



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0139022
(43) 공개일자 2022년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2021-0045118
(22) 출원일자 2021년04월07일
심사청구일자 2021년04월07일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
석기태
강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동,
원주반곡아이파크)
최미란
강원도 춘천시 동면 소양강로 104, 102동 604호
(춘천장학사랑으로부영아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

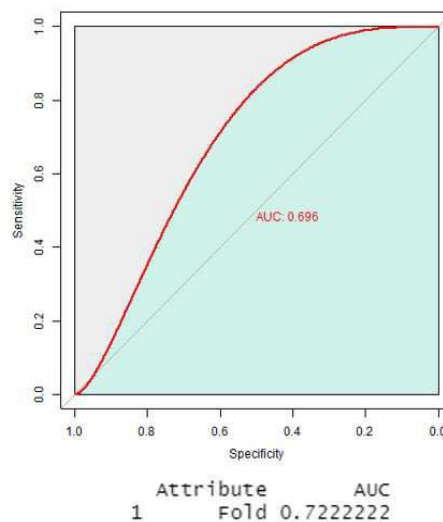
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 베일로넬라 디스파 균주를 활용한 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법

(57) 요약

베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주를 활용한 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 알코올성 간경변증을 qPCR 분석을 이용해 진단하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김형섭

강원도 춘천시 효제길 37번길 7, 302호(효자동, 동영주택)

최예린

강원도 춘천시 성심로 35번길 7

윤상준

강원도 춘천시 삭주로 49-9, 304호(교동)

김동준

강원도 춘천시 후석로 325, 102동 2408호(후평동, 춘천더샵아파트)

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

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정하는 단계를 포함하는, 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은

대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량을 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 대조군의 균주 함량을 비교하는 단계;를 추가로 포함하는, 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것인, 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 알코올성 간경변증 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것인, 알코올성 간경변증 진단용 조성물.

청구항 6

제4항의 조성물을 포함하는, 알코올성 간경변증 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주를 활용한 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 알코올성 간경변증을 qPCR 분석을 이용해 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 특정 환경에 존재하는 미생물들과 이런 미생물들의 유전정보를 마이크로바이옴(microbiome)하며, 인간의 건강에 영향을 미치는 미생물들과 그들의 유전정보를 인체 마이크로바이옴(human microbiome)이라고 한다. 인체 마이크로바이옴 중 미생물이 가장 많이 분포하고 있는 부위가 장이다. 장내 마이크로바이옴은 복잡하고 다양한 군집으로 이뤄져 있다. 장내에는 유익균, 무익균 및 유해균이 존재하며, 이상적인 장내 환경으로는 유익균이 우세한 환경 속에서 유해균과의 균형을 유지하는 상태이다. 하지만 현대인들의 서구식 식습관과 잦은 음주를 하는 생활 습관은 유익균의 번식을 억제하고 유해균의 증식을 촉진시켜 장내 환경의 균형을 깨게 만든다. 특히 유해균들이 많아지게 되면 장내 감염을 방어하는 면역 기능이 약화되어 염증성 장질환이나 비만 및 당뇨병 발병에 영향을

미친다[Chassaing B. et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. Nature. 2015; 519: 92-6]. 이외에도 장내 세균의 변화가 지방간, 간경화 등 간질환, 심장질환, 위장관계 암의 발생 위험을 높인다는 연구 결과도 속속 나오고 있다 [Qin N. et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. Nature. 2014; 513(7516):59-64].

[0003] 현대인의 생활 습관 중 장내 미생물 환경에 영향을 미치는 지속적인 음주는 지방간, 알코올성 간염 그리고 간경변증을 발생시키며 이를 알코올성 간질환이라고 한다. 이중 알코올성 간경변증은 알코올성 지방간이나 알코올성 간염이 만성화되어 간이 딱딱해지거나 크기가 위축되는 상태를 말한다. 우리나라 통계청이 발표한 사망원인통계 결과에 의하면 2018년에 알코올성 간질환사망자수는 3,818명으로 이 중 알코올성 간경화로 인한 사망자는 64%에 해당한다[사망원인통계, 2018, 통계청]. 알코올성 간질환의 발생은 알코올 간손상의 유전적 감수성 같은 유전적 요소와 성별, 영양상태 같은 환경적 요소에 의해 영향을 받는다. 알코올성 간질환은 장 투과성이나 간 민감성의 증가로 인한 간과 장의 기능상 변화에 의해 생긴다.

