

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

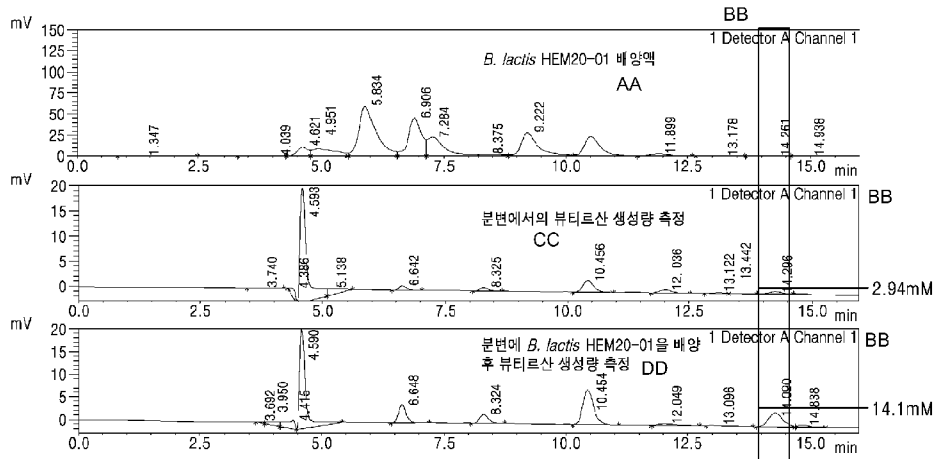
WO 2022/145807 A1

2022년 7월 7일 (07.07.2022)

- (51) 국제특허분류: C12N 1/20 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/01 (2006.01)
A61K 35/741 (2014.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/018915
- (22) 국제출원일: 2021년 12월 14일 (14.12.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0184265 2020년 12월 28일 (28.12.2020)KR
- (71) 출원인: 주식회사 에이치이엠퍼마 (HEM PHARMA INC.) [KR/KR]; 37554 경상북도 포항시 북구 흥해읍 한동로 558, 204호, 에프101호, 에프102호, 102호, 205호, 306호(창업보육센터), Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 박소영 (PARK, So Young); 16508 경기도 수원시 영통구 광고중앙로 145, A동 1018호(이의동), Gyeonggi-do (KR). 지요셉 (JI, Yo Sep); 16222 경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 70, 8707동 1503호(이의동, 광고호반베르디움), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인엠에이피에스 (MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06239 서울특별시 강남구 테헤란로8길 37, 8층(역삼동, 한동빌딩), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, 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,

(54) Title: NOVEL BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS HEM20-01 STRAIN, AND COMPOSITION FOR TREATING DEPRESSION COMPRISING SAME OR CULTURE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주, 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 우울증 치료용 조성물



AA ... Culture medium
 BB ... 1 Detector A Channel 1
 CC ... Measurement of amount of butyric acid produced in feces
 DD ... Measurement of amount of butyric acid produced after culturing B. lactis HEM20-01 in feces

(57) Abstract: The present application relates to a *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HEM20-01 strain (KCTC14143BP), and a composition comprising the strain for treating, preventing, or alleviating depression. *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HEM20-01 strain (KCTC14143BP) according to one embodiment of the present invention can treat or prevent depression by reducing corticosterone, endotoxins, and inflammatory cytokines, and thus can be applied to pharmaceutical compositions, food compositions, functional health food compositions, and the like.



WO 2022/145807 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(57) 요약서: 본원은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)HEM20-01 균주 (KCTC14143BP), 이를 포함하는 우울증 치료, 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본원의 일 구현예에 따른 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*)HEM20-01 균주 (KCTC14143BP)는 콜티코스테론, 엔도톡신 및 염증성 사이토카인을 저감함으로써, 우울증을 치료 또는 예방할 수 있는 바, 이는 약학 조성물, 식품 조성물, 건강기능식품 조성물 등에 응용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주, 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 우울증 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본원은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP), 이를 포함하는 우울증 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 주요 우울 장애(Major Depressive Disorder, 우울증)는 현재 세계적으로 장애의 주요 원인이며, 2030년까지 심장질환을 능가하여 1위 질병 부담이 될 것으로 예상되고 있다 (Reddy, 2010; Tucci and Moukaddam, 2017).
- [3] 이와 관련하여 최근 장내 미생물 총과 주요 우울 장애 사이에 잠재적 인과 관계가 보고 되고 있다. 장내 미생물 균총이 신경계, 면역계, 및 내분비계 사이에서 일어나는 의사소통 경로에 적극적으로 관여한다고 알려져, 미생물총-장-뇌 (MGB, Microbiota-gut-brain) 라는 축 (axis)이 주요 우울 장애 연구에 중요 바탕으로 정립되었다 ((Sherwin et al., 2016; Thursby and Juge, 2017; van de Guchte et al., 2018).
- [4] 선행 연구에 따르면, 건강한 사람과 비교했을 때, 주요 우울 장애 환자의 장내 미생물 총이 다른 프로파일을 가지고 있다고 보고되었다. 주요 우울 장애 환자에게서는 *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Dialister* 속이 감소한다고 알려져있고, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Oscillibacter*, *Allistipes* 속 등이 증가한다고 알려져있다. 또한, 무균쥐 (Germ-free mice)에 주요우울장애 환자의 분변 미생물 균총을 이식했을 때, 건강한 사람의 미생물 균총을 이식했을 때와 다르게 우울 관련 행동을 유의적으로 보였다고 보고된 바 있다 (Kelly et al., 2016; Zheng et al., 2016). 따라서 장내 미생물 균총에 중점을 두고 MGB축 관점에서 주요 우울 장애를 다루는 것이 강조되고 있다.
- [5] 특히 프로바이오틱스로 MGB축을 조절하여 주요 우울 장애를 치료하는 연구가 전임상, 임상으로 많이 진행되고 있다. 이에 따라 프로바이오틱스의 항우울 효능 기작이 여러 차례 보고되어 왔는데, 프로바이오틱스 투여에 따른 장 유래 신경전달물질 생성, 뷰티르산 생성으로 인한 장 기능 개선 및 장 유래 신경 호르몬 생성 증진, 균 유래 단백질과 면역의 항 염증 작용 등이 보고 되었다 (Yong et al., 2020).
- [6] 특별히 선행 임상 연구에서, 건강한 성인 남녀 40명을 대상 (대조군20명, 실험군 20명)으로 4주간 *B. animalis spp. lactis* 를 포함한 균주 혼합 분말 (5×10^9 CFU) 을 투여한 후, 슬픈 일을 떠올릴 때 느껴지는 우울감 및 불안감 자가 보고

(Leiden Index of Depression Sensitivity-Revised, LEIDS-R) 를 실행하였을 때 유산균 투여군이 공격성 및 반추가 유의하게 감소하는 것을 확인한 바 있다 (Steenbergen et al., 2015).

- [7] 우울증 치료를 위한 조성물에 대한 연구 결과로 비피도박테리움 비피덤을 포함하는 조성물(대한민국 공개특허 제 10-2017-0129718호) 등이 있으나, 우울증 치료 또는 예방과 관련하여 우수한 효과를 나타내는 조성물에 대한 개발 및 연구가 여전히 필요한 실정이다.
- [8] 이에, 본 발명자들은 우울증을 치료 또는 예방할 수 있는 우수한 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 콜티코스테론, 엔도톡신 및 염증성 사이토카인을 저감하는 신규 균주를 개발하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본원은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP), 상기 균주를 포함하는 우울증 치료 또는 예방용 조성물을 제공하고자 한다.
- [10] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본원의 제1측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP)를 제공한다.
- [12] 본원의 제2측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [13] 본원의 제3측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본원의 일 구현예에 따른 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP)는 콜티코스테론, 엔도톡신 및 염증성 사이토카인을 저감함으로써, 우울증을 치료 또는 예방할 수 있는 바, 상기 균주는 식품 조성물, 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 등에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 처리에 따른 뷰티르산 생선 촉진능을 확인하기 위한 실험 결과를 나타낸 도면이다.

- [16] 도 2는, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 설탕물 선호 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [17] 도 3은, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 참신 억제 사료 공급 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [18] 도 4는, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 분무 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [19] 도 5는, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 높은 십자형 미로 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [20] 도 6은, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 꼬리 매달기 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [21] 도 7은, 우울 관련 행동 개선능을 확인하기 위한 강제적 수영 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [22] 도 8은, 스트레스 호르몬 개선능을 확인하기 위해 혈중 코티코스테론을 측정 한 결과를 나타낸 도면이다.
- [23] 도 9는, 혈중 엔도톡신을 측정 한 결과를 나타낸 도면이다.
- [24] 도 10은, 장 투과성 개선능을 확인하기 위해 소장 말단과 대장의 밀착연결 단백질의 발현량을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [25] 도 11 및 도 12는, 염증 지표 개선능을 확인하기 위해 소장 말단과 대장에서 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) 발현량을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [26] 도 13은, 염증 지표 개선능을 확인하기 위해 해마에서 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) 발현량을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [27] 도 14는, 염증 지표 개선능을 확인하기 위해 해마에서 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6) 수치를 효소면역측정법(ELISA)을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [29] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부제가 다른 부제 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부제가 다른 부제에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부제 사이에 또 다른 부제가 존재하는 경우도 포함한다.

