직 화살표는 ScPro1 효모균의 투여를 나타낸다.

[0146] 효모균은 투여 후 3일째에 양호한 생존율을 그리고 투여 기간 중 4일 내지 7일에 강한 치사율을 보이는 것으로 나타났다. 이것은 이 효모균이 보통 유발 환경에 이식되지 못함을 나타낸다.

[0147] 미생물학적 분석 결과는 도 2에 도시된다. 이것은 효모균의 투여 중지 후 상승하는 ScPro1 효모균의 존재 하에 엔테로박테리아의 감소를 나타낸다. ScPro1 효모균의 투여 동안, 항생제(클로르암페니콜, 게나마이신)에 내성인 플로라가 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

[0148] ScPro1 효모균이 휘발성 단쇄 지방산(SCFA)의 제조에 미치는 효과에 관한 결과는 아래 표에 요약되어 있다(보통 유발 배지 중 mM으로서 표현됨).

표 2

	처리전	처리중	처리후
아세테이트	71.4 ±2.3	57.6 ±4.2	60.6 ±0.7
프로피오네이트	22.8 ±0.6	26.5 ±4.2	35.7 ±1.1
부티레이트	35.0 ±1.6	36.5 ±2.2	26.6 ±4.2
이소부티레이트	3.2 ±0.3	3.3 ±0.2	3.4 ±0.1
이소발레레이트	5.6 ±0.5	5.2 ±0.2	5.3 ±0.0
발레레이트	8.0 ±0.6	7.8 ±1.4	9.1 ±0.9
이소카프로에이트	0.1 ±0.1	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
카프로에이트	9.0 ±1.1	7.3 ±0.3	5.7 ±0.7
헵타노에이트	0.2 ±0.2	0.0 ±0.1	0.0 ±0.0
총계	155.3 ±2.7	144.1 ±6.8	146.4 ±3.4

[0150] 처리 동안, 부분적으로 프로피오네이트 대신 아세테이트의 감소가 확인되었다. 이것은 아세트산 생성 마이크로 플로라의 활성 감소를 시사한다.

[0151] 다른 모니터링된 파라미터 중에서, 이하에 대하여 확인된 처리 효과는 관찰되지 않았다:

[0152] * 가스 생성(양 및 비율로);

[0153] * 전체 당류 및 단당류의 농도(경시적으로 안정); 및

[0154] * 효소 활성.

[0155] **실시예 3: 시토킨 생성 유도에 대한 ScPro1, SCB1 효모균의 영향 연구**

[0156] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 시토킨의 생성 유도에 대한 살아 있는 ScPro1 및 SCB1 효모균의 영향을 연구하였다.

[0157] 순간 건조 형태 및 활성 건조 형태의 ScPro1 및 SCB1 효모균을 인간 PBMC에서 IL-10, ILK-12, TNF α, TNF δ 시

토킨의 유도 생성능에 대하여 테스트하였다.

[0158] 인간 말초 혈액 단핵 세포의 제조

[0159] 수혈 센터에서 건강한 대상으로부터 얻은 신선한 인간 혈액을 PBS-Ca(GIBCO)로 2회 회석하고 Ficoll 구배(GIBCO)에서 정제하였다. 400 x g에서 30분 동안 20℃에서 원심분리 후, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 혈청 중에 원형층으로 형성되었다. PBMC를 조심스럽게 흡인하고, PBS-Ca를 사용하여 최종 부피 50 ml로 현탁시키고, 20℃에서 350 x g로 10 분 원심분리 단계로 동일한 완충 용액 중에서 3회 세정하였다. PBMC를 10% w/v의 태아 소 혈청(56℃에서 30분 동안 비활성화), 1% w/v의 L-글루타민(GIBCO) 및 겐타마이신(150 µg/ml)(GIBCO)이 풍부한 완전 RPMI 배지(GIBCO)를 사용하여 재현탁시켰다. PBMC를 현미경을 이용하여 카운팅하고, 2×10^6 세포/ml의 농도로 조절하고, 24-웰 세포 배양 접시(Corning, Inc)에서 (1 ml의 분취 용액에)분포시켰다.

[0160] 미생물학적 제제

[0161] 발새 생성된 락토바실러스, 락토코쿠스 및 에스케리치아 콜리(대조군 균주)의 배양물을 pH 7.2에서 PBS 완충액으로 2회 세정한 다음, 2.10^9 CFU/ml의 농도로 PBS에 재현탁시켰다.

[0162] 제1 실험에서 사용된 효모균 농도는 2.10^8 CFU/ml였다. 초기 용량 비교 연구를 위하여, 10 대 10의 일련의 희석을 실시하여 2.10^7 CFU/ml, 2.10^8 CFU/ml 및 2.10^9 CFU/ml의 효과를 비교한다.

[0163] 인간 말초 혈액 단핵 세포의 항온처리

[0164] 10 µL의 이들 처리 현탁액(working suspension)을 5%의 CO₂ 및 95%의 대기 공기로 이루어지는 가스 혼합물에서 37℃에서 항온처리하도록 설정된 PBMC를 함유하는 접시의 웰에 옮겼다. 24 시간 항온처리 후, 상청액을 흡인하고, 2,000 rpm에서 원심분리하고(Eppendorf model), 제거하여 20℃에서 유지하였다.

[0165] 대조군은 그람-음성 박테리아(락토바실러스 및 락토코쿠스), 그람-음성 박테리아(에스케리치아 콜리) 및 임의의 효모균을 포함하지 않는 완충액으로 이루어진다.

[0166] 시토킨의 정량

[0167] 시토킨의 발현 수준을 ELISA로 측정하였다. ELISA 플레이트를 (하룻밤 동안) 항체로 덮고 항체를 PBS/1% BSA(소 혈청 알부민)로 포화시켰다. 15.62 내지 2,000 pg/ml(발새 항온처리)의 검출 역치를 갖는 공지된 농도의 시토킨으로 조정액(calibration)을 제조하였다. TMB 기질(테트라메틸벤지딘, Pharmingen 2)으로 스트렙타비딘 활성을 측정함으로써 항시토킨의 정량 연구를 실시하였다. 시판되는 Pharmingen 키트를 제조자의 설명서에 따라 사용하였다. 4 종의 시토킨, 즉, 3 종의 염증 유도 시토킨(TNF α, INF γ, IL-12) 및 1 종의 항염증 시토킨(IL-10)을 선택하였다.

[0168] 결과

[0169] 1/1 효모균/PBMC의 비율에서 5의 별개의 공여체에게 4종의 시토킨에 대한 반응을 평가하였다.

[0170] 배양 상청액 중의 4 분비 시토킨의 투약 결과는 아래 표 3에 요약되어 있다. 데이터는 5 공여체의 투약으로부터 얻은 평균값(Avg)으로서 표현된다. 표는 또한 평균 표준 오차 값(Sem)을 제공한다.

표 3

[0171]

	IL-10(pg/ml)		INF γ (pg/ml)		TNF α , (pg/ml)		IL-12(pg/ml)	
	Avg	Sem	Avg	Sem	Avg	Sem	Avg	Sem
음성 대조군	0	0	50	0	50	0	0	0
E. 콜리	2474	839	57376	29591	11185	3875	15	15
락토코쿠스 락티스	111	43	136103	62706	25362	9818	1101	543
비피도박테리움 룡균	1072	355	33780	27164	14517	5601	22	20
락토바실러스 아시도필러스	435	259	85543	46838	18369	6857	539	343
SCB1	569	291	27807	19231	6492	2698	14	10
ScPro1	442	292	15218	9304	3643	1847	8	5

- [0172] 1) 효모균 ScPro1 및 SCB1에 대하여, 표준 박테리아와 달리, PBMC에 의하여 유도된 IL-12는 매우 소량으로 또는 심지어 검출 불가능한 양으로 생성됨이 관찰되었다.
- [0173] 2) 실질적인 수준의 IL-10이 살아 있는 양 효모균에 대하여 관찰되어 SCB1이 ScPro1보다 더 양호한 결과를 가짐을 시사하였다.
- [0174] 3) INF γ 및 TNF α 에 대하여, ScPro1 및 SCB1 효모균의 작용 하에 분비된 양은 다른 테스트된 박테리아 생균제에 비하여 명백히 더 적다.
- [0175] 결론:
- [0176] - 락토바실리 생균제에서 종래 관찰되는 것과는 달리 ScPro1 및 SCB1 효모균은 PBMC의 존재 하에 염증 유발 시 토킨 IL-12를 유도하지 않는 것이 매우 명백하다.
- [0177] - ScPro1 및 SCB1 효모균은 PBMC의 존재 하에 실질적인 수준의 IL-10(항염증성)을 유도한다.
- [0178] - PBMC에 의하여 분비되는 IFN- γ 및 TNF- α 의 양은 ScPro1 및 SCB1 효모균의 존재 하에 박테리아 생균제보다 명백히 더 적다.
- [0179] **실시예 4: 류린 화학 유도 모델(TNBS)에서 결장염에 대한 ScPro1 및 SCB1 효모균의 보호 효과의 평가**
- [0180] 제안된 동물 모델이 현재 사용되며 효모균의 항염증 효과를 측정하기 위하여 적용되었다.
- [0181] 6주된 Balb/c 마우스를 이 테스트 동안 사용하였다. 임의로 물과 음식을 제공하여 실험 1주일 전에 실험실 조건에 마우스를 적응시켰다. 10 마리의 마우스 군에 대하여 각 샘플을 테스트하였다. 7일 동안 임의로 5%(w/v-1)의 TNBS를 함유하는 음료수 공급 동안 주기적으로 결장염을 유도하였다. TNBS에 의한 결장염 유도 개시 3일전 및 TNBS 치료 동안(7일) 하루에 한 번 강제로 먹여 효모균을 경구 투여하였다.
- [0182] 두 테스트 그룹 외에, 대조군 그룹(음성 대조군)을 준비하였고, 이것에 대하여 생리학적 식염수 용액만을 사용하였다.
- [0183] 테스트된 파라미터는 치료 후 다음과 같다:
- [0184] - **장염의 현미경 평가(Wallace 스코어)**. 충혈, 결장벽의 두께 및 궤양의 범위와 같은 염증의 중증도를 나타내는 평가 기준에 따라 0 내지 10의 범위인 Wallace 스코어 시스템에 따라 거시적 병변을 평가하기 위하여 해부 현미경(배율, x5) 하에서 각 마우스의 결장을 조사하였다.
- [0185] - **염증의 조직학적 평가(Ameho 스코어)**. 항문관으로부터 2 cm에서 정확히 채취된 결장 부분을 염증의 침윤 정도, 짓무름, 궤양 또는 괴사의 존재 및 병변의 표면 범위와 깊이에 따라 0 내지 6 범위인 Ameho 스코어에 따른 조직학적 평가에 사용하였다. 2명의 독립적인 오퍼레이터가 장 병변 및 악화 정량을 실시하였다.
- [0186] - **IL-10 및 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 발현 정량**. 이를 위하여, 전체 RNA를 제조자의 지시에 따라 RNeasy 키트(Macherey Nagel, Hoerd, France)를 사용하여 결장 조직으로부터 분리하였다. 분광광도계를 사용하여 메신저 RNA를 정량하였다. 37°C에서 30분 동안 20 내지 50 단위의 RNase-free DNase I(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재 Roche Diagnostics Corporation사)로 치료 후, 올리고-DT 프라이머(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재 Roche Diagnostics Corporation사)를 원형 단일 가닥 DNA의 합성에 사용하였다. 메신저 RNA는 GeneAmp Abiprism 700 장치(Applera, Courtaboeuf, France)에 의하여 SYBR 그린 Master Mix(Applera, Courtaboeuf, France) 및 시험관 연구를 위한 특정 인간 올리고뉴클레오티드(아래 표 4 참조)로 정량되었다. 보정 및 비보정된 대조군을 각 테스트에서 유도하였다. 각 샘플을 3회 측정하였다. 그린 SYBR의 색 강도를 소프트웨어 패키지 Abiprism 7000 SDS(Applera, Courtaboeuf, France)로 분석하였다. 모든 결과는 β -액틴을 코딩하는 유전자에 대하여 정상화(normalization)된다.

