



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0038015  
(43) 공개일자 2024년03월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/747 (2015.01) A61K 35/745 (2015.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)  
A61P 1/04 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 35/747 (2013.01)  
A61K 35/745 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7005329
- (22) 출원일자(국제) 2022년07월15일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년02월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/056538
- (87) 국제공개번호 WO 2023/286027  
국제공개일자 2023년01월19일
- (30) 우선권주장  
102021000018740 2021년07월15일 이탈리아(IT)

- (71) 출원인  
알파시그마 에스.피.에이.  
이탈리아 볼로냐 아이-40133 비아 라가찌 텔 '99, 5
- (72) 발명자  
비피 안드레아  
이탈리아 볼로냐 40133 비아 라가찌 텔 '99 5 알파시그마 에스.피.에이.  
피오레 발터  
이탈리아 볼로냐 40133 비아 라가찌 텔 '99 5 알파시그마 에스.피.에이.
- (74) 대리인  
리엔목특허법인

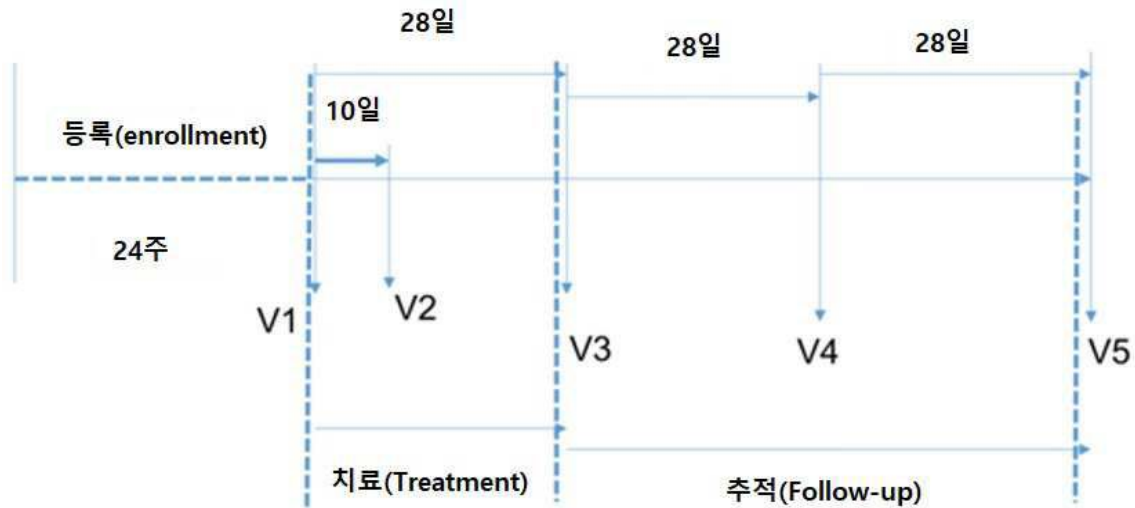
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신생아의 치료에서 락토바실러스 파라카세이 박테리아 균주의 용도

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 종에 속하는 하나 이상의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-01 DSM 26760, 및 신생아 및/또는 1개월 내지 12개월 이하 대상체에서 염증성 및/또는 기능성 위장관 장애, 병원성 미생물에 의한 위장관 감염, 기생충에 의한 위장관 감염, 알레르기, 면역 매개 장애 또는 자가면역 장애의 예방적 및/또는 근치적 치료, 및 대상체의 성장 지원에서의 그의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 1/00* (2018.01)

*A61P 1/04* (2018.01)

*A61P 29/00* (2023.02)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

염증성 및/또는 기능성 위장관 장애를 갖는 대상체의 예방적 치료 및/또는 근치적 치료 방법에서의 용도를 위한 박테리아 균주로서, 상기 장애는 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 괴사성 장염, 패혈증, 과민성 장 증후군(IBS), 변비형 IBS(IBC with prevalent constipation or constipated bowel), 설사형 IBS(IBC with prevalent diarrhea or diarrheic bowel), 교대형 IBS(IBC with alternating bowel), 미분류(unclassified) IBS, 만성 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 및 궤양성 직장염을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되고;

- 상기 박테리아 균주는 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 종에 속하며, 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572, 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 이들의 혼합물을 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되고;
- 상기 대상체는 생후 첫 4주 이내의 신생아 대상체인 것인 박테리아 균주.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 대상체는 연령이 1개월 내지 12개월 이하인 것인 박테리아 균주.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 균주는 생존 가능한 박테리아 균주 또는 상기 박테리아 균주의 파생물(derivative)이고, 상기 파생물은 톨달화(tyndallized) 박테리아 균주, 초음파 처리된 박테리아 균주, 방사선, 바람직하게는 감마 방사선 조사에 의해 불활성화된 박테리아 균주, 용해된 박테리아 균주 또는 박테리아 균질물, 박테리아 균주의 추출물 또는 벽 분획을 포함하거나 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되고; 바람직하게는 톨달화 박테리아 균주인 것인 박테리아 균주.

#### 청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 괴사성 장염, 패혈증, 과민성 장 증후군(IBS), 변비형 IBS, 설사형 IBS, 교대형 IBS, 미분류 IBS, 만성 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 직장염을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 것인 박테리아 균주.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항 다른 용도를 위한 혼합물 M으로서, 상기 혼합물은 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572, 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 이들의 혼합물을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택된 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 박테리아 균주; 및 적어도 하나의 식품 등급 또는 의약품 등급 첨가제 및/또는 부형제를 포함하거나, 대안적으로 그로 구성되는 것인 혼합물 M.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 혼합물 M은 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572, 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 이들의 혼합물을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택된 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 박테리아 균주; 및

- 하기를 포함하거나 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택된 적어도 하나의 추가 박테리아 균주를 포함하거나 대안적으로 그로 구성되는 것인 혼합물 M:
  - 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) BbIBS01 DSM 33231,
  - 비피도박테리움 브레베 BbIBS02 DSM 33232,

- 비피도박테리움 애니멀리스 아종 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) B1IBS01 DSM 33233,
- 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LpIBS01 DSM 33234,
- 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) BbfIBS01 DSM 32708; 및

이들의 혼합물.

#### 청구항 7

청구항 5 또는 6에 있어서, 상기 혼합물 M은 하기를 포함하거나 또는 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 추가 활성 성분을 더 포함하는 것인 혼합물 M:

- 그룹 A, B, C, D, E 및/또는 K로부터 적어도 하나의 비타민, 바람직하게는 그룹 B 비타민 및/또는 비타민 D;
- 글루타티온, 레스베라트롤 및 트랜스-레스베라트롤과 같은 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 아스타잔틴, 라이코펜을 포함하거나 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 항산화 물질;
- 장 이완 작용을 갖는 식물, 바람직하게는 발레리안, 시계꽃, 레몬 밤, 산사나무 및 카모마일로부터 선택되는 식물 또는 그의 추출물을 포함하거나 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 식물성 물질;
- 미네랄 또는 그의 염, 예를 들어 아연, 셀레늄, 마그네슘, 칼륨;
- 오메가 9, 및/또는 다중불포화 지방산, 오메가 3 및 오메가 6을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 단일불포화 지방산;
- 하나 이상의 면역자극제, 지사제 및/또는 영양소;
- 하나 이상의 프리바이오틱(prebiotic), 바람직하게는 이눌린, 프럭토-올리고당(FOS), 갈락토-올리고당(GOS), 자일리톨-올리고당(XOS), 구아검, 락토페린 및 이들의 혼합물로 구성된 그룹 (II)에서 선택되는 프리바이오틱; 더욱 바람직하게는 이눌린; 및

이들의 혼합물.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 괴사성 장염을 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 것인 박테리아 균주.

#### 청구항 9

청구항 5 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 괴사성 장염을 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되는 것인 혼합물 M.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 생후 첫 4주의 신생아 대상체에서 염증성 및/또는 기능성 위장관 장애, 바람직하게는 조산 신생아의 신생아 산통 또는 만성 장염(예를 들면, 괴사성 장염)의 예방적 및/또는 근치적(curative) 치료, 병원성 미생물(예를 들면, 바이러스 또는 박테리아)에 의한 위장관 감염, 기생충에 의한 위장관 감염, 알레르기, 면역 매개 또는 자가면역 장애의 예방적 및/또는 근치적 치료, 및 대상체 성장의 보조적 치료에서의 용도를 위한 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 종에 속하는 하나 이상의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760, 및 그의 조성물에 관한 것이다.

[0002] 신생아 장의 미생물 군집화(colonisation)는 출생 직후 시작되며 점막 장벽 기능의 발달, 장 항상성 및 면역계의 성숙에 필수적이다.

[0003] 본 발명의 맥락에서, 용어 '신생아(newborn)' 또는 '신생아 대상체(newborn subject)'는 출생 순간부터 생후 첫 4주(28일) 사이의 기간에 있는 포유동물(인간 또는 동물 대상체)을 지칭한다.

### 배경 기술

[0004] 출생 후 초기에, 산모의 질 및/또는 피부 미생물군(microbiota), 질 분만 또는 제왕절개 분만, 모유(모유 수유) 또는 인공 영양 양육(artificial milk feeding), 항생제 및/또는 기타 약물의 투여 등 다양한 요인이 장내 미생물군의 구성에 영향을 미친다. 특히, 제왕절개, 인공 우유, 조산 및 항생제의 사용은 미생물군에서 유익한 박테리아 종의 풍부도(abundance) 및 다양성을 감소시켜 장내 미생물 불균형(dysbiosis)의 상태를 촉진한다. 이는 결과적으로 조산아에서 장 산통, 괴사성 장염의 발병 위험, 이후에 알레르기, 또는 염증성 또는 기능성 장 질환 및/또는 관련 증상과 같은 면역 매개 질환의 발병 위험을 증가시킬 수 있다.

[0005] 현재 체중 1,500g 미만의 조산아 중 약 12%가 괴사성 장염을 앓고, 약 1/3은 패혈증이나 기타 합병증으로 사망한다.

[0006] 생후 첫 수주 동안, 내부 장기의 성숙이 완전하지 않고 그에 따른 기능도, 쇠약하거나 아플 수 있더라도, 어린이나 성인의 기능과 비교할 수 없기 때문에, 신생아는 생리학적으로 '연약한' 성인이나 심지어 아주 어린 어린이와도 비교할 수 없다.

[0007] '장내 미생물군(gut microbiota)'은 위장(gut-enteric 또는 gut-intestainl) 환경에 존재하는 모든 미생물(모든 박테리아, 고세균, 진핵생물 및 바이러스)을 의미한다.

[0008] 미생물군은 숙주 유기체를 위해 많은 유용한 활동을 수행한다. 실제로, 미생물군을 구성하는 미생물은 다당류를 분해하여, 소화 기능을 돕고, 비타민을 합성하고, 병원성 종의 군집화를 저해하고, 장 발달에 필요한 신호를 제공하고, 염증 및 면역 반응을 조절하는 데 기여한다. 많은 위장 장애 및 기타 계통(system)에 영향을 미치는 장애의 병인은 장내 미생물에 대한 비정상적인 면역학적 반응으로 여겨진다. 더욱이, 장내 미생물군은 그것이 생성하는 대사산물 및 장 세포와 함께 장벽을 구성하며, 이 장벽의 기능부전은 병원성 미생물에 의한 감염뿐만 아니라 많은 면역 매개 질환의 병태생리학과 관련된다.

[0009] 좋은 건강 상태를 유지하려면 면역계와 장내 미생물 사이의 균형이 필요하다. 따라서, 이러한 균형 상태는 장내 미생물군의 구성에 따라 달라지는 것으로 나타났다. '장내 미생물 불균형(dysbiosis)'이라는 용어로 알려진 미생물군의 불균형은 장 및 기타 신체 계통 모두에 유해한 효과를 유발하는 면역계 장애를 초래할 수 있다.

[0010] 따라서, 프로바이오틱 박테리아 균주(즉, 적절한 양을 투여했을 때 건강상의 이점을 제공하는 살아있는 미생물)의 유익한 효과는 주로 장 장벽의 투과성을 정상화하고, 장내 미생물을 정규화하며, 미생물군과 면역계 사이의 균형을 회복시키는 것에서 기인한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 다루고 해결하는 기술적 과제는 생후 초기 수개월(1개월 내지 12개월 이하; 1개월은 28일 또는 29일 또는 30일 또는 31일일 수 있음)에 신생아 및/또는 포유동물 대상체에서 위장 질환 또는 염증성 또는 기능성 증상(예를 들면, 장산통, 만성 장염) 및 병원성 미생물에 의한 위장 감염 또는 기생충에 의한 위장 감염의 치료를 위한 효과적인 해법을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 치료된 대상체의 말년에 위장계와 관련된 알레르기 및/또는 면역 매개 또는 자가면역 장애(예를 들면, 셀리아병(celiac disease))의 발병을 예방적으로 치료하는 기술적 과제를 다루고 해결한다. 마지막으로, 본 발명의 목적은 생후 첫 수개월에 신생아 및/또는 포유동물 대상체의 신체 성장을 지지하기 위한 효과적인 해법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0012] 본 출원인은 연구 개발 활동에 이어, 신생아 및/또는 생후 첫 수개월의 대상체에서 적절하고 락토바실러스, 특히 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)가 풍부한 장내 미생물군의 발달에 효과적이고 효율적으로 기여하는 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) DG® CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM과 같은 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 박테리아의 하나 이상의 균주 및 그의 조성물(간략히, 본 발명의 조성물)을 제공하여 전술된 기술적 과제를 다루고 해결한다.

- [0013] 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속의 박테리아 균주 중에서, 락토바실러스 파라카세이 종(예를 들면, 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 균주 LPC-S01 DSM 26760)은 프로바이오틱(probiotic) 박테리아 균주로 흔히 사용되는 종에 속한다. 특히, 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572는 그의 유익한 특성에 대해 방대하게 연구되었다. 그러나, 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572의 신생아 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에 대한 효과는 현재까지 연구된 적이 없었다.
- [0014] 주목해야 할 점은 박테리아 균주 락토바실러스 카세이(*L. casei*) DG<sup>®</sup>(CNCM I-1572) 또는 *L. paracasei* DG<sup>®</sup>(CNCM I-1572)는 Zheng 등이 과학 저널 Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020에 발표한 락토바실러스 속의 재분류에 따라 2022년 2월 2일에 락티카세이바실러스 파라카세이(*Lacticaseibacillus paracasei*) DG I-1572 DSM 34154로 재등록되었다는 것이다. 2개의 전술된 명칭은 두 가지 이름은 항상 동일한 박테리아 균주를 지칭하므로, 호환적이다.
- [0015] 신생아 연령(생후 첫 4주)의 대상체에게 투여된 본 발명에 따른 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및 락토바실러스 파라카세이 균주 LPC-S01 DSM 26760, 그의 혼합물 및 조성물은 투여 기간 및/또는 생후 첫 수개월(first months of life) 동안 장관에 효과적이고 효율적으로 집락화할 수 있어서, 장내 미생물군과 숙주에게 유익한 면역계 사이의 균형을 가져오고, 장 장벽의 투과성을 강화하는 것으로 나타난다.
- [0016] 마지막으로, 본 발명의 박테리아 균주, 그의 혼합물 및 조성물은 내약성이 좋고, 관련 부작용이 없으며, 제조가 용이하고 비용 효율적이다.
- [0017] 이하의 상세한 설명으로부터 명확해지는 이들 목적 및 기타 목적은 첨부된 청구범위에 청구된 기술적 특징으로 인해 본 발명의 조성물 및 혼합물에 의해 달성된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0018] 도 1: 임상 연구의 계획(scheme);
- 도 2a 내지 2e: V1-V5 대조 방문(control visit) 동안 수집된 분변 샘플의 중재군(arm) 1(분석 중인 조성물, Tx) 및 중재군 2(위약)의 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>의 정량화;
- 도 3a 내지 3d: V1-V5 대조 방문 시점에 락토바실러스 종(*Lactobacillus spp.*)의 상대적 존재비(abundance)의 히스토그램;
- 도 4: 부탄산 및 프로판산을 포함한 확인된 대사산물을 보여주는 PLS-DA(partial least square-discriminant analysis)의 대사체 우세(metabolomic predominance).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0019] 발명의 상세한 설명
- [0020] 본 발명의 목적은 신생아 대상체(생후 첫 4주) 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 염증성 및/또는 기능성 위장관 장애, 예를 들면, 신생아 산통 또는 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 괴사성 장염, 패혈증, 과민성 장 증후군(간단히 IBS), 변비형 IBS, 설사형 IBS, 교대상 IBS, 미분류 IBS, 또는 크론병과 같은 만성 염증성 장 질환(IBD), 궤양성 직장염, 천식, 비만, 제1형 당뇨병, 아토피성 피부염, 다발성 경화증, 암, 및 자폐증의 예방적 치료 및/또는 근치적 치료에서의 용도를 위한 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 종에 속하는 하나 이상의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 균주 LPC-S01 DSM 26760, 본 발명의 하기에 정의된 바와 같은 그의 혼합물 또는 조성물(간략하게, 본 발명의 혼합물 또는 조성물)이다.
- [0021] 바람직하게는, 본 발명의 균주, 혼합물 또는 조성물은 신생아 산통 또는 조산아의 만성 장염 또는 괴사성 장염의 예방적 치료 및/또는 근치적 치료에서 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 미만의 대상체에서의 용도를 위한 것이다.
- [0022] 본 발명의 목적은 신생아 대상체(생후 첫 4주) 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 병원성 미생물(예를 들면, 바이러스(예를 들면, 로타바이러스, 아데노바이러스 엔테리쿠스(Adenovirus entericus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 아스트로바이러스(Astrovirus), 인플루엔자 바이러스) 또는 살모넬라(*Salmonella*), 시겔라

(*Shigella*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 대장균과 같은 박테리아)에 의한 위장관 감염, 기생충에 의한 위장 감염증(바람직하게는 연충(helminth) 또는 회충(intestinal worm)(예를 들면, 오시우리(Ossiuri), 지아디아(Giardia) 등)에 의해 유발됨), 알레르기, 면역 매개 또는 자가면역 장애(예를 들면, 셀리악병(coeliac disease), 그레이브병(Graves' disease), 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 제1형 진성 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스(루푸스), 혈관염, 애디슨병(Addison's disease), 다발근염, 쇼그렌 증후군, 진행성 전신 경화증, 사구체신염(신장의 염증)), 불임, 천식, 비만, 제1형 당뇨병, 아토피 피부염, 다발성 경화증, 암, 및 자폐증의 예방적 치료 및/또는 근치적 치료에서의 용도를 위한 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 적어도 하나의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 균주 LPC-S01 DSM 26760, 본 발명의 하기에 정의된 바와 같은 그의 혼합물 또는 조성물(간략하게, 본 발명의 혼합물 또는 조성물)이다.