- [30] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [31] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [32] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [33] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [34] 본원의 제 1 측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP)를 제공한다.
- [35] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 균주는 콜티코스테론을 저감하는 것일 수 있으며, 구체적으로 기저 상태의 혈중 콜티코스테론을 저감하는 것일 수 있다.
- [36] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “콜티코스테론(corticosterone)”은 부신피질 호르몬의 일종으로서 스트레스 상황에서 신체 체계 항상성이 무너졌을 시, 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis; Hypothalamus-pituitary-adrenal axis)의 작용으로 부신 피질에서 분비되는 스트레스 호르몬이며, 과다분비되면 면역체계를 교란시키고 스트레스 조절 회로를 손상시켜 우울증과 같은 정신질환을 일으킨다고 알려져 있다.
- [37] 따라서, 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주는 혈중 콜티코스테론을 저감시키며, 이로 인해 우울증 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.
- [38] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 균주는 엔도톡신을 저감하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 균주는 혈중 엔도톡신을 저감하는 것일 수 있다.
- [39] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “엔도톡신(endotoxin)”은 그람 음성 박테리아의 외막 성분으로 체내 면역 세포와 반응하여 염증 반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며 화학적으로 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)라고 불리우기도 한다. 엔도톡신에 노출되게 되면 즉시 면역반응을 개시하며, 면역반응 결과 여러 가지 염증과 관련된 세포들을 감염(노출)된 조직으로 모으고 면역매개 물질(사이토카인)들을 분비하게 된다. 이러한 염증 반응이 과도하게

일어날 경우 내독소혈증(Endotoxemia)을 유발하여 죽음에 이르게 할 수도 있다. 전임상 및 임상 선행 연구에 따르면, 이러한 염증성 지표가 주요 우울 장애와 강한 상관관계가 있다고 알려져 있다.

- [40] 따라서, 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주는 혈중 엔도톡신을 저감시키며, 이로 인해 전신에 영향을 주는 염증 관련 지표를 유의하게 개선하는 효과를 나타내며 이를 통해 우울증 치료에 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.
- [41] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 균주는 장 투과성을 개선하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 균주는 장내 밀착 연결을 구성하는 ZO-1 및 오클루딘(occludin) 단백질의 발현량을 증가하여 장 투과성을 개선하는 것일 수 있다.
- [42] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "밀착 연결(tight junction)"은 세포연접의 한 종류로써 연결되어 있는 두 세포 사이의 세포나 물질 이동을 차단하며, 인접한 세포의 세포막이 밀착연접 단백질에 의해 부분적으로 융합되어 형성된다. 장에서는 장관 상피세포로부터 독소 및 해로운 항원의 확산을 막기 위해 장관 상피세포의 정단부에 흡착 단백질 복합체로 구성되어 있으며 독소와 같은 외부자극에 의해서 장관 상피세포가 손상될 경우에 밀착연접의 변경으로 투과성이 높아지고 장벽의 결합이 떨어진다.
- [43] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "장 투과성"은 장벽의 물질 투과성 즉, 장 내강과 주변물 사이의 장 상피 내벽에 의해 형성된 장벽의 투과성을 의미하는 것으로서 필수적인 영양소들을 체내로 유입시키고 엔도톡신과 같은 독성 물질들은 배제시키는 기능을 균형적으로 적절히 수행하는데 있어 중요하다. 장 투과성은 공지된 장 투과성 분석 및/또는 부착 분자, 면역 또는 염증의 바이오마커, 또는 엔도톡신과 같은 박테리아 마커 등의, 상피 온전성에 대한 마커 분석을 이용하여 특정될 수 있다. 또한 장 투과성은 장 장애, 예를 들어 소장결장염(예를 들어 괴사성 소장결장염), 허혈성 결장염뿐만 아니라 패혈증 및 비알코올성 지방간 질환(NAFLD), 비알코올성 지방간염(NASH) 및 간경화증(예를 들어, 알코올 간경화증)을 포함하는 간 질환의 범위에 있는 다양한 질환과 관련될 수 있다.
- [44] 따라서, 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주는 장 투과성을 개선하며, 이로 인해 엔도톡신이 혈류로 유입되는 것을 저감하여 염증 관련 지표를 개선하는 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.
- [45] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 균주는 염증성 사이토카인을 저감하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 균주는 장관 해마에서 염증성 사이토카인의 발현량을 저감하는 것일 수 있다.
- [46] 따라서, 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주는 장관 해마에서 염증성 사이토카인을 저감함으로써 전신에 영향을 주며 주요 우울 장애와 강한 상관성이 있는 염증 관련 지표를 개선시키며, 이로 인해 우울증 치료 또는 예방 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

- [47] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 균주는 우울증을 치료, 예방 또는 개선하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 균주는 장내 환경 개선용 또는 장 질환 치료용 약학 조성물, 식품 조성물, 건강기능식품 조성물 등 다양한 조성물에 포함될 수 있다.
- [48] 본원의 제2측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 식품 조성물에도 공히 적용된다.
- [49] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "개선"은, 상기 조성물의 투여로 장내 환경이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [50] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 우울증을 예방 또는 개선하는 것일 수 있으며, 구체적으로 콜티코스테론, 엔도톡신 및 염증성 사이토카인을 저감함으로써 우울증을 예방 또는 개선하는 것일 수 있다.
- [51] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주, 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양액, 이의 파쇄물 및/또는 이의 추출물을 포함하는 것일 수 있다.
- [52] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "사균체"는 생균의 반대되는 개념으로서 발효를 통해 얻어진 생균과 대사산물들을 열처리 등에 의해 균의 성장이 일어나지 못하도록 한 형태를 의미한다. 사균체는 세포질(cytoplasm), 세포벽(cell wall), 박테리오신(bacteriocin) 등의 항균활성 물질, 다당류(polysaccharide), 유기산 등을 포함할 수 있다. 상기 사균체를 이용한 제품은 생균 제품과 비교하여 높은 안정성을 가지고 있으며, 특히 내열성이 우수하며, 외부 환경에 대한 안정성이 높아 기존 생균 제품보다 보관이 용이하고 유통기간을 늘릴 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한, 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있기 때문에 대체제로서의 활용성과 아직 사균체 제품 생산에 본격적으로 뛰어들지 못하는 업체가 손에 꼽을 정도이기 때문에 시장성과 성장가능성이 매우 크다.
- [53] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "배양액"은 본원의 균주를 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, "배양물"과 혼용하여 사용될 수 있다.
- [54] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [55] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한

효과를 얻는 것을 의미한다.

- [56] 본원의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 장내 환경 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [57] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조 식품의 용어는 혼용될 수 있다. 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [58] 본원의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 우울증 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [59] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [60] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신 (niacin), 비오틴 (biotin), 폴레이트 (folate), 판토텐산 (panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [61] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

- [62] 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [63] 본원의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [64] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [65] 본원의 식품 조성물은 장내 환경 개선 효과를 나타낼 수 있다면 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주를 다양한 중량%로 포함할 수 있으며, 구체적으로 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주를 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [67] 본원의 제3측면은, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 약학 조성물에도 공히 적용된다.
- [68] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 비피도박테리움 애니멀리스 락티스

HEM20-01 균주, 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양액, 이의 파쇄물 및/또는 이의 추출물을 포함하는 것일 수 있다.

- [69] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "치료"는 본원의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 우울증이 발병된 개체에 투여하여 우울증의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [70] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 우울증을 치료 또는 예방하는 것일 수 있으며, 구체적으로 콜티코스테론, 엔도톡신 및 염증성 사이토카인을 저감함으로써 우울증을 치료 또는 예방하는 것일 수 있다.
- [71] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [72] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [73] 본원의 일 구현예에 있어서, 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 균주의 사균체에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 슈크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose), 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 예를 들어, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [74] 본원의 일 구현예에 있어서, 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [75] 본원의 일 구현예에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 비수성용제 또는 현탁제로는, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 좌제로는, 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [76] 본원의 일 구현예에 따른 약학 조성물은 의약품 조성물 또는 의약외품 조성물일 수 있다.
- [77] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중