표 4

[0187]

유전자	뉴클레오티드 프라이머 서열
β -액틴	F: 5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAAg-3'
	R: 5'-AAGCAATgCTgTCACCTTCCC-3'
PPAR α	F: 5'-ACgATgCTgTCCTCCTTgATg-3'
	R: 5'-gTgTgATAAAgCCATTGCCgT-3'

IL-10	F: 5'-CAGTCAGCCAGACCCACAT-3' R: 5'-gCTCCACTgCCTTgCTTT-3'
-------	---

- [0188] ScPro1 및 SCB1 효모균을 상기 개시한 표준 예방 모델에서 테스트하였다. 결장염 유도 전의 동물의 체중 모니터링은 마우스에 투여된 효모균 제제의 내성이 매우 양호함을 나타내었다.
- [0189] Wallace 스코어에 의하여 평가하였을 때, 양성 대조군에 비하여 ScPro1 효모균(활성 건조 효모균, 1 mg/일) 및 SCB1 효모균으로 장염이 60% 감소하였다. SCB1 효모균은 또한 염증 감소를 유도하였다. 또한, Ameho 스코어에 의하여 평가된 장 괴사는 양성 대조군에 비하여 ScPro1 효모균(순간 건조 효모균, 1 mg 또는 100 μ g/일)으로 스코어가 3분의 1 감소하였다.
- [0190] 단독으로 또는 함께 투여된 ScPro1 및 SCB1 효모균은 항염증 인터류킨 IL-10 및 핵 수용체 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 증가시킨다.
- [0191] 도 7 내지 10은 상이한 1일 투약에서 ScPro1 및 SCB1 효모균의 우수한 거시적 Wallace 및 Ameho 스코어 값을 나타낸다.
- [0192] 10 μ g 및 1 mg의 1일 투약에서 순간 건조 형태의 ScPro1 및 SCB1 효모균의 거시적 Wallace 스코어 및 조직학적 Ameho 스코어는 각각 도 7 및 8에 나타내었다.
- [0193] 도 7 및 8의 그래프의 각 칼럼의 숫자는 하기 요소를 나타낸다:
- [0194] 1은 TNBS 단독,
- [0195] 2는 TNBS + ScPro1(1 mg),
- [0196] 3은 TNBS + ScPro1(100 μ g),
- [0197] 4는 TNBS + SCB1(1 mg),
- [0198] 5는 TNBS + SCB1(100 μ g).
- [0199] 100 μ g/일로 투여된 순간 건조 ScPro1 효모균은 거시적 및 조직학적 레벨에서 병변을 현저히 감소시킴을 알 수 있었다.
- [0200] 1일 용량 100 μ g 및 1 mg으로 단독으로 또는 조합하여 투여된 순간 건조 또는 활성 건조 형태의 ScPro1 및 SCB1 효모균의 거시적 Wallace 스코어 및 조직학적 Ameho 스코어는 각각 도 9 및 10에 나타낸다.
- [0201] 도 14 및 15는 각각 장 세포에서 항염증 인터류킨 및 PPAR α 핵 수용체를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 나타낸다.
- [0202] 도 9, 10, 14 및 15의 그래프의 각 칼럼의 숫자는 하기 요소를 나타낸다:
- [0203] 1는 TNBS 단독,
- [0204] 2는 TNBS + 순간 건조 ScPro1(100 μ g),
- [0205] 3은 TNBS + 활성 건조 ScPro1(10 μ g),
- [0206] 4는 TNBS + 활성 건조 SCB1(100 μ g),
- [0207] 5는 TNBS + 활성 건조 ScPro1(1 μ g),
- [0208] 6은 TNBS + 활성 건조 ScPro1(100 μ g),
- [0209] 7은 TNBS + 활성 건조 ScPro1(100 μ g) + SCB1(100 μ g).
- [0210] 결론:
- [0211] 활성 건조 형태의 ScPro1은 거시적 수준에서 병변을 현저히 유도하며 ScPro1 및 SCB1의 조합에 의하여 거시적 및 조직학적 수준 모두에서 항염증 상승 효과가 나타남을 알 수 있다.
- [0212] ScPro1 및 SCB1은 100 μ g의 용량에서 항염증 인터류킨 IL-10을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 각각 2.9 및 3.1 증가시켰다. ScPro1 + SCB1(막대 그래프 7번)의 조합은 이 발현 수준을 2.7 배가시킨다(도 14).

- [0213] ScPro1 및 SCB1은 100 μ g의 용량에서 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 각각 1.5 및 1.6 증가시켰다. ScPro1 + SCB1(막대 그래프 7번)의 조합은 이 발현 수준을 1.7 배가시킨다(도 15).
- [0214] **실시예 5: 화학 유도 염증 뮤린 모델에서 장에서의 칸디다 알비칸스의 정착**에 대한 ScPro1 및 SCB1 효모균의 영향 연구
- [0215] 이 연구는 병원성 효모균 칸디다 알비칸스의 장내 정착 및 화학 유도된 결장염 뮤린 모델에서 이의 염증 유발 효과에 대한 생균제 유형의 ScPro1 및 SCB1 효모균의 투여 효과를 측정하는 것을 목적으로 한다.
- [0216] 테스트된 효모균은 순간 건조 형태이다.
- [0217] * 실험 조건:
- [0218] Balb/C 군주의 암컷 마우스는 4 내지 6주 연령이다. 0일부터 14일까지, 염증의 화학적 유도를 위하여 상기 동물은 음료수 중 1.5%로 DSS(텍스트란 황산나트륨)를 받았다.
- [0219] 세 실험을 실시하였다.
- [0220] 제1 실험에서, 5일째에, 마우스에게 200 μ L의 PVS (포스페이트 완충액) 중 5×10^7 ScPro1 효모균 세포를 포함하는 캐놀라를 강제로 삽입하였다. 이 조작을 19일 동안 매일 새롭게 하였다. 0일에, 마우스에게 200 μ L의 PBS 중 C. 알비칸스 SC5314 군주의 5×10^7 ScPro1 효모균 세포를 포함하는 캐놀라를 강제로 삽입하였다.
- [0221] 제2 실험에서, 0일에, 마우스에게 200 μ L의 PBS 중 C. 알비칸스 SC5314 군주의 5×10^7 ScPro1 효모균 세포를 포함하는 캐놀라를 강제로 삽입하였다. 4일에, 마우스 배치에 200 μ L의 PBS 중 5×10^7 ScPro1 효모균 세포를 강제로 공급하였다. 이 조작을 14일 동안 매일 새롭게 하였다.
- [0222] 제3 실험에서, 0일에, 마우스에게 200 μ L의 PBS 중 C. 알비칸스 SC5314 군주의 5×10^{17} ScPro1 효모균 세포를 포함하는 캐놀라를 강제로 삽입하였다. 1 시간 후, 마우스 배치에 200 μ L의 PBS 중 5×10^7 ScPro1 효모균 세포를 강제로 공급하였다. 이 마지막 조작을 14일 동안 매일 새롭게 하였다.
- [0223] (실험 1, 2 및 3으로부터의) 동물을 이하의 포인트에 대하여 매일 모니터링하였다:
- [0224] - 대변의 밀도, 항문 출혈, 체중(임상적 스코어),
- [0225] - 1 ml의 PBS 중 1 g의 균질화된 대변의 레트로배양(retroculture), 각각 10 μ L를 Candi-셀렉트 배지에 파종; 37°C에서 배양 24 시간 후, C. 알비칸스(청색으로 착색) 및 S. 세레비시아이(녹색으로 착색)의 CFU를 카운팅,
- [0226] - 테스트 말기에 동물이 희생되었다. 심천자(cardiac puncture)로 혈액을 측각 채취하여 실온에서 디캔팅하고, 혈청을 원심 분리에 의하여 회수하여 -80°C에서 보관하였다; 결장을 채취하여 4 구획으로 나누고, 이들 중 3 구획을 고도로 동결건조시키고 하나를 조직학적 연구를 위해 고정액(4% PFA)에 두었다.
- [0227] * 결과:
- [0228] 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 제1 실험(예방 효과 테스트)에서, 이러한 화학적으로 유도된 결장염의 모델에서 DSS의 투여는 4일로부터 C. 알비칸스가 장내 점막에 정착하는 것을 현저히 증가시키는 것으로 관찰되었다(DSS+Ca). 매우 흥미롭게도, 19일 동안 ScPro1 생균제 효모균의 투여는 DSS에 의하여 유도되는 C. 알비칸스의 정착을 현저히 감소시키는 것으로 보인다.
- [0229] 도 4에 도시된 바와 같이, 제2 실험(치료 테스트)에서, ScPro1 또는 SCB1 생균제 효모균의 투여는 DSS에 유도되는 정착을 감소시키는 것으로 관찰된다. 또한, ScPro1 효모균의 효과는 14일에 DSS에 의한 치료 중단 후에도 가시적이다.
- [0230] * 결론:
- [0231] ScPro1 효모균 또는 SCP1 효모균의 투여는 C. 알비칸스의 정착을 현저히 감소시키는 것으로 보이며 이것은 예방 조건하에 및 치료 조건하에 모두 해당한다. 이것은 치료 중단시에도 이러한 보호 효과가 지속된다는 사실에 주목하여야 한다.
- [0232] **실시예 6: 크론병의 영향을 받은 환자의 회장 생체 조직에서 분리한 E. 콜리** 병원성 군주의 부착력 및 침윤력에

대한 ScPro1 또는 SCB1 효모균 또는 유도체의 억제 효과에 대한 연구

- [0233] 크론병의 영향을 받은 환자의 회장 생체 조직에서 분리한 E. 콜리 병원성 균주의 부착력 및 침윤력 억제 효과에 미치는 살아 있는 효모균, ScPro1, SCB1 및 유도체의 영향을 연구하였다.
- [0234] 크론병(CD)의 영향을 받은 환자의 회장 생체 조직에서 분리한 부착성-침윤성 E. 콜리를 나타내는 AIEC로 표시되는 E. 콜리 균주는 내장 내피 세포에 부착하여 이것을 침윤할 수 있다.
- [0235] 크론병의 영향을 받은 환자에서 만성 회장 병변에서 분리한 LF82 E. 콜리 균주는 침윤성 박테리아 병원의 모든 특징을 가진다. E. 콜리, 시겔라 및 살모넬라에서 이미 기재한 침윤성 유전 결정 인자의 부재 및 LF82 균주의 부착-침윤 표현형의 특성화는 AIEC로 표시된 크론병과 연관될 수 있는 E. 콜리의 신규한 병원 그룹의 존재의 정의를 유도하였다. 뮤린 또는 인간 대식 세포에 의한 식균 작용 후, AIEC LF82 균주는 숙주 세포의 생존성을 보존하면서 다양한 액포에서 생존하고 증식한다. 감염 후, 대식 세포는 유의적인 비율의 TNF α 를 분비한다. AIEC 균주의 과급은 CD의 영향을 받은 환자의 회장 병변에서 36.4%이다.
- [0236] 진핵 세포에 대한 박테리아의 부착 과정은 부착소라 불리는 박테리아 표면에 존재하는 리간드 및 호스트의 내피 세포의 표면에서 발견되는 단백질, 당단백질 또는 당지질 성질의 수용체 사이의 특이적 상호작용의 결과이다. 박테리아에 대하여, I형 필라이(pili)의 FimH 부착소는 내장 상피 세포에 대한 AIEC 박테리아의 부착에 관여하는 것으로 나타났다. 박테리아 FimH 부착소는 만노스 잔류물 중에 풍부하고 CD의 영향을 받은 환자의 90%에서 회장 수준에서 비정상적으로 과다 발현되는 한 당단백질인 CEACAM6 장세포(enterocyte) 수용체(CD66c 또는 NCA로서도 표시됨)를 인식한다.
- [0237] **실험 조건:**
- [0238] 배양된 내장 상피 세포의 부착력 및 침윤력을 특징으로 하는 균주 AIEC LF82를 표현형 균주로서 사용하였다.
- [0239] 이 연구는 AIEC LF82 균주로 얻은 결과를 확인하기 위하여 CD의 영향을 받은 환자로부터 분리한 AIEC 균주까지 확대되었다.
- [0240] 만노스(Afa/Dr 부착소)와 독립적인 기전에 의하여 내피 세포에 부착하는 DAEC(확산 부착성 에스케리치아 콜리) C1845 E. 콜리 균주를 음성 대조군으로 사용한다.
- [0241] **유착 테스트**
- [0242] 살아 있는 ScPro1 및 SCB1 효모균에서, Boudeau 등(2001 Mol. Microbiol. 39: 1272-84)에 개시된 절차에 따라 AIEC LF82 균주로부터 제조된 I형 필라이의 정제된 추출물의 존재 하에 또는 AIEC 박테리아의 존재 하에 정량적 유착 테스트를 실시하였다. 유착 지수는 설정된 효모균 농도 및 박테리아 또는 정제된 I형 필라이의 생존 가능 농도로 결정되었다.
- [0243] 유착이 관찰되지 않는 만노단백질 유형의 효모균 분획의 경우, I형 필라이의 결합능은 ELISA 기술에 의하여 결정되었다.
- [0244] 이들 테스트는 마이크로플레이트에서 통상적으로 실시된다. 효모균 분획은 마이크로플레이트에 고정된다. I형 정제 필라이의 각종 희석물을 효모균 분획과 접촉시킨다. 세정 후, I형 필라이는 래빗에서 얻어지는 I형 항필라이 항체로 노출된다(Boudeau et al., 2001). 세정 후, 퍼옥시다제와 결합된 2차 항체가 사용된다. 450 나노미터의 광학 밀도에서 마이크로플레이트를 판독함으로써 퍼옥시다제(H_2O_2) 및 발색제(테트라메틸벤지딘)의 기질을 사용하여 정량화한다.
- [0245] ScPro1 또는 SCB1 효모균에 의하여 내장 내피 세포의 표면에서 발현되는 CEACAM6 수용체와 AIEC 박테리아의 상호작용에 대한 테스트
- [0246] 사용된 세포:
- [0247] 시험관 억제 테스트(전배양 및 공배양)를 위하여, 수용체 CEACAM6을 강하게 발현시키는 미분화된 T84 내장 상피 세포를 유지하였다. T84 세포를 37°C에서 50%의 Ham-F12(Life Technology) 및 10%의 태아 소 혈청을 첨가한 DMEM(둘베코 변형 이글 배지) 기본 배지에서 5%의 CO₂ 하에 열을 보충하지 않고 배양하였다. 이 배지에 MEM(최소 필수 배지) 배지(Life Technology)를 위한 1%의 비필수 아미노산(Life Technology), 1%의 글루타민(Life Technology), 200 U/L의 페니실린, 50 mg/L의 스트렙토마이신, 0.25 mg/L의 암포테리신 B 및 1%의 X-100 비타민 혼합물을 첨가하였다. 세포를 웰당 4.105 세포로 파종하고 5%의 CO₂ 하에 37°C에서 48 시간 동안 항온처리하

였다. 이후 T84 세포의 카펫을 PBS로 세정한 다음, 1 ml의 감염 배지(DMEM/F12 + 10%의 FCS)를 각 웰에 첨가하였다. Luria-Bertani 브로스(LB)에서 37℃에서 AIEC LF82 균주의 하룻밤 배양물로부터, PBS 중 0.1의 OD620을 갖는 박테리아 부유물을 제조하였다. T84 세포는 감염 배지에서 0.1의 OD620에서 25 μ L의 박테리아 부유물을 첨가함으로써 1 세포당 10 박테리아의 감염 중복 지수(MOI)까지 감염되었다. 24-웰 플레이트를 CO2가 풍부한 분위기 하에 37℃에서 3시간 동안 항온처리하였다. 박테리아의 부착 및 잉여 침윤은 이하에 개시되는 바와 같이 실행된다.

