

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0114370
A61K 8/96 (2006.01) (43) 공개일자 2006년11월06일

(21) 출원번호 10-2006-7017196
(22) 출원일자 2006년08월25일
번역문 제출일자 2006년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/006712 (87) 국제공개번호 WO 2005/091933
국제출원일자 2005년03월02일 국제공개일자 2005년10월06일

(30) 우선권주장 60/550,078 2004년03월04일 미국(US)

(71) 출원인 이엘씨 매니지먼트 엘엘씨
미국, 뉴욕 10153, 뉴욕, 피프스 애버뉴 767

(72) 발명자 설리반, 마이클
미국, 뉴욕 11741, 홀브룩, 씨 스프링메도우 드라이브 232
쉬니트게르, 스티븐 에프.
미국, 뉴욕 11746, 헌팅턴 스테이션, 웰렛트 플레이스 10
맘모네, 토마스
미국, 뉴욕 11735, 파밍데일, 스펜서 스트리트 4
고야츠, 이아릴
미국, 뉴욕 11725, 코마크, 킹스 파크 로드 198

(74) 대리인 강명구

심사청구 : 있음

(54) 락토바실러스(L a c t o b a c i l l u s) 추출물을이용한 피부 치료 방법

요약

본 발명은 피부 세포에서 베타-디펜신(beta-defensin)을 촉진하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 효과량의 락토바실러스(Lactobacillus) 추출물 또는 이의 활성 분획물을 피부 세포에 도포하는 단계를 포함한다.

대표도

도 7

색인어

락토바실러스(Lactobacillus) 추출물

명세서

기술분야

본 발명은 미용 조성물 및 이의 용도에 관계한다. 특히, 본 발명은 피부 세포에서 베타-디펜신(beta-defensin)의 생산을 촉진하는데 이용될 수 있는 미용 조성물에 관계한다.

배경기술

항균 펩티드는 다수의 식물과 동물 중에 널리 분포하는 자연 발생 방어 시스템이다. 척추동물에서 발견된 한가지 항균 펩티드 유형은 디펜신(defensin)으로 알려져 있는 분자군이다. 구조적으로, 이들 분자는 6개의 불변 시스테인 및 3개의 분자간 시스테인 이황화 결합에 의해 결합된다(Lehrer et al., Cell 64: 229-230, 1997; Ann.Rev.Immunol. 11: 105-128,1993). 2가지 상이한 종류의 디펜신이 관찰되었다. 첫 번째 종류는 호중구와 대식세포에 저장되고, 이들 세포에 의해 식세포되는 세균(microbe)을 불활화시키는데 이용되는 고전적인 디펜신이다. 두 번째 종류는 포유동물 폐와 피부 세포로부터 분리된 베타-디펜신을 포함한다. 이들 분자는 병원균, 예를 들면, 박테리아, 진균, 바이러스에 대한 넓은 범위의 항생 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Porter et al., Infect. Immun. 65(6): 2396-2401, 1997).

상기한 바와 같이, 피부 세포는 베타-디펜신을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 불활화된 상태의 박테리아 세포, 특히 슈도모나스(*Pseudomonas*)에 피부 세포의 노출은 각화세포에서 베타-디펜신-2의 생산을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 아마도, 이런 반응은 피부를 특히 세균 형태의 유해 자극으로부터 보호하기 위하여 피부에 존재한다. 그람 양성 박테리아의 촉진 성분은 리포테이코산(lipoteichoic acid) 또는 펩티도글리칸(peptidoglycan)인 반면, 내독소 LPS는 그람-음성 박테리아에 대한 베타-디펜신 반응을 유도하는 것으로 이론화되었다.

더욱 안정한 촉진물질(stimulant)로 피부로부터 이런 반응을 의도적으로 유도하여 피부에 일관된 보호제(protective agent)를 제공할 수 있다면 유익할 것이다. 하지만, 현재까지, 피부 세포 베타-디펜신을 유도하는데 있어 슈도모나스(*Pseudomonas*)보다 안전한 박테리아의 이용은 제안되지 않고 있다. 본 발명은 미용학적으로 허용되는 비-병원성 박테리아로 피부 세포에서 베타-디펜신의 생산을 촉진하는 방법을 제시한다.

본 발명의 요약

본 발명은 피부 세포에서 베타-디펜신의 생산을 촉진하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 촉진 효과량(stimulatory effective amount)을 피부 세포에 도포하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 촉진 효과량(stimulatory effective amount)의 도포로 유해 자극에 기인한 손상으로부터 피부를 보호하는 방법에 관계한다.

도면의 간단한 설명

도 1과 2에서는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출 분획물의 다양한 샘플에서 리보솜 28S RNA 밴드의 시각적 정량을 도시한다. 도 1, 통로 확인: 1, 1844 여과액 5x10E9; 2, 1839 발효액 10E8; 3, 1839 보유액 5x10E10; 4, 1839 여과액 10E9; 5, 1839 여과액 5x10E9; 6, 1839 여과액 10E10; 7, 1839 HXCH 10E10; 8, 람다 Hind III. 도 2, 통로 확인: 1, 람다 Hind III; 2, 처리되지 않은 B; 3, 1844 발효액 5x10E9; 4, 1844 보유액 10E10; 5, 1844 보유액 5x10E10; 6, 1844 여과액 5x10E10; 7, 1844 HXCH 10E9; 8, 1844 HXCH 5x10E9.

도 3은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 다양한 분획물의 제조를 예시하는 흐름도이다.

도 4에서는 48시간의 NHEK 성장 이후 내부 대조 18S 리보솜 mRNA 수준에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 1839와 1844의 다양한 분획물의 효과를 도시한다. 밝은 회색 샘플은 처리되지 않은 샘플에 해당한다. 녹색 샘플은 가공되지 않은 1844 발효액(10^8 , 10^9 , 5×10^9 또는 10^{10} 개 박테리아)에 해당한다. 밝은 녹색 샘플은 1839 가공되지 않은 발효액(10^8 , 10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 적색 샘플은 1844 열-교환 샘플(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 황색 샘플은 1839 열-교환 샘플(10^8 , 10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 남색 샘플은 1844 여과액(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 밝은 남색 샘플은 1839 여과액(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 상기 여과액은 수용성 세포 잔해로 구성되는데, 이들은 교차 흐

름(cross-flow) 필터를 통과할 수 있다. 자주색 샘플은 1844 보유액(10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10})에 해당한다. 분홍색 샘플은 1839 보유액(10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10})에 해당한다. 상기 보유액은 불수용성 세포 잔해를 보유하는데, 이들은 교차 흐름 필터(0.22μ)를 통과할 수 없다. "*"로 표시된 샘플은 독립된 처리물질이다.

도 5에서는 48시간의 NHEK 성장 이후 인간 베타 디펜신-2 mRNA 수준에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 1839와 1844의 다양한 분획물의 효과를 도시한다. 밝은 회색 샘플은 처리되지 않은 샘플에 해당한다. 녹색 샘플은 가공되지 않은 1844 발효액(10^8 , 10^9 , 5×10^9 또는 10^{10} 개 박테리아)에 해당한다. 밝은 녹색 샘플은 1839 가공되지 않은 발효액(10^8 , 10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 적색 샘플은 1844 열-교환 샘플(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 황색 샘플은 1839 열-교환 샘플(10^8 , 10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 남색 샘플은 1844 여과액(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 밝은 남색 샘플은 1839 여과액(10^9 , 5×10^9 또는 10^{10})에 해당한다. 상기 여과액은 수용성 세포 잔해로 구성되는데, 이들은 교차 흐름(cross-flow) 필터를 통과할 수 있다. 자주색 샘플은 1844 보유액(10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10})에 해당한다. 분홍색 샘플은 1839 보유액(10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10})에 해당한다. 상기 보유액은 불수용성 세포 잔해를 보유하는데, 이들은 교차 흐름 필터(0.22μ)를 통과할 수 없다. "*"로 표시된 샘플은 독립된 처리물질이다.

도 6에서는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 분획물의 효과와 비교하여, 48시간의 NHEK 성장 이후 인간 베타 디펜신-2 mRNA 수준에 대한 다른 물질의 효과를 도시한다. 밝은 회색 샘플은 처리되지 않은 샘플에 해당한다. 백색 샘플은 MMP로부터 Magniferin(#4245)이다. 적색 샘플은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 샘플(10^5 , 10^6 또는 10^7 개 박테리아)에 해당한다. 짙은 청록색 샘플은 아가 성장된 락토바실러스(*Lactobacillus*)(10^8 개 박테리아)와 아가 성장된 슈도모나스(*Pseudomonas*)(10^5 또는 10^6 개 박테리아)의 혼합물에 해당한다. 황색 샘플은 아가 성장된 락토바실러스(*Lactobacillus*)(10^8)에 해당한다. 남색 샘플은 24hr 가공되지 않은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 발효액에 해당한다. 청록색 샘플은 가공되지 않은 열-교환 샘플에 해당한다. 어두운 녹색 샘플은 여과액에 해당한다. 상기 여과액은 수용성 세포 잔해로 구성되는데, 이들은 교차 흐름 필터(0.22μ)를 통과할 수 있다. 밝은 녹색 샘플은 보유액에 해당한다. 상기 보유액은 불수용성 세포 잔해를 보유하는데, 이들은 교차 흐름 필터(0.22μ)를 통과하지 못한다.

