

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0126824

(43) 공개일자 2022년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 35/74* (2015.01) *A23L 33/135* (2016.01)*A61P 1/16* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 35/74* (2013.01)*A23L 33/135* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0030524

(22) 출원일자 2021년03월09일

심사청구일자 2021년03월09일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

석기태

강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동, 원주반곡아이파크)

이나영

강원도 춘천시 안마산로 133, 108동 3106호(퇴계동, e편한세상 춘천 한숲시티)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인본

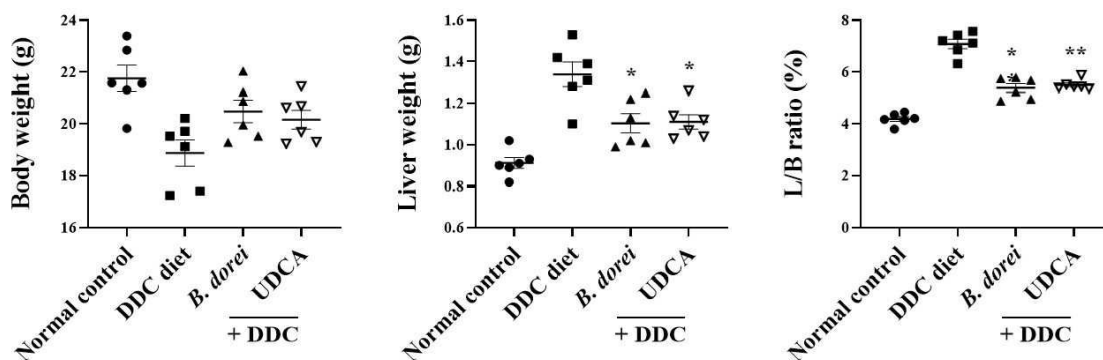
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간염유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

## (57) 요약

박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간염유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 간염유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 간염유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

## 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A61P 1/16** (2018.01)

**A61P 43/00** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/30** (2013.01)

(72) 발명자

**김병용**

경기도 안양시 만안구 삼봉로 61, 101동 905호(박달동, 금호타운)

**윤상준**

강원도 춘천시 삭주로 49-9, 304호(교동)

**최예린**

강원도 춘천시 성심로 35번길 7

**김형섭**

강원도 춘천시 효제길 37번길 7, 302호(효자동, 동영주택)

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                    |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

박테로이데스 도레이 균주를 유효성분으로 포함하는 간섭유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 박테로이데스 도레이 균주는 발효된 원유로부터 분리된 것인, 간섭유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 박테로이데스 도레이 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것인, 간섭유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품인 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 박테로이데스 도레이 균주는 발효된 원유로부터 분리된 것인, 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 7

제4항에 있어서,

상기 박테로이데스 도레이 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것인, 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 8

박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 건강식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림류, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나인, 간섭유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 간섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 간섬유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[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. 이렇듯 장내미생물은 건강과 질병에 중요한 역할을 한다. 이렇게 장내 미생물총을 조절을 통하여 유익균의 비율을 높여서 면역 조절 활성화효과, 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] 장내 미생물총의 구성과 기능에 대한 불균형은 위장 염증 및 대사상태에서 신경계, 심혈관계, 호흡계 질환에 이르는 만성질환과 관련이 있다. 현재 미생물군 유전체와 숙주 상호작용에 대한 지식을 개선하는 것과 병행하여 미생물군 유전체를 이해하는데 상당한 노력이 집중되고 있다. 이러한 노력은 궁극적으로 건강을 회복하거나 질병을 예방하기 위한 수단으로 교란된 인간 미생물 생태계를 재건하는 효과적인 접근 방식을 개발하는 것을 목표로 한다. 간섬유증은 간에 섬유가 증가한 상태로 대부분 만성 간질환에서 발생하는 콜라겐을 포함한 세포 외 기질 단백질의 과도한 축적으로 일어난다. 진행성 간섬유증은 간경변, 간부전 및 문맥 고혈압을 유발하며 간이식이 필요할 수도 있다[Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest 2005; 115:209-18].

[0004] 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].

[0005] TAA로 명명된 티오아세트아미드는 티오노-설파(thiono-sulfur) 함유 화합물로 동물실험에서 간섬유화를 유도하여 잠재적인 항섬유증 약물의 기본 메커니즘과 치료효과를 조사하는데 널리 사용한다. TAA 자체는 간독성이 아니지만 반응성 대사산물이 단백질과 지질에 공유 결합하여 산화 스트레스와 중심엽 괴사를 유발한다[Delire B, Starkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. J Clin Transl Hepatol 2015; 3:53-66].

