

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

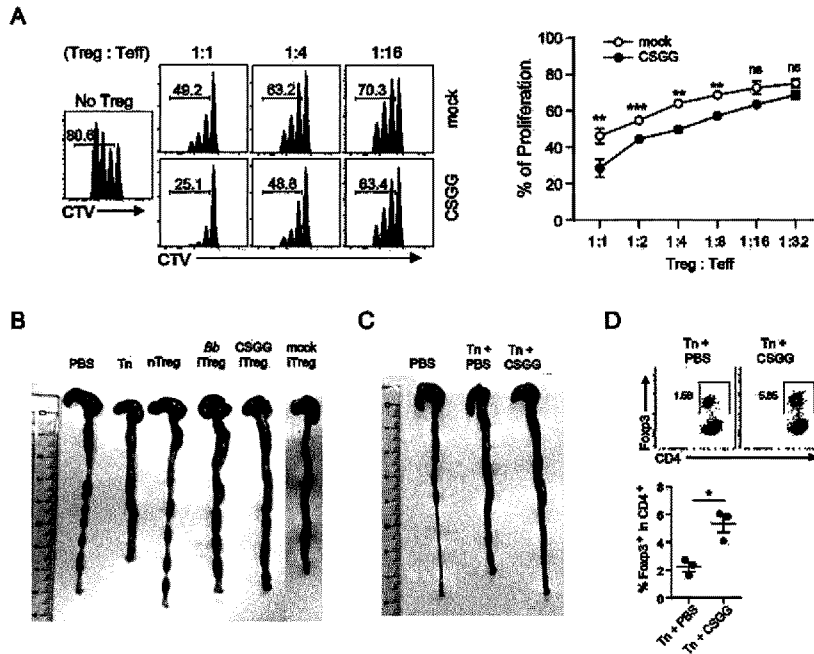
(43) 국제공개일
2018년 12월 20일 (20.12.2018) WIPO | PCT

WO 2018/230960 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/006700
- (22) 국제출원일: 2018년 6월 14일 (14.06.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0075079 2017년 6월 14일 (14.06.2017) 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: 임신혁 (IM, Sin-Hyeog); 37660 경상북도 포항시 남구 희망대로 520 108-1401, Gyeongsangbuk-do (KR). 베르마라비 (VERMA, Ravi); 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: 이치영 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, 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,

(54) Title: NOVEL BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM STRAIN AND STRAIN-DERIVED POLYSACCHARIDE

(54) 발명의 명칭: 신규한 비피도박테리움 비피덤 균주 및 균주 유래 다당체



(57) Abstract: The present invention relates to a *Bifidobacterium bifidum* inducing regulatory T cells (Treg), a polysaccharide derived from *Bifidobacterium bifidum*, and a probiotic strain producing a polysaccharide and, more particularly, a polysaccharide containing β -1-6-glucan as an effective ingredient, a probiotic strain producing β -1-6-glucan, a food comprising the polysaccharide or strain as an effective ingredient for alleviation of immune disease or inflammatory disease, a therapeutic agent comprising the polysaccharide or strain as an effective ingredient for alleviation of immune disease or inflammatory disease, a method for preparing induced regulatory T cells (iTreg) by treatment with the polysaccharide or strain, and a cell therapy product for prevention or treatment of immune disease or inflammatory disease, comprising the induced regulatory T cells prepared by the method.



WO 2018/230960 A2

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 역내 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), 유럽 (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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 비피도박테리움 비피덤 및 비피도박테리움 비피덤에서 유래된 다당체 및 다당체를 생산하는 프로바이오틱 균주에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체, β -1-6-glucan을 생산하는 프로바이오틱 균주, 상기 다당체 또는 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 개선용 식품, 치료제, 상기 다당체 또는 균주를 처리하여 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 유도 조절 T 세포를 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 비피도박테리움 비피덤 균주 및 균주 유래 다당체

기술분야

- [1] 본 발명은 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 비피도박테리움 비피덤 및 비피도박테리움 비피덤에서 유래된 다당체 및 다당체를 생산하는 프로바이오틱 균주에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체, β -1-6-glucan을 생산하는 프로바이오틱 균주, 상기 다당체 또는 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 개선용 식품, 치료제, 상기 다당체 또는 균주를 처리하여 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 유도 조절 T 세포를 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 포유류의 위장관에는 "마이크로비오타 (microbiota)"를 구성하는 수많은 종류의 균이 공생한다. 마이크로비오타의 변화는 알레르기 질환, 자가 면역 및 위장관 염증 장애와 같은 다양한 질환과 밀접하게 관련되어 있다. 무병원균 (specific pathogen free; SPF) 마우스에 비해 무균 (germ free; GF) 마우스는 림프조직의 형성 및 면역 반응에 비정상적인 반응을 나타내며 (Macpherson and Harris, Nature Reviews Immunology 4:478-485, 2004), 이러한 현상은 공생 미생물의 도입으로 해결될 수 있다 (Mazmanian et al., Cell 122:107-118, 2005). 장내 미생물은 T 헬퍼 17 (Th17) 세포 또는 조절 T (Treg) 세포 (Ivanov and Honda, Cell host & microbe 12:496-508, 2012; Wu and Wu, Gut microbes 3:4-14, 2012)와 같은 CD4 T 세포의 특정 계통의 발달과 분화를 조절한다 (Atarashi et al., Science 331:337-341, 2011; Macpherson and Harris, Nature Reviews Immunology 4:478-485, 2004; Round and Mazmanian, Nature Reviews Immunology 9:313-323, 2009). Treg 세포는 억제 기능을 가진 CD4⁺ T 세포의 하위 집합이며 전사 인자 Foxp3의 발현을 특징으로 한다 (S. Hori et al., Science 299:1057-1061, 2003). Treg 세포는 일반적으로 흉선 (nTreg)에 형성되지만 정상 CD4⁺ 세포 (pTreg)의 주변에서도 발생할 수 있다.
- [4] 최근에는 미생물 군집의 개별 종들이 숙주의 면역 성분을 형성하는 것으로 나타났다. 즉, Treg와 Th17 세포는 다양한 항원에 대한 숙주의 면역 반응을 조절하는 상호작용을 한다. 예를 들어, 절편섬유상 박테리아 (segmented filamentous bacteria; SFB)는 소장에서 Th17 세포를 강력하게 유도하며, 이는 전신성 자가면역을 촉진하고 장내 병원균에 대한 숙주 내성에 중요한 역할을 한다 (Gaboriau-Routhiau et al., Immunity 31:677-689, 2009; Ivanov et al., Cell

139:485-498, 2009; Wu *et al.*, *Immunity* 32:815-827, 2010). 반면, 장내 균총을 구성하는 균주나 일부 프로바이오틱스 균주 중 일부는 마우스 결장에서 Treg 세포의 분화, 축적 및 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Tanoue, T *et al.*, *Nature reviews Immunology* 16: 295-309, 2016). 전사인자 Foxp3 (forkhead box P3)를 발현하는 CD4⁺ 조절 T 세포 (Tregs)는 다른 장기에 비해 소화기 프로프리아층 (lamina propria; LP), 특히 대장에서 더 많이 관찰된다 (Atarashi *et al.*, *Science* 331:337-341, 2011). 점막 Foxp3⁺ Tregs의 수와 기능은 특정 장내 박테리아의 존재에 의해 영향을 받는다는 몇몇 연구가 있다. Clostridia의 IV, XIVa, 및 XVIII 클러스트에 속하는 17개 균주의 혼합물은 마우스 대장에서 Treg 세포의 분화, 축적 및 기능을 향상시켰다 (Atarashi *et al.*, *Nature* 500:232-236, 2013). 비피도박테리아 및 락토바실리의 프로바이오틱 균을 매일 처리한 마우스는 Tregs 유도를 통해 마우스의 염증 상태를 변형시킨다 (Di Giacinto *et al.*, *The Journal of Immunology* 174:3237-3246, 2005; Karimi *et al.*, *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:186-193, 2009; Lyons *et al.*, *Clinical & Experimental Allergy* 40:811-819, 2010). 인간 공생균인 박테로이데스 프라길리스로 마우스를 콜로니제이션하면 Treg 세포를 생산하는 Th1 및 IL-10을 강화시킨다 (Round and Mazmanian, *PNAS* 107:12204-12209, 2010; Telesford *et al.*, *Gut microbes* 6:234-242, 2015). 이전 연구에서 5종의 프로바이오틱 균의 혼합물인 IRT5이 Treg 세포를 유도하고 다양한 면역질환을 억제할 수 있음을 확인하였다 (Chae *et al.*, *PloS One* 7, e52119, 2012; Kwon *et al.*, *Clinical Immunology* 146:217-227, 2013; Kwon *et al.*, *PNAS* 107:2159-2164, 2010). 그러나, Treg 세포 생성의 기본 분자 메커니즘은 아직 명확하지 않다. 여러 연구에 따르면 박테리아가 생산한 대사산물 또는 세포벽 성분이 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 Treg를 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). 환자에게 부족한 주요 미생물을 투여하면 조절장애 미생물의 불균형 (dysbiosis)을 복원할 수 있다. 예를 들어, 건강한 기증자의 분변 미생물 (fecal microbiota; FMT)을 환자에게 옮기는 것은 위장병에 유익한 효과가 있는 것으로 보고되었다. 그러나, FMT는 안전성 문제로 인해 아직까지 일반적 치료법으로 승인되지 않았다. 또한, 프로바이오틱스를 포함한 충분한 양의 안전성 보장 박테리아를 복용하면 다양한 면역질환을 개선할 수 있다고 보고되어 있다. 그러나, 유익한 미생물이란 환자의 면역 상태에 따라 달라질 수 있다. 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.

- [5] 생체 내 Treg 세포의 강화는 자가면역 및 알레르기 질환과 같은 다양한 과면역 질환을 조절할 수 있다. 본 발명에서는 안정성이 보장된 미생물로 유도된 Treg (iTreg) 세포를 향상시킬 목적으로, 프로바이오틱 후보 균주를 선별하여 *Bifidobacterium bifidum* PRI1을 최상의 후보로 선택하였다. 이 박테리아가 식이 항원 또는 공생 반응성 유도 조절 T 세포 (iTreg 세포)의 생성을 유도할 수 있음을 무균생쥐 (Germ Free mouse; GF mouse) 시스템을 이용하여 밝혔다. *Bifidobacterium bifidum* PRI1 유래 작용 분자로서는, 대사 산물인 부티레이트 (Butyrate), 아세테이트 (Acetate)를 포함한다. 또한 본 발명은 *Bifidobacterium bifidum* PRI1에서 유래한 베타 글루칸/갈락탄 다당체 (cell surface beta glucan/galactan polysaccharide; CSGG)가 기능적으로 장 염증을 억제한다는 것이다.
- [6] 이에, 본 발명자들은 면역조절 및 염증성 면역질환에 대해 치료적 잠재력을 가진 Treg 세포 유도 메커니즘을 밝히고자 예의 노력한 결과, 선별된 프로바이오틱 박테리아의 베타 글루칸/갈락탄 다당체 (cell surface beta glucan/galactan polysaccharide; CSGG)가 iTreg 세포의 생성을 유도할 수 있는 주요 작용분자임을 밝힌 후 상기 CSGG에 의해 유도된 iTreg 세포가 대장염을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [7]
- [8] **발명의 요약**
- [9] 본 발명의 목적은 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체 및 상기 다당체를 생산하는 프로바이오틱 균주를 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용 약학 조성물 및 식품을 제공하는데 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는데 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공하는데 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 억제제 또는 면역 치료제를 제공하는데 있다.

- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다당체 또는 상기 균주를 이용한 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용 세포치료제를 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는데 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공하는데 있다.
- [19]
- [20] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [21] 본 발명은 β -1-6-glucan을 생산하는 신규한 프로바이오틱 균주를 제공한다.
- [22] 본 발명은 또한, β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체를 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 치료제를 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [27] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공한다.
- [28] 본 발명은 또한, 상기 다당체 또는 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 억제제 또는 면역 치료제를 제공한다.
- [29] 본 발명은 또한, 수지상 세포 (DC; Dendritic cell)에 상기 다당체 또는 상기 균주를 처리하여 조절 수지상 세포 (rDC; regulatory Dendritic Cell)를 획득하는 단계; 및 상기 rDC를 $CD4^+$ T 세포와 공배양하여 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 단계를 포함하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법을 제공한다.
- [30] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용 세포치료제를 제공한다.
- [31] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는

염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [32] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도를 제공한다.

[33]

도면의 간단한 설명

- [34] 도 1은 *B. bifidum*의 모노콜로니제이션 (monocolonization)이 결장 프로프리아층에서 Treg 개체군 (population)을 증가시키는 것에 관한 것이다. (A)-(C)는 GF 마우스, 또는 *Lpa* 또는 *Bb*로 콜로니제이션된 마우스 대장 (cLP)의 Treg 세포에서 CD4⁺FOXP3⁺ 세포, CTLA4⁺ 및 IL10⁺를 유세포분석법 및 백분율 분석으로 나타낸 것이다. (D)-(F)는 박테리아가 콜로니제이션된 GF 마우스의 대장에서 Treg 세포의 다른 종류들의 절대 수, 대표적인 유세포분석 플롯 및 신호를 나타낸 것이다. 사분면의 숫자는 세포 비율을 나타내고, 그래프 플롯의 원은 각 매개 변수에 해당하는 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n≥3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 ±SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 (Student's t test).
- [35] 도 2는 Treg 유도 박테리아로의 *B. bifidum* PRI1을 확인한 것이다. (A)-(B)는 Treg 유도를 촉진하는 박테리아 균주로서 *B. bifidum* PRI1 (*Bb*)를 선택한 것으로, 선별된 후보 프로바이오틱 균주에서 대표적인 IL-10/IL-12 사이토카인 비율 (A) 및 Foxp3 발현 (B)이다. 지시된 콜로니 형성 단위 (cfu) 역가를 갖는 각각의 박테리아 균주를 총 장간막 림프절 (mLN) 세포와 함께 72시간 배양한 후, 사이토카인 수준 또는 Foxp3 발현을 ELISA 또는 유세포분석법으로 분석하였다. (C)는 콜로니제이션 3주 후, DNA-Cy5 프로브 (EUB338, 적색)로 HISTO-FISH 염색을 하여 GF 마우스의 장 틈새에 *B. bifidum* PRI1 (*Bb*)의 국소화 분석이다. (D)는 GF, *Bb*-모노콜로니제이션 (monocolonized) (*Bb*) 및 SPF 마우스의 맹장 이미지 (좌) 및 맹장 무게 (우)를 나타낸 것이다. (E)는 GF 또는 *Bb*-모노콜로니제이션 (*Bb*) 마우스의 맹장 및 대변에서 부티레이트와 아세테이트 수준을 측정하는 것이다. (F)는 GF 마우스, SFB 또는 *Lpa*로 모노콜로니제이션된 마우스, SPF 마우스의 대장 (cLP) 프로프리아층에서 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 유세포분석 플롯을 나타낸 것이다. 사분면의 숫자는 세포 비율을 나타내고, 그래프 플롯의 원은 각 매개 변수에 해당하는 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n≥3 마우스). (*B.bifidum*:*Bb*, *Lactobacillus acidophilus*:*Lac*, *Lactobacillus casei*:*Lca*, *Lactobacillus reuteri*:*Lre*, *Lactobacillus paracasei*:*Lpa*, *Segmented filamentous bacteria*:*SFB*). 모든 그래프 플롯은 평균 ±SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Student's t test).
- [36] 도 3은 Treg 세포의 생성 및 표현형에 대한 *B. bifidum*의 모노콜로니제이션 (monocolonization)의 영향에 관한 것이다. (A)는 SPF, GF 또는 *Bb*, *SFB* 또는 *Lpa*

로 모노콜로니제이션된 마우스의 소장의 프로프리아층 (siLP), mLN, pLN 및 비장에서 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 빈도를 나타낸 것이다. (B) 및 (C)는 각각의 박테리아로 모노콜로니제이션된 마우스의 cLP 또는 siLP에서 CD4⁺CD103⁺Foxp3⁺ (B) 및 CD4⁺CD44^{hi}CD62L^{lo}Foxp3⁺ T 세포 (C)의 유세포분석 플롯 및 빈도를 백분율로 나타낸 것이다. 사분면의 숫자는 세포 비율을 나타내고, 그래프 플롯의 원은 각 매개 변수에 해당하는 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n≥3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 ±SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t test).

[37] 도 4는 *B. bifidum*의 모노콜로니제이션이 다른 림프 기관에서 Treg 개체군 (population)을 증가시키는 것을 보여준다. GF, *Bb* 또는 *Lpa*로 모노콜로니제이션 3주 후의 마우스의 림프 기관으로부터 세포를 분리하였다. (A) 및 (B)는 표시된 림프 조직에서 Helios⁻ 및 Nrp1⁻ Treg 개체군의 빈도를 나타낸 것이다. (C)-(D)는 GF 또는 *Bb* 또는 *Lpa*로 모노콜로니제이션된 마우스의 표시된 기관으로부터 Helios⁺Foxp3⁺ (C) 또는 RORγt⁺ Helios⁻ Foxp3⁺ Treg 세포 (D)의 유세포분석 플롯 및 빈도를 백분율로 나타낸 것이다. 사분면의 숫자는 세포 비율을 나타내고, 그래프 플롯의 원은 각 매개 변수에 해당하는 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n≥3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 ±SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t test).

[38] 도 5는 *B. bifidum*의 모노콜로니제이션이 pTreg 세포의 새로운 생성을 촉진하는 것을 보여준다. (A)는 *Bb*의 모노콜로니제이션 후 pTreg 세포의 새로운 생성 분석을 위한 실험적 전략을 나타낸 것이다. (B)-(C)는 CD45.1⁺Foxp3^{GFP} 리포터 마우스에서 분류된 나이브 CD4⁺ Foxp3⁻ T 세포를 GF 마우스로 옮기고, *Bb*로 3주 동안 모노콜로니제이션한 것이다. Foxp3⁺ Treg 개체군은 cLP (B) 및 siLP (C)에서 GFP 발현으로 분석하였다. (D)는 표시된 림프 기관에서 GFP 발현에 의한 Foxp3⁺ Treg 개체군의 빈도를 측정하는 것이다. (E)는 CD45.1⁺Foxp3^{GFP} 리포터 마우스에서 분류된 나이브 CD4⁺ Foxp3⁻ T 세포를 SPF 마우스로 옮기고, mock (PBS) 또는 *Bb* (5×10⁸ cfu)를 3주간 격일 간격으로 식이하여, cLP에서 Foxp3⁺ Treg 세포를 분석한 것이다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n≥3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 ±SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t test).

