

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 11월 18일 (18.11.2021) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2021/230581 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/005747

(22) 국제출원일:

2021년 5월 7일 (07.05.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0056034 2020년 5월 11일 (11.05.2020) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).

(72) 발명자: 권미나 (KWEON, Mi-Na); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 225동 3202호, Seoul (KR). 김승일

(KIM, Seungil); 15523 경기도 안산시 상록구 충정공길 14-2, 가동 302호, Gyeonggi-do (KR).

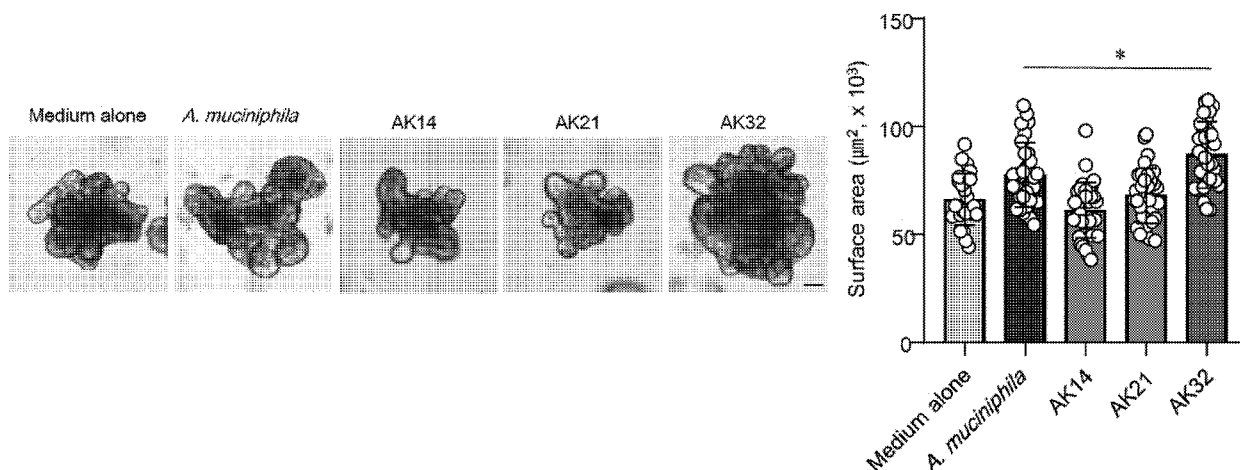
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06158 서울시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

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

(54) Title: DISCOVERY OF NOVEL AKKERMANSIA MUCINIPHILA AK32 AND APPLICATION THEREOF FOR PREVENTION OR TREATMENT OF INTESTINAL INJURY

(54) 발명의 명칭: 신규한 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주의 발견 및 장 손상의 예방 또는 치료를 위한 응용



(57) Abstract: The present invention relates to novel *Akkermansia muciniphila* AK32 and a composition comprising same for the prevention or treatment of intestinal injury. The strain of the present invention, *Akkermansia muciniphila* AK32 (accession number: KCTC 14172BP), increases the number of goblet cells and crypt depth in the small intestine, promotes the expression of genes associated with proliferation of enterocytes, and is effective in restoration and growth of small intestinal tissue and small intestinal organoids, and thus is effective for manufacturing of food, drugs, intestinal regulators, probiotics, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 및 이를 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주는 소장 음 높이 및 술잔 세포 수를 증가시킬 뿐만 아니라, 소장 상피세포 증식과 관련된 유전자 발현을 촉진시키고, 소장 조직 및 소장 오가노이드의 재생 및 성장에 효과적이기 때문에, 이를 이용한 식품, 약학적, 정장용, 생균제, 프로바이오틱스 등의 제조에 효과적이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2021/230581 A1

(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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주의 발견 및 장 손상의 예방 또는 치료를 위한 응용

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 및 이를 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2020년 05월 11일에 출원된 한국특허출원 제10-2020-0056034호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 염증성 장 질환은 특발성 질환으로 소화기관에 만성 및 재발성 염증과 장 점막 조직에 손상이 유발되는 질환이다.
- [5] 통상적으로 크론병(Crohn's disease, CD)과 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)을 염증성 장 질환으로 명명하며, 그 원인은 명확히 밝혀지지 않았지만 유전적 소견, 면역과 환경적 요인 및 일부 미생물(병원균)에 의해 발병한다고 제시되고 있다.
- [6] 보다 구체적으로는, 장벽의 면역 기능 이상 또는 장내 환경적 항원의 침입으로 인한 염증성 사이토카인의 증가와 병원균 감염 등으로 인한 장내 세균총의 장내 불균형(dysbiosis)이 주요한 원인으로 제시되고 있다. 특히 장내 세균의 다양성이 저하되고 특정 공생 세균인 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 중 장내세균과(*Enteribacteriaceae*)의 과잉 증식 및 부착, 및 침습성 대장균(AIEC)과 마이코박테리움(*Mycobacterium*)과 같은 특정 병원균의 감염에 의해 장내 불균형이 야기되는 것으로 알려져 있다.
- [7] 한편, 유산균의 항균 효과 및 체내 면역 조절 작용을 통한 염증성 질환 완화 효과가 확인되면서, 유산균을 이용한 대장염 예방 또는 증상을 개선하고자 하는 연구들이 수행되었다.
- [8] 특히 프로바이오틱스 유산균은 병원성 세균의 장내 부착을 방지하고, 젖산, 박테리옌과 같은 자체 항균 물질을 생산하여 병원성 세균의 침입을 막는다. 이러한 병원성 미생물에 의해 장내 불균형(dysbiosis)이 일어난 장내 균총을 조절하여 숙주의 특정 기관에 영향을 미칠 수 있으며, 장내 균총과 장 점막 간 상호작용에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 장 점막 부착능과 점액질 분비량, 뮤신(mucin)과 같은 방어물질의 생성 및 장 점막의 밀착 연결 보존(tight junction integrity)을 증가시켜 장 점막의 기능을 개선시킬 수 있다.
- [9] 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp), 비피도박테리움 종(*Bifidobacterium* sp), 사카로마이세스 보울라디(*Saccharomyces boulardii*), 에세케리아 콜라이(*Escherichia coli*)

Escherichia coli) Nissle1917 및 복합유산균 제품인 VSL#3가 가장 보편적으로 염증성 장 질환의 치료에 사용되고 있다. 특히 프로바이오틱스의 염증성 장 질환에 대한 효과는 외과 수술을 마친 궤양성 대장염 환자의 낭염 치료에서 가장 우수하게 나타났다.

- [10] 그러나 이러한 프로바이오틱스 미생물의 잠재적 효과에도 아직까지 프로바이오틱스에 대한 작용 기작이 명확하게 밝혀지지 않았으며, 이에 따른 추가적인 연구 결과가 요구되고 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주를 제공하는 것으로서, 본 발명자들은 본 발명의 신규한 AK32 균주가 소장 음(crypt) 높이 및 술잔 세포(goblet cell) 수를 증가시킬 뿐만 아니라, 소장 상피세포 증식과 분화에 관련된 유전자 발현을 촉진시키고, 소장 조직의 재생 및 성장에 효과적임을 확인하였다.
- [13] 이에, 본 발명의 목적은 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics)를 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 정장용 조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식품첨가용 조성물을 제공하는 것이다.
- [21]
- [22] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에

제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[23]

기술적 해결방법

[24] 상기 과제를 해결하기 위하여, 또한, 본 발명은 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주를 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics)를 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 정장용 조성물을 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식품첨가용 조성물을 제공한다.

[32] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 손상을 예방 또는 개선할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 서열번호 3으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 MMD(methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit) 효소를 생산할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 상피세포 증식을 촉진할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 장 손상은 방사선 조사에 의한 장 손상, 약물에 의한 장 손상, 알코올성 장 손상 및 염증성 장질환에 의한 장 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 염증성 장질환은 십이지장궤양, 장폐색증, 급성 위장관 출혈, 크론씨 질환(Crohn's disease), 장관형 베체트병, 회장낭염(pouchitis), 과민성 대장 증후군, 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 장 손상의 예방, 개선 또는

치료 방법을 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 장 손상의 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액의 장 손상에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

[40]

발명의 효과

[41] 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주는 소장 움 높이 및 술잔 세포 수를 증가시킬 뿐만 아니라, 소장 상피세포 증식과 관련된 유전자 발현을 촉진시키고, 소장 조직 및 소장 오가노이드의 재생 및 성장에 효과적이기 때문에, 이를 이용한 식품, 약학적, 정장용, 생균제, 프로바이오틱스 등의 제조에 효과적이다.

[42]

도면의 간단한 설명

[43] 도 1a는 *A. muciniphila* BAA-835 또는 대변으로부터 채집된 *A. muciniphila* 균주 AK14, AK21 또는 AK32의 배양 상청액으로 처리된 소장 오가노이드의 명시야 이미지 및 표면적을 나타낸 것이다. scale bar = 50 μ m.

[44] 도 1b는 Gpr41 / Gpr43 길항제의 존재 또는 부존재 하에 배양 상청액으로 처리된 소장 오가노이드의 명시야 이미지 및 표면적을 나타낸 것이다. scale bar = 50 μ m.

