



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년04월20일
(11) 등록번호 10-1030661
(24) 등록일자 2011년04월14일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7026182
(22) 출원일자(국제출원일자) 2007년05월30일
심사청구일자 2010년06월08일
(85) 번역문제출일자 2008년10월27일
(65) 공개번호 10-2009-0015903
(43) 공개일자 2009년02월12일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2007/050371
(87) 국제공개번호 WO 2007/142596
국제공개일자 2007년12월13일

(73) 특허권자
바이오가이아 에이비
스웨덴, 에스이-103 64 스톡홀름, 우편사서함 3242
(72) 발명자
콘놀리, 에이몬
스위스, 리딩고 에스-181 30, 모션스바겐 3
몰리스탐, 보
스웨덴, 레룸 에스-443 31, 세테르폴리츠바겐 12
(74) 대리인
최홍걸, 강명구

(30) 우선권주장
11/446,628 2006년06월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20050271641 A1

전체 청구항 수 : 총 3 항

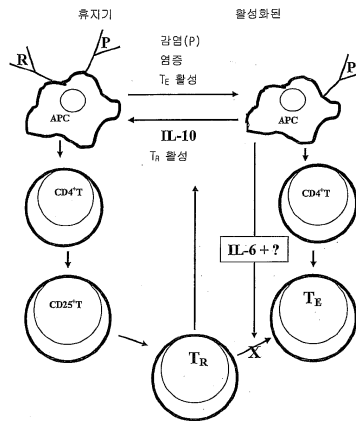
심사관 : 김민정

(54) 유아 산통을 감소시키기 위한 선별된 유산균의 용도

(57) 요약

본 발명에서는 유아 산통(infant colic)의 예방 및/또는 치료를 위한, IL-10의 생산 및 결과적으로, CD4+CD25+ TR 세포의 증식을 촉진하는 능력에 대하여 선별된 특성의 유산균(lactic acid bacteria) 균주, 이들 균주를 선별하는 방법 및 이들 균주를 포함하는 산물을 제시한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

IL-10 수준을 증가시키고, CD4+CD25+TR(T Regulatory) 세포 증식을 자극시킬 수 있는 락토바실러스 루테리 (*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938.

청구항 2

유아 산통을 감소시키는 조성물에 있어서, IL-10 수준을 증가시키고, 단핵구-유도된 수지상 세포에서 T 조절세포 생산을 자극시킬 수 있는 능력에 대하여 선별된 유산균 균주를 함유하고, 상기 유산균 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938인 것을 특징으로 하는, 유아 산통(infantile colic)을 감소시키는 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 중쇄 트리글리세리드 오일(medium chain tri-glyceride oil)을 더욱 함유하는 것을 특징으로 하는, 유아 산통을 감소시키는 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명에서는 산통(colic)의 예방 및/또는 치료를 위한, 사이토킨 IL-10 수준을 증가시키는 능력에 대하여 선별된 특정의 유산균(lactic acid bacteria) 균주, 이들 균주를 선별하는 방법 및 이들 균주를 포함하는 산물을 제시한다.

배경기술

[0002] 이환율(prevalence)과 고통(distress)의 관점에서 돌출(salience)에도 불구하고, 유아 산통의 특성과 원인은 여전히 불분명하다. 이러한 장애에 관한 산모의 묘사는 유아가 낮 동안 희색이 돌다가 얼굴을 찡그리기 시작하고 얼굴이 붉어지고 다리를 끌어올리고 소리치고 대략 2-20분 동안 계속 울고, 이후 이러한 증상이 갑자기 중단한다는 것이다. 이러한 장애를 기술하는데 이용되는 용어에서도 논란이 있다. 이런 용어에는 "유아 산통", "저녁 산통(evening colic)"(이러한 통증이 주로 밤에 국한되기 때문에) 및 "3개월 산통(three months colic)"(이러한 통증이 출생으로부터 대략 3개월 이후에 소멸되기 때문에)이 포함된다(Illingworth RS. Difficulties in breastfeeding. In Ronald S. Illingworth, ed. The Normal Child. 10th edn. Harcourt (India) Pvt. Ltd.

1997; 39-44). 연구자마다 상이한 정의를 이용되고 있다. 산통이 최소한 3주간 주당 3일 이상, 일일 3시간 이상 동안 울부짖는 발작(paroxysm)이라는 Wessels의 정의가 주로 수용되고 있다(Sondergaard C, Skajaa E, Henriksen TB. Fetal growth and infantile colic. Arch Dis Child Fetal-Neonatal Ed 2000; 83 (1): F44-47). 현재까지, 주요한 가능 원인 인자는 3가지 군으로 분류되었다: 정신사회적 장애(psychosocial disorder), 위장 장애(gastrointestinal disorder)와 신경발생 장애(neurodevelopmental disorder).

[0003] 정신사회적 인자(psychosocial factor)에는 정상적인 울음의 변형, 비전형적 양육 상황(atypical parenting)의 행동 효과(behavioral effect) 및 부모-유아 상호작용(parent-infant interaction)에서 문제점의 표명이 포함된다.

[0004] 위장 장애(gastrointestinal disorder)는 우는 증세(crying spell) 동안 유아의 다리 위치와 찌푸린 얼굴(grimacing)로 인하여, 산통에 관련된다. 이들 위장 인자는 하기에 간단히 재검토된다:

[0005] 젖병 수유(bottle feeding), 수평 위치(horizontal position)에서 수유 및 수유후 트림(burping post-feeding)의 부재와 같은 부적절한 수유 기술이 유발 인자(causative factor)로 간주되고 있다. 첫 6개월 동안 모유 수유(breast-feeding)는 유일한 보호 인자(protective factor)인 것으로 밝혀졌다. 유아 산통의 위험은 비-모유 수유 유아에서 1.86배 높다(Saavedra MA, Dacosta JS, Garcias G, Horta BL, Tomasi E, Mendoca R. Infantile colic incidence and associated risk factors: a cohort study. Pediatr (Rio J) 2003; 79(2): 115-122). Lothe 등은 산통이 우유 유청 단백질(whey protein)에 대한 민감성(sensitivity)에 기인한다는 것을 증명하였다(Lothe L, Lindberg T. Cow's milk whey protein elicits symptoms of Infantile colic in colicky formula-fed infants: A double-blind cross over study. Pediatrics 1989; 83: 262).

[0006] 최근 연구에서, 식품 과민성(food hypersensitivity)은 유아 산통의 사례 중에서 극히 일부에서만 유발 인자로 정의될 수 있는 것으로 결론되었다(Hill DJ, Hosking CS. Infantile colic and food hypersensitivity. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30 (Suppl): S67-76). 최근에, Buchanan은 유아 산통에서 저알레르기성 우유(hypoallergenic milk)의 시도가 충분한 증거에 의해 뒷받침되지 않음을 증명하였다(Buchanan P. Effectiveness of treatment for Infantile colic. Trial of hypoallergenic milk is not supported by strong enough evidence. BMJ 1998; 317(7170): 1451-1452). 유아 산통을 나타내는 유아는 알레르기 질환의 위험이 더욱 높은 것으로 생각된다. 하지만, 최근 연구에서, 아토피(atopy), 알레르기 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 쌕쌕거림(wheezing)과 최대 유속 변동률(peak flow variability)의 마커는 유아 산통을 나타내거나 나타내지 않는 유아에서 동등한 것으로 밝혀졌다(Castro-Rodriguez JA, Stern DA, Halonen M, Wright AL, Holberg CJ et al. Relationship between Infantile colic and Asthma/ atopy: A prospective study in an unselected population. Pediatrics 2001; 108(4): 878-882).

