

명세서

발명의 명칭: PMAS 방법을 이용한 개인 맞춤형 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본원은, 장내 환경 개선물질 스크리닝용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 게놈(genome)은 염색체에 담긴 유전자를 말하고, 장균총(microbiota)은 미생물군총으로 환경 내 미생물 군집을 말하며, 마이크로바이옴(microbiome)은 환경 내 총 미생물 군집의 유전체를 말한다. 여기서, 마이크로바이옴(microbiome)은 게놈(genome)과 장균총(microbiota)이 합쳐진 것을 의미할 수 있다.
- [3] 장균총(microbiota)은 숙주 예를 들어, 사람의 면역, 대사물질 등의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 장균총과 숙주는 화학물질 신호를 주고 받으며 장균총에 의한 면역세포의 발현이나 신경전달물질 생성, 단쇄지방산(SCFA; Short chain fatty acids) 등이 숙주 내 체계에 비대한 영향을 미친다.
- [4] 프로바이오틱스/프리바이오틱스는 숙주의 불균형한 장균총을 균형화하고, 이에 따른 건강한 장균총의 대사산물이 호스트의 건강을 증진시킨다. 기존의 프로바이오틱스는 일반 의약품과 마찬가지로, 모든 사람에게 동일한 균양(dose), 유사한 균 종(species)을 부여하고 있다.
- [5] 하지만, 사람마다 마이크로바이옴 유사성(microbiome similarity)은 50% 미만으로, 점차 프로바이오틱스를 개인 맞춤형으로 부여해야 한다는 인식과 연구가 늘어나고 있다
- [6] 따라서, 본 발명은 개인 맞춤형으로 프로바이오틱스 또는 프리바이오틱스를 포함하는 각종 장균총 조절 및 개선을 도모하는 식품 및 건강기능성 식품 및 의약품의 개인별 장균총 적합도를 검증할 수 있는 방법을 제안한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본원은, 장내 환경 개선물질 스크리닝용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 스크리닝 방법, 장내 바이오마커 검출을 통한 질병 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [8] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본원의 제 1 측면은, L-시스테인(L-cystein)을 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[10] 본원 제 2 측면은, (a) 개체로부터 수득한 시료를 제1항의 조성물과 혼합하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 혼합물에 1개 이상의 장내 환경 개선 후보물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 배양물을 분석하는 단계를 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[11] 본원의 실시예 및 구현예들에 따르면, 장균총과 장균총 대사체 기반으로 체외조건에서 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품의 검증 방법을 제공함으로써, 개인 맞춤형으로 장균총 개선 후보 효능 물질을 스크리닝하는 유효한 분석 방법을 제공할 수 있다.

[12] 이러한 본원에 따른 방법은 바이오마커 기반 스크리닝 시스템에 적용할 수 있으며, 개인 맞춤형 효과적인 스크리닝 방법으로 개인 맞춤형 후보 물질을 빠르게 검증할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은, PMAS기법을 통한 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 스크리닝 과정에 대한 일 예시도를 나타낸 것이다.

[14] 도 2는, PMAS 기법을 통한 샘플 분석을 설명하기 위한 일 예시도를 나타낸 것이다.

[15] 도 3은, PMAS 기법을 통한 샘플 분석 결과를 해석하기 위한 일 예시도를 나타낸 것이다.

[16] 도 4는, PMAS 실시 후 획득된 분석 결과를 통해 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 후보물질을 선별하는 일 예를 나타낸 것이다.

[17] 도 5는 PMAS 배지 구성에 따른 단쇄지방산 함량 분석 결과를 나타낸 도면이다.

[18] 도 6은 PMAS 배양 시간에 따른 단쇄지방산 함량 분석 결과를 나타낸 도면이다.

[19] 도 7은 본원의 PMAS 기법의 반복 재현성을 나타낸 도면이다.

[20] 도 8은 본원의 PMAS 기법의 임상 결과와의 동일성을 나타낸 도면이다.

[21] 도 9는 본원의 PMAS 시행 시의 플레이트 웰 구성의 일 예시도를 나타낸 것이다.

[22] 도 10은 본원의 PMAS 검사에 따른 뷰티르산양 변화 분석의 일 예시도를 나타낸 것이다.

[23] 도 11은 본원의 PMAS 검사에 따른 미생물 다양성 변화 분석의 일 예시도를 나타낸 것이다.

[24] 도 12는 본원의 PMAS 검사에 따른 미생물 구성과 뷰티르산의 상관관계 분석의 일 예시도를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [26] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [27] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [28] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현에 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현에 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [29] 본원의 제 1 측면은, L-시스테인(L-cystein)을 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [30] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 장내 환경을 개선할 수 있는 후보물질을 선별하기 위한 것으로서, 구체적으로 장내 환경 개선의 진행상황을 확인하여 상기 후보물질이 장내 환경을 개선할 수 있는지 여부를 평가하는 일련의 과정에서 사용되는 조성물로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [31] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 사용자 개인의 내장 환경을 체외에서 동일/유사하게 형성(mimicking)하기 위한 조성물로서, 상기 조성물을 이용하면 체외 조건에서도 후보물질의 장내 환경 개선 여부를 정확하고 효율적으로 확인할 수 있는 바, 개인 맞춤형 장내 환경 개선 물질을 스크리닝 하는 데에 유용하게 이용할 수 있다.
- [32] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “장내 환경 개선”은 장 내 미생물 및 상기 미생물들의 대사체 등의 구성을 유리하게 바꾸는 것으로서, 장내 환경 개선에 의해 장내 유익균 및 유익균 대사체가 증가하여, 비타민 합성, 소화 흡수 증진, 감염 예방 및 면역 강화 등의 효과를 나타낼 수 있으며, 유해균 및 유해균 대사체 등이 감소하여, 장내 부패 감소, 세균 독소 감소 및 발암 물질 등을 감소시키는 것을 의미한다. 또한 장내 환경을 개선함으로써 설사, 변비 및 장염 등의 장 관련 질병뿐만 아니라, 암, 비만, 당뇨 및 뇌관련 질병 등을 예방 또는 치료 할 수 있다.
- [33] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 장내 환경 개선은 장균총의 미생물 다양성 증가, 장내 미생물로부터 유래된 내독소 및 황화수소의 감소, 유익한 장균총 유래 대사체의 증가, 단쇄지방산 증가 또는 감소, 유익균의 종류 및 수의 증가 및 유해균의 종류 및 수의 감소 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수

