

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 4월 23일 (23.04.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/080653 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/06 (2006.01) A61K 31/716 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/736 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/009422

(22) 국제출원일: 2019년 7월 29일 (29.07.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0123814 2018년 10월 17일 (17.10.2018) KR

(71) 출원인: 기초과학연구원 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) [KR/KR]; 34126 대전시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR). 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION)

[KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

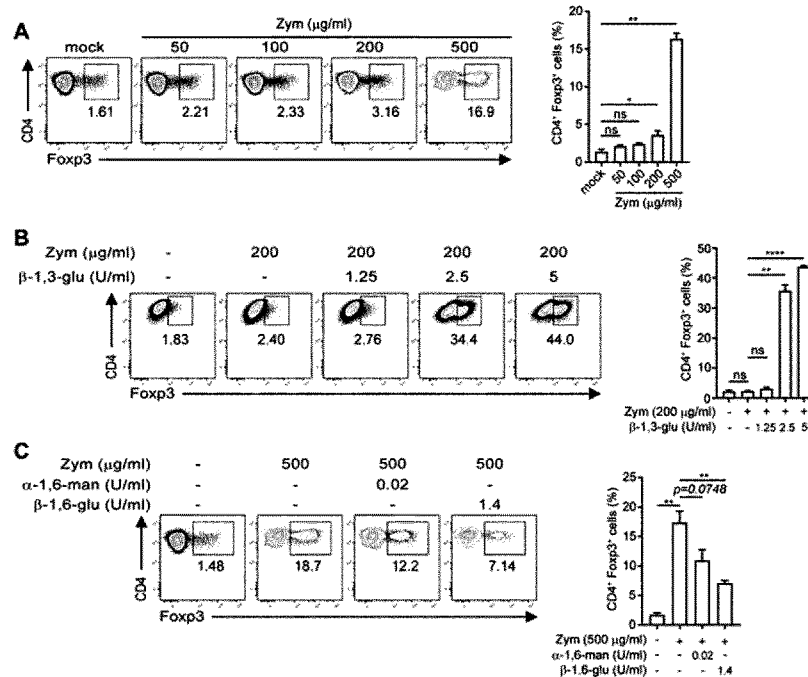
(72) 발명자: 임신헌 (IM, Sin-Hyeog); 34660 경상북도 포항시 남구 회망대로 520 180-1401, Gyeongsangbuk-do (KR). 라비비르마 (RAVI, Verma); 37664 경상북도 포항시 남구 효자동길6번길 16 301호, Gyeongsangbuk-do (KR). 이창현 (LEE, Changhon); 37664 경상북도 포항시 남구 효자동길10번길 35 102호, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

(54) Title: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF YEAST-DERIVED POLYSACCHARIDE INDUCING TREG CELL

(54) 발명의 명칭: TREG 세포를 유도하는 효모 유래 다당체의 구조 및 기능 특성



(57) Abstract: The present invention relates to a yeast-derived polysaccharide inducing Treg cells and a use thereof and, more particularly, to a polysaccharide containing mannan and β-glucan, an immunomodulatory composition comprising the polysaccharide as an active ingredient, a pharmaceutical composition or food comprising the polysaccharide as an active ingredient for prevention or treatment of immune disease or inflammatory disease, a method for preparation of regulatory T cells by using the polysaccharide, a cell therapy product comprising the regulatory T cells prepared by the preparation method as an active ingredient, and a treatment method using same. Even at a low dose, the novel polysaccharide according to the present invention allows the production of tolerogenic antigen presenting cells through the β-glucan and mannan structure retained therein, whereby the novel polysaccharide can induce the differentiation or production of antigen-specific regulatory T cells (Treg cells) to modulate the target immune system with low adverse effects. Therefore, MGCP and the Treg cells induced by the polysaccharide are effective for preventing or treating immune disease

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

or inflammatory disease.

(57) 요약서: 본 발명은 Treg 세포를 유도하는 효모 유래 다당체 및 이의 용도에 관한 것으로 보다 상세하게는 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 다당체, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 식품, 상기 다당체를 이용한 조절 T 세포의 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 세포치료제 및 이를 이용한 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 다당체는, 낮은 용량으로도 다당체가 가지는 베타-글루칸 및 만난(mannan) 구조를 통해 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 생성하고 이에 의해 항원 특이적인 조절 T 세포(Treg 세포)의 분화 또는 생성을 유도하여 적은 부작용으로 목표하는 면역 체계를 조절할 수 있다. 따라서, MGCP 및 상기 다당체에 의해 유도된 Treg 세포는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 및 치료에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: TREG 세포를 유도하는 효모 유래 다당체의 구조 및 기능 특성

기술분야

- [1] 본 발명은 Treg 세포를 유도하는 효모 유래 다당체 및 이의 용도에 관한 것으로 보다 상세하게는 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 다당체, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 식품, 상기 다당체를 이용한 조절 T 세포의 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 세포치료제 및 이를 투여하는 단계를 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 치료방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 포유류는 면역 시스템과 끊임없이 상호 작용하는 일련의 미생물을 보유하고 있다. 공생 미생물은 숙주와 공생관계를 맺으며, 소화, 행동, 면역 시스템의 성숙과 같은 다양한 과정에서 숙주와 상호 작용한다(Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat Rev Immunol 2010;10(10):735-44.). 마찬가지로, 곰팡이는 인체에 존재하며, 숙주의 면역시스템에 영향을 준다(Wheeler ML, Limon JJ, Underhill DM. Immunity to Commensal Fungi: Detente and Disease. Annu Rev Pathol 2017;12:359-85.). 선천성 면역세포는 Toll-유사 수용체(Toll-like receptors, TLRs)와 같은 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)를 통해 다당류를 포함한 곰팡이 세포 표면의 다양한 병원균 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)을 검출한다. 신호를 탐지하면 선천성 면역세포가 유전자 발현 profile을 변경하고 후천적 면역을 조율하기 위해 사이토카인과 같은 면역 신호 분자를 생산한다(Iliev ID, Leonardi I. Nat Rev Immunol 2017;17(10):635-46., Underhill DM, Iliev ID. Nat Rev Immunol 2014;14(6):405-16. 및 Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Annu Rev Immunol 2015;33:257-90.).
- [4] 이러한 공생 미생물들은 T 헬퍼 17 세포(Th17) 또는 조절 T 세포(Treg 세포)와 같은 CD4 세포의 특정 계통의 발달과 분화를 조절한다. Treg 세포는 면역억제기능을 가진 CD4+ 세포의 하위 집합이며 전사 인자 Foxp3의 발현을 특징으로 한다. Treg 세포는 크게 생성 위치에 따라 흉선 유래 세포(nTreg 세포) 및 비흉선 세포로서, 2차 면역기관에서 CD4+ T naive로부터 유도된 Treg 세포(iTreg 또는 pTreg)로 나누어 진다. 생체 내 Treg 세포의 강화는 자가면역 및

- 알레르기 질환과 같은 다양한 과면역 질환을 조절할 수 있다. 이러한 Treg 세포 생성의 기본 분자 메커니즘은 명확히 밝혀진 바 없으며, 여러 연구에 따르면, 박테리아가 생산한 대사 산물 또는 특정 화학 구조를 갖는 세포벽 유래 다당체들이 Treg 세포의 분화를 촉진할 수 있다고 한다. 예를 들어 부티레이트는 클로스트리디아에 의해 결장 Treg 세포를 유도하는 주요 효과 분자로 보고되었다 (Furusawa et al., Nature 504:446-450, 2013). *B. fragilis*의 쌍성이온 다당류인 다당류 A (PSA)는 Treg 세포를 생산하는 IL-10 유도에 중요한 효과 면역조절제로 확인되었다 (Mazmanian et al., Cell 122:107-118, 2005; Ochoa-Reparaz et al., The Journal of Immunology 185:4101-4108, 2010). 또한 *Bifidobacterium bifidum* 유래 세포표면 다당체인 CSGG등이 Treg세포를 유도할 수 있다고 보고된 바 있다 (Ravi Verma et al., Science immunology 3 (28), eaat6975)
- [5] 이와 같은 미생물 또는 이의 대사산물 등을 환자의 치료에 이용하기 위해서, 일부 환자는 과다 활성화된 면역반응 (즉, 알레르기 또는 자가면역 질환)을 억제해야 하는 반면, 일부 환자는 면역계를 강화 (즉, 암 또는 바이러스 감염)시킬 필요가 있다. 예를 들어, Th17-유도 프로바이오틱스 균인 비피도박테리움을 류마티스성 관절염 동물모델에 투여했을 때 관절염 증상을 악화시켰다 (Tze Guan Tan, 113(50):E8141-E8150, 2016). 따라서, 유익한 미생물의 동정 및 그 작용인자의 메커니즘을 밝히는 것은 치료학적으로 매우 중요하다.
- [6]
- [7] 한편, 효모 유래 다당류는 면역 조절 기능을 가지고 있으며, 면역시스템을 활성화 하거나 억제하기 위한 치료제로 이용된다(Tzianabos AO. Clin Microbiol Rev 2000;13(4):523-33.) 베타-글루칸은 복잡하고 다양한 구조를 가진 곰팡이 세포벽의 가장 풍부한 다당류이다(Camilli G, Tabouret G, Quintin J. The Complexity of Fungal beta-Glucan in Health and Disease: Effects on the Mononuclear Phagocyte System.). 이들은 면역 반응에 영향을 미치는 생물학적 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(Silva VdO, de Moura NO, de Oliveira LJR, et al. Promising Effects of Beta-Glucans on Metabolism and on the Immune Responses: Review Article.).
- [8] 일반적으로, 연구자들은 베타-글루칸을 전염병 치료제 또는 암 치료제의 보조제로 사용해왔다(Sun B, Yu S, Zhao D, et al. Vaccine 2018;36(35):5226-34. 및 Novak M, Vetvicka V. J Immunotoxicol 2008;5(1):47-57.). 반면에 몇몇의 연구에서는 베타-글루칸이 항 염증성 기능을 가지는 것으로 보고하고 있다(Dalonso N, Goldman GH, Gern RM. Appl Microbiol Biotechnol 2015;99(19):7893-906. 및 Lee KH, Park M, Ji KY, et al. Bacterial beta-(1,3)-glucan prevents DSS-induced IBD by restoring the reduced population of regulatory T cells.). 곰팡이의 베타-글루칸과 유사하게 곰팡이 만난 또한 면역조절 역할을 수행하는 것으로 보고 되었다(Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense

against *Candida albicans*.). 그러나 면역 조절자로서의 다당류의 역할이 보고됨에도 불구하고, 다당류가 면역계를 조절하는 정확한 요소 및 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀진 바 없다. 특히 다당체의 구조와 분자량에 따라 서로 다르게 일어나는 면역 반응 (면역 증강 또는 과민면역억제 반응)에 대해서는 정확히 규정된 바 없다. 이를 규명하는 것은, 특정 질환에서 관찰되는, 잘못된 면역반응을 원하는 방향으로 재설계하는데 매우 중요하며, 질환 치료제 개발에도 적용될 수 있다.

- [9] 자이모산(zymosan)은 효모의 유령 세포(ghost cell, *Saccharomyces cerevisiae*)로서, 대부분의 효모들은 유사한 세포벽 성분을 가지고 있다. 효모 (이스트) 세포벽은 만난으로 구성된 외막과 β -1,6-글루칸을 통해 연결된 여러 층의 β -1,3-linked 글루칸의 복잡한 구조를 가진 글루칸으로 구성된 내막으로 구분되는 두 개의 층 구조를 갖는다(Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 2017;5(3)). 자이모산의 다당류는 주로 구조적으로 이스트와 유사한 β -글루칸과 만난으로 구성된다. 이외 많은 연구에서 곰팡이 다당류의 면역 시스템에 대한 역할을 연구하기 위해 자이모산을 활용했으나, 이러한 연구결과는 논란의 여지가 있다. 일부 연구에 따르면, 자이모산이 면역 시스템을 활성화시켜 염증성 질환을 악화시키는 것으로 나타났으며(Sanguedolce MV, Capo C, Bongrand P, et al. Zymosan-stimulated tumor necrosis factor- α production by human monocytes 및 Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, et al. *J Exp Med* 2003;197(9):1107-17), 자가 면역 질환을 완화시키기 위해 항원 특이적 T 세포 반응을 억제하는 IL-10 생성 면역 관용성 항원 제시 세포를 유도함으로써 면역학적으로 내성을 유도할 수 있음을 증명하는 다른 연구들도 있다(Karumuthil-Melethil S, et al. *Diabetes* 2015; 64(4):1341-57. 및 Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, et al. *J Clin Invest* 2006;116(4):916-28.).
- [10] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 효모 유래의 다당체에서 면역 조절 기능을 가지는 정확한 요소 및 메커니즘을 밝히고 이를 통해 낮은 용량으로도 효율적으로 Treg의 분화 또는 생성을 유도할 수 있는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 효모 세포벽에서부터 신규한 다당체를 정제하고, MGCP(mannan/beta-glucan containing polysaccharides)라 명명하였다. 또한, in vitro 및 in vivo에서 상기 MGCP에 의해 Treg 세포가 유도될 수 있고, MGCP에 의한 Treg 세포의 유도에 β -1,6-글루칸이 필수적임을 확인하였으며, MGCP 또는 MGCP에 의해 유도된 Treg 세포의 투여는 대장염을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [11] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[12]

[13] **발명의 요약**

[14] 본 발명의 목적은 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 신규한 다당체를 제공하는 데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물을 제공하는 데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 개선용 식품을 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 조성물의 용도를 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체를 이용한 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용 세포치료제를 제공하는 데 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 세포치료제를 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[23] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 세포치료제의 용도를 제공하는 데 있다.

[24]

[25] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 다당체를 제공한다.

[26] 본 발명은 또한, 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물을 제공한다.

[27] 본 발명은 또한, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[28] 본 발명은 또한, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 개선용 식품을 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 조성물의 용도를 제공한다.

[31] 본 발명은 또한, 항원 제시 세포(antigen presenting cell)에 상기 다당체를

처리하여 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 획득하는 단계; 및 상기 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 CD4+ T 세포와 공배양(co-incubation)하여 조절 T 세포(Treg 세포)를 유도하는 단계를 포함하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법을 제공한다.

[32] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용 세포치료제를 제공한다.

[33] 본 발명은 또한, 상기 세포치료제를 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[34] 본 발명은 또한, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 세포치료제의 용도를 제공한다.

[35]

도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 자이모산 유래의 다당체 성분이 in vitro에서 Treg 세포의 생성에 차별적인 영향을 미치는 것에 관한 것이다. 비장 CD11c+ DC를 표지된 용량의 자이모산으로 자극 시킨 뒤, 미분화 CD4 T 세포 (naive CD4+ T cell)와 함께 배양하였다. 유동 세포계측 플롯(Flow cytometry plots)은 세번의 독립 실험을 대표한다. 모든 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[37] 도 1A는 다양한 농도의 자이모산에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T세포의 빈도를 나타낸 것이다.

[38] 표지된 자이모산의 양을 표지된 절단효소로 분해한 다음, 비장 CD11c+ DC는 naive CD4 T 세포의 첨가 전에 절단된 자이모산으로 프라이밍 하였다(도 1B, 도 1C).

[39] 도 1B는 β -1,3-글루카나아제(β -1,3-glucanase) 처리된 자이모산에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.

[40] 도 1C는 표지된 효소와 절단된 자이모산에 의한 CD4+Foxp3+ T 세포의 유도를 나타낸 것이다.

[41]

[42] 도2는 자이모산의 다당체의 면역반응에 대한 역할에 관한 것이다.

[43] 비장 CD11c+ DC는 다른 용량의 자이모산으로 자극된 후 Th1 및 Th17 세포 방향으로의 sub-optimal 비대칭(skewing) condition아래에서 naive CD4 T 세포와 함께 배양되었다. 모든 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[44] 도 2A는 Th1 및 Th17 세포 방향으로의 optimal 비대칭(skewing) condition아래에서 T-bet 또는 ROR γ t의 유동 세포계측 플롯 및 MFI를 나타낸 것이다.

- [45] 비장 DC를 자극하기 전에 동종의 절단효소를 처리하여 표지된 용량의 자이모산으로부터 특정 다당류를 제거하였다. 변형된 자이모산을 Th1 또는 Th17 주환경에서 naive CD4 T 세포와 함께 배양한 DC에 처리하였다.
- [46] 도 2B는 β -1,3-글루칸 제거된 자이모산에 의한 T-bet 또는 ROR γ t의 MFI를 나타낸 것이다.
- [47] 도 2C는 만노시다아제 또는 β -1,6-글루카네이즈 처리된 자이모산에 의한 T-bet 또는 ROR γ t의 MFI를 나타낸 것이다.
- [48]
- [49] 도 3은 MGCP의 화학적 조성 및 기능적 특성에 관한 것이다.
- [50] 도 3A는 MGCP의 조성을 나타낸 것이다.
- [51] naive CD4 T 세포와 함께 배양되기 전에 비장 DC는 표지된 다당류에 의해 자극되었다.
- [52] 도 3B는 만난 또는 쿠들란(β -1,3-글루칸)에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [53] 도 3C는 푸스톨란(선형 β -1,6-글루칸)에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [54] 도 3D는 다양한 농도의 D-(+) 만노스에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [55] 도 3E는 비손상 이스트 세포벽 또는 β -1,3-글루칸이 제거된 이스트 세포벽에서 정제된 MGCP에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [56] 모든 바 그래프는 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).
- [57]
- [58] 도 4는 MGCP의 조성을 분석한 결과를 나타낸 표이다.
- [59]
- [60] 도 5는 MGCP에 의한 Treg 세포의 분화에서 β -1,6-글루칸의 역할을 나타낸 것이다.
- [61] 도 5A는 MGCP의 양성자 NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [62] 도 5B는 mannan의 화학적 구조를 나타낸 것이다.
- [63] 도 5C는 MGCP의 β -1,6-글루칸 부분의 화학적 구조를 나타낸 것이다.
- [64] 도 1과 동일하게, 비장 CD11c+ DC는 naive CD4 T 세포와 배양되기 전에 표지된 분자로 처리하였다(도 5D 및 5E).
- [65] 도 5D는 MGCP에 의해 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [66] 도 5E는 표지된 효소로 절단된 MGCP에 의한 Treg 세포의 유도를 나타낸 것이다.
- [67] 유동 세포 계측플롯은 유사한 결과를 갖는 3번의 독립 실험을 대표한다. 모든 그래프 플롯은 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ (스튜던트 t 테스트).

