



(21) 申請案號：111122308

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 15 日

(51) Int. Cl. :

*A61K35/747 (2015.01)**A61K35/741 (2015.01)**A61P3/00 (2006.01)**A61P3/10 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/06/16

南韓

10-2021-0077914

(71) 申請人：南韓商 G I 細胞股份有限公司 (南韓) GI CELL, INC. (KR)

南韓

南韓商 G I 生物群系公司 (南韓) GI BIOME (KR)

南韓

(72) 發明人：張明浩 JANG, MYOUNG-HO (KR)；梁甫伎 YANG, BO-GIE (KR)；洪天杓 HONG, CHUN-PYO (KR)；金彩河 KIM, CHEA HA (KR)；李多晶 LEE, DAJEONG (KR)；金惠利 KIM, HYE RI (KR)

(74) 代理人：許世正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：5 共 57 頁

(54) 名稱

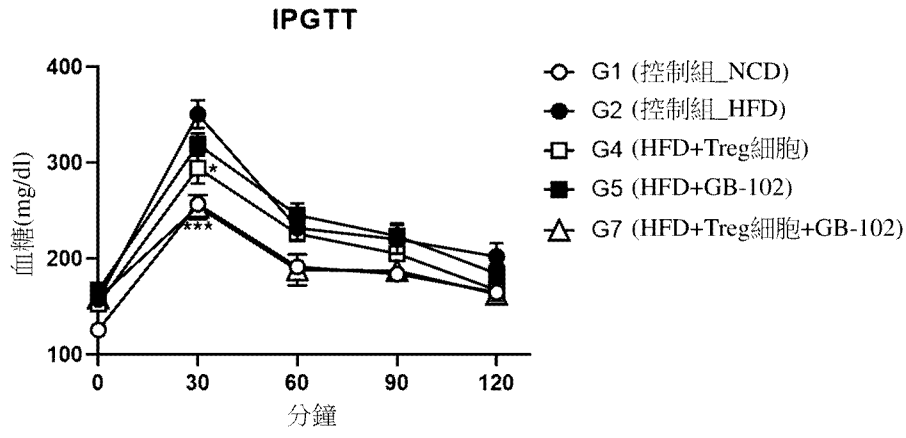
發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞用於組合療法以抑制體重增加以及預防或治療代謝疾病的用途

(57) 摘要

本發明揭露含有發酵乳酸桿菌 (Lactobacillus fermentum) 菌株的組合物，較佳為含有寄存編號為 KCTC 14105BP 的發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株與調節型 T 細胞的組合物，以及該菌株與調節型 T 細胞的同施用以抑制體重增加或是預防及／或治療代謝疾病的用途。該組合物及該組合療法具有顯著抑制體重增加的功效。因此，該組合物及該組合療法能容易使用於控制受試者的體重，並可利用於美容、畜牧、醫藥等領域，尤其，可利用於醫藥組合物、食品添加劑、保健功能性食品以及用於改善、預防及治療代謝疾病的治療劑之領域。

Disclosed is a composition containing a Lactobacillus fermentum strain, preferably a composition containing Lactobacillus fermentum GB-102 strain deposited with accession number KCTC 14105BP and regulatory T cells, and the use of co-administration of the strain and regulatory T cells for the suppression of weight gain or the prevention and/or treatment of metabolic diseases. The composition and the combination therapy have an effect of remarkably suppressing weight gain. Therefore, the composition and the combination therapy can be easily used to control the body weight of a subject, and are useful in the fields of beauty, livestock, medicines, and the like, in particular, are useful in the fields of pharmaceutical compositions, food additives, health functional foods, and therapeutic agents for ameliorating, preventing and treating metabolic diseases.

指定代表圖：



【圖4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞用於組合療法以抑制體重增加以及預防或治療代謝疾病的用途

【英文發明名稱】 USE OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM* STRAIN AND REGULATORY T CELLS FOR COMBINATION THERAPY FOR SUPPRESSING WEIGHT GAIN AND PREVENTION OR TREATMENT OF METABOLIC DISEASES

【中文】

本發明揭露含有發酵乳酸桿菌 (*Lactobacillus fermentum*) 菌株的組合物，較佳為含有寄存編號為 KCTC 14105BP 的發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株與調節型 T 細胞的組合物，以及該菌株與調節型 T 細胞的同施用以抑制體重增加或是預防及／或治療代謝疾病的用途。該組合物及該組合療法具有顯著抑制體重增加的功效。因此，該組合物及該組合療法能容易使用於控制受試者的體重，並可利用於美容、畜牧、醫藥等領域，尤其，可利用於醫藥組合物、食品添加劑、保健功能性食品以及用於改善、預防及治療代謝疾病的治療劑之領域。

【英文】

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

第 1 頁，共 2 頁 (發明摘要)

Disclosed is a composition containing a *Lactobacillus fermentum* strain, preferably a composition containing *Lactobacillus fermentum* GB-102 strain deposited with accession number KCTC 14105BP and regulatory T cells, and the use of co-administration of the strain and regulatory T cells for the suppression of weight gain or the prevention and/or treatment of metabolic diseases. The composition and the combination therapy have an effect of remarkably suppressing weight gain. Therefore, the composition and the combination therapy can be easily used to control the body weight of a subject, and are useful in the fields of beauty, livestock, medicines, and the like, in particular, are useful in the fields of pharmaceutical compositions, food additives, health functional foods, and therapeutic agents for ameliorating, preventing and treating metabolic diseases.

【指定代表圖】 圖 4。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞用於組合療法以抑制體重增加以及預防或治療代謝疾病的用途

【英文發明名稱】 USE OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM* STRAIN AND REGULATORY T CELLS FOR COMBINATION THERAPY FOR SUPPRESSING WEIGHT GAIN AND PREVENTION OR TREATMENT OF METABOLIC DISEASES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於發酵乳酸桿菌（*Lactobacillus fermentum*）菌株在與調節型 T 細胞（regulatory T cell）組合施用以抑制體重增加以及預防及／或治療代謝疾病的用途，較佳為寄存編號為 KCTC 14105BP 的發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株及／或寄存編號為 KCTC 14106BP 的發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株與調節型 T 細胞在組合療法及共同施用以抑制體重增加及預防或治療代謝疾病的用途。

【先前技術】

【0002】 代謝症候群（Metabolic syndrome）係針對由代謝異常或失調所致之心血管疾病的一群危險因子的總稱，據報導其極有可能導致如心血管疾病、糖尿病及中風之代謝疾病。國家心肺 PF-B2816-TW (2022TWP4326)

第 1 頁，共 46 頁（發明說明書）

血液研究所（National Heart, Lung and Blood Institute，NHLBI）及美國心臟協會（American Heart Association，AHA）表示代謝症候群與肥胖、空腹血糖受損、高三酸甘油酯、低 HDL 膽固醇、高空腹血糖、凝血增加、胰島素抗性等相關聯。

【0003】 肥胖係患有代謝症候群患者最具代表性的特徵，在肥胖患者中主要代謝異常係胰島素抗性（insulin resistance）。當脂肪，尤其是腹部內臟脂肪，過度累積於體內時，大量自由脂肪酸會流入肝門靜脈血液中。當血液脂肪酸增加時，肝臟或肌肉會透過胰島素接受脂肪酸而不是葡萄糖，這會阻礙葡萄糖的流入，造成胰島素抗性。內臟脂肪細胞對脂肪分解刺激的反應非常敏感，無法良好儲存三酸甘油酯，且容易釋放自由脂肪酸。因此，自由脂肪酸直接流入肝門靜脈並干擾胰島素訊號系統，進而削弱胰島素的作用。此外，自由脂肪酸在脂肪組織中造成慢性炎症，並產生會干擾胰島素訊號系統的多種脂肪激素（adipokine）及細胞激素，從而使胰島素抗性增加並促進代謝症候群的誘發。在肥胖人群中，當發生胰島素抗性且葡萄糖無法進入細胞時，血糖會升高，造成糖尿病。此外，當胰島素的分泌為了補償胰島素抗性而增加以提高血液胰島素濃度時，鹽類從肝臟的排泄會受到抑制，故鹽類和水會累積在體內。交感神經受到刺激，造成血管收縮、高血壓、血液三酸甘油酯增加、HDL 膽固醇降低。結果，發生血脂異常。由胰島素抗性所致之糖尿病、高血壓及血脂異常共同作用誘

發動脈粥狀硬化，其導會致如冠狀動脈的絞痛症及心肌梗塞以及大腦動脈的腦梗塞之代謝疾病（*J Clin Invest* 2000; 106:171-76；*Diabetes* 1988;37:1595-607）。

【0004】 因此，治療肥胖被認為是預防及治療代謝症候群及相關代謝疾病的最重要的目標。目前抗肥胖處方藥包含 **Xenical[®]**（*Roche Pharmaceuticals, Switzerland*）、**Reductil[®]**（*Abbott Laboratories Ltd, USA*）及 **Exolise[®]**（*Atopharma, France*）等。抗肥胖藥物分類為食慾抑制劑、能量消耗促進劑、脂肪吸收抑制劑等，大多數抗肥胖藥物係藉由調控與下視丘相關的神經傳遞物來抑制食慾的食慾抑制劑。然而，習知的抗肥胖藥物具有造成如心臟疾病、呼吸道疾病及神經系統疾病之副作用以及耐久性低的問題。因此，需要開發安全且有效的抗肥胖藥物。

【0005】 同時，積極進行對益生菌的研究以使用被認為是安全的微生物的細菌（例如乳酸菌）來預防或治療肥胖及代謝疾病。尤其，研究結果報導乳酸菌具有如維持正常腸道菌群、改善腸道菌群、展現出抗糖尿病及抗脂血活性、抑制致癌及大腸癌、展現出宿主免疫系統的非特異性活性等之效果。

【0006】 世界衛生組織將當施用適當量時有益於宿主健康的活微生物定義為「益生菌」（*Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506-514 (2014)）。乳酸桿菌屬物種係屬於乳酸桿菌科（*Lactobacillaceae*）的乳酸菌（**LAB**）。乳酸桿菌屬係具有獨特生

態狀態的眾所周知的微生物家族。已知多種乳酸菌傳統上與食品相關，例如牛奶、乳製品、發酵食品及香腸。乳酸桿菌係被 FDA 普遍認為安全（GRAS）的一群微生物，並廣泛使用於食品及其他產業。乳酸桿菌分類為兼性厭氧生物、不形成孢子、不運動（non-motile）、桿狀、革蘭氏陽性菌，且通常為過氧化氫酶陰性。乳酸桿菌可為同型發酵性或異型發酵性，並產生乳酸作為初級發酵的最終產物（Front Cell Infect Microbiol 2, 86 (2012)）。乳酸桿菌展現出光滑且凸出的菌落。

【0007】 關於與肥胖或代謝疾病的預防性或治療性效果相關的乳酸桿菌菌株，韓國專利第 10-1494279 號揭露具有抑制脂肪細胞分化之效果的胚芽乳酸桿菌（*Lactobacillus plantarum*）KY1032 菌株（寄存編號：KCCM-10430），韓國專利第 10-0996577 號揭露具有抗肥胖效果的 *Lactobacillus kerbetus* HY7601（寄存編號：KCTC11456BP），韓國專利第 10-1394348 號揭露具有抑制脂肪細胞分化之效果的胚芽乳酸桿菌 DSR920 菌株（寄存編號：KCCM 11210P）。據報導各菌株透過各菌株的獨立機制具有抗肥胖活性，但效果未達到足以在商業上成功的程度。

