



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월16일
(11) 등록번호 10-2500496
(24) 등록일자 2023년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2015.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7022803
(22) 출원일자(국제) 2018년01월12일
심사청구일자 2021년01월07일
(85) 번역문제출일자 2019년08월02일
(65) 공개번호 10-2019-0104568
(43) 공개일자 2019년09월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/050789
(87) 국제공개번호 WO 2018/130667
국제공개일자 2018년07월19일
(30) 우선권주장
1700542.2 2017년01월12일 영국(GB)
1709731.2 2017년06월19일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080080981 A
KR1020070116234 A
WO2013192163 A1

(73) 특허권자
프로비 에이비
스웨덴, 룬드 223 70, 이데온가탄 1에이
(72) 발명자
아가드, 다니엘
스웨덴, 롬마 234 42, 카르스토프스바겐 38
라조우 아렌, 이리니
스웨덴, 룬드 226 53, 파겔헨드스바겐 8
라르손, 라르스 니클라스
스웨덴, 룬드 22649, 스카이텔린젠 283
(74) 대리인
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 20 항

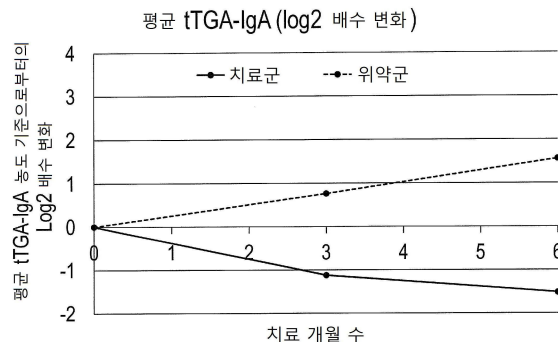
심사관 : 양용철

(54) 발명의 명칭 프로바이오틱 조성물 및 이의 사용

(57) 요약

본 발명은 소아 지방변증 자가면역성 (CDA)의 예방 및/또는 치료, 또는 소아 지방변증 (CD)의 예방 및/또는 치료를 위해 대상체에서 사용하기 위한 락토바실러스의 적어도 하나의 프로바이오틱 균주에 관한 것이다. 본 발명에 따른 사용을 위한 바람직한 조성물은 락토바실러스 파라카세이와 락토바실러스 플란타룸의 조합, 특히 L. 플란타룸 HEAL 9 (DSM 15312)와 조합된 L. 파라카세이 8700:2 (DSM 13434)를 포함하는 조성물이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 하나 이상의 프로바이오틱 균주와 함께 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 8700:2 (DSM 13434)의 하나 이상의 프로바이오틱 균주를 포함하는, 대상체에 서 소아 지방변증 자가면역성 (celiac disease autoimmunity: CDA) 또는 소아 지방변증 (CD)의 예방 또는 치료 용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 균주는 *L. 플란타룸*(*L. plantarum*) HEAL 9 (DSM 15312); *L. 플란타룸*(*L. plantarum*) HEAL 19 (DSM 15313); *L. 플란타룸*(*L. plantarum*) HEAL 99 (DSM 15316); *L. 플란타룸*(*L. plantarum*) 299v (DSM 9843); 및 *L. 플란타룸*(*L. plantarum*) 299 (DSM 6595) 중 하나 이상으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 8700:2 (DSM 13434)의 하나 이상의 프로바이오틱 균주는 1일당 1×10^6 내지 1×10^{14} CFU, 1×10^9 내지 1×10^{11} CFU, 또는 1×10^{10} CFU의 양으로 투여되는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 부형제, 희석제 또는 담체를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 부형제, 희석제 또는 담체는 고체 또는 액체 제형, 또는 약학적 제형인, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 액체 담체는 물 또는 다른 수성 용매를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 고체 담체는 말토덱스트린, 이눌린, 감자 전분, 옥수수 전분 또는 다른 채소 전분, 미세겔정질 셀룰로스 (MCC), 및 당 알코올로 구성되는 그룹으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 건조 발효된 또는 비-발효된 약학 조성물인, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 하나 이상의 프로바이오틱 균주와 함께 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 8700:2 (DSM 13434)의 하나 이상의 프로바이오틱 균주; 및 부형제, 희석제 또는 담체로 구성되며, 락토바실리(*Lactobacilli*)의 어느 다른 프로바이오틱 균주들 또는 락토바실리(*Lactobacilli*) 이외의 미생물들의 프로바이오틱 균주들의 유효량이 없는, 약학 조성물.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 담체는 식품 및 미량 영양소(micronutrient) 중 적어도 하나인, 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 식품은 글루텐 불포함 제품, 또는 발효되거나 비-발효된 유제품, 또는 요거트, 과일 주스, 음

료, 수프, 식물 기반 식품, 또는 콩 제품, 건조 식품 바, 유아식, 유아 영양식, 영아용 조제 우유 및 초유 대체물(breast milk replacements from birth)로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 유아 또는 영아용 조제 우유는 기성 액체 형태(a ready-to-feed liquid form)로서 영아에게 먹이기 전에 물과 혼합되도록 건조 분말 형태인, 약학 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 미량 영양소는 비타민 A, Be, B12, D로부터 선택된 하나 이상의 비타민; 및 미네랄 철, 아연, 및 마그네슘 중 하나 이상으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 적어도 하나인, 약학 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구 투여용 캡슐, 정제 또는 분말로서 제공되는, 약학 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학 조성물은 동결-건조된 제제의 형태인, 약학 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 약학 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 인간은 소아이며, 여기서 소아는 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 살 미만인, 약학 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 인간은 하나 이상의 혈청학적, 면역학적, 유전적 위험 인자, 또는 이의 조합의 존재에 의해 CD의 위험이 증가한 것으로 식별 가능한 인간인, 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 유전적 위험 인자는 HLA-DQ2 및 HLA-DQ8 중 적어도 하나인, 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 위험 인자는 지속적인 조직 트랜스글루타미나제 (tTGA) 양성인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소아 지방변증 자가면역성 (celiac disease autoimmunity, CDA), 또는 소아 지방변증 (CD)의 대상체에서, 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 종의 적어도 하나의 프로바이오틱 (probiotic) 균주에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 이러한 사용을 위한 조성물, 및 유효량의 상기 프로바이오틱 균주를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, CDA 및/또는 CD의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0003] 도입

[0004] 소아 지방변증 (CD)은 소장의 장 점막에 발병하는 만성적인 면역-매개 질병이다. 이는 밀, 호밀 및 보리에서 발견되는 주요 저장 단백질인 글루텐에 대한 불내성 (intolerance)에 의해 유발된다 (Schuppan D 등 Gastroenterology. 2009;137(6):1912-33). 소아 지방변증의 전형적인 증상 및 임상적 징후는 복부 불편감, 팽창 및 설사, 및 이후 영양 실조의 징후 (예를 들어, 체중 감소, 빈혈 및 골다공증)를 포함한다. 그러나, 상당한

비율의 환자는 증상이 거의 없고, 스크리닝을 통해 진단된다 (Ludvigsson JF 등 *Journal of Internal Medicine*. 2011;269(6):560-71). 최근에는, 치료가 평생 동안의 글루텐 불포함 식이 (GFD)로 이루어진다.

[0005] CD의 병리생리학은 완전히 이해되지는 못했으나, T-세포 유도성인 것으로 제안된다. 소장에서의 글루텐 단백질의 소화 이후, 생성된 글리아딘 펩티드는 피부 장벽을 가로질러서, 항원-제시 세포에 의해 MHC-II-구조 상에 제시되고, 고유층 (lamina propria)에서 글리아딘-특이적 CD4+ T-도움 (T_H) 1 세포 및 CD8+ 세포 독성 T (T_C) 세포의 활성화를 가능하게 한다. 이것은 몇몇 사이토카인, 특히 IFN- γ , TNF- α 및 IL-21의 상향 조절을 가져오며, 이들 중 앞선 2개는 골수섬유아세포 (myelofibroblasts)의 활성화를 통해 전형적인 점막 재모델링 및 용모 위축 (villous atrophy)을 유발하는 반면, 나머지 하나는 CD4+ 세포의 활성을 유지하는데 관여할 가능성이 높다(상기 Schuppan D 등). 지난 10년 동안, 글리아딘에 의한 선천성 면역계의 수반되는 직접적 자극은 질병의 발생에서 추가적인 중요 인자인 것으로 나타났다. 이것은 최근 수지상 세포 및 대식 세포의 IL-15 신호전달을 상향조절에 기인하여, 상피내 림프구 (IELs)의 활성화를 통한 점막 손상을 유도한다 (Londei M 등, *Molecular Immunology*. 2005;42(8):913-8).

[0006] CD의 세계적인 유병률은 대략 1%로 추정하나, 인종 그룹 및 지리적인 위치에 따라 크게 달라진다. 스웨덴은 1.5-3%의 추정 유병률을 가져, 가장 발병률이 높은 국가들 중에 있는 것으로 순위가 매겨진다 (상기 Ludvigsson JF 등). 아직 어떠한 과정이 글리아딘 구조에 대한 기능장애 반응을 유도하는데 도움을 주는지와, 집단들 간에 질병 유병률이 상이한 이유를 완전히 결정하지 못하고 있다. 거의 모든 소아 지방변증 질병 환자가 DR3-DQ2 및/또는 DR4-DQ8 할로 타입의 매개체(carrier)라는 사실에서 입증된 바와 같이, CD에는 명백한 유전적 요소가 있다 (Sollid LM 등 *The Journal of Experimental Medicine*. 1989;169(1):345-50). 게다가, 다수의 영향을 덜 미치는 다른 유전자도 또한 질병의 위험성에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 이들 중 대부분은 적응 면역 반응의 활성화와 관련된다 (Hunt KA 등, *Nature Genetics*. 2008;40(4):395-402). CD는 이들 유전적 위험 특성을 몇몇 다른 자가 면역 장애와 공유하는데, 이들 중 가장 중요한 것은 HLA-DQB1 및 HLA-DRB1 좌위, 뿐만 아니라 몇몇 비-HLA 좌위 내의 주요 감수성 유전자를 공유하는 1형 당뇨병 (T1D)이다 (Smyth DJ 등, *New England Journal of Medicine*. 2008;359(26):2767-77). 그럼에도 불구하고, 단지 이들 할로타입을 갖는 소수의 것들만 질병을 발생시키기 때문에, 유전학 단독으로는 CD를 설명할 수 없다. 지난 수십년간 많은 나라에서 관찰된 발생률의 신속한 증가는 또한 몇몇 방식으로 발병 과정에 기여하는 환경적 인자를 시사하였다. 연구의 중요한 영역은 유아 급식(infant feeding practices), 모유 수유, (및 장 미생물군에서의 변이 또는 교란)을 포함한다 (De Palma G 등, *Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. Journal of Leukocyte Biology*. 2010;87(5):765-78).

[0007] 이전에는 장 생검이 CD의 진단을 위한 핵심 기준으로 고려되었으나, 몇몇 혈청학적 마커가 발견되었고, 이들 중에서 조직 트랜스글루타미나제 자가 항체 (tTGA)는 높은 진단 감수성 및 특이성에 기인하여, 임상적 실행에서 가장 통상적으로 이용된다 (van der Windt DA 등, *Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. Jama*. 2010;303(17):1738-46). 더욱이, 2012년에 유럽 소아 소화기, 간장학 및 영양학회(ESPGHAN)의 개정된 가이드라인 (Husby S 등, *ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012;54(1):136-60)은, 적절한 추가적인 시험이 뒤따를 경우, 유의하게 상승된 tTGA 수준이 진단을 확인하기 위한 생검의 필요성을 없앨 수 있다는 것을 암시한다. CD 환자의 대부분에서, tTGA 수준은 GFD을 도입한 이후 감소한다.

[0008] 소아(children)에서, 이러한 감소는 또한 장내 점막의 조직학적 개선을 잘 예측하며 (Bannister EG 등, *American Journal of Gastroenterology*. 2014;109(9):1478-83), 이는 tTGA가 이원 진단 수단으로서 뿐만 아니라 질병 활성 및 식이 순응을 위한 마커로서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나, 이것은 지속적으로 상승된 tTGA 수준 [소위 CD 자가면역성 (CDA), 또는 장 생검 특징이 정상적인 것으로 확인되는 경우 보다 넓게 잠재적 CD라고 지칭됨]을 갖는 것으로 발견되는 무증상 환자의 관리 방법에 대해 의문을 제기한다. 이러한 소아들은 CD 발병의 위험성이 높고 (Liu E 등, *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(1):42-9), 현재 GFD 이외에는 그 위험을 줄이거나 없애기 위해 사용할 수 있는 치료 옵션이 없다.