[0006] 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 막기위해 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].

[0007] 생균제는 유해균에 대한 저항성 증진을 통한 가축의 생산성 증진을 위해 가축에 급여하기 위한 살아있는 젖산균 항생제의 대체제로 사용될 수 있어, 사람의 체내에서도 유해균을 조절하는 역할을 할 수 있다. 이러한 생균제의 이로운 특성을 이용하기 위해 인간 및 동물의 소화관에서 미생물을 효과를 확인하는 것이 중요하다. 장내 미생물총을 복원하거나 개선하는 생균제는 현대 질병의 치료제 개발을 기대해 볼 수 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 박테로이데스 도레이 균주가 간섬유화를 개선하고 장내 미생물총 조절로 인한 면역 증진효과가 있어

후보 균주를 간섭유증 치료제로 제안하고자 하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 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

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 박테로이데스 도레이 균주를 유효성분으로 포함하는 간섭유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 박테로이데스 도레이 균주는 발효된 원유로부터 분리된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 박테로이데스 도레이 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 일 실시예에 따라, 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품일 수 있다.

[0015] 한편, 본 발명의 다른 일 실시예에 따라, 상기 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물이 제공된다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 건강식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림류, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 어느 하나일 수 있다.

### 발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 분리된 박테로이데스 도레이(*Bacteroides dorei*) 균주는 간섭유증 유도 마우스 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 인해 장내 미생물총이 조절되어 섬유화 정도를 개선시키는 효과가 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 박테로이데스 도레이(*Bacteroides dorei*) 균주를 간섭유증 유도 마우스에 투여하였을 경우 장내미생물총에 변형을 주고 이는 장-간축에 의해 간 조직에서 섬유화 유전자 발현을 저하시키고 병리학적으로 간섬유화로부터 보호 및 억제시키는 효과를 가지므로 간섭유증에 대한 예방과 치료에 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 DDC 식이 섭취로 유도한 간섭유증 마우스 모델의 모식도이다.

도 2는 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주의 체중 및 간 무게 보호효과의 비교도이다.

도 3은 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주의 혈액에서 총빌리루빈 감소의 측정도이다.

도 4는 DDC 모델 간에서 *B. dorei* 균주의 섬유화 유전자 발현 억제의 비교도이다.

도 5는 DDC 모델 간성상 세포에서 *B. dorei* 균주의 섬유화 유전자 발현 억제의 비교도이다.

도 6은 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주의 섬유화 진행 억제의 병리학적 비교도이다.

도 7은 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 문수준에서 장내미생물총 변화의 비교도이다.

도 8은 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 종수준에서 장내미생물총 변화의 비교도이다.

도 9는 DDC 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 인한 장내미생물 주 좌표 분석과 다양성을 나타낸 것이다.

도 10은 TAA 복강주사로 유도한 간섭유증 마우스 모델의 모식도이다.

도 11은 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주의 체중 및 간 무게 보호효과의 비교도이다.

도 12는 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주의 섬유화 유전자 발현 억제의 측정도이다.

도 13은 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주의 섬유화 진행 억제의 병리학적 비교도이다.

도 14는 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 문수준에서 장내미생물총의 변화 비교도이다.

도 15는 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 종수준에서 장내미생물총의 변화 비교도이다.

도 16는 TAA 모델에서 *B. dorei* 균주 섭취로 인한 장내미생물 주 좌표 분석과 다양성의 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, 박테로이데스 도레이(*Lactobacillus lactis* CKDB001) 균주를 유효성분으로 포함하는 간섭유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0022] 본 발명 명세서 전체에 걸쳐서 상기 박테로이데스 도레이(*Bacteroides dorei*)는 *B. dorei* 균주와 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0023] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 박테로이데스 도레이 균주는 발효된 원료로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 박테로이데스 도레이(*Bacteroides dorei*) 균주를 배양하여  $10^9$  CFU/mL의 농도로 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따라, 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이 제공된다.
- [0026] 이때, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따라, 박테로이데스 도레이 균주를 포함하는 간섭유증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물이 제공된다.
- [0028] 본 발명의 박테로이데스 도레이 균주를 건강기능식품 및 건강식품 조성물로 사용하는 경우 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 박테로이데스 도레이 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.
- [0029] 본 발명에 따른 박테로이데스 도레이 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. 박테로이데스 도레이 균주의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 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.
- [0030] 본 발명의 박테로이데스 도레이 균주를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 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 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 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 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0031] 상기 외에는 본 발명의 박테로이데스 도레이 균주를 함유하는 건강기능식품 및 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0032] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명

하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034] 실시예 1. BACTEROIDES DOREI의 분리 및 준비

[0035] 1. 생균제 미생물 후보의 특성확인 및 동정

[0036] 본 발명은 분리된 박테로이데스 도레이(*Bacteroides dorei*) 균주를 전장유전체분석을 통해 식별하였고, (주)천랩에서 제공받았다.

