(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005616
(43) 공개일자 2024년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2015.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0183730(분할)
(22) 출원일자 2023년12월15일
심사청구일자 2023년12월15일
(62) 원출원 특허 10-2021-0032544
원출원일자 2021년03월12일
심사청구일자 2021년03월12일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
주식회사 종근당바이오
서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)
(72) 발명자
석기태
강원특별자치도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동, 원주반곡아이파크)
이나영
강원특별자치도 춘천시 안마산로 133, 108동 3106호 (퇴계동, e편한세상 춘천 한숲시티)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본, 특허법인본

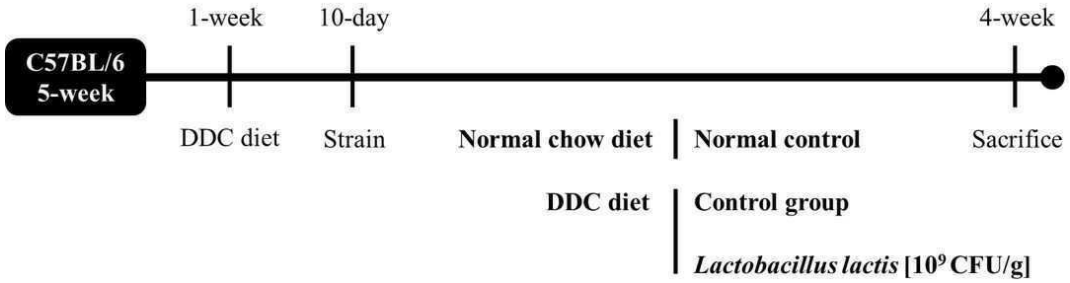
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 간섬유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 43/00 (2018.01)
(72) 발명자
김병국
서울특별시 양천구 신정로7길 76, 202동 1207호(신정동, 푸른마을2단지아파트)
정현채
경기도 군포시 대야1로22번길 8-1, 201동 509호(대야미동, 건양타워1차아파트)
윤상준
강원특별자치도 춘천시 삭주로 49-9, 304호(교동)
최예린
강원특별자치도 춘천시 성심로 35번길 7
김형섭
강원특별자치도 춘천시 효제길 37번길 7, 302호(효자동, 동영주택)
굽타 하리프리야
강원특별자치도 춘천시 삭주로70번길 16-1, 105호(교동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345321142
과제번호 2020R1A6A1A03043026
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명 소화기연구소
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한림대학교 산학협력단
연구기간 2020.06.01 ~ 2029.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711103487
과제번호 2018M3A9F3020956
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 미생물 제어 및 응용 원천기술개발
연구과제명 장내 마이크로바이옴을 활용한 만성간질환 치료용 파마바이오틱스 후보제 발굴 및 효능검증
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한림대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

마우스에 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘 또는 사염화탄소를 투입하여, Col1a, Timp1 및 TGF-β의 발현 수준을 증가시키는 단계; 및

마우스에 수탁번호 KCTC 14149BP 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 섭취시키는 단계;를 포함하는, Col1a, Timp1 및 TGF-β의 발현 수준을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

사염화탄소는 복강 주사를 통해 마우스에 투입되는 것인, Col1a, Timp1 및 TGF-β의 발현 수준을 감소시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘은 섭취를 통해 마우스에 투입되는 것인, Col1a, Timp1 및 TGF-β의 발현 수준을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 간섬유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체면역세포의 약 60%가 장에 존재하기 때문에 장이 건강해야 신체가 건강하다. 현대인들의 불규칙한 생활습관과 스트레스 등으로 장내세균의 불균형이 발생하여 장 건강에 영향을 준다. 이때 유산균은 장내 유익균 증가와 유해균 감소에 도움을 주어 장내 미생물총을 조절한다. 장내 미생물은 건강과 질병에 중요한 역할을 한다. 장내 미생물총의 조절을 통하여 유익균의 비율을 높여서 면역 조절 활성효과, 공복 혈당 감소, 병원성 박테리아 부착 및 침입방지 등 다양한 질환들의 개선을 위해 사용될 수 있다[Hallajzadeh J, Eslami RD, Tanomand A. Effect of Lactobacillus delbrueckii Subsp. lactis PTCC1057 on Serum Glucose, Fetuin-A, and Sestrin 3 Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. Probiotics Antimicrob Proteins 2020, Yu Q, Zhu L, Wang Z, Li P, Yang Q. Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis R4 prevents Salmonella typhimurium SL1344-induced damage to tight junctions and adherens junctions. J Microbiol 2012; 50:613-7].

