



(19) 대한민국 지식재산청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년07월16일
(11) 등록번호 10-2992760
(24) 등록일자 2026년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01) C12N 1/20 (2026.01)
C12N 1/36 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2026-0006247

(22) 출원일자 2026년01월13일

심사청구일자 2026년01월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020230048337 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

홍지영

강원특별자치도 춘천시 동내면 외솔길19번길 80-7
(호반베르디움아파트)

전진평

경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인본

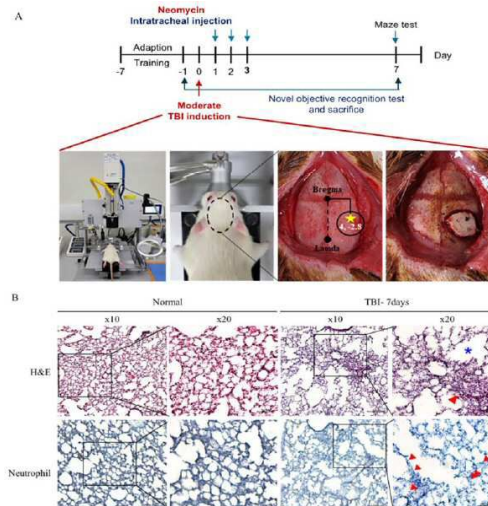
심사관 : 박정연

(54) 발명의 명칭 열처리된 프레보텔라 균주를 포함하는 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은 열처리된 Prevotella 균주를 유효성분으로 포함하는 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 혈액-뇌 장벽 내피세포, 성상세포, 미세아교세포 등의 뇌 관련 세포에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS 등의 염증성 마커의 발현 또는 분비를 효과적으로 감소시키고, 외상성 손상을 받은 세포의 생존율을 증가시킬 수 있다. 또한, Prevotella 유래 대사체인 아라키돈산, 인돌-3-락트산, 트립토판, 갈산, 아세틸시스테인 등을 추가로 포함함으로써 항염증 효과를 더욱 증진시킬 수 있다. 본 발명은 외상성 뇌손상 후 신경염증을 제어하기 위한 기초 연구 도구 및 치료제 개발의 기반을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

C12N 1/36 (2013.01)

C12N 5/0622 (2013.01)

G01N 33/5058 (2013.01)

C12N 2500/72 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

(72) 발명자

이재준

강원특별자치도 춘천시 후석로 325, 102동 707호(후평동, 포스코더샵아파트)

정혜리

강원특별자치도 춘천시 효평길 47-1 (효자동)

신승호

강원특별자치도 춘천시 보안길 36, 106동 2903호(후평동, 우미린뉴시티)

윤동혁

충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

(56) 선행기술조사문헌

Nyam et al., Neurocritical Care, 41:798-812 (2024. 5. 15.)*

TEETAU ERIC NYAM ET AL, NEUROCRIT CARE., 2024, VOL.41, NO.3, PP.798~812

QIN YE ET AL, MICROBES INFECT., 2024, VOL.26, NO.4, 105316

KR100355246 B1

KR101807607 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2710069760
과제번호	RS-2023-00223501
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	뇌신경계 임상현장 난제 해결을 위한 융합형 의사과학자 육성 및 현장맞춤형 미래의
료선도기술 실용화 사업	
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

60℃에서 10분, 70℃에서 10분, 80℃에서 10분간 순차적으로 단계적 열처리된 *Prevotella melaninogenica* 균주를 유효성분으로 포함하는, 생체 외(in vitro)에서 외상성 손상이 유도된 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뇌 관련 세포는 혈액-뇌 장벽 내피세포, 성상세포 및 미세아교세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 *Prevotella melaninogenica* 균주는 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염증성 마커의 발현 또는 분비를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 아라키돈산(arachidonic acid)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

(a) 혈액-뇌 장벽 내피세포, 성상세포 및 미세아교세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 뇌 관련 세포에 외상성 손상을 유도하는 단계; 및

(b) 상기 세포에 열처리된 *Prevotella* 균주를 처리하여 염증성 마커의 발현 또는 분비를 감소시키는 단계; 를 포함하고,

상기 열처리된 *Prevotella* 균주는 60℃에서 10분, 70℃에서 10분, 80℃에서 10분간 순차적으로 단계적 열처리된 *Prevotella melaninogenica* 균주인, 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증을 감소시키는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 외상성 손상은 기계적 세포 손상(mechanical cell injury) 및 산소-포도당 결핍/재산소화(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)로 이루어진 군에서 선택되는 방법에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 열처리된 *Prevotella* 균주는 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 6시간 내지 48시간 동안 처리되는 것

을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 염증성 마커는 qRT-PCR, 웨스턴 블롯(western blot) 및 ELISA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 방법은 CCK-8 분석법을 이용하여 상기 뇌 관련 세포의 생존율을 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 열처리된 Prevotella 균주의 처리에 의해 세포 생존율이 증가하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 열처리된 Prevotella 균주를 유효성분으로 포함하는 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 외상성 뇌손상(Traumatic Brain Injury, TBI) 후 발생하는 뇌 관련 세포의 염증 반응을 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 외상성 뇌손상은 교통사고, 낙상, 폭행 등 외부의 물리적 충격에 의해 뇌에 손상이 발생하는 질환으로, 전 세계적으로 사망과 장애의 주요 원인 중 하나이다. 외상성 뇌손상 환자는 전 세계적으로 연간 약 6,900만 명에 달하며, 이 중 상당수가 장기적인 신경학적 후유증을 겪고 있다.