[0038] 2. *Bacteroides dorei* 조성물의 준비

[0039] *Bacteroides dorei* 균주는 (주)천랩에서 공급받았다. 박테로이데스 도레이를 고체 RCM 배지에 도말하여, Jar(미쓰비시가스화학, 일본)에 혐기조성팩과 인디케이터를 넣고 37℃에서 48시간 배양한다. 배양한 *Bacteroides dorei*는  $10^9$  CFU/mL의 농도로 준비한다.

[0041] 실시예 3. 간섬유증 유도 마우스 모델 유도 및 분석방법

[0042] 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두얼바이오텍(서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 22℃±2℃ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행동안 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.

[0044] 1. 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘 모델

[0045] 식이 섭취로 간섬유증 모델을 유도하기 위해 0.1%의 3,5-디에톡시카르보닐-1,4-디하이드로콜리딘(이하 줄여서 DDC) 혼합사료를 두얼바이오텍에서 제조하여 3주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 간섬유증 모델 마우스는 4개의 그룹으로 분류하였다(도 1): 정상(n=10), 질병유도(n=10), 질병유도와 함께 *B. dorei* 투여(n=10), 그리고 질병유도와 함께 우르소데옥시콜산 투여(n=10).

[0047] 2. 티오아세트아미드 모델

[0048] 복강주사로 간섬유증 모델을 유도하기 위해 티오아세트아미드(이하 줄여서 TAA)(시그마, 미국)과 생리식염수(제일제약, 한국) 희석하여 6주동안 주 3회씩 농도를 높이면서 복강 주입하여(1차 용량 50mg/kg, 2차 용량: 100mg/kg, 3차~6차 용량: 200mg/kg, 이후 모든 용량: 300mg/kg) 간섬유증 모델을 확립하였다. 간섬유증 모델 마우스는 4개의 그룹으로 분류하였다(도 10): 정상(n=10), 질병유도(n=10), 질병유도와 함께 *B. dorei* 투여(n=10), 그리고 질병유도와 함께 우르소데옥시콜산(대웅제약, 한국) 투여(n=10).

[0050] 3. 처리방법

[0051] 각 동물모델에 따라 4주 및 11주 후 흡입 마취제 투여(에어라인액, 미국)를 통해 동물을 희생시켰다. 체중과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간조직을 분리했다. 전혈(800 µL) 샘플을 원심 분리 (19,000 g, 5분)하여 혈청을 분리하였다. 간 조직은 빠르게 분리하여 80℃에 보관했다.

[0053] 4. 병리학분석

[0054] 분리된 간조직을 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 매립시키고, 조직 섹션을 헤마톡실린에오신(H&E), 마손

트라이크롬(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 문맥주위 염증 및 단편 괴사 또는 국소 간세포 괴사, 3: 중등도 문맥 주의 염증 및 단편 괴사 또는 심한 초점 세포손상, 4: 심한 문맥주위 염증 및 단편 괴사 또는 가교 괴사])과 스테이징(섬유증정도[등급0: 섬유증 없음, 1: 확장된 섬유성 문맥관, 2" 문맥주위 섬유증 또는 문맥에서 문맥 중격까지, 구조적 왜곡 없음, 3: 구조적 왜곡이 있는 섬유증 연결, 명백한 간경변 없음, 4: 간경변 가능성 있음 또는 확정])를 평가하였습니다.

#### [0056] 5. 섬유화인자에 대한 간 조직 분석

[0057] 조직으로부터의 mRNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트 (인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트 (어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 mRNA (2  $\mu$ g)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버설 마스터 믹스(뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하였다.

#### [0059] 6. 대변 미생물 분석

[0060] 메타제노믹 DNA는 QIAamp 스톨 키트(큐아젠, 독일)를 사용하여 추출하고 박테리아 16S rRNA 유전자의 V3 - V4 영역의 증폭은 바코드 범용 프라이머를 사용하여 수행하였다. 마이크로바이옴 프로파일링은 EzBioCloud(천랩, 한국)의 16S 기반 미생물 분류학적 프로파일링 플랫폼을 사용하여 수행하였다. 모든 16S rRNA 서열은 천랩 데이터베이스에 보관되었으며 이 연구에서 얻은 16S rRNA 유전자의 염기 서열 판독은 바이오프로젝트번호 PRJNA532302로 보관된다.

