

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-513799

(P2020-513799A)

(43) 公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 Z N A B	4 B 0 1 8
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	4 C 0 8 7

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-548319 (P2019-548319)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月20日 (2019. 2. 20)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年9月4日 (2019. 9. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/002015
 (87) 国際公開番号 WO2019/164230
 (87) 国際公開日 令和1年8月29日 (2019. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0020573
 (32) 優先日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2019-0018989
 (32) 優先日 平成31年2月19日 (2019. 2. 19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 516348577
 エムディー ヘルスケア インコーポレイテッド
 MD HEALTHCARE INC.
 大韓民国 ソウル 03923、マポード、ワールド カップ ブクロー 56-ギル、9、#1303、(サンアムードン、ウリィ テクノロジー ビルディング)
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
 (72) 発明者 キム、ユンクン
 大韓民国 10908 キョンギード、パチュエシ、ハンビットーロ、70、521-203

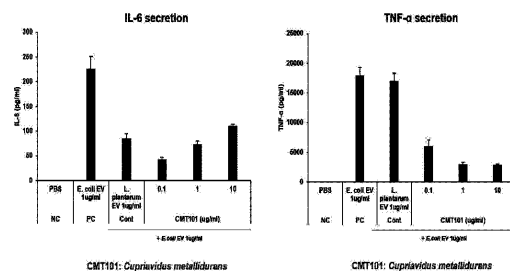
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クブリアウイドゥス属細菌由来のナノ小胞及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞及びその使用に関する。本発明者らは、正常人に比べて胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫などの悪性疾患、心筋病症、心房細動、異形狭心症などの心臓疾患、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病などの患者のサンプルで前記小胞が有意に減少され、前記小胞は、病原性小胞による炎症媒介体の分泌を有意に抑制すると同時に癌発生を抑制した。本発明によるクブリアウイドゥス属細菌由来の小胞は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫などの悪性疾患、心筋病症、心房細動、異形狭心症などの心臓疾患、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断方法、及び前記疾患の予防又は治療用組成物を開発するための目的で有用である。

【選択図】なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断のための情報を提供する方法

：

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞から DNA を抽出するステップ；

(b) 前記抽出した DNA に対して 16S rDNA に存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った後、それぞれの PCR 産物を取得するステップ；及び

(c) 前記 PCR 産物の定量分析を通じて正常人に比べてクプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

【請求項 2】

前記ステップ (a) でのサンプルは、大便、血液、小便又は唾液であることを特徴とする、請求項 1 に記載の情報提供方法。

【請求項 3】

クプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される 1 以上の疾病の予防又は治療用である、薬学的組成物。

【請求項 4】

前記小胞は、平均直径が 10 ~ 200 nm であることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記小胞は、クプリアウイドゥス属細菌から自然的又は人工的に分泌されることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞は、クプリアウイドゥス・メタリデュランス (Cupriavidus metallidurans) から分泌されることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

クプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される 1 以上の疾病予防又は改善用食品組成物。

【請求項 8】

前記小胞は、平均直径が 10 ~ 200 nm であることを特徴とする、請求項 7 に記載の食品組成物。

【請求項 9】

前記小胞は、クプリアウイドゥス属細菌から自然的又は人工的に分泌されることを特徴とする、請求項 7 に記載の食品組成物。

【請求項 10】

前記クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞は、クプリアウイドゥス・メタリデュランス (Cupriavidus metallidurans) から分泌されることを特徴とす

る、請求項 7 に記載の食品組成物。

【請求項 1 1】

クプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される 1 以上の疾病の予防又は治療用である、吸入剤組成物。

【請求項 1 2】

下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断方法：

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞から DNA を抽出するステップ；

(b) 前記抽出した DNA に対して 16S rDNA に存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いて PCR を行った後、それぞれの PCR 産物を取得するステップ；及び

(c) 前記 PCR 産物の定量分析を通じて正常人に比べてクプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

【請求項 1 3】

クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞を有効成分として含む薬学的組成物を個体に投与するステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される 1 以上の疾病の予防又は治療方法。

【請求項 1 4】

クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される 1 以上の疾病の予防又は治療のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クプリアウイドゥス属細菌由来のナノ小胞及びその使用に関し、より具体的には、クプリアウイドゥス属細菌に由来するナノ小胞を用いた癌、心血管疾患、肺疾患、代謝疾患及び神経 - 精神疾患などの診断方法、及び前記小胞を含む前記疾患の予防、改善又は治療用組成物などに関する。

【背景技術】

【0002】

21 世紀に入ってから、過去には伝染病と認識された急性感染性疾患の重要性が減る一方、ヒトとマイクロバイームとの不調和により発生する免疫機能の異常を伴った慢性疾患が生活の質とヒトの寿命を決定する主要疾患となり疾病パターンが変わった。21 世紀の難治性慢性疾患として、癌、心血管疾患、慢性肺疾患、代謝疾患及び神経 - 精神疾患などが国民保健において大きい問題になっている。前記難治性慢性疾患は、原因因子による免疫機能の異常を伴った慢性炎症を特徴としている。

【0003】

人体に共生する微生物は 100 兆に至り、ヒト細胞より 10 倍多く、微生物の遺伝子数は、ヒトの遺伝子数の 100 倍を超えることが知られている。微生物叢 (microbi

10

20

30

40

50

otaあるいはmicrobiome)は、与えられた生息地に存在する真正細菌(bacteria)、古細菌(archaea)、真核生物(eukarya)を含んだ微生物群集(microbial community)を言う。

【0004】

人体に共生する細菌及び周辺環境に存在する細菌は、他の細胞への遺伝子、低分子化合物、タンパク質などの情報を交換するためにナノメートルサイズの小胞(vesicle)を分泌する。粘膜は、200ナノメートル(nm)サイズ以上の粒子が通過できない物理的な防御膜を形成する。粘膜に共生する細菌の場合には粘膜を通過できないが、細菌由来の小胞は、サイズが100ナノメートル以下であるので、比較的自由に粘膜を通じて上皮細胞を通過した後、人体に吸収される。局所的に分泌された細菌由来の小胞は、粘膜の上皮細胞あるいは皮膚角質細胞を通じて吸収されて局所炎症反応を誘導するだけでなく、人体に吸収されて各臓器に分布する。そして、吸収された臓器で免疫及び炎症反応を調節する。例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)のような病原性グラム陰性菌に由来する小胞は、気道を通じて吸入されて肺気腫を誘発して慢性閉鎖性肺疾患(COPD)を誘導する。腸を通じて吸収された場合には、局所的に大腸炎を起こす。血管内では、血管内皮細胞炎症反応を通じて全身的な炎症反応及び血液凝固を促進させる。また、インシュリンが作用する筋肉細胞などに吸収されてインシュリン抵抗性と糖尿病を誘発する。一方、有益な細菌に由来する小胞は、病原性小胞による免疫機能の異常を調節して疾病を調節することができる。

10

【0005】

細菌に由来する小胞などの因子に対する免疫反応は、インターロイキン(Interleukin、以下、IL)-17サイトカインの分泌を特徴とするTh17免疫反応が発生する。これは、細菌由来の小胞に露出するとき、IL-6が分泌され、これがTh17免疫反応を誘導する。Th17免疫反応による炎症は、好中球浸潤を特徴とし、炎症が発生する過程で大食細胞、好中球などのような炎症細胞から分泌される腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor-alpha、以下、TNF-)が疾病の発生に重要な役目を担当する。

20

【0006】

クプリアウイドゥス属細菌(*Cupriavidus* spp.)は、好気性グラム陰性桿菌として土壌及び臨床検体から分離される。このうちクプリアウイドゥス・メタリデュランス(*Cupriavidus metallidurans*)は、毒性重金属に抵抗する特徴があり、酸素を通じたリン酸化を通じてエネルギーを生産し、一般的に、病原性がないことが知られている。また、クプリアウイドゥス・ネカトル(*Cupriavidus necator*)、クプリアウイドゥス・タイワンエンシス(*Cupriavidus taiwanensis*)などのクプリアウイドゥス種は、マメ科植物で窒素を固定する細菌として知られている。しかし、クプリアウイドゥス属の細菌が細菌外に小胞を分泌するという事実は報告されなかった。特に、癌、心血管疾患、肺疾患、代謝疾患及び神経-精神疾患などの難治性疾患の診断及び治療に応用した事例は報告されたことがない。

30

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、上記のような従来の問題点を解決するために鋭意研究した結果、メタゲノム分析を通じて正常人に比べて胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫などの悪性疾患、心筋病症、心房細動、異形狭心症などの心臓疾患、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病、又は鬱病患者由来のサンプルからクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の含量が有意に減少していることを確認した。また、クプリアウイドゥス属細菌に属するクプリアウイドゥス・メタリデュランス(*C. metallidurans*)菌から小胞を分離して大食細胞に処理したとき、病原性小胞によるIL-6及びTNF-の分泌を顕著に抑制すると同

50

時にマウスモデルにおいて抗癌効果があることを確認し、これに基づいて本発明を完成した。

【0008】

そこで、本発明は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断のための情報提供方法を提供することを目的とする。

【0009】

また、本発明は、クブリアウィドゥス属由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防、改善又は治療用組成物を提供することを他の目的とする。

10

【0010】

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は、上記で言及した課題に制限されず、言及しなかったまた他の課題は、以下の記載から当業者に明確に理解されるべきである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記のような本発明の目的を達成するために、本発明は、下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断のための情報提供方法を提供する：

20

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出するステップ；

(b) 前記抽出したDNAに対して16S rDNAに存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行った後、それぞれのPCR産物を取得するステップ；及び

(c) 前記PCR産物の定量分析を通じて正常人に比べてクブリアウィドゥス属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

30

【0012】

また、本発明は、下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断方法を提供する：

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出するステップ；

(b) 前記抽出したDNAに対して16S rDNAに存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いてPCRを行った後、それぞれのPCR産物を取得するステップ；及び

40

(c) 前記PCR産物の定量分析を通じて正常人に比べてクブリアウィドゥス属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

【0013】

本発明の一具現例で、前記ステップ(a)でのサンプルは、大便、血液、小便又は唾液であってもよい。

【0014】

本発明の他の具現例で、前記ステップ(b)でのプライマー対は、配列番号1及び配列番号2のプライマーであってもよい。

50

【0015】

また、本発明は、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞を有効成分として含む、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0016】

また、本発明は、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞を有効成分として含む、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防又は改善用食品組成物を提供する。