[0003] 외상성 뇌손상은 일차 손상(primary injury)과 이차 손상(secondary injury)으로 구분된다. 일차 손상은 외부 충격에 의한 직접적인 뇌 조직 손상을 의미하며, 이차 손상은 일차 손상 이후 수시간에서 수일에 걸쳐 진행되는 복잡한 병리학적 과정을 포함한다. 이차 손상에는 염증 반응, 산화 스트레스, 흥분독성, 세포사멸 등이 포함되며, 이러한 과정이 신경학적 예후를 크게 좌우한다.

[0004] 특히 외상성 뇌손상 후 발생하는 신경염증(neuroinflammation)은 손상을 악화시키는 주요 기전으로 알려져 있다. 뇌 관련 세포인 혈액-뇌 장벽 내피세포, 성상세포(astrocyte), 미세아교세포(microglia) 등에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS 등의 염증성 사이토카인과 매개체가 과도하게 생산되어 신경세포 사멸을 촉진하고 뇌 기능 회복을 저해한다.

[0005] 최근 연구에서 장-뇌 축(gut-brain axis) 및 폐-뇌 축(lung-brain axis)을 통한 마이크로바이옴이 뇌 건강에 영향을 미친다는 사실이 밝혀지고 있다. 특히 폐 마이크로바이옴은 외상성 뇌손상 환자에서 변화를 보이며, 이러한 변화가 예후와 관련이 있다는 연구 결과가 보고되고 있다.

[0006] Prevotella는 그람 음성 혐기성 세균으로, 구강, 장, 호흡기 등에 정상적으로 존재하는 상재균이다. 최근 연구에서 Prevotella의 존재량(abundance)이 외상성 뇌손상 환자의 예후와 연관성을 보인다는 보고가 있으나, Prevotella 균주를 직접 이용하여 뇌 관련 세포의 염증을 감소시키는 기술에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

[0007] 한편, 생체 외(in vitro) 실험 모델은 외상성 뇌손상의 기전을 연구하고 치료제를 개발하는 데 중요한 도구로 활용되고 있다. 기계적 세포 손상(mechanical cell injury) 모델과 산소-포도당 결핍/재산소화(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 모델은 외상성 뇌손상의 생체 외 모델로 널리 사용되며, 이를 통해 손상 후 염증 반응 및 치료 효과를 평가할 수 있다.

[0008] 따라서 Prevotella 균주를 이용하여 외상성 뇌손상 후 발생하는 뇌 관련 세포의 염증 반응을 효과적으로 감소시킬 수 있는 조성물 및 방법의 개발이 절실히 필요한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2024-0086719호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 열처리된 *Prevotella* 균주를 이용하여 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증을 효과적으로 감소시킬 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 외상성 뇌손상 모델에서 염증성 마커의 발현 또는 분비를 효과적으로 감소시키고 세포 생존율을 증가시킬 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 나아가, *Prevotella* 균주 유래 대사체를 추가로 포함하여 항염증 효과를 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증을 감소시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 열처리된 *Prevotella* 균주를 유효성분으로 포함하는 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 뇌 관련 세포는 혈액-뇌 장벽 내피세포, 정상세포 및 미세아교세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0016] 상기 *Prevotella* 균주는 *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia* 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0017] 상기 조성물은 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염증성 마커의 발현 또는 분비를 감소시킬 수 있다.
- [0018] 상기 조성물은 아라키돈산(arachidonic acid), 인돌-3-락트산(indole-3-lactic acid), 트립토판(L-tryptophan), 갈산(galic acid), 아세틸시스테인(acetylcysteine) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 *Prevotella* 유래 대사체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 또한, (a) 혈액-뇌 장벽 내피세포, 정상세포 및 미세아교세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 뇌 관련 세포에 외상성 손상을 유도하는 단계; 및 (b) 상기 세포에 열처리된 *Prevotella* 균주를 처리하여 염증성 마커의 발현 또는 분비를 감소시키는 단계;를 포함하는, 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0020] 상기 외상성 손상은 기계적 세포 손상(mechanical cell injury) 및 산소-포도당 결핍/재산소화(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)로 이루어진 군에서 선택되는 방법에 의해 유도될 수 있다.
- [0021] 상기 열처리된 *Prevotella* 균주는 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 6시간 내지 48시간 동안 처리될 수 있다.
- [0022] 상기 염증성 마커는 qRT-PCR, 웨스턴 블롯(western blot) 및 ELISA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있다.
- [0023] 상기 방법은 CCK-8 분석법을 이용하여 상기 뇌 관련 세포의 생존율을 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 열처리된 *Prevotella* 균주의 처리에 의해 세포 생존율이 증가할 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 열처리된 *Prevotella* 균주를 포함하는 조성물은 생체 외에서 외상성 뇌손상 모델의 뇌 관련 세포에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS 등의 염증성 마커의 발현 또는 분비를 효과적으로 감소시킬 수 있다.