[68]

[69] 도 6은 HPLC를 이용하여 전체 MGCP를 분석한 결과이다. HPLC 분석 조건은 TSK G-5000PWXL 크기 배제 컬럼을 사용하였고 용리제는 암모늄 중탄산염(ammonium bicarbonate) 50mM, 유속은 0.8ml/min이다. 분석 결과는 refractive index detector와 206nm 파장의 UV detector를 사용하여 확인하였다. 분자량 확인을 위해 사용한 standard 물질은 dextran standard를 사용하였고 이에 대한 정보는 표 2에 있다. A, B, C는 HPLC 분석 결과를 바탕으로 분획한 세 분획을 나타낸다.

[70]

[71] 도 7은 도 6에서의 MGCP의 A, B, C분획을 HPLC 분석 한 결과이다. 분석 조건은 도 6과 동일하게 수행하였다. 분자량 확인을 위해 사용한 standard 물질은 dextran standard를 사용하였고 이에 대한 정보는 표 2에 있다.

[72]

[73] 도 8은 MGCP로 유도된 Treg 세포의 염증성 면역반응의 억제에 관한 것이다(in vivo). iTreg 세포는 in vitro에서 비장 DC와 유사유전자형으로(congenically) 표지된 naive CD4 T 세포(CD45.1+CD4+Foxp3EGFP-CD44loCD62Lhi)와 비장 DC의 공동 배양을 통해 생성되었다. iTreg 세포 (CD45.1+CD4+Foxp3EGFP+)는 선별된 FACs이며, Rag1-/- 마우스로 미접촉 CD4 T 세포(CD45.1-CD4+Foxp3Thy1.1CD44loCD62Lhi)와 함께 전달입양 되었다. 마우스를 엔드포인트(endpoint)에서 분석하였다. 각 점은 개개의 마우스를 나타내며 모든 바 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[74] 도 8A는 체중의 변화를 나타낸 것이다.

[75] 도 8B는 결장 길이를 나타내는 사진이다.

[76] 도 8C는 H&E 염색된 결장을 나타낸 사진이다.

[77] 도 8D는 대장염의 조직 병리학 스코어를 나타낸 것이다.

[78] 도 8E는 도너 미접촉 CD4 T 세포(CD45.1-)에서의 IFN- γ 생산을 나타낸 것이다.

[79]

[80] 도 9는 in vivo에서 MGCP의 보충이 Treg 세포의 신규한 생성을 촉진함을 나타내는 것이다. 마우스(CD45.1-)를 2주동안 매일 mock 또는 200 μ g의 MGCP로 처리한 다음, 유사유전자형으로(congenically) 표지된 naive CD4 T 세포(CD45.1+CD4+Foxp3EGFP-CD44loCD62Lhi)를 수여 받았다. MGCP는 세포의 전달 후 추가적으로 1주동안 투여되었다. CD4 T 세포를 수용자 마우스의 결장 점막 고유층(colonic lamina propria)에서 분석하였다. 각 점들은 개개의 마우스를 나타낸다. 유동 세포계측 플롯은 독립 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[81] 도 9A는 공여자 세포 유래의 Treg 세포(CD45.1+CD4+Foxp3EGFP+)의 빈도를

나타낸 것이다.

- [82] 도 9B는 공여자 세포(CD45.1+) 유래의 CD4+Foxp3EGFP- 및 CD4+Foxp3EGFP+ CD4 T 세포에서의 CTLA-4의 MFI를 나타낸 것이다
- [83] 도 9C는 수용자 유래 세포(CD45.1-CD4+Foxp3EGFP+)의 Treg 세포 빈도를 나타낸 것이다.
- [84] 도 9D는 호스트(CD45.1-) 유래 CD4+Foxp3- 세포 및 CD4+Foxp3+ 세포에서 CTLA-4의 발현을 나타낸 것이다.
- [85] 도 9E는 결장 점막 고유층(colonic lamina propria)에서 수용자 유래의 Treg 세포의 수를 나타낸 것이다.
- [86] 도 9F는 호스트 유래의 Treg 세포(CD45.1-CD4+Foxp3EGFP+Helios-)에서 말초 Treg 세포(peripheral Treg cells)의 빈도를 나타낸 것이다.
- [87] 도 9G는 결장 Treg 세포(CD4+Foxp3EGFP+)로부터 IL-10의 생산을 나타낸 것이다.
- [88] 도 9H는 이펙터 CD4 T 세포(CD4+Foxp3EGFP-)에서 IFN- γ 및 IL-17A의 양을 나타낸 것이다.
- [89]
- [90] 도 10은 MGCP의 보충이 소장에서 Treg 세포를 유도하고 림프절 조직에서는 유도하지 않음을 나타내는 것이다. 도 9과 같은 방법으로, MGCP(200 μ g)를 매일 2주간 투여한 다음 유사 유전자형으로(congenically) 표지된 naive CD4 T 세포를 수여받았다. MGCP의 보충은 추가적으로 1주 동안 계속 되었다. 소장의 점막 고유층의 CD4 T 세포를 평가하였다(A-H). 각 점은 개별 마우스를 대표한다. 유동 세포계측 플롯은 유사 결과를 갖는 세번의 독립 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ 이다(스튜던트 t 테스트).
- [91] 도 10A는 도너 세포로부터의 CD4+Foxp3+ T 세포로의 분화를 나타낸 것이다.
- [92] 도 10B는 도너 유래 CD4 T 세포로부터의 CTLA-4 발현을 나타낸 것이다.
- [93] 도 10C는 수용체 세포에서 CD4+Foxp3+ T세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [94] 도 10D는 호스트 유래 CD4 T 세포에서 CTLA-4의 MFI를 나타낸 것이다.
- [95] 도 10E는 마우스 결장에서 CD4+Foxp3+ T 세포의 수를 나타낸 것이다.
- [96] 도 10F는 수용자 유래의 CD4+Foxp3+ T 세포에서 유도성 Treg 세포의 비율을 나타낸 것이다.
- [97] 도 10G는 CD4+Foxp3+ T 세포에서 IL-10의 생산을 나타낸 것이다.
- [98] 도 10H는 이펙터 CD4 T 세포(CD4+Foxp3-)에서 IFN- γ 및 IL-17A의 생산을 나타낸 것이다.
- [99] 도 10I는 mLN에서 수용자 및 공여자 세포에서 유래하는 CD4+Foxp3+ T 세포를 나타낸 것이다.
- [100] 도 10J는 비장에서 수용자 및 공여자 세포에서 유래하는 CD4+Foxp3+ T 세포를 나타낸 것이다.

[101]

[102] 도 11은 MGCP의 투여가 항원-반응성 Treg 세포를 유도하고 실험성 대장염을 완화함을 나타내는 것이다. CBir 마우스에서 분리한 Naive CD4 T cells (CD4+Foxp3EGFP-CD44^{lo}CD62L^{hi})를 Rag1 결핍 마우스로 입양 전달하였다. 실험 기간 전체에 걸쳐 세포 입양전달 전달부터 격일로 DW(mock) 또는 200 μ g의 MGCP를 보충했다. 수용체는 엔드포인트에서 분석 되었다. 각 점들은 개개의 마우스를 나타낸다. 데이터는 세번의 독립 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[103] 도 11A는 체중의 변화를 나타낸 것이다.

[104] 도 11B는 결장의 대표 사진이다.

[105] 도 11C는 초기 체중에서 정상적인 결장 길이를 나타낸 것이다.

[106] 도 11D는 H&E 염색된 결장을 나타낸 사진이다.

[107] 도 11E는 대장염의 조직 병리학 스코어를 나타낸 것이다.

[108] 도 11F는 체중 감소 초기 단계에서 결장 점막 고유층(colonic lamina propria)으로 부터의 CD4+Foxp3+ T 세포 유도를 분석한 것이다.

[109] 도 11G는 실험의 엔드포인트에서 결장 CD4 T 세포(CD4+Foxp3EGFP-)로부터 IFN- γ 의 생산을 나타낸 것이다.

[110]

[111] 도 12는 대장염 상태 아래의 면역에 대한 MGCP 투여의 영향을 나타낸 것이다.

[112] 도 12A는 체중 감소 전, mock 및 MGCP 투여 및 CBir naive CD4 T 세포 수여된 Rag1 결핍 마우스의 결장 CD4+Foxp3+ T 세포에서의 CD103 및 CTLA-4의 발현량을 나타낸 것이다.

[113] 도 12B는 실험 종결 단계에서 결장 점막 고유층에서 유래한 CD4 T 세포의 IL-17A의 생산을 나타낸 것이다.

[114] 모든 바 그래프는 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[115]

[116] 도 13은 MGCP가 조절 표현형에 대한 DC의 전사체 형태(transcriptomic configuration)를 조절함을 나타내는 것이다. DC 서브셋(MHCII+CD11c+)은 CD103 및 CD11b의 발현에 따라 소장으로부터 분류된 FACs이며 도 1과 동일한 실험 절차를 통해 MGCP에 의한 Treg 세포 유도능력을 시험하였다. 데이터는 유사한 결과를 가지는 세 번의 독립 실험을 대표하며 모든 바 그래프는 mean $\pm$ SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[117] 도 13A는 각 DC 서브셋에서 MGCP 매개의 CD4+Foxp3+ T 세포의 유도의 데이터를 나타낸 것이다.

[118] GF 마우스(n=6)에 mock 또는 MGCP를 2주간 투여하였다 전사체는 결장

CD11c+ DC로부터 정제하였다.

[119] 도 13B는 mock 및 MGCP 투여된 GF 마우스 결장 DC의 면역 억제 관련 마커를 나타낸 것이다.

[120] 도 13C는 결장 DC에서 면역관용성 DC 마커의 발현을 나타낸 것이다.

[121] Cox2는 MGCP 처리 전 비장 DC에서 억제되었으며, Naive CD4 T 세포는 Cox2 선택적 저해제인 Celecoxib의 존재아래 상기 DC와 함께 72시간 동안 배양되었다.

[122] 도 13D는 CD4+Foxp3+ T 세포의 유동 세포계측 플롯을 나타낸 것이다.

[123] 도 13E는 mock 또는 MGCP 처리된 celecoxib의 존재/부존재 아래 유도된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.

[124]

[125] 도 14는 MGCP에 의한 Treg 세포의 생성에 있어서, 장 대식세포의 영향에 관한 것이다. 정제된 장내 대식세포(MHCII+CD11c+CD11b+F4/80+CD103-) FACs는 naive CD4 T 세포와 함께 배양되기 전 MGCP로 자극되었다. 유동 세포계측 플롯은 유사한 결과를 갖는 두 번의 독립적 실험을 대표하는 것이다.

[126]

[127] 도 15는 다양한 PRR의 MGCP로 유도된 Treg 세포의 생성과의 관련성을 나타내는 것이다. 도 1과 유사한 방법으로 특정한 선천적 면역 수용체 결핍 마우스로부터 정제된 비장 DC를 MGCP로 처리하였다. Naive CD4 T 세포는 MGCP 자극된 DC와 함께 배양되었다.

[128] 도 15A는 각 수용체 결핍 DC에서 MGCP 또는 mock를 처리한 경우에 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.

[129] 도 15B는 MyD88 신호전달체계 결핍 DC에서 MGCP 또는 mock를 처리한 경우에 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.

[130] 도 15C는 생성된 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다. 도 15C의 경우 MGCP를 비장 DC에 처리하기 전에 특정 CLR을 길항제(antagonist)로 차단했다. 남아있는 길항제 및 MGCP를 씻어낸 후 DC는 Naive CD4 T세포와 함께 배양되었다.

[131] 모든 바 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$ 이다(스튜던트 t 테스트).

[132]

[133] 도 16은 Dectin1이 MGCP에 의한 Treg 세포의 유도에 미치는 영향에 관한 것이다. Dectin1 풍부/결핍 마우스의 장간막 림프절 CD11c+DC를 MGCP로 8시간동안 자극하였다. Dectin1 손상/비손상 된 마우스에 200μg의 MGCP를 매일 2주간 보충하였으며, 유사유전자형으로(congenically) 표지된 OT-II naive CD4 T 세포(Thy1.1+Vα2+CD4+Foxp3EGFP-CD44loCD62Lhi)를 수여하였다. 수용자는 세포를 옮기기 하루 전날부터 시작하여 OVA 단백질(20mg)을 격일로 투여하였으며, 동시에 MGCP는 추가적으로 1주동안 매일 투여하였다.

[134] 도 16A는 mock 또는 MGCP로 처리된 DC에서 Cox2 전사체의 발현을 나타낸

것이다.

- [135] 도 16B는 소장 of 점막 고유층(lamina propria)에서 공여자 OT-II CD4 T 세포 유래의 Treg 세포의 유동 세포계측 플롯을 나타낸 것이다.
- [136] 도 16C는 소장 of 점막 고유층(lamina propria)에서 공여자 OT-II CD4 T 세포 유래의 Treg 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [137] 도 16D는 소장에서 수용자 세포로부터 분화된 유도성 Treg 세포 비율의 유동 세포계측 플롯을 나타낸 것이다.
- [138] 도 16E 소장에서 수용자 세포로부터 분화된 유도성 Treg 세포 비율의 빈도를 나타낸 것이다.
- [139] 데이터는 유사한 결과를 가지는 세 번의 독립 실험을 대표하며 모든 바 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).
- [140]
- [141] 도 17은 Dectin1이 MGCP를 인식하고 Treg 세포의 생성을 유도함을 나타낸 것이다. Dectin1 풍부/결핍 마우스의 장간막 림프절 CD11c+DC를 8시간동안 자극시켰다. 도 17B 내지 15D의 경우, OT-II naive CD4 T 세포(Thy1.1+Vα2+CD4+Foxp3EGFP-CD44loCD62Lhi)를 수여하기 전에, Dectin1 손상/비손상 마우스에 2주동안 매일 200μg의 MGCP를 보충하였다. OVA 단백질(20mg/마우스)을 격일로 투여하면서 추가적으로 1주동안 MGCP를 투여하였다.
- [142] 도 17A는 표지된 면역관용성 DC관련 전사체의 발현수준을 나타낸 것이다.
- [143] 도 17B는 소장에서 수용자 유래의 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [144] 도 17C는 소장에서 수용자 유래의 CD4+Foxp3+ T 세포의 수를 나타낸 것이다.
- [145] 도 17D는 장간막 림프절에서 공여자 유래의 OVA-반응성 CD4+Foxp3+ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다.
- [146] 각 점들은 개개의 마우스를 나타낸다. 데이터는 유사한 결과의 세 번의 독립 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 mean±SEM 값이다. * 는 $p < 0.05$, ** 는 $p < 0.01$, *** 는 $p < 0.001$, **** 는 $p < 0.0001$ 이다(스튜던트 t 테스트).
- [147]
- [148] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [149] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [150]
- [151] 많은 연구에서, 자이모산은 염증 전 면역 반응을 자극할 수 있으며, 몇몇 결과는 면역 감소 역할을 하는 것으로 보고 되었다. 그러나, 면역 반응을 결정하는

효모의 정확한 다당체의 구조는 여전히 알려진 바 없다.

- [152] 본 발명의 일 실시예에서, 자이모산의 실험 데이터는 많은 양($500\mu\text{g/mL}$)이 Treg 세포의 분화를 촉진시키는 것으로 나타났지만, 낮은 용량($50\mu\text{g/mL}$)에서는 오히려 $\text{ROR}\gamma\text{t}$ 의 발현을 촉진하여 Treg의 분화를 촉진시키지 못하는 것으로 나타났다. 또한, 다당체의 구성 중 베타-1,6-글루칸 및 만난이 Treg 세포의 분화를 촉진하며, 베타-1,3-글루칸은 Treg 세포의 분화를 억제함을 확인하였다.
- [153] 본 발명의 다른 실시예에서, 효모의 세포벽으로부터 본 발명자가 상기한 실시예에서 밝혀낸 Treg 세포 유도 성분인 만난 및 베타-글루칸을 함유하는 신규한 다당체를 정제하였고, 이를 Mannan/ β -Glucan Containing Polysaccharides(MGCP)라 명명하였으며, *in vitro* 및 *in vivo*에서 상기 다당체의 낮은 농도의 처리 또는 투여에 의해서도 효과적으로 Treg 세포가 유도될 수 있음을 확인하였다. 이에 따라, 효모 세포벽 유래의 신규한 다당체의 구성 및 구조에 의한 Treg 세포 분화 메커니즘을 수용체, 유전자 전사체 형태 변화 및 사이토카인 발현 수준까지 확립하고, 상기 다당체 또는 이에 의해 유도된 Treg 세포의 투여는 *in vivo* 에서 효과적으로 대장염을 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [154]
- [155] 따라서 본 발명은 일 관점에서, 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 다당체에 관한 것이다.
- [156] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 알파-1,6-결합 (α -1,6-linked mannose)으로 연결된 만노스 골격(back bone)을 가지는 만난(mannan)과 베타-1,6-결합(β -1,6-linked)으로 결합된 글루코스 골격(back bone)을 가지는 베타-글루칸(β -glucan)이 결합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [157] 본 발명의 일 실시예에서, 효모 유래의 신규한 다당체(MGCP)를 구조적/기능적으로 분석한 결과, 만난 및 베타-글루칸의 구체적인 결합 구조를 확인 하고, 베타-1,6-글루칸 백본 및 만난이 Treg 세포의 분화를 촉진하며, 베타-1,3-글루칸은 Treg 세포의 분화를 억제함을 확인하였다.
- [158] 본 발명의 일 실시예에서, 다당체는 만노스(80.6%): 글루코스(14.9%): 갈락토스 (4.5%)의 조성비를 가짐을 확인하였다. 만난 유닛의 상세한 구조는 알파-1,6-결합 만노스 백본을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 알파-1,2-결합 또는 알파-1,3-결합으로 연결된 단일 유닛 만노스(30%), 2유닛 만노스(16.8%) 또는 3 유닛 만노스(28.4%)를 사이드 체인으로 하여 각각 연결되어 있는 것(사이드 체인이 없는 만노스(24.8%))을 확인하였다(도 5B).
- [159] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 만노스(mannose), 글루코스(glucose) 및 갈락토스(galactose)의 함량비가 만노스 (80.5%): 글루코스 (15.0%): 갈락토스 (4.5%)의 조성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으며, 구체적으로 만노스 (80.6%): 글루코스(14.9%): 갈락토스(4.5%), 더욱 구체적으로 만노스 (79.4%): 글루코스 (14.7%): 갈락토스 (4.4%)의 조성을 가질 수 있으나 이에 한정 되는 것은 아니다.

