

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 4월 25일 (25.04.2019)



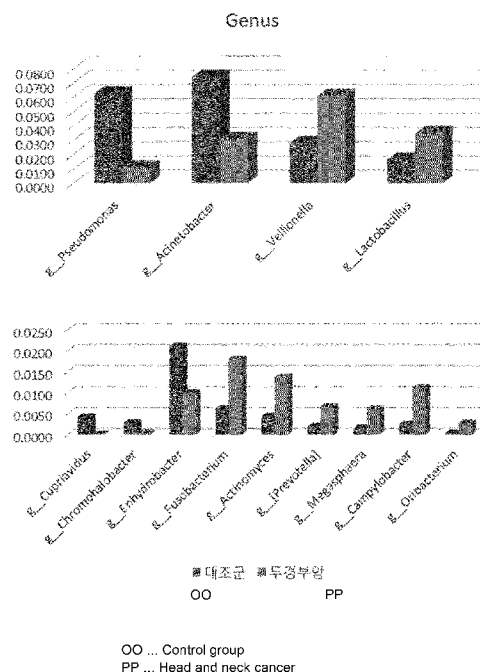
(10) 국제공개번호
WO 2019/078434 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6895 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004837
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 26일 (26.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0135467 2017년 10월 18일 (18.10.2017) KR
10-2018-0047952 2018년 4월 25일 (25.04.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엠디헬스케어 (MD HEALTHCARE INC.) [KR/KR]; 03923 서울시 마포구 월드컵북로56길 9, 1303호 (상암동, 우리기술빌딩), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김윤근 (KIM, Yoon-Keun); 10908 경기도 파주시 한빛로 70, 521동 203호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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).

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING HEAD AND NECK CANCER VIA BACTERIAL METAGENOMIC ANALYSIS

(54) 발명의 명칭: 세균 메타게놈 분석을 통한 두경부암 진단방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing head and neck cancer via bacterial metagenomic analysis and, more particularly, to a method for diagnosing head and neck cancer by performing bacterial metagenomic analysis by means of samples derived from a normal person and a subject and analyzing variations in the contents of extracellular vesicles derived from certain bacteria. Extracellular vesicles secreted from bacteria that are present in the environment may cause chronic inflammation locally, or be absorbed into a body and have a direct influence on carcinogenesis, and head and neck cancer is difficult to diagnose at an early stage prior to the appearance of symptoms thereof and thus makes efficient treatment difficult. The metagenomic analysis of extracellular vesicles, derived from bacteria, using samples derived from human bodies, according to the present invention, allows prediction of the incidence risk of head and neck cancer, thus allows early diagnosis and prediction of a head and neck cancer risk group and can delay the time of onset or prevent the occurrence of the disease through appropriate management, and also can lower the incidence rate of head and neck cancer and increase the effect of treatment by enabling early diagnosis after the onset.

(57) 요약서: 본 발명은 세균 메타게놈 분석을 통해 두경부암을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 정상인 및 피검자 유래 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 특정 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 분석함으로써 두경부암을 진단하는 방법 등에 관한 것이다. 환경에 존재하는 세균에서 분비되는 세포막 소포는 국소적으로 만성염증을 일으키거나 또는 체내에 흡수되어 암 발생에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 두경부암은 증상이 나타나기 전 조기진단이 어려워 효율적인 치료가 어려운 실정이다. 이에, 본 발명에 따른 인체 유래 샘플을 이용한 세균 유래 세포막 소포의 메타게놈 분석을 통해 두경부암 발병의 위험도를 미리 예측함으로써 두경부암의 위험군을 조기에 진단 및 예측하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있으며, 발병 후에도 조기진단 할 수 있어 두경부암의 발병률을 낮추고 치료효과를 높일 수 있다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 세균 메타게놈 분석을 통한 두경부암 진단방법 기술분야

- [1] 본 발명은 세균 메타게놈 분석을 통해 두경부암을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 정상인 및 피검자 유래 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 특정 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 분석함으로써 두경부암을 진단하는 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 뇌 아래에서 가슴 윗부분은 두경부라고 하는데 구강, 후두, 인두, 비강 등이 포함되며 이러한 기관에 암이 생긴 것을 두경부암이라고 한다. 이중 구강암은 구강에 발생하는 암으로서 구강을 싸고 있는 점막을 구성하는 편평세포에서 기원하는 것이 대부분이다. 위험요인으로는 흡연 및 불결한 구강 위생, 지속적인 만성 자극 등이 알려져 있다. 인두암은 인두부위 점막에서 발생하는 악성종양으로 흡연, 음주, 비이러스 감염 등이 위험요인으로 알려져 있다. 우리나라에서는 한국중앙암등록본부에서 발표한 자료에 의하면, 갑상선암을 제외한 두경부암이 매년 3,000명의 환자가 발생하고, 암종에서 발생빈도가 8위에 해당한다. 두경부암 진단은 암이 의심되면 종양에서 조직을 떼어내어 조직검사로 확진한다. 또한, 암의 범위를 파악하기 위하여 전산화단층촬영, 자기공명영상검사, 양성자단층촬영 등의 검사를 수행한다.
- [3] 한편, 인체에 공생하는 미생물은 100조에 이르러 인간 세포보다 10배 많으며, 미생물의 유전자수는 인간 유전자수의 100배가 넘는 것으로 알려지고 있다. 미생물총(microbiota)은 주어진 거주지에 존재하는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)을 포함한 미생물 군집(microbial community)을 말하고, 장내 미생물총은 사람의 생리현상에 중요한 역할을 하며, 인체 세포와 상호작용을 통해 인간의 건강과 질병에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 우리 몸에 공생하는 세균은 다른 세포로의 유전자, 단백질 등의 정보를 교환하기 위하여 나노미터 크기의 소포(vesicle)를 분비한다. 점막은 200 나노미터(nm) 크기 이상의 입자는 통과할 수 없는 물리적인 방어막을 형성하여 점막에 공생하는 세균인 경우에는 점막을 통과하지 못하지만, 세균 유래 소포는 크기가 대개 100 나노미터 크기 이하라서 비교적 자유롭게 점막을 통과하여 우리 몸에 흡수된다.
- [4] 환경 유전체학이라고도 불리는 메타게놈학은 환경에서 채취한 샘플에서 얻은 메타게놈 자료에 대한 분석학이라고 할 수 있다(국내공개특허 제2011-073049호). 최근 16s 리보솜 RNA(16s rRNA) 염기서열을 기반으로 한 방법으로 인간의 미생물총의 세균 구성을 목록화하는 것이 가능해졌으며, 16s 리보솜 RNA의 유전자인 16s rDNA 염기서열을 차세대 염기서열분석(next

generation sequencing, NGS) 플랫폼을 이용하여 분석한다. 그러나 두경부암 발병에 있어서, 타액 등의 인체 유래물에서 세균 유래 세포에 존재하는 메타게놈 분석을 통해 두경부암의 원인인자를 동정하고 두경부암을 진단하는 방법에 대해서는 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 두경부암의 원인인자 및 발병 위험도를 미리 진단하기 위하여, 정상인 및 피검자 유래 샘플인 타액에 존재하는 세균 유래 세포막 소포로부터 유전자를 추출하고 이에 대하여 메타게놈 분석을 수행하였으며, 그 결과 두경부암의 원인인자로 작용할 수 있는 세균 유래 세포막 소포를 동정하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [6] 이에, 본 발명은 세균 유래 세포막 소포에 대한 메타게놈 분석을 통해 두경부암을 진단하기 위한 정보제공방법, 두경부암 진단방법, 및 두경부암 발병 위험도 예측 방법 등을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [7] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 두경부암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [9] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 PCR (Polymerase Chain Reaction) 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [10] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 두경부암 진단방법을 제공한다.
- [11] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 PCR (Polymerase Chain Reaction) 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [12] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 두경부암 발병 위험도 예측방법을 제공한다.
- [13] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (c) 상기 PCR (Polymerase Chain Reaction) 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량

증감을 비교하는 단계.

- [14] 본 발명의 일 구현예로, 상기 샘플은 타액일 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(Cyanobacteria) 및 푸소박테리아(Fusobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 문(phylum) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하여 두경부암을 진단하는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 구현예로, 상기 (c) 단계에서 할로박테리아(Halobacteria), 클로로플라스트(Chloroplast), 푸소박테리아(Fusobacteriia), 및 입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하여 두경부암을 진단하는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서 할로박테리아레스(Halobacteriales), 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta), 슈도모나달레스(Pseudomonadales), 오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales), 푸소박테리아레스(Fusobacteriales), 및 캄필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하여 두경부암을 진단하는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서 슈도모나다시예(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시예(Halobacteriaceae), 옥살로박테라시예(Oxalobacteraceae), 할로모나다시예(Halomonadaceae), 코마모나다시예(Comamonadaceae), 락토바실라시예(Lactobacillaceae), 파라프레보텔라시예(Paraprevotellaceae), 푸소박테리아시예(Fusobacteriaceae), 및 캄필로박테라시예(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하여 두경부암을 진단하는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서 쿠프리아비두스(Cupriavidus), 크로모할로박터(Chromohalobacter), 슈도모나스(Pseudomonas), 아시네토박터(Acinetobacter), 엔하이드로박터(Enhydrobacter), 락토바실러스(Lactobacillus), 베일로넬라(Veillonella), 푸소박테리움(Fusobacterium), 액티노마이세스(Actinomyces), 프레보텔라(Prevotella), 메가스페라(Megasphaera), 캄필로박터(Campylobacter), 및 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하여 두경부암을 진단하는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(Cyanobacteria) 및 푸소박테리아(Fusobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 문(phylum) 세균 유래 세포밖 소포,