- [0025] 또한, 본 발명의 조성물은 외상성 손상을 받은 뇌 관련 세포의 생존율을 증가시켜 세포 보호 효과를 나타낼 수 있다.
- [0026] 나아가, Prevotella 유래 대사체를 추가로 포함함으로써 항염증 효과를 더욱 증진시킬 수 있다.
- [0027] 본 발명은 외상성 뇌손상 후 신경염증을 제어하기 위한 기초 연구 도구 및 치료제 개발의 기반을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 외상성 뇌손상(TBI) 동물 모델 및 폐 마이크로바이옴 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 Prevotella 존재량에 따른 GCS(Glasgow Coma Scale) 및 mRS(modified Rankin Scale) 점수의 상관관계를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 혐기성 배양 시스템을 이용한 Prevotella melaninogenica 균주의 배양 및 세포 수 측정 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 4는 Prevotella melaninogenica 및 Prevotella intermedia의 성장 곡선(growth curve)을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 생체 외 실험 모델에서 열처리된 Prevotella 균주의 항염증 효과를 평가하기 위한 실험 설계도이다.
- 도 6은 열처리된 Prevotella 균주 처리에 따른 혈액-뇌 장벽 내피세포의 세포 생존율 및 염증성 마커 발현 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 외상성 뇌손상 모델에서 폐 마이크로바이옴 조절에 따른 면역세포 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 열처리된 Prevotella 균주를 유효성분으로 포함하는 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증 감소용 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 "Prevotella 균주"는 그람 음성 혐기성 세균으로, 구강, 장, 호흡기 등에 정상적으로 존재하는 상재균이다. 바람직하게는 Prevotella melaninogenica 및 Prevotella intermedia로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 균주를 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 "열처리된"이란 Prevotella 균주를 열처리하여 비활성화된 상태를 의미한다. 열처리는 통상적인 방법으로 수행될 수 있으며, 바람직하게는 60~100℃에서 10~60분간 처리하여 균주를 사멸시킬 수 있다. 더욱 바람직하게는 단계적 열처리를 진행할 수 있으며, 60℃에서 10분간 처리, 70℃에서 10분간 처리, 80℃에서 10분간 처리하여 열처리할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 "뇌 관련 세포"는 뇌 기능과 관련된 세포를 의미하며, 구체적으로 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)을 구성하는 내피세포, 성상세포(astrocyte), 미세아교세포(microglia) 등을 포함한다. 이러한 세포들은 외상성 뇌손상 후 염증 반응에 중요한 역할을 한다.
- [0034] 본 발명에서 "염증성 마커"는 염증 반응을 나타내는 사이토카인, 케모카인, 효소 등을 의미하며, 구체적으로 TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-6 (Interleukin-6), IL-1 β (Interleukin-1 beta), iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 등을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 조성물에서 열처리된 Prevotella 균주는 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 1×10^8 내지 1×10^9 cells/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 Prevotella 유래 대사체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 대사체는 아라키돈산(arachidonic acid), 인돌-3-락트산(indole-3-lactic acid), 트립토판(L-tryptophan), 갈산(galic acid), 아세틸시스테인(acetylcysteine) 등을 포함할 수 있다. 이러한 대사체는 Prevotella 균주의 배양액으로부터 분리하거나, 화학적으로 합성하여 첨가할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물에서 아라키돈산은 0.1~30 ng/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 2.5~5 ng/ml의 농

도로 포함될 수 있다.

