(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067636
(43) 공개일자 2024년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/155 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/155 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0148865
(22) 출원일자 2022년11월09일
심사청구일자 2022년11월09일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이현승
대전광역시 중구 서문로 96, 206동 1404호
(74) 대리인
특허법인주원

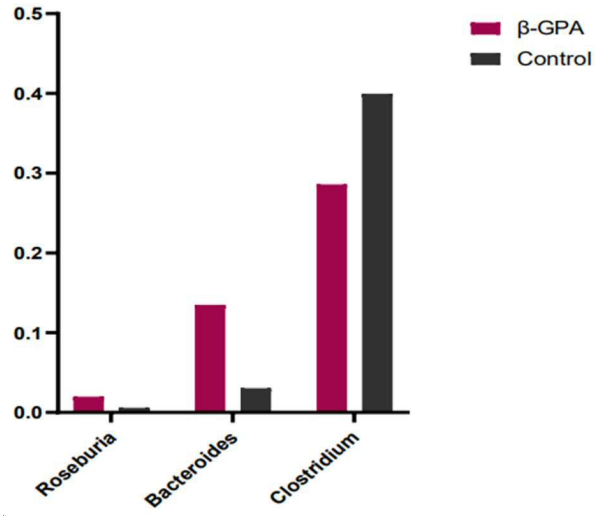
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **베타-구아니디노프로피온산을 포함하는 장내 미생물 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA) 포함하는 조성물 및 이의 장내미생물 개선 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160134
과제번호	2021R1A2C4001829
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	간질환 스펙트럼에서 미토리보좀의 역할 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2020.11.01 ~ 2022.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 장내 미생물 개선용 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 장내 미생물 개선은 유익균인 로세부리아(Roseburia) 및 박테로이드(Bacteroides)의 생장을 증가시키고, 유해균인 클로스트리디움(Clostridium)의 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 장내 미생물 개선용 조성물

청구항 3

베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 클로스트리디움은 클로스트리디움 디피실리(Clostridium difficile), 클로스트리디움 퍼프린젠스 (Clostridium perfringens), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 클로스트리디움 히스토리티쿰(Clostridium histolyticum) 및 클로스트리디움 소르델리(Clostridium sordellii)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 클로스트리디움 감염증은 보툴리누스 중독증, 봉와직염, 근막염, 괴사성 장염, 파상풍, 설사, 염증성장질환 및 과민성 대장증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 6

베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움속 미생물 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 클로스트리디움은 클로스트리디움 디피실리(Clostridium difficile), 클로스트리디움 퍼프린젠스 (Clostridium perfringens), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 클로스트리디움 히스토리티쿰(Clostridium histolyticum) 및 클로스트리디움 소르델리(Clostridium sordellii)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 클로스트리디움 감염증은 보툴리누스 중독증, 봉와직염, 근막염, 괴사성 장염, 파상풍, 설사, 염증성장질환 및 과민성 대장증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 개선용 약학 조성물

청구항 9

베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 개체에서 장내 미생물을 개선하는 방법

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 장내 미생물 개선은 유익균인 로세부리아속(Roseburia genus) 및 박테로이드속(Bacteroides genus) 미생물의 생장을 증가시키고, 유해균인 클로스트리디움속(Clostridium genus) 미생물의 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 장내 미생물을 개선하는 방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장내미생물 개선 효과가 우수한 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 마이크로바이옴(microbiome)이란 마이크로바이오타(microbiota)와 게놈(genome)이 합쳐서 만들어진 합성어로, 인간, 동·식물, 토양, 바다, 호수, 암벽, 대기 등 모든 환경에서 서식하거나 공존하는 미생물과 그 유전정보 전체를 포함하는 미생물 군집이라고 할 수 있다. 최근에는 다양한 환경에서의 미생물 군집을 말하기도 한다. 식물 마이크로바이옴, 동물 마이크로바이옴, 환경 마이크로바이옴, 인체 마이크로바이옴, 장내 마이크로바이옴, 피부 마이크로바이옴 등 다양한 마이크로바이옴에 대한 연구들이 이루어지고 있으며, 이 중에서도 인체 마이크로바이옴에 대한 연구가 가장 많이 진행되고 있다.

[0004] 장내미생물 분포의 변화가 대사질환(비만, 당뇨병, 지방간, 지방간염 등)과 밀접한 연관이 있다는 사실이 밝혀지고 있다. 이러한 사실은 장내미생물이 숙주의 질환을 조절하는데 중요한 역할을 담당할 것을 시사한다.

