(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0160116
(43) 공개일자 2023년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
A61P 25/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0059763
(22) 출원일자 2022년05월16일
심사청구일자 2022년05월16일

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
백인경
서울특별시 송파구 새말로12길 16, 404동 201호(장지동, 송파파인타운4단지)
국중기
광주광역시 남구 제중로 11(양림동, 양림1단지휴먼시아)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

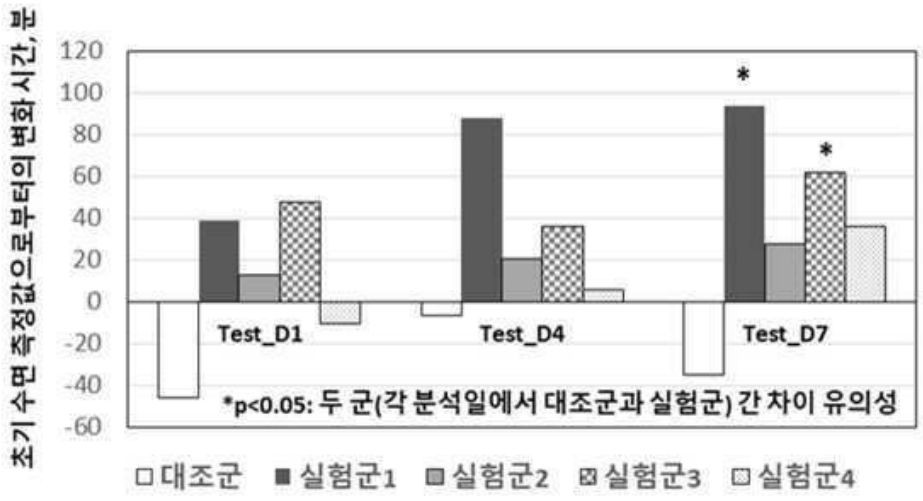
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **프레보텔라 히스티콜라 KCOM 3796**

(57) 요 약

본 발명은 수면장애의 예방 또는 치료에 유용한 프레보텔라 히스티콜라 KCCM13103P 균주에 관한 것이다. *프레보텔라 히스티콜라*는 총 수면시간, 비렘(Non-REM, NREM) 수면시간 및 렘(REM) 수면시간의 증가와 더불어, 입면시간 및 각성시간의 감소로 수면장애의 예방 및 치료를 위한 안전한 약물의 제조를 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째

(52) CPC특허분류
A61P 25/20 (2018.01)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
박순낭
광주광역시 서구 상무대로1099번길 15-1, 1동 609호(화정동, 중흥파크)
임윤경
광주광역시 북구 대자실로 23(운암동, 운암동현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711127139
과제번호 2021R1A2C2009051
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구
연구과제명 한국인 유래 구강 세균의 특성 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 조선대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019122084
과제번호 2019R1A2C2084000
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업, 중견연구자지원사업
연구과제명 유전자 맞춤 항노화 기능성 식물자원 식소재 개발을 위한 동물실험 및 성인대상 중재연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 국민대학교 산학협력단
연구기간 2019.09.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCCM13103P로 기탁된 *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796 (*Prevotella histicola* KCOM 3796).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796은 구강 타액에서 분리된 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796의 16S rDNA 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796은 수면장애의 예방, 개선 또는 치료 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애는 불면증 (insomnia), 호흡관련 수면장애 (breathing-related sleep disorder) 및 일주기 리듬 수면장애(circadian rhythm sleep disorder)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 불면증은 수면시작 불면증(sleep onset insomnia), 수면유지 불면증(sleep maintenance insomnia) 및 수면종료 불면증(sleep terminal insomnia) 으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 호흡관련 수면장애는 폐색성 수면 무호흡증(obstructive sleep apnea syndrome), 중추성 수면 무호흡증(central sleep apnea syndrome) 및 중추성 폐포 환기저하증(central alveolar hypoventilation syndrome) 으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 상기 일주기 리듬 수면장애는 지연된 수면위상형(delayed sleep phase type), 전진된 수면위상형(advanced sleep phase type), 비행기 시차형(jet lag type) 및 교대 근무형(shift work type) 수면장애로

구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 9

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 총 수면시간의 증가에 의한 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 10

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 비렘(Non-REM, NREM) 수면시간의 증가에 의한 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 11

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 렘(REM) 수면시간의 증가에 의한 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 12

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 입면시간의 감소에 의한 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

청구항 13

제 4 항에 있어서, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 총 각성시간의 감소에 의한 것을 특징으로 하는, *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수면장애의 예방, 개선 또는 치료에 유용한 *프레보텔라 히스티콜라* KCOM 3796 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 미국의 불면증 치료제 시장 규모는 약 2조원에 달하고, 최근에는 매년 20% 이상의 성장률을 보이고 있다. 미국의 대표적인 수면장애 의약품은 스틸녹스라는 제품으로 미국뿐 아니라, 국내 수면제 시장의 약 50%의 시장 점유율을 나타내고 있다. 일반적으로 수면제는 단기적 사용시 효과가 좋지만, 4주 이상의 장기 복용은 의존성 및 부작용의 문제를 가지고 있고, 특히 불면증 유병률이 높은 노인에게는 복용 시 부작용의 주의가 요해진다. 따라서 수면제를 대체할 수 있는 천연 수면보조제에 대한 관심이 점차 높아져 그 시장 규모가 확대되어가고 있는 실정이다. 현재 미국과 유럽 국가에서 가장 흔히 사용되고 있는 천연 수면보조제가 10종 이상이 되는데, 불면증 치료에 대한 이들 수면보조제의 효과를 과학적 연구를 통해 보여준 보고는 매우 제한적이다. 미국의 소비자 보고서에 의하면 수면제를 이용한 사람들의 64%, 수면보조제를 이용한 사람들의 20%가 수면증진 효과를 경험한 것으로 나타나 실제로 수면보조제의 유용성이 매우 낮음을 알 수 있다. 국내의 경우, 현재 식품의약품안전처에서 인정한 수면증진 및 개선용 건강기능식품인 국내 천연 수면보조제 제품은 거의 전무한 실정이며, 관련 기능성 원료에 대한 연구도 제한적이다. 향후 노인 인구의 증가와 함께 의료비를 줄이면서 불면증을 해결하려고 하는 요구도가 높아질 것으로 예측되는데, 안전하고 저렴한 천연 수면증진 소재의 발굴이 요구된다.

[0004] 장내 미생물(Gut microbiota, gut flora, 또는 microbiome)은 인간의 소화기관 내에서 살아가는 박테리아

(bacteria), 고세균(archaea), 곰팡이균(fungi) 등을 포함하는 미생물을 의미하며, 다양한 연구 및 통계자료에 의하면 상기 장내 미생물은 주로 다음의 3가지 엔테로타입(enterotype)으로 구성되어 있음이 확인 되었다: 프레보텔라(Prevotella), 박테로이데스(Bacteroides) 및 루미노코쿠스(Ruminococcus).

[0005] 이중 프레보텔라 속 미생물은 주로 탄수화물 및 단당류와 관련이 있으며, 박테로이데스는 단백질, 아미노산 및 포화 지방과 관련이 있다고 알려져 있다. 또한, 식이요법에 따라 하나의 엔테로타입이 우세할 수 있으며, 식이 요법을 변경하면 종의 수에 상응하는 변화가 발생한다(Wu et al, "Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes". *Science*, 2011). 2021년 연구에 따르면 어린 시절의 식단과 운동이 성인이 되었을 때 미생물군의 전체 구성과 다양성에 상당한 영향을 미칠 수 있다고 발표되었다(Monica P. McNamara et al, "Early-life effects of juvenile Western diet and exercise on adult gut microbiome composition in mice", *The Journal of Experimental Biology*, 2021).

[0006] 따라서, 상기 식단 및 생활방식에 따라 변경된 장내 미생물의 구성 및 다양성이 어떠한 질병의 발생이나 진행과 연관되어 있는지를 확인하는 연구들이 증가되고 있다.

[0007] 하지만, 아직까지 상기 장내 미생물과 인간을 포함한 포유류들에 있어서의 수면패턴 간 상관관계에 대한 연구, 혹은 상기 장내 미생물을 이용한 천연 수면보조제의 연구는 미흡한 실정이다. 이미 인체 내에 존재하는 상기 장내 미생물을 이용한 수면보조제가 개발될 경우, 오랜 시간 지속적인 효과를 나타내면서도 내성 없이 보다 안전한 수면을 제공할 수 있을 것이다.

[0009] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 보다 안전한 천연물 유래의 수면 보조제를 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과 인간의 구강 또는 장내 미생물 중 하나인 *프레보텔라 히스티콜라* 또는 이의 배양액이 수면시간의 증가와 더불어, 입면시간 및 각성시간의 감소로 효능이 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 *프레보텔라 히스티콜라* (*Prevotella histicola*)를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*로부터 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*로부터 유래된 세포밖 소포체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물의 치료 용도를 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라*로부터 유래된 세포밖 소포체의 치료 용도를 제공하는 데 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 하기의 단계를 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다:

[0020] (a) *프레보텔라 히스티콜라* 균주를 준비하는 단계; 및

[0021] (b) 상기 균주를 배양액에서 배양하는 단계.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 *프레보텔라 히스티콜라* 균주 유래의 세포밖 소포체를 준비하는 단계를 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0024] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0026] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 신규한 *프레보텔라 히스티콜라*(*Prevotella histicola*) 균주를 제공한다.