도 7에서는 피부에서 미생물총(microflora)의 양에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 효과를 도시한다.

도 8에서는 항균/디펜신 자극물질 트리클로산(triclosan) 및 프로밀린(promillin)과 비교하여, 피부 미생물총에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 효과를 도시한다.

도 9에서는 6주 동안 (a) 여드름 구진(papule)과 농포(pustule) 및 (b) 여드름 개방형과 폐쇄형 면포(comedone)에 대한 10% 락토바실러스(*Lactobacillus*) 용액을 함유하는 조성물의 효과를 도시한다.

도 10에서는 트리클로산(triclosan) 및 알가드(Alguard)와 비교하여, 락트산 자극(lactic acid stinging)에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 효과를 도시한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물이 일반적으로 용량-의존 방식으로, 피부 세포에서 베타-디펜신의 생산을 촉진할 수 있다는 관찰에 기초한다. 특히, 수용성과 불수용성 물질을 모두 포함하는 추출물을 비롯한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 여러 상이한 형태가 피부 세포 배양액에서 베타-디펜신 생산을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 다양한 처리 샘플의 제조의 개요는 도 1에 제공한다. 요약하면, 가공되지 않은 각 추출물 샘플 및 열-분별되고 교차-여과된 여과액과 보유액은 베타-디펜신 생산을 촉진하는데 있어 상당한 수준의 활성을 보인다. 활성은 적어도 1×10^9 내지 1×10^{10} 범위의 세포 농도를 보유하는 샘플에서 가장 현저하다. 비프-기초된 액체배지(beef-based broth)와 콩-기초된 액체배지(bean-based broth)에서 성장된 추출물 모두 베타-디펜신 유도 활성을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 미용 분야에서 다양한 목적으로 이용되고 있다. 가령, W09907332에서는 병원성 미생물총으로부터 피부를 보호하는데 유용한 발효액의 생산에서 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 균주의 이용을 기술한다. EP 1097700에서는 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 여과액을 함유하는 헤어 성장 조성물을 기술한다. WO 02/60395는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)과 함께 발효된 쌀로부터 제조된 산물에 관계하는데, 상기 산물은 유화제로서 피부 관리 산물에 유용한 것으로 생각된다. JP 3112983에서는 분쇄

된 락토바실러스(*Lactobacillus*) 세포 및 피부에서 수분 유지를 위한 발효 액체의 조합을 기술한다. JP 2002037742에서는 피부 약화와 노화 방지에 유용한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 발효된 대사물질을 기술한다. JP 2002037739에서는 다양한 기질에서 락트산 박테리아의 발현 대사물질인 “면역조절물질”을 기술한다. JP 2804312에서는 미백에 유용한 것으로 생각되는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 종에 의해 발효된 두유를 기술한다. 하지만, 락토바실러스(*Lactobacillus*)가 피부 세포에서 베타-디펜신의 생산을 촉진하는데 이용된 사례는 없다.

상이한 형태의 추출물이 본 발명의 조성물과 방법에 이용될 수 있는데, 그 이유는 적절한 활성이 다양한 분획물에서 발견될 수 있기 때문이다. 가령, 끓임 되지만 추가로 가공되지 않은 추출물이 이용될 수 있다; 하지만, 박테리아 세포가 파괴되는 열 교환-처리된(순간 가열되고 순간 냉각된) 추출물을 이용하여 유사한 활성을 달성할 수도 있다. 이에 더하여, 열 교환-처리된 추출물은 22 μ 필터로 교차 흐름 여과(cross-flow filtration)하여 여과액(수용성 세포 잔해를 보유)과 보유액(불수용성 세포 잔해를 보유)을 산출하는데, 이들 각각은 활성 디펜신-유도 활성을 보유한다. 이들 추출물이나 분획물은 단독으로 또는 조합으로 이용될 수 있다.

실제로, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 베타-디펜신의 생산을 촉진할 수 있는 양으로, 임의의 국소적으로 유용한 담체에 혼합된다. 담체는 제약학적으로 또는 미용학적으로 허용되는 물질, 다시 말하면, 외부 신체 표면, 예를 들면, 피부, 머리카락 또는 손톱에 도포를 위한 제약학적 또는 미용학적 운반체(vehicle)인데, 이런 운반체는 활성 성분을 의도된 표적에 전달하고, 치료되는 표면에 도포되는 경우에 통상의 인간이나 다른 수용자 생물체에 유해하지 않다. 본 명세서에서, “제약학적” 또는 “미용학적”은 활성 성분과 양립하는 인간과 동물, 바람직하게는 포유동물용 의약품 또는 화장품, 예를 들면, 젤, 크림, 로션, 연고, 무스(mousse), 스프레이, 고형 스틱(solid stick), 분말, 현탁액, 분산액 등을 포괄한다. 다양한 유형의 운반체의 제조 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 예로써 Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry, Williams and Schmitt, eds., Blackie Academic and Professional, Second Edition, 1996 Harry's Cosmeticology, Eighth Edition, M. Reiger, ed.(2000); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twentieth Edition, A. Gennaro, ed.,(2003)에서 확인할 수 있다. 국소 전달에 유용한 임의의 전형적인 조성물, 예를 들면, 수성 분산액, 무수성 조성물, 에멀전(물에서 오일이나 실리콘 에멀전, 오일이나 실리콘에서 물 에멀전, 다중 에멀전, 마이크로에멀전, 나노에멀전)이 이용될 수 있는데, 단 이들 성분은 활성 추출물이나 분획물과 양립해야 한다. 조성물은 또한, 조성물의 활성을 강화 또는 보충하는 다른 국소적으로 유용한 성분을 함유할 수도 있다. 조성물에 동반되는 성분의 선택은 조성물의 의도된 용도에 좌우된다. 국소적으로 유용한 표준 재료는 예로써 The International Cosmetic ingredient Dictionary and Handbook, 10th Edition, 2004에서 확인할 수 있다. 추출물과 혼합될 수 있는 국소적으로 허용되는 재료의 유용한 종류의 실례에는 방향제 또는 필수 오일; 색소 또는 착색제; 제조 보조제(formulation aid), 예를 들면, 뭉침 방지제(anti-caking agent), 거품 방지제(anti-foaming agent), 충전제(filler), 부피 형성제(bulking agent), 농후제(thickener), 겔란트(gellant), 구조제(structuring agent), 에멀전 안정제(emulsion stabilizer); 계면활성제와 유화제; 의도된 표적에서 부착과 유지를 강화하는 필름-형성제(film-forming agent); 추진제(propellant), 보존제, pH 조절제, 중화제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 추출물과 조합으로 이용될 수 있는 다른 성분은 조성물이 도포되는 각질 표면에 추가의 이점을 제공하는 재료(이후, “피부 도움제(skin benefit agent)”)이다. 피부 도움제의 실례에는 수렴제(astringent), 예를 들면, 정향나무 기름(clove oil), 멘톨(menthol), 장뇌(camphor), 유칼립투스 기름(eucalyptus oil), 유제놀(eugenol), 메틸 락테이트(menthyl lactate), 위치 헤이즐 증류액(witch hazel distillate); 항산화제 또는 유리-라디칼 소거제, 예를 들면, 아스코르브산, 이의 지방산과 인산염, 토코페롤과 이의 유도체, N-아세틸 시스테인, 소르브산(sorbic acid)과 리포산(lipoic acid); 항-여드름제, 예를 들면, 살리실산(salicylic acid)과 벤조일 페록사이드(benzoyl peroxide); 향균 또는 향진균제, 예를 들면, 카프릴릴 글리콜(caprylyl glycol), 트리클로산(triclosan), 페녹시에탄올(phenoxyethanol), 에리트로마이신(erythromycin), 톨나프테이트(tolnaftate), 나이스타틴(nystatin) 또는 클로트리마졸(clotrimazole); 킬레이트화제, 예를 들면, EDTA; 국소 마취제, 예를 들면, 벤조카인(benzocaine), 리도카인(lidocaine) 또는 프로카인(procaine); 항-노화/항-주름제, 예를 들면, 레티노이드(retinoid) 또는 하이드록시산(hydroxy acid); 피부 미백제(skin lightening agent), 예를 들면, 감초(licorice), 아스코빌 포스페이트(ascorbyl phosphates), 하이드로퀴논(hydroquinone) 또는 코지산(kojic acid); 피부-조절제(가령, 혼합성과 폐쇄성 습윤제); 항-자극제(anti-irritant), 예를 들면, 콜라(cola), 비사보롤(bisabolol), 알로에 베라(aloe vera) 또는 판텐올(panthenol); 소염제, 예를 들면, 하이드로코르티손(hydrocortisone), 클로베타솔(clobetasol), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니손(prednisone), 아세틸 살리실산(acetyl salicylic acid), 글리시리신산(glycyrrhizic acid) 또는 글리시레틴산(glycyrrhetic acid); 항-셀룰라이트제(anti-cellulite agent), 예를 들면, 카페인과 다른 산틴(xanthine); 습윤제(humectant), 예를 들면, 알킬렌 폴리올(alkylene polyol) 또는 히알루론산(hyaluronic acid); 연화제(emollient), 예를 들면, 유성 에스테르(oily ester) 또는 바셀린(petrolatum); 일광 차단제(sun protecting agent)(유기 또는 무기), 예를 들면, 아보벤존(avobenzone), 옥시벤존(oxybenzone), 옥틸메톡시신나메이트(octylmethoxycinnamate), 산화티타늄(titanium dioxide) 또는 산화아연(zinc oxide); 박피제(exfoliating agent)(화학적 또는 물리적), 예를 들면, N-아세틸 글루코사민(N-acetyl glucosamine), 만노오스 포스페이트(mannose phosphate), 하이드록시산(hydroxy acid), 락토비온산(lactobionic acid), 피치 컨넬(peach kernel), 또는 해염(sea salt); 셀프-탄닝제(self-tanning agent), 예를 들면, 디하이드록시아세톤(dihydroxyacetone); 생

