

명세서

발명의 명칭: 락토바실러스 파라카제이 균주 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 균주 및 그 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 락토바실러스 파라카제이 KBL382 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주, 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 알레르기 증상 개선, 면역 조절 능력 개선, 염증 증상 개선, 아토피 피부염 개선, 장 건강 개선을 위한 건강기능식품용 조성물, 및 알레르기 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 아토피 피부염 및/또는 장질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 프로바이오틱스(probiotics)는 장내 미생물 균형에 도움을 주는 항균 활성화와 효소 활성을 가진 미생물 및 상기 미생물이 생산하는 생산물을 말한다. 아울러 프로바이오틱스는 건조세포나 발효산물 형태로 사람이나 동물에 공급되어, 장내 균총을 개선하는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균으로 정의되고 있다. 프로바이오틱스가 갖추어야 할 특성은 인간의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성, 장으로 가는 동안 살아 남아야 한다. 더 나아가 전달 식품 안에서 소비되기 전에 생존율과 활성을 유지하고, 감염 예방으로 사용되는 항생제에 대해 민감해야 하며, 항생제 내성을 갖는 플라스미드를 보유하지 않아야 한다. 또한, 장내 환경에서 산, 효소, 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다.
- [4] 이러한 프로바이오틱스로는 소화효소(amylase, protease, lipase, cellulase, phosphatase) 생성능력이 우수한 바실러스 종(*Bacillus sp.*), 젖산을 생성하는 락토바실러스 종(*Lactobacillus sp.*), 가축의 분변에 남아있는 악취 유발물질(암모니아, 황화수소, 아민류 등)을 대사과정에 이용하여 악취유발을 막는 광합성 박테리아(*Photosynthetic bacteria*) 등을 그 예로 들 수 있다.
- [5] 특히 바실러스 종과 락토바실러스 종은 다양한 항균 물질들을 생산하는 균주들이 존재하기 때문에, 매우 유용한 프로바이오틱스로 알려져 있다. 이들 유산균들은 항생제 내성 기작과 관련이 없는 항균 기작을 가지는 박테리오신(Bacteriocin)이라는 항균 펩타이드를 생산하는데, 박테리오신은 분자량, 생화학적 성질, 숙주에 대한 항균 범위나 기작이 상당히 다른 다형적 특징을 가지고 있다. Klaenhammer은 박테리오신을 생산하는 박테리아와 근접한 종들에 대한 직접적인 항균활성을 가진 단백질 또는 단백질복합체라고 정의하고 있다.
- [6] 한편, 과민성 대장 증후군(Irritable Bowel Syndrome)은 복통 및/또는 변화된 장

거동 또는 배변 습관과 관련된 불편함을 특징으로 하는 증상으로, 이러한 증상은 구조적 또는 생화학적 이상으로는 설명되지 않는다. 긴박뇨, 복부 팽만 및 불완전한 장 운동의 느낌 역시 IBS의 일반적 증상이다. 따라서, 이 질환은 기능성 팽만감, 비심장성 흉통, 비-궤양성 소화불량 및 만성적인 변비 또는 설사 등의 질환을 포함하는 기능성 위장 장애로 분류된다. 특히, IBS는, 관련 증상이 환자의 안녕과 정상적인 기능성 측면 모두에 작용하기 때문에, 복통 및 불편함을 넘어 이환율과 삶의 질에 막대한 영향을 미친다.

- [7] 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease)은 장관 내 비정상적인 만성 염증이 호전과 재발을 반복하는 질환으로서, 장의 모든 염증성 질환을 포함하며, 구체적인 예로 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염 또는 베체트병(Behcet's disease)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. IBS 및 IBD를 치료하기 위한 약물 개발 분야에서 막대한 연구들이 수행되고 있다. 이와 관련하여, 다양한 항우울제들이, 임상 실험에서 그 효능은 보통 수준이고 이의 임상적인 활용성은 상당한 부작용으로 인해 제한적임에도 불구하고, 대중적으로 사용되고 있다. 세로토닌성 제제들에서도 전반적인 IBS 증상들에 대한 효능이 입증되고 있다. 그러나, 최근 안전성에 대한 문제들로 인해 그 적용이 여러가지로 제약되고 있으며, 이에 IBS에 대한 새로운 치료제를 개발하는데 관심이 크게 증폭되고 있다.

- [8] 한편, 알레르기(allergy)란 이물질(항원, allergen)에 대한 특이하고 변형된 반응을 나타내는 생화학적 현상이며, 이때 이물질이 증상을 일으키게 되면 이를 알레르겐(Allergen)이라 하고, 그 결과 생긴 질환을 알레르기 질환이라고 한다. 알레르기(Allergy)는 발생원인인 항원 항체 반응의 결과로 나타나는 생체의 병적 과정이며, 일반적으로 반응을 일으키는데 필요한 시간 및 보체 관여의 유형으로부터 크게 4종류로 분류하고 있다. 이 중 제1형은 아나필락틱(anaphylactic[cytotropic;즉시형]) 형태로 표적기관이 주로 소화장기, 피부 및 폐장으로 일반적인 증상은 위장관 알러지, 담마진, 위축성 피부염, 알러지성 비염 및 기관지성 천식 등이 있다. 제1형의 병리기전은 항원이 비만세포와 호염기구의 표면에 부착되어 있는 IgE 항체에 접촉됨으로써 표적세포를 활성화시켜 히스타민, 루코트리엔, PAF 등의 화학매체를 분비하여 혈관과 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는데 이는 주로 제4형(지연형)과 복합되는 경우가 많다. 즉, 이 아나필라시스와 알레르기 반응은 비만 세포 등에서 일어나는 다양한 변화에 기인된다 탈과립을 유도하는 비만세포의 활성화는 Fc 수용체에 대한 항원, 안티(anti)-IgE, 렉틴(lectin) 등의 결합, 아나필라톡신(anaphylatoxin)등의 자극, 칼슘이오노포어(calcium ionopore), compound 48/80, 코데인(codeine) 등 합성피질 자극 호르몬과 같은 약물에 의해 야기된다.

- [9] 비만세포 및 혈중 호염구는 여러 가지 알레르기 질환 즉, 알레르기성 비염, 알레르기성 피부염, 천식, 음식 알레르기 및 아나필락틱 쇼크 등을 유발하는

주요 체내 세포로 알려져 있다 이들 세포는 세포표면에 알레르기를 유발하는 항체인 IgE에 대한 수용체(FcRI)를 가지고 있고, 그것은 알레르기를 유발하는 물질(항원, allergen)에 의해 자극을 받아 자신이 가지고 있는 다양한 알레르기를 유발시키는 물질을 세포 바깥으로 분비한다(Kim K et al, Eur J Pharmacol, 581:191-203, 2008).

