

명세서

발명의 명칭: 스핀고모나스 속 세균 유래 나노소포 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 스핀고모나스 속 세균 유래 나노소포 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 스핀고모나스 속 세균에서 유래하는 나노소포를 이용한 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 등의 진단방법, 상기 소포를 포함하는 상기 질환에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 및 상기 소포를 포함하는 뇌질환 치료 약물전달용 조성물 등에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2018년 12월 10일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2018-0158623호 및 2019년 10월 23일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2019-0132138호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

- [4] 21세기에 들어서면서 과거 전염병으로 인식되던 급성 감염성질환의 중요성이 탈해지는 반면, 인간과 마이크로바이옴(microbiome)과의 부조화에 의해 발생하는 면역기능 이상을 동반한 만성질환이 삶의 질과 인간 수명을 결정하는 주요 질환으로 질병패턴이 바뀌었다. 21세기 난치성 만성질환으로서, 암, 심혈관질환, 알레르기-만성폐질환, 대사질환, 및 신경-정신질환이 인간 수명과 삶의 질을 결정하는 주요 질환으로서 국민보건에 큰 문제가 되고 있다.
- [5] 인체에 공생하는 미생물의 개수는 100조 개에 이르러 인간 세포보다 약 10배가 많으며, 미생물의 유전자수는 인간 유전자수의 100배가 넘는 것으로 알려져 있다. 미생물총(microbiota 혹은 microbiome)은 주어진 거주지에 존재하는 진정세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)을 포함한 미생물 군집(microbial community)을 말한다.
- [6] 우리 몸에 공생하는 세균 및 주변 환경에 존재하는 세균은 다른 세포로의 유전자, 저분자화합물, 단백질 등의 정보를 교환하기 위하여 나노미터 크기의 소포(vesicle)를 분비한다. 점막은 200 나노미터(nm) 크기 이상의 입자는 통과할 수 없는 물리적인 방어막을 형성하여 점막에 공생하는 세균인 경우에는 점막을 통과하지 못하지만, 세균 유래 소포는 크기가 100 나노미터 크기 이하라서 비교적 자유롭게 점막을 통하여 상피세포를 통과하여 우리 몸에 흡수된다. 국소적으로 분비된 세균 유래 소포는 점막의 상피세포를 통해 흡수되어 국소 염증반응을 유도할 뿐만 아니라, 상피세포를 통과한 소포는 림프관을 통해 전신적으로 흡수되어 각 장기로 분포하고, 분포된 장기에서 면역 및 염증반응을 조절한다. 예를 들어, 대장균(*Eshcherichia coli*)과 같은 병원성 그람음성세균에서

유래하는 소포는 국소적으로 염증반응 및 암을 일으키고, 혈관으로 흡수된 경우에는 혈관 내피세포 염증반응을 통해 전신적인 염증반응 및 혈액응고를 촉진시킨다. 또한 인슐린이 작용하는 근육세포 등에 흡수되어서 인슐린저항성과 당뇨병을 유발한다. 반면, 유익한 세균에서 유래하는 소포는 병원성 소포에 의한 면역기능 및 대사기능 이상을 조절하여 질병을 조절할 수 있다.

- [7] 세균에서 유래하는 소포 등의 인자에 대한 면역반응은 인터루킨(Interleukin, 이하 IL)-17 사이토카인 분비를 특징으로 하는 Th17 면역반응이 발생하는데, 이는 세균 유래 소포에 노출 시 상피세포, 면역세포 등에서 IL-6가 분비되고, 이는 IL-17 분비를 특징으로 하는 Th17 면역반응을 유도한다. Th17 면역반응에 의한 염증은 호중구 침윤을 특징으로 하고, 염증이 발생하는 과정에서 호중구, 대식세포 등과 같은 염증세포에서 분비되는 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha, 이하 TNF- α)가 염증 및 암 발생에 중요한 역할을 담당한다.
- [8] 스피노고모나스 속(genus *Sphingomonas*) 세균은 물, 토양, 및 식물의 뿌리 등과 같이 자연계에 널리 서식하는 호기성 그람음성세균으로서, 다른 그람음성세균이 세포외막에 LPS(lipopolysaccharide)를 갖고 있는데 반해, 대신에 세포외막에 GSL(glycosphingolipid)를 갖고 있다. 스피노고모나스 속에는 20개의 종이 알려져 있고, 이 중에서 스피노고모나스 포시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*)는 인간에 병원체 감염을 일으킨다고 보고되었다. 그러나 아직까지 상기 균을 포함하여 스피노고모나스 속 세균에서 유래하는 소포를 응용하여 암, 심혈관질환, 아토피피부염 등과 같은 난치성 질환의 진단 및 치료에 응용한 사례는 보고된 바가 없다.
- [9] 이에, 본 발명에서는 스피노고모나스 속 세균 유래 소포가 정상인에 비하여 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 및 아토피피부염 환자의 임상 샘플에 유의하게 감소되어 있음을 확인하여 상기 질환들을 진단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 스피노고모나스 속 세균에 속하는 스피노고모나스 포시모빌리스 및 스피노고모나스 코렌시스(*Sphingomonas koreensis*)로부터 소포를 분리하고 그 특성을 분석한 결과, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 등의 질환에 대한 예방 또는 치료용 조성물로 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 소포를 경구로 투여하였을 때 뇌로 약물을 전달할 수 있음을 확인하였다.

