



등록특허 10-2533469



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월17일

(11) 등록번호 10-2533469

(24) 등록일자 2023년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/745 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)

A61P 29/00 (2023.01) C12N 1/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0000820

(22) 출원일자 2021년01월05일

심사청구일자 2021년01월05일

(65) 공개번호 10-2022-0098922

(43) 공개일자 2022년07월12일

(56) 선행기술조사문헌

KR101778734 B1*

KR1020100032579 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

윤상선

서울특별시 은평구 백련산로 36, 303동 806호(응암동, 백련산 힐스테이트 2차)

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 26, 타워팰리스 G-1506

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 6 항

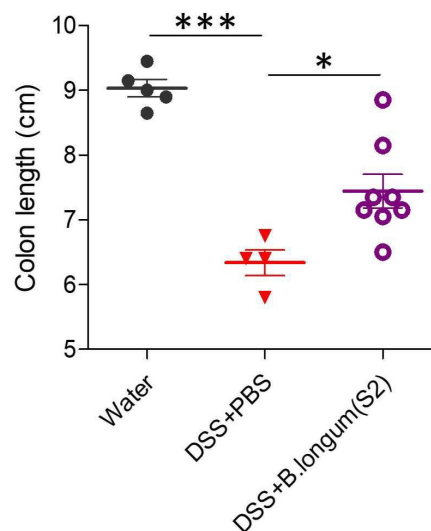
심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명의 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화스트레스에 대항하는 방어 기전을 가지므로 염증성 질환의 치료 용도로 매우 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

C12N 1/20 (2021.05)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23Y 2300/55 (2013.01)

(72) 발명자

천재희

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 101동 803호(내수동, 경희궁파크팰리스)

김승원

서울특별시 용산구 대사관로30가길 10-7(한남동)

김지형

경기도 고양시 일산동구 강석로 110, 522동 303호(마두동, 강촌마을5단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020903
과제번호	918003043SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105311
과제번호	2017M3A9F3041233
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	새로운 유전자 스크리닝 시스템을 통한 프로바이오틱스 유전자 기능 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030988
과제번호	HR14C0006070020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	제2유닛 (7세부) 마이크로바이옴 활용 감염 및 면역질환 치료기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

비피도박테리움(Bifidobacterium) 속 균주, 이의 배양물, 배양액 및 그로부터 얻어진 추출물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 비피도박테리움 속 균주는 *Bifidobacterium longum* YMC_19_03_2 (기탁 번호: KFCC11834P)인, 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 균주는 활성 산소 조건에서 저항능을 갖는 것인, 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염, 크론병 (Crohn's disease), 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염 (pouchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 조성물.

청구항 7

비피도박테리움(Bifidobacterium) 속 균주, 이의 배양물, 배양액 및 그로부터 얻어진 추출물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 유효 성분으로 포함하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 비피도박테리움 속 균주는 *Bifidobacterium longum* YMC_19_03_2 (기탁 번호: KFCC11834P)인, 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 균주는 활성 산소 조건에서 저항능을 갖는 것인, 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 7항에 있어서,

상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염, 크론병 (Crohn's disease), 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염 (pouchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 활성 산소 조건에서 저항능이 있어 염증 환경 속에서도 높은 생존율을 유지하며 이로인 효과를 낼 수 있는, 신규한 공생 미생물 균주의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 활성산소 (Reactive oxygen species; ROS) 또는 활성산소종은 산소 원자를 포함한 화학적으로 반응성이 있는 분자를 의미한다. 상기 활성산소는 생물체 내에서 생성되는 산소의 화합물로서, 과산화 이온과 과산화수소를 포함하고 짝지어지지 않은 전자를 가지고 있기 때문에 반응성이 매우 높아 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시킬 수 있는 산화력이 매우 강력한 산소에 해당한다. 이와 같은 활성산소는 정상적인 대사 과정에서도 발생할 수 있으며, 세포 신호와 항상성을 조절하는데 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 그러나, 활성산소의 농도는 자외선이나 높은 열에 노출되는 것처럼 환경적인 스트레스로서 개체 내에서 급증할 위험이 존재하며, 이에 따라 세포 구조를 손상시켜 다양한 질환이 야기되도록 할 수 있다.