있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [34] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "L-시스테인 (L-cystein)"은 아미노산류 강화제 중 하나로서, 생체 내에서 글루타치온의 구성성분으로 대사에 중요한 역할을 하며, 과일주스 등의 갈변 방지 및 비타민 C의 산화 방지 등에도 이용된다.
- [35] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-시스테인은 0.001%(w/v) 내지 5%(w/v)의 농도로 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 0.01%(w/v) 내지 0.1%(w/v)의 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-시스테인은 다양한 종류의 제형, 또는 염의 형태로 상기 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물에 포함될 수 있으며, 구체적으로 상기 L-시스테인은 L-시스테인 염산염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 뮤신(Mucin)을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [38] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "뮤신(Mucin)"은 점막에서 분비되는 점액물질로 점액소 또는 점소라고도 불리우며, 턱밀샘 뮤신이 있으며 그 외에 위점막뮤신, 소장뮤신 등이 있다. 뮤신은 당단백질의 일종으로서, 실제 장 내 미생물들이 활용할 수 있는 탄소원 및 질소원이 되는 에너지원 중 하나라고 알려져 있다.
- [39] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 뮤신은 0.01%(w/v) 내지 5%(w/v)의 농도로 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 0.1%(w/v) 내지 1%(w/v)의 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 뮤신을 제외한 영양물질을 포함하지 않을 수 있으며, 구체적으로 단백질 및 탄수화물과 같은 질소원 및/또는 탄소원을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [41] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 탄소원 및 질소원이 되는 단백질은 트립톤, 펩톤 및 효모 추출물 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로 트립톤일 수 있다.
- [42] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 탄소원이 되는 탄수화물은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스와 같은 단당류와 말토오스, 락토오스와 같은 이당류 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로 글루코스일 수 있다.
- [43] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 글루코스(Glucose) 및 트립톤(Tryptone)을 포함하는 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 염화나트륨(NaCl), 탄산나트륨(NaHCO_3), KCl(염화칼륨) 및 헤민(Hemin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 상기 염화나트륨은 10 내지 100mM의 농도로 포함되는 것일 수 있고, 상기 탄산나트륨은 10 내지 100mM의 농도로 포함되는 것일 수 있고, 상기 염화칼륨은 1 내지 30mM의

농도로 포함되는 것일 수 있으며, 상기 헤민은 1×10^{-6} g/L 내지 1×10^{-4} g/L 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [45] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 배양 배지 조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 장내 환경 개선 물질은 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프로바이오틱스(Probiotics)"는 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 균을 의미하는 것으로서, 구체적으로, 장에 도달하여 장 점막에서 생육할 수 있게 된 프로바이오틱스는 젖산을 생성하여 장내 환경을 산성으로 만드며, 산성 환경에서 견디지 못하는 유해균들은 그 수가 감소하게 되고 산성에서 생육이 잘 되는 유익균들은 더욱 증식하게 되어 장내 환경을 건강하게 만들어 주게 된다. 상기 프로바이오틱스는 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 락토코커스 (*Lactococcus*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 프로바이오틱스는 상기 균주를 포함하는 발효유, 과일, 분말 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [48] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프리바이오틱스(Prebiotics)"는 유익균인 프로바이오틱스를 활성화시키는 동시에 장 속의 나쁜 유해균을 억제하는 성분으로, 프로바이오틱스가 잘 자랄 수 있도록 장내 환경을 조성하는 역할을 한다. 또한, 상기 프리바이오틱스는 프로바이오틱스의 생성을 위해 분해하고 에너지원으로 활용할 먹이 역할을 하는 것으로서, 체내에 흡수되지 않는 당류이기 때문에 소장에 흡수되지 않고 그대로 장까지 이동해 유산균의 먹이가 되는 것은 물론 유해균까지 감소시키는 효과가 있다.
- [49] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 장내 환경을 체외(in vitro) 조건에서 구현하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [50] 본원의 제 2 측면은, (a) 개체로부터 수득한 시료를 상기 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물과 혼합하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 혼합물에 1개 이상의 장내 환경 개선 후보물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 배양물을 분석하는 단계를 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법을 제공한다. 본원의 제1측면과 중복되는 내용은 본원의 제2측면의 방법에도 공히 적용된다.
- [51] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 장내 환경 이상에 의한 질병 예방 및 치료용 물질을 스크리닝하는 방법일 수 있다.
- [52] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 장내 환경을 개선할 수 있는 후보물질을 장내 환경 개선이 필요한 개체로부터 수득한 시료에 일련의 과정을 통해 처리한 후, 장내 환경 개선의 진행상황을 확인하여 상기 후보물질이 장내 환경을 개선할 수 있는지 여부를 평가하는 일련의 과정으로 이해될 수 있으나,

특별히 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로, 상기의 장내 환경 개선 정도를 확인하여, 장내 환경이 개선되는 경우에는, 상기의 후보물질을 장내 환경 개선 물질로 판단할 수 있다.

