(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월22일
(11) 등록번호 10-1981147
(24) 등록일자 2019년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/569* (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5047 (2013.01)
G01N 33/56977 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0114899
(22) 출원일자 2018년09월27일
심사청구일자 2018년09월27일
(56) 선행기술조사문헌
Helft et al., Immunity, Vol. 42, 2015, pp. 1197-1211.*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
권재열
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
김예은
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 이민영

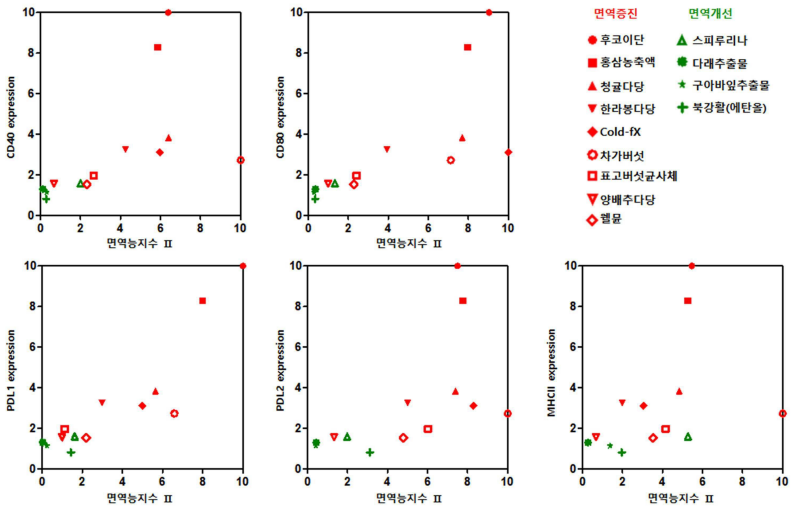
(54) 발명의 명칭 **수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 수지상세포를 이용하여 면역소재의 면역증진 또는 면역개선 효과 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계; (B) 상기 처리구와 대조구에서, MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0)과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1)의 세포비율을 측정하는 단계; 및 (C) 하기 식에 따라 상기 대상 소재의 면역증진 효과를 수치화하는 단계;를 포함하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법에 관한 것이다.

$$\text{면역능지수 } II = \frac{(\text{처리구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}{(\text{대조구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}$$

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
G01N 33/6872 (2013.01)
G01N 2333/70553 (2013.01)
G01N 2333/70578 (2013.01)

(72) 발명자
이영하
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
선푸름
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
강성욱
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)

(56) 선행기술조사문헌
Liu et al., NATURE IMMUNOLOGY, Vol. 12, No. 5, 2011, pp. 415-424.*
Maestre-Batlle et al., SCIENTIFIC REPORTS, 2017, pp. 1-9.*
KR1020170110297 A
KR1020110010030 A
KR1020110084118 A
JP11174053 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 315064-3
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발사업
연구과제명 면역 식품(소재)의 면역능 검증을 위한 표준설정 연구 및 민간 보급 프로세스 구축
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.10.12 ~ 2018.10.11

명 세 서

청구범위

청구항 1

(A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계;

(B) 유세포분석법으로, 상기 처리구와 대조구에서 MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0)과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1)의 세포비율을 측정하는 단계;

(C) 하기 식에 따라 상기 대상 소재의 면역증진 효과를 수치화하는 단계;를 포함하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법.

$$\text{면역능지수}\,II = \frac{(\text{처리구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}{(\text{대조구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}$$

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단계(B)에서,

CD11c가 발현되는 세포들에서 A0, A1 그룹의 세포비율을 측정하는 것을 특징으로 하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서,

배양된 처리구 및 대조구의 살아있는 세포에서 CD11c+ 세포들을 게이팅하는 소단계와,

이어서 CD11c+ 세포들을 CD40 vs. MHCII 발현 평면상에 펼쳐서 A0 그룹과 A1 그룹을 구획하는 소단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 살아있는 세포는,

FSC-H vs. FSC-A 플롯에서 단리되지 않은 세포(doublets와 clumps)를 제외하는 소단계, FSC-A vs. SSC-A 플롯에서 세포 잔해(debris)를 제외하는 소단계 및 SSC-A vs. Live/Dead 플롯에서 살아있는 세포만 게이팅하는 소단계를 포함하는 과정을 거쳐 획득되는 것을 특징으로 하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법.

청구항 7

청구항 1, 2, 5 및 6 중 어느 한 항에 의한 면역증진 평가방법을 활용한 면역증진 소재 스크리닝 방법.

청구항 8

수지상세포는 피측정자로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 청구항 1, 2, 5 및 6 중 어느 한 항에 의한 면역증진 평가방법을 활용한 개인 맞춤형 면역증진 소재 선별방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 수지상세포를 이용하여 면역소재의 면역증진 또는 면역개선 효과 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0002]

배 경 기 술

[0003] 최근 건강에 대한 관심이 고조되면서 면역과 관련한 각종 질환으로 고생하는 환자뿐만 아니라 건강에 큰 이상이 없는 사람들도 면역에 관련된 여러 가지 대체요법에 따른 식품이나 건강보조식품을 섭취하는 사례가 늘고 있다.

[0004] 정부에서는 이러한 면역관련 식약류에 대한 최소한의 관리를 위해 또한 사용지침을 주기 위해 '면역기능인정제품'을 지정하여 관리하고 있다. 2017년 기준 면역기능인정제품으로 인삼, 홍삼, 알콕시글리세롤함유 상어간유, 알로에 겔, 클로렐라와 같은 '고시형원료' 함유제품과, 게르마늄효모, 금사 상황버섯, 당귀혼합추출물, 클로렐라, 표고버섯균사체, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, L-글루타민, 다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토분말 등 복합물, 구아바잎추출물등복합물, 스피루리나, 청국장균배양정제물(폴리감마글루탐산칼륨) 등 '개별인정원료'를 함유하는 제품이 있다. 물론 이외에도 수많은 식품 또는 건강보조식품, 기능성 소재 등이 소비되고 있다.