10

【0017】

また、本発明は、クプリアウィドゥス(Cupriavidus)属細菌由来の小胞を有効成分として含む、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防又は治療用吸入剤組成物を提供する。

【0018】

また、本発明は、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞を有効成分として含む薬学的組成物を個体に投与するステップを含む、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防又は治療方法を提供する。

20

【0019】

また、本発明は、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防又は治療のため使用を提供する。

【0020】

本発明の一具現例で、前記小胞は、平均直径が10~200nmであってもよい。

【0021】

本発明の他の具現例で、前記小胞は、クプリアウィドゥス属細菌から自然的又は人工的に分泌されるものであってもよい。

30

【0022】

本発明の他の具現例で、前記クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞は、クプリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞であってもよい。

【発明の効果】

【0023】

本発明者らは、腸内細菌の場合には体内に吸収されないが、細菌由来の小胞の場合には上皮細胞を通じて体内に吸収されて全身的に分布し、腎臓、肝臓、肺を通じて体外に排泄されることを確認し、患者の大便、血液、小便又は唾液などに存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を通じて胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病患者の大便、血液、小便又は唾液に存在するクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が正常人に比べて有意に減少していることを確認した。また、クプリアウィドゥス属細菌の一種であるクプリアウィドゥス・メタリデュランスを体外で培養して小胞を分離した後、体外で炎症細胞に投与したとき、病原性小胞による炎症媒介体の分泌を有意に抑制させることを確認したところ、本発明によるクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に対する診断方法、

40

50

及び前記疾患に対する予防、改善又は治療用組成物に有用に用いられ得ると期待される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1 a は、マウスに細菌と細菌由来の小胞（EV）を口腔で投与した後、時間別に細菌と小胞の分布様相を撮影した写真であり、図1 b は、口腔で投与した後12時間目に、血液、腎臓、肝臓その他の臓器を摘出して細菌と小胞の体内分布様相を評価した結果である。

【図2】図2 ~ 図2 c は、胃癌患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図2 a は大便、図2 b は血液、図2 c は小便を試料とした結果である。

10

【図3】図3 a 及び図3 b は、大腸癌患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図3 a は、大便、図3 b は、小便を試料とした結果である。

【図4】図4 は、膵臓癌患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図5】図5 は、胆管癌患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図6】図6 a 及び図6 b は、乳癌患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図6 a は血液、図6 b は小便を試料とした結果である。

20

【図7】図7 a 及び図7 b は、卵巣癌患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図7 a は血液、図7 b は小便を試料とした結果である。

【図8】図8 a 及び図8 b は、膀胱癌患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図8 a は血液、図8 b は小便を試料とした結果である。

【図9】図9 は、前立腺癌患者及び正常人の小便に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図10】図10 は、頭頸部癌患者及び正常人の唾液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

30

【図11】図11 は、リンパ腫患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図12】図12 a ~ 図12 c は、心臓疾患患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図12 a は心筋病症、図12 b は心房細動、図12 c は異形狭心症の場合を示す。

【図13】図13 は、脳卒中患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

40

【図14】図14 は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図15】図15 a ~ 図15 c は、糖尿病患者及び正常人に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果であって、図15 a は血液、図15 b は小便、図15 c は唾液を試料とした結果である。

【図16】図16 は、腎不全患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

50

【図 17】図 17 は、認知症患者及び正常人の血液に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図 18】図 18 は、パーキンソン病患者及び正常人の小便に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図 19】図 19 は、鬱病患者及び正常人の小便に存在する細菌由来の小胞のメタゲノム分析を実施した後、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を比較した結果である。

【図 20】図 20 は、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の細胞死滅効果を評価するために、前記小胞を大食細胞 (Raw 264.7) に投与して細胞死滅程度を評価した結果である。

10

【図 21】図 21 は、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗炎症及び免疫調節効果を評価するために、病原性小胞である大腸菌小胞 (E. coli EV) 処理前にクブリアウイドゥス属細菌由来の小胞を前処理して、大腸菌小胞による炎症媒体である IL-6 及び TNF- α の分泌に及ぶ影響を評価した結果である。

【図 22】図 22 は、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗癌効能を評価するために、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞をマウスに投与したプロトコルである。

【図 23】図 23 は、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗癌効能を評価するために、クブリアウイドゥス・メタリデュランス小胞を腹腔 (IP) 又は経口 (PO) で投与して、癌細胞による腫瘍発生に及ぶ影響を評価した結果である。

20

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞及びその使用に関する。

【0026】

本発明者らは、メタゲノム分析を通じてクブリアウイドゥス属細菌由来の小胞が正常人に比べて癌、心血管疾患、肺疾患、代謝疾患及び神経-精神疾患患者の臨床サンプルで有意に減少していることを確認して、前記疾病を診断することができることを確認した。また、クブリアウイドゥス・メタリデュランス (C. metallidurans) 菌株から小胞を最初に分離して特性を分析した結果、前記菌株由来の小胞が病原性小胞による免疫機能の異常と炎症及び癌を調節することができることを確認した。

30

【0027】

さて、本発明は、下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断のための情報提供方法を提供する：

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞から DNA を抽出するステップ；

(b) 前記抽出した DNA に対して 16S rDNA に存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った後、それぞれの PCR 産物を収得するステップ；及び

40

(c) 前記 PCR 産物の定量分析を通じて正常人に比べてクブリアウイドゥス属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

【0028】

本発明で用いられる用語「診断」とは、広い意味では患者の病気の実態を全ての面にわたって判断することを意味する。判断の内容は、病名、病因、病型、軽重、病状の詳細な様態、合併症の有無及び予後などである。本発明で「診断」は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、

50

異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び／又は鬱病の発病有無及び疾患の程度などを判断することである。

【0029】

本発明において、前記サンプルは、大便、血液、小便又は唾液であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0030】

本発明で用いられる用語「メタゲノム」とは、「群遺伝体」とも言い、土壌、動物の腸など孤立した地域内の全てのウイルス、細菌、カビなどを含む遺伝体の総合を意味するもので、主に培養されない微生物を分析するために配列分析器を用いて一度に多くの微生物を同定することを説明する遺伝体の概念として用いられる。特に、「メタゲノム」は、一種のゲノム、遺伝体を言うのではなく、一つの環境単位の全ての種の遺伝体として一種の混合遺伝体を言う。これは、オミックス的に生物学が発展する過程で一つの種を定義するとき、機能的に既存の一種だけではなく、多様な種が互いに相互作用して完全な種を作るという観点から生じた用語である。技術的には、迅速配列分析法を用いて種に関係なく全てのDNA、RNAを分析し、一つの環境内での全ての種を同定し、相互作用、代謝作用を解明する技法の対象である。

10

【0031】

本発明の他の様態として、本発明は、クブリアウイドゥス属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の予防、治療又は改善用組成物を提供する。前記組成物は、食品組成物、吸入剤組成物及び薬学的組成物を含み、本発明で食品組成物は、健康機能食品組成物を含む。また、本発明の組成物は、口腔噴霧剤、鼻腔噴霧剤又は吸入剤の剤型であってもよい。

20

【0032】

本発明で用いられる用語「予防」とは、本発明による組成物の投与によって前記疾患を抑制するか発病を遅延させる全ての行為を意味する。

【0033】

本発明で用いられる用語「治療」とは、本発明による組成物の投与によって前記疾患に対する症状が好転するか利するように変更されるすべての行為を意味する。

30

本発明で用いられる用語「改善」とは、治療される状態と関連したパラメータ、例えば、症状の程度を少なくとも減少させる全ての行為を意味する。

【0034】

本発明で用いられる用語「ナノ小胞(Nanovesicle)」あるいは「小胞(Vesicle)」とは、多様な細菌から分泌されるナノサイズの膜になった構造物を意味する。グラム陰性菌(gram-negative bacteria)由来の小胞、又は外膜小胞(outer membrane vesicles、OMVs)は、リポ多糖(lipopolysaccharide)だけでなく、タンパク質、低分子化合物及び細菌DNAとRNAも有しており、グラム陽性菌(gram-positive bacteria)由来の小胞は、タンパク質、低分子化合物、核酸外にも細菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン(peptidoglycan)とリポタイコ酸(lipoteichoic acid)も有している。本発明において、ナノ小胞あるいは小胞は、クブリアウイドゥス属細菌から自然的に分泌されるか又は人工的に生産するものであって、10~200nmの平均直径を有している。

40

【0035】

前記小胞は、クブリアウイドゥス属細菌を含む培養液を遠心分離、超高速遠心分離、高圧処理、押出、超音波分解、細胞溶解、均質化、冷凍-解凍、電気穿孔、機械的分解、化学物質処理、フィルタによる濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、フリーフロー電気泳動及び毛細管電気泳動からなる群より選択された一つ以上の方法を用いて分離することができる。また、不純物の除去のための洗浄、収得された小胞の濃縮などの過程を追加で含む

50

ことができる。

【0036】

本発明の一実施例では、細菌及び細菌由来の小胞をマウスに経口投与して細菌及び小胞の体内吸収、分布及び排泄様相を観察した結果、細菌の場合には、腸粘膜を通じて吸収されないのに比べて、細菌由来の小胞は、投与5分以内に吸収されて全身的に分布し、腎臓、肝臓などを通じて排泄されることを確認した（実施例1参照）。

【0037】

本発明の他の実施例では、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病などの患者にと年齢と性別が対応した正常人の大便、血液、小便又は唾液から分離した小胞を用いて細菌メタゲノム分析を実施した結果、正常人のサンプルに比べて胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病などの患者のサンプルでクブリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（実施例3～実施例20参照）。

【0038】

本発明のまた他の実施例では、前記実施例の結果を土台に、クブリアウイドゥス属細菌に属するクブリアウイドゥス・メタリデュランス種の細菌由来の小胞の特性を分析するために一層研究した結果、クブリアウイドゥス・メタリデュランス菌株を培養してそれから分泌された小胞が抗炎症効果を示すかを評価し、多様な濃度のクブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞を大食細胞に処理した後、炎症疾患の原因因子である大腸菌由来の小胞を処理して炎症媒介体の分泌を評価した結果、大腸菌由来の小胞によるIL-6及びTNF- α の分泌をクブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞が効率的に抑制することを確認した（実施例22参照）。

【0039】

本発明のまた他の実施例では、クブリアウイドゥス・メタリデュランス菌株を培養してそれから分泌された小胞が抗癌治療効果を示すかを評価した。そのために、癌細胞株をマウスの皮下に注射して癌モデルを作り、クブリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞を癌細胞株の処理4日前からマウスに経口又は腹腔で投与した後、20日間癌組織のサイズを測定した結果、前記小胞を腹腔及び経口で投与した場合に、対照群に比べて癌組織のサイズが減少した。特に、経口投与した場合に顕著に減少していることを確認した（実施例23参照）。

