(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 11 월 7 일 (07.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/228438 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 35/74 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A23L 33/195* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/017254

(22) 국제출원일: 2023 년 11 월 1 일 (01.11.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0057127 2023 년 5 월 2 일 (02.05.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **임영희 (LIM, Young Hee)**; 03730 서울특별시 서대문구 통일로25길 30, Seoul (KR). **조주영 (CHO, Joo Young)**; 54022 전라북도 군산시 구영6길 31, Jeollabuk-do (KR). **우희은 (WOO, Hee Eun)**; 06998 서울특별시 동작구 동작대로29길 110, Seoul (KR). **염지아 (YEOM, Ji Ah)**; 02853 서울특별시 성북구 고려대로 30, Seoul (KR).

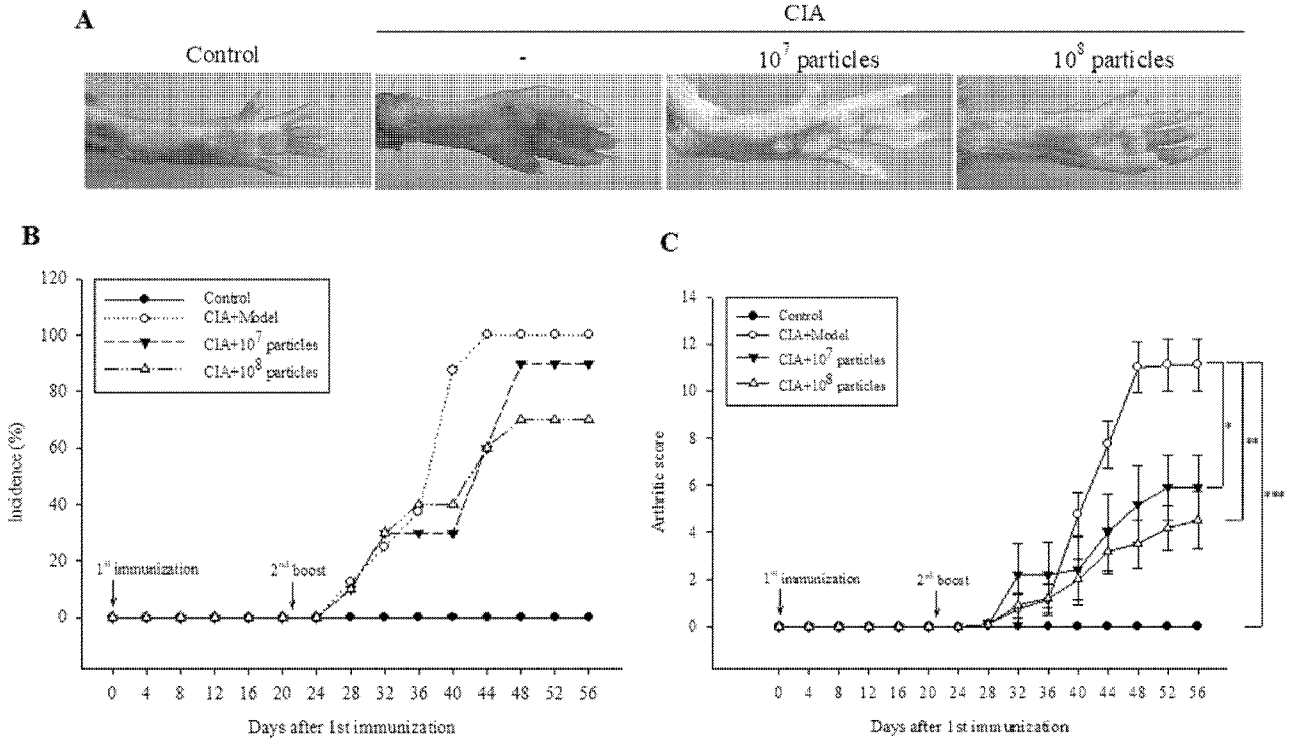
(74) 대리인: **특허법인(유)남아이피그룹 (NAM IP GROUP)**; 04516 서울특별시 중구 서소문로 95, 3층, Seoul (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,

WO 2024/228438 A1

(54) Title: COMPOSITION INCLUDING PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII MJ2 STRAIN-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES OR CHAPERONIN PROTEIN AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION, ALLEVIATION, OR TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 발명의 명칭: 프로피오니박테리움 프레우덴레키 ＭＪ２ 균주 유래 세포외 소포체 또는 샤페로닌 단백질을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition including Propionibacterium freudenreichii MJ2 strain-derived extracellular vesicles or chaperonin protein as an active ingredient for the prevention, alleviation, or treatment of rheumatoid arthritis. Specifically, the present invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of rheumatoid arthritis and a food composition for the prevention or alleviation of rheumatoid arthritis, each containing, as an active ingredient, extracellular vesicles or 60 kDa chaperonin protein (Cpn60) derived from *Propionibacterium freudenreichii* strain.

[다음 쪽 계속]

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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체 또는 샤페로닌 단백질을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60) 을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 프로피오니박테리움 프레우덴레키 ＭＪ２ 균주 유래 세포외 소포체 또는 샤페로닌 단백질을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체 또는 샤페로닌 단백질을 유효성분으로 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 류마티스 관절염은 관절 주위를 둘러싸고 있는 활막이라는 조직의 염증으로 인해 발생하는 질환으로 움직일 수 있는 거의 모든 관절에서 발생할 수 있으며 수개월에서 수년에 걸쳐 진행되는 만성 질환이다. 류마티스 관절염은 면역체계 이상으로 생기는 질환으로 관절 외에도 다양한 장기에 문제를 일으킬 수 있지만 가장 대표적인 초기 증상으로는 손과 발의 관절이 붓고 통증이 느껴지는 증상이 있으며 무릎이나 어깨, 팔꿈치나 턱관절에 증상이 나타나기도 한다. 또한, 관절 이외에 심장 및 혈관에 염증이 생길 수 있으며 간질성 폐질환이 나타날 수 있다고 알려져 있다.

[3] 파골세포(osteoclast)는 뼈를 파괴하고 흡수하는 세포로 다핵세포의 특징을 보인다. 파골세포는 염증반응에 의해 비정상적으로 분화되는데 염증 유도인자인 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)에 의해 유도되며 파골세포 전구세포 표면의 RANKL 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포로의 분화를 유도한다. 따라서 파골세포의 분화를 억제하는 것이 관절염을 예방, 치료하기 위한 표적이 될 수 있으며 파골세포의 분화 억제 물질은 관절염을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제가 될 수 있다.

[4] 현재 류마티스 관절염의 치료제로는 관절 손상을 방지할 수 있는 항류마티스제, 비스테로이드성 항염제 및 면역억제제 등이 사용되고 있다. 하지만 비스테로이드성 항염제는 통증을 완화시키는 효과를 보이지만 질병의 경과를 억제하지 못하고 장기간 복용 시 위장 장애를 일으킬 수 있으며, TNF-α 억제제와 같은 면역억제제는 잠복 결핵과 같은 부작용이 나타날 수 있다. 과거에 비해 현재 치료약제들의 효과가 향상되었음에도 불구하고 아직까지 약제들의 부작용 문제, 고비용 및 장기간 투여에 비해 치료효능이 미비한 문제가 여전히 남아있다.

[5] 그러므로 보다 효과적으로 류마티스 관절염 증상을 억제하면서 안전성을 가지며 치료학적 효과가 우수한 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[6] 한편, 세포외 소포체(Extracellular vesicles, EV)는 세포에서 방출되는 막 형태의 소포체를 의미한다. 세포외 소포체는 이중 인지질막으로 구성되어 있고, 그 안에는 핵산, 단백질, 지질 등이 포함되어 있다. 과거에는 이러한 세포외 소포체를 세

포가 분비하는 찌꺼기로 여겨졌으나 여러 연구를 통해 세포외 소포체가 세포 간 상호작용, 면역기능, 특정 질환에 대한 진단 등에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다. 따라서 세포외 소포체가 질병의 바이오마커로 개발되어 사용되고 있으나 그 자체의 효능을 이용하여 특정 질병의 치료제로 사용하는 기술에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 또한, 아직까지 프로바이오틱스 미생물에서 유래된 세포 외 소포체를 분리하여 이를 류마티스 관절염의 치료제로서 사용 가능함을 연구한 예가 없다.

[7] 이에 본 발명자들은 류마티스 관절염의 새로운 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 본 발명자들이 분리 및 동정한 바 있는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 세포외 소포체를 분리하였고, 상기 분리한 세포외 소포체 및 상기 소포체에 함유되어 있는 샤페로닌 단백질이 파골세포 분화 억제 효과가 우수하며, 콜라겐 유도 류마티스 관절염 마우스에 투여한 결과, 류마티스 관절염을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 따라서 본 발명의 목적은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은, 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[11] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2(*Propionibacterium freudenreichii* MJ2, 기탁번호 KCCM12272P) 균주일 수 있다.

[12] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은, 파골세포 분화 관련 인자의 발현 억제; 염증성 사이토카인의 생성 억제; 파골세포내 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 억제; IL-10의 발현 증가; 골미란(bone erosion) 개선; 또는 콜라겐 항원 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체 생성 억제; 활성을 갖는 것일 수 있다.

[13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포외 소포체는 상기 조성물 내에 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL 의 양으로 함유되어 있는 것일 수 있다.

[14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포외 소포체는 평균 입경이 150~200nm 일 수 있다.

[15] 또한 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2(*Propionibacterium freudenreichii* MJ2, 기탁번호 KCCM12272P) 균주일 수 있다.

[17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은, 파골세포 분화 관련 인자의 발현 억제; 염증성 사이토카인의 생성 억제; 파골세포내 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 억제; IL-10의 발현 증가; 골미란(bone erosion) 개선; 또는 콜라겐 항원 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체 생성 억제; 활성을 갖는 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포외 소포체는 상기 조성물 내에 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL 의 양으로 함유되어 있는 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포외 소포체는 평균 입경이 150~200nm 일 수 있다.

발명의 효과

[20] 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키(Propionibacterium freudenreichii) MJ2 균주로부터 분리된 세포외 소포체 및 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)은 파골세포 분화 관련 인자들의 발현을 억제할 수 있고, 염증성 사이토카인의 생성을 억제할 수 있으며, TRAP 활성 억제, IL-10 발현 증가, 골미란(bone erosion) 개선 및 콜라겐 항원 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체 생성 억제 활성을 모두 갖는 특징이 있을 뿐만 아니라 세포 독성 및 간독성을 야기하지 않아 체내 안정성이 있으므로, 과도한 면역반응 및 염증반응의 제어를 통한 류마티스 관절염의 예방, 개선 또는 치료용 의약품 및 건강기능식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체를 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체를 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

[23] 도 3은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체를 NTA(nanoparticle tracking analysis)로 측정한 결과이다.

[24] 도 4는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체에 대한 세포독성 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[25] 도 5는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 파골세포 분화 억제 활성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[26] 도 6은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 파골세포 분화 유도 인자 유전자 발현 억제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[27] 도 7은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 파골세포 분화 유도 인자 단백질 발현 억제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[28] 도 8은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 관절염 개선 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[29] 도 9는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 간독성 지표의 수준을 측정한 결과이다.

[30] 도 10은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 무릎 관절 손상 개선 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[31] 도 11은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 콜라겐 항원 특이적 항체 농도 감소 효과를 나타낸 결과이다.

[32] 도 12는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 염증성 사이토카인 발현 감소 및 항염증성 사이토카인 발현 증가 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[33] 도 13은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 파골세포 분화 유도 인자들의 유전자 발현 억제 및 파골세포 분화 억제 인자의 유전자 발현 증가를 나타낸 결과이다.

[34] 도 14는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 파골세포 분화 억제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[35] 도 15는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질을 합성 및 분리 정제한 결과를 나타낸 것이다.

[36] 도 16은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질에 대한 세포독성 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[37] 도 17은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질에 대한 파골세포 분화 억제 활성 결과를 나타낸 것이다.

[38] 도 18은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질에 대한 파골세포 분화 유도 인자들의 유전자 발현 억제 활성 결과를 나타낸 것이다.

[39] 도 19는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 관절염 개선 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[40] 도 20은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 간독성 지표의 수준을 측정한 결과이다.

[41] 도 21은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 골미란 개선 효과를 나타낸 결과이다.

[42] 도 22는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 콜라겐 항원 특이적 항체 농도 감소 효과를 나타낸 결과이다.

[43] 도 23은 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 염증성 사이토카인 발현 감소 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[44] 도 24는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 파골세포 분화 유도 인자들의 유전자 발현 억제 활성을 나타낸 결과이다.

[45] 도 25는 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 샤페로닌 단백질의 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델에서 파골세포 분화 억제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 본 발명은 류마티스 관절염을 효과적으로 개선 또는 치료할 수 있는 새로운 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 본 발명자가 원유로부터 분리 및 동정한 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)이 류마티스 관절염을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 활성이 있음을 최초로 규명하였다.

[47] 따라서 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[48] 구체적으로 상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키 균주는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2(*Propionibacterium freudenreichii* MJ2, 기탁번호 KCCM12272P) 균주일 수 있다.

[49] 본 발명에 따른 상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주는 경기도 김포 목장으로부터 조달된 원유에서 NGS(next generation sequencing) 방법으로 P. freudenreichii 균이 있음을 확인 후 YELA 배지를 사용하여 30℃, anaerobic condition에서 7일간 배양한 뒤, 단일 콜로니를 분리하는 과정을 통해 후보균주를 선정하여 16s rDNA 시퀀싱(universal primer : 1492R)을 이용하여 신규한 P. freudenreichii MJ2 균주를 본 발명자가 처음으로 분리하였고, 상기 균주를 2018년 06월 08일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여 KCCM 12272P 기탁번호를 부여받았다.

[50] 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주에 대한 류마티스 관절염 치료 효과를 갖는 약리학적 유효성분을 규명하기 위하여, 상기 균주 자체(생균체, 사균체), 균주의 배양물(균주를 포함하는 배양물), 균주의 배양액(균주를 제거한 배양액) 및 균주 배양액으로부터 분리된 세포외 소포체를 대상으로 파골세포의 분화 억제 정도를 분석하였다.

[51] 그 결과, 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 자체(생균체, 사균체)에 비해 상기 균주로부터 분리된 세포외 소포체의 파골세포 분화 억제 효과가 현저히 우수한 것으로 나타났고, 이러한 효과는 균주의 배양물(균주를 포함하는 배양물), 균주의 배양액(균주를 제거한 배양액)에 비해서도 우수한 것으로 나타났다.

[52] 이에 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체에 대하여, 류마티스 관절염을 개선, 예방 또는 치료할 수 있는지에 대해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[53] 본 발명의 일실시예에서는, 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주를 30℃에서 48시간 동안 배양한 후, 배양액을 4℃에서 10,000×*g*의 속도로 20분간 원심분리하여 상등액만을 수득한 다음, 여과지를 이용하여 100 kDa 이상의 세포외 소포체를 분리한 후, 이를 다시 4℃에서 150,000×*g*의 속도로 3시간 원심분리하여 상기 균주로부터 분리된 세포외 소포체를 수득하였다.

[54] 이후 상기 방법으로 수득한 세포외 소포체에 대한 특성을 분석하였는데, 분리된 본 발명의 세포외 소포체의 크기는 입경이 약 150~200nm, 바람직하게는 약 170nm 인 것으로 나타났고, 구형의 형태를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[55] 본 발명의 다른 일실시예에서는 상기 분리된 세포외 소포체에 함유된 단백질들을 프로테옴 분석을 통해 확인한 결과, 60 kDa chaperonin, Chain A, Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase 12S subunit 단백질 등 하기 표 1에 나타낸 20종류의 단백질들이 주를 이루고 있는 것을 확인하였고, 특히 60 kDa 샤페로닌(chaperonin) 단백질에 대한 류마티스 관절염 예방, 개선 및 치료 활성 여부를 확인하였다.

[56] 먼저, 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체에 대하여 파골세포 분화 억제 효능이 있는지 확인하기 위해, 대식세포주에 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 처리하여 파골세포 분화를 유도한 후, 본 발명의 세포외 소포체를 다양한 농도로 추

가로 처리한 다음, 파골세포 분화 마커의 발현수준 및 TRAP 활성화된 파골세포의 수를 분석하였는데, 그 결과, 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL 의 세포외 소포체를 처리한 군들은 세포외 소포체를 처리하지 않은 대조군에 비해 파골세포 분화가 억제되는 것으로 나타났다. 한편, 1×10^9 particles/mL 의 세포외 소포체를 처리한 군에서는 세포가 사멸되는 것으로 나타났다.

[57] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는, 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체를 콜라겐 유도 류마티스 관절염 마우스에 투여 후(세포외 소포체는 1×10^7 particles/mL 및 1×10^8 particles/mL의 양으로 투여), 질환의 개선 여부를 관찰하였는데, 그 결과, 육안 관찰에서도 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체를 투여한 군에서 류마티스 관절염의 증상이 개선되는 것을 확인할 수 있었고, 골미란 및 무릎 관절의 손상을 완화시키는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 류마티스 관절염 유발 시, 혈액 내 생성이 촉진된 콜라겐 항원 특이적 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체의 농도가 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[58] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체가 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료할 수 있는 효과가 있음을 확인하였고, 이러한 효과를 위한 본 발명의 세포외 소포체의 처리양은 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL이 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

[59] 뿐만 아니라 본 발명의 다른 일실시예에서는, 세포외 소포체에서 확인된 주된 단백질인 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 합성하였고, 상기 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)에 대한 파골세포 분화 억제 활성을 분석한 결과, 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60) 역시 파골세포의 분화를 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

[60] 상기 60 kDa 샤페로닌 단백질은 진핵세포 및 원핵세포에 필수 불가결한 진화 단계에서 보존된 단백질로서 고유의 단백질 접힘 기능 이외에 수용체로서 세포 내외에서 리간드와 결합 및 세포 간 신호전달 물질로 작용함이 알려져 있으나, 아직까지 60 kDa 샤페로닌 단백질이 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료할 수 있다는 내용에 대해서는 연구된 바가 없다.

[61] 나아가 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체 및 60 kDa 샤페로닌 단백질이 류마티스 관절염을 실제적으로 치료할 수 있는 약리학적 효능이 있는지 확인하기 위해, 본 발명의 세포외 소포체 및 60 kDa 샤페로닌 단백질을 각각 투여한 마우스에 콜라겐을 투여하여 류마티스 관절염을 유도한 후, 각 마우스의 관절염 질환지수를 분석하였다.