배경 기술

[0009] 초기의 연구들에서는 활성 CD를 갖는 환자의 미생물군(microbiota)이 건강한 대조군 및 무-증상 환자에 비해, 그램-음성 병원균의 정도가 더 높게 구성된 것으로 나타났다 (Nadal I 등, *Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. Journal of Medical Microbiology*. 2007;56(Pt12):1669-74). 이에 따라, 후기 연구들은 이러한 미생물군이 글리아딘에 대한 반응에서 염증 반응의

정도를 강화시키는 반면 (De Palma G 등, Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;87(5):765-78), 반대로 특정 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 균주는 글리아딘의 소화에 영향을 주어, 이들의 면역 잠재성을 감소시킨다고 제안하였다 (Laparra JM 등, Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;109(4):801-7).

[0010] 최근 발표된 일부 연구는 특이적인 비피도박테리움 균주를 투여하는 것의 효과를 이미 임상적으로 명백한 CD의 맥락에서 평가하였다. Olivares 등 [Olivares M 등, *The British Journal of Nutrition*. 2014;112(1):30-40]은 최근 CD로 진단받은 36명의 소아를, 3개월 동안 GFD 이외에 비피도박테리움 롱굼 (*Bifidobacterium longum*) CECT 7347 또는 위약(placebo)을 매일 소비하는 치료군으로 무작위 배분하였다. GFD의 도입에 기인하여, 면역학적 변수에 대한 프로바이오틱 효과는 전용하기 어려우며; 연구는 tTG 수준을 평가하지 않았으나, 위약군에 비해 치료군에서 성숙한 T 세포의 총 수준의 유의한 감소를 발견하였다. 게다가, 이들은 프로바이오틱-치료군의 소아들이 대조군에 비해 키가 큰 비율이 높았음을 나타내었다.

[0011] 또한, 문헌 [Smecuol 등 *Journal of Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013;47(2):139-47)]에서는, 22 명의 성인 CD 환자를 현재 GFD 없이 비피도박테리움 인판티스 (*Bifidobacterium infantis*) 또는 위약으로 매일 3주간 치료하고, 장내 투과성, 면역학적 변수 및 증상의 변화에 대해 평가하였다. 프로바이오틱-치료군의 참가자는 대조군에 비해 위장관 증상의 개선을 보고하였다. 그러나, B. 롱굼 CECT 7347과 달리, B. 인판티스 (NLS) 는 염증 마커 및 장내 미생물군 및 숙주-관련 방어 기작에 영향을 미치는데 실패하였다.

[0012] 특이적인 비피도박테리움 균주에 의한 상기 연구는 둘 다 CD에서 이들 비피도박테리움 균주의 일부 유익한 역할을 암시하며, 한편 이들은 또한 추가 연구의 필요성도 강조한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서, CDA 및 CD의 상당한 연구에도 불구하고, 최근 CD에 대한 유일하게 이용가능한 치료법은 글루텐 불포함식이 (GFD)이다. 나아가, 소아 지방변증 자가면역성 (CDA)의 예방 및/또는 치료, 또는 소아 지방변증 (CD)의 예방 및/또는 치료를 위한 조성물 및 방법의 필요성이 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 기술

[0015] 본 발명에 따르면, 대상체에서 소아 지방변증 자가면역성 (CDA)의 예방 및/또는 치료, 또는 소아 지방변증 (CD)의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한, 락토바실러스 종의 적어도 하나의 프로바이오틱 균주가 제공된다.

[0016] "예방 및/또는 치료를 위한 사용"에 대해, 본 발명자들은 대상체에서 심각성을 방지, 지연, 감소시키고, 및/또는 CDA 또는 CD와 관련된 하나 이상의 증상 및/또는 다른 마커를 제거하는데 대한 효과를 증가시키는 사용을 의미한다.

[0017] 프로바이오틱 락토바실러스 균주

[0018] 락토바실러스 종의 바람직한 프로바이오틱 균주는 락토바실러스 파라카세이 (*L. paracasei*); 락토바실러스 플란타룸 (*L. plantarum*); 락토바실러스 아시도필루스 (*L. acidophilus*); 락토바실러스 람노수스 (*L. rhamnosus*); 락토바실러스 카세이 (*L. casei*); 락토바실러스 로이테리 (*L. reuteri*); 락토바실러스 브레비스 (*L. brevis*); 락토바실러스 크리스파투스 (*L. crispatus*); 락토바실러스 불가리쿠스 (*L. bulgaricus*); 락토바실러스 페렘툼 (*L. fermentum*); 락토바실러스 살리바리우스 (*L. salivarius*); 락토바실러스 존스니이(*L. johnsonii*); 및 락토바실러스 락티스 (*L. lactis*)로부터 선택된다.

[0019] 바람직하게는, 락토바실러스 종의 적어도 하나의 프로바이오틱 균주는 락토바실러스 파라카세이 및/또는 락토바실러스 플란타룸이다.

[0020] 락토바실러스 균주 기탁

[0021] 본 발명에 따른 사용을 위한 락토바실러스의 바람직한 균주는, 부다페스트 조약 하에, Probi A.B 사

(Sölvegatan 41, 스웨덴 룬드 Lund 22370 소재)에 의해 이하와 같이 기탁되었다:

종	균주	수탁 번호	기탁 일자	기탁자	수탁자
락토바실러스 플란타룸	HEAL 9	DSM 15312	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 19	DSM 15313	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 99	DSM 15316	27/11/2002	Probi	DSMZ
	299	DSM 6595	02/07/1991	Probi	DSMZ
	299v	DSM 9843	16/03/1995	Probi	DSMZ
	GOS42	DSM 32131	02/09/2015	Probi	DSMZ
락토바실러스 파라카세이	8700:2	DSM 13434	06/04/2000	Probi	DSMZ
	O2A	DSM 13432	06/04/2000	Probi	DSMZ
락토바실러스 람노수스	271	DSM 6594	02/07/1991	Probi	DSMZ

[0022]

[0023]

바람직하게는, L. 파라카세이의 종은 L. 파라카세이 8700:2 (DSM 13434), L. 파라카세이 O2:A (DSM 13432) 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0024]

바람직하게는, L. 플란타룸의 종은 L. 플란타룸 HEAL 9 (DSM 15312); L. 플란타룸 HEAL 19 (DSM 15313); L. 플란타룸 HEAL 99 (DSM 15316); L. 플란타룸 299v (DSM 9843); 및/또는 L. 플란타룸 299 (DSM 6595) 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0025]

유리하게는, 본 발명은 소아 지방변증 자가면역성 (CDA)의 예방 및/또는 치료, 또는 소아 지방변증 (CD)의 예방 및/또는 치료를 위해 대상체에서 사용하기 위한, 적어도 하나의 프로바이오틱 L. 파라카세이 균주 및 적어도 하나의 프로바이오틱 L. 플란타룸 균주의 조합을 제공한다.

[0026]

가장 바람직하게는, 상기 조합은 L. 파라카세이 8700:2 (DSM 13434) 및 L. 플란타룸 HEAL 9 (DSM 15312)이다.

[0027]

조성물은 특정 프로바이오틱 종 또는 락토바실러스의 균주를 포함할 수 있지만, 바람직하게는 이들은 다른 유효량의 락토바실러스의 어느 다른 프로바이오틱 균주 또는 다른 미생물 없이, 특정 균주로 구성된다.

[0028]

조성물 및 제형

[0029]

본 발명의 프로바이오틱 균주는 바람직하게는 동결-건조된다.

[0030]

본 발명의 프로바이오틱 균주는 고체 또는 액체 제형으로서의 적합한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 제공될 수 있고, 이들은 일 구현예에서 약학적 제형일 수 있다.

[0031]

적합한 액체 담체의 예는 물 및 다른 수성 용매를 포함한다.

[0032]

적합한 고체 담체의 예는 말토덱스트린, 이눌린, 감자 전분, 옥수수 전분 또는 다른 채소 전분, 미세결정질 셀룰로스 (MCC), 및 당 알코올을 포함한다.

[0033]

조성물은 건조 발효된 또는 비-발효된 조성물일 수 있다. 건조 비-발효된 조성물의 경우, 발효는 대상체의 위장관에서 조성물이 소화된 이후 발생한다.

[0034]

사용시, 본 발명의 프로바이오틱 균주(들)은 대상체에 투여되기 이전에, 액체 또는 고체 담체와 혼합될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 섭취되기 전에, 상기 균주(들)을 물 또는 일부 다른 수성 용매로 이루어지는 담체, 또는 드링크와 혼합할 수 있다. 유사하게, 프로바이오틱 균주는 하나 이상의 식품으로 이루어지는 담체와 혼합될 수 있다. 바람직한 식품은 글루텐 불포함 제품, 예컨대 발효된 또는 비-발효된 유제품, 예컨대 요거트, 과일 주스; 음료, 수프, 식물 기반 식품, 예컨대 콩 제품, 건조 식품 바, 유아식, 유아 영양식, 영아용 조제 분유, 초유 대체물(breast milk replacements from birth)이다.

[0035]

유아 또는 영아용 분유는 본 발명의 락토바실러스 균주(들)의 프로바이오틱에 대한 특히 바람직한 담체이다. 이는 기성 액체 형태로서 영아에게 먹이기 전에 물과 혼합되도록 건조 분말 형태일 수 있다. 이는 통상 우유로부터 제조되며, 유청 및 카제인 단백질을 함유한다.

[0036]

본 발명의 프로바이오틱 종(들)은 또한 공지의 식이보조제의 하나 이상의 성분, 예를 들어, 미량 영양소, 예컨대 비타민 및 미네랄과 함께 조성물 중에 제공될 수 있다.

- [0037] 소아 지방변증의 전형적인 증상 및 임상적인 징후는, 복부 불편감, 팽창 및 설사, 이후 영양 실조의 징후 (예를 들어, 체중 감소, 빈혈, 및 골다공증)을 포함한다. 영양 실조와 관련된 위험성을 고려하여, 소아 지방변증으로 새로 진단받은 소아들이 비타민 D, 아연 및 철의 결핍이었다는 것이 알려졌다 (Erdem 등, Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease. *Turk J Med Sci*. 2015;45(4):833-6 2015). 유사하게, 소아 지방변증으로 새롭게 진단받은 성인 및 치료되지 않은 CD 환자도 또한 비타민 B₆ 및 B₁₂, 비타민 D, 엽산, 아연, 마그네슘 및 철에 대한 기준의 한계 미만의 값을 갖는 것으로 알려졌다 (Wierdsma 등, Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. *Nutrients*. 2013 Sep 30;5(10):3975-92. doi: 10.3390/nu5103975, Caruso 등, Appropriate nutrient supplementation in celiac disease 2013 *Ann Med*. 2013 Dec;45(8):522-31. doi: 10.3109/07853890.2013.849383. Review, Schø sler 등, Symptoms and findings in adult-onset celiac disease in a historical Danish patient cohort *Scandinavian Journal of Gastroenterology* Vol. 51, Iss. 3, 2016). 대부분의 경우, 일단 CD 또는 CDA로 진단 받았을 때, 식이로부터 글루텐을 제거하면 장의 "건강한" 내력을 회복하고, 비타민 및 미네랄 상태의 정상화를 유도한다. 그러나, 글루텐 불포함 식이에 적응함에 의한 장 염증의 해결이 항상 미네랄 결핍을 상쇄하기에 충분 하지는 않다 (상기 Caruso 등 2013). 이런 이유로, CD/CDA로 진단받거나 또는 CD/CDA가 진행될 위험이 있는 사 람들에 대한 비타민 및/또는 미네랄의 보충이, 본 발명에 의한 프로바이오틱 락토바실러스와 함께 사용될 수 있 다. 바람직하게는, 비타민(들) 및/또는 미네랄(들)은 비타민: A, B₆, B₁₂, D; 및/또는 미네랄: 철, 아연, 마그네 슴 중 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0038] 바람직하게는, 본 발명의 프로바이오틱 균주(들) 조성물은 경구 투여용 캡슐 또는 정제 또는 분말의 형태로 제 공된다. 스틱 팩(Stick packs)은 식품 산업 및 약학적 분야에서 사용되는 1회분/단일 투여량 포장의 대중적인 형태이다 (www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/를 참고하라). 이들은 소비자들에게 매우 편리하며, 사전 결정된 양의 본 발명의 프로바이오틱 조성물을 함유함으로써, 정확한 투여량을 섭취하여 본 발명에 따른 원하는 예방 및/또는 치료 효과의 달성을 보장한다.
- [0039] 바람직하게는, 사용시 본 발명의 프로바이오틱 균주(들)은 1×10^6 내지 1×10^{14} 콜로니 형성 단위 (CFU), 바람직 하게는 1×10^9 내지 1×10^{11} CFU, 가장 바람직하게는 1×10^{10} CFU의 1일 양으로 대상체에 투여된다. CFU의 1일 양은 바람직하게는 단일 투여 또는 처치(serving)로 투여될 수 있다.
- [0040] 치료될 대상체
- [0041] 바람직하게는, 대상체는 인간이다. 유리하게는, 인간 대상체는 소아이다. 바람직하게는, 소아는 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 살 미만이다. 유리하게는, 본 발명의 조성물은 출생 및 특히 젖내기 시점, 즉 영아가 모유 공급을 전적으로 중단한 시점에서의 투여를 위한 것이다.
- [0042] 위험 대상체의 식별
- [0043] 바람직하게는 대상체는 CD의 하나 이상의 증상이 결여되나, CD 발생의 위험성이 있다.
- [0044] 이상적으로는, 대상체는 하나 이상의 혈청학적, 면역학적 및/또는 유전적 위험 인자의 존재에 의해 CD의 위험이 증가되었다고 식별된다.
- [0045] 혈청학적, 면역학적 및/또는 유전적 위험 인자의 존재를 탐지하는 다양한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다; 그러나, 특히 적합한 방법은 편의성을 위해 본원에 제공되었다.
- [0046] CDA 및/또는 CD-관련 마커
- [0047] • 혈청형
- [0048] o DQ2 양성
- [0049] o DQ8 양성
- [0050] • 유전학적 검정
- [0051] o DQ2.5_{시스} 할로 타입 (DQA1*05/DQB1*02)
- [0052] o DQ2.2_{시스} 할로 타입 (DQA1*02:01/DQB1*02:02)