[45] 도 1c는 PDH(pyruvate dehydrogenase) E1 component 및 MMD(methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit)의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[46] 도 1d는 *A. muciniphila* BAA-835 또는 AK32 식이 마우스의 소장 오가노이드의 명시야 이미지 및 표면적을 나타낸 것이다. scale bar = 50 μ m.

[47] 도 1e는 *A. muciniphila* BAA-835 또는 AK32 식이 마우스 소장에서의 술잔 세포 수 및 움의 높이를 나타낸 것이다. scale bar = 10 μ m.

[48] 도 1f는 AK32 균주 식이 마우스 소장 조직에서 Lgr5, Lyz1, Muc2, Wnt3, Axin2 및 Ctnnb1의 mRNA 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[49] 도 2는 AK32 균주의 전체 게놈 지도를 나타낸 것이다.

[50] 도 3a는 AK32 균주와 BAA-835 균주의 PDH 아미노산 서열을 비교하여 나타낸 것이다.

[51] 도 3b는 AK32 균주와 BAA-835 균주의 MMD 아미노산 서열을 비교하여 나타낸 것이다.

[52] 도 4a는 AK32 균주와 BAA-835 균주의 균 배양액에서의 SCFA를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[53] 도 4b는 AK32 균주와 BAA-835 균주 각각을 마우스에 4주간 구강 투여 후 맹장

내용물에서 SCFA를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[54]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[55]

본 발명은 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주를 제공한다.

[56]

본 발명자들은 상기 신규한 균주를 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)로 명명하고, 2020년 04월 20일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 수탁번호 KCTC 14172BP로 기탁하였다.

[57]

본 발명의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 손상을 예방 또는 개선할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[58]

본 발명의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 서열번호 3으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는 MMD(methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit) 효소를 생산할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59]

본 발명의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 상피세포 증식을 촉진할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[60]

본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 AK32 균주가 기존의 다른 균주들과 비교하여 소장 오가노이드 증식능이 우수함을 확인하였다.

[61]

또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[62]

본 발명에서 용어 '배양'이란 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경 조건에서 생육시키기 위하여 수행하는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서는 '발효'를 포함하는 개념이다.

[63]

상기 '아커만시아 뮤시니필라 AK32'의 균체는 배양 배지로부터 수득된 생균 그 자체뿐만 아니라, 당업자에게 알려진 유산균에 대한 임의의 가공형태를 포함하는 것으로 예를 들어 균체 파쇄물, 건조물, 동결물 등을 포함하며 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 용어 '배양액'은 '발효액'을 포함하는 의미이며, 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리 하여 균주를 제거한 여액(원심분리한 상등액) 등의 배양액 자체로부터 파생되는 가공물을 포함한다.

[64]

본 발명에서, 상기 장 손상은 방사선 조사에 의한 장 손상, 약물에 의한 장 손상, 알코올성 장 손상 및 염증성 장질환에 의한 장 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[65]

본 발명에서, 방사선은 세포 내의 물과 반응하여 활성산소를 생성하고 이로 인해 유발된 독성이 세포 및 조직에 영향을 미치고, 염증 반응을 야기한다. 정상 조직이 방사선에 노출되면 정상 조직 내에 존재하는 방사선 감수성이 높은 세포들, 특히 혈관세포 및 면역세포가 영향을 받는다. 이 혈관세포와 면역세포는 염증 반응에 관여하는 대표적인 세포들이다. 따라서 방사선에 의해 나타나는

부작용 가운데 가장 높은 빈도를 차지하는 것이 장 염증, 예컨대 장염, 폐렴과 같은 염증 반응이다. 본 발명에 따르면, 상기 장 손상은 급성 위장관 증후군(acute gastrointestinal syndrome, GIS)이다.

- [66] 본 발명에서, 상기 염증성 장질환은 십이지장궤양, 장폐색증, 급성 위장관 출혈, 크론씨 질환(Crohn's disease), 장관형 베체트병, 회장낭염(pouchitis), 과민성 대장 증후군, 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [67] 본 발명에서, 장 기능 개선은 예를 들어, 장내 균총을 개선하는 것; 장내 유익균의 증식을 촉진하는 것; 장내 단쇄 지방산의 함량을 증가시키는 것; 유해균의 증식을 억제하는 것; 또는 장내 상피세포의 증식을 유도하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효과가 나타나는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명의 조성물 내의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [69] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [70] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [71] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [72] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [73] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, (HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrolog), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [74] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

- [75] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [77] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [78] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [79] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs),

- 테제스터 트리글리세라이드 기재(TG-95, MA, 57)와 같은 기재가 사용될 수 있다.
- [80] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [81] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [82] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [83] 본 발명에 따른 약학적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [84] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [85] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [86] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [87] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

- [88] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [89] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [90] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [91] 본 발명의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [92] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [93] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.
- [94] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료

및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[95] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics)를 제공한다.

[96] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 정장용 조성물을 제공한다.

[97] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.

[98] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식품첨가용 조성물을 제공한다.

[99] 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주는 생균이나 프로바이오틱스로 인간 및 동물의 장 건강 증진을 위한 용도, 즉, 정장용, 생균제 또는 식품첨가용 조성물로 사용될 수 있다. 상기 조성물은 상기 균주 자체, 이의 파쇄물 및 상기 균주 배양물 등을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 부형제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[100] 상기 조성물은 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리 하여 균주를 제거한 여액(원심분리한 상등액) 등을 포함한다. 조성물 내 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주의 함량은 조성물의 용도 및 제형에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에 따른 정장용 또는 생균제 조성물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 아커만시아 뮤시니필라 AK32, 이의 파쇄물 및 이의 배양물을 약제학적 분야에서 통상적으로 사용하는 담체 및 향료와 혼합하여 정제(tablet), 트로키(troche), 캡슐(capsule), 엘릭실(elixir), 시럽(syrup), 산제(powder), 현탁제(suspension) 또는 과립제(granule) 등의 형태로 제조 및 투여될 수 있다.

[101] 담체로는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제 등을 사용할 수 있다. 투여 방식은 경구, 비경구 또는 도포법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 경구투여하는 것이 바람직하다. 또한, 투여용량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 상태 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 사료용 조성물은 발효사료, 배합 사료, 펠렛형태 및 사일리지(silage) 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주와 여러 가지 미생물 균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조될 수 있으며, 상기 배합사료는 여러 종류의 일반 사료와 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32를 혼합 하여 제조될 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 발효사료 또는 배합사료를 펠렛형으로 제형화하여 제조될 수 있으며, 사일레지는 청예사료를 본 발명에 따른 아커만시아 뮤시니필라 AK32로 발효시킴으로써 제조될 수 있다.

- [102] 본 발명에 따른 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 또는 이의 배양물은 김치, 음료, 이유식, 발효유, 빵 등의 식품에 대한 식품첨가제로 사용될 수 있다. 아울러, 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 또는 이의 배양물은 발효제품 제조를 위한 스타터(starter)로 사용될 수 있다. 상기 발효제품은 치즈, 김치, 발효생식제품 등을 포함한다. 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 또는 이의 배양물을 이용한 발효제품은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대, 현미와 율무 등의 곡류 분말에 본 발명에 따른 아커만시아 뮤시니필라 AK32 또는 이를 포함하는 2-3종의 혼합 유산균을 처리하여 적정 온도에서 발효시킨 후, 백태, 찹쌀, 수수 등의 다양한 농산물을 영양적인 균형과 기호성이 우수하도록 적절히 배합하여 발효 생식제품을 제조할 수 있다.
- [103] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 장 손상의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.
- [104] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물의 장 손상 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.
- [105] 또한, 본 발명은 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액의 장 손상에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [106]
- [107] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [108]
- [109] 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.
- [110]
- [111] **[실시예]**
- [112] **실험예 1. 실험 방법**
- [113] **실험예 1-1. 마우스 준비**
- [114] 본 발명 실시예에서 사용된 모든 동물은 8-10 주령 암컷 마우스이며, 무균 음식과 물을 자유롭게 섭식하였다. C57BL/6 마우스는 OrientBio(Korea)에서 구입하였다. 마우스는 아산 병원(Korea)의 동물 시설에 수용하고 특정 병원체가 없는 조건에서 사육하였다. 모든 동물 실험은 Asan Medical Center의 기관 동물 관리 및 사용위원회(승인 번호 2019-12-251)로부터 승인받았다. 모든 실험은

관련 지침 및 규정에 따라 수행되었다.

[115]

[116] 실험예 1-2. 인간 대변에서 *A. muciniphila* 균주의 분리

[117] *A. muciniphila*의 새로운 11개의 균주를 32 명의 지원자 건강한 사람의 대변에서 분리하였다. 대변을 PBS로 용해하고, GasPak 100 시스템(BD Bioscience)을 사용하여 혐기성 조건 하에서 37 °C에서 텍스트로스가 포함되어 있지 않은 0.4 % 뮤신 첨가 BHI 한천 배지(KisanBio)에 분주하였다. *A. muciniphila*를 단리하고 프라이머 세트 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'(서열번호 1) 및 5'-CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'(서열번호 2)를 사용하여 PCR로 확인하였다.