[62] 그 결과, 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질의 투여 없이 류마티스 관절염이 유발된 마우스는 시간이 경과함에 따라 관절염 질환지수가 증가하여 증상이 악화되는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로

닌 단백질을 투여한 군에서는 관절염 질환지수가 현저하게 감소되어 류마티스 관절염 증상이 완화되는 것으로 나타났다.

[63] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질이 류마티스 관절염을 예방 및 개선할 수 있음을 알 수 있었다.

[64] 또 다른 일실시예에서는, 류마티스 관절염 발병 시 나타나는 증상인 골미란, 즉 염증을 유발하는 세포가 뼈 표면을 갉아먹어 골이 녹아 내리거나 깊이 패이는 증상이 나타나는데, 이러한 골미란 증상을 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질이 완화시킬 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다.

[65] 그 결과, 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질을 투여한 마우스 군에서는 이를 투여하지 않은 대조군에 비해 골미란 영역이 현저하게 감소되어 있는 것으로 나타났고, 관절무릎 손상도 완화되는 것을 확인하였다.

[66] 또한, 본 발명자들은 혈청학적으로 자가면역질환인 류마티스 관절염 증상 정도를 확인하기 위하여 혈장 내에서 콜라겐 항원 특이적 IgG의 양을 측정한 결과, 류마티스 관절염이 유발된 대조군 마우스의 혈장 내에서는 콜라겐 항원 특이적 IgG 항체들의 생성이 증가되어 있는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질을 투여한 마우스 군에서는 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체의 농도가 질병 대조군에 비해 현저하게 감소되어 있는 것으로 나타났다.

[67] 또한, 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질을 투여한 마우스 군에서는 질병 대조군에 비해 염증성 사이토카인의 생성 수준도 현저하게 감소된 것으로 나타났으며, 반면 항염증성 사이토카인인 IL-10의 발현은 증가시키는 것으로 나타났다.

[68] 이러한 결과는 본 발명의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질이 과도한 면역반응 및 과도한 염증반응을 억제할 수 있음을 의미하며, 면역반응 및 염증반응의 제어를 통해 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[69] 그러므로 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[70] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[71] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[72] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[73] 본 발명에서 "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[74] 본 발명에서 "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 류마티스 관절염과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[75] 본 발명의 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 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[76] 본 발명에 다른 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 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[77] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 ㎏ 당 0.001 내지 150 ㎎, 바람직하게는 0.01 내지 100 ㎎을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 류마티스 관절염의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[78] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 류마티스 관절염의 예방, 조절 또는 치료 방법을 제공한다.

[79] 본 발명에서 "개체"란 질병의 예방, 조절 또는 치료방법을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[80] 또한 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[81] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 류마티스 관절염의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시 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 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[82] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 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.

[83] 본 발명의 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 ㎖당 일반적으로 약 0.01 내지 0.20 g, 바람직하게는 약 0.04 내지 0.10 g 이다.

[84] 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, 탄산음료에 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 내지 0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[85] 또한 본 발명의 일실시예에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)은 염증성 사이토카인의 생성을 억제하는 효과가 있어, 이를 이용할 경우 항염 활성을 갖는 화장료 조성물로 사용할 수 있다.

[86] 따라서 본 발명은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 포함하는 항염용 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[87] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60) 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[88] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 본 발명의 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[89] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[90] 하기 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[91]

[92] <실시예 1>

[93] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체 분리

[94] 본 발명에서 사용한 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 균주는 본 발명자가 한국미생물보존센터에 2018.06.08.일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12272P를 부여받은 균주를 사용하였다. *P. freudenreichii* MJ2는 경기도 김포 목장 유래 원유(raw milk)에서 선택배지(YELA)를 이용하여 single colony를 분리하는 과정을 통해 후보 균주를 선정한 뒤, 16s rDNA sequencing을 이용해 동정한 균이다.

[95] 본 발명자들은 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 균주로부터 세포외 소포체를 분리하기 위하여, 배지 YELA에 2차례 이상 활성화시킨 MJ2 균을 접종 후, GasPak(BD, Franklin lakes, NJ, USA)을 이용해 혐기 환경을 조성하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 균액을 4℃에서 10,000×*g* 속도로 20분간 원심분리시켜 상등액만을 0.22 μm 진공 필터로 여과시켰다. 이후 MWCO(molecular weight cutoff) 100 kDa의 필터로 한외여과(ultrafiltration, Amicon® Stirred Ultrafiltration Cell, Millipore, USA)하여 100 kDa 이상의 세포외 소포체를 분리하였다. 이후 분리 및 농축된 용액을 0.22 μm 진공 필터로 다시 여과시켜 노폐물 및 세포 잔해들을 제거하였고, 수득한 용액을 4℃에서 150,000×*g* 속도로 3시간 동안 초원심분리(ultracentrifugation, CP100WX, Hitachi, Tokyo, Japan) 하여 세포외 소포체를 분리하였다. 또한 펠렛을 생리식염수(PBS, Phosphate-buffered saline)에 재현탁한 후 4℃에서 150,000×*g* 속도로 3시간 동안 다시 초원심분리하여 배지성분을 제거함으로써 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 균주로부터 세포외 소포체를 수득하였다.

[96]

[97] <실시예 2>

[98] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체의 확인

[99] 상기 <실시예 1>에서 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체의 확인을 위해 NTA(nanoparticle tracking analysis), 주사전자현미경(scanning electron microscope; SEM)과 투과전자현미경(transmission electron microscope; TEM)을 이용하여 크기와 형태를 분석하였다.

[100]

[101] 그 결과, 도 1 내지 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명에서 분리된 세포외 소포체의 크기는 약 170 nm인 것으로 확인되었으며 구형의 형태를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

[102]

[103] <실시예 3>

[104] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체의 단백질 동정

[105] 본 발명자들은 본 발명에서 분리한 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체의 프로테옴 분석을 위해, 인-솔루션(in-solution) 트립신 단백질 분해 방법을 이용하였다. 구체적으로 상기 <실시예 1>에서 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체 100 μg을 8 M Urea(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 1% 프로테아제 억제제(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 혼합한 분해용액으로 용해시킨 후, 8 M Urea와 25 mM DTT(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 60℃에서 45분간 변성 및 환원반응을 수행하였다. 이후 샘플을 냉각시키고 25 mM 중탄산 암모늄 (ammonium bicarbonate)에 용해된 25 mM 요오드아세트아미드(iodoacetamide)용액을 첨가하고 빛이 차단된 상태로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Urea는 25 mM 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate)으로 1 M 농도가 되도록 희석하였고 8배 희석된 단백질은 Pierce trypsin protease(MS grade, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 밤새도록 37°C에서 분해 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 샘플은 C_{18} 컬럼 (Oasis® HLB 1 cc Vac cartridges, Waters Corporation, MA, USA)을 이용하여 염을 제거하였고, 나노 질량 분석(Nano-LC-MS/MS)은 Easy n-LC(Thermo Fisher San Jose, CA, USA)와 LTQ Orbitrap XL mass spectrometer(Thermo Fisher, San Jose, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 상기 인-솔루션 분해방법으로 수득한 MJ2 균주 유래 세포외 소포체의 분해 펩타이드를 3 μm 기공 크기의 C_{18} nanobore 컬럼 (150 mm × 0.1 mm)에 로딩한 다음, 다음과 같은 조건으로 단백질들을 분리하였다: 0-40% 버퍼 B 80분, 40-60% 버퍼 B 4분, 95% 버퍼 B 4분, 100% 버퍼 A 6분; flow rate 500 nl/min (버퍼 A 조성: 0.1% formic acid, 3% acetonitrile in H_2O, 버퍼 B 조성: 0.1% formic acid in acetonitrile).

[106] 또한 질량 스펙트럼은 전체 질량 스캔(350-1200 m/z) 후, 10개의 MS/MS 스캔과 함께 데이터 종속 획득을 사용하였으며, MJ2 균주 유래 세포외 소포체에 존재하는 단백질의 분석은 마스코트 알고리즘 (Matrixscience, USA)을 사용하여 단백질 서열 데이터베이스에 존재하는 펩타이드 서열을 확인하였다.

[107] 상기와 같은 방법으로 세포외 소포체에 대한 프로테옴 분석 결과, 하기 표 1에 기재된 20개의 단백질들이 동정되었고, 60 kDa chaperonin, Chain A, Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase 12S subunit 단백질이 주를 이루고 있는 것을 알 수 있었다.

[108] [표1]

세포외 소포체에 대한 프로테옴 분석

Accession	Protein description	Protein score	Monoisotopic mass (Mr)	pI
CEH03981.1	60 kDa chaperonin 1 (Protein Cpn60 1) (groEL protein 1) (Heat shock protein 60 1)	362	56244	4.70

pdb|1ON3|A	Chain A, Methylmalonyl-CoA carboxyltransferase 12S subunit	334	334	5.38
AAA25676.1	methylmalonyl-CoA carboxyltransferase subunit 12S monomer	289	66057	5.22
pdb|1RR2|A	Chain A, transcarboxylase 5S subunit	164	52623	5.64
CEH00767.1	penicillin-binding protein (peptidoglycan glycosyltransferase)	130	75382	7.71
CEH00696.1	iron-sulfur protein	107	57776	6.75
CEH01375.1	dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase	86	32123	5.34
CEH02479.1	surface layer protein A (S-layer protein A)	78	58552	4.69
CEH00694.1	Hypothetical protein PFCIRM127_12145	77	23227	4.70
CEH00758.1	Carboxylic ester hydrolase	74	46724	5.38
CEH00733.1	Methylmalonyl-CoA carboxytransferase, 1.3S subunit (Transcarboxylase, 1.3S subunit). 123bp	73	12360	5.39
CEH02032.1	Enolase 1	66	46005	4.47
CEH02295.1	50S ribosomal protein L2	57	30408	11.08
CEH04045.1	Hypothetical protein PFCIRM125_11275	44	10739	6.59
CEH00999.1	dihydrolipoyllysine-residue (2-methylpropanoyl)transferase. Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex (E2) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase)	42	48357	5.58
CEH00698.1	Oxidoreductase	39	29476	5.56
CEH00239.1	Putative minor extracellular serine protease	39	150361	5.25
CEH01003.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha (Branched-chain alpha-keto aci	38	40647	4.60

	d dehydrogenase E1 component alpha chain) (BCKDH E1-alpha)			
CEH02678.1	Hypothetical protein PFCIRM125_06735	35	35910	5.29
CEH01770.1	polar amino acid ABC transporter, binding protein component	33	31672	4.84

[109]

[110] <실시예 4>

[111] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체 처리에 따른 세포독성 여부 분석

[112] 본 발명에 따른 *Propionibacterium freudenreichii* MJ2 유래 세포외 소포체에 대한 세포독성 여부를 확인하기 위해, Raw 264.7 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 cells/mL의 세포수로 분주한 후 37℃ 온도의 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 Raw 264.7 세포에 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 무혈청 배지로 희석한 본 발명의 세포외 소포체를 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9 particles/mL로 각각 처리하여 4일 동안 배양하였다. 그 후, MTT 시약을 사용하여 SpectraMax 340PC384 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 세포 생존율을 측정하였다.

[113]

[114] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 세포외 소포체를 처리하지 않은 DMEM 배지로 배양된 대조군과 비교한 결과, 세포외 소포체를 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ particles/mL로 처리한 실험군에서는 90% 이상의 세포 생존율을 보이는 것을 확인함에 따라 본 발명자들은 본 발명의 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 세포체가 세포에 독성을 야기하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[115]

[116] <실시예 5>

[117] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체의 파골세포 분화 억제능 분석

[118] 본 발명자들은 상기 <실시예 1>에서 분리한 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체가 파골세포 분화 억제 활성이 있는지를 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[119]

[120] <5-1> TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성화된 파골세포 수의 억제

[121] 대식세포 세포주인 Raw 264.7 세포를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지로 배양하였다. 상기 배지에는 10% FBS와 100 units/mL penicillin과 100 μg/mL streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 배양은 37℃에서 5% CO_2 -95% 공기 조성으로 배양하였다. 세포가 80% 컨플루언트하게 자라면 스크래퍼

(scrapper)를 이용하여 세포를 배양 플레이트로부터 떼어내고, 1×10^4 cells/mL의 세포수로 조정하여 37℃ 배양기에서 하루 동안 안정화시킨 다음, 10% FBS, 100 units/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 α-MEM(Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification) 배지로 교체하였다. 교체한 배지에는 50 ng/mL의 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)를 희석하여 처리함으로써 상기 대식세포를 파골세포로 분화 유도하였다. 이후 본 발명에 따른 세포외 소포체를 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 particles/mL로 각각 추가로 처리한 다음 4일 동안 배양하였다.

[122] 이후, 각 실험 세포군에서 파골세포의 표지 물질인 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase)의 활성을 확인하기 위해 TRAP 염색방법으로 분화된 파골세포의 수를 측정하였다. 이를 위해 과정을 수행한 세포의 상등액은 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후, 세포를 고정시켰다. TRACP & ALP Assay Kit(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 고정시킨 세포를 37℃에서 30분간 염색하였다. 상등액을 제거하고 세포를 증류수로 세척한 후, 광학현미경을 통해 핵이 3개 이상인 파골세포, 즉 분화된 파골세포를 관찰하였다.

[123]

[124] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 세포외 소포체를 처리한 군의 경우, RANKL만 처리하고 세포외 소포체를 처리하지 않은 대조군에 비해 TRAP 활성화된 파골세포의 수가 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타났다.

[125] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체가 파골세포의 분화를 억제하는 활성이 있음을 알 수 있었다.

[126]

[127] <5-2> 파골세포 분화 유도 인자의 유전자 발현억제

[128] 실시예 <5-1>과 동일한 방법으로 배양된 세포로부터 세포의 상등액을 제거하고 Ribo-Ex(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 각 세포 실험군으로부터 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 Revert Aid First Strand cDNA kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하였고, KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, Foster City, CA, USA) 시약으로 QuantStudio 6 Flex (Life Technologies, Thermo Scientific) 기기를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였으며, 이때 사용한 프라이머의 정보는 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

[129] [표2]

실시간 PCR에 사용한 각 유전자에 대한 프라이머 정보

유전자	Forward (5′-3′)	Reverse (5′-3′)
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CACATTGGGGGTAGGAACAC

RANK	TGCAGCTCAACAAGGATACG	GAGCTGCAGACCACATCTGA
NFκB	TCCTGGCCTCTAGCCTTGTA	GCCAAGGAAGAAAAGTGCTG
c-fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
NFATc1	GGTGCTGTCTGGCCATAACT	GCGGAAAGGTGGTATCTCAA
Calcr	CGGACTTTGACACAGCAGAA	GTCACCCTCTGGCAGCTAAG
Ctsk	CAGCTTCCCCAAGATGTGAT	AGCACCAACGAGAGGAGAAA
Atp6v0d2	GACCCTGTGGCACTTTTTGT	GCTTGCATTTGGGGAATCTA

[130] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 세포외 소포체를 1×10^7 particles/mL 및 1×10^8 particles/mL로 처리한 군은 RANKL만 처리한 대조군에 비해 파골세포 분화를 촉진하는데 관여하는 유전자들의 발현양이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

[131]

[132] <5-3> 파골세포 분화 유도 인자의 단백질 발현억제

[133] 상기 실시예 <5-2>에서 실험에 사용한 세포를 대상으로 4℃의 온도에서 2,500×*g*의 속도로 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 세포를 얻었다. Cold-PBS(생리식염수)로 세포를 세척하고, RIPA lysis buffer(BYLABS, Korea) 및 1% 프로테아제 억제제 칵테일(Thermo Scientific)을 사용하여 세포를 얼음에 15분간 두어 용해시켰다. 용해시킨 세포를 4℃의 온도에서 14,000×*g*의 속도로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 단백질 시료로 삼았다. Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific)를 통해 단백질 양을 정량하였고, 100℃에서 변성시킨 후, 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 단백질 10 μg을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 로딩하여 SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF 막에 옮긴 다음 특정 항체를 이용하여 반응시키고 UVP ChemStudio (Analytik, Jena, Germany)를 통해 단백질 밴드를 확인하였다.

[134] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, RANKL 처리로 파골세포 분화를 촉진시켜 류마티스 관절염을 유도한 대조군이 RANKL 처리 없이 류마티스 관절염을 유도하지 않은 군에 비해 c-fos, RANK, NFATc1의 발현양이 유의하게 높아진 것으로 나타난 반면, 본 발명의 세포외 소포체를 투여한 실험군들은 세포외 소포체를 투

여하지 않은 군에 비해 c-fos, RANK, NFATc1의 발현양이 농도 의존적으로 유의하게 감소되어진 것을 확인할 수 있었다.

[135] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에 따른 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체는 류마티스 관절염의 주요 원인에 되는 파골세포 분화를 야기하는 유전자의 발현을 억제할 수 있을 뿐만아니라 파골세포 분화에 관여하여 단백질의 발현도 억제할 수 있어, 파골세포 분화에 의한 류마티스 관절염의 발병을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[136]

[137] <실시예 6>

[138] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체 투여에 따른 류마티스 관절염 개선 효과 확인

[139]

[140] <6-1> 콜라겐-유도 류마티스 관절염(CIA) 마우스의 제조

[141] 콜라겐 유도 류마티스 관절염 마우스 모델로 8주령의 male DBA/1J 마우스 (중앙실험동물, Seoul, Korea)를 이용하였다. 1주간 적응 후 그룹당 8마리로 무작위적으로 그룹화한 후, 관절염을 유도하지 않고 PBS를 투여한 그룹(Control), 관절염을 유도한 후 PBS를 투여한 그룹(Model), 관절염을 유도한 후 *P. freudentreichii* MJ2 유래 세포외 소포체 저농도 1×10^7 particles/mouse를 투여한 그룹 (Low-dose Extracellular Vesicles; LDEV), 관절염을 유도한 후 *P. freudentreichii* MJ2 유래 세포외 소포체 고농도 1×10^8 particles/mouse 를 투여한 그룹(High-dose Extracellular Vesicles; HDEV)으로 나누었다. 관절염 유도는 제2형 Bovine collagen (2 mg/mL)을 complete Freund's Adjuvant(CFA, 1mg/mL)와 1:1로 에멀젼화 시킨 후, 꼬리 피내에 주사하여 첫 번째 면역(1st immunization)을 진행하고 3주 후 제2형 Bovine collagen (2 mg/mL)을 incomplete Freund's Adjuvant(IFA)와 1:1로 멀젼화 시킨 후 꼬리 피내에 주사하여 두 번째 면역(2nd boost)을 유도하였다. 관절염을 유도한 후, 부어오르는 증상 및 염증이 심한 정도를 관절염 질환지수(Arthritic score) 기준(하기 표 3)에 따라 육안적으로 평가하여 점수를 나타내었다.