- [0053] o DQ2.5_{트랜스} 할로 타입, 예를 들어 DQ2.2_{시스} 할로 타입
- [0054] o DQ2.5_{트랜스} 할로타입, 예를 들어 DQ2.2_{시스} 할로타입 (DQA1*02:01/DQB1*02:02) 및 DQ7.5_{시스} 할로타입 (DQA1*05:05/DQB1*03:01)
- [0055] o DQ8_{시스} 할로 타입 (DQA1*03/DQB1*03:02)
- [0056] o DQA1*05:01 대립 형질
- [0057] o DQA1*05:05 대립 형질
- [0058] o DQB1*03:02 대립 형질
- [0059] 소아 지방변증이 발행할 위험성의 증가는, 면역성 혈청형 및/또는 유전적 분석에 의해 결정될 수 있다. 면역성 혈청형을 사용하여, DQ2 혈청형 마커 및/또는 DQ8 혈청형 마커의 존재를 식별하였다. 게놈 DNA의 유전적 분석은 서열-특이적 프라이머 (PCR-SSP)을 사용하는 서열-특이적 PCR, 또는 유전자 서열 분석에 의해 수행될 수 있다. 서열-특이적 PCR 방법은 이하의 것들을 포함한다: 서열-특이적 프라이머에 의한 PCR (PCR-SSP) (Sacchetti L 등, Rapid Identification of HLA DQA1*0501, DQB1*0201, and DRB1*04 Alleles in Celiac Disease by a PCR-Based Methodology. *Clin Chem*. 1997 Nov;43(11):2204-6.); 서열-특이적 프라이머 및 TaqMan 프로브에 의한 정량적 실시간 PCR (qPCR) (Reinton 등, A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1*05, DQB1*02 and DQB1*0302 to aid diagnosis of celiac disease. *J Immunol Methods*. 2006 Oct 20;316(1-2):125-32. Epub 2006 Sep 18.); 서열-특이적 프라이머 및 용융 곡선 분석에 의한 qPCR (Selleski 등, Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arq Gastroenterol*. 2015 Apr-Jun;52(2):143-6. doi: 10.1590/S0004-28032015000200013.); PCR 증폭 이후 서열-특이적 뉴클레오티드 유전자 서열 분석 방법에 의한 혼성화는, 사슬-종결 디데옥시뉴클레오티드에 의한 생거(Sanger) 서열 분석, 발열 서열 분석(pyrosequencing), 합성에 의한 서열 분석 (Illumina sequencing), 라이게이션에 의한 서열 분석 (SOLiD sequencing), 나노포어 서열 분석 (MinION), 이온 토렌트 반도체(Ion Torrent semiconductor) 서열 분석 및 단일-분자 실시간 서열 분석 (Pacific Biosciences)을 포함한다.
- [0060] DQ2 또는 DQ8 혈청형에 대응하는 유전학적 마커는: DQ2.5_{시스} 할로 타입 (DQA1*05/DQB1*02); DQ2.2_{시스} 할로 타입 (DQA1*02:01/DQB1*02:02); DQ2.5_{트랜스} 할로 타입, 예를 들어 DQ2.2_{시스} 할로 타입 (DQA1*02:01/DQB1*02:02) 및 DQ7.5_{시스} 할로 타입 (DQA1*05:05/DQB1*03:01); DQ8_{시스} 할로 타입 (DQA1*03/DQB1*03:02); DQA1*05:01 대립 형질; DQA1*05:05 대립 형질; DQB1*03:02 대립 형질을 포함한다.
- [0061] CDA 및/또는 CD를 위한 면역학적 마커는 이하의 것들을 포함한다: 방사능리간드 결합 에세이에 포함되는 조직 트랜스글루타미나제 항체 수준 (Agardh 등, Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). 2004;93(8):1046-51, Agardh 등, Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA. *Pediatric diabetes*. 2001;2(2):58-65.); 총 혈청 IgA의 결핍의 부재를 포함하는 IgA 근내막 항체 (EMA) 수준; 탈아미노화된 글리아딘 펩티드 (DGP IgA 및 IgG) 수준.
- [0062] 바람직하게는, 하나 이상의 위험 인자(들)는 HLA-DQ2 및/또는 HLA-DQ8이다.
- [0063] 바람직하게는, 하나 이상의 면역성 위험 인자는 지속적인 조직 트랜스글루타미나제 (tTGA) 양성으로, 즉 tTGA 양성 검정에서 둘 이상 연속적인 경우이다.
- [0064] tTG 양성은 본원에 기재된 tTG 자가 항체, 바람직하게는 IgA-tTGA 및/또는 IgG-tTGA의 존재 하에 나타날 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 위약군에 비교한, L. 파라카세이+ L. 플란타룸 군주 치료군에서의 시간의 경과에 따른 평균 tTGA-IgA 수준의 변화를 나타낸다.

도 2는 위약군에 비교한, L. 파라카세이+ L. 플란타룸 치료군의 시간의 경과에 따른 평균 tTGA-IgG 수준의 변

화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

이하의 재료, 방법 및 예는 본 발명의 측면들을 구체화시킨다.

재료 및 방법

유전적, 혈청학적 및 면역학적 위험 인자에 의한 CD의 위험성이 증가한 대상체의 연구 집단 식별

참가자는 CiPiS 및 TEDDY 연구의 스웨덴 참가자로부터 채택되었다. TEDDY 연구 프로토콜은 다른 곳에도 전반적으로 기재되어 왔다 (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design. *Pediatric Diabetes*. 2007;8(5):286-98). 간략히, 2004년 내지 2010년 사이에, 이들 센터에서 신생아들은 HLA 유전형이 분석되고, 이하의 유전형들 중 하나를 갖는 경우 적절한 것으로 간주되었다: DR3-DQ2/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR8, DR3-DQ2/DR3-DQ2, DR4-DQ8/DR4b, DR4-DQ8/DR1, DR4-DQ8/DR13, DR4-DQ8/DR9, 또는 DR3-DQ2/DR9. 스웨덴 센터에서, 총 48,140명의 소아가 스크리닝되었고, 그 중 3,723명이 HLA-적절한 것으로 밝혀졌다. 이들 중, 연구 참가에 대한 서면 동의서는 총 2,525 케이스에서 부모 또는 1차 보호자(primary caretaker)에 의해 제공되었다. TEDDY 프로토콜 내에서, 혈액 샘플이 6개월마다 수집되었고, 소아는 2세부터 시작하여 tTGA에 대하여 1년에 한번씩 스크리닝되었다. tTGA 양성을 나타내는 경우, 초기 혈액 샘플은 혈청 전환의 시점을 결정하기 위해 소급하여 분석되었다. 2개의 연속 혈액 샘플에서 양성을 검정하는(testing) 참가자는 지속적인 tTGA 양성으로 간주되었고, CDA에 대하여 포함되었다(ruled in for CDA). 모든 최종 결과는 영국 브리스톨 소재의 사우스메드 병원의 유럽 표준 실험실에서 수행된 실험 분석에 기반을 두었다. CD에 관한 추가적인 평가는 TEDDY 프로토콜의 범주를 벗어난 것이다. 스웨덴에서, 장 생검을 수행하기 위한 결정은 tTGA 수준, 증상의 정도, 및 영양 실조의 징후에 따라 경우에 맞게(case-by-case) 이루어진다.

CiPiS 연구에서, 2000년 내지 2004년 사이에 스코네(Skåne)에서 태어난 소아들은 제대혈의 HLA 유전형 분석, 및 모계 인자에 대한 설문지를 사용하여 스크리닝되었다. DQ2 및/또는 DQ8를 갖는 소아들은 HLA 위험성이 있다고 간주되었다. 총 6202명의 위험성이 있는 소아, 뿐만 아니라 대조군으로서 HLA 위험성이 없는 7654 명의 소아도 방문 초대되었다. tTGA 스크리닝은 HLA-위험 그룹에서의 1620/6206 (26.1%)의 참가자 및 대조군의 1815/7654 (23.7%)에서 3세에 수행되었고, HLA-위험이 있는 1910/5870 (32.5%)의 참가자 및 대조군의 7072명 중 2176명 (30.6%)에서 9세에 수행되었다. tTGA 양성으로 검정되는 경우, 참가자는 지속적인 tTGA 양성을 확인하기 위해 적어도 3개월 이후 재-시험되었고, 그 결과 이들은 장 생검을 위한 지역 소아과 병원으로 보내졌다. 참가자는 2012년 3월과 2015년 8월 사이에 이들 2개의 코호트로부터 계속 방문 요청을 받았다. 포함 기준은 이하와 같다:

• 2개의 연속 샘플에서 tTGA 양성 (브리스톨 tTGA 에세이를 사용할 때 <30 U/mL).

• 소아 지방변증의 징후 없음.

• TEDDY 프로토콜을 따라 스크리닝된 모든 당뇨병-관련 자가 항체에 대해 음성 (GADA, IAA, IA-2A, ZnT8A).

• 장거리 프로토콜을 통해 TEDDY 연구에 참가하지 않음.

T1D-관련 자가 항체에 대해 양성인 소아는 본 연구에서 배제하여, 체도 자가면역성(islet autoimmunity)의 자연적 내력에 대한 영향을 최소화하였다. 그러나, T1D-관련 자가 항체가 CD 발생의 위험 증가에 대한 혈청학적 마커를 구성하며, 또한 본 발명의 사용 및 방법에 따른 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 바람직한 대상체를 식별하는데 사용될 수 있다는 것은 명백한 사실일 것이다.

연구 설계

포함 기준에 맞는 소아들은 초기 미팅을 위해 초대받은 후, 대략 3개월 및 6개월 이후의 후속 방문을 위해 일정을 잡았다. 참가자는 치료군 또는 대조군 그룹으로 1:1의 비율로 무작위 배정되었다. 초기 미팅 및 첫번째 후속 방문 시에, 각 그룹에 락토바실러스 또는 위약을 각각 함유하는 분말화된 제형이 제공되었고, 총 6개월의 기간 동안 매일 1회, 분말을 100mL의 차가운 액체에 용해하거나 또는 과일/식품과 혼합한 후, 식사와 함께 섭취함으로써 상기 제품을 매일 소비하고, 프로바이오틱을 함유하는 어느 다른 식품 제품의 소비를 중단하고, 야채를 냉장 보관 (2-8°C)하도록 지시하였다. 부모들은 또한 뜨거운 음료 또는 뜨거운 식품에 상기 분말을 첨가하지 않도록

록 지시받았다. 매 방문시마다, 10mL의 정맥혈 및 대변 샘플을 수집하였다. 치료 또는 대조군 그룹에 대한 할당은 참가자, 의료진 및 실험실 직원에게 알리지 않았다(blinded).

[0079] **조직 트랜스글루타미나제 자가 항체 분석- CD를 발생시키는 면역적인 위험 인자**

[0080] 방사능 리간드 결합 에세이 (Radioligand binding assays, RBA)를 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 tTGA를 평가하였다 ((Agardh D 등, *Pediatric Diabetes*. 2001;2(2):58-65) (Agardh D 등, Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway: 1992). 2004;93(8):1046-51). 간략히, 인간 조직 트랜스글루타미나제 (tTG)는 35S-메티오닌 (Perkin Elmer, 미국 매사추세츠 월섬 소재)의 존재 하에, TNT SP6 결합된 망상적혈구 용해물 시스템 (Promega, 미국 위스콘신 매디슨 소재)을 사용하는, 시험관내 전사 및 cDNA의 번역에 의해 합성되었다. IgG-tTGA 및 IgA-tTGA 둘 다 분석되었다. IgG-tTGA 분석을 위해, 35S-tTG를 희석하여 인간 혈청에 첨가하고, 4°C로 밤새 항온처리하였다. 단백질 A 세파로스 (PAS) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 미국 캘리포리아 칼즈배드 소재)를 사용하여, 혈청 내의 IgG에 결합시킴으로서, 유리 상태 및 항체-결합된 35S-tTG를 분리하였다. PAS 및 면역 침지된 35S-tTG-혈청을 96 웰 MultiScreenHTS DV 필터 플레이트 (Merck Life Science, 독일 다름슈타트 소재)에 첨가하고, 평판 진탕기 상에서 항온처리한 후, 세정한다. OptiPhase Supermix 신틸레이션 각테일 (Perkin Elmer)을 첨가하고, 반응성을 MicroBeta Counter TriLux (Perkin Elmer)에서 측정하였다. 염소 항-인간 IgA-아가로스 (Merck Life Science)를 PAS 대신 사용한 점을 제외하고는, IgA-tTGA 분석이 유사하게 실시되었다. TGA의 수준은 U/mL로서 표현되며, 각각의 IgA-tTGA 및 IgG-tTGA가 대략 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 및 1000 U/mL로 포함되는 표준 곡선으로부터 계산되었다. IgG-tTG 및 IgA-tTG의 양의 값의 컷 오프 수준은 >4.0 U/mL로 설정되었고, 이는 398명의 성인 혈액 공여자의 99 퍼센트를 나타낸다 (Agardh D 등, *Acta paediatrica*. 2004;93(8):1046-51). 선택적인 IgA 결핍이 의심되는 경우, 참가자는 이들의 원래 연구의 일부로서 총 IgA 수준에 대하여 시험되었다; 그러나, 이러한 질환은 참가자들 간에는 탐지되지 않았다.

