(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0153702
(43) 공개일자 2023년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2015.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0053421
(22) 출원일자 2022년04월29일
심사청구일자 2022년04월29일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
주식회사 종근당바이오
서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)
(72) 발명자
석기태
강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동, 원주반곡아이파크)
김병국
서울특별시 양천구 신정로7길 76, 202동 1207호(신정동, 푸른마을2단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

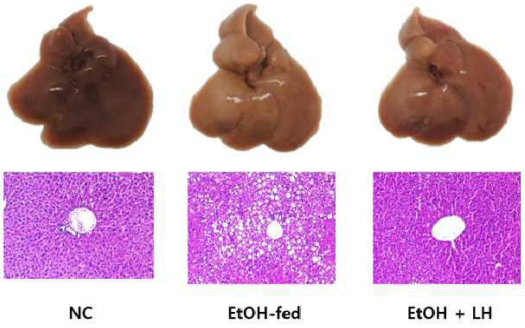
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 포함하는 알코올성 간질환의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 락토바실러스 헬베티커스 (*Lactobacillus helveticus*) CKDB001 균주를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



Group	Fatty change	Grade	Stage
NC	1.25 (0.16)	0.75 (0.16)	0 (0)
EtOH-fed	2.4 (0.22)	1.3 (0.15)	1.3 (0.15)
EtOH + LH	1.78 (0.22)	0.89 (0.11)	0.89 (0.11)

(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/334 (2013.01)
A23V 2400/147 (2023.08)

(72) 발명자
정현채
경기도 군포시 대야1로22번길 8-1, 201동 509호(대야미동, 건양타워1차아파트)
정민교
경기도 남양주시 부평로48번길 140, 110동 1302호 (더샵 남양주퍼스트시티)
최미란
강원도 춘천시 동면 소양강로 104, 102동 604호 (춘천장학사랑으로부영아파트)
민병현
경기도 남양주시 진접읍 내각1로89번길 2-19
김동준
강원도 춘천시 후석로 325, 102동 2408호(후평동, 춘천더샵아파트)
김경환
서울특별시 노원구 노원로 428, 202동 1006호(상계동, 상계2차중앙하이츠아파트)
신창훈
경기도 화성시 수노을1로 192, 704동 1503호(새솔동, 금강펜테리움센트럴파크송산)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345332092
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 1711159001
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

수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 $1x10^{8}$ CFU/g 이상 농도인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간질환은 알코올 섭취로 인한 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 간질환은 염증성 간질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 알코올성 간 기능 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 균주는 $1x10^{8}$ CFU/g 이상 농도인 것인, 식품 조성물.

청구항 7

수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 숙취해소용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 균주는 $1x10^{8}$ CFU/g 이상 농도인 것인, 숙취해소용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 헬베티커스 (*Lactobacillus helveticus*) CKDB001 균주를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 균주를 유효성분으로 포함하여 알코올성 간질환 (Alcoholic liver disease, ALD) 억제 효과 및 장내 미생물 조절을 통한 이로운 효과를 얻기 위해 사용될 수 있는 *L. helveticus* CKDB001 균주에 관한 것으로 이 균주를 사용해 알코올성 간질환 유도 마우스에서 알코올성 지방간 또는 알코올성 간염 억제 및 장내 미생물 조절을 통한 알코올성 간질환에 이로운 효과를 얻는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알코올 및 알코올과 함께 섭취하는 고칼로리 식품 섭취는 비만 및 간질환의 발생을 증가시키고 있다. 알코올은 여러 말단 기관, 주로 간, 장 및 뇌에 손상을 일으킨다. 그러나 알코올 또는 알코올 관련 손상으로 인한 말단 기관 손상의 발병은 매우 개별적이며 예측할 수 없다. 알코올성 간질환은 만성간질환으로, 전세계적으로 발생되는 간질환에 의한 사망률의 주요 원인 중 하나이다. 알코올 오남용으로 인한 환자의 약 20~30%는 간 손상을 일으키고 그보다 더 적은 수는 간경화 또는 알코올성 간염을 일으킨다. 따라서, 알코올성 간질환은 알코올성 지방간으로부터 지방간염, 간섬유증, 간경변증 등으로 진행될 수 있으며 더 심한 경우에는 간암으로도 이어지는 질환이다. [Bajaj, J.S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2019, 16, 235-246.]