[0005]

[0006] 한편, 사람을 대상으로 하는 한국 건강기능식품의 면역기능평가 가이드라인에 비추어보면 식품 섭취에 의해 기대되는 면역기능은 크게 ① 저하된 면역의 증강을 목적으로 하는 것과 ② 민감해진 면역반응(알레르기)을 조절해주는 것 등 두 가지로 분류된다. 즉, 면역관련 각종 식약품들은 **면역증진**(Immunity; 면역능, 면역항원, 항감염, 면역증강)용과 **면역관용**(Tolerance; 알레르기개선, 항염증, 과대면역개선, 과민면역개선)용으로 구분된다. 면역증진과 면역관용은 상호 상반된 기능이다. 정상적인 면역기능 수행을 통해 건강함을 유지하기 위해서는 면역증진과 면역관용이 잘 조정된 균형이 필요하다. 위험한 병원체들과 암화된 세포(transformed cell)들을 특이적으로 공격하여 잘 제거하지만, 해 없는 자가조직, commensal microorganisms, food antigens, 그리고 environmental antigens에는 관용성을 나타내야 한다. 그러한 면에서 이러한 두 가지 면역기능에 대해 식약품 소재가 미치는 효과를 효과적으로 조사할 수 있는 평가방법이 필요하다.

[0007] 그러나 현재까지 다양한 면역관련 식약품 소재가 개발되어 시판되고 있음에도 이러한 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가 시스템이나, 면역증진 소재의 개발을 위한 표준화된 시험법이 없는 것이 현실이다. 그렇기 때문에 A 소재가 B 소재에 비해 면역증강 효과가 몇 % 더 강하다는 식의 상대적이고 비합리적인 비교만 있거나, C 소재가 면역관련 생체물질 D의 발현을 몇 % 촉진한다는 등의 단편적 데이터만 있을 뿐 각종 면역관련 소재의 면역기능의 특성 및 강도에 따라 분류하고 수치화하는 것도 이루어지지 않고 있다.

[0008]

[0009] 공개특허 2011-0084118는, 피험자로부터 분리된 면역세포를 후보식품의 존재하에 배양하는 단계 및 배양결과 상기 후보식품이 면역세포를 활성화하는지를 결정하는 단계를 포함하는, 개인별 맞춤형 면역증진 식품의 선별을 위한 면역분석방법을 제시하고 있다. 그러나 이 종래기술은 이미 알려진 면역소재가 특정인에게 효과가 있는지

여부를 확인하는 방법에 한정될 뿐이다.

[0010] 하기 논문은, 쥐 피부세포로부터의 특수한 수지상세포 바이오 센서 클론 및, 이를 활용하여 약물을 분류하는 방법에 관한 것으로서 특수 개발된 수지상세포에서 IL-1beta의 발현 유도를 통해 항암제를 분류하는 것이다. 그런데 이에 의하면 유사한 방법으로 면역관련 식약품 소재를 분류할 수 있을 것이라는 힌트를 주긴 하지만, 특수한 수지상세포를 개발하고 이를 활용한 것이어서 '범용성'이 없다. 또한 면역에 많은 생체물질이 관여함에도 불구하고 IL-1beta의 발현만을 확인하기 때문에 그 결과를 신뢰하기 어렵다.

[0011]

[0012] 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도에 대한 합리적인 평가 시스템이나 실험방법론이 없는 이러한 현실은 면역관련 식약품의 활용과 개발 양 측면에서 문제를 야기하고 있다.

[0013] 사람마다 개인적인 기질이나 환경적인 차이에 의해 면역증강이 필요한 (즉, 면역관용이 있으면 안되는) 사람이나 상황일 수도, 그 반대일 수도 있다. 또한 면역증강 또는 면역관용이 요구되더라도 그 정도가 과하게 되면 오히려 부작용이 발생할 여지가 있다. 무분별한 면역관련 식약품의 남용은 오히려 건강을 악화시킬 우려가 있어 이는 개인적인 문제뿐만 아니라 사회적으로도 큰 문제를 야기할 수 있다.

[0014] 또한 면역관련 식약품으로 가능성이 있는 소재의 발굴과 개발 역시 개별적, 단편적으로 이루어지고 있다. 예컨대, 어떤 소재의 면역관련 특성이 발견되면 이를 확인하기 위해 동물실험으로 직행할 수밖에 없어 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다.

[0015] 그럼에도 아직까지 면역관련 식약품 소재의 세포독성 여부 및 정도, 면역특성(indexing), 면역증진 강도 등을 체계적으로 평가하는 방법에 대해 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) 공개특허 2011-0084118

비특허문헌

[0017] (비특허문헌 0001) Cancer Res 2009; 69: (17). September 1, 2009

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 이상과 같은 문제를 해결하기 위해 제안된 것으로, 식약품 소재의 면역능의 특성과 강도를 객관화, 수치화할 수 있는 평가방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 평가방법을 활용하여 면역증진 소재를 스크리닝하는 방법 및 개인 맞춤형 면역증진 소재 선별방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0020]

과제의 해결 수단

[0021] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은

[0022] (A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계; (B) 상기 처리구와 대조구에서, MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0)과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1)의 세포비율을 측정하는 단계; 및 (C) 하기 식에 따라 상기 대상 소재의 면역증진 효과를 수치화하는 단계;를 포함하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법에 관한 것이다.

$$\text{면역능지수}\,II = \frac{(\text{처리구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}{(\text{대조구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}$$

[0023]

[0024]

발명의 효과

[0025] 이상과 같이 본 발명은 면역관련 식약품 소재의 면역능의 특성(면역증강 또는 면역관용)과 강도를 시험관 수준에서 신속하고 객관적으로 평가할 수 있도록 한다.

[0026] 이러한 본 발명에 의해 종래 알려진 면역관련 식약품 소재의 면역학적 특성을 객관적이고 정확하게 파악할 수 있어 면역관련 식약품의 품질 표준화가 가능하게 되며, 소비자는 자신에게 적절한 면역관련 식약품을 선택할 수 있게 된다.

[0027] 또한 이러한 본 발명에 의하면, 새로운 면역 소재의 발굴과 탐색이 용이하게 되고, 후속 동물실험의 방향을 가이드할 수 있어 종래에 비해 시간과 비용을 절감하면서도 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있게 된다.

[0028]

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명에서 수지상세포의 준비 및 시료 처리 과정의 개념도.

도 2는 본 발명에서 유세포분석시 적용된 안티바디 패널.

도 3, 4는 본 발명에서 게이팅 전략을 보여주는 개념도 및 그 결과 인자들의 발현양상을 보여주는 도표.

도 5는 면역기능이 검증된 소재들의 면역능지수II 값을 보여주는 도표.

도 6은 면역기능이 검증된 소재들의 인자 발현량과 면역특성이 상관관계 없음을 보여주는 도표.

