

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2021년 4월 8일 (08.04.2021)

WIPO | PCT

WO 2021/066549 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61P 13/12 (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01) C12R 1/225 (2006.01)
A61K 35/747 (2014.01)

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013379

(22) 국제출원일: 2020년 9월 29일 (29.09.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2019-0122531 2019년 10월 2일 (02.10.2019) KR

(71) 출원인: 주식회사 코바이오랩 (KO BIOLABS, INC.) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 220동 628호, Seoul (KR).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(72) 발명자: 이기욱 (LEE, Ki Uk); 12222 경기도 남양주시 경춘로1286번길 35, 1607동 1201호, Gyeonggi-do (KR). 송석천 (SONG, Seok Cheon); 08832 서울시 관악구 관악로11길 50, 205호, Seoul (KR). 남태욱 (NAM, Tae Wook); 13479 경기도 성남시 분당구 서판교로66번길 3-3, Gyeonggi-do (KR). 한승혁 (HAN, Seung Hyeok); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 125동 2403호, Seoul (KR). 남보영 (NAM, Bo Young); 07036 서울시 동작구 양녕로26길 11, 에이동 304호, Seoul (KR). 박지민 (PARK, Ji Min); 07036 서울시 영등포구 선유서로34길 17, 101동 502호, Seoul (KR).

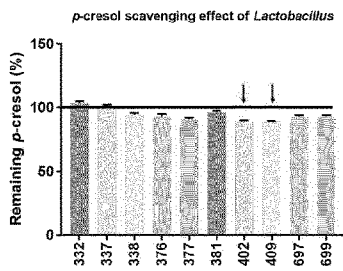
(74) 대리인: 특허법인 광장리앤코 (LEE & KO IP); 04532 서울시 중구 남대문로 63, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS KBL409 STRAIN AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 락토바실러스 에시도필러스 KBL409 균주 및 그 용도

[도3]



(57) Abstract: The present invention relates to Lactobacillus acidophilus KBL409 strain and use thereof. The Lactobacillus acidophilus KBL409 strain (accession number KCTC 13518BP) according to the present invention reduces kidney inflammation and the concentrations of uremic substances in blood, such as blood urea nitrogen, creatinine, p-cresol and the like to protect the kidneys, and exhibits the effects of proteinuria reduction, renal mitochondrial function recovery and renal fibrosis inhibition, and thus can be effectively applied to renal function improvement and the prevention and treatment of renal diseases, including chronic renal disease.

(57) 요약서: 본 발명은 락토바실러스 에시도필러스 KBL409 균주 및 그 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 락토바실러스 에시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주는 신장의 염증을 감소시키고, 혈중 요소 질소, 크레아티닌, p-크레졸 등의 혈중 요독 물질의 농도를 감소시켜 신장을 보호하고, 단백질 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및 신장 섬유화 억제 효과를 나타내어, 신기능 개선 및 만성 신부전을 비롯한 신장 질환의 예방 및 치료 용도로 유용하게 활용될 수 있다.



WO 2021/066549 A1

명세서

발명의 명칭: 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 및 그 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 및 그 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 신규한 프로바이오틱인 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주, 및 상기 균주, 이의 배양물, 파쇄물 및 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 함유하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품용 조성물 및 동물 사료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 만성 신부전(chronic kidney disease, CKD)은 세계적인 보건 문제로 대두되고 있는 질병으로서, 미국에서는 10명 중 한 명의 빈도로, 국내에서도 전체 조사 인구의 13%가 만성 신부전을 보인다고 보고된 바 있다. 만성 신부전은 쉽게 가역적인 회복을 기대하기 어려우며, 점차적으로 신기능이 감소하여 만성 신부전 5기에 들어서면 말기 신부전 상태로 투석이나 이식을 준비해야 한다.
- [3] 현재까지 알려진 신부전의 치료는 신기능 소실로 나타나는 합병증을 치료하는데 초점이 맞추어져 있을 뿐, 신부전을 근본적으로 회복시킬 수 있는 약은 없다. 최근 몇 십 년간 신부전으로의 진행을 막는 여러 약제들이 시도되어 왔으나, 레닌 안지오텐신 시스템 (Renin-angiotensin system, RAS)을 차단하는 약물 정도만이 신부전 악화를 어느 정도 완화시켜 줄 뿐이고, 아직까지 이를 회복시키는 데 임상적으로 유용한 뚜렷한 약제는 없는 실정이다.
- [4] 신부전이 진행하면 요독 물질(uremic toxin)이 몸에 축적되면서 여러 가지 합병증이 일어난다. 이러한 요독 물질들은 체내의 염증반응 및 산화성 스트레스를 유발하고 혈관의 노화를 촉진하는 등 주요 합병증의 원인으로 여겨지고 있다(Cachofeiro V et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2008:S4-9; Wu J et al. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *Biomed Res Int* 2014; 2014:615312). 요독 물질로는 PCS(*p*-cresyl sulfate), IS(indoxyl sulfate), TMAO(trimethylamine-N-oxide) 등이 있으며, 만성 신부전 환자의 경우 혈청 및 소변에서의 PCS, IS, TMAO 수준이 일반인보다 높다고 보고되어 있다(Ramezani A et al., Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am J Kidney Dis*. 2016 67:483-498). 이들은 장내 균총(microbiota)이 음식물에 포함된 티로신 (또는 페닐알라닌), 트립토판, 콜린(choline)을 장에서 분해하여 생성된 대사체인 *p*-크레졸(cresol), 인돌(indole), TMA(trimethylamine)가 상피세포를 통해 흡수된 후 간에서 대사된 이차 대사체이다(하기 도 25 참조).

[5]

[6]

[7]

[8]

이러한 요독 물질이 몸에 축적되는 가장 중요한 원인은 신장 배설의 감소이다. 하지만, 요독 물질들의 상당부분은 음식물이 경구를 통하여 흡수된 후 장내에서 발생하는 질소분해산물(nitrogen waste product)들이며, 이는 장내 환경 및 미생물에 의해 영향을 많이 받는다. 이러한 이유로 '장 투석(enteric dialysis)'이라는 개념이 도입되었으며, 장 짐막은 반투막(semi-permeable membrane) 역할을 하여 일부 노폐물을 장으로 배설하는 역할도 한다. 실제로 장내에서 발생하는 요독 물질의 흡수를 저해하기 위해 개발된 약제들이 임상에 쓰이고 있으며, 인결합제제와 칼륨 저하억제제 같은 약물들은 인 또는 칼륨같은 특정 물질을 장에서 흡수가 되지 않도록 유도하는 약물들이다. 또한 AST-120(Kremezin®, Kureha-Chemical Co., Tokyo, Japan)는 탄소 소재 미세구체로 구성된 경구 흡착제로 장내에서 발생하는 대표적인 요독 물질인 인돌계 물질을 흡착하여 변으로 배설을 유도하는 약물이다. 하지만 이러한 약물들은 대부분 소화 불량감, 오심, 구토, 변비 등 소화기 계통의 부작용이 많아 약물 순응도는 다른 일반 약제에 비해 낮다. 따라서, 아직까지 투석 또는 이식 외에 요독을 제거할 수 있는 효율적인 방법이 없다.

[9]

프로바이오틱스(probiotics)는 장내 미생물 균형에 도움을 주는 항균 활성화와 효소 활성을 가진 미생물 및 상기 미생물이 생산하는 생산물을 말한다. 아울러 프로바이오틱스는 건조세포나 발효산물 형태로 사람이나 동물에 공급되어, 장내 균총을 개선하는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균으로 정의되고 있다. 프로바이오틱스가 갖추어야 할 특성은 인간의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성의 특성을 가지며, 장으로 가는 동안 살아 남아야 한다. 더 나아가 전달 식품 안에서 소비되기 전에 생존율과 활성을 유지하고, 감염 예방으로 사용되는 항생제에 대해 민감해야 하며, 항생제 내성을 갖는 플라스미드를 보유하지 않아야 한다. 또한, 장내 환경에서 산, 효소, 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다. 최근 프로바이오틱스는 다양한 건강 기능 개선 효과가 보고되면서 기존 화합물에 기초한 치료제를 대체할 수 있는 주요한 치료 물질로 각광받고 있다.

[10]

최근 다양한 연구를 통해 건강한 장내 미생물 군집은 영양 및 대사, 면역 반응 조절에 중요한 역할을 하며, 장내 미생물의 불균형은 비만, 제2형 당뇨, 염증성

장질환, 심혈관계 합병증 등 다양한 질병에 관여하는 것으로 보고되었다. 만성 신부전의 경우도 환자들의 십이지장(duodenum) 및 공장(jejunum)에서 정상인들에서는 나타나지 않는 균주들의 증식이 관찰되며, 특히 호기성 균주(aerobic bacteria)의 과증식이 나타나게 되는데 일부 보고에서는 Enterobacteria 또는 Enterococci 같은 균주가 혈액투석 환자에서 100배 이상 증가한다고 보고하였다(Simenhoff ML et al. Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried Lactobacillus acidophilus. Miner Electrolyte Metab 1996; 22:92-96; Hida M et al., Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis. Nephron 1996; 74:349-355). 또한 만성 신부전 환자들에서는 장내 미생물 환경의 적절한 균형을 잡아주고, 단쇄 지방산을 생성하여 효모, 곰팡이 및 유해 세균의 감염을 억제하며, 다양한 metabolite를 분비하는 것으로 알려진 Lactobacillus 또는 Bifidobacteria 균주들이 감소하여 궁극적으로 장내 불균형(intestinal dysbiosis)이 초래된다는 보고가 있다(Koppe L et al., Probiotics and chronic kidney disease. Kidney Int 2015; 88:958-966.; Ramezani A & Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. J Am Soc Nephrol 2014; 25:657-670; Ranganathan N et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. Adv Ther 2010; 27:634-647).

- [11] 따라서 만성 신부전 환자들에서 불균형을 이룬 장내 세균의 환경을 건강한 환경으로 전환시켜주어 요독에 의한 합병증을 줄이고 신기능을 개선시키려는 시도들이 최근에 보고되었다. 특히 실험적으로 스프라그 돌리 래트(Sprague Dawley rat)를 이용한 5/6 신절제 모델에서 Lactobacillus 및 Bifidobacteria 균주를 포함한 probiotics를 16주 동안 투여하였을 경우 혈중 내 질소 레벨이 감소하여 probiotics를 이용한 신기능 개선효과를 기대하게 했다(Ranganathan N et al. Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats. ScientificWorldJournal 2005; 5:652-660). 환자를 대상으로 한 임상 연구에서도 긍정적인 결과를 보였는데 1996년 연구에서 8명의 투석을 받고 있는 말기 신부전 환자들에게 Lactobacillus 균주를 경구로 투여하여 혈중 dimethylamine (DMA) 및 Nitrosodimethylamine을 보고한 이래, 만성 신부전 환자들에게서 probiotics를 투여했을 경우 신부전의 지표인 혈중 요소 질소 레벨 (BUN, blood urea nitrogen)을 낮추어 주는 것으로 알려졌다(Ranganathan N et al. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. Adv Ther 2010; 27:634-647; Ranganathan N et al. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. Curr Med Res Opin 2009; 25:1919-1930). 만성 신부전 환자를 대상으로 최초로 진행한 무작위 이중 맹검

연구에서, probiotics와 prebiotics를 혼합한 장용 피복 캡슐(enteric coated capsule)로 제조하여 만성 신부전 4기 환자에게 투여하였더니 중요한 장내 발생 요독인 *p-cresol* 혈중 레벨이 유의하게 감소함을 관찰하였고, 전체 환자의 혈중에서 indoxyl sulfate 레벨이 감소하지는 않았지만, 항생제에 노출되지 않았던 환자에서 유의하게 감소되었음을 관찰하였다. 또한 장내 세균 분석에서 *Bifidobacteria* 균주의 유의한 증가가 있어 장내 환경을 개선시킬 수 있음을 보고하였다(Rossi M et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. Clin J Am Soc Nephrol 2016; 11:223-231).

[12] 이에 본 발명자들은, 종래 만족할 만한 치료법이 없는 만성 신부전을 비롯한 신장 질환의 치료를 위해 프로바이오틱스 연구에 매진하였고, 그 결과, 신규한 락토바실러스 애시도필러스 균주가 신장 염증 억제, 요독 물질 감소, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및 신장 섬유화 억제 측면에서 탁월한 효과를 나타내어 신장 기능 개선 및 신장 질환의 치료 또는 예방에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

[14] **발명의 요약**

[15] 본 발명의 목적은 신장 기능의 개선, 또는 신장 질환의 예방 및 치료에 우수한 효과를 보이는 신규한 락토바실러스 애시도필러스 균주 및 이의 다양한 용도를 제공하는 것이다.

[16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기탁번호 KCTC 13518BP인 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[18] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 신장 염증 감소, 요독 물질의 혈중 농도 감소, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및/또는 신장 섬유화 억제를 통하여 신장 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[19] 본 발명에서, 상기 요독 물질은 혈중 요소 질소, 혈중 크레아티닌 및/또는 혈중 p-크레졸을 포함할 수 있다.

