

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 30일 (30.11.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/229282 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/747 (2015.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006632

(22) 국제출원일:

2023년 5월 16일 (16.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0064153 2022년 5월 25일 (25.05.2022) KR

10-2022-0128062 2022년 10월 6일 (06.10.2022) KR

(71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)

[KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

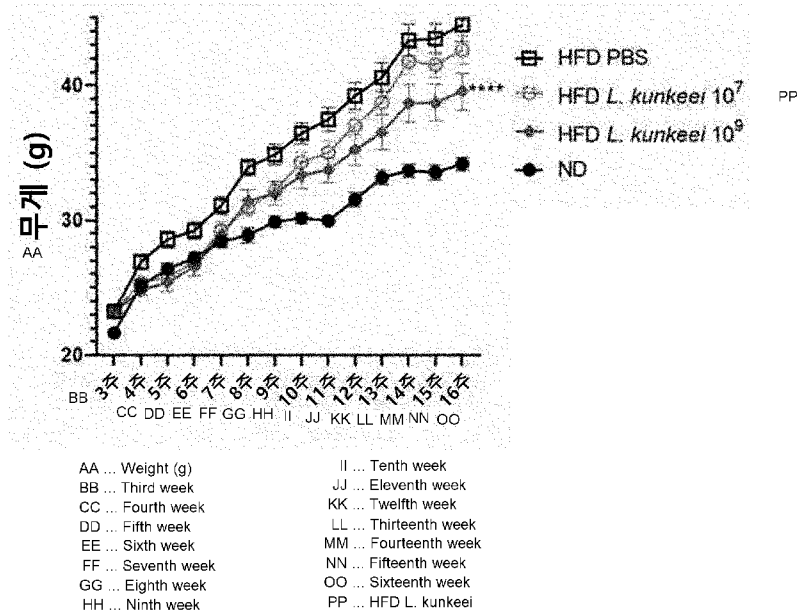
(72) 발명자: 박종환 (PARK, Jong Hwan); 61746 광주광역시 남구 노대실로 49, 610동 102호, Gwangju (KR). 고흥범 (KOH, Hong Bum); 61149 광주광역시 북구 월동로 88, 101동 1205호, Gwangju (KR). 허주영 (HUH, Joo Young); 61424 광주광역시 동구 경양로 234, 103동 1304호, Gwangju (KR). 정도현 (JUNG, Do Hyeon); 61684 광주광역시 남구 봉선로 133번길 4, 2동 501호, Gwangju (KR). 송은정 (SONG, Eun Jung); 61220 광주광역시 북구 서암대로 159번길 21, 303호, Gwangju (KR). 마은비 (MA, Eun Bi); 61982 광주광역시 서구 군분로199번길 3, 403호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 특허법인 에스알비 (SRB IP & LAW FIRM); 06130 서울특별시 강남구 강남대로94길 53, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING, TREATING, OR IMPROVING METABOLIC DISEASES, COMPRISING LACTOBACILLUS KUNKEEI NCHBL-003 STRAIN OR CULTURE MEDIUM THEREOF

(54) 발명의 명칭: 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing, treating, or improving metabolic diseases, comprising a *Lactobacillus kunkeei* NCHBL-003 strain or a culture medium thereof, wherein the composition not only inhibits adipocyte differentiation and weight gain, but also has a blood sugar lowering effect, thus being able to be effectively used in preventing, treating, or improving metabolic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 지방 세포 분화를 억제하고 체중 증가를 억제할 뿐만 아니라, 혈당 강하 효과를 나타내므로, 이를 효과적으로 대사성 질환의 예방, 치료 또는 개선 용도에 이용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 교육부의 지원 하에서 과제고유번호 1320213639, 세부과제번호 2021-3639에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 "대한창의적자산실용화지원사업", 연구과제명은 "꿀벌유래 유산균의 체지방 억제 및 혈당강하 효과에 대한 동물 유효성 평가", 주관기관은 전남대학교 산학협력단, 연구기간은 2021.10.01 ~ 2022.01.31이다.
- [2] 본 특허출원은 2022년 5월 25일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2022-0064153호에 대하여 우선권을 주장하고, 2022년 10월 6일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2022-0128062호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [3] 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주의 배양액 또는 생균을 이용하여 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) 등의 대사성 질환에 대한 예방, 치료 또는 개선 용도로 사용하는 기술에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 최근, 식생활의 서구화와 더불어 유전적, 환경적 요인 등으로 인한 비만 및 당뇨 등의 성인병 발생률이 증가하고 있는 추세이다. 대한비만학회에 따르면 국내 고도비만율은 2009년 3.5%에서 2018년 6.01%로 10년간 약 72%나 증가하였다. 이와 같은 상승세라면 2030년에는 국민 10명 중 1명이 고도 비만에 해당할 것이라는 전망이다.
- [5] 이에 따른 사회적 비용도 무시할 수 없다. 2008년 한 해 국내에서 비만 치료에 쓰인 비용은 1조 7,923억원으로 매해 그 비용이 증가하고 있는 실정이다. 이를 예방 및 치료할 수 있는 물질들에 대한 연구들이 진행되고 있는 가운데 최근 다양한 건강 기능성 식품 개발이 시도되고 있다. 비만은 단순히 살이 찐 상태가 아닌, 각종 질환을 유발하며 생명까지 위협할 수 있는 질병으로 명백하게 분류된다. 과체중으로 인한 골관절염, 수면무호흡증과 같은 동반 질환뿐 아니라 비알콜성 지방간, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등 대사 관련 합병증 및 중증 심혈관질환이나 암 등과 같은 심각한 질환까지도 이환될 수 있다.
- [6] 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 만성 간염의 원인 중 70-90%를 차지하며 산화 스트레스가 증가하거나 인슐린 저항성이 심해지면 간에서 염증 반응이 일어나고, 결국 중증 지방간 또는 비알콜성 지방간염(non-

alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 악화될 수 있다. 지방간염으로 진행된 경우 간경변, 간부전 및 간세포암으로 발전할 위험이 높아지며 심혈관 질병을 비롯한 또다른 만성질환으로 이어져 사망에 이를 수 있기 때문에 이러한 연결고리를 끊는 것이 중요하다.

- [7] 국내외 여러 제약회사들이 NASH 치료제 개발에 뛰어들고 있지만 아직 허가당국으로 승인받은 제품은 없는 실정이다. 현재 사용하고 있는 비만 치료제는 주로 뇌에 직접 작용하여 포만감을 유도, 식욕을 억제시키고, 오르리스타트(orlistat)와 같은 비만 치료제는 지방의 흡수를 저하시켜 체중 감소를 유도한다. 포만감을 유도하는 비만 치료제의 경우 의존성 및 내성 때문에 항정신성 의약품으로 지정, 관리 받게 되는데 노르에피네프린 혹은 세로토닌의 신경 접합부에서 이러한 신경전달물질의 농도를 증가시켜 포만감을 유발하기도 하고, 세로토닌 수용체나 아드레날린성 수용체를 자극하여 유발하기도 한다.
- [8] 이러한 약물들은 3개월 이상 복용 시 피로, 우울증, 환청, 수면장애와 같은 부작용이 나타나기 때문에 약물 중독 위험성에 주의하여야 한다. 때문에 비만으로 발생하는 대사증후군 치료에 있어서, 항비만 효과 및 대사질환 개선 효과는 높고 부작용은 적은 소재의 새로운 작용기전을 가진 치료 전략이 대두되고 있다.
- [9] 한편, 락토바실러스 속 미생물은 동형 또는 이형발효를 하는 유산균으로서, 유제품이나 채소의 발효과정에서 흔히 볼 수 있으며 대부분 유익균으로 분류되고 있다. 최근 많은 연구에서 장내 유익균인 락토바실러스 균, 또는 비피도박테리움 균 즉 프로바이오틱스를 투여함으로써 고지방 식이로 유도된 비만 상황에서 체중 감소, 지방간과 지방 조직의 염증의 개선, 장내 미생물 불균형의 완화 등의 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에 본 발명자들은 꿀벌에서 유래한 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*)의 지방세포 분화 억제와 비만 개선 효과가 우수한 것을 확인하였다.
- [11] 이에, 본 발명의 목적은 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액의 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선 용도에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것

으로, 본 발명에 따른 조성물은 지방 세포 분화를 억제하고 체중 증가를 억제할 뿐만 아니라, 혈당 강하 효과를 나타낸다.

- [15] 본 발명자들은 꿀벌에서 유래한 락토바실러스 쿤케이의 생균 또는 배양액을 이용하여 지방전구세포로부터 지방 세포 분화를 억제하고, 고지방식으로 유도된 비만 유도 마우스 모델에서 체중 증가 억제 효과 및 혈당 강하 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [16] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [17] 본 발명의 일 양태는 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.
- [18] 본 발명에 있어서 상기 균주는 수탁번호 KCTC14908BP로 기탁된 것일 수 있다.
- [19] 본 발명에 있어서 상기 균주는 생균, 사균, 또는 이의 혼합물인 것일 수 있고, 예를 들어, 생균인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [20] 본 발명에 있어서 상기 조성물은 상기 균주를 5×10^5 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 5×10^5 내지 5×10^9 CFU/ml, 5×10^5 내지 5×10^7 CFU/ml, 또는 5×10^7 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 5×10^7 내지 5×10^9 CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [21] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 균주를 12시간 이상 배양하여 수득한 것일 수 있고, 바람직하게는 12 내지 30시간, 12 내지 28시간, 12 내지 26시간, 12 내지 24시간, 18 내지 30시간, 18 내지 28시간, 18 내지 26시간, 18 내지 24시간, 24 내지 30시간, 또는 24 내지 28시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있고, 예를 들어, 24 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것일 수 있고, 바람직하게는 pH 6.5 내지 8.0, pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 8.5, 또는 pH 7.0 내지 8.0인 것일 수 있고, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [23] 배양액에서는 유산균이 자라면서 젖산 등의 대사체를 생산하게 되어 산성화될 수 있고, 이는 세포 배양에 적절하지 않은 pH 범위에 해당한다. 이러한 점에 근거하여, 세포 배양에 있어서 가장 적절한 pH 값은 7.4이다.
- [24] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 전체 조성물 대비 20.0 내지 100.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 20.0 내지 90.0%, 20.0 내지 80.0%, 20.0 내지 70.0%, 20.0 내지 60.0%, 20.0 내지 50.0%, 30.0 내지 100.0%, 30.0 내지 90.0%, 30.0 내지 80.0%, 30.0 내지 70.0%, 30.0 내지 60.0%, 30.0 내지 50.0%, 40.0 내지 100.0%, 40.0 내지 90.0%, 40.0 내지 80.0%, 40.0 내지 70.0% 또는 40.0 내지 60.0% 포함되는 것일 수 있고, 예를 들어, 40.0 내지 50.0% 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [25] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 균주를 배양한 후 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있고, 예를 들어, 배양 상층액인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명에 있어서 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [27] 본 발명의 약학적 조성물은 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액의 약학적 유효량 및/또는 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [28] 본 명세서에서 용어 "약학적 유효량"은 상술한 락토바실러스 사케이 CVL-001 균주 배양액의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [29] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구, 피부, 정맥, 근육, 피하 등의 경로로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다.
- [31] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [32] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡셀제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [33] 본 발명의 다른 양태는 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물이다.
- [34] 본 발명에 있어서 상기 균주는 수탁번호 KCTC14908BP로 기탁된 것일 수 있다.

- [35] 본 발명에 있어서 상기 균주는 생균, 사균, 또는 이의 혼합물인 것일 수 있고, 예를 들어, 생균인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 본 발명에 있어서 상기 조성물은 상기 균주를 5×10^5 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 5×10^5 내지 5×10^9 CFU/ml, 5×10^5 내지 5×10^7 CFU/ml, 또는 5×10^7 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 5×10^7 내지 5×10^9 CFU/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 균주를 12시간 이상 배양하여 수득한 것일 수 있고, 바람직하게는 12 내지 30시간, 12 내지 28시간, 12 내지 26시간, 12 내지 24시간, 18 내지 30시간, 18 내지 28시간, 18 내지 26시간, 18 내지 24시간, 24 내지 30시간, 또는 24 내지 28시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있고, 예를 들어, 24 내지 26시간 동안 배양하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [38] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것일 수 있고, 바람직하게는 pH 6.5 내지 8.0, pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 8.5, 또는 pH 7.0 내지 8.0인 것일 수 있고, 예를 들어, pH 7.0 내지 7.5인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 전체 조성물 대비 20.0 내지 100.0%(v/v) 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 20.0 내지 90.0%, 20.0 내지 80.0%, 20.0 내지 70.0%, 20.0 내지 60.0%, 20.0 내지 50.0%, 30.0 내지 100.0%, 30.0 내지 90.0%, 30.0 내지 80.0%, 30.0 내지 70.0%, 30.0 내지 60.0%, 30.0 내지 50.0%, 40.0 내지 100.0%, 40.0 내지 90.0%, 40.0 내지 80.0%, 40.0 내지 70.0% 또는 40.0 내지 60.0% 포함되는 것일 수 있고, 예를 들어, 40.0 내지 50.0% 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명에 있어서 상기 배양액은 균주를 배양한 후 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것일 수 있고, 예를 들어, 배양 상층액인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [41] 본 발명에 있어서 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간, 비알콜성 지방간염, 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [42] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다.
- [43] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알

콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

- [44] 상기 음료는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [45] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [46] 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 지방 세포 분화를 억제하고 체중 증가를 억제할 뿐만 아니라, 혈당 강하 효과를 나타내므로, 이를 효과적으로 대사성 질환의 예방, 치료 또는 개선 용도에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3T3-L1 지방전구세포(pre adipocyte cell)에서의 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) NCHBL-004 배양액 상층액의 세포 독성 여부를 나타낸 그래프이다.
- [48] 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 지방전구세포에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액 상층액의 지방세포 분화 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [49] 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 지방전구세포에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액 상층액의 지방세포 분화 억제 효과를 나타낸 사진이다.
- [50] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 지방전구세포에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액 상층액에 의한 지방 세포 분화 관련 전사인자 발현량을 나타낸 사진이다.
- [51] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 중체 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

- [52] 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 증체 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [53] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 당부하 검사의 혈당 강하 효과를 나타낸 그래프이다.
- [54] 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 당부하 검사의 혈당 강하 효과를 나타낸 그래프이다.
- [55] 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 당부하 검사의 혈당 강하 그래프 아래 면적을 나타낸 그래프이다.
- [56] 도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 당부하 검사의 혈당 강하 그래프 아래 면적을 나타낸 그래프이다.
- [57] 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 인슐린부하 검사의 혈당 강하 효과를 나타낸 그래프이다.
- [58] 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 인슐린부하 검사의 혈당 강하 효과를 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 인슐린부하 검사의 혈당 강하 그래프 아래 면적을 나타낸 그래프이다.
- [60] 도 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 인슐린부하 검사의 혈당 강하 그래프 아래 면적을 나타낸 그래프이다.
- [61] 도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 간 무게 감소 효과를 나타낸 그래프이다.
- [62] 도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 피하지방 무게 감소 효과를 나타낸 그래프이다.
- [63] 도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)의 조직학적 임상 증상 결과를 나타낸 사진이다.