- [0038] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 식염수, 완충 용액, 세포 배양 배지 등을 포함할 수 있으며, 생체 외 세포 실험에 적합한 모든 담체를 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한 생체 외에서 뇌 관련 세포의 염증을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 방법은 (a) 혈액-뇌 장벽 내피세포, 성상세포 및 미세아교세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 뇌 관련 세포에 외상성 손상을 유도하는 단계를 포함한다.
- [0041] 상기 외상성 손상은 기계적 세포 손상(mechanical cell injury) 모델을 이용하여 유도할 수 있다. 기계적 세포 손상 모델은 세포에 물리적 충격을 가하여 외상성 뇌손상을 모사하는 모델로, 통상적인 장치를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0042] 또는, 상기 외상성 손상은 산소-포도당 결핍/재산소화(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 모델을 이용하여 유도할 수 있다. OGD/R 모델은 세포를 저산소 및 무당 조건에 노출시킨 후 재산소화하여 허혈-재관류 손상을 모사하는 모델이다.
- [0043] 본 발명의 방법은 (b) 상기 세포에 열처리된 *Prevotella* 균주를 처리하여 염증성 마커의 발현 또는 분비를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0044] 상기 열처리된 *Prevotella* 균주는 1×10^7 내지 1×10^{10} cells/ml의 농도로 처리될 수 있으며, 바람직하게는 1×10^8 내지 1×10^9 cells/ml의 농도로 처리될 수 있다.
- [0045] 처리 시간은 6시간 내지 48시간일 수 있으며, 바람직하게는 12시간 내지 24시간일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 방법에서 염증성 마커의 발현 또는 분비는 qRT-PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯(western blot), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 등의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 방법은 CCK-8(Cell Counting Kit-8) 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 열처리된 *Prevotella* 균주의 처리에 의해 외상성 손상을 받은 세포의 생존율이 증가함을 확인할 수 있다.
- [0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 실시예 1: *Prevotella* 균주의 배양
- [0050] *Prevotella melaninogenica* 균주(경상국립대학교병원 난배양성병원체자원전문은행으로부터 분양)와 *Prevotella intermedia* 균주(ATCC로부터 구입)를 혐기성 배지에서 배양하였다.
- [0051] 혐기성 배양을 위해 30ml 멸균된 유리병에 broth media와 *Prevotella* 균주를 넣고 media를 꽉 채운 후, 37℃에서 1~2일간 교반(stirring)하여 균이 자라는지 확인하였다. 균이 자라면 일부는 stock으로 보관하고, 일부는 agar plate에, 일부는 broth에 계대배양하였다.
- [0052] Agar plate 배양을 위해 broth에서 자란 균을 spreading하여 혐기 jar에서 배양하였다. 혐기성 환경 조성을 위해 혐기팩을 사용하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 혐기성 배양 시스템을 성공적으로 구축하였다.
- [0053] 배양된 균주의 세포 수 및 생존율을 측정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, Total cell count와 Live cell count를 확인한 결과, *Prevotella melaninogenica*는 50시간 broth culture에서 OD600 값이 2.085이고 total cell이 1.25×10^9 /ml였으며, *Prevotella intermedia*는 66시간 broth culture에서 OD600 값이 4.08이었다.
- [0054] 도 4에 나타난 바와 같이, *Prevotella melaninogenica*의 성장 곡선을 분석한 결과, 1/100 dilution 후 3시간 마다 흡광값을 측정하였을 때 27시간 경에 최대 성장을 보였으며, *Prevotella intermedia*는 21시간 경에 최대 성장을 나타내었다.
- [0055] 실시예 2-1: *Prevotella* 균주의 열처리
- [0056] 실시예 1에서 배양된 *Prevotella* 균주를 80℃에서 30분간 열처리하여 불활성화하였다. 열처리 후 균주가 사멸되었는지 확인하기 위해 agar plate에 접종하여 24시간 후 colony 형성 여부를 확인하였고, colony가 형성되지 않

음을 확인하였다.

