



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0058849  
(43) 공개일자 2020년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/747 (2014.01) A61K 9/19 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 35/747 (2013.01)  
A61K 9/19 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0143467  
(22) 출원일자 2018년11월20일  
심사청구일자 2018년11월20일

(71) 출원인  
주식회사 프로바이오닉  
전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18, 204호, 205호(장동, 전라북도생물산업진흥원바이오식품산업화센터)  
(72) 발명자  
박용하  
서울특별시 종로구 송월길 99, 213동 1401 (홍과동, 경희궁자이)  
라더이르판아흐마드  
경상북도 경산시 삼풍로4길 8-5, B동 201호 (삼풍동)  
김병천  
대구광역시 동구 과계로 71, 310동 1106호 (지묘동, 팔공보성3차아파트)  
(74) 대리인  
김영록

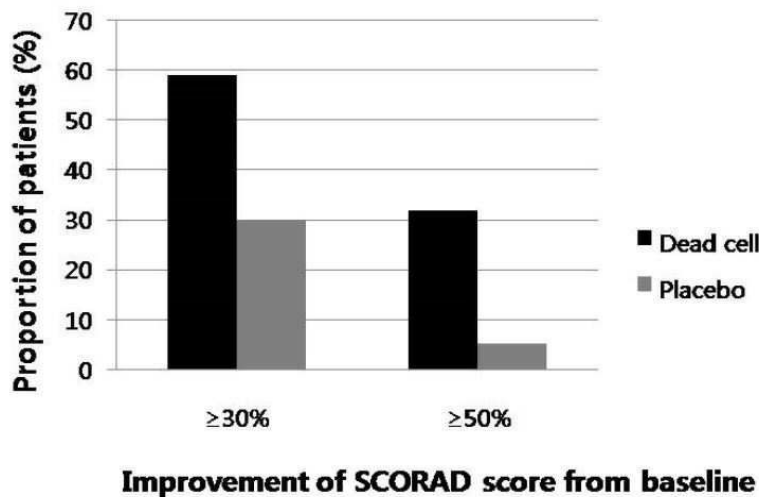
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명은 아토피성 피부염 증상을 가진 어린이 및 청소년의 아토피성 피부염 증상의 억제 및 치료에 사용할 수 있는 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물을 제공하는 발명의 효과를 가진다.

**대표도** - 도3



(52) CPC특허분류

*A61P 17/00* (2018.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 사균은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 포함하는 배양액의 동결건조물인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 사균은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 포함하는 배양액의 동결건조물을 분쇄한 후 제조된 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 분말인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물.

**청구항 4**

락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 추출물은 락토바실러스 사케이 probio-65를 포함하는 배양액의 추출물로 농축 과정 후 사용되는 액상, 또는 상기 락토바실러스 사케이 probio-65를 포함하는 배양액의 추출물로 농축 과정에서 생성된 농축액의 건조물을 분쇄한 후 제조된 분말인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아토피성 피부염을 가지고 있는 유아 및 청소년에서 아토피성 피부염의 증상을 나타내는 척도인 SCORAD total score, SCORAD objective(병변의 정도) score 총점, SCORAD objective(병변의 정도)의 찰상 score, SCORAD objective(병변의 정도)의 건조 score를 통계학적으로 유의성 있게 감소할 수 있게 하고, 피부의 유분을 통계적으로 유의성 있게 증가시킬 수 있게 하여 아토피성 피부염 증상 저감 및 치료에 이용 가능한 면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 프로바이오틱 유산균(Probiotics lactic acid bacteria)은 건강증진, 질환이나 질병의 예방 및 치료효과를 가진 유산균을 지칭한다. 이미 핀란드 등 유럽 각국에서는 오래전부터 건강증진 목적의 보조제로 프로바이오틱 유산균이 널리 사용되었고, 항암작용 및 면역증강 효과, 항알레르기 등의 우수한 효과가 있음이 실제 동물 및 인체를 대상으로 한 임상시험연구를 통해 밝혀지고 있다.

[0003] 아토피성 피부염(Atopic symptom)은 성인에게는 1 내지 3%의 유병률로 발생하고, 소아에서는 10% 전후의 유병률로 발생하는 질환으로, 주로 영유아기와 소아기에 발생하여 심한 가려움을 동반한 만성 염증성 피부질환이다. 아토피성 피부염이 발생한 일부 환자는 천식과 비염으로 병증이 확대되기도 하고, 피부염에 의한 지속적인 가려움 등으로 발병한 어린 환자뿐 아니라 보호자를 포함한 가족 모두에게 육체적, 정신적 고통은 유발하여 가족 구

성원의 삶의 질을 저하한다. 현재 아토피성 피부염의 중증도를 평가하는 적절한 혈액검사는 없으며, 아토피성 피부염 중증도를 평가하기 위해 현재 가장 널리 사용되는 것은 SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) index이다. SCORAD index는 20명 이상의 피부과 의사들로 구성된 European Task Force on AD에 의해 만들어졌으며 타당성, 신뢰도, 민감도가 여러 연구에서 다루어졌고 확인되었다.

[0004] 아토피성 피부염 환자에게 가장 두드러진 증상인 가려움증은 알레르기성 염증반응에서 시작된다고 알려져 있다. 피부 밖에 있는 알레르겐과 같은 자극원이 가려움증의 시작 원인 물질이다. 이 자극원이 아토피성 피부염 환자의 손상된 피부 장벽을 투과하여 피부에 도달하면 피부에서 알레르기성 염증 반응이 시작된다. 피부에서 염증 반응이 시작되면 히스타민을 비롯한 여러 매개체가 염증 부위 피부의 가려움증을 일으킨다. 가려움증이 시작된 환자는 염증이 발생한 피부 부위에 긁는 행동을 하게 되고, 긁음으로 인한 피부 자극으로 염증이 발생한 피부 조직 손상의 결과를 야기하고 긁기 전제 비하여 더 심각한 피부염증을 일으킨다.

[0005] 피부에 발생하는 가려움증의 작용기전 측면에서 아토피성 피부염은 두드러기에 의한 가려움증과는 그 작용 기전이 다르다. 두드러기에 의한 가려움증의 경우 주로 히스타민 분비의 결과이지만 아토피성 피부염에서는 다양한 매개체가 관여하여 항히스타민제의 임상적 치료 효과가 제한적이다. 아토피성 피부염의 가려움증은 병증의 결과에 의한 증상이 아니라 병태생리에 중요한 한 축을 담당하는 중요한 요인으로, 한번 발생하면 가려움증과 이에 수반하는 긁기가 반복적으로 끊임없이 증폭된다.

[0006] 현재 아토피성 피부염을 확실하게 치료할 수 있는 적절한 치료 방법이 없으며 아토피성 피부염 증상이 있는 사람들은 자가 관리 방안으로 보습제 사용, 알레르겐 및 악화 인자 회피요법, 외용제 약물 사용법, 목욕요법, 식이 주의법으로 질환을 관리하고 있다. 한편, 중증 및 경증의 아토피성 피부염 환자에게 약물치료 방법으로는 사용되는 주된 약제에는 항히스타민제, 국소 스테로이드 외용제, 국소 면역조절 외용제, 경구 스테로이드제가 있다. 중증의 환자는 스테로이드 주사제를 사용하기도 한다.

[0007] 아토피성 피부염에 대처하려는 방안으로 프로바이오틱 유산균의 효과가 최근에 보고되고 있다. 일부 유산균은 아토피성 피부염에 상당한 치료 효과를 보이고 아토피 발병에 대한 예방효과, 더불어 음식 알레르기 발생을 근본적으로 차단해주는 효과를 가지고 있다. 아토피성 피부염에 효과가 있는 것으로 밝혀진 프로바이오틱스는 락토바실러스 람노수스, 비피도박테리움 락티스, 락토바실러스 루테리 등이 있다. 프로바이오틱 유산균은 100년 이상 사용되어 온 성분으로써 면역증강효과, 항암효과 등 우수한 건강증진 효과가 꾸준한 연구와 임상시험을 통해 입증되었으며 임신부나 유아에게도 전혀 해가 없다. 프로바이오틱 유산균이 일반 유산균 음료와 다른 점은 아토피 및 알레르기, 음식 알레르기의 치료 및 예방 효과가 있는 특정 균종만을 선택하여 만들어진 물질로 고유 효과를 가지고 있다. 또한, 일반 유산균 음료 속에 들어있는 균 수와는 비교가 되지 않을 정도로 많은 양으로 만들어진다. 진정한 효과를 보기 위해서는 아토피에 효과가 입증된 균종을 선택하여 충분한 균수를 사용하여야 한다.

[0008] 락토바실러스 사케이 아종 사케이(Lactobacillus sakei subsp. sakei)는 유럽의 축산국가에서는 소시지 발효나 고기류의 발효에 많이 사용되는 유산균이며, 한국인들이 수백 년간 섭취하여 안전성이 전통적으로 확보된 발효식품인 김치의 발효과정에서 중요한 역할을 하여 숙성 중인 김치에 다량이 분포하고 있다. 락토바실러스 사케이 probio-65(Lactobacillus sakei probio-65)는 김치에서 분리된 균주로, 내산성, 내담즙성, 항생제 저항성을 나타내고, 동물체의 체내 및 장내에서 해로운 병원성 미생물의 생육을 억제하고, 면역증진 활성을 나타내며, 특히 아토피성 피부염 병변의 질병악화인자로 알려진 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)의 생육억제 작용이 강력하여 아토피성 피부염의 치료 또는 예방에 효과적이고, 알레르기 관련 질환의 치료 또는 예방에도 효과적이며, 장내 유해 미생물의 이상 증식을 억제하여 장내 미생물 균총을 안정화하는 효능을 가진다. 본 발명자는 대한민국 등록특허 제10-0479719호에서 유해 병원성 미생물 생육 억제능 및 항알레르기성을 갖는 신규 내산성 락토바실러스 사케이 probio-65를 제안한 바 있다.

