

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

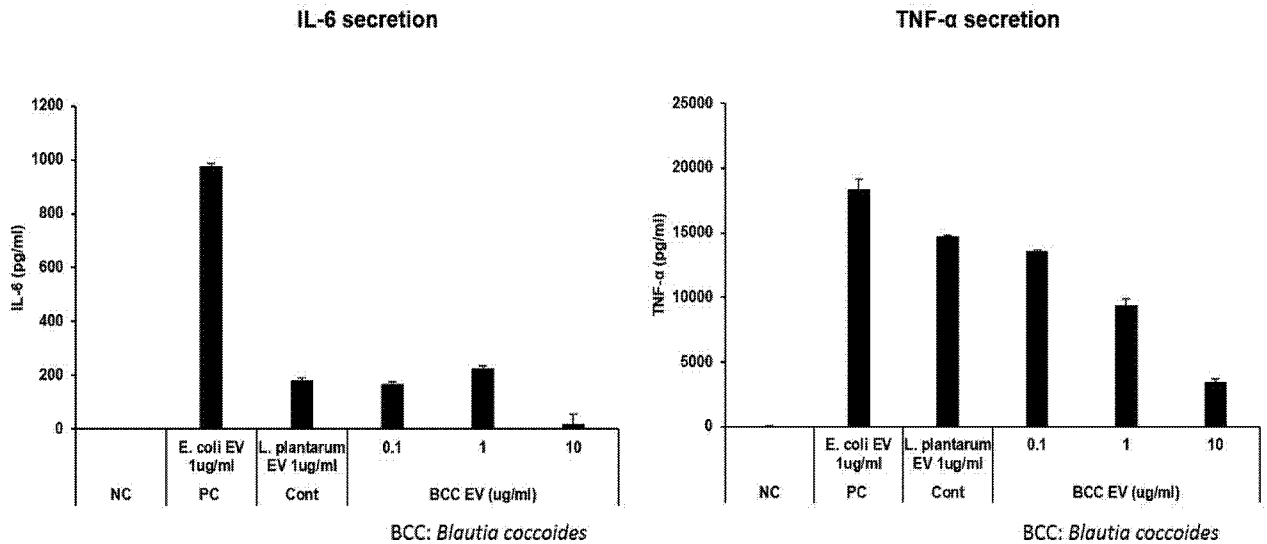
WO 2019/164283 A1

2019년 8월 29일 (29.08.2019) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/689* (2018.01) *A61K 35/74* (2006.01)
C12Q 1/6851 (2018.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61P 37/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/002102
- (22) 국제출원일: 2019년 2월 21일 (21.02.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0023210 2018년 2월 26일 (26.02.2018) KR
10-2019-0019742 2019년 2월 20일 (20.02.2019) KR
- (71) 출원인: 주식회사 엠디헬스케어 (MD HEALTHCARE INC.) [KR/KR]: 03923 서울시 마포구 월드컵북로56길 9, 1303호 (상암동, 우리기술빌딩), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김윤근 (KIM, Yoon-Keun); 10908 경기도 파주시 한빛로 70, 521동 203호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: BLAUTIA SP. BACTERIUM-DERIVED NANOVESICLES AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 블라우티아 속 세균 유래 나노소포 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to *Blautia* sp. bacterium-derived vesicles and a use thereof. The present inventors experimentally found that significantly reduced levels of the vesicles are in clinical samples from patients with colorectal cancer, liver cancer, pancreatic cancer, cholangiocarcinoma, ovarian cancer, bladder cancer, myocardial infarction, atrial fibrillation, and variant angina, compared to normal persons and that administration of vesicles isolated from the strain remarkably repressed the inflammatory mediator secretion induced by pathogenic vesicles such as vesicles derived from *E. coli*. The *Blautia* sp. bacterium-derived vesicles according to the present invention can be effectively used to develop a method for diagnosis of colorectal cancer, liver cancer, pancreatic cancer, cholangiocarcinoma, ovarian cancer, bladder cancer, myocardial infarction, atrial fibrillation, or variant angina and a composition for prevention, alleviation, or treatment of colorectal disease, liver disease, pancreatic disease, cholangiocarcinoma, ovarian cancer, bladder cancer, myocardial infarction, atrial fibrillation, variant angina, or graft-versus-host disease.



WO 2019/164283 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(57) 요약서: 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명자들은 정상인에 비하여 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 및 이형협심증 환자의 임상샘플에서 상기 소포가 유의하게 감소되어 있었고, 상기 균주에서 분리한 소포를 투여하였을 때 대장균 유래 소포와 같은 병원성 소포에 의한 염증매개체 분비를 현저히 억제함을 실험적으로 확인하였는바, 본 발명에 따른 블라우티아 속 세균 유래 소포는 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증의 진단방법, 및 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증, 또는 이식편대숙주병에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 개발하기 위한 목적으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 블라우티아 속 세균 유래 나노소포 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 나노소포 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 블라우티아 속 세균에서 유래하는 나노소포를 이용한 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증 등의 진단방법, 및 상기 소포를 포함하는 상기 질병 등의 예방 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 21세기에 들어서면서 과거 전염병으로 인식되던 급성 감염성질환의 중요성이 덜해지는 반면, 인간과 마이크로바이옴과의 부조화에 의해 발생하는 면역기능 이상을 동반한 만성질환이 삶의 질과 인간 수명을 결정하는 주요 질환으로 질병패턴이 바뀌었다. 21세기 난치성 만성질환으로서, 암, 심혈관질환, 만성폐질환, 대사질환, 및 신경-정신질환이 인간 수명과 삶의 질을 결정하는 주요 질환으로서 국민보건에 큰 문제가 되고 있으며 상기 난치성 만성질환은 원인인자에 의한 면역기능 이상을 동반한 만성염증을 특징으로 한다.
- [3] 한편, 인체에 공생하는 미생물은 100조에 이르러 인간 세포보다 10배 많으며, 미생물의 유전자수는 인간 유전자수의 100배가 넘는 것으로 알려지고 있다. 미생물총(microbiota 혹은 microbiome)은 주어진 거주지에 존재하는 진정세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)을 포함한 미생물 군집(microbial community)을 말한다. 우리 몸에 공생하는 세균 및 주변 환경에 존재하는 세균은 다른 세포로의 유전자, 저분자화합물, 단백질 등의 정보를 교환하기 위하여 나노미터 크기의 소포(vesicle)를 분비한다. 점막은 200 나노미터(nm) 크기 이상의 입자는 통과할 수 없는 물리적인 방어막을 형성하여 점막에 공생하는 세균인 경우에는 점막을 통과하지 못하지만, 세균 유래 소포는 크기가 100 나노미터 크기 이하라서 비교적 자유롭게 점막을 통하여 상피세포를 통과하여 우리 몸에 흡수된다. 국소적으로 분비된 세균 유래 소포는 점막의 상피세포를 통해 흡수되어 국소 염증반응을 유도할 뿐만 아니라, 상피세포를 통과한 소포는 림프관을 통해 전신적으로 흡수되어 각 장기로 분포하고, 분포된 장기에서 면역 및 염증반응을 조절한다. 예를 들어, 대장균(*Eshcherichia coli*)와 같은 병원성 그람음성세균에서 유래하는 소포는 국소적으로 대장염을 일으키고, 혈관으로 흡수된 경우에 혈관 내피세포 염증반응을 통해 전신적인 염증반응 및 혈액응고를 촉진시키고, 또한 인슐린이 작용하는 근육세포 등에 흡수되어선 인슐린저항성과 당뇨병을 유발한다. 반면, 유익한 세균에서 유래하는 소포는 병원성 소포에 의한 면역기능 및 대사기능 이상을 조절하여 질병을 조절할 수 있다.

[4] 세균에서 유래하는 소포 등의 인자에 대한 면역반응은 인터루킨(Interleukin, 이하 IL)-17 사이토카인 분비를 특징으로 하는 Th17 면역반응이 발생하는데, 이는 세균 유래 소포에 노출 시 IL-6가 분비되고, 이는 Th17 면역반응을 유도한다. Th17 면역반응에 의한 염증은 호중구 침윤을 특징으로 하고, 염증이 발생하는 과정에서 대식세포 등과 같은 염증세포에서 분비되는 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha, 이하 TNF- α)가 중요한 역할을 담당한다.

[5] 블라우티아 속 세균은 장에서 발견되는 혐기성 그람양성세균으로서 골수이식 후 장에 상기 세균이 증가한 경우에 이식편대숙주병(Graft versus Host disease)에 의한 사망률이 줄어든다고 보고되었다. 그러나 아직까지 블라우티아 속 세균이 세포밖으로 소포를 분비한다는 사실이 보고되지 않았고, 특히 암 또는 심혈관질환 등과 같은 난치성 질환의 진단 및 치료에 응용한 사례는 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 메타게놈 분석을 통해 정상인에 비하여 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 및 이형협심증 환자 유래 샘플에서 블라우티아 속 세균 유래 소포의 함량이 유의하게 감소되어 있음 확인하였다. 또한, 블라우티아 속 세균에 속하는 블라우티아 코코이데스(*B. coccoides*) 균에서 소포를 분리하여 대식세포에 처리하였을 때, 병원성 소포에 의한 IL-6 및 TNF- α 의 분비를 현저히 억제함을 확인한 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[7] 이에, 본 발명은 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[8] 또한, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증, 또는 이식편대숙주병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[11] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포밖 소포로부터 DNA를 추출하는

단계;

- [12] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
- [13] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 블라우티아 속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 낮을 경우 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증으로 분류하는 단계.
- [14] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증의 진단 방법을 제공한다:
- [15] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [16] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
- [17] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 블라우티아 속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 낮을 경우 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증으로 판정하는 단계.
- [18] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (a) 단계에서의 샘플은 혈액 또는 대변 일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (b) 단계에서의 프라이머쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포의, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구현예로, 상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 소포는 블라우티아 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분비되는 것일 수 있다.

- [26] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 블라우티아 속 세균 유래 소포는 블라우티아 코코이테스 유래 소포일 수 있다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 대장질환은 대장염, 과민성장증후군 또는 대장암 일 수 있다.
- [28] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 간질환은 간염, 간경변 또는 간암 일 수 있다.
- [29] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 췌장질환은 췌장염 또는 췌장암 일 수 있다.

