
단일 균주 생균치료제 약동약리학적 대사체 바이오마커 탐색 방법론

주관연구개발기관 : 가톨릭대학교 산학협력단
공동연구개발기관 : 연세대학교 산학협력단
고려대학교 산학협력단
(주) 입셀
(주) 지놈앤컴퍼니
(주) 세라트젠
(주) 애임스바이오사이언스

2025.09.23

스마트임상시험신기술개발연구사업단

- 본 지침서/안내서는 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상시험신기술개발연구사업단의 지원을 받아 수행한 「첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」 (과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었습니다.
- 본 지침서는 보건복지부, 식품의약품안전처 등 관련 기관의 제도 및 정책과 상이할 수 있으며, 어떠한 법적 구속력 및 책임을 가지지 않으므로 참고용으로만 활용하시기 바랍니다.
- 본 지침서의 내용은 현재의 과학적·기술적 근거 등을 토대로 작성되었으며, 향후 과학기술의 발전 및 관련 법규정의 개정 및 구체적인 사실관계의 변화 등에 따라 내용이 달라질 수 있습니다.
- 본 저작물에 대한 권한은 (주) 지놈앤컴퍼니에 있으며, 무단으로 지침서의 내용을 수정하여 재배포하는 것을 금합니다. 또한, 본 지침서의 전부 또는 일부를 인용·활용할 경우 반드시 출처를 명시하여야 합니다.

단일 균주기반 생균치료제의 약동/약리학적 반응과 연계된 대사체 바이오마커 탐색을 위한 방법론 제안서

2025.9.23.