[0027] 상기 *프레보텔라 히스티콜라* 균주는 바람직하게는 구강 또는 위장관 내에서 분리된 것이며, 보다 바람직하게는 구강 타액에서 분리된 것이다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *프레보텔라 히스티콜라*(*Prevotella histicola*) 균주는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료 활성을 나타낸다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, *프레보텔라 히스티콜라*(*Prevotella histicola*) 균주, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물을 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라*로부터 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "*프레보텔라 히스티콜라*" 또는 "*프레보텔라 히스티콜라* 균주"는 혐기성이며 운동성이 없는 그람 음성 간균(Gram-negative bacilli)인 프레보텔라 속 균주로서, 인간의 구강이나 위장관에 공생하는 균주이다. 상기 *프레보텔라 히스티콜라* 또는 *프레보텔라 히스티콜라* 균주는 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 수탁번호 KCCM13103P, KCCM13104P 및 KCCM13105P로 구성된 군으로부터 선택되는 수탁번호로 기탁된 *프레보텔라 히스티콜라*인 것이다.

[0035] 보다 바람직하게는 상기 *프레보텔라 히스티콜라*는 2022년 1월 11일자로 한국미생물보존센터에 기탁된 KCCM13103P(*Prevotella histicola* KCOM 3796), KCCM13104P(*Prevotella histicola* KCOM 4081) 및 KCCM13105P(*Prevotella histicola* KCOM 4227)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다.

[0036] 보다 바람직하게는 상기 *프레보텔라 히스티콜라* 의 16S rDNA 서열은 KCOM 3796의 경우 서열번호 3, KCOM 4081의 경우 서열번호 4 및 KCOM 4227의 경우 서열번호 5의 16S rDNA 염기서열을 포함하며, 표준균주(T05-04) 대비 99% 이상의 상동성을 나타내었다(도 4)

[0037] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 *프레보텔라 히스티콜라*는 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결건조된 형태로 존재할 수도 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 유산균의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, *프레보텔라 히스티콜라*는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 배양물이거나, 상기 균주와 추가의 성분을 함께 배양하여 수득한 발효물이거나, 상기 균주를 유기용매로 추출한 추출물, 상기 균주의 세포막을 용해시키거나, 파쇄 또는 균질화 처리한 용해물(또는 파쇄물) 등의 형태로 제제화할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 한 구체예에서, 상기 조성물은 생균 또는 사균으로 존재하는 *프레보텔라 히스티콜라*균주를 포함하는 조성물일 수 있다.

[0039] 다른 구체예에서, 상기 조성물은 *프레보텔라 히스티콜라*균주의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물을 포함하는 조성물일 수 있다.

[0040] 다른 구체예에서, 상기 조성물은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물로부터 유래된(derived) 세포밖 소포체(Extracellular vesicle)를 포함하는 조성물일 수 있다.

[0041] 세포밖 소포체(extracellular vesicles, EVs)는 세포 간의 물질(단백질, 지질, 유전물질) 교환을 가능하게 하며, 생리적/병리적으로 신호를 전달하는 매개체로서 기능한다. 세포밖 소포체는 크게 엑소좀(exosomes)과 마이크로베시클 (microvesicles)로 분류된다. 엑소좀은 생물의 기원에 따라 그 크기가 다양하며, 다중 소포 엔도좀(multi-vesicular endosomes)이 성숙하는 과정에서 엔도좀 막이 안쪽으로 들어와 생성된 내강 소낭(intraluminal vesicles)인데, 다중 소포 엔도좀이 세포 표면과 결합할 때 분비된다. 마이크로베시클은 크기가 50-1000 nm로, 원형질막(plasma membrane)이 바깥으로 솟아나와 분리되어 세포 밖으로 분비되는 소낭이다. 각 세포들은 생리적 상태에 따라 세포밖 소포체를 다르게 생성하고, 특정한 지질/단백질/핵산 조성을 갖는 세포밖 소포체를 분비한다(이재욱(2019). 세포밖 소포체의 세포 생물학에 대한 조명. BRIC View 2019-R03).

[0042] 본 명세서에서 용어 "세포밖 소포체"는 상기 엑소좀(exosomes) 및 마이크로베시클 (microvesicles)을 포함하는 의미로 사용된다.

[0043] 상기 엑소좀 또는 세포밖 소포체는 약 1-1,000 ㎚ 범위 내에서 다양한 직경을 가지며, *프레보텔라 히스티콜라* 유래 엑소좀은 바람직하게는 10-800 ㎚, 가장 바람직하게는 10 내지 600 ㎚의 직경을 가진다.

[0044] 본 발명의 조성물이 포함하는 엑소좀 또는 세포밖 소포체는 *프레보텔라 히스티콜라* 배양액(예를 들어, 배양 상등액) 내에 다량으로 포함되어 있다.

[0045] 상기 엑소좀 또는 세포밖 소포체는 *프레보텔라 히스티콜라* 배양물(예를 들어, 배양 상등액) 내에 다량으로 포함되어 있어, 이를 분리하여 정제된 엑소좀 또는 세포밖 소포체 자체를 치료제로 활용하거나, 상기 엑소좀 또는 세포밖 소포체를 다량으로 포함하는 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물을 치료제로 활용할 수도 있다.

[0046] 본 명세서에서 용어 “분리(isolation)” 또는 "추출(extract)"은 생물학적 시료(예를 들어, *프레보텔라 히스티콜라* 배양물) 내에서 목적하는 물질(예를 들어, 엑소좀)을 선택적으로 수득하는 과정(positive isolation) 뿐 아니라 목적하는 물질 이외의 불순물을 선택적으로 제거하는 과정(negative isolation)을 모두 포함한다. 따라서 용어 “분리”는 “수득(obtain)”, “추출(extract)”, “정제(purify)”와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 엑소좀 또는 세포밖 소포체를 분리하는 과정은, 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 방법이 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 상기 상용화된 엑소좀 분리키트(예를 들어, EXO-BB, ExoQuick® -ULTRA, ExoQuick® -TC, Capturem™ Exosome Isolation Kit, Total Exosome Isolation Kit, ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit, Exo2DTM 등)를 활용하거나, 용액 내 성분들 간 비중 차이에 따른 분리(예를 들어 원심분리법), 크기에 따른 분리(예를 들어 한외여과 또는 진공 필터), 특정 기질에 대한 친화도에 기반한 분리(예를 들어 친화성 크로마토그래피)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 비균질 시료 내에서 목적 물질의 고유의 물성에 기반한 분리 방법으로서 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *프레보텔라 히스티콜라*의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물에는 상기 *프레보텔라 히스티콜라*의 세포내의 소포체(vesicles), 내강 소포체(intraluminal vesicles, ILVs), 엔도좀(endosomes) 및/또는 다중 소포 엔도좀(multi-vesicular endosomes, MVEs)을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 세포내의 소포체는 *프레보텔라 히스티콜라*의 원형질막(plasma membrane)과의 결합을 통해 엑소좀(exosomes)으로 분비될 수 있다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 *프레보텔라 히스티콜라*의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물에는 마이크로베시클(microvesicles) 및/또는 엑소좀(exosomes)을 포함하는 상기 *프레보텔라 히스티콜라*의 세포밖 소포체(Extracellular vesicles, EVs)를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애는 불면증 (insomnia), 호흡관련 수면장애 (breathing-related sleep disorder) 및 일주기 리듬 수면장애(circadian rhythm sleep disorder)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "불면증(insomnia)"은 잠을 자고 싶어도 잠을 이루지 못하는 날들이 지속되고 이로 인해 낮 동안의 활동에 장애를 받게 되는 경우를 의미한다.

[0052] 상기 불면증은 그 양상에 따라 잠들기가 어려운 수면시작 불면증(sleep onset insomnia), 수면 중에 잠을 자주 깨며 다시 잠들기가 어려운 수면유지 불면증(sleep maintenance insomnia), 아침에 일찍 잠에서 깨어 잠을 이루지 못하는 수면종료 불면증(sleep terminal insomnia) 등 크게 3가지 유형으로 구분된다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "호흡 관련 수면장애(breathing-related sleep disorder)"는 수면 중의 호흡장애로 인하여

졸음이나 불면증이 유발되는 경우를 의미한다. 호흡장애로 인해 수면 중에 규칙적인 호흡이 어렵거나 한동안 호흡이 멈춰지는 현상이 나타나는데 이때 잠에서 깨어나게 된다. 주된 증상은 과도한 졸음으로 이러한 졸음은 야간수면 시에 정상적인 호흡을 하기 위해서 자주 잠에서 깨어나게 되어 숙면을 취하지 못하기 때문에 발생한다.

