



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월24일
(11) 등록번호 10-2401535
(24) 등록일자 2022년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 49/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56911 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0094922
(22) 출원일자 2020년07월30일
심사청구일자 2020년07월30일
(65) 공개번호 10-2021-0014605
(43) 공개일자 2021년02월09일
(30) 우선권주장
1020190092689 2019년07월30일 대한민국(KR)
1020200087105 2020년07월14일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120008034 A*

(73) 특허권자
주식회사 고바이오랩
서울특별시 관악구 관악로 1, 220동 745-1호 (신림동, 서울대학교 종합연구동)
(72) 발명자
고광표
서울특별시 서초구 효령로 72길 57, A동 1307호(서초동, 서초트라펠리스)
김원
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 2동 701호(서초동, 삼풍아파트)
(74) 대리인
유미특허법인
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 27 항

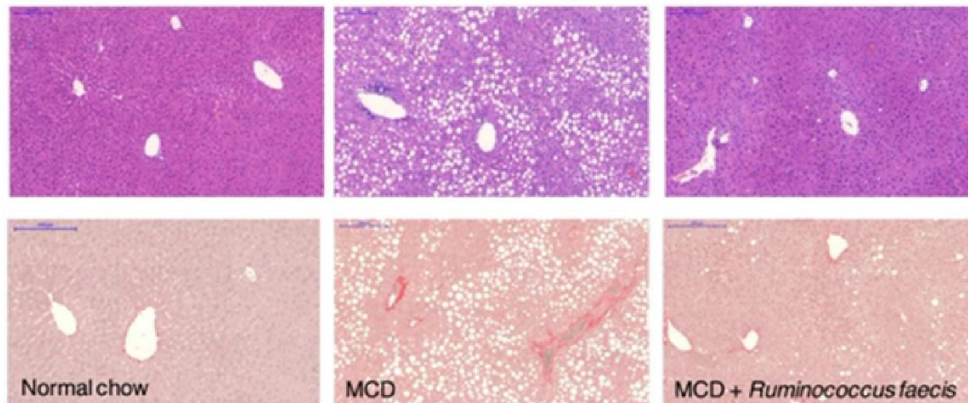
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 간 손상 예방, 개선, 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 간손상, 예를 들면 비-알코올성 지방간 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 루미노코쿠스 속 균주를 포함하는 간손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 49/0008 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
 G01N 2500/04 (2013.01)
 G01N 2800/085 (2013.01)
 G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

유현주

인천광역시 남동구 석산로169번길 25, 102호(간석동, 인향아파트)

이길재

서울특별시 관악구 난곡로 55, 231동 1702호(신림동, 관악산휴먼시아아파트)

조보람

서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 220동 628호(신림동)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180010237 A
 KR1020190026687 A
 WO2018118941 A1*
 WO2019118515 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465028812
과제번호	HI17C0912010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발(R&D)
연구과제명	대규모 한국인 비알코올 지방간 전향 코호트에서 간병리 조직소견에 따른 혈청 대사
체 분석	
기여율	1/2
과제수행기관명	서울특별시보라매병원
연구기간	2019.01.01~2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465028823
과제번호	HI17C0912020019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발(R&D)
연구과제명	대규모 한국인 비알코올 지방간 전향 코호트에서 간병리 조직소견에 따른 분변 내
마이크로비옴 분석	
기여율	1/2
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01~2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 포함하는, 인슐린 저항성을 가지는 환자의 비-알코올성 지방간 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비-알코올성 지방간은 하기 (1) 내지 (5) 중 1종 이상의 특성을 갖는 것인, 조성물:

- (1) 혈중 ALT 농도가 증가됨,
- (2) 혈중 AST 농도가 증가됨,
- (3) 맹장 내 이차 담즙산 농도가 감소됨,
- (4) 섬유성 유전자 발현량이 증가됨, 및
- (5) 체중에 대한 간 무게 비율이 증가됨.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 환자는 당뇨병 환자인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 환자는 제2형 당뇨병 환자인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비-알코올성 지방간은 비-비만성 비-알코올성 지방간인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 비-알코올성 지방간은 비만성 비-알코올성 지방간인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 동결 건조물인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 하기 (1) 내지 (5) 중 1종 이상을 특징으로 하는 것인, 조성물:

- (1) 혈중 ALT 농도의 감소,
- (2) 혈중 AST 농도의 감소,
- (3) 맹장 내 이차 담즙산 농도의 증가,
- (4) 섬유성 유전자 발현량의 감소, 및
- (5) 체중에 대한 간 무게 비율의 감소.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 이차 담즙산은 deoxycholic acid(DCA), lithocholic acid(LCA), 및 ursodeoxycholic acid(UDCA)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 섬유성 유전자는 Colla1, Timp1, 및 α -SMA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 비의존적으로 비-알코올성 지방간을 개선 또는 치료하는 것인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은 동결건조 보호제를 추가로 포함하며, 상기 조성물은 동결 건조물인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 저항성을 가지는 대상(subject)에 투여되어 하기 (1) 내지 (3) 중 1종 이상을 특징으로 하는 것인, 조성물:

- (1) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 혈중 ALT 수치 감소율,
- (2) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 혈중 AST 수치 감소율,
- (3) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 체중에 대한 간 무게 비율 (liver ratio)의 감소율.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 조성물은 섬유증 마커 유전자가 과발현된 대상에 투여되는 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 섬유증 마커 유전자는 Colla1, Timp1, 및 α -SMA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 루미노코쿠스 속 균주는 루미노코쿠스 파에시스 (*Ruminococcus faecis*)인, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 루미노코쿠스 속 균주는 기탁번호 KCTC 5757를 가지는 루미노코쿠스 파에시스 (*Ruminococcus faecis*)인, 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 균주는 탄소원의 농도 5 내지 30% (w/v), 질소원의 농도 50 내지 90% (w/v), 미네랄의 농도 5 내지 15% (w/v), 및 아미노산의 농도 0.1 내지 10% (w/v)인 배양 배지에서 배양 8시간 이후 성장을 지속하는 것인, 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 조성물은 동결건조 보호제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 동결건조 보호제는 자당, 인산칼슘, 아르지닌, 염화나트륨, 과당, 제일인산칼륨, 제이인산칼륨, 및 트레할로스로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 21

루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 포함하는, 인슐린 저항성을 가지는 환자의 비-알코올성 지방간 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 환자는 당뇨병 환자인, 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 환자는 제2형 당뇨병 환자인, 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 비의존적으로 간 손상을 개선하는 것인, 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 저항성을 가지는 대상(subject)에 투여되어 하기 (1) 내지 (3) 중 1종 이상을 특징으로 하는 것인, 조성물:

- (1) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 혈중 ALT 수치 감소율,
- (2) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 혈중 AST 수치 감소율,
- (3) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 높은 체중에 대한 간 무게 비율 (liver ratio)의 감소율.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 비-알코올성 지방간은 당뇨병성 비-알코올성 지방간인, 조성물.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 비-알코올성 지방간은 제2형 당뇨병성 비-알코올성 지방간인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 손상 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비알코올성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 단순한 지방증(steatosis)에서부터, 궁극적으로 진행성 (advanced) 섬유증 및 간경변으로 이어지는 공격적인 조직 형태인 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis)에 이르는 대사 장애의 간 질환을 특징으로 한다. NAFLD의 세계 유병율은 대부분의 역학 연구에서 24-30%로 추정되며, 비만 및 대사 증후군과 평행하게 증가하고 있다.

[0003] 최근 증가된 관심은 다양한 대사성 질환에서 장 미생물총(intestinal microbiota)의 특정 역할을 확인하고 이해하는데 초점을 맞추고 있다. 정상 미생물총에 비한 장내 미생물총의 비정상적인 변화를 일컫는 장내 미생물 불균형(Gut dysbiosis)은, 이로운 단쇄 지방산(short-chain fatty acid, SCFA) 생산 박테리아의 감소, 담즙산 조성의 변화, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)에 대한 면역 반응의 활성화, 에탄올 생산 박테리아의 과증식에 의한 에탄올 생산 증가, 및 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)의 콜린(choline) 및 트리메틸아민(trimethylamine)으로의 전환과 관련되어 있다. 장-간 축(gut-liver axis)에 영향을 주는 장내 마이크로바이옴(gut microbiome)의 변화는, NAFLD 및 간경변과 같은 만성간질환(chronic liver disease) 및 진행성(advanced) 섬유증의 진행에 기여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, NAFLD 질병군에서 증가 또는 감소된 상태에 있는 균주를 정상 상태로 감소 또는 증가시키더라도 NAFLD의 개선 또는 치료 효과가 반드시 나타나는 것은 아니다. 그 이유는 질병군에서 나타난 장내 마이크로바이옴의 변화가 질환으로 인해 나타나는 생리학적 변화로 인한 결과일 수도 있기 때문이다.

[0004] 그러므로, NAFLD의 조직학적(histological) 중증도 여부를 결정하고, 장내 마이크로바이옴 변화를 잘 규정짓고 효과적인 NAFLD의 예방, 치료 및 진단 방법이 요망된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 것으로서, 간 손상, 예를 들어 비알코올성 지방간 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 예는 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 포함하는, 간 손상의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 일 예는, 탄소원 및 질소원을 포함하는 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주의 배양용 조성물에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 일 예는 본 발명에 따른 간 손상의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 손상의 예방, 개선 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0010] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명의 일 예는 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 포함하는, 간 손상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물인 것일 수 있다. 상기 조성물은 부티르산(butyric acid)을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 상기 간 손상은 지방간, 간염, 간섬유화, 및 간경화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 상기 간 손상은 비-알코올성 간손상인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 간염은 비-알코올성 지방간염일 수 있으며, 상기 지방간은 비-알코올성 지방간인 것일 수 있다. 상기 비-알코올성 지방간은 비-비만성 비-알코올성 지방간, 비만성 비-알코올성 지방간, 또는 당뇨병 비-알코올성 지방간인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 당뇨병 비-알코올성 지방간은 2형 당뇨병에 기인한 것일 수 있다.

[0013] 제2형 당뇨병 환자 중 40%의 확률로 비알코올성 지방간염 (NASH)을 가지고 있으며, 비알코올성 지방간을 갖고 있는 제2형 당뇨병 환자의 경우 제2형 당뇨병이 없는 비알코올성 지방간 환자와 비교하여 비알코올성 지방간염 (80.2% vs. 64.4%; $p < 0.001$) 및 간섬유화의 (40.3% vs. 17.0%; $p < 0.001$) 유병률이 높다. 따라서 제2형 당뇨병이 있는 비알코올성 지방간 환자를 위한 치료제의 개발이 필요한 실정이다. 제2당뇨병에 의한 간 손상은 제2당뇨병성 간 손상을 치료할 수 있다.

[0014] 상기 조성물은 인슐린 비의존적으로 간 손상을 예방, 개선, 또는 치료하는 것일 수 있다. 본원 실시예에서 인슐린 저항성을 가지는 동물 모델을 이용하여 본 발명에 따른 조성물의 간 손상 효과를 확인해본 결과, 간 손상이 현저히 개선되었으며, 이에 본 발명에 따른 조성물은 인슐린 비의존적으로 간 손상을 개선 및 치료하는 것을 확인하였다.

