(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 12 월 29 일 (29.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/208823 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/741 (2015.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01) *C12Q 1/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/012687

(22) 국제출원일: 2015 년 11 월 25 일 (25.11.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0088795 2015 년 6 월 23 일 (23.06.2015) KR

(71) 출원인: **서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: **최영님 (CHOI, Youngnim)**; 03174 서울시 종로구 새문안로 3 길 23, 1601, Seoul (KR). **박희경 (PARK, Heekyung)**; 04595 서울시 중구 다산로 32, 4-1101, Seoul (KR). **김윤지 (KIM, Yunji)**; 01663 서울시 노원구 한글비석로 396, 107-312, Seoul (KR). **최윤식 (CHOI, Yunsik)**; 11808 경기도 의정부시 오목로 117, 104-1804, Gyeonggi-do (KR). **이아름 (LEE, Ahreum)**; 53223 경상남도 거제시 옥포로 23 길 13, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **박원미 (PARK, Weonmee)**; 06224 서울시 강남구 논현로 412, 603 호, Seoul (KR).

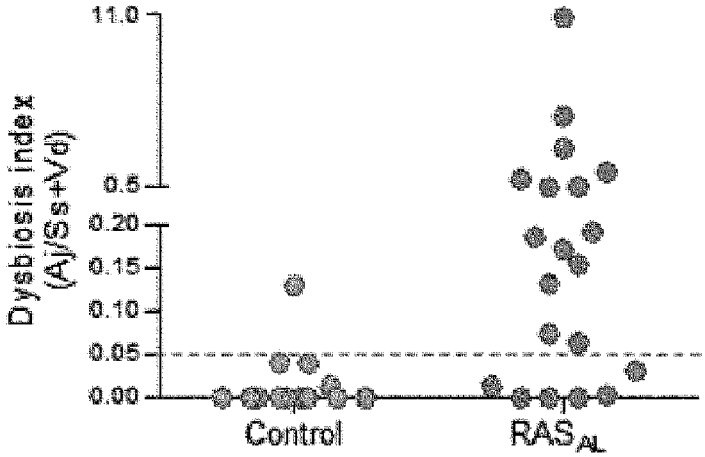
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION, CONTAINING AMINOGLYCOSIDE-BASED ANTIBIOTIC AND PROBIOTICS, FOR PREVENTING OR TREATING APHTHOUS STOMATITIS

(54) **발명의 명칭** : 아미노글리코시드계 항생제 및 프로바이오틱스를 포함하는 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) **Abstract**: Disclosed herein is a pharmaceutical composition for treating or preventing aphthous stomatitis, the composition containing: as probiotics, one or more microorganisms of *Streptococcus salivarius* and *Veillonella dispar*; and/or an aminoglycoside-based antibiotic. Disclosed herein is also a composition for diagnosing recurrent aphthous stomatitis, the composition containing a material for detecting *Acinetobacter johnsonii*, *Streptococcus salivarius*, and *Veillonella dispar*, and disclosed is a method for determining the recurrence of aphthous stomatitis using the amounts of *Acinetobacter johnsonii*, *Streptococcus salivarius*, and *Veillonella dispar*.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/208823 A1

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본원은 프로바이오틱스로서 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 중 하나 이상의 미생물 및/또는 아미노글리코시드계의 항생제를 포함하는 아프타구내염 치료 또는 예방용 약학 조성물을 개시한다. 본원은 또한 아시네토박터 존슨이(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스 및 베일로넬라 디스파르 검출용 물질을 포함하는 재발성 아프타 구내염 진단용 조성물을 개시하며 , 아시네토박터 존슨이, 스트렙토코커스 살리바리우스 및 베일로넬라 디스파르의 양을 이용한 아프타구내염의 재발여부를 판별하는 방법을 개시한다.

명세서

발명의 명칭: 아미노글리코시드계 항생제 및 프로바이오틱스를 포함하는 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본원은 항생제 및 프로바이오틱스를 이용한 재발성 아프타 구내염의 치료 또는 예방과 관련된 것이다.

배경기술

[2] 궤양성 구내염(ulcerated stomatitis)이라고도 알려진 아프타 구내염(aphthous stomatitis)은 구강 점막 내 궤양으로 유사한 크기의 다른 외상성 궤양과 비교하여 극심한 통증을 동반하며 빈번한 재발과 긴 치유기간이 필요한 질환이다 (Scully C, et al. Br Dent J. 2005;199: 259-264). 아프타 구내염은 통상 약 7일 내지 약 10일간 지속되나, 수주 동안 계속될 수도 있으며, 인구의 10-20%가 일생 동안 구강 궤양에 걸리는 것으로 알려져 있다 (Aas JA, et al., J Clin Microbiol. 2005;43: 5721-5732).

[3] 하지만 병을 일으키는 원인에 대하여는 명확하게 밝혀진 바가 없어, 병인 기전에 따른 정확한 표적에 기반을 둔, 근원적으로 치료 약물이 없는 것이 실정이다. 따라서 치료는 대증치료에 집중되어 있으며, 환자의 임의 완화 치료로 인한 부작용으로 인한 문제도 심각하다.

[4] 보편적으로 사용되는 치료법은 통증을 일시적으로 경감시키는 국소 소독제, 항생제, 및 수면제(예컨대, 2% 점성 리도카인 또는 10-20% 벤조카인 겔)를 사용하는 것이다. 또한, 트리암시놀론 아세토나이드(triamcinolone acetonide) 및 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 글루코코르티코이드를 국소적으로 도포하기도 한다('Oral and Maxillofacial Pathology' by B.W. Neville et al. 1995; pp. 236-239). 하지만 글루코코르티코이드는 심각한 부작용으로 인해 사용 시 처방을 요한다. 아울러 암렉사녹스(amlexanox) 경구 페이스트 5%(Block Drug Company 제조의 Aphthasol™)가 아프타 궤양을 치료하는 처방약으로 사용되지만 그 효능은 여전히 상당히 제한적이다.

[5] 미국 특허 제6148718호는 구강점막 급성 감염의 치료에 사용되는 투약제형에 관한 것으로 페니실린, 베타락탐계 등의 항생제를 구강 사용에 효과적으로 사용될 수 있도록 하는 제형을 개시한다.

[6] 한국공개특허공보 2005-007585는 아프타 궤양 및 단순 헤르페스 병변의 예방 및 치료조성물 및 방법에 관한 것으로, 유착성 페이스트(mucoadhesive paste) 중에 포함된 아연을 제외한 다가 금속을 포함하는 조성물을 개시한다.

[7] 따라서 병인 기전에 따른 정확한 타겟을 가지는 이를 근원적으로 치료할 수 있는 약물의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본원은 아프타 구내염의 타겟 세균 조성을 선택적으로 조절해주어, 근본적 치료가 가능한 새로운 개념의 예방 또는 치료제를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[9] 한 양태에서 본원은 프로바이오틱스로서 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 중 하나 이상을 포함하는 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[10] 일 구현예에서 본원에 따른 조성물은 아시네토박터(*Acinetobacter* johnsonii)의 증식은 억제하면서 상기 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*)의 증식은 증가시키거나 또는 증식에는 영향이 없는 아미노글리코시드계 항생제를 추가로 포함한다.

[11] 일 구현예에서 본원에 조성물에 포함될 수 있는 아미노글리코시드계 항생제는 카나마이신, 아미카신, 토프라마이신, 디베카신, 젠타마이신, 시소마이신, 네틸마이신, 네오마이신, 또는 스트렙토마이신 중 하나 이상이나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[12] 일 구현예에서는 특히 아미노글리코시드계 항생제는 젠타마이신 또는 토프라마이신 중 하나 이상이다.

[13] 일 구현예에서 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*)의 증식은 억제하면서 상기 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*)의 증식은 증가시키거나 또는 증식에는 영향이 없는 젠타마이신의 농도는 약 0.5 ~ 1μg/ml로 포함된다.

[14] 일 구현예에서 본원에 따른 조성물은 국소 도포에 적합한 제형으로, 생체 유착성 또는 점막 유착성 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[15] 다른 양태에서 본원은 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 검출용 물질을 포함하는 재발성 아프타 구내염 진단용 조성물을 제공한다.

[16] 또 다른 양태에서 본원은 아프타 구내염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 검사 대상자 유래의 구강 점막 시료에서 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 의 양을 결정하는 단계; 상기 결정된 양에 근거하여 디스바이오시스 인덱스를 결정하는 단계; 및 상기 디스바이오시스 인덱스가 정상 대조군과 비교하여 높은 경우, 이를 아프타 구내염으로 판별하는 단계를 포함하는, 인비트로에서 아프타 구내염 판별 방법을 제공한다.

[17] 본원에 따른 방법에서 구강 점막 시료는 아프타 구내염으로 치료받은 대상자 유래의 시료로, 상기 시료에서 결정된 디스바이오시스 인덱스가 상기 환자의 치료전 구강 점막 시료에서 결정된 디스바이오시스 인덱스와 비교하여 차이가 없는 경우 이를 재발성 아프타 구내염 위험군으로 판별하는 단계를 추가로

포함한다.

[18] 또 다른 양태에서 본원은 프로바이오틱스로서 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 중 하나 이상 또는 상기를 포함하는 약학 조성물을 아프타 구내염 치료가 필요한 사람에게 투여하는 단계를 포함하는 아프타 구내염 치료 방법을 제공한다.

[19] 또 다른 양태에서 본원은 아프타 구내염 진단 방법을 제공하며, 상기 방법은 검사 대상자 유래의 구강 점막 시료에서 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 의 양을 결정하는 단계; 상기 결정된 양에 근거하여 디스바이오시스 인덱스를 결정하는 단계; 및 상기 디스바이오시스 인덱스가 정상 대조군과 비교하여 높은 경우, 이를 아프타 구내염으로 판별하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[20] 본원에 따른 아미노글리코시드계 항생제 및/또는 프로바이오틱스를 포함하는 아프타구내염 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 기존의 비특이적으로 작용하는 항균 가글제와 같이 구강세균 전반에 비특이적으로 작용하는 것이 아니라, 표적이 되는 미생물의 조성을 선택적으로 조절해주는 치료제로 새로운 개념의 예방/치료제로 그 치료효과가 크다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1a 내지 도 1c는 대조군과 궤양이 있는 아프타 구내염(RAS_{AL})과 대조군에서 점막 및 타액의 미생물총(microbiota)을 비교한 결과로, 도 1a는 Chao 1 및 Shannon 다양성 인덱스에 의해 측정된 종 분포를 box & whisket 플롯으로 나타낸 것이고, 도 1b는 가중치 Unifrac 메트릭을 이용하여 생성된 PCoA 플롯으로 두 가지의 성분이 변화(varience)의 51.6%를 나타내고 있으며, 도 1c는 가중치 메트릭을 이용하여 수득한 점막 컴뮤너티의 그룹내 및 그룹간 Unifrac 거리를 나타낸 그래프이고, 도 1d는 5개의 우점 문(phylum)과 상위 15개의 우점 속(Genus)을 나타내는 파이 그래프로, *는 유의적 차이를 나타낸다.