- [21] 할로박테리아(Halobacteria), 클로로플라스트(Chloroplast),
푸소박테리아(Fusobacteriia), 및
입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터
선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
- [22] 할로박테리아레스(Halobacteriales), 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales),
스트렙토피타(Streptophyta), 슈도모나달레스(Pseudomonadales),
오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales), 푸소박테리아레스(Fusobacteriales), 및
캠필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종
이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
- [23] 슈도모나다시에(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시에(Halobacteriaceae),
옥살로박테라시에(Oxalobacteraceae), 할로모나다시에(Halomonadaceae),
코마모나다시에(Comamonadaceae), 락토바실라시에(Lactobacillaceae),
파라프레보텔라시에(Paraprevotellaceae), 푸소박테리아시에(Fusobacteriaceae), 및
캠필로박테라시에(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종
이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
- [24] 쿠프리아비두스(Cupriavidus), 크로모할로박터(Chromohalobacter),
슈도모나스(Pseudomonas), 아시네토박터(Acinetobacter),
엔하이드로박터(Enhydrobacter), 락토바실러스(Lactobacillus),
베일로넬라(Veillonella), 푸소박테리움(Fusobacterium),
엑티노마이세스(Actinomyces), 프레보텔라(Prevotella), 메가스페라(Megasphaera),
캠필로박터(Campylobacter), 및 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진
군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량
증감을 비교하는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
- [26] 푸소박테리아(Fusobacteria) 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,
- [27] 푸소박테리아(Fusobacteriia) 및
입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터
선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
- [28] 푸소박테리아레스(Fusobacteriales) 및 캠필로박테라레스(Campylobacteriales)로
이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
- [29] 락토바실라시에(Lactobacillaceae), 파라프레보텔라시에(Paraprevotellaceae),
푸소박테리아시에(Fusobacteriaceae), 및
캠필로박테라시에(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종
이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
- [30] 락토바실러스(Lactobacillus), 베일로넬라(Veillonella),
푸소박테리움(Fusobacterium), 엑티노마이세스(Actinomyces),
프레보텔라(Prevotella), 메가스페라(Megasphaera), 캠필로박터(Campylobacter),
및 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의

속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 증가되어 있는 경우 두경부암으로 진단할 수 있다.

- [31] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
- [32] 시아노박테리아(Cyanobacteria) 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,
- [33] 할로박테리아(Halobacteria) 및 클로로플라스트(Chloroplast)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
- [34] 할로박테리아레스(Halobacteriales), 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta), 슈도모나달레스(Pseudomonadales), 및 오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
- [35] 슈도모나다시예(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시예(Halobacteriaceae), 옥살로박테라시예(Oxalobacteraceae), 할로모나다시예(Halomonadaceae), 및 코마모나다시예(Comamonadaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
- [36] 쿠프리아비두스(Cupriavidus), 크로모할로박터(Chromohalobacter), 슈도모나스(Pseudomonas), 아시네토박터(Acinetobacter), 및 엔하이드로박터(Enhydrobacter)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소되어 있는 경우 두경부암으로 진단할 수 있다.

발명의 효과

- [37] 환경에 존재하는 세균에서 분리되는 세포막 소포는 체내에 흡수되어 암 발생에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 두경부암은 증상이 나타나기 전 조기진단이 어려워 효율적인 치료가 어려운 실정이다. 이에, 본 발명에 따른 인체 유래 샘플을 이용한 세균 유래 세포막 소포의 메타게놈 분석을 통해 두경부암의 원인인자 및 발병의 위험도를 미리 진단함으로써 두경부암의 위험군을 조기에 진단하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있다. 이에 더하여, 두경부암 발병 후에도 조기진단 할 수 있어 두경부암의 발병률을 낮추고 치료효과를 높일 수 있을 뿐 아니라, 두경부암으로 진단받은 환자에서 메타게놈 분석을 통해 원인인자 노출을 피함으로써 암의 경과를 좋게 하거나, 재발을 막을 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1a는, 마우스에 장내 세균과 세균유래 소포 (EV)를 구강으로 투여한 후, 시간별로 세균과 소포의 분포양상을 촬영한 사진이고, 도 1b는 구강으로 투여한 후 12시간째에, 타액 및 여러 장기를 적출하여, 세균과 소포의 체내 분포양상을 평가한 그림이다.
- [39] 도 2는 두경부암환자 및 정상인 타액에서 세균 유래 소포를 분리한 후, 메타게놈 분석을 수행하여 문(phylum) 수준에서 진단적 성능이 유의한 세균

유래 소포(EVs)의 분포를 나타낸 결과이다.

[40] 도 3은 두경부암환자 및 정상인 타액에서 세균 유래 소포를 분리한 후, 메타게놈 분석을 수행하여 강(class) 수준에서 진단적 성능이 유의한 세균 유래 소포(EVs)의 분포를 나타낸 결과이다.

[41] 도 4는 두경부암환자 및 정상인 타액에서 세균 유래 소포를 분리한 후, 메타게놈 분석을 수행하여 목(order) 수준에서 진단적 성능이 유의한 세균 유래 소포(EVs)의 분포를 나타낸 결과이다.

[42] 도 5는 두경부암환자 및 정상인 타액에서 세균 유래 소포를 분리한 후, 메타게놈 분석을 수행하여 과(family) 수준에서 진단적 성능이 유의한 세균 유래 소포(EVs)의 분포를 나타낸 결과이다.

[43] 도 6은 두경부암환자 및 정상인 타액에서 세균 유래 소포를 분리한 후, 메타게놈 분석을 수행하여 속(genus) 수준에서 진단적 성능이 유의한 세균 유래 소포(EVs)의 분포를 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[44] 본 발명은 세균 메타게놈 분석을 통해 두경부암을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 정상인 및 피검자 유래 샘플을 이용해 세균 유래 세포밖 소포로부터 유전자를 추출하고 이에 대하여 메타게놈 분석을 수행하였으며, 두경부암의 원인인자로 작용할 수 있는 세균 유래 세포밖 소포를 동정하였다.

[45] 이에, 본 발명은 (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포밖 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[46] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

[47] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하는 단계를 포함하는 두경부암을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[48] 본 발명에서 사용되는 용어, "두경부암"이란 구강, 후두, 인두, 비강 등의 기관에 암이 생긴 것을 말하며, 구강암, 침샘암, 인두암, 비강암을 포함한다.

[49] 본 발명에서 사용되는 용어, "두경부암 진단"이란 환자에 대하여 두경부암이 발병할 가능성이 있는지, 두경부암이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 두경부암이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법은 임의의 특정 환자에 대한 두경부암 발병 위험도가 높은 환자로서 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 두경부암을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료방식을 선택함으로써 치료를 결정하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.

[50] 본 발명에서 사용되는 용어, "메타게놈(metagenome)"이란 "균유전체"라고도

하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈 또는 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다. 본 발명에서는 바람직하게 혈청에서 분리한 세균 유래 세포막 소포를 이용하여 메타게놈 분석을 실시하였다.

- [51] 본 발명에 있어서, 상기 정상인 및 피검자 샘플은 타액일 수 있고, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [52] 본 발명의 실시예에서는 상기 세균 유래 세포막 소포에 대한 메타게놈 분석을 실시하였으며, 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 및 속(genus) 수준에서 각각 분석하여 실제로 두경부암 발생의 원인으로 작용할 수 있는 세균 유래 소포를 동정하였다.
- [53] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는, 피검자 유래 타액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 세균 메타게놈을 문 수준에서 분석한 결과, *Cyanobacteria*, 및 *Fusobacteria* 문 세균 유래 세포막 소포의 함량이 두경부암환자와 정상인에 사이에 유의한 차이가 있었다(실시예 4 참조).
- [54] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는, 피검자 유래 타액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 세균 메타게놈을 강 수준에서 분석한 결과, *Halobacteria*, *Chloroplast*, *Fusobacteriia*, 및 *Epsilonproteobacteria* 강 세균 유래 세포막 소포의 함량이 두경부암환자와 정상인에 사이에 유의한 차이가 있었다(실시예 4 참조).
- [55] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는, 피검자 유래 타액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 세균 메타게놈을 목 수준에서 분석한 결과, *Halobacteriales*, *Bifidobacteriales*, *Streptophyta*, *Pseudomonadales*, *Oceanospirillales*, *Fusobacteriales*, 및 *Campylobacterales* 목 세균 유래 세포막 소포의 함량이 두경부암환자와 정상인에 사이에 유의한 차이가 있었다(실시예 4 참조).
- [56] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는, 피검자 유래 타액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 세균 메타게놈을 과 수준에서 분석한 결과, *Pseudomonadaceae*, *Halobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Halomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Lactobacillaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Fusobacteriaceae*, 및 *Campylobacteraceae* 과 세균 유래 세포막 소포의 함량이 두경부암환자와 정상인에 사이에 유의한 차이가 있었다(실시예 4 참조).
- [57] 보다 구체적으로 본 발명의 일실시예에서는, 피검자 유래 타액 샘플에

존재하는 소포에 대하여 세균 메타게놈을 속 수준에서 분석한 결과, *Cupriavidus*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Campylobacter*, 및 *Oribacterium* 속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 두경부암환자와 정상인에 사이에 유의한 차이가 있었다(실시예 4 참조).