[0003] 알코올 섭취로 인한 장내 미생물 구성의 변화는 알코올성 간질환의 발병 및 진행에 영향을 줄 수 있고 질병이 진행됨에 따라 악화될 수 있다. [Seitz, H.K.; Bataller, R.; Cortez-Pinto, H.; Gao, B.; Gual, A.; Lackner, C.; Mathurin, P.; Mueller, S.; Szabo, G.; Tsukamoto, H. Alcoholic liver disease. Nature Reviews Disease Primers 2018, 4, 1-22.]

[0004] 한편, 인체에는 약 100조 개의 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. 인간의 신체에 공생하는 모든 미생물과 이들의 유전정보를 총칭하여 휴먼 마이크로바이옴 (Human microbiome)이라고 하고 각 조직 및 기관은 고유한 생리 기능을 가지고 있기 때문에 서로 다른 다양한 미생물총과 화학적 환경이 존재한다. 인체에는 장에 가장 많은 공생 미생물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있다. [Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squaglia, M.; Tartaglione, A.; Guarino, A. Impact of prebiotics on human health. Digestive and Liver Disease 2006, 38, S283-S287.] [Valdes, A.M.; Walter, J.; Segal, E.; Spector, T.D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. Bmj 2018, 361.]

[0005] 모든 장내 미생물의 약 99%는 유산균과 비피더스균을 포함한 공생 박테리아로 존재한다. 이들은 영양소 처리 및 신호 전달에 기여하고 비타민 및 단쇄지방산 (Short chain fatty acids, SCFAs)과 같은 필수 기능을 가진 대사산물을 생산한다. 적당량을 섭취했을 때 인체에 이로움을 주는 살아있는 균을 프로바이오틱스 (Probiotics) 라고 정의하는데 프로바이오틱스는 대사질환, 장관질환, 알러지성 질환, 호흡기 감염증, 간질환, 기타 질환 등을 개선하는 효능을 가지고 있다. 특히, 비알코올성 지방간질환 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 인슐린저항성 개선과 간지방증을 감소시킨다고 알려져 있으나 현재까지 알코올성 간질환에서의 프로바이오틱스 효능은 미미하게 알려져 있으며 이를 통해 발생하는 메커니즘을 완전히 규명하기 위해서는 광범위한 연구가 요구된다.

[0006] *L. helveticus*는 *Lactobacillus* 속의 한 종으로 발효유 음료 및 일부 유형의 경질 치즈 생산에 가장 일반적으로 사용되는 유산균이며 그람 양성 유산균이다. *L. helveticus*는 수송 시스템 및 세포 내 펩티다제로 구성된 고효율 단백질 분해 시스템을 보유하고 있으며, 치즈 가공에 *L. helveticus*를 사용하는 것 외에도 건강 증진 특성을 지닌 발효유 제조에 산업적으로 응용되고 있다. [Griffiths, M.W.; Tellez, A.M. Lactobacillus helveticus: the proteolytic system. Front Microbiol 2013, 4, 30, doi:10.3389/fmicb.2013.00030.] 선행 연구에 따르면 발효 유제품은 혈압을 낮추고 면역 체계를 자극하며 칼슘 흡수를 촉진하고 병원체에 대한 항독성 효과를 발휘할 수 있다. 이러한 유익한 효과는 *L. helveticus*의 단백질 분해 시스템에 의해 우유 단백질이 가수분해되는 동안 방출되는 다양한 펩타이드에 의해 생성되며, 이는 박테리아에게 성장을 위해 요구되는 영양분을 제공한다는 연

구결과도 있다. 하지만 알코올성 간질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 부족하여 알코올성 간질환의 개선이나 치료에 필요한 *L. helveticus*의 효능 및 기능성 규명이 필요하다.