[0054] 상기 호흡 관련 수면장애에서 나타나는 호흡장애는 크게 3가지 유형이 있는데, 그 첫째는 폐색성 수면 무호흡증(obstructive sleep apnea syndrome)으로 수면 도중에 기도가 막혀 무호흡이나 호흡저하가 반복적으로 나타나는 경우로서, 가장 흔한 유형이다. 둘째는 중추성 수면 무호흡증(central sleep apnea syndrome)으로서 기도의 막힘은 없으나 신경학적 질환이나 심장질환 등으로 인하여 수면 중에 호흡정지가 나타나는 경우를 말한다. 마지막으로 중추성 폐포 환기저하증(central alveolar hypoventilation syndrome)은 호흡조절기능의 손상으로 인해 동맥의 산소수준이 감소되는 현상이다.

[0055] 본 명세서에서 용어 "일주기 리듬 수면장애(circadian rhythm sleep disorder)"는 수면-각성 주기의 변화로 인해 졸음이나 불면이 반복되는 경우를 의미한다. 즉 환경(예: 야간근무, 외국여행 등)에 의해 요구되는 수면-각성 주기와 개인의 일주기 수면-각성 주기의 부조화로 인하여 과도한 졸음이나 불면이 반복되고 지속되는 경우가 이에 해당한다.

[0056] 상기 일주기 리듬 수면장애는 4가지 유형으로 구분된다. 첫째 유형은 지연된 수면위상형(delayed sleep phase type)으로서 개인의 수면-각성 주기가 사회적으로 요구되는 것보다 지연되어 있는 경우이다. 두 번째 유형은 전진된 수면위상형(advanced sleep phase type)으로 초저녁에 잠이 들어 이른 새벽에 깨서 더 이상 잠을 이루지 못하는 수면주기를 가진 경우를 의미하며, 노인들에게 흔한 증상이다. 세 번째 유형은 비행기 시차형(jet lag type)으로서 외국여행으로 인해 새로운 시간대에서 요구되는 수면-각성 주기와 개인의 수면-각성 주기가 불일치하는 경우이다. 네 번째 유형은 교대 근무형(shift work type)으로서 교대근무에 의해 요구되는 수면-각성 주기와 개인의 수면-각성 주기가 불일치하는 경우이다.

[0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 총 수면시간의 증가에 의한 것이다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 투여군은 대조군으로서 *프레보텔라 스테르코레아* (*Prevotella stercorea*) 대비 총 수면시간(24시간 기록)의 증가를 나타내었다(도 7).

[0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 비렘(Non-REM, NREM) 수면시간의 증가에 의한 것이다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 투여군은 대조군으로서 *프레보텔라 스테르코레아* 대비 비렘 수면시간이 증가하는 양상을 나타내었다(도 8).

[0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 렘(REM) 수면시간의 증가에 의한 것이다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 투여군은 대조군으로서 *프레보텔라 스테르코레아* 대비 렘 수면시간이 증가하는 양상을 나타내었다(도 9).

[0063] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 입면시간의 감소에 의한 것이다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 투여군은 대조군으로서 *프레보텔라 스테르코레아* 대비 전반적으로 입면시간이 더 감소된 결과를 나타내었다(도 10).

[0065] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수면장애의 예방, 개선 또는 치료는 총 각성시간의 감소에 의한 것이다.

[0066] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 투여군은 대조군으로서 *프레보텔라 스테르코레아* 대비 전반적으로 각성시간이 점차적으로 더 감소된 결과를 나타내었다(도 11).

[0067] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 균주 유래 세포밖 소포체는 증가된 총 수면시간 및 감소된 총 각성시간을 나타내었다(도 13).

[0068] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 균주 유래 세포밖 소포체는 증가된 비렘 수면

시간을 나타내었다(도 14).

[0069] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것이다.

[0071] 또한, 본 발명은 치료상 유효량의 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물; 또는 상기 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물로부터 유래된 세포밖 소포체;를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.

[0073] 본 발명 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물의 치료 용도(for use in therapy)를 제공한다.

[0075] 본 발명 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물로부터 유래된 세포밖 소포체의 치료 용도를 제공한다.

[0077] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 치료 용도는 수면장애의 치료 용도인 것이다.

[0078] 여기에서 사용된 “대상체(subject)”는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 수면장애의 예방, 개선 및/또는 치료를 필요로 하는 인간 또는 동물일 수 있다.

[0079] 본 발명에 의한 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다.

[0080] 비경구로 투여하는 경우, 예컨대, 정맥 내 주입, 경피 투여, 피하 주입, 근육 내 주입, 유리체 내 주입(intravitreal injection), 점안 투여(eye drop administration), 뇌실 내 주입(intracerebroventricular injection), 척추강 내 주입(intrathecal injection), 양막 내 주입 (intraamniotic injection), 동맥 내 주입 (intraarterial injection), 관절강 내 주입 (intraarticular injection), 심장 내 주입 (intracardiac injection), 음경해면체 내 주입 (intracavernous injection), 뇌 내 주입 (intracerebral injection), 뇌수조 주입 (intracisternal injection), 관상 내 주입 (intracoronary injection), 두개 내 주입 (intracranial injection), 경막 내 주입 (intradural injection), 경막 외 주입 (epidural injection), 해마 내 주입 (intrahippocampal injection), 비강 내 주입 (intranasal injection), 골강 내 주입 (intraosseous injection), 복강 내 주입 (intraperitoneal injection), 흉강 내 주입 (intrapleural injection), 척수 내 주입 (intraspinal injection), 흉곽 내 주입 (intrathoracic injection), 흉선 내 주입 (intrathymic injection), 자궁 내 주입 (intrauterine injection), 질 내 주입 (intravaginal injection), 심실 내 주입 (intraventricular injection), 방광 내 주입 (intravesical injection), 결막 하 주입 (subconjunctival injection) , 종양 내 주입 (intratumoral injection), 국소 주입 및 복강 주입(intraperitoneal injection) 등으로 투여할 수 있다.

[0081] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어, “약제학적으로 허용가능한 담체”란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 성분의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 본 명세서에서의 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 또는 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여, 조직 또는 장기에 주입하기에 적합한 주사제의 형태로 제형화할 수 있다. 또한, 등장성 멸균 용액, 또는 경우에 따라 멸균수나 생리식염수를 첨가하여 주사 가능한 용액이 될 수 있는 건조 제제(특히 동결 건조 제제)로 제형화할 수도 있다. 또한, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합하여 사용할 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용할 수 있다.

[0082] 또한, 바람직하게 본 발명의 조성물은 충진제, 부형제, 붕해제, 결합제 및 활택제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

[0083] 본 명세서에서, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 대상체에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0084] 예컨대, 본 발명의 조성물은 임상 투여시에 근육 정맥, 또는 복강 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0085] 주사를 위해서, 바람직하게는 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리 식염수 버퍼와 같은 약리학적으로 맞는 버퍼로 제형될 수 있다. 점막 투과 투여를 위해서, 통과할 배리어에 적합한 비침투성제가 제형에 사용된다. 그러한 비침투성제들은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다.

[0086] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0087] 본 명세서에서, "유효량"은 목적하는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미하며, 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 *프레보텔라 히스티콜라*의 유효량은 수면 장애의 예방, 개선 또는 치료 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 상기 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 종류 및 함량, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다.

[0088] 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0089] 본 명세서에서, “치료”는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화(즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감(부분적이거나 전체적으로), 검출 가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, “치료”는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 늘이는 것을 의미할 수도 있다. “치료”는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방 조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "개선" 또는 “완화”하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병 상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.

[0090] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 식품 조성물인 것이다.

[0091] 본 발명의 식품 조성물이 포함하는 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물; 또는 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물로부터 유래된 세포밖 소포체는 앞서 기술한 모든 내용을 그대로 적용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 활용될 경우, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 또는 조미료, 음료, 바 등의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 발효유 등의 음료를 포함할 수 있다. 이에, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라* 또는 이의 배양물로 이루어지는 식품 발효용 유산균 스타터를 제공한다.

[0093] 본 발명의 식품 조성물은 상기 유효성분 이외에 식품학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0094] 상기 식품 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 식품학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 식품학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0095] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니

나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0096] 본 발명에 따른 식품 조성물은 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 비타민복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0097] 본 발명의 식품 조성물은 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아추출물 (예를 들어 레바우디오시드A, 글리시르히진 등]) 및 합성향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0098] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물; 또는 상기 *프레보텔라 히스티콜라*, 이의 배양물, 파쇄물, 추출물 또는 발효물로부터 유래된 세포밖 소포체;를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제 또는 사료를 제공한다.

[0099] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립 형태로 제조될 수 있다. 상기 사료첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산등의 유기산이나 인산 나트륨, 인산 칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 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. 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화 될 수 있으며, 통상의 사료성분을 함께 포함할 수 있다.

[0100] 상기 사료첨가제 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 건조성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[0101] 상기 사료첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료첨가제는 탑드레싱으로서 또는 이들을 동물사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료첨가제를 동물사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 식품학적으로 허용가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수전분, 락토오스, 수크로오스, 콩플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

[0102] 또한, 상기 사료첨가제 및 사료는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료첨가제는 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[0103] 본 발명의 사료 또는 사료첨가제는 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물식이에 적용할 수 있다.