- [10] 알레르기 질환 중, 아토피 피부염(Atopic Dermatitis)은 잘 알려진 바와 같이 신생아 또는 아동에게 발병하며 성인이 될 때까지 지속될 수도 있는 만성 재발성 피부 질환이다. 아토피 피부염은 천식이나 알레르기성 비염과 같이 IL-4 및 IL-5를 생산하는 T 림프구의 국소 침윤과 연관된 염증성 피부 질환으로, IL-4는 T 헬퍼2(Th2) 표현형의 발달을 제어하고 그 결과 면역글로불린(Ig)의 과생산 및 호산구증가증을 야기하며, 혈청 IgE 수준이 증가한다. 식품 및 흡입성 알레르겐에 대한 피부 테스트가 양성인 대상자의 80-90%는 아토피 피부염에 걸린 것으로 입증되었다.
- [11] 아토피 피부염을 비롯한 알레르기 질환을 치료 또는 예방하기 위한 다양한 치료법이 대두되고 있으나, 아직까지 효과적인 치료 방법이 존재하지는 않는다. 일부 약물 기반 치료법이 알려져 있으나, 치료를 위한 약물의 단기간 복용에도 내성을 보이고, 장기 복용시 상당한 부작용을 야기할 수 있기 때문에, 최근 약물에 의한 알레르기 질환 치료를 기피하고 있으며, 현재로서는 절대적이고도 확실한 효능을 갖는 치료법이 없이 알레르기 기타 피부 가려움이나 피부 발적과 같은 자극적인 증상들을 호전시키지 못하는 경우가 많다.
- [12] WO 96/29083와 EP 554418은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 299v(DSM 6595) 및 락토바실러스 카세이 ssp. 람노수스(*Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus*) 271 (DSM 6594) 등의, 장에서 집락을 이루는 2종의 락토바실러스 균주를 개시하였다. EP 415941에서는 락토바실리와 혼합하기 전에 오토밀 죽(oat gruel)을 효소로 처리하는 것을 포함하는, 영양 조성물의 제조 방법을 개시하였다. 미국 특허 7195906에서는 염증 질환, 특히 IBD 및 IBS와 같은 위장 염증 작용을 치료하기 위해, 절제하여 세정한 인간 위장관에서 분리된 비피도박테리움 균주를 개시하였다.
- [13] 그러나 염증성 장질환 및 과민성 대장 증후군을 포함하는 장 건강 개선에 탁월한 효과를 보이는 균주 및 알레르기 증상 개선에 탁월한 효과를 보이는 균주는 아직 발견되지 않았고, 상기 효과를 보이는 균주를 찾기 위한 연구는 수많은 연구 기관에서 지속하고 있는 실정이다.
- [14] 이에 본 발명자들은, 프로바이오틱스의 건강증진 효과는 속(genus)과 종(species)의 일반적 특징이라기보다는 균주(strain) 특이적이라는 점에 착안하여 (Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada, 2002), 다양한 균주를 스크리닝하여 면역 조절 효과, 항염증 활성, 알레르기 개선, 장 건강 개선 및 장 질환 치료 효과가 탁월한 신규한 균주를 동정하고 이들 균주의 우수한 치료 효과를

확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[15]

[16] **발명의 요약**

[17] 본 발명의 목적은 장 건강의 개선, 장 질환의 치료 또는 예방, 면역 조절 능력 강화, 자가면역 질환 치료 또는 예방, 알레르기 증상 개선, 염증 증상 개선, 아토피 피부염 개선 및 치료에 활용할 수 있는 신규한 균주를 제공하는 것이다.

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주를 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 식품용 또는 식품 첨가용 조성물을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 장질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 알레르기 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[23] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적 유효량을 이룰 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는

장질환의 치료방법을 제공한다.

- [24] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기 질환의 치료방법을 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료방법을 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 장질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명은 또한, 알레르기 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [28] 본 발명은 또한, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, 장질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [30] 본 발명은 또한, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한

락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주,
 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는
 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의
 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종
 이상을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

- [31] 본 발명은 또한, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제를
 제조하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP)
 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는
 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의
 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종
 이상을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[32]

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 본 발명에 따른 KBL382 균주, KBL384 균주 및 KBL385 균주의 염증성
 사이토카인 조절 효과를 PBMC에서 확인한 결과이다.
- [34] 도 2는 본 발명에 따른 KBL382 균주, KBL384 균주 및 KBL385 균주의 T 세포
 분화 마커 유전자 발현 조절 효과를 PBMC에서 확인한 결과이다.
- [35] 도 3은 항 CD3 항체 첨가로 T 세포가 활성화 된 PBMC 세포주에서 본 발명에
 따른 KBL382 균주, KBL384 균주 및 KBL385 균주의 투여에 따른 사이토카인 (A)
 IL-2, (B) IFN- γ , (C) IL-4, (D) IL-13, (E) IL-17A, 및 (F) IL-10의 발현량 변화를
 관찰한 결과이다.
- [36] 도 4는 본 발명에 따른 KBL382 균주, KBL384 균주 및 KBL385 균주를 각각
 장염이 유발된 마우스 모델에 투여하고, (A) 체중 변화, (B) 대장 길이 변화, (C)
 대장 길이 변화 및 막창자(cecum) 무게 변화, (D) 대장 조직의 H&E 염색 및 (E)
 대장 조직의 MPO(myeloperoxidase) 수치 변화를 통하여 장염 완화 효과를 확인한
 결과이다.
- [37] 도 5는 본 발명에 따른 KBL382 균주 및 KBL385 균주의 밀착연접 강화 효과를
 장관벽 밀착연접에 관여하는 유전자 (A) ZO1, (B) Claudin3, (C) MUC4의 발현량
 변화로 관찰한 결과이다.
- [38] 도 6은 본 발명에 따른 KBL382 균주의 장염 완화 효과를 확인하기 위하여
 시판중인 장염 치료용 항체 인플릭시맙과 (A) 대장 길이 개선 효과 및 (B) 체중
 감소 개선 효과를 비교한 결과이다.
- [39] 도 7은 본 발명에 따른 KBL382 균주의 아토피 완화 효과를 확인하고자
 아토피성 피부질환 동물 모델에서 KBL382 균주 투여에 따른 (A) 피부염 스코어
 측정, (B) 가려움 완화 효과, (C) 피부 두께 감소 효과 및 (D) 혈중 IgE 농도의 감소
 효과를 관찰한 결과이다.

[40]

[41] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[42] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[43]

[44] 본 발명에서는 인간 유래 미생물의 면역 조절 효과를 확인하여, 면역 조절에 탁월한 효과를 나타내는 락토바실러스 파라카제이 균주인 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP), KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 및 KBL385 균주(기탁번호 KCTC13511BP)를 확인하였으며, 상기 균주의 16s rDNA를 분석한 결과, 상기 균주가 종래 공지된바 없는 신규한 균주임을 확인하였다.

[45]

[46] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 신규한 프로바이오틱인 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주에 관한 것으로, 상기 균주는 각각 하기 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 16s rDNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[47] <서열번호 1> 락토바실러스 파라카제이 KBL382 균주의 16s rDNA 서열
>KBL382
GCAGGTGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCAACC
GAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAA
GTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTC
TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAC
TCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG
GCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC
CGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCA
AAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAAT
CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGA
GCGTCTAAGTGGCTCACGCCT

- [48] <서열번호 2> 락토바실러스 파라카제이 KBL384 균주의 16s rDNA 서열
>KBL384
GCCAGTGGGGGGGTGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGC
ACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT
TAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATG
GTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGG
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA
AAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT
GGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGC
GGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCA
GTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGG
GGCAAAATGACAGGTGGTGCATGTTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGA
CTGCCGGTGACAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGC
TAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCCTTAGGGAGC
GAGCCGTCTAAGGTGAACCAAAGTTTG

[49] <서열번호 3> 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주의 16s rDNA 서열
>KBL385

```

GCAGTTGGGGGGGAGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGAC
CGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCCCTTA
AGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTT
CTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGAGGTTGATCGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTGGGTGCTAAAA
CTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGCCGCGTGACGGTATCCAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC
GGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGC
AAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAA
TCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGCGA
GCCGTCTAAGTGTACAAAGTT

```

[50] 본 발명에서는 또한, KBL382, KBL384, KBL385 균주가 각각 항염증 및 면역 조절 효과와 더불어 장관벽의 밀착연접 강화 효과가 있음을 확인하였고, 장염 유발 동물 모델에 KBL382, KBL384, KBL385 균주를 투여한 경우 장염에 의한 체중 감소 및 대장 길이 감소가 현저히 개선되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 균주 중 KBL382 균주는 아토피 피부염을 유발한 동물모델에 투여한 경우 피부염 스코어가 현저히 개선되고, 가려움이 완화되며, 피부 두께가 감소하고, 알레르기 반응에 따른 혈중 IgE의 수치가 현저히 개선되는 것을 확인하였다.