[0015] 본 발명에 따른 조성물은 간 손상을 가진 대상에게 투여하여, 현저히 개선된 간손상의 치료 효과를 나타낸다. 상기 간 손상을 가진 대상은 하기 (1) 내지 (5) 중 1종 이상의 특징을 가지는 것일 수 있다:

[0016] (1) 혈중 ALT 농도가 증가된 상태, 예를 들어 정상 대조군의 혈중 ALT 농도의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 2.2배 이상, 2.3배 이상, 2.4배 이상, 2.5배 이상, 2.6배 이상, 2.7배 이상, 2.8배 이상, 2.9배 이상, 3배 이상, 3.5배 이상, 4배 이상, 4.5배 이상, 5배 이상, 5.5배 이상, 6배 이상, 6.5배 이상, 7배 이상, 7.5배 이상, 8배 이상, 8.5배 이상, 9배 이상, 9.5배 이상, 또는 10배 이상인 상태.

[0017] (2) 혈중 AST 농도가 증가된 상태, 예를 들어 정상 대조군의 혈중 AST 농도의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 2.2배 이상, 2.3배 이상, 2.4배 이상, 2.5배 이상, 2.6배 이상, 2.7배 이상, 2.8배 이상, 2.9배 이상, 3배 이상, 3.5배 이상, 4배 이상, 4.5배 이상, 5배 이상, 5.5배 이상, 6배 이상, 6.5배 이상, 7배 이상, 7.5배 이상, 8배 이상, 8.5배 이상, 9배 이상, 9.5배 이상, 또는 10배 이상인 상태.

[0018] (3) 맹장 내 이차 담즙산 농도가 감소된 상태, 예를 들어 정상 대조군의 맹장 내 이차 담즙산 농도의 1배 미만, 0.9배 이하, 0.8배 이하, 0.7배 이하, 0.6배 이하, 0.5배 이하, 0.4배 이하, 0.3배 이하, 0.2배 이하, 또는 0.1배 이하인 상태.

[0019] (4) 섬유증 마커 유전자 발현량이 증가된 상태, 예를 들어 정상 대조군의 섬유증 마커 유전자 발현량의 1배 초

과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 2.2배 이상, 2.3배 이상, 2.4배 이상, 2.5배 이상, 2.6배 이상, 2.7배 이상, 2.8배 이상, 2.9배 이상, 3배 이상, 3.5배 이상, 4배 이상, 4.5배 이상, 5배 이상, 5.5배 이상, 6배 이상, 6.5배 이상, 7배 이상, 7.5배 이상, 8배 이상, 8.5배 이상, 9배 이상, 9.5배 이상, 10배 이상, 11배 이상, 12배 이상, 13배 이상, 14배 이상, 15배 이상, 16배 이상, 17배 이상, 18배 이상, 19배 이상, 또는 20배 이상 과발현된 상태. 상기 섬유증 마커 유전자는 Coll1a1, Timp1, 및 α-SMA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[0020] (5) 체중에 대한 간 무게 비율이 증가된 상태, 예를 들어 정상 대조군의 체중에 대한 간 무게 비율의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 2.2배 이상, 2.3배 이상, 2.4배 이상, 2.5배 이상, 2.6배 이상, 2.7배 이상, 2.8배 이상, 2.9배 이상, 또는 3배 이상인 상태.

[0021] 상기 정상 대조군은 간 손상을 가지지 않는 대조군을 의미한다.

[0022] 또한 상기 대상의 간 손상은 지방간, 간염, 간섬유화, 및 간경화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 상기 간 손상은 비-알코올성 간손상인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 간염은 비-알코올성 지방간염일 수 있으며, 상기 지방간은 비-알코올성 지방간인 것일 수 있다. 상기 비-알코올성 지방간은 비-비만성 비-알코올성 지방간, 비만성 비-알코올성 지방간, 또는 당뇨병성 비-알코올성 지방간인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에 따른 조성물은 당뇨병을 가지는 대상에게 투여되는 것일 수 있으며, 특히 본 발명에 따른 조성물은 인슐린 비의존적으로 간 손상을 예방, 개선, 또는 치료할 수 있으므로, 제2당뇨병을 가지는 대상에게 투여되는 것일 수 있다.

[0024] 본원 실시예에서 제2당뇨병 모델을 이용하여 본 발명에 따른 조성물의 간 손상, 예를 들어 비-알코올성 지방간 치료 효과를 확인한 결과, 혈중 ALT 농도 감소능, 혈중 AST 농도 감소능, 체중에 대한 간의 비율 감소능 등의 치료 효과가, 제2당뇨병을 가지지 않는 모델에서 나타난 치료 효과 대비 현저히 우수하였으며, 이는 본 발명에 따른 조성물이 제2당뇨병 대상에서 특히 우수한 치료 효과를 가지는 것을 의미한다.

[0025] 특히, 제2당뇨병을 가지는 대상에서의 치료 효과가 더욱 우수하였으며, 인슐린 저항성 차이가 루미노코쿠스에 의한 간 손상 개선 또는 치료와 관련된 감수성 차이에 중요한 역할을 하였다.

[0026] 본 발명에 따른 조성물은 간 손상을 가지는 대상에 투여되어 하기 (1) 내지 (5) 중 1종 이상의 특징을 발생시키는 것일 수 있다:

[0027] (1) 혈중 ALT 농도의 감소, 예를 들어 상기 조성물을 투여한 경우의 혈중 ALT 농도가, 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군의 혈중 ALT 농도 100%를 기준으로 100% 미만, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 94% 이하, 93% 이하, 92% 이하, 91% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 59% 이하, 58% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 또는 40% 이하 (일 예로 도 1b에서, MCD와 루미노코쿠스 파에시스 균주를 병용 투여할 경우, MCD 단독 투여한 경우 대비 39.21%의 ALT 수치를 보였다.)

[0028] (2) 혈중 AST 농도의 감소, 예를 들어 상기 조성물을 투여한 경우의 혈중 AST 농도가, 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군의 혈중 AST 농도 100%를 기준으로 100% 미만, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 94% 이하, 93% 이하, 92% 이하, 91% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 64% 이하, 63% 이하, 62% 이하, 61% 이하, 60% 이하, 또는 59% 이하 (일 예로 도 1b에서, MCD와 루미노코쿠스 파에시스 균주를 병용 투여할 경우, MCD 단독 투여한 경우 대비 57.52%의 AST 수치를 보였다.)

[0029] (3) 이차 담즙산 (예를 들어, 맹장 (cecal) 내 이차 담즙산) 농도의 증가, 예를 들어 상기 조성물을 투여한 경우의 이차 담즙산 농도가, 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군의 이차 담즙산의 농도 100%를 기준으로 100% 초과, 105% 이상, 110% 이상, 115% 이상, 120% 이상, 125% 이상, 130% 이상, 135% 이상, 140% 이상, 145% 이상, 150% 이상, 160% 이상, 170% 이상, 180% 이상, 190% 이상, 또는 200% 이상 (일 예로 도 1i에서, MCD와 루미노코쿠스 파에시스 균주를 병용 투여할 경우, MCD 단독 투여한 경우 대비 217.50%의 LCA 농도, 143.37%의 DCA 농도를 보였다.)

[0030] (4) 섬유증 유전자 발현량의 감소, 예를 들어 상기 조성물을 투여한 경우의 섬유증 관련 유전자, 예를 들어 Coll1a1, Timp1, α-SMA 중 1종 이상의 발현량이, 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군의 발현량 100%를 기준으

로 100% 미만, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 94% 이하, 93% 이하, 92% 이하, 91% 이하, 90% 이하, 80% 이하, 78% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 또는 60% 이하 (일 예로 도 1h에서, MCD와 루미노코쿠스 파에시스 균주를 병용 투여할 경우, MCD 단독 투여한 경우 대비 90.60%의 Colla1 발현량, 77.17%의 α -SMA 발현량, 58.50%의 Timp1 발현량을 보였다.)

- [0031] (5) 체중에 대한 간 무게 비율의 감소, 예를 들어 상기 조성물을 투여한 경우의 체중에 대한 간 무게 비율이, 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군의 체중에 대한 간 무게 비율의 100% 미만, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 94% 이하, 93% 이하, 92% 이하, 91% 이하, 90% 이하, 89% 이하, 88% 이하, 또는 87% 이하 (일 예로 도 1g에서, MCD와 루미노코쿠스 파에시스 균주를 병용 투여할 경우, MCD 단독 투여한 경우 대비 86.27%의 liver ratio를 보였다.)
- [0032] 상기 조성물을 투여하지 않은 대조군은, 동일한 질병을 가지나 본 발명에 따른 조성물을 투여하지 않은 비투여군을 의미한다.
- [0033] 상기 이차 담즙산은 deoxycholic acid(DCA), lithocholic acid(LCA), 및 ursodeoxycholic acid(UDCA)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0034] 상기 섬유성 유전자는 Colla1, Timp1, 및 α -SMA로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 조성물은 간 손상을 가지고 인슐린 저항성을 가지는 대상(subject), 예를 들어 제2형 당뇨병성 간 손상을 가지는 대상(subject)에 투여되어 하기 (1) 내지 (3) 중 1종 이상의 특징을 발생시키는 것일 수 있다:
- [0036] (1) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 2.2배 이상, 2.3배 이상, 2.4배 이상, 2.5배 이상, 또는 2.6배 이상의 ALT 수치 감소율,
- [0037] (2) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.1배 이상, 또는 2.2배 이상의 AST 수치 감소율,
- [0038] (3) 인슐린 저항성을 가지지 않는 대조군 대비 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 또는 10배 이상의 체중에 대한 간 무게 비율 (liver ratio)의 감소율.
- [0039] 본 발명에서 용어 '유효성분'이란, 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0040] 본 발명에서 용어 '예방'은, 질병, 장애 또는 질환의 발병을 억제하거나 지연을 의미한다. 질병, 장애 또는 질환의 발병이 예정된 기간 동안 억제되거나 지연된 경우 예방은 완전한 것으로 간주될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 용어 '치료'란, 특정 질병, 장애 및/또는 질환 또는 질환에 따른 증상을 부분적으로 또는 완전히 경감, 개선, 완화, 저해 또는 지연시키며, 중증도를 감소시키거나, 하나 이상의 증상 또는 특징의 발생을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 명확하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 본 발명에서 용어 '담체'는, 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하고, 용어 '약학적으로 허용되는'이란, 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0044] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미결정셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0045] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구용 제제로 제형화될 수 있다. 상기 경구용 제제의 비제한적인 예로는, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭실제 등을 들 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 용어 '부형제'는, 치료제가 아닌, 어느 물질을 의미하며, 치료제의 전달을 위한 담체 또는 매체로 이용되거나 또는 약학적 조성물에 추가되는 것을 의미한다. 이에 의해, 취급 및 저장 특성을 개선하거나 또는 조성물의 단위 투여량 형성을 허용 및 촉진시키게 된다.
- [0048] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 액제, 현탁제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 에멀전, 시럽제, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어 '경구 투여'는, 활성물질이 소화되도록 제조된 물질, 즉 흡수를 위한 위장기관으로 투여되는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설을 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 용어 '약학적 조성물의 유효 투여량'은, 특정한 증상을 치료하기 위해 충분한 활성 성분의 조성물의 양을 의미한다. 이는 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있고, 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 일시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있다.
- [0052] 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물은 체중 1 kg 당 0.001 내지 10,000 mg, 0.001 내지 5,000 mg, 0.001 내지 1,000 mg, 0.001 내지 500 mg, 0.001 내지 300 mg, 0.001 내지 100 mg, 0.001 내지 50 mg, 0.001 내지 30 mg, 0.001 내지 10 mg, 0.001 내지 5 mg, 0.001 내지 1 mg, 0.001 내지 0.5 mg, 0.001 내지 0.1 mg, 0.001 내지 0.05 mg, 0.001 내지 0.01 mg, 0.01 내지 10,000 mg, 0.01 내지 5,000 mg, 0.01 내지 1,000 mg, 0.01 내지 500 mg, 0.01 내지 300 mg, 0.01 내지 100 mg, 0.01 내지 50 mg, 0.01 내지 30 mg, 0.01 내지 10 mg, 0.01 내지 5 mg, 0.01 내지 1 mg, 0.01 내지 0.5 mg, 0.1 내지 10,000 mg, 0.1 내지 5,000 mg, 0.1 내지 1,000 mg, 0.1 내지 500 mg, 0.1 내지 300 mg, 0.1 내지 200 mg, 0.1 내지 100 mg, 0.1 내지 50 mg, 0.1 내지 30 mg, 0.1 내지 10 mg, 0.1 내지 5 mg, 0.1 내지 1 mg, 0.1 내지 0.5 mg, 1 내지 10,000 mg, 1 내지 5,000 mg, 1 내지 1,000 mg, 1 내지 500 mg, 1 내지 300 mg, 1 내지 200 mg, 1 내지 100 mg, 1 내지 50 mg, 1 내지 10 mg, 1 내지 5 mg, 10 내지 10,000 mg, 10 내지 5,000 mg, 10 내지 1,000 mg, 10 내지 500 mg, 10 내지 300 mg, 10 내지 200 mg, 10 내지 100 mg, 10 내지 50 mg, 10 내지 40 mg, 10 내지 30 mg, 10 내지 20 mg, 100 내지 10,000 mg, 100 내지 5,000 mg, 100 내지 1,000 mg, 100 내지 500 mg, 100 내지 300 mg, 또는 100 내지 200 mg의 일일 투여량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예로, 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 성인 환자의 경구 투여 기준으로 0.001 내지 10 g/1일, 0.001 내지 5 g/1일, 0.01 내지 10 g/1일, 또는 0.01 내지 5 g/1일인 것일 수 있다. 또한, 일일 총 투여량을 분할하여 필요에 따라 연속적