[10]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 메타게놈(Metagenome) 분석을 통해 정상인에 비하여 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염

환자 유래 샘플에서 스피코모나스 속 세균 유래 소포의 함량이 유의하게 감소되어 있음 확인하였다. 또한, 스피코모나스 속 세균에 속하는 스피코모나스 포시모빌리스 및 스피코모나스 코린시스 균에서 소포를 분리하여 대식세포에 처리하였을 때, 병원성 소포에 의한 IL-6 및 TNF- α 분비를 현저히 억제함을 확인한 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[12] 이에, 본 발명은 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단 방법 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 스피코모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[14] 또한, 본 발명은 스피코모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 뇌질환 치료 약물전달용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

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

[16]

과제 해결 수단

[17] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[18] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[19] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및

[20] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 스피코모나스 속 세균 유래 소포의 함량이 낮을 경우, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환으로 판정하는 단계.

[21] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단 방법을 제공한다:

[22] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[23] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여

제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및

- [24] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 스펜고모나스 속 세균 유래 소포의 함량이 낮을 경우, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환으로 판정하는 단계.
- [25] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (a) 단계에서의 샘플은 혈액 또는 소변일 수 있다.
- [26] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (b) 단계에서의 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [27] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [28] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물 및 화장품 조성물을 포함할 수 있다.
- [29] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [30] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [32] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [33] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 뇌로 약물을 전달하는 약물전달체 조성물(또는 뇌질환 치료 약물전달용 조성물)을 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 목적하는 뇌질환 치료 약물을 담지한 스펜고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌질환 치료 약물 전달 방법을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 스펜고모나스 속 세균 유래 소포의 뇌질환 치료 약물 전달

용도를 제공한다.

- [36] 본 발명의 일 구현예로, 상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것일 수 있다.
- [37] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 소포는 스핀고모나스 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분리되는 것일 수 있다.
- [38] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 소포는 세균에 열처리, 가압처리 등의 방법으로 분리되는 것일 수 있다.
- [39] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 포시모빌리스에서 분리되는 것일 수 있다.
- [40] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 코린시스에서 분리되는 것일 수 있다.

[41]

발명의 효과

- [42] 본 발명자들은 세균인 경우에는 체내에 흡수되지 않지만, 세균 유래 소포인 경우에는 상피세포를 통해 체내에 흡수되어, 전신적으로 분포하고, 신장, 간, 폐를 통해 체외로 배설됨을 확인하였고, 환자 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 통해 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 환자의 혈액 또는 소변에 존재하는 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 정상인에 비하여 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다. 또한, 스핀고모나스 속 세균인 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스를 체외에서 배양하여 소포를 분리하고, 체외에서 염증세포에 투여하였을 때, 병원성 소포에 의한 염증매개체 분비를 유의하게 억제함을 관찰하였다. 또한, 스핀고모나스 포시모빌리스 소포를 구강으로 투여하였을 때, 뇌로 소포가 전달되는 것을 관찰하였다. 이에, 본 발명에 따른 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염에 대한 진단방법, 및 화장품, 식품, 또는 약물 등 상기 질환에 대한 예방, 개선, 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있으며, 나아가 뇌로 약물을 전달하기 위한 약물전달체로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[43]

도면의 간단한 설명

- [44] 도 1a는 마우스에 세균(bacteria)과 세균 유래 소포(EV)를 구강으로 투여한 후, 시간별로 세균과 소포의 분포양상을 촬영한 사진이고, 도 1b는 구강으로 투여한 후 12시간째에, 혈액, 신장, 간, 및 여러 장기를 적출하여, 세균과 소포의 체내 분포양상을 평가한 그림이다.
- [45] 도 2는 마우스에 장내에 세균과 세균 유래 소포(EV)를 투여한 후, 장 점막 상피세포로 세균과 세균 유래 소포의 침윤 여부를 평가한 그림이다(Lu, gut

lumen; LP, gut lamina propria).

