

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 2월 4일 (04.02.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/020663 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/017674

(22) 국제출원일:

2019년 12월 13일 (13.12.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0093050 2019년 7월 31일 (31.07.2019) KR

(71) 출원인:

(주) 에이투젠 (ATOGEN CO.,LTD) [KR/KR];
34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동),
Daejeon (KR).

(72) 발명자:

정도윤 (JEONG, Do Yeun); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 백보람 (BECK, Bo Ram); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 강지희 (KANG, Ji Hee); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 이용현 (LEE, Yong Hyun); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 박건석 (PARK, Gun Seok); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 임성훈 (IM, Sung Hoon); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR). 송원호 (SONG, Won Ho); 34015 대전시 유성구 테크노1로 11-8, 201호(관평동), Daejeon (KR).

(74) 대리인:

특허법인오암 (OAM PATENT & TRADE-MARK LAW FIRM); 35240 대전시 서구 문예로 69, 201호 (둔산동, 오성빌딩), Daejeon (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

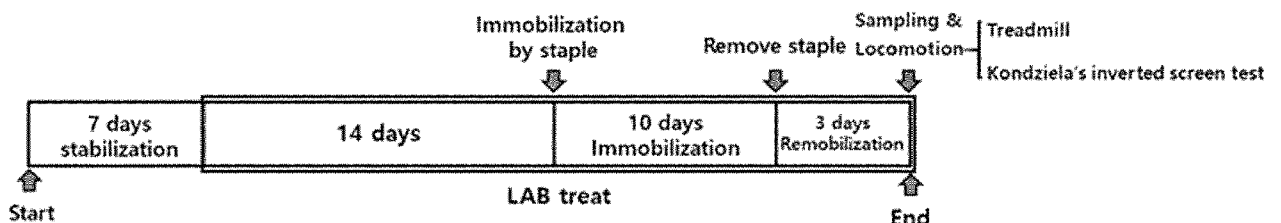
(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, 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))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING LACTOBACILLUS REUTERI ATG-F4 FOR PREVENTION OR TREATMENT OF MUSCULAR DISORDER

(54) 발명의 명칭: 락토바실러스 루테리 ATG-F4를 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising *Lactobacillus reuteri* ATG-F4 strain for prevention or treatment of sarcopenia. More specifically, the strain exhibits an effect of improving muscle rehabilitation and motor ability by increasing the muscle mass in skeletal muscles and as such, can be used in a composition for prevention or treatment of sarcopenia or muscular atrophy.

(57) 요약서: 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4) 균주를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상기 균주는 골격근의 근육량을 증가시켜 근육 재활 및 운동능력 향상에 효과를 나타내어 근감소증 또는 근위축증을 예방 또는 치료하는 조성물로 이용할 수 있다.



WO 2021/020663 A1

명세서

발명의 명칭: 락토바실러스 루테리 ATG-F4를 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4)를 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 락토바실러스 루테리 ATG-F4를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 우리나라는 평균 수명의 연장으로 인해 급격히 고령화 사회로 접어들었다. 2018년 기준, 65세 이상 인구는 738만 1천명으로 전체 인구 중 14.3%를 차지하고 있다(2018 고령자 통계, 통계청). 노화가 진행됨에 따라 여러 가지 신체 변화를 나타내는데, 그중에서 가장 대표적인 생물학적 변화는 근감소증(sarcopenia)이다.
- [4] 일반적으로 일상에서 근감소증을 예방하기 위해 할 수 있는 가장 좋은 방법은 지속적인 근육의 사용을 통한 근육의 소실 예방이지만 부상이나 장애 등과 같이 본인의 의지와 상관없이 근육의 사용이 불가능해지는 경우에도 근육의 퇴화에 의한 근위축이 발생할 수 있으므로, 이러한 경우에도 근육에 자극을 주거나 근육의 퇴화를 예방하여 근감소를 막을 수 있는 대응책과 그에 대한 연구가 필요하다.
- [5] 근위축증은 근육의 사용 감소와 같은 기계적 자극의 부재에 의한 근육 조직의 손상, 직접적인 상해나 물리적 요인에 의한 근육의 파괴, 노화에 의한 근육 세포의 회복력 장애, 그리고 근육의 작용을 조절하는 신경의 손상으로 인한 근육 사용의 장애와 같은 요인에 의해 발생한다(Booth FW., J Appl Physiol RespirEnviron Exerc Physiol., 1982).
- [6] 근감소증은 나이가 들면서 근육량과 근력 감소가 함께 나타나는 대표적인 퇴행성 근육 및 신경질환이다. 근감소증의 임상 증상은 여성보다는 남성에게서 더욱 활발하고, 50세 이상부터 나타나기 시작하여 80세 이상에서는 2명 중 1명이 근감소증이 있으며, 근육량, 운동력 및 근력이 현저히 감소되어 결국 독립생활을 못하게 하는 증상을 보인다.
- [7] 근감소증을 예방하기 위한 것으로서 끼니마다 25 내지 30g에 해당하는 양질의 단백질을 섭취하는 식이요법도 제안되었으나, 이는 달걀 4 내지 5개 또는 닭가슴살 약 120g을 매 끼니마다 섭취해야만 도달할 수 있는 양으로서 현실적으로 일반인이 실천하기는 매우 어렵기에 최근 많은 사람들이 단백질 보충제를 대안으로 선택하고 있다. 그러나 이 또한 단백질 과다섭취의 원인이 될

수 있어 부작용이 발생할 가능성이 높다. 더욱이 신장 질환이 있는 경우에는 고단백질 식이를 수행할 수 없고, 노화가 진행됨에 따라 신장의 기능 또한 감소하므로 근감소증을 예방하기 위해서는 고단백질 섭취 이외의 다른 대안이 필요하다.

- [8] 이에 본 발명자들은 근감소증 및 근위축증을 예방 또는 치료하기 위해 약물에 따른 항생제 내성 문제와 단백질 과다섭취 등 부작용이 없는 치료방법을 연구하던 중, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주가 근육 재활 및 근력강화에 효과가 있는 것을 확인함으로써 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주를 포함하는 근감소증 및 근위축증 예방 또는 치료용 조성물을 완성하였다.

[9]

[10] [선행기술문헌]

[11] [특허문헌]

- [12] (특허문헌 1) 한국등록특허 제10-1951919호 (발명의 명칭 : 도파민 분비 증진 기능이 있는 신규한 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주, 이를 함유하는 정신질환의 예방 또는 치료용 조성물, 출원인 : (주)에이투젠, 등록일자 : 2019.02.19.)

- [13] (특허문헌 2) 한국등록특허 제10-1997060호 (발명의 명칭 : 발효 녹용을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물, 출원인 : 주식회사 허브앤솔루션, 등록일자 : 2019.07.01.)

- [14] (특허문헌 3) 한국등록특허 제10-1800632호 (발명의 명칭 : 엔테로코커스 패칼리스, 이의 배양액 또는 이의 사균체를 유효성분으로 함유하는 근육감퇴, 약화 및 근위축 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 및 식품첨가제, 출원인 : 연세대학교 원주산학협력단 외 2인, 등록일자 : 2017.11.17.)

- [15] (특허문헌 4) 한국공개특허 제10-2013-0048946호 (발명의 명칭 : 락토바실러스 루테리 C S 132 또는 이의 배양물을 포함하는 항암용 조성물. 출원인 : 가톨릭대학교 산학협력단, 공개일자 : 2013.05.13.)

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [17] 본 발명의 목적은 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP)를 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[18]

과제 해결 수단

- [19] 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

- [20] 상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [21] 상기 근육질환은 근감소증, 근위축증, 근육퇴행위축증, 심위축증, 긴장감퇴증, 근이영양증, 근육 퇴화증 및 근무력증 중 어느 하나인 질환인 것일 수 있다.
- [22] 상기 조성물은 전경골근, 비복근, 장지신근 또는 가자미근으로 이루어진 군 중에서 어느 하나 또는 둘 이상의 근육의 양이 증가되는 효능이 있는 것일 수 있다.
- [23] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [24] 또 다른 발명은 상기 조성물을 포함하는 근육질환 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [25] 또한, 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육량 증강용 조성물에 관한 것이다.
- [26] 상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [27] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [28] 상기 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주에 대한 생리학적/유전학적 정보는 PCT/KR2019/006937(한국등록특허 제10-1951919호, 발명의 명칭 : 도파민 분비 증진 기능이 있는 신규한 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주, 이를 함유하는 정신질환의 예방 또는 치료용 조성물, 출원인 : ㈜에이투젠, 등록일자 : 2019.02.19.)에 기재되어 있다.
- [29] 본 발명은 상기 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주를 포함하는 조성물로 근육질환 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 상기 근육질환은 근위축증(muscular atrophy), 근감소증(sarcopenia), 근육퇴행위축증, 심위축증, 긴장감퇴증(atony), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화증 및 근무력증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 조성물은 근육질환 중 근감소증에 있어서 예방 또는 치료 효과가 좋을 수 있다.
- [30] 본 발명의 조성물은 전경골근, 비복근, 장지신근 또는 가자미근으로 이루어진 군 중에서 어느 하나 또는 둘 이상의 근육의 양이 증가되는 효능이 있어, 이를 통해 근육질환 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [31] 본 발명은 상기 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주의 균체; 상기 균체의

과쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택될 수 있다.

