

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 26일 (26.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/178653 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/74 (2015.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 35/66 (2015.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004983

(22) 국제출원일: 2015년 5월 19일 (19.05.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2014-0060409 2014년 5월 20일 (20.05.2014) KR
10-2015-0068864 2015년 5월 18일 (18.05.2015) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University-Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).

(72) 발명자: 김윤근 (KIM, Yoon-Keun); 413-953 경기도 파주시 가람로 70, 413 동 201 호 (와동동, 가람마을 4단지 한양수자인), Gyeonggi-do (KR). 박현택 (PARK, Hyun-Tack); 681-310 울산시 중구 중가로 250, 102 동 403 호 (유곡동, 동원로얄듀크), Ulsan (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 135-846 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).

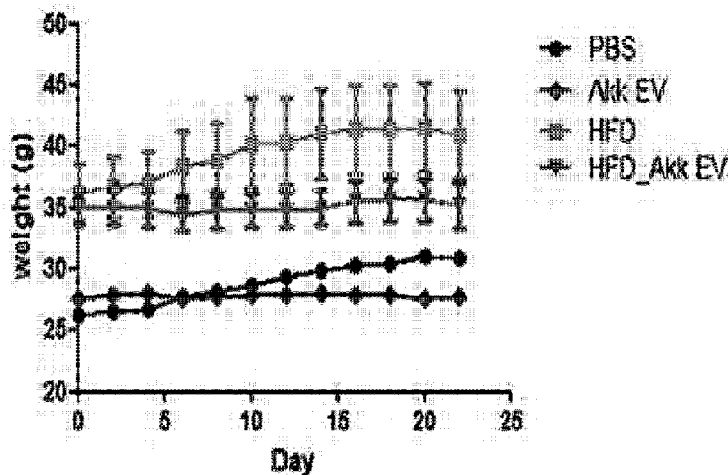
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING METABOLIC DISEASE, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM AKKERMANSIA MUCINIPHILA BACTERIA

(54) 발명의 명칭 : Akkermansia muciniphila 균에서 유래하는 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는 대사질환의 치료 또는 예방용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical and food composition for treating, preventing, or alleviating a metabolic disease, containing, as an active ingredient, extracellular vesicles derived from *Akkermansia muciniphila*. The composition of the present invention can be used as a pharmaceutical/food composition and the like for treating, preventing, or alleviating a metabolic disease, in particular a metabolic disease such as obesity, diabetes, hyperlipidemia, arteriosclerosis, and hypertension, occurring or exacerbated due to a high fat diet. In addition, in the present invention, a fermented food itself, prepared by adding *Akkermansia muciniphila*, can be used for the purpose of preventing or alleviating a metabolic disease occurring or exacerbated due to a high fat diet.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2015/178653 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*)에서 유래한 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는 대사질환의 치료, 예방 또는 개선용, 약학 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 대사질환, 특히 고지방 식이에 발생 또는 악화되는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증, 고혈압 등의 대사질환의 치료, 예방 또는 개선용 약학/식품 조성물 등으로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에서는 고지방 식이에 발생 또는 악화되는 대사질환의 예방 또는 개선 목적으로 *Akkermansia muciniphila*를 첨가하여 제조한 발효식품 자체를 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: Akkermansia muciniphila 균에서 유래하는 세포밖 소포를 유효성분으로 함유하는 대사질환의 치료 또는 예방용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*)에서 유래한 세포밖 소포(extracellular vesicles)를 유효성분으로 함유하는 대사질환의 치료, 예방 또는 개선용, 약학 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 대사질환(Metabolic disease)은 생체 내에서의 물질대사 장애에 의해 발생하는 질환을 총칭한다. 일반적으로 당질, 지질, 단백질, 비타민, 전해질 및 수분 등의 불균형에 의해 발생하게 되는데, 그 예로는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증, 고혈압 등이 있다. 이 중에서도 제2형 당뇨병의 경우에는 성인기에 주로 나타나는 당뇨병으로서 인슐린에 대한 저항성의 증가를 특징으로 한다. 인슐린 수용체 자체의 감소, 혹은 그 민감도가 떨어지거나 세포 내 글리코겐 합성을 일으키는 2차 전달자에 문제가 생기면 인슐린에 대한 민감도가 떨어지게 된다. 따라서, 제2형 당뇨병을 인슐린 비의존성 당뇨병이라 하며 당뇨의 85~90%를 차지한다.
- [3] 한편, 원핵세포 또는 진핵세포는 세포밖 소포를 분비하고, 분비된 소포가 여러 기능을 수행함이 최근 보고되었다. 세균에서 분비된 세포밖 소포는 내독소(lipopolysaccharide; LPS)와 세균 유래 단백질을 함유하고 있고, 염증성 질환을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 병원성 세균에서 유래하는 소포에 의한 국소 염증반응의 발생을 억제하는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 상태이다.
- [4] 또한, 사람 또는 동물의 여러 분비물, 배설물 또는 조직 세척액 등에서 세포밖 소포가 발견되었음이 보고되었으며, 조직에 존재하는 세포밖 소포는 소포를 분비하는 조직의 상태를 반영하는 것으로 알려져 있고, 질병의 진단에 이용될 수 있음이 보고되었다.
- [5] 대장에는 숙주세포 수의 약 10배 정도 되는 수의 장내 공생 세균이 서식하고 있다. *Akkermansia muciniphila* 균은 사람을 포함한 포유류의 장내에 공생하면서 점액을 분해하여 생존하는 그람음성균으로서 당뇨와 비만과 연관이 있는 균으로 알려져 있고, 또한 *Akkermansia muciniphila* 균 자체는 염증성 장염을 악화시킨다고 알려져 있다. 최근 본 발명자는 *Akkermansia muciniphila*가 세포밖 소포를 분비하고, 이 균에서 유래하는 세포밖 소포가 염증성 장염을 예방하는 효과가 있음을 보고한 바 있다(Kang CS *et al.* Extracellular vesicles derived from Gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of

dextran sulfate sodium-induced colitis. PLOS ONE 2013).

- [6] 한편, 5' AMP-activated protein kinase(AMPK)는 세포에서 에너지 항상성에 중요한 역할을 하는 효소로서, 간, 뇌, 근육, 지방, 췌장 등에 발현된다. AMPK를 활성화시키면, 간에서 콜레스테롤, 중성지방(triglyceride) 합성을 억제하고, 근육에서 지방산 산화, 포도당 흡수를 증가시키고, 췌장에서 인슐린 분비를 조절한다고 알려져 있다. 당뇨병 치료제 중에서 인슐린 저항성을 회복시키는 메트포르민(metformin)이나 운동 등이 AMPK를 활성화하여 대사질환을 호전시킨다고 알려져 있다.

- [7] 그러나, 아직까지 *Akkermansia muciniphila* 균 자체가 아닌, 이 균에서 유래된 세포막 소포가 비만이나 당뇨병 등의 대사질환을 경감 또는 치료할 수 있다는 연구 결과는 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은, *Akkermansia muciniphila*가 분비하는 세포막 소포가 고지방 식이에 의해 유도되는 비만과 당뇨를 억제하고, 고지방 식이에 의해 발생하는 당뇨병의 병인에 중요한 인슐린 저항성을 회복시키고, 이는 AMPK 활성화를 통해 일어날 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [9] 따라서, 본 발명은 *Akkermansia muciniphila*에서 유래한 세포막 소포를 이용하여, 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 등의 대사질환의 치료 또는 예방용의 약학 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [10] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은, 아커만시아 뮈시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는, 대사질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은, 아커만시아 뮈시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 함유하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은, 아커만시아 뮈시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은, 아커만시아 뮈시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 대사질환의 예방 또는 치료에 이용하는 용도를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포막 소포는 아커만시아 뮈시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분비된 것임을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 세포막 소포는 평균 직경이 20~300nm이며,

바람직하게는 50~200nm인 것을 특징으로 한다.

- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 대사질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 고혈압으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 한다.

- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 식품은 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균을 첨가하여 발효시킨 발효식품인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명의 *Akkermansia muciniphila*에서 유래하는 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은, 고지방 식이에 의해 유도되는 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 고혈압 등의 대사질환을 치료 및 예방할 수 있다.

- [19] 또한, 본 발명의 *Akkermansia muciniphila*에서 유래하는 세포막 소포를 함유하는 발효식품 조성물은, 고지방 식이에 의해 유도되는 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 고혈압 등의 대사질환을 예방 및 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 *Akkermansia muciniphila* 배양액에서 분리된 세포막 소포를 전자현미경으로 관찰한 결과이다.

- [21] 도 2는 *Akkermansia muciniphila* 유래의 세포막 소포의 평균 직경을 광산란법으로 측정한 결과이다.

- [22] 도 3은 *Akkermansia muciniphila* 균과 *Akkermansia muciniphila* 유래의 세포막 소포의 단백질 발현양상을 SDS-PAGE로 비교평가한 결과이다.

- [23] 도 4는 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 사이토카인(IL-6)의 분비가 *Akkermansia muciniphila* 유래의 세포막 소포(EV) 전처리에 의해 억제됨을 보여주는 결과이다.

- [24] 도 5는 고지방 식이에 의해 유도된 비만 및 당뇨 마우스 모델에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 (EV)를 위장으로 직접 투여한 후 대사질환의 치료효과를 확인하기 위한 실험 프로토콜이다.

- [25] 도 6은 고지방 식이에 의해 유도된 대사질환 마우스 모델에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 (Akk EV)를 위장으로 직접 투여한 후 체중변화를 관찰한 결과이다.

- [26] 도 7은 고지방 식이에 의해 유도된 대사질환 마우스 모델에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 (Akk EV)를 위장으로 직접 투여한 후 공복 시의 혈당량을 측정한 결과이다.

- [27] 도 8은 고지방 식이에 의해 유도된 대사질환 마우스 모델에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 (Akk EV)를 위장으로 직접 투여한 후 혈액 내 인슐린의 농도를 측정한 결과이다.

- [28] 도 9는 고지방 식이에 의해 유도된 대사질환 마우스 모델에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 (Akk EV)를 위장으로 직접 투여한 후 비장 세포를 체외로 분리하여 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체로 48시간 자극을 준 후에 그

상층액에서 IFN- γ 와 IL-17의 농도를 측정한 결과이다.

[29] 도 10은 마우스 근육세포 (myocyte)에 고지방산을 처리하여 인슐린 저항성을 유도한 후, Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포 (Akk EV)에 의해 인슐린 신호전달 저해가 회복되었는지 확인한 결과이다.

[30] 도 11은 마우스 위장에 Akkermansia muciniphila균(bacteria)과 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 각각 직접 투여한 후, 이들의 체내 분포양상을 비교평가한 결과이다.

[31] 도 12는 마우스 위장에 Akkermansia muciniphila균(bacteria)과 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 각각 직접 투여한 후 12시간째에, 혈액 및 여러 장기(심장, 폐, 간, 신장, 비장, 지방, 근육)를 적출하여, 이들의 체내 분포양상을 비교평가한 결과이다.

[32] 도 13은 마우스 대장에 Akkermansia muciniphila균(bacteria)과 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 각각 직접 투여한 후, 이들이 장 방어막을 뚫고 조직으로 흡수되는지를 비교평가한 결과이다.

[33] 도 14는 마우스 대장에 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 직접 투여한 후, 장관내 모세혈관에 세포막 소포가 흡수되는지를 확인한 결과이다.

[34] 도 15는 체외 근육세포(myocyte)에 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 다양한 농도(0.1, 1, 10ug/mL)로 투여한 후 60분째에, AMPK의 활성화를 확인한 결과이다.

[35] 도 16은 체외 근육세포(myocyte)에 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV) 1ug을 투여한 후, 다양한 시간(10, 20, 30, 60min)에 AMPK의 활성화를 확인한 결과이다.

[36] 도 17은 체외 근육세포(myocyte)에 metformin, AMPK 신호 억제제(compound C), E. coli 유래 세포막 소포를 각각 투여한 후, AMPK의 활성화를 확인한 결과이다.