[0003] 유산균은 위와 장에서 다양한 메커니즘을 통해 장내에 군집을 형성하여 살 수 있다. 장-간 축에 의해 유산균의 유익한 효과는 간경화, 비알코올성 지방간 질환 및 알코올성 간질환의 간 기능 개선으로 확장될 수 있기 때문에 유산균 투여를 통해 장내 환경 및 간질환을 개선할 수 있다[Sharma V, Garg S, Aggarwal S. Probiotics and liver disease. Perm J 2013; 17:62-7].

[0004] 간섬유증은 간에 섬유가 증가한 상태로 대부분 만성간질환에서 발생하는 콜라겐을 포함한 세포 외 기질 단백질의 과도한 축적으로 일어난다. 진행성 간섬유증은 간경변, 간부전 및 문맥 고혈압을 유발하며 간이식이 필요할 수도 있다[Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115:209-18].

[0005] 간 담즙 정체성 질환은 심각한 사망률과 관련된 만성 간질환의 관련 원인을 나타낸다. 이에 대한 치료 전략을 이해하고 해결하는 것이 병리학적 특징을 요약하는 생체 내 모델을 개발하는데 필수적이다. DDC로 명명된 3,5-

디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘의 공급은 담즙정체성 질환의 생체모델로 섬유화와 염증성 침윤과 같은 인간 담즙 정체성 질환의 주요 병리학적 특징이 재현된다[Pose E, Sancho-Bru P, Coll M. 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Diet: A Rodent Model in Cholestasis Research. Methods Mol Biol 2019; 1981:249-57].

[0006] CCl_4로 명명된 사염화탄소의 전형적인 독성은 간경변과 간섬유증을 유발하는 대표적인 물질이다. 이로 유발된 간섬유증은 만성 간병변의 결과로 간암종으로 진행될 수 있다. 사염화탄소는 흡입, 구강 또는 위내 투여, 피하주사 및 복강내 주사가 가능하고 음용수에 타서 복합 투여하면 더 빨리 유도할 수 있다[Dong S, Chen QL, Song YN, Sun Y, Wei B, Li XY, et al. Mechanisms of CCl4-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. J Toxicol Sci 2016; 41:561-72].

[0007] 항생제는 우리 몸에서 유해균을 없애는 일을 한다. 그러나 항생제의 과용과 남용은 알레르기 반응, 발진, 설사 등의 부작용과 지속적으로 낮은 농도의 항생제에 노출되면 약효가 저하하는 내성이 생긴다. 동물 사육에서 유해균 감염을 막기 위해 항생제를 사용하면 우유, 계란, 육류와 같은 항생제 잔여물이 남을 수 있다. 이러한 잔여물은 항생제 내성 박테리아의 면역 병리학적으로 다양한 부작용을 일으킬 수 있다[Bacanli M, Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food. Food Chem Toxicol 2019; 125:462-6].

[0008] 생균제는 유해균에 대한 저항성 증진을 통한 가축의 생산성 증진을 위해 가축에 급여하기 위한 살아있는 젖산균으로서 항생제의 대체제로 사용될 수 있으며, 사람의 체내에서도 유해균을 조절하는 역할을 할 수 있다. 하지만 이러한 생균제의 이로운 특성을 이용하기 위해서는 인간 및 동물의 소화관에서 미생물의 효과를 확인하는 것이 중요하다. 이와 같이 장내 미생물총을 복원하거나 개선하는 생균제를 활용하여 현대 질병의 치료제 개발을 기대해 볼 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주가 간섬유화을 개선하고 장내 미생물총 조절로 인한 면역 증진효과가 있어 후보 생균제를 간섬유증 치료제로 제안하고자 하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 14149BP 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 발효된 원유로부터 분리된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 일 실시예에 따라, 수탁번호 KCTC 14149BP 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이 제공된다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품일 수 있다.

