



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0098464
(43) 공개일자 2021년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/741 (2014.01) A61K 31/047 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01) A61K 31/718 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/741 (2013.01)
A61K 31/047 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7017306

(22) 출원일자(국제) 2019년11월05일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년06월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/059865

(87) 국제공개번호 WO 2020/097077

국제공개일자 2020년05월14일

(30) 우선권주장

62/755,945 2018년11월05일 미국(US)

(71) 출원인

더 유니버시티 오브 시카고

미국 일리노이 60637 시카고 싸우스 엘리스 애버
뉴 5801

클로스트라바이오

미국, 60615 일리노이, 시카고 이스트 53번째 스
트리트 1452

(72) 발명자

나글러, 캐서린 알.

미국, 60615 일리노이, 시카고 스위트 2씨, 하퍼
애비뉴 사우스 5113, 유니버시티 오브 시카고, 폴
스카이 센터 포 엔터프라이즈 앤 이노베이션

바오, 리유에

미국, 60615 일리노이, 시카고 스위트 2씨, 하퍼
애비뉴 사우스 5113, 유니버시티 오브 시카고, 폴
스카이 센터 포 엔터프라이즈 앤 이노베이션

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 90 항

(54) 발명의 명칭 감염성, 자가 면역 및 알레르기성 질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 개시는 식품 알레르기, 감염증, 자가 면역 병태, 및 기타 알레르기성 병태를 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 따라서, 본 개시는 박테리아 *Anaerostipes caccae*를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체에서 감염증, 자가 면역, 또는 알레르기성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱(prebiotic)을 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체에서 식품 알레르기를 치료하거나 또는 알레르기 항원(allergen)에 대한 알레르기 반응을 감소시키거나 또는 아나필락시스 반응(anaphylactic response)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/19 (2013.01)
A61K 31/7016 (2013.01)
A61K 31/702 (2013.01)
A61K 31/718 (2013.01)
A61P 11/02 (2018.01)
A61P 11/06 (2018.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
G01N 33/6893 (2013.01)

(72) 발명자

안토노포울로스, 디오니시오스

미국, 60615 일리노이, 시카고 스위트 2씨, 하퍼
애비뉴 사우스 5113, 유니버시티 오브 시카고, 폴
스카이 센터 포 엔터프라이저십 앤 이노베이션

콜슨, 존 더블유.

미국, 60615 일리노이, 시카고 이스트 53번째 스트
리트 1452, 클로스트라바이오 내

헤서, 로렌 안데스

미국, 60615 일리노이, 시카고 스위트 2씨, 하퍼
애비뉴 사우스 5113, 유니버시티 오브 시카고, 폴
스카이 센터 포 엔터프라이저십 앤 이노베이션

명세서

청구범위

청구항 1

박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱(prebiotic)을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체에서 식품 알레르기를 치료하거나 또는 알레르기 항원(allergen)에 대한 알레르기 반응을 감소시키거나 또는 아나필락시스 반응(anaphylactic response)을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 2

박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 식품 알레르기 또는 아나필락시스 반응의 위험에 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 3

박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 필요로 하는 대상체에서 아토피성 질환을 치료하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 아토피성 질환은 습진, 아토피성 피부염, 천식 또는 알레르기성 비염을 포함하는, 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드(galactooligosaccharide), 락툴로오스(lactulose), 락티톨(lactitol), 에리트리톨(erythritol), 이소말트(isomalt), 폴리글리시톨(polyglycitol), 아세테이트 및 락테이트 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락테이트, 아세테이트, 및 락티톨 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 소화가능한 올리고사카라이드 및 소화 불가능한 올리고사카라이드 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 6g 이상의 소화 불가능한 올리고사카라이드를 포함하는, 방법.

청구항 9

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 올리고사카라이드는 개질된 올리고사카라이드(modified oligosaccharide)를 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 개질된 올리고사카라이드는 *A. caccae* 발효가능한 부티레이트-방출 올리고사카라이드를 포함하는, 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중의 어느 한 항에 있어서,

1×10^6 내지 1×10^{15} CFU의 *A. caccae*가 상기 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 부티레이트 운반 화합물(butyrate carrying compound)의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 pHPMA-b-pBMA를 포함하는, 방법.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 경구 투여되는 것인, 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*, 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물은 동시에 투여되는 것인, 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 이전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 1시간 이상 전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 17 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 상기 프리바이오틱 후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중의 어느 한 항에 있어서,

10g 이상의 프리바이오틱이 상기 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*의 콜로니 형성 단위(colony forming unit) 대 상기 프리바이오틱의 그램(gram)의 비율은 1000:1 내지 10000:1인, 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 식품 알레르기는 우유(cow's milk), 계란, 땅콩 알레르기, 콩 알레르기, 밀/글루텐 알레르기(wheat/gluten allergy), 조개류 알레르기(shellfish allergy), 참깨 알레르기(sesame allergy), 또는 나무 견과류 알레르기(tree nut allergy)를 포함하는, 방법.

청구항 23

제 1 항 내지 제 22 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 식품 알레르기 또는 아토피성 질환으로 진단 받은 것인, 방법.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 식품 알레르기 또는 아토피성 질환에 대한 사전 치료를 받은 것인, 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 대상체는 상기 사전 치료에 대해 내성인 것으로 판단되었던 것인, 방법.

청구항 26

제 1 항 내지 제 25 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

상기 대상체는 1세 미만, 5세 미만, 12세 미만 또는 18세 미만인, 방법.

청구항 28

제 1 항 내지 제 27 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 살아있는 박테리아 생성물(live bacterial product)인, 방법.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 박테리아는 동결건조되는(lyophilized or freeze-dried) 것인, 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 29 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 경구 투여되는 것인, 방법.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 정제 또는 캡슐제로 투여되는 것인, 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 31 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 락테이트-함유 분유(lactate-containing formula) 또는 식품의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 3 미만의 보호/비보호 조작 분류 단위(operational taxonomic unit; OTU)의 비율을 갖도록 결정되는 것인, 방법.

청구항 34

식품 알레르기를 갖는 대상체를 진단하는 방법으로서,

상기 방법은 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율을 결정하는 것을 포함하되, 상기 대상체는 상기 비율이 3 미만일때 식품 알레르기로 진단되는 것인, 방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서,

상기 방법은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 상기 프리바이오틱을 포함하는 조성물로, 식품 알레르기로 진단된 상기 대상체를 치료하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락티톨, 에리트리톨, 이소말트, 폴리글리시톨, 락테이트 및 아세테이트 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락테이트, 아세테이트, 및 락티톨 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 38

제 35 항 내지 제 37 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 소화가능한 올리고사카라이드 및 소화 불가능한 올리고사카라이드 중의 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 39

제 35 항 내지 제 38 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 6g 이상의 소화 불가능한 올리고사카라이드를 포함하는, 방법.

청구항 40

제 38 항 또는 제 39 항에 있어서,

상기 올리고사카라이드는 개질된 올리고사카라이드를 포함하는, 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 개질된 올리고사카라이드는 *A. caccae* 발효가능한 부티레이트-방출 올리고사카라이드를 포함하는, 방법.

청구항 42

제 35 항 내지 제 41 항 중의 어느 한 항에 있어서,

1×10^6 내지 1×10^{15} CFU의 *A. caccae*가 상기 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 43

제 35 항 내지 제 42 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 부티레이트 운반 화합물의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 pHPMA-b-pBMA를 포함하는, 방법.

청구항 45

제 43 항 또는 제 44 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 경구 투여되는 것인, 방법.

청구항 46

제 35 항 내지 제 45 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*, 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물은 동시에 투여되는 것인, 방법.

청구항 47

제 35 항 내지 제 42 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 이전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 48

제 35 항 내지 제 42 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 49

제 35 항 내지 제 48 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물 1시간 이상 전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 50

제 43 항 내지 제 49 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 상기 프리바이오틱 후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 51

제 35 항 내지 제 50 항 중의 어느 한 항에 있어서,

10g 이상의 프리바이오틱이 상기 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 52

제 35 항 내지 제 51 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*의 콜로니 형성 단위 대 상기 프리바이오틱의 그램의 비율은 1000:1 내지 10000:1인, 방법.

청구항 53

제 34 항 내지 제 52 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 식품 알레르기는 우유 알레르기를 포함하는, 방법.

청구항 54

제 34 항 내지 제 53 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 식품 알레르기로 진단 받지 않았고/않았거나 식품 알레르기의 증후를 나타내지 않았던 것인, 방법.

청구항 55

제 34 항 내지 제 54 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 56

제 55 항에 있어서,

상기 대상체는 1세 미만, 5세 미만, 12세 미만 또는 18세 미만인, 방법.

청구항 57

제 35 항 내지 제 56 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 살아있는 박테리아 생성물인, 방법.

청구항 58

제 35 항 내지 제 57 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 박테리아는 동결건조되는(lyophilized or freeze-dried) 것인, 방법.

청구항 59

제 35 항 내지 제 58 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 경구 투여되는 것인, 방법.

청구항 60

제 59 항에 있어서,

상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 정제 또는 캡슐제로 투여되는 것인, 방법.

청구항 61

제 35 항 내지 제 60 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 락테이트-함유 분유 또는 식품의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 62

박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물.

청구항 63

제 62 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락티톨, 에리트리톨, 이소말트, 폴리글리시톨 중의 하나 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 64

제 63 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 및 락티톨 중의 하나 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 65

제 62 항 내지 제 64 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 부티레이트 운반 화합물을 더 포함하는, 조성물.

청구항 66

제 65 항에 있어서,

상기 부티레이트 운반 화합물은 pHPMA-b-pBMA를 포함하는, 조성물.

청구항 67

제 62 항 내지 제 64 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 소화가능한 올리고사카라이드 및 소화 불가능한 올리고사카라이드 중의 하나 또는 둘 다를 포함하는, 조성물.

청구항 68

제 62 항 내지 제 67 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 프리바이오틱은 6g 이상의 소화 불가능한 올리고사카라이드를 포함하는, 조성물.

청구항 69

제 67 항 또는 제 68 항에 있어서,

상기 올리고사카라이드는 개질된 올리고사카라이드를 포함하는, 조성물.

청구항 70

제 69 항에 있어서,

상기 개질된 올리고사카라이드는 *A. caccae* 발효가능한 부티레이트-방출 올리고사카라이드를 포함하는, 조성물.

청구항 71

제 62 항 내지 제 70 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*는 1×10^6 내지 1×10^{15} CFU 투여량(dosage)의 양인, 조성물.

청구항 72

제 62 항 내지 제 71 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 *A. caccae*의 콜로니 형성 단위 대 상기 프리바이오틱의 그래프의 비율은 1000:1 내지 10000:1인, 조성물.

청구항 73

제 62 항 내지 제 72 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 약학 부형제(pharmaceutical excipient)를 더 포함하는, 조성물.

청구항 74

제 62 항 내지 제 73 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 경구 투여용으로 제형화되는 것인, 조성물.

청구항 75

제 62 항 내지 제 74 항 중의 어느 한 항의 조성물을 포함하는 정제, 캡슐제, 또는 분말제.

청구항 76

박테리아 *Anaerostipes caccae*을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체에서 감염성, 자가 면역, 또는 알레르기성 질환을 치료하는 방법.

청구항 77

제 76 항에 있어서,
상기 질환은 아토피성 질환을 포함하는, 방법.

청구항 78

제 77 항에 있어서,
상기 아토피성 질환은 습진, 아토피성 피부염, 천식 또는 알레르기성 비염을 포함하는, 방법.

청구항 79

제 76 항 내지 제 78 항 중의 어느 한 항에 있어서,
 1×10^6 내지 1×10^{15} CFU의 *A. caccae*가 상기 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 80

제 76 항 내지 제 79 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 감염성, 자가 면역, 또는 알레르기성 질환으로 진단 받은 것인, 방법.

청구항 81

제 1 항 내지 제 23 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 상기 감염성, 자가 면역, 또는 알레르기성 질환에 대한 사전 치료를 받은 것인, 방법.

청구항 82

제 81 항에 있어서,
상기 대상체는 상기 사전 치료에 내성인 것으로 판단되었던 것인, 방법.

청구항 83

제 76 항 내지 제 82 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 84

제 83 항에 있어서,
상기 대상체는 1세 미만, 5세 미만, 12세 미만 또는 18세 미만인, 방법.

청구항 85

제 76 항 내지 제 84 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 *A. caccae*는 살아있는 박테리아 생성물인, 방법.

청구항 86

제 76 항 내지 제 85 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 박테리아는 동결건조되는(lyophilized or freeze-dried) 것인, 방법.

청구항 87

제 76 항 내지 제 86 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 *A. caccae*는 경구 투여되는 것인, 방법.

청구항 88

제 87 항에 있어서,
상기 *A. caccae*는 정제 또는 캡슐제로 투여되는 것인, 방법.

청구항 89

제 78 항 내지 제 88 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 방법은 락테이트-함유 분유 또는 식품의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 90

제 76 항 내지 제 89 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 3 미만의 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율을 갖도록 결정되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본원은 2018.11.05.자로 출원된 미국 가특허출원 제62/755,945호의 우선권의 이익을 주장하며, 상기 출원은 그 전체가 본원에서 참조로 인용된다.

[0003] 본 발명은 분자생물학 및 의학 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 서구화된 사회에서 질환 유병률이 세대별로 현저하게 증가하면서 식품 알레르기가 주된 공중 보건 문제가 되었다(1, 2). 이러한 발병률의 급격한 증가에 대한 하나의 가설은, 항생제의 빈번한 사용, 식단의 변화, 및 보다 높은 비율의 제왕 절개 및 분유 수유를 비롯한 최근의 라이프스타일 요인이 장내 공생 미생물 의구성을 변경시켜서 알레르기성 질환에 대한 감수성을 증가시킨다는 것이다. 숙주-미생물군 상호작용은 적절한 면역 생체 항상성(immune homeostasis)을 확립하는데 필수적이며, 종종 '균집붕괴(dysbiosis)'라고 불리는 자연적으로 선택된 박테리아 집단의 교란이 수많은 다른 병리현상과 관련이 있으며; 여러 연구에 따르면 초기 생애의 균집붕괴가 특히 해로울 수 있음을 시사하고 있다(3, 4).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 알레르기 및 기타 관련 질환의 효과적인 치료를 위해 미생물 군집(microbiome)을 변형시키는 조성물이 당해 기술분야에서 요구된다.
- [0006] 본 개시는 대상체의 식품 알레르기, 감염증, 자가 면역 병태 및 기타 아토피성 질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공함으로써 당해 분야의 요구를 충족시킨다. 따라서, 본 개시는, 박테리아 *Anaerostipes caccae*를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여 상기 대상체의 감염성, 자가 면역, 또는 알레르기성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 추가 측면은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱(prebiotic)을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체의 식품 알레르기를 치료하거나 또는 알레르기 항원(allergen)에 대한 알레르기 반응을 감소시키거나 또는 아나필락시스 반응(anaphylactic response)을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 상기 방법은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체의 식품 알레르기를 치료하는 것에 관한 것이다. 일부 측면에서, 상기 방법은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체의 식품 알레르기 또는 아나필락시스 반응을 갖거나 또는 발병시킬 위험에서 상기 대상체를 치료하는 것에 관한 것이다. 예를 들어 상기 대상체는 식품 알레르기의 가족력 또는 식품 알레르기에 대한 유전 적 소인이 있거나 알레르기 항원에 대한 우발적 노출로 인한 아나필락시스 반응의 위험에 처할 수 있다. 일부 측면에서, 상기 대상체는 바람직하지 않은 미생물 프로파일 또는 식품 알레르기가 대상체에서 존재할 수 있거나 발병할 수 있다는 표시를 갖는 대상체이다. 다른 측면에서, 상기 방법은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체의 알레르기 항원에 대한 알레르기 반응을 감소시키는 것에 관한 것이다.
- [0007] 추가 측면에서, 상기 방법은, 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하여, 상기 대상체의 아나필락시스 반응을 치료 또는 예방하는 것에 관한 것이다. 추가의 측면은, 필요로 하는 대상체의 아토피성 질환을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 방법은 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물을 대상체에 투여함으로써 상기 대상체의 아토피를 치료하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 추가 측면은 식품 알레르기를 갖는 대상체를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 보호/비보호 조작 분류 단위(operational taxonomic unit; OTU)의 비율을 결정하는 단계를 포함하되, 상기 대상체는 상기 비율이 3 미만일때 식품 알레르기로 진단된다. 추가 측면은, 알레르기 병태, 감염증, 또는 자가 면역 병태를 갖는 대상체를 진단하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율을 결정하는 단계를 포함하되, 상기 대상체는 상기 비가 3 미만일때 알레르기 병태, 감염증, 또는 자가 면역 병태로 진단된다. 일부 구현예에서, 상기 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율은 약 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 또는 0.5, 그 미만, 또는 그 초과(또는 본원에서의 임의의 유효가능한 범위)이다.
- [0009] 본 개시의 추가 측면은 박테리아 *Anaerostipes caccae* 및 프리바이오틱을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 추가 측면은 본 개시의 조성물을 포함하는 정제, 캡슐제, 또는 분말제에 관한 것이다.
- [0010] 위에서 및 본원에서 기술된 임의의 측면으로 사용될 수 있는 특정 구현예가 하기에서 기술된다.
- [0011] 위에서 개시된 측면의 일부 구현예에서, 상기 방법은 아토피성 질환을 치료하는 것에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 아토피성 질환은 습진, 아토피성 피부염, 천식 또는 알레르기성 비염을 포함한다.
- [0012] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체의 알레르기 항원에 대한 알레르기 반응을 감소시키기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 상기 알레르기 항원에 대한 알레르기 반응을 나타내는 것으로 결정되었다. 알레르기 반응은 여러 형태를 취할 수 있으며 여러 수준의 중증도 또는 강도를 가질 수 있다. 이러한 알레르기 반응은 사람마다 다를 수 있지만 시간이 지남에 따라 개인마다 변할 수도 있다. 반응의 중증도 또는 강도를 평가하는 시스템은 당해 분야에 알려져 있으며 설명되어 있다. 예를 들어 채점 시스템(scoring system)이 문헌 「Sampson et al, J. Allergy Clin. Immunol. Vol 130 (6) p. 1260 (2012)」에 기술되어 있으며, 상기 문헌은 모든 목적으로 참조로 인용된다. 알레르기 반응을 감소시킨다는 문구는 당해 분야에 공지된 채점 시스템 중 하나에 의해 측정되는 바와 같이 알레르기 반응의 중증도 또는 강도를 감소시키는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응을 감소시키는 것은 상기 알레르기 반응의 통계학적으로 유의미한 감소에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 다수의 인간 또는 동물 집단에 대한 알레르기 반응의 평균 중증도 또는 강

도가 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 식품 알레르기에 더하여 습진, 천식 및 알레르기성 비염을 포함하는 임의의 아토피성 질환에 대한 반응을 의미할 수 있다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 샘슨(Sampson) 등에 의해서 기술된 채점 시스템에 따라 점수가 매겨진 것처럼 적어도 한 등급씩 감소된다. 예를 들어 특정 구현예에서, 상기 알레르기 반응은 등급 3에서 등급 2로 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 등급 2에서 등급 1로 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 등급 1에서 등급 0으로 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 등급 3에서 등급 2로 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 등급 3에서 등급 0으로 감소된다. 일부 구현예에서, 알레르기 반응은 등급 2에서 등급 0으로 감소된다.

[0013] 상기 용어 "프리바이오틱(prebiotic)"은 상부 위장관, 예를 들어 소장(small intestine)에 들어가기 전에 소화 또는 분해에 민감하지 않은 2 이상의 중합도를 갖는 올리고사카라이드(oligosaccharide) 또는 폴리사카라이드를 지칭하며, 그것은 발효 또는 소화된 올리고사카라이드 또는 그들의 소화 부산물이 미생물 군집을 변화시키거나 인간 또는 동물에게 이익을 제공하는 결장 내의 미생물 또는 기타 과정에 의해 발효되거나 소화될 수 있다.

[0014] 일부 구현예에서, 상기 방법은 아나필락시스 반응을 치료하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 아나필락시스 반응은 식품 알레르기로부터 유래하는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 아나필락시스 반응은 약물 알레르기로부터 유래하는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 아나필락시스 반응은 벌레 물림(insect bite)로부터 유래하는 것이다.

[0015] 일부 구현예에서, 단쇄 올리고사카라이드는 적어도, 최대 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75의 중합도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드(galactooligosaccharide; GOS)을 포함한다. GOS는 종종 상당량의 락토오스를 포함하고 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)에 의해 분해될 수 있는 모유(human breast milk)에서 풍부하게 발견될 수 있다. GOS의 특정 예는 스타키오스(stachyose), 라피노오스(raffinose), 베르바스코오스(verbascose), β (1-4)갈락토실-락토오스(4'-갈락토-올리고사카라이드) 및 β (1-6)-갈락토실-락토오스(6'-갈락토-올리고사카라이드) 및 락툴로오스(락툴로오스)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 프럭탄(fructan)(단쇄 프루토올리고사카라이드(scFOS), 프루토-올리고사카라이드(FOS), 및 인슐린을 포함함), 갈락탄(galactan), 글루칸(glucan) 및 기타 올리고사카라이드를 포함한다. 이들의 예는 단쇄 FOS(2 내지 4의 중합도를 갖는 하기 프루토오스의 단쇄); 프루토올리고사카라이드(4 내지 20의 중합도를 가짐); 인슐린(20 초과(>)의 중합도를 가짐) 또는 페인(phlein); 대두 올리고사카라이드(SOS); 갈락토올리고사카라이드(GOS); 이소말토오스, 이소말토트리오스(isomaltotriose) 및 파노스(panose)를 포함한 이소말토올리고사카라이드(IMOS)(밀, 보리, 옥수수, 귀리, 타피오카, 쌀, 감자의 전분으로부터 유래됨); 라피노스(raffinose) 및 테트라사카라이드 스타키오스(tetrasaccharide stachyose)를 포함한 대두 올리고사카라이드(SOS)(대두로부터 유래됨); 자일란(xylan), 자일로티오스(xylobiose), 및 자일로테트라오스(xylotetraose)를 포함한 자일로올리고사카라이드(XOS)(죽순, 과일, 야채, 우유, 및 꿀에서 발견되는 전분에서 유래됨); 펙틴을 포함한 펙틴올리고사카라이드(pecticoligosaccharide)(POS); 키틴을 포함한 키토올리고사카라이드; 락툴로오스; 베타-글루칸(곡물 예를 들어 귀리, 보리, 밀, 및 호밀로부터 유래됨); 및 전분-함유 식품이 냉각될 때 형성되는 저항 전분(resistant starch)(예를 들어 파스타, 감자, 및 쌀)을 포함하는, 유형 III 저항 전분을 포함한다. 추가의 예는 폴리올 예를 들어 이소말트(isomalt), 말티톨(maltitol), 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 락티톨(lactitol), 에리트리톨 및 폴리글리시톨을 포함한다. 폴리올의 공급원은 사과, 살구, 아보카도, 블랙 베리, 체리, 라이치(lychee), 천도복숭아, 복숭아, 배, 자두, 자두, 수박, 콜리플라워(cauliflower), 및 버섯을 포함한다. 또다른 추가의 예는 비-프럭탄(non-fructan) 예를 들어 말토덱스트린, 사이클로덱스트린, 및 피로덱스트린(감자 및 옥수수 전분에서 유래됨), 밀 덱스트린, 고-아밀로오스 옥수수 전분(high-amylose cornstarch)(및 옥수수 전분(maizestarch)), 아밀로오스, 및 아밀로펙틴을 포함한 덱스트린을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 상기 프리바이오틱이 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락티톨, 에리트리톨, 이소말트, 폴리글리시톨, 아세테이트 및 락테이트 중의 하나 이상을 포함하는 것의 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 갈락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 락테이트, 아세테이트, 및 락티톨 중의 하나 이상을 포함한다.

[0016] 또한 본원에 기재된 화합물의 유도체 및 가공된 형태가 포함된다. 유도체 또는 가공된 형태는, 예를 들어 상기 프리바이오틱을 보다 쉽게 소화 가능하고, 특정 유형의 박테리아에 더 특이적으로 만들어서 상기 프리바이오틱의 발효 특성을 변경시키거나, 또는 발효 산물, 예를 들어 단쇄 지방산(SCFA) 및/또는 기타 자일로물의 수율을 증가시키도록 개질될 수 있다. 또한, 이들 화합물의 양을 함유하고/하거나 프리바이오틱 효과를 가질 수 있는 것으로 알려진 식품 및 식품 유도체가 포함된다. 이들 식품은 그들의 전분을 분리하도록 가공될 수 있거나, 또는 그들의 전분을 분리하지 않고, 예를 들어 소비를 위해 식품 전체를 그라인딩(grinding)함으로써 투여될 수

있다. 상기 식품의 예는, 양파, 아티초크(artichoke), 마늘, 밀, 바나나, 아스파라거스(asparagus), 치커리(chicory), 부추, 토마토, 죽순, 과일, 야채, 우유, 꿀, 밀, 호밀, 보리, 옥수수, 귀리, 타피오카(tapioca), 쌀, 및 감자를 포함한다.

[0017] 상기 용어 "프리바이오틱 유도체"는 소비하기 전에 발효 특성, 소화능을 증가시키거나, 또는 단쇄 지방산 및 기타 자일로물과 같은 생성물에 의해서 발효를 증가시키도록 제조된 변형된 형태의 프리바이오틱을 의미한다.

[0018] 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 소화가능한 올리고사카라이드 및 소화불가능한 올리고사카라이드 중의 하나 또는 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 적어도 6g의 소화가능한 올리고사카라이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 소화가능한 올리고사카라이드 및/또는 소화불가능한 올리고사카라이드를 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 또는 40g을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "소화불가능한 올리고사카라이드"는 동물에게 소화될 수 없는 식물의 부분을 지칭한다. 상기 소화불가능한 올리고사카라이드는 수용성(물 속에서 용해될 수 있는) 또는 수-불용성(물 속에서 용해되지 않는)일 수 있다. 본 개시의 방법 및 조성물에 유용한 소화불가능한 올리고사카라이드의 특정한 예는 인슐린(치커리 또는 용설란에서 유래됨), 아마 섬유, 콩 섬유(soy fiber), 귀리 섬유, 옥수수 섬유, 구아 검, 아라비아 고무, 낙엽송 껍질(Larch bark), 빈 검(bean gum), 아카시아 고무, 호박 섬유, chia 섬유(chia fiber) 및 이들의 조합물 중의 하나 이상을 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 상기 올리고사카라이드는 개질된 올리고사카라이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 개질된 올리고사카라이드는 *A. caccae* 발효가능한 부티레이트-방출 올리고사카라이드를 포함한다. 부티레이트-방출은 발효의 부산물로서 대사산물 부티레이트의 생성을 의미한다. 일부 구현예에서, 상기 올리고사카라이드는 발효 또는 소화 후에 위장관에서 락테이트의 농도, 질량 또는 양을 증가시키는 것이다. 그의 예는 밀, 호밀, 옥수수(corn)/옥수수(maize), 귀리, 쌀, 및 감자를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae* 발효가능한 부티레이트-방출 올리고사카라이드는 *A. caccae*에 의해서 부티레이트로 발효될 수 있는 화합물을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 상기 방법은 부티레이트 운반 화합물(butyrate carrying compound)의 투여를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 보유 화합물은 국제공개공보 WO 2018/195067에서 더 기술되는 pHPMA-b-pBMA를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 보유 화합물은 국제공개공보 WO 2018/195067에 개시되는 것을 포함하며, 상기 국제공개공보는 참조로 인용된다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 보유 화합물은 위내 위관(intragastric gavage)에 의해서 투여된다.

[0021] 일부 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{15} 개의 세포 또는 CFU의 *A. caccae*가 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도, 최대, 또는 약 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 또는 1×10^{15} 개(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)의 세포 또는 CFU의 *A. caccae*가 투여된다.

[0022] 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae*, 상기 프리바이오틱, 및/또는 부티레이트 운반 화합물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae*는 상기 프리바이오틱 및/또는 상기 부티레이트 운반 화합물보다 적어도 1시간 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae* 및/또는 부티레이트 운반 화합물은 상기 프리바이오틱 및/또는 부티레이트 운반 화합물보다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 또는 18시간 또는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 전 또는 후에(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위) 투여된다. 일부 구현예에서 10g의 프리바이오틱이 상기 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 또는 50 g(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)의 프리바이오틱이 상기 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, *A. caccae*의 콜로니 형성 단위(colony forming unit) 대 프리바이오틱 및/또는 부티레이트 운반 화합물의 g의 비율은 1000:1 내지 10000:1이다. 일부 구현예에서, 상기 비는 적어도, 최대, 또는 약 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 8:1, 10:1, 20:1, 40:1, 50:1, 80:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1, 300:1, 400:1, 500:1, 1000:1, 1500:1, 2000:1, 2500:1, 3000:1, 3500:1, 4000:1, 4500:1, 5000:1, 7500:1, 10000:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:400, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500, 1:4000, 1:4500, 1:5000, 1:7500, 또는 1:10000(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)이다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 운반 화합물은 상기 프리바이오틱 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 운반 화합물 및 상기 프리바이오틱은 동일한 조성물 중에 있다. 일부 구현예에서, 상기 부티레이트 운반 화합물은 상기 프리바이오틱 투여 직후 또는 5, 10, 20, 30 또는 60분 미만(또는 그 안의 임의의 유도가능한 범위)에 투여된다.

- [0023] 일부 구현예에서, 상기 식품 알레르기는 우유 알레르기(cow's milk allergy)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 식품 알레르기는 땅콩 또는 계란 알레르기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 식품 알레르기, 우유 알레르기, 땅콩 알레르기, 계란 알레르기, 콩 알레르기, 밀/글루텐(wheat/gluten) 알레르기, 조개류(shellfish) 알레르기, 참깨 알레르기, 나무 견과류(tree nut)(피스타치오(pistachio), 캐슈(cashew), 호두, 아몬드, 개암(hazelnut), 마카다미아 너트(macadamia nut)) 알레르기, 알레르기 병태, 자가 면역 질환 또는 감염증으로 진단되었다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 식품 알레르기, 알레르기성 질환, 자가 면역 질환 또는 감염증으로 사전 치료를 받은 적이 있었다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 사전 치료에 내성이 있는 것으로 판정되었다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 식품 알레르기, 알레르기성 질환, 자가 면역 질환 또는 감염증으로 진단되지 않았고/않았거나 식품 알레르기, 알레르기성 질환, 자가 면역 질환 또는 감염증의 증상을 나타내지 않았다.
- [0024] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 신생아, 1세 미만, 5세 미만, 12세 미만 또는 18세 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1세 미만 또는 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개월 미만, 또는 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일 미만(또는 그 안의 임의의 유도가능한 범위)이다. 특정 구현예에서, 환자는 18세 미만의 소아 환자이다. 다른 구현예에서, 상기 환자는 성인 환자이다.
- [0025] 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae*는 살아있는 박테리아 생성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 박테리아는 동결건조된다(lyophilized or freeze-dried). 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 경구 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 정제 또는 캡슐제로 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 *A. caccae* 및/또는 프리바이오틱은 본원에 기술된 투여 경로에 의해 투여된다.
- [0026] 상기 용어 "식품" 또는 "식품 유도체"는 전체 아이템에서 발견되거나 프리바이오틱을 추가로 분리하기 위해 가공된 프리바이오틱스를 포함하는 조리되거나 조리되지 않은 아이템들을 의미한다.
- [0027] 일부 구현예에서, 상기 방법은 락테이트-함유 제형 또는 식품의 투여를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 식품은 사과, 살구, 아보카도, 블랙 베리, 체리, 라이치, 천도 복숭아, 복숭아, 배, 자두, 자두, 수박, 콜리 플라워 및 버섯, 양파, 아티초크, 마늘, 밀, 바나나, 아스파라거스, 치커리, 부추, 토마토, 죽순, 과일, 야채, 우유, 꿀, 밀, 호밀, 보리, 옥수수(corn 또는 maize), 귀리, 타피오카, 쌀, 및 감자를 더 포함한다.
- [0028] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 3 미만의 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율을 갖는 것으로 결정된다. 일부 구현예에서, 상기 보호/비보호 조작 분류 단위(OTU)의 비율은 약 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 또는 0.5, 그 미만, 또는 그 초과(또는 그 안의 임의의 유도가능한 범위)이다.
- [0029] 일부 구현예에서, 상기 보호 OTU는 보충 표 3에서 기술된 1111294, 360015, 뉴 레퍼런스(New Reference) OTU147, 628226, 349024, 712677, 780650, 843459, 262095, 뉴 레퍼런스 OTU166, 579851, 551822, 298247, 345540, 582691, 259772, 325419, 797229, 557627, 828483, 299267, 4448331, 3376513, 813217, 뉴. 클린업. 레퍼런스(New. CleanUp. Reference) OTU56927, 335701, 191999, 183865, 231787, 342397, 581782, 304641, 4389289, 또는 541119로부터 선택된 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 비-보호 OTU는 보충 표 3에서 기술된 195258, 315846, 551902, 318190, 591635, 585227, 370225, 199354, 198866, 583398, 583656, 535375, 1111191, 580629, 365181, 359809, 585914, 365385, 583117, 180082, 589071, 514272, 484304, 또는 589277로부터 선택된 하나 이상을 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, 상기 조성물은 약학적 부형제를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다.
- [0031] 본원 전반에 걸쳐서, 상기 용어 "약"은 측정 또는 정량화 방법에 대한 고유한 오차 변동을 포함함을 나타내기 위해 사용된다.
- [0032] 상기 용어 "포함하는(comprising)"과 함께 사용될 때 단어 "a" 또는 "an"의 사용은 "하나(one)"를 의미할 수 있지만, "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 초과"의 의미와도 동일하다.
- [0033] 상기 어구 "및/또는"은 "및" 또는 "또는"을 의미한다. A, B, 및/또는 C를 기술하는 것은 A 단독, B 단독, C 단독, A와 B의 조합, A와 C의 조합, B와 C의 조합, 또는 A, B 및 C의 조합을 포함한다. 즉, "및/또는"은 포괄적인 '또는'을 의미한다.
- [0034] 상기 단어 "포함하는"(및 "포함하는"의 임의의 형태, 예를 들어 "포함한다"), "갖는"("포함한"의 임의의 형태,

예를 들어 "포함한다") 또는 "함유하는"("함유하는"의 임의의 형태, 예를 들어 "함유한다")는 포괄적 또는 개방형(open-ended)이며 추가의, 언급되지 않은 구성요소들 또는 방법 단계들을 배제하지 않는다.