- [58] 상기 실시예 결과를 통해 상기 동정된 세균 유래 세포막 소포의 분포 변수가 두경부암 발생 예측에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[61] 실시예 1. 세균 및 세균 유래 소포의 체내 흡수, 분포, 및 배설 양상 분석

- [62] 세균과 세균 유래 소포가 점막을 통해 전신적으로 흡수되는 지를 평가하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 마우스의 위장에 형광으로 표지한 세균과 세균 유래 소포를 각각 50 μ g의 용량으로 위장관으로 투여하고 0분, 5분, 3시간, 6시간, 12시간 후에 형광을 측정하였다. 마우스 전체 이미지를 관찰한 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 상기 세균(Bacteria)인 경우에는 전신적으로 흡수되지 않았지만, 세균 유래 소포(EV)인 경우에는, 투여 후 5분에 전신적으로 흡수되었고, 투여 3시간 후에는 방광에 형광이 진하게 관찰되어, 소포가 비뇨기계로 배설됨을 알 수 있었다. 또한, 소포는 투여 12시간까지 체내에 존재함을 알 수 있었다.

- [63] 세균과 세균유래 소포가 전신적으로 흡수된 후, 여러 장기로 침윤된 양상을 평가하기 위하여, 형광으로 표지한 50 μ g의 세균과 세균유래 소포를 상기의 방법과 같이 투여한 다음 12시간째에 마우스로부터 타액(Blood), 심장(Heart), 폐(Lung), 간(Liver), 신장(Kidney), 비장(Spleen), 지방조직(Adipose tissue), 및 근육(Muscle)을 적출하였다. 상기 적출한 조직들에서 형광을 관찰한 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이, 상기 세균(Bacteria)은 각 장기에 흡수되지 않은 반면, 상기 세균 유래 세포막 소포(EV)는 타액, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 지방조직, 및 근육에 분포하는 것을 확인하였다.

[64] 실시예 2. 타액으로부터 소포 분리 및 DNA 추출

- [65] 타액으로부터 소포를 분리하고 DNA를 추출하기 위해, 먼저 10 ml 튜브에 타액을 넣고 원심분리(3,500 x g, 10min, 4°C)를 실시하여 부유물을 가라앉혀 상등액만을 회수한 후 새로운 10 ml 튜브에 옮겼다. 0.22 μ m 필터를 사용하여 상기 회수한 상등액으로부터 세균 및 이물질을 제거한 후, 센트리프루프튜브(centrifuge filters 50 kD)에 옮기고 1500 x g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 50 kD 보다 작은 물질은 버리고 10 ml까지 농축 시켰다. 다시 한 번

0.22 μm 필터를 사용하여 박테리아 및 이물질을 제거한 후, Type 90ti 로터로 150,000 x g, 4°C에서 3시간 동안 초고속원심분리방법을 사용하여 상등액을 버리고 덩어리진 pellet을 생리식염수(PBS)로 녹여 소포를 수득하였다.

- [66] 상기 방법에 따라 타액으로부터 분리한 소포 100 μl 를 100°C에서 끓여서 내부의 DNA를 지질 밖으로 나오게 한 후 얼음에 5분 동안 식혔다. 다음으로 남은 부유물을 제거하기 위하여 10,000 x g, 4°C에서 30분간 원심분리하고 상등액 만을 모은 후 Nanodrop을 이용하여 DNA 양을 정량하였다. 이후 상기 추출된 DNA에 세균 유래 DNA가 존재하는지 확인하기 위하여 하기 표 1에 나타낸 16S rDNA primer로 PCR을 수행하여 상기 추출된 유전자에 세균 유래 유전자가 존재하는 것을 확인하였다.

- [67] [표1]

primer		서열	서열번호
16S rDNA	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG AGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC -3'	2

- [68] 실시예 3. 타액에서 추출한 DNA를 이용한 메타게놈 분석

- [69] 상기 실시예 2의 방법으로 유전자를 추출한 후, 상기 표1에 나타낸 16S rDNA 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하여 유전자를 증폭시키고 시퀀싱(Illumina MiSeq sequencer)을 수행하였다. 결과를 Standard Flowgram Format(SFF) 파일로 출력하고 GS FLX software(v2.9)를 이용하여 SFF 파일을 sequence 파일(.fasta)과 nucleotide quality score 파일로 변환한 다음 리드의 신용도 평가를 확인하고, window(20 bps) 평균 base call accuracy가 99% 미만(Phred score <20)인 부분을 제거하였다. 질이 낮은 부분을 제거한 후, 리드의 길이가 300 bps 이상인 것만 이용하였으며(Sickle version 1.33), 결과 분석을 위해 Operational Taxonomy Unit(OTU)은 UCLUST와 USEARCH를 이용하여 시퀀스 유사도에 따라 클러스터링을 수행하였다. 구체적으로 속(genus)은 94%, 과(family)는 90%, 목(order)은 85%, 강(class)은 80%, 문(phylum)은 75% 시퀀스 유사도를 기준으로 클러스터링을 하고 각 OTU의 문, 강, 목, 과, 속 레벨의 분류를 수행하고, BLASTN와 GreenGenes의 16S DNA 시퀀스 데이터베이스(108,453 시퀀스)를 이용하여 97% 이상의 시퀀스 유사도 갖는 박테리아를 분석하였다(QIIME).

- [70] 실시예 4. 타액에서 분리한 세균유래 소포 메타게놈 분석 기반 두경부암 진단모형

- [71] 상기 실시예 3의 방법으로, 두경부암환자 50명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 215명의 타액에서 소포를 분리한 후 메타게놈 시퀀싱을 수행하였다. 진단모형

개발은 먼저 t-test에서 두 군 사이의 p값이 0.05 이하이고, 두 군 사이에 2배 이상 차이가 나는 군주를 선정하고 난 후, logistic regression analysis 방법으로 진단적 성능 지표인 AUC(area under curve), 정확도, 민감도, 및 특이도를 산출하였다.

- [72] 타액 내 세균유래 소포를 문(phylum) 수준에서 분석한 결과, Cyanobacteria, 및 Fusobacteria 문 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 두경부암에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 2 및 도 2 참조).

- [73] [표2]

	대조군		두경부암		t-test					
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio	AUC	Accuracy	sensitivity	specificity
p__Cyanobacteria	0.0202	0.0322	0.0068	0.0081	0.0000	0.33	0.72	0.82	1.00	0.02
p__Fusobacteria	0.0097	0.0140	0.0235	0.0296	0.0025	2.42	0.69	0.83	0.99	0.12

- [74] 타액 내 세균유래 소포를 강(class) 수준에서 분석한 결과, Halobacteria, Chloroplast, Fusobacteriia, 및 Epsilonproteobacteria 강 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 두경부암에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 3 및 도 3 참조).

[75] [표3]

	대조군		두경부암		t-test					
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio	AUC	Accuracy	sensitivity	specificity
c__Halobacteria	0.0013	0.0035	0.0002	0.0004	0.0000	0.18	0.72	0.81	1.00	0.02
c__Chloroplast	0.0200	0.0321	0.0065	0.0080	0.0000	0.32	0.73	0.82	1.00	0.02
c__Fusobacteriia	0.0097	0.0140	0.0235	0.0296	0.0025	2.42	0.69	0.83	0.99	0.12
c__Epsilonproteobacteria	0.0026	0.0046	0.0112	0.0200	0.0041	4.36	0.74	0.84	0.99	0.20

[76] 타액 내 세균유래 소포를 목(order) 수준에서 분석한 결과, Halobacteriales, Bifidobacteriales, Streptophyta, Pseudomonadales, Oceanospirillales, Fusobacteriales, 및 Campylobacteriales 목 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 두경부암에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 4 및 도 4 참조).

[77] [표4]

	대조군		두경부암		t-test						
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio	AUC	Accuracy	sensitivity	specificity	
o__Halobacteriales	0.0013	0.0035	0.0002	0.0004	0.0000	0.18	0.72	0.81	1.00	0.02	
o__Bifidobacteriales	0.0123	0.0198	0.0034	0.0032	0.0000	0.28	0.70	0.81	1.00	0.00	
o__Streptophyta	0.0200	0.0321	0.0065	0.0080	0.0000	0.32	0.73	0.82	1.00	0.02	
o__Pseudomonadales	0.1615	0.1683	0.0609	0.0819	0.0000	0.38	0.78	0.83	0.98	0.18	
o__Oceanospirillales	0.0071	0.0081	0.0029	0.0029	0.0000	0.41	0.74	0.82	1.00	0.04	
o__Fusobacteriales	0.0097	0.0140	0.0235	0.0296	0.0025	2.42	0.69	0.83	0.99	0.12	
o__Campylobacterales	0.0026	0.0046	0.0112	0.0200	0.0041	4.36	0.74	0.84	0.99	0.20	

[78] 타액 내 세균유래 소포를 과(family) 수준에서 분석한 결과, Pseudomonadaceae, Halobacteriaceae, Oxalobacteraceae, Halomonadaceae, Comamonadaceae, Lactobacillaceae, Paraprevotellaceae, Fusobacteriaceae, 및 Campylobacteraceae 과 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 두경부암에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 5 및 도 5 참조).