[0004] 간은 장내 마이크로바이옴이 생산한 대사물질을 혈액의 순환을 통해 마이크로바이옴의 변화에 영향을 준다. 마우스의 경우 지속적인 알코올 공급이 지방간과 간경화를 발생시킬 뿐만 아니라 장내 마이크로바이옴의 구성비에도 영향을 준다[Yan AW et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. Hepatology. 2011; 53:96-105].

[0005] 알코올성 간질환의 진단은 혈청 아스파르테이트아미노전달효소(aspartate aminotransferase, AST)와 알라닌아미노전달효소(alanine aminotransferase, ALT) 그리고 감마글루타미트랜스펩티다제(gamma glutamyl transpeptidase, GGT)등의 생화학적 지표로 진단하거나 또 다른 방법으로는 간조직 생검을 통해 진단할 수 있다. 그러나 조직검사는 통증유발과 감염 등의 부작용이 발생할 수 있으므로 보다 안전하고 정확한 진단이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2017-0034520
(특허문헌 0002) 한국공개특허 10-2015-0100722

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명은 상기한 실정을 고려하여, 피검체 유래 샘플인 혈액에서 유전자를 추출하고 이에 대하여 qPCR을 수행하여, 정상인 유래 샘플과 비교하여 알코올성 간경변 환자 유래 샘플에서 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*)균주의 함량 증감을 비교하여 알코올성 간경변증 진단 방법을 제안하는 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, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정하는 단계를 포함하는, 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정하는 단계 및 상기 개체 및 대조군의 균주 함량을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*)균주의 함량은 베일로넬라 디스

과 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정할 수 있는 제제가 제공된다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 조성물을 포함하는 알코올성 간경변증 진단용 키트가 제공된다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법은, 진단하고자 하는 대상으로부터 용이하게 획득할 수 있는 혈액 샘플을 이용하여 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 qPCR 분석법을 통해 알코올성 간경변을 예측 또는 진단 할 수 있기 때문에 알코올성 간경변의 위험군을 조기에 진단 및 예측하는 효과를 가지므로 알코올성 간경변에 대한 예방과 진단에 이용될 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 혈액에서 분리한 *Veillonella dispar* 균주의 정상대조군과 알코올성 간경변 환자의 유전자 함량 비교도이다.

도 2는 제작된 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 primer 검증도이다.

도 3은 혈액에서 분리한 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량을 변수로 한 알코올성 간경변증 진단 모형도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 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.

[0019] 본 발명의 일 실시예는, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정하는 단계를 포함하는, 알코올성 간경변증 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0020] 이때, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량을 측정하는 단계 및 상기 개체 및 대조군의 균주 함량을 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것일 수 있다.

[0022] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, 알코올성 간경변증은 과다한 음주로 인해 발생하는 알코올성 간질환의 일종으로, 복수, 식도정맥류(식도 혈관의 압력이 증가하여 식도 정맥의 수과 크기가 증가하고, 이에 따라 정맥이 혹처럼 부풀어 오르는 증상)의 출혈, 간성 혼수(의식이 흐려지거나 다른 사람처럼 행동함)등이 나타나는 질병을 의미하는 것으로서, 알코올성 간경변증의 발병은 유적전인 특징, 성별에 따라 차이가 있으며, 일반적으로 하루 80g 이상의 알코올을 10 내지 20년간 섭취한 경우 발병할 수 있다. 본원에서 상기 "알코올성 간경변증"은 "간경변증"과 혼용되어 명명될 수 있다.