[0016] 한편, 본 발명의 다른 일 실시예에 따라, 수탁번호 KCTC 14149BP 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물이 제공된다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 건강식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림류, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis CKDB001*) 균주를 간섬유증 유도 마우스에 투여하였을 경우 간 조직에서 섬유화 유전자 발현을 저하시키고 병리학적으로 간섬유화로부터 보호 및 억제시키는 효과를 가지므로 간섬유증에 대한 예방과 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 DDC 식이 섭취로 유도한 간섬유증 마우스 모델 모식도이다.

도 2는 DDC 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 체중 및 간 무게 보호효과 비교도이다.

도 3은 DDC 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 섬유화 유전자 발현 억제 측정도이다.

도 4는 DDC 식이 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 섬유화 진행 억제 병리학적 비교도이다.

도 5는 CCl_4 주사로 유도한 간섬유증 마우스 모델 모식도이다.

도 6은 CCl_4 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 체중 및 간 무게 보호효과 비교도이다.

도 7은 CCl_4 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 섬유화 유전자 발현 억제 측정도이다.

도 8은 CCl_4 모델에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 섬유화 진행 억제 병리학적 비교도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따라, 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다. 본 발명에 있어서, 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)"에 수탁번호 "KCTC 14149BP"로 기탁된 것이다. 이하에서 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis CKDB001*)는 *L. lactis* CKDB001과 혼용하여 사용될 수 있다.

[0022] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 발효된 원유로부터 분리된 것일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 1그람(g) 당 1.10E+11 집락형성단위(CFU)의 상기 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 분말의 생균제를 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따라, 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이 제공된다.

[0025] 이때, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따라, 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물이 제공된다.

[0027] 본 발명의 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 건강기능식품 및 건강식품 조성물로 사용하는

경우 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 모두 포함한다.

[0028] 본 발명에 따른 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 포함하는 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 식품 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로 건강기능식품 및 건강식품 조성물 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양의 범위 이하일 수 있다.

[0029] 본 발명의 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0030] 상기 외에는 본 발명의 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 함유하는 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0031] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] 실시예 1. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 분리

[0034] 1. 생균제 미생물 후보의 특성 확인 및 동정

[0035] 본 발명의 생균제 미생물은 발효된 원유에서 분리되었고 ㈜종근당 바이오에서 제공받았다. 생균제 유산균은 그람 양성이다. 다음 기준에 따라 특성이 확인되었다.

[0036] 1) *In vitro* 안전성 측정

[0037] 2) 구강에서 위를 거쳐 장까지 이동하는 동안의 안정성

[0038] 3) 항생제 감수성

[0039] 이러한 특성을 측정한 결과는 아래 표 1과 같이 정리되었다.

표 1

[0040]

락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 표현형 특성			
가) 위장관 환경 안정성 (생존율)			
내산성		내담즙성	
95 %		98 %	
나) 유해 효소 활성			
Gelatinase	Urease	Hemolysis	
음성	음성	음성	
다) 항생제 감수성 (μg/ml)			
Ampicillin	0.19	Vancomycin	0.5

Gentamicin	1	Erythromycin	0.047
Clindamycin	0.094	Tetracycline	0.75
Streptomycin	4	Kanamycin	16
Chloramphenicol	4		
라) HT-29 세포 (장세포) 부착능			
152 % (대조군 대비)			

[0041] 2. 선택된 균주의 동정가) 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 동정

[0042] 이 균주는 전장유전체분석을 통해 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*로 식별되었다. 분리된 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 생균제로 만들어지기 위해, 생물학적으로 순수한 배양으로 유지되었다.

[0043] 나) 동정된 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주에 대한 생화학적 테스트

[0044] 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 그람 염색 및 현미경 관찰로 동정되었다.

[0046] 실시예 2. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 조성물의 준비

[0047] 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 ㈜종근당바이오에서 공급받았다. 정제된 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 동결건조 시킨 미세분말 형태로 전달받았다.