- [0023] 본 발명의 목적은 신생아 대상체(생후 첫 4주) 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 상기 대상체의 성장의 지지(보조(adjutant)) 치료에서의 용도를 위한 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 하나 이상의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 균주 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 균주 LPC-S01 DSM 26760, 본 발명의 하기에 정의된 바와 같은 그의 혼합물 또는 조성물(간략하게, 본 발명의 혼합물 또는 조성물)이고, 성장은 g/주로 평가된, 투여된 대상체의 체중 증가로 이해된다.
- [0024] 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> (이탈리아, SOFAR S.p.A.의 등록 상표)로 식별된 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 1995년 5월 5일에 의해 수탁 번호 CNCM I-1572로 파리 파스티르 연구소의 CNCM(the National Collection of Cultures of Microorganisms)에 기탁되었고(간단히 말해, DG<sup>®</sup> 또는 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572); 초기에 이 균주는 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup> CNCM 서브-카세이(*Lactobacillus casei* DG<sup>®</sup> sub.casei)라는 명칭을 가졌고; 나중에 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572로 재분류되었다. 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup> 또는 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup>라는 명칭에 관계없이 항상 동일한 박테리아 균주라는 것이 밝혀졌다.
- [0025] 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01로 식별된, 또는 락토바실러스 파라카세이 S01로 명명된 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2012년 11월 20일에 의해 수탁 번호 DSM 26760으로 DSMZ(the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, LPC-S01 또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760). 출원인이 채택한 락토바실러스 파라카세이 S01 DSM 26760 또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760이라는 명칭에 관계없이 항상 동일한 박테리아 균주라는 것이 밝혀졌다.
- [0026] 본 발명의 방법 또는 치료에서의 용도를 위한 본 발명의 조성물은: (i) 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760을 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성되는 본 발명의 혼합물 M; 및 선택적으로, (ii) 적어도 하나의 식품 등급 또는 의약품 등급 첨가제 및/또는 부형제를 포함한다.
- [0027] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 포함된 상기 혼합물 M은:
- [0028] - 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760; 및
- [0029] - 하기로 구성된 그룹 (I)에서 선택된 하나 이상의 추가 박테리아 균주를 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성될 수 있다:
- [0030] (a) 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) BbIBS01 DSM 33231,
- [0031] (b) 비피도박테리움 브레베 BbIBS02 DSM 33232,
- [0032] (c) 비비피도박테리움 애니멀리스 아종 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) B1IBS01 DSM 33233,
- [0033] (d) 비락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LpIBS01 DSM 33234,
- [0034] (e) 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) BbfIBS01 DSM 32708; 및
- [0035] 이들의 혼합물.
- [0036] 비피도박테리움 브레베 BbIBS01로 식별된 비피도박테리움 브레베 종에 속하는 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2019년 7월 31일에 의해 수탁 번호 DSM 33231로 DSMZ(the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, BbIBS01 또는 *B. breve* BbIBS01 DSM 33231).

- [0037] 비피도박테리움 브레베 BbIBS02로 식별된 비피도박테리움 브레베 종에 속하는 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2019년 7월 31일에 의해 수탁 번호 DSM 33232로 DSMZ(the Deutsche Sammiung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, BbIBS02 또는 *B. breve* BbIBS01 DSM 33232).
- [0038] 비피도박테리움 애니멀리스 아종 락티스 B1IBS01(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* B1IBS01)로 식별된 비피도박테리움 애니멀리스 종에 속하는 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2019년 7월 31일에 의해 수탁 번호 DSM 33233으로 DSMZ(the Deutsche Sammiung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, B1IBS01 또는 *B. animalis subsp. lactis* B1IBS01 DSM 33233).
- [0039] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LpIBS01로 식별된 락토바실러스 플란타룸 종에 속하는 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2019년 7월 31일에 의해 수탁 번호 DSM 33234로 DSMZ(the Deutsche Sammiung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, LpIBS01 또는 *L. plantarum* LpIBS01).
- [0040] 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) MIMBb23sg = BbfIBS01로 확인된 비피도박테리움 비피둠 종에 속하는 박테리아 균주 또는 그의 파생물로서, 상기 박테리아 균주는 SOFAR S.p.A.에 의해 2017년 12월 4일에 의해 수탁 번호 DSM 32708로 DSMZ(the Deutsche Sammiung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에 기탁되었다(간단히 말해, BbfIBS01 또는 *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708). 출원인이 채택한 비피도박테리움 비피둠 BbfIBS01 DSM 32708 또는 비피도박테리움 비피둠 MIMBb23sg DSM 32708이라는 명칭에 관계없이 이는 항상 동일한 박테리아 균주라는 것이 밝혀졌다.
- [0041] 본 발명에 언급된 모든 박테리아 균주(즉, DG<sup>®</sup>, LPC-S01, BbIBS01, BbIBS02, B1IBS01, LpIBS01 및 BbfIBS01)는 부다페스트 조약의 조항에 따라 기탁되었다. 본 특허 출원에 설명 및/또는 청구된 박테리아 균주의 기탁자 및 본 특허 출원 소유자는 이로써 특허 기간 전체 동안 이러한 모든 균주를 사용할 수 있도록 하는 데 동의함을 표명한다.
- [0042] 유리하게는, 본 발명의 조성물에 포함된 상기 박테리아 균주(즉, DG<sup>®</sup>, LPC-S01, BbIBS01, BbIBS02, B1IBS01, LpIBS01 및 BbfIBS01)는 생존 가능한 박테리아 균주(프로바이오틱스)이다. 대안적으로, 본 발명의 상기 박테리아성 균주는 본 발명에 정의된 바와 같은 생존 가능한 균주의 파생물(derivative)일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 맥락에서, 용어 박테리아 균주의 "파생물(derivative)"(또는 생존 가능한 박테리아 균주의 "파생물")은 포스트바이오틱(postbiotic) 또는 파라바이오틱(parabiotic), 예를 들어 락타화, 초음파 처리, 방사선(바람직하게는 감마 방사선) 조사에 의해 불활성화된 박테리아 균주, 박테리아 균주의 용해물 또는 균질화물, 박테리아 균주의 추출물 또는 벽 분획, 박테리아 균주에 의해 생성된 대사산물 또는 대사 바이오산물(metabolic bioproduct) 또는 세포외다당류(exopolysaccharides: EPS) 및/또는 당업자에게 공지된 박테리아 균주의 기타 유도체 산물을 의미하는 것으로 이해된다. 상기 파생물은 당업자에게 공지된 방법에 따라 획득된다. 바람직하게는, 용어 박테리아 균주의 "파생물"은 락타화, 초음파 처리, 방사선 불활성화된(바람직하게는 감마선 조사에 의해 불활성화된) 균주, 박테리아 균주의 용해물 또는 균질화물, 박테리아 균주의 추출물 또는 벽 분획; 더욱 바람직하게는 락타화된 균주를 의미한다.
- [0044] 선택적으로 그룹 (II)에서 선택된 하나 이상의 프로바이오틱 및/또는 그룹 (III)에서 선택된 추가적인 활성 성분과 함께, 본 발명의 조성물에 포함된 혼합물 M에 포함된 박테리아 균주(En)의 혼합물의 예는 하기와 같다:
- [0045] E1: DG<sup>®</sup> 및 LPC-S01;
- [0046] E2: DG<sup>®</sup> 및 그룹 (I)에서 선택된 하나 이상의 균주;
- [0047] E3: LPC-S01 및 그룹 (I)에서 선택된 하나 이상의 균주;
- [0048] E4: DG<sup>®</sup> 및/또는 LPC-S01, 및 BbfIBS01 및 그룹 (I)에서 선택된 하나 이상의 균주;
- [0049] E5: DG<sup>®</sup> 및/또는 LPC-S01, 및 BbIBS01, BbIBS02, B1IBS01 및 LpIBS01의 혼합물;
- [0050] E6: DG<sup>®</sup> 및/또는 LPC-S01, BbfIBS01 및 BbIBS01, BbIBS02, B1IBS01 및 LpIBS01의 혼합물.

- [0051] 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 그룹 (I)에서 선택된 하나 이상의 박테리아 균주 및/또는 하기에 기술된 그룹 (III)에서 선택된 하나 이상의 추가 활성 성분 외에, 본 발명의 조성물에 포함된 혼합물 M은 추가로 하나 이상의 프리바이오틱을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 이눌린, 프락토-올리고당(FOS), 갈락토-올리고당(GOS), 자일리톨-올리고당(XOS), 구아검, 락토펜 및 이들의 혼합물로 구성된 그룹 (II)로부터 선택된 프리바이오틱, 바람직하게는 이눌린을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 유리하게는, 본 발명의 조성물에 포함된 혼합물 M은 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 이눌린; 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및 이눌린을 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된다.
- [0053] 본 발명의 조성물에 포함된 혼합물 M은 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 선택적으로 그룹 (I)로부터 선택된 하나 이상의 박테리아 균주 및/또는 그룹 (II)로부터 선택된 하나 이상의 프리바이오틱 외에, 하기로 구성된 그룹 (III)으로부터 선택된 하나 이상의 추가 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다:
- [0054] - 그룹 A, B, C, D, E 및/또는 K로부터의 적어도 하나의 비타민, 바람직하게는 그룹 B 비타민 및/또는 비타민 D;
- [0055] - 항산화 물질. 예를 들면, 글루타티온, 레스베라트롤 및 트랜스-레스베라트롤과 같은 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 아스타잔틴, 라이코펜;
- [0056] - 장 이완 작용을 갖는 식물성 물질(botanical) 또는 그의 추출물, 예를 들면, 발레리안(valerian), 시계꽃(passion flower), 레몬 밤(lemon balm), 산사나무(hawthorn) 및 카모마일(camomile);
- [0057] - 미네랄 또는 그의 염, 예를 들어 아연, 셀레늄, 마그네슘, 칼륨;
- [0058] - 단일불포화 지방산, 예를 들면, 오메가 9, 및/또는 다중불포화 지방산, 예를 들면, 오메가 3 및 오메가 6;
- [0059] - 면역자극제, 지사제 및/또는 영양소; 및
- [0060] 이들의 혼합물.
- [0061] - 하나 이상의 프리바이오틱(prebiotic), 바람직하게는 이눌린, 프락토올리고당(FOS), 갈락토-올리고당(GOS), 자일리톨-올리고당(XOS), 구아검, 락토펜 및 그의 혼합물로 구성된 군 (II)에서 선택되는 프리바이오틱; 더욱 바람직하게는 이눌린; 및
- [0062] 이들의 혼합물.
- [0063] 유리하게는, 본 발명의 조성물에 포함된 혼합물 M은 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 그룹 B 비타민 및 비타민 D; 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및 그룹 B 비타민 및 비타민 D를 포함하거나, 또는 대안적으로 그로 구성된다.
- [0064] 본 발명의 맥락에서, 상기 박테리아 균주와 함께 본 발명의 조성물에 선택적으로 포함되는 식품 등급 또는 의약품 등급으로 허용되는 "첨가제 및/또는 부형제"는 고체 제형, 반고체 또는 액체 제형의 조성물의 제조를 위해 당업자에게 공지된 모든 보조 물질, 예를 들어, 담체, 희석제, 용매, 가용화제, 산성화제, 증점제, 감미제, 향미제, 착색제, 감미제, 윤활제, 계면활성제, 보존제, 안정화제, pH 안정화 완충제, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 예를 들어, 신생아 또는 생후 1개월 내지 12개월의 대상체에게 경구 투여하기 위한 점적제(drop) 조성물의 경우, 종자유를 희석제로 사용할 수 있다.
- [0065] 기술된 구체예 중 어느 하나에 따른 본 발명의 혼합물 M 또는 조성물은 약학 조성물(또는 생균 치료제(Live Biotherapeutic Product: LBP)), 의료 기기용 조성물, 식품 보충제용 조성물, 식품(또는 신규 식품 또는 특수 의료용 식품(FSMP)), 식품 보충제 또는 식품용 조성물일 수 있다.
- [0066] 기술된 구현예 중 어느 하나에 따른 본 발명의 박테리아 균주, 그의 혼합물 및 조성물은 경구 또는 비강 투여용, 바람직하게는 경구용으로, 고체 제형 또는 대안적으로 액체 제형, 예를 들면, 수성 또는 오일(예를 들면, 다양한 종자유 또는 해바라기씨유) 기반 점적제의 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0067] 유리하게는, 상기 하나 이상의 박테리아 균주 또는 각각의 박테리아 균주는 본 발명의 혼합물 M 또는 조성물의

1일 용량과 관련하여 본 발명의 혼합물 M 또는 조성물에  $10 \times 10^6$  CFU 내지  $10 \times 10^{12}$  CFU, 바람직하게는  $10 \times 10^8$  CFU 내지  $10 \times 10^{10}$  CFU 범위의 농도, 보다 바람직하게는 약  $10 \times 10^8$  CFU 또는  $10 \times 10^9$  CFU(CFU: 콜로니 형성 단위)의 농도로 존재한다.

- [0068] 예를 들어, 본 발명의 혼합물 또는 조성물(예를 들면, 경구 투여용 점적제)의 1일 용량은  $1 \times 10^9$  L. *paracasei* DG<sup>®</sup> CNCM I-1572 및 종자유를 포함한다.
- [0069] 진술된 일일 투여량은 이를 필요로 하는 대상체에게 개별 용량(단일 용량)으로 또는 반복된 용량, 예를 들어 1일 2회, 3회 또는 4회 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 1일 2회 본 발명의 조성물 15-5개 점적(유성), 바람직하게는 12 내지 8개 점적, 예를 들어 약 9-10개 점적은 약 20억 개의 박테리아 균주, 바람직하게는 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup> CNCM I-1572에 해당한다.
- [0070] 본 발명의 조성물 또는 혼합물 M에서 살아있는 박테리아 균주의 수를 평가하기 위해, 이들 조성물 또는 혼합물 M을 플레이트 카운트 방법으로 분석하여 CFU 값을 결정할 수 있다.
- [0071] 명확하게 하기 위해, 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 혼합물(M)에 포함된 박테리아 균주, 프리바이오틱스 및/또는 추가의 (선택적) 활성 성분이 개별적으로(바람직하게는 30분 내지 60분의 시간 간격으로) 그리고 임의의 순서로 투여될 수 있으나, 바람직하게는 동시에 대상에게 투여되며, 보다 더 바람직하게는 더 빠른 효과를 달성하고 투여의 용이성을 위해 단일 조성물로 투여된다. 상기 균주 및 (선택적) 활성 성분이 단일 조성물로 투여되는 경우, 상기 단일 조성물은 본 발명의 조성물에 해당한다.
- [0072] 달리 명시하지 않는 한, "x 내지 y 범위 내"의 양으로 성분을 포함하는 조성물, 혼합물 또는 기타는 상기 성분이 상기 범위에 존재하는 모든 양으로 조성물 또는 기타에 존재할 수 있고, 명시적으로 기재되지 않아도, 범위의 극단이 포함된다는 것을 의미한다.
- [0073] 달리 명시하지 않는 한, 조성물이 하나 이상의 구성요소 또는 물질을 '포함'한다는 기술은 구체적으로 표시된 것 외에 다른 구성요소 또는 물질이 존재할 수 있음을 의미한다.
- [0074] 본 발명의 문맥에서 "치료 방법"은 치료가 필요한 대상체에 대한 중재(intervention)를 의미하며, 이는 대상에게 치료 유효량으로 병리 또는 질병 및 관련 증상 또는 장애의 제거, 경감/감소 또는 예방을 목적으로 본 발명의 박테리아 균주 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0075] 본 발명의 맥락에서 용어 "대상체(subject)"는 신생아 연령(생후 0 내지 4주) 및/또는 생후 1개월 내지 12개월 이하(2개월 초부터 12개월 말까지)의 포유동물(동물 및 인간), 바람직하게는 인간 대상체를 의미한다.
- [0076] 유리하게는, 본 발명의 균주, 혼합물 또는 조성물로 치료 또는 투여되는 대상체는 신생아 대상체일 수 있고, 제왕절개로 또는 조산으로 태어난 생후 1개월 내지 12개월 이하의 대상체일 수 있다.
- [0077] 용어 '치료 유효량(therapeutically effective amount)'은 개인, 연구자, 수의사, 의사, 또는 기타 아동 관련 또는 의료 종사자가 추구하고 정의한 조직, 계통(system), 포유동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어내는 활성 화합물 및/또는 박테리아 균주의 양을 의미한다.
- [0078] 본 발명의 맥락에서 용어 "의료 기기(medical device)"는 1997년 2월 24일자입법령 제46호(Legislative Decree No. 46) 또는 새로운 MDR(Medical Device Regulation)(EU) 2017/745(MDR)에 따른 의미로 사용된다.
- [0079] 본 발명의 맥락에서 용어 '신규 식품(novel food)'은 1997년 EC 규정 258에 따른 의미로 사용된다.
- [0080] 구체예
- [0081] 본 발명의 바람직한 구체예 FRn은 다음과 같다.
- [0082] FR1. 염증성 및/또는 기능성 위장관 장애를 갖는 대상체의 예방적 치료 및/또는 근치적 치료 방법에서, 생후 첫 4주의 신생아 대상체 또는 생후 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서의 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 장애는 상기 대상체의 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염, 피사성 장염, 패혈증, 과민성 장 증후군(IBS), 변비형 IBS(IBC with prevalent constipation or constipated bowel), 설사형 IBS(IBC with prevalent diarrhea or diarrhetic bowel), 교대형 과민성 장 증후군(IBC with alternating bowel), 미분류(unclassified) IBS, 만성 염증성 장 질환(IBD), 크론병, 궤양성 직장염, 천식, 비만, 제1형 당뇨병, 아토피성 피부염, 다발성 경화증, 암, 자폐증, 알레르기, 셀리악병(coeliac disease), 그레이브병