[20] 본 발명에서 상기 신장 질환은 요독증, 만성 신부전, 급성 신부전, 아급성 신부전, 신장 섬유화증, 사구체신염, 신우신염, 간질성 신염, 단백뇨, 당뇨병성 신증, 고혈압성 신증, 악성신경화증, 루프스 신장염, 혈관성 미세혈관병증, 이식 거부, 사구체병증, 신장비대, 신장 증식증, 조영제 유발성 신장병, 독소 유발된 신장 손상, 산소 유리-라디칼 매개된 신장병, 다낭성 신장질환 및 신장염으로 구성된 균에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 식품용 조성물을

제공한다.

- [22] 본 발명은 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 동물사료용 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 균주(KBL409)의 신장 기능 개선 효과를 증강시킬 수 있는 추가의 프로바이오틱 균주, 예컨대 락토바실러스 파라카제이 및/또는 락토바실러스 플란타럼과 함께 병용 투여될 수 있다. 바람직하게는, 상기 추가의 프로바이오틱 균주는 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주 및/또는 락토바실러스 플란타럼 KBL396(기탁번호 KCTC13278BP)를 포함한다.
- [24] 본 발명은 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 조성물의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 67종의 락토바실러스 및 락토코커스 균주의 *p*-cresol 분해능을 비교한 결과이다.
- [27] 도 2는 33종의 비피도박테리움 균주의 *p*-cresol 분해능을 비교한 결과이다.
- [28] 도 3은 높은 *p*-cresol 분해능을 보이는 10종의 락토바실러스 후보 균주의 *p*-cresol 분해능을 비교한 결과이다.
- [29] 도 4는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주의 처리 시간에 따른 *p*-cresol 분해능을 나타낸 결과이다.
- [30] 도 5는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 처리시 PBMC의 IL-2, IL-4, IL-13 및 IL-17A 발현량을 확인한 결과이다.
- [31] 도 6은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 처리시 PBMC의 IFN- γ 발현량을 확인한 결과이다.
- [32] 도 7은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 처리시 PBMC의 IL-10 발현량을 확인한 결과이다.
- [33] 도 8은 만성 신부전 동물 모델에서 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주의 신장 보호 효과 규명을 위한 실험 모식도이다.
- [34] 도 9는 아데닌 및 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 신기능의 변화를 나타낸 결과이다.
- [35] 도 10은 아데닌 및 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 알부민뇨의 변화를 나타낸 결과이다.
- [36] 도 11은 아데닌 및 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 신장

- 형태 및 신장 섬유화 변화를 나타낸 결과이다: (A) 대조군, (B) KBL409 투여군, (C) 아데닌 사료 투여군, (D) 아데닌 사료 및 KBL409 투여군.
- [37] 도 12는 만성 신부전 유도시 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 Procolla, Acta2의 mRNA 발현 변화를 나타낸 결과이다.
- [38] 도 13은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여시 만성 신부전 유도 신장의 섬유화 관련 단백질 지표의 변화를 나타낸 결과이다.
- [39] 도 14는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여시 신장 내 대식세포 관련 지표의 변화를 나타낸 결과이다.
- [40] 도 15는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 조직 내 대식세포의 변화를 면역조직화학 검사를 통해 확인한 결과이다: (A) F4/80 염색, (B) CD68 염색.
- [41] 도 16은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 내 Tlr4, Asc, Nlrp3, IL-18의 mRNA 발현 변화를 나타낸 결과이다.
- [42] 도 17은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 조직 내 NRLP3 활성도의 변화를 면역조직화학 검사를 통해 확인한 결과이다.
- [43] 도 18은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 내 미토콘드리아의 형태 변화를 투과 전자 현미경 검사를 통해 확인한 결과이다.
- [44] 도 19는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여시 만성 신부전 유도 모델의 전신성 염증반응의 변화를 나타낸 결과이다.
- [45] 도 20은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 따른 혈중 *p*-크레졸 농도 변화를 나타낸 결과이다: (A) 대장균과의 비교 (B) 락토바실러스 애시도필러스 균주들 간의 비교.
- [46] 도 21은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 투여에 따른 혈중 TMAO 농도 변화를 나타낸 결과이다.
- [47] 도 22는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 단독 투여, KBL409 및 KBL382 균주 병용 투여, KBL409 및 KBL396 균주 병용 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 내 Nlrp3, Pre-IL18의 mRNA 발현 변화를 나타낸 결과이다.
- [48] 도 23은 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 단독 투여, KBL409 및 KBL382 균주 병용 투여, KBL409 및 KBL396 균주 병용 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 내 Ppargc1a, Tfam의 mRNA 발현 변화 및 Mfn1 발현 변화를 나타낸 결과이다.
- [49] 도 24는 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 단독 투여, KBL409 및 KBL382 균주 병용 투여, KBL409 및 KBL396 균주 병용 투여에 의한 만성 신부전 유도 신장 내 Fn, Procoll의 mRNA 발현 변화 및 Bax/Bcl2 비율 변화를 나타낸 결과이다.
- [50] 도 25는 음식물에 포함된 티로신, 트립토판, 콜린이 장내 균총(microbiota) 및 간을 통해 요독 물질(uremic toxin)로 대사되는 경로를 나타낸 도식도이다.

[51] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[52] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[53] 본 발명에서는 인간 유래 미생물의 요독 물질 분해 효과를 확인하여, 신기능 개선 효과가 탁월한 락토바실러스 애시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주를 선별하였는데, 상기 균주의 16S rDNA를 분석한 결과, 상기 균주가 종래 공지된 바 없는 신규한 균주임을 확인하였다.

[54]

[55] 따라서, 본 발명은 일관점에서 신규한 프로바이오틱인 락토바실러스 애시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주에 관한 것으로, 상기 균주는 하기 서열번호 1로 표시되는 16s rDNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[56]

[57] <서열번호 1> 락토바실러스 애시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주의 16s rDNA 서열

[58]

```
GGGAAAGTTGCGGGTGTCTATACATGCGAGTGCAGCGAGCTGAACCAACAGATTCACTCGGTGAT
GACGTTGGGAACCGGAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGGG
ATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAGG
CGGCGTAAGCTGTCGATATGAGTGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGGCTAC
CAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCC
AAACTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTAGGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGT
AACTGGCCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAAGCAAAAGTCAACGGCTAACTACGTGCCACGACCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGATTTATGCGGTAAGCGAGCGCAGCGCAAGCAAGAAATAA
GTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAACTGTTTTCTTGAAGTGCAGA
AGAGGAGACTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACAGTGGCG
AAGGCGGCTCTCTGTCTGCAACTGACCTGAGGCTCGAAAGCATGGTAGCGCAACAGGATTAGA
TACCCTGTAGTCCATGCCSTAAACAGATGAGTGCTAAAGTGTGGGAGGTTTTCCGCTCTCAGTCTG
CAGTAAACGCATTAAAGCACTCGGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATCGAAGCAACGCGAAGAACTTACCA
GGTCTTGACATCTAGTSCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCTTCGGGGACACTAAGACAGGTGTG
GCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGT
CATTAGTTGCCAGCATTAAAGTGGCACTCTAATGAGACTCGCGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAAGTCAATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACATACA
ACGAGGAGCAAGCTGGCAAGGCAAGCGAATCTTAAAGCTGTCTCAATTCGGACTGCAAGTCT
GCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATGCTAGTAAATCGGGATCAGCAGCGCCGGGTGAATACGT
TCCCGGGCCCTTGTACACACCGCCCTCACACCTAGGGAGTCTGCAATGCCCAAGCCGGTGGCCT
AACCTTCGGGAAGGAGCCGCTAAGCAGTCAAGTGTTC
```

[59]

[60] 이에, 본 발명에서는 상기 균주에 대한 효능 실험을 진행하였고, 그 결과 상기 균주는 신장 염증을 감소시키고, 만성 신부전의 원인이 되는 요독 물질의 분해 효과가 탁월할 뿐 아니라, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및 신장 섬유화 억제 효과를 나타내어, 신기능 향상 내지 신장 질환의 치료 또는 예방에 탁월한 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[61]

구체적으로, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주는 만성 신부전 동물 모델에서 혈중 요소 질소, 혈중 크레아티닌 및/또는 혈중 p-크레졸 등의 요독 물질의 농도 및 단백뇨를 현저히 감소시키는 것으로 나타났다.

[62]

또한, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주는 신장 섬유화의 지표인 Procol1a 및 Acta2 mRNA 발현량, 및 Collagen1, Fibronectin, α-SMA 및

Vimentin 발현량을 현저히 감소시켰고, 조직병리학적 검사를 통해서도 신부전의 특징인 신세뇨관 확장, 신세뇨관 세포의 편평함, 세뇨관 사이질의 확장 및 기질 축적, 그리고 신장 섬유화의 증가를 완화시킴을 확인할 수 있었다.

[63] 나아가, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주는 세뇨관 사이질 내의 대식세포의 침윤 및 신장내 인플라썬의 발현을 억제할 뿐만 아니라, 만성 신부전시 발생하는 미토콘드리아의 기능 이상을 회복시키고, IL-6 및 TNF- α 를 억제함으로써 만성 신부전 모델에서 전신성 염증반응을 감소시키는 것으로 확인되었다.

[64]

[65] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 약학적 유효량을 함유하는 신장 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

[66]

본 발명의 약학적 조성물은 생균의 균체, 건조 균주의 형태, 균주의 배양물, 균주의 파쇄물 또는 이들의 조합을 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 매체와 조합한 조성물로 제공될 수 있다. 이용되는 담체 또는 매체는 용매, 분산제, 코팅, 흡수 촉진제, 제어된 방출제(즉, 서방제), 및 1종 이상의 불활성 부형제(전분, 폴리올, 과립제, 극미세 셀룰로스(microfine cellulose), 미세결정형 셀룰로스, 희석제, 운할제, 결합제, 붕해제 등을 포함함) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수도 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 부형제 그리고 상기 추가의 성분의 예로는, 결합제, 충전제, 붕해제, 운할제, 항미생물제 및 코팅제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[67]

본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 신기능 개선 내지 신장 질환의 예방 또는 치료하는 효과를 가지는 공지된 약제, 예컨대 레닌-안지오텐신 시스템 차단제와 병용하여 투여할 수 있다.

[68]

[69] 본 발명의 약학적 조성물은 특히, 경구용 단위 제형으로서 장용 피복된 장용성 제제로서 제공될 수 있다. 본 명세서에서의 "장용 피복"은 위산에 의해서는 분해되지 아니하여 피복이 유지되나, 소장에서는 충분히 분해되어 활성 성분이 소장내에 방출될 수 있도록 하는, 약제학상 허용 가능한 모든 종류의 공지의

피복을 포함한다. 본 발명의 "장용 피복"은 pH 1의 HCl 용액과 같은 인공 위즙을 36°C 내지 38°C에서 접촉시킬 때, 2시간 이상 동안 그대로 유지되며, 바람직하게는 이후에 pH 6.8의 KH_2PO_4 완충 용액과 같은 인공 장즙에서 30분 이내에 분해되는 피복을 지칭한다.

[70] 본 발명의 장용 피복은 1개의 코어(core)에 약 16 내지 30, 바람직하게는 16 내지 20 또는 25 mg 이하의 양으로 피복된다. 본 발명의 장용 피복의 두께가 5 내지 100 μm , 바람직하게는 20 내지 80 μm 인 경우가 장용 피복으로서 만족스러운 결과를 나타낸다. 장용 피복의 재료는 공지의 고분자 물질들 중에서 적당히 선택된다. 적당한 고분자 물질은 다수의 공지 문헌(L. Lachman 외, *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3판, 1986, pp. 365~H.Sucker 외, *Pharmazeutische Technologie*, Thieme, 1991, pp. 355-359; *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 4판, Vol. 7, pp. 739 ~742, 및 766 ~778, (SpringerVerlag, 1971); 및 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 13판, pp. 1689 ~1691 (Mack Publ., Co., 1970))에 열거되어 있고, 셀룰로즈 에스테르 유도체, 셀룰로즈 에테르, 아크릴 수지의 메틸아크릴레이트 공중합체 및 말레산 및 프탈산 유도체의 공중합체가 이들에 포함될 수 있다.

[71] 본 발명의 장용 피복은 장용 피복 용액을 코어에 분무하는 통상적인 장용 피복법을 사용하여 제조될 수 있다. 장용 피복 공정에 사용되는 적당한 용매로는 에탄올과 같은 알콜, 아세톤과 같은 케톤, 다이클로로메탄(CH_2Cl_2)과 같은 할로젠화 탄화수소 용매이며 이들 용매들의 혼합 용매가 사용될 수도 있다. 디(di)-n-부틸프탈레이트 또는 트리아세틴과 같은 연화제를 1 대 약 0.05 내지 약 0.3 (코팅 재료 대 연화제)의 비율로 피복 용액에 첨가한다. 분무 과정을 연속적으로 수행하는 것이 적절하며 피복의 조건을 고려하여 분무량을 조절하는 것이 가능하다. 분무압은 다양하게 조절할 수 있고, 일반적으로 약 1 내지 약 1.5 바(bar)의 분무압으로 만족할만한 결과가 얻어진다.