4공동(지놈앤컴퍼니) 초안 작성

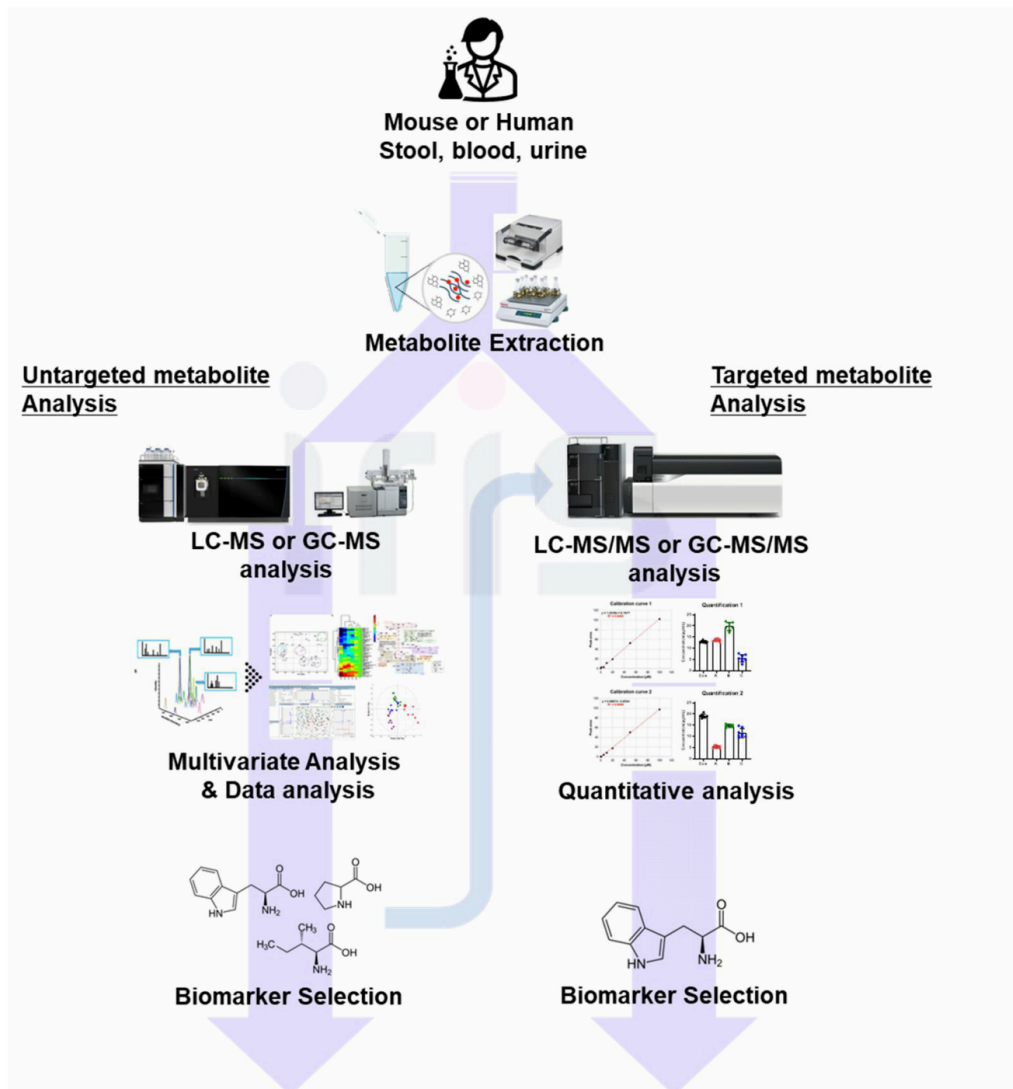


그림 1. 생균치료제 약동학분석을 위한 대사체 기반 분석 도식도

1. 목적

2022년 4월 제정된 식품의약품안전처의 가이드라인에 따르면, 생균치료제 (Live Biotherapeutic Product, LBP)는 박테리아 등 살아있는 미생물을 주성분(유효성분)으로 하여 제조한 의약품으로, 같거나 다른 종의 미생물로부터 유래한 하나 또는 여러 개의 미생물 균주를 포함한 의약품을 말한다. 해당 가이드라인에 따르면 생균치료제는 기존적으로 사람이나 다른 생물체에서 유래된 것을 원료 또는 재료로 하여 제조한 의약품인 “생물의약품”에 속하여, 생균치료제의 비임상 평가는 「생물학적제제 등의 품목허가 심사 규정」에 따른다. 생균치료제의 위해성 분석과 관련하여 생균치료제는 제품 그 자체가 전신 노출되지 않으며 활성 또는 대사물질이 직·간접적으로 숙주의 생리학적 기능에 영향을 미칠 수 있음이 알려져 있다. 따라서 생균치료제의 약리 작용을 확인하기 위한 비임상 평가 시, 생균치료제 그 자체뿐만 아니라 생균치료제에 의해 생산되는 대사물질 혹은 생균치료제와 호스트와 상호작용하여 생산되는 대사물질에 대한 연구가 필요하다.

약동학분석 상 흡수가 되지 않으나, 전신 효능을 기대하는 단일 균주 기반 생균치료제의 경우, 미생물 유래 혹은 호스트 유래 대사물질/단백질을 통하여 효능이 나타날 수 있다. 생균치료제의 효능은 단일 대사물질보다는 다양한 대사물질의 복합 작용으로 나타날 수 있어, 단일 대사물질로 설명하는 것은 어려울 수 있다. 따라서 생균치료제 투약에 따른 대사체 바이오마커를 탐색하기 위해서는 생균치료제가 생산 가능한 대사체와 생균치료제를 동물 혹은 인체에 투약 후 분변, 혈액, 소변 등 검체에서 다양한 대사체를 오믹스 기술을 활용하여 탐색하는 방법이 필요하다.

생균치료제의 약동학적 분포 평가 방법으로 유전자 기반 분석법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 유전자 변형이 없는 인간의 장내 미생물기반 단일 생균치료제는 환자의 장내 미생물과 동일한 16S rRNA 서열을 가질 가능성이 있어 16S rRNA 서열기반 균총분석으로 이 둘을 구별할 수 없다. 따라서 정확한 단일 생균치료제의 약동학 분석을 위해서는 개발하고자 하는 단일 생균치료제만 보유하는 유전적 특징을 발굴하고, 해당 유전 위치를 검출할 수 있는 specific primer design, PCR or qPCR 조건

수립 등 분석법 개발이 필요하다. 또한 생균치료제 투여가 기존 장 내 존재하는 균주의 경쟁하거나 생장에 도움을 줄 수 있기 때문에 약동학 분석 시, 기존 균총 분석 결과와 단일 생균치료제의 특이적인 유전적 특징을 검출할 수 있는 분석 결과를 비교 분석하여 신체 내에서 분포 파악이 필요하다.