[118]

[119] 실험예 1-3. *A. muciniphila*의 경구 투여

[120] *A. muciniphila*(ATCC BAA-835^T) 및 새로 분리된 *A. muciniphila* AK32 균주를 0.4 % mucin(Sigma)이 보충된 뇌 심장 주입 배지(BD Bioscience)에서 배양하고, 37 °C에서 GasPak 100 시스템(BD Bioscience)을 사용하여 혐기성 배양하였다. 배양된 배양물을 농축시키고 혐기성 PBS에 현탁시킨 뒤, 경구용 Zonde 바늘로 4 주 동안 매일 마우스(용량 당 8×10^8 CFU)에 투여 하였다.

[121]

[122] 실험예 1-4. 움(crypt) 분리

[123] 소장(Small intestinal, SI)을 종 방향으로 개방하고 PBS로 세척하였다. 움을 분리하기 위해, 조직을 PBS 중의 1 mM EDTA에서 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하고, PBS에서 세척 한 후, 4 °C에서 추가 1 시간 동안 인큐베이션하기 위해, PBS에서 5 mM EDTA로 옮겼다. 이어서, 샘플을 PBS에 현탁시킨 뒤, 70 μ m 세포 스트레이너(BD Falcon)로 여과하였다.

[124]

[125] 실험예 1-5. 오가노이드 배양

[126] 오가노이드 배양을 위해, 웰당 200-500 개의 움을 Matrigel(Corning)에 부유시켰다(suspended).

[127]

Advanced DMEM/F12(Gibco), $\times 100$ 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 1 mM N-아세틸 시스테인(Sigma-Aldrich), B27 보충제(Thermo Fisher Scientific), N2 보충제(Thermo Fisher Scientific), EGF(Thermo Fisher Scientific), Noggin(R & D Systems) 및 R-spondin-1-조절 배지를 포함하는 완전 ENR 배지(노진이 보충된 ER 배지)에서 배양하였다. ENR 배지는 2 ~ 3 일마다 교체하였다. 오가노이드의 표면적은 반전 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 웰에서 오가노이드의 임의의 겹치지 않는 사진을 찍음으로써 현미경으로 측정하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH) 및 Zen 이미지 프로그램(Carl Zeiss)을 사용하여 각 사진을 분석하였다. 면적 측정을 위한 오가노이드 둘레는 수동 및 자동화 된 ImageJ 소프트웨어로 측정하였다.

[128]

[129] **실험 예 1-6. 조직학**

[130] 소장 회장을 제거하고 종 방향으로 개방하였다. 이어서, 스위스 롤에 의해 조직을 제조하고, 4 % 파라포름알데히드(PFA)에 고정시킨 후, 파라핀에 포매시켰다. 조직 섹션은 헤마톡실린-에오신(H & E) 또는 Periodic acid-Schiff(PAS)로 염색하였다.

[131]

[132] **실험 예 1-7. 오가노이드에 대한 맹장(cecum) 내용물 처리**

[133] 각 100mg의 맹장 내용물을 1ml의 무혈청 DMEM/F12(Gibco) 배지에 희석하고 1 시간 동안 볼텍스로 회전시켰다. 내용물을 4,000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하고, 배양하기 전에 상청액을 0.22- μ m 주사기 필터(Pall Corporation)를 통과시켰다. 맹장 내용물의 구성에 대한 효과를 다루기 위해, 고급 DMEM/F12에서 부유된 맹장 내용물의 0.01 % 상청액으로 ENR 배지를 보충하였다. Gpr43 길항제(GLPG0974, 0.1 μ M, Tocris) 및 Gpr41 길항제(β 하이드록시 부티레이트, 3 mM, Sigma)를 사용 하였다.

[134]

[135] **실험 예 1-8. 전체 게놈 시퀀싱**

[136] 아가로스 겔 전기영동을 실행하여 gDNA의 완전성을 점검하고, Quant-IT PicoGreen(Invitrogen)을 사용하여 gDNA를 정량화 하였다. 이어서, 서열 라이브러리는 PacBio DNA 템플릿 준비 키트 1.0을 사용하는 BluePippinTM 사이즈 선택 시스템을 사용한 20-kb 템플릿 제제의 지침서에 따라 제조하였다. 라이브러리는 Quant-IT PicoGreen을 사용하여 정량화하고, 고감도 DNA 칩(Agilent Technologies)을 사용하여 검증하였다. 이어서, 라이브러리를 PacBio RSII의 8-웰-SMART cell v3에서 PacBio P6C4 chemistry을 사용하여 시퀀싱하였다. AK32의 게놈은 새로운 PacBio 시퀀싱 데이터로 구축되었다. 이어서, Chunlab, Inc.에서 시퀀싱 분석을 수행하였다. PacBio 시퀀싱 데이터는 HGAP2 프로토콜(Pacific Biosciences)을 사용하여 PacBio SMRT Analysis 2.3.0으로 수집하였다. PacBio 시퀀싱 데이터로부터 얻은 결과물은 서클레이터 1.4.0(Sanger Institute)을 사용하여 원형화하였다. 전체 게놈의 유전자 찾기 및 기능 주석 파이프 라인(functional annotation pipeline)은 EzbioCloud 게놈 데이터베이스를 사용하였다. 단백질 코딩 서열은 Prodigal 2.6.2에 의해 예측되었다. tRNA를 코딩하는 유전자를 tRNAscan-SE 1.3.1을 사용하여 검색하였다. rfam 및 기타 비코딩 RNA는 Rfam 12.0 데이터베이스에서 검색하였다. 비교 전체 게놈은 평균 뉴클레오타이드 동일성 염기 BLAST(ANIb)로 연구하였다. ANIb 값은 Kostas lab(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani>)의 ANI 계산기로 계산하였다.

[137]

[138] **실험 예 1-9. Real-time PCR**

[139] 소장 및 오가노이드로부터의 총 RNA를 RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 사용하여

추출하고, cDNA를 Superscript II역전사 효소 및 올리고 dT 프라이머(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 합성하였다. *A. muciniphila*의 총 RNA는 Trizol(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 추출하였다. 박테리아 RNA를 사용한 cDNA 합성을 위해, gDNA 리무버(Toyobo)와 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix를 사용하였다. cDNA는 Real-time PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 SYBR 그린 화학(Affymetrix)을 사용하여 수행된 Real-time PCR의 주형으로 사용되었다.

- [140] 사용한 프라이머는 다음과 같다: *Muc2*,
 5'-CCTTAGCCAAGGGCTCGGAA-3'(서열번호 4) 및
 5'-GGCCCGAGAGTAGACCTTGG-3'(서열번호 5); *Lyz1*,
 5'-ATGGCGAACACAATGTCAAA-3'(서열번호 6) 및
 5'-GCCCTGTTTCTGCTGAAGTC-3'(서열번호 7); *Wnt3*,
 5'-CTTCTAATGGAGCCCCACCT-3'(서열번호 8) 및 5'-
 GAGGCCAGAGATGTGTACTGC-3'(서열번호 9); *Axin2*,
 5'-AACCTATGCCCCGTTTCCTCT-3'(서열번호 10) 및
 5'-GAGTGTAAGACTTGGTCCA-3'(서열번호 11); *Ctnnb1*,
 5'-ATGGAGCCGGACAGAAAAGC-3'(서열번호 12) 및
 5'-TGGGAGGTGTCAACATCTTC-3'(서열번호 13); *Lgr5*,
 5'-CCTGTCCAGGCTTTCAGAAG-3'(서열번호 14) 및
 5'-CTGTGGAGTCCATCAAAGCA-3'(서열번호 15); β -*actin*, 5'-
 TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'(서열번호 16) 및 5'-
 TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'(서열번호 17); *pdh*, 5'-
 AACCGATTATTGAAGCGGCA-3'(서열번호 18) 및
 5'-ATATTGGCGGCTTCGTGAAA-3'(서열번호 19); *mmd*, 5'-
 GACCAAGAAGGAACGCCTCA-3'(서열번호 20) 및
 5'-GTTCCGTCACCTTGCATTTCG-3'(서열번호 21); Universal 16S rDNA,
 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'(서열번호 22) 및 5'-
 ATTACCGCGGCTGCTGG-3'(서열번호 23); *A. muciniphila* 16S rDNA,
 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'(서열번호 24) 및
 5'-CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'(서열번호 25).

[141]

[142] 실험예 1-10. SCFA(Short-chain fatty acid)의 정량적 측정

[143] 대사 산물 분석을 위한 모든 시약 및 용매는 Sigma에서 구입하였다. 마우스 맹장 내용물의 경우, 10-20 mg의 맹장 내용물을 400 μ l의 내부 표준 용액(1 mM의 프로피온산 (C3)-d6, 100 μ M의 부티르산 (C4)-d7)으로 격렬하게 균질화시켰다. 균 배양 상청액의 분석을 위해, 100 μ l의 배양 상청액을 200 μ l의 내부 표준 용액과 혼합하였다. 원심 분리 후, 상청액을 여과 제거 하였다. AABD-SH(20 μ l, 20 mM), TPP(Triphenylphosphine, 20 μ l, 20 mM) 및 DPDS(2,2-dipyridyl disulfide,

20 μ l)가 포함된 디클로로메탄을 여과액에 첨가하였다. 볼텍싱하면서 상기 용액을 실온에서 10 분 동안 배양하고, 진공 건조시켰다. 샘플을 80 μ L 메탄올로 재구성하고 LC-MS/MS 분석을 준비하였다. 1290 HPLC(Agilent Technologies, Denmark), Qtrap 5500(ABSciex) 및 역상 컬럼(Pursuit 5 C18 150 $\times$ 2.0 mm, Agilent Technologies)이 장착된 LC-MS/MS 시스템을 사용하였다. 각 대사 산물에 대한 특정 전이에 해당하는 추출된 이온 크로마토그램(EIC, Extracted ion chromatogram)을 정량에 사용하였다. 각 EIC의 곡선 아래 면적은 내부 표준의 EIC 면적으로 정규화하였다. 각각의 대사 산물 대 내부 표준물의 피크 면적 비율을 샘플에서의 혈청 부피 또는 조직 중량을 사용하여 표준화한 다음, 상대적인 비교를 위해 사용하였다.