[0081] **락토바실러스 배양액 제조 및 치료 산물의 조성물**

[0082] 락토바실러스 배양액은 스웨덴 룬드 소재의 Probi AB 사에 의해 제조되었다. 활성을 갖는 제품은 L. 플란타룸 HEAL 9 (DSM 15312) 및 말토텍스트린 (Glucidex IT-19, 프랑스 로게트 소재)과 조합된 동결-건조 L. 파라카세이 8700:2 (DSM 13434)로 이루어지며, 조합되어 1×10^{10} CFU를 포함하는 분말의 형태이고, 각각의 종은 동등하게 표시되었다. 분말화된 말토텍스트린 및 효모 펩톤 (HYP-A, BioSpringer, France)으로 이루어지는 위약은 색상 및 맛을 조절하여, 두 시험 산물 (프로바이오틱 및 위약)은 외관 및 맛에서 동일하였다. 참가자는 상기 산물을 냉장고에 보관하고, 매일 아침 1 그램의 사체를 소비하도록 지시받았다. 산물의 효능과 관련된 것은 농도 (즉 조성물의 질량 또는 부피의 단위 당 락토바실러스의 질량 또는 숫자)라기보다는 락토바실러스의 총 CFU인 것은 명백한 사실일 것이다.

[0083] **유세포 분석**

[0084] 단핵성 세포 (PBMCs)의 분리

[0085] 실시예 1의 코호트 유래의 말초혈 단핵구 (PBMC)는 친수성 다당류 (BD Vac® CPT™ 세포 제조 튜브 FICOLL™ 4 mL, Cat No 362760 Becton Dickinson, 미국 뉴저지 소재)를 사용하여 밀도 구배 원심 분리(1800 G)에 의해 전혈로부터 분리하였다. 세포는 혈액 샘플 수집의 2-24 시간 이내에 분리되었다. 흡입된 중간 부분의 단핵구 층을 L-글루타민(GIBCO no 21875034, Thermo Fisher Scientific, 스웨덴 예테보리 소재)을 포함하는 RPMI-1640 배지로 3회 세척하였다. 세포는 RPMI-1640 중 $1-4 \times 10^6$ /mL 림프구의 최종 농도가 되도록 (즉, PBMC 현탁액의 부피를 조절하여, mL당 $1-4 \times 10^6$ 림프구가 있음), Abbott CELL_DYN Ruby 상에서 계수되었다 .

[0086] 면역 염색 프로토콜

[0087] 요약

[0088] 계수한 이후, PBMC를 표면 및 세포내 구조에 대한 단일 클론 항체로 염색하였다. 단일 클론 항체 (표 2)는 4가지 형광 색소인 플루오로세인 이소티오시아네이트 (FITC), 파이크에리트린 (PE), 페리딘 염록소 단백질 (PerCP) 및 알로파이코시아닌 (APC)으로 사전-표지되었다. 염색된 면역은 4-색 FACSCalibur® 기기 (BD Biosciences, 미국 캘리포리아 소재)를 사용하여 레이저 빔을 통과시킴으로서 분석되었다. FACSCalibur®는 세포 집단을 한정하고, 이들의 크기, 과립성 및 형광 강도의 특징에 의해 세포를 계수한다. 광학적 탐지기는 광신호를 증폭하고 이를 전기적 데이터 신호로 전환한다. 데이터를 얻어, CellQuestPro® 소프트웨어 (BD

Biosciences)에서 분석하였다.

표 1: 유세포 분석에 사용된 항체.

항체 & 형광색소	공급 회사	카탈로그 번호
CCR9 APC	R&D Systems, Inc., 영국 애빙던 소재	FAB17991A
CD45RO APC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	559865
CD62L APC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	559772
IgG1 isotype APC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	555751
CD25 FITC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	555431
CD3 FITC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	555332
CD38 FITC	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	340909
CCR4 PE	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	551120
CD8 PE	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	345773
CD45RA PE	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	555489
인테그린 베타 7 PE	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	555945
CD19 PerCP	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	345778
CD4 PerCP	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	345770
CD8 PerCP	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	345774

[0089]

CD3 FITC/CD16 + CD56 PE	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	342403
IgG2a 이소타입 FITC/IgG1 이소타입 PE/CD4 PerCP-Cy 5.5	BD Biosciences, 미국 캘리포니아 소재	340965
인간 IgG 이소타입 대조군	Fisher Scientific, 스웨덴 예테보리 소재	12000C
eBioscience™ 인간 조절 T 세포 염색 키트 (CD4, CD25, FoxP3)	AH diagnostics AB, 스웨덴 솔나 소재	88-8999-40

[0090]

표 2: 유세포 분석에 사용된 항체 조합 및 농도

직접 염색					
튜브	혼합물 패널	표지	100μL 중의 Mab 제제	희석	획득, 수집 및 구분된(gated) 림프구의 수
1	이소타입 대조군	FITC/PE/PerCP APC	5 μL 2.5 μL	1/20 1/40	3000
2	CD3 CD16+56 CD19	FITC PE PerCP	5 μL 5 μL 20 μL	1/20 1/5	10000
3	CD3 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 μL 0.4 μL 5 μL 20 μL	1/20 1/250 1/20 1/5	10000
4	CD3 CD45RA CD8 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 μL 0.4 μL 2.5 μL 20 μL	1/20 1/250 1/40 1/5	10000
5	CD3 CD8 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	5 μL 0.4 μL 5 μL 2.5 μL	1/20 1/250 1/20 1/40	10000
6	CD25 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 μL 0.4 μL 5 μL 20 μL	1/10 1/250 1/20 1/5	100000
7	CD25 CCR4 CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 μL 2.5 μL 5 μL 20 μL	1/10 1/40 1/20 1/5	50000
8	CD25 CCR4 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 μL 2.5 μL 5 μL 2.5 μL	1/10 1/40 1/20 1/40	50000

[0091]

9	CD45 RA 인테그린 β7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	10 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/10 1/10 1/20 1/20	50000
10	CD3 인테그린 β7 CD4 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
11	CD3 인테그린 β7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
12	CD38 인테그린 β7 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 μL 10 μL 5 μL 2.5 μL	1/10 1/10 1/20 1/40	50000
인간 조절 T 세포 염색 키트					
튜브	혼합물 패널	표지	100μL 중의 Mab 제제	희석	획득된 세포의 수
13	이소타입 대조군 IgG2a	PE	20 μL	1/5	3000
14	CD4/CD25 FoxP3	FITC/APC PE	20 μL 혼합물 20 μL	1/20 & 1/5 1/5	50000

[0092]

[0093] 차단(blocking)

[0094] PBMC는 2개의 튜브로 나누었다: RPMI 중의 약 $2-4 \times 10^6$ 림프구/mL PBMC를 차단하기 위한 튜브 A; RPMI의 첨가에 의해 약 $1-2 \times 10^6$ 림프구/mL까지 희석된, PBMC를 차단 없이 염색하기 위한 튜브 B. 튜브 A 중의 PBMC는 정상 인간 IgG (1/34 희석)를 빛으로부터 보호된 상태에서 15분 동안 2-8°C로 항온 처리하였다.

[0095] 직접 염색 (튜브 1-12)

- [0096] 상기 표의 튜브 1-12에 의한 항체 혼합물은 FACS 튜브 (BD Falcon, VWR cat no 352052) 내에서 제조되었다. 튜브 A로부터의 차단된 PBMC를 튜브 9-11에 첨가하고, 튜브 B로부터의 비-차단된 PBMC를 튜브 1-8 및 12에 첨가하였다. FACS 튜브 1-12는 가볍게 볼텍스하고, 빛으로부터 보호한 상태에서 30분 동안 2-8℃로 항온 처리하였다. 염색된 PBMC에 2ml의 차가운 인산 완충 식염수 (PBS, pH 7.4, Gibco cat no 10010-015, Fisher Scientific, 스웨덴 에테보리 소재)를 첨가하고, 이를 가볍게 볼텍스하고, 원심분리하고 (10분, 400×g), 상청액을 버림으로서 세척하였다. 염색된 PBMC는 200 μ l 차가운 PBS-1% 포름알데히드 용액 (3 부 PBS, pH 7.4, Gibco cat no 10010-015 내지 1 부 4% 포름알데히드 용액, Apoteket cat no 34 24 36) 중에 재현탁하고, 빛으로부터 보호된 상태에서 2-8℃로 밤새 항온 처리함으로서 고정한다.
- [0097] 인간 조절 T 세포 염색 키트에 의한 염색 (튜브 13-14)
- [0098] FACS 튜브 13 (상기 표 참고)는 튜브 B로부터의 100 μ l 비-차단된 PBMC에 의해 제조되었다. FACS 튜브 14 (상기 표 참고)는 20 μ l의 CD4 FITC/CD25 APC 각테일 및 튜브 A로부터의 100 μ l의 차단된 PBMC에 의해 표면 염색하고, 가볍게 볼텍스한 후, 30분 동안 빛으로부터 보호된 상태에서 2-8℃로 항온처리하여 제조하였다. 튜브 13 및 14 내의 PBMC에 2ml 차가운 PBS를 첨가하고, 이를 가볍게 볼텍스하고, 원심분리하고 (5분, 400×g), 상청액을 버림으로서 세척하였다. 튜브 13 및 14 내의 PBMC는 1ml 고정/침투 용액 (1부의 고정/침투 4×농축물 및 3부의 고정/침투 희석물) 중에 재현탁하고, 빛으로부터 보호된 상태에서 2-8℃로 밤새 항온 처리함으로서 고정되었다.
- [0099] 고정된 PBMC (튜브 13 및 14)는 세척하고, 원심분리하고 (10분, 400×g), 상청액을 버리고, 2ml의 1×침투 버퍼 (1부의 10×침투 버퍼 및 9부의 증류수) 중에 재현탁하고, 가볍게 볼텍스하고, 앞선 4개의 단계들을 다시 반복하고, 최종적으로 다시 원심분리(10분, 400×g)함으로서 침투된다. 튜브 14 중의 침투된 PBMC는 빛으로부터 보호된 상태에서 15분 동안 2-8℃로 항온처리함으로서, 2 μ l 정상 래트 혈청으로 차단되었다. 세포내 염색은 20 μ l 래트 IgG2a 이소타입 대조군 PE를 튜브 13에 첨가하고, 20 μ l 항-인간 FoxP3 PE를 튜브 14에 첨가한 후, 빛으로부터 보호된 상태에서 30분 동안 2-8℃로 항온처리함으로서 수행되었다. 염색된 PBMC는 2ml PBS로 세척하고, 가볍게 볼텍스하고, 원심분리하고 (10분, 400×g), 상청액은 유세포 분석에 앞서 200 μ l PBS 중에 세포를 재현탁하기 전에 폐기되었다.
- [0100] 유세포 분석
- [0101] Becton Dickinson FACSCalibur®은 광학 시스템에서 단일 입자 또는 세포의 6개의 상이한 변수들을 검출할 수 있다. 상기 장비는 광 산란 및 형광 강도를 디지털 펄스로 전환시킨다. 전방 산란 (FSC)은 크기의 측정을 제공하고, 측면 산란 (SSC)은 세포질 과립성의 측정을 제공한다. 상기 장비는 4-색 형광 검출기를 갖는다: 청색 (488nm) 레이저는 FL1, FL2 및 FL3을 검출하고, 추가적인 적색 다이오드 레이저 (635nm)는 FL4를 검출한다.
- [0102] 기기의 주기적인 시스템 세정 이후, 3-색 CalIBRITE 비드 (BD no 340486) 및 CalIBRITE APC 비드 (BD no 340487) 및 AutoCOMPTM 소프트웨어에 의한 교정 점검(calibration check)으로 광전 배증관 (PMT) 전압을 설정하고 조절하며, 검출기의 형광 보상을 최적화하도록 실행된다(FL1; FL2, FL3 및 FL4). CalIBRITE 비드는 정확한 크기를 가지며, 비염색 및 염색된 백혈구를 모의하는 정확한 양의 형광 색소를 표지된다. AutoCOMP™ 소프트웨어는 CalibFile를 생성하였다. 모든 단일 클론 항체는 Calib File 기기 셋팅에 의해 사전-역가 측정되었다. CellQuest Pro 소프트웨어를 사용하여, BD FACSCalibur를 전개하였다. 3000-10000개의 획득, 수집 및 구분된 (gated) 림프구를 상기 표에 따른 각 튜브에 대해 측정하였다.
- [0103] 이소타입-매칭된 대조군 항체들 [IgG2/IgG1/CD4 이소타입 (FITC, PE 및 PerCP-Cy 5.5) 및 IgG1 이소타입 (APC), BD Biosciences, CA USA]을 사용하여, 닷 플롯 사분면을 설정하고, 오염된 비-림프구를 삭감함으로서 림프구 집단의 백분율을 계산하였다. 림프구가 식별되고, 닷 플롯 내에 구분되어, 측면 산란 (세포질 과립) 및 FL1 변수 (FITC 양성 강도) CD3+ T-세포를 나타내었다. 림프구의 다색 백 게이트는 이후 FSC 및 SSC 닷 플롯에 나타내었다. 구역은 이들 식별된 림프구 (림프구 게이트) 주위에 설정되었다. 관심 대상의 염색된 단일 클론 항체의 상이한 2-변수 조합들 (FL1, FL2, FL3 및 FL4)을 갖는 림프구 게이트로부터 새로운 닷 플롯이 제시되었고, 이후 특징적인 하위셋트가 식별되었다. 사분면은 이소타입 대조군, 음성 집단으로부터의 2변수 닷 플롯 내에 설정되었다. 하위 셋트는 림프구 게이트 내의 4분면 집단의 백분율로 기록되었다. 림프구 게이트 내의 비-염색된 음성 세포는 삭감되었다. 본원에 사용된 용어 "백혈구"는 PBMC(즉, 분리된 세포의 총 집단)를 의미한다.
- [0104] 구체적으로, T 세포의 하위 그룹인, CD4+ (T_h) 또는 CD8+ (T_c) 세포가 림프구 게이트로부터 구분되었다. 이러한 게이트로부터, 미경험 세포는CD3+CD4/CD8+CD45RA+CD45RO-로서 구분되고, 기억 세포는 CD3+CD4/CD8+CD45RA-CD45RO+로서 구분된다. 활성화 및 분화된 효과기 및 기억 세포는 CD3+CD4/8+CD62L+, CD4+CD25+CD45RA+CD45RO+,