[72]

[73] 본 발명에 있어서, 신장 질환이란, 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 기능이 저하되거나 이상이 초래된 상태를 모두 지칭하며, 만성적인 모든 신장병이 포함되고, 뚜렷하지 않고 기질적 변화와 사구체 여과 기능이 저하되어 가는 질환들을 모두 포함한다. 신장의 손상으로 인한 기능의 저하는 신장 및 관련 구조의 증대, 신장의 위축, 체액량의 변화, 전해질 불균형, 대사성 산증, 가스교환장애, 항감염 기능 손상, 요독성 독소의 축적 등을 초래한다.

[74] 본 발명에 있어서, 상기 신장 질환은 신장 염증 감소, 혈중 요소 질소, 크레아티닌 또는 p-크레졸 등의 요독 물질의 혈중 농도 감소, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및/또는 신장 섬유화 억제제를 통해 개선, 치료 또는 예방될 수 있는 질환을 말한다. 구체적으로, 요독증, 만성 신부전, 급성 신부전, 아급성 신부전, 신장 섬유화증, 사구체신염, 신우신염, 간질성 신염, 단백뇨,

당뇨병성 신증, 고혈압성 신증, 악성신경화증, 루프스 신장염, 혈관성 미세혈관병증, 이식 거부, 사구체병증, 신장비대, 신장 증식증, 조영제 유발성 신장병, 독소 유발된 신장 손상, 산소 유리-라디칼 매개된 신장병, 다낭성 신장질환 및 신장염 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[75] 본 발명에서 용어 '치료'는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하는 것을 의미한다.

[76] 또한, 본 발명에서, 용어 '예방'은 질병을 축소시키는 방지(averting), 지연(delaying), 방해(impeding) 또는 저해(hindering)와 관련된 것이다.

[77] 본 발명에 따른 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제와 함께 포함할 수 있다.

[78] 본 발명에서, 용어 "유효량(또는, 약학적 유효량)"은 바람직한 효과를 전달하기에는 매우 충분하지만 의학적 판단 범위 내에서 심각한 부작용을 충분히 방지할 정도로 적은 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 의하여 체내에 투여되는 미생물의 양은 투여 경로, 투여 대상을 고려하여 적절하게 조정될 수 있다.

[79] 본 발명의 조성물은 대상 개체에 1일 1회 이상 투여될 수 있다. 단위 투여량은 사람 피험자 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 적절한 약제학적 담체를 포함하며 치료 효과를 나타내는 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주의 예정된 양을 함유한다. 성인 환자의 경구 투여용 투여 단위는 본 발명의 미생물 0.001 g 이상을 함유하는 것이 바람직하며, 본 발명의 조성물의 경구 투여량은 일회에 0.001 내지 10g, 바람직하게는 0.01 내지 5 g이다. 하나의 예로서, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주의 약학적 유효량은 0.01 내지 10 g/1일이며, 1×10^8 내지 1×10^{10} CFU/일의 투여량으로 투여될 수 있다. 그러나, 투여량은 환자의 질환의 심각도 및 함께 사용되는 미생물과 보조 유효 성분에 따라 가변적이다. 또한, 일일 총 투여량을 여러 횟수로 분할하여 필요에 따라 연속적으로 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량 범위는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 아니한다.

[80]

[81] 본 발명은 다른 관점에서 락토바실러스 애시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주, 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 함유하는 식품용 조성물에 관한 것이다.

[82] 상기 식품용 조성물은 신장 기능 개선을 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 식품용 조성물, 바람직하게는 건강기능식품일 수 있다. 또한 이러한 신장 기능의 개선은 신장 염증 감소, 요독 물질의 혈중 농도 감소, 단백뇨 감소, 신장

- 미토콘드리아의 기능 회복 및/또는 신장 섬유화 감소로 인해 달성될 수 있다.
- [83] 상기 식품용 조성물은 신장 기능의 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [84] 상기 식품용 조성물이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강기능식품 및 기능성 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [85] 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [86] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [87] 본 발명에서 상기 기능성 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며, 지시된 비율로 필수 성분으로서 신장 기능 개선을 위한 상기 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [88] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [89] 본 발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 100중량%로 포함할 수

있으며, 바람직하게는 1중량% 내지 99중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100 mL를 기준으로 0.001g 내지 10g, 바람직하게는 0.01g 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

- [90] 본 발명의 식품용 조성물은 상기 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주를 독립적으로 또는 허용 가능한 담체에 첨가하거나, 인간 또는 동물이 섭취하기에 적합한 조성물 형태로 제조될 수 있다. 즉, 다른 프로바이오틱 세균을 함유하지 않은 식품 및 이미 몇 가지의 프로바이오틱 세균을 함유한 식품에 첨가되어 사용될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품을 제조함에 있어서, 본 발명의 균주와 함께 사용 가능한 다른 미생물들은 인간이나 동물이 섭취하기에 적합하고 섭취시 병원성 유해세균을 억제하거나 포유동물 장관 내의 미생물 균형을 개선시킬 수 있는 프로바이오틱 활성을 갖는 것들이며, 특별히 제한되지 않는다. 그러한 프로바이오틱 미생물의 예로는 사카로미세스(*Saccharomyces*), 칸디다(*Candida*), 피치아(*Pichia*) 및 토룰롭시스(*Torulopsis*)를 포함하는 효모(yeast), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 리조퍼스(*Rhizopus*), 뮤코(*Mucor*), 페니실린(*Penicillium*) 등과 같은 곰팡이 및 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 락토코커스(*Lactococcus*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 페디오코커스(*Pediococcus*) 속에 속하는 세균 등이 있다. 적당한 프로바이오틱 미생물의 구체적인 예로는 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 알리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*), 락토바실러스 델브루키(*Lactobacillus delbruckii*), 락토바실러스 존스니(*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 파시미누스(*Lactobacillus farciminus*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코커스 애시딜락티시(*Pediococcus acidilactici*)등을 들 수 있다. 바람직하게는, 우수한 프로바이오틱 활성을 가지면서 신기능 개선 효과가 뛰어난 프로바이오틱 미생물을 본 발명의

식품용 조성물에 추가로 포함함으로써 그 효과를 더욱 증진시킬 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물에 사용될 수 있는 담체의 예로는 증량제, 고섬유 첨가제, 캡슐화제, 지질 등일 수 있으며 이러한 담체들의 예는 당업계에 충분히 공지되어 있다. 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주는 동결건조되거나 캡슐화된 형태 또는 배양 현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다.

[91]

[92] 본 발명의 조성물은 또한, 상기 균주를 함유하는 동물 사료용 첨가제 또는 이를 함유하는 동물사료용 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

[93]

본 발명의 동물 사료용 첨가제는 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 상기 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 이외에 비병원성의 다른 미생물을 더 포함할 수도 있다. 첨가할 수 있는 미생물로는 예컨대 단백질 분해효소, 지질 분해효소 및 당 전환 효소를 생산할 수 있는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 고초균, 소의 위와 같은 혐기적 조건에서 생리적 활성 및 유기물 분해능이 있는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 균주, 가축의 체중을 증가시키며 우유의 산유량을 늘리고 사료의 소화 흡수율을 높이는 효과를 보여주는 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)와 같은 사상균(Slyter, L. L. J. Animal Sci.1976, 43. 910-926) 및 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모(Johnson, D. E et al. J. Anim. Sci.,1983, 56, 735-739 ; Williams, P. E. V. et al,1990, 211) 등이 사용될 수 있다.

[94]

본 발명의 동물 사료용 첨가제는 상기 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주 이외에 하나 이상의 효소제제를 더 포함할 수도 있다. 첨가되는 효소제제는 건조 또는 액체 상태가 모두 가능하며 효소제제로는 리파제(lipase)와 같은 지방 분해효소, 파이틱 애시드(phytic acid)를 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠(glycogen) 등에 포함되어 있는 α -1,4-글리코시드 결합(glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제(amylase), 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 셀룰로스(cellulose)를 분해하는 카르복시메틸셀룰라제(carboxymethylcellulase), 자일로스(xylose)를 분해하는 자일라제(xylase), 말토스(maltose)를 두 분자의 글루코스(glucose)로 가수분해하는 말타제(maltase) 및 사카로스(saccharose)를 가수분해하여 글루코스-프룩토스(glucose-fructose) 혼합물을 만드는 전환효소(invertase) 등과 같은 당 생성 효소 등이 사용될 수 있다.

[95]

본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 KBL409 균주를 동물 사료용 첨가제로 사용함에 있어서, 사료용 원료로는 각종 곡물 및 대두 단백을 비롯한 땅콩, 완두콩, 사탕무우, 펄프, 곡물 부산물, 동물 내장 가루 및 어분 가루 등이 사용될 수 있으며, 이들은 가공되지 않거나 또는 가공된 것을 제한없이 사용할 수 있다. 가공과정은, 반드시 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 사료원료가 충전된 상태에서 가압 하에 일정한 배출구로 압축되는 공정으로, 단백질의 경우에는

변성이 되어 이용성이 증가되는 압출 성형(extrusion)을 사용하는 것이 바람직하다. 압출성형(extrusion)은 열처리 과정을 통해 단백질을 변성시키고 항효소인자를 파괴시키는 등의 장점을 갖는다. 또한, 대두 단백질과 같은 경우에는 압출 성형을 통해서 단백질의 소화율을 향상시키고 대두에 존재하는 단백질 분해효소의 저해제 중 하나인 트립신 저해제(trypsin inhibitor)와 같은 항 영양인자들을 불활성화시키며 단백질 분해효소에 의한 소화율 향상을 증가시켜 대두 단백질의 영양적 가치를 증가시킬 수 있다.

[96]

[97] 한편, 본 발명의 약학적, 식품용 또는 동물사료용 조성물은 KBL409 균주의 신기능 개선 효과를 증강시킬 수 있는 추가의 프로바이오틱 균주를 추가로 포함하거나, 또는 본 발명의 조성물을 추가의 프로바이오틱 균주를 포함하는 별도의 조성물과 동시 또는 순차적으로 병용 투여할 수 있다.

[98] KBL409 균주의 신장 기능 개선 효과를 증강시킬 수 있는 추가의 프로바이오틱 균주는 바람직하게는, 락토바실러스 파라카제이 및 락토바실러스 플란타럼을 포함하며, 보다 바람직하게는, 상기 추가의 프로바이오틱 균주는 하기 서열번호 2의 16s rDNA 서열을 갖는 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주 및/또는 하기 서열번호 3의 16s rDNA 서열을 갖는 락토바실러스 플란타럼 KBL396(기탁번호 KCTC13278BP)일 수 있다.

[99]

[100] <서열번호 2> 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP) 균주의 16s rDNA 서열

[101]

GCAGGTGGCGGGTGTCTATACATGCAGTTCGACGAGTTCCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGA
GATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTGGA
AACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCAGTGGTTCCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGA

[102]

TGGACCCGAGGGGATATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCAACAGGCGATGATAGCGGACATGAGAGGTTG
ATCGCCACATTGGGACTGAGACAGGCCCAAACTCTACGGGAGGCAGCGTAGGAAATCTCCACAATGGACGCA
AGTGTGATGGAGCAACCGCGGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGTGGTAAAATCTGTGTGGAGAAATGGTCGG
CAGAGTAATGTTGTGGCGTGAAGTATCCAAACAGAAAGCCAGCGCTAATAGTCCAGCAGCCGGGTAAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAITTTATGGGGGTAAAGCGAGCCCAAGCGGCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCC
TCGCCTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATATGGAAGACACAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGACCGCTGAGGCTCGAA
AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGGCGTAAAGGATGAATGCTAGGTGTGGAGGGTTTC
CGCCCTCAGTCCGCGCTAACCAATTAAGCATTCGGCTGGGGAGTAGCAACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAAGCGGAAAGAACCTTACCAGGCTTTGACAT
CTTTTGATCACTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTGTGCTGAGCTGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTTATGACTAGTTGCAGCATTAGTGGGCACTCTAG
TAAACTCCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTAACTGACCTGACACA
CGTGTAGCAATGGATGACAAAGAGTGGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTTAAAGCACTTCTAGTTGCGG
CTGTAGGCTGCAACTCGCTACAGGAGTGGGAATCGCTAGTAAATCGGGGATCGACCGCGGGTGAATAGTGTCC
CGGGCTTGTACACCCCGGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCGGAGCGGGTGGCGTAACCTTTAGGGAGC
GAGCGCTAAGTGGCTACGGCT

[103]

[104] <서열번호 3> 락토바실러스 플라타렘 KBL396(기탁번호 KCTC13278BP) 균주의 16s rDNA 서열

[105] TATCAGTACGTGCTATAATGCAGTCGACGACTCTGGTATTGATTGGTTCATCATGATTTACATTGA
GTGAGTGGCACTGGTGTAGTAAACAGTGGGAACCTGGCCAGANGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT
ACCGCATAAAGACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGGGG
TATTACTAGATGGTGGGTAAAGGCTCACCATGGCAATGATAGGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTG
GGACTSAGACAGCGGCCAAACTCC:ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAAATGGAGAAAGCTGATGGAGC

[106] AACCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTGGCTCTGAAAACCTCTGTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTT
CAGGTATTGACGGTATTTAACCCAGAAAGCCACCGCTAACTACGTGGCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTCCTGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAGCCTTCGGCTCAACCGA
AGAAGTGCATCGGAACCTGGGAACCTTGGTGCAGAGAAGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGGGTAG
ATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACCTGAGGCTGAAAGTATGGGTAGCA
AAGCGATTAGATGCCCTGGTAGTGCATACCGTAAACGATGAARCTAAGTCTTGGAGGGTTTCGGCCCTTCAGTGC
TGCAGCTAAGCAATTAAGCATTCGGCTGGGGAGTACGSCCCGCAAGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGGC
CCGACAAAGCGGTGGGAGCAUVTGGGTTTAAATCAAGCTAGCGGAGAAACCTTACCCAGGTTTGGACATACTAAT
GCAAAATCTAAAGAGATTAGACGTTTCCCTTCCGGGGACATGGGATACCGGGTGGGTGCATGGGTGGTGTGTCAGC
TTGTGGTGTGACAAATGTTGGGTTTAAAGTTCCCGAAAGCGAGCGCAACCTTATTATCAGTTGCGACGATTAAGT
TGGGCACCTTGGTGGACTGCGCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGATGAGGTCAAATCATCA'GCCCTTATGAC
CTGGCTACACACGTGCTACAAATGGATGGTACACAGGATTEGGAACTCGCGGAGTAAGCTAATCTCTTAAGCCAT
TCTCAGTTGGATTGTAGCTGCAACTCGCCATGATGAATCGGAATGCTAGTAACTGGGATCAGCATGCGGG
TGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACCGCCGCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCCGGTGGGTAAC
CTTTAGAACCGCCCTAATGGCACCACCATCG.