[39] 도 6은 *B. bifidum*의 콜로니제이션에 의한 식이항원- 및 마이크로비오타 반응성 Treg 세포 유도에 관한 것이다. (A) 및 (B)는 Thy1.1⁺Foxp3^{GFP} 마우스의 CTV-표지된 나이브 CD4⁺ OT-II⁺Foxp3⁻ T 세포를 GF 마우스 또는 14일 동안 pre-콜로니제이션한 GF 마우스에 입양전달한 다음 7일간 격일로 OVA (20mg)을 식이하여, 공여체 (Thy1⁺OT-II) 세포의 cLP CD4⁺Foxp3⁺ 개체군을 분석한 것이다. FACS 플롯 (A) 및 생체 내에서 생성된 Treg 세포의 빈도 (B)로 표시하였다. (C)-(E)는 CBirTgCD45.1⁺Foxp3^{GFP} 마우스에서 분류된 나이브 CD4⁺CBir⁺Foxp3⁻ T 세포를 SPF *Rag1*^{-/-} 수여체에 입양전달한 다음 실험 종료시까지 매일 *Bb* 또는 PBS를 식이하여, 체중, 대장 길이 및 조직 병리의 변화 (각각 C, D 및 E)를

측정하고 분석한 것이다. (F)-(G)는 mock 또는 *Bb* 콜로니제이션 마우스의 cLP 내의 CBir⁺CD45.1⁺Foxp3⁺ Treg 세포 (F) 및 IFN- γ ⁺ 세포 (G)의 유세포분석 플롯 및 빈도를 나타낸 것이다. (H)는 GF 또는 *Bb*-GF 마우스의 대장 CD4⁺ 세포를 분류하여 CTV로 표지한 다음, GF, *Bb* 또는 *Lpa* 콜로니제이션 마우스의 배설물 항원 존재하에서 T 세포가 제거된 비장 APC와 함께 배양하여, 3일 후 표시된 항원에 대한 반응하는 Treg 세포의 상대적인 증식을 FACS로 분석한 것이다. (I)는 GF 마우스와 비교하여 *Bb* 모노콜로니제이션 마우스의 대장, mLN 및 비장의 Treg에서 TCR-CDR3 영역 α 사슬 고유의 43개 및 β 사슬 고유의 61개의 빈도 분포를 비교한 것이다. 사분면의 숫자는 세포 비율을 나타내고, 그래프 플롯의 원은 각 매개 변수에 해당하는 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 ($n \geq 3$ 마우스). 모든 바 그래프는 평균 \pm SEM을 보여준다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's t test).

- [40] 도 7은 *B. bifidum*의 콜로니제이션에 의한 식이항원- 및 마이크로비오타 반응성 Treg 세포 유도에 관한 것이다. (A)는 GF 또는 *Bb* 콜로니제이션 GF 마우스에서 식이항원 (OVA 특이 OTII T 세포)에 반응하여 유도된 OVA 특이 pTreg 세포를 결정하기 위한 실험적 전략을 나타낸 것이다. (B)는 PBS 또는 *Bb* 식이된 *Rag1*^{-/-} SPF 마우스에서 유도된 마이크로비오타 (플라젤린-특이 CBir T 세포) 특이 pTreg 세포를 결정하기 위한 실험적 전략을 나타낸 것이다. (C)는 PBS 또는 *Bb* 식이된 CBir 나이브 T세포가 전달된 *Rag1*^{-/-} SPF 마우스의 cLP에서 CD4⁺Foxp3⁺ 또는 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 ROR γ , GATA3, 및 T-bet 개체군 분석에 관한 것이다. (D)는 *Bb* 또는 *Lpa*로 모노콜로니제이션된 마우스 또는 GF 마우스의 배설물 항원의 조합 존재하에 *Bb* 유도된 Treg 증식을 결정하기 위한 실험적 전략을 나타낸 것이다. (E)는 GF 또는 *Bb*로 모노콜로니제이션된 마우스의 총 대장 CD4⁺ 세포를 선별하여 CTV로 표지한 다음, GF 또는 *Bb* 또는 *Lpa*로 모노콜로니제이션된 마우스의 배설물 항원의 조합 존재하에 T 세포가 제거된 비장 세포 (APC)와 함께 배양하여, 3일 후 표시된 항원에 대한 반응하는 Treg 세포의 상대적인 증식을 FACS로 분석한 것이다. 데이터는 3개의 독립적인 실험을 대표한다 ($n \geq 3$ 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 \pm SEM을 보여준다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t test).

- [41] 도 8은 Treg 세포의 TCR 레퍼토리에 대한 *B. bifidum* 모노콜로니제이션의 영향에 관한 것이다. (A)는 GF 마우스 또는 *Bb* 모노콜로니제이션 마우스의 다른 장기 (대장, MLN 및 비장)에서 얻은 Treg 세포 레퍼토리의 α 사슬과 β 사슬에서 샤논 (Shannon) 다양성을 비교한 것이다. (B)는 *Bb* 모노콜로니제이션 및 GF 마우스의 대장 Treg 세포에서 상위 85개 상위 TCR-CDR3 영역의 빈도를 보여주는 α 사슬과 β 사슬의 히트맵이다. 'common' 표시 (28 펩타이드)의 CDR3 영역은 각 그룹에서 판독 카운트의 존재를 나타낸다. 색조는 주어진 TCR이 발견된 상대적인 빈도를 보여준다. (C)는 양방향 바 플롯으로 표시되는 일반적인 TCR-CDR3 알파 영역의 빈도 분포; 대장의 85, MLN의 1469 및 비장의 1381이며,

(D)는 양방향 바 플롯으로 표시되는 일반적인 TCR-CDR3 베타 영역의 빈도 분포; 대장의 118, MLN의 1724 및 비장의 1381이다.

[42] 도 9는 *B. bifidum*의 세포 표면 베타-글루칸/갈락탄 폴리사카라이드 (CSGG)의 Treg 세포 유도 매개에 관한 것이다. (A)는 *B. bifidum*의 세포 표면 β -1,6-글루칸 (CS β G) 다당체의 구조이다. Glcp: glucopyranose. (B)는 CSGG 유도 iTreg 세포에 대한 β -1,6-글루칸 처리 효과이다. (C)는 *Bb*, *Lpa*로 콜로니제이션하거나 또는 CSGG (100 μ g/용량)를 3주간 격일로 복강내 주사한 GF 마우스 또는 GF 마우스에서 Treg 세포의 개체군 및 표현형을 나타낸 것이다. (D)는 건강한 공여자의 PBMC의 나이브 CD4⁺ T 세포와 함께 CSGG로 전처리 된 DC를 공배양 하여 농도 의존적 인간 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs의 유도를 확인한 것이다. (E)는 mock 또는 CSGG로 처리한 CD11c⁺ DCs의 RNA-Seq를 분석한 것이다. (F)는 mock 또는 CSGG로 전처리한 마우스로부터 유래된 나이브 CD4⁺ T 세포 및 CD11c⁺ DCs를 준최적의 iTreg 생성물과 함께 배양한 것이다. CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포의 개체군은 유세포분석으로 결정되었다. (G)는 나이브 CD4⁺ T 세포를 mock 또는 CSGG로 전처리한 야생형 또는 TLR2 결핍 CD11c⁺ DCs와 함께 배양한 후, 배양 상등액에서 TGF β 1 수준을 측정하는 것이다. 데이터는 최소 3개의 독립적인 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 평균 \pm SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Student's t test).

[43] 도 10은 *B. bifidum*의 DC 의존 메커니즘을 통해 Treg 세포 유도 촉진에 관한 것이다. (A)는 GF 또는 *Bb* 모노콜로니제이션 마우스의 총 대장내 Hprt에 대한 표준화된 사이토카인의 상대적인 mRNA 발현을 정량한 것이다. (B)~(D)는 GF 또는 *Bb* 모노콜로니제이션 마우스의 cLP-DCs (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺CD103⁺F4/80⁻)의 상대적인 mRNA 발현 수준이다. (E)는 DC:T 세포 공배양 시스템에서 인비트로 Treg 유도에 대한 실험 전략이다. (F)는 비장 CD11c⁺DCs와 다양한 양의 *Bb* (cfu) 적정에 반응하여 Foxp3⁺ 세포의 농도 의존적 유도 및 T 세포의 생존을 나타낸 것이다. (G)는 *Bb* 또는 *Lpa*로 전처리된 비장 CD11c⁺DCs를 3일 동안 준최적 Treg 유도 조건 (항-CD3; 0.1 μ g/ml, TGF- β ; 0.1ng/ml, IL-2; 100unit/ml) 에서 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양한 다음, Foxp3⁺ Treg 세포를 라이브 세포내에서 분석한 것이다. IL-10 분비는 배양 상등액의 ELISA 분석에 의해 결정되었다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n \geq 3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 \pm SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t test). 대표적인 유세포분석 및 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포의 평균 빈도를 보여준다.

[44] 도 11은 *B. bifidum*에 의해 유도된 Treg 세포의 핵심 이펙터 분자로서 베타-글루칸/갈락탄 폴리사카라이드 (CSGG)를 확인한 것이다. (A)는 *B. bifidum*의 분획으로 전처리 된 비장 CD11c⁺DCs를 준최적 Treg 유도 조건하에 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양하고, 3일 후 Foxp3⁺ Treg 세포를 FACS로 분석한 것이다. (B)는 표시된 양의 총 세포 표면 다당류 (tCSPS)로 전처리 한 비장 CD11c⁺DCs를 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양하고, 3일 후 Foxp3⁺ Treg 세포를 FACS로 분석한

것이다. (C)는 *B. bifidum*의 총 세포 표면 다당류 (tCSPS)로부터 분리한 중성 (CSGG) 또는 음전하의 다당류 (PG β G)의 구조를 나타낸 것이다. (Glc_p: glucopyranose, Gal_p: galactopyranose, Gal_f: glucofuranose, Gro: glycerol이고, n = 반복 단위, 각 다당류의 상대 존재량을 % (mol/mol)로 표시함). (D)는 tCSPS (100 μ g/ml)와 비교하여 중성 (CSGG; 5 μ g/ml)과 음전하의 다당류 (PG β G: 100 μ g/ml) 간의 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 유도 활성을 비교한 것이다. (E)는 β -1,6-glucanase, β -1,4-galactanase 및 β -1,4-glucanase의 처리가 CSGG-유도된 iTreg 세포의 유도에 미치는 영향을 나타낸 것이다 (CSGG; 50 μ g/ml). (F)는 나이브 CD4⁺ T 세포를 준최적의 Treg 유도 조건하에서 DCs가 없는 CSGG (50 μ g/ml)로 처리한 것이다 (항-CD3; 0.1 μ g/ml, α -CD28; 0.1 μ g/ml, TGF- β ; 0.1ng/ml, IL-2; 100unit/ml). 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n \geq 3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 \pm SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t test).

[45] 도 12는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 CSGG의 Treg 세포 유도 향상에 관한 것이다.

(A)는 준최적의 Treg 유도 조건하에서 나이브 CD4⁺ T 세포와 박테리아 또는 CSGG로 전처리된 CD11c⁺ DCs를 공배양 한 다음, *in vitro*에서 CD4⁺Foxp3⁺ 개체군의 생성을 나타낸 것이다. (B)는 GF 마우스 또는 *Bb*, *Lpa* 또는 CSGG (100 μ g/dose)를 GF 마우스에 3주 동안 격일로 복강내 주사하여

모노콜로니제이션시킨 마우스에서 CD4⁺Foxp3⁺ 개체군을 나타낸 것이다. (C) 및 (D)는 GF 마우스에 CSGG (100 μ g/dose) 또는 PBS를 3주간 격일로 복강내 주사하고, Treg 세포의 표시된 개체군의 빈도를 림프 기관에서 분석한 것이다. 데이터는 3~5건의 독립적인 실험을 대표한다 (n \geq 3 마우스). 모든 그래프 플롯은 평균 \pm SEM을 보여준다. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Student's t test).

[46] 도 13은 CSGG가 TLR2 의존성 조절 DCs의 생성을 통해 iTreg 유도를 촉진하는

것을 나타낸다. (A)는 mock 또는 CSGG로 전처리된 CD11c⁺ DCs와 나이브 CD4⁺ T 세포를 공배양한 다음, 배양 상등액에서 사이토카인 수준을 확인한 것이다.

(B)는 *Bb* 또는 CSGG 처리 후 생체 외 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 유도에 대한 항-TGF β Ab 처리의 효과를 나타낸 것이다. (C)는 CSGG로 전처리한 IL-10^{-/-} KO 마우스 또는

야생형의 CD11c⁺ DCs를 야생형 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양하고, 3일 후에 iTreg 유도를 측정하는 것이다. (D)는 CSGG 처리시 TLR 아형을 코딩하는 유전자의

발현을 알아보기 위해 RNA-seq 데이터를 분석한 것이다. (E)는 나이브 CD4⁺ T 세포 및 mock 또는 CSGG로 전처리된 마우스 유래의 CD11c⁺ DCs를 준최적의

iTreg 생성 조건하에서 3일 동안 공배양한 다음, CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포 유도를 유세포분석으로 측정한 것이다. (F)는 야생형 또는 mock 또는 CSGG로 전처리된

TLR2-결핍 CD11c⁺ DCs를 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양 한 후, 배양 상등액에서 IL-10 및 IFN γ 사이토카인 수준을 측정한 것이다. (G)는 C-형 렉틴에 대한 블로킹

항체의 존재하에 CD11c⁺ DCs를 mock 또는 CSGG로 전처리한 다음, 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양하여 iTreg 유도를 유세포분석으로 조사한 것이다. (H)는 야생형

또는 CSGG로 전처리된 Dectin1^{-/-} 또는 Dectin2^{-/-} KO 마우스의 CD11c⁺ DCs를

야생형 나이브 CD4⁺ T 세포와 공배양하고, 3일 후에 iTreg 유도를 측정하였다. 데이터는 적어도 3번의 독립적인 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 평균 \pm SEM을 보여준다. * $p < 0.05$ (Student's t test).

- [47] 도 14는 CSGG로 유도된 iTreg 세포의 장 염증 억제 기능에 관한 것이다. (A)-(C)는 Thy1.1+Foxp3^{GFP} 리포터 마우스로부터 분리한 나이브 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포를 iTreg 세포의 표시된 조합에서 RAG1^{-/-} 수여자체에 입양 공동 전달한 것이다. 체중, 대장 길이 및 대장 조직의 병리적 변화를 측정하였다. (D)는 실험 종료시 cLP에서 전달된 Treg 세포의 Foxp3 안정성을 분석한 것이다. 전달시 분류된 CD4⁺Foxp3^{GFP+} 세포의 순도는 98 % 이상이었다. (E)-(G)는 CD45.1+Foxp3^{GFP} 리포터 마우스로부터 분리한 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포를 RAG1^{-/-} 마우스에 입양 전달한 다음, PBS 또는 CSGG (100 μ g/ml)를 복강내 투여한 것이다. 체중, 대장 길이 및 대장 조직의 병리적 변화를 측정하였다. (H)는 실험 종료시 cLP에서 이펙터 T 세포의 IFN γ 생성을 분석한 것이다. 데이터는 적어도 3번의 독립적인 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 평균 \pm SEM을 보여준다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Student's t test).
- [48] 도 15는 CSGG로 유도된 iTreg 세포의 장 염증 억제 기능에 관한 것이다. (A)는 CTV 표시된 나이브 응답자 Thy1.1+CD4⁺Foxp3⁺ T 세포를 분류하여 공배양한 것이다. CD45.1+CD4⁺Foxp3⁺ iTreg 세포는 표시된 CD45.2⁺ 마우스의 T 세포가 제거된 비장세포로부터 정제된 mock 또는 CSGG가 처리된 APCs로 생체 외에서 생성하였다. 응답자 T 세포의 증식은 유세포분석으로 분석하였다. (B)는 nTreg 및 mock, Bb, 또는 CSGG로 생체 외에서 유도된 iTreg 세포에 의해 억제된 입양 전달 RAG1^{-/-} 대장염의 대장 길이를 나타낸 것이다. (C)는 mock (PBS) 또는 CSGG (100 μ g/dose)를 복강내 투여하여 입양 전달된 나이브 T 세포에 의해 유도된 RAG1^{-/-} 대장염의 대장 길이를 나타낸 것이다. (D)는 mock 또는 CSGG 처리된 입양 전달 RAG1^{-/-} 마우스의 mLN에서 CD4⁺CD45.1+Foxp3⁺ Treg 개체군을 나타낸 것이다. 데이터는 적어도 2번의 독립적인 실험을 대표한다. 모든 바 그래프는 평균 \pm SEM을 보여준다. * $p < 0.05$ (Student's t test).

[49]

[50] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[51] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[52]

[53] 본 발명에서는 인간 공생 박테리아인 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (*B. bifidum*)이 나이브 CD4 T 세포를 염증성 대장염을 억제하는 기능적 활성의 Foxp3⁺ iTreg 세포로의 분화를 향상시킬 수 있음을 보여준다. 세포 표면 유래 베타-글루칸/갈락탄 다당체 (CSGG)는 iTreg 세포를 유도할 때 전체 박테리아의

기능을 요약하는 활성 분자다. CSGG의 작용 기전은 수지상 세포 (Dendritic Cell, DC)에서 TLR2/IL-10 조절 경로의 유도에 의해 매개된다.