【0008】 在此背景下，本發明人確認到一種新穎的發酵乳酸桿菌菌株（寄存編號：KCTC 14105BP 及 KCTC 14106BP），發現這些菌株具有肥胖及代謝疾病的預防性或治療性效果，並據此提出專利申請案（韓國專利申請第 10-2021-0086537 號及第 10-2021-

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

第 4 頁，共 46 頁（發明說明書）

0086539 號) 。 作為大量努力藉由發酵乳酸桿菌 (*Limosilactobacillus fermentum*) 菌株改善抑制體重增加以及預防及治療代謝疾病的效果之結果，本發明人發現當施用此菌株與調節型 T 細胞 (Treg 細胞) 的組合時，相較於當此菌株或調節型 T 細胞單獨施用時，在施用葡萄糖後控制血糖程度的能力 (葡萄糖耐受性) 以及抑制體重增加的能力大幅改善，可據此預防及治療包含肥胖及胰島素抗性的代謝疾病。基於此發現而完成本發明。

【0009】 在技術背景揭露的資訊僅提供用於更好理解本發明的技術背景，因此其可能不包含形成對本領域具有通常知識者而言顯而易見的習知技術的資訊。

【發明內容】

【0010】 因此，本發明鑒於上述問題而完成，本發明之一目的在於提供發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞在共同施用以抑制體重增加的用途。

【0011】 本發明之另一目的在於提供用於抑制體重增加的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞。

【0012】 本發明之另一目的在於提供發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞在製備用於抑制體重增加的組合物的用途。

【0013】 本發明之另一目的在於提供使用發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞抑制體重增加的方法。

【0014】 本發明之另一目的在於提供發酵乳酸桿菌菌株在與

調節型 T 細胞組合施用以預防或治療代謝疾病的用途。

【0015】 本發明之另一目的在於提供用於治療或預防代謝疾病的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞。

【0016】 本發明之另一目的在於提供發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞在製備用於治療或預防代謝疾病的組合物的用途。

【0017】 本發明之另一目的在於提供使用發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞治療或預防代謝疾病的方法。

【0018】 為了達成上述目的，本發明提供一種用於抑制體重增加的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株作為有效成分，其中組合物與調節型 T 細胞組合施用。

【0019】 本發明亦提供一種用於抑制體重增加的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞作為有效成分。

【0020】 本發明亦提供發酵乳酸桿菌菌株在與調節型 T 細胞組合施用以抑制體重增加的用途，以及發酵乳酸桿菌菌株在製備用於抑制體重增加的組合物的用途。

【0021】 本發明亦提供一種抑制體重增加的方法，其包含對受試者組合施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞。

【0022】 本發明亦提供改善、治療或預防代謝疾病的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株作為有效成分，組合物與調節型 T 細胞組合施用。

【0023】 本發明亦提供用於改善、治療或預防代謝疾病的組

合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞作為有效成分。

【0024】 本發明亦提供發酵乳酸桿菌菌株在與調節型 T 細胞組合施用以改善、預防或治療代謝疾病的用途。

【0025】 本發明亦提供一種改善、治療或預防代謝疾病的方法，包含對受試者組合施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞。

【圖式簡單說明】

【0026】 本發明之上述及其他目的、特徵及其他優點將從以下實施方式結合附圖而更清楚地被理解，其中：

【0027】 圖 1 係根據本發明之發酵乳酸桿菌 GB-102 及 GB-103 菌株與習知的乳酸桿菌屬菌株的親緣關係樹；

【0028】 圖 2 係透過 8 周高脂肪飲食的任食飼養誘發肥胖的小鼠在單獨或組合施用 GB-102 菌株及 Treg 細胞時的體重變化之圖。體重變化的統計分析使用變異數分析 (ANOVA) 進行。使用學生 t 檢定 (Student t-test) 將各組別彼此比較。所得之值以平均值 \pm SEM (其中，在各組中 $n > 5$) 表示。當 P 值小於 0.05 時被認為有顯著差異；

【0029】 圖 3 揭示在對小鼠單獨或組合施用 GB-103 及 Treg 細胞時，腹腔內給予葡萄糖，藉由量測小鼠尾端的血糖，透過葡萄糖耐受性測試確認血糖控制效果。統計分析使用 ANOVA 進行。使用學生 t 檢定將各組別彼此比較。所得之值以平均值 \pm SEM (其中，在各組中 $n > 5$) 表示。當 P 值小於 0.05 時被認為有顯著差

異；

【0030】 圖 4 揭示在對小鼠單獨或組合施用 GB-103 及 Treg 細胞時，腹腔內給予葡萄糖，藉由量測小鼠尾端的血糖，透過葡萄糖耐受性測試確認血糖控制效果。統計分析使用單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 進行。當認為結果顯著時，使用 Dunnett's 多重比較檢定 (Dunnett's multiple comparison test) 將各組彼此比較，並進行事後比較檢定 (post-hoc test)。所得之值以平均值 \pm SEM (其中，在各組中 $n > 5$) 表示。當 P 值小於 0.05 時被認為有顯著差異；以及

【0031】 圖 5 揭示在對小鼠單獨或組合施用 GB-103 及 Treg 細胞時，腹腔內給予葡萄糖，藉由量測小鼠尾端的血糖，透過葡萄糖耐受性測試確認血糖控制效果。統計分析使用單因子變異數分析進行。當認為結果顯著時，使用 Dunnett's 多重比較檢定將各組彼此比較，並進行事後比較檢定。所得之值以平均值 \pm SEM (其中，在各組中 $n > 5$) 表示。當 P 值小於 0.05 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) 時被認為有顯著差異。

【實施方式】

【0032】 除非另有定義，否則於此所用之所有技術及科學用語與本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解的意義相同。一般而言，於此所用之命名法在本領域中為眾所周知且常用。

【0033】 在本文所述之濃度範圍中，用語「至」旨在包含下限

與上限兩者的臨界範圍（不小於下限且不大於上限）。除非包含兩個臨界範圍，否則濃度範圍被描述為「高於」及「低於」。如本文所用，用於數值的用語「約」用以包含本領域具有通常知識者預期的範圍以具有實質上等同於給定數值的效果，例如給定數值的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 等，但不限於此。

【0034】 使用微生物改善、預防及治療如肥胖之代謝疾病的方法作為習知的手術療法或基於化合物的藥物療法的替代品引起極大的關注。然而，微生物取決於其物種會展現出非常多樣的活性及副作用，即使在相同物種亦會展現出多樣的活性並取決於所施用的受試者的情況會展現出多種副作用（Tze Guan Tan, 113(50):E8141-E8150, 2016）。為此，需要明確辨別特定菌株以及其對於代謝疾病的預防性及治療性效果。

【0035】 近來，舉例而言，報導有展現出如抑制脂肪細胞分化、抑制脂酶以及具有脂肪分解活性之效果的菌株，但單獨施用該菌株不足以獲得治療或預防代謝疾病的效果。

【0036】 在本發明的示例中，本發明人發現在被施用調節型 T 細胞（Treg 細胞）與發酵乳酸桿菌菌株的組合的高脂肪飲食動物模型中，觀察到大幅抑制體重增加以及控制血糖（葡萄糖耐受性）的效果。

【0037】 已知肥胖會造成過量的脂肪累積於骨骼肌及肝臟中，並根據在脂肪累積代謝的過程中如自由脂肪酸（acyl-CoA）、

二醯甘油（DAG）及神經醯胺之脂質代謝物的增加會抑制胰島素傳訊路徑，從而誘發胰島素抗性的發展（Proc. Nutr. Soc. 63: 375-380；J. Lipid Res. 50:S74-S79；Diabetes 60: 2588-2597）。

【0038】 因此，在一態樣中，本發明係關於一種用於抑制體重增加的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株作為有效成分，其中組合物與調節型 T 細胞組合施用。本發明之特徵在於當發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞組合施用時，對於體重增加的抑制活性大幅受到改善。

【0039】 如本文所用，用語「發酵乳酸桿菌（*Lactobacillus fermentum*）」因與「*Limosilactobacillus fermentum*」具有相同意義故可互換使用。

【0040】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株較佳為選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

【0041】 如本文所用，用語「調節型 T 細胞（Treg 細胞）」係指一種分化的 T 細胞，其用以抑制免疫功能、維持對自體抗原的耐受性以及抑制自體免疫疾病的發病。調節型 T 細胞通常表現免疫抑制細胞激素，例如 IL-10，並抑制效應 T 細胞的誘發及增殖。在本發明中，調節型 T 細胞可自然源於動物，但不限於此，並可包含透過細胞工程、基因工程等製備的重組的調節型 T 細胞，

例如 CAR Treg 細胞。

【0042】 如於本文所用，用語「與...組合施用」、「組合施用」或「共同施用」表示二種以上類型的有效成分同時或依序施用，或者基於二種以上類型的有效成分的作用在各有效成分獨立施用時以特定間隔施用以獲得改善的效果。

【0043】 在本發明中，共同施用可藉由組合施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞來進行，並可進一步與含有其他有效成分的組合物或其他療法組合使用。

【0044】 在本發明中，與調節型 T 細胞組合施用的發酵乳酸桿菌菌株可製備成與調節型 T 細胞合併於單一製劑中，或者可各自製備成獨立製劑的組合物再組合施用。舉例而言，含有發酵乳酸桿菌菌株的組合物可製備成口服施用的製劑，調節型 T 細胞可製備成靜脈施用的製劑，但不限於此。

【0045】 在本發明中，含有發酵乳酸桿菌菌株的組合物較佳製備成口服製劑，但不限於此。在本發明中，含有發酵乳酸桿菌菌株的組合物可以合適對人類或動物施用的組合物的形式使用。

【0046】 發酵乳酸桿菌菌株為本發明之組合物的有效成分，可以凍乾物、膠囊、培養懸浮液、發酵溶液、乾燥粉末或顆粒的形式作為口服製劑來提供。

【0047】 當製備作為本發明之組合物的有效成分之發酵乳酸桿菌菌株的非口服（parenteral）製劑時，其可含有無菌水溶液、

非水溶劑、懸浮液、乳液、凍乾物及栓劑。非水溶劑及懸浮液的示例包含丙二醇、聚乙二醇、如橄欖油之植物油、如油酸乙酯之可注射酯類等。栓劑基質的示例包含 Witepsol、聚乙二醇（macrogol）、Tween 61、可可脂、月桂脂（laurin butter）、甘油明膠（glycerogelatin）等。本領域已知的合適的製劑可根據文獻（Remington's Pharmaceutical Science (latest edition), Mack Publishing Company, Easton PA）所揭露的方法製備。

【0048】 在本發明中，組合物除了發酵乳酸桿菌菌株還可更含有常用且合適的載體、賦形劑及稀釋劑。

【0049】 在本發明中，調節型 T 細胞可製備成單獨的製劑以與本發明之組合物組合施用。在本發明中，調節型 T 細胞可製備成含有其的注射製劑，較佳為用於靜脈施用的製劑，但不限於此。含有調節型 T 細胞之單獨的組合物可更含有能施用於人類或動物之合適且常用的載體、賦形劑及稀釋劑，並可更含有能夠維持調節型 T 細胞的生存或活性的額外成分。