[32] 또한, 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주 또는 이의 배양물을 함유하는 약학 조성물을 제공할 수 있다. 상기 약학 조성물은 근감소증 또는 근위축증의 예방, 개선 또는 치료에 효과적이다.

[33] 상기 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주 또는 이의 배양물은 본 발명의 약학 조성물에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[34] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 균주 또는 이의 배양물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[35] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더욱 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[36] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될

수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 균주는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[37] 또한, 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주 또는 이의 배양물과 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

[38] 상기 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주 또는 이의 배양액은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 균주를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제 등이 있다.

[39] 본 발명의 균주 또는 이의 배양액을 함유하는 조성물로 유도되는 치료의 개념은 본 발명의 균주 또는 이의 배양액의 섭취로 인해 질병이 예방, 호전, 개선 또는 치료되는 광의의 개념을 갖는다.

[40]

발명의 효과

[41] 본 발명은 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주(수탁번호 KCTC13717BP)를 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 균주는 골격근의 근육량을 증가시켜 근육 재활 및 운동능력 향상에 효과를 나타내어 근육질환 예방 또는 치료용 조성물로 이용할 수 있다.

[42]

도면의 간단한 설명

[43] 도 1은 실험예 1에 따른 쥐의 근육 회복 동물실험 schedule을 나타낸 것이다.

[44] 도 2(a 및 b)는 실험예 1에 따른 근감소 회복에 따라 증가된 체중 및 체중 당 TA(tibialis anterior, 전경골근) 무게 비율을 나타낸 그래프이다.

[45] 도 3(a 내지 d)은 실험예 1에 따른 근감소증 유발 실험군의 골격근 무게를 비교하여 나타낸 그래프이다.

[46] 도 4는 실험예 2의 건강한 모델에 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주를 급여하였을 경우의 골격근 무게를 나타낸 그래프이다.

[47] 도 5는 실험예 3-1의 treadmill test에서 실시한 속도, 각도 및 진행시간을 나타낸 그래프이다.

[48] 도 6(a 및 b)은 실험예 3-1의 근감소증 유발 실험군에 대한 treadmill test 결과를 나타낸 그래프이다.

[49] 도 7(a 및 b)은 실험예 3-2의 근감소증 유발 실험군에 대한 Kondziola's inverted screen test 결과를 나타낸 그래프이다.

- [50] 도 8은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATG-F4의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 것이다.
- [51] 도 9는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) ATG-F1의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 것이다.
- [52] 도 10은 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATG-F3의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 것이다.
- [53] 도 11a는 ATG-F3 및 F4 균주의 16S rRNA 염기서열 간의 상이성을 나타낸 것이다.
- [54] 도 11b는 ATG-F3 및 F4 균주의 16S rRNA 염기서열 간의 상이성을 나타낸 것이다.
- [55]

발명의 실시를 위한 형태

- [56] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지도록, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [57]
- [58] 실시예 1. ATG-F1, ATG-F3 및 ATG-F4 유산균의 분리와 동정
- [59] 2016년 1월 8일, 2018년 5월 31일, 2018년 6월 4일에 신생아 분변을 각각 공여받았으며, 이를 0.9% 식염수에 10배 연쇄희석법으로 희석한 결과물을 de Man Rogosa Sharpe(MRS) 배지에 도말하여 37°C에 48시간 가량 배양하였다.
- [60] 배양된 MRS 배지에서 발생한 유산균의 콜로니를 현미경으로 관찰하여 간균형태, 카탈라아제(catalase) 반응이 없는 것을 골라내어, 전장유전체분석(whole genome sequencing)을 진행하였으며 ATG-F1, ATG-F3, ATG-F4라고 하였다(각각 F1, F3, F4라 표기하기도 함).
- [61] 상기 ATG-F1, ATG-F3 및 ATG-F4 균주의 16S rRNA 염기서열 분석은 (주)솔젠트(Solgent, Daejeon)에 의뢰하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 27F (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'), 518F (5' - CCA GCA GCC GCG GTA ATA C - 3'), 907R (5' - CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT - 3'), 1492R (5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3')을 이용하여 총 4번의 염기서열 reading을 하였고, 각 reading의 염기서열 alignment를 통해 도출된 contig 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST online tool(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 분석하였으며, 상기 균주의 16S rRNA 염기서열을 하기 도 8 내지 10에 나타내었다.
- [62] 16S rRNA sequencing을 통해 얻은 서열번호 1 내지 3의 염기서열을 NCBI의 BLAST database에 대조해본 결과, ATG-F3과 ATG-F4 균주는 *Lactobacillus reuteri* strain IRT와 16S rRNA 서열이 99.9% 일치하여 분류학상 위치는 *Lactobacillus*

*reuteri*에 속하는 것으로 나타났다. 또한, ATG-F1 균주는 *Lactobacillus casei*에 속하는 것으로 나타났다.

- [63] 이에, 본 발명의 균주를 *Lactobacillus reuteri* ATG-F4로 명명하였다. 상기 균주는 상세하게는 PCT/KR2019/006937(한국등록특허 제10-1951919호, 발명의 명칭 : 도파민 분비 증진 기능이 있는 신규한 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주, 이를 함유하는 정신질환의 예방 또는 치료용 조성물)에 개시되어 있다.
- [64] 다음으로, 같은 종인 ATG-F3과 F4 균주간의 16S rRNA 염기서열의 상이성을 분석하였다.
- [65] 염기서열에 대한 상이성은 EMBL-EBI의 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)를 이용하여 분석하였으며, 이를 하기 도 11a 및 11b에 나타내었다.
- [66] 도 11a 및 11b를 참고하면, ATG-F3과 F4 균주가 같은 종이기는 하나, 16S rRNA 염기서열에는 차이가 있는 것을 확인할 수 있으며, 이를 통해 생리학적 특성 또한 차이를 나타낼 것으로 예상할 수 있다.
- [67] 다음으로, 당발효 패턴을 통한 동정 및 특성을 파악하기 위해 API50 CH test(BioMerieux, France)를 실시하였다. 간략하게 10ml API50 CHL medium에 순수배양된 유산균을 약 0.5의 OD₆₀₀ 흡광도가 되도록 현탁한 후, 현탁배양액을 API50 CH test strip의 각 cupule에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 접종 후 24, 48, 72시간째 시점에서 당발효 결과를 확인하였다. 이때 API50 CH를 이용한 49개의 당류에 대한 유산균 ATG-F1, F3 및 F4의 발효 패턴에서 +는 양성반응, w는 약한 양성반응, -는 음성반응을 의미한다.
- [68]

[69] [표 1]

Carbohydrates	<i>L. casei</i> ATG-F1	<i>L. reuteri</i> ATG-F3	<i>L. reuteri</i> ATG-F4
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	w
L-Arabinose	-	+	+
Ribose	w	+	+
D-Xylose	-	-	w
L-Xylose	-	-	-
Adonitol	w	-	w
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-
Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Fructose	+	-	-
Mannose	+	-	-
Sorbose	+	-	-
Rhamnose	-	-	w
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	w
Mannitol	+	-	-
Sorbitol	+	-	w
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	w
N-Acetylglucosamine	+	-	-
Amygdalin	w	-	-
Arbutin	+	-	w
Esculin	+	-	+
Salicin	+	-	w

Cellobiose	+	-	w
Maltose	w	+	+
Lactose	-	+	+
Melibiose	-	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	-	-
Inulin	+	-	-
Melezitose	+	-	-
Raffinose	-	+	+
Starch	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	+	-	w
Turanose	+	-	-
Lyxose	-	-	-
Tagatose	+	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	+
D-Arabitol	-	-	w
L-Arabitol	-	-	w
Gluconate	w	w	+
2-keto-glugonate	-	-	-
5-keto-gluconate	-	-	-

[70]

[71]

ATG-F1 유산균의 당분해능을 조사한 결과 리보오스, 아도니톨, 아미그달린, 말토오스, 글루코네이트에 대하여는 약한 양성 반응 (48시간 이내에 파란색이 녹색으로 변화)이 나타났으며, 갈락토스, 글루코스, 프럭토스, 마노스, 소르보스, 만니톨, 소르비톨, N-아세틸글루코사민, 알부틴, 에스쿨린, 살리신, 셀로비오스, 수크로오스, 트레할로오스, 이눌린, 멜레치토스, 젠티오비오스, 튜라노스, 타가토오스에 대하여서는 양성 반응 (48시간 이내 파란색이 노란색으로 변화)이 나타났다. 총 24개의 당을 분해할 수 있는 능력이 있는 것으로 나타났다. ATG-F3 유산균의 당분해능을 조사한 결과 글루코네이트에 대하여는 약한 양성

반응(48시간 이내에 파란색이 녹색으로 변화)이 나타났으며, L-아라비노스, 리보오스, 갈락토스, 글루코스, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 라피노오스에 대하여서는 양성 반응(48시간 이내 파란색이 노란색으로 변화)이 나타났다. 총 10개의 당을 분해할 수 있는 능력이 있는 것으로 나타났다.