도 7은 면역기능이 확인된 다양한 신규 소재들의 면역능지수II 값을 보여주는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명자는, 면역증강 또는 면역관용 기능이 확인된 식약품 소재로 처리된 수지상세포의 표면에 발현되는 MHC, 공동활성인자 CD40, CD80, PD-L1, PD-L2 및 접착분자 CD11b, CD11c들의 발현양상에 일정한 패턴이 있음을 발견하였다. 또한 이러한 패턴들은 처리된 식약품 소재의 면역증강 기능 혹은 면역관용 기능 특성에 대응하며, 그 면역기능의 강도와도 관련이 있음을 확인하였다. 이에 본 발명자는 이러한 패턴을 지수화하고 면역증강 또는 면역관용 기능이 확인된 식약품 소재를 대상으로 그 유효성을 검증하여 본 발명을 도출하게 되었다.

[0031] 보다 구체적으로, 다양한 면역관련 소재로 수지상세포를 처리하고, MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0)의 세포비율과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1)의 세포비율을 조사 분석하였다. 그 결과, 면역증진 효과가 있는 것으로 알려진 소재의 경우 A1/A0의 비율이 높았고, 반대로 면역관용 효과가 있는 것으로 알려진 소재에서는 A1/A0의 비율이 낮다는 상관관계를 확인하고 본 발명을 완성한 것이다. 이러한 본 발명은 실제 면역관련 동물모델 실험과 대비하여 그 타당성이 확인되었다.

[0032]

[0033] 전술하였듯이 본 발명은

[0034] (A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계; (B) 상기 처리구와 대조구에서, MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0)과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1)의 세포비율을 측정하는 단계; 및 (C) 하기 식에 따라 상기 대상 소재의 면역증진 효과를 수치화하는 단계;를 포함하는 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법에 관한 것이다.

$$\text{면역능지수}\,II = \frac{(\text{처리구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}{(\text{대조구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}$$

[0035]

[0036] 바람직하게는 상기 A0, A1 그룹의 세포비율은 CD11c가 발현되는 세포들에서 측정하는 것이 좋다.

[0037] 본 발명은 생물학적 실험을 반영한 것이므로 '평균 이상' '평균 이하'의 경계가 명확하게 구분되지 않는 경우도 있을 것인데, 이러한 경우 실험자가 본 발명이 속하는 기술분야에서 용인되는 범위 내에서 그 경계를 구분할 수 있을 것이다.

[0038]

[0039] 본 발명의 발명자가 검토분석한 바에 의하면, 면역관련 소재들의 면역능지수II의 역수가 소재의 면역관용 정도와 비교적 정확하게 대응됨이 확인되었다. 따라서 본 발명에서의 면역능지수II는 실질적으로 면역관용지수로도 활용될 수 있을 것이다.

[0040]

[0041] 하기 실시예에서는 상기 수지상세포로 마우스 골수세포로부터 분화된 것을 이용하였으나, 이에 제한되지 않고 인체에서 분리된 것을 이용할 수도 있다.

[0042]

[0043] 본 발명에서 상기 대상 소재의 추출물은, 물, C1~C4 의 알콜, 헥산, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 글리세린, 초산에틸, 에테르, 클로로포름 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출용매로 추출된 것일 수 있다. 하기 실시예에서는 대상 소재에 따라, 분말, 물 추출물 및 알콜 추출물을 사용하였다.

[0044]

[0045] 본 발명에서 상기 대조구는 대상 소재 추출물이 포함되지 않은 vehicle, 즉 블랭크로 처리된 것이다.

[0046]

[0047] 본 발명에서 상기 단계(B)에서 CD11b, MHCII 및 CD11c 등 면역인자들의 발현여부 및 발현 정도는, 유세포분석법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmnoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학법(immnohistochemistry), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048]

[0049] 본 발명에서 상기 단계(B)는, 하기 실시예에서처럼, 유세포분석법에 의해 수행되는 것이 바람직하다.

[0050] 이 경우, 처리구와 대조구 세포로부터,

[0051] ① FSC-H vs. FSC-A 플롯에서 단리되지 않은 세포(doublets와 clumps)를 제외하는 소단계,

[0052] ② FSC-A vs. SSC-A 플롯에서 세포 잔해(debris)를 제외하는 소단계,

[0053] ③ SSC-A vs. Live/Dead 플롯에서 살아있는 세포만 게이팅하는 소단계,

[0054] ④ 살아있는 세포에서 CD11c+ 세포들을 게이팅하는 소단계 및

[0055] ⑤ 게이팅된 CD11c+ 세포들을 CD40 vs. MHCII 발현 평면상에 펼쳐서 A0 그룹과 A1 그룹을 구획하는 소단계를 거쳐 수행될 수 있다.

[0056] 이 경우 A0 그룹과 A1 그룹의 세포수 또는 세포비율은 유세포분석 결과 정보로부터 통상의 방법에 따라 용이하게 확인할 수 있다.

[0057]

[0058] 이상과 같은 본 발명에 의한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법은, 면역능이 알려지지 않는 식약품 소재의 면

역증진 소재 스크리닝 방법으로 활용될 수 있다. 유세포분석을 적용하는 경우에는 Live/Dead 세포 비율 정보도 도출되기 때문에 소재의 독성도 동시에 평가가 가능하게 된다.

[0059] 또한 피측정자로부터 유래된 단구세포를 통해 얻은 수지상세포를 적용하는 경우에는 개인 맞춤형 면역증진 소재 선별방법으로도 활용될 수 있을 것으로 예견된다.

[0060]

[0061] 이하 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0062]

[0063] **[실시예]**

[0064] **1. 대상 소재 추출물의 준비**

[0065] 대상 소재 추출물은 농축액 또는 분말형태로 한국한의학연구원(대전, 한국)과 (주)비케이바이오(제주, 한국)에서 공급받았다. 소재 추출용액(에탄올 또는 물)에 대한 정보를 표시하였다.

[0066] 추출물을 10% DMSO in PBS 용액으로 40 또는 200 ㎎/㎖의 보관액을 제조하여 -20℃에 보관하였다.

[0067]

[0068] **2. 수지상세포의 준비 및 시료 처리**

[0069] 다물사이언스(한국)에서 구매하여 일반적 조건의 충남대학교 의과대학 실험동물 관리 사육실에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 섭취시키며 사육한 6~10주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 통상의 방법에 따라 골수세포를 획득하였다.

