

---

# 단일 균주 생균치료제 유전자 기반 약동학 분석 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 사실 관계의 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 약동학분석을 위한 유전자 기반 분석법 제안서

2025.9.23.

4공동(지놈앤컴퍼니) 초안 작성

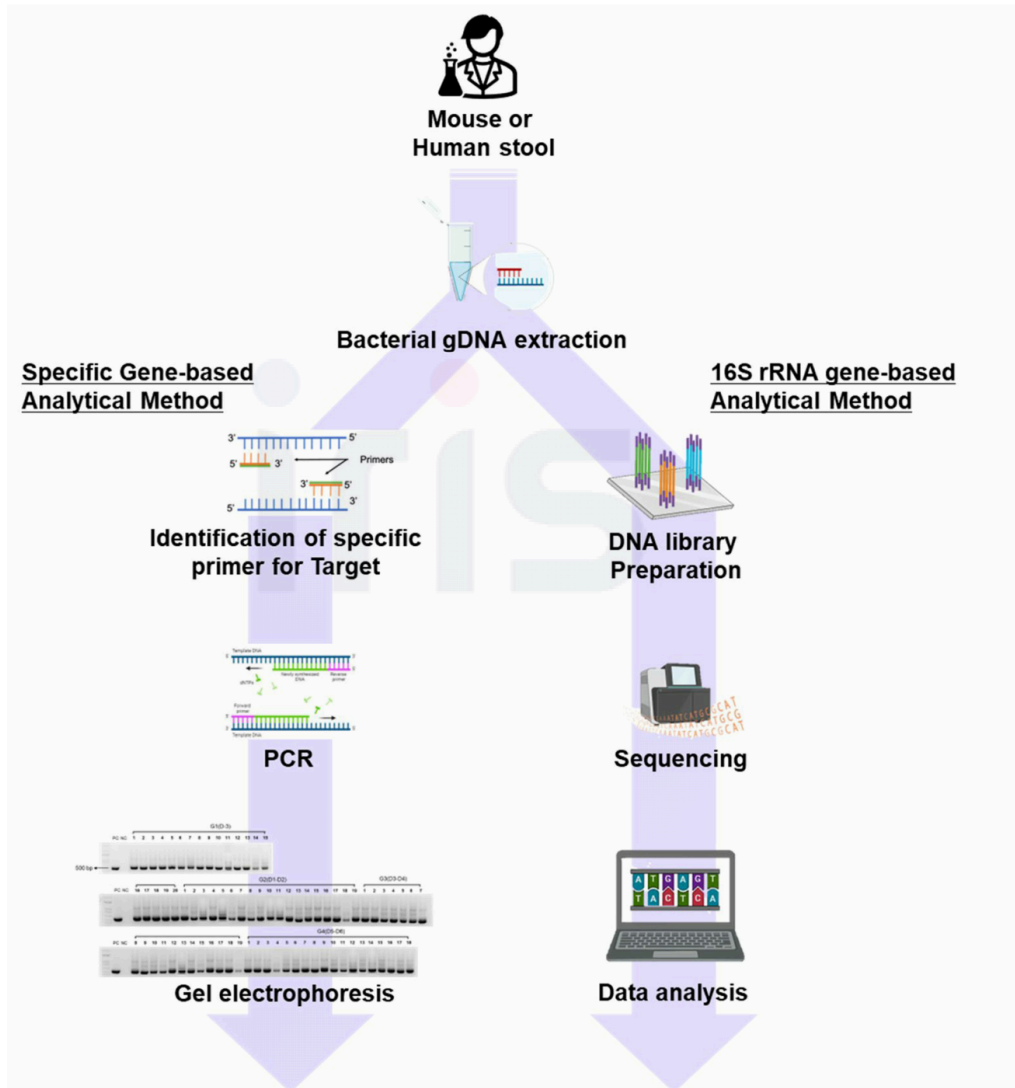


그림 1. 단일 생균치료제 약동학분석을 위한 유전자 기반 분석 도식도

## 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. 생균치료제는 제품 그 자체가 전신 노출되지 않는 특징을 가진다고 알려져 있으나, 최근 연구에 따르면 면역세포에 의해 포식된 박테리아가 특정 장기로 이동할 수 있으며, 중증 질환자들에서 빈번하게 발생하는 장 누수로 혈액 내 박테리아가 존재하는 균혈증(bacteremia) 등 전신 노출 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 따라서 생균치료제의 약동학적 분포 평가를 통해 약리 작용뿐만 아니라 잠재적 독성 예측이 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 유전자 기반 분석법