[51]

[52] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 KBL382, KBL384, 또는 KBL385 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된

군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 식품용 또는 식품 첨가용 조성물에 관한 것이다.

- [53] 상기 식품용 또는 식품 첨가용 조성물은 장 건강 개선 또는 장 질환 예방에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [54] 상기 식품용 또는 식품 첨가용 조성물은 또한, 알레르기 증상 개선을 위한 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [55] 또한, 상기 식품용 또는 식품 첨가용 조성물은 또한, 자가면역 질환 또는 염증성 질환 개선을 위한 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [56] 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강기능식품 및 기능성 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [57] 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [58] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명에서 상기 기능성 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 충칭을 의미하며, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 장 질환 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

- [60] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 장질환 증상의 개선 또는 예방을 위한 식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [61] 본 발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 100중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1중량% 내지 99중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 10g, 바람직하게는 0.01g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.
- [62] 본 발명의 식품용 조성물은 상기 KBL382, KBL384, 또는 KBL385 균주를 독립적으로 또는 허용 가능한 담체에 첨가하거나, 인간 또는 동물이 섭취하기에 적합한 조성물 형태로 제조될 수 있다. 즉, 다른 프로바이오틱 세균을 함유하지 않은 식품 및 이미 몇 가지의 프로바이오틱 세균을 함유한 식품에 첨가되어 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품을 제조함에 있어서, 본 발명의 균주와 함께 사용 가능한 다른 미생물들은 인간이나 동물이 섭취하기에 적합하고 섭취시 병원성 유해세균을 억제하거나 포유동물 장관 내의 미생물 균형을 개선시킬 수 있는 프로바이오틱 활성을 갖는 것들이며, 특별히 제한되지 않는다. 그러한 프로바이오틱 미생물의 예로는 사카로미세스(*Saccharomyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*) 및 토룰롭시스(*Torulopsis*)를 포함하는 효모(yeast), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 리조퍼스(*Rhizopus*), 뮤코(*Mucor*), 페니실린(*Penicillium*) 등과 같은 곰팡이 및 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 락토코커스(*Lactococcus*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 그로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 페디오코커스(*Pediococcus*) 속에 속하는 세균 등이 있다. 적당한 프로바이오틱 미생물의 구체적인 예로는 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 알리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*),

락토바실러스 델브루키(*Lactobacillus delbruckii*), 락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 파시미누스(*Lactobacillus farciminus*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코커스 애시디락티시(*Pediococcus acidilactici*)등을 들 수 있다. 바람직하게는, 우수한 프로바이오틱 활성을 가지면서 면역활성 증강 효과가 뛰어난 프로바이오틱 미생물 혼합균을 본 발명의 식품용 조성물에 추가로 포함함으로써 그 효과를 더욱 증진시킬 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물에 사용될 수 있는 담체의 예로는 증량제, 고섬유 첨가제, 캡슐화제, 지질 등일 수 있으며 이러한 담체들의 예는 당업계에 충분히 공지되어 있다. 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 균주는 동결건조되거나 캡슐화된 형태 또는 배양 현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다.

[63]

[64] 본 발명의 조성물은 또한, 상기 균주를 함유하는 동물 사료용 첨가제 또는 이를 함유하는 동물사료의 형태로 제공될 수 있다.

[65]

본 발명의 동물 사료용 첨가제는 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 상기 KBL382, KBL384 또는 KBL385 균주 이외에 비병원성의 다른 미생물을 더 포함할 수도 있다. 첨가할 수 있는 미생물로는 예컨대 단백질 분해효소, 지질 분해효소 및 당 전환 효소를 생산할 수 있는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 고초균, 소의 위와 같은 혐기적 조건에서 생리적 활성 및 유기물 분해능이 있는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주, 가축의 체중을 증가시키며 우유의 산유량을 늘리고 사료의 소화 흡수율을 높이는 효과를 보여주는 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)와 같은 사상균 (Slyter, L. L. *J. Animal Sci.* 1976, 43. 910-926) 및 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모(Johnson, D. E et al. *J. Anim. Sci.*, 1983, 56, 735-739 ; Williams, P. E. V. et al, 1990, 211) 등이 사용될 수 있다.

[66]

본 발명의 동물 사료용 첨가제는 상기 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주 이외에 하나 이상의 효소제제를 더 포함할 수도 있다. 첨가되는 효소제제는 건조 또는 액체 상태가 모두 가능하며 효소제제로는 리파제(lipase)와 같은 지방 분해효소, 파이틱 애시드(phytic acid)를 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠(glycogen) 등에 포함되어 있는 α -1,4-글리코시드 결합(glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제(amylase), 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 셀룰로스(cellulose)를 분해하는 카르복시메틸셀룰라제(carboxymethylcellulase), 자일로스(xylose)를 분해하는 자일라제(xylase), 말토스(maltose)를 두 분자의 글루코스(glucose)로

가수분해하는 말타제(maltase) 및 사카로스(saccharose)를 가수분해하여 글루코스-프룩토스(glucose-fructose) 혼합물을 만드는 전환효소(invertase) 등과 같은 당 생성 효소 등이 사용될 수 있다.

- [67] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주는 동물 사료용 첨가제로 사용함에 있어서, 사료용 원료로는 각종 곡물 및 대두 단백을 비롯한 땅콩, 완두콩, 사탕무우, 펄프, 곡물 부산물, 동물 내장 가루 및 어분 가루 등이 사용될 수 있으며, 이들은 가공되지 않거나 또는 가공된 것을 제한없이 사용할 수 있다. 가공과정은, 반드시 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 사료원료가 충전된 상태에서 가압 하에 일정한 배출구로 압축되는 공정으로, 단백질의 경우에는 변성이 되어 이용성이 증가되는 압출 성형(extrusion)을 사용하는 것이 바람직하다. 압출성형(extrusion)은 열처리 과정을 통해 단백질을 변성시키고 항효소인자를 파괴시키는 등의 장점을 갖는다. 또한, 대두 단백질과 같은 경우에는 압출 성형을 통해서 단백질의 소화율을 향상시키고 대두에 존재하는 단백질 분해효소의 저해제중의 하나인 트립신 저해제(trypsin inhibitor)와 같은 항 영양인자들을 불활성화시키며 단백질 분해효소에 의한 소화율 향상을 증가시켜 대두 단백질의 영양적 가치를 증가시킬 수 있다.
- [68]
- [69] 본 발명은 또 다른 관점에서, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 장질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [70] 본 발명은 또 다른 관점에서, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 알레르기 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [71] 본 발명은 또 다른 관점에서, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 유효량 함유하는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [72] 본 발명의 약학적 조성물은 생균의 균체, 건조 균주의 형태, 균주의 배양물, 균주의 파쇄물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 담체 혹은 매체와 조합될 수 있는 조성물로 제공될 수 있다. 이용되는 담체 혹은 매체는 용매, 분산제, 코팅, 흡수 촉진제, 제어된 방출제(즉, 서방제), 및 1종 이상의 불활성 부형제(전분, 폴리올, 과립제, 극미세 셀룰로스(microfine cellulose), 미세결정형