- [54] 공생 미생물의 조절장애는 많은 질병의 발병과 밀접하게 관련되어 있기 때문에, Treg 유도 미생물에 의한 생체내 Treg 세포의 증진은 다양한 염증 질환을 조절할 수 있다. 장내 미생물은 면역 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 이러한 장내 미생물의 조절장애는 면역 억제성 Foxp3⁺ T 조절 (Treg) 세포의 손상된 기능과 관련된 염증질환을 일으킬 수 있다. 몇몇 공생 미생물이 Treg 세포의 유도를 향상시킨다고 알려져 있지만 (Tanoue, *T et al.*, *Nature reviews Immunology* 16:295-309, 2016), 이 과정을 제어하는 "작용 분자", 즉 박테리아에 의해 유도된 Treg 세포의 분자 기작, 항원 특이성 및 표적 세포와 같은 것에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.
- [55] 그러므로, 본 발명에서는 일반적으로 안전한 (GRAS) 박테리아로 간주되는 프로바이오틱 후보균주를 대상으로 선별하였으며, 식이 항원 또는 공생균에 대해 다양한 TCR 특이성을 갖는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (*B. bifidum*)을 Treg 유도 박테리아의 최상의 후보로 선정하였다. *Bifidobacterium bifidum* PRI1은 2017년 5월 19일에 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁되었다 (수탁번호: KCTC13270BP). 또한, *B. bifidum* 및 이의 세포 표면 유래 베타-글루칸/갈락탄 다당체 (CSGG)가 Treg을 유도하는 주요 구성요소임을 확인하였으며, 특히 CSGG는 전체 박테리아의 활동을 효율적으로 재현하고 부분적으로 TLR2 의존성 메커니즘을 통해 조절 수지상 세포를 매개하여 마우스와 인간 모두에서 작용하여 Treg 세포를 유도하는 것을 확인하였다. *B. bifidum* 또는 정제된 CSGG에 의해 유도된 Treg 세포는 대장염에 대한 안정적이고 강력한 치료 또는 억제 능력을 나타내었다.
- [56] 따라서, 본 발명은 β -1-6-glucan을 생산하는 새로운 균주에 관한 것이다.
- [57] 또한, 본 발명은 일관점에서 β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체에 관한 것이다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이러한 다당체는 단독으로도 사용될 수 있다. 특히 β -1-6-glucan을 주성분으로 하는 복합물, 또는 단독물일 수도 있다.
- [59] 또한, 상기 β -1-6-glucan, β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 및 β -galactofuranan는 전체 다당체 중 5~50: 2~15: 2~15: 1~5의 몰비인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10~20: 3~10: 3~10: 2~4의 몰비이며, 가장 바람직하게는 18: 5: 5: 2의 몰비인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 다당체는 전체 100 중량%에 대하여 β -1-6-glucan 5~50 중량%, β -1-4-galactan 2~15 중량%, β -1-6-galactan 2~15 중량% 및 β -galactofuranan 1~5중량%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게 상기 다당체는 전체 100 중량%에 대하여 β -1-6-glucan 10-20 중량%, β -1-4-galactan 3-10 중량%, β -1-6-galactan 3-10 중량% 및

- β -glalactofuranan 2-4중량 %일 수 있으며, 각각의 다당체는 전체 100 중량%에 대하여 18, 5, 5 및 2 중량%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 분자량이 약 3~5kDa인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 4kDa인 것이나, 100kDa 이하의 다양한 분자량을 지닌 혼합물이라면 이에 한정되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 다당체의 전하는 중성인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [63] 상기 조절 T 세포 (Treg)의 유도는 DC (Dendritic cell)에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 IL-10 및 TGF- β 생성 유도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 *Bifidobacterium bifidum* 균주 유래인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1과 염기서열 상동성이 99% 이상인 균주 유래인 것이며, 가장 바람직하게는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC 13279BP) 균주 유래인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 *Bifidobacterium bifidum* PRI1과 염기서열 상동성이 99% 이상인 균주는 *Bifidobacterium bifidum* A8 또는 *Bifidobacterium bifidum* LMG11582일 수 있다.
- [66] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 항염증 또는 면역기능 조절 활성을 가지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 면역억제 활성인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 장 출혈 등 장내 상처가 있는 사람의 경우 프로바이오틱스를 잘못 복용하면 부작용이 발생할 수 있는데, 이런 경우 다당체를 투여하는 경우 치료 효과를 볼 수 있다.
- [67]
- [68] 본 발명은 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체를 생산하는 균주에 관한 것이다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 *Bifidobacterium bifidum*인 것이 바람직하나, CSGG 다당체를 생산하는 균주라면 한정되지 않는다. 또한, 본 발명에 있어서, 상기 *Bifidobacterium bifidum*는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1과 염기서열 상동성이 99% 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC13279BP)인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 β -1-4-glalactan, β -1-6-glalactan 또는 β -glalactofuranan을 추가로 생산하는 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 균주는 IL-10 및 TGF- β 생성 유도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [72] 상기 조절 T 세포 (Treg)의 유도는 DC에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 균주는 항염증 또는 면역기능 조절 활성을 가지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 과민면역을 억제하는 활성을 갖는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [74] 특히, 상기 균주는 CSGG 다당체를 생성하므로, 음식물, 장내 다른 세균 또는 균 자체 유래 물질 등의 다양한 항원에 의해 항원 특이적 Treg를 유도하여, 염증 또는 면역질환 치료에 적용 가능하다.
- [75]
- [76] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 조절용 조성물에 관한 것이다.
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -glactofuranan을 추가로 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명에 있어서, 상기 다당체 또는 균주는 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 다당체 또는 균주는 IL-10 및 TGF- β 생성 유도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [79] 상기 조절 T 세포 (Treg)의 유도는 DC에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [80] 본 발명에서 사용되는 용어, "면역 조절"이란, 혈액 내 면역 불균형을 해소하고 면역 항상성을 유지하는 것을 의미한다. 면역 항상성 유지는 면역을 억제시키는 메카니즘인 면역관용 (tolerance)과 면역을 증진하는 면역반응 (immunity)간 균형을 이룬 상태를 일컫는 것으로, 이러한 상태의 유지는 면역 질환 치료, 특히 자가면역 질환의 치료에 있어서 필수적인 요소이다.
- [81] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 억제제 또는 면역 치료제에 관한 것이다.
- [82] 본 발명의 용어 "면역억제제"란 항원의 작용에 대하여 숙주가 항체를 만드는 능력 (체액성 면역반응) 또는 세포성 면역반응을 일으키는 능력을 저하시키거나 차단하기 위해 사용되는 다양한 물질들을 말한다.
- [83] 또한, 본 발명의 용어 "면역치료"란 자기 몸의 면역시스템의 활성화 (activation) 또는 억제 (suppression) 반응을 유도하여 질병을 물리치는 치료법을 말한다. 가장 대표적인 면역치료법은 면역활성을 유도하여 암세포를 죽이는 항암 면역치료법 (Cancer Immunotherapy)이며, 비정상적인 면역반응에 의해 유발되는 질환인 자가면역질환 (autoimmune disease), 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, IBD), 알러지 (allergy) 등의 질환에 대해서는 면역억제제를 통한 면역치료가 가능하다.

- [84] 따라서, 본 발명에서는 "면역억제제"와 "면역치료제"가 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [85]
- [86] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [87] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [88] 본 발명에 있어서, 상기 다당체 또는 균주는 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4+Foxp3+ Treg 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 다당체 또는 균주는 IL-10 및 TGF- β 생성 유도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [89] 상기 조절 T 세포 (Treg)의 유도는 DC에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [90] 또한, 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.
- [91] 상기 면역 조절용 조성물은 면역증진 효과 및 면역 과잉 억제 효과를 나타낼 수 있다. 상기 면역증진 효과는 대식세포에서 TNF- α 의 발현을 증가시키거나 비장세포 증식능을 향상시켜 면역을 증진시키는 효과이다. 상기 면역과잉 억제 효과는 비장세포에서 비특이적 자극원으로 인한 림프구 과발현을 억제하여 면역 과잉을 억제하는 효과이다.
- [92] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "면역질환"은 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.
- [93] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "자가면역질환"은 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.
- [94] 본 발명의 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인 "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.

- [95] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 면역 질환 또는 염증성 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] 상기 약학 조성물은 β -1-6-glucan, β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 및 β -glalactofuranan (CSGG) 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 것 이외에 통상적으로 약학 조성물에 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] 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.
- [102] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제,

유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.

- [103] 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.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료제에 관한 것이다.
- [108]
- [109] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

- [110] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [111] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 조성물을 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.
- [112] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [113] 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 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [114] 본 발명의 *B. bifidum* 또는 CSGG는 생체 내에서 다양한 항원 특이 Treg 세포를 유도할 수 있으므로, 경구 내성의 보조제로서 사용할 수 있다.
- [115]
- [116] 본 발명은 또 다른 관점에서, β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.
- [117] 본 발명에 있어서, 상기 다당체는 β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [118] 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.
- [119] 본 발명에 있어서, 상기 다당체 또는 상기 균주는 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [120] 상기 조절 T 세포 (Treg)의 유도는 DC에 의해 매개되는 것을 특징으로 할 수 있으며, IL-10 및 TGF- β 생성을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [121] 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.
- [122] 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 제조가능하며, 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.

[123] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.

[124] 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.

[125] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 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.

[126] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 테히드로초산나트륨 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(dulcin, 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.

[127] 본 발명의 CSGG 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 균주과 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 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[128]

[129] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 수지상 세포 (DC; Dendritic cell)에 β -1-6-glucan 다당체 또는 상기 다당체를 생산하는 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 처리하여 조절 수지상 세포 (rDC)를 획득하는 단계; 및 (b) 상기 rDC를 CD4⁺T 세포와 공배양하여 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 단계를 포함하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법에 관한 것이다.

[130] 본 발명에 있어서, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 IL-10 및 TGF- β 생성을

증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[131] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 항-CD3 항체, IL-2 및 TGF- β 로 자극하여 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[132] 본 발명에 있어서, 상기 수지상 세포 및 CD4⁺ T 세포는 말초혈액 단핵세포 (PBMCs) 유래인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[133]

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

[135] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 투여하는 것을 포함하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[136] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 세포치료제를 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.

[137] 본 발명에 있어서, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것을 특징으로 할 수 있으며, 또한, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 IL-10 및 TGF- β 생성을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[138] 본 발명에 있어서, 상기 면역 질환 또는 염증성 질환은 염증성 대장염인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[139]

[140] *B. bifidum*은 모유 수유아의 장내 미생물 중 지배적인 박테리아 구성원의 일부이며 이 균의 부족은 유년기 알레르기, 천식 및 자가 면역 질환과 관련이 있다. 일부 상업용 프로바이오틱스 제품에는 *B. bifidum*이 포함되어 있지만 효능이 불분명하고 일부 *Bifidobacterium* 종은 류마티스 관절염의 진행을 악화시키는 것과 같은 해로운 영향을 미칠 수 있다 (PNAS, 113(50): E8141-E8150, 2016). 따라서, 공생균의 특정 구성 요소가 면역계에 유익한 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다. *B. bifidum* PRI1에서 정제된 CSGG가 Treg 세포를 자극하는데 매우 효과적이며, 대장염 진행을 억제할 수 있음이 본 발명을 통해 증명되어, 박테리아 세포벽 다당체의 면역 조절 역할이 면역 및 알레르기 질환 치료를 위한 프로바이오틱 박테리아 선택에 특히 유용할 것으로 생각된다.

[141] *B. bifidum*을 SPF 마우스에 접종하거나 GF 마우스에 콜로니제이션 시키면, 나이브 CD4⁺ 세포를 Nrp1-Foxp3⁺, Helios-Foxp3⁺ 또는 Nrp1-Helios-Foxp3⁺ 표현형을 가지고 높은 수준의 IL-10 및 CTLA4를 발현하는 peripherally 유도된 Treg (iTreg) 세포로 분화시킨다.

[142] 본 발명에서는 *B. bifidum*이 생체 내에서 pTreg 생성을 유도할 수 있는 두 가지 병렬 메커니즘을 제안하였다.

[143] 첫째, *B. bifidum* 모노 콜로니제이션에 의한 부티레이트의 강화된 수준은 T

세포를 직접 표적으로 하거나 또는 조절성 DC 표현형을 유도하여 간접적으로 Treg 생성을 촉진할 수 있다 (Y. Furusawa *et al.*, Nature 504:446-450, 2013; N. Arpaia *et al.*, Nature 504:451-455, 2013). 즉, *B. bifidum*이 결장 Treg 세포의 유도를 자극하는 분자 기작은 적어도 두 가지 유형의 작용분자, 대사산물 (부티레이트) 및 세포 표면 다당체 (CSGG)에 의해 매개 될 수 있다. 이전의 연구들은 공생 미생물에 의해 생산된 발효 산물인 단쇄 지방산 (short chain fatty acids; SCFAs) 중 부티레이트가 iTreg 유도 물질의 공통된 작용분자 중 하나 일 수 있다고 제안하였다. SPF 생쥐에 부티레이트 생산 박테리아 (*Clostridium butyrate*; Atarashi *et al.*, Nature 500:232-236, 2014) 또는 부틸화 전분을 투여하면 Foxp3 유전자 locus의 인핸서 및 프로모터 영역에서 히스톤 H3 아세틸화를 증가시켜 결장 Treg 세포를 증가시켰다 (Yukihiro Furusawa *et al.* Nature 504:446-450, 2013). 그러나, 장내 미생물에서 직접 유래된 물질이 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 유도할 수 있는지는 알 수 없었다.

- [144] 본 발명의 일 실시예에서는 GF 생쥐의 맹장 크기가 *B. bifidum* 콜로니제이션에 의해 정상화되었고, 맹장과 대변에서 부티레이트 수준이 유의하게 증가함을 발견하였다. 부티레이트 외에도 전체 박테리아의 Treg 유도 활성을 모방하는 주요 작용분자로서 Cell Surface derived beta-Glucan/Galactan polysaccharides (CSGG)를 확인하였다. 세포 표면으로부터 분리된 다른 다당체인 음전하를 띠는 다당체 PG β G (phospho glycerol- β -galactofuran)은 Treg 유도 활성이 없었다. PG β G는 Th1/Th17 반응을 향상시켰다. PG β G의 화학구조는 *Bifidobacterium bifidum* 아종인 pennsylvanicum DSM 20239의 리포테이코산 (lipoteichoic acid; LTA)과 매우 유사하다 (Fisher W, Eur J Biochem 165(3):639-646, 1987). 그람 양성균의 LTA는 일반적으로 프로 염증성 활성을 가지고 있으며, 이를 제거하면 프로바이오틱 젯산균의 항염증 능력이 향상된다 (Sara Lebeer, Trends in Microbiology, January 2012, Vol. 20, No. 1). 이러한 결과는 동일한 박테리아에서 유래된 박테리아 다당체의 구조가 차별적으로 면역반응을 조절할 수 있음을 시사하며, 공생균 유래 다당체의 구조 및 기능의 연관성을 밝히는 것은 중요하다.

- [145] 둘째, *B. bifidum*의 세포 표면에서 유래된 CSGG는 DC-의존성 메커니즘을 통해 Treg 세포를 유도한다 (V. K. Raker *et al.*, Frontiers in immunology 6:569, 2015). DCs는 CSGG 및 *Bifidobacterium bifidum* 유도된 iTreg 생성에서 중요한 역할을 한다. *B. bifidum*과 작용분자인 CSGG는 TLR/IL-10 경로를 통해 DC의 표현형을 조절 DC (rDCs)로 유도할 수 있다. *B. bifidum*의 콜로니제이션 또는 CSGG 처리는 전체 결장 및 cLP-DC (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺CD103⁺F4/80⁻CDF)에서 IL-10, TGF- β , GM-CSF 및 다른 Treg 유도 인자의 발현 수준을 증가시킨다. 다양한 Toll 수용체 (TLRs) 중에서, DC의 TLR2는 CSGG 유도된 내성 신호의 감지 및 전달에 중요한 역할을 담당하며, TLR2 KO (knock-out) DC는 CSGG 유도된 Treg 세포 생성에서 유의한 결함 (TLR2 DC 대비 약 35%의 Treg 세포 생성)을 나타냈다.

다른 연구들은 또한 CD4 T 세포 (Round JL, 2011 Science) 또는 DCs (Suryasarathi Dasgupta, Cell host and microbes, 2014)의 TLR2가 IL-10 생산을 위한 박테리아 유래 다당체의 인식에 중요한 역할을 한다고 제안했다. TLR2 이외에, TLR2 KO DC가 여전히 Treg 세포를 유도하기 때문에 다른 수용체가 CSGG 유도 iTreg 생성에도 관여할 수 있다. CLR (C-type lectin receptors) 억제제는 CSGG에 의해 유도된 Treg 생성을 감소시키지 않았기 때문에, CLR는 관여하지 않을 수 있다. CSGG의 인식 및 T 세포에 대한 내성신호의 전달에 어떤 수용체 또는 이들의 조합이 관련하는지를 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. TGF- β 와 IL-10은 DC에서 CSGG-TLR2 신호를 통한 Treg 세포 분화의 핵심 작용분자 일 수 있다. TGF- β 차단 항체의 첨가는 CSGG 유도된 Treg 세포를 완전히 사라지게 하였다. 면역조절 사이토카인 IL-10은 CSGG 유도된 Treg 세포의 생성에 중요한 역할을 한다. TLR2 KO DC는 훨씬 낮은 수준의 IL-10을 생산하고 Treg 세포를 유도하는데 있어서 감소된 활성을 보였다. 이러한 결과는 다양한 면역반응에서 IL-10이 면역조절의 주요 조절인자임을 시사한다 (Lochner *et al.*, The Journal of experimental medicine 205:1381-1393, 2008).

[146] 또한, *B. bifidum*의 콜로니제이션 또는 CSGG의 투여는 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포뿐만 아니라 CD103⁺도 증가시켜 CSGG 치료가 장 Treg 세포를 유도할 수 있음을 시사한다 (B. Yang *et al.*, Mucosal immunology 9:444-457, 2016; E. Sefik *et al.*, Science 349:993-997, 2015). *B. bifidum*의 콜로니제이션은 식이 및 식물 반응성 Treg 세포를 유도하여 식중독뿐만 아니라 식물에 의한 조절 장애를 억제할 수도 있다. 따라서 *B. bifidum* 또는 CSGG에 의해 유도된 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포가 고도로 억제된 장 특이 작용 Treg에 속한다고 볼 수 있다 (M. Esposito *et al.*, The Journal of Immunology 185:7467-7473, 2010; D. M. Tartar *et al.*, The Journal of Immunology 184:3377-3385, 2010).