[37] 도 18은 체외 근육세포(myocyte)에 인슐린, metformin, Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 각각 투여한 후, 포도당의 흡수정도를 비교평가한 결과이다.

[38] 도 19는 체외 근육세포(myocyte)에 인슐린, metformin, Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 각각 투여한 후, 포도당의 흡수 수용체인 GLUT4 transporter의 발현정도를 비교평가한 결과이다.

[39] 도 20은 체외 근육세포(myocyte)에 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포(EV)를 투여한 후, 포도당의 흡수에 대한 AMPK 신호 억제제(compound C)의 효과를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 본 발명은 장내 세균, 특히 Akkermansia muciniphila에서 유래하는 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는, 대사질환의 치료, 예방 또는 개선용 약학/식품

조성물에 관한 것이다.

- [41] 본 발명자들은 고지방 식이에 의해 유도된 대사질환 마우스 모델에서, *Akkermansia muciniphila*에서 유래하는 세포막 소포를 위장으로 투여하였을 때, 비만이 억제되고, 지방산에 의한 인슐린 저항성이 회복됨과 동시에 당뇨병의 표현형이 억제되고, 면역기능이 향상됨을 확인하였다.
- [42] 또한, 본 발명자들은 *Akkermansia muciniphila* 세균 자체와 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포의 단백질 발현양상이 상이함을 확인하였다.
- [43] 또한, 본 발명자들은 *Akkermansia muciniphila* 세균 자체와 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포의 체내 흡수양상을 비교한 결과, 세포막 소포의 체내 흡수가 훨씬 우수함을 알 수 있었다.
- [44] 또한, 본 발명자들은 근육세포에 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포를 투여하였을 때, AMPK 활성화에 의해 근육세포에서 포도당 흡수 수용체(GLUT4)의 발현이 촉진되고 결국 포도당 흡수가 증가됨을 확인하였다.
- [45] 본 명세서에서 '대사질환(Metabolic disease)'이란, 생체 내에서의 물질대사 장애에 의해 발생하는 질환을 총칭한다. 일반적으로 당질, 지질, 단백질, 비타민, 전해질 및 수분 등의 불균형에 의해 발생하게 되는데, 대표적인 예로는 고지방 식이에 의해 발생하는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증 등이 있다.
- [46] 본 명세서에서 '대사질환의 치료 또는 예방'이란, 대사질환의 경감, 완화 및 증상의 개선을 포함하며, 또한 대사질환이 걸릴 가능성을 낮추는 것을 포함하는 의미이다.
- [47] 본 명세서에서 '*Akkermansia muciniphila*에서 유래하는 세포막 소포'란 *Akkermansia muciniphila*의 배양액에서 분리되거나, 또는 *Akkermansia muciniphila*로 발효시킨 식품에서 분리될 수 있다. 상기 세균 배양액 또는 상기 세균 첨가 발효식품에서 상기 세포막 소포를 분리하는 방법은 세포막 소포를 포함한다면 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 세균 배양액이나 발효식품에서, 원심분리, 초고속 원심분리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 모세관 전기영동, 폴리머를 이용한 분리 등의 방법 및 이들의 조합을 이용하여 세포막 소포를 분리할 수 있다. 또한, 불순물의 제거를 위한 세척, 수득된 세포막 소포의 농축 등의 과정을 추가로 포함할 수 있다.
- [48] 상기 세포막 소포는 자연적으로 분비된 것이거나, 혹은 인공적으로 분비된 세포막 소포를 포함한다.
- [49] 상기 방법에 의하여 분리된 세포막 소포는 평균 직경이 20~300nm일 수 있으나, 바람직하게는 30~200nm이다.
- [50] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 대사질환의 치료 또는 예방용 조성물은 약학적 조성물로 제조될 수 있다. 치료 및 예방에 사용하기 위해 본 발명의 세포막 소포 자체를 투여하는 것이 가능하나, 약학적 조성물의 활성 성분으로서 상기 세포막 소포가 포함되는 것이 바람직하다.
- [51] 상기 약학적 조성물은 상기 분리된 세포막 소포를 유효성분으로 함유하며,

약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

- [52] 본 발명의 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥 내, 피하, 복강 내, 흡입, 피부도포 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다.
- [53] 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로써 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 본 발명의 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명에 의한 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로는 0.01~1000 mg/일, 바람직하게는 1~500 mg/일이며, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있다.
- [54] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 대사질환의 예방 또는 개선용 조성물은 식품 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 상기 세포밖 소포를 함유할 뿐만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 세포밖 소포 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [55] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 김치와 같은 발효식품 자체를 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [56] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에

의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58] **실시예 1: Akkermansia muciniphila 배양액에서 세포밖 소포 분리**

[59] Akkermansia muciniphila(ATCC BAA-835) 균주를 멸균된(autoclaved) Brain heart infusion broth(BD 237500) 2L에서 72시간 동안 O.D 1.5가 되도록 혐기성 챔버에서 배양한 후, 배양액을 20분간 고속 원심분리(10,000×g)하여 균 침전 펠렛을 제외한 상층액을 얻었다. 상층액은 0.45 μ m 필터와 0.22 μ m 필터로 여과를 수행하여 Quixstand benchtop system을 이용하여 약 14배 정도 농축한 배양액을 얻었다. 이 배양액은 다시 150,000×g, 4°C에서 2시간 동안 초고속 원심분리를 수행하여 펠렛을 얻은 후 멸균 생리식염수(PBS)로 녹여 단백질 정량하였다.

[60]

[61] **실시예 2. 세포밖 소포의 특성 분석**

[62] 상기 실시예 1의 방법으로 획득한 것이 Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포인지 확인하기 위해, 단백질 정량에 의해 50 μ g/ml의 샘플을 얻은 후 JEM 1011 전자 현미경(Jeol, Japan)으로 관찰하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포가 구형임을 확인할 수 있었다.

[63]

또한, Akkermansia muciniphila에서 분리한 세포밖 소포의 크기를 광산란법(dynamic light scattering, DLS)으로 확인하기 위해, 50 μ g/ml의 샘플을 zetasizer nano ZS (Malvern, UK)를 통하여 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포의 평균 직경이 20~300nm의 범위임을 알 수 있었다.

[64]

또한, Akkermansia muciniphila에서 분리한 세포밖 소포의 단백질 패턴을 확인하기 위해, 10 μ g/ml의 샘플을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포(EV)의 단백질 발현양상이 Akkermansia muciniphila 세균(Bacteria) 단백질 발현과 다름을 알 수 있었다.

[65]

또한, Akkermansia muciniphila에서 분리한 세포밖 소포의 항염증 효과를 평가하기 위해, 대식세포에 LPS(100ng/ml)을 처리하기 전에 세포밖 소포(1 μ g/ml)를 전처리한 후 ELISA를 통해 분비되는 염증성 사이토카인을 측정하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포를 대식세포에 전처리하면 LPS에 의해 유도되는 IL-6의 분비량이 감소함을 알 수 있었다.

[66]

[67] **실시예 3. 고지방 식이로 유도된 비만 및 당뇨병 마우스에서 Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포의 치료효과**

[68]

상기 실시예 1에서 얻어진 Akkermansia muciniphila 유래 세포밖 소포가 고지방 식이에 의해 유도된 비만과 당뇨병을 억제하는지 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

- [69] 정상식이(Regular diet; RD)를 2달 동안 먹인 정상 마우스와, 고지방 식이(High fat diet; HFD)를 2달 동안 먹여 비만 및 당뇨병을 유도한 마우스 모델에, 실시예 1에서 얻어진 세포막 소포를 마우스당 10 μ g씩 3주 동안 이틀 간격으로 투여하였다(도 5 참조). 이때, 대조군(negative control)으로는 정상식이만 먹인 마우스와 정상식이 및 세포막 소포를 투여한 마우스 그룹을 사용하였다.
- [70] 이틀 간격으로 세포막 소포를 투여함과 동시에 몸무게를 측정한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 고지방 식이만 먹인 마우스 그룹(HFD)에 비해 세포막 소포를 투여한 고지방 식이 마우스 그룹(HFD_Akk EV)은 3주 동안 체중의 증가가 나타나지 않는 것을 확인하였다.
- [71] 또한, 세포막 소포의 투여가 끝난 후 6시간 동안 굶긴 다음 공복시 혈당을 측정한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 세포막 소포를 투여한 고지방 식이 마우스 그룹(HFD + Akk EV)의 혈당이 고지방 식이만 먹인 마우스 그룹(HFD - Akk EV)에 비해 감소되어 있는 것을 확인하였다.
- [72] 또한, 세포막 소포 투여가 끝나고 24시간 후, 마우스의 심장에서 채취한 혈액에서 인슐린의 농도를 측정한 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, 세포막 소포를 투여한 고지방 식이 마우스 그룹(HFD + Akk EV)이 고지방 식이만 먹인 마우스 그룹(HFD - Akk EV)에 비해 인슐린 농도가 더 증가되어 있는 것을 확인하였다.
- [73] 상기의 결과로부터 Akkermansia muciniphila로부터 유래한 세포막 소포가 고지방 식이로 인해 유도된 비만 및 당뇨를 치료하는데 효과가 있음을 알 수 있다.
- [74]
- [75] **실시예 4. 면역기능 조절 효과**
- [76] 상기 실시예 1에서 얻어진 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포가 면역기능에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.
- [77] 상기 실시예 3과 같은 방법으로 세포막 소포 투여를 종료한 후 24시간 뒤에 마우스 혈액을 채취함과 동시에 비장을 함께 채취하였다. 채취한 각 마우스 그룹의 비장은 100 μ m와 40 μ m의 cell strainer를 이용하여 조직에 있는 면역세포를 추출하였다. 추출물을 400xg, 5분간 원심분리하고, 세포의 수를 세어 well 당 5 $\times$ 10⁵ cell을 세포배양 플레이트(plate)에 넣은 뒤, T세포의 co-stimulatory molecule을 자극(사이토카인 분비 자극)하는 anti-CD3 및 anti-CD28을 각각 1 μ g/mL, 0.5 μ g/mL을 넣어주고 48시간 동안 배양하였다.
- [78] 배양이 끝난 후, 각 그룹간의 염증성 사이토카인(cytokine) 분비 차이를 확인하기 위하여, 세포배양 플레이트에서 각 그룹의 상층액을 거두어 400xg, 5분간 원심분리로 상층액에 존재하는 세포를 제거하고 다시 그 상층액만 거두었다. 거둔 상층액은 ELISA로 IFN- γ 와 IL-17의 농도를 확인한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 고지방 식이만 투여한 마우스 그룹(HFD - Akk EV)에서는

증가했던 IFN- γ 와 IL-17의 농도가, Akkermansia muciniphila 유래의 세포막 소포를 함께 투여한 고지방 식이 마우스 그룹(HFD + Akk EV)에서는 감소되었음을 확인하였다.

- [79] 비만 및 당뇨병은 염증과도 관련이 있기 때문에, IFN- γ 및 IL-17와 같은 염증성 사이토카인이 감소되었다는 것은 비만 및 당뇨병의 치료에 면역기능을 호전시켜 효과를 나타내는 것임을 의미하는 것이다.

[80]

[81] 실시예 5. 인슐린 저항성에 의한 신호전달 억제에 미치는 영향

- [82] 상기 실시예 1에서 얻어진 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포가 인슐린 저항성을 회복시키는지 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

- [83] *In vitro*에서 인슐린 저항성을 구현하기 위해, 마우스 유래 근육세포 (C2C12, ATCC CRL-1772) 배양액에 지방산(sodium palmitate, SIGMA) 1mM 과 4%의 BSA(Bovine serum albumin)을 48시간 처리하였다. 이 후 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포를 1 μ g/ml 농도로 넣어 6시간 동안 배양하고, 인슐린을 2nM의 농도로 처리하여 세포 내부의 신호전달을 확인하였다.