[142] [표3]

관절염 질환지수(Arthritic score) 기준

0점	부종, 발적, 종창 등 관절염의 증상이 관찰되지 않음
1점	한 두 개의 종창을 동반한 홍조를 띠거나 경한 상태의 부종과 발적 발생
2점	두 군데 이상에서 확실한 홍조를 띠거나 부종, 종창 발생
3점	발가락에서 발목 전 부위에 걸쳐 상당한 부종과 종창 발생, 자유로이 움직이지 못함

[143] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 PBS를 투여하며 관절염을 유도한 그룹에서 가장 심한 관절염 증상이 나타났으며, *P. freudenreichii* MJ2 균주 유래 세포외 소

포체를 투여하며 관절염을 유도한 그룹은 육안적으로 유의하게 관절염 증상 완화 효과를 보였다.

[144]

[145] <6-2> 콜라겐-유도 류마티스 관절염(CIA) 마우스의 간독성 지표 분석

[146] 간독성 지표인 AST(아스파테이트아미노전이효소), ALT(알라닌아미노전이효소)를 혈청에서 측정한 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 각 실험군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명에서 사용한 세포외 소포체 투여 농도 범위 내에서는 마우스 동물에 간독성을 야기하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[147]

[148] <6-3> 본 발명에 따른 세포외 소포체 투여에 따른 류마티스 관절염 마우스 모델에서 골미란(Bone erosion)에 미치는 효과 분석

[149] 무릎관절의 골미란 및 손상을 비교하기 위해 H&E 염색분석을 진행한 결과, 본 발명의 세포외 소포체 투여에 의해 무릎관절의 손상이 감소한 것으로 나타났으며, 류마티스 관절염 마우스에 세포외 소포체를 투여했을 때, 골미란 및 무릎 관절 손상을 완화 시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 10).

[150]

[151] <6-4> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 본 발명의 세포외 소포체 투여에 따른 콜라겐 항원 특이적 igG, IgG1, IgG2a 항체 농도 분석

[152] 상기 실시예 <6-1>에서 사용한 마우스의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체 농도를 ELISA 방법을 통해 측정하였다.

[153] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 관절염 유발 시 혈액 내 콜라겐 항원 특이적 IgG 항체들의 생성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었으며, 반면 본 발명의 세포외 소포체를 투여한 군에서는 콜라겐 항원 특이적 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체의 농도가 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

[154]

[155] <6-5> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 본 발명의 세포외 소포체 투여에 따른 면역반응과 염증성 사이토카인의 변화 분석

[156] 상기 실시예 <6-1>에서 사용한 마우스로부터 혈액을 채취하고 혈청을 사용하여 각 그룹별 염증성 사이토카인인 TNFα 및 IL-6의 수준을 ELISA 방법으로 분석하였고, IL-17의 mRNA 발현양은 quantitative real-time PCR 방법으로 분석하였다. 또한 항염증성 사이토카인인 IL-10의 양을 ELISA 방법을 통해 측정하였다.

[157] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 염증성 사이토카인인 TNFα, IL-6 및 IL-17의 수준은 류마티스 관절염 유발군에 비해 본 발명의 고농도의 세포외 소포체를 투여한 군에서 현저하게 감소된 것으로 나타났다. IL-10의 경우, 본 발명의 고농도의 세포외 소포체를 투여한 군에서 증가하는 경향을 보였다.

[158] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 세포외 소포체의 투여는 류마티스 관절염에 의한 과도한 면역반응을 억제할 수 있고, 염증성 사이토카인

의 수준을 억제시킬 수 있고 항염증성 사이토카인의 수준을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[159]

[160] <6-6> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 세포외 소포체 투여에 따른 파골세포 분화에 미치는 영향 분석

[161] 상기 실시예 <6-1>에서 사용한 마우스로부터 윤활막 조직(synovium tissue)을 분리하고 상기 조직 내에서 파골세포 분화와 관련된 인자들인 Nuclear factor of activated T cells 1(NFATc1), Cathepsin K(Ctsk), Calcitonin receptor(Calcr), Matrix metallopeptidase 9(MMP9), Osteoprotegrin(OPG) 및 Receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL)의 상대적 mRNA 발현양을 quantitative real-time PCR로 분석하였다.

[162] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, NFATc1, Ctsk, Calcr, MMP9의 발현양은 류마티스 관절염을 유발하지 않은 군에 비해 류마티스 관절염을 유발한 군에서 유의하게 증가한 것으로 나타난 반면, 본 발명의 세포외 소포체를 투여군의 경우 NFATc1 및 MMP9의 발현양은 모든 농도에서 유의하게 감소한 것으로 나타났으며 Ctsk 및 Calcr의 발현양은 고농도에서 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 또한 파골세포의 분화를 억제하고 조골세포(Osteoblast)의 분화를 촉진하는 Osteoprotegrin(OPG)/RANKL 발현량 비율은 고농도의 *P. freudenreichii* MJ2 균주 유래 세포외 소포체를 투여한 그룹에서 유의하게 증가하였다.

[163] 또한, 무릎관절 조직을 TRAP 염색하여 적자색으로 나타나는 TRAP 양성 세포수(osteoclast)를 분석한 결과, 류마티스 관절염을 유발하지 않은 군에 비해 류마티스 관절염 유발군에서 TRAP 양성 세포수가 월등히 증가한 것으로 나타났다. 한편, 본 발명의 세포외 소포체를 투여한 군은 류마티스 관절염 유발군에 비해 TRAP 양성 세포수가 현저하게 감소된 것으로 나타났다(도 14참조).

[164] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 본 발명의 세포외 소포체가 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있고 염증반응을 개선할 수 있어, 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[165]

[166] <실시예 7>

[167] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 세포외 소포체에 함유된 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)의 제조

[168] 상기 <실시예 3>에서 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 세포외 소포체에 함유된 주요 단백질을 프로테옴 분석을 통해 확인하였고, 상기 표 1에서 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)이 세포외 소포체에 주요 인자로 함유되어 있음을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 당업계에 알려진 ExiProgen™ EC Protein Synthesis Kit

및 ExiProgen™ 장비 (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 합성하였고, 합성된 Cpn60 단백질을 분리 및 정제하였다.

[169]

[170] 그 결과, 상기 합성된 Cpn60 단백질을 정제한 결과를 SDS-PAGE 및 Coomassie blue 염색을 통해 확인하였는데, 도 15에 나타낸 바와 같이, 상기 과정을 통해 약 60 kDa 근처에서 정제한 Cpn60 단백질을 확인할 수 있었다.

[171]

[172] <실시예 8>

[173] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 60 kDa 샤페로닌 단백질 (Cpn60)의 세포독성 여부 분석

[174] 상기 <실시예 7>에서 정제한 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)에 대한 세포독성 여부를 분석하였다. 이를 위해 Raw 264.7 세포주에 RANKL 50 ng/ml을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하면서 Cpn60 단백질을 1.25~5 μg/ml 농도별로 처리 후, MTT 방법을 이용하여 세포 독성 여부를 분석하였다.

[175]

[176] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이 본 발명의 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 처리한 모든 처리 농도범위 내에서는 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[177]

[178] <실시예 9>

[179] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 60 kDa 샤페로닌 단백질 (Cpn60)의 TARP 효소 활성 억제 분석

[180] Raw 264.7 세포주에 RANKL 50 ng/ml을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하면서 Cpn60 단백질을 4일간 처리한 후, 파골세포 분화 마커인 TRAP 효소를 염색하여 관찰하였다.

[181]

[182] 그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, Cpn60 단백질을 처리한 군은 파골세포의 분화 마커인 TRAP 효소의 활성이 유의하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[183]

[184] <실시예 10>

[185] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 60 kDa 샤페로닌 단백질 (Cpn60)의 파골세포 분화 관련 유전자들의 발현 억제능 분석

[186] Raw 264.7 세포주에 RANKL 50 ng/ml을 처리하여 파골세포로 분화를 유도하면서 Cpn60을 3일간 처리한 후, 각 실험군의 세포로부터 RNA를 추출하여 파골세포 분화 관련 유전자들의 발현양의 변화를 실시간 PCR을 통해 분석하였다.

[187]

[188] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, Cpn60 단백질을 처리한 군은 RANKL만을 처리한 군에 비해 파골세포 분화와 관련된 유전자들인 RANK, NFκB, c-fos,

NFATc1, Calcr, Ctsk, Atp6v0d2의 발현양이 모두 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타났다.

[189]

[190] <실시예 11>

[191] 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주 유래 60 kDa 샤페로닌 단백질 투여에 따른 류마티스 관절염 개선 효과 확인

[192]

[193] <11-1> 콜라겐-유도 류마티스 관절염(CIA) 마우스의 제조

[194] 콜라겐 유도 류마티스 관절염 마우스 모델로 8주령의 male DBA/1J 마우스(중앙실험동물, Seoul, Korea)를 이용하였다. 1주간 적응 후 그룹당 14마리로 무작위적으로 그룹핑한 후, PBS를 먹인 후 관절염을 유도하지 않은 그룹(Control), PBS를 먹인 후 관절염을 유도한 그룹(Model), *P. freudenreichii* MJ2 유래 surface protein fraction (1 mg/kg/mouse) 투여 후 관절염을 유도한 그룹(SP), Cpn60 (0.1 mg/kg/mouse) 투여 후 관절염을 유도한 그룹(Cpn60)으로 나누었다. 각 시료를 관절염 유도 전, 3주간 구강(Control 및 model 그룹) 및 복강투여(SP 및 Cpn60 그룹)를 통해 DBA/1 마우스에 직접 주입하고 콜라겐으로 관절염을 유도하였다. 관절염 유도는 제2형 Bovine collagen을 complete Freund's Adjuvant(CFA)와 1:1로 에멀젼화 시킨 후, 꼬리 피내에 주사하여 첫 번째 면역(1st immunization)을 진행하고 3주 후 제2형 Bovine collagen을 incomplete Freund's Adjuvant(IFA)와 1:1로 멀젼화 시킨 후 꼬리 피내에 주사하여 두 번째 면역(2nd boost)을 유도하였다. 관절염을 유도한 후, 부어오르는 증상 및 염증이 심한 정도를 관절염 질환지수(Arthritic score) 기준(상기 표 3)에 따라 육안적으로 평가하여 점수를 나타내었다.

[195] 관절염 동물 모델 실험의 경우 in vitro 평가에서 파골세포 분화 억제 효과를 보인 *P. freudenreichii* MJ2 균주로부터 분리한 surface proteins fraction(SP)을 함께 사용하여 효과를 평가하였다.

[196]

[197] 그 결과, 도 19에 나타낸 바와 같이 PBS를 투여하고 관절염을 유도한 군이 가장 심한 관절염 증상을 보이는 것으로 나타났고, SP를 투여한 군은 CIA 유도 56일째에 통계적으로 관절염 증상이 유의하게 감소하였으며, Cpn60 투여군은 CIA 유도 50, 53, 56일째에 통계적으로 유의한 차이를 보이며 관절염 증상이 감소하는 것으로 나타났다.

[198]

[199] <11-2> 콜라겐-유도 류마티스 관절염(CIA) 마우스의 체중 및 간독성 지표 분석

[200] 상기 실시예 <11-1>에서 사용한 각 동물 실험군에 대해, 체중 변화를 일주일 간격으로 측정한 결과 대조군과 비교하여, 콜라겐 주입으로 관절염을 유발한 군은 체중이 유의하게 감소하였으나, 콜라겐을 주입하여 관절염을 유발시킨 군들 간에는 유의한 체중 변화의 차이는 보이지 않았다(표 4).

[201] [표4]

체중변화

그룹	초기 무게(mg)	최종 무게(mg)
Control	24.278±0.798	27.389±1.438
Model	23.511±1.355	23.267±1.669***
SP	23.667±1.209	23.989±1.801***
Cpn60	23.100±1.503	23.478±1.138***

[202] ***p<0.000, compared with the control group

[203]

[204] 또한, 간독성 지표인 AST(아스파테이트아미노전이효소), ALT(알라닌아미노전이효소)를 혈청에서 측정한 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 각 실험군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명에서 사용한 SP 및 Cpn60의 투여 농도 범위 내에서는 마우스 동물에 간독성을 야기하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[205]

[206] <11-3> 본 발명에 따른 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)투여에 따른 류마티스 관절염 마우스 모델에서 골미란(Bone erosion)에 미치는 효과 분석

[207] 상기 실시예 <11-1>에서 사용한 마우스 군들에 대하여 류마티스 관절염에 의한 골미란 증상을 확인하기 위해 마우스 뒷발을 micro-CT를 이용하여 분석하였다.

[208]

[209] 그 결과, 도 21에 나타낸 바와 같이, 류마티스 관절염을 유도하지 않은 대조군에 비해 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 군(model)에서는 확연하게 골미란 증상이 유발된 것을 확인하였다. micro-CT 분석 프로그램 분석결과, 골미란 영역의 부피와 표면이 류마티스 관절염 유발 군에 비해 본 발명의 Cpn60 단백질 투여군에서 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타났다.

[210] 또한, Surface/volume ratio의 경우, 류마티스 관절염 유발 군(model)과 비교하였을 때 Cpn60 투여군에서 유의하게 높은 ratio를 보였다. 해면골(Trabecular bone)의 rod와 plate를 평가할 때 사용되는 구조 모델 색인결과에서는, Cpn60 투여시 류마티스 관절염 유발 군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다.

[211] 무릎관절의 골미란 및 손상을 비교하기 위해 H&E 염색분석을 진행한 결과, 본 발명의 Cpn60 단백질 투여에 의해 무릎관절의 손상이 감소한 것으로 나타났으며, 류마티스 관절염 마우스에 Cpn60 단백질을 투여했을 때, 골미란 및 무릎 관절 손상을 완화 시킬 수 있음을 알 수 있었다(도 21).

[212]

[213] <11-4> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 본 발명의 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)투여에 따른 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체 농도 분석

[214] 상기 실시예 <11-1>에서 사용한 마우스의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하고 콜라겐 항원 특이적 IgG, IgG1, IgG2a 항체 농도를 ELISA 방법을 통해 측정하였다. 구체적으로 면역플레이트에 mouse type II 콜라겐을 4℃에서 코팅한 후, 상온에서 블록킹 과정을 수행한 다음, 샘플과 Horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibody, anti-IgG1 antibody, anti-IgG2a antibody를 첨가하여 3시간 반응시켰다. 3시간 후, 기질을 넣고 2N H_2SO_4를 통해 반응을 정지시켜 혈장 내의 각 IgG 항체 양을 측정하였다.

[215]

[216] 그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이, 관절염 유발 시 혈액 내 콜라겐 항원 특이적 IgG 항체들의 생성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었으며, 반면 본 발명의 Cpn60 단백질을 투여한 군에서는 콜라겐 항원 특이적 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체의 농도가 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

[217]

[218] <11-5> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 본 발명의 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)투여에 따른 면역반응과 염증성 사이토카인의 변화분석

[219] 상기 실시예 <11-1>에서 사용한 마우스로부터 혈액을 채취하고 혈청을 사용하여 각 그룹별 염증성 사이토카인인 TNFα 및 IL-6의 수준을 ELISA 방법으로 분석하였고, IL-17의 mRNA 발현양은 quantitative real-time PCR 방법으로 분석하였다.

[220]

[221] 그 결과, 도 23에 나타낸 바와 같이, 염증성 사이토카인인 TNFα, IL-6 및 IL-17의 수준은 류마티스 관절염 유발군에 비해 본 발명의 Cpn60을 투여한 군에서 현저하게 감소된 것으로 나타났다.

[222] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 Cpn60의 투여는 류마티스 관절염에 의한 과도한 면역반응을 억제할 수 있고, 염증성 사이토카인의 수준을 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[223]

[224] <11-6> 콜라겐 유도 류마티스 관절염 유발 마우스에서 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60) 투여에 따른 파골세포 분화에 미치는 영향 분석

[225] 상기 실시예 <11-1>에서 사용한 마우스로부터 윤활막 조직(synovium tissue)을 분리하고 상기 조직 내에서 파골세포 분화와 관련된 인자들인 *Nfatc1, Cask, Calcr*의 상대적 mRNA 발현양을 quantitative real-time PCR로 분석하였다.

[226]

[227] 그 결과, 도 24에 나타낸 바와 같이, *Nfatc1, Cask, Calcr*의 발현양은 대조군(류마티스 관절염을 유발하지 않은 군)에 비해 류마티스 관절염을 유발한 군(model)에서 유의하게 증가한 것으로 나타난 반면, 본 발명의 Cpn60 단백질을 투여군의 경우 *Nfatc1, Cask, Calcr*의 발현양은 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

[228] 또한, 무릎관절 조직을 TRAP 염색하여 무릎 관절 부위에서 적자색으로 염색된 TRAP 양성 세포수(osteoclast)를 분석한 결과, 대조군에 비해 류마티스 관절염 유

발군(model)에서 TRAP 양성 세포수가 월등히 증가한 것으로 나타났다. 한편, 본 발명의 Cpn60 단백질을 투여한 군은 류마티스 관절염 유발군에 비해 TRAP 양성 세포수가 현저하게 감소된 것으로 나타났다(도 25 참조).

[229] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2 균주로부터 분리한 본 발명의 세포외 소포체 및 Cpn60 단백질이 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있고 염증반응을 개선할 수 있어, 류마티스 관절염을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[230] 본원발명은 하기와 같은 국가연구개발사업을 통해 연구된 결과물이다.