[0070] 획득된 골수세포를 하기 표와 같은 조성의 배지에 혼합하고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 6일 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다.

[0071]

성분	함량
RPMI 1640	444.5 ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	50 ml
Penicillin/streptomycin	5 ml
β-mercaptoethanol	0.5 ml
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	20 ng/ml
Total	**500 ml**

[0072] 배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하고 원심분리하였다(1500rpm, 5분). 분리된 세포를 동일 배지에 현탁하고 48-well plate에 5×10^5개가 되도록 분주하였다(도 1).

[0073] 이때 상기 대상 소재 추출물의 보관액을 상기 배지로 최종농도가 100~1000 ㎍/㎖가 되도록 희석하여 농도별로 처리하고 동일한 조건에서 24시간 배양한 후 부착되지 않은 세포를 수거하여 유세포분석을 수행하였다. 세포독성이 심한 소재의 경우에는 최종농도를 낮추어가며 실험을 진행하였다.

[0074]

[0075] **3. 유세포분석**

[0076] 수지상세포의 생존율과 세포표면 활성인자 및 억제인자의 발현 정도를 측정하기 위하여 유세포분석을 실시하였다.

[0077] 세포염색법은 확립된 방법에 따라 수행하였고, Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존율을 확인하였다. 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 유세포분석장치 (FACS Canto Ⅱ, BD bioscience, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0078]

[0079] (1) 실험재료

[0080] ① 안티바디(도 2)

[0081] FITC-conjugated anti-CD273(PD-L2) (11-9972-85, eBiosciences),

[0082] PE-anti-CD274(PD-L1) (558091, BD Pharmingen),

[0083] PerCP-Cy5.5-MHCⅡ (562363, BD Pharmingen),

[0084] PE-Cy7-anti-CD80 (25-0801-82, eBioscience),

[0085] APC-anti-CD11c (20-0114-U100, Tonbo bioscience),

[0086] APC-Cy7-CD11b (BD Pharmingen, USA),

[0087] ② FACS buffer

[0088] 1X PBS (phosphate buffered saline), 1% BSA (Bovine serum albumin), 0.05% NaN_3 (Sodium azide)

[0089] ③ LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966, Invitrogen)

[0090] 동봉된 DMSO 50 μl로 stock을 만들어 -20℃에 보관. 세포 염색 시 PBS에 1:1000으로 희석하여 사용. Light protection, Desiccate.

[0091]

[0092] (2) 수지상세포의 염색 및 유세포분석

[0093] 종래 확립된 방법에 따라 수지상세포를 염색하고 유세포분석을 수행하였다. 통상의 방법에 따라 유세포분석 과정에서 소재의 독성 즉, 세포의 생존율 평가도 이루어졌다. 각 실험은 2~3회 반복하여 시행하였다. 유세포분석 실험에서 얻어진 결과는 Prism Graph-Pad를 이용하여 평균 ± 표준오차로 분석하였고, 데이터는 FlowJo software (FlowJo, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0094]

[0095] (3) 게이팅 및 데이터 분석

[0096] 다음과 같은 전략에 따라 게이팅이 이루어졌다. 하기 설명에서 게이팅과정을 통해 "X를 제외, 분리 또는 선택"한다는 것은 '유세포분석 데이터에서 X에 대한 전자정보를 제외, 분리 또는 선택하여 정보처리'한다는 의미이다.

[0097] 먼저, FSC-H vs. FSC-A 플롯에서 단리되지 않은 세포(doublets와 clumps)를 제외하고, 이어서 FSC-A vs. SSC-A 플롯에서 세포 잔해(debris)를 제외하여 단일세포(singlet cell)를 분리하였다. 이어서 SSC-A vs. Live/Dead 플롯에서 사멸 세포를 제거하고 생존 세포만 게이팅하였다.

[0098] 이어서 상기 생존 세포를 대상으로 아래와 같이 다양한 전략에 따라 게이팅 하여 대상 소재가 수지상세포에 대한 보조자극인자 및 억제인자 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

[0099]

[0100] **4. 평가방법의 확정 및 검증**

[0101] (1) 사전 실험

[0102] 면역증진 효과가 있는 것으로 알려진 다양한 소재와, 항염증(면역관용) 효과가 있는 것으로 알려진 다양한 소재의 알콜추출과 물추출을 전술한 방법에 따라 수지상세포에 처리하고, 보조자극인자 및 억제인자의 발현특성을 확인하였다(도 3, 4 참조).

[0103] 이어서 CD11c, MHICII 그리고 CD40의 발현정도에 기초하여 수지상세포를 CD40 vs. MHCII 발현 평면상에 펼치고, 각각 미발현, 발현, 고발현으로 구분하여 9구획으로 구분하였다(도 4 참조). 그 결과 대부분의 소재들에서 ① CD40이 발현되지 않으면서 MHC II가 보통으로(도면에서 2번구획) 또는 강하게(3번구획) 발현되는 그룹과, ② MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 보통으로(도면에서 6번구획) 또는 강하게(9번구획) 발현되는 그룹이 비교적 명확하게 구분되었다. 즉, MHC II가 발현되지만 CD40은 발현되지 않는 그룹(A0; 2번구획+3번구획)과, MHC II가 강하게 발현되면서 CD40도 발현되는 그룹(A1; 6번구획+9번구획)이 비교적 명확하게 구분되었다.

[0104] 그 결과, 면역증진 효과가 높은 것으로 알려진 소재들에서 A1/A0의 비율이 높았고, 면역관용 효과가 있는 소재들에서는 그 비율이 낮았다. 즉, 소재 처리에 따른 A1/A0의 비율과 상기 소재의 기존에 알려진 면역특성(면역증진 또는 면역관용)에 상관관계가 나타남을 확인하였다.

[0105]

[0106] (2) 본 발명에 의한 평가방법의 확정

[0107] 이상과 같이, 면역관련 기능적 특성이 알려진 소재로부터 면역기능과 A0, A1 그룹의 비율 사이에 일정한 패턴이 있음을 발견하였다. 이에 소재들의 면역기능 강도를 평가하고 하고 타 소재들과의 객관적 비교가 가능하도록 면역항원성의 척도로 하기 식과 같은 면역능지수II를 정의하였다.

$$\text{면역능지수}\,II = \frac{(\text{처리구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}{(\text{대조구})\dfrac{A1(\%)}{A0(\%)}}$$

[0108]

[0109] 이때 대조구는 대상 소재 추출물이 포함되지 않은 vehicle, 즉 블랭크로 처리된 것이다. 본 발명에서는 위 1, 2에 기술한 바와 같이, 처리구와 동일한 양의 10% DMSO in PBS 용액에 동일한 양의 (수지상세포 배양) 배지가 혼합된 것을 vehicle로 하였지만, 추출물이 포함되지 않는 점 이외에 처리구에 첨가되는 처리액과 동일한 것이라면 vehicle로 특별한 제한은 없다.