[107]

[108] 상기 락토바실러스 파라카제이 KBL382 및 락토바실러스 플라타렘 KBL396은 각각 0.001 내지 10g/일, 바람직하게는 0.01 내지 5g/일의 투여량으로 1일 1회 내지 수회 투여될 수 있다.

[109] 하나 이상의 프로바이오틱 균주가 단일 조성물 내 혼합물로 투여되거나, 하나 이상의 프로바이오틱 균주가 상이한 조성물로 별도 투여되는 관점에서, 균주들의 상승 작용적 프로바이오틱 효과가 유용한 한도로 유지되는 한 임의의 적절한 비율의 균주가 사용될 수 있다. 이러한 비율들은 해당 분야의 숙련된 기술자가 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들면, 1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 또는 10:1 비율 또는 이들 한계값들 사이의 임의의 비율, 예컨대, 1:1의 두 가지 균주(예컨대, KBL409:KBL382)가 사용될 수 있다.

[110]

[111] 본 발명은 또 다른 관점에서 신장 질환의 예방 또는 치료에 사용되기 위한 상기 균주 또는 조성물의 용도 및 상기 치료제의 제조를 위한 상기 균주 또는 조성물의 용도를 제공한다.

[112] 본 발명은 또 다른 관점에서 약학적 유효량의 상기 균주 또는 조성물을 신장 질환의 예방 또는 치료가 요구되는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[113] 상기 질환의 예방 또는 치료방법에 사용되는 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[114] 한편, 상기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 투여할 수 있는 개체는 인간을 포함한 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 동물일 수 있다.

[115]

[116] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[117]

[118] 실시예 1. *p*-크레졸 분해능을 가지는 유산균의 선별

[119] 주요 신장 요독 물질인 *p*-cresol sulfate(PCS), indole sulfate(IS), trimethylamine N-oxide(TMAO)의 전구체는 각각 *p*-크레졸, 인돌, 트리메틸아민(trimethylamine, TMA)이며, 각각 장내 미생물에 의한 페닐알라닌 (또는 티로신), 트립토판, 콜린의 분해산물이다. 본 발명에서는 신장 요독 물질의 전구체를 대사/분해할 수 있는 미생물 동정에 초점을 맞추어 연구를 수행하였으며, 이중 *p*-크레졸 분해능을 주된 선별 대상으로 선정하여 요독 물질 분해를 통한 신장 질환 치료 효과를 나타내는 프로바이오틱 균주를 선별하고자 하였다. 이를 위하여, 인간 유래의 총 67종의 락토바실러스 및 락토코커스 균주, 총 33종의 비피도박테리움 균주의 *p*-크레졸 분해능을 평가하였다. 모든 균주는 낮은 pH 및 담즙염에 저항성이므로, 이들은 진행 시간 동안 위장관에서 생존 가능하였다. *p*-크레졸 분해능은 *p*-크레졸을 함유하는 MRS 배지에서 균주들을 배양한 후 잔여 *p*-크레졸의 농도를 가스크로마토그래피로 측정하여 확인하였다.

[120]

[121] 1-1. 균주의 배양 및 시료의 준비

[122] 본 실험에 사용된 균주들을 200 μ M의 *p*-크레졸을 포함하는 MRS 배지에서 24 h 동안 배양하였다. 각 시료 50 μ L에 진한 황산 2.5 μ L를 넣고 90 °C 30 min 가열한 후 준비한 internal standard (0.2 mg/mL 2,6-dimethylphenol, Sigma-Aldrich)를 2.5 μ L 넣고, 분석 용매로서의 ethyl acetate를 50 μ L 넣어 1분간 vortex로 섞어주었다. 이를 15,000 rpm에서 2분간 원심분리 후 GC vial (with 250 μ L glass insert)에 상층액을 담았다.

[123]

[124] 1-2. *p*-크레졸의 농도 측정을 통한 균주의 선별

[125] 가스크로마토그래피를 사용하여 배양 상층액내 *p*-크레졸 양을 측정하였다. 분석장비는 GC-EI-MS (Agilent 5985)를 사용하여 flow rate 1.3mL/min로 초기 75 °C에서 150 °C(rate 20°C) 그리고 250 °C(rate 25°C로 오븐 온도를 올려가며 분석을 진행하였다(Post run 75°C 3min). 컬럼은 DB-5 capillary column 30 m X 0.25 mm, df=0.25 (Agilent)를 사용하였다.

[126] 그 결과, 락토바실러스 및 락토코커스 균주의 경우 대부분 분해능이 높지

않았으나, 일부 우수한 *p*-크레졸 분해능을 보이는 10종의 균주들을 1차 선별하였다(도 1). 비피도박테리움 균주의 경우 대부분 *p*-크레졸을 분해하지 못하는 것이 확인되었다(도 2).

[127]

[128] 1-3. 균주의 2차 선별

[129] 상기 실시예 1-2에서 *p*-크레졸 분해능이 확인된 10종의 락토바실러스 균주들에 2차로 *p*-크레졸 분해능 평가 실험을 수행한 결과, *Lactobacillus acidophilus* 종에 속하는 KBL402 및 KBL409가 가장 높은 *p*-크레졸 분해능을 보유하고 있음을 확인하였다(도 3). 두 균주는 16S rDNA 서열상 거의 유사한 종으로 판단되어, KBL409 균주를 선정하여 추가 실험을 진행하였다.

[130]

[131] 1-4. KBL409 균주의 *p*-크레졸 분해능 측정

[132] KBL409를 대상으로 실시예 1-2와 동일한 방법으로 시간에 따른 *p*-크레졸 분해능을 측정한 결과, KBL409는 처리 12 시간 후 95%, 36시간 후 85%까지 배양액 내의 *p*-크레졸을 감소시킬 수 있음을 확인하였다(도 4). 이로써, 특히 KBL409는 우수한 *p*-크레졸 분해능을 나타내어, *p*-크레졸의 과다 축적으로 인한 신장 질환을 효과적으로 완화할 수 있음을 알 수 있었다.

[133]

[134] 실시예 2. KBL409의 항염증 효과 확인

[135] 신장 질환에서 세포 사멸의 중요 기전 중 하나인 pyroptosis는 염증반응에 수반하여 발생하므로, 염증반응의 개선 효과를 통한 신장 보호 효과에 대해 검증할 필요가 있다. KBL409의 *p*-크레졸 분해능과 더불어 항염증 효과도 함께 확인하기 위하여, PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 이용하여 염증성 및 항염증성 마커들의 발현 정도를 확인하였다.

[136]

[137] 2-1. PBMC의 준비 및 균주의 처리

[138] 인간 유래의 PBMC (Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC, USA)를 1%의 페니실린/스트렙토마이신, 1%의 젠타마이신 및 10%의 FBS를 함유한 RPMI-1640 배지 (Gibco, Paisley UK)에서 배양하였다. 배양된 PBMC (2×10^5 cell)를 96-well plate에 넣고 T 세포를 활성화시키는 항 CD3 항체를 $1 \mu\text{g/mL}$ (OKT3; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)로 처리한 후 1:100 비율의 KBL409 균주 혹은 대장균을 첨가하여 37°C 에서 72시간을 배양하였다.

[139]

[140] 2-2. 염증성 및 항염증성 사이토카인의 측정

[141] 균주 처리후 배양된 PBMC 세포의 상층액만을 수득하여 각 사이토카인의 양을 측정하였다. IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , 및 IL-17A의 측정에는 BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences)를 사용하였으며, IL-13의 측정에는 IL-13 Human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit

(BMS231-3; Thermo Fisher Scientific)를 사용하였다.

[142] 그 결과, KBL409 처리군(CD3/KBL409)에서 Th1의 염증성 사이토카인인 IL-2, Th2의 염증성 사이토카인인 IL-4 및 IL-13, 그리고 Th17의 염증성 사이토카인인 IL-17A의 발현이 대장균 처리군(CD3/E.coli) 및 PBS 처리군(CD3/PBS)에 비해 현저히 낮게 유지되는 것을 확인하였다(도 5). 한편, 또 다른 Th1의 염증성 사이토카인인 IFN- γ 는 PBS 처리군(CD3/PBS)과는 큰 차이가 없었으나 대장균 처리군(CD3/E.coli)에 비해서는 현저히 낮게 유지되는 것을 확인하였다(도 6). 또한, KBL409를 PBMC에 처리한 후 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현량을 확인한 결과, KBL409 처리군(CD3/KBL409)에서의 IL-10의 발현이 PBS 처리군(CD3/PBS)에 비해 월등히 증가하였음을 확인하였다(도 7). 따라서, KBL409는 전반적인 T 세포의 염증성 사이토카인 발현을 현저히 억제시키고, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현을 증가시킴으로써, 만성 신부전에 수반되는 신장 및 전신성 염증반응을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[143]

[144] 실시예 3. 만성 신부전 유도 마우스 모델에서의 KBL409의 효과 확인

[145] 아데닌(0.2% adenine)이 포함된 사료(chow)를 먹이로 섭취하게 하여 신부전을 유도하는 방법은 수술이 필요 없어 이에 의한 사망이 없으며, 사료 섭취가 비교적 용이하여 장기간 관찰할 수 있고, 신절제를 필요로 하지 않아 양쪽 신장에서 신부전을 모두 관찰할 수 있고, 충분한 조직을 확보할 수 있는 장점이 있어 신부전 유도 모델로 널리 사용되고 있다(Jia T et al. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. BMC Nephrol 2013; 14:116). 본 발명에서는, 아데닌 유도 신부전 모델을 이용하여 KBL409 투여시의 신기능, 신장 섬유화 등의 변화 및 염증의 개선 효과를 확인하였다. 또한, 신기능 저하에 의한 혈중 요독 물질의 감소 효과를 함께 확인하였다.

[146]

[147] 3-1. 만성 신부전 유도 마우스 모델 제작 및 군주의 투여

[148] 본 실험에서는 평균 체중 20g 내외의 7주령 C57BL/6 마우스를 대조군과 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 도 8에 도시한 바와 같이, 대조군은 다시 2군으로 나누어 KBL409 군주를 투여한 군(Con+KBL409; n = 10)과 투여하지 않은 군(Con; n = 10)으로 나누었다. 실험군은 아데닌 사료를 투여하여 만성 신부전을 유도하였으며, 역시 KBL409 군주를 투여한 군(CKD+KBL409; n = 10), 투여하지 않은 군(CKD; n = 10)으로 나누어 총 4군의 마우스로 실험을 진행하였다. 아데닌 사료는 통상적인 식이에 0.2%의 아데닌을 추가한 식이가 되도록 하였으며, KBL409 군주는 1×10^9 CFU를 매일 경구 투여하였다. 모든 군의 마우스는 6주간 사육 후 희생시키고 신장을 적출하였다(도 8).

[149]

[150] 3-2. 신기능의 변화 확인

[151] 혈중요소질소(BUN)는 혈액 중의 요소에 함유된 질소를 측정된 값이고,

크레아티닌은 단백질의 일종인 크레아틴의 노폐물로서 신장의 사구체로 여과되는 체내 여과지표이며, 단백뇨(proteinuria)라고도 하는 알부민뇨(albuminuria)는 소변에 단백질이 섞여 나오는 것이다. 알부민뇨의 양, BUN 및 크레아티닌의 함량이 높을 경우 신장 기능이 저하되었음을 나타낸다. 이에, KBL409의 만성 신부전에 대한 효과를 확인하고자 상기 각 마우스 군별로 희생 전 수집한 소변 및 혈액에서 생화학분석기(Automated Chemistry Analyzer, Roche, HITACHI7600)를 이용하여, 알부민뇨의 양, BUN 및 크레아티닌의 양을 측정하였다.