[0003] 화학적으로 산화 스트레스가 존재하는 경우 활성산소의 생산량이 증가하거나, 글루타치온과 같은 항산화 방어 효과가 유의미한 수준으로 감소된다. 산화 스트레스의 효과는 이러한 변화의 크기에 따라 달라질 수 있으며, 교란 수준이 적으면 세포는 스스로 이러한 상태를 극복하고 원상태로 돌아갈 수 있다. 그러나, 산화 스트레스에 의한 교란 수준이 심각한 경우에는 세포 사멸이 발생할 수 있고, 심지어 산화 스트레스가 보통 수준인 경우에도 세포 자살이 촉발될 수 있다. 상기 산화 스트레스에 의해 발생된 활성 산소는 개체에 존재하는 DNA에 직접적인 손상을 입힐 수 있고, 이에 따라 노화, 당뇨병, 고지혈증, 비만, 대장암, 류머티즘 또는 천식 등의 다양한 질환이 유발될 수 있다.

[0004] 한편, 장내 미생물은 숙주의 상피 보호벽상에서 공생하고 있는 균주와 다양한 미생물들로 구성되어 있고, 이렇게 공생 중인 균주들은 개체의 건강 유지 및 생존에 있어, 신체 전반적으로는 대사, 염증, 면역, 혈액 생산 등의 생리 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 공생 미생물 군총 (공생미생물들의 총합)은 다양한 종 (species)으로 구성되어 있으며, 다양한 유전자들 (마이크로바이옴, microbiome)을 가지고 있어 외부 자극 및 미세한 환경 변화에 대응하며 인체와 매우 다이내믹 (dynamic)한 상호 작용을 한다. 정상 공생 미생물 군총을 가지고 있는 건강한 인체는 병원성 세균이 장내에 감염되면 다양한 항균 작용을 통해 병원균의 침입을 이겨낼 수 있다. 반면 광범위 항생제를 지속적으로 복용하거나, 또는 산화 스트레스 조건 등에 노출되면 병원성 세균에 대한 면역 시스템이 정상적으로 작동하지 않는다고 알려져 있다.

[0005] 이에, 공생 미생물 군총을 유지하고, 산화 스트레스 조건에서도 살아남을 수 있는 활성산소 조건에서 저항능을 가지며, 개체의 염증성 질환을 치료할 수 있는 신규한 균주에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 활성산소 조건에서 저항능을 갖는 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속에 포함되는 신규한 균주, 이의 배양물, 배양액 또는 그로부터 얻어진 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 균주, 이의 배양물, 배양액 또는 그로부터 얻어진 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0010] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0012] 본 발명의 일 구현 예에서는 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속 균주, 이의 배양물, 배양액 및 그로부터 얻어진 추출물로 이루어진 균에서 선택된 적어도 하나를 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 제공한다.
- [0013] 본 발명의 상기 비피도박테리움 속 균주는 비피도박테리움 롱구 (Bifidobacterium longum)일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 상기 비피도박테리움 롱구 균주는 바람직하게는 비피도박테리움 롱구 YMC_19_03_38 (*Bifidobacterium longum* YMC_19_03_38) 또는 비피도박테리움 롱구 YMC_19_03_2 (*Bifidobacterium longum* YMC_19_03_2)일 수 있다. 본 발명에 따른 비피도박테리움 롱구 균주는 염증성 질환, 특히 염증성 장 질환의 증상을 완화 또는 개선시키는 활성이 매우 뛰어나며, 상기 균주는 한국 미생물 보존 센터 (Korean Culture Center of Microorganisms; KCCM)에 기탁되어 있다(균주명: *Bifidobacterium longum* YMC_19_03_38, 기탁 번호: KFCC11835P, 기탁 일자: 2019 년 8 월 6 일/ 균주명: *Bifidobacterium longum* YMC_19_03_2, 기탁 번호: KFCC11834P, 기탁 일자: 2019 년 8 월 6 일).
- [0015] 본 발명의 상기 비피도박테리움 속에 포함되는 균주는 건강한 사람의 대변으로부터 얻은 균주 중에서, 혐기성 조건과 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 환경에서 내성을 갖는 균주만 선별 분리된 것으로서, 통상의 방법에 따라 전체 게놈 서열 및 16s rRNA 유전자의 염기 서열을 이용한 계통 분석을 통해 선별된 균주가 비피도박테리움 속에 속하는 것을 확인하였다. 나아가, 상기 기탁된 두 개의 균주 (YMC_19_03_38 및 YMC_19_03_2)에 대해 각각 유전체 서열을 분석한 결과, 신규한 유전체 서열을 함유한 비피도박테리움 속에 속하는 미생물임을 다시 한 번 확인하였다.
- [0016] 본 발명의 상기 "배양물"은 미생물을 공지의 액체 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하며, 미생물이 포함되어 있는 배지를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 상기 배양물은 본 발명의 상기 균주를 배지에서 배양시킨 후, 얻어지는 것으로서, 상기 배지는 비피도박테리움 속 균주의 배양에서 사용되는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 선택될 수 있으며, 예를 들면, GYSM 배지, 흙산 한천 배지 (Humic acid agar medium), 베네트 한천 배지 (Bennett's agar medium) 또는 맥아 추출 한천 배지 (Malt extract agar medium)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 "배양액"은 미생물을 공지의 액체 또는 고체 배지에서 배양하여 얻은 산물을 의미하며, 미생물이 포함되지 않은 개념을 말한다. 본 발명의 상기 배양액은 소정의 균주를 액체 배지에서 배양한 뒤에 여과 또는 원심 분리와 같은 방법을 통해 균주 자체가 제거된 액상의 산물을 의미하며, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 배양액은 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속에 포함되는 균주의 배양물로부터 상기 균주가 제거된 것을 말한다.
- [0019] 본 발명의 상기 여과 방법은 특별히 제한되지 않으며, 상기 여과의 수행 횟수는 예를 들면 1 내지 10 회, 1 내지 5 회, 또는 1 내지 3 회 수행될 수 있다. 또한, 상기 여과 시에 여과지 또는 필터를 사용할 경우, 여과지의 포어 사이즈는 5 내지 10 μm 여과지 또는 포어 사이즈가 0.1 내지 1.0 μm 인 필터를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 상기 "추출물"은 본 발명의 상기 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속에 포함되는 균주의 배양물 또는 배양액의 추출물일 수 있으며, 당업계에서 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들면 용매 추출법, 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출법 (supercritical fluid extraction)에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추