[0007] 유당분해효소 결핍증(lactose malabsorption)은 수소 호기 검사(breath hydrogen test)에 기초하여 보고되었다(Hyams J, Geerstama M, Etienne N, Treem W. Colonic hydrogen production in infants with colic. J Pediatr 1989; 115: 592). 유아 산통을 나타내거나 나타내지 않는 유아 간에 대변 수소 농도(stool hydrogen concentration)에서 차이는 관찰되지 않았다. 하지만, 더욱 높은 수준의 메탄(methane)을 생산하는 유아는 산통이 감소하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 산통 경감에서 메탄 생산의 역할을 암시하였다(Belson A, Shetty AK, Yorgin PD, Bujanover Y, Peled Y, Dar MH, Riaz S. Colonic hydrogen elimination and methane production in infants with and without infantile colic syndrome. Dig Dis Sci 2003; 48(9): 1762-1766).

[0008] 위장(GIT) 호르몬, 예를 들면, 모틸린(motilin), 혈관 활성 펩티드(vasoactive intestinal peptide)는 산통 유아에서 비정상적으로 높은 것으로 밝혀졌다. Lothe 등은 후기에 산통이 발병한 유아에서 생후 제1일(first day of life)부터 상승된 수준을 확인하였는데, 이는 유아 산통에서 비정상적 GIT 생리를 암시하였다(Lothe L, Ivansson SA, Ekman R, Lindberg T. Motilin and infantile colic: A prospective study. Acta Pediatr Scand 1990; 79(4): 410-416).

[0009] 앞서 기술된 신경-발달 장애(neuro-developmental disorder)는 복부 경련(abdominal cramping)과 산통이 연동 항진(hyperperistalsis)의 결과임을 암시한다. 이러한 이론은 항콜린성제(anticholinergic agent)의 이용이 산통 증상을 감소시킨다는 증거에 의해 뒷받침된다(Gupta SK. Is colic a gastrointestinal disorder? Curr Opin Pediatr 2002; 14:588-92).

[0010] 대부분의 유아가 4개월이 넘으면 산통에서 벗어난다는 사실은 산통의 신경발생 원인(neurodevelopmental cause)을 뒷받침한다(Barr RG. Colic and crying syndromes in infants. Pediatrics 1998;102(5 suppl E):1282-

6).

- [0011] 전반적으로 수용되는 정의에서, 생균제(probiotic)는 장내 미생물 균형(intestinal microbial balance)을 향상 시킴으로써 숙주 동물(host animal)에 유익한 영향을 주는 생균 영양 보조제(live microbial feed supplement)이다. 상기 정의는 초기에, 가축(farm animal)에 대한 동물 사료(animal feed)의 보충을 지칭하였지만, 이후 인간 상황(human situation)에 보편적으로 적용되고 있다. 인간에 의한 생균제의 주요 소비는 젖산균(*Lactobacillus*)과 비피더스균(*Bifidobacteria*)의 장내 종을 포함하는 유제품(dairy-based food) 형태로 이루어진다. 이러한 정의는 생균제의 소비가 장내 미생물총(intestinal microflora)의 구성에 영향을 준다는 것을 암시한다.
- [0012] 장 생태계(intestinal ecosystem)에 대한 생균제의 이러한 효과는 소비자에게 상당히 유익한 방식으로 영향을 주는 것으로 제안된다. 생균제의 작용을 통한 장내 환경(intestinal milieu)에 변화에 기인한 다수의 잠재적 이점, 예를 들면, 특히, 장의 감염성 질환(infectious disease)에 증가된 내성(resistance), 설사의 감소된 지속 기간, 혈압(blood pressure) 감소, 혈중 콜레스테롤 농도(serum cholesterol concentration) 감소, 알레르기 감소, 말초혈 백혈구(peripheral blood leucocyte)에 의한 식세포작용(phagocytosis)의 촉진, 사이토킨 유전자 발현의 조절, 어쥬번트 효과(adjuvant effect), 종양의 퇴행 및 발암인자(carcinogen) 또는 보조-발암인자(co-carcinogen) 생산에서 감소가 상세하게 보고되었다.
- [0013] Christensen 등은 생균제 젖산균(*Lactobacillus*)이 수상돌기 세포(dendritic cell, DC)의 Th1/Th2/Th3/Tr1/Treg-촉진 능력을 조절함으로써 면역조절 효과(immunomodulatory effect)를 발휘한다는 것을 최초로 보고한 연구자 그룹 중의 하나이다. 이들은 무린 DC가 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)를 비롯한 상이한 젖산균(*Lactobacillus*) 종의 공동-배양액에 노출되면, 이들이 사이토킨 IL-6, IL-10, IL-12와 TNF- α 의 생산 및 MHC 클래스 II와 CD86 표면 마커(surface marker)의 상향-조절(up-regulation)에 대하여 농도 의존성 방식(concentration dependent manner)으로 상이하게 조절된다는 것을 확인하였다. 모든 젖산균(*Lactobacillus*)은 표면 MHC 클래스 II와 CD86 마커(DC 성숙을 지시함)를 상향 조절하였다. 이들 연구에서 특히 주목되는 점은 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)(균주 12246)가 불량한 IL-12 유도물질이지만, 락토바실러스 존 소닐(*L. johnsonii*) 또는 락토바실러스 카제이(*L. casei*)와 공동-배양되면 이들 두 종에 의해 촉진되는 친염증성 사이토킨 신호(proinflammatory cytokine signal) IL-12, IL-6과 TNF- α 의 생산을 차별적으로 저해한다는 것이었다. IL-10 생산은 이들 조건 하에 변화가 없었다.
- [0014] 이들 조사 결과는 "락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)가 '위험 신호'를 갖지 않는 항원에 대한 내성(tolerance)을 긍정하는 장내 수상돌기 세포(intestinal dendritic cell) 발생의 환경 조절(environmental modulation)에 기여하고, 이와 동시에 LPS와 같은 위험 신호를 통하여 인식되는 병원균(pathogen)에 대응하는 능력을 유지시키며", "락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)가 항염증성 IL-10을 유도하면서 IL-12와 TNF- α (및 IL-6)의 생산을 하향 조절하는데 효과적인 잠재적 정밀-표적된 치료이고, 친염증성 장내 사이토킨 환경을 상쇄시키는 대안적 치료 접근법(alternative therapeutic approach)을 대표할 수 있으며", 따라서 "섭취된 생균제를 비롯한 장 미생물총(gut microflora)의 구성에 따라, 장을 조절하는 Th1/Th2/Th3 유도 능력(driving capacity)의 잠재력이 존재한다"라는 결론을 이끌어냈다(Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J Immunol 168 171-178).
- [0015] Smits 등은 이들 조사결과를 확장하고, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)가 DC를 자극하여 T 조절(TR) 세포 생산을 촉진하는 능력을 갖는다는 것을 확인하였다. 이들은 인간 단핵구-유래된 DC와 함께 시험관내에서 공동-배양된 3가지 상이한 젖산균(*Lactobacillus*) 종을 이용하였다. 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) 균주를 제외하고, 이들 젖산균(*Lactobacillus*) 중에서 2가지, 인간 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주(ATCC 53609)와 락토바실러스 카제이(*L. casei*)는 이들 DC를 자극하여 TR 세포의 발달을 촉진하였다. 이들 TR 세포는 증가된 수준의 IL-10을 생산하고, IL-10-의존성 방식으로 방관자(bystander) T 세포의 증식을 저해할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, Zaat BAJ, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg L (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 115 1260-1267).
- [0016] 숙주 자체에 대한 경구 투여된 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)의 효과와 관련된 첫 번째 증거 중의 하나는 병