[0035] 그들의 사용을 위한 조성물 및 방법은 본원 명세서 전반에 개시된 성분들 또는 단계들 중의 어느 것들을 "포함할" 수 있거나, "필수적으로 그것들로 구성될" 수 있거나, 또는 "그것들로 구성될" 수 있다. 개시된 성분들 또는 단계들 중의 어느 것들로 "필수적으로 구성되는" 조성물 및 방법은 청구된 발명의 기본적인 및 신규한 특징에 실질적으로 영향을 미치지 않는 특정 물질들 또는 단계들에 대한 청구범위를 제한한다.

[0036] 본원 명세서에서 논의된 임의의 구현에는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있으며, 그 반대도 가능한 것으로 고려된다. 더욱이, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하는데 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나 본 발명의 특정 구현예를 나타내면서 상세한 설명 및 특정 구현예는 단지 예시로서 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 상세한 설명으로부터 당업자들에게 명백 할 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

[0038] 하기 도면은 본원 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 여기에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이들 도면을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-도 1d. 건강하지만 CMA가 아닌 영유아의 미생물총(microbiota)은 식품에 대한 알레르기 반응으로부터 보호한다. (a) 무균 마우스, 및 β 락토글로불린(BLG) + 콜레라 독소(CT)로 감작된(sensitized) 8개의 공여체(건강한 마우스 4마리, CMA 4마리 보충 표 1 참조) 각각의 분변으로 집락된(colonized) 마우스에서 BLG로 제 1 켈린지 후 표시된 시점에서의 코어 체온의 변화; $n=42$ CMA, 2회의 독립적인 실험으로부터 수거된, 8개의 공여체 각각에 대한 4 내지 12마리의 마우스를 갖는 24마리의 GF 마우스 및 31마리의 건강한 마우스. (b) 혈청 BLG-특이적 IgE, (c) BLG-특이적 IgG1 및 (d) a에서의 마우스로부터의 mMCP-1. a의 경우 원은 평균을 나타내고, 에러 막대(error bar)는 s.e.m.을 나타낸다. b-d의 경우 원은 개별 마우스를 나타내고, 막대는 평균 + s.e.m.을 나타낸다. 선형 혼합된-효과 모델을 사용하여 다중 시험 보정(multiple testing correction)을 위한 벤자미니-호흐베르그 FDR(Benjamini-Hochberg FDR; BH-FDR) 방법으로 a-d에서 그룹들을 비교하였다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

도 2a-도 2f. 8명의 영아 공여체의 분변 샘플을 분석한 결과 알레르기 표현형과 관련된 분류학적 특성이 밝혀졌다. (a) CMA와 건강한 공여체 사이에 차등적으로 풍부한 OTU의 히트맵(Heatmap). 로(row)는 0.10에서 제어되고 최소 4개의 인간 분변 샘플과 최소 2개의 집락된 마우스 그룹에 존재하는 펄스-발견 속도(false-discovery rate; FDR)에서 다른 것으로 확인된 58개의 OTU를 보여준다(보충 표 3 참조). 칼럼(column)은 각 공여체(D) 또는 집락된 마우스 그룹(m)을 나타낸다. 공여체당 $n=2-3$ 기술적 복제물, 2주 및 3주 포스트-집락(post-colonization)에서 취한 분변으로 집락된 마우스 그룹당 $n=1-4$ 마우스(방법 참조). 히트맵 위의 막대 그래프는 각각의 공여체 또는 마우스 그룹에 대해 계산된 잠재적으로 보호(오렌지색) 또는 비-보호(청색) OTU의 풍부도 점수를 나타낸다. (b-d) BLG-특이적 IgE의 수준에 대해 플롯된 a에서 집락된 마우스, (b) BLG-특이적 IgG1 (c), 및 도 1에서의 모든 마우스로부터의 mMCP-1 (d)로부터 유래된 비-보호 OTU에 대한 보호의 비율(도 10b 참조). 각각의 원은 각각의 4개의 건강한(오렌지색) 또는 CMA(청색) 공여체 분변으로 집락된 모든 마우스로부터의 평균 결과치를 나타낸다. (e) a(2주 및 3주 포스트-집락에서 수거된 분변을 사용한, 건강한 그룹에서 $n=8$ 마우스 및 CMA 그룹에서 $n=9$ 마우스)에서의 샘플로부터 건강한-집락된 마우스(오렌지색) 또는 CMA-집락된 마우스(청색)에서 상당히 풍부한 분류군(taxa)의 LEfSe 분석. (f) 그룹별로(건강=오렌지색, CMA=청색) 채색된 LEfSe 분석에 의해서 차등적으로 풍부한 것으로 검출된 분류군을 사용한, a로부터 집락된 마우스 샘플의 커뮤니티 조성(community composition)을 보여주는 분지도(cladogram). 이산 펄스 발견 속도(discrete false discovery rate; DS-FDR) 방법을 사용하여 a에서의 그룹들을 비교하였으며 e에서 크루스칼-월리스 시험(Kruskal-Wallis test)을 수행하였다(방법 참조).

도 3의 a-b. 독특한 회장(ileum) 전사체 시그니처(ileal transcriptome signature)는 건강한 마우스와 CMA 집락된 마우스를 구별한다. (a) 집락 후 7일 후에 GF($n=3$), 건강하게-집락된($n=18$) 또는 CMA-집락된($n=18$) 마우스에서 분리된 회장 IEC에서 차등적으로 발현된 32개의 유전자(DEG)의 히트맵(보충 표 4 참조). 각각의 칼럼은 나타낸 공여체 분변으로 집락된 개별 마우스를 나타낸다. 4개 유형의 유전자 발현 변화는 아래와 같이 표시된다: (1) 건강한 마우스에서 상향: CMA 및 GF 둘 다에 상대적인 건강한 마우스에서 상향-조절된 유전자; (2) CMA

에서 상향: 건강한 마우스 및 GF 마우스 둘 다에 상대적인 CMA 마우스에서 상향-조절된 유전자; (3) 건강한 마우스에서 하향: CMA 및 GF 둘 다에 상대적인 건강한 마우스에서 하향-조절된 유전자; 및 (4) CMA에서 하향: 건강한 마우스 및 GF 마우스에 상대적인 CMA 마우스에서 하향-조절된 유전자. (b) 건강하게-집락된(오렌지색) 또는 CMA-집락된(청색) 마우스와 관련되는 a로부터의 DEG에서 상당히 풍부한 유전자 온톨로지(Gene Ontology; GO) 기간(terms) 및 KEGG 경로(볼드). 초기하 테스트(hypergeometric test)가 다중 시험 보정을 위한 벤자미니-호흐베르크 FDR(BH-FDR)와 함께 b에서 사용되었다(방법 참조).

도 4a-도 4l. 건강하게-집락된 마우스의 회장에서 회장 OTU와 DEG의 상관 관계는 식품에 대한 알레르기 반응으로부터 보호하는 클로스트리디아 종(Clostridial species), *A. caccae*를 식별한다. (a) CMA 대 건강한 마우스 회장 IEC 샘플로부터 회장 OTU(로(row))의 상대 풍부도와 DEG(칼럼)의 발현 사이의 스피어만 랭크 상관 계수(Spearman's rank correlation coefficient)를 보여주는 히트맵(도 3의 a 및 방법 참조). (b) 회장 16S 데이터 세트(dataset)(보충 표 5 참조)로부터의 OTU259772 (*Lachnospiraceae*)의 풍부도(abundance)와 *Ror2*, *Fbp1*, *Tgfbr3*, *Acot12* 및 *Me1*의 회장에서 RNA-Seq의 스피어만 상관관계. 원은 개별 마우스를 나타내며 음영 처리된 밴드는 건강한- 및 CMA-집락된 마우스로부터의 회장 샘플에서 16S 시퀀싱 (c)에 의한 OTU259772 (*Lachnospiraceae*)의 선형 회귀 (c,d) 풍부도 및 qPCR (d)에 의한 *Anaerostipes caccae*의 풍부도에 의해 피팅된(fitted) 95% 신뢰구간을 나타낸다. LD는 분석을 위한 검출 한계 미만인 샘플을 나타낸다. (e) 건강한- 및 CMA-집락된 마우스의 회장 샘플에서 OTU259772 (*Lachnospiraceae*; 16S 시퀀싱)의 풍부도와 *Anaerostipes caccae*(qPCR)의 풍부도 사이의 스피어만 상관관계. 16S 및 qPCR 실험 둘 다에서 LD를 상회하였던 회장 샘플이 표시된다($n=19$). (f) GF 마우스로부터 및 건강한- 및 CMA-집락된 마우스 또는 qPCR에 의해서 *A. caccae*로 단일 집락된(monocolonized) 마우스로부터 분리된 회장 IEC에서 *Ror2*, *Fbp1*, *Tgfbr3*, *Acot12* 및 *Me1*의 유전자 발현. 데이터는 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 Hprt로 정규화되고 1로 설정된 GF에서 발현의 배수 변화로 표시된다. (g) BLG + CT 감작된 CMA 및 *A. caccae*-단일 집락된 마우스에서 BLG를 사용한 첫번째 챌린지 후 표시된 시점에서 코어 체온의 변화. h-j, g에서 마우스로부터의 혈청 BLG-특이적 IgE (h) BLG-특이적 IgG1 및 (i) mMCPT-1(j). k,l CMA 또는 *A. caccae* 집락된 마우스로부터의 비장 세포의 배양 상청액에서 IL-13(k) 및 IL-4(l)은 챌린지 후 24시간 동안 회생되었고 BLG로 72시간 동안 자극되었다. c, d, f, 및 h-l의 경우 원은 개별 마우스를 나타내고, 막대는 평균 + s.e.m.을 나타낸다. g의 경우 원은 평균을 나타내고, 막대는 s.e.m.을 나타낸다. a-b의 경우, 그룹당 $n=18$ 건강하게-집락된 또는 18마리의 CMA-집락된 마우스. c 및 d의 경우, 그룹당 $n=19$ 건강하게-집락된 마우스 또는 21마리의 CMA-집락된 마우스. f의 경우, $n=14$ GF, 20마리의 *A. caccae*-집락된, 18마리의 건강하게-집락된 마우스 또는 23마리의 CMA-집락된 마우스. g-j의 경우 2개의 상이한 CMA 공여체(5 및 6)를 사용한 3회의 독립적인 실험으로부터 수거된 CMA-집락된 마우스 및 16마리의 *A. caccae*-집락된 마우스, 막대는 평균 + s.e.m.를 나타낸다. k 및 l의 경우, 1회의 실험으로부터의 $n=6$ CMA-집락된 마우스 및 9마리의 *A. caccae*-집락된 마우스, 원은 개별 마우스를 나타내고, 막대는 평균 + s.e.m.를 나타낸다. 상기 DS-FDR 방법을 사용하여 c에서의 그룹, d에서의 양측 스튜던트 t-시험(two-sided Student's t-test), 분산의 원-웨이 분석(one-way analysis of variance; ANOVA)을, f에서의 본페로니 다중 시험 보정(Bonferroni multiple testing correction) 또는 g에서의 선형 혼합효과 모델(linear mixed-effect model), 및 로그 변환후 h-l에서의 양측 t-시험과 비교하였다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

도 5. BLG 및 콜레라 독소로 건강한- 또는 CMA-집락된 마우스의 감작(sensitization)은 장 병리(intestinal pathology)를 초래하지 않는다. 공여체 1(건강함) 및 5(CMA, 보충 표 1 참조)에 대한 챌린지 후 24시간 후에 BLG + 콜레라 독소-감작된 건강한- 또는 CMA-집락된 마우스로부터의 조직학적 샘플의 대표적인 이미지. 모든 섹션들이 나타낸 바와 같이 H&E 또는 PAS로 염색됨. 스케일 막대=100 μ m.

도 6. 건강하거나 또는 CMA 영아로부터의 분변으로 GF 마우스의 장기간 집락(colonization)은 장 병리를 유도하지 않는다. 보충 표 1에 기술된 공여체들에 대한 집락 후 5 내지 6개월 후에 수거된 건강한- 또는 CMA-집락된 마우스로부터의 조직학적 샘플의 대표적인 이미지. 모든 섹션들이 나타낸 바와 같이 H&E 또는 PAS로 염색됨. 스케일 막대=100 μ m.

도 7의 a-b. 건강한- 또는 CMA-집락된 마우스로부터의 분변 샘플의 다양성 분석. 도 2a로부터 건강하게-집락된 마우스(오렌지색) 또는 CMA-집락된 마우스(청색)로부터의 분변에서의 (a) 샤논 다양성 지수(Shannon Diversity index) 및 (b) 피엘로우 균일성 지수(Pielou's Evenness index). 집락 후 2주 및 3주 후에 취한 분변으로 집락된 마우스 그룹당 $n=1-4$ 마우스(방법 참조). 각각이 원은 분변 샘플을 나타내고, 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다.

도 8의 a-d. 건강하고 독점적으로 모유-수유하는 영아 미생물총의 이송은 BLG 및 콜레라 독소로 과민성 반응으

로부터 보호한다. (a) 건강한 모유-수유 또는 CMA 영아 공여체의 분변으로 집락된 마우스의 BLG로 첫번째 챌린지 후 표시된 시점에서 중심 체온의 변화(적어도 2회의 독립적인 실험으로부터 수거된, 그룹당 $n=13$ 마우스). (b-d) 혈청 BLG-특이적 IgE, (b) BLG-특이적 IgG1 (c) 및 mMCP-1 a에서 마우스로부터의 (d). BLG + CT 감염된 CMA-집락된 마우스 중의 4마리는 챌린지 후 아나필락시스로 사망하였다. a의 경우 심볼은 평균을 나타내고, 막대는 s.e.m.을 나타낸다. b-d의 경우, 심볼은 개별 마우스를 나타내고 막대는 평균 + s.e.m.을 나타낸다. 선형 혼합된-효과 모델을 이용하여 a에서의 그룹 및 로그 변환 후 b에서의 양측-스튜던트 t-시험을 비교하였다. 인간 모유-수유된 분변 공여체가 **보충 표 2**에 기술되어 있다. * $P<0.05$.

도 9의 a-d. 우유(cow's milk)에 대한 지속적인 노출은 물 또는 엔파밀(Enfamil)을 먹고 BLG + 콜레라 독소로 감염된 무균 마우스에서 BLG에 대한 내성을 유발하지 않는다. (a) 3회의 독립적인 실험으로부터 수거된 물 ($n=12$) 또는 엔파밀($n=10$)를 목인 마우스의 BLG로 첫번째 챌린지 후 표시된 시점에서 코어 체온의 변화. b-d, 혈청 BLG-특이적 IgE, (b) BLG-특이적 IgG1(c) 및 mMCP-1 a에서 마우스로부터의 (d). a의 경우, 원은 평균을 나타내고, 에러 막대(error bar)는 s.e.m.를 나타낸다. b-d의 경우 원은 개별 마우스를 나타내고, 막대는 평균 + s.e.m.을 나타낸다. 선형 혼합된-효과 모델을 이용하여 a에서의 그룹 및 로그 변환 후 b-d에서의 양측-스튜던트 t-시험을 비교하였다. ** $P<0.01$. n.s.=중요하지 않음($P=0.36$).

도 10a-도 10b. CMA 및 건강한 공여체 및 집락된 마우스 그룹에서 보호 및 비-보호 OTU의 이진수 표시(binary representation) (a) CMA 및 건강한 공여체에서 보호/비보호 OTU의 존재/부재 비율에 대한 이진 맵(binary map)(도 2a와 동일한 레이아웃). 칼럼은 각각의 공여체(D) 또는 집락된 마우스 그룹(m)을 도시한다. 공여체당 $n=2-3$ 기술적 복제물 및 집락 후 2주 및 3주에 취한 분변으로 집락된 마우스 그룹당 $n=1-4$ 마우스(**방법** 참조). 로(row)는 적어도 4개의 인간 분변 샘플 및 적어도 2개의 그룹의 집락된 마우스(**보충 표 3** 참조)에 존재하는, 인간 CMA 대 건강한 공여체 비교에서 0.10(**방법** 참조)으로 조절된 58개의 OTU FDR을 보여준다. 그리드 맵(grid map) 위의 막대 그래프는 각각의 개별 공여체 또는 마우스 그룹에서 잠재적 보호(건강한 공여체에서 보다 풍부함; 오렌지색) 및 잠재적 비-보호(CMA 공여체에서 보다 풍부함; 청색) OTU의 총수를 나타낸다. 상기 그리드 맵은 각각의 샘플에서 보호 및 비-보호 OTU의 존재(녹색) 또는 부재(백색)를 나타낸다. (b) 보호/비-보호 OTU 비율은 58개의 OTU의 존재 또는 부재를 고려하여 취한 a로부터의 개별 공여체 또는 마우스 그룹별로 계산되었다. 공여체 튜링 이송 수령자(murine transfer recipient)는 각각 사각형과 원으로 표시된다. 수직 파선은 2.6의 비율을 나타낸다.

도 11. 건강한 그리고 CMA 영아 공여체의 보다 큰, 독립적인 코호트(cohort)를 사용한 보호/비-보호 OTU 비율의 검증. 종래 분리되고 레퍼런스 5로부터 기술된 건강한 ($n=19$) 및 CMA ($n=19$) 영아로부터의 분변 샘플에서 보호/비-보호 OTU 비율의 분석(**도 2** 및 **도 10** 참조). 수평 중심선은 중앙값(median)을 나타내고, 박스는 25번째 및 75번째 백분위 수를 나타내며, 위스커(whisker)는 IQR(사분위수 범위)의 최대 1.5배 내에서 가장 먼 데이터 포인트까지 확장된다. 모든 개별 포인트가 표시되며 각 원은 대상체를 나타낸다. **도 2a**에 표시된 58개의 OTU 중에서, 55개의 OTU는 공지의 참조 ID로 할당되었고 3개는 새로운 참조 ID로 할당되었다. 새로운 참조 OTU ID는 다른 분석 코호트에서 비교할 수 없으므로 본 발명자들은 공지의 참조 ID를 가진 OTU에 집중하였다. 55개의 공지된 OTU 중에서, 52개(029개의 보호 OTU 및 23개의 비-보호 OTU)는 상기 코호트에서 검출되었고 상기 비율 계산에 사용되었다(**방법** 참조). 다른 3개는 검출되지 않았다. 양측 윌콕슨 순위 합계 시스템(two-sided Wilcoxon rank sum test)이 사용되었다. * $P<0.05$.

도 12의 a-c. 건강한 것 대 CMA OTU 풍부 비율은 마우스 분변 및 회장 샘플 사이에 유의한 상관 관계가 있다. (a) 버블 플롯(bubble plot)은 건강한- 및 CMA-집락된 마우스로부터 분변(건강한 그룹 중의 $n=8$ 마우스, CMA 그룹 중의 $n=9$ 마우스, 분변 샘플은 **도 2a**에서와 동일하게 집락 후 2주 및 3주 후에 수거됨) 및 회장 샘플(건강한 그룹 중의 $n=22$ 마우스, CMA 그룹 중의 $n=25$ 마우스)에서 유사한 패턴을 보여준다. CMA와 건강한 공여체 사이에서 상당히 차등적으로 풍부한 58개의 OTU는 **도 2a**에서와 같이 동일한 순서로 표시된다. 원의 크기는 CMA 혹은 건강함에 대한 상대적 풍부한 척도를 나타낸다. 색상 강도는 DS-FDR 퍼뮤테이션 시험을 사용하여 계산된 통계적 유의성을 나타낸다(**방법** 참조). (b 및 c) 건강한 대 CMA OTU 풍부 비율은 마우스 분변과 회장 샘플 사이에 상당한 상관관계에 있다. 각각의 점은 하나의 개별 OTU를 나타낸다. b의 경우, 각각의 OTU에 대해, 그의 평균 풍부도는 분변 샘플을 위한 8마리의 건강하게-집락된 마우스 및 9마리의 CMA-집락된 마우스 중에서, 및 그의 회장 샘플을 위한 22마리의 건강하게-집락된 마우스 및 25마리의 CMA-집락된 마우스 중에서 그룹 수준별로 계산되었다. 분변들에서 OTU 풍부도의 비율이 x-축 상에 회장 중의 OTU 풍부도의 비율이 y-축 상에 플롯되었다. c의 경우, 적어도 2회의 독립적인 실험들로부터 풀링된 $n=35$ (15마리의 건강하게-집락된 그리고 20마리의 CMA-집락된) 마우스가 상기 분변 및 회장 OTU 풍부도 비율의 계산을 위해 사용되었으며, 상기 분변 및

회장 샘플은 동일한 개별 마우스로부터 수집되었다. 추가 상세는 **방법**을 참조한다.

도 13의 a-c. OTU259772 (*Lachnospiraceae*) 및 *Anaerostipes caccae*의 풍부도는 건강한- 및 CMA-집락된 마우스로부터의 분변 샘플에서 상관된다. 16S 데이터 세트로부터의 OTU259772 (*Lachnospiraceae*)의 풍부도 및 (a) (b) **도 2**로부터의 건강하게-집락된 ($n=7$) 및 CMA-집락된 ($n=8$) 마우스로부터의 분변 샘플에서 qPCR에 의한 *Anaerostipes caccae*의 풍부도. 각각의 개별 마우스의 경우, 1-2개의 분변 샘플은 집락후 2주 및 3주후에 수거되었다. LD는, **도 2**로부터의 건강하게-집락된 및 CMA-집락된 마우스로부터의 분변 샘플에서 OTU259772 (*Lachnospiraceae*; 16S 시퀀싱)의 풍부도와 *Anaerostipes caccae*(qPCR)의 풍부도 사이에 (c) 스피어만 상관관계의 분석에 대한 검출 한계 미만이었다 샘플을 나타낸다. 16S 및 qPCR 둘 다에서 LD를 상회한 분변 샘플은 ($n = 13$)로 표시된다. 각각의 원은 하나의 분변 샘플을 나타낸다. **a** 및 **b**의 경우 막대는 평균 + s.e.m.을 나타낸다. **c**의 경우 선형 회귀에 의해서 피팅된 95% 신뢰구간을 나타낸다. DS-FDR 방법을 사용하여 **a**에서의 그룹 및 **b**에서의 양측 스튜던트 t-시험을 비교하였다. *** $P < 0.001$.

도 14. 회장 샘플 중의 *Anaerostipes caccae*의 풍부도는 회장 IEC 중의 유전자 발현과 상관된다. qPCR에 의한 *Anaerostipes caccae*의 풍부도와 회장 IEC 중의 *Ror2*, *Fbp1*, *Tgfbr3*, *Acot12* 및 *Me1*의 RNA-Seq 발현 사이의 스피어만 상관관계(도 3의 a 참조). 원은 개별 마우스를 나타내고 음영 밴드는 선형 회귀에 의해서 피팅된 95% 신뢰 구간을 나타낸다. 적어도 2회의 독립적인 실험으로부터 수거된 $n=36$ (18마리의 건강한- 및 18마리의 CMA-집락된) 마우스. 검출 한계를 상회하는 값을 갖는 샘플이 표시된다(*A. caccae* 풍부도>0).

도 15는 *A. caccae* 분리 및 특성화 도식을 나타낸다.

도 16. *A. caccae_lah*는 암피실린에 매우 취약하다. 또한 테트라사이클린에도 다소 취약하다.

도 17. *A. caccae_lah*는 단일 배양에서 복합체 탄수화물을 발효시킬 수 없지만 락토오스를 포함한 영양분 분유 중의 것과 같은 간단한 당을 발효시킬 수 있다. *A. caccae_lah*는 CMG 브로쓰에서 24시간 동안 동결된 스톡으로부터 성장시킨 다음, 10ul는 10mg/ml 탄수화물로 보충된 최소 펩톤 효모(PY) 브로쓰로 이송하였다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. 모든 실험은 이중으로 수행되었으며 그룹은 원 웨이 ANOVA로 분석되었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 대 PY 단독.

도 18. *A. caccae_lah*는 부티레이트를 생성하는 것과 함께 락테이트 및 아세테이트를 사용할 수 있다. *A. caccae_lah*는 CMG 브로쓰에서 24시간 동안 동결된 글리세롤 스톡으로부터 성장시킨 다음, 10 μ l는 33 mM 아세테이트 및/또는 40 mM 락테이트로 보충된 최소 PY 브로쓰로 이송하였다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. 모든 실험은 이중으로 수행되었으며 그룹은 원 웨이 ANOVA로 분석되었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 대 PY 단독.

도 19. *A. caccae_lah*는 알레르기성(CMA) 영아 공여체의 복합체 박테리아 혼합물과 함께 배양된 섬유에서 실질적으로 더 많은 부티레이트를 생성한다. *A. caccae_lah* 또는 인간 CMA 분변 샘플을 동결된 글리세롤 스톡에서 별도로 CMG 브로쓰에서 24시간 동안 성장시킨 다음, 총 10 μ l는 10 mg/ml 감자 전분 또는 셀로 바이오스로 보충된 최소 PY 브로쓰로 이송하였다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. 모든 실험은 중복으로 수행되었다.

도 20a-도 20b. CMA 저장소 마우스 분변의 박테리아 혼합은 동결된 글리세롤 스톡의 인간 CMA 분변보다 기준선에서 더 많은 부티레이트를 생성하지만(A), *A. caccae_lah*와 락테이트 및 아세테이트의 첨가는 여전히 부티레이트 수준에서 현저한 차이가 발생한다(B). *A. caccae_lah* 또는 인간 또는 마우스 분변에서 추출한 CMA 믹스를 동결된 글리세롤 스톡에서 별도로 CMG 브로쓰에서 24시간 동안 성장시킨 다음, 총 10 μ l는 10mg/ml 탄수화물로 보충된 최소 PY 브로쓰로 이송하였다. 24시간 후 그룹에서 CMA는 시간=0, *A. caccae_lah*, 탄수화물은 시간= 4h에 이송되었다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 또는 72시간 후에 측정되었다. 모든 실험은 중복으로 수행되었다.

도 21은 *A. caccae_lah*의 CMA-집락된 마우스로의 집락화 및 프리바이오틱 보충제에 대한 의존성을 결정하기 위한 실험 설계를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

예시적 구현예들의 기술

인간의 알레르기성 질환을 조절(regulating)하는데 있어서 미생물총(microbiota)의 역할을 보다 잘 이해하기 위

해서 본 발명자들은 건강한 영아 또는 우유 알레르기성(cow's milk allergic; CMA) 영아의 분변으로부터 유도된 박테리아로 무균(germ-free; GF) 마우스를 집락하였다(colonized). 본 발명자들은, 여기서 건강한 영아로부터의 박테리아로 무균 마우스의 집락이 상기 우유 알레르기 항원 β -락토글로불린에 대한 박테리아에 대한 감락으로부터 보호된다는 것을 보여준다. CMA 영아로부터 박테리아로 집락된 마우스는 BLG 첼린지에 대한 아나필락틱 반응을 나타내었고, 혈청 BLG-특이적 IgE를 상당히 증가시켰다. 박테리아 조성물의 차이는 인간 공여체 및 집락된 마우스 모두에서 건강한 집단 및 CMA 집단을 분리하였다. 장막 상피세포(ileal intestinal epithelial cell)의 RNA-Seq 분석은 모든 공여체에 대해 건강한-집락된 마우스 및 CMA-집락된 마우스를 구별하는 차별적으로 발현된 유전자(DEG)를 나타내었다. 건강한-집락된 마우스의 회장(ileum)에서 DEG와 장막 OTU의 상관관계는 식품에 대한 알레르기 반응으로부터 보호되는 클로스트리디아 스페시스(Clostridial species), *Anaerostipes caccae*를 확인하였다. 상기 발견은 장내 미생물총(intestinal microbiota)의 조성물이식이 항원에 대한 알레르기 반응을 조절하는데 중요하다는 것을 입증하고, 박테리아 커뮤니티(bacterial community)를 조절하는 개입이 식품 알레르기에 대해 치료적으로 관련될 수 있다는 것을 입증한다.

[0041] I. 정의

[0042] 용어 "단위 도즈(unit dose)" 또는 "투여량(dosage)"은 대상체에게 사용하기에 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 그의 투여, 즉 적절한 경로 및 치료 요법과 관련하여 본원에서 논의된 바람직한 반응을 생성하도록 계산된 상기 치료 조성물의 소정의 양을 지칭한다. 치료 횟수 및 단위 도즈에 따라 투여되는 양은 목적하는 효과에 좌우된다. 환자 또는 대상체에게 투여되는 본 발명의 조성물의 실제 투여량은 대상체의 체중, 나이, 건강, 및 성별과 같은 물리적 및 생리학적 요인, 치료되는 질환의 유형, 질환 침투(disease penetration)의 정도, 사전 또는 병행 치료 중재술(previous or concurrent therapeutic intervention), 환자의 특발증(idiopathy), 투여의 경로, 및 특정 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어 도즈는 또한 약 1 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 1000 mg/kg/체중(이러한 범위는 개재 도즈(intervening dose)를 포함함) 또는, 투여당 더 많은 도즈, 및 그 안에서 유도가능한 임의의 특정 도즈를 포함할 수 있다. 본원에서 열거된 수치로부터 유래할 수 있는 범위의 비-제한적 예들에서, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 100 mg/kg/체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다. 투여에 책임이 있는 의사는 임의의 경우에, 조성물 중의 활성 성분(들)의 농도 및 개별 대상체에 대한 적절한 투여량(들)을 결정할 것이다.

[0043] "대상체" 및 "환자"는 인간 또는 비-인간, 예를 들어 영장류, 포유류, 척추 동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료", "치료하는", 또는 "완화(amelioration)"은 질환, 질병 또는 건강 병태(medical condition)와 관련하여 사용될 때 증상 또는 병태의 진행 또는 중증도를 역전(reverse), 경감(alleviate), 완화(ameliorate), 억제, 서행(slow down) 또는 중단(stop)시키는 것이다. 상기 용어 "치료하는"은 병태의 적어도 하나의 불리한 효과 또는 증상을 감소 또는 완화하는 것을 포함한다. 치료는 일반적으로 하나 이상의 증상 또는 임상적 마커(marker)가 감소되면 효과적이다. 또한, 치료는 병태의 진행이 감소되거나 중단되는 경우 "효과적"이다. 즉, "치료"는 증상 또는 마커의 개선 뿐만 아니라, 치료가 없을 것으로 예상되는 증상의 진행 또는 악화 중 적어도 하나를 포함한다. 유익한 또는 원하는 임상 결과는 하나 이상의 증상(들)의 개선, 결손 정도의 경감, 및 치료의 부재시에 예상되는 것과 비교하여 증가된 수명을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.

[0045] 용어 "분리된"은 (1) 초기에 생성될 때 (자연에서든 실험적 환경에서든) 관련된 적어도 일부의 성분들로부터 분리되고/되거나 (2) 사람의 손으로 생산, 준비, 정제 및/또는 제조된 박테리아 또는 기타 독립체 또는 물질을 포함한다. 분리된 박테리아는 초기에 관련된 다른 성분들의 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 이상으로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 분리된 박테리아는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 초과, 또는 약 99% 초과 순수하다. 본원에서 사용되는 용어 "순수"는 다른 성분들이 실질적으로 없는 것이다.

[0046] 용어 "정제하다", "정제하는" 및 "정제된"은 초기에 생성되거나 발생될 때 (자연에서든 실험적 환경에서든), 또는 그의 초기 생성 후 임의의 시간동안 관련되는 성분 중의 적어도 일부에서 분리된 박테리아 또는 기타 물질을 의미한다.

[0047] 박테리아 또는 박테리아 집단은 그것이 생성시에 또는 생성 후에 예를 들어 박테리아 또는 박테리아 집단을 함유하는 물질 또는 환경으로부터 분리되는 경우 정제되는 것으로 고려될 수 있으며, 정제된 박테리아 또는 박테리아 집단은 다른 물질을 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 이하, 또

는 약 90% 초과 함유할 수 있으며 여전히 "분리된" 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 정제된 박테리아 및 박테리아 집단은 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 초과, 또는 99% 초과 순수하다. 본원에서 제공된 박테리아 조성물의 경우에, 상기 조성물 중에 존재하는 하나 이상의 박테리아 유형은 상기 박테리아 유형을 함유하는 물질 또는 환경에서 생성되고/되거나 존재하는 하나 이상의 다른 물질로부터 독립적으로 정제될 수 있다. 박테리아 조성물 및 그의 박테리아 성분들은 일반적으로 잔류 서식지 생성물로부터 정제된다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "포함하는(comprising)" 또는 "포함하다(comprises)"는, 본 발명에 필수적이되, 필수적이지 않은 불특정 구성요소의 포함에 대해 개방적인 것으로, 조성물, 방법, 및 그의 각각의 성분(들)과 관련하여 사용된다.

[0049] 본원에서 사용되는 표현 "필수적으로 ~로 구성되는"은 주어진 구현예에 필요한 구성요소들을 지칭한다. 상기 표현은 본 발명의 구현예의 기본적 및 신규하거나 기능적 특징(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 추가 구성요소들의 존재를 허용한다. 약학 조성물과 관련하여, 상기 표현 "필수적으로 ~로 구성되는"은 언급된 활성 성분들을 포함하고, 임의의 다른 활성성분을 배제하지만, 임의의 약학 부형제 또는 치료학적으로 활성인 다른 성분들을 배제하지 않는다.

[0050] 표현 "~로 구성되는"은 본원에서 기술되는 조성물, 방법, 및 그들의 각각의 성분들을 지칭하며, 이것은 그 구현예의 기재에서 언급되지 않은 임의의 구성요소는 배제된다.

[0051] 본원 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an", 및 "the"는 그 문맥이 명확히 다르게 지시하고 있지 않는한 복수 언급(plural references)을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "상기 방법"에 대한 언급은 본원에서 기술되고/되거나 본 개시 등을 읽을때 당해 기술분야의 숙련가들에게 명확해지는 유형의 하나 이상의 방법들, 및/또는 단계들을 포함한다.

[0052] 본원에서 사용되는, 특정 성분의 견지에서, "본질적으로 부재"는 특정 성분 중의 어느 것도 조성물로 의도적으로 제형화되지 않고/않거나 오염물 또는 미량으로만 존재하는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 따라서 의도하지 않은 조성물 오염으로 인한 특정 성분의 총량은 0.01% 미만이다. 가장 바람직한 것은 특정 성분의 양이 표준 분석 방법으로 검출될 수 없는 조성물이다.