[231] 과제번호: 2022R1A2C1010264

[232] 부처명: 과학기술정보통신부

[233] 과제관리(전문)기관명: 한국연구재단

[234] 연구사업명: (이공)(유형1-1(통합유형1))중견연구

[235] 연구과제명: 프로피온산균 유래 chaperonin의 류마티스 관절염 개선 기능성 및 기전 규명

[236] 기여율: 1/1

[237] 과제수행기관: 고려대학교 산학협력단

[238] 연구기간: 2022.03.01. ~ 2023.02.28

[239]

[240] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60k Da 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2(*Propionibacterium freudenreichii* MJ2, 기탁번호 KCCM12272P) 균주인 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은,
파골세포 분화 관련 인자의 발현 억제;
염증성 사이토카인의 생성 억제;
파골세포내 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 억제;
IL-10의 발현 증가;
골미란(bone erosion) 개선; 또는
콜라겐 항원 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체 생성 억제; 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포체는 상기 조성물 내에 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL 의 양으로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 세포외 소포체는 평균 입경이 150~200nm인 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 프로피오니박테리움 프레우덴레키(*Propionibacterium freudenreichii*) 균주 유래의 세포외 소포체 또는 60 kDa 샤페로닌 단백질(Cpn60)을 유효성분으로 함유하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 프로피오니박테리움 프레우덴레키는 프로피오니박테리움 프레우덴레키 MJ2(*Propionibacterium freudenreichii* MJ2, 기탁번호 KCCM12272P) 균주인 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

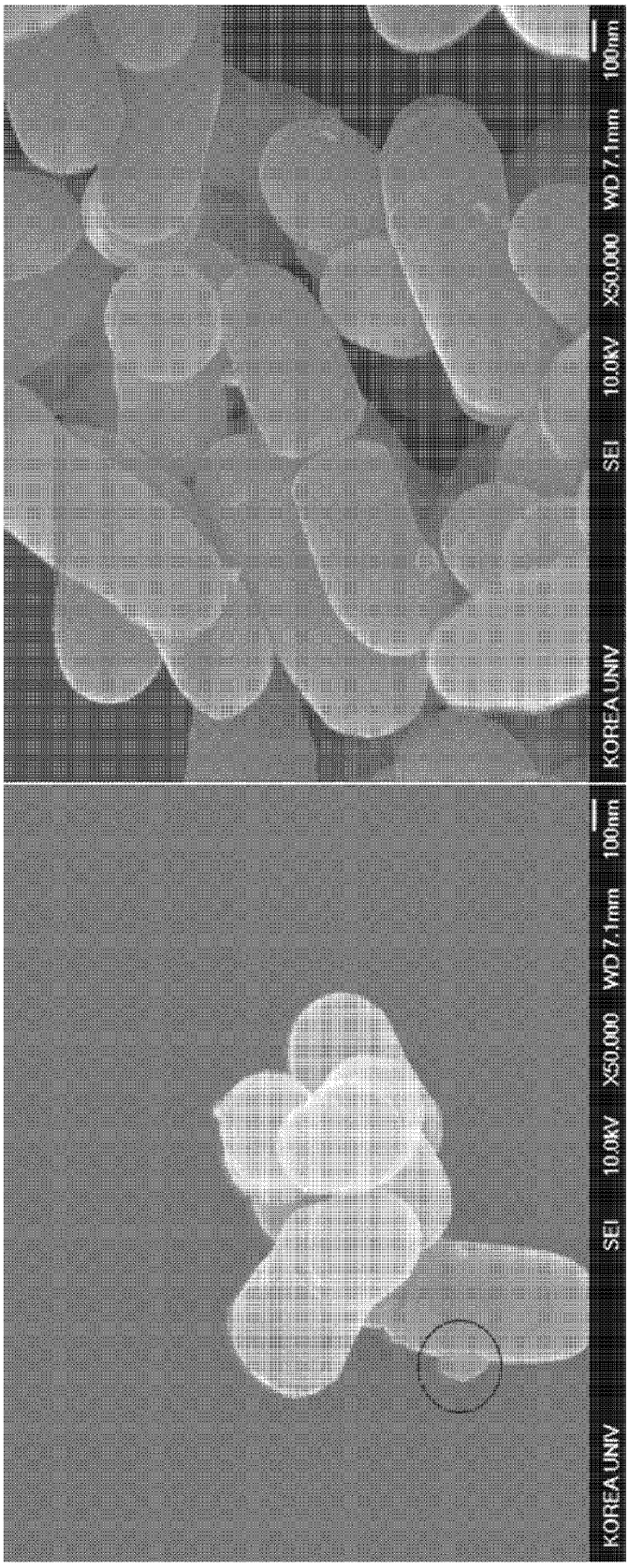
[청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 조성물은,
파골세포 분화 관련 인자의 발현 억제;
염증성 사이토카인의 생성 억제;

파골세포내 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 억제;
IL-10의 발현 증가;
골미란(bone erosion) 개선; 또는
콜라겐 항원 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체 생성 억제; 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

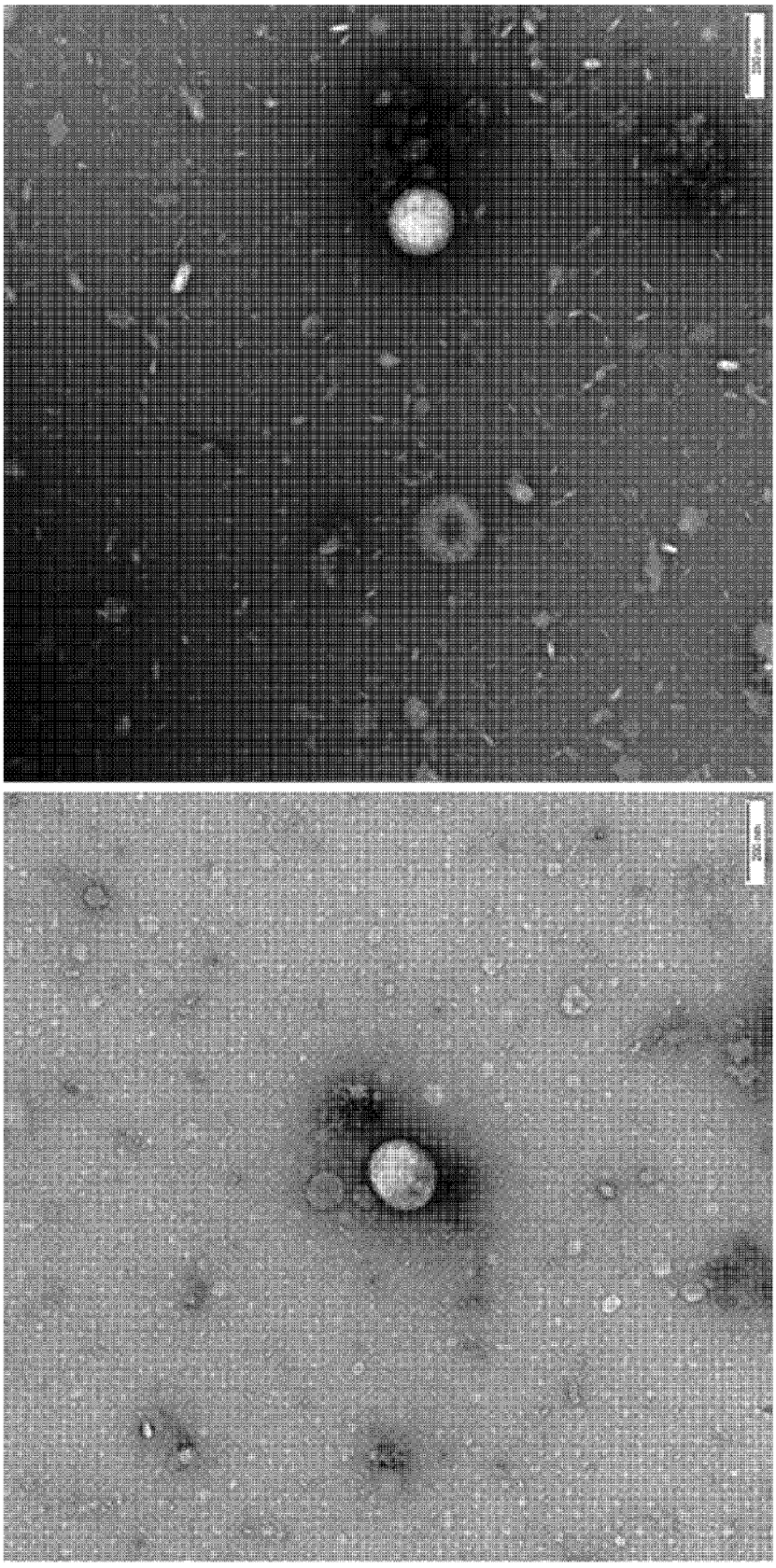
[청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 세포외 소포체는 상기 조성물 내에 1×10^6 particles/mL 내지 1×10^8 particles/mL 의 양으로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 10] 제6항에 있어서,
상기 세포외 소포체는 평균 입경이 150~200nm인 것을 특징으로 하는, 류마티스 관절염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

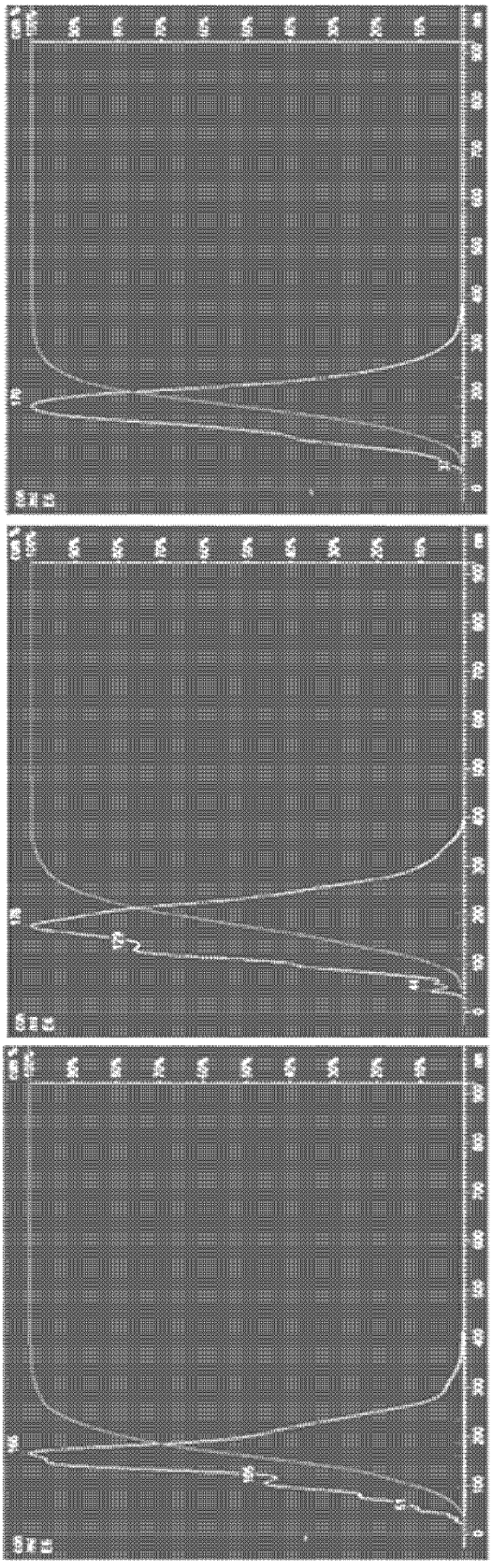
[도1]


KOREA UNIV
SEI 10.0kV X50,000 WD 7.1mm 100nm
KOREA UNIV
SEI 10.0kV X50,000 WD 7.1mm 100nm

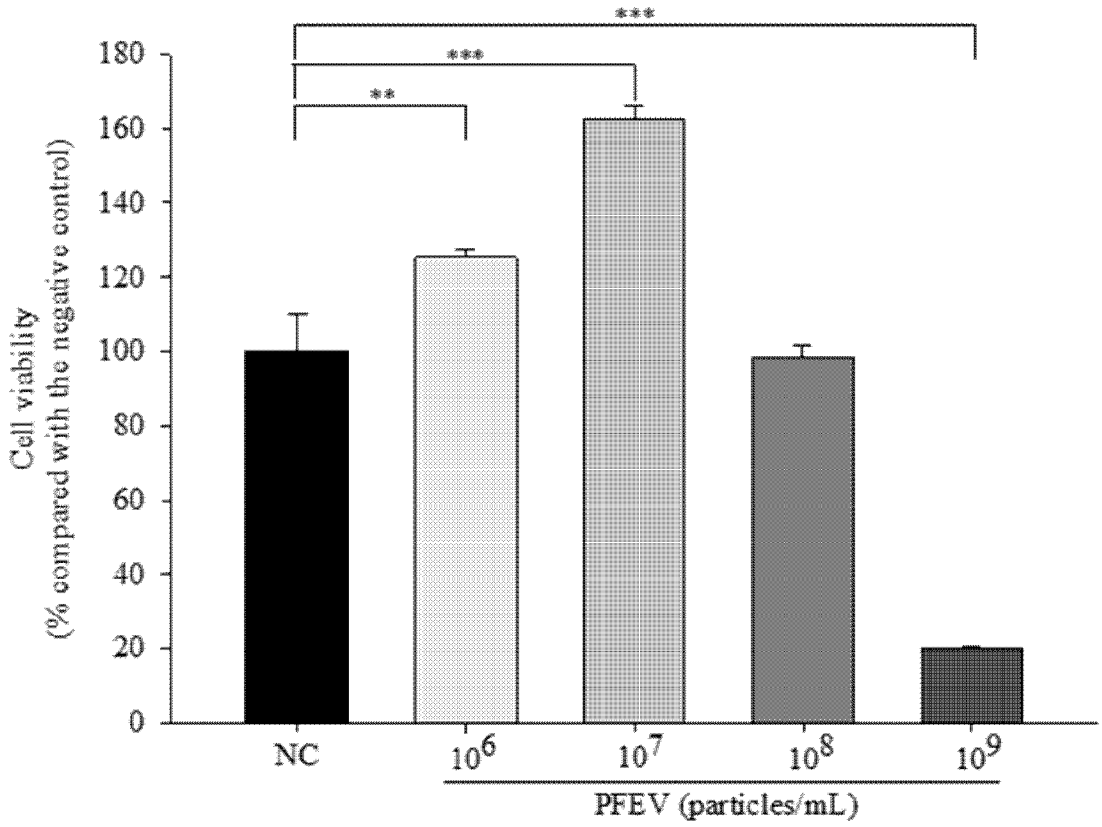
[도2]



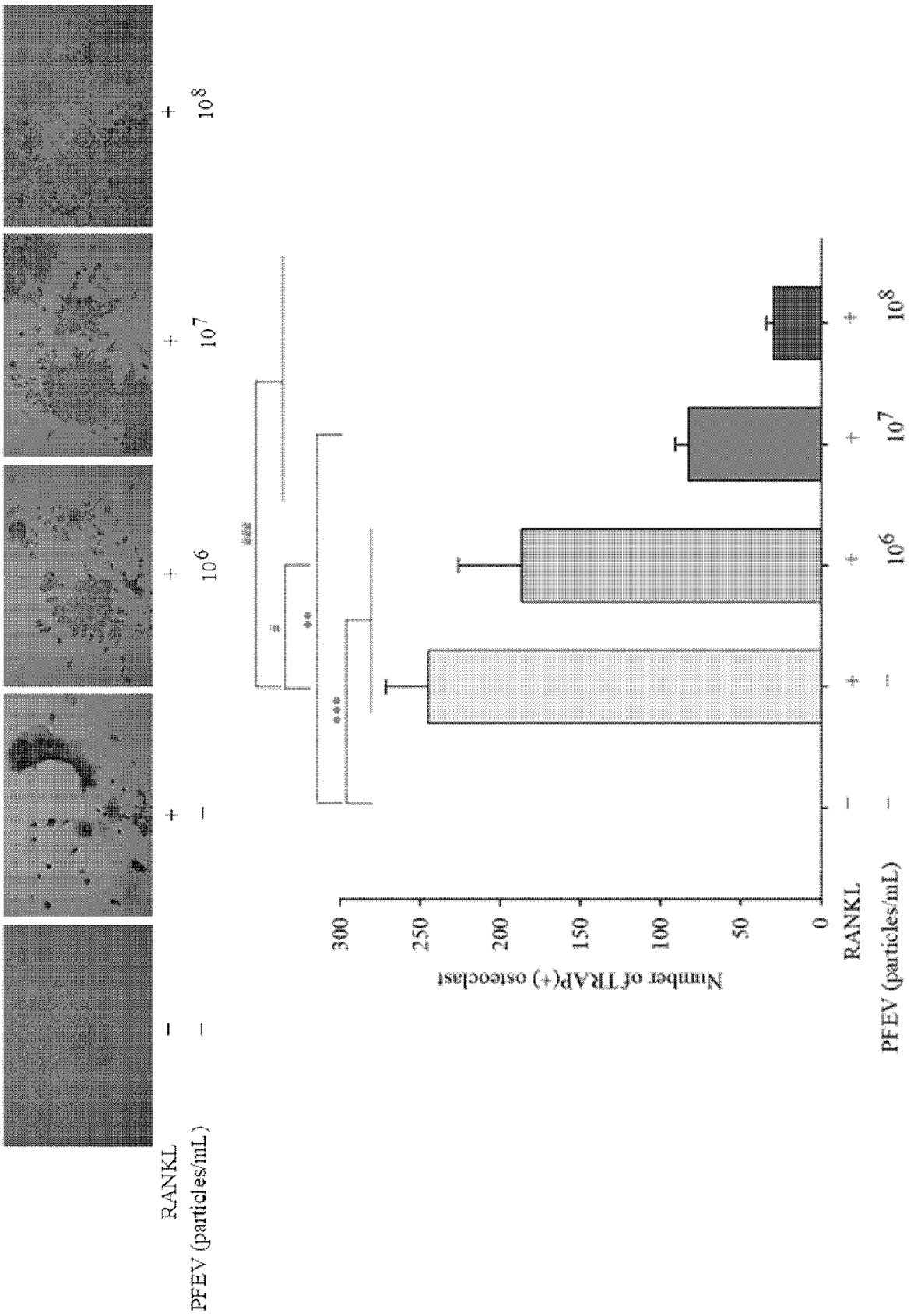
[도3]