CD4+CD25+CCR4+CD45RO, CD4+CD25+CCR4+CD62L+, CD8+CD45RA+CCR9+β 7+, CD3+CD4+/CD8+β 7+CCR9+, CD4+CD38+β 7+CD62-로서 구분되었다. B 세포는 CD3-CD19+ 림프구로 정의된다. 림프구 게이트로부터, CD4+ 세포가 구분된 후, CD25+ 세포에 대해 구분된다. 이 집단은 이후 FoxP3+ 세포의 발현에 대해 평가받았다. CD4+CD25+ 게이트로부터, 최대 CD25 발현백분율을 갖는 CD4+CD25^고가 결정되었다. CD4+CD25^고 림프구 집단은 이후 FoxP3의 발현에 대해 추가로 평가받았다. NK 세포는 림프구 게이트로부터 구분되었다. 이 게이트로부터, NK 세포는 CD3-CD16+/CD56+ 세포로서 구분되었다.

[0105] 림프구 에세이 부위는 >70% 림프구를 포함하였다. CD3+ T-세포의 내부-에세이(intra-assay) 분석은 3%의 공분산(covariance)을 나타내었고, CD3+ T-세포의 상호-에세이(inter-assay) 분석은 5%의 공분산을 나타내었다.

[0106] **통계적 분석**

[0107] 연구 결과는 6개월 이후 tTG 자가항체의 혈청 수준의 변화 (1명의 소아가 불충분한 부피를 이유로 배제되었다), 및 B 세포, NK 세포, 및 조절 T 세포의 하위집단의 말초 면역반응에서의 변화로 평가할 때 소아 지방변증 자가 면역성이다. 2원 변수의 상기 그룹들 간의 비교는 피셔 정확 시험(Fisher's exact test)의 평균에 의해 실시되었다. 연속 및 순위화된 분류 데이터 그룹들 간의 비교는 윌콕슨 순위합(Wilcoxon rank-sum) 시험에 의해 실시되었는데, 예를 들어 윌콕슨 순위합 시험은 0, 3 및 6개월 시점에서 프로바이오틱-치료군과 위약군 간의 tGA 수준을 비교하는데 사용되었다. 각 그룹 내의 시간의 경과에 따른 tGA 수준의 변화를 비교하기 위해, 연속 변수에 대한 윌콕슨 부호위수 (Wilcoxon signed rank) 시험이 사용되었다. IgA-tGA 및 IgG-tGA의 수준은 별개의 데이터 셋트로 분석되었다. 마찬가지로, 윌콕슨 순위합 시험은 유세포 측정으로 분석된 변수들에 대하여 기준으로부터 3 및 6개월 시점까지의 측정된 변화에 대하여, 프로바이오틱-치료군 및 위약군 간의 비교를 위해 적용되었다. 윌콕슨 부호위수 시험은 각 그룹 내의 기준으로부터 3 및 6개월 시점까지의 차이점을 측정하기 위해 사용되었다. t-시험은 그룹들 간의 HLA 분포를 비교하기 위해 사용되었다.

[0108] 누락된 데이터는 귀속되지 않았다. 즉, 분석은 관찰된 경우이다. 탈락(drop-outs)의 영향을 피하고, 임상 시험 지침에 완벽하게 부합하는 소아들에 대한 치료의 비교를 제한하기 위해, 치료 목적(intention-to-treat) 분석 및 프로토콜에 따른(per-protocol) 분석이 수행되었다. 모든 기록된 p-값은 양 방향(2-sided)이고, 다수를 위해 조정되지 않았다 (즉, 공칭). < 0.05의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 통계적 분석은 StatXact 버전 10.1 (Cytel, Cambridge, MA, USA)에서 실시되었다.

[0109] **결과- L. 파라카세이 및 L. 플란타룸 균주에 의한 치료는 소아 지방변증 자가면역성 (CDA)에서 tTG 자가 항체를 감소시켰다.**

[0110] 총 118명의 소아가 포함 기준을 만족하였으며, 연구 참가를 요청받았다. 이들 중 90명의 소아 및 이들의 보호자가 연구 참가에 동의하였다: CiPiS 연구로부터 1명 및 TEDDY 연구로부터 나머지 89명. 이들 중 12명 (13%)은 초기 방문 이후 연구에서 떠났다. 1명의 소아가 혈액 샘플이 tTG 분석을 수행하기에 불충분한 부피인 것을 이유로 배제되었다. 전체적으로, 77명 (87%)의 소아가 최종 데이터 세트에 포함되었다; 각각, 프로바이오틱-치료군 중의 40명 (52%) 및 위약군 중 37명 (48%). 이들 그룹의 기준 특성은 표 3에 나타나있고, HLA 분포는 표 3A에 나타나있다. 평균 및 중간 연구 지속 기간은 각각 188일 및 190일이었었다 (Q1: 176.5일, Q3: 203일, 153 - 237 일에 걸쳐 분포됨).

표 3: 연구 개시시 (첫번째 방문)의 기준 특성들.

	치료 n = 40	위약 n = 37	p-값
연령, 나이, 평균	4.85	4.42	0.284 ¹
성별, n			0.172 ²
남자	22	14	
여자	18	23	
중량, kg, 평균	22.0	20.8	0.182 ¹
신장, cm, 평균	114.0	110.8	0.243 ¹

¹ 윌콕슨 순위합 (Wilcoxon Rank Sum) 시험, 양 방향 (2-sided); ² 피셔 정확(Fishers Exact) 시험, 양말단

[0111]

표 3A: 연구 집단의 HLA 분포

HLA-유형	프로바이오틱 그룹 n (%)	위약군 n (%)	p-값
DR3-DQ2/DR4-DQ8	10 (25.0)	16 (42.1)	0.112
DR4-DQ8/DR4-DQ8	10 (25.0)	7 (18.4)	0.488
DR4-DQ8/DR8/DQ4	4 (10.0)	2 (5.2)	0.439
DR3-DQ2/DR3-DQ2	15 (37.5)	13 (34.2)	0.766
DR4/DR1	1 (2.5)	0 (0.0)	0.333

표 4: 조직 트랜스글루타미나제 자가 항체 (tTGA) 수준, IgA 및 IgG. p-값은 각 방문시 치료군과 위약군의 비교값이다.

	방문 1	방문 2 (약 3 개월)	방문 3 (약 6 개월)
tTGA-IgA, 평균 (중간)			
치료	158.80 (4.71)	72.84 (3.07)	55.41 (2.69)
위약	12.96 (4.38)	21.98 (4.93)	38.23 (3.72)
p-값 ¹	0.8912	0.3013	0.6545
tTGA-IgG, 평균 (중간)			
치료	186.98 (1.57)	141.74 (1.64)	86.35 (1.61)
위약	8.00 (1.60)	14.26 (1.56)	64.33 (1.36)
p-값 ¹	0.8480	0.9373	0.5428

¹ 윌콕슨 순위합 시험, 양 방향

3개월 이후, tTG-IgG의 수준은 기준 수준에 비해 프로바이오틱 군에서 평균 29.4 ± 513 U/ml 감소하였고, 위약군에서는 평균 6.3 ± 48 U/ml 증가하였으나 (각각, $p=0.046$ 및 $p=0.034$), 3개월 이후 상기 그룹들 간의 IgA-tTG 수준에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 6개월 이후, 프로바이오틱 군에서는 IgA-tTG (평균 감소 107.0 ± 855 U/ml; $p=0.013$) 및 IgG-tTG (평균 감소 84.7 ± 748 U/ml; $p=0.062$) 모두에 대해 수준이 감소하였고, 위약군에서는 그 반대였으며, IgA-tTG (평균 증가 25.0 ± 161 SD U/ml; $p=0.043$) 및 IgG-tTG (평균 증가 56.2 ± 349 U/ml; $p=0.008$) 모두에 대해 기준에 비해 증가된 수준이 나타났다.

결과- L. 파라카세이 및 L. 플란타룸 중에 의한 치료는 자연 살해 T 세포의 비율을 감소시키고, 자연 살해 세포의 증가된 비율을 상쇄하고, 세포 독성 T 세포에서의 CD62L 발현을 감소시킨다.

유세포 분석을 사용하여 양쪽 연구 그룹에서, 기준 시점 및 각각의 후속 방문 시의 백혈구의 갯수 및 상태에서의 임의의 변화를 평가하였다.

표 5는 CD3+ CD56+ 세포로 식별된 자연 살해 T (NK-T) 세포의 백분율이 락토바실러스 치료에 의해 감소하였고, 그 감소가 치료군 ($p=0.0297$) 내에서 그리고 치료군과 위약군의 사이에서, 두번째 후속 방문시 통계적으로 유의한 것으로 나타낸다 ($p=0.0079$). 표 6은 CD3-CD56+로 식별된 자연 살해 (NK) 세포의 백분율이 프로바이오틱 군 ($p=0.0381$)에 비해, 위약군에서 6-개월 방문에 의해 통계적으로 유의하게 증가한다는 것을 나타낸다.