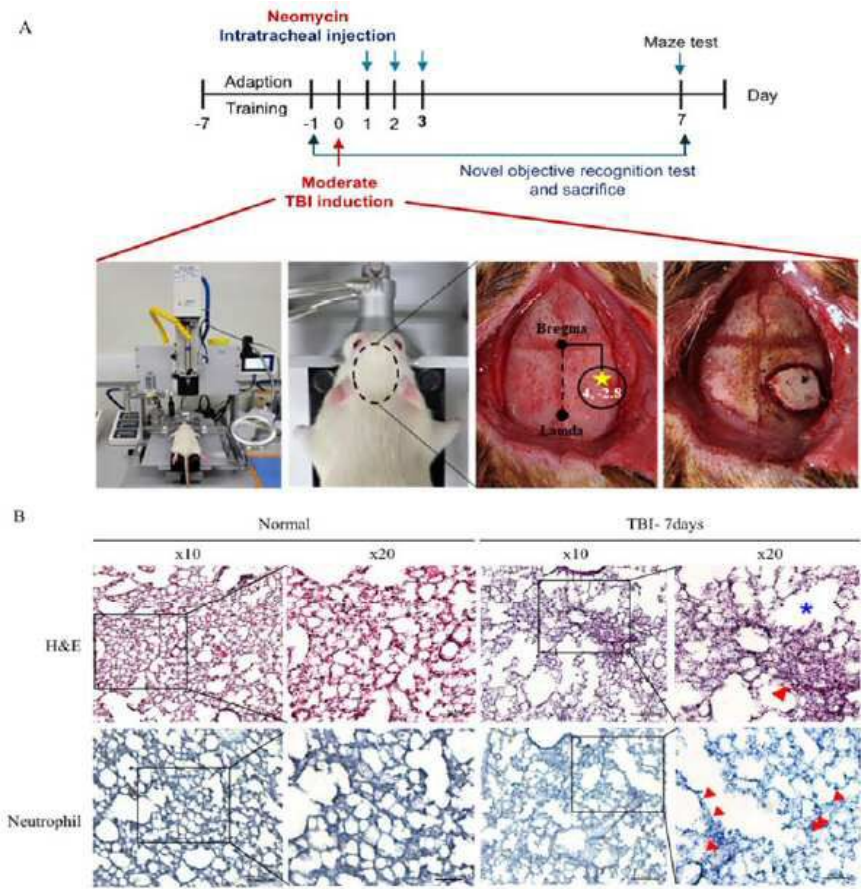
- [0057] 실시예 2-2: 단계적 열처리를 통한 균주 전처리
- [0058] 실시예 1에서 배양된 *Prevotella melaninogenica* 균주를 단계적 열처리 방법으로 불활성화하였다.
- [0059] 균주 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 집균한 후, PBS에 재현탁하였다. 이후 60℃에서 10분간 처리, 온도를 70℃로 상승시켜 10분간 유지, 온도를 80℃로 상승시켜 10분간 유지하여 열처리하였다(각 단계 사이의 온도 상승 속도: 약 2℃/min).
- [0060] 대조군으로 80℃에서 30분간 일괄 열처리한 균주를 준비하였다.
- [0061] 열처리 후 agar plate에 접종하여 48시간 후 colony 형성 여부를 확인한 결과, 단계적 열처리군과 일괄 열처리군 모두에서 colony가 형성되지 않음을 확인하였다.
- [0062] 단계적 열처리 균주와 일괄 열처리 균주의 세포벽 구조를 투과전자 현미경(TEM)으로 비교 관찰한 결과, 단계적 열처리군에서 세포벽 구조가 더 잘 보존되어 있었다.
- [0063] 배양 상등액의 대사체 분석을 LC-MS/MS로 수행한 결과, 단계적 열처리군에서 아라키돈산(arachidonic acid)의 방출량이 일괄 열처리군 대비 1.8배 높았으며($p<0.05$), 인돌-3-락트산(indole-3-lactic acid)의 방출량도 1.5배 높았다($p<0.05$).
- [0064] 인간 혈액-뇌 장벽(BBB) 내피세포에 기계적 세포 손상을 유도한 후, 단계적 열처리 균주 또는 일괄 열처리 균주를 각각 1×10^8 cells/ml 농도로 처리하였다.
- [0065] 24시간 후 항염증 효과를 평가한 결과, 단계적 열처리군에서 TNF- α mRNA 발현량이 대조군(TBI 단독) 대비 $68.7 \pm 4.3\%$ 감소한 반면, 일괄 열처리군에서는 $62.4 \pm 4.9\%$ 감소하였다($p<0.05$). IL-6 mRNA 발현량도 단계적 열처리군에서 $65.2 \pm 5.1\%$, 일괄 열처리군에서 $59.3 \pm 5.3\%$ 감소하였다($p<0.05$). 이러한 결과는 단계적 열처리 방법이 세포벽 구조를 더 잘 보존하면서 유효 대사체의 방출을 촉진하여, 일괄 열처리에 비해 우수한 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.
- [0066] 실시예 3: 생체 외 외상성 뇌손상 모델에서의 항염증 효과 평가 - 기계적 세포 손상 모델
- [0067] 도 5에 나타난 바와 같이, 인간 혈액-뇌 장벽(BBB) 내피세포(Human BBB endothelial cell)를 배양 용기에 분주하고 24시간 배양한 후, 기계적 세포 손상 장치를 이용하여 외상성 손상을 유도하였다.
- [0068] 손상 유도 직후, 실시예 2에서 제조한 열처리된 *Prevotella* 균주를 최종 농도 1×10^8 cells/ml로 첨가하였다. 대조군으로는 PBS를 처리하였다.
- [0069] 24시간 배양 후, 세포 생존율을 CCK-8 분석법으로 측정하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 열처리된 *Prevotella* 균주를 처리한 군에서 대조군(TBI 단독군) 대비 세포 생존율이 유의하게 증가하였다.
- [0070] 또한, 배양 상등액을 수거하여 ELISA로 TNF- α 및 IL-6의 분비량을 측정하였고, 세포로부터 RNA를 추출하여 qRT-PCR로 IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현량을 측정하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, TNF- α 및 IL-6의 분비량과 mRNA 발현량이 대조군 대비 유의하게 감소하였다.
- [0071] 실시예 4: 생체 외 외상성 뇌손상 모델에서의 항염증 효과 평가 - OGD/R 모델
- [0072] 도 5에 나타난 바와 같은 실험 설계에 따라, 인간 혈액-뇌 장벽(BBB) 내피세포를 배양 용기에 분주하고 24시간 배양한 후, 배지를 무당 배지로 교체하고 저산소 챔버(1% O₂)에 1시간 동안 노출시켜 산소-포도당 결핍 상태를 유도하였다. 이후 정상 배지로 교체하고 정상산소 조건에서 재산소화를 진행하였다.
- [0073] 재산소화 직후, 실시예 2에서 제조한 열처리된 *Prevotella* 균주를 최종 농도 1×10^8 cells/ml로 첨가하였다. 대조군으로는 PBS를 처리하였다.
- [0074] 24시간 배양 후, 실시예 4와 동일한 방법으로 세포 생존율, 염증성 마커의 분비량 및 발현량을 측정하였다. 그 결과, 열처리된 *Prevotella* 균주를 처리한 군에서 대조군 대비 세포 생존율이 유의하게 증가하였으며, TNF- α 및 IL-6의 분비량과 mRNA 발현량이 유의하게 감소하였다.
- [0075] 실시예 5: 인간 미세아교세포에서의 항염증 효과 평가
- [0076] 도 5에 나타난 바와 같은 실험 설계에 따라, 인간 미세아교세포(Human microglia)를 배양 용기에 분주하고 24시

간 배양한 후, 실시예 4와 동일한 방법으로 기계적 세포 손상을 유도하였다. 손상 유도 직후, 실시예 2에서 제조한 열처리된 *Prevotella* 균주를 최종 농도 1×10^8 cells/ml로 첨가하였다.