- [53] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 *in vitro*(체외) 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [54] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"는 장내 환경에 이상이 있거나, 장내 환경 이상에 의한 질병이 발병 또는 발병할 가능성이 있거나, 또는 장내 환경이 개선되어야 할 필요성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [55] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "시료"는 상기 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 세포, 소변, 분변 등일 수 있으나, 장균총, 장내 미생물 대사체, 내독소, 단쇄지방산 등 장내에 존재하는 물질을 검출할 수 있는 한, 그 종류가 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 시료 준비 과정, 시료 전처리 과정, 시료 분석 과정 및 데이터 분석 과정, 도출된 데이터를 통해 개인 맞춤형 장내 환경 개선 물질을 선별하는 과정을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 고속 스크리닝 방법일 수 있으며, 상기 고속은 기존에 알려진 장균총 분석 방법 및 장내 환경 분석 방법보다 신속한 것을 의미하는 것으로서, 구체적으로 상기 고속은 12시간 내지 48시간, 보다 구체적으로 18시간 내지 24시간을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [58] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 12시간 내지 48시간동안 수행하는 것일 수 있으며, 구체적으로 18시간 내지 24시간동안 수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 혐기 조건에서 수행되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 방법의 (b) 단계의 배양은 혐기 조건에서 수행되는 것일 수 있다.
- [60] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 장내 환경 개선 후보물질은 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양물을 분석하는 것은, 장내 환경의 개선 여부를 분석하는 것으로서, 구체적으로 배양물에 포함된 내독소(endotoxin), 장내 이상 발효 결과물로서 황화수소(hydrogen sulfide), 단쇄지방산(Short-chain fatty acids, SCFAs) 및 장균총 유래 대사체 중 하나 이상의 종류, 함량 및/또는 농도를 분석하는 것일 수 있으며, 상기 시료에 후보물질을 처리하였을 때 변하는 종류, 함량 및/또는 농도를 분석하는 것일 수 있다.

- [62] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "내독소(endotoxin)"는 세균의 세포 내부에서 발견되는 독성 물질로 단백질·다당류·지질의 복합체로 이루어진 항원 등이다.
- [63] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 내독소는 LPS(Lipopolysaccharide)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 LPS는 구체적으로 그람 음성(Gram negative), 프로 염증성(Pro-inflammatory)일 수 있다.
- [64] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "단쇄지방산 (short-chain fatty acid: SCFA)"은 단쇄지방산은 탄소수가 6개 이하인 짧은 길이의 지방산을 의미하는 것으로서, 장내 미생물로부터 생성되는 대표적인 대사산물이다. 단쇄지방산은 면역력 증가, 장내 림프구 안정, 인슐린 신호 저하, 교감 신경 자극 등 체내에 유용한 기능을 가지고 있다.
- [65] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 단쇄지방산은 포름산(Formate), 아세트산(Acetate), 프로피온산(Propionate), 부티르산 (Butyrate), 아이소부티르산 (Isobutyrate), 발레르산(Valerate) 및 아이소발레르산(Iso-valerate)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양물을 분석하는 것은, 배양물의 장균총에 포함된 균의 종류, 함량, 농도, 및/또는 다양성 변화를 분석하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [67] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 장균총은 장내 유익균 및 유해균을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 장내 유익균은 락토바실러스(Lactobacillus)와 비피도박테리움(Bifidobacterium) 등을 포함하는 것일 수 있으며, 장내 유해균은 프로테오박테리아(Proteobacteria) 및 클로스트리듐 디피실리균(Clostridium difficile) 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본원의 일 구현예에 있어서, 내독소(endotoxin), 장내 이상 발효 결과물로서 황화수소(hydrogen sulfide), 단쇄지방산(Short-chain fatty acids, SCFAs) 및 장균총 유래 대사체, 장균총, 및 장내 미생물 다양성을 분석하는 방법은 흡광도 분석법, 크로마토그래피 분석법, 차세대시퀀싱방법(Next Generation Sequencing) 등의 유전자 분석법, 메타지놈 분석법 등의 통상의 기술자가 상기 분석을 위해 이용할 수 있는 다양한 분석법을 이용할 수 있다.
- [69] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 (c) 단계의 분석 결과를 대조균의 분석 결과와 비교하여 단쇄지방산의 함량을 증가시키거나, 장균총 내의 유익균의 종류 및 함량을 증가시키거나, 내독소 및 황화수소의 함량을 감소시키거나 또는 장균총 내의 유해균의 종류 및 함량을 감소시키는 후보물질을 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [70] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "대조균"은 장내환경 개선 후보물질 처리에 따른 장내 환경 변화(단쇄지방산, 장균총, 내독소, 황화수소, 장내 미생물 대사체의 종류, 농도, 및/또는 함량 등)와 대조될 수 있는 시료 또는 데이터라면