[0007] 본 발명에서는 리코타치즈 (홈메이드)에서 분리한 *L. helveticus* CKDB001 균주를 사용하였다. 알코올성 간질환 유도 마우스 모델에서 *L. helveticus* CKDB001 균주의 섭취로 인해 장내 미생물총이 조절되어 알코올성 간질환을 개선시킴을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 *L. helveticus* CKDB001 균주가 알코올성 간질환을 개선하고 장내 미생물총 조절을 통한 지방생성 인자 감소와 면역 증진 효과가 있어 상기 균주를 포함하는 생균제를 알코올성 간질환 예방 및 치료용 조성물로 제안함에 있다.

[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, 본 발명은 리코타치즈 (홈메이드)에서 분리된 *L. helveticus* CKDB001 균주를 제공할 수 있고, 상기 균주는 알코올성 간질환에 대한 예방과 치료에 이용될 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 균주는 $1x10^{8}$ CFU/g 이상인 것일 수 있다.

[0013] 또한 본 발명에서, 상기 간질환은 알코올 섭취로 인한 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 간질환은 염증성 간질환인 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 숙취해소용 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 리코타치즈 (홈메이드)에서 분리된 *L. helveticus* CKDB001 균주를 제공하는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따른 *L. helveticus* CKDB001 균주를 알코올성 간질환 유도 마우스에 투여하였을 경우 간 조직에서 지방과 염증 생성 유전자의 발현을 저하시키고 병리학적으로도 지방간과 염증으로부터 보호 및 억제시키는 효과를 가지므로 알코올성 간질환에 대한 예방과 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 에탄올 포함 식이 섭취로 유도한 알코올성 간질환 마우스 모델 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 알코올성 간질환 유도 마우스 모델에서 *L. helveticus* CKDB001 균주의 간 조직을 확인한 결과, 알코올성 간질환 억제 효과를 확인한 것이다.

도 3은 알코올성 간질환 유도 마우스의 혈액에서 *L. helveticus* CKDB001 균주의 간기능 지표 비교도를 나타낸 것이다.

도 4는 알코올성 간질환 유도 마우스의 간에서 *L. helveticus* CKDB001 균주의 염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현 억제 측정도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 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.

[0020] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0021] 본 발명의 조성물이 포함하는 균주인 “락토바실러스 헬베티커스 (*Lactobacillus helveticus*)”는 혐기성이고 운동성이 없는 그람 양성 간균으로, 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속에 속하는 것으로 알려져 있다.

[0022] 본 발명의 락토바실러스 헬베티커스 (*Lactobacillus helveticus*) CKDB001 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture; KCTC)"에 수탁번호 KCTC 13670BP로 기탁된 것이고, 서열번호 2로 표시되는 16s rRNA 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에서, 상기 균주는 분말의 생균제 형태로 포함된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 균주의 농도는 $1x10^8$ CFU/g 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 $1x10^9$ CFU/g 인 것일 수 있다. 상기 농도 이상의 균주를 포함한 경우, 섭취하였을 때 체내에서 장내 마이크로바이옴을 변화시키기에 충분할 수 있다.

[0024] 본 발명의 유효성분인 상기 균주는, 상기 균주를 분리 및/또는 정제한 균체 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체의 추출물, 배양물 상층액, 이들의 농축액, 농축물, 건조물 또한 필요에 따라서 희석액, 희석물 등이며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명에서, 상기 균주의 균체에 대한 배양법, 추출법, 분리법, 농축법, 건조법, 희석법 등은 특별히 한정되지 않는다. 상기 균체를 배양하기 위한 배지로는 EG 배지; LB 배지; RCM 배지; 및/또는 혈소판 (blood plate), 말토오즈 (maltose), 수크로오즈 (sucrose), 글루코오즈 (glucose), 녹말 (starch), 만니톨 (mannitol), 젤라틴 (gelatin), 카제인 (casein), 스킴밀크 (skim milk), 그 밖의 당류 및 효모 추출물에서 선택된 어느 하나 이상의 성분을 포함하는 배지;일 수 있으며, 배양 방법으로는 일반적인 각종 호기적 또는 혐기적인 방법을 사용할 수 있고, 상기 균주의 배양 온도로는 30℃내지 40℃를 설정하고, 배양 중에는 수산화나트륨 등의 알칼리를 사용하여 배지의 pH를 중성으로부터 산성, 예를 들어 pH가 5 내지 6 정도가 되도록 유지하는 중화배양법을 사용할 수도 있다. 이와 같은 중화배양법 외에 회분배양법 등의 임의의 배양 방법을 사용할 수 있으며, 배양한 후에는 필요에 따라서 배양물이나 그 상층액을 농축, 건조, 희석 등을 할 수도 있다. 또한 원심분리법이나 막분리법을 사용하여 배양물의 상층액과 균체를 분리하여 균체를 농축한 상태로 회수할 수도 있다. 그리고 균체에 초음파 처리나 효소 처리 등을 행하여 균체 내의 성분을 추출하거나, 배양물이나 그 상층액, 균체나 그 추출물 등을 건조할 수도 있다. 이들은 본 발명의 상기 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 알코올성 간질환에 의해 발생되는 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 행위라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명의 상기 "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 알코올성 간질환에 의해 발생된 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0028] 본 발명의 상기 "개선"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 알코올성 간질환에 의해 발생되는 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명에서, 상기 균주는 $1x10^8$ CFU/g 이상 농도인 것일 수 있고, 바람직하게는 $1x10^8$ CFU/g 이상 농도인 것일 수 있다.