【0040】

本発明による薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体を含んでいてもよい。前記薬学的に許容可能な担体は、製剤時に通常的に用いられるものであって、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、シクロデキストリン、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、リボソームなどを含むが、これに限定されず、必要に応じて、抗酸化剤、緩衝液など他の通常の添加剤をさらに含むことができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、潤滑剤などを付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤型、丸薬、カプセル、顆粒又は錠剤で製剤化することができる。適当な薬学的に許容される担体及び製剤化についてはレミントンの文献に開示されている方法を用いて各成分によって好ましく製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、剤型に特別な制限はないが、注射剤、吸入剤、皮膚外用剤又は経口摂取剤などに製剤化することができる。

【0041】

本発明の薬学的組成物は、目的とする方法によって経口投与するか非経口投与（例えば、静脈内、皮下、皮膚、鼻腔、気道に適用）でき、投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び時間によって異なるが、当業者により適切に選択される。

10

20

30

40

50

【0042】

本発明による薬学的組成物は、薬学的に有効な量で投与する。本発明において、薬学的に有効な量は、医学的治療に適用可能な合理的なベネフィット/リスクの割合で疾患を治療するに十分な量を意味し、有効容量のレベルは、患者の疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出の割合、治療期間、同時に用いられる薬物を含んだ要素及びその他医学分野によく知られた要素によって決定され得る。本発明による組成物は、個別治療剤で投与するか他の治療剤と併用して投与され得、従来の治療剤とは順次又は同時に投与され得、単一又は多重投与され得る。上記した要素を全て考慮して副作用なしに最小限の量で最大の効果を得ることができる量を投与することが重要であり、これは、当業者によって容易に決定され得る。

10

【0043】

具体的に、本発明による薬学的組成物の有効量は、患者の年齢、性別、体重によって変わることができ、一般的には、体重1kg当たり0.001~150mg、好ましくは、0.01~100mgを毎日又は隔日投与するか、1日1回~3回に分けて投与することができる。しかし、投与経路、肥満の重症度、性別、体重、年齢などによって増減できるので、前記投与量がいかなる方法でも本発明の範囲を限定するものではない。

【0044】

本発明の吸入剤組成物は、有効成分を吸入剤にそのまま添加するか他の成分とともに用いてもよく、通常的な方法によって適切に用いてもよい。有効成分の混合量は、その使用目的（予防又は治療用）によって適切に決定され得る。

20

【0045】

本発明の食品組成物は、健康機能食品組成物を含む。本発明による食品組成物は、有効成分を食品にそのまま添加するか他の食品又は食品成分とともに用いてもよく、通常的な方法によって適切に用いてもよい。有効成分の混合量は、その使用目的（予防又は改善用）によって適切に決定され得る。一般的に、食品又は飲料の製造時に、本発明の組成物は、原料に対して15重量%以下、好ましくは、10重量%以下の量で添加される。しかし、健康及び衛生を目的とするか又は健康調節を目的とする長期間の摂取の場合には、前記量は前記範囲以下であってもよい。

【0046】

本発明の食品組成物は、指示された割合で必須成分として前記有効成分を含有すること以外に他の成分には特別な制限がなく、通常の飲料のように多様な香味剤又は天然炭水化物などを追加成分として含有することができる。上述した天然炭水化物の例は、モノサッカライド、例えば、ブドウ糖、果糖など；ジサッカライド、例えば、マルトース、スクロースなど；及びポリサッカライド、例えば、デキストリン、シクロデキストリンなどのような通常的な糖、及びキシリトール、ソルビトール、エリスリトールなどの糖アルコールである。上述したもの以外の香味剤として天然香味剤（ソーマチン、ステビア抽出物、例えば、レバウディオサイドA、グリシルヒジンなど）及び合成香味剤（サッカリン、アスパルテムなど）を好適に用いることができる。前記天然炭水化物の割合は、当業者の選択によって適切に決定され得る。

30

【0047】

上記外に、本発明の食品組成物は、様々な栄養剤、ビタミン、ミネラル（電解質）、合成風味剤及び天然風味剤などの風味剤、着色剤及び充填剤（チーズ、チョコレートなど）、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に用いられる炭酸化剤などを含有することができる。このような成分は、独立的に又は組み合わせて用いることができる。このような添加剤の割合も当業者により適切に選択され得る。

40

【0048】

以下、本発明の理解を助けるための好ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記の実施例により本発明の内容が限定されるものではない。

50

【実施例】

【0049】

(試験例1. 腸内細菌及び細菌由来の小胞の体内吸収、分布及び排泄様相の分析)

腸内細菌と細菌由来の小胞が胃腸管を通じて全身的に吸収されるかを評価するために次のような方法で実験を行った。マウスの胃腸に蛍光で標識した腸内細菌と腸内細菌由来の小胞をそれぞれ50 µgの容量で胃腸管に投与し、0分、5分、3時間、6時間、12時間後に蛍光を測定した。マウスの全体イメージを観察した結果、図1aに示したように、細菌の場合には全身的に吸収されなかったが、細菌由来の小胞の場合には、投与5分後に全身的に吸収され、投与3時間後には、膀胱で蛍光が濃く観察されて、小胞が泌尿器系に排泄されることが分かった。小胞は、投与12時間まで体内に存在することが分かった。

10

【0050】

また、腸内細菌と腸内細菌由来の小胞が全身的に吸収された後、多くの臓器に浸潤された様相を評価するために、蛍光で標識した50 µgの細菌と細菌由来の小胞を上記の方法のように投与した後、投与12時間後に血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、脂肪、筋肉を採取した。採取した組織で蛍光を観察した結果、図1bに示したように、細菌由来の小胞が血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、脂肪、筋肉、腎臓に分布したが、細菌は吸収されないことが分かった。

【0051】

(試験例2. 臨床サンプルで細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

血液、小便、大便又は唾液などの臨床サンプルを先に10 mlチューブに入れ、遠心分離法(3,500 × g、10 min、4℃)で浮遊物を沈めて上澄液のみを新しい10 mlチューブに移した。0.22 µmのフィルタを用いて細菌及び異物を除去した後、遠心濾過機(centrifugal filters 50 kD)に移し、1500 × g、4℃で15分間遠心分離して50 kDより小さい物質は捨てて10 mlまで濃縮した。もう一度、0.22 µmのフィルタ(filter)を用いてバクテリア及び異物を除去した後、Type 90 tiローターで150,000 × g、4℃で3時間の間超高速遠心分離方法を用いて上澄液を捨て、固まったペレット(pellet)を生理食塩水(PBS)でとかした。

20

【0052】

上記方法で分離した小胞100 µlを100 µlでボイルして内部のDNAを脂質の外から出るようにし、その後、氷に5分間冷やした。その後、残った浮遊物を除去するために、10,000 × g、4℃で30分間遠心分離して上澄液のみを集めた。そして、Nanodropを用いてDNA量を定量した。以後、前記抽出されたDNAに細菌由来のDNAが存在するかを確認するために、下記表1に示した16S rDNAプライマー(primer)でPCRを行って、前記抽出された遺伝子に細菌由来の遺伝子が存在することを確認した。

30

【0053】

【表1】

プライマー		配列	配列番号
16S rDNA	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1
	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	2

40

【0054】

上記方法で抽出したDNAを上記の16S rDNAプライマーを用いて増幅した後にシーケンシングを行い(Illumina MiSeq sequencer)、その結果をStandard Flowgram Format(SFF)ファイルに出力し、GS FLX software(v2.9)を用いてSFFファイルをsequen

50

ceファイル(.fasta)とnucleotide quality scoreファイルに変換した後、リードの信用度評価を確認し、window(20bps)平均base call accuracyが99%未満(Phred score<20)である部分を除去した。Operational Taxonomy Unit(OTU)分析のためには、UCLUSTとUSEARCHを用いてシーケンス類似度によってクラスタリングを行い、属(genus)は94%、科(family)は90%、目(order)は85%、綱(class)は80%、門(phylum)は75%のシーケンス類似度を基準にクラスタリングし、各OTUの門(phylum)、綱(class)、目(order)、科(family)、属(genus)レベルの分類を行い、BLASTNとGreenGenesの16S RNAシーケンスデータベース(108,453シーケンス)を用いて属レベルで97%以上のシーケンス類似度を有する細菌をプロファイリングした(QIIME)。

10

【0055】

(試験例3. 胃癌患者の大便、血液及び小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例2の方法で胃癌患者63人の大便と、性別と年齢をマッチングした正常対照群126人の大便を対象として、大便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の大便に比べて胃癌患者の大便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表2及び図2a参照)。

20

【0056】

【表2】

大便	対照群		胃癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0054	0.0308	0.0000	0.0001	0.001	0.01

【0057】

試験例2の方法で胃癌患者67人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群198人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて胃癌患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表3及び図2b参照)。

30

【0058】

【表3】

血液	対照群		胃癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0094	0.0158	0.0013	0.0026	<0.0001	0.13

また、試験例2の方法で胃癌患者61人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群120人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて胃癌患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表4及び図2c参照)。

40

【0059】

【表4】

小便	対照群		胃癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0139	0.0687	0.0045	0.0071	0.01	0.33

【0060】

(試験例4. 大腸癌患者の大便及び小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

50

試験例 2 の方法で大腸癌患者 52 人の大便と、性別と年齢が対応した正常対照群 83 人の大便を対象として、大便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の大便に比べて大腸癌患者の大便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 5 及び図 3 a 参照）。

【0061】

【表 5】

大便	対照群		大腸癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0052	0.0306	0.0021	0.0082	0.01	0.40

10

【0062】

また、試験例 2 の方法で大腸癌患者 38 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 38 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて大腸癌患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 6 及び図 3 b 参照）。

【0063】

【表 6】

小便	対照群		大腸癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0249	0.1064	0.0062	0.0039	0.04	0.25

20

【0064】

（試験例 5 . 膵臓癌患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析）

試験例 2 の方法で膵臓癌患者 291 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 291 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて膵臓癌患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 7 及び図 4 参照）。

30

【0065】

【表 7】

血液	対照群		膵臓癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0056	0.0132	0.0002	0.0010	<0.0001	0.03

【0066】

（試験例 6 . 胆管癌患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析）

試験例 2 の方法で胆管癌患者 79 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 259 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて胆管癌患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 8 及び図 5 参照）。