또는 비연속적으로 투여할 수 있다.

- [0053] 본 발명에 따른 조성물은 동결건조 보호제를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 동결건조 보호제는 단당류, 이당류, 다당류, 탄수화물, 무기염류, 아미노산, 자당, 인산칼슘, 아르지닌, 염화나트륨, 과당, 제일인산칼륨, 제이인산칼륨, 및 트레할로스로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0054] 상기 자당은 100 내지 300 g/L, 100 내지 250 g/L, 100 내지 200 g/L, 150 내지 300 g/L, 150 내지 250 g/L, 150 내지 200 g/L, 200 내지 300 g/L, 또는 200 내지 250 g/L로 동결건조 보호제에 첨가되는 것일 수 있으며, 일 예로 200 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.
- [0055] 상기 인산칼슘은 5 내지 20 g/L, 5 내지 15 g/L, 5 내지 12 g/L, 5 내지 11 g/L, 7 내지 20 g/L, 7 내지 15 g/L, 7 내지 12 g/L, 7 내지 11 g/L, 10 내지 20 g/L, 10 내지 15 g/L, 10 내지 12 g/L, 또는 10 내지 11 g/L의 농도로 동결건조 보호제에 첨가되는 것일 수 있으며, 일 예로 10.5 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.
- [0056] 상기 아미노산은 1 내지 10 g/L, 1 내지 8 g/L, 1 내지 6 g/L, 1 내지 5 g/L, 3 내지 10 g/L, 3 내지 8 g/L, 3 내지 6 g/L, 3 내지 5 g/L, 4 내지 10 g/L, 4 내지 8 g/L, 4 내지 6 g/L, 또는 4 내지 5 g/L의 농도로 동결건조 보호제에 첨가되는 것일 수 있으며, 일 예로 4 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.
- [0057] 상기 염화나트륨은 0.1 내지 5 g/L, 0.1 내지 3 g/L, 0.1 내지 1 g/L, 0.5 내지 5 g/L, 0.5 내지 3 g/L, 또는 0.5 내지 1 g/L의 농도로 동결건조 보호제에 첨가되는 것일 수 있으며, 일 예로 0.8 g/L로 첨가되는 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명에 따른 루미노코쿠스 속 균주는 루미노코쿠스 파에시스 (*Ruminococcus faecis*)인 것일 수 있다. 일 예로, 상기 루미노코쿠스 속 균주는 기탁번호 KCTC no. 5757를 가지는 루미노코쿠스 파에시스인 것일 수 있다. 본 명세서에서 상기 기탁번호 KCTC no. 5757를 가지는 루미노코쿠스 파에시스는 루미노코쿠스 파에시스 KBL1028로 표기될 수 있다.
- [0059] 상기 균주는 탄소원의 농도 5 내지 30% (w/v), 질소원의 농도 50 내지 90% (w/v), 미네랄의 농도 5 내지 15% (w/v), 및 아미노산의 농도 0.1 내지 10% (w/v)인 배양 배지에서 배양 8시간, 배양 9시간, 배양 10시간, 배양 11시간, 배양 12시간, 배양 13시간, 또는 배양 14시간 이후 성장을 지속하는 것일 수 있다.
- [0060] 상기 균주는 표 3에 따른 조성을 가지는 FMK1028 배지에서 배양 효율이 우수한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 균주는 표 3에 따른 조성을 가지는 FMK1028 배지에서 배양 후 흡광도가, YBHI 배지, GAM 배지, MRS 배지, BL 배지, 및 RCM 배지로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상에서 배양 후 흡광도보다 높은 것을 특징으로 할 수 있다. 일 예로, 상기 균주는 표 3에 따른 조성을 가지는 FMK1028 배지에서 14시간 배양 후 단위 부피 당 생균수가, YBHI 배지에서 배양한 경우의 10배, 50배, 100배, 150배, 200배, 250배, 300배, 350배, 400배, 450배, 500배, 550배, 또는 600배 이상인 것일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 일 예는, 탄소원 및 질소원을 포함하는 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus spp.*) 균주의 배양용 조성물에 관한 것이다. 상기 탄소원은 포도당, 자당, 과당, 유당, 맥아당, 당밀, 및 갈락토스로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 상기 질소원은 효모추출물 (yeast extract), 대두펩톤 (soy peptone), 탈지유, 트립톤, 카자미노산 (Casamino acids), 감자펩톤 (potato peptone), 완두콩펩톤 (pea peptone), 밀펩톤 (wheat peptone), 잠두펩톤 (broadbean peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone), 및 루핀 펩톤 (lupin peptone) 으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 일 예는 탄소원 및 질소원을 포함하는, 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus spp.*) 균주의 배양용 조성물에 관한 것이다. 상기 탄소원은 5 내지 30% (w/v)의 농도일 수 있으며, 상기 질소원은 50 내지 90% (w/v)의 농도일 수 있다. 상기 루미노코쿠스 속 균주는 전술한 바와 같다.
- [0063] 상기 탄소원은 포도당, 자당, 과당, 유당, 맥아당, 당밀, 및 갈락토스로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0064] 상기 질소원은 효모추출물 (yeast extract), 대두펩톤 (soy peptone), 탈지유, 트립톤, 카자미노산 (Casamino acids), 감자펩톤 (potato peptone), 완두콩펩톤 (pea peptone), 밀펩톤 (wheat peptone), 잠두펩톤 (broadbean peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone), 및 루핀 펩톤 (lupin peptone) 으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0065] 상기 루미노코쿠스 속 균주의 배양용 조성물은 루미노코쿠스 속 균주의 배양 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12

시간, 13시간, 또는 14시간 이후의 성장을 촉진하는 것일 수 있다.

- [0066] 상기 루미노코쿠스 속 균주의 배양용 조성물은 미네랄, 아미노산, 비타민, 핵산 및 무기염류로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0067] 상기 미네랄은 아세트산 나트륨, 염화나트륨, 제일인산나트륨, 제이인산나트륨, 염화칼슘, 황산마그네슘, 및 황산망간으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0068] 상기 아미노산은 L-시스테인(L-cystein), L-류신(L-leucine), L-이소류신(L-isoleucine), L-발린(L-Valine), L-트립토판(L-tryptophan), L-트레오닌(L-threonine), L-페닐알라닌(L-phenylalanine), 및 L-메티오닌(L-methionine)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0069] 상기 탄소원의 농도는 5 내지 30% (w/v), 상기 질소원의 농도는 50 내지 90% (w/v), 상기 미네랄의 농도는 5 내지 15% (w/v), 및 상기 아미노산의 농도는 0.1 내지 10% (w/v)인 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 일 예는, 본 발명에 따른 루미노코쿠스 속 균주의 배양용 조성물에, 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 접종하여 배양하는 단계를 포함하는, 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주의 배양방법에 관한 것이다.
- [0071] 상기 배양 방법은 상기 균주 접종 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 또는 14시간 이후의 성장을 촉진하는 것일 수 있다.
- [0072] 상기 배양은 정치 배양, 유가식 배양, 또는 회분식 배양인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 일 예는 본 발명에 따른 간 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 대상 (subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 간 손상 예방, 개선 또는 치료 방법에 관한 것이다. 상기 조성물은 루미노코쿠스 속 (*Ruminococcus* spp.) 균주를 포함하는 것일 수 있다. 상기 간 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 상기 루미노코쿠스 속 균주 등은 전술한 바와 같다. 상기 대상 (subject)은 간 손상을 가진 대상이며, 상기 간 손상을 가진 대상은 전술한 바와 같다. 예를 들어, 상기 간 손상을 가진 대상은 인슐린 저항성을 가지는 대상인 것일 수 있으며, 일 예로 당뇨병을 가지는 대상, 구체적으로 제2형 당뇨병을 가지는 대상인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0074] 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 간 손상, 예를 들어 비알코올성 지방간 질환의 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1a는 MCD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 간손상 치료 효과를 알아보기 위한 실험 과정을 나타낸 도면이다.
- 도 1b는 MCD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 ALT 및 AST 측정 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 1c 내지 도 1e는 MCD 식이에 의해 유도된 간손상의 조직학적 심각성이 루미노코쿠스 파에시스를 먹인 생쥐에서 유의하게 개선된 것을 나타낸 도면으로,
- 도 1c는 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 간 조직이 완화된 것을 H&E (위), Sirius red (아래) 염색법을 통하여 나타낸 도면이다.
- 도 1d는 루미노코쿠스 파에시스 투여로 병리학적으로 완화된 것을 NAFLD activity score 를 이용해 정량한 도면이다.
- 도 1e는 루미노코쿠스 파에시스 투여로 인해 완화된 간 속 콜라겐 분포를 나타낸 도면이다.
- 도 1f는 MCD 식이에 의한 체중 변화를 나타낸 도면이다.
- 도 1g는 루미노코쿠스 파에시스 투여시(MCD + *R. faecis*) 대조군 투여 생쥐(MCD)와 비교하여 체중 내 간 비율 (liver ratio)을 나타낸 도면이다.

도 1h는 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 섬유증 발생 및 증식의 마커가 완화된 것을 나타낸 도면이다.

도 1i는 MCD 식이에 의해 감소된 이차 담즙산(DCA 및 LCA)의 국소 수준이 루미노코쿠스 파에시스 처리에 의해 증가된 것을 나타낸 도면이다.

도 2a는 CDAHFD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 간손상 치료 효과를 알아보기 위한 실험 과정을 나타낸 도면이다.

도 2b는 CDAHFD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 ALT 수준이 감소한 것을 나타낸 도면이다.