물학적 활성 펩티드, 예를 들면, 팔미토일 펜타펩티드(palmitoyl pentapeptide) 또는 아르기레린(argireline)이 포함되지
만 이들에 국한되지 않는다. 이들 보충적 피부 도움제는 의도된 목적으로 이용되는 경우에, 활성에 유효한 것으로 공지된
통상적인 양으로 이용된다.

이용되는 추출물의 양은 추출물에서 박테리아 물질의 농도에 좌우되지만, 대략 1×10^9 내지 1×10^{10} 개 세포의 농도에 기초
한 추출물은 전체 조성물의 대략 0.001 내지 50wt%, 바람직하게는 대략 0.001 내지 30wt%, 더욱 바람직하게는 대략 1
내지 20wt%의 농도로 이용될 수 있다. 전반적으로 안전한 것으로 인식되는 임의 종의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주
가 추출물의 기초로서 이용될 수 있다. 특히, 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*)으로부터 추출물이 선호된다.

디펜신-유도 추출물은 피부에서 세균 집단의 성장의 감소 또는 예방에 유용하다. 효과량(앞서 기술됨)의 락토바실러스
(*Lactobacillus*) 추출물을 함유하는 조성물은 이런 목적으로 필요에 따라, 예를 들면, 바람직하지 않은 세균과 접촉할 수
있는 피부의 개방형 자상이나 상처에 도포되거나, 또는 장기적으로, 피부 균총(flora)을 매일 건전한 수준으로 유지하기 위
하여 깨끗한 피부에 도포된다.

이들 추출물은 미용학적 또는 제약학적 산물에서 보존제(preservative)로서 이용될 수도 있다. 특히, 락토바실러스 플란타
룸(*Lactobacillus plantarum*) 추출물과 이의 분획물은 시험관내에서, 그람 양성균과 그람 음성 박테리아 모두에 대하여 넓
은 범위의 활성을 보인다.

본 발명의 추출물은 여드름 치료에도 이용될 수 있다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 추출물을 함유하
는 국소 조성물은 6주 기간동안 정기적으로 도포하는 경우에, 염증성과 비-염증성 여드름 병소 모두의 발생률이 감소하는
것으로 밝혀졌다(참조: 실시예 5).

본 발명의 추출물은 2개월동안 정기적(일일 2회)으로 도포하는 경우에 락트산 자극의 감소(실시예 6)에 의해 입증되는 바
와 같이, 피부 감수성(skin sensitivity)의 감소에도 유용하다.

본 발명의 아래의 무-제한적 실례에 의해 더욱 상술된다.

실시예

실시예 1

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 발효 절차

락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) 미생물은 아래의 조성을 보유하는 비-동물 MRS 아가에서 6.3+/-0.2의 최종 pH
에 유지시킨다:

펩톤(peptone) 10 gram/liter

효모 추출물 20

글루코오스 20

Tween 80 1.08

이인산칼륨(Dipotassium Phosphate) 2

아세트산나트륨 5

구연산암모늄 2

황산마그네슘 0.2

황산망간 0.05

작업 MRS 아가 배지를 만들기 위하여, 55.3 g의 분말을 1 ℓ의 정제수에 부유시키고 완전하게 혼합한다. 혼합물은 활발하게 교반하고 1분간 끓여 분말을 완전하게 용해시킨다. 이후, 121℃에서 15분간 가압 멸균하여 배지를 멸균한다.

락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)의 특징

수확된 락토바실러스 플란타룸(L. plantarum)은 일반적으로 0.9-1.2 마이크론 너비와 3-8 마이크론 길이를 보유하는 끝이 둥근 일직선 막대 형태이다. 상기 미생물은 한 쌍(pair)이나 짧은 사슬에서 단독으로 존재한다. 락토바실러스 플란타룸(L. plantarum)의 생화학적 특징은 표 1에 예시한다.

[표 1]
락토바실러스 플란타룸(L. plantarum)의 특징

치사율(Mortality)	-
그람 염색(Gram stain)	+
카세인 절단	+*
인돌 생산	-
H ₂ S	+/-
카탈라아제	-
시토크롬	-
벤지딘 반응	-
색소	회백색(off white)
고체 배지에서 성장	+
혐기성 성장	+
최적 온도	30-40℃ .
최적 pH	5.5

*37℃에서 48시간후 양성 반응을 보이는 양성 균주 예상 %

발효

수확된 락토바실러스 플란타룸(L. plantarum)은 발효에 의해 혐기성 성장시킨다. 락토바실러스 플란타룸(L. plantarum) 미생물은 무균 루프(sterile loop)로 MRS 슬란트(slant)로부터 이전하고 2 ℓ의 비-동물 MRS 액체배지를 보유하는 플라스크에 접종한다. 액체배지는 교반하면서 37℃에서 하룻밤동안 배양하여 우수한 성장을 달성한다. 배지는 흐려진다. 이후, 배양액은 고체 배지로 이전하고 그람 염색(Gram stain)하여 배양액의 순도를 확인한다.

15 ℓ New Brunswick 발효기는 아래의 조성을 보유하는 10 ℓ의 배지로 채운다:

식물성 펩톤 20 gram/liter

효모 추출물 5

글루코오스 20

Tween 80 1.08

이인산칼륨 2

아세트산나트륨 5

구연산암모늄 2

황산마그네슘 0.2

황산망간 0.05

발효기와 배지는 15 lbs. 압력과 121°C에서 15분간 멸균시킨다. 발효기 배지는 탈이온수(de-ionized water)에 첨가하고 발효기에 집어넣으며, 10 l 부피로 희석하고 17 psi와 120°C에서 20분간 멸균시킨다. 초순수 압축 질소(ultra pure compressed nitrogen)를 발효기에 살포하여, 1.5 l/min의 유속에서 0 mm Hg의 용존 산소(dissolved oxygen)를 유지시켰다. 실온으로 냉각한 이후, 2 l 플라스크로부터 집중물은 발효기에서 10 l의 배지에 무균 첨가한다. 150 rpm으로 교반하면서 발효기 온도가 30-32°C가 되도록 한다. 배지의 최초 pH는 6.0-6.2이다. 배양액은 30-32°C에서 16-20 시간동안 배양하는데, 혼합물의 최종 pH는 4.0-4.2이고, 개체군 밀도(population density)는 ml당 10⁶-10⁷개의 세포이다.

이후, 발효 용액은 가열과 냉각 부분을 보유하는 코일 열 교환기(coil heat exchanger)를 통과시킨다. 액체배지는 온도를 105-110°C로 상승시켜 용해시키고, 직후에 7-10°C로 냉각시킨다. 이 시점에서, 모든 본래 세포는 용해된다. 이후, 발효액은 분당 0.4 l의 유속으로 0.22 마이크론 교차 흐름 여과 단위를 통과시키고 보조 저장 용기로 이전하는데, 이때 0.5% 페녹시에탄올(phenoxyethanol)이 보존제로서 첨가된다. 그 다음, 생성물은 무균 다중-배열 용기(sterile poly-lined container)에 보관한다.