【0050】 根據本發明之載體、賦形劑或稀釋劑的示例包含乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、麥芽糖醇、澱粉、阿拉伯膠（acacia rubber）、藻酸鹽、明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、微晶纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、水、羥基苯甲酸甲酯、羥基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸鎂、礦物油等。組合物的製劑可使用常用的稀釋劑或賦形劑來製備，例如

填充劑、增量劑、黏結劑、濕潤劑、崩解劑或界面活性劑。在本發明中，組合物可更含有潤滑劑、濕潤劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、甜味劑或調味劑。本發明之醫藥組合物可使用本領域已知的方法製備成腸溶衣製劑，而使得作為有效成分的微生物能夠在通過胃並抵達小腸後快速釋放於腸中。

【0051】 此外，本發明之組合物可使用習知的包囊方法製備成膠囊。舉例而言，使用標準載體製備含有本發明之凍乾的微生物的丸粒並接著裝入硬質明膠膠囊。或者，可使用本發明之微生物與任何合適的醫藥載體來製備懸浮液或分散液並可接著裝入軟質明膠膠囊，其中醫藥載體例如水膠（aqueous gum）、纖維素、矽酸鹽或油。

【0052】 在本發明中，組合物可被提供為腸溶衣製劑，尤其為單位口服製劑。如本文所用，用語「腸溶衣（enteric coating）」包含不會被胃酸降解但在小腸中充分降解以將有效成分釋放至小腸之所有類型的藥學上可接受的包衣。腸溶衣的材料可適當選自已知的聚合物材料並描述於許多已知的出版物中（L. Lachman et al., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd ed., 1986, pp. 365-373；H. Sucker et al., *Pharmazeutische Technologie*, Thieme, 1991, pp. 355-359；Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 4th ed., Vol. 7, pp. 739-742, and 766-778, (Springer Verlag, 1971)；及 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 13th ed., pp. 1689-1691 (Mack Publ., Co., 1970)）。腸溶衣的材料包含纖維素脂衍生

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

物、纖維素醚、丙烯酸樹脂的丙烯酸甲酯共聚物以及順丁烯二酸與酞酸衍生物的共聚物，但不限於此。

【0053】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞透過獨立途徑施用。可由本領域具有通常知識者使用適合的施用方案以適當劑量獨立施用各有效成分。舉例而言，如在本發明一實施例中，較佳地，口服施用發酵乳酸桿菌菌株，並透過靜脈注射施用調節型 T 細胞，但本發明不限於此。

【0054】 在本發明中，可藉由同時施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞來進行共同施用。

【0055】 在本發明中，可藉由依序施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞來進行共同施用。舉例而言，可在施用發酵乳酸桿菌菌株之後施用調節型 T 細胞，或者可在施用調節型 T 細胞之後施用發酵乳酸桿菌菌株。在本發明中，當依序施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞時，它們會以一時間間隔施用，其包含但不限於 1 分鐘間隔、5 分鐘間隔、10 分鐘間隔、20 分鐘間隔、30 分鐘間隔、1 小時間隔、1 天間隔、數天間隔或數周間隔，並由本領域具有通常知識者以適當間隔依序施用。

【0056】 在本發明中，施用可重複進行一次以上。當重複施用本發明之有效成分時，即重複施用發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞時，施用間隔可由本領域具有通常知識者根據所施用之受試者的狀況及所期望之效果的程度來輕易調整。舉例而言，施用間

隔可為 1 小時間隔、6 小時間隔、8 小時間隔、12 小時間隔、1 天間隔、2 天間隔、1 周間隔、2 周間隔或 1 個月間隔，但不限於此。在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞可各自以獨立施用間隔施用。在本發明一實施例中，發酵乳酸桿菌菌株一天施用一次，調節型 T 細胞一周施用一次，但本發明不限於此。

【0057】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞各自以有效劑量施用。在本發明中，用語「有效劑量」可表示不小於獲得本發明所期望之效果的最小劑量的劑量，亦即抑制體重增加的效果或者治療或預防代謝疾病的效果。在本發明中，當組合物為食品組合物或醫藥組合物時，分別以細胞學上有效劑量或藥學上有效劑量施用。

【0058】 在本發明中，含有發酵乳酸桿菌菌株的組合物可以組合物的形式施用，例如醫藥組合物或食品組合物，而無關乎與其組合施用的 Treg 細胞的製劑。較佳地，含有發酵乳酸桿菌菌株的醫藥組合物以及含有 Treg 細胞的醫藥組合物各自以有效劑量施用，或者含有發酵乳酸桿菌菌株的食品組合物以及含有 Treg 細胞的醫藥組合物以有效劑量施用，但本發明不限於此。

【0059】 舉例而言，在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株以約 1×10^1 CFU 至約 1×10^{20} CFU 之劑量施用，較佳為約 1×10^4 CFU 至約 1×10^{16} CFU，更佳為約 1×10^6 CFU 至約 1×10^{12} CFU。在本發明一實施例中，發酵乳酸桿菌菌株以約 5×10^9 CFU/頭/200 μ l 之劑量

施用，但不限於此。

【0060】 在本發明中，相對於組合物的總量，發酵乳酸桿菌菌株的含量可為 10^4 至 10^{16} CFU/g，較佳為 10^6 至 10^{12} CFU/g，或者含有等量活細菌的培養物可包含於組合物中。一般而言，可對成年患者一次或多次分次施用 1×10^6 CFU/g 以上的活細菌，較佳為 1×10^8 至 1×10^{12} CFU/g 的活性菌。

【0061】 舉例而言，在本發明中，調節型 T 細胞以約 1×10^1 個細胞至約 1×10^{50} 個細胞的量施用，較佳為約 1×10^3 個細胞至約 1×10^{30} 個細胞，更佳為約 1×10^4 個細胞至約 1×10^{10} 個細胞。在本發明一實施例中，調節型 T 細胞以約 1×10^6 個細胞/頭/200 μ l 的量施用，但本發明不限於此。

【0062】 如本文所用，用語「抑制體重增加」係指抑制由例如過量糖份攝取、脂肪累積及激素變化之多種原因所致的體重增加。在本發明中，抑制體重增加可表示相較於不施用本發明之用於抑制體重增加的組合物時，體重增加顯著減少。

【0063】 此外，在本發明中，抑制體重增加用以包含減少體重，因此本發明之用於抑制體重增加的組合物展現出減重效果。

【0064】 在本發明中，組合物可用作為用於抑制體重增加及／或促進減重的醫藥組合物或食品組合物，其所使用的量及形式可取決於目的而適當控制。

【0065】 根據本發明之組合物在抑制體重增加及促進減重方

面有效，並因其幾乎不具有因藥物所致之毒性及副作用故能夠長期施用。

【0066】 在本發明中，組合物可用作為用於抑制體重增加及／或促進減重的醫藥組合物或食品組合物。

【0067】 根據本發明之醫藥組合物可以藥學有效量施用，用語「藥學有效量」係指足以以適用於所有醫學治療之合理的效益／風險比例來治療疾病的量，有效劑量程度可取決於包含下述多種因素來決定：患者的疾病類型、疾病的嚴重程度、藥物的活性、患者對藥物的敏感性、施用時間、施用途徑、排泄速率、療程、與其同時使用的藥物以及在醫藥領域中已知的其他因素。本發明之醫藥組合物可作為單一治療劑施用或與其他治療劑組合施用，或者與習知的治療劑依序或同時施用，並可以單劑量或多劑量施用。考量這些因素，重要的是施用足以達到最大功效而無副作用的最小量，且此量可由本領域具有通常知識者輕易決定。

【0068】 如本文所用，用語「食品組合物」以廣義使用以涵蓋含有營養物的物質，食品組合物的示例包含肉、香腸、麵包、巧克力、糖果、零食、糕點、披薩、拉麵、其他麵食、口香糖、包含冰淇淋之乳製品、各種湯、飲料、茶、飲品、維生素複合物、益生元（prebiotics）、益生菌、後生元（postbiotics）、保健補充食品、保健功能性食品、保健食品等。用語「食品組合物」以一般意義使用以涵蓋「食品」及「食品添加劑」或添加至食品的「用

於食品添加的組合物」。

【0069】 在本發明中，當食品提供作為人類以外的動物的飼料時，可與實質上相同於「飼料」的意義互換使用。因此，在本發明中，食品組合物可表示飼料組合物或飼料添加劑（飼料添加組合物）。

【0070】 在本發明中，食品組合物可為具有抑制體重增加或促進減重之活性的保健功能性食品。

【0071】 如本文所用，用語「功能性食品」與用語「特殊保健食品（food for special health use, FoSHU）」具有相同意義，並係指具有強烈醫藥及藥學作用的食物，其已加工處理以有效率提供生物調節功能以及營養供給功能。於此，用語「功能性」表示在健康目的上獲得有益的效果，例如控制營養或對人體結構或功能展現出生理作用。本發明之食品可藉由本領域常用的方法製備，可使用本領域常用的原料及成分進行製備。此外，食品亦可製備成任何被認為是食品的製劑而不受限，根據本發明之保健功能性食品可為粉末、顆粒、錠劑、膠囊或飲品的形式。

【0072】 用語「保健食品」係指較一般食品具有積極保健維持或促進作用的食物，用語「保健補充食品」係指以保健補充為目的而攝取的食物。在某些情況下，用語「保健功能性食品」、「保健食品」及「保健補充食品」可互換使用。

【0073】 食品組合物可更含有生理上可接受的載體，載體的

種類沒有特別限制，可使用本領域常用的任何載體。

【0074】 此外，組合物可含有常用於食品組合物的附加成分以改善氣味、味道、視覺品質（外觀）等。舉例而言，組合物可含有維生素 A、C、D、E、B1、B2、B6 及 B12、菸鹼酸、生物素、葉酸、泛酸等。此外，組合物可含有礦物質，例如鋅（Zn）、鐵（Fe）、鈣（Ca）、鎂（Mg）、錳（Mn）、銅（Cu）及鉻（Cr）。此外，組合物可含有胺基酸，例如離胺酸、色胺酸、半胱胺酸及纈胺酸。

【0075】 此外，組合物可含有食品添加劑，例如防腐劑（山梨酸鉀、苯甲酸鈉、水楊酸、去氫乙酸鈉等）、消毒劑（漂白粉及高度漂白粉、次氯酸鈉等）、抗氧化劑（丁羥甲氧苯（BHA）、丁羥甲苯（BHT）等）、著色劑（焦油色素等）、顯色劑（亞硝酸鈉等）、漂白劑（亞硫酸鈉）、調味料（MSG 等）、甜味劑（甘味精、賽克拉美（cyclamate）、糖精、鈉等）、風味劑（香草精、內酯等）、膨脹劑（明礬、D-酒石酸氫鉀等）、增強劑、乳化劑、增稠劑、塗層劑、膠基劑（gum base agents）、消泡劑、溶劑及加強劑。添加劑可根據食品的類型選擇並以適當量使用。