도 2c는 CDAHFD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 AST 수준이 감소한 것을 나타낸 도면이다.

도 2d는 CDAHFD 식이에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 체중에 대한 간 무게의 비율을 나타낸 도면이다.

도 3a는 유전적 랩틴-결핍 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따른 간손상 치료 효과를 알아보기 위한 실험 과정을 나타낸 도면이다.

도 3b는 유전적 랩틴-결핍 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 ALT 수준이 감소한 것을 나타낸 도면이다.

도 3c는 유전적 랩틴-결핍 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 AST 수준이 감소한 것을 나타낸 도면이다.

도 3d는 유전적 랩틴-결핍 동물 모델에서 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 체중에 대한 간 무게의 비율이 감소한 것을 나타낸 도면이다.

도 3e는 유전적 랩틴-결핍 동물 모델에서 ipGTT에 의해 측정된 혈청 공복 인슐린 수치 및 인슐린 저항성을 나타낸 도면이다.

도 4a는 간 섬유화 질환군에서 루미노코쿠스 브로미가 유의하게 감소된 상태인 것을 나타낸 도면이다.

도 4b는 루미노코쿠스 브로미 투여에 따른 체중 내 간 비율(liver ratio) 수치를 나타낸 도면이다.

도 4c는 루미노코쿠스 브로미 투여에 따른 ALT 수치를 나타낸 도면이다.

도 5a는 YBHI 배지, RCM 배지, BL 배지, MRS 배지, GAM 배지, 또는 FMK1028 배지에서 루미노코쿠스 파에시스의 배양성과 세포의 형태를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5b는 루미노코쿠스 파에시스의 성장곡선과 단위 부피당 생균수를 나타낸 도면이다.

도 5c는 발효기에서 배양된 루미노코쿠스 파에시스의 성장곡선과 생균수를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0078] 실시예 1: 실험 동물을 이용한 간손상 치료 시험

[0079] (1) 실험 동물의 준비

[0080] 루미노코쿠스 파에시스(Ruminococcus faecis, KCTC no. 5757 [JCM no. 15917])를 한국생명공학연구원 생물자원 센터(KCTC, Jeollabuk-do, Republic of Korea)에서 분양받아 YBHI 배지에서 혐기성(anaerobic) 조건 하에 배양하고, 24시간 후 채취하고, PBS (+ 0.5% 시스테인)을 사용하여 2회 세척한 후, 경구로 급식하였다. 실험 동물로 6주의 수컷 C57BL/6N 생쥐(Orient Bio, Gyeonggi-do, Republic of Korea)를 대학 가이드라인에 따라 서울대학교의 일반 동물 시설에서 사육하였고, 모든 동물 실험은 서울대학교 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

[0081] MCD 식이에 의해 유도된 NAFLD 동물 모델 실험을 진행하고자, 생쥐를 표준 식이(standard chow diet)에 적응시킨지 1주일 후, 루미노코쿠스 파에시스의 장내 정착을 위하여 스트렙토마이신(streptomycin)을 1 g/L 농도로 식

수에 처리하여 1주일간 급수하였다. 이후 5주 동안, 생쥐에게 메티오닌 및 콜린 결핍 L-아미노산 식이 (methionine and choline deficient L-amino acid diet, MCD) (Research diet, New Brunswick, NJ, USA; Cat. no.: A02082002B)를 공급하는 동시에, 200 μ L의 PBS에 10^9 CFU가 들어가도록 현탁한 루미노코쿠스 파에시스 또는 대조군 PBS(sham)중 하나를 200 μ L씩 매일 경구 투여하였다(도 1a). 5주간의 투여 이후 생쥐를 안락사시켜 생화학적 분석, 해부학적 분석, 간 섬유증 발생 및 증식의 마커 발현 확인, 및 담즙산 분석을 진행하였다.

[0083] (2) 생화화학적 분석

[0084] 혈청 알라닌 아미노전달효소(alanine aminotransferase, ALT) 및 아스파테이트 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST) 수치는 Fuji DRI-CHEM 3500i 생화학 분석기(FujiFilm, Tokyo, Japan)로 측정하였다. ALT 및 AST 측정 결과를 도 1b에 나타내었다.

[0086] (3) 해부학적 분석

[0087] 안락사 후, 간 시료를 절제하고 10% 포르말린 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정시켰다. 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 및 시리우스 레드 염색(Sirius red staining)은 록원바이오희합연구재단(LOGONE Bio Convergence Research Foundation, Seoul, Republic of Korea)에서 수행되었다. 염색된 전체 슬라이드 이미지는 Panoramic Viewer(3DHISTECH, Budapest, Hungary)를 사용하여 분석되었다. 콜라겐 비례 면적(collagen proportionate area)을 계산하기 위해, 그룹당 8 개의 이미지를 무작위로 선택하고 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>)를 사용하여 분석하였다.

[0088] 또한, 체중에 대한 간의 비율은 5주간의 루미노코쿠스 파에시스를 투여한 생쥐의 체중과 간의 무게를 측정 후 체중 대비 간의 무게 비율을 계산하였다. 생쥐의 체중 측정 결과를 도 1f에 나타내었고, 체중 대비 간의 무게 비율을 도 1g에 나타내었다.

[0090] (4) 간 섬유증 발생 및 증식의 마커 발현 확인

[0091] 간 샘플의 총 RNA를 easy-spin™ Total RNA Extraction 키트(iNTRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Republic of Korea)를 이용하여 추출하였고, High Capacity RNA-to-cDNA 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. 정량적 PCR은 SYBR™ Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex qPCR 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 수행하였다. 사용한 프라이머 서열은 다음과 같았다.

표 1

Gene name	Primer category	Sequences	SEQ ID NO.
Cyclophilin A	Forward	5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA-3'	1
	reverse	5'- TGCCGGAGTCGACAATGAT-3'	2
Colla1	forward	5'- ACCTGTGTGTTCCCTACTCA-3'	3
	reverse	5'-GACTGTTGCCTTCGCCTCTG-3'	4
Timp1	forward	5'-TGCCTGCTGCGATTACAACC-3'	5
	reverse	5'-GGAATGGTGTGGTGATGCATGG-3'	6
α -SMA	forward	5'-GGCTCTGGGCTCTGTAAGG-3'	7
	reverse	5'-CTCTTGCTCTGGGCTTCATC-3'	8

[0093] (5) 담즙산 분석

[0094] 생쥐의 맹장을 추출한 후, 10배의 부피비에 해당하는 80% 메탄올을 넣고 섞어주었다. 담즙산 추출을 위하여 초음파분쇄기(sonicator)로 3 분간 시료를 과쇄한 후 4 $^{\circ}$ C 조건에서 24시간동안 보관하였다. 이후 원심분리를 통해 획득한 상층액에 100% 메탄올 1 mL를 추가하고 bead beating 기계를 이용하여 15 frequency, 30 분 조건으로 두번째 추출을 진행하였다. 담즙산이 용해된 메탄올은 30 $^{\circ}$ C, 24시간 조건으로 진공 건조를 통해 액체상 물질을 모두 증발시키며 나머지 고형물질을 55% 메탄올을 이용하여 녹였다. 추출된 담즙산을 전용 튜브에 옮겨담은 후 Micromass® Q-ToF 질량 분석기(Waters Technologies, Milford, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0096] (6) 실험 결과

[0097] 루미노코쿠스 파에시스 투여시(MCD + *R. faecis*) 대조군 투여 생쥐(MCD)와 비교하여 ALT 및 AST 수치가 감소되었

다 (도 1b).

[0098] 해부학적 및 조직학적 분석 결과로, MCD 식이에 의해 유도된 NAFLD의 조직학적 심각성이 루미노코쿠스 파에시스를 먹인 생쥐에서 유의하게 개선되었다 (도 1c 내지 도 1e). MCD 식이는 기존 문헌에 알려진 대로 급격한 체중 저하를 일으켰으며 루미노코쿠스 파에시스 투여는 체중에 영향을 미치지 않았다 (도 1f). 그러나 루미노코쿠스 파에시스 투여시(MCD + *R. faecis*) 대조군 투여 생쥐(MCD)와 비교하여 체중 내 간 비율(liver ratio)이 감소하였다 (도 1g).

[0099] 간 섬유증 발생 및 증식의 마커 발현 확인 결과, 간 섬유증 발생 및 증식의 마커가 루미노코쿠스 파에시스 급식 생쥐에서 현저하게 완화되었다(Timp1, p=0.0018; α-SMA, p=0.0330) (도 1h).

[0100] 생화학적 및 조직학적 간 손상 마커의 변화와 병행하여, 이차 담즙산(DCA 및 LCA)의 국소 수준 또한 MCD 식이에 의해 감소되고 루미노코쿠스 파에시스 처리에 의해 증가되었다 (도 1i).

[0101] 이러한 결과는 루미노코쿠스 파에시스 MCD 다이어트 생쥐 모델에서 간 섬유증에 대한 보호 효과가 있음을 나타낸다.

[0103] **실시예 2: 동물 모델을 이용한 간손상 치료 시험**

[0104] 비알코올성 지방간에 의한 간 손상에 대한 루미노코쿠스 파에시스의 완화 효과를 확인하기 위해, 체중 감소를 방지하고 인슐린 저항성을 보이지 않는 choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet(CDAHFD) 식이 생쥐 모델을 사용하였다.

[0105] 콜린(choline)은 간세포 속의 트리글리세리드(triglyceride)를 VLDL의 형태로 축적하고 배출시키는 역할을 하나, CDAHFD 식이에는 콜린이 결여되어 있어 고지방 식이로 인한 트리글리세리드가 간세포 안에 누적되어 지방간이 유도되며, MCD 모델과는 다르게 체중저하가 발생하지 않고 간섬유화(fibrosis)가 더욱 심하게 유도되는 식이모델이다. 그러나, CDAHFD 모델은 인슐린 저항성이 유도되지 않는 것으로 알려져 있다.

[0106] 구체적으로, 도 2a에 나타난 바와 같이, C57BL/6N 생쥐를 표준 식이 (standard chow diet)에 적응한지 1주일 후, 루미노코쿠스 파에시스의 장내 정착을 위하여 1주일 동안 스트렙토마이신(streptomycin) (1 g/L)을 음용수에 녹여 먹였다. 그 후 8주 동안, choline이 결여되고 지방 60%의 고지방이 포함되어 있는 CDAHFD (choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet) 사료를 먹였고, 200 μL의 PBS에 10⁹ CFU가 첨가되도록 현탁한 루미노코쿠스 파에시스 또는 대조군 PBS(sham)중 하나를 200 μL씩 매일 경구 투여하였다. 8주간의 투여 이후 생쥐를 안락사시켜 혈청 생화학적 분석 및 해부학적 분석을 진행하였다. 생화학적 분석으로서 ALT 및 AST 분석은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였으며, 체중에 대한 간 비율을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0107] 도 2b 내지 도 2d에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 ALT 및 AST 수준이 감소하였으며 (도 2b 및 도 2c), 다만 체중에 대한 간 비율은 루미노코쿠스 파에시스 투여에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다 (도 2d). 이는 루미노코쿠스 파에시스가 CDAHFD 사료로 유도된 비-알코올성 지방간 손상에 대해 치료 효과를 가지는 것을 의미하며, 다만 체중에 대한 간 비율이 유의한 차이를 보이지 않은 것은 간 속에 축적된 지방이 유의하게 줄지 않은 것을 의미한다.