[0104] 상기 포유류로서 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치동물, 및 실험용 설치동물뿐만 아니라, 애완동물(예: 개, 고양이) 등에게 사용할 수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있고, 상기 어류로서 송어 등에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 본 발명의 사료 또는 사료첨가제는 동물식이에 적용되어 동물의 성장, 면역 강화 등을 위해 사용될 수 있다.

[0106] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 *프레보텔라 히스티콜라*(*Prevotella histicola*) 균주의 양은 1회를 기준으로 약 10^6 내지 10^{12} cfu/ml일 수 있으며, 예컨대 10^7 내지 10^{11} cfu/ml, 10^8 내지 10^{11} cfu/ml일 수 있다. 균주를 투여할 경우에는 생균 상태로 투여하는 것이 바람직하며, 섭취 전에 사멸시키거나 감쇄(attenuation) 상태로 투여할 수 있다. 또한, 배양 상등액 등을 사용하여 제조할 경우에는 열처리 과정을 통한 멸균화 과정을 추가적으로 거칠 수 있다. 최소의 효능을 가지는데 필요한 균주량 및 일일 섭취 정도는 섭취자의 신체 또는 건강상태에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 약 10^6 내지 10^{12} cfu/ml일 수 있으며, 예컨대 10^7 내지 10^{11} cfu/ml, 10^8 내지 10^{11} cfu/ml일 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 *프레보텔라 히스티콜라*(*Prevotella histicola*) 균주 유래 세포밖 소포체의 양은 1회를 기준으로 약 10^6 내지 10^{12} cfu/ml으로부터 분리된 세포밖 소포체의 양 일 수 있으며, 예컨대 10^7 내지 10^{11} cfu/ml, 10^8 내지 10^{11} cfu/ml으로부터 분리된 세포밖 소포체의 양 일 수 있다.

[0108] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 수면장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다:

[0109] (a) *프레보텔라 히스티콜라* 균주를 준비하는 단계; 및

[0110] (b) 상기 균주를 배양액에서 배양하는 단계.

[0111]

[0112] 본 발명의 바림직한 구현예에 따르면, 상기 제조방법은 (c) 상기 배양액으로부터 세포밖 소포체를 분리하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *프레보텔라 히스티콜라* 균주 유래의 세포밖 소포체를 준비하는 단계를 포함하는 수면장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0116] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0117] (ⅰ) 본 발명은 신규한 *프레보텔라 히스티콜라* 균주를 제공한다.

[0118] (ii) 본 발명의 *프레보텔라 히스티콜라* 균주는 총 수면시간, 비렘(Non-REM, NREM) 수면시간 및 렘(REM) 수면시간의 증가와 더불어, 입면시간 및 각성시간의 감소로 수면장애의 예방 및 치료를 위한 안전한 약물 또는 식품으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0120] 도 1은 전체 실험 과정 및 기간을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 수면뇌파검사 시스템의 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 배양된 기탁균주의 사진이다.

도 4는 배양된 기탁균주의 16S rDNA 핵산염기서열 상동성(%) 분석 결과이다.

도 5는 배양된 기탁균주의 16S rDNA 핵산염기서열 ANI 값 분석 결과이다.

도 6은 배양된 기탁균주의 계통분류학적 분석 결과이다.

도 7은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 수면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다.

도 8은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 비렘 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 비렘 수면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다.

도 9는 수면뇌파검사에서 초기 측정된 렘 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 렘 수면시간을 비교한 결과를 나타낸다.

도 10은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 총 입면시간(잠들기까지 걸린 시간)에 비해 변화된 입면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다.

도 11은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 수면시간 및 각성시간(24 시간 기록)을 대조군, 실험군1, 실험군4로 나누어서 변화를 살펴본 결과를 나타낸다.

도 12는 수면뇌파검사에서 비렘 수면시간(24 시간 기록)을 군으로 나누어서 변화를 살펴본 결과를 나타낸다.

도 13은 수면뇌파검사에서 측정된 수면시간 및 각성시간(24시간 기록)의 변화를 살펴본 결과이다.

도 14는 수면뇌파검사에서 측정된 깊은 수면 상태인 비렘 수면시간(24시간 기록)의 변화를 살펴본 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0123] **실시예**

[0124] ***연구재료 및 방법***

[0125] **1. 실험 동물**

[0126] 본 실험에서는 7주령인 Sprague-Dawley 종 백서를 사용하였다. 모든 동물은 일정한 온도(20-21℃)에서 1주일간 09:00~21:00의 명암주기에 적응시켰고 물과 식이는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

[0128] **2. 미생물의 준비**

[0129] **2-1. 기탁균주의 출처**

[0130] 기탁균주 3종(KCCM13103P, KCCM13104P, KCCM13105P)은 조선대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자 3인의 구강 타액에서 분리하였고, 각 기탁균주와 관련된 정보는 표 1에 나타난 바와 같다. 환자를 식별할 수 있는 개인정보는 익명화되어 표 1의 정보만 연구자에게 전달되었다.

표 1

[0132] **기탁균주와 관련된 정보**

기탁균주 번호	균주명	균주 출처 정보				
		성별	나이	분리원	진단명	분리일자
KCCM13103P (KCOM 3796)	Prevotella histicola	F	67	타액	임플란트 주위염 (peri-implantitis)	2019.10.22
KCCM13104P(KCOM 4081)	Prevotella histicola	F	62	타액	만성치주염 (chronic periodontitis)	2020.08.05
KCCM13105P (KCOM 4227)	Prevotella histicola	F	82	타액	만성치주염 (chronic periodontitis)	2020.10.21

[0133] **2-2. 미생물 배양 방법**

[0134] 환자의 타액을 phosphate buffered saline(PBS, 농도는 1xPBS)으로 1,000 및 10,000배로 희석한 후, 이를 혈액 한천배지[tryptic soy broth (TSB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US)에 0.05% cysteine HCl-H_2O, 0.5% yeast extract, 5 μg/ml hemin 및 2 μg/ml vitamin K_1, 5% sheep blood가 첨가된 고체배지]에 도말하여, 37℃ 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 7일 동안 배양하였고, 여기서 자라난 세균 군락을 무작위로 선정하여 분리 배양하였다.

[0136] **2-3. 미생물 동정 방법**

[0137] 분리 배양된 미생물은 16S rDNA 핵산염기서열결정법과 전장유전체(whole genome) 핵산염기서열 비교분석법을 이용하여 종-수준으로 동정되었다. 미생물의 16S rDNA 핵산염기서열을 분석하기 위해 16S rRNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGA GTT TGA TCM[A/C] TGG CTC AG-3'(서열번호 1), 1492R; 5'-TAG GGY[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(서열번호 2)와 Accupomer® Premix (Bioneer, Seoul, Korea), PTC-200 polymerase chain reaction(PCR) machine(MJ Reserch INC., Watertown, MA, US)을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. 최종 20 μl의 PCR 혼합용액이 되도록, 20 pmoles 씩의 27F 및 1492R primers와 100 pg의 세균 지놈 DNA를 넣어 PCR 반응액을 제조하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분간 초기 변성을 실시한 후 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72℃에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물 2 μl씩을 취해 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다. 증폭된 16S rDNA를 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, WI, USA)에 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, 핵산염기서열 결정을 위해 바이오니아사(Bioneer, Daejeon, Korea)에 의뢰되었다. 분석된 KCCM13103P(KCOM 3796), KCCM13104P(KCOM 4081) 및 KCCM13105P(KCOM 4227)의 16S rDNA 염기서열은 서열번호 3 내지 5와 같다.

[0138] 기탁균주를 동정하기 위해 Genbank(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)로부터 다운받은 *Prevotella histicola* 표준균주(T05-04)와 참고균주(N2-20)의 16S rDNA 핵산염기서열 정보와 비교하여 기탁균주의 16S rDNA 핵산염기서열 상동성이 분석되었다. MegAlin 프로그램(7.0 version, DNAStar Lasergene, DNAStar Inc., Madison, WI, USA)에서 Clustal W 알고리즘 방법을 이용하여 서열정렬 후 표준균주, 참고균주, 기탁균주의 상동성(percent identity) 및 Distances 값(Divergence)이 산출되었으며 계통학적 분석 결과가 phylogenetic tree로 묘사되었다. 또한 OrthoANI 프로그램(Lee 등, Int J Syst Evol Microbiol, 2016;66:1100-1103 및 https://www.ezbiocloud.net/)에서 USEARCH 알고리즘을 이용하여 표준균주와 기탁균주 각각의 전장유전체 핵산염기서열의 상동성이 분석되어 average nucleotide identity(ANI) 값이 산출되었다. 세균 전장유전체 핵산염기서열을 기반으로 세균을 종 수준으로 동정할 때, 표준균주와 대상 균주의 16S rDNA 핵산염기서열의 상동성이 98.6% 이상이면서, 전장유전체 핵산염기서열의 ANI 값이 95% 이상일 때, 대상 균주를 표준균주와 같은 종으로 판정된다(Chun 등, Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68:461-466).