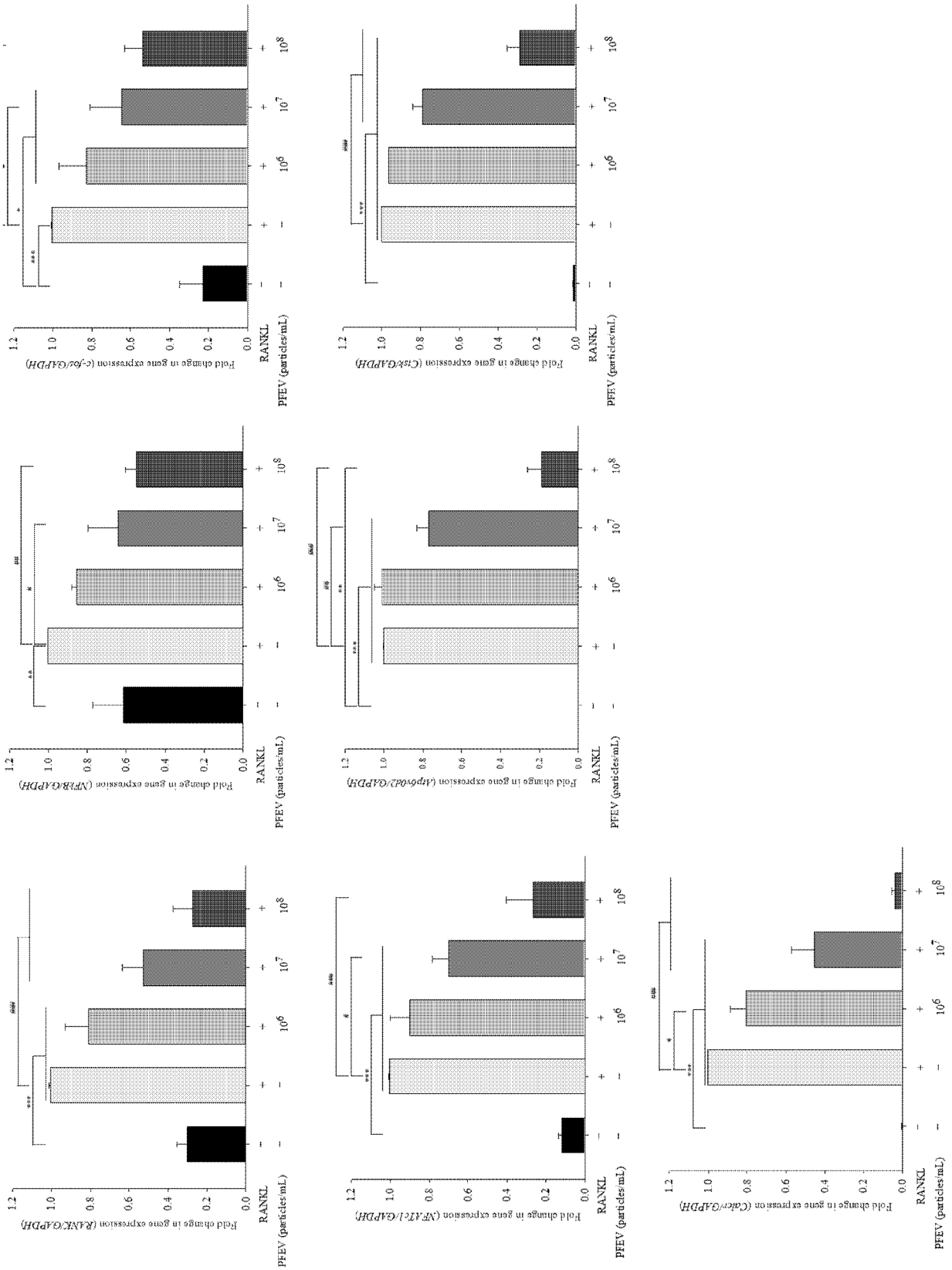
[도4]


***
***
**
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability
(% compared with the negative control)
NC
10^6
10^7
10^8
10^9
PFEV (particles/mL)

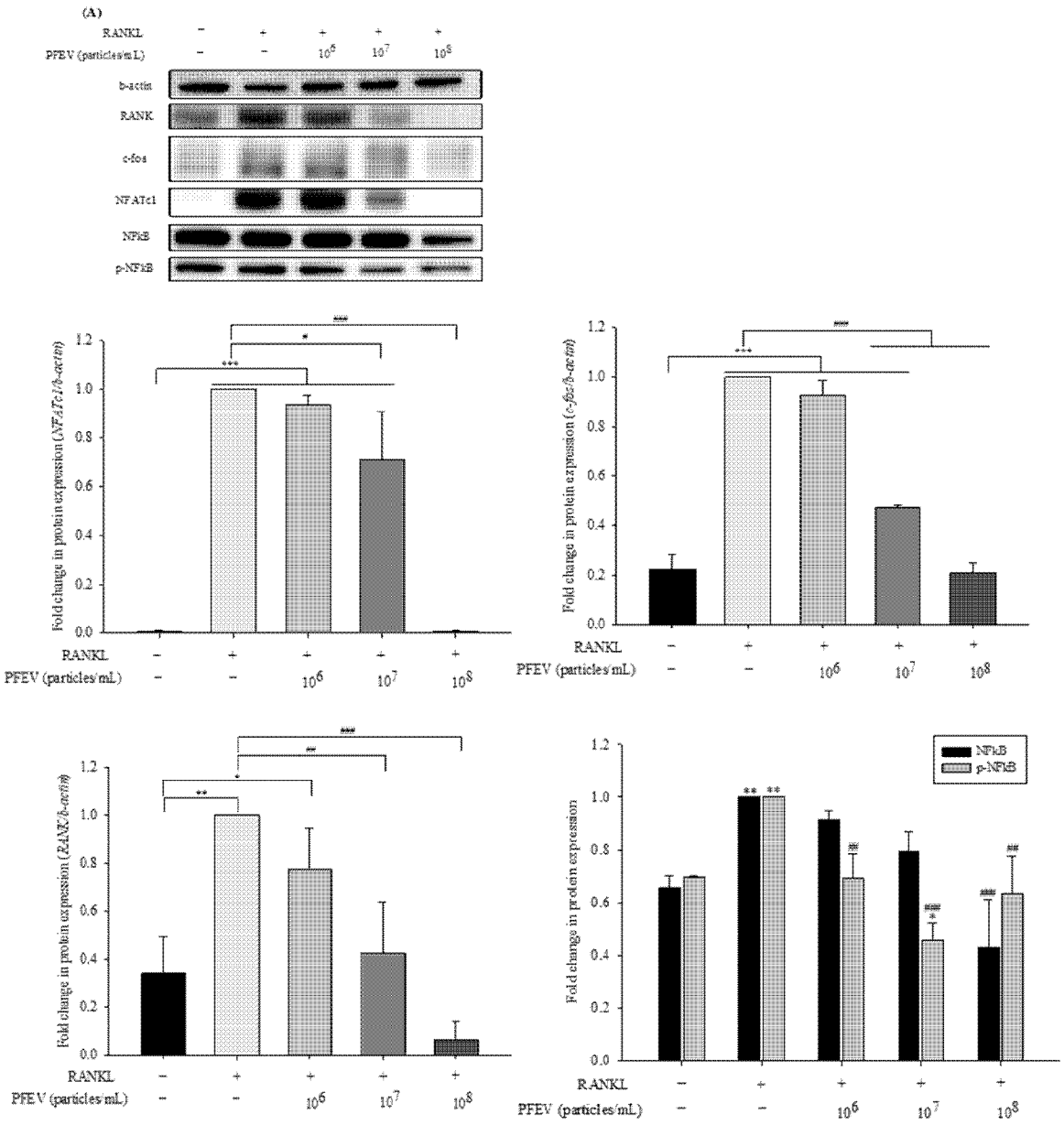
[도5]


RANKL
PFEV (particles/mL)
Number of TRAP(+) osteoclast
300
250
200
150
100
50
0
###
#
**
***
10^6
10^7
10^8

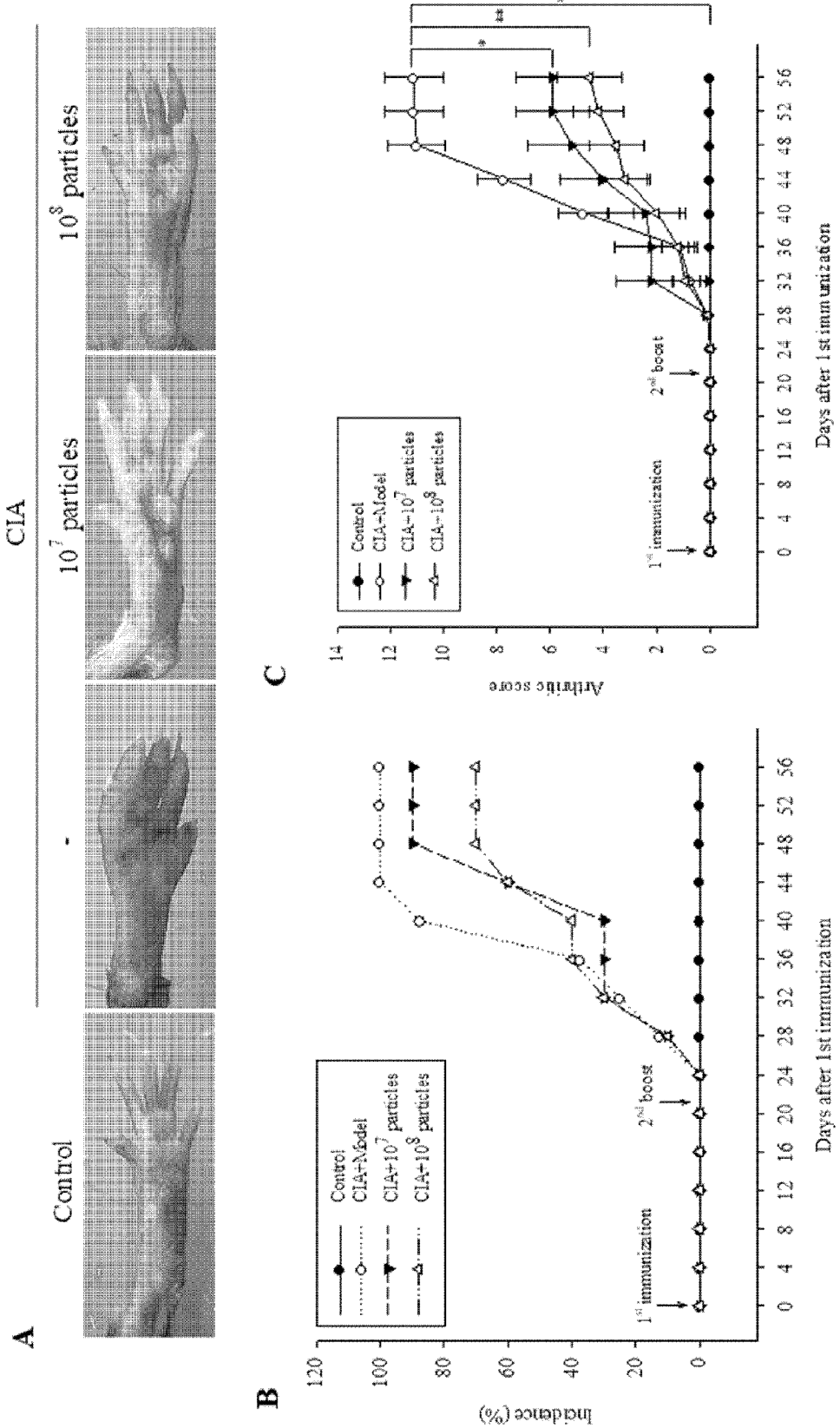
[도6]


Fold change in gene expression (c-fos/GAPDH)
Fold change in gene expression (Ctsk/GAPDH)
Fold change in gene expression (NFATc1/GAPDH)
Fold change in gene expression (Atp6v0d2/GAPDH)
Fold change in gene expression (RANK/GAPDH)
Fold change in gene expression (OSCAR/GAPDH)
Fold change in gene expression (DC-STAMP/GAPDH)
RANKL
PFEV (particles/mL)

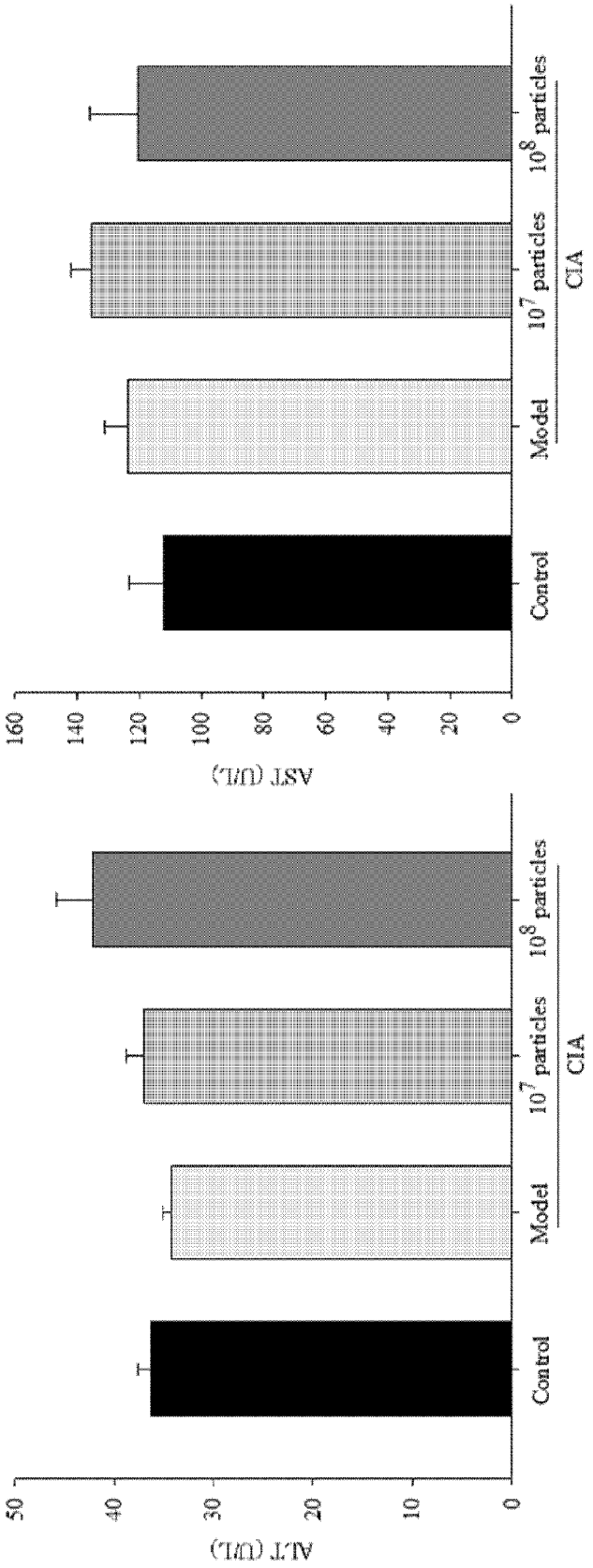
[도7]


(A)
RANKL
PFEV (particles/mL)
b-actin
RANK
c-fos
NFATc1
NFkB
p-NFkB
Fold change in protein expression (NFATc1/b-actin)
Fold change in protein expression (c-fos/b-actin)
Fold change in protein expression (RANK/b-actin)
Fold change in protein expression
NFkB
p-NFkB

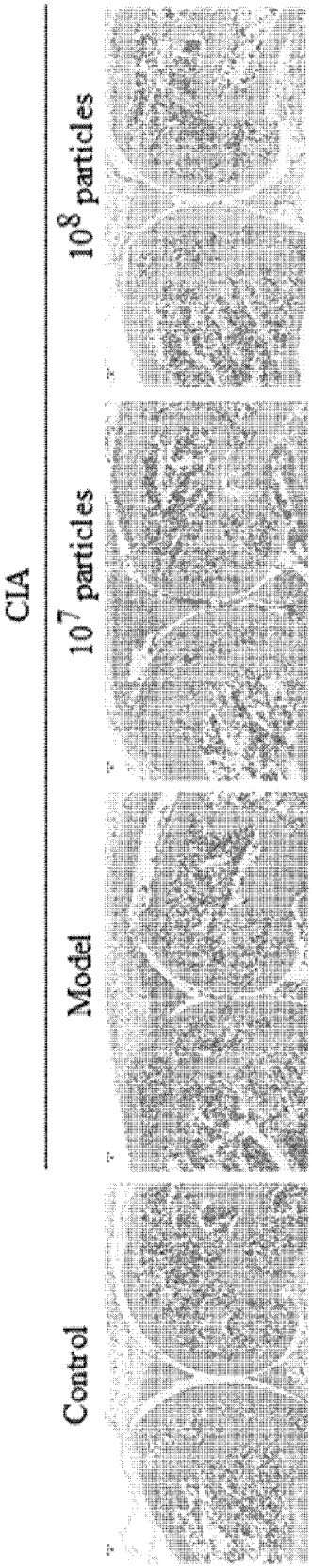
[도8]


A
CIA
Control
-
10^7 particles
10^8 particles
B
Incidence (%)
Control
CIA-Model
CIA+10^7 particles
CIA+10^8 particles
1st immunization
2nd boost
Days after 1st immunization
C
Arthritic score
Control
CIA-Model
CIA+10^7 particles
CIA+10^8 particles
1st immunization
2nd boost
Days after 1st immunization

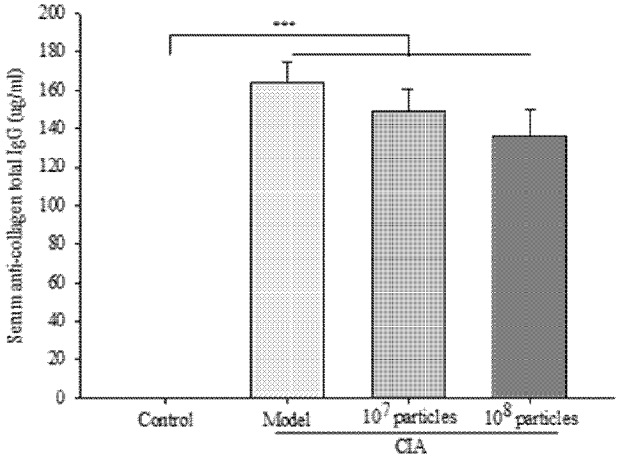
[도9]

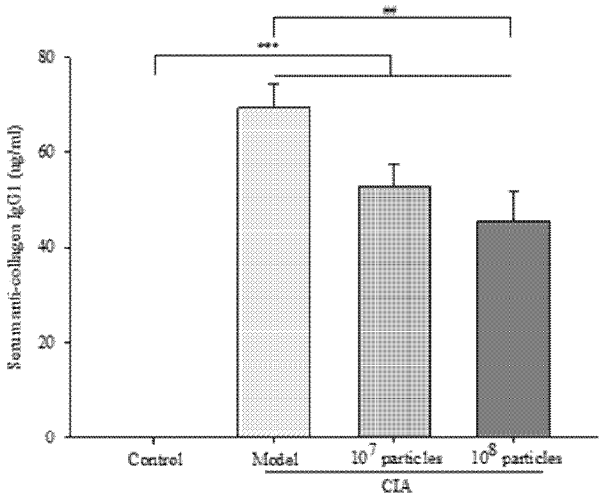

AST (U/L)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA
ALT (U/L)
0
10
20
30
40
50
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