[0009] 락토바실러스 사케이 probio-65 균주의 면역 조절 특성 조사 연구에 의하면 Foxp3+ 전사조절인자 발현 증가능 평가 실험에서 대조군으로 사용한 PBS와 부용제의 Foxp3+ 전사조절인자 발현은 높지 않았으나, 락토바실러스 사케이 probio-65의 생균과 사균에서는 Foxp3+ 전사조절인자 발현이 높게 나타난 결과를 보여 주었고, 사균에 있어서 생균보다 더 높은 값을 보여주었다. 또한, 락토바실러스 사케이 probio-65에 의한 항염증성 사이토카인 Interleukin 10(IL-10) 발현능 평가실험에서는 락토바실러스 사케이 probio-65와 장간막 림프구를 공동배양 후 얻어진 상층액으로 IL-10의 발현량을 측정된 결과 PBS에 비해 락토바실러스 사케이 probio-65 생균 또는 사균을 공동배양하였을 때 IL-10의 발현량이 증가하는 것으로 나타났고, 생균보다 사균의 경우 더 높은 발현량을 보여주었다. 락토바실러스 사케이 probio-65에 의한 Th1, Th17 관련 염증성 사이토카인의 발현능 평가실험에서는 락

토바실러스 사케이 probio-65의 생균보다 사균을 공동배양하였을 시 IFN- $\gamma$  및 IL-17의 발현이 더 높게 나타나는 것이 확인되었다. 따라서 면역 조절 물질의 분석을 통하여 락토바실러스 사케이 probio-65는 면역증강보다는 면역조절이나 면역억제(과다면역억제)에 대한 사용 가능성이 높다고 생각하며 이러한 효과는 생균에서 보다 사균에서 더 높은 것이 발견되었다 (임정희 등 2011, Korean J. Microbiol.Biotechnol. 39:313~316).

- [0010] NC/Nga 쥐를 이용한 in vivo 동물실험에서 피부질환을 일으킨 쥐에게 락토바실러스 사케이 probio-65 균체의 생균 혹은 사균을 급여 하였을 때 실험동물의 피부상태가 좋아진 결과를 보여 주었으며, 쥐가 가려운 곳을 긁는 횟수가 감소하였다. 또한, 혈청의 분석결과 IgE와 cutaneous T-cell-attracting chemokine (CTACK)이 유의성 있게 감소하는 것이 발견되었고, 사균체의 경우 혈청에서의 IL-4 그리고 IL-6 싸이토카인 감소 현상을 보여주었다. 이러한 동물실험 결과는 락토바실러스 사케이 probio-65 균체의 생균 혹은 사균을 실험동물에게 급여하였을 때, 피부염증 (skin inflammation)과 아토피성 피부염과 같은 피부질환 발생을 억제하는 것을 의미한다 (Kim et al. 2013. J. Appl. Microbiol. 115:517~526).
- [0011] 본 발명자는 락토바실러스 사케이 probio-65의 기타 효능과 관련하여 연구를 진행하던 중 락토바실러스 사케이 probio-65의 사균이 아토피성 피부염의 증상 완화 또는 치료용 조성물로 사용 가능하다는 것을 발견하였다.
- [0012] 기능성 유산균의 섭취는 유산균을 살아있는 상태로 즉 생존력이 유지되고 있는 생균제로 이용하여야만 그 기능을 발휘할 수 있다고 기존에 알려져 있으나, 최근에는 유산균의 생존력이 사라진 형태인 사균(dead cell or ghost probiotics)로도 각각의 유산균 고유의 기능성이 발현된다는 보고가 있다.
- [0013] 면역조절 능력을 갖춘 유산균인 Lactobacillus plantarum L-137 균주의 경우 유산균을 사균으로 바꾸면 세포벽의 구조 안정성이 증가하여 열처리한 사균이 생균체와 비교하였을 경우 더 많은 interleukin-2의 생산을 유도하고, 인공 장액에서도 열처리 사멸된 유산균의 활성이 유지된다. 저온보관에서도 보관시간이 길어지면 Lactobacillus plantarum L-137의 세포벽이 불안정해지거나 인체의 소화액과 접촉 때문에 세포벽이 약화함으로 사균이 더 유용하다고 보고되었다 (Fujiki 등 2012, Biosci.Biotechnol.Biochem.76:918~922).
- [0014] 면역조절자인 IL-10의 생산을 촉진하는 기능을 가진 Lactobacillus paracasei NCC 2461을 이용한 연구에서도 사균이 효과가 있음이 보고되고 있다. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)에서 면역 조절 물질의 변화 연구에서 NCC 2461 세포는 생균을 처리한 경우보다 사균을 처리하였을 경우 IL-10의 생산이 더 높았다. 열처리된 NCC 2461는 microRNA의 발현이 차별화되어 IL10 mRNA의 안정성에 영향을 주고, 이 프로바이오틱은 RNA 단편을 가지고 있으며, 열처리로 파쇄된 막을 통해 배출된 RNA 단편이 숙주의 유전자 발현에 영향을 줄 수 있다 (Demont 등 2015, J Allergy Clin Immunol. 137:1264~1267).
- [0015] 유산균 사균의 일부 생리활성기능에 관한 위에 언급한 두 연구 결과에서 유산균 사균은 생균보다 더 뛰어난 효과를 가지고 있음을 보여준다. 기능성향상에 더하여 생균인 경우 저온 보관에서도 세포 구성성분의 분해가 일어나지만, 열처리 사균은 안정성이 증가하고, 사균의 이용은 생균체 생산 및 판매과정의 균수를 유지하는 데 필요한 저온저장 등의 유통과정의 단계가 감소시킬 수 있고, 열처리 공정이 필요한 다양한 형태의 가공제품생산에 생균은 적용하기 곤란한데 비하여 사균은 다양한 제품을 생산에 사용될 수 있다.
- [0016] 유산균을 생균을 이용한 아토피성 피부염 억제 는 부작용이 없고, 생체적으로 안전함으로 다양한 연구가 진행 중이다. 특히 김치로부터 분리한 유산균 생균의 아토피 억제능은 기존에 보고 된 바 있으나 사균에 의한 아토피 억제 는 효과 증명이 필요하다. 또한, 상업적으로 이용 가능한 아토피 억제용 유산균 사균 관련 기술은 아직까지 보고되고 있지 아니한 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0017] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 부작용이 없고, 아토피성 피부염 억제 및 치료 효능을 가지는 면역 활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0018] 본 발명의 상기 및 기타 목적은 하기 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성될 수 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0019] 본 발명의 면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는

치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0020] 여기서, 상기 사균은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 포함하는 배양액의 동결건조물인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 사균은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균을 포함하는 배양액의 동결건조물을 분쇄한 후 제조된 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 분말인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명의 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 포함하는 아토피성 피부염의 증상 저감 또는 치료용 조성물은 락토바실러스 사케이 probio-65 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 여기서, 상기 추출물은 락토바실러스 사케이 probio-65를 포함하는 배양액의 추출물로 농축 과정 후 사용되는 액상, 또는 상기 락토바실러스 사케이 probio-65를 포함하는 배양액의 추출물로 농축 과정에서 생성된 농축액의 건조물을 분쇄한 후 제조된 분말인 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

- [0024] 본 발명은 아토피성 피부염 증상을 가진 어린이 및 청소년의 아토피성 피부염 증상의 억제 및 치료에 사용할 수 있는 면역활성이 높은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 또는 그 추출물을 포함하는 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료용 조성물을 제공하는 발명의 효과를 가진다. 또한, 본 발명의 조성물은 열처리 사균으로 제공됨으로 보관 유통 및 재가공이 용이한 조성물을 제공할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0025] 도 1은 시험군(사균)과 대조군(Placebo)을 섭취한 임상대상자에 대한 임상시험 기간 및 병원 방문 시기를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 시험대상자의 임상시험 참여상태 및 분석군을 정리 도면이다.
- 도 3은 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 섭취에 의해 아토피성 피부염 증상이 30% 혹은 50% 개선된 시험자를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 섭취에 의해 시간의 경과에 따른 아토피성 피부염 증상의 개선 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 피부염 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 긁기 빈도를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 피부를 나타내는 사진이다.
- 도 8은 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 IgE의 변화를 나타내는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0026] 본 발명의 상술한 목적, 특징 및 장점들은 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명함으로써 더욱 명백해질 것이다. 후술하는 상세한 설명은 한정적인 의미로 기술되는 것은 아니고, 본 발명의 범위는 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다.
- [0027] 이하, 첨부된 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

**실시예**

- [0030] **실시예 1 락토바실러스 사케이 probio-65의 배양액 제조**
- [0031] 락토바실러스 사케이 probio-65 균주는 -80℃의 냉동고에서 보관하였고, 보관 중인 균주의 생리활성도를 계대배양으로 증가시킨 후 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 분말 제작용 종균으로 사용하였다. 냉동고에서 꺼낸 락토바실러스 사케이 probio-65는 MRS broth(Difco laboratories, USA) 배지에 접종하여 37℃의 온도에서 15시간 동안 2~3회 계대배양 한 후, 생육이 왕성한 상태의 종균 배양액을 선택하였다. 선택한 종균 배양액을 MRS broth 배지에 접종한 후 37℃에서 15시간 동안 배양하고, 배양된 균체를 주 배양용 스타터로 사용하였다. 락토

바실러스 사케이 probio-65의 배양용 주 배지는 글루코즈 1중량%, 효모 추출물 1중량%, 소이펍톤 0.25중량%, 폴리옥시에틸렌 소비탄 모노-올리에이트(Polyoxyethelene sorbitan mono-oleate) 0.1중량%, 황산암모늄 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.1중량%, 황산마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 0.01 중량%, 인산이수소칼륨(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.1중량% 및 물 90~99중량%를 포함하는 것으로 액체배양 배지를 121℃에서 15분간 멸균한 후, 이 배지를 이용하여 상기 락토바실러스 사케이 probio-65를 37℃에서 24시간 동안 액체 배양함으로써 락토바실러스 사케이 Probio65 배양액을 제조하였다.