[0140] **2-4. 기탁균 시료 준비 방법**

[0141] 7 ml 액체배지를 넣은 14 ml tube 2개에 고체배지에서 배양된 활성화된 *Prevotella histicola* 기탁균의 5-10 colony를 접종하여 24시간 동안 37℃ 혐기성 세균배양기에서 배양하였다. 250 ml bottle 12개에, 각각 200 ml 액체배지를 넣고 24시간 배양된 세균 배양액 1 ml씩 접종하여 24-28시간 배양하였다. 이렇게 대량 배양된 세균 배양액을 250 ml centrifuge tube에 담아 7000 rpm에서 15분 동안 원심 분리한 후 상층액을 버리고 세균 펠릿을 3 ml PBS buffer로 현탁하여, 한개의 centrifuge tube에 옮겨 합한 후 15 ml conical tube에 3 ml씩 나누어 담아 멸균된 솜으로 막고, 뚜껑을 잘 닫아 -80℃에서 얼리고 30-32시간 동안 동결건조하였다. 동물실험에서 필요로 하는 시료 양을 준비하기 위해 얼리기 전 세균 현탁액이 들어있는 tube 한 개에서 10 ul 세균 현탁액을 취해 PBS buffer로 10^4, 10^5, 10^6 배 희석한 후, 세균 희석용액의 10 ul를 취해 각각 고체배지에 도말하여 2-3일 동안 배양한 후 군락의 수를 측정하였다. 이에 근거하여 동결건조한 세균을 준비하였고 이를 혐기시스템팩(BD Gaspak EZ™ Pouch, USA)에 넣고 동물실험 전까지 세균의 혐기상태를 유지하며 4℃에서 보관 하였다.

[0143] **3. 생균주 투여 동물실험 설계**

[0144] 생균주를 이용한 동물실험은 대조군(n=5)과 4군의 실험군, 즉 실험군1(n=5), 실험군2(n=5), 실험군3(n=4), 실험군4(n=6)를 포함하여 실험 결과를 비교하였고, 전체 실험 과정 및 기간은 도 1에 나타난 바와 같다. 대조군에게는 *Prevotella stercorea*(인체에서 발견되는 미생물로, 프레보텔라 속에서 두 번째로 비율이 높은 종에 해당) 시료를, 실험군1에게는 대표 균주인 *Prevotella histicola*(KCTC 15171; CCUG 55407; DSM 19854; JCM 15637) 시료를, 실험군2에게는 기타 균주인 *Prevotella histicola*(CCUG 60372) 시료를, 실험군3과 실험군4에게는 한국인 구강에서 채취한 *Prevotella histicola*(실험군3은 KCCM13103P, 실험군4는 KCCM13105P) 시료를 경구 투여하였다. 경구투여에 적응시키기 위해 수면 측정 시작 5일 전부터 매일 동일한 시간(08시~09시 사이)에 증류수 1 ml를 경구 투여하였다. 대조군 및 실험군1과 실험군2에게는 배지 1 ml을 08~09시 사이에 2일 간 경구 투여하면서 미생물 투여 전 초기(baseline) 수면 측정을 2일 간 실시하였고, 이후 배지에 배양한 생균 시료를 투여하였다. 실험군3과 실험군4에게는 배지 없이 동결건조한 생균 시료를 준비하여 증류수에 희석하여 투여하였기 때문에, 증류수를 08~09시 사이에 경구 투여하면서 미생물 투여 전 초기(baseline) 수면 측정을 1-2일 간 실시하였다. 각 실험군에 사용된 미생물은 확인을 위해 유전자 분석(16S rDNA 시퀀싱)을 완료하였으며, 1일 투여 시료의 생균 수는 1×10^{10} cfu로 하였다.

[0146] **4. 균주의 세포밖 소포체(extracellular vesicle: EV) 투여 동물실험 설계**

[0147] EV를 이용한 동물실험은 실험군 2군으로 구성되어 각 군마다 4마리씩 실험한 결과로, 실험군5에게는 대표 균주인 *Prevotella histicola*(KCTC 15171; CCUG 55407; DSM 19854; JCM 15637)의 EV 시료를 실험군6에게는 한국인의 구강에서 채취한 *Prevotella histicola*(KCCM13105P)의 EV 시료를 경구 투여하였다. 경구투여에 적응시키기 위해 수면 측정 시작 5일 전부터 매일 동일한 시간(08시~09시 사이)에 증류수 1 ml을 경구 투여하였다. EV 시료 양은 실험군5에게는 4.56 mg(생균 수 1×10^{9} cfu로부터 추출된 양)을, 실험군6에게는 2 mg을 매일 경구 투여하였다.

[0149] **5. 수면뇌파 측정 방법**

[0150] 백서의 수면상태 분석을 위해 뇌파검사(Electroencephalography, EEG 2 channel)와 근전도 검사(Electromyography, EMG 1 channel)를 수행하였다(8239 Headmount, Pinnacle Technology Inc.). 검사를 위한 장치를 두개골에 이식하기 위해 수술을 진행하였는데, 그 방법은 다음과 같다. 깊은 마취상태(isoflurane 마취)를 유도하여 백서의 머리털을 전통 커터를 이용해 깎은 후 stereotaxic device에 머리를 고정시키고 메스를 이용해 두개골이 보이도록 두피와 피하 결합조직을 함께 절개하였다. 치과용 드릴을 이용하여 두개골 4부위에 구멍을 뚫은 후 EEG 측정을 위해 EEG 전극을 삽입하였고, EMG 측정을 위해 목 근육 2부위에 EMG 전극을 삽입한 후, 비 흡수성 실 및 치과용 아크릴을 이용하여 고정시켰다. 절개 부분을 봉합하고 소독한 후 3일 동안 복강 내로 항생제를 투여하여 수술로 인한 염증을 예방하였다. 수술 후 상처 부위를 세척하면서 최소 10일간의 회복 기간을 가진 후 수면뇌파 측정 실험이 시작되었다. EEG 및 EMG 기록은 오전 9시부터 시작하여 24시간 동안 지속적으로 진행되었다. 수면 단계의 분석을 위해 백서를 케이지에 넣고 preamplifier와 연결시키고, 수면 기록을 위해 Pinnacle technology Inc.의 3 channel EEG/EMG 시스템(Sirenia Sleep Pro, Pinnacle Technology, Oregon ST, USA)(도 2)을 이용하였다. 수면 단계 분류는 뇌파 및 근전도 파형의 진폭 값에 따라 각성 상태(wake) 및 비렘 수면상태(non-rapid eye movement, 깊은 수면 상태) 및 렘 수면상태(rapid eye movement, 얕은 수면 상태)로 구분하여 분석하였다. 뇌파 획득 조건은 sampling rate 200 Hz, preamplification gain 10으로 설정하였고, channel 획득 조건은 EEG는 gain 1, filter Hz는 25, EMG는 gain 1, filter Hz는 100으로 설정하였다.

[0152] ***연구결과***

[0153] **1. 기탁균 배양 및 동정 결과**

[0154] 배양된 기탁균주는 도 3에 나타난 바와 같다.

[0155] 도 4에서 나타난 바와 같이 *Prevotella histicola* 표준균주(T05-04) 및 참고균주(N2-20)와 기탁균주(KCCM13103P, KCCM13104P, KCCM13105P)의 상동성(%, 붉은박스)이 99% 이상으로 나타나 기탁균주가 표준균주 및

참고균주와 같은 종으로 판정되었다.

[0156] 도 5는 OrthoANI 프로그램에서 분석된 결과를 나타내는데, 표준균주(T05-04)와 3종의 기탁균주 간의 ANI 값이 모두 95% 이상으로 기탁균주는 모두 *Prevotella histicola* 종으로 나타났다.

[0157] 도 6의 phylogenetic tree에서 나타난 바와 같이 진화론적 측면에서 3종의 기탁균주 중 KCCM13105P이 *Prevotella histicola* 표준균주(T05-04) 및 참고균주(N2-20)와 가장 가까우며, 기탁균주 2종인 KCCM13103P와 KCCM13104P가 가깝게 나타났다.

[0159] **2. 생균주 투여 동물실험 결과**

[0160] 모든 실험 백서에서 수면뇌파검사 결과를 획득하였다. 초기 수면 측정값은 1-2일 간 측정한 값(2일 측정값은 평균값)을 사용하였고, 미생물 투여 후 1일 째, 4일 째, 7일 째 기록된 수면 측정값(모든 군에서 측정) 및 미생물 투여를 중단 후 1-3일 째까지의 수면 측정값(대조군, 실험군1 및 실험군4만 측정)을 사용하였다. 대조군과 실험군의 비교는 초기 수면 측정값에서 이후 수면 측정값이 어떻게 변화하였는지를 계산한 값(이후 수면 측정값 - 초기 수면 측정값)을 비교하였다. 통계적 검증은 비모수통계방법인 Mann-Whitney U Test를 사용하였고 양측 검정에서 $p<0.05$를 유의한 것으로 판단하였다.

[0161] 도 7은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 수면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다. 대체로 실험군은 미생물 투여 후 초기 수면 측정값에 비해 점차 수면시간이 증가하는 양상을, 대조군은 거의 변화가 없거나 수면시간이 다소 감소하는 양상을 나타냈다. 특히, 대조군에 비해 실험군1 및 실험군3에서 미생물 투여 7일 째에 투여 전보다 수면시간이 1시간 이상 증가된 것으로 나타났다($p<0.05$). 실험군2와 실험군4에서도 통계적으로 유의하지는 않았지만 투여 전에 비해 미생물 투여 7일 째에 수면시간이 증가한 것으로 나타났다.