[144]

[145] 실험예 1-11. 통계 분석

[146] 통계 분석은 프리즘 소프트웨어(GraphPad, La Jolla, CA)를 사용하여 수행하였다. Pairwise 및 2 개의 독립적인 그룹의 비교를 위해 two-tailed t-test를 사용하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 제시하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[147]

[148] 실시예 1. *A. muciniphila* AK32 균주의 분리 및 기탁

[149] ISC-매개 상피 발달에서 일반적으로 사용되는 유형 균주(즉, ATCC BAA-835^T)보다 더 나은 *A. muciniphila* 균주를 발견하기 위해, 건강한 인간 대변으로부터 *A. muciniphila*를 분리하였다. 선택적 배지 및 종 특이적 PCR을 사용하여, 3개의 *A. muciniphila* 균주(AK14, AK21, AK32)를 수득하였다.

[150] ISC 매개 상피 발달에 대한 단리된 *A. muciniphila* 균주의 효과를 평가하기 위해, 각각의 단리된 균주로부터 수득된 배양 상청액의 존재 하에서 장 오가노이드를 사용하는 스크리닝 시스템을 채택하였다.

[151] 도 1a에 나타난 바와 같이, 3 개의 새로 분리된 균주 중에서 AK32의 배양 상청액만이 기존의 *A. muciniphila* 또는 다른 이소 타입 균주와 비교했을 때 오가노이드 크기가 유의하게 증가함을 확인하였다.

[152] 즉, 분리된 3개의 균주 중, *A. muciniphila* AK32 균주를 하기 실시예에 따라 가장 우수한 균주로 최종적으로 결정하였고, 아커만시아 뮌시니필라 에이케이32(*A. muciniphila* AK32, AK32)로 명명하였다(기탁번호: KCTC 14172BP).

[153]

[154] 실시예 2. *A. muciniphila* AK32 균주의 장 손상 개선 효과 확인

[155] 먼저, AK32에 의해 증가된 ISC 매개 상피 발달이 SCFA에 의존하는지 여부를 확인하기 위하여, Gpr41/43 길항제를 채택하였다.

[156] 도 1b에 나타난 바와 같이, Gpr41/43 길항제를 사용한 군에서 AK32의 배양 상청액에 의해 상향 조절된 소장 오가노이드 크기가 상당히 감소되었다.

[157] 또한, 도 1c에 나타난 바와 같이, 기존의 ATCC BAA-835^T 균주와 비교하여,

AK32 균주에서 SCFA 분비에 영향을 미치는 효소 pdh(pyruvate dehydrogenase E1 component) 및 mmd(Na^+ translocating methymalonyl-CoA/oxaloacetate decarboxylase) 발현이 유의하게 높음을 확인하였다.

- [158] 또한, 도 1d에 나타난 바와 같이, 생체 내 AK32 균주의 상향 조절 기능을 추가로 확인하기 위해, 마우스에 4주 동안 AK32 또는 전형적인 *A. muciniphila* ATCC BAA-835^T를 식이하였다.
- [159] 흥미롭게도, 기존의 ATCC BAA-835^T 식이 마우스와 비교하여 AK32 균주 식이 마우스에서의 소장 오가노이드 크기가 상당히 증가한 것으로 나타났다.
- [160] 또한, 도 1e에 나타난 바와 같이, AK32 식이 마우스는 ATCC BAA-835^T와 비교하여 소장에서 움 높이 및 점액 생성 술잔 세포의 수를 증가시키는 것으로 나타났다.
- [161] 또한, 도 1f에 나타난 바와 같이, AK32 식이 마우스는 ATCC BAA-835^T보다 소장에서 *Lgr5*, *Lyz1*, *Muc2*, *Wnt3*, *Axin2* 및 *Ctnnb1*의 mRNA 발현 수준을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다.
- [162] 또한, 도 2에 AK32 균주의 전체 게놈 지도를 나타내었다.
- [163] 또한, 도 3a 및 3b에 AK32 균주와 BAA-835 균주의 PDH(도 3a) 및 MMD(도 3b)의 아미노산 서열을 비교하였는 바, MMD 서열이 상이한 것으로 나타났다.
- [164] 또한, 하기 표 1에 AK32 균주와 BAA-835 균주의 게놈 기능정보(genome annotation)을 분석한 결과를 나타내었다.
- [165] [표1]

Strain	Base (bp)	No. of CDS ^a	GC contents (%)	tRNA	rRNA	ANI ^b (%)
<i>A. muciniphila</i> BAA-835	2,664,102	2,184	55.8	53	9	-
<i>A. muciniphila</i> AK32	3,004,919	2,600	55.3	56	9	97.39

^a Coding sequences

^b Average nucleotide identity based BLAST to type strain BAA-835.

- [166] 상기 결과로부터, 새로 발견된 AK32 균주가 ISC 매개 상피 발달 측면에서 특징적인 게놈을 가지면서, 기존의 *A. muciniphila* 균주와 비교하여 그 효과가 우수하며, strain 중에서도 그 효과가 단연 가장 우수함을 알 수 있었다.
- [167]
- [168] **실시예 3. *A. muciniphila* AK32 균주의 SCFA 분비 촉진 효과 확인**
- [169] 미생물 유래 대사 산물은 장 항상성을 유지하기 위한 주요 요인 중 하나이므로, *A. muciniphila* AK32 및 BAA-835 균 배양액에서의 SCFA를 비교하고,
- [170] 마우스에 4주간 구강투여 후 맹장 내용물에서 SCFA의 양을 비교하였다.

[171] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 AK32 균주는 BAA-835^T 균주와 유사하거나 그보다 우수한 SCFA 분비 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다.

[172]

[173] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 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.

[174]

산업상 이용가능성

[175] 본 발명의 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주는 장 손상 예방, 개선, 또는 치료를 위한 식품, 약학적, 정장용, 생균제, 프로바이오틱스 등의 제조에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

[176]

특허절차상 미생물기탁의 국제적 승인에
관한 부다페스트 조약

국제서식

원 기탁 건에 대한 수령증

7.1 규칙에 의해 발행됨

기탁자: 권미나

대한민국, 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 부여된 식별 번호: <i>아커만시아 뮤시니필라</i> AK32	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 14172BP
II. 과학적 성질 및/또는 제안된 분류학상의 위치	
상기 항목 I에 기재된 미생물은 다음을 동반하였다: ☐ 과학적 성질 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (해당란에 X 표시)	
III. 수령 및 승인	
본 국제 기탁당국은 2020년 4월 20일에 수령한 I.란의 미생물을 수탁한다.	
IV. 변경 요청의 수령	
본 국제 기탁 당국은 년 월 일에 수탁된 I.란의 미생물을 수령하였고, 년 월 일에 원기탁으로부터 부다페스트 조약에 기초한 기탁에의 이관 신청을 수령하였다.	
V. 국제 기탁 당국	
명칭: KCTC 한국 생명자원센터 주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원(KRIBB)	국제 기탁 기관을 대표할 권한을 가진 자의 서명 : (서명) 김 성 건, 센터장 일자: 2020년 4월 20일

양식 BP/4 (KCTC 양식 17호)