실시예 2

도입: 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 전술한 바와 같이 New Brunswick 발효기(10 l 부피)를 이용하여 혐기 조건하에 성장시키고 MIC 1844로 명명하였다. MIC 1844는 30°C에서 24시간동안 발효시켰다. 상기 박테리아는 전술한 바와 같이 열 교환(1회 통과)으로 분별하고 교차 흐름 필터(0.22μ)를 통과시켰다. 가공되지 않은 발효액, 열 교환(가공 없음) 분획물, 여과액, 보유액은 NHEK에서 hBD-2 유도를 검사하였다. 열 교환으로부터 회수되고 교차 흐름을 통하여 가공된 비-여과 세포 잔해는 보유액(retentate)으로 명명하였다. 상기 보유액은 여과 과정으로 7-배 농축하였다. 가공되지 않은 발효액의 최종 농도는 2.5 내지 5.0x10¹⁰ 세포/ml이었다. 열 교환과 교차 흐름 여과로부터 회수된 여과 물질(물질대사된 배지와 가용성 세포 성분)은 여과액(filtrate)으로 명명하였다. 여과액은 가공되지 않은 열 교환 분획물 또는 가공되지 않은 발효액과 동일한 농도를 보유하였다. 모든 분획물은 NHEK와 함께 배양하기에 앞서 20분간 끓였다. 이들 예방 조치는 생존 박테리아가 NHEK 처리동안 급속하게 증식하여 포유동물 배양액에 오염 및 무효한 결과를 초래할 수 있기 때문이다.

1844 발효액에서 박테리아 농도는 비프-기초된 MRS 액체배지에서 성장된 1839 발효액과 유사할 것으로 예상되고, 4°C에서 3개월동안 보관하였다. 박테리아 추출물로 NHEK로 처리하기 이전에는 총수를 측정할 수 없었다. 이런 이유로, 박테리아 세포 농도는 유사한 것으로 추정하였다.

리포테이코산(수용성)과 펩티도글리칸(불수용성)은 톨-유사 수용체(toll-like receptor)를 통하여 NHEK로 hBD-2를 유도하기 위한, 그람-양성 박테리아로부터 주요 세포 벽 성분이다. LPS 또는 내독소(endotoxin)는 hBD-2를 유도하기 위한, 그람-음성 박테리아로부터 외부 막의 주요 성분이다. 락토바실러스(*Lactobacillus*) 리포테이코산은 아마도, 여과액에 존재하고 NHEK에서 hBD-2 mRNA의 유도에 기여한다. 유사하게, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 펩티도글리칸은 보유액에 존재하고 NHEK에서 hBD-2 mRNA의 유도에 기여할 수 있다. 이는 이들 분획물 모두에서 활성이 관찰되는 이유를 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

방법: NHEK는 Cascade EPI Life의 존재하에 성장시켰다. 세포는 80-90% 합류 수준(confluence)으로 처리하였다. NHEK는 48시간동안 처리하고 RNA를 회수하였다. 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 Solabia에 의해 제공된 콩 추출물의 존재하에 성장시켰다. 상기 배지는 스크래치(scratch)로부터 제조하였다. 락토바실러스(*Lactobacillus*) MRS 액체배지(DIFCO)는 펩톤, 비프(beef) 추출물, 효모 추출물, 텍스트로스, 아세트산나트륨, 선별된 염을 함유한다. 상기 조성에서, 비프 추출물(10 g/liter)은 콩 추출물(10 g/liter)(Solabia)로 대체되었다. 1844 실험으로부터 가공되지 않은 발효액, 열-교환 분획물, 여과액 분획물, 보유액 분획물은 1839 분획물과 비교하였다. 상기 1839 분획물은 MRS 액체배지(비프 추출물)에서 성장된 락토바실러스(*Lactobacillus*)로부터 유래되고 열-교환되었다. 4가지 분획물은 4°C에서 3개월동안 보관하였다. 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 10L New Brunswick 발효액에서 30°C에서 24시간동안 성장시켰다. 1844 발효액으로부터 회수는 2.5-5x10¹⁰ 세포/ml이었다. 1839 발효액은 대략 9x10¹⁰-2.8x10¹¹ 세포/ml이었다. 이는 콩 추출물을 이용하는 경우에, 세포 수에서 44-72% 감소로 해석된다.

1844 가공되지 않은 발효액은 4가지 분량: 10^8 , 10^9 , 5×10^9 또는 10^{10} 개 박테리아로 100mm 평판에 접종된 NHEK에 첨가하였다. 열-교환된 1844 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 3가지 분량: 10^9 , 5×10^9 또는 10^{10} 개 박테리아로 NHEK에 첨가하였다. 1844 여과액은 4가지 분량: 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10} 개 박테리아로 첨가하였다. 1844 보유액은 4가지 분량: 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} 또는 5×10^{10} 개 박테리아로 100mm 평판에서 NHEK에 첨가하였다. 0.22μ 보다 작은 박테리아 성분은 교차 흐름 여과이후 여과액에서 회수되었다. 0.22μ 보다 큰 세포 잔해는 교차 흐름 여과(4가지 분량)이후 보유액에서 회수되었다. 박테리아 분획물 중에서 일부는 산성(pH 3 내지 4)인데, 이로 인하여 첨가이후 각화세포 배지가 황색으로 변하였다. pH는 최대 200μ 의 800mM HEPES로 즉시 중화시켰다. HEPES를 모든 배양액에 첨가하였다. 비교를 위하여, 4°C 에서 3개월간 보관된 1839 박테리아 추출물을 배양하였다. 이들 처리는 박테리아 산정이 가능하기 이전에 시작되기 때문에, 양 발효액은 동일한 박테리아 농도에 도달하는 것으로 추정하였다. 이런 이유로, 1839에 이용된 것과 동일한 처리 부피가 1844에 이용되었다(가공되지 않은 발효액: 1, 10, 50, 100 μ l; 열-교환 분획물: 10, 50, 100 μ l; 여과액: 3.6, 18, 36, 180 μ l; 보유액: 10, 50, 100, 500 μ l). 모든 박테리아 추출물은 20분간 끓였다.

전체 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 회수하였다. mRNA의 농도는 RiboGreen 키트(Molecular Probes) 및 선별된 샘플의 겔 전기영동으로 결정하였다. RiboGreen 검사를 여러 번 수행하여 각 샘플을 이중 또는 삼중으로 평가하였다. 결과는 평균하였다(표 2). RNA 분해의 양은 2개의 겔에서 평가하였다(도 1과 2). RNA는 RETROscript 키트(Ambion)를 이용하여 cDNA로 전사하였다. 내부 기준은 18S 리보솜 RNA이었다. cDNA는 FastStart DNA Master SYBR Green I 키트(Roche)와 함께, Light Cycler를 이용하여 증폭하였다. 18S 리보솜 RNA와 hBD-2에 특이적인 프라이머는 기준에 보고되었다. 18S 리보솜 RNA의 경우, 100 ng 주형을 40회 증폭하였다. hBD-2의 경우, 300 ng 주형을 40회 증폭하였다. PCR 반응으로 산출된 상이한 분자량을 보유하는 PCR 산물의 총수는 용융 곡선 프로그램(melting curve program)(Roche)으로 간접적으로 결정하였다. 각 프라이머 세트에 대하여 단일 융점 피크(single melting point peak)가 관찰되었다.

결과와 결론: 전체 RNA 수준은 RNA에 특이적인 형광 프로브(RiboGreen ELISA)로 측정하였다(표 1). 리보솜 28S RNA 밴드의 시각적 정량은 선별된 샘플 군에서 결정하였다(도 1과 2). RNA 분해는 전혀 관찰되지 않았다. 28S 리보솜 RNA 밴드(위쪽 밴드)의 강도는 약간 변하였다[$783000+/-25000$ (도 1) 및 $882000+/-46000$ (도 2)]. 양 겔에 대한 밴드의 강도는 8000 화소 영역(pixel area)으로 제한되었다. 18S 리보솜 mRNA(아래쪽 밴드)는 내부 대조(internal control)로서 증폭하였다. 역전사의 효능을 측정하기 위한 외부 대조(external control)는 포함되지 않았다. 상이한 분획물을 나타내는 흐름도는 도 3에 제시한다.