- [84] 인슐린을 처리하지 않은 군과 처리한 군에서, 세포 내 인슐린 신호전달에서 중요한 지표인 phospho-Insulin Receptor Substrate-1(p-IRS-1)의 양 차이를 western blot으로 확인한 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 세포막 소포가 처리된 군에서 p-IRS-1이 나타난 것으로 보아 인슐린 저항성으로 인해 저해되었던 세포 내 신호전달이 회복되었음을 알 수 있었다.

- [85] 상기 결과는 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포가 고지방산에 의해 근육세포에서 유도된 인슐린 저항성, 즉 인슐린으로 인한 세포 내 신호전달이 저해되었던 것을 회복시켜주는 역할을 할 수 있음을 의미한다.

[86]

[87] 실시예 6. 세균 및 세균 유래 세포막 소포의 체내 흡수, 분포, 배설 양상

- [88] Akkermansia muciniphila 세균과 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포가 위장관을 통해 전신적으로 흡수되는지를 비교평가하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

- [89] 우선, 대조군으로는 PBS를 이용하였으며, 각각 형광으로 표지한 50 μ g의 Akkermansia muciniphila 세균과 Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포를 마우스 위장관으로 투여하고, 0분, 5분, 3시간, 6시간, 12시간 후에 형광발광 영상장비(IVIS; In Vivo Imaging System)를 이용하여 형광을 측정하였다. 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 세균인 경우에는 전신적으로 흡수되지 않았지만, 세균 유래 세포막 소포인 경우에는 투여 후 5분만에 전신적으로 흡수되었고, 투여 3시간째에는 방광에 형광이 진하게 관찰되어 세포막 소포가 비뇨기로 배설됨을 알 수 있었으며, 투여 12시간까지도 체내에 존재함을 알 수 있었다.

- [90] 또한, Akkermansia muciniphila 유래 세포막 소포가 전신적으로 흡수된 후 여러

장기로 침윤된 양상을 확인하기 위하여, 형광으로 표지한 50 μ g의 세포막 소포를 마우스 위장관으로 투여하고, 12시간 후에 혈액, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 지방, 근육을 채취하였다. 채취한 조직에서 IVIS 방법으로 형광을 관찰한 결과, 도12에 나타낸 바와 같이, 세포막 소포가 위장관으로 투여된지 12시간 후에 혈액 및 상기 장기들에서 모두 분포함을 알 수 있었으나, 세균 자체의 형광은 관찰되지 않았다.

[91] 또한, *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 장내 방어벽을 투과하는지 확인하기 위해, 마우스의 대장에 10 μ g의 *Akkermansia muciniphila* 세균과 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포를 각각 10분간 투여해 주었다. 이후 대장을 분리하여 면역조직화학법(IHC;immunohistochemistry)으로 확인한 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 세균인 경우에는 장내 방어벽을 통과하지 못하였으나, 세포막 소포인 경우에는 장내 방어벽으로 통과하여 조직으로 흡수됨을 알 수 있었다.

[92] 또한, *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 장내 방어벽을 투과하여 모세혈관으로 흡수되지 확인하기 위해, 마우스의 대장에 형광으로 표지한 10 μ g의 세포막 소포를 주입하였다. 이후 Live imaging법으로 대장에 위치한 모세혈관을 관찰한 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 혈관 내에서 세포막 소포가 흡수되어 이동하는 것을 알 수 있었다.

[93]

[94] 실시예 7. *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 근육세포에서 AMPK의 활성화에 미치는 영향

[95] AMPK는 에너지 항상성 유지에 중요한 단백질로 알려져 있기 때문에, *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 근육세포(myocyte)에서 AMPK 활성화를 통해 포도당 대사에 미치는 영향을 평가하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[96] 우선, 체외에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 처리 농도에 따른 AMPK 활성을 평가하기 위해, 근육세포에 세포막 소포를 0, 0.1, 1, 10 μ g/ml의 농도로 1시간 처리하였다. 이후 AMPK 신호전달에서 중요한 지표인 pAMPK(Phospho-5' AMP-activated protein kinase)와 pACC(Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase)의 발현양 차이를 western blot으로 측정한 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 세포막 소포 처리 농도에 따라 pAMPK 및 pACC의 발현이 증가하였기 때문에, 세포막 소포가 농도에 의존적으로 AMPK를 활성화함을 알 수 있었다.

[97] 또한, 체외에서 *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포 처리 시간에 따른 AMPK 활성을 평가하기 위해, 근육세포에 세포막 소포를 10 μ g/ml의 농도로 0, 10, 20, 30, 60분 처리하였다. 이후 AMPK 신호전달에서 중요한 지표인 pAMPK와 pACC의 발현양상을 western blot으로 측정한 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, pAMPK와 pACC의 발현양상이 세포막 소포 처리 10분 후에 증가하기 시작하여 60분간 지속됨을 알 수 있었다.

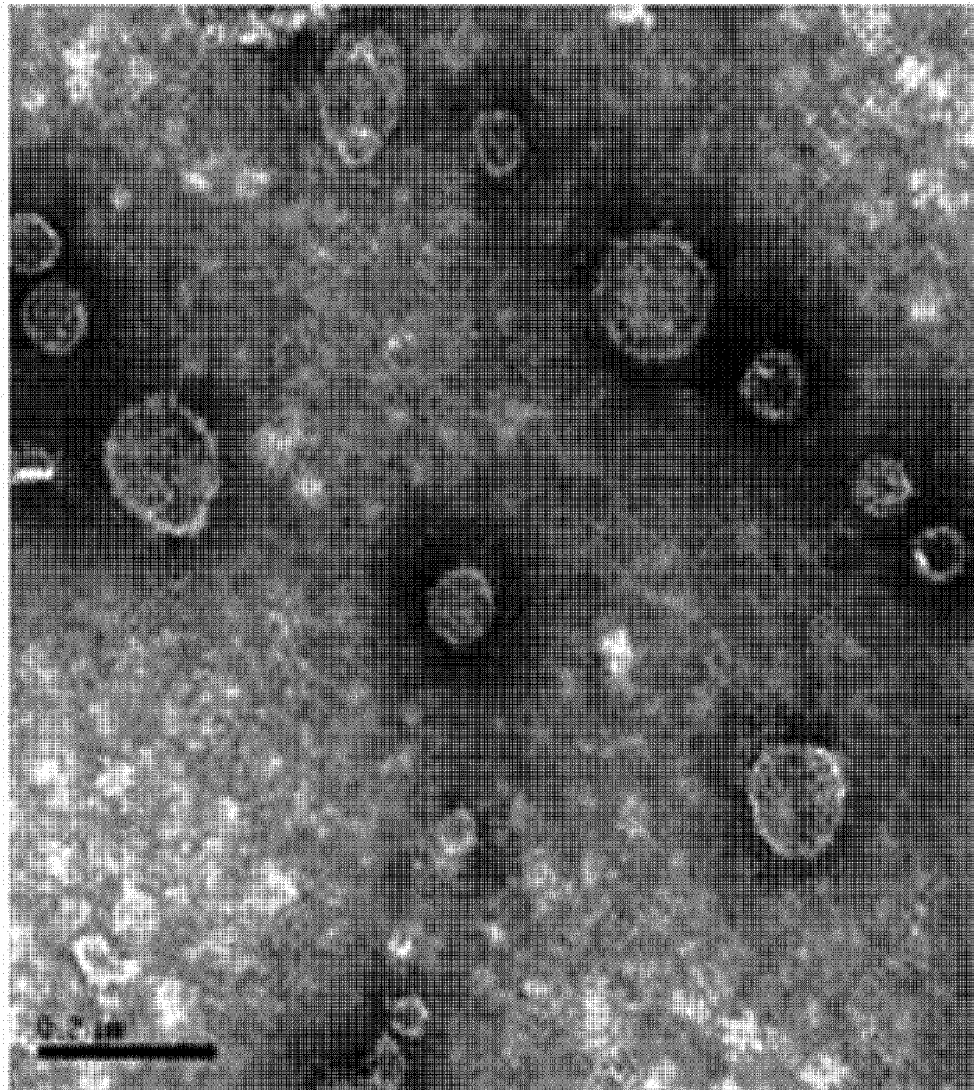
- [98] 한편, 상기 *Akkermansia muciniphila* 이외의 균에서 유래된 세포막 소포가 AMPK 활성화에 미치는 효과를 더욱 비교하기 위하여, 근육세포에 *E.coli* 유래 세포막 소포를 10 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 이후 AMPK 신호전달에서 중요한 지표인 pAMPK와 pACC의 발현량을 western blot으로 측정한 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, pAMPK와 pACC의 발현량이 현저히 감소하였기 때문에 AMPK 신호전달이 저해됨을 알 수 있었다. 반대로, AMPK의 신호전달은 metformin(당뇨병 치료제)에 의해 증가하고, compound C(AMPK 신호전달 억제제)에 의해 감소하였다.
- [99]
- [100] 실시예 8. *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 근육세포에서 포도당 흡수에 미치는 영향
- [101] *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 근육세포(myocyte)에서 포도당 흡수에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 체외에서 근육세포에 10 μ g/ml의 *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포를 1시간 처리한 후, 포도당 흡수량을 방사선 동위원소(2-[¹⁴C]deoxyglucose)로 확인하였다. 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 대조군(NT; No Treatment)에 비하여 *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포(EV)에 의해 근육세포에서 포도당 흡수가 증가하였고, 이는 인슐린(10nm)이나 metformin(50mM) 처리에 의한 증가와 유사한 정도임을 알 수 있었다.
- [102] 또한, *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포가 근육세포(myocyte)에서 포도당 운송 단백질(GLUT4 transporter)의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 체외에서 근육세포에 10 μ g/ml의 *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포를 1시간 처리한 후, 세포막에서의 GLUT4 발현정도를 O-PhenyleneDiamine(OPD) assay로 측정하였다. 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이, 대조군(NT; No Treatment)에 비하여 *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포(EV)에 의해 GLUT4의 발현이 증가하였고, 이는 인슐린(10nm)이나 metformin(50mM) 처리에 의한 증가와 유사한 정도임을 알 수 있었다.
- [103] 또한, *Akkermansia muciniphila* 유래 세포막 소포에 의해 증가되는 포도당 흡수가 AMPK 신호전달에 의해 억제되는지를 평가하기 위하여, 근육세포에 compound C(AMPK 신호전달 저해제)를 전처리하고 10 μ g/ml의 세포막 소포를 1시간 처리한 후 포도당 흡수량을 방사선 동위원소(2-[¹⁴C]deoxyglucose)로 측정하였다. 그 결과, 도 20에 나타난 바와 같이, *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포에 의해 증가되는 포도당 흡수가 compound C에 의해 감소됨을 알 수 있었다. 이와 같이, *Akkermansia musiniphila* 유래 세포막 소포에 의해 근육세포에서 인슐린 저항성이 호전되는 것은, AMPK 신호전달과정과 밀접한 관계가 있음을 의미하는 것이다.
- [104]
- [105] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술