[147] CSGG는 공생 그람 음성균 *Bacteroides fragilis*의 주요 면역조절 분자인 capsular polysaccharides A (PSA)와 비교하여 매우 다른 특징을 가지고 있다 (Neeraj K. Surana *et al.*, Immunol Rev. 245(1):13-26, 2012). CGGG와 PSA는 모두 Treg 세포를 유도하는데 TLR2/IL-10 신호를 필요로 하지만, Treg 세포의 특성은 상당히 다르다. *Bacteroides fragilis*의 PSA 또는 외막 소체 (OMV)는 주로 Foxp3⁺ Treg 세포가 아닌 IL-10^{high} 조절 T 세포를 유발하지만 (Cell Host & Microbe 124:509-520, 2012; Cell, 122 (1):107-18, 2005; PNAS. 107(27):12204-9, 2010), CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 세포 생성에 대한 직접적인 증거는 없다. PSA는 또한 높은 수준의 IFN- γ ^{high} Th1 생산을 유도한다 (Round *et al.*, Science 332:974-977, 2011; Shen *et al.*, Cell host & microbe 12:509-520, 2012). PSA에 의해 유도된 Treg 세포는 Foxp3⁺ IL-10^{high}IFN γ ^{high}과 같은 표현형 (J. L. Round *et al.*, Science 332:974-977, 2011; Y. Shen *et al.*, Cell host & microbe 12:509-520, 2012)을 나타내지만, CSGG로 유도된 Treg 세포는 대부분 Foxp3⁺IL-10^{high}IFN γ ^{low}을 나타낸다. PSA는 항원 제시 세포를 활성화시켜 IL-12 분비를 촉진시키고 내성을 유도하기보다는 수치상 세포의

- 활성화를 유도한다 (Cell, 122(1):107-18, 2005). CSGG는 높은 수준의 IL-10 및 CTLA4를 생산하는 Nrp1-Helios Foxp3⁺ 및 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 유도한다.
- [148] 본 발명의 일 실시예에서는 시험관 내 및 생체 내 GF 생쥐에서 *Bacteroides fragilis*와 *B. bifidum* PRI1 사이의 Treg 유도 활성을 비교하였다. *Bacteroides fragilis*이 모노 콜로니제이션된 마우스는 Foxp3⁺ Treg 세포의 증가를 나타내지 않았고, CD4⁺ 세포에서 IFN γ +IL-10^{high}를 보였다. 유세포분석법 및 ELISA에 의한 사이토카인 분석은 *B.fragilis* 처리군에서 높은 수준의 IL-10 및 IFN- γ 를 발현함을 나타냈다. 또한, *B. bifidum*은 Foxp3⁺ iTreg 세포를 유도하는 반면 *B.fragilis*는 Foxp3 Treg 세포가 아닌 IL-10^{high} Tr1 세포를 유도할 가능성이 높다. 또한, PSA 또는 *Bacteroides fragilis*의 투여가 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 증진시킬 수 있는지에 대한 직접적인 증거는 없다.
- [149] 더욱이, 준최적의 Treg 유도 조건하에서 PSA 처리된 DC는 Foxp3⁺IFN γ +IL-10^{high} 세포를 주로 유도하는 반면 CSGG 처리된 DC는 Foxp3⁺IFN γ -IL-10^{high} 세포를 생성하였다. PSA는 MHCII 분자에 결합된 T 세포에 처리되고 제시되기 때문에 항원 특이적 Treg 세포를 유도할 수 없다 (B. A. Cobb *et al.*, Cellular microbiology 7:1398-1403, 2005). 대조적으로, CSGG는 MHCII에 적재되기 어려우므로 식이 항원 또는 공생균에 반응하는 다양한 항원 특이적 Treg 세포를 유도할 수 있다. 이러한 기능적 차이는 화학구조 및 메커니즘의 차이에 의해 매개될 수 있다. PSA는 양전하 및 음성으로 하전된 당 잔기를 교대로 포함하는 독특한 양이온성 (zwitterionic) 모티프를 갖는다. 이러한 전하 및 크기에 따라, PSA는 T 세포 자극에서 다른 활성을 갖는다. Native PSA는 평균 ~ 130 kDa이며, 너무 작은 단편 (5000Da 단편)은 활성이 없지만 17.1kDa 단편 (~ 22 반복 단위)은 대장염을 억제하는 기능을 한다고 보고되어 있다 (Kalka-Moll WM, *et al.* J Immunol. 164:719-724, 2000). PSA는 TLR-2를 통해 DCs로 흡수되어 적절히 잘라진 후 MHCII 분자에 결합하여, PSA를 인식하는 T 세포와 작용을 하여 특정 helper T 세포의 분화를 유도하게 된다 (Cobb BA *et al.*, Cell Microbiol. 7:1398-1403, 2005). 이 경우, PSA에 의해 유도되는 Treg, Tr1 면역 조절 세포는, PSA에 특이성을 가지며, 이러한 현상은 향후 항원 특이적인 Treg 세포 유도에 한계성을 지닌다. CSGG는 평균 ~ 4000Da의 중성 다당체이며, PSA와는 달리, 주로 T 세포에 직접 작용하는 것이 아니라 DC 특성 조절을 통해 작용한다. 이러한 작용 메커니즘의 차이는, CSGG 처리에 의해 다양한 항원 특이적 Treg 세포를 유도할 수 있을 가능성을 제시하고 있다. 즉, 처리된 PSA가 MHC II 상에 로딩됨에 따라 PSA 특이 Treg 세포만 생성될 수 있다. 한편, CSGG는 MHC II에 내포작용 매개 프로세싱 및 로딩을 수행하기보다는 DC의 표현형 변화를 유도하여 rDC가 되도록 유도한다.
- [150] 본 발명의 일 실시예에서, CSGG를 GF 생쥐에 투여하면 cLP 및 MLN에서 CD4⁺ Nrp Foxp3⁺ Tregs 세포가 유의하게 향상되었다. 따라서, 모든 종류의 항원과 함께 처리된 *B. bifidum* 또는 CSGG는 식이항원 또는 공생 박테리아 항원 특이 Treg

세포와 같은 항원 특이적 Treg 세포를 유도할 수 있다. 흥미로운 결과 중 하나는 Bb의 콜로니제이션 또는 CSGG의 투여가 대장에서 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포의 수준을 향상시킨다는 것이다. 또한, mock iTreg와 비교하여, Bb 또는 CSGG로 유도된 iTreg 세포는 장염증 억제 능력이 있는 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포의 개체군이 더 높다. 대장염 모델의 mock-iTreg 세포와 비교하여, Bb 또는 CSGG로 유도된 iTreg 세포는 Foxp3 locus의 CNS2에서 더 높은 탈메틸화 상태 (50~60%)를 갖는 지속적인 Foxp3 발현을 나타내었다. 따라서, Bb 또는 CSGG에 의해 유도된 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포가 장 특이 작용 Treg에 속한다고 믿는다 (Esposito *et al.*, J Immunology 185:7467-7473, 2010; Tartar *et al.*, J Immunology 184:3377-3385, 2010; B-H Yang *et al.*, Mucosal Immunology 9:444-457, 2016). 이러한 과정에서 선천 면역세포의 역할을 연구하여, Bb 또는 CSGG 처리가 ROR γ t⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 강화시키는 기본 메커니즘을 더 조사할 수 있다.

[151]

[152]

본 발명에서는 *B. bifidum* PRI1과 그것의 작용분자인 CSGG가 iTreg 세포의 생성을 촉진한다는 것을 제시한다. *Bifidobacterium bifidum*은 방선균류 (Actinobacteria)에 속하며 인간의 내장에서 특이적으로 동정되었으며, 모유 수유아의 내장 microbiota의 주요 박테리아 구성원의 일부로 나타났다 (Turroni *et al.*, Applied and environmental microbiology 75:1534-1545, 2009). 자연분만과 비교하여, 제왕절개 분만은 소아기 알레르기, 천식 및 자가면역 질환과 관련이 있는 *Bifidobacterium* 종의 결핍을 초래하였다. IBD 환자는 건강한 대조군보다 분변에서 *B. bifidum*의 비율이 더 적다 (Wang *et al.*, Journal of clinical microbiology 52:398-406, 2014; Verma *et al.*, Journal of clinical microbiology 48:4279-428, 2010). 다양한 종류의 공생균 중 비피도박테리움은 일반적으로 숙주 반응을 조절할 수 있는 능력에서 락토바실러스 보다 강한 항염증성적인 특징을 지닌다. 그러나, 공생균의 면역조절 효과는 균주 특이적이며, 기능성 균주의 동정은 여전히 큰 숙제로 남아있다. 예를 들어, 동일한 *Bacteroides fragilis* 균 내에서 지질다당체 생산 균주는 염증 신호를 증가시키고 질병 진행을 악화시킨다 (Walter J. Lukiw *et al.*, Front Microbiol 7:1544, 2016). 반면, PSA 생성 균주는 염증 질환을 억제한다고 알려져 있다. 따라서 어떻게 동일 species내에서도 각각 다른 면역학적 특성을 갖는지를 규명하는 것은 매우 중요한 숙제이다. 이러한 균주 특이적 면역 조절 특이성을 규명하는 방법으로는, 균들 유래 물질들과 이들을 면역학적 특성을 규명하여 이를 기능적 마커로 활용하는 방법이다. 예를 들어, 부티레이트는 부티르산이 장간막 Treg 세포의 분화를 촉진함에 따라 Treg 유도 박테리아의 표지자가 될 수 있다 (Yukihiro Furusawa *et al.*, Nature 504:446-450, 2013; Liao HY *et al.*, Scientific reports, 6:20481, 2016). 또 다른 방법은 비교 게놈 분석에 의해 알려진 균주와 높은 유전 상동성을 갖는 균주를 동정하는 것이다 (C. Preston Neff, Cell Host & Microbe, 20(4):535-547, 2016). 본 발명에서는 *B. bifidum* 균주 중에서 A8 (99.97%)과 LMG11582 (99.98%)가 가장 높은 염기 유사성과 CSGG

합성과 관련된 orthologous 유전자를 가지고 있음을 발견했다. IPLA 20015 및 A8 균주는 인간 PBMC 배양 시스템에서 Treg 증진 박테리아로 알려져 있다. 시험관 내에서 Treg 유도 활성을 비교한 결과, A8 균주는 본 발명의 균주와 유사한 활성을 보였으나, 낮은 염기 상동성 (98.9 %) 및 CSGG 합성과 관련된 몇몇 orthologous 유전자가 없는 ATCC 29521은 Treg 유도 활성이 훨씬 낮았다.

- [153] 본 발명에서는 *B. bifidum* 또는 CSGG의 투여가 생체 내에서 다양한 항원 특이 Treg 세포를 유도하기 위한 경구 내성의 보조제로서 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, *B. bifidum* 또는 CSGG 치료는 MHC II에서 항원 제시를 방해하지 않으면서 rDC를 유도하므로, 자가면역 또는 알레르기 관련 단백질과 함께 *B. bifidum* 또는 CSGG를 투여하면 항원 특이적 Treg 세포가 유도되어 질병 진행을 억제할 수 있음을 확인하였다. 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.

- [154] 본 발명은 조절 T (Treg) 세포를 유도 또는 생성하여 과면역 질환을 치료할 수 있는 CSGG (cell surface beta-glucan/galactan) 다당체 및 이를 발현하는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1에 관한 것으로, *Bifidobacterium bifidum* PRI1이 발현하는 CSGG (cell surface beta-glucan/galactan) 다당체는 기존에 알려진 프로바이오틱스 균주의 다당체와 차이가 있으며, 상기 CSGG가 프로바이오틱스 균주의 CD4⁺Foxp3⁺Treg 세포의 형성을 유도하는 주요 물질로 확인되었고, TLR2-매개 DC를 생성하는 메커니즘을 통해 염증성 장질환 또는 과면역 질환 치료 효과를 나타낸다. 본 발명에서는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1이 발현하는 CSGG (cell surface beta-glucan/galactan) 다당체의 구체적인 구조식을 밝히고, 상기 CSGG가 조절 T (Treg) 세포를 유도에 주요 작용물질임을 최초로 밝혔다. 본 발명의 CSGG의 β -D-glucan의 구조는 beta-1-6-glucan으로서, 알려진 β -D-glucan 구조인 2-substituted-(1,3)-beta-D-glucan과는 그 기능이 완전히 다르다. 이전에 알려진 β -D-glucan는 프리바이오틱스 기능인데 비해, 본 발명의 beta-1-6-glucan은 그 자체가 면역조절 기능을 갖는다. 또한, PSA (PSA; polysaccharide A)와 같은 다당체는 PSA는, PSA 이외의 항원 특이적인 Treg 유도 능력이 없으나, 이에 반해 CSGG 생성 균주는 다양한 종류의 항원, 즉, 음식물, 장내 다른 세균, 균 자체 유래 물질 등에 대한 Treg을 유도할 수 있으므로, PSA와 CSGG는 그 구조 및 작용기작이 전혀 상이하다. 세포 표면의 다당체를 하나의 물질로 일반화하기는

힘드나, 본 발명에서는 구조적 차이가 어떻게 기능과 연관되어 있는지를 규명하였다. 즉, 본 발명의 균에서 생성된 물질인 CSGG 그 자체가 Treg을 유도하는 균 자체의 기능을 대변할 수 있는 활성 지표물질인 것이다.

[155] CSGG는 Treg 유도 박테리아의 새로운 기능적 표지자로 작용할 수 있으며, CSGG 또는 CSGG 생성 *B. bifidum*은 자가면역 및 알레르기 질환에 대한 특이적 면역 요법을 개발하기 위한 내성 유발 보조제로서 사용될 수 있다.

[156]

[157] 실시예

[158] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[159]

[160] 재료 및 방법

[161] 1. 마우스 및 박테리아 균주

[162] 1-1: 마우스

[163] 마우스는 POSTECH Biotech Center의 동물 시설에서 관리하였으며, 모든 실험 절차는 POSTECH 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인을 받았다. 무균 (Germ-free) C57BL/6 (B6) 마우스는 Drs. Andrew Macpherson (Bern Univ., Switzerland) 및 Dr. David Artis (Then at Univ. Pennsylvania, currently at Cornell University, USA)로부터 제공받아 POSTECH에서 확립하고, sterile flexible film isolators (Class Biological Clean Ltd., USA)에서 유지 관리하였다. GF 현황은 매월 맹장 내용물에 의해 모니터링 하였다. *Foxp3-eGFP*, *Tlr2^{-/-}*, *Tlr4^{-/-}*, *Tlr6^{-/-}* 및 *MyD88^{-/-}* 동물은 The Jackson Laboratory에서 구입하였다. C57BL/6-CD45a(Ly5a)-*Rag1^{-/-}*TCR OT-II (*Rag1^{-/-}* OT-II TCR 형질전환체) 및 *Rag1^{-/-}* 마우스는 Tagonic 교환 프로그램을 통해 얻었다. CBir 마우스는 Charles O. Elsona (University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA; Yingzi Cong, PNAS, 19256-19261, doi: 10.1073/pnas.0812681106)로부터 제공받았다. 6 ~ 12 주령의 성별 및 연령에 맞는 마우스를 사용하였다.

[164]

[165] 1-2: 박테리아

[166] *B. bifidum* PRI1과 다른 *B. bifidum* 균주는 0.1 % L-cysteine이 첨가된 MRS 배지 (BD, Difco)에서 혐기 배양하였으며, *L. paracasei*는 MRS 배지에서 배양하였다. 모노-콜로니제이션을 위하여, 박테리아 (5×10^8 CFU/200 μ L)를 무균 (GF) 마우스에 경구 투여하였다.

[167]

[168] 2. *B. bifidum*에서 세포 표면 다당체의 정제

[169] 배양한 *B. bifidum* PRI1을 수확하고 PBS로 2회 세척하였다. 세포 표면 다당체의

정제는 이전의 방법 (D. L. Kasper *et al.*, Journal of bacteriology 153:991-997, 1983)을 약간 수정하여 수행하였다. 68°C에서 산성 페놀 (Sigma-Aldrich) 처리를 실시하여 피막 다당류를 추출하고, 에테르를 처리하여 잔류 페놀을 제거한 다음, 증류수에 3일간 투석하였다. 핵산과 단백질을 제거하기 위해, DNase I (Roche) 및 RNase (Sigma-Aldrich)로 37°C에서 밤새 처리한 다음, Pronase (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich)로 37°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 아세트산 처리 후, 침전물을 제거하기 위해 원심 분리를 하였다. 냉각된 에탄올을 첨가하여 다당류를 침전시킨 다음, 증류수에서 3일 동안 투석하고 동결 건조시켰다. 정제된 다당류를 물에 용해시키고 HPLC 컬럼 (TSKgel G5000PWXL, Tosho)으로 겔 여과를 수행하였다. 중성 및 음성 전하 다당류를 추가로 분리하기 위해 음이온 교환 크로마토그래피 (HiPrep Q FF 16/10, GE healthcare)를 수행하였다. 다당류의 농도는 산성 페놀 분석 (M. DuBois *et al.*, Analytical chemistry 28:350-356, 1956)에 의해 결정되었다.

[170]

[171] 3. 16S rRNA 유전자 분석에 의한 박테리아 콜로니제이션 분석

[172] 모노 콜로니제이션을 확인하기 위해 박테리아의 게놈 DNA를 NeucleoSpin DNA Stool (Macherey-Nagel)을 사용하여 마우스의 분변 또는 내장 내용물로부터 분리하였다.

[173] PCR 분석은 C1000 touch thermal cycler (Bio Rad)를 사용하여 수행하였으며, 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다.

[174]

[175] [표1]

서열번호	프라이머	서열 (5' → 3')
1	총 박테리아 EUB (forward)	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
2	총 박테리아 EUB (reverse)	GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT
3	BibiF- (forward)	CCACATGATCGCATGTGATTG
4	BibiF- (reverse)	CCGAAGGCTTGCTCCCAA

[176]

[177] 4. 형광 in situ hybridization (FISH)에 의한 박테리아 콜로니제이션 분석

[178] *B. bifidum* PRI1에 의한 모노 콜로니제이션 3주 후, 마우스를 희생하여 소장을 십이지장 (유문의 말단에서 1~3cm 이내), 공장 (Treitz의 인대로부터 2~4cm 이내) 및 회장 (회맹부 밸브에서 1~3cm 이내)의 3부분으로 나누었다. 각 소장 절편 1cm와 결장을 조직학적 분석을 위해 Carnoy's 고정을 하였다. Carnoy's 고정액

(3:1의 메탄올:빙초산)을 떨어뜨리고, 세포 현탁액을 500g에서 5 분간 원심분리한 후 펠렛을 Carnoy's 고정액에 재현탁 하였다 (Choolani *et al.*, 2007). Carnoy's 용액으로 고정한 파라핀 임베디드 (embedded) 섹션을 탈왁스 처리하고 Cy5로 표지된 *B. bifidum* 16S rRNA 형광 프로브 (서열번호 5: Bbif, 5'-CCACAATCACATGCGATCATG-3')와 혼성화 하였다 (Dinoto *et al.*, 2006). 100ng의 프로브를 함유하는 혼성화 완충액 (100nM Tris, pH 7.2, 0.9M NaCl, 0.1% SDS)으로 45°C 가습 챔버에서 16시간 동안 혼성화 시켰다. 슬라이드를 예열된 (37°C) 혼성화 완충액 100ml에서 15분 동안 세척하고, 예열된 (37°C) 세척용액 (100mM Tris, pH 7.2, 0.9M NaCl) 10ml로 15분 동안 세척한 다음 (Smith *et al.*, 2011), 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 DNA를 면역염색 하였다. 슬라이드를 물로 세척하여 에어 드라이한 후, 형광현미경 (IX70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 이미지를 얻었다.

[179]

[180] 5. 대장염의 T 세포 전달 모델

[181] 이전에 보고된 방법 (A. Izcue *et al.*, Annual review of immunology 27: 313-338, 2009; F. Powrie *et al.*, Immunity 3:171-174, 1995)에 따라 나이브 CD4⁺ T 세포의 입양 전달에 의해 대장염을 유도하였다. *B. bifidum* PRI1 (Bb), CSGG 또는 mock 처리에 의해 유도된 iTreg 세포 (2×10⁵)와 함께 분류된 나이브 CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP}- T 세포 (>99% pure, 1×10⁶)를 *Rag1*^{-/-} 마우스의 정맥 내로 전달하였다. 대장염의 진행은 일주일에 두 번 체중을 측정하여 모니터링 했으며, 마우스의 체중이 초기 체중의 약 25%가 되었을 때 실험 종료를 결정하였다. Treg 세포를 양성 대조군으로 하여, *ex vivo*로 분리된 CD4⁺ Foxp3^{GFP+} Treg 세포 (2×10⁵)를 나이브 T 세포와 함께 *Rag1*^{-/-} 마우스로 공동 전달하였다. 실험 종료시 대장 길이와 조직학적 평가를 측정하여 대장염의 중증도를 결정하였다. Treg 세포와 사이토카인의 수준도 분석하였다.