[72] ATG-F4 유산균의 당분해능을 조사한 결과 D-아라비노스, D-자일로스, 아도니톨, 람노오스, 이노시톨, 소르비톨, 메틸- α D-글루코피라노사이드, 알부틴, 살리신, 셀로비오스, 젠티비오스, L-아라비톨, D-아라비톨에 대하여는 약한 양성 반응 (48시간 이내에 파란색이 녹색으로 변화)이 나타났으며, L-아라비노스, 리보오스, 갈락토스, 글루코스, 에스쿨린, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 라피노오스, L-푸코오스, 글루코네이트에 대하여서는 양성 반응(48시간 이내 파란색이 노란색으로 변화)이 나타났다. 또한 총 25개의 당을 분해할 수 있는 능력이 있는 것으로 나타났다.

[73] ATG-F1, F3 및 F4 유산균의 당분해능을 조사한 결과 차이를 나타내는 것을 통해 상기 유산균 모두 각각 생리학적 특성이 모두 다른 것을 확인할 수 있다.

[74]

[75] 실시예 2. 락토바실러스속 유산균 배양

[76] 본 실시예에서는 락토바실러스 카제이 ATG-F1(*Lactobacillus casei* ATG-F1), 락토바실러스 루테리 ATG-F3(*Lactobacillus reuteri* ATG-F3) 및 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP)를 이용하였다. 각 유산균은 MRS broth(Difco™ *Lactobacilli* MRS Broth)에 37°C, 24시간 배양하고, 배양된 유산균은 12,000g에서 10분간 원심분리하여 균체만 획득한 후, 0.85%(v/v) saline에 현탁하여 각 실험에 사용하였다.

[77]

[78] 실험예 1. 근감소증 유발 모델에서의 근육 회복 활성화 확인

[79] 본 실험예에서 실시한 모든 동물실험에 앞서 (주)에이투젠의 실험동물운영위원회(IACUC)에 의해 동물실험이 적절한 절차로 승인(승인번호 : ATG-IACUC-REV-180810)되었으며, 윤리적 동물실험의 지도가 이루어졌다. 본 실험에서 이용한 동물은 4주령의 C57BL/6J로 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 실험하였다.

[80] 본 실험예는 근감소증 유발 모델(A model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a skin stapler in mice)에서 락토바실러스 카제이 ATG-F1, 락토바실러스 루테리 ATG-F3 또는 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균 섭취에 따른 근육 재활 및 운동능력 향상 확인을 위한 동물실험을 진행하였다.

[81] 총 25마리의 4주령 C57BL/6J 쥐(male)를 실험 그룹 당 5마리씩 사용하여 실험하였으며 도 1에 나타낸 schedule에 따라 진행하였다. 먼저 1주 동안 주변환경 적응기간을 두고, 5주령이 되었을 때부터 2주 동안 유산균을 섭취하도록 하였다. 대조군(Ctrl)과 근감소증 유발군(Ctrl-Disuse)은 멸균된 식수와 일반사료를 자율 급여하였다. 실험군(근감소증 유발 후 유산균

급여군(F1, F3, F4))은 10^7 CFU/ml의 유산균을 멸균된 식수에 희석하여 자율 급여하였다. 7주령이 되었을 때, surgical skin staplers(Covidien Royal 35W skin stapler)를 이용하여 쥐의 두 뒷다리를 10일 동안 움직이지 못하도록 고정하였다(Caron, A. Z. et al., 2009; Du et al., 2011). 다리를 고정하고 10일 후에 스테이플을 제거하고 3일 동안의 회복기간을 두었다.

[82] 회복기간 후, 상기 대조군, 근감소증 유발군 및 실험군의 근육재활 능력을 알아보기 위해 체중(Body weight, BW) 및 체중 당 TA 무게(TA/Body weight)와 4가지 타입의 골격근(skeletal muscle: tibialis anterior(전경골근, TA), gastrocnemius(비복근, GA), extensor digitorum longus(장지신근, EDL), soleus(가자미근, SOL); 이하 TA, GA, EDL, SOL)을 떼어내 무게를 비교하였으며 이를 도 2 및 3에 나타내었다.

[83] 도 2(a 및 b)를 참고하면 근감소증 유발군(Ctrl-Disuse) 대비 유산균을 섭취한 실험군에서 체중이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 체중 당 TA 근육량 역시 유산균을 섭취한 실험군에서 증가하는 것을 확인할 수 있다. 특히, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균을 섭취한 실험군의 체중 및 체중 당 TA 근육량이 가장 많이 증가한 것을 확인할 수 있어 근육재활 효과가 우수하다는 것을 알 수 있다.

[84] 도 3(a 내지 d)을 참고하면, 4가지 타입의 골격근(TA, GA, EDL, SOL) 무게 모두 근감소증 유발군에 비해 유산균을 섭취한 실험군에서 무게가 증가한 것을 확인할 수 있다. 특히, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균을 섭취한 실험군은 근감소증 유발군에 비해 TA, GA, SOL의 무게가 1.21배 증가하였으며, EDL의 무게는 1.62배 가량 증가하였다.

[85] 이를 통해 근감소증 또는 근위축증 회복에 따른 체중 및 근육량 증가를 확인하였으며 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균을 섭취한 실험군에서 근육량 증가 및 재활 효과가 가장 우수하다는 것을 알 수 있다.

[86]

[87] **실험예 2. 건강한 모델에서의 F4 유산균 섭취로 인한 근육량 증가효과 확인**

[88] 일반사료와 멸균된 식수를 급여하는 대조군(Ctrl)과 일반사료와 약 10^7 CFU/ml의 락토바실러스 루테리 ATG-F4를 포함한 멸균된 식수를 급여하는 실험군(F4)으로 나누었으며, 각 실험군 당 5마리의 쥐를 사용하였다. 4주령의 쥐를 1주간 안정화를 한 뒤, 4주간 실험을 진행하였다.

[89] 4주 후에 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균 섭취로 인한 근육량의 차이를 알아보기 위해 4가지 타입의 골격근(TA, GA, EDL, SOL)을 떼어내 무게를 비교하였으며 이를 도 4에 나타내었다.

[90] 도 4를 참고하면, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 균주를 급여한 실험군(F4)의 골격근의 근육량이 증가한 것을 확인할 수 있다. 대조군에 비해 TA 1.08배, GA 1.03배, EDL 1.01배, SOL 1.48배 증가한 것을 통해 건강한 모델에서도 근육량이 증가하는 효과가 있음을 확인하였다.

[91]

- [92] 실험예 3. 근감소증 유발 쥐에서의 근육 회복 활성화 및 운동 능력 향상 확인
- [93] 실험예 3-1. **Treadmill test**
- [94] 운동능력 및 지구력을 평가하기 위해 treadmill test를 진행하였으며 5 LANE TREADMILL for MICE(HARVARD)를 사용하여 실험하였다. 상기 실험예 1과 같이 대조군, 근감소증 유발군 및 실험군(근감소증 유발 후 유산균 급여군(F1, F3, F4))을 설정하여 실험을 진행하였다. 또한, Treadmill test는 the protocol used for the running test를 참고하였으며 도 5와 같이 수행하였다.
- [95] 도 5를 참고하면, 먼저 8m/min의 속도로 5분 동안 쥐를 워밍업시켰다. 시작점에는 1.25mA의 전기자극을 주어 달리기를 유도하였으며 10m/min의 속도로 시작하여 15분마다 2m/min씩 속도가 증가되도록 하였다. 총 8단계로 최대 2시간까지 running time을 측정하였다. 1시간 이후에는 각도를 5°올리고, 1시간 반 이후에는 각도를 10°로 올렸다. 전기자극을 가함에도 불구하고 5초 동안 달리지 않는 쥐는 체력고갈로 간주하여 실험을 종료하였으며, 실험 종료 후 측정된 쥐의 달리는 시간 및 거리를 비교하였으며 이를 도 6에 나타내었다.
- [96] 도 6(a 및 b)을 참고하면, 근감소증 유발군에 비해 유산균을 섭취한 실험군에서 보다 더 긴 달리기 시간과 거리를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 특히, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균을 섭취한 실험군이 근감소증 유발군에 비해 달린 시간 1.17배 및 달린 거리 1.25배가 증가함으로써 보다 운동능력 및 지구력이 증가하여 근육 재생 및 재활 활성화 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있다.
- [97]
- [98] 실험예 3-2. **Kondziela's inverted screen test**
- [99] 근력 및 지구력을 평가하기 위해 Kondziela's inverted screen test를 진행하였으며 상기 실험예 1과 같이 대조군, 근감소증 유발군 및 실험군(근감소증 유발 후 유산균 급여군(F1, F3, F4))을 설정하였다.
- [100] Kondziela's inverted screen test는 격자망(wire mesh screen, 규격 : 440×330mm, 격자 당 가로/세로 각각 1mm로 구성)을 이용하였다(Deacon, R.M., 2013;Reekes, T.H. et al, 2016). 격자망의 중앙에 쥐를 올리고 뒤집은 뒤, 시간을 측정하였다. 낙하 시 충격흡수를 위해 바닥에는 깔짚을 깔아주고, 격자망은 바닥으로부터 40cm 이상 위에 고정시켰다. 실험은 독립적으로 3회 반복 수행하여 쥐의 낙하 시간을 기록하고 평균값을 확인하였다. 하기 표 2를 참고하여 60초마다 1점씩 점수를 매겼으며, 241초 이후에는 일괄적으로 5점 만점 처리하였다. 이에 대해 낙하 시간과 낙하 시간에 따른 점수 결과를 도 7에 나타내었다.