[0048] 1. 동결건조 시킨 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 미세분말 형태로 준비

[0049] 2. 위산에 약한 생존율을 높이기 위한 ㈜종근당바이오에서 특수 코팅처리로 준비

[0050] 3. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주는 10^9 CFU/g의 농도로 증류수에 현탁 하여 주 2회 공급하였다.

[0052] 실시예 3. 간섬유증 유도 마우스 모델 유도 및 분석방법

[0053] 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두열바이오텍(서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 22±2℃ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행 동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였고 매일 관찰하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적응기간을 포함하였고 이 기간 동안에는 1주일 동안 정상적인 사료를 제공하였다. 실험동물들은 인도주의적 치료를 받았으며 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대학 동물실험 및 사용위원회(2019-4)의 승인을 받았다.

[0055] 1. 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘 모델

[0056] 식이 섭취로 간섬유증 모델을 유도하기 위해 0.1%의 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘(이하 줄여서 DDC) 혼합사료를 두열바이오텍에서 제조하여 3주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 간섬유증 모델 마우스는 3개의 그룹으로 분류하였다(도 1): 정상(n=6), 질병유도식이(n=6), 그리고 질병유도식이와 함께 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취(n=6).

[0058] 2. 사염화탄소 모델

[0059] 복강주사로 간섬유증 모델을 유도하기 위해 옥수수기름(시그마, 미국)과 사염화탄소(이하 줄여서 CCl_4)(쇼와, 일본) 4:1 희석하여 10주 동안 주 2회씩 복강 주입하여 간섬유증 모델을 확립하였다. 간섬유증 모델 마우스는 3개의 그룹으로 분류하였다(도 5): 정상(n=6), 질병유도주사(n=6), 그리고 질병유도주사와 함께 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취(n=6).

[0061] 3. 처리방법

[0062] 각 동물모델에 따라 4주 및 11주 후 흡입 마취제 투여(에어래인액, 미국)를 통해 동물을 희생시켰다. 체중과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간조직을 분리했다. 전혈(800μL) 샘플을 원심 분리 (19,000 g, 5분)하여 혈청을 분리하였다. 간 조직은 빠르게 분리하여 80℃에 보관했다.

[0064] 4. 병리학분석

[0065] 분리된 간 조직을 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 매립시키고, 조직 섹션을 헤마톡실린에오신(H&E), 마손트라이크롬(MT), 및 시리우스레드(SR) 염색을 하였다. 간경화의 분석을 위해 사용되는 병리학적 분석인 그레이딩(염증정도, 단편적 또는 가교 괴사[등급0: 없음, 1: 괴사 없는 문맥염증 또는 소엽 염증, 2: 경미한 문맥 주위 염증 및 단편 괴사 또는 국소 간세포 괴사, 3: 중등도 문맥 주의 염증 및 단편 괴사 또는 심한 초점 세포 손상, 4: 심한 문맥 주위 염증 및 단편 괴사 또는 가교 괴사])과 스테이징(섬유증정도[등급0: 섬유증 없음, 1: 확장된 섬유성 문맥관, 2: 문맥 주위 섬유증 또는 문맥에서 문맥 중격까지, 구조적 왜곡 없음, 3: 구조적 왜곡이 있는 섬유증 연결, 명백한 간경변 없음, 4: 간경변 가능성 있음 또는 확정])를 평가하였다.

[0067] 5. 섬유화인자에 대한 간 조직 분석

[0068] 조직으로부터의 mRNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트(인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트(어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 mRNA (2 μg)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버셜 마스터 믹스(뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하였다.

[0070] 6. 데이터 분석

[0071] 연속 변수는 평균 및 표준편차로 분석하였다. 체중, 섬유화인자 및 조직학 분석을 위해 One-way ANOVA, the Kruskal-Wallis test, 그리고 independent sample T-test를 수행했다. 추가 통계 분석을 위해 데이터를 NOREVA (http://idrb.zju.edu.cn/noreva)의 MSTUS55를 기반으로 하였다. 계층 적 군집 분석(HCA)을 수행하고 사후 테스트를 통한 분산분석(ANOVA)을 다중 실험 뷰어(MeV)를 사용하여 수행하였다. 유의확률 P값 <0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주된다. 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어(ver. 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0073] 실시예 4. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 간섬유증 유도 마우스 모델에서 간섬유화 억제 능력 측정