[0162] 수면 질의 변화를 비교하기 위해 특히 깊은 수면 상태인 비렘 수면 시간을 분석 비교하였다. 도 8은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 비렘 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 비렘 수면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다. 실험군3에서 미생물 투여 7일 째 비렘 수면시간이 유의적으로 증가($p<0.05$) 하였으며, 다른 실험군에서도 증가 양상을 나타낸 반면 대조군에서는 다소 감소하는 양상을 나타냈다. 특히 실험군3과 실험군1에서 미생물 투여 7일 째에 비렘 수면시간이 1시간 가량 증가된 것으로 나타나 수면의 질이 상당히 향상된 것으로 나타났다.

[0163] 도 9는 수면뇌파검사에서 초기 측정된 렘 수면시간(24 시간 기록)에 비해 변화된 렘 수면시간을 비교한 결과를 나타낸다. 실험군에서 미생물 투여 기간에 렘 수면시간이 전반적으로 증가한 양상을 나타내었고, 특히 대조군에 비해 실험군1에서 미생물 투여 4일 및 7일 째에 렘 수면시간이 30분 가량 증가하였다($p<0.05$). 이러한 증가는 총 수면시간 자체가 가장 많이 증가한 실험군1에서 얕은 수면시간도 동시에 증가한 것으로 여겨진다.

[0164] 도 10은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 총 입면시간(잠들기까지 걸린 시간)에 비해 변화된 입면시간(24시간 기록)을 비교한 결과를 나타낸다. 유의적인 차이는 없지만 대조군에 비해 실험군1에서 전반적으로 입면시간이 더 감소된 결과를 나타내 잠을 자기 시작하면 약 25분 가량 빨리 잠드는 것으로 나타났다. 그 외 실험군2와 실험군3에서 미생물 투여 첫째 날에, 실험군4에서는 미생물 투여 7일째에 대조군에 비해 입면시간이 더 감소된 결과를 나타냈다.

[0165] 도 11 및 12는 수면뇌파검사에서 초기 수면 측정값, 미생물 투여 동안 및 투여 중지 후 수면 측정값의 변화를 대조군 및 실험군(실험군1과 실험군4만 포함)으로 나누어서 초기 수면 측정값과 비교한 통계적 검정 결과를 나타낸다.

[0166] 도 11은 수면뇌파검사에서 초기 측정된 수면시간 및 각성시간(24 시간 기록)을 대조군, 실험군1, 실험군4로 나누어서 변화를 살펴본 결과를 나타낸다. 대조군에서는 총 수면시간이 미생물 투여 첫날부터 7일 째 및 투여 중지 3일 째 날까지 감소 및 증가를 반복하지만 결국 초기 측정된 수면시간과 마지막 측정된 수면시간이 거의 비슷해 큰 변화가 없는 것으로 분석되었다. 하지만, 실험군1에서는 미생물 투여 1일 째부터 수면시간이 증가하면서 4일 및 7일 째 급격히 증가하였고 투여 중지 3일 째까지 증가 추이가 유지되는 것으로 나타났다. 실험군1에 비해 증가 정도는 작지만, 실험군4에서도 미생물 투여 7일 째에 수면시간이 증가하였고 투여 중지 2일 째까지 증가 추이가 유지되다가 3일째에는 다소 감소 경향을 나타냈다. 각성시간 결과에서도 대조군은 각성시간의 감소 및 증가를 반복하면서 큰 변화가 없는 것으로 분석되었지만, 실험군1에서는 꾸준히 각성시간이 감소하

여 최대 111분 가량, 실험군4에서도 최대 42분 가량 감소하는 것으로 나타났다. 감소된 각성시간은 수면시간으로 바뀐 것으로 여겨진다.

[0167] 도 12는 수면뇌파검사에서 비렘 수면시간(24 시간 기록)을 군으로 나누어서 변화를 살펴본 결과를 나타낸다. 대조군에서 비렘 수면시간은 미생물 투여 첫날부터 7일 째 및 투여 중지 마지막 날까지 감소 및 증가를 반복하지만 결국 초기 측정된 비렘 수면시간과 마지막 측정된 비렘 수면시간이 거의 비슷해 큰 변화가 없는 것으로 분석되었다. 하지만, 실험군1에서는 미생물 투여 1일 째부터 수면시간이 증가하면서 7일 째 급격히 증가하였고 투여 중지 3일 째까지도 증가 추이가 유지되는 것으로 나타났다. 실험군4에서도 미생물 투여 7일 째까지 비렘 수면시간이 증가하였고 그 증가 정도는 실험군1 결과와 유사하게 나타났으며, 다만 투여 중지 후에는 증가 추이보다는 유지하는 결과를 나타냈다.

[0169] **2. 균주의 세포밖 소포체(extracellular vesicle: EV) 투여 동물실험 결과**

[0170] 모든 실험 백서에서 수면뇌파검사 결과를 획득하였다. 초기 수면 측정값은 1일치(실험군6) 혹은 2일치 평균값(실험군5)을 사용하였고, EV 투여 후 1일, 3일, 6일 째까지 기록된 수면 측정값을 사용하였다. 결과에서 적은 실험동물 수로 인해 통계적 유의성 측면에서 제한점이 있지만, 변화 추이가 분명히 나타났다.

[0171] 도 13은 수면뇌파검사에서 측정된 수면시간 및 각성시간(24시간 기록)의 변화를 살펴본 결과이다. EV 투여 첫날부터 총 수면시간이 증가하면서 3일 및 6일 째까지 꾸준히 증가하여 실험군5의 경우 약 25분 가량, 실험군6의 경우 43분 가량 수면시간이 증가하였다. 반면 각성시간은 반대로 꾸준히 감소하여, 감소된 각성시간 만큼 수면시간으로 바뀐 것이 관찰되었다. 실험군6의 경우 EV 양이 실험군5에 비해 1/2 정도인 2 mg에 해당했으나 수면시간 증가 값은 1.7배 더 늘어난 결과를 나타냈다.

[0172] 도 14는 수면뇌파검사에서 측정된 깊은 수면 상태인 비렘 수면시간(24시간 기록)의 변화를 살펴본 결과이다. EV 투여 첫날부터 주간 수면시간이 증가하면서 3일 및 6일 째까지 꾸준히 증가하여 실험군5의 경우 약 30분, 실험군6의 경우 40분 가량 비렘 수면시간이 늘어나, 도 13에서 증가된 수면시간은 온전히 깊은 수면시간으로 증가된 결과를 나타냈다.

[0174] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

수탁번호

[0176]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM13103P

수탁일자 : 20220111

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM13104P

수탁일자 : 20220111

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KCCM13105P

수탁일자 : 20220111

도면

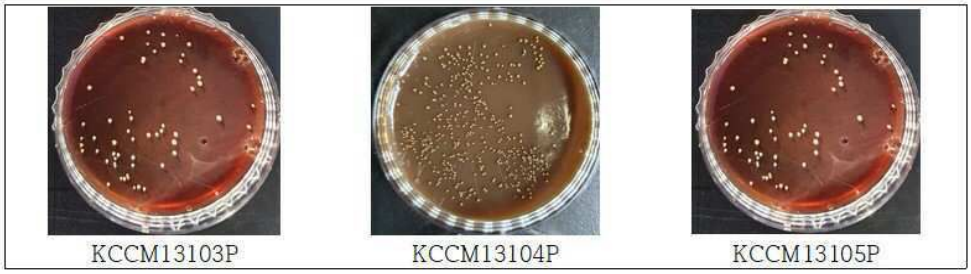
도면1

실험 과정	기간 (일)
백서 입고/적응	7일
증류수 투여	5일
수술/회복	10일
배지 혹은 생리식염수 투여:초기 수면 측정	1-2일
생균 혹은 EV 투여 시작:투여 중 수면 측정	6-7일
생균 투여 중지: 투여 중지 중 수면 측정	3일