2. 단일 생균치료제의 약동학분석을 위한 대사체 기반 분석법

그림 1의 단일 생균치료제 약동학분석을 위한 대사체 기반 분석 도식도는 약동학분석을 위한 분석법 개발 단계를 요약하여 보여주고 있다.

가. Untargeted metabolomics-based analytical method

- A. **특이적 대사체 바이오마커 탐색:** 단일 생균치료제만의 특이적 대사체 바이오마커 발굴을 위해서는 비표적 대사체 분석(untargeted metabolomics)이 선행되어야 한다. 단일 생균치료제 투여군과 위약군 간의 차이를 확인하기 위해 먼저 GC-MS 또는 LC-MS 기반 대사체 분석을 수행한다. 이 접근법은 사전에 특정 대사체를 가정하지 않고, 혈액, 혈청, 대변, 맹장 등의 다양한 시료에서 수백 종의 대사체를 동시에 포괄적으로 탐색할 수 있는 장점이 있다. 시료는 메탄올 또는 혼합 유기용매 등을 이용하여 추출 및 전처리하며, 내부표준물질(internal standard)을 첨가하여 시료 간 분석 신뢰도를 보정한다. 이후 GC-MS 또는 LC-MS를 활용하여 MS spectra 데이터를 수집한다. 수집된 raw data는 오픈소스 소프트웨어(MS-DIAL, XCMS 등)를 이용해 피크 추출, RT alignment, 정규화 과정을 거친다. 비표적 분석에서 도출된 데이터들은 다변량 통계분석(multivariate statistical analysis)를 수행한다. 우선 주성분분석(PCA)을 통해 전체 분포와 군집 차이를 탐색하고, 이후 부분최소제곱 판별분석(PLS-DA, OPLS-DA)을 적용하여 그룹 간 차이를 설명하는 주요 대사체를 선별한다. 통계적 유의성 확보를 위해 VIP score(>1.0), p -value(<0.05)

등을 기준으로 대사체 후보군을 축소한다.

- B. **후보 대사체 발굴 및 기능 해석:** 선별된 유의미한 대사체들은 단순한 수치 변화에 그치지 않고, 반드시 생물학적 맥락 속에서 해석되어야 한다. 이를 위해 대사 경로 분석(metabolic pathway analysis)을 수행하여, 변화된 대사체가 특정 대사 경로(예: 아미노산 대사, 짧은 사슬지방산 합성)에 집중되는지를 확인한다. 이 과정에서 MetaboAnalyst, KEGG 등의 데이터베이스와 플랫폼을 활용하여 pathway enrichment 및 특징적 경로 분석을 수행한다. 또한, 숙주 phenotype과의 상관관계 분석(correlation analysis)을 병행하여, 특정 대사체 변화가 면역지표, 염증수준 등과 어떤 연관성을 가지는지 평가한다. 이는 단순한 대사체 프로파일링을 넘어서, 생균치료제 투여 효과를 설명할 수 있는 기능적 단서를 제공한다. 결과적으로, 이 과정을 통해 확보된 후보 대사체들은 단일 생균치료제 반응 특이적 잠정 biomarker로 제시될 수 있으며, 이후 타겟 분석을 통한 정량적 검증 단계로 이어진다.

나. Targeted metabolomics-based analytical method

- A. **후보 대사체 정량 검증:** 비표적 분석에서 도출된 후보 대사체를 검증하기 위해, 타겟 대사체 분석(targeted metabolomics)을 수행한다. 이 단계는 표준물질을 이용해 분석법을 정밀하게 세팅하고, 실제 생체 시료에서 대사체 농도를 절대 정량하는 과정이다. 구매가 가능한 표준물질을 확보하여 검량곡선(calibration curve)을 작성하며, 검량곡선은 최소 6~8점으로 구성한다. 분석법 검증 단계에서는 직선성($R^2 \geq 0.99$), 정밀도, 정확도 등을 평가하여 분석의 신뢰성을 확보한다.
- B. **MRM 기반 분석법 확립:** 후보 대사체별로 LC-MS/MS 다중반응모니터링(MRM, multiple reaction monitoring) 전이(transition)를 설정한다. 전구체 이온(m/z)과 주요 daughter ion(m/z)을 기반으로

collision energy를 최적화하여, 특이적이고 재현성 높은 신호를 확보한다. 분석 조건은 시료 특성에 따라 HILIC 또는 C18 컬럼을 선택하고, mobile phase의 조성 및 pH, gradient, injection volume 등을 최적화한다.