[0074] 1. 간섬유증 유도 마우스 모델에서의 간섬유화 인자 억제효과

[0076] 간섬유증 질환은 섬유화의 진행이 가장 큰 특징이다. 섬유화의 원인으로는 TGF-β의 과발현과 간성상 세포의 비정상적인 활성 등 다양하다. 아직 정확한 원인에 대해 밝혀지지 않았지만, 간섬유화에서 대표적인 섬유화 인자(Timp1, Col1a, 및 TGF-β)들은 질환의 평가에서 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 qPCR을 통해 간섬유증 유도 모델에서 각 섬유화 인자들의 발현을 비교 분석하였다. 간섬유증의 유도로 인하여 크게 증가된 Timp1, Col1a, 및 TGF-β의 발현이 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 섭취함에 따라 유의적으로 감소되는 것을 확인했다.

[0078] 가) DDC모델

[0079] 간섬유증 유도 식이를 3주동안 공급하면서 정상 식이군, 간섬유증 유도군, 그리고 간섬유증 유도군에 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 투여하였다. 간섬유증을 유도하면서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 투여했을 때 간경화에서 대표적인 섬유화인자인 Col1a, Timp1 및 TGF-β의 발현

이 현저하게 감소하였다. Colla의 경우 간섬유증을 유도한 대조군 22.2±4.8에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 투여 시 12±2.4(p <0.05)로, Timp1의 경우 53.1±7.6에서 32.8±1.9(p <0.05), 그리고 TGF-β의 경우 8.1±1.7에서 5.1±0.7(p <0.05)로 감소시켰다(도 3 참조).

[0081] 나) CCl_4 모델

[0082] 간섬유증 유도 주사를 10주 동안 복강 주사하면서 정상 식이군, 간섬유증 유도군, 그리고 간섬유증 유도군에 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주를 투여하였다. Colla의 경우 간섬유증을 유도한 대조군 29.3±5.9에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 투여 시 16.9±5.5(p <0.05)로, Timp1의 경우 5.2±1.4에서 2.2±1.2(p <0.05), 그리고 TGF-β의 경우 2.2±0.5에서 1.6±0.6(p <0.05)로 감소시켰다(도 7 참조).

[0084] 3. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주의 간섬유화 유도 마우스 모델에서의 간경화 보호효과

[0085] 간경화의 간섬유화를 보다 확실하게 확인하기 위하여 병리학적 분석을 수행하였다. 간 조직은 헤마톡실린에오신, 마손트라이크롬, 및 시리우스레드 염색을 통해 수행했다. 간섬유증 유도 모델에서 섬유화가 증가되어 그레에딩, 스테이징 그리고 시리우스레드 측정면적이 정상 대조군에 비해 크게 증가하였다. 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주섭취를 통해 증가된 그레이딩, 스테이징, 그리고 시리우스레드 측정면적을 모두 감소시켜 보호효과를 확인했다.

[0087] 가) DDC 모델

[0088] 간섬유증 모델 유도 시 시리우스레드 염색 측정면적이 43.1±5.5에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취 시 22.7±11.4(p <0.01)로 감소하였다.

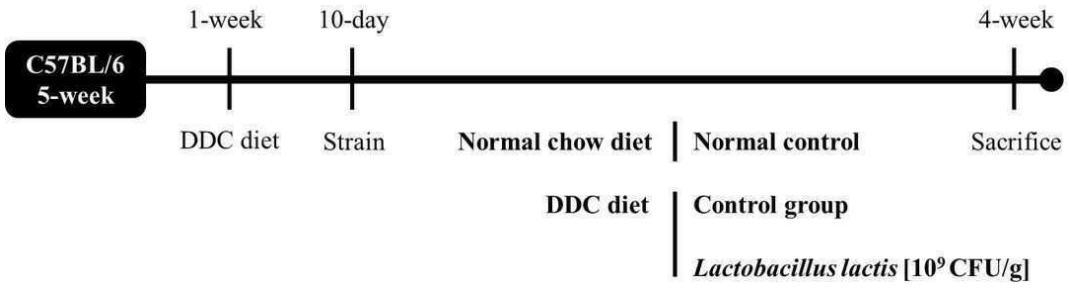
[0090] 나) CCl_4 모델

[0091] 간섬유증 모델 유도 시 그레이딩 3에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취 시 2.8±0.2로, 스테이징 3에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취 시 2.8±0.4로 감소하였다. 시리우스레드 염색 측정면적이 29.8±6에서 락토바실러스 델브루키 subsp. 락티스 CKDB001 균주 섭취 시 24±3.8로 감소하였다.