(Grave's disease)으로부터 선택된 면역 매개 자가면역질환, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 제1형 진성 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 전신 홍반성 루푸스(루푸스), 혈관염, 애디슨병(Addison's disease), 다발근염, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 진행성 전신 경화증, 사구체신염(신장의 염증), 불임 및 체중 증가의 지지를 포함하거나, 대안적으로 그로 구성된 균으로부터 선택되고;

- [0083] 상기 박테리아 균주는 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*) 종에 속하며,
- [0084] 상기 조성물은:
- [0085] (i) 락토바실러스 파라카세이 종에 속하는 하나 이상의 균주를 포함하거나 또는 대안적으로 그로 구성된 혼합물 M, 및
- [0086] (ii) 하나 이상의 식품 등급 또는 의약품 등급 첨가제 및/또는 부형제를 포함하는 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0087] FR2. FR1에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서,
- [0088] 상기 박테리아 균주는 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572, 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760 및 이들의 혼합물로부터 선택되고;
- [0089] 상기 조성물은:
- [0090] (i) 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760을 포함하거나 또는 대안적으로 그로 구성된 혼합물 M, 및
- [0091] (ii) 하나 이상의 식품 등급 또는 의약품 등급 첨가제 및/또는 부형제를 포함하는 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0092] FR3. FR1 또는 FR2에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주 또는 조성물은 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 미만의 대상체에서 신생아 산통, 장 산통, 만성 장염 또는 조산아의 만성 장염의 예방적 및/또는 근치적 치료에서 사용하기 위한 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0093] FR4. FR1 또는 FR2에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주 또는 조성물은 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 병원성 미생물에 의한 위장 감염 또는 기생충에 의한 위장 감염의 예방적 및/또는 근치적 치료에서 사용하기 위한 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0094] FR5. FR1 또는 FR2에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주 또는 조성물은 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 알레르기의 예방적 및/또는 근치적 치료에서 사용하기 위한 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0095] FR6. FR1 또는 FR2에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주 또는 조성물은 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 면역 매개 자가면역질환, 예를 들면, 셀리악병, 그레이브병, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 제1형 진성 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스(루푸스), 혈관염, 애디슨병, 다발근염, 쇼그렌 증후군, 진행성 전신 경화증, 사구체신염(신장의 염증), 불임 및 체중 증가의 지지의 예방적 및/또는 근치적 치료에서 사용하기 위한 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0096] FR7. FR1 또는 FR2에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주 또는 조성물은 신생아 대상체 및/또는 1개월 내지 12개월 이하의 대상체에서 상기 대상체의 체중 증가 지지의 예방적 및/또는 근치적 치료에서 사용하기 위한 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0097] FR8. FR1-7 중 어느 하나에 따른 용도를 위한 조성물로서, 상기 (i) 혼합물 M은 하기를 포함하거나 또는 대안적으로 하기로 구성되는 것인 조성물:
- [0098] - 락토바실러스 파라카세이 DG® CNCM I-1572 및/또는 락토바실러스 파라카세이 LPC-S01 DSM 26760; 및
- [0099] - 하기로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 추가 박테리아 균주:
- [0100] - 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) BbIBS01 DSM 33231,
- [0101] - 비피도박테리움 브레베 BbIBS02 DSM 33232,
- [0102] - 비피도박테리움 애니멀리스 아종 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) B1IBS01 DSM 33233,

- [0103] - 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) LpIBS01 DSM 33234,
- [0104] - 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) BbfIBS01 DSM 32708; 및
- [0105] 이들의 혼합물.
- [0106] FR9. FR1-8 중 어느 하나에 따른 용도를 위한 조성물로서, 상기 (i) 혼합물 M은 하기로부터 선택된 하나 이상의 추가 활성 성분을 추가로 포함하는 것인 조성물:
- [0107] - 그룹 A, B, C, D, E 및/또는 K로부터의 적어도 하나의 비타민, 바람직하게는 그룹 B 비타민 및/또는 비타민 D;
- [0108] - 글루타티온, 레스베라트롤 및 트랜스-레스베라트롤과 같은 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 아스타잔틴, 라이코펜과 같은 항산화 물질;
- [0109] - 장 이완 작용을 갖는 식물, 바람직하게는 발레리안, 시계꽃, 레몬 밤, 산사나무 및 카모마일로부터 선택되는, 식물 물질, 식물성 물질, 또는 그의 추출물;
- [0110] - 미네랄 또는 그의 염, 예를 들어 아연, 셀레늄, 마그네슘, 칼륨;
- [0111] - 오메가 9와 같은 단일 불포화 지방산 및/또는 오메가 3 및 오메가 6과 같은 다중 불포화 지방산;
- [0112] - 면역자극제, 지사제 및/또는 영양소
- [0113] - 하나 이상의 프리바이오틱, 바람직하게는 이눌린, 프락토올리고당(FOS), 갈락토올리고당(GOS), 자일리톨올리고당(XOS), 구아검, 락토펜 및 이들의 혼합물로 구성된 그룹 (II)에서 선택되고, 더욱 바람직하게는 이눌린인 하나 이상의 프리바이오틱; 및
- [0114] 이들의 혼합물.
- [0115] FR10. FR1-9 중 어느 하나에 따른 용도를 위한 박테리아 균주 또는 조성물로서, 상기 균주는 생존 가능한 박테리아 균주 또는 상기 박테리아 균주의 파생물(derivative)이고, 상기 박테리아 균주의 파생물은 틴달화(tyndallized) 박테리아 균주, 초음파 처리된 박테리아 균주, 방사선(바람직하게는 감마 방사선) 조사에 의해 불활성화된 박테리아 균주, 용해되거나, 균질화된 박테리아 균주, 박테리아 균주의 추출물 또는 벽 분획으로부터 선택되거나, 바람직하게는 틴달화 박테리아 균주인 것인 박테리아 균주 또는 조성물.
- [0116] 실험 부분 (Experimental Part)
- [0117] 본 출원인은 락토바실러스 파라카세이 DG 균주<sup>®</sup> CNCM I-1572 프로바이오틱(생존 세포)의 투여 후 생후 첫 3개월 동안 숙주의 장내 미생물군에 대한 효과를 평가하기 위해 신생아에서 임상 연구를 수행했다.
- [0118] 1. 임상 연구의 목적
- [0119] 연구의 1차 목적:
- [0120] 락토바실러스 파라카세이 균주 CNCM I-1572를 포함하는 경구 투여용 점적제 형태(오일 기반)의 본 발명에 따른 조성물(간략하게, 분석 대상 조성물)의 보충이 연구 집단에서 락토바실러스 파라카세이 균주 CNCM I-1572의 농도 측면에서 분변 장내 미생물군의 조성을 변화시키는 지 여부를 평가하는 것이다.
- [0121] 분석 대상 조성물:
- [0122] 해바라기씨 오일(헬리안투스 안누스(*Heliantus annuus*) L.), DL-알파-토코페롤, 락토바실러스 파라카세이 CNCM I-1572(8 ml당 140억 개 이상의 살아있는 세포).
- [0123] 연구의 2차 목적:
- [0124] 28일 동안 분석 대상 조성물의 섭취량을 하기 측면에서 평가하는 것이다:
- [0125] - 섭취 후 56일과 84일차에 미생물계(microbiota system)의 생태 예측을 통한 분변 장내 미생물군의 조성 변화(실시간 PCR)
- [0126] - 섭취 후 28, 56, 84일차에 미생물계의 생태 예측을 통한 분변 장내 미생물의 기능적 활성(대사체학) 변화
- [0127] - 대변의 양 및 질(빈도 및 점도)의 변화;

- [0128] - Rome IV 기준에 따라 정의된 신생아 산통의 발생;
- [0129] - 제품의 안전성과 내약성;
- [0130] - 환자 성장.
- [0131] 2. 연구의 조직
- [0132] 탐색 타이밍(search timing)(도 1)
- [0133] - 등록 기간: 24주;
- [0134] - 치료 기간: 4주;
- [0135] - 추적 기간: 8주;
- [0136] - 환자당 연구 기간: 12주(84일);
- [0137] - 총 연구 기간: 36주.
- [0138] 3. 연구 설계
- [0139] 무작위, 위약 대조, 이중 맹검, 단일 센터 임상 연구(randomized, placebo-controlled, single-centre clinical study). 신생아는 출생 체중에 따라 세 그룹으로 분류되었다:
- [0140] - 정상 출생 체중(>2500g, NBW),
- [0141] - 저 출생 체중(1500-2500g LBW),
- [0142] - 초저 출생 체중(1000-1500g, VLBW).
- [0143] 시험은 유일한 참여 및 조정 센터로서 로마에 있는 Policlinico Casilino의 신생아학 U.O.(U.O. of Neonatology of the Policlinico Casilino)에서 수행되었다.
- [0144] 3.1. 연구 집단(Study population)
- [0145] 연구는 NBW 20명, LBW 20명, VLBW 20명으로 나누어진 60명의 조산 및 만삭 신생아 등록을 포함한다.
- [0146] 3.2 개입(intervention)의 유형
- [0147] 등록된 60명의 대상체를 1:1 비율로 2개의 중재군(arm)에 각각 3개의 그룹으로 무작위 배정했다.
- [0148] 중재군 1:
- [0149] 점적제(drop) 형태의 테스트 조성물, 4주(28일) 동안 20억 CFU(colony-forming unit)의 락토바실러스 파라카세이 DG<sup>®</sup>(CNCM I-1572)에 해당하는, 1일 1회 9개의 점적.
- [0150] 중재군 2:
- [0151] 대조군: 위약, 4주(28일) 동안 1일 2회 9개의 점적.
- [0152] 3.3 연구 기간
- [0153] 12주 기간은 분석 대상 조성물의 섭취에 의해 결정된 *L. casei* DG 균주<sup>®</sup>(락토바실러스 파라카세이 CNCM I-1572)의 지속에 근거하여 장 미생물군의 변화를 평가할 수 있게 한다. 12주 기간은 치료 4주 및 추적관찰(follow-up) 8주로 나누어진다. 약 24주의 등록 기간을 포함하면 총 연구 기간은 36주이다.
- [0154] 4. 연구 대상체의 선택
- [0155] 4.1 포함 기준
- [0156] - 생후 0-48시간(0-48 hours in life);
- [0157] - 출생 체중이 1000g 이상인 남녀 신생아;
- [0158] - 제왕절개로 태어난 신생아.
- [0159] 4.2 제외 기준(주요 기준만 포함)

- [0160] - 질 분만;
- [0161] - 극저 체중 출생 체중(ELBW)( $<1000\text{g}$ );
- [0162] - 확립된 또는 의심되는 전신 감염;
- [0163] - 조사자의 의견으로 치료를 방해할 수 있는 중증 병리;
- [0164] - 연구 시작 이후 신생아 또는 수유모가 시험 제품(trial product) 이외의 프로바이오틱스의 섭취;
- [0165] - 출생부터 전체 연구 기간 동안 전신 항생제 치료 또는 예방(NBW만 해당)
- [0166] - 출생 전 30일 및 전체 연구 기간 동안 수유모(NBW 신생아의 수유모)에 의한 전신 항생제 치료 또는 예방.
- [0167] 신생아가 처방된 치료의 80% 이상 내지 120% 이하를 복용한 경우 프로토콜 순응 집단(Per Protocol population)에 적합한 것으로 간주된다.
- [0168] 5. 절차 및 방법
- [0169] 가능한 경우, 상황에 맞는 대변 샘플 수집을 동반한 대조 방문(control visit)
- [0170] V1 1일차(생후 0-48시간); V2 10일차(+/- 2일); V3 28일차(+/- 3일); V4 56일차(+/- 3일); V5 84일차(+/- 3일)(도 1).
- [0171] 또한, 연구 기간 동안, 부모로부터 수집한 분변 샘플을 하기 계획(scheme) 1에 따라 전달하였다(각 방문 전 24 시간 이내에 1개의 샘플 수집).
- [0172] 치료-전(Pre-treatment):
- [0173] - 생후 48시간 이내의 분변 및 가능한 경우, 태변.
- [0174] 치료 단계:
- [0175] - 섭취 개시 후 10일차 분변;
- [0176] - 섭취 개시로부터 28일차 분변;
- [0177] 추적(follow-up) 단계:
- [0178] - 섭취 개시로부터 56일차 분변;
- [0179] - 섭취 개시로부터 84일차 분변;
- [0180] 대변 샘플의 화학-물리적 분석:
- [0181] - 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>(락토바실러스 파라카세이 CNCM I-1572)의 박테이사 수를 평가하기 위한 실시간 PCR 분석;
- [0182] - 프로바이오틱스 투여 전 및 투여 후 장내 미생물군의 특성을 파악하기 위한 메타게놈학(metagenomics) 및 대사체학 분석.
- [0183] 구체적으로, 미생물군을 박테리아 리보솜 서브유닛 16S rRNA를 코딩하는 유전자 부분의 뉴클레오티드 서열 분석을 통해 분석하였다. 구체적으로, 하기 단계로 구성된 메타게놈 전략을 채택할 것이다:
- [0184] - 분변 샘플로부터 메타게놈 DNA의 추출, 정량화 및 정규화
- [0185] - 16S rRNA를 코딩하는 박테리아 유전자의 V3-V4 초가변 영역(hypervariable region)의 PCR 증폭;
- [0186] - PCR 산물의 정량화;
- [0187] - Illumina MiSeq 기술을 이용한 시퀀싱;
- [0188] - 생물정보학적 서열 분석(미생물 군집의 특성화, 계층적 클러스터링(hierarchical clustering), 분류학적 분석, 히트맵을 사용한 계통발생 덴드로그램(phylogenetic dendrograms with heatmaps) 구축).
- [0189] 대사체 분석을 위해, 휘발성 유기 화합물(VOC)로 생성된 미생물 기원의 대사 산물을 식별하고 정량화했다. 이들 화합물은 GC-MS/SPME(Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry by Solid Phase Micro Extraction)

시스템을 사용하여 추출하였다. VOC 추출을 위해 카르복시-폴리디메틸실록산(CAR-PDMS) 코팅 섬유(85  $\mu\text{m}$ )를 SPME 공정에 사용했다. 3회 반복 분석된 각 샘플로부터, 평균 100-500 mg을 내부 표준(IS)으로 4-메틸-2-펜탄올을 첨가한 10 ml 유리 바이알에 넣었다. 그 후, 분변 샘플을 45°C에서 10분간 평형화시켰다. 섬유를 5973C 선택적 질량 검출기와 결합되고 Supelcowax 10 모세관 컬럼이 장착된 GC-MS(Hewlett Packard 6890 GC)에 주입하기 전에 45분 동안 각 샘플에 노출시켰다. 대사산물은 순수 화합물과 비교한 체류 시간(retention time: Rt)을 이용하여 식별된다. 크로마토그램은 단편 패턴을 NIST 라이브러리로부터의 패턴과 비교한 후 수동 육안 검사를 통해 통합되고 식별된다. 정량적 대사산물 데이터는 IS 면적에 대한 상대적 면적을 보간하여 취득된다.