분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

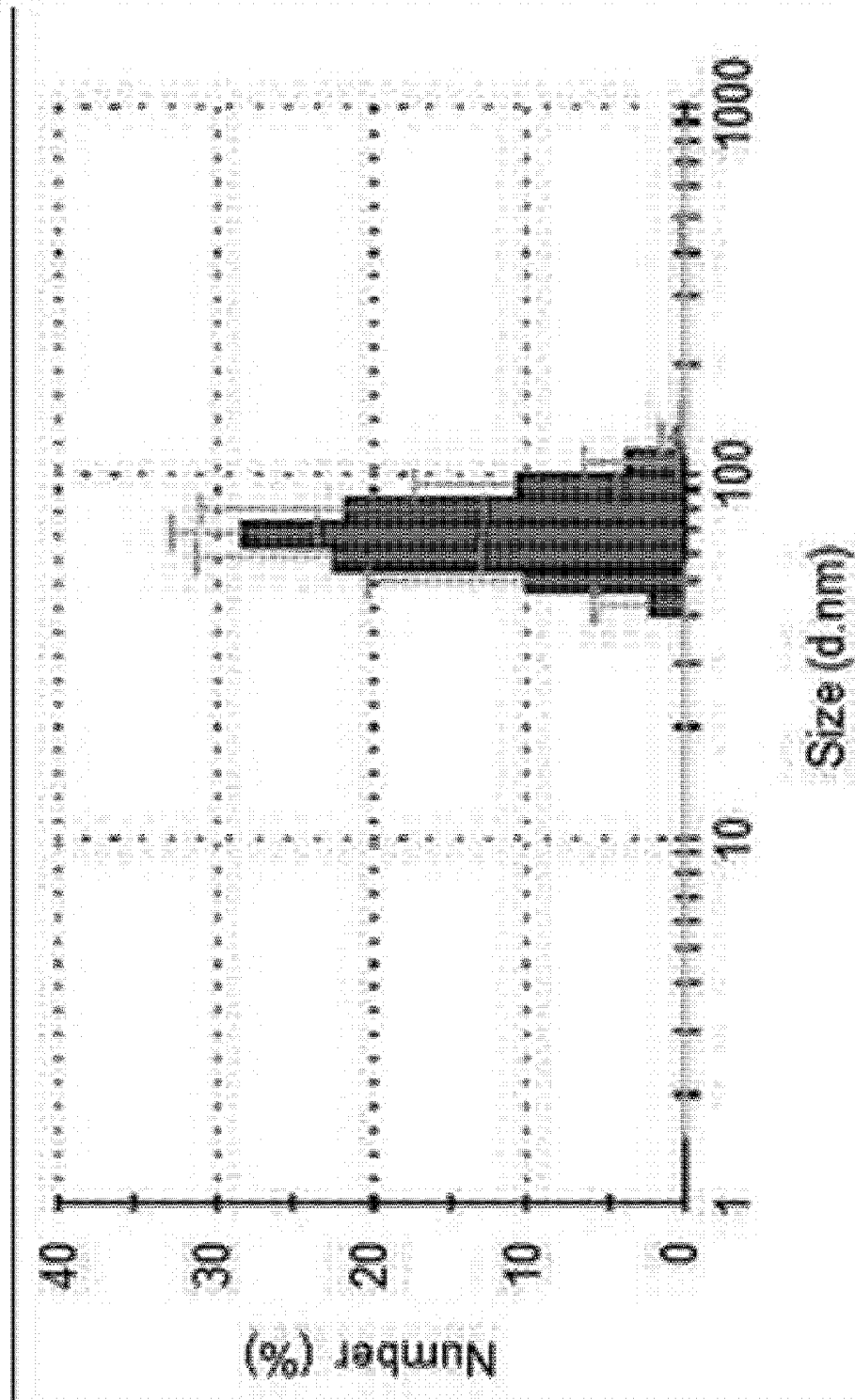
청구범위

- [청구항 1] 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 유효성분으로 함유하는, 대사질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 세포막 소포는 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분리된 것을 특징으로 하는, 대사질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 세포막 소포는 평균 직경이 20~300nm인 것을 특징으로 하는, 대사질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 대사질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증 및 고혈압으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 대사질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 5] 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 유래하는 세포막 소포를 함유하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 세포막 소포는 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균에서 자연적으로 또는 인공적으로 분리된 것을 특징으로 하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 세포막 소포는 평균 직경이 20~300nm인 것을 특징으로 하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 8] 제 5 항에 있어서, 상기 대사질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증 및 고혈압으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제 5 항에 있어서, 상기 식품은 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균을 첨가하여 발효시킨 발효식품인 것을 특징으로 하는, 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사질환의 치료 방법.
- [청구항 11] 제 1 항의 조성물의 대사질환 치료 용도.

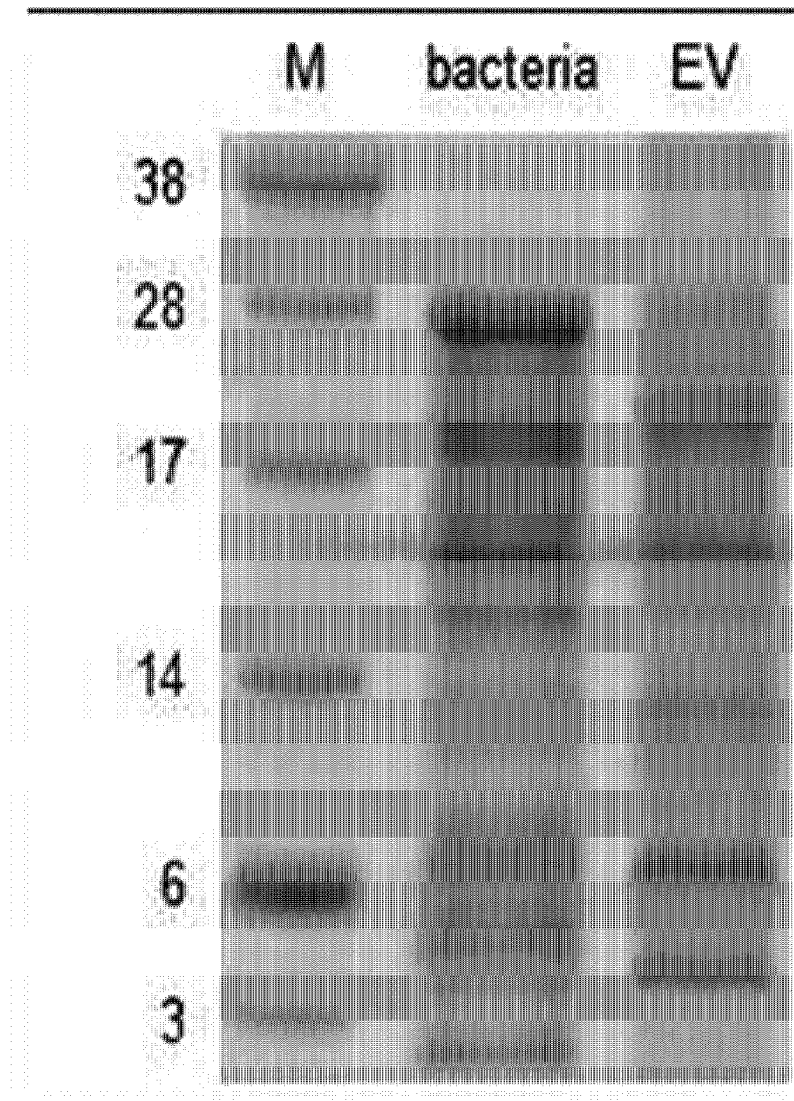
[도1]



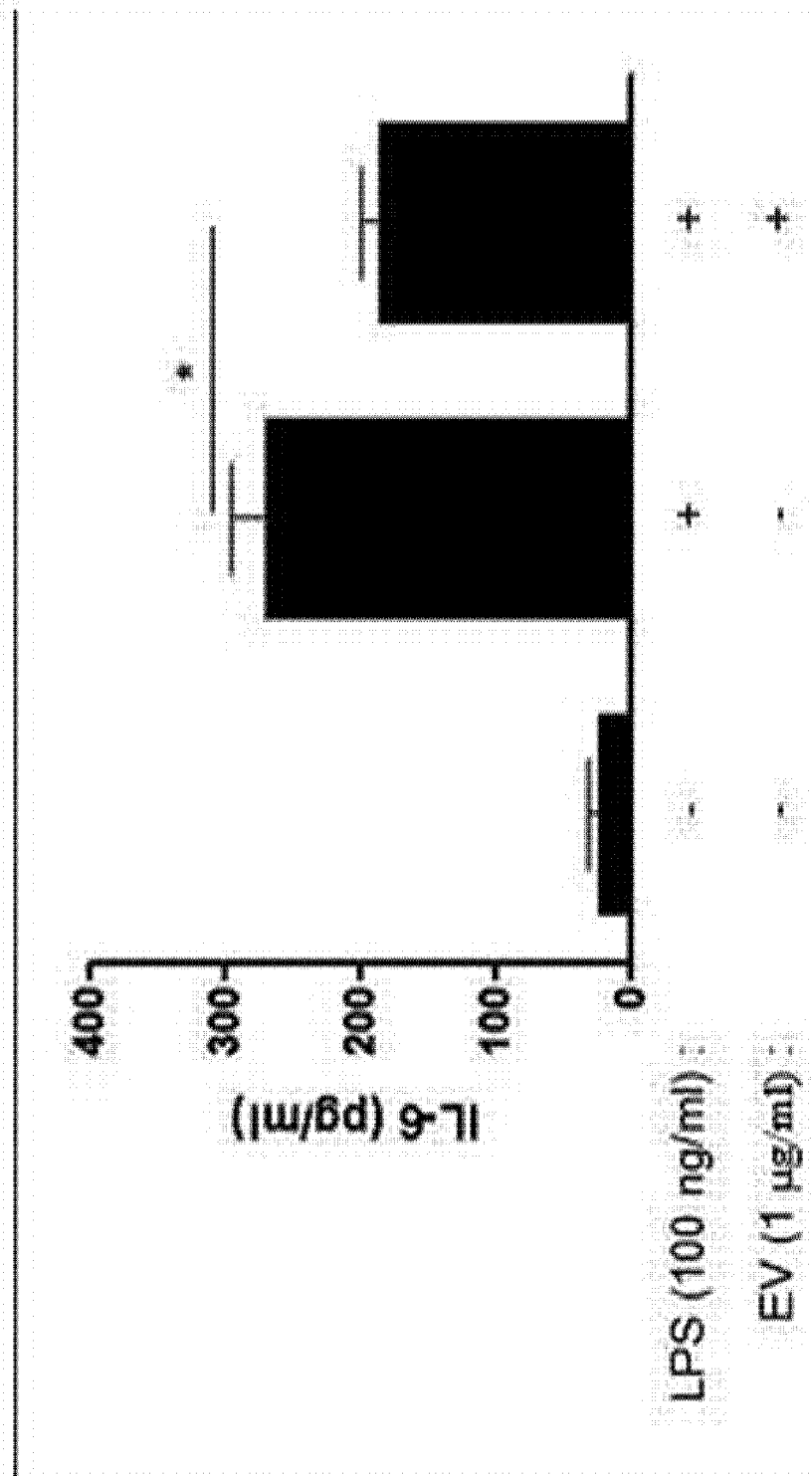
[도2]



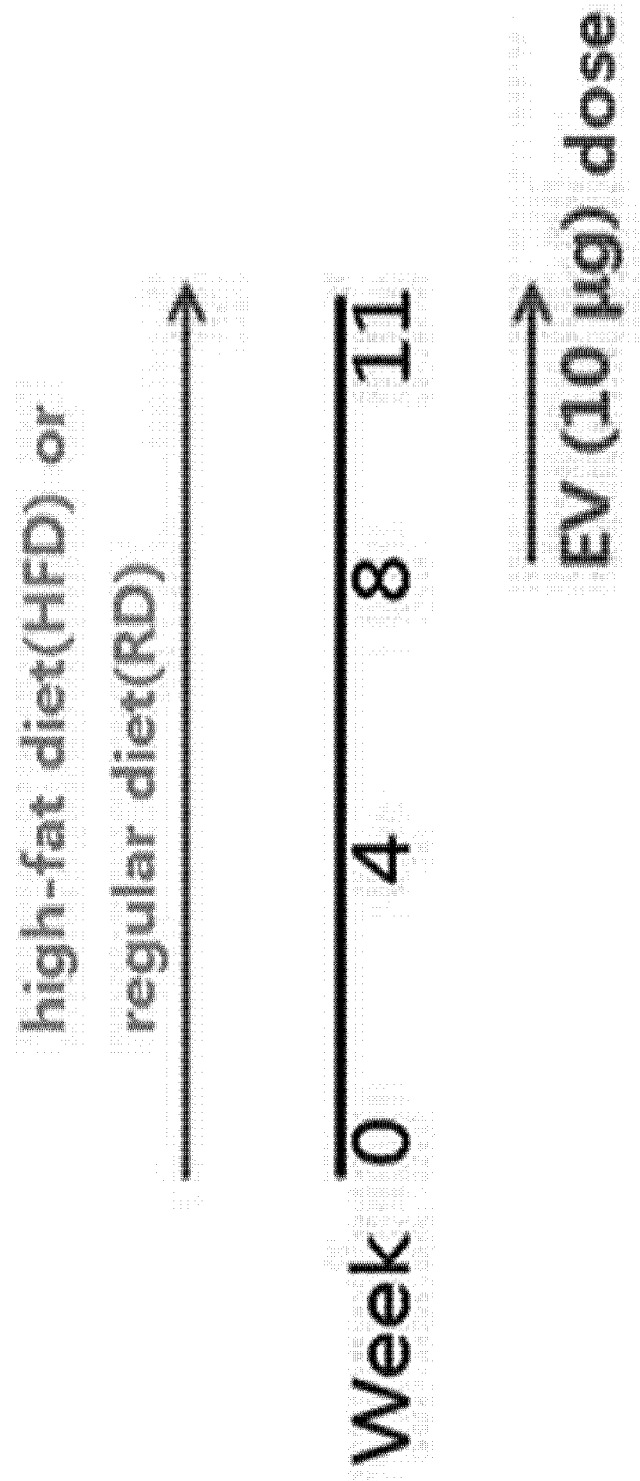
[도3]