【0076】 除了本發明之發酵乳酸桿菌菌株，組合物可更含有細胞學上可接受的食物補充添加劑，並可與其他食物或食物成分組合使用，並可依據習知的方法適當使用。所混合之有效成分的量可根據使用目的（預防、保健或治療性處理）而適當決定。

【0077】 在另一態樣中，本發明係關於一種用於抑制體重增加的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞。

【0078】 在另一態樣中，本發明係關於發酵乳酸桿菌菌株在與調節型 T 細胞組合施用以抑制體重增加的用途，以及發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞在製備用於抑制體重增加的組合物的用途。

【0079】 在另一態樣中，本發明係關於一種抑制體重增加的方法，此方法包含對受試者組合施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞。

【0080】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株較佳包含選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

【0081】 根據本發明之抑制體重增加的方法旨在包含減少體重的方法。因此，本發明之方法可用以減少受試者的體重。

【0082】 在本發明中，可透過多種途徑進行施用。施用的模式可為口服或非口服施用，非口服施用可為例如皮下、靜脈內、肌內、子宮內鞘內腔或腦血管內注射，但不限於此。在本發明中，施用的方案、劑量及次數可取決於下述多種相關因素來決定，例如患者的年齡、性別及體重以及疾病的嚴重程度。

【0083】 在本發明中，可藉由組合施用發酵乳酸桿菌菌株與

免疫細胞來進行共同施用，並可進一步與含有其他有效成分的組合物或其他療法組合使用。

【0084】 在本發明中，除非另有註記，否則共同施用可具有在本發明之用於抑制體重增加的組合物之方面所述之特徵相同的特徵。

【0085】 在本發明中，抑制體重增加的方法可與本發明之方法以外的用於抑制體重增加的多種療法或用於抑制體重增加的已知試劑組合使用。

【0086】 根據本發明之用於抑制體重增加的組合物以及抑制體重增加的方法展現出顯著的體重控制效果，並因此能夠使用於預防或治療肥胖。

【0087】 在本發明另一實施例中，腹腔葡萄糖耐受性測試（intraperitoneal glucose tolerance test，IPGTT）的結果顯示出發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞的共同施用具有抑制體重增加及控制血糖的效果。

【0088】 腹腔葡萄糖耐受性測試係確認受試者的胰島素抗性的最常見的方法。據報導，在代謝三酸甘油酯的過程中產生的脂質代謝物(Proc. Nutr. Soc. 63: 375-380)，具體為自由脂肪酸(acyl-CoA)、二醯甘油(DAG)、神經醯胺等，會抑制胰島素傳訊路徑而誘發胰島素抗性的發展(Diabetes 60: 2588-2597)。肥胖與胰島素抗性具有因果關係，因此通常在大多數情形中會同時觀察到

肥胖與胰島素抗性。肥胖與胰島素抗性係多種代謝疾病的主要原因，例如糖尿病、高血壓、動脈硬化、高脂血症、高胰島素血症、胰島素抗性、代謝性炎症、空腹血糖異常、葡萄糖耐受性受損及葡萄糖耐受性症候群。

【0089】 因此，透過共同施用本發明之發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞來抑制體重增加（減重）以及改善血糖控制能力的效果表示共同施用能夠用於代謝疾病的預防或治療。

【0090】 因此，在另一態樣中，本發明係關於一種用於治療或預防代謝疾病的組合物，其含有發酵乳酸桿菌菌株，組合物與調節型 T 細胞組合施用。

【0091】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株較佳包含選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

【0092】 在本發明中，代謝疾病係指由代謝異常造成的疾病。在本發明中，「代謝疾病」與「代謝症候群」因其實質上意義相同故可互換使用。在本發明中，代謝疾病係推測由胰島素抗性造成的疾病，並在膽固醇、血壓及血糖之二者以上顯示出異常的症狀。代謝疾病係指增加多種心血管疾病及第 2 型糖尿病的危險因子之一群同時發生的病症，並可用以涵蓋胰島素抗性及多種併發代謝異常以及相關的臨床態樣。

【0093】 在本發明中，代謝疾病可為例如心血管疾病或葡萄糖代謝異常，更具體而言，可選自由肥胖、糖尿病、高血壓、動脈硬化、高脂血症、高胰島素血症、胰島素抗性、空腹血糖異常、葡萄糖耐受性受損及葡萄糖耐受性症候群所組成之群組，但不限於此，並包含因體重增加或葡萄糖控制所造成或者具有體重增加或葡萄糖控制作為主要症狀的疾病。

【0094】 如本文所用，用語「心血管疾病（CVD）」係指與心臟及血管相關的循環系統疾病，例如包含高血壓、缺血性心臟病、冠狀動脈疾病、心絞痛、心肌梗塞、動脈粥狀硬化、心律不整、腦血管疾病、中風等，但不限於此。

【0095】 如本文所用，用語「肥胖」係以過量的脂肪累積為特徵的疾病，世界衛生組織將肥胖定義為身體質量指數（BMI）為30以上。肥胖亦基於腰圍（waist circumference，WC）等而被定義（韓國肥胖學會（Korean Society for Obesity））。因此，肥胖將被視為具有寬廣的意義，包含因過重或高體脂百分比而對受試者的健康產生不利影響或極有可能產生不利影響的所有情況。在本發明中，用語「肥胖」與「肥胖症（adipositas）」因其實質上意義相同故可互換使用。尤其，已知肥胖係因脂質代謝物增加所致之胰島素抗性的主要原因（Proc. Nutr. Soc. 63: 375-380）。肥胖會增加下述疾病的發病率：動脈硬化、心血管疾病（中風及缺血性心血管疾病）、高血壓、糖尿病、高脂血症、脂肪肝、膽石

症、阻塞型睡眠呼吸中止症、月經失調、多囊胞性卵巢症、不孕症、性慾減退、抑鬱症、退化性關節炎、痛風等。透過本發明之組合物的預防性或治療性效果可預期對由肥胖造成的疾病的預防性或治療性效果。在本發明中，肥胖可為單純性肥胖、症狀性肥胖、兒童肥胖、成人肥胖、增生性肥胖、肥大性肥胖、上身肥胖、下身肥胖、內臟脂肪型肥胖或皮下脂肪型肥胖。

【0096】 如本文所用，用語「糖尿病」係指一種類型的代謝疾病，其顯示出如胰島素分泌不足或功能異常之症狀，其特徵在於表示血液葡萄糖濃度升高的高血糖（高血糖症（**hyperglycemia**）），並展現出由高血糖所致之多種症狀及跡象，進而造成葡萄糖排泄於尿液中。較佳地，糖尿病可為肥胖型糖尿病，但本發明不限於此。

【0097】 如本文所用，用語「高血壓（**hypertension**）」之特徵在於流經動脈的血液的灌流血壓升高。當收縮壓為 140 mmHg 以上且舒張壓為 90 mmHg 以上時，通常可診斷為高血壓。高血壓沒有明確的症狀，包含確切原因不明的原發性（或自發性）高血壓以及因腎臟疾病、內分泌疾病及子癇前症所造成的續發性高血壓。大多數的高血壓（90-95%）為原發性高血壓，並推測高血壓係由如肥胖、壓力、飲酒及吸菸之環境因素以及遺傳因素所造成，但不限於此。

【0098】 如本文所用，用語「動脈硬化」定義為動脈的彈性降

低、脂肪累積於動脈壁的内表面上且異常組織增生從而使動脈壁的寬度變窄的現象。動脈硬化係表示動脈發生病理變化的用語，疾病名稱取決於由動脈硬化造成問題的器官來決定，例如由動脈硬化所致之腦梗塞、由冠狀動脈硬化所致之心肌梗塞等，但不限於此。

【0099】 如本文所用，用語「高脂血症（hyperlipidemia）」係因如三酸甘油酯及膽固醇之脂肪的異常代謝所致由血液中大量的脂肪所造成的疾病。具體而言，高脂血症係指在血液中如三酸甘油酯、LDL 膽固醇及自由脂肪酸之脂質成分增加的狀況。高脂血症包含高膽固醇血症或高三酸甘油酯血症，但不限於此。

【0100】 如本文所用，用語「脂肪肝」係指因肝臟中脂肪代謝障礙所致之脂肪過量累積於肝細胞中的狀態，並被定義為肝臟中的脂肪重量為 5% 以上的情況，其造成多種疾病，例如心絞痛、心肌梗塞、中風、動脈硬化、脂肪肝及胰臟炎。脂肪肝分為酒精誘發的酒精性脂肪肝及非酒精性脂肪肝疾病（NAFLD），但不限於此。

【0101】 如本文所用，用語「非酒精性脂肪肝疾病」係指病因並非酒精的脂肪肝疾病，包含從單純的脂肪變性（steatosis）至非酒精性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis, NASH）及肝硬化的一系列過程。非酒精性脂肪肝疾病的病因包含抗心律不整藥物、抗病毒藥物、類固醇、細胞毒性藥物等的副作用、透過碳水化合

物攝取過量的熱量、肥胖、糖尿病以及一些遺傳因素，但不限於此。

【0102】 如本文所用，用語「高胰島素血症」係以在血液中出现過量胰島素為特徵的疾病。胰島素係由胰腺分泌之調節血糖的程度的激素，並促進糖流入肌肉及其他周邊組織。因此，高胰島素血症可能因作為胰島素分泌器官的胰腺失調而發生，最大的發病原因係胰島素抗性，但不限於此。

【0103】 如本文所用，用語「胰島素抗性」係指因細胞對降低血糖的胰島素沒有反應而無法有效燃燒葡萄糖的情況。當胰島素抗性高時，人體認為其需要胰島素並產生更多胰島素，這造成高胰島素血症、高血壓或血脂異常以及心臟病及糖尿病，但不限於此。

【0104】 如本文所用，用語「胰島素抗性症候群」係因胰島素抗性所造成之疾病的總稱。胰島素抗性症候群之特徵在於對於胰島素作用的細胞抗性、高胰島素血症、非常低密度脂蛋白（VLDL）與三酸甘油酯增加、高密度脂蛋白（HDL）降低以及高血壓，並被認為是疾病及第 2 型糖尿病的危險因子。

【0105】 如本文所用，用語「代謝性炎症（meta-inflammation）」係慢性且低度的炎症，並表示因營養物或代謝物過量供應而發生的發炎反應。尤其，已知由肥胖造成的慢性發炎反應在胰島素抗性增加與代謝異常的過程中有重要的作用。

【0106】 在本發明中，組合物可為醫藥組合物或食品組合物。

【0107】 在本發明中，除非另有註記，否則醫藥組合物或食品組合物可與關於用於抑制體重增加的組合物描述的內容相同。

【0108】 如本文所用，用語「預防」係指藉由施用根據本發明之組合物來抑制或延遲肥胖或肥胖相關疾病的發病的任何動作。

【0109】 如本文所用，用語「治療」表示能夠藉由施用根據本發明之組合物來改善或有益改變肥胖或肥胖相關疾病的症狀的任何動作。

【0110】 在另一態樣中，本發明係關於發酵乳酸桿菌菌株在與調節型 T 細胞組合施用以改善、預防或治療代謝疾病的用途。

【0111】 在另一態樣中，本發明係關於發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞在製備用於改善、治療或預防代謝疾病的組合物的用途。