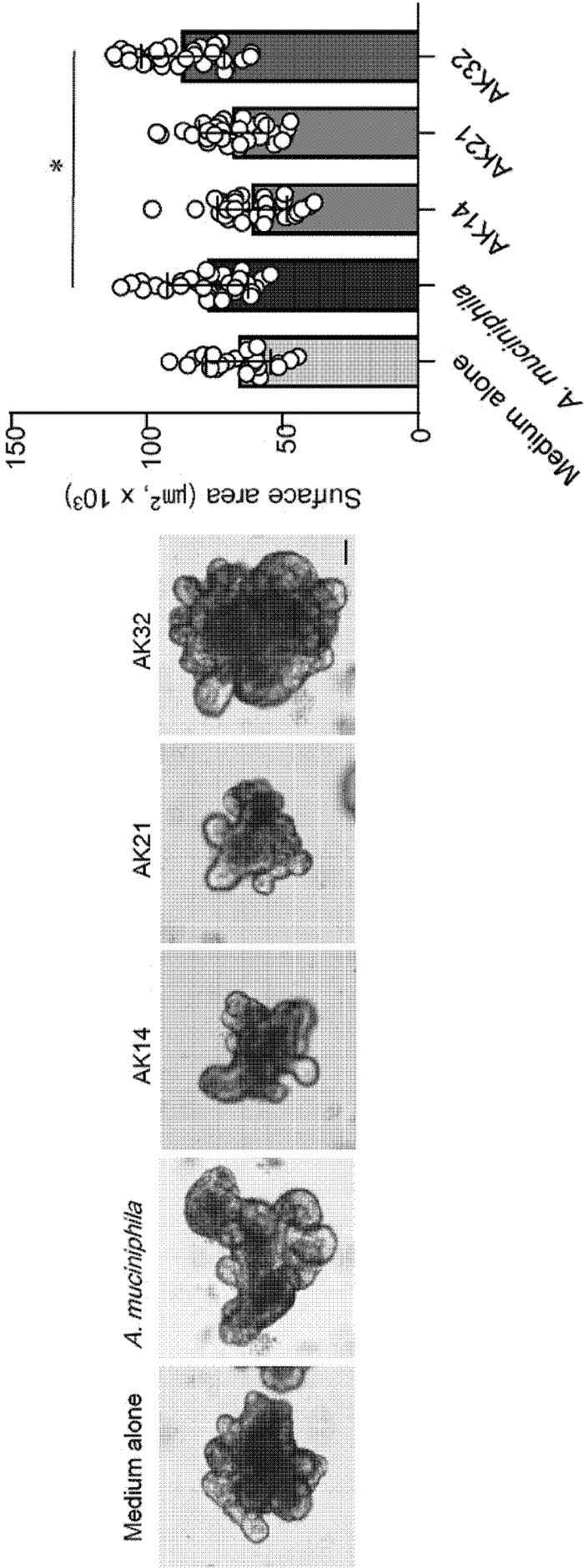
단독페이지

청구범위

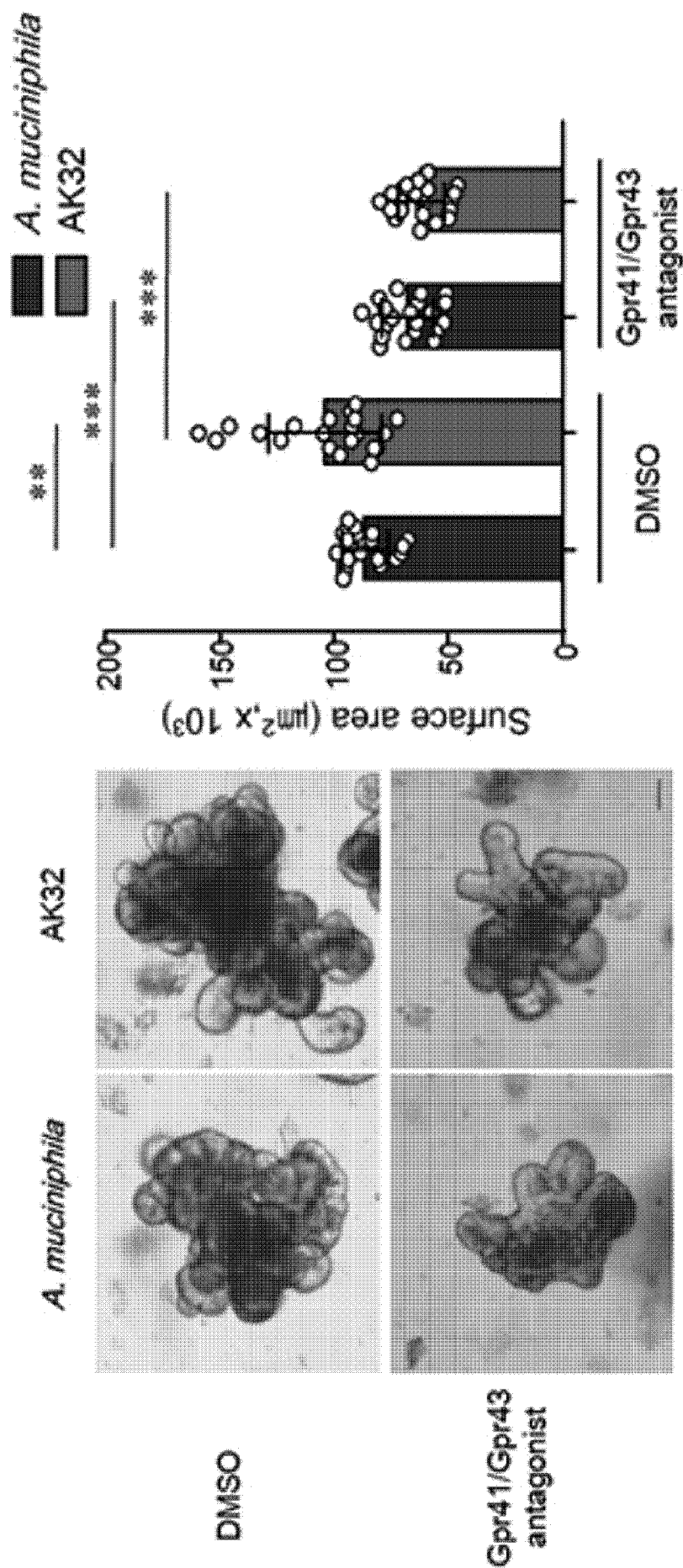
- [청구항 1] 아커만시아 뮤시니필라 AK32(*Akkermansia muciniphila* AK32)(기탁번호: KCTC 14172BP) 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 손상을 예방 또는 개선하는 것을 특징으로 하는, 균주.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 서열번호 3으로 이루어진 아미노산 서열을 포함하는
MMD(methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit) 효소를 생산하는 것을 특징으로 하는, 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 아커만시아 뮤시니필라 AK32는 장 상피세포 증식을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 균주.
- [청구항 5] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 장 손상은 방사선 조사에 의한 장 손상, 약물에 의한 장 손상, 알코올성 장 손상 및 염증성 장질환에 의한 장 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 십이지장궤양, 장폐색증, 급성 위장관 출혈, 크론씨 질환(Crohn's disease), 장관형 베체트병, 회장낭염(pouchitis), 과민성 대장 증후군, 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics).
- [청구항 11] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 정장용 조성물.
- [청구항 12] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물.
- [청구항 13] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식품첨가용 조성물.
- [청구항 14] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 장 손상의 예방, 개선 또는 치료 방법.
- [청구항 15] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액을

- 포함하는 조성물의 장 손상의 예방, 개선 또는 치료 용도.
- [청구항 16] 제1항의 아커만시아 뮤시니필라 AK32 균주 또는 이의 배양액의 장 손상에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도.

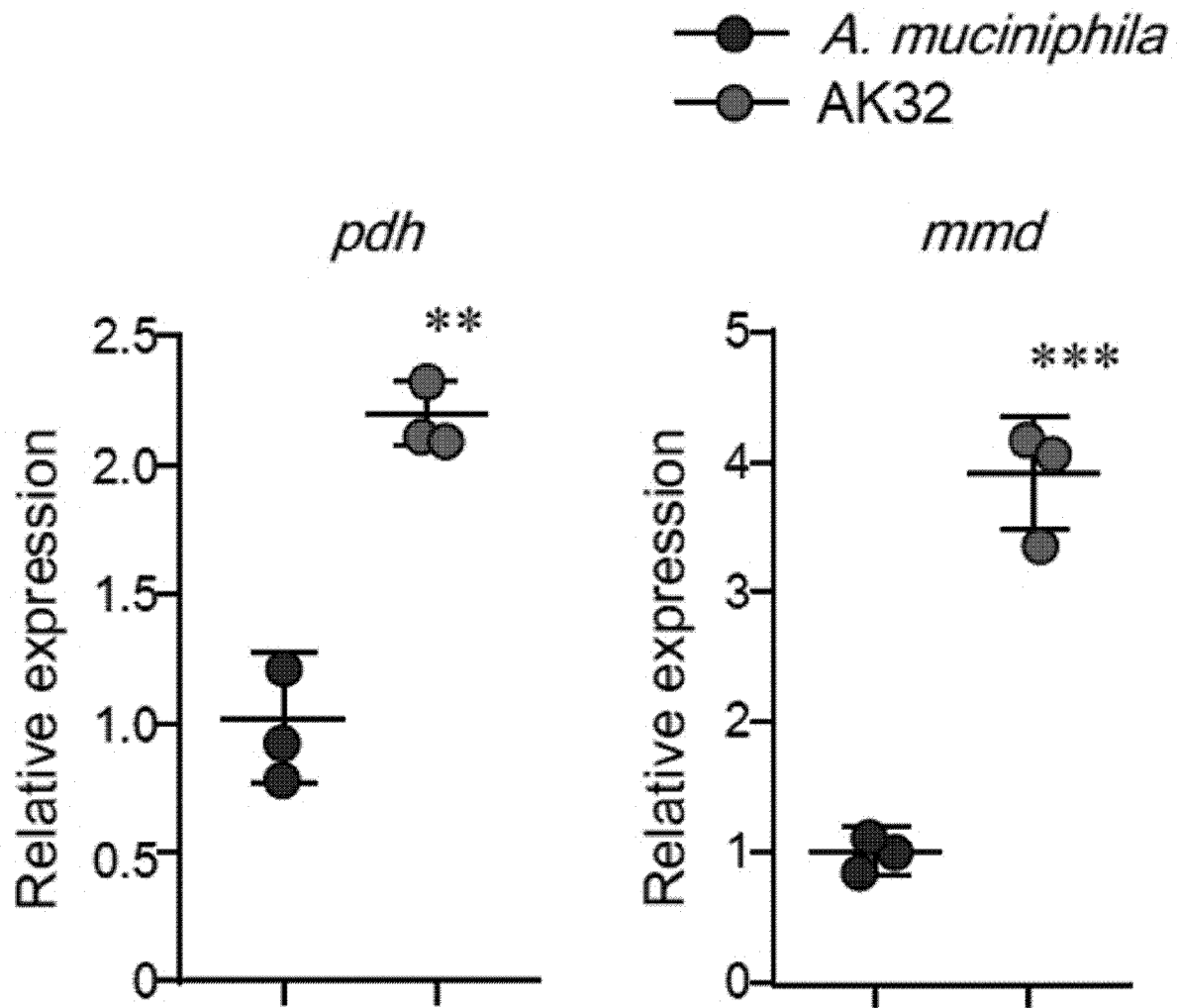
[도 1a]