[0248] CEACAM6을 발현시키지 않는 CHO-K1 세포 및 CEACAM6을 안정하게 발현시키는 유전적으로 변형된 동일한 세포 (CHO-K1/CEACAM6)에 대한 실험을 사용하였다. CHO-K1 세포를 DMEM/F12 배지, 5%의 태아 소 혈청 세포, 1%의 L-글루타민, 200 U/L의 페니실린, 50 mg/L의 스트렙토마이신 및 0.25 mg/L의 암포테리신 B에서 배양하였다. CHO-K1/CEACAM6 세포를 DMEM/F12 배지, 5%의 태아 소 혈청, 1%의 L-글루타민 및 600 μ g/ml의 히그로마이신에서 배양하였다. 세포를 24-웰 플레이트에 2.10^5 세포/웰로 파종하였다. 37℃에서 7~8 시간 항온처리 후, 5 mM의 부티르산나트륨을 첨가한 새로운 배양 배지로 배지를 교체하여 CEACAM6의 발현을 유도한다. 웨스턴 블롯을 실시하여 형질감염된 세포에 의한 CEACAM6 단백질의 발현을 모니터링하였다.

[0249] 37℃에서 20~24 시간 항온처리 후, 1 시간 동안 순간 건조 ScPro1 효모균 균주의 농도를 증가시키면서 세포를 항온처리하고(전배양 실험), 이어서 이들을 20의 MOI(4.10^6 박테리아/웰)로 감염시켜, T84 세포에 대하여 앞서 행한 실험 동안 사용된 박테리아/효모균 비율을 관찰하였다. 37℃에서 3 시간 항온처리 후, 하기 개시하는 바와 같이 효모균의 존재 또는 부재 하에 부착 박테리아를 카운팅하였다.

[0250] 또다른 실험은 환자로부터의 수술 부위를 사용하였다. 크론병의 영향을 받는 3명의 환자의 회장 생체 조직으로부터 얻은 장세포를 PBS에서 세정한 다음 2 ml의 오픈도르프 튜브에서, 1 ml의 DMEM 배지, 20%의 태아 소 혈청에서, 0, 1.25, 2.5 또는 5 mg/ml의 순간 건조 ScPro1 효모균 균주의 존재 하에 전배양하였다. 37℃에서 15분 동안 회전에 의하여 상기 튜브를 교반 하에 두고, 효모균의 존재 하에 장세포를 IEC LF82 균주의 하룻밤 LB 배양물 50 μ L로 감염시켰다. 교반하면서 3 시간 동안 항온처리하였다. 장세포를 PBS에서 2회 세정한 다음, 슬라이드 및 라멜라 사이에 부착시키고 상 대비 현미경으로 관찰하였다. 장세포의 브러쉬 보더에 부착하는 박테리아를 효모균의 존재 하에 또는 부재 하에 카운팅하였다. 또한, 비염진모 돌연변이 LF82-델타 fimH로 실험하여, CEACAM6 수용체에서 I형 필라이를 인식하지 않는 AIEC 박테리아의 기저 부착 수준을 결정하였다. 또한, 부착 억제 실험은 항-CEACAM6 항체의 존재 하에 실시하였다.

[0251] 내장 상피 세포 T84에 대한 박테리아의 부착 및 잉여 침윤을 측정하기 위하여 따른 절차

[0252] 세포 카펫을 1 ml의 PBS로 4회 세정한 다음 세포를 실온에서 증류수 중 500 μ L의 1% Triton X-100으로 5분간 항온처리하여 용해시켰다. 용해물을 희석한 다음 LB-한천 겔로스 상에 분산시켜 부착 박테리아의 수에 해당하는 CFU 수를 측정하였다.

[0253] 침윤성 박테리아를 카운트하기 위하여, 세포 카펫을 3 시간 감염 후 PBS로 세정한 다음 100 μ g/ml의 겐타마이신을 함유하는 1 ml의 감염 배지로 1 시간 동안 항온처리하여 세포의 박테리아를 파괴하였다. 침윤성 박테리아를 세포 용해 후 카운트하고, 연속적으로 희석하고 LB-한천 겔로스 상에 분산시켰다.

[0254] AIEC LF82 균주의 부착 및 침윤 수준을 효모균 또는 효모균 유도체에 의한 임의의 치료를 받지 않은 AIEC LF82 균주로 감염된 세포와 비교하여 분석하였다.

[0255] 모든 결과는 R 비율에 따라 표현한다:

[0256] $R = \text{ScPro1 효모균의 존재 하에 부착성 또는 침윤성 박테리아의 수} / \text{임의의 치료 없는 부착성 또는 침윤성 박테리아의 수}$.

[0257] 절차 1: 공배양 모델

[0258] 부착 및 침윤 테스트 동안 T84 세포 및 박테리아 부유물을 상기 개시한 바와 같이 제조하였다. 효모균 또는 효모균의 유도체를 소정 농도로 PBS에 부유시킨 다음 이 부유액 25 μ L를 T84 세포의 감염 배지(1 ml)에 첨가하였다. 이어서 세포를 박테리아 균주로 MOI = 10에서 즉시 감염시켰다. 세포의 존재 하에 박테리아/항온처리된 효모균의 부유액을 균질화하고, 24-웰 플레이트를 37℃에서 3 시간 동안 항온처리하였다. 박테리아 균주의 부착 및 침윤 수준을 상기 개시한 바와 같이 측정하였는데, 이것을 감염 동안 효모균 또는 효모균 추출물의 존재 및 부재 하에 측정하였다. 효모균의 부재 하에(100%) 박테리아 부착 또는 침윤 수준 및 효모균의 존재 하에 박테리

아 부착 또는 침윤 수준 사이의 비율은 박테리아의 잉여 부착 및 침윤 수준을 나타낸다.

[0259] 절차 2: 전배양 모델

[0260] T84 세포 및 박테리아 부유물은 부착 및 침윤 테스트 동안 상기 개시한 바와 같이 제조하였다. 효모균 또는 효모균 유도체의 부유액을 25 μ L의 부피에서 T84 세포의 감염 배지(1 ml)에 첨가하였다. 효모균 부유액을 균질화하고 24-웰 플레이트의 세포를 37°C에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 이러한 항온처리 후, T84 세포를 MOI = 10에서 효모균의 존재 하에 37°C에서 3 시간에 박테리아 균주로 감염시켰다. 부착성 및 침윤성 박테리아를 효모균의 존재 또는 부재 하에 상기 개시한 바와 같이 카운팅하여 잉여 부착 또는 침윤 퍼센트를 측정하였는데, 여기서 100%는 효모균 부재 하에서의 부착 또는 침윤을 나타낸다.

[0261] - CEACAM6의 발현 확인

[0262] 배양된 세포의 각 배치를 면역세포화학적으로 표지하여 CEACAM6의 발현의 존재를 확인하고 그 양을 평가하였다. 세포를 무균 유리 라멜라에서 배양하였다. 세포 카펫을 PBS로 세정한 다음 실온에서 10분 동안 pH 7.4에서 3% 파라포름알데히드로 고정하였다. 세포를 1 시간 동안 습한 대기 중에서 PBS-5% 말 혈청으로 1/100으로 희석시킨 항-CECAM6 단클론 항체(클론 9A7, Genovac)와 함께 항온처리하였다. PBS로 세정 후, 세포를 1 시간 동안 습한 대기 중에서 PBS-5% 말 혈청으로 1/500으로 희석시킨 플루오로크롬(FITC-항-마우스, Zymed)에 결합한 2차 항체와 접촉시켰다. 유리 라멜라를 Moewiol과 함께 슬라이드 상에 고정한 다음 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0263] - 세포의 세포독성 없음 체크

[0264] 상이한 용량의 효모균에 의하여 유도된 세포의 세포독성 없음을 효모균/세포 또는 FDL/세포 항온처리 배지에 락테이트 탈수소효소(LDH)를 투약하여 테스트하였다(Glasser et al., 2001).

[0265] 결과:

[0266] LF82로 유착 테스트

[0267] 배양된 ScPro1 또는 SCB1 효모균[= 프레쉬 형태 또는 건조 형태(순간 건조 또는 동결 건조 형태)]의 존재 하에 LF82로 얻은 유착 역가(titer)를 3 내지 5 회의 독립적인 실험의 결과인 하기 표 5에 요약한다:

표 5

효모균	형태	유착 역가		
		평균	평균 역가	최대 역가
ScPro1	새로운 배양물	1/7	1/3	1/12
ScPro1	순간 건조	1/58	1/20	1/96
ScPro1	동결 건조	1/43	1/24	1/64
SCB1	새로운 배양물	1/28	1/12	1/40
SCB1	순간 건조	1/16	1/12	1/20
SCB1	동결 건조	1/19	1/16	1/24

[0269] 절대적으로, LF82를 사용하여 양호한 유착 결과가 건조 효모균, 순간 건조 ScPro1 및 순간 건조 SCB1에서 얻어진다.

[0270] 이들 효모균에 대하여, 유착 가능성에 미치는 방법, 바람직한 충격 방법, 특히 건조 방법의 중요성을 나타내었다.

[0271] 정제된 필라이로 유착 테스트

[0272] 배양된 ScPro1 효모균(= 프레쉬 형태 또는 순간 건조 형태) 및 (건조) SCB1 효모균의 존재 하에 정제된 필라이로 얻은 유착 역가를 이하의 표 6에 요약한다.

표 6

효모균	형태	유착 역가		
		실시예 1	실시예 2	실시예 3
ScPro1	압착 프레쉬 효모균	1/300	1/300	1/400
ScPro1	순간 건조	1/600	1/600	1/300

SCB1	동결 건조	1/300	1/300	1/200
------	-------	-------	-------	-------

- [0274] 이 실험은 필라이-효모균 감염이 실제로 유착에 필요함을 확인한다. 필라이는 만노즈 구조를 인식하는 특성을 가지는데, 만노즈 구조는 효모균에서 인식되고 관찰되는 유착 현상에 관여하는 것이다. 순간 건조 ScPro1 효모균으로 최상의 결과가 얻어진다.
- [0275] ScPro1 효모균의 만노단백질 분획에 대한 1형 필라이의 결합능을 측정하기 위한 테스트의 결과
- [0276] 도 18은 AIEC LF82 균주에서 얻은 정제된 1형 필라이가 효모균 만노단백질에 특이적으로 결합한다는 것을 명백히 보여준다. 이들 만노단백질(EL05 및 EL06)의 제조 방법(열적 또는 효소적 방법)은 필라이의 친화 상수에 약간의 영향을 미친다.
- [0277] 상피 세포의 표면에서 발현되는 CEACAM6 수용체와 AIEC 박테리아의 상호작용의 억제 결과
- [0278] **1/ 공배양 모델에서 T84 내장 상피 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 부착 및 침윤 억제력에 대하여 효모균 또는 효모균 유도체 샘플을 스크리닝한 결과**
- [0279] 순간 건조 ScPro1 효모균($3.09 \cdot 10^7$ 효모균/mg), 건조 ScPro1 효모균($1.86 \cdot 10^7$ 효모균/mg) 및 순간 건조 ScB1 효모균($5.83 \cdot 10^7$ 효모균/mg) 뿐만 아니라 EL05 효모균(건조 형태)의 만노단백질을 조사하였다.
- [0280] 비교로서, Ultra-levure®($2.054 \cdot 10^7$ 효모균/mg 함유 Biocodex)를 첨가하였다.
- [0281] **공배양 모델에서 동일한 수의 효모균으로 효모균의 억제력 비교**
- [0282] PBS에서의 세정 및 7,500 rpm에서 15분 원심분리 후, 효모균 샘플을 PBS에 $4 \cdot 10^8$ 효모균/ml의 농도로 재부유시켰다. PBS에서 효모균을 희석시켰다: 1/2, 1/10, 1/20 및 1/100.
- [0283] 절차 1을 사용하여 3회의 독립적인 실험을 실시하였다. 도 19a 및 19b의 결과(잉여 부착 및 잉여 침윤)를 잉여 부착 및 침윤 비율로 나타내었고 오차 막대는 평균 표준 오차에 해당한다.
- [0284] 도 19a 및 19b로 이하의 결과를 얻을 수 있다:
- [0285] 부착:
- [0286] - 순간 건조 ScPro1 및 건조 ScPro1 효모균은 용량 의존적 방식으로 T84 세포에 대한 LF82 균주의 부착을 강하게 억제한다. $5 \cdot 10^5$ 효모균/ml(순간 건조 ScPro1 효모균에 대하여) 대 $5 \cdot 10^6$ 효모균/ml(건조 ScPro1 효모균에 대하여)으로부터 억제가 현저하다.
- [0287] - 순간 건조 ScB1 효모균은 각각 순간 건조 ScPro1 및 건조 ScPro1 균주에 대하여 18.7% 및 8%의 잉여 부착 대 $1 \cdot 10^7$ 효모균/ml에서 45.7%의 잉여 부착을 갖는 두 다른 효모균 샘플보다 덜 강하게 부착을 억제한다.
- [0288] 침윤:
- [0289] - 순간 건조 ScPro1 효모균은 $1 \cdot 10^5$ 효모균/ml로부터 얻은 AIEC LF82 균주에 의한 T84 세포의 침윤을 현저히 억제한다. $1 \cdot 10^7$ 효모균/ml에서, 잉여 침윤 비율은 16.3%이다.
- [0290] - 건조 ScPro1 및 순간 건조 ScB1 효모균에 대하여, 각각 $1 \cdot 10^6$ 효모균/ml 및 $5 \cdot 10^6$ 효모균/ml로부터 억제 효과는 더 지연된다.
- [0291] **공배양 모델에서 EL05 만노단백질로 억제 테스트**
- [0292] EL05 효모균 만노단백질을 PBS에 160 mg/ml의 농도로 부유시켰다. PBS에서 1/2, 1/4 1/8, 1/40의 연속적인 희석을 실시하고 25 μ L의 각 만노단백질 부유액을 절차 1을 사용하면서 감염 배지에 첨가하였다.
- [0293] 3 회의 독립적인 실험을 실시하였다. 도 20a 및 20b에 의하여 나타낸 결과(잉여 부착 및 잉여 침윤)를 잉여 부착 비율로 나타내며 오차 막대는 평균 표준 막대에 해당한다.
- [0294] 이들 도면은 EL05 효모균 만노단백질이 공배양 모델에서 용량 의존적 방식으로 T84 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 부착 및 침윤 억제능을 가짐을 보여준다.