[0023] 한편, 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주는 (주)천랩에서 제공받아 사용되었다.

[0024] 또한, 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, qPCR은 실시간 중합효소 연쇄 반응(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)으로, 분자 생물학에서 중합 효소 연쇄 반응을 기반으로 한 실험 방법이다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 목표 DNA 분자의 증폭과 양의 측정을 동시에 수행하며, DNA 샘플에서 하나 또는 그 이상의 특정 서열을 위해, 실시간 중합효소 연쇄반응은 검

출과 양의 측정을 할 수 있게한다. 계량은 절대적인 복제 수 또는 상대적인 양을 셀 수 있다.

- [0025] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "생물정보학 (bioinformatics)"은 생물학적인 문제를 응용수학, 정보과학, 통계학, 컴퓨터 과학, 인공지능, 화학, 생화학등을 이용하여 주로 분자 수준에서 다루는 학문이다. 전산생물학의 연구분야는 시스템즈 생물학과 중복되기도 한다. 주 연구분야는 서열정렬, 유전자 검색, 유전자 조합, 단백질 구조 정렬, 단백질 구조 예측, 유전자발현의 예측, 단백질간 상호작용, 진화모델 등 다양하다. 상기 생물정보학의 하위 분야로서, 유전체학(개인 유전체학, 기능 유전체학, 비교 유전체학), 변이체학, 단백질체학, 상호작용체학 및 다중체학 등이 포함된다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "시료"는 알코올성 간경병증이 발생되거나 발생될 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 인간일 수 있으며, 구체적으로 한국인 또는 아시아인일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "대조군"은 알코올성 간경병증이 발생되지 않은 일반 개체 또는 비환자군을 의미하는 것일 수 있다.
- [0029] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "진단"은, 특정 개인에 대하여 알코올성 간경병증이 이미 발생하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예측"은, 특정 개인에 대하여 알코올성 간경병증이 발생할 가능성이 있는지, 발생할 가능성이 있다면 알코올성 간경병증이 발생할 가능성이 불특정 다수인에 비하여 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 의미한다.
- [0031] 본 발명의 다른 일 실시예는 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*)균주의 함량을 측정할 수 있는 체제를 포함하는, 알코올성 간경병증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0032] 상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 함량은 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자를 qPCR로 측정하는 것일 수 있다.
- [0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 알코올성 간경병증 진단용 조성물은 알코올성 간경병증의 발병을 진단하거나, 알코올성 간경병증 발병 위험을 예측하거나 또는 알코올성 간경병증의 예후를 예측하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 한편, 본 발명의 또 다른 일 실시예는, 전술한 조성물을 포함하는 알코올성 간경변증 진단용 키트를 제공한다.
- [0035] 또한 본 발명의 다른 일 실시예는 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주의 유전자는 알코올성 간경변증 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 상기 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주가 알코올성 간경변증 진단용 마커 조성물에 포함되는 것일 수 있다.
- [0036] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "마커(marker)"는 바이오마커를 의미하며 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있다.
- [0038] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0040] **실시예 1. 샘플의 수집**
- [0041] 알코올성 간경화 환자 25명(알코올성 간경화군)과 간경화 증상이 없는 9명(정상 대조군)을 모집하였다. 알코올성 간경화군은 의사의 진단에 의거하여 선정하여 혈액을 채혈하였다.
- [0043] **실시예 2. 혈액으로부터 DNA 추출**

[0044] 혈액으로부터 DNA를 추출하기 위해 1.5 mL 튜브에 500 μ L의 혈액을 넣고 1 mL의 RBC lysis buffer 10분 처리하고, 이를 15℃에서 5분동안 500 X g로 원심분리 하였다. 원심분리한 튜브에서 상등액을 버리고 pellet을 취했다. 만약 pellet이 확실히 보이지 않을 때 에는 위의 과정을 한 번 더 반복하였다.