[0031] 본 발명에서, 상기 간질환은 알코올 섭취로 인한 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에서, 상기 간질환은 염증성 간질환인 것일 수 있다. 본 발명의 상기 염증성 간질환은 간경변(cirrhosis), C형 간염, 알코올성 간질환, 진행성 섬유증으로 인한 간 손상, 간 섬유증, 원발성 담즙성 간경변(PBC) 및 원발성 경화성 담관염 (PSC)에서 선택된 어느 하나 이상이 질환을 동반한 간 염증이 포함될 수 있고, 간 염증의 예방, 치료 또는 개선으로 인한 빌리루빈, 및/또는 간 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제 (ALP, AP, 또는 Alk Phos), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT), 락테이트 데하이드로게나제 (LDH) 및 5' 뉴클레오티다제의 감소를 기대할 수 있다.

[0033] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다.

[0036] 본 발명의 상기 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 투하가 바람직하다. 본 발명에서 상기 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0038] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 상기 균주 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 알코올성 간질환의 진단, 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명에서 상기 “개체”란, 알코올성 간질환의 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 랫드, 마우스 또는 기니 피그 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 상기 비-포유동물의 예로는 조류 또는 어류 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명에서 용어 “투여”란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 경구 또는 비경구 등의 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0043] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 알코올성 간 기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 숙취해소용 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0047] 본 발명에서, 상기 식품 또는 숙취해소용 조성물은 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 일 수 있고, 종류에는 특별한 제한은 없다. 일 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, 정제, 캡슐, 환제 또는 액제 형태 등 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 모두 포함한다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 균주를 포함하는 건강기능식품, 건강식품 및 식품 첨가제 조성물은 식품 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 상기 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 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.

[0050] 본 발명에서 상기 균주를 함유하는 것 외에 추가되는 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 향미제인 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, 건강식품 또는 식품 첨가제 조성물 100g 당 일반적으로 약 1g 내지 20g, 바람직하게는 약 5g 내지 12g일 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 상기 균주를 함유하는 건강기능식품, 건강식품 또는 식품 첨가제 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.

[0052] 본 발명의 또 다른 구현예에 따라, 수탁번호 KCTC 13670BP인 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물이 제공될 수 있다. 상기 사료 조성물은 동물에게 식이를 급여하기 위한 사료 또는 사료 첨가제를 포함하는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 상기 락토바실러스 헬베티커스 CKDB001 균주가 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물에 함유되어 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염 등의

인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명에서, 상기 균주가 사료로 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 상기 균주가 상기 사료 첨가제로 사용될 경우에는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다. 상기 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 구성되어 있다. 또한 사료 조성물은 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 또한 사료 첨가제 조성물은 침지, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제 급여의 대상은 알코올성 간질환의 예방 또는 개선이 필요한 개체로, 상기 개체는 상기 염증성 질환이 발생하였거나 발생할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 포함할 수 있고, 상기 동물은 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 랫드, 마우스 또는 기니 피그; 비-포유동물, 예를 들어 조류 또는 어류 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 조성물의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0058] 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.