#### [0062] 7. 데이터 분석

[0063] 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.

[0065] 실시예 4. *B. dorei* 군주의 간섬유증 유도 마우스 모델에서 체중 및 간 무게 보호효과 비교

[0066] 1. *B. dorei* 군주 섭취로 인한 체중 보호효과

[0067] 체중/ 간무게가 간질환에서 의미하는 것

[0068] 가) DDC 모델

[0069] DDC 혼합사료를 섭취했을 때, 정상그룹( $21.8 \pm 1.1$ )에서 질병유도그룹( $18.9 \pm 1.1$ )의 체중은 감소하였다. 하지만 *B. dorei* 군주 그룹( $19.4 \pm 1$ )과 UDCA그룹( $20.2 \pm 0.8$ )은 체중 감소로부터 보호했다(도 2 참조).

[0070] 나) TAA 모델

[0071] TAA 복강주사 시 정상그룹( $25.9 \pm 1.5$ )에서 질병유도그룹( $24.1 \pm 1.3$ )은 체중이 감소했고, *B. dorei* 군주 그룹( $22.4 \pm 1.9$ )과 UDCA그룹( $22.6 \pm 1.3$ ) 모두 감소하였다. TAA 모델에서는 체중 감소로부터 보호 효과는 없었다(도 11 참조).

[0073] 2. *B. dorei* 군주 섭취로 인한 간 무게 보호효과

[0074] 가) DDC 모델

[0075] DDC 혼합사료를 섭취했을 때, 질병유도그룹( $1.3 \pm 0.1$ )의 간 무게는 정상그룹( $0.9 \pm 0.1$ )으로부터 증가하였다. 하

지만 *B. dorei* 군주 그룹( $1.1 \pm 0.1$ )과 UDCA그룹( $1.1 \pm 0.1$ )은 간 무게 증가로부터 보호하는 효과를 나타냈다(도 2 참조).

[0077] 나) TAA 모델

[0078] TAA 복강주사를 주입하여 간섬유증을 유도하였을 때, 질병유도그룹( $1.5 \pm 0.1$ )의 간 무게는 정상그룹( $1.4 \pm 0.1$ )으로부터 증가하였다. 하지만 *B. dorei* 군주 그룹( $1.3 \pm 0.1$ )과 UDCA그룹( $1.3 \pm 0.1$ )은 간 무게 증가로부터 보호하는 효과를 나타냈다(도 11 참조).

[0080] 실시예 5. *B. dorei* 군주의 간섬유증 유도 마우스 모델 혈액에서 총빌리루빈 수치 감소 측정

[0081] DDC 모델에서 *B. dorei* 군주 섭취 시 혈액에서 총빌리루빈 수치 감소

[0082] DDC 사료 섭취 시, 정상그룹( $0.5 \pm 0.1$ )에서 간섬유증 유도그룹( $0.7 \pm 0.1$ )의 혈액에서 총빌리루빈 수치가 증가한다. *B. dorei* 군주 투여에 ( $0.5 \pm 0.1$ ) 정상군만큼 감소하는 효과를 나타낸다. UDCA 그룹( $0.6 \pm 0.1$ ) 역시 감소하였다(도 3 참조).

[0084] 실시예 6. *B. dorei* 군주의 간섬유증 유도 마우스 모델에서 간섬유화 억제능력 측정

[0085] 1. 간섬유증 유도 마우스 모델에서의 간섬유화 인자 억제효과

[0086] 간섬유증 질환은 섬유화의 진행이 가장 큰 특징이다. 섬유화의 원인으로는 TGF- $\beta$ 의 과발현과 간성상 세포의 비정상적인 활성화 등 다양하다. 아직 정확한 원인에 대해 밝혀지지 않았지만, 간섬유화에서 대표적인 섬유화 인자(Timp1, Colla, 및 TGF- $\beta$ )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, Colla, 및 TGF- $\beta$ 의 발현이 *B. dorei* 군주를 섭취함에 따라 유의적으로 감소되는 것을 확인했다.