[0033] **실시예 2 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 분말의 제조**

[0034] 락토바실러스 사케이 probio-65 배양액 200L를 연속원심분리기를 사용하여 원심분리하여 균체를 회수하고, 회수한 락토바실러스 사케이 probio-65 균체를 열처리하여 사멸시켰다. 사멸된 락토바실러스 사케이 probio-65 균체의 수분은 동결건조기(Ilshin Lab, Korea)에서 64시간 동안 동결건조하여 제거되게 하였다. 동결건조된 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 시료는 분쇄한 후 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 분말로 사용하였다.

[0036] **실시예 3 아토피성 피부염 증상을 가지는 어린이 및 청소년에서 락토바실러스 사케이 probio-65 사균의 유효성 및 안정성 평가 (인체적용시험)**

[0037] **실시예 3-1 임상대상 선정기준 및 제외기준**

[0038] 만 3세 이상 만 18세 이하의 경증 및 중등도의 아토피 피부염 증상이 있는 어린이 및 청소년으로 본 시험에 참여할 것을 동의하고 서면동의서에 시험대상자와 부모(또는 법정대리인)가 자의로 서명한 자료 아토피 피부염 증상의 판별에 있어서 6개월 이상 간헐적 또는 지속적인 아토피 피부염 증상이 있으며, SCORAD 점수가 20점~50점 (mild-moderate)에 해당하는 자를 선정하였다.

[0039] 아토피 피부염 이외에 중증의 피부질환, 전신질환이 있는 사람, 스크리닝 기준 4주 이내에 항생제, 코르티코스테로이드제, 항히스타민제, 면역억제제를 투여하고 있는 사람, 스크리닝 기준 4주 이내에 아토피 피부염개선을 위해 의약품, 한약, 건강기능식품을 투여하고 있는 사람, 스크리닝 기준 4주 이내에 광선치료를 받은 사람, 스크리닝 기준 2주 이내에 프로바이오틱스를 복용한 적이 있는 사람, 본 임상시험 중에 다른 시험에 참가할 계획이 있는 사람, 본 임상시험 시작 4주 이내에 다른 임상시험에 참여했던 사람, 시험자가 본 임상시험에 부적합하다고 판단하는 사람은 선정에서 배제되었다.

[0040] **실시예 3-2 임상대상자의 방문별 관찰검사 및 결과분석**

[0041] **실시예 3-2-1 임상대상자수**

[0042] 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 혹은 대조구를 섭취하는 시험군은 각각 25명을 모집하는 것이 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판정되었다. 임상시험에서는 탈락자 15%를 고려하여 각각 30명을 모집하였다.

[0043] 도 1은 시험군(사균)과 대조군(Placebo)을 섭취한 임상대상자에 대한 임상시험 기간 및 병원 방문 시기를 나타낸 도면이다. 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 임상대상자는 방문 1회차에 Screening 단계를 진행하였고, 방문 2회차에 무작위배정(randomization) 단계를 진행하여 시험군(사균)과 대조군(Placebo)으로 구분하였으며, 중간과정의 검사를 위해 시험 시작 후 방문 3(6주 차)와 방문 4(12주 차)에 임상시험 진행 병원에 방문하였다.

[0044] **실시예 3-2-2 임상시험 대상자의 방문별 관찰검사 방법**

[0045] **실시예 3-2-2-1 임상시험 대상자의 1차 방문**

[0046] 본 임상시험에 참여를 원하는 시험대상자는 임상시험에 대한 설명을 듣고 다음 순서에 따라 평가하였다.

[0047] ①시험 참여 전에 시험 과정을 설명하고, 시험대상자와 시험대상자의 부모(또는 법정 대리인)에게 서면 동의서를 받았다.

[0048] ②시험대상자는 순서대로 연구 스크리닝 번호를 지정받았다.

[0049] ③시험대상자의 인구학적 정보, 병력(외과적 수술력을 포함한 과거력 및 현 병력) 및 약물 투여력을 조사하였다.

[0050] ④이학적검사를 실시하였다.

- [0051] ⑤활력징후(맥박, 체온) 및 신체계측(신장, 체중)을 측정하였다.
- [0052] ⑥SCORAD index 평가를 실시하였다.
- [0053] ⑦임상병리검사를 실시하였다.
- [0054] ⑧1차 시험대상자 적합성 평가 후 시험대상자의 다음 방문 일을 지정하였다.
- [0055] **실시예 3-2-2-2 임상시험 대상자의 2차 방문**
- [0056] 이 방문은 최초 방문일 이후 14일 이내에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.
- [0057] ①병력 및 약물투여력 변화를 조사하여 기록하였다.
- [0058] ②이학적검사를 실시하였다.
- [0059] ③활력징후(맥박, 체온)를 측정하였다.
- [0060] ④1, 2차 방문 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준의 적합성을 최종 평가하였다.
- [0061] ⑤무작위 배정하여 배정번호를 부여하였다.
- [0062] ⑥IGA 평가를 실시하였다.
- [0063] ⑦피부상태 측정(수분, 유분, pH)을 실시하였다.
- [0064] ⑧Eosinophil, IgE, ECP, CCL17, CCL27 검사를 실시하였다.
- [0065] ⑨식사지도 및 식이조사를 실시하였다.
- [0066] ⑩시험식품/대조식품을 처방하였고, 섭취 방법에 대하여 교육하였다.
- [0067] ⑪1차 표준 보습제를 배부하였다.
- [0068] ⑫다음 방문일을 지정하였다.
- [0069] **실시예 3-2-2-3 임상시험 대상자의 3차 방문**
- [0070] 이 방문은 2차 방문일 이후 42일(±7일) 이후에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.
- [0071] ①이상반응 유무를 확인하였다.
- [0072] ②병용약물 및 병용요법의 변화 여부를 확인하였다.
- [0073] ③이학적검사를 실시하였다.
- [0074] ④활력징후(맥박, 체온) 측정 및 신체계측(체중)을 실시하였다.
- [0075] ⑤SCORAD index 평가를 실시하였다.
- [0076] ⑥IGA 평가를 실시하였다.
- [0077] ⑦피부상태 측정(수분, 유분, pH)을 실시하였다.
- [0078] ⑧식사지도 및 식이조사를 실시하였다.
- [0079] ⑨섭취 순응도를 확인하였다.
- [0080] ⑩시험식품/대조식품을 처방하였고, 섭취방법을 다시 한번 설명하였다.
- [0081] ⑪1차 표준 보습제 반납을 확인하고, 2차 표준 보습제를 배부하였다.
- [0082] ⑫다음 방문일을 지정하였다.
- [0083] **실시예 3-2-2-4 임상시험 대상자의 4차 방문**
- [0084] 4차 방문은 시험종료일로써 2차 방문일 이후 84일(±5일) 이후에 이루어졌고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같았다.