발명의 효과

- [30] 본 발명자들은 장내 세균인 경우에는 체내에 흡수되지 않지만, 세균 유래 소포인 경우에는 상피세포를 통해 체내에 흡수되어, 전신적으로 분포하고, 신장, 간, 폐를 통해 체외로 배설됨을 확인하였고, 환자 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 통해 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 및 이형협심증 환자의 혈액 또는 대변에 존재하는 블라우티아 속 세균 유래 소포가 정상인에 비하여 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다. 또한, 블라우티아 속 세균의 한 종인 블라우티아 코코이테스를 체외에서 배양하여 소포를 분리하여, 염증세포에 투여하였을 때, 병원성 소포에 의한 염증매개체 분비를 유의하게 억제함을 관찰하였는 바, 본 발명에 따른 블라우티아 속 세균 유래 소포는 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증에 대한 진단방법, 및 상기 질환 등에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1a는 마우스에 세균과 세균 유래 소포 (EV)를 구강으로 투여한 후, 시간별로 세균과 소포의 분포양상을 촬영한 사진이고, 도 1b는 구강으로 투여한 후 12시간째에, 혈액, 신장, 간, 및 여러 장기를 적출하여, 세균과 소포의 체내 분포양상을 평가한 결과이다.
- [32] 도 2는 대장암 환자 및 정상인 대변에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [33] 도 3은 간암 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [34] 도 4는 췌장암 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [35] 도 5는 담관암 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [36] 도 6은 난소암 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [37] 도 7은 방광암 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [38] 도 8은 심근경색환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈

- 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 세포의 분포를 비교한 결과이다.
- [39] 도 9는 심방세동 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 세포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 세포의 분포를 비교한 결과이다.
- [40] 도 10은 이형협심증 환자 및 정상인 혈액에 존재하는 세균 유래 세포 메타게놈 분석을 실시한 후, 블라우티아 속 세균 유래 세포의 분포를 비교한 결과이다.
- [41] 도 11은 블라우티아 코코이데스 유래 세포의 염증유발 효과를 평가하기 위하여, 블라우티아 코코이데스 유래 세포를 대식세포(Raw264.7 cell)에 처리하여 염증매개체인 IL-6 및 TNF- α 분비 정도를 병원성 세포인 대장균 세포 (*E. coli* EV)와 비교한 결과이다.
- [42] 도 12는 블라우티아 코코이데스 유래 세포의 항염증 및 면역조절 효과를 평가하기 위하여, 병원성 세포인 대장균 세포 (*E. coli* EV) 처리 전에 블라우티아 유래 세포를 전처리하여, 대장균 세포에 의한 염증매개체인 IL-6 및 TNF- α 분비에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 세포 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [44] 본 발명자들은 메타게놈 분석을 통해 블라우티아 속 세균 유래 세포가 정상인에 비하여 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 및 이형협심증 환자의 임상 샘플에 유의하게 감소되어 있음을 확인하여 상기 질병을 진단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 블라우티아 속 세균에 속하는 블라우티아 코코이데스로부터 세포를 분리하고 특성을 분석한 결과, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병 등의 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 이용할 수 있음을 확인하였다.
- [45] 이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [46] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 세포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [47] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
- [48] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 블라우티아 속 세균 유래 세포막 세포의 함량이 낮을 경우 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증으로 분류하는 단계.
- [49] 본 발명에서 사용되는 용어, “진단”이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 합병증의 유무, 및 예후 등이다. 본 발명에서 진단은

대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 및/또는 이형협심증 등의 발병 여부 및 질환의 수준 등을 판단하는 것이다.

- [50] 본 발명에서 사용되는 용어, “나노소포(Nanovesicle)” 혹은 “소포(Vesicle)”란, 다양한 세균에서 분비되는 나노크기의 막으로 된 구조물을 의미한다. 그람음성균(gram-negative bacteria) 유래 소포, 또는 외막 소포체(outer membrane vesicles, OMVs)는 내독소(lipopolysaccharide) 뿐만 아니라 독성 단백질 및 세균 DNA와 RNA도 가지고 있고, 그람양성균(gram-positive bacteria) 유래 소포는 단백질과 핵산 외에도 세균의 세포벽 구성성분인 펩티도글리칸(peptidoglycan)과 리포테이코산(lipoteichoic acid)도 가지고 있다. 본 발명에 있어서, 나노소포 혹은 소포는 블라우티아 속 세균에서 자연적으로 분비되거나 또는 인공적으로 생산하는 것으로, 구형의 형태이며, 10 내지 200 nm의 평균 직경을 가지고 있다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 용어, “메타게놈”이란 “균유전체”라고도 하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈, 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다.
- [52] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 혈액 또는 대변일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 블라우티아 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 또는 이식편대숙주병의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 식품 조성물 및 약학적 조성물을 포함하며, 본 발명에서 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다. 본 발명의 조성물은 주사제, 구강분무제, 또는 흡입제 제형일 수 있다.
- [54] 본 발명에서 상기 대장질환은 대장염, 과민성장증후군 또는 대장암 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 본 발명에서 상기 간질환은 간염, 간경변 또는 간암 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 본 발명에서 상기 췌장질환은 췌장염 또는 췌장암 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 본 발명에서 사용되는 용어, “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동,

이형협심증, 및/또는 이식편대숙주병 등을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

- [58] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 및/또는 이식편대숙주병 등에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [59] 본 발명에서 사용되는 용어, “개선”이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [60] 상기 소포는 블라우티아 속 세균을 포함하는 배양액을 원심분리, 초고속 원심분리, 고압처리, 압출, 초음파분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기천공, 기계적 분해, 화학물질 처리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 및 모세관 전기영동으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 사용하여 분리할 수 있다. 또한, 불순물의 제거를 위한 세척, 수득된 소포의 농축 등의 과정을 추가로 포함할 수 있다.
- [61] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 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 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분마다 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제, 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.
- [62] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도)에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [63] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 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. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수

있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [64] 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [65] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 유효성분을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [66] 본 발명의 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [67] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [68] 본 발명의 일 실시예에서는 세균 및 세균 유래 소포를 마우스 경구로 투여하여 세균 및 소포의 체내 흡수, 분포, 및 배설 양상을 평가하여, 세균인 경우에는 장점막을 통해 흡수되지 않는데 비해 소포는 투여 5분 이내에 흡수되어 전신적으로 분포하고, 신장, 간 등을 통해 배설됨을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [69] 본 발명의 일 실시예에서는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암,

심근경색, 심방세동, 및 이형협심증 환자에 연령과 성별을 매칭한 정상인의 혈액 또는 대변에서 분리한 소포를 이용하여 세균 메타게놈 분석을 실시하였다. 그 결과, 정상인 샘플에 비하여, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 및 이형협심증 환자의 임상샘플에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(실시예 3 내지 11 참조).

[70] 본 발명의 다른 실시예에서는, 블라우티아 코코이데스 균주를 배양하여 이로부터 분리된 소포가 면역조절 및 항염증 효과를 나타내는지를 평가하였는데, 다양한 농도의 블라우티아 코코이데스 유래 소포를 대식세포에 처리한 후, 염증질환 원인인자인 대장균 유래 소포를 처리하여 염증매개체 분비를 평가한 결과, 대장균 유래 소포에 의한 IL-6 및 TNF- α 분비를 블라우티아 코코이데스 유래 소포가 효율적으로 억제함을 확인하였다(실시예 13 참조).

[71] 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.

발명의 실시를 위한 형태

[72] [실시예]

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

[74] 장내 세균과 세균 유래 소포가 위장관을 통해 전신적으로 흡수되는지를 평가하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 마우스의 위장에 형광으로 표지한 장내세균과 장내 세균 유래 소포를 각각 50 μ g의 용량으로 위장관으로 투여하고 0분, 5분, 3시간, 6시간, 12시간 후에 형광을 측정하였다. 마우스 전체 이미지를 관찰한 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 세균인 경우에는 전신적으로 흡수되지 않았지만, 세균 유래 소포인 경우에는, 투여 후 5분에 전신적으로 흡수되었고, 투여 3시간 후에는 방광에 형광이 진하게 관찰되어, 소포가 비뇨기계로 배설됨을 알 수 있었다. 또한, 소포는 투여 12시간까지 체내에 존재함을 알 수 있었다.

[75] 또한, 장내세균과 장내 세균 유래 소포가 전신적으로 흡수된 후, 여러 장기로 침윤된 양상을 평가하기 위하여, 형광으로 표지한 50 μ g의 세균과 세균 유래 소포를 상기의 방법과 같이 투여한 후, 투여 12시간 후에 혈액, 심장, 폐, 간, 신장, 비장, 지방, 근육을 채취하였다. 채취한 조직에서 형광을 관찰한 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이, 세균 유래 소포가 혈액, 심장, 폐, 간, 비장, 지방, 근육, 신장에 분포하였으나, 세균은 흡수되지 않음을 알 수 있었다.

[76]

[77] 실시예 2. 임상샘플에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[78] 혈액, 대변 등의 임상샘플을 먼저 10 ml 튜브에 넣고 원심분리법(3,500 x g, 10min, 4°C)으로 부유물을 가라앉히고 상등액만을 새로운 10 ml 튜브에 옮겼다. 0.22 μ m 필터를 사용하여 세균 및 이물질을 제거한 후, 센트리프럽튜브 (centrifugal

filters 50 kD)에 옮겨서 1500 x g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 50 kD 보다 작은 물질은 버리며 10 ml 까지 농축 시켰으며 다시 한 번 0.22 μ m 필터(filter)를 사용하여 박테리아 및 이물질을 제거한 후, Type 90ti 로터로 150,000 x g, 4°C에서 3시간동안 초고속원심분리방법을 사용하여 상등액을 버리고 덩어리진 펠렛(pellet)을 생리식염수(PBS)로 녹였다.

[79] 상기 방법으로 분리한 세포 100 μ l를 100°C에서 끓여서 내부의 DNA를 지질 밖으로 나오게 하고 그 후 열음에 5분 동안 식혔다. 그리고 남은 부유물을 제거하기 위하여 10,000 x g, 4°C에서 30분간 원심분리하고 상등액만을 모은 다음 Nanodrop을 이용하여 DNA 양을 정량하였다. 이후, 상기 추출된 DNA에 세균 유래 DNA가 존재하는지 확인하기 위하여 하기 표 1에 나타난 16s rDNA 프라이머(primer)로 PCR을 수행하여 상기 추출된 유전자에 세균 유래 유전자가 존재하는 것을 확인하였다.