NHEK를 처리하는데 이용되는 대부분의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 처리되지 않은 샘플의 범위 내에서 18S 리보솜 mRNA 수준을 산출하였다(도 4). 대부분의 경우에, 18S 리보솜 mRNA 수준에서 용량-의존성 증가가 관찰되었는데, 이는 상기 추출물이 증식을 유도한다는 것을 암시한다. 18S 리보솜 mRNA 수준에서 가장 강한 증가는 1839 열-교환 샘플, $10E10$ 박테리아에서 관찰되었다. 예외적으로, 1839 발효액은 18S 리보솜 mRNA 수준에서 용량-의존성 감소를 보였다. 일반적으로, 18S 수준에서 감소는 일부 자연적 세포 스트레스의 신호이고, 용량-의존한다는 점에서 상기 추출물과 관련된 것으로 보인다. 18S mRNA 수준에서 감소는 NHEK 증식에서 감소 또는 증가된 NHEK 사멸에 의해 해명될 수 있다. 전반적으로, 18S 리보솜 mRNA 수준은 처리되지 않은 대조의 표준 편차 범위 이내에 존재하지만, 용량-의존성 방식으로 약간 증가하는 것으로 보인다.

모든 1844 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 NHEK에서 hBD-2 mRNA 수준의 용량-의존성 증가를 유도하였다. 가공되지 않은 발효액, 열-교환 분획물, 여과액 또는 보유액은 5×10^9 내지 10^{10} 개 박테리아에 상당하는 용량을 이용한 경우에 hBD-2 mRNA 수준을 유도하였다. 1844 보유액과 1844 여과액은 hBD-2 mRNA를 유도하기 위하여, 열-교환 분획물 또는 가공되지 않은 발효액과 비교하여 약간 더 높은 분량을 요구하였다(도 5).

결론적으로, 1839 실험 또는 1844 실험으로부터 모든 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 활성을 보유하였다. 낮은 18S 리보솜 mRNA 수준을 보유하는 1839 발효액도 최대 분량이 현저하게 감소하긴 하지만, hBD-2 mRNA 수준을 유도할 수 있었다. 모든 1839 분획물은 4°C 에서 3개월간 보관에도 불구하고 활성을 유지하였다. 1839 분획물에 대한 hBD-2 mRNA 수준은 MIC1839에서 기존의 데이터에 동등하였다(평균 35×10^5 개 사본 vs. 평균 55×10^5 개 사본). 이런 차이는 처리되지 않은 샘플에서 hBD-2 mRNA 수준의 증가에 의해 해명될 수 있다(20×10^5 개 사본 vs. 45×10^5 개 사본). 따라서, 이들은 상당히 유사하였다(비교를 위하여 도 6 참조). 1839 발효액에 비하여 1844 발효액으로부터 더욱 적은, 구체적으로 대략 44-72% 감소된 락토바실러스(*Lactobacillus*)가 수확되었다. 쿵 추출물은 박테리아 총수에서 이런 감소에도 불구하고, hBD-2 mRNA의 유도를 현저하게 감소시키지 않는 것으로 보였다. 1844 보유액은 1839 발효액에서 앞서 수행된 바와 동일한 방식으로 농축된 것으로 추정하고, 7-배 농축 계수(concentration factor)를 이용하였다. 이러한 검사 결과는

재현가능한 것으로 보이는데, 그 이유는 병행 가공된 이중 처리 샘플이 2개의 처리 세트(1844 발효액과 1844 열-교환 분획물)에 대한 표준 편차 내에 존재하지만 세 번째 처리 세트(1844 보유액)에 대한 표준 편차 내에 존재하지 않는 수치를 제공하기 때문이다. hBD-2 mRNA 수준에서 전반적인 증가는 적지만 유의하였다. 이러한 데이터 세트는 교차-호름 여과가 샘플의 활성을 증가시키지 않는다는 것을 입증하는데, 그 이유는 여과액과 보유액이 발효액보다 약간 낮은 유사한 수준의 mRNA 유도를 나타내기 때문이다. 이런 이유로, hBD-2 mRNA의 적어도 2가지 상이한 유도물질이 존재한다. 아마도, 이들 유도물질은 여과액에서 리포테이코산 및 보유액에서 펩티도글리칸이다. 모든 1844 추출물은 hBD-2 mRNA 수준에서 용량-의존성 증가를 유도하였다.

[표 2]

비프(1839)와 콩(1844)을 함유하는 락토바실러스(Lactobacillus) 발효액으로 48시간동안 처리된 NHEK로부터 유래된 전체 RNA의 정량.

샘플(MIC 1844)	Ribo-Green ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Avg.	4 μg 의 RNA에 상당하는 # μl
#1 NHEK 처리되지 않은 A 48hrs	2.96/3.03	3.00	1.33
#2 NHEK 처리되지 않은 B 48hrs	2.62/2.65	2.64	1.52
#3 NHEK 1844 발효액 10E8 48hrs	2.62/2.72/2.65	2.66	1.50
#4 NHEK 1844 발효액 10E9 48hrs	2.71/2.75/2.76	2.74	1.46
#5 NHEK 1844 발효액 5x10E9 50 μl 48hrs	2.73/2.63/2.59	2.65	1.51
#6 NHEK 1844 발효액 100 μl 10E10 48hrs	2.34/2.72	2.53	1.58
#7 NHEK 1844 보유액 10E9 10 μl 48hrs	2.86/2.80/2.92	2.86	1.40
#8 NHEK 1844 보유액 5x10E9 48hrs	2.62	2.62	1.53
#9 NHEK 1844 보유액 10E10 48hrs	2.82/3.05/3.01	2.96	1.35
#10 NHEK 1844 보유액 5x10E10 48hrs	2.52	2.52	1.59
#11 NHEK 1844 여과액 10E10 48hrs	2.31/2.30	2.31	1.73
#12 NHEK 1844 여과액 5x10E10 180 μl 48hrs	2.26/2.10	2.18	1.83
#13 NHEK 1844 HXCH 10E10 100 μl 48hrs	2.59/2.60	2.60	1.54
#14 NHEK 1844 HXCH 5x10E9 50 μl 48hrs	2.69/2.55	2.62	1.53
#15 NHEK 1844 HXCH 10E9 10 μl 48hrs	2.61/2.71	2.66	1.50
#16 NHEK 1839 발효액 10E8 48hrs	2.83/3.26	3.05	1.31
#17 NHEK 1839 발효액 10E9 48hrs	2.88/3.01	2.95	1.36
#18 NHEK 1839 발효액 10E10 48hrs	2.88/2.88	2.88	1.39
#19 NHEK 1839 보유액 10E9 48hrs	2.96/2.96	2.96	1.35
#20 NHEK 1839 보유액 10E10 48hrs	3.26/3.26	3.26	1.23
#21 NHEK 1839 보유액 5x10E10 48hrs	2.32	2.32	1.72
#22 NHEK 1839 여과액 10E9 48hrs	2.61/2.76	2.69	1.49
#23 NHEK 1839 여과액 5x10E9 48hrs	2.27/2.59	2.43	1.65
#24 NHEK 1839 여과액 10E10 48hrs	2.46/2.65	2.56	1.56
#25 NHEK 1839 여과액 5x10E10 48hrs	2.12/2.10	2.11	1.90
#26 NHEK 1839 HXCH 10E8 48hrs	2.76/3.05	2.91	1.37
#27 NHEK 1839 HXCH 10E9 48hrs	3.06/3.06	3.06	1.31
#28 NHEK 1839 HXCH 10E10 48hrs	2.76/2.82	2.79	1.43

실시예 3

디펜신의 방출을 촉진하는 것으로 주장되는 락토바실러스(Lactobacillus) 추출물로 1회 처리이후 피부 미생물총을 조사하는 임상 연구를 설계한다. 검사된 물질은 락토바실러스(Lactobacillus)가 없는 Carbopol 겔 운반제 및 20% 락토바실러스(Lactobacillus) 추출물을 함유하는 Carbopol 겔 운반제(각 pH 3.90)이다.

피험자

총 9명의 피험자(남성과 여성, 25-55세의 연령)가 본 연구에 참여한다. 모든 피험자는 급성이나 만성 질환 및/또는 피부학적 또는 안과학적 문제가 없는 건강한 정상인이다. 검사 결과의 평가를 간섭할 수 있는 일광화상, 발진, 습진성 염증, 화상 자국 등이 있는 피험자는 본 연구로부터 배제한다. 임신이나 수유중인 여성은 배제한다. 검사 부위에는 관찰 시작이후에 관찰되는 와즈 네비(warts nevi), 사마귀, 일광화상, 선반, 흉터, 진행중인 피부 병소가 전혀 없다.