[0110]

[0111] (3) 검증 테스트

[0112] 후코이단, PSK, 청귤다당, 유산균다당, Cold-fX, 홍삼농축액, 표고버섯균사체, 다래추출물, 스피루리나, 구아바잎추출물과 같이 종래 면역기능이 동물실험 검증과정을 통해 확인된 십종의 소재를 대상으로 상기 4의 사전 실험과 같은 방식으로 면역능지수II를 측정하여 면역기능에 대한 수치화를 시도하였다(아래 표 및 도 5 참조).

면역능지수 II		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
후코이단	8.74	400
홍삼농축액	7.24	800
청귤다당	3.35	50
한라봉다당	2.84	400
Cold-fX	2.72	100
차가버섯	2.38	100
표고버섯균사체	1.72	50
스피루리나	1.39	20
양배추다당	1.36	400
엘뮨	1.33	50
다래추출물	1.14	100
구아바잎추출물	0.99	20
북강활 (에탄올)	0.71	100

[0113]

[0114]

[0115] 도표에서 볼 수 있듯이, 이미 면역증진소재로 인증받은 소재들은 면역능지수II이 높은 값을 나타내고 과민면역 개선으로 인증받은 소재들은 낮은 값을 가짐을 알 수 있다.

[0116] 시험관내 처리조건에서 세포 생존율 70% 이상에서 면역관련측정치에 효과를 보이는 가장 높은 시료처리농도에서의 면역능지수II 값을 등급화하여 종래 알려진 소재들의 면역관련 기능과 비교하여 통합적으로 살펴보면, 면역능지수II 값이 3 이상이면 면역증진 기능이 있는 것으로, 2 이하이면 면역관용 기능이 있는 것으로 확인되었다.

[0117]

[0118] (4) 인자들의 발현량과 면역특성의 관계

[0119] 종래에는 수지상세포에 대한 소재의 효과를 시험관 수준에서 평가할 때 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 비교하는 방법을 사용하였다. 도 6에 위 검증테스트에 사용된 소재들에 의한 각 인자들의 발현량과 면역능지수II 관계를 도시하였다.

[0120] 도시된 바와 같이, 예를 들면 자극인자 CD40의 발현량이 상대적으로 적은 청귤다당, 차가버섯 등이 발현량이 많은 후코이단, 홍삼농축액보다 더 면역증진 작용을 하며, 억제인자 PD-L1의 발현량이 상대적으로 아주 많은 후코이단, 홍삼농축액 등이 실제 가장 큰 면역증진 작용을 하며, 오히려 상대적으로 발현량이 적은 스피루리나나 다래추출물 등이 면역관용 작용을 함을 알 수 있다. 즉, 기존의 각 자극인자와 억제인자들의 발현량 측정값과 소재의 면역특성(면역능지수 II)은 상관관계를 보이지 않는다.

[0121] 따라서 종래와 같이 소재처리에 의한 각 자극인자와 억제인자들의 발현량을 단순 비교하는 방법으로는 소재들의 상대적인 면역능을 예측하고 동물실험모델을 설계하는데 적합하지 않음을 확인할 수 있다.

[0122]

[0123] **5. 상품으로 개발중인 면역소재에 대한 평가 및 새로운 면역소재의 발굴**

[0124] 면역기능이 있는 것으로 평가되어 특허등록되었거나 특허출원중인 주)비케이바이오의 식품소재들과 특허출원하였거나 개발중인 한국한의학연구원의 소재들을 대상으로 상기 4의 사전 실험과 같은 방식으로 면역능지수I를 측정하여 면역증진 또는 면역관용 기능이 있는지, 있다면 강도가 어느 정도인지를 예측하였다.

[0125] 면역기능이 동물실험을 통해 검증된 10개 소재들과 면역능 평가대상 시료에 대한 면역능지수II 값을 표와 도면(도 7)에 표시하였다.

면역능지수 II		
평가소재	면역능지수값	처리농도 (μg/ml)
양유	18.138	1000
톳추출분말	13.749	400
양배추추출분말	13.399	800
미역추출분말	8.865	400
후코이단	8.745	400
CP-다당	8.416	1000
홍삼농축액	7.244	800
은시호 (효소2)	7.224	600
KP-다당	6.937	1000
차가버섯	3.607	200
유산균다당	3.446	400
브로콜리다당	3.439	100
청귤다당	3.354	50
PSK (Krestin)	3.256	100
감귤다당	3.205	400
알로에다당	3.192	100
방울양배추추출분말	2.974	100
백개자	2.844	1000
한라봉다당	2.839	400
Cold-fX	2.721	100
황개자	2.066	800
은시호 (에탄올)	1.983	800
자몽과피다당	1.944	200
한라봉폴리페놀	1.917	200
아삼	1.842	100
표고버섯균사체	1.717	50
식방풍	1.490	50
스피루리나	1.391	20
양배추다당	1.361	400
Resveratrol	1.361	2
웰뮨	1.334	20
다래추출물	1.135	100
구아바잎추출물	0.988	20
Vitamin D3	0.922	0.0001
북강활	0.711	100

[0126]

[0127]

[0128] 그 결과, 양유, 톳추출분말, 양배추추출분말, 미역추출분말, 후코이단, CP-다당, 홍삼농축액, 은시호(효소2), KP-다당 등이 가장 좋은 면역증진 소재로, 차가버섯, 유산균다당, 브로콜리다당, 청귤다당, PSK, 감귤다당, 알로에다당, 방울양배추추출분말, 백개자, 한라봉다당, Cold-fX, 차가버섯, 황개자 등도 상대적으로 좋은 면역증진소재로, 은시호(에탄올), 자몽과피다당, 한라봉폴리페놀, 아삼, 표고버섯균사체, 식방풍, 스피루리나, 양배추다당, Resveratrol, 웰뮨 등도 면역증진소재가 될 수 있으나, 다래추출물, 구아바잎추출물, Vitamin D3, 북강활 등은 면역관용 소재임이 예측되었다.