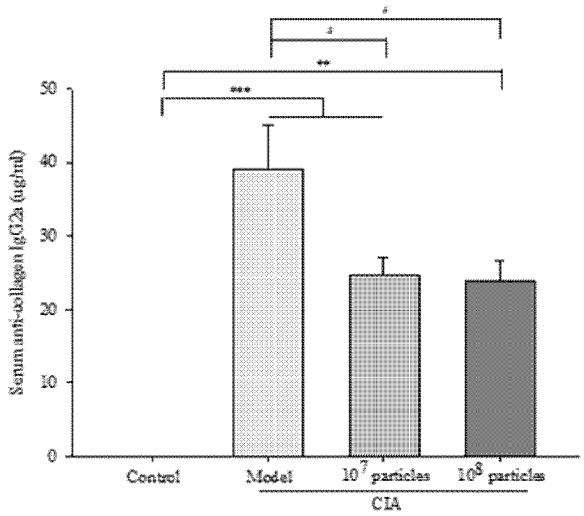
[도10]



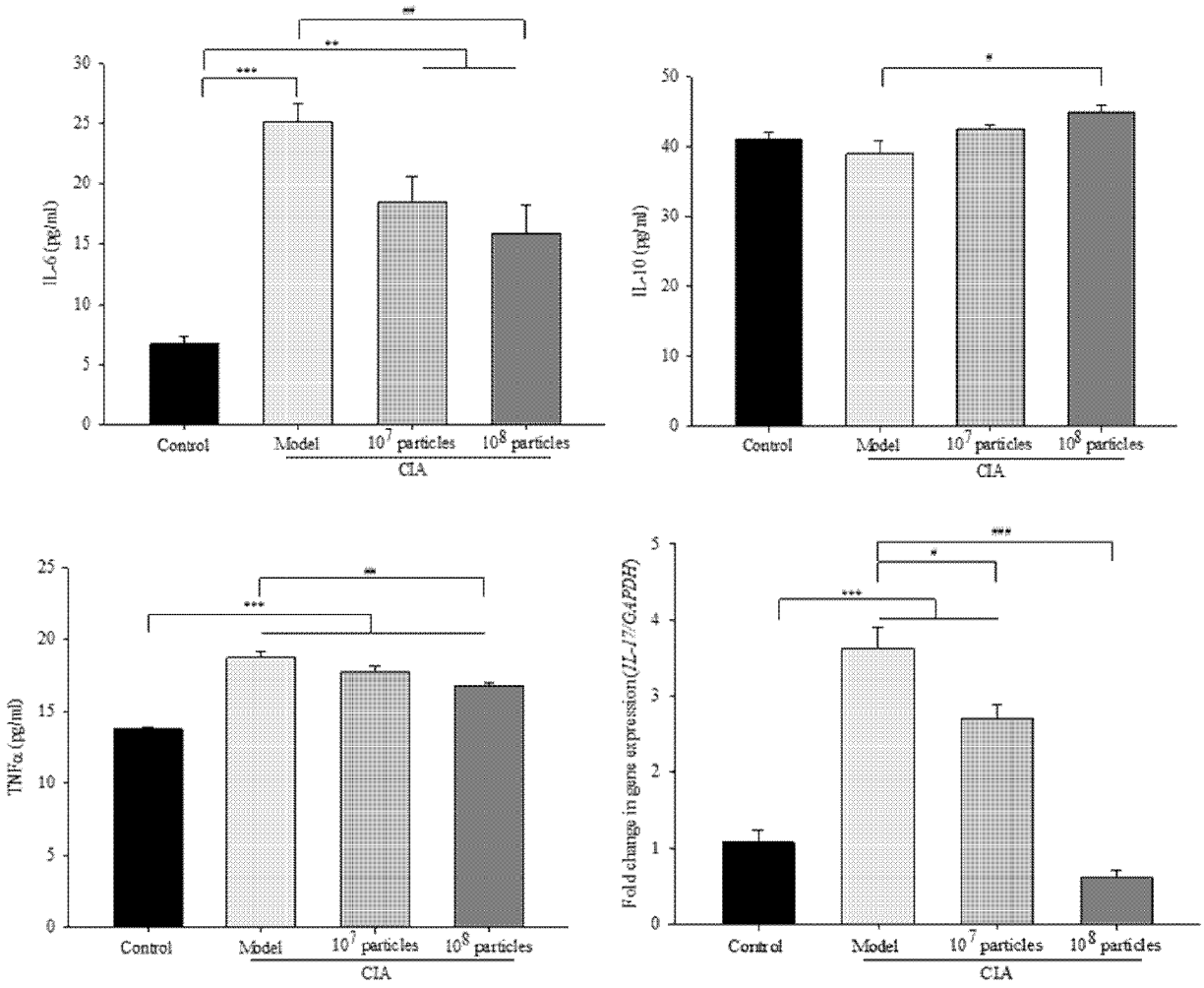
[도11]


Serum anti-collagen total IgG (ug/ml)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

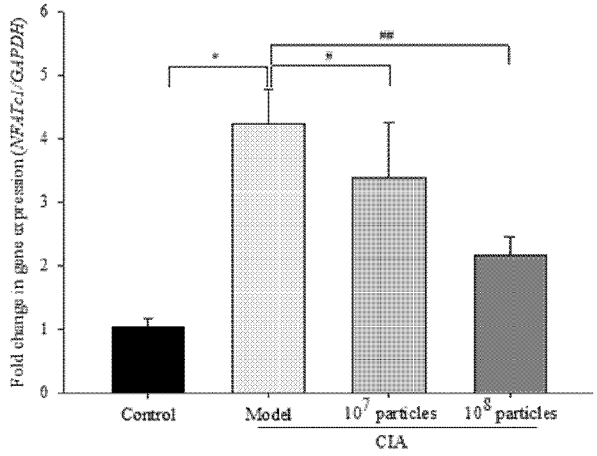

Serum anti-collagen IgG1 (ug/ml)
80
60
40
20
0
***
**
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

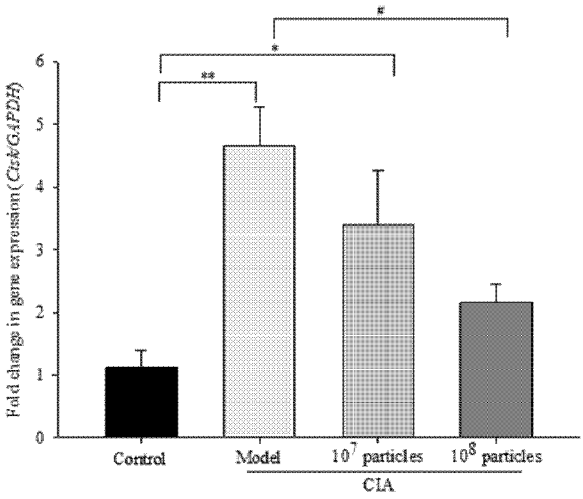

Serum anti-collagen IgG2a (ug/ml)
50
40
30
20
10
0
***
**
*
#
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

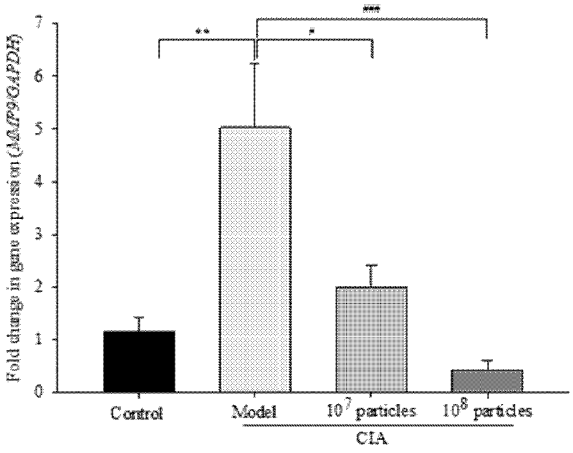
[도12]

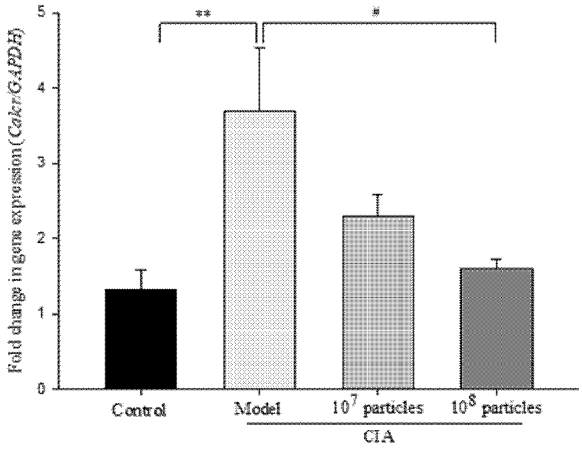

IL-6 (pg/ml)
IL-10 (pg/ml)
TNFα (pg/ml)
Fold change in gene expression(IL-17/GAPDH)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

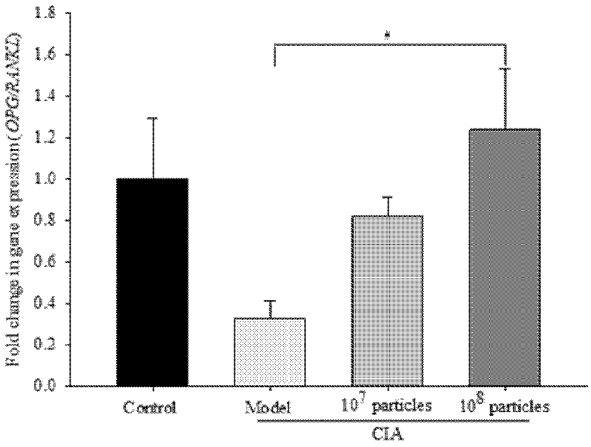
[도13]


Fold change in gene expression (NFATc1/GAPDH)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

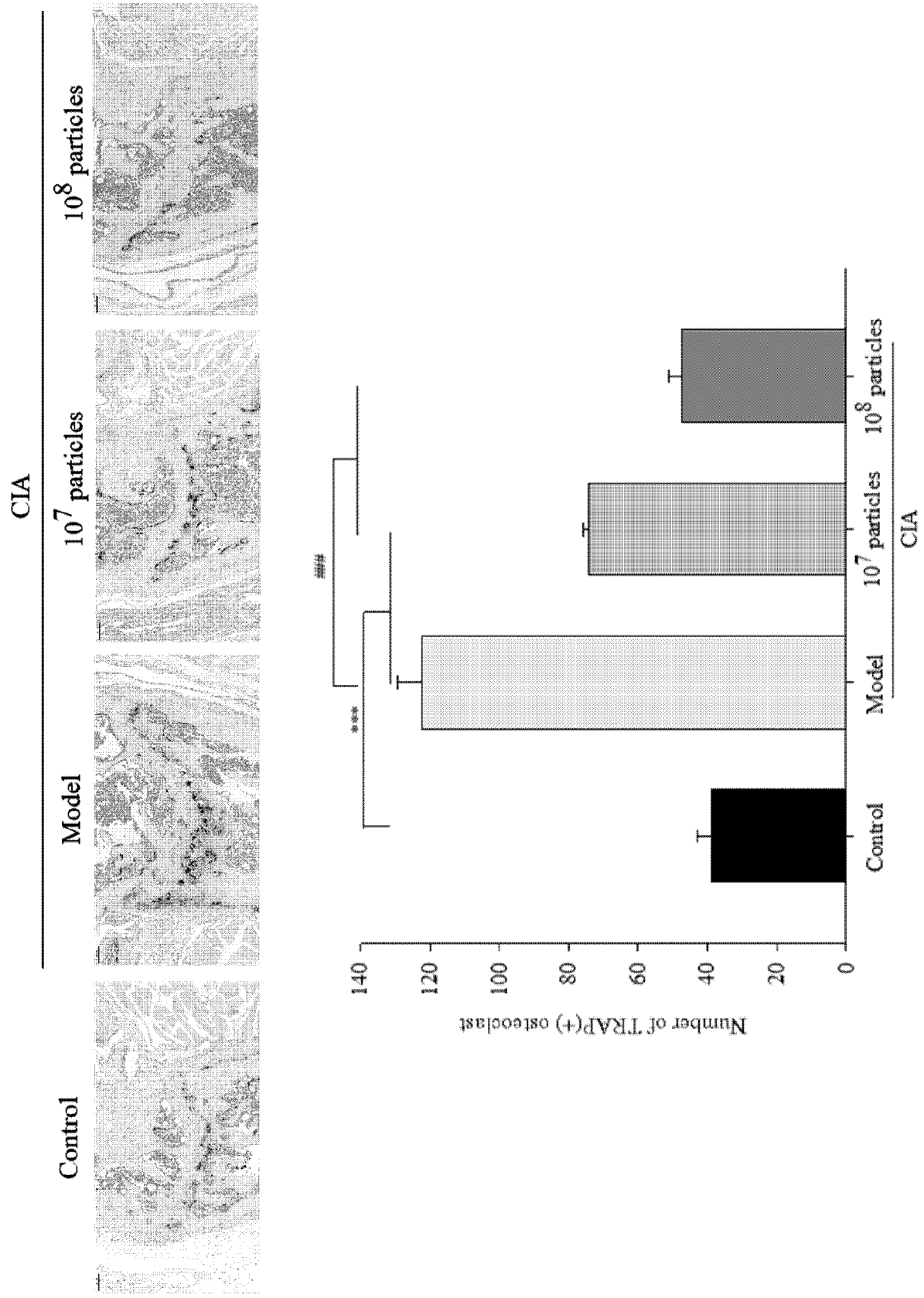

Fold change in gene expression (Ctsk/GAPDH)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA


Fold change in gene expression (MMP9/GAPDH)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

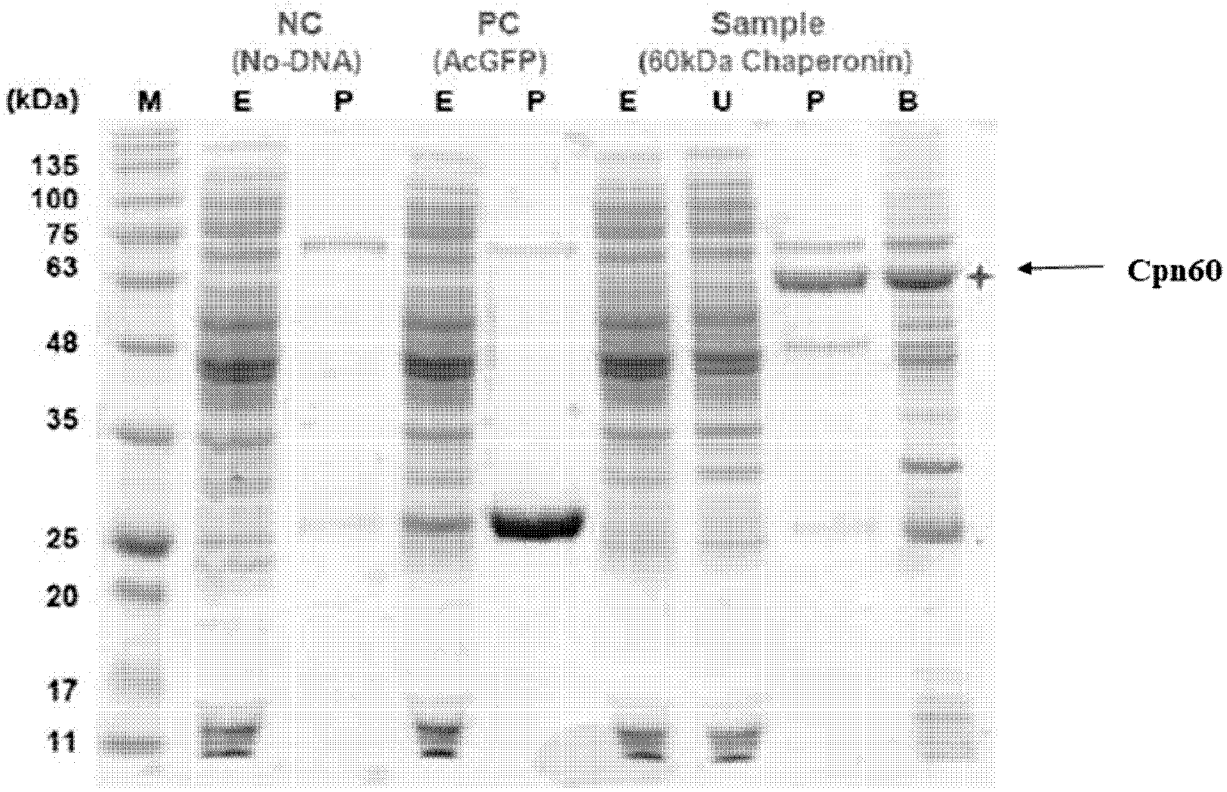

Fold change in gene expression (Calcr/GAPDH)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA


Fold change in gene expression (OPG/RANKL)
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

[도14]