- [0085] ①이상반응 유무를 확인하였다.
- [0086] ②병용약물 및 병용요법의 변화를 확인하였다.
- [0087] ③이학적검사를 실시하였다.
- [0088] ④활력징후(맥박, 체온) 측정 및 신체계측(체중)을 실시하였다.
- [0089] ⑤임상병리검사를 실시하였다.
- [0090] ⑥SCORAD index 평가를 실시하였다.
- [0091] ⑦IGA 평가를 실시하였다.
- [0092] ⑧피부상태 측정(수분, 유분, pH)을 실시하였다.
- [0093] ⑨Eosinophil, IgE, ECP, CCL17, CCL27 검사를 실시하였다.
- [0094] ⑩식이조사를 실시하였다.
- [0095] ⑪2차 표준 보습제 반납을 확인하였다.
- [0096] ⑫섭취 순응도를 확인하였다.
- [0097] **실시예 3-2-3 임상시험 결과 분석 대상자수**
- [0098] **실시예 3-2-3-1 임상시험 안정성 결과 분석 대상자수**
- [0099] 안전성 결과 분석인 Safety Set은 임상시험에 무작위 배정된 후 임상시험용 식품을 한 번 이상 섭취한 시험대상자 중 안전성 관련 정보가 수집된 시험군 30명, 대조군 30명으로 전체 60명에게서 도출한 평가 지표가 안정성 결과 분석에 포함되었다.
- [0100] **실시예 3-2-3-2 임상시험 유효성 평가 분석 대상자수**
- [0101] 본 임상시험의 유효성 평가는 PP Set을 주 분석으로 하고, FA Set도 추가적으로 분석하였다.
- [0102] FA Set은 임상시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어졌다. 따라서 무작위 배정된 시험대상자 60명(시험군 30명, 대조군 30명) 중 동의철회 또는 추적실패로 중도탈락하여 유효성 평가를 실시하지 않는 9명(시험군 4명, 대조군 5명)이 제외되어 총 51명(시험군 26명, 대조군 25명)이 FA Set에 포함되었다.
- [0103] 유효성 평가 주 분석대상인 PP Set은 FA Set에 포함된 시험대상자 중에서 임상시험을 종료하고, 임상시험 결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 시험대상자로서 시험군에서는 중도탈락 1명, 순응도 70% 미만 1명, 방문3 SCORAD 검사 미실시 1명, 방문일 위반 1명으로 총 4명, 대조군에서는 중도탈락 1명, 순응도 70% 미만 2명, 방문3 SCORAD 검사 미실시 1명, 병용금지약물 복용 1명으로 총 5명이 제외되어 총 42명(시험군 22명, 대조군 20명)이 PP Set에 포함되었다.
- [0104] **실시예 3-3 임상시험방법**
- [0105] 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 섭취에 의한 아토피성 피부염 개선에 관한 임상시험은 섭취 사균 시료의 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 임상시험으로 디자인되었다. 아토피성 피부염을 가진 대상자의 자의 또는 법정대리인에 의해 임상시험 동의서에 서명한 시험대상자가 본 임상시험에 등록되면 방문 평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 시험대상자에 한하여 시험군, 대조군 중 한 군으로 무작위 배정되었다. 배정된 시험대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였다.
- [0106] **실시예 3-3-1 임상시험 시험식품 및 위약대조 시험**
- [0107] 시험군은 시험식품으로 락토바실러스 사케이 probio-65 사균 동결건조 분말이 포함된 시료를 섭취하였다. 섭취한 사균의 균체수는  $1 \times 10^{10}$  CFU/day이었다. 섭취한 시험식품은 사균과 부형제인 셀룰로오스를 혼합하여 2g/포의 제품으로 조제한 후 사용하였다. 시험대상자는 시험식품을 1일 1포씩 식후 30분에 직접 또는 물에 타서 섭취하였다. 대조식품(Placebo)은 셀룰로오스를 사용하였고, 정상 제품의 중량 및 섭취방법은 시험식품과 동일하게 하였다.

[0108] **실시예 3-3-2 시험식품의 무작위 배정**

[0109] 임상시험은 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하여 병행시험으로 진행하였으며, 필요한 시험대상자 수는 탈락률(15%)을 고려하여 각 군당 30명씩 총 60명이었다.

[0110] 방문 2에서 선정, 제외기준에 적합한 모든 시험대상자에 대하여 실시기관에 따라 블록화 무작위배정법의 할당코드에 의하여 각 군으로 배정하였다. 섭취 군간의 균형 있는 무작위배정을 위하여 일정한 블록의 크기를 적용하였고, 각 군의 시험대상자 수의 비는 1:1로 동일하게 하였다. 무작위배정표는 SAS® system의 Randomization program으로 발생한 난수(A, B의 Random number)의 순열을 시험대상자 번호 1번부터 순차적으로 적용시킨 것으로 SAS®를 통해 임상시험 전에 미리 고안하여 생성하였다. 의뢰자는 임상시험용 식품 포장 시 무작위 배정표에 따라 임상시험용 식품 라벨을 부착한 후, 임상시험 시작 전에 시험기관에 공급하였다. 이후, 방문 2에서 해당 시험대상자가 본 임상시험의 대상자로 적합한 경우에 다음의 시험대상자 번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 시험/대조식품을 섭취하도록 하였다.

[0111] **실시예 3-3-3 임상시험방법 이중눈가림**

[0112] 이중눈가림 유지를 위하여 본 임상시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 임상시험 시험자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 중대한 이상약물반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 임상시험 종료 시까지 공개하지 않았다. 본 임상시험에서는 시험기간 중 눈가림 해제가 발생하지 않았다. 임상시험 시험자는 선정된 시험대상자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 시험대상자에게 공급하였으며, 임상시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 눈가림을 유지하였다.

[0113] **실시예 3-4 안전성 평가**

[0114] 시험군과 대조군을 섭취한 임상시험 대상자에 대한 섭취식품의 안정성 평가분석은 Safety set을 대상으로 시험대상자 60명 전원을 대상으로 진행하였다.

[0115] **실시예 3-4-1 이상반응평가**

[0116] 이상반응의 평가를 위해 시험기간 동안 보고된 모든 이상반응에 대한 평가는 시험대상자의 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하였다. 각 군간 이상반응이 발생한 시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

[0117] **실시예 3-4-2 임상병리검사**

[0118] 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type) 자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 One-way ANOVA test를 실시하였다. 군간 비교에서 유의한 결과를 가질 경우에는 다중비교(Multiple comparison) 방법을 이용하여 분석하였다. 노검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

[0119] 방문 1, 4(또는 중도탈락 시 종료방문)에 임상병리검사를 실시하여 시험대상자의 전신적인 건강상태를 평가하였다. 임상병리 검사 결과를 당일 확인할 수 있는 경우, 방문1과 방문2를 동일일에 실시할 수 있었다. 이 경우 반드시 임상시험용 식품의 섭취가 이루어지기 전에 임상병리 검사 결과를 포함한 선정기준 및 제외기준을 모두 확인하였다.

[0120] 방문1의 임상병리검사는 7일 이내의 검사결과가 있다면 적용가능 하였으며, 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행하였다. 검사 항목에는 다음이 포함되었다.

[0121] **실시예 3-4-2-1 혈액학적 임상병리검사**

[0122] 혈액학적 검사는 WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Seg.Neutrophils, Platelet, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils, ESR 14종을 대상을 수행하였다. 혈액의 세포학적 및 이화적인 성질과 상태를 검사하는 것으로서 WBC(백혈구), Seg.Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils(백혈구백분율) 검사는 세균감염을 시사하고 알려지 질환을 파악하며 RBC, Hb, Hct, Platelet 검사는 다혈구형증, 빈혈, 출혈 등을 진단할 수 있다. 또 MCV, MCH, MCHC, ESR 는 비타민 B12결핍성 빈혈, 철결핍성 빈혈, 비중해성 빈혈 등의 진단과 각종 질환의 경과와 예후판정에 사용된다.

[0123] **실시예 3-4-2-2 혈액화학적 임상병리검사**

[0124] 혈액화학적 검사는 Calcium, Phosphorus, Glucose, BUN, Uric acid, Cholesterol, Total protein, Albumin, Total Bilirubin, Alk.phos, AST(GOT), ALT(GPT), Creatinine, Na, K, Cl 등 16종을 대상으로 수행하였다. 혈액 속의 여러 성분을 생화학적 방법으로 측정하는 것으로 혈청단백질(Albumin), 지질(Cholesterol), 혈청효소활성(Alk.phos), Phosphorus, AST(GOT), ALT(GPT), Total Bilirubin 검사는 간 질환의 유무와 그 감별진단 및 그 정도와 예후의 판단, 치료방침의 결정에 중요한 역할을 한다. 특히 간의 실질장애와 담도폐색(쓸개즙정체) 등 간 담도계 계통의 장애를 진단하는데 유익하다. 전해질(NA, K, CL, Calcium)은 설사, 구토, 탈수, 열성상태를 진단할 수 있으며 혈당검사(Glucose)는 당뇨, 감염, 말단비대증 등을 진단한다. BUN, Uric acid, Creatinine는 소아기때 미성숙한 신장기능을 반영하는 지표로 신우염, 요로질환, 신증후군 등을 진단할 수 있다.

[0125] **실시예 3-4-2-3 뇨 검사**

[0126] 뇨 검사는 오줌에 포함된 SG, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen, Nitrite, RBC, WBC 등의 성분을 검사하였다. 소변의 성분을 검사함으로써 전신의 상태, 병변을 알아내는 진단법으로 소변을 생성하는 신장을 비롯하여 통로인 요관, 방광, 요도에 병변이 있으면 혼탁뇨나 혈뇨 등의 이상이 나타나고, 또 소변 속에는 전신의 대사산물이 배설되고 있으므로 비뇨기 이외의 전신적인 질환의 진단에도 일반적인 검사이다. 뇨 검사를 통해 이상징후를 알아보고 정밀한 검사를 통해 발병 여부를 파악하여 조기 발견 치료하기 위함이다.

[0127] **실시예 3-4-3 활력징후(맥박, 체온) 및 체중**

[0128] 활력징후(맥박, 체온) 및 체중은 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하였고, 군간 비교는 One-way ANOVA test를 실시하였다. 군간 비교에서 유의한 결과를 가질 경우에는 다중비교(Multiple comparison) 방법을 이용하여 분석하였다.

[0129] **실시예 3-5 유효성 평가방법**

[0130] 락토바실러스 사케이 probio-65 사균의 아토피 피부염 개선에 대한 유효성 평가는 1차 유효성 평가 변수와 2차 유효성 평가 변수로 나누어 평가하였다. 1차 유효성 평가 변수는 SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) total score로 평가하였고, 2차 유효성 평가 변수는 SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score, SCORAD subjective(소양감, 수면방해) score, IGA(Investigator's Global Assessment), 피부상태(수분, 유분, pH) 변화, 혈중 Eosinophil(count), IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK)로 판별하였다.