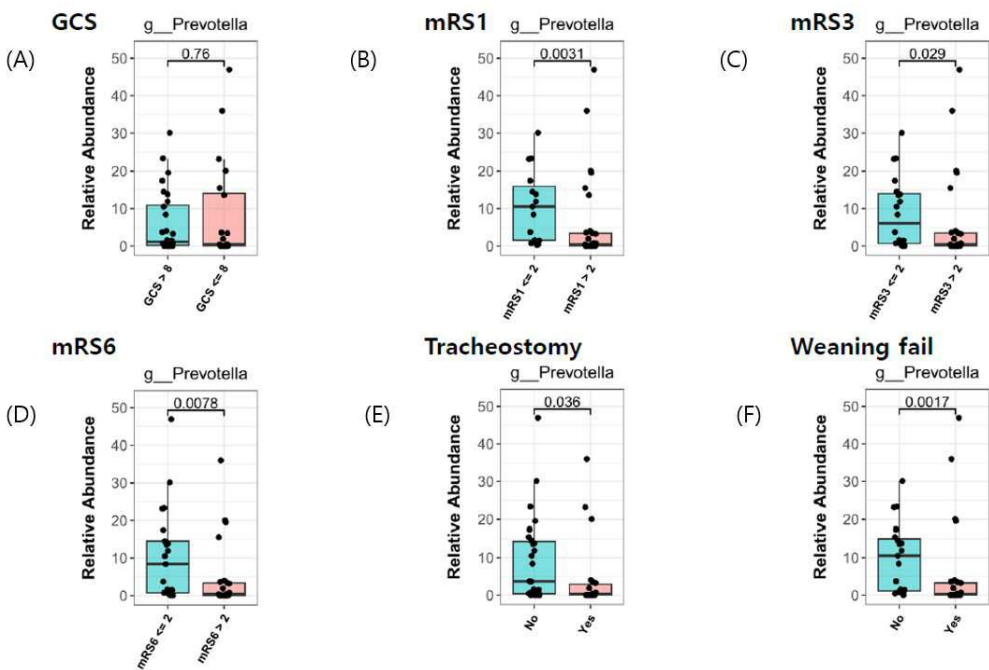
- [0077] 실시예 6: *Prevotella* 유래 대사체의 항염증 효과 평가
- [0078] 실시예 3에서 확인한 *Prevotella* 유래 대사체 중 아라키돈산(arachidonic acid)의 항염증 효과를 평가하였다.
- [0079] 인간 혈액-뇌 장벽(BBB) 내피세포에 실시예 4와 동일한 방법으로 기계적 세포 손상을 유도한 후, 아라키돈산을 2.5 ng/ml 또는 5 ng/ml 농도로 처리하였다. 대조군으로는 vehicle을 처리하였다.
- [0080] 24시간 배양 후, 세포 생존율을 CCK-8 분석법으로 측정하였고, qRT-PCR로 TNF- α 및 IL-6의 mRNA 발현량을 측정하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 아라키돈산을 처리한 군에서 대조군 대비 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였다. TNF- α 의 mRNA 발현량은 5 ng/ml 농도에서 유의하게 감소하였다.
- [0081] 실험예 1: 외상성 뇌손상 환자에서 *Prevotella* 존재량과 예후의 상관관계
- [0082] 외상성 뇌손상 환자의 기관지폐포세척액(BAL, bronchoalveolar lavage)을 채취하여 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 통해 폐 마이크로바이옴을 분석하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 외상성 뇌손상(TBI) 환자군과 정상군(Normal)을 비교한 결과, TBI 환자군에서 *Streptococcus*, *Lactobacillus* 등의 균주는 증가한 반면, *Prevotella* 균주는 감소하는 경향을 보였다.
- [0083] 환자의 신경학적 예후를 평가하기 위해 GCS(Glasgow Coma Scale) 점수와 mRS(modified Rankin Scale) 점수를 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, *Prevotella* 존재량이 높은 환자군($GCS > 8$)과 낮은 환자군($GCS \leq 8$)을 비교한 결과, *Prevotella* 존재량과 GCS 점수 간에는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았으나($p=0.76$), mRS1(퇴원 후 1개월) 점수와는 유의한 상관관계를 보였다($p=0.047$).
- [0084] 도 2에 나타난 바와 같이, $mRS1 \leq 2$ (양호한 예후) 그룹에서 *Prevotella* 존재량이 유의하게 높았으며(평균 14.6%), $mRS1 > 2$ (불량한 예후) 그룹에서는 현저히 낮았다(평균 3.5%). 또한 기관절개술(Tracheostomy) 시행 여부와도 유의한 상관관계를 보여($p=0.036$), *Prevotella* 존재량이 높을수록 기관절개술이 필요하지 않은 경향을 나타내었다.
- [0085] 이러한 결과는 *Prevotella* 균주가 외상성 뇌손상 후 신경학적 예후 개선에 긍정적인 역할을 할 수 있음을 시사한다.
- [0086] 실험예 2: 동물 모델에서 폐 마이크로바이옴 조절에 따른 면역세포 변화
- [0087] 도 1에 나타난 바와 같이, 중등도 외상성 뇌손상(Moderate TBI) 동물 모델을 제작하고, 기관내 주입(Intratracheal injection)을 통해 Neomycin을 투여하여 폐 마이크로바이옴을 조절하였다. 대조군으로는 Normal 그룹과 TBI 단독 그룹을 설정하였다.
- [0088] 도 7에 나타난 바와 같이, 외상성 뇌손상 후 비장(Spleen)에서 면역세포의 변화를 FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석을 통해 평가하였다. TBI 그룹에서는 Treg 세포, Th1 세포, Th17 세포, macrophage, neutrophil이 증가하였으며, Neomycin 처리 시 이러한 변화가 더욱 증가하는 경향을 보였다.
- [0089] 이는 폐 마이크로바이옴의 변화가 전신 면역 반응에 영향을 미치며, 특히 *Prevotella*와 같은 유익한 균주의 감소가 염증성 면역 반응을 증가시킬 수 있음을 시사한다.
- [0090] 상기 실시예 및 실험예를 통해 열처리된 *Prevotella* 균주가 생체 외 외상성 뇌손상 모델에서 뇌 관련 세포의 염증을 효과적으로 감소시키고 세포 생존율을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또한, *Prevotella* 유래 대사체인 아라키돈산을 병용 처리함으로써 그 효과를 더욱 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