[80] [표1]

primer		서열	서열번호
16S rDNA	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA AGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAAT CC-3	2

[81] 상기 방법으로 추출한 DNA를 상기의 16S rDNA 프라이머를 사용하여 증폭을 한 다음 시퀀싱을 수행하고 (Illumina MiSeq sequencer), 결과를 Standard Flowgram Format (SFF) 파일로 출력하고 GS FLX software (v2.9)를 이용하여 SFF 파일을 sequence 파일 (.fasta)과 nucleotide qualityscore파일로 변환한 다음 리드의 신용도 평가를 확인하고, window (20 bps) 평균 base call accuracy가 99% 미만 (Phred score <20)인 부분을 제거하였다. Operational Taxonomy Unit (OTU) 분석을 위해서는 UCLUST와 USEARCH를 이용하여 시퀀스 유사도에 따라 클러스터링을 수행하고, 속(genus)은 94%, 과(family)는 90%, 목(order)은 85%, 강(class)은 80%, 문(phylum)은 75% 시퀀스 유사도를 기준으로 클러스터링을 하고 각 OTU의 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 속(genus) 레벨의 분류를 수행하고, BLASTN와 GreenGenes의 16S RNA 시퀀스 데이터베이스 (108,453 시퀀스)를 이용하여 속 수준에서 97% 이상의 시퀀스 유사도 갖는 세균을 프로파일링 하였다 (QIIME).

[82]

[83] 실시예 3. 대장암환자의 대변 내 세균 유래 세포 메타게놈 분석

[84] 실시예 2의 방법으로 대장암환자 29명의 대변과, 정상인 358명의 대변을 대상으로, 대변 내에 존재하는 세포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을

수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 대변에 비하여 대장암환자의 대변에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 2 및 도 2 참조).

[85] [표2]

대변	대조군		대장암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0037	0.0100	0.0017	0.0017	0.0009	0.45

[86]

[87] **실시예 4. 간암환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[88] 실시예 2의 방법으로 간암환자 86명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 331명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 간암 환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 3 및 도 3 참조).

[89] [표3]

혈액	대조군		간암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0095	0.0134	0.0043	0.0043	<0.0001	0.45

[90]

[91] **실시예 5. 췌장암환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[92] 실시예 2의 방법으로 췌장암환자 176명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 271명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 췌장암환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 4 및 도 4 참조).

[93] [표4]

혈액	대조군		췌장암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0086	0.0164	0.0045	0.0071	0.0003	0.52

[94]

[95] **실시예 6. 담관암환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[96] 실시예 2의 방법으로 담관암환자 79명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 259명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를

평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 담관암환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 5 및 도 5 참조).

[97] [표5]

혈액	대조군		담관암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0088	0.0169	0.0019	0.0047	<0.0001	0.22

[98]

[99] **실시예 7. 난소암환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[100] 실시예 2의 방법으로 난소암환자 137명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 139명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 난소암환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 6 및 도 6 참조).

[101] [표6]

혈액	대조군		난소암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0084	0.0096	0.0025	0.0034	<0.0001	0.30

[102]

[103] **실시예 8. 방광암환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[104] 실시예 2의 방법으로 방광암환자 91명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 176명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 방광암환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 7 및 도 7 참조).

[105] [표7]

혈액	대조군		방광암		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0129	0.0209	0.0005	0.0005	<0.0001	0.04

[106]

[107] **실시예 9. 심근경색환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[108] 실시예 2의 방법으로 심근경색 환자 57명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 163명의 혈액의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 심근경색환자의 혈액에

블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 8 및 도 8 참조).

[109] [표8]

혈액	대조군		심근경색		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0061	0.0085	0.0012	0.0053	<0.0001	0.19

[110]

[111] **실시예 10. 심방세동환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[112] 실시예 2의 방법으로 심방세동 환자 34명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 62명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 심방세동환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 9 및 도 9 참조).

[113] [표9]

혈액	대조군		심방세동		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0139	0.0259	0.0020	0.0028	0.0006	0.14

[114]

[115] **실시예 11. 이형협심증환자 혈액 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[116] 실시예 2의 방법으로 이형협심증 환자 80명의 혈액과, 나이와 성별을 매칭한 정상인 80명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 블라우티아 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 이형협심증환자의 혈액에 블라우티아 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다 (표 10 및 도 10 참조).

[117] [표10]

혈액	대조군		이형협심증		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	Ratio
g__Blautia	0.0078	0.0117	0.0041	0.0049	0.01	0.53

[118]

[119] **실시예 12. 블라우티아 코코이데스 유래 소포의 염증유발 효과**

[120] 염증세포에서 블라우티아 코코이데스 유래 소포의 염증매개체(IL-6, TNF- α) 분비에 대한 영향을 알아보기 위해, 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 블라우티아 코코이데스 유래 소포를 다양한 농도(0.1, 1, 10 μ g/ml)로 처리한 후,

ELISA를 진행하였다. 보다 구체적으로, 48-well 세포 배양 플레이트 안에 4×10^4 개씩 분주한 Raw 264.7 세포에 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 무혈청 배지를 넣은 다양한 농도의 블라우티아 코코이테스 유래 세포를 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포 배양액을 1.5 ml 튜브에 모아 3000 g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 모아 -80°C 에 보관해두었다가 ELISA를 진행하였다.

- [121] ELISA를 수행하기 위해, 캡처(Capture) 항체를 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 희석시켜 96 well 폴리스틸렌(polystyrene) 플레이트에 작용 농도에 맞게 50 μl 씩 분주한 후 4°C 에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 PBST(0.05 % tween-20이 들어있는 인산완충생리식염수) 용액 100 μl 로 세 번씩 씻어준 후, RD(1 % BSA(bovine serum albumin)가 들어있는 인산완충생리식염수) 용액 100 μl 을 분주하여 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking) 하였다. 샘플 및 스텐다드(standard)를 농도에 맞게 50 μl 씩 분주하고 상온에서 2시간 동안 반응시키고 PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, 검출(detection) 항체를 RD에 희석시켜 작용 농도에 맞게 50 μl 씩 분주하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다.
- [122] 그 다음, PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, Strpetavidin-HRP (R&D system, USA)를 RD에 1/40으로 희석시켜 50 μl 씩 분주하여 상온에서 20분간 반응시켰으며, 마지막으로 PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, TMB 기질 (SurModics, USA) 50 μl 를 분주하고 5분에서 20분 후 발색이 진행되었을 때, 1 M 황산용액을 50 μl 씩 분주해 반응을 멈추고 SpectraMax M3 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [123] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 블라우티아 코코이테스 유래 세포를 대식세포주에 처리하였을 때, 염증매개체 분비는 병원성 세포인 대장균 유래 세포 (E. coli EV) 보다 현저히 낮음을 확인하였다.

[124]

[125] 실시예 13. 블라우티아 코코이테스 유래 세포의 항염증 효과

- [126] 상기 실시예 12의 결과를 바탕으로, 블라우티아 코코이테스 유래 세포의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 다양한 농도(0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 블라우티아 코코이테스 유래 세포를 대식세포주(Raw 264.7)에 12시간 전처리한 후, 병원성 세포인 대장균 유래 세포(E. coli EV) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하고 12시간 뒤 염증성 사이토카인의 분비를 ELISA로 측정하였으며 유용미생물 대조군으로는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래 세포를 사용하였다.

- [127] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 블라우티아 코코이테스 유래 세포를 전처리한 경우 대장균 유래 세포에 의한 IL-6 및 TNF- α 의 분비가 현저히 억제됨을 확인하였으며 특히, 블라우티아 코코이테스 유래 세포의 전처리에 의한 TNF- α 의 분비 억제효과가 유용미생물 대조군인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 유래 세포의 전처리에 의한 TNF- α 의 분비 억제효과보다 현저하게 큼을 확인하였다. 상기 결과는 대장균 유래 세포와 같은 병원성 세포에

의해 유도되는 염증반응을 블라우티아 유래 소포가 효율적으로 억제할 수 있음을 의미한다.

[128]

[129] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[130] 본 발명에 따른 블라우티아 속 세균 유래 세포막 소포는 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증의 진단방법뿐만 아니라 상기 질환 등에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있으므로 관련 의료 및 식품 산업 분야에서 유용하게 활용 가능할 것으로 기대된다.

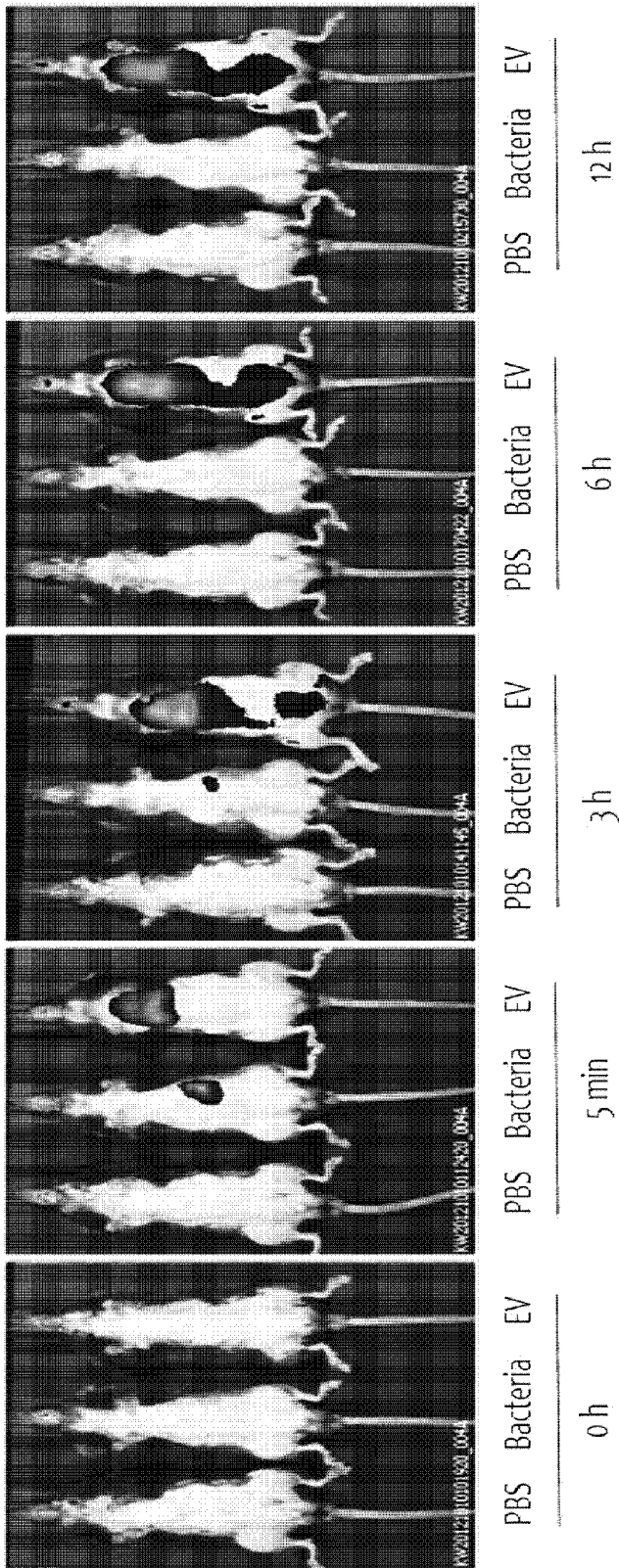
청구범위

- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증의 진단을 위한 정보제공 방법:
 (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
 (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
 (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 낮을 경우 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증으로 분류하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 (a) 단계에서의 샘플은 혈액 또는 대변인 것을 특징으로 하는, 정보제공 방법.
- [청구항 3] 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 및 이식편대숙주병으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
 상기 소포는 블라우티아 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분비되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
 상기 블라우티아 속 세균 유래 소포는 블라우티아 코코이데스(*Blautia coccoides*) 유래 소포인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제3항에 있어서,
 상기 대장질환은 대장염, 과민성장증후군, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제3항에 있어서,
 상기 간질환은 간염, 간경변, 또는 간암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제3항에 있어서,
 상기 췌장질환은 췌장염 또는 췌장암인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