[22] 도 2a 및 도 2b는 RAS(recurrent aphthous stomatitis)의 디스바이오시스(dysbiosis) 인덱스를 나타내는 것으로, 점막에서 *A. johnsonii* 의 상대적인 양을 *S. salivarius* 플러스 *V. dispar*의 상대적 양(abundance)으로 나눈 값으로 정의되며, 도 2a는 19개 대조군 시료 및 20개의 RAS_{AL} 시료의 인덱스를 나타내고, 도 2b는 치료 후 인덱스 변화를 4개의 RAS_{PS} 시료를 이용하여 분석한 결과로, 적색의 점선은 로지스틱 회귀분석에 의거한 RAS의 존재를 예측하는 값이다.

[23] 도 3a 및 b는 RAS와 연관된 박테리아가 인간 구강 상피 세포에 미치는 세포독성을 분석한 결과로 HOK-16B 세포를 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주를 MOI 100, 500, 및 1000로 24시간 동안 처리한 후 트리판블루 배제 염색을 수행하여, 각각 생활도 및 대조군과 비교한 증식정도를 비교한

결과이다. *: $P < 0.05$ compared to control, †: $P < 0.05$ compared to A. *johnsonii* of the same MOI.

[24] 도 4a 내지 4d는 RAS와 연관된 세 가지 세균에 대한 젠타마이신의 최소억제농도를 측정한 실험으로 *A. johnsonii* (도 4a), 및 *V. dispar* (도 4b) 및 *S. salivarius* (도 4c, 4d) 각 균주를 0.5 ~ 128μg/ml 젠타마이신이 포함된 배지에 $5x10^6$ /ml로 희석해 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 최소억제농도는 항생제가 포함되지 않은 배지에서 배양한 세균의 흡광도 대비 90%이상의 성장을 억제하는 농도로 정의하였다.

[25] 도 5a는 불멸화된 구강상피세포인 HOK-16B 세포에 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주를 HOK-16B 세포 수 대비 1000배수로 첨가해 24시간 배양한 후 Annexin-V와 PI 염색을 수행한 결과이다. *A. johnsonii*에 의해 세포 생존율이 89%에서 35%로 감소해 매우 높은 세포독성을 보인데 반해 *salivarius*와 *V. dispar*는 매우 낮은 세포독성을 보였다.

[26] 도 5b는 HOK-16B 세포에 *A. johnsonii*를 HOK-16B 세포 수 대비 500배수로 첨가해 24시간 배양했을 때와 여기에 1μg/ml 농도의 젠타마이신을 추가한 경우 1μg/ml 농도의 젠타마이신과 *V. dispar* 100배수를 첨가했을 때 세포독성을 비교한 결과로 젠타마이신에 의해 *A. johnsonii*의 세포독성이 모두 사라졌고 *V. dispar* 첨가에 의해 HOK-16B 세포의 생활도(viability)가 더 증가된 것을 나타낸다.

[27] 도 6은 구강상피세포에 아프타성구내염과 관련이 있는 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주를 상피세포 수 대비 1:500의 비율로 감염시킨 후, 4시간, 16시간 및 24시간 후에 배양액에 분비된 염증성 싸이토카인인 TNF-알파, IL-1베타 및 IL-8을 ELISA로 측정한 결과로, 아프타구내염의 위험을 높이는 Aj 세균은 염증성 싸이토카인의 분비를 증가시켜 아프타성구내염의 특징인 심한 통증을 매개하나, 아프타성구내염의 위험을 낮추는 Ss와 Vd 세균은 염증성 싸이토카인의 분비를 낮추어 염증을 줄이고, 통증도 줄일 수 있음을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

[28] 본원은 아프타구내염의 미생물총의 변화 규명에 근거한 것이다. 구체적으로 본원에서는 환자에서 *A. johnsonii* 의 증가, *S. salivarius* 및 *V. dispar*의 감소가 아프타 구내염 위험 및 재발과 연관되어 있음을 발견하였다.

[29] 따라서 한 양태에서 본원은 프로바이오틱스로서 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 중 하나 이상의 미생물과 선택적으로 항생제를 포함하는 재발성 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[30] 본원의 조성물이 효과가 있는 아프타 구내염은 궤양성 구내염(ulcerated stomatitis)이라고도 알려진 구강 점막 내 궤양으로 유사한 크기의 다른 외상성 궤양과 비교하여 극심한 통증을 동반하며 빈번한 재발과 긴 치유기간이 필요한

질환이다(Scully C, et al. Br Dent J. 2005;199: 259-264). 아프타 구내염은 재발성이 매우 강한 것이 특징이다. 아프타 구내염에 동반되는 궤양은 구강(구강 점막 표면)의 얕은 통증성 궤양으로 통상 저림 또는 작열감(전구기; prodromal period)에 이어 궤양화된 붉은 반점 또는 종창(조직의 팽창)이 동반된다. 궤양은 흔히 회백색 삼출물(exudate)로 피복되며, 연변 홍반(erythematous margin)(염증성)으로 둘러싸인다. 이는 극미한 크기(경증 아프타)에서부터 1/4 인치 이상의 크기(중증 아프타)를 갖는다.

[31] 본원에서 "병변" 또는 "궤양"이란 용어는 입술, 혀, 잇몸, 및 구강의 기타 내부 조직의 병변 또는 궤양을 포함하며, 상기 병변 또는 궤양은 점막, 점막하부, 상피, 진피 및/또는 피하 조직의 것일 수 있다.

[32] 본원에서 "치료"는, 증후의 개선, 질병 또는 증상의 치유를 포함한다.

[33] 본원에서 "예방"은 사전-궤양화 증상을 나타내는 부위에서의 궤양화 예방(방지)을 포함하는 것으로, 사전-궤양화 증상은 구강내 궤양이 형성되기 전의 자통감, 작열감, 통증, 염증, 붉은 반점, 홍반성 종창 등을 포함하는 것이다.

[34] 본원에서 “프로바이오틱 박테리아 또는 미생물”또는 “프로바이오틱스”는 이를 섭취하는 숙주에게 유익한 살아있는 미생물 균주를 일컫는 것이다.

[35] 본원에 따른 조성물에 포함되는 프로바이오틱 박테리아는 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*)를 포함한다.

[36] 본원에 따른 조성물에 포함되는 프로바이오틱스는 아프타 구내염에서 발생한 미생물의 불균형에 의한 의학적 증상인 디스바이오시스(dysbiosis)를 되돌려, 구내염을 예방 또는 치료하기에 적합한 양으로 포함될 수 있으며, 시중에서 구입할 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 균주가 사용될 수 있다.

[37] 본원에 따른 일 구현예에서 프로바이오틱스는 조성물 ml 당 10^2 내지 10^{13} CFU(colony forming units)로 포함 될 수 있다.

[38] 본원에 따른 조성물은 항생제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 항생제는 특히 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*)의 증식은 억제하면서 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*)의 증식을 증가시키고 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*)의 증식에는 영향을 미치지 않는 항생제를 의미한다.

[39] 이러한 항생제와 프로바이토틱스가 함께 사용되는 치료제를 셀렉트바이오틱스로 명명하였다. 이러한 셀렉트바이오틱스는 구강점막을 보호하는 상주균을 프로바이오틱스로 사용함과 동시에 구내염의 위험을 높이는 세균을 선택적으로 억제하는 항생제를 병용하여 구내염의 예방 및 치료에 매우 효과적이다.

[40] 본원에 따르면 *A.johnsonii*가 구강상피세포의 높은 사멸을 유도하는 것으로 나타났으며, 따라서 *A. johnsonii*은 사멸시키며, 스트렙토코커스 살리바리우스 및 베일로넬라 디스파르를 프로바이오틱스로 공급할 경우, 구내염의 치료에 매우 효과적일 수 있다.

[41] 본원에서는 특히 아미노글리코시드계 항생제가 상기 조건에 적합함을 발견하였다. 아미노글리코시드계 항생제는 분자 구조에 아미노-변형된 글리코시드 또는 아미노슈가를 포함하는 그람음성 박테리아에 대한 항생제를 일컫는 것으로, 단백질 합성을 억제한다. 예를 들면 카나마이신, 아미카신, 토프라마이신, 디베카신, 젠타마이신, 시소마이신, 네틸마이신, 네오마이신, 스트렙토마이신과 같은 항생제를 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서는 아미노글리코시드계 항생제가 단독 또는 조합으로 사용될 수 있다. 본원에 따른 다른 구현예에서는 젠타마이신 및/또는 토프라마이신이 사용된다.

[42] 본원에 따른 일 구현예에서는 젠타마이신이 사용된다.

[43] 본원에 따른 다른 구현예에서 젠타마이신은 0.5 ~ 1μg/ml의 농도로 사용되며, 상기 농도에서 *A. johnsonii*은 사멸시키며, 스트렙토코커스 살리바리우스의 증식은 증가시키고, 베일로넬라 디스파르의 증식에는 영향을 미치지 않는다.

[44] 본원은 아프타 구내염의 미생물총의 변화와 연관되어 있음을 발견한 것으로, 이런 측면에서 본원은 또한 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 검출용 물질을 포함하는 재발성 아프타 구내염 진단용 조성물 또는 키트에 관한 것이다.

[45] 본원에 따른 키트 또는 조성물에 포함된 검출용 물질은 구내염이 의심되는 대상자 유래의 시료 예를 들면 구강 점막에서 상기 미생물을 검출하기 위한 것이다. 상기와 같은 미생물은 생화학적으로 또는 예를 들면 각 미생물에 특이적인 보존된 영역 예를 들면 16sRNA의 서열분석 또는 증폭, 또는 유전체를 제한효소로 처리한 후 전기영동을 포함하는 방법에 의해 수행될 수 있다. 일반적으로 동일한 종에 속하는 박테리아로 판단되기 위해서는 공지된 16sRNA 서열과 비교하여 핵산서열이 적어도 97%의 동일성을 나타내야 하며, 비교는 예를 들면 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool is an algorithm for comparing primary biological sequence information) GAP (http://ftp.sunet.se/pub/molbio/docs/afrc-molbio-man/html-format/ch5-5.2.html#Heading13) 또는 BESTFIT (http://www.chem.umass.edu/~cmartin/Courses/BioStruct/Proj/Flanagan/bestfit.html) 과 같은 프로그램을 이용하여 분석될 수 있다. 또는 각 세균의 16sRNA 유전자에 특이적인 폴리뉴클레오타이드 프로브를 합성한 후 여기에 금나노 입자를 붙여 전기화학 검출법(electrochemical detection, ECD)으로 검출할 수도 있으며, Afonso et al., Biosensors and Bioelectronics 2013,Vol 40: pp 121-126)에 기재된 바를 참고할 수 있다.

[46] 본원에 따른 조성물은 다양한 방법으로 비경구투여 될 수 있으며, 특히 점막 표면에 국소 투여되는 것이 바람직하다.

[47] 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[48] 본원에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적 또는 치료적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[49] 본원에 따른 약학적 조성물로서 겔, 연고, 크림, 페이스트, 로션, 액상(예컨대, 구강 세정액 및 세척액), 약물 도포 붕대(medicated bandage), 스프레이, 또는 구강 또는 피부 궤양/병변의 치료에 적절한 임의의 다양한 국소 투여에 적합한 형태로 제형화될 수 있다.