- [0190]
- [0191] 6. 유효성 및 안전성 평가
- [0192] 6.1. 유효성 평가
- [0193] 1차 평가변수(primary endpoint)
- [0194] - 실시간 PCR에 의한 28일차 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>의 박테리아 계층 수
- [0195] 2차 평가변수(secondary endpoint)
- [0196] - 28일, 56일 및 84일차에 장내 미생물군의 불균형(dysbiosis)( $\alpha$ -다양성(diversity) 및  $\beta$ -다양성) 지표;
- [0197] - 56일 및 84일차 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>의 박테리아 계층 수;
- [0198] - 신생아용 암스테르담 대변 척도(Amsterdam stool scale)를 사용한, 방문 전날(1일, 10일, 28일, 56일, 84일차) 분변 배출의 횟수, 점도, 양 및 색상;
- [0199] - 분변의 화학-물리적 분석(1일, 10일, 28일, 56일, 84일차);
- [0200] - 28, 56, 84일차에 미생물군의 전반적인 대사 프로파일의 변화 평가에 의한 VOC 대사체(volatilome), 즉, 휘발성 분변 대사산물(화합물 카테고리: 단쇄지방산(SCFA), 알코올, 케톤, 알데히드, 티올, 산, 에스테르, 피라진, 피리딘, 페놀, 푸란, 테르펜, 알칸, 알켄 등)의 정량적 평가;
- [0201] - '로마 IV(Rome IV)' 진단 기준에 따른 산통의 존재 평가;
- [0202] - 부작용의 평가.
- [0203] 7. 통계 분석
- [0204] 통계적 방법
- [0205] 범주형 데이터(categorical data)는 개수(count)와 백분율로 표시되는 반면, 연속형 데이터는 평균과 표준 편차 또는 중앙값과 범위로 표시된다.
- [0206] 범주형 데이터의 비교는 카이제곱(Chi-square) 검정이나 Fisher의 정확 검정(Fisher's exact test)을 통해 적절하게 수행된다. 연속 데이터는 스튜던트 t-검정(독립 또는 종속 데이터의 경우)에 의해, 반복 측정의 경우 Anova 및 Anova로 비교되며, 여기서 적절한 통계적 검정이 데이터의 정규성(normality)이 결정된다; 정규 분포가 아닌 데이터의 경우, 합계 순위 검정(sum rank test)(Mann Whitney Rank 합계 검정) 또는 합계 부호 순위 테스트(sum signed rank test)(Wilcoxon Signed Rank), Kruskal Wallis 검정 또는 Friedman 검정과 같은 비-파라미터 검정(non-parametric test)이 이용된다. 반응 변수에 대한 여러 독립 변수의 동시 효과를 평가하거나 시간 데이터에 대한 가능한 혼란 요인(confounder) 및/또는 분석을 식별하기 위해 필요한 경우 다변량 회귀 기법이 이용된다. 결과는 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의미한 것으로 간주된다.
- [0207] 모든 분석은 Stata 15 소프트웨어(StatCorp)를 사용하여 수행된다.
- [0208] 8. 연구의 미생물학적 결과
- [0209] 8.1 1차 평가변수: 실시간 PCR에 의한 28일차 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>의 박테리아 계층 수
- [0210] V1-V5 대조 방문 동안 수집된 분변 샘플의 결과가 도 2a 내지 2e의 다이어그램에 도식화된다.
- [0211] 이러한 다이어그램(박스 플롯(box plot))은 각 추적(follow-up) 시점에 위약 그룹 및 분석 대상 조성물이 투여

된 'Tx' 그룹에서 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>의 농도를 보여준다. 각 그룹에 대해, 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup> 농도 (CFU/ml)의 중앙값, 25번째 백분위수(percentile), 75번째 백분위수, L의 최소값 및 최대값이 표시된다.

- [0212] 최초 투여 후 10일차부터 시작하여 치료군의 대상체의 장에서 검출된 프로바이오틱스 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup>는 섭취 후 84일차까지 지속되었고, 추적의 V3 시점(치료 56일차)부터 약간 감소했다.
- [0213] 8.2 메타게놈 분석
- [0214] 도 3a 내지 3d는 대조 방문 V2-V5의 시점에 락토바실러스 종(Lactobacillus spp.)의 상대적 존재비(relative abundance)의 히스토그램을 보여준다.
- [0215] 미생물군의 생태학 분석으로부터, 분석 대상 조성물의 투여(Tx 군)가 투여 개시 후 최대 10일(V2 시점)까지 락토바실러스 속(Lactobacillus spp.)의 상대적 존재비를 통계적으로 유의하게 증가시키고(pFDR≤0.05), 이러한 증가는 시점 V4 및 V5에서 p < 0.05의 경향을 계속 갖는 것으로 추론될 수 있다.
- [0216] 8.3 대사체 분석(Metabolomic analysis)
- [0217] 도 4는 PLS-DA 대사체 분석 결과의 다이어그램을 보여준다; 세로 축은 확인된 대사산물을 열거하고, 가로 축은 변수 중요도(VIP: variable importance in projection)를 나타낸다.
- [0218] PLS-DA 분석에서는 부탄산 및 프로판산 대사산물(SCFA)이 Tx 샘플에서 상기 대사산물의 농도가 증가함에 따라 위약 그룹과 Tx 그룹 간의 클러스터링에서 주요 역할을 하는 것으로 확인되었다.
- [0219] PLS-DA에 의해 시점을 개별적으로 고려하면, TX 샘플에서 SCFA의 농도가 증가함에 따라 V2와 V4 시점 간에 샘플의 가장 큰 분리가 발생함을 알 수 있다.
- [0220] 이러한 경향은 분석 대상 조성물을 투여받은 Tx 그룹의 대상체에서 락토바실러스의 상대적 존재비가 더 높은 것(섹션 8.2)과 일치한다.
- [0221] 8.4 획득된 모든 미생물학적 데이터 간의 상관관계
- [0222] 이전 단락에서 논의된 세 가지 다른 접근법(실시간 PCR, 메타게놈 분석, 대사체 분석)에서 수득된 결과는 Spearman 상관관계를 통해 서로 상관되었다.
- [0223] 상관 분석을 위해, 메타게놈, 대사체 및 실시간 PCR 분석이 위약 그룹과 분석 대상 조성물로 치료된 Tx 그룹 간에 가장 통계적으로 유의한 차이를 보였기 때문에, 분석 대상 조성물의 투여에 해당하는 시점 V2 및 V3(V2: 10일차; V3: 28일차)를 선택하였다.
- [0224] 세 가지 접근법에서 얻은 데이터를 종합하면, 프로바이오틱스 L. Casei DG<sup>®</sup>는 미생물군의 생태 및 기능 모두에 영향을 미치며, 장에 서식하는 박테리아의 생태적 지위(ecological niche) 및 상응하는 기능적 프로파일을 변형시킨다는 것을 알 수 있다.
- [0225] 특히, 부탄산 및 프로판산과 같은 특정 단쇄지방산(SCFA)이 피칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 오실로스피라(*Oscillospira*), 에게르텔라(*Eggerthella*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속의 특정 유익한 박테리아와 긍정적인 상관관계를 보였다.
- [0226] 9. 연구의 임상 결과: 대변 수, 점도, 양 및 색
- [0227] 각각의 연구 방문에서 관찰된 배변(evacuation) 횟수는 위약으로 치료받은 대상체보다 분석대상 조성물로 치료받은 대상체에서 실질적으로 더 높았다.
- [0228] 배변의 양에 관해서, 치료 개시 후 10일, 56일, 84일차에 두 연구군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(각각 P=0.12, 0.61, 및 0.25).
- [0229] 치료 기간의 종료(28일차, V3)시에만 분석 대상 조성물로 치료받은 대상체에 유리하게 배변 횟수의 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.03).
- [0230] 대변의 색상 및 점도("암스테르담 유아 대변 척도(Amsterdam infant stool scale)"에 따라 평가된 매개변수)와 관련하여, 대변 색과 관련하여 치료의 개시 후 10일차(P<0.0001) 및 56일차(P=0.007)에 및 대변 점도와 관련하여, 10일차(P=0.0016), 56일차(P<0.0001), 및 84일차(P=0.05)에 분석 대상 조성물로 치료받은 대상체에 유리하

게 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다.

[0231] 10. 연구의 안전성 결과

[0232] 안전성 분석 결과가 하기 표 1에 요약된다.

표 1

		치료 중재군 (arm)	
		위약(N = 29)	Tx(N = 30)
하나 이상의 AE*가 발생한 환자 수	N (%)	15 (51.7)	12 (40.0)
하나 이상의 제품 관련 AE*가 발생한 환자 수.	N (%)	0 (0.0)	0 (0.0)
하나 이상의 심각한 AE*가 발생한 환자 수	N (%)	8 (27.6)	4 (13.3)
하나 이상의 중증 AE*가 발생한 환자 수	N (%)	2 (6.9)	2 (6.7)
AE*로 인해 사전에 연구를 종료한 환자 수	N (%)	1(3.4)	0 (0.0)
AE* 수	N	21	16
심각한(serious) AE의 수.	N	10	6
관련 AE* 수	N	0	0
중증(severe) AE* 수	N	2	4
사망자 수	N	0	1

[0234] \*AE = 부작용(adverse effect)

[0235] 총 37건의 부작용(AE)이 기록되었고, 그 중 21건은 위약 치료 그룹(군)에서, 16명은 분석 대상 조성물로 치료받은 대상체의 그룹(Tx)에서 발생했다.

[0236] 등록되고 랜덤화된 59명의 대상체 중 27명이 하나 이상의 부작용을 나타냈다(위약 그룹의 대상체 15명, Tx 그룹의 대상체 12명).

[0237] 분석 대상 조성물로 치료받은 1명의 대상체에서 단지 2건의 심각한 부작용(괴사성 대장염 및 의심되는 패혈증)이 보고되었다. 그러나, 심각한 부작용 중 어느 것도 분석 대상 조성물의 투여와 관련된 것으로 보이지 않았다.

[0238] 위약 그룹에서 관찰된 심각한 부작용(입원이 필요한 경증 위식도 역류)에 대해서 동일한 판단이 내려질 수 있다.

[0239] 과중성 혈관내 응고 및 패혈성 쇼크에 의해 유발된 분석 대상 조성물로 치료받은 환자에서 기록된 사망은 조사자에 의해 연구 치료와 '관련될 가능성이 없는 것'으로 분류되었다.

[0240] 나머지 모든 중증 및 비-중증 부작용은 투여된 연구 치료제(위약 또는 분석 중인 조성물)와 관련이 없거나(N = 29) 관련될 가능성이 없는(N = 3) 것으로 간주되었다.

[0241] 연구 기간 동안 두 그룹에서는 습진이나 피부 질환은 기록되지 않았다.

[0242] 11. 결론

[0243] 전술된 바를 고려하여 다음과 같이 결론을 내린다:

[0244] - 1차 평가변수와 관련하여, 분석 대상 조성물로 처리된 Tx 그룹에서, 프로바이오틱 L. casei DG<sup>®</sup>는 치료 개시 후 10일차부터 장에서 검출되었고(V2, 도 2b), 관찰 기간 V5의 종료까지 지속되었다(도 2e).

[0245] - 락토바실러스 종의 상대적 존재도와 관련하여, 분석 대상 조성물은 관찰 기간 V5의 종료까지 락토바실러스의 상대적 존재도의 통계적으로 유의한 증가를 가져오는 것으로 나타났다(도 3d).

[0246] - PLS-DA 대사체 분석에서, 부탄산과 프로판산 대사산물이 확인되었고, 이는 Tx 샘플에서 더 높은 농도를 보였다(도 4).

[0247] - 이전 미생물학적 분석의 상관관계로부터, 부탄산과 프로판산의 존재가 치료된 대상체의 미생물군에 유익한 특정 종의 박테리아와 양의 상관관계를 보였다는 것이 추론될 수 있다.

[0248] - 분석 대상 조성물로 치료받은 대상체는 위약 치료 그룹에 비해 통계적으로 유의미하게 더 많은 배변 횟수 및 더 나은 대변 색상 및 점도(신생아에 대한 암스테르담 대변 척도에 따라 평가됨)을 나타냈다.

- [0249] - 마지막으로, 앞서 분석한 안전성 및 내약성(tolerability) 프로파일 및 두 연구 그룹 모두에서 기록된 중증 부작용의 평가에 근거하여, 분석 대상 조성물은 위약과 유사한 안전성 프로파일로, 안전하고 내약성이 우수한 것으로 입증되었다.
- [0250] 전술된 바와 같이, 생후 첫 수주에, 포유류, 특히 인간은 아직 내부 장기의 성숙이 완료되지 않았기 때문에 아동과 동일시할 수 없기 때문에, 수득된 결과는 결코 명확하지 않다. 따라서, 본원에 기술된 균주가 수득된 약리학적 반응을 제공할 수 있거나, 신생아에서 우수한 내약성을 보일 것으로 예상할 수 없었기 때문에, 이러한 균주의 효능 및 안전성을 확인하기 위해 전술된 임상 시험을 수행하는 것이 필요했다.
- [0251] **실험 부분(Experimental Part)**
- [0252] 지금까지 건강한 신생아(조산 및 만삭 신생아)와 같은 취약한 집단에 대한 LCDG의 영향을 평가하기 위한 연구는 수행된 바 없었다.
- [0253] 본 이중 맹검, 위약 대조 연구의 목적은 투여 기간 동안 및 그 후에 미생물군 구성에 긍정적인 영향을 미치는 능력을 평가하는 것에 의해 LCDG의 소아용 제형(paediatric formulation)이 신생아(출생 체중에 따라 세 그룹으로 분류됨: 정상 출생 체중, 저 출생 체중, 초저 출생 체중(Very low birth weight))의 위장관을 통해 살아서 통과하는 능력을 확인하는 것이었다. 제품의 안전성(체중, 길이 및 머리 둘레 파라미터 모니터링), 배변 빈도, 대변 점도 및 복통 발생도 평가하였다.
- [0254] **재료 및 방법**
- [0255] 실험 제품
- [0256] 락토바실러스 파라카세이(*L. casei* DG<sup>®</sup> - CNCM I-1572; LCDG)는 SOFAR S.p.A에서 공급되었다.
- [0257] LCDG의 10억 CFU(colony forming unit)에 해당하는 락토바실러스 파라카세이 9 점적(drop)을 28일 동안 1일 2회 투여했다. 점적을 혀에 직접 투여하거나 차갑거나 미지근한 액체와 혼합하여 투여했다.
- [0258] 연구의 대상체(subject)
- [0259] 본 연구는 2018년 9월부터 2021년 3월까지 진행되었다. 연구에 참여하는 환자는 이탈리아 로마 폴리클리니코 카실리노 병원 신생아과(Hospital Neonatology Unit, Policlinico Casilino)의 조산 및 만삭 신생아 그룹에서 선택되었다. 연구의 포함 기준은 하기와 같이 결정되었다: 생후 0-48시간의 연령, 출생 체중  $\geq 1000\text{g}$ 인 남녀 신생아, 제왕절개로 분만된 신생아 및 신생아의 부모/보호자의 서면 동의서. 제외 기준은 질 분만, 극저 출생 체중(ELBW)( $<1000\text{g}$ ), 확립되거나 의심되는 전신 감염, 알려진 중증 신경 질환, 알려진 중증 대사 질환, 알려진 유전 질환 및 염색체 장애, 중증 기형(예를 들면, 단장 증후군; 장폐색; 동맥관 개존증(ductus arteriosus patency), 무증상이고, 치료가 필요하지 않은 경우 포함될 수 있음), 알려진 중증의 일차 또는 이차 모성 면역결핍, 알려진 산모의 음식 알레르기, 산모의 당뇨병(임신성 당뇨병 포함), 최근 또는 의심되는 산모의 알코올 또는 약물 남용 병력, 조사자가 치료를 방해할 수 있다고 믿는 중증 병태(severe condition), 부적절한 신뢰도 또는 환자에 의한 프로토콜의 비-순응(non-compliance) 또는 비-준수(non-observance)를 초래할 수 있는 상태의 존재였다. 또한, 신생아에게는 연구 기간 전체 동안 시험 제품 이외의 프로바이오틱스를 투여하는 것을 금지하였고, 수유모에게는 연구 기간 전체에서 어떠한 프로바이오틱스의 투여도 금지하였다. 정상 체중(NBW) 신생아에 대해서만, 출생 후부터 연구 기간 전체 동안 전신 항생제 치료 또는 예방이 허용되지 않았고, (NBW 영아의) 수유모는 연구 전 30일 및 전체 연구 기간 동안 전신 항생제 치료 또는 예방이 허용되지 않았다.
- [0260] 신생아의 각 부모/보호자는 연구 참여에 대한 고지 동의서(informed consent)에 서명하고 시험 제품의 사용 조건이 포함된 설명서를 받았다. 포함/제외 기준에 따라, 60명의 조산 및 만삭 신생아가 선택되었다.
- [0261] 연구 설계
- [0262] 이 12주, 무작위, 이중 맹검, 단일 센터, 위약 대조 임상 시험의 목적은 분만 후 첫 48시간 동안 신생아에게 LCDG의 투여가 28일 동안 제품 보충 후 분변 장내 미생물군의 구성을 변화시키는지 여부를 평가하는 것이었다. 12주 기간은 4주의 치료 및 8주의 추적으로 나뉘었다.
- [0263] 아동은 5회의 현장 방문(on-site visit)에 참여했다: 1차 방문(V1; 출생 후 0-48시간), 2차 방문(V2; 10일 +/- 2일), 3차 방문(V3; 28일 +/- 3일; 제품 섭취 종료), 4차 방문(V4; 56일 +/- 3일) 및 5차 방문(V5; 84일 +/- 3, 연구의 종료).