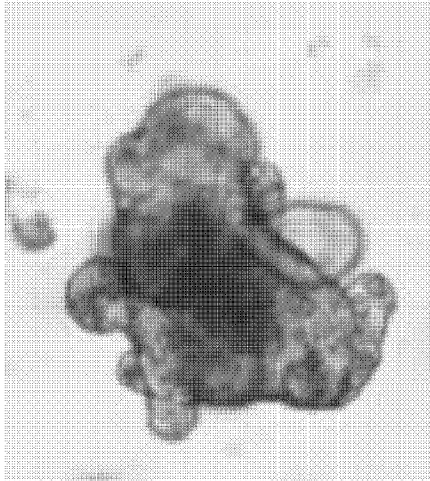
[도 1b]



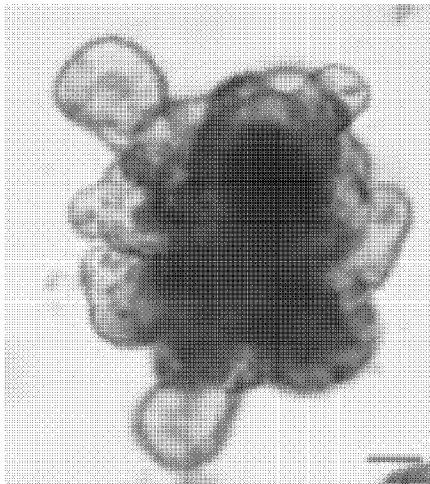
[도1c]



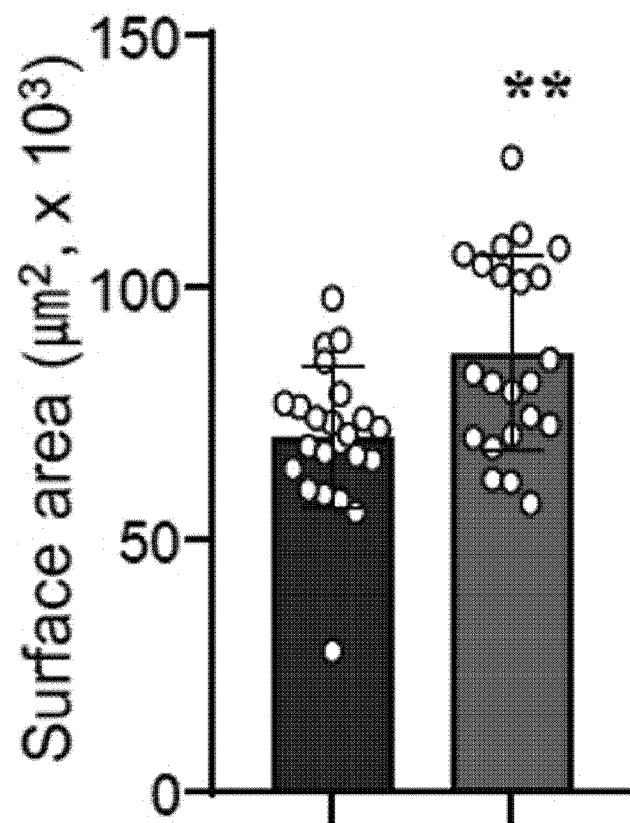
[도1d]