- [64] 도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 비알콜성 지방간의 조직학적 임상증상 결과를 나타낸 그래프이다.
- [65] 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 지방 조직의 지방 세포 크기를 나타낸 사진이다.
- [66] 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 지방 조직의 지방 세포 크기를 나타낸 그래프이다.
- [67] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균에 의한 지방 조직에서의 대사 관련 유전자 발현량을 나타낸 그래프이다.
- [68] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 지방 조직에서의 지방 세포 분화 관련 유전자 발현량을 나타낸 그래프이다.
- [69] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 비만 유도 마우스 동물 모델에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균에 의한 지방 조직에서의 염증 관련 유전자 발현량을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [70] 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [71] 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.
- [72] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[73]

- [74] 실시예 1: 꿀벌로부터 분리된 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 균주 배양액의 제조

[75] 1-1. 유산균의 분리

- [76] 꿀벌의 장내 미생물군으로부터 유산균을 분리하기 위하여 먼저 대상 곤충을 6월 초순 광주지역에서 채집 후 멸균된 채집용기에 담아 개체별로 10분 동안 냉장보관 후 꺼내어 그린벤치 내에서 미세 외과기구를 사용하여 위장관을 무균적으로 적출하였다. 꿀벌의 장내 미생물 군집은 적출된 위장관 내용물에서 10 ml

의 멸균된 Tween 80이 첨가된 0.1% 펩톤 생리적 식염수(0.9% w/v NaCl, 0.1% w/v Tween 80, 0.1% w/v peptone)에 현탁하여 확보하였다.

- [77] 유산균은 내장 분쇄물의 현탁액 500 ul를 액체배지(Difco™ Lactobacilli MRS Broth, BD, USA)를 이용해 연속적으로 적당히 희석한 후 백금이를 이용하여 고형 배지(BBL™ LBS Agar, BD, USA)에 도말하여 BD GasPak™ EZdp를 넣어서 37°C에서 배양하면서 세균의 집락이 확인될 때까지 배양하였다. LBS 고형배지에서 확인된 세균의 집락은 그람염색의 그람 양성 결과와 3% 과산화수소수와 섞어서 확인된 카탈라제 음성반응을 통해 락토바실러스(*Lactobacillus*)인 것으로 동정하였다. 분리된 야외 분리주 락토바실러스는 15% 글리세롤(glycerol)이 포함된 MRS배지에 넣어 -20°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.
- [78] 분리된 균주 중 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) NCHBL-004의 계통학적 동정은 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통해 수행하였으며, PHYDIT program을 이용하여 16S rRNA 유전자의 1차 및 2차 구조의 유사성에 기초하여 락토바실러스 속 균주들의 16S rRNA 유전자와 비교하였다.

- [79] [표1]

서열 번호	명칭	서열
1	Lactobacillus kunkeei NCHBL-003 16S rRNA	TGCAGTCGAACGAGCTCTCCCAAATTGATTTTATGCTTG CATAAATGATTTTTGGATTTCGGAGCGAGTGGCGAACTG GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCCGAAGCGGGGGA TAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAATTAGT TGGAACCGCATGGTTCCAACCTTGAAAGATGGCTCTGCT ATCACTTTGGGATGGACCCGCGCCGTATTAGTTAGTTGG TGAGATAAAAGCCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGA CCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA GTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAA GAAGAACAAGTGTTAGAGTAACTGTTAACACTTTGACG GTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTGTAAGT CTGCTGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAAGTGCAG TGGAAACTACAAAACCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTTA

		CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAAT ACTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAG CTAACGCATTAAGTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC AAGTGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGA AGAACCTTACCAGCTCTTGACATCTTTCTGCCAACC
--	--	---

[80]

[81] **1-2. 균주 배양액의 제조**

[82] DMEM(high glucose) 배지에 꿀벌의 장 내부로부터 분리된 유산균인 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균과 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균(1×10^8 CFU/ml)을 24시간 동안 배양하여 원심분리 후 상층액을 분리하였다. 상층액을 pH 7.4로 맞춘 후 시린지 필터(syringe filter, 0.2 μ m)를 사용하여 멸균 후 보관하였다.

[83]

[84] **실시예 2: 지방세포 분화 억제 효과에 대한 실험 (in vitro)**[85] **2-1. 세포 독성 평가**

[86] 세포 독성은 죽은 세포로부터 유리되는 LDH(Lactate dehydrogenase)를 측정하여 평가할 수 있다. 한국세포주 은행에서 구입한 3T3-L1 지방전구세포(preadipocyte cell)는 DMEM 배지에 10% BCS(Bovine calf serum) 및 1% PS(penicillin)를 첨가하여 계대배양하여 유지하였다. 세포는 48 웰 플레이트(well plate)에 1×10^5 cells/ml의 밀도로 10% FBS, 1% PS가 첨가된 배지와 함께 0.2 ml씩 접종(seeding)하였다. 플레이트(plate)에 접종한 후 밀도가 100%에 도달했을 때를 Day-2로 지정하고 2일 동안 더 배양하면서 배양된 플레이트 내의 모든 세포가 G1 단계에서 세포주기정지(cell cycle arrest) 상태가 되도록 유도하였다.

[87] 자발성(spontaneous) LDH를 측정하기 위하여 대조군으로는 아무것도 처리하지 않는 웰(well)을 준비하였다. 구체적으로, 3T3-L1 지방전구세포의 Day 0부터 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 배지에 MDI(IBMx, 덱사메타손(Dexamethasone), 인슐린(Insulin))를 첨가하여 지방세포 분화를 유도하였다. Day 2에는 인슐린만 포함된 배지로 교체하였다. Day 4부터는 2일 간격으로 배지를 교체하며 분화될 때(Day 8)까지 배양하였다.

[88] 최대(maximum) LDH를 측정하기 위하여 실험군으로는 배양액을 처리한 웰을 준비하였다. 상기 대조군과 동일하게 준비하되, 3T3-L1 지방전구세포가 100%의 밀도로 성장한 지점에서 2일 후인 Day 0에 배양액(12.5, 25, 50%)을 처리하였다. 배양액 희석은 DMEM 배지를 이용하여 수행하였다.

- [89] 상기 세포들을 24시간 동안 배양한 후, LDH 분석(LDH assay)을 진행하여 세포 독성을 평가하였다. triton X-100 용액을 첨가한 웰을 준비한 후 LDH 기질 믹스(substrate mixture)를 첨가하고 흡광도를 측정하여 독성의 백분율을 구하였다.
- [90] 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액(0, 12.5, 25, 50%)으로부터 유리된 LDH를 백분율로 계산하여 세포 독성을 평가하였다.
- [91] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 3T3-L1에 배양액을 처리하였던 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
- [92]
- [93] **2-2. 지방 세포 분화에 대한 억제 평가**
- [94] 3T3-L1은 12 웰 플레이트에 1×10^5 cells/ml의 밀도로 10% FBS, 1% PS가 첨가된 배지와 함께 1 ml씩 접종하였다. 100%의 밀도로 세포가 자란 지점에서 2일 후인 Day 0에 배양액(0, 12.5, 25, 50%)과 분화 유도 물질인 MDI를 처리하였다.
- [95] Day 2에 배지를 교체하면서 배양액(0, 12.5, 25, 50%)과 인슐린을 처리하였고, Day 4에 배지를 교체하면서 배양액(0, 12.5, 25, 50%)을 처리하였으며, 분화가 진행될 때까지 이를 2일 간격으로 반복하였다. 분화된 지방세포가 관찰되면 지방 구 염색을 위해 배지를 4% 포르말린으로 교체하여 20분 동안 세포를 고정한 후 증류수로 2번 세척하였다.
- [96] 이후 오일 레드 O(Oil red O) 염색 시약과 증류수(D.W)를 6:4 비율로 혼합한 염색약을 사용하여 20분 동안 지방 세포를 염색하였다. 증류수로 2번 세척한 후 현미경으로 관찰 및 촬영한 뒤, 100% 이소프로판올(isopropanol)을 처리하여 오일 레드 O 염색을 추출하였고 510 nm 흡광도에서 측정하여 분화 정도를 정량적으로 분석하였다.
- [97] 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, 3T3-L1 세포에 MDI를 처리했을 때 지방 세포로의 분화가 증가하였으며 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 배양액 처리에 의해서 농도 의존적으로 지방 세포의 수가 현저히 감소하였다. 그러나 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액 처리에 의해서는 지방 세포의 수가 감소하지 않았다.
- [98] 이로부터 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 배양액은 지방 세포로의 분화를 억제함을 확인할 수 있었다.
- [99]
- [100] **2-3. 지방세포 분화 관련 전사인자 억제 평가**
- [101] 지방 조직 안에서 발생하는 지방 형성 과정에서 SREBP1c(sterol regulatory element binding protein 1c), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ), C/EBP α (CCAAT-enhancer binding protein α)와 같은 주요 전사인자들을 통해 지질 생합성, 지방 방울(lipid droplet) 생성 및 지질 축적 등이 증가한다. 이에 따라 지방 세포로 분화한 3T3-L1 세포에서 유산균 배양액 처리의 유무에 따라 앞서 설명한

전사인자의 단백질 발현량을 웨스턴 블로팅(Western blotting) 방법으로 측정하였다.

- [102] 구체적으로, 12 웰 플레이트에 1×10^5 cells/ml의 밀도로 접종된 3T3-L1 세포를 앞서 설명한 실험 방법대로 유산균 배양액 처리와 더불어 Day 8까지 배양하였다. 각 군별 세포들을 셀 스크래퍼(cell scraper)로 수거한 뒤 프로테아제 억제제(protease inhibitor)를 포함한 단백질 용해 버퍼(protein lysis buffer)를 이용하여 단백질을 분리하였다.
- [103] 각 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE 겔(gel)에 로딩하여 단백질 분자량 크기(size)대로 분리한 후 PVDF(Polyvinylidene fluoride) 멤브레인(membrane)으로 전이(transfer)시켰다. 전이된 멤브레인은 1차 항체 SREBP1c(#ab28481, Abcam), PPAR γ (#2443S, Cell Signaling Technology), C/EBP α (#8178T, Cell Signaling Technology), β -actin(#sc-47778, Santa cruz Biotechnology)를 4°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 TBST 버퍼로 세척하였다.
- [104] 2차 항체 Anti-Rabbit IgG, Anti-Mouse IgG, HRP-linked Secondary Antibody(#31640, Invitrogen)을 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 TBST로 세척하였다. 검출 시약(Detection Reagent)를 멤브레인에 처리하고 사진을 현상하여 표적 단백질의 발현량을 측정하였다.
- [105] 도 3에서 확인할 수 있듯이, MDI 처리를 통해 지방 세포 분화를 유도했을 시 관련 전사인자들의 단백질 발현량이 증가하였으며 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 배양액 처리에 의해서 농도 의존적으로 전사인자의 발현량이 현저히 감소하였다. 그러나 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 배양액 처리에 의해서는 전사인자의 발현량이 감소하지 않았다.
- [106] 이로부터 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 배양액은 전사인자 발현량의 감소를 통해 지방 세포 분화를 억제함을 확인할 수 있었다.
- [107]
- [108] **실시예 3: 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 및 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004의 생균 준비**
- [109] 마우스에 급이하기 위한 생균을 제조하기 위하여 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균과 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균(1×10^8 CFU/ml)을 고체 배지(MRS agar)에서 24시간 동안 30°C 조건으로 배양하였다. 단일 콜로니(single colony)를 채취하여 액체 배지(MRS broth)에서 전배양을 진행하였다. 전배양은 5 ml 배지에서 150 rpm으로 30°C 조건에서 24시간 동안 수행하였으며 이후 10배로 희석하여 동일한 조건에서 3시간 동안 본배양을 수행하였다.
- [110] 균수를 맞추주기 위해 흡광도 600 nm에서 O.D값 0.6이 나오도록 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 PBS로 농도를 맞추었다. 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주는 이 조건에서 1.57×10^9 CFU/ml 만큼, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 균주는 1.48×10^9 CFU/ml 만큼 존재하는 것으로 확인되었다. 마우스

개체마다 1일 주기로 0.2 ml씩 균주별로 각각 1×10^7 CFU/mouse, 1×10^9 CFU/mouse의 농도로 급이될 것을 고려하여 3,000 rpm에 15분 조건으로 원심분리를 수행함으로써 생균 배지를 제조하였다.

[111]

[112] 실시예 4: 비만 개선 효과에 대한 실험 (in vivo)

[113] 4-1. 비만 유도 마우스의 체중 변화 측정

[114] 60%가 지방으로 구성된 고지방식이(High Fat diet)를 마우스에 투여하면 일반식이(Normal diet)를 투여한 마우스에 비해 체중이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 고지방식이 투여로 유도된 비만 마우스 동물 모델은 비만 질환 연구에 많이 이용되고 있다.