- [160] 따라서 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 만노스 및 글루코스의 함량비가 만노스 70% 내지 90% : 글루코스 10% 내지 30%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 경우에 따라서, 0%초과 10% 미만의 갈락토스를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [161] 본 발명에 있어서, 상기 만난(mannan)은 i) 알파-1,6-결합 (α -1,6-linked mannose)으로 연결된 만노스 골격(back bone) 및 ii) 알파-1,2-결합 또는 알파-1,3-결합으로 연결된 단일 만노스(single mannose), 2 유닛 만노스(two unit mannose) 및 3 유닛 만노스(three unit mannose)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 사이드 체인으로 포함하는 것 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 상기 만난은 i) 알파-1,6-결합 (α -1,6-linked mannose)으로 연결된 만노스 골격(back bone) 및 ii) 알파-1,2-결합 또는 알파-1,3-결합으로 연결된 단일 만노스(single mannose), 2 유닛 만노스(two unit mannose) 및 3 유닛 만노스(three unit mannose)를 사이드 체인으로 포함할 수 있다.
- [162] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 단일 만노스 사이드 체인 20% 내지 40% : 2 유닛 만노스 사이드 체인 10% 내지 30% : 3 유닛 만노스 사이드 체인 20% 내지 40% : 사이드 체인이 없는 만노스 골격 20% 내지 40%의 함량비로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [163] 구체적으로, 상기 다당체의 만난은 단일 유닛 만노스 30% : 2 유닛 만노스 17.0% : 3 유닛 만노스 28.5%의 일 수 있으며, 구체적으로 단일 유닛 만노스 30% : 2 유닛 만노스 16.8% : 3 유닛 만노스 28.4%, 더욱 구체적으로 단일 유닛 만노스 25.7% : 2 유닛 만노스 22.6% : 3 유닛 만노스 27.0% 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [164] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 만난은 단일 만노스(30%) : 2 유닛 만노스(16.8%) : 3 유닛 만노스(28.4%)의 조성으로 포함하고 있음을 확인하였다.
- [165] 또한 본 발명에 있어서, 상기 베타-글루칸(β -glucan)은 베타-1,6-결합(β -1,6-linked)으로 결합된 글루코스 골격 및 베타-1,3-결합(β -1,3-link)으로 연결된 단일 유닛 글루코스를 사이드 체인으로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 전체 글루코스 대비 베타-1,3-결합 글루코스 사이드 체인의 함량비는 20.0%, 구체적으로 18.0% 일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 전체 글루코스 대비 18%의 베타-1,3-결합 글루코스 사이드 체인을 포함하는 것으로 확인되었다.
- [166] 본 발명에 있어서, 다당체의 구성 중 베타-1,6-글루칸 및 만난이 Treg 세포의 분화를 촉진하며, 베타-1,3-글루칸은 Treg 세포의 분화를 억제함을 확인하였다. 따라서, 상기 베타-글루칸은 베타-1,3-결합 글루코스가 제거되고, 베타-1,6-결합 글루코스만으로 구성된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [167] 본 발명의 일 실시예에서, 효모 유래의 신규한 다당체(MGCP)의 분자량을 확인한 결과, 크게 두 개의 피크를 확인할 수 있었고, 다당체의 분자량이 약 4kDa 내지 60kDa 임을 확인하였다. 전체 다당체를 크게 세 분획으로 나누어 확인 한

결과 또한, 약 3.5kDa 내지 60kDa의 분자량을 가짐을 확인하였다. 또한, 다당체의 분자량이 작아질수록, 바람직하게는 20kDa 이하인 경우에 있어서, Treg 유도 활성이 뛰어나고, 100kDa 이상의 큰 분자량을 가지는 경우 Treg 유도 활성이 떨어지는 것으로 나타났다.

[168] 따라서 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 분자량이 3.5kDa 내지 60kDa인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 4kDa 내지 20kDa인 분자량을 지닌 것을 특징으로 할 수 있다.

[169] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 조절 T 세포(Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포는 CD4+Foxp3+ 조절 T 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[170] 본 발명의 용어 “조절 T 세포(Treg)”는 분화된 T 세포의 한 종류로서, 면역 작용을 억제하는 역할을 하여 자가항원에 대한 관용을 유지하고 자가면역 질병의 발병을 억제한다. 조절 T 세포는 일반적으로 IL-10 등의 면역 억제성 사이토카인을 발현하며, 이펙터 T 세포의 유도와 확산을 억제한다.

[171] 본 발명의 용어 “유도”는 목적하는 세포의 분화 또는 생성을 유도하는 것을 의미하며, 본 발명에서는 미접촉 T 세포 등으로부터 조절 T 세포로 분화시키는 것을 의미한다.

[172] 본 발명에서 “유도”는 “분화”, “생성” 또는 “생산”등과 호환적으로 사용될 수 있다.

[173] 본 발명의 용어 “미접촉 T 세포(naive T cell)”는 골수에서의 progenitor T cell이 흉선에서 성숙된 분화전의 T 세포를 의미한다. 미접촉 T 세포는 IL-2, IL-4, TGF- β 등의 자극을 받아 이펙터 T 세포, 헬퍼 T 세포(Th), 조절 T 세포(Treg) 등으로 분화할 수 있다.

[174] 본 발명에 있어서, 상기 조절 T세포의 유도는 DC(Dendritic Cell)에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 DC는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)를 발현하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 패턴 인식 수용체는 바람직하게는, Dectin1, Dectin2, TLR2, TLR4 및 TLR6로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[175] 본 발명에 있어서, 상기 DC에 의해 매개는 상기 다당체의 처리로 자극되어 면역 관용성 DC로 전사체 지형이 변형되어 Treg 세포의 유도를 매개 하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 상기 전사체 지형의 변형은 IL-10, Cd274, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), Tgf β 1 및 Cox2(사이클로옥시게나아제 코딩 유전자, Ptgs2)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 과발현 되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[176] 또한 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 Treg으로부터 헬리오스(Helios), IL-10 및 CTLA-4의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있고 이펙터 T 세포의 IFN- γ 를 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[177] 본 발명의 일 실시예에서, 신규한 다당체는 효모 추출물에서 유래하였으며,

구체적으로는 효모의 세포벽에서 분리되었다. 베타-1,3-글루칸이 제거된 효모세포벽에서 유래된 만난/베타-글루칸 함유 다당체(MGCP)의 경우 증가된 Treg 세포 유도능을 나타내었다.

[178] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 효모(yeast) 유래인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 효모 세포벽 유래일 수 있고, 더욱 바람직하게는 베타-1,3-글루칸이 제거된 효모의 세포벽 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.

[179] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 항 염증 기능 또는 면역기능 조절 활성을 가지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 면역억제 활성인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 장 출혈 등 장내 상처가 있는 사람의 경우 프로바이오틱스를 잘못 복용하면 부작용이 발생할 수 있는데, 이런 경우 다당체를 투여하여 치료효과를 볼 수 있다.

[180]

[181] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역조절용 조성물에 관한 것이다.

[182] 본 발명의 용어 “면역조절”이란, 혈액 내 면역 불균형을 해소하고 면역 항상성을 유지하는 것을 의미한다. 면역 항상성의 유지는 면역을 억제시키는 면역관용(tolerance)과 면역을 증진하는 면역반응(immunity)간의 균형을 이루는 상태를 일컫는 것으로 이러한 상태의 유지는 면역 질환 치료, 특히 자가면역 질환의 치료에 있어서 필수적인 요소이다.

[183] 상기 면역 조절용 조성물은 면역 활성의 조절 및 면역질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 목적으로 약학 조성물 또는 건강기능식품 등으로 사용될 수 있으며, 이때 사용량 및 사용 형태는 목적에 따라 적절히 조절할 수 있다.

[184] 본 발명의 일 실시예에서, MGCP의 경구투여는 결장 Treg 세포의 유도를 증가시키는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 MGCP의 경구투여는 Treg 세포의 CTLA-4 및 IL-10의 발현을 유의하게 증가시켰으며, 이펙터 T 세포의 IFN- γ 발현을 현저히 감소시켰다.

[185] 본 발명의 다른 실시예에서, MGCP를 급여한 미생물 플라젤린 반응성 CD4 T 세포를 보유한 마우스에서 체중 감소 및 결장 길이의 단축을 현저히 감소시켰으며, 상피세포의 증식 및 림프구의 결장 내 침투 또한 효과적으로 억제하였다. 조직 병리학 스코어링 결과도 mock 투여 마우스에 비해 현저히 완화된 결과를 나타내었다.

[186] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[187] 본 발명의 용어 “면역 질환”이란 면역 체계의 이상이 직접적인 원인이 되어 발병할 수 있는 질환을 의미하며, 피부염, 알러지, 비염, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건주위염, 제1형 당뇨병, 피부경화증(scleroderma), 퇴행성 신경질환, 제2형 당뇨병, 규폐증, 죽상동맥경화증, 백반증, 결막염 및 자가면역질환으로 구성된 군에서 선택된

어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [188] 본 발명의 용어 “자가면역 질환”이란, 생체 내의 면역 세포가 외부 침입 항원이 아닌 생체 스스로의 조직 또는 세포를 항원으로 인식하여 공격하여 발생하는 질환으로서, 류마티스성 관절염, 전신성 경피증(scleroderma), 아토피 피부염, 건선(乾癬), 천식, 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 중증근무력증, 피부근염(dermatomyositis), 다발성근염(polymyositis), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 자가면역성 뇌척수염, 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa), 측두동맥염(temporal arteritis), 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 청포창, 아프타구내염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [189] 본 발명의 용어 “염증성 질환”은 염증을 주 병변으로 하는 질병을 총칭하는 것으로서, 부종, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스성 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선 관절염, 골관절염, 류마티스성 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 중증근무력증 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [190] 본 발명에서 사용되는 용어, “예방”은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 면역 질환 또는 염증성 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [191] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 면역 질환 또는 염증성 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [192] 본 발명의 약학 조성물은 그 유효성분의 상술한 면역 증진 효과, 또는 면역 과잉 억제 효과를 통해 다양한 면역질환에 대한 예방 또는 치료 및 항염증 효과를 나타낸다.
- [193] 상기 약학 조성물은 상기 다당체를 함유하는 것 이외에 통상적으로 약학 조성물에 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [194] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [195] 본 발명에 따른 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여

사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 현탁제 또는 유화액제, 주사제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[196] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 불활성인 유기 또는 무기 담체를 이용하여 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 즉, 제형이 정제, 코팅된 정제, 당의정 및 경질 캡슐제인 경우 락토스, 수크로스, 전분 또는 그 유도체, 탈크, 칼슘 카보네이트, 젤라틴, 스테아르산 또는 그 염을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 연질 캡슐제인 경우에는 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체의 폴리올을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 용액 또는 시럽 형태인 경우, 물, 폴리올, 글리세롤, 및 식물성 오일 등을 포함할 수 있다.

[197] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

[198] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[199] 본 발명의 조성물은 면역, 특히 자가면역 또는 알레르기 관련 단백질과 함께 투여될 수 있다. 구체적인 단백질로는, 자가면역 질환에 관여하는 자가 항원들, 예를 들면, 류마티스 관절염은 heat shock proteins (HSPs), citrullinated filaggrin, glucose-6-phosphate isomerase, p205, 콜라겐 등을 포함할 수 있고, 제1형 당뇨병은 insulin, Zinc transporter 8 protein (ZnT8), Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1), Chromogranin A (CHGA), Islet amyloid polypeptide (IAPP)을 포함할 수 있으며, 중증근무력증에 관련된 자가항원인 아세틸콜린 수용체를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 자가면역 질환에 알려진 모든 종류의 자가 항원뿐만 아니라, 식품 알러지를 일으키는 것으로 알려진 다양한 알러지 유도 물질들인 땅콩, 우유, 달걀, Tree nuts, 콩, 새우 등의 갑각류, 생선 유래 물질 등을 포함할 수 있다.

[200] 본 발명의 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 방식은, 예를 들면, 피하, 정맥, 근육 또는 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의

종류에 따라 결정된다.

[201] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 병증의 정도, 투여경로에 따라 달라질 수 있다.

[202]

[203] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 다당체 또는 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[204] 본 발명은 또 다른 관점에서, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 본 발명의 다당체 또는 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[205]

[206] 본 발명은 또 다른 관점에서, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 본 발명의 다당체의 사용에 관한 것이다.

[207]

[208] 본 발명에 따른 약학 조성물은 우수한 면역증강 및 면역 과잉 억제 효과를 제공할 뿐만 아니라 약물에 의한 독성 및 부작용도 거의 없어 면역질환의 치료 또는 예방의 목적으로 장기간 복용할 수 있다.

[209]

[210] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.

[211] 상기 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품은 면역 활성을 증강시키거나 과잉면역을 억제 또는 개선하여 면역 기능의 항상성을 유지하는 활성을 갖는 건강기능식품인 것을 특징으로 할 수 있다.

[212] 본 발명의 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[213] 상기 건강기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있으며, 본 발명에 따른 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태일 수 있다.

- [214] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.
- [215] 상기 식품조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [216] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [217] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [218] 본 발명의 상기 다당체와 함께 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [219] 본 발명의 일 실시 예에서, *in vivo* 및 *in vitro*를 불문하고 MGCP가 결장 Treg 세포를 유도하고, Treg 세포에서의 IL-10 및 CTLA-4의 발현을 증가 시켰으며, 이펙터 T 세포에서 IFN- γ 의 발현을 억제함으로써, 면역 작용을 억제하는 것을 확인하였다.
- [220] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 다당체는 DC를 매개하여 Treg 세포를 유도하는 것임을 확인하였다. 구체적으로, DC의 Dectin1, Dectin2, TLR2, TLR4 및 TLR6가 결핍된 경우 Treg의 세포 분화가 감소 되는 것을 확인 하였으며, 특히 Dectin1 및 TLR4가 결핍된 경우 그 감소폭이 현저하였다. 또한, MyD88 신호 전달 체계가 결핍된 경우에도 Treg 세포의 유도가 감소하는 것을 확인 하였다.
- [221] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 이러한 PRR을 통한 다당체의 인식은 IL-10, Cd274, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), Tgfb β 1 및 Cox2 등의 DC의 전사체 지형(transcriptome landscape)을 면역 관용성(tolerogenic) DC의 표현형으로 변형

시켰으며, 특히 celecoxib을 처리하여 실험한 결과 Cox2가 과발현 됨으로써, Treg세포를 유도하는 것으로 나타났다. 수지상 세포 외에도, Treg 세포는 항원을 인식하고 제시하는 모든 세포에 의해 유도 될 수 있다.

[222] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 항원 제시 세포(antigen presenting cell)에 제1항의 다당체를 처리하여 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 수득하는 단계; 및 상기 면역관용성 항원 제시 세포를 CD4+ T 세포와 공배양(co-incubation)하여 조절 T 세포(Treg 세포)를 유도하는 단계를 포함하는 조절 T 세포(Treg)의 제조방법에 관한 것이다.

[223] 본 발명의 용어 “항원 제시 세포”란, 항원을 받아들여 처리한 후 항원 유래 조각을 MHC classII분자와 같은 항원 제시 분자와 함께 T 세포에 제시하여 분화를 유도하는 세포를 의미한다. 예로써 상기 항원 제시 세포는 대식 세포, B 세포, 수지상 세포(dendritic cell; DC), 랑게르한스 세포 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[224] 본 발명의 용어 “면역관용성 항원 제시 세포”란, 다양한 억제 항원에 대해 면역계를 면역 내성(tolerogenic) 상태로 만드는 면역 억제성을 갖는 항원 제시 세포의 한 종류이다. 면역 관용성 항원 제시 세포는 주로 T 세포의 아네르기화 및 사멸 유도, Treg의 유도 와 같은 T 세포 조절을 통해 면역환경에 영향을 미친다. 이러한 면역 억제적 특성 때문에 알레르기 질환, 자가면역 질환 등에 있어서 세포치료제의 후보 물질로 각광받고 있다. 면역관용성 항원 제시 세포는 예를 들어, 면역 관용성 대식 세포, 면역 관용성 수지상 세포(tolerogenic DC) 또는 면역 관용성 B 세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[225] 본 발명에 있어서, 상기 항원 제시 세포는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)를 발현하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 패턴 인식 수용체는 바람직하게는, Dectin1, Dectin2, TLR2, TLR4 및 TLR6로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[226] 본 발명에 있어서, 상기 면역 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)는 IL-10, Cd274, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), Tgfβ1 및 Cox2로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 과발현 하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[227] 본 발명에 있어서, 상기 조절 T 세포는 CD4+Foxp3+ 조절 T 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[228] 또한 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 Treg 세포로부터 헬리오스(Helios), IL-10 및 CTLA-4의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있고 이펙터 T 세포의 IFN-γ를 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[229]

[230] 본 발명의 일 실시예에서, MGCP로 유도된 Treg 세포가 in vivo에서 기능적 활성을 가지고 대장염을 완화할 수 있는지 확인하기 위해, MGCP 처리된 DC에 의해 생성된 Treg 세포(CD45+)를 미접촉 CD4+ T 세포와 함께 마우스에게

입양전달 하였다. 수용체 마우스의 체중 감소 및 결장 길이의 단축은 MGCP-Treg 수용 마우스에서 유의하게 감소하였으며, 결장조직의 상피세포 구조 파괴를 예방하고, 조직 병리학 스코어로 나타난 것과 같이 결장 점막 고유층에 대한 림프구의 침투를 억제했다. 또한 도너 미접촉 CD4+ T 세포의 IFN- γ 생산 수치를 현저히 감소시켰다.