A. muciniphila

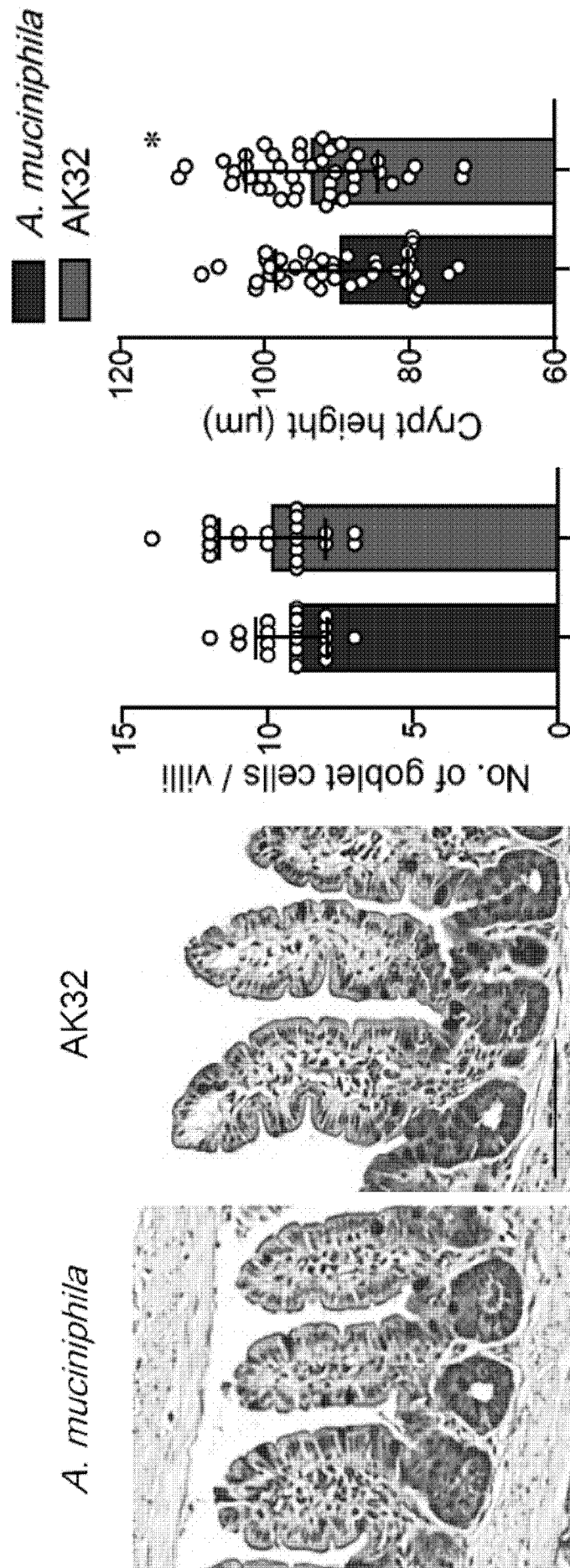
AK32



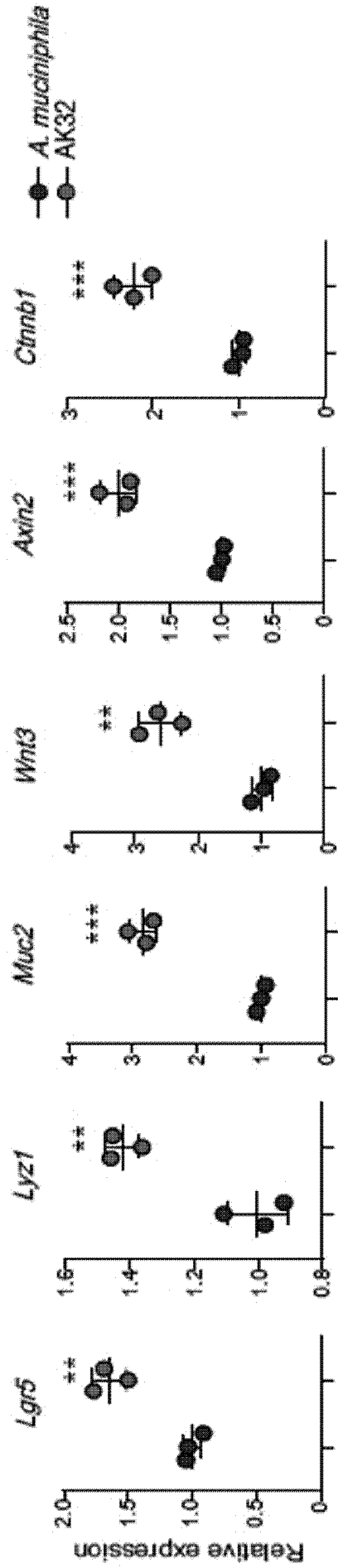
■ *A. muciniphila*
■ AK32



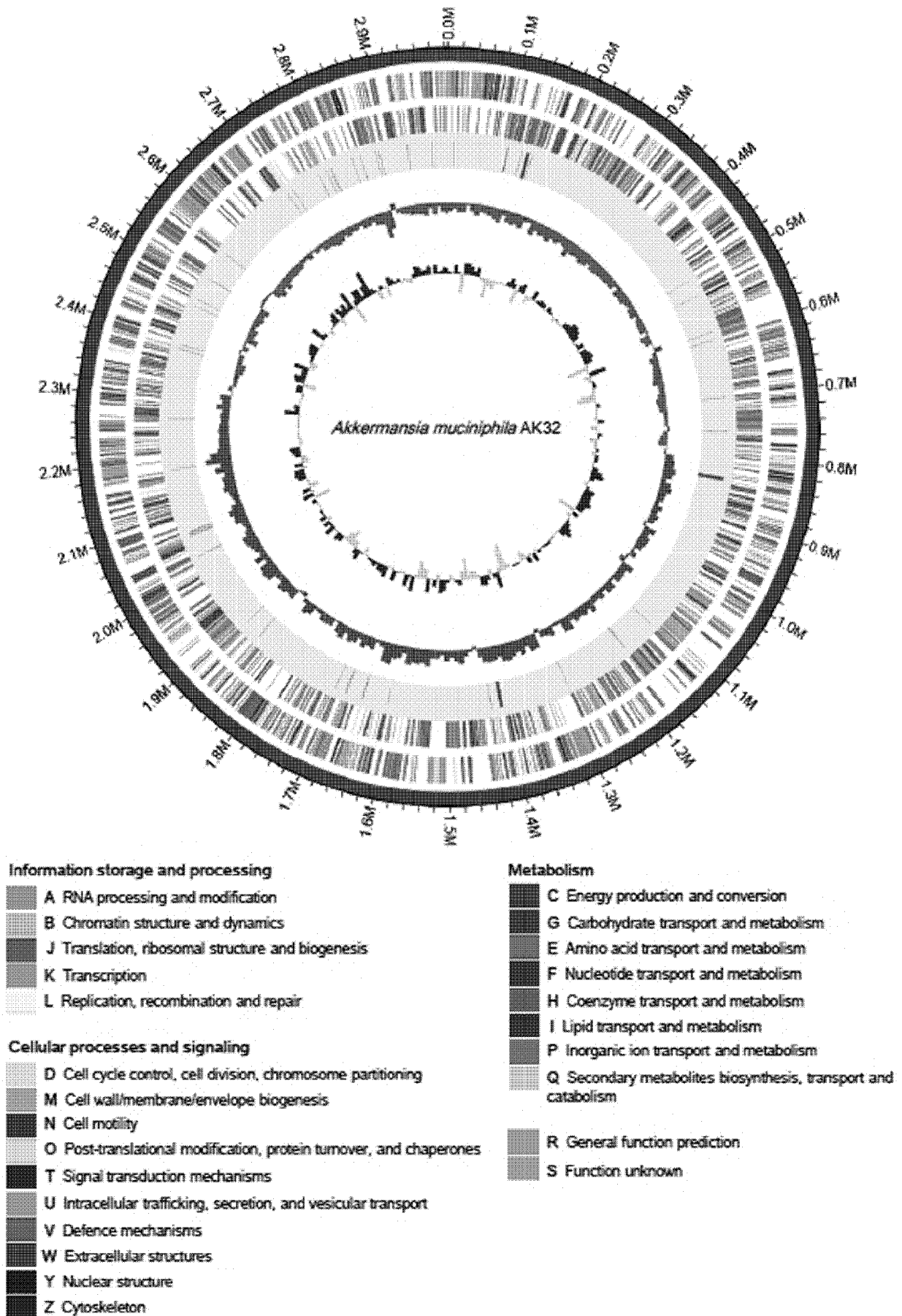
[도1e]



[도 1f]



[도2]



[도3a]

BAA-835	MLLARAFDTKISSLYKAGKITGGVYLGRGHEAIAACGGVFLTAGYDVIAPFIREQAARVT
AK32	MLLARAFDTKISSLYKAGKITGGVYLGRGHEAIAACGGVFLTAGYDVIAPFIREQAARVT

BAA-835	WGEPIIEAARAYLGSALGYMKGRDGNVHRGLPAEGYMAPISHLGSTVAFVIGCLFAKRLD
AK32	WGEPIIEAARAYLGSALGYMKGRDGNVHRGLPAEGYMAPISHLGSTVAFVIGCLFAKRLD

BAA-835	GKLPGPVGVAFCGDGTSTGAFHEAANMANVERLPLVLVVTNNQFAYSTPNIREFGEASL
AK32	GKLPGPVGVAFCGDGTSTGAFHEAANMANVERLPLVLVVTNNQFAYSTPNIREFGEASL

BAA-835	ADRGRGYGFTVHETDGTDFMATLETFTAVNNAREGRGPQWVLAKTLRMCGHGEHDDASY
AK32	ADRGRGYGFTVHETDGTDFMATLETFTAVNNAREGRGPQWVLAKTLRMCGHGEHDDASY

BAA-835	IPRELKEEYEKKDPVAVAERQLLAAGWLTPEETAALKKQYADEVQLAVATAQREPEPDPF
AK32	IPRELKEEYEKKDPVAVAERQLLAAGWLTPEETAALKKQYADEVQLAVATAQREPEPDPF

BAA-835	REDWNATVWRPY
AK32	REDWNATVWRPY

[도3b]

```

BAA-835 MSLFDSLITFLQGMGVFSLSWQMVGMWGIAILLLYLGVAQYEPLLMVPIAFGALIANIP
AK32    MSLFDSLITFLQGMGVFSLSWQMVGMWGIAILLLYLGVAQYEPLLMVPIAFGALIANIP
*****

BAA-835 DNGMLITQLNQQVISSNEQGEVTATSLNNVGYL RVHVAPLQQAPSKVPANLTPESRAQY
AK32    DNGMLITQLNQQVISSNEQGEVTSTSLNNVGYL RVHVAPLQQTPAKVPANLTPEARAQY
*****:*****:*.*****:****

BAA-835 QEIMQQPMQVYPGSQLTVSKIKSVRESQEKAKADAARLGDDSLTVDPNLKDFQNVTE DNG
AK32    LETMQQPMQVYPGSQLTVSKIKSVRESQEKAKADAARLGDDSLTVDPNLKDFQNVTE DNG
* *****

BAA-835 NEPVFLLTNGEGTTVVRQQGVNYFDTSGNRIPVDLKTQKLEPLVVSAAQKYVAVGQHTQE
AK32    NEPVFLLTNGEGTTVVRQQGVNYFDTSGNRVPVDLKTQKLEPLVVSAAQKYVAVGQHTQE
*****:*****

BAA-835 LLVTSIHGGLYDWIGLGIKAEIFPPIIFLGVGALTDFGPLLAAPRTLLLGAAAQVGVAAT
AK32    LLVTSIHGGLYDWIGLGIKAEIFPPIIFLGVGALTDFGPLLAAPRTLLLGAAAQVGVAAT
*****

BAA-835 FFMALFMGFTP NESASIGIIGGADGPTSIFLTMKLAPHLLGAVAVAAYTYMSLVPLIQPP
AK32    FFMALFMGFNPNEAASIGIIGGADGPTSIFLTMKLAPHLLGAVAVAAYTYMSLVPLIQPP
*****_***:*****

BAA-835 IMALLTTKKERLIRMKSLRTVSKSEKLEFFAVLVTIVTILLIPDASPLIGMLMLGNFLREC
AK32    IMALLTTKKERLIRMKSLRTVSKSEKLEFFAVLVTIVTILLIPDASPLIGMLMLGNFLREC
*****

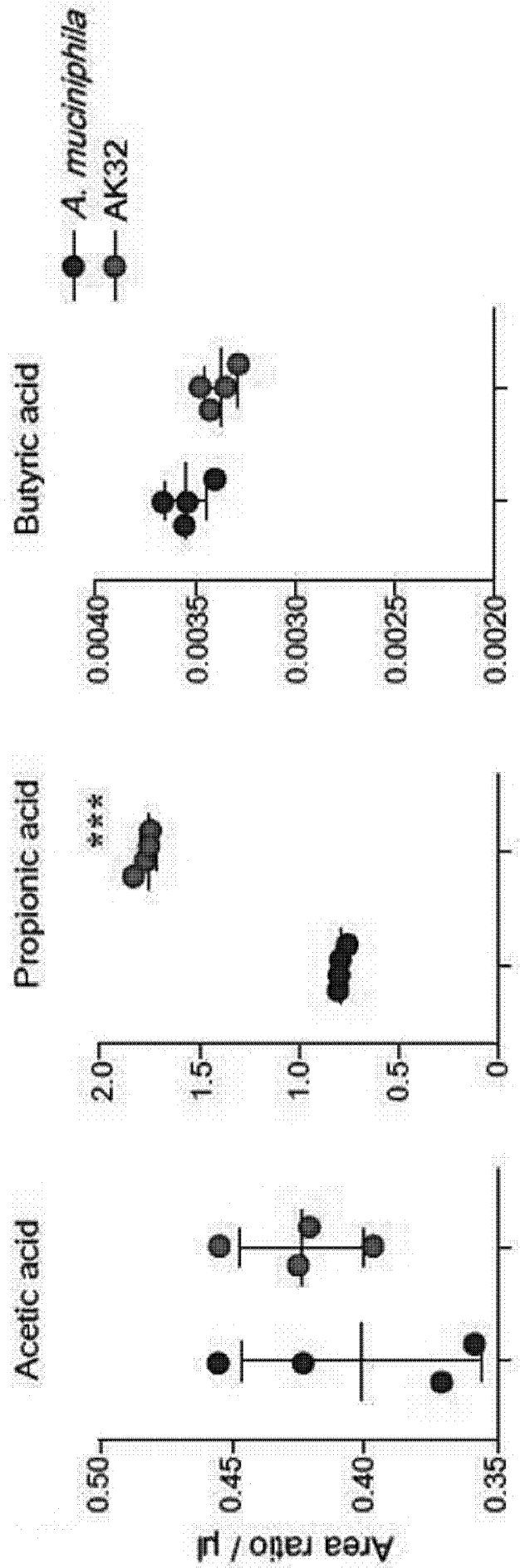
BAA-835 KVTERLVQASQNEIINIVTIFLGTSVGLTMQGDREFLQSETLLIILLGIVAFGVATAGGVI
AK32    KVTERLVQASQNEIINIVTIFLGTSVGLTMQGDREFLQAE TLLIILLGIVAFGVATAGGVI
*****:*****

BAA-835 AAKIMNLIWRKNPNFLIGSAGVSAVPMAARVSHNVGQKYDPSNYLLMHAMGPNVAGVIG
AK32    AAKLMNLIWRKNPNFLIGSAGVSAVPMAARVSHNVGQKYDPSNYLLMHAMGPNVAGVIG
***:*****

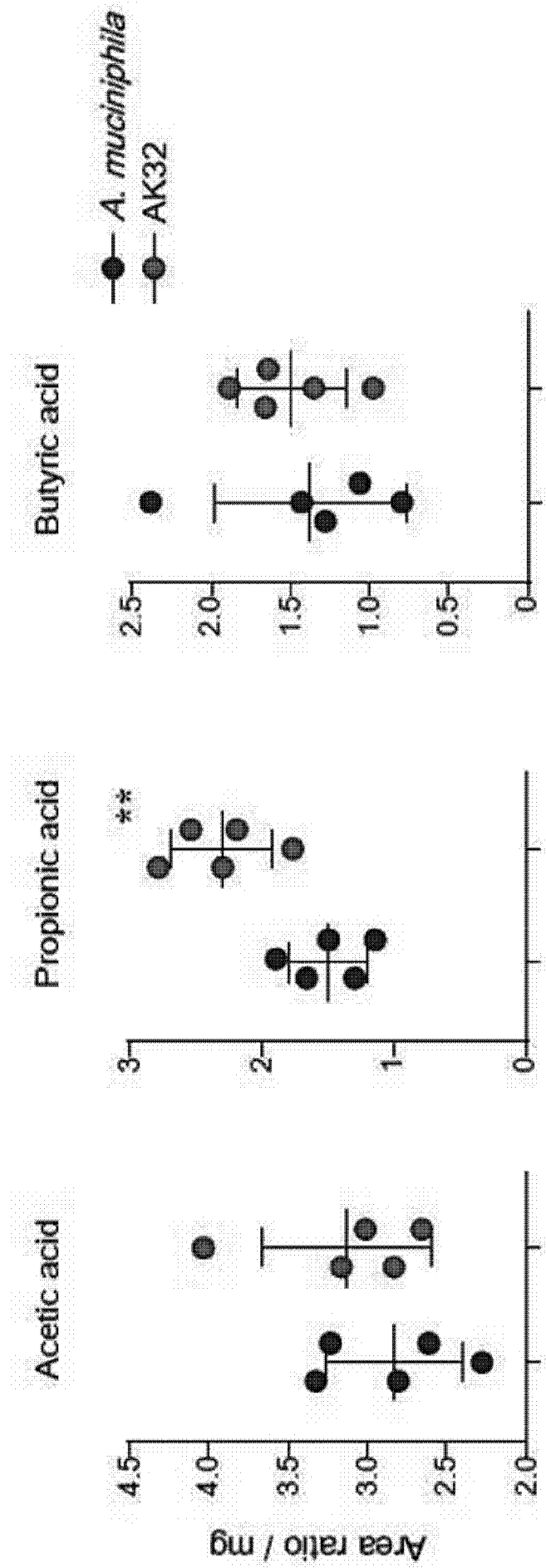
BAA-835 TAVIAGYYIATLAK
AK32    TAVIAGYYIATLAK
*****