[182]

[183] 6. *In vivo* 입양 전달

[184] 분류된 나이브 폴리클로날 CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP}- T 세포 (>99.5% pure) (1×10⁶)를 GF C57BL/6 마우스의 정맥내로 전달하고, 단일 균주를 경구 투여하였다. 입양 전달 3주 후에 마우스를 희생하였다. 식이 항원에 반응하는 Treg 세포의 TCR 특이성을 분석하기 위해, OT-II CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP}- T 세포로부터 분리된 나이브 T 세포 (1×10⁶)를 입양 전달 전 2주 동안 *B. bifidum* PRI1로 모노 콜로니제이션시킨 GF C57BL/6 마우스의 정맥내로 전달하고, 7일 동안 격일로 OVA (20mg/dose/mice)를 식이하였다. 공생 박테리아에 반응하는 Treg 세포의 TCR 특이성을 분석하기 위해, 분류된 (>99.5% pure) 나이브 CBir CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP}- T 세포 (1×10⁶)를 SPF 조건으로 유지된 C57BL/6 마우스의 정맥내로 전달하고, 실험 종료시까지 *B. bifidum* PRI1 (5×10⁸ cfu/dose)를 주 3회 식이하였다. 마우스는 입양 전달 3주 후에 희생하였다.

[185]

[186] 7. DC 의존 시험관 내 iTreg 세포의 유도

[187] 대장 LP DCs (MHCII+CD11c+CD11b+CD103+F4/80), 비장 총 DCs (tDC; MHCII+CD11c+), 비장 CD8 α + (MHCII+CD11c+CD11b) 및 비장 CD8 α - (MHCII+CD11c+CD11b+) DCs를 세포 분류 또는 CD11c 자성비드 (Miltenyi Biotech)로 각각 정제하였다. 분리된 DC는 10% FBS, 5% 페니실린/스트렙토마이신, 2mM L-글루타민, 1mM 나트륨 피루베이트, 비필수 아미노산, β -ME을 포함하는 완전한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 비장 DCs (2×10^4)는 96 웰 플레이트에 접종하여 2시간 동안 배양한 다음, 표시된 박테리아, *B. bifidum* PRI1의 분화 세포 분획물 또는 *B. bifidum* PRI1의 정제된 다당체와 10~12 시간 동안 배양하였다. 세포를 세척하고, 준최적 Treg 유도 조건 (0.1 μ g/ml 항-CD3, 100U IL-2 및 0.1ng TGF β)에서 3일 동안 나이브 CD4+ T 세포 (2×10^5)와 공배양 하였다. 사이토카인 또는 Treg 세포의 수준은 ELISA 및 유세포분석법에 의해 각각 결정되었다.

[188]

[189] 8. CSGG 처리에 의한 DC 분화 및 iTreg 세포 유도를 위한 인간 샘플

[190] 아주대학교 병원 임상연구심의위원회 (IRB)로부터 이 연구를 승인받았으며 (AJIRB-BMR-SMP-17-155), Ficoll-Hypaque gradient를 통해 건강한 공여자에게서 말초혈액 단핵세포 (PBMCs)를 얻었다 (Lymphoprep, Nycomed, Norway). CD14 마이크로 비드 키트 (Miltenyi biotech)를 사용하여 양성 선별을 통해 단핵구 (monocyte)를 PBMC (CD14 +> 95 %)로부터 분리하였다. 5×10^5 monocyte/ml을 rhIL-4 (35 ng/ml) 및 GM-CSF (70 ng/ml) (R&D Systems, UK) 존재하에 10% 열 불활성화 된 FCS 및 항생제가 보충된 RPMI-1640 배지 (2 mM l-glutamine, 25 mM HEPES; BioWhittaker)로 7일 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 2일 및 5일째에, 0.5 ml의 배지를 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 새로운 배지로 교체하였다. 7일째, 미성숙 DC를 회수하여 mock 또는 상이한 양의 CSGG로 14 시간 동안 전처리하였다. 그 다음, 인간 PBMC로부터 분리한 나이브 CD4+ T 세포와 준최적 Treg 유도 조건 (0.1 μ g/ml 항-CD3, 100U IL-2 및 0.1ng TGF β)에서 3일 동안 배양하였다. Treg 세포의 수준은 유세포분석법에 의해 결정되었다.

[191]

[192] 9. RNA-seq에 대한 데이터 가용성

[193] 총 RNA는 mock 또는 CSGG (100 μ g/ml)로 4시간 동안 자극한 비장 CD11c+ DCs로부터 추출하고 RibospinTMII (GeneAll biotechnology)로 정제하였다. RNA 정량 및 품질 관리는 NanoDrop 2000TM (Thermo Fisher Scientific)로 수행하였다. 라이브러리 준비는 TruSeq Stranded mRNA 샘플 준비 키트 (Illumina)로 수행하였으며, RNA 시퀀싱은 NextSeq 500 Sequencing System으로 수행하였다. RNA-seq 데이터는 등록 번호 GEO : RNA-seq 데이터 : GSE98947로 Gene Expression Omnibus (NCBI) 데이터 저장소에 기탁하였다.

[194]

[195] 10. RNA 분리 및 실시간 정량 RT-PCR

[196] TRIzol reagent (Invitrogen)를 사용하여 대장 및 cLP DC로부터 분리한 총 RNA를 M-MLV 역전사 효소 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 역전사시켜 cDNA를 제조하였다. 합성된 cDNA는 다음 프라이머 세트 (표 2) 및 CHROMO4 Detector (Biorad)를 이용하여 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)에 적용하였다.

[197]

[198] [표2]

서열번호	프라이머	서열 (5' -> 3')
6	HPRT (forward)	TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC
7	HPRT (reverse)	GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T
8	IL-10 (forward)	ATA ACT GCA CCC ACT TCC CA
9	IL-10 (reverse)	TCA TTT CCG ATA AGG CTT GG
10	TGF- β (forward)	CTC CCG TGG CTT CTA GTG C
11	TGF- β (reverse)	GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G
12	IL- β (forward)	CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC C
13	IL- β (reverse)	TGC CGT CTT TCA TTA CAC AG
14	Csf2 (forward)	AGG GTC TAC GGG GCA ATT TC
15	Csf2 (reverse)	GGC AGT ATG TCT GGT AGT AGC TG

[199]

16	PD-L1 (forward)	GCT CCA AAG GAC TTG TAC GTG
17	PD-L1 (reverse)	TGA TCT GAA GGG CAG CAT TTC
18	IDO (forward)	GCT TTG CTC TAC CAC ATC CAC
19	IDO (reverse)	CAG GCG CTG TAA CCT GTG T
20	COX2 (forward)	TGG CTG CAG AAT TGA AAG CCC T
21	COX2 (reverse)	AAA GGT GCT CGG CTT CCA GTA T
22	CD80 (forward)	ACC CCC AAC ATA ACT GAG TCT
23	CD80 (reverse)	TTC CAA CCA AGA GAA GCG AGG
24	CD86 (forward)	TGT TTC CGT GGA GAC GCA AG
25	CD86 (reverse)	CAG CTC ACT CAG GCT TAT GTT TT
26	CD40 (forward)	CCT TGC ACT GTG AGG AGA
27	CD40 (reverse)	CTT CGC TTA CAA CGT GTG CT

[200]

[201] 모든 qRT-PCR 은 95°C에서 5 분, 95°C에서 30 초, 62°C에서 30 초, 72°C에서 30 초 동안 40 사이클로 동일한 조건하에서 수행하였다. 데이터는 HPRT 발현 수준으로 값을 표준화 하였다. 결과는 처리군 사이의 각 유전자에 대한 상대적인 발현 수준으로 기술되었다.

[202]

[203] 11. 림프구 분리 및 유세포분석

[204] 나이브 CD4⁺ T 세포는 세포 분리기를 사용하여 mLN, pLN 및 비장으로부터 정제하였다 (순도 98 % 이상). 마우스의 대장 및 소장을 종 방향으로 오픈하여 점액을 PBS 로 세척하여 제거하였다. 대장은 작은 조각으로 잘라 Ca²⁺ 및 Mg²⁺가 포함되지 않은 10mM EDTA 및 20mM HEPES, 1mM 피루브산 나트륨, 3% FBS 및 PBS로 37°C에서 20분 동안 진탕배양 하였다. 조직은 면도칼로 더 작은 조각으로 갈아서, 3% FBS, 20mM HEPES, 1mM 피루브산 나트륨 및 0.5mg/ml의 Collagenase D (Roche) 및 DNaseI (Sigma)가 각각 포함된 RPMI 1640 배지에서 37°C로 45분

동안 진탕배양 하였다. 효소 처리 후, 상층액을 100 μ m 세포 여과기를 사용하여 10mM EDTA를 함유하는 차가운 PBS로 여과시켰다. 세포를 Percoll™ (GE Healthcare) 구배 (상단 40% percoll, 하단 75% percoll) 위에 놓고 2000 rpm에서 20분 동안 브레이크 없이 원심분리하였다. 40% 및 75% 층 사이의 세포를 취해, 10% FBS (Hyclone), Pen/Strep, β -ME, 피루브산 나트륨, 2.0mM L-glutamine이 포함된 RPMI 배지 (Hyclone SH30027.01)로 2번 세척하고 FACS 염색에 사용하였다. 세포 현탁액은 LIVE / DEAD fixable viable dye (eBiosciences) 또는 PI를 사용하여 PBS에서 Live/dead로 먼저 염색하였다. 다음 1% FBS (Gibco) 및 EDTA (Sigma-Aldrich)를 함유하는 완충액에서 추가 염색을 하였다. 표면 염색은 0.2% 소 혈청 알부민을 함유하는 PBS에서 20분 동안 수행하였다. 세포 내 전사 인자 염색을 위해서는, 세포를 Fixation/Permeabilization buffer (eBioscience) 및 1x permeabilization/wash buffer (eBioscience)로 염색하였다. 세포내 사이토카인 분석을 위해서는, 정제된 라미나 프로프리아 (lamina propria) 림프구를 GolgiPlug (BD biosciences, 0.5 μ L/sample)를 사용하여 500ng/ml Ionomycin (Calbiochem) 및 100ng/ml PMA (Calbiochem)로 37°C에서 4-5 시간 세포를 제자극하였다. 세포를 IC 고정 버퍼 (eBioscience)로 고정하고, permeabilization/wash 완충액 (eBioscience)에서 투과성을 부여하고, IL-10, IL-13, IFN- γ 및 IL-17A 항체를 사용하여 염색하였다.

- [205] 다음의 항체 클론을 사용하였다. CD4 (RM4-5), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD90.1 (Thy1.1) (OX-7), CD90.2 (Thy1.2) (30-H12), CD103 (2E7), V α 2 (B20.1), Foxp3 (FJK-16s), CTLA4 (UC10-4B9), Nrp1 (3E12), Helios (22F6), T-bet (4B10), ROR γ t (AFKJS-9), GATA-3 (16E10A23), IL-10 (JES5-16E3), IL-13 (eBio13A), IFN- γ (XMG1.2), IL-17A (17B7), CD11c (N418), CD11b (M1/70), F4/80 (BM8), MHCII (M5/114.15.2).
- [206] 유세포분석 분류를 위해서는, 죽은 세포는 배제하고 개체군은 다음으로 게이트 하였다. LP DCs (CD45⁺MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺ CD103⁺F4/80⁻), SP DCs (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁺ 또는 MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻), 나이브 CD4⁺T 세포 ((CD4⁺CD45.1⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP-}), 나이브 OT-II TCR 트랜스제닉 T 세포 (CD4⁺CD90.1⁺OT-II⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP-}), CBir TCR 트랜스제닉 나이브 T 세포 (CD4⁺CD45.1⁺CD62L^{hi}CD44^{lo}Foxp3^{GFP-}).
- [207] Moflo-XDP 및 유세포분석법을 사용하여 수행된 세포 분류는 5개의 레이저가 장착된 LSR Fortessa 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 수행하였다. 데이터는 FACSDiva 소프트웨어 (BD Biosciences) 및 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [208]
- [209] 12. CDR3 고효율 시퀀싱 (high-throughput sequencing)을 이용한 TCR 래퍼토리 분석
- [210] 총 RNA는 GF 마우스 또는 *B. bifidum* PRI1로 3주간 모노 콜로니제이션된

마우스의 분류된 CD4⁺Foxp3^{GFP+} Treg 세포로부터 추출하였다. 죽은 세포는 ISOGEN (Nippon Gene)에 의한 FVD 염색으로 제외시켰다. Repertoire Genesis Inc.의 편향되지 않은 TCR 레퍼토리 분석 기술을 사용하여 차세대 시퀀싱을 수행하였다. Adaptor-ligation PCR은 이전 방법으로 수행하였다 (R. Yoshida *et al.*, Immunogenetics 52:35-45, 2000). Superscript III 역전사 효소 (Invitrogen)로 첫번째 이중 가닥 cDNA를 합성하고, 5' 어댑터 올리고 뉴클레오티드와 라이게이션한 다음, 어댑터 및 TCR α 불변 영역 또는 TCR β 불변 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하였다. TCR α 및 TCR β cDNA의 증폭 후, Nextera XT 색인 키트 v2 setA (Illumina)를 사용하여 색인 (바코드) 서열을 추가하였다. 시퀀싱은 Illumina Miseq paired-end 플랫폼 (2x300 bp)으로 수행하였다. 데이터 처리는 Repertoire Genesis, Inc.가 작성한 Repertoire Analysis 소프트웨어를 사용하였다. TCR 서열은 국제 ImMunoGeneTics 정보 시스템 (IMGT) 데이터베이스 (<http://www.imgt.org>)의 참조 서열의 가능한 데이터 세트를 사용하여 할당하였다. 점수가 낮은 서열을 제거한 후, TCR 레퍼토리 분석은 Repertoire Genesis Incorporation (Ibaraki, Japan)이 개발한 생물 정보학 소프트웨어를 사용하였다. 시퀀스 읽기는 다른 시퀀스 읽기와 동일성이 없으므로 고유 시퀀스 읽기 (USR)로 정의되었다. 동일한 USR의 카피 번호는 RG 소프트웨어에 의해 자동으로 계산된다.

[211]

[212] 13. 체외에서 iTreg 세포 생성에 대한 TGF- β 중화의 효과

[213] 비장 MHCII⁺CD11c⁺ DCs (2x10⁴)를 2시간 동안 둥근 바닥 96 웰 플레이트에 접종한 후 *B. bifidum* PR11 또는 CSGG와 함께 12시간 동안 배양하였다. 세포를 세척하고, 0.1 μ g/ml의 항-CD3 (BD Bioscience), 100U IL-2 (Peprotech) 및 0.1ng/ml의 TGF- β 존재 또는 15 μ g/ml 항-TGF- β 항체 (R&D)의 부재하에 나이브 CD4⁺ T 세포 (2x10⁵)와 공 배양하였다. 배양 3일 후, CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 개체군을 유세포분석하였다.

[214]

[215] 14. 시험관 내 억제 분석

[216] 시험관내 생성된 CD45.1⁺CD4⁺Foxp3^{GFP} iTreg 세포를 분류하고, 37°C에서 10분 동안 펄스 처리한 반응세포 (Thy1.1⁺CD4⁺Foxp3⁻)와 함께 배양하였다. CTV로 표지된 세포는 PBS로 2회 세척하고 즉시 사용하였다. T 세포가 제거된 비장세포 (1x10⁵)와 CTV-펄스 처리된 반응세포 (5x10⁴) 및 지시된 양의 iTreg 세포를 0.5 μ g/ml의 항-CD3와 함께 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 혼합하였다. 세포를 4일 동안 배양하고 그들의 증식을 CTV 강도의 희석을 결정하기 위한 유세포분석으로 분석하였다. 억제율 (%)은 반응세포의 백분율만 비교하여 분열세포의 총 백분율로 계산하였다.

[217]

[218] 15. 조직학

- [219] 실험 대장염의 임상적 상태는 H & E 염색을 이용한 조직학적 분석으로 평가하였다. 대장을 수집하고 10% 포름 알데히드로 고정시켰다. 고정 후, 조직을 파라핀 블록에 끼우고 3 μ m 두께로 절단하여 헤마톡실린 (Sigma-Aldrich) 및 에오신 (Sigma-Aldrich)로 염색하였다.
- [220]
- [221] 16. 통계분석
- [222] 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 (La Jolla, CA)를 사용하여 수행하였고, 대조군과 실험군 간의 차이는 Unpaired-Student's t-test를 사용하여 평가하였다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타내었다. Treg 세포 및 실험적 대장염의 생체 내 안정성 분석을 위해, 본페로니 (Bonferroni)의 다중 비교 검사로 양방향 분산 분석을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. P < 0.05는 유의한 것으로 간주되었다.
- [223]
- [224] 실시예 1: Treg 유도 박테리아 스크리닝
- [225] 면역조절 미생물에 의해 생체내 Treg 세포가 강화되면 염증성 장애 관련 미생물부조화 (dysbiosis)를 조절할 수 있다. 안전성이 보장된 미생물 중 Treg 유도 박테리아를 동정하기 위해, 이전에 보고된 ex vivo 스크리닝 시스템 (Kwon *et al*, PNAS 107:2159-2164, 2010, Kim JE, J Funct Foods. 350-362, 2015)을 이용하여 200여 종 이상의 프로바이오틱스 균주를 스크리닝하였다.
- [226] 각각의 박테리아 균주는 항생제 (Gentamycin®) 존재하에서 Foxp3 리포터 마우스의 mLNs (mesenteric lymph node) 세포와 공배양 하였다. Foxp3, IL-10 및 IL-12의 수준을 측정하여, IL-10/IL-12 비가 >100이고 Foxp3 발현을 10% 이상 증가시키는 균주를 선별하였다.
- [227] 그 결과, Foxp3+ Treg 유도 박테리아의 최적 후보로 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (*B. bifidum*; Bb)을 선택하였으며 (도 2A 및 B), *Lactobacillus paracasei sub. tolerans* 467 (*L. paracasei*; Lpa)를 면역반응을 유도하지 않는 대조군 균주로 선택하였다. 선택된 *Bifidobacterium bifidum* PRI1은 2017년 5월 19일에 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁되었다 (수탁번호: KCTC13270BP).
- [228]
- [229] 실시예 2: *B. bifidum*에 의한 Treg 세포 유도
- [230] *B. bifidum*이 생체내 Treg 세포를 유도할 수 있는지 알아보았다.
- [231] SFB (Segmented filamentous bacteria)는 Th17-유도 대조군 박테리아로 사용하였다. *B. bifidum* (Bb)을 무균 (germ free; GF) 마우스에 1회 투여하면 대장에 안정적으로 콜로니제이션되었으며 (도 2C), 확대된 맹장 크기는 정상 SPF 마우스와 유사한 사이즈로 정상화시켰다 (도 2D). 이는 Bb의 섬유질 소화 활성을 의미한다. 또한, 부티레이트 및 아세테이트와 같은 단쇄 지방산 (short chain fatty acids; SCFAs)은 식이섬유 발효의 최종산물이므로, Bb가 콜로니제이션된 마우스는 맹장 및 대변에서 프로피오네이트 수준은 변하지 않고, 아세테이트와 부티레이트 수준이 유의하게 증가하였다 (도 2E).