그 종류가 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로, 아무런 처리를 하지 않은 개체의 시료, 또는 비히클, 식염수, DMSO 등의 대조물질만을 처리한 개체의 시료 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [71] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 장균총, 온도, 습도, 모션을 포함하는 사용자 개인의 내장 환경을 체외에서 동일/유사하게 형성(mimicking)하고, 일정 개수 이상의 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 후보들을 병렬분석 가능하며, 이를 통해 가장 효과적인 개인 맞춤형 장균총 개선 후보 물질을 고속으로 스크리닝할 수 있다.
- [72] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 체내 장내 미생물 환경을 가장 용이하게 대표 할 수 있는 사람 및 다양한 동물의 분변 샘플을 대상으로 체외(in-vitro)에서 전처리, 장균총 개선 후보 물질 처리, 후보 물질의 기능성 및 행동 양식의 검증(Verification of functionality and mode of action)을 수행하며, 후보 물질의 결과로 초래된 장균총의 분류학적 식별(Taxonomic identification), 미생물 안전성(Microbial safety) 및 미생물 기능성(Microbial functionality)을 조사할 수 있으며, 이와 같이 개인의 분변과 특수 배지를 포함하는 고속 스크리닝 방법(Fast screening method containing individual's feces and special media) 및 분변 유래 마이크로바이옴(microbiome)과 대사물질(metabolites) 분석을 통하여 효율적인 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품을 스크리닝(Efficient personalized probiotics screening)할 수 있다.
- [73] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 분변 등의 시료를 이용하여 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품을 스크리닝(screening)할 수 있는 방법을 제안하는 것을 그 요지로 한다. 이하, 본원에 따른 방법은 PMAS(Personalized Pharmaceutical Meta-Analysis Screening)이라 칭하여 설명한다.
- [74] 본원 제 3 측면은, 장내 환경 이상에 의한 질병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다. 본원의 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 본원의 제3측면의 방법에도 공히 적용된다.
- [75] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 개체로부터 획득한 시료에서 장내 환경 이상에 의한 질병을 진단하기 위한 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 방법은 샘플 준비 과정, 샘플 전처리 과정, 샘플 분석 과정 및 데이터 분석 과정, 도출된 데이터를 토대로 질병을 진단하는 과정을 포함하는 것일 수 있다.
- [76] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 바이오마커는 장내에서 검출되는 물질일 수 있으며, 구체적으로, 장균총, 내독소, 황화수소, 장내 미생물 대사체, 단쇄지방산 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [77] 이하, 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원은 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [78] [실시예]
- [79] **실시예 1. PMAS(Personalized Pharmaceutical Meta-Analysis Screening) 기법을 이용한 개인 맞춤형 후보 물질 스크리닝 시스템의 전반적 과정**
- [80] 본원은 개인의 분변 등의 시료를 이용하여 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 등을 체외(in vitro) 조건에서 스크리닝하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 본원에서는 상기 스크리닝 시스템을 PMAS(Personalized Pharmaceutical Meta-Analysis Screening)라 칭하여 설명한다.
- [81] 도 1은 PMAS기법을 통한 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 스크리닝 과정에 대한 일 예시도를 나타낸 것으로, 도 1을 이용하여 본원의 스크리닝 시스템에 대한 전반적인 과정을 설명하면 다음과 같다.
- [82] (1) 시료 준비
- [83] 사람 또는 동물의 분변과 PMAS 배지를 1:12의 비율로 혼합하고, 스토마커(stomacher)를 이용하여 균질화한 후, 거름망을 이용하여 변의 잔여물은 걸러낸다. 프로바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 후보 물질 처리에 앞서, 변과 배지가 섞인 혼합물을 혐기 챔버 안에서 4시간동안 환원한다.
- [84] (2) 분변-배지 혼합물 분주
- [85] 혐기 챔버 내에서 분변과 배지의 균질화된 혼합물을 96-웰 플레이트 등의 배양 플레이트에 각각 동일 양씩 분주한다.
- [86] (3) 후보 물질 처리
- [87] 처리할 프로바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 후보 물질은 멸균된 1x PBS에 현탁시키고 농도와 양을 균일화하여 분변-배지 혼합물이 들어있는 배양 플레이트에 각각 분주한다.
- [88] (4) 혐기 배양
- [89] 온도, 습도 및 모션을 장내 환경과 유사하게 형성한 채로 혐기 조건에서 플레이트를 배양하여 각 실험군을 발효 배양 시킨다.
- [90] (5) 샘플 분석
- [91] 배양된 각각의 실험군을 원심분리하여 상등액과 침전물(pellet)을 분리한 후, 상등액으로부터 대사체, 단쇄지방산, 독성 물질 등을 분석하고, 침전물로부터 장균총 분석을 수행한다.
- [92] **실시예 2. PMAS 기법의 샘플 분석 과정**
- [93] 상기 실시예 1의 PMAS 기법에서 샘플 분석 단계의 과정의 일 예시도는 도 2 및 도 3에서 나타낸다.
- [94] 구체적으로, 후보물질을 처리한 실험군의 배양이 종료된 후, 배양된 각각의 실험군을 원심분리하여 얻어진 상등액으로부터 흡광도 측정분석법과 크로마토그래피 분석법을 통해 황화수소 및 박테리아 LPS(내독소) 등의 독성

물질 분석 및 단쇄지방산 등의 미생물 대사체 분석을 수행하며, 원심분리하여 얻어진 침전물(pellet)으로부터 배양-비의존적장균총 분석(Culture-independent analysis method)을 수행한다. 예를 들어, N,N-디메틸-p-페닐렌디아민 (N,N-dimethyl-p-phenylene-diamine)과 염화철 (FeCl₃)로 반응시키는 메틸렌블루법(methylene blue method)을 통해서 배양을 통해 생성된 황화수소의 변화량을 측정하고, 내독소 어세이 키트 (Endotoxin assay kit) 분석을 통해 염증반응 증진요인 중 하나인 내독소(Endotoxin)의 레벨을 측정할 수 있다. 또한 가스 크로마토그래피 분석법을 활용하여 미생물 대사체인 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트 등의 단쇄지방산을 분석할 수 있다. 장균총은 시료 내 유전체를 전부 추출한 후 GULDA방법에서 제시된 박테리아 특이적인 프라이머를 사용한 실시간 PCR 분석법(real-time PCR)이나 차세대시퀀싱(Next Generation Sequencing)과 같은 메타지놈(metagenome)분석을 통하여 유전체 기반의 분석법으로 분석할 수 있다. 즉, 본원에 따른 방법은 독성 물질 분석, 단쇄지방산 등을 포함하는 장균총 유래 대사체 분석 및 장균총 분석 중 적어도 하나에 기초하여 개인 맞춤형 장균총 개선 후보 물질을 스크리닝할 수 있으며, 구체적으로, 내독소(endotoxin)와 황화수소(hydrogen sulfide)를 포함하는 독성 물질 분석을 통해 내 독성 물질의 레벨이 줄어든 후보 물질을 찾고, 단쇄지방산 분석을 통해 미리 설정된 타겟 단쇄지방산 변화를 확인하며, 장균총 분석을 통해 후보 물질 처리 전후 변화된 장균총을 확인함으로써, 개인 맞춤형 장균총 개선 후보 물질을 스크리닝할 수 있다.