아리 회장(chick ileum)에서 관찰되는 증가된 CD4+/CD8+ T 세포 비율(cell ratio)이었다(Walter J. Dobrogosz, NUTRAfoods 2005 4(2/3) 15-28). 최근에, Valeur 등은 이러한 관찰 결과를 인간 회장까지 확대하였다. 이들은 (a) 장 전체에서 개별 인간-특이적 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730 세포의 분포 및 (b) 장의 회장 영역(ileal region) 내에서 특이적으로 CD4+ T 세포의 동원(recruitment) 및/또는 증식(proliferation)에서 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730의 명백한 관여를 보이는 인간 개체에서 직접적인 *in situ* 증거를 획득하였다. 이들은 "락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 투여가 인간 상피세포에 CD4+ T-보조 세포의 동원을 유도하였다. 이러한 동원은 인간에서 상기 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 균주의 생균 효과(probiotic effect)를 설명함에 있어 한 가지 인자일 수 있다"라고 결론하였다(Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract, *Appl Environ Microbiol* 70 1176-1181).

[0017] 툴 유사 수용체(toll like receptor, TLR)는 미생물 모티프(microbial motif)를 인식하고 일단의 유전자를 활성화시켜 사이토킨 생산을 유도한다. 전통적으로, TLR은 미생물 감염(microbial infection)의 센서(sensor)로서 간주되었는데, 이들의 역할은 염증 반응(inflammatory response)을 유도하는 것이다. 하지만, TLR에 의해 인식되는 모티프는 병원균에 대하여 특이적이지 않고 전체 종류의 미생물에 의해 공유되는 특수하지 않은 모티프이고, 면역계(immune system)가 TLR을 통하여 공생 세균(commensal bacteria)과 병원성 세균(pathogenic bacteria)을 어떻게 구별하는지는 아직 완전하게 이해되지 않고 있다. 최근의 데이터에서, TLR은 염증 반응의 유도에서 역할에도 불구하고, 공생 미생물총(commensal microflora)을 인식함으로써 장 항상성(intestinal homeostasis)을 유지하는데 일정한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):229-41).

[0018] 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)를 비롯한 다양한 젖산균(*Lactobacillus*) 종의 균주는 생균 제제(probiotic formulation)에 이용되고 있다. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)는 동물의 위장관(gastrointestinal tract)의 자연 발생 거주체 중의 하나이고, 인간을 비롯한 건강한 동물의 장에서 일상적으로 발견된다. 이는 항균 활성(antimicrobial activity)을 갖는 것으로 알려져 있다(참조: U.S. Patent No. 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238, 5,849,289). 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 세포가 글리세롤(glycerol)의 존재에서 혐기성 조건(anaerobic condition) 하에 성장되는 경우에, 이들은 β-하이드록시-프로피온알데히드(β-hydroxy-propionaldehyde, 3-HPA)로 알려져 있는 항균 물질(antimicrobial substance)을 생산한다.

[0019] 장 면역계(intestinal immune system)와 공생 균총(commensal flora) 사이에 명백하고 복잡한 관계가 존재한다. 최근에, 내장 내인성 균총(luminal endogenous flora)은 장 상피 세포(intestinal epithelial cell)에 위치하는 툴-유사 수용체(toll-like receptor, TLR)와 NOD-수용체의 활성화를 통하여 세균-유도된 선천성 숙주 반응(innate host response)과 후천성 숙주 반응(adaptive host response)의 핵심 과정을 개시할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Haller D, Jobin C. Interaction between resident luminal bacteria and the host: can a healthy relationship turn sour? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 123-36. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241). 동물 모형에서, 사이토킨은 신경-과 근육-면역 상호작용(immune interaction)을 통하여 장 신경근육조직(enteric neuromusculature)의 과반사 반응(hyper-reflex response)을 개시할 수 있다(Milla PJ. Inflammatory cells and the regulation of gut motility. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: S750).

[0020] 실험 연구와 임상 연구에서, 특정 생균제 균주는 T 세포의 증식을 저해하고 Th1과 Th2 사이토킨 모두의 분비를 감소시키며, 또한 억제성 사이토킨, 예를 들면, IL-10과 TGF-β를 우선적으로 생산하는 것으로 밝혀졌다(Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infants. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-121). 더 나아가, 인간 지원자에서, 락토바실러스(*L. reuteri*)는 인간 위장관 내에 균체를 형성하고, 인간 회장 상피(human ileum epithelium)에서 CD4+ T-보조 세포의 동원을 비롯한 면역조절 활성(immunomodulatory activity)을 발휘할 수 있다(Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1176-81). DC의 성숙(maturation)은 미성숙 DC를 성숙 항원 제시 세포(antigen presenting cell)로 전환시키는 과정인데, 이들 세포는 림프절(lymph node)로 이동한다. 이러한 과정은 미성숙 DC를 특징짓는 강력한 항원 흡입 능력(antigen uptake capacity)의 상실 및 보조-자극 분자(co-stimulatory

molecule) 발현과 다양한 사이토킨의 상향 조절(upregulation)을 결과한다(Mellman I, Steinman RM: Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001, 106:255-8. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000, 18:767-811).