[79] [표5]

	대조군		두경부암		t-test					
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio	AUC	Accuracy	sensitivity	specificity
f__Pseudomonadaceae	0.0646	0.1537	0.0116	0.0124	0.0000	0.18	0.76	0.83	1.00	0.08
f__Halobacteriaceae	0.0013	0.0035	0.0002	0.0004	0.0000	0.18	0.72	0.81	1.00	0.02
f__Oxalobacteraceae	0.0060	0.0190	0.0014	0.0024	0.0007	0.23	0.71	0.81	0.99	0.02
f__Halomonadaceae	0.0045	0.0062	0.0012	0.0019	0.0000	0.27	0.79	0.82	0.98	0.12
f__Comamonadaceae	0.0066	0.0133	0.0024	0.0027	0.0000	0.36	0.72	0.81	1.00	0.02
f__Lactobacillaceae	0.0164	0.0156	0.0348	0.0451	0.0069	2.12	0.75	0.82	0.97	0.14
f__[Paraprevotellaceae]	0.0045	0.0054	0.0096	0.0093	0.0004	2.15	0.74	0.82	0.98	0.16
f__Fusobacteriaceae	0.0062	0.0096	0.0179	0.0273	0.0045	2.90	0.68	0.83	0.99	0.14
f__Campylobacteraceae	0.0025	0.0046	0.0112	0.0200	0.0040	4.43	0.74	0.84	0.99	0.20

[80] 타액 내 세균유래 소포를 속(genus) 수준에서 분석한 결과, Cupriavidus,

Chromohalobacter, Pseudomonas, Acinetobacter, Enhydrobacter, Lactobacillus, Veillonella, Fusobacterium, Actinomyces, Prevotella, Megasphaera, Campylobacter, 및 Oribacterium 속 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 두경부암에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 6 및 도 6 참조).

[81] [표6]

	대조군		두경부암		t-test					
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio	AUC	Accuracy	sensitivity	specificity
g__Cupriavidus	0.0041	0.0115	0.0001	0.0003	0.0000	0.02	0.78	0.81	0.98	0.08
g__Chromohalobacter	0.0028	0.0041	0.0004	0.0009	0.0000	0.15	0.80	0.82	0.99	0.10
g__Pseudomonas	0.0626	0.1525	0.0107	0.0116	0.0000	0.17	0.76	0.83	1.00	0.08
g__Acinetobacter	0.0742	0.0878	0.0305	0.0286	0.0000	0.41	0.71	0.82	1.00	0.02
g__Enhydrobacter	0.0210	0.0398	0.0099	0.0092	0.0003	0.47	0.69	0.82	1.00	0.02
g__Lactobacillus	0.0163	0.0156	0.0347	0.0451	0.0006	2.13	0.75	0.82	0.97	0.14
g__Veillonella	0.0278	0.0436	0.0608	0.0550	0.0002	2.19	0.72	0.81	0.98	0.08
g__Fusobacterium	0.0062	0.0096	0.0179	0.0273	0.0045	2.90	0.68	0.83	0.99	0.14
g__Actinomyces	0.0043	0.0061	0.0137	0.0121	0.0000	3.16	0.81	0.83	0.97	0.24
g__[Prevotella]	0.0019	0.0032	0.0066	0.0084	0.0003	3.42	0.74	0.83	0.98	0.22
g__Megasphaera	0.0016	0.0029	0.0061	0.0077	0.0002	3.82	0.77	0.82	0.96	0.20
g__Campylobacter	0.0025	0.0045	0.0112	0.0200	0.0037	4.57	0.75	0.84	0.99	0.20
g__Oribacterium	0.0004	0.0008	0.0027	0.0039	0.0001	7.35	0.77	0.85	0.98	0.28

[82]

[83] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는

기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

- [84] 본 발명에 따른 세균 메타게놈 분석을 통해 두경부암 진단에 대한 정보를 제공하는 방법은 정상인 및 피검자 유래 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 특정 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 분석함으로써 두경부암의 발병 위험도를 예측하고 두경부암을 진단하는데 이용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 두경부암 진단을 위한 정보제공방법:
 (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
 (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
 (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(Cyanobacteria) 및 푸소박테리아(Fusobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 할로박테리아(Halobacteria), 클로로플라스트(Chloroplast), 푸소박테리아(Fusobacteriia), 및 입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 할로박테리아레스(Halobacteriales), 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta), 슈도모나달레스(Pseudomonadales), 오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales), 푸소박테리아레스(Fusobacteriales), 및 캄필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 슈도모나다시예(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시예(Halobacteriaceae), 옥살로박테라시예(Oxalobacteraceae), 할로모나다시예(Halomonadaceae), 코마모나다시예(Comamonadaceae), 락토바실라시예(Lactobacillaceae), 파라프레보텔라시예(Paraprevotellaceae), 푸소박테리아시예(Fusobacteriaceae), 및 캄필로박테라시예(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는

- 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 쿠프리아비두스(*Cupriavidus*),
 크로모할로박터(*Chromohalobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*),
 아시네토박터(*Acinetobacter*), 엔하이드로박터(*Enhydrobacter*),
 락토바실러스(*Lactobacillus*), 베일로넬라(*Veillonella*),
 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 액티노마이세스(*Actinomyces*),
 프레보텔라(*Prevotella*), 메가스페라(*Megasphaera*),
 캄필로박터(*Campylobacter*), 및 오리박테리움(*Oribacterium*)로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량
 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 정상인 및 피검자 샘플은 타액인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(*Cyanobacteria*) 및
 푸소박테리아(*Fusobacteria*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의
 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,
 할로박테리아(*Halobacteria*), 클로로플라스트(*Chloroplast*),
 푸소박테리아(*Fusobacteriia*), 및
 입실론프로테오박테리아(*Epsilonproteobacteria*)로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
 할로박테리아레스(*Halobacteriales*),
 비피도박테리아레스(*Bifidobacteriales*), 스트렙토피타(*Streptophyta*),
 슈도모나달레스(*Pseudomonadales*),
 오세아노스피릴라레스(*Oceanospirillales*),
 푸소박테리아레스(*Fusobacteriales*), 및
 캄필로박테라레스(*Campylobacteriales*)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
 슈도모나다시예(*Pseudomonadaceae*), 할로박테리아시예(*Halobacteriaceae*),
 옥살로박테라시예(*Oxalobacteraceae*), 할로모나다시예(*Halomonadaceae*),
 코마모나다시예(*Comamonadaceae*), 락토바실라시예(*Lactobacillaceae*),
 파라프레보텔라시예(*Paraprevotellaceae*),
 푸소박테리아시예(*Fusobacteriaceae*), 및
 캄필로박테라시예(*Campylobacteraceae*)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
 쿠프리아비두스(*Cupriavidus*), 크로모할로박터(*Chromohalobacter*),
 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*),
 엔하이드로박터(*Enhydrobacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*),

베일로넬라(Veillonella), 푸소박테리움(Fusobacterium),
 액티노마이세스(Actinomyces), 프레보텔라(Prevotella),
 메가스페라(Megasphaera), 캄필로박터(Campylobacter), 및
 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의
 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로
 하는, 정보제공방법.

[청구항 9]

제8항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
 푸소박테리아(Fusobacteria) 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,
 푸소박테리아(Fusobacteriia) 및
 입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
 푸소박테리아레스(Fusobacteriales) 및
 캄필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
 락토바실라시에(Lactobacillaceae),
 파라프레보텔라시에(Paraprevotellaceae),
 푸소박테리아시에(Fusobacteriaceae), 및
 캄필로박테라시에(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
 락토바실러스(Lactobacillus), 베일로넬라(Veillonella),
 푸소박테리움(Fusobacterium), 액티노마이세스(Actinomyces),
 프레보텔라(Prevotella), 메가스페라(Megasphaera),
 캄필로박터(Campylobacter), 및 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의
 함량이 증가되어 있는 경우 두경부암으로 진단하는 것을 특징으로 하는,
 정보제공방법.

[청구항 10]

제8항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
 시아노박테리아(Cyanobacteria) 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,
 할로박테리아(Halobacteria) 및 클로로플라스트(Chloroplast)로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,
 할로박테리아레스(Halobacteriales),
 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta),
 슈도모나달레스(Pseudomonadales), 및
 오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales)로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
 슈도모나다시에(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시에(Halobacteriaceae),

옥살로박테라시에(Oxalobacteraceae), 할로모나다시에(Halomonadaceae), 및 코마모나다시에(Comamonadaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는 쿠프리아비두스(Cupriavidus), 크로모할로박터(Chromohalobacter), 슈도모나스(Pseudomonas), 아시네토박터(Acinetobacter), 및 엔하이드로박터(Enhydrobacter)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소되어 있는 경우 두경부암으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

- [청구항 11] 하기의 단계를 포함하는, 두경부암 진단방법:
 (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
 (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
 (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(Cyanobacteria) 및 푸소박테리아(Fusobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 문(phylum) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 할로박테리아(Halobacteria), 클로로플라스트(Chloroplast), 푸소박테리아(Fusobacteriia), 및 입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 할로박테리아레스(Halobacteriales), 비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta), 슈도모나달레스(Pseudomonadales), 오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales), 푸소박테리아레스(Fusobacteriales), 및 캄필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 15] 제11항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 슈도모나다시에(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시에(Halobacteriaceae),

옥살로박테라시에(Oxalobacteraceae), 할로모나다시에(Halomonadaceae),
코마모나다시에(Comamonadaceae), 락토바실라시에(Lactobacillaceae),
파라프레보텔라시에(Paraprevotellaceae),

푸소박테리아시에(Fusobacteriaceae), 및

캠필로박테라시에(Campylobacteraceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는
1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는
것을 특징으로 하는, 진단방법.