셀룰로스(예컨대, 셀피어, 셀피어 비즈(Celphere beads), 희석제, 윤활제, 결합제(binder), 봉해제 등을 포함함) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수도 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체로서 이용하기 위한 부형제 그리고 상기 추가의 성분의 예로는, 결합제, 충전제, 봉해제, 윤활제, 향미생물제 및 코팅제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

- [73] 본 발명에 있어서, 상기 장 질환은 복부 팽만감, 복부 불편감, 병원성 미생물에 의한 감염성 설사, 위장염, 염증성 장질환, 신경성 장염 증후군, 과민성 대장 증후군, 소장 미생물 과성장증 및 장 급이성 설사로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 장의 정상적인 장벽 기능 손상에 의해 야기되는 질환을 포함한다.
- [74] 염증성 장 질환(IBD)은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염을 포함하며, 크론병 및 궤양성 결장염을 포함하는 질환 군을 지칭한다. 궤양성 결장염은 단지 대장에만 영향을 미친다. 궤양성 결장염에서의 염증 및 궤양은 대장의 4개 층 중 가장 안쪽에 있는 2개의 층인 점막층 및 점막하층에 제한된다. 크론병에서 염증 및 궤양은 소장 및 대장 둘 다에서 장벽의 모든 층을 통해 확장할 수 있다.
- [75] 한편, 과민성 대장 증후군은 기질적 원인이 없이 장기간 반복되는 복부팽만감 등의 복부 불편감 및 복통과 더불어 설사, 변비 등의 배변 습관의 변화를 동반하는 만성 질환이며 그 증상이 정신적인 요인이나 스트레스를 유발하는 사회 환경에 의해서 악화되기도 한다.
- [76] 본 발명에 있어서, 알레르기 질환은 아토피 피부염, 담마진, 알레르기 비염, 알레르기 결막염, 천식, 음식 알레르기, 아나필락틱 쇼크 등을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [77] 본 발명에 있어서, 자가면역 질환은 류마티스성 관절염, 루프스, 전신성 경피증, 아토피 피부염, 건선, 건선 관절염, 천식, 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 중증 근무력증, 피부근염, 다발성근염, 다발성 경화증, 자가면역성 뇌척수염, 결절성 다발성 동맥염, 하시모토 갑상선염, 다발성 경화증, 측두동맥염, 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 천포창, 아프타구내염, 자가면역 용혈성 빈혈, 베게너 육아종증, 쇼그렌 증후군, 애디슨병, 크론병, 베체트병 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [78] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증을 주 병변으로 하는 질병을 총칭하는 것으로서, 부종, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 만성 부비동염, 인후염, 편도염, 기관지염, 폐렴, 위궤양, 위염, 대장염, 통풍, 습진, 여드름, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 강직성 척수염, 류마티스성 열, 섬유근통(fibromyalgia), 골관절염, 건선 관절염, 류마티스성 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염 근육염, 간염, 방광염, 신장염,

쇼그렌 증후군, 중증 근무력증, 패혈증, 맥관염, 활액낭염, 측두 동맥염, 다발성 경화증 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[79] 자가면역질환은 조절 T 세포(Regulatory T cell, Treg)의 활성화 또는 T 세포로의 분화로 인해 예방 또는 치료가 가능하다고 알려져 있다. 조절 T 세포는 CD4+ T세포의 한 종류로서 면역체계를 조절하고, 자가 항원에 대한 관용을 유지하여 자가면역 질환을 제어하는 역할을 한다. 조절 T 세포의 발달, 유지 및 기능에는 특이적으로 Foxp3라는 전사인자가 관여하는데, 면역 억제 사이토카인인 IL-10 및 TGF- β 의 분비를 통해 면역 반응을 조절한다.

[80] 또한, T 세포의 Th1 세포, Th2 세포, Th17 세포로의 분화율이 낮고 T 세포의 Treg 세포로의 분화율이 높은 경우 염증 반응을 효과적으로 억제할 수 있다고 알려져 있다.

[81] 비장 T 세포로부터 분화된 Th1 세포, Th2 세포 및 Th17 세포는 각각 하기 전사인자 및 사이토카인의 발현과 관련된 것으로 알려져 있다: Th1 세포의 경우, T-bet, IFN- γ 및 IL-12; Th2 세포의 경우, GATA3 및 IL-5; Th17 세포의 경우, ROR γ IL-17.

[82]

[83] 본 발명에 따른 군주에 의해 발휘되는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 개선, 치료 또는 예방의 효과는 다음의 어느 하나 이상의 기전에 의해 유도되는 것을 특징으로 할 수 있다:

[84] i) 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF, IL-1b, IL-8, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-17A로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현 또는 분비를 억제시킴;

[85] ii) 항염증 및 면역 조절 사이토카인인 IL-10의 발현 또는 분비를 증진시킴; 및

[86] iii) 항염증 활성 및 면역 조절에 관여하는 Treg의 발현을 증진시킴.

[87]

[88] 상기 '치료하는'이란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본 발명에서 사용된 상기 '치료'란 용어는 '치료하는' 이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[89] (1) 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 발달을 저지시킴,

[90] (2) 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 확산을 예방함,

[91] (3) 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환을 경감시킴.

[92] (4) 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 재발을 예방함, 및

[93] (5) 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 증상을

완화함(palliating)

[94]

[95] 본 발명에 따른 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 락토바실러스 파라카제이 KBL382, 락토바실러스 파라카제이 KBL384, 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385 균주를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[96] 본 발명에서, 용어 "유효량(또는, 유효한 양)"은 바람직한 효과를 전달하기에는 매우 충분하지만 의학적 판단 범위 내에서 심각한 부작용을 충분히 방지할 정도로 적은 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 의하여 체내에 투여되는 미생물의 양은 투여 경로, 투여 대상을 고려하여 적절하게 조정될 수 있다.

[97] 본 발명의 조성물은 대상 개체에 매일 일회 이상 투여될 수 있다. 단위 투여량은 사람 피험자 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 적절한 약제학적 담체를 포함하며 치료 효과를 나타내는 본 발명의 미생물의 예정된 양을 함유한다. 성인 환자의 경구 투여용 단위 단위는 본 발명의 미생물 0.001 g 이상을 함유하는 것이 바람직하며, 본 발명의 조성물 경구 투여량은 일회에 0.001 내지 10g, 바람직하게는 0.01 내지 5 g이다. 본 발명의 미생물의 약학적 유효량은 0.01 내지 10 g/1일이다. 그러나, 투여량은 환자의 장 질환의 심각도 및 사용되는 미생물과 보조 유효 성분에 따라 가변적이다. 또한, 일일 총 투여량을 여러 횟수로 분할하여 필요에 따라 연속적으로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량 범위는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 아니한다.

[98] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[99] 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 위장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 장 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[100] 본 발명의 약학적 조성물은 특히, 경구용 단위 제형으로서 장용 피복된 장용성 제제로서 제공될 수 있다. 본 명세서에서의 "장용 피복"은 위산에 의해서는 분해되지 아니하여 피복이 유지되나, 소장에서는 충분히 분해되어 활성 성분이 소장내에 방출될 수 있도록 하는, 약제학상 허용 가능한 모든 종류의 공지의

피복을 포함한다. 본 발명의 "장용 피복"은 pH 1의 HCl 용액과 같은 인공 위즙을 36°C 내지 38°C에서 접촉시킬 때, 2시간 이상 동안 그대로 유지되며, 바람직하게는 이후에 pH 6.8의 KH₂PO₄ 완충 용액과 같은 인공 장즙에서 30분 이내에 분해되는 피복을 지칭한다.