[0131] **실시예 3-5-1 SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) index 평가 방법**

[0132] 시험대상자의 방문1, 3, 4회차에 각각 SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) index 평가를 실시하였다. SCORAD index는 객관적, 주관적 SCORAD로 나누어 평가하였다.

**표 1**

SCORAD index	평가항목	점수범위
Objective	A 병변의범위	0-100
	B 병변의정도	0-18
Subjective	C 자각증상	0-20

[0133]

[0134] 표 1은 SCORAD index의 평가 항목 및 점수 범위를 나타내는 표이다. 상기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 객관적 SCORAD(objective SCORAD)는 연구자가 시험대상자의 신체 병변의 범위(extent, %)와 정도(intensity)를 객관적으로 평가하였다. 병변의 범위(extent, %)는 신체 부위별로 병변이 몇 퍼센트를 침범하고 있는가를 평가하였다.

[0135] 병변의 정도(intensity)는 홍반/암화(erythema/darkening), 부종/구진화(edema/papulation), 진물/가피

(oozing/crusting), 찰상(excoriation), 태선화(lichenification), 건조(xerosis) 6개 항목으로 나누어 심한 정도를 각 0~3점(0; 없음, 1; 경증, 2; 중간, 3; 중증)으로 평가하였다. 주관적 SCORAD(subjective SCORAD)는 시험대상자 자신이 소양감(pruritus)과 수면방해(sleep loss) 증상의 정도를 0~10으로 나누어 표시하도록 하는 방법(visual analog scale)이다. 단, 시험대상자가 주관적 SCORAD 증상의 정도를 평가하기 어려울 경우, 시험대상자의 부모(또는 법정 대리인)가 대신 평가하였으며, 0주, 6주, 12주에서 모두 동일한 평가자에 의해 평가되었다.

[0136] SCORAD total score는 A(병변의 범위), B(병변의 정도), C(자각 증상) 3가지

[0137] 항목 각각의 점수를 계산한 후  $A/5 + 7B/2 + C$  계산식으로 산정하였다. 점수 범위는 0-103점이고, 고득점일수록 증상 정도가 심함을 의미한다.

[0138]  $SCORAD\ total\ score = A/5 + 7B/2 + C$

[0139] **실시예 3-5-2 전반적인 증상 개선(IGA; Investigator's Global Assessment)**

[0140] **평가 방법**

[0141] 방문 2~4에 연구자는 시험대상자의 아토피성 피부염 증상의 전반적인 개선 상태를 0~5점으로 나누어 평가하였다. IGA의 기준과 점수 범위는 표 2와 같다. 표 2는 아토피성 피부염의 전반적인 증상 개선 기준 및 상태를 나타내는 표이다.

**표 2**

Scale	기준
0 Clear	아토피의 염증성 증상이 없음
1 Almost clear	약간의 인지할 수 있는 홍반(erythema), 구진/침윤(papulation/infiltration)
2 Mild disease	경증의 홍반(erythema), 구진/침윤(papulation/infiltration)
3 Moderate disease	중등증의 홍반(erythema), 구진/침윤(papulation/infiltration)
4 Severe disease	중증의 홍반(erythema), 구진/침윤(papulation/infiltration)
5 Very severe disease	삼출성과 부스럼이 있는 중증의 홍반(erythema), 구진/침윤(papulation/infiltration)

[0142]

[0143] **실시예 3-5-3 피부 상태 측정 (수분, 유분, pH) 방법**

[0144] 방문 2~4에 Fore arm과 Lower leg 피부 표면의 일정 부위에 Courage + Khazaka electronic의 Multiprobe Adapter 9과 Probes를 이용하여 수분(Tewameter® TM 300 and Triple TM 330T), 유분(Sebumeter® SM815), pH(Skin-pH-meter® PH905)를 측정하였다.

[0145] **실시예 3-5-4 Eosinophil, IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK) 검사방법**

[0146] 면역관련 혈액 지표로 Eosinophil(count), IgE, ECP 검사는 방문2, 4에 혈액을 채취하여 분석하였다. IgE, ECP는 원심분리 후, 4℃에서 냉장보관 하였으며, 혈액 시료의 분석 및 폐기 인체적용시험을 수행한 병원규정에 따랐다.

[0147] Eosinophil(count)은 알레르기 및 Th2 면역반응에서 가장 중요한 염증세포의 하나로 Eotaxin에 의해 활성화되어 염증 부위로 이동한 뒤 ECP를 포함한 다양한 세포독성단백질과 사이토카인 등을 분비하여 염증반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. IgE는 알레르기 질환을 매개하는 가장 중요한 면역 지표로서 역할을 하며, ECP는 알레르기 및 Th2 특이적인 면역반응에서 중요한 염증성 매개 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다. 케모카인(chemokine)

은 저분자 단백질로 알려져 있고, 화학 주성(chemoattractants)을 나타내며, 단백질의 구조와 기능에 따라 C, CC, CXC 및 CX3C 등 4가지 subfamily로 나눌 수 있는데, 이들 케모카인은 염증부위에 백혈구를 침윤시켜 염증반응을 더욱 유발한다. CC계열의 대표적인 Th2 케모카인은 thymus & activation-regulated chemokine (TARC/CCL17), macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) 및 cutaneous T cell-attracting chemokine(CTACK/CCL27) 등이 있고, 염증부위에 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도하는 것으로 알려졌다. AD 환자 또는 AD 유사 동물모델의 혈청에서 TARC/CCL17, MDC/CCL22 및 CTACK/CCL27 등 케모카인이 다량 검출되는 것으로 알려졌다.

[0148] **실시예 3-6 유효성 통계분석방법**

[0149] 통계분석은 SAS® (Version 94, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석하였다. 유효성 평가분석의 주 분석 대상은 PP Set으로 하고, FA Set을 추가적으로 실시하였다.

[0150] **실시예 3-6 -1 1차 유효성 평가 변수 분석**

[0151] 1차 유효성 평가변수인 SCORAD total score의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 변화 정도에 대한 섭취 군간의 차이는 Two sample t-test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

[0152] **실시예 3-6-2 2차 유효성 평가 변수 분석**

[0153] 2차 유효성 평가변수인 SCORAD score(objective, subjective), IGA, 피부상태(수분, 유분, pH), 혈중 Eosinophil(count), IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK)의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 변화 정도에 대한 섭취 군간의 차이는 Two sample t-test를 이용하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

[0154] 추가 분석으로 시험 기간 중 국소 스테로이드 제제 및 보습제를 사용한 시험대상자의 비율 (%)을 제시하였고, 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정 (Fisher's exact test)을 이용하여 섭취 군간 비율 차이를 비교하였다. 또한, 보습제 사용량에 대한 군간 비교는 One-way ANOVA test를 실시하였다. 시험대상자의 기저 특성 중 군간 차이가 나타난 항목을 보정하여 공분산분석(ANCOVA)을 실시하였다.

[0155] **실시예 3-7 시험식품의 안전성평가 결과**

[0156] 안전성 평가는 무작위 배정되어 임상시험 임상시험용 식품을 적어도 한 번 이상 섭취한 시험대상자 중 안전성 관련 정보가 수집된 시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였다.

[0157] 시험군 투여구에서는 총 4명의 시험대상자에게서 4건, 대조군에서는 총 3명의 시험대상자에게서 6건의 이상 반응이 있었다. 주된 이상반응은 두 군 모두 감염성 질환이었다. 이중 대조군 1명에서 총 1건의 중대한 이상 반응이 발생하였으며, 시험자에 의해 임상시험용 식품과의 관련이 없다고 판단되었고 완전 치유됨을 확인하였다. 이상 반응으로 인하여 중도 탈락한 시험대상자는 없었다.

[0158] **실시예 3-7-1 시험식품의 안전성결과 이상반응**

[0159] 이상반응의 증상 정도 조사에서 시험군 투여구에서는 경도(mild) 4건, 대조군은 경도(mild) 5건, 중등도(Moderate) 1건이었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0160] 임상시험용 식품과의 관련성에서 시험군 투여구에서는 '명확히 관련이 없음'이 4건, 대조군은 '관련 있을 가능성이 있음' 이 2건, '관련이 없다고 생각됨' 이 1건, '명확히 관련이 없음' 이 3건으로 시험자에 의해 판단되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0161] 임상시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 대조군 2건이었고, 소화기 계통 이상반응이 있었으며 상기 이상 반응은 완전치유 되었음을 확인하였다.

[0162] **실시예 3-7-2 혈액학적 및 혈액화학적검사 분석 결과**

[0163] 혈액학적 및 혈액화학적검사 분석 결과 섭취 12주 후 Platelet은 시험군 투여구에서  $29.83 \pm 58.89 \times 10^3 / \mu l$  증가하였으며 ( $p=00109$ ), 대조군에서  $10.47 \pm 36.07 \times 10^3 / \mu l$  감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나 ( $p=00009$ ) 모두 정상범위 이내에서의 변화였다. 추가로 Dunnett 분석을 한 결과 시험군(사군)과 대조군에서 유의한 차이가 나타났음을 확인하였다. 이외 모든 검사항목에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지

않았다.