- [0295] 2/ 전배양 모델에서 T84 내장 상피 세포에 대한 AIEC LF82 균주의 부착 및 침윤 억제력에 대한 효모균 또는 효모균 생성물의 샘플 스크리닝
- [0296] 공배양 모델에 대하여 사용된 것과 동일한 샘플의 효모균 및 분획을 이 전배양 모델에서 사용하였다.
- [0297] 전배양 모델에서 동일한 수의 효모균으로 효모균의 억제력 비교
- [0298] PBS에서의 세정 및 7,500 rpm에서 15분 원심분리 후, 효모균 샘플을 PBS에 4.10^8 효모균/ml의 농도로 재부유시켰다. PBS에서 효모균을 희석시켰다: 1/2, 1/10, 1/20 및 1/100. 절차 2를 사용하여 3회의 독립적인 실험을 실시하였다.
- [0299] 도 21a 및 21b에 의해 나타난 결과(잉여 부착 및 잉여 침윤)를 잉여 부착 및 침윤 비율로 나타내었고 오차 막대는 평균 표준 오차에 해당한다.
- [0300] T84 세포를 효모균으로 전처리함으로써, 순간 건조 ScPro1 및 건조 ScPro1 균주에 대하여 5.10^6 효모균/ml의 용량으로부터 LF82 균주의 부착의 현저한 억제를 얻을 수 있다. 그러나, 이 단계에서, 순간 건조 ScB1 효모균으로 현저한 억제는 관찰되지 않았다.
- [0301] T84 세포를 효모균으로 전처리함으로써, 건조 ScPro1 균주에 대하여 1.10^5 효모균/ml의 용량으로부터 LF82 균주의 침윤의 억제를 얻을 수 있다.
- [0302] 5.10^5 효모균/ml의 용량으로부터, 3 효모균 샘플은 LF82 균주의 침윤에서 현저한 감소를 유도한다.
- [0303] 전배양 모델에서 EL05 만노단백질로 억제 테스트
- [0304] EL05 효모균의 만노단백질을 PBS에 160 mg/ml의 농도로 부유시켰다. PBS에서 1/2 1/4, 1/8 및 1/40의 연속적인 희석을 실시하고 25 μ L의 각 만노단백질 부유액을 절차 2를 사용하면서 감염 배지에 첨가하였다. 3의 독립적인 실험을 실시하였다. 도 22a 및 22b의 결과(잉여 부착 및 잉여 침윤)를 잉여 부착 비율로 나타내며 오차 막대는 평균 표준 막대에 해당한다.
- [0305] EL05 만노단백질은 2 mg/ml의 농도로 LF82 균주의 부착 및 침윤을 용량 의존적 방식으로 억제할 수 있다.
- [0306] 전배양 모델에서 CEACAM6 수용체를 발현시키거나 발현시키지 않는 CHO-K1 세포에 AIEC LF82 균주의 부착에 대한 효모균에 의한 억제 테스트의 결과
- [0307] 앞에서 언급한 바와 같이 절차 2를 사용하여 5의 독립적인 실험을 실시하였다.
- [0308] 도 23은 25 μ m/ml의 효모균을 사용한 전배양으로부터 CEACAM6/CHO 세포로 관찰되는 AIEC LF82 균주 부착의 현저한 억제를 나타낸다. 용량 의존적 억제 효과가 이들 세포에서 관찰된다.
- [0309] AIEC LF82 균주의 부착은 또한 특히 CHO-K1 세포의 표면에서 발현되는 만노실화 단백질의 발현으로 인하여 이들 세포에 대하여 관찰된다. 그러나, 순간 건조 ScPro1 효모균을 사용한 LF82 균주의 전배양은 비감염 세포에 대한 부착을 매우 현저히 억제할 수 없다.
- [0310] 따라서, 이것은 효모균이 LF82 균주가 상기 세포에 의하여 발현되는 CEACAM6 수용체에 부착하는 것을 방해함을 확인하는 것이다.
- [0311] 전배양 모델에서 크론병 환자의 장세포의 브러쉬 보더에 AIEC LF82 균주의 부착 억제 결과
- [0312] 도 24는 실험 동안 수득되는 평균 부착 지수를 나타내며 이것은 증가하는 농도의 순간 건조 ScPro1 효모균 (mg/ml)의 존재 또는 부재 하에 또는 항-CEACAM6 항체의 존재 하에 계산하였다. 이 도면의 결과에 따르면, 순간 건조 ScPro1 효모균 균주의 존재시 환자의 장세포의 브러쉬 보더에서 AIEC LF82 균주의 현저하고 용량 의존적인 감소가 보고된다. 5 mg/ml의 효모균의 용량에서, AIEC LF82 균주의 잉여 부착은 항-CEACAM6 항체의 존재 하에 관찰되는 것 또는 임의의 1형 필라인을 갖지 않는 돌연변이에서 관찰되는 것과 유사하다.
- [0313] 결론:
- [0314] 이 연구로부터:
- [0315] - 특히 순간 건조 형태의 ScPro1 및 SCB1 효모균은 LF82 균주의 유착에 대한 강한 억제력을 가진다.

- [0316] - ScPro1 및 SCB1 효모균은 시험관에서 용량 의존적 방식으로 E. 콜리에 의한 인간 상피 세포(T84, 회장 생체 조직 장세포) 및 인간 CEACAM6 수용체를 발현시키는 CHO 세포의 부착 및 침윤을 억제할 수 있다.
- [0317] - 만노단백질은 시험관에서 용량 의존적 방식으로 E. 콜리에 의한 인간 상피 세포(T84, 회장 생체 조직 장세포) 및 인간 CEACAM6 수용체를 발현시키는 CHO 세포의 부착 및 침윤을 억제할 수 있다.
- [0318] - 시험관에서, ScPro1 효모균은 고농도에서 세포의 약 80%를 박테리아 감염으로부터 부분적으로 보호할 수 있다.
- [0319] **실시예 7: 시험관에서 배양된 인간 내장 상피 세포에서 IL-10 및 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 발현에 대한 ScPro1, SCB1 효모균 및 효모균 유도체의 조절 역할에 대한 연구**
- [0320] 단독형 또는 조합형 ScPro1 및 SCB1 효모균 및/또는 효모균 분획의 생균성 및 이들이 특정 내장 수용체 감염으로 인한 염증 유발을 억제하는 능력을 조사하였다.
- [0321] 시험관내 테스트
- [0322] 본 발명에 따른 효모균 및 효모균 유도체의 효과는 특히 두 결장암 세포주 CaCo-2(ATCC HTB-37) 및 HT-29(ATCC HTB-38)에 대한 시험관내 분석에 의하여 내장 상피 세포의 상이한 수용체들에 대하여 연구되었다.
- [0323] 이를 위하여, 이하의 방법에 따라 RNA를 추출함으로써 전사 분석을 실시하였다.
- [0324] 세포를 Trizol에 용해시킨다. 가용성 분획에 대하여, 10 U의 리보뉴클레아제 억제제 및 10 U의 데옥시리보뉴클레아제를 함유하는 200 μ L의 용액을 첨가함으로써 데옥시리보뉴클레아제 단계를 실시한다.
- [0325] 10 μ g의 RNA를 200 U의 역전사효소 디티오프레이틀, 올리고-dT15 및 데옥시리보뉴클레오티드의 존재 하에 역전사하였다.
- [0326] cDNA를 특정 센스 및 안티센스 프라이머, 특히 IL-10 및 PPAR α 유전자를 사용함으로써 경쟁자와 동시에 공지의 중합 효소 연쇄 반응 기술(PCR)로 증폭시킨다.
- [0327] 3% 아가로스 겔 상에서 상이한 샘플들의 이동 및 1.25 U의 Ampli Taq Gold 5000의 존재 하에 실시된 40 주기의 증폭 후, 밴드 강도를 이미지 분석기로 측정한다.
- [0328] 결과는 내장 표준 β -액틴의 10^5 분자에 대한 mRNA 분자의 수로 표현한다.
- [0329] 도 11에서 그룹핑한 결과는 내장 상피 세포와 효모균 또는 유도체를 접촉시킨 후 1 시간(기호 A) 및 3 시간(기호 B)에 항염증 단백질 IL-10을 코딩하는 유전자의 mRNA 발현값을 포함한다.
- [0330] 이 도면 11에서, 이하의 기호는 기준 신호의 4배 초과와 초기 발현 수준을 나타내는 테스트 효모균/효모균 유도체를 나타낸다:
- [0331] 3은 사카로마이세스 세레비시아이 효모균을 나타내고,
- [0332] 5는 본 발명의 ScPro1 효모균을 나타내며,
- [0333] 6은 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 추출물을 나타내고,
- [0334] 12는 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 RNA 분획을 나타낸다.
- [0335] 이들 결과는 실제로 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 및 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 유도체가 1 시간 후 항염증 시토킨 IL-10을 코딩하는 유전자의 초기 발현을 유도함을 나타낸다.
- [0336] 실제로, 미처리 대조군과 비교하여, 본 발명에 따른 효모균 및 유도체에 대한 mRNA 발현은 세로 좌표축에서 이미 우수한 초기 발현 신호에 해당하는 값인 4를 초과한다.
- [0337] 다른 결과는 도 13에 그룹핑되어 있다. 이 도면은 제공된 양의 효모균 유도체에 따른, IL-10 단백질 코딩 유전자의 mRNA 발현의 조절을 나타낸다.
- [0338] 이 도면 13에서, 발현을 1 시간(1h) 후 및 3 시간(3 h) 후 측정하였다. 이하의 기호로 표시된 본 발명에 따른 효모균 및 사카로마이세스 세레비시아이 추출물의 발현이 관찰될 수 있다:
- [0339] 5 본 발명에 따른 ScPro1 효모균,

- [0340] 6 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 추출물,
- [0341] 8 사카로마이세스 세레비시아이의 벽 β -글루칸,
- [0342] 9 효모균 사카로마이세스 세레비시아이의 벽 만노단백질,
- [0343] *11 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 DNA 분획, 및
- [0344] 12 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 RNA 분획.
- [0345] 상이한 농도의 효모균 및/또는 유도체로 발현을 측정하였다.
- [0346] 도 13에서 칼럼의 색이 진할수록 효모균/유도체의 농도가 높다.
- [0347] 도 13의 결과는 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 추출물이 조기에 항염증 시토킨(IL-10)의 mRNA를 유도함을 나타낸다.
- [0348] 도 12에 그룹핑된 결과는 내장 상피 세포와 효모균 또는 유도체를 접촉시킨 후 1 시간(기호 A) 및 3 시간(기호 B)에 핵 수용체 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현값을 포함한다.
- [0349] 이 도면 12에서, 이하의 기호는 기준 신호의 3배 초과와 지연 발현 수준을 나타내는 테스트 효모균/효모균 유도체를 나타낸다:
- [0350] 1 활성 건조 형태의 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 ScPro1 효모균,
- [0351] 4 사카로마이세스 세레비시아이 효모균,
- [0352] 5 활성 건조 형태의 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 Scpro1 효모균,
- [0353] 8 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 벽의 분획,
- [0354] 9 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 벽 β -글루칸의 분획,
- [0355] 10 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 벽 만노단백질의 분획,
- [0356] 11 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 DNA 분획,
- [0357] 12 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 RNA 분획.
- [0358] 이들 결과는 실제로 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 및 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 유도체가 3 시간 후 지연된 방식으로 핵 수용체 PPAR α 를 코딩하는 유전자의 발현을 유도함을 나타낸다.
- [0359] 실제로, 본 발명에 따른 효모균 및 유도체에 대한 mRNA 발현은 세로 좌표축에서 이미 우수한 지연 발현 신호에 해당하는 값인 3을 초과한다.
- [0360] **실시예 8: 크론병 환자의 생체 조직에서 분리한 인간 내장 상피 세포에서 IL-10 및 TNF- α 를 코딩하는 유전자의 발현에 대한 효모균 및 효모균 유도체의 생체외 조절 역할에 대한 연구**
- [0361] 시토킨 IL-10(항염증) 및 TNF- α (염증 유발)의 분비에 미치는 효모균 및/또는 효모균 유도체의 영향을 생체외적으로 크론병의 영향을 받거나 받지 않은 환자의 생체 조직에서 연구하였다.
- [0362] 내장 생체 조직을 크론병의 영향을 받거나 받지 않은 환자에서 채취한 다음 35%의 CO₂를 함유하는 대기 중에서 7°C에서 페니실린 및 스트렙토마이신을 보충한 HBSS-CMF 배지에 24 시간 동안 두었다. 세정 후, 생체 조직을 RPMI 1640 배지에서 4 시간 동안 효모균 또는 효모균 유도체와 접촉시켰다. 상청액을 회수하여 ELISA에 의한 분석을 하였다. 이후 생체 조직을 용해시켜 mRNA 또는 전체 단백질을 추출하였다.
- [0363] ELISA에 의하여 추출한 단백질 및 세포 배양액의 상청액을 면역 분석함으로써 시토킨의 분비를 확인하였다. 침착 완충액(vol/vol; 75 mM Tris pH 6.8; 5% 글리세롤; 0.25% 브로모페놀 블루; 2% SDS, 5% β -머캅토에탄올)에서 95°C에서 5분 동안 변성된 단백질을 침착시키고(50 μ g) 10% 폴리아릴아미드 겔에 용해시켰다. 이동 후, 단백질을 16 V에서 1 시간 동안 반건조 전자이동기(Hoefer TE77, 프랑스 오르세이 소재 Amersham Pharmacia Biotech)에 의하여 PVDF 멤브레인(Hybond-P, 프랑스 오르세이 소재 Amersham Pharmacia Biotech)에 옮겼다. PPAR α 및 IL-10을 인간 항-PPAR α 및 항-IL-10 래빗 폴리클론 항혈청에 의하여 노출시키고, 1/500으로 희석하

고, 소프트웨어 패키지 Gel Analyst(프랑스 파리 소재 CLARA VISION)를 사용하여 Biomax-MR 필름(Kodak) 상에서 화학발광(E.C.L. Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France)으로 정량하였다.