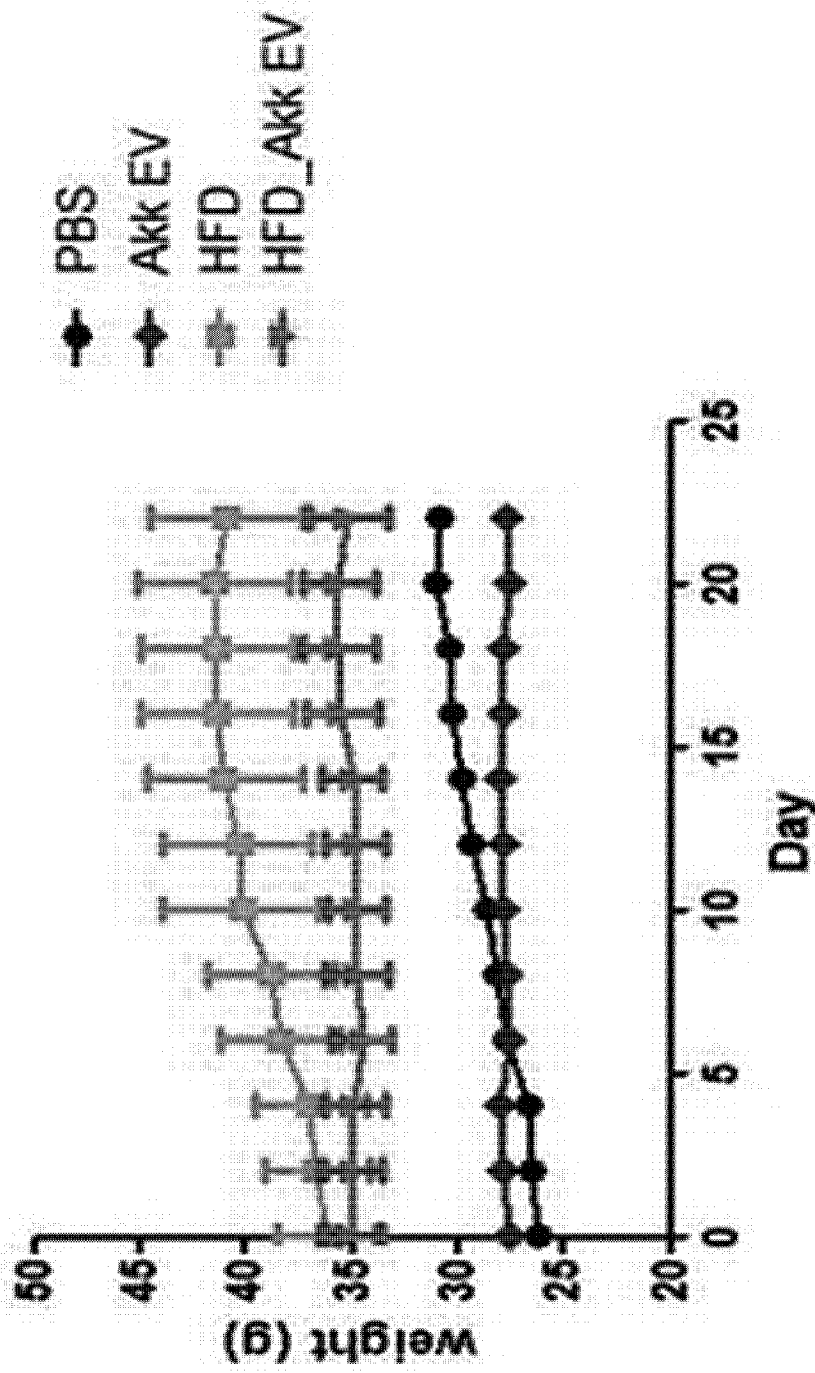
[도4]



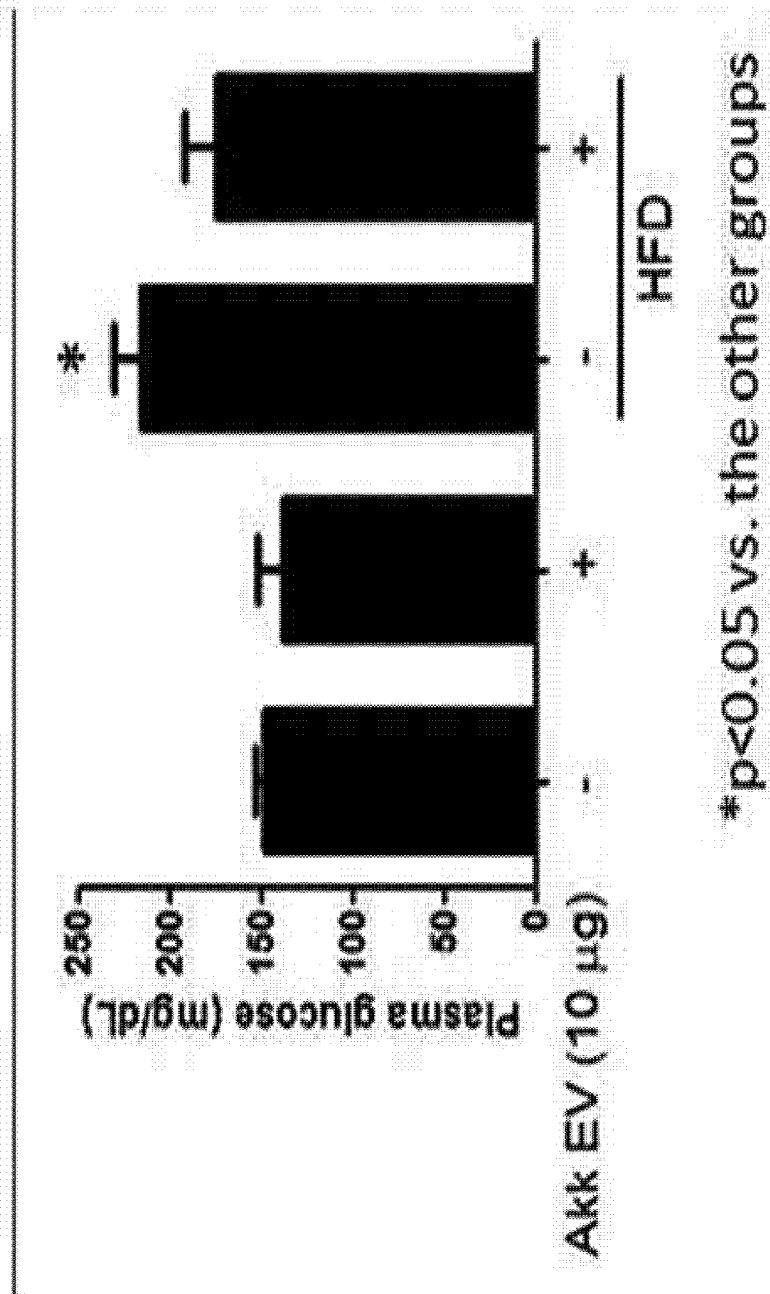
[도5]



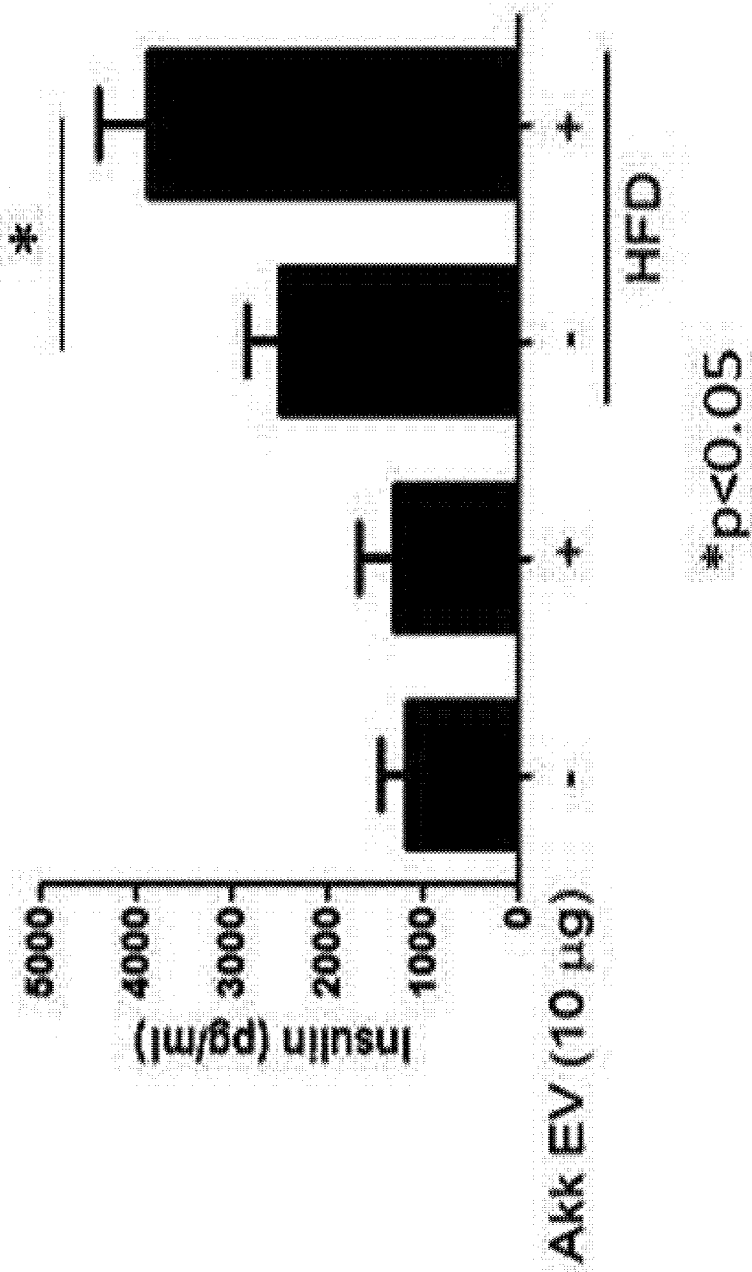
[도6]