- [46] 도 3은 간경변 환자, 간암 환자, 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [47] 도 4는 심근경색 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [48] 도 5는 신부전 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [49] 도 6은 당뇨병 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [50] 도 7은 뇌종양 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [51] 도 8은 경도인지장애, 알츠하이머 치매 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [52] 도 9는 우울증 환자 및 정상인의 혈액에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [53] 도 10은 자폐증 환자 및 정상인의 소변에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [54] 도 11은 아토피피부염 환자 및 정상인의 혈액 및 소변에 존재하는 세균 유래 소포 메타게놈 분석을 실시한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 비교한 결과이다.
- [55] 도 12는 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 세포사멸 효과를 평가하기 위하여, 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 대식세포(Raw264.7 cell)에 처리하여 세포사멸을 평가한 결과이다(EV, extracellular vesicle).
- [56] 도 13a 및 도 13b는 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 염증유발 효과를 평가하기 위하여, 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 대식세포(Raw264.7 cell)에 처리하여, 염증매개체 분비 정도를 병원성 소포인 대장균 소포 (*E. coli* EV)와 비교한 결과로, 도 13a는 IL-6 분비 정도를 비교한 것이고, 도 13b는 TNF- α 분비 정도를 비교한 것이다(EV: extracellular vesicle).
- [57] 도 14a 및 도 14b는 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 병원성 소포인 대장균 소포(*E. coli* EV) 처리 전에 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 전처리하여, 대장균 소포에 의한 염증매개체 분비에 미치는 영향을 평가한 결과로, 도 14a는 IL-6 분비 정도를 비교한 것이고, 도 14b는 TNF- α 분비 정도를 비교한 것이다(SPC101, *Sphingomonas paucimobilis* EV; EV, extracellular vesicle).
- [58] 도 15a 및 도 15b는 스피고모나스 코린시스 유래 소포의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 병원성 소포인 대장균 소포(*E. coli* EV) 처리 전에

스핀고모나스 코린시스 유래 소포를 전처리하여, 대장균 소포에 의한 염증매개체 분비에 미치는 영향을 평가한 결과로, 도 15a는 IL-6 분비 정도를 비교한 것이고, 도 15b는 TNF- α 분비 정도를 비교한 것이다(SPC102, *Sphingomonas koreensis* EV; EV, extracellular vesicle).

[59] 도 16은 마우스에 스페르미노모나스 포시모빌리스 유래 소포를 구강으로 투여한 후, 시간별로 소포의 분포양상을 촬영한 사진이다.

[60] 도 17은 마우스에 스페르미노모나스 포시모빌리스 유래 소포를 구강으로 투여한 후, 뇌조직에서 소포의 분포양상을 시간별로 평가한 그림이다.

[61]

발명의 실시를 위한 형태

[62] 본 발명은 스페르미노모나스 속 세균 유래 소포 및 이의 용도에 관한 것이다.

[63] 본 발명자들은 메타게놈 분석을 통해 정상인에 비하여 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 환자 유래 샘플에서 스페르미노모나스 속 세균 유래 소포의 함량이 현저히 감소되어 있음을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[64] 이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단 방법 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[65] (a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[66] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA 염기서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및

[67] (c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 스페르미노모나스 속 세균 유래 소포의 함량이 낮을 경우 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환으로 판정하는 단계.

[68] 본 발명에서 사용되는 용어 "진단"이란, 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 합병증의 유무, 및 예후 등이다. 본 발명에서 진단은 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 또는 아토피피부염 등의 발병 여부 및 질환의 수준 등을 판단하는 것이다.