[0053] 본원의 청구범위에서 사용된 용어 "또는"은, 그 개시가 대안만을 지칭하는 정의 및 "및/또는"을 지지하지만, 대안만을 명시적으로 표시하거나 또는 그 대안이 상호 배타적인 것이 아닌한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다. 본원에서 사용되는 용어 "또다른"은 적어도 제 2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0054] 본원 전반에 걸쳐서, 용어 "약"은 수치값이 장치에 대한 오류의 고유의 변동치를 포함하고, 방법은 상기 수치값, 또는 연구 대상 중에 존재하는 변동치를 결정하는데 사용된다.

[0055] 어구 "유효량" 또는 "치료학적 유효량" 또는 "충분한 양"은 원하는 결과를 생성하는데 충분한 약물 또는 제제의 투여량을 의미한다.

[0056] II. 미생물 조성물

[0057] 본 개시의 구현예는 감염성, 자가 면역 또는 알레르기성 질환의 치료를 위한 미생물 조성물에 관한 것이다.

[0058] 본 개시는 또한 전술한 하나 이상의 미생물 배양물(microbial culture)을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 따라서 박테리아 종은 건조된 형태 또는 동결 건조된 형태이든 살아 있는 박테리아인 투여 형태로 존재한다. 이것은 바람직하게는 적절한 투여를 위해서, 예를 들어 경구 치료를 위한 정제 또는 분말 형태로, 잔재적으로는 장용성 코팅(enteric coating)으로 채택될 수 있다.

[0059] 특정한 측면에서, 상기 조성물은 경구 투여용으로 제형화된다. 경구 투여는 저작성 제형(chewable formulation), 용해 제형(dissolving formulation), 캡슐화된/코팅된 제형, 다중-적층된 로젠지(multi-layered lozenge) (별도의 활성 성분 및/또는 활성 성분 및 부형제로), 서방성/경시 방출성 제형(slow release/timed release formulation), 또는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 기타 적당한 제형을 사용하여 성취될 수 있다. 용어 "정제"가 본원에서 사용되지만 그 제형은 다른 용어, 예를 들어 로젠지, 알약, 캡슐제 등으로 통상적으로 지칭될 수 있는 다양한 물리적 형태를 취할 수 있다.

[0060] 본 개시의 조성물은 바람직하게는 경구 투여용으로 제형화되지만, 다른 투여경로가 사용될 수 있으며, 제한되지는 않지만 피하, 근육내, 피내, 경피, 안구내, 복강내, 점막, 질, 직장 및 정맥내를 포함한다.

- [0061] 본 개시의 조성물의 원하는 도즈는 일, 주, 월 또는 연중 내내 적절한 간격으로 투여되는 다중(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상)의 서브-도즈(sub-dose)로 제공될 수 있다.
- [0062] 한 측면에서, 개시된 조성물은 캡슐제로 제조될 수 있다. 캡슐제(즉, 담체)는 젤라틴, 셀룰로스, 탄수화물 등과 같은 다양한 물질로 형성된 중공의 일반적으로 원통형 캡슐제일 수 있다.
- [0063] 또다른 측면에서, 개시된 조성물은 좌약으로 제조될 수 있다. 좌약은 제한되지는 않지만 박테리아 및 하나 이상의 담체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 아카시아, 아세틸화된 모노글리세라이드, 카누바 왁스(carnauba wax), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 옥수수 전분, 디부틸프탈레이트, 도쿠세이트 나트륨(docusate sodium), 젤라틴, 글리세린, 산화철, 카올린, 락토오스, 마그네슘 스테아레이트, 메틸 파라벤, 약학적 글레이즈(pharmaceutical glaze), 포비돈(povidone), 프로필 파라벤, 나트륨 벤조에이트, 소르비탄 모놀리에이트, 수크로오스 탈크(sucrose talc), 이산화티탄, 화이트 왁스(white wax) 및 착색제를 포함할 수 있지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0064] 일부 측면에서, 개시된 미생물 조성물은 정제로서 제조될 수 있다. 상기 정제는 박테리아 및 하나 이상의 정제화 제제(tableting agents)(즉, 담체), 예를 들어 이염기성 인산 칼슘, 스테아르산, 크로스카멜로스(croscarmellose), 실리카, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 코팅을 포함할 수 있다. 상기 정제는 직접 압축 공정(direct compression process)을 이용하여 형성될 수 있지만, 당해 분야의 숙련가는 다양한 기술이 상기 정제를 형성하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0065] 다른 측면에서, 상기 개시된 미생물 조성물은 식품 또는 음료 또는 대안으로는 식품 또는 음료에 대한 첨가제로서 형성될 수 있으며, 적절한 양의 박테리아를 상기 식품 또는 음료에 첨가하여 상기 식품 또는 음료를 담체로 만든다.
- [0066] 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 대상체의 위장관에 존재하는 *A. caccae*의 성장을 자극하는데 효과적인 식품 또는 영양 보충제를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 영양 보충제는 건강한 인간 장내 미생물 군집(microbiome)과 관련된 또다른 박테리아에 의해서 생성된다.
- [0067] **III. 치료 조성물의 투여**
- [0068] 본원에서 제공된 요법은 치료제들, 예를 들어 미생물 조성물 및 프리바이오틱의 조합물을 투여를 포함한다. 상기 요법제는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어 상기 미생물 조성물 및 프리바이오틱은 순차적으로(다른 시간에) 또는 동시에(동일한 시간에) 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물 및 상기 프리바이오틱은 별도의 조성물 중에 있다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물 및 상기 프리바이오틱은 동일 조성물 중에 있다.
- [0069] 본 개시의 구현예는 박테리아 및 하나 이상의 프리바이오틱을 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 박테리아 및/또는 프리바이오틱(들)은 하나의 조성물 또는 하나 이상의 조성물, 예를 들어 2개의 조성물, 3개의 조성물, 또는 4개의 조성물로 투여될 수 있다. 상기 제제들의 다양한 조합물이 사용될 수 있으며, 예를 들어 박테리아(또는 박테리아를 포함하는 조성물)은 "A"이고 프리바이오틱은 "B"이다:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

- [0070]
- [0071] 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 상기 프리바이오틱 이전에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 상기 프리바이오틱 이전 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24시간 또는 2, 3, 4, 6, 8, 10 일 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)의 투여량(dose)은 상기 프리바이오틱 이전 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24시간 또는 2, 3, 4, 6, 8, 10 일 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 상기 프리바이오틱 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 상기 프리바이오틱 후에 또는 적어도 하나의 상기 프리바이오틱의 후에 또는 적어도 2개의 상기 프리바이오틱 후에 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24시간 또는 2, 3, 4, 6, 8, 10일 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주(또는

그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)의 투여량은 상기 프리바이오틱 후에 또는 적어도 하나의 상기 프리바이오틱의 후에 또는 적어도 2개의 상기 프리바이오틱 후에 적어도, 최대, 또는 약 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24시간 또는 2, 3, 4, 6, 8, 10일 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)에 투여된다.

[0072] 일부 구현예에서, 상기 미생물 조절체 조성물(microbial modulator composition)은 경구 투여용으로 제형화된다. 당업자는 살아있거나 또는 사멸된 미생물을 포함할 수 있고 식품 보충제(예를 들어 알약(pill), 정제 등)로서 또는 기능성 식품 예를 들어 음료 또는 발효된 요구르트로서 존재할 수 있는 다양한 제형을 알고 있다.

[0073] 본 개시의 제제는 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 프리바이오틱은 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내(intraorbitally), 이식, 흡입, 척수강내, 심실내 또는 비강 내 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 미생물 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 국소, 경구, 경피, 복강내, 안와내, 이식, 흡입, 척수강내, 심실내 또는 비강내 투여된다. 적당한 투여량(dosage)은 치료되는 질환의 유형, 상기 질환의 중증도 및 및 경과, 개인의 임상 병태, 개인의 임상 기록 및 치료에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 결정될 수 있다.

[0074] 예를 들어 인간에게 투여되는 구현예의 상기 미생물 조절체 조성물의 박테리아의 적어도 하나의 분리되거나 또는 정제된 집단 각각 또는 박테리아의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13, 14, 또는 15개 집단 각각의 치료 유효량 또는 충분량은 적어도 약 1×10^3 개의 집락 형성 단위(colony forming unit; CFU) 또는 적어도 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개의 CFU(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)일 것이다. 일부 구현예에서, 단일 도즈는 적어도, 최대, 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개 또는 그 이상의 CFU(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)의 양으로 존재하는 박테리아(예를 들어 본원에서 기술된 특정 박테리아 또는 종, 속, 또는 과)을 함유할 것이다. 일부 구현예에서, 단일 도즈는 전체 박테리아의 적어도, 최대, 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개 또는 1×10^{15} 개 초과 CFU(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)를 함유할 것이다.

[0075] 일부 구현예에서, 예를 들어 인간에게 투여되는 구현예의 상기 미생물 조성물의 박테리아의 적어도 하나의 분리되거나 또는 정제된 집단 각각의 치료 유효량 또는 충분량은 적어도 약 1×10^3 개의 세포 또는 적어도 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개의 CFU(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)일 것이다. 일부 구현예에서, 단일 도즈는 적어도, 최대, 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개 또는 그 이상의 세포(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)의 양으로 존재하는 박테리아(예를 들어 본원에서 기술된 특정 박테리아 또는 종, 속, 또는 과)을 함유할 것이다. 일부 구현예에서, 단일 도즈는 전체 박테리아의 적어도, 최대, 또는 약 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} 개 또는 1×10^{15} 개 초과 세포(또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위)를 함유할 것이다.

[0076] 상기 치료는 다양한 "단위 도즈"를 포함할 수 있다. 단위 도즈는 예비-결정된 양의 상기 치료 조성물을 함유하는 것으로 정의된다. 투여되는 양, 및 특정 경로 및 제형은 임상 분야의 종사자들이 결정할 수 있는 기술 범위 내에 있다. 단위 도즈는 단일 주입(single injection)으로 투여될 필요는 없지만 정해진 기간 동안의 연속 주입(continuous infusion)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단위 도즈는 단일 투여 도즈를 포함할 수 있다. 치료 및 단위 도즈의 수에 따르는 투여되는 양은 원하는 치료 효과에 의존한다. 유효한 도즈는 특정 효과를 성취하는데 필요한 양을 지칭한다. 특정 구현예의 실시에서, 10 mg/kg 내지 200 mg/kg 범위의 도즈가 이들 제제의 보호 능력에 영향을 줄수 있는 것으로 고려된다. 따라서 도즈는 약 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 및 200, 300, 400, 500, 1000 μ g/kg, mg/kg, μ g/day, 또는 mg/day 또는 그 안에서 임의의 유도가가능한 범위의 도즈를 포함한다. 또한, 상기 도즈는 1일 동안, 및/또는 수

일, 주 또는 개월 동안 투여될 수 있다.

[0077] 특정 구현예에서, 상기 약학 조성물의 유효 도즈는 약 1 μM 내지 150 μM 의 혈중 농도를 제공할 수 있는 것이다. 또다른 구현예에서, 상기 유효 도즈는 약 4 μM 내지 100 μM ; 또는 약 1 μM 내지 100 μM ; 또는 약 1 μM 내지 50 μM ; 또는 약 1 μM 내지 40 μM ; 또는 약 1 μM 내지 30 μM ; 또는 약 1 μM 내지 20 μM ; 또는 약 1 μM 내지 10 μM ; 또는 약 10 μM 내지 150 μM ; 또는 약 10 μM 내지 100 μM ; 또는 약 10 μM 내지 50 μM ; 또는 약 25 μM 내지 150 μM ; 또는 약 25 μM 내지 100 μM ; 또는 약 25 μM 내지 50 μM ; 또는 약 50 μM 내지 150 μM ; 또는 약 50 μM 내지 100 μM 의 혈중 농도(또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위)를 제공한다. 다른 구현예에서, 상기 도즈는 치료제가 대상체에 투여되어 발생하는 체제가 하기 혈중 농도를 제공할 수 있다: 약, 적어도 약, 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 μM 또는 mM 또는 그 안에서 임의의 유도가능한 범위. 특정 구현예에서, 대상체에 투여되는 치료제는 신체에서 대사된 치료제로 대사되며, 이 경우 혈중 농도는 그 체제의 양을 지칭한다. 대안적으로, 치료제가 대상체에 의해 대사되지 않는한, 본원에서 논의된 혈중 농도는 대사되지 않은 치료제를 지칭할 수 있다.

[0078] 치료 조성물의 정확한 양은 또한 개업의의 판단에 따라 다르며 각 개인에 따라 다르다. 도즈에 영향을 미치는 요인으로는 환자의 신체적 및 임상적 병태, 투여 경로, 의도된 치료 목표(증상 완화 대 치료), 특정 치료 물질 또는 대상체가 받을 수 있는 기타 요법의 효능, 안정성 및 독성이 포함된다.

[0079] $\mu\text{g/kg}$ (체중) 또는 mg/kg (체중)의 투여량 단위가 $\mu\text{g/ml}$ 또는 μM 또는 mM(혈중 농도), 예를 들어 4 μM 내지 100 μM 의 비교가능한 농도 단위로 전환될 수 있고 나타낼 수 있다는 것은 당업자라면 이해하고 인식할 수 있을 것이다. 또한 흡수량(unptake)은 종 및 기관/조직에 따라 다르다는 것으로 이해된다. 흡수량 및 농도 측정과 관련하여 적용할 수 있는 전환 인자 및 생리학적 가정은 잘 알려져 있으며, 당업자는 하나의 농도 측정을 다른 농도 측정으로 전환하고 여기서 설명된 도즈, 효능 및 결과에 관한 합리적인 비교 및 결론을 내릴 수 있게 된다.

[0080] 프리바이오틱은 당업계에 공지된 약학적 제형의 기술을 사용하여 제형화 될 수 있다. 그들은 위장관의 특정 부위에 전달되는 것으로 알려진 특수화된 기법을 사용하여 제형화될 수 있다. 당해 분야에 공지된 2가지 예가 공개된 PCT 출원 WO 2018/195067 A1 및 또한 미국 특허출원 제US15/257,673호에 기술되어 있으며, 이들은 각각 참고로 인용된다. 프리바이오틱 또는 프리바이오틱과 *A. caccae*의 조합물에 대한 다른 제형이 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 조성물은 WO 2018/195067에 기재된 것과 같은 부티레이트 담체 화합물을 포함한다.

[0081] IV. 치료 방법

[0082] 본 개시의 방법은 감염성, 자가 면역 및 알레르기성 질환의 치료에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 식품 알레르기의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 식품 알레르기는 밀크 알레르기(milk allergy)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 밀크 알레르기는 우유 알레르기(cow's milk allergy)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 밀크 알레르기는 소, 염소, 또는 양 밀크 알레르기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은, 알레르기, 천식, 당뇨병(예를 들어 유형 1 당뇨병), 이식 거부, 관절염(류마티스 관절염 예를 들어 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍 또는 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 급성 면역 학적 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 유형 II 콜라겐 유발성 관절염, 감염성 관절염, 라임 관절염(Lyme arthritis), 증식성 관절염, 건선성 관절염, 스틸병(Still's disease), 척추 관절염, 및 전신성 청소년-발병 류마티스 관절염(systemic juvenile-onset rheumatoid arthritis), 골관절염, 관절염 크로니카 프로그레디엔테(arthritis chronica progrediente), 변형성 관절염(arthritis deformans), 다관절염 크로니카 프리마리아(polyarthritis chronica primaria), 반응성 관절염, 및 강직성 척추염), 염증성 과증식성 피부 질환(inflammatory hyperproliferative skin disease), 건선 예를 들어 플라크 건선(plaque psoriasis), 구타트 건선(gutatte psoriasis), 농포성 건선, 및 손톱의 건선, 아토피성 질환 예를 들어 건초열(hay fever) 및 조브 증후군(Job's syndrome)을 포함하는 아토피, 접촉성 피부염, 만성 접촉성 피부염, 박리성 피부염, 알레르기성 피부염, 알레르기성 접촉성 피부염, 포진성 피부염, 산수성 피부염, 지루성 피부염, 비특이적 피부염, 일차 자극성 접촉 피부염, 및 아토피성 피부염을 포함한 피부염, x-링크된 하이퍼 IgM 증후군(x-linked hyper IgM

syndrome), 알레르기 성 안내 염증성 질환(allergic intraocular inflammatory diseases), 두드러기 (urticaria) 예를 들어 만성 알레르기성 두드러기, 및 만성 자가면역 두드러기(chronic autoimmune urticaria)를 포함한 만성 특발성 두드러기, 근염(myositis), 다발성 근염/피부 근염, 청소년 피부 근염(juvenile dermatomyositis), 독성 표피 괴사, 경피증(전신 경화증 포함), 경화증 예를 들어 전신성 경화증, 다발성 경화증(MS), 예를 들어 척추-광학(spino-optical) MS, 원발성 진행성 MS(PPMS) 및 재발 완화성 MS(RRMS), 진행성 전신 경화증, 죽상 동맥 경화증, 동맥 경화증, 반발성 경화증, 운동 실조성 경화증, 시신경 골수염(NMO), 염증성 장 질환(IBD)(예를 들어 크론병, 자가 면역-매개된 위장병(autoimmune-mediated gastrointestinal disease), 대장염 예를 들어 궤양성 대장염, 궤양성 대장염, 현미경적 대장염(microscopic colitis), 교원성 대장염, 다발성 대장염, 괴사성 장염, 경벽성 대장염, 자가 면역 염증성 장 질환), 장 염증, 괴저 농피증, 결절 홍반, 원발성 경화성 담관염, 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 포함한 호흡 곤란 증후군(respiratory distress syndrome), 수막염, 포도막 전체 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가 면역 혈액 질환, 류마티스 척추염, 류마티스 활막염, 유전성 혈관 부종, 뇌수막염에서와 같은 뇌신경 손상(cranial nerve damage), 임신 포진, 임신 천포창, 음낭 소양증, 자가 면역 조기 난소 부전(autoimmune premature ovarian failure), 자가 면역 병태로 인한 돌발성 난청, IgE-매개된 질환(IgE-mediated disease) 예를 들어 아나필락시스(anaphylaxis) 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염 예를 들어 라스무센 뇌염(Rasmussen's encephalitis) 및 변연계(limbic) 및/또는 뇌간 뇌염(brainstem encephalitis), 포도막염, 예를 들어 전방 포도막염(anterior uveitis), 급성 전방 포도막염, 육아종성 포도막염(granulomatous uveitis), 비육아종성 포도막염, 수정체 항원성 포도막염, 후방 포도막염 또는 자가 면역 포도막염, 신증후군(nephrotic syndrome) 존재 또는 부재의 사구체 신염(GN) 예를 들어 만성 또는 급성 사구체 신염 예를 들어 원발성 GN, 면역-매개된 GN, 막 형성(membranous) GN(막 형성 신병증(membranous nephropathy)), 특발성 막 형성 GN 또는 특발성 막 형성 신병증, 유형 I 및 유형 II를 포함한 막-또는 막 형성-증식성 GN(MPGN), 및 급속 진행성 GN, 증식성 신염, 자가 면역 다선성 내분비 부전(autoimmune polyglandular endocrine failure), 형질 세포성 국한성 귀두염(balanitis circumscripta plasmacellularis)을 포함한 귀두염, 귀두포피염, 원심성 환상 홍반, 고정 이색소성 홍반, 다형성 홍반, 환상 육아종, 광택 태선, 경화성 위축성 태선, 만성 단순 태선, 극상 태선, 편평 태선, 충만 비늘증, 표피 박리 과다 각화증, 전암성 각화증(premalignant keratosis), 괴저성 농피증, 알레르기성 병태 및 반응, 알레르기성 반응, 알레르기성 또는 아토피성 습진, 건성 습진, 발한 장애성 습진, 소포성 손발바닥 습진(vesicular palmoplantar eczema)을 포함한 습진, 천식 예를 들어 천식 기관지(asthma bronchiale), 기관지 천식(bronchial asthma), 및 자가-면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응, 임신 중 태아 A-B-O 혈액형과 같은 외부 항원에 대한 면역 반응을 포함한 병태, 만성 폐 염증성 질환, 자가 면역 심근염, 백혈구 유착 결손증, 루푸스 신염, 루푸스 뇌염, 소아성 루푸스, 비신장성 루푸스, 신장외 루푸스, 원반형 루푸스 및 원반형 홍반 루푸스를 포함한 루푸스, 루푸스 탈모증, 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 예를 들어 피부 SLE 또는 아급성 피부 SLE, 신생아 루푸스 증후군(NLE), 파종상 홍반성 루푸스(lupus erythematosus disseminatus), 소아성 인슐린-의존성 당뇨병(pediatric insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM)을 포함한 청소년-발병 (유형 I) 당뇨병, 및 성인 발병 당뇨병 (유형 II 당뇨병) 및 자가 면역 당뇨병을 치료하기 위한 것이다. 또한, 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연된 과민증(hypersensitivity), 유육종증, 림프종 육아종증을 포함한 육아종증, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 무과립구증, 혈관염을 포함한 혈관염, 대-혈관성 혈관염(large-vessel vasculitis)(류마티스성 다발근통 및 거대 세포 동맥염(giant cell (Takayasu's) arteritis)을 포함함), 중-혈관성 혈관염(가와사키병(Kawasaki's disease) 및 결절성 다발성 동맥염/결절성 동맥 주위염을 포함함), 현미경적 다발성 동맥염, 면역 혈관염, CNS 혈관염, 피부 혈관염, 과민성 혈관염, 괴사성 혈관염 예를 들어 전신 괴사성 혈관염 및 ANCA-관련된 혈관염, 예를 들어 처그-스트라우스 혈관염(Churg-Strauss vasculitis) 또는 증후군(CSS) 및 ANCA-관련된 소-혈관성 혈관염, 측두 동맥염, 재생 불량성 빈혈, 자가 면역 재생 불량성 빈혈, Coombs 양성 빈혈, Diamond Blackfan 빈혈, 용혈성 빈혈 또는자가 면역성 용혈성 빈혈 (AIHA)을 포함한 면역성 용혈성 빈혈, 에디슨 병, 콕스 포지티브 빈혈(Coombs positive anemia), 다이아몬드 블랙판 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 용혈성 빈혈 또는 자가 면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia; AIHA)을 포함한 면역 용혈성 빈혈, 에디슨병(Addison's disease), 자가 면역 호중구 감소증, 범혈구 감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 당뇨병 관련 질환, CNS 염증성 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 장기 손상 증후군 예를 들어 패혈증, 외상 또는 출혈에 대해 2차적인 것, 항원-항체 복합-매개된 질환, ti-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병/증후군(Behcet's disease/syndrome), 캐슬만 증후군(Castleman's syndrome), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 레이노드 증후군(Reynaud's syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome), 유사천포창(pemphigoid) 예를 들어 유사천포창 수포 및 피부 유사천포창, 천포창(pemphigus)(천포창 불가리스(pemphigus vulgaris), 낙엽 천포창(pemphigus foliaceus), 천포

창 점액-막 유사천포창(pemphigus mucus-membrane pemphigoid), 및 천포창 홍반(pemphigus erythematosus)을 포함함), 자가 면역 다발성 내분비병증, 라이터병(Reiter's disease) 또는 증후군, 열 손상, 자간전증, 면역 복합 장애 예를 들어 면역 복합 신염, 항체-매개된 신염, 다발성 신경병증, 만성 신경병증 예를 들어 IgM 다발성 신경병증 또는 IgM-매개된 신경병증, 자가 면역 또는 면역-매개된 혈소판 감소증 예를 들어 만성 또는 급성 ITP를 포함한 특발성 혈소판 감소 성 자반증(ITP), 공막염 예를 들어 특발성 케라토-공막염, 상공막염(episcleritis), 자가 면역 고환염 및 난소염을 포함한 고환 및 난소의 자가 면역 질환, 원발성 갑상선 기능 저하증, 부갑상선 기능 저하증, 갑상선염을 포함한 자가 면역 내분비 질환 예를 들어 자가 면역 갑상선염, 하시모토병(Hashimoto's disease), 만성 갑상선염(하시모토 갑상선염) 또는 아급성 갑상선염, 자가 면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능 저하증, 그레이브병(Grave's disease), 다선성 증후군 예를 들어 자가 면역 다선성 증후군(또는 다선성 내분비증 증후군), 신경학적 부신 생물 증후군(neurologic paraneoplastic syndromes)을 포함한 부신생물 증후군 예를 들어 램베르트-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome) 또는 이튼-램베르트 증후군, 강직-인간 증후군(stiff-man or stiff-person syndrome), 뇌척수염 예를 들어 알레르기성 뇌척수염 또는 뇌척수염 알레르기 및 실험적 알레르기성 뇌척수염(EAE), 실험적 자가 면역성 뇌척수염, 중증 근무력증 예를 들어 흥선종-관련된 중증 근무력증, 소뇌 변성(cerebellar degeneration), 신경근증, 안구간(opsoclonus) 또는 안구간 근간 대경련 증후군(opsoclonus myoclonus syndrome; OMS) 및 감각 신경병증, 다초점 운동 신경병증, 쉬한 증후군(Shyhan's syndrome), 자가 면역 간염, 만성 간염, 루포이드 간염(lupoid hepatitis), 거대세포 간염(giant cell hepatitis), 만성 활동성 간염 또는 자가 면역 만성 활동성 간염, 림프성 간질성 폐렴(LIP), 폐쇄세기관지염(비-이식) 대 NSIP, 갈랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 버거병(Berger's disease)(IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선형 IgA 피부병, 급성 열성 호중구 피부병, 각막하 농포성 피부병, 일과성 가시세포 분리 피부병(transient acantholytic dermatosis), 간경변 예를 들어 원발성 담즙성 간경변증 및 폐경변, 자가 면역 장 병증 증후군, 셀리악병(Celiac 또는 Coeliac disease), 비열대성 스프루(celiac sprue)(글루텐성 장 질환(gluten enteropathy)), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭 글로불린 혈증, 근위축성 측삭 경화증(ALS; 루게릭 병), 자가 면역성 귀질환, 관상 동맥 질환 예를 들어 자가 면역 내이질환(autoimmune inner ear disease; AIED), 자가 면역 난청, 다발성 연골염 예를 들어 불응성 또는 재발성 또는 재발 성 다연골염, 폐포 단백증, 코건 증후군(Cogan's syndrome)/비매독성 간질성 각막염, 벨 마비(Bell's palsy), 스위트병(Sweet's disease)/증후군, 주사 자가 면역(rosacea autoimmune), 대상포진 관련 통증, 아밀로이드증, 비-암성 림프구 증가증(non-cancerous lymphocytosis), 단클론 비세포 림프구 증가증(예를 들어 양성 단일 클론 감마병증 및 결정되지 않은 중요성의 단일 클론 감마병증, MGUS)을 포함한 원발성 림프구 증가증, 말초 신경병증, 부신 생물증후군, 이온통로병증(channelopathy) 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 장애, 청각 장애, 실명, 주기적 마비 및 CNS의 이온통로병증, 염증성 근육 병증, 국소 또는 분절 또는 국소 분절 사구체 경화증(FSGS), 내분비 안염, 포도막염, 맥락 망막염, 자가 면역 간 질환, 섬유 근육통, 다발성 내분비 장애, 슈미트 증후군(Schmidt's syndrome), 부신염, 위 위축, 미숙성 치매, 탈수 초성 질환 예를 들어 자가 면역 탈수 초성 질환 및 만성 염증성 탈수 초성 다발성 신경병증, 드레슬러 증후군(Dressler's syndrome), 탈모 욱지기(alopecia areata), 전두 탈모증(alopecia totalis), CREST 증후군(석회증(calcinosis), 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 식도 운동 장애, 공막근), 예를 들어 항-정자 항체에 기인한 양성 및 자성 자가 면역 불임, 혼합된 결합 조직 질환, 샤가스병(Chagas' disease), 류마티스성 열, 재발성 유산, 농부폐(farmer's lung), 다형 홍반, 심장 절개 후 증후군, 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 조류 애호가 폐(bird-fancier's lung), 알레르기성 육아종성 혈관염, 양성 림프구성 혈관염, 알포트 증후군(Alport's syndrome), 폐포염 예를 들어 알레르기성 폐포염 및 섬유성 폐포염, 간질성 폐질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 기생충 질환 예를 들어 리슈만편모충증(leishmaniasis), 후만증(kypanosomiasis), 주혈 흡충증, 회충증(ascariasis), 아스페르길루스증(aspergillosis), 스타터 증후군(Sampter's syndrome), 카플란 증후군(Caplan's syndrome), 탕기열, 심내막염, 심내막 섬유증, 미만성 간질성 폐섬유증, 간질성 폐섬유증, 폐섬유증, 지속 용기 홍반(erythema elevatum et diutinum), 태아적아구증(erythroblastosis fetalis), 호산성 근막염(eosinophilic fasciitis), 슈만 증후군(Shulman's syndrome), 플레티 증후군(Felty's syndrome), 플로라시아(flariasis), 모양체염(cyclitis) 예를 들어 만성 모양체염, 이색성 모양체염, 홍채 모양체염(급성 또는 만성) 또는 푸쉬 모양체염(Fuch's cyclitis), 헤토치-손레인 자반병(Henoch-Schonlein purpura), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 감염, SCID, 후천성 면역 결핍 증후군(AIDS), 에코바이러스 감염, 패혈증, 내독소 혈증, 체장염, 갑상선증, 파보바이러스 감염(parvovirus infection), 풍진 바이러스 감염, 예방접종 후 증후군, 선천성 풍진 감염, 엡스타인-바 바이러스 감염(Epstein-Barr virus infection), 볼거리, 에반스 증후군(Evan's syndrome), 자가 면역 생식선 부전, 소무도병(Sydenham's chorea), 연쇄상 구균후 신염, 패혈성 혈전 유비테란(thromboangitis obliterans), 갑상선 중독증, 척수매독(tabs dorsalis), 맥락막염, 거대세포 다발성 근육통, 만성 과민성 폐렴, 건성 각결막염

(keratoconjunctivitis sicca), 유행성 양성 각결막염, 양성 가족성(benign familial) 및 허혈-재관류(ischemia-reperfusion) 손상, 이식 기관 재관류(transplant organ reperfusion), 레티널 자가 면역(retinal autoimmunity), 관절염(joint inflammation), 기관지염, 만성 폐쇄성 기도/폐질환, 규폐증, 아프타(aphthae), 아프타성 구내염, 동맥 경화성 장애, 아스페르니오게네스(asperniogenesis), 자가 면역 용혈, 보크병(Boeck's disease), 한랭 글로불린 혈증(cryoglobulinemia), 듀푸이트렌 구축(Dupuytren's contracture), 안구내 안구혈증, 수정체 과민증, 장염 알레르기, 나성 결절 홍반(erythema nodosum leprosum), 특발성 안면 마비, 만성 피로 증후군, 열성 류마티스병, 함만-리치병(Hamman-Rich's disease), 감각 신경성 청력 상실, 발작성 혈색소뇨증(haemoglobinuria paroxysmatica), 성선 기능 저하증, 국소 회장염, 백혈구 감소증, 감염 단핵구증, 횡단성 골수염, 원발성 특발성 점액 수종(primary idiopathic myxedema), 신증(nephrosis), 안염 심파티카(symphatica), 육아종 고환염(orchitis granulomatosa), 췌장염, 다발성 신경근염 아큐타(polyradiculitis acuta), 괴저성 농피증, 퀴르바인 갑상선염(Quervain's thyroiditis), 후천성 비장 위축증(acquired splenic atrophy), 비-홍선 악성종양, 백반증, 독성-쇼크 증후군, 식중독, T 세포의 침윤과 관련된 병태, 백혈구-유착 결손증, 사이토카인 및 T- 림프구에 의해서 매개된 급성 및 지연된 과민증과 관련된 면역 반응, 백혈구 당뇨병과 관련된 질환, 다중 장기 손상 증후군, 항원-항체 복합-매개된 질환, 반구체성 지하막병(antiglomerular basement membrane disease), 알레르기성 신경염, 자가 면역 다내분비병증(polyendocrinopathies), 난소염, 원발성 점액 수종, 자가 면역 위축성 위염, 교감성 안염, 류마티스성 질환, 혼합된 결합 조직 질환, 신 증후군(nephrotic), 췌도염(pancreatitis), 다내분비 장애, 자가 면역 다선 증후군 유형 I, 성인-발병 특발성 부갑상선 기능 저하증(AOIH), 심근 병증 예를 들어 확장성 심근병증, 포피 수포증(EBA), 혈색소 침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화성 담관염, 화농성 또는 비-화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 사골, 전두염, 상악 또는 접형동염, 호산구 관련 장애 예를 들어 호산구 증가증, 폐 침윤성 호산구 증가증, 호산구 증가-근육통 증후군, 로플러 증후군(Löffler's syndrome), 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구 증가증, 기관지 폐렴성 아스페르길루스 증, 아스 페르길루스 증(aspergilloma), 또는 호산구를 함유하는 육아종(granulomas), 아나필락시스, 혈청 음성 척추 관절염, 다내분비 자가 면역 질환, 경화성 담관염, 공막, 상공막, 만성 점막 피부 칸디다증(chronic mucocutaneous candidiasis), 브루튼 증후군(Bruton's syndrome), 영아기의 일과성 저 감마 글로불린 혈증, 위스코트-알드리치 증후군(Wiskott-Aldrich syndrome), 운동 실조 모세 혈관 확장 증후군, 혈관 확장증, 교원병(collagen disease)과 관련된 자가 면역 질환, 류머티즘, 신경계 질환, 림프절염, 혈압 반응 감소, 혈관 기능 장애, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각 과민, 신장 허혈, 뇌 허혈 및 혈관 화를 수반하는 질환, 알레르기성 과민증 장애, 사구체 신경염, 재관류 손상, 허혈성 재관류 장애, 심근 또는 기타 조직의 재관류 손상, 림프종 기관지염, 염증성 피부병, 급성 염증 성분을 갖는 피부병, 다발성 장기 부전, 수포성 질환, 신장 피질 괴사, 급성 화농성 수막염 또는 기타 중추 신경계 염증성 장애, 안구 및 안와 염증 장애, 과립구 수혈 관련 증후군, 사이토카인 유발 독성, 기면증, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 골수염, 내동맥 증식, 소화성 궤양, 판막염, 이식편 대 숙주 질환, 접촉 과민증, 천식 기도 과민 반응 및 자궁 내막증과 관련된 면역 반응이 고려된다.