출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 또는 이들의 조합 등의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 용매 추출법에 이용되는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 다이에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 다이클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올, 함수 알코올, 다이에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 클로로포름 또는 헥산에서 선택될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 상기 균주, 이의 배양물, 이의 배양액 또는 그로부터 얻어진 추출물은 활성산소 조건에서 저항능을 가져 염증 환경, 특히는 대장 내 염증 환경 속에서도 상기 균주는 높은 생존율을 유지하며 이로인 효과를 낼 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 "활성산소 조건에서 저항능"은 산소 호흡을 하는 모든 생물에서 에너지 생산을 위한 전자전달 과정에서 부득이하게 발생되거나, 또는 감염 등에 의한 염증 반응에 의해 발생하는 활성산소가 존재하는 환경, 즉 산화 스트레스 환경에서 사멸되지 않고 살아남을 수 있는 능력을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화스트레스에 대항하는 방어 기전(산화 스트레스에 대한 저항성)을 가지고 있을 수 있다. 나아가, 본 발명의 상기 신규한 균주는 활성산소 조건에서 저항능을 가지므로 목적하는 기관에 존재하는 정상 미생물 군총을 유지할 수 있다.

[0024] 본 발명의 상기 "염증성 질환"의 염증은 유해한 자극에 대한 생체 반응 중의 하나로 면역세포, 혈관, 염증 매개체들이 관여하는 보호 반응에 해당한다. 염증 반응을 일으키는 물질로는 병원체, 손상된 세포, 자극 물질 등이 있으며, 염증 자체는 질병이 아니며, 오히려 생명체에 필요한 방어 체계, 즉 감염을 치유하거나 조직의 재생을 증진시키는 보호 기능을 가지지만, 동시에 염증의 결과로 조직의 손상이나 질병이 일어날 수 있다. 염증성 질환은 세포의 손상을 초기 단계에서 억제하는 작용, 상처 부분의 파괴된 조직 및 괴사된 세포를 제거하는 작용, 동시에 조직을 재생하는 작용이 방해되는 경우에 발생하는 질환을 말한다. 염증성 질환의 예시로는 염증성 장 질환, 아토피 피부염, 천식 등과 같은 알레르기성 질환, 피부염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 결막염, 백내장, 치주염, 폐렴, 패혈증, 위궤양, 위염, 크론병, 치질, 자가면역 질환, 섬유근통, 관절염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증, 퇴행성 신경변성 질환 등이 있다.