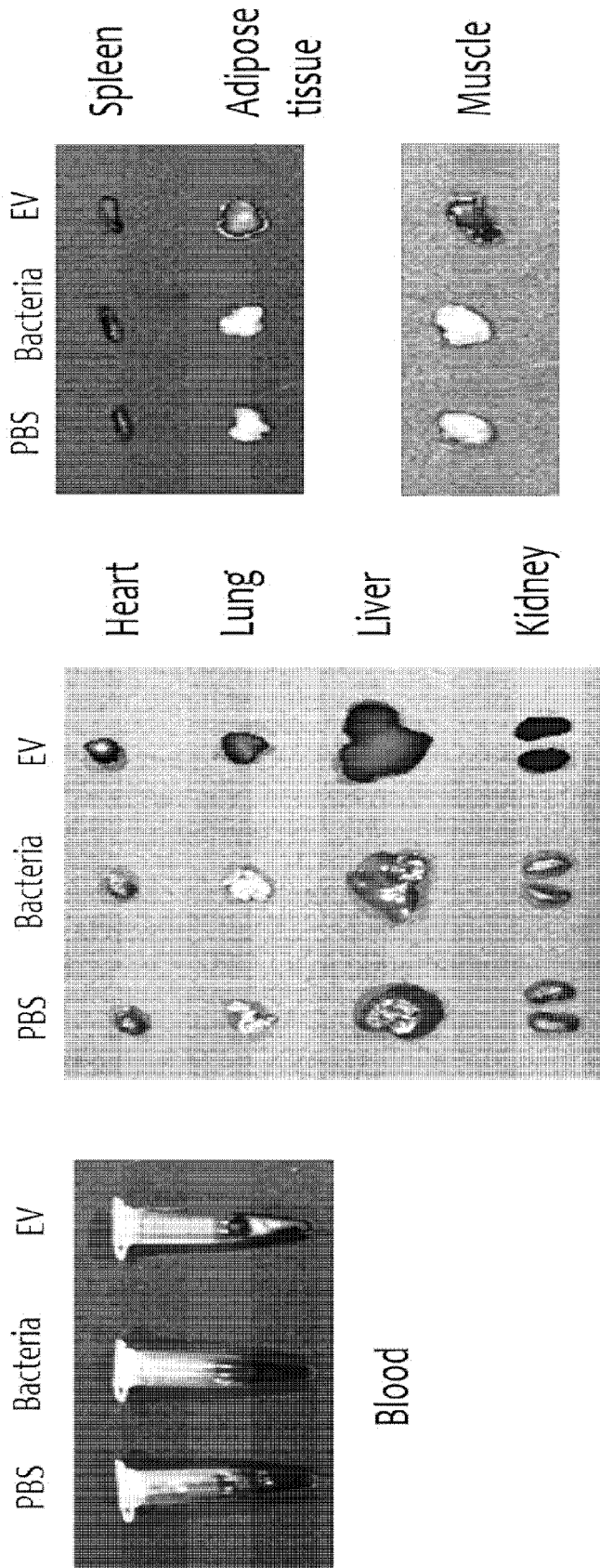
- [청구항 10] 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 및 이식편대숙주병으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 소포는 블라우티아 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분비되는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 블라우티아 속 세균 유래 소포는 블라우티아 코코이데스(*Blautia coccooides*) 유래 소포인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 대장질환은 대장염, 과민성장증후군, 또는 대장암인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 15] 제10항에 있어서, 상기 간질환은 간염, 간경변, 또는 간암인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 16] 제10항에 있어서, 상기 췌장질환은 췌장염 또는 췌장암인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 17] 하기의 단계를 포함하는, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동 또는 이형협심증의 진단방법:
 (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
 (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
 (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 낮을 경우 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 또는 이형협심증으로 판정하는 단계.
- [청구항 18] 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장질환, 간질환, 췌장질환, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 및 이식편대숙주병으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질병의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 19] 블라우티아(*Blautia*) 속 세균 유래 소포의, 대장질환, 간질환, 췌장질환,

담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증 및 이식편대숙주병으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질병의 예방 또는 치료용도.

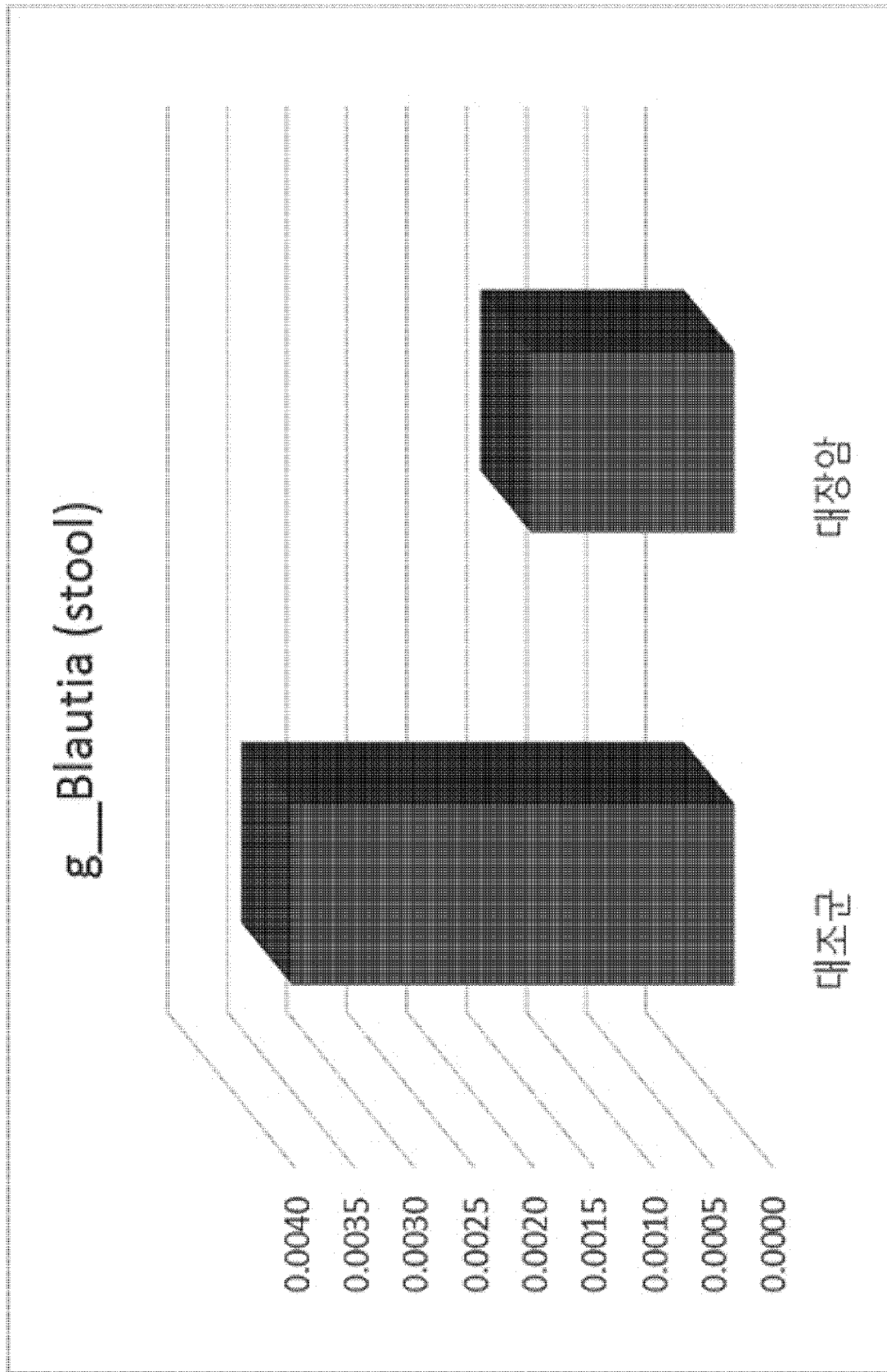
[도 1a]