의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

- [78] 본원의 상기 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 소독 청결제, 세정제, 주방용 세정제, 청소용 세정제, 치약, 가글제, 물티슈, 세제, 비누, 핸드 워시, 헤어세정제, 헤어 유연제, 가습기 충전제, 마스크, 연고제 및 필터 충전제로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [79] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본원의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본원의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 장 질환에 대한 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 성분과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [80] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1ng 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본원의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [81] 본원의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 균주가 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [82] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [83] 실시예 1: 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01의 단쇄지방산 생성촉진능 확인
- [84] 본원의 신규 균주인 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HEM20-01, 기탁기관: 한국생물자원센터, 수탁번호: KCTC14143BP, 수탁일자: 2020년 2월 21일)의 단쇄지방산 생성 촉진능을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [85] 실시예 1-1: 단쇄지방산 생성량 분석을 위한 체외 조건 배양
- [86] 본원의 균주에 의한 단쇄지방산 생성량을 체외 조건에서 확인하기 위해, 하기와 같은 방법으로 균주 배양을 수행하였다.
- [87] 먼저, 하기 조성의 장 환경 유사 배지를 준비한 후, 혐기 챔버(whitley A95 anaerobic workstation)에서 24시간 동안 치환하여, 배지를 혐기(anaerobic) 상태로 만들었다.
- [88] - 장 환경 유사 배지: NaCl 60mM, NaHCO₃ 40mM, KCl 10mM, Hemin 5x10⁻⁵ g/L, mucin 0.5%(w/v), L-cysteine HCl 0.05% (w/v)
- [89] 96 웰 플레이트의 각 웰에 실험군(HEM20-01)에는 5x10⁷ CFU/ml 농도의 해당하는 균주 30ul, 장 환경 유사 배지 180ul, 사람의 분변샘플 15mg을 분주하였고, 균을 처리하지 않은 대조군(NC, Negative control) 웰에는 장 환경 유사 배지 210ul, 사람의 분변샘플 15mg을 분주하였다. 상기 실험군 균주 HEM20-01은 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HEM20-01)을 의미한다.
- [90] 다음으로, 상기 실험군이 분주된 96웰-플레이트를 18시간 동안 혐기 챔버(whitley A95 anaerobic workstation)에서 교반기(DLAB mx-m)를 이용하여 교반하며 배양하고, 배양 후 3800rpm으로 10분간 원심분리하여 각 웰의 상등액 100ul를 96-웰 세포 배양 플레이트로 옮겼다. 다음으로, 96개의 GC(Gas chromatography)용 바이알에 대사체 추출을 위한 GC 추출용액 100ul[GC 추출용액 조성: DW 10ml, NaCl 3.3g, Phosphoric acid 50ul, 2-ethyl butyric acid 0.5ul]과 DW 50ul 및 상기 96-웰 세포 배양 플레이트의 상등액을 50ul 씩 분주하였으며, 기체 크로마토그래피(Gas chromatography) 분석법을 활용하여 미생물 대사체인 아세트산, 프로피온산, 뷰티르산 및 아이소뷰티르산을 분석하였다(도 1).
- [91] 실시예 1-2: 뷰티르산(Butyrate) 생성 촉진능 확인
- [92] 상기 실시예 1-1에서 수행한 기체 크로마토그래피 분석법을 이용하여, 신규 균주 처리에 따른 뷰티르산 정량 변화를 확인하였다.
- [93] 상기 뷰티르산 증감 확인 결과, HEM20-01 균주를 단독 배양한 경우에는 뷰티르산이 생성되지 않았지만, 장 환경과 유사한 배지와 사람의 분변을 함께 처리한 경우 뷰티르산 비율이 유의하게 증가하는 것이 확인되었다(도 1).

[94] 상기 결과를 토대로, 본원의 HEM20-01 균주는 자체적으로는 뷰티르산 생성을 할 수 없지만, 장 내 환경(장균총)에서 뷰티르산 생성을 촉진하는 기능이 있음을 알 수 있었다.

[95] 우울증 동물 모델 선정

[96] BALB/c 쥐가 유전적으로 다른 종의 쥐에 비해 불안 관련 행동을 가지며, 우울 관련 행동 실험에서 가장 일관되게 반응한다고 보고된 바 있다(Crawly, 2008; Jacobson and Cryan, 2007; Satori et al., 2011). 따라서 BALB/c 쥐를 우울증 동물 모델로 선정하였다. 7-8주령 27마리(암컷: 14마리, 수컷: 13마리)를 이용하여 스트레스 대조군 14마리(암컷: 7마리, 수컷: 7마리), 유산균 투여군 13마리(암컷: 7마리, 수컷: 6마리)를 아래 [표 1]과 같이 구분하여 실험을 진행하였다.

[97] [표 1]

[98]

그룹	처치	동물 수
스트레스 대조군	1x PBS 200ul/day	14
유산균 투여군	<i>B.lactis</i> HEM20-01 1x10 ⁹ CFU/200ul/day	13

[99] 1주간의 경구 투여 적응기를 거쳐 총 3주간 *B. lactis* HEM20-01을 투여하였고, 한주간 우울 행동실험을 진행한 후 5주차에 동물을 희생하였다(표 2).

[100] [표 2]

[101]

0 주차	1 주차	2 주차	3 주차	4 주차	5 주차
경구 투여 적응기	유산균 경구 투여	유산균 경구 투여	유산균 경구 투여	우울 행동 실험	동물 희생

[102] 조직 분석

[103] 동물 희생 때, 감정과 기억을 관장하는 해마를 적출하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 및 효소면역측정법(ELISA)으로 우울감 관련 면역지표 발현량과 단백질량을 확인하였다. 또한 장내 면역을 관장하는 대장(colon)과 소장 말단(distal ileum)을 적출하여 qRT-PCR로 면역 지표를 확인하였다. 혈액을 채취하여 ELISA로 스트레스 관련 호르몬의 수치를 확인하고 엔도톡신의 변화를 관찰하였다.

[104] 실시예 2: 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01의 우울 관련 행동 개선 확인

[105] 본원의 신규 균주인 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HEM20-01 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HEM20-01, 기탁기관: 한국생물자원센터, 수탁번호: KCTC14143BP, 수탁일자: 2020년 02월 21일)의 우울증 치료 효과를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다(표 3).

[106] [표 3]

[107]

우울 행동 실험	표적 우울 증상
설탕물 선호 실험 Sucrose Preference Test	무쾌감증 anhedonia
참신 억제 사료 공급 실험 Novelty-suppressed feeding test	무쾌감증 anhedonia
분무 실험 Slash test	자기 관리 행동 self-care
높은 십자형 미로 실험 Elevated Plus Maze Test	불안 Anxiety
꼬리 매달기 실험 Tail suspension Test	절망 자포자기 Despair
강제적 수영 실험 Forced Swim Test	절망 자포자기 Despair

[108] **실시예 2-1: 설탕물 선호 실험**

[109] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 무쾌감증을 측정하기 위해, 건강한 쥐는 단 것을 선호하고, 우울한 쥐는 단 것에 대한 선호가 줄어드는 것을 이용한 설탕물 선호 실험을 수행하였다.

[110] 물 병 두개 중 하나에는 1% 설탕물, 다른 하나에는 일반 물을 넣고 2일간 24시간 기준으로 물병의 위치를 교차하는 훈련 기간을 거친 후 24시간 동안 모든 물병을 제거하여 갈증을 유도하였다. 실험 당일 물병과 설탕물병을 주어 낮시간 중 첫 5시간, 낮시간 전체, 밤시간 전체 동안의 섭취량을 측정하여 스트레스 대조군과 *B. lactis* HEM20-01 투여군 간의 설탕물 섭취량을 비교하였다.

[111] 그 결과 스트레스 대조군에 비하여 *B. lactis* HEM20-01를 투여한 그룹에서 낮시간 첫 5시간 동안의 설탕물 섭취량이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 이러한 유의적인 증가는 낮시간 전체동안(light cycle) 관찰되었고, 쥐가 활발히 활동하는 시간인 밤 시간에는 두 그룹간에 유의한 차이가 없었지만, 24시간 동안 측정된 결과에서는 *B. lactis* HEM20-01를 투여한 그룹의 설탕물 섭취량이 유의하게 개선됨을 확인하였다(도 2).

[112] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 무쾌감증 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.

[113] **실시예 2-2: 참신 억제 사료 공급 실험**

[114] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 무쾌감증을 측정하기 위해, 우울한 쥐가 건강한 쥐에 비해 먹이에 늦게 도달하며 먹이를 먹는 양이 적은 것을 이용한 참신 억제 사료 공급 실험을 수행하였다.