[50] 본원에 따른 조성물은 고형, 액상 또는 페이스트 형태로 제형화 될 수 있다.

[51] 이러한 측면에서 본원에 따른 조성물은 피부과학적으로(dermatologically) 또는 약학적으로 허용 가능한 적절한 고체 또는 액상 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[52] 고형 담체는 카르복시메틸셀룰로오스 또는 그의 유도체, Carbopol(R) 폴리머, 폴리아크릴산 폴리머, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 적절한 액상 담체는 본원에 따른 항생제 또는 프로바이오틱스가 유효한 수준으로 용해 또는 분산될 수 있는 물질을 포함한다. 액상 조성물은 붕대 및 기타 드레싱의 침지에 사용되는 흡수성 패드(absorbent pad)를 통해 도포되거나, 펌프형 또는 에어로졸 분무기(aerosol sprayer)를 이용해 환부에 분무될 수 있으며, 구강 세정제로서 사용될 수 있다.

[53] 일 구현예에서 본원에 따른 조성물은 생체 유착성 또는 점막 유착성 페이스트 또는 담체를 포함한다. 예를 들면 CARBOPOL® 폴리머, Carbopol-폴록사머 겔, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 소디움 카르복시메틸 셀룰로스, 구아검, 폴리비닐 피롤리돈, 키토산, 폴리아크릴산, 하이드록시프로필 셀룰롯, 소디움 스타치 클리콜레이트, 알기네이트를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일반적으로, 생체 유착성 제제 및/또는 점막 유착성 담체를 포함하는 제형은 사전-궤양 및/또는 사후-궤양 조직 부위에서 장기간 예를 들면 약 1시간 내지 약 8시간의 접촉이 가능할 수 있도록 제조된다.

[54] 본원에 따른 조성물에 포함되는 항생제 및 프로바이오틱스는 복합체로서 하나의 제형에 포함되거나 또는 각각 별개의 제형으로 형성되어 함께 또는 연속적으로 투여될 수 있다.

[55] 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제형화 할 수 있다.

[56] 다른 측면에서 본원은 미생물총의 변화에 의해 아프타 구내염을 진단할 수 있는 방법에 관한 것이다.

[57] 일 구현예에서는 아프타 구내염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

검사대상자 유래의 구강 점막 시료 에서 Aj, Ss, Vd의 양(abundance)을 결정하는 단계; 상기 결정된 양에 근거하여 디스바이오시스 인덱스를 결정하는 단계; 및 상기 디스바이오시스 인덱스가 정상 대조군과 비교하여 높은 경우, 이를 아프타 구내염으로 판별하는 단계를 포함하는 아프타 구내염 판별 방법을 개시한다.

[58] 본원에 따른 방법에 디스바이오시스 인덱스는 점막에서 *A. johnsonii* 의 상대적 양을 *S. salivarius* plus *V. dispar* 의 상대적 양으로 나눈 값으로 정의된다.

[59] 본원에 따른 방법에서 세 가지 세균의 상대적인 양은 각 세균의 16sRNA 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 정량적 PCR 예를 들면 실시간 증폭 PCR(real-time PCR)로 측정할 수 있다. 세균에 특이적인 16sRNA는 RA database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) 등에서 수득할 수 있으며, 이를 BLAST와 같은 서열비교 분석 프로그램을 이용하여 정렬한 후, 차이가 나는 부분을 검출하는 프라이머를 용이하게 제작할 수 있을 것이다. 폴리뉴클레오타이드 서열 비교는 또한 예를 들면 GAP (http://ftp.sunet.se/pub/molbio/docs/afrc-molbio-man/html-format/ch5-5.2.html#Heading13) 또는 BESTFIT (http://www.chem.umass.edu/~cmartin/Courses/BioStruct/Proj/Flanagan/bestfit.html) 과 같은 프로그램을 이용하여 분석될 수 있다.

[60] 또는 각 세균의 16sRNA 유전자에 특이적인 폴리뉴클레오타이드 프로브를 합성한 후 여기에 금나노 입자를 붙여 전기화학 검출법(electrochemical detection, ECD)으로 검출할 수도 있으며, Afonso et al., Biosensors and Bioelectronics 2013,Vol 40: pp 121-126)에 기재된 바를 참고할 수 있다.

[61] 일 구현예에서 본원에 따른 방법은 아프타 구내염의 재발 예측에 사용될 수 있다. 이런 측면에서 본원에 따른 방법은 점액 또는 타액 시료로서 아프타 구내염으로 치료받은 환자 유래의 것을 사용하여 상기 시료에서 결정된 디스바이오시스 인덱스가 상기 환자의 치료전 시료와 비교하여 차이가 없는 경우 이를 재발성 아프타 구내염 위험군으로 판별하는 단계를 추가로 포함한다. 구내염 재발이 예측되는 경우, 본원에 따른 프로바이오틱스의 복용을 통해 미생물총을 정상 상태로 돌려놓음으로서 재발을 방지할 수 있을 것이다.

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

[63] **실시예**

[64] **실험방법 및 재료**

[65] **집단 연구 및 시료 수집**

[66] 본 연구는 헬싱키 선언 및 STROBE 가이드라인에 맞추어 진행되었다. 프로토콜(CRI 12018)은 서울대학교 치과병원 연구윤리 위원회에 의해 승인되었다. 2013년 2월부터 2014년 1월까지 서울대학교 치과병원의 구강내과 외래를 방문한 경미한 RAS 활성 병변(RAS_{AL})이 발생한 20명의 환자와 구강 점막

질환이 없는 20명의 대조군 환자가 연구에 등록하였다. 모든 연구는 고지된 승인하에 수행되었다. 연구수행 직전 달에 항생제 또는 스테로이드를 사용한 환자 및 구강건조증(비자극 전체 타액 유속 <0.1ml/min)을 갖는 대상체는 제외하였다. 또한 다른 구강 점막 질환(칸디다 균 수 > 1,000 colony forming unit/ml, 혈액결핍 관련 질환)을 갖는 환자도 제외하였다. RAS 환자 병변 점막 미생물총을 정상 대조군의 상응하는 부위의 미생물총과 비교하였으며, 치료 후 치유가 진행되는 부위가 있는 RAS_{AL}의 미생물총과도 비교하였다. 단지 4명의 환자만이 병변이 완전히 치유 된 후 일주일째 추가의 시료채취를 위해 다시 내원하였다. 4명 중 두 명(RAS2 및 RAS3)은 사잇기간에 0.1% 덱사메타손 가글을 사용하였다. 또한 RAS_{AL}의 타액의 미생물총도 비교를 하였으며, 이는 대조군과 비교하여 환자의 건강한 부위 및 질환이 발생한 부위의 미생물 차이를 반영한다. 모든 대상체는 시료채취 전 두시간 동안 섭취 및 항균 구강세정제 사용을 피하도록 하였다. 점막 시료 채취를 위해, 20 mm x 20 mm 크기의 멸균된 폴리비닐리덴 디플루오리드 막(Korea Inc, Seoul, Korea)을 가장 넓은 궤양병변 부위에 30초 통안 정치하였다. 건강 대조군의 경우, 입술 또는 볼 점막으로부터 시료를 채취하였다. 최소 2ml의 비자극된 전타액 시료를 뱉도록 하여 수집하였다.

[67] **DNA 추출, 16S rRNA 유전자 증폭 및 파이로서열분석**

[68] 타액을 원심분리하여 막 및 펠렛으로부터 PowerSoil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 제조자의 방법대로 사용하여 유전체 DNA를 분리하였다. 40개의 점막(n=20, n=20, and n=4 for Controls, RAS_{AL}, 및 RAS_{PS})과 20개 타액(n=10 및 n=10 대조군 및 RAS_{AL})에 대하여 파이로서열분석을 수행하였다. 최종 연구 사이즈는 각 그룹에서 10개의 시료를 분석한 후에 결정되었다. 16S rRNA 유전자의 증폭 및 서열분석은 454 GS FLX Titanum Sequencing System (Roche, USA)을 사용하여 ChunLab Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행되었다.

[69] **파이로서열분석 데이터 분석**

[70] 위에 기재한 바와 같이 분석한 서열에서 PCR 프라이머 서열을 제거한 후, 300bp 보다 짧거나 또는 두 개 이상의 불명확한 염기를 포함하는 서열을 제거하였다. 각 서열판독 결과의 계통분류는 EzTaxon database-e (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net) [Chun J, et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57: 2259-2261]에 대하여 수행되었다. 종의 풍부성 및 다양성은 the Ribosomal RNA database project's pyrosequencing pipeline (http://pyro.cme.msu.edu)을 이용하여 수행되었다. 판독서열을 동일한 파일로타입에 할당하기 위한 컷오프 값은 ≥ 97% 동일성으로 하였다. 무작위 샘플링을 통하여 시료간 판독 카운트에 있어 변이를 조정하였다. 커뮤너티 간의 전체적인 계통거리는 the weighted Fast UniFrac [Hamady M, et al. ISME J. 2010;4: 17-27.]를 이용하여 계산하였고, principal coordinate analysis (PCoA)를 이용하여 가시화하였다. 나아가 The Human

Microbiome Project (HMP) Consortium [Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486: 207-214.] 에 의해 발표된 볼 점막 및 타액의 파이로서열분석 결과를 본 연구의 대조군 대상체의 것과 비교하였다.

[71] **박테리아, 상피 세포 배양 및 염색**

[72] *Acinetobacter johnsonii* KCTC 12405 (Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea) 는 호기성의 30℃ 조건에서 BHI 배지에서 배양하였다. *Veillonella dispar* KCOM 1864 (Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea) 는 혐기성의 37℃ 조건에서 ATCC medium 188 배지에서 배양하였다. *Streptococcus salivarius* KCTC 5512 (KCTC) 및 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (American Type Culture Collection,, USA) 혐기 37℃ 조건에서 5μg/ml hemin 및 10μg/ml vitamin K을 포함하는 ATCC medium 188 및 BHI 배지에서 배양하였다. 불멸화 인간 구강 케라티노사이트 HOK-16B (Park NH et al., Oncogene 1995, 10(11):2145-2153)는 성장인자를 포함하는 각질 성장 배지 (Clonetics, USA)에서 배양되었다. HOK-16B 세포는 48웰 플레이트의 각 웰에 $4x10^4$cells/well의 농도로 3중으로 씨딩된 후 24시간 동안 배양하였고, MOI (multiplicity of infection) 100, 500, 및 1000로 박테리아로 감염되었다. 이어 포화습도 95% 공기 및 5% CO_2, 조건에서 24시간 동안 배양한 후 각 웰의 세포 생존도 및 세포 수를 트리판블루 배제 키트(Life technologies, USA)를 제조자의 방법대로 사용하여 세포사멸 여부를 측정하였다. 또한 세포는 유세포분석용 Annexin V FITC and PI 키트(Life technologies, USA)를 사용하여 염색한 후 유세포분석(BD Bioscience, USA)를 수행하였다.