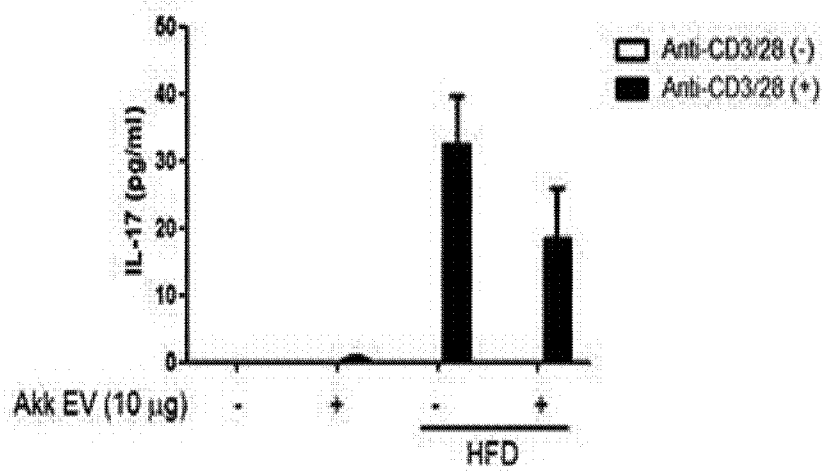
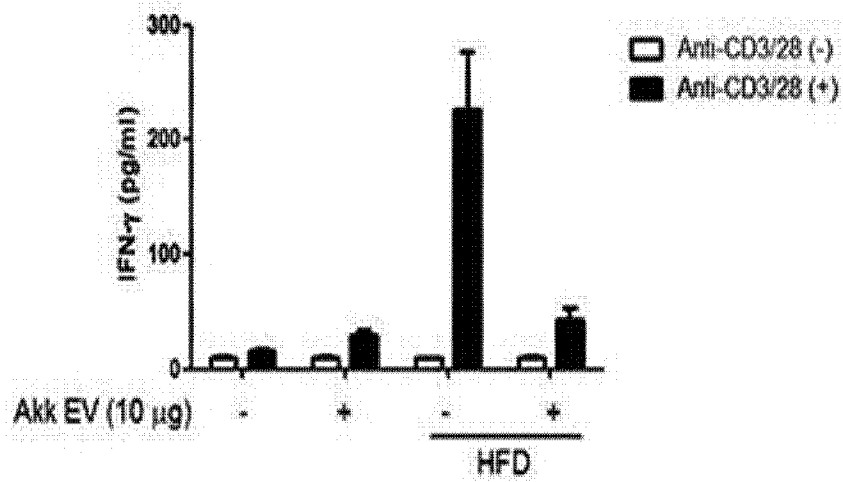
[도7]



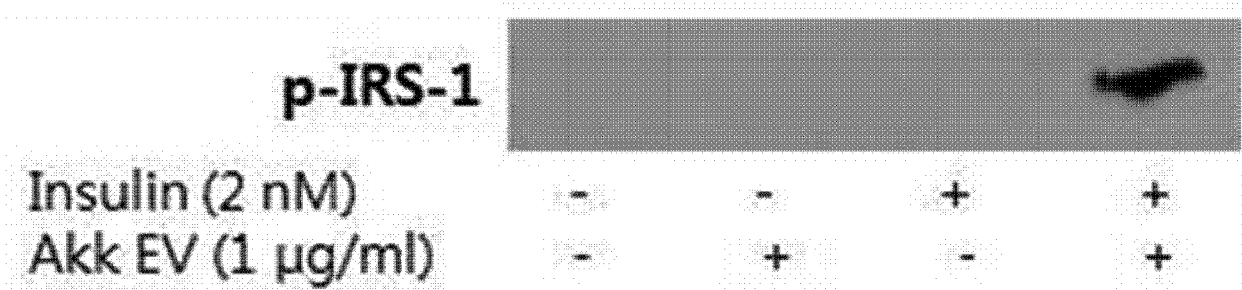
[도8]



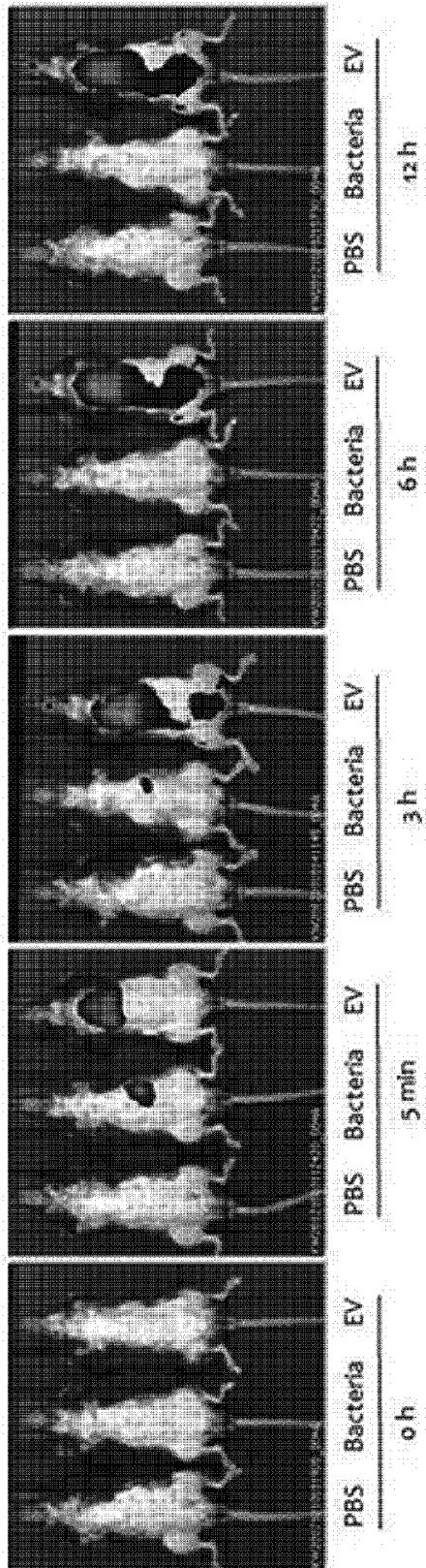
[도9]



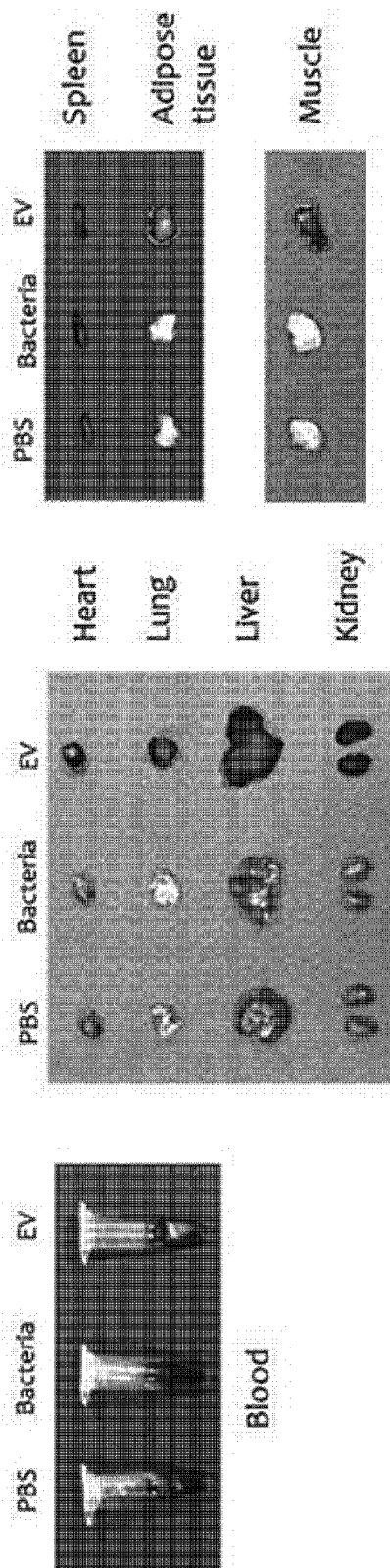
[도10]



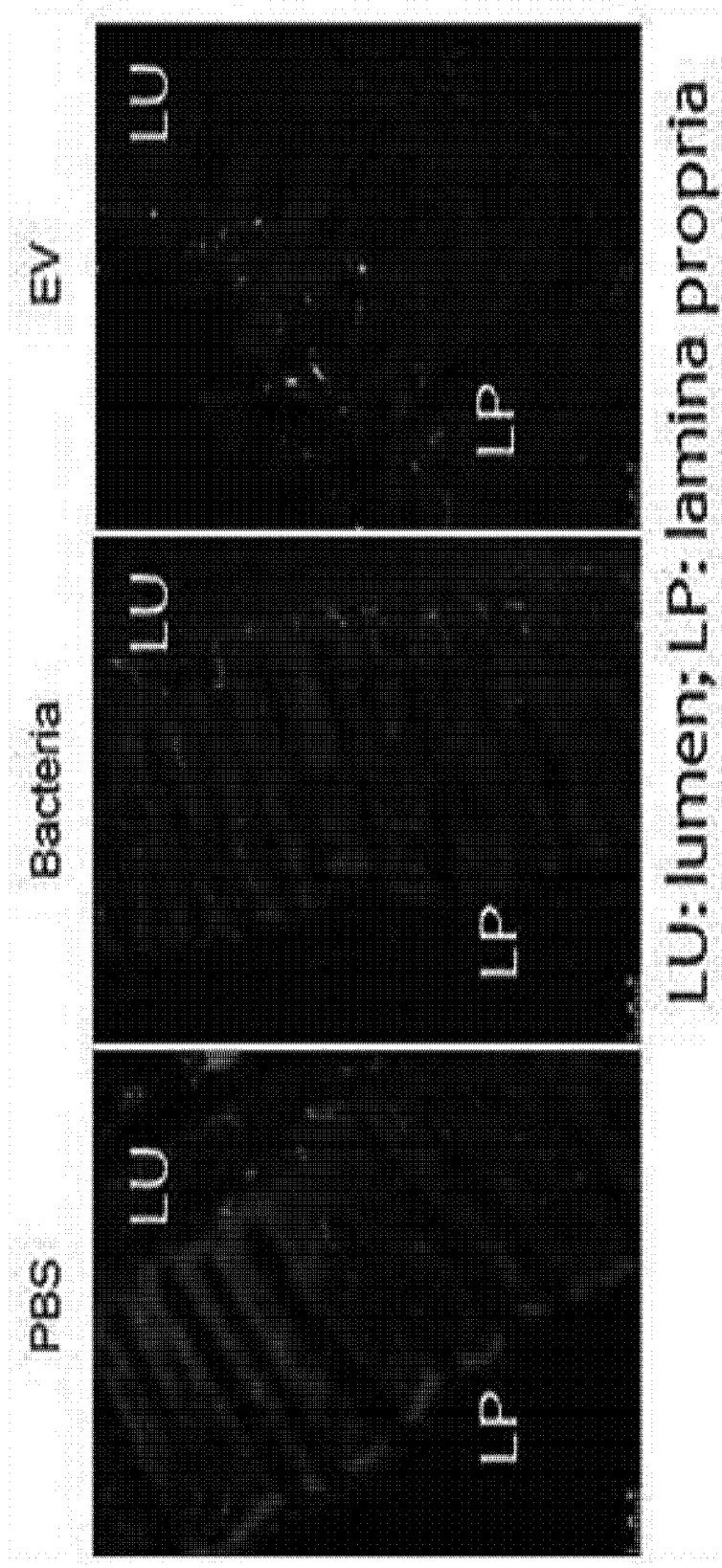
[도11]