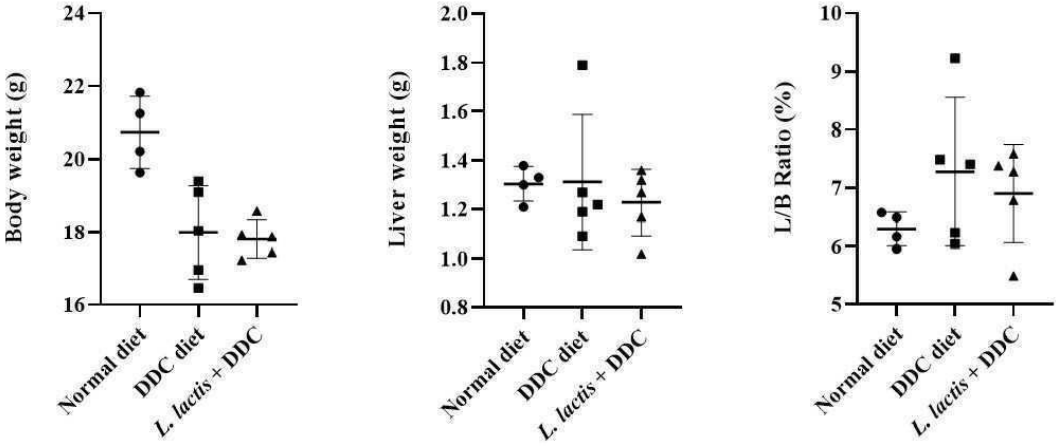
[0093] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