[0025] 본 발명의 상기 "염증성 장 질환 (Inflammatory bowel disease; IBD)"은 위장관 내에 만성적인 염증을 유발하는 질환으로서, 그 증상으로는 복통, 발열, 설사, 하혈 등을 수반한다. 대체로, 궤양성 대장염 (ulcerative colitis; UC)과 크론병 (Crohn's disease; CD)의 2 가지 형태로 염증성 장 질환이 분류될 수 있다. 궤양성 대장염은 문드러짐이나 궤양을 형성하는 대장의 원인 불명의 확산성 비특이성 염증 (diffuse nonspecific inflammation)의 일종으로서, 혈성 설사를 비롯하여 다양한 전신 증상을 수반한다. 또한, 크론병은 구강에서 항문까지 전 소화관을 비연속성으로 점막에서 장관 전 층에 궤양, 섬유화, 협착과 병변이 진전되는 원인불명의 육아종성 염증성 병변으로, 복통, 만성 설사, 발열, 영양장애 등의 전신 증상을 수반한다. 이와 같은 염증성 장 질환의 발생율은 종래에는 서양인에게 높다고 알려져 있었으나, 최근 식습관 등 생활 습관의 변화 등으로 인하여 우리나라를 비롯한 아시아권 국가에서도 환자수가 급증하고 있는 추세이다. 본 발명의 상기 염증성 장 질환의 발생 원인이나 병태 생리에 대해서는 아직까지 명확하게 알려진 바 없으나, 유전적 요인, 장내 세균 또는 음식물 등의 환경적인 요인, 및 면역학적 요인 등이 복합적으로 관여할 것으로 추측되고 있다. 이러한 발생 원인 중 하나로서, 장 내에서 발생하는 산화 스트레스와 항산화 방어 기작 사이의 불균형을 들 수 있다. 구체적으로, 산화제 (oxidant) 및 자유 라디칼의 생산은 염증 유전자의 발현을 중재하는 신호 기작을 활성화시킬 뿐만 아니라, 세포의 분열, 분화 및 사멸을 조절하는 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있다. 그러나, 이러한 산화제 및 자유 라디칼이 과잉으로 생산되는 경우에는 장 상피세포 (Intestinal epithelial cells; IEC)에서 염증, 세포 손상 및 세포 사멸이 유도될 수 있을 뿐만 아니라, 점막 장벽의 기능 장애까지 유도됨으로써 위장관 내에 만성적인 염증이 유발될 수 있을 것으로 추측하고 있다. 본 발명의 목적상 상기 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화 스트레스에 대항하는 방어 기전을 가지므로 염증성 질환, 바람직하게는 염증성 장 질환의 치료 용도로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염, 크론병 (Crohn's disease), 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤

양 및 회장낭염 (pouchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명에서 상기 "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 염증성 질환의 임상 증상이 확산되지 않도록 질환의 발병에 대해 보호하는 요법을 사용하는 모든 행위를 지칭하며, 보다 상세하게는 염증성 장 질환 증상의 발현, 재발 또는 확산을 억제하는 것을 말한다.
- [0028] 본 발명에서 상기 "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 염증성 질환, 보다 구체적으로는 염증성 장 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0031] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0033] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속 균주, 이의 배양물, 배양액 및 그로부터 얻어진 추출물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 상기 식품 조성물에서 상기 비피도박테리움 속 균주, 배양물, 배양액, 추출물, 염증성 질환 등은 상기 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서 기재한 바와 동일하여 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략한다.
- [0038] 본 발명에서, "개선"은 본 발명의 조성물을 조사하여 염증성 질환, 보다 구체적으로는 염증성 장 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제,

캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명의 상기 균주 등이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 0.001 중량% 내지 90 중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 40 중량%로 포함할 수 있고, 장기간 섭취 용도일 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으나, 유효 성분이 안전성 면에서 아무런 문제가 없는 경우에는 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[0042] 본 발명의 상기 식품 조성물에서 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0043] 본 발명의 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 신규한 균주는 혐기성 조건 및 과산화수소가 과량으로 포함된 배양 조건에서 내성을 가지므로, 활성산소 조건에서 저항능, 즉 산화 스트레스에 대항하는 방어 기전을 가진다. 이에 따라, 목적하는 기관 내 활성산소가 존재하는 염증 환경에서도 정상 미생물 균총을 유지할 수 있고, 이에 따라 유익한 효과를 내어 염증성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료하는 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 선별된 균주의 활성산소 포함 배양 배지에서 배양 능력을 확인하기 위하여 OD₆₀₀ 값을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 대장염 유발군 (DSS+PBS)과 B. longum 투여군 (DSS+B.longum) 각각의 log-rank test에 의한 마우스의 생존율을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 DSS로 대장염이 유도된 모델에서 정상 대조군 (control), 대장염 유발군 (DSS+PBS), B. longum 투여군 (DSS+B.longum) 각각의 DAI 점수 (disease activity index score)를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 DSS로 대장염이 유도된 모델에서 각 군 마우스의 대장 길이를 측정하여 나타낸 도이다.

도 5 및 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 정상 대조군 (control), 대장염 유발군 (DSS+PBS) 및 B. longum 투여군 (DSS+B.longum) 각각에 PAS 염색 (PAS staining) 을 수행하고 Image J ((NIH Image, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 PAS 염색을 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0048] **실시예 1: 균주의 활성산소가 포함된 배지에서 배양 능력 확인**

[0049] 균주를 얻기 위한 대변 (Stool) 시료를 식염수를 이용하여 10^{-1} 내지 10^{-10} 배로 희석하였다. 상기 희석된 시료 중에서 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-10} 배 희석된 시료를 2 mM의 과산화수소 (H_2O_2)가 포함된 비피도박테리움

(*Bifidobacterium*) 속 균주 특이적 배양 배지가 포함되어 있는 페트리 디스크에 각각 스프레딩하고, 37 °C의 혐기성 조건에서 16 시간 내지 18 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 페트리 디스크에 생성된 콜로니(Colony)인 하기 표 1과 같이 균주를 선별하고, 이를 이하 실험에 사용하기 전까지 스킵 밀크에 넣고 -20 °C에 보관하였다.

표 1

구분	박테리아 명칭
S2	<i>Bifidobacterium longum</i>
S10	<i>Bifidobacterium longum</i>
S38	<i>Bifidobacterium longum</i>

상기 실시예 1에서 선별된 균주를 각각 분주하고 37 °C의 혐기성 조건에서 24 시간 동안 배양한 뒤 OD₆₀₀ 값을 확인하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 여기서, 대조군으로는 레퍼런스 균주인 비피도박테리움 롱구(*Bifidobacterium longum*; Ref) 및 전형적 대장균(Typical E.Coli; tEc)를 사용하였다.

도 1에서 보는 바와 같이, 레퍼런스 균주(Ref)의 경우에는 과산화수소가 포함된 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0인 반면, S2, S10 및 S38는 2 mM의 과산화수소가 포함된 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.4 내지 0.6인 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 S2 (수탁번호: KFCC11834P (*Bifidobacterium longum* YMC_19_03_2)), S10 및 S38 (수탁번호: KFCC11835P (*Bifidobacterium longum* YMC_19_03_38))은 종래의 비피도박테리움 롱구과는 전혀 다른 활성산소 조건에 저항능을 갖는 신규한 균주임을 알 수 있다. 이에 따라, 활성산소 조건에 저항능을 가지므로 염증성 장 질환에 미치는 영향을 추가로 확인하고자 이하의 실험을 수행하였다.

실시예 2: 대장염 마우스 모델에서의 대장염 치료 효과의 평가

1. 대장염 마우스 모델의 준비

본 발명의 발명자들은 연세대학교 의과대학 평가위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 얻어 모든 실험을 수행하였으며, 이하의 실험에서는 8 주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 오리엔트바이오로부터 구입하여 실험에 이용하였다. 실험실 환경으로 온도 21±2 °C, 습도 50±10 % 및 12 시간/12 시간(dark/light cycle) 조건에서 1 주간 사료와 물을 충분히 공급하여 순화시켰다.