- [232] *L.paracasei* (Lpa) 또는 SPF와는 달리 *B. bifidum* (Bb)으로 3주 콜로니제이션된 GF 마우스는 결장 프로프리아층 (cLP)에서 Foxp3⁺ Treg 세포의 빈도를 극적으로 증가시켰다 (도 1A 및 도 2F). 뿐만 아니라, 장간막 림프절 (mesenteric lymph nodes; MLN), 비장 및 소장 프로프리아층 (siLP) 및 말초 림프절 (peripheral lymph nodes; LN)과 같은 다른 기관에서도 Treg 세포가 약간 증가되었다 (도 3A). *B. bifidum*이 콜로니제이션된 GF 마우스 (Bb)의 결장 프로프리아층 (cLP)에서 Treg 세포는 CD103⁺ 및 메모리 표현형 (CD62L^{lo}CD44^{hi})이 상당히 높은 비율을 나타냈으며 (도 3B 및 C), CTLA4 및 IL-10도 높은 수준의 발현을 나타냈다 (도 1B 및 C).
- [233]
- [234] 실시예 3: Bb에 의해 새롭게 생성된 iTreg
- [235] Treg 세포는 기원에 따라 흥선 유래 Treg (tTreg) 또는 말초에 의해 유도된 Treg (pTreg 또는 iTreg)로 더 분화될 수 있으므로, Treg 세포에서 Helios 및 Nrp1 발현을 분석하여 Treg 기원을 추적하였다.
- [236] Helios⁺ Nrp1⁺ 흥선 유래 Treg (tTreg)와 Helios⁻ Nrp1⁻ 말초 유래 Treg (pTreg) 세포 (시험관 내 배양조건에서 생성된 경우 "iTreg"라고 불림)를 구별하기 위하여 IKAROS 계열 전사인자 Helios 및 Neuropilin 1 (Nrp1)의 발현을 관찰하였다 (J. M. Weiss *et al.*, The Journal of experimental medicine 209:1723-1742, 2012; E. M. Shevach *et al.*, Immunological reviews 259:88-102, 2014; J. P. Edwards *et al.*, The Journal of Immunology 193:2843-2849, 2014).
- [237] 그 결과, *B. bifidum*이 콜로니제이션된 cLP에서는 Nrp1⁺ tTreg 세포가 약간 증가하였으나, 모든 기관에서 Nrp1⁻ 및 Helios^{lo} pTreg 세포가 훨씬 많이 증가하였다 (도 1D-F 및 도 4A-C). 또한, 새로 생성된 pTreg 세포의 상당 부분이 전사인자 ROR γ t를 발현했으며 (도 1G 및 도 4D), 이는 미생물과의 상호작용에 의해 상향 조절된다 (B. Yang *et al.*, Mucosal immunology 9:444-457, 2016; E. Sefik *et al.*, Science 349:993-997, 2015).
- [238] 다음으로, Bb의 콜로니제이션에 의해 유도된 Treg 세포의 증가는 이미 존재하는 Treg 세포의 확장이 아닌, 말초 조직의 나이브 CD4⁺ T 세포로부터 새롭게 생성된 것임을 확인하기 위해, 입양전달 실험을 하였다. *B. bifidum*으로 유도된 Treg 세포의 말초 기원을 Foxp3^{GFP} 마우스로부터 분류된 allelically-marked 나이브 CD4⁺CD45.1⁺Foxp3⁻CD62L^{hi}CD44^{lo} T 세포를 *B. bifidum*으로 모노 콜로니제이션된 GF 마우스에 입양 전달하여 확인하였다 (도 5A).
- [239] 3주 후 공여체 세포 분석 결과, *B. bifidum*으로 콜로니제이션된 GF 마우스의 장 (cLP)에서 공여체 세포중 Foxp3⁺ Treg 세포의 상당 부분이 나타났다 (도 4A-D). *B. bifidum* 3주 투여 SPF 마우스에서 pTreg 세포의 유도가 유사하게 증가하였다 (도 5E). 이러한 결과는 *B. bifidum*의 투여가 주로 결장의 나이브 CD4 T 세포로부터 iTreg를 새롭게 생성할 수 있음을 나타낸다.
- [240]

- [241] 실시예 4: pTreg 세포의 TCR 특이성을 분석
- [242] *B. bifidum*의 존재하에서 생성된 pTreg 세포의 TCR 특이성을 분석하였다. *B. bifidum*의 콜로니제이션이 식이항원에 pTreg 세포를 촉진하는지, 즉 *B. bifidum*의 콜로니제이션이 식이항원 반응성 iTreg 세포의 생성을 증가시킬 수 있는지를 테스트하였다. OVA 특이 TCR-형질전환 OT-II 마우스의 CTV 표지된 나이브 CD4⁺Thy1.1⁺Foxp3⁻ T 세포를 GF 마우스로 입양전달한 다음, 마우스를 Bb로 콜로니제이션하거나 콜로니제이션하지 않고 방치한 후 경구 OVA 단백질을 공급하였다. 즉, OT-II.Thy1.1⁺Foxp3^{GFP} 마우스의 CTV-표지된 OVA-특이적 나이브 CD4⁺ 세포를 OVA 단백질을 투여한 정상 또는 *B. bifidum* 콜로니제이션 GF 마우스로 입양 전달하였다 (도 7A).
- [243] 그 결과, 이전에 관찰된 바와 같이 (K. S. Kim *et al.*, Science 351:858-863, 2016) 정상 GF 숙주에서 확장된 OT-II 세포의 작은 분획은 siLP 및 cLP에서 Foxp3을 상향 조절하였다 (도 6A 및 B). 즉, GF-OVA 식이 마우스와 비교하여, Bb 콜로니제이션 마우스는 주로 cLP에서 Thy1.1⁺OT-II 특이 Foxp3⁺ Treg 세포 및 숙주 유래 Treg 세포의 유의한 증가를 보였다. 특히, *bifidum* 콜로니제이션 GF 마우스에서 공여체 OT-II 세포에 의한 Foxp3의 상향 조절의 효율은 cLP에서는 2~3 배 증가하였으나, siLP와 mLN에서는 변하지 않았다 (도 6B).
- [244]
- [245] 실시예 5: 마이크로비오타에 특이적인 pTreg 세포의 생성
- [246] *B. bifidum*의 콜로니제이션이 마이크로비오타에 특이적인 pTreg 세포의 생성을 촉진하는지 여부를 결정하기 위해, 박테리아 플라젤린 (flagellin)을 인식하는 CBir TCR 유전자 변형 마우스를 사용하였다 (Y. Cong *et al.*, The Journal of Immunology 165:2173-2182, 2000). 나이브 CD4⁺Foxp3⁻ T 세포는 CBir 유전자 변형 마우스로부터 CD45.1⁺Foxp3^{GFP} 배경으로 분류하여 SPF *Rag1*^{-/-} 수혜체로 입양 전달한 다음, mock (PBS) 또는 *B. bifidum*을 5주 동안 격일로 공급하였다 (도 7B).
- [247] 그 결과, CBir T 세포의 대조군 SPF *Rag1*^{-/-} 수혜체 마우스만 점진적인 체중 감소 (도 6C), Treg 세포는 거의 없고 (도 6F) CD4⁺IFN γ 및 ROR γ ⁺Foxp3⁻ T 세포의 비율은 높은 (도 6G 및 도 7C) 두꺼운 점막의 (도 6E) 대장이 길이가 감소하는 (도 6D) 등의 대장염의 현저한 징후를 나타냈다. 병리학의 이러한 다양한 징후는 *B. bifidum* 투여와 함께 CBir T 세포를 주사한 숙주에서는 거의 나타나지 않았다. (도 6C-G 및 도 7C).
- [248]
- [249] 실시예 6: iTreg 세포의 *B. bifidum* 자체에 대한 특이성
- [250] *B. bifidum*에 의해 유도된 pTreg 세포가 *B. bifidum* 자체에 대한 특이성을 갖는지 여부를 시험하기 위해, *B. bifidum*이 콜로니제이션된 GF 마우스의 총 대장 CD4⁺ T 세포를 정상 GF 마우스, *B. bifidum* 또는 *L. paracasei*가 콜로니제이션된 GF 마우스의 배설물 항원으로 전처리한 비장 APC와 공배양한 다음, 3일 후 이들 세포의 T 세포 증식 (CTV 희석)을 분석하였다 (도 7D).

- [251] 그 결과, 대부분의 Treg 세포가 시험관 내 배양조건에서 죽었지만, *B. bifidum*이 콜로니제이션된 GF 마우스의 Foxp3⁺Treg 세포는 *B. bifidum* 항원 처리된 APC로 자극하면 Foxp3 발현 및 증식이 지속되었다 (도 6H 및 도 7E).
- [252] 또한, GF와 *B. bifidum* 모노 콜로니제이션 마우스 사이의 TCR 특이성을 대장, mLN 및 비장으로부터 분류된 Foxp3⁺ Treg 세포의 α 및 β 사슬의 시퀀싱으로 비교하였다.
- [253] 그 결과, 두 Treg 세포가 α 및 β 사슬에서 유사한 패턴의 다양성을 보였지만 (도 8A) *B. bifidum* 콜로니제이션 마우스의 대장 Treg 세포는 GF 대조군에 존재하지 않는 별개의 TCR 패턴을 보였다 (도 6I 및 도 8A-D). 종합적으로, 이러한 결과는 *B. bifidum*이 식이 항원 및 / 또는 공생 미생물 및 *B. bifidum* 자체에 대한 광범위한 TCR 특이성을 갖는 기능적으로 활성의 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 유도한다는 것을 나타낸다.
- [254]
- [255] 실시예 7: *B. bifidum* 콜로니제이션에 의한 rDCs 유도 및 새로운 pTreg 분화 증진
- [256] *B. bifidum*에 의한 콜로니제이션이 조절 수지상 세포 (rDCs)의 집단을 유도하는지 여부를 조사하였으며, 이는 새로운 pTreg 분화를 향상시킬 수 있다.
- [257] 나이브 T 세포를 iTreg 세포로 분화시키기 위해서는 면역조절 사이토카인 환경이 필요하기 때문에, *B. bifidum*의 콜로니제이션이 결장내 면역관용 환경을 유도하는지를 시험하였다. GF 마우스와 비교하여, Bb가 콜로니제이션된 마우스에서 분리된 cLP-DCs (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺CD103⁺F4/80⁺) 및 결장 전체 세포는 il10, Csf2, Tgf β 1, ido, Ptgs2, Pcdcl 뿐만 아니라 공동 자극분자인 Cd86 및 Cd40와 같은 억제 분자의 mRNA 발현을 현저히 증가시켰다 (도 10A-D). 이는 Bb의 콜로니제이션이 iTreg 세포의 분화를 촉진시키는 조절 수지상 세포 (rDCs)를 유도할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [258] 또한, *B. bifidum*과 함께 분류된 cLP-DC를 10-12 시간 배양한 후 세척하고 준최적의 Treg 유도 조건에서 3일 동안 나이브 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포와 공동 배양하여 생체내 모방 실험을 수행하였다. *B. bifidum*으로 cLP-DC를 전처리한 결과, mock 또는 *L. paracasei* (Lpa) 처리 대조군에 비해 iTreg 세포 및 IL-10 생산의 유도 및 증식이 농도 의존적으로 증가하였다 (도 10E-G).
- [259]
- [260] 실시예 8: *B. bifidum*의 작용분자 확인
- [261] 8-1: *B. bifidum*의 작용분자
- [262] 시험관 내 시스템을 사용하여, iTreg 분화를 촉진하는 *B. bifidum* 유래의 작용분자를 확인하기 위해 광범위한 실험을 수행하였다. *B. bifidum*은 혐기성이며 DC와의 공배양 중 대부분 죽었으므로, Bb의 세포 구성요소 중 일부가 iTreg 유도 활성의 작용분자인지를 테스트하였다.
- [263] 그 결과, 세포벽, 세포막 및 시토솔의 분획물 중에서 세포표면 추출물만이 효과적으로 Treg 세포를 유도하였다. 세포표면 추출물에 RNase, DNase, Pronase

또는 고온에서 끓이는 처리는 Treg 유도 활성을 감소시키지 않았으며, 이는 다당체가 이펙터 분자일 수 있음을 암시하는 것이다. 실제로, 전체 세포표면 다당류 (total cell surface polysaccharides; tCSPS)는 Treg 세포를 농도 의존적으로 유도하였다 (도 11A-B).

[264] tCSPS는 이온 배제 크로마토그래피를 통해 분리되고, 낮은 이온 강도에서 용출된 분획을 depth NMR로 분석하였다.

[265] 그 결과, *B. bifidum*의 세포표면 다당체는 적어도 5가지 종류로 이루어져 있었다 (도 11C); beta-1-6-glucan (18%), beta-1-4-galactan (5%), beta-1-6-galactan (5%), beta-galactofuranan (2%) 및 phospho glycerol-β-galactofuran, PGβG (64%)이 각각 다른 양 (mol/mol)으로 나타났다. PGβG 다당체는 전체 다당체 중에서 가장 풍부한 다당체 (64%)이고, 평균 8000Da로 음전하를 띠며, 나머지 4가지 중성 다당체 (β-1-6-glucan, β-1-4-galactan, β-1-6-galactan 및 β-galactofuranan)는 비슷한 분자량 (평균 ~ 4000Da)으로, 이들은 개별적으로 더 이상 분리되지 않는다.

[266] 그 다음, 중성의 혼합 다당체 또는 PGβG의 다당체 중 어느 것이 시험관 내에서 Treg 세포를 유도하는 활성을 갖는지를 시험하였다. 그 결과, 음전하를 띠는 다당체 (PGβG)가 아닌 중성 다당체만이 Treg 세포를 유도하였다 (도 11D).

[267] 따라서, *B. bifidum* 유래 중성 다당체 혼합물을 "Cell Surface beta-Glucan/Galactan, CSGG"라고 명명하였다.

[268]

[269] 8-2: CSGG의 Treg 유도 확인

[270] CSGG 다당류 중에서 β-1,6-glucanase를 처리하면 농도 의존적으로 CSGG-유도된 iTreg 세포 수준이 감소하기 때문에 세포 표면 β-1-6-glucan (CSβG)이 핵심 작용분자일 수 있다 (도 9A-B 및 도 11E). 더욱이 DC가 없는 상태에서 CSGG와 나이브 CD4⁺ T 세포의 공배양이 iTreg 세포를 유도하는데 실패했기 때문에 CSGG는 DC 의존성을 통해 Treg 세포를 유도하는 것으로 보인다 (도 11F).

[271] 다음으로 CSGG가 *in vitro* 및 *in vivo*에서 Treg 세포를 유도하는 전체 박테리아의 능력을 재현할 수 있는지 여부를 테스트하였다. CSGG 처리된 DCs는 *B. bifidum*으로 처리된 DC를 Foxp3⁺ iTreg 세포를 투여량에 따라 효과적으로 유도하였다 (도 12A). CSGG (100μg/용량)를 3주 동안 3회 GF 마우스에 복강주사한 결과, cLP 및 mLN에서 *B. bifidum*이 콜로니제이션된 마우스와 유사한 수준으로 CD4⁺Foxp3⁺ 및 Nrp1-Roryt⁺ Treg 세포가 유도되었다 (도 9C 및 도 12B-C). 이 Treg 세포는 대조군 GF 마우스의 Treg 세포보다 CD103⁺ 및 활성화된 표현형 CD44^{hi}CD62L^{lo}Foxp3⁺의 비율이 더 높았다 (도 12D). 더욱이, 건강한 공여자의 PBMC 유래의 인간 DCs 및 나이브 CD4 T 세포와 CSGG의 공배양은 농도 의존적으로 CD25⁺Foxp3⁺ Treg 세포를 유도 하였다 (도 9D).

[272]

- [273] 8-3: CSGG 합성 유전자 상동성과 Treg 유도 활성화
- [274] 유산균의 항 알레르기 효과는 균주에 따라 다르며 Th1/Th2 사이토카인 발현 및 균형에 의해 영향을 받는다고 알려진 것과 같이 (Fujiwara D *et al.*, *Int Arch Allergy Immun.* 135(3):205-215, 2004), 프로바이오틱 박테리아의 기능적 활성화는 종 특이적이지 않고 균주 특이적이기 때문에, 모든 *B. bifidum*의 균주가 iTreg 세포를 유도하는 기능을 하는지, 아니면 본 발명의 *B. bifidum* PRI1 균주와 높은 염기 상동성이 있는 균주만이 iTreg 유도 활성을 갖는지 여부를 시험하였다. 본 발명의 *B. bifidum* PRI1 균주 (GenBank accession number; CP018757)의 전체 게놈 시퀀싱을 수행하고 예상되는 CSGG 합성과 관련된 orthologous 유전자와 다른 *B. bifidum*의 게놈과의 염기 상동성 및 Treg 유도 활성을 비교하였다.
- [275] 그 결과, 본 발명의 *B. bifidum* PRI1은 다른 *B. bifidum* 균주와 높은 상동성을 보였다. 특히, A8 균주 (Lopez P *et al.*, *PLOS ONE*, 6(9): e24776, 2011)는 본 발명의 *B. bifidum* PRI1 균주와 유사한 활성을 가지나, CSGG 합성에 관련한 몇몇 orthologous 유전자가 부족하고 Treg 유도 활성이 훨씬 적었다.
- [276]
- [277] 실시예 9: CSGG에 의한 rDC 생성의 메커니즘
- [278] CSGG 처리가 *B. bifidum*이 콜로니제이션된 마우스의 cLP-DC에서 관찰된 것과 같이, 일반적인 DC의 표현형을 조절 DCs (rDCs)로의 변형을 유도하는지를 시험하였다. 즉, CSGG에 의한 rDC 생성의 근본적인 메커니즘을 밝히기 위해 CSGG로 4 시간 처리 한 CD11c⁺ DCs의 RNA-seq 분석을 수행하였다.
- [279] 그 결과, mock 대조군 처리와 비교하여 CSGG 처리는 mRNA 및 단백질에서 *Ifna2*, *Pdcd1*, *Tgfb1*, *Csf2*, *Ptgs2*, *il10* 및 *il27*과 같은 rDC 관련 마커의 수준을 유의하게 향상시켰다 (도 9E 및 도 13A).
- [280] 또한, CSGG 처리는 IL-10 및 TGF- β 의 단백질 수준을 현저하게 증가시키는 반면, IFN- γ 의 수준은 감소시킨다. IL-10과 비교하여, 항-TGF β 중화 항체의 첨가는 *B. bifidum* 또는 CSGG 처리에 의해 유도된 iTreg 생성을 거의 완전하게 차단할 수 있기 때문에 TGF- β 가 중추적인 역할을 한다고 볼 수 있다 (도 13B 및 C). CSGG 처리는 *TLR2* 발현을 선택적으로 증가시켰고 (도 13D), *TLR2*^{-/-} 또는 *Myd88*^{-/-} DCs는 CSGG-매개 iTreg 유도에서 유의한 감소를 보였기 때문에 (도 9F-G 및 도 13E), DC의 다양한 패턴 인식 수용체 중에서 *TLR2* 및 *Myd88*은 CSGG 인식 및 신호 전달에 관여하는 주요 분자일 수 있다. *TLR2* 제거 DC는 배양물에서 TGF β 1 및 IL-10의 감소를 유도하였지만 (도 9G), IFN γ 수준은 변화가 없었다 (도 13F). C형 렉틴 수용체 (CLR)는 CSGG 매개 iTreg 세포 생성에 관여하지 않을 수도 있다 (도 13G 및 H).
- [281]
- [282] 실시예 10: CGGG로 유도된 Treg 세포의 기능
- [283] *in vitro* 및 *in vivo*에서 CGGG로 유도된 Treg 세포의 기능을 조사하였다.
- [284] iTreg 세포는 종종 염증 상태에서 기능적이지 않거나 불안정하기 때문에,