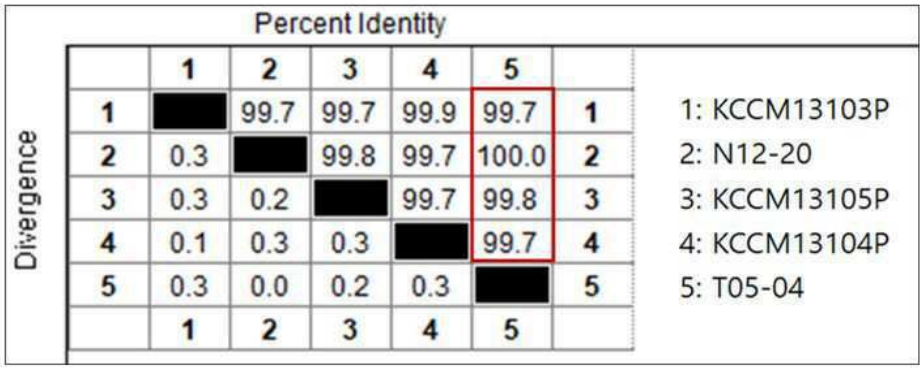
도면2



도면3

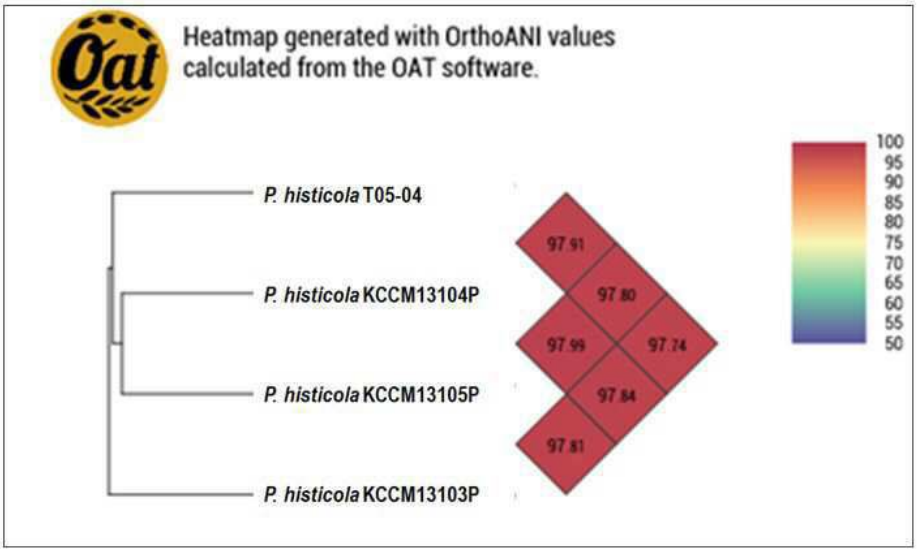


도면4

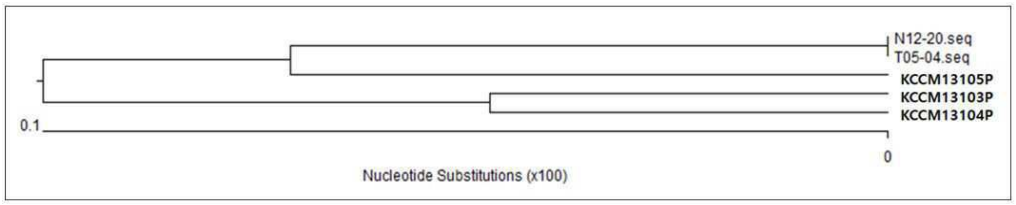


	1	2	3	4	5	
1		99.7	99.7	99.9	99.7	1
2	0.3		99.8	99.7	100.0	2
3	0.3	0.2		99.7	99.8	3
4	0.1	0.3	0.3		99.7	4
5	0.3	0.0	0.2	0.3		5
	1	2	3	4	5	

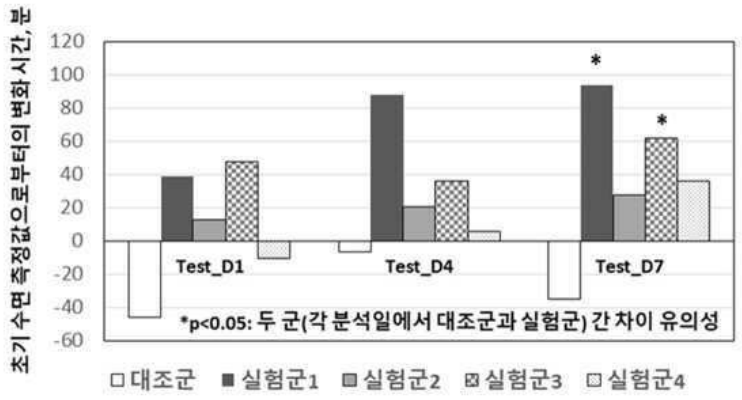
도면5



도면6

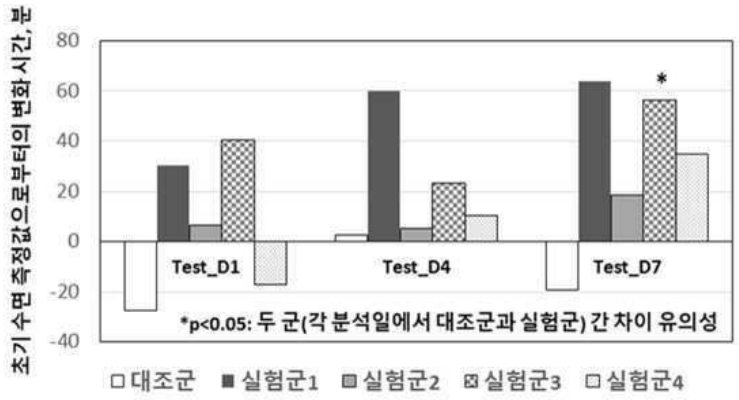


도면7



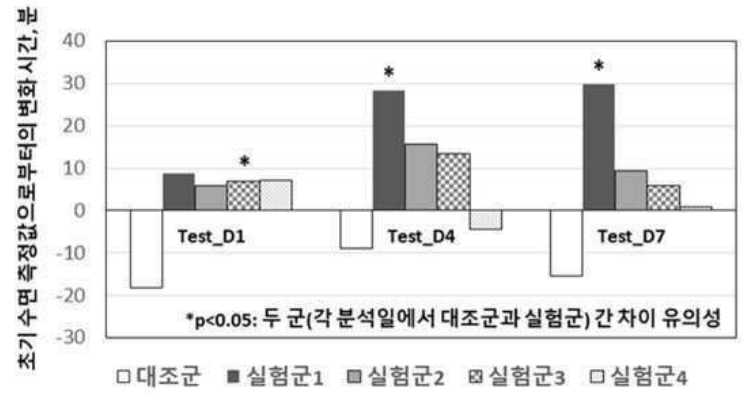
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째

도면8



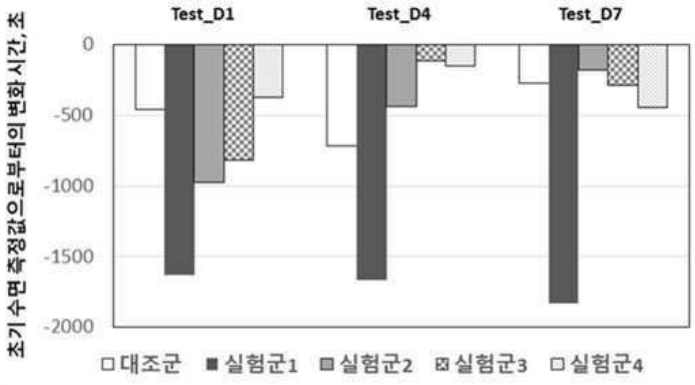
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째

도면9



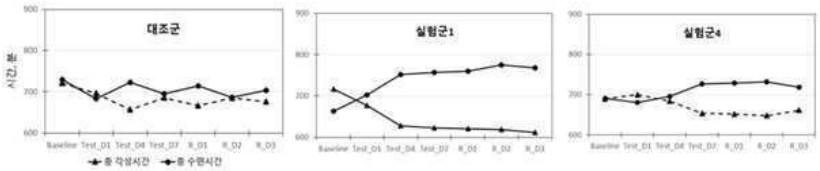
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째

도면10



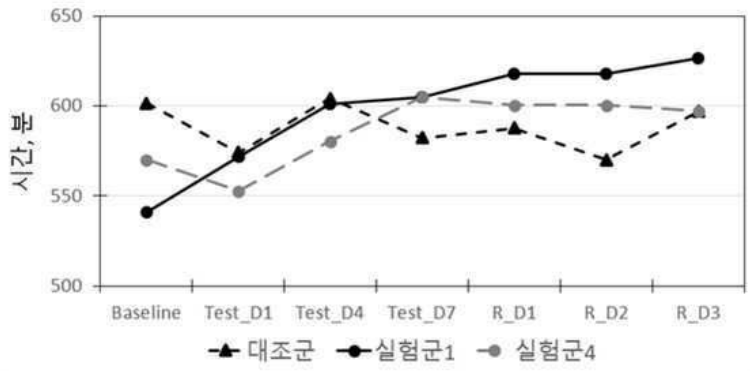
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째

도면11



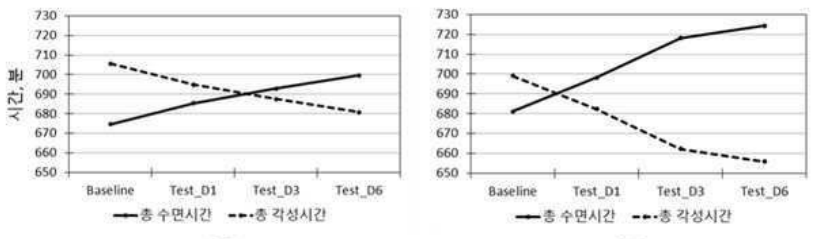
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째,
R_D1: 투여 중지 후 첫 날, R_D2: 투여 중지 후 2일 째, R_D3: 투여 중지 후 3일 째