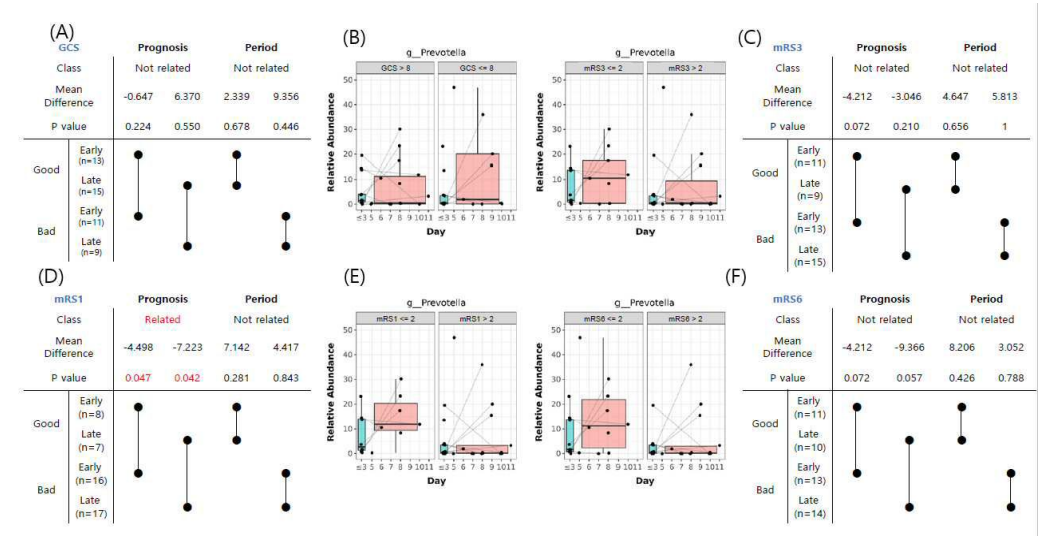
도면1



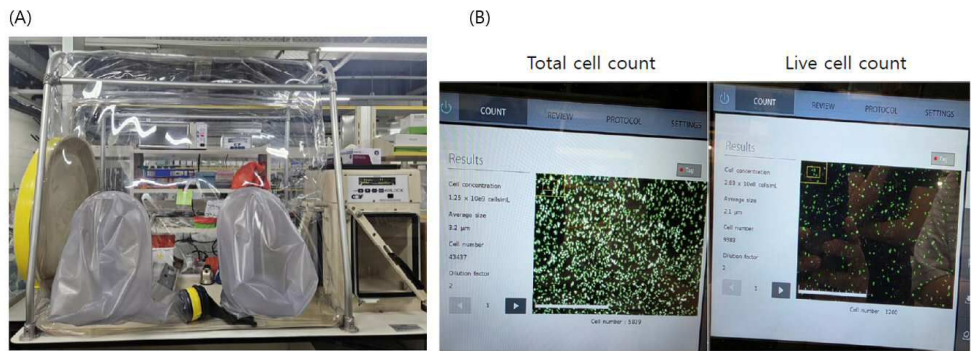
도면2a



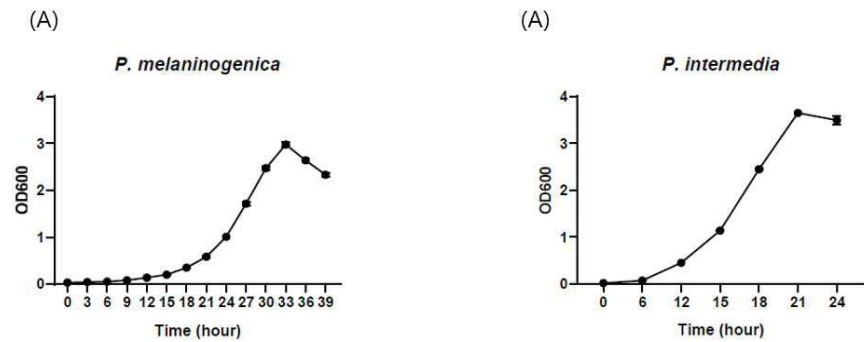
도면2b