- [95] 실시예 3. PMAS 기법의 샘플 분석 결과를 이용한 개인 맞춤형 후보 물질 스크리닝 과정
- [96] 상기 실시예 2의 샘플 분석 결과를 토대로 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 등을 스크리닝하는 과정의 일 예시도는 도 4에서 나타낸다.
- [97] 구체적으로, PMAS 시행 후 분석된 결과 중 독성 물질 생성 증감, 단쇄지방산 변화, 유해균 및 유익균 증감 정도를 판단하여 처리한 후보 물질의 장균총 개선 효능 유무를 판별한다. 먼저 발효 배양 종료 후 원심분리를 시행했을 때 상등액이 최소 분석 가능 양 이상 남지 않으면 PMAS 처리 및 배양을 다시 거쳐서 분석에 사용할 상등액 양을 충분한 만큼 확보한다. 이 중 독성물질이 증가하고 전체 단쇄 지방산 양이 정상 범위 외이며, 유해균이 처리 전과 비교하여 유의적으로 감소하였을 경우, 이는 처리 물질에 의하여 장균총 불균형이 유도된 것으로 간주되어 선별 대상에서 제외된다. 단 유익균이 수적으로 감소한 경우에는 차세대시퀀싱방법(Next Generation Sequencing)등을 활용한 메타지놈(metagenome)분석을 통해 조사한 전체 장균총의 다양성이 유의적으로 감소한 경우에만 선별 대상에서 제외한다. 상기 내용 외에 추가적으로 프로바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품 후보 물질이 장내 특정 바이오마커에 미치는 영향을 참고하여 스크리닝하고자 하는 경우, 기

상술한 선별 기준이 통과한 경우에 한하여 해당 바이오마커 관련 분석을 시행하여 선별한다.

- [98] 즉, 본 발명은 내 독소(endotoxin)와 황화수소(hydrogen sulfide)를 포함하는 독성 물질 분석, 단쇄 지방산(Short chain fatty acids)을 포함하는 장균총 유래 대사체 분석, 프로테오박테리아(Proteobacteria)와 클로스트리듐 디피실리균 (Clostridium difficile) 등을 포함하는 장내 유해균 분석 및 락토바실러스 (Lactobacillus) 및 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 등을 포함하는 장내 유익균 분석 중 적어도 하나에 기초하여 개인 맞춤형 장균총 개선 후보 물질을 스크리닝할 수 있는데, 구체적으로 내독소(endotoxin) 및 황화수소(hydrogen sulfide)를 포함하는 독성 물질 분석을 통해 독성 물질의 레벨이 줄어든 후보 물질을 찾고, SCFA 분석을 통해 미리 설정된 타겟 단쇄 지방산 변화를 확인하며, 장내 유해균 분석 및 상기 장내 유익균 분석을 통해 장내 유해균 및 장내 유익균의 증감 정도를 확인함으로써, 개인 맞춤형 장균총 개선 후보 물질을 스크리닝할 수 있다. 예컨대, 본원은 독성 물질 생성이 유의적으로 증가하지 않고, 총 단쇄 지방산 양이 정상 범위 이내이며, 유해균이 유의적으로 증가하지 않고, 유익균이 유의적으로 감소하지 않은 경우 또는 유익균이 유의적으로 감소하더라도 장균총 다양성이 증가하는 경우 전체 단쇄지방산 중 뷰티르산의 비율이 가장 크게 증가하는 실험군을 선별하여 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 식품, 건강 기능성 식품 및 의약품 스크리닝을 수행할 수 있다. 물론, 본 발명은 독성 물질 생성이 유의적으로 증가하지 않고, 총 SCFA 양이 정상 범위 이내이며, 유해균이 유의적으로 증가하지 않고, 유익균이 유의적으로 감소하지 않은 경우 또는 유익균이 유의적으로 감소하더라도 장균총 다양성이 증가하면서 추가적인 장내 특정 생체 지표 분석이 필요한 경우 특정 생체 지표에 대한 증감 및 유무를 추가 분석하고, 분석 결과에 따라 PMAS 물질 처리의 결과 특정 생체 지표가 영향을 받는 실험군을 선별하여 개인 맞춤형 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강 기능성 식품 및 의약품 스크리닝을 수행할 수 있다.

[99] **실험예 1. PMAS 기법의 배지 조성 확인**

- [100] 상기 실시예 1의 PMAS 기법에서 사용하기 위한 PMAS 배지의 최적의 조성을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [101] 구체적으로, 하기 표 1에 기재된 다양한 물질 조성을 포함하는 배지에 분변 샘플을 1:12 (w/v) 비율로 혼합한 후, 스토마커(Sthomacher)를 이용하여 균질화하였다.