- [101] 본 발명의 장용 피복은 1개의 코어(core)에 약 16 내지 30, 바람직하게는 16 내지 20 또는 25 mg 이하의 양으로 피복된다. 본 발명의 장용 피복의 두께가 5 내지 100 μm , 바람직하게는 20 내지 80 μm 인 경우가 장용 피복으로서 만족스러운 결과를 나타낸다. 장용 피복의 재료는 공지의 고분자 물질들 중에서 적당히 선택된다. 적당한 고분자 물질은 다수의 공지 문헌(L. Lachman 외, The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 3판, 1986, pp. 365~373; H. Sucker 외, Pharmazeutische Technologie, Thieme, 1991, pp. 355-359; Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 4판, Vol. 7, pp. 739 ~ 742, 및 766 ~ 778, (SpringerVerlag, 1971); 및 Remington's Pharmaceutical Sciences, 13판, pp. 1689 ~ 1691 (Mack Publ., Co., 1970))에 열거되어 있고, 셀룰로즈 에스테르 유도체, 셀룰로즈 에테르, 아크릴 수지의 메틸아크릴레이트 공중합체 및 말레인 및 프탈산 유도체의 공중합체가 이들에 포함될 수 있다.
- [102] 본 발명의 장용 피복은 장용 피복 용액을 코어에 분무하는 통상적인 장용 피복법을 사용하여 제조될 수 있다. 장용 피복 공정에 사용되는 적당한 용매로는 에탄올과 같은 알콜, 아세톤과 같은 케톤, 다이클로로메탄(CH₂Cl₂)과 같은 할로젠화 탄화수소 용매이며 이들 용매들의 혼합 용매가 사용될 수도 있다. 디(di)-n-부틸프탈레이트 또는 트리아세틴과 같은 연화제를 1 대 약 0.05 내지 약 0.3 (코팅 재료 대 연화제)의 비율로 피복 용액에 첨가한다. 분무 과정을 연속적으로 수행하는 것이 적절하며 피복의 조건을 고려하여 분무량을 조절하는 것이 가능하다. 분무압은 다양하게 조절할 수 있고, 일반적으로 약 1 내지 약 1.5 바(bar)의 분무압으로 만족할만한 결과가 얻어진다.
- [103] 본 발명은 또 다른 관점에서 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용되기 위한 상기 균주 또는 조성물의 용도 및 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환 치료제의 제조를 위한 상기 균주 또는 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [104] 구체적으로 본 발명은, 장질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [105] 본 발명은 또한, 알레르기 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는

락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[106] 본 발명은 또한, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[107] 본 발명은 또한, 장질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[108] 본 발명은 또한, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[109] 본 발명은 또한, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[110] 본 발명에서, 용어 '예방'은 질병을 축소시키는 방지(averting), 지연(delaying), 방해(impeding) 또는 저해(hindering)와 관련된 것이다.

[111] 본 발명에서, 용어 '치료'는 질병의 증상을 개선, 치유 또는 감소 또는 질병의 진행을 감소 또는 정지시키기 위해 질병에 걸린 피험자를 돌보는 것과 관련된 것이다.

[112]

[113] 본 발명은 또 다른 관점에서 약학적 유효량의 상기 균주 또는 조성물을 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료나 장 건강, 알레르기 반응, 면역력 감소 또는 염증 반응의 개선이 요구되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

- [114] 구체적으로 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적으로 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 장질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [115] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적으로 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기 질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [116] 본 발명은 또한, 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 균주 또는 락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 치료학적으로 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [117] 상기 장질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [118] 한편, 상기 장 질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 투여할 수 있는 개체는 인간을 포함한 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 동물일 수 있다.
- [119]
- [120] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [121]
- [122] 실시예 1. 면역조절 기능을 갖는 프로바이오틱 균주의 스크리닝
- [123] 백혈병 단핵구인 THP-1 세포주 및 말초혈액단핵구(PBMC)를 이용하여 면역조절 기능을 갖는 프로바이오틱 균주를 스크리닝하였다. 상기 2종의 세포주에 각각 인간 소화관(gut) 또는 질(vagina)에서 유래한 균주를 세포주:균주가 1:100의 비율이 되도록 분주하고, 염증 유발 반응의 주요 지표가 되는 사이토카인인 IL-6에 대한 염증 조절의 주요 지표가 되는 사이토카인인 IL-10의 비율(IL-10/IL-6), 그리고 자가 면역 반응의 주요 지표가 되는

사이토카인인 IFN- γ 에 대한 IL-10의 비율(IL-10/IFN- γ)을 측정하였다. 스크리닝에는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) 2종, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 1종, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 5종, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 2종, 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 4종, 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) 4종, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 1종, 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 2종 및 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 2종으로, 총 23종의 균주를 이용하였다.

- [124] 스크리닝 결과, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 그리고 KBL385 세 균주에서 IL-10/IL-6 값이 가장 높게 나타났다. 특히 세 락토바실러스 파라카제이 균주 중 KBL382가 THP-1 세포주에서 IL-10/IL-6 값이 2.22로 가장 높았고, 말초혈액단핵구에서 IL-10/IFN- γ 값이 9으로 매우 높은 면역조절 효과를 나타내었다. 하기 표 1은 본 스크리닝에 사용된 프로바이오틱 23 균주 중 3종의 락토바실러스 파라카제이 균주의 IL-10/IL-6 그리고 IL-10/IFN- γ 값을 측정한 결과이다. 이에 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 그리고 KBL385 세 균주가 장 건강 개선에 높은 효과가 있을 것으로 예측하고 이들 균주에 대한 추가 실험을 진행하였다.

[125]

[126] [표1]

Cell line	균주	IL-10/IL-6
THP-1	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL382	2.222168
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL384	0.621436
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL385	1.08215
Cell	균주	IL-10/IFN-r
PBMC	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL382	9.0295403
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL384	7.4016942
	<i>Lactobacillus paracasei</i> KBL385	7.9818579

[127]

- [128] 실시예 2. *Lactobacillus paracasei* KBL382, KBL384 그리고 KBL385 균주의 염증성 사이토카인 발현 및 T 세포 분화 조절 효과 검증 (*in vitro* test)

- [129] 상기 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 그리고 KBL385 균주에 의한 면역조절 효과의 검증을 위해 THP-1 세포주에 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 그리고 KBL385 균주를 처리하는 경우 면역 조절에 관여하는 사이토카인들의 생성능 및 PBMC에 락토바실러스 파라카제이 KBL382와 KBL385 균주를 처리할 경우 T 세포 분화의 마커 유전자 발현 여부를 확인하였다.