[231] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 조절 T 세포(Treg)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

[232] 본 발명은 또 다른 관점에서, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 상기 방법으로 제조된 조절 T 세포(Treg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제의 용도에 관한 것이다.

[233] 본 발명에 있어서, 상기 조절 T 세포는 CD4+Foxp3+ 조절 T 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[234] 본 발명은 또 다른 관점에서, 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 상기 다당체 또는 세포 치료제의 사용에 관한 것이다.

[235]

[236] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[237]

[238] 재료 및 방법

[239] 1. 마우스

[240] 마우스는 포스텍 생명 공학 센터(POSTECH Biotech Center)의 동물 시설에서 사육되었다. 모든 실험 절차는 포스텍 연구소 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받아 진행하였다. C57BL/6 마우스는 포스텍에서 동종번식으로 유지되었다. Foxp3-eGFP, Tlr2-/-, Tlr4-/-, Tlr6-/- 및 MyD88-/- 마우스를 Jackson Labortory로부터 얻었다. CD45a-Rag1-/-TCR OT-II (Rag1-/-OTII TCR 형질전환체) 및 Rag1-/- 마우스는 Taconic으로부터 얻었다. Dectin1-/- and Dectin2-/- 동물은 Yoichiro Iwakura박사(Tokyo University of Science, Japan)가 제공해 주었다. 무균(Germ-Free, GF) C57BL/6 마우스 콜로니가 Andrew Macpherson 박사(Bern Univ., Switzerland) 및 David Artis 박사(Then at Univ. Pennsylvania, currently at Cornell Univ., USA)의 도움을 받아 브리더에 의해 확립되었다. GF 마우스는 무균 연성 막 아이솔레이터(sterile flexible film isolators, Class Biological Clean Ltd., USA)에서 유지되었다. CBir 마우스는 버밍엄의 알라바마 대학교의 Charles O. Elson으로부터 제공받았다. 생후 6 내지 12 주령의 성별 및 연령에 맞는 마우스를 사용하였다.

[241]

[242] 2. 효모 세포벽으로부터 MGCP의 정제

[243] 효모 추출물(teast extract, BD Biosciences) 20g, 폴리솔베이트 80(Polysorbate 80, Sigma-Aldrich) 2g, 구연산 암모늄(Ammonium Citrate, Sigma-Aldrich) 4g, 아세트산 나트륨(Sodium Acetate, Sigma-Aldrich) 10g, 황산 마그네슘(Magnesium sulfate, Sigma-Aldrich), 0.1g의 망간 황산염(Manganese sulfate, Sigma-Aldrich) 및 4g의 디포타슘 포스페이트(Dipotassium phosphate, Sigma-Aldrich)를 2L의 증류수에 용해시켰다. 상기 용액을 오토 클레이브(auto clave)하고 실온에서 냉각하였다. 트리클로로 아세트산(TCA, Sigma Aldrich)을 최종 농도 0.4%가 되도록 상기 용액에 처리하고 밤새 자기 교반하면서 4°C에서 배양 하였다. TCA 처리 된 용액을 냉각 된 3방울(3 Volume)의 에탄올과 함께 밤새 -20 °C에서 배양 하였다. 배양된 용액을 원심 분리한 뒤 상층액 제거 및 펠렛을 건조하여 남아있는 에탄올을 제거하고, 20mM MgCl₂, 20mM CaCl₂(pH 7.5)을 포함한 10mM Tris 버퍼로 현탁시켰다. 현탁된 용액을 RNase(Sigma-Aldrich) 및 DNase (Roche)로 최종 농도 0.4mg/ml가 되도록 처리하고 37°C에서 밤새 배양하였다. 그 후, 아지드 나트륨(sodium azid)으로 최종 농도 0.05%가 되도록 처리하고 37°C에서 30분간 배양 하였다. 배양 후, pronase(Protease, Streptomyces griseus, Sigma-Aldrich) 용액을 0.3mg/ml로 처리하고 밤새 37°C에서 배양하였다. 최종농도가 0.3mg/mL가 되도록 pronase 한 번 더 추가하고 2시간동안 추가 배양하였다. 최종농도 0.4%가 되도록 TCA를 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 용액을 원심 분리하여 상층액을 3 방울의 냉각 된 에탄올에 옮기고 밤새 -20°C에서 배양하였다. 원심 분리 후, 상등액을 제거하고 펠렛을 건조하여 잔류 에탄올을 제거하였다. 펠렛을 100mM Tris 버퍼(pH 7.5)로 현탁하고 동일한 양의 페놀을 처리하고 여러 번 뒤집어 잘 섞었다. 용액을 원심 분리하고 상위 튜브를 새로운 튜브로 옮기고 페놀을 반복하여 처리하였다. 용액을 원심 분리하고 상층액을 새 튜브에 옮기고 동일한 양의 isomyl Alcohol:Chloroform 1:29 (v:v) 용액을 처리하고 잘 섞었다. 원심 분리한 뒤 상층액을 옮기고 이를 한번 더 반복하였다. 다당류를 증류수에서 3일간 투석하고 동결 건조하여 수득하였다. 다당류의 농도는 산성 페놀 분석으로 측정하였다.

[244]

[245] 3. 림프구의 분리 및 유동 세포계측 분석(flow cytometry analysis)

[246] 미접촉 CD4 T 세포(Naive CD4 T cell)는 FACs 분류기(FACs sorter, Astrios, Beckman Coulter) 또는 EasySep™ 마우스 Naive® CD4+ T 세포 분리키트(STEMCELL Technology)를 사용하여 pLN, mLN 및 비장으로부터 제조사의 프로토콜에 따라 분리되었다. 대장 및 소장으로부터의 분리에 있어서, 장을 세로로 절개하여 열고 PBS로 세척하여 점액과 대변을 제거했다. 장을 작은 조각으로 잘라내어 10mM EDTA, 20mM HEPES, 1mM 피루브산 나트륨 및 3% FBS를 포함하는 PBS와 함께 자석 막대로 교반하면서 37°C에서 20 분간 배양하였다. 조직을 분쇄하고 37°C에서 45분간 3% FBS, 20mM HEPES, 1mM

피루브산 나트륨, 0.5mg/ml Collageanse D(Roche) 및 DNase I(Sigma-Aldrich)이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 조직을 10mM EDTA하에서 추가 5 분 배양 하였다. 상등액을 100 mm 셀 스트레이너(cell strainer)로 여과하고, 냉각된 PBS로 옮겨 남은 효소 및 EDTA를 제거하였다. 세포를 Percoll™(GE Healthcare) 그라디언트에 40 % 및 75 %로 로드했다. 림프구를 percoll 그라디언트 막의 표면으로부터 수확하고 1% FBS, 1% 페니실린/스트렙토신이 첨가된 DMEM 배지로 세척하였다. 사이토카인의 분석을 위해, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 2mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨, 비필수 아미노산 및 0.1% 베타-ME(v/v)를 함유하는 완전한 RPMI 배지에서 37 °C에서 4-5 시간 동안 Golgistop(BD Biosciences)의 존재하에 PMA(Calbiochem) 및 이오노마이신 (Calbiochem)을 가지고 세포를 자극하였다. 세포는 유동 세포계측 분석을 위해 제조사의 프로토콜에 따라 염색되었다.

[247] 세포의 염색에는 하기의 시약이 사용되었다:

[248] Live/DEAD 고정 가능 염료(Life Technologies), 고정/투과 버퍼 (eBioscience), 투과 버퍼 (eBioscience), IC 고정 버퍼 (eBioscience) 및 항체.

[249] 상기 실험에는 하기의 항체 클론이 사용되었다:

[250] CD4 (RM4-5), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD45.1 (A20), CD103 (2E7), Foxp3 (FJK-16s), CTLA4 (UC10-4B9), Nr1 (3E12), IL-10 (JES5-16E3), IFN- γ (XMG1.2), IL-17A (17B7), CD11c (N418), CD11b (M1/70), F4/80 (BM8), MHCII (M5/114.15.2).

[251]

[252] 4. In vitro에서 항원제시세포 의존적 T 세포 분화

[253] 2×10^4 개의 표지 조직(indicated tissues)유래의 CD11c+ DC를 표지된 다당류 또는 MGCP로 처리하고 10ng/mL의 GM-CSF(Perprotech)의 존재 하에 14시간동안 RPMI 1640 완전배지에서 배양하였다. MGCP를 처리하여 DC를 자극하는 경우에, DC는 MGCP 농도가 별도 기재된 경우를 제외하고 대부분의 in vitro 실험에서 50 μ g/mL의 MGCP로 자극되었다. 자극된 DC를 세척하고 2×10^5 미접촉 CD4 T 세포와 함께 3일동안 공동 배양하였다. 대부분의 실험은 0.1 μ g/ml의 anti-CD3(BioXcell), 100 U/ml의 IL-2, 0.1 또는 0.05 ng/ml의 TGF-베타1(Miltenyi Biotech) 및 10ng/ml의 GM-CSF를 포함하는 준최적 Treg 세포 분화(skewing) 조건에서 수행되었다. 준최적 Th1 주환경을 위해, 0.1 μ g/mL의 항-CD3, 100 U/ml의 IL-2, 2.5 ng/ml의 IL-12, 10 ng/ml의 GM-CSF 및 10 μ g/ml의 항-IL-4 존재 아래에서 세포를 배양하였다. 3일의 배양 이후에 세포를 상기한 유동 세포계측법으로 분석하였다. 몇몇 실험에서 길항제는 MGCP의 자극에 앞서 비장DC에 처리되었다. 다당류 분해효소를 사용하는 실험 절차의 경우 비장 DC에 처리하기 전에 자이모산 또는 MGCP를 제조사의 프로토콜에 따라 동일한 효소로 분해하였으며, 미접촉 CD4 T 세포와 함께 배양하였다. celecoxib을 사용한 실험에서, 억제제는 MGCP를 사용하여 비장 DC를 자극하기전에

30분동안 처리되었으며, 그 후 celecoxib의 존재 조건 하에 미접촉 CD4 T 세포와 함께 배양하였다.

[254] 상기 실험에는 하기의 시약이 사용되었다:

[255] α -(1-6) core mannosidase(QAbio), pustulanase(Prokaryase), zymolyase(MPbio), Mincle 단일클론항체(anti-Mincle mAb, MBL), DC-SIGN 항체(anti-DC-SIGN Ab, Abcam), 제조합 마우스 MMR 단백질(R&D systems)

[256]

[257] 5. CD4 T 세포 전달을 통한 실험성 대장염(experimental colitis)의 유도

[258] 실험성 대장염은 과거 알려진 방법에 따라 유도되었다(Powrie F, Leach MW, Mauze S, et al. Immunity 1994;1(7):553-62. 및 Leach MW, Bean AG, Mauze S, et al. Am J Pathol 1996;148(5):1503-15.). 구체적으로, 유사유전자형(congenic, CD45.1+) Foxp3-EGFP 마우스 또는 CBir 마우스로부터 분류된 CD4+Foxp3^{GFP}-CD44^{lo} CD62L^{hi} 미접촉 T 세포(1×10^6) FACs가 Rag1 결핍 마우스로 전달되었다. In vitro에서 생성된 MGCP로 유도된 Treg 세포의 효능을 평가하기 위해, 미접촉 CD4 T 세포를 표지된 Treg 세포(2×10^5)와 동시에 입양 전달(adoptively transferred)하였다. CBir 생쥐 유래의 미접촉 CD4 T 세포를 가지고 대장염을 유도하기 위해, 수용체는 전체 실험 기간 동안 mock 또는 MGCP를 격일마다 경구 투여받았다. 일주일에 두 번 체중을 측정하여 대장염의 진행을 모니터링 하였으며, 마우스는 체중이 약 20%로 감소되면 희생되었다. 질병의 중증도는 결장의 길이, 조직학적 평가 및 도너 미접촉 CD4 T 세포로부터의 사이토카인 생성을 측정하여 분석하였다.

[259]

[260] 6. In vivo 입양 전달

[261] 미접촉 CD4 T 세포를 전달시키기 전에, 200 μ g의 MGCP를 C57BL/6 또는 Dectin1-/- 마우스에 매일 2주간 경구 투여하였다. 유사유전자 대립형질(congenic allele)을 보유하는 Foxp3-EGFP 또는 OT-II 마우스에서 분리된 CD4+Foxp3^{EGFP}-CD44^{lo}CD62L^{hi} 미접촉 T 세포(정제 >99 %, 1.5×10^6)를 MGCP가 투여된 결핍 마우스에게로 정맥투여를 통해 옮겼으며, MGCP를 1주동안 매일 추가적으로 투여하였다. OT-II 미접촉 CD4 T 세포를 수여 받은 마우스에게는 20mg의 OVA단백질을 세포 전달 전달부터 실험이 끝날 때까지 1주동안 격일로 보충해 주었다.

[262]

[263] 7. RNA 염기 서열 분석(RNA sequencing)

[264] GF 마우스에게 mock 및 MGCP를 2주간 매일 투여했다. mock 및 MGCP가 보충된 GF 마우스 유래의 결장 CD11c+ DC는 마이크로 비드를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 결장 점막 고유층 전체세포로부터 분리되었다. 전체 RNA는 mock 또는 MGCP 급여 마우스의 결장 DC로부터 정제되었다. 리보스핀 TMII(Ribospin TMII, GeneAll biotechnology)가 전체 RNA의 분리에 사용되었다.

TruSeq Stranded mRNA 샘플 준비 키트(Illumina, San Diego, CA)를 라이브러리 준비에 사용하였다. RNA 염기서열분석은 NextSeq 500 Sequencing platform을 가지고 수행되었다. RNA 염기서열 데이터는 Gene Expression Omnibus (NCBI) 데이터 저장소에 기탁되었다(등록 번호 GEO: RNA-seq data: GSE126937).

[265]

[266] 8. 정량 역전사 중합효소 PCR(QrtPCR)

[267] 전체 전사체는 mock 및 MGCP 보충 GF 마우스 유래의 결장 CD11c+ DC로부터 정제되었다. 세포를 수확한뒤 TRIzol 시약에 용해시켰다. 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 정제 되었다. 정제된 총 RNA는 M-MLV 역전사효소(promega)를 사용하여 cDNA로 합성되었다. 표지된 마커의 발현량은 하기 표의 프라이머 쌍 및 상기 방법으로 제조된 cDNA를 이용하여 분석하였다. 모든 데이터는 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)의 발현 수준으로 정상화(normalized) 되었다. 결과는 mock 대조군의 발현수준에 대한 상대적인 발현수준으로서 추가적으로 분석되었다.

[268]

[269] [표1]

프라이머 염기서열

표지 마커	프라이머 염기서열		서열 번호
HPRT	Forward	5'-TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC-3'	1
	Reverse	5'-GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T-3'	2
IL-10	Forward	5'-ATA ACT GCA CCC ACT TCC CA-3'	3
	Reverse	5'-TCA TTT CCG ATA AGG CTT GG-3'	4
TGF-	Forward	5'-CTC CCG TGG CTT CTA GTG C-3'	5
	Reverse	5'-GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G-3'	6
PD-L1	Forward	5'-GCT CCA AAG GAC TTG TAC GTG-3'	7
	Reverse	5'-TGA TCT GAA GGG CAG CAT TTC-3'	8
IDO	Forward	5'-GCT TTG CTC TAC CAC ATC CAC-3'	9
	Reverse	5'-CAG GCG CTG TAA CCT GTG T-3'	10
COX2	Forward	5'-TGG CTG CAG AAT TGA AAG CCC T-3'	11
	Reverse	5'-AAA GGT GCT CGG CTT CCA GTA T-3'	12

[270] 9. 조직학적 분석

[271] 실험성 대장염의 임상학적 점수는 H&E 염색을 통한 조직학적 분석으로 측정하였다. 간단히 말해, 콜론 1cm를 10% 포름알데히드에 고정시키고 파라핀 조각에 묻었다. 파라핀 조각을 3 μ m 두께로 절단하고 Hematoxylin(Sigma-Aldrich) 및 Eosin(Sigma-Aldrich)으로 염색 하였다.

[272]

[273] 10. 통계분석

[274] 통계 분석은 그래프패드 프리즘 소프트웨어(Graphpad Prism software, La Jolla, USA)를 사용하여 수행되었다. 대조군과 실험군의 차이는 양측의 비작지음-스튜던트 t-테스트를 사용하여 평가하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다.