[0045] 이렇게 얻은 pellet에 25 mM NaOH 와 0.2 mM EDTA로 조성된 buffer를 50 μ L 가해준 후, 98℃에서 한시간동안 가열하였고 15℃로 식을 때까지 기다렸다. 여기에 40 mM Tris HCL (pH 5.5) 용액을 50 μ L 넣어주고 4,000 rpm에서 5분동안 원심분리 하였다. 이 과정 후 얻어진 상등액을 nanodrop을 이용하여 DNA 양을 100 μ g/ml로 정량하였다.

[0047] 실시예 3. 혈액으로부터 추출한 DNA를 이용한 qPCR 분석

[0048] Primer 염기서열은 하기 표 1과 같다

표 1

Primer	서열
Forward	5'-AACGCGTTGAAATTCGTCATGAAC-3'
Reverse	5'-GTGTAACAAGGAGTACGGACC-3'

[0051] 정상 대조군 9명과 알코올성 간병변 25명의 혈액에서 DNA를 추출한 다음, 상기 표 1의 *Veillonella dispar* 균주의 primer를 사용하여 qPCR을 실시한 후, 상대 정량법으로 두 군을 비교하였다. 각 well 당 DNA template 2 μ L, Primer 10 pmol, 2x PowerUP™ SYBR™ Green Master MIX 10 μ L, nuclease free water 6 μ L을 사용하여 총 20 μ L로 반응하였다. 이때 PCR 조건은 초기 50℃ 2분, 95℃ 4분 반응 후, 95℃ 15초, 59℃ 20초의 cycle을 40 회 반복하였다. 상대 정량시 각 검체의 bacterial universal 16S rDNA sequence로 보정(normalization)하였으며, 보정값에 대해 정상대조군과 알코올성 간경변의 각 평균값(±표준오차)을 t-test 검정을 통해 비교하였다. 그 결과 혈액에서 분리한 *Veillonella dispar* 균주의 함량을 알코올성 간경변 환자와 정상대조군에서 비교했을 때 차이를 보였다. 상기 결과를 통해, 진단하고자 하는 대상의 혈액 시료에서 *Veillonella dispar* 균주의 양을 확인한다면 알코올성 간경변을 진단할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 1 및 표 2 참조)

표 2

	정상대조군	알코올성 간경변
평균값(±표준오차)	0.248 ± 0.087	0.725 ± 0.213

[0054] 실시예 4. 제작 Primer의 1차 특이성 검증

[0055] 실시의 예 3을 통해서 제작된 *Veillonella dispar* 균주의 primer가 잘 증폭되는지 확인하였다. 확인 결과 제작된 primer는 잘 증폭하였으며, 정확한 증폭산물 크기를 만든다는 것을 확인하였다(도 2 참조).