[0088] 가) DDC모델

[0089] DDC 복합 사료로 간섬유증 유도 식이를 3주동안 공급하면서 정상 식이군, 간섬유증 유도군, 그리고 간섬유증 유도군에 각 *B. dorei* 군주, UDCA를 투여하였다. 간섬유증을 유도하면서 *B. dorei* 군주를 투여했을 때 간경화에서 대표적인 섬유화인자인 Colla, Timp1 및 TGF- $\beta$ 의 발현이 현저하게 감소하였다. Colla의 경우 간섬유증을 유도한 대조군  $15.2 \pm 7.2$ 에서 *B. dorei* 군주 투여 시  $8.6 \pm 1.4$  ( $p < 0.05$ )로, Timp1의 경우  $4.2 \pm 1.5$ 에서  $2.2 \pm 0.5$  ( $p < 0.05$ ), 그리고 TGF- $\beta$ 1의 경우  $2.9 \pm 1.0$ 에서  $2.1 \pm 0.5$  ( $p < 0.05$ )로 감소시켰다(도 4 참조). 간세포에서 간성상 세포를 분리하여 같은 섬유화 인자들의 발현을 비교분석 하였다. DDC 사료를 3주간 섭취했을 때 간성상 세포에서도 Colla( $17 \pm 0.2$ )의 발현이 *B. dorei* 군주 투여 시( $2.3 \pm 0.4$ ) ( $p < 0.01$ ) 감소하였다. Timp1도 질병유도그룹  $21.8 \pm 16.3$ 에서  $4.5 \pm 3.4$ 로 ( $p < 0.01$ ), TGF- $\beta$ 1도  $2.4 \pm 0.3$ 에서  $1.2$  ( $p < 0.01$ )로 감소하였다(도 5 참조).

[0091] 나) TAA 모델

[0092] 간섬유증 유도 주사를 10주동안 복강 주사하면서 정상 식이군, 간섬유증 유도군, 그리고 간섬유증 유도군에 각 *B. dorei* 군주, UDCA를 투여하였다. Colla의 경우 간섬유증을 유도한 대조군  $7.5 \pm 1.4$ 에서 *B. dorei* 군주 투여 시  $4.5 \pm 2.7$  ( $p < 0.05$ )로, Timp1의 경우  $8.8 \pm 1.9$ 에서  $5.5 \pm 1.6$  ( $p < 0.05$ ), 그리고 TGF- $\beta$ 의 경우  $1.7 \pm 0.4$ 에서  $1.4 \pm 0.3$ 로 감소시켰다(도 12 참조).

[0094] 2. *B. dorei* 군주의 간섬유화 유도 마우스 모델에서의 간경화 보호효과

[0095] 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. *B. dorei*

균주 섭취를 통해 증가된 그레이딩, 스테이징, 그리고 시리우스레드 측정면적을 모두 감소시켜 보호효과를 확인했다.

[0096] 가) DDC 모델

[0097] 간섭유증 모델 유도 시 그레이딩 2에서 *B. dorei* 투여 시,  $1.9 \pm 0.5$ 로 감소하고, 스테이징  $2.7 \pm 0.5$ 에서  $1.9 \pm 0.5$  ( $p < 0.01$ )로 감소하였다. 시리우스레드 염색 측정면적이  $16.4 \pm 2.2$ 에서 *B. dorei* 투여 시  $8.9 \pm 1.3$  ( $p < 0.05$ )로 감소하였다(도 6 참조).

[0099] 나) TAA 모델

[0100] 간섭유증 모델 유도 시 그레이딩  $2.4 \pm 0.5$ 에서 *B. dorei* 투여 시  $1.4 \pm 0.5$ 로, 스테이징  $2.8 \pm 0.4$ 에서 *B. dorei* 투여 시  $1.4 \pm 0.5$  ( $p < 0.01$ )로 감소하였다. 시리우스레드 염색 측정면적이  $26.5 \pm 4.3$ 에서 *B. dorei* 투여 시  $19.2 \pm 1.7$  ( $p < 0.01$ )로 감소하였다(도 13 참조).

[0102] 실시예 7. *B. dorei* 균주의 섭취로 인한 장내미생물총의 변화

[0103] 1. 장내미생물총의 비교

[0104] 가) DDC 모델

[0105] 장내미생물총을 문 수준에서 비교하였을 때, DDC 복합사료 섭취는 정상군으로부터 *Proteobacteria*를 증가시킨다. *B. dorei* 균주 투여 시 질병유도그룹에 비교하여 *Verrucomicrobi*가 증가하며, *Firmicutes*가 감소하였다(도 7 참조). 종 수준에서의 변화는 보기 쉽게 히트맵으로 표현하였다(도 8 참조).

[0107] 나) TAA 모델

[0108] 장내미생물총을 문 수준에서 비교하였을 때, TAA 복강주사는 정상군으로부터 *Firmicutes*를 증가시키며, *Proteobacteria*의 비율이 사라지고, *Verrucomicrobia*가 나타났다. *B. dorei* 균주 투여 시 질병유도그룹에 비교하여 *Bacteroidetes*가 증가하며, *Firmicutes*가 감소하고, *Verrucomicrobia*의 비율이 사라져 정상군과 비슷한 결과를 나타낸다(도 14 참조). 종 수준에서의 변화는 보기 쉽게 히트맵으로 표현하였다(도 15 참조).