[115] 7주령의 C57BL/6 수컷 마우스에 생균 배지 투여와 함께 일반식이 또는 고지방식이를 투여하였다. 일반식이 또는 고지방식이 투여 2주 후 체중을 측정하여 그룹별 체중의 무게를 동일하게 맞추었다. 일반식이 또는 고지방식이 투여 3주 후부터 1주 간격으로 체중을 측정하였다. 10주째에 당부하 검사를 실시하였고, 15주째에 인슐린부하 검사를 실시하였으며, 16주째에 부검하여 장기 무게를 측정하였다.

[116] 그룹의 정보는 다음과 같다. 모든 그룹의 마우스 숫자는 10마리로 설정하였다.

[117] [표2]

그룹명	식이	경구투여
G1	일반식이 급이	PBS(phosphate buffered saline)
G2	고지방식이 급이	PBS
G3	고지방식이 급이	락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 1×10^7 CFU/mouse
G4	고지방식이 급이	락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 1×10^9 CFU/mouse
G5	고지방식이 급이	락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 1×10^7 CFU/mouse
G6	고지방식이 급이	락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 1×10^9 CFU/mouse

[118]

[119] 표 2에 따라 수행한 결과, 고지방식이를 먹인 그룹(G2)에서 일반식이를 먹인 그룹(G1)에 비해 유의적으로 체중이 증가되는 것으로 관찰되었다.

[120] [표3]

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
체중 (g, Week 16)	34.25	44.25	42.64	39.21	40.4	40.73

[121]

[122] 표 3 및 도 4a에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 1×10^9 CFU 농도로 투여한 그룹(G4)에서도 G2보다 유의적으로 체중이 감소한 것으로 나타났다. 저농도인 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 1×10^7 CFU 농도로 투여한 그룹(G3)에서는 체중이 평균적으로 감소하였지만 유의적인 수준은 아니었다.

[123] 표 2 및 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^7 과 1×10^9 CFU 농도로 각각 먹인 두 그룹(G5, G6)에서 G2 대비 체중이 유의적으로 감소하였다.

[124] 이로부터 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균이 체중 감소 효과를 유도하는 것으로 확인되었다.

[125]

[126] 4-2. 비만 유도 마우스의 당부하 혈당 평가

[127] 마우스에 글루코스(Glucose)를 경구로 투여하였을 경우 혈당이 일시적으로 상승하지만 체내 정상 인슐린 분비에 의해 혈당이 다시 감소하는 경향이 나타난다. 그러나 고지방식이를 먹인 마우스 동물 모델에서는 혈당이 지속적으로 높게 유지되는 것으로 알려져 있다.

[128] 상기 실시예 4-1에서 준비된 그룹별 마우스는 실험 전날 오후 9시부터 다음 날 9시까지 12시간 공복 유지 후 당부하 검사에 활용되었다. $0.2 \mu\text{m}$ 여과(filteration)로 멸균시킨 10% 글루코스(Glucose in PBS) 용액을 준비하여 각 개체마다 $2 \text{ mg}(\text{glucose/g, volume}(\mu\text{l})=\text{body weight}(\text{g}) \times 20)$ 씩 경구 투여를 수행하였다. 마우스를 케이지에 다시 넣고 꼬리에서 채혈하여 혈당 수치를 0, 15, 30, 60, 90, 120분마다 측정하였다.

[129] 본 연구에서 고지방식이를 먹인 G2 그룹은 일반식이 먹인 그룹 G1에 비해 혈당 수치가 상당히 높게 유지되는 것으로 관찰되었다.

[130] [표4]

당부하 혈당 (mg/dL)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0 min	115.3	175	160.3	195.2	159.3	160.7
15 min	263.5	400.3	356.2	372.2	383	378.7
30 min	238.8	341.7	312.2	325.5	298.7	293.8
60 min	188.8	260.7	234.8	223.2	207.8	207.2
90 min	131.8	215.3	180.8	192.8	167.5	154.8
120 min	98.5	187.7	160.3	168.5	140.5	152.5

[131]

- [132] 표 4, 도 5a 및 5b에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 먹인 그룹(G3-6)에서 G2 대비 혈당 수치가 감소되었다. 특히 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004의 경우 혈당을 측정할 각각의 시각에서도 유의미한 수준으로 감소하였다.
- [133] 도 5c 및 5d에서 확인할 수 있듯이, 당부하 검사 그래프의 아래 면적을 계산한 AUC 결과에서 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 1×10^7 CFU 농도로 먹인 그룹(G3)에서 G2 대비 유의적으로 감소하였다. 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^7 , 1×10^9 CFU 농도로 각각 투여한 두 그룹(G3, 4)에서 G2 대비 유의적으로 감소한 수준임을 관찰하였다.
- [134] 즉 당부하검사를 통해 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004는 고지방식으로 유도한 비만 모델에서 혈당 강하 효과가 있음을 확인하였다.
- [135]
- [136] **4-3. 비만 유도 마우스의 인슐린부하 혈당 평가**
- [137] 고지방식이를 먹인 마우스 동물 모델에서는 혈당이 매우 높게 유지되는 것으로 알려져 있다. 이러한 마우스 동물 모델에 인슐린을 복강 투여했을 경우 혈당이 일시적으로 감소하지만, 고지방식이를 먹인 마우스 동물 모델에서는 혈당의 감소가 비교적 덜하다.
- [138] 상기 실시예 4-1에서 준비된 그룹별 마우스는 오전 9시부터 오후 1시까지 4시간 공복 유지 후 인슐린부하 검사에 활용되었다. $0.2 \mu\text{m}$ 여과로 멸균시킨 인슐린 (Insulin in PBS) 용액을 준비하여 각 개체마다 $0.5 \text{ IU/kg(BW. Vol} = 20 \mu\text{l})$ 씩 복강 투여(27-gauge sterile needle)를 수행하였다. 마우스를 케이지에 다시 넣고 꼬리에서 채혈하여 혈당 수치를 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150분마다 측정하였다.
- [139] 본 연구에서 고지방식이를 투여한 G2 그룹은 일반 식이를 투여한 그룹 G1 대비 혈당 수치가 상당히 높게 유지되는 것으로 관찰되었다.

[140] [표5]

인슐린부하 혈당 (mg/dL)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
0 min	150.0	185.1	204.4	207.2	193.4	186.0
15 min	104.0	211.3	226.1	186.9	171.8	173.7
30 min	67.6	160.1	146.7	145.9	103.7	111.6
60 min	65.9	147.3	129.3	120.0	94.9	100.7
90 min	76.8	163.8	133.1	129.4	104.6	111.8
120 min	83.7	160.9	133.5	143.0	115.4	126.3
150 min	94.1	169.4	140.0	138.9	116.6	132.5

[141]

[142] 표 5, 도 6a 및 6b에서 확인할 수 있듯이, 특히 고지방식이와 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 먹인 그룹(G3-6)에서 G2 대비 혈당 수치가 감소하였다. 특히 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004의 경우 혈당을 측정된 각각의 시각에서도 유의미하게 감소하였다.

[143] 도 6c 및 6d에서 확인할 수 있듯이, 인슐린부하검사 그래프의 아래 면적을 계산한 AUC 결과에서 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003(G3, 4)의 경우 G2 대비 혈당 수치가 감소하였지만 유의적인 수준은 아니었다. AUC 결과에서 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^7 , 1×10^9 CFU 농도로 각각 투여한 두 그룹(G5, 6)에서 G2 대비 유의적으로 감소한 수준임을 확인하였다.

[144] 즉 인슐린부하 검사를 통해 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004는 고지방식으로 유도한 비만 모델에서 혈당 강하 효과가 있음을 확인하였다.

[145]

[146] **4-4. 비만 유도 마우스의 장기 무게 측정**

[147] 고지방식으로 비만을 유도한 마우스 동물 모델에 대하여 16주차에 부검을 실시하였고 장기 무게를 측정하여 비교하였다.

[148] 조직화학적 분석을 위해 10% 포르말린(formalin) 용액에 고정시켜 둔 간과 지방 조직은 파라핀으로 포매한 후, 3 um 두께로 박절하여 절편 슬라이드를 만들었다. 헤마톡실린과 에오신으로 구성된 H&E 염색약을 사용하여 핵과 세포질을 염색한 후 광학현미경과 현미경에 장착된 디지털 카메라를 이용하여 100배 배율에서 현상하였다. 비알콜성 지방간의 조직학적 임상 증상 평가를 위해 다음과 같은 기준을 세우고 평가를 실시하였다: 지방증(Steatosis)(0-3), 간세포성 팽창(Hepatocellular ballooning)(0-3), 간 내 염증세포 침윤(Lobular inflammatory cell infiltration)(0-2). 지방조직의 지방세포 크기는 Image J 프로그램을 이용하여 측정하였다.

[149] 간 무게와 피하지방 무게 모두 고지방식이를 먹인 그룹 G2가 정상식이 그룹 G1보다 증가되었다.

[150] 도 7a에서 확인할 수 있듯이, 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 1×10^9 CFU 농도로 먹인 그룹 G4에서 간 무게의 감소가 관찰되었지만 유의적인 수준은 아니었음을 확인하였다. 고지방식이와 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 먹인 그룹(G5, 6)에서 간 무게의 감소가 나타났으며 1×10^9 CFU 농도로 먹인 그룹인 G6에서 감소가 유의적인 수준임을 확인하였다.

[151] 도 7b에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 먹인 그룹(G3, 4)에서 피하지방 무게의 감소가 나타났으며 1×10^9 CFU 농도로 투여한 그룹(G4)에서 감소가 유의적인 수준임을 확인하였다. 고지방식이와 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 먹인 그룹(G5, 6)

에서 피하지방 무게의 감소가 나타났으며 1×10^7 CFU 농도로 투여한 그룹(G5)에서 감소가 유의적인 수준임을 확인하였다.

[152]

[153] **4-5. 비만 유도 마우스에서의 지방간 임상증상 평가**

[154] 고지방식을 먹인 마우스 동물 모델에서는 간 조직 내 지질이 축적되어 비알콜성 지방간의 임상증상이 나타난다고 알려져 있다.

[155] 지방 조직은 TRIzol 시약(reagent) 용액을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA를 Nanodrop 분광광도계를 이용하여 정량하였고, 역전사 반응은 TOPscript RT DryMIX(Enzynomics, Korea)를 사용하여 RNA에서 cDNA를 합성하여 분석하였다. 합성된 cDNA를 주형(template)으로 사용하여 각각의 프라이머(primer)와 키트(TOPreal SYBR Green PCR kit, Enzynomics, Korea)를 첨가하고 real-time PCR (Rotor-Gene Q, QIAGEN) 기기를 이용하여 증폭시킨 후 정량소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[156] real-time PCR로 증폭된 생성물은 Ct(comparative cycle threshold)법을 이용하여 정량하였으며 각 시료는 하우스키핑(housekeeping) 유전자인 18S rRNA를 내부 통제요인(internal control)으로 사용하여 발현량을 보정하였다. PCR에 사용한 각 유전자의 프라이머 서열은 표 6에 제시하였다.

[157] [표6]

서열번호	명칭	서열
2	18S rRNA forward primer	AGGAGCTGAA GGGCCACGGG
3	18S rRNA reverse primer	TGGGAACAGTGACGCGGGTC

[158]

[159] 도 8a 및 8b에서 확인할 수 있듯이, 고지방식을 16주 동안 급이한 결과 간 조직내 지방증(steatosis), 간세포성 팽창(hepatocellular ballooning), 간내 염증세포 침윤(lobular inflammatory cell infiltration)이 발생했음을 확인하였다. 고지방식과 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 급이한 결과 이러한 임상 증상이 감소했으며 1×10^9 CFU 농도로 먹인 그룹(G4)에서 유의적인 감소가 나타났다. 고지방식과 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 급이한 두 그룹(G5, 6) 모두 임상 증상이 감소하였으며 이는 고지방식만을 먹인 G2 대비 유의적인 수준임을 확인하였다.

[160]

[161] **4-6. 비만 유도 마우스에서의 지방 조직의 조직학적 평가**

[162] 고지방식을 먹인 마우스 동물 모델에서는 지방 조직의 지질 축적이 증가하면서 지방 세포의 크기 또한 증가한다고 알려져 있다.

[163] 도 9a 및 9b에서 확인할 수 있듯이, 고지방식과 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 1×10^9 CFU 농도로 급이한 그룹에서(G4) 지방세포의 크기의

평균이 감소하였다. 고지방식이와 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 급이한 결과 지방 세포의 크기의 평균이 감소하였으며 생균을 1×10^9 CFU 농도로 급이한 그룹(G6)에서 유의미한 수준으로 감소하였음을 확인하였다.

[164]

[165] **4-7. 비만 유도 마우스에서의 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003에 의한 부고환 지방조직의 유전자 발현 평가**

[166] 상기 실시예 4-1에서 준비된 그룹별 마우스에 대하여 16주차에 부검을 실시하였고 부고환지방에서 RNA를 추출하여 대사 관련 유전자의 발현 정도를 평가하였다. 발현량 평가에 사용된 프라이머는 하기 표 7과 같다.

[167] [표7]

서열번호	명칭	서열
4	Adiponectin forward primer	AGGAGCTGAA GGGCCACGGG
5	Adiponectin reverse primer	TGGGAACAGTGACGCGGGTC
6	GLUT4 forward primer	ACATACCTGA CAGGGCAAGG
7	GLUT4 reverse primer	CGCCCTTAGTTGGTCAGAAG
8	HSL forward primer	TGGGGAGCTCCA GTCGGAAGAGG
9	HSL reverse primer	CATTAGACAG CCGCCGTGCTG
10	ATGL forward primer	CTCATTCGCTGGCTGCGGCT
11	ATGL reverse primer	CCCCAGTGACCAGCGCTGTG
12	CPT1a forward primer	ACCACTGGCCGCATGTCAAG
13	CPT1a reverse primer	AGCGAGTAGCGCATAGTCAT

[168]

[169] 아디포넥틴(adiponectin)은 지방 세포에서 대부분 생성되며 당과 지질대사의 조절 및 인슐린 감수성을 증가시키며 대사증후군에서 감소하는 것으로 잘 알려져 있다. GLUT4(glucose transporter type 4)는 인슐린 자극에 의해 말초조직의 세포 내 포도당 흡수를 매개하는 역할을 하며 인슐린 저항성이 생기면 세포질로부터 세포막으로의 GLUT4 전좌(translocation)가 저해된다.