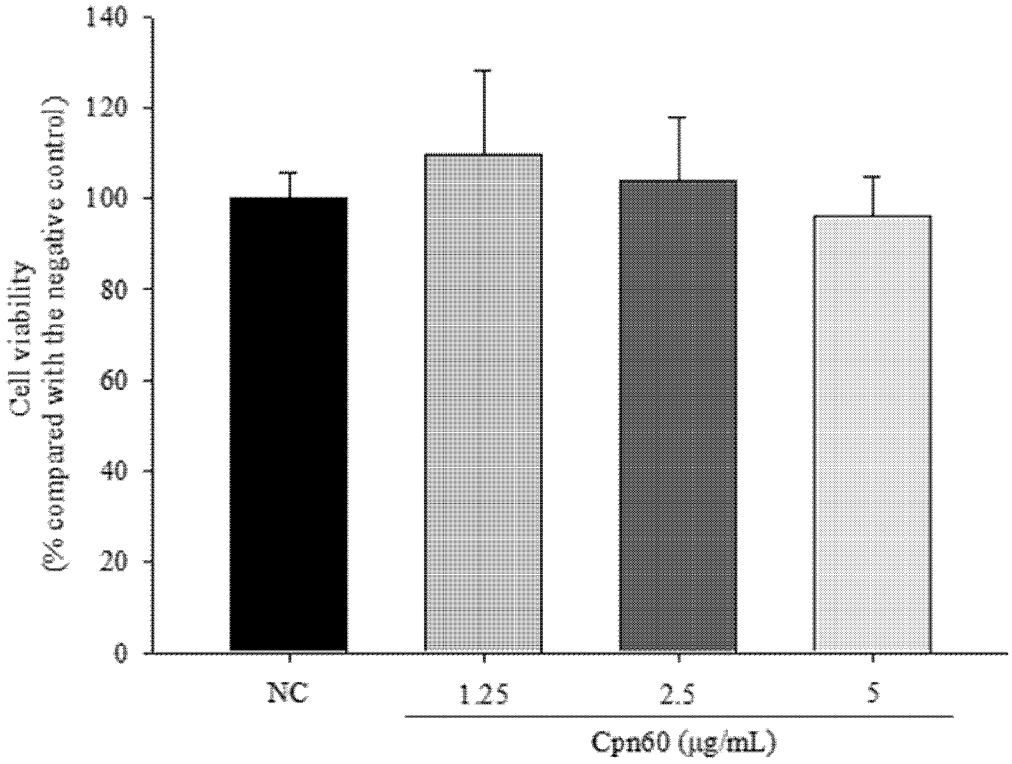

CIA
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
Number of TRAP(+) osteoclast
140
120
100
80
60
40
20
0
***
###
Control
Model
10^7 particles
10^8 particles
CIA

[도15]

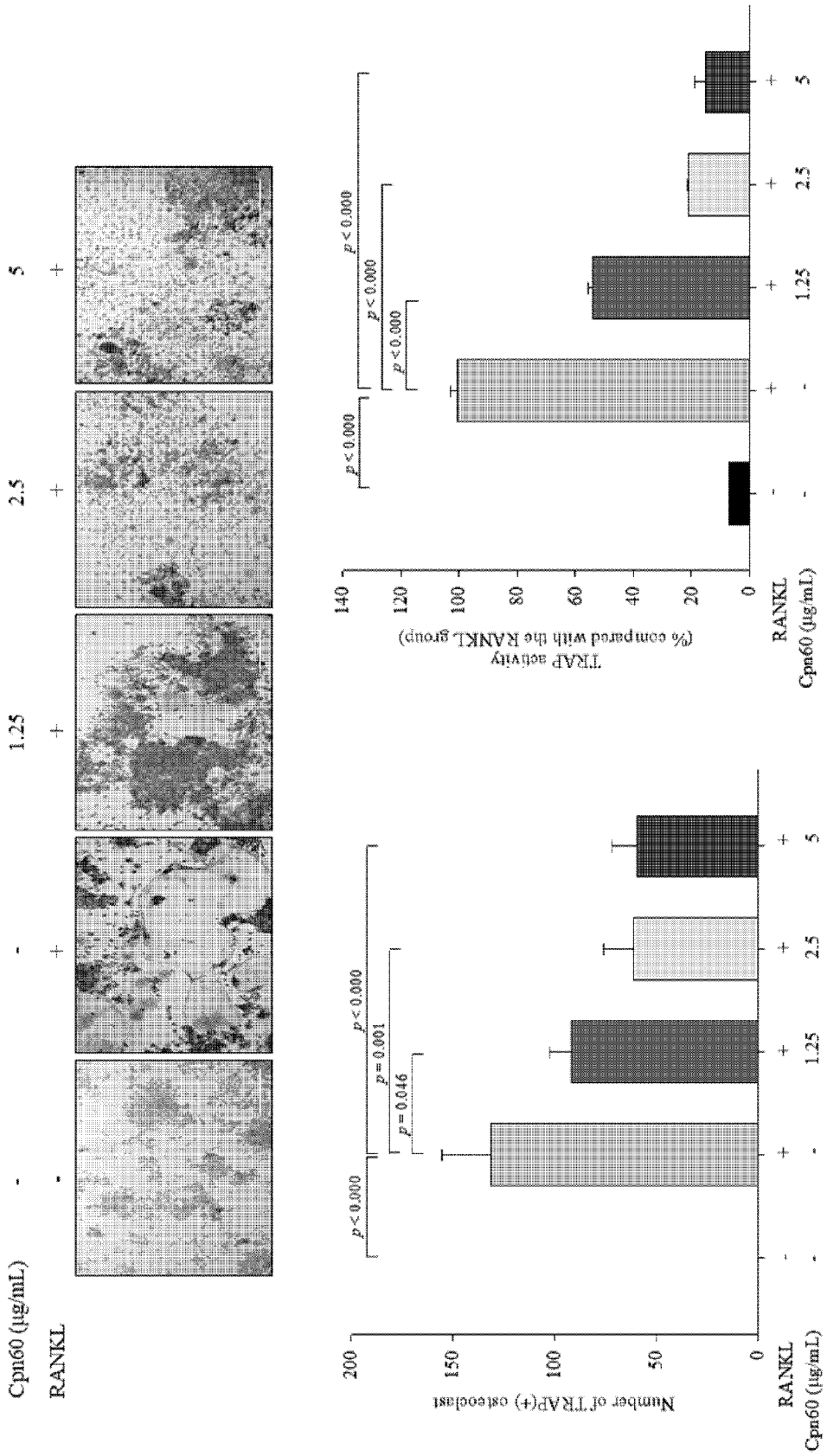


Lane M: *AccuLadder*™ 3-color Prestained Protein size marker (Broad)
Lane E: Expression sample
Lane U: Unbound sample
Lane P: Purification sample
Lane B: Bead (Resuspension) sample

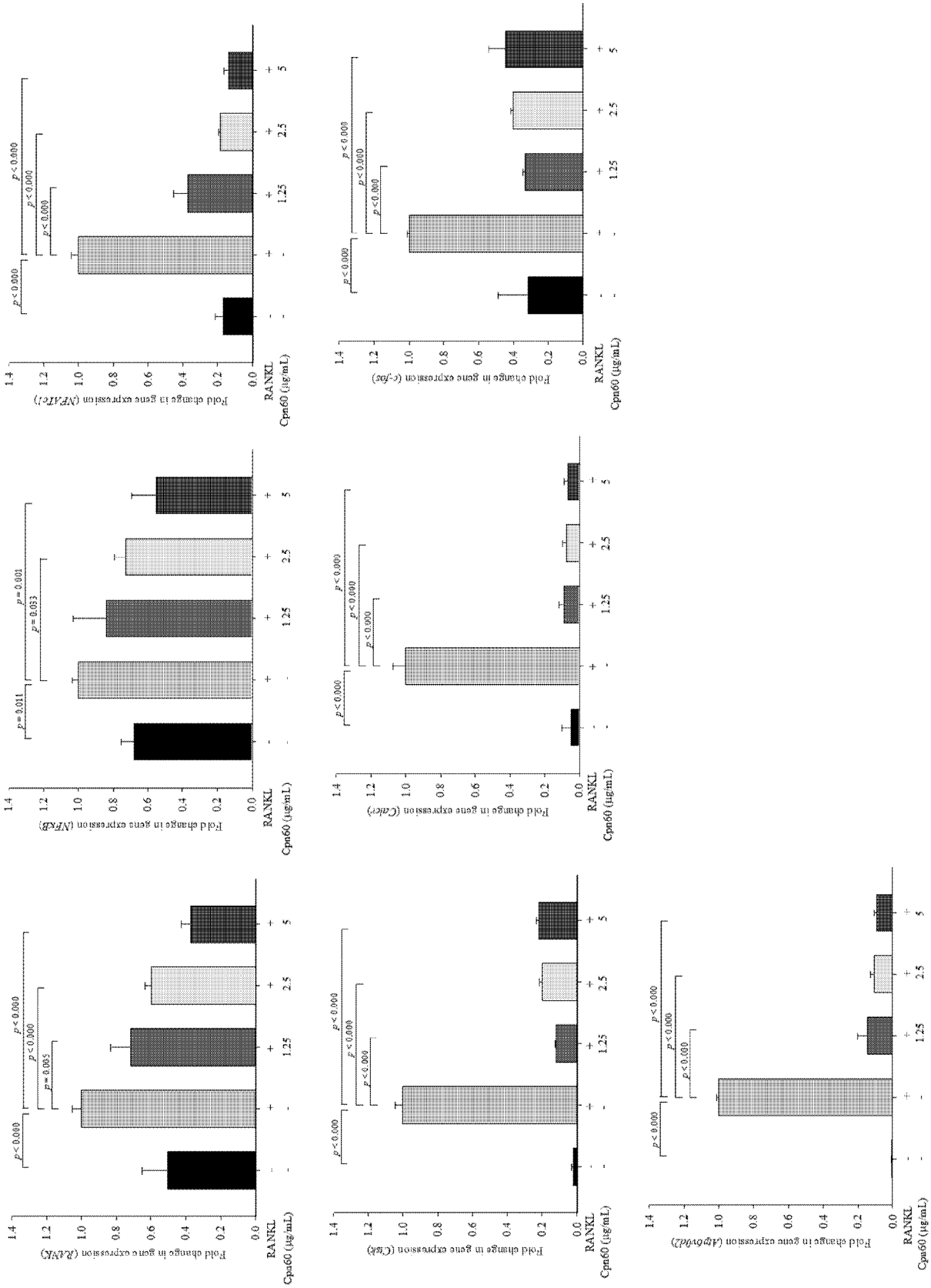
[도16]


140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability
(% compared with the negative control)
NC
1.25
2.5
5
Cpn60 (μg/mL)

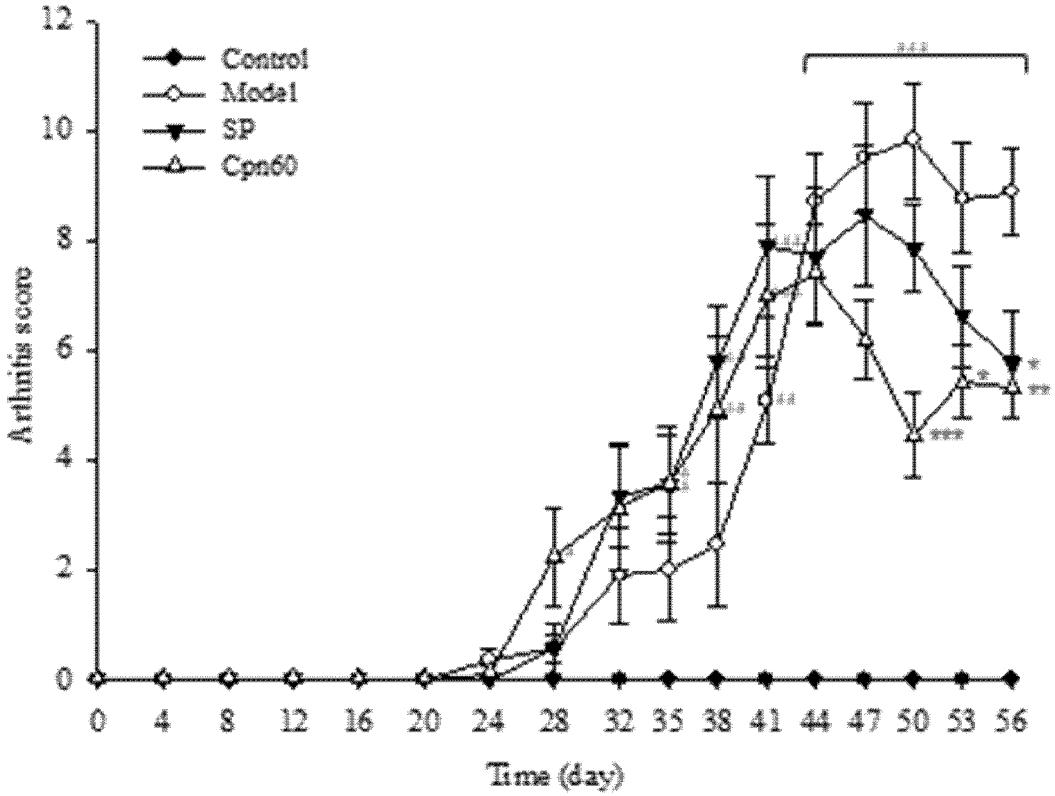
[도17]


Cpn60 (μg/mL)
RANKL
Number of TRAP(+) osteoclast
TRAP activity
(% compared with the RANKL group)
p < 0.000
p = 0.001
p = 0.046

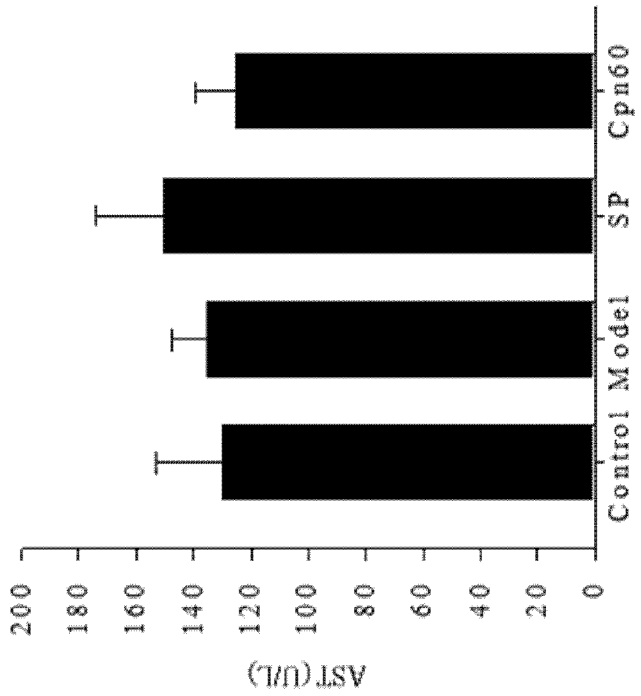
[도18]

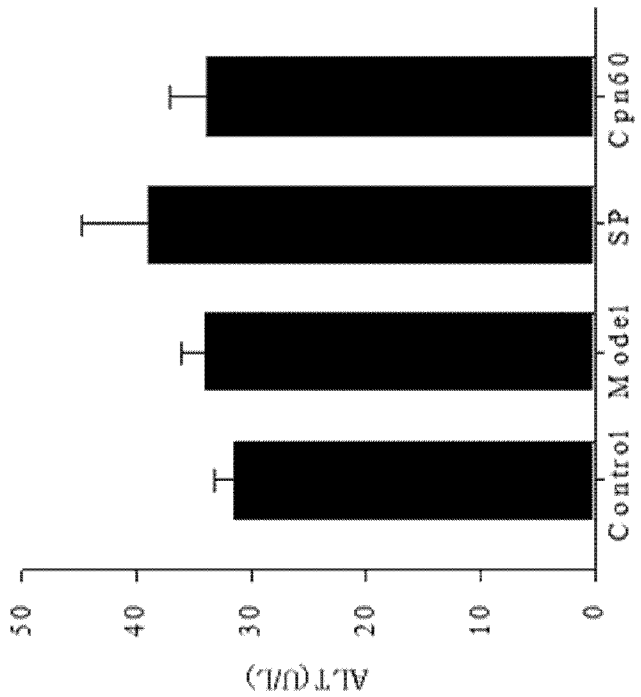

Fold change in gene expression (NFATc1)
Fold change in gene expression (NFκB)
Fold change in gene expression (Calcr)
Fold change in gene expression (c-fos)
Fold change in gene expression (RANK)
Fold change in gene expression (Csk)
Fold change in gene expression (Atp6v0d2)
RANKL
Cpn60 (μg/mL)

[도19]

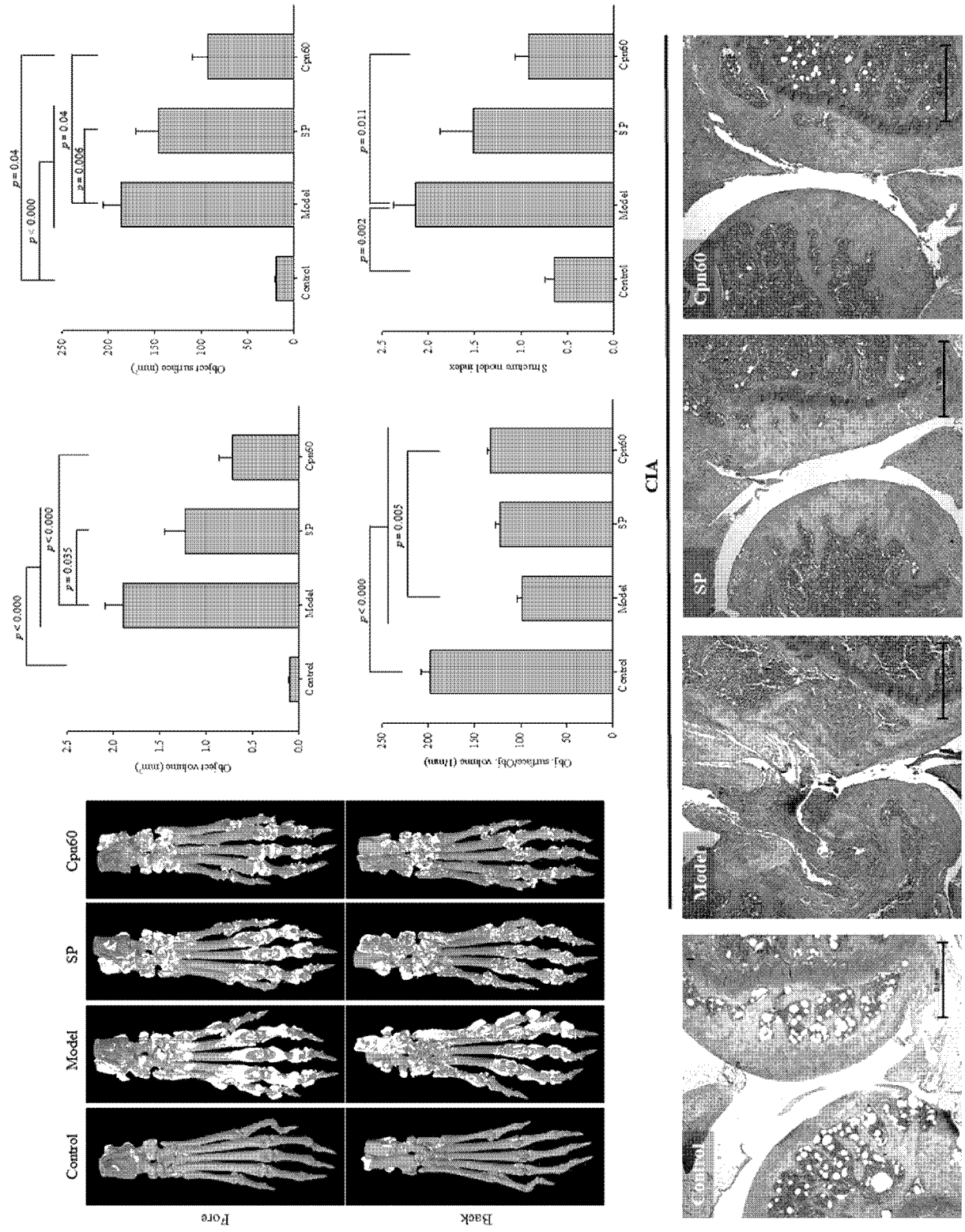

Control
Model
SP
Cpn60
Arthritis score
Time (day)
0
2
4
6
8
10
12
0 4 8 12 16 20 24 28 32 35 38 41 44 47 50 53 56