[0083] V. 키트

[0084] 본 개시의 특정 측면은 또한 본 개시의 방법을 수행하기 위한 키트, 예를 들어 본원에 기재된 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 키트는 라벨을 갖는 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병(bottle), 바이알 및 시험관(test tube)을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 상기 용기는 위에서 기술한 바와 같이 예후 또는 비-예후 적용에 유용한 프로브(probe)를 포함하는 조성물을 보유할 수 있다. 상기 용기 상의 라벨은 조성물이 특정 예후 또는 비-예후 적용에 사용되는 것을 나타낼 수 있으며, 또한 위에서 기술된 것과 같은 생체내 또는 시험관내 사용에 대한 지침을 나타낼 수 있다. 상기 키트는 위에서 기술된 용기 및 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 사용 지침이 있는 패키지 삽입물을 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 물질을 포함하는 하나 이상의 다른 용기를 포함할 수 있다.

[0085] VI. 실시예

[0086] 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 하기 실시예가 포함된다. 다음의 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타낸다는 것을 당업자는 이해해야 하며, 따라서 그의 실시를 위한 바람직한 양태를 구성하는 것으로 고려되어야 한다. 그러나 당업자는 본 개시 내용에 비추어 볼 때, 개시된 특정 실시예에서 많은 변경이 이루어질 수 있으며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 유사하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 인식해야 한다.

[0087] 실시예 1 - 건강한 영아는 식품 알레르기로부터 보호하는 장내 박테리아를 갖는다.

[0088] B. 결과

[0089] 본 발명자들의 실험실 및 기타 사항은 CMA를 갖는 영아의 분변 미생물 군집이 건강한 카운터파트와 현저하게 다르다는 것을 입증하였다(5, 6). 이러한 결과 및, 미생물총의 멤버들이 알레르기 보호성일 수 있다는 증거(7)에 기초하여, 본 발명자들은 노토바이오틱 마우스 모델(gnotobiotic mouse model)을 사용하여 공생 박테리아가 우유 알레르기 항원 β -락토글로불린(BLG)에 대한 알레르기 반응으로부터의 보호에서 인과적 역할(causal role)을 하는지를 조사하였다. 무균(GF) 마우스는 연령, 성별 및 출생 방식(8, 9)이 일치하는 4명의 건강한 영아 및 4명의 IgE-매개된 우유 알레르기(CMA) 영아 공여체로부터의 인간 분변로 집락되었다(8, 9)(보충 표 1). 인간의 분변을 사용한 무균 마우스의 안정적인 집락을 위해 식이 요법이 중요하다는 것이 이전에 보고되었다(참조 10). 뮤린 숙주(murine host)에서 인간 박테리아의 성장을 지원하기 위해, 마우스는 조제 분유를 먹인 건강한 영아 또는 CMA 영아로부터 분변을 받았으며 식물 기반 마우스 차우(plant-based mouse chow)에 추가로 인간 영아 공여체가 소비한 동일한 조제 분유를 먹였다. 초기 전달 수신자(initial transfer recipient)는 후속 실험을 위한 살아있는 저장소로 사용되었다. CMA 영아 공여체는 지속적인 알레르기 증상을 관리하기 위해 광범위하게 가수 분해된 카제인 분유(extensively hydrolyzed casein formula; EHCF)를 받았으며 건강한 공여체는 표준 젖소-기반 분유를 받았다(5). 초기 전달 수신자(initial transfer recipient)는 후속 실험을 위한 살아있는 저장소로 사용되었다(방법 참조).

[0090] 건강한 영아 또는 CMA 영아 미생물총으로 집락된 GF 마우스 및 마우스 그룹을 BLG 및 점막 보조 콜레라 독소(CT)로 감염시켰다. 박테리아 집락이 없는 GF 마우스는 심부 체온의 저하(도 1a) 및 BLG-특이적 IgE 및 IgG1의 생성(도 1b, 도 1c)에 의해 입증된 바와 같이 식품에 대한 아나필락시스 반응에 매우 민감하였다(도 1b, 도 1c)(7, 11). 본 발명자들은 또한 BLG 챌린지에 대한 반응으로 4명의 CMA 공여체 각각의 분변 샘플로 집락된 마우스에서 심부 체온의 상당한 감소를 측정하였다(도 1a). 감염된 CMA- 집락된 마우스는 건강한-집락된 마우스와 비교할 때 훨씬 더 높은 혈청 농도의 BLG-특이적 IgE(도 1b), IgG1(도 1c) 및 mMCP-1(도 1d)을 생성하였다. 놀랍게도, 4개의 건강한 영아 미생물총을 받은 모든 마우스는 BLG 챌린지에 대한 아나필락시스 반응으로부터 보호되었고; 챌린지 후 그들의 코어 체온은 GF 또는 CMA-집락된 마우스에서 측정된 것과 상당히 달랐다(도 1a). 조직학적 분석은 챌린지 후(도 5) 또는 장기간 집락 후(도 6) 채취한 회장 또는 결장 조직 샘플에서 병리 또는 염증의 어떠한 증거도 나타내지 않았다. 미생물 분석은 건강한 마우스 그룹과 CMA 집락된 마우스 그룹 간에 커뮤니티 다양성 및 균일성이 유사하다는 것을 보여주었다(도 7). 우유 함유 분유(cow's milk containing formula)가 건강한-집락된 마우스에서 아나필락시스에 대한 미생물 독립적 보호에 기여했는지 여부를 조사하기 위해 본 발명자들은 모유-수유된 건강한 공여체 및 CMA 공여체로부터 추가 분변 전달(fecal transfer)을 수행하였다(보충 표 2). 수령 마우스(recipient mice)는 식물-기반 마우스 차우만 받았다. 모유-수유된 건강한 공여체의 분변으로 집락된 마우스는 BLG 감염 및 챌린지에 대한 아나필락시스 반응으로부터 보호되었다. 그러나, 모유-수유된 CMA 공여체의 분변으로 집락된 마우스는 건강한-집락된 마우스(도 8의 a)와 더 높은 수준의 BLG 특이적 IgE(도 8의 b)에 비해 심부 체온이 상당히 더 많이 저하되었다. 감염은 또한 물 또는 엔페밀(Enfamil)을 먹인 GF 마우스에서 BLG와 비교되었다. 두 그룹의 마우스 모두 BLG에 의한 감염에 강하게 반응하였다(도 9). 챌린지 후 심부 체온의 저하 또는 BLG-특이적 IgE 또는 IgG1의 혈청 농도에서 유의한 차이가 없었으며; 그러나 우유 함유 분유를 먹인 마우스에서는 혈청 mMCP-1이 억제되었다.

[0091] 8명의 분유를 먹인 영아 공여체(보충 표 1)의 분변 샘플을 분석하여 건강한 영아와 CMA 영아간에 차등적으로 풍부한 58개의 조작 분류 단위(OTU)를 확인하였다(도 2a; 보충 표 3). 단일 OTU 수준에서 각 공여체와 뮤린 전달 수용자 사이에 변이가 존재하기 때문에, 본 발명자들은 공여체-유래 미생물 군집(microbiome) 조성 차이가 집락된 마우스 그룹을 구별할 수 있는지 여부를 조사하였다. 상기 데이터를 제공하기 위한 집계된 측정(aggregated measure)으로서, 본 발명자들은 잠재적으로 "보호"(건강한 공여체에서 더 풍부함, n=34) 및 잠재적으로 "비보호"(CMA 공여체에서 더 풍부함, n=24) OTU의 수를 계산하여 각 공여체에 대한 존재/부재 비율을 생성하였다(도 10a; 방법 참조). 또한, 본 발명자들은 샘플에서의 상대적 풍부도(이하 풍부도 점수라고 함)를 기반으로 각 OTU에 가중된 점수를 계산하였다(도 2a; 방법 참조). OTU 존재비 점수가 존재/부재 비율에 대해 플롯되었을 때, 공여체는 비율에 따라 건강한 그룹과 CMA 그룹으로 분리되었다(도 10b, 사각형). 이러한 역치(threshold)는 또한 생물학적 표현형(도 10b, 원)에 의해 CMA- 및 건강한-집락된 마우스를 분리하여, 이러한 공여체-유래 집계된 미생물총 시그내처(signature)이 뮤린 전달 수용자(murine transfer recipient)에서 검증됨을 입증한다. 이전에 발표된 연구에서 수집된 16S 분변 샘플 데이터를 재분석하여 CMA 환자에 비해 건강한 영아에서 유의하게 더 높은 보호/비보호 OTU 비율이 동일한 나폴리 코호트의 관련없는 샘플 세트에서 독립적으로 검증되었다(5)(도 11). 공여체-유래된 OTU 비율은 또한 BLG-특이적 IgE(도 2b), BLG-특이적 IgG1(도 2c) 및

mMCPT-1(도 2d). 흥미롭게도, 선형 판별 효과 크기(linear discriminant effect size; LEfSe) 분석(도 2e, 도 2f)은 클로스트리디아 분류(*Clostridia class*)의 과(family)인 *Lachnospiraceae*가 건강한 집락된 마우스에서 풍부하다는 것을 보여주었다(7).

[0092]

식이 항원에 대한 내성은 소장에서의 흡수로 시작된다(4, 12). 대부분의 공생 박테리아는 결장에 있으며; 소장 에서 박테리아는 회장에서 가장 많이 존재한다(13). 이들 박테리아와 IEC의 상호 작용은 숙주-미생물 인터페이스에서 면역 조절의 핵심이다(13, 14). Ileal IEC는 8명의 영아 공여체 각각에 의해 집락된 마우스 그룹으로부터 분리되었고 RNASeq에 의해 유전자 발현을 정량화하였다(도 3의 a). 건강한-집락된 마우스는 CMA 집락된 마우스와 비교하여 독특한 회장 유전자 세트를 상향 조절하였다(도 3의 a; 보충 표 4). 예를 들어 소장 (15)의 상피 세포에서 풍부하게 발현되는 핵심 글루코네오제닉 효소(key gluconeogenic enzyme)를 암호화하는 *Fbp1*은 모든 건강한 결장 마우스에서 유의하게 상향 조절되었다(도 3의 a). *Fbp1*의 감소된 발현은 산화적 인산화에서 호기성 해당 과정으로의 대사 전환과 연관되어 있으며(16, 17) 이는 상피의 산소화를 변경하고 군집붕괴(dysbiosis)에 기여한다(18). *Tgfbr3* 및 *Ror2*는 건강한 집락된 마우스에 비해 CMA-집락된 마우스의 회장에서 하향 조절되었다(도 3의 a). *Tgfbr3*은 성장 인자 TGF- β 에 대한 수용체를 암호화하고 젖먹이 래트(suckling rat)의 소장에서 풍부하게 발현된다(19). 가용성 TGF β RIII 및 TGF- β 2는 모유에 고농도로 존재한다. *Wnt5a*에 의한 TGF- β 신호 전달의 활성화는 *Ror2*를 통해 매개되며 상피 회복에 중요하다(20). 대조적으로, 피루베이트 대사(pyruvate metabolism)에 관여하는 유전자인 *Acot12* 및 *Me1*은 건강한-집락된 마우스에 비해 CMA-집락된 마우스의 회장에서 상향 조절되었다. 이들 대사 및 분자 과정은 도 3의 b에 도시된 CMA- 및 건강한-집락된 마우스에서 상당히 변경된 유전자 온톨로지 경로(Gene Ontology pathway)에 반영된다.

[0093]

도 1에서 식별된 분변 OTU 시그내처 여부를 결정한다. 도 2는 또한 본 발명자들이 건강한- 및 CMA-집락된 마우스에서 회장 OTU와 분변 시그내처 사이의 상관 관계를 조사한 회장 박테리아 집단을 반영한다(도 12의 a). 대부분의 분류군은 마우스 분변과 회장 샘플 사이에서 CMA에 비해 건강한 상태에서 동일한 방향으로 변화(풍부 증가 또는 감소)하는 것으로 밝혀졌다(도 12의 b, 도 12의 c). 건강한 마우스 및 CMA-집락된 마우스(도 3의 a)로부터 회장 IEC에서 차별적 유전자 발현의 확인은 회장 박테리아가 알레르기 감작에 기여하기 위해 숙주 면역을 조절함을 시사하였다. 회장 박테리아 및 회장 차별 발현 유전자(DEG)의 통합 분석은 9개의 OTU가 건강한-마우스 또는 CMA-집락된 마우스의 회장에서 상향 조절된 유전자와 유의하고 일관되게 상관 관계가 있음을 나타냈다(도 4a). 흥미롭게도, 건강한 집락된 마우스의 회장에서 상향 조절된 DEG와 관련된 보호 OTU의 3/5은 건강한 집락된 마우스(259772, New18, 177986)에서 상향 조절된 3개의 보호 *Lachnospiraceae* OTU 모두가 최근접 일치 종으로 *Anaerostipes caccae*를 갖는 것을 보여준 NCBI 데이터베이스(16S 리보솜 RNA, 박테리아 및 고세균(Archaea))에 대한 조립된 16S 서열의 패밀리 *Lachnospiraceae*. A BLAST 서치(search)의 구성원이다. 특히, OTU259772는 인간 영아 분변 및 식이에 대한 종래 연구에서 *A. caccae*로 주석을 달았다(21). *A. caccae*는 비-포자 형성(non-spore forming)이며 락테이트 및 아세테이트를 사용하며 부티레이트를 생성한다(22, 23). 도 3의 a로부터 *Lachnospiraceae* OTU259772와 관심있는 몇몇 높게 상관된 회장 DEG(*Ror2*, *Fbp1*, *Tgfbr3*, *Acot12* 및 *Me1*) 사이의 Spearman 상관 관계가 도 4b에 도시된다. 종래 검증된 중-특이적 프라이머(24)와 함께 정량적 PCR(qPCR)을 사용한 회장 및 분변 샘플의 분석은 건강한-집락된 마우스에서 *A. caccae*의 농축에 대한 독립적인 확인을 제공하였다(도 4c-도 4e 및 도 13의 a-c). 회장 샘플에서 *A. caccae*의 풍부함은 또한 회장 IEC의 DEG와 상관 관계가 있었다(도 14). 참고로, 상관 관계가 높은 두 DEG(*Acot12* 및 *Me1*)는 피루베이트 대사에 관여한다. 부티레이트는 결장 상피 세포의 중요한 에너지 원이다(25). 부티레이트는 β -산화를 통해 대장 세포의 산소 소비를 유도하여 부티레이트를 생성하는 절대 혐기성 미생물을 위한 국소 저산소 틈새를 유지한다(26). 군집붕괴(dysbiosis) 조건에서 대장 세포는 주요 중간체로 피루베이트 생산을 포함하는 과정인 해당 과정을 통해 에너지를 생성한다(27). CMA-집락된 마우스의 IEC에서 부티레이트를 생산하는 *A. caccae*와 피루베이트 대사 관련 유전자의 풍부함 사이의 음의 상관 관계는 군집붕괴 조건에서 회장 상피 기능의 대사 변화를 반영하는 것으로 추측된다.

[0094]

이어서, *A. caccae*가 GF 마우스를 단일 집락(monocolonizing)함으로써 건강한 미생물군과 관련된 아나필락시스에 대한 유전자 발현 및 보호의 변화를 모방 할 수 있는지 여부를 조사했다(방법 참조). 건강한 집락된 마우스(*Fbp1*, *Tgfbr3*)에서 유의하게 상향 조절된 유전자 중 일부는 GF 또는 CMA-집락된 마우스와 비교할 때 *A. caccae* 단일 집락된 마우스에서도 유의하게 상향 조절되었다(도 4f). *Acot12* 발현은 CMA-집락된 마우스에서 유의하게 상향 조절되었지만, 건강한-집락된 마우스 또는 *A. caccae* 단일 집락된 마우스에서는 그렇지 않았다(도 4f). BLG+CT에 감작된 *A. caccae* 단일 집락된 마우스는 BLG 챌린지에 대한 아나필락시스 반응으로부터 보호되었다. 도 1에서와 같이, CMA 집락된 마우스는 아나필락시스를 나타내는 코어 체온의 현저한 저하를 나타냈다(도 4의 g). 중심 체온 및 mMCPT-1의 혈청 농도의 변화는 모두 CMA 집락된 마우스와 비교하여 *A. caccae* 단일 집락된

마우스에서 유의하게 감소되었다(도 4g, 도 4j). 항원 특이적, Th2 의존성, 항체(혈청 BLG 특이적 IgE 및 IgG1)(도 4h, 도 4i) 및 사이토카인 반응 IL-13 및 IL-4(도 4k, 도 4l)는 모두 *A. caccae* 단일 집락된 마우스에서 감소되었다.

[0095] 본 발명자들은 클로스트리디아 분류(Clostridia class)의 혐기성, 점막-관련된 박테리아가 조절체 T 세포(28, 29)의 유도, 면역 조절 대사 산물(30, 31)의 생산, 및 집락 내성(32)의 조절을 통한 장 항상성의 유지에서 그들의 보고된 역할 때문에 상당한 관심을 끌었다는 것을 보여주었다. 본 발명자들은 이러한 면역 조절 박테리아가 식품 흡수의 분위에서 회장에 존재하고 식품에 대한 아나필락시스 반응에 대한 보호에서 그들의 역할을 입증했다. 본원에 기술된 회장 유전자 발현의 클로스트리디아-관련된 변화의 기계론적 분석(mechanistic analysis)은 식이 항원에 대한 내성 유지에 중요한 추가 경로를 밝혀낼 가능성이 높다. 이 보고서에 설명된 모델은 알레르기 상태가 군집붕괴(33)를 유발하는지 또는 군집붕괴가 알레르기에 선행하는지 여부를 다루지 않는다. 실제로, 많은 요인들이 식품 알레르기의 발병에 기여할 가능성이 높다. 이 데이터는 공생 박테리아가 식품에 대한 알레르기 반응을 예방하는데 중요한 역할을 하고 이러한 질병을 예방하거나 치료하기 위한 미생물 군유 전체 조절 전략 개발에 대한 개념 증명을 제공한다는 것을 보여준다.

[0096] C. 방법

[0097] **노토바이오틱 마우스 허스밴더리(Gnotobiotic Mouse Husbandry).** 모든 마우스는 노토바이오틱 리서치 애니멀 팩설리티(Gnotobiotic Research Animal Facility; GRAF)에서 사육되고 수용되었다. 마우스는 앤케어(Ancare) 폴리카보네이트 마우스 케이지(카탈로그 번호 N10HT) 및 테크라드 파인 웨이빙스(Teklad Pine Shavings)(7088, 오토클레이브로 멸균됨)가 구비된 트렉슬러(Trexler) 스타일 유연성 필름 분리기 하우징 유닛(Trexler style flexible film isolator housing units)(Class Biologically Clean)에서 20 내지 24℃의 실온에서 12시간 명/암 주기로 유지되었다. 마우스에 pH 5.2에서 임의의 양으로 오토클레이브 멸균 수, USP 등급을 제공하였다. 침구는 매주 교체되었고; 분유를 먹인 마우스의 케이지는 병에서 분유가 누출되어 매일 침구 교체가 필요하였다. 모든 마우스에 Purina Lab Diet® 5K67을 먹이고 실험실 동물의 관리 및 사용 가이드(2013년 8판)에 따라 온도 조절 환경에서 보관하였다. 식이는 121℃×30분에서 오토클레이브하여 멸균되었다. 분리기의 무균성은 qPCR에 의한 분변 샘플의 배양 및 16S rRNA 분석을 통해 매주 확인되었다. 배양은 BHI, Nutrient 및 Sabbaroud Broth에서 37℃ 호기성 및 혐기성 및 42℃ 호기성에서 96시간 동안 이루어졌다. 모든 마우스는 Axenic Profile Screen을 사용하여 IDEXX Radil 또는 Charles River Lab을 통해 주요 장기의 모든 내부 및 외부 기생충, 전체 혈청학 프로파일 및/또는 PCR, 세균학, 총체적 및 조직학적 분석에 대한 재활성화 또는 수령시 초기에 스크리닝된다. 무균(GF) C3H/HeN 마우스는 T. Golovkina(University of Chicago)에서 시설 내로 옮겨졌다.

[0098] **인간 분변 샘플의 제조.** 예방 접종 프로그램 참여자로부터 건강한(비-알레르기 성) 분변 샘플을 채취하였다. 이들 대상체들은 아토피성 질환에 걸릴 위험이 없었으며 그들의 임상 기록은 알레르기성 질환에 대해 음성이었다. CMA를 갖는 영아는 3차 소아 알레르기 센터에서 진단을 받았으며[「Pediatric Allergy Program at the Department of Translational Medical Science of the University of Naples 'Federico II」 참조]; 완전한 환자 정보는 보충 표 1 및 2를 참조한다. 이 연구의 모든 측면은 헬싱키 선언에 따라 수행되었으며 나폴리 대학 'Federico II'의 윤리위원회의 승인을 받았다. 연구에 참여한 모든 아동의 부모/보호자로부터 서면 동의를 얻었다. 신선한 분변 샘플을 멸균 튜브에 클리닉에서 수집하고, 무게를 재고, 100-500mg 당 2mL LB 브로스 + 30% 글리세롤과 혼합하고, 멸균 저온 유리병(cryovial)에 분취한 다음 즉시 -80℃에서 보관하였다. 샘플은 균질화될 때까지 -80℃에서 보관된 드라이 아이스 상에서 시카고 대학으로 배송되었다. 마우스를 집락하기 위해 동결된 분변 샘플을 혐기성 챔버에 도입하고 해동하였다. 해동된 분변을 2.5mL 예비-환원된 PBS + 0.05% 시스테인을 구비한 멸균 50mL 튜브에서 3mm 보로실리케이트 유리 비드와 혼합하고 부드럽게 볼 텍싱하여 분리하였다. 생성된 균질물(homogenate)은 100μm 필터를 통해 여과되었다. 이러한 균질화 및 여과 과정을 3회 더 반복하고 최종 여액을 동일한 부피의 30% 글리세롤 + 0.05% 시스테인과 혼합하였다. 이 용액을 노토바이오틱 분리기(gnotobiotic isolator)로 수송 및 도입하기 위해 고무 마개를 구비한 발취 튜브(Balch tube)에 분취하였다. 잔류 분변 용액을 -80℃에서 분취량으로 동결시켰다.

[0099] **무균 마우스의 집락.** 모든 마우스는 생후 3주에 식물-기반 마우스 사료(Purina Lab Diet® 5K67)에 이유(離乳)하고 이유 시점에서 집락화되었다. GF 마우스는 오토클레이브 멸균수를 받았다. 수컷 및 암컷 마우스 모두가 모든 실험에 사용되었다. 각 실험은 제어된 한배 새끼(littermate)였다. 모든 마우스는 고유 한 5자리 쿼터 태그로 식별되었다. 모든 작업은 「Institutional Biosafety and Animal Care and Use Committees」에 따라 수

행되었다. 각 인간 영아 공여체 이송은 교차 오염을 방지하기 위해 자체의 유연한 필름 분리기에 유지되었다. 실험에서, 저장소 마우스는 500 μ L의 갓 준비된 영아 분변 균질물로 GF 마우스의 위내 위관 영양법에 의해 인간 분변 공여체로부터 생성되었다. 이들 저장소는 마우스 분변의 위내 위관 영양에 의해 마우스 대 마우스 전달을 통해 후속 실험 마우스를 집락하는데 사용되었다. 저장소와 실험 마우스 모두의 분변 샘플을 16S rRNA 분석에 의해 정기적으로 검사하여, 위관 영양에 의한 저장소에서 실험용 마우스로의 마우스간 이동이 시간이 지남에 따라 매우 재현 가능하고 안정적임을 입증하였다. 실험 마우스의 집락을 위해, 저장소 마우스에서 새로 배설된 분변 펠릿을 1mL의 멸균 PBS에서 균질화하고 250 μ L의 상기 균질물을 사용하여 1마리의 수용 마우스를 위관 영양하였다. 영아용 분유를 먹인 마우스의 경우, 음용수는 집락 4시간 전에 분유로 대체되었다. 건강한 영아 분변으로 집락된 마우스에게는 「Enfamil Infant (Mead Johnson Nutrition, Evansville, IN)」를 제공하고 CMA-집락된 마우스는 광범위하게 가수 분해된 카제인 분유(extensively hydrolyzed casein formula; EHCF), 투트라미겐(Nutramigen) I(Mead Johnson Nutrition)를 임의로 제공하였다. 건조 및 액체 형태의 분유가 둘 다 사용되었다. 건조 분유가 제조사의 지침에 따라 USP 등급의 오토클레이브 멸균수와 혼합되었다. 모든 분유는 매일 갱신되었다.

[0100] *Anaerostipes caccae* 집락된 마우스의 경우, *A. caccae*(DSM-14662, DSMZ)를 감소된 쇠들러 브로쓰(Schaedler's Broth)(Remel)의 혐기성 챔버(Coy, 모델 B)에서 37°C에서 밤새 1.08의 광학 밀도(OD600)로 배양하였다. μ L(대략 2.5×10^8 CFU)을 GF 마우스에 먹였다. 이들 마우스는 중-특이적 프라이머(보충 표 6)를 사용하여 qPCR에 의해 집락을 모니터링하고 살아있는 저장소로 유지되었다. 실험 마우스의 집락을 위해, 엔파밀(Enfamil) 영아용 분유(액체)를 집락 4시간 전에 음용수에 첨가하였다. 리포지토리 마우스(repository mouse)로부터 새로 배설된 분변 펠릿을 1mL의 멸균 PBS에서 균질화하고 250 μ L의 상기 균질물을 사용하여 1명의 수용 마우스를 위관 영양하였다. *A. caccae*를 사용한 단일 콜로니는 모든 실험 마우스에 대해 희생시 수집된 분변 샘플의 16S rRNA-표적화 시퀀싱에 의해 확인되었다.

[0101] **16S rRNA-표적화된 시퀀싱.** 박테리아 DNA는 파워 소일 DNA 분리 키트(Power Soil DNA Isolation Kit)(MoBio)를 사용하여 추출되었다. 16S rRNA 유전자 앰플리콘 시퀀싱은 아르곤 내셔널 레이보러토리(Argonne National Laboratory)의 엔바이러멘탈 샘플 제제(Environmental Sample Preparation) 및 시퀀싱 팩셀리티(Sequencing Facility)의 일루미나(Illumina) MiSeq에서 수행되었다. 레퍼런스 34에 설명된 절차를 사용하여 12 bp 바코드가 있는 분변 샘플에서 151bp 페어드-엔드 리드(paired-end read)를 생성하였다. 16S rRNA 유전자의 V4 영역은 일루미나 플로우셀(Illumina flowcell)에서 사용되는 시퀀싱 어댑터 서열을 포함하는 영역-특이적 프라이머(region-specific primer) (515F-806R)로 PCR 증폭되었다. 영아 공여체 분변 샘플, 및 노토바이오틱 마우스 분변(gnotobiotic mouse fecal) 및 회장 샘플(ileal sample)(n=99)로 구성된 미생물총 시그내처 코호트(microbiota signature cohort)는 미생물 생태학으로의 정량적 통찰(Quantitative Insights into Microbial Ecology; QIIME) (버전 1.9)에 의해 분석되었다(35). 로 리드(raw read)는 저품질 베이스를 제거하기 위해 트리밍(trimming)되었으며; 페어드-엔드 3' 오버랩핑 서열(paired-end 3' overlapping sequence)은 SeqPrep(주소 github.com/jstjohn/SeqPrep의 월드 와이드 웹에서 찾아짐)을 사용하여 병합되었다. 개방형 레퍼런스 OTU 피킹 프로토콜(open reference OTU picking protocol)은 그린진 데이터베이스(Greengenes database)(2013년 8월 릴리스)에 대해 97% 서열 동일성으로 사용되었다(36). 서열은 PyNAST로 정렬되었다(37). 분류학적 할당은 우클러스터 컨센서스 분류 할당자(ucclust consensus taxonomy assigner)로 이루어졌으며(38); 치머슬레이어(ChimeraSlayer) (v20110519)를 사용하여 예측된 키메라 서열을 제거하였다(주소 microbiomeutil.sourceforge.net의 월드 와이드 웹에서 찾아짐). 데이터는 공여체 및 집락된 마우스 코호트(n=99, 공여체 분변 샘플, 집락 2주 및 3주 후 마우스 분변 샘플, 마우스 회장 샘플로 구성됨)에 대해 3,160 리드, 및 도 12의 c에 나타난 마우스 코호트에 대해 10,050 리드(n=70, 집락 1주 후 35마리의 마우스의 페어드 분변 및 회장 샘플로 구성됨)의 균등한 깊이로 희박화되었다. 알파(샤먼(Shannon) 지수) 및 베타 다양성 지표는 양면 만-휘트니-윌코슨 시험(Mann-Whitney-Wilcoxon test)(비-파라메트릭(non-parametric)) 및 PERMANOVA R 패키지 베건(R package vegan)(v2.4.5) (39)'에서 가중치가 부여된 UniFrac 거리를 갖는 PERMANOVA를 각각 사용하여 CMA 및 건강한 그룹 사이에서 비교되었다(39)'. 피에로우(Pielou)의 균등 지수 J'는 수학식
$$J' = \frac{H'}{\ln S}$$
에 의해 계산되었으며, 여기서 H'는 샤먼 지수이고 S는 OTU의 최대수이다. 이산 펄스-검색 속도(Discrete False-Discovery Rate; DS-FDR)(40)를 사용하여 CMA의 분변 군집 및 파라미터 "transform_type=normdata, method=meandiff, alpha=0.10, numperm=1000, fdr_method=dsfdr" (accessed 02262018) (<https://github.com/biocore/dsFDR>)가 있는 건강한 그룹 사이에서 차별적으로 풍부한 박테리아 분류군을 식별하였다. 벤자미니-호흐베르그-FDR(Benjamini-Hochberg-FDR; BH-FDR) 방법과 비교하여 DS-FDR 방법은 제한된

샘플 크기로 검정력이 증가하고 희소 데이터 구조(미생물 풍부도 표에서 0이 아닌 값의 낮은 비율)에 견고하며, 따라서 미생물 군집의 데이터 분석에 매우 적합하다(40). DS-FDR 알고리즘은 조정된 P-값을 계산하지 않으며; 그 대신 원하는 수준 (0.10)에서 FDR을 제어하는 퍼뮤테이션 테스트(permutation test)(기본값 1000 퍼뮤테이션)에서 펄스-발견 비율(false-discovery rate)을 추정한다. 따라서 출력값에서 로 P-값(raw P-values), 테스트 통계 및 부정된 가설을 계산한(보충 표 3 및 보충 표 5). 각 비교에서, 4개 미만의 샘플에 존재하는 OTU는 DS-FDR 테스트를 적용하기 전에 제거되었다. 선형 판별 분석 효과 크기(linear discriminant analysis effect size; LEfSe)는 샘플당 정규화된 값 1,000,000과 다른 파라미터에 대한 기본값을 사용하여 CMA 또는 건강한 그룹이 다른 그룹에 비해 상당히 풍부한 속(genera)을 식별하는데 사용되었다(41). LEfSe 분석에서 선형 판별 분석(LDA) 점수는 두 그룹간에 차별적으로 풍부한 분류군에 대해 계산되었다. $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis 검정) 및 $\log_{10}(\text{LDA}) \geq 2.0$ (또는 ≤ -2.0)에서 분류군이 중요한 것으로 간주되었다. 도 2a에서, DS-FDR을 사용한 건강한 비교와 공여체 CMA에서의 차등 풍부도 테스트 후, 본 발명자들은 추가 분석을 위해 총 58개의 OTU를 남겨두고 적어도 2개의 마우스 그룹에 존재를 요구함으로써 중요한 OTU를 추가로 필터링 하였다. OTU 비율은 잠재적으로 보호할 수 있는 OTU의 총수(건강한 상태에서 더 풍부함)를 잠재적으로 비보호적인 OTU의 총수(CMA에서 더 풍부함)로 나누어 계산하였다. 또한, OTU 풍부도 점수는 도 2a에 도시된 건강한 공여체 분변 샘플에 비해 CMA에서 확인된 58개의 OTU의 풍부함을 고려하여 계산되었다. 첫째, 신호를 가우시안 분포에 가깝게 가져오기 위해 상대적 풍부도에 데이터 변환을 적용하였다. 각 OTU의 상대적 풍부도에 상수 (1×10^6)를 곱하여 모든 값을 1보다 큰 값으로 만들고, $\log_{10}$ 을 변환하고, 값을 샘플 전체의 평균 제곱근으로 나누어 스케일링하였다. 잠재적으로 보호되지 않는 OTU의 풍부도에 (-1)을 곱하였다. 다음으로, 58개의 OTU의 변환된 풍부도의 합을 계산하여 집계 점수를 생성하였다. 독립 코호트에서 OTU 비율 차이를 검증하기 위해 본 발명자들은 레퍼런스에서 건강한 영아 및 CMA 영아(n=38)로부터 수집된 분변 샘플의 16S 시퀀싱 데이터를 재분석하였다. 위에서 설명한 동일한 분석 프로토콜을 사용하여 6,424개 리드의 균등한 길이로 희박한 데이터를 사용한다. 도 2a에 도시된 58개의 OTU 중 55개의 OTU가 알려진 참조 ID로 할당되었고 3개는 새로운 참조 ID로 할당되었습니다(보충 표 3). 새로운 참조 OTU ID는 다른 분석 코호트 간에 비교할 수 없으므로 본 발명자들은 알려진 참조 ID를 가진 OTU에 초점을 맞추었다. 55개의 알려진 OTU 중의 52개는 재분석된 독립 코호트에서 매칭되었고 도 10에 도시된 보호/비보호 OTU 비율의 계산에 사용되었다.