[0364] 도 16 및 17은 각각 IL-10 및 TNF- α 에 대하여 얻은 결과를 나타낸다. 세로 좌표축은 pg/ml로 측정된 시토킨의 양을 나타낸다. 각 포인트는 급성 상태의 크론병 환자(흑색 원), 크론병 완화 환자(회색 원) 및 건강한 환자(백색 원)의 생체 조직의 측정에 해당한다. 막대는 측정 평균을 나타낸다.

[0365] 이들 도면에서:

[0366] - 1 활성 건조 형태의 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비시아이 ScPro1 효모균,

[0367] - 3 사카로마이세스 세레비시아이 효모균,

[0368] - 8 사카로마이세스 세레비시아이 효모균 벽의 분획,

[0369] - 11 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 DNA 분획,

[0370] - 12 사카로마이세스 세레비시아이 효모균의 RNA 분획.

[0371] 도 16에서, 본 발명에 따른 ScPro1 효모균은 생리학적 식염수 존재 하에서만 행한 측정에 해당하는 음성 대조군(-) 및 건강한 환자에 비하여 크론병 환자 및 완화 환자의 상피 세포에 의한 항염증 시토킨 IL-10의 분비를 2배 배가시킨다.

[0372] 도 17은 본 발명에 따른 ScPro1 효모균이 크론병 환자 또는 완화 환자의 생체 조직에서 분리한 내장 세포에 의한 염증 유발 시토킨, TNF- α 의 분비를 증가시키지 않음을 나타낸다. ScPro1 또는 다른 테스트된 효모균 또는 효모균 유도체의 어느 것도 TNF- α 의 임의의 분비를 유도하지 않았다.

[0373] 실시예 9: 직장결장 팽창의 무린 모델에서 효모균 및 효모균 유도체의 진통 특성 연구

[0374] 건강한 래트에서

[0375] 1/ 실험 및 방법

[0376] 175 및 200 g의 수컷 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 래트(프랑스 라르브레슬 소재 Charles River)를 이들 테스트 동안 사용한다. 래트를 실험 1 주일 전에 애니멀 하우스 조건에 적응시킨다. 이들을 무리당 5 마리의 수로 유지하고, 물과 음식을 임의로 제공한다. 모든 테스트는 국제 통증 연구 협회의 연구 및 윤리 문제 위원회(Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain[6])의 권장 사항에 따라 실시한다. 동물의 불편을 회피 또는 최소화하기 위하여 주의한다.

[0377] *2/ 결장의 민감성 평가

[0378] 거동적 반응을 유도하는 데 필요한 장관내 압력을 측정함으로써 동물의 유해수용(nociception)을 평가한다. 이 압력은 결장으로 도입된 풍선의 팽창에 의한 결장직장 팽창으로 발생한다. 거동적 반응은 동물 신체의 후부 기립 및 심각한 수축에 상응하는 시각적으로 명백한 비정상적인 수축을 특징으로 한다[7-9]. 휘발성 마취제(2% 이소플루란)로 래트를 마취시키고 풍선(Bourdu [8]에 의해 기술된 절차에 따라 제조)을 항문으로부터 7 cm에 가능한 덜 침윤적으로 직장내 경로를 통해 삽입한다. 카테터를 꼬리 밑에 접착제로 부착한다. 5 분 후, 래트를 Plexiglas box의 중간에 두고 카테터를 전자 바로스탯(Distender Series IIRTM, G & J Electronics)에 연결한다. 통증 반사 작용을 유발할 때까지 또는 80 mm의 제한 수온압에 도달할 때까지 증가압을 계속적으로 인가한다.

[0379] 3/ 투여된 화합물

[0380] 효모균을 15일 동안 하루에 한 번 강제로 투입하였다.

[0381] 결장 직장 팽창 전 30분에, 1 mg/kg의 용량으로 복강내 주입된 모르핀을 양성 대조군으로 사용한다.

[0382] 이하의 8 그룹의 래트를 조사하였다:

[0383] - PBS를 받은 10 마리의 대조군 래트,

[0384] - 순간 건조 ScPro1(100 μ g/d)을 받은 10 마리의 래트(기호 1),

- [0385] - 활성 건조 ScPro1 균주(100 $\mu\text{g/d}$)를 받은 10 마리의 래트(기호 2),
- [0386] - SCB1 균주(100 $\mu\text{g/d}$)를 받은 10 마리의 래트(기호 3),
- [0387] - 순간 건조 ScPro1(50 $\mu\text{g/d}$) + 순간 건조 SCB1(50 $\mu\text{g/d}$) 균주를 받은 10 마리의 래트(기호 4),
- [0388] - 모르핀(1 mg/kg, 팽창 30분 전)을 1회 주입받은 10 마리의 래트(기호 5).

[0389] 4/ 결과

[0390] 도 26은 한편으로 단독으로(기호 1) 또는 SCB1 균주와 조합하여(기호 4) 투여한 순간 건조 형태의 및 다른 한편으로 활성 건조 형태(기호 2)의 ScPro1 효모균이 아무 것도 투여하지 않은 래트에 비하여 통증 인지 역치를 증가시키므로써 내장 통증의 인지를 현저히 감소시킴을 보여준다.

[0391] 이하의 결과는 대조군과 비교하여 수은의 mm로 제공된다:

[0392] - 74.5 ± 3.07 대 53.6 ± 3.9 , 순간 건조 ScPro1 균주에 대하여 $p = 0.07$ - (기호 1),

[0393] - 66.5 ± 3.36 대 53.6 ± 3.9 , 순간 건조 ScPro1 및 SCB1 균주에 대하여 $p = 0.04$ - (기호 4),

[0394] - 72 ± 2.59 대 53.6 ± 3.9 , 순간 건조 ScPro1 균주에 대하여 $p < 0.01$ - (기호 2),

[0395] 다른 한편으로, 이러한 효과는 72 ± 2.59 mm 수은의 통증 역치와 1 mg/kg의 용량에서 사용되는 모르핀 - 기호 5에 의하여 유도된 것과 비교한다.

[0396] 순간 건조 SCB1 균주는 또한 건강한 래트, 70.6 ± 3.10 mm의 수은 $p = 0.026$ 에서 진통 효과를 유도한다.

[0397] 내장 과민증을 갖는 래트에서

[0398] 1/ 실험 및 방법

[0399] 175 및 200 g의 암컷 스프라그 돌리 래트(프랑스 라르브레슬 소재 Charles River)를 사용하였다. 래트를 실험 1주일 전에 실험실 조건에 적응시켰다. 이들을 우리당 5 마리의 수로 유지하고, 물과 음식을 임의로 제공하였다. 모든 테스트는 국제 통증 연구 협회의 연구 및 윤리 문제 위원회(Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain[6])의 권장 사항에 따라 실시하였다. 동물의 불편을 회피 또는 최소화하기 위하여 생활 환경에 대하여 매우 주의하였다.

[0400] 2/ 부티레이트 세정에 의한 결장의 과민증 유도

[0401] 각 세정에 대하여, 카테터(2 mm Fogarty)를 항문으로부터 7 cm에서 결장으로 도입하고 상기 동물에게 3일 동안 하루에 두 번 중성 pH(pH 6.9)의 1 ml의 200 mM 부티르산나트륨 용액을 공급하였다. "건강한" 동물은 식염수 용액을 공급받았다.

[0402] 3/ 본 발명에 따른 효모균으로 동물 치료

[0403] 내장 과민증을 갖는 10 그룹을 동물을 사용하였다(그룹당 $n=10$). 치료된 동물은 15일 동안 하루에 한 번 위내 강제 공급으로 100 μg 의 효모균을 받았다. 대조군 동물은 앞과 동일한 절차에 따라 PBS를 받았다. 효모균을 PBS 용액에 부유시킨다. 부티레이트 또는 식염수 용액의 점적은 첫번째 강제 공급후 7일에 개시하여 3일 동안 실시한다. 복통 과민증을 항문 경로를 통한 치료 개시 수 14일에, 즉 복통 유발 점적 전 7일에 측정하였다.

[0404] 4/ 연구된 동물의 그룹

[0405] 7 그룹의 래트를 연구하였다. 숫자 기호는 도 26에 상응한다.

[0406] - PBS를 받은 10 마리의 래트(대조군),

[0407] - 순간 건조 ScPro1(100 $\mu\text{g/d}$)을 받은 10 마리의 래트(기호 1),

[0408] - 활성 건조 ScPro1 건조 효모균(100 $\mu\text{g/d}$)을 받은 10 마리의 래트(기호 2),

[0409] - 순간 건조 ScPro1 효모균(100 $\mu\text{g/d}$)을 받은 10 마리의 래트(기호 3),

[0410] - 순간 건조 ScPro1(50 $\mu\text{g/d}$) + 순간 건조 SCB1(50 $\mu\text{g/d}$) 균주를 받은 10 마리의 래트(기호 4),

[0411] - 모르핀을 받은 10 마리의 래트(기호 5),

[0412] - 피브레이트를 받은 10 마리의 래트(기호 6).

[0413] 5/ 결과

[0414] 우선 대조군 래트에 대하여, 과민화된 래트에 대한 테스트에서의 통증 역치는 건강한 래트의 통증 역치보다 아 래임을 유의하여야 한다.

[0415] 단독으로 또는 SCB1 효모균과 조합하여 복용된 순간 건조 ScPro1 효모균은 모델에서 흥미로운 진통 효과를 보인다.

[0416] 수치는 다음 표 7과 같다:

표 7

기호	수은 mm
1	56.5±4.27 p= 0.03
4	59±4.33 p = 0.02

[0418] 본 발명에

[0419] 따른 효모균은 건강한 래트에서 관찰되는 것과 동일한 통증 인지 수준을 분구할 수 있다. 효모균에 의하여 유도된 진통 효과는 모르핀에 의하여 유도된 것과 동등하다.

[0420] 도 26은 또한 내장 과민증을 갖는 래트에서 통증 인지 역치를 인자 2 만큼 증가시키는 페노피브레이트의 강한 진정 효과를 나타낸다(70±4.48 p= 0.001).

[0421] 이 결과는 내장 통증의 조절에서 PPAR α 수용체의 역할을 확인하는 것이다.

수탁번호

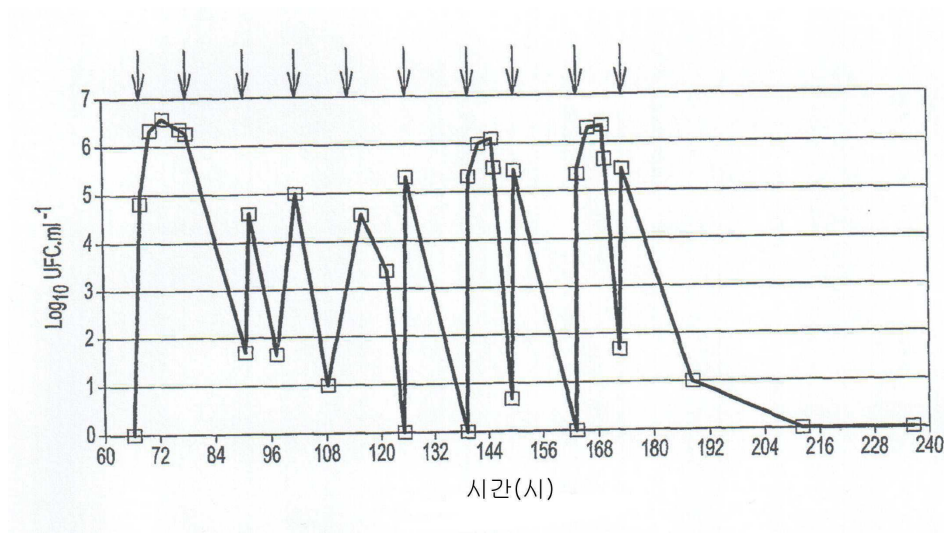
[0422]

기탁기관명 : 프랑스국립미생물수집센터
수탁번호 : CNCM03799
수탁일자 : 20070821

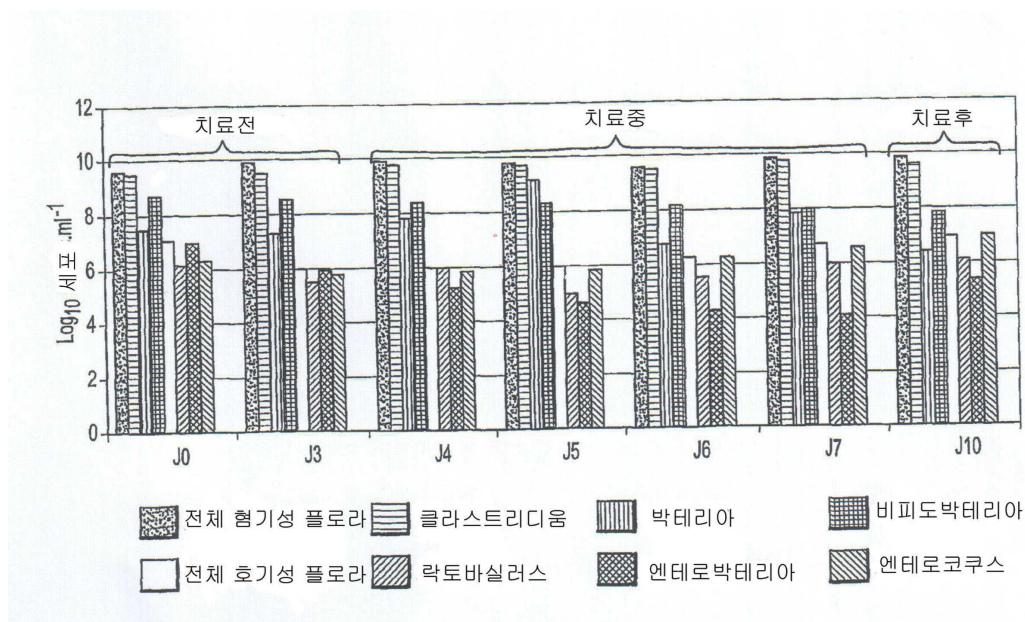
기탁기관명 : 프랑스국립미생물센터
수탁번호 : CNCM03856
수탁일자 : 20081017