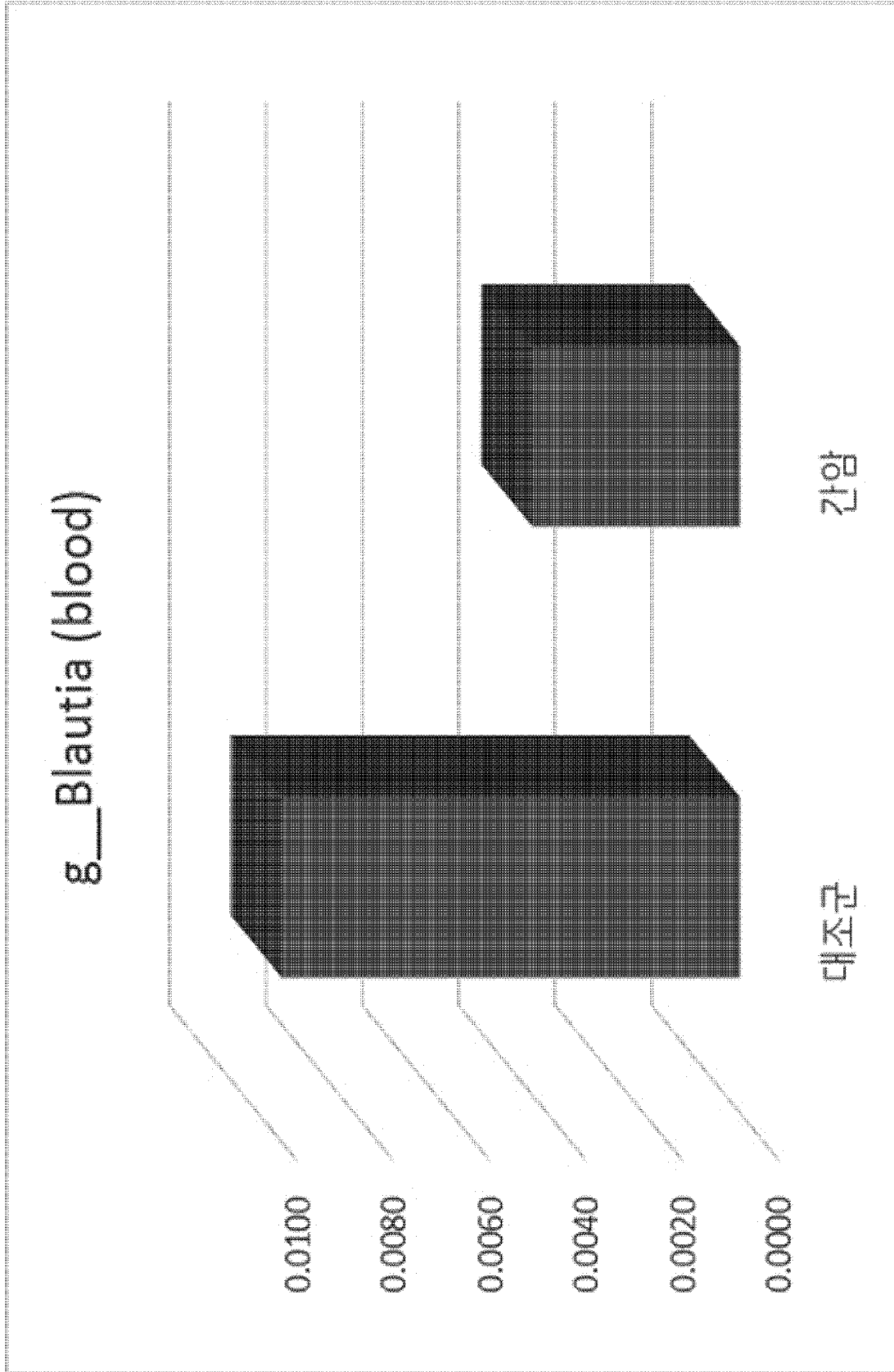
[Fig 1b]



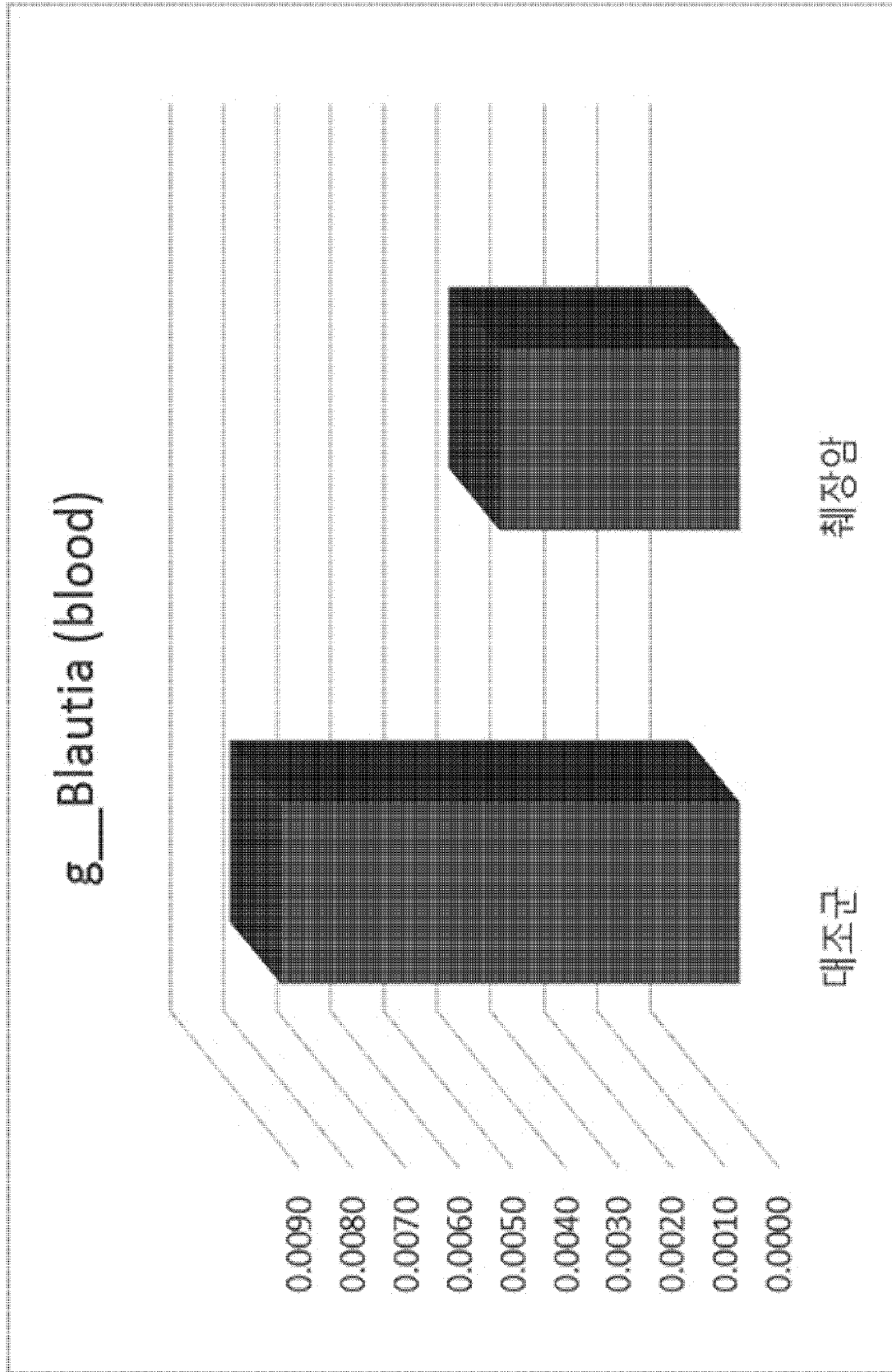
[도2]



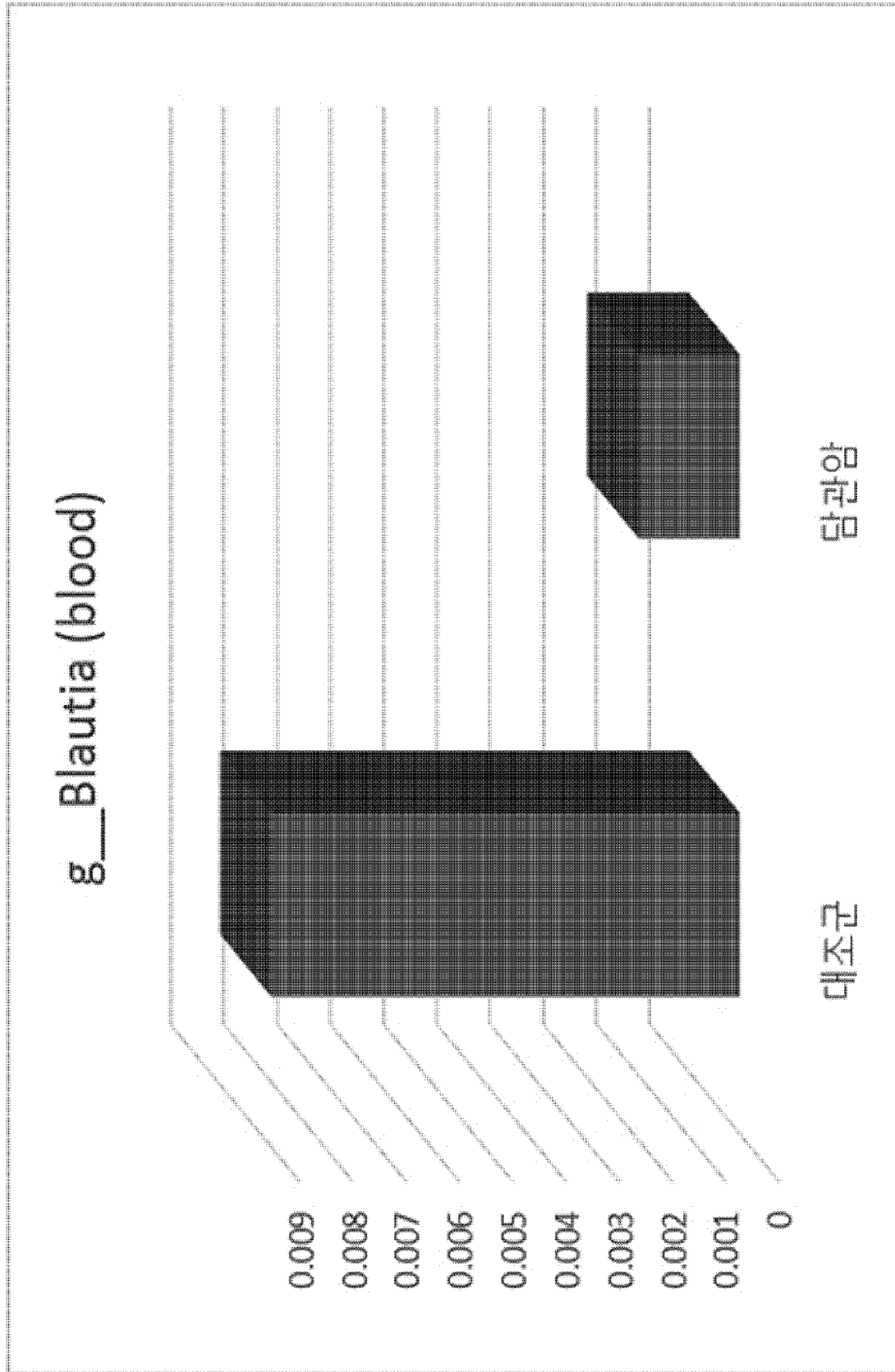
[도3]