[0102] **식품 알레르겐 감작 및 챌린지.** 프로토콜은 레퍼런스 7에서 채택되었다. 모든 마우스는 3주 연령에 식물-기반 마우스 사료(Purina Lab Diet® 5K67)에 이유시킨다. GF 마우스는 오토클레이브 멸균수를 받았다. GF 마우스는 오토클레이브 멸균수를 받았다. 영아 공여체의 분변으로 집락하거나 *A. caccae*로 단일 집락한 마우스의 경우, 식수는 집락 4시간 전에 분유로 대체되었다. 건강한 분변 또는 *A. caccae*로 집락된 마우스는 엔파밀(Enfamil)을 받았다. CMA 집락된 마우스는 누트라미겐(Nutramigen)(모두 메드 존슨(Mead Johnson)에서 공급됨)을 받았다. 이유(GF) 또는 집락(건강/*A. caccae*/CMA) 후 1주일인 0일에 모든 마우스를 4시간 동안 금식한 다음 200mM 중탄산나트륨의 위관 영양을 제공하였다. 30분 후, 마우스에게 20mg의 BLG(Sigma) 및 10 µg의 CT(List Biologicals)를 투여하였다. 이 프로토콜은 5주 동안 매주 반복되었다. 분유-먹인 마우스의 경우, 마지막 감작 후 1주일 동안 분유를 멸균수로 대체하였다. 42일째에 챌린지하기 전에, 마우스를 4시간 동안 금식하고 위관 영양법으로 중탄산나트륨을 투여하였다. 100mg BLG의 2회 용량을 각각 30분 간격으로 위내 위관 영양을 통해 투여하였다. 알레르기 항원 챌린지 이전과 첫번째 챌린지 후 5분마다 직장 프로브(PhysiTemp)를 사용하여 두번째 챌린지 후 최소 30분까지 심부 체온을 맹검 방식(blinded fashion)으로 측정하였다. mMCP-1 수준을 측정하기 위해 두번째 챌린지 1시간 후에 혈청을 수집하였다. 항체 측정을 위해 항원 챌린지(challenge) 24시간 후 혈청을 수집하였다.

[0103] **ELISA.** 제조업체의 프로토콜(eBioscience)에 따라 두번째 챌린지 1시간 후 수집된 혈청에서 mMCP-1을 정량화 하였다. BLG-특이적 ELISA는 레퍼런스 7에서 수정된 프로토콜을 사용하여 수행되었다. 간단히 말해서, 플레이트를 100mM 탄산염-중탄산염 완충액(pH 9.6)에서 100 µg/mL BLG로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트는 3% BSA로 실온에서 2시간 동안 차단되었다. 분석은 BLG + alum으로 면역화된 CNBr-세파로스(CNBr-Sepharose) 친화성 컬럼에서 정제된 BLG-특이적 항체(IgE 또는 IgG1)로 표준화되었다(42). BLG-특이적 항체는 고트 항-마우스(goat anti-mouse) IgE-UNLB(Southern Biotech) 및 래비트 항-고트(rabbit anti-goat) IgG-AP(ThermoFisher)로 검출된 다음 p-NPP(KPL Labs) 또는 IgG1-HRP(Southern Biotech)로 개발되었으며 TMB(Sigma)로 개발되었다.

[0104] 사이토카인 분석을 위해 5주 동안 BLG + CT로 감작된 *A. caccae* 또는 CMA 집락된 마우스로부터 챌린지 후 24시간에 비장을 수거하였다. 비장 세포는 cMEM(4% FCS(HyClone), 10mM HEPES(Gibco), 100U/ml 페니실린/스트렙

토마이신(Gibco) 및 55 μ M 2-머캅토에탄올(Gibco) 포함)에서 37°C, 10% CO₂, 10mg/ml BLG(Sigma)에서 2×10^6 개의 세포/ml의 농도로 자극되었다. 72시간 배양 상청액의 사이토카인 농도는 IL-13 및 IL-4(둘 다 인비트로젠(Invitrogen)으로부터)에 대해 ELISA에 의해 결정되었다.

[0105] **상피 세포 분리.** 감각 실험에서와 같이 마우스는 생후 3주에 이유 후 집락 이전에 영아용 분유를 먹었다. 집락 7일 후, 마우스를 안락사시키고 회장을 제거하였다. IEC 격리를 위해, 조직은 레퍼런스 (43)에서 기술된 바와 같이 세정하고 인버트(invert)하였다. IEC는 30분 동안 5분마다 세포 회복 용액(Cell Recovery Solution)(Corning)에서 인버트된 조직을 팽윤(inflating)시켜 수거하였다. IEC 샘플은 TRIzol(ThermoFisher)에서 용해되었고 RNA는 퓨어링크 RNA 미니 키트(PureLink RNA Mini Kit)(Ambion) + 온-칼럼 DNase 처리(on-column DNase treatment)(PureLink DNase Set, Ambion)로 추출되었다.

[0106] **RNASeq.** RNA 라이브러리는 Ribo-Zero 인간/마우스/랫트(Illumina)와 함께 TruSeq 표준 전체 라이브러리 제제 키트(Stranded Total Library Preparation Kit)를 사용하여 준비되었다. 샘플은 HiSeq2500 기기에서 50bp 단 일 리드 화학(single reads chemistry)을 사용하여 시카고 대학의 팡서널 게노믹스 코어(Functional Genomics Core)에서 시퀀싱되었으며 2개의 레인(lane)에서 시퀀싱 복제를 수행하였다. 로 리드(raw read)의 품질은 FastQC (v0.11.5)(44)에서 평가하였다. 39개의 RNAseq 샘플에 대한 QC30 점수는 $96.81\% \pm 0.06\%$ (평균 $\pm$ s.e.m.)로, 품질 점수 ≥ 30 인 염기의 백분율을 나타낸다. 마우스 레퍼런스 전사체(transcriptome)에 대한 정렬은 스트랜드-특이적 모드(45)로 칼리스토(Kallisto)(v0.43.1)에 의해 겐코드 유전자 애노테이션(Gencode gene annotation)(vM16, GRCh38)으로 수행되었다. 이러한 모드는 크머-기반 의사 정렬 알고리즘(kmer-based pseudoalignment algorithm)을 구현하여 RNASeq 데이터에서 전사를 정확하게 정량화하는 동시에 리드에서의 오류를 강력하게 감지한다. 평균 매핑 속도(average mapping rate)는 레퍼런스 전사체에 대한 칼리스토 의사 정렬(Kallisto pseudoalignment)을 기준으로 $62.77\% \pm 1.10\%$ (평균 $\pm$ S.E.M)이었다. 평균적으로, 샘플당 3천5백만개의 로 시퀀싱 리드가 생성되었으며 2천2백만개가 칼리스토(Kallisto)를 사용하여 전사체에 매핑되었다. 트식임포트(tximport)(v1.4.0)(46)를 사용하여 유전자 수준으로 요약되고 M 값의 트리밍된 평균(TMM) 방법으로 정규화되고 log2 변형된 가닥-특이적 프로토콜을 지정하여 전사 수준 풍부도를 정량화하였다. 추가 분석을 위해 최소 3개의 샘플(백만회 리드당 카운트(CPM) > 3)에서 발현된 유전자를 보관하였다. 그룹 간에 차별적으로 발현된 유전자는 정밀 가중치(v3.34.5)(47)와 함께 리마 붐 알고리즘(limma voom algorithm)을 사용하여 식별되었다. 복제 상관 함수(duplicateCorrelation)를 사용하여 차단 인자로서 공여체(Donor)(1 ~ 8)와 마우스 샘플 간의 상관 관계를 추정하였다. lmFit 함수를 사용하여 모든 마우스 샘플(n39, 18명의 CMA-집락된, 18명의 건강한-집락된 및 3 GF)을 위에서 계산된 상관 관계 구조를 통합하는 하나의 선형 모델에 맞추었다. 컨트라스트(contrast)는 각각의 비교(comparison)에서 DEG를 식별하기 위해 CMA 대 건강한 것, CMA 대 GF 및 건강한 것 대 GF로 설정되었다. CMA와 건강한 것 사이에서 유의하게 차별적으로 발현되고 GF 마우스와도 다른 유전자는 하기 2 단계 절차를 사용하여 확인되었다: (1) 유전자를, 0.10 미만의 펄스-발견 속도(FDR) 상관된 p-값에서 폴드 변화율(fold change) ≥ 1.5 또는 ≤ -1.5 로 CMA 대 건강한 것의 비교에서 다른 것으로 검출한 단계; (2) 단계 (1)로부터의 유전자를 FDR 0.05에서 CMA 대 GF 또는 건강한 것 대 GF 비교에서 폴드 변화율 ≥ 1.5 또는 ≤ -1.5 로 추가 필터링한 단계. 보다 엄격한 FDR 임계값(0.05)은 음성 대조군(GF)과 비교할 때 잠재적으로 트루 양성 우선 순위를 지정하기 위해 단계 (2)에서 적용되었다. 벤자미니-호호베르그(Benjamini-Hochberg) FDR(BH-FDR) 방법을 사용하여 다중 테스트 보정을 수행하였다(48). 총 32개의 DEG가 이들 임계값을 통과했으며, 이는 집락된 마우스에서 4가지 유형의 유전자 발현 변화를 나타낸다: (1) 건강한 상태에서 상향: CMA 및 GF에 비해 건강한 마우스에서 상향 조절되는 유전자; (2) CMA에서 상향: 건강한 유전자와 GF 둘 다에 비해 CMA 마우스에서 상향 조절되는 유전자; (3) 건강한 상태에서 하향: 건강한 마우스에서 CMA 및 GF에 비해 하향 조절되는 유전자; 및 (4) CMA에서 하향: 건강한 것 및 GF에 비해 CMA 마우스에서 하향 조절되는 유전자. 4개의 DEG 그룹이 **도 3의 a 및 도 4a**에 도시된다. 관심의 32 DEG에서 상당히 풍부한 유전자 온톨로지 및 KEGG 경로는 클러스터 프로파일러(v3.6.0)(49)를 사용하여 0.10 미만의 펄스-발견 속도(FDR) 보정 p-값(BH-FDR 방법, 초기하 테스트(hypergeometric test))에서 확인되었다. 상기 DEG는 이 분석을 위해 하기 두 그룹으로 분할된다: (1) 건강한 것은 건강한 상태에서는 상향, CMA에서는 하향인 모든 유전자를 포함하고, (2) CMA는 CMA에서는 상향 및 건강한 것에서는 하향인 모든 유전자를 포함하였다. CMA 및 건강한 샘플 사이에 상당히 차등적으로 풍부한 DEG와 회장 OTU 간의 상관 관계는 스피어만(Spearman)의 순위 상관 방법을 사용하여 계산한 다음 필터를 적용하여 (1) 지정된 그룹에서 최소 1 DEG와 유의한 상관 관계를 나타내는 OTU를 $P < 0.05$ 로 유지하였다. 잠재적으로 보호할 수 있는 OTU(건강한 상태에서 더 풍부함)의 경우, "건강한 것에서 상향" 및 "CMA에서 하향" 그룹의 유전자와 상관 관계가 있으며; 잠재적으로 비보호 OTU(CMA에서 더 풍부함)의 경우, "CMA에서 상향" 또는 "CMA에서 하향" 그룹의

유전자와 상관 관계가 있고; (2) 지정된 그룹의 DEG 중 최소 60%에 걸쳐 상대적으로 일관된 양의 상관 관계(스피어만의 $\rho > 0.20$)의 추세를 나타내는 OTU를 유지한다. 잠재적으로 보호할 수 있는 OTU의 경우, 이들은 결합된 "건강한 것에서 상향" 및 "CMA에서 하향" 그룹의 유전자와 상관 관계가 있으며; 잠재적으로 비보호 OTU의 경우, 이들은 결합된 "CMA에서 상향" 및 "건강한 것에서 하향" 그룹의 유전자와 상관 관계가 있고; (3) 최소 3개의 CMA와 3개의 건강한 마우스에 OTU를 유지한다. 9개의 회장 OTU가 이러한 상관 필터를 통과했으며 도 4a에 도시된다. OTU의 상대적 풍부도와 유전자 발현 사이의 상관 관계는 스피어만의 상관 방법을 사용하여 분석에 대한 검출 한계를 초과하는 샘플과 함께 계산되었다.

[0107] **qPCR.** 유전자 발현은 레퍼런스 7에 기재된 바와 같이 qPCR에 의해 측정되었다. 간단히 말하면, iScript cDNA 합성 키트(BioRad)를 사용하여 RNA로부터 cDNA를 제조하였다. 유전자 발현은 제조업체의 지침에 따라 PowerUp SYBR 그린 마스터 믹스(Applied Biosystems)로 측정되었다. 프라이머는 보충 표 7(20, 50-54)에 수록되었다. 관심 유전자의 발현은 Hprt로 정규화되었다. 상대 발현은 기하 평균을 중심으로 $\Delta\Delta Ct$ 를 사용하여 측정되었다. GF 마우스를 기준으로 사용하였다.

[0108] 배변 및 회장 샘플에서 *A. caccae*의 존재는 레퍼런스 (25)에 기술된 qPCR을 사용하여 확인되었다. 파워 소일 DNA 분리 키트(Power Soil DNA Isolation Kit)(MoBio)를 사용하여 박테리아 DNA를 추출하고 10 μ M 워킹 희석(working dilution)에서 각 프라이머 4 μ l와 박테리아 DNA 2 μ l를 사용하여 파워업 SYBR 그린 마스터 믹스(PowerUp SYBR green master mix)(적용된 바이오시스템)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 프라이머는 보충 표 6에 수록되어 있다. 반응의 순환 조건은 2분 동안 50 °C의 활성화 사이클에 이어서, 10분 동안 95°C의 1회의 사이클 및 20초 동안 94°C에서 40회의 사이클, 20초 동안 55°C의 사이클 및 50초 동안 72°C의 사이클로 구성되었다. 형광 프로브는 이 사이클의 마지막 단계에서 감지되었다. PCR 생성물의 특이성을 확인하기 위해 PCR의 종료시에 용융 곡선을 수행하였다. 상대 풍부도는 분변 g당 총 16S rRNA 복제물로 정규화된 2-Ct로 표현되고 상수 (1×10^{25})를 곱하여 모든 값을 1 이상으로 가져온다.

[0109] **조직 병리학적 분석.** 조직학적 분석을 위해 3mm 편편의 중간 결장 및 중간 회장 조직을 H & E 염색(H&E staining)을 위한 10% 포르말린 또는 PAS(Periodic-acid Schiff) 염색을 위한 카르누이 고정액(Carnoy's fixative)로 고정시켰다. 섹셔닝(sectioning) 및 염색은 시카고 대학의 인간 조직 자원 센터(Human Tissue Resource Center)에서 수행하였다. 모든 섹션은 위장 병리학자에 의해서 맹검 방식으로 검토되었다.

[0110] **통계학적 분석.** 프리즘(Prism) 7.0(GraphPad)을 사용하여 도면의 범례에 표시된 대로 다중 비교 및 양면 스튜던트 t-검정(two-sided Student's *t*-test)(도 4d 및 도 13의 b)을 위해 보페로니 보정(Bonferroni correction)을 이용하여 원-웨이(one-way)(도 4f) ANOVA를 수행하였다. DS-FDR 방법을 사용하여 CMA와 건강한 그룹을 비교하는 중요한 OTU(도 2a, 도 4c 및 도 13의 a)를 식별하였다. BH-FDR 방법은 RNA-Seq 분석(도 3의 a) 및 GO 농축 분석(도 3의 b)에서 다중 테스트 보정에 사용되었다. DS-FDR 방법을 사용하여 CMA와 건강한 그룹을 비교하는 중요한 OTU(도 2a, 도 4c 및 도 13의 a)를 식별하였다. BH-FDR 방법은 RNA-Seq 분석(도 3의 a) 및 GO 농축 분석(도 3의 b)에서 다중 테스트 보정에 사용되었다. 양측 비-파라미터릭 만-휘트니-윌콕슨 테스트(two-sided non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test)를 이용하여 샤논 다양성(Shannon Diversity) 및 피엘로우 균일성(Pielou's Evenness)을 비교하였다(도 7의 a, 도 7의 b). 보다 크고 독립적인 영아 집단에서 보호/비보호 OTU 비율의 분석은 양면 만-휘트니-윌콕슨 테스트를 이용하여 수행되었다(도 11). BLG(도 1a-도 1d, 도 4g, 도 8의 a, 도 9의 a)에 대한 상이한 공여체 집락된 마우스의 생물학적 반응은 R (lmerTest v3.0.1)(56)에서 제한된 최대 가능성(restricted maximum likelihood; REML)에 기초한 선형 혼합 효과 모델(55)로 조사되었다. 시간(선형 및 2차 둘 다)에 대한 그룹(도 1a에서 GF, 건강한 것 및 CMA; 도 4g에서 *A. caccae* 및 CMA; 도 8의 a에서 건강한 BFD 및 CMA BFD; 도 9의 a에서 H₂O 및 엔파밀(Enfamil)) 온도 변화는 온도=그룹 + 시간*그룹 + 시간*시간*그룹으로, 개별 마우스에 대해 추정된 랜덤한 절편 및 기울기로 모델링되었다. 그룹 온도 추이의 대조는 다중 비교를 위해 벤자미니-호르베르그(Benjamini-Hochberg) FDR (BH-FDR) 조정과 함께 t-검정을 이용하여 수행되었다. 그룹이 여러 공여체를 포함하는 경우를 제어하기 위해(도 1a), 종래 모델은 무작위 효과로 각 공여체 내에 네스팅된(nested) 마우스를 포함하도록 업데이트되고 대조를 반복하였다. 두 모델의 결과가 일치했기 때문에 첫번째 모델의 결과가 방법의 일관성을 위해 보고된다. 도 1b-도 1d에서, 항체 농도는 로그 형질 전환되고(log transformed), 무작위 효과(random effect)로 공여체를 갖는 $\log(\text{농도})=\text{그룹}$ 으로 모델링되었다. 그룹 차이에 대한 대조는 전술한 방법을 사용하여 수행되었다. 도 4h-도 4i, 도 8의 b-d, 도 9의 b-d에 있어서, 항체 및 사이토카인 농도는 로그 형질 전환되고 t-테스트를 이용하여 비교하였다. 데이터 분석 명령(재현성을 위한 데이터 파일 및 R 마크 다운 파일 포함)은 요청시 작성자에게 제공된다.

표 1

[0111]

보충 표 1. 본 연구에 사용된 분유-공급된 영아 공여체에 대한 환자 데이터

	건강한 것				CMA			
공여체 ID#	1	2	3	4	5	6	7	8
성별	웅성	웅성	웅성	웅성	웅성	웅성	웅성	웅성
분만방식	제왕절개	제왕절개	제왕절개	제왕절개	제왕절개	제왕절개	제왕절개	제왕절개
재태기간	만기	만기	만기	만기	만기	만기	만기	만기
모유수유	< 14일	< 14일	< 14일	< 14일	< 14일	< 14일	< 14일	< 14일
분변 수집 연령	6개월	6개월	6개월	6개월	6개월	6개월	6개월	6개월
CMA 증상 발병 연령	--	--	--	--	2개월12일	2개월	6개월	5개월20일
CMA 진단 증상	--	--	--	--	두드러기 및 구토	두드러기 및 구토	습진, 두드러기, 구토	습진, 구토
IgE-매개된 메카니즘	--	--	--	--	Yes	Yes	Yes	Yes
진단시 피부 프릭(prick) 시험 값(mm)								
-알파락토알부민	--	--	--	--	5	12	10	4
-베타락토글로불린	--	--	--	--	3	3	1	10
-카제인	--	--	--	--	3	5	4	8
-전유(whole milk)	--	--	--	--	7	6	5	7
진단시 총 혈청 IgE(kU/L)	--	--	--	--	340	127	267	358

표 2

[0112]

보충 표 2. 보충 도 4에서 모유-수유된 영아 공여체에 대한 환자 데이터

항 목	건강한 영아	우유 알레르기를 갖는 영아
공여체 ID#	9	10
성 별	자성	자성
분만방식	자연(spontaneous)	자연
재태기간	만기	만기
모유수유	Yes	Yes
	(모체는 우유 단백질을 소비함)	(모체는 우유 단백질을 소비함)
분변 수집 연령	6개월	6개월
CMA 증상 발병 연령	--	5개월
CMA 진단 증상	--	습진, 과민증, 구토, 번성(thrive) 실패, 설사
IgE-매개된 메카니즘	--	Yes
진단시 피부 프릭 시험 값(mm)		
-알파락토알부민	--	151
-베타락토글로불린	--	1
-카제인	--	7
-전유	--	15
진단시 총 혈청 IgE(kU/L)	--	334

표 3

[0113]

보충 표 3. 도 2a에서 나타낸, CMA- 및 건강한-공여체 대변 샘플 사이에서 차등적으로 풍부한 58개의 OTU

OTU	방향 변화	DS-FDR 거부	DS-FDR 시험 통계	DS-FDR 로 P 값(Raw Pvalues)	분류(Taxonomy)
1111294	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.184530795	0.015984016	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__;
360015	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.068956969	0.001998002	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
New.Refere nce OTU147	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.039674728	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__;
628226	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.034540622	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__;
349024	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.01594088	0.013986014	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus; s__
712677	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.012704055	0.027972028	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales
780650	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.010383613	0.012987013	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__;
843459	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.009899159	0.002997003	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__;
262095	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.007552857	0.01998002	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__; s__
New.Refere nce OTU166	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.005328787	0.006993007	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae
579851	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.005308631	0.022977023	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__[Eubacterium]; s__dolichum
551822	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.005216137	0.026973027	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae
298247	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.004133646	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Epulopiscium; s__
345540	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.003450891	0.000999001	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__;

582691	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.002271895	0.004995005	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__ ; s__
259772	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.002219727	0.016983017	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Coprococcus; s__
325419	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.001426612	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__ ; s__
797229	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.001367202	0.000999001	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__ ; s__
557627	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000748282	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__ ; s__
828483	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000737522	0.020979021	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium
299267	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000617653	0.026973027	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__ ; s__
4448331	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000531974	0.030969031	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__ ; s__
3376513	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000490385	0.024975025	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
813217	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000418414	0.004995005	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__ ; s__
New.CleanUp p.Reference OTU56927	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000411459	0.001998002	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
335701	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000408096	0.032967033	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
191999	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000393548	0.008991009	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae
183865	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.00036463	0.014985015	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
231787	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000362215	0.003996004	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__ ; s__

342397	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000334965	0.006993007	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
581782	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000327138	0.012987013	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__; s__
304641	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000299547	0.014985015	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__; s__
4389289	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000274745	0.032967033	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__; s__
541119	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000220503	0.032967033	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Enterobacteriales; f__Enterobacteriaceae; g__; s__
195258	CMA에서 상 향	TRUE	0.000463044	0.000999001	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__ovatus
315846	CMA에서 상 향	TRUE	0.0009126	0.012987013	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__[Barnesiellaceae]; g__; s__
551902	CMA에서 상 향	TRUE	0.001063128	0.002997003	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__; s__
318190	CMA에서 상 향	TRUE	0.001133533	0.002997003	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__; s__
591635	CMA에서 상 향	TRUE	0.001212852	0.004995005	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Ruminococcus; s__
585227	CMA에서 상 향	TRUE	0.001492734	0.022977023	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira; s__
370225	CMA에서 상 향	TRUE	0.001699313	0.008991009	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae; g__Bifidobacterium; s__adolescentis
199354	CMA에서 상 향	TRUE	0.003134517	0.012987013	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__[Barnesiellaceae]; g__; s__
198866	CMA에서 상 향	TRUE	0.003516506	0.002997003	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Parabacteroides; s__

583398	CMA에서 상향	TRUE	0.003665419	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__
583656	CMA에서 상향	TRUE	0.003887232	0.000999001	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
535375	CMA에서 상향	TRUE	0.004373572	0.000999001	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
1111191	CMA에서 상향	TRUE	0.004749497	0.021978022	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
580629	CMA에서 상향	TRUE	0.005200626	0.017982018	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
365181	CMA에서 상향	TRUE	0.00614329	0.000999001	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Collinsella; s__aerofaciens
359809	CMA에서 상향	TRUE	0.007206031	0.006993007	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Alcaligenaceae; g__Sutterella; s__
585914	CMA에서 상향	TRUE	0.007841977	0.001998002	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Parabacteroides; s__distasonis
365385	CMA에서 상향	TRUE	0.009299774	0.014985015	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae; g__Bifidobacterium; s__
583117	CMA에서 상향	TRUE	0.009878272	0.000999001	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
180082	CMA에서 상향	TRUE	0.011856764	0.002997003	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Parabacteroides; s__
589071	CMA에서 상향	TRUE	0.016312063	0.002997003	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__uniformis
514272	CMA에서 상향	TRUE	0.029745704	0.011988012	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__; s__

484304	CMA에서 상향	TRUE	0.030173538	0.004995005	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Bifidobacteriales; f__Bifidobacteriaceae; g__Bifidobacterium; s__
589277	CMA에서 상향	TRUE	0.052225784	0.001998002	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__

표 4

표 4. 도 3a에서 나타낸, CMA- 및 건강하게 걸러진 마우스 회장 RNAseq 샘플, 및 상이한 형태 네카티는 대조군에서 차등적으로 발현된 32개의 유전자									
유전자	EnsemblGeneID	RNAseq 평균 발현	DEG 그룹	CMA versus Healthy		CMA versus GF		Healthy versus GF	
				변화의 방향	FDR-조정된 P 값	변화의 방향	FDR-조정된 P 값	변화의 방향	FDR-조정된 P 값
Slc22a13	ENSMUSG000000074028	2.778111515	건강한 것에서 상향	NE	0.063113496	3.40496861	건강한 것에서 상향	NE	0.005425032
Fbp1	ENSMUSG000000069805	5.552525453	건강한 것에서 상향	ND	0.000581517	2.373595096	건강한 것에서 상향	NE	0.005425032
Apoa1d1	ENSMUSG000000071847	1.494018834	건강한 것에서 상향	NE	0.435864462	1.265633652	건강한 것에서 상향	NE	0.025785895
Npl	ENSMUSG000000042684	5.041978196	건강한 것에서 상향	NE	0.293803914	1.388291017	건강한 것에서 상향	NE	0.024969934
Alec2	ENSMUSG0000000025194	9.209485113	CMA에서 상향	CMA에서 상향	2.04E-05	2.175407835	ND	0.042313216	1.444608007
Bhmt	ENSMUSG000000047168	1.082085196	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.010848769	1.505881058	NE	0.410644089	1.308805284
Mfsd2b	ENSMUSG000000037336	1.777883345	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.061865715	1.537225758	NE	0.075749268	1.837944202
Cyp3a59	ENSMUSG000000061292	2.136791204	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.027389658	1.549562876	NE	0.009662128	2.190597918
Urn1	ENSMUSG000000034648	1.595303389	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.013681852	1.581394892	NE	0.007383553	1.714726833
Slc9b2	ENSMUSG000000037994	1.102430337	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.085368856	1.605005893	NE	0.031991401	2.02570437
Mrcr7	ENSMUSG000000047502	3.89754756	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.021327414	1.617161783	NE	0.42241223	1.257572339
Gria2a	ENSMUSG000000059003	2.458692024	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.085653544	1.617995585	NE	0.676602939	1.213889325
Gria2b	ENSMUSG000000055022	1.148935328	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.014593455	1.651618302	NE	0.68375077	1.135579703
Letm2	ENSMUSG000000037363	1.650075654	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.018797255	1.665833385	NE	0.001104306	2.371462071
Plaf1r	ENSMUSG000000056529	1.301260118	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.073471735	1.694815563	NE	0.021173615	2.232120867
Me1	ENSMUSG000000032418	4.3922554	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.016384547	1.703263564	NE	0.038233817	1.603254667
Smco1	ENSMUSG000000046345	1.23463105	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.090599686	1.755629553	NE	0.0265988488	2.508688181
Cyp2b10	ENSMUSG000000030483	7.581089071	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.029753823	1.757005744	NE	0.00927326	2.023601722
Cyp21l3	ENSMUSG000000028571	4.136663388	CMA에서 상향	CMA에서 상향	0.053930421	1.800812438	NE	0.001587354	3.68957984
Aco112	ENSMUSG000000021620	5.494716849	CMA에서 상향	CMA에서 상향	5.48E-05	2.01501538	NE	0.462442117	1.192539171
Cyp229	ENSMUSG000000030353	2.680142327	CMA에서 상향	CMA에서 상향	8.17E-05	4.735853239	NE	0.592396835	1.391570036
Akt1c19	ENSMUSG000000071551	6.653987069	건강한 것에서 하향	NE	0.007181957	1.539241768	건강한 것에서 하향	NE	0.000475667
Gstm1	ENSMUSG000000058135	3.552920591	건강한 것에서 하향	NE	0.010848769	1.592387077	건강한 것에서 하향	NE	0.020964575
Ces1f	ENSMUSG000000031725	6.194279856	건강한 것에서 하향	NE	0.027389658	1.893583214	건강한 것에서 하향	NE	0.00373614
Ces1g	ENSMUSG000000057074	2.742386148	건강한 것에서 하향	NE	0.090559257	1.907760384	건강한 것에서 하향	NE	0.001377
Tgfr3	ENSMUSG000000029287	1.883866476	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.000408545	2.746599332	NE	0.553319278	1.228328585
Acta1	ENSMUSG000000031972	1.201617812	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.027389658	2.50770332	NE	0.822471304	1.118236611
Hist1h2bj	ENSMUSG000000069300	1.79373615	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.07249982	1.935238841	NE	0.030887258	1.975095231
Gp2	ENSMUSG000000030954	0.806917328	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.070122494	1.870775326	NE	0.208403405	1.534911637
Ddit4	ENSMUSG000000020108	3.745786556	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.070340591	1.576061582	NE	0.861431628	1.1065799056
Hist1h2bn	ENSMUSG000000095217	3.070162335	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.08015986	1.565406563	NE	0.000151693	2.272909018
Ror2	ENSMUSG000000021464	2.322930094	CMA에서 하향	CMA에서 하향	0.034226688	1.545471585	NE	0.786E-05	2.677348863
NE: 평가 불가; 비교 "CMA vs GF" 또는 "건강한 것 vs GF" 중의 어느 하나에서 필터링 기준과 부합하지 않을 때, 변화의 방향은 평가 불가이다.									
ND: 결정 불가; DEG가 비교 "CMA vs GF" 및 "건강한 것 vs GF" 둘 다에서 필터링 기준에 부합할 때, 보다 높은 P 값을 갖는 것은 컨플릭트(conflict)를 해결하기 위해서 결정되지 않는 것으로 재설정됨.									