[0059] **실시예 1. *L. helveticus* CKDB001 조성물의 준비**

[0060] *L. helveticus* CKDB001 균주는 ㈜종근당바이오에서 공급받았다. *L. helveticus* CKDB001 균주는 동결건조 시킨 미세분말 형태로 전달받았다. *L. helveticus* CKDB001 균주는 $1x10^9$ CFU/g의 농도로 증류수에 현탁 하여 주 2회 공급하였다.

[0061] **실시예 2. 알코올성 간질환 유도 마우스 모델 수립**

[0062] 동물모델 평가를 위하여 알코올성 간질환 유도 마우스 모델을 유도하였고, 샘플을 수집하였다. 실험동물은 인도주의적 치료를 받았다. 또한 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대학 동물실험 및 위원회의 승인을 받았다.

[0063] 먼저 특정 병원체가 없는 7주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두열바이오텍 (서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 22±2℃온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용되었다. 또한 실험 진행 동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적응기간을 포함하였고, 이 기간 동안에는 1주일 동안 정상적인 사료를 제공하였다.

[0064] 식이 섭취로 알코올성 간질환 모델을 유도하기 위해 에탄올 포함 식이를 제조하여 10주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 알코올성 간질환 모델 마우스는 정상대조군(NC, n=10), 알코올성 간질환 유도 식이군(EtOH-fed, n=10), 그리고 알코올성 간질환 유도 식이와 함께 *L. helveticus* CKDB001 균주 섭취군(EtOH+LH, n=10)으로 분류하였다 (도 1).

[0065] 실험 시작 12주 후, 상기 마우스에 흡입 마취제 (에어래인액, 미국)를 투여하여 희생시켰다. 다음으로, 체중과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간 조직을 분리하였고, 전혈 샘플을 원심 분리 (2,000 g, 20분)하여 혈청을 분리하였다. 간 조직은 빠르게 분리하여 -80℃에 보관하였다.

[0066] **실시예 3. 데이터 분석**

[0067] 연속 변수는 평균 및 표준편차로 분석하였다. 조직학 분석과 간 기능 분석 및 분류학적 바이오마커 발견을 위해 One-way ANOVA을 수행하였다. 유의확률 P값 <0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism (ver. 8.0.2, GraphPad Software, LLC, San Diego, CA 92108 USA)를 사용하여 수행하였다.

[0068] **실시예 4. 간 조직의 병리학적 분석**

[0069] 분리된 간 조직을 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀으로 블록을 제작하였고, 조직 섹션에 대하여 헤마톡실린 에오신 (H&E) 염색을 하였다. 알코올성 간질환의 병리학적 분석은 지방증 (Fatty change), 지방증에 의한 실질 조직 침범 정도 평가 [등급0: <5%, 1: 5~33%, 2: >33~66%, 3: >66%], 염증 (Grade), 모든 염증 병소 (foci)의 전반적 평가[등급0: <No foci, 1: <2 foci per 200x field, 2: 2~4 foci per 200x field, 3: >4 foci per 200x field], 간의 손상 단계 (Stage), 손상이 발생한 세포 비율 [등급0: None, 1: Inflammation, 2: Fibrosis, 3: Cirrhosis]로 수행하였다.

[0070] 위와 같이 제시된 병리학적 분석법에 따라 정상식이를 섭취한 정상대조군에 비해 에탄올 포함 식이를 섭취한 군에서 지방증, 염증 및 간의 손상이 발생하였고, *L. helveticus* CKDB001 균주 섭취에 의해 지방증, 염증 및 간의 손상이 감소하였다 (도 2). [Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005;41:1313-21.]

[0071] **실시예 5. 간 기능 지표 측정 및 분석**

[0072] 분리한 혈청으로 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 혈액생화학분석기 (KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Finland)를 이용하여 측정하였다.