- [115] 24시간 동안 사료를 굶긴 후, 새로운 환경(novel arena) 가운데에 먹이 하나를 두었을 때 쥐가 불안, 경계를 이기고 가운데에 놓여진 먹이까지 얼마나 빨리 도달하는 가(latency for food), 일정 시간 동안 먹이를 얼마나 섭취하는가(food pallet consumption)를 측정하였다.
- [116] 그 결과 스트레스 대조군에 비하여 *B. lactis* HEM20-01를 투여한 그룹이 새로운 환경에서 사료에 다가가기까지 시간(latency for food)이 유의적으로 짧게 걸렸으며, 사료 섭취량(fed pellet weight)이 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 3).
- [117] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 무쾌감증 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.
- [118] **실시예 2-3: 분무 실험**
- [119] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 자기 관리 행동을 측정하기 위해, 우울한 쥐가 건강한 쥐에 비해 털을 손질하고 핥기 시작하기까지의 시간(latency for grooming)이 더디고, 지속시간(grooming duration)이 짧은 것을 이용한 분무 실험을 수행하였다.
- [120] 10% 설탕물을 쥐에게 분무하였고 이후 자신의 털을 얼마나 잘 돌보는가(grooming)를 5분간 관찰하였다.
- [121] 그 결과 *B. lactis* HEM20-01을 투여한 그룹이 유의적으로 빠른 시간 내에 그루밍(latency to grooming)을 하는 것으로 관찰되었고, 그루밍 지속 시간(grooming duration)이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 4).
- [122] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 자기 관리 행동 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.
- [123] **실시예 2-4: 높은 십자형 미로 실험**
- [124] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 불안 증상을 측정하기 위해, 높은 십자형 미로 실험을 수행하였다. 십자형 미로는 지상으로부터 50cm 높이에 위치하며, 두개의 열린팔(open arm), 두개의 닫힌팔(closed arm) 및 중앙(center)으로 되어있다. 십자형 미로 중앙에 쥐를 올려두고 5분간 관찰했을 때, 건강한 쥐는 불안감보다는 호기심이 강해 열린 팔(open arm)에 비교적 오래 머무는 반면, 우울한 쥐는 닫힌 팔(closed arm)에 머무는 시간이 긴 것으로 알려져 있다.
- [125] 실험 결과 *B. lactis* HEM20-01 투여 그룹이 스트레스 대조군에 비해 열린 팔(open arm)에 머문 시간이 증가하는 경향성을 보였고, 중앙(center)에 머무는 시간은 유의적으로 증가함을 관찰하였으며, 닫힌 팔(closed)에 유의적으로 적은 시간 머무는 것을 확인하였다(도 5).
- [126] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 불안 증상 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.
- [127] **실시예 2-5: 꼬리 매달기 실험**
- [128] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 절망, 자포자기 증상을

측정하기 위해, 꼬리 매달기 실험을 수행하였다.

[129] 실험대에 50cm 높이의 스탠드를 세워두고 테이프를 이용해 쥐 꼬리를 스탠드에 매달아 6분간 쥐의 움직임을 관찰했을 때, 건강한 쥐일수록 그 상황에서 벗어나기 위해 발버둥을 치지만, 우울한 쥐는 상대적으로 발버둥치지 않고 가만히 머무는 시간(immobility time)이 긴 것으로 알려져 있다.

[130] 실험 결과 *B. lactis* HEM20-01 투여 그룹이 스트레스 대조군 대비 움직임을 멈춘 상태(immobility)가 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 6).

[131] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 절망, 자포자기 증상 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.

[132] **실시예 2-6: 강제적 수영 실험**

[133] 주요 우울 장애 진단을 위한 우울 관련 여러 증상들 중 절망, 자포자기 증상을 측정하기 위해, 강제적 수영 실험을 수행하였다.

[134] 높이 30cm, 지름 15cm인 투명 실린더에 25도씨 정도의 물을 18cm 가량 붓고 쥐를 물에 빠뜨려 6분간의 움직임을 관찰했을 때, 건강한 쥐는 태생적으로 수영을 하여 벗어나려 하는데, 우울한 쥐일수록 벗어나려는 움직임 없이(immobility) 물에 떠있는 것으로 알려져 있다.

[135] 실험 결과 *B. lactis* HEM20-01 투여 그룹이 스트레스 대조군에 비해 발버둥치는 것을 멈추기까지의 시간(latency to abandon)이 오래 걸리는 것으로 확인되었다(도 7).

[136] 상기 결과를 토대로, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주는 절망, 자포자기 증상 개선에 효과가 있음을 알 수 있다.

[137] **실시예 3: 스트레스 호르몬 개선능 확인**

[138] 콜티코스테론은 스트레스 상황에서 신체 체계 항상성이 무너졌을 시, 시상하부 뇌하수체 부신 축(HPA axis; Hypothalamus-pituitary-adrenal axis)의 작용으로 인해 부신 피질에서 분비되는 스트레스 호르몬으로서, 본원의 *B. lactis* HEM20-01 균주의 스트레스 호르몬 개선능 확인을 위해 5주차 동물 희생 때 채취한 혈액을 이용하여 효소면역측정법(ELISA)으로 혈중 콜티코스테론을 측정하였다. 그 결과 *B. lactis* HEM20-01 투여 그룹이 스트레스 대조군에 비해 혈중 콜티코스테론이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 8).

[139] **실시예 4: 혈중 엔도톡신 및 장 투과성 개선능 확인**

[140] 그람 음성 박테리아의 외막 성분으로 알려져있는 엔도톡신(endotoxin or LPS)은 체내 면역 세포와 반응하여 염증 반응을 일으킨다고 알려져있다. *B. lactis* HEM20-01의 투여로 스트레스 대조군과 비교하여 혈중 엔도톡신 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(도 9). 장세포를 통한 투과가 엔도톡신의 주요 혈액 유입 경로이기 때문에 소장 말단과 대장의 밀착연결 단백질(tight junction protein)인, ZO-1과 오클루딘(occludin)의 발현량을 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통하여 확인했을 때, *B. lactis* HEM20-01 투여로 인해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 10).

[141] 상기 결과를 토대로 *B. lactis* HEM20-01의 투여로 장 투과성이 개선되고, 전신에 영향을 주는 염증 관련 지표가 유의적으로 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

[142] **실시예 5: 염증 지표 개선능 확인**

[143] 전임상 및 임상 선행 연구를 따르면, 주요 우울 장애와 염증성 지표가 강한 양의 상관성이 있다고 알려져 있다. 또한 유산균의 투여는 장내 항염증성 반응을 일으킨다고 알려져 있다. *B. lactis* HEM20-01 투여에 따른 소장 말단 및 대장의 염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokines)의 발현량 변화를 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)으로 보았을 때, 소장 말단(distal ileum)에서 염증성 사이토카인으로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ 의 발현량이 스트레스 대조군 대비 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(도 11). 또한 이러한 경향성은 대장에서도 동일하게 관찰되었다(도 12). 따라서 프로바이오틱스 후보균 *B. lactis* HEM20-01 투여에 따라 장내 염증 반응이 유의적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.

[144] 우울 관련 염증지표의 발현은 장뿐 아니라 해마에서도 보고되고 있다. 해마에서 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)을 통해 동일한 염증성 사이토카인의 발현량을 확인했을 때, *B. lactis* HEM20-01 투여가 스트레스 대조군 대비 해마 염증성 사이토카인의 발현을 유의적으로 감소하는 것으로 확인했다(도 13). 또한 효소면역측정법 (ELISA)으로 해마 조직 내 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-6 단백질 수치를 확인했을 때, *B. lactis* HEM20-01 섭취로 해마 내 염증성 사이토카인이 스트레스 대조군 대비 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 14).

[145] 따라서 *B. lactis* HEM20-01 투여로 전신 스트레스 호르몬 수치, 염증관련 지표 및 우울 관련 행동의 개선을 BALB/c모형을 통해 관찰하였으며 이를 통해 *B. lactis* HEM20-01가 항우울 관련 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[146] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[147] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[148] [수탁번호]

[149] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[150] 수탁번호 : KCTC14143BP
 [151] 수탁일자 : 20200221
 [152]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
 국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증
 수산: **홀잡펠이펙티브마이क्र로브스**
 대한민국 경기도 수원시 영통구 창룡대로 256번길 77 홀잡펠이펙티브마이क्र로브스

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> HEM20-01	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 14143BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2020년 02월 21일 에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, 에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: Korean Collection for Type Cultures 주소: (56212) 대한민국 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원(KRIBB)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2020. 05. 18.