[275]

- [276] 실시예 1: 자이모산(zymosan)의 Treg 세포 유도 능력 확인
- [277] 면역 시스템에서 이스트 다당류의 면역 조절 기능을 연구하기 위해 자이모산을 DC로 처리한 후 미접촉 CD4 T 세포와 함께 배양하였다. 자이모산 처리된 DC는 농도 의존적으로 Treg 세포의 유도를 촉진하였으며, 자이모산은 500 μ g/mL에서 가장 높은 유도 성능을 나타내었다(도 1A) 다음으로, 자이모산이 이펙터 T 세포를 유도하는데 유사한 농도 의존 효과를 나타내는지 확인하였다. 자이모산은 가장 낮은 농도에서 ROR γ t의 발현을 유도하는 반면 T-bet의 발현에는 영향을 미치지 않았다(도 2A). 놀랍게도, 이펙터 T 세포에서 T-bet 및 ROR γ t의 발현은 자이모산의 농도가 증가함에 따라 억제되었다(도 2A).
- [278] 또한, Treg 세포의 유도에 관여하는 정확한 자이모산 유래의 다당체를 확인하기 위해, 절단 효소를 사용하여 상이한 구조의 다당체를 절단 하였다. 자이모산에서, 베타-1,3-글루칸을 제거하면 Treg 세포의 유도가 극적으로 증가한다(도 1B). 한편, 자이모산의 베타-1,6-글루칸 및 만난의 절단은 Treg 세포의 유도를 억제하여 대조적인 효과를 나타낸다(도 1C). 베타-1,3-글루칸 및 베타-1,6-글루칸의 절단은 자이모산 매개 ROR γ t 억제의 보상과 별개로 처리하지 않은 대조군에 비하여 ROR γ t의 발현 증가를 나타내었다(도 2B 및 2C). 상기 결과는 자이모산의 특정 다당체 구조의 면역학적 효과를 나타낸다. 상기 결과를 통해, 베타-1,6-글루칸 및 만난은 Treg 세포의 생성에 필수적인 반면, 베타-1,3-글루칸은 Th1 면역 반응을 유도하고 Treg 세포의 생성을 억제함을 알 수 있다.
- [279]
- [280] 실시예 2: MGCP의 정제 및 구조 및 기능적 특성분석
- [281] 재료 및 방법에서 상기한 바와 같은 방법으로 효모 세포벽에서 다당체를 정제한 후, 구조적 특성 및 면역 기능적 관련성을 확인했다. 효모 유래 다당체의 조성 분석 결과는 만노스(mannose, 80.6%), 글루코스(glucose, 14.9%) 및 갈락토스(galactose, 4.5%)로 구성되어 있음을 확인하였다(도 3A 및 도4). 양성자 핵 자기 공명(NMR) 분광학을 통한 다당류 구조 및 형태의 추가적 분석은 만난 및 베타-1,6-글루칸을 주 성분으로 한다는 것을 뒷받침 하였다(도 5A). 만난 유닛의 상세한 구조는 알파-1,6-결합 만노스 백분을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 알파-1,2-결합 또는 알파-1,3-결합으로 연결된 단일 유닛 만노스(30%), 2유닛 만노스(16.8%) 또는 3 유닛 만노스(28.4%)를 사이드 체인으로 하여 각각 연결되어 있는 것(사이드 체인이 없는 만노스(24.8%))을 확인하였다(도 5B). 만난 성분의 구조는 *S.cerevisiae*의 세포벽에서 발견되는 전형적인 만난 구조와 비슷했다. 베타-1,6-글루칸은 베타-1,6-결합 글루코스 골격을 중심으로 구성되며, 골격의 글루코스 중 18%는 베타-1,3-결합된 단일 유닛 글루코스를 사이드 체인으로 한다(도 5C). 이러한 구조를 갖는 효모 유래의 다당체는 신규한 것으로서, 정제된 다당체를 Mannan/ β -Glucan Containing Polysaccharides(MGCP)라 명명하였다.

[282] MGCP의 분자량을 확인하기 위하여, 본 기술분야에 알려진 방법으로, HPLC를 이용하여 분석하였다. TSK G-G5000PWXL 크기 배제 컬럼을 사용하였으며, 용리제(Eluent)는 50mM의 암모늄 중탄산염(ammonium bicarbonate)을 0.8ml/min의 유속으로 흘려주었다. 분석 결과는 시차 굴절 분석기(refractive index detector)와 206nm 파장의 자외선 분석기(UV detector)를 사용하여 확인하였다. 분자량의 확인을 위해 사용한 기준 물질은 Dextran standard를 사용하였고 이에 대한 정보는 하기 표 2와 같다.

[283]

[284] [표2]

Dextrans (kDa)	logPM	머무름 시간 (min) (retention time)	머무름 부피 (mL) (retention volume)
1	3	13.156	10.5248
5	3.698970004	12.528	10.0224
50	4.698970004	10.71	8.5680
150	5.176091259	9.843	7.8744
410	5.612783857	9.122	7.2976
670	5.826074803	8.809	7.0472

[285] HPLC 결과, 크게 두 개의 피크를 인하였고, MGCP의 분자량은 4kDa 내지 60kDa임을 확인하였다(도 6 및 하기 표 3). MGCP 전체의 HPLC 분석 결과를 바탕으로, 도 6에 도시된 바와 같이, 전체 MGCP를 A, B, C의 세 부분으로 분획하였으며, 각 분획의 분자량을 HPLC를 통하여 확인하였다(도 7 및 하기 표 3).

[286]

[287] [표3]

샘플	머무름 시간 (min)	분자량 (kDa)
총 MGCP	10.529	59.026
	12.020	7
	12.399	4
MGCP 분획 A	10.512	60
MGCP 분획 B	10.593	53
	11.855	8.9
MGCP 분획 C	10.620	51
	12.001	7
	12.523	3.5

[288] MGCP의 면역 기능적 관련성을 분석하였으며, 구체적으로 Treg 세포 유도능력을 확인하였다. MGCP가 처리된 비장 DC는 Treg 세포를 용량 의존적으로 유도하였다(도 5D). MGCP의 각 구조의 Treg 세포 유도 관련성을 분석하기 위해, 우선 통상적으로 입수 가능한 만난, 베타-1,6-글루칸(Pustulan) 또는 베타-1,3-글루칸(curdlan)을 독립적으로 처리한 결과, 이들 중 어느 하나도

독립적으로는 Treg 세포를 유도할 수 없었다(도 3B 및 3C). 반면에 이전의 보고와 같이, D-(+) 만노스는 Treg 세포를 유도할 수 있음을 확인하였다(도 3D). Treg 세포 분화의 유도를 담당하는 GMCP의 필수 부위를 결정하기 위해, 만난, 베타-1,6-글루칸 및 베타-1,3-글루칸 각각을 절단하는 효소로 각 구조를 절단하여 실험하였다. MGCP에서 베타-1,6-글루칸을 절단하면 Treg 세포의 생성이 현저하게 감소하고 만난의 절단은 감소된 Treg 세포의 분화를 나타내지만 유의한 값은 아니었다(도 5E). 또한, 두 다당류의 동시제거는 Treg 세포 유도에서 β -1,6-글루칸을 단독으로 절단한 것과 유사하게 나타나며, 이는 Treg 세포의 유도가 β -1,6-글루칸에 주로 의존한다는 것을 의미한다(도 5E). 흥미롭게도, β -1,3-글루칸 제거 이스트 세포벽에서 정제된 다당류는 손상되지 않은 이스트 세포벽에서 정제된 MGCP와 비교하여 더 많은 Treg 세포의 생성을 보였다(도 3E). 이러한 결과는 MGCP의 구성 모두가 Treg 세포를 유도하는 결정적인 요소임을 시사한다. β -1,3-연결 단일 글루코스를 사이드체인으로 포함하는 β -1,6-글루칸 부위는 MGCP에 의한 Treg 세포 유도 능력에 있어 필수적이며, 반면에 β -1,3-글루칸 부위는 Treg 세포를 억제한다.

[289] 도시되지는 않았지만, 다당체의 분자량이 커지는 경우, 특히 100kDa 이상이 되는 경우에는 Treg 세포의 유도 활성이 떨어지는 것으로 나타났다.

[290]

[291] 실시예 3: In vivo에서 MGCP로 유도된 Treg 세포의 염증성 대장염 완화효능 확인

[292] MGCP가 Treg 세포의 분화를 촉진함을 확인 하였는바, in vitro에서 분화된 Treg 세포가 대장염이 발병한 마우스(in vivo)에서 완화효과를 나타내는지 확인하였다. 유사 유전자형(congenic) 마커(CD45.1+)를 갖는 Treg 세포는 DC에 MGCP를 처리하여 in vitro에서 생성되었으며, 미접촉 CD4 T 세포와 동시에 수용 마우스에게 입양전달(adoptively transferred)되어, MGCP로 유도된 Treg 세포의 면역 억제 기능을 확인하였다. 그 결과, MGCP로 유도된 Treg 세포는 대장염의 진행을 방해하는 것으로 나타났다. 구체적으로, 체중 감소 및 결장 길이의 단축은 MGCP-Treg 세포 수용 마우스에서 유의하게 감소하였다(도 8A 및 6B). 대장염의 임상적 증상과 관련하여, MGCP로 유도된 Treg 세포의 전이는 결장 조직의 상피 세포 구조의 파괴를 예방하고, 조직 병리학 스코어로 표시된 결장 점막 고유층(colonic lamina propria)에 림프구의 침투를 억제하였다(도 8C 및 6D). 대장염의 발병 기전에서 IFN- γ 이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로, 결장 점막 고유층의 CD4 T 세포로부터 병원성 사이토카인(cytokine)인 IFN- γ 의 생산을 평가했다. 도너 미접촉 CD4 T 세포의 IFN- γ 의 생산 수준은 단순히 미접촉 CD4 T 세포만 수여된 개체에 비하여 MGCP-Treg 세포 수여 개체에서 극적으로 감소했다(도 8E). 상기 결과는 MGCP로 유도된 Treg 세포가 염증 사이토카인의 생성을 억제하고 염증성 대장염을 개선 시킴을 나타낸다.

[293]

[294] 실시예 4: MGCP의 경구 투여를 통한 결장 Treg 세포의 생성 유도

[295] In vitro 에서, MGCP는 in vivo에서 기능적으로 활성을 갖는 Treg 세포의 유도를 촉진하였다. MGCP가 in vivo에서도 Treg 세포를 생성할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, MGCP를 마우스에게 구강 내 투여한 후 결장 미접촉 CD4 T 세포(CD45.1+)를 전달(transfer)시켰다. 흥미롭게도, MGCP의 투여는 대조군보다 결장에서 도너 CD4 T 세포로부터 상당히 높은 빈도(frequency)의 Treg 세포를 생성시켰다(도 9A). 상기 Treg 세포는 Treg 세포의 억제성을 나타내는 중요한 지표인 CTLA-4를 발현한다(도 9B). 소장에서 또한, 도너 세포 중 Treg 세포 빈도의 유사한 증가가 관찰 되었고, 이들 또한 CTLA-4를 발현하였다(도 10A 및 8B). 반면, 수용체 유래의 Treg 세포의 빈도 및 호스트 Treg 세포의 CTLA-4 발현량은 결장 및 소장에서 대조군과 유사하게 나타났다(도 9C, 7D, 8C 및 8D). MGCP를 처리한 마우스의 결장 Treg 세포의 절대적인 숫자는 결장에서 증가를 나타냈지만, 유의한 값은 아니었다(도 9E 및 8E). MGCP 투여 마우스의 장 전체의 수용체 Treg 세포 중 헬리오스(Helios)를 발현하는 세포가 증가한 것으로 관찰 되었다(도 9F 및 8F). 기능적으로, MGCP의 투여는 오직 결장 점막 고유층의 Treg 세포의 IL-10 생산을 유의하게 증가시켰으며, 소장에서는 증가시키지 않았다(도 9G 및 8G). 결장 점막 고유층에서 이펙터 T 세포의 IFN- γ 의 생산은 MGCP 처리 후 감소되었지만 IL-17A의 수준은 변하지 않았다(도 9H). 이와 대조적으로, 소장 CD4 T 세포의 IFN- γ 및 IL-17A의 발현은 mock과 MGCP처리 마우스 모두에서 유사하게 나타났다(도 10H). MGCP의 투여는 장에서 도너 CD4 T 세포로부터 Treg 세포의 분화를 유도하지만, MGCP의 처리는 비장 또는 mLN에서 호스트 또는 도너 유래의 CD4 T 세포로부터 Treg 세포의 분화를 유도할 수 없었다(도 10I 및 8J). 종합하여 볼 때, in vivo에서 MGCP는 결장 이펙터 CD4 T 세포에서 염증성 사이토카인인 IFN- γ 을 감소시킬 뿐 아니라 IL-10 생산이 향상된 기능성 결장 Treg 세포의 새로운 생성을 촉진했다. 상기 결과는, MGCP가 항상성 조건 아래의 결장의 면역 조절 환경에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[296]

[297] 실시예 5: MGCP로 유도된 마이크로바이오타(microbiota)-특이적 Treg 세포의 대장염 개선

[298] MGCP가 미생물 항원 특이적 Treg 세포를 유도하고 생체 내 염증성 면역 반응을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, 미생물 플라젤린-반응성 CD4 T 세포(microbial flagellin-reactive CD4 T cells)를 보유한 CBir 마우스를 사용하였다. CBir 마우스의 미접촉 CD4 T 세포를 Rag1-/- 마우스로 옮기고 경구투여를 통해 mock(DW) 또는 MGCP를 매일 투여했다. 면역이 약화된 마우스에 미생물 반응성 미접촉 CD4 T 세포(microbe responsive naive CD4 T cells)를 입양전달(adoptive transfer)하는 것은 공생 마이크로바이오타에 대한 과도한 면역반응으로 인한 실험성 대장염을 유발한다는 보고가 있다(도 11A). 그러나 MGCP의 보충은 체중

감소에 현저한 저항성을 나타냈다(도 11A). 체중 변화에 대한 효과에 더하여, 결장 길이의 단축 또한 MGCP의 투여로 예방되었다(도 11B 및 9C). 임상적 징후와 일치하게도, MGCP 투여 마우스는 상피 세포의 증식 및 림프구의 결장 내 침투를 억제하였다(도 11D). 또한, 조직 병리학 스코어는 mock 처리된 마우스에 비하여 완화된 것으로 나타났다(도 11E). 상기 결과들은 MGCP가 기능성 Treg 세포의 새로운 생성을 촉진하여, 염증 전 환경에서 병원성 사이토카인의 생산을 억제할 수 있음을 시사한다(도 8 및 도 9).

- [299] 따라서, MGCP의 처리가 Treg 세포의 생성을 촉진하면서도, 수용 마우스의 공생 항원 특이적 CD4 T 세포로부터 유해 사이토카인의 생산을 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다. MGCP 투여된 마우스는 mock 처리된 마우스와 비교하여 도너 미접촉 CD4 T 세포로부터 미생물 반응성 Treg 세포(microbe-reactive Treg 세포 cell)의 분화를 증가 시켰고(도 11F), Treg 세포의 안정성과 기능에 중요한 분자인 CD103 및 CTLA-4의 발현은 MGCP 처리된 마우스 및 mock 처리된 마우스의 Treg 세포에서 유사하게 나타났다(도 12A). 대장염의 임상적 징후와 일치하여, 도너 CD4 T 세포로부터 IFN- γ 의 생산은 mock 처리된 마우스에 비하여 MGCP 투여된 마우스에서 실질적으로 억제 되었지만(도 11G), IL-17A 수치는 결장 점막 고유층에서 유사하게 나타났다(도 12B). 이를 종합할 때, 상기 결과는 MGCP로 유도된 Treg 세포의 전이뿐 아니라, MGCP의 투여 또한 공생 항원에 반응하는 Treg 세포의 생성을 촉진하고 염증성 대장염의 발달 및 IFN- γ 의 생산을 억제한다는 것을 나타낸다.

[300]

- [301] 실시예 6: 장 CD103+CD11b+DC에 의한 MGCP 매개 Treg 세포의 유도에서 Cox2의 필요성

- [302] MGCP가 항원 제시 세포에 의해 Treg 세포를 유도하는 메커니즘을 확립하기 위해 MGCP 자극에 의한 Treg 세포의 부노화를 유도하는 DC 서브셋 및 대식세포의 능력을 평가 하였다. DC는 장에서 CD11b 및 CD103의 발현에 따라 구별된다. 각 장의 DC 서브셋 및 대식세포를 MGCP로 자극한 다음 미접촉 CD4 T 세포와 함께 배양하였다. MGCP를 처리한 장 CD103+CD11b+DC는 mock을 처리한 경우 대비 약 10배의 Treg 세포의 생성 증가를 유도 했다(도 13A). CD103+CD11b+DC 및 대식세포는 MGCP 자극 후에 Treg 세포의 수준이 증가하지는 않았지만, MGCP 처리 되지 않은 경우에도, Treg 세포를 효율적으로 유도했다(도 13A 및 도 14). MGCP가 DC를 자극하여 DC가 Treg 세포를 유도하고, 미생물 자극제(microbial stimulants)에 의한 DC 활성화 기능을 억제하는 메커니즘을 확립하기 위해 무균 마우스(Germ Free mice, GF)에 DW(mock) 또는 MGCP를 2주간 매일 경구투여 하였다. 전사체 형태 분석(analyze transcriptomic configuration)을 위해, CD11c+ DC를 mock 또는 MGCP 처리 마우스의 결장에서 분리했다. MGCP의 투여는 Il10, Cd274(PD-L1 코딩유전자), 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 및 Tgfb1 등의

면역관용성(tolerogenic) DC 관련 마커의 발현을 증진시켰다(도 13B 및 11C). 흥미롭게도, MGCP 처리된 마우스의 DC는 mock(DW) 처리된 마우스의 DC와 비교하여 Ptgs2(사이클로옥시게나아제-2 코딩유전자, Cox2)의 발현을 약 20배 증가시켰다(도 13B 및 11C). Cox2는 중앙 환경에서 Treg 세포를 유도하는 것으로 이전에 알려져 있었기 때문에, MGCP에 의한 Treg 세포 분화에 대한 Cox2의 역할을 평가했다. 비장 DC는 MGCP로 자극되었으며 Cox2 선택적 억제제인 Celecoxib의 존재아래 미접촉 CD4 T 세포와 함께 배양하였다. MGCP에 의한 Treg 세포의 유도는 Cox2를 억제함으로써 상당히 감소되었다(도 13D 및 11E). 상기 결과는 MGCP로 유도된 Treg 세포의 증가가 Cox2 의존적으로 CD103⁺ CD11b⁺ 장 DC 서브셋에 의해 특이적으로 매개된다는 것을 시사한다. 또한, MGCP는 DC 전사체 지형(transcriptome landscape)을 면역관용성 DC의 표현형으로 나타나도록 변형시켰다.