[69] 본 발명에서 사용되는 용어 "나노소포(Nanovesicle)" 혹은 "소포(Vesicle)"란, 다양한 세균에서 분비되는 나노 크기의 막으로 된 구조물을 의미한다. 그람음성균(gram-negative bacteria) 유래 소포, 또는 외막 소포(outer membrane vesicles, OMVs)는 내독소(lipopolysaccharide) 또는

글리코스핑고리피드(glycosphingolipid), 독성 단백질, 및 세균 DNA와 RNA도 가지고 있고, 그람양성균(gram-positive bacteria) 유래 소포는 단백질과 핵산 외에도 세균의 세포벽 구성성분인 펩티도글리칸(peptidoglycan)과 리포테이코산(lipoteichoic acid)도 가지고 있다. 본 발명에 있어서, 나노소포 혹은 소포는 스피노고모나스 속 세균에서 자연적으로 분비되거나 또는 세균에 열처리, 가압처리 등을 통해 인공적으로 생산하는 것으로, 10 내지 200 nm의 평균 직경을 가지고 있다.

- [70] 본 발명에서 사용되는 용어, "메타게놈"이란, "군유전체"라고도 하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈, 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다.
- [71] 상기 소포는 스피노고모나스 속 세균을 포함하는 배양액을 원심분리, 초고속 원심분리, 고압처리, 압출, 초음파분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기천공, 기계적 분해, 화학물질 처리, 필터에 의한 여과, 겔 여과 크로마토그래피, 프리-플로우 전기영동, 및 모세관 전기영동으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법을 사용하여 분리할 수 있다. 또한, 불순물의 제거를 위한 세척, 수득된 소포의 농축 등의 과정을 추가로 포함할 수 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서의 샘플은 혈액 또는 소변일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서의 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 프라이머 쌍일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 스피노고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [75] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물, 및 화장품 조성물을 포함한다.
- [76] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 스피노고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는

치료방법을 제공한다.

- [77] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 스피르고모나스 속 세균 유래 소포의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [78] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 스피르고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [79] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 스피르고모나스 속 세균 유래 소포의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [80] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 목적하는 뇌질환 치료 약물을 담지한 스피르고모나스 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌질환 치료 약물 전달 방법을 제공한다.
- [81] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 스피르고모나스 속 세균 유래 소포의 뇌질환 치료 약물 전달 용도를 제공한다.
- [82] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 아토피피부염 등을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [83] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 아토피피부염 등에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [84] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [85] 본 발명에서 사용되는 용어 "약물전달체"란, 특정 장기, 조직, 세포, 또는 세포소기관으로 약물을 전달하기 위하여 본 발명에 따른 조성물에 약물을 로딩하여 전달하는 모든 수단 또는 행위를 의미한다.
- [86] 본 발명의 일 실시예에서는, 세균 및 세균 유래 소포를 마우스 경구로 투여하여 세균 및 소포의 체내 흡수, 분포, 및 배설 양상을 평가하여, 세균인 경우에는 장 점막을 통해 흡수되지 않는데 비해 소포는 투여 5분 이내에 흡수되어 전신적으로 분포하고, 신장, 간 등을 통해 배설됨을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [87] 본 발명의 다른 실시예에서는, 세균과 세균 유래 소포를 장으로 직접 투여하여 점막의 방어막을 통과하는지를 평가하였는 바, 세균인 경우에는 점막의 방어막을 통과하지 못하였지만, 세균 유래 소포인 경우에는 점막의 방어막을

통과함을 확인하였다(실시예 2 참조).

- [88] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 환자 및 상기 환자와 연령 및 성별을 매칭한 정상인의 혈액 또는 소변에서 분리한 소포를 이용하여 세균 메타게놈 분석을 실시하였다. 그 결과, 정상인 샘플에 비하여, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 환자의 임상 샘플에 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(실시예 4 내지 12 참조).
- [89] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스 균주를 배양하여 이로부터 분리된 소포의 염증유발 효과를 평가하였는데, 다양한 농도의 상기 세균 유래 소포를 대식세포에 처리한 후, 대표적 병원성 소포인 대장균 유래 소포를 처리하여 염증매개체 분비 정도를 비교한 결과, 대장균 유래 소포에 의한 IL-6 및 TNF- α 분비와 비교해서 상기 스핀고모나스속 세균 유래 소포에 의한 염증 매개체 분비능이 현저히 감소되어 있었다(실시예 14 참고).
- [90] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스 균주 유래 소포의 항염증 효과를 평가하였는데, 병원성 소포인 대장균 유래 소포를 처리하기 전에 다양한 농도의 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스 유래 소포를 대식세포에 처리한 후, 염증매개체 분비를 평가한 결과, 염증유발 대장균 유래 소포에 의한 IL-6 및 TNF- α 분비를 상기 소포가 효율적으로 억제함을 확인하였다(실시예 15 및 16 참고).
- [91] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 스핀고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 경구로 투여하였을 때, 1시간이 경과한 시점부터 위에 상기 소포가 분포하였고, 3시간이 경과한 시점부터는 소장 및 대장에도 분포됨을 확인하였으며, 이러한 장기 내 분포는 72시간까지 유지됨을 확인하였다. 나아가 형광 표지한 스핀고모나스 포시모빌리스 유래 소포 특이적으로 3시간부터 뇌로 이동하여, 32시간까지 증가하다가 이후 72시간이 경과한 시점까지 점차적으로 감소함을 확인하였다(실시예 17 참조).
- [92] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한