[170] 지질대사에서 중요한 호르몬 민감성 지방분해효소(Hormone-sensitive liase, HSL)와 중성지방 분해효소(Adipose triglyceride lipase, ATGL)는 지방조직에서 주로 활성화되고 중성지방을 분해하는 작용을 하며 카르니틴 팔미토일 전환효소

(Carnitine Palmitoyltransferase 1A, CPT1A)는 미토콘드리아의 지방산 베타 산화를 촉진시키는 역할을 한다.

[171] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균을 급이한 결과 부고환지방에서 상기 유전자들의 발현이 유의적인 수준으로 증가함을 확인하였다. 단, 1×10^7 CFU 농도로 투여한 그룹(G3)에서의 GLUT4 유전자 발현 증가 정도와 G3, G4 두 군에서의 CPT1 α 유전자 발현 증가 정도는 유의적인 수준은 아니었다. 이를 통해 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 생균 투여 시 지방조직 내 대사 관련 유전자 발현을 조절한다는 사실을 확인하였다.

[172]

[173] **4-8. 비만 유도 마우스에서의 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004에 의한 부고환지방조직의 유전자 발현 평가**

[174] 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 대하여 16주차에 부검을 실시하였고 부고환지방에서 RNA를 추출하여 지방세포 분화 관련 유전자와 염증관련 유전자의 발현 정도를 평가하였다.

[175] [표8]

서열번호	명칭	서열
14	C/EBP α forward primer	GAACAGCAACG AGTACCGGGTA
15	C/EBP α reverse primer	CCATGGCCTTGACCAAGGAG
16	PPAR γ forward primer	GGTGAACTCTGGGAGATTC
17	PPAR γ reverse primer	CAACCATTGGGTCAGCTCTT
18	aP2 forward primer	ACATGATCATCA GCGTAAATGGG
19	aP2 reverse primer	TCATAACACATT CCACCACCAGC
20	TNF- α forward primer	CGTCAGCCGATTTGCTATCT
21	TNF- α reverse primer	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
22	Caspase1 forward primer	AGGAATTCTGG AGCTTCAATCAG
23	Caspase1 reverse primer	TGGAAATGTG CCATCTTCTTT

[176]

[177] 지방세포 분화에 작용하는 전사인자인 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ), C/EBP α (CCAAT-enhancer binding protein)는 각각의 표적 유전자의 발

현을 조절하여 지방세포 분화를 촉진하며, aP2(adipocyte protein 2)는 성숙된 지방 세포에서 발견되는 유전자이다.

- [178] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 고지방식이와 함께 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^7 CFU 농도로 투여한 결과(G5) 상기 유전자의 발현이 감소했으며 C/EBP α 와 aP2의 경우 유의적인 수준으로 감소하였다. 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^9 CFU 농도로 투여한 경우(G6), PPAR γ 와 aP2의 유전자 발현이 감소하였지만 유의적인 수준은 아니었다.
- [179] 대사 질환 발생에 있어서 염증반응은 만성적으로 낮은 수준으로 나타나고 있으며 인슐린 저항성을 유도하고 비만에 의한 대사질환의 병태생리학적 기전으로 제시되고 있다. 지방세포에서 염증관련 유전자인 TNF α (tumor necrosis factor α), MCP1(monocyte chemoattractant protein-1)은 지방세포에서 주로 분비되는 염증성 사이토카인이며 caspase-1은 지방조직에서 대식세포 유래 염증에 주요한 기능을 한다고 알려져 있다.
- [180] 도 12에서 확인할 수 있듯이, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^7 CFU 농도로 투여한 결과(G5) 상기 유전자들의 발현이 모두 유의적인 수준으로 감소하였고, 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균을 1×10^9 CFU 농도로 투여한 경우(G6) 상기 유전자들의 발현이 감소하였으며, 특히 caspase-1에서의 발현 감소가 유의적인 수준이었다.
- [181] 이로부터 락토바실러스 플란타룸 NCHBL-004 생균 투여 시 지방 조직에서 지방 세포 분화 관련, 염증 관련 유전자 발현을 조절한다는 사실을 확인하였다.

산업상 이용가능성

- [182] 본 발명은 락토바실러스 쿤케이(Lactobacillus kunkeei) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 락토바실러스 쿤케이 NCHBL-003 균주의 배양액 또는 생균을 이용하여 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) 등의 대사성 질환에 대한 예방, 치료 또는 개선 용도로 사용하는 기술에 관한 것이다.

[183]

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제용 양식
원기탁에 관한 수령
규정 7.1에 따른 발행

수 신: 전남대학교 산학협력단
전남대학교 산학협력단
광주 북구 용봉로 77
대한민국

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Lactobacillus kunkeei</i> NCHBL-003	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC14908BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다: [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치 (적용대상에 체크할 것)	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I에 표시된 미생물을 수탁 받고, 2022년 03월 17일 수령하였다.	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 I.에 표시된 미생물은 본 국제기탁기관에 에 수탁되었고, 의 부다페스트조약에 의한 기탁으로의 변환 요청이 에 수령되었다.	
V. 국제기탁기관	
명 칭: 생물자원센터 주 소: 한국생명공학연구원(KRIBB) 전라북도 정읍시 입신길 181 56212 대한민국	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가지거나 권한을 부여받은 담당자의 날인: 김성건 센터장 날짜: 2022년 03월 17일

FORM BP/4 (KCTC Form 17)

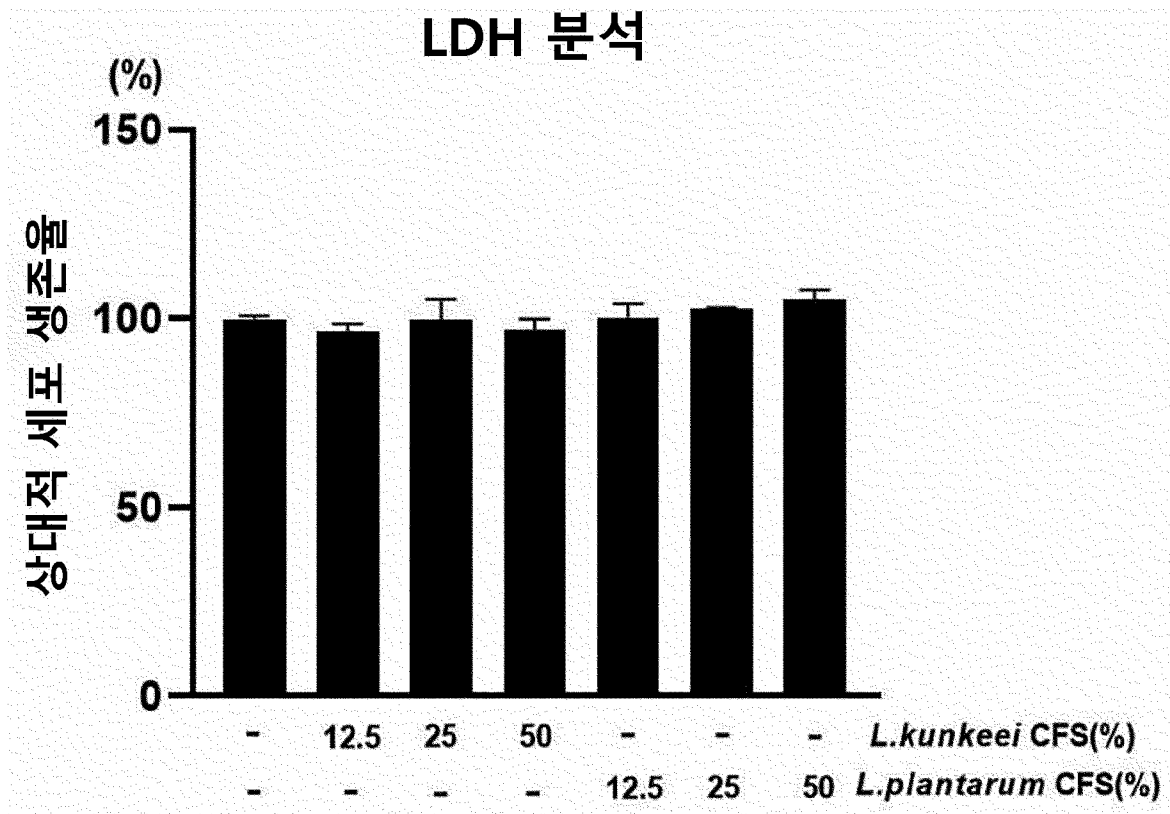
단일 페이지

청구범위

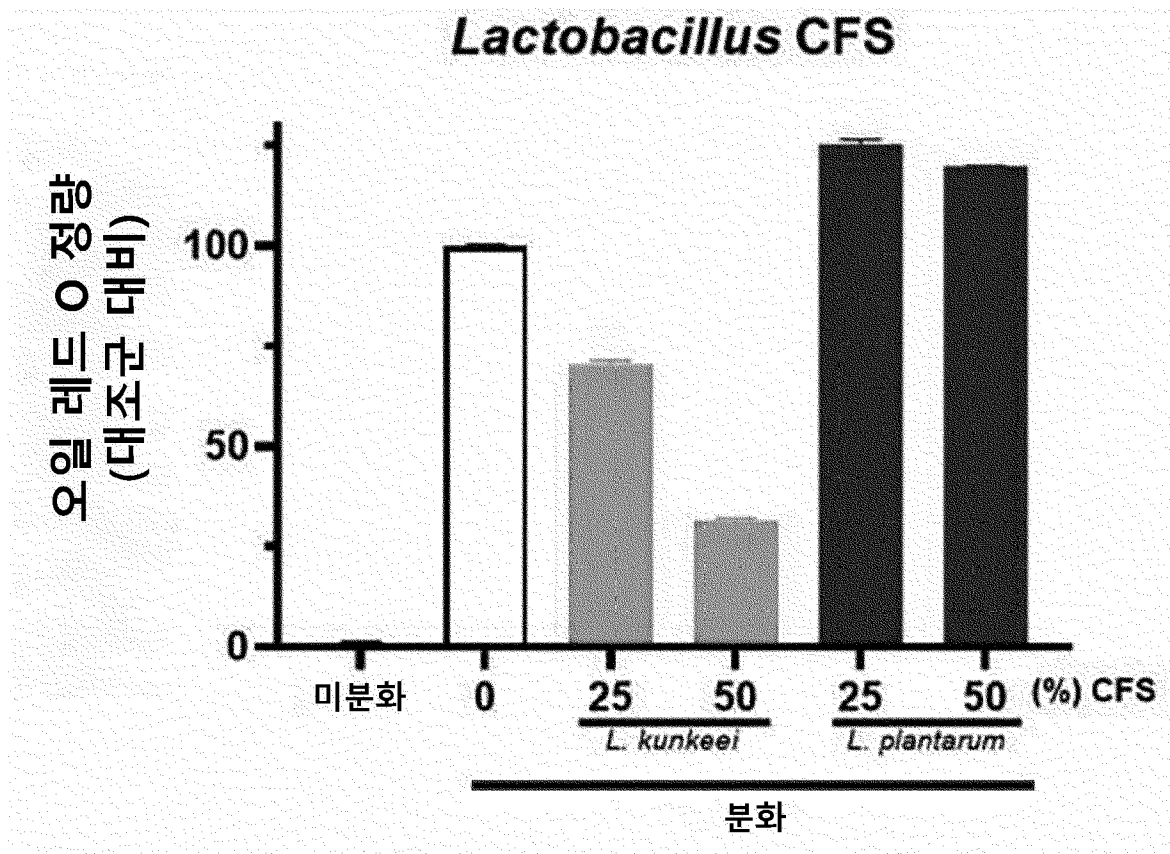
- [청구항 1] 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC14908BP로 기탁된 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 균주는 생균, 사균, 또는 이의 혼합물인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 균주를 5×10^5 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 배양액은 균주를 12시간 이상 배양하여 수득한 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 배양액은 균주를 배양한 후 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 9] 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*) NCHBL-003 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC14908BP로 기탁된 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 균주는 생균, 사균, 또는 이의 혼합물인 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 조성물은 상기 균주를 5×10^5 내지 5×10^{11} CFU/ml의 농도로 포함하는 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 배양액은 균주를 12시간 이상 배양하여 수득한 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 배양액은 pH 6.5 내지 8.5인 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 15] 제9항에 있어서, 상기 배양액은 균주를 배양한 후 균주를 제거하여 수득된 배양 상층액, 이의 농축물, 이의 분획물 또는 이의 동결건조물인 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.

- [청구항 16] 제9항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 고혈압, 고지혈증, 심혈관질환 및 고인슐린혈증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 대사성 질환 개선용 건강기능식품 조성물.