도면

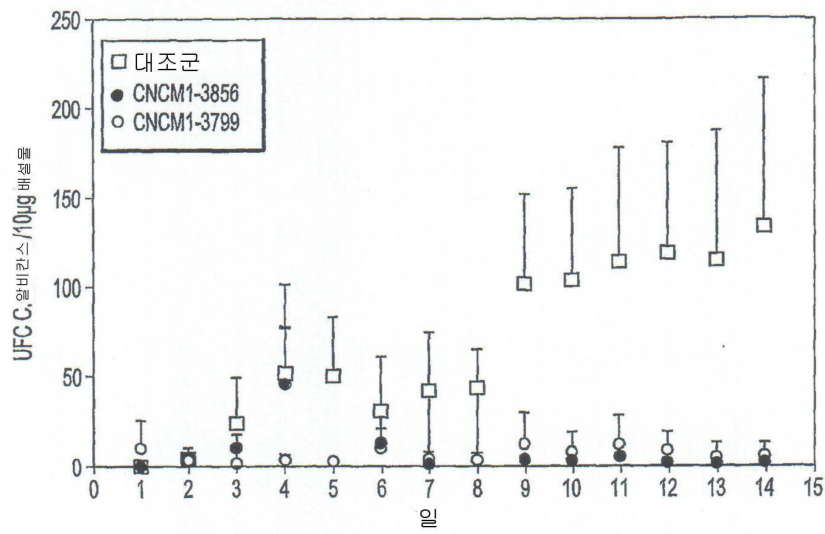
도면1



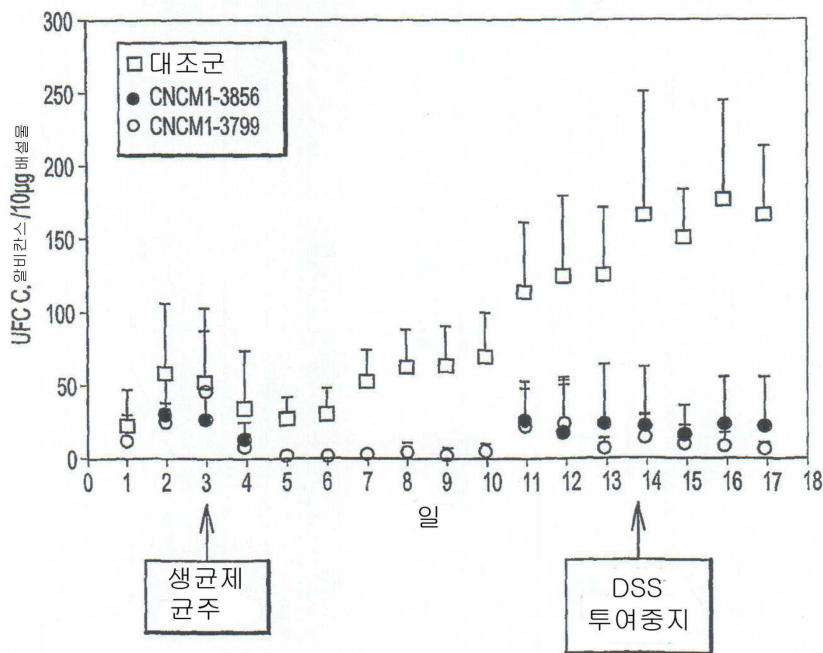
도면2



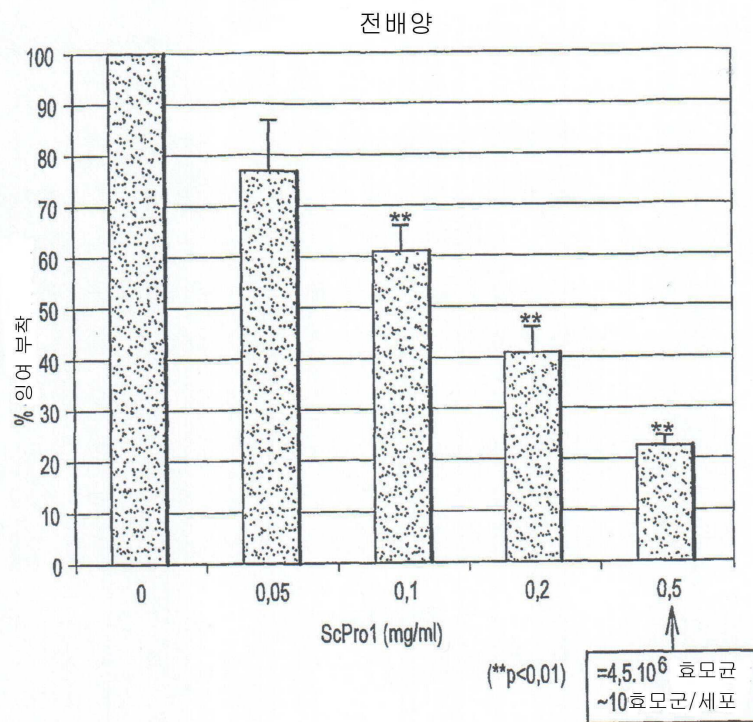
도면3



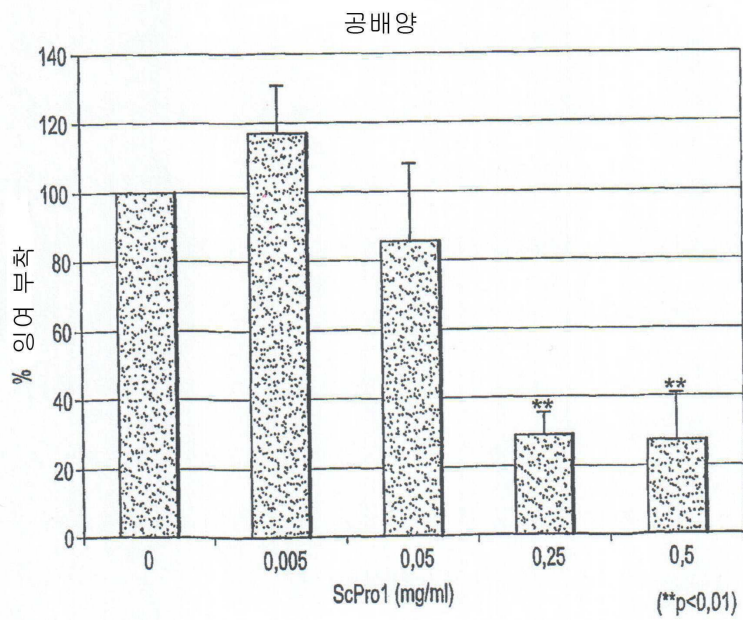
도면4



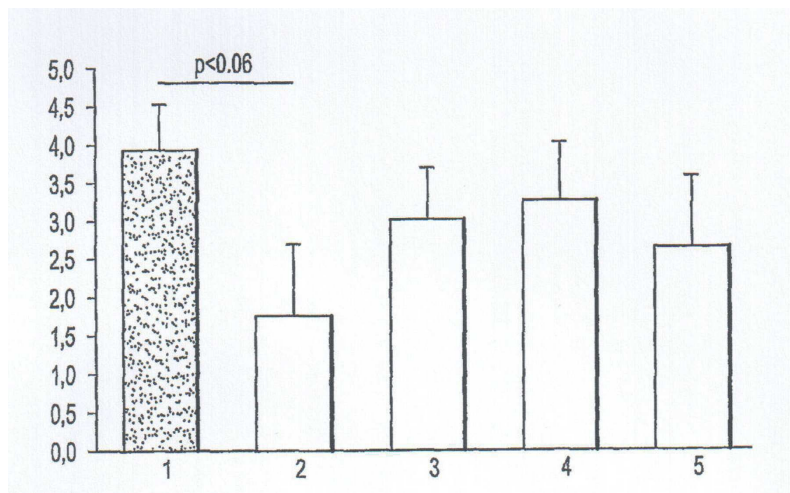
도면5



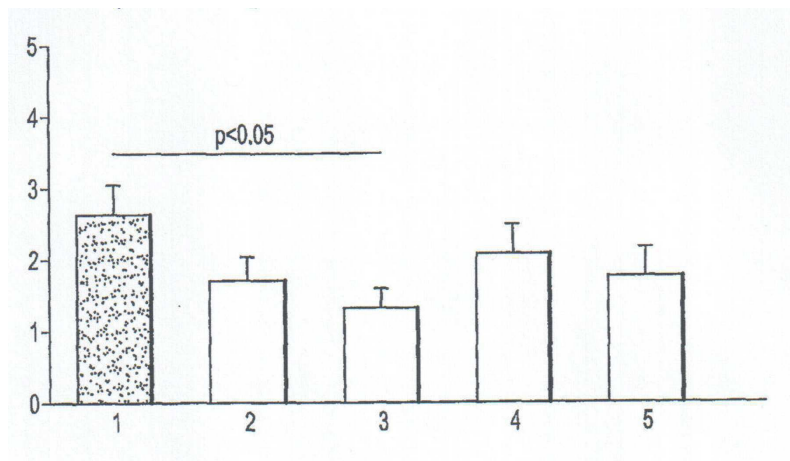
도면6



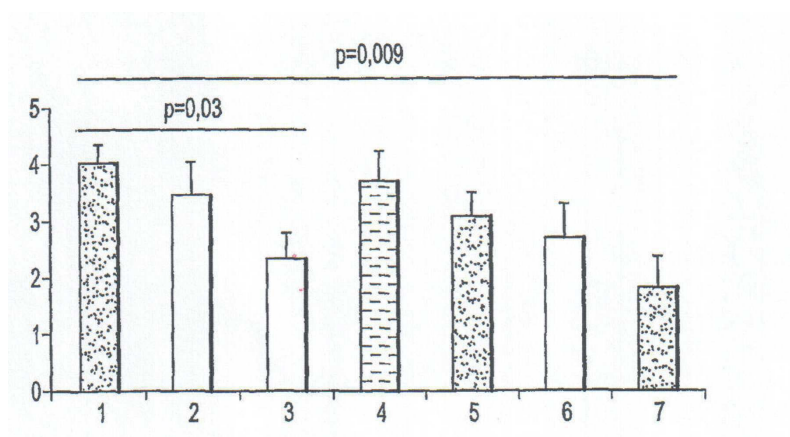
도면7



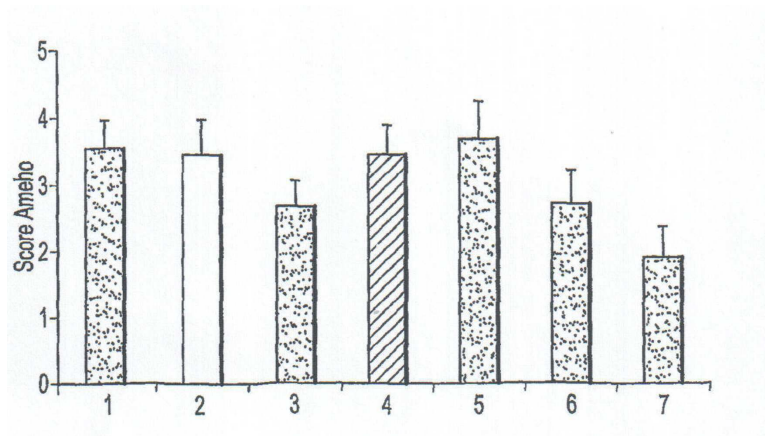
도면8



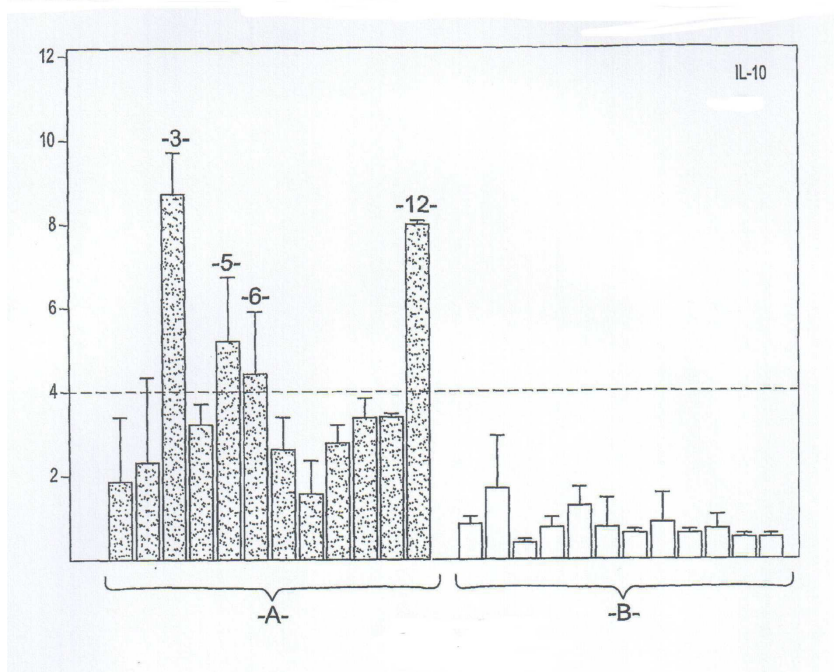
도면9