[0110] 2. 다양성의 비교

[0111] 가) DDC 모델

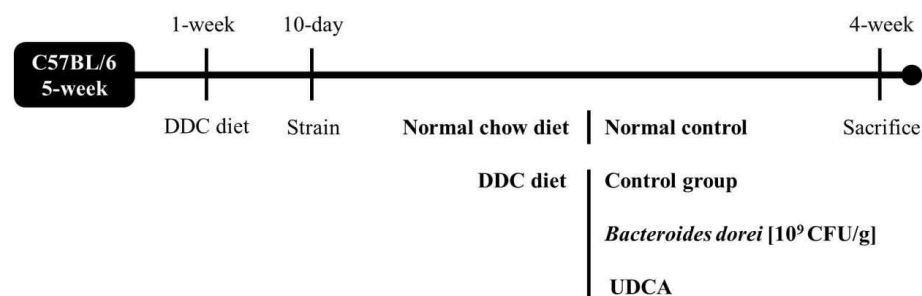
[0112] 장내미생물 주 좌표 분석과 다양성 비교 (도 9 참조),

[0113] 나) TAA 모델

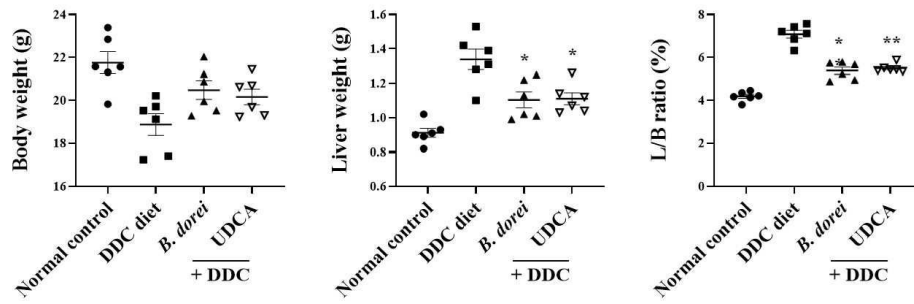
[0114] 장내미생물 주 좌표 분석과 다양성 비교 (도 16 참조),

## 도면

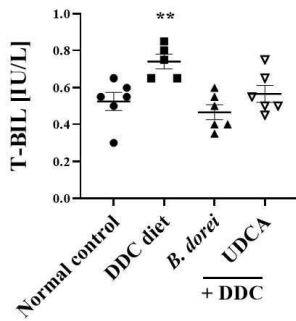
### 도면1



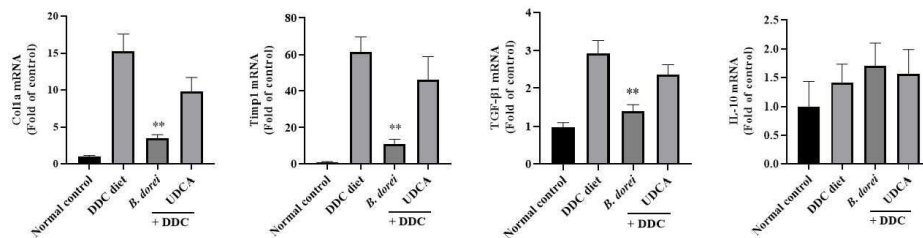