[0129]

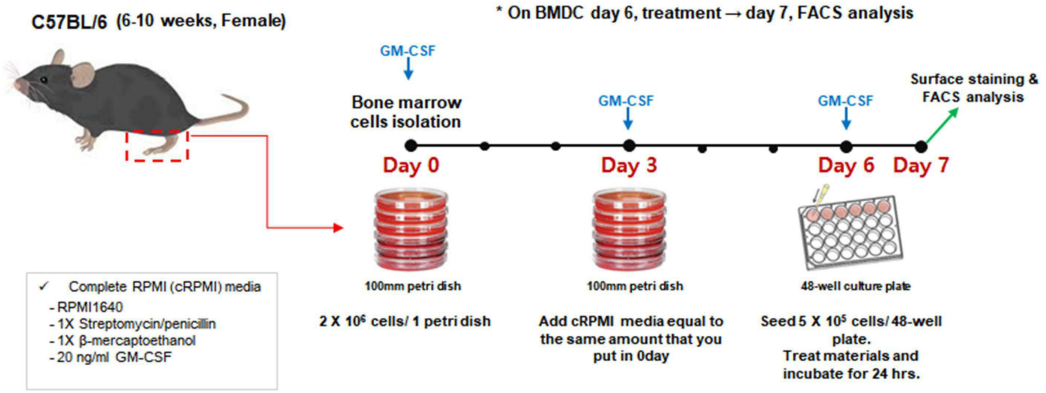
[0130]

[0131] 이상과 같은 본 발명에 의하면 시험관내에서 수지상세포에 소재를 처리하고 면역 자극인자와 억제인자 각각의 발현여부, 발현정도를 확인함으로써 소재의 세포독성 여부 및 정도, 면역특성(indexing), 면역증진 강도 등에 대한 기초정보를 용이하게 획득할 수 있게 된다. 또한 처리된 수지상세포가 생성하는 면역관련 물질들의 발현 비율을 인덱싱하여 소재의 면역성의 특성 및 강도에 따라 소재를 분류하고 서열하는 것이 가능해지므로, 대상소재의 면역특성(면역증강 or 면역관용)과 그 강도를 체계적으로 정립할 수 있게 된다.

[0132] 또한 본 발명은 면역식품(소재)의 면역증진을 시험관 수준에서 평가할 수 있도록 면역기능 검사치의 수량화 및 등급화를 가능하게 하는 것이다. 이에 의해 종래 알려진 면역식품(소재)의 면역학적 특성을 정확하게 파악할 수 있어 면역식품의 품질 표준화가 가능하게 된다. 또한 본 발명에 의하면 새로운 소재가 면역기능을 가지는지, 그렇다면 면역증진인지 면역관용인지 그 효과의 정도가 어떤지를 빠르고 정확하게 평가할 수 있으므로 신소재 탐색이 용이해지고, 동물모델에 대한 가이드라인을 제시할 수 있어 새로운 면역기능 소재의 탐색과 검증을 효율적으로 할 수 있게 된다.