- [0264] V1에서, 신생아는 출생 체중에 따라 3개의 그룹으로 계층화될 것이다: 정상 출생 체중(>2500g, NBW), 저 출생 체중(1500-2500g LBW), 초저 출생 체중(1000-1500g, VLBW).
- [0265] 이렇게 계층화된 적격 환자는 1:1의 비율로 하기 중재군(arm) 중 하나로 무작위 배정된다: 중재군 1(Arm 1): 치료 그룹: 생후 48시간부터 개시하여 4주(28일) 동안 20억 CFU(집락 형성 단위)에 해당하는 LCDG를 1일 2회 9개의 점적; 중재군 2: 위약 그룹: 생후 48시간부터 개시하여 4주(28일) 동안 위약(시험 제품과 구별되지 않는 제품)을 1일 2회 9개의 점적.
- [0266] 동일한 방문 동안, 아기와 엄마의 인구통계학적 데이터 및 아기의 대변 샘플을 수집했다. 주요 결과는 실시간 PCR에 의한 치료 28일차(V3)에 LCDG에 대한 박테리아 계층 수 측면에서 분변 장내 미생물군의 조성이었다. 연구 기간 동안 평가된 부차적 결과는: 투여의 개시 후 28일, 56일 및 84일(각각 V3, V4 및 V5)에 미생물군 생태의 예측에 의한 분변 장내 미생물군의 기능적 활성의 변형(대사체학 분석 -  $\alpha$ - 및  $\beta$ -다양성); 투여의 개시 후 56일 및 84일(각각 V4 및 V5)에 미생물군 생태의 예측에 의한 분변 장내 미생물군의 조성 변화(실시간 PCR); 대변의 질 및 양(빈도 및 점도)의 변화; Rome IV 기준[Castelluzzo]에 따라 정의된 신생아 산통의 발생; 제품의 안전성 및 내약성; 환자 번영(prosperity)이었다.
- [0267] 윤리
- [0268] 본 연구는 헬싱키 선언에서 유래되거나 파생된 윤리적 원칙 및 우수 임상 관리 기준(Good Clinical Practice Guideline)에 따라 수행되었습니다. 연구자는 모든 연구 문서를 관련 윤리 위원회에 제출하고 윤리 위원회로부터 받은 승인/우호적 의견(approval/favorable opinion)의 사본을 스폰서에게 전달했다(ASL Roma 2: Prot.n° 01220672/2018). 신생아의 모든 부모/보호자는 서명된 고지 동의서를 제공했다.
- [0269]
- [0270] 결과의 평가
- [0271] 대변 샘플은 각 방문 전 24시간 이내에 수집되었다.
- [0272] 각 신생아에 대해, 배변 횟수를 기록하고, 암스테르담 대변 스케일(하기에 기술됨)을 이용하여 대변 샘플의 색상 및 점도를 평가했다.
- [0273] 또한, 각 방문 일에 Casilino 병원의 임상 병리학 실험실에서 스테르코빌리노겐, 중성 지방, 지방산, 비누, 아미드, 고기 및 야채 섬유, 점액 및 pH를 포함한, 대변 샘플의 물리화학적 분석을 수행했다. 최적의 보존 조건을 보장하기 위해, 대변 샘플을 -20°C에서 병원 냉동고에 보관하고, 분자 분석을 위해, 스폰서가 위탁한 택배를 통해 드라이아이스와 함께 매월 Bambino Gesù Pediatric 병원(상파울로 소재)의 기생충학/인간 마이크로바이옴 연구소로 보냈다.
- [0274] (이미 검증되고 발표된 방법에 따라; Ferrario) 락토바실러스 카세이 DG<sup>®</sup> 균주의 박테리아 부하를 평가하기 위해 실시간 PCR 분석을 수행하고, 메타게놈 및 대사체 분석을 수행하여 프로바이오틱스 투여 전후의 장내 미생물군을 특성화했다. 특히, 박테리아 리보솜 소단위 16S rRNA를 코딩하는 유전자 부분의 뉴클레오티드 서열 분석을 통해 미생물군을 평가했다. 대변 샘플에서 메타게놈 DNA를 추출하고, 정량화하고, 정규화했다. 16S rRNA를 코딩하는 박테리아 유전자의 V3-V4 초가변 영역을 PCR로 증폭시키고, PCR 산물을 Illumina MiSeq 기술을 이용하여 정량화하고 시퀀싱했다. 미생물 군집 특성화(microbial community characterisation), 계층적 클러스터링, 분류학적 분석 및 히트맵을 사용한 계통발생 덴드로그램 구축을 위해 생물정보학적 서열 분석을 수행했다.
- [0275] 대사체 분석을 위해, 휘발성 유기 화합물(VOC 카테고리: 단쇄 지방산, 알코올, 케톤, 알데히드, 티올, 산, 에스테르, 피라진, 피리딘, 페놀, 푸란, 테르펜, 알칸, 알켄, 등)로 생성된 미생물 기원의 대사 산물을 식별하고 정량화했다. 이들 화합물은 GC-MS/SPME(Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry by Solid Phase Micro Extraction) 시스템을 사용하여 추출하였다. VOC 추출을 위해 카르복시-폴리디메틸실록산(CAR-PDMS) 코팅 섬유(85  $\mu$ m)를 SPME 공정에 사용했다. 각 샘플을 3회 반복 분석하고, 평균 100-500 mg을 내부 표준(IS)으로 4-메틸-2-펜탄올을 첨가한 10 ml 유리 병에 넣었다. 그 후, 분변 샘플을 45°C에서 10분간 평형화시켰다. 섬유를 5973C 선택적 질량 검출기와 결합되고 Supelcowax 10 모세관 컬럼이 장착된 GC-MS(Hewlett Packard 6890 GC)에 주입하기 전에 45분 동안 각 샘플에 노출시켰다. 대사산물은 순수 화합물과 비교한 체류 시간(retention time: Rt)을 이용하여 식별된다. 크로마토그램은 단편 패턴을 NIST 라이브러리로부터의 패턴과 비교한 후 수동 육안 검사를 통해 통합되고 식별된다. 정량적 대사산물 데이터는 IS 면적에 대한 상대적 면적을 보간하여 취득된다.

- [0276] 연구 동안 부작용을 모니터링하고 1일(V1), 10일(V2), 28일(V3), 56일(V4) 및 84일(V5)차에 신생아의 체중, 신장 및 머리 둘레를 측정하여 안전성을 평가했다.
- [0277] 마지막으로, '로마 IV' 진단 기준(하기에 기술됨)에 따라 산통의 발생 평가를 수행하고, V1에서 산모에게 제공된 특별한 일지를 통해 매일 배변 빈도 및 점도를 모니터링했다.
- [0278] 암스테르담 대변 스케일(Amsterdam stool scale)
- [0279] 스케일은 대변의 양을 4가지 등급으로 분류한다: 1: 얼룩(smear), 2: 최대 25%, 3: 25-50% 및 4:>50%.
- [0280] 대변의 점도는 A: 묽음(watery), B: 부드러움(soft), C: 형성됨(formed), D: 단단함(hard)으로 분류된다.
- [0281] 마지막으로 대변 색상은 6가지 클래스(I-VI)로 분류된다.
- [0282] 영아 산통의 "로마 IV" 진단 기준
- [0283] 임상적 목적을 위해, 영아 산통의 진단은 하기 모든 기준의 존재에 근거해야 한다: 소아는 증상 발병 및 해소 시점에 생후 5개월 미만이다; 뚜렷한 원인 없이 발생하고 부모가 예방하거나 해결할 수 없는 장기간의 울음, 동요, 또는 과민성(irritation)의 빈발기; 성장 결핍, 발열 또는 질병의 증거 부재. 용어 '동요(agitation)'는 간헐적인 발성을 의미하고, '정확히 울지는 않지만, 깨어 있고 행복한 사람의 행동도 아닌 [행동]'으로 정의된다. 소아는 종종 울음과 동요를 번갈아 가며 나타내므로, 두 증상을 구별하기가 어렵다.
- [0284] 연구 목적을 위해, 영아 산통의 진단은 다음 두 가지 모두와 함께 이전 기준을 포함해야 한다: 연구자 또는 의사와의 전화 통화 또는 일대일 인터뷰 동안, 부모는 적어도 주당 3일 동안 1일 3시간 이상 지속되는 울음 또는 동요의 기간을 보고하고; 선택된 아동 그룹에서 24시간 동안 지속되는 것으로 보고된, 최소 3시간 동안 지속되는 것으로 확인된, 울음 및 초조의 지속 시간이 일일 일지의 작성을 통해 전향적으로 정량화된다.
- [0285] 통계 분석
- [0286] 작업 가설은 *L. casei* DG<sup>®</sup> (*Lactobacillus paracasei* CNCMI-1572; LCDG)는 동일한 연구에서 28일 후[Putignani et al, 제출] 2.36 Log<sub>10</sub>/200mg 대변 카피(SD 0.4의 0.04 내지 SD 2.5의 2.5까지)의 차이를 보였던 락토바실러스 살리바리스(*L. salivaris*)와 유사하게 거동하는 것으로 가정한다. 각 그룹(NBW, LBW, VLBW)에서, 치료 그룹에서 20억 CFU/일의 섭취량을 인정하면, 각 치료 그룹의 9명 환자의 샘플은 양측 t 검정 및 각 계층에서 95% 유의성 수준으로, 연구에 80% 검정력(power)을 제공한다.
- [0287] 박테리아 균주 락토바실러스 카세이(*L. casei*) DG<sup>®</sup>(CNCM I-1572) 또는 *L. paracasei* DG<sup>®</sup>(CNCM I-1572)는 Zheng 등이 과학 저널 Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020에 발표한 락토바실러스 속의 재분류에 따라 2022년 2월 2일에 락티카세이바실러스 파라카세이(*Lacticaseibacillus paracasei*) DG I-1572 DSM 34154로 재등록되었다는 것이 주목되어야 한다. 2개의 전술된 명칭은 두 가지 이름은 항상 동일한 박테리아 균주를 지칭하므로, 호환적이다.
- [0288] 추적 시 잠재적인 손실(10% 탈락)을 예상하여, 총 60명의 신생아에 대해, 각 체중 계층별로 20명의 신생아를 등록시켰다(이 중 10명은 활성 치료를 받았고 10명은 위약을 받았음).
- [0289] 범주형 데이터는 개수(count)와 백분율로 표시되고, 연속형 데이터는 평균과 표준편차 또는 중앙값과 범위로 표시되었다.
- [0290] 범주형 데이터의 비교는 카이제곱(Chi-square) 검정이나 Fisher의 정확 검정(Fisher's exact test)을 통해 적절하게 수행된다. 연속 데이터는 스튜던트 t-검정(독립 또는 종속 데이터의 경우)에 의해, 반복 측정의 경우 Anova 검정 및 Anova로 비교되며, 여기서 적절한 통계적 검정이 데이터의 정규성(normality)이 결정된다; 비-정규 분포의 경우, Mann Whitney Rank 합계 검정 또는 Wilcoxon Signed Rank 검정, Kruskal Wallis 또는 Friedman 검정과 같은 비-파라미터 검정(non-parametric test)이 이용된다. 독립 변수 세트의 반응 변수에 대한 동시 효과를 평가하거나 시간 데이터에 대한 가능한 혼란 요인(confounder) 및/또는 분석을 식별하기 위해 필요한 경우 다변량 회귀 기법이 이용된다. 수득된 결과는 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의미한 것으로 간주된다. 모든 분석은 Stata 15 소프트웨어(StatCorp)를 사용하여 수행된다.
- [0291] **결과**
- [0292] **환자 배치 및 기본 특성**

- [0293] Policlinico Casilino 병원 신생아과의 조산 및 만삭 신생아 중에서 선택된 60명의 대상체를 2개의 치료 중재군에 1:1 비율로 무작위 배정했다: 30명은 LCDG로 치료하고 30명은 위약으로 치료했다(도 5).
- [0294] 위약 그룹에서, 20명의 대상체(66.7%)가 연구를 완료했고 10명의 대상체 (33.3%)는 연구를 완료하지 않았고, 2명의 대상체(6.7%)는 동의를 철회했으며, 1명의 대상체(3.3%)는 부작용(AE)으로 인해 연구를 조기 중단했고, 6명의 대상체(20.0%)는 추적(FUP) 중에 상실되었고, 1명의 대상체(3.3%)는 하인두 과오종에 대한 수술의 필요성으로 인해 포기했다.
- [0295] LCDG 그룹에서, 26명(86.7%)이 연구를 완료했고 4명(13.3%)이 완료하지 못했으며, 이들 중 3명(10.0%)은 FUP 동안 상실되었고, 1명(3.3%)은 '과중성 혈관내 응고' 및 '폐혈성 쇼크'로 사망했다.
- [0296] 인구통계학적 및 기본적 특성에 있어서, 산모의 평균 연령은 위약 그룹의 경우 35세±6세, LCDG(치료) 그룹의 경우 35세±5세(P=0.94)였고, 산모의 종족(ethnic) 그룹, 수유 유형, 산모의 체중 및 신장, 식이 타입, 흡연 상태, 신체 활동, 애완동물 유무 및 교육 수준에 대해 두 치료 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.
- [0297] 신생아의 특성과 관련하여, 본 연구에서는 출생 체중에 따라 정상 출생 체중(NBW), 저 출생 체중(LBW) 및 초저 출생 체중(VLBW)의 3개 그룹으로 분류했다. 연구 동안, 12쌍의 쌍둥이가 태어났고(총 24명의 신생아), 구체적으로 LCDG 그룹에는 14명(46.7%)의 대상체가 포함되었고, 위약 그룹에는 10명(34.5%)의 대상체가 포함되었다(P=0.34). 위약 그룹과 LCDG 그룹에서 각각 18명(62.1%) 및 17명(56.7%)의 신생아가 여아였으며(P=0.67), 신생아의 평균 출생 체중은 위약 그룹 및 LCDG 그룹에서 각각 2050g±784g 및 2005g±768g이었다.(P=0.82). APGAR 점수, 재태 연령, PN/EG 비율(AGA 및 SGA)에서도 두 치료 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다.
- [0298] 락토바실러스 카세이 DG(LCDG)는 첫 투여 후 10일부터 장에서 검출되었고 마지막 방문(84일)까지 지속적으로 유지되었다.
- [0299] 본 발명자들은 출생 시 59명의 대상체로부터 수집되고, VLW(n=20), LW(n=20) 및 NW(n=19)로 계층화된 251개의 대변 샘플을 분석했다. LCDG 균주는 첫 번째 투여 후 10일(V2)부터 대변 샘플에서 검출되었으며 마지막 방문(84일, 연구 종료 방문)까지 지속되었고, 첫 번째 추적 시점보다 약간 감소했다(56번째 연구일; 제품의 마지막 투여 후 28일차)(도 6a). LCDG의 존재는 치료 기간(10일 및 28일) 및 추적(56일 및 84일) 동안, 방문 시 수집된 샘플에서 대조 그룹보다 치료 그룹에서 유의하게 더 높았다. 이 증거는 또한 출생 체중(NW, LW 및 VLW)에 따라 각 그룹의 샘플을 계층화하는 것에 의해 확인되었다. 특히, 위약 그룹에서 3개의 체중 등급간 비교(그룹내 분석)는 V2(최초 투여 후 10일)에서 LCDG 농도에서 통계적 차이(p값=0.01)를 보인 반면, 치료 그룹에서, V3(제품의 마지막 투여 후 28일)에 3가지 체중 등급 간 LCDG 농도의 통계적 차이(p 값=0.01)가 발생했다. 평가된 나머지 시점에서는 체중 등급 간에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(도 6b). 더욱이, 56일차에 치료 그룹과 위약 그룹 간의 LCDG 농도의 차이는 NW 및 VLW 아기에 대해 통계적으로 유의했다(도 6b).
- [0300] 각 그룹의 상이한 시점에서 LCDG 농도를 비교하기 위해 Wilcoxon 부호 순위 검정을 수행했다. 위약 그룹에서, V1과 V2(p-값 = 0.012), V1과 V3(p-값 = 0.016), V1과 V4(p-값 = 0.012) 간의 비교가 통계적으로 유의했다. 치료 그룹의 경우, V1과 V2(p-값 = 1.5x10<sup>-12</sup>), V1과 V3(p-값 = 5.8x10<sup>-9</sup>), V1과 V4(p-값 = 1.8x10<sup>-8</sup>), V1과 V5(p-값 = 2.0x10<sup>-6</sup>), V2와 V4(p-값 = 1.6x10<sup>-3</sup>), V2와 V5 (p-값 = 9.7x10<sup>-3</sup>) 간의 비교가 통계적으로 유의했다(도 7).
- [0301] LCDG를 사용한 치료는 장내 마이크로바이옴의 이질성을 보존할 수 있었다.
- [0302] LCDG 치료(처리)가 장내 마이크로바이옴의 이질성을 보존할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 16S-rRNA를 표적으로 하는 메타게놈 방법을 이용하여, 대변 샘플에 대한 α- 및 β-다양성 분석을 수행했다.
- [0303] 각 시점에서 위약 그룹과 치료 그룹으로 분리된 대상체의 α-다양성의 분석은 V2(10일) 시점과 V3(28일) 시점에, 위약 그룹의 미생물군이 치료 그룹보다 더 큰 미생물 종 풍부도(species richness)를 갖는 것으로 나타났다(이를 보여주었다(p≥0.05)). 시점 V4에, α-다양성 지표는 동등한 것으로 보이는 반면(p≥0.05), 시점 V5에서는 치료 그룹이 위약 그룹보다 큰 풍부도를 가졌다(p≥0.05)(도 8a). 그러나 다양한 시점에서 위약 그룹과 치료 그룹 사이에는 통계적으로 유의한 비교가 없었다(p≥0.05).
- [0304] β-다양성 분석에서, Unweighted UniFrac 알고리즘으로 획득되고, 위약 그룹과 치료 그룹 간 다양한 시점에서 PCoA로 표현된 다양성 매트릭스(diversity matrix)는 다양한 시점에 두 그룹 사이에 통계적으로 유의한 비교가 없다(p≥0.05)는 것을 보여주었다. 이 결과는 비가중치(unweighted) Unifrac 알고리즘으로 계산된 거리 행렬에 적용된 PERMANOVA 통계 분석에 의해 확인되었다(도 8b).