[0005] 구아니디노프로피온산, 베타-구아니디노프로피온산 또는 N-(아미노이미노메틸)-베타-알라닌으로도 지칭되는 β-구아니디노프로피온산(β-GPA)은 크레아틴 유사체이다. 동물(래트, 원숭이, 햄스터) 연구는 산성 구아니딘 유도체, 예를 들면, β-GPA가 인슐린-비의존성 당뇨병의 동물 모델에서 고혈당증을 완화시킬 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, 이는 때때로 혈당 수치를 조절하기 위하여 당뇨병 환자에서 식이 보충제로서 사용된다. β-GPA는 물에 고도로 용해성인(50 ㎎/㎖ 초과) 백색 결정질 분말이다.

[0006] 한국등록특허 제190257호는 3-구아니디노프로피온산을 포함하는 대사질환 치료용 약학 조성물에 관한 내용을 개시하고 있고, 한국공개특허 제2018-0059446호는 개선된 특성의 β-구아니디노프로피온산의 약제학적으로 허용가능한 염 및 이의 용도에 관해 개시하고 있다.

[0007] 그러나, 본 발명의 베타-구아니디노프로피온산이 장내미생물에 미치는 영향에 관해 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제190257호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2018-0059446호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 베타-구아니디노프로피온산을 유효성분으

로 포함하는 조성물의 장내미생물 개선 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 장내 미생물 개선용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 장내 미생물 개선은 유익균인 로세부리아(Roseburia) 및 박테로이드(Bacteroides)의 생장을 증가시키고, 유해균인 클로스트리디움(Clostridium)의 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 것이다.

[0015] 본 발명의 일 예에서, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 클로스트리디움은 클로스트리디움 디피실리(Clostridium difficile), 클로스트리디움 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 클로스트리디움 히스토리티쿰(Clostridium histolyticum) 및 클로스트리디움 소르델리(Clostridium sordellii)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0018] 상기 클로스트리디움 감염증은 보툴리누스 중독증, 봉와직염, 근막염, 괴사성 장염, 파상풍, 설사, 염증성장질환 및 과민성 대장증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 예에서, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 개체에서 장내 미생물을 개선하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 포함하는 조성물은 bGPA를 지방간염 마우스 모델에 함께 투여하였을 때, 지방간의 호전 뿐만 아니라 장내미생물 균총의 다양성을 향상시키고, 대사적으로 유익한 짧은사슬지방산을 분비하는 균총의 분포를 증가시켰다. 따라서 본 발명의 bGPA는 지방간염 예방과 치료 뿐만 아니라 장내미생물 균총의 개선 목적으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 구현 예에 따른 β-구아니디노프로피온산의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 구현 예에 따른 고지방고과당고콜레스테롤 식이 기반 지방간염/간섬유화 동물모델 실험 프로토콜을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 구현 예에 따른 동물모델에서 β-구아니디노프로피온산에 의한 간손상 마커 변화를 나타낸 것이다. Control; 고지방고과당고콜레스테롤 식이군, β-GPA; 고지방고과당고콜레스테롤 식이+β-GPA 투여 군.

도 4는 본 발명의 일 구현 예에 따른 동물모델에서 β-구아니디노프로피온산에 의한 간의 조직학적 변화를 나타낸 것이다. Control; 고지방고과당고콜레스테롤 식이군, β-GPA; 고지방고과당고콜레스테롤 식이+β-GPA 투여 군.

도 5는 본 발명의 일 구현 예에 따른 동물모델에서 β-구아니디노프로피온산에 의한 대변의 장내미생물 다양성을 나타낸 것이다. Control; 고지방고과당고콜레스테롤 식이군, β-GPA; 고지방고과당고콜레스테롤 식이+β-GPA 투여 군.

도 6은 본 발명의 일 구현 예에 따른 PcoA plot을 통한 β-구아니디노프로피온산의 효과를 나타낸 것이다. Control; 고지방고과당고콜레스테롤 식이군, b-GPA; 고지방고과당고콜레스테롤 식이+β-GPA 투여 군.