도면2



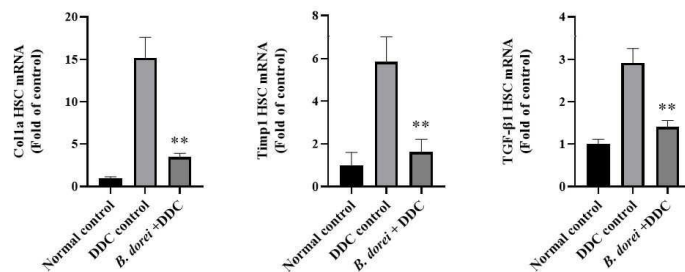
도면3



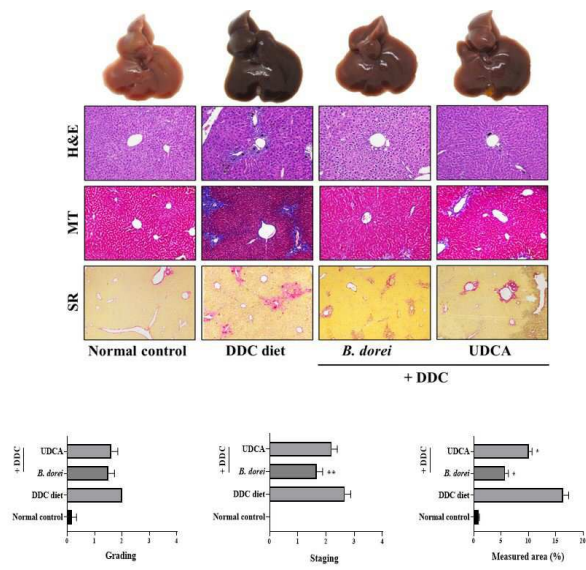
도면4



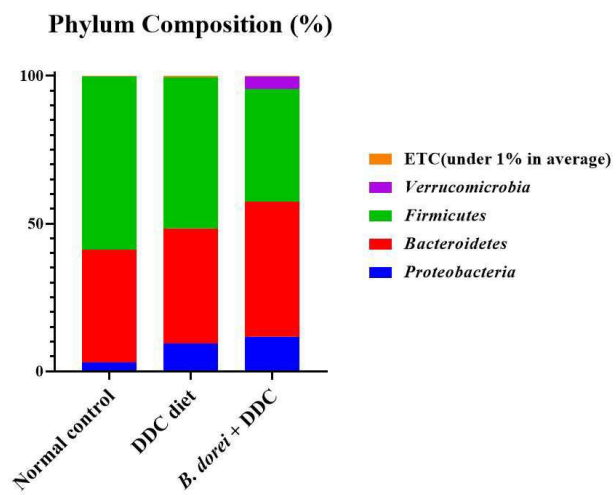
도면5



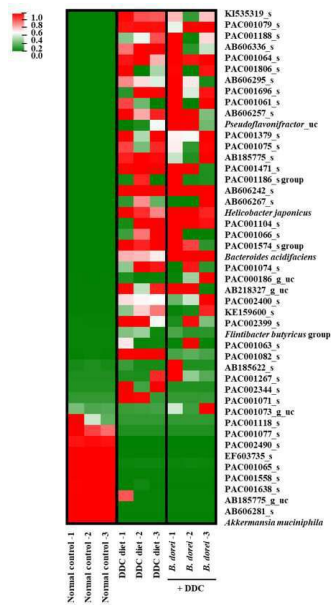
도면6



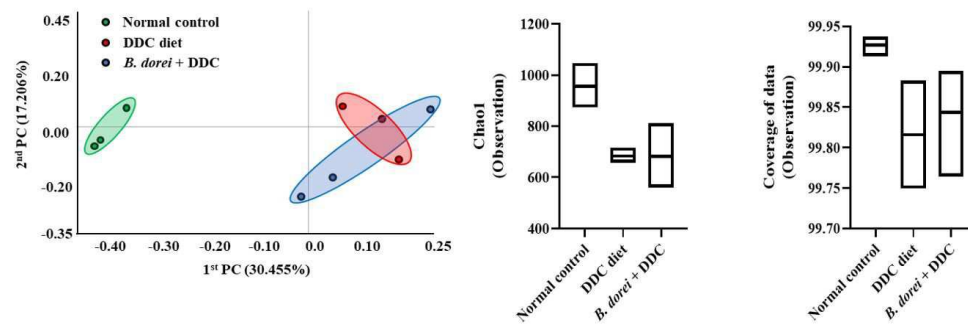
도면7



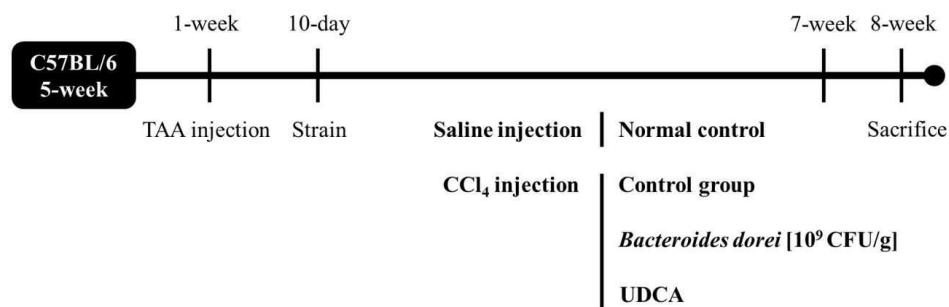