[도1]



[도2a]



미분화

0%

25%

50%

L. kunkeei
CFS

25%

50%

L. plantarum
CFS

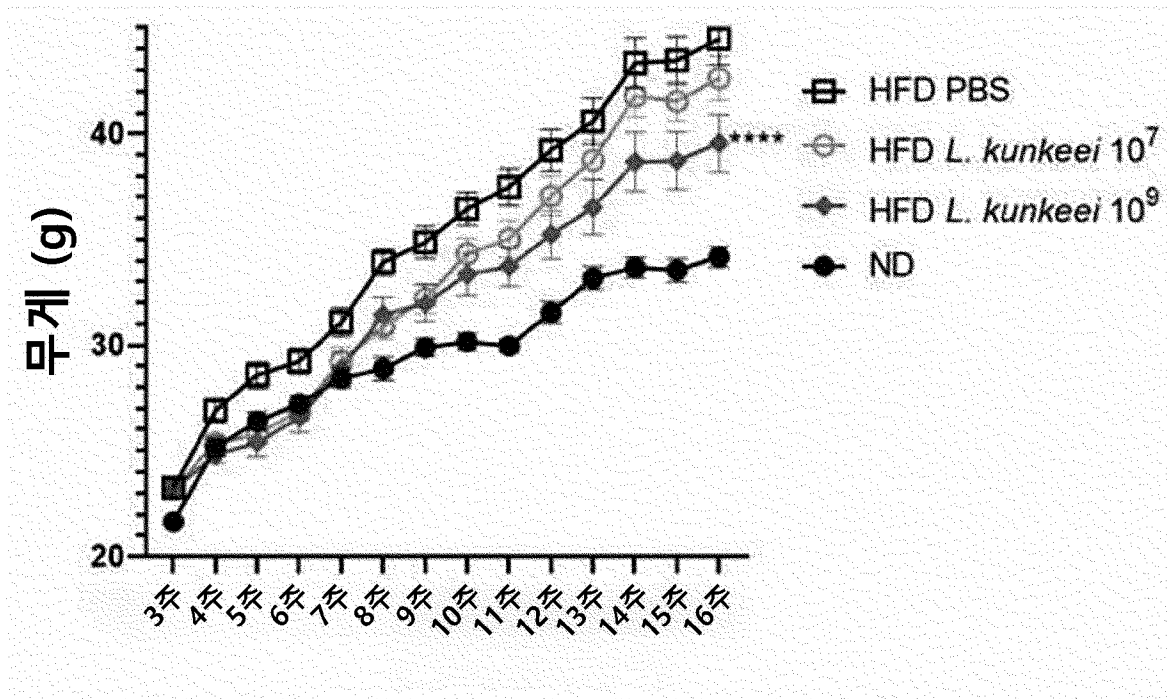
L. kunkeei

	미분화	0%	12.5%	25%	50%
SREBP1	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
PPAR γ	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
C/EBP α	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
β -Actin	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band

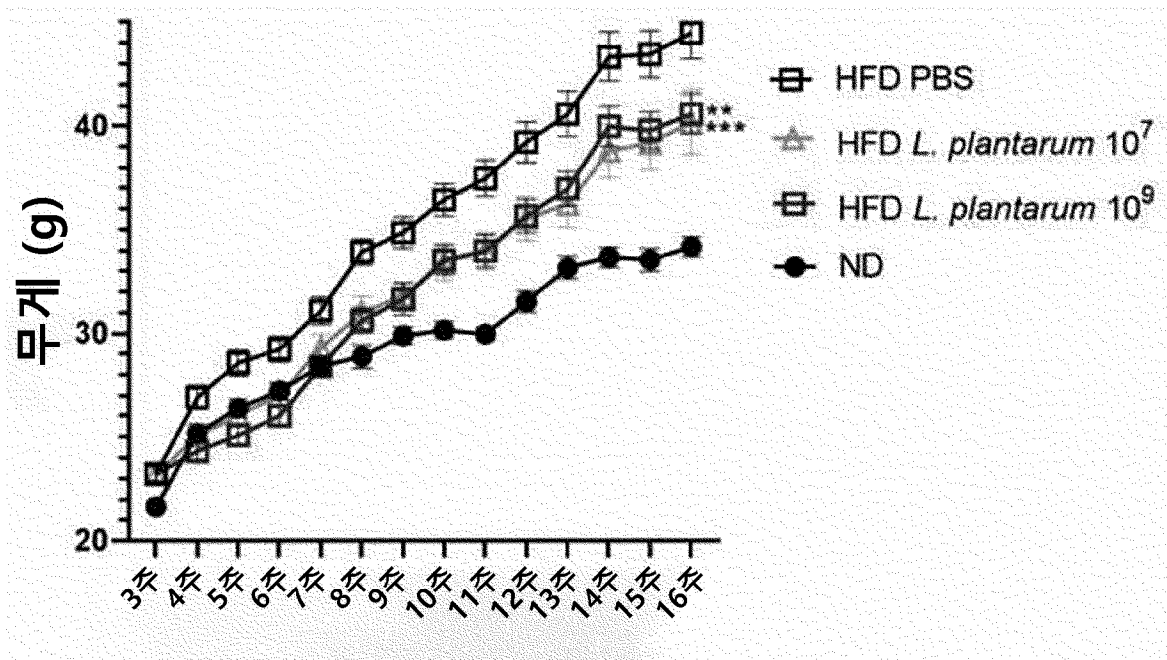
L. plantarum

	미분화	0%	12.5%	25%	50%
SREBP1	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
PPAR γ	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
C/EBP α	Weak band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
β -Actin	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band

[도4a]

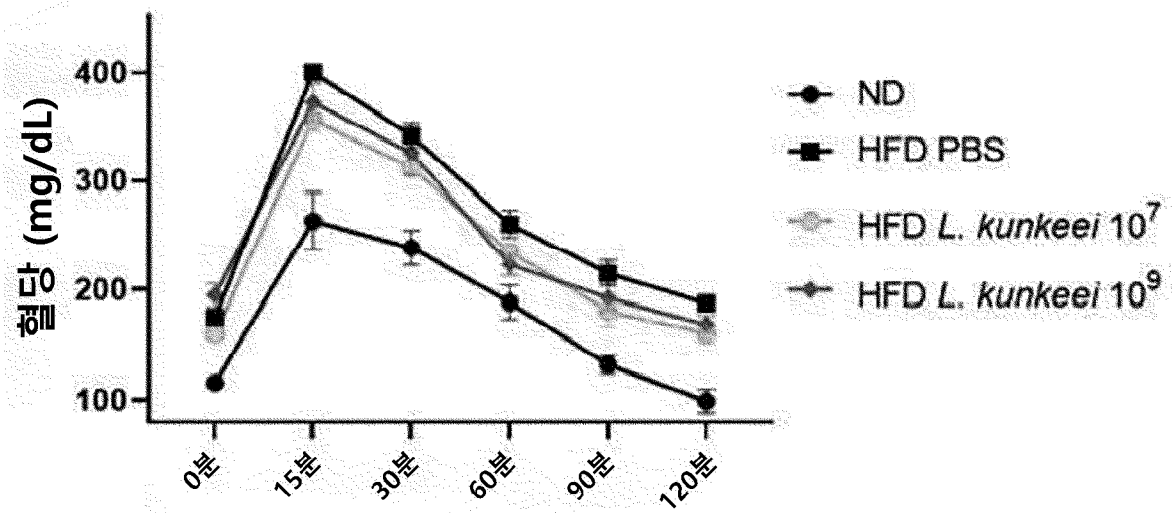


[도4b]



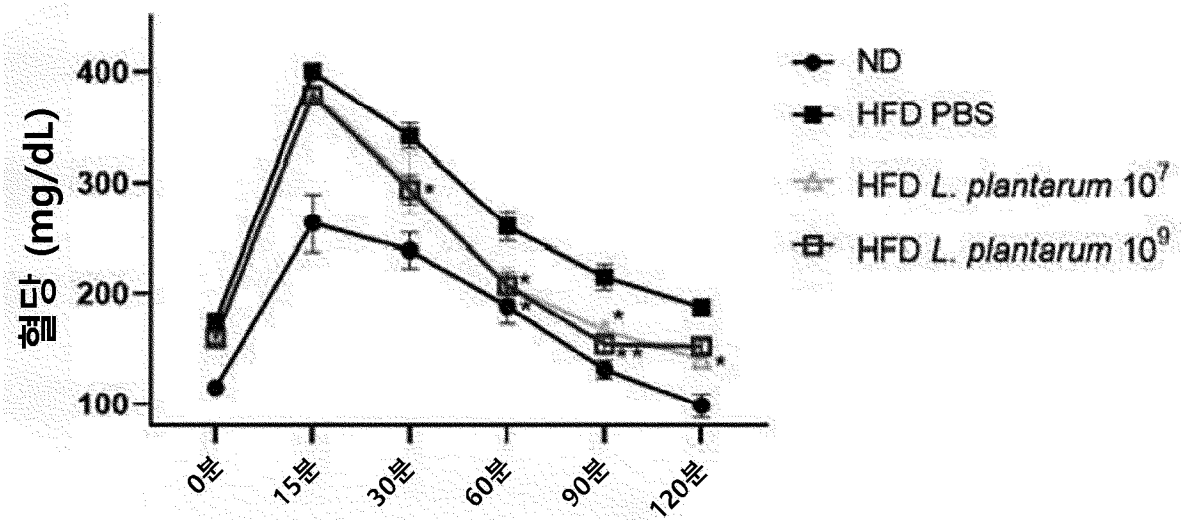
[도5a]

당 부하 검사

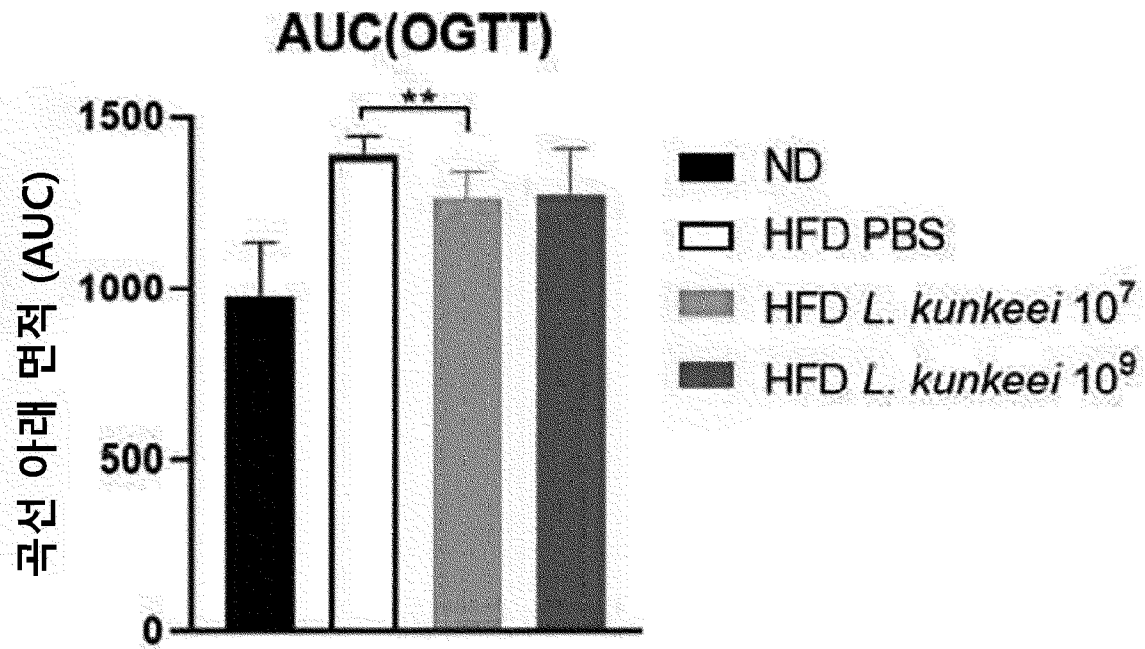


[도5b]

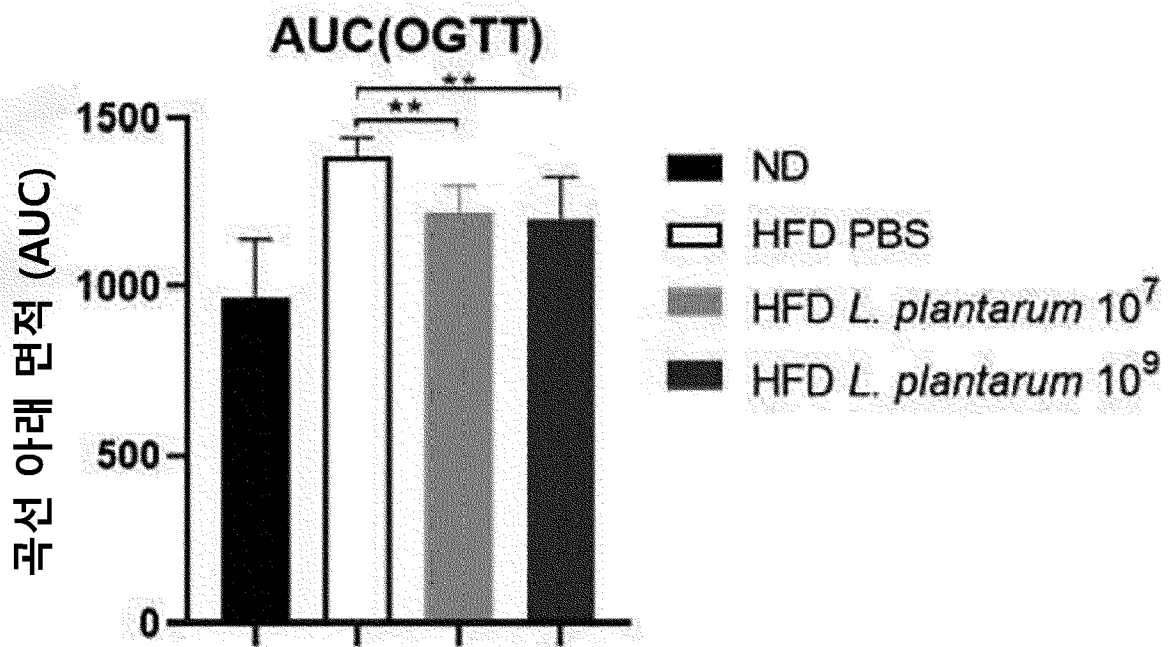
당 부하 검사



[도5c]