도 7은 본 발명의 일 구현 예에 따른 β-구아니디노프로피온산에 의한 주요 장내미생물의 변화를 나타낸

것이다. Control; 고지방고과당고콜레스테롤 식이군, β-GPA; 고지방고과당고콜레스테롤 식이+β-GPA 투여 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명의 바람직한 구현예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정 사항들이 도시되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0026] 본 발명에서 용어, "예방" 또는 "방지"라 함은 질환의 원인으로부터 발생을 억제하거나 지연시키는 것을 의미한다.

[0027] 본 명세서에서, "치료"라 함은 완전히 치유하지 않아도 증상의 진전 및/또는 악화를 억제하여 손상의 진행을 멈추거나, 또는 증상의 일부 혹은 전부를 개선하여 치유의 방향으로 유도하는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 용어 “개선”은 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 장내 미생물 개선용 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 장내 미생물 개선은 유익균인 로세부리아(Roseburia) 및 박테로이드(Bacteroides)의 생장을 증가시키고, 유해균인 클로스트리디움(Clostridium)의 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 것이다.

[0031] 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 클로스트리디움은 클로스트리디움 디피실리(Clostridium difficile), 클로스트리디움 퍼프린젠스(Clostridium perfringens), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 클로스트리디움 히스토리티쿰(Clostridium histolyticum) 및 클로스트리디움 소르델리(Clostridium sordellii)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0033] 상기 클로스트리디움 감염증은 보툴리누스 중독증, 봉와직염, 근막염, 괴사성 장염, 파상풍, 설사, 염증성장질환 및 과민성 대장증후군으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물에서, 상기 조성물은 클로스트리디움 감염증 예방 또는 치료에 유용한 추가 성분을 포함할 수 있고, 추가성분은 화합물, 천연물을 포함하는 클로스트리디움 감염증에 효과가 공지된 모든 성분을 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하여 모든 형태의 조성물로 제조될 수 있고, 바람직하게는 약학 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 화장료 조성물의 형태로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있으며, 산제, 정제, 캡슐제, 주사제 및 액제가 보다 바람직하다. 이러한 제제화는 약제학 분야에서 통상적으로 행하여지는 방법으로 수행될 수 있으며, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0037] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유 등을 포함한다.

[0038] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 추가로 사용하여 조제될 수 있다.

[0039] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도

하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0040] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween), 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 약학 조성물은 1 일 0.01 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함될 수 있다. 일일 투여량은 약 0.1 내지 1,000 mg/kg으로, 바람직하게는 100~300 mg/kg일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 유효성분으로 포함하는 클로스트리디움 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 조성물을 첨가할 수 있는 건강기능식품으로는 예를 들어, 각종 일반식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

[0044] 또한, 상기 조성물은 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 g을 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0045] 본 발명의 건강기능음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 함유할 수 있다. 상술한 천연탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 솔비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제인 타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등; 및 합성 향미제, 예를 들어 사카린, 아스파르탐 등을 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다. 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 추출물들은 천연 과일 쥬스, 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이때, 첨가제의 비율은 그다지 중요하지는 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0046] 본 발명의 다른 예에서, 본 발명은 베타-구아니디노프로피온산(beta-guanidinopropionic acid, β-GPA)을 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 개체에서 장내 미생물을 개선하는 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0050] **<실시예 1> 고지방고과당고콜레스테롤 식이 기반 동물모델**

[0051] 6주령 C57BL/6J 수컷 생쥐 총 12마리에 정상식이 혹은 고지방고과당고콜레스테롤 식이 (Rodent Diets With 40 kcal% Fat (Palm Oil), 20 kcal% Fructose and 2% Cholesterol; D09100310 새론바이오)를 투여하였다. 고지방

고과당고콜레스테롤 식이는 지방간염을 유도하기 위하여 사용되었다.

[0052] 생쥐가 12주령이 되었을 때, 고지방고과당고콜레스테롤 식이를 투여한 생쥐를 대조군과 식수에 beta-Guanidinopropanoic acid (cat no: BD9459; BLD pharmatech Ltd.) 2%의 농도로 처리한 그룹으로 나누었다. 일주일에 2회씩 식수 통을 갈아주어 자유롭게 마실 수 있도록 하였다.

[0053] 실험에 사용한 그룹은 정상식이, 정상식이+2% beta-Guanidinopropanoic acid가 포함된 식수, 고지방고과당고콜레스테롤 식이, 고지방고과당고콜레스테롤 식이+ beta-Guanidinopropanoic acid가 포함된 식수를 투여한 군으로 분리하여 수행되었다.