40

【0067】

【表 8】

血液	対照群		胆管癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0058	0.0135	0.0000	0.0002	<0.0001	0.01

【0068】

50

(試験例 7 . 乳癌患者の血液及び小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で乳癌患者 96 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 192 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて乳癌患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 9 及び図 6 a 参照)。

【0069】

【表 9】

血液	対照群		乳癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0158	0.0347	0.0065	0.0059	0.0004	0.41

10

【0070】

試験例 2 の方法で乳癌患者 127 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 220 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて乳癌患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 10 及び図 6 b 参照)。

【0071】

【表 10】

小便	対照群		乳癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0249	0.0865	0.0072	0.0065	0.002	0.29

20

【0072】

(試験例 8 . 卵巣癌患者の血液及び小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で卵巣癌患者 136 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 136 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて卵巣癌患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 11 及び図 7 a 参照)。

30

【0073】

【表 11】

血液	対照群		卵巣癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0242	0.0432	0.0011	0.0017	<0.0001	0.04

【0074】

実施例 2 の方法で卵巣癌患者 136 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 136 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて卵巣癌患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 12 及び図 7 b 参照)。

40

【0075】

【表 12】

小便	対照群		卵巣癌		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0333	0.0988	0.0016	0.0028	0.0002	0.05

【0076】

50

(試験例 9 . 膀胱癌患者の血液及び小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で膀胱癌患者 9 6 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 1 8 4 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて膀胱癌患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 1 3 及び図 8 a 参照)。

【 0 0 7 7 】

【表 1 3】

血液	対照群		膀胱癌		t-test	
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0085	0.0202	0.0002	0.0002	<0.0001	0.02

10

【 0 0 7 8 】

また、試験例 2 の方法で膀胱癌患者 9 5 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 1 5 7 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて膀胱癌患者の小便でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 1 4 及び図 8 b 参照)。

【 0 0 7 9 】

【表 1 4】

小便	対照群		膀胱癌		t-test	
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0020	0.0039	0.0008	0.0013	0.008	0.42

20

【 0 0 8 0 】

(試験例 1 0 . 前立腺癌患者の小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で前立腺癌患者 5 3 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 1 5 9 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて前立腺癌患者の小便でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 1 5 及び図 9 参照)。

30

【 0 0 8 1 】

【表 1 5】

小便	対照群		前立腺癌		t-test	
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0117	0.0530	0.0051	0.0054	0.01	0.44

【 0 0 8 2 】

(試験例 1 1 . 頭頸部癌患者の唾液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で頭頸部癌患者 5 7 人の唾液と、正常対照群 2 7 7 人の唾液を対象として、唾液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の唾液に比べて頭頸部癌患者の唾液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表 1 6 及び図 1 0 参照)。

40

【 0 0 8 3 】

【表 1 6】

唾液	対照群		頭頸部癌		t-test	
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0038	0.0105	0.0001	0.0003	<0.0001	0.02

50

【 0 0 8 4 】

(試験例 1 2 . リンパ腫患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法でリンパ腫患者 5 7 人の血液と、性別と年齢をマッチングした正常対照群 1 6 3 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べてリンパ腫患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した (表 1 7 及び図 1 1 参照) 。

【 0 0 8 5 】

【 表 1 7 】

血液	対照群		リンパ腫		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0048	0.0105	0.0003	0.0011	0.003	0.05

10

(試験例 1 3 . 心臓疾患患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で心筋病変患者 7 2 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 1 6 3 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて心筋病変患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した (表 1 8 及び図 1 2 a 参照) 。

【 0 0 8 6 】

【 表 1 8 】

血液	対照群		心筋病変		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0077	0.012	0.0006	0.0011	0.0002	0.07

20

【 0 0 8 7 】

実施例 2 の方法で心房細動患者 3 4 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 6 3 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて心房細動患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した (表 1 9 及び図 1 2 b 参照) 。

30

【 0 0 8 8 】

【 表 1 9 】

血液	対照群		心房細動		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0011	0.0027	0.0000	0.0000	0.01	0.00

【 0 0 8 9 】

試験例 2 の方法で異形狭心症患者 8 0 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 8 0 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて異形狭心症患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した (表 2 0 及び図 1 2 c 参照) 。

40

【 0 0 9 0 】

【 表 2 0 】

血液	対照群		異形狭心症		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0242	0.0492	0.0024	0.004	0.0002	0.10

【 0 0 9 1 】

50

(試験例14. 脳卒中患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例2の方法で脳卒中患者115人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群109人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて脳卒中患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表21及び図13参照)。

【0092】

【表21】

血液	対照群		脳卒中		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0099	0.031	0.0001	0.0006	0.001	0.01

10

【0093】

(試験例15. 慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例2の方法でCOPD患者205人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群231人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べてCOPD患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表22及び図14参照)。

20

【0094】

【表22】

血液	対照群		COPD		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0107	0.0237	0.0049	0.0052	<0.0001	0.45

【0095】

(試験例16. 糖尿病患者の血液、小便及び唾液細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例2の方法で糖尿病患者61人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群122人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて糖尿病患者の血液でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表23及び図15a参照)。

30

【0096】

【表23】

血液	対照群		糖尿病		t-test	
	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus	0.0172	0.0367	0.0001	0.0001	<0.0001	0.01

【0097】

実施例2の方法で糖尿病患者60人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群134人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて糖尿病患者の小便でクプリアウィドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した(表24及び図15b参照)。

40

【0098】

【表 2 4】

小便	対照群		糖尿病		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0137	0.0551	0.0007	0.0007	0.007	0.05

【0099】

実施例 2 の方法で糖尿病患者 37 人の唾液と、年齢が対応した正常対照群 277 人の唾液を対象として、唾液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の唾液に比べて糖尿病患者の唾液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 2 5 及び図 1 5 c 参照）。

10

【0100】

【表 2 5】

唾液	対照群		糖尿病		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0038	0.0105	0.0004	0.0010	<0.0001	0.12

【0101】

（試験例 1 7 . 腎不全患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析）

試験例 2 の方法で腎不全患者 32 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 32 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて腎不全患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 2 6 及び図 1 6 参照）。

20

【0102】

【表 2 6】

血液	対照群		腎不全		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0084	0.0073	0.0001	0.0002	0.0001	0.01

30

【0103】

（試験例 1 8 . 認知症患者の血液細菌由来の小胞のメタゲノム分析）

試験例 2 の方法で認知症患者 67 人の血液と、性別と年齢が対応した正常対照群 70 人の血液を対象として、血液内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の血液に比べて認知症患者の血液でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 2 7 及び図 1 7 参照）。

【0104】

【表 2 7】

血液	対照群		認知症		t-test	
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value
g_Cupriavidus	0.0008	0.0023	0.0000	0.0002	<0.0001	0.02

40

【0105】

（試験例 1 9 . パーキンソン病患者の小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析）

試験例 2 の方法でパーキンソン病患者 39 人の小便と、性別と年齢が対応した正常対照群 76 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べてパーキンソン病患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した（表 2 8 及び図 1 8 参照）。

50

【 0 1 0 6 】

【表 2 8】

小便	対照群		パーキンソン病		t-test		
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus		0.0287	0.1006	0.0000	0.0002	0.01	0.00

【 0 1 0 7 】

(試験例 2 0 . 鬱病患者の小便細菌由来の小胞のメタゲノム分析)

試験例 2 の方法で鬱病患者 2 0 人の小便と、性別と年齢をマッチングした正常対照群 2 1 人の小便を対象として、小便内に存在する小胞から遺伝子を抽出してメタゲノム分析を行った後、クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞の分布を評価した。その結果、正常人の小便に比べて鬱病患者の小便でクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞が有意に減少していることを確認した (表 2 9 及び図 1 9 参照) 。

10

【 0 1 0 8 】

【表 2 9】

小便	対照群		鬱病		t-test		
	Taxon	Mean	SD	Mean	SD	P-value	Ratio
g_Cupriavidus		0.0361	0.0783	0.0001	0.0002	0.04	0.00

【 0 1 0 9 】

(試験例 2 1 . クプリアウイドゥス・メタリデュランス菌の培養及び小胞の分離)

クプリアウイドゥス・メタリデュランス (*Cupriavidus metallidurans*) 菌株を培養した後、その小胞を分離して特性を分析した。クプリアウイドゥス・メタリデュランス菌株を 2 8 の好気性チャンバで吸光度 (OD_{600}) が 1 . 0 ~ 1 . 5 になるまで TSB (*Tryptic soy broth*) 培地で培養した後、LB (*Luria Bertani broth*) 培地に継代培養 (*sub-culture*) した。以後、菌株が含まれている培地の上澄液を回収して 1 0 , 0 0 0 g 、 4 で 2 0 分間遠心分離した後、菌株を除去して 0 . 2 2 μ m のフィルタで濾過した。濾過した上澄液を 1 0 0 kDa *Pellicon 2 Cassette* のフィルタメンブレイン (*Merck Millipore, US*) で *MasterFlex pumpsystem* (*Cole-Parmer, US*) を用いて限外濾過 (*microfiltration*) を通じて 5 0 ml の体積で濃縮した。濃縮した上澄液をもう一度 0 . 2 2 μ m のフィルタで濾過した。その後、BCA (*Bicinchoninic acid*) assay を用いてタンパク質を定量し、得られた小胞に対して下記実験を実施した。

20

30

【 0 1 1 0 】

(試験例 2 2 . クプリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗炎症効果)

炎症細胞でクプリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞の細胞死滅に対する影響を確認するために、マウス大食細胞株である Raw 2 6 4 . 7 細胞にクプリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞 (*C. metallidurans EV*) を多様な濃度 (0 . 1 、 1 、 1 0 μ g / ml) で処理した後、細胞生存力測定 (*Cell viability test*) を行った。より具体的に、4 8 - well の細胞培養プレート中に 4 \times 1 0 ⁴ 個ずつ分注した Raw 2 6 4 . 7 細胞に、DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) 無血清培地を入れた多様な濃度のクプリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞を処理して 1 2 時間の間培養した。その後、細胞に EZ - CYTOX (*Dogen, Korea*) を 4 時間の間処理した後、SpectraMax M3 *microplate reader* (*Molecular Devices, USA*) を用いて 4 5 0 nm で吸光度を測定した。その結果、図 2 0 に示したように、クプリアウイドゥス・メタリデュランス由来の小胞を大食細胞株に処理したとき、細胞死滅が誘導されないことを確認した。