- CSGG 처리에 의해 유도되어 시험관 내에서 생성된 iTreg 세포의 면역 억제 활성을 시험하였다. CD45.1+CD4+Foxp3⁻ 나이브 T 세포는 mock 또는 CSGG 처리한 DCs와 2일 동안 배양한 다음, 세포를 분류하여 CD45.1+CD4+Foxp3⁺ iTregs를 정제하였다. CTV로 표지된 반응자 CD45.2+CD4+Foxp3⁻ T 세포를 CD45.1+ Treg 세포와 상이한 비율로 공배양 한 다음, 증식을 FACS로 분석하였다.
- [285] 그 결과, 시험관 내 조건에서, CSGG 처리된 DC의 존재하에 생성되어 분류된 iTreg 세포는 mock 처리된 DC로 배양된 세포에 비해 현저히 향상된 면역 억제능을 나타내었다 (도 15A).
- [286] 생체 내에서 Treg 세포의 억제 활성을 시험하기 위해, 대장염의 T 세포 전달 모델을 사용하였다. 나이브 CD4⁺ T 세포는 분류된 allelically-표지된 (CD45.1⁺) iTreg 세포와 함께 또는 단독으로 *Rag1*^{-/-} 림프구감소증 마우스로 전달하였다 (도 14A).
- [287] 그 결과, mock 유도된 iTreg의 공동 주입은 효과가 없었고, 대장염 징후를 억제하지 못하였다. 나이브 T 세포 단독 투여한 수여 마우스도 3주 만에 대장염과 체중 감소의 심각한 징후를 보였다. 그러나, 대조적으로 *B. bifidum* 또는 CSGG에 의해 유도된 iTreg 세포의 전달은 대장염 발달 및 체중 감소를 유의하게 감소시켰다 (도 14A-D 및 도 15B).
- [288]
- [289] 실시예 11: CSGG 투여에 의한 대장염 발달 억제
- [290] CSGG 자체의 투여가 대장염 발달을 억제할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, CD45.1+Foxp3^{GFP} 마우스로부터 분류된 나이브 CD4+Foxp3⁻ T 세포를 SPF *Rag1*^{-/-} 숙주 마우스로 입양전달한 다음, 실험 종료시까지 일주일에 3번 PBS 또는 CSGG (100 μ g/dose)를 복강내 투여하였다.
- [291] 그 결과, 나이브 T 세포를 전달한 후 PBS 처리한 수여 마우스는 심한 대장염이 발생하였으나, CSGG 투여 마우스는 체중 감소 및 조직병리학적으로 분석한 대장염 진행이 유의하게 감소하였다 (도 14E-G 및 도 15C). CSGG 처리의 보호 효과는 전체 Foxp3⁺Treg 세포의 증가 및 IFN- γ 생성 작용 T 세포의 빈도 감소와 관련이 있다 (도 14H 및 도 15C). 이 결과는 CSGG 처리에 의해 유도되는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포가 염증성 대장염의 진행을 억제할 수 있음을 시사한다.
- [292]
- [293] [수탁번호]
- [294] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [295] 수탁번호 : KCTC13270BP
- [296] 수탁일자 : 20170519
- [297]
- 산업상 이용가능성**
- [298] 본 발명의 다당체 예를 들어, 베타 글루칸/갈락탄 다당체 (cell surface beta

glucan/galactan polysaccharide; CSGG) 및 이를 생성하는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC13270BP)은 다양한 항원에 의해 Treg 세포의 유도가 가능하므로, 상기 균주, 상기 CSGG 다당체 또는 상기 유도된 Treg 세포는 면역 질환 또는 염증성 질환 예방 또는 치료에 유용하다.

[299]

[300] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[301]

서열목록 Free Text

[302] 전자파일 첨부하였음.

[303]

특허출원상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약
국제 규격

7.1조에 따른 국제 규격의

원기탁 증명서

대한민국 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 포항공과대학교 임신혁 귀하

I. 미생물의 동정	
기탁자로부터 받은 학명 정보: <i>Bifidobacterium bifidum</i> PR11	국제 기탁기관에 수여된 기탁번호: KCTC 13270BP
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치 상기 I항에 표시된 미생물은 하기의 서류와 같이 제출되었음: [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치 (적절한 위치에 ×표 하시오.)	
III. 접수 및 수리 본 국제 수탁기관은 상기 I항목에 표시된 미생물을 2017년 05월 19일자로 접수하였음.	
IV. 전환 청구의 접수 상기 I항에 표시된 미생물은 본 국제수탁기관에 의해 접수되었으며, 원기탁을 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 전환하는 청구를 접수하였음.	
V. 국제 수탁 기관	
명칭: 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture) 주소: 대한민국 56212 전라북도 정읍시 입선길 181 한국 생명공학연구원(KRIBB)	국제 수탁기관의 대표자 서명 김차영 2017년 06월 07일

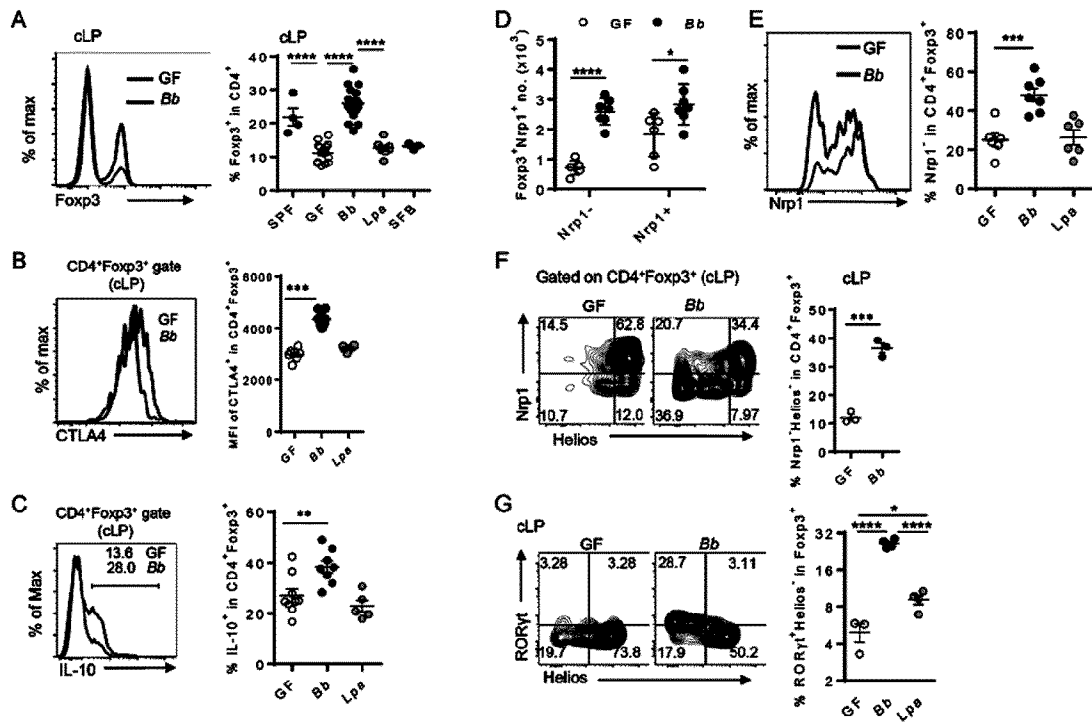
서식 BP/4

청구범위

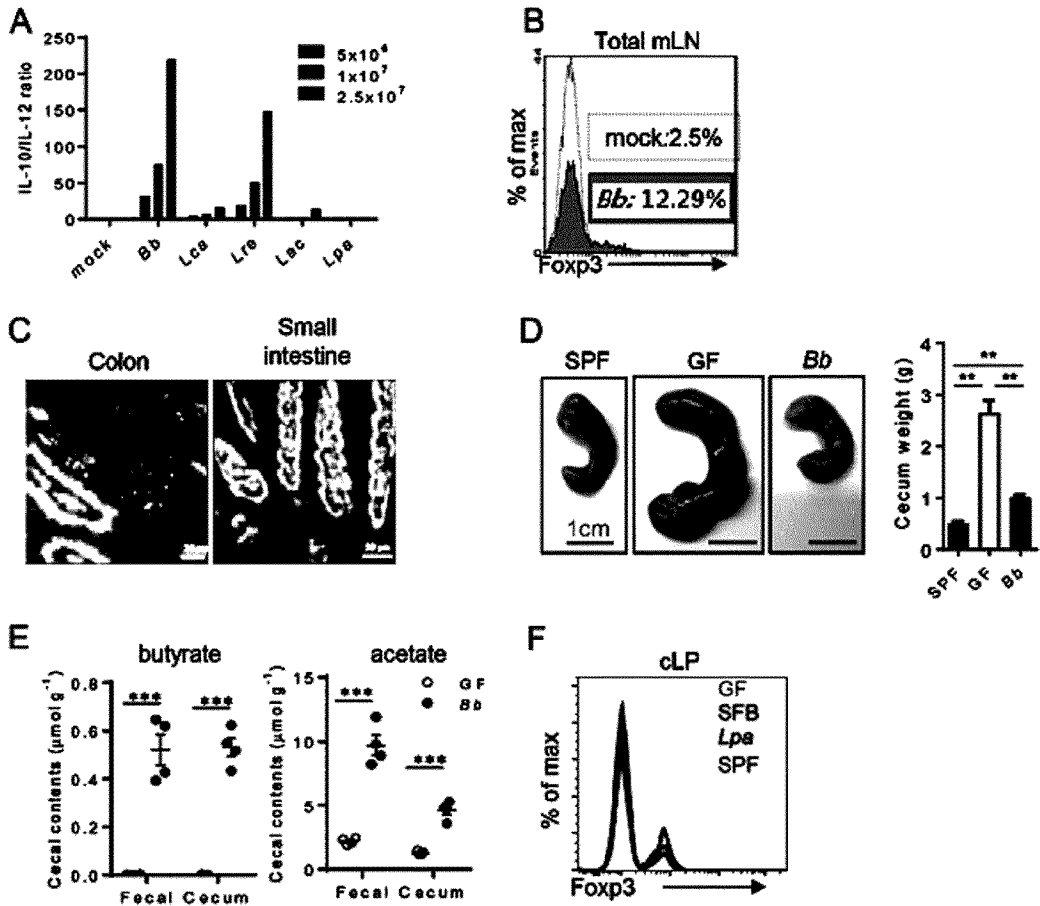
- [청구항 1] β -1-6-glucan을 유효성분으로 함유하는 다당체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 또는 β -galactofuranan을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 β -1-6-glucan, β -1-4-galactan, β -1-6-galactan 및 β -galactofuranan의 함량비 (몰비)는 5~50: 2~15: 2~15: 1~5인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 다당체는 분자량이 3~5kDa 또는 100kDa 이하의 혼합물인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 다당체의 전하는 중성인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 다당체는 조절 T 세포(Treg)를 유도하는 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, *Bifidobacterium bifidum* 유래인 것을 특징으로 하는 다당체.
- [청구항 9] β -1-6-glucan을 생산하는 프로바이오틱 균주.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 프로바이오틱 균주는 *Bifidobacterium bifidum*인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 균주는 *Bifidobacterium bifidum* PRI1 (KCTC 13270BP) 또는 상기 *Bifidobacterium bifidum* PRI1과 염기서열 상동성이 99% 이상인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 14] 제1항의 다당체 또는 제9항의 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 제1항의 다당체 또는 제9항의 균주를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품.
- [청구항 16] 다음 단계를 포함하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법:
 (a) 수지상 세포 (DC; Dendritic cell)에 제1항의 다당체 또는 제9항의 균주를 처리하여 조절 수지상 세포 (rDC)를 획득하는 단계; 및
 (b) 상기 rDC를 CD4⁺ T 세포와 공배양하여 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 단계.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 조절 T 세포 (Treg)는 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포인 것을 특징으로 하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법.

- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 (b) 단계는 항-CD3 항체, IL-2 및 TGF- β 로 자극하여 조절 T 세포 (Treg)를 유도하는 것을 특징으로 하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 수지상 세포 및 CD4⁺ T 세포는 말초혈액 단핵세포 (PBMCs) 유래인 것을 특징으로 하는 유도 조절 T 세포 (iTreg)의 제조방법.
- [청구항 20] 제16항의 제조방법으로 제조된 유도 조절 T 세포 (iTreg)를 유효성분으로 함유하는 면역 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제.

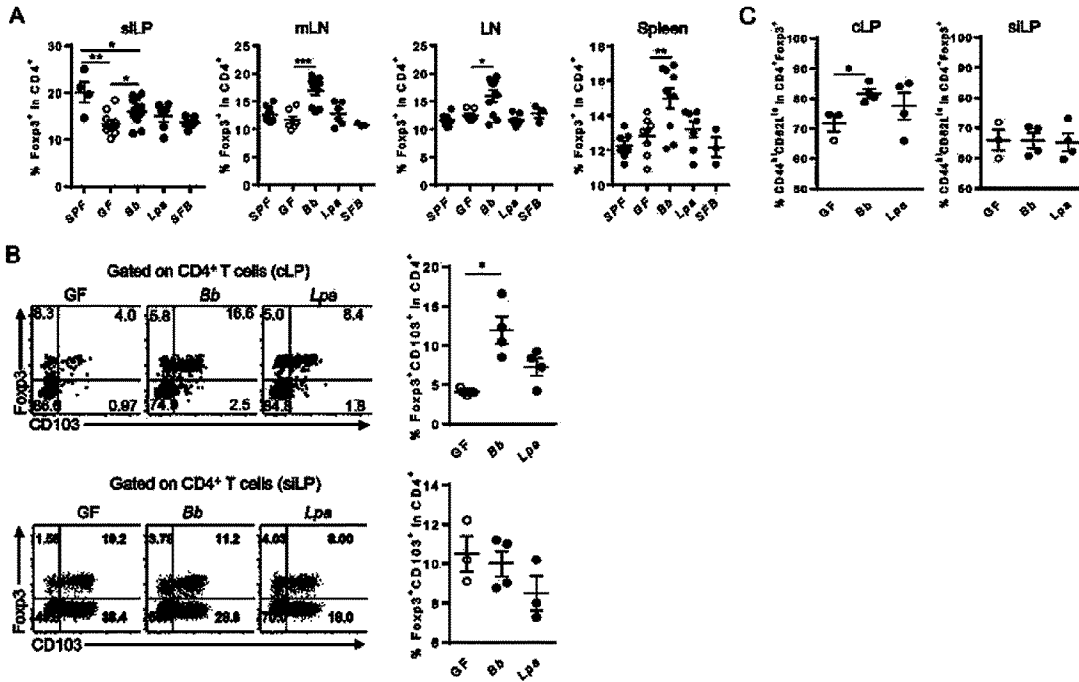
[도1]



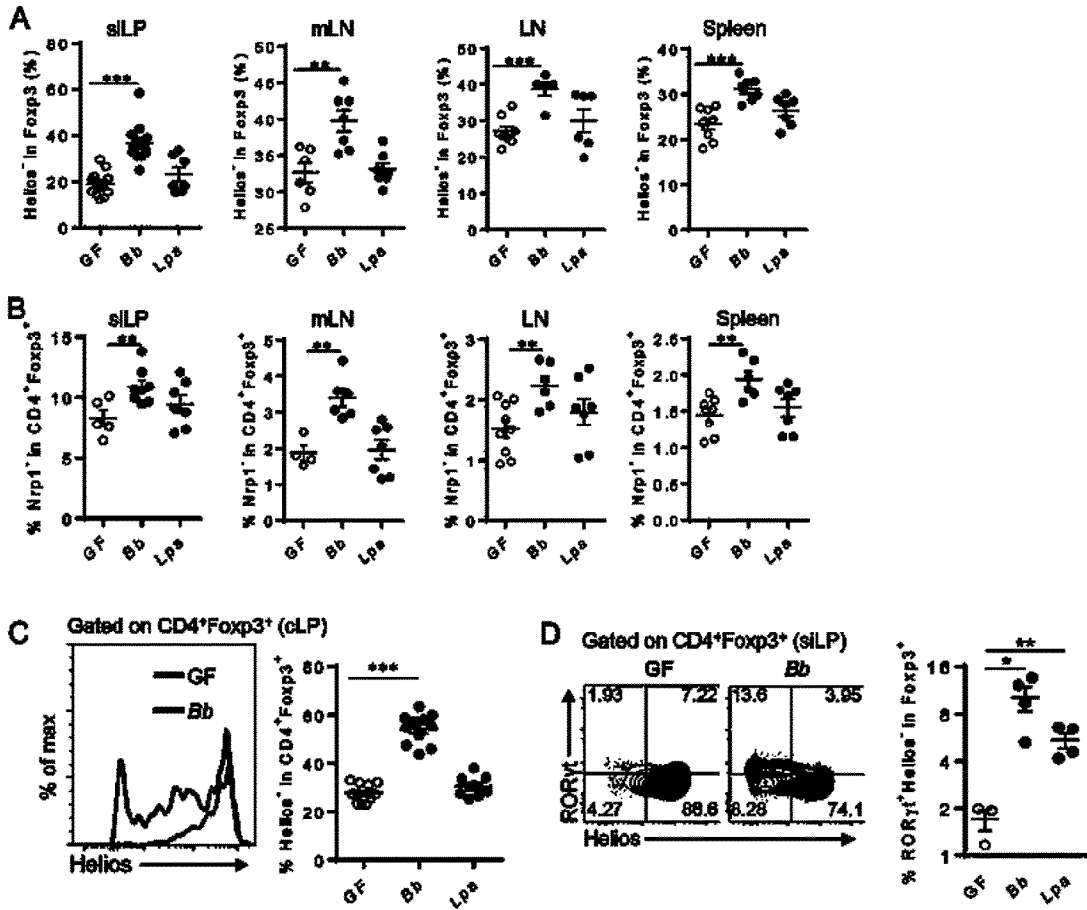
[도2]