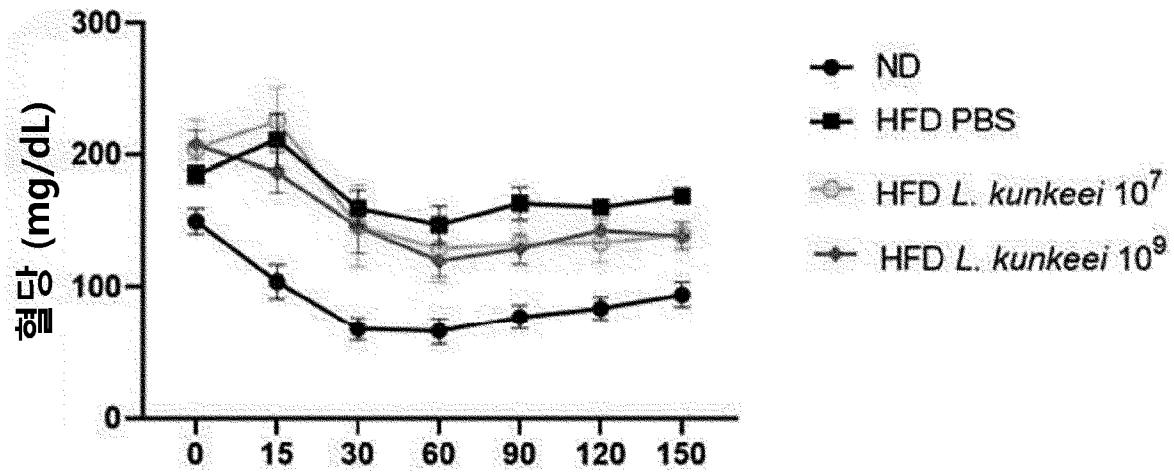


[도5d]



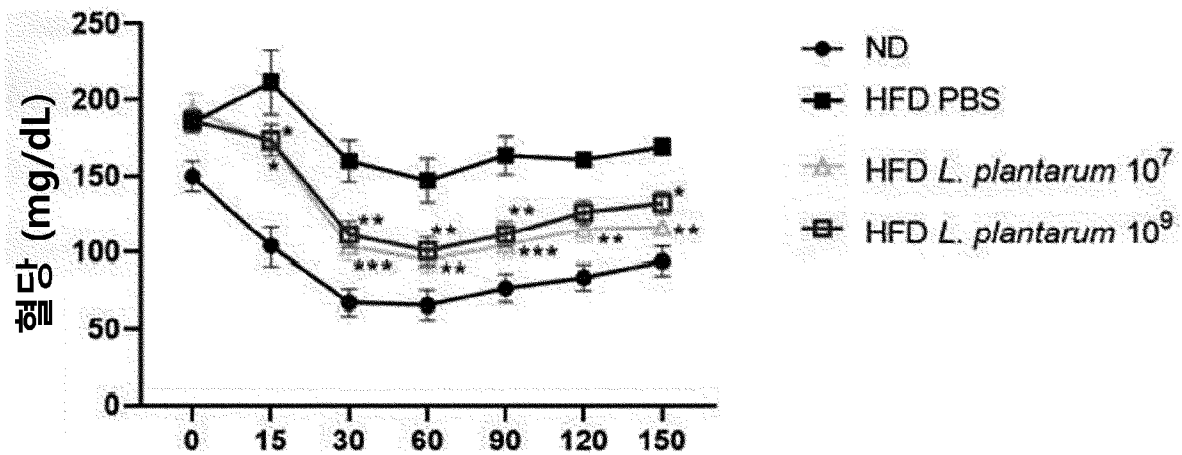
[도6a]

인슐린 부하 검사



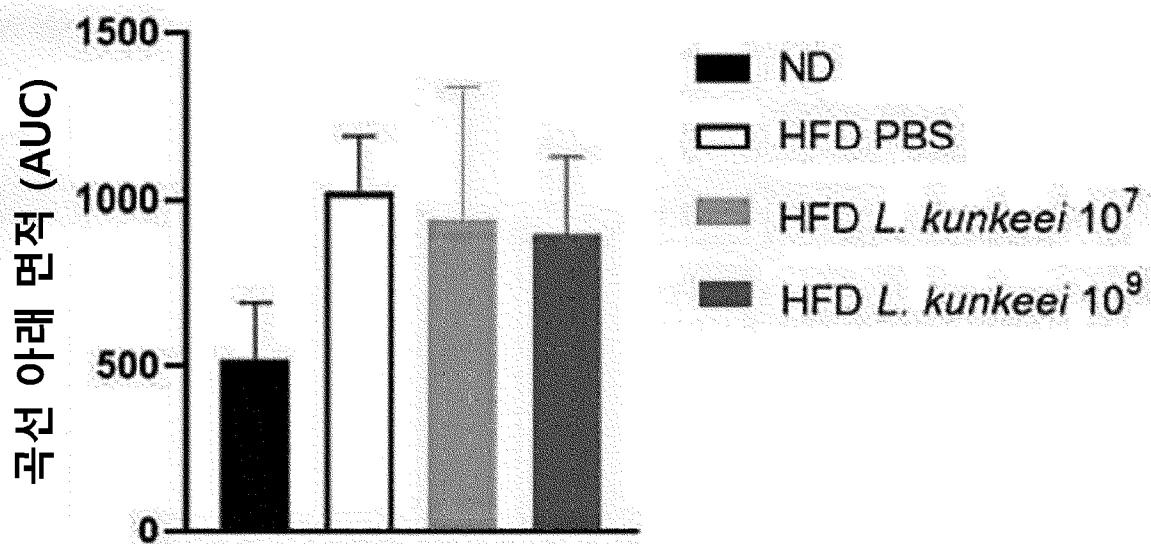
[도6b]

인슐린 부하 검사

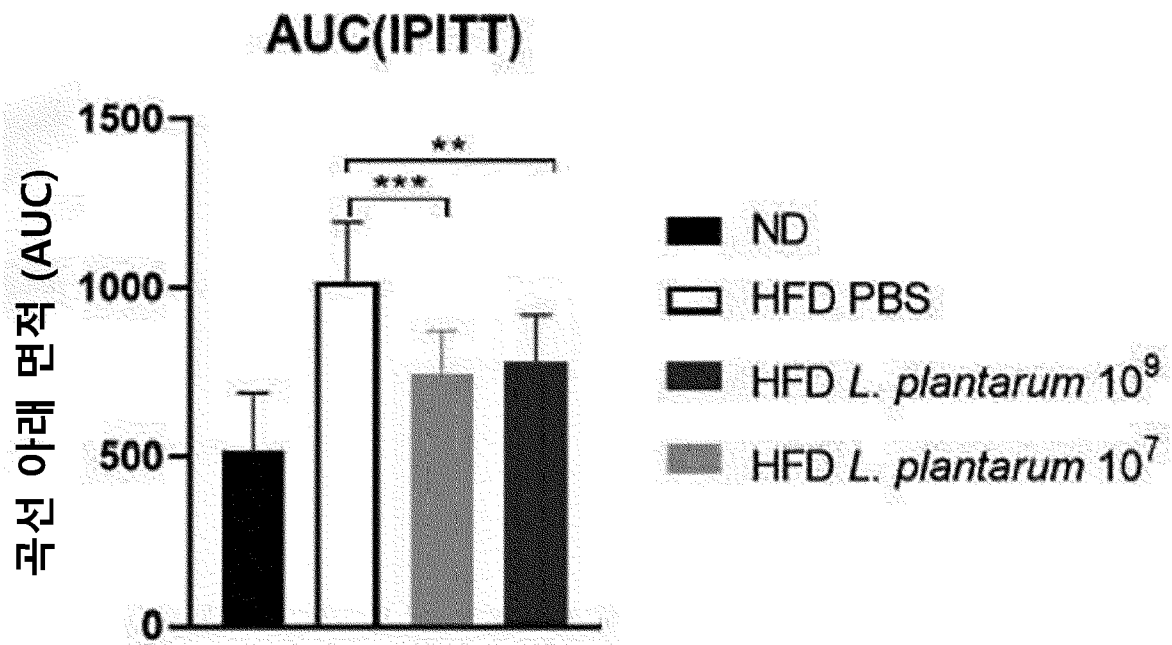


[도6c]

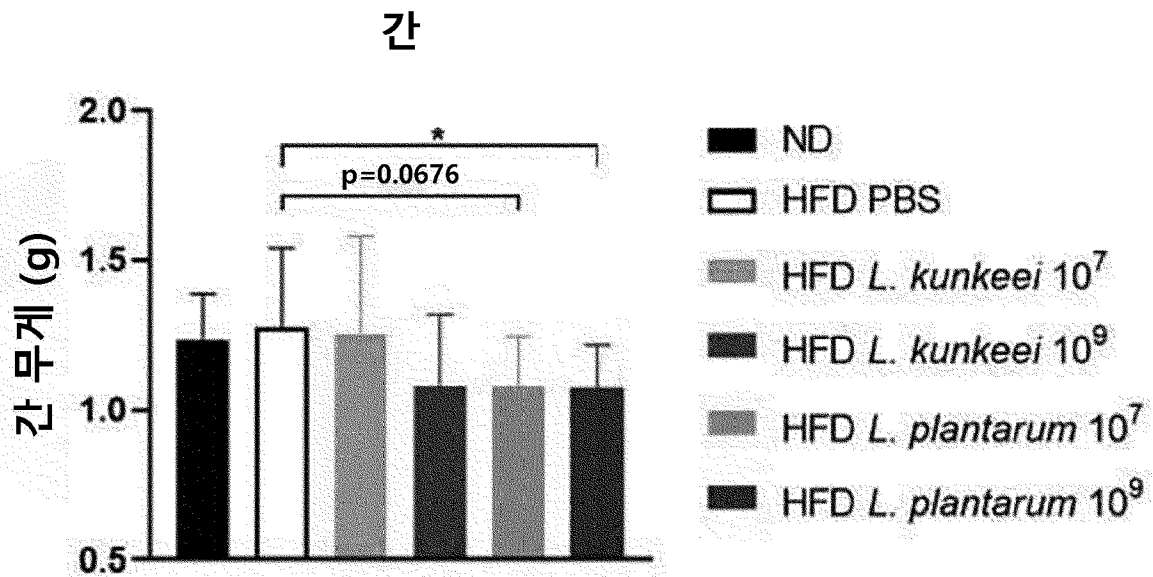
AUC (IPITT)



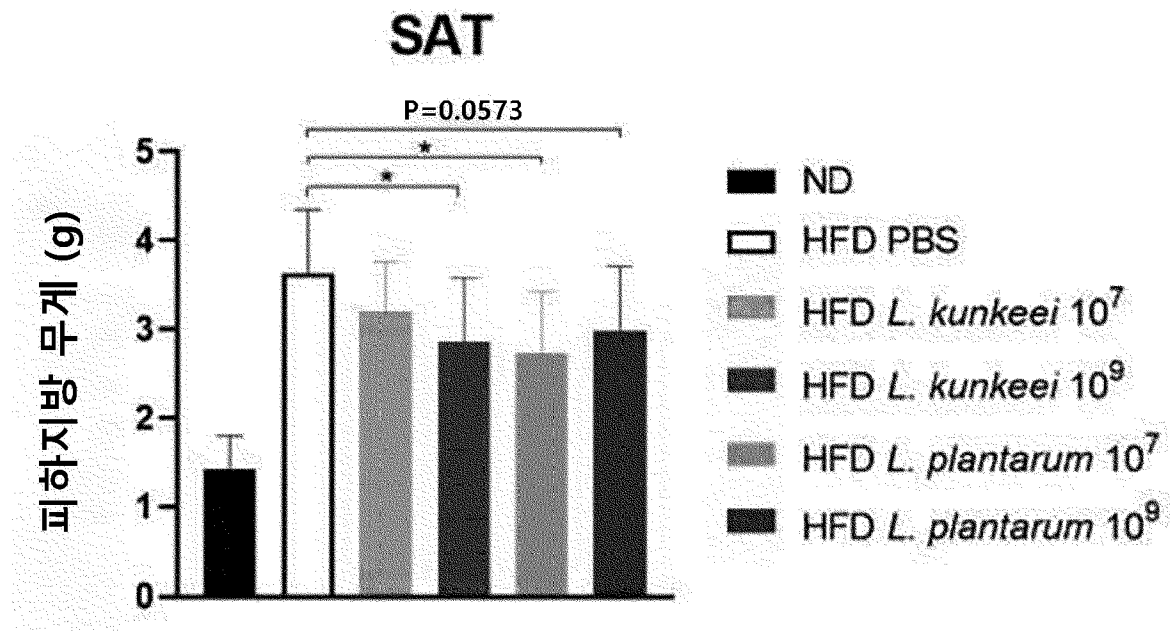
[도6d]



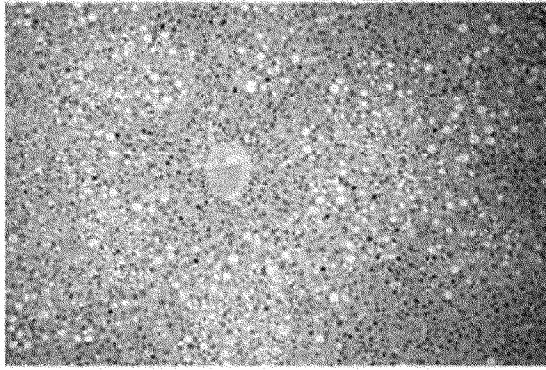
[도7a]