40

【 0 1 1 1 】

50

上記結果を土台に、クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗炎症効果を評価するために、多様な濃度(0.1、1、10 µg/ml)のクブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞を大食細胞株に12時間前処理した後、病原性小胞である大腸菌由来の小胞1 µg/mlを処理し、12時間後に炎症性サイトカインの分泌をELISAで測定した。ELISAを行うために、キャプチャー(Capture)抗体をリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline、PBS)に希釈して96 wellのポリスチレン(polystyrene)プレートに作用濃度に合わせて50 µlずつ分注した後、4で一晩の間反応させた。

【0112】

その後、PBST(0.05% tween-20が入っているリン酸緩衝生理食塩水)溶液100 µlで3回ずつ洗浄した後、RD(1% BSAが入っているリン酸緩衝生理食塩水)溶液100 µlを分注して常温で1時間の間ブロッキング(blocking)し、サンプル及びスタンダード(standard)は、濃度に合わせて50 µlずつ分注して常温で2時間の間反応させた。その後、PBST 100 µlで3回洗浄した後、検出(detection)抗体をRDに希釈して作用濃度に合わせて50 µlずつ分注して常温で2時間の間反応させ、PBST 100 µlで3回洗浄した後、Streptavidin-HRP(R&D system、USA)をRDに1/40で希釈して50 µlずつ分注して常温で20分間反応させた。

【0113】

最後に、PBST 100 µlで3回洗浄した後、TMB基質(SurModics、USA)50 µlを分注して5分~20分後に発色が進行した時点で、1Mの硫酸溶液を50 µlずつ分注して反応を止め、SpectraMax M3 microplate reader(Molecular Devices、USA)を用いて450 nmで吸光度を測定した。

【0114】

その結果、図21に示したように、クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞を前処理した場合、大腸菌由来の小胞によるIL-6及びTNF-の分泌が顕著に抑制されることを確認した。特に、クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞の前処理によるTNF-の分泌抑制効果が有用微生物対照群であるラクトバシラス・プランタルム(Lactobacillus plantarum)由来の小胞の前処理によるTNF-の分泌抑制効果より著しく大きいことを確認した。上記結果は、大腸菌由来の小胞のような病原性小胞により誘導される炎症反応をクブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞が効率的に抑制できることを意味する。

【0115】

(試験例23.クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗癌効果)

前記試験例を土台に、クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞の抗癌効果を確認した。そのために、図22に示したように、クブリアウィドゥス・メタリデュランス菌株(CMT101)由来の小胞を6週齢のC57BL/6の雄マウスに腹腔注射又は経口で投与し、投与4日目に癌細胞株(CT26 cell)を皮下に注射して癌モデルを作った。癌細胞株を投与した後、クブリアウィドゥス・メタリデュランス菌株由来の小胞を腹腔注射又は経口で毎日投与して24日目まで癌組織のサイズを測定した。その結果、図23に示したように、癌組織のサイズは、対照群である生理食塩水経口投与群に比べて前記小胞を腹腔注射で投与したマウスと経口で投与したマウスで癌組織のサイズが減少した。特に、経口で投与した場合にサイズが一層減少した。上記結果は、クブリアウィドゥス・メタリデュランス由来の小胞を投与したとき、癌組織の成長を効率的に抑制することができることを意味する。

【0116】

上述した本発明の説明は例示のためのもので、本発明が属する技術分野において通常の知識を有した者は、本発明の技術的思想や必須的な特徴を変更しなくても他の具体的な形態に容易に変形が可能であることが理解できる。したがって、以上で記述した実施例は、

10

20

30

40

50

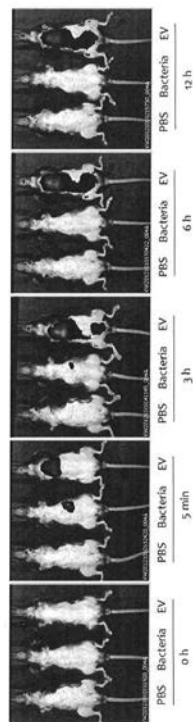
全ての面で例示的なものであり、限定的ではないものと理解すべきである。

【産業上の利用可能性】

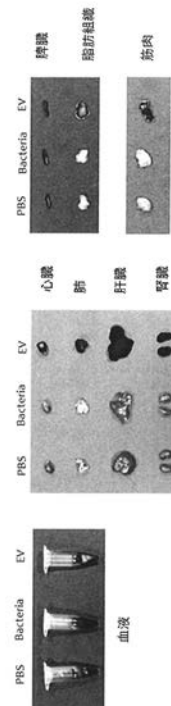
【0117】

本発明によるクプリアウイドゥス属細菌由来の小胞は、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に対する診断方法だけでなく、前記疾患に対する予防、改善又は治療用組成物でも用いられるので、関連医療及び食品産業分野に有用に用いられ得ると期待される。