- C. **대사체 Biomarker 확립**: 정량 검증을 완료한 대사체는 실제 생균치료제 투여군과 위약군 간의 절대농도 비교에 활용된다. 이를 통해 특정 대사체가 투여 반응을 일관되게 반영한다면, 해당 대사체를 생균치료제 특이적 biomarker로 확립할 수 있다. 또한, 확립된 biomarker는 임상 및 비임상 연구에서 투여 반응 모니터링 지표로 사용될 수 있으며, 생균치료제의 mode of action(MOA)을 보완적으로 설명하는 근거 자료로도 활용 가능하다.

다. Considerations in Translational Application

- A. 비임상 시료와 임상 시료 간에는 대사체 변화 경향이 반드시 일치하지 않을 수 있다. 비임상 동물 모델(예: 설치류)에서 뚜렷이 확인된 대사체 변화가 사람에서는 미약하거나 방향성이 다르게 나타날 수 있으며, 이는 중간 대사 차이, 장내 미생물 조성의 차이, 시료 매트릭스(serum, plasma, feces 등)의 특성에 기인할 수 있다. 따라서, 비임상에서 발굴된 후보 대사체는 임상 시료에서 재검증(re-validation) 되어야 하며, 비임상과 임상 모두에서 일관된 경향성을 보이는 대사체만을 최종 biomarker로 제시하는 것이 바람직하다. 이러한 과정을 통해 확립된 대사체는 생균치료제의 mode of action(MOA) 보완적 설명에 기여할 뿐 아니라, 임상 적용 가능성을 갖춘 특이적 biomarker로 확립될 수 있다.

3. 참고문헌

- 1) 식약처. 생균치료제의 임상시험 시 품질·비임상 평가 가이드라인 (민원인 안내서). 2023.08. Available from:
https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=15331&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq

- 2) Dunn, Warwick B., et al. "Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry." *Nature protocols* 6.7 (2011): 1060-1083. doi:10.1038/nprot.2011.335
- 3) Emegano, Declan Ikechukwu, Dilek Battal, and Kumsal Kocadal. "Metabolomics-based biomarkers of probiotic efficacy in toxicological settings." *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 13.1 (2024): 85. doi: 10.1186/s43088-024-00546-1
- 4) O'Connell, Thomas M. "The application of metabolomics to probiotic and prebiotic interventions in human clinical studies." *Metabolites* 10.3 (2020): 120. doi:10.3390/metabo10030120
- 5) Roach, Jarrod, et al. "Microbiome metabolite quantification methods enabling insights into human health and disease." *Methods* 222 (2024): 81-99. doi: 10.1016/j.ymeth.2023.12.007
- 6) Li, Bohai, et al. "Integrating metabolomics, bionics, and culturomics to study probiotics-driven drug metabolism." *Frontiers in Pharmacology* 14 (2023): 1047863. doi: 10.3389/fphar.2023.1047863

발행기관 (주) 지놈앤컴퍼니
발행일 2025년 09월 23일
발행인 김혜림
편집위원장 민창기
편집위원 한승훈, 박성수, 김혜림
감수위원 분과위원회 위원 중 검토 의견서를 제출한 위원(희망자에 한함)

문의처 (우편번호) 서울특별시 마포구 마포대로 137 KPX빌딩 6층
전화번호 : 02-398-5082
이메일 : scrc@konect.or.kr

본 지침서/안내서는 보건복지부의 재원으로 국가임상시험지원재단 스마트임상시험신기술개발연구사업단의 지원을 받아 수행한 「첨단 바이오 분야 초기 임상시험 관련 기술 개발」(과제고유번호: RS-2023-KH141565)의 결과물로 제작되었음을 밝힙니다.