[0021] 공지된 성숙 프로토콜(maturation protocol)은 항원에 노출 동안 또는 노출 이후에 DC가 직면하는 것으로 생각되는 환경에 기초한다. 이러한 접근법의 최적 실패는 단핵구-조건 배지(monocyte-conditioned media, MCM)의 이용이다. MCM은 단핵구를 배양하고, 이후 성숙 인자(maturation factor)의 공급원으로서 배양 상층액을 이용함으로써 시험관내에서 산출된다. 성숙을 담당하는 MCM에서 주요 성분은 친-염증성 사이토킨인 인터루킨-1 베타(IL-1 β), IL-6과 TNF- α 이다(Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N: A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. Blood 1997, 90:3640-6.). 성숙 DC는 다양한 사이토킨을 생산하는데, 이들은 T 세포 반응을 촉진하고 감독한다. 이들 사이토킨 중에서 2가지는 IL-10과 IL-12이다. 이들 사이토킨은 유도된 T 세포 반응의 감독에서 상반되는 효과를 나타낸다: IL-12는 Th1 타입 반응을 유도하는 반면, IL-10은 이런 반응을 저해한다.

[0022] 따라서, DC를 비롯한 APC(항원 제시 세포)의 활성화 상태(activation state)는 CD4+T 세포 반응의 유형과 크기(magnitude)를 결정한다. 휴지기 APC(흉선(thymus)에서 상피 세포 포함)는 CD4+CD25+TR 세포의 발달을 촉진할 수 있다. 병원균에 의한 감염 동안, TLR에 의한 미생물 분자(microbial molecule)의 인식은 APC의 활성화를 결과한다. APC는 이후, IL-6과 추가의 가용성 인자(soluble factor)를 생산하는데, 이들은 서로 함께 TR 세포의 억제 효과(suppressive effect)를 극복하고 상기 병원균에 대한 TE(T 작동체 세포) 세포의 효율적인 생산을 가능하게 한다. 휴지기 APC와 활성화된 APC 사이에 동적 균형(dynamic equilibrium) 역시 TR과 TE 세포 둘 모두의 작용에 의한 영향을 받을 것이다(도 1).

[0023] Pessi et al. (2000)에서는 경구 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) GG 이후에 아토피 아동에서 IL-10 생산을 기술한다. 하지만, 본 발명과 달리, 상기 연구에서는 운동성 질환(motility disorder)과 산통을 억제하는 능력에 대하여 선별된, 많은 양의 IL-10을 생산하는 능력을 가진 균주를 특정적으로 기술하지 못하였다(Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus*. GG. Clin Exp Allergy. 2000 Dec;30(12): 1804-8).

[0024] Hermelijn et al. (2005)에서는 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)와 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)가 단핵구-유도된 DC를 자극하여 TR 세포의 발달을 유도하는 반면, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)이 그렇지 못하다는 것을 보여준다. 이들 TR 세포는 증가된 수준의 IL-10을 생산하였다. 본 발명과 달리, 상기 연구에서는 IL-10 상승을 장 이동성(gut motility) 또는 산통과 연결시키지 못하였다. 균주와 관련해서도, 상기 연구에서는 2가지 상이한 세균 종이 IL-10 수준을 증가시키는데 유효하다고 기술하였다. 이는 동일한 종의 상이한 균주가 IL-10 수준을 증가시키는데 있어 상이한 능력을 갖기 때문에 산통을 감소시키는데 가장 효과적인 생균제가 균주 수준에서 결정되고 선별되어야 한다는 것을 증명한 본 발명과 대비된다.

[0025] 현재, 산통에 대한 치료제는 없다. 산통에 대한 현재의 치료 패러다임(treatment paradigm)은 약리학 및/또는 비-약리학 방법으로 구성되고, 기껏해야 증상의 약간 감소를 제공할 뿐이다. 부모에게 제공되는 산통에 대한 전형적인 치료 개입(therapeutic intervention)은 식이(dietary), 신체(physical), 행동(behavioral)과 약리(pharmacological)를 비롯한 4가지 범주 내에 속한다. 식이 조절(dietary manipulation)에는 다양한 수유 기술에 대한 전문적인 권고, 또는 저알레르기성 우유의 이용, 콩이나 락토오스-없는 이유식(formulas) 및 고형물료 조기 도입이 포함된다(Lothe, L., et al. cow's milk formula as a cause of infantile colic: a double-blind study. Pediatrics 1982; 70:7-10; Forsyth B W C. colic and the effect of changing formulas: a double-blind multiple-crossover study. J Pediatr 1989;115,521-6; Treem, W R, et al. Evaluation of the effect of a fiber-enriched formula on infantile colic. J Pediatr 1991; 119:695-701). 하지만, 콩 이유식의 이용, 또는 수유 기술에서 변화가 모든 사례의 산통에 효과적으로 작용하는 것은 아니다. 이들 권고사항을 연구하는 데이터의 재검토에서, 저알레르기성 이유식, 예를 들면, 부분적으로 가수분해된 또는 아미노산-기초된 이유식의 이용은 유아 중에서 대략 25% 정도에게만 도움을 주는 것으로 밝혀졌다(Lucassen, P L B J, et al. Infantile colic: crying time reduction with a whey hydrolysate: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. Pediatrics 2000; 106: 1349-54; Estep, D C, et al. Treatment of infant colic with amino acid-based infant formula: a preliminary study. Acta Paediatr 2000;89:22-7).

[0026] 산통의 관리를 위한 신체적 전략에는 가스 생산/환류를 완화시키기 위한 신체 위치(body position)의 물리적 이

동, 복부 압력 가하기, 또는 신체 마사지가 포함된다. 다른 방법에는 산통의 유아 인식(infant awareness)을 최소화시키는 산만함(sense of distraction) 유발, 예를 들면, 유아 차 태우기, 승차 시뮬레이터(car ride simulator), 유아용 진동기(crib vibrator), 또는 유아용 그네(infant swing)의 이용 등이 포함된다(Lipton E L. Swaddling and child care practice: historical, cultural and experimental observations. *Pediatrics* 1965;35:521-67; Byrne J M, Horowitz F D. Rocking as a soothing intervention: the influence of direction and type of movement. *Infant Behav Dev* 1981;4:207-18).

[0027] 다른 접근법은 유아를 달래주는 것으로 생각되는 녹음 소리를 들려주는 것이다. 하지만, 의학 문헌에서 이들 방법은 효과가 없는 것으로 보고되고 있다(Parkin P C, Schwartz C J, Manuel B A. Randomized controlled trial of three interventions in the management of persistent crying of infancy. *Pediatrics* 1993;92(2): 197-201). 이들 전략은 기껏해야, 산통 증상의 감소에서 약간의 효과를 나타낼 뿐이다.

[0028] 산통 치료를 위한 행동 개입의 권고사항은 가장 일관성이 없는 요법이다. 일부 연구자는 감각 자극(sensory stimulation)을 증가시키는 것을 주장하는 반면, 다른 연구자는 이런 자극을 감소시키는 것을 주장한다(Balon A J. Management of infantile colic. *Amer Pham Physician* 1997; 55:235-242; Lucassen P L B J, Assendelft W J J, Gubbels J W, van Eijk T M, van Geldrop W J, Effectiveness of treatments for infantile colic: systematic review. *BMJ* 1998;316(5): 1563-9; Carey W B, "Colic"--primary excessive crying as an infant-environmental interaction. *Pediatr Clin North Am* 1984;31:993-1005). 다른 권고사항에는 울음에 대한 조기 대응, 또는 유아가 울도록 내버려 두기, 고무젖꼭지(pacifier) 물리기, 규칙적인 수유 일정의 이행, 시선 마주침(eye contact)과 쌍방향 게임(interactive playing)이 포함된다.