제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제, 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.

- [93] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [94] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [95] 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있다.
- [96] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 유효성분을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [97] 본 발명의 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

- [98] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [99] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 스펀고모나스 속 세균 유래 소포뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [100] 또한, 본 발명의 조성물은 스펀고모나스 속 세균 유래 소포 이외에, 스펀고모나스 속 세균 유래 소포와 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 유기 자외선 차단제로는 글리세릴파바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소듐페닐디벤즈이미다졸테트라설포네이트, 디에틸헥실부타미도트리아존, 디에틸아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메틸렌비스-벤조트리아졸릴테트라메틸부틸페놀, 4-메틸벤질리텐캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에틸헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에틸디하이드록시프로필파바, 옥토크릴렌, 에틸헥실디메틸파바, 에틸헥실메톡시신나메이트, 에틸헥실살리실레이트, 에틸헥실트리아존, 이소아밀-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에틸벤잘말로네이트), 테레프탈릴리덴디캠퍼설포닉애씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트 및 아미노벤조산(파바)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [101] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다. 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [102] 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.

[103]

[104] **[실시예]**

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

[106] 세균과 세균 유래 소포가 위장관을 통해 전신적으로 흡수되는 지를 평가하기 위하여 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 우선 마우스의 위장에 형광으로 표지한 상기 세균과 상기 세균 유래 소포를 각각 50 μ g의 용량으로 구강 투여하고 0분, 5분, 3시간, 6시간, 12시간 후에 형광을 측정하였다. 마우스 전체 이미지를 관찰한 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 세균의 경우에는 전신적으로 흡수되지 않았지만, 세균 유래 소포의 경우에는, 투여 후 5분에 전신적으로 흡수되었고, 투여 3시간 후에는 방광에서 형광이 진하게 관찰되어, 소포가 비뇨기계로 배설됨을 알 수 있었으며 또한, 소포는 투여 12시간까지 체내에 존재함을 알 수 있었다(도 1a 참조).

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

[108]

[109] **실시예 2. 세균 및 세균 유래 소포의 장 점막 방어막 침투 유무 평가**

[110] 세균과 세균 유래 소포가 점막 방어막을 통과하여 조직으로 침윤되는지를 평가하기 위하여, 세균과 세균 유래 소포를 장으로 직접 투여한 후, 면역조직화학(Immunohistochemistry) 방법으로 점막 방어막을 통과하여 장 조직으로의 침윤을 평가하였다. 점막조직에서 세균과 소포 존재를 평가하기 위하여 세균과 소포에 대한 항체를 제작하여 GFP(Green fluorescent protein)를 달아 사용하였고, DAPI(4, 6-diamidino 2-phenylindole) 염색을 한 후, 현미경으로 관찰하였다.

[111] 그 결과, 세균의 경우에는 점막 방어막을 통과하지 못한 반면, 세균 유래 소포는 점막으로 통과하여 장 조직으로 침윤됨을 확인하였다(도 2 참조).