도면

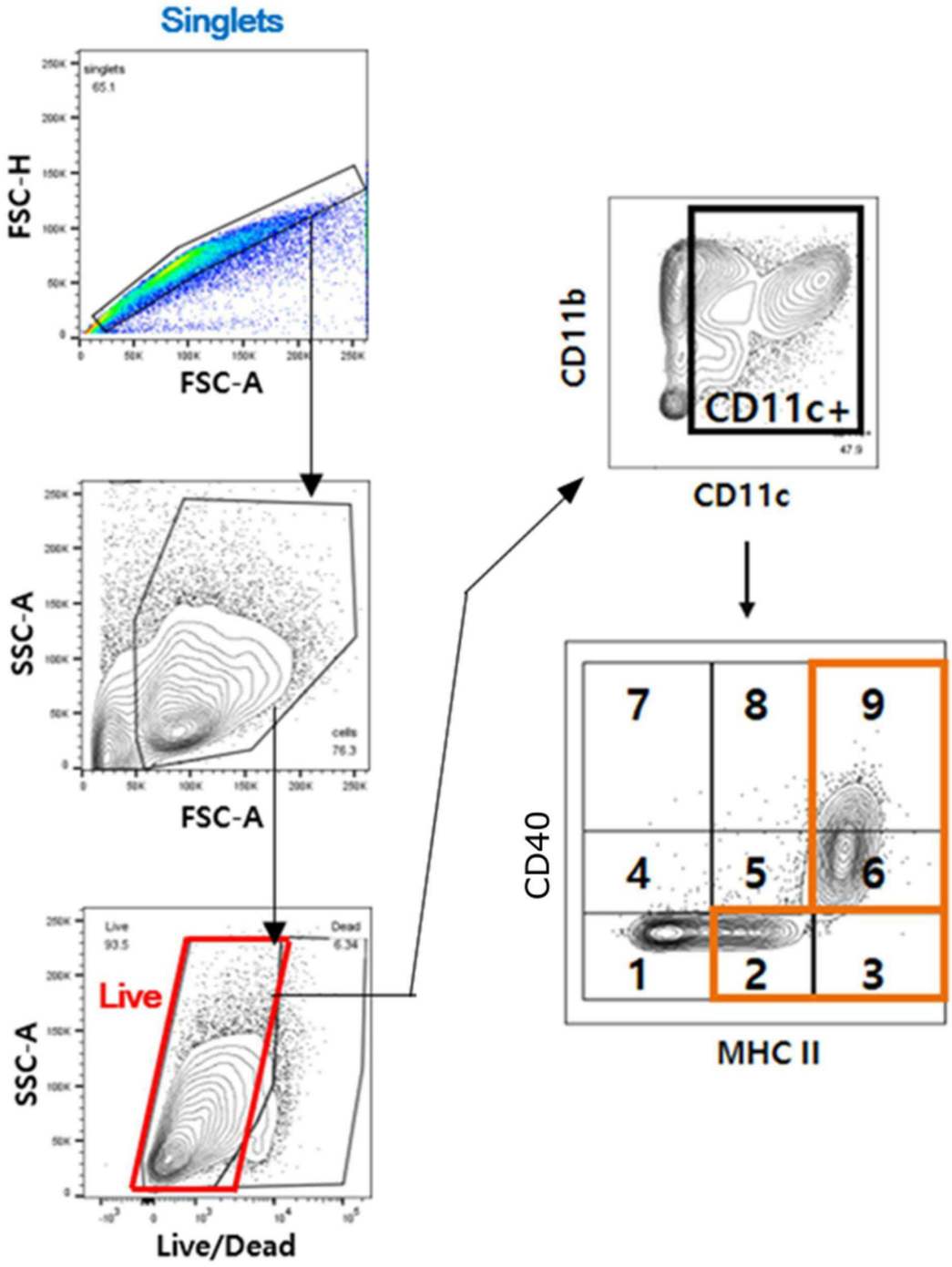
도면1



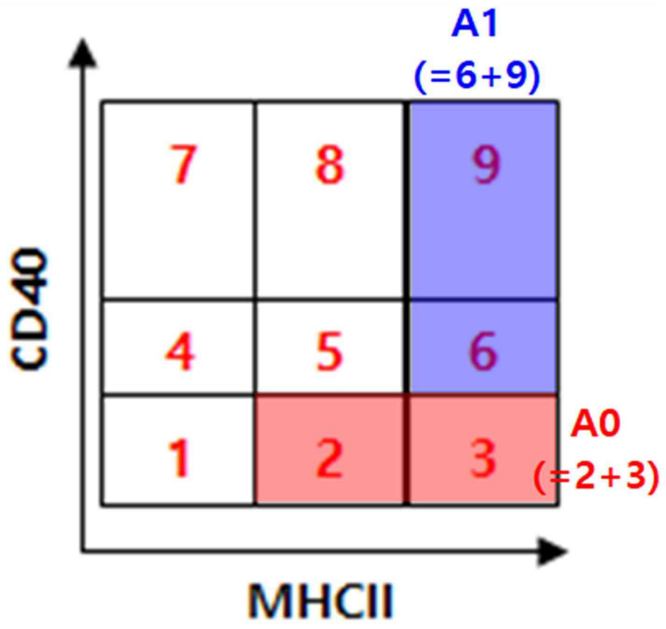
도면2

Immuno/Tolerogenic DC(mouse)	Blue laser (488nm)				Red laser (640 nm)		Violet Laser(405nm)		stimulation	surface
	530/30	588/42	670LP	780/60	660 / 668	785 / 785	450/50	510/50	Fix/Perm	ICS
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421/V450	BV510/V500		
Surface(Total volume : 200ul)	PD-L2	PD-L1	MHCII	CD80	CD11c	CD11b	CD40	L/D		
vendor	eBio	BD	BD	eBio	TONBO	Biolegend	BD	Life technologies		
Clone	122	MIH5	M5/114.15.2	16-10A1	N418	M1/70	3/23			
cat#	11-9972-85	558091	562363	25-0801-82	20-0114-U100	101226	562846	L34966		
Vol. per test(μl)	0.3	0.3	0.02	0.3	0.25	0.32	0.3	1/25 dilution -> 5ul		

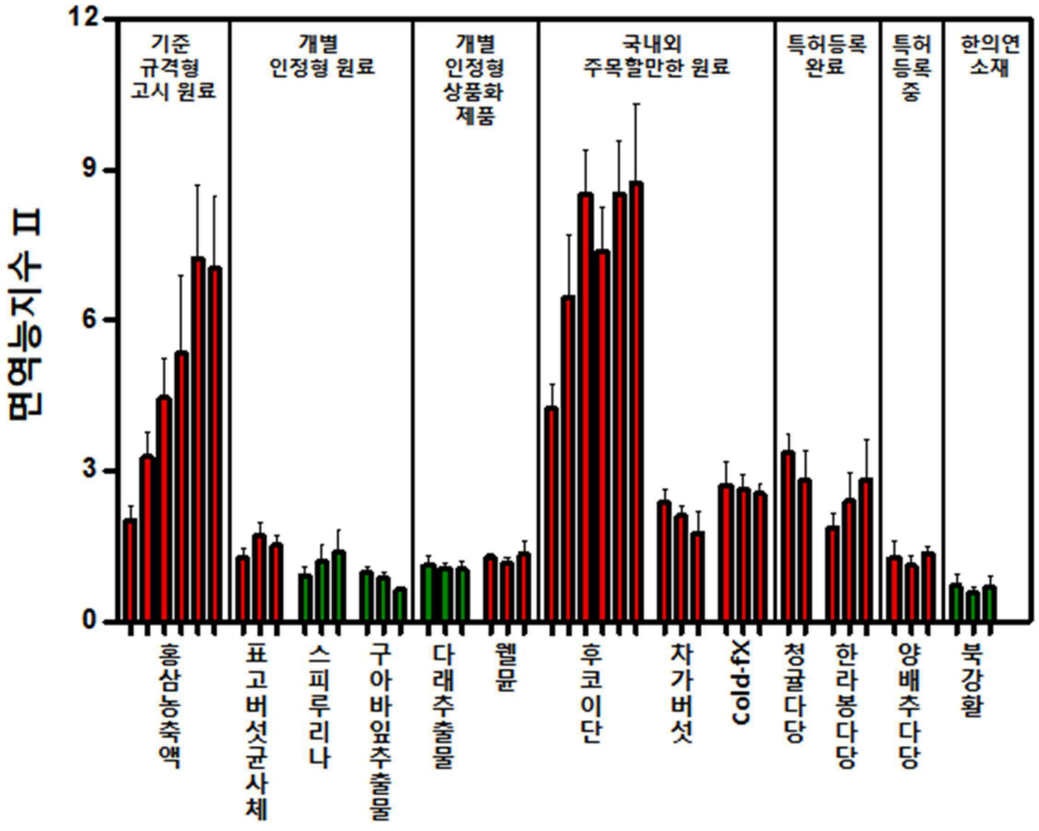
도면3


Singlets
singlets
65.1
FSC-H
FSC-A
SSC-A
cells
76.3
FSC-A
Live
93.5
Dead
6.34
Live
SSC-A
Live/Dead
CD11b
CD11c+
47.9
CD11c
CD40
7
8
9
4
5
6
1
2
3
MHC II