[0054] 식수에 2% beta-Guanidinopropanoic acid를 총 10주간 지속하고 난 뒤에, 생쥐를 부검하여 혈액, 간조직을 채취하였다. 결과적으로 지방간염에 의한 간섬유화 유도를 위한 고지방고과당 식이 투여기간은 16주 이었고, 항섬유화 효과를 판정하기 위해 2% beta-Guanidinopropanoic acid를 총 10주간 투여하였다.

[0055] 매주 체중과 식이 섭취량을 측정하였고 간손상 마커인 AST/ALT를 측정하고 간조직에 대한 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 지방침착과 염증반응을 평가하였다.

[0057] **<실시예 2> 생쥐 분변 분석**

[0058] 생쥐 부검 1~2일 전 마우스 각각 개체들을 mouse bedding이 깔리지 않은 cage에 놓은 뒤, 5분에서 10분가량 분변이 나올 때까지 기다렸다(설사를 하거나 분변양이 적은 경우 가능한 만큼만 샘플링). 생쥐 분변이 나오게 되면 균질화를 위해 개체 당 3알정도 채취한 뒤 -20℃ 이하에서 냉동보관하였다. 냉동보관을 통해서 샘플을 6개월 ~ 1년이상 보관 가능하다.

[0059] 채취한 분변 샘플에서 추출한 DNA를 next-generation sequencing 기법을 통해서 시퀀싱을 진행하여 분변 내 박테리아 DNA에 대한 샷건 메타지놈 (shotgun metagenome) 데이터를 생성하였다.

[0060] 생성된 데이터는 Shotgun metagenome alignment program인 METEOR version 3.2 (bowtie2기반 분석 프로그램)를 사용하여 IGC2 gut catalogue reference로 gut microbiome의 metagenome 정보를 얻고, gut microbiome데이터에 섞여서 포함된 Mus musculus reference 정보는 제거하였다.

[0061] Alignment 완료된 Bacterial species (1992개) abundance table을 momr R package를 이용하여 Downsizing(10M)과 Normalization 과정을 진행하여 생성했다.

[0062] Vegan R package를 이용하여 Bacterial species의 다양성 수치, 즉 α, βdiversity를 구하였다.

[0063] Abundance및 alpha, beta diversity를 기준으로 GPA처리 전후의 다양성 및 bacterial species의 양적 변화를 통계적으로 확인하였다.

[0065] **<시험예: 결과>**

[0066] 고지방고과당고콜레스테롤 식이 그룹에서 beta-Guanidinopropanoic acid에 의하여 현저한 간손상 마커(AST 및 ALT)의 감소가 관찰되었다(도 3).

[0067] beta-Guanidinopropanoic acid는 간내 지방침착과 염증반응을 감소시켰다(도 4).

[0068] Shannon index, Simpson index를 통해서 대변의 장내미생물의 다양성을 관찰한 결과, beta-Guanidinopropanoic acid는 장내미생물의 다양성을 현저하게 증가시킨다는 것을 확인하였다(도 5).

[0069] beta-Guanidinopropanoic acid의 투여는 장내미생물의 clustering을 대조군과 현저하게 구분지을 수 있게 만들었다(도 6).

[0070] beta-Guanidinopropanoic acid의 투여는 짧은사슬지방산 분비를 촉진하는 균총인 Roseburia, Bacteroides의 현저한 증가를 유도하고, 대사적으로 유해한 균총인 Clostridium의 감소를 촉진하였다(도 7).

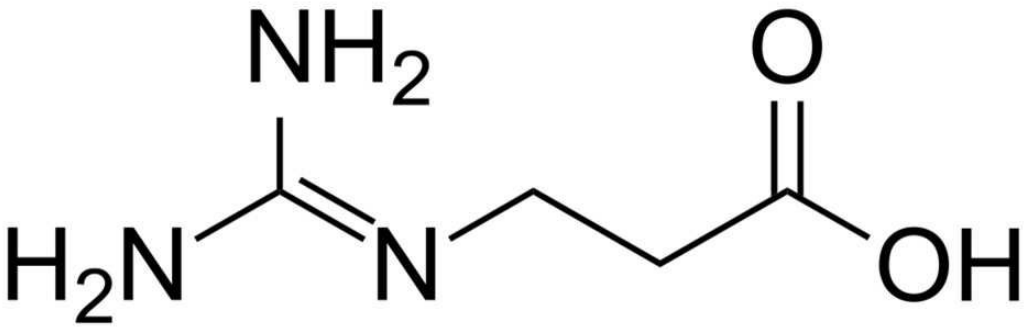
[0072] 본 발명은 bGPA 투여에 의해 예방 및 개선되는 장내미생물 균총에 관한 것이다. 일반적으로 식이에 의한 비만을 유도하면 장내미생물 균총의 다양성이 감소하는데, bGPA를 지방간염 마우스 모델에 함께 투여하였을 때, 지방간