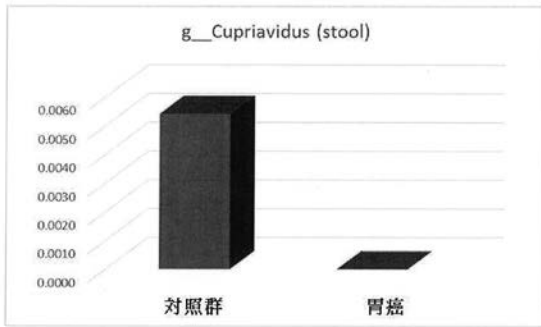
【図 1 a】



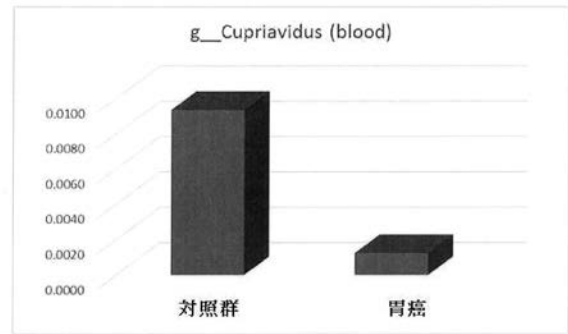
【図 1 b】



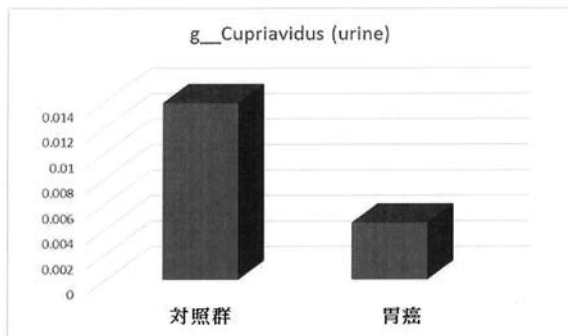
【 図 2 a 】



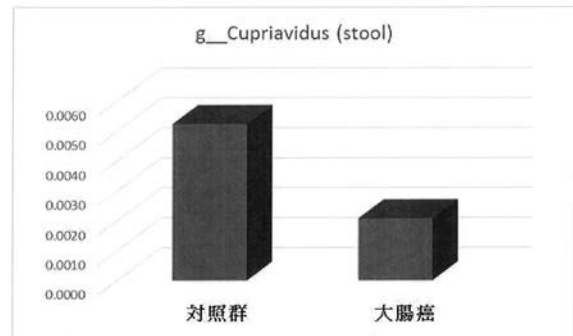
【 図 2 b 】



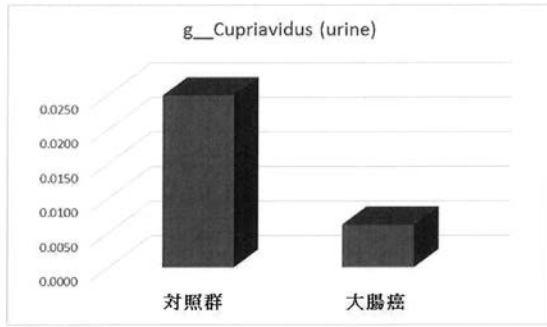
【 図 2 c 】



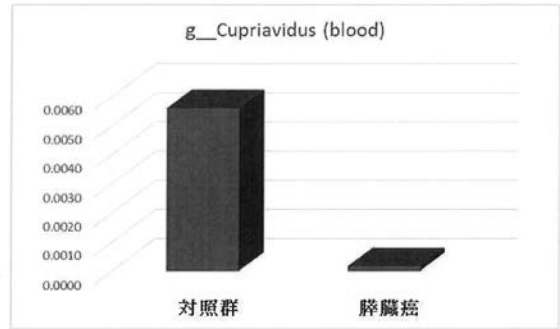
【 図 3 a 】



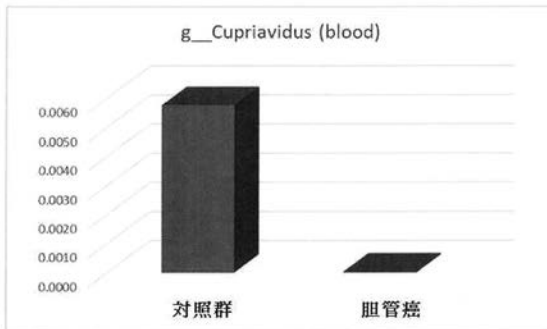
【 図 3 b 】



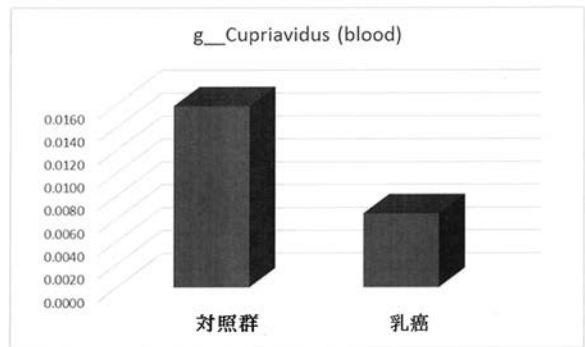
【 図 4 】



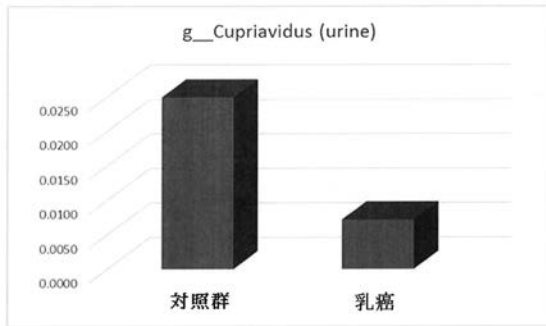
【 図 5 】



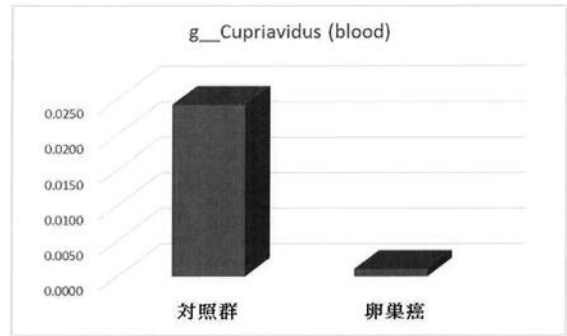
【 図 6 a 】



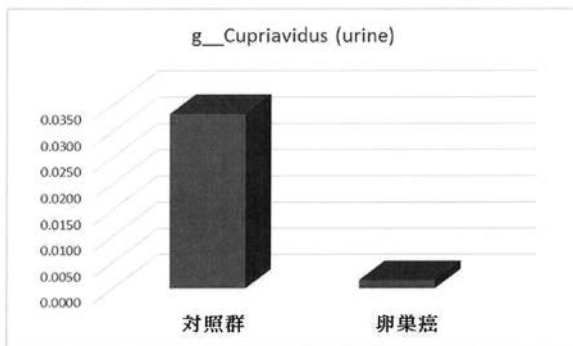
【 图 6 b 】



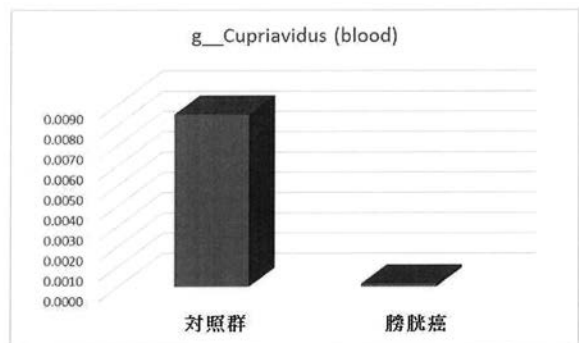
【 图 7 a 】



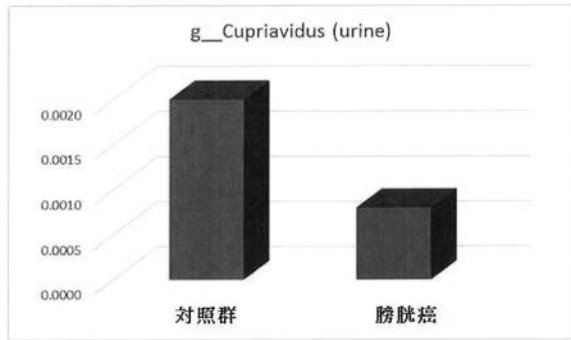
【 图 7 b 】



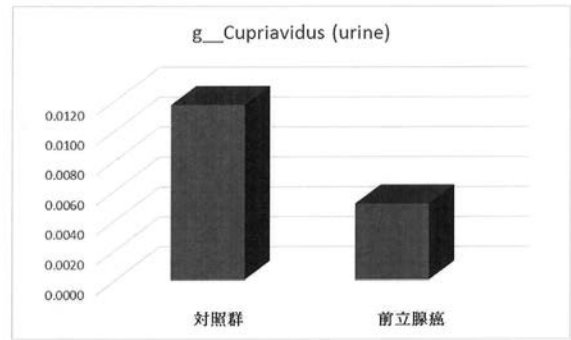
【 图 8 a 】



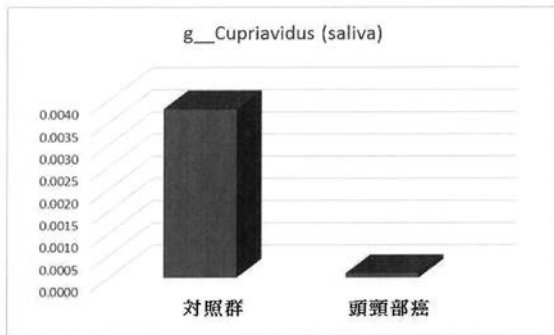
【 図 8 b 】



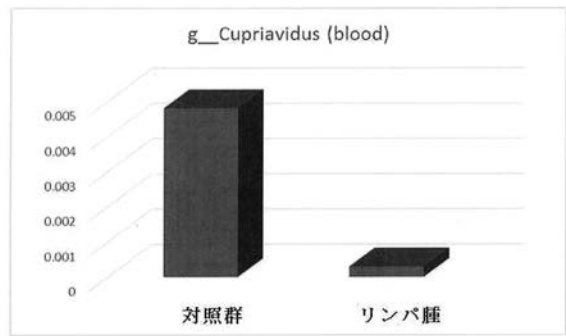
【 図 9 】



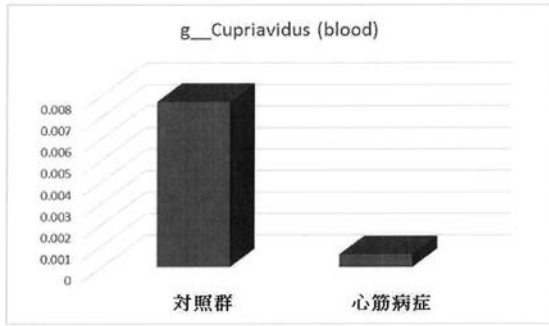
【 図 1 0 】



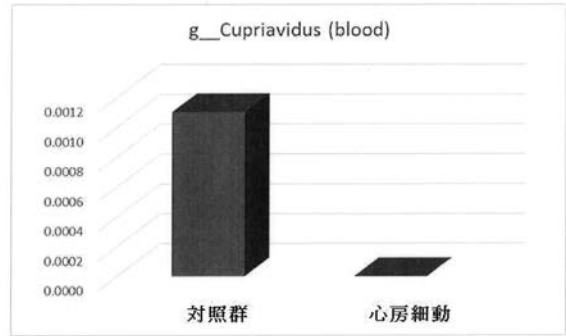
【 図 1 1 】



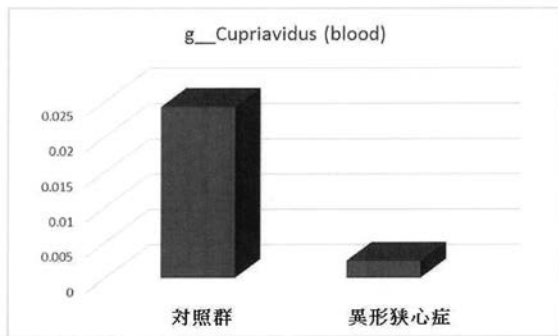
【 図 1 2 a 】



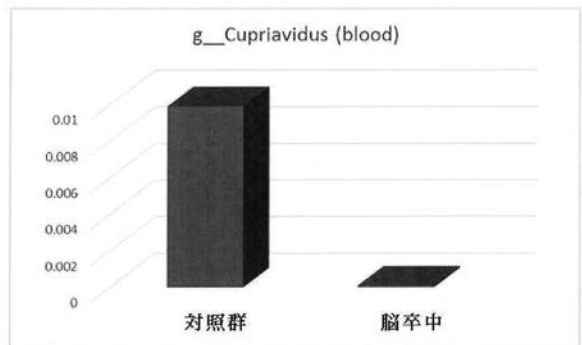
【 図 1 2 b 】



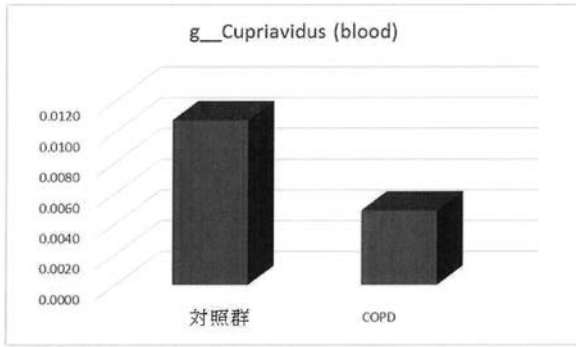
【 図 1 2 c 】



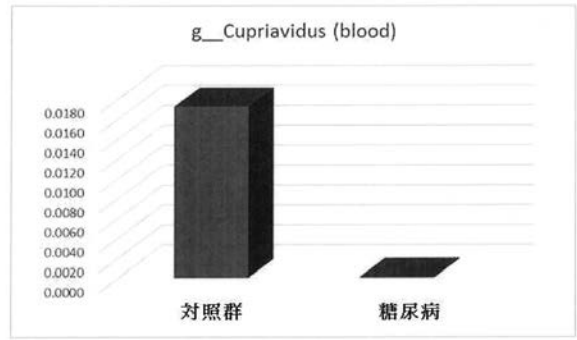
【 図 1 3 】



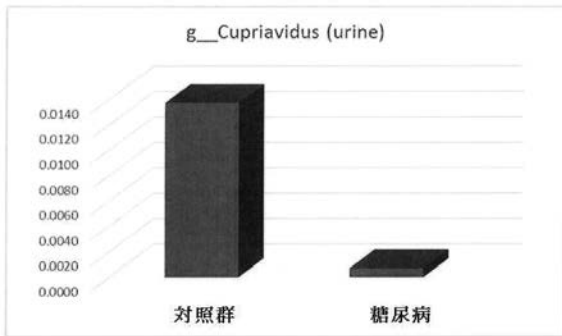
【 图 1 4 】



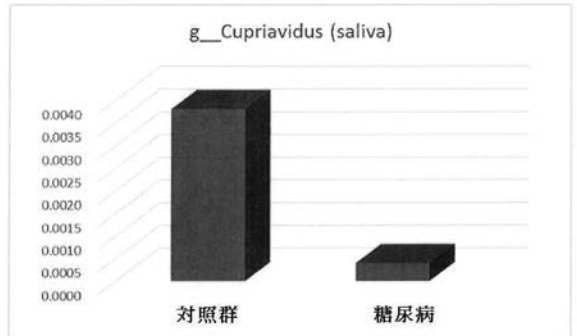
【 图 1 5 a 】



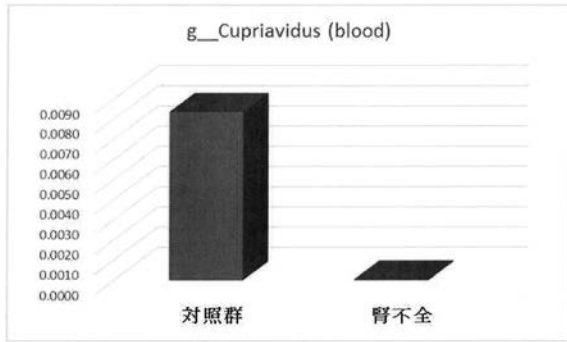
【 图 1 5 b 】



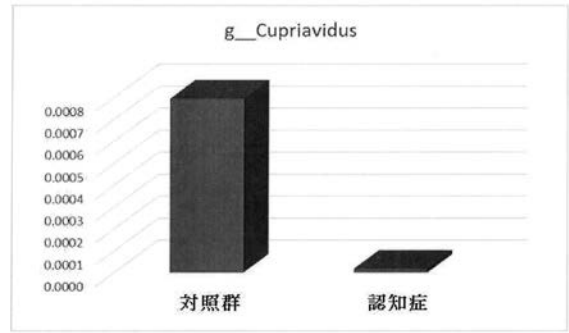
【 图 1 5 c 】



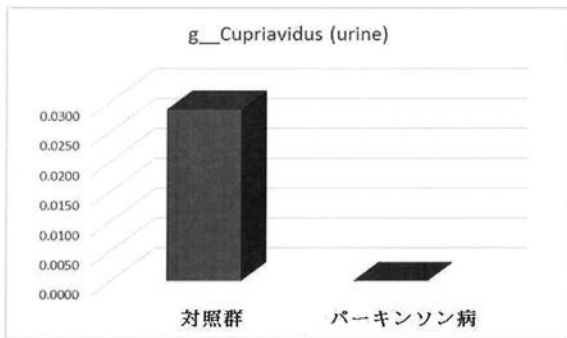
【 図 1 6 】



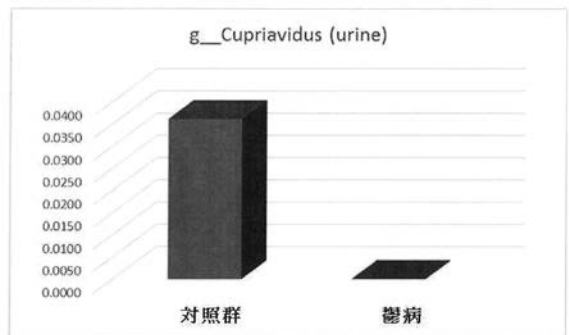
【 図 1 7 】



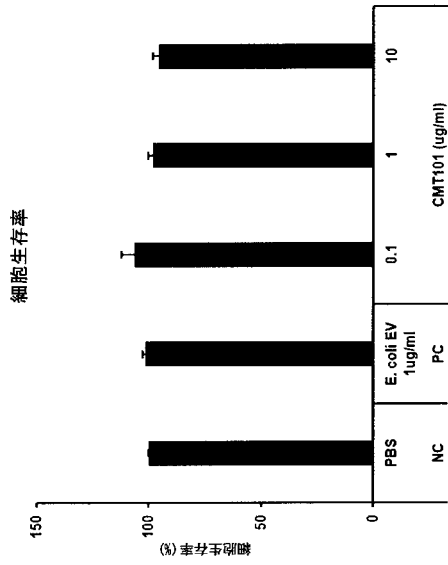
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】

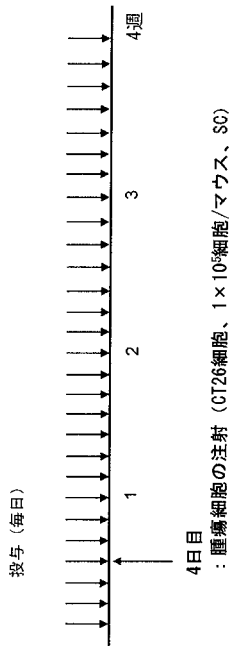


【 図 2 0 】



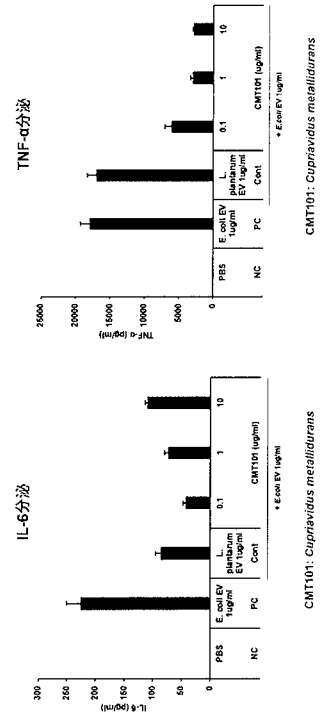
CMT101: *Cupriavidus metallidurans*

【 図 2 2 】

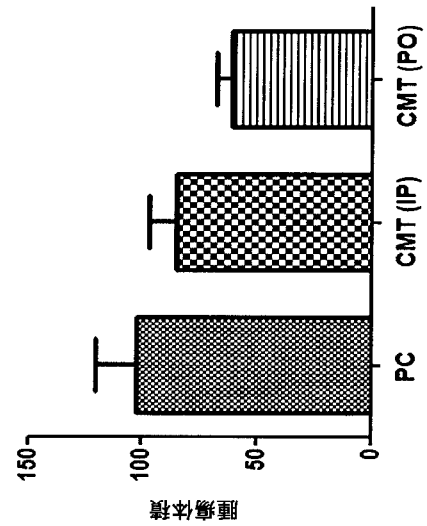


グループ	処置	投与量	数
A	-		10
B	<i>C. Metallidurans</i> EV (IP)	20 µg/day	10
C	<i>C. Metallidurans</i> EV (PO)	20 µg/day	10

【 図 2 1 】



【 図 2 3 】



【配列表】

2020513799000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月4日(2019.9.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記のステップを含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病の診断のための情報を提供する方法

:

(a) 正常人及び被検者のサンプルから分離した細胞外小胞からDNAを抽出するステップ;

(b) 前記抽出したDNAに対して16S rDNAに存在する遺伝子配列に基づいて製作したプライマー対を用いてPCR(Polymerase Chain Reaction)を行った後、それぞれのPCR産物を収得するステップ;及び

(c) 前記PCR産物の定量分析を通じて正常人に比べてクプリアウィドゥス(Cupriavidus)属細菌由来の細胞外小胞の含量が低い場合、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病又は鬱病に分類するステップ。

【請求項2】

前記ステップ(a)でのサンプルは、大便、血液、小便又は唾液であることを特徴とする、請求項1に記載の情報提供方法。

【請求項3】