[도20]

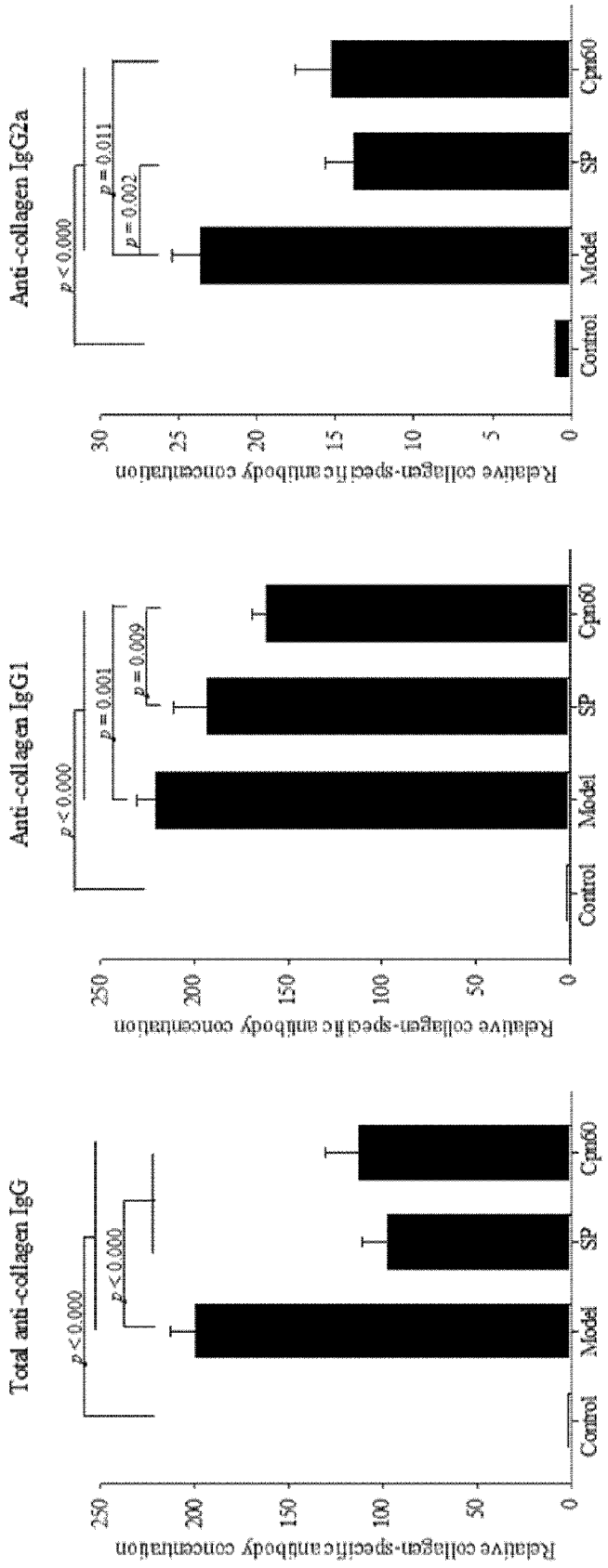

AST (U/L)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Control
Model
SP
Cpn60


ALT (U/L)
0
10
20
30
40
50
Control
Model
SP
Cpn60

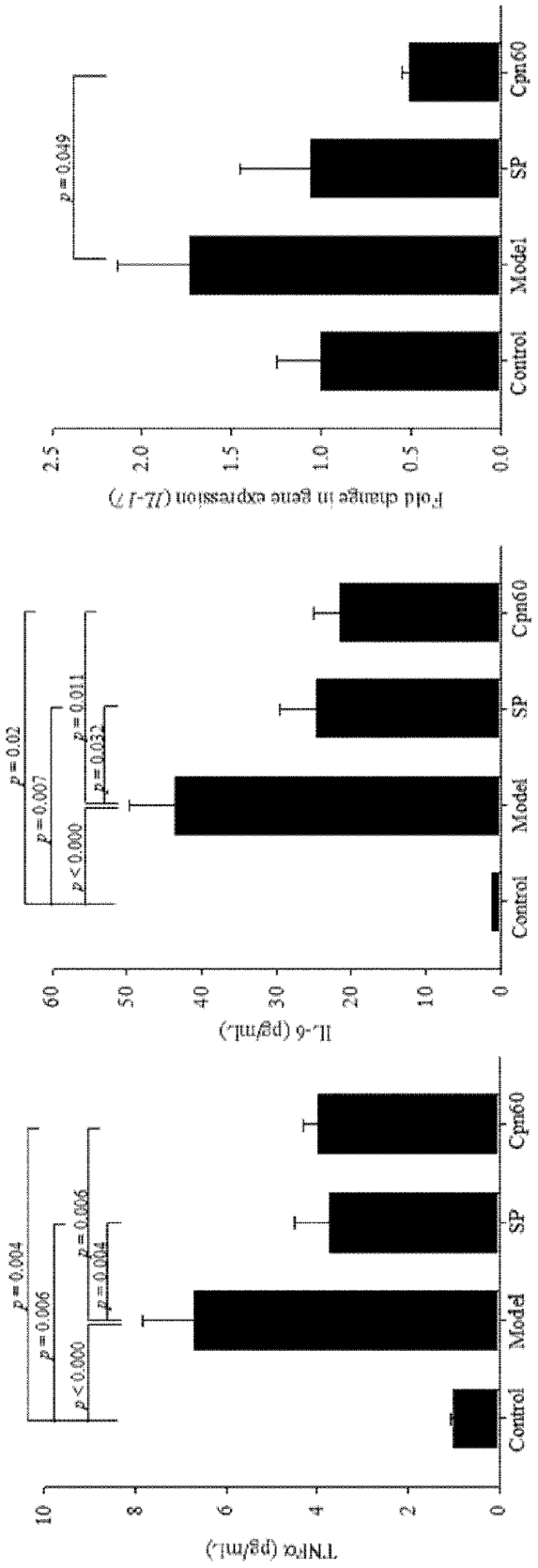
[도21]


CIA
Control
Model
SP
Cpn60
Obj. surface/Obj. volume (1/mm)
Obj. volume (mm³)
Object surface (mm²)
Structure model index
Back
Fore
p < 0.000
p = 0.005
p = 0.035
p = 0.002
p = 0.011
p = 0.04
p = 0.006

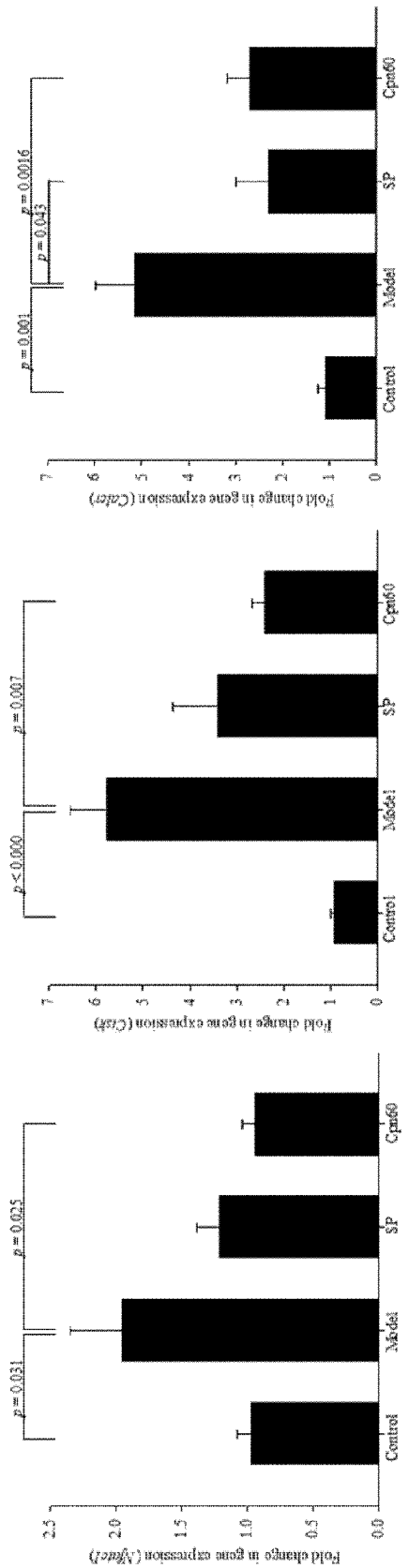
[도22]


Total anti-collagen IgG
Anti-collagen IgG1
Anti-collagen IgG2a
Relative collagen-specific antibody concentration
0
50
100
150
200
250
5
10
15
20
25
30
p < 0.000
p < 0.000
p = 0.001
p = 0.009
p < 0.000
p = 0.002
p = 0.011
Control
Model
SP
Cpn60

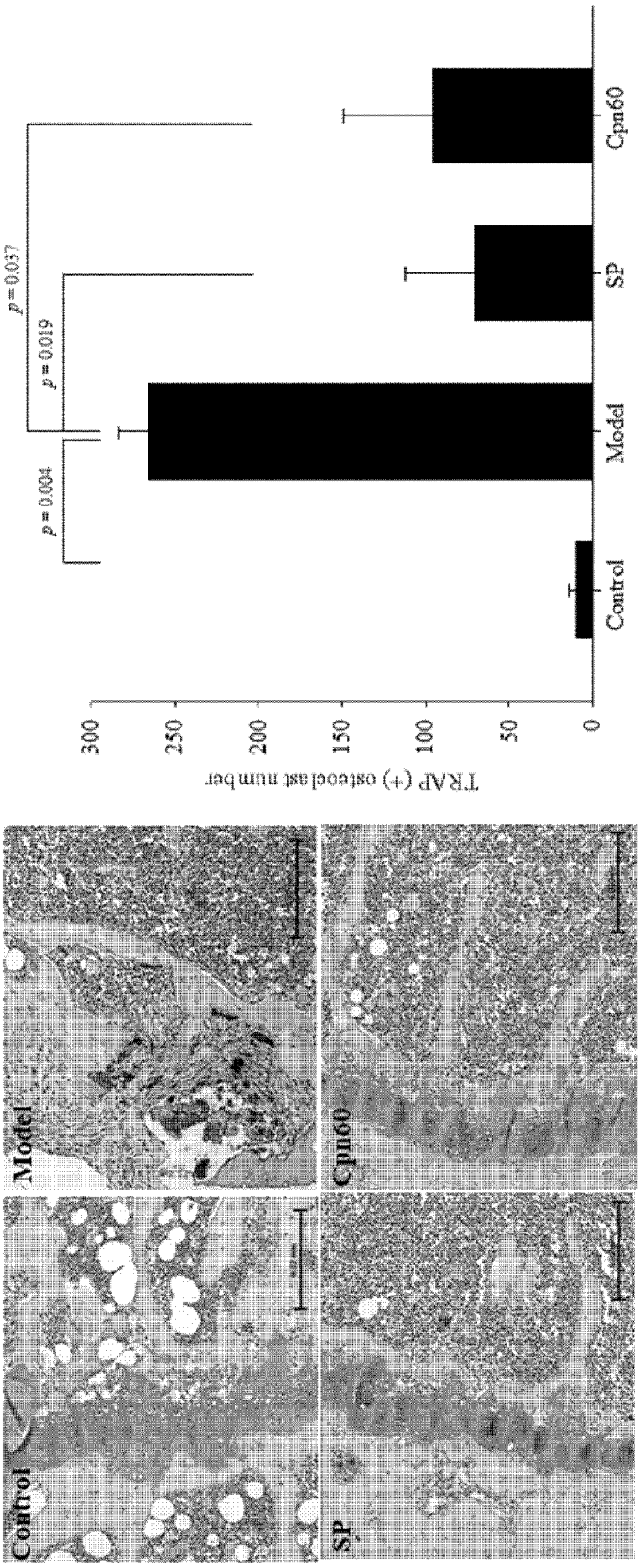
[도23]


Fold change in gene expression (IL-1β)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
p = 0.049
Control
Model
SP
Cpn60
IL-6 (pg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
p = 0.02
p = 0.007
p < 0.000
p = 0.011
p = 0.032
Control
Model
SP
Cpn60
TNFα (pg/mL)
10
8
6
4
2
0
p = 0.004
p = 0.006
p < 0.000
p = 0.006
p = 0.004
Control
Model
SP
Cpn60

[도24]


Fold change in gene expression (Ifnar1)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
p = 0.031
p = 0.025
Control
Model
SP
Cpn60
Fold change in gene expression (Casp1)
0
1
2
3
4
5
6
7
p < 0.000
p = 0.007
Control
Model
SP
Cpn60
Fold change in gene expression (Cxcl10)
0
1
2
3
4
5
6
7
p = 0.001
p = 0.043
p = 0.0016
Control
Model
SP
Cpn60

[도25]


TRAP (+) osteoclast number
300
250
200
150
100
50
0
Control
Model
SP
Cpm60
p = 0.004
p = 0.019
p = 0.037
Control
Model
SP
Cpm60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/017254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/74(2006.01)i; **A61K 38/16**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A61P 19/02**(2006.01)i; **A23L 33/135**(2016.01)i; **A23L 33/195**(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/74(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/702(2006.01); A61K 35/20(2006.01); C12Q 1/68(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: 프로피오니박테리움 프레우덴레키(Propionibacterium freudenreichii), 세포외 소포체(extracellular vesicles), 샤페로닌(chaperonin), 파골세포(osteoclast), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEOM, J. et al. Probiotic Propionibacterium freudenreichii MJ2 Enhances Osteoblast Differentiation and Mineralization by Increasing the OPG/RANKL Ratio. Microorganisms. 2021, vol. 9, document no. 673, pp. 1-22. See pages 3, 7, 10, 17 and 18.	1-10
A	KR 10-2022-0107541 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 02 August 2022 (2022-08-02) See claims 1-11.	1-10
A	KR 10-2020-0000956 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 06 January 2020 (2020-01-06) See entire document.	1-10
A	JP 2016-028033 A (MEIJI CO., LTD.) 25 February 2016 (2016-02-25) See entire document.	1-10

☑ 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	Date of mailing of the international search report
02 February 2024	**05 February 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/017254

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0006303 A (MD HEALTHCARE INC. et al.) 17 January 2018 (2018-01-17) See entire document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/017254

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2022-0107541 A	02 August 2022	KR 10-2482433 B1	27 December 2022
		WO 2022-158922 A2	28 July 2022
		WO 2022-158922 A3	15 September 2022
KR 10-2020-0000956 A	06 January 2020	None	
JP 2016-028033 A	25 February 2016	CN 102665738 A	12 September 2012
		CN 102665738 B	01 July 2015
		JP 2013-071134 A1	22 April 2013
		JP 5951087 B2	13 July 2016
		WO 2011-071134 A1	16 June 2011
KR 10-2018-0006303 A	17 January 2018	CN 109715832 A	03 May 2019
		CN 109715832 B	10 May 2022
		EP 3483284 A1	15 May 2019
		EP 3483284 A4	18 March 2020
		JP 2019-535231 A	12 December 2019
		JP 6808011 B2	06 January 2021
		KR 10-1923969 B1	30 November 2018
		US 11193173 B2	07 December 2021
		US 2019-0345561 A1	14 November 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/017254

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/74(2006.01)i; **A61K 38/16**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A61P 19/02**(2006.01)i; **A23L 33/135**(2016.01)i; **A23L 33/195**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/74(2006.01); A23L 33/135(2016.01); A61K 31/702(2006.01); A61K 35/20(2006.01); C12Q 1/68(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: 프로피오니박테리움 프레우덴레키 (Propionibacterium freudenreichii), 세포외 소포체(extracellular vesicles), 샤페로닌(chaperonin), 파골세포(osteoclast), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YEOM, J. 등, "Probiotic Propionibacterium freudenreichii MJ2 Enhances Osteoblast Differentiation and Mineralization by Increasing the OPG/RANKL Ratio", Microorganisms, 2021, 9권, 문헌번호 673, 페이지 1-22 페이지 3, 7, 10, 17, 18	1-10
A	KR 10-2022-0107541 A (고려대학교 산학협력단) 2022.08.02 청구항 1-11	1-10
A	KR 10-2020-0000956 A (고려대학교 산학협력단) 2020.01.06 전문	1-10
A	JP 2016-028033 A (MEIJI CO., LTD.) 2016.02.25 전문	1-10
A	KR 10-2018-0006303 A (주식회사 엠디헬스케어 등) 2018.01.17 전문	1-10

☐ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년02월02일(02.02.2024)	**2024년02월05일(05.02.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/017254

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0107541 A	2022/08/02	KR 10-2482433 B1	2022/12/27
		WO 2022-158922 A2	2022/07/28
		WO 2022-158922 A3	2022/09/15
KR 10-2020-0000956 A	2020/01/06	없음	
JP 2016-028033 A	2016/02/25	CN 102665738 A	2012/09/12
		CN 102665738 B	2015/07/01
		JP 2013-071134 A1	2013/04/22
		JP 5951087 B2	2016/07/13
		WO 2011-071134 A1	2011/06/16
KR 10-2018-0006303 A	2018/01/17	CN 109715832 A	2019/05/03
		CN 109715832 B	2022/05/10
		EP 3483284 A1	2019/05/15
		EP 3483284 A4	2020/03/18
		JP 2019-535231 A	2019/12/12
		JP 6808011 B2	2021/01/06
		KR 10-1923969 B1	2018/11/30
		US 11193173 B2	2021/12/07
		US 2019-0345561 A1	2019/11/14