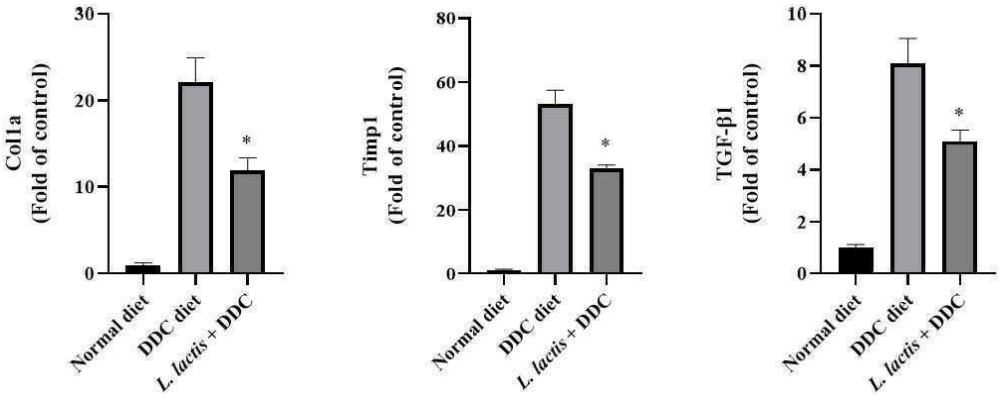
도면1



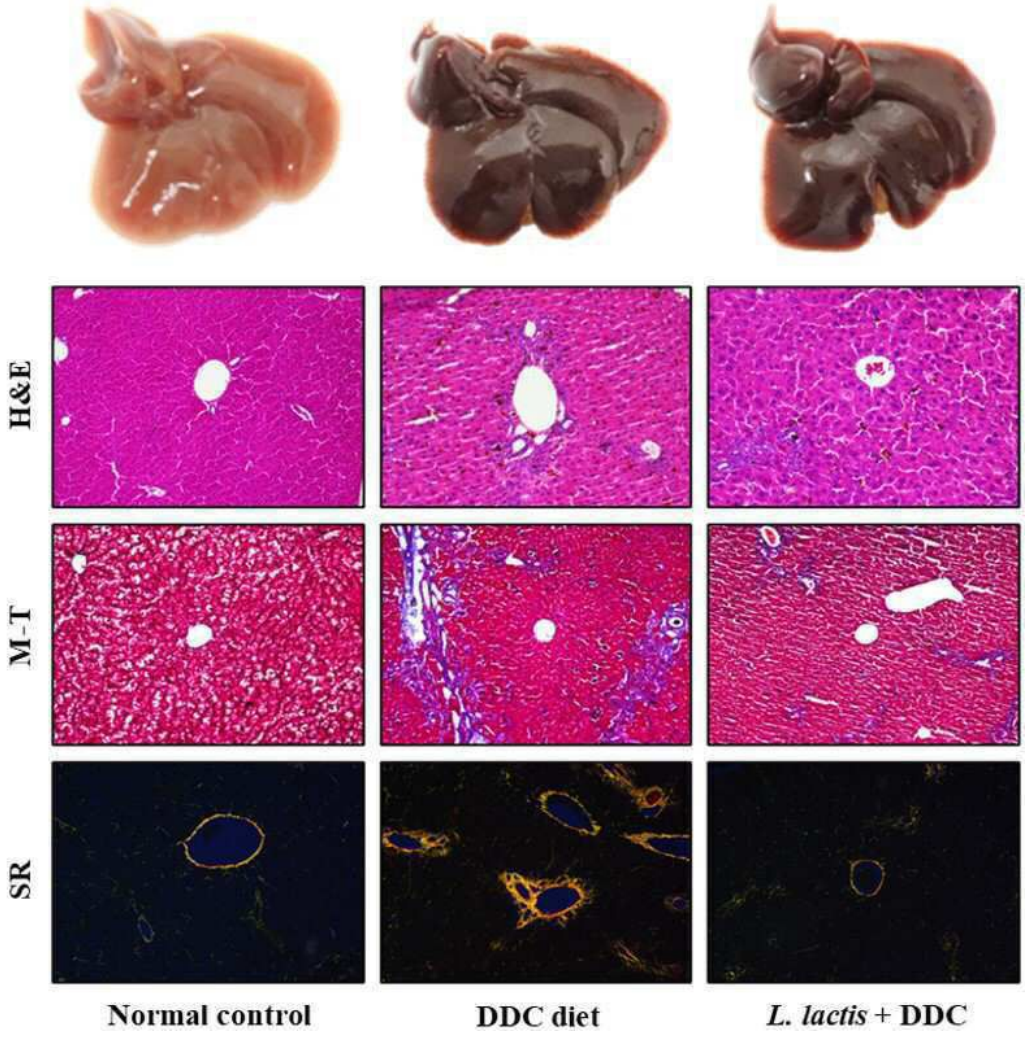
도면2


Body weight (g)
24
22
20
18
16
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC
Liver weight (g)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC
L/B Ratio (%)
10
9
8
7
6
5
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC

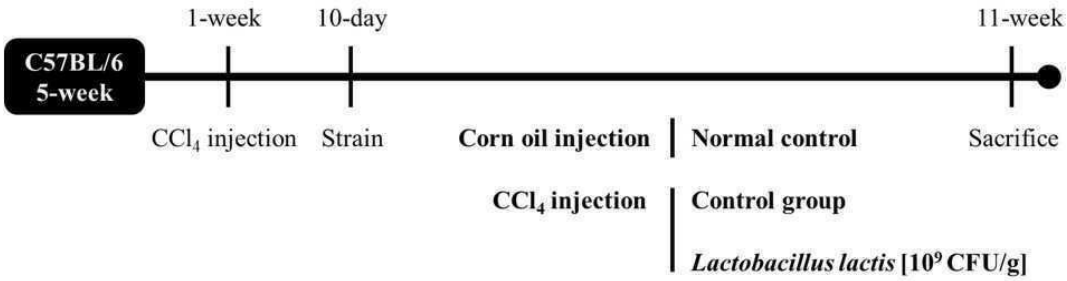
도면3


Col1a
(Fold of control)
30
20
10
0
*
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC
Timp1
(Fold of control)
80
60
40
20
0
*
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC
TGF-β1
(Fold of control)
10
8
6
4
2
0
*
Normal diet
DDC diet
L. lactis + DDC