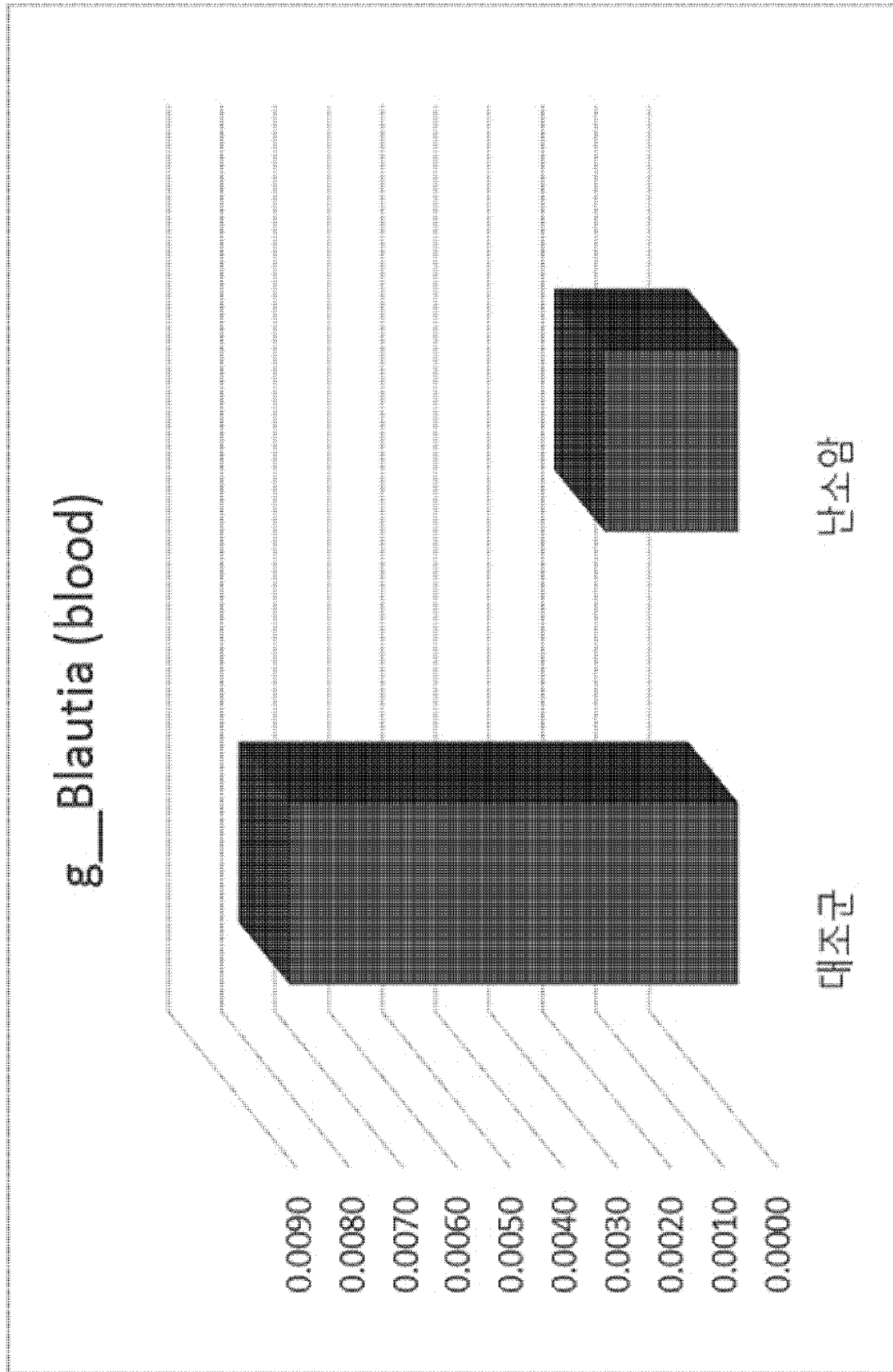
[도4]



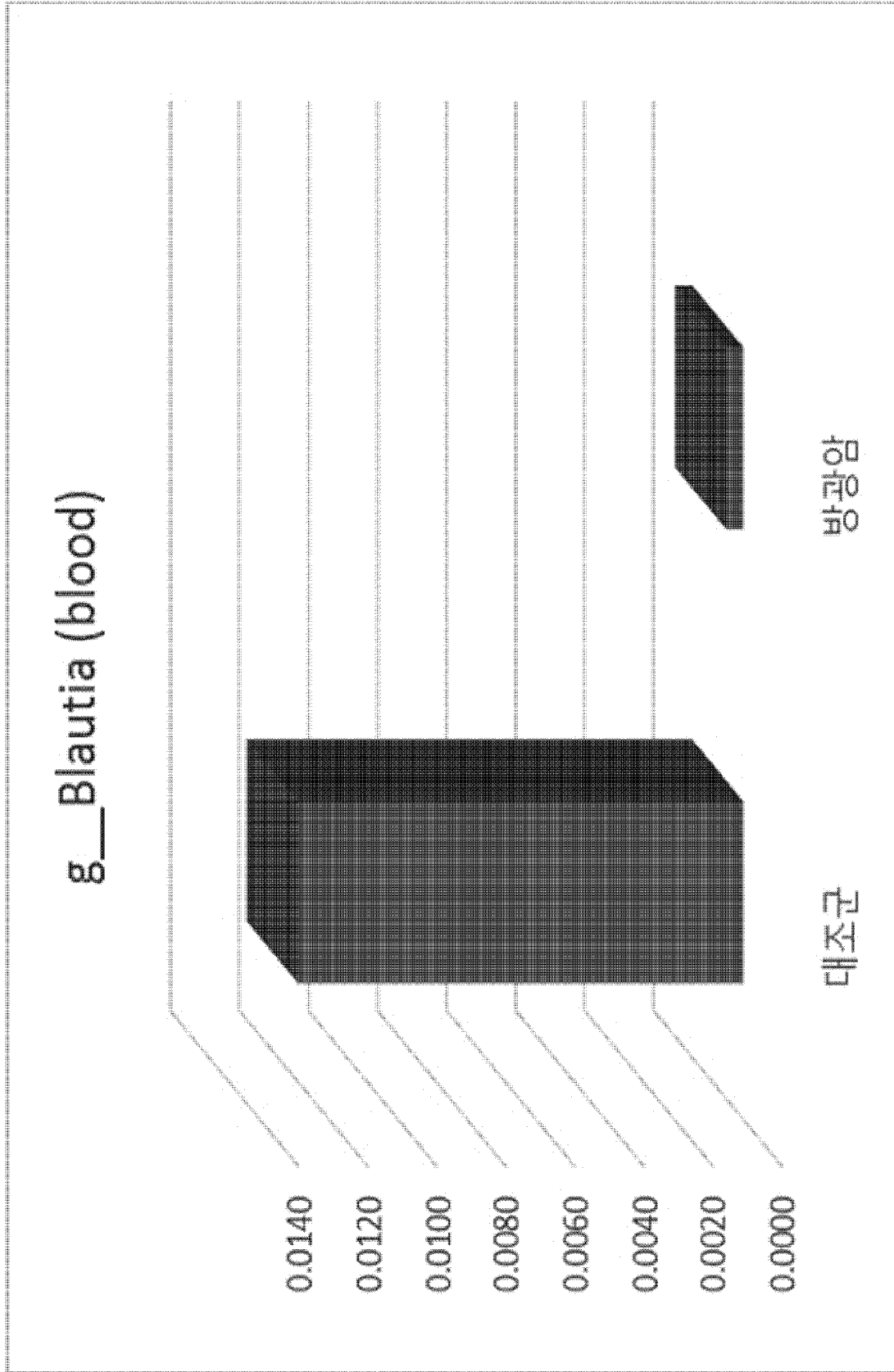
[도5]



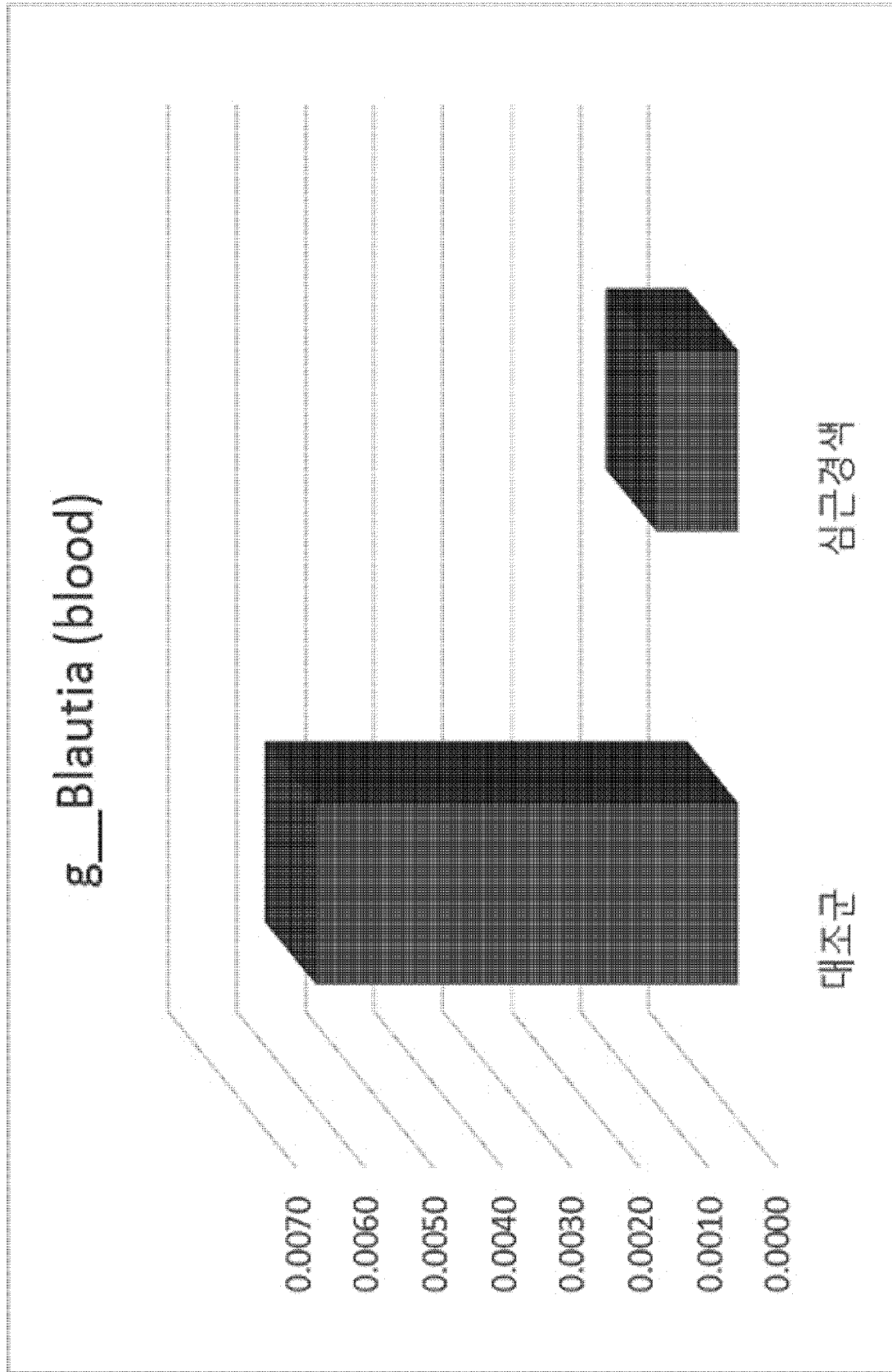
[도6]