BP/4 형식

단일 페이지

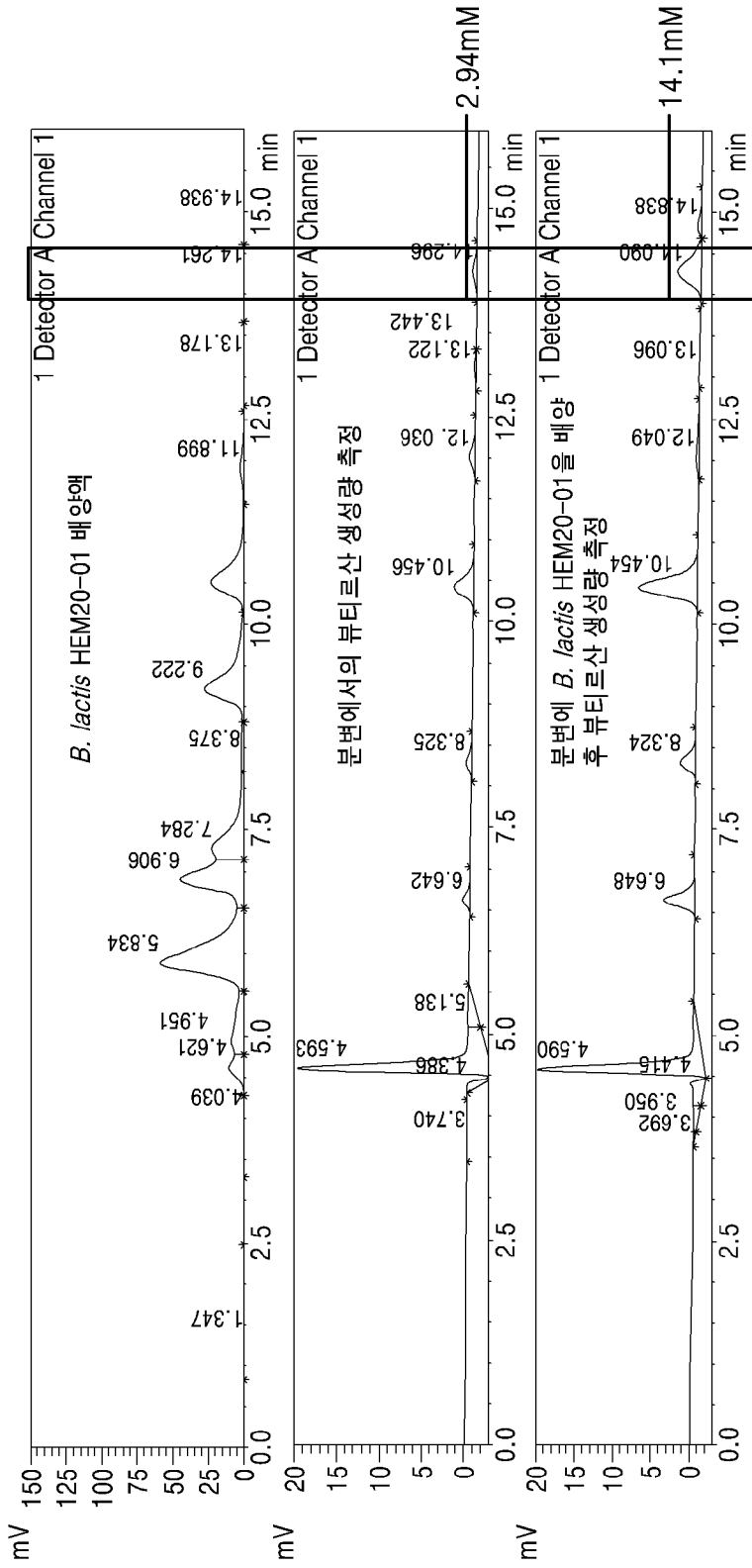
(원문과 상위 없음을 확인함) 대리인 : 특허법인 엠에이피에스 (인)



청구범위

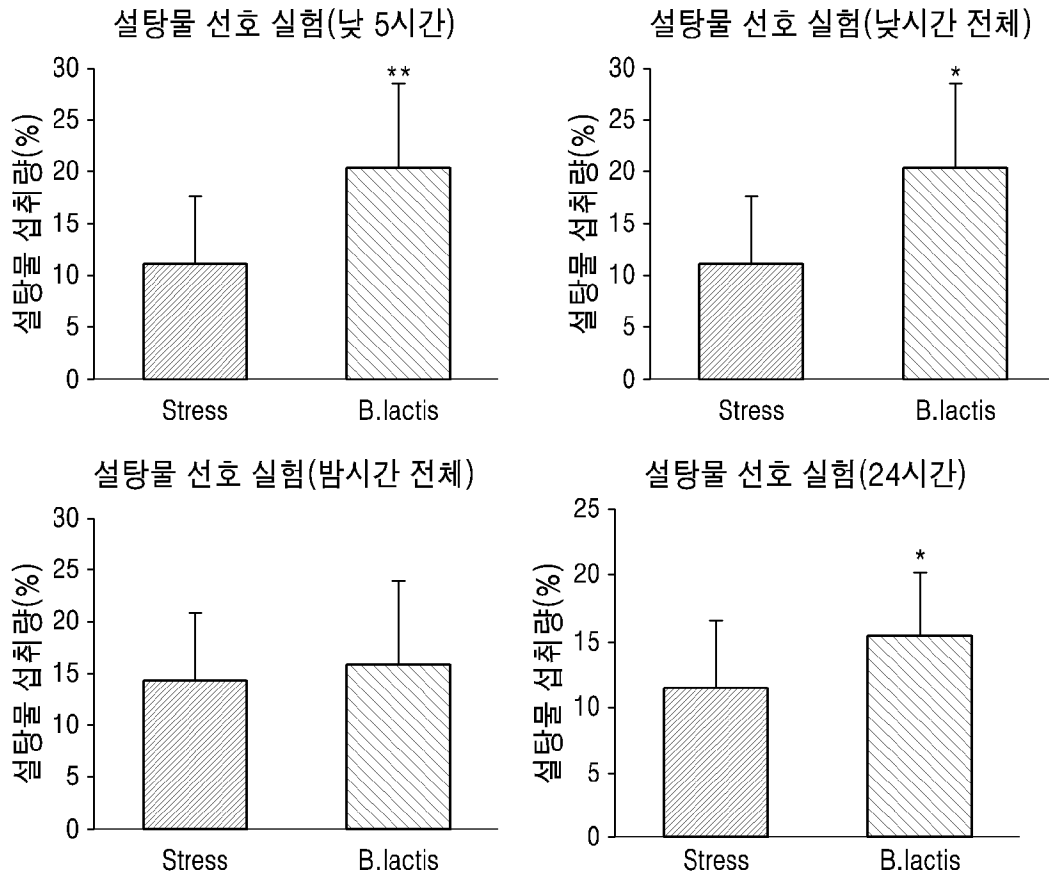
- [청구항 1] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP).
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 균주는 혈중 콜티코스테론을 저감하는 것인, 균주.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 균주는 혈중 엔도톡신을 저감하는 것인, 균주.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 균주는 장 투과성을 개선하는 것인, 균주.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 균주는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현량을 저감하는 것인, 균주.
- [청구항 6] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 7] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) HEM20-01 균주 (KCTC14143BP) 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 우울증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

[15]



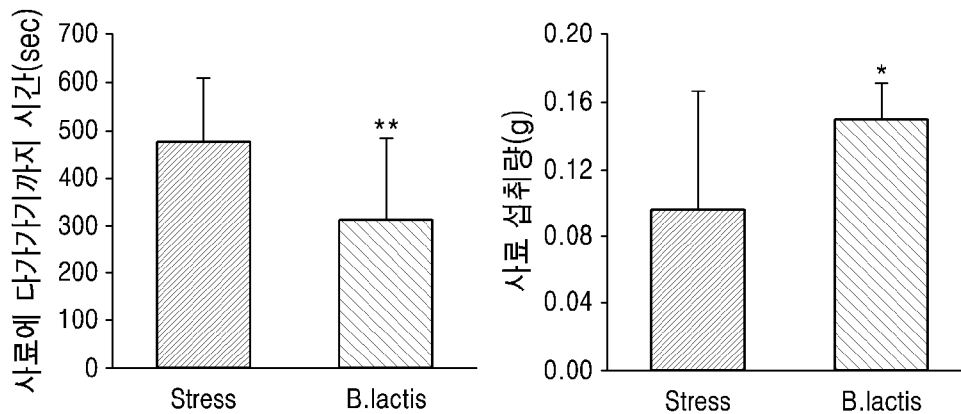
[도2]

설탕물 선호 실험 (Sucrose preference test)

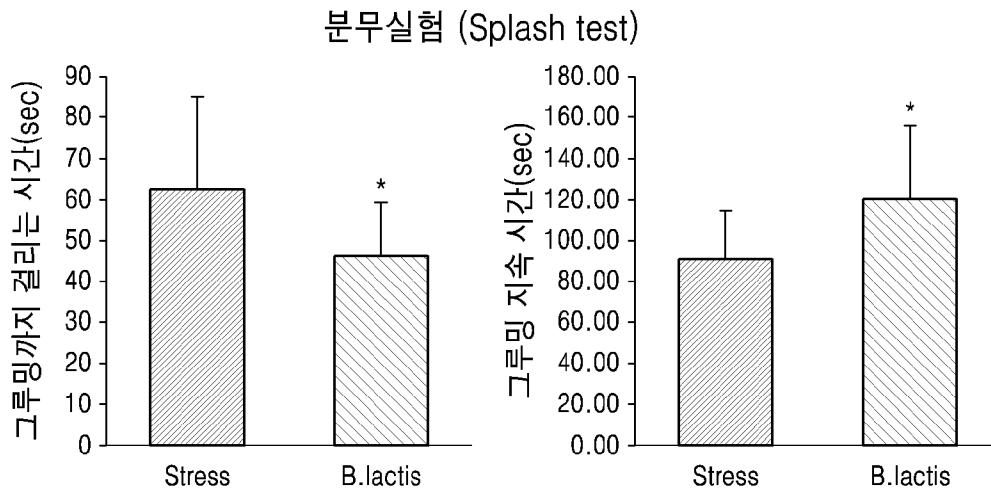


[도3]

참신 억제 사료 공급 실험 (Suppressed-novelty feeding test)