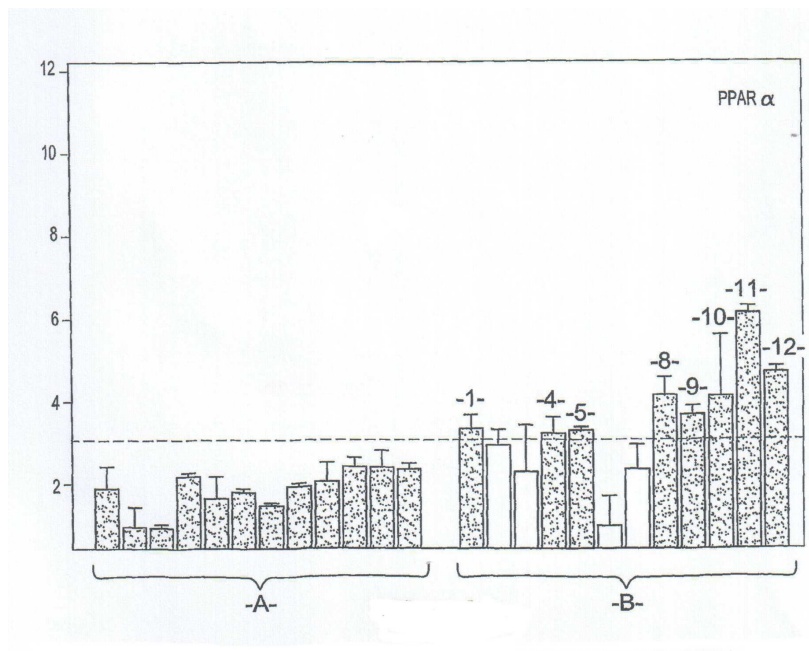
도면10



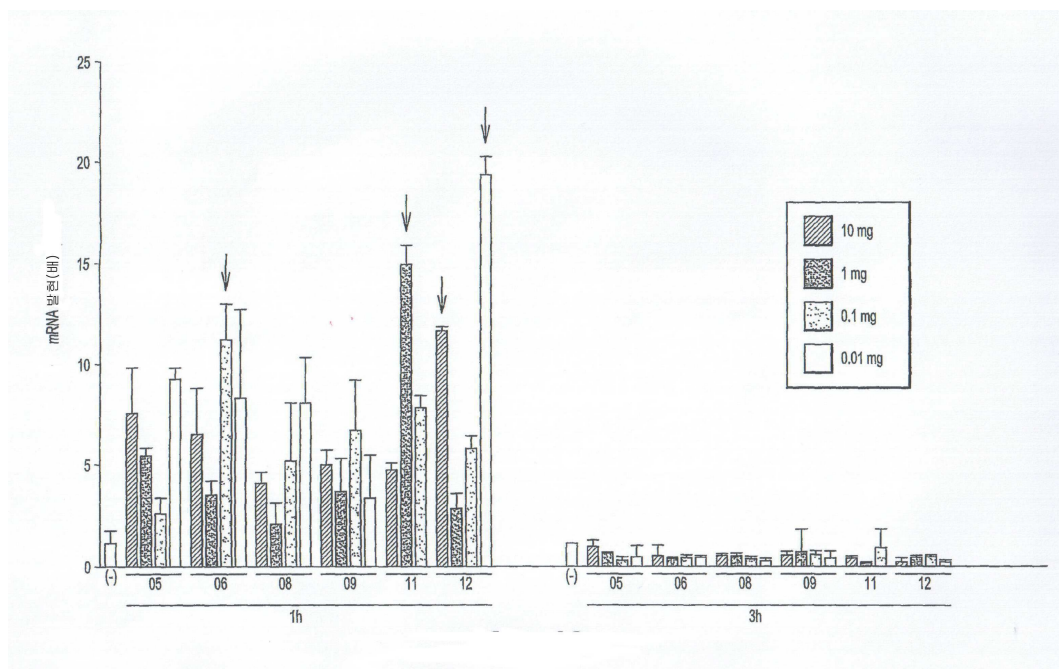
도면11



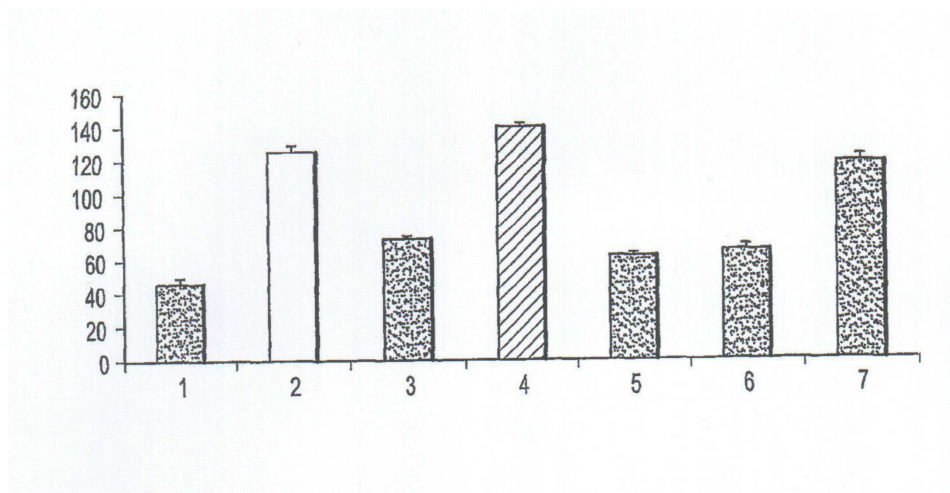
도면12



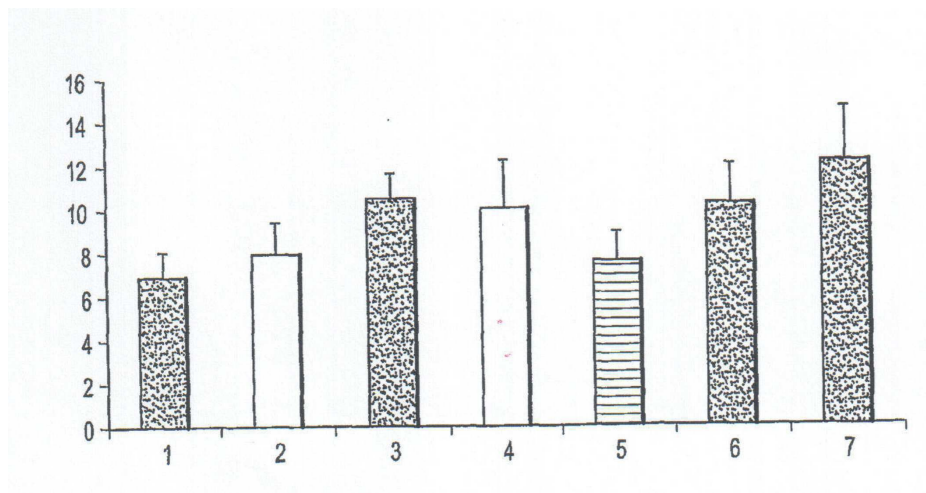
도면13



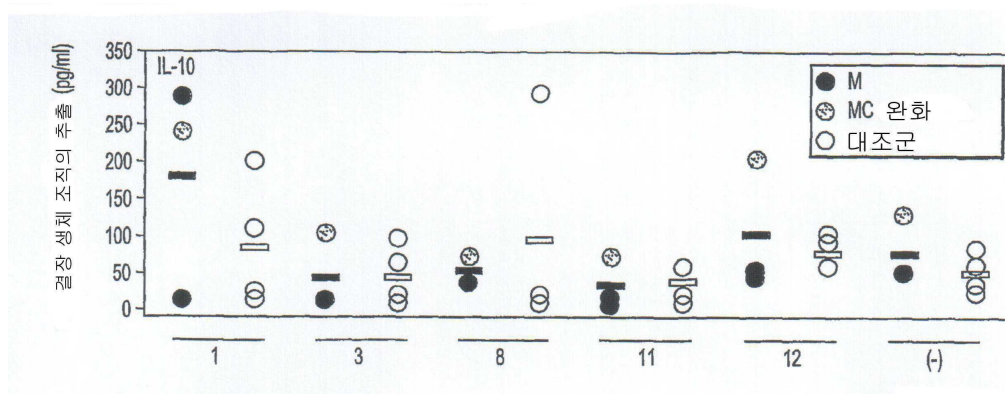
도면14



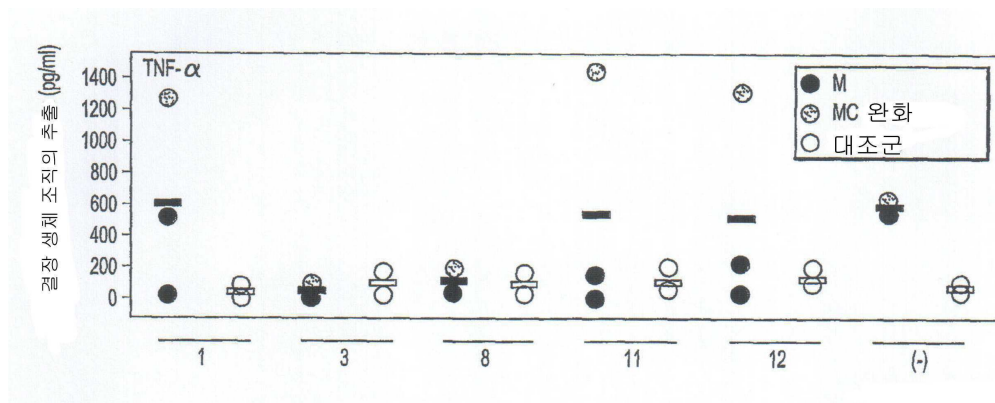
도면15



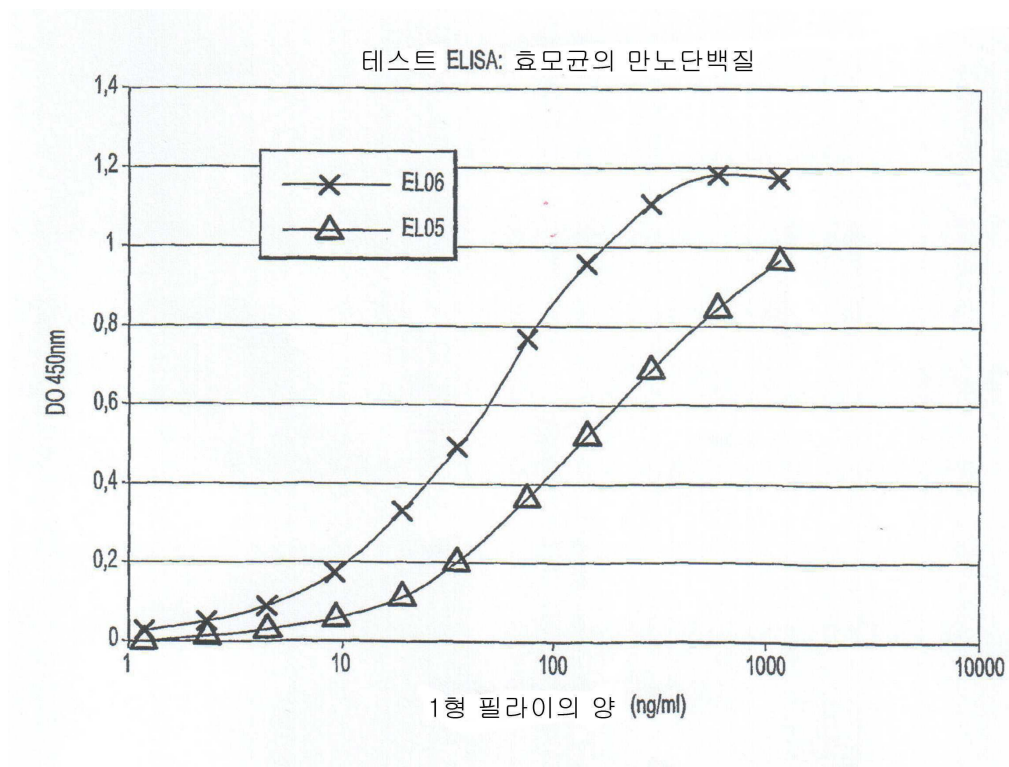
도면16



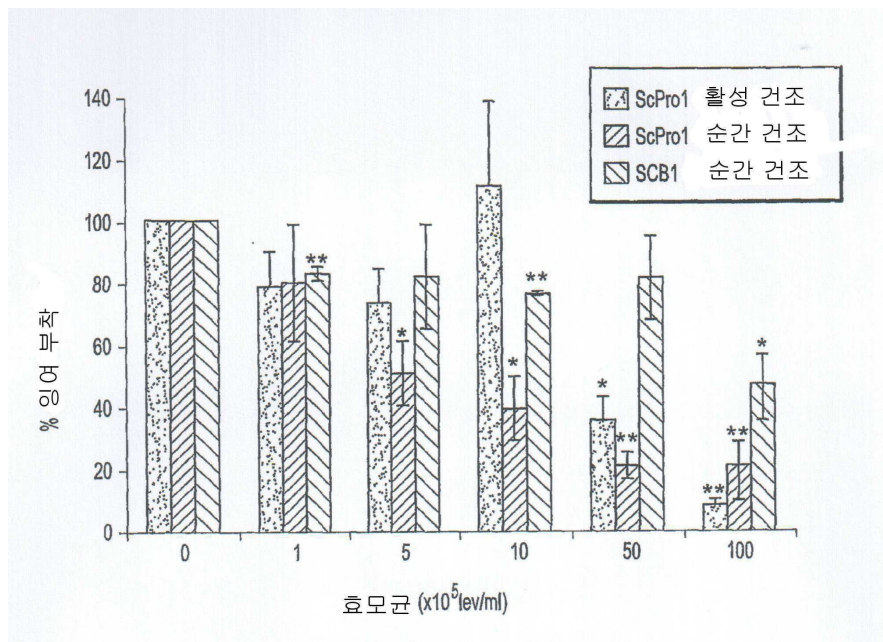
도면17



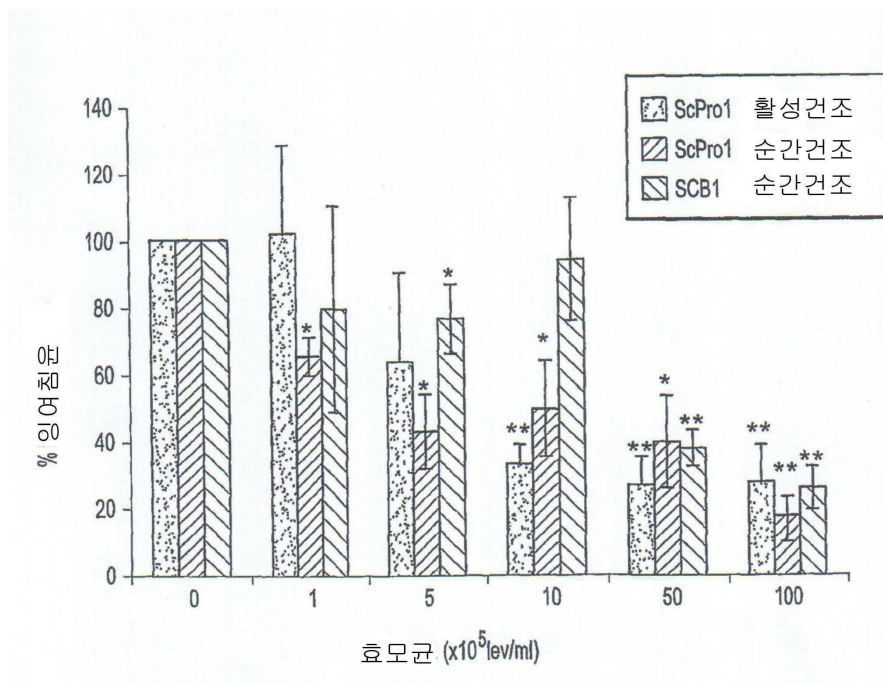
도면18



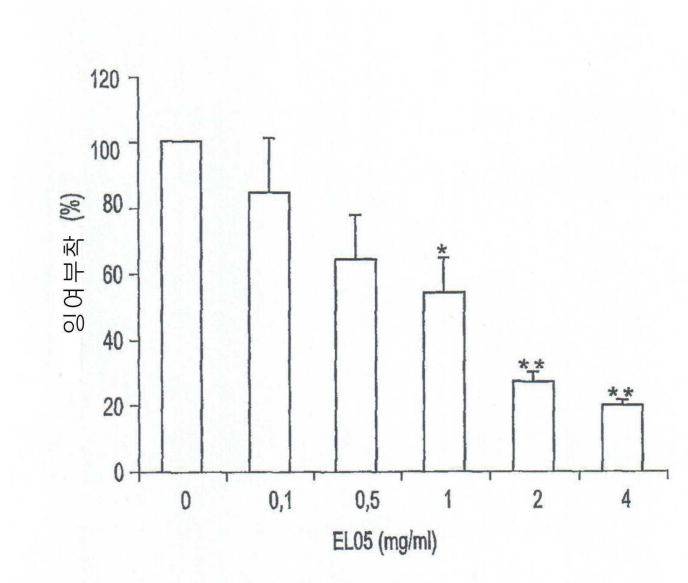