- [130] 우선, THP-1 세포주를 24웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 cell씩 분주하고, 성숙한 대식세포(macrophage)로 분화 시킨후, 배양액을 교체하였다. 3시간 후 한 웰에는

양성 대조군(positive control)로 LPS를 1 µg/ml의 농도로, 다른 웰에는 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 혹은 KBL385 균주를 각각 생균수 1×10^7 cell씩 처리하고 24시간이 경과한 후 배양 액을 모아 BD Cytometric Bead Array(CBA) human inflammation kit(Cat No. 551811)을 이용하여 제조자 방식에 따라 각 사이토카인의 양을 측정하였다. 음성 대조군(Cont)으로는 PBS 버퍼를 처리한 후 동일한 실험 과정을 진행하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, THP-1 세포주에서는 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 KBL385 균주를 처리한 군이 LPS를 처리한 군보다 염증성 사이토카인 IL-6, TNF, IL-1b 그리고 IL-8이 현저히 낮게 측정되는 양상을 나타내었다. KBL384 균주를 처리한 경우, IL-6는 LPS를 처리한 실험군보다 현저히 낮은 양상을 확인하였으나, TNF, IL-1b, IL-8의 경우는 LPS를 처리한 군에 비해 큰 차이가 없었다. IL-10의 경우 LPS를 처리한 군에 비해 KBL382, KBL384, KBL385 균주를 처리한 군에서 유의한 증감이 관찰되지는 않았으나, 음성 대조군에 비해서는 전반적으로 증가가 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 KBL385 균주가 THP-1 세포에서 염증성 사이토카인의 생성을 현저히 억제시키는 효능을 가지고 있다고 결론 내리고, T세포 분화 양상을 확인하는 후속 실험을 진행하였다.

- [131] T 세포 분화에 끼치는 KBL382, KBL385 균주의 영향을 확인하기 위해, PBMC 세포를 24 웰 플레이트의 각 웰에 5×10^5 cell씩 분주한 후, 락토바실러스 파라카제이 KBL382 혹은 KBL385 균주를 5×10^6 cell씩 되도록 첨가하였다. 대조군으로는 대장균(*E.coli* 0157 EC4115)을 생균수 기준으로 각 웰에 5×10^6 cell씩 넣거나 LPS를 500 ng/ml의 농도가 되도록 첨가하였다. 대장균의 경우 염증 유발 반응과 관련된 T 세포의 effector cell marker인 T-bet, GATA3, RORrt 유전자의 발현을 증가시키는 반면, LPS는 염증 조절과 관련된 Treg 세포의 마커인 FOXP3 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 상기 조건으로 준비된 PBMC세포 실험군을 5일 동안 인큐베이션 한 후 수득해서 세포를 모았다. 유전자 발현량을 확인하기 위해 우선 easy-spin 켄 (DNA free) Total RNA Extraction Kit (Intron)을 이용해 RNA를 추출한 후 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ThermoFisher)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 Rotor-Gene® Q (Qiagen) 장비를 사용, Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen)으로 제조자 방식에 따라 real-time PCR을 수행하여 Th1의 마커(effector cell marker) 유전자인 T-bet, Th2의 마커 유전자인 GATA3, Th17의 마커 유전자인 RORrt, 그리고 Immune regulatory T 세포(Treg 세포)의 마커 유전자인 FOXP3 mRNA 발현을 측정하였다. 이때 각 실험군 간의 상대적인 유전자 발현량을 보정하기 위한 대조군(internal control) 으로 B2M 유전자의 발현량을 측정하였다. 각 유전자 발현을 확인하기 위해 사용한 프라이머(primer)의 염기 서열은 다음과 같다.

[132]

[133] B2M

- [134] Forward: 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3' (서열번호 4)
- [135] Reverse: 5'-GAT GCT TCT TAC ATG TCT CG-3' (서열번호 5)
- [136]
- [137] T-bet
- [138] Forward: 5'-CCC CAA GGA ATT GAC AGT TG-3' (서열번호 6)
- [139] Reverse) 5'-GGG AAA CTA AAG CTC ACA AAC-3' (서열번호 7)
- [140]
- [141] GATA3
- [142] Forward: 5'-CTG CAA TGC CTG TGG GCT C-3' (서열번호 8)
- [143] Reverse: 5'-GAC TGC AGG GAC TCT CGC T-3' (서열번호 9)
- [144]
- [145] RORrt
- [146] Forward: 5'-AAG ACT CAT CGC CAA AGC AT-3' (서열번호 10)
- [147] Reverse: 5'-TCC ACA TGC TGG CTA CAC A-3' (서열번호 11)
- [148]
- [149] FOXP3
- [150] Forward: 5'-TCA AGC ACT GCC AGG CG-3' (서열번호 12)
- [151] Reverse: 5'-CAG GAG CCC TTG TCG GAT-3' (서열번호 13)
- [152]
- [153] 그 결과, 도 2에서 나타낸 바와 같이, 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 KBL385 균주는 대장균과 비교해 염증성 T 세포의 effector cell marker인 T-bet, GATA3, RORrt 유전자의 발현량이 유의하게 낮게 유지되는 반면, LPS와 유사하게 면역항상성 유지를 위한 Treg 세포의 마커인 FOXP3의 mRNA는 유의하게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [154]
- [155] 실시예 3. *Lactobacillus paracasei* KBL382, KBL384 그리고 KBL385 균주의 T 세포 면역 조절 효과 검증 (*in vitro* test)
- [156] 한편, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 균주에 의한 T 세포의 면역조절 효과의 검증을 위하여, PBMC 세포에서 T 세포를 활성화시킨 다음 상기 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 균주를 각각 처리할 경우, 염증성 사이토카인의 발현량을 확인하였다.
- [157] T 세포를 활성화시키는 항 CD3 항체(1 µg/ml, ebioscience)와 함께 PBMC 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 2 X 10⁵ cell씩 분주한 후, 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 혹은 KBL385 균주를 생균수 기준으로 1 X 10⁷ cell 씩 (bacteria:PBMC = 50:1) 되도록 첨가하였다. 대조군으로는 대장균 *Escherichia coli* K12(ATCC 10798) 을 생균수 기준으로 1 X 10⁷ cell씩 각 웰에 첨가하였다. 상기 조건으로 준비된 T 세포가 활성화 된 PBMC 세포 실험군을 3일 동안 배양한 후 상층액을 모아 BD cytometric Bead Array(CBA) human inflammation kit (Cat No.