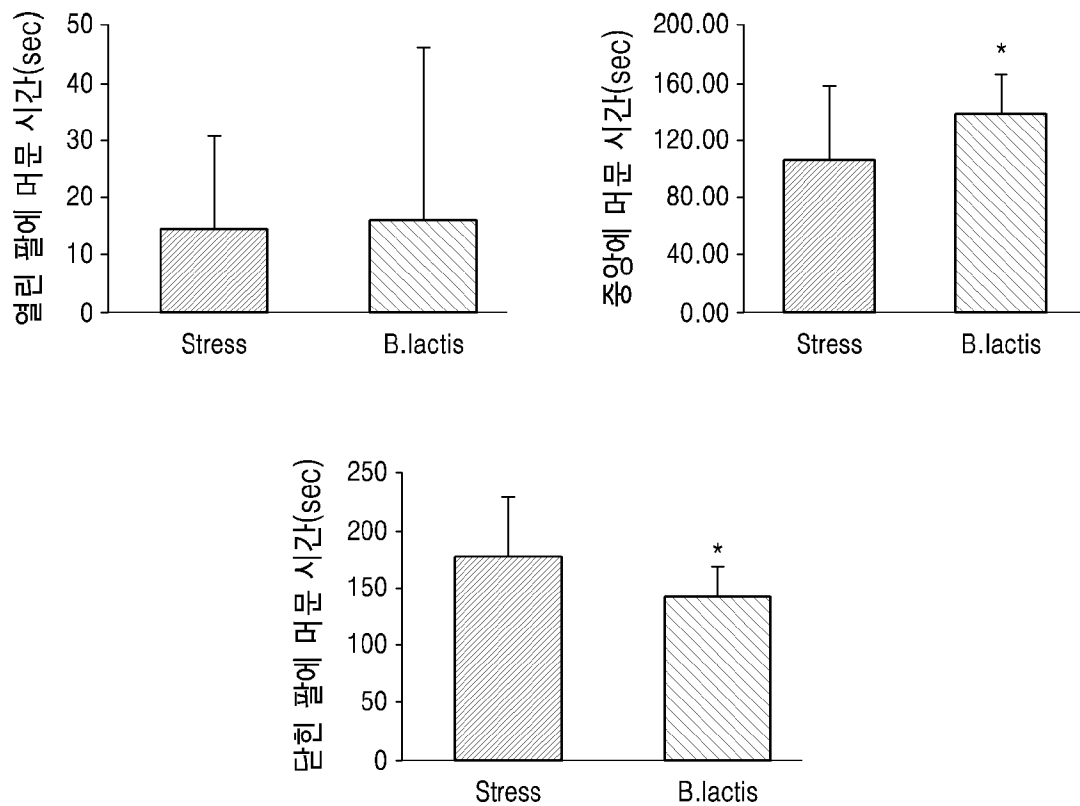


[도4]



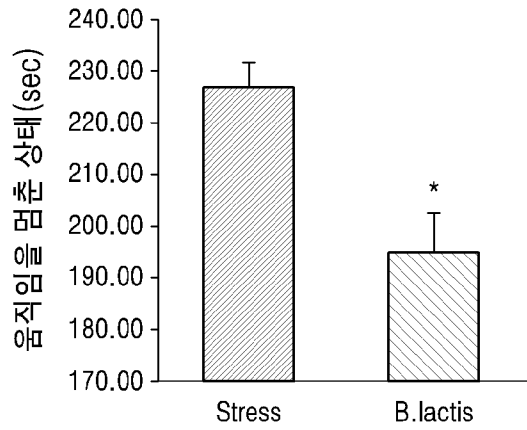
[도5]

높은 십자형 미로 실험 (Elevated plus maze test)



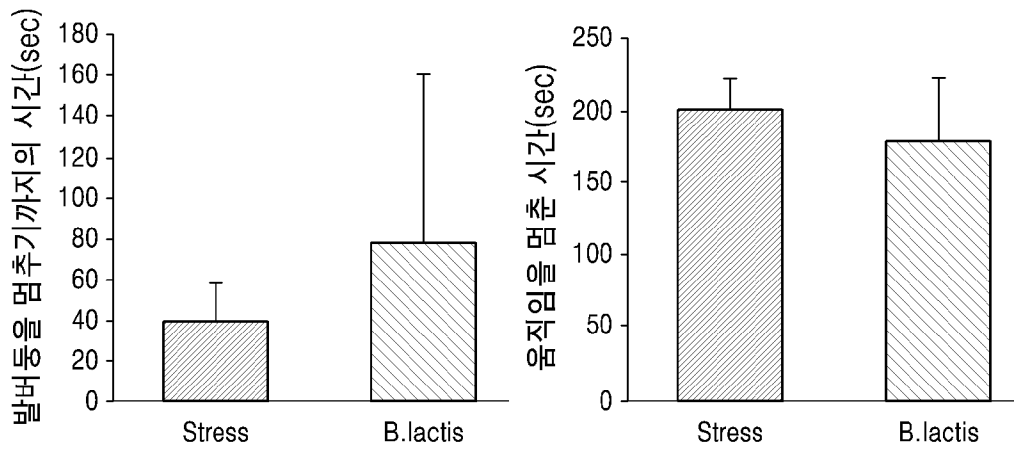
[도6]

꼬리 매달기 실험 (Tail suspension test)



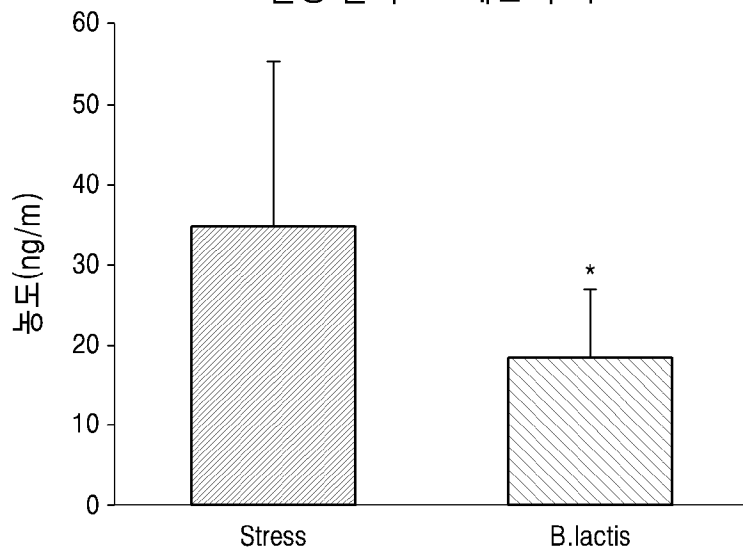
[도7]

강제적 수영 실험 (Forced swim test)

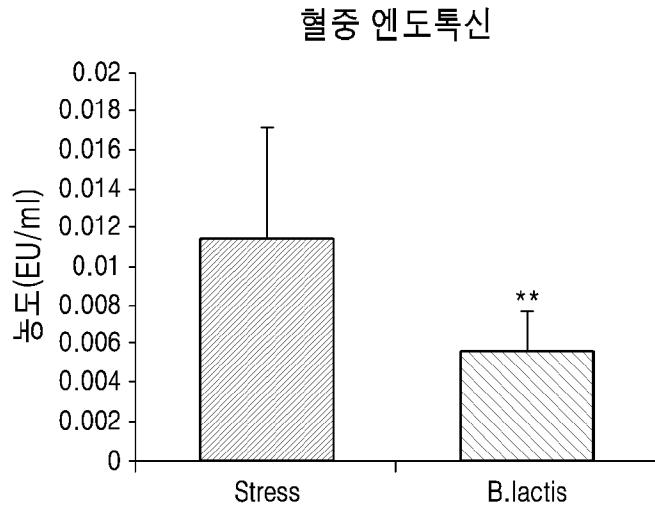


[도8]