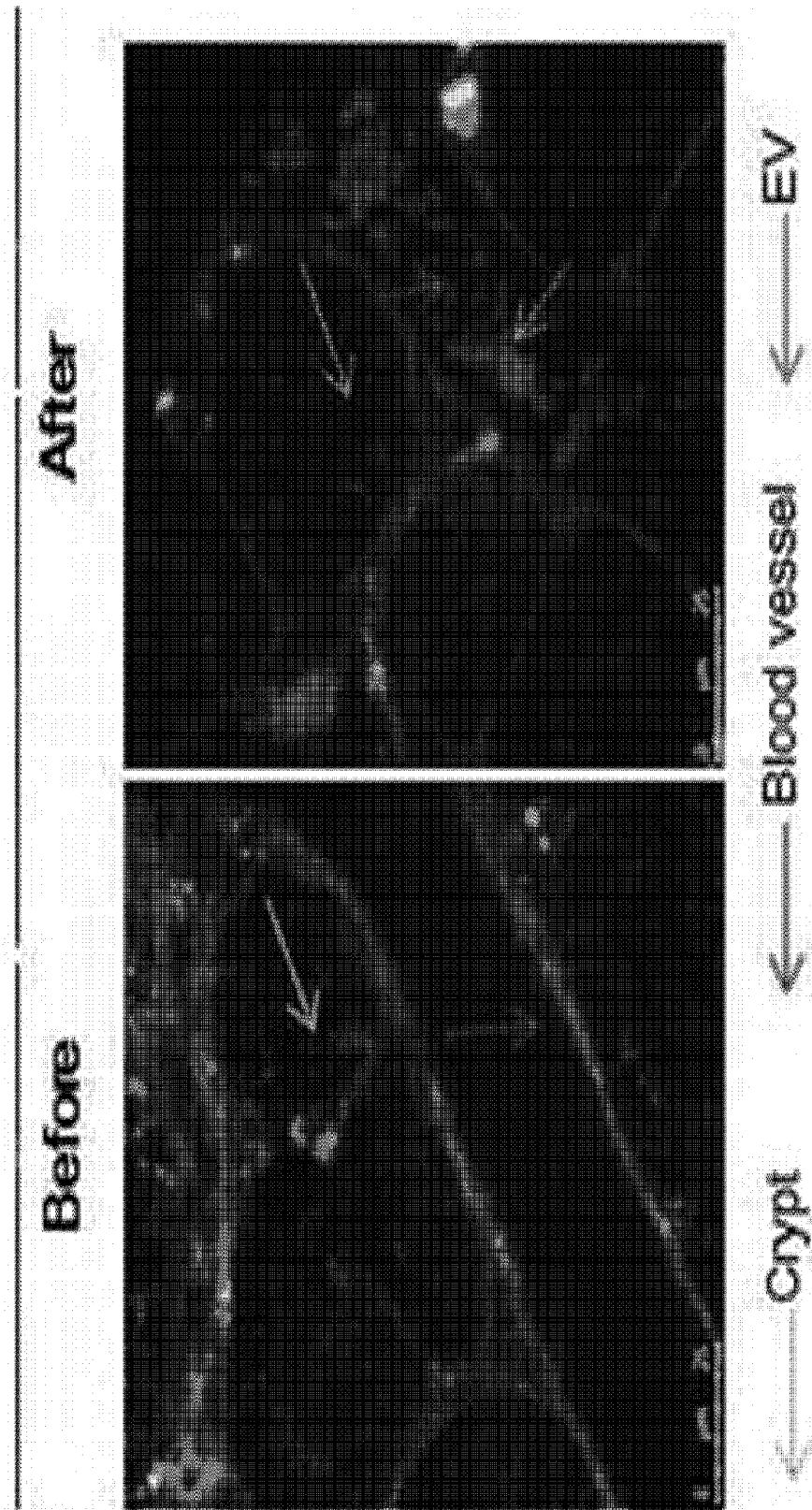
[도12]



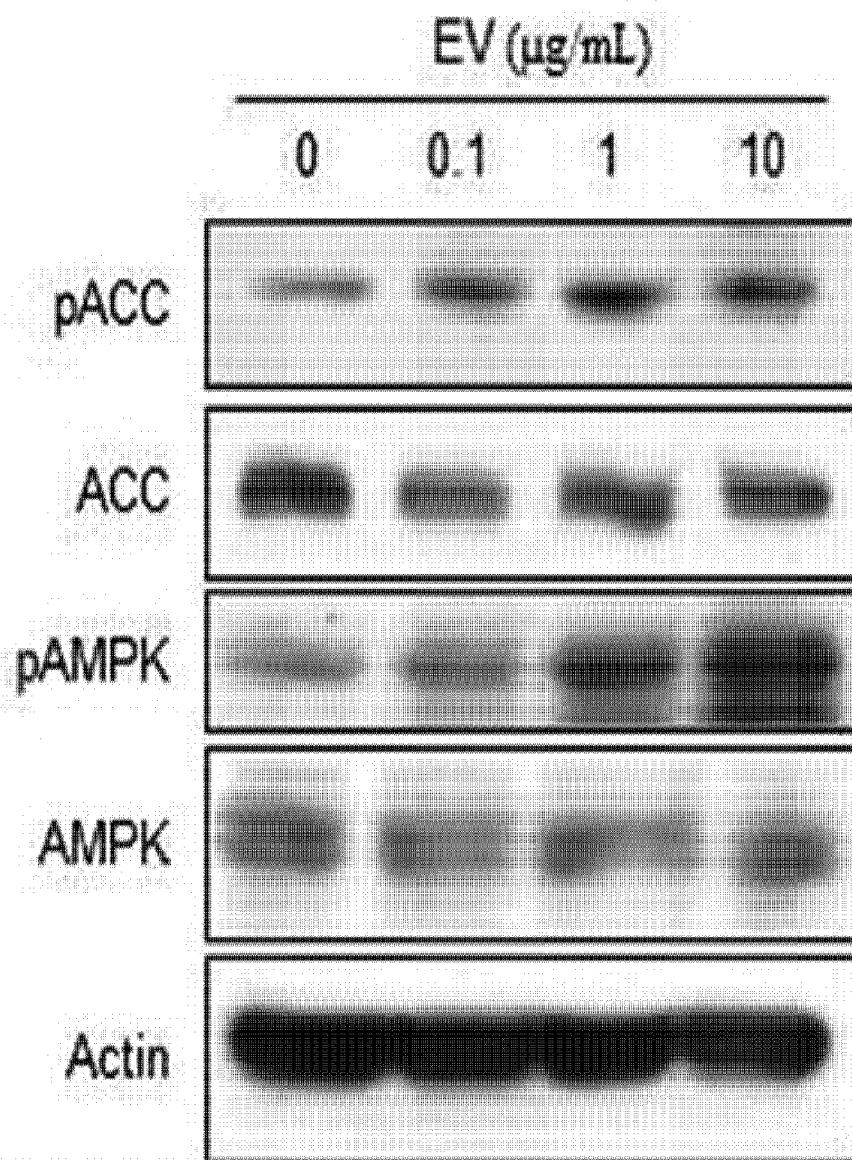
[도13]



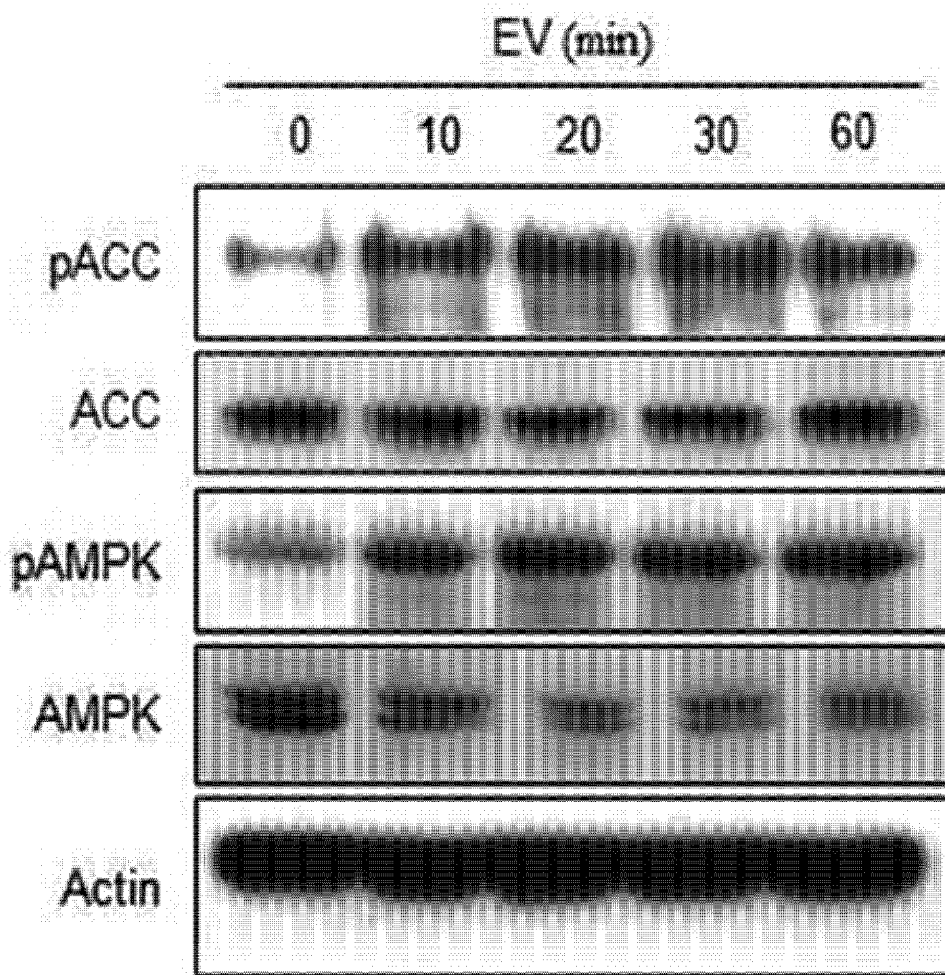
[도14]



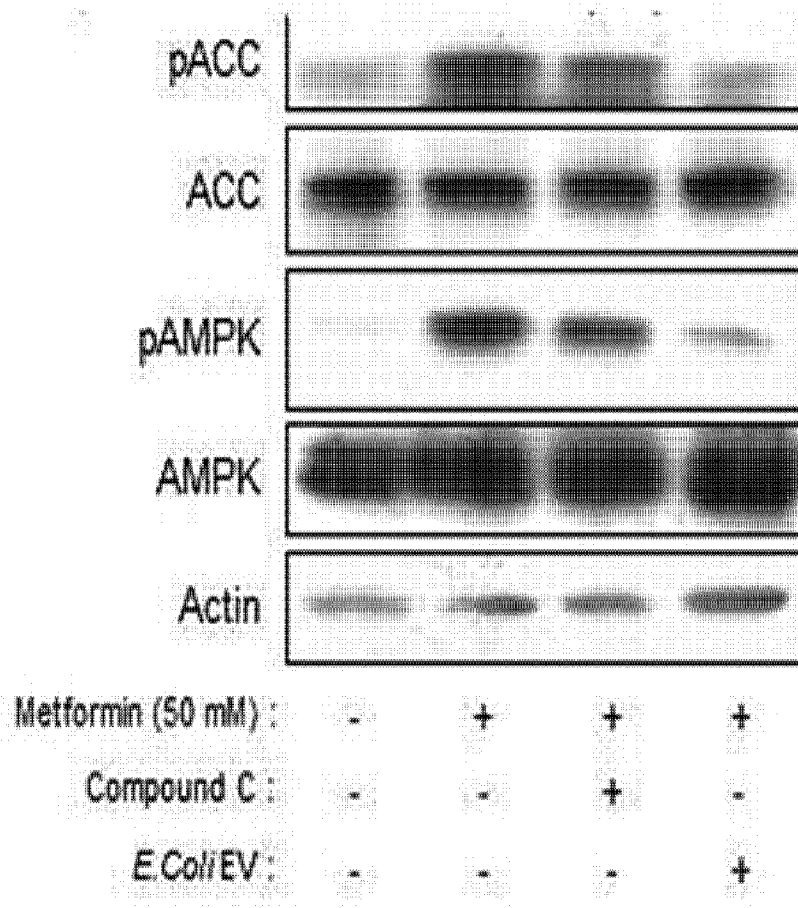
[도15]