- 551811)을 이용하여 제조자 방식에 따라 각 사이토카인의 양을 측정하였다.
- [158] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 항 CD3 항체 첨가로 T 세포가 활성화된 PBMC 세포주에서는 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 군주는 모두 Th1의 사이토카인인 IL-2과 IFN γ , Th2의 사이토카인인 IL-4와 IL-13, 그리고 Th17의 사이토카인인 IL-17A의 발현을 대장균을 첨가한 군주 및 PBS만 처리한 실험군에 비해 현저히 감소시키는 반면, 항 염증 사이토카인인 IL-10은 실험에 사용된 세 종의 락토바실러스 파라카제이 군주에서 모두 PBS만 처리한 실험군에 비해 월등히 증가시키며, 이중 KBL382 군주는 대장균 첨가군보다도 현저히 증가시키는 것을 확인하였다. 이와 같은 실험 결과를 종합할 때 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 군주는 모두 T 세포의 염증성 사이토카인을 현저히 감소시키고 항 염증 사이토카인은 증가시킨다는 결론을 내리게 되었다.
- [159]
- [160] 실시예 4. 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 군주의 장염 완화 효과 검증(*in vivo* test)
- [161] 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 및 KBL385 군주가 *in vivo* 상에서도 장 기능 개선 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여, C57BL/6 마우스를 각 10마리씩의 군집으로 구분한 후, 2% DSS를 수돗물에 용해하여 식수로 9일간 음용시킴으로써 장염을 유도하였다. 이와 동시에 대조군 마우스에는 PBS를 매일 200 μ l씩 경구 투여하였고, 실험군 마우스에는 락토바실러스 파라카제이 KBL382, KBL384 혹은 KBL385 군주를 각각 PBS에 2×10^{10} CFU/ml이 되도록 희석시킨 후 매일 200 μ l씩 경구 투여하여 일일 투여량이 4×10^9 CFU가 되도록 하였다. 이후, DSS를 공급하여 장염이 유발되는 9일 동안, 대조군 및 실험군 마우스의 체중 변화를 매일 측정하였고, DSS를 공급한 후 9일째 되는 날 마우스를 부검하여 대장(colon)의 길이를 측정하였다.
- [162] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 체중 변화에 있어서 KBL382, KBL384, KBL385의 세 군주 처리군 모두 아무것도 처리하지 않은 대조군 마우스에 비해 유의한 체중 감소의 개선 효과를 나타내었고, 대장 길이 변화에 있어서도 세 군주 모두에서 대조군 마우스에 비해 대장 길이 감소 폭이 현저히 개선된 것을 확인하였다.
- [163] 또한, KBL382 및 KBL385 군주 실험군을 대상으로 염증의 정도를 측정하기 위한 H&E 염색을 실시하였고, 조직에서 Myeloperoxidase(MPO) 수치를 측정하였다. 부검 후 대장의 병변을 H&E 염색으로 살펴보기 위해 대장의 distal 부분을 10% 중성 포르말린 용액에 고정후 파라핀 조직표본을 5 μ m 두께 절편후 hematoxylin & eosin으로 염색하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한 MPO 측정을 위해서는 우선 대장 조직을 protease inhibitor를 첨가한 RIPA buffer에 넣고 homogenizer로 조직을 파쇄시켰다. 파쇄된 조직을 4°C에서 15,000 X g로 10분 동안 원심 분리를 한 이후 상층액을 사용하여 ELISA kit (Hycult Biotech,

MPO, Mouse, cat. HK210-02)) 프로토콜을 따라 MPO 측정을 하였다.

- [164] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, KBL382, KBL385 두 군주를 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비해 염증이 완화되었다는 사실을 H&E 염색 결과 확인할 수 있었고 MPO양도 KBL385 실험군에서 소폭 감소하고 KBL382 실험군에서 현저히 감소한 것을 볼수 있었다. 여기서 확보된 대장 조직을 이용하여 장관벽 밀착연접 강화 효과를 확인하였다.

[165]

- [166] 실시예 5. 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 KBL385이 장관벽 밀착연접(tight junction) 강화 효과

- [167] 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 KBL385 군주의 장관벽 밀착연접 강화 효과를 확인해 보고자 실시예 4에서 분리된 마우스 대장 조직에서 분리된 세포에서 장관벽 밀착연접에 관여하는 유전자의 mRNA 발현량을 비교 측정하였다. 유전자 발현량을 확인하기 위해 우선 easy-spin제 (DNA free) Total RNA Extraction Kit (Intron)을 이용해 조직에서 RNA를 추출한 후 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ThermoFisher)로 cDNA를 합성하였다. Rotor-gene SYBR green PCR kit (Qiagen)를 사용하여 Rotor-Gene® Q (Qiagen)로 *in vivo* 장관벽 밀착연접 마커 단백질들인 zonula occluden-1(ZO-1), Claudin3 그리고 MUC-4의 mRNA 발현량을 측정하였다. 각 실험군 간의 상대적인 유전자 발현량을 보정하기 위한 대조군으로 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase(HPRT) 유전자의 발현량을 측정하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 프라이머는 다음과 같이 각 유전자에 특이적인 결합이 가능한 서열을 가지도록 하였다.

[168]

- [169] Zo-1

[170] Fw: 5'-ACC CGA AAC TGA TGC TGT GGA TAG-3' (서열번호 14)

[171] Rw: 5'-AAA TGG CCG GGC AGA ACT TGT GTA-3' (서열번호 15)

[172]

- [173] Claudin3

[174] Fw: 5'-CAG ACG TCC GTC AGT TTT CG-3' (서열번호 16)

[175] Rw: 5'-CAT GGC TGC TGG ACT TGA AC-3' (서열번호 17)

[176]

- [177] MUC-4

[178] Fw: 5'-GTC TCC CAT CAC GGT TCA GT-3' (서열번호 18)

[179] Rw: 5'-TGT CAT TCC ACA CTC CCA GA-3' (서열번호 19)

[180]

- [181] HPRT

[182] Fw: 5'-TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC-3' (서열번호 20)

[183] Rw: 5'-GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T-3' (서열번호 21)

[184]

- [185] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, KBL382 및 KBL385 균주를 투여한 마우스에서 측정된 세 유전자의 발현량이 PBS만을 투여한 대조군에 비해 증가하여 장관벽 밀착연접이 회복되었음을 확인하였고, 따라서 상기 균주를 염증성 장질환 및 과민성 대장 증후군 등의 치료 용도로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [186]
- [187] 실시예 6. 장염 치료용 항체와 KBL382간의 장염 완화 효과 비교
- [188] 인플릭시맙(제품명 레미케이드)은 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 성인 크론병, 소아 크론병, 건선, 건선성 관절염 등 자가면역성 질환에 주사제의 형태로 사용되는 치료용 제조합 항체의약품이다. KBL382 균주와 인플릭시맙이 *in vivo* 상에서 장질환 증상 개선 효과에 어떤 차이를 보이는지를 확인하고자 하였다.
- [189] 효과 비교를 위하여, C57BL/6 마우스를 각 8마리씩의 군집으로 구분한 후, 2% DSS를 수돗물에 용해하여 식수로 9일간 음용시킴으로써 장염을 유도하였다. 이와 동시에 대조군 마우스에는 PBS를 매일 200 μ l씩 경구 투여하였고, 실험군 마우스에는 KBL382 균주를 PBS에 2×10^{10} CFU/ml이 되도록 희석시킨 후 매일 200 μ l씩 경구 투여하여 일일 투여량이 4×10^9 CFU가 되도록 하였다. 치료용 항체 투여군에는 인플릭시맙 항체를 마우스당 5 mg/kg의 용량이 되도록 3일차에 한번 투여하였다.
- [190] 이후, DSS를 공급하여 장염이 유발되는 9일 동안, 대조군 및 실험군 마우스의 체중 변화를 매일 측정하였고, DSS를 공급한 후 9일째 되는 날 마우스를 부검하여 대장(colon)의 길이를 측정하였다.
- [191] 그 결과, 도 6(A)에 나타난 바와 같이, 대장 길이 변화에 있어서 KBL382 균주 처리군 및 인플릭시맙 투여군에서 대조군 마우스에 비해 대장 길이 감소 폭이 현저히 개선된 것을 확인하였다. 인플릭시맙 투여군에 대비하여 KBL382 균주 처리군의 대장 길이 개선 효과는 유사하거나 오히려 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [192] 체중 변화에 있어서도, 도 6(B)에 나타난 바와 같이 KBL382 균주 처리군 및 인플릭시맙 투여군에서 아무것도 처리하지 않은 대조군 마우스에 비해 유의한 체중 감소의 개선 효과를 나타내었다. 투여후 5일까지의 초기 체중 감소의 완화 효과는 인플릭시맙 투여군이 KBL382 균주 처리군에 비해 뛰어난 것으로 확인되었으나, 그 이후 인플릭시맙의 개선 효과는 감소하는 반면 382 균주 처리군의 체중 감소 효과가 증가하여 투여군간의 효과가 9일차까지 점점 유사해지는 경향을 확인하였다. 따라서 상기 균주를 염증성 장질환 및 과민성 대장 증후군 등의 치료 용도로 활용함에 있어, 시판중인 치료용 항체와 유사한 정도의 치료 효과를 기대할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [193]
- [194] 실시예 7. KBL382의 아토피 완화 효과