표 7은 세포 독성 T 세포(CD3+CD8+)의 수를 나타내는데, 제1 후속 방문 (3개월) 시에만 위약군에서 평균 1.74% 증가하였다 ($p=0.017$). 표 7A는 구분된 T_H 세포(CD3+CD4+)의 비율을 나타내는데, 두번째 후속 방문시 (6개월) 위약군에서 평균 5.55% ($p=0.039$) 감소한 반면, 프로바이오틱 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

표 7에 더하여, 표 8 및 9에서의 CD3+CD8+ 세포 표면 상의 CD62L의 발현은, 두번째 후속 방문시 위약에 비해 프로바이오틱 치료군에서 더 많은 CD62L^지 세포 독성 T 세포 ($p=0.0815$) 및 더 적은 CD62L^고 세포 독성 T 세포 ($p=0.0729$)를 갖는 통계적 경향을 나타내었다. CD62L는 세포 접착 분자 L-셀렉틴인데, 이는 내피 세포와 림프구의 상호작용에 관계되어, 두번째 림프 조직으로의 도입을 돕는다. 세포 표면 상의 CD62L의 존재는 미경험 상태 (CD62L^고)를 나타내는 반면, 세포가 활성화된 경우 이들은 이들 표면으로부터 CD62L를 방출한다 (CD62L^지). 표 9A에서는 또한 두번째 후속 방문시 위약군에서 CD3+CD8+CD62L^지 세포 감소를 거의 나타나지 않았으나(평균 0.86% 감소, $p=0.014$), 프로바이오틱 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0120]

표 7A에 더하여, 표 9B는 위약군에서의 CD3+CD4+CD62L^지 세포의 감소 경향을 나타낸 반면 (평균 5.55% 감소, $p=0.039$), 프로바이오틱 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

표 5: NK-T 세포 CD3+CD56+ (림프구의 NK-T 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	33	39	38	32	31
	누락	13	7	8	14	15
	최소	0.10	0.10	0.10	-1.54	-3.67
	중간	0.44	0.45	0.44	-0.09	-0.16
	최대	4.74	3.27	1.60	1.57	1.00
	평균	0.77	0.67	0.51	-0.12	-0.29
	표준편차	0.85	0.62	0.34	0.66	0.81
	P-값	NA	NA	NA	0.2082	0.0297
위약	N	32	34	34	30	30
	누락	12	10	10	14	14
	최소	0.12	0.22	0.19	-0.95	-0.94
	중간	0.46	0.49	0.58	0.02	0.18
	최대	1.26	1.30	2.35	0.97	1.72
	평균	0.55	0.59	0.69	0.04	0.13
	표준편차	0.30	0.33	0.40	0.41	0.52
	P-값	NA	NA	NA	0.6815	0.1082
P-값		0.4590	0.8238	0.0202	0.2316	0.0079

[0121]

표 6: NK 세포 CD3-CD56+ (림프구의 NK 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	33	39	38	32	31
	누락	13	7	8	14	15
	최소	1.11	3.14	1.68	-26.45	-34.27
	중간	8.79	7.63	7.07	0.18	-1.61
	최대	43.71	21.95	15.14	8.62	10.74
	평균	10.69	8.33	7.76	-2.01	-2.86
	표준편차	8.99	4.55	3.50	7.54	9.81
	P-값	NA	NA	NA	0.4559	0.2639
위약	N	32	34	34	30	30
	누락	12	10	10	14	14
	최소	2.37	1.99	3.08	-11.55	-6.78
	중간	7.18	7.11	7.65	1.80	2.18
	최대	26.01	27.77	47.42	9.55	21.41
	평균	8.33	8.44	10.62	0.66	2.68
	표준편차	5.52	5.02	8.32	4.29	6.55
	P-값	NA	NA	NA	0.1347	0.0606
P-값		0.2930	0.8842	0.2172	0.2194	0.0381

[0122]

표 7: CD3+CD8+ (CD3+ 림프구의 세포 독성 T 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	19.23	20.42	24.06	-9.73	-4.15
	중간	33.62	33.22	34.56	0.93	1.14
	최대	42.13	45.21	44.05	13.63	15.40
	평균	32.51	33.50	34.08	1.24	2.10
	표준편차	6.22	6.04	5.67	4.47	4.94
	P-값	NA	NA	NA	0.1122	0.0732
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	17.62	17.33	17.47	-4.17	-14.04
	중간	32.39	33.08	31.86	1.12	0.31
	최대	47.94	50.53	47.49	9.93	16.86
	평균	32.10	33.53	33.15	1.74	1.01
	표준편차	7.70	8.53	7.37	3.36	6.35
	P-값	NA	NA	NA	0.0171	0.6295
P-값		0.6181	0.9679	0.4206	0.4643	0.4136

[0123]

표 7A: CD3+ CD4+ (CD3+ 백혈구의 T-도움 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	2.13	1.21	4.73	-30.81	-38.10
	중간	14.95	13.71	11.75	-1.34	-3.01
	최대	48.34	31.08	29.82	19.02	17.09
	평균	17.04	13.84	14.63	-2.47	-3.44
	표준편차	9.78	7.36	6.79	12.40	12.63
	P-값	NA	NA	NA	0.3176	0.2286
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	1.06	6.40	0.93	-32.01	-31.93
	중간	14.04	13.30	13.35	0.04	-4.07
	최대	50.33	35.42	29.26	11.53	14.57
	평균	19.01	15.61	14.20	-4.43	-5.55
	표준편차	12.82	8.00	7.13	11.98	12.61
	P-값	NA	NA	NA	0.2508	0.0386
P-값		0.8244	0.4243	0.8073	0.8649	0.6679

[0124]

표 8: CD3+CD8+CD62L^저 (CD3+CD8+ 세포의 CD62L^저 %, 또는 림프구의 %로서 CD62L^저의 발현이 낮은 세포 독성 T 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	12.93	11.02	12.99	-30.81	-22.56
	중간	30.01	25.78	28.38	0.12	2.86
	최대	61.80	70.98	90.33	43.51	60.32
	평균	32.53	32.12	33.72	0.89	3.66
	표준편차	13.05	15.49	18.31	17.39	16.52
	P-값	NA	NA	NA	1.0000	0.3495
	P-값	1.0000	0.7983	0.3736	0.7692	0.0815
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	8.59	10.38	13.17	-25.80	-21.86
	중간	33.01	28.55	25.92	-2.69	-3.39
	최대	55.58	63.70	68.32	55.02	34.12
	평균	32.15	31.07	28.73	-0.63	-3.25
	표준편차	10.91	14.24	13.44	15.51	14.66
	P-값	NA	NA	NA	0.5619	0.1622
	P-값	1.0000	0.7983	0.3736	0.7692	0.0815

[0125]

표 9: CD3+CD8+ CD62L^고 (CD3+CD8+ 면역의 CD62L^고 %, 또는 CD62L^고의 발현이 높은 세포 독성 T 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	38.20	28.91	7.83	-43.45	-61.92
	중간	69.75	73.68	71.19	-0.19	-2.72
	최대	87.07	88.73	86.80	31.37	22.56
	평균	67.25	67.68	65.74	-0.87	-4.07
	표준편차	13.13	15.42	18.30	17.46	16.37
	P-값	NA	NA	NA	1.0000	0.2867
	P-값	0.9554	0.8206	0.3001	0.7212	0.0729
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	44.42	35.40	31.27	-56.01	-34.20
	중간	66.93	71.24	73.51	3.18	3.26
	최대	91.41	89.62	86.56	25.80	21.86
	평균	67.62	68.63	71.03	0.56	3.24
	표준편차	10.91	14.31	13.40	15.51	14.65
	P-값	NA	NA	NA	0.4846	0.1689
	P-값	0.9554	0.8206	0.3001	0.7212	0.0729

[0126]

표 9A: CD3+CD8+ CD62L^저 (CD3+CD8+ 세포의 CD62L^저 %, 또는 백혈구의 %로서 CD62L^저의 발현이 낮은 세포 독성 T 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	0.62	0.14	0.57	-3.63	-5.08
	중간	2.53	2.11	2.43	-0.37	-0.10
	최대	10.30	14.95	7.67	12.94	4.87
	평균	2.91	2.54	2.75	0.01	-0.01
	표준편차	2.05	2.37	1.61	2.84	1.93
	P-값	NA	NA	NA	0.2917	0.7922
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	0.20	0.63	0.23	-5.70	-4.99
	중간	2.70	2.26	2.02	-0.31	-0.85
	최대	8.68	7.48	7.66	4.58	4.78
	평균	2.98	2.62	2.24	-0.45	-0.86
	표준편차	2.03	1.58	1.56	1.89	2.09
	P-값	NA	NA	NA	0.2087	0.0143
P-값		0.7241	0.5793	0.1456	0.8460	0.0879

[0127]

표 9B: CD3+CD4+ CD62L^저 (CD3+CD4+ 세포의 CD62L^저 %, 또는 백혈구의 %로서 CD62L^저의 발현이 낮은 T-도움 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	0.35	0.31	0.63	-5.97	-5.16
	중간	2.42	1.74	1.85	-0.47	-0.67
	최대	7.69	17.53	10.62	15.99	5.43
	평균	2.83	2.45	2.59	-0.30	-0.18
	표준편차	1.80	2.92	2.05	3.64	2.44
	P-값	NA	NA	NA	0.1446	0.3330
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	0.27	0.61	0.13	-4.93	-6.83
	중간	2.56	2.19	2.06	-0.23	-0.83
	최대	10.62	5.69	6.82	3.67	2.86
	평균	3.25	2.41	2.31	-0.86	-0.91
	표준편차	2.20	1.38	1.54	1.98	2.15
	P-값	NA	NA	NA	0.0702	0.0506
P-값		0.4414	0.2857	0.6680	0.8336	0.4559

[0128]

[0129] **결과- L. 파라카세이 및 L. 플란타룸 균주에 의한 치료는 T 도움 세포 (CD4+ CD25+ 세포) 활성화의 증가, 및 CD4+CD25+FoxP3+ 세포의 증가를 방지한다.**

[0130] 추가적인 유세포 분석은 T 도움 세포 (CD3+CD4+로 식별됨)에 포커스를 맞추었고, CD4+ T 도움 세포의 하위-집단들은 2개의 연구 그룹들 간에 상이하였다.

[0131] 표 10은 두번째 후속 방문 (6개월)시에 미경험 T_H 세포 (CD4+CD45RA+CD45RO-)의 집단이 위약군에서는 평균 4.73% ($p=0.002$) 감소한 것을 나타내었다. 표 10은 또한 락토바실러스 치료가 위약에 비해 미경험 T 세포 마커 CD45RA+/RO-를 갖는 세포의 비율에서의 이러한 감소를 방지하는 것을 나타내었다 (V1-V0에 대해 $p=0.0532$; V2-V0에 대해 $p=0.0217$). 반대로, 표 11은 기억 T_H 세포 (CD4+CD45RA-CD45RO+)의 집단이 위약군에서는 두번째 후속

방문 (6개월) 시에 평균 3.07% ($p=0.003$) 감소했다는 것을 나타내었다. 표 11은 또한 락토바실러스 치료가 위약에 비해 기억 T 세포 마커 CD45RA-/RO+를 갖는 세포의 비율에서의 이러한 증가를 방지한다는 것을 나타낸다 (V1-V0에 대해 $p=0.0650$; V2-V0에 대해 $p=0.0198$).

[0132] 표 10A는 위약군에서는 두번째 후속 방문 (6개월) 시에 미경험 T_C 세포 (CD8+CD45RA+CD45RO-)의 집단이 평균 2.17% ($p=0.030$) 감소한 반면, 프로바이오틱 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다는 것을 나타내었다.

[0133] 락토바실러스 치료가 또한 위약에 비해 기억 (CD45RO+) T-도움 세포의 백분율의 증가를 방지하였고 (표 12-15), CCR4를 발현하는 기억 T_H 세포 (CD4+CD45RO+CCR4+)의 백분율 증가를 방지하였다 (위약군 평균 증가 7.63%, $p=0.003$; 비교적인 $p=0.0110$; 표 15A).

[0134] 락토바실러스 치료가 CD38 세포외 효소 (ectoenzyme) 및 당단백질 세포 접착 분자를 발현하나 L-셀렉틴 (CD62L)을 발현하지 않는 CD4+ CD38+ CD62L-T 도움 세포에서의 감소를 방지하였다(두번째 후속 방문시의 경향) (표 16, $p=0.0753$). 치료가 또한 두번째 후속 방문 시에 관찰된 CD4+ CCR9+ $\beta 7$ + T 도움 세포의 감소를 방지한다 (표 17, $p=0.0382$). T 세포 표면 상의 $\beta 7$ [장 귀소(homing) 수용체 $\alpha 4\beta 7$ 유래]의 발현이 장 귀소 세포의 특징으로 간주된다.

[0135] 표 18은 락토바실러스 치료가 두번째 후속 방문시 활성화된 T 도움 세포의 비율 증가를 방지하는 것을 나타내며, 상기 활성화는 CD25, 즉 인터류킨-2 수용체 알파 사슬에 의해 식별된다. 표 18A는 미경험 CD4+CD25+CD45RA+ 세포의 백분율이 두번째 후속 방문 (6개월)시 위약군에서 평균 5.72% ($p=0.0179$) 감소하나, 프로바이오틱 군에서는 유의한 변화가 관찰되지 않는다는 것을 나타내었다.

[0136] 표 19는 두번째 후속 방문시 락토바실러스 치료가, T 조절 세포 [높은 CD25 양성을 갖는 CD4+ 세포 (CD25^{hi})로 식별됨]의 비율 증가를 방지한다는 것을 추가로 나타낸다.

[0137] 표 20은 두번째 후속 방문 시 위약군에서 CD4+CD25+FoxP3+ 세포의 백분율 증가 경향 (0.32%의 평균 증가, $p=0.0521$), 및 위약군에 비교한 프로바이오틱 치료의 전반적인 유의한 효과를 나타낸다 ($p=0.0275$).