[73] **싸이토카인 분비 분석**

[74] 위에 기재된 바와 같이 상피세포를 MOI 500으로 각각 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주로 감염하였다. 감염 후에 각각 4시간, 16시간 및 24시간 후에 배양액에 분비된 염증성 싸이토카인인 TNF-알파, IL-1베타 및 IL-8을 ELISA 키트 (R&D systems, USA)를 사용하여 제조자의 방법대로 측정하였다.

[75] **통계분석**

[76] 데이터는 달리 언급하지 않는 한 mean ± 표준편차로 나타낸다. 두 개의 그룹 간의 UniFrac distance 및 상대적 abundance의 차이는 각각 Mann-Whitney U-test and t-test를 이용하여 분석하였다. RAS 리스크와 박테리아 종간의 연관성은 로지스틱 회귀 분석을 이용하여 수행되었다. 박테리아의 세포독성은 Bonferroni correction을 도입한 ANOVA post-hoc test로 분석되었다. 모든 통계분석은 SPSS Statistics19 software (SPSS Inc., USA)을 이용하여 수행되었다. 유의성은 $P<0.05$로 설정하였다.

[77] **실시예 1. 아프타구내염의 미생물 총 특징 규명**

[78] 실험에 사용한 점막 및 타액시료가 유래된 RAS 환자의 인구학적 데이터는 표 1에 요약되어 있다.

[79] [표 1]

[80]

	대조군 대상체(n=9)	RAS 환자 (n = 20)
성별	9 남성, 10 여성	11 남성, 9 여성
나이	44.1±3.5	44.4±3.5
흡연경력	1 (5.3%)	3 (15%)
궤양 숫자	-	한개: 13 (65%) 다수: 7 (35%)
채취 부위	입술 점막: 7 (36.8%), 볼점막: 12 (63.2%)	입술 점막: 4 (20%), 볼점막: 13 (65%) 혀끝: 3 (15%),
비자극 타액유속	0.46±0.08 ml/minute	0.63±0.07 ml/minute

[81] 연구에 참여한 RAS가 발병한 11명의 남성 및 9명의 여성의 나이는 19세부터 81세까지의 분포를 나타냈다. RAS 그룹에서, 3명의 환자가 흡연경력이 있었는데, 1명은 과거에 흡연자였으며, 한 명은 단지 RAS 증상을 경감시키기 위해 흡연을 하였으며, 한 명은 매일 담배를 피우는 것으로 나타났다. 점막의 시료 채취 부위는 혀 끝 (n=3), 볼 점막 (n=4), 및 입술 점막 (n=13)을 포함하였다. 13명의 환자는 한 개의 궤양이 발생되었으며, 7명의 환자는 혀끝, 입술 점막 및 물렁 입천장에 다수의 궤양이 발생되었다. 건강 대조군은 21세에서 71세의 9명의 남성 및 10명의 여성이었다. 한 명은 파이로서열분석의 실패로 제외하였다. 점막 시료채취 부위는 볼 점막 (n=7) 및 입술 점막 (n=12) 이었다. 단지 한 명의 대상체가 현재 흡연자였다.

[82] 64개의 시료로부터 43개의 점막 (n=19, n=20, 및 n=4 for Controls, RAS_{AL}, 및 RAS_{PS}) 및 17개의 타액 (n=8 및 n=9 for Controls 및 RAS_{AL}) 미생물총 커뮤너티 데이터 세트를 수득하였다. 60개 컴뮤너티로부터 총 58,491개의 필터된 판독결과(시료당 평균 9,434 판독)를 수득하였으며, 이는 각 시료당 99%를 넘는 Good's coverage에 해당하는 것이다. 4개의 시료는 16sRNA가 증폭이 불충분하여 파이로서열분석을 수행하지 못하였다.

[83] 일부 질환에서는 미생물의 다양성이 변화하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 치주염에서는 플라크 박테리아의 다양성이 증가되는 것으로 나타났으며, 크론병에서는 장내 미생물총의 다양성이 감소되는 것으로 나타났다 [Griffen AL et al ISME J. 2012;6: 1176-1185; Hansen R, et al. Am J Gastroenterol. 2012;107: 1913-1922]. 따라서, 대조군 및 RAS_{AL} 그룹간의 알파 다양성을 비교하였다. 대조군과 비교하여, Chao 1 으로 분석된 RAS_{AL} 미생물총의 종 풍부성은 점막에서 감소한 것으로 나타났으나 (319 ± 18 vs. 279 ± 20) 타액에서는 증가하는 것으로 나타났다 (389 ± 23 vs. 437 ± 45). Shannon index를 통해 분석된 미생물총 컴뮤너티의 다양성은 유사한 양상을 나타냈다. RAS_{AL} 미생물총의 다양성은

대조군과 비교하여 점막에서는 다소 낮고 (3.61 ± 0.11 vs. 3.47 ± 0.11) 타액에서는 다소 높은 것으로 나타났다 (4.05 ± 0.09 vs. 4.22 ± 0.13). 그러나 이런 모든 차이는 통계적으로 유의하지 않은 것이다 (도 1a).

[84] 시료간의 변이를 결정하기 위한 UniFrac 기반의 PCoA 분석 결과 미생물총 프로파일은 생태적 니체에 의해 더 잘 구분되는 것으로 나타났는데, 즉 질환보다는 점막 vs. 타액에 의해 더 잘 구분되었다. 점막에서의 상이한 위치, 즉, 혀끝, 입술, 또는 볼 점막은 별개의 클러스터링을 나타내지 않았다. 타액 미생물총의 경우, RAS_{AL} 클러스터는 대조군 시료와 비교하여 다소 시프트되었다. 흥미롭게도 RAS_{AL} 클러스터 점막 시료는 PCoA 플롯에서 넓게 분포되어 있는데, 이는 RAS 병변에서 박테리아 커뮤너티가 서로간에서 보다 이질적이라는 것을 의미한다 (도 1b). 실제, RAS_{AL} 에서 대조군과 비교하여 보다 높은 인트라그룹 UniFrac 거리는 RAS 병변에서 대상체 간 (inter-subject) 변이가 증가하였음을 확인하는 것이다. 나아가, 인터그룹 UniFrac 거리는 대조군의 인트라그룹 거리보다 높았는데, 이는 대조군 및 RAS_{AL} 시료사이의 전체 박테리아 프로파일이 유의한 차이가 있음을 의미하는 것이다 (도 1c). 환자의 비병변 부위는 물론 병변 부위를 반영하는 타액 컴뮤너티에서 UniFrac 거리에서 인트라 또는 인터그룹간의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

[85] 다음 대조군 및 RAS_{AL} 그룹사이의 각 텍손의 상대적 양을 비교하였다. 점막 시료로부터 총 26개의 상이한 파일럼이 규명되었지만, *Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes,* 및 *Fusobacteria* 이 주를 이루는 것으로 나타났다 (>99% in Controls 및 >97% in RAS_{AL}). 대조군 대상체에서 관찰된 주요 파일럼의 상대적 양은 RAS_{AL} 환자의 것과 차이가 없었다 (도 1d). 속(genus) 수준에서, 대조군에서 스트렙토코커스가 총 점막 미생물총의 거의 반을 점유하였으며, 다른 주요 속은 *Haemophilus, Rothia, Neisseria, Actinomyces,* 및 *Veillonella*인 것으로 나타났다. 대조군과 비교하여, RAS_{AL} 점막 커뮤너티에서 *Veillonella*는 감소하였으며, *Acinetobacter*는 증가한 것으로 나타났다 (표 2). 종의 수준에서 *S. salivarius, Veillonellas* (*V. dispar* and *V. atypica*), and *Actinomyces odontolyticus*를 포함하는 수 개의 스트렙토코커스의 양 (abundance)은 RAS_{AL} 점막에서 감소하는 것으로 나타났다. 대신에, *Acinetobacter oryzae, A. johnsonii, Neisseria oralis, Blautia wexlerae, Ruminococcus gnavus,* 및 *Bacteroides fragilis*의 양은 증가한 것으로 나타났다 (표 2).

[86] [표 2]

[87]

		Controls (n= 19)	RAU_{AL} (n= 20)	*P* value
Genus	*Veillonella*↓	1.82 (0.49-10.44)	0.82 (0-3.33)	0.002
	Acinetobacter↑	0 (0-2.54)	0.79 (0-7.69)	0.001
	Campylobacter↓	0.22 (0-1.07)	0.08 (0-2.11)	0.035
	Lachnoanaerobaculum↓	0.09 (0.02-0.87)	0.04 (0-0.47)	0.007
	Blautia↑	0 (0-0.24)	0.02 (0-3.73)	0.002
	Myxococcus↑	0 (0-0.14)	0.04 (0-3.73)	0.006
	Pseudomonas↑	0 (0-0.33)	0.02 (0-2.28)	0.011
	Atopobium↓	0.04 (0-0.44)	0 (0-0.42)	0.025
	Ruminococcus_g6↑	0 (0-0.55)	0.02 (0-0.86)	0.012
	Moryella↓	0.04 (0-0.45)	0 (0-0.17)	0.001
	Faecalibacterium↑	0 (0-0.09)	0.01 (0-0.58)	0.012
	Staphylococcus↑	0 (0-0.15)	0.02 (0-0.28)	0.004
	Streptococcaceae_uc↓	0.02 (0-0.06)	0 (0-0.04)	<0.0005
	Flavobacterium↑	0 (0-0)	0 (0-0.38)	0.002
Species	*Streptococcus salivarius*↓	4.51 (0.08-18.08)	0.52 (0-10.2)	<0.0005
	Veillonella dispar↓	1.54 (0.29-5.30)	0.49 (0-2.16)	0.001
	Streptococcus parasanguinis↓	1.32 (0-11.45)	0.06 (0-0.98)	0.001
	Acinetobacter oryzae↑	0 (0-1.1)	0.58 (0-5.88)	0.006
	Actinomyces odontolyticus↓	0.41 (0-1.73)	0.11 (0-1.45)	0.009
	Veillonella atypica↓	0.06 (0-4.69)	0 (0-0.97)	0.032
	Prevotella melaninogenica↓	0.12 (0.05-0.85)	0.07 (0-0.69)	0.038
	Acinetobacter johnsonii↑	0 (0-0.54)	0.2 (0-1.86)	0.001
	FM997095_s↓	0.2 (0.01-1.35)	0.03 (0-1.25)	0.003
	Streptococcus_uc↓	0.15 (0.03-1.35)	0.03 (0-0.16)	<0.0005
	Neisseria oralis↑	0 (0-0.81)	0.02 (0-1.83)	0.025
	HQ757980_s↓	0.09 (0-1.15)	0 (0-2.32)	0.008
	Capnocytophaga granulosa↓	0.03 (0-2.55)	0 (0-0.79)	0.018
	4P002811_s↓	0.06 (0-1.4)	0.01 (0-0.42)	0.034
	4P003152_s↓	0.06 (0-1.27)	0 (0-0.09)	0.001
	Streptococcus peroris↓	0.075 (0-0.56)	0.003 (0-0.4)	0.027
	Campylobacter concisus↓	0.1 (0-0.51)	0.02 (0-0.14)	0.001
	4P003193_s↓	0.02 (0-2.07)	0 (0-0.47)	0.027
	Prevotella histicola↓	0.01 (0-2.29)	0 (0-0.29)	0.007
	Lachnoanaerobaculum orale↓	0.07 (0.01-0.53)	0.02 (0-0.45)	0.028
	Streptococcus vestibularis↓	0.02 (0-0.33)	0 (0-1.25)	<0.0005
	Streptococcus lactarius↓	0.03 (0-0.87)	0 (0-0.1)	0.011
	Blautia wexlerae↑	0 (0-0.24)	0.02 (0-3.21)	0.001
	Prevotella salivae↓	0.01 (0-0.49)	0 (0-0.96)	0.007
	DQ447842_s↓	0.05 (0-0.32)	0.006 (0-0.11)	0.035
	4P002810_s↓	0.05 (0-0.38)	0 (0-0.34)	0.013
	Ruminococcus gnavus↑	0 (0-0.53)	0.02 (0-0.86)	0.014
	Stomatobaculum longum↓	0.03 (0-0.45)	0 (0-0.17)	0.001
	Bacteroides fragilis↑	0 (0-0.29)	0.004 (0-0.43)	0.013
	BABG01000051_s↑	0 (0-0.07)	0.004 (0-0.52)	0.007
	Streptococcaceae_uc_s↓	0.02 (0-0.06)	0 (0-0.04)	0<0.0005

[88] 표 2에서 상대적 양은 중위 (median) % 및 범위로 나타냈으며, 화살표는 대조군과 비교하여 RAS 또는 $RAU(recurrent\ aphthous\ ulcers)_{AL}$ 의 증가 또는 감소를 나타낸다.