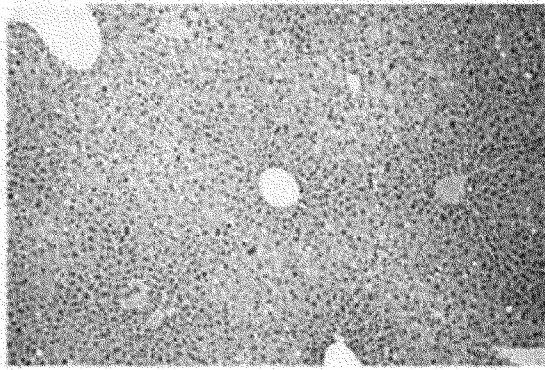
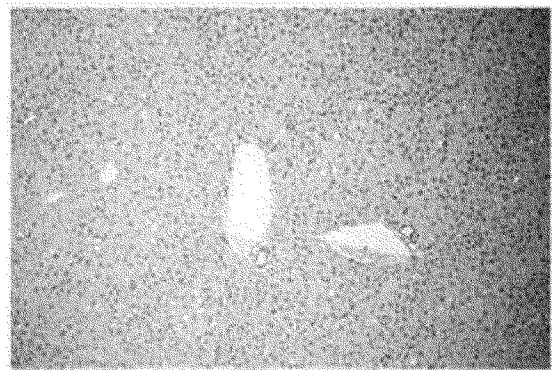
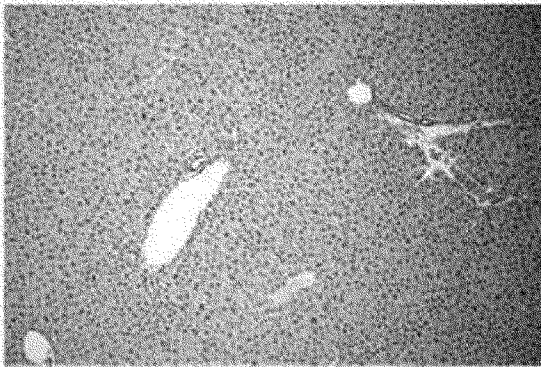
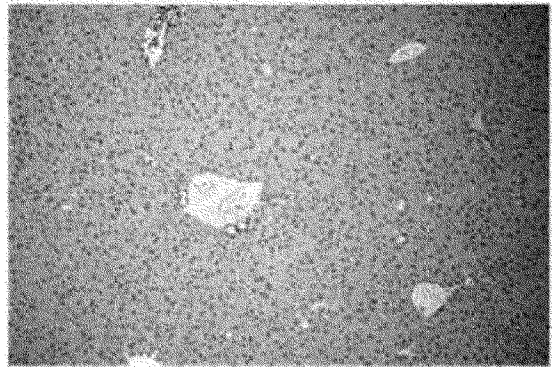
[도7b]



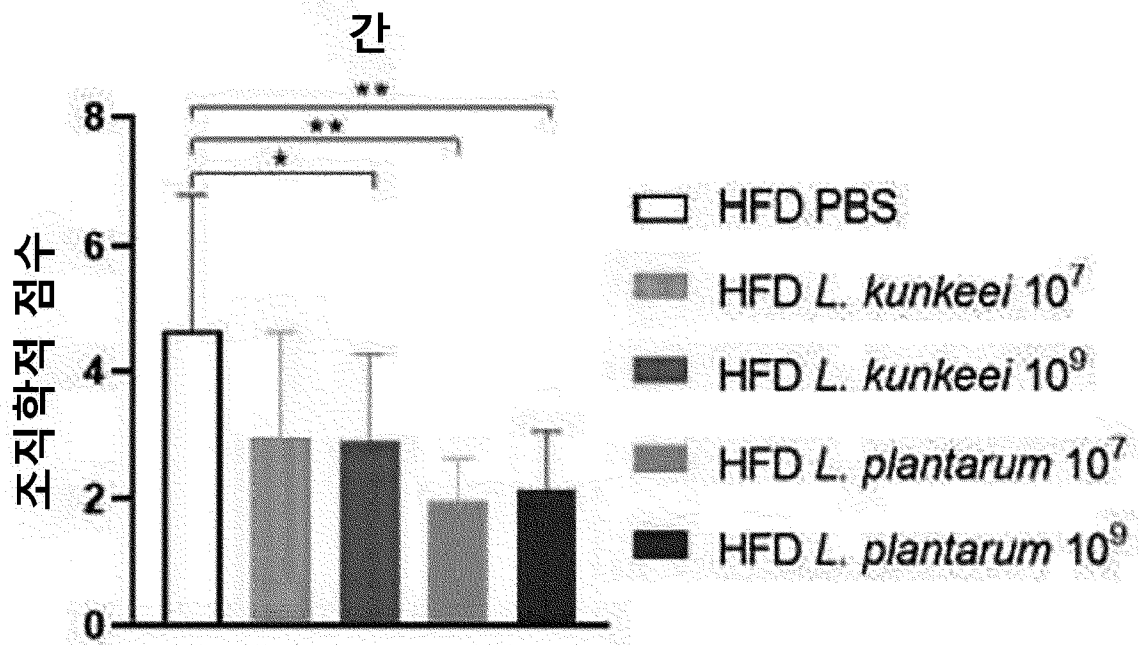
[도8a]



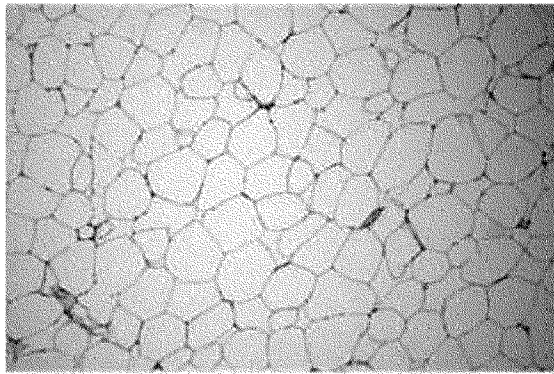
<고지방식이 PBS>

<고지방식이 *L. kunkeei* 10⁷><고지방식이 *L. kunkeei* 10⁹><고지방식이 *L. plantarum* 10⁷><고지방식이 *L. plantarum* 10⁹>

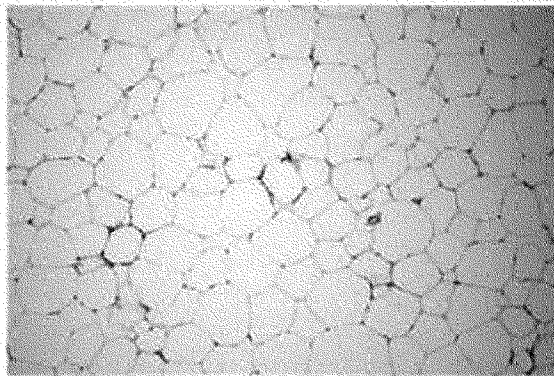
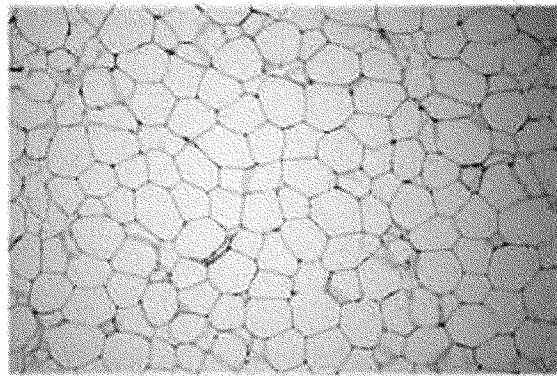
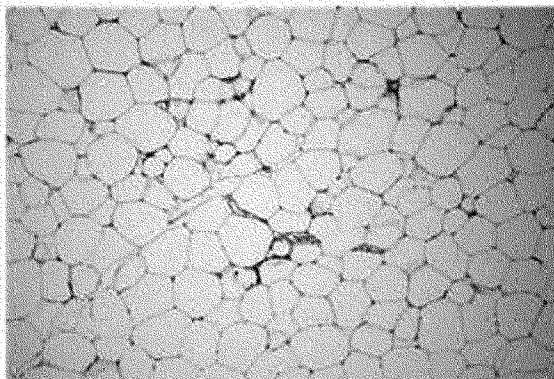
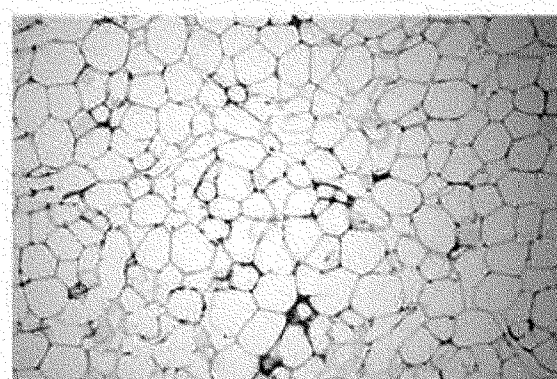
[도8b]



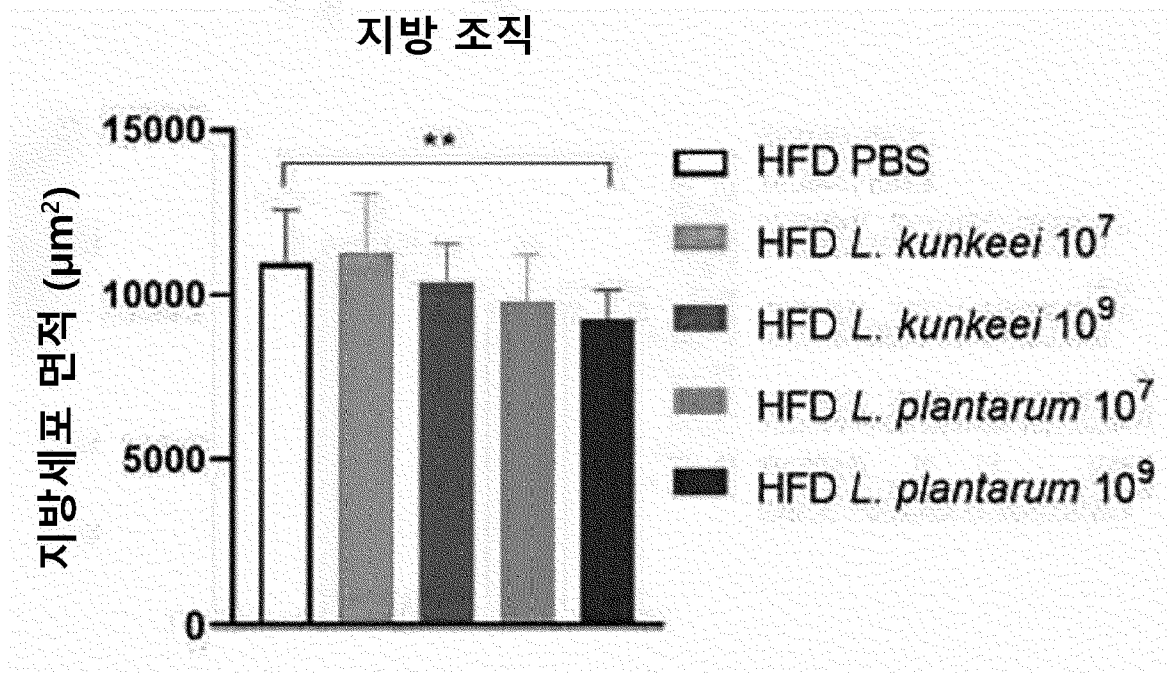
[도9a]



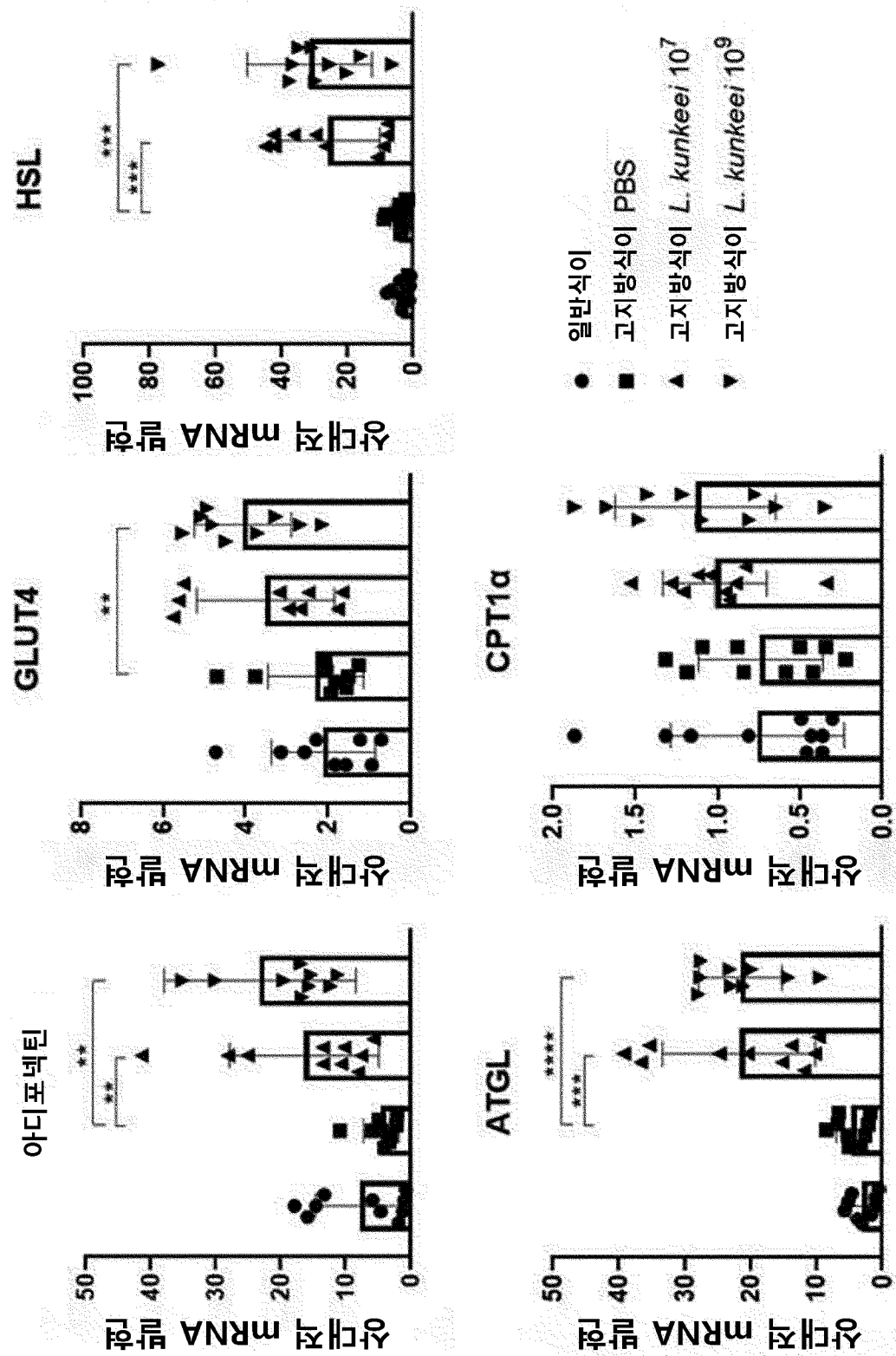
<고지방식이 PBS>

<고지방식이 *L. kunkeei* 10^7 ><고지방식이 *L. kunkeei* 10^9 ><고지방식이 *L. plantarum* 10^7 ><고지방식이 *L. plantarum* 10^9 >