[0073] 그 결과 정상 대조군을 나타내는 normal control (NC)군에 비해 에탄올 포함 식이를 섭취한 질병 유도군 (EtOH-fed)에서 간 기능 지표인자인 AST와 ALT의 수치가 증가하였고 에탄올 포함 식이를 섭취한 질병 유도군에 비해 *L. helveticus* CKDB001 균주를 처리한 군 (EtOH+LH)에서는 AST와 ALT의 값이 유의적으로 감소하였다. *L. helveticus* CKDB001 균주는 에탄올 포함 식이에 의해 유도된 알코올성 간질환을 효과적으로 개선하는 결과를 보였다. 상기 결과로부터 *L. helveticus* CKDB001 균주가 에탄올 포함 식이 섭취로 유도되는 알코올성 간질환을 개선하는데 유용한 소재임을 알 수 있다 (도 3).

[0074] **실시예 6. 간 염증 지표 측정 및 분석**

[0075] 간 조직에서 total RNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트 (인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트 (어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 total RNA (2 μg)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버셜 마스터 믹스 (뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하였다.

[0076] *L. helveticus* CKDB001 균주가 면역 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자인 Tnf-α, Il-1β, Cxcl2, Cxcl9, Ly6g, E-selectin의 mRNA level을 분석하였다. 에탄올 포함 식이로 인해

증가한 Tnf-α, Il-1β, Cxcl2, Cxcl9, Ly6g, E-selectin의 유전자 발현이 *L. helveticus* CKDB001 균주에 의해 줄어들었다.

[0077] 이 결과로 *L. helveticus* CKDB001 균주가 에탄올 포함 식이 섭취로 인해 유도되는 염증 발생을 개선하는 소재임을 알 수 있었다 (도 4).

[0078] 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.

수탁번호

[0079]

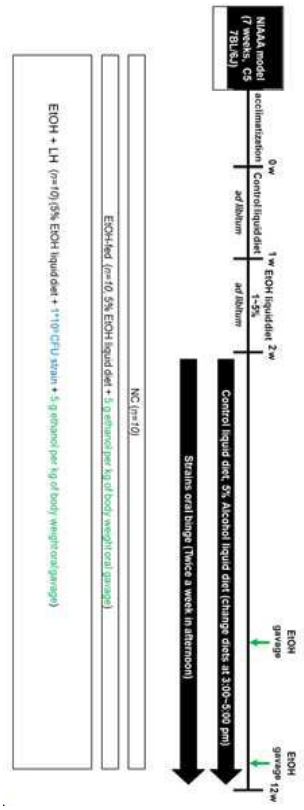
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13670BP