[0109] **실시예 3: 유전적 렙틴-결핍 모델을 이용한 간손상 치료 시험**

[0110] 인슐린 저항성을 가지는 경우에도 루미노코쿠스 파에시스에 의한 비알코올성 지방간 치료 효과가 발생하는지 여부를 확인하기 위해, 인슐린 저항성을 갖는 자발적인 당뇨병 및 지방간을 발생시키는 유전적 렙틴 결핍(genetic leptin-deficient) (*db/db*) 모델을 사용하여 루미노코쿠스 파에시스의 비알코올성 지방간 치료 효과를 확인해보았다. *db/db* 모델의 대조군으로 *db/m* 을 사용하였으며 *db* allele의 heterozygote에 해당한다.

[0111] *db/db* 모델은 렙틴 수용체(leptin receptor)에 돌연변이를 가지는 모델로서, 비만, 인슐린 저항성이 유도되어 고혈당이 나타나며, 제2형 당뇨 모델로 많이 사용된다. *db/db* 모델의 경우에는 간내 지방증(steatosis)이 빠르게 유도되는 것으로 알려져 있지만, 지방간염(NASH), 간섬유화(fibrosis)는 쉽게 유도되지 않는 것으로 알려져 있다.

[0112] 구체적으로, 도 3a에 나타난 바와 같이, *db/db* 모델 생쥐를 표준 식이(standard chow diet)에 적응시킨 지 1주일 후, 루미노코쿠스 파에시스의 장내 정착을 위하여 1주일 동안 스트렙토마이신(streptomycin) (1 g/L)을 음용수에 녹여 처리하였다. 그 후 5주 동안 보통 식이를 급여하는 동시에, 200 μL의 PBS에 10⁹ CFU가 들어가도록

현탁한 루미노코쿠스 파에시스 또는 대조군 PBS(sham)중 하나를 200 μL씩 매일 경구 투여하였다. 5주간의 투여 이후 생쥐를 안락사시켜 생화학적 분석 및 해부학적 분석을 진행하였다. 생화학적 분석으로서 ALT 및 AST 분석은 상기 실시예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 수행하였으며, 체중에 대한 간 비율을 상기 실시예 1과 실질적으로 동일한 방법으로 측정하였다.

[0113] db/db 생쥐에서 ipGTT에 의해 측정된 혈청 공복 인슐린 수치는 Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA 키트 (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 인슐린 저항성을 확인하기 위한 복강 당 부하 검사는 루미노코쿠스 파에시스 투여 3주차 때 진행되었으며 16시간의 물 이외의 식이제한 후 글루코스 용액을 체중 1 kg 당 1 g 글루코스가 투여되도록 복강에 투여하였다. 이후 정해진 시간에 Accu-Chek® Performa 혈당측정기(Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

[0114] 도 3b 내지 도 3d에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 ALT 및 AST 수준이 감소하였으며 (도 3b 및 도 3c), 특히 체중에 대한 간 비율 또한 유의하게 감소하였다 (도 3d). 그럼에도 불구하고, 도 3e에 나타난 바와 같이 db/db 생쥐에서 ipGTT에 의해 측정된 혈청 공복 인슐린 수치 및 인슐린 저항성은 루미노코쿠스 파에시스 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

[0115] 루미노코쿠스 파에시스는 인슐린 저항성을 가지는 db/db 모델에서도 비알코올성 지방간 치료 효과를 보였으며, 이러한 결과는 루미노코쿠스 파에시스가 인슐린 비의존적 방식으로 NAFLD 치료 효과를 가지는 것을 의미하며, 제2형 당뇨병 환자의 비알코올성 지방간 치료에도 효과적으로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0116] 특히, 인슐린 저항성 차이에 따른 치료 반응 감수성을 확인하기 위해서 db/db 모델과 그에 대한 비교 모델로 CDAHFD 모델을 선택하였다. 그 이유는 CDAHFD 모델의 경우 인슐린 저항성 없이 비알코올성 지방간 질환이 유도되므로 인슐린 저항성이 유도되는 db/db 모델과 비교하여 인슐린 저항성에 따른 치료 효과를 비교할 때 적합하기 때문이다. MCD 모델의 경우 급격한 체중 저하를 비롯한 신체 기능의 저하를 불러오기 때문에 인슐린 저항성 차이에 따른 치료 반응의 감수성을 확인하기 위한 대조군으로 활용하기에는 적합하지 않았다.

[0117] 도 3b에 나타난 바와 같이 루미노코쿠스 파에시스 투여에 따라 ALT 수치가 약 42.98% 감소하였고, 도 3c에 나타난 바와 같이 AST 수치가 약 41.00% 감소하였으며, 도 3d에 나타난 바와 같이 체중에 대한 간 무게 비율이 약 9.43% 감소하였다. 이는 도 2b의 CDAHFD 모델에서 ALT 수치가 약 16.40% 감소한 것 대비하여 약 2.6배 이상의 ALT 수치 감소율을 보였고, 도 2c의 CDAHFD 모델에서 AST 수치가 약 18.18% 감소한 것 대비하여 약 2.2배 이상의 AST 수치 감소율을 보였으며, 도 2d의 CDAHFD 모델에서 체중에 대한 간 무게 비율이 유의하게 감소하지 않았으나 인슐린 저항성을 가지는 동물모델에서는 체중에 대한 간 무게 비율이 유의하게 감소한 점을 고려해보았을 때, 루미노코쿠스 파에시스는 인슐린 저항성의 차이, 또는 제2형 당뇨병 발병 유무의 차이에 따른 간 손상 개선 또는 치료와 관련된 감수성 차이를 가지며, 제2당뇨병 대상에서 현저히 우수한 치료 효과를 나타냄을 의미한다.

[0119] **실시예 4: 루미노코쿠스 브로미 (*Ruminococcus bromii*)의 섬유증 치료 효과**

[0120] **(1) 비-알코올성 지방간 질환군에서 유의하게 감소된 루미노코쿠스 브로미**

[0121] 생체 검사를 통해 NAFLD를 가지고 있는 것으로 입증된 171명의 대상자와 31명의 NAFLD를 가지고 있지 않은 대상자가 포함되었으며 조직학적으로(histologically) NAFLD를 분류하였다. 대변 샘플의 DNA는 QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자의 V4 영역을 타겟으로 한 시퀀싱(sequencing)은 MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA)을 이용하여 수행하였고, 시퀀싱 데이터의 추가적인 분석은 QIIME™ 파이프라인 (v 1.8.0; <http://qiime.org/>)을 이용하여 수행하였다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 브로미는 간 섬유화 질환군에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

[0123] **(2) 루미노코쿠스 브로미의 비-알코올성 지방간 치료 효과 검증**

[0124] 다음으로, 비알코올성 지방간 질환군에서 유의하게 감소한 것으로 나타난 루미노코쿠스 브로미가 비알코올성 지방간 치료 효과를 가지는지 여부를 확인해보았다.

[0125] 구체적으로, 루미노코쿠스 브로미(*Ruminococcus bromii*, ATCC no. 27255)를 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 modified PYG 배지에서 혐기성(anaerobic) 조건 하에 배양하고, 24시간 후 채취하고, PBS(+ 0.5% 시스테인)을 사용하여 2회 세척한 후, 경구로 급식하였다.

[0126] C57BL/6N 생쥐를 표준 식이(standard chow diet)에서 1주일 환경적응 후, 루미노코쿠스 브로미의 장내 정착을 위하여 1주일 동안 스트렙토마이신(streptomycin) (1 g/L)을 음용수에 녹여 먹였다. 그 후 5주 동안, 생쥐에게 메티오닌 및 콜린 결핍 L-아미노산 식이(methionine and choline deficient L-amino acid diet, MCD)

(Research diet, New Brunswick, NJ, USA; Cat. no.: A02082002B)를 먹였고, 200 μL의 PBS에 10⁹ CFU가 들어 가도록 현탁한 루미노코쿠스 브로미 또는 대조군 PBS (sham) 중 하나를 200 μL씩 매일 경구 투여하였다. 5주간 의 투여 이후 생쥐를 안락사시켜 생화학적 분석을 진행하였다. 생화학적 분석으로서 ALT 및 AST 분석은 상기 실 시에 1과 실질적으로 동일한 방법으로 수행하였으며, 체중에 대한 간 비율을 상기 실시예 1과 실질적으로 동일 한 방법으로 측정하였다.

[0127] 그러나, 도 4b 내지 도 4c에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 브로미 투여시(MCD + R.bromii) 대조군 투여 생쥐 (MCD)와 비교하여 체중 내 간 비율(liver ratio)과 ALT 수치 모두 유의한 변화가 나타나지 않았다.

[0128] 루미노코쿠스 브로미는 비알코올성 지방간 치료 효과를 나타내지 않았으며, 이는 비알코올성 지방간 질환군에서 감소된 것으로 나타난 모든 균주가 비알코올성 지방간 치료 효과를 가지는 것은 아님을 알 수 있었으며, 특히 루미노코쿠스 파에시스와 동일한 속(genus)에 속하는 균주라 하더라도 모두 비알코올성 지방간 치료 효과를 가 지는 것은 아니며, 따라서 비알코올성 치료 효과는 루미노코쿠스 파에시스의 고유한 효과임을 알 수 있었다. 또 한, 루미노코쿠스 브로미는 비알코올성 지방간 질환군에서 유의하게 감소하였으나, 이를 투여하여도 비알코올성 지방간 치료 효과를 보이지 않아, 비알코올성 지방간에서 감소된 균주의 투여가 치료로 연결될 것으로 예측하기 는 어려웠다.

[0130] 실시예 5: 루미노코쿠스 파에시스의 배양 및 생산

[0131] (1) 최적 배지 탐색

[0132] 루미노코쿠스 파에시스(기탁번호 KCTC no.5757)의 최적 배지 탐색을 위해 시판중인 Bacto™ brain heart infusion(BHI) Medium (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 포함하는 YBHI 배지와, 시판중인 Difco™ Reinforced Clostridial Medium(RCM 배지) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), MB cell BL broth(BL 배지) (Kisan Bio, Seoul, Republic of Korea), Difco™ Lactobacilli MRS broth(MRS 배지) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), MB cell Gifu anaerobic medium(GAM 배지) (Kisan Bio, Seoul, Republic of Korea)들과 본 발명에서 제조한 FMK1028 배지에서 배양성을 확인하였다. 최적 배지 선별을 위한 배양성은 배양 후 흡광도 증가와 pH 감소, 그리 고 현미경 검경으로 확인된 세포 균질성을 기준으로 평가하였다. YBHI 배지와 FMK1028 배지의 조성은 각각 하 기 표 2와 표 3에 나타내었다.

표 2

YBHI 배지

Components	g/L
Bacto™ brain heart infusion	37
Yeast Extract	5
Cellobiose	1
Maltose	1
L-cysteine	0.5

표 3

FMK1028 배지

Components	g/L
Glucose	10
Yeast Extract	45
Soy peptone	10
Sodium acetate	3
Sodium chloride	5
L-cysteine	0.5

[0135] 최적 배지 탐색에 사용된 배지들은 모두 멸균 전 pH를 6.8로 조정하였다. YBHI 배지에서 14 시간 동안 배양된 루미노코쿠스 파에시스 전배양액을 각각 YBHI 배지, RCM 배지, BL 배지, MRS 배지, GAM 배지, 또는 FMK1028 배 지에 최종 부피비로 1%를가 되도록 각각 접종하였다. 접종 후 혐기 조건, 37 °C에서 정치배양(standing

culture) 하였으며 14 시간 뒤에 배양액의 600 nm에서의 흡광도와 pH를 측정하고 세포의 형태를 관찰하였다. 흡광도는 Orion Aquamate 8000 분광기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였으며, pH는 SevenCompact pH/Ion meter (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)로 측정하였다. 세포의 형태는 Optinity KB-320 광학현미경(Korea Labtech, Gyeonggi-do, Republic of Korea)으로 관찰하였다.