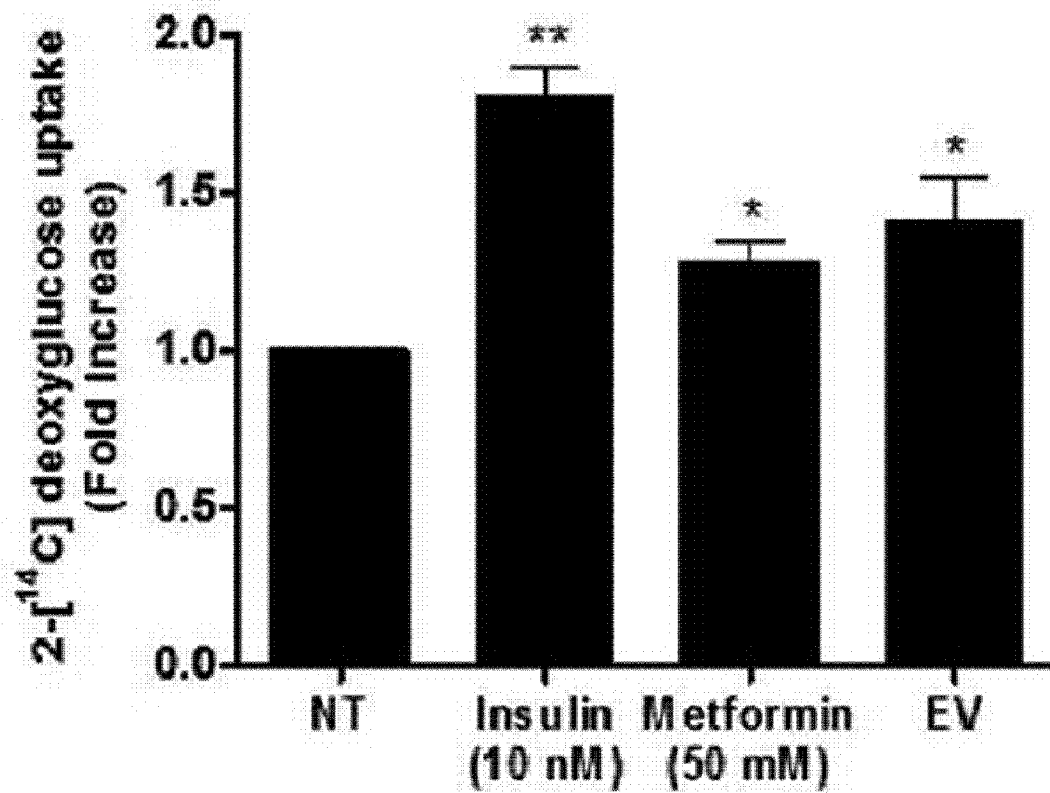
[도16]



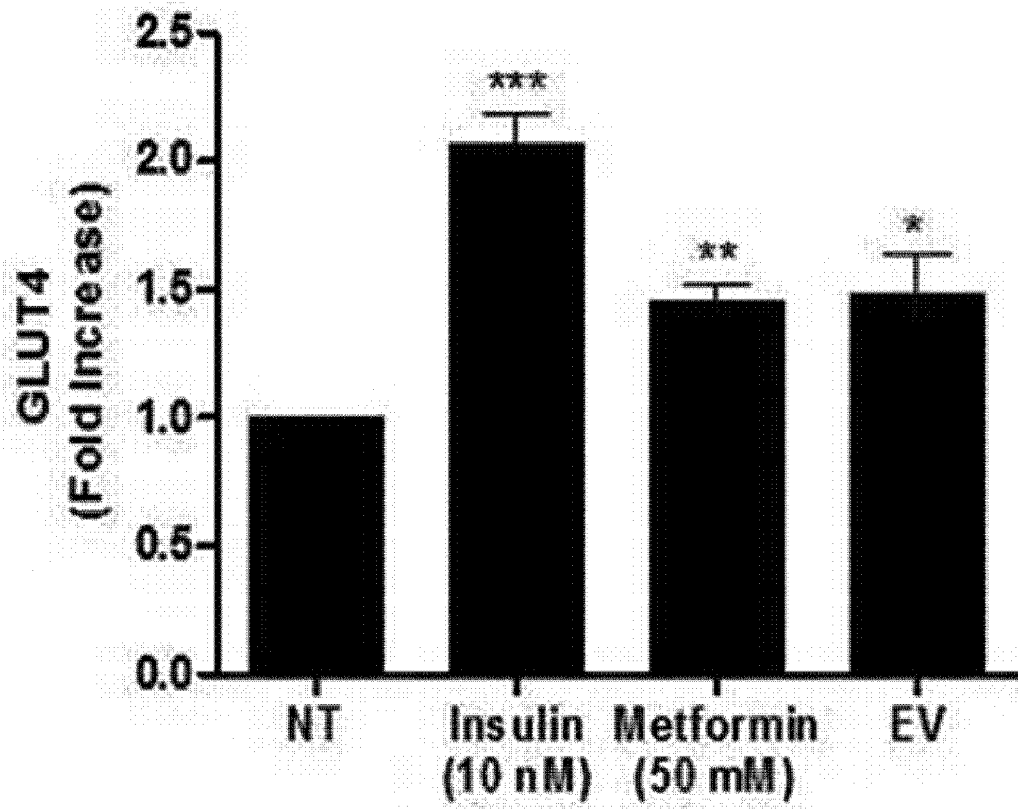
[도17]



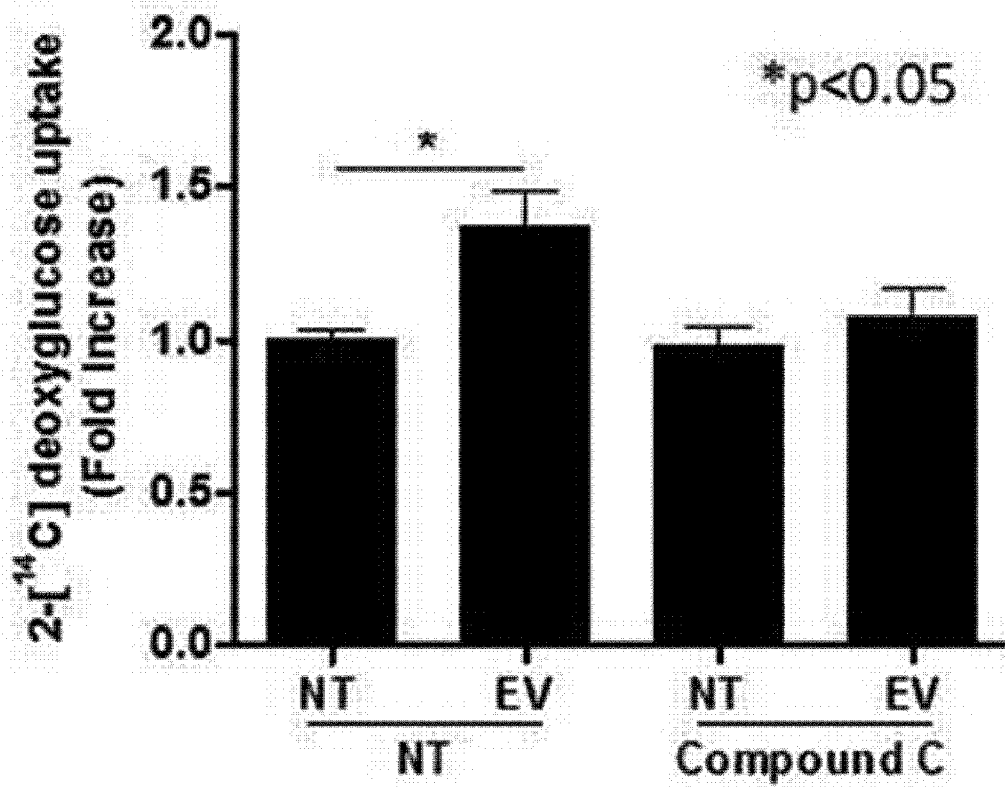
[도18]



[도19]



[도20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004983**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 35/74(2006.01)i, A61K 35/66(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)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 35/74; A61K 36/8964; A61K 35/66; A61P 3/06; C12Q 1/68; A61P 3/04; A61P 3/10; A23L 1/30

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: Akkermansia muciniphila(Akkermansia muciniphila), extracellular vesicles, Metabolic disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0021920 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 06 March 2013 See abstract; paragraphs [0002] and [0020]-[0030]; and claims 1-7.	1-9,11
A	KANG, C. S. et al., "Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis", PLOS One, 2013, vol. 8, no. 10, paper number e76520, inner pages 1-11. See abstract; and page 1, right column - page 2, left column and page 5.	1-9,11
A	US 2013-0224155 A1 (ETHICON ENDO-SURGERY, INC. et al.) 29 August 2013 See abstract; paragraphs [0007], [0008], [0010] and [0066]-[0069]; and claims 1, 14, 16 and 19 -21.	1-9,11
A	HANSEN, C. H. F. et al., "Early life treatment with vancomycin propagates Akkermansia muciniphila and reduces diabetes incidence in the NOD mouse", Diabetologia, 2012, vol. 55, no. 8, pages 2285-2294. See abstract; and page 2286.	1-9,11
A	KR 10-2010-0120846 A (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 17 November 2010 See abstract; and figure 1.	1-9,11



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

"I" 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

27 AUGUST 2015 (27.08.2015)

Date of mailing of the international search report

27 AUGUST 2015 (27.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004983

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.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004983

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0021920 A	06/03/2013	NONE	
US 2013-0224155 A1	29/08/2013	EP 2836224 A2	18/02/2015
		WO 2013-130773 A2	06/09/2013
		WO 2013-130773 A3	18/12/2014
		WO 2013-130773 A8	16/10/2014
KR 10-2010-0120846 A	17/11/2010	KR 10-1075742 B1	21/10/2011
		US 2012-0070515 A1	22/03/2012
		US 8431166 B2	30/04/2013
		WO 2010-120029 A1	21/10/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/74(2006.01)i, A61K 35/66(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/74; A61K 36/8964; A61K 35/66; A61P 3/06; C12Q 1/68; A61P 3/04; A61P 3/10; A23L 1/30

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: 아커만시아 뮤시니필라(Akkermansia muciniphila), 세포팜 소포, 대사질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0021920 A (포항공과대학교 산학협력단) 2013.03.06 요약; 단락 [0002] 및 [0020]-[0030]; 및 청구항 1-7 참조.	1-9, 11
A	KANG, C. S. 등, 'Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis', PLOS One, 2013년, 8권, 10호, 논문번호 e76520, 내부페이지 1-11. 요약; 및 페이지 1, 오른쪽 컬럼- 페이지 2, 왼쪽 컬럼 및 페이지 5 참조.	1-9, 11
A	US 2013-0224155 A1 (ETHICON ENDO-SURGERY, INC. 등) 2013.08.29 요약; 단락 [0007], [0008], [0010] 및 [0066]-[0069]; 및 청구항 1, 14, 16 및 19-21 참조.	1-9, 11
A	HANSEN, C. H. F. 등, 'Early life treatment with vancomycin propagates Akkermansia muciniphila and reduces diabetes incidence in the NOD mouse', Diabetologia, 2012년, 55권, 8호, 페이지 2285-2294. 요약; 및 페이지 2286 참조.	1-9, 11
A	KR 10-2010-0120846 A (이화여자대학교 산학협력단) 2010.11.17 요약; 및 청구항 1 참조.	1-9, 11

☐ 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

2015년 08월 27일 (27.08.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 08월 27일 (27.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



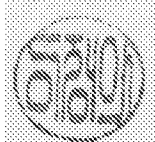
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



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: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0021920 A	2013/03/06	없음	
US 2013-0224155 A1	2013/08/29	EP 2836224 A2 WO 2013-130773 A2 WO 2013-130773 A3 WO 2013-130773 A8	2015/02/18 2013/09/06 2014/12/18 2014/10/16
KR 10-2010-0120846 A	2010/11/17	KR 10-1075742 B1 US 2012-0070515 A1 US 8431166 B2 WO 2010-120029 A1	2011/10/21 2012/03/22 2013/04/30 2010/10/21