[112]

[113] **실시예 3. 임상 샘플에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석**

[114] 혈액 또는 소변을 먼저 10 ml 튜브에 넣고 원심분리기(3,500 x g, 10 min, 4 °C)로 부유물을 가라앉힌 후, 상등액만을 새로운 10 ml 튜브에 옮겼다. 0.22 μ m 필터를 사용하여 세균 및 이물질을 제거한 후, 센트리프루프튜브(centrifuge filters 50 kD)에 옮겨서 1500 x g, 4 °C에서 15분간 원심분리하여 50 kD 보다 작은 물질은 버리며 10 ml 까지 농축 시켰다. 다시 한 번 0.22 μ m 필터(filter)를 사용하여 박테리아 및 이물질을 제거한 후, Type 90ti 로터로 150,000 x g, 4 °C에서 3시간

동안 초고속원심분리를 수행하고, 상등액을 제거한 후 덩어리진 펠릿(pellet)을 생리식염수(Phosphate buffered saline, PBS)로 녹였다.

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

- [116] [표1]

프라이머		서열	서열번호
16S rDNA	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG- 3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTAT AAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA ATCC-3	2

- [117]

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

- [119]

- [120] 실시예 4. 간질환 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

- [121] 상기 실시예 3의 방법으로 간경변 환자 97명, 간암 환자 76명, 그리고 나이와 성별을 매칭한 정상인 171명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스핀고모나스 속 세균 유래

소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 간경변 및 간암환자의 혈액에 스피고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 3 참조).

[122]

[123] 실시예 5. 심근경색 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[124] 상기 실시예 3의 방법으로 심근경색 환자 69명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 159명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 심근경색 환자의 혈액에 스피고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 4 참조).

[125]

[126] 실시예 6. 신부전 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[127] 상기 실시예 3의 방법으로 신부전 환자 36명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 72명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 신부전 환자의 혈액에 스피고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 5 참조).

[128]

[129] 실시예 7. 당뇨병 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[130] 상기 실시예 3의 방법으로 당뇨병 환자 81명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 126명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 당뇨병 환자의 혈액에 스피고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 6 참조).

[131]

[132] 실시예 8. 뇌종양 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[133] 상기 실시예 3의 방법으로 뇌종양 환자 80명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 121명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스피고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 뇌종양 환자의 혈액에 스피고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 7 참조).

[134]

[135] 실시예 9. 경도인지장애 및 치매 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[136] 상기 실시예 3의 방법으로 경도인지장애 환자 76명, 알츠하이머치매 환자 70명, 및 나이와 성별을 매칭한 정상인 146명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스피고모나스 속 세균

유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 경도인지장애 및 알츠하이머치매 환자의 혈액에 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 8 참조).

[137]

[138] 실시예 10. 우울증 환자의 혈액에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[139] 상기 실시예 3의 방법으로 우울증 환자 70명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 140명의 혈액을 대상으로, 혈액 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스핀고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액에 비하여 우울증 환자의 혈액에 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 9 참조).

[140]

[141] 실시예 11. 자폐증 환자의 소변에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[142] 상기 실시예 3의 방법으로 자폐증 환자 30명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 40명의 소변을 대상으로, 소변 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스핀고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 소변에 비하여 자폐증 환자의 소변에 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 10 참조).

[143]

[144] 실시예 12. 아토피피부염 환자의 혈액 및 소변에서 세균 유래 소포 메타게놈 분석

[145] 상기 실시예 3의 방법으로 아토피피부염 환자 61명과 나이와 성별을 매칭한 정상인 52명의 혈액 및 소변을 대상으로, 혈액 및 소변 내에 존재하는 소포에서 유전자를 추출하여 메타게놈 분석을 수행한 후, 스핀고모나스 속 세균 유래 소포의 분포를 평가하였다. 그 결과, 정상인 혈액 및 소변에 비하여 아토피피부염 환자의 혈액 및 소변에 스핀고모나스 속 세균 유래 소포가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 11 참조).

[146]

[147] 실시예 13. 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스 배양액에서 소포 분리

[148] 스핀고모나스 포시모빌리스 및 스핀고모나스 코린시스 균주를 배양한 후 이의 소포를 분리하여 특성을 분석하였다. 상기 균주를 37 °C 배양기에서 흡광도(OD 600)가 1.0~1.5가 될 때까지 MRS(de Man-Rogosa and Sharpe) 배지에서 배양한 후 LB(Luria-Bertani) 배지에 서브-컬처(sub-culture) 하였다. 이후 균주가 포함되어 있는 배양액을 회수하여 10,000 x g, 4 °C에서 20분 동안 원심분리하여 균체를 제거하고, 0.22 µm 필터에 여과하였다. 여과한 상층액을 100 kDa Pellicon 2 Cassette 필터 멤브레인(Merck Millipore, US)으로 MasterFlex 펌프 시스템(Cole-Parmer, US)을 이용하여 미세여과(microfiltration)를 통해 50 ml 이하의 부피로 농축하였다. 농축시킨 상층액을 다시 한 번 0.22 µm 필터로

여과한 다음, BCA(Bicinchoninic acid) assay를 이용해 단백질을 정량하였고, 얻어진 소포에 대하여 하기 실험들을 실시하였다.