의 호전 뿐만 아니라 장내미생물 균총의 다양성을 향상시키고, 대사적으로 유익한 짧은사슬지방산을 분비하는 균총의 분포를 증가시켰다. 따라서 본 발명의 bGPA는 지방간염 예방과 치료 뿐만 아니라 장내미생물 균총의 개선 목적으로 유용하게 활용될 수 있다.

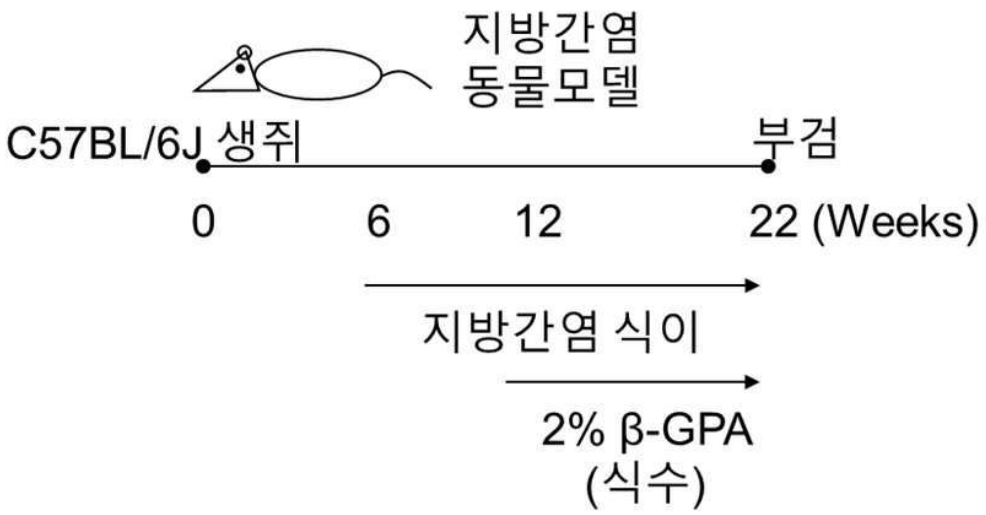
[0073] 지방간염 동물모델에 bGPA의 투여는 간 손상을 억제하면서, 장내미생물 분포의 다양성을 증가시키고, roseburia 및 bacteroides 등의 대사적으로 유익한 짧은사슬지방산을 분비하는 균총의 분포를 증가시켰으며, 유해균인 clostridium 종은 감소시키는 효과를 보였다.