[102] [표1]

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5
글루코스(Glucose)	O	X	O	X	X
트립톤(Tryptone)	O	X	X	O	X
뮤신(Mucin)	X	X	X	X	O
L-시스테인 염산염(L-cystein Hydrochloride)	X	O	O	O	O

- [103] 다음으로, 상기 분변 시료를 96-웰 플레이트에 분주하고, 대조군에는 아무 물질도 처리하지 않고, 프리바이오틱스 군에는 프리바이오틱스 체제를 처리한 후(배지:분변샘플:프리바이오틱스 = 1:12:2(w/v)), 혐기 환경, 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 대조군과 프리바이오틱스 군의 뷰티르산, 프로피온산 및 아세트산의 함량을 비교 분석하였다.
- [104] 그 결과, Test 1 및 Test 3의 경우 장내 미생물에 의해 발효되어 단쇄지방산을 생성한다고 알려져 있는 프리바이오틱스를 처리하였음에도 불구하고, 뷰티르산, 프로피온산 및 아세트산의 함량에 변화가 없었으며, Test 4의 경우는 프리바이오틱스를 처리하였을 때 오히려 뷰티르산, 프로피온산 및 아세트산의 함량이 감소된 것을 확인하였다(도 5).
- [105] 반면, Test 2 및 Test 5의 경우에는 프리바이오틱스를 처리한 군에서 전반적으로 단쇄지방산의 함량이 증가된 것을 확인하였으며(도 5), Test 5의 경우 Test 2보다 단쇄지방산의 절대량(mM)이 많이 검출되어 분석시 용이한 바, 이하의 실험예에서는 Test 5 조성을 가진 배지를 이용하여 실험을 수행하였다.
- [106] 상기 결과를 종합해보면, L-시스테인 염산염이 포함되면서 영양성분이 포함되지 않은 조성(Test 2) 및 L-시스테인 염산염과 뮤신이 포함된 조성(Test 5)의 경우 프리바이오틱스 처리에 따른 실제 예상한 결과를 얻을 수 있다는 것을 알 수 있는 바, L-시스테인 염산염 또는 L-시스테인 염산염 및 뮤신이 포함되면서 글루코스 등의 탄수화물 및 트립톤 등의 단백질이 포함되지 않은 조성을 갖는 배지를 이용하면 체외 조건에서 장내 환경을 유사하게 재현함으로써 신속하고 정확하게 후보물질 처리에 따른 장내 환경 변화를 확인할 수 있다.
- [107] **실험예 2. 장내 환경 개선 물질을 스크리닝 하기 위한 배양시간 설정**
- [108] 상기 실시예 1의 PMAS 기법에서의 혐기 배양 단계에서의 최적의 배양 시간을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [109] 구체적으로, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 다만 혐기 배양의 배양시간을 0시간, 18시간, 21시간, 24시간, 40시간 및 48시간으로 설정하여 실험을 수행하였고, 배양 후 뷰티르산, 프로피온산 및 아세트산의 함량을 측정하였다.

- [110] 그 결과, 대조군과 프리바이오틱스군 모두 배양 18시간까지 단쇄지방산의 함량이 급격히 증가되었으며, 그 이후로는 정체기에 돌입하는 것이 확인되었다(도 6).
- [111] 상기 결과를 토대로, 본원의 PMAS 기법을 이용하여 고속으로 후보물질을 스크리닝하기 위해서는 혐기 배양 시간을 18시간으로 설정하는 것이 가장 효율적임을 알 수 있다.
- [112] **실험예 3. PMAS 기법을 이용한 개인 맞춤형 후보물질 스크리닝 방법의 유효성 확인**
- [113] 본원의 PMAS 기법을 이용하여 개개의 장내 환경을 체외(in vitro) 조건에서 형성하여 개인 맞춤형 후보물질을 정확하게 스크리닝할 수 있는 지 유효성을 확인하기 위해 하기의 실험들을 수행하여 확인하였다.
- [114] **(1) 반복 재현성 확인**
- [115] 본원의 PMAS 기법을 이용한 분석 결과가 동일 개체에서 반복적으로 재현되는 지 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [116] 구체적으로, 서로 다른 사람 A와 B로부터 각기 다른 날짜에 수거한 분변 샘플(A1 ~ A4, B1 ~ B3)에 대한 PMAS 분석 결과의 반복 재현성을 확인하기 위해, 물질 처리를 하지 않은 대조군과, 5가지의 후보물질을 처리한 실험군의 뷰티르산 양을 측정하였고, 5가지 후보물질 처리군의 뷰티르산 정량값을 각각의 대조군의 뷰티르산 정량값으로 나눠, 각 샘플 당 후보물질 처리시의 뷰티르산 증감량 파악하였다. 다음으로 각 샘플의 시기별 5가지 후보물질 처리 결과를 모두 상관관계를 피어슨 상관 관계를 이용하여 분석하였다(상관계수가 1에 근접할수록 더 유사함을 나타냄).
- [117] 그 결과, 같은 사람에게서 수거된 분변샘플에 대한 PMAS 분석 결과는 상당히 유사한 경향을 보이거나(상관계수 0.8 이상), 다른 사람 간의 PMAS 분석 결과와는 차이를 보이는 것을 확인할 수 있는바(도 7), 상기 결과를 종합해보면, 본원의 PMAS 기법을 이용하면 체외 조건에서도 동일인의 시료에서의 결과가 반복적으로 재현됨을 알 수 있다.
- [118] **(2) 임상결과와의 동일성 확인**
- [119] 본원의 PMAS 기법을 이용한 분석 결과가 실제 임상결과와 동일성을 나타내는지 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [120] 구체적으로, 24명의 사람으로부터 분변 샘플을 확보하였고, 상기 분변 샘플에 프로바이오틱스 A 처리에 따른 단쇄지방산 함량의 증감 여부를 본원의 PMAS 기법을 이용하여 분석하였다.
- [121] 다음으로, 상기 24명의 사람이 실제로 프로바이오틱스 A를 복용한 후, 복용 전 후의 분변 샘플의 단쇄지방산 증감 여부를 임상적으로 확인하였고, 상기 임상 결과를 상기 PMAS 결과와 비교 분석하였다.
- [122] 그 결과, 24명 중 12명은 실제로 프로바이오틱스 A를 복용한 후 분변 내 단쇄지방산이 증가된 것이 확인되었고, 나머지 12명은 단쇄지방산이 감소된

것으로 확인되었다. 또한, 프로바이오틱스 A의 효과를 PMAS 기법으로 확인한 결과 총 14명의 샘플에서 단쇄지방산이 증가되었으며, 10명의 샘플에서 단쇄지방산이 감소된 것으로 확인되었으며(도 8), 상기 결과를 토대로 하기와 같이 분석하였다.