[101] [표2]

쥐의 낙하 시간 (단위 : 초)	점수
1 이상 ~ 60 이하	1
61 이상 ~ 120 이하	2
121 이상 ~ 180 이하	3
181 이상 ~ 240 이하	4
241 이상	5

[102]

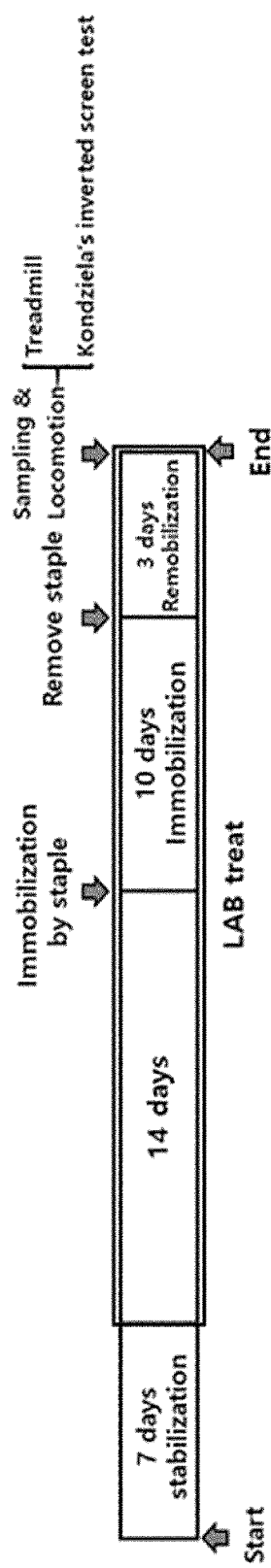
[103] 도 7(a 및 b)을 참고하면, 근감소증 유발군에 비해 유산균을 섭취한 실험군에서 더 오랜 시간 매달리는 것을 확인할 수 있다. 특히, 락토바실러스 루테리 ATG-F4 유산균을 섭취한 실험군이 근감소증 유발군에 비해 매달린 시간 2.40배 및 표 2를 통해 매긴 점수 1.67배 정도 증가함으로써 보다 근력 및 지구력이 증가하여 근육 재생 및 재활 활성화 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

청구범위

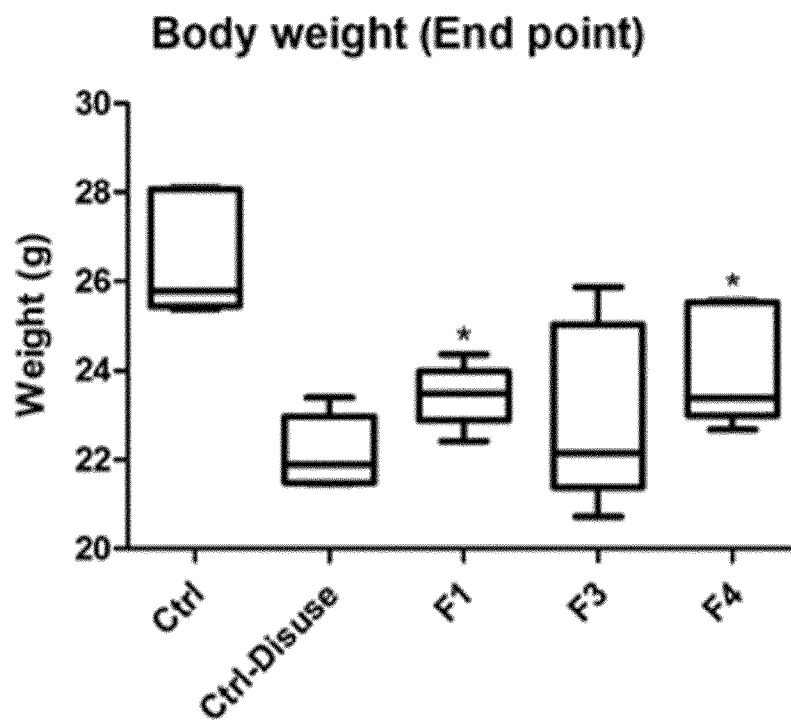
- [청구항 1] 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것을 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 근육질환은 근감소증, 근위축증, 근육퇴행위축증, 심위축증, 긴장감퇴증, 근이영양증, 근육 퇴화증 및 근무력증 중 어느 하나인 질환인 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것을 포함하는 근육질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것을 포함하는 근육질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 8] 락토바실러스 루테리 ATG-F4(*Lactobacillus reuteri* ATG-F4, 수탁번호 KCTC13717BP) 균주를 포함하는 것을 특징으로 하는 근육량 증강용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 균주는 균주의 균체; 상기 균체의 파쇄물; 상기 균주의 배양물; 상기

균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액; 상기 균주의 균체 추출물; 상기 균주의 배양물의 추출물; 또는 상기 균주의 배양물에서 균체를 제거한 배양액의 추출물; 중에서 선택되는 것을 포함하는 근육량 증강용 조성물.

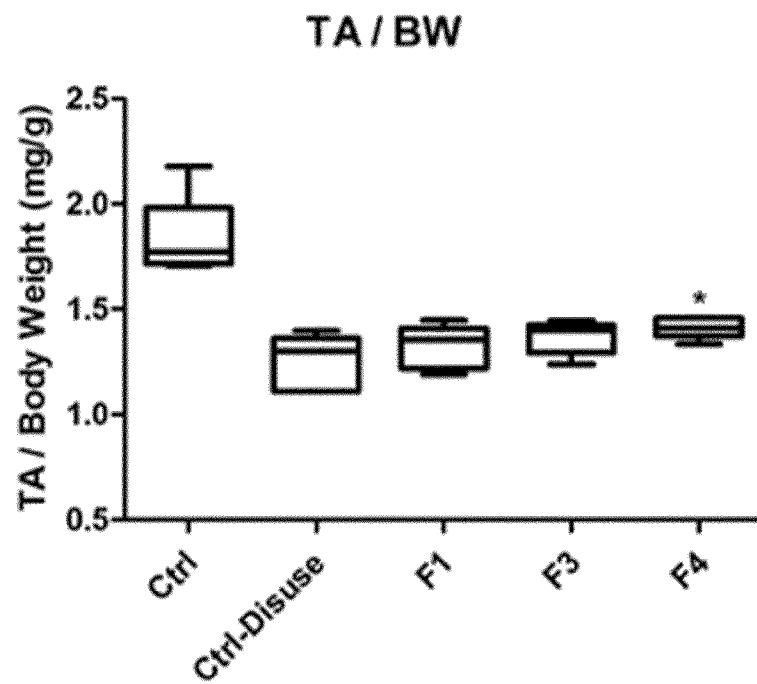
[도1]



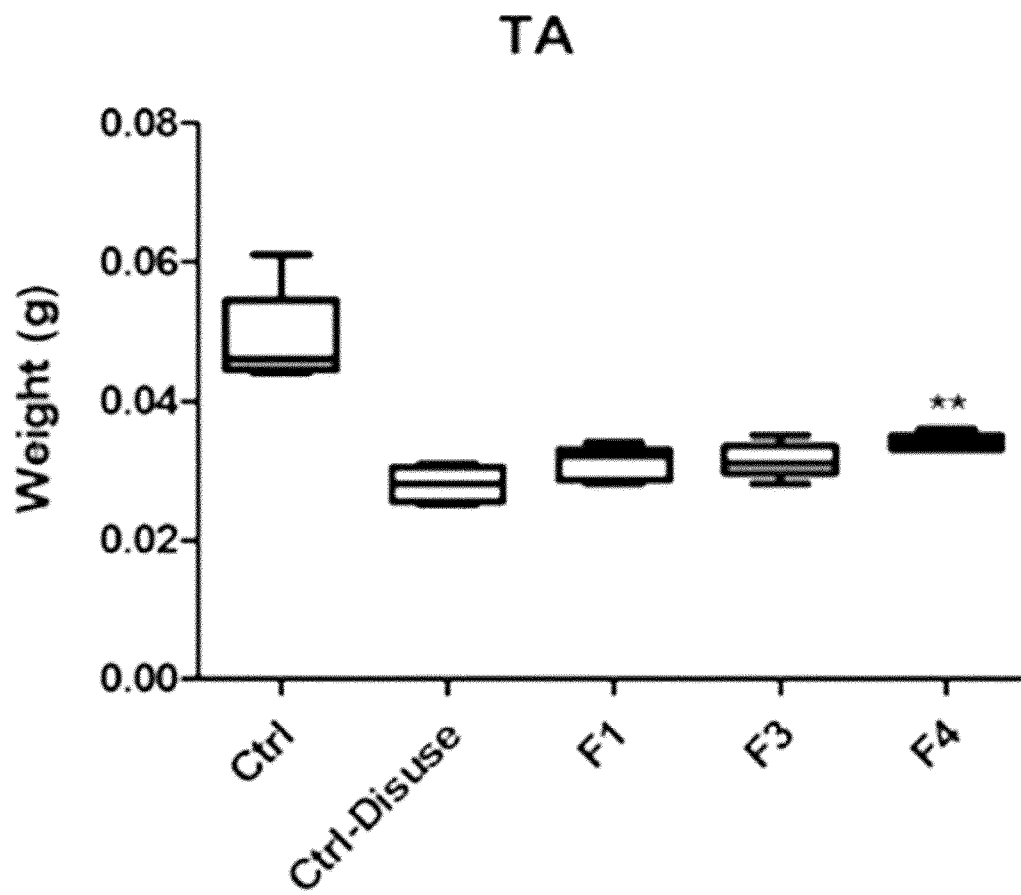
[도2a]