- [0305] 문(phylum) 수준에서 OTU(operational taxonomic units)의 분포 분석 및 다양한 시점의 비교에 적용된 Kruskal Wallis 검정을 수행하였고, 이는 위약/치료 비교에서 통계적으로 유의한 차이( $p \geq 0.05$ )를 나타내지 않았다(도 8c).
- [0306] 속(genus) 수준에서 위약과 치료 간의 유일한 통계적으로 유의한 비교는 시점 V2에서 관찰되었다( $< 0.05$ ); 특히, 락토바실러스 속은 치료 그룹에서 더 높았다(도 8d).
- [0307] LCDG의 투여는 단쇄지방산(SCFA)의 농도를 증가시킨다.
- [0308] 모든 추적 시점(V1 내지 V5)에 수집이 완료된 대상체로부터 수집된 대변 샘플( $n=85$ )에 대해 대사체 분석을 수행했다. 대변 샘플은 GC-MS/SPME(Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry by Solid Phase Micro Extraction) 시스템을 사용하여 분석하였다.
- [0309] 492개의 대사산물을 식별하고, 정량화하고, 15가지 화합물 클래스(산, 알코올, 알데히드, 알칸, 알켄, 아민, 방향족 탄화수소, 에스테르, 푸란, 푸라논, 인돌, 케톤, 페놀, 피라진 및 테르펜)로 분류하였다. 예상한 대로, 각 샘플의 대사 프로파일은 대상체 간에 상당한 변동성을 보여주었다. 원시 데이터 매트릭스(raw data matrix)는 가능한 한 강건한 분석을 수행하기 위해 전체 샘플 세트의 최소 10%에 존재하는 대사산물을 유지하는 98개 대사산물의 매트릭스로 압축되었다. 전체 데이터 분석은 이 압축 매트릭스(condensed matrix)를 기반으로 개발되었다. 각 시점에 대해, 관리된(supervised) 접근법, 즉, PLS-DA(partial least squares discriminant analysis)를 이용하여 다변량 분석을 수행하였다. 치료(위약/치료제)에 따른 샘플의 가장 큰 클러스터링은 V2(10일) 시점과 V4(56일) 시점 간에 발생했고, 처리된 샘플에서 SCFA 농도가 증가했다(도 9).
- [0310] 또한, 각 연구 방문 시, 중성 지방, 산성 지방, 비누, 전분, 육류 및 식물성 섬유, 점액 및 pH 값의 존재를 평가하기 위해 대변의 물리화학적 평가를 수행했다. 두 치료 그룹 간의 차이를 비교하기 위해 카이제곱 검정을 적용했고, 어떠한 매개변수에 대해서도 유의한 차이( $P > 0.05$ )가 발견되지 않았다.
- [0311] LCDG의 투여는 미생물군의 생태 및 기능 모두에 영향을 가져서, 장에 상주하는 박테리아의 생태적 지위 및 상응하는 기능적 프로파일을 변형시켰다.
- [0312] 실시간 PCR, 메타게놈 및 대사체학의 3가지 접근법으로 취득된 결과는 Spearman 상관관계에 의해 서로 상관관계가 있었다. 상관 분석을 위해 각각 10일 및 28일차에 프로바이오틱스의 투여와 일치하는 시점 V2와 V3를 선택했고, 이는 메타게놈 분석, 대사체 분석 및 실시간 분석에서 이러한 시점에 위약 그룹과 치료 그룹 사이에 가장 통계적으로 유의한 차이가 나타났기 때문이다.
- [0313] 특히, 시점 V2에, 락토바실러스 파라카세이(CFU/mL)는 대사산물인 시클로헥사논, n-데칸산 및 3,4-디메틸 헵탄 및 OTU인 락토바실러스(*Lactobacillus*), 그라눌리카텔라(*Granulicatella*)와 양의 상관관계( $p \leq 0.05$ )를 나타냈다. 또한 OTU와 대사산물 간에 여러 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 주목될 수 있다. 프로바이오틱스 섭취 후 가장 큰 관심을 끄는 것은 부탄산을 포함한 SCFA이며, 이는 루미노코커스(*Ruminococcus*), 프레보텔라(*Prevotella*), 콜린셀라(*Collinsella*), 피칼리박테리움(*Faecalibacterium*) 및 오실로스피라(*Oscillospira*)와 유의한 상관관계( $p \leq 0.05$ )를 보인다. 펜탄산은 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 그라눌리카텔라(*Granulicatella*) 및 엔테로코커스(*Enterococcus*)와 유의한 상관관계( $p \leq 0.05$ )를 보이는 반면, 프로피온산은 에게르텔라(*Eggerthella*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 유의한 상관관계( $p \leq 0.05$ )를 갖는다.
- [0314] 시점 V3에, 락토바실러스 파라카세이(CFU/mL)는 2,3-디메틸 펜타날, 1-헥산올, 데카날 및 도데칸산과 양의 상관관계가 있었고( $p \leq 0.05$ )(도 10a), 반면 락토바실러스 파라카세이(CFU/mL)와 다양한 OTU 간에는 유의한 상관관계가 발견되지 않았다(도 10b). 마지막으로, OTU와 대사산물 사이에 여러 유의한 양의 상관관계( $p \leq 0.05$ )가 있음을 알 수 있다. 특히 부탄산과 프로판산은 콜린셀라(*Collinsella*)와 유의한 상관관계( $p \leq 0.05$ )를 보이고, 펜탄산은 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 피칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 프레보텔라(*Prevotella*) 및 코프로코커스(*Coprococcus*)와 양의 상관관계를 갖는다(도 10c).
- [0315] LCDG의 투여는 산통의 수를 감소시키지 않았다.
- [0316] '로마 IV' 진단기준에 따라, 일주일에 최소 3일 동안 3시간 이상 울고, 1일 최소 3시간 이상의 동요(agitation) 상태인 경우, 연구자는 산통의 에피소드(episode)로 기록했다. 연구 동안, 엄마들은 울음이 3시간 이상 지속되면, 영아의 울음을 기록하는 일지를 작성해야 했다. 관련된 모든 연구 방문(무작위화 후 10, 28, 56 및 84일)에서, 두 연구 그룹(위약 및 Enterolactis Baby) 간에 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다. 실제로 각 연

구 그룹에서 하루 3시간 이상 울었던 환자의 수와 평균 울음 시간은 연구 방문 때마다 거의 비슷했고, 연구 동안 총 8건의 산통이 발생했다(위약군에서 4건 및 LCDG 그룹에서 4건).

**[0317] 대변의 점도, 양 및 색상**

**[0318]** 임상 시험 동안, 대변의 점도, 양 및 색상을 암스테르담 대변 스케일(Amsterdam Stool Scale)을 사용하여 평가하였다. 색상과 점도는 10일차(V2)와 56일차(V4)에 위약 그룹과 치료 그룹 간에 유의하게 달랐다.

**[0319]** V2에서 p-값은 배변의 색상에 대해  $P < 0.0001$ 이었고, 배변의 점도에 대해  $P = 0.0016$ 이었다. 구체적으로, 각각 위약 그룹과 치료 그룹에 속하는 PT에 대해 기록된 총 143건의 배변과 총 221건의 배변 중, 위약 그룹에 대한 37건(25.9%) 및 치료 그룹에 대한 18건(8.1%)의 배변은 색상 II로 분류되었고, 위약 그룹에 대한 7건(4.9%)의 배변 및 치료 그룹에 대한 0건의 배변이 색상 IV로 분류되었다. 점도에 대해, 점도 B로 분류된 것은 위약 그룹에 대한 80건(55.9%) 배변 및 치료 그룹에 대한 152건(68.8%) 배변이었고, 점도 C/D 및 D로 분류된 것은 위약 그룹에는 없었고, 치료 그룹의 경우 6건(2.7%) 및 2건(0.9%)의 배변이었다.

**[0320]** 방문 4에서, 위약 그룹과 치료 그룹에서, PT에 대해 각각 119건의 배변 및 183건의 배변이 발생했고, 치료 그룹 간에 색상 및 점도에 통계적으로 유의한 차이가 있었다(암스테르담 스케일을 사용하여, 배변의 색상에 대해  $P = 0.007$ , 배변의 점도에 대해  $P < 0.0001$ ).

**[0321]** 양에 관해서는 28일차(V3)에 수집된 샘플에서만 유의했고, 위약 그룹과 치료 그룹에 대해 각각 총 122건과 219건의 배변이 기록되었다.

**[0322] 안전 평가 (Security Assessments)**

**[0323]** 등록된 신생아의 성장을 모니터링하기 위해, 각 연구 방문에서 체중, 신장 및 머리 둘레 매개변수를 평가했다. 치료 그룹과 위약 그룹을 비교하면, 연구 동안 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다. 마지막으로, (치료 그룹보다 위약 그룹에서 더 높았던, RR을 제외하고) 활력 징후(vital sign)에서 차이가 발견되지 않았다.

**[0324]** 부작용(AE)과 관련하여, 연구 동안, 위약 그룹에서는 총 21건의 AE가 기록되었고 LCDG 그룹에서는 16건의 AE가 기록되었다. 이러한 부작용 중, 위약 그룹에서는 10건의 SAE(severe AE), 치료 그룹에서는 6건의 SAE, 위약 그룹에서는 2건의 중증 AE, 치료 그룹에서는 4건의 중증 AE가 기록되었다.

**[0325]** 위약 그룹에서, 10건(47.6%)의 AE가 경증, 9건(42.9%)의 AE가 중등증(moderate severity), 및 2건(9.5%)의 AE가 중증으로 간주된 반면, LCDG 그룹에서는 8건(50.0%)의 AE가 경증, 4건(25.0%)의 AE가 중등증, 및 4건(25.0%)의 AE가 중증으로 간주되었다.

**[0326]** 위약 그룹에 속하는 PT에서 발생한 AE 중에서, 3건(14.3%)의 AE는 치료와 관련이 없을 것으로 간주되었고(1건은 '신생아 호흡곤란 증후군', 2건은 '복통'), 1건(4.8%)의 AE는 치료와 관련이 있을 것으로 간주되었다('위식도 역류 질환'). LCDG 그룹에 속하는 PT에서, 2건(12.5%)의 AE가 치료와 관련이 없을 것으로 간주되었고(2차 방문 후 PT 9일의 사망을 초래한 '과중성 혈관내 응고' 및 '폐혈성 쇼크') 2건(12.5%)의 AE는 치료와 관련이 있을 것으로 간주되었다('괴사성 대장염' 및 '폐혈증').

**[0327] 검토(Discussion)**

**[0328]** 특정 신생아 임상 시험에서는 장 산통의 치료에서 프로바이오틱스의 작용을 연구하여, 위약과 비교하여 울음 에피소드(crying episode) 및 산통 증상의 지속 기간을 줄이는 효능을 밝혔다[Lundelin].

**[0329]** 신생아 기간 동안 프로바이오틱스 치료의 장기 추적 연구는 프로바이오틱스 치료 그룹에서 위약 그룹에 배정된 대상체보다 알레르기 발병을 경험한 비율이 더 낮은 것으로 나타났다[Denkel].

**[0330]** 더욱이, 프로바이오틱스 투여는 괴사성 장염 발생 감소 및 조산 신생아의 사망률 감소와 상관관계가 있었다[Lundelin, Strunk, Shane, Costeloe].

**[0331]** 이러한 발견에 따르면, 프로바이오틱스는 탁월한 안전성 프로파일을 특징으로 한다. 프로바이오틱스에 함유된 박테리아 균주에 의해 유발된 균혈증의 사례가 기록되었지만 이는 극히 드물고 중증 면역결핍의 존재에 의해 결정된다[Lundelin, Salminen, Thomas].

**[0332]** 그러나, 신생아에 대한 프로바이오틱스 보충의 안전성 및 잠재적 효과에 대해서는 더 많은 증거가 필요하다.

**[0333]** 프로바이오틱스 혼합물에서 락토바실러스의 사용이 증가하고 있다는 점을 고려할 때, 분변 중 LCDG 세포의 정확한 식별 및 계수(count)는 인간 장내 미생물군에서 이러한 프로바이오틱스의 실제 안정성 및 지속성에 대한 조

사를 향상시킬 것이다[Arioli].

- [0334] 본 연구에서는 처음으로 LCDG의 안전성 및 미생물군의 조성에 긍정적으로 영향을 미치는 그의 능력을 NMW 유아 뿐만 아니라 LW 및 VLW 대상체를 포함한 특수 집단에서 테스트하였다.
- [0335] LCDG는 최초 투여 후 10일부터 장에서 검출되어 마지막 방문(84일, 연구 종료)까지 지속적으로 유지되었고, 첫 번째 추적 관찰 시점(연구 56일차; 제품의 마지막 투여 후 28일)부터 약간 감소했다. LCDG의 존재는 NW 및 VLW 아기의 경우 V3(28일차, 치료의 마지막 날)에 대조 그룹보다 치료 그룹에서 훨씬 더 높았다.
- [0336] 대변 샘플에서 프로바이오틱스 균주를 분석하는 경우, 알파 및 베타 다양성 분석을 고려할 때, 전체 미생물군 프로파일의 변화는 시간 의존적이고 치료에 영향을 받지 않는 것으로 보인다(치료가 장내 미생물군의 이질성을 보존할 수 있음을 입증함), 1차 분석에 따르면, 속 수준에서, 프로바이오틱스의 투여는 투여의 개시 후 10일차에 락토바실러스 속(*Lactobacillus spp*)의 통계적으로 유의한 증가를 초래한다. 이러한 증가는 이후 시점에도 검출되나, 통계적으로 유의하지 않게 된다.
- [0337] 대사체 분석과 관련하여, 예상대로 각 샘플의 대사 프로파일은 대상체 간에 상당한 변동성을 보여주었다. PLS-DA 분석은 부티르산과 프로판산(SCFA) 대사산물을 위약 그룹과 치료 그룹 사이의 클러스터링에 주요 기여 인자(contributor)로 확인하였고, 치료 그룹에서 수집된 샘플에서 그들의 농도 증가를 보여주었다.
- [0338] 이러한 모든 결과는 장내 미생물군의 이질성을 보존하면서, 위장관 통과에서 생존할 수 있는 LCDG의 능력을 강조하고 확인했다. 이러한 결과는 건강한 소아(3-12세)[Radicioni] 또는 성인 집단[Drago]에서 수행된 연구의 결론과 일치한다.
- [0339] 또한, 3가지 상이한 접근법(실시간 PCR, 메타유전체학 및 대사체학)으로 수득된 결과는 Spearman 상관관계를 통해 서로 상관되었다.
- [0340] 이러한 접근법에서 얻은 데이터의 통합은 프로바이오틱 LCDG의 투여가 미생물군의 생태 및 기능 모두에 영향을 미치고 장에 상주하는 박테리아의 생태적 지위 및 상응하는 기능 프로파일을 변형시킨다는 것을 보여준다. 특히, 부탄산 및 프로판산과 같은 특정 단쇄지방산(SCFA)이 피칼리박테리움(*Faecalibacterium*), 오실로스피라(*Oscillospira*), 에게르텔라(*Eggerthella*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 및 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속의 특정 유익한 박테리아와 긍정적인 상관관계를 보였다. 이러한 분자들은 영양분 흡수에 영향을 미치는 능력을 보였다[Heimann]. 또한, 테스트 28일차에 락토바실러스 파라카세이(CFU/mL)와 시클로헥사논, n-데칸산 및 3,4-디메틸 헵탄 간에 양의 상관관계( $p \leq 0.05$ )가 발견되었다.
- [0341] 대변의 점도, 양 및 색상도 임상 시험 동안 기록되었다. 양은 28일차에 수집된 샘플에서만 유의했고, 색상과 점도는 10일차 및 56일차(투여 종료 후 4주)에 유의하게 차이가 있었다.
- [0342] 한편, 'Rome IV' 진단 기준에 따른 산통 발생률에서는 차이가 관찰되지 않았으나, 치료 및 전체 연구 기간 모두가 파라미터의 개선을 보기에는 불충분할 수 있다는 점을 고려하여 이러한 결과를 분석해야 할 것으로 보인다. 예를 들어, Partty 등[Partty]은 최대 2개월(이 연구 기간의 두 배) 동안 프로바이오틱스 보충을 연장하고 최대 1년의 추적 기간을 통해, 조산 신생아에서 울음 및 동요와 관련된 증상을 완화할 수 있다는 것을 입증했다.
- [0343] 안전성에 관해서, 전술된 바와 같이, (치료 그룹보다 위약 그룹에서 더 높았던, RR을 제외하고) 활력 징후에는 차이가 발견되지 않았다.
- [0344] 연구 동안, 등록된 신생아의 성장을 모니터링하기 위해 각 연구 방문 시 체중, 신장 및 머리 둘레 파라미터도 평가하였다. 치료 그룹과 위약 그룹을 비교하여, 연구 동안 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다. 이전 논문은 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 조합을 포함하는 상업적으로 제조된 공생 용액(symbiotic solution)이 조산 신생아의 체중 및 머리 둘레를 개선할 수 있다는 것을 보여주었으나[Guney], 다른 연구는 본 발명자들의 결과와 일치하는 데이터(즉, 치료 그룹과 위약 그룹 간에 차이가 없음)[Vlieger], 특히 체중 파라미터의 경우[Indrio, Underwood]를 보여주었다. 신생아의 체중 증가는 많은 공존하는 병리 및 부모의 완전한 보충(total parental supplementation) 및/또는 모유 강화의 이용가능성에 의해 영향을 받으며[Moni], 이는 해당 연구에서 두 그룹 모두의 체중 추세에 영향을 미쳤을 수 있다.
- [0345] 최근 Matin 등[Matin]은 신생아의 총 혈청 빌리루빈(TSB) 수치와 체중 증가의 변화를 테스트하기 위해, 수유모 또는 초저 출생 체중(VLBW) 신생아에게 프로바이오틱스( $1.5 \times 10^9$  CFU/g *Lactocaseibacillus paracasei subsp. paracasei*)를 경구 투여하는 것을 포함한 연구의 결과를 발표했다. 선택된 프로바이오틱스의 투여는 신생아의

TSB 수준을 감소시켰지만, 중재(intervention)의 1주차 후에 체중 증가에는 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0346] 또한, 분석된 안전성 및 내약성 프로파일 및 두 연구 그룹 모두에서 기록된 중증 AE의 평가를 바탕으로, 본 연구에서 테스트 제품은 위약으로서 안전하고 내약성이 우수한 것으로 나타났다.