절차

피부 미생물총

참가자들은 실험실에 등록하고 순한 액체 비누로 얼굴을 씻는다. 얼굴의 오른쪽은 운반제로 처리되고, 왼쪽은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물을 함유하는 조성물로 처리된다. 이들 물질은 연구자에 의해 무균 글러브를 이용하여 혼합되고 도포된다. 3시간후에, 통상의 미생물총이 피부에 나타나기 시작한다. 이 기간동안, 참가자들은 머리카락이 얼굴에 닿지 않도록 하고, 얼굴을 만지거나 씻거나 무언가를 바르지 않도록 지시된다. 3시간의 종결 시점에서, 미생물학적 분석을 위하여 표면의 볼 부위로부터 식염 세척액(saline washing)을 얻는다.

무균 유리 실린더와 무균 고무 폴리스만(sterile rubber policeman)을 이용하여 이마 부위의 식염(Dulbeccos Phosphate Buffered Saline) 세척액을 얻는다. 1 ml의 식염 세척액은 컵에 부어넣고, 피부는 고무 폴리스만(10회 스트로크)으로 문지르고 세척하며, 이후 식염을 흡출하고 9 ml PBS에 모은다. 이들 샘플은 호기성과 혐기성 박테리아 총수를 분석한다.

결과

도 7의 그래프에서는 각 참가자에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 처리된 부위 vs 운반제 처리된 부위의 비율을 보여준다. 1의 수치는 차이 없음을 지시하고, 1 미만의 수치는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 처리된 부위에서 박테리아 성장의 감소를 지시한다. 그래프에서 관찰된 바와 같이, 20% 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물은 피부에서 박테리아 성장을 감소시키는데 유효하였다. 9명의 참가자 중에서 6명은 처리이후 3시 시점에, 미생물 성장에서 감소를 보였다. 1명은 변화가 없었고, 2명은 20% 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물에서 더욱 높은 박테리아 성장을 보였다.

실시에 4

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 추출물의 여러 상이한 분획물은 박테리아와 진균 성장을 저해하는 능력을 검사한다. 분획물은 1-상층액 분획물; 2-농축된 세포 분획물; 3-농축된 완전 액체배지; 4-농축되지 않은 완전 액체배지; 5-농축되지 않은 식물성 액체배지; 6-중류수 대조이다.

방법:

본 실험을 위한 여러 미생물은 미용 보존제 검사에서 다양성과 적합성으로 인하여 선택된다. 이들 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*)(*EC*), 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)(*KP*), 슈도모나스 아에루긴사(*Pseudomonas aeruginosa*)(*PA*), 슈도모나스 세파시아(*Pseudomonas cepacia*)(*PC*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)(*SA*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*)(*SE*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)(*CA*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*)(*CP*), 아스페르길루스 니게르(*Aspergillus niger*)(*AN*)이다.

개별 박테리아 배양액(*EC, KP, PA, PC, SA, SE*)은 Trypticase Soy Agar(TSA) 평판에 스트리킹(streaking)하고, 진균 배양액(*CA, CP, AN*)은 Potato Dextrose Agar(PDA)에 스트리킹하였다. 코크 천공기(#5)를 이용하여 각 평판의 중간에 웰(well)을 만들고, 각 샘플의 200 µl 분량을 각 개별 미생물에 대한 개별 웰에 첨가하였다. 이후, 이들 평판은 37°C에서 48시간동안 배양하였다. 이후, 이들 평판은 검사하고 저해 구역(존재하는 경우)을 관찰하였다. 이들 구역은 각 웰의 가장 자리로부터 밀리리터 단위로 측정한다.

결과:

락토바실러스(*Lactobacillus*) 발효액의 MIC 구역:(미생물과 샘플 설명을 참조한다). 저해 구역 > 2mm는 유의한 활성으로 간주된다.

E	C	K	P	P	A	P	C	S	A	S	E	C	A	C	P	A	N
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

No.1	3	3	3	3	5	3	0	0	0
No.2	2	2	4	4	4	7	1	0	1
No.3	5	5	6	5	7	7	3	3	0
No.4	2	2	1	3	2	3	0	0	0
No.5	3	3	2	4	6	3	1	1	0
No.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

결론:

락토바실러스(*Lactobacillus*)의 5가지 분획물은 미용 제품의 보존제 효능 검사(Preservative Efficacy Testing)에 통상적으로 이용되는 여러 미생물에 대한 항균 활성을 평가한다. 모든 분획물은 그람 음성과 그람 양성 박테리아 모두에 대하여 유의한 수준의 활성을 보였다. 효모와 곰팡이에 대한 활성은 전혀(또는 거의) 관찰되지 않았다.

실시예 5

아래의 조성을 보유하는 항-여드름 로션을 검사하여 염증성과 비-염증성 여드름 병소를 감소시키는 이의 능력을 확인한다.

재료 중량 %

증류수 QS

나트륨 EDTA 0.100

쿼터늄(Quaternium) 22 0.100

스클로틴 겔(sclerotium gum) 0.500

시티아레스(Cetareth) 20 2.500

부틸렌 글리콜 5.000

폴리메틸 메타크릴레이트 1.000

제올라이트(Zeolite) 0.500

사이클로펜타실록산(cyclopentasiloxane) 10.500

디메티콘(100cts) 2.000

미리스틸 알코올 0.750

나트륨 히알루로네이트(sodium hyaluronate) 2.000

조류 추출물(Alguard) 0.900

비사보롤(Bisabolol) 0.050

토코페릴 아세테이트(Tocopheryl acetate) 0.100

보존제 1.000

착색제 0.0042

아크릴아마이드/나트륨 아크릴로일디메틸 2.000

타우레이트 공중합체/이소헥사데칸/

폴리소르베이트 80

착색제 0.0080

락토바실러스(*Lactobacillus*) 용액 10.000

6주 시험이후, 상기 조성물은 염증성 병소와 비-염증성 병소 모두를 유의하게($p < .0001$) 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 이들 결과는 도 9에 그래프로 도시한다.

실시예 6

디펜신의 방출을 촉진하는 물질, 다시 말하면, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물과 알가드(Alguard)로 2개월간 처리한 이후 피부 감수성을 조사하는 임상 연구를 수행한다. 본 연구는 각각 동일한 기부(base)에서 3가지 검사 물질로 수행된다; 검사 물질은 (1) 1%에서 락토바실러스(*Lactobacillus*) 발효액(락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*))(0.22 μ 이하 크기로 발효된 락토바실러스(*Lactobacillus*)로부터 유래됨); (2) 0.1%에서 트리클로산(항생제)(대조); (3) 1%에서, 적색 조류(포르피리디움 중(*porphyridium sp.*); Rhodophyta)의 생물삼출물(bioexudate)인 알가드(Poly sea)이다. 이는 1% 폴리사카라이드를 함유하고 항-자극 특성을 보이는 것으로 주장된다.

피험자

총 29명의 여성(25-55세의 연령)이 본 연구에 참여한다. 이들 참가자는 각각 9-10명의 세 군으로 나눈다. 모든 피험자는 급성이나 만성 질환 및/또는 피부학적 또는 안과학적 문제가 없는 건강한 정상인이다.

검사 결과의 평가를 간섭할 수 있는 일광화상, 발진, 습진성 염증, 화상 자국 등이 있는 피험자는 본 연구로부터 배제한다. 임신이나 수유중인 여성은 배제한다. 검사 부위에는 관찰 시작이후에 관찰되는 와즈 네비(warts nevi), 사마귀, 일광화상, 선천, 흉터, 진행중인 피부 병소가 전혀 없다.

절차

처리

참가자들은 검사 물질에 각각 상응하는 9-10명의 세 군으로 나눈다. 이들 참가자들은 2개월동안 일일 2회 얼굴 전체와 좌측 팔에 도포되는 크림이 제공된다. 오른쪽 팔은 처리되지 않은 대조이다. 이들은 임의의 다른 피부 로션이나 처리 제품을 사용하지 말도록 지시받긴 하지만, 평소에 사용하는 세제와 화장품은 제품을 바꾸지 않는다면 계속 사용할 수 있었다. 연구 당일에, 참가자들은 크림, 로션, 화장품 등이 남아있지 않도록 얼굴과 팔을 씻은 후에 실험실에 등록하도록 지시된다. 이들 참가자들은 기준 시점, 1개월 시점, 2개월 시점에 락트산 자극을 측정한다. 10% 락트산이 얼굴의 한 면에 도포되고, 다른 면에는 식염이 도포된다(Frosch and Kligman, JSoc Cosmet Chem, 28:197-209, 1977). 이들 참가자들에 의해 보고된 자극 강도(Sting intensity)는 2.5분과 5분후에 상세하게 기록한다. 누적 자극 강도(cumulative sting intensity)는 락트산 처리된 부위에서 자극 강도의 총합 - 식염 처리된 부위에서 자극 강도의 총합이다. 1개월과 2개월 처리이후, 참가자들은 락트산으로 다시 검사한다. 검사 당일에, 이들 참가자들은 상기 제품을 도포하지 않는다. 기준 시점 vs 4주 처리의 자극 강도 사이의 차이를 산정한다.