[0164] 뇨검사의 분석 결과 모든 검사항목에서 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0165] 활력징후 (맥박, 체온) 및 체중 분석 결과에서 섭취 6주 및 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0166] **실시예 3-8 아토피성 피부염 개선 결과**

[0167] 본 임상시험의 유효성 평가는 SCORAD(SCORing of Atopic Dermatitis) total score, SCORAD objective(병변의 범위, 정도) score, SCORAD subjective(소양감, 수면방해) score, IGA(Investigator's Global Assessment), 피부상태 (수분, 유분, pH) 변화, 혈중 Eosinophil(count), IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK)의 변화량으로 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

[0168] **실시예 3-8-1 아토피성 피부염 SCORAD total score 결과**

[0169] 시험군(사군)과 대조군의 SCORAD total score 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군(사군) 투여군은 10.51±13.69 감소하였고 (p=00017), 대조군은 3.39±8.50 감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 (Two sample t-test; p=0.0486, Wilcoxon rank sum test; p=0.0242) FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 9.56±13.30 감소하였고 (p=0.0012), 대조군은 6.15±10.28 감소하였으나 (p=0.0064) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0170] 표 3 및 표 4는 0주, 6주, 12주에서 측정된 시험군과 대조군의 SCORAD total score 변화를 PP Set, FA Set으로 분석한 결과를 나타내는 표이다.

**표 3**

	시험군 N=22 Mean±SD	대조군 N=20 Mean±SD	p-value*	p-value <sup>§</sup>
Baseline(방문1)	12.33±10.83	10.67±10.20	0.6126	0.3196
6주(방문3)	7.97±9.39	10.67±11.30		
Change from baseline	-4.35±8.81	-0.00±11.32	0.1698	0.1544
p-value**	0.0307	0.9999		
12주(방문4)	7.99±7.40	10.83±10.94		
Change from baseline	-4.34±9.30	0.16±11.89	0.1773	0.1989
p-value**	0.0401	0.9521		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§ : Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test

[0171]

**표 4**

	시험군 N=26 Mean±SD	대조군 N=25 Mean±SD	p-value*	p-value <sup>§</sup>
Baseline(방문1)	12.04±10.09	10.52±9.43	0.5807	0.2912
6주(방문3)	8.61±8.84	9.49±10.43		
Change from baseline	-3.43±8.46	-1.03±10.42	0.3714	0.6708
p-value**	0.0493	0.6246		
12주(방문4)	8.57±7.17	9.67±10.12		
Change from baseline	-3.47±9.27	-0.85±10.91	0.3599	0.5464
p-value**	0.0680	0.7004		

\*: Compared between groups; p-value by Two sample t-test

\*\* : Compared within groups; p-value by Paired t-test

§ : Compared between groups; p-value by Wilcoxon rank sum test

[0172]

- [0173] **실시예 3-8-2 아토피성 피부염 SCORAD objective(병변의 범위) score 결과**
- [0174] 시험군(사군)과 대조군의 SCORAD objective(병변의 범위) score 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군(사군) 투여군은  $4.34 \pm 9.30$  감소하였고 ( $p=0.0401$ ), 대조군은  $0.16 \pm 11.89$  증가하였으나 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군(사군) 투여군은  $3.47 \pm 9.27$  감소하였고, 대조군은  $0.85 \pm 10.91$  감소하였으나 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- [0175] **실시예 3-8-3 아토피성 피부염 SCORAD objective(병변의 정도) score 결과**
- [0176] 병변의 정도(intensity)는 연구자가 시험대상자의 신체 병변을 홍반/암화(erythema/darkening), 부종/구진화(edema/papulation), 진물/가피(oozing/crusting), 찰상(excoriation), 태선화(lichenification), 건조(xerosis) 6개 항목으로 나누어 심한 정도를 각 0~3점(0; 없음, 1; 경증, 2; 중간, 3; 중증)으로 평가하였다. 시험군(사군)과 대조군의 SCORAD objective(병변의 정도) score 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은  $2.05 \pm 2.90$  감소하였고( $p=0.0034$ ), 대조군은  $0.70 \pm 1.78$  감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ( $p=0.0186$ ).
- [0177] **실시예 3-8-3-1 아토피성 피부염 SCORAD objective(병변의 정도)의 찰상 score 결과**
- [0178] SCORAD objective(병변의 정도)의 찰상 score 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군(사군)은  $0.32 \pm 0.84$  감소하였고, 대조군은  $0.20 \pm 0.70$  증가하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ( $p=0.0363$ ).
- [0179] **실시예 3-8-3-2 아토피성 피부염 SCORAD objective(병변의 정도)의 건조 score 결과**
- [0180] SCORAD objective(병변의 정도)의 건조 score 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군(사군)은  $0.55 \pm 0.80$  감소하였고( $p=0.0043$ ), 대조군은  $0.05 \pm 0.76$  증가하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ( $p=0.0180^*$ ,  $p=0.0132$ )
- [0181] 이 외 홍반/암화, 부종/구진화, 진물/가피, 태선화의 score 변화량에서는 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나는 항목은 없었다.
- [0182] **실시예 3-8-4 아토피성 피부염 SCORAD subjective score 총점 결과**
- [0183] 시험군(사군)과 대조군의 SCORAD subjective score 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은  $2.48 \pm 4.70$  감소하였고( $p=0.0220$ ), 대조군은  $0.98 \pm 3.81$  감소하였으나 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- [0184] 소양감, 수면방해 score 변화량 분석에서는 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타나는 항목은 없었다.
- [0185] **실시예 3-8-5 IGA 변화량 분석 결과**
- [0186] 시험군(사군)과 대조군의 IGA 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은  $0.59 \pm 0.85$  감소하였고( $p=0.0039$ ), 대조군은  $0.40 \pm 0.60$  감소하였으나( $p=0.0075$ ) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. FA Set 분석에서도 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- [0187] **실시예 3-8-6 피부상태 (수분, 유분, pH) 변화량 분석 결과**
- [0188] 시험군(사군)과 대조군의 피부상태 (수분, 유분, pH) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 Lower Leg Left 유분은 섭취 12주 후 시험군은  $1.68 \pm 2.94$  증가하였고 ( $p=0.0226$ ), 대조군이  $0.32 \pm 1.70$  감소하여 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 (Two sample t-test;  $p=0.0159$ , Wilcoxon rank sum test;  $p=0.0132$ ).
- [0189] FA Set으로 Lower Leg Left 유분 변화량을 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은  $1.52 \pm 2.76$  증가하였고 ( $p=0.0149$ ), 대조군은  $0.13 \pm 2.47$  증가하여 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 (Wilcoxon rank sum test;  $p=0.0351$ ).
- [0190] **실시예 3-8-7 Eosinophil count, IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK) 변화량 분석 결과**
- [0191] 시험군(사군)과 대조군의 Eosinophil count, IgE, ECP, CCL17(TARC), CCL27(CTACK) 변화량을 PP Set과 FA Set

으로 분석한 결과에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타난 항목은 없었다.

- [0192] **실시예 3-8-8 스테로이드제 사용 유무 분석 결과**
- [0193] 시험기간 동안의 시험군(사군)과 대조군의 스테로이드제 사용 유무를 PP set과 FA Set으로 분석한 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- [0194] **실시예 3-8-9 보습제 사용 유무 및 사용량 분석 결과**
- [0195] 시험기간 동안의 시험군(사군)과 대조군의 보습제 사용 유무 및 사용량을 PP
- [0196] Set과 FA Set으로 분석한 결과, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
- [0197] 위 실험결과와 관련하여, 도 3은 락토바실러스 사케이 probio-65 사군 섭취에 의해 아토피성 피부염 증상이 30% 혹은 50% 개선된 시험자를 나타내는 그래프이다.
- [0198] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사군(Dead cell)을 섭취한 시험자의 약 59%는 30% 이상의 SCORAD score의 개선효과가 있었으나, 대조군(Placebo)을 섭취한 시험자는 약 30%만 30% 이상의 SCORAD score의 개선효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사군(Dead cell)을 섭취한 시험자의 약 32%는 50% 이상의 SCORAD score의 개선효과가 있었으나, 대조군(Placebo)을 섭취한 시험자는 약 5%만 50% 이상의 SCORAD score의 개선효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0199] 도 4는 락토바실러스 사케이 probio-65 사군 섭취에 의해 시간의 경과에 따른 아토피성 피부염 증상의 개선 정도를 나타내는 그래프이다.
- [0200] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시험 시작 후 방문 3(6주차)의 경우 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사군(Dead cell)을 섭취한 시험자의 약 22%는 SCORAD score의 개선효과가 있었으나, 대조군(Placebo)을 섭취한 시험자는 약 13%만 SCORAD score의 개선효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 시험 시작 후 방문 4(12주차)의 경우 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사군(Dead cell)을 섭취한 시험자의 약 32%는 SCORAD score의 개선효과가 있었으나, 대조군(Placebo)을 섭취한 시험자는 약 11%만 SCORAD score의 개선효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0201] 따라서, 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 probio-65 사군은 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료의 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0202] **실시예 3-9 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액 추출물의 제조**
- [0203] 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액에 추출용매를 첨가하고 상온에서 교반시켜 균주 내부물질 및 배양액의 유효물질을 추출하였다. 상기 추출액을 여과한 후 감압농축하는 것에 의해 추출용매와 추출액을 분리시킨 후 분리된 추출액을 가열 농축하거나 동결건조기(Ilshin Lab, Korea)로 동결건조하여 락토바실러스 사케이 Probio-65 배양액 추출물 액상 혹은 분말(이하 'SEL001')을 제조하였다.
- [0204] **실시예 3-10 동물모델을 이용한 락토바실러스 사케이 Probio-65 추출물의 아토피 증상 개선 동물실험**
- [0205] 동물실험은 6주령 ICR 수컷 마우스(Mouse)를 대상으로 실시하였다. 각 실험군마다 6마리씩 총 18마리를 구입하여 실내온도 23±2℃, 습도 60±5%, 명암주기 12시간의 환경 조건에서 적응시키기 위해 중앙실험동물에서 구입한 일반 사료(Central Lab. Animal Inc., Korea)로 1주간 예비 사육한 후 아토피 유발 및 약물처리, 유산균 추출물 처리 실험을 실시하였다.
- [0206] **실시예 3-10-1 실험군의 분류**
- [0207] 실험군은 DNCB로 아토피를 유발한 아토피대조군(DNCB), 아토피 유발 후 치료약물인 clobetasol을 처리한 약물처리군(DNCB+drug), 아토피 유발 후 락토바실러스 사케이 Probio-65 추출물인 SEL001을 처리한 시험군(DNCB+SEL001)으로 나누었다.
- [0208] 각 시험구는 6마리의 실험동물로 구성되었으며, 2마리씩 하나의 cage에서 사육하였다.
- [0209] **실시예 3-10-2 정상쥐의 아토피 유발**
- [0210] DNCB에 의한 아토피 유발은 Renstrom 등(1995)이 이용한 방법을 일부 수정하여 6일 동안 진행하였다. 마우스의 등 피부의 표피 털을 제거하고, 피부에 1% DNCB 용액 0.1ml를 처리하였다. 48시간 후 추가 피부염 유발 약물을