도면12



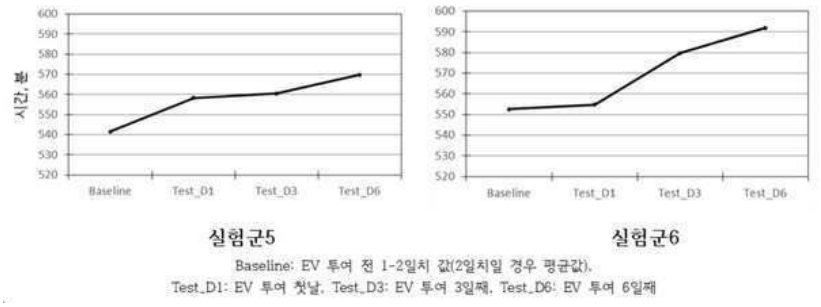
Test_D1: 미생물 투여 첫 날, Test_D4: 미생물 투여 4일 째, Test_D7: 미생물 투여 7일 째,
R_D1: 투여 중지 후 첫 날, R_D2: 투여 중지 후 2일 째, R_D3: 투여 중지 후 3일 째

도면13



Baseline: EV 투여 전 1-2일치 값(2일치일 경우 평균값),
Test_D1: EV 투여 첫날, Test_D3: EV 투여 3일째, Test_D6: EV 투여 6일째

도면14



서 열 목 록

<110> Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation

Industry Academic Cooperation Foundation Chosun University

<120> Prevotella histicola KCOM 3796

<130> HPC-10549

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> universal PCR primer 27F

<220><221> variation

<222> (12)

<223> M is A or C

<400> 1

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> universal PCR primer 1492R

<220><221> variation

<222> (6)

<223> Y is C or T

<400> 2

tagggytacc ttgttacgac tt 22

<210> 3

<211> 1452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prevotella histicola KCOM 3796 16S rDNA

<400> 3

gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg ggaaacggca ttaagtgctt 60

gcacttttg gacgtcgacc ggcgcacggg tgagtaacgc gtatccaacc ttcccatgac 120

taagggataa cctgccgaaa ggcagactaa taccttatgg tcttcactga cggcatcaga 180

tgtgaagtaa agatttatcg gttatggatg gggatgcgtc tgattagctt gttggcgggg 240

taacggccca ccaaggcaac gatcagtagg ggttctgaga ggaaggtccc ccacattgga 300

actgagacac ggtccaaact cctacgggag gcagcagtga ggaatattgg tcaatgggcg 360

agagcctgaa ccagccaagt agcgtgcagg atgacggccc tatgggttgt aaactgcttt 420

tgtatgggga taaagtcaat cacgtgtgat tgtttgcagg taccatacga ataaggaccg 480

gctaattccg tgccagcagc cgcggtaata cggaaggtcc gggcgttatc cggatttatt 540

gggttaaagg gagcgtaggc tggagattaa gtgtgttgtg aaatgtagac gctcaacgtc 600

tgacttgcag cgcatactgg tttccttgag tacgcacaac gttggcggaa ttcgtcgtgt 660

agcggtgaaa tgcttagata tgacgaagaa ctccgattgc gaaggcagct gacgggagcg 720

caactgacgc tgaagctcga aggtgcgggt atcgaacagg attagatacc ctggtagtcc 780

gcacagtaaa cgatggatgc ccgctgttgg tacgtggtat cagcggctaa gcgaaagcat 840

taagcatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac tcaaaggaat tgacgggggc 900

ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac gcgaggaacc ttacccgggc 960

ttgaattgca gaggaaggat ttagagataa tgacgccctt cggggtctct gtgaaggtgc 1020

tgcatggttg tcgtcagctc gtgccgtgag gtgtcggctt aagtgccata acgagcgcaa 1080

cccctgtctt tagttgccat caggtgatgc tgggcactct ggagatactg ccaccgtaag 1140

gtgtgaggaa ggtggggatg acgtcaaatc agcacggccc ttacgtccgg ggctacacac 1200

gtgttacaat ggccggtaca gagggacggt gtaatgtaaa ttgcatccaa tcttgaaagc 1260

cggtcccagt tcggactggg gtctgcaacc cgaccccacg aagctggatt cgctagtaat 1320

cgcgcatcag ccatggcgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaag 1380

ccatgaaagc cgggggtgcc tgaagtccgt gaccgcaagg atcggcctag ggcaaaactg 1440

gtgattgggg ct 1452

<210> 4

<211> 1453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prevotella histicola KCOM 4081 16S rDNA

<400> 4

gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg ggaaacggca ttaagtgctt 60

gcacttttg gacgtcgacc ggcgcacggg tgagtaacgc gtatccaacc ttcccatgac 120

taagggataa cctgccgaaa ggcagactaa taccttatgg tcttcactga cggcatcaga 180

tgtgaagtaa agatttatcg gttatggatg gggatgcgtc tgattagctt gttggcgggg 240

taacggccca ccaaggcgac gatcagtagg ggttctgaga ggaaggtccc ccacattgga 300

actgagacac ggtccaaact cctacgggag gcagcagtga ggaatattgg tcaatgggcg 360

agagcctgaa ccagccaagt agcgtgcagg atgacggccc tatgggttgt aaactgcttt 420

tgtatgggga taaagtcaat cacgtgtgat tgtttgcagg taccatacga ataaggaccg 480

gctaattccg tgccagcagc cgcggtaata cggaaggtcc gggcgttatc cggatttatt 540

gggtttaaag ggagcgtagg ctggagatta agtgtgttgt gaaatgtaga cgctcaacgt 600

ctgacttgca gcgcatactg gtttccttga gtacgcacaa cgttggcgga attcgtcgtg 660

tagcggtgaa atgcttagat atgacgaaga actccgattg cgaaggcagc tgacgggagc 720

gcaactgacg ctgaagctcg aaggtgcggg tatcgaacag gattagatac cctggtagtc 780

cgcacagtaa acgatggatg cccgctgttg gtacctggta tcagcggcta agcgaaagca 840

ttaagcatcc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 900

cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata cgcgaggaac cttacccggg 960

cttgaattgc agaggaagga tttagagata atgacgccct tcggggtctc tgtgaaggtg 1020

ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct taagtgccat aacgagcgca 1080

acccctgtct ttagttgcca tcaggtgatg ctgggcactc tggagatact gccaccgtaa 1140

ggtgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc cttacgtccg gggctacaca 1200

cgtgttacaa tggccggtac agagggacgg tgtaatgtaa attgcatcca atcttgaaag 1260

ccggtcccag ttcggactgg ggtctgcaac ccgaccccac gaagctggat tcgctagtaa 1320

tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcaa 1380

gccatgaaag ccgggggtgc ctgaagtccg tgaccgcaag gatcggccta gggcaaaact 1440

ggtgattggg gct 1453

<210> 5

<211> 1453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prevotella histicola KCOM 4227 16S rDNA

<400> 5

gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg ggaaacggca ttaagtgctt 60

gcacttttg gacgtcgacc ggcgcacggg tgagtaacgc gtatccaacc ttcccatgac 120

taagggataa cctgccgaaa ggcagactaa taccttatgg tcttcactga cggcatcaga 180

tgtgaagtaa agatttatcg gttatggatg gggatgcgtc tgattagctt gttggcgggg 240

taacggccca ccaaggcaac gatcagtagg ggttctgaga ggaaggtccc ccacattgga 300

actgagacac ggtccaaact cctacgggag gcagcagtga ggaatattgg tcaatgggcg 360

agagcctgaa ccagccaagt agcgtgcagg atgacggccc tatgggttgt aaactgcttt 420

tgtatgggga taaagtcaat cacgtgtgat tgtttgcagg taccatacga ataaggaccg 480

gctaattccg tgccagcagc cgcggtaata cggaaggtcc gggcgttatc cggatttatt 540

gggtttaaag ggagcgtagg ctggagatta agtgtgttgt gaaatgtaga cgctcaacgt 600

ctgacttgca gcgcatactg gtttccttga gtacgcacaa cgttggcgga attcgtcgtg 660

tagcggtgaa atgcttagat atgacgaaga actccgattg cgaaggcagc tgacgggagc 720

gcaactgacg ctgaagctcg aaggtgcggg tatcgaacag gattagatac cctggtagtc 780

cgcacagtaa acgatggatg cccgctgttg gtacttggta tcagcggcta agcgaaagca 840

ttaagcatcc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 900

cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata cgcgaggaac cttacccggg 960

cttgaattgc agaggaagga tttagagata atgacgccct tcggggtctc tgtgaaggtg 1020

ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct taagtgccat aacgagcgca 1080

acccctgtct ttagttgcca tcaggttaag ctgggcactc tggagatact gccaccgtaa 1140

ggtgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc cttacgtccg gggctacaca 1200

cgtgttacaa tggccggtac agagggacgg tgtaatgtaa attgcatcta atcttgaaag 1260

ccggtcccag ttcggactgg ggtctgcaac ccgaccccac gaagctggat tcgctagtaa 1320

tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcaa 1380

gccatgaaag ccgggggtgc ctgaagtccg tgaccgcaag gatcggccta gggcaaaact 1440

ggtgattggg gct 1453