표 5

[0115]

보충 표 5: CMA 및 건강한 마우스 회장 샘플 사이에서 차등적으로 풍부한 108개의 OTU

OTU	방향 변화	DS-FDR 거부	DS-FDR 시험 통계	DS-FDR 로 P 값(Raw Pvalues)	분류(Taxonomy)
349024	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.22217917	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
259772	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.044282455	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
828483	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.017799339	0.021978022	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium
262095	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.015344578	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
332718	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.012123767	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
360238	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.007986609	0.011988012	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
238205	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.00449814	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium; s_butyricum
359750	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.004188868	0.021978022	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium; s_perfringens
New.Refere nce OTU16	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.004114455	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_luteciae
309696	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.003306804	0.003996004	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
345540	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.003062398	0.000999001	k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Enterobacteriales; f_Enterobacteriaceae; g_ ; s_
586271	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.002603169	0.01998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_
356760	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.002063474	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
303809	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.001887759	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium; s_butyricum
327851	건강한 것 에서 상향	TRUE	-0.00174762	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_

New.ReferenceOTU18	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.001578146	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
291195	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.001382348	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
577710	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000950458	0.010989011	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_producta
292820	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000949102	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
573157	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000929379	0.011988012	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales
529116	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000921743	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium
579608	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000882353	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
289925	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000678999	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
177986	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000602909	0.028971029	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU64312	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000594549	0.003996004	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
967427	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000546212	0.001998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
237444	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000487754	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
328283	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000459212	0.003996004	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
145801	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.00045917	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
New.ReferenceOTU109	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000449108	0.026973027	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
592866	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000408332	0.017982018	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_
4313711	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.00035444	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_

New.ReferenceOTU26	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000337736	0.004995005	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
351020	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000324044	0.014985015	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium; s_neonatale
833731	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000280741	0.000999001	k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Enterobacteriales; f_Enterobacteriaceae; g_ ; s_
392887	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000260077	0.025974026	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_ ; s_
199301	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000256085	0.01998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_ ; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU98242	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000237095	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_ ; s_
255359	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.00020765	0.007992008	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU22852	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000197185	0.010989011	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
New.ReferenceOTU72	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.00018357	0.021978022	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
132041	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000168657	0.017982018	k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Actinobacteria; o_Bifidobacteriales; f_Bifidobacteriaceae; g_Bifidobacterium; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU102634	건강한 것에서 상향	TRUE	-0.000163884	0.022977023	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU48619	건강한 것에서 상향	TRUE	-7.42886E-05	0.014985015	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
New.CleanUp.ReferenceOTU92891	건강한 것에서 상향	TRUE	-7.35692E-05	0.022977023	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Streptococcus; s_
77514	CMA에서 상향	TRUE	0.000105274	0.028971029	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
560336	CMA에서 상향	TRUE	0.000118911	0.028971029	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides; s_
566434	CMA에서 상향	TRUE	0.000132797	0.016983017	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_ ; g_ ; s_
4352657	CMA에서 상향	TRUE	0.000145962	0.022977023	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_

367790	CMA에서 상향	TRUE	0.000158719	0.028971029	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
3768338	CMA에서 상향	TRUE	0.000171334	0.028971029	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
311587	CMA에서 상향	TRUE	0.000184786	0.007992008	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_ ; s_
273232	CMA에서 상향	TRUE	0.000198366	0.022977023	k_Bacteria; p_Verrucomicrobia; c_Verrucomicrobiae; o_Verrucomicrobiales; f_Verrucomicrobiaceae; g_Akkermansia; s_muciniphila
804526	CMA에서 상향	TRUE	0.000198943	0.021978022	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Coproccoccus; s_
331850	CMA에서 상향	TRUE	0.000211798	0.022977023	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
4434334	CMA에서 상향	TRUE	0.000236036	0.003996004	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_ ; s_
4422039	CMA에서 상향	TRUE	0.000259764	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae
343047	CMA에서 상향	TRUE	0.000280211	0.00999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Dorea; s_
295085	CMA에서 상향	TRUE	0.000318338	0.021978022	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
195061	CMA에서 상향	TRUE	0.000318762	0.011988012	k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Adlercreutzia; s_
362539	CMA에서 상향	TRUE	0.000376855	0.015984016	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_ ; s_
New.CleanUp.Referenc eOTU35999	CMA에서 상향	TRUE	0.000385001	0.026973027	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum
587933	CMA에서 상향	TRUE	0.000403677	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_Coprobacillus; s_
3002161	CMA에서 상향	TRUE	0.000470934	0.01998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum
3715618	CMA에서 상향	TRUE	0.000529033	0.008991009	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_gnavus

591635	CMA에서 상향	TRUE	0.000561008	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_Ruminococcus; s_
249142	CMA에서 상향	TRUE	0.000585252	0.027972028	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_
634449	CMA에서 상향	TRUE	0.000585747	0.018981019	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_; s_
318190	CMA에서 상향	TRUE	0.000620436	0.00999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_; s_
548587	CMA에서 상향	TRUE	0.000660208	0.014985015	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum
New.ReferenceOTU4	CMA에서 상향	TRUE	0.000693503	0.013986014	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_gnavus
New.CleanUp.ReferenceOTU11241	CMA에서 상향	TRUE	0.000784602	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum
535955	CMA에서 상향	TRUE	0.000789934	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Peptostreptococcaceae; g_; s_
551902	CMA에서 상향	TRUE	0.000807109	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_; s_
535601	CMA에서 상향	TRUE	0.000857422	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_; s_
269611	CMA에서 상향	TRUE	0.000862436	0.016983017	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Ruminococcaceae; g_; s_
175508	CMA에서 상향	TRUE	0.000942059	0.005994006	k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_; s_
585914	CMA에서 상향	TRUE	0.001135819	0.014985015	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Porphyromonadaceae; g_Parabacteroides; s_distasonis
587530	CMA에서 상향	TRUE	0.001147768	0.004995005	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum
659361	CMA에서 상향	TRUE	0.001476101	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Dorea; s_
New.ReferenceOTU85	CMA에서 상향	TRUE	0.001499115	0.010989011	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Dorea; s_
193744	CMA에서 상향	TRUE	0.001689778	0.017982018	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_

583656	CMA에서 상향	TRUE	0.001702377	0.014985015	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
631764	CMA에서 상향	TRUE	0.001846097	0.002997003	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Coriobacteriia; o__Coriobacteriales; f__Coriobacteriaceae; g__Adlercreutzia; s__
564188	CMA에서 상향	TRUE	0.001945213	0.001998002	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Dorea; s__
531675	CMA에서 상향	TRUE	0.001946525	0.022977023	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Blautia; s__
New.Refere nceOTU35	CMA에서 상향	TRUE	0.002345204	0.024975025	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__; s__
572860	CMA에서 상향	TRUE	0.002838657	0.001998002	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
362342	CMA에서 상향	TRUE	0.00291165	0.02997003	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Ruminococcus; s__
929836	CMA에서 상향	TRUE	0.003147941	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__Coprobacillus; s__
1111191	CMA에서 상향	TRUE	0.003451219	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__gnavus
535375	CMA에서 상향	TRUE	0.003453613	0.008991009	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Bacteroidaceae; g__Bacteroides; s__
551822	CMA에서 상향	TRUE	0.004090919	0.005994006	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae
368486	CMA에서 상향	TRUE	0.004218387	0.003996004	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__[Eubacterium]; s__dolichum
583398	CMA에서 상향	TRUE	0.00561987	0.000999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__[Ruminococcus]; s__
New.Refere nceOTU166	CMA에서 상향	TRUE	0.006055017	0.024975025	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae
367213	CMA에서 상향	TRUE	0.006097534	0.022977023	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__; s__
546876	CMA에서 상향	TRUE	0.009753471	0.022977023	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Blautia; s__
369763	CMA에서 상향	TRUE	0.010722879	0.00999001	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Erysipelotrichi; o__Erysipelotrichales; f__Erysipelotrichaceae; g__Coprobacillus; s__

829337	CMA에서 상향	TRUE	0.011237604	0.011988012	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_Coprobacillus; s_
592616	CMA에서 상향	TRUE	0.013715698	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_ ; s_
582691	CMA에서 상향	TRUE	0.01557264	0.002997003	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_ ; s_
628226	CMA에서 상향	TRUE	0.024223372	0.004995005	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_ ; s_
1078587	CMA에서 상향	TRUE	0.032792882	0.015984016	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
370183	CMA에서 상향	TRUE	0.044102787	0.01998002	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_Blautia; s_
363731	CMA에서 상향	TRUE	0.055865924	0.025974026	k_Bacteria; p_Verrucomicrobia; c_Verrucomicrobiae; o_Verrucomicrobiales; f_Verrucomicrobiaceae; g_Akkermansia; s_muciniphila
360015	CMA에서 상향	TRUE	0.07274586	0.022977023	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Lachnospiraceae; g_[Ruminococcus]; s_gnavus
579851	CMA에서 상향	TRUE	0.082564668	0.000999001	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Erysipelotrichi; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_[Eubacterium]; s_dolichum

표 6

보충 표 6: *Anaerostipes caccae* 의 qPCR 분석에 대한 프라이머 서열

Anaerostipes caccae	F	GTTCGATGGATTTCCTATAT (SEQ ID NO:1)	Ref 24.
	R	CTTTCACACTGAATCATGCGATT (SEQ ID NO:2)	

[0116]

표 7

보충 표 4f에서의 qPCR 분석에 사용된 프라이머 서열

Hprt	F	TGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (SEQ ID NO:3)	Ref. 50.
	R	AGCAAGCTTGCAACCTTAACCA (SEQ ID NO:4)	
Fbp1	F	CCATCATAATCGAACCTGAG (SEQ ID NO:5)	Ref. 51.
	R	CTTCTCAGAAGGCTCATCAG (SEQ ID NO:6)	
Tgfb3	F	CCGGTGTGAACTGTCACCGATC (SEQ ID NO:7)	Modified from Ref. 52.
	R	CCTGATGAAAAGTGGACCACAG (SEQ ID NO:8)	
Ror2	F	ATCGACACCTTGGGACAACC (SEQ ID NO:9)	Ref. 20.
	R	AGTGCAGGATTGCCGTCTG (SEQ ID NO:10)	
Acot12	F	CCGTGGCACTAAGGTCAGTT (SEQ ID NO:11)	Ref. 53.
	R	ACGTTACGGTGACGAATTG (SEQ ID NO:12)	
Me1	F	AGTATCCATGAACAAAGGGCAC (SEQ ID NO:13)	Ref. 54.
	R	ATCCCATACAGCCAAGGTC (SEQ ID NO:14)	

[0117]

[0118] 실시예 2: 분리 및 특성화, 체외 발효, 초기 체내 실험 설계

[0119] *A. A. caccae* 분리 및 특성화

[0120] *A. caccae*를 30% 글리세롤 스톱에 냉동된 건강한 영아 분변에서 분리한다. 먼저, 건강한 공여체 #2의 희석되지 않은 분변 글리세롤 스톱은 비타민 K, 헤민(hemin) 및 항생제가 보충된 뇌 심장 추출액(brain heart infusion; BHI) 한천 위에서 플레이팅(plating)된다. 사용된 항생제는 16 µg/ml의 시프로플록사신(ciprofloxacin) 또는 16 µg/ml의 시프로플록사신, 6 µg/ml의 겐타마이신(gentamicin), 5 µg/ml의 아즈트레오남(aztreonam), 및 10 µg/ml의 콜리스틴(colistin)의 혼합물이다(58, 60). 이러한 공여체는 종래 시퀀싱 데이터에서 4명의 건강한 공여체 중의 *A. caccae*의 상대적 풍부도가 가장 높기 때문에 선택되었다. 플레이트는 6일 동안 37°C의 혐기성 챔버에서 배양된다. 그런 다음 플레이트를 스크래핑(scraping)하여 50% 글리세롤 용액 중에 현탁시킨다. 그런 다음 상기 현탁액을 분취하고(aliquoted) 분취액 중의 하나는 qPCR에 사용하고 다른 하나는 향후 배양에 사용하기 위해 -80°C에서 냉동시킨다. *A. caccae* 풍부도는 16S rRNA 유전자에 대한 종-특이적 프라이머와 함께 qPCR을 사용하여 정량화한다(24). *A. caccae*가 가장 많이 함유된 것으로 나타난 플레이트(들)의 동결된 부분 표본을 희석하고 BHI 한천 위에서 플레이팅하고 37°C에서 6일 동안 혐기성 챔버에서 배양시킨다. 이어서 단일 집락이 10^{-5} 희석액으로부터 선택되고 예비-감소된 초핑된 고기(pre-reduced chopped meat) 및 포도당 옥수(CMG)에 접종하고 혐기성 챔버에서 밤새 배양시킨다. 이어서 이러한 브로쓰 배양물의 분취량을 *A. caccae* 특이적 PCR 및 Sanger 시퀀싱을 위한 범용 PCR 16S rRNA 증폭을 위해 취한다. 또다른 분취량을 취하고 50% 글리세롤 용액으로 1:1로 희석하고 저온에서 -80°C에서 냉동시킨다. PCR 및 상거 시퀀싱(Sanger sequencing) 둘 다에 의해 *A. caccae*에 양성인 콜로니는 순도를 높이기 위해 냉동된 저온 유리병(cryovial)에서 BHI 한천 위에서 스트리킹된다. 이 플레이트의 단일 콜로니를 초핑된 고기 + 포도당 옥수에 접종하고 혐기성 챔버에서 37°C에서 밤새 성장시킨다. 상기 스톱 배양액의 분취량은 50% 글리세롤에서 1:1로 희석되고 향후 연구를 위해 -80°C에서 저온 유리병에 저장된다. 이러한 분리는 도 15에 도시된다.

[0121] *A. caccae* 분리의 추가 확인은 CosmosID® 전체 게놈 분석에 의해 분석된다. 도 15에 도시된 방법은 7개의 *A. caccae* 분리주를 생성하였으며, 이들 모두는 건강한 공여체 #2로부터 유래되었다. 상거 시퀀싱(Sanger sequencing)(66a_Rep_1_1_IonXpress_011_trimmed, D24_colony_4_2_IonXpress_015, D24_colony_5_IonXpress_016을 보여줌)에 의해 서로 가장 다른 것으로 보이는 3개의 콜로니는 전체 게놈 염기서열을 분석하였다. 분석된 3개의 콜로니는 모두 *A. caccae* 3_2_56FAA 및 *A. caccae* DSM 14662와 매우 유사하지만 이들 알려진 레퍼런스에서 고유한 균주이다. *A. caccae*(>98.5%) 상동성으로 분류되는 컷오프 상동성 내에 있지만 SNP 거리(>100 SNP)는 우리 분리주가 참조 균주 3_2_56FAA 및 DSM 14662의 고유 균주임을 식별한다. 그러나 우리의 모든 분리주는 서로 동일하므로 (0개의 SNP)가 균주를 *A. caccae* *lah*라고 지칭된다. CosmosID®에 의한 전체 게놈 분석은 또한 분리물에 독성 유전자가 없음을 확인하였으며 기록된 유일한 항생제 내성 유전자는 테트라 사이클린 클래스에 대한 것이다. 이는 하기 표에 자세히 설명되어 있다:

Anarostipes caccae DSM 14662 DSM 14662	Anarostipes caccae DSM 14662 DSM 14662	0	149	124	124	124	31351	31326	31378	31363
	Anarostipes caccae 3-2_56FAA	149	0	101	101	101	31365	31340	31392	31377
	D24_colony_4_2_lonXpress_015	124	101	0	0	0	31340	31315	31367	31352
	D24_colony_5_lonXpress_016	124	101	0	0	0	31340	31315	31367	31352
	66a_Rep_1_lonXpress_011_trimmed	124	101	0	0	0	31340	31315	31367	31352
	Anarostipes hadrus 278951D7560868	31351	31365	31340	31340	31340	0	140	192	177
	Anarostipes hadrus DSM 3319 DSM 3319	31326	31340	31315	31315	31315	140	0	124	109
	Anarostipes hadrus PEL 85	31378	31392	31367	31367	31367	192	124	0	126
	Anarostipes hadrus 8PB5	31363	31377	31352	31352	31352	177	109	126	0

*A. caccae_lah*의 항생제 감수성은 항생제 디스크 주변의 성장 억제를 특징으로 한다. 냉동된 *A. caccae_lah* 스탁의 아이스 칩을 CMG 브로쓰에서 밤새 배양하고 100 μ l의 브로쓰를 BHI 한천 위에 스프레드(spread)한다. 항생제 디스크(스트렙토마이신 10 μ g, 카나마이신 30 μ g, 테트라사이클린 30 μ g 및 암피실린 10 μ g)를 한천 위에 놓고 항생제 감수성(antibiotic susceptibility)을 나타내는 클리어런스 영역을 측정한다. 플레이트는 6일 동안 혐기성 조건에서 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션된다. *A. caccae_lah*는 큰 반경의 클리어런스(clearance)에 의해서 나타낸 암피실린(ampicillin)에 매우 민감하다(도 16). 또한 테트라사이클린 내성 유전자를 가지고 있음에도 불구하고 테트라사이클린에 다소 민감하다(도 16).

B. 생체외 발효

*A. caccae_1ah*는 단일 배양에서 복합 탄수화물을 발효시킬 수 없지만 락토오스를 포함한 영양용 분유와 같은 간단한 당(simple sugar)을 발효시킬 수 있다. *A. caccae_1ah* 스톱의 얼음-칩(ice-chip)을 혐기성 조건에서 37 °C의 CMG 브로쓰에서 24시간 동안 배양하였다. 이러한 예비배양(preculture) 방법은 미래의 모든 생체외 발효 실험에 사용된다. 이어서 10µl의 예비배양물을 7mL의 최소 펩톤 효모(peptone yeast; PY) 브로쓰 단독으로 옮기거나 10mg/ml의 포도당, 수크로오스, 락토오스, 셀로바이오스(cellobiose) 또는 감자 전분으로 보충하였다. 이러한 PY의 모든 변형은 아나로브 시스템(Anaerobe System)에 의해 예비-감소된 혐기성으로 준비되었다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. *A. caccae_1ah*는 OD600으로 측정된 셀로바이오스 또는 감자 전분에 비해 PY 브로쓰에 자당, 포도당 및 락토오스를 보충했을 때 풍부하게 성장하였다. 용액 중의 부티레이트는 레퍼런스 61 및 62에 설명된 대로 HPLC-UV-Vis로 정량화된다. 성장과 유사하게, *A. caccae_1ah*는 자당, 포도당 또는 락토오스에서 성장할 때 가장 많은 부티레이트를 생성하였다. 이러한 간단한 당은 영양용 분유에서 발견되는 것과 유사하다. *A. caccae_1ah*의 풍부도 및 영양용 분유의 부티레이트 생성을 시험하기 위해서, *A. caccae_1ah*는 CMA를 갖는 영아를 위해 고안된 철분 강화된 저 알레르기 분유인 Nutramigen® (10mg/ml 탄수화물)

물), 또는 우유(cow's milk)를 함유하는 표준 영양용 분유인 Enfamil[®] (10mg/ml 카보하이드레이트)이 보충된 PY 브로쓰에서 배양되었다. 이들은 건강한 (Enfamil) 및 CMA (Nutramigen) 영아 공여체가 소비하는 것과 동일한 분유이며 이러한 각각의 미생물 군집으로 집락된 모든 마우스에서도 소비된다. *A. caccae_lah*는 풍부도는 Enfamil 또는 Nutramigen을 PY 브로쓰로 배양했을 때 유사했으며, 이것은 *A. caccae_lah*가 성장을 위해 우유 소비에 의존하지 않는다는 것을 입증한다. 그러나 부티레이트 생성은 PY 브로쓰 단독에 비해 Nutramigen에서 가장 높았다. Nutramigen의 대부분의 당은 프룩토오스 및 수크로오스를 함유하는 옥수수 시럽으로, 수크로오스만 보충했을 때 *A. caccae_lah*의 높은 부티레이트 생성을 반영한다. 모든 그룹은 원-웨이 ANOVA로 분석되었습니다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 대 PY. 이들 결과가 도 17에 도시된다.

[0126] *A. caccae_lah*는 락테이트 및 아세테이트를 함께 사용하여 부티레이트를 생성할 수 있다. *A. caccae* 및 다른 클로스트리디아(Clostridia)는 일반적으로 섬유 발효종으로 간주되지만 종래 데이터에서 볼 수 있듯이 *A. caccae_lah* 단독으로는 성장 또는 부티레이트 생성을 위해 복합체 섬유(complex fiber)를 소비 할 수 없습니다. 다른 그룹은 1차 분해 물질인 박테로이드 종(Bacteroides species)이 복합체 섬유질을 분해하고 클로스트리디아 종이 부티레이트를 생성하기 위해 소비할 수 있는 락테이트 및 아세테이트 대사 산물을 생성한다는 것을 보여주었다(59). 이러한 복합체 교차-공급이 생체외에서 모방될 수 있는지 여부를 조사하기 위해 PY 브로쓰에 *A. caccae_lah*의 부티레이트 생성을 자극하기 위해 이러한 대사 산물만을 보충한다. *A. caccae_lah* 예비배양은 위에서 설명한 대로 동결된 글리세롤 스톱에서 성장시킨 다음, 10 μ l 33mM의 아세테이트 및/또는 40mM 락테이트가 보충된 최소 PY 브로쓰로 이송하였다(57). 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. 도 18에 도시된 바와 같이, *A. caccae_lah*는 대사산물 중의 하나 또는 둘 다를 보충했을 때 상당한 성장을 나타냈다. 흥미롭게도, 이러한 군주는 단일 보충제에 비해 락테이트 및 아세테이트를 모두 보충했을 때 상당히 높은 수준의 부티레이트를 생성하였다. 이러한 데이터는 이러한 과(family)의 박테리아에 대한 다른 간행물에서 기술된 교차-공급 메커니즘 및 대사주기를 지원한다. 모든 그룹은 원 웨이 ANOVA에 의해서 분석되었다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 대 PY 단독.

[0127] 도 19에 도시된 바와 같이, *A. caccae_lah*는 알레르기성 (CMA) 유아 공여체로부터의 복합체 세균 혼합물과 공동 배양에서 복합체 탄수화물로부터 실질적으로 더 많은 부티레이트를 생성한다. *A. caccae_lah* 또는 인간 CMA 분변 샘플(인간 공여체 6으로부터의 냉동 글리세롤 스톱) 예비배양물을 위에서 기술한 바와 같이 성장시켰다. 이어서 총 10 μ l(10 μ l의 *A. caccae_lah*, 10 μ l의 CMA 또는 5 μ l의 *A. caccae_lah* + 5 μ l의 CMA)를 최소 PY 브로쓰 단독으로 이송하거나 10mg/ml의 감자 전분 또는 셀로바이오스(Anaerobe Systems)로 보충하였다. 성장 및 부티레이트 생성은 48시간 후에 측정되었다. *A. caccae_lah*는 단일 배양에서 3개의 배지 모두에서 유사하게 성장했으며 CMA 배양에서는 검출 한계 미만이었다. *A. caccae_lah*가 CMA 박테리아 믹스와 함께 배양되었을 때, 그것의 존재비는 qPCR에 의해 측정된 단일 배양 성장에서와 유사하거나 약간 더 높았다. 이것은 *A. caccae_lah*가 기질을 놓고 경쟁하고 복잡한 공-배양에서 니취(niche)를 설정할 수 있음을 보여준다. 앞서 살펴본 바와 같이, 단일 배양에서 *A. caccae_lah*는 탄수화물이 보충된 배지에서 성장했을 때 상당한 부티레이트를 생성할 수 없었다. 부티레이트 생성은 또한 PY 및 PY + 전분에서 CMA 배양만으로 최소화되었다. 그러나 공-배양은 *A. caccae_lah* 단독 또는 CMA 단독에 비해 탄수화물, 특히 전분을 보충할 때 훨씬 더 높은 수준의 부티레이트를 생성하였다. 감자 전분이 생체내에서 *A. caccae_lah*의 성장과 부티레이트 생성을 지원하는 좋은 프리바이오틱 보충제일 수 있다는 몇 가지 증거가 존재한다. 셀로바이오스를 보충했을 때, CMA와 공-배양은 *A. caccae_lah* 단독보다 더 많은 부티레이트를 생성하여 CMA 박테리아 혼합물에 섬유질 분해로 부티레이트를 생성할 수 있는 일부 종이 포함되어 있으며, *A. caccae_lah*의 첨가는 시스템에 추가 부티레이트를 기여하지 않음을 시사한다. 시스템에 추가 부티레이트. 따라서 셀로바이오스는 적절한 프리바이오틱 보충제가 아니다.

[0128] 본 발명자들은, 집락된 저장소 마우스(colonized repository mice)의 분변이 미래의 모든 CMA 마우스를 집락하는데 사용될 것이기 때문에 CMA-집락된 저장소 마우스의 분변으로부터의 박테리아 믹스가 인간 CMA 믹스와 유사하게 행동할지 여부를 결정하였다. 이전에 CMA 공여체 6에서 집락된 저장소 마우스의 분변 펠렛을 수집하고 멸균 PBS에서 균질화한 다음 50% 글리세롤 용액에 1:1로 희석하고 저온에서 -80℃에서 냉동시켰다. *A. caccae_lah*, 인간 CMA 미생물총(hCMA) 및 마우스 CMA 미생물총(msCMA)의 예비배양물을 위에서 기술한 바와 같이 제조하였다. 이어서 예비배양물을 보충제 단독(10ul), 함께 (5ul의 *A. caccae* + 5ul의 CMA) 또는 *A. caccae_lah*와 함께 또는 보충제없이 PY 브로쓰에 접종하고 24시간 후에 보충제를 첨가하였다. 보충제(뉴트라미젠(Nutramigen), 락테이트/아세테이트)를 앞서 설명한 것과 동일한 농도로 첨가하고 약 10mg/ml 밀기울(wheat bran)을 사용하였다. 성장 및 부티레이트 생성은 t=48h 또는 72h에서 측정되어 나중에 첨가된 그룹에서 *A. caccae*의 완전한 48시간 성장을 허용하였다. 예상대로 CMA 믹스에는 측정가능한 *A. caccae*가 없었다. CMA 저

장소 마우스 분변으로부터의 박테리아 믹스는 새로 해동된 인간 CMA 분변보다 베이스 라인에서 더 많은 부티레이트를 생성하지만, *A. caccae_lah*와 락테이트 및 아세테이트를 첨가하면 여전히 부티레이트 농도가 현저하게 증가한다(도 20). 마우스로 이동하는 동안 종의 손실, 시간이 지남에 따라 저장소 마우스에서 부티레이트 생성체(butyrate producer)의 풍부함 증가 또는 냉동 배양에 소요된 시간의 차이를 포함하여 두 CMA 소스 간의 차이에 기여할 수 있는 많은 요인이 있다. *A. caccae_lah*는 생체외에서 적은 풍부도로 접종하면 성장할 수 있다.

[0129]

이러한 일련의 실험에서, 발명자들은, *A. caccae*가 CMA-집락된 마우스에 도입될 때 훨씬 더 낮은 상대적 풍부도일 것이기 때문에, *A. caccae_lah*가 CMA 믹스보다 적은 풍부도로 접종될 때 여전히 공-배양에서 성장할 수 있는지를 결정하였다. 이 실험은 *A. caccae_lah*를 CMA-집락된 마우스에 동시 1:1 접종보다 더 정확하게 도입하는 현실을 반영하기 위해 수행되었다. *A. caccae_lah* 또는 CMA 예비-배양을 본원에 기술된 대로 수행한 다음, 10 μ l를 10mg/ml의 탄수화물(10mg/ml의 탄수화물 뉴트라미젠, 뉴트라미젠 + 10mg/ml scFOS(단쇄 프루토-올리고사카라이드, 임상적 프리바이오틱), 또는 뉴트라미젠 + LA(40mM 락테이트 + 33mM 아세테이트)가 보충된 최소 PY 브로스로 이송하였다. *A. caccae_lah* 및 CMA 예비배양물을 하기 다양한 비율로 보충된 PY 브로스 또는 CMG 브로스로 이송하였다: 10ul의 *A. caccae_lah* : 0ul의 CMA; 5ul의 *A. caccae_lah* : 5ul의 CMA; 3ul의 *A. caccae_lah* : 7ul의 CMA; 1ul의 *A. caccae_lah* : 9ul의 CMA. 종별 qPCR에서 알 수 있듯이, *A. caccae_lah*의 부피는 그의 팽창 또는 부티레이트 생성에 큰 영향을 미치지 않았다. scFOS의 첨가는 뉴트라미젠 단독 배지에 비해 총 부티레이트 농도를 감소시켰다. 락테이트 및 아세테이트의 첨가는 최고의 부티레이트 농도를 결과한다. 이 배지에서 부티레이트의 양은 *A. caccae_lah* 단독 배양에서 보다 공-배양에서 더 많으며, *A. caccae_lah* 단일 배양에서는 48시간에 배지에서 검출가능한 락테이트 또는 아세테이트가 존재하지 않는다. 이것은 배양된 CMA 종이 상기 시스템에 추가 락테이트 및 아세테이트를 기여하고 있으며, 이는 보충된 대사산물이 고갈된 후에도 *A. caccae_lah*에 의한 지속적인 부티레이트 생성을 허용할 수 있음을 시사한다.

[0130]

생체내 집락화 실험을 시작하기 전에, 건강한 저장소 마우스에서 *A. caccae*의 존재 및 CMA 저장소 마우스에서의 부재를 qPCR로 확인하고 측정하였다. 건강한 영아 공여체 2의 분변으로 집락된 저장소 마우스는 qPCR에 의해 측정 가능한 *A. caccae* 풍부함을 나타내는 반면, CMA 공여체 6의 분변으로 집락된 저장소 마우스는 그렇지 않았다. 본 발명자들은 프리바이오틱 보충제와 함께 *A. caccae_lah*를 CMA 집락된 마우스에 제공하면 종이 성장하고 숙주에서 니취를 확립할 수 있을 것이라고 예측한다. 이상적으로는, 본 발명자들은 *A. caccae_lah*를 투여하여 CMA 집락된 마우스에서 *A. caccae_lah*의 풍부함이 건강한 집락된 마우스에서 검출된 것과 유사한 수준에 도달하게 할 수 있을 것이다.

[0131]

C. 초기 생체 내 연구를 위한 실험 계획(도 21)

[0132]

이 실험에서, 본 발명자들은 *A. caccae_lah*의 CMA 집락된 마우스로의 집락화 및 그의 프리바이오틱 보충제에 대한 의존성을 검증하는 것을 목표로 한다. 무균(GF) C3H/HeN 무균 마우스는 이유시키고 뉴트라미젠을 먹인다. 동시에, 마우스 모델에서 CMA-미세 환경을 확립하기 위해 위내 위관 영양법(I.G.)에 의해 CMA 저장소 마우스(인간 공여체 6)의 분변 슬러리를 마우스에게 제공한다. CMA 미생물은 7일 동안 집락된다. 마우스는 상기 실험 전반에 걸쳐서 뉴트라미젠을 지속적으로 공급받는다. 추가 락테이트/아세테이트 또는 탄수화물 보충제와 함께 뉴트라미젠을 마우스에게 무제한으로 먹이면 *A. caccae*가 집락하는데 도움이 되는 충분한 연속 기질을 제공할 수 있다. 이유 후 7일째부터 마우스는 *A. caccae_lah* 및 프리바이오틱 또는 대조군 둘 다의 I.G. 위관 영양을 받는다. 마우스 코호트는 분변 수집 직후에 PBS(대조군) 100ul 또는 프리바이오틱 보충제(락테이트 10mg/ml + 아세테이트 10mg/ml 또는 감자 전분 10mg/ml)를 받는다. 30분 후, 마우스는 250ul의 살아있는 생물 치료제(LBP, 즉 약 1×10^6 CFU *A. caccae_lah*) 또는 글리세롤 중의 동일한 양의 멸균 CMG 브로스를 음성 대조군으로 받는다. 첫주 후에, LBP의 위관 영양이 중단되지만 프리바이오틱(또는 대조군)은 1주 동안 계속 투여된다. 이것은 더 많은 박테리아를 도입하지 않으면서 마우스에서 LBP(*A. caccae_lah*) 집단을 유지하기에 프리바이오틱의 투여가 충분한지 여부를 결정하기 위한 것이다. 이러한 2주 동안 매일 분변을 수집하여 qPCR에 의한 *A. caccae_lah*의 풍부도 및 HPLC UV-Vis에 의한 분변 부티레이트 농도를 분석한다. *A. caccae* 풍부도가 분변에서 검출되지 않는 42일 또는 첫번째 시점에 마우스를 희생시켰다. 희생 후, 맹장 부티레이트를 측정하고 유전자 Ror2, Fbp1, Tgfbr3, Acot1 및 Me1의 발현을 qPCR에 의해 회장 장 상피 세포(ileal intestinal epithelial cell; iIEC)에서 분석한다. 맹장 부티레이트(cecal butyrate)는 일반적으로 분변 부티레이트 보다 더 민감한 척도이며 결장에서 생성된 대부분의 부티레이트는 즉시 집락 세포에 의해 소비되기 때문에 *A. caccae_lah*에 의한 생체내에서 더 우수한 부티레이트 생성 척도일 수 있다. 이러한 특정 유전자는 면역학적으로 관련이 있고 건강한 마우스, CMA- 및 *A. caccae*-집락된 마우스간에 차별적으로 발현되는 것으로 나타났기 때문에 iIEC에서

분석을 위해 선택된다(도 4f 참조).

- [0133] 추가 실험으로서, 본 발명자들은 I.G 위관 영양에 의해서 마우스에 부티레이트 운반 화합물을 추가로 전달함으로써 *A. caccae*에 의해서 집락을 증강시키는 것을 겨냥할 수 있다. 부티레이트 운반 화합물의 예는 허브렐(Hubbell) 등의 공개된 PCT 출원 WO 2018/195067 A1에 기술되어 있다. 부티레이트 분배 중합체 pHPMA-b-pBMA의 80mg/mL의 용액을 제조하고 허브렐 등의 공개공보에 기술된 바와 같이 53.3 mg/mL로 희석시킨다. 상기 문헌의 단락 [129]에 직접 기술된 실험에서, 프리바이오틱 보충제를 투여받은 마우스의 코호트는 또한 상기 프리바이오틱 보충제를 받은 직후 I.G. 위장 영양에 의해서 125uL의 상기 희석된 부티레이트 분배 중합체 용액을 받는다. 나머지 실험은 위에서 기술된 바와 같이 수행된다.
- [0134] 본원에서 개시되고 청구된 방법들 모두는 본 개시의 견지에서 과도한 실험없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본원에 기재된 방법의 방법 및 단계 또는 단계의 순서에 변형이 적용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 관련된 특정 제제가 본원에 기재된 제제로 대체될 수 있는 반면, 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음이 명백 할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체 및 수정은 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.
- [0135] 레퍼런스(참고문헌)
- [0136] 하기 레퍼런스들은 이들 문헌이 본원에 기술된 것들에 보충적인 예시적인 절차적 또는 기타 세부 사항을 제공하는 범위 내에서 구체적으로 본원 명세서에 참고로 포함된다.
- [0137] 1. Sicherer, S.H., *et al.* Critical Issues in Food Allergy: A National Academies Consensus Report. *Pediatrics* (2017).
- [0138] 2. Iweala, O.I. & Burks, A.W. Food Allergy: Our Evolving Understanding of Its Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *Curr Allergy Asthma Rep* **16**, 37 (2016).
- [0139] 3. Wesemann, D.R. & Nagler, C.R. The Microbiome, Timing, and Barrier Function in the Context of Allergic Disease. *Immunity* **44**, 728-738 (2016).
- [0140] 4. Plunkett, C.H. & Nagler, C.R. The Influence of the Microbiome on Allergic Sensitization to Food. *J Immunol* **198**, 581-589 (2017).
- [0141] 5. Berni Canani, R., *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *Isme j* **10**, 742-750 (2016).
- [0142] 6. Bunyavanich, S., *et al.* Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 1122-1130 (2016).
- [0143] 7. Stefka, A.T., *et al.* Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13145-13150 (2014).
- [0144] 8. Dominguez-Bello, M.G., *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11971-11975 (2010).
- [0145] 9. Mueller, N.T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z. & Dominguez-Bello, M.G. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med* **21**, 109-117 (2015).
- [0146] 10. Blanton, L.V., *et al.* Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science* **351**(2016).
- [0147] 11. Cahenzli, J., Koller, Y., Wyss, M., Geuking, M.B. & McCoy, K.D. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* **14**, 559-570 (2013).
- [0148] 12. Pabst, O. & Mowat, A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* **5**, 232-239 (2012).
- [0149] 13. Honda, K. & Littman, D.R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75-84 (2016).

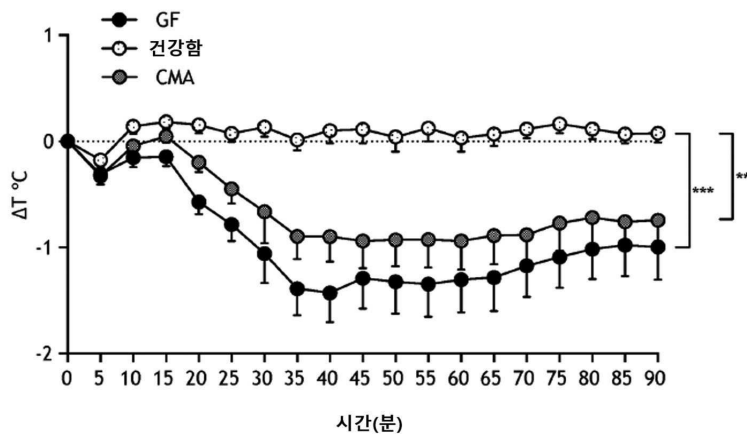
- [0150] 14. Thaïss, C.A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* **535**, 65-74 (2016).
- [0151] 15. Yanez, A.J., *et al.* Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol* **197**, 189-197 (2003).
- [0152] 16. Ostroukhova, M., *et al.* The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**, L300-307 (2012).
- [0153] 17. Zhu, Y., *et al.* NPM1 activates metabolic changes by inhibiting FBP1 while promoting the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **6**, 21443-21451 (2015).
- [0154] 18. Berger, C.N., *et al.* *Citrobacter rodentium* Subverts ATP Flux and Cholesterol Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells In Vivo. *Cell Metab* (2017).
- [0155] 19. Zhang, M., Zola, H., Read, L. & Penttila, I. Identification of soluble transforming growth factor-beta receptor III (sTbetaIII) in rat milk. *Immunol Cell Biol* **79**, 291-297 (2001).
- [0156] 20. Miyoshi, H., Ajima, R., Luo, C.T., Yamaguchi, T.P. & Stappenbeck, T.S. Wnt5a potentiates TGF-beta signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science* **338**, 108-113 (2012).
- [0157] 21. Planer, J.D., *et al.* Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* **534**, 263-266 (2016).
- [0158] 22. Schwiertz, A., *et al.* *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Systematic and applied microbiology* **25**, 46-51 (2002).
- [0159] 23. Duncan, S.H., Louis, P. & Flint, H.J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5810-5817 (2004).
- [0160] 24. Kurakawa, T., *et al.* Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. *PLoS One* **10**, e0126226 (2015).
- [0161] 25. Donohoe, D.R., *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* **13**, 517-526 (2011).
- [0162] 26. Byndloss, M.X., *et al.* Microbiota-activated PPAR-gamma signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* **357**, 570-575 (2017).
- [0163] 27. Donohoe, D.R., Wali, A., Brylawski, B.P. & Bultman, S.J. Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PLoS One* **7**, e46589 (2012).
- [0164] 28. Atarashi, K., *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**, 337-341 (2011).
- [0165] 29. Atarashi, K., *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232-236 (2013).
- [0166] 30. Furusawa, Y., *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-450 (2013).
- [0167] 31. Yano, J.M., *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **161**, 264-276 (2015).
- [0168] 32. Kim, Y.G., *et al.* Neonatal acquisition of *Clostridia* species protects against colonization by bacterial pathogens. *Science* **356**, 315-319 (2017).
- [0169] 33. Noval Rivas, M., *et al.* A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 201-212 (2013).