[303]

[304] 실시예 7: MGCP로 유도된 Treg 세포의 생성 매커니즘에서 패턴인식 수용체의 중요성

[305] DC는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)를 발현하여 장내에 존재하는 다당류를 포함한 미생물 항원을 인식한다. MGCP 매개 면역 조절에서 다당류 인식 수용체의 역할을 조사하기 위해, 특정 수용체가 손상된 마우스의 DC를 이용하여 Treg 세포의 분화를 확인하였다. Dectin1이 결핍된 비장DC는 MGCP에 의한 Treg 세포의 생성을 유의하게 감소시켰지만, Dectin2의 결핍은 Treg 세포의 분화를 비교적 적게 감소시켰다(도 15A). 또한, TLR2, TLR4 및 TLR6이 각각 결핍된 DC는 WT DC와 비교하여 MGCP에 의한 Treg 세포 분화를 감소시켰으며, TLR4는 가장 현저한 효과를 나타내었다(도 15A). DC에서 TLR 결핍에 의한 Treg 세포 생성 감소와 일치하여, MyD88 신호전달이 손상된 DC는 Treg 세포 분화가 현저히 감소하는 것을 나타냈다(도 15B). 게다가, 다른 C-type 렉틴 수용체의 가능한 역할을 연구하기 위해 DC-SIGN, Mincle 및 만노스 수용체 각각의 길항적 차단 항체를 이용하였다. DC에서 DC-SIGN 신호의 차단은 MGCP에 의한 Treg 세포 분화의 부분적 감소를 나타냈지만, 다른 수용체의 경우 어떠한 유의한 효과도 나타나지 않았다(도 15C). 이를 종합할 때, 상기 결과는 Dectin1 및 TLR4가 MGCP에 의한 Treg 세포의 유도에 중요한 역할을 함을 시사하며, 이 외에도 MGCP는 다양한 선천적 수용체를 통해 Treg 세포를 유도한다.

[306]

[307] 실시예 8: MGCP에 의한 Treg 세포 유도에서 Dectin1의 중요성 확인

[308] MGCP로 유도된 Treg 세포 생성에서의 Dectin1의 역할을 확인하기 위해, Dectin1이 온전하거나 결핍된 마우스의 mLN DC를 mock 또는 MGCP로 자극하였다. Dectin1 풍부 DC는 MGCP 자극 후 Cox2 및 다른 조절 마커의 발현 증가를 나타냈지만, Dectin1 결핍 DC에서는 MGCP가 Cox2의 발현을 촉진시키지

못했다(도 16A 및 15A). MGCP 처리 후의 Cox2 발현에 대한 Dectin1의 역할과 일치하게도, Ido 및 Tgf β 1 전사체는 Dectin1 풍부 DC에서 MGCP 자극에 의해 특이적으로 증가되었으나, 손상된 DC에서는 그렇지 않은 것으로 나타났다(도 17A). 놀랍게도, Dectin1의 부재는 Il10 및 Cd274와 같은 다른 조절 DC 마커의 MGCP 매개된 발현 증가에 있어 변화를 일으키지 않았다(도 17A). MGCP로 유도된 Treg 세포 생성에 대한 Dectin1의 필수적인 역할을 뒷받침 하기 위해, Dectin1 결핍 마우스에서 MGCP의 효과를 시험했다. OT-II 마우스로부터 미접촉 CD4 T 세포를 수여 받은 마우스에 MGCP를 투여하였으며, 격일로 오브알부민(ovalbumin)을 보충하였다. MGCP는 실험 전체에 걸쳐 수용체 쥐에게 투여되었다. 흥미롭게도, MGCP의 투여는 Dectin1 풍부 수용체의 소장에서 오브알부민 활성 Treg 세포의 분화를 극적으로 증가 시킨 반면, Dectin1 결핍 쥐에서의 MGCP의 Treg 세포 분화 유도 효과는 감소되었다(도 16B 및 14C). 반면에, Dectin1 결핍 또는 풍부 수용체에서 수용체 유래의 세포 중 Treg 세포의 빈도는 mock 및 MGCP 처리된 경우가 유사하게 나타났다(도 17B). MGCP 처리한 Dectin1 비손상 마우스의 호스트 세포에서 유래한 Treg 세포의 빈도는 mock 처리된 마우스의 것과 유사하게 나타났지만, MGCP 아래에서 Dectin1 풍부 마우스만이 Treg 세포의 수가 상당히 증가하였으며, Dectin1 결핍 마우스에서는 그렇지 않았다(도 17C). 흥미롭게도, MGCP 투여는 Dectin1 풍부 마우스에서 수용체 유래 세포 중의 유도성 Treg 세포(inducible Treg 세포 cell)의 빈도를 증가시켰으나, Dectin1 녹아웃 마우스에서는 그렇지 않았다(도 16D 및 14E). 또한, MGCP가 이들 마우스의 장간막 림프절(mesenteric lymph node)에서 Treg 세포의 유도에 영향을 주는지 평가했다. Dectin1 비손상(intact) 마우스에서 Treg 세포 분화의 빈도가 증가했지만, Dectin1 녹아웃 마우스에서는 MGCP의 영향을 무시할 수 있었다(도 17D). 종합적으로, MGCP에 의한 in vivo Treg 세포 유도 분자 매커니즘이 DC의 Cox2 상향조절에 의해 매개되는 Dectin1에 의존함을 시사한다.

[309]

[310] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[311]

산업상 이용가능성

[312] 본 발명에 따른 신규한 다당체는, 낮은 용량으로도 다당체가 가지는 베타-글루칸 및 만난(mannan) 구조를 통해 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 생성하고 이에 의해 항원 특이적인 조절

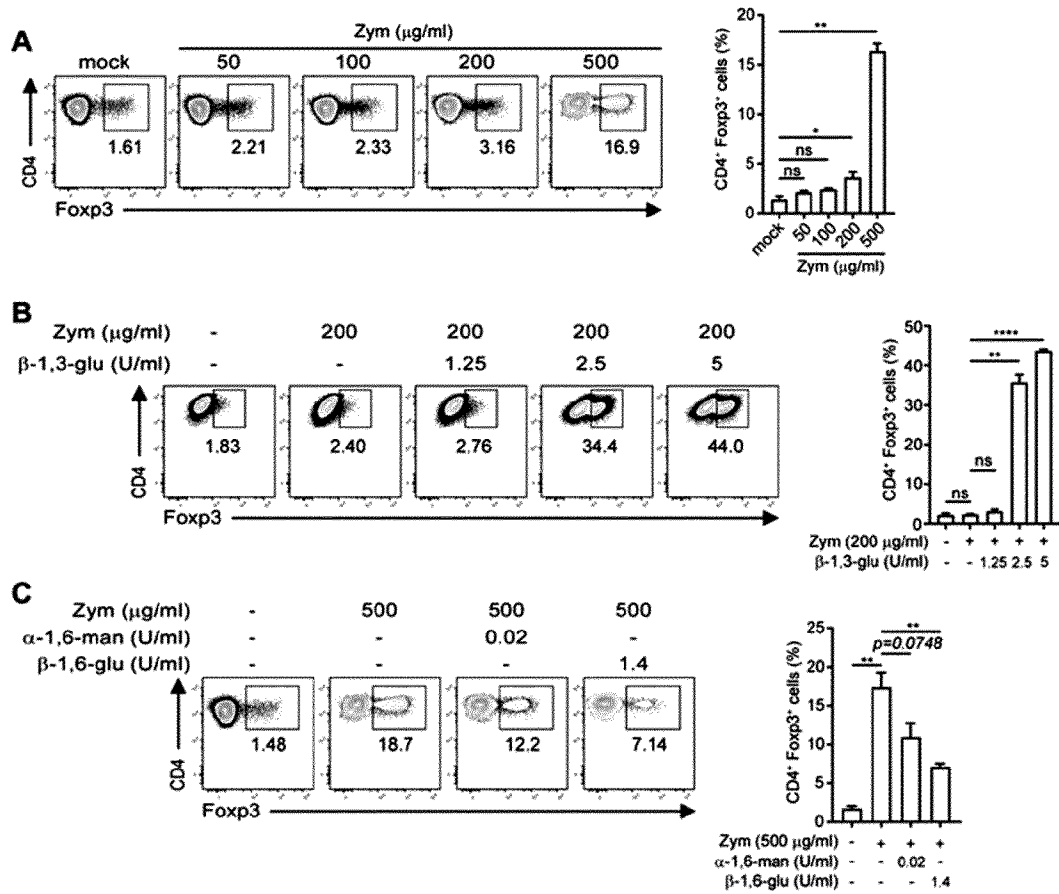
T 세포(Treg 세포)의 분화 또는 생성을 유도하여 적은 부작용으로 목표하는 면역 체계를 조절할 수 있다. 따라서, MGCP 및 상기 다당체에 의해 유도된 Treg 세포는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 및 치료에 유용하다.

청구범위

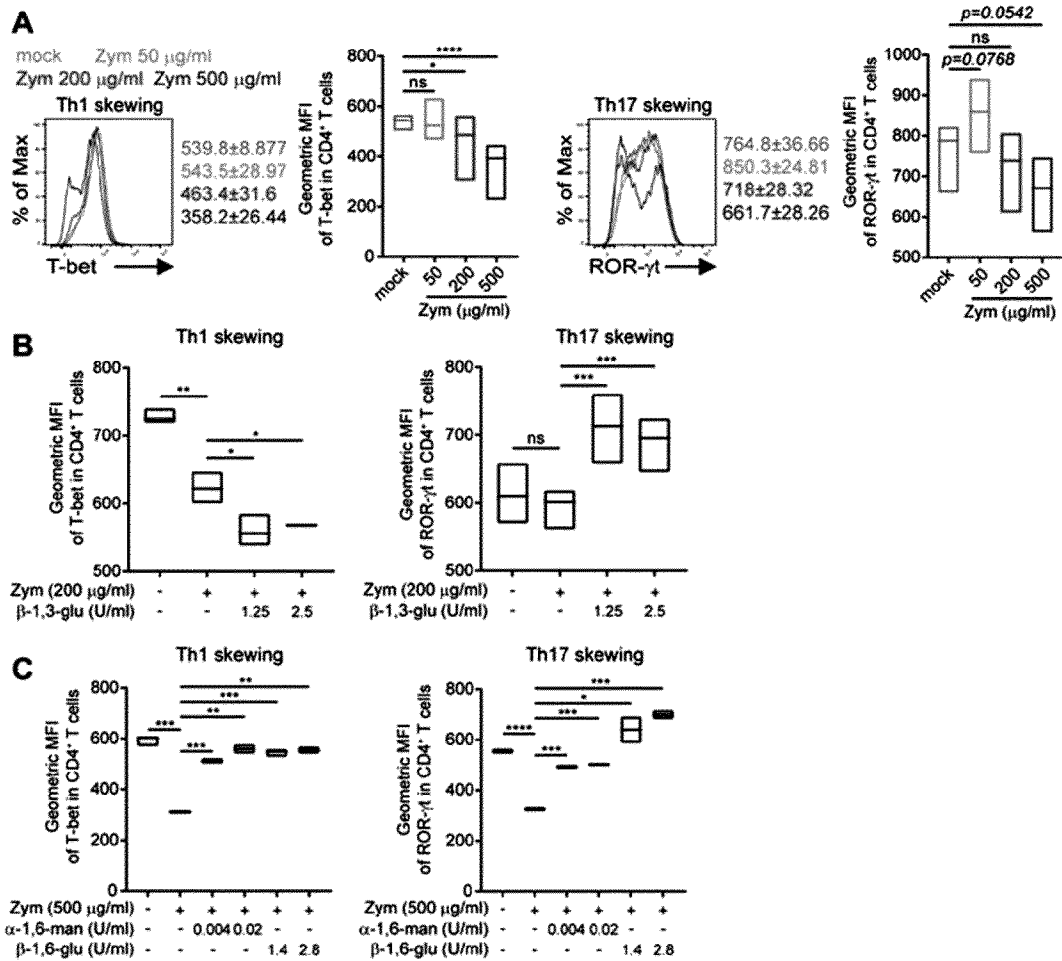
- [청구항 1] 만난(mannan) 및 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 다당체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 다당체는 알파-1,6-결합 (α -1,6-linked mannose)으로 연결된 만노스 골격(back bone)을 가지는 만난(mannan)과 베타-1,6-결합(β -1,6-linked)으로 결합된 글루코스 골격(back bone)을 가지는 베타-글루칸(β -glucan)을 포함하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 만난(mannan)은
- i) 알파-1,6-결합 (α -1,6-linked mannose)으로 연결된 만노스 골격(back bone); 및
 - ii) 알파-1,3-결합 또는 알파-1,2-결합으로 연결된 단일 만노스(single mannose), 2 유닛 만노스(two unit mannose) 및 3 유닛 만노스(three unit mannose)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 사이드 체인을 포함하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 다당체는 단일 만노스 사이드 체인 20% 내지 40% : 2 유닛 만노스 사이드 체인 10% 내지 30% : 3 유닛 만노스 사이드 체인 20% 내지 40% : 사이드 체인이 없는 만노스 골격 20% 내지 40%의 함량비로 포함하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 다당체는 분자량이 4kDa 내지 60kDa인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 베타-글루칸(β -glucan)은
- i) 베타-1,6-결합(β -1,6-linked)으로 결합된 글루코스 골격, 및
 - ii) 베타-1,3-결합(β -1,3-link)으로 연결된 단일 유닛 글루코스 사이드 체인을 포함하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 베타-1,3-결합으로 연결된 단일 유닛 글루코스 사이드 체인은 전체 글루코스 대비 베타-1,3-결합 글루코스 사이드 체인이 10% 내지 30%의 비율로 포함된 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 만노스 70% 내지 90% : 글루코스 10% 내지 30%의 함량비로 포함된 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 조절 T 세포(Treg 세포)를 유도하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 조절 T 세포(Treg 세포)는 CD4+Foxp3+ 조절 T 세포인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 효모(yeast) 유래인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물.
- [청구항 13] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 14] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다당체를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품.
- [청구항 15] 다음의 단계를 포함하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법:
 (a) 항원 제시 세포(antigen presenting cell)에 제1항 내지 제11항의 다당체를 처리하여 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 획득하는 단계; 및
 (b) 상기 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)를 CD4+ T 세포와 공배양(co-incubation)하여 조절 T 세포(Treg 세포)를 유도하는 단계.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 항원 제시 세포는 수지상 세포(Dendritic cell; DC)인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 항원 제시 세포는 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)를 발현하는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)는 Dectin1, Dectin2, TLR2, TLR4 및 TLR6로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법.
- [청구항 19] 제15항에 있어서, 상기 면역관용성 항원 제시 세포(tolerogenic antigen presenting cell)는 IL-10, Cd274, 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), Tgf β 1 및 Cox2로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 과발현 하는 것을 특징으로 하는 조절 T 세포(Treg 세포)의 제조방법.
- [청구항 20] 제15항 내지 제19항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 조절 T 세포(Treg 세포)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제.