[89] *Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria,* Fusobacteria, 및 *TM7* 이 타액 미생물총에 포함된 우점종인 것으로 나타났다 (>99% in controls 및 >97% in RAS_{AL}). 이들 중에서 특히 RAS_{AL} 그룹의 *Bacteroidetes* 및 *Fusobacteria* 의 양이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다(*P*=0.002 및 *P*=0.002, 각각). 도 1d에 나타난 상위 15개의 속에서, RAS_{AL} 타액 미생물총에서 스트렙토코커스가

유의적으로 감소하였으나 *Porphyromonas* 및 *Capnocytophaga*는 증가한 것으로 나타났다. 종의 수준에서, *S. salivarius, S. parasanuinis, Rothia dentocariosa, N. sicca group,* 및 *A. viscosus* 의 양은 RAS_{AL} 시료에서 감소하였다. 대신에 *C. gingivalis, N. flava, Aggregatibacter segnis,* 및 *C. sputigena*는 증가한 것으로 나타났다 (표 3).

[90] [표 3]

[91]

		Controls (n= 8)	RAU_{AL} (n= 9)	*P* value
Genus	*Streptococcus* ↓	25.78 (12.10-44.24)	13.05 (3.5-26.86)	0.034
	Porphyromonas ↑	0.51 (0.17-2.65)	3.43 (0.23-12.27)	0.016
	Capnocytophaga ↑	0.93 (0.19-6.43)	2.56 (1.55-10.43)	0.043
	GU410548_g ↑	0.02 (0-0.03)	0.07 (0-4.72)	0.014
	Abiotrophia ↑	0 (0-0.09)	0.04 (0-0.28)	0.017
	Escherichia ↓	0.05 (0-0.17)	0 (0-0.03)	0.033
Species	*AM420091_s* ↑	0.24 (0-1.94)	1.53 (0.17-10.64)	0.043
	Streptococcus salivarius ↓	3.22 (0.76-10.42)	0.71 (0.03-3.84)	0.007
	Streptococcus parasanguinis↓	0.98 (0.24-8.42)	0.33 (0.03- 1.11)	0.043
	Capnocytophaga gingivalis ↑	0.19 (0.04- 0.62)	0.73 (0.04- 3.5)	0.009
	Neisseria flava ↑	0 (0-0.1)	0.32 (0-6.99)	0.003
	Rothia dentocariosa ↓	0.97 (0.06-2.31)	0.28 (0-0.69)	0.043
	HQ767899_s ↓	0.44 (0.02-2.97)	0.04 (0-1.29)	0.034
	Aggregatibacter segnis ↑	0.03 (0-0.19)	0.28 (0-2.65)	0.023
	Capnocytophaga sputigena ↑	0.05 (0-0.2)	0.36 (0.06-1.62)	0.003
	4P003196_s ↑	0.04 (0.01-0.42)	0.14 (0.1- 2.09)	0.021
	Neisseria sicca group ↓	0.25 (0-6.62)	0 (0-0)	< 0.0005
	Actinomyces viscosus ↓	0.05 (0-1.37)	0 (0-0.16)	0.028
	HQ757980_s ↓	0.1 (0.03-0.88)	0 (0-0.74)	0.032
	4P004176_s ↑	0 (0-0.03)	0.04 (0-0.23)	0.015
	Porphyromonas catoniae ↑	0 (0-0.01)	0.03 (0-0.23)	0.029
	Escherichia coli group ↓	0.06 (0-0.17)	0 (0-0.03)	0.033
	AM420214_s ↑	0 (0-0.01)	0.01 (0- 0.13)	0.021

[92] 표 3에서 상대적 양은 중위 % 및 범위로 표시되었다. 화살표는 대조군에서 화살표는 대조군과 비교하여 RAS_{AL}의 증가 또는 감소를 나타낸다.

[93] 상기와 같이 구강점막 세균 조성에 대한 파이로서열분석을 통하여 재발성 아프타 구내염 환자의 점막에서 건강한 사람과 비교해 보았을 때, 7개의 종은 증가, 24개의 종은 감소한다는 결과를 얻을 수 있었으며, 회귀분석을 통하여 *Streptococcus salivarius* (Ss), *Veillonella dispar* (Vd), *Acinetobacter johnsonii* (Aj)가 아프타성 구내염에 연관이 되어있다는 것을 알 수 있었다.

[94] **실시예 2. RAS의 디스바이오시스 인덱스 결정**

[95] 다음으로 상기와 같은 박테리아 종의 양의 변화가 RAS 위험도와 관련되어 있는지를 살펴보았다. 포워드 방법을 사용하여 점막 미생물총의 로지스틱 회귀 분석 결과, *S. salivarius* 의 양(per % increase)은 RAS 리스크의 감소와 관련된 것으로 나타났다 (odds ratio [OR] 0.691, 95% confidence interval [95% CI] 0.526-0.909, *P*=0.008). 백워드 방법을 사용한 분석 결과 두 종이 연관된 것으로 나타났다. *V. dispar* 의 양은 RAS 리스크의 감소와 관련이 있는 것으로 나타났으며(OR 0.124, CI 95% 0.024-0.646, *P*=0.013), *A. johnsonii* 의 양은 RAS

리스크의 증가와 관련된 것으로 나타났다 (OR 7547, CI 95% 4.9-1.2E7, *P*=0.017). 유사하게, 타액에서 *S. salivarius* 의 양은 RAS의 감소와 관련이 되어 있는 것으로 나타났다 (OR 0.342, CI 95% 0.120-0.973, *P*=0.044). 점막에서 *S. salivarius* plus *V. dispar* 의 상대적 양으로 나눈 *A. johnsonii* 의 상대적 양을 디스바이오시스 (dysbiosis) 인덱스로 정의하였으며, 이는 RAS 리스크와 유의하게 관련되어 있는 것으로 나타났다 (OR 3.14E9. CI 95% 30.96-3.19E17, *P*=0.02). 나아가, 디스바이오시스 인덱스는 RAS의 부재 및 존재에 대하여 분석된 총 케이스의 82%에서 정확하게 예측하였다 (대조군의 95% 및 70% of RAS, 도 2a).

[96] 다른 중요한 이슈는 RAS_{AL} 미생물총의 특징이 RAS의 내재적 특징인지 또는 질환의 결과 즉 궤양/염증에 의한 것인지 여부를 결정하는 것이었다. 치료 후 시료를 기증한 4명의 환자에서, 세명은 치료 후에 디스바이오시스 인덱스가 감소하였다 (도 2b). RAS16에서, 디스바이오시스 인덱스는 변화하지 않았는데, 이는 *A. johnsonii* 가 RAS_{AL} 시료에서 검출되지 않았기 때문인 것으로 생각되며, *S. salivarius* plus *V. dispar*의 양은 치료후에 2.5% 에서 11.7% 로 증가하였다.

[97] **실시예 3. RAS 관련 박테리아의 구강상피 세포에 대한 세포독성**

[98] RAS의 원인 병리론에 있어서, 박테리아의 역할을 규명하기 위하여, 세 종류의 RAS 관련 박테리아 종의 세포독성을 구강 상피세포에 실험을 수행하였다. 치주병원균인 *P. gingivalis*을 대조군으로 사용하였다. 불멸화된 구강상피세포인 HOK-16B에 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주를 MOI 100, 500, 및 1000로 24시간 동안 처리하였다. 6웰 플레이트에서 두 번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 결과는 트리판블루 배제 염색으로 분석하여도 생활도 및 대조군과 대비한 증식정도를 측정하였다.

[99] 결과는 도 3a 및 3b에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이, *A. johnsonii* 는 *S. salivarius* 및 *V. dispar*와 비교하여 HOK-16B 세포에 대한 더 큰 세포독성을 나타냈으며, 이는 *P. gingivalis*에 의한 세포독성에 필적하는 수준이었다. 나아가, *A. johnsonii* 는 MOI 100에서 조차 HOK-16B 세포의 증식을 억제하였다. *A. johnsonii* 는 37℃에서 자라지 않았는데, 이는 박테리아 성장에 의한 세포독성을 배제하는 것이다.

[100] 또한 구강상피세포인 HOK-16B 세포에 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V.* dispar 각 균주를 HOK-16B 세포 수 대비 1000배수로 첨가해 24시간 배양한 후 Annexin-V와 PI 염색을 수행한 결과 도 5a에 나타난 바와 같이 *A. johnsonii*에 의해 세포 생존율이 89%에서 35%로 감소해 매우 높은 세포독성을 보인데 반해 *salivarius*와 *V. dispar* 는 매우 낮은 세포독성을 보였다.

[101] 아울러 HOK-16B 세포에 *A. johnsonii*를 HOK-16B 세포 수 대비 500배수로 첨가해 24시간 배양했을 때와 여기에 1μg/ml 농도의 젠타마이신을 추가한 경우 1 μg/ml 농도의 젠타마이신과 *V. dispar* 100배수를 첨가했을 때 세포독성을 비교 측정한 결과 도 5b에 나타난 바와 같이 젠타마이신에 의해 *A. johnsonii*의 세포독성이 모두 사라졌고 *V. dispar* 첨가에 의해 HOK-16B 세포의

생활도(viability)가 더 증가된 것으로 나타났다.