- [123] 1) PMAS 결과 단쇄지방산이 증가하였을 때, 실제로도 단쇄지방산이 증가된 경우 - $11/14 = 0.79$
- [124] 2) PMAS 결과 단쇄지방산이 감소하였을 때, 실제로도 단쇄지방산이 감소된 경우 - $9/10 = 0.9$
- [125] 3) 실제 단쇄지방산이 증가한 사람 중 PMAS 결과에서도 단쇄지방산이 증가한 경우 - $11/12 = 0.92$
- [126] 4) 실제 단쇄지방산이 감소한 사람 중 PMAS 결과에서도 단쇄지방산이 감소한 경우 - $9/12 = 0.75$
- [127] 5) 단쇄지방산 증가에 대한 false negative - $1-0.92 = 0.08$
- [128] 6) 단쇄지방산 증가에 대한 false positive - $1-0.75 = 0.15$
- [129] 7) Prevalence(실제 프로바이오틱스A를 복용하고 단쇄지방산이 증가할 빈도)를 0.5라고 가정할 시, $PPV = (0.92 \times 0.5) / (0.92 \times 0.5 + (1-0.75) \times (1-0.5)) = 0.86$
- [130] 상기 결과를 종합해보면, 본원의 PMAS 기법은 체외(in vitro) 조건에서도 동일 개체 내에서의 반복성을 재현할 수 있고, 실제 임상과 매우 유사한 결과를 얻을 수 있는 바, 이를 토대로 상기 PMAS 기법은 장내 환경을 매우 유사하게 재현할 수 있음을 알 수 있으며, 이를 이용하면 개개인에게 효과가 우수한 장내 환경 개선 물질을 신속하고 효율적으로 스크리닝 할 수 있음을 알 수 있다.
- [131] **실험예 4. PMAS 기법을 개인 맞춤형 후보 물질 스크리닝 시스템의 구체적인 구현예**
- [132] 상기 실시예 1 내지 실시예 3 및 실험예 1 내지 3에서 설명한 PMAS 기법을 이용하면, 하기와 같이 개개인의 장내 환경을 체외 조건에서 신속하고 정확하게 분석하고, 이를 토대로 장내 환경을 개선할 수 있는 후보 물질을 스크리닝 할 수 있다. 하기의 설명은 PMAS 기법을 이용한 스크리닝 시스템의 일 예시이며, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 과정 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [133] **(1) 분변-배지 혼합물 준비 및 후보물질 처리**
- [134] 96-웰 플레이트에 8개의 서로 다른 사람의 분변샘플을 각각 PMAS 배지와 혼합 및 균질화하여 동일양씩 분배하고(가로축), 상기 분변샘플이 분주된 96-웰 플레이트에 세로로 서로다른 후보물질을 처리하였다(도 9).
- [135] 대조군(기준)은 PMAS 검사 후 검측하는 분석 수치 결과를 대조하여 장내환경 개선 정도를 판단하기 위함이며, reference treatment 중 항생제 혼합물(ABX)은

분변 내 미생물의 활성이 급격히 감소한 환경을 조성하기 위한 음성 대조군이고, 클로스트리디움 뷰티리쿰(CB, 뷰티르산을 자체적으로 생산하는 박테리아 균주)은 장내환경개선 유무를 판단하는데 유력한 물질인 뷰티르산이 분명하게 증가한 환경을 조성하기 위한 양성 대조군으로 활용하였다. 또한, 나머지 박테리아 균주 LB, EF, BF균주들은 시험하고자하는 후보물질들이며, 서로다른 번호는 서로다른 박테리아 strain임을 나타낸다.

- [136] **(2) PMAS 분석 결과 - 뷰티르산양 변화 분석**
- [137] 상기 (1)과 동일한 방법으로 100명의 서로 다른 성인의 분변 샘플을 이용하여 PMAS 검사를 수행하고, 이에 따른 뷰티르산 양의 변화를 분석하였으며, 이는 도 10에 나타냈다.
- [138] 구체적으로, 도 10 히트맵의 각 행은 분변 샘플을 나타내며, PMAS 실시 후 대조군(기준) 웰 대비 뷰티르산 양이 증가한 경우 빨간색, 감소한 경우 파란색으로 표시하였다.
- [139] 그 결과, 뷰티르산 양성 대조군인 CB 처리시에 다른 처리에 비하여 뷰티르산이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있으며, 음성 대조군인 ABX 처리시에 다른 처리에 비하여 뷰티르산이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있다(미생물의 활성 감소로 인한 미생물 대사체-뷰티르산 감소).
- [140] 또한, 시험군인 후보물질들은 Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterococcus 계열의 박테리아로, 자체적으로 뷰티르산을 생성하지 못함에도 불구하고, 어떤 분변에는 이와 같은 균주를 처리했을 시 뷰티르산이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해, 어떤 경우(어떤 분변 시료의 경우) PMAS환경 내에서 특정 후보물질의 처리가 시료내 다른 미생물들의 활성 변화 (뷰티르산이 증가하는 방향으로)를 유발함을 추론할 수 있다.
- [141] 상기 결과를 종합해보면, PMAS 기법에서 후보물질 처리에 의한 환경 변화는 각 분변 시료마다 다르게 나타남을 확인할 수 있으며, 이를 통하여 각 분변내 미생물 기반 장내 환경 개선 후보물질을 스크리닝 할 수 있음을 알 수 있다.
- [142] **(3) PMAS 분석 결과 - 장내 미생물 다양성 변화**
- [143] 상기 (1)과 동일한 방법으로 100명의 서로 다른 성인의 분변 샘플을 이용하여 PMAS 검사를 수행하고, 이 중 일부 샘플에 대한 장내 미생물 다양성 변화를 분석하였으며, 이는 도 11에 나타냈다.
- [144] 구체적으로, 도 11 히트맵의 각 행은 분변 샘플을 나타내며, PMAS 실시 후 대조군(기준) 웰 대비 미생물 다양성이 증가한 경우 빨간색, 감소한 경우 파란색으로 표시하였다.
- [145] 그 결과, 각 분변 샘플마다 미생물을 다양성을 증가시키거나 감소시키는 후보처리물질이 모두 다른 것을 확인할 수 있으며, 또한 각 후보물질이 나타내는 효과 또한 서로다른 분변 샘플에 따라 다르게 나타나는 것이 확인 되었다. 또한, ABX처리시에는 타처리군에 비하여 미생물 다양성이 확연히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