[149]

[150] 실시예 14. 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 염증유발 효과

[151] 염증세포에서 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포(*Sphingomonas*

paucimobilis EV, SPC101)의 염증매개체(IL-6, TNF- α) 분비에 대한 영향을 알아보기 위해, 마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 다양한 농도(0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후, 세포사멸과 ELISA를 진행하였다.

[152] 보다 구체적으로, 48-well 세포 배양 플레이트 안에 5×10^4 개씩 분주한 Raw 264.7 세포에 DMEM(Dulbecos Modified Eagles Medium) 무혈청 배지로 희석한 다양한 농도의 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 이후 세포사멸은 EZ-CYTOX(Dogen, Korea)을 이용하여 측정하였고, 세포 배양액은 1.5 ml 튜브에 모아 3000 x g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 모아 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관해두었다가 ELISA를 진행하였다.

[153] ELISA를 수행하기 위해, 캡처(Capture) 항체를 PBS에 희석시켜 96-웰 폴리스티렌(polystyrene) 플레이트에 작용 농도에 맞게 50 μl 씩 분주한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안(overnight) 반응시켰다. 이후 PBST(0.05 % tween-20이 들어있는 PBS) 용액 100 μl 로 세 번씩 씻어준 후, RD(1 % BSA 가 들어있는 PBS) 용액 100 μl 을 분주하여 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking) 하였다. 그 다음, 샘플 및 스탠다드(standard)를 농도에 맞게 50 μl 씩 분주하고 상온에서 2시간 동안 반응시키고 PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, 디텍션(detection) 항체를 RD에 희석시켜 작용 농도에 맞게 50 μl 씩 분주하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음, PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, Streptavidin-HRP (R&D system, USA)를 RD에 1/40으로 희석시켜 50 μl 씩 분주하여 상온에서 20분간 반응시켰다.

[154] 마지막으로, PBST 100 μl 로 세 번 씻어준 후, TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 기질 (SurModics, USA) 50 μl 를 분주하고 5분에서 20분 후 발색이 진행되었을 때, 1 M 황산용액을 50 μl 씩 분주해 반응을 멈추고 SpectraMax M3 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[155] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포 (SPC 101) 처리에 의한 세포사멸은 관찰되지 않았다(도 12 참조). 또한, 염증세포에서의 염증매개체 분비 양상을 평가한 결과, 양성대조군인 대장균 유래 소포(*E. coli* EV 1 $\mu\text{g/ml}$) 처리 시에 비해 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포 (SPC101)의 처리 시 IL-6(도 13a) 및 TNF- α (도 13b)와 같은 염증매개체의 분비가 훨씬 감소되어 있음을 확인하였다(도 13a 및 도 13b 참조).

[156]

[157] 실시예 15. 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 항염증 효과

[158] 상기 실시예 14의 결과를 바탕으로, 스피고모나스 포시모빌리스 유래 소포의

항염증 효과를 평가하기 위하여, 다양한 농도(0.1, 1, 10 µg/ml)의 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포(SPC101)를 마우스 대식세포주에 12시간 전처리한 후, 병원성 원인 인자인 대장균 유래 소포 1 µg/ml를 처리하고 12시간 후에 염증성 사이토카인의 분비를 ELISA로 측정하였다.

[159] 그 결과, 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 전처리 시, 대장균 유래 소포 자극에 의한 염증세포에 유도되는 IL-6(도 14a) 및 TNF-α(도 14b)와 같은 염증매개체 분비가 현저히 억제됨을 확인하였다(도 14a 및 14b 참조).

[160]

[161] **실시예 16. 스피노고모나스 코린시스 유래 소포의 항염증 효과**

[162] 상기 실시예 16의 결과를 바탕으로, 다른 스피노고모나스속 세균의 항염증 효과를 평가하기 위하여, 스피노고모나스 코린시스 유래 소포(SPC102)를 다양한 농도(0.1, 1, 10 µg/ml)로 마우스 대식세포주에 12시간 전처리한 후, 병원성 원인 인자인 대장균 유래 소포 1 µg/ml를 처리하고 12시간 후에 염증성 사이토카인의 분비를 ELISA로 측정하였다.