- [0170] 34. Caporaso, J.G., et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621-1624 (2012).
- [0171] 35. Caporaso, J.G., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335-336 (2010).
- [0172] 36. DeSantis, T.Z., et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72, 5069-5072 (2006).
- [0173] 37. Caporaso, J.G., et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266-267 (2010).
- [0174] 38. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461 (2010).
- [0175] 39. Oksanen, J., et al. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4.5. (2017).
- [0176] 40. Jiang, L., et al. Discrete False-Discovery Rate Improves Identification of Differentially Abundant Microbes. *mSystems* 2(2017).
- [0177] 41. Segata, N., et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology* 12, R60 (2011).
- [0178] 42. Bashir, M.E., Louie, S., Shi, H.N. & Nagler-Anderson, C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 172, 6978-6987 (2004).
- [0179] 43. Nik, A.M. & Carlsson, P. Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme. *Biotechniques* 55, 42-44 (2013).
- [0180] 44. Andrew, S. FastQC: A quality control application for high throughput sequence data. Babraham Institute Project page: on the world wide web at www.bioinformaticsbabraham.ac.uk/projects/fastqc (2016).
- [0181] 45. Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34, 525-527 (2016).
- [0182] 46. Soneson, C., Love, M.I. & Robinson, M.D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* 4, 1521 (2015).
- [0183] 47. Law, C.W., Chen, Y., Shi, W. & Smyth, G.K. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology* 15, R29 (2014).
- [0184] 48. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Statist. Soc. B* 57, 289-300 (1995).
- [0185] 49. Yu, G., Wang, L.G., Han, Y. & He, Q.Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16, 284-287 (2012).
- [0186] 50. Upadhyay, V., et al. Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity. *Nat Immunol* 13, 947-953 (2012).
- [0187] 51. Liu, X., et al. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene* 29, 442-450 (2010).
- [0188] 52. Roelen, B.A., Lin, H.Y., Knezevic, V., Freund, E. & Mummery, C.L. Expression of TGF-beta s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo. *Dev Biol* 166, 716-728 (1994).
- [0189] 53. Ellis, J.M., Bowman, C.E. & Wolfgang, M.J. Metabolic and tissue-specific regulation of acyl-CoA metabolism. *PLoS One* 10, e0116587 (2015).
- [0190] 54. Al-Dwairi, A., Pabona, J.M., Simmen, R.C. & Simmen, F.A. Cytosolic malic enzyme 1 (ME1) mediates high fat diet-induced adiposity, endocrine profile, and gastrointestinal tract proliferation-associated biomarkers in male mice. *PLoS One* 7, e46716 (2012).

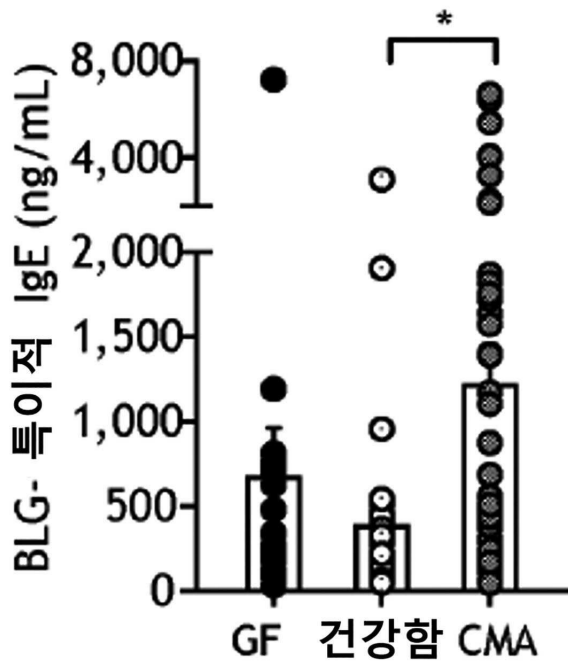
- [0191] 55. Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. Mixed-Effects in Models S and S-Plus, (Springer, New York, 2000).
- [0192] 56. Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Rune, H. & Christensen, B. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. Journal of Statistical Software 82, 1-26 (2017).
- [0193] 57. Moens, F., et al. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. Int J Food Microbiol 241: 225-236 (2017).
- [0194] 58. Rettedal, E. A., et al. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria. Nat Commun 5: 4714 (2014).
- [0195] 59. Riviere, A., et al. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. Front Microbiol 7: 979 (2016).
- [0196] 60. Surana, N. K. and D. L. Kasper Moving beyond microbiome-wide associations to causal microbe identification. Nature 552(7684): 244-247 (2017).
- [0197] 61. Torii, T., et al. Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability. Ann Clin Biochem 47(5): 447-452 (2010).
- [0198] 62. Tyagi, A. M., et al. The Microbial Metabolite Butyrate Stimulates Bone Formation via T Regulatory Cell-Mediated Regulation of WNT10B Expression. Immunity 49(6): 1116-1131 e1117 (2018).