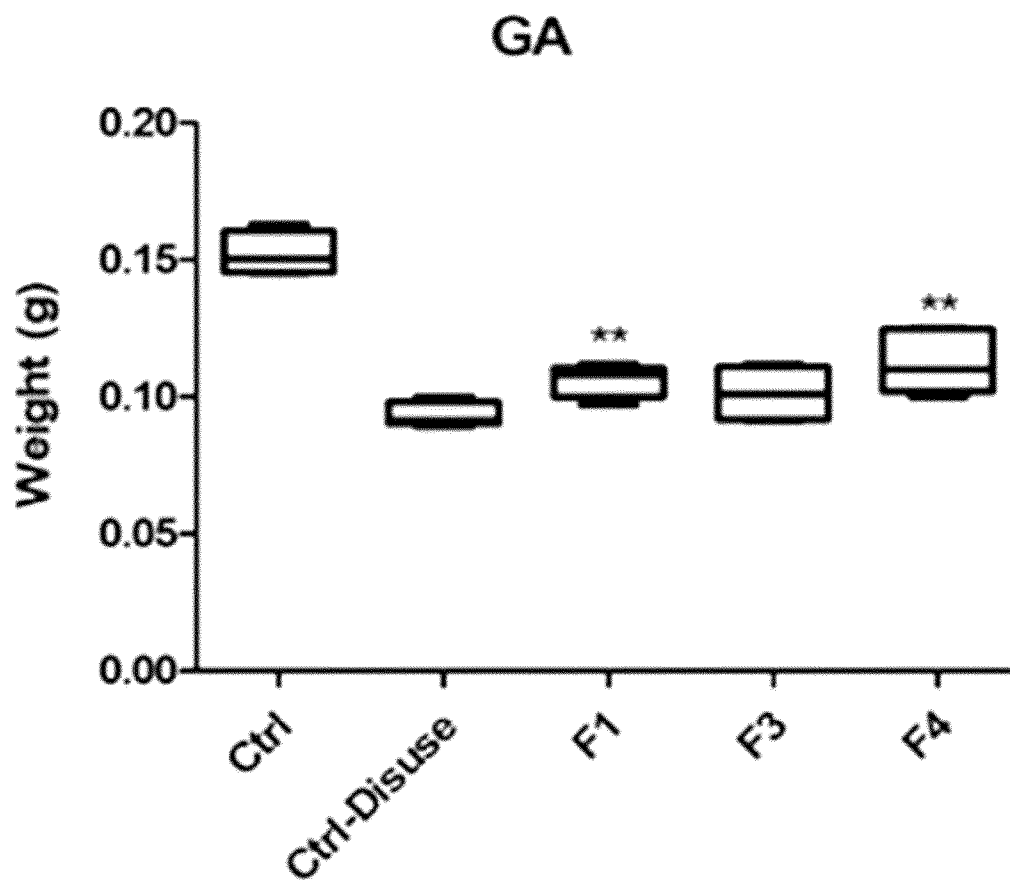
[도2b]



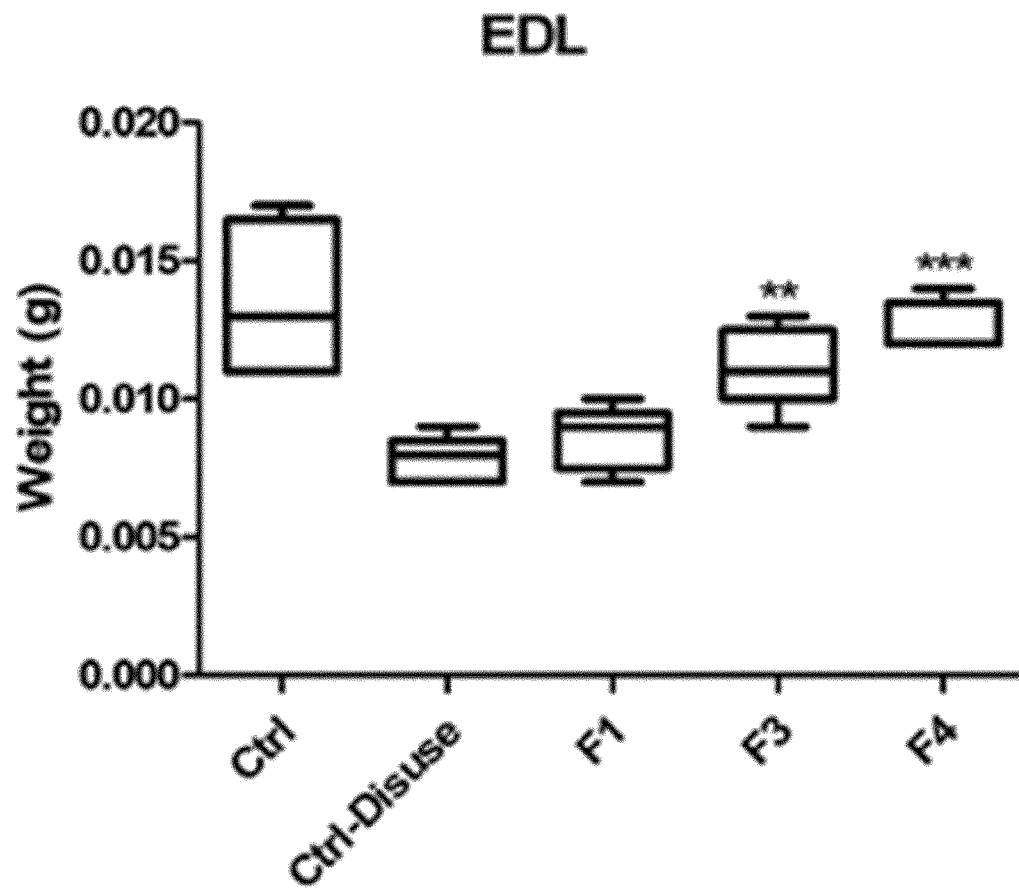
[도3a]



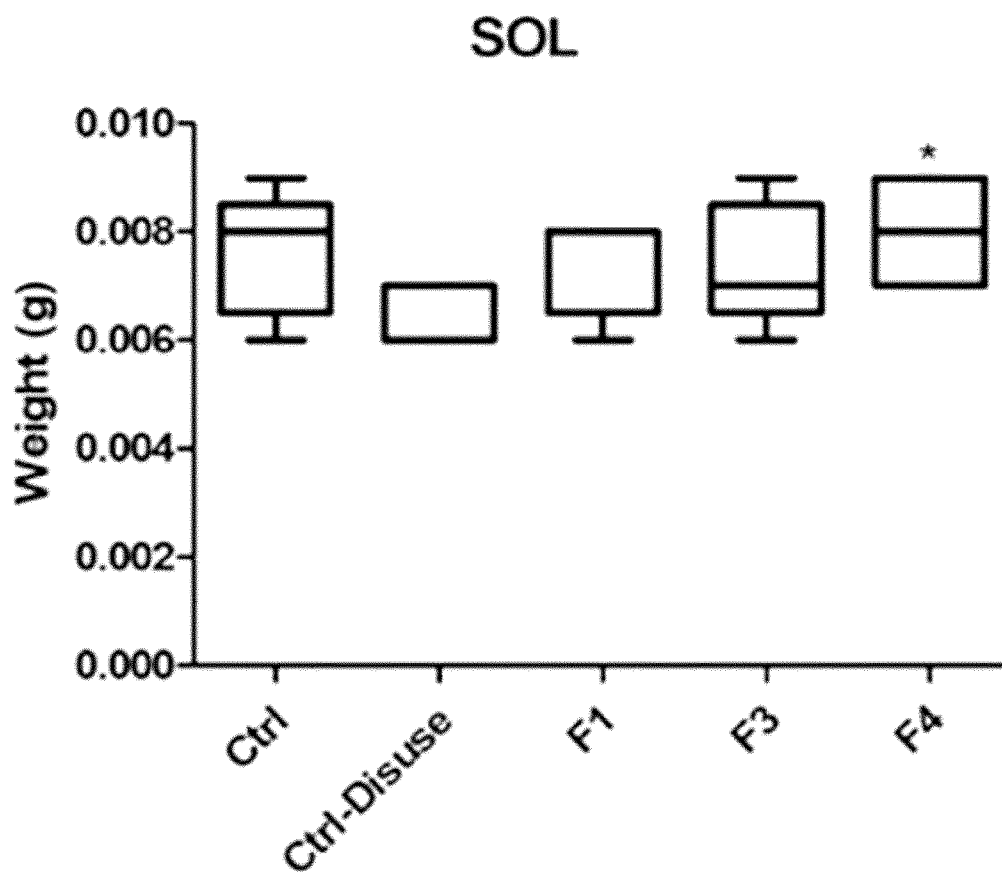
[도3b]