도 10에서는 이들 참가자들의 누적 자극 스코어(cumulative sting score)를 도시한다. 상기 그래프로부터, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물이 락트산 유도된 자극을 감소시키는데 현저하게 유효하다는 것을 명백하게 확인할 수 있다. 1개월과 2개월간 이용한 이후, 자극에서 각각 27%($p=0.035$)와 39%($p=0.009$) 감소가 관찰된다. 알가드는 1개월과 2개월간 이용한 이후, 자극에서 각각 8%($p=.53$)와 27%(0.058) 감소가 관찰된다. 트리클로산은 피부를 자극하는 것으로 보이는데, 그 이유는 이를 이용한 이후 자극 반응(sting response)이 증가했기 때문이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

피부 세포에서 베타-디펜신(beta-defensin)을 촉진하는 방법에 있어서, 효과량의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 또는 이의 활성 분획물을 피부 세포에 도포하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 추출물은 열-처리된 추출물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 추출물은 0.22 μ 필터에서 여과된 열-처리된 추출물의 여과액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 추출물은 0.22 μ 필터에서 여과된 열-처리된 추출물의 보유액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

효과량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 및 미용학적으로 또는 제약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 피부에 국소 도포용 조성물.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 추출물은 열-처리된 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8.

제 6항에 있어서, 추출물은 0.22 μ 필터에서 여과된 열-처리된 추출물의 여과액인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9.

제 6항에 있어서, 추출물은 0.22 μ 필터에서 여과된 열-처리된 추출물의 보유액인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10.

제 6항에 있어서, 피부 도움제(skin benefit agent)를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11.

피부에서 미생물총(microflora)의 양을 감소시키는 방법에 있어서, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물의 효과량을 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 11항에 있어서, 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

미용학적 또는 제약학적 조성물을 보존하는 방법에 있어서, 상기 조성물에 항균 효과량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 이의 활성 분획물을 통합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

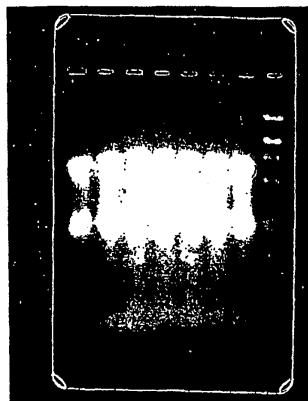
여드름의 치료 방법에 있어서, 여드름이 발생된 피부에 효과량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 추출물을 도포하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

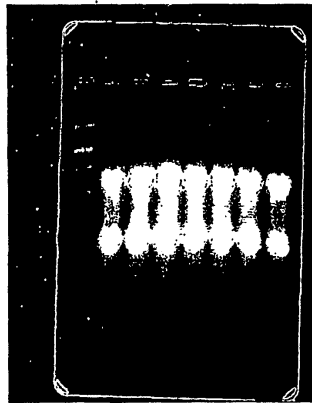
피부 감수성(skin sensitivity)을 감소시키는 방법에 있어서, 감수성 피부에 효과량의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 추출물을 도포하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

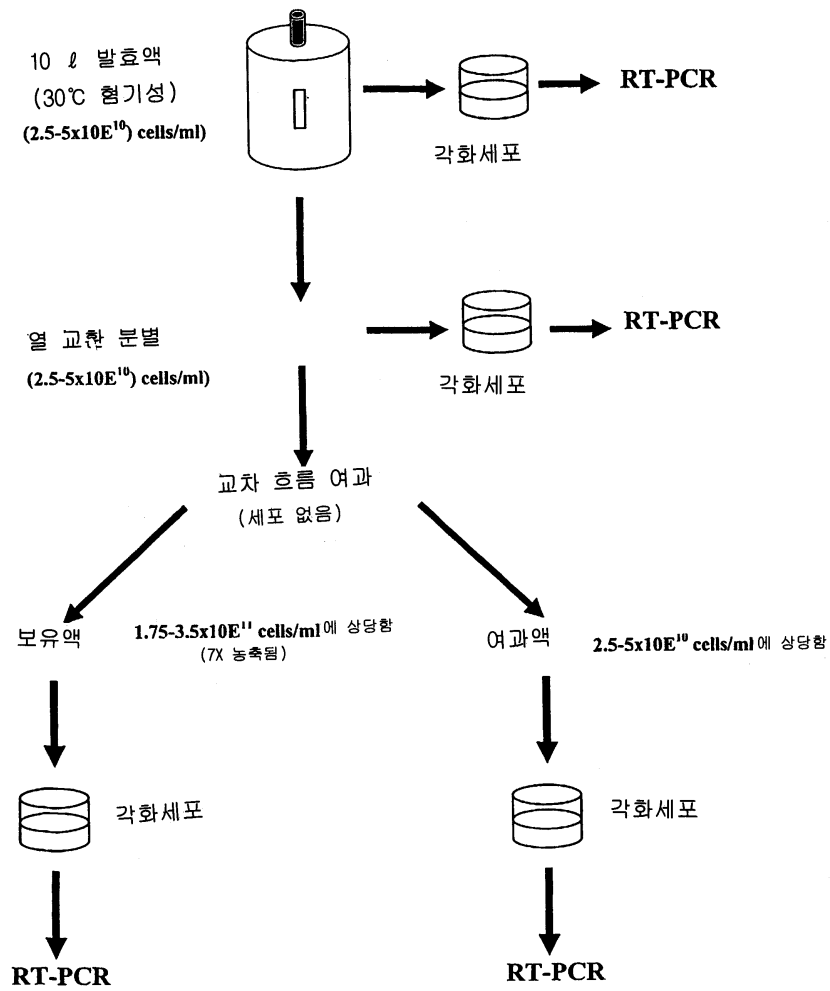
도면1



도면2

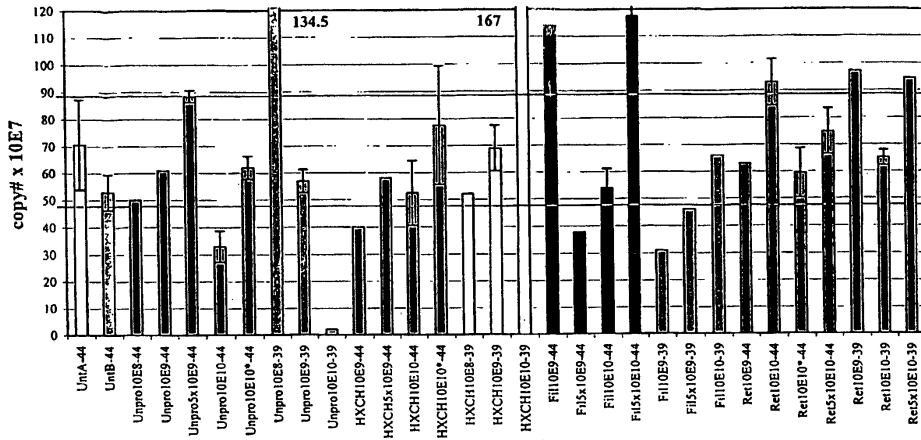


도면3



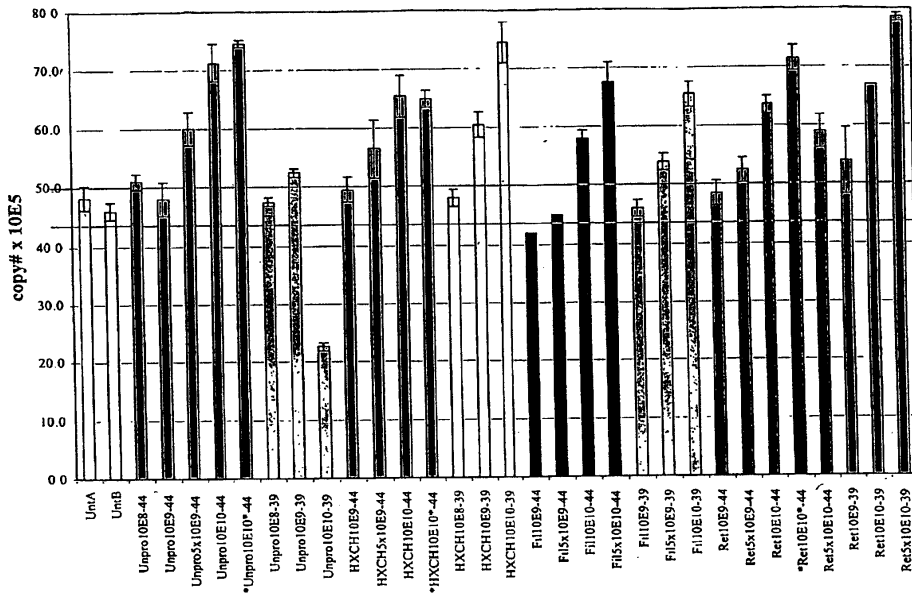
도면4

48시간이후 각화세포, 18S 리보솜 RNA 수주에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 (1839 vs. 1844)의 효과(샘플에는 가공되지 않은 샘플, 열 교란 샘플, 여과액, 보유액이 포함된다)