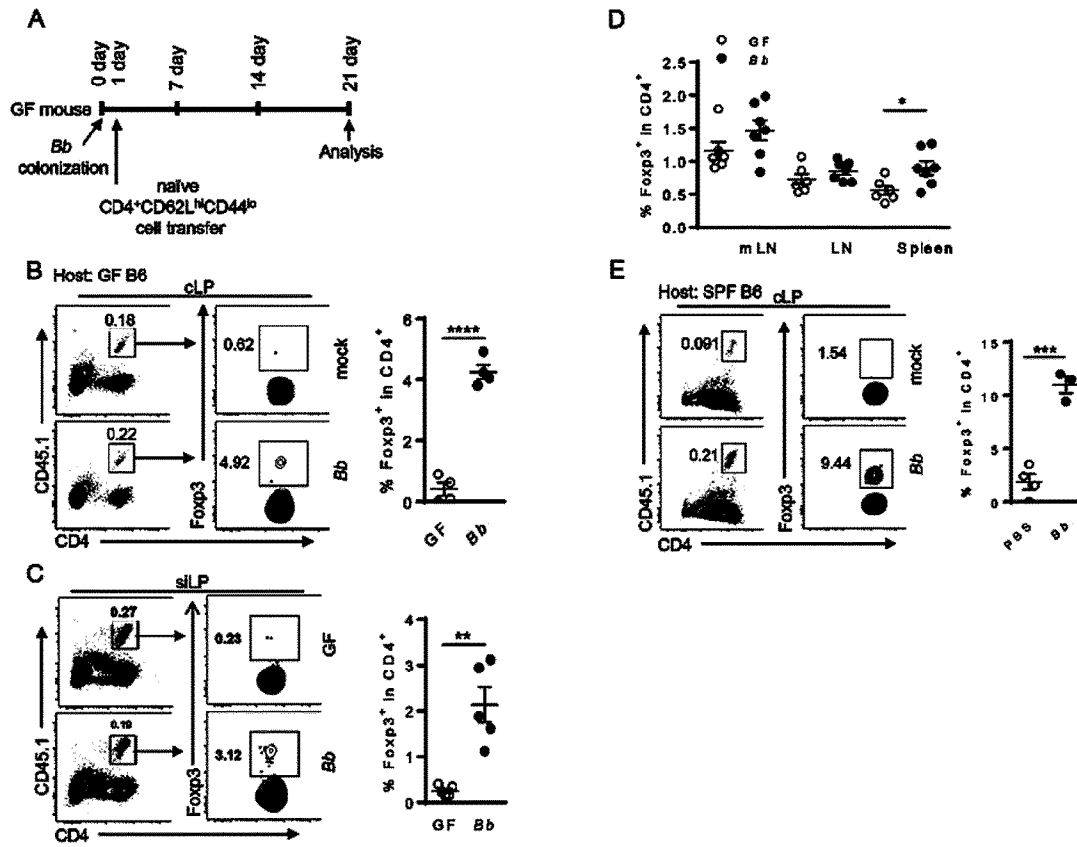
[도3]



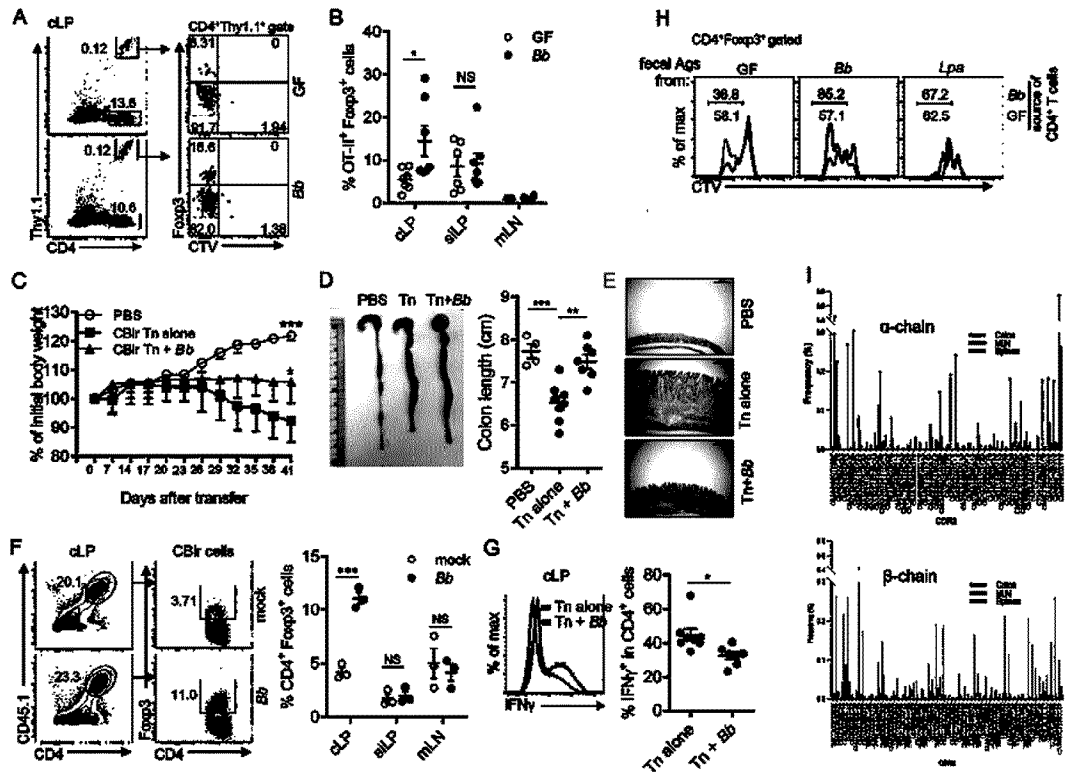
[도4]



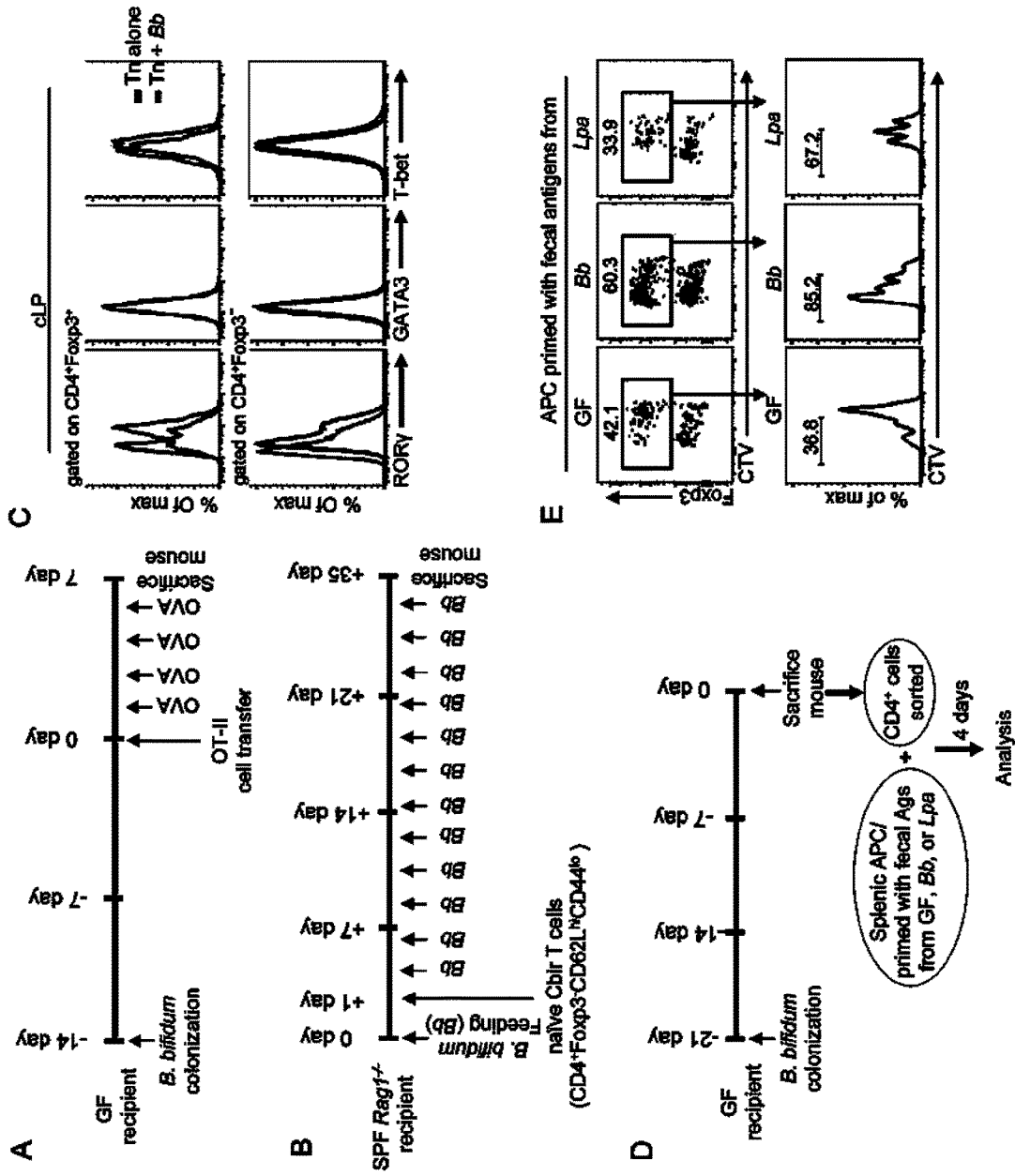
[도5]



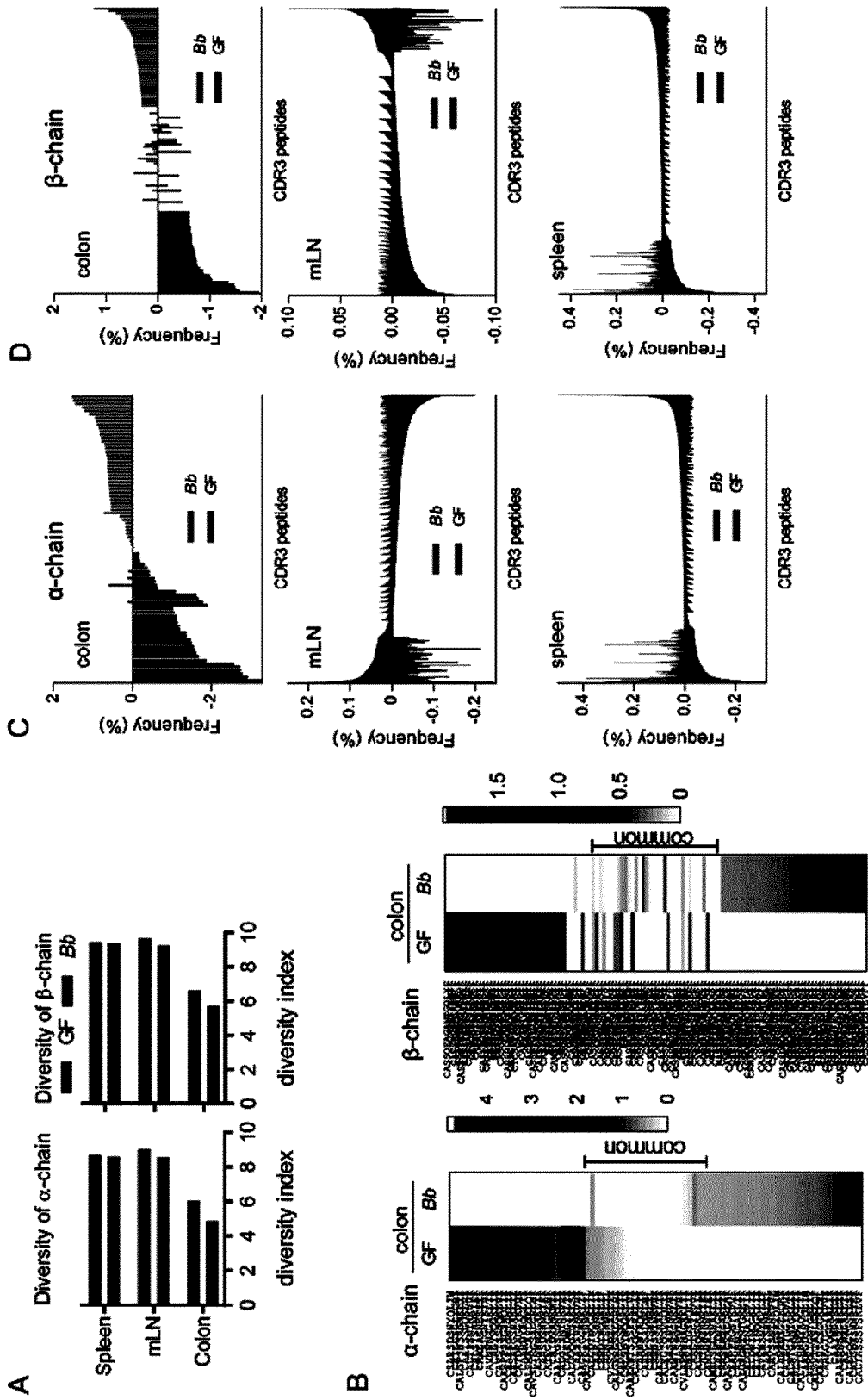
[도6]



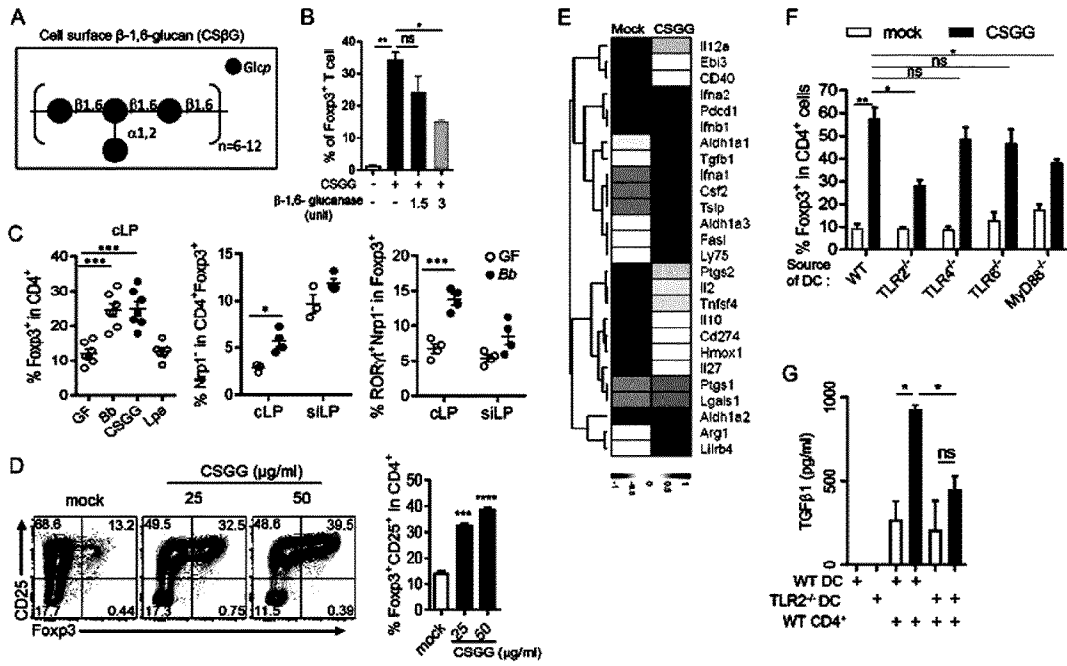
[도7]



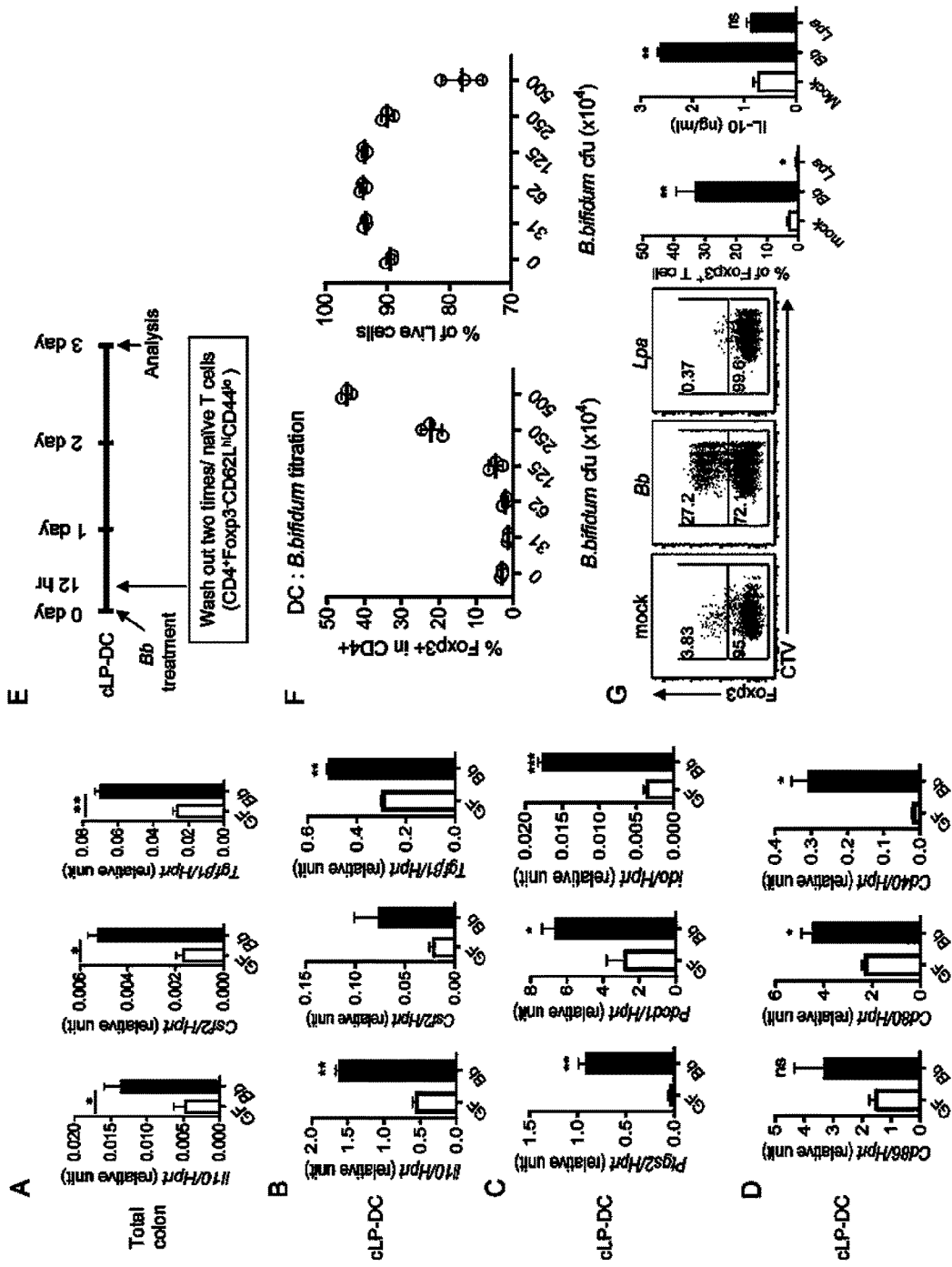
[도8]