[청구항 16]

제11항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 쿠프리아비두스(Cupriavidus),

크로모할로박터(Chromohalobacter), 슈도모나스(Pseudomonas),

아시네토박터(Acinetobacter), 엔하이드로박터(Enhydrobacter),

락토바실러스(Lactobacillus), 베일로넬라(Veillonella),

푸소박테리움(Fusobacterium), 액티노마이세스(Actinomyces),

프레보텔라(Prevotella), 메가스페라(Megasphaera),

캠필로박터(Campylobacter), 및 오리박테리움(Oribacterium)로 이루어진

군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량
증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 진단방법.

[청구항 17]

제11항에 있어서,

상기 정상인 및 피검자 샘플은 타액인 것을 특징으로 하는, 진단방법.

[청구항 18]

제11항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 시아노박테리아(Cyanobacteria) 및

푸소박테리아(Fusobacteria)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의
문(phylum) 세균 유래 세포막 소포,

할로박테리아(Halobacteria), 클로로플라스트(Chloroplast),

푸소박테리아(Fusobacteriia), 및

입실론프로테오박테리아(Epsilonproteobacteria)로 이루어진 군으로부터

선택되는 1종 이상의 강(class) 세균 유래 세포막 소포,

할로박테리아레스(Halobacteriales),

비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta),

슈도모나달레스(Pseudomonadales),

오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales),

푸소박테리아레스(Fusobacteriales), 및

캠필로박테라레스(Campylobacteriales)로 이루어진 군으로부터 선택되는

1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,

슈도모나다시에(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시에(Halobacteriaceae),

옥살로박테라시에(Oxalobacteraceae), 할로모나다시에(Halomonadaceae),

코마모나다시에(Comamonadaceae), 락토바실라시에(Lactobacillaceae),

파라프레보텔라시에(Paraprevotellaceae),

푸소박테리아시에(*Fusobacteriaceae*), 및
 캄필로박테라시에(*Campylobacteraceae*)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 과(*family*) 세균 유래 세포막 소포, 또는
 쿠프리아비두스(*Cupriavidus*), 크로모할로박터(*Chromohalobacter*),
 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*),
 엔하이드로박터(*Enhydrobacter*), 락토바실러스(*Lactobacillus*),
 베일로넬라(*Veillonella*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*),
 액티노마이세스(*Actinomyces*), 프레보텔라(*Prevotella*),
 메가스페라(*Megasphaera*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 및
 오리박테리움(*Oribacterium*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의
 속(*genus*) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로
 하는, 진단방법.

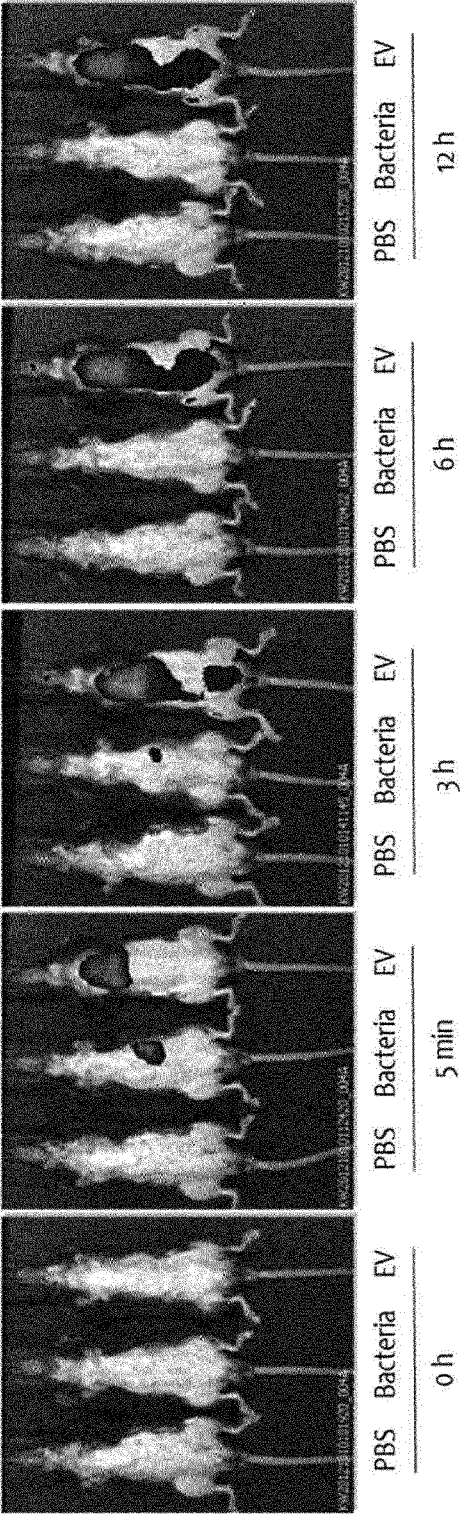
[청구항 19] 제18항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
 푸소박테리아(*Fusobacteria*) 문(*phylum*) 세균 유래 세포막 소포,
 푸소박테리아(*Fusobacteriia*) 및
 입실론프로테오박테리아(*Epsilonproteobacteria*)로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 강(*class*) 세균 유래 세포막 소포,
 푸소박테리아레스(*Fusobacteriales*) 및
 캄필로박테라레스(*Campylobacterales*)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 목(*order*) 세균 유래 세포막 소포,
 락토바실라시에(*Lactobacillaceae*),
 파라프레보텔라시에(*Paraprevotellaceae*),
 푸소박테리아시에(*Fusobacteriaceae*), 및
 캄필로박테라시에(*Campylobacteraceae*)로 이루어진 군으로부터 선택되는
 1종 이상의 과(*family*) 세균 유래 세포막 소포, 또는
 락토바실러스(*Lactobacillus*), 베일로넬라(*Veillonella*),
 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 액티노마이세스(*Actinomyces*),
 프레보텔라(*Prevotella*), 메가스페라(*Megasphaera*),
 캄필로박터(*Campylobacter*), 및 오리박테리움(*Oribacterium*)로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상의 속(*genus*) 세균 유래 세포막 소포의
 함량이 증가되어 있는 경우 두경부암으로 진단하는 것을 특징으로 하는,
 진단방법.

[청구항 20] 제18항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,
 시아노박테리아(*Cyanobacteria*) 문(*phylum*) 세균 유래 세포막 소포,
 할로박테리아(*Halobacteria*) 및 클로로플라스트(*Chloroplast*)로 이루어진
 군으로부터 선택되는 1종 이상의 강(*class*) 세균 유래 세포막 소포,

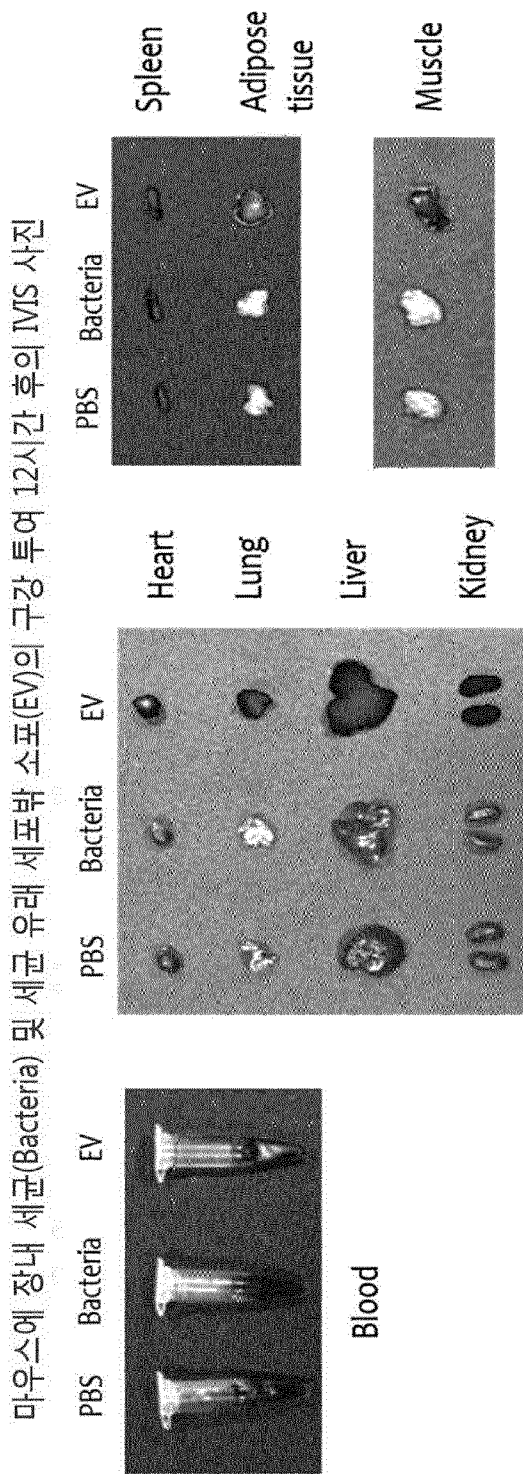
할로박테리아레스(Halobacteriales),
비피도박테리아레스(Bifidobacteriales), 스트렙토피타(Streptophyta),
슈도모나달레스(Pseudomonadales), 및
오세아노스피릴라레스(Oceanospirillales)로 이루어진 군으로부터
선택되는 1종 이상의 목(order) 세균 유래 세포막 소포,
슈도모나다시예(Pseudomonadaceae), 할로박테리아시예(Halobacteriaceae),
옥살로박테라시예(Oxalobacteraceae), 할로모나다시예(Halomonadaceae),
및 코마모나다시예(Comamonadaceae)로 이루어진 군으로부터 선택되는
1종 이상의 과(family) 세균 유래 세포막 소포, 또는
쿠프리아비두스(Cupriavidus), 크로모할로박터(Chromohalobacter),
슈도모나스(Pseudomonas), 아시네토박터(Acinetobacter), 및
엔하이드로박터(Enhydrobacter)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종
이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소되어 있는 경우
두경부암으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단방법.