```

[도4a]



[도4b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)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); A61K 35/741(2014.01); A61K 47/48(2006.01); A61K 8/99(2006.01); A61K 9/00(2006.01); A61K 9/127(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: 아커만시아 뮤시니필라 AK32 (Akkermansia muciniphila AK32), MMD (methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit), 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Disease, IBD), 크론병 (Crohn's disease), 장상피세포 (intestinal epithelial cell)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0103140 A (MD HEALTHCARE INC. et al.) 13 September 2017 (2017-09-13) See claims 1 and 3-5.	1-13,15,16
A	US 2018-0296613 A1 (SCHWEIZERISCHES FORSCHUNGSINSTITUT FUR HOCHGEBIRGSKLIMA UND MEDIZIN IN DAVOS) 18 October 2018 (2018-10-18) See entire document.	1-13,15,16
A	KR 10-2018-0053336 A (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN et al.) 21 May 2018 (2018-05-21) See entire document.	1-13,15,16
A	REUNANEN, J. et al. Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. Applied and Environmental Microbiology. June 2015, vol. 81, no. 11, pp. 3655-3662. See entire document.	1-13,15,16
☒ 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 "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 23 August 2021		Date of mailing of the international search report 23 August 2021
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

International application No.

PCT/KR2021/005747

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MACCHIONE, I. G. et al. Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders . European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2019, vol. 23, pp. 8075-8083. See entire document.	1-13,15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005747

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/005747

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.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/005747

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0103140	A	13 September 2017	None			
US	2018-0296613	A1	18 October 2018	CN	108367031	A	03 August 2018
				EP	3359171	A1	15 August 2018
				JP	2018-534277	A	22 November 2018
				US	10537597	B2	21 January 2020
				US	10960032	B2	30 March 2021
				US	2020-164003	A1	28 May 2020
				WO	2017-060698	A1	13 April 2017
KR	10-2018-0053336	A	21 May 2018	AU	2016-319221	A1	29 March 2018
				BR	112018004532	A2	11 December 2018
				CA	2998039	A1	16 March 2017
				CN	108289918	A	17 July 2018
				EA	201800199	A1	28 December 2018
				EP	3347030	A1	18 July 2018
				EP	3347030	B1	14 July 2021
				EP	3626081	A1	25 March 2020
				HK	1257222	A1	18 October 2019
				IL	257978	D0	31 May 2018
				JP	2019-500004	A	10 January 2019
				MX	2018002990	A	08 June 2018
				US	10736924	B2	11 August 2020
				US	2018-0250347	A1	06 September 2018
				US	2021-0015876	A1	21 January 2021
				WO	2017-042347	A1	16 March 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; C12R 1/01(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01); A61K 35/74(2014.01); A61K 47/48(2006.01); A61K 8/99(2006.01); A61K 9/00(2006.01); A61K 9/127(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: 아커만시아 뮤시니필라 AK32 (Akkermansia muciniphila AK32), MMD(methylmalonylCoA/oxaloacetate decarboxylase beta subunit), 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD), 크론병 (Crohn's disease), 장상피세포(intestinal epithelial cell)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0103140 A (주식회사 엠디헬스케어 등) 2017.09.13 청구항 1, 3-5	1-13,15,16
A	US 2018-0296613 A1 (SCHWEIZERISCHES FORSCHUNGSINSTITUT FUR HOCHGEBIRGSKLIMA UND MEDIZIN IN DAVOS) 2018.10.18 전체 문헌	1-13,15,16
A	KR 10-2018-0053336 A (위니베르시트카슬리프드루뱅크 등) 2018.05.21 전체 문헌	1-13,15,16
A	REUNANEN, J. 등, "Akkermansia muciniphila Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer", Applied and Environmental Microbiology, 2015.06, 81권, 11호, 페이지 3655-3662 전체 문헌	1-13,15,16
A	MACCHIONE, I. G. 등, "Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders", European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23권, 페이지 8075-8083 전체 문헌	1-13,15,16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 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 2021년08월23일(23.08.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년08월23일(23.08.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **14**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0103140 A	2017/09/13	없음	
US 2018-0296613 A1	2018/10/18	CN 108367031 A	2018/08/03
		EP 3359171 A1	2018/08/15
		JP 2018-534277 A	2018/11/22
		US 10537597 B2	2020/01/21
		US 10960032 B2	2021/03/30
		US 2020-164003 A1	2020/05/28
		WO 2017-060698 A1	2017/04/13
KR 10-2018-0053336 A	2018/05/21	AU 2016-319221 A1	2018/03/29
		BR 112018004532 A2	2018/12/11
		CA 2998039 A1	2017/03/16
		CN 108289918 A	2018/07/17
		EA 201800199 A1	2018/12/28
		EP 3347030 A1	2018/07/18
		EP 3347030 B1	2021/07/14
		EP 3626081 A1	2020/03/25
		HK 1257222 A1	2019/10/18
		IL 257978 D0	2018/05/31
		JP 2019-500004 A	2019/01/10
		MX 2018002990 A	2018/06/08
		US 10736924 B2	2020/08/11
		US 2018-0250347 A1	2018/09/06
		US 2021-0015876 A1	2021/01/21
		WO 2017-042347 A1	2017/03/16