도면

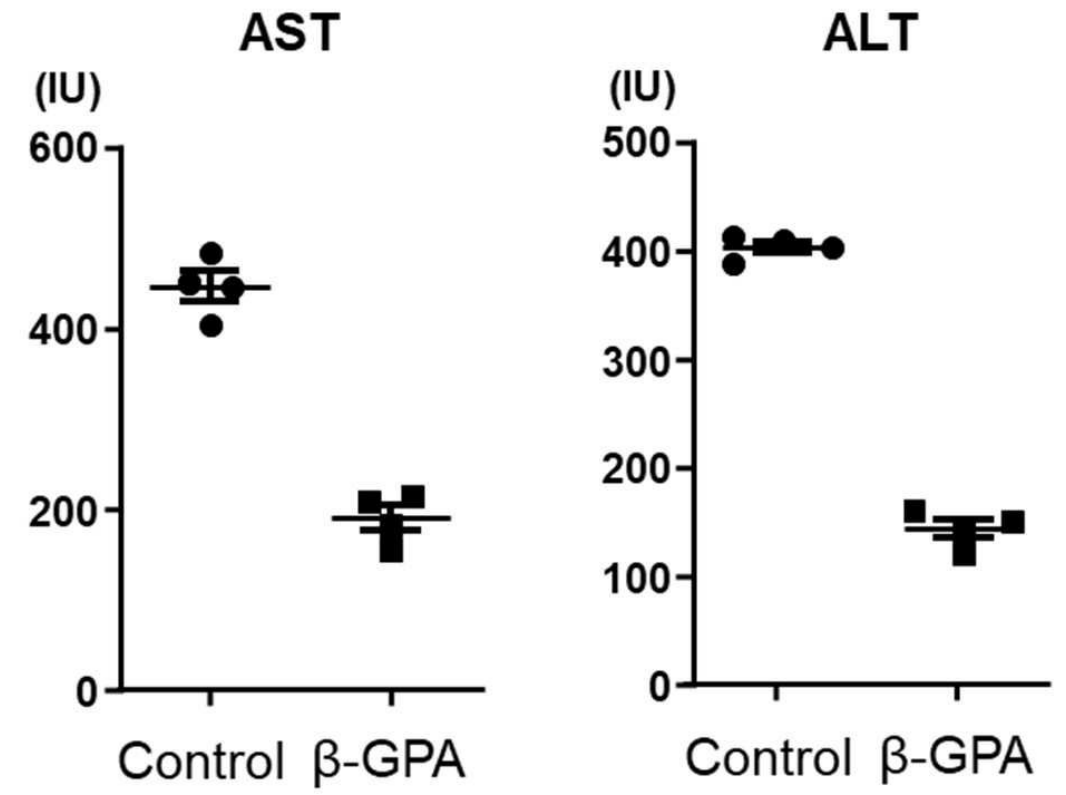
도면1



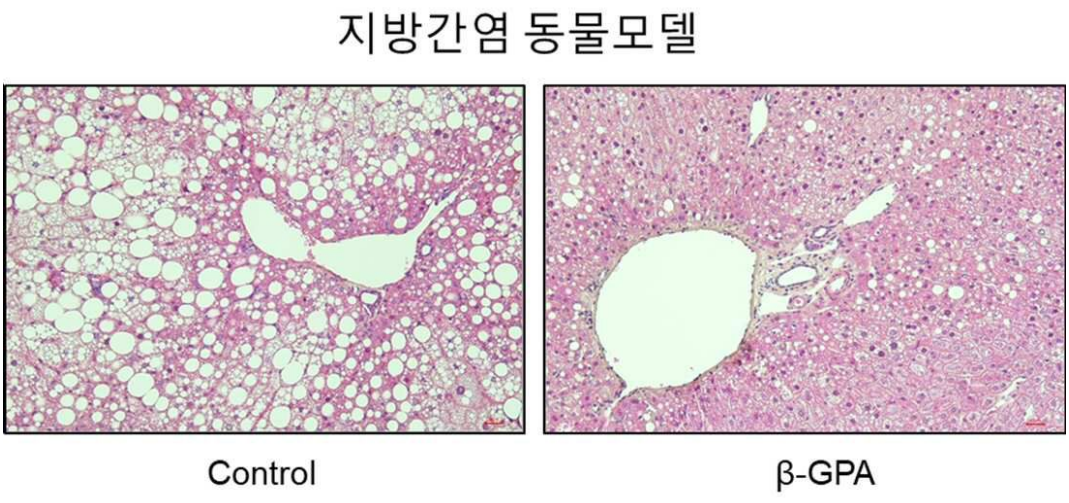
도면2



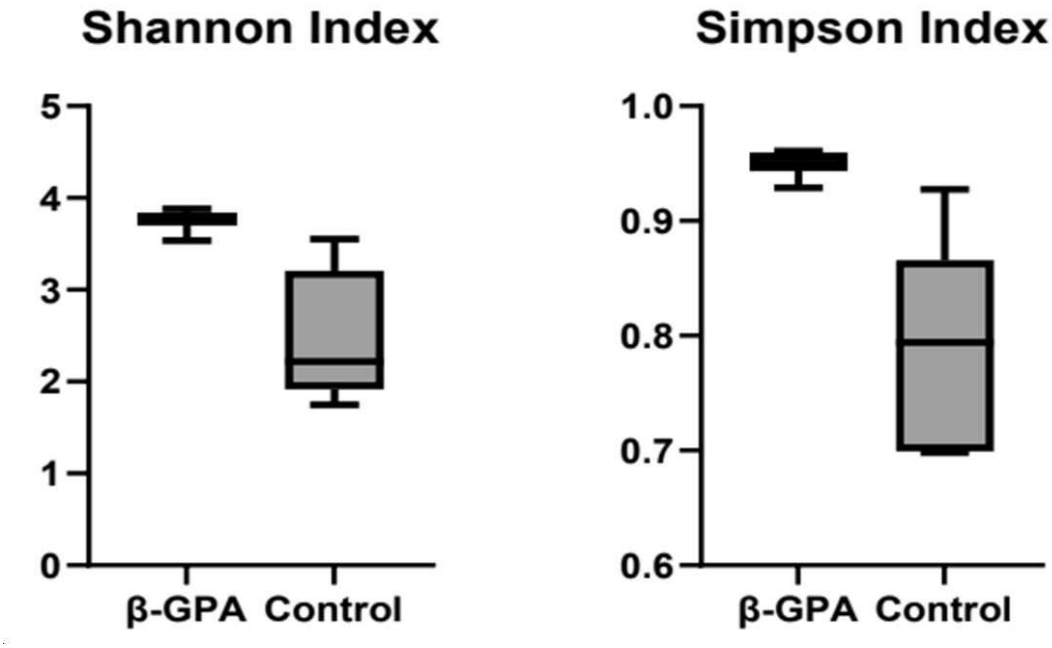
도면3


AST
(IU)
600
400
200
0
Control
β-GPA
ALT
(IU)
500
400
300
200
100
0
Control
β-GPA