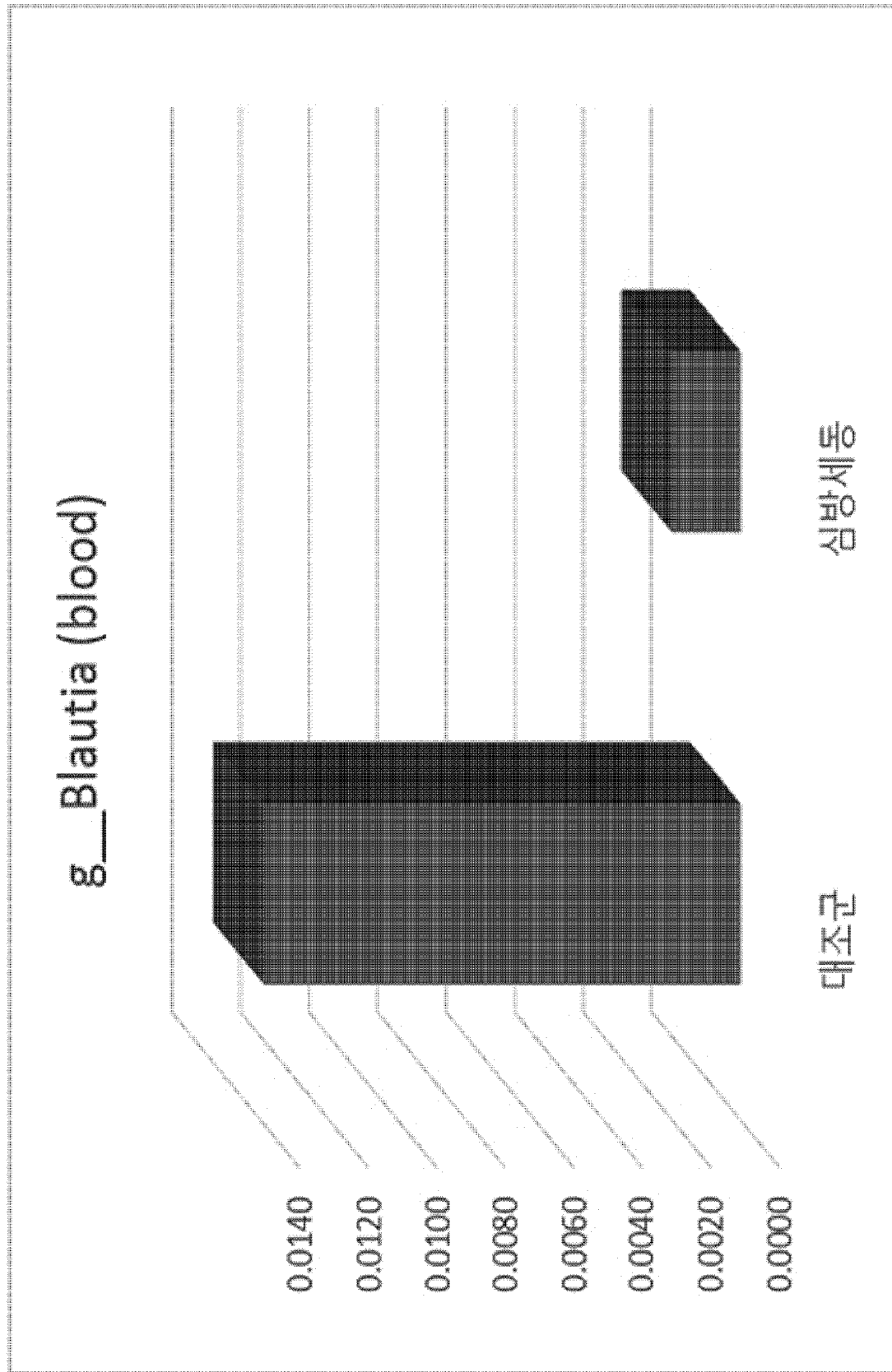
[도7]



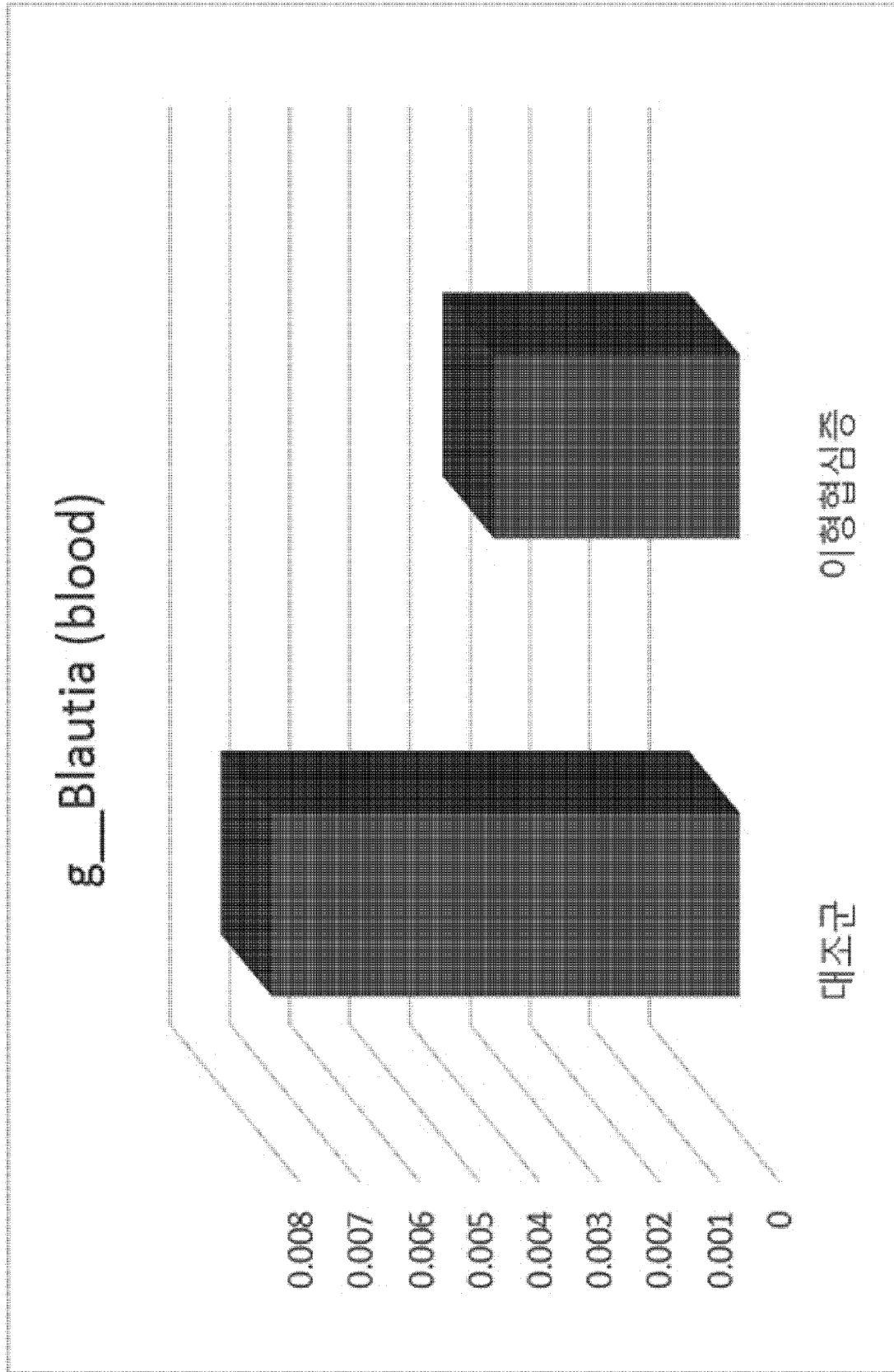
[도8]



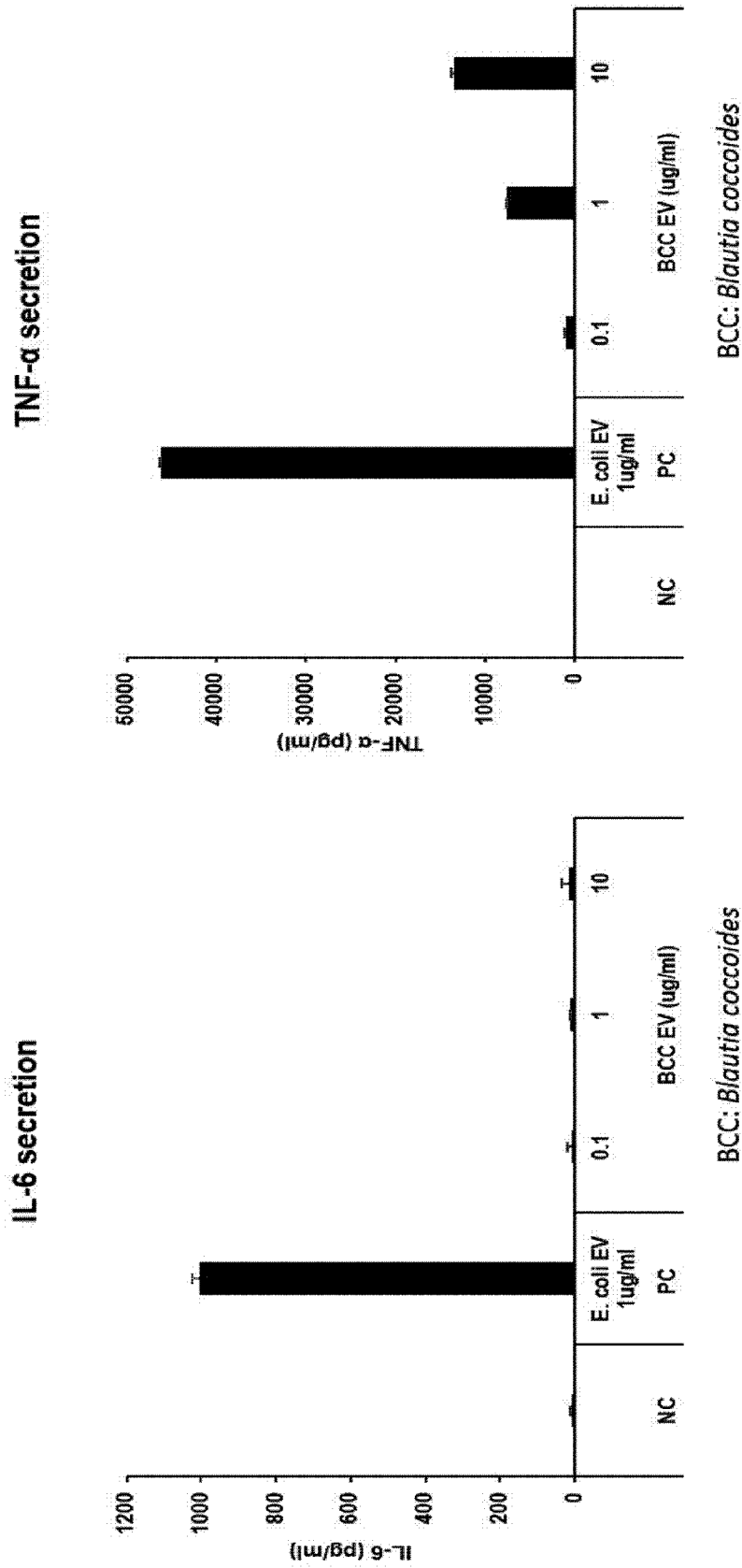
[도9]