- [146] **(4) PMAS 분석 결과 - 초기 분변 샘플의 미생물 구성과 PMAS 검사 후 뷰티르산 양 변화의 상관 관계**
- [147] 상기 (1)과 동일한 방법으로 100명의 서로 다른 성인의 분변 샘플을 이용하여 PMAS 검사를 수행하고, 이에 따른 초기 분변 샘플의 미생물 구성과 PMAS 검사 후 뷰티르산 양 변화의 상관 관계를 분석하였으며, 이는 도 12에 나타났다.
- [148] 구체적으로, 도 12A는 PMAS 실시 후 각 분변 시료가 가지는 ‘서로 다른 후보물질 처리에 대한 뷰티르산 변화 결과(다변량, 기준 대조군 제외 10개의 결과)’를 PCA 분석을 통해 한 평면에 표시한 그래프이며(x축 PC1, y축 PC2, 전체데이터의 90.36%를 표현, 그래프의 dot은 각 분변을 표현), 범주의 initial faecal microbiota PC1은 PMAS 실시에 사용된 분변의 PMAS 이전 장내 미생물 결과 (initial faecal microbiota)를 weighted UniFrac distance로 계산한 PC1 스코어이다. 또한, 도 12B는 PMAS 실시 후의 각 분변의 뷰티르산 변화 결과의 주성분 PC1과 PMAS 실시 전의 각 분변의 장균총 변화의 베타다양성 PC1의 상관관계를 나타낸 그래프이다.
- [149] 상기 결과를 토대로, “PMAS 실시 후 각 분변 시료의 뷰티르산 변화 결과”가 그 분변 시료의 “PMAS 전 미생물 분석 결과”와 유의적인 상관관계를 가짐을 알 수 있다. 즉 각 분변 시료에서 PMAS 이후 뷰티르산 변화 패턴이 서로 다르게 나타나는 것은 (무작위적으로 일어나는 변화가 아니라) 그 분변에 있던 서로 다른 미생물의 분포 및 구성에 기인했음을 추론할 수 있다.
- [150] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [151] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] L-시스테인 (L-cystein)을 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 뮤신(Mucin)을 추가로 포함하는 것인, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 단백질 및 탄수화물을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 장내 환경 개선 물질은 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 식품, 건강기능성 식품 및 의약품으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 장내 환경 개선 물질 스크리닝용 조성물.
- [청구항 5] (a) 개체로부터 수득한 시료를 제1항의 조성물과 혼합하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계의 혼합물에 1개 이상의 장내 환경 개선 후보물질을 처리하고 배양하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계의 배양물을 분석하는 단계
를 포함하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 방법은 체외(in vitro) 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서,
상기 (b) 단계의 배양은 혐기조건에서 18시간 내지 24시간동안 수행하는 것인, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 8] 제 5 항에 있어서,
상기 (c) 단계에서 배양물을 분석하는 것은, 배양물에 포함된 내독소(endotoxin), 황화수소(hydrogen sulfide), 단쇄지방산(Short-chain fatty acids, SCFAs) 및 장균총 유래 대사체 중 하나 이상의 함량, 농도 또는 종류를 분석하는 것인, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 단쇄지방산은 아세트산(Acetate), 프로피온산(Propionate), 뷰티르산(Butyrate), 아이소뷰티르산(Isobutyrate), 발레르산(Valerate) 및 아이소발레르산(Iso-valerate)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인, 장내 환경 개선 물질 스크리닝 방법.
- [청구항 10] 제 5 항에 있어서,
상기 (c) 단계에서 배양물을 분석하는 것은, 배양물에 포함된 장내 미생물의 종류, 농도, 함량 또는 다양성 변화를 분석하는 것인, 장내 환경

- 개선 후보물질 스크리닝 방법.
- [청구항 11] 제 5 항에 있어서, 상기 방법은
- (d) 상기 (c) 단계의 분석 결과를 대조군의 분석 결과와 비교하여
단쇄지방산의 함량을 증가시키거나, 장균총 내의 유익균의 종류 및
함량을 증가시키거나, 내독소 및 황화수소의 함량을 감소시키거나 또는
장균총 내의 유해균의 종류 및 함량을 감소시키는 후보물질을 선별하는
단계
- 를 추가로 포함하는 것인, 장내 환경 개선 후보물질 스크리닝 방법.