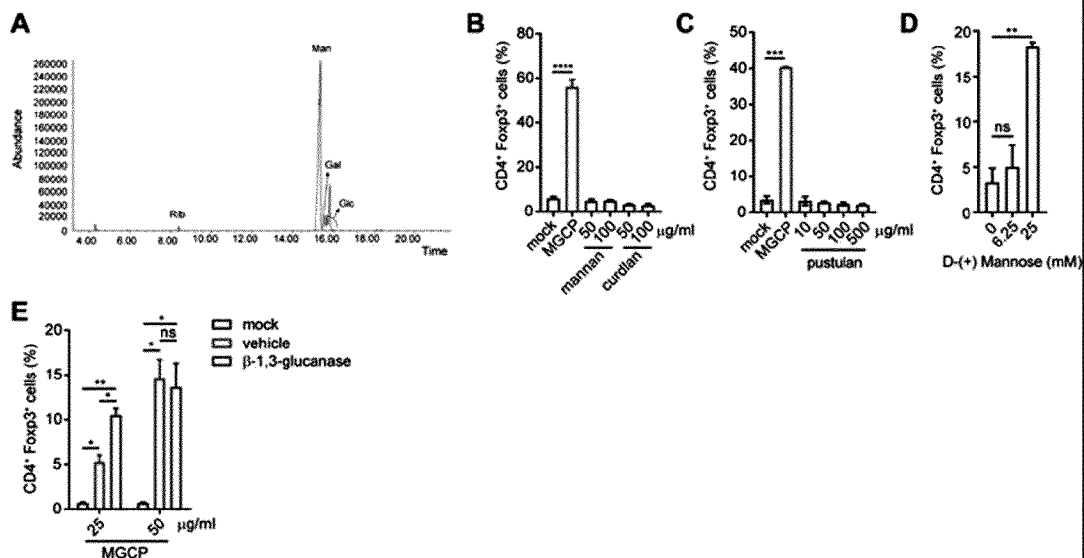
[도 1]



[도2]



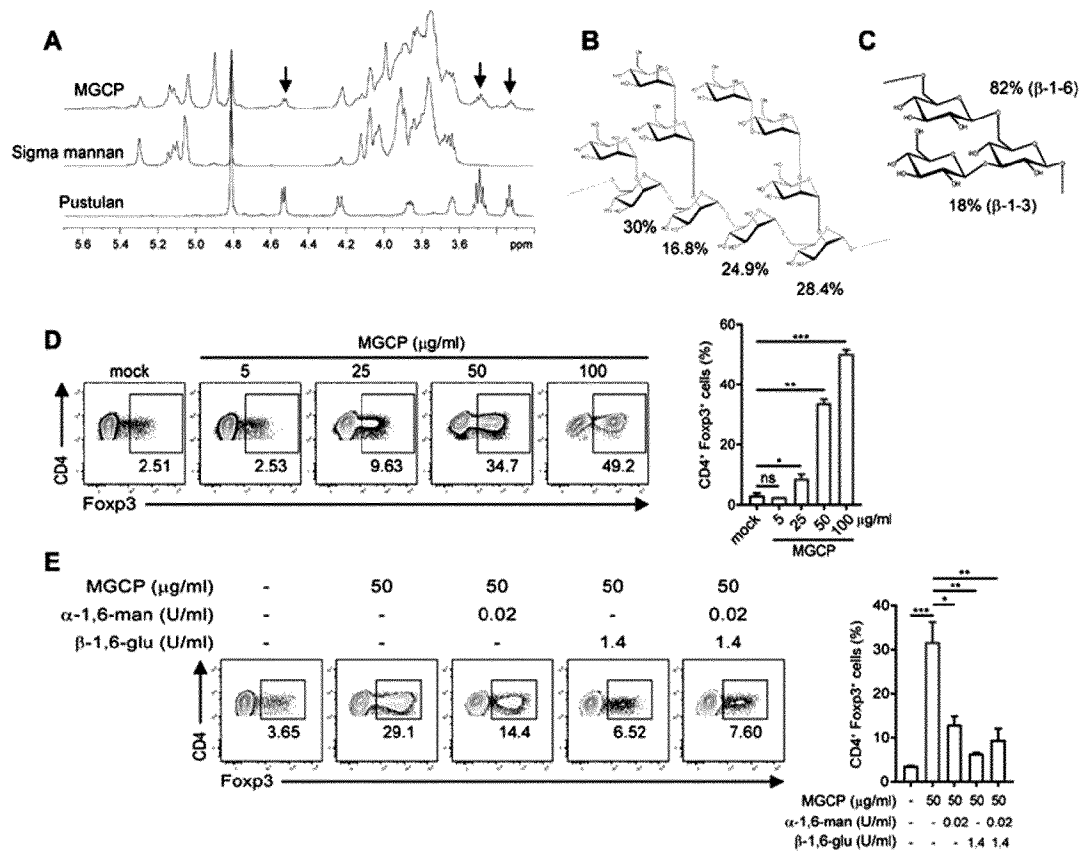
[도3]



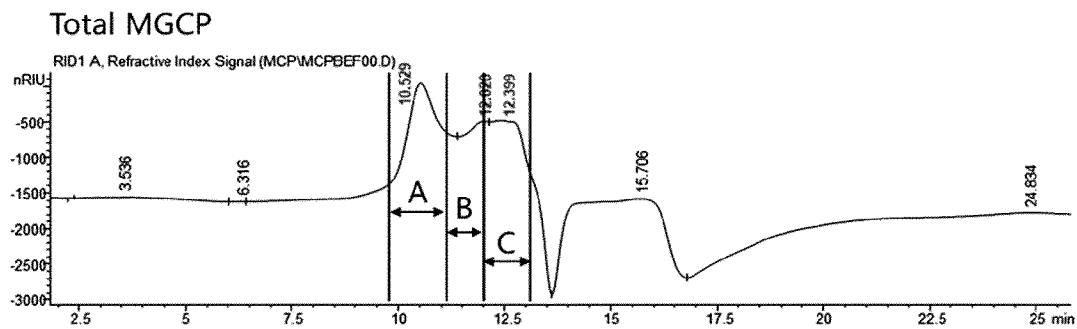
[도4]

	Man	Gal	Glc
MGCP	5.4	0.3	1

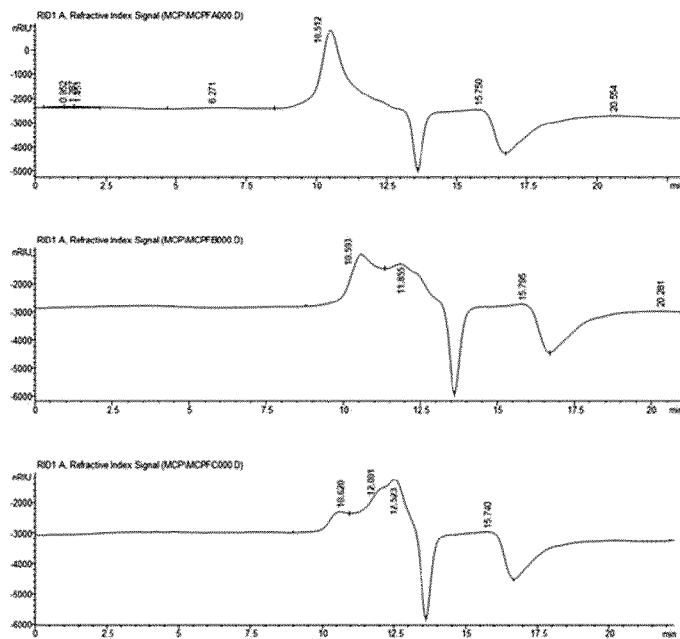
[도5]



[도6]



[도7]

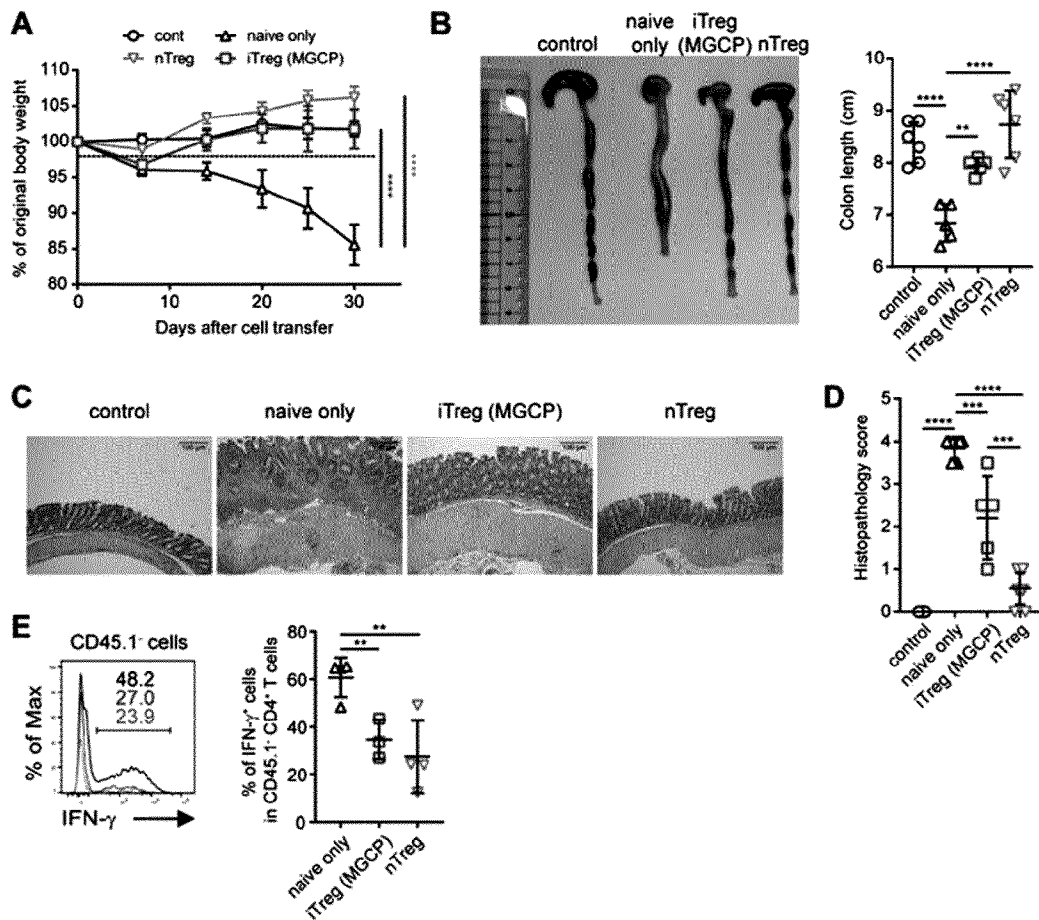


MGCP fraction A.

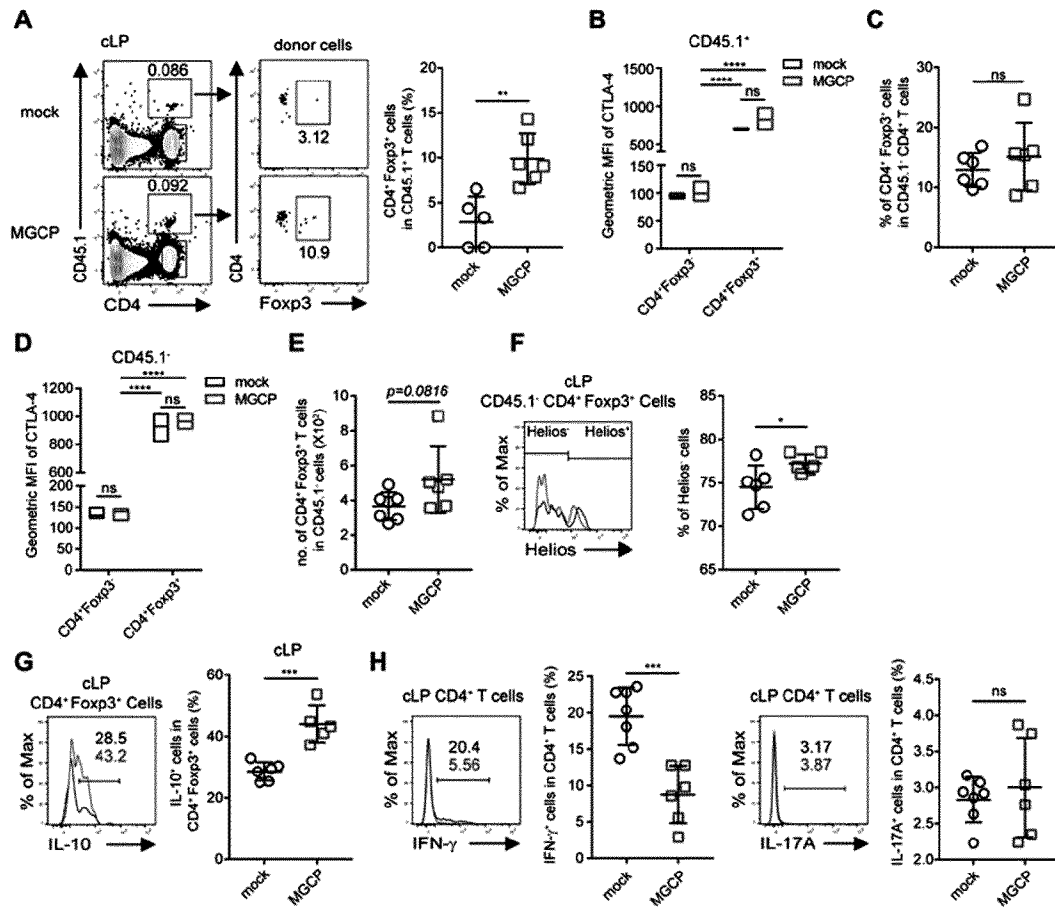
MGCP fraction B.

MGCP fraction C.

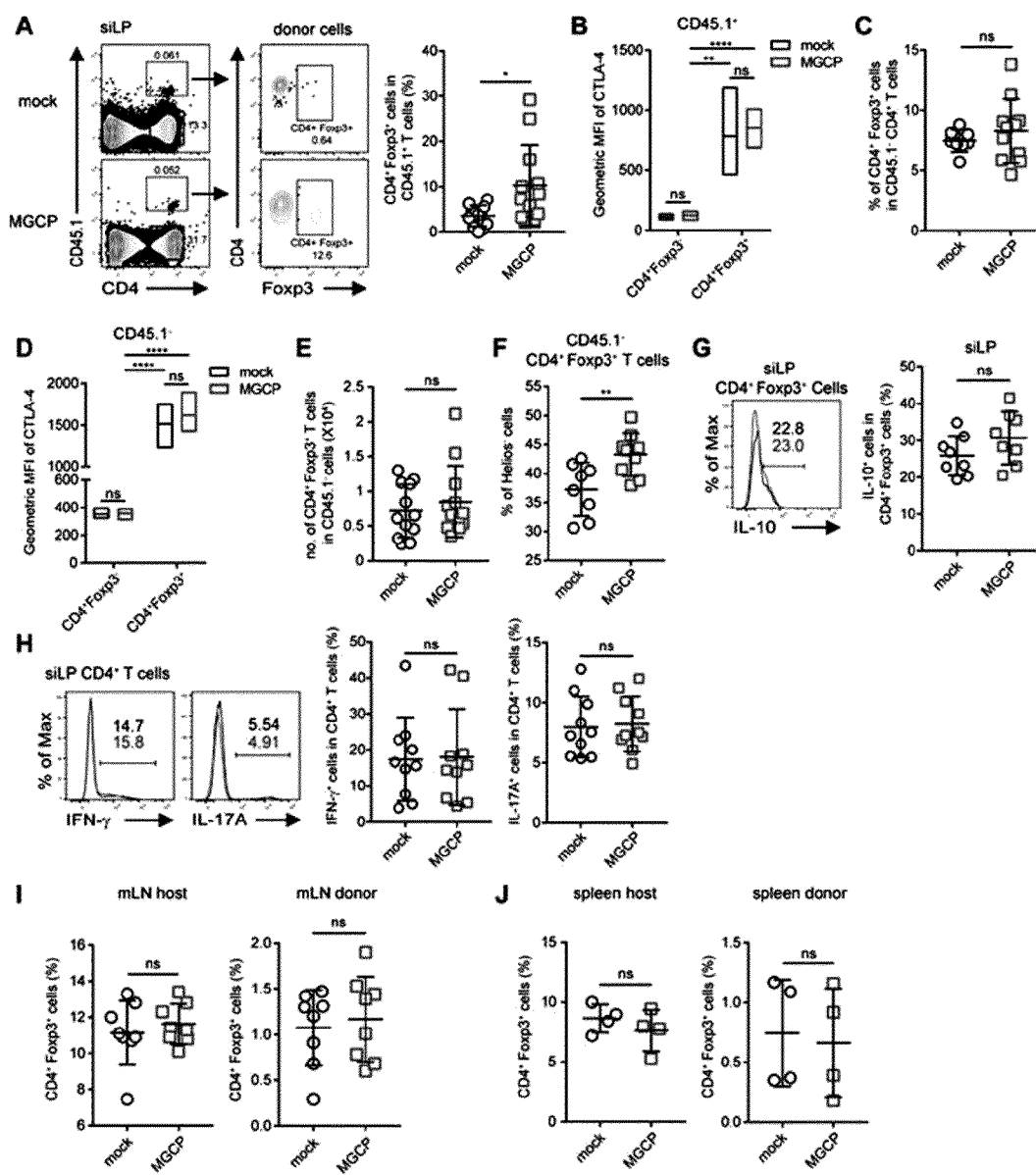
[도8]



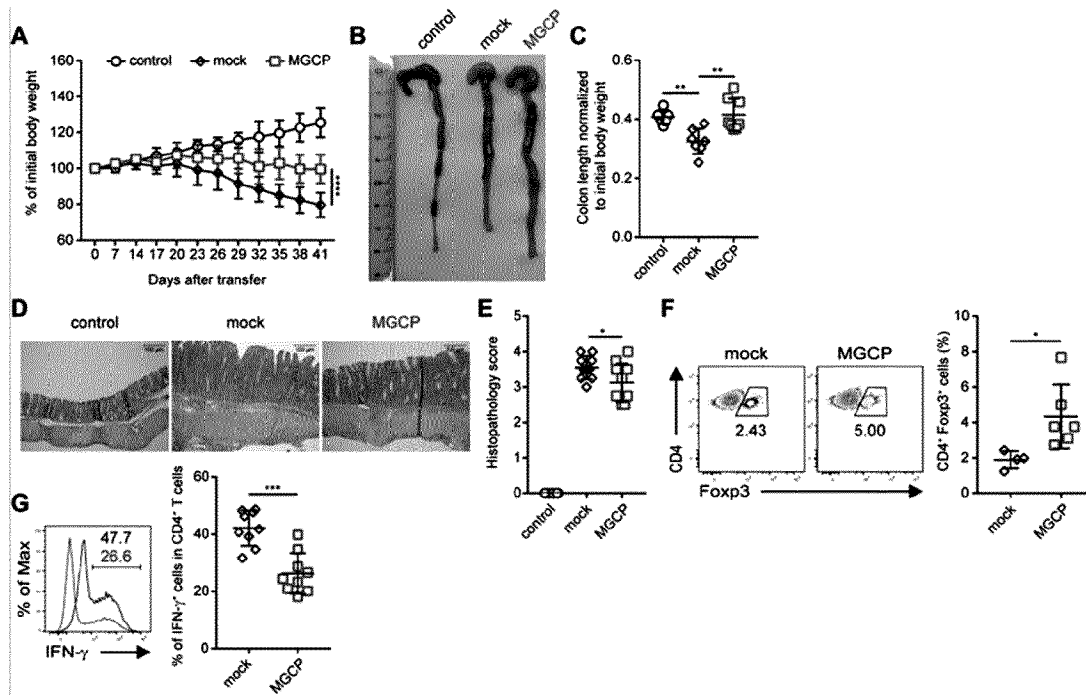
[도9]