도면

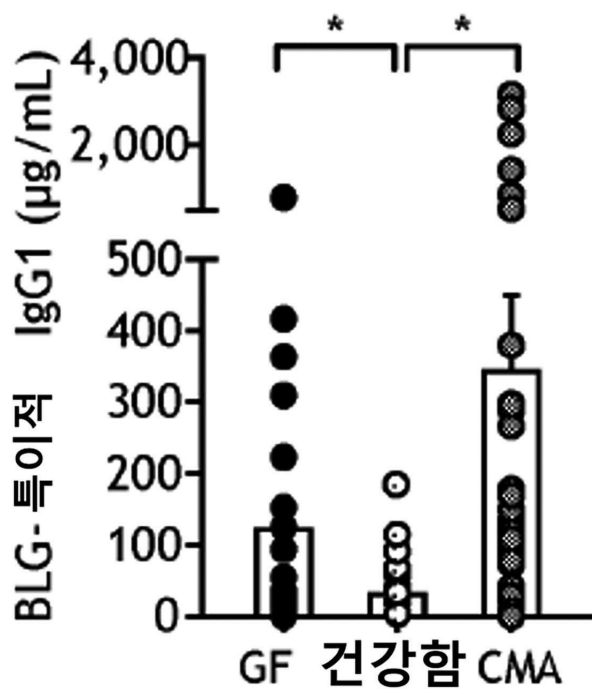
도면1a



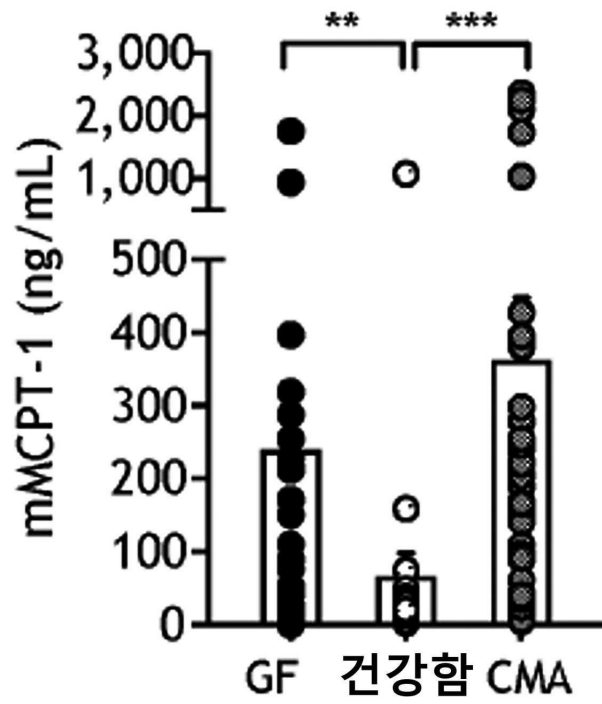
도면1b



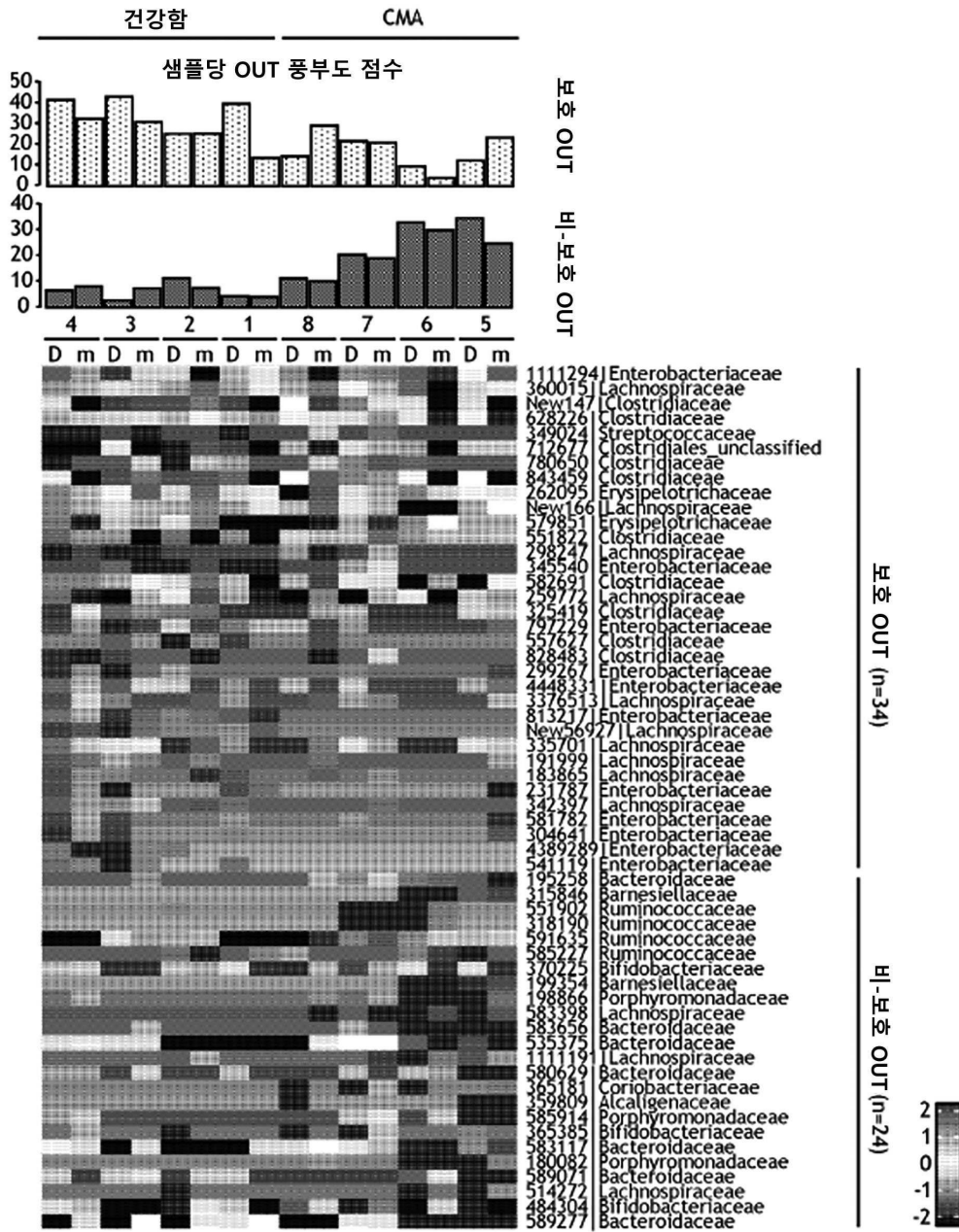
도면1c



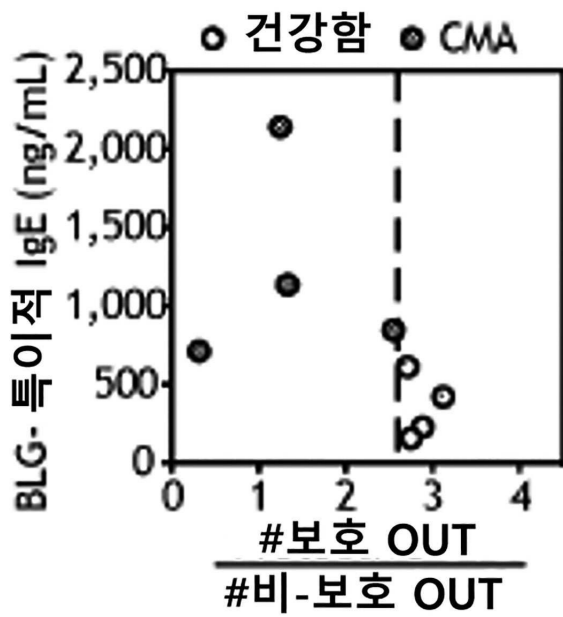
도면1d



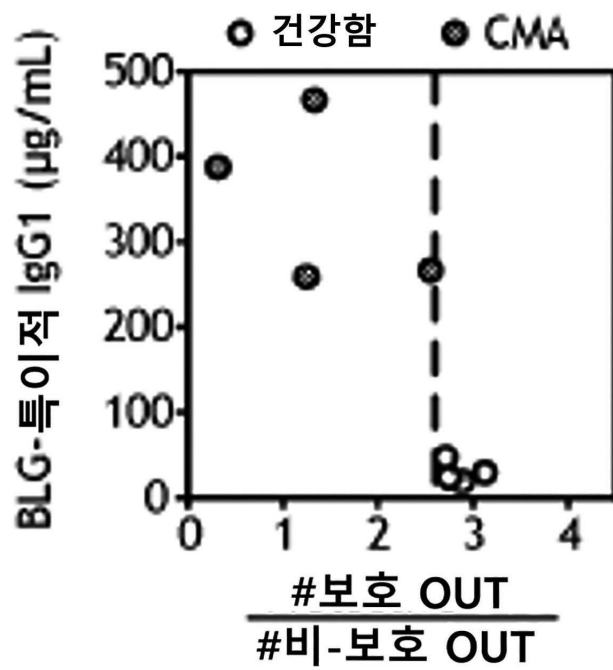
도면2a



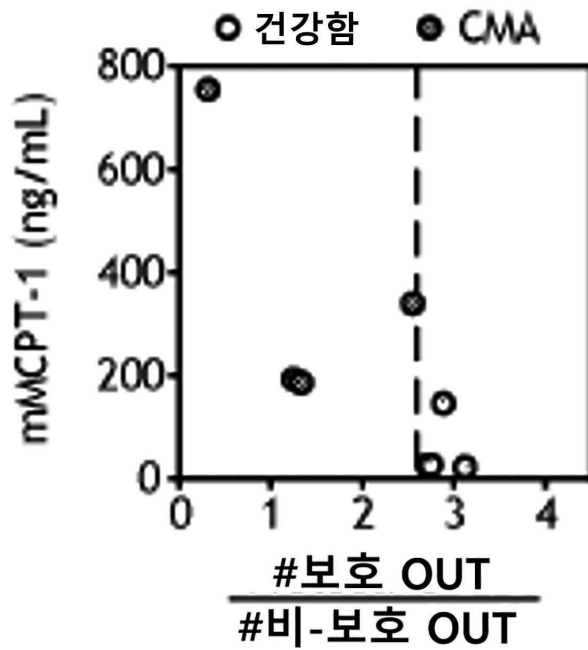
도면2b



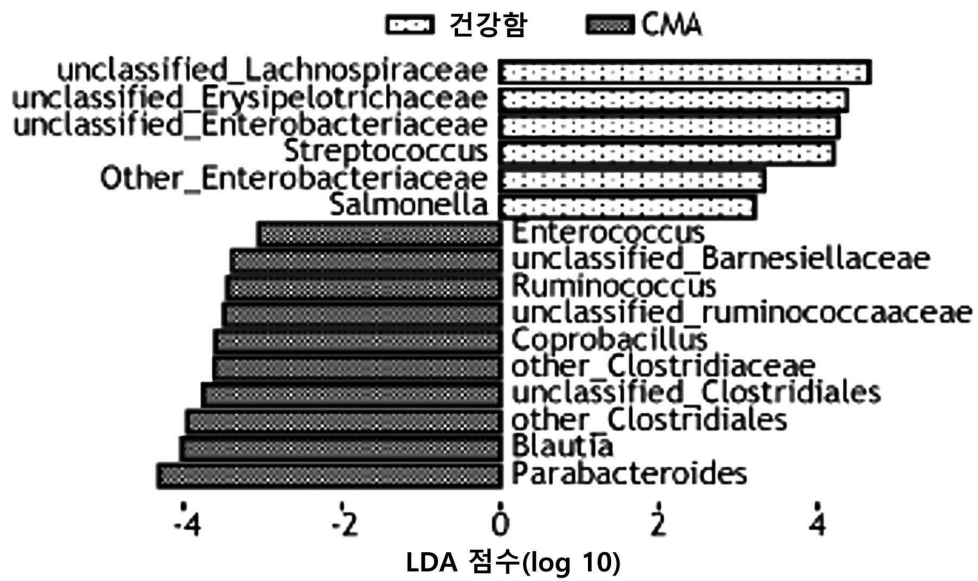
도면2c



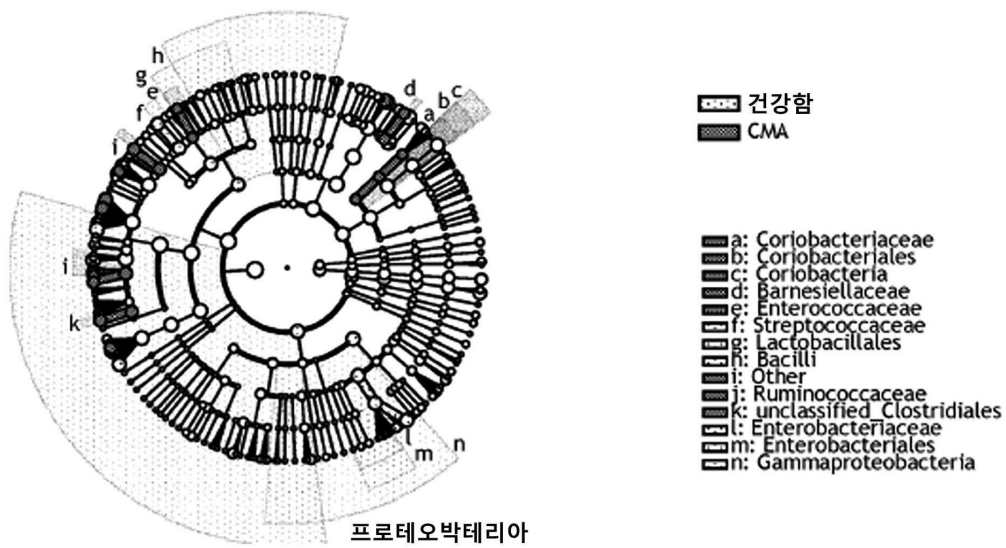
도면2d



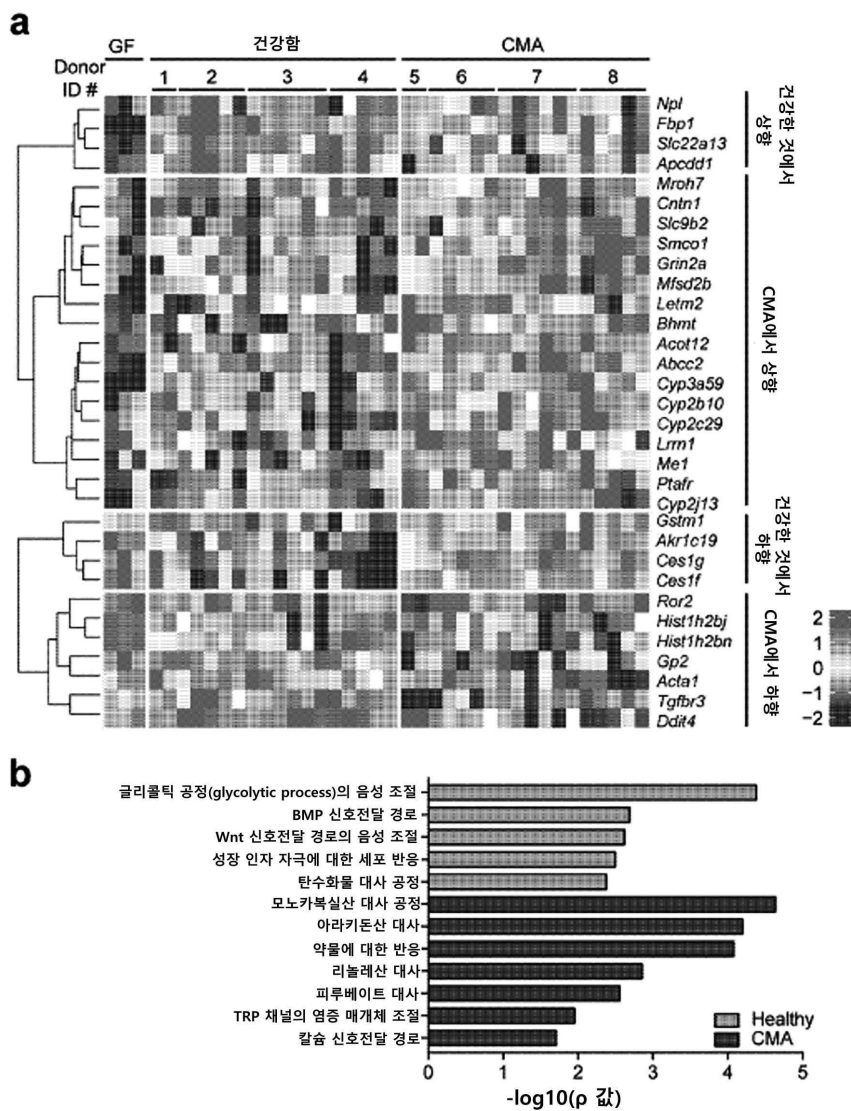
도면2e



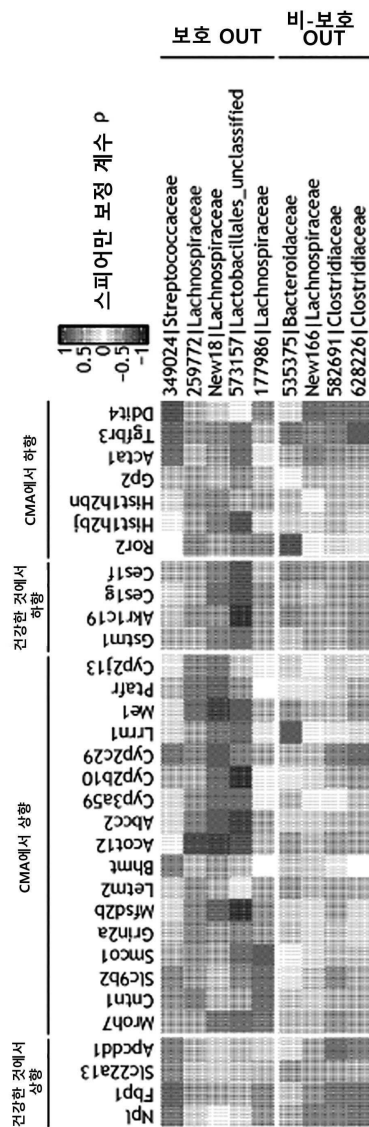
도면2f



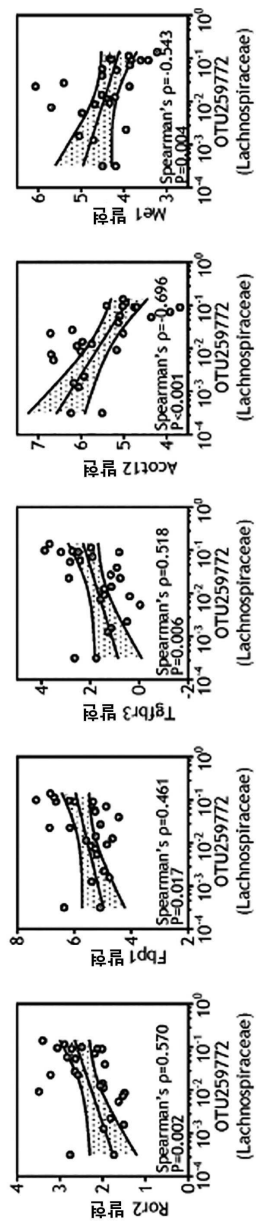
도면3



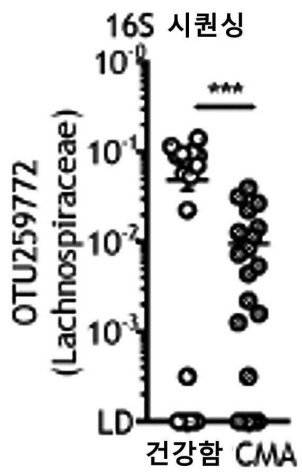
도면4a



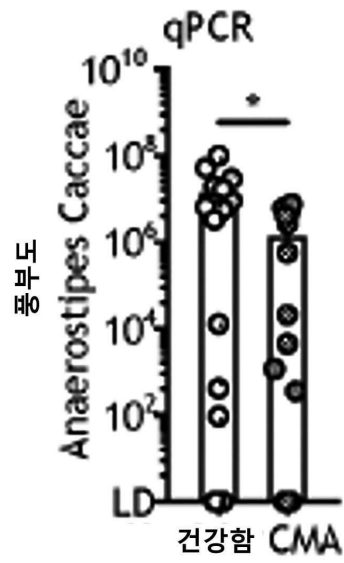
도면4b



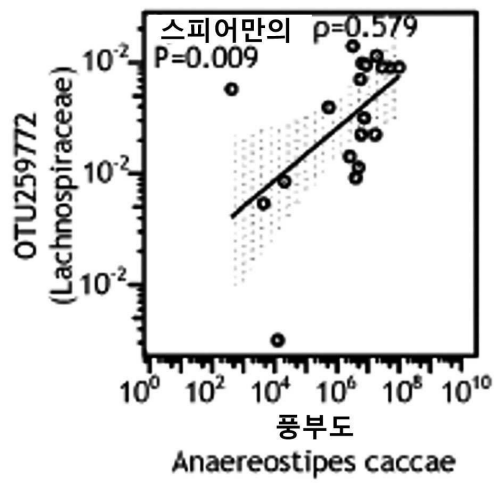
도면4c



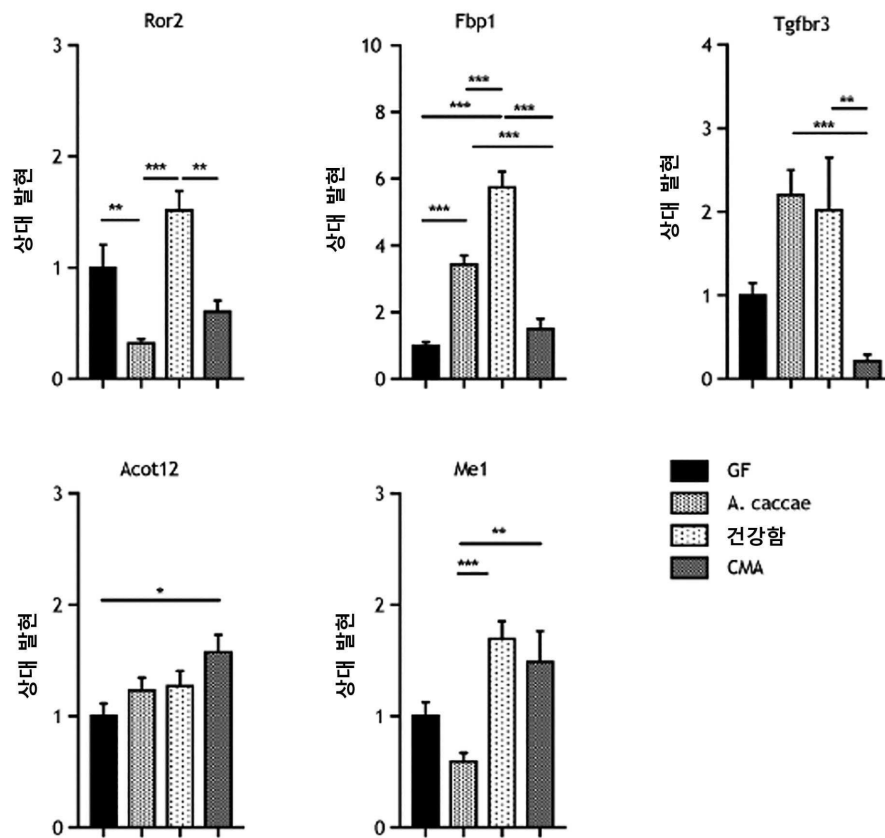
도면4d



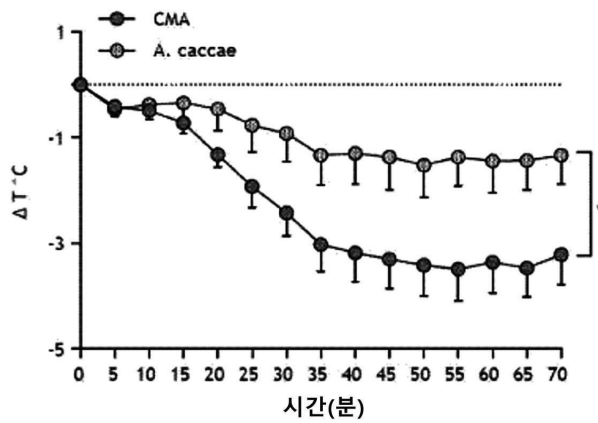
도면4e



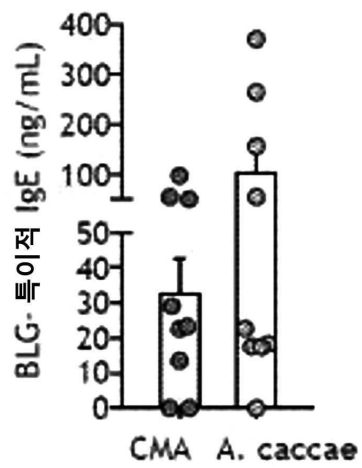
도면4f



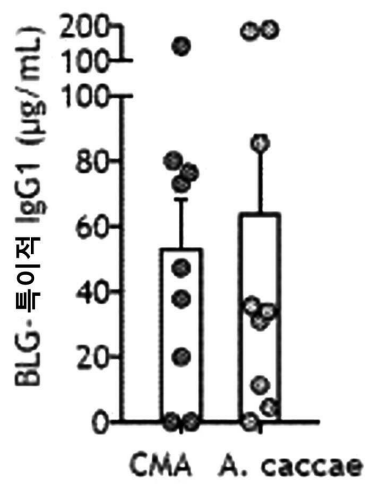
도면4g



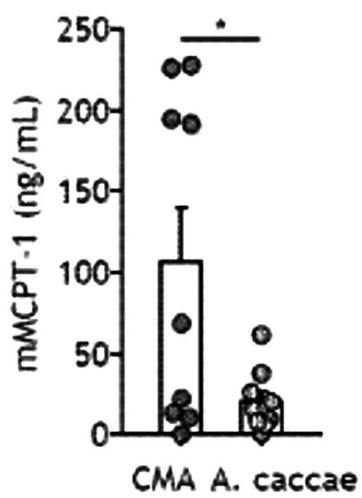
도면4h



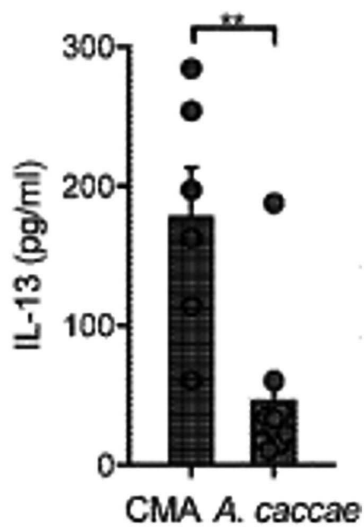
도면4i



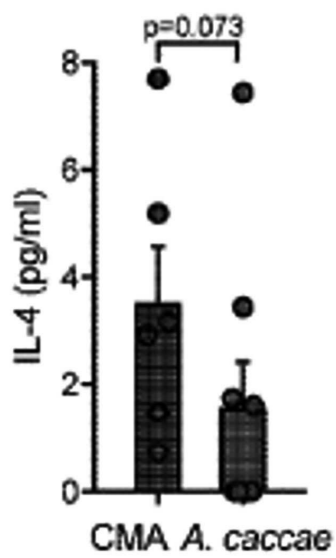
도면4j



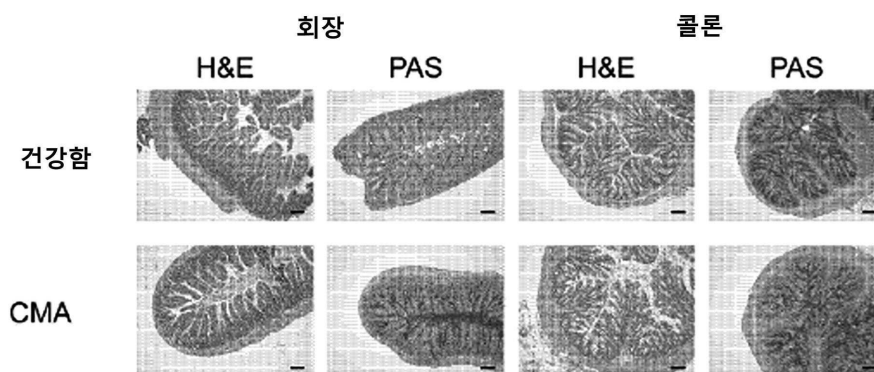
도면4k



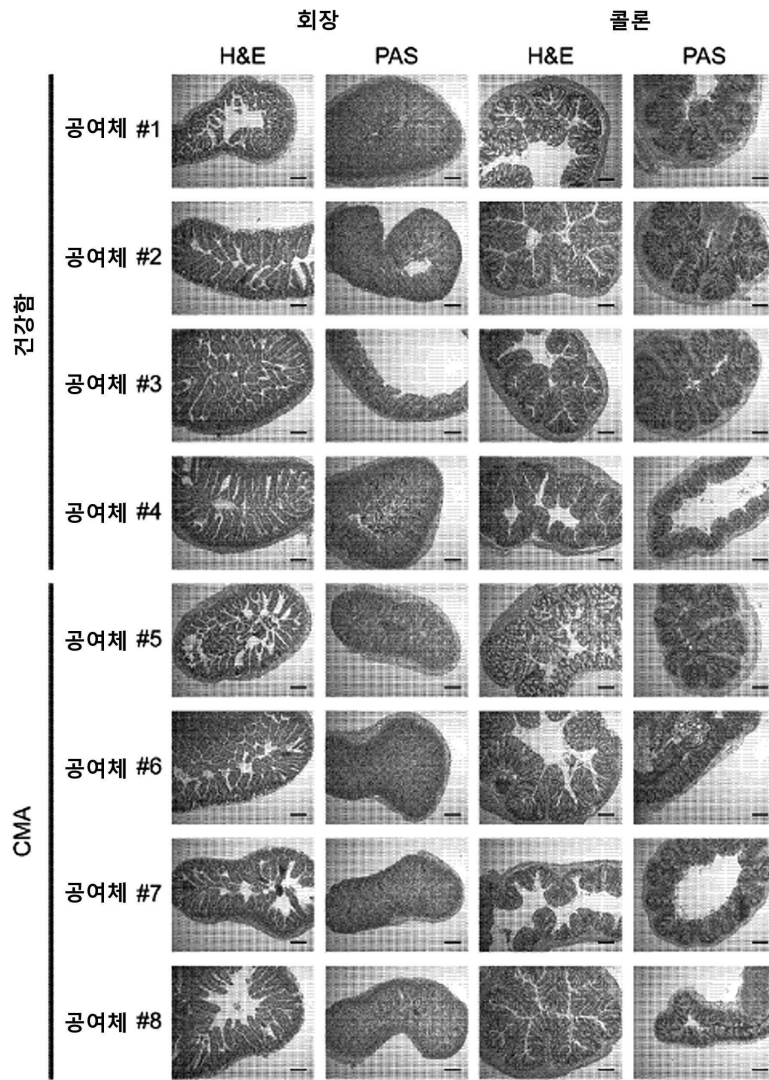
도면4l



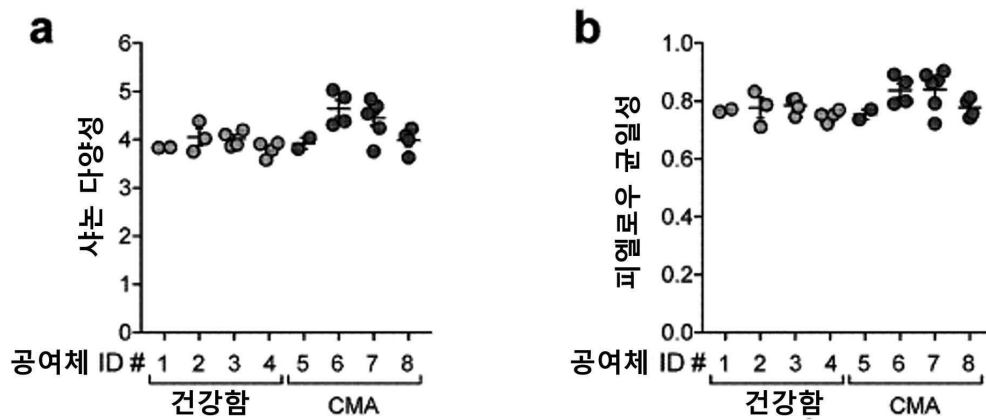
도면5



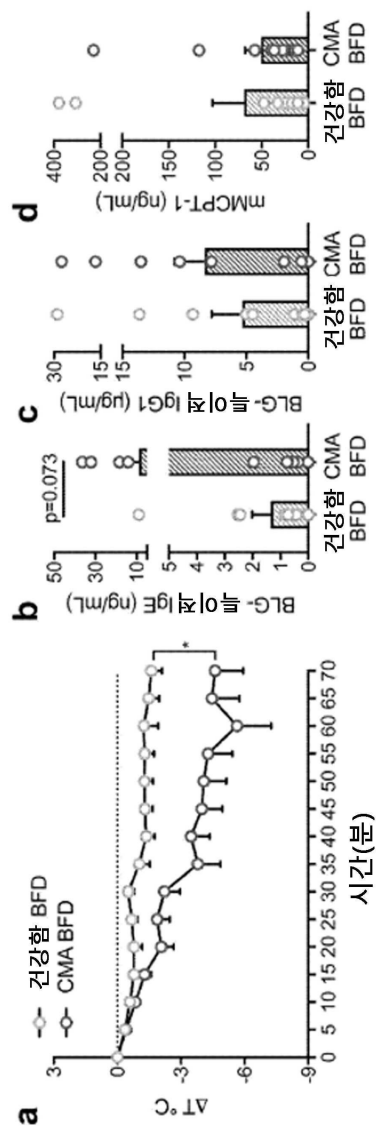
도면6



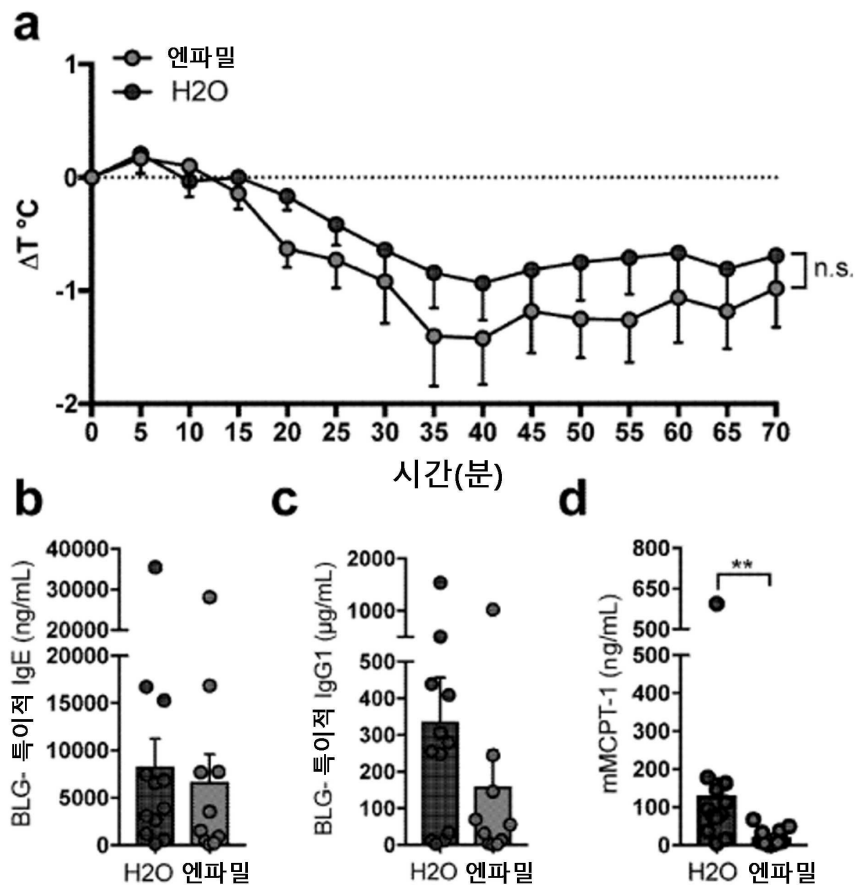
도면7



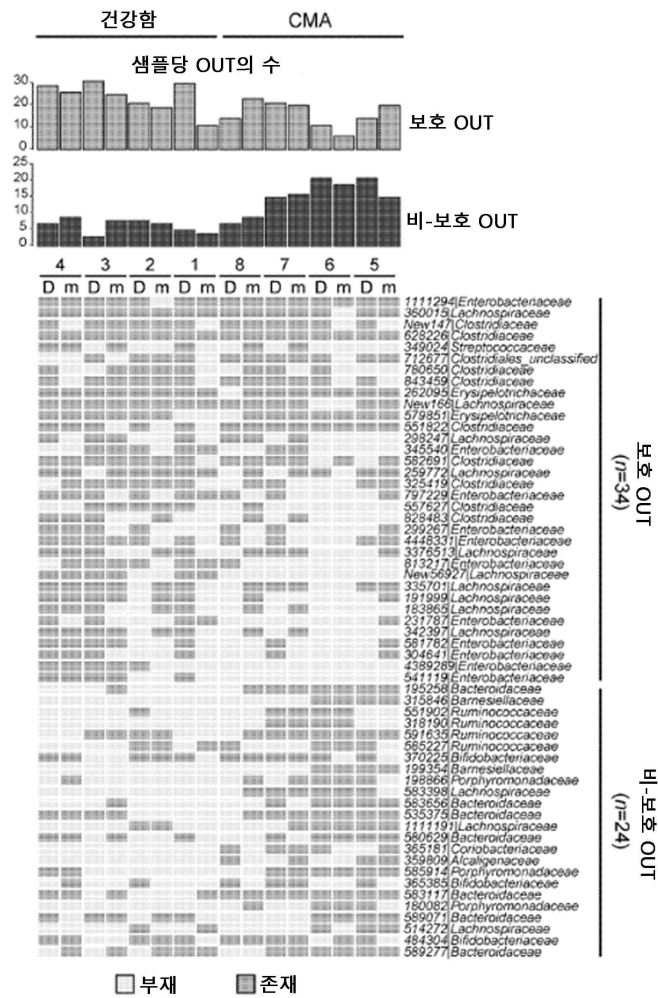
도면8



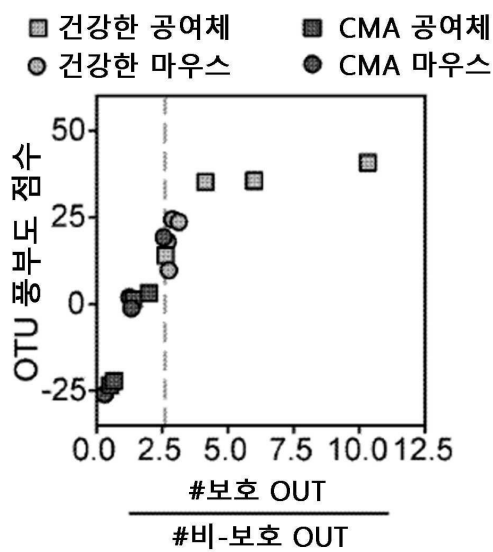
도면9



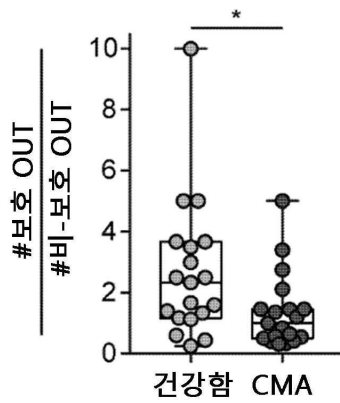
도면10a



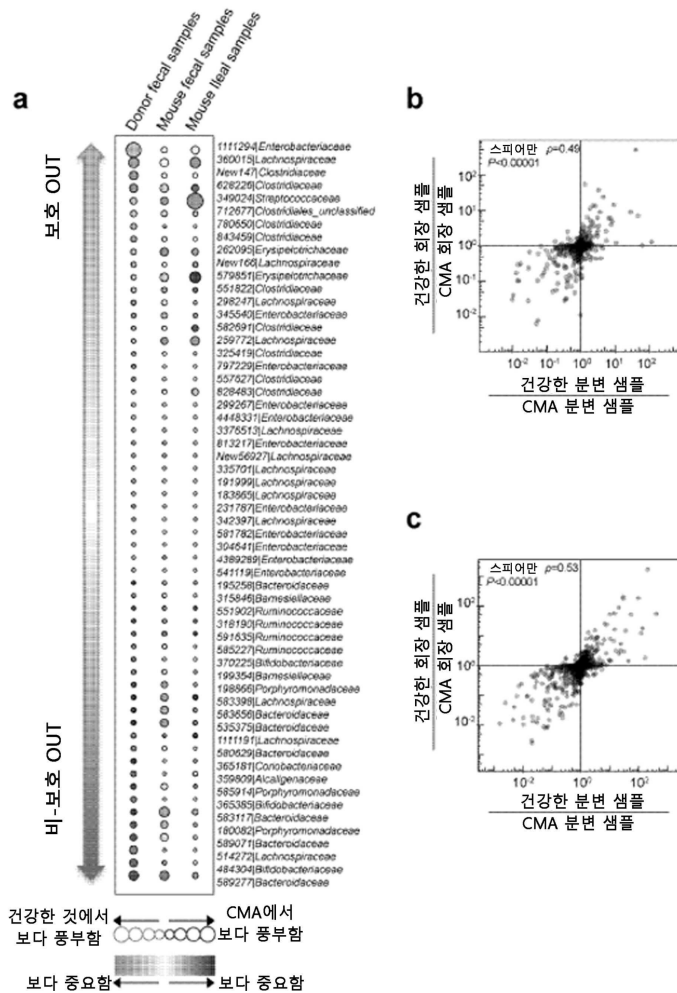
도면10b



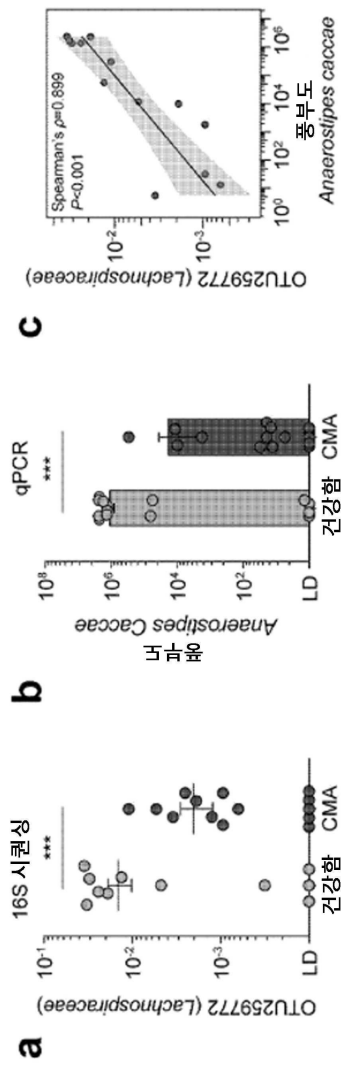
도면11



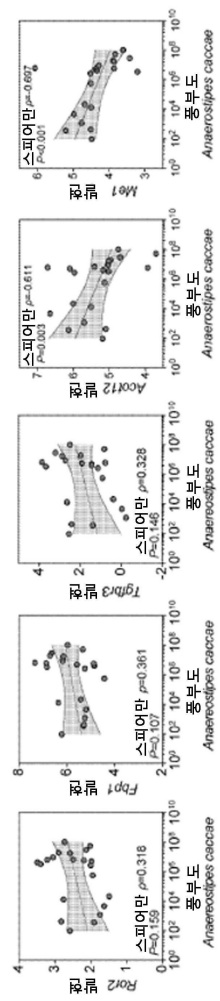
도면12



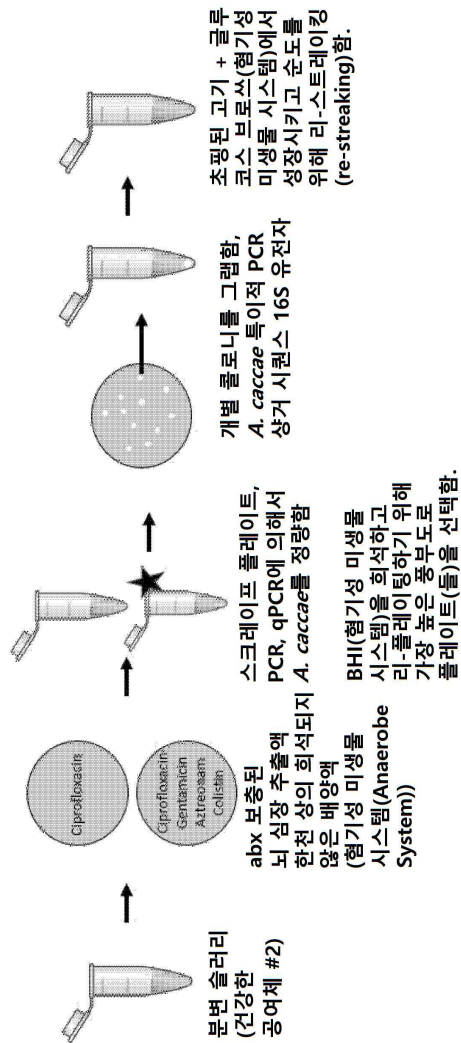
도면13



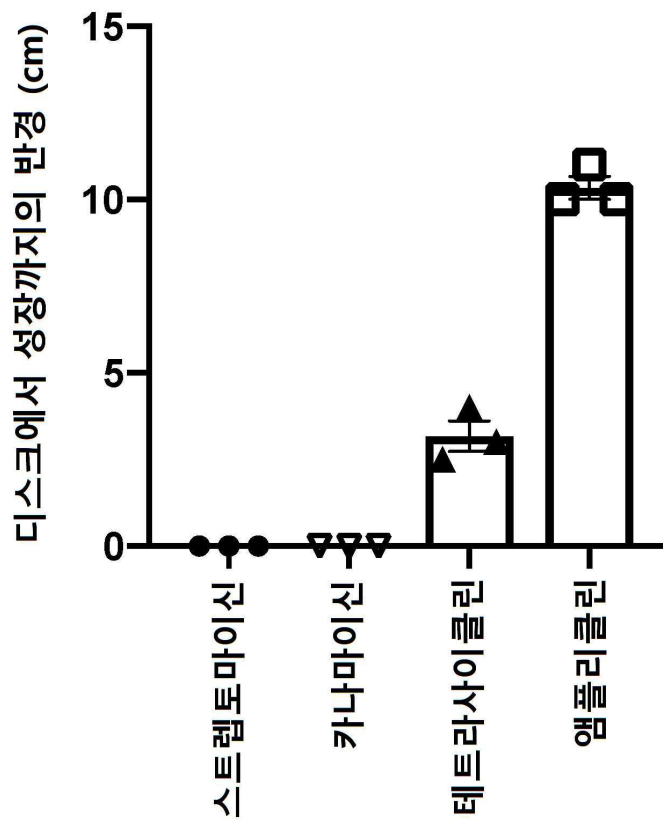
도면14



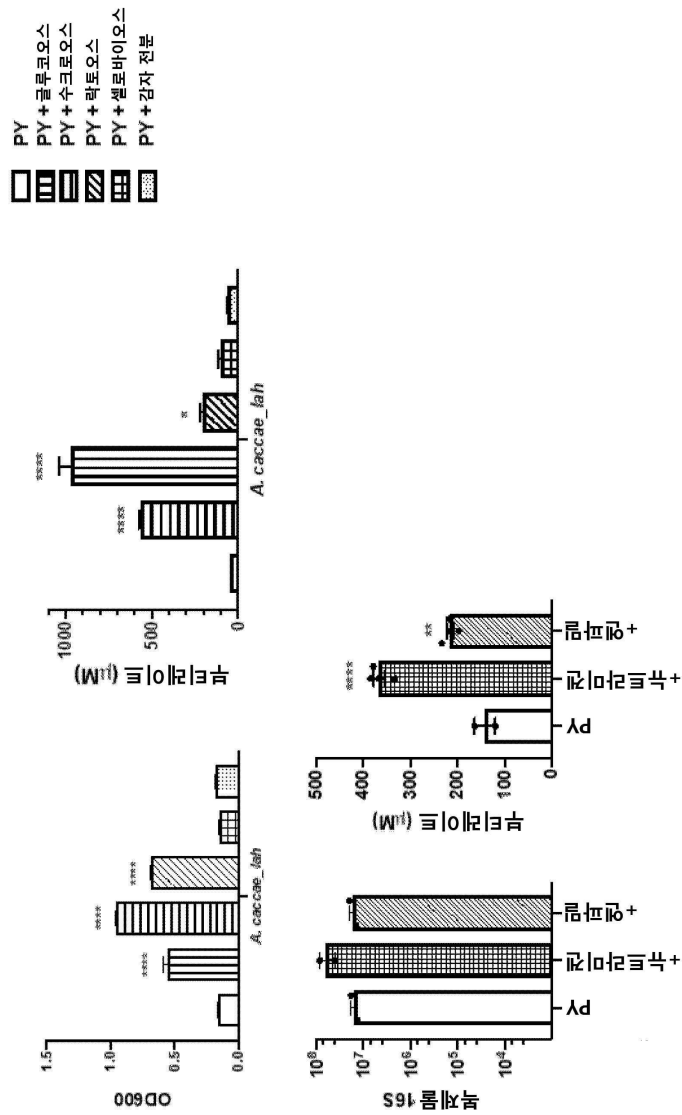
도면15



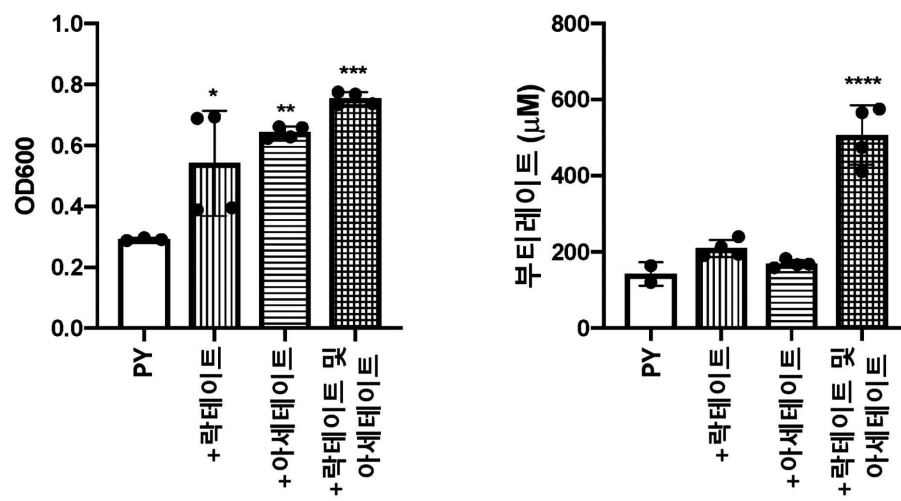
도면16



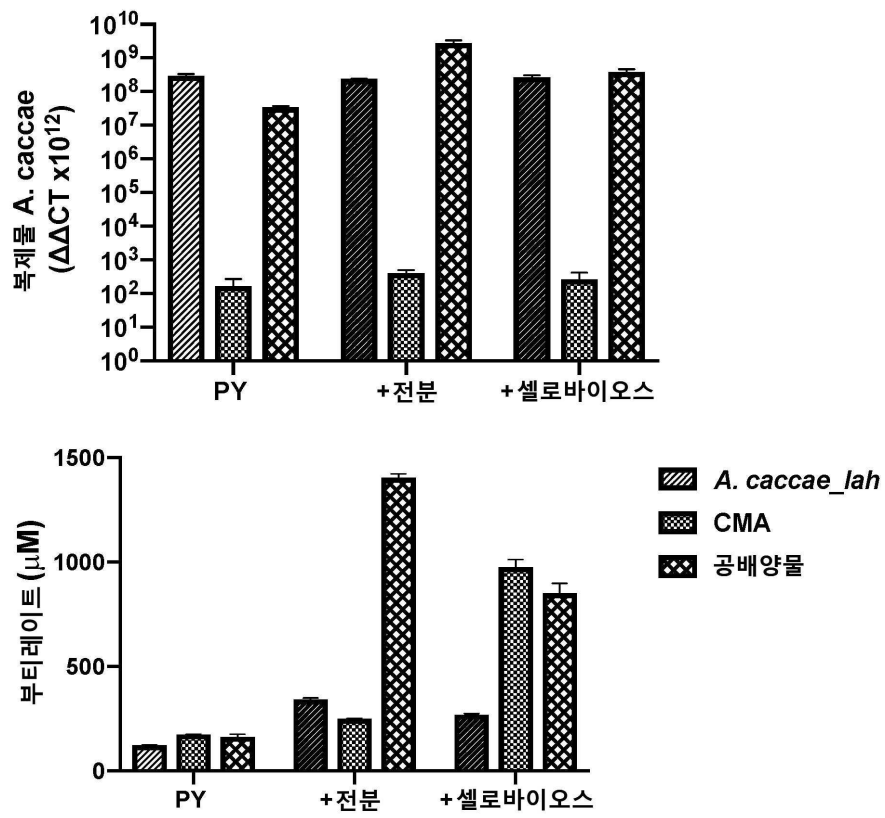
도면17



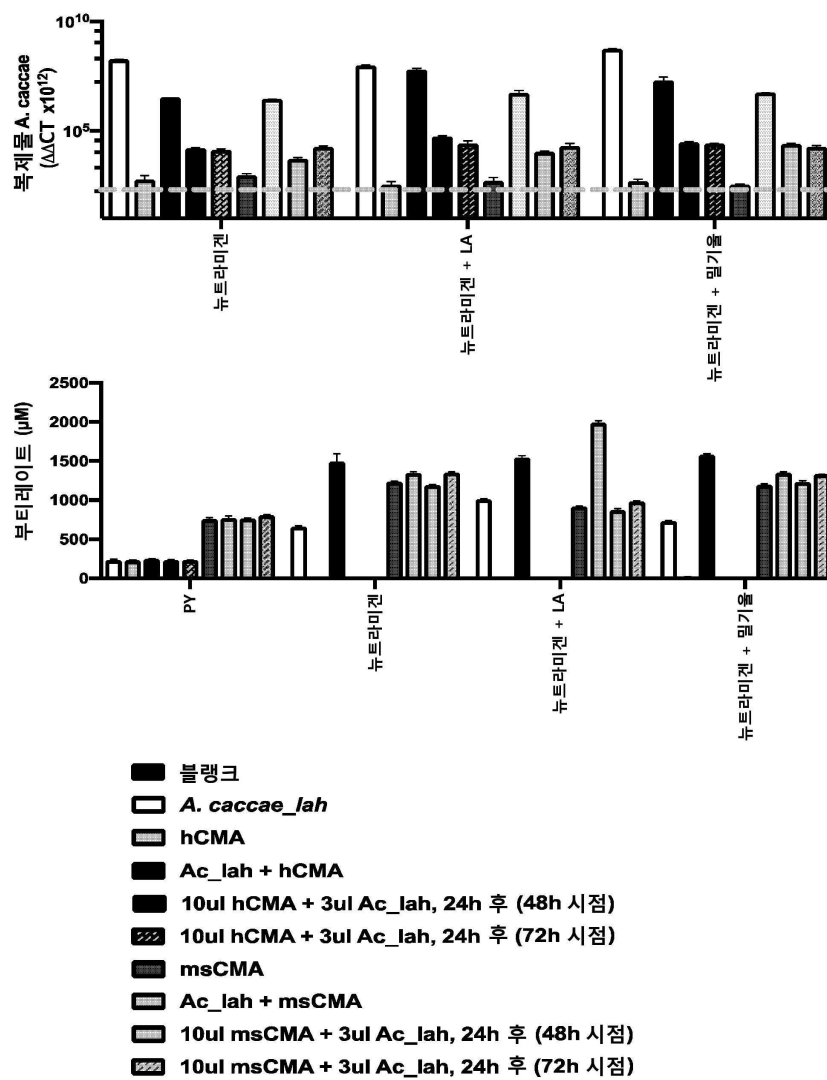
도면18



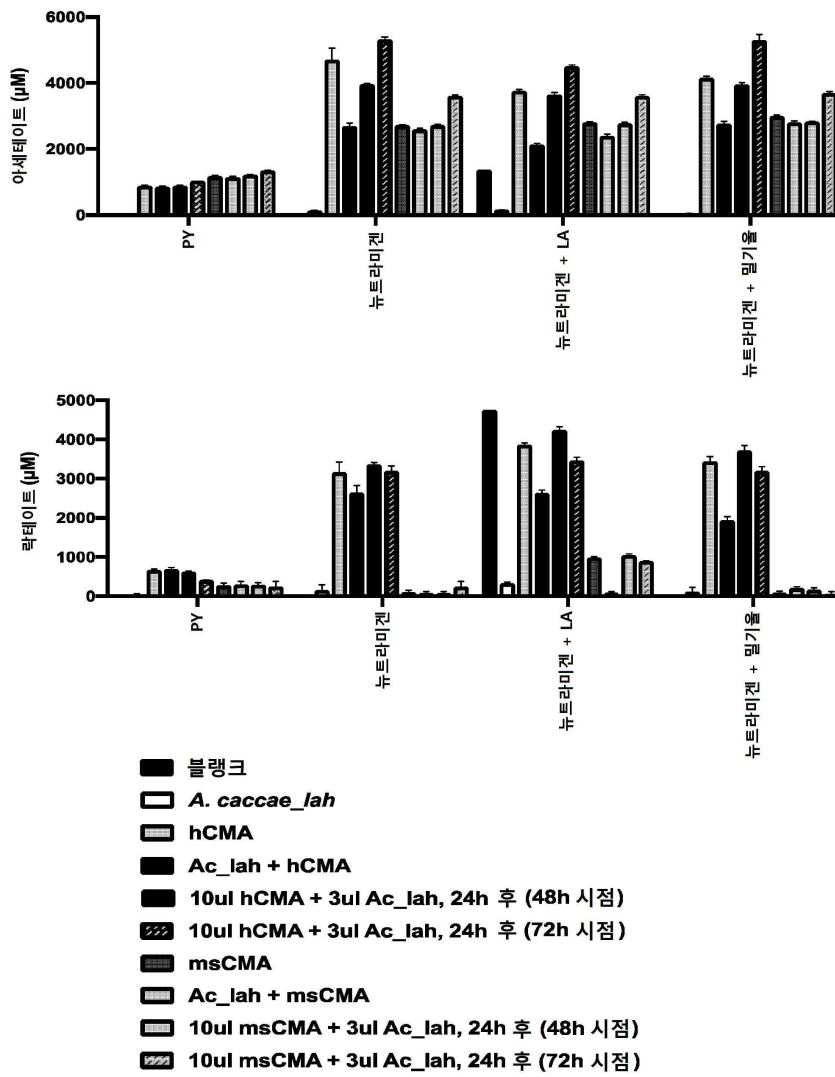
도면19



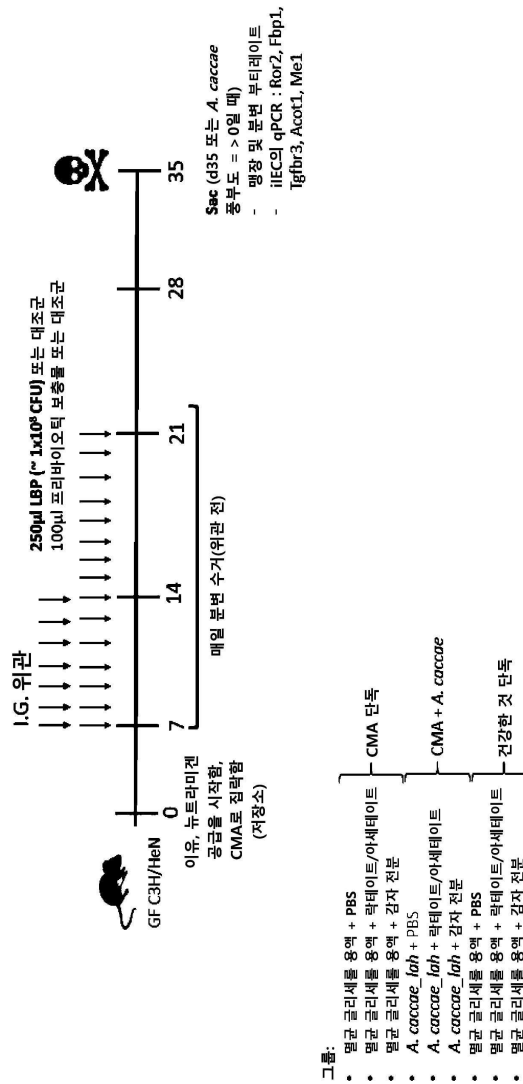
도면20a



도면20b



도면21



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE UNIVERSITY OF CHICAGO

CLOSTRABIO

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING INFECTIOUS, AUTOIMMUNE, AND ALLERGIC DISEASE

<130> ARCD.P0666WO/1001093687

<140> PCT/US2019/059865

<141> 2019-11-05

<150> 62/755,945

<151> 2018-11-05

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 1

gttttcggat ggatttccta tat 23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 2

cttttcacac tgaatcatgc gatt 24

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 3

tgaagagcta ctgtaatgat cagtcaac 28

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

agcaagcttg caaccttaac ca 22

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 5
 ccatcataat cgaacctgag 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400>
 > 6
 cttctcagaa ggctcatcag 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 7
 ccggtgtgaa ctgtcaccga tc 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 8
 cctgatgaaa actggaccac ag 22
 <210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

atcgacacct tgggacaacc 20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

agtgccaggat tgccgtctg 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

ccgtggcact aaggtcagtt 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

acgttacggt gcacgaattg 20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 13

agtatccatg aacaaagggc ac 22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 14

atcccattac agccaaggtc 20