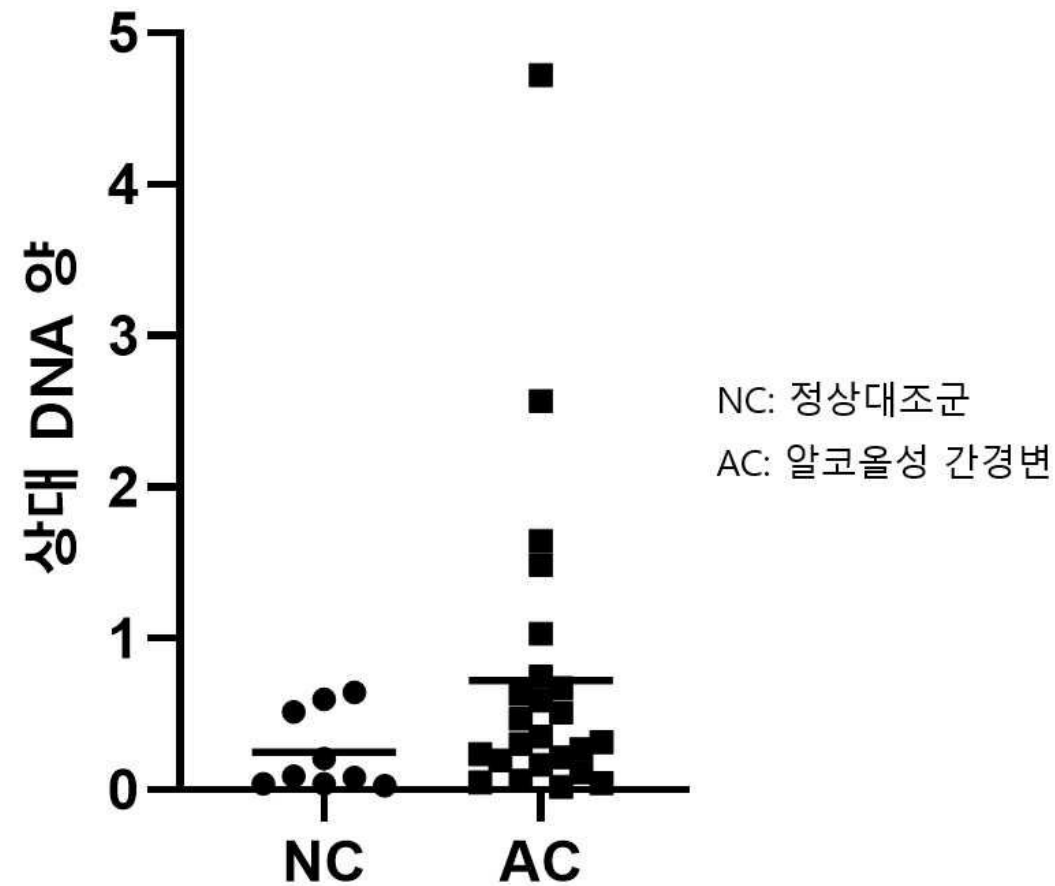
[0057] 실시예 5. 혈액 내의 *Veillonella dispar* 균주 유전자 분석을 통한 진단법 개발

[0058] 상기 실시예 3의 결과를 바탕으로, 혈액 시료에서 *Veillonella dispar* 균주 양을 확인하여 알코올성 간경변을 진단하는 방법을 개발하였다. 이를 위하여 실시예 3의 qPCR 결과를 토대로 *Veillonella dispar* 균주 유전자 함량을 변수로 하여 로지스틱 방법으로 알코올성 간경변 진단 모형을 제작하였다. 그 결과, 진단적 유용성의 지표인 AUC (area under curve)가 0.722로 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 알코올성 간경변 진단 모형을 이용하여 분석 시료인 혈액으로부터 획득된 베일로넬라 디스파 (*Veillonella dispar*) 균주 양을 변수로 하여 진단하면, 진단 정확성이 매우 높은 알코올성 간경변 진단 방법으로 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

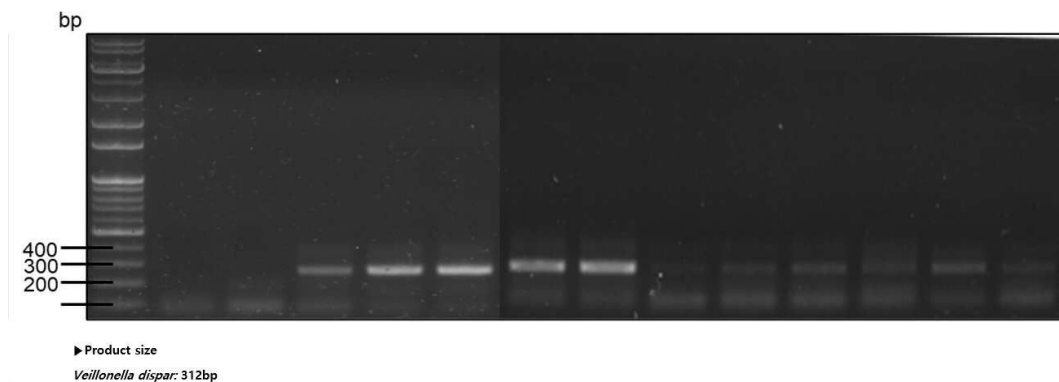
[0060] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