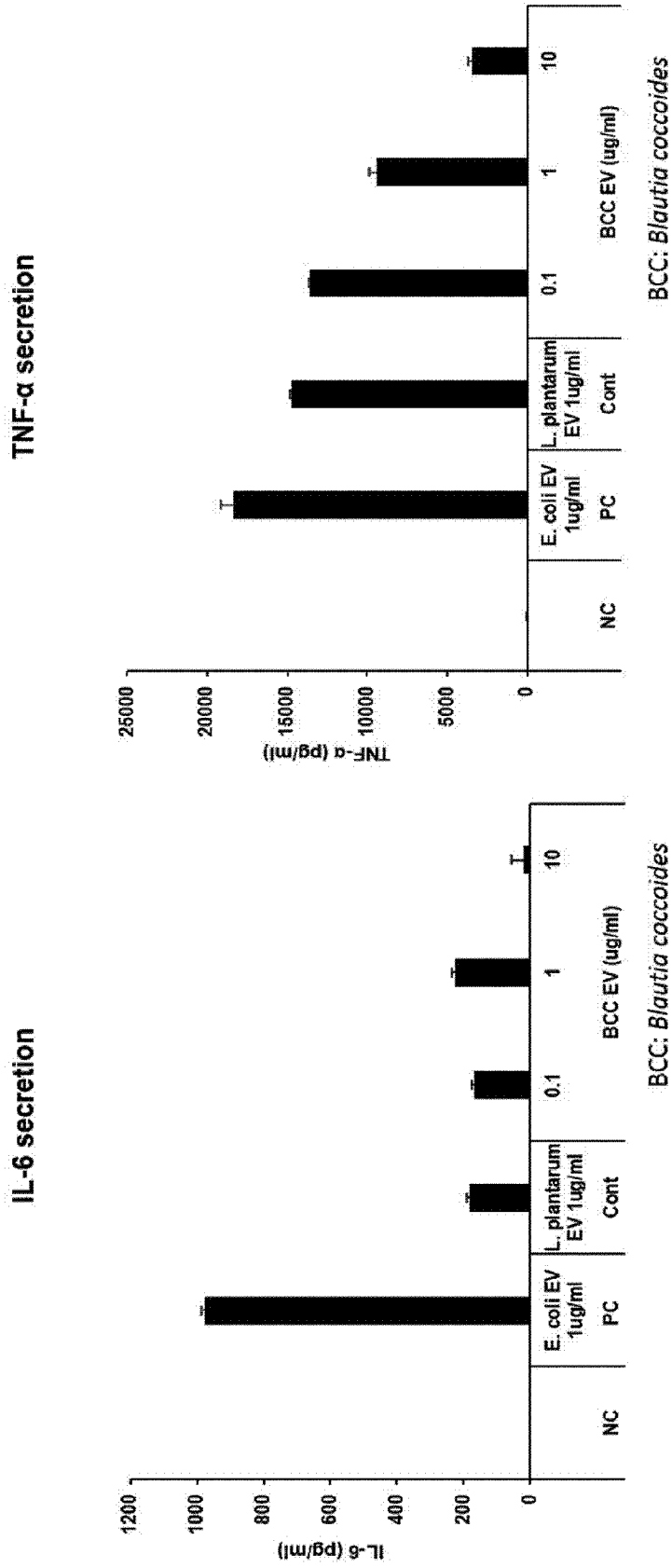
[도 10]



[도11]



[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/6851(2018.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 37/00(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)

C12Q 1/689; A61K 35/00; A61K 35/74; A61P 3/04; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; A23L 33/135; A61P 35/00; A61P 37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: blautia, extracellular vesicle, nano-vesicle, colorectal cancer, hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, cholangiocarcinoma, ovarian cancer, bladder cancer, myocardial infarction, atrial fibrillation, variant angina, blautia coccoides

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2018-0006303 A (MD HEALTHCARE INC. et al.) 17 January 2018 See abstract; claims 1-18.	1-17,19
Y	KR 10-2018-0012846 A (4D PHARMA RESEARCH LIMITED) 06 February 2018 See abstract; claims 1-38; paragraphs [0013], [0097].	1-17,19
Y	KR 10-2016-0073157 A (EWhA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION et al.) 24 June 2016 See abstract; claims 1-14; paragraphs [0014], [0036].	1-17,19
Y	US 2012-0058094 A1 (BLASER, Martin J. et al.) 08 March 2012 See abstract; claims 19, 21.	1-17,19
A	WO 2012-159023 A2 (VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY et al.) 22 November 2012 See abstract; claims 1, 9.	1-17,19



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

28 MAY 2019 (28.05.2019)

Date of mailing of the international search report

28 MAY 2019 (28.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

 Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/002102

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.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a 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/KR2019/002102

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2018-0006303 A	17/01/2018	KR 10-1923969 B1 WO 2018-008895 A1	30/11/2018 11/01/2018
KR 10-2018-0012846 A	06/02/2018	AU 2016-278067 A1 BR 112017025005 A2 CA 2988661 A1 CN 108271354 A CO 2017013443 A2 EA 201890048 A1 EP 3240554 A1 JP 2017-535511 A JP 6426265 B2 MX 2017016560 A PE 02432018 A1 TW 201710495 A US 2017-0360856 A1 WO 2016-203218 A1	14/12/2017 07/08/2018 22/12/2016 10/07/2018 28/03/2018 29/06/2018 08/11/2017 30/11/2017 21/11/2018 21/02/2018 31/01/2018 16/03/2017 21/12/2017 22/12/2016
KR 10-2016-0073157 A	24/06/2016	CN 107429290 A EP 3235910 A1 JP 2017-538421 A JP 6430648 B2 KR 10-1798176 B1 US 2017-0369930 A1 WO 2016-099076 A1	01/12/2017 25/10/2017 28/12/2017 28/11/2018 15/11/2017 28/12/2017 23/06/2016
US 2012-0058094 A1	08/03/2012	US 2017-151290 A1 US 9386793 B2 WO 2012-024638 A2 WO 2012-024638 A3	01/06/2017 12/07/2016 23/02/2012 03/05/2012
WO 2012-159023 A2	22/11/2012	US 2014-0179726 A1	26/06/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))		
C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/6851(2018.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/74(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/689; A61K 35/00; A61K 35/74; A61P 3/04; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; A23L 33/135; A61P 35/00; A61P 37/00		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 블라우티아, 세포뮵 소포, 나노소포, 대장암, 간암, 췌장암, 담관암, 난소암, 방광암, 심근경색, 심방세동, 이형협심증, 블라우티아 코코이테스		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2018-0006303 A (주식회사 엠디헬스케어 등) 2018.01.17 요약; 청구항 1-18 참조.	1-17, 19
Y	KR 10-2018-0012846 A (4디 콤파 리서치 리미티드) 2018.02.06 요약; 청구항 1-38; 단락 [0013], [0097] 참조.	1-17, 19
Y	KR 10-2016-0073157 A (이화여자대학교 산학협력단 등) 2016.06.24 요약; 청구항 1-14; 단락 [0014], [0036] 참조.	1-17, 19
Y	US 2012-0058094 A1 (BLASER, MARTIN J. 등) 2012.03.08 요약; 청구항 19, 21 참조.	1-17, 19
A	WO 2012-159023 A2 (VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY 등) 2012.11.22 요약; 청구항 1, 9 참조.	1-17, 19
<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 “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 신구성 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 2019년 05월 28일 (28.05.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 05월 28일 (28.05.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

제2기제란 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: 18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 18은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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.

제3기제란 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 10-2018-0006303 A	2018/01/17	KR 10-1923969 B1 WO 2018-008895 A1	2018/11/30 2018/01/11
KR 10-2018-0012846 A	2018/02/06	AU 2016-278067 A1 BR 112017025005 A2 CA 2988661 A1 CN 108271354 A CO 2017013443 A2 EA 201890048 A1 EP 3240554 A1 JP 2017-535511 A JP 6426265 B2 MX 2017016560 A PE 02432018 A1 TW 201710495 A US 2017-0360856 A1 WO 2016-203218 A1	2017/12/14 2018/08/07 2016/12/22 2018/07/10 2018/03/28 2018/06/29 2017/11/08 2017/11/30 2018/11/21 2018/02/21 2018/01/31 2017/03/16 2017/12/21 2016/12/22
KR 10-2016-0073157 A	2016/06/24	CN 107429290 A EP 3235910 A1 JP 2017-538421 A JP 6430648 B2 KR 10-1798176 B1 US 2017-0369930 A1 WO 2016-099076 A1	2017/12/01 2017/10/25 2017/12/28 2018/11/28 2017/11/15 2017/12/28 2016/06/23
US 2012-0058094 A1	2012/03/08	US 2017-151290 A1 US 9386793 B2 WO 2012-024638 A2 WO 2012-024638 A3	2017/06/01 2016/07/12 2012/02/23 2012/05/03
WO 2012-159023 A2	2012/11/22	US 2014-0179726 A1	2014/06/26