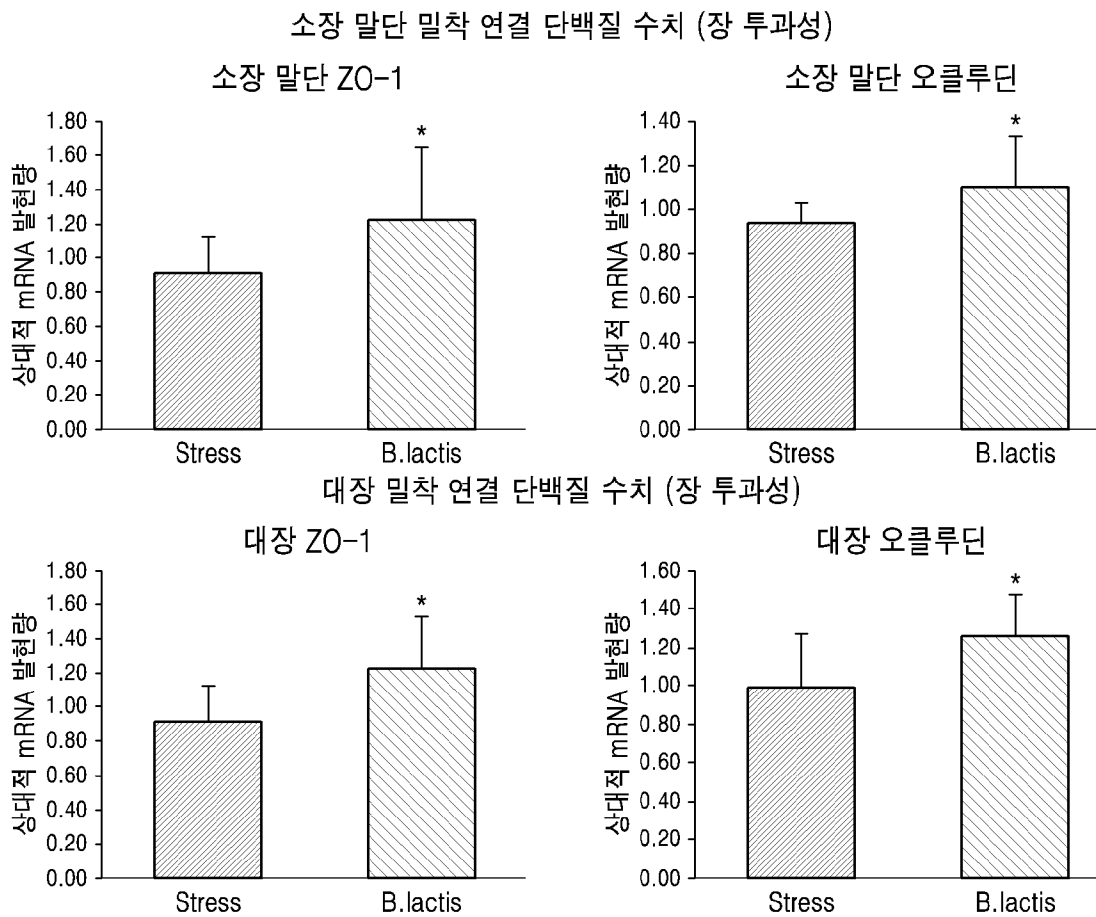
혈중 코르티코스테론 수치



[도9]

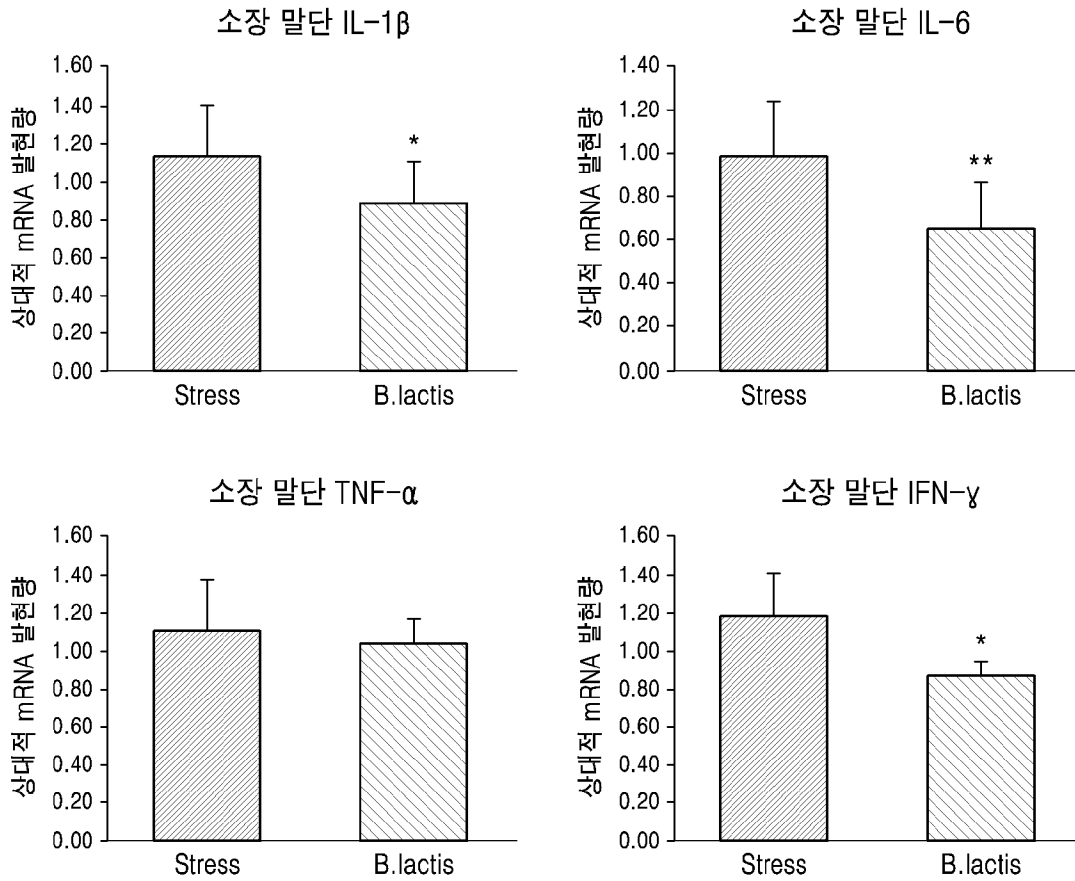


[도10]



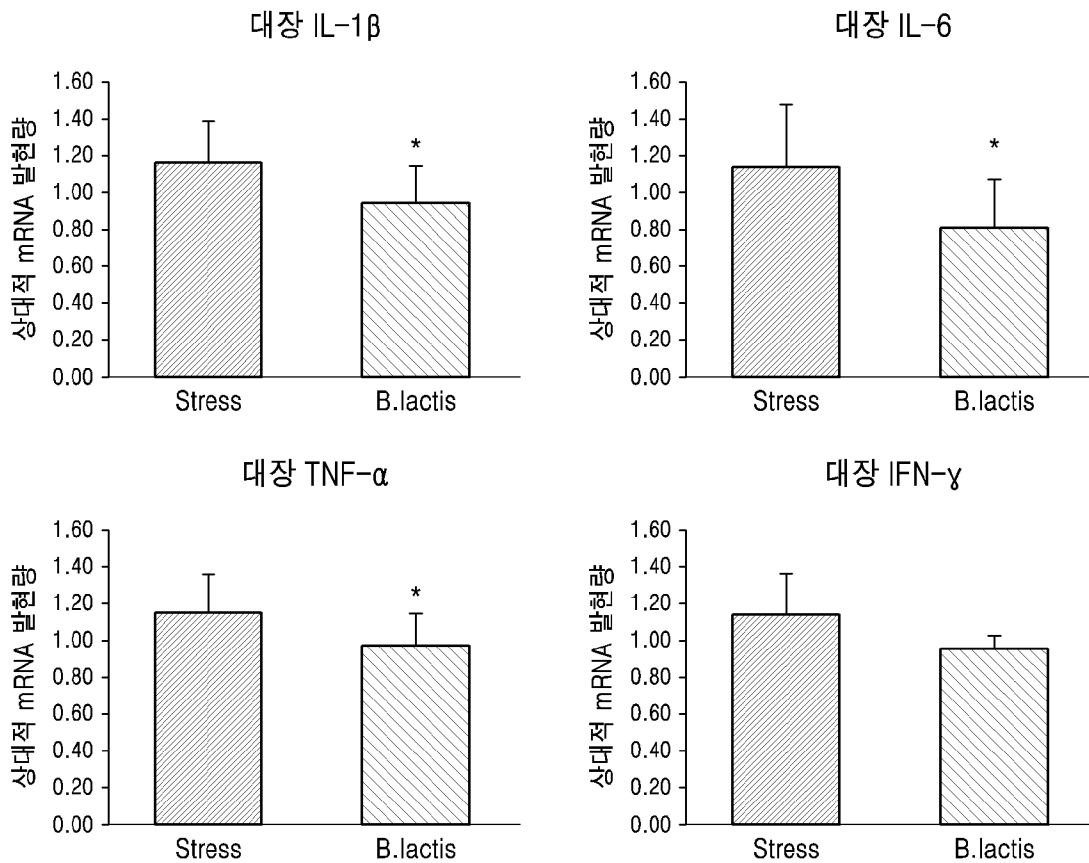
[도 11]