【0112】 在另一態樣中，本發明係關於一種改善、治療或預防代謝疾病的方法，其包含對受試者組合施用發酵乳酸桿菌菌株與調節型 T 細胞。

【0113】 在本發明中，發酵乳酸桿菌菌株較佳包含選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

【0114】 在本發明中，除非另有註記，否則施用與共同施用可

具有在根據本發明之用於抑制體重增加的組合物及抑制體重增加的方法之方面所述之特徵相同的特徵。

【0115】 [寄存資訊]

寄存機構名稱：韓國生命科學與生物技術研究所 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)

寄存編號：KCTC14105BP

寄存日期：20200114

寄存機構名稱：韓國生命科學與生物技術研究所

寄存編號：KCTC14106BP

寄存日期：20200114

【0116】 示例

【0117】 在下文中，將參考以下示例詳細描述本發明。然而，對於本領域具有通常知識者顯而易見的是以下示例僅提供於說明本發明，而不應被解釋為限制本發明的範圍。

【0118】 示例 1：調節型 T 細胞 (Treg 細胞) 的製備

【0119】 示例 1-1. 淋巴結及脾臟的製備

【0120】 為了獲得源自小鼠的調節型 T 細胞 (Treg 細胞) ，將淋巴結及脾臟從 B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch}/J 小鼠 (The Jackson laboratory; distributor: Saeron Bio) 取出，轉移至含有 5 mL 之 PBS 的 50 mL 錐形管，並接著保存於冰上。將具有如表 1 所示相同成分的 5 mL 之 FACS 緩衝液初步裝入新的 50 mL 錐形管中，堆疊

70 μm 濾器以製備淋巴結及脾臟樣本。

【0121】 將淋巴結及脾臟各自放置於 70 μm 濾器上並研磨，使 FACS 緩衝液 A 流過組織以獲得細胞。將所獲得之細胞在 4°C 下以 1,300 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，將 3 mL 之 ACK 裂解液 (Lonza, # BP10-548E) 與細胞沉澱物混合，使所獲得之混合物在室溫下靜置 5 分鐘。將 47 mL 之 FACS 緩衝液 A 加入所得之產物，然後在 4°C 下以 1,300 rpm 離心 10 分鐘。接著，移除上清液，以 1 mL 之 FACS 緩衝液 A 裂解殘留物，並進行細胞計數。

【0122】 示例 1-2：小鼠 Treg 細胞分離及培養

【0123】 如下所述使用 CD4⁺ T 細胞分離套組 (小鼠) (Miltenyi biotec, #130-115-818) 從示例 1-1 獲得之骨髓細胞僅分離出調節型 T 細胞 (Treg 細胞)，接著在 4°C 下以 300 \times g 離心並移除上清液。

【0124】 將 MACS 緩衝液 (每 10⁷ 個細胞為 40 μL) 加入細胞以裂解細胞沉澱物，並將生物素抗體混合物 (biotin-antibody cocktail) (每 10⁷ 個細胞為 10 μL) 加入其中。將細胞在 4°C 下孵育 5 分鐘，將 MACS 緩衝液 (每 10⁷ 個細胞為 30 μL) 加入其中，將抗生物素微珠 (20 μL /10⁷ 個細胞) 加入其中。在 4°C 孵育 10 分鐘後，使細胞流入預濕潤的 LS 管柱以獲得通過管柱的上清液。重複上述相同過程，將所得產物以 300 \times g 在 4°C 離心，移除上清液。

【0125】 將細胞裂解於 1 mL 之 FACS 緩衝液 A，加入 20 μ L CD4-Pacific Blue (BioLegend, cat# 100531)，使所得產物於冰上靜置 20 分鐘。接著，進一步加入 4 mL 之 FACS 緩衝液並以 1,300 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘。移除上清液，將 5 mL 之 FACS 緩衝液加入至殘留物，將所得產物以 1,300 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘。接著，移除上清液，將細胞裂解於 10 mL MACSQuant Tyto Running Buffer (Miltenyii biotec/# 130-107-207)。最後，使用 MACSQuant[®] Tyto[®] 分離出 CD4+Foxp3GFP+ 細胞。

【0126】 將分離的調節型 T 細胞 (Treg 細胞) 裂解於如下表 1 所示之 1 mL 之 GC-RPMI 培養基中，接著計數。基於所測得之 Treg 細胞數將細胞以 5×10^5 個細胞/mL 接種於 GC-RPMI 培養基，使用 rmIL-2 在 100 nM/mL 之濃度下處理，並培養 7 天。

【0127】 [表 1]

用於 500 mL	體積	最終濃度
FBS	50 ml	10%
1M HEPES	5 ml	20 mM
10,000 U/ml 青黴素 & 10,000 μ g/ml 鏈黴素	5 ml	100 U/ml 青黴素 & 100 μ g/ml 鏈黴素
50 mg/ml 建它黴素	0.5 ml	50 μ g/ml
100 mM 丙酮酸鈉	5 ml	1 mM
55 mM 2-巰乙醇	0.5 ml	55 μ M
100 mM NEAA	5 ml	1 mM

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

【0128】 示例 2：發酵乳酸桿菌菌株的分離與辨別

【0129】 示例 2-1：菌株的分離

【0130】 本發明之發酵乳酸桿菌菌株係分離自一位為了醫學檢查之目的而拜訪醫院的健康女性的陰道樣本。具體而言，使用棉籤收集陰道樣本，內襯接種於 Rogosa SL 板培養基，在無氧室中在 37°C 下孵育 48 小時。當細菌的菌落生長時，將單一菌落繼代培養於新的 Rogosa SL 板培養基以純化分離。在純化分離後，使用 MRS 培養基進行菌株培養。

【0131】 示例 2-2：針對脂肪累積具有抑制活性的菌株的選擇

【0132】 為了選擇針對脂肪累積具有抑制活性的菌株，確認了抑制胰脂酶活性的能力以及抑制 3T3-L1 前脂肪細胞分化成脂肪細胞的能力。

【0133】 具體而言，將示例 2-1 之菌株稀釋至 0.1 mg/mL 的濃度，將 0.167 mM 棕櫚酸對硝苯酯 (PNP; Sigma, USA) 溶液、0.061 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 及 0.3 mg/mL 脂酶溶液放置於板上並在 25°C 反應 10 分鐘，然後在 405 nm 量測吸光度，以確定抑制胰脂酶活性的能力。

【0134】 此外，3T3-L1 前脂肪細胞分化成脂肪細胞的抑制係使用 Oil Red O (Sigma, USA) 來量測，其與產生於細胞中的脂肪細胞特異性反應。在脂肪分化後，移除培養基，以 PBS 清洗兩次，以 10% 福馬林在 4°C 下固定 1 小時，以 60% 異丙醇清洗兩次，在

室溫下以 0.5% Oil Red O 溶液染色 30 分鐘。染色之後，移除染料溶液並以蒸餾水清洗兩次。當蒸餾水完全蒸發時，將異丙醇加入其中，並在 520 nm 量測吸光度。

【0135】 最後，使用 MTT(溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎊) 法量測在示例 2-1 獲得之菌株中的 3T3-L1 細胞生存力 (cell viability)。將 3T3-L1 細胞以 16×10^4 個細胞/孔的濃度接種於 96 孔盤並培養 24 小時，移除培養基。於此，按濃度稀釋的乳酸菌樣品 (100、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 被加入至 100 μL 之新鮮的 DMEM 培養基並培養 24 小時。接著，將配製成 5 mg/mL 的 20 μL 之 MTT (Sigma, USA) 溶液加入至所得的培養基並在 37°C 下孵育 4 小時。在孵育後，移除上清液，將 200 μL 之二甲亞砒 (DMSO) 加入至殘留物，在 546 nm 量測吸光度。

【0136】 基於上述結果，確認各菌株的脂肪累積抑制效果。在所製備的菌株之中，最後選擇發酵乳酸桿菌 GB102 及 GB103 菌株，其展現出最高的脂肪細胞累積抑制效果及最低的細胞毒性率。

【0137】 示例 2-3. 所選之菌株的分子分物學辨別

【0138】 為了辨別最後所選之發酵乳酸桿菌 GB-102 及 GB-103 菌株，分析了 16S rRNA 基因序列。使用針對細菌的 16S rRNA 基因的 27F 與 1492R 引子透過桑格氏定序法 (Sanger sequencing method) 獲得之序列揭示於下表 2。

【0139】 [表 2]

名稱	序列 (5'至 3')	SEQ NO.
GB102_16S _full	GCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATT GATGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTC GCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC ACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGG ACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCG CATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGC TAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTG GATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGG TGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATG CATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCA CAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCC TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAC CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGT AAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTA TGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTA TTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC AAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA GAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGAT GTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGT GCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAG AAGAGGGTAGTGGA ACTCCATGTGTAGCG GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCA ACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTA	1

	<p>GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCT AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCA TGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAA CCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAA CCCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAA CGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTA GTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGT GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG GTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCC TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA TGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCG AGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCT CAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCT GCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCG GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA TGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGG GGTAACCTTTTAGGAGCCAGCC</p>	
GB103_16S _full	<p>ATACATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAA TTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGATT TTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGA GTAACACGTAGGTAACTGCCCAGAAGCG</p>	2

GGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAAT
ACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACA
ACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCAC
TTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTT
GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGA
TGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC
GGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCAT
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGC
AACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGG
CTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAC
ACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGA
CGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGT
CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGA
GAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAG
TGCAGAAGAGGGTAGTGGA ACTCCATGTG
TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGT
CTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCAT
GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGG
TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCG
GAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG

	<p>GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCG AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGC GCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTC GGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTC GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT TACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT CTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATG CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT ACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACT CGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCG TTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTC GCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCG GTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCC</p>	
--	---	--

【0140】 結果，如表 3 所示，GB102 菌株顯示出與發酵乳酸桿菌（*Limosilactobacillus fermentum*）的標準菌株（模式菌株）的序列相似性最高，與大猩猩乳酸桿菌（*Lactobacillus gorilla*；*Limosilactobacillus gorilla*）的序列相似性次高。這表示 GB102 及 GB103 菌株係與發酵乳酸桿菌及大猩猩乳酸桿菌相似的菌株。

【0141】 [表 3]

菌株	物種	標準菌株 名稱	序列相 似性(%)

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

第 36 頁，共 46 頁（發明說明書）

GB102	發酵乳酸桿菌 (<i>L. fermentum</i>)	CECT 562(T)	99.79
	大猩猩乳酸桿菌 (<i>L. gorilla</i>)	KZ01(T)	98.26
GB103	發酵乳酸桿菌 (<i>L. fermentum</i>)	CECT 562(T)	99.93
	大猩猩乳酸桿菌 (<i>L. gorilla</i>)	KZ01(T)	98.13