[0029] 산통 치료를 위한 약리학적 개입은 처방과 비-처방 약제의 이용으로 이어졌다. 현재 이용되는 처방 약제에는 증상 완화를 제공하긴 하지만 추최외로 증상(extra pyramidal symptoms), 호흡 장애(respiratory depression)와 변비(constipation)를 비롯한 위험을 내포하는 벨라도나 알칼로이드(belladonna alkaloid)와 아편제(opiate)(paregoric)가 포함된다. 가령, 아트로핀(atropine)과 효과에서 유사한 항콜린성제(anticholinergic drug), 예를 들면, 히오시아민(Hyoscyamine)(LEVISINE[®]), 또는 GASTROSED[®])과 디사이클로민(Dicyclomine)은 동공(pupil)을 확대시키고, 심장 박동(heart rate)을 증가시키고, 타액(saliva)의 생산을 감소시키고, 위장관과 요로(urinary tract) 및 기관지(bronchi)의 경련을 완화시킨다. 이들 항콜린성제가 유아 산통을 효과적으로 치료하는 것으로 일관되게 확인된, 미국에서 시판되는 유일한 처방 약제이긴 하지만, 유감스럽게도, 치료된 유아의 최대 5%에서 호흡 곤란(breathing difficulty), 일시 호흡 정지(apnea), 발작(seizure), 졸도(syncope), 질식(asphyxia), 혼수(coma)와 근육 긴장감퇴(muscular hypotonia)를 비롯한 부작용이 발생하고 있다(Williams J, Watkin-Jones R. Dicyclomine: worrying symptoms associated with its use in some small babies (*BMJ* 1984;288:901; Myers J H, Moro-Sutherland D, Shook J E. Anticholinergic poisoning in colicky infants treated with hyoscyamine sulfate. *Am J Emerg Med* 1997;15:532-5). 이에 더하여, 디사이클로민을 복용한 유아에서 여러 사망 사례가 보고되었다(Garriott J C, Rodriguez R, Norton L E. Two cases of death involving dicyclomine in infants. *Clinical Toxicol* 1984;22(5) :455-462).

[0030] 유아 산통에 효과적인 치료제로서 보고된 비-처방 약제에는 고용량(supraphysiologic) 디펜히드라민(diphenhydramine)(BENADRYL[®]), 페노바르비탈(phenobarbital), 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate) 및 심지어 알코올을 비롯한 여러 진정 또는 수면-유도 약물이 포함된다. 하지만, 호흡기 질환을 앓는 아동에서 이들 약물과 연관된 심각한 부작용의 잠재적 가능성이 존재하고, 따라서 산통 치료에서 이들의 폭넓은 이용이 제한된다(Balon A J. Management of infantile colic. *Amer Pham Physician* 1997;55:235-242; Gurry D. Infantile colic. *Australian Pham Phys* 1994;23(3):337-34632).

[0031] 산통 치료를 위한 더욱 안전한 비-처방 약물 치료에는 거의 대부분, 장내 가스 기포(intestinal gas bubble)의 크기를 감소시키는 비-흡수성 일반 의약품(non-absorbable, over-the-counter drug)인 시메티콘(simethicone) 또는 디메틸폴리실록산(dimethylpolysiloxane)의 투여가 포함된다. 시메티콘은 매우 안전한 프로파일(profile)을 보유하고 빈번하게 권고되긴 하지만, 여러 연구에서 유아 산통에 대한 시메티콘의 효능은 위약 수준에 불과한 것으로 확인되었다(Metcalf, T J, et al, *Pediatrics* 1994 July; 94(1) :29-34. Sferra, T J, et al., *Pediatr Clin North Am* 1996 April; 43(2):489-510. Danielson, B. et al., *Acta Paediatr Scand* 1985 May; 74(3):446-50. Colon, A R, et al., *Am Fam Physician* 1989 December; 40(6): 122-4.). 결과적으로, 현재 시점에서 산통에 대한 가장 일반적인 치료는 유아가 이러한 장애로부터 벗어날 때까지 그냥 기다리는 것이다.

[0032] 이런 이유로, 유아와 영아에서 산통을 치료하는데 유용한 안전하고 효과적인 화합물과 조성물 및 기술이 요구된

다. 본 발명의 조성물과 방법은 유아에서 산통과 연관된 증상을 안전하고 효과적으로 치료할 수 있는 산물을 제 공함으로써 이러한 요구를 충족시킨다. 특히 출원 EP1364483A10에서는 유아에서 장-신경근육 비정상(gut-neuromuscular abnormality), 예를 들면, 산통의 치료를 위한 생균제를 기술한다. 상기 출원에서는 생균제로서, 여러 상이한 세균 종을 언급한다. 본 발명의 발명자들이 동일한 종의 균주 사이에서도 IL-10 생산 촉진에서 상당한 차이가 존재한다는 것을 증명했다는 점에서, 상기 출원은 산통을 감소시키는데 가장 효과적인 생균제가 전 체 세균 종이 아닌 IL-10 수준을 증가시키는데 효과적인 선별된 특정 유산균 균주인 본 발명과 대비된다.

[0033] 2005년에 Savino는 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730로 보충이 시메티콘을 이용한 표준 요법 (standard therapy)과 비교하여, 모유-수유 유아에서 7일 이내의 치료로 산통 증상을 현저하게 향상시킨다는 것 을 증명하였다. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 치료에 대한 반응 속도(response rate)는 95%인 반면, 시메티 콘에는 7%의 유아만 반응하였다. Savino는 이러한 결과를 the European Society for Pediatric Research (ESPR), Meeting August 31, 2005 - September 3, 2005, Siena, Italy (Pediatr Res. 2005;58(2): 411)에 제 출하였다. Savino의 결과가 유익한 효과를 보여주긴 하지만, 그는 IL-10의 생산을 촉진하는 특정 균주 및 장 이 동성(gut motility)과 결과적으로, 산통 사이의 관계를 인식하지 못하였다. 본 발명에서는 이와 같은 최적 균주 를 선별하는 방법을 제시한다.

[0034] Collins는 운동 기능(motor function)의 교란이 다양한 장 영역 내에서 염증(inflammation) 또는 면역 활성화 (immune activation)의 상황에서 발생하고 공통의 존재(entity)를 포함하는 다양한 증상, 예를 들면, 식도염 (esophagitis), 위염(gastritis)과 특발성 염증성 장 질환(idiopathic inflammatory bowel disease, IBD)을 유 발한다고 기술하였다. 이들 관찰 결과는 장의 이동성 역시 면역계의 영향을 받는다는 것을 암시한다. 이러한 배 경에서, 운동계(motor system)는 내강(lumen) 내에 존재하는 유해 자극으로부터 장을 방어하는데 있어 중요한 역할을 수행할 수도 있다(Collins S., The Immunomodulation of Enteric Neuromuscular Function: Implications for Motility and Inflammatory Disorders. Gastroenterology 1996; 111 :1683-1699). 이러한 개념은 예로써, Vantrappen 등의 관찰 결과에 의해 반영되는데, 이들은 소장(small intestine) 내에서 세균 과 다성장(bacterial overgrowth)이 소장 내에서 소화간 이동성(interdigestive motility)의 정상적인 순환 패턴 (cyclic pattern)의 교란을 동반한다는 것을 증명하였다(Vantrappen G, Jannssens J, Hellemans J, Ghoois Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. J Clin Invest 1977; 9:1158-1168).