[163] 그 결과, 스피노고모나스 코린시스 유래 소포를 전처리 시, 대장균 유래 소포 자극에 의한 염증세포에 유도되는 IL-6(도 15a) 및 TNF-α(도 15b)와 같은 염증매개체 분비가 현저히 억제됨을 확인하였다(도 15a 및 15b 참조).

[164]

[165] **실시예 17. 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포의 분포 양상**

[166] 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포를 경구로 투여하였을 때, 시간별 장기 내 흡수 및 분포를 확인하기 위해 아래와 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 형광으로 표지한 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포 10 µg을 경구로 투여하고 각각 1, 3, 6, 32, 48, 72시간 후에 형광을 측정하였다. 마우스 전체 이미지의 형광을 관찰한 결과, 경구 투여 1시간부터 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포가 위에 분포되었고 3시간부터는 소장 및 대장에도 분포됨을 확인하였으며 이러한 장기 내 분포가 72시간까지 유지됨을 관찰하였다(도 16 참조).

[167] 또한, 형광 표지한 스피노고모나스 포시모빌리스 유래 소포 특이적으로 3시간부터 뇌로 이동함이 확인되었고, 뇌로 이동한 세포외소포의 분포도가 32시간까지 증가하다가 32시간 이후부터 72시간까지 점차적으로 감소함을 확인하였다(도 17 참조).

[168]

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

[170]

산업상 이용가능성

- [171] 본 발명에 따른 스펜고모나스 속 세균 유래 소포는 상피세포를 통해 체내에 흡수되어 전신적으로 분포하고, 신장, 간, 폐를 통해 체외로 배설됨이 확인되었으며, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염 환자의 혈액 또는 소변에서 유의하게 감소되어 있음이 확인되었고, 병원성 소포에 의한 염증매개체 분비를 유의하게 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 스펜고모나스 속 세균 유래 소포는 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염에 대한 진단방법, 및 화장품, 식품, 또는 약물 등 상기 질환에 대한 예방, 개선, 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있으며, 나아가 뇌로 약물을 전달하기 위한 약물전달체로 유용하게 이용될 수 있다는 점에서 산업적 이용 가치가 클 것으로 예상된다.

청구범위

- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단을 위한 정보제공방법:
(a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
(b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
(c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 스피노고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포의 함량이 낮을 경우, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환으로 판정하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 (a) 단계에서의 샘플은 혈액 또는 소변인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 3] 스피노고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 소포는 스피노고모나스 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분비되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 스피노고모나스 속 세균 유래 소포는 스피노고모나스 포시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제3항에 있어서,
상기 스피노고모나스 속 세균 유래 소포는 스피노고모나스 코린시스(*Sphingomonas koreensis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 스피노고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된

- 하나 이상의 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 소포는 평균 직경이 10 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 소포는 스핀고모나스 속 세균에서 자연적 또는 인공적으로 분비되는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서,
상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 포시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서,
상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 코린시스(*Sphingomonas koreensis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 13] 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 아토피피부염의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 14] 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는, 뇌질환 치료 약물전달용 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 포시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 뇌질환 치료 약물전달용 조성물.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 스핀고모나스 속 세균 유래 소포는 스핀고모나스 코린시스(*Sphingomonas koreensis*)에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 뇌질환 치료 약물전달용 조성물.
- [청구항 17] 하기의 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 진단 방법:
(a) 정상인 및 피검자 샘플에서 분리한 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
(b) 상기 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA에 존재하는 유전자 서열에 기초하여 제작한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행한 후, 각각의 PCR 산물을 수득하는 단계; 및
(c) 상기 PCR 산물의 정량분석을 통하여 정상인에 비하여 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포의 함량이 낮을 경우, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환으로 판정하는 단계.

- [청구항 18] 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 19] 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포의 간경변, 간암, 심근경색, 신부전, 당뇨병, 뇌종양, 경도인지장애, 치매, 우울증, 자폐증, 및 아토피피부염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도.
- [청구항 20] 스핀고모나스(*Sphingomonas*) 속 세균 유래 소포의 뇌질환 치료 약물 전달 용도.