[102] **실시예 4. RAS와 연관된 세 가지 세균에 대한 젠타마이신의 최소억제농도 측정**

[103] *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주를 0.5 ~ 128μg/ml 젠타마이신이 포함된 배지에 5x10^6/ml로 희석해 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최소억제농도는 항생제가 포함되지 않은 배지에서 배양한 세균의 흡광도 대비 90%이상의 성장을 억제하는 농도로 정의하였다. 결과는 도 4a 내지 4d에 기재되어 있다. 도 4a에서 *A. johnsonii*에 대한 최소억제농도는 0.5μg/ml인데 반해 도 4b, 4c 및 4d에서 나타난 바와 같이 *V. dispar*와 S. salivarius에 대한 최소억제농도는 4~32μg/ml이다. 게다가 *S. salivarius*의 경우 두 가지 균주 (1)과 (2) 모두 최소 억제농도보다 낮은 농도에서는 항생제가 포함되지 않은 배지에서 배양한 세균보다 성장이 증가하였다. 따라서 상기 결과는 0.5 ~ 1μg/ml 젠타마이신은 *A. johnsonii*의 증식은 억제하면서 *S. salivarius*의 증식을 증가시키고 *V. dispar*의 증식에는 최소한의 영향을 미치는 농도임을 나타낸다.

[104] **실시예 5.** *S. salivarius*와 *V. dispar* 세균에 의한 싸이토카인 분비 억제

[105] 실험방법에 기재된 바와 같이 *A. johnsonii, S. salivarius,* 및 *V. dispar* 각 균주가 염증에 미치는 영향을 측정하였다. 결과는 도 6에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 아프타구내염의 위험을 높이는 Aj 세균은 염증성 싸이토카인의 분비를 증가시켜 아프타성구내염의 특징인 심한 통증을 매개하나, 아프타성구내염의 위험을 낮추는 Ss와 Vd 세균은 염증성 싸이토카인의 분비를 낮추어 염증을 줄이고, 통증도 줄일 수 있음을 나타낸다.

[106] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[107] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

[청구항 1] 프로바이오틱스로서 스트렙토코커스 살리바리우스 (*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르 (*Veillonella dispar*) 중 하나 이상을 포함하는 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*)의 증식은 억제하면서 상기 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*)의 증식은 증가시키거나 또는 증식에는 영향이 없는 아미노글리코시드계 항생제를 추가로 포함하는 것인, 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 아미노글리코시드계 항생제는 카나마이신, 아미카신, 토프라마이신, 디베카신, 젠타마이신, 시소마이신, 네틸마이신, 네오마이신, 또는 스트렙토마이신 중 하나 이상인, 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 항생제는 젠타마이신 또는 토프라마이신 중 하나 이상인, 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 젠타마이신의 농도는 0.5 ~ 1μg/ml인 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 6] 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 약학 조성물은 국소 도포에 적합한 생체 유착성 또는 점막 유착성 담체를 추가로 포함하는 것인, 아프타 구내염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

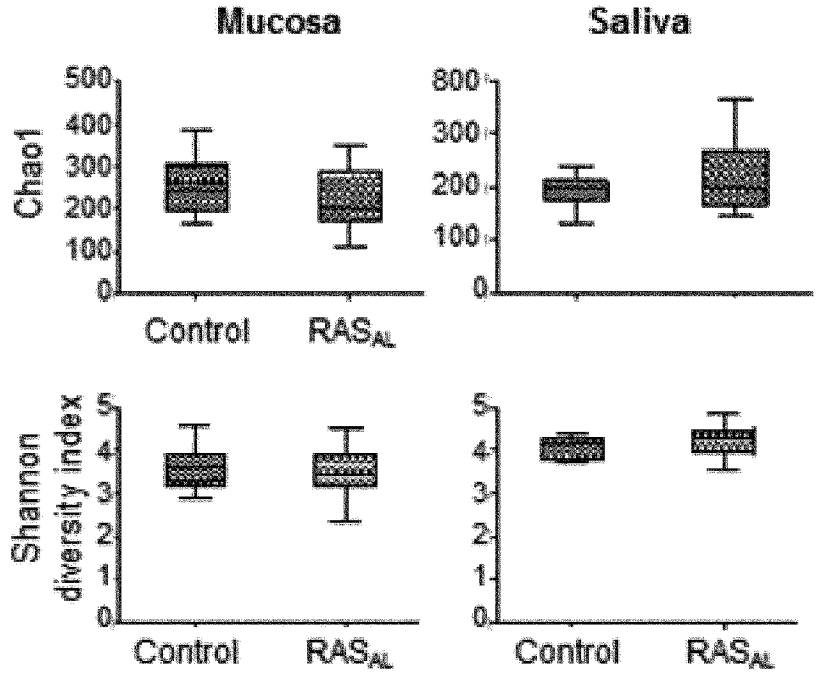
[청구항 7] 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 검출용 물질을 포함하는 재발성 아프타 구내염 진단용 조성물.

[청구항 8] 아프타 구내염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여,
검사 대상자 유래의 구강 점막 시료에서 아시네토박터(*Acinetobacter johnsonii*), 스트렙토코커스 살리바리우스(*Streptococcus salivarius*) 및 베일로넬라 디스파르(*Veillonella dispar*) 의 양을 결정하는 단계;
상기 결정된 양에 근거하여 디스바이오시스 인덱스를 결정하는 단계; 및
상기 디스바이오시스 인덱스가 정상 대조군과 비교하여 높은 경우, 이를 아프타 구내염으로 판별하는 단계를 포함하는, 인비트로에서 아프타 구내염 판별 방법.

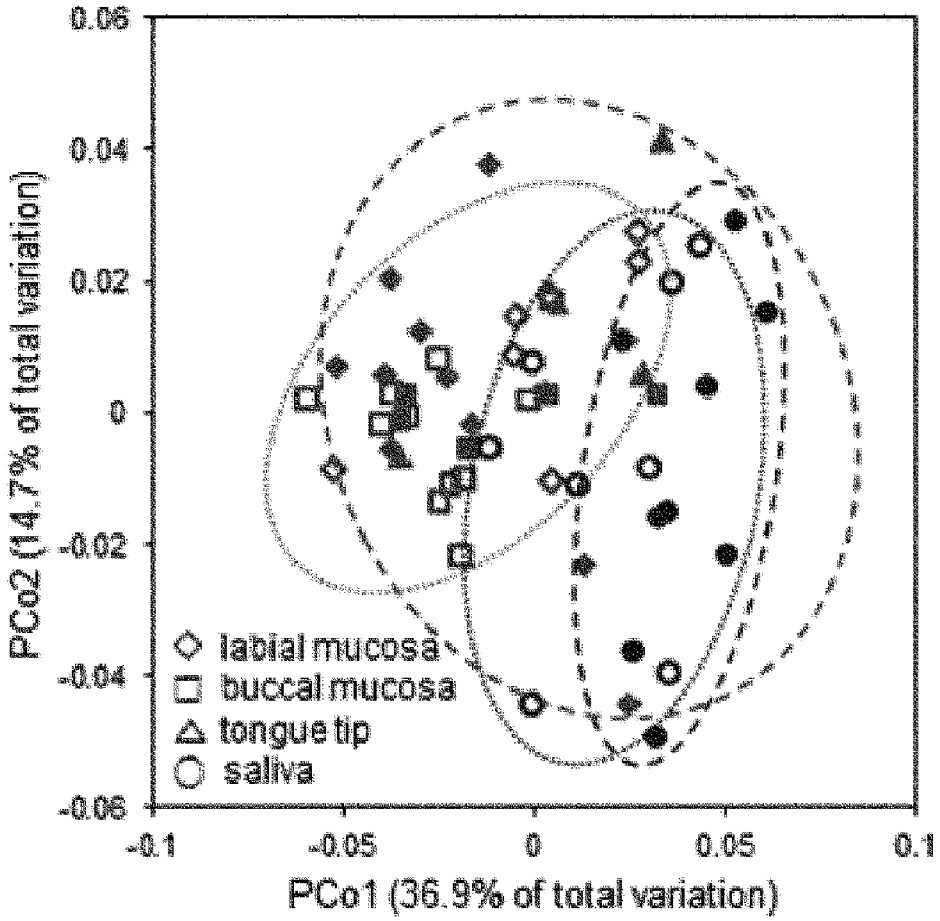
[청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 구강 점막 시료는 아프타 구내염으로 치료받은 대상자 유래의 시료로, 상기 시료에서 결정된 디스바이오시스 인덱스가 상기 환자의 치료전 구강 점막 시료에서 결정된 디스바이오시스 인덱스와 비교하여

차이가 없는 경우 이를 재발성 아프타 구내염 위험군으로 판별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 인비트로에서 아프타 구내염 판별 방법.

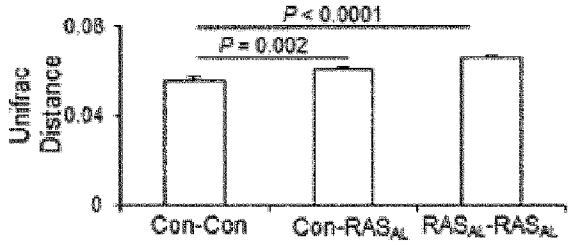
[도1a]


Mucosa
Saliva
Chao1
500
400
300
200
100
0
800
300
200
100
0
Control
RASAL
Shannon diversity index
5
4
3
2
1
0
Control
RASAL
Control
RASAL

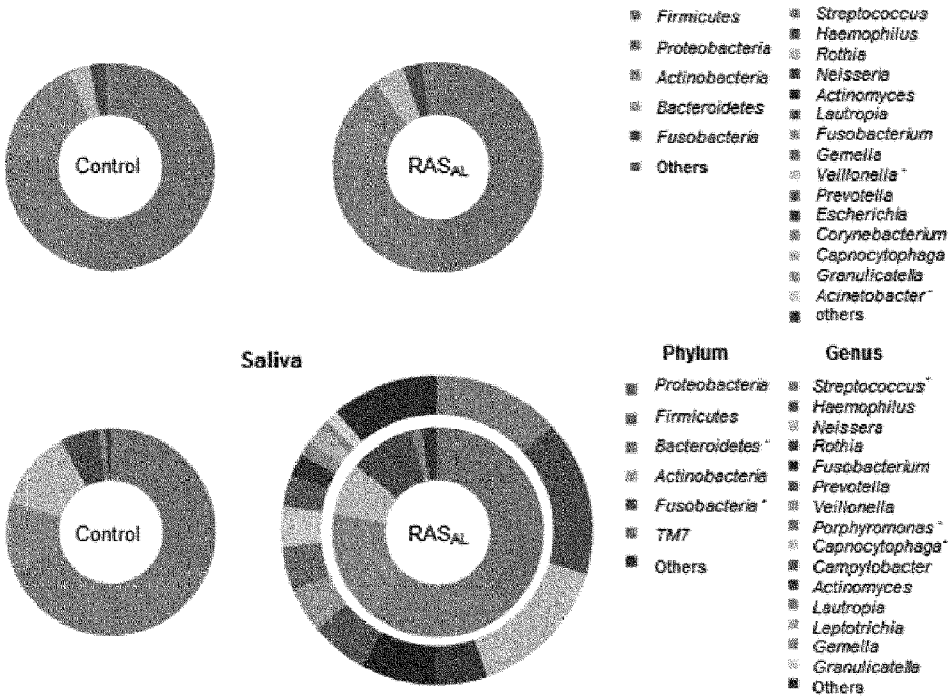
[도1b]