[0035] 상승된 IL-10 수준은 과다-활성화된 면역계를 억제하는 것으로 널리 알려져 있다. 또한, 장 이동성은 장 면역계 에 연관된 신경 신호(neurological signal)에 의해 통제되고, 산통은 예로써, 세균 과다성장에 기인한 증가된 장 이동성의 결과인 것으로 이미 확인되었다.

[0036] 선진국에서는 위생 조치(hygienic measure)가 출산과 동시에 시작되는데, 이는 모체의 장 미생물총을 흡수하는 신생아(neonate) 수용력을 교란한다. 결과적으로, 상이한 미생물총이 유아에서 확립된다. 이들 신생아들은 예로 써, 대장균(*Escherichia coli*)과 젖산균(*Lactobacillus*)을 보유하는 대신에, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 다른 피부 세균이 더욱 빈번하게 균체를 형성한다.

[0037] 본 발명의 발명자들은 피부 세균의 과다성장이 신체의 면역계를 과다-활성화시켜 과다-활성화된 장 이동성 및 결과적으로, 산통을 유발하는 반면, IL-10 생산을 촉진하는 능력을 가진 더욱 많은 수의 특이적인 장 세균, 예 를 들면, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938이 TR 시스템의 성숙, 다시 말하면, CD4+CD25+TR 세포의 증식을 결과한다는 예상치 않은 발견을 하였다. CD4+CD25+ 세포의 상향 조절은 잠잠해진 장 이동성 및 결과적으 로, 산통 유아에 대한 유익한 효과를 결과한다.

[0038] 이들 조사 결과로 인하여, IL-10 증가 특성에 대한 비병원성 세균 균주가 선별되었는데, 놀랍게도, 이들 균주의 이러한 특성은 유아 산통에서 감소와 상관하는 것으로 밝혀졌다. 결과적으로, 본 발명은 산통의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조에서 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938 및 동일한 방식으로 선별된 다른 균 주의 용도에 관계한다.

[0039] 본 발명의 다른 목적은 인간을 비롯한 동물 투여용으로 이들 균주를 포함하는 산물을 제시하는 것이다. 다른 목 적과 이점은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백할 것이다.

[0040] 본 발명의 요약

[0041] 본 발명에서는 산통의 예방 및/또는 치료를 위한, IL-10의 생산 및 결과적으로, CD4+CD25+ TR 세포의 증식을 촉 진하는 능력에 대하여 선별된 특정의 유산균(lactic acid bacteria) 균주, 이들 균주를 선별하는 방법 및 이들

균주를 포함하는 산물을 제시한다.

[0042] 본 발명의 다른 목적과 특징은 아래의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 더욱 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

[0045] 장 내에 피부 세균의 군체 형성(colonization) 및 TR-세포의 결핍은 신생아의 면역계를 과다-활성화시켜 과다-활성화된 장 이동성 및 결과적으로, 산통을 유발한다. IL-10 생산을 촉진할 수 있는 능력을 가진 더욱 많은 수의 특이적인 장 세균 세포, 예를 들면, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938은 TR 시스템의 성숙, 다시 말하면, CD4+CD25+TR 세포의 증식을 결과한다. 여러 연구자들, 예를 들면, Rautava 등(상기)에 의해, 다른 젖산균(*Lactobacillus*) 균주가 IL-10의 생산을 유도하는 것으로 이전에 보고되었다. CD4+CD25+ 세포의 상향 조절은 잠잠해진 장 이동성 및 결과적으로, 산통에 대한 유익한 효과를 결과하였다. 놀랍게도, 사이토킨 IL-10 수준에서 증가를 유도하는 이들 균주는 평균 울음 시간(average crying time)(실시예 2)을 감소시킬 수 있는 동일한 균주인 것으로 밝혀졌다.

[0046] 본 발명에서는 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938을 비롯하여 산통을 감소시키는 능력에 대하여 선별된 유산균 균주를 제시한다. 이들 균주로부터 유래된 완전 세포 또는 구성요소를 포함하는 식품(food), 영양 보조제(nutritional additive)와 제제(formulation), 약제(pharmaceuticals) 또는 의료 장치(medical device)와 같은 산물은 당분야에 공지된 바와 같이 제조될 수 있고, 일반적으로, 공지된 섭취가능 서포트(ingestible support) + 젖산균(*Lactobacillus*) 균주 또는 이로부터 유래된 성분을 포함한다.

[0047] 단핵구-유래된 DC에서 IL-10의 생산을 촉진하는 능력 및 결과적으로, CD4+CD25+TR 세포의 발달을 유도하는 능력에 대하여 젖산균(*Lactobacillus*) 균주를 선별하는 방법으로서 시험관내연구가 이용될 수 있다(실시예 1)

[0048] 데이터에서는 특정 균주 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730과 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938에 의한 IL-10의 강력한 촉진을 지시하고, 이러한 조절이 후기 대수 증식기(late log phase)/정체 성장기(stationary growth phase) 동안 이들 두 특정 균주에 의해 성장 배지(growth medium) 내로 방출된 물질에 의해 매개된다는 것을 증명한다. 대조적으로, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)의 다른 두 균주는 적절한 IL-10 생산을 촉진할 수 없었다.

[0049] 산통을 예방하거나 치료하기 위한 이들 선별된 균주의 임상적 의의(clinical relevance)를 확인하기 위하여, 유아 산통으로 진단된 모유-수유 유아에서 추가의 연구가 수행된다.

[0050] 본 발명의 이들 특징은 아래의 실시예를 참조하면 더욱 명확하게 이해되지만, 이들 실시예는 본 발명을 한정하지 않는다.

실시예

[0051] 실시예 1.

[0052] 단핵구-유래된 DC에 의한 IL-10 발현을 촉진하는 생균제 균주 능력에 관한 연구:

[0053] 미성숙 DC는 10% FCS(HyClone, Logan, UT), 재조합 인간(rh) GM-CSF(500 U/ml; Schering-Plough, Uden, The Netherlands)와 rhIL-4(250 U/ml; Pharma Biotechnologie Hannover, Hannover, Germany)를 포함하는 IMDM(Life Technologies, Paisley, U.K.)에서 배양된 말초혈 단핵구(Hilkens, C. M. U., P. Kalinski, M. de Boer, and Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. Blood 90: 1920)로부터 생성한다(Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. J. Immunol. 162:3231).