[0136] 도 5a는 각 배지에서 루미노코쿠스 파에시스의 배양성과 세포의 형태를 비교한 결과이다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 14시간 배양 후 배양액의 흡광도는 FMK1028 배지에서 가장 높았으며 다음으로는 YBHI 배지, GAM 배지, MRS 배지, BL 배지, RCM 배지 순으로 높았다. 배양 후 배양액의 pH는 FMK1028 배지에서 가장 낮았으며 다음으로는 BL 배지, YBHI 배지, MRS 배지, RCM 배지, GAM 배지 순으로 낮았다. 현미경으로 관찰한 결과는 FMK1028과 GAM 배지에서 유래한 세포의 균질성이 가장 우수하였으며 다음으로 YBHI 배지에서 배양된 세포가 우수하였다.

[0137] 종합적으로, 루미노코쿠스 파에시스의 배양성은 본 발명에서 제조한 FMK1028 배지에서 가장 우수하였다.

[0139] **(2) 최적 배지 성장곡선 및 생균수**

[0140] 루미노코쿠스 파에시스의 배양성이 가장 우수한 FMK1028 배지를 이용하여 성장곡선과 생균수를 측정하였다. 대조군으로 YBHI 배지를 사용하였다.

[0141] YBHI 배지에서 14 시간 동안 배양된 루미노코쿠스 파에시스 전배양액을 YBHI 배지와 FMK1028 배지에 부피비로 1%가 되도록 각각 접종하였다. 접종 후 혐기 조건, 37 °C에서 정치 배양(standing culture)을 14 시간 동안 진행하였고, 배양액의 600 nm 에서의 흡광도를 측정하여 성장곡선으로 나타내었다.

[0142] 생균수 측정을 위해 각각의 배지에 접종된 루미노코쿠스 파에시스를 14 시간 배양 후 GAM 배지를 이용하여 십배수 연속희석법(10-fold serial dilution)에 따라 희석하였으며, 그 희석액 0.1 mL을 취하여 GAM 배지 아가(agar) 평판에 도말 한 후 혐기 조건, 37 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 30 - 300개 정도의 콜로니가 형성된 아가 평판의 콜로니를 계수하여 배양액의 단위 부피 당 생균수(CFU/mL)로 환산하였다. 측정된 성장곡선과 단위 부피당 생균수는 도 5b에 나타내었다. 도 5b에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 파에시스는 대조군인 YBHI 배지에서 배양 8 시간 후 정지상에 도달하여 흡광도 2.55를 나타내었다. FMK1028 배지에서 배양 후 8 시간까지 YBHI와 유사한 성장곡선을 나타내었으나, 배양 후 14 시간까지 지속 성장하여 흡광도 6.18을 나타내었다. 14 시간 배양 후 단위 부피 당 생균수를 측정한 결과 YBHI 배지보다 FMK1028 배지에서 600 배 높은 생균수가 확인되었다.

[0144] **(3) 발효기를 이용한 대량배양 및 원말화**

[0145] 루미노코쿠스 파에시스의 대량배양 및 원말화를 위해 발효기를 이용하여 배양 세포의 회수시점을 확인하였다. 루미노코쿠스 파에시스 전배양액 16 mL을 8 L의 FMK1028 배지에 접종 후 발효기(Fermentec, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea)를 가동하여 혐기조건, 37 °C, 250 rpm 조건으로 배양하였다. 배양시간에 따른 성장곡선과 생균수를 측정하여 도 5c에 나타내었다. 도 5c은 발효기를 가동하여 배양한 루미노코쿠스 파에시스의 성장곡선과 생균수를 나타낸 결과이다.

[0146] 도 5c에 나타난 바와 같이, 루미노코쿠스 파에시스는 8시간 배양 후 정지상에 도달하여 흡광도 8.25와 생균수 5.15×10^9 CFU/mL를 나타내었다. 정지상인 배양 후 11시간에는 흡광도가 감소하여 7.25를 나타내었으며 생균수도 소폭 감소하여 4.95×10^9 CFU/mL를 나타내었다. 도 5b에서 제시된 정치 배양 결과와는 달리 발효기를 이용한 배양결과 정지상에 도달하는 시간이 8시간으로 단축되며, 플라스크 회분 배양시의 14시간 배양 결과와 비교시 정지상에서의 흡광도(6.18 → 8.25) 및 생균수(1.2×10^9 CFU/mL → 5.15×10^9 CFU/mL) 측정 결과도 향상되었음을 확인할 수 있었다.

[0147] 상기 결과를 근거로 발효기를 이용하여 루미노코쿠스 파에시스를 대량 배양하였다. 배양 후 8시간에 2236R 고속원심분리기(Labogene, Liller ød, Denmark)를 이용하여 7,000 rpm, 40 분 조건으로 배양된 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 300 mL 비이커에 넣고 마그네틱 바와 교반기를 이용하여 동결보호제와 무게 비율 1:1로 20 분 동안 혼합하였다. 사용된 동결보호제의 조성은 하기 표 4에 나타내었다. 동결보호제와 혼합된 세포는 -80 °C 초저온 냉동고에서 24 시간 동결시킨 후 72 시간동안 동결 건조 후 세밀 분쇄하여 분말화시켰다.

표 4

[0148]

Cryoprotective agents (CPA)

Components	g/L
Sucrose	200
Potassium phosphate dibasic	6
Potassium phosphate monobasic	4.5
L-arginine	4
NaCl	0.8

[0149]

최종적으로, 발효기를 이용한 대량배양 및 원말화 과정에서 측정된 생균수는 하기 표 5에 나타내었다.

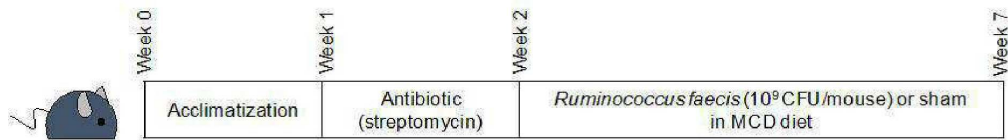
표 5

[0150]

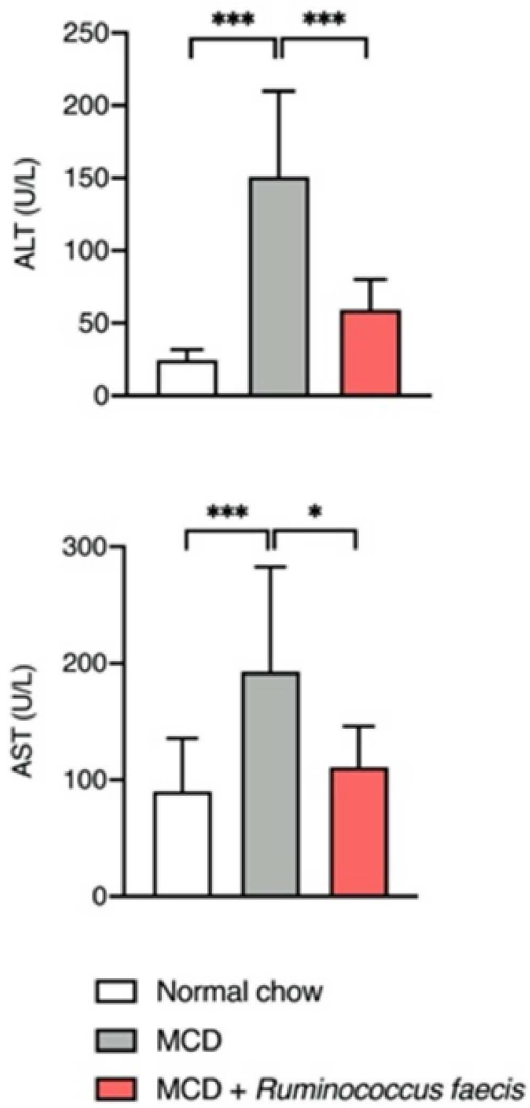
Culture condition	Culture container	14 L jar vessel
	Medium	FMK1028
	Culture volume (L)	8
	Culture time (h)	8
Viable cells	Harvested cells (CFU/mL)	$5.50 \times 10^9 \pm 2.83 \times 10^8$
	Mixture with CPA (CFU/mL)	$1.43 \times 10^{11} \pm 2.41 \times 10^{10}$
	Powder (CFU/g)	$2.67 \times 10^{10} \pm 5.28 \times 10^9$