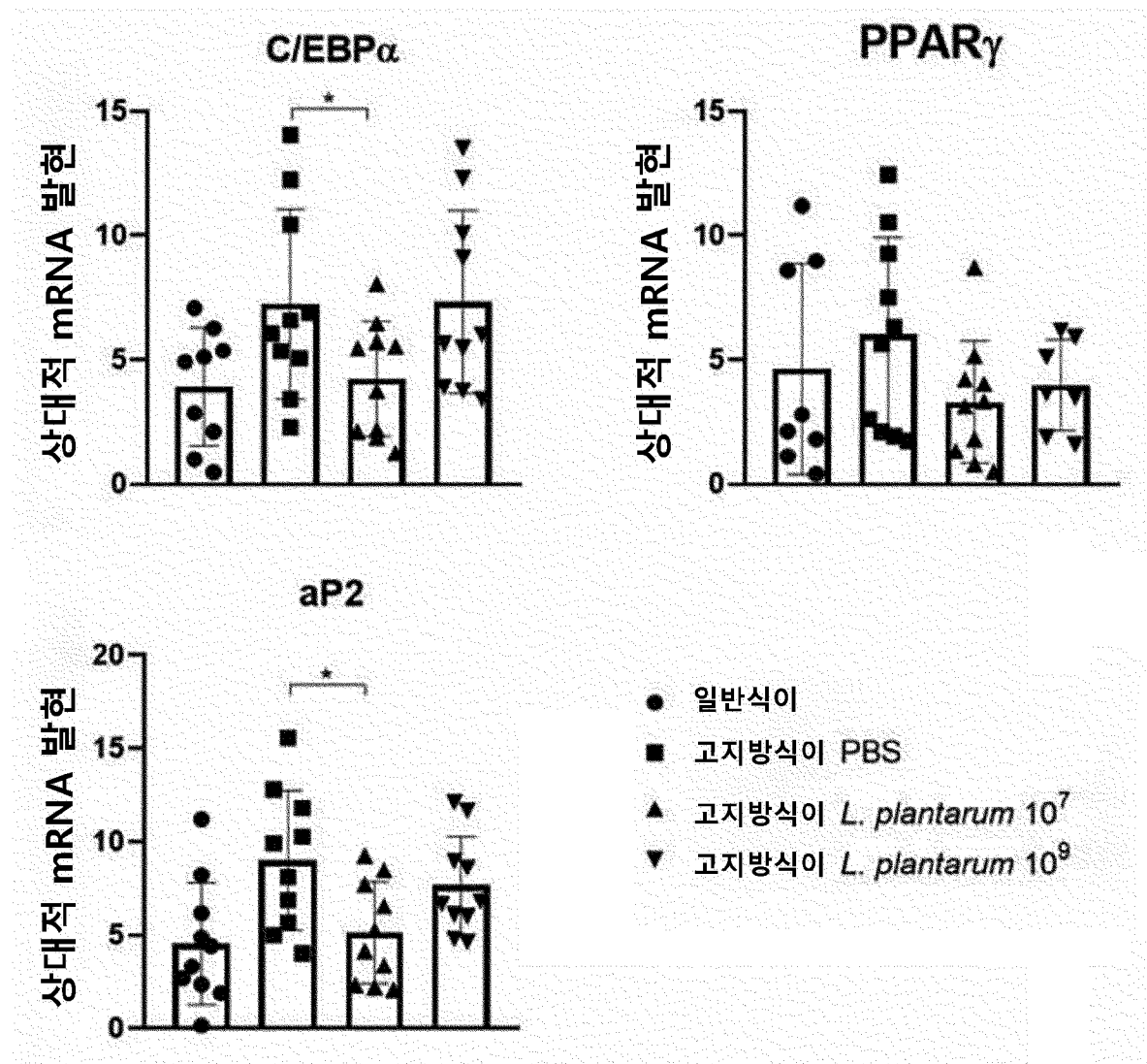
[도9b]



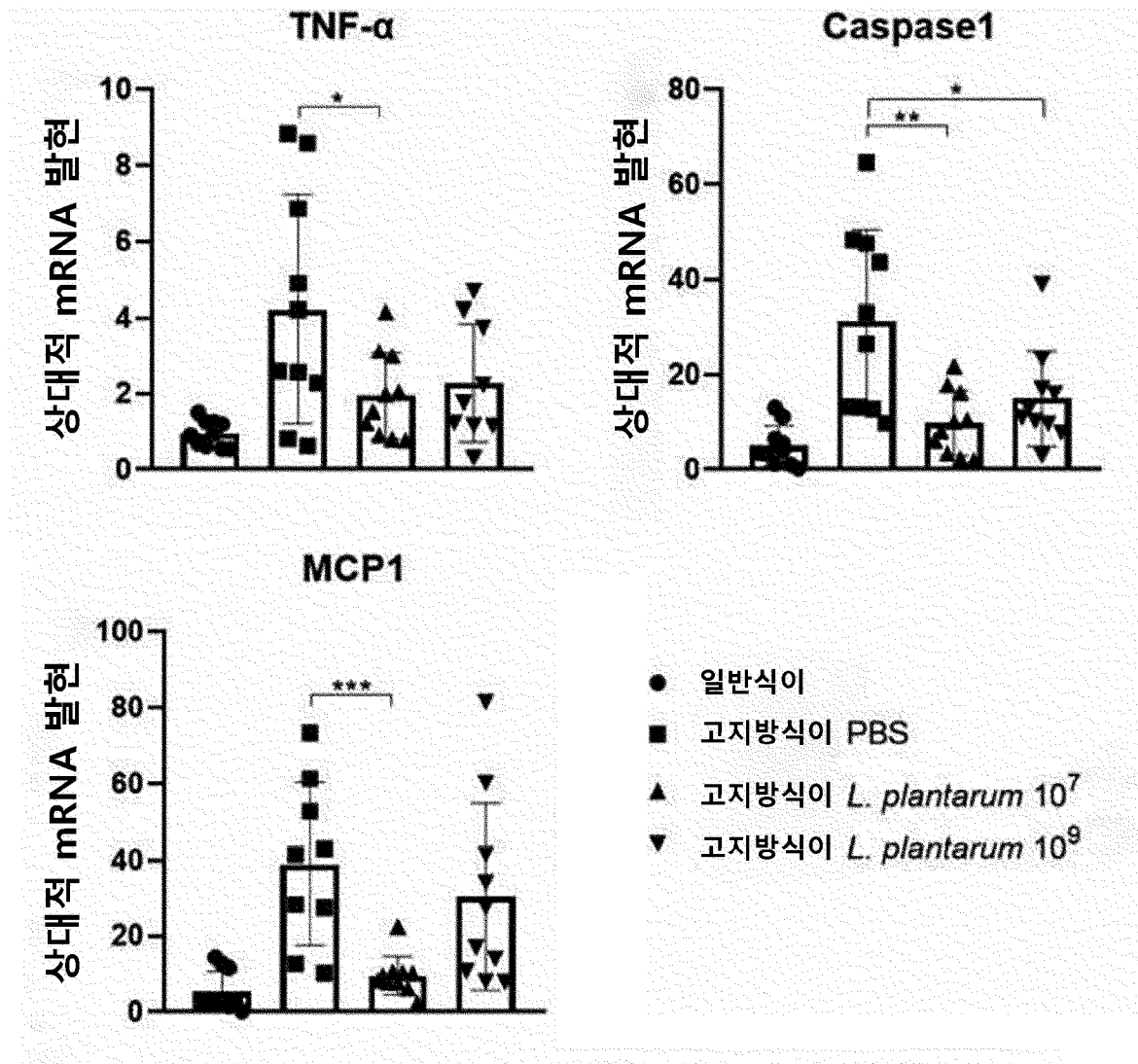
[도10]



[도11]



[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/747(2015.01)i; A61P 3/00(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61P 1/16(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 35/747(2015.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 락토바실러스 쿤케이(Lactobacillus kunkeei), 비만(obesity), 당뇨병(diabetes mellitus), 비알콜성 지방간(non alcoholic fatty liver disease), 비알콜성 지방간염(non alcoholic steatohepatitis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU-YEUNG, B. S. Y. Engineering and characterization of probiotics to tackle fructose-induced metabolic syndrome. Nanyang Technological University. 2020, pp. 1-113. See pages 3, 33, 51 and 52.	1-16
X	AMIRSIDOVA, D. I. et al. The hypoglycemic activity of lactic acid bacteria isolated from medicinal plants of uzbekistan and their probiotic potential. Journal of Pharmaceutical Research International. 22 December 2021, vol. 33, no. 60B, pp. 445-457. See abstract; sections 2.1, 2.3.1, 2.3.2, 3, 3.1 and 4; and Tables 1 and 2.	1-16
PX	ZARIPOVA, Mekhrangiz et al. The hypoglycemic potential of endophytic Lactobacillus kunkeei, isolated from Dandelion flowers in rats. Journal of Basic and Applied Pharmacology. 30 June 2022, vol. 2, no. 1, pp. 043-051. See entire document.	1-16
A	JP 2022-023025 A (INTREXON ACTOBIOTICS N.V.) 07 February 2022 (2022-02-07) See claims 1-3.	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 September 2023		Date of mailing of the international search report 14 September 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006632**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2001-0106068 A (BIONEER CORPORATION) 29 November 2001 (2001-11-29) See entire document.	1-16
A	JP 2018-008980 A (YAMADA BEE FARM CORP.) 18 January 2018 (2018-01-18) See entire document.	1-16
A	JP 2015-223106 A (YAMADA BEE FARM CORP.) 14 December 2015 (2015-12-14) See entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006632

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006632

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2022-023025	A	07 February 2022	CN	108883140	A	23 November 2018
				EP	3402499	A1	21 November 2018
				EP	3402499	B1	21 July 2021
				EP	3919065	A1	08 December 2021
				EP	3919065	A4	08 December 2021
				JP	2019-505524	A	28 February 2019
				US	10905727	B2	02 February 2021
				US	2019-0022154	A1	24 January 2019
				US	2021-0154247	A1	27 May 2021
				WO	2017-122180	A1	20 July 2017
KR	10-2001-0106068	A	29 November 2001	KR	10-0404236	B1	01 November 2003
JP	2018-008980	A	18 January 2018	JP	2014-073130	A	24 April 2014
				JP	2015-099883	A1	07 May 2015
				JP	5468183	B2	09 April 2014
				JP	6420535	B2	07 November 2018
				JP	6685974	B2	22 April 2020
				US	10570366	B2	25 February 2020
				US	2014-0363880	A1	11 December 2014
				US	2018-0112176	A1	26 April 2018
				US	9856451	B2	02 January 2018
				WO	2013-099883	A1	04 July 2013
JP	2015-223106	A	14 December 2015	JP	6486612	B2	20 March 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/747(2015.01)i; A61P 3/00(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61P 1/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/747(2015.01); A23L 1/30(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C12N 1/20(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 락토바실러스 쿤케이(Lactobacillus kunkeei), 비만(obesity), 당뇨병(diabetes mellitus), 비알콜성 지방간(non alcoholic fatty liver disease), 비알콜성 지방간염(non alcoholic steatohepatitis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	AU-YEUNG, B. S. Y. 'Engineering and characterization of probiotics totackle fructose-induced metabolic syndrome', Nanyang Technological University, 2020, 페이지 1-113 페이지 3, 33, 51, 52	1-16
X	AMIRSIDOVA, D. I. 등, "The hypoglycemic activity of lactic acid bacteria isolated from medicinal plants of uzbekistan and their probiotic potential", Journal of Pharmaceutical Research International, 2021.12.22., 33권, 60B호, 445-457 페이지 abstract; 섹션 2.1., 2.3.1., 2.3.2., 3, 3.1. 및 4; Table 1, 2	1-16
PX	ZARIPOVA, MEKHRANGIZ 등, "The hypoglycemic potential of endophytic Lactobacillus kunkeei, isolated from Dandelion flowers in rats", Journal of Basic and Applied Pharmacology, 2022.06.30., 2권, 1호, 043-051 페이지 전문	1-16
A	JP 2022-023025 A (INTREXON ACTOBIOTICS N.V.) 2022.02.07 청구항 1-3	1-16
A	KR 10-2001-0106068 A ((주)바이오니아) 2001.11.29 전문	1-16
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년09월14일(14.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월14일(14.09.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2018-008980 A (YAMADA BEE FARM CORP.) 2018.01.18 전문	1-16
A	JP 2015-223106 A (YAMADA BEE FARM CORP.) 2015.12.14 전문	1-16

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2022-023025 A	2022/02/07	CN 108883140 A	2018/11/23
		EP 3402499 A1	2018/11/21
		EP 3402499 B1	2021/07/21
		EP 3919065 A1	2021/12/08
		EP 3919065 A4	2021/12/08
		JP 2019-505524 A	2019/02/28
		US 10905727 B2	2021/02/02
		US 2019-0022154 A1	2019/01/24
		US 2021-0154247 A1	2021/05/27
		WO 2017-122180 A1	2017/07/20
KR 10-2001-0106068 A	2001/11/29	KR 10-0404236 B1	2003/11/01
JP 2018-008980 A	2018/01/18	JP 2014-073130 A	2014/04/24
		JP 2015-099883 A1	2015/05/07
		JP 5468183 B2	2014/04/09
		JP 6420535 B2	2018/11/07
		JP 6685974 B2	2020/04/22
		US 10570366 B2	2020/02/25
		US 2014-0363880 A1	2014/12/11
		US 2018-0112176 A1	2018/04/26
		US 9856451 B2	2018/01/02
JP 2015-223106 A	2015/12/14	WO 2013-099883 A1	2013/07/04
		JP 6486612 B2	2019/03/20