- [195] KBL382 균주의 아토피 완화 효과를 확인하고자 아토피성 피부질환 동물 모델인 NC/Nga 마우스 모델을 이용하였다.
- [196] NC/Nga 마우스를 각 그룹당 9마리씩 그룹핑 한 후, 마우스의 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 제모하고 24시간 방치하였다. 그 후 집먼지진드기(HDM: house dust mites) 항원인 *Dermatophagoides farinae* 추출물(DFE: *Dermatophagoides farinae* extract)이 포함된 연고를 마리당 100 mg의 DFE가 처리되도록 제모 부위에 1주일에 1~2회씩 7주간 도포하여 아토피 피부염을 유발하였다. 피부염 유발 3주차부터 대조군 마우스에는 PBS를 매일 200 μ l씩 경구 투여하였고, 실험군 마우스에는 KBL382 균주 및 락토바실러스 람노시스 KBL365 균주를 각각 200 μ l의 PBS에 최소 마리당 1×10^9 CFU 가 되도록 희석시킨 후 매일 200 μ l씩 경구 투여하였다. 이후, 균을 투여하는 4주 동안, 대조군 및 실험군 마우스의 피부염 스코어(Dermatitis Score)를 매주 측정하였고, 균을 투여한 후 4주째 되는 날 마우스의 긁는 시간(scratching time)과 피부 두께 그리고 마우스를 부검하여 혈중 IgE 농도를 측정하였다.
- [197]
- [198] 7-1. 피부염 스코어의 측정
- [199] DFE로 유발된 피부 병변의 평가를 위해 아래와 같은 방법을 통해 피부염 스코어를 측정하였다. 피부상태는 균주를 투여하기 시작한 3주째부터 1주간격으로 4주 동안 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness), 부종(edema), 홍진과 출혈(erythema/hemorrhage) 그리고 미란과 상처(erosion/excoriation) 4가지 지표를 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한 상태를 3점(severe)을 주었고, 총점으로 평가하였다.
- [200] 그 결과 도 7(A) 에서 볼 수 있듯이, 아토피 피부염이 유도된 대조군(Negative) 및 KBL365 균주를 투여한 군에 비해 KBL382균주를 투여한 군에서 피부염 스코어가 유의하게 감소되었음을 확인하였다. 이로써, KBL382 균주의 섭취에 따른 아토피 피부염 스코어의 완화를 확인할 수 있었다.
- [201]
- [202] 7-2. 가려움 완화 효과
- [203] DFE로 유발된 아토피성 피부염 마우스 모델에서 KBL382 균주의 투여에 따른 가려움 완화 효과를 확인하고자, 균주 투여 4주 후 10분간 마우스의 긁는 횟수(number of scratches)을 측정하였다.
- [204] 그 결과, 도 7(B) 에서 볼 수 있듯이, KBL382 균주를 투여한 실험군에서 긁는 횟수가 PBS 투여군에 비해 현저히 감소하는 것으로 나타나, KBL382 균주의 섭취로 아토피성 피부염의 가려움 증상이 완화되는 것을 확인할 수 있었다.
- [205]
- [206] 7-3. 피부 두께의 감소
- [207] DFE로 유발된 아토피성 피부염 마우스 모델에서 KBL382 균주의 투여에 따른

피부의 두께 증가 감소 효과를 확인하고자, 군주 투여 4주 후 양각기(calipers)를 이용하여 마우스의 귀 및 등 피부의 두께를 측정하고 아토피 피부염에 의한 부종 증상의 완화를 관찰하였다. 그 결과, 도 7(C)에서 볼 수 있듯이, KBL382 군주를 투여한 실험군에서 대조군 및 KBL365 군주 투여군 대비 유의하게 귀 및 피부의 두께가 감소되는 효과를 관찰할 수 있었다.

[208]

[209] 7-4. 혈중 IgE 농도의 감소

[210] 아토피 피부염 환자의 IgE 농도는 대부분 아토피 피부염의 임상적 중증도가 심해질수록 증가되었다고 밝혀져 있다 (Matsumoto M, *J Immunol.* 1999). 이에 아토피 피부염의 발생으로 나타나는 대표적인 혈액학적 인자인 IgE의 농도를 군주 투여 3주 후 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고 Mouse IgE ELISA Set (Cat No. 555248, BD OptEIA 켄)을 사용하여 측정하였다. 그 결과, 도 7(D)에서와 같이, KBL382 군주를 경구 투여한 실험군에서 혈중 IgE 농도가 유의미하게 감소되는 것으로 나타나, KBL382 군주의 섭취에 따른 아토피 피부염 치료 효과를 확인할 수 있었다.

[211]

[212] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[213]

[214] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[215] 수탁번호 : KCTC13509BP

[216] 수탁일자 : 20180417

[217]

[218] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[219] 수탁번호 : KCTC13510BP

[220] 수탁일자 : 20180417

[221]

[222] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[223] 수탁번호 : KCTC13511BP

[224] 수탁일자 : 20180417

[225]

산업상 이용가능성

[226] 본 발명에 따른 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 군주, 락토바실러스 파라카제이 KBL384(기탁번호 KCTC13510BP) 군주 및

락토바실러스 파라카제이 KBL385(기탁번호 KCTC13511BP) 균주는 항염증 활성 및 면역조절 기능이 우수하고, 장관벽 밀착연접의 강화 효과가 탁월하며, 장염에 따른 체중 감소 및 대장 길이의 감소를 억제하여 장염 치료 효과를 발휘하고, 이와 더불어 세포의 알레르기 반응을 약화시키고, 아토피 피부염에 대한 증상을 현저히 개선하여 알레르기 질환의 개선 효과도 함께 발휘한다. 따라서 하나의 균주로, 항염증 효과, 면역 조절 효과, 장 건강 기능 개선 및 알레르기 질환 개선을 위한 목적을 모두 달성할 수 있어 프로바이오틱 소재로 유용하게 활용될 수 있다.

[227]

서열목록 Free Text

[228] 전자파일 첨부하였음.

[229]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규격

7.1 조에 따른 국제 규격의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 고바이오랩 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Lactobacillus paracasei</i> KBL 382	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13509BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I 항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2018년 4월 17일 자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture) 주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 입 신길 181 한국 생명공학연구원(KRIBB)	국제 수탁기관의 대표자 서명:  담당자 김차영 2018년 4월 17일

* 상기번역문은 원본과 동일함을 증명합니다. 변리사 이 처 영

[230]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규격

7.1 조에 따른 국제 규격의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 고바이오랩 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Lactobacillus paracasei</i> KBL 384	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13510P
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I 항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2018년 4월 17일 자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture) 주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 입 신길 181 한국 생명공학연구원(KRIBB)	국제 수탁기관의 대표자 서명:  담당자 김차영 2018년 4월 17일

* 상기번역문은 원본과 동일함을 증명합니다. 변리사 이 처 영

[231]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규격

7.1 조에 따른 국제 규격의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 고바이오랩 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Lactobacillus paracasei</i> KBL 385	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13511BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I 항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: ☐ 과학적 성질 ☐ 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2018년 4월 17일자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture) 주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 입 신길 181 한국 생명공학연구원(KRIBB)	국제 수탁기관의 대표자 서명:  담당자 김차영 2018년 4월 17일

* 상기번역문은 원본과 동일함을 증명합니다. 변리사 이 처 영