소장 말단 염증 지표

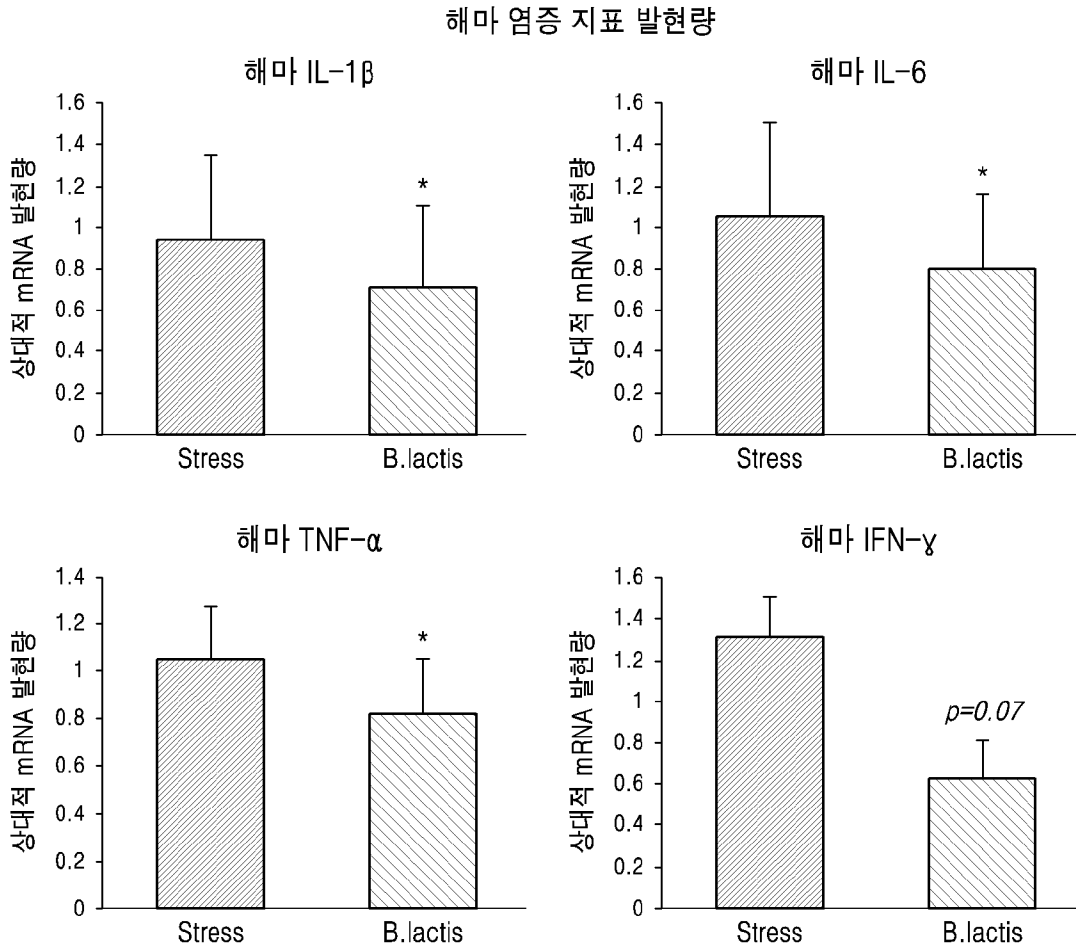


[도 12]

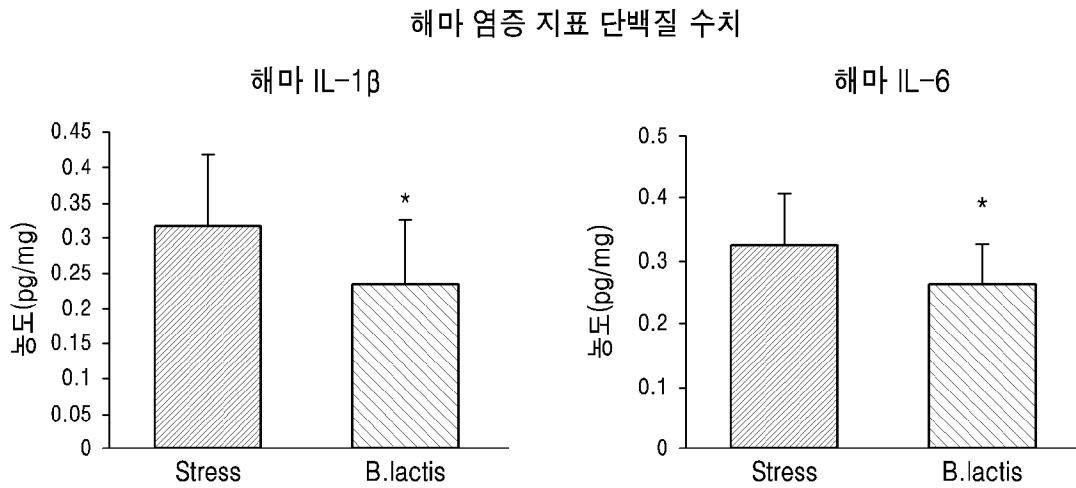
대장 염증 지표



[도 13]



[도 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/018915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/741(2014.01)i; A61P 25/24(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/575(2006.01); A61K 35/74(2006.01); A61P 25/00(2006.01); A61P 25/18(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(Bifidobacterium animalis subsp. lactis), 우울증(depressive disorder)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VLAINIC, Josipa et al. Probiotics as an adjuvant therapy in major depressive disorder. Current Neuropharmacology. 2016, vol. 14, pp. 952-958. See abstract; and page 955.	1-7
A	WO 2017-160711 A1 (HOLOBIOME, INC.) 21 September 2017 (2017-09-21) See entire document.	1-7
A	KR 10-2019-0038451 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 08 April 2019 (2019-04-08) See entire document.	1-7
A	KR 10-2012-0015335 A (MICROPHARMA LIMITED) 21 February 2012 (2012-02-21) See entire document.	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 March 2022		Date of mailing of the international search report 18 March 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/018915

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
WO	2017-160711	A1	21 September 2017	CA	3016911	A1	21 September 2017				
				CN	109715177	A	03 May 2019				
				EP	3429604	A1	23 January 2019				
				JP	2019-508479	A	28 March 2019				
				US	11116804	B2	14 September 2021				
				US	2019-0070225	A1	07 March 2019				
				<hr/>							
KR	10-2019-0038451	A	08 April 2019	AU	2021-282468	A1	06 January 2022				
				CA	3063669	A1	06 December 2019				
				CN	111465684	A	28 July 2020				
				EP	3715448	A2	30 September 2020				
				JP	2020-534853	A	03 December 2020				
				KR	10-2021-0064173	A	02 June 2021				
				KR	10-2022-0004233	A	11 January 2022				
				KR	10-2260489	B1	04 June 2021				
				KR	10-2348851	B1	12 January 2022				
				WO	2019-066599	A2	04 April 2019				
				WO	2019-066599	A3	23 May 2019				
				<hr/>							
				KR	10-2012-0015335	A	21 February 2012	CA	2796929	A1	04 November 2010
CA	2796929	C	10 March 2020								
CN	102481322	A	30 May 2012								
EP	2419114	A1	22 February 2012								
EP	2419114	B1	20 April 2016								
EP	2419114	B2	27 February 2019								
EP	2516052	A1	31 October 2012								
EP	3067056	A1	14 September 2016								
JP	2012-525338	A	22 October 2012								
JP	2015-127338	A	09 July 2015								
JP	6100526	B2	22 March 2017								
US	0660857	B2	26 May 2020								
US	2011-0217368	A1	08 September 2011								
US	2012-0258047	A1	11 October 2012								
WO	2010-124387	A1	04 November 2010								
WO	2011-075848	A1	30 June 2011								
<hr/>											
KR	10-2215599	B1	15 February 2021	None							

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61K 35/741(2014.01)i; A61P 25/24(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/575(2006.01); A61K 35/74(2006.01); A61P 25/00(2006.01); A61P 25/18(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (Bifidobacterium animalis subsp. lactis), 우울증(depressive disorder)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	VLAINIC, JOSIPA 등, 'Probiotics as an adjuvant therapy in major depressive disorder', Current Neuropharmacology, 2016, 14권, 페이지 952-958 요약; 및 페이지 955 참조.	1-7
A	WO 2017-160711 A1 (HOLOBIOME, INC.) 2017.09.21 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2019-0038451 A (경희대학교 산학협력단 등) 2019.04.08 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2012-0015335 A (마이크로파마 리미티드) 2012.02.21 전체 문헌 참조.	1-7
PX	KR 10-2215599 B1 (주식회사 에이치이엠) 2021.02.15 청구항 1-7 참조. (*위 문헌은 본 국제출원 우선권의 등록공보임.)	1-7
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년03월17일 (17.03.2022)	2022년03월18일 (18.03.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대 전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-160711 A1	2017/09/21	CA 3016911 A1	2017/09/21
		CN 109715177 A	2019/05/03
		EP 3429604 A1	2019/01/23
		JP 2019-508479 A	2019/03/28
		US 11116804 B2	2021/09/14
		US 2019-0070225 A1	2019/03/07
KR 10-2019-0038451 A	2019/04/08	AU 2021-282468 A1	2022/01/06
		CA 3063669 A1	2019/12/06
		CN 111465684 A	2020/07/28
		EP 3715448 A2	2020/09/30
		JP 2020-534853 A	2020/12/03
		KR 10-2021-0064173 A	2021/06/02
		KR 10-2022-0004233 A	2022/01/11
		KR 10-2260489 B1	2021/06/04
		KR 10-2348851 B1	2022/01/12
		WO 2019-066599 A2	2019/04/04
WO 2019-066599 A3	2019/05/23		
KR 10-2012-0015335 A	2012/02/21	CA 2796929 A1	2010/11/04
		CA 2796929 C	2020/03/10
		CN 102481322 A	2012/05/30
		EP 2419114 A1	2012/02/22
		EP 2419114 B1	2016/04/20
		EP 2419114 B2	2019/02/27
		EP 2516052 A1	2012/10/31
		EP 3067056 A1	2016/09/14
		JP 2012-525338 A	2012/10/22
		JP 2015-127338 A	2015/07/09
		JP 6100526 B2	2017/03/22
		US 0660857 B2	2020/05/26
		US 2011-0217368 A1	2011/09/08
		US 2012-0258047 A1	2012/10/11
		WO 2010-124387 A1	2010/11/04
WO 2011-075848 A1	2011/06/30		
KR 10-2215599 B1	2021/02/15	없음	