처리하였다. 추가 처리는 실험동물 피부에 DNCB 용액 0.12ml씩 3일 동안 매일 1회 진행하였다. 피부 과민성 유발 후, 실험구는 SEL001 (40mg/cm<sup>2</sup>)로 처리하였고, 약물대조 시험구는 치료용 약인 clobetasol(40mg/cm<sup>2</sup>)로 처리하였다. 약물처리는 3주간 계속하였다.

[0211] **실시예 3-10-3 아토피성 피부염 유발 동물에서 병증의 시각적 평가**

[0212] 동물실험군에 속하는 모든 실험동물에서 아토피성피부염의 정도는 김 등(2008)이 임상시험에서 사용한 임상시험 시각적 평가방법(visual evaluation method)으로 측정하였다. 임상 시험동물의 평가는 홍반/출혈; 부종; 표피박리/긁무름; 건조의 4가지 항목을 평가하였다. 각각의 항목은 증상의 심한 정도에 따라 0, 1, 2, 3의 4 단계의 등급으로 구분하였다. 총 피부염 정도(total dermatitis score)는 최고 값이 12인 4종류의 평가항목의 합으로 나타내었다.

[0213] 마우스는 연속적인 0.1ml와 0.12ml의 1% DNCB 용액 처리 후 아토피와 유사한 임상증상이 관찰되었다. 실험동물의 긁기 빈도는 각각의 동물을 분리시킨 후 단위 관찰시간 동안의 긁는 회수를 측정하였다.

[0214] DNCB로 아토피가 유도된 실험동물에서 추출물인 SEL001의 국소도포가 아토피 증상의 개선을 보인다는 것이 확인되었다.

[0215] 도 5는 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 피부염 정도를 나타낸 그래프이다.

[0216] 도 6은 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 긁기 빈도를 나타낸 그래프이다

[0217] 도 7은 아토피 피부염이 유발된 실험동물의 피부를 나타내는 도면이다.

[0218] **실시예 3-10-4 아토피성 피부염 유발 동물에서 혈장내 IgE 변화**

[0219] 임상시료 급여가 종료된 후, 각 시험군 동물의 하대정맥에서 혈액을 회수하였다. 혈액시료는 실온에서 정치상태로 30분간 방치한 후, 원심분리로 혈청을 분리하였다. 혈청 시료에 포함된 전체 IgE의 농도는 마우스용 IgE ELISA kit(Shibayagi, Shibukawa, Japan)로 확인하였다. ELISA 반응은 시약 공급업체의 표준 방법을 이용하였다.

[0220] 도 8은 아토피 피부염이 유발 실험동물의 IgE의 변화를 나타낸 그래프이다.

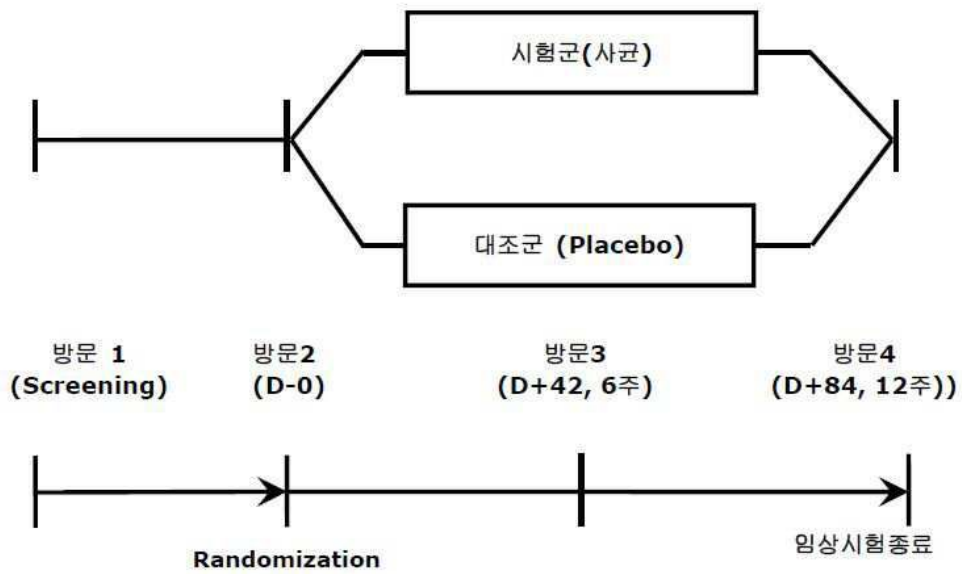
[0221] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, DNCB에 의해 유도된 아토피 피부염을 가진 쥐는 약물이나 SEL001이 처리된 시험구에 비해 현저하게 높은 IgE의 양을 나타낸다. SEL001을 피부에 도포한 마우스의 혈청에서는 아토피 유발 후, 아무것도 처리하지 않은 시험구와 약물을 처리한 시험구의 마우스 혈청에 비해 낮은 양의 IgE가 확인되었다. 이러한 결과는 SEL001이 DNCB에 의한 피부 염증 유발을 저해함을 나타낸다.

[0222] 따라서, 본 발명에 따른 락토바실러스 사케이 Probio-65 사균 및 락토바실러스 사케이 Probio-65 추출물은 아토피성 피부염 증상 저감 또는 치료의 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

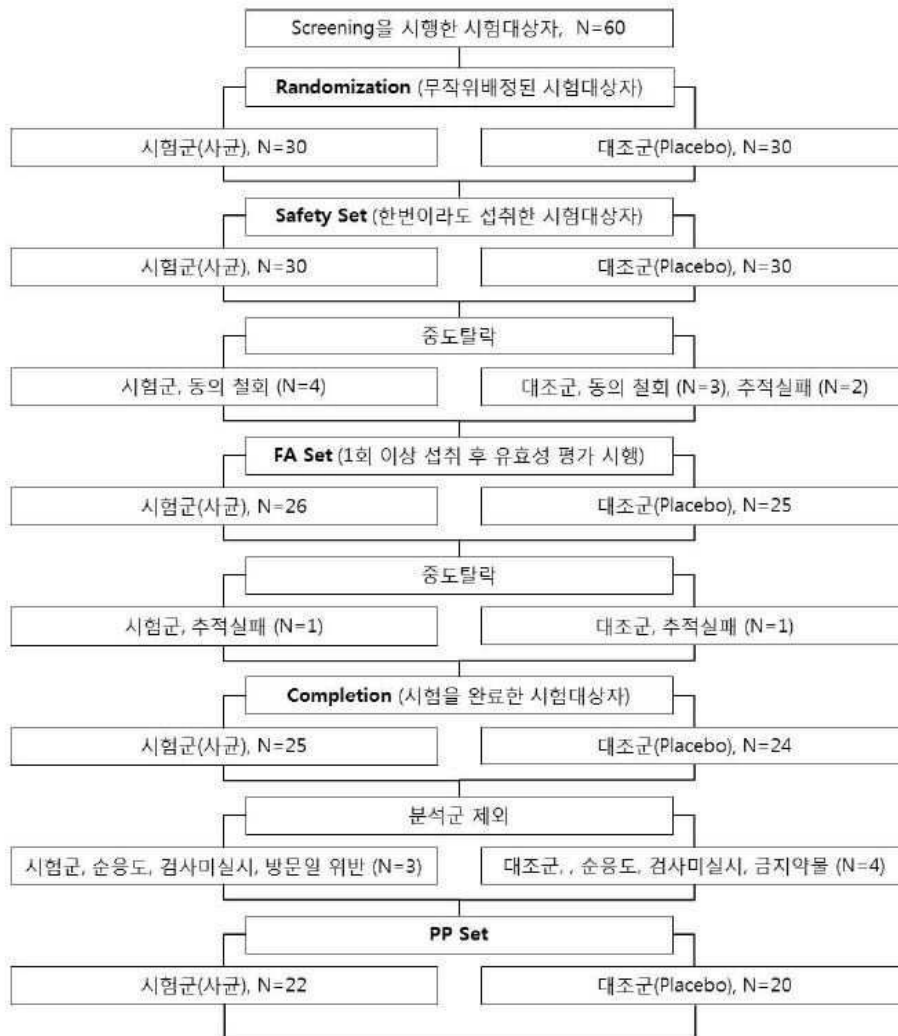
[0224] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특정 실시예에 한정되지 아니한다. 즉, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 첨부된 특허청구범위의 사상 및 범주를 일탈함이 없이 본 발명에 대한 다수의 변경 및 수정이 가능하며, 그러한 모든 적절한 변경 및 수정은 균등물들도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주되어야 할 것이다.