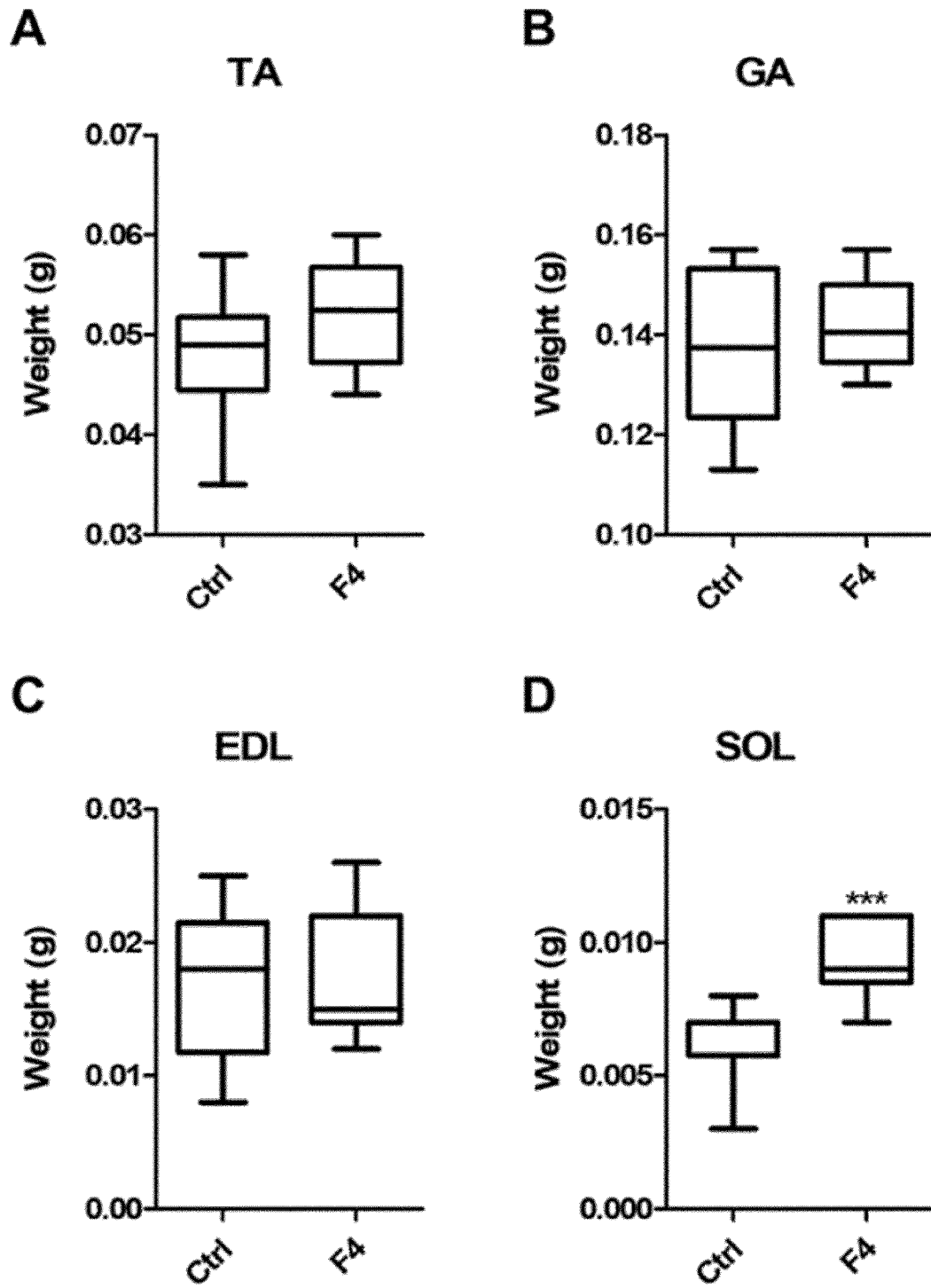
[도3c]



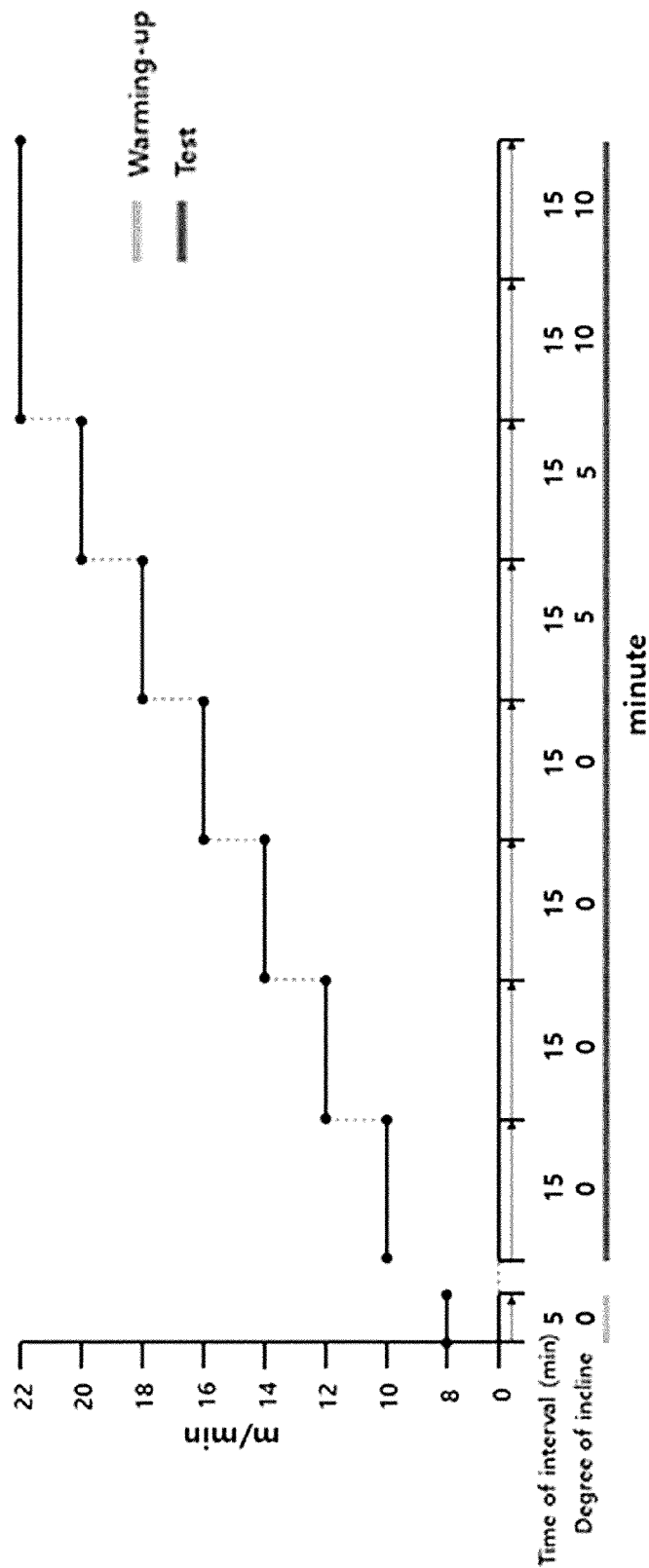
[도3d]



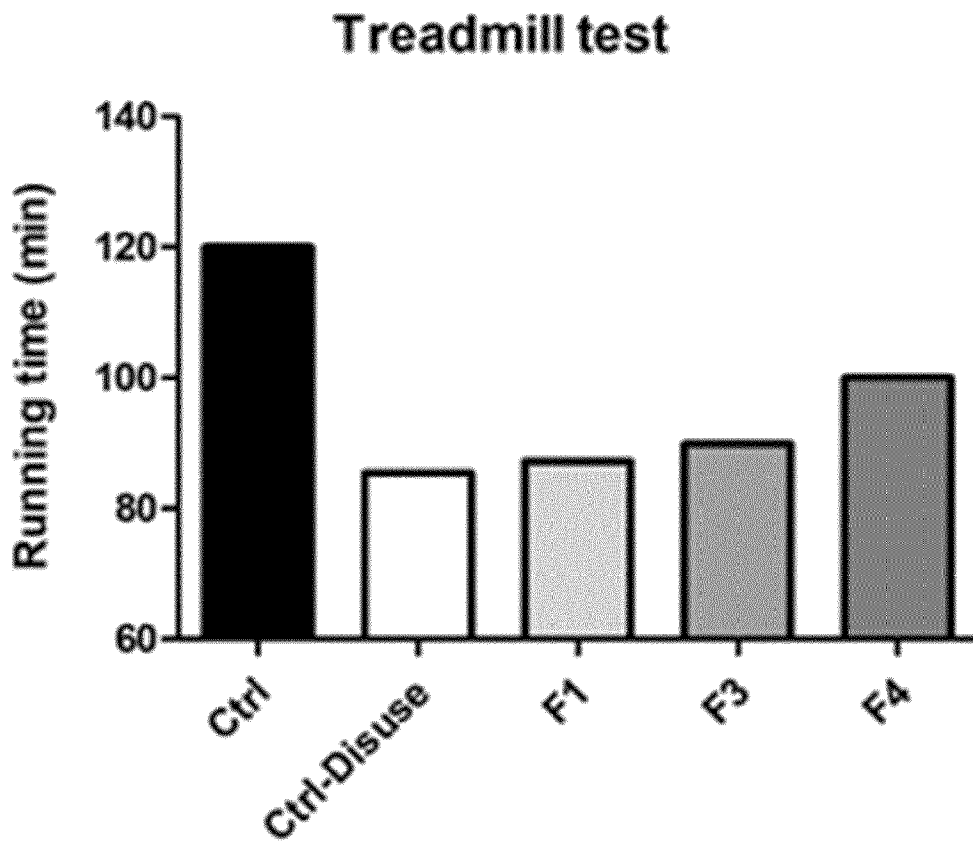
[도4]