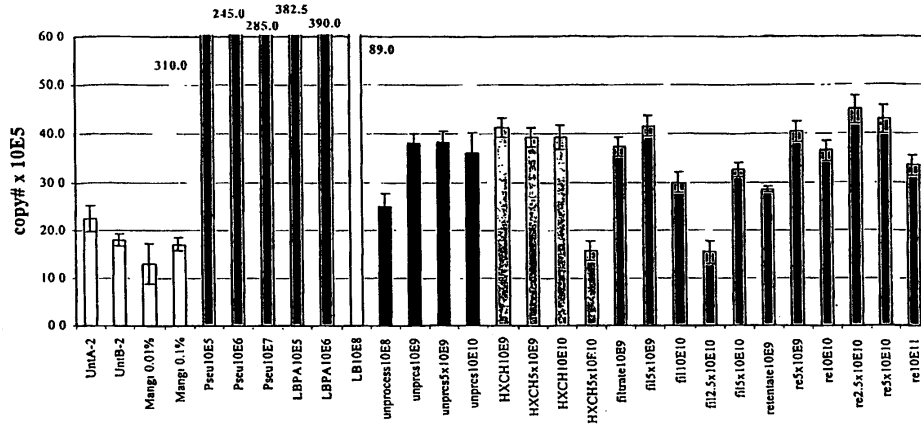
도면5

NHEK와 함께 48시간 배양이후 hBD-2 mRNA 수주에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 (1839 vs. 1844)의 효과(샘플에는 가공되지 않은 샘플, 열 교란 샘플, 여과액, 보유액이 포함된다)



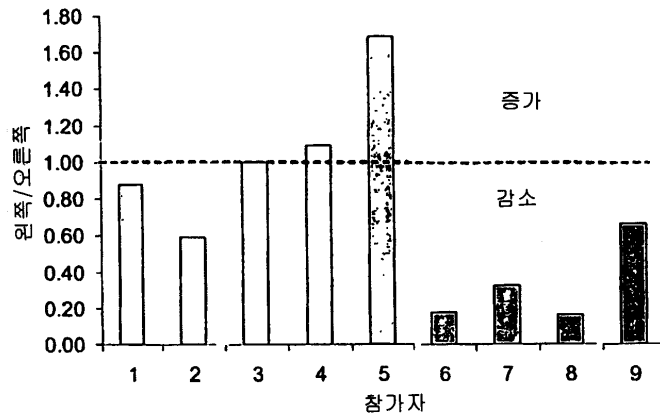
도면6

NHEK와 함께 48시간 배양이후 hBD-2 mRNA 수준에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물 (24시간 발효액, 열 교환 분획물, 여과액, 보유액)의 효과



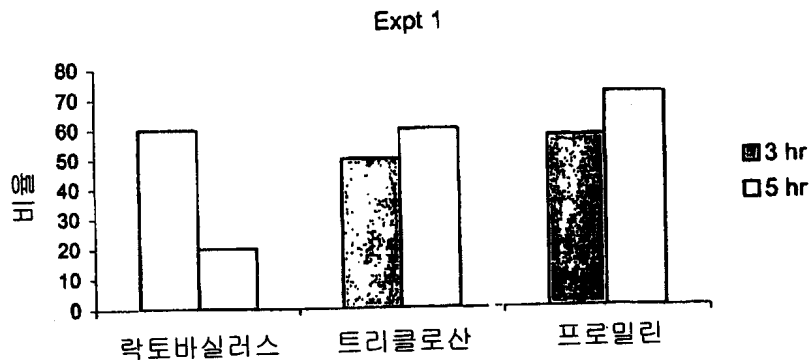
도면7

락토바실러스(*Lactobacillus*) vs. 운반제로 처리된 피부에서 미생물총(microflora)의 비율



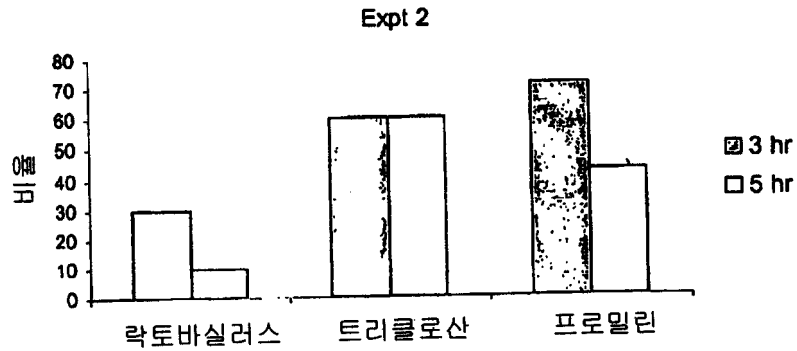
도면8a

대조와 비교하여 미생물 감소를 보인 참가자의 인원수



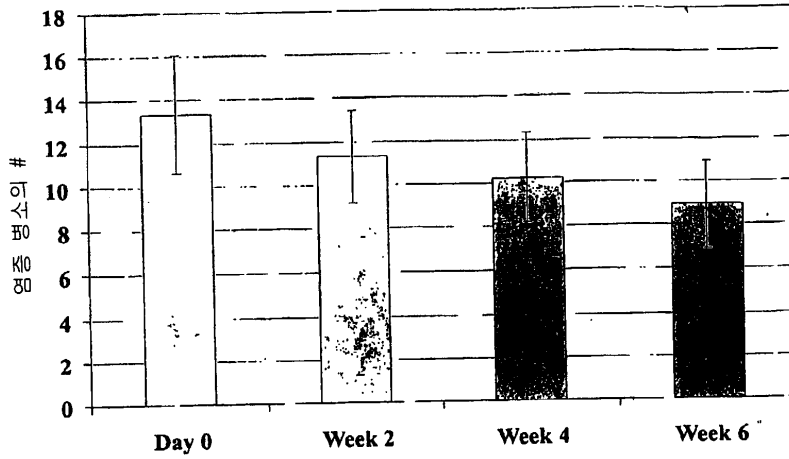
도면8b

대조와 비교하여 미생물 감소를 보인 참가자의 인원수



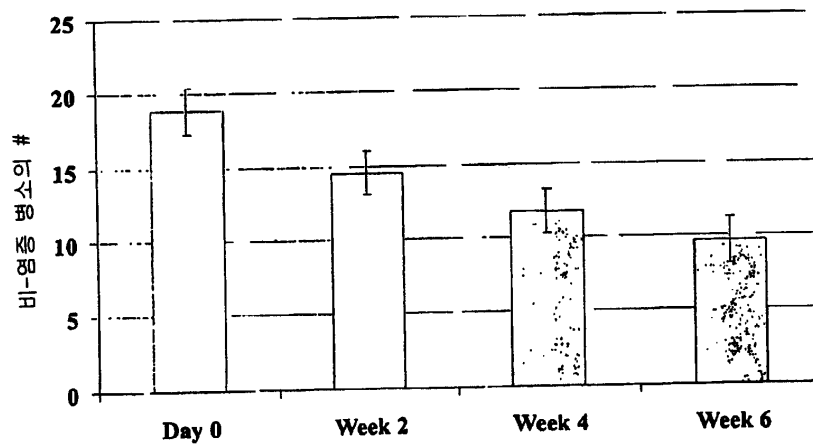
도면9a

여드름 구진(papule)과 농포(pustule)에 대한 10% 락토바실러스(*Lactobacillus*) 조성물의 효과



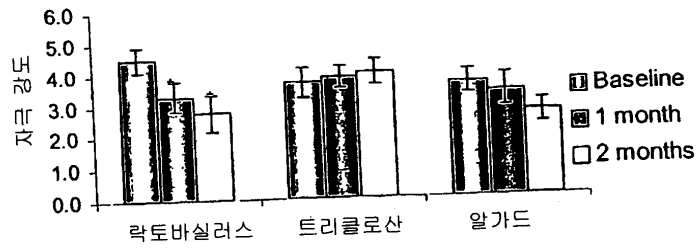
도면9b

개방형과 폐쇄형 면포(comedone)에 대한 10% 락토바실러스(*Lactobacillus*) 조성물의 효과



도면10

락트산 자극(lactic acid stinging)의 감소에 대한 락토바실러스(*Lactobacillus*) 추출물, 트리클로산(triclosan), 알가드(Alguard)의 효과



* p<0.05