도면19a



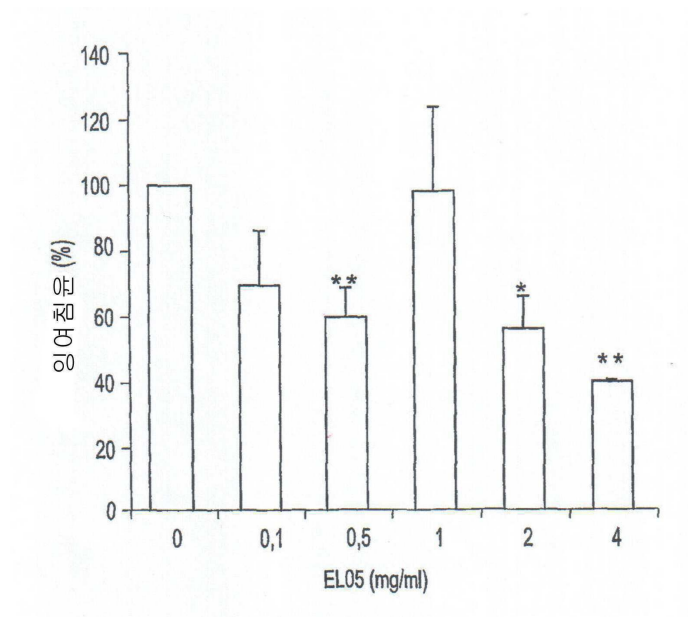
도면19b



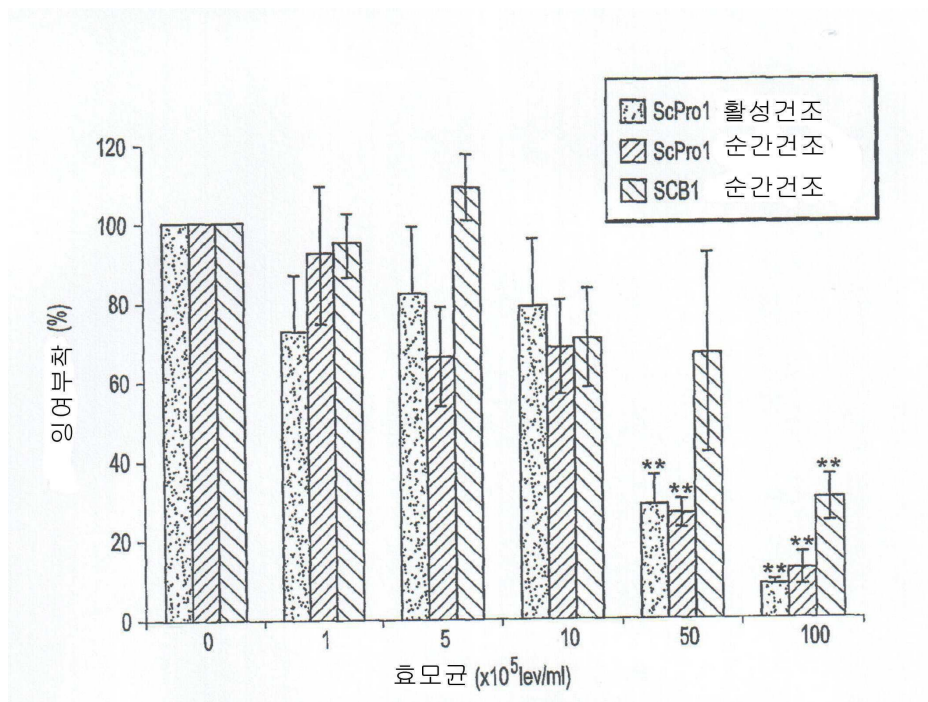
도면20a



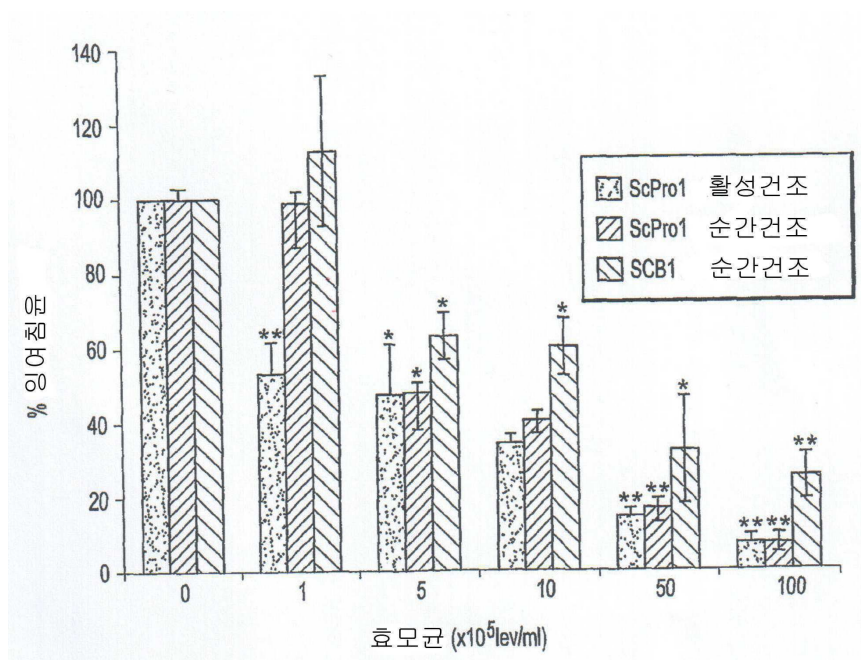
도면20b



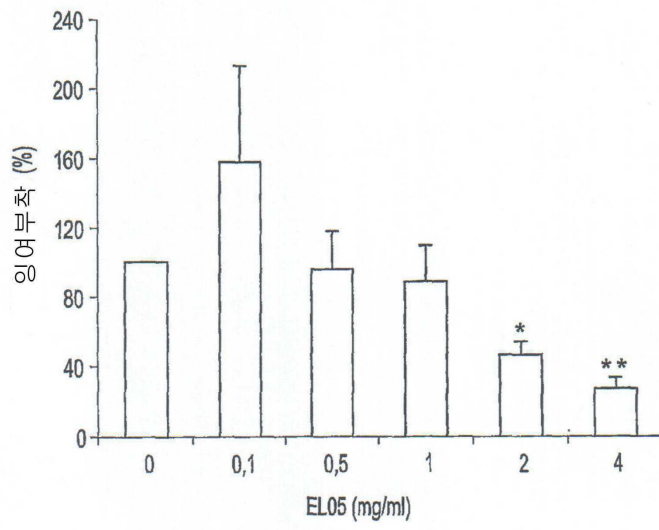
도면21a



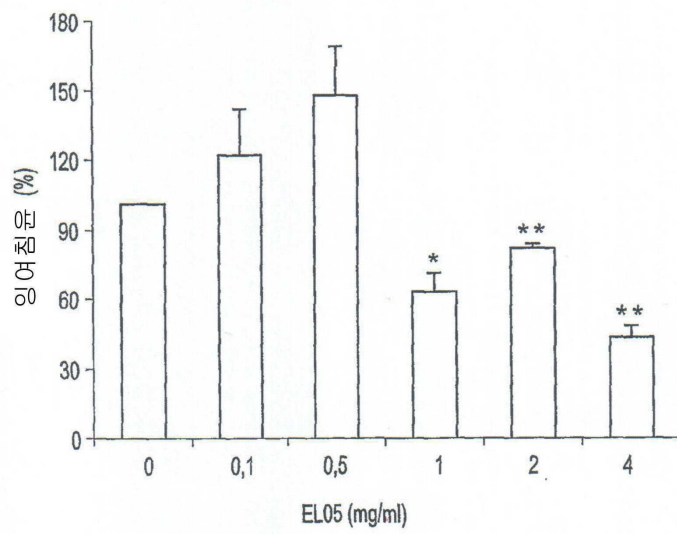
도면21b



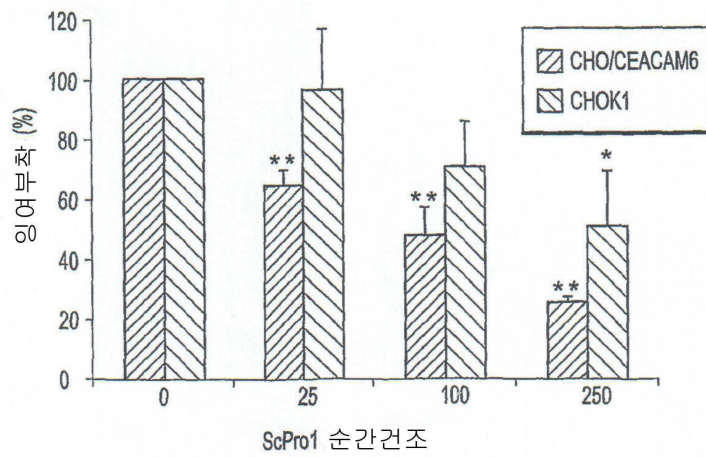
도면22a



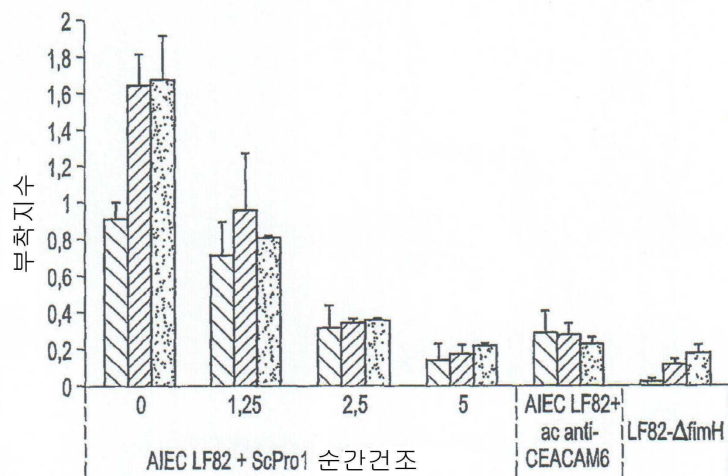
도면22b



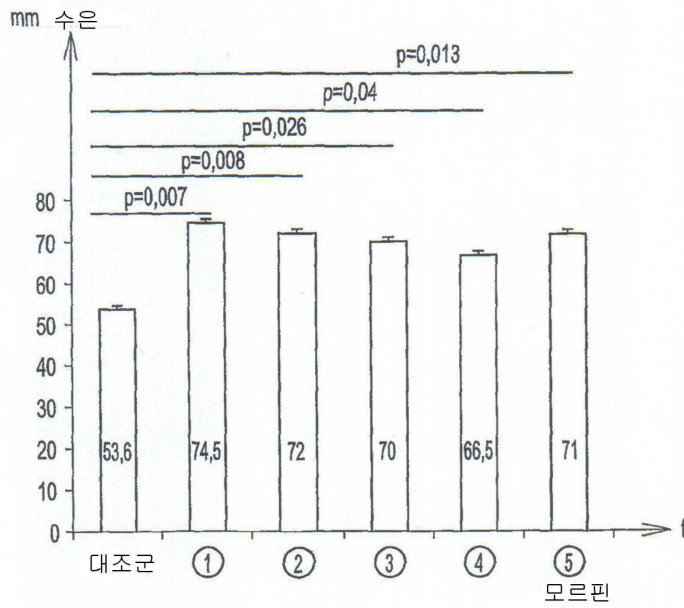
도면23



도면24



도면25



도면26