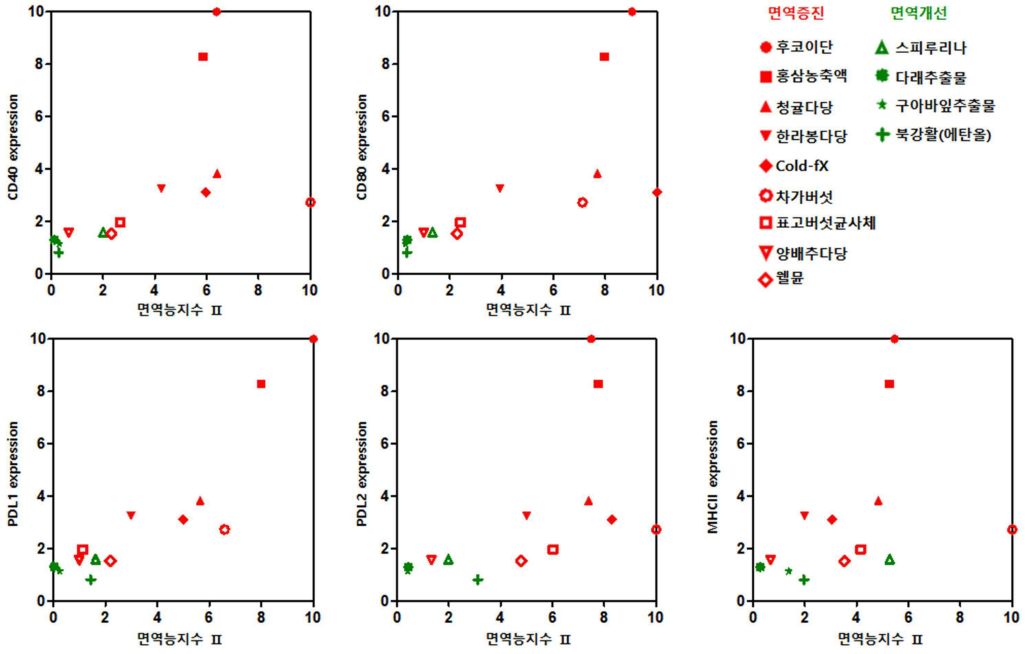
도면4


A1
(=6+9)
7
8
9
4
5
6
1
2
3
A0
(=2+3)
CD40
MHCII

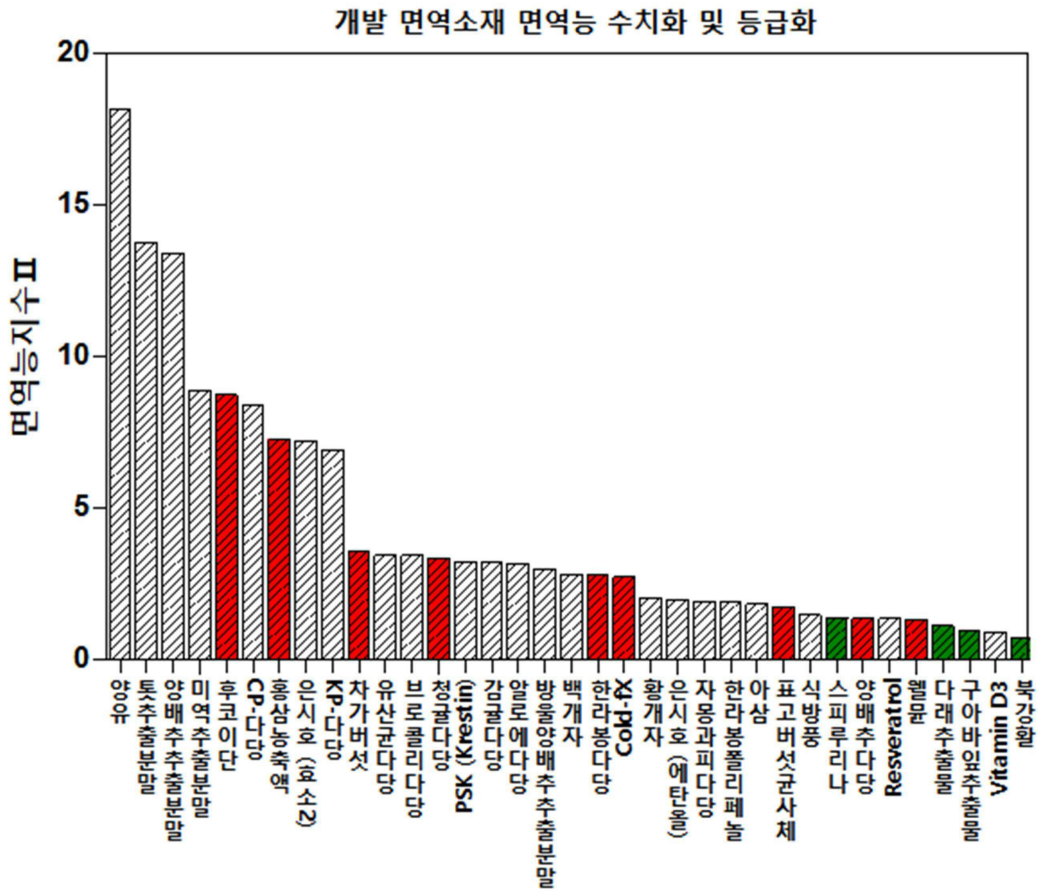
도면5


12
9
6
3
0
면역능지수 II
기준 규격형 고시 원료
개별 인정형 원료
개별 인정형 상품화 제품
국내외 주목할만한 원료
특허등록 완료
특허 등록 중
한의연 소재
홍삼농축액
표고버섯균사체
스피루리나
구아바잎추출물
다래추출물
헬몬
후코이단
차가버섯
Cordyceps
청귤다당
한라봉다당
양배추다당
북강활

도면6


CD40 expression
CD80 expression
PDL1 expression
PDL2 expression
MHCII expression
면역능지수 II
면역증진
후코이단
홍삼농축액
청귤다당
한라봉다당
Cold-fX
차가버섯
표고버섯균사체
양배추다당
헬뮨
면역개선
스피루리나
다래추출물
구아바잎추출물
북강활(에탄올)

도면7


개발 면역소재 면역능 수치화 및 등급화
면역능지수II
양유
토스추출분말
양배추추출분말
미역추출분말
후코이단
CP-다당
홍삼농축액
은시호 (표 소2)
KP-다당
차가버섯
유산균다당
브로콜리다당
청귤다당
PSK (Krestin)
감귤다당
알로에다당
방울양배추추출분말
백개자
한라봉다당
Cold-fX
황개자
은시호 (에탄올)
자몽과피다당
한라봉폴리페놀
아삼
표고버섯균사체
식방풍
스피루리나
양배추다당
Resveratrol
헬뮨
다래추출물
구아바잎추출물
Vitamin D3
북강활