[0054] 본 실시예에서 조사되는 균주는 ATCC(Manassas, VA, USA and DSMZ, Braunschweig, Germany)로부터 입수가 가능한 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC 55730, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938, 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 4660 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 4964이다. 균주는 6.25% 양 혈액(sheep blood)을 포함하는 Columbia agar(Oxoid, Basingstoke, United Kingdom)에서 배양한다. 젖산균(*Lactobacillus*)은 5% CO₂ 대기에서 37°C에서 배양한다. 3

일후, 세균의 수는 620 nm(OD620)에서 흡광도(optical density)를 측정함으로써 결정한다. 전형적으로, 0.35의 OD620은 모든 검사 균주에서 1×10^8 군체-형성 단위(colony-forming unit, cfu)에 상응한다.

[0055] 6일 시점에, 미성숙 DC의 성숙은 성숙 인자(maturation factor)로서 함께 이용되는 사이토킨 IL-1 β (25 ng/ml)와 TNF- α (50 ng/ml)(Peprotech(Rocky Hill, NJ)로부터 구입된 사이토킨)의 조합의 존재에서, LPS(E coli; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo)와 검사 젖산균(*Lactobacillus*)으로 유도한다.

[0056] 성숙 DC에 의한 IL-12, IL-10과 IL-6 사이토킨 생산은 Vieira PL, et. al. (Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. J Immunol 2000;164:4507-12)에 기술된 바와 같이, CD40 리간드-발현 생쥐 형질세포종(plasmacytoma) 세포(J558)에 의한 24-시간 자극으로 결정한다. 상층액은 24시간 후에 수확하고, IL-10의 농도는 ELISA로 측정한다. 결과는 도 2를 참조한다. 이들 결과에서 알 수 있는 바와 같이, DC에 의한 IL-10 생산을 촉진하는 능력에서 상이한 젖산균(*Lactobacillus*) 균주에 의한 영향에서 상당한 차이가 존재한다.

[0057] 실시예 2

[0058] 유아 산통의 치료에서 선별된 생균제 균주 vs. 시메티콘

[0059] 유아 산통으로 진단된 모유-수유 유아는 the Department of Pediatric and Adolescence Science (Drottning Silvias University Hospital, Goteborg)에 등록된다. 2500 내지 4000g의 출생시 체중(birth weight)으로 임신 기간(gestational age)에 적합하고, 산통 증상이 Wessel 기준을 충족하고 등록에 앞서 거의 6 ± 1 일 시점에 발병한 21-90일령 유아 환자가 본 연구에 포함(inclusion)이 고려된다(Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS, Detwiler AC. Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called "colic". Pediatrics 1954; 14: 421-35). 등록된 모든 유아는 생균제에 대한 반응에 영향을 주는 식이 변화에 따른 장내 미생물총에서 변동성(variability)을 감소시키기 위하여 오로지 모유-수유된다. 만성 질환(chronic illness) 또는 위장 질환(gastrointestinal disorder)의 임상적 증거가 관찰되었거나, 또는 등록 이전의 주(week)에 항생제 또는 생균제를 복용한 유아는 배제된다.

[0060] 본 연구에서, 산통 유아는 아래의 치료 군에서 생균제 또는 시메티콘을 복용하도록 무작위화된다:

[0061] (P1) SD2112로 불리는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC 55730,

[0062] (P2) 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 DSM 17938(Budapest Treaty 하에 2006년 2월 6일자로 DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig에 기탁됨),

[0063] (P3) 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 균주 ATCC PTA 4660,

[0064] (S) 시메티콘

[0065] 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)는 28일 동안 일일 1회, 수유후 30분 시점에 상업적으로 가용한 MCT-오일(중쇄 트리글리세리드 오일) 현탁액 5 방울로 10^8 군체 형성 단위(colony forming unit, CFU)의 용량으로 투여한다. MCT 오일은 자연적으로 생성되는데, 가장 풍부한 공급원은 코코넛 오일(coconut oil)이다. 대부분의 MCT 오일은 코코넛 오일로부터 정제된다. MCT 오일은 향이 없고 점도(viscosity)가 낮으며 투명하고 밝은 색 액체이다. 이러한 오일 현탁액은 2-8 $^{\circ}$ C에서 21개월 동안 안정하다(제조업체, BioGaia AB(Stockholm, Sweden)에 의해 상세히 보고됨)(MCT 오일의 대체 공급원은 Karlshamns AB(Karlshamn, Sweden)에 의한 Akomed R이다). 본 연구 동안, 부모들에게 상기 산물을 사용하지 않으면 냉동 보관하도록 지시한다. 시메티콘(S)은 28일 동안 일일 2회, 수유 후 3 ml의 상업적으로 가용한 용액(Mylicon Infants Gas Relief Drops, J&J, 7050 Camp Hill Rd., Fort Washington, Pennsylvania, 19034-2210, USA)에서 60 mg/day의 용량으로 제공한다. 등록 시에, 모든 엄마들에게 보고된 바와 같이, 우유-없는 식이를 따르도록 지시한다: 우유, 요구르트, 비숙성 치즈(fresh cheese)와 숙성 치즈(strong cheese), 크림, 버터, 비스킷의 회피. 이러한 식이의 고수는 전체 치료 기간 동안 지속되는 식이 일기기법(diet diary)으로 모니터한다. 7일, 14일, 21일과 28일 시점에, 연구자들 중의 한명이 이러한 식이에 순응도(compliance)를 검사한다.

[0066] 상기 기관의 윤리 위원회(Ethical Committee)는 이러한 연구 프로토콜(study protocol)을 승인하였고, 유아는 부모로부터 서면 동의서(written informed consent)를 받은 이후에만 본 연구에 등록된다.

[0067] 추적 방문(follow-up visit)

[0068] 소아과 의사가 유아를 처음 진찰하는 일자 는 -1일(Day -1)로 규정된다. 이 일자에, 각 유아는 건강 진단(medical examination)을 실시하고, 출산 유형, 출생시 체중(birth weight)과 임신 기간(gestational age), 위장 질환과 아토피의 가족력(family history)과 관련된 배경 데이터(background data)를 확보하기 위하여 부모들을 인터뷰 하였다. 특히, 아토피는 이들 유아의 한명 이상의 가족 구성원(엄마, 아빠 및/또는 형제)이 아토피성 습진(atopic eczema), 알레르기성 비염(allergic rhinitis) 또는 천식(asthma)을 앓은 적이 있으면 양성(positive)으로 간주되었다. 게다가, 본 연구 기간 동안 아토피 질환의 임의의 징후와 증상을 기록하였다. 부모에게는 또한, 등록 익일[0일(Day 0)]에 일일 평균 울음 시간(daily average crying time) 및 산통 에피소드(colic episode)의 횟수에 관한 데이터를 기록하도록 요청하였다. 의사는 이들 유아를 연구 군중 하나에 무작위 지정하였다. 연구 산물(study product)의 투여는 1일(Day 1)에 시작하였다.