0.06
0.04
0.02
0
-0.02
-0.04
-0.06
PCo2 (14.7% of total variation)
labial mucosa
buccal mucosa
tongue tip
saliva
-0.1
-0.05
0
0.05
0.1
PCo1 (36.9% of total variation)

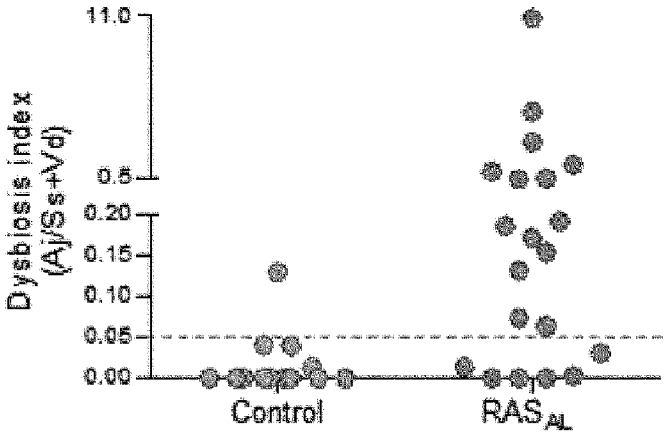
[도1c]


P < 0.0001
P = 0.002
Unifrac Distance
0.08
0.04
0
Con-Con
Con-RASAL
RASAL-RASAL

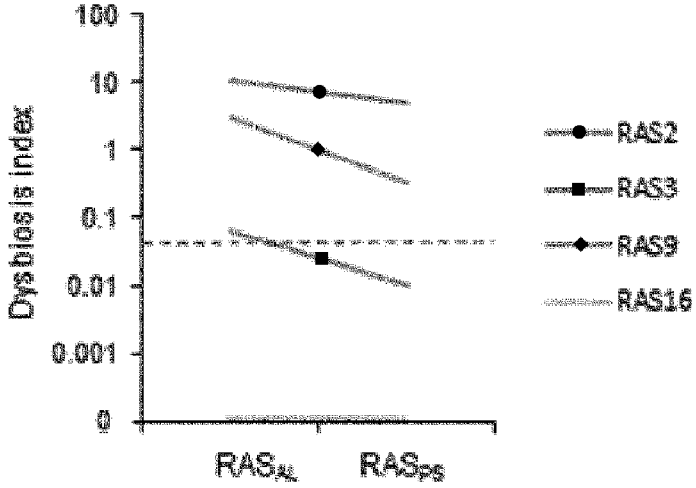
[도1d]


Control
RASAL
Firmicutes
Proteobacteria
Actinobacteria
Bacteroidetes
Fusobacteria
Others
Streptococcus
Haemophilus
Rothia
Neisseria
Actinomyces
Lautropia
Fusobacterium
Gemella
Veillonella
Prevotella
Escherichia
Corynebacterium
Capnocytophaga
Granulicatella
Acinetobacter
others
Saliva
Control
RASAL
Phylum
Proteobacteria
Firmicutes
Bacteroidetes
Actinobacteria
Fusobacteria
TM7
Others
Genus
Streptococcus
Haemophilus
Neisseria
Rothia
Fusobacterium
Prevotella
Veillonella
Porphyromonas
Capnocytophaga
Campylobacter
Actinomyces
Lautropia
Leptotrichia
Gemella
Granulicatella
Others

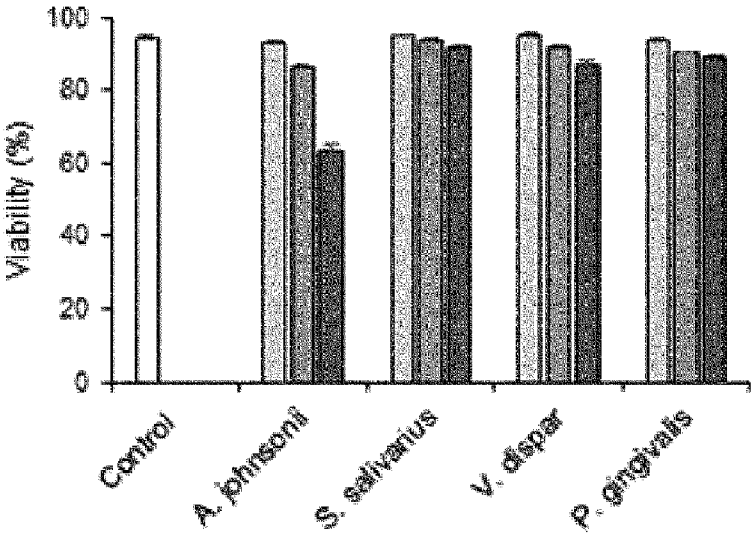
[도2a]


Dysbiosis index
11.0
0.5
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Control
RASAL

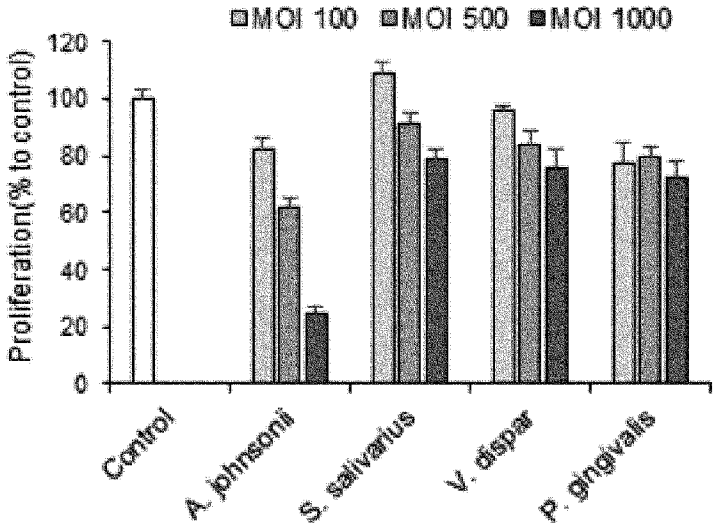
[도2b]


100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
Dysbiosis index
RAS2
RAS3
RAS9
RAS16
RAS_AL
RAS_PS

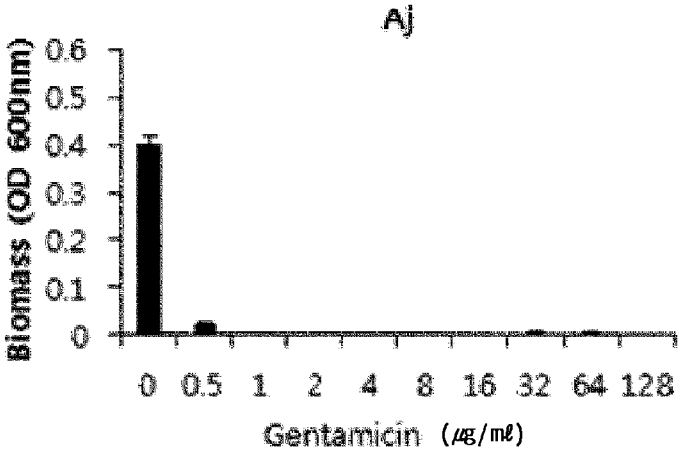
[도3a]


100
80
60
40
20
0
Viability (%)
Control
A. johnsonii
S. salivarius
V. dispar
P. gingivalis

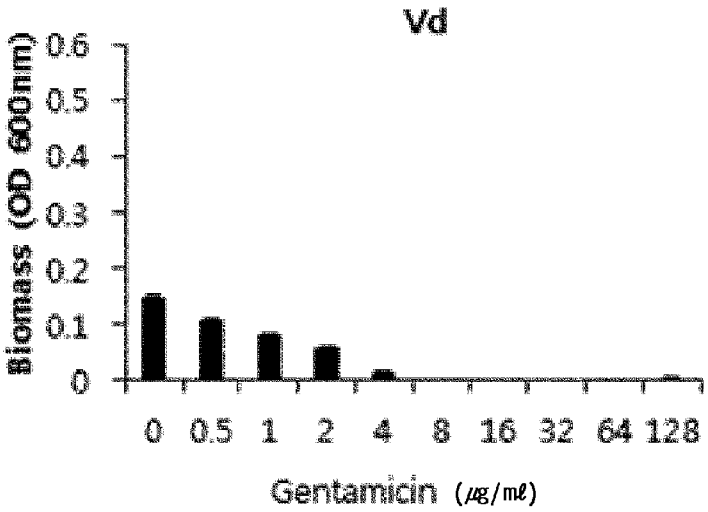
[도3b]


MOI 100
MOI 500
MOI 1000
120
100
80
60
40
20
0
Proliferation(% to control)
Control
A. johnsonii
S. salivarius
V. dispar
P. gingivalis

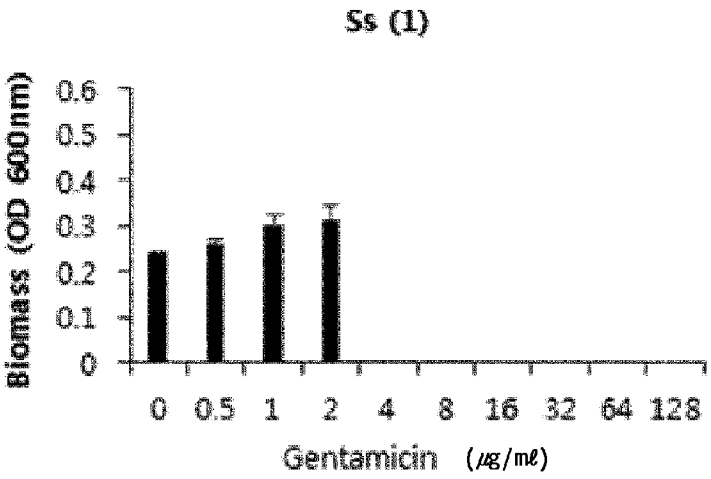
[도4a]


Aj
Biomass (OD 600nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32 64 128
Gentamicin (㎍/㎖)

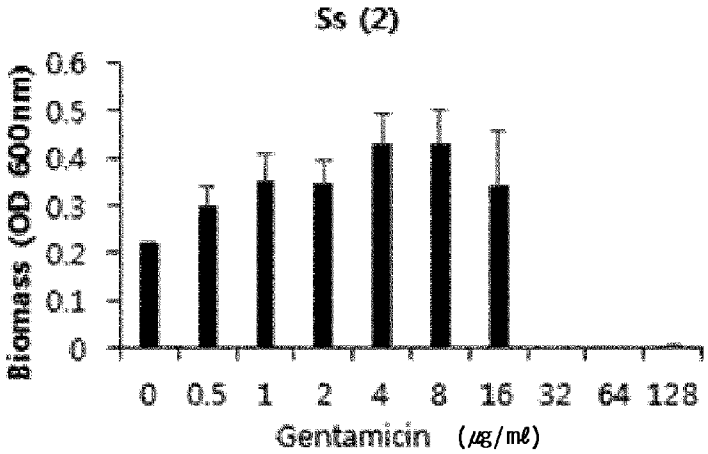
[도4b]