[도 1a]

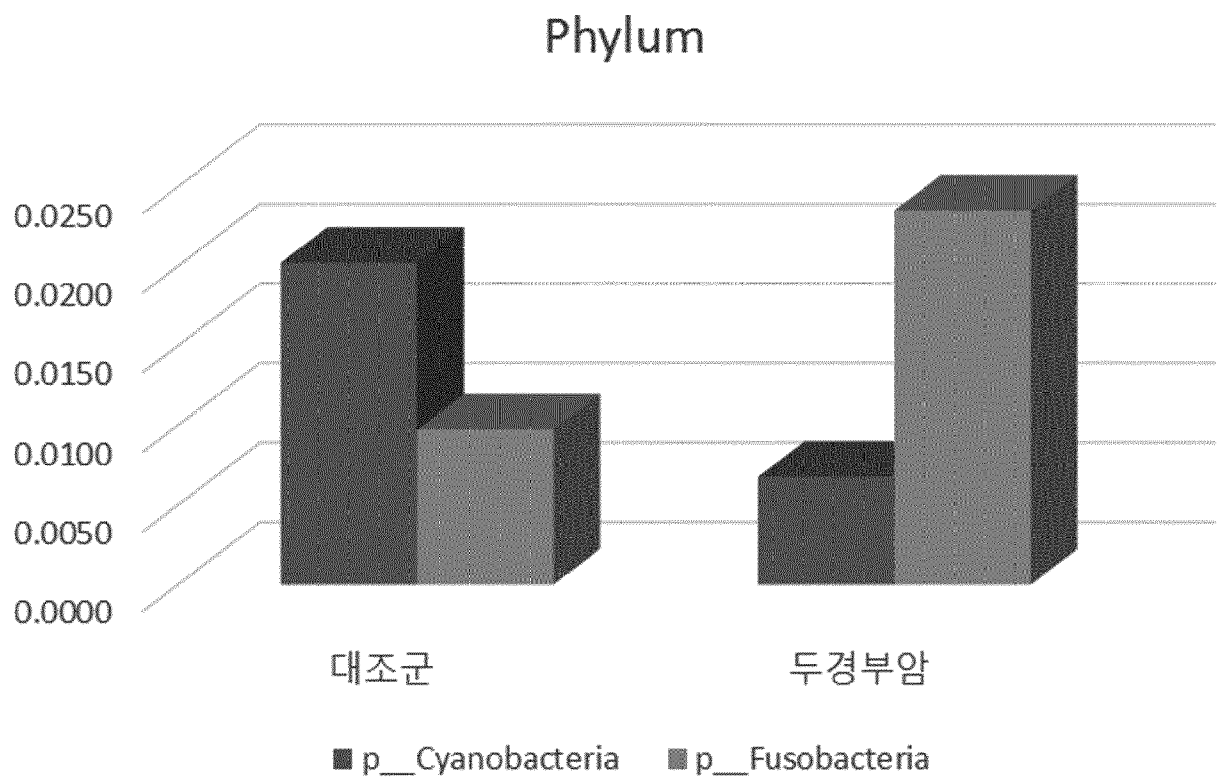
마우스에서 장내세균(Bacteria) 및 세균 유래 소포(EV)의 구강 투여 후의 IVIS 사진



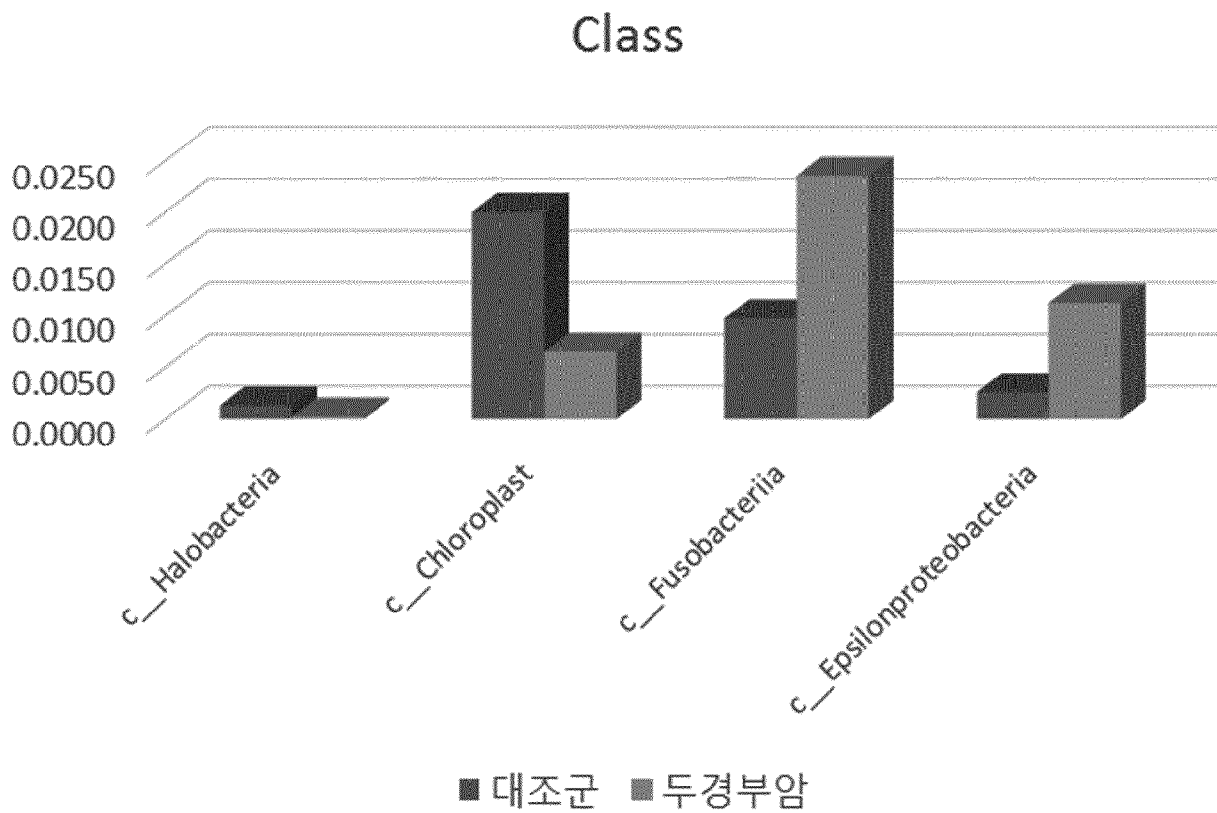
[도1b]



[도2]

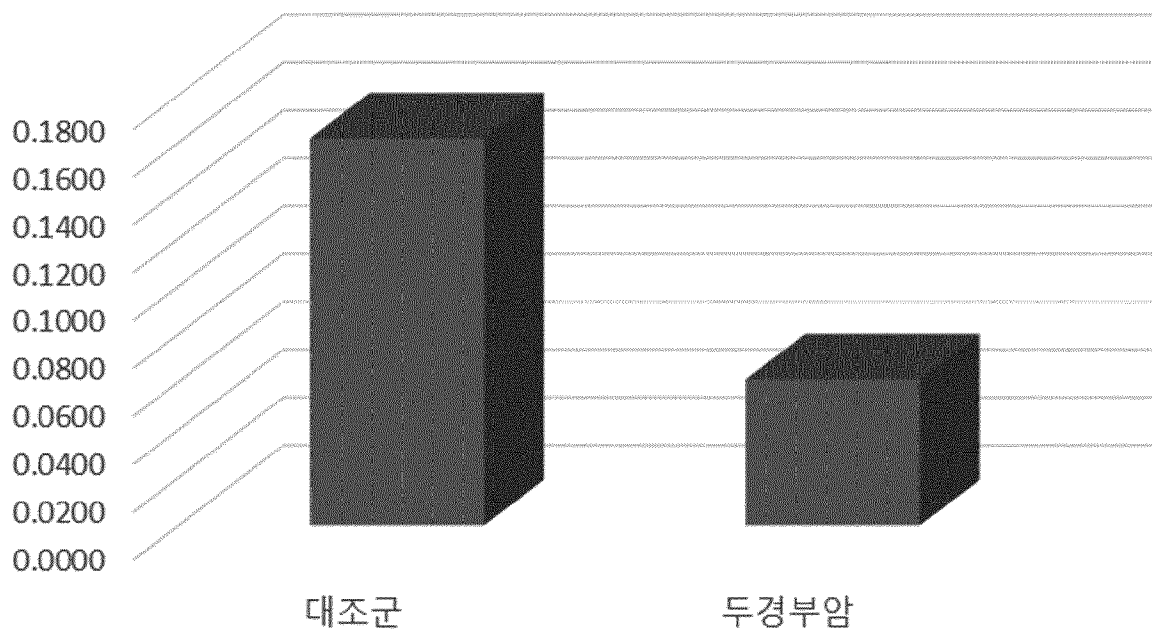


[도3]