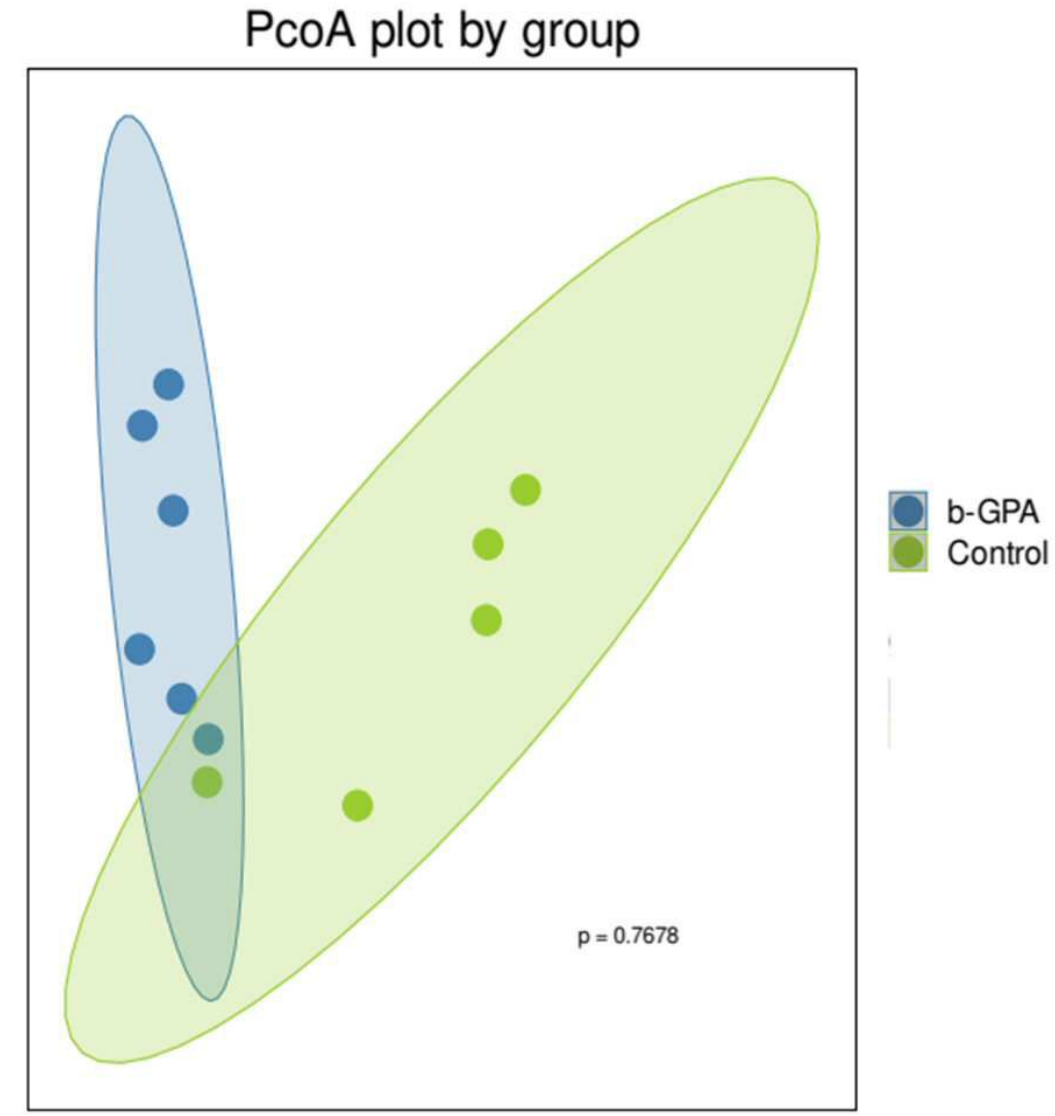
도면4


지방간염 동물모델
Control
β-GPA

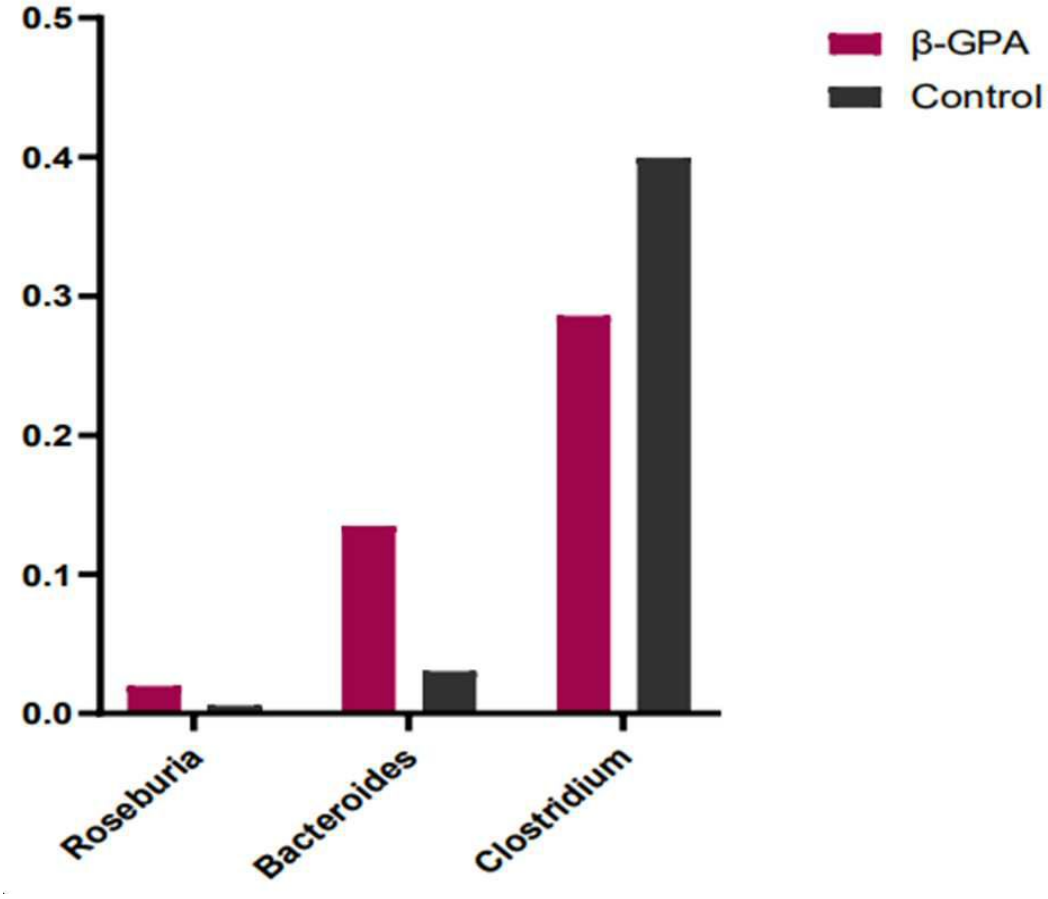
도면5


Shannon Index
5
4
3
2
1
0
β-GPA
Control
Simpson Index
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
β-GPA
Control

도면6



도면7


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
β-GPA
Control
Roseburia
Bacteroides
Clostridium