[152] 그 결과, 도 9에서 알 수 있듯이, 아데닌 사료 투여군(CKD)은 대조군(Con)에 비해 BUN 및 크레아티닌 농도의 현저한 상승이 관찰되어 성공적으로 만성 신부전이 유도된 것을 확인하였다. 또한, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)은 아데닌 사료만을 투여 받은 군에 비해 유의하게 낮은 BUN 및 크레아티닌의 농도를 나타냈다(도 9). 알부민뇨의 경우, 아데닌 사료 투여군(CKD)은 대조군(Con)에 비해 알부민뇨의 양이 현저하게 증가한 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)은 이에 비해 알부민뇨의 양이 유의하게 감소하였다(도 10). 따라서, 본 발명의 KBL409의 투여는 대표적인 신부전 지표인 알부민뇨의 양, BUN 및 크레아티닌의 농도를 감소시켜 신기능을 개선하는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[153]

[154] 3-3. 신장 섬유화의 변화 확인

[155] 신장 섬유화는 신장 조직에서 발생하는 과도한 염증반응, 산화성 스트레스, 상피세포의 섬유세포화와 같은 다양한 원인들에 의해 신장 조직이 섬유화되어 신기능을 상실하게 되는 증상을 의미한다. 이는 신장 질환의 중요한 표지자이며, 말기 신부전의 매우 흔한 증상 중 하나이다. 이에, 만성 신부전에 따른 신장 섬유화에 대한 KBL409의 효과를 확인하기 위하여, 실시예 3-1에서 확보한 각 군의 신장 조직 샘플의 조직병리학적 검사, Procol1a 및 Acta2 mRNA 발현량 분석, Collagen1, Fibronectin, α -SMA 및 Vimentin 발현량 분석을 수행하였다.

[156]

[157] 3-3-1. 조직병리학적 검사

[158] 실시예 3-1에서 얻은 신장 조직 샘플을 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매(formalin fixed paraffin embedded(FFPE))를 거쳐 4 μ m 두께의 조직 절편으로 제작하였다. 혈관 사이질의 확장 및 신장 조직 내 사구체 비대증(glomerular hypertrophy)을 보기 위한 과요오드산-슈프(periodic acid-Schiff, PAS) 염색 및 간질 섬유증(interstitial fibrosis)을 보기 위한 Masson's trichrome 염색을 수행하였다. 염색 후 각 군의 조직 절편을 광학현미경으로 관찰하였다.

[159] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD, 도 11C)에서는 대조군(Con, 도 11A) 대비 신부전의 특징인 신세뇨관 확장, 신세뇨관 세포의 편평함(flattened epithelium), 및 신세뇨관 사이질의 확장 및 기질의 축적이 관찰되었으며, Masson's trichrome

염색을 통한 신장 섬유화의 증가가 관찰되었다. 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409, 도 11D)에서는 위에서 언급한 조직학적 변화가 완화된 것이 뚜렷이 관찰되며, 특히 섬유화가 현저히 감소된 것이 확인되었다.

[160]

[161] 3-3-2. 신장 섬유화의 지표 확인(1)

[162] 섬유화의 지표인 Procol1a, Acta2 유전자의 신장 조직 내 발현 정도를 측정하기 위하여, 상기 실시예 3-1에서 얻은 각 군의 신장 조직으로부터 mRNA를 분리하여 Procol1a 및 Acta2 유전자의 mRNA 발현량을 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR)로 분석하였다.

[163] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 대조군(Con)에 비해 Procol1a 및 Acta2 유전자의 mRNA 발현량이 크게 증가한 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 유의한 감소가 보이는 것을 확인하였다(도 12).

[164]

[165] 3-3-3. 신장 섬유화의 지표 확인(2)

[166] 실시예 3-1에서 얻은 각 군의 신장 조직으로부터 신장 섬유화 관련 단백질 지표인 Collagen1, Fibronectin, α -SMA 및 Vimentin의 발현을 western blotting으로 확인하였다.

[167] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 Collagen1, Fibronectin, α -SMA, Vimentin의 발현량이 현저히 증가한 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 13).

[168] 따라서, 본 발명의 KBL409는 신장 섬유화를 효과적으로 억제하여 신장 손상에 의한 만성 신부전의 진행을 억제하는 데 유용함을 알 수 있었다.

[169]

[170] 3-4. 신장 내 대식세포의 변화 확인

[171] 신장 사이질을 침윤하는 F4/80-양성 대식세포의 수는 신장 손상의 마커로서의 역할을 한다. 이에, 만성 신부전의 대표적인 표지자인 대식세포의 침윤 정도에 대한 KBL409의 효과를 확인하기 위하여, 실시예 3-1에서 확보한 각 군의 신장 조직 샘플을 이용하여 대식세포의 변화를 관찰하였다.

[172]

[173] 3-4-1. F4/80, Cd68 및 Mcp1 발현량 분석

[174] 실시예 3-1에서 얻은 각 군의 신장 조직으로부터 대식세포 침윤 정도의 지표인 F4/80, Cd68, 및 monocyte에 대한 chemokine인 Mcp1의 mRNA의 신장 내 발현을 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR) 분석으로 확인하였다.

[175] 그 결과, F4/80, Cd68 및 Mcp1의 mRNA 발현량이 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 크게 증가한 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 14).

[176]

[177] 3-4-3. 조직병리학적 검사

- [178] 상기 실시예 3-3-1과 동일한 방법으로 실시예 3-1에서 얻은 신장 조직 샘플을 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매(formalin fixed paraffin embedded(FFPE))를 거쳐 4 μm 두께의 조직 절편으로 제작한 후 대식세포 침윤 정도의 지표인 F4/80 및 CD68의 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.
- [179] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 세뇨관 사이질 내의 대식세포의 침착이 대조군(Con)에 비해 현저히 증가하였지만, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 침윤의 정도가 크게 감소한 것을 확인하였다(도 15).
- [180] 따라서, KBL409의 투여는 만성 신부전에서 대식세포의 침윤을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [181]
- [182] 3-5. 신장 내 인플라마솜(inflammasome) 발현의 변화 확인
- [183] 인플라마솜은 다양한 조합의 염증-유발 자극을 인식하고 caspase-1의 활성화를 통해 중요한 전염증성 사이토카인, 예컨대 IL-1 β 및 IL-18의 생산을 조절하는 단백질 복합체이며, 만성 신부전에서 세포 사멸의 중요 기전 중 하나인 pyroptosis는 인플라마솜에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 이에, 신장 내 인플라마솜 발현에 대한 KBL409의 효과를 확인하기 위하여, 실시예 3-1에서 확보한 각 군의 신장 조직 샘플을 이용하여 Tlr4, Asc, Nlrp3, IL-18의 발현 분석 및 NRLP3 인플라마솜의 발현 분석을 수행하였다.
- [184]
- [185] 3-5-1. Tlr4, Asc, Nlrp3 및 IL-18 발현량 분석
- [186] 실시예 3-1에서 얻은 각 군의 신장 조직으로부터 주로 지질다당류(lipopolysaccharide) 등을 감지하여 인플라마솜의 활성화를 유도하는 Tlr4 유전자, 인플라마솜의 구성 요소인 Asc 및 Nlrp3, 인플라마솜에 의한 염증반응 과정의 주요 사이토카인인 IL-18의 mRNA 발현을 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR) 분석으로 확인하였다.
- [187] 그 결과, Tlr4, Asc, Nlrp3 및 IL-18의 mRNA 발현량은 대조군(Con) 대비 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 크게 증가한 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 16). 이로써, 본 발명의 KBL409의 투여는 만성 신부전 유도 신장 내 Tlr4, Asc, Nlrp3, IL-18의 발현을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [188]
- [189] 3-5-2. 조직병리학적 검사
- [190] 상기 실시예 3-3-1과 동일한 방법으로 준비한 신장 조직 샘플을 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매(formalin fixed paraffin embedded(FFPE))를 거쳐 4 μm 두께의 조직 절편으로 제작한 후 인플라마솜의 구성 요소인 NRLP3의 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

- [191] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 대조군(Con)에 비해 만성 신부전 유도 신장 조직 내 NRLP3 발현이 현저히 증가하였지만, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 크게 감소한 것을 확인하였다(도 17). 이로써, KBL409의 투여는 만성 신부전 유도시 증가된 NRLP3의 발현을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [192]
- [193] 3-6. 신장 내 미토콘드리아의 변화 확인
- [194] 미토콘드리아의 중요한 기능 중의 하나는 포도당 또는 지방산과 같은 연료 대사물질로부터 나온 에너지를 ATP로 전환시키는 산화 인산화 공정을 수행하는 것이다. 이러한 미토콘드리아의 기능 이상이 신장 질환의 발병 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에, 만성 신부전이 유도된 신장 내 미토콘드리아의 형태 변화에 대한 KBL409의 효과를 확인하기 위하여, 실시예 3-1에서 확보한 각 군의 신장 조직 샘플을 투과 전자 현미경(transmission electron microscope)으로 관찰하였다.
- [195] 그 결과, 도 18로부터 확인할 수 있듯이, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 신장 내 미토콘드리아의 크기가 감소하고 내막이 파괴되어 cristae가 소실된 것을 확인할 수 있었다. 반면, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 미토콘드리아의 구조가 회복된 것을 확인하였다(도 18). 따라서, KBL409의 투여는 만성 신부전 발병시 발생하는 미토콘드리아의 기능 이상을 회복시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [196]
- [197] 3-7. 전신성 염증반응의 변화 확인
- [198] 신장에서 만성 염증으로 인해 대식세포와 림프구가 활성화되면 IL-1 β TNF- α 등 다양한 사이토카인이 분비되고, 신장 섬유화가 촉진되며 콜라겐의 축적이 일어나게 되어 신장이 망가지게 된다. 이에, 만성 신부전이 유도된 마우스 모델의 전신성 염증반응에 대한 KBL409의 효과를 확인하기 위하여, 전신성 염증반응을 유도하는 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α 의 농도를 효소 결합 면역침강 분석법(ELISA)을 이용하여 측정하였다.
- [199] 그 결과, 아데닌 사료 투여군(CKD)에서는 대조군(Con)에 비해 IL-6 및 TNF- α 의 농도가 모두 크게 상승하였으나, 아데닌 사료 및 KBL409 투여군(CKD+KBL409)에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 19). 따라서, KBL409 군주가 만성 신부전 모델에서 IL-6 및 TNF- α 를 억제하여 전신성 염증반응을 완화하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [200]
- [201] 실시예 4. 혈중 요독 물질 농도 변화의 비교 실험
- [202] 4-1. 혈중 p-크레졸 농도 변화의 비교
- [203] 혈액에서 검출되는 p-크레졸은 신장 질환 증상 정도에 따라 3-300 μ M 사이인 것으로 확인되어, 해당 농도 구간에 맞춘 calibration curve를 도출하였다. 희생 전

수집한 혈액 시료를 이용하여 *p*-크레졸 농도를 측정하였다. 동물 시험 마우스 혈청 50 μ L에 진한 황산 2.5 μ L를 넣고 90 °C30 min 가열한 후 준비한 internal standard (0.2 mg/mL 2,6-dimethylphenol, Sigma-Aldrich)를 2.5 μ L 넣고, 분석 용매로서의 ethyl acetate를 50 μ L 넣어 1분간 vortex로 섞어주었다. 이를 15,000 rpm에서 2분간 원심분리 후 GC vial (with 250 μ L glass insert)에 상층액을 담았다. GC-MS 정량은 실시예 1의 균주 선별 시 사용된 분석 과정과 동일하게 진행하였다.

- [204] 상기 calibration curve를 기반으로 각 시료별 *p*-크레졸 농도를 측정한 결과, 도 20으로부터 알 수 있듯이, 정상 마우스(Con+PBS)에서는 균주 투여 여부에 무관하게 *p*-크레졸이 매우 낮은 농도로 검출되는 반면, CKD 유도 마우스 시료(CKD+PBS)에서의 전반적인 *p*-크레졸 농도는 높게 상승하는 것을 확인하였다. 대장균 투여군(CKD+positive)과 KBL409 균주 투여군(CKD+KBL409) 간의 *p*-크레졸 농도를 비교했을 때, KBL409 균주를 투여한 군에서 *p*-크레졸 농도가 낮게 측정되는 것이 관찰되었다(도 20A). KBL409 균주와 다른 2종의 락토바실러스 애시도필러스 균주들(ATCC832 및 ATCC4357)을 투여한 마우스의 혈중 농도를 비교했을 때, 만성 신부전 유도시 균주를 투여하지 않은 군(CKD+PBS)의 *p*-크레졸 농도에 비해 KBL409 균주 투여시(CKD+KBL409) 혈중 *p*-크레졸 농도가 감소된 것이 확인되었으며, 다른 2종의 락토바실러스 애시도필러스 균주들을 투여한 마우스(CKD+ATCC832 및 CKD+ATCC4357)에서는 혈중 *p*-크레졸 농도 감소에 큰 효과가 없는 것으로 확인되었다: CKD+PBS: 19.8 μ M; CKD+KBL409: 15.9 μ M; CKD+ATCC832; 18.2 μ M; CKD+ATCC4357: 23.7 μ M(도 20B). 따라서, 본 발명의 KBL409 균주는 다른 락토바실러스 애시도필러스 균주에 비하여 *p*-크레졸 감소 효과 측면에서 현저히 우수함을 확인하였다.