【0142】 示例 3. 發酵乳酸桿菌菌株的基因組及比較基因組的分析

【0143】 為了辨別並表徵 GB102 及 GB103 菌株的基因組物種，使用次世代定序技術 (NGS) 及生物資訊技術，將菌株基因組完全定序並預測包含於基因組中的基因的功能。此外，透過與相同物種之完全解碼的基因組進行比較分析，確認菌株的特異性。將各菌株培養於 MRS 培養液在 37°C 下於無氧室中培養 4 小時，使用 MG 基因組 DNA 純化套組 (MGMED, Inc., Korea) 萃取基因組 DNA。為了獲得平均長度為 10 kb 以上的長讀取 (long read) 數據，使用 PacBio RS II 設備進行序列分析，為了產生具有準確度高之序列長度小於 500 bp 的片段序列以補償準確度低的長讀取數據，使用 NovaSeq 6000 進行序列分析。使用 SMRT analysis server 的 HGAP2 pipeline 將長讀取數據組裝至高品質草圖 (high-quality draft) GB102 基因組中。透過長讀取數據及片段序列數據校正可能出現於組裝基因組草圖序列中的 SNP 及插入缺失錯誤。從完整的基因組序列，使用 Prodigal program 預測 CDS，使用

RFAM tool 預測 rRNA 及 tRNA。基於公開的 UniProt 資料庫、GenBank NR 資料庫、Subsystem 資料庫、PFAM 資料庫及 COG 資料庫，藉由進行同源性檢索（使用 BLAST 演算法）預測 CDS 功能。使用 Jspecies program 從公開於 GenBank 之發酵乳酸桿菌物種的標準菌株 B1 28^T (= ATCC 14931^T)、大猩猩乳酸桿菌標準菌株 KZ01^T、胃乳酸桿菌 (*Lactobacillus gastricus*) 標準菌株 DSM 16045^T 以及 GB102 與 GB103 菌株的基因組序列計算平均核苷酸同一性 (average nucleotide identity, ANI)。分析結果顯示出 GB102 及 GB103 菌株具有與發酵乳酸桿菌標準菌株為 95% 以上之 ANI 值，這表示 GB102 及 GB103 菌株屬於發酵乳酸桿菌物種 (表 4)。此外，GB102 及 GB103 菌株並非 100% 等同於標準菌株，這表示 GB102 及 GB103 菌株係先前未被分離及報導過的新物種。此外，GB102 及 GB103 菌株因其長基因組距離而被辨別為不同的菌株。本發明人將 GB102 及 GB103 細菌命名為「發酵乳酸桿菌 GB102」(寄存編號：KCTC 14105BP) 及「發酵乳酸桿菌 GB103」(寄存編號：KCTC 14106BP) 並於 2020 年 1 月 14 日寄存於位於韓國生命科學與生物技術研究所的韓國細胞系庫 (Korea Cell Line Bank) (Korean collection for type cultures, KCTC)。

【0144】 [表 4]

菌株名稱	基因組尺寸 (bp)	GC 比	ANI 值					
			GB102	GB103	B1 28	KZ01	DSM	

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

							16045
GB102	2,039,432	51.88	---	98.43	99.14	79.31	68.77
GB103	2,260,513	51.25	98.51	---	98.42	79.72	69.23
B1 28	1,905,587	52.30	99.09	98.51	---	79.42	68.66
KZ01	1,641,621	48.11	79.05	79.37	79.11	---	68.07
DSM 16045	1,848,461	41.64	68.22	68.38	68.02	68.18	---

【0145】 示例 4. 基於基因組的親緣關係分析以確定在發酵乳酸桿菌物種中各菌株的演化位置

【0146】 進行基於基因組的親緣關係分析以確定在發酵乳酸桿菌物種中各菌株的演化位置。將公開於 GenBank 之 34 種發酵乳酸桿菌菌株的完全解碼的基因組序列與 GB102 及 GB103 基因組序列相比較。使用胃乳酸桿菌 LG045 菌株的完全解碼的基因組序列作為外群來繪製基於基因組的親緣關係樹。使用 orthoMCL program 進行菌株的基因組中所出現之蛋白質編碼基因的直系同源群分析 (Ortholog clustering)。選擇出現於所有 37 個菌株的基因組且在各菌株的基因組中單獨存在的 930 個基因，並使用 RAxML program 製作親緣關係樹。所製作之親緣關係樹表示 GB102 及 GB103 菌株係源自不同於標準菌株 (B1 28^T) 或現有專利菌株 (來自 Nestlé Culture Collection (NCC) 的 NCC2970 菌株) 的譜系的菌株 (如圖 1 所示)。

【0147】 示例 5：確認 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌菌株的共同施用對肥胖及代謝疾病的影響

【0148】 示例 5-1. 由高脂肪飲食誘發的所有實驗組的肥胖 PF-B2816-TW (2022TWP4326)

小鼠的建構及試驗方法

【0149】 使用 B6 小鼠 (C57BL/6 , 雄性 , Coretech Korea co., Ltd.) 作為動物試驗模型。

【0150】 在治療性模型中測試治療性效果，此治療性模型由單獨或組合施用乳酸桿菌 GB-102 或 GB-103 與 Treg 細胞來建立，其中預期乳酸桿菌因被餵食 60% kcal 高脂肪飲食以誘發高度肥胖的小鼠的腸微生物叢的改變而具有免疫增強效果，Treg 細胞與肥胖症狀及血糖控制相關。為了建立治療性模型，取 140 隻 4 周齡 C57BL/6 雄性小鼠並使其適應 2 周，以 60% kcal 高脂肪飲食誘發肥胖持續 8 周，體重一周量測一次，在試驗的 7 周中共 8 次。

【0151】 如下表所示，設置各組，對實驗動物進行體重量測及葡萄糖耐受性測試，以確定對肥胖及代謝疾病的治療性功效。

【0152】 具體而言，為了確認單獨或組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-102 或 GB-103 作為用於具有由高脂肪飲食誘發之肥胖的小鼠的肥胖的治療劑之效果，將小鼠分類為共 7 組實驗組 (表 5)。此時，將發酵乳酸桿菌 GB-102 或 GB-103 製備成凍乾的活細胞粉末，稀釋於 PBS 中，並以 5×10^9 CFU/頭/200 μ l 之劑量每天口服施用一次。將在示例 1-2 中培養 7 天的 Treg 細胞收集於 50 mL 錐形管，以 1,300 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘，移除上清液，將所得產物以 PBS 稀釋，以 1×10^6 個細胞/頭/200 μ l 之劑量每周一次進行靜脈施用。並且，在解剖時觀察小鼠對施用的反應、

毛髮的光澤及動物的異常反應，並使如觀察和群體關籠之壓力因素最小化。

【0153】〔表 5〕

項目	測試組		劑量	施用方法
G1	控制組(NCD)		PBS + PBS	-
G2	控制組(HFD)		PBS + PBS	-
G4	僅 Treg 細胞		PBS + 1×10^6 個細胞/頭/200 μ l	靜脈施用，一周一次持續 7 周 (共 7 次)
G5	GB-102		PBS + 5×10^9 cfu/頭/200 μ l	口服施用，一天一次持續 7 周 (共 49 次)
G7	Treg 細胞+ GB-102	Treg	PBS + 1×10^6 個細胞/頭/200 μ l	靜脈施用，一周一次持續 7 周 (共 7 次)
		GB-102	PBS + 5×10^9 cfu/頭/200 μ l	口服施用，一天一次持續 7 周 (共 49 次)
G8	GB-103		PBS + 5×10^9 cfu/頭/200 μ l	口服施用，一天一次持續 7 周 (共 49 次)
G9	Treg 細胞+ GB-103	Treg	PBS + 1×10^6 個細胞/頭/200 μ l	靜脈施用，一周一次持續 7 周 (共 7 次)
		GB-103	PBS + 5×10^9 cfu/頭/200 μ l	口服施用，一天一次持續 7 周 (共 49 次)

【0154】 示例 5-2：單獨或共同施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB102 及 GB103 對體重變化的影響

【0155】 從體重變化的量測結果可看出，單獨施用 Treg 細胞的組別以及單獨施用發酵乳酸桿菌 GB-102 的組別並未大幅減少體重，而組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-102 的組別展現出顯著的減重效果（表 6 及圖 2）。

【0156】 [表 6]

組別 (AVG)	第 0 天	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周
G1	0.00	-0.38	-0.75	-0.31	0.44	1.04	1.30	1.65
	0.00	±0.28	±0.45	±0.61	±0.73	±0.88	±0.83	±0.75
G2	0.00	1.63	3.06	4.55	5.97	6.99	7.63	8.46
	0.00	±0.31	±0.25	±0.30	±0.36	±0.41	±0.51	±0.67
G4	0.00	0.43	1.31	2.51	3.17	4.13	4.82	5.86
	0.00	±0.31	±0.25	±0.30	±0.36	±0.41	±0.51	±0.67
G5	0.00	0.99	1.74	3.07	3.10	4.31	5.48	6.53
	0.00	±0.18	±0.29	±0.42	±0.69	±0.74	±0.70	±0.77
G7	0.00	0.42	1.95	3.13	2.56	3.58	4.36	4.74
	0.00	±0.17	±0.23	±0.28	±0.64	±0.44	±0.40	±0.41

數據以平均值± SEM 表示

G1：陰性控制組（NCD），G2：陰性控制組（HFD），

G4：僅 Treg 細胞，G5：GB-102，G7：Treg+GB-102

【0157】 此外，可看出單獨施用 Treg 細胞的組別並無減重效果，而單獨施用發酵乳酸桿菌 GB-103 的組別相較於高脂肪飲食的控制組展現出減重效果。此外，可看出組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-103 的組別相較於單獨施用各測試物質的組別，展現出顯著的減重效果（表 7 及圖 3）。

PF-B2816-TW (2022TWP4326)

【0158】 [表 7]

組別 (AVG)	第 0 天	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周
G1	0.00	-0.38	-0.75	-0.31	0.44	1.04	1.30	1.65
	0.00	±0.28	±0.45	±0.61	±0.73	±0.88	±0.83	±0.75
G2	0.00	1.63	3.06	4.55	5.97	6.99	7.63	8.46
	0.00	±0.31	±0.25	±0.30	±0.36	±0.41	±0.51	±0.67
G4	0.00	0.43	1.31	2.51	3.17	4.13	4.82	5.86
	0.00	±0.31	±0.25	±0.30	±0.36	±0.41	±0.51	±0.67
G8	0.00	0.45	1.19	1.90	2.23	3.50	4.22	4.83
	0.00	±0.20	±0.43	±0.53	±0.59	±0.60	±0.59	±0.64
G9	0.00	-0.25	0.84	1.59	0.96	2.66	3.26	3.61
	0.00	±0.08	±0.09	±0.31	±0.45	±0.51	±0.55	±0.35

數據以平均值± SEM 表示

G1：陰性控制組（NCD），G2：陰性控制組（HFD），G4：僅 Treg 細胞，G8：
GB-103，G9：Treg+GB-103

【0159】 示例 5-3. 在共同施用免疫細胞與發酵乳酸桿菌菌株時的腹腔葡萄糖耐受性測試（IPGTT）

【0160】 在進行腹腔葡萄糖耐受性（IPGTT）測試之前，所有量測動物皆禁食至少 12 小時。將進食小鼠的尾端剪掉，以血糖計量測空腹血糖。將葡萄糖以蒸餾水稀釋以獲得 10% 葡萄糖，將其以對應於各個動物的體重的 10 倍之量（ μ l）施用。在施用後，以 30 分鐘間隔持續 2 小時從尾巴收集血液，以葡萄糖計量測血糖。