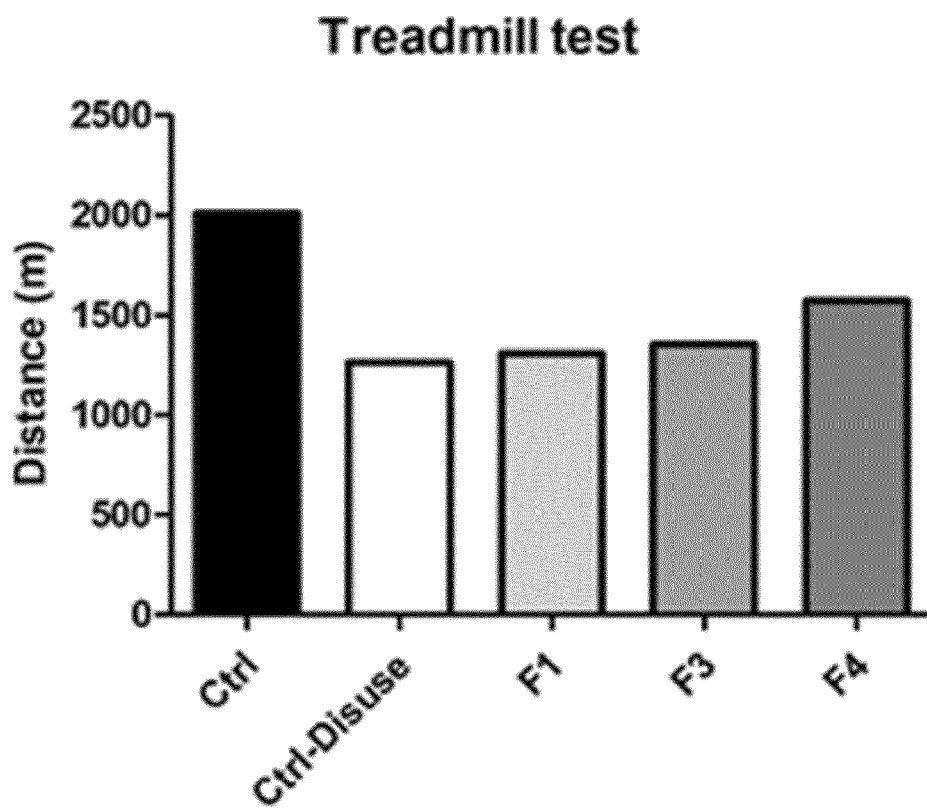
[도5]



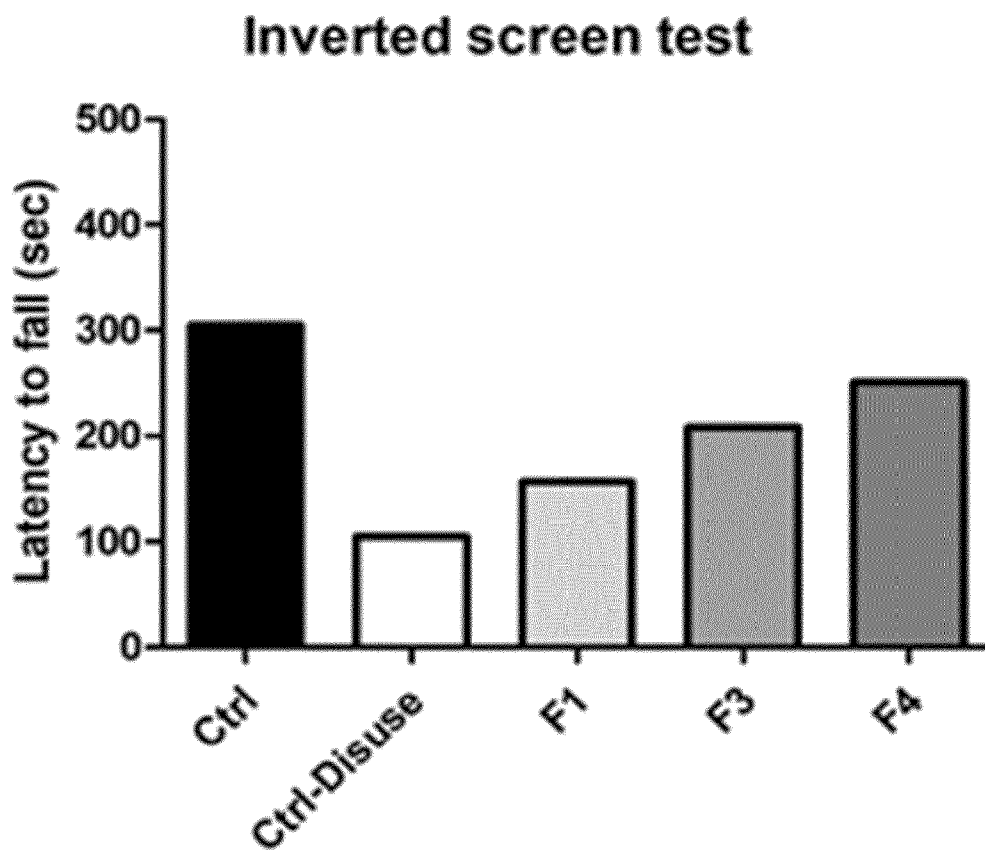
[도6a]



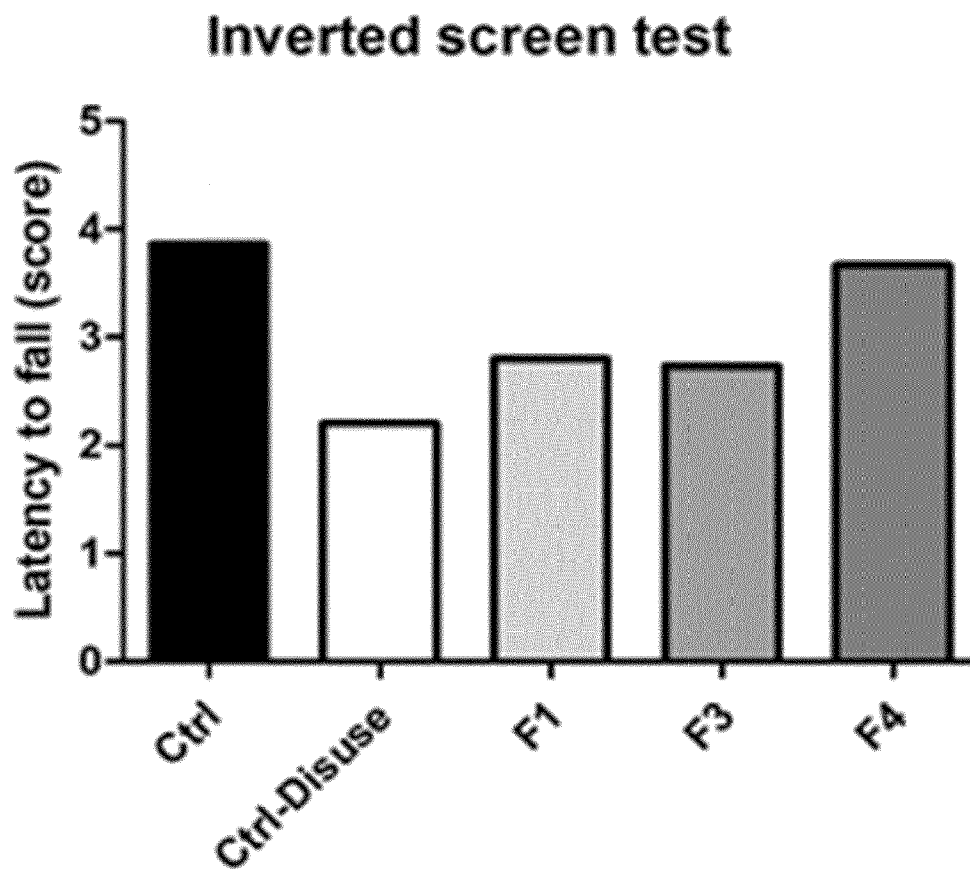
[도6b]



[도7a]



[도7b]



[도8]

TCAGGATGAACGCCGGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCACTGATTGATGGTGCTTGCAC
 CTGATTGACGATGGATCACCAGTGAAGTGGCGACGGGTGAATAACACGTAGGTAACTGCCCGGAGCGGGGATA
 ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCGCATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTAT
 CACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAG
 TTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGSAATCTTCC
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAAGTGAAGAAAGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGSA
 GAAGAAGCTGCGTGAAGTAAGTGTTCACGCAAGTACGGTATCCAACGAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGT
 CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACGAGAAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGG
 AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAAC
 TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGC
 TAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAA
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGA
 ACCTTACCAAGGCTTGCATCTTGCCTAACCTTAGAGATAAGGCGTCCCTTCGGGGAGCAATGACAGGTGGTG
 CATGGTCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTACTAGTTGCC
 AGCATTGAGTTGGGCACTCTAGTGAAGTGCCTGGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGATCATCATG
 CCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGAGCGGTACAACGAGTGCAGAACTCGCSAGAGTAAGCTAATC
 TCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACGAAAGTCGGAATCGTGAATATCGCGGAT
 CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTTTGTAAACGCCCAA
 GTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGTTGAAGTCGTAACAGGAACCCG

[도9]

TGCACTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAG
 TAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAAC
 CGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
 AAATCCTACGGGAGGCGAGTGAAGGAATCTCCACAATGGAGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGA
 AGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAAGTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGTCGGCGTGACGGTA
 TCCAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA
 TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGG
 AAATGGGAAACTTGAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGA
 ACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGAAGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG
 ATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCGAGCTAAC
 GCATTAAAGCATTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATC
 AGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
 TCCGCAACGAGCGCAACCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTTAGTAAGACTGCCGTTGACAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGCTGTACAATGGATGGT
 ACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCG
 CCTACACGAAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
 CGCCGCTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCGCTCTA

[도 10]

CAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA
CAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGT
TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGAC
ACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCG
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAAGTGTTCACGCAGT
GACGGTATCCAACAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCTTTCGGCTTAACCGAAGAAGT
GCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATA
TGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGG
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTT
AGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAAGTGGTGATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTG
CAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGAGC

[도 11a]

ATG-F3	CAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGA	26
ATG-F4	TCAGGATGAACGCCGGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGA	60

ATG-F3	TTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA	86
ATG-F4	TTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA	120

ATG-F3	CACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCA	146
ATG-F4	CACGTAGGTAACCTGCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCA	180

ATG-F3	TAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATG	206
ATG-F4	TAACAACAAAAGCCCGCATGGCTTTTGTGGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATG	240

ATG-F3	GACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGC	266
ATG-F4	GACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGC	300

ATG-F3	CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGACAGGTCCATACTCCTACGGGAG	326
ATG-F4	CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGACAGGTCCATACTCCTACGGGAG	360

ATG-F3	GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTG	386
ATG-F4	GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTG	420

ATG-F3	AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTCGCTGAGAGTAACTG	446
ATG-F4	AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTCGCTGAGAGTAACTG	480

ATG-F3	TTCACGCAGTGACGGTATCCAACAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	506
ATG-F4	TTCACGCAGTGACGGTATCCAACAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG	540

ATG-F3	TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT	566
ATG-F4	TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT	600

ATG-F3	GCTTAGGTCTGATGTGAAAGCTTTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGA	626
ATG-F4	GCTTAGGTCTGATGTGAAAGCTTTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGA	660

ATG-F3	CTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG	686
ATG-F4	CTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG	720

ATG-F3	GAAGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC	746
ATG-F4	GAAGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC	780

ATG-F3	ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGG	806
ATG-F4	ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGG	840

ATG-F3	TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA	866
ATG-F4	TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA	900

[도 11b]

ATG-F3	GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA	926
ATG-F4	GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA	960

ATG-F3	TGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACC	986
ATG-F4	TGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACC	1020

ATG-F3	TTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGC	1046
ATG-F4	TTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGC	1080

ATG-F3	TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCC	1106
ATG-F4	TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCC	1140

ATG-F3	AGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACG	1166
ATG-F4	AGCATTGAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACG	1200

ATG-F3	ACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACA	1226
ATG-F4	ACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACA	1260

ATG-F3	ACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGT	1286
ATG-F4	ACGAGTCGCAAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGT	1320

ATG-F3	AGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG	1346
ATG-F4	AGGCTGCAACTCGCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG	1380

ATG-F3	GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACGCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAACGCC	1406
ATG-F4	GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACGCGCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAACGCC	1440

ATG-F3	CAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGAGC-----	1438
ATG-F4	CAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGG	1500

ATG-F3	-----	1438
ATG-F4	TGAAGTCGTAACAGGAAACCCCG	1523

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/017674**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 35/747(2014.01)i, A61P 21/00(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)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)

A61K 35/747; A23L 33/135; A61K 35/74; C07K 1/14; C12N 1/20; A61P 21/00

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: Lactobacillus reuteri, muscle diseases

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017-0368112 A1 (ERDMAN, Susan E.) 28 December 2017 See paragraph [0040]; and claims 37 and 45.	1-9
A	KR 10-1951919 B1 (ATOGEN CO., LTD.) 25 February 2019 See entire document.	1-9
A	KR 10-2019-0038451 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 08 April 2019 See entire document.	1-9
A	KR 10-2005-0109928 A (BIOGAIA AB. et al.) 22 November 2005 See entire document.	1-9
PX	KR 10-2049700 B1 (ATOGEN CO., LTD.) 28 November 2019 See entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

“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

01 MAY 2020 (01.05.2020)

Date of mailing of the international search report

01 MAY 2020 (01.05.2020)

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

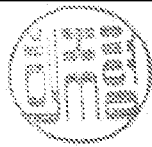
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/017674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2017-0368112 A1	28/12/2017	WO 2017-223364 A1	28/12/2017
KR 10-1951919 B1	25/02/2019	None	
KR 10-2019-0038451 A	08/04/2019	CA 3063669 A1	06/12/2019
		WO 2019-066599 A2	04/04/2019
		WO 2019-066599 A3	23/05/2019
KR 10-2005-0109928 A	22/11/2005	EP 1608308 A2	28/12/2005
		EP 1608308 A4	26/08/2009
		JP 2006-519014 A	24/08/2006
		US 2004-0208863 A1	21/10/2004
		US 2009-0136454 A1	28/05/2009
		WO 2004-069178 A2	19/08/2004
		WO 2004-069178 A3	21/12/2007
KR 10-2049700 B1	28/11/2019	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 35/747(2014.01)i, A61P 21/00(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 35/747; A23L 33/135; A61K 35/74; C07K 1/14; C12N 1/20; A61P 21/00 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 루테리(Lactobacillus reuteri), 근육질환(muscle diseases)																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2017-0368112 A1 (ERDMAN, SUSAN E.) 2017.12.28 단락 [0040]; 및 청구항 37, 45 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1951919 B1 ((주)에이투젠) 2019.02.25 전체 문헌 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2019-0038451 A (경희대학교 산학협력단 등) 2019.04.08 전체 문헌 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2005-0109928 A (바이오가이아 에이비 등) 2005.11.22 전체 문헌 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>KR 10-2049700 B1 ((주) 에이투젠) 2019.11.28 전체 문헌 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	US 2017-0368112 A1 (ERDMAN, SUSAN E.) 2017.12.28 단락 [0040]; 및 청구항 37, 45 참조.	1-9	A	KR 10-1951919 B1 ((주)에이투젠) 2019.02.25 전체 문헌 참조.	1-9	A	KR 10-2019-0038451 A (경희대학교 산학협력단 등) 2019.04.08 전체 문헌 참조.	1-9	A	KR 10-2005-0109928 A (바이오가이아 에이비 등) 2005.11.22 전체 문헌 참조.	1-9	PX	KR 10-2049700 B1 ((주) 에이투젠) 2019.11.28 전체 문헌 참조.	1-9
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	US 2017-0368112 A1 (ERDMAN, SUSAN E.) 2017.12.28 단락 [0040]; 및 청구항 37, 45 참조.	1-9																		
A	KR 10-1951919 B1 ((주)에이투젠) 2019.02.25 전체 문헌 참조.	1-9																		
A	KR 10-2019-0038451 A (경희대학교 산학협력단 등) 2019.04.08 전체 문헌 참조.	1-9																		
A	KR 10-2005-0109928 A (바이오가이아 에이비 등) 2005.11.22 전체 문헌 참조.	1-9																		
PX	KR 10-2049700 B1 ((주) 에이투젠) 2019.11.28 전체 문헌 참조.	1-9																		
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “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 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2020년 05월 01일 (01.05.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 05월 01일 (01.05.2020)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2019/017674

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2017-0368112 A1	2017/12/28	WO 2017-223364 A1	2017/12/28
KR 10-1951919 B1	2019/02/25	없음	
KR 10-2019-0038451 A	2019/04/08	CA 3063669 A1	2019/12/06
		WO 2019-066599 A2	2019/04/04
		WO 2019-066599 A3	2019/05/23
KR 10-2005-0109928 A	2005/11/22	EP 1608308 A2	2005/12/28
		EP 1608308 A4	2009/08/26
		JP 2006-519014 A	2006/08/24
		US 2004-0208863 A1	2004/10/21
		US 2009-0136454 A1	2009/05/28
		WO 2004-069178 A2	2004/08/19
		WO 2004-069178 A3	2007/12/21
KR 10-2049700 B1	2019/11/28	없음	