정상 대조군(control, n=5), 대장염 유발군(DSS+PBS, n=8), *B. longum* S2 투여군(DSS+B.*longum*, n=8)으로 나누어 실험을 진행하였으며, 대장염을 유발하기 위해서 DSS(MPbio제품, 카탈로그 No. 0216011080)를 이용하였다. 보다 구체적으로 대장염 유발군(DSS+Veh)과 *B. longum* 투여군(DSS+B.*longum*)은 2.5 % (W/V)의 DSS가 포함된 음용수를 7 일간 연속하여 공급하였으며, 8 일째부터는 대장염 유발군은 DSS 투여를 중지하고 마우스 희생 전까지 멸균된 일반 음용수로 교체하고, *B. longum* 투여군은 상기 실시예 1에서 선별된 *B. longum*을 1 x 10⁻⁹ CFU 농도로 200 μl씩 7 일간 매일 경구 투여하였다.

2. 마우스 생존율 평가

본 발명에 따르는 *B. longum*의 염증성 장 질환의 치료 효과를 확인하기 위하여, 상기 1.에서 얻어진 대장염 유발군(DSS+PBS)과 *B. longum* 투여군(DSS+B.*longum*)의 대장 염증으로 인한 폐사일을 바탕으로 log-rank test에 의한 마우스의 생존율을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이 때 *B. longum* 투여군은 상기 표 1의 *B. longum* (S2)를 투여하였다.

도 2에서 보는 바와 같이, 대장염 유발군에서의 생존율이 10 일째 15 % 감소하였고, 11 일째부터는 40 % 이상 감소하였으나, 본 발명의 *B. longum* 투여군(S2)은 대장염 유발군에 비하여 생존율이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 이를 통하여 *B. longum*을 투여하는 경우 염증성 장 질환의 치료 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있다.

3. DAI (Disease activity index) 측정 및 평가

상기 1.에서 얻어진 정상 대조군, 대장염 유발군, *B. longum* 투여군의 마우스 각각 실험 개시일부터 종료일까지 매일 마우스의 체중 변화, 혈변 및 대변 점성도를 측정하였고, 질병 활성도(Disease activity index; DAI)를

분석하여 하기 표 1에 따라 점수화 하였다. 보다 구체적으로, 14 일 동안 각 군의 마우스의 체중을 매일 측정하여 체중 변화를 확인하였고, 그 외에도 체중 감소, 대변의 점성 및 출혈 여부의 3 가지의 요인을 하기 표 2에 나타낸 기준으로 0 내지 4 점으로 점수화한 뒤 합산하여 대장염의 활성도를 계산하였으며 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서의 ***는 각각 대장염 유발군과 B. longum 투여군의 현저한 차이($P < 0.001$)를 의미한다.

표 2

점수	체중 감소	혈변	대변 점성도
0	(없음)	정상	정상
1	1 % 초과-5 % 이하	붉은색 혈변	묽음
2	5 % 초과-10 % 이하	검붉은색 혈변	매우 묽음
3	10 % 초과-20 % 이하	심각한 출혈	설사
4	20 % 초과	-	-

도 3을 참조하면, 대장염 유발군은 7 일째부터 붉은색으로 혈변이 보이기 시작하여 DAI 점수가 증가하는 것으로 나타났으나, 본 발명의 B. longum 투여 (S2)를 시작한 군에서는 4 일째부터 유의적으로 DAI가 완화되는 것을 확인할 수 있다.

상기 결과를 통해, B. longum S2에 의하여 장 상피 장벽이 유지될 수 있기 때문에, 병원체에 대한 첫번째 방어 기작으로 장 상피 반응을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

4. 대장 길이 변화 측정 및 결과

상기 1.에서 얻어진 각 군별 마우스들에서 장의 길이 변화를 확인하고자 마우스를 희생하고, 결장 적출 후 대장의 길이를 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서의 *는 $P < 0.05$ 를, ***는 $P < 0.001$ 을 의미한다.

도 4에서 보는 바와 같이, 정상 대조군에 비해, 대장염 유발군의 대장 길이가 약 30 % 정도 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 DSS에 의해 대장염이 유발되었음을 확인할 수 있다. 하지만, 본 발명의 B. longum 투여군 (S2)은 대장염 유발군에 비하여 대장의 길이가 증가하는 것을 보였는 바, 이를 통해 본 발명의 B. longum 이 대장염에 의한 대장 길이의 변화를 최소화시키거나, 단축되는 것을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 B. longum 군주는 염증성 대장 질환을 가진 개체의 증상의 완화 또는 개선시키는 활성이 매우 뛰어난 것을 알 수 있다.