クプリアウィドゥス(Cupriavidus)属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される1以上の疾病の予防又は治療用である、薬学的組成物。

【請求項4】

前記小胞は、平均直径が10~200nmであることを特徴とする、請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記小胞は、クプリアウィドゥス属細菌から自然的又は人工的に分泌されることを特徴とする、請求項3又は4に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記クプリアウィドゥス属細菌由来の小胞は、クプリアウィドゥス・メタリデュランス(Cupriavidus metallidurans)から分泌されることを特徴とする、請求項3~5のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項7】

クプリアウィドゥス(Cupriavidus)属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される1以上の疾病予防又は改善用食品組成物。

【請求項 8】

前記小胞は、平均直径が10～200nmであることを特徴とする、請求項7に記載の食品組成物。

【請求項 9】

前記小胞は、クプリアウイドゥス属細菌から自然的又は人工的に分泌されることを特徴とする、請求項7又は8に記載の食品組成物。


【請求項 10】

前記クプリアウイドゥス属細菌由来の小胞は、クプリアウイドゥス・メタリデュランス (Cupriavidus metallidurans) から分泌されることを特徴とする、請求項7～9のいずれか一項に記載の食品組成物。

【請求項 11】

クプリアウイドゥス (Cupriavidus) 属細菌由来の小胞を有効成分として含む胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆管癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、頭頸部癌、リンパ腫、心筋病症、心房細動、異形狭心症、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、糖尿病、腎不全、認知症、パーキンソン病及び鬱病からなる群より選択される1以上の疾病予防又は治療用である、吸入剤組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2019/002015
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/6851(2018.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/74(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/689; A61K 35/74; A61K 39/104; A61K 39/108; A61P 33/00; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; A23L 33/135 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: cupriavidus, nanovesicle, gastric cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer, cholangiocarcinoma, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, prostate cancer, head and neck cancer, lymphoma, cardiomyopathy, atrial fibrillation, variant angina, chronic obstructive pulmonary disease, stroke, diabetes, renal insufficiency, dementia, Parkinson's disease, depression		
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 See abstract; claims 1-18.	1-12,14
A	KR 10-2016-0073157 A (EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION et al.) 24 June 2016 See abstract; claims 1-15.	1-12,14
A	US 2013-0089530 A1 (MICROBES, INC.) 11 April 2013 See abstract; claims 1, 5.	1-12,14
A	KR 10-2011-0025068 A (AEON MEDIX INC.) 09 March 2011 See the entire document.	1-12,14
A	KR 10-2017-0015958 A (MD HEALTHCARE INC.) 10 February 2017 See the entire document.	1-12,14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">28 MAY 2019 (28.05.2019)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">28 MAY 2019 (28.05.2019)</p>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/002015