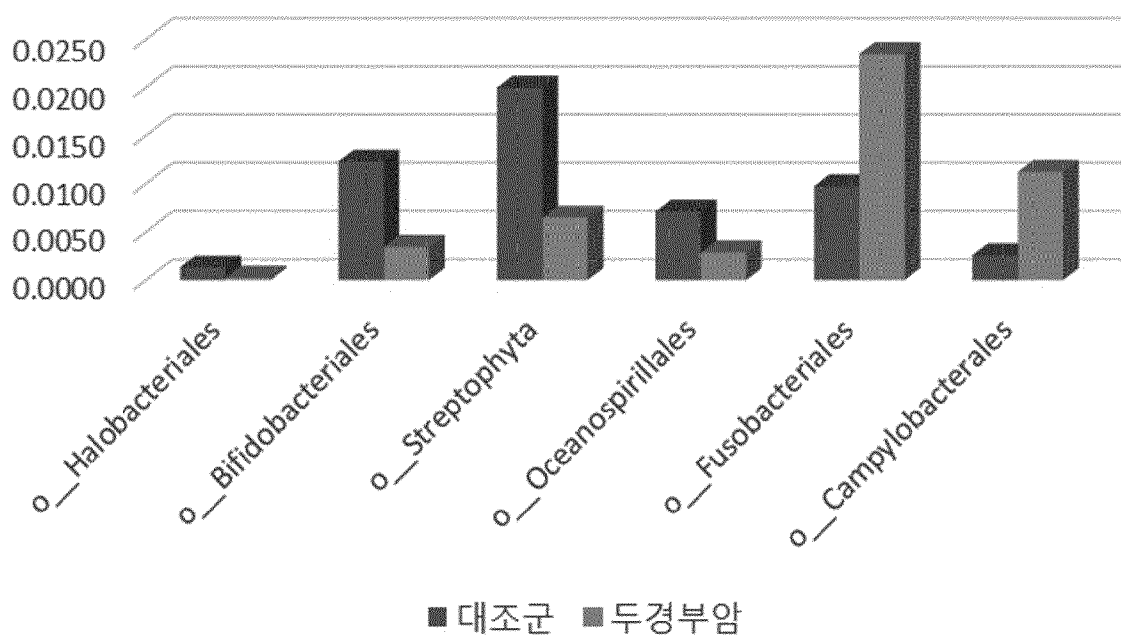


[도4]

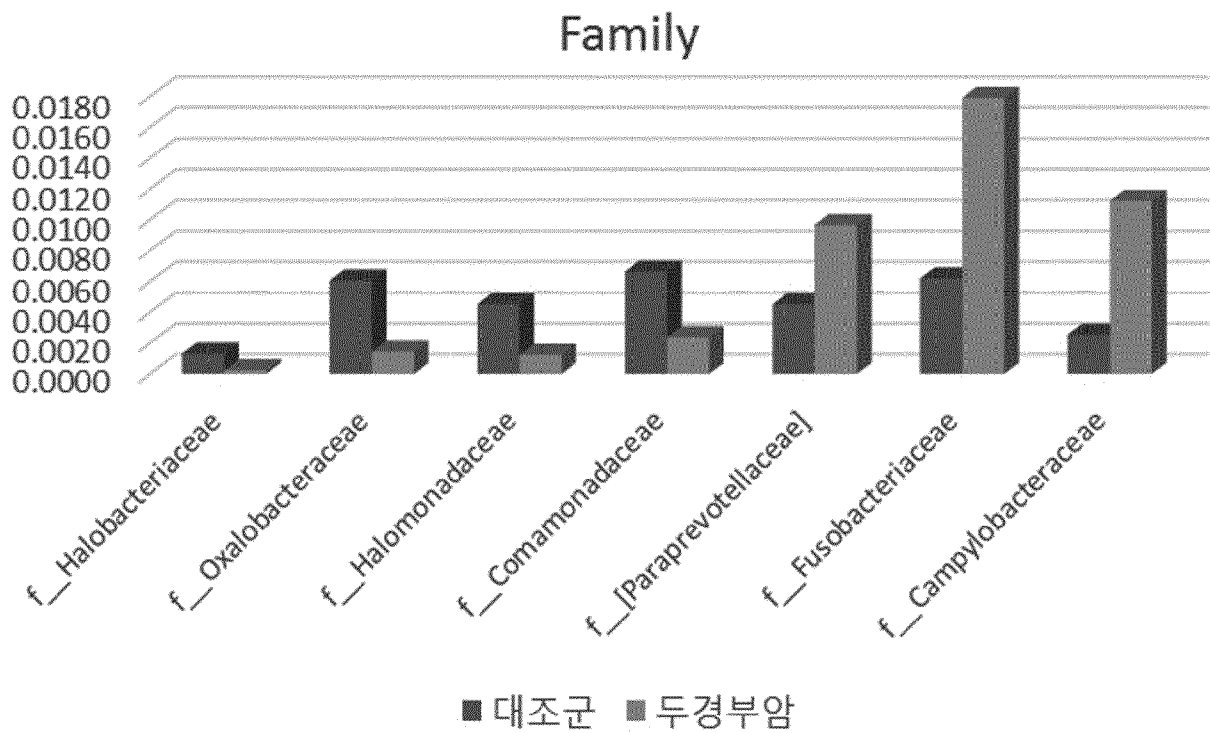
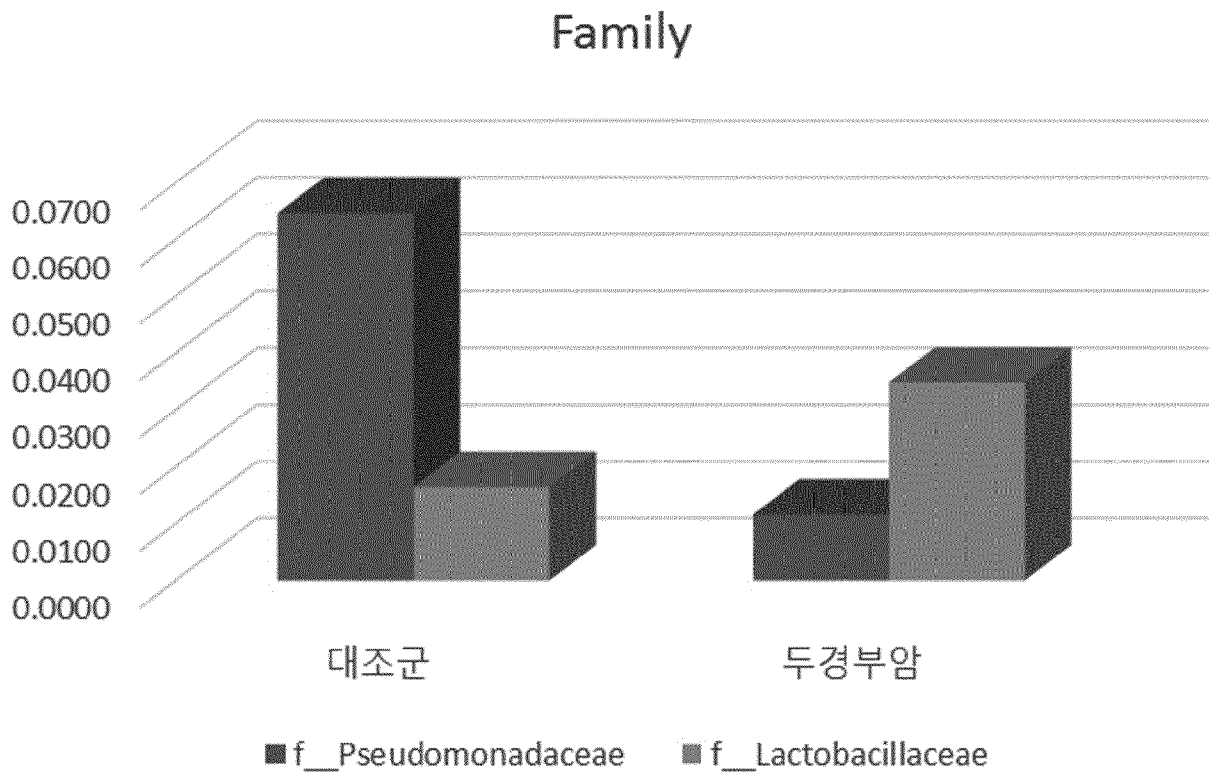
order_Pseudomonadales