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

### 가. Specific gene based analytical method

- A. **특이적 유전자 발굴:** 단일 생균치료제만의 특이적 유전자 발굴을 위해서는 전장유전체 분석(Complete genome analysis)가 필요하다. 인간 유전체는 다른 인간과 약 99.9%의 높은 유사성을 보이기 때문에, 질병 연계 유전적 변이를 확인하기 위한 GWAS 분석은 reference human genome에 read depth를 높인 short-read sequence를 비교하여 분석을 진행한다. 하지만 미생물의 경우, 빠른 유전자 변형을 통해 진화하기 때문에 균주 간 유사성이 떨어진다. 일반적으로 3% 이상 유전적 차이(97% 이하 ANI)를 가진 균주는 다른 균주로 분류한다. 따라서 long-read sequencing 및 short-read sequencing 분석을 통한 de novo assembly를 통해 plasmid 존재 및 전장유전체 파악하는 것이 필요하다. 생균치료제의 전장유전체를 파악 후, 기존 database에서 확보된 동일 종에 대한 유전체를 비교 분석하여 특이적 유전자를 발굴한다.
- B. **특이적 유전자 검출 방법 개발:** 특이적 유전자를 발굴하였다면 이를 검출할 수 있는 방법을 개발하여 실제 분포시험에 활용할 수 있다. 특이적 유전자 위치라도 primer를 설계하는 단계에서 예상치 못한 다른 미생물의 유전자를 증폭할 수 있기 때문에 primer 설계 후, in silico PCR 및 정제된 단일 생균치료제 gDNA를 이용한 농도 반응성 평가 등을 통해 해당 primer가 단일 생균치료제에 특이적이며, PCR intensity가 실제 시료 내 농도를 반영할 수 있는지 파악하여야 한다.

## 나. 16S rRNA gene based analytical method

- A. **16S rRNA gene의 가변 부위(variable regions)기반 미생물 군집 분석:** 모든 박테리아는 진핵세포와 달리 30S 리보솜 소단위체(단백질 복합체)를 구성하는 16S rRNA gene을 보유하고 있으며, 1500여 개의 염기쌍으로 이루어져 있다. 이 유전자 전체 중 모든 박테리아에 유사한 서열을 가지며 리보솜 기능에 필수적인 보존 부위 (conserved regions)와 V1부터 V9까지 총 9개의 가변 부위 (hypervariable regions)가 존재하며, 이 지역을 증폭하고 시퀀싱하여 특정 박테리아 종을 식별할 수 있다. 이 중 V3-V4 영역은 다양한 미생물 군집 분석에서 가장 흔하게 사용되는 영역으로 알려져 있으며, 이를 증폭하였을 때, 약 550 염기서열의 DNA 조각(amplicon)을 확보할 수 있다. 해당 amplicon을 차세대 염기서열 분석(NGS, next generation sequencing)을 통해 빠르게 분석한다.
- B. **데이터 분석:** NGS 분석이 완료된 후 염기서열 정보와 그 염기서열에 대한 quality value값을 나타내는 FASTQ 형식의 데이터를 확보하게 된다. Q value가 신뢰할만한 수준으로 확보된 데이터는 컴퓨터를 활용하여 assembly 진행하고, 가능한 긴 길이의 contig들의 염기서열 정보를 확보한다. 이 때, 다양한 open source 프로그램(예를 들어, QIIME1, QIIME2) 및 데이터베이스(예를 들어, NCBI RefSeq, QIIME2, EzBioCloud)를 활용하여, 미생물 군집 분석을 진행한다. 앞서 설명한 대로 동일한 종은 유사한 16S rRNA gene 서열을 보유하기 때문에 구별하기 어렵다. 하지만 제한적이긴 하지만 동일한 종으로 분류된 read여도 앰플리콘 서열 변이(amplicon sequence variant) 정보를 활용하여, 종 내에서 다른 균주를 구별하는데 활용할 수 있다. 분석 결과는 각 세균의 '상대량(% , relative abundance)'로 표현되어 생균치료가 각 샘플에서 얼마나 많은 비율을 차지하는지 확인할 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=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=13](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=0&company_cd=&company_nm=&page=13)
- 2) Luis M. Rodriguez-R et al. "An ANI gap within bacterial species that advances the definitions of intra-species units." *mBio* 15.1 (2023): e0269623. doi: 10.1128/mbio.02696-23
- 3) Jethro S. Johnson et al. "Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis." *Nature communications* 10.1 (2019): 5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1
- 4) Evan Bolyen et al. "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2." *Nature biotechnology* 37.8 (2019): 852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9

---

**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.