[205]

[206] 4-2. 혈중 TMAO 농도 변화의 비교

[207] 혈중 TMAO는 신장 질환 정도에 따라 1-90 μ M 사이 인 것으로 확인되어, 해당 농도 구간에 맞춘 calibration curve를 도출하였다. 희생 전 수집한 혈액 시료를 이용하여 혈중 TMAO 농도를 측정하였다. 동물 시험 마우스 혈청 30 μ L에 ice cold MeOH 120 μ L (LC grade)를 넣고 vortex 1min. 20,000g, 4°C20min간 centrifuge 후 상층액 100 μ L를 vivaspin 500, 3KDa에 로딩하고 15,000g, 4°C30min 간 centrifuge후 얻은 filtrate를 total recovery vial에 담아 TMAO 분석을 위한 시료로 사용하였다.

[208] 액체크로마토그래피를 사용하여 혈청의 TMAO를 측정하였다. 분석장비는 UPLC-qTOF를 사용하였으며, Positive ESI ionization, sensitive mode로 분석을 진행하였다. 이동상으로는 (A) 0.045% ammonium hydroxide, 0.025% formic acid (pH8.1), (B) pure acetonitrile를 사용하였으며, 초기조건 95% (B)에서 2.5분에 45% (B), 5분에 다시 95% (B)가 되도록 하였으며, 그리고 5.5분 까지 95% (B)를

유지하도록 하였고, flow rate 0.4mL/min으로 분석하였다. 분석 컬럼은 ACQUITY UPLC BEH Amide Column 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm (186004801, waters)를 사용하였다. MS parameters로는 Capillary vorage 2KV, Sampling cone 15, Source offset 10, Source temperature 150°CDesolvation temperature 200°C00, Nebuliser 7 로 하였다.

[209] 각 시험군에서 혈중 TMAO 농도 및 KBL409의 효과를 확인하였다. 우선, KBL409를 고농도 및 저농도로 투여한 동물 실험 시료의 혈중 TMAO 농도를 확인하였다. 만성 신부전 유도시 TMAO 농도 증가가 확인되었으며 (CKD+PBS) 특히 고농도의 KBL409를 투여한 마우스에서는 뚜렷한 TMAO의 혈중 농도 감소가 확인되었다 (CKD + High KBL409)(도 21A). 다음으로, KBL409를 포함하는 세 종의 *L. acidophilus*를 투여한 만성 신부전 유도 마우스에서 혈중 TMAO 농도를 확인하였다. 만성 신부전 유도로 TMAO 농도 증가가 확인되었으며 투여한 세 종의 *L. acidophilus* 균주 모두에서 TMAO 농도가 감소되었으나, 특히 KBL409 균주를 투여한 마우스에서 혈중 TMAO 농도가 가장 크게 감소한 것이 확인되었다(도 21B).

[210]

[211] 실시예 5. KBL409과 추가의 프로바이오틱 균주의 병용 투여

[212] 5-1. 만성 신부전 유도 마우스 모델 제작 및 균주의 투여

[213] 본 실험에서는 평균 체중 20g 내외의 7주령 C57BL/6 마우스를 각 군당 10마리씩, 음성 대조군(Control), 만성 신부전 유도군(CKD), Renady1™(KIBOW BIOTECH, 미국) 투여 양성 대조군(CKD+positive control), KBL409 단독 투여군(CKD+KBL409), KBL409+KBL382 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed1(382)), KBL409+KBL396 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed2(396))의 총 6군으로 나누어 실험을 진행하였다. 만성 신부전 유도 실험군은 아데닌 사료를 투여하여 만성 신부전을 유도하였으며, 아데닌 사료는 통상적인 식이에 0.2%의 아데닌을 추가한 식이가 되도록 하였다. KBL409 균주는 1x10⁹ CFU를 매일 경구 투여하였다. 병용 균주(KBL409+KBL382 또는 KBL409+KBL396)의 경우, KBL409를 7x10⁸ CFU로, KBL382 또는 KBL396는 3x10⁸ CFU로 동시에 투여하여 전체 균수로 1x10⁹ CFU를 매일 투여하였다. 양성대조군인 Renady1 또한 복합균주로 전체 균수가 1x10⁹ CFU가 되도록 매일 경구 투여하였다. 모든 투여 균주의 준비는 0.05% L-cysteine이 포함된 PBS에 현탁하여 준비하였다. 모든 군의 마우스는 6주간 사육 후 희생시키고 신장을 적출하였다.

[214]

[215] 5-2. 신장 질환 마커의 발현 변화 확인

[216] 5-2-1. Nlrp3, Pre-IL18, Ppargc1a, Tfam 및 Mfn1 발현량 분석

[217] 실시예 5-1에서 확보한 각 군의 신장 조직으로부터 만성 신부전의 발병에 주요한 영향을 미치는 인플라마솜 복합체의 구성 요소인 Nlrp3, 및 인플라마솜에

의한 염증반응 과정의 주요 사이토카인인 IL-18의 전구체 Pre-IL18의 mRNA 발현량을 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR)로 분석하였다.

- [218] 그 결과, Nlrp3 및 Pre-IL18의 mRNA 발현은 대조군(Control) 대비 만성 신부전 유도군(CKD)에서 증가한 반면, 양성 대조군(CKD+positive control), KBL409 단독 투여군(CKD+KBL409), KBL409+KBL382 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed1(382)), KBL409+KBL396 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed2(396))에서는 감소한 것을 확인하였다(도 22). 그 중에서도, KBL409+KBL382 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed1(382))에서 다른 그룹에 비해 우수한 Ppargc1a, Tfam 및 Mfn1의 발현 증가 효과가 관찰되었다(도 23). 이로써, 본 발명의 KBL409 및 KBL382의 병용 투여는 균주를 단독 투여하였을 때보다 만성 신부전 유도 신장 모델에서 Ppargc1a, Tfam 및 Mfn1의 발현을 더욱 효과적으로 증가시켜, 이러한 상승 작용으로 미토콘드리아 기능 손상에 따른 신장 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[219]

[220] 5-2-2. Fn 및 Procol1 발현량 및 Bax/Bcl2 비율 분석

- [221] 세포사멸(apoptosis)은 허혈성 신기능장애를 유발한다고 알려져 있는데, 신장 허혈은 Bax를 활성화시키고 Bcl2를 감소시킴으로써 Bax/Bcl2 비율을 증가시켜 세포사멸을 유도한다. 즉, 신장 상피세포에서 Bax는 막 투과성을 증가시키는 친-세포사멸 단백질, Bcl-2는 Bax에 의한 “막 공격”을 길항하는 항-세포사멸 단백질이며, Bax/Bcl2 비율은 세포 사망의 주요 결정인자가 된다. 본 실험에서는, 상기 각 군의 신장 조직으로부터, 대표적인 섬유성 질환의 바이오마커인 Fn(피브로넥틴) 및 Procol1의 mRNA 발현량과 Bax 및 Bcl2의 발현량을 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR)로 분석 확인하였다.

- [222] 그 결과, Fn, Procol1의 mRNA 발현량 및 Bax/Bcl2 비율은 대조군(Control) 대비 만성 신부전 유도군(CKD)에서 증가한 반면, 양성 대조군(CKD+positive control), KBL409 단독 투여군(CKD+KBL409), KBL409+KBL382 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed1(382)), KBL409+KBL396 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed2(396))에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 그 중에서도, KBL409+KBL382 병용 투여군(CKD+KBL409+mixed1(382))에서 다른 그룹에 비해 우수한 Fn, Procol1 및 Bax/Bcl2의 억제 효과가 관찰되었다(도 24). 이로써, 만성 신부전 유도 동물 모델에서 본 발명의 KBL409 및 KBL382의 병용 투여는 균주를 단독 투여하였을 때보다 더욱 효과적으로 Fn, Procol1 및 Bax의 발현을 억제시키고 Bcl2의 발현을 증가시킴으로써 이러한 상승 작용으로 신장 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[223]

- [224] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[225]

[226] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[227] 수탁번호 : KCTC13518BP

[228] 수탁일자 : 20180427

[229]

[230] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[231] 수탁번호 : KCTC13509BP

[232] 수탁일자 : 20180417

[233]

[234] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[235] 수탁번호 : KCTC13278BP

[236] 수탁일자 : 20170529

[237]

산업상 이용가능성

[238] 본 발명에 따른 락토바실러스 애시도필러스 KBL409(기탁번호 KCTC 13518BP) 균주는 신장의 염증을 감소시키고, 혈중 요소 질소, 크레아티닌, p-크레졸 등의 혈중 요독 물질의 농도를 감소시켜 신장을 보호하고, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및 신장 섬유화 억제 효과를 나타내어, 신기능 개선 및 만성 신부전을 비롯한 신장 질환의 예방 및 치료 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

서열목록 Free Text

[239] 전자파일 첨부하였음.

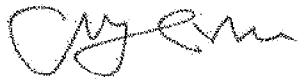
[240]

특허출처상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규정

7.1조에 따른 국제 규정의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 고바이오랩 귀하

I. 미생물의 등장	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Lactobacillus acidophilus</i> KBL409	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC13518BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I항에 표시된 미생물은 하기의 서용의 같이 제출되었음: <input type="checkbox"/> 과학적 성질 <input type="checkbox"/> 분류학상 위치 (적절한 위치에 X표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2018년 4월 27일 자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 경우를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture)	국제 수탁기관의 대표자 서명: 
주소: 대한민국 58212, 전라북도 정읍시 일성길 181 한국생명공학연구원(KRIBB)	담당자 김차영 2018년 4월 27일

위 번역문은 원문과 상위없음을 확인함.
대리인 특허법인 홍장리




[241]

특허질서상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규칙

7.1조에 따른 국제 규칙의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 고바이오랩 (주)

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Lactobacillus paracasei</i> KBL 382	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13509BP
II. 과학적 상질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I항에 표시된 미생물은 하기의 서술과 같이 제출되었음: [] 과학적 상질 [] 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2018년 4월 17일자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture)	국제 수탁기관의 대표자 서명: 
주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 임선길 181 한국 생명공학연구원(KRIIBO)	담당자 김차경 2018년 4월 17일

본 증명서는 원문과 상위없음을 확인함.

대리인 특허법원 출장서명




[242]

특허질차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규정

7.1조에 따른 국제 규정의

원기탁 증명서

대한민국 08826 서울, 관악구, 관악로, 1, 서울대학교, 교광표 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 화명 정보: <i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i> SNUG10271	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13278BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2017년 5월 25일 자료 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture)	국제 수탁기관의 대표자 서명: 
주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 임선길 181 한국생명공학연구원(KRIBB)	담당자 김차영 2017년 6월 26일

위 번역본은 원문과 상이없음을 확인함.

태리일 특허법원 송창리영



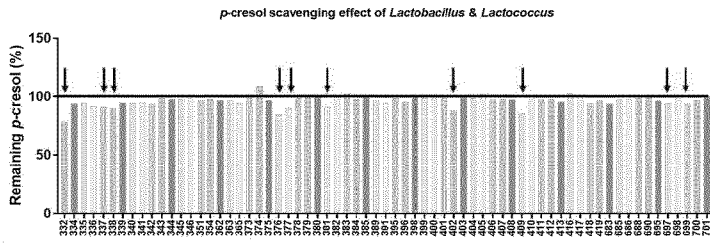
청구범위

- [청구항 1] 기탁번호 KCTC 13518BP인 락토바실러스 에시도필러스 KBL409 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1로 표시되는 16s rDNA 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 3] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 식품용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 식품용 조성물은 신장 기능을 개선하는 것을 특징으로 하는 식품용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 신장 기능의 개선이 신장 염증 감소, 요독 물질의 혈중 농도 감소, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및/또는 신장 섬유화 감소로 인한 것인 식품용 조성물.
- [청구항 6] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 동물사료용 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 함유하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 신장 질환의 예방 또는 치료가 신장 염증 감소, 요독 물질의 혈중 농도 감소, 단백뇨 감소, 신장 미토콘드리아의 기능 회복 및/또는 신장 섬유화 억제에 의한 것인 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 요독 물질이 혈중 요소 질소, 혈중 크레아티닌 및/또는 혈중 p-크레졸인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 신장 질환은 요독증, 만성 신부전, 급성 신부전, 아급성 신부전, 신장 섬유화증, 사구체신염, 신우신염, 간질성 신염, 단백뇨, 당뇨병성 신증, 고혈압성 신증, 악성신경화증, 루프스 신장염, 혈관성 미세혈관병증, 이식 거부, 사구체병증, 신장비대, 신장 증식증, 조영제 유발성 신장병, 독소 유발된 신장 손상, 산소 유리-라디칼 매개된 신장병, 다낭성 신장질환 및 신장염으로 구성된 균에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 추가의 프로바이오틱 균주, 균주의 배양물, 균주의 파쇄물 및 균주의 추출물로 구성된 균에서 선택된 1종 이상을 추가로 함유하는 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 추가의 프로바이오틱 균주는 락토바실러스 파라카제이 및 락토바실러스 플란타럼으로부터 선택되는 1종 이상인, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 락토바실러스 파라카제이는 락토바실러스 파라카제이 KBL382(기탁번호 KCTC13509BP)이고, 상기 락토바실러스 플란타럼은 락토바실러스 플란타럼 KBL396(기탁번호 KCTC13278BP)인,

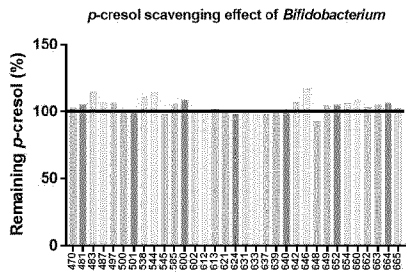
약학적 조성물.