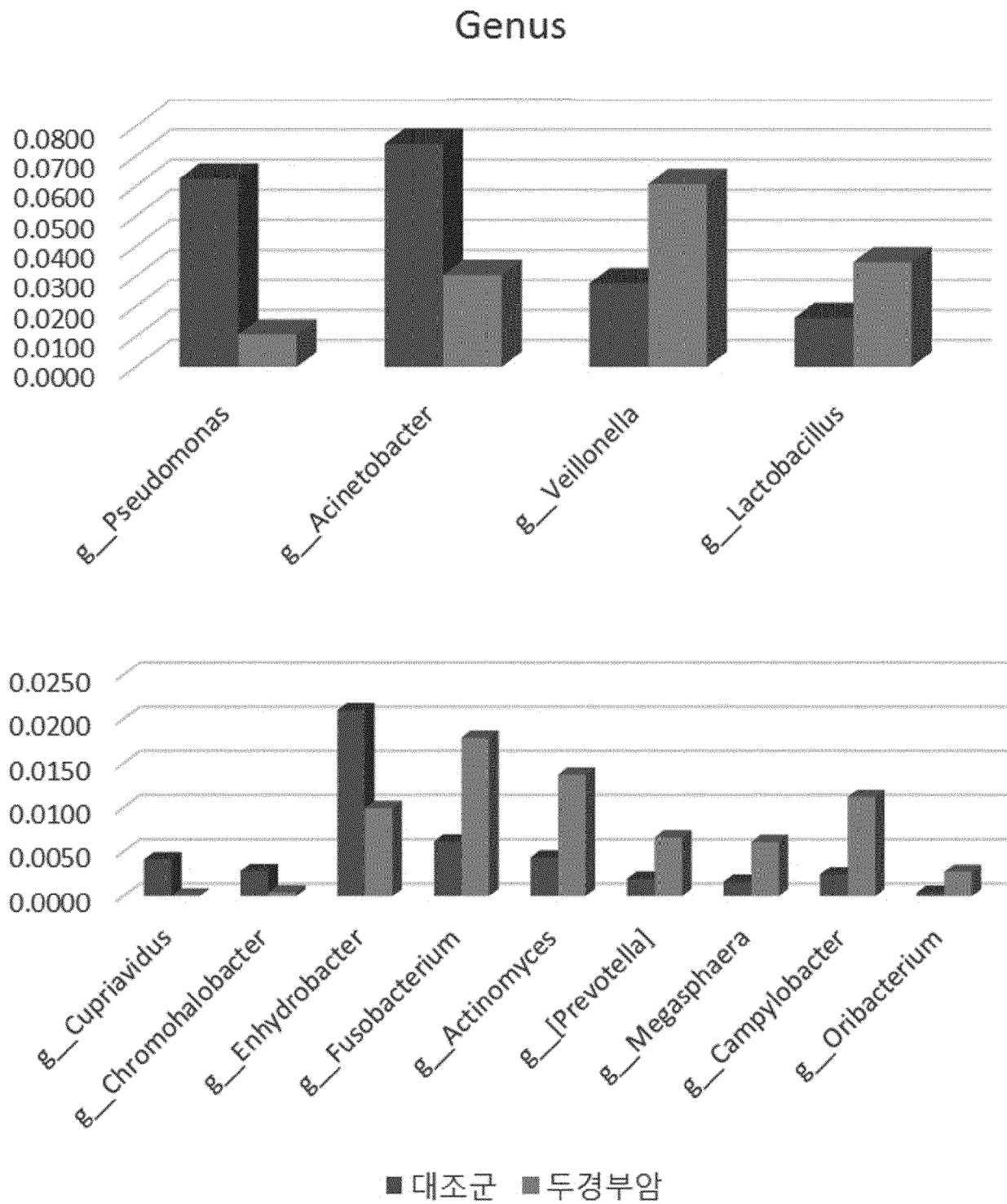
Order



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6895(2018.01)i

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)

C12Q 1/6895; A61K 39/05; C12N 1/00; C12Q 1/68; A61K 9/133

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: head and neck cancer, extracellular vesicle, bacteria, PCR, diagnosis method

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017-009693 A1 (UNIWERSYTET JAGIELLONSKI) 19 January 2017 See page 1; examples 1-3; and claim 11.	1-20
Y	PRINCIPE, Simona et al., "Tumor-derived Exosomes and Microvesicles in Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Biology and Biomarker Discovery", Proteomics, 2013, vol. 13, pages 1608-1623 See pages 1609, 1611, 1617.	1-20
Y	AL-HEBSHI, Nezar Noor et al., "Inflammatory Bacteriome Featuring Fusobacterium Nucleatum and Pseudomonas Aeruginosa Identified in Association with Oral Squamous Cell Carcinoma", Scientific Reports, 12 May 2017, vol. 7, Article No. 1834, inner pages 1-10 See pages 1, 4.	2-6,8-10,12-16 18-20
A	WO 2011-027990 A2 (AEON MEDIX INC.) 10 March 2011 See abstract; example 27; and claims 1-3, 8, 43-45, 50, 57.	1-20
A	SHIN, Jae M. et al., "Microbial Communities Associated with Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - a High Fusobacterial and Low Streptococcal Signature", Scientific Reports, 30 August 2017, vol. 7, Article No. 9934, inner pages 1-11 See pages 1, 6-9.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 13 AUGUST 2018 (13.08.2018)	Date of mailing of the international search report 14 AUGUST 2018 (14.08.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2018-008895 A1 (MD HEALTHCARE INC. et al.) 11 January 2018 See abstract; claims 1, 2; and table 1.	1,7,11,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/004837

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-009693 A1	19/01/2017	EP 3320110 A1 PL 413090 A1	16/05/2018 16/01/2017
WO 2011-027990 A2	10/03/2011	CN 102480932 A CN 102480932 B CN 102549143 A CN 102549143 B EP 2484752 A2 EP 2484752 A4 EP 2484752 B1 EP 2494865 A2 EP 2494865 A4 ES 2607955 T3 JP 2013-503857 A JP 2013-503858 A JP 5785947 B2 JP 5818793 B2 KR 10-1430283 B1 KR 10-1511017 B1 KR 10-2011-0025068 A KR 10-2011-0025603 A PL 2484752 T3 US 2012-0159658 A1 US 2012-0222142 A1 US 2015-0017664 A1 US 2015-0232934 A1 US 8969653 B2 US 9201072 B2 US 9273359 B2 US 9274109 B2 WO 2011-027956 A2 WO 2011-027956 A3 WO 2011-027971 A2 WO 2011-027971 A3 WO 2011-027990 A3	30/05/2012 14/01/2015 04/07/2012 29/10/2014 08/08/2012 13/11/2013 21/09/2016 05/09/2012 14/05/2014 04/04/2017 04/02/2013 04/02/2013 30/09/2015 18/11/2015 14/08/2014 13/04/2015 09/03/2011 10/03/2011 30/06/2017 21/06/2012 30/08/2012 15/01/2015 20/08/2015 03/03/2015 01/12/2015 01/03/2016 01/03/2016 10/03/2011 28/04/2011 10/03/2011 25/08/2011 03/11/2011
WO 2018-008895 A1	11/01/2018	KR 10-2018-0006303 A	17/01/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6895(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6895; A61K 39/05; C12N 1/00; C12Q 1/68; A61K 9/133

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: 두경부암, 세포밖 세포, 세균, PCR, 진단방법

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2017-009693 A1 (UNIWERSYTET JAGIELLONSKI) 2017.01.19 페이지 1; 실시예 1-3; 및 청구항 11 참조.	1-20
Y	PRINCIPE, SIMONA 등, 'Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: Implications for tumor biology and biomarker discovery', Proteomics, 2013, 13권, 페이지 1608-1623 페이지 1609, 1611, 1617 참조.	1-20
Y	AL-HEBSHI, NEZAR NOOR 등, 'Inflammatory bacteriome featuring Fusobacterium nucleatum and Pseudomonas aeruginosa identified in association with oral squamous cell carcinoma', Scientific Reports, 2017.05.12, 7권, Article No. 1834, 내부 페이지 1-10 페이지 1, 4 참조.	2-6, 8-10, 12-16, 18-20
A	WO 2011-027990 A2 (주식회사이엔메딕스) 2011.03.10 요약; 실시예 27; 및 청구항 1-3, 8, 43-45, 50, 57 참조.	1-20
A	SHIN, JAE M. 등, 'Microbial communities associated with primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma-a high Fusobacterial and low Streptococcal signature', Scientific Reports, 2017.08.30, 7권, Article No. 9934, 내부 페이지 1-11 페이지 1, 6-9 참조.	1-20

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 08월 13일 (13.08.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 08월 14일 (14.08.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



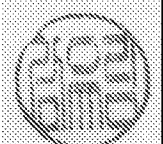
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	WO 2018-008895 A1 (주식회사 엠디헬스케어 등) 2018.01.11 요약; 청구항 1, 2; 및 표 1 참조.	1, 7, 11, 17

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-009693 A1	2017/01/19	EP 3320110 A1 PL 413090 A1	2018/05/16 2017/01/16
WO 2011-027990 A2	2011/03/10	CN 102480932 A CN 102480932 B CN 102549143 A CN 102549143 B EP 2484752 A2 EP 2484752 A4 EP 2484752 B1 EP 2494865 A2 EP 2494865 A4 ES 2607955 T3 JP 2013-503857 A JP 2013-503858 A JP 5785947 B2 JP 5818793 B2 KR 10-1430283 B1 KR 10-1511017 B1 KR 10-2011-0025068 A KR 10-2011-0025603 A PL 2484752 T3 US 2012-0159658 A1 US 2012-0222142 A1 US 2015-0017664 A1 US 2015-0232934 A1 US 8969653 B2 US 9201072 B2 US 9273359 B2 US 9274109 B2 WO 2011-027956 A2 WO 2011-027956 A3 WO 2011-027971 A2 WO 2011-027971 A3 WO 2011-027990 A3	2012/05/30 2015/01/14 2012/07/04 2014/10/29 2012/08/08 2013/11/13 2016/09/21 2012/09/05 2014/05/14 2017/04/04 2013/02/04 2013/02/04 2015/09/30 2015/11/18 2014/08/14 2015/04/13 2011/03/09 2011/03/10 2017/06/30 2012/06/21 2012/08/30 2015/01/15 2015/08/20 2015/03/03 2015/12/01 2016/03/01 2016/03/01 2011/03/10 2011/04/28 2011/03/10 2011/08/25 2011/11/03
WO 2018-008895 A1	2018/01/11	KR 10-2018-0006303 A	2018/01/17