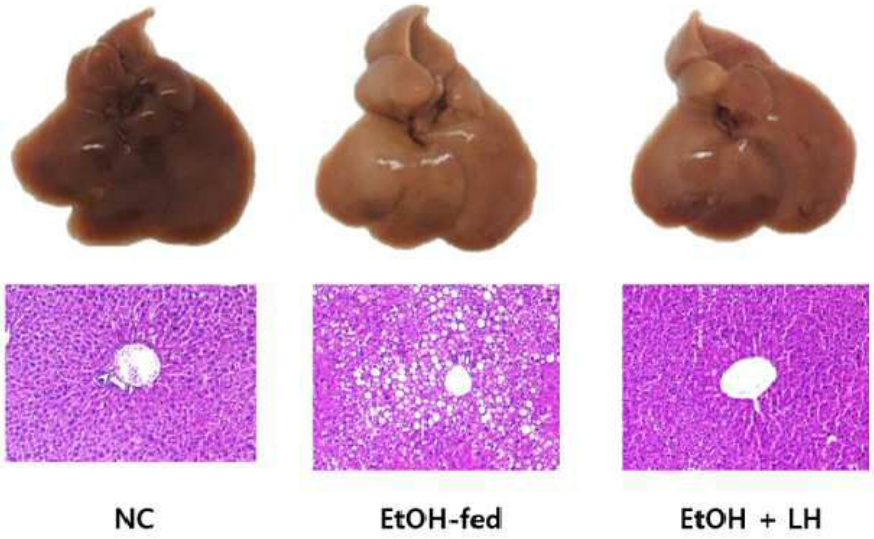
수탁일자 : 20181023

도면

도면1

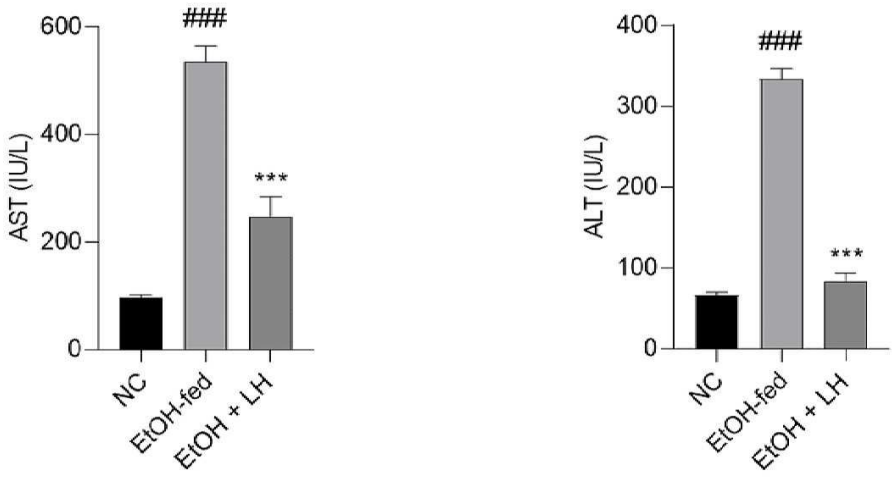


도면2

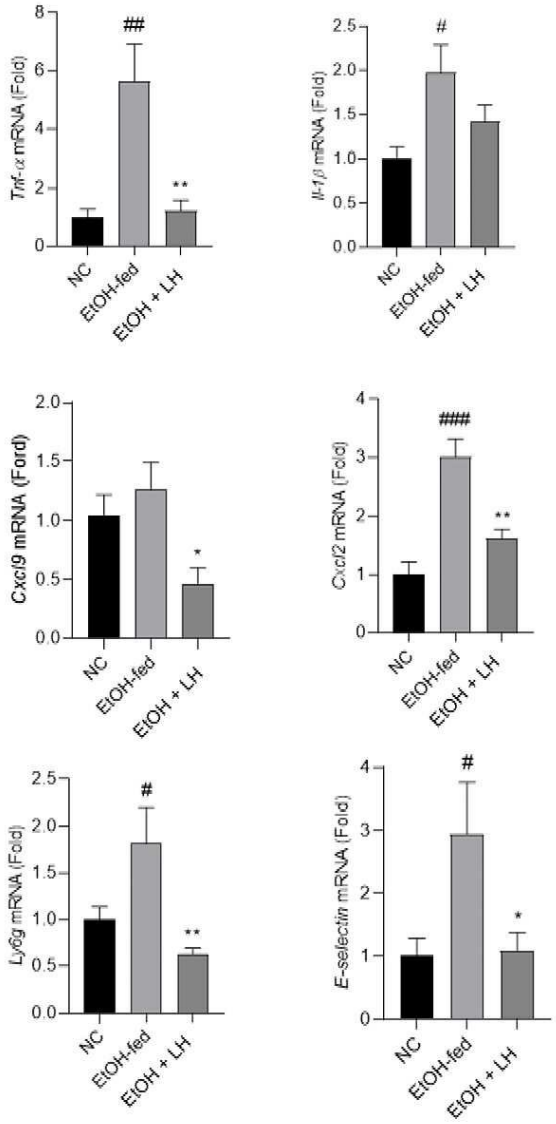


Group	Fatty change	Grade	Stage
NC	1.25 (0.16)	0.75 (0.16)	0 (0)
EtOH-fed	2.4 (0.22)	1.3 (0.15)	1.3 (0.15)
EtOH + LH	1.78 (0.22)	0.89 (0.11)	0.89 (0.11)

도면3



도면4


Tnf-α mRNA (Fold)
##
**
Il-1β mRNA (Fold)
#
Cxcl9 mRNA (Fold)
*
Cxcl2 mRNA (Fold)
###
**
Ly6g mRNA (Fold)
#
**
E-selectin mRNA (Fold)
#
*
NC
EtOH-fed
EtOH + LH