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002015

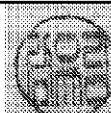
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
KR 10-2018-0006303 A	17/01/2018	KR 10-1923969 B1	30/11/2018		
		WO 2018-008895 A1	11/01/2018		
KR 10-2016-0073157 A	24/06/2016	CN 107429290 A	01/12/2017		
		EP 3235910 A1	25/10/2017		
		JP 2017-538421 A	28/12/2017		
		JP 6430648 B2	28/11/2018		
		KR 10-1798176 B1	15/11/2017		
		US 2017-0369930 A1	28/12/2017		
		WO 2016-099076 A1	23/06/2016		
US 2013-0069530 A1	11/04/2013	CA 2491534 A1	13/07/2005		
		CA 2613616 A1	04/01/2007		
		CA 2714927 A1	29/04/2011		
		CN 102055026 A	11/05/2011		
		EP 1555710 A1	20/07/2005		
		EP 1897159 A2	12/03/2008		
		EP 2323213 A1	18/05/2011		
		JP 2005-203369 A	28/07/2005		
		JP 2008-547184 A	25/12/2008		
		JP 2011-096625 A	12/05/2011		
		US 2004-0159796 A1	19/08/2004		
		US 2005-0153203 A1	14/07/2005		
		US 2005-0233216 A1	20/10/2005		
		US 2006-0035145 A1	16/02/2006		
		US 2007-0238022 A1	11/10/2007		
		US 2009-0181312 A1	16/07/2009		
		US 2010-0047697 A1	25/02/2010		
		US 2012-0100425 A1	26/04/2012		
		US 2013-0045415 A1	21/02/2013		
		US 2013-0252083 A1	26/09/2013		
		US 2014-0023918 A1	23/01/2014		
		US 2014-0239902 A1	28/08/2014		
		US 6982428 B2	03/01/2006		
		US 7682737 B2	23/03/2010		
		US 7947391 B2	24/05/2011		
		US 8932753 B2	13/01/2015		
		US 9147912 B2	29/09/2015		
		WO 2007-002160 A2	04/01/2007		
		WO 2007-002160 B1	26/04/2007		
		WO 2013-055920 A1	18/04/2013		
		KR 10-2011-0025068 A	09/03/2011	CN 102480932 A	30/05/2012
				CN 102480932 B	14/01/2015
CN 102549143 A	04/07/2012				
CN 102549143 B	29/10/2014				
EP 2484752 A2	08/08/2012				
EP 2484752 B1	21/09/2016				
EP 2494865 A2	05/09/2012				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/002015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2013-503857 A	04/02/2013
		JP 2013-503858 A	04/02/2013
		JP 5785947 B2	30/09/2015
		JP 5818793 B2	18/11/2015
		KR 10-1430283 B1	14/08/2014
		US 2012-0159658 A1	21/06/2012
		US 2012-0222142 A1	30/08/2012
		US 2015-0017664 A1	15/01/2015
		US 2015-0232934 A1	20/08/2015
		US 8969653 B2	03/03/2015
		US 9201072 B2	01/12/2015
		US 9273359 B2	01/03/2016
		US 9274109 B2	01/03/2016
		WO 2011-027956 A2	10/03/2011
		WO 2011-027956 A3	28/04/2011
		WO 2011-027971 A2	10/03/2011
		WO 2011-027971 A3	25/08/2011
		WO 2011-027990 A2	10/03/2011
		WO 2011-027990 A3	03/11/2011
KR 10-2017-0015958 A	10/02/2017	CN 107750161 A	02/03/2018
		EP 3269378 A2	17/01/2018
		JP 2018-511583 A	26/04/2018
		KR 10-1862507 B1	29/05/2018
		KR 10-2016-0110232 A	21/09/2016
		KR 10-2017-0000369 A	02/01/2017
		US 2018-0055894 A1	01/03/2018
		WO 2016-144139 A2	15/09/2016
		WO 2016-144139 A3	10/11/2016

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2019/002015
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/6851(2018.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A61K 35/74(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류틀 기재) C12Q 1/689; A61K 35/74; A61K 39/104; A61K 39/108; A61P 33/00; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; A23L 33/135		
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: 큐프리미티스, 나노소포, 위암, 대장암, 췌장암, 담관암, 유방암, 난소암, 방광암, 전립선암, 두경부암, 림프종, 심근병증, 심방세동, 이형협심증, 만성폐쇄성폐질환, 뇌종양, 당뇨병, 신부전, 치매, 파킨슨병, 우울증		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2018-0006303 A (주식회사 엠디헬스케어 등) 2018.01.17 요약; 청구항 1-18 참조.	1-12, 14
A	KR 10-2016-0073157 A (이화여자대학교 산학협력단 등) 2016.06.24 요약; 청구항 1-15 참조.	1-12, 14
A	US 2013-0089530 A1 (MICROBES, INC.) 2013.04.11 요약; 청구항 1, 5 참조.	1-12, 14
A	KR 10-2011-0025068 A (주식회사이엔메딕스) 2011.03.09 전체 문헌 참조.	1-12, 14
A	KR 10-2017-0015958 A (주식회사 엠디헬스케어) 2017.02.10 전체 문헌 참조.	1-12, 14
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 05월 28일 (28.05.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 05월 28일 (28.05.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2019/002015

제2기제란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

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

- 1. 청구항: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 13은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2019/002015

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0006303 A	2018/01/17	KR 10-1923969 B1 WO 2018-008895 A1	2018/11/30 2018/01/11
KR 10-2016-0073157 A	2016/06/24	CN 107429290 A EP 3235910 A1 JP 2017-538421 A JP 6430648 B2 KR 10-1798176 B1 US 2017-0369930 A1 WO 2016-099076 A1	2017/12/01 2017/10/25 2017/12/28 2018/11/28 2017/11/15 2017/12/28 2016/06/23
US 2013-0089530 A1	2013/04/11	CA 2491534 A1 CA 2613616 A1 CA 2714927 A1 CN 102055026 A EP 1555710 A1 EP 1897159 A2 EP 2323213 A1 JP 2005-203369 A JP 2008-547184 A JP 2011-096625 A US 2004-0159796 A1 US 2005-0153203 A1 US 2005-0233216 A1 US 2006-0035145 A1 US 2007-0238022 A1 US 2009-0181312 A1 US 2010-0047697 A1 US 2012-0100425 A1 US 2013-0045415 A1 US 2013-0252083 A1 US 2014-0023918 A1 US 2014-0239902 A1 US 6982428 B2 US 7682737 B2 US 7947391 B2 US 8932753 B2 US 9147912 B2 WO 2007-002160 A2 WO 2007-002160 B1 WO 2013-055920 A1	2005/07/13 2007/01/04 2011/04/29 2011/05/11 2005/07/20 2008/03/12 2011/05/18 2005/07/28 2008/12/25 2011/05/12 2004/08/19 2005/07/14 2005/10/20 2006/02/16 2007/10/11 2009/07/16 2010/02/25 2012/04/26 2013/02/21 2013/09/26 2014/01/23 2014/08/28 2006/01/03 2010/03/23 2011/05/24 2015/01/13 2015/09/29 2007/01/04 2007/04/26 2013/04/18
KR 10-2011-0025068 A	2011/03/09	CN 102480932 A CN 102480932 B CN 102549143 A CN 102549143 B EP 2484752 A2 EP 2484752 B1 EP 2494865 A2	2012/05/30 2015/01/14 2012/07/04 2014/10/29 2012/08/08 2016/09/21 2012/09/05

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2019/002015

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2013-503857 A	2013/02/04
		JP 2013-503858 A	2013/02/04
		JP 5785947 B2	2015/09/30
		JP 5818793 B2	2015/11/18
		KR 10-1430283 B1	2014/08/14
		US 2012-0159658 A1	2012/06/21
		US 2012-0222142 A1	2012/08/30
		US 2015-0017664 A1	2015/01/15
		US 2015-0232934 A1	2015/08/20
		US 8969653 B2	2015/03/03
		US 9201072 B2	2015/12/01
		US 9273359 B2	2016/03/01
		US 9274109 B2	2016/03/01
		WO 2011-027956 A2	2011/03/10
		WO 2011-027956 A3	2011/04/28
		WO 2011-027971 A2	2011/03/10
		WO 2011-027971 A3	2011/08/25
		WO 2011-027990 A2	2011/03/10
		WO 2011-027990 A3	2011/11/03
KR 10-2017-0015958 A	2017/02/10	CN 107750161 A	2018/03/02
		EP 3269378 A2	2018/01/17
		JP 2018-511583 A	2018/04/26
		KR 10-1862507 B1	2018/05/29
		KR 10-2016-0110232 A	2016/09/21
		KR 10-2017-0000369 A	2017/01/02
		US 2018-0055894 A1	2018/03/01
		WO 2016-144139 A2	2016/09/15
		WO 2016-144139 A3	2016/11/10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/24 (2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 2 3 L	33/10 (2016.01)	A 2 3 L	33/10	
C 1 2 Q	1/689 (2018.01)	C 1 2 Q	1/689	
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	E
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CB03 CB04 CB07 DA13 FB01 FB02
 4B018 MD85 ME03 ME08 ME14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ52 QR32 QR39 QR62
 QR75 QR77 QS25 QS34
 4B065 AA01X AA01Y AA93X AC20 BD50 CA23 CA44 CA46 CA60
 4C087 AA01 AA02 BC31 CA09 MA13 MA17 MA22 MA23 MA35 MA37
 MA41 MA52 MA56 MA63 MA66 NA14 ZA02 ZA12 ZA15 ZA36
 ZA59 ZA81 ZB26 ZC35

专利名称(译)	源自铜绿假单胞菌的纳米囊泡及其用途		
公开(公告)号	JP2020513799A	公开(公告)日	2020-05-21
申请号	JP2019548319	申请日	2019-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	MD医疗公司		
[标]发明人	キムユンクン		
发明人	キム、ユン-クン		
IPC分类号	C12Q1/06 A61K35/74 A61P35/00 A61P9/00 A61P9/06 A61P11/00 A61P25/28 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/16 A61P25/24 A23L33/10 C12Q1/689 C12N1/20 C12N15/11 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A23L33/135 A61K35/741 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P35/00 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q1/689 G01N33/50 A61K9/1271 A61K9/51 A61K35/74 B82Y5/00 G16B40/10		
FI分类号	C12Q1/06 A61K35/74.ZNA.B A61P35/00 A61P9/00 A61P9/06 A61P11/00 A61P25/28 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/16 A61P25/24 A23L33/10 C12Q1/689 C12N1/20.E C12N15/11 G01N33/50.P G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/DA13 2G045/FB01 2G045/FB02 4B018/MD85 4B018/ME03 4B018/ME08 4B018/ME14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR39 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BD50 4B065/CA23 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA60 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC31 4C087/CA09 4C087/MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA41 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA12 4C087/ZA15 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZA81 4C087/ZB26 4C087/ZC35		
优先权	1020180020573 2018-02-21 KR 1020190018989 2019-02-19 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自铜绿假单胞菌的囊泡及其用途。 本申请人与正常人相比，胃癌，结肠癌，胰腺癌，胆管癌，乳腺癌，卵巢癌，膀胱癌，前列腺癌，头颈癌，恶性疾病如淋巴瘤，心肌病，心房纤颤，病人样本中的心脏囊泡如变异型心绞痛，慢性阻塞性肺疾病，中风，糖尿病，肾功能不全，痴呆，帕金森氏病和抑郁症，囊泡明显减少，囊泡是致病的。 它显著抑制了性囊泡分泌炎症介质，同时抑制了癌症的发展。 根据本发明衍生自铜绿假单胞菌的囊泡，胃癌，结肠癌，胰腺癌，胆管癌，乳腺癌，卵巢癌，膀胱癌，前列腺癌，头颈癌，淋巴瘤和其他恶性疾病，心肌病，开发诊断心房颤动，心脏病学如变异型心绞痛，慢性阻塞性肺疾病，中风，糖尿病，肾衰竭，痴呆，帕金森氏病或抑郁症的方法，以及用于预防或治疗该疾病的组合物 有用的目的。 [选择图]无