도면

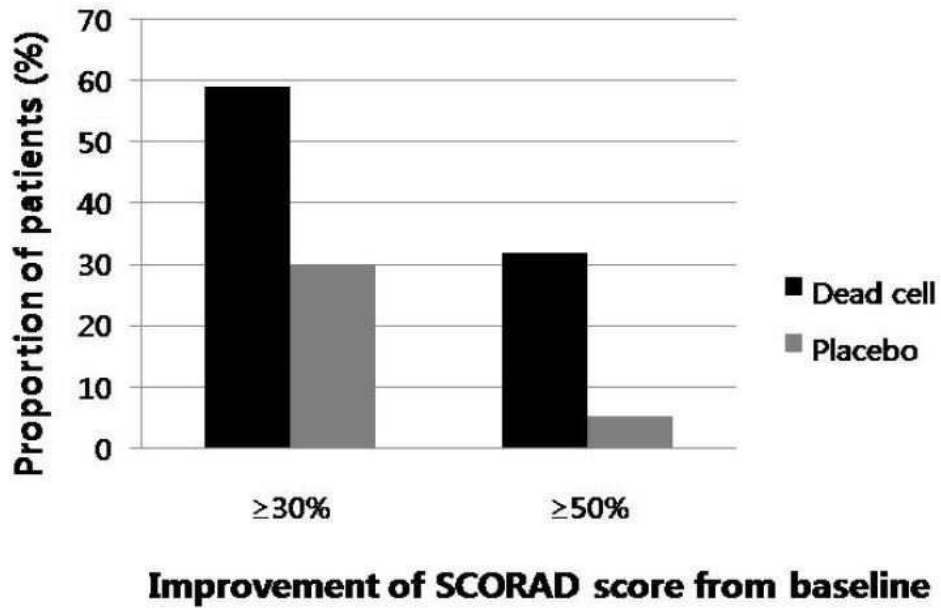
도면1



도면2



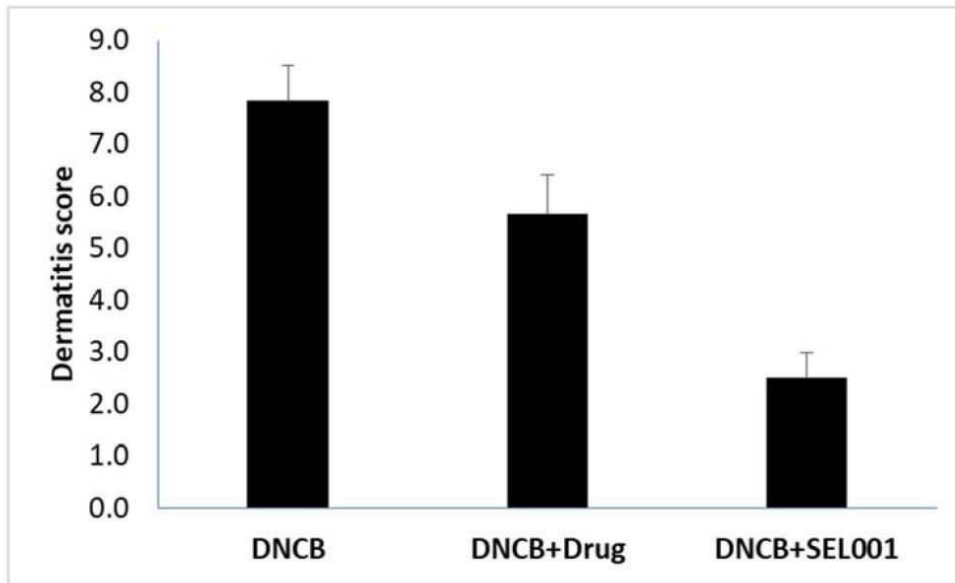
도면3



도면4

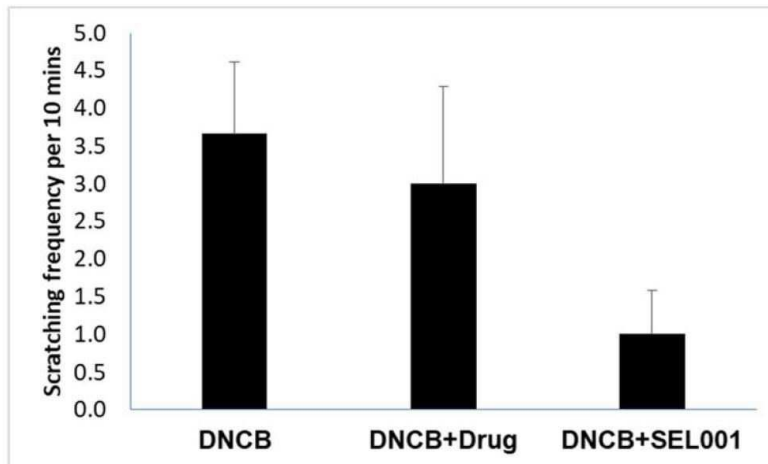


도면5



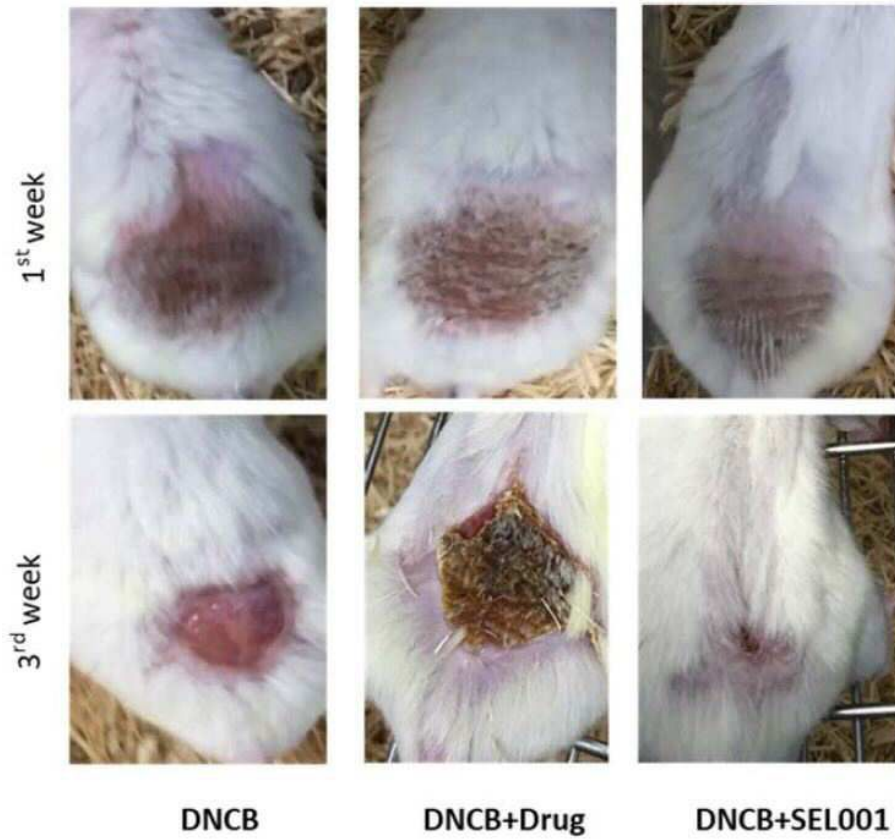
Dermatitis score of DNCB induced atopic dermatitis.

도면6



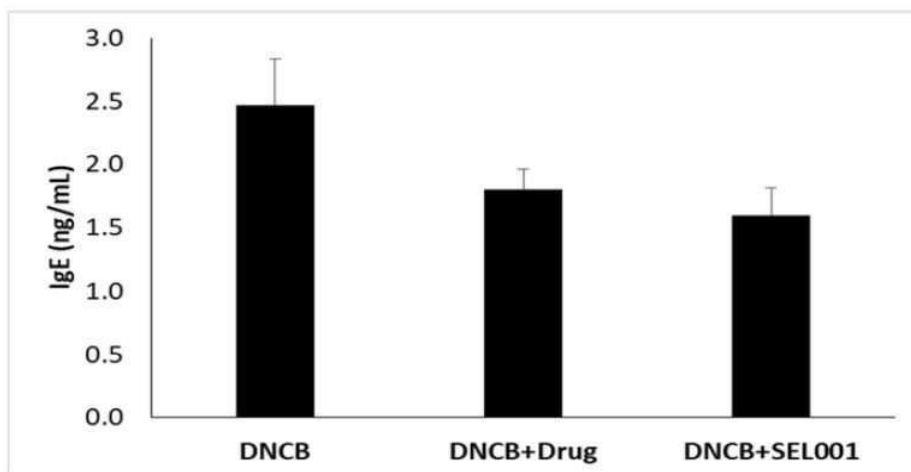
Scratching frequency of mice challenged with DNCB induced atopic dermatitis.

도면7



Visual appearance of dorsal skin.

도면8



Change in serum IgE level in DNCB induced atopic mice.