도면8



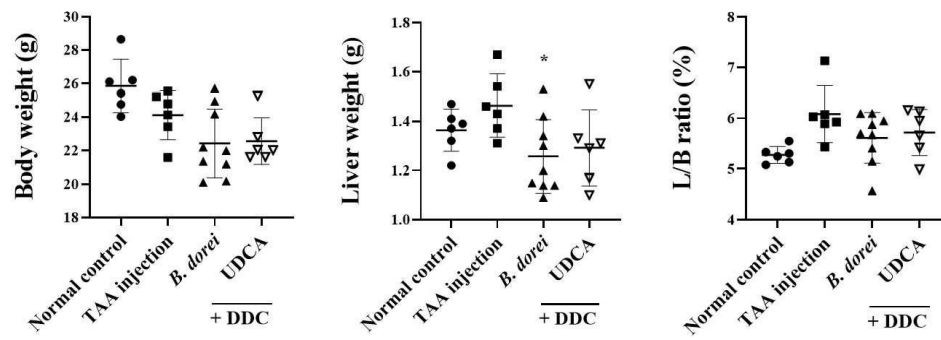
도면9



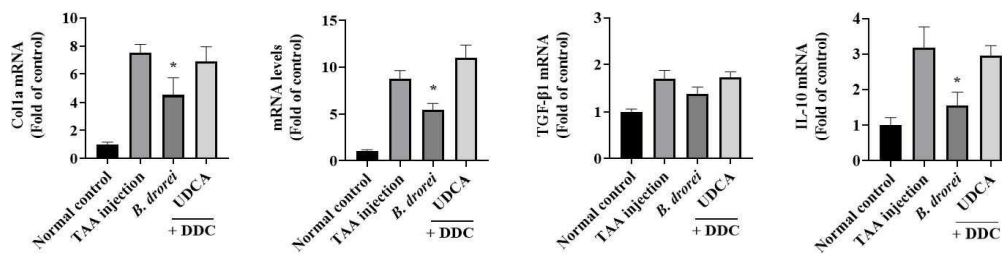
도면10



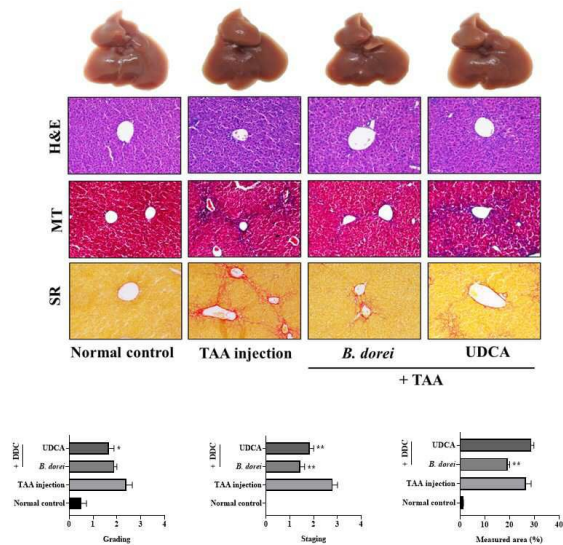
도면11



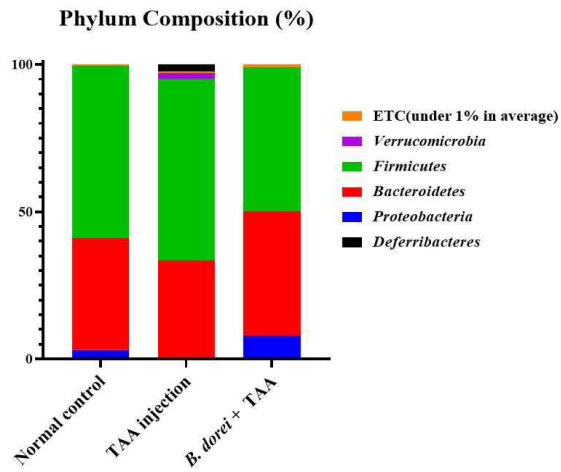
도면12



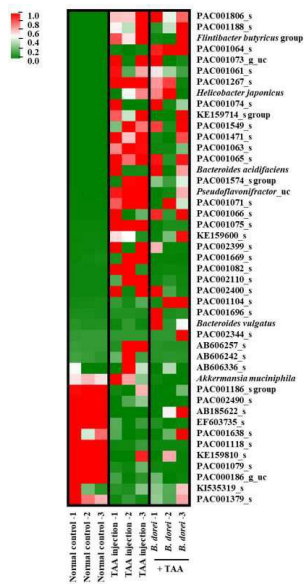
도면13



도면14



도면15



도면16