Vd
Biomass (OD 600nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32 64 128
Gentamicin (㎍/㎖)

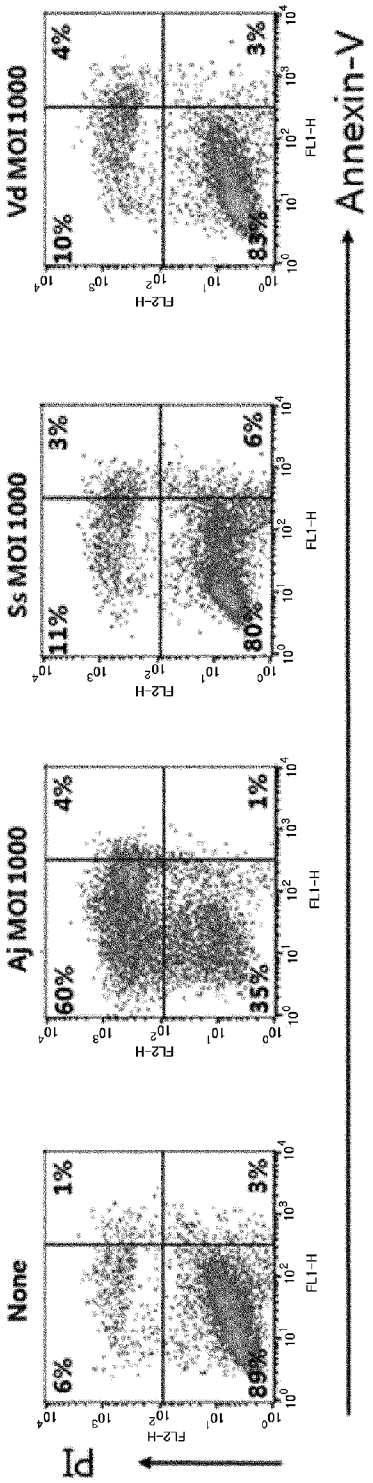
[도4c]


Ss (1)
Biomass (OD 600nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32 64 128
Gentamicin (㎍/㎖)

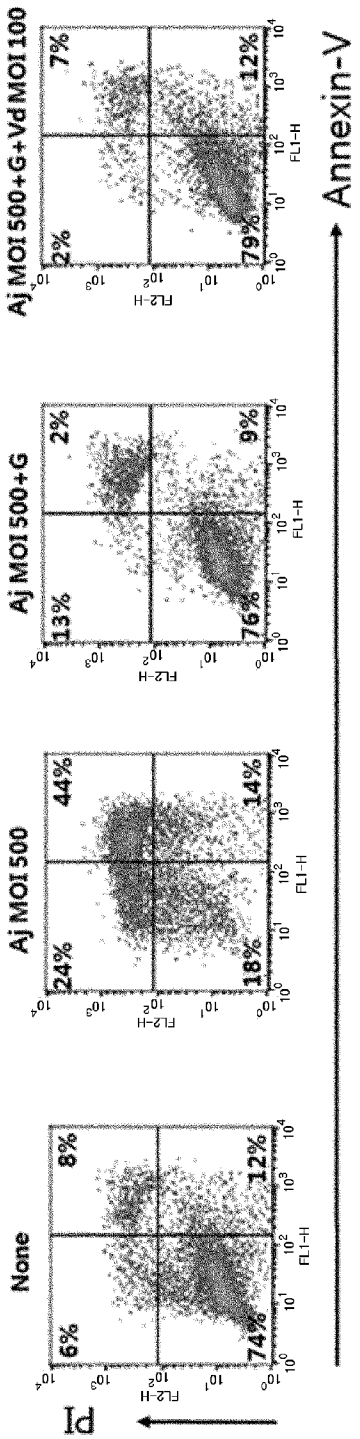
[도4d]


Ss (2)
Biomass (OD 600nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 0.5 1 2 4 8 16 32 64 128
Gentamicin (㎍/㎖)

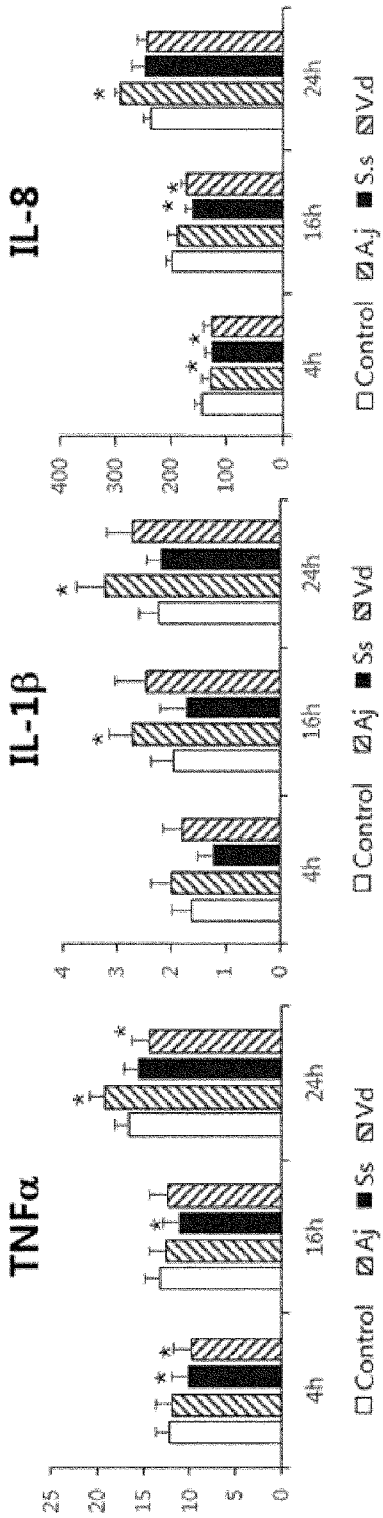
[도5a]


Vd MOI 1000
Ss MOI 1000
Aj MOI 1000
None
4%
3%
10%
83%
3%
6%
11%
80%
4%
1%
60%
35%
1%
3%
6%
89%
FL1-H
FL2-H
Annexin-V
PI

[도5b]


None
Aj MOI 500
Aj MOI 500+G
Aj MOI 500+G+Vd MOI 100
PI
Annexin-V
FL2-H
FL1-H
6%
74%
8%
12%
24%
18%
44%
14%
13%
76%
2%
9%
2%
79%
7%
12%

[도6]


IL-8
400
300
200
100
0
4h
16h
24h
Control
A.j
S.s
V.d
IL-1β
4
3
2
1
0
4h
16h
24h
Control
Aj
Ss
Vd
TNFα
25
20
15
10
5
0
4h
16h
24h
Control
Aj
Ss
Vd

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/012687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/741(2014.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A61K 31/352(2006.01)i, C12Q 1/02(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 35/741; A61K 8/99; A61K 8/73; A61K 8/60; A61P 1/02; A61K 35/744; A61K 31/352; C12Q 1/02

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: aphthous disease, probiotic, streptococcus salivarius, Veillonella dispar, Acinetobacter johnsonii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-000082 A1 (INTEGRA MEDICAL INC.) 08 January 2015 Abstract; pages 6-7; and claims 14-28	1-6
A		7-9
A	SEOUDI, N. et al., "The Oral Mucosal and Salivary Microbial Community of Behet's Syndrome and Recurrent Aphthous Stomatitis", Journal of Oral Microbiology, 01 June 2015, vol. 7, paper no. 27150, inner pages 1-9 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2013-0123861 A (DONG-EUI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 November 2013 See the entire document.	1-9
A	BURTON, J. P. et al., "A Preliminary Study of the Effect of Probiotic Streptococcus Salivarius K12 on Oral Malodour Parameters", Journal of Applied Microbiology, 2006, vol. 100, pages 754-764 See the 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	Date of mailing of the international search report
25 JULY 2016 (25.07.2016)	**25 JULY 2016 (25.07.2016)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/012687

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Conference Presentation Material, "93rd General Session & Exhibition of the IADR; 44th Annual Meeting of the AADR; 39th Annual Meeting of the CADR", 11 March 2015, Poster nos. S4427, S4428 See the entire document. ※ The above document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-9
X	KIM. Y. et al., "Dysbiosis of Oral Microbiota in Recurrent Aphthous Ulcers", Korean Division of the International Association for Dental Research, The 33rd Annual Academic Session, The 31ST General Meeting", 29 November 2014, Poster no. P-89 See the entire document. ※ The above document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/012687

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-000082 A1	08/01/2015	AU 2014-286892 A1	28/01/2016
		CA 2917268 A1	08/01/2015
		CN 105451752 A	30/03/2016
		EP 3016667 A1	11/05/2016
		KR 10-2016-0030956 A	21/03/2016
		US 2016-166501 A1	16/06/2016
KR 10-2013-0123861 A	13/11/2013	KR 10-1450098 B1	14/10/2014

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/012687

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/741(2014.01)i, A61K 35/744(2014.01)i, A61K 31/352(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/741; A61K 8/99; A61K 8/73; A61K 8/60; A61P 1/02; A61K 35/744; A61K 31/352; C12Q 1/02

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: 아프타 구내염, 프로바이오틱, 스트렙토코커스 살리바리우스, 베일로넬라 디스파르, 아시네토박터 존스니

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2015-000082 A1 (INTEGRA MEDICAL INC.) 2015.01.08 요약; 페이지 6-7; 및 청구항 14-28	1-6
A		7-9
A	SEOUDI, N. 등, 'The oral mucosal and salivary microbial community of Behet's syndrome and recurrent aphthous stomatitis' Journal of Oral Microbiology, 2015.06.01, 7권, 논문번호 27150, 내부페이지 1-9 문헌 전체 참조.	1-9
A	KR 10-2013-0123861 A (동의대학교 산학협력단) 2013.11.13 문헌 전체 참조.	1-9
A	BURTON, J. P. 등, 'A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodour parameters' Journal of Applied Microbiology, 2006, 100권, 페이지 754-764 문헌 전체 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

"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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 07월 25일 (25.07.2016)	2016년 07월 25일 (25.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
박정민
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/012687

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	학술대회 발표자료, '93rd General Session & Exhibition of the IADR; 44th Annual Meeting of the AADR; 39th Annual Meeting of the CADR' 2015.03.11, 포스터 번호 S4427, S4428 문헌 전체 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-9
X	KIM. Y. 등, 'Dysbiosis of oral microbiota in recurrent aphthous ulcers' Korean Division of the International Association for Dental Research, The 33rd Annual Academic Session, The 31ST General Meeting' 2014.11.29., 포스터 번호 P-89 문헌 전체 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-9

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/012687

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2015-000082 A1	2015/01/08	AU 2014-286892 A1	2016/01/28
		CA 2917268 A1	2015/01/08
		CN 105451752 A	2016/03/30
		EP 3016667 A1	2016/05/11
		KR 10-2016-0030956 A	2016/03/21
		US 2016-166501 A1	2016/06/16
KR 10-2013-0123861 A	2013/11/13	KR 10-1450098 B1	2014/10/14