【0161】 觀察在單獨或組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-102 時之腹腔葡萄糖耐受性試驗中的變化。結果顯示出單獨施用 Treg 細胞的組別以及單獨施用發酵乳酸桿菌 GB-102 的組別現出血糖控制效果，而組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-PF-B2816-TW (2022TWP4326)

102 的組別達到低的血糖尖峰並最快達到空腹血糖程度，這表示組合施用的組別相較於單獨施用的組別展現出優異的血糖控制效果（表 8 及圖 4）。

【0162】 [表 8]

AVG(mg/dl)	0 分鐘	30 分鐘	60 分鐘	90 分鐘	120 分鐘
G1	125.90	257.20	191.60	184.10	165.10
	±3.64	±7.14	±6.71	±7.32	±9.34
G2	157.53	350.80	232.20	220.33	202.40
	±4.48	±14.52	±12.46	±15.32	±14.08
G4	152.89	294.67	226.00	205.33	167.44
	±6.48	±16.09	±6.47	±5.27	±5.96
G5	167.40	319.30	245.60	223.90	184.70
	±5.18	±11.68	±12.35	±13.38	±9.92
G7	159.38	255.38	196.63	192.63	169.63
	±4.99	±10.86	±16.3	±10.04	±9.97

數據以平均值±SEM 表示

G1：陰性控制組（NCD），

G2：陰性控制組（HFD），G4：僅 Treg 細胞，

G5：GB-102，G7：Treg+GB-102

【0163】 此外，觀察在單獨或組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-103 時之腹腔葡萄糖耐受性試驗中的變化。結果顯示出單獨施用 Treg 細胞的組別以及單獨施用發酵乳酸桿菌 GB-103 的組別展現出血糖控制效果，而組合施用 Treg 細胞與發酵乳酸桿菌 GB-103 的組別達到低的血糖尖峰並最快達到空腹血糖程度，這表示組合施用的組別相較於單獨施用的組別展現出優異的血糖控制

效果（表 9 及圖 5）。

【0164】 [表 9]

AVG	0 分鐘	30 分鐘	60 分鐘	90 分鐘	120 分鐘
G1	125.90	257.20	191.60	184.10	165.10
	±3.64	±7.14	±6.71	±7.32	±9.34
G2	157.53	350.80	232.20	220.33	202.40
	±4.48	±14.52	±12.46	±15.32	±14.08
G4	152.89	294.67	226.00	205.33	167.44
	±6.48	±16.09	±6.47	±5.27	±5.96
G8	169.78	281.11	230.67	229.22	197.67
	±3.43	±13.09	±16.12	±17.13	±12.76
G9	138.11	238.00	186.33	172.78	162.78
	±5.94	±5.35	±7.91	±9.76	±6.53

數據以平均值±SEM 表示

G1：陰性控制組（NCD），G2：陰性控制組（HFD），G4：單獨 Treg 細胞，

G8：GB-103，G9：Treg+GB-103

【0165】 本發明之含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞的組合物以及使用其的組合療法展現出良好的體重增加抑制效果。因此，本發明之含有發酵乳酸桿菌菌株及調節型 T 細胞的組合物以及使用其的組合療法能夠輕易用於控制受試者的體重，並可利用於美容、畜牧、醫藥等領域，尤其，可利用於食品添加劑、保健功能性食品以及用於改善、預防及治療代謝疾病的治療劑之領域。

【0166】 儘管已詳細描述本發明之具體的構成，但本領域具有通常知識者將理解，此詳細描述提供作為較佳的實施例以便說
PF-B2816-TW (2022TWP4326)

明，並不應被解釋為限制本發明的範圍。因此，本發明之實質範圍由請求項及其均等物界定。

【符號說明】

【0167】 無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="2022TWP4326-序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.2.0" productionDate="2022-10-14">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>111122308</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-06-15</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>PP-B2816</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>KR</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>KR 2021-0077914</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-06-16</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">南韓商 G I 細胞股份有限公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>GI Cell, Inc.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">發酵乳酸桿菌菌株與調節型T細胞用於組合療法以抑
制體重增加以及預防或治療代謝疾病的用途</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>2</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1441</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1441</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>GB102_16S_full</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>GB102_16S_full</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..1441</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成建構體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcaagtcgaacgcgttggcccaattgattgatggtgcttgcacctgattgattttggtcgcc
aacgagtggcggacgggtgagtaacacgtaggtaacctgccagaagcgggggacaacatttggaaacagatgctaatac
cgcataacaacgttgttcgatgaacaacgcttaaaagatggcttctcgtatcacttctggatggacctgcggtgcatt
agcttgttgggtgggtaatggcctaccaaggcagatgatgcatagccgagttgagagactgatcgccacaatgggactga
gacacggccatactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatgggcgcaagcctgatggagcaaacaccgct
gagtgagaagggttctcgctcgtaaagctctgttgttaaagaagaacacgtatgagagtaactgttcatacgttgacgg
tatttaaccagaaagtcacggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggtggcaagcgttatccggatttatt
ggcgtaaaagagagtgcaggcgggtttctaaagcttgatgtgaaagccttcggcttaaccggagaagtgcacggaactg
gataacttgagtgcagaagagggtagtggaactccatgtgttagcggtaggaatgcgtagatataatggaagaacaccagtgg
cgaaggcggctacctggtctgcaactgacgctgagactcgaaagcatgggttagcgaacaggattagataccctggtagtc
catgccgtaaacgatgagtgcctaggtgttggagggttccgcccttcagtgccggagctaacgcattaagcactccgcct
ggggagtacgaccgcaaggtgaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcga
agctacgcaagaaccttaccaggtcttgacatcttgcccaaccttagagataggcggttctctcggaacgcaatga
caggtggtgcatggtcgtcgtcagctcgtgctgtagatgttgggttaagtcccgaacgagcgcgaaccttgttactag
ttgccagcattaagttgggactctagtgagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggacgacgctcagatcatcat
gccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggacggtacaacgagtcgcgaactcgcgagggcaagcaaatctct
taaaaccgttctcagttcggactgcaggctgcaactcgctgcacgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatcagcatg
ccgcggtgaatacgttcccgggcttgtacacaccgcccgtcacaccatgagagtttgaacacccaaagtcggtgggggt
aaccttttaggagccagcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>

```