- [청구항 14] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 15] 제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물 및 상기 균주의 추출물로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 신장 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 조성물의 용도.

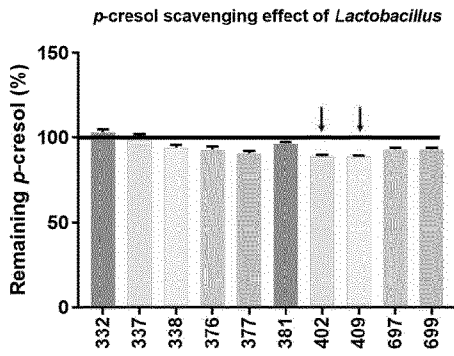
[도1]



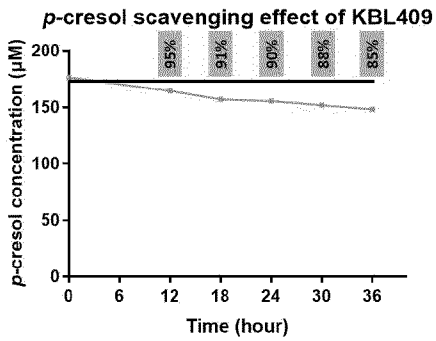
[도2]



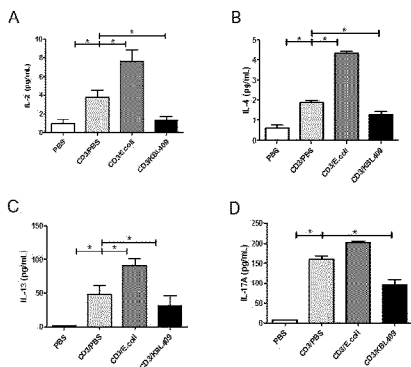
[도3]



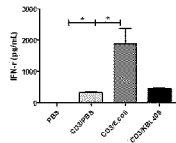
[도4]



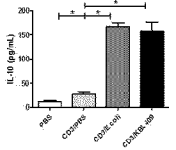
[도5]



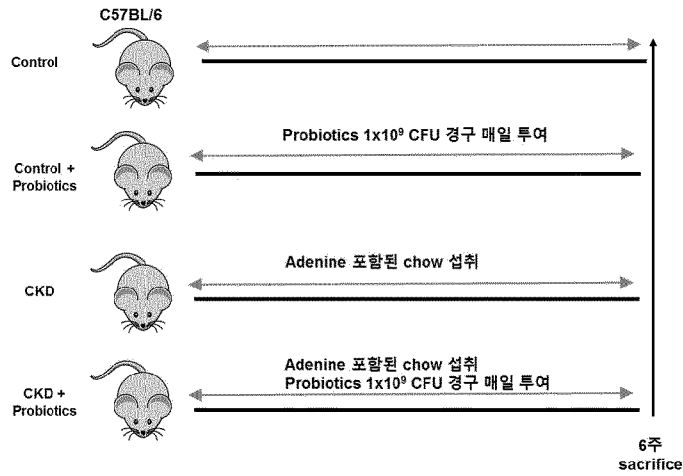
[도6]



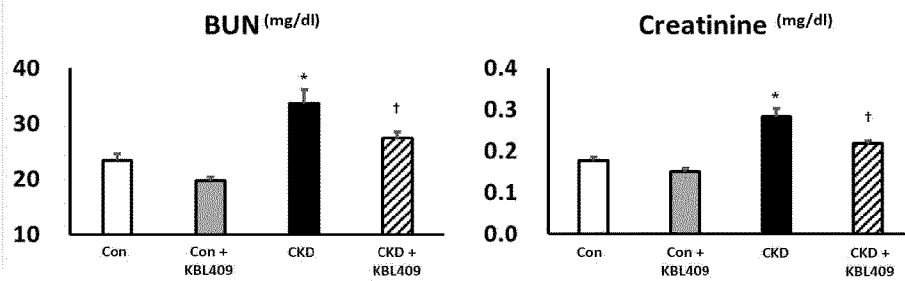
[도7]



[도8]

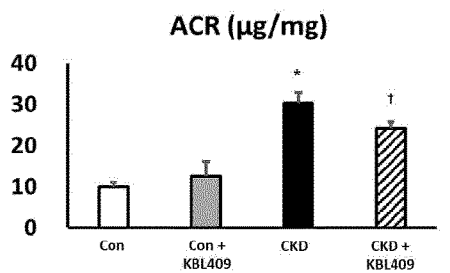


[도9]



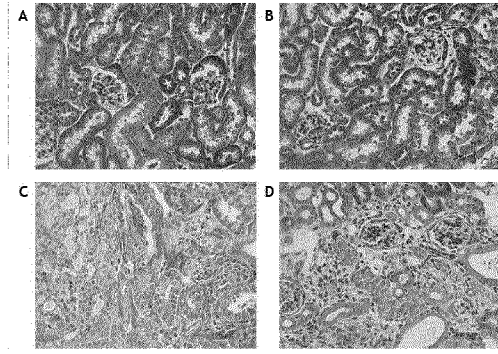
*, P<0.05 vs. Con and CKD + KBL409; †, p<0.05 vs. CKD

[도10]

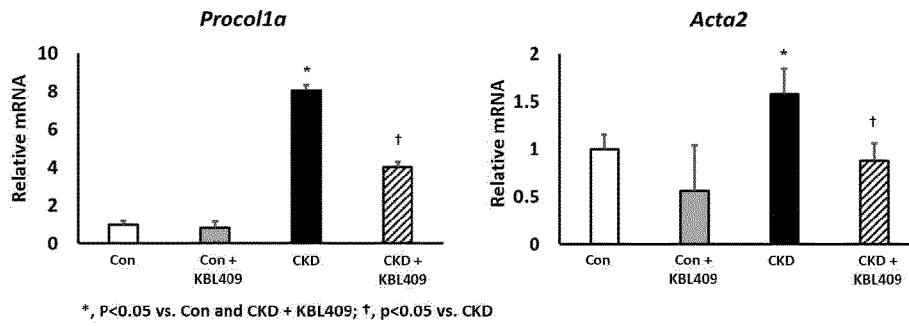


*, P<0.05 vs. Con and CKD + KBL409; †, p<0.05 vs. CKD

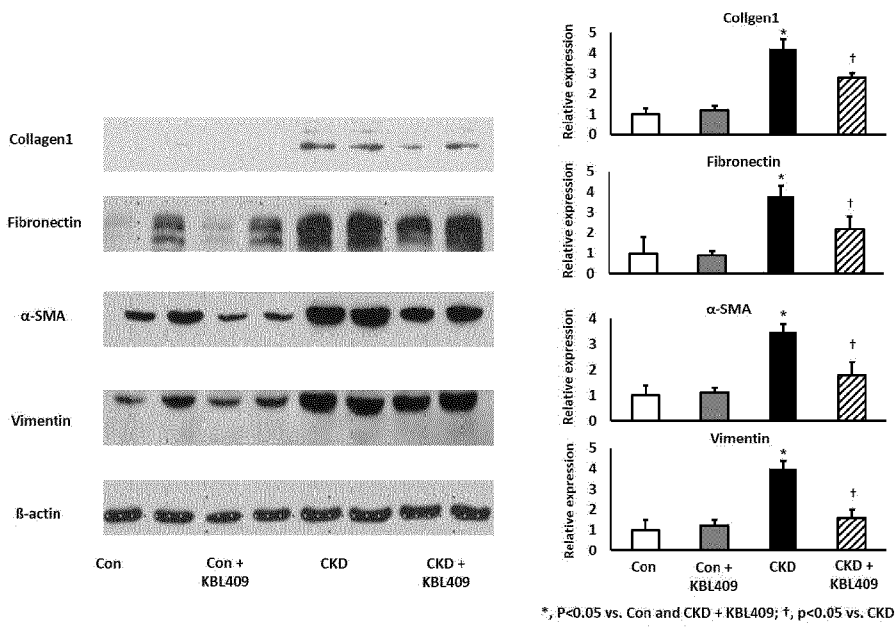
[도 11]



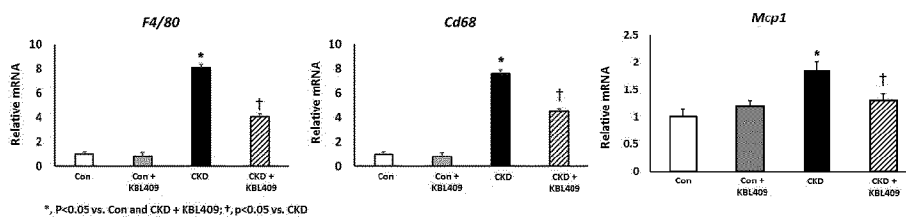
[도 12]



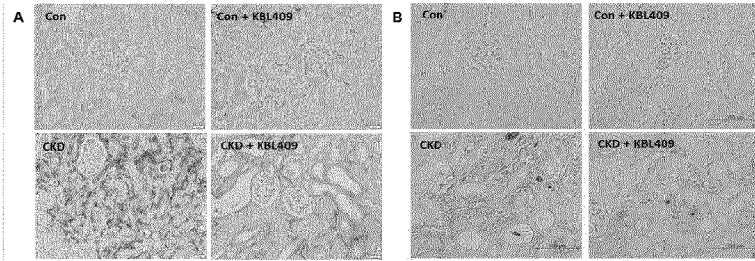
[도 13]



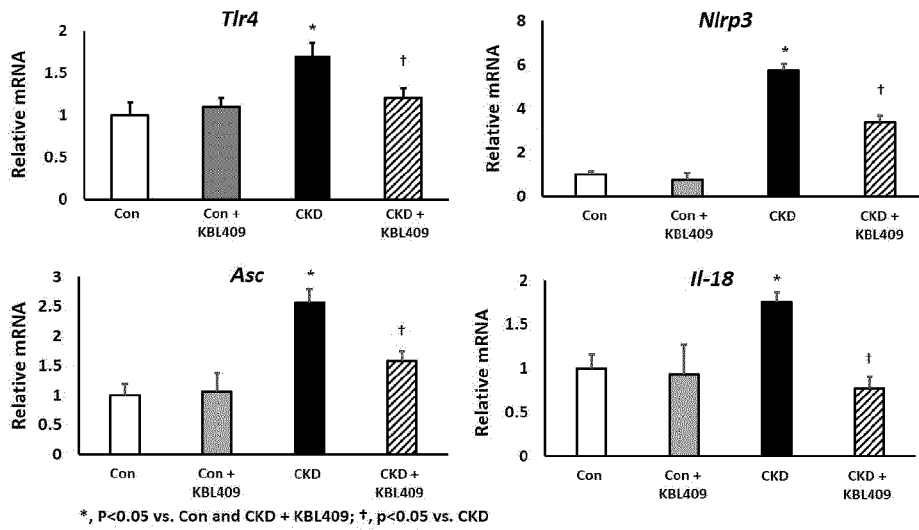
[도 14]



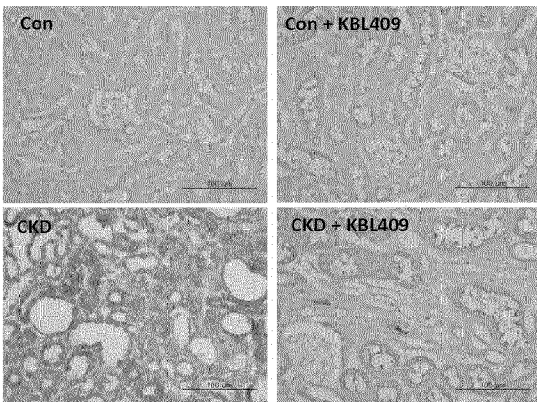
[도 15]