[0347] *한계 및 향후 계획*

[0348] 전반적으로, 본 연구의 결과는 NBW, LBW 및 VLBW 신생아와 같은 취약한 집단에 대해서도 제품의 높은 안전성 프로파일을 확인했다. LDCG는 위장관에서 생존하고 장내 미생물군과 SCFA 조성에 영향을 미치는 능력을 확인했지만, 영양소 흡수 및 결과적으로 신생아 성장에 있어 장내 미생물군의 핵심 역할을 고려하면, 향후 1년 이상의 추적을 고려하여 제품의 장기적 효과를 분석하는 것이 유용할 것이다.

[0349] 이 임상 시험에서 완전히 강조되지 않은 또 다른 흥미로운 측면은 다양한 영양 조건에서 제품이 마이크로바이옴 및 혈청 대사체(serum metabolome)에 미치는 잠재적 영향이다. 실제로, 초기 유아기(early childhood)의 영양은 장내 미생물군의 발달을 결정한다. 모유 수유와 달리, 인공 우유 양육(artificial milk feeding)은 장내 미생물군과 혈청 대사체에 더 불리한 상태가 되도록 영향을 미치는 것으로 나타났다. 최근에, 또 다른 락토바실러스 파라카세이 균주는 인공 우유 양육의 영향을 상쇄하지는 않지만, 미생물 및 혈청 대사체에 영향을 미쳐 인공 우유 양육의 일부 불리한 대사적 영향을 완화할 수 있는 것으로 나타났다[Lee].

[0350] **도면**

[0351] **도 5. 연구 설계의 흐름도.** 60명의 참가자가 임상 시험에 등록되었고, 1:1 비율로 투여 그룹 중 하나에 무작위로 배정되었다. 위약 그룹과 치료 그룹에서 각각 20명 및 26명이 연구를 완료했다. 위약 그룹과 치료 그룹에서 각각 20명 및 26명 대상체가 연구를 완료했다.

[0352] **도 6. 락토바실러스 카세이 DG(LCDG)는 최초 투여 후 10일부터 장에서 검출되었고, 마지막 방문(84일)까지 지속적으로 유지되었다.**

[0353] **A)** 박스 플롯은 위약과 치료 간에 구별되는, 각 추적 시점에 대한 LCDG 농도를 보여주고; **B)** 데이터는 대상체의 출생 체중에 따라 계층화되었다: VLW(초저 체중), LW(저 체중), NW(정상 체중). 락토바실러스 카세이 DG 농도(CFU/mL)의 중앙값, 25번째 백분위수, 75번째 백분위수, 최소값 및 최대값이 각 그룹에 대해 표시되었다. 상단 막대는 통계적으로 유의한 비교를 나타낸다( $p$ -값 $<0.05$ ).

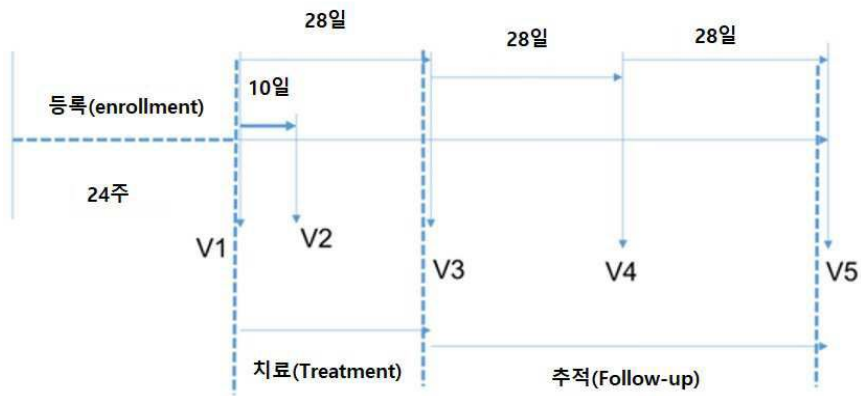
[0354] **도 8. LCDG 치료는 장내 미생물군의 이질성을 보존할 수 있었다. (A)** 10일, 28일, 56일 및 84일(각각 V2, V3, V4 및 V5)에 위약 그룹과 치료 그룹 간의  $\alpha$  다양성 분석. **B)**  $\beta$ -다양성 분석. 위약 그룹과 치료 그룹 사이의 다양한 시점에서 PCoA로 표시되는 Unweighted UniFrac 알고리즘을 이용하여 다양성 매트릭스를 획득했다. **C)** 다양한 시점의 비교에 적용된 Kruskal Wallis 테스트 및 문(phylum) 수준의 OTU 분포의 히스토그램. **D)** 모든 시점에서 락토바실러스 종의 상대적 존재도를 보여주는 히스토그램.

[0355] **도 9. LCDG의 투여는 단쇄 지방산(SCFA)의 농도를 증가시켰다.** 각 시점에서 위약과 치료를 비교하는 PLS-DA(Partial Least Square Discriminant Analysis; 좌측: 점수 그래프; 우측: VIP 점수)로 대사산물 분석이 표시된다: **A)** V1; **B)** V2; **C)** V3; **D)** V4; **E)** V5.

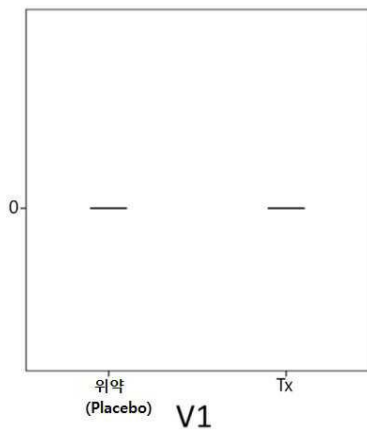
[0356] **도 10. LCDG의 투여는 미생물군의 생태 및 기능 모두에 영향을 미쳐서, 장에 상존하는 박테리아의 생태적 지위 및 상응하는 기능적 프로파일을 변형시켰다.** 28일차(V3, 치료 종료)에 락토바실러스 파라카세이, 대사산물 및 OTU 간의 상관관계 분석. **A)** 대사산물과 락토바실러스 파라카제이(CFU/mL) 사이의 상관관계의 히트맵; **B)** OTU와 락토바실러스 파라카제이(CFU/mL) 간의 상관관계의 히트맵; **C)** OTU와 대사산물 간의 상관관계의 히트맵.