표 10: CD4+CD45RA+RO- (CD3+CD4+ 세포의 CD45RA+CD45RO- %, 또는

림프구의 %로서의 미경험 T-도움 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	38.93	48.45	49.57	-16.37	-14.55
	중간	68.60	66.79	65.01	1.78	-0.59
	최대	80.51	83.83	78.37	26.60	17.89
	평균	65.25	66.88	65.68	1.75	-0.08
	표준편차	9.63	8.00	7.95	8.17	6.92
	P-값	NA	NA	NA	0.3105	0.7457
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	42.72	46.64	47.24	-19.50	-28.78
	중간	71.52	68.41	68.87	-1.72	-4.03
	최대	85.28	82.13	82.39	12.27	19.53
	평균	69.70	67.91	65.87	-2.79	-4.73
	표준편차	9.62	9.12	9.00	7.67	8.80
	P-값	NA	NA	NA	0.0692	0.0017
P-값		0.0420	0.4672	0.7901	0.0532	0.0217

[0138]

표 10A: CD8+ CD45RA+RO- (CD3+CD8+ 세포의 CD45RA+CD45RO- %, 또는 백혈구의 %로서의 미경험 세포 독성 T 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	0.85	0.52	1.96	-9.82	-9.82
	중간	5.23	5.39	5.79	-0.12	-0.26
	최대	14.25	17.78	15.00	10.20	7.09
	평균	6.29	6.06	6.16	0.10	-0.58
	표준편차	3.61	3.62	3.07	5.13	4.34
	P-값	NA	NA	NA	0.9655	0.4016
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	0.94	2.03	0.59	-20.68	-20.47
	중간	5.57	4.67	4.70	-1.24	-1.71
	최대	23.89	15.68	14.23	6.07	9.28
	평균	7.27	5.94	5.44	-1.88	-2.17
	표준편차	5.07	3.64	3.35	4.99	5.38
	P-값	NA	NA	NA	0.0731	0.0308
	P-값	0.6745	0.7197	0.2647	0.2156	0.1951

표 11: CD4+CD45RA-RO+ (CD3+CD4+ 세포의 CD45RA-CD45RO+ %, 또는 기억 T-도움 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	5.36	1.96	9.45	-15.41	-10.50
	중간	18.46	17.46	18.40	-0.25	0.05
	최대	43.39	27.98	35.53	5.00	9.07
	평균	19.61	17.00	18.72	-1.95	-0.34
	표준편차	8.58	5.71	6.20	6.05	5.42
	P-값	NA	NA	NA	0.2336	0.8513
위약	N	31	32	34	27	29
	누락	13	12	10	17	15
	최소	0.84	0.28	0.31	-6.51	-5.91
	중간	14.89	14.47	17.85	0.23	3.82
	최대	30.44	40.92	30.94	17.82	11.81
	평균	15.69	16.37	17.76	1.53	3.07
	표준편차	6.03	7.51	7.24	5.21	4.82
	P-값	NA	NA	NA	0.2220	0.0032
	P-값	0.0749	0.4463	0.6040	0.0650	0.0198

표 12: CD4+CD25+CD45RO+ (CD3+CD4+CD25+ 세포의 % CD45RO+, 또는 CD25 를 발현하는 T-도움 세포의 기억 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	4.30	20.03	29.09	-54.63	-34.75
	중간	49.80	48.33	49.82	0.54	4.67
	최대	79.94	81.02	75.62	38.33	22.71
	평균	50.68	49.47	50.48	0.51	0.94
	표준편차	17.76	14.48	11.69	15.44	12.57
	P-값	NA	NA	NA	0.5814	0.4161
	N	32	33	33	29	29
	누락	12	11	11	15	15
위약	최소	1.36	4.51	21.47	-25.54	-26.73
	중간	44.76	42.96	48.32	2.13	12.56
	최대	66.91	76.11	79.29	45.63	60.72
	평균	41.87	44.75	52.11	3.18	11.75
	표준편차	15.19	15.84	15.63	14.01	17.00
	P-값	NA	NA	NA	0.2770	0.0006
	P-값	0.0536	0.2195	0.7440	0.7690	0.0027

[0141]

표 13: CD4+CD25+CCR4+ CD45RO+ (CD4+CD25+CCR4+ 세포의 CD45RO+ %)

(CD25 및 CCR4 를 모두 발현하는 T-도움 세포의 % 기억 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	0.00	50.16	48.73	-16.72	-30.75
	중간	70.63	74.93	72.53	3.15	2.40
	최대	91.41	91.89	92.78	64.64	20.14
	평균	69.16	73.65	72.40	4.13	1.96
	표준편차	16.42	9.60	11.23	14.97	11.94
	P-값	NA	NA	NA	0.1406	0.2367
	N	32	33	33	29	29
	누락	12	11	11	15	15
위약	최소	7.09	47.80	42.75	-23.37	-10.71
	중간	68.36	72.43	75.77	2.30	6.65
	최대	91.72	87.69	97.06	53.46	57.05
	평균	67.18	71.72	75.98	4.06	9.38
	표준편차	15.39	9.70	11.15	12.95	13.82
	P-값	NA	NA	NA	0.0760	0.0007
	P-값	0.4407	0.4513	0.1512	0.9181	0.0825

[0142]

표 14: CD4+CD25^고 CD45RO+ (CD4+CD25^고 세포의 CD45RO+ %, 또는 CD25의 고발현을 갖는 T-도움 세포의 기억 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	3.80	21.34	25.97	-53.86	-39.60
	중간	45.89	48.07	46.22	-0.95	-0.41
	최대	82.58	84.63	71.63	39.87	30.38
	평균	48.43	46.67	47.65	-0.12	-0.29
	표준편차	18.10	15.41	12.85	15.80	15.81
	P-값	NA	NA	NA	0.7905	0.8872
위약	N	32	32	33	28	29
	누락	12	12	11	16	15
	최소	1.82	14.37	19.27	-35.46	-41.68
	중간	41.13	40.76	44.30	0.45	7.78
	최대	73.40	77.40	93.43	44.43	63.66
	평균	41.22	42.91	49.31	1.53	9.35
	표준편차	17.19	16.16	18.32	16.54	21.65
	P-값	NA	NA	NA	0.6456	0.0121
P-값		0.1316	0.2188	0.9315	0.7891	0.0456

[0143]

표 15: CD4+CD25^고 CCR4+ CD45RO+ (CD4+CD25^고 CCR4+ 세포의 CD45RO+ %, 또는 CCR4 및 고수준의 CD25를 발현하는 기억 T-도움 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	0.00	52.12	55.22	-19.05	-20.84
	중간	75.68	79.65	78.81	0.47	3.97
	최대	97.30	92.41	95.63	70.53	28.18
	평균	73.10	77.16	77.04	3.32	1.84
	표준편차	17.86	9.84	10.22	16.78	11.65
	P-값	NA	NA	NA	0.5136	0.3259
위약	N	32	32	33	28	29
	누락	12	12	11	16	15
	최소	9.93	45.90	34.09	-21.33	-22.60
	중간	73.76	77.93	82.87	3.82	7.88
	최대	94.87	89.46	98.37	64.49	66.47
	평균	71.24	75.47	81.30	4.20	10.67
	표준편차	17.52	10.28	12.33	16.12	17.87
	P-값	NA	NA	NA	0.2183	0.0011
P-값		0.6383	0.5311	0.0492	0.9790	0.0452

[0144]

표 15A: CD4+ CCR4+ CD45RO+ (표면 상에 CDR4 를 발현하는 기억 T-도움 세포의 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	1.71	44.95	38.12	-33.51	-27.79
	중간	65.03	70.17	66.43	1.27	0.50
	최대	90.03	90.63	86.20	64.29	17.88
	평균	64.95	68.80	66.81	2.74	-0.32
	표준편차	15.29	9.60	10.60	15.27	10.20
	P-값	NA	NA	NA	0.1461	1.0000
위약	N	32	33	34	29	30
	누락	12	11	10	15	14
	최소	6.23	39.83	40.82	-19.87	-23.38
	중간	65.73	68.45	69.99	3.22	5.86
	최대	84.23	90.04	90.64	33.60	41.56
	평균	62.97	67.78	70.12	4.63	7.63
	표준편차	15.11	10.42	11.82	12.77	13.92
	P-값	NA	NA	NA	0.0920	0.0026
	P-값	0.7338	0.7553	0.1900	0.5179	0.0110

[0145]

표 16: CD4+CD62L^저 CD38+ (CD38+ CD4+의 CD62L^저 %, 또는 CD38 및 낮은 수준의 CD62L 를 발현하는 T-도움 세포의 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	30	39	38	29	28
	누락	16	7	8	17	18
	최소	1.30	1.42	0.94	-8.68	-6.11
	중간	3.90	3.86	3.57	-0.15	0.64
	최대	10.53	20.90	23.76	7.98	19.44
	평균	4.89	5.32	5.58	0.17	1.03
	표준편차	3.03	4.01	4.45	3.87	5.00
	P-값	NA	NA	NA	0.6740	0.5670
위약	N	31	32	33	27	28
	누락	13	12	11	17	16
	최소	1.08	1.03	1.33	-10.31	-12.08
	중간	5.23	3.41	3.97	-1.11	-1.32
	최대	15.50	20.62	20.32	14.44	17.54
	평균	6.52	5.50	5.31	-0.89	-1.29
	표준편차	4.12	4.88	3.90	5.04	5.50
	P-값	NA	NA	NA	0.1111	0.0735
	P-값	0.1292	0.4923	0.9202	0.1856	0.0753

[0146]

표 17: CD4+CCR9+ $\beta 7$ + (CCR9 및 인테그린 $\beta 7$ 에 대해 양성인 CD4+ 세포의 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	0.72	0.41	0.52	-4.42	-2.67
	중간	1.34	1.26	1.46	-0.13	0.21
	최대	5.96	5.62	5.40	1.40	4.32
	평균	1.68	1.44	1.71	-0.41	0.06
	표준편차	1.11	0.88	0.94	1.12	1.25
	P-값	NA	NA	NA	0.0703	0.6227
위약	N	32	31	34	27	30
	누락	12	13	10	17	14
	최소	0.60	0.59	0.37	-7.10	-5.40
	중간	1.65	1.61	1.42	-0.03	-0.33
	최대	8.71	2.68	3.31	1.24	1.79
	평균	2.07	1.62	1.61	-0.46	-0.57
	표준편차	1.62	0.63	0.74	1.75	1.36
	P-값	NA	NA	NA	0.5342	0.0237
P-값		0.2378	0.0848	0.7900	0.4932	0.0382

[0147]

표 18: CD4+CD25+ (CD3+CD4+ 세포의 CD25+ %, 또는 CD25 에 대해 양성인 T-도움 세포의 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	4.78	5.25	5.54	-8.36	-6.83
	중간	8.82	9.85	8.83	0.13	-0.10
	최대	19.55	15.51	19.82	7.03	8.12
	평균	9.80	9.84	9.57	0.16	-0.12
	표준편차	3.65	2.21	2.99	3.44	4.21
	P-값	NA	NA	NA	0.7151	0.8078
위약	N	32	33	33	29	29
	누락	12	11	11	15	15
	최소	3.03	4.53	4.70	-5.89	-6.79
	중간	9.15	9.89	9.88	1.15	1.37
	최대	20.66	15.39	18.29	5.76	12.74
	평균	9.76	10.02	10.60	0.66	1.60
	표준편차	3.76	2.69	3.83	3.06	3.74
	P-값	NA	NA	NA	0.1828	0.0121
P-값		0.9628	0.9217	0.3423	0.4124	0.0971

[0148]

표 18A: CD4+ CD25+ 중 CD45RA+ (표면 상에 CD25를 발현하는 미경험 CD4+ 세포 %)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	3.05	11.46	10.09	-23.80	-21.93
	중간	28.76	35.65	30.19	0.78	-0.80
	최대	57.29	56.58	59.50	32.86	18.99
	평균	31.03	33.89	31.67	1.48	-1.18
	표준편차	14.08	11.63	11.48	11.96	9.86
	P-값	NA	NA	NA	0.6554	0.5221
위약	N	32	33	33	29	29
	누락	12	11	11	15	15
	최소	19.96	15.04	12.36	-33.69	-32.45
	중간	39.71	35.61	35.89	-3.86	-3.76
	최대	72.86	65.34	73.61	19.31	10.99
	평균	38.69	37.03	33.75	-3.38	-5.72
	표준편차	12.72	14.35	13.59	11.28	11.09
	P-값	NA	NA	NA	0.1373	0.0179
P-값		0.0316	0.4770	0.6121	0.1244	0.1930

[0149]

표 19: CD4+CD25^고 (T 조절 세포로 간주되는, CD25에 대해 크게 양성인 CD4+ 세포의 %).