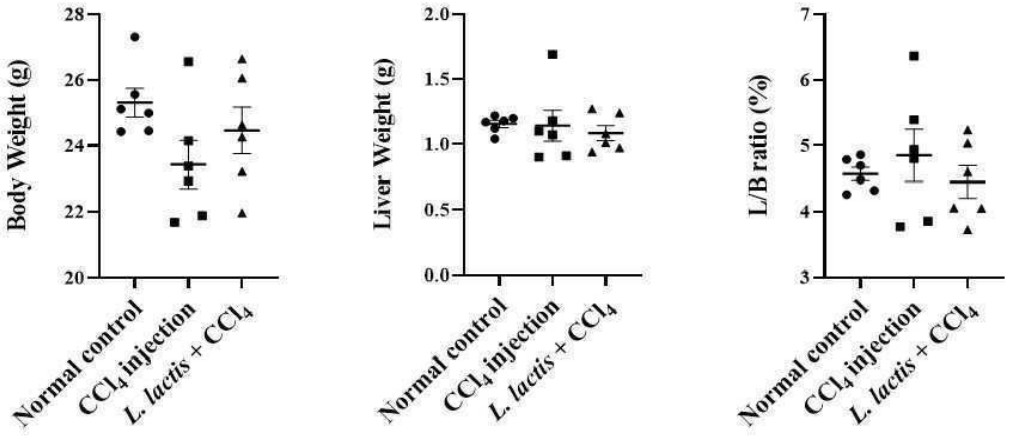
도면4


H&E
M-T
SR
Normal control
DDC diet
L. lactis + DDC

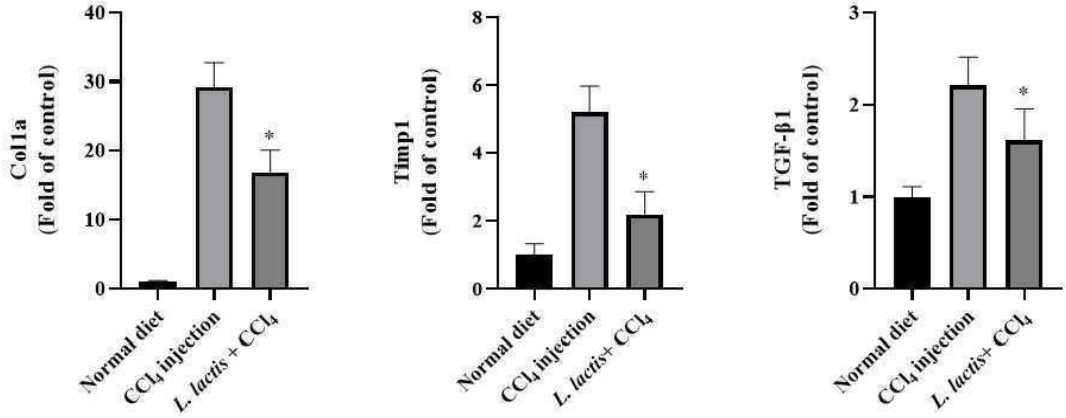
도면5


1-week
10-day
11-week
C57BL/6
5-week
CCl4 injection
Strain
Corn oil injection
Normal control
Sacrifice
CCl4 injection
Control group
Lactobacillus lactis [10^9 CFU/g]

도면6


Body Weight (g)
28
26
24
22
20
Normal control
CCl4 injection
L. lactis + CCl4
Liver Weight (g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Normal control
CCl4 injection
L. lactis + CCl4
L/B ratio (%)
7
6
5
4
3
Normal control
CCl4 injection
L. lactis + CCl4

도면7


Col1a
(Fold of control)
40
30
20
10
0
*
Normal diet
CCl4 injection
L. lactis + CCl4
Timp1
(Fold of control)
8
6
4
2
0
*
Normal diet
CCl4 injection
L. lactis+ CCl4
TGF-β1
(Fold of control)
3
2
1
0
*
Normal diet
CCl4 injection
L. lactis+ CCl4

도면8