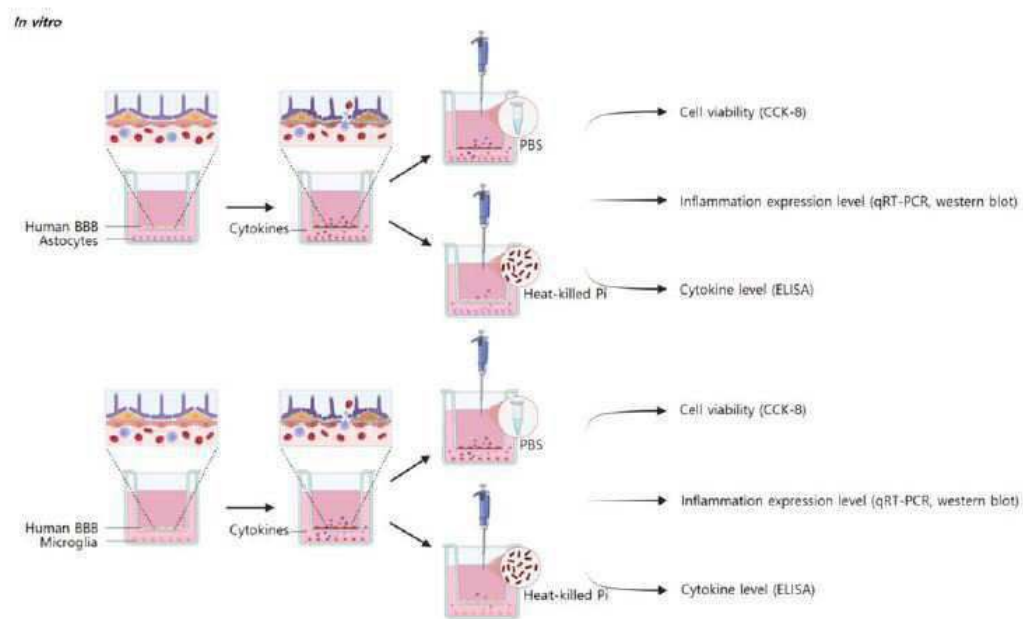
도면3



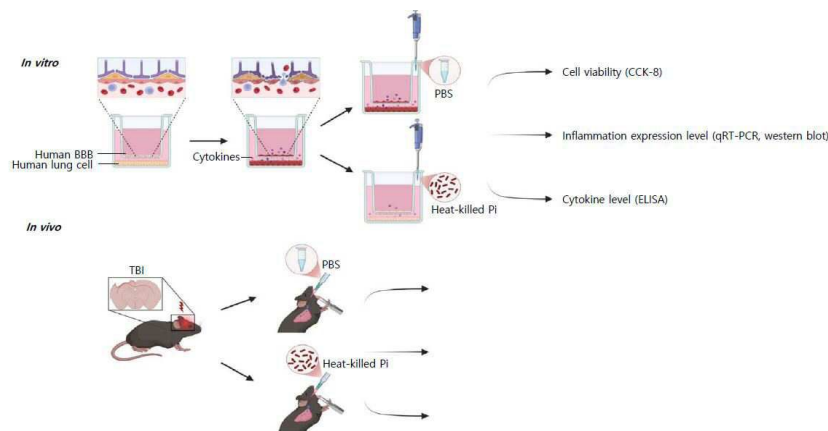
도면4



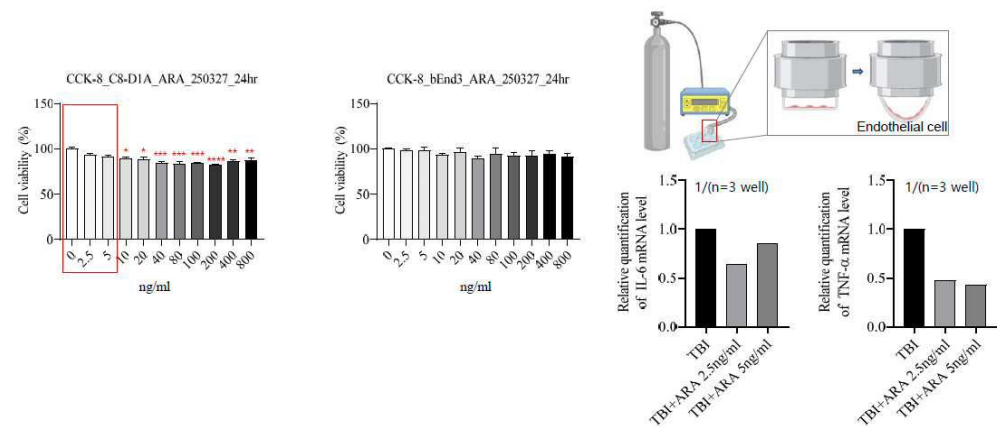
도면5a



도면5b



도면6



도면7