5. PAS 염색 (PAS staining) 분석 및 정량화

뮤신은 대장에서 섭취한 자극적인 음식물이나 유해 물질로부터 장 점막 (장 상피세포)을 보호하고, 장 연동 운동의 윤활제 역할을 하며, 유산균의 정착을 도와 장내 유해균을 감소시키거나 그 자체가 장내 세균의 먹이가 되어 장내에서 유익한 역할을 하는 유산균의 증식에도 도움이 되는 것으로 알려져 있는 물질에 해당한다. 이러한 뮤신 분비의 정도를 측정하기 위하여, 상기 1.에서 얻어진 각 군별 마우스의 대장 조직을 취한 뒤 PAS 염색을 수행하고 Image J (NIH Image, Bethesda, MD, USA)를 통하여 PAS 염색을 정량화 하고 대장 조직의 손상 정도를 확인하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서의 *는 $P < 0.05$ 를 나타내고, ***는 $P < 0.001$ 을 나타낸다.

도 5에서 보는 바와 같이, 대장염 유발군에서는 대장 조직이 전반적 부위에 걸쳐 음와 (crypt)가 모두 손상되고 대장 점막 부위에 넓은 범위로 염증 세포가 침윤된 것을 확인할 수 있었던 반면, 본 발명에 따른 B. longum 투여 군 (S2)에서는 비교적 정상적인 음와가 관찰되었으며, 배상 세포 (goblet cell)가 증가된 것을 확인하였다.

또한, 도 6을 참조하면, PAS 염색을 분석한 결과 대장염 유발군에 비해 본 발명의 B. longum 투여군 (S2)에서 뮤신 분비가 유의하게 증가한 것을 확인하였으며, DSS에 의해 대장염이 유도되지 않은 마우스와 동등한 수준이거나 그보다 증가한 수준으로 나타난 것으로 확인되어 뮤신 분비의 증가를 확인하였다.

상기 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 비피도박테리움 롱굼 군주는 종래의 비피도박테리움 롱굼과는 전혀 다른 활성산소 조건에 저항능을 갖는 신규한 균주로서 뮤신 분비를 증가시켜 개체의 장내 면역을 매우 효과적으로 개선시킬 수 있으며, 염증성 질환 특히는 염증성 장 질환의 치료에 매우 효과적임을 알 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0078]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11835P

수탁일자 : 20190806

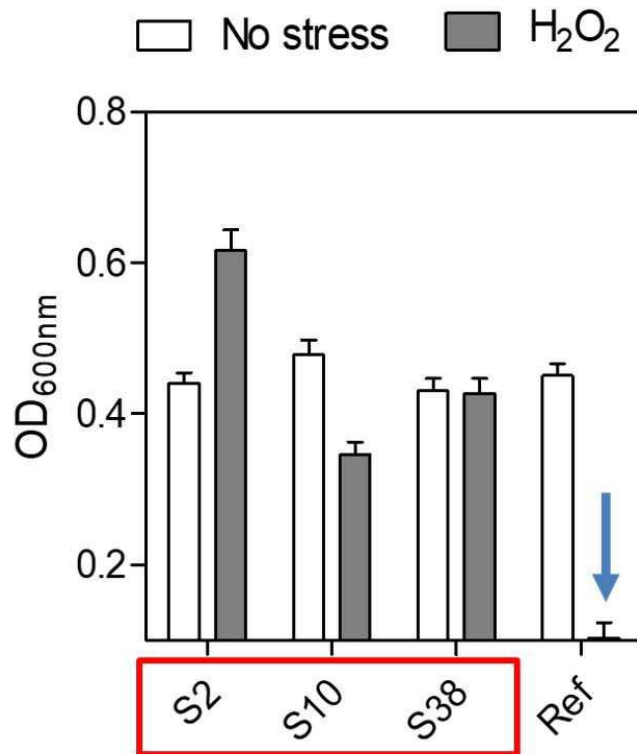
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11834P