```

<INSDSeq_length>1447</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1447</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q3">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>GB103_16S_full</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>GB103_16S_full</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1447</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成建構體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atacatgcaagtcgaacgcgcttgcccaattgattgatggtgcttgcacctgattgattttg
gtcgccaacgagtggcggacgggtgagtaacacgtaggtaacctgccagaagcgggggacaacatttggaaacagatgc
taataccgcataacagcgttgttcgcatgaacaacgcttaaagatggcttctcgctatcacttctggatggacctgagg
tgcattagcttgttgggtgggtaacggcctaccaaggcagatgatgcatagccgagttgagagactgatcgccacaatgg
gactgagacacggccatactcctacgggagggcagcagtagggaatcttccacaatgggcgcaagcctgatggagcaaca
ccgctgagtgagaagggttctggctcgtaaagctctgttgttaaagaagaacacgtatgagagtaactgttcatacgt
tgacggtatthaaccagaaagtcacggctaactacgtgccagcagccgcggtatacgttaggtggcaagcgttatccgga
ttattgggcgtaagagagtgacggcggtttctaaagcttgatgtgaaagccttcggcttaaccggagaagtgcacgg
aaactggataacttgagtgcagaagagggtagtggaaactccatgtgtagcgggtggaatgcgtagatataatggaagaacac

```

cagtggcgaaggcggctacctggtctgcaactgacgctgagactcgaaagcatgggtagcgaacaggattagataccctg
gtagtccatgccgtaaacgatgagtgctaggtgttggagggtttccgcccttcagtgccggagctaacgcattaagcact
ccgcctggggagtacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtaggagcatgtggttta
attcgaagctacgcaagaaccttaccaggtcttgacatcttgcgccaaccttagagatagggcgtttcttcgggaacg
caatgacaggtggtgcatggtcgtcgtcagctcgtgctgagatgttgggttaagtcccgaacgagcgcgaaccttgt
tactagttgccagcattaagttgggcactctagtgagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggacgacgtcagat
catcatgcccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatggacggtacaacgagtcgcgaactcgcgagggcaagcaa
atctcttaaaccgttctcagttcggactgcaggctgcaactcgctgcacgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatc
agcatgcccggtgaatacgttccccggccttgacacaccgcccgtcacacatgagagtttgtaacacccaaagtcgg
tgggtaaccttttaggagccagcc</INSDSeq_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種用於抑制體重增加的組合物，包含發酵乳酸桿菌（*Lactobacillus fermentum*）菌株作為有效成分，該組合物與調節型 T 細胞組合施用。

【請求項2】 如請求項 1 所述之組合物，其中該發酵乳酸桿菌菌株包含選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

【請求項3】 如請求項 1 所述之組合物，其中該組合物係一醫藥組合物或一食品組合物。

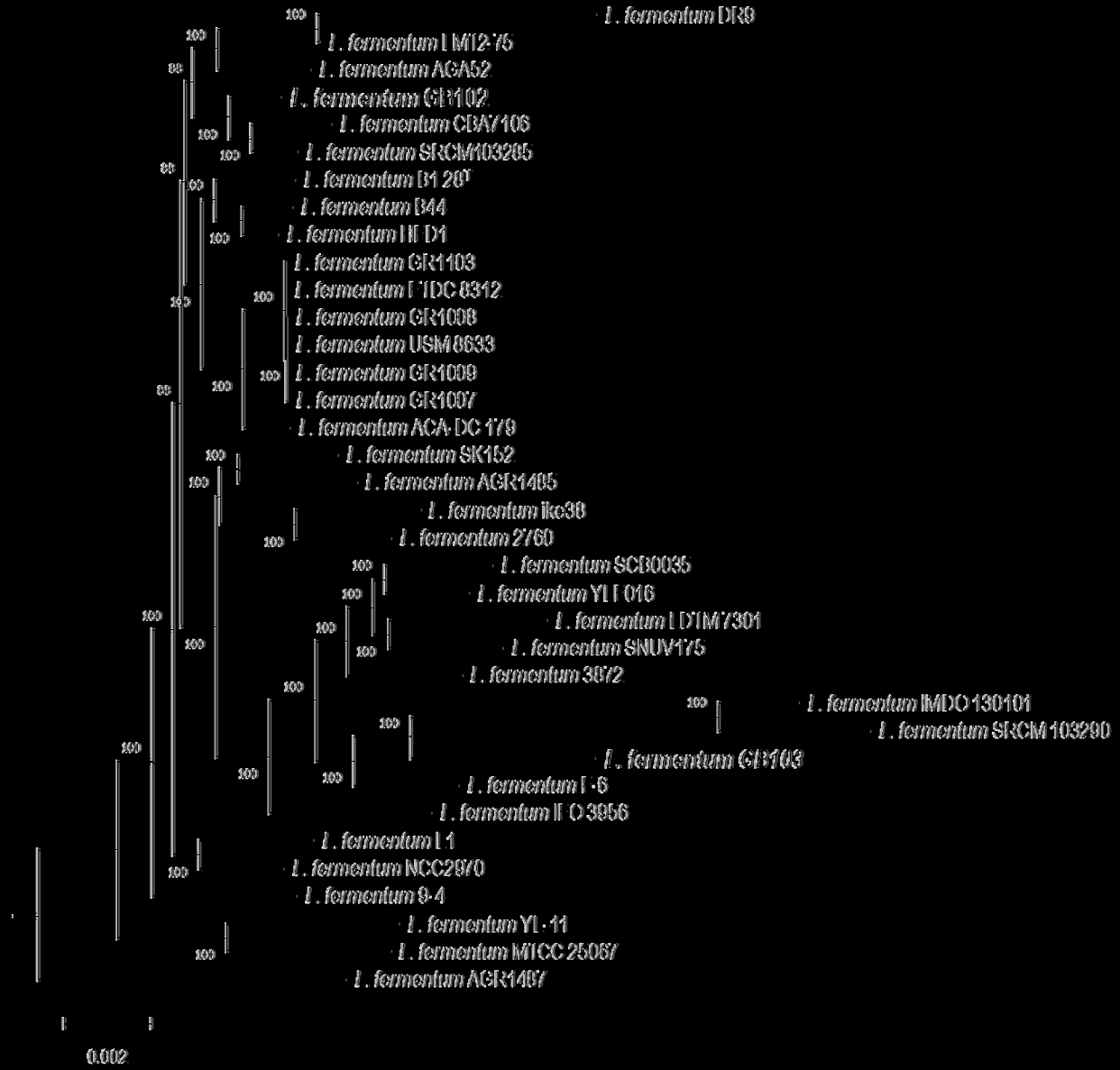
【請求項4】 一種用於預防或治療代謝疾病的組合物，含有發酵乳酸桿菌（*Lactobacillus fermentum*）菌株作為有效成分，該組合物與調節型 T 細胞組合施用。

【請求項5】 如請求項 4 所述之組合物，其中該發酵乳酸桿菌菌株包含選自由寄存編號為 KCTC 14105BP 之發酵乳酸桿菌 GB-102 菌株以及寄存編號為 KCTC 14106BP 之發酵乳酸桿菌 GB-103 菌株所組成的群組之至少一者。

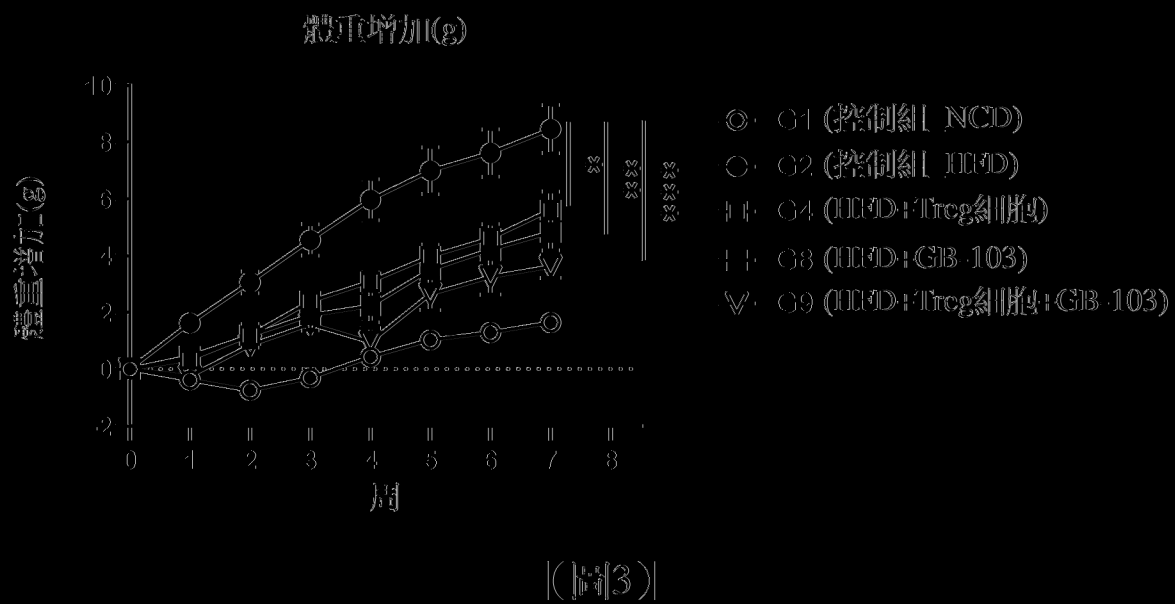
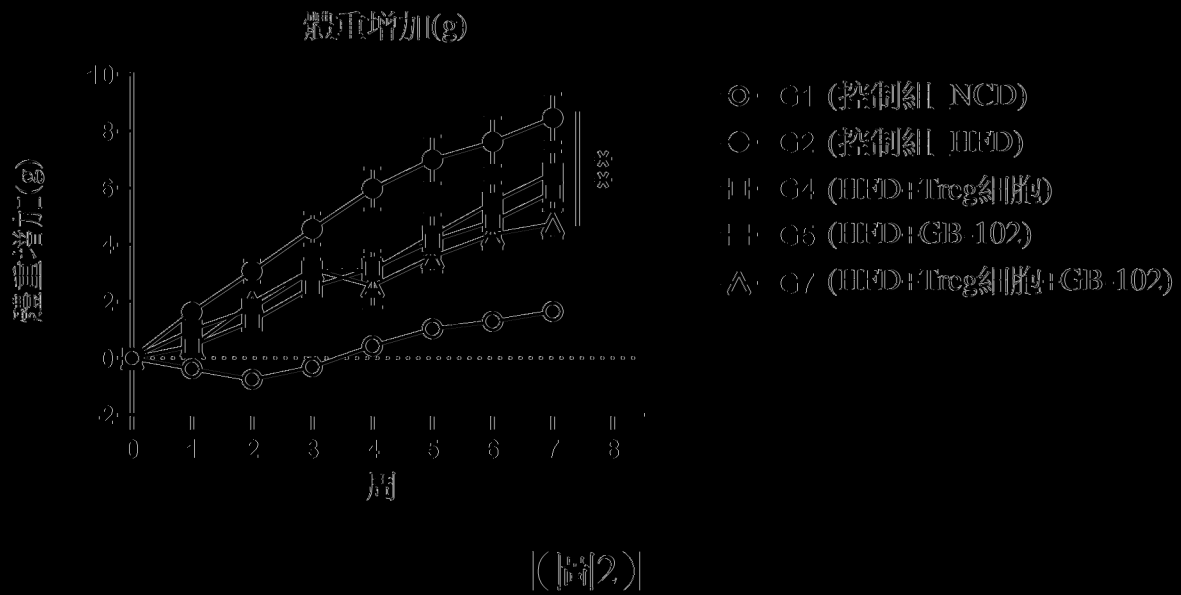
【請求項6】 如請求項 4 所述之組合物，其中該代謝疾病選自由肥胖、糖尿病、高血壓、動脈硬化、高脂血症、高胰島素血症、胰島素抗性、代謝性炎症、空腹血糖異常、葡萄糖耐受性受損及葡萄糖耐受性症候群所組成的群組。

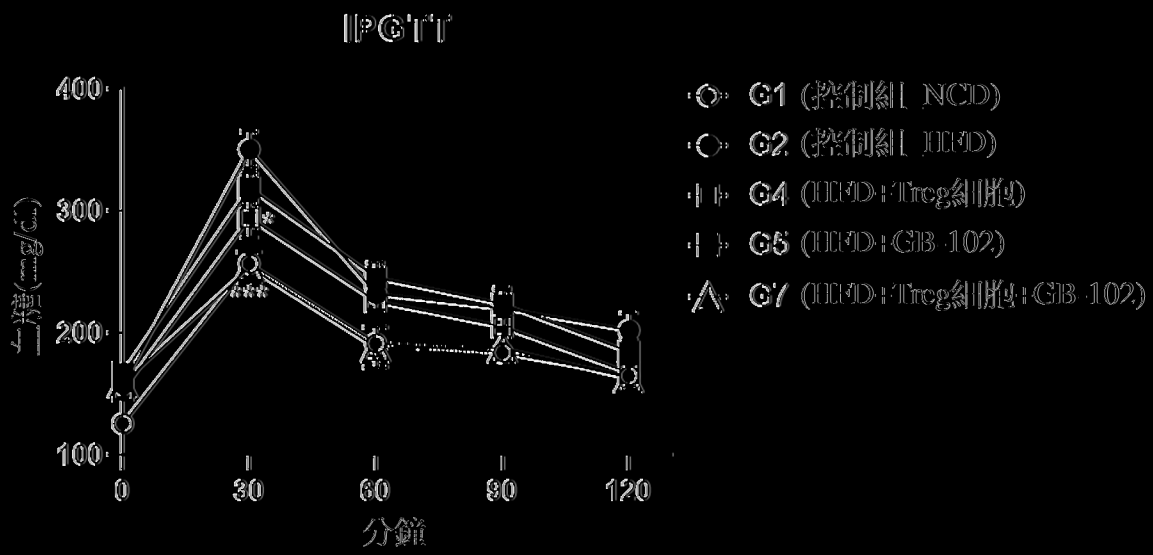
【請求項7】 如請求項4所述之組合物，其中該組合物係一醫藥組合物或一食品組合物。

(發明圖式)

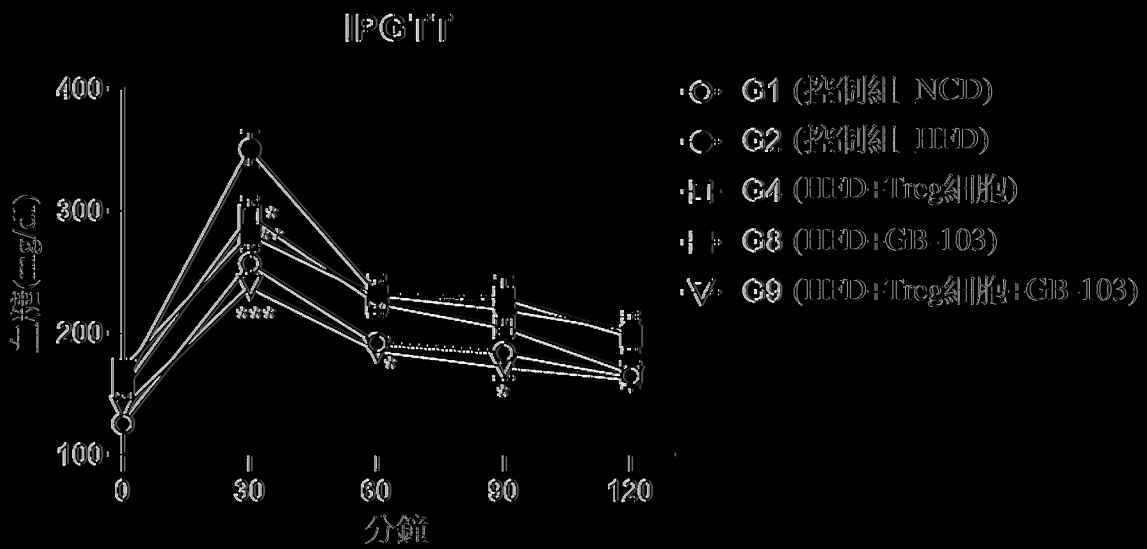


(發明圖式)





(圖4)



(圖5)