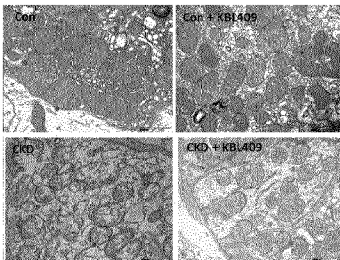
[도 16]



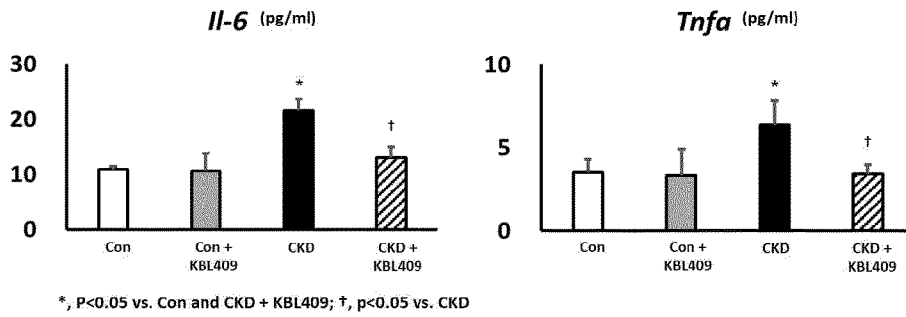
[도 17]



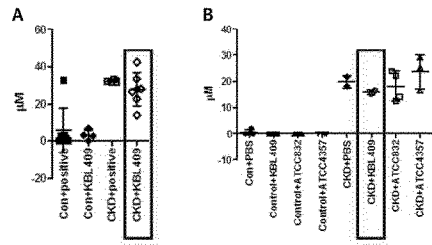
[도 18]



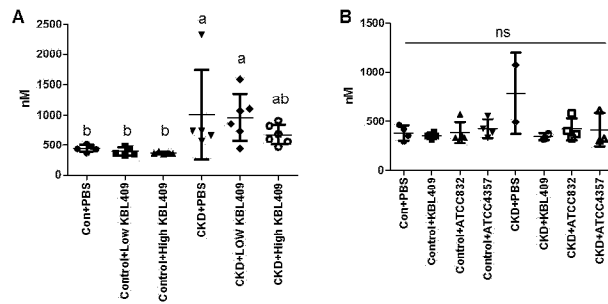
[도19]



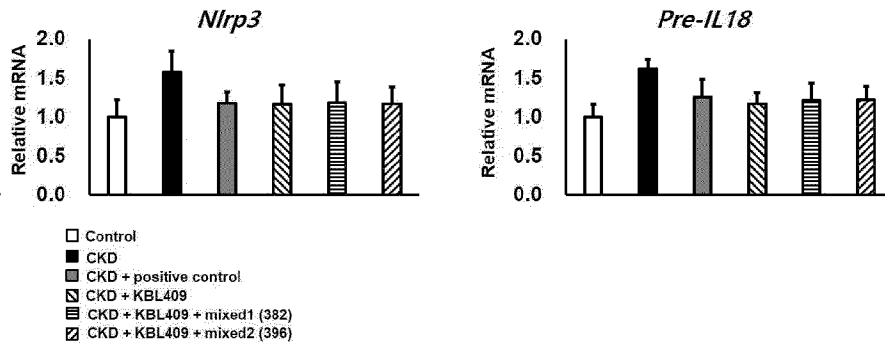
[도20]



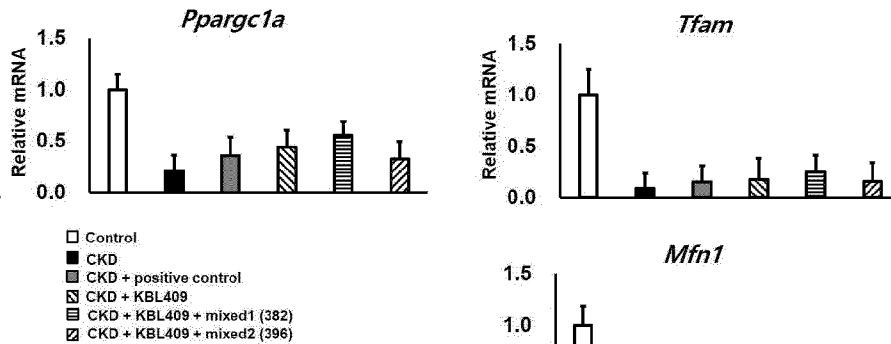
[도21]



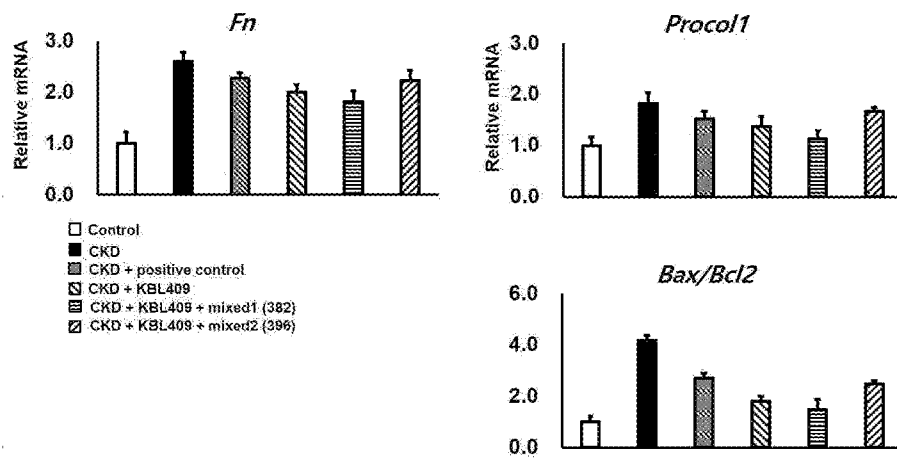
[도22]



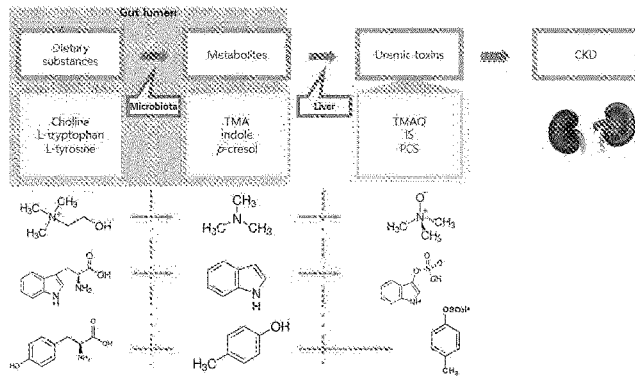
[도23]



[도24]



[도25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/013379

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A23K 10/16(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; C12R 1/225(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 35/74(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 락토바실러스 에시도필러스 (Lactobacillus acidophilus), 16s rDNA, 신장 질환 (kidney disease), 프로바이오틱스(probiotics), p-cresol		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2019-0073363 A (GREEN CROSS WELLBEING CORPORATION) 26 June 2019 (2019-06-26) See abstract; and claims 1-16.	1,3-13,15
Y		2
Y	NCBI. GenBank Accession No. MF804413.1. Lactobacillus acidophilus strain zrx02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 24 July 2018. See entire document.	2
X	US 8481025 B2 (RANGANATHAN, N.) 09 July 2013 (2013-07-09) See abstract; and claims 1-5.	1,3-13,15
X	KR 10-2018-0104544 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 September 2018 (2018-09-21) See abstract; paragraph [0025]; and claims 1-18.	1,3-10,15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2021		Date of mailing of the international search report 13 January 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/013379

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1504912 B1 (KOREA YAKULT CO., LTD.) 23 March 2015 (2015-03-23) See abstract; and claims 1-6.	1-13,15
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/013379

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2019-0073363	A	26 June 2019	EP	3741376	A1	25 November 2020
				KR	10-2019-0125546	A	06 November 2019
				KR	10-2041916	B1	08 November 2019
				KR	10-2100122	B1	13 April 2020
				WO	2019-117654	A1	20 June 2019
US	8481025	B2	09 July 2013	AU	2002-255717	A1	03 November 2003
				AU	2002-255717	B2	26 July 2007
				AU	2011-314299	A1	02 May 2013
				AU	2011-314299	B2	29 January 2015
				CA	2478991	A1	30 October 2003
				CA	2478991	C	30 June 2015
				CA	2812909	A1	19 April 2012
				CA	2812909	C	13 August 2019
				CN	100402042	C	16 July 2008
				CN	103228143	A	31 July 2013
				CN	1622816	A	01 June 2005
				EP	1492549	A1	05 January 2005
				EP	1492549	B1	11 May 2016
				EP	2621285	A1	07 August 2013
				JP	2005-532294	A	27 October 2005
				JP	2013-538827	A	17 October 2013
				KR	10-1940001	B1	18 January 2019
				KR	10-2005-0004805	A	12 January 2005
				KR	10-2008-0111160	A	22 December 2008
				KR	10-2014-0026326	A	05 March 2014
				KR	10-2018-0004840	A	12 January 2018
				US	2005-0074442	A1	07 April 2005
				US	2009-0180990	A1	16 July 2009
				US	2011-0097307	A1	28 April 2011
				US	2012-0328573	A1	27 December 2012
				US	2013-0330299	A1	12 December 2013
				US	2014-0161780	A1	12 June 2014
				US	2017-0106029	A1	20 April 2017
				US	2020-0113953	A1	16 April 2020
				US	8257693	B2	04 September 2012
				US	9655932	B2	23 May 2017
				US	9980988	B2	29 May 2018
				WO	03-088984	A1	30 October 2003
				WO	2012-050701	A1	19 April 2012
				WO	2018-125735	A1	05 July 2018
KR	10-2018-0104544	A	21 September 2018	KR	10-2019-0134563	A	04 December 2019
				KR	10-2121946	B1	12 June 2020
KR	10-1504912	B1	23 March 2015	KR	10-2014-0144496	A	19 December 2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A23K 10/16(2016.01)i; A61K 35/747(2014.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; C12R 1/225(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 35/74(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 락토바실러스 에시도필러스 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>), 16s rDNA, 신장 질환(kidney disease), 프로바이오틱스(probiotics), p-cresol		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2019-0073363 A ((주)녹십자헬빙) 2019.06.26 요약; 청구항 1-16	1,3-13,15
Y		2
Y	NCBI, GenBank Accession No. MF804413.1, `Lactobacillus acidophilus strain zrx02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence`, 2018.07.24 전체 문헌	2
X	US 8481025 B2 (RANGANATHAN, N.) 2013.07.09 요약; 청구항 1-5	1,3-13,15
X	KR 10-2018-0104544 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2018.09.21 요약; 단락 [0025]; 청구항 1-18	1,3-10,15
A	KR 10-1504912 B1 (주식회사한국야쿠르트) 2015.03.23 요약; 청구항 1-6	1-13,15
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년01월12일(12.01.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년01월13일(13.01.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: **14**
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
 청구항 14는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. 청구항:
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0073363 A	2019/06/26	EP 3741376 A1	2020/11/25
		KR 10-2019-0125546 A	2019/11/06
		KR 10-2041916 B1	2019/11/08
		KR 10-2100122 B1	2020/04/13
		WO 2019-117654 A1	2019/06/20
US 8481025 B2	2013/07/09	AU 2002-255717 A1	2003/11/03
		AU 2002-255717 B2	2007/07/26
		AU 2011-314299 A1	2013/05/02
		AU 2011-314299 B2	2015/01/29
		CA 2478991 A1	2003/10/30
		CA 2478991 C	2015/06/30
		CA 2812909 A1	2012/04/19
		CA 2812909 C	2019/08/13
		CN 100402042 C	2008/07/16
		CN 103228143 A	2013/07/31
		CN 1622816 A	2005/06/01
		EP 1492549 A1	2005/01/05
		EP 1492549 B1	2016/05/11
		EP 2621285 A1	2013/08/07
		JP 2005-532294 A	2005/10/27
		JP 2013-538827 A	2013/10/17
		KR 10-1940001 B1	2019/01/18
		KR 10-2005-0004805 A	2005/01/12
		KR 10-2008-0111160 A	2008/12/22
		KR 10-2014-0026326 A	2014/03/05
		KR 10-2018-0004840 A	2018/01/12
		US 2005-0074442 A1	2005/04/07
		US 2009-0180990 A1	2009/07/16
		US 2011-0097307 A1	2011/04/28
		US 2012-0328573 A1	2012/12/27
		US 2013-0330299 A1	2013/12/12
		US 2014-0161780 A1	2014/06/12
		US 2017-0106029 A1	2017/04/20
		US 2020-0113953 A1	2020/04/16
		US 8257693 B2	2012/09/04
US 9655932 B2	2017/05/23		
US 9980988 B2	2018/05/29		
WO 03-088984 A1	2003/10/30		
WO 2012-050701 A1	2012/04/19		
WO 2018-125735 A1	2018/07/05		
KR 10-2018-0104544 A	2018/09/21	KR 10-2019-0134563 A	2019/12/04
		KR 10-2121946 B1	2020/06/12
KR 10-1504912 B1	2015/03/23	KR 10-2014-0144496 A	2014/12/19