도면

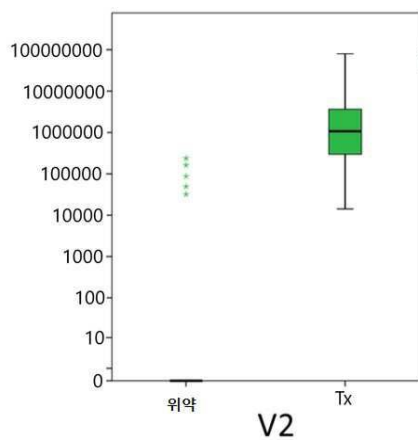
도면1



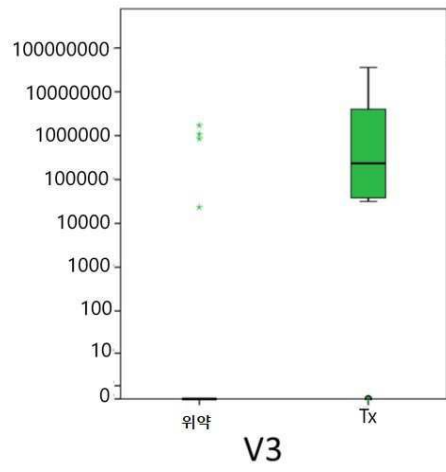
도면2a



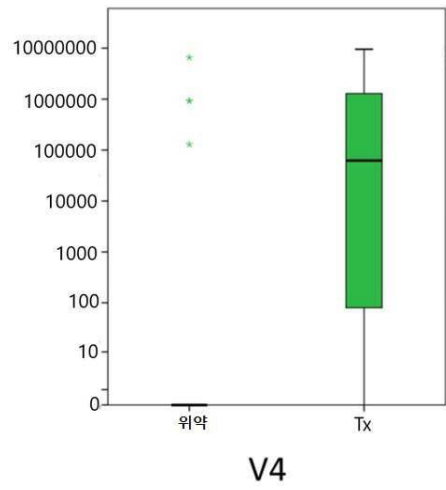
도면2b



도면2c



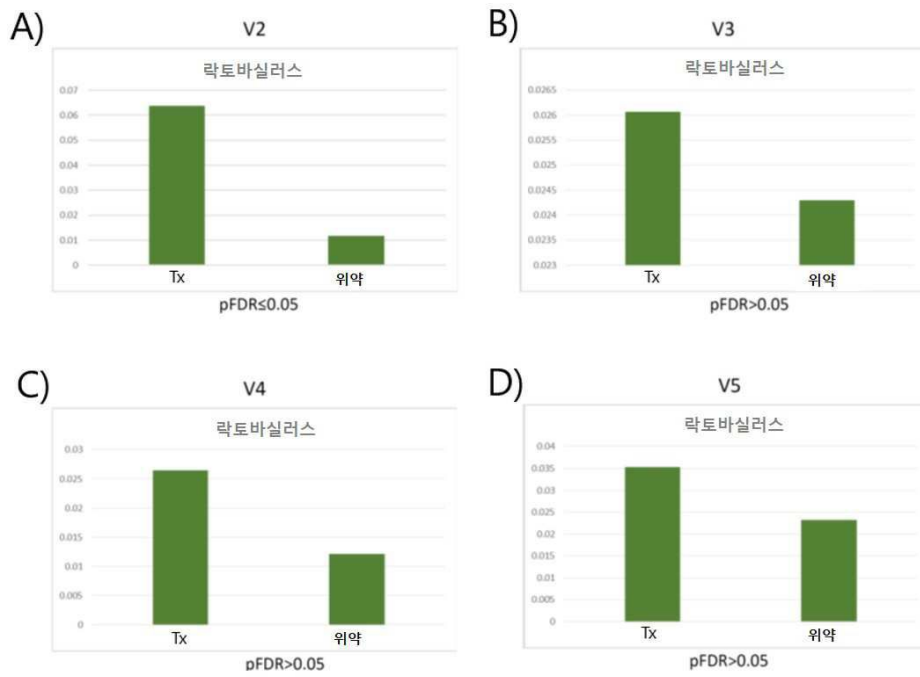
도면2d



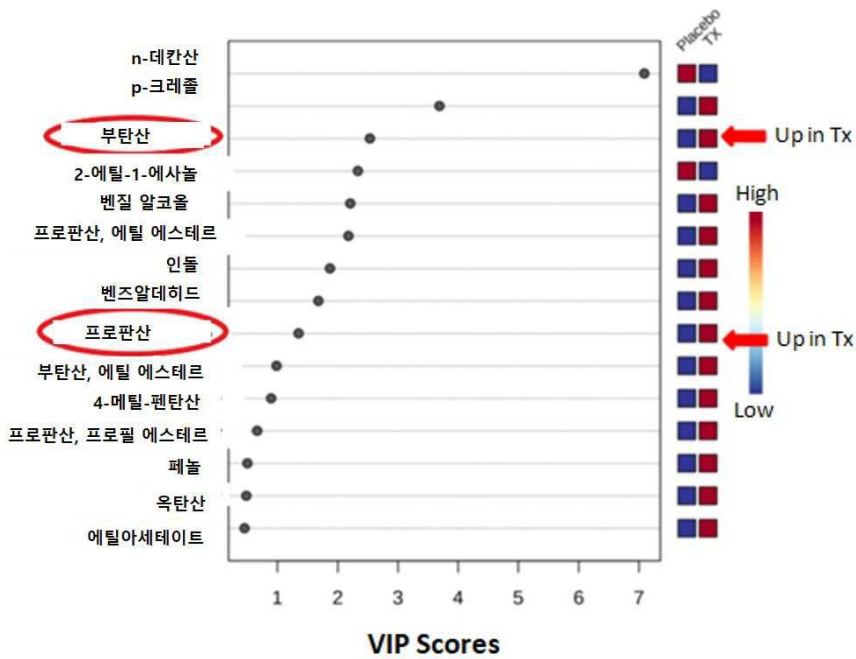
도면2e



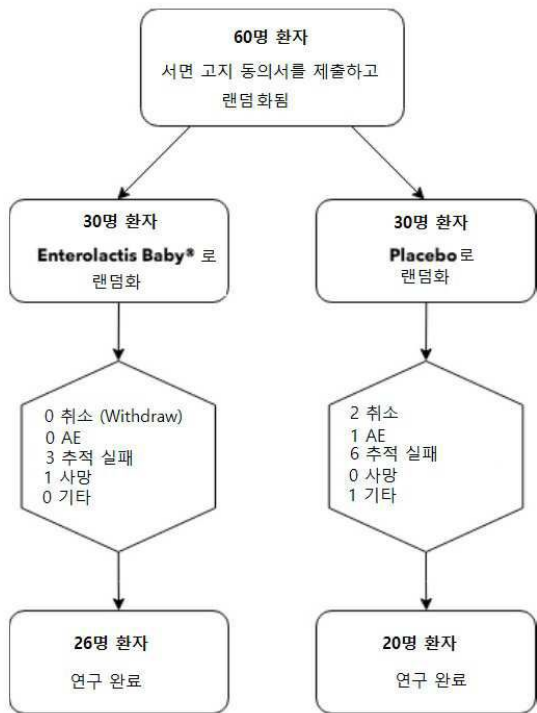
도면3



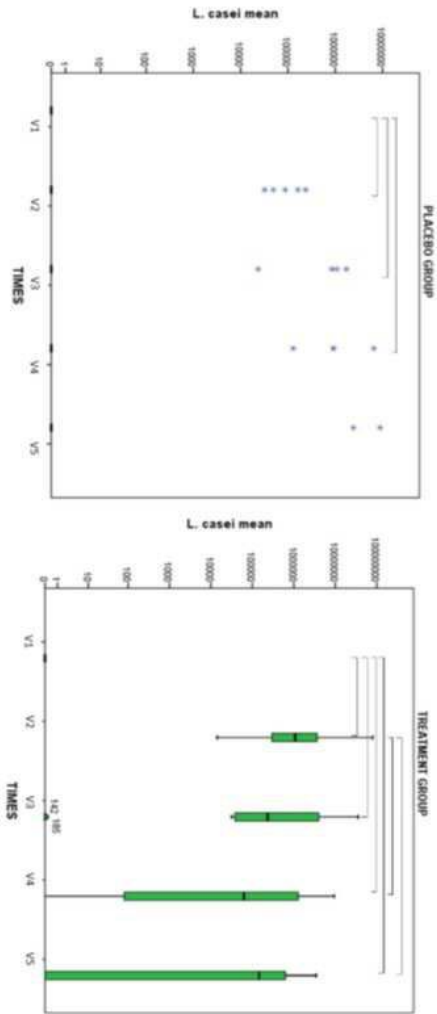
도면4



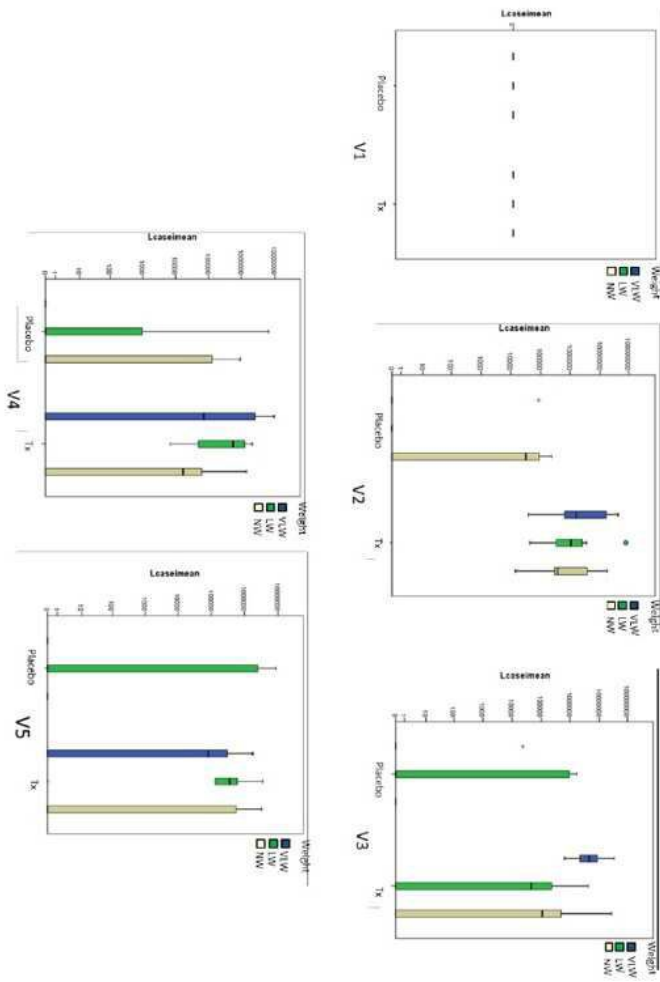
도면5



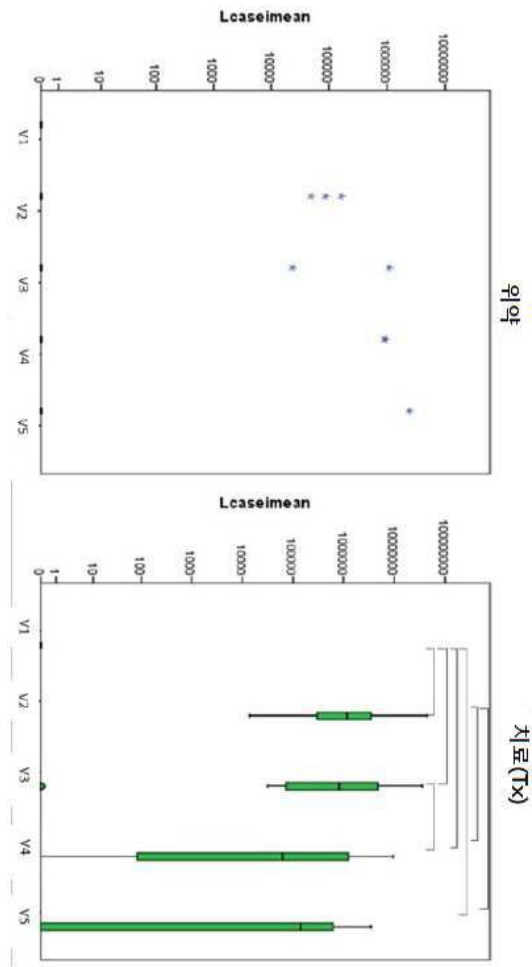
도면6a



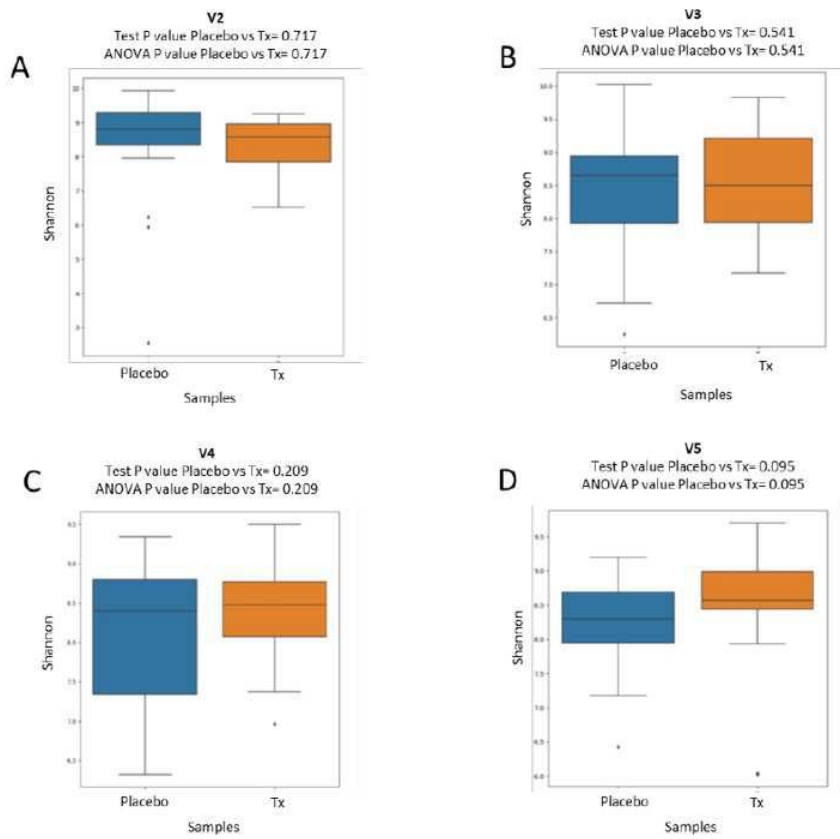
도면6b



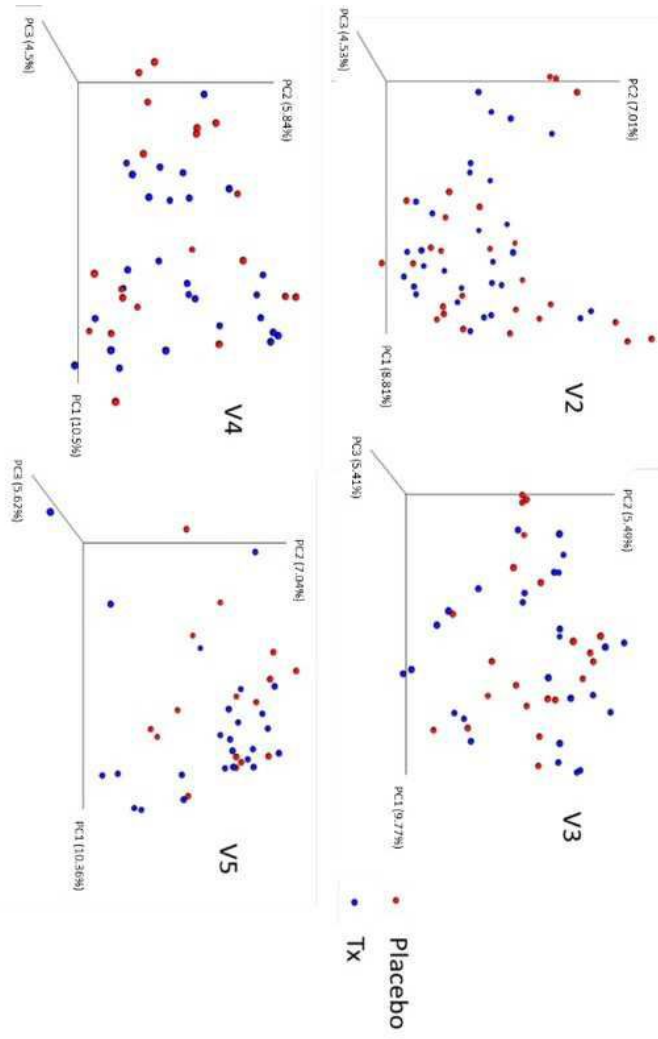
도면7



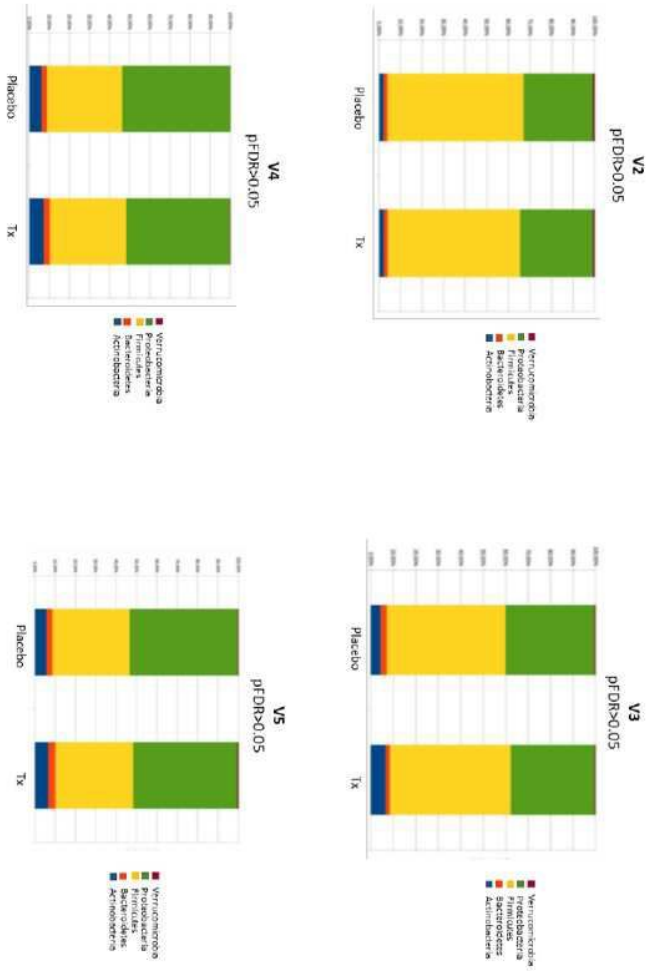
도면8a



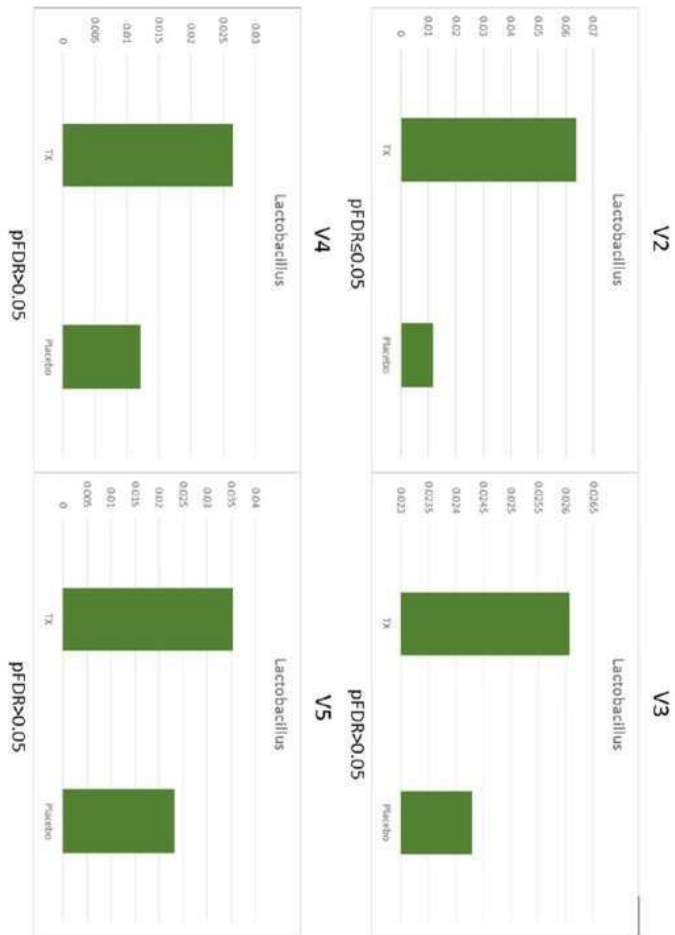
도면8b



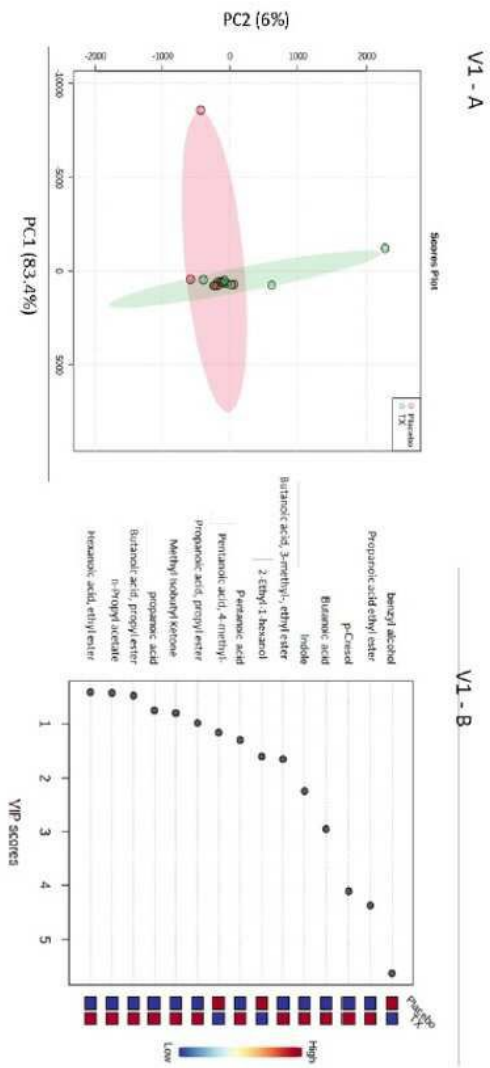
도면8c



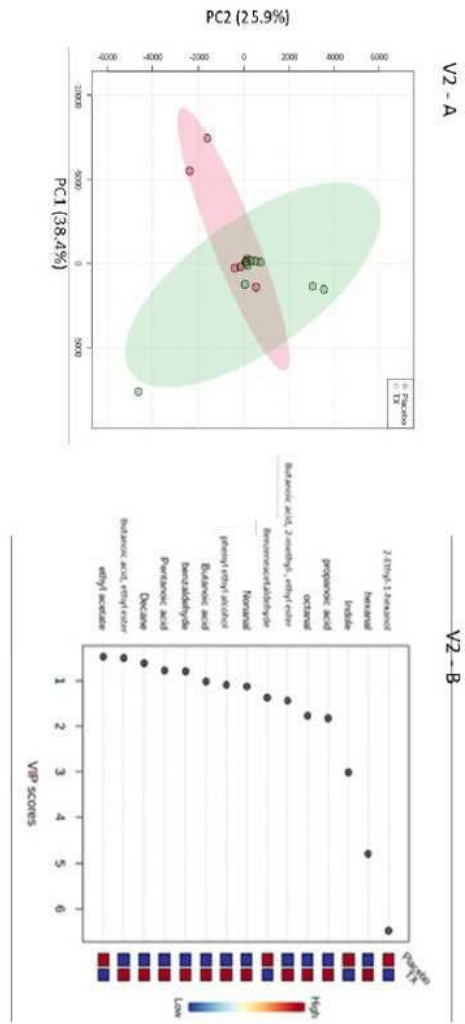
도면8d



도면9a

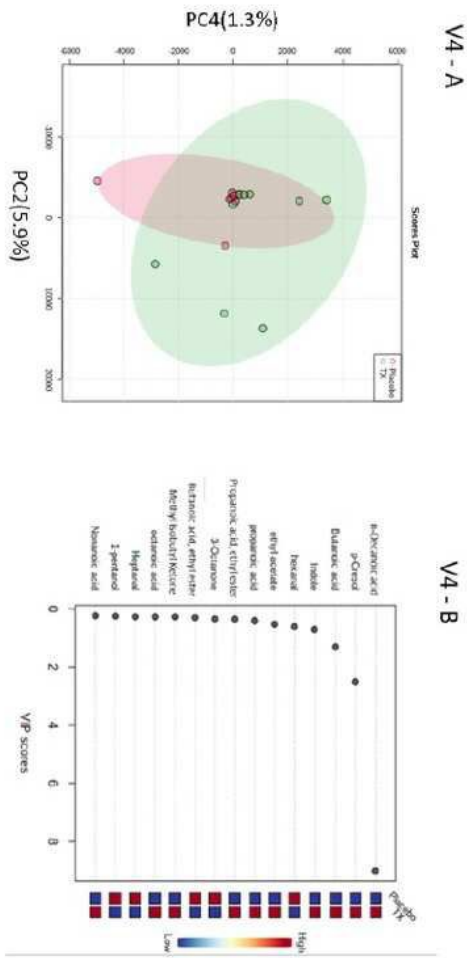


도면9b

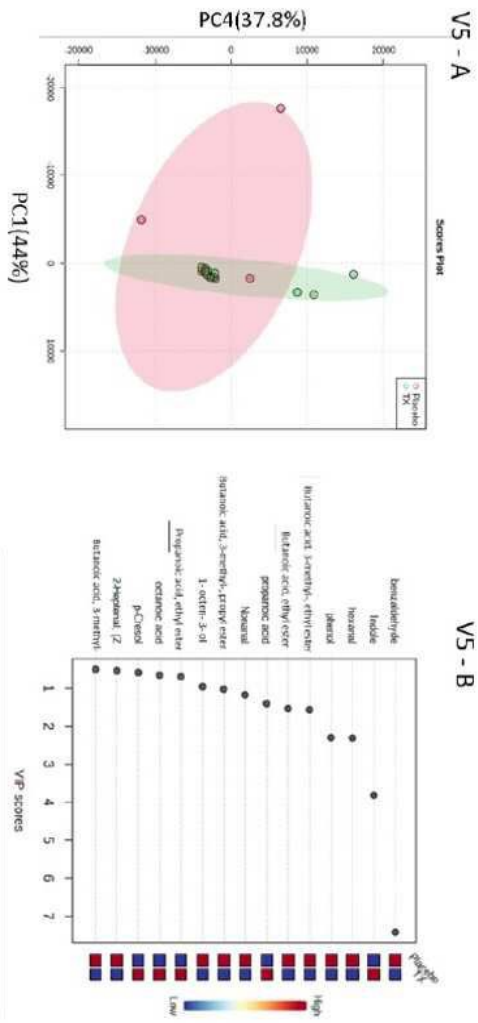




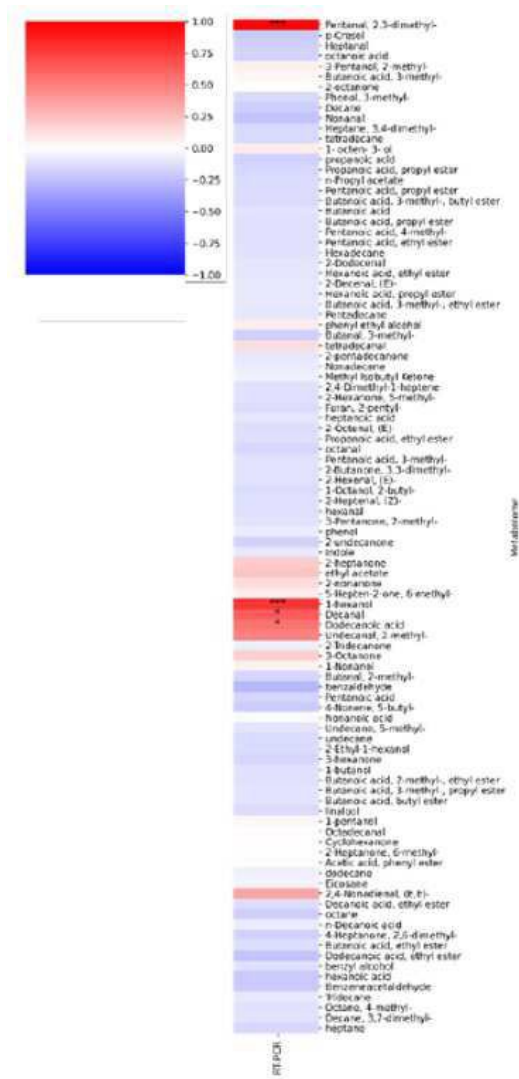
도면9d



도면9e



도면10a



도면 10b