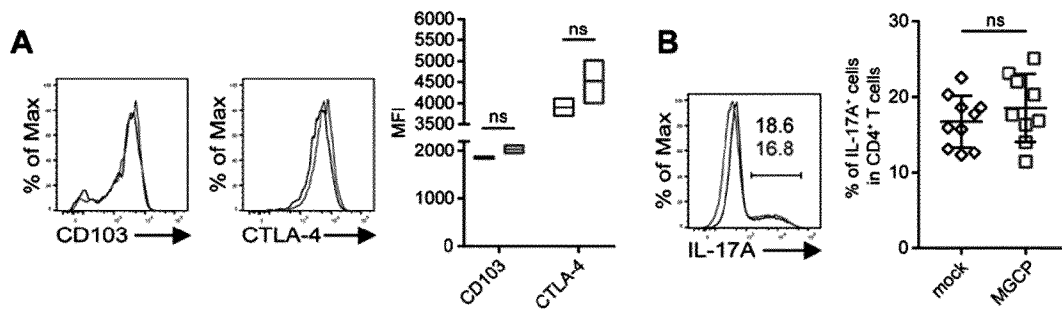
[도10]



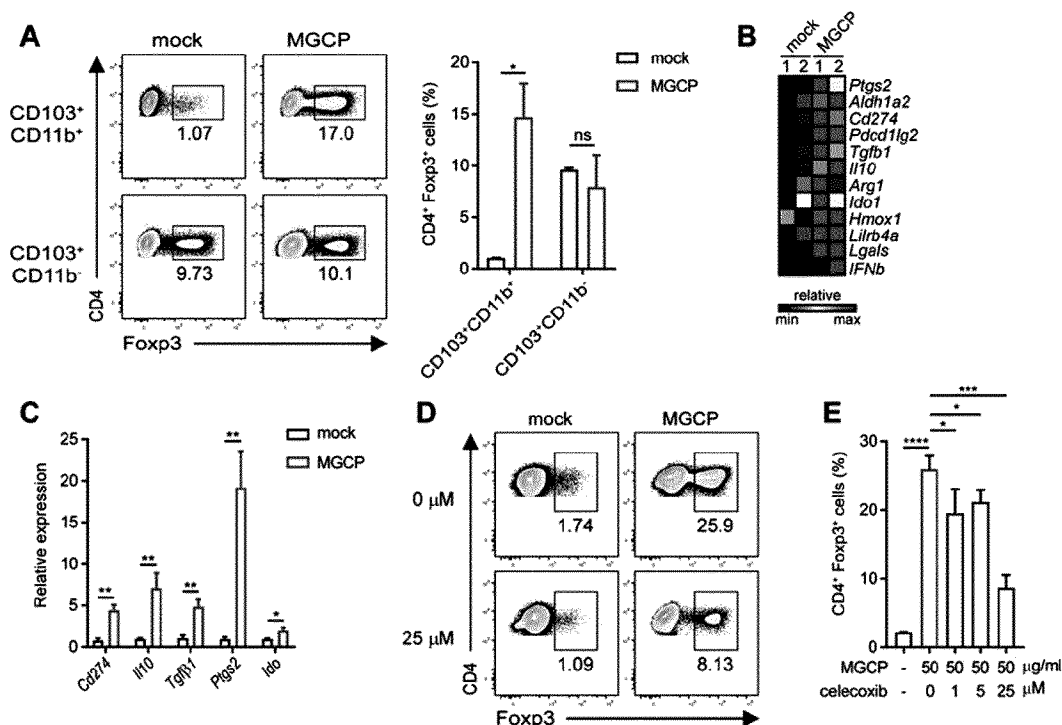
[도11]



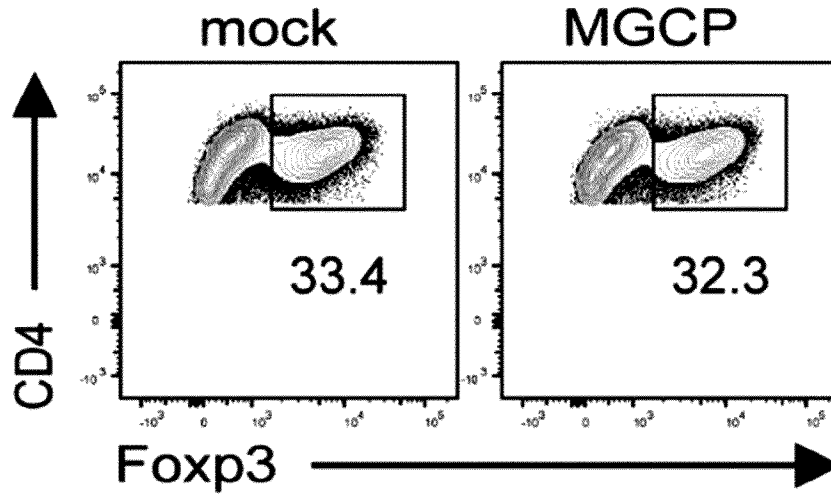
[도12]



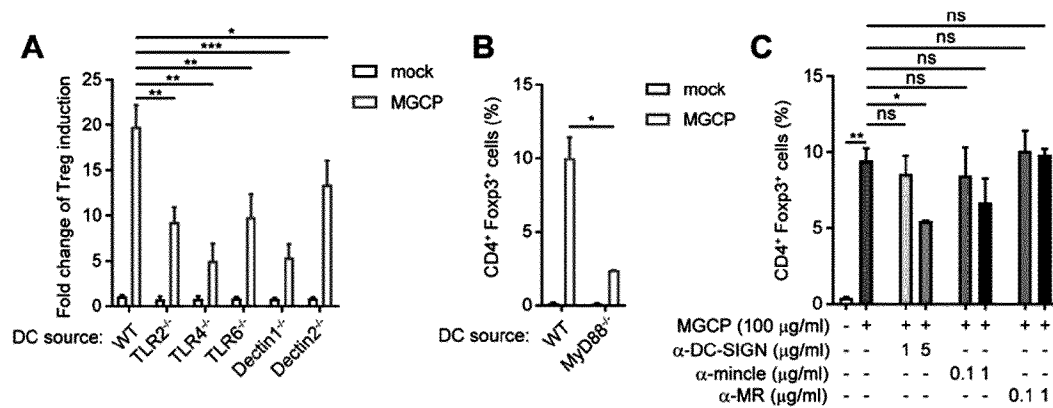
[도13]



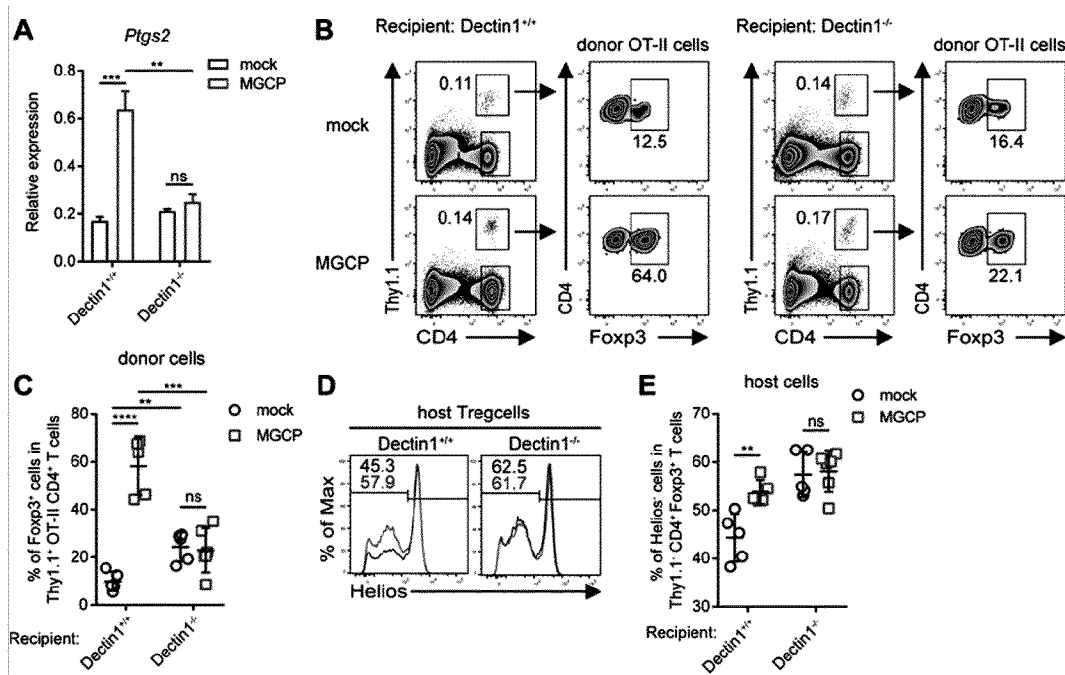
[도14]



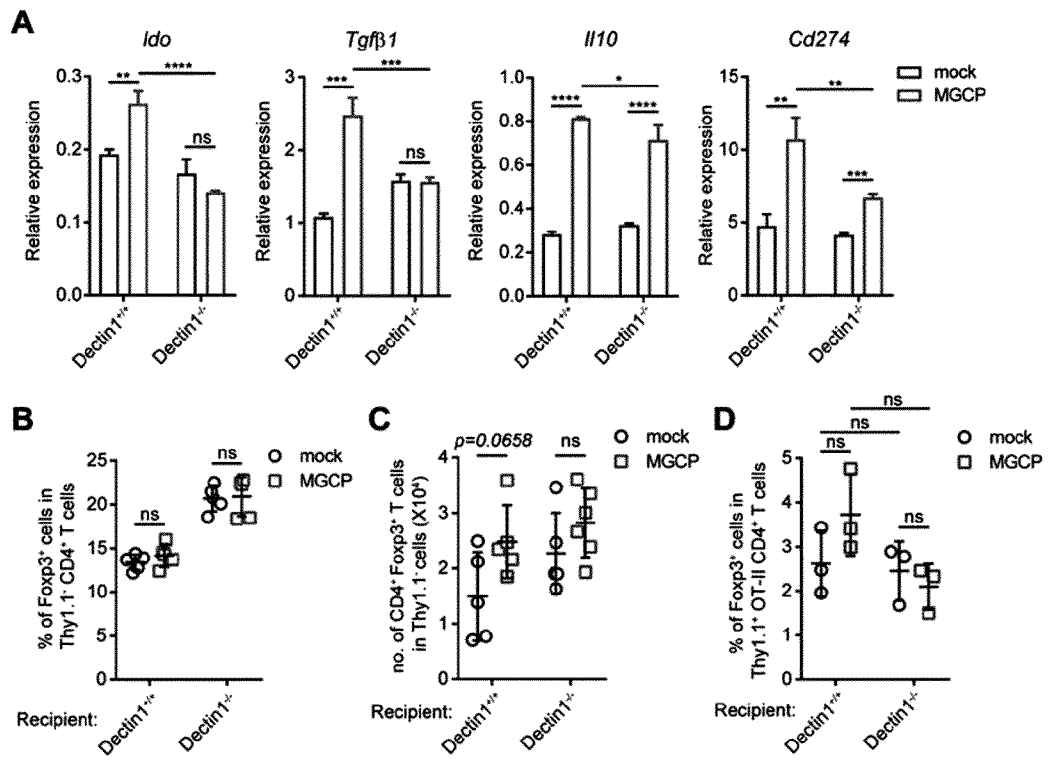
[도15]



[도16]



[도17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/009422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/06(2006.01)i, A61K 31/715(2006.01)i, A61K 31/736(2006.01)i, A61K 31/716(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/06; A61K 31/715; A61P 37/04; C12P 19/04; A61K 31/736; A61K 31/716; A61K 39/39

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mannan, β -glucan, polysaccharide, regulatory T cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0250235 A1 (SAARINEN, Juhani et al.) 13 October 2011 See claims 62, 71, 72, 74 and 79; paragraphs [0008] and [0012].	1-14
X	ALIZADEH, M. Yeast products as potential sources of immunomodulatory and growth promoting activity for broiler chickens. 2015, Ph.D. thesis. Department of Animal Science, University of Manitoba See abstract; page 52.	1-14
X	EUROFINS Homepage. Yeast cell wall polysaccharides: β -glucans & mannans. 04 January 2018, pages 1-2, Retrieved from <URL:https://cdnmedia.eurofins.com/corporate-eurofins/media/12145195/yeast_cell_wall_polysaccharides.pdf> See page 1.	1-14
X	KR 10-1999-0028736 A (CARLTON AND UNITED BREWERIES LIMITED) 15 April 1999 See claims 1, 19, 21-25 and 30.	1-14
A	IM, S.-H. Reprogramming of the immune system by rationally selected probiotics. In: The 13th Regular Seminar on 2018 1st Semester of Department of Biotechnology. 07 June 2018, UNIST. BLDG 110 Room N104. Retrieved from <URL:http://sls.unist.ac.kr/ko/_newsevent/se_minar_view.asp?seq=1320> See the entire document.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 OCTOBER 2019 (25.10.2019)	Date of mailing of the international search report 25 OCTOBER 2019 (25.10.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/009422

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LEE, C. et al. Structure and functional characterization of yeast derived polysaccharides in inducing Treg cells. P-104. In: KAI International Meeting 2018. 07-09 November 2018, Sejong University Convention Center. Seoul, Korea See the entire document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/009422

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **16-19**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 16-19 refer to multiple dependent claims not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: **15, 20**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/009422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0250235 A1	13/10/2011	CN 102257011 A	23/11/2011
		CN 102257011 B	22/04/2015
		EP 2370475 A1	05/10/2011
		EP 2370475 A4	22/10/2014
		EP 2370475 B1	15/02/2017
		ES 2624703 T3	17/07/2017
		US 9320291 B2	26/04/2016
		WO 2010-070207 A1	24/06/2010
KR 10-1999-0028736 A	15/04/1999	AT 252646 T	15/11/2003
		AU 6182496 A	05/02/1997
		AU 701745 B2	04/02/1999
		BR 9609323 A	15/06/1999
		CA 2226262 A1	23/01/1997
		CN 1192247 A	02/09/1998
		DE 69630455 T2	22/07/2004
		EP 0847446 A1	17/06/1998
		EP 0847446 A4	02/11/2000
		EP 0847446 B1	22/10/2003
		HK 1012422 A1	13/08/2004
		JP 11-508772 A	03/08/1999
		JP 4057057 B2	05/03/2008
		MX 9800127 A	29/11/1998
		MY 116657 A	31/03/2004
		NZ 310923 A	29/11/1999
		TW 424110 B	01/03/2001
		US 6444448 B1	03/09/2002
		WO 97-02356 A1	23/01/1997

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/06(2006.01)i, A61K 31/715(2006.01)i, A61K 31/736(2006.01)i, A61K 31/716(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/06; A61K 31/715; A61P 37/04; C12P 19/04; A61K 31/736; A61K 31/716; A61K 39/39

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 만난(mannan), 베타-글루칸(β -glucan), 다당체(polysaccharide), 조절 T 세포(regulatory T cell)**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2011-0250235 A1 (SAARINEN, JUHANI 등) 2011.10.13 청구항 62, 71, 72, 74 및 79; 단락 [0008] 및 [0012] 참조.	1-14
X	ALIZADEH, M., 'Yeast products as potential sources of immunomodulatory and growth promoting activity for broiler chickens', 2015, 박사 논문, Department of Animal Science, University of Manitoba 초록; 페이지 52 참조.	1-14
X	EUROFINS 홈페이지, "Yeast cell wall polysaccharides: β -glucans & mannans", 2018.01.04, 페이지 1-2, <URL:https://cdnmedia.eurofins.com/corporate-eurofins/ media/12145195/yeast_cell_wall_polysaccharides.pdf> 페이지 1 참조.	1-14
X	KR 10-1999-0028736 A (칼튼 앤 유나이티드 브레웰리스 리미티드) 1999.04.15 청구항 1, 19, 21-25 및 30 참조.	1-14
A	IM, S.-H., 'Reprogramming of the immune system by rationally selected probiotics', In: 생명공학부 2018학년도 1학기 제13회 정기세미나, 2018.06.07, UNIST, BLDG 110 Room N104, <URL:http://sls.unist.ac.kr/ko/_newsevent/seminar_view.asp?seq=1320> 전체 문헌 참조.	1-14

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 10월 25일 (25.10.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 10월 25일 (25.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	LEE, C. 등, 'Structure and functional characterization of yeast derived polysaccharides in inducing Treg cells' , P-104, In: KAI International Meeting 2018, 2018.11.07-09, Sejong University Convention Center, Seoul, Korea 전체 문헌 참조.	1-14

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 16-19
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 16-19는 PCT 규칙 6.4(a)의 규정을 충족하지 않는 종속항을 인용하고 있습니다.
3. ☒ 청구항: 15, 20
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2011-0250235 A1

2011/10/13

CN 102257011 A
CN 102257011 B
EP 2370475 A1
EP 2370475 A4
EP 2370475 B1
ES 2624703 T3
US 9320291 B2
WO 2010-070207 A1

2011/11/23
2015/04/22
2011/10/05
2014/10/22
2017/02/15
2017/07/17
2016/04/26
2010/06/24

KR 10-1999-0028736 A

1999/04/15

AT 252646 T
AU 6182496 A
AU 701745 B2
BR 9609323 A
CA 2226262 A1
CN 1192247 A
DE 69630455 T2
EP 0847446 A1
EP 0847446 A4
EP 0847446 B1
HK 1012422 A1
JP 11-508772 A
JP 4057057 B2
MX 9800127 A
MY 116657 A
NZ 310923 A
TW 424110 B
US 6444448 B1
WO 97-02356 A1

2003/11/15
1997/02/05
1999/02/04
1999/06/15
1997/01/23
1998/09/02
2004/07/22
1998/06/17
2000/11/02
2003/10/22
2004/08/13
1999/08/03
2008/03/05
1998/11/29
2004/03/31
1999/11/29
2001/03/01
2002/09/03
1997/01/23