도면

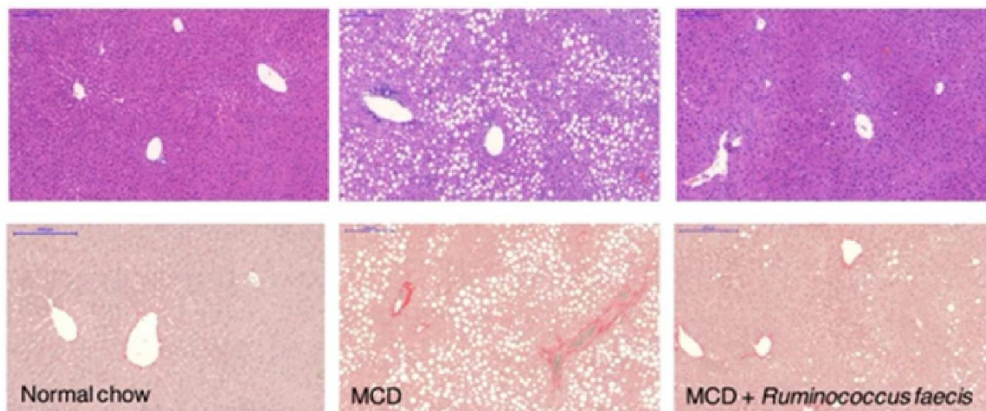
도면1a



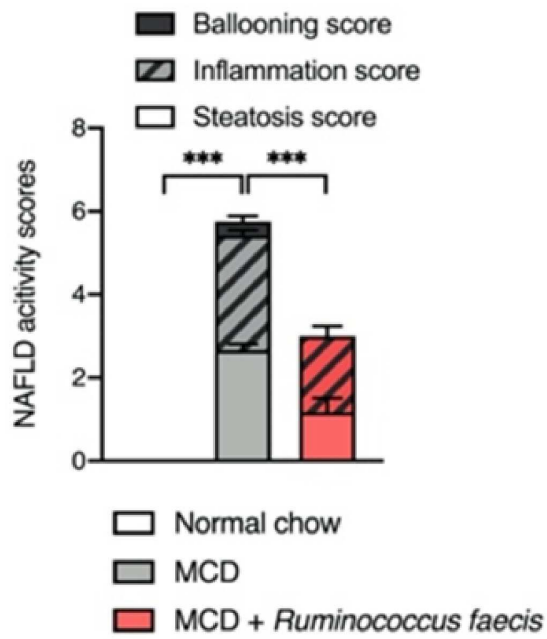
도면1b



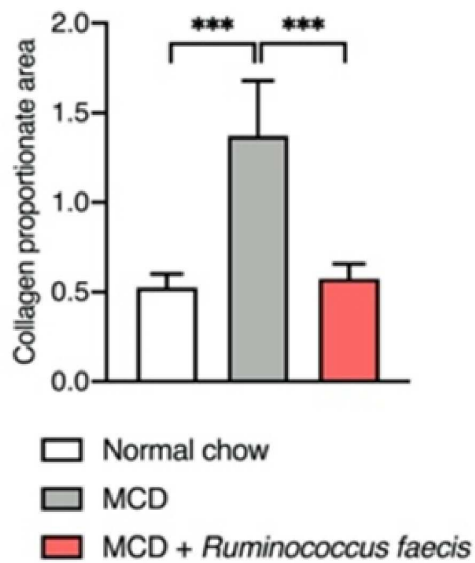
도면1c



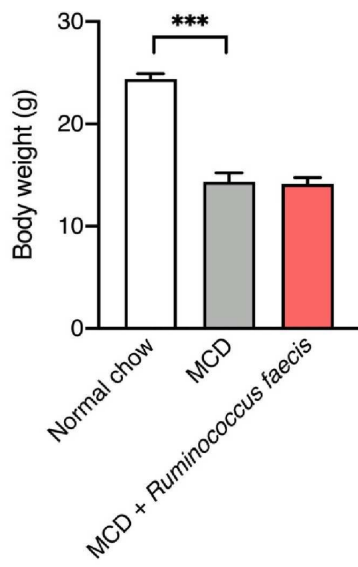
도면1d



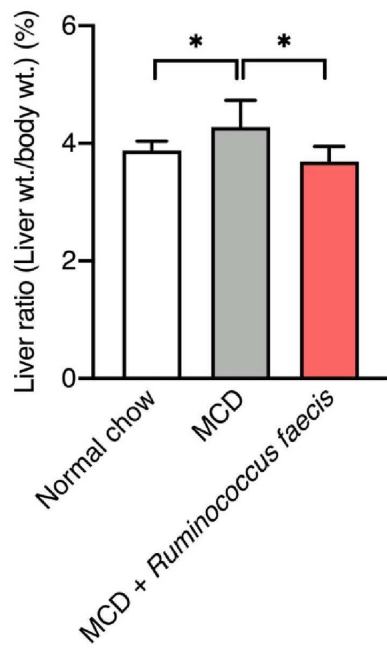
도면1e



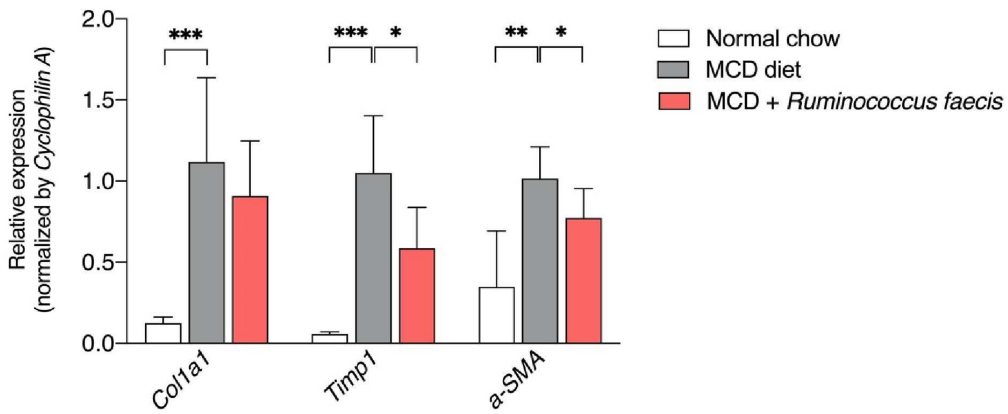
도면1f



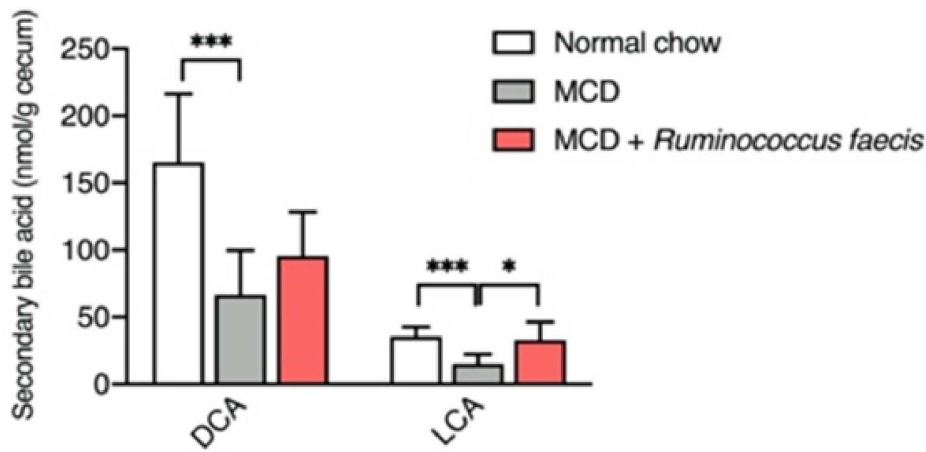
도면1g



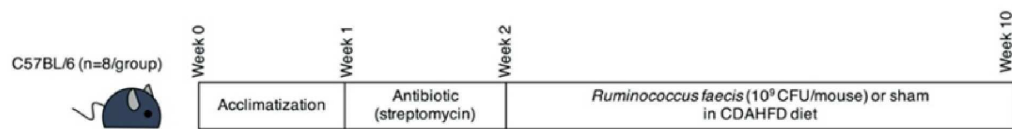
도면1h



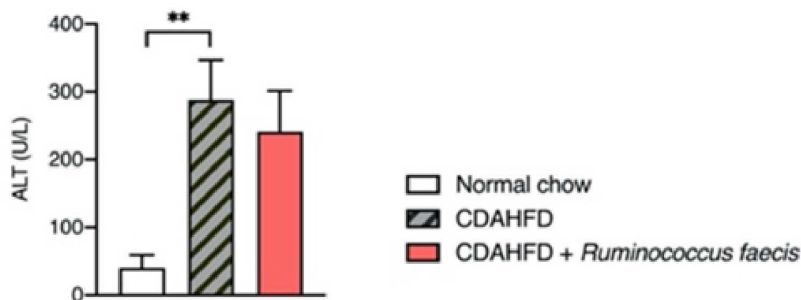
도면1i



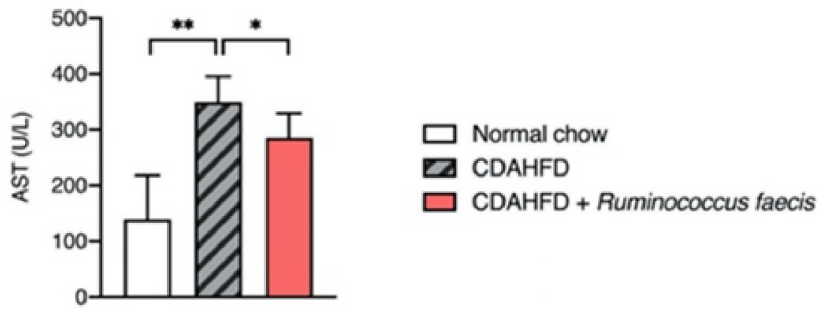
도면2a



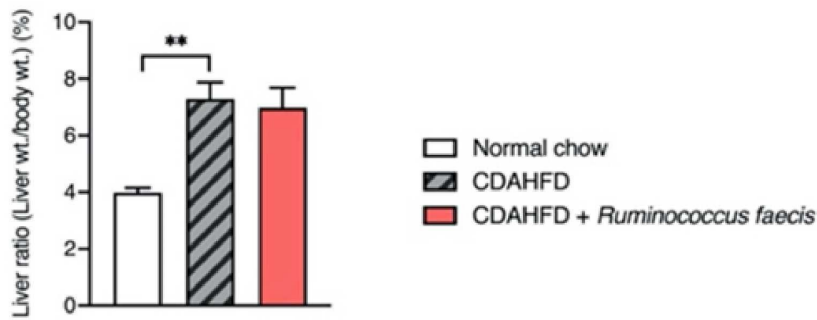
도면2b



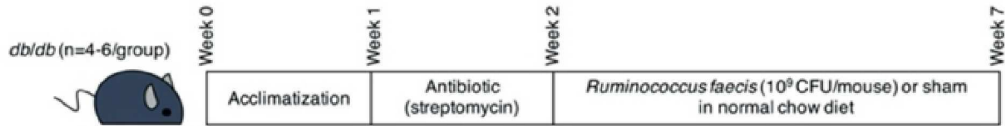
도면2c



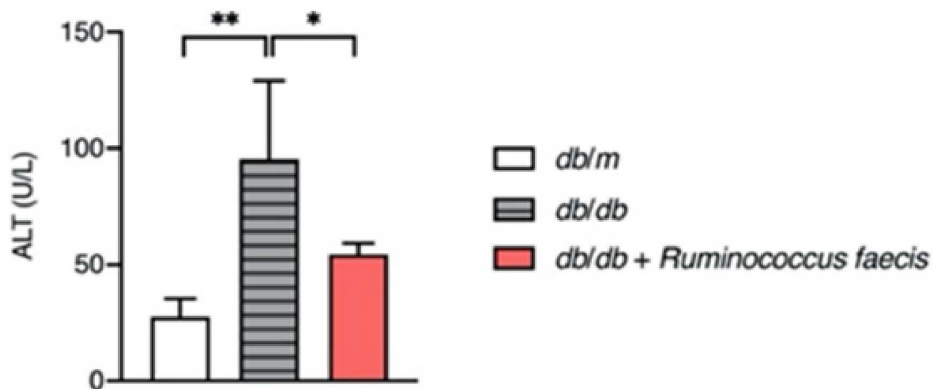
도면2d



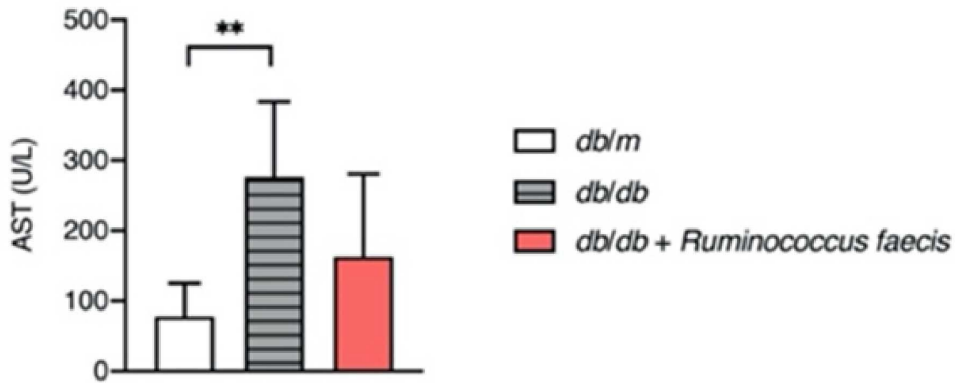
도면3a



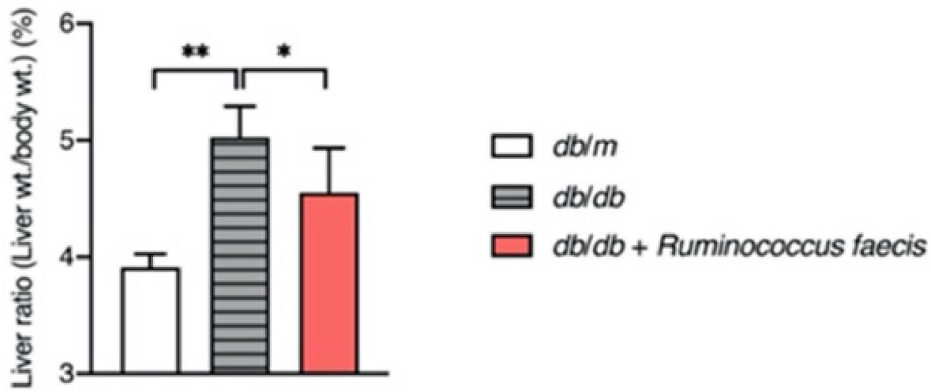
도면3b



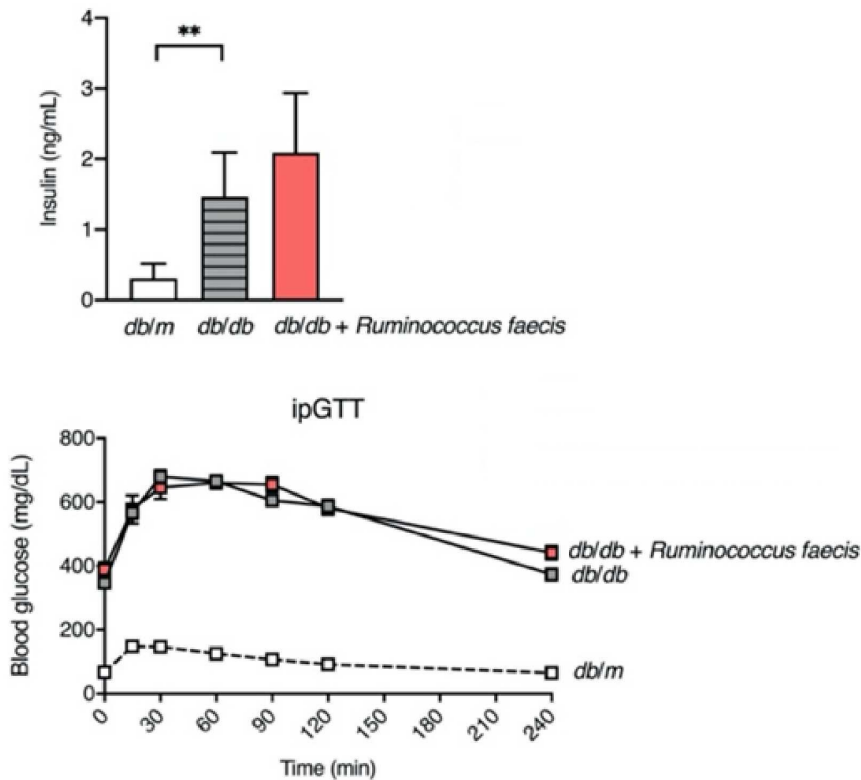
도면3c



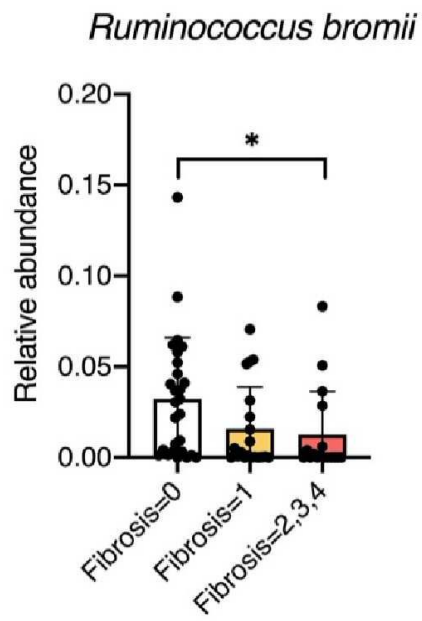
도면3d



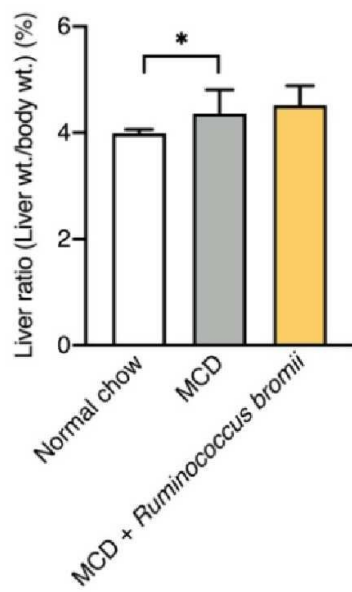
도면3e



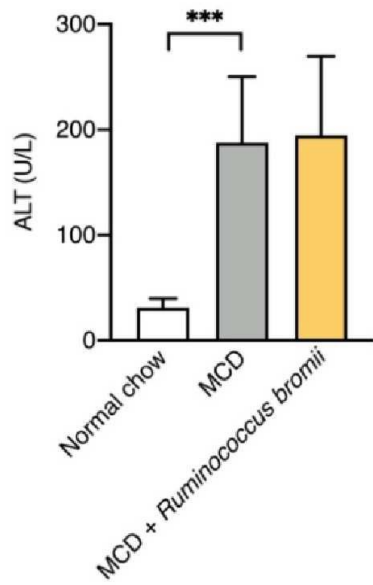
도면4a



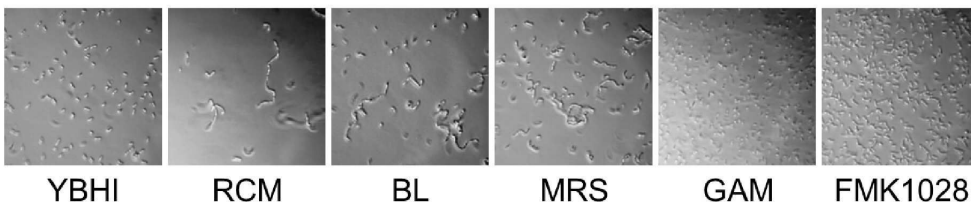
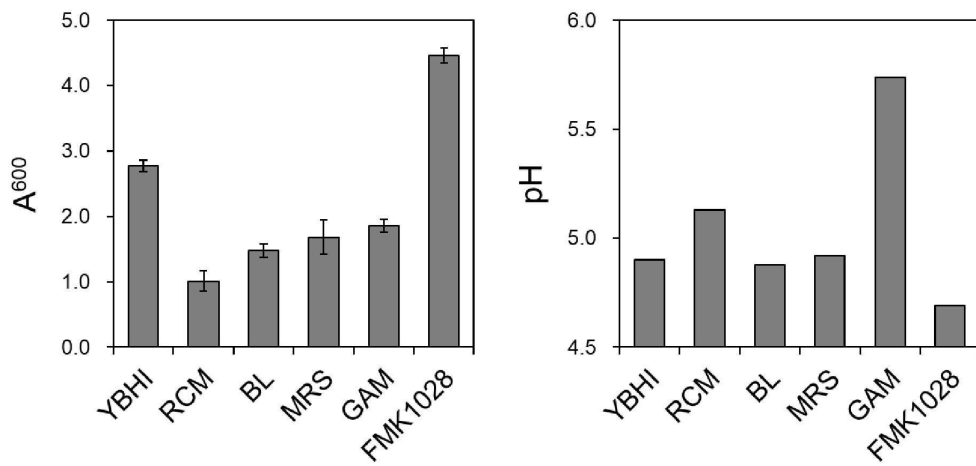
도면4b



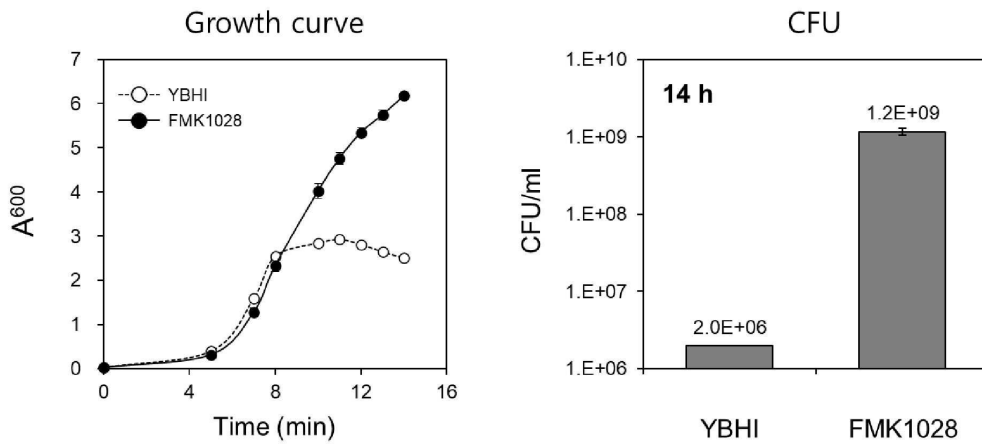
도면4c



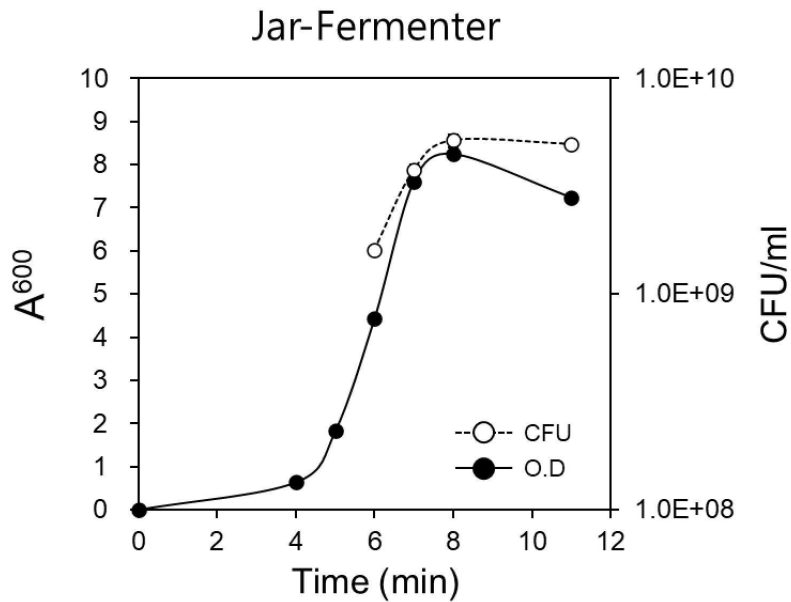
도면5a



도면5b



도면5c



서열목록

- <110> KoBioLabs, Inc.
- <120> Composition for Preventing, Improving, or Treating Liver Injury
- <130> DPP20202231KR
- <150> KR 10-2019-0092689
- <151> 2019-07-30
- <150> KR 10-2020-0087105
- <151> 2020-07-14
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> (Synthetic) Cyclophilin A primer FWD
 <400> 1
 tggagagcac caagacagac a 21
 <210> 2
 <211> 19

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> (Synthetic) Cyclophilin A primer RVS
 <400> 2
 tgccggagtc gacaatgat 19
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> (Synthetic) Coll1a1 primer FWD
 <400> 3
 acctgtgtgt tcctactca 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> (Synthetic) Coll1a1 primer RVS

 <400> 4
 gactgttgcc ttcgcctctg 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> (Synthetic) Timp1 primer FWD
 <400> 5

tgcttgcctgc gattacaacc	20
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> (Synthetic) Timp1 primer RVS	
<400> 6	
ggaatgggtgt ggtgatgcat gg	22
<	
210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> (Synthetic) a-SMA primer FWD	
<400> 7	
ggctctgggc tctgtaagg	19
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> (Synthetic) a-SMA primer RVS	
<400> 8	
ctcttgctct gggcttcac	20