[0069] 부모에게 본 연구에 관한 서면 정보를 제공하고, 구조화된 일기기법(structured diary)을 이용하여 0일에서부터 28일까지, 달랠 수 없는 울음 에피소드(crying episode)의 일일 횟수와 이들의 지속 시간, 대변 경도(stool consistency)와 빈도 및 임의의 관찰된 부작용(constipation, vomiting, cutaneous reactions, etc)을 기록하도록 요청하였다. 모든 부모가 균일한 방식으로 울음 시간(crying time)을 기록하고 유아에게 정확한 약제가 제공되도록 담보하기 위하여, 연구자들 중의 한명은 부모에게 자문하도록 전화상으로 항상 대기하였다.

[0070] 각 환자는 1일, 7일, 14일, 21일과 28일에 동일한 소아과 의사가 재검하였다.

[0071] 결과

[0072] 등록된 120명의 모유-수유 산통 유아 중에서, 30명은 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730(P1) 치료에, 30명은 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) DSM 17938(P2) 치료에, 30명은 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC PTA 4660(P3) 치료에, 30명은 시메티콘(S)에 무작위 지정되었다. 어떤 유아도 본 시험과 관련된 부작용으로 인하여 중도 탈락하지 않았다. 이들 군은 연령, 출생시 체중, 성별, 출산 유형, 아토피 또는 위장 질환의 가족력 및 흡연에 노출과 관련하여 유사하였다.

[0073] 일일 평균 울음 시간은 0일과 1일에 치료 군에서 유사하였다. 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730(P1)과 DSM 17938(P2)을 복용하는 유아는 ATCC PTA 4660과 시메티콘으로 치료된 유아와 비교하여, 7일에 일일 울음 시간에서 유의한 감소를 보였다. 14일, 21일과 28일에, 울음 시간은 이들 4 치료 군간에 유의하게 상이하였다. 연구 시작에서 종결 시점까지 일일 평균 울음 시간에서 (P1)과 (S) 간에 차이 및 연구 시작에서 종결 시점까지 일일 평균 울음 시간에서 (P2)와 (S) 간에 차이는 28일에, 각각 82분과 83분이었다(표 1). 이들 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 검사 산물(test product)의 투여 이전에는 이들 4 치료 군은 상당히 동등하였다. 7일후 시점에 이미, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 55730과 DSM 17938은 다른 2가지 대안과 비교하여 긍정적인 차이를 명백하게 보였다. 28일후, 이러한 차이는 더욱 확대되었다.

표 1

[0074] 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 군과 시메티콘 군에서 울음 시간(일일 평균 시간(min)).

산통 유아 N=120	락토바실러스 루테리 (<i>L. reuteri</i>) ATCC 55730 N=30	락토바실러스 루테리(<i>L. reuteri</i>) DSM 17938 N=30	락토바실러스 루테리(<i>L. reuteri</i>) ATCC PTA 4660 N=30	시메티콘 N=30
0일	206	203	204	205
1일	191	190	198	194
7일	147	148	171	172
14일	98	100	156	155
21일	75	77	150	148
28일	58	59	145	141

[0075] 본 발명은 특정 구체예에 관하여 기술되긴 했지만, 본 발명의 기술적 사상 또는 범위를 벗어나지 않은 다양한 개변이 가능하고, 따라서 이런 개변은 본 발명의 범위 내에 속한다.

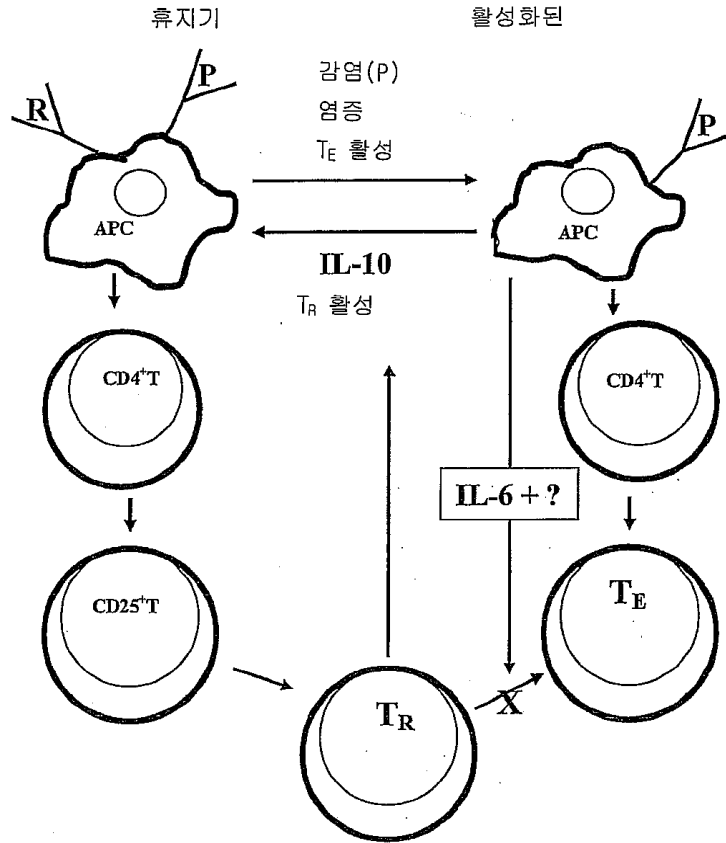
도면의 간단한 설명

도 1. CD4+CD25+TR 세포의 발달을 촉진함에 있어 특성의 선별된 유산균 균주에 대한 제안된 역할.

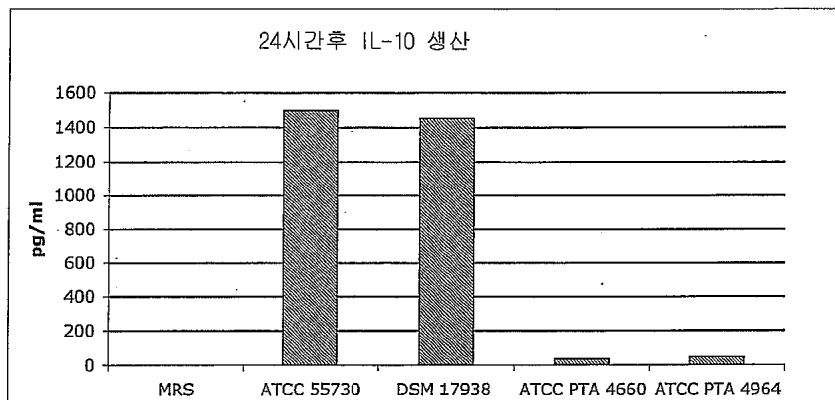
도 2a. 막대-그래프 형태로 DC 세포에 의한 IL-10 생산; 도 2b. 표 형태로 DC 세포에 의한 IL-10 생산.

도면

도면1



도면2a



도면2b

	IL-10 생산 (pg/ml)
MRS	
ATCC 55730	1500
DSM 17938	1450
ATCC PTA 4660	35
ATCC PTA 4964	47