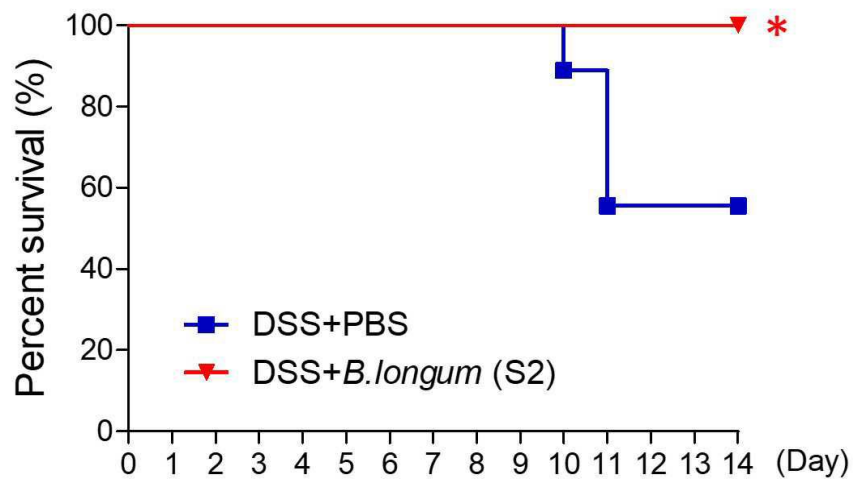
수탁일자 : 20190806

도면

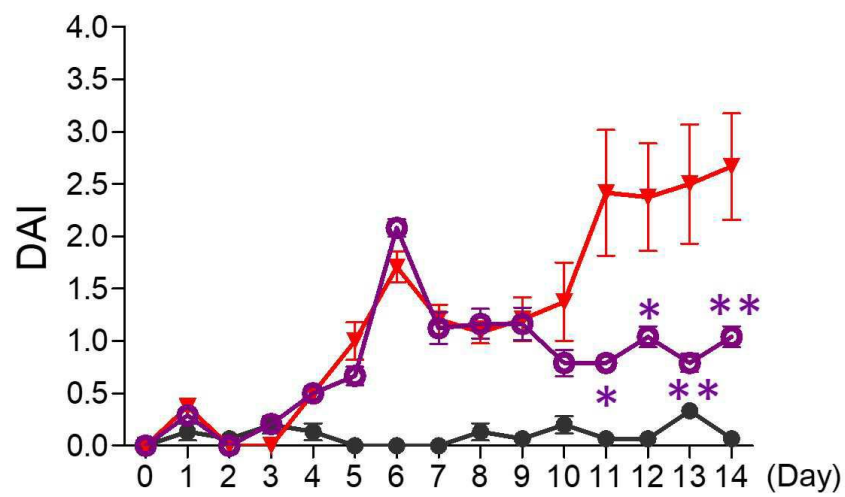
도면1



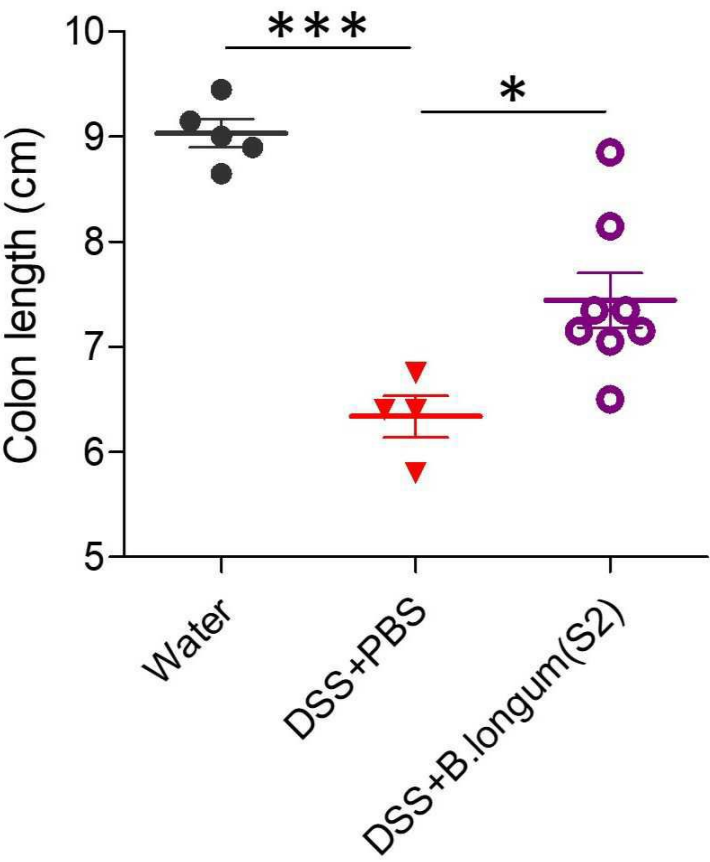
도면2



도면3



도면4



도면5



도면6