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	32	39	38	31	30
	누락	14	7	8	15	16
	최소	1.83	2.12	2.22	-4.60	-4.14
	중간	3.93	4.52	4.30	0.52	0.08
	최대	9.31	7.11	8.58	3.91	3.23
	평균	4.17	4.36	4.22	0.29	0.04
	표준편차	1.62	1.10	1.33	1.66	1.98
	P-값	NA	NA	NA	0.2260	0.8670
위약	N	32	33	33	29	29
	누락	12	11	11	15	15
	최소	1.25	2.03	1.56	-3.54	-3.35
	중간	4.04	4.38	4.63	0.38	1.06
	최대	8.99	7.52	8.26	3.64	5.39
	평균	4.21	4.49	4.76	0.47	0.90
	표준편차	1.63	1.37	1.71	1.54	1.82
	P-값	NA	NA	NA	0.0846	0.0081
P-값		0.8493	0.8332	0.1720	0.7831	0.1026

[0150]

표 20: CD4+CD25+Foxp3+ (백혈구의 %로서의 T-조절 세포)

그룹	통계	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
락토바실러스	N	31	39	38	30	29
	누락	15	7	8	16	17
	최소	0.22	0.18	0.17	-1.78	-2.11
	중간	1.62	1.74	1.50	0.04	-0.15
	최대	3.58	2.88	3.22	2.10	1.30
	평균	1.55	1.67	1.45	0.11	-0.20
	표준편차	0.79	0.66	0.64	0.86	0.87
	P-값	NA	NA	NA	0.4995	0.3276
위약	N	29	33	34	26	27
	누락	15	11	10	18	17
	최소	0.29	0.83	0.08	-0.84	-1.71
	중간	1.57	1.78	1.83	0.14	0.31
	최대	2.75	3.43	3.78	1.32	2.32
	평균	1.54	1.74	1.82	0.19	0.32
	표준편차	0.64	0.54	0.85	0.64	0.91
	P-값	NA	NA	NA	0.1711	0.0521
P-값		0.8515	0.9351	0.0326	0.6866	0.0275

논의

본 연구에서의 중요한 주요 발견은, 정상 식이에서 지속적인 소아 지방변증 자가면역성을 갖는 소아에서, 락토바실러스 균주의 사용에 의해 tTG 자가 항체 수준의 증가가 지연된다는 점이다 (도 1 및 2). 이는 초기의 활성 소아 지방변증 자가 면역에 대한 프로바이오틱 보충제의 약화 효과에 대한 확실한 증거를 제공하는데, 이전에는 관찰된 바 없었다. 단지 글루텐-불포함 식이만이 시간의 경과에 따라 tTG 자가 항체의 수준을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다 (Agardh D 등, *Acta paediatrica*. 2004;93(8):1046-51). 락토바실러스의 소아 지방변증 자가면역성에 대한 효과는 T 세포의 조절에 관여하는 말초 면역 반응에서의 지속적인 변화에 의해 추가로 뒷받침되며, 이는 단지 위약군의 소아에서만 관찰되었다. 흥미롭게도, 위약군에서 발견되는 대부분의 림프구 하위 세트들 간의 차이는 활성 소아 지방변증 환자들에서 발견되는 것과 유사하였다.

위약군에서의 CD4+CD25+Foxp3+ T-세포의 증가 (이는 치료군에서는 변함없이 유지됨)는, 활성화된 CD4+ 세포에 대한 2종의 락토바실러스 균주의 하향 조절 효과에 의해 설명될 수 있다. 위약군에서 CD3+CD4+ 세포의 감소가 관찰된 사실은, 장 점막 내의 글루텐-감수성 림프구가 구획화된 이후에 올 수 있는 것으로 간주될 수 있다. 더욱이, CD45RA를 발현하는 미경험 T_H 세포는 감소하는 반면, CD45RO를 발현하는 효과기 및 기억 T_H 세포의 백분율은 위약군에서보다 더 높았으며, 이는 비치료된 소아 지방변증 환자에서 이전에 관찰되었고, 글루텐에 의해 활성화된 순환하는 CD45+ αβTcR+ 및 γδTcR+ 림프구의 백분율이 더 높다는 사실에 의해 설명된다 (Kerttula TO 등, *Clin Exp Immunol*. 1998;111(3):536-40). 이 설명은 또한 위약군에서 CCR4를 발현하는 CD45RO+ 세포의 증가된 비율의 발견에 의해 더욱 강화되며, 이는 감작된(primed) 조절 T 세포의 재순환을 시사한다. CCR4는 염증의 징후에 대한 T-세포들의 소집을 위한 중요한 케모카인 수용체이고, 분화된 조절 T 세포 상에서 높게 발현된다 (Iellem A 등, *Eur J Immunol*. 2003;33(6):1488-96). 위약군에서 CD4+CD25^고CD45RO+CCR4+ 세포 및 CD4+CD25+Foxp3+ 세포의 증가는, 이전에 문헌 [Frisullo G 등, *Human Immunol*. 2009;70(6):430-5; Tiittanen M 등, *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):498-507]에 기재된 바와 같이, 지속적인 장내 염증 및 식이 글루텐 항원에 대한 면역 반응을 없애기 위한 시도를 나타낸다.

특정 관련 사항의 3번째 발견은 지속되는 소아 지방변증 자가면역성을 갖는 위약군에서 시간의 경과에 따른 NK 세포의 말초적인 변화이며, 이는 프로바이오틱 균주를 부여받은 소아에게는 관찰되지 않았다. NK 및 NK-T 세포의 집단은 활성 소아 지방변증의 조직 및 말초부 모두에서 감소하는 것으로 밝혀졌다. (Dunne MR 등, *PLoS ONE*. 2013;8(10):e76008). 이것은 프로바이오틱 군에서 NK 세포가 증가하였으나, 위약군에서는 그러하지 않은 것으로 발견된 본 연구의 발견 사항과 일치한다. 이것은 소아 지방변증에서의 NK 세포의 중요성, 및 NK 세포에 대한 직접적 또는 간접적인 자극 효과를 가질 수 있다는 사실을 추가로 뒷받침하는데, 이는 프로바이오틱 보충이 말초부에서의 자가 면역 반응 감소로서 반영된다.

[0156] **결론**

[0157] 요약하면, 상기 그룹들 간에 면역학적 특성들을 비교함으로써, 본 발명자들은 tTG 자가 항체 수준의 감소로서 반영된, 소아 지방변증 자가면역성에 대한 현저한 억제 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 관찰은 자가 면역 조절에 관련된 T 림프구의 비율, 및 위약을 투여받은 진행중인 복강내 자가 면역성을 갖는 소아에게서 특히 나타나는 NK 세포에서의 말초부 변화의 일관된 변화에 의해 더욱 강화되었다. 이러한 새로운 발견은 인간의 자가 면역 질환에서 프로바이오틱 박테리아에 의한 치료적 개입이라는 잠재적인 새로운 분야를 제공한다.

[0158] 본 발명자들은 GFD의 영향 없이 CD 병리학과 관련된 면역학적 변화를 연구하기로 선택하였다. GFD에 의한 치료는, CD 환자에서 몇몇 면역학적 마커, 예컨대 tTGA의 신속한 변화를 유발하였다. (Midhagen G 등, *Journal of Internal Medicine*. 2004;256(6):519-24) 및 (Agardh D 등, *clinical and Experimental Immunology*. 2006;144(1):67-75). 이후, 본 발명자들은 연구 참가를 위해 <30 U/ml의 낮은 컷-오프 한계를 사용하였고, 이는 유의하게 상승된 tTGA 수준이 장 생검이 없이 CD를 진단하기에 충분한 증거가 될 수 있다고 기술한 최근의 진단 가이드라인을 따랐다 (Husby S 등, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012;54(1):136-60. 따라서, 본 연구의 참가자들 대다수가 계속되는 자가면역성의 초기 징후로서 낮은 초기 tTGA 수준을 갖고 본 연구에 들어왔다는 사실은, 본 연구 집단의 고유한 요소가 있다고 기대하게 한다.

[0159] IgA-tTGA 및 IgG-tTGA 수준 모두가 CD에서 명백한 진단 검정이지만, 최근의 임상적 권고는 더 높은 특이성 및 임상적 관련성에 기인하여, 통상의 총 IgA 수준을 갖는 소아에 대한 IgA-tTGA의 사용을 지지하였다. (상기 Husby S 등).

[0160] 이 연구에서, 프로바이오틱 락토바실러스-치료군에서의 IgA-tTGA 수준의 변화는 위약군보다 더욱 유의하게 감소했다. 실제로, 이것은 이들은 방문 초대 0일 때 높은 수준으로 진행되었으나 3 및 6개월 이후 이들의 IgA-tTGA 수준이 유의하게 감소된, 락토바실러스로 치료받은 2명의 소아에서 반영되었는데, 이는 프로바이오틱 군주가 CD 자가면역성을 갖는 일부 소아에 대해 효과를 가질 수 있음을 나타낸다 (데이터는 도시되지 않음).

[0161] 이러한 임상 연구에서 사용된 예시적인 프로바이오틱 락토바실러스인 락토바실러스 플란타룸 HEAL9 및 락토바실러스 파라카세이 8700:2는, 글루텐 함유 식이 요법을 받는 소아에게서 CD 자가면역 억제 효과를 나타내었다. 이것은 락토바실러스 군주가 'HLA- 위험' 개체에서 CD 자가면역성을 예방 및/또는 지연시킬 수 있으며, 이는 CD에 대한 프로바이오틱 락토바실러스의 예방적 응용이 가능함을 시사하였다.

[0162] 본 발명자들이 아는 바로는, 이것은 프로바이오틱 락토바실러스 종들이 CD의 유전적 위험이 있는 소아에서 지속되는 CD 자가면역의 진행을 지연 또는 예방할 수 있다는 것을 평가하고 보여주는 첫 번째 중재적인 연구이다. 이는 본 발명의 프로바이오틱 락토바실러스 군주가 CDA에서 CD로의 진행을 지연 및/또는 예방하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0163] 기탁기관명: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

[0164] 수탁번호 : DSMZ15312

[0165] 수탁일자 : 20021127

[0166] 기탁기관명: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

[0167] 수탁번호 : DSMZ15313

[0168] 수탁일자 : 20021127

[0169] 기탁기관명: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

[0170] 수탁번호 : DSMZ15316

[0171] 수탁일자 : 20021127

[0172] 기탁기관명: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

[0173] 수탁번호 : DSMZ6595

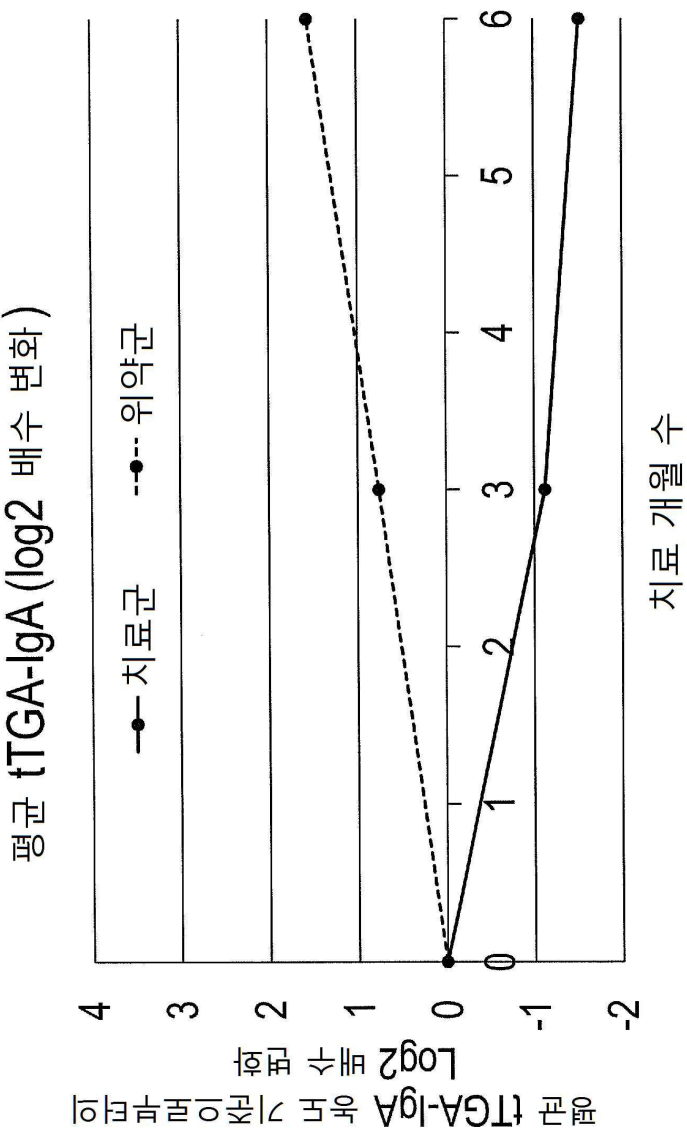
[0174] 수탁일자 : 19910702

[0175] 기탁기관명: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

- [0176] 수탁번호 : DSMZ9843
- [0177] 수탁일자 : 19950316
- [0178] 기탁기관명: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
- [0179] 수탁번호 : DSMZ32131
- [0180] 수탁일자 : 20150902
- [0181] 기탁기관명: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
- [0182] 수탁번호 : DSMZ13434
- [0183] 수탁일자 : 20000406
- [0184] 기탁기관명: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
- [0185] 수탁번호 : DSMZ13432
- [0186] 수탁일자 : 20000406
- [0187] 기탁기관명: 기탁기관명: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
- [0188] 수탁번호 : DSMZ6594
- [0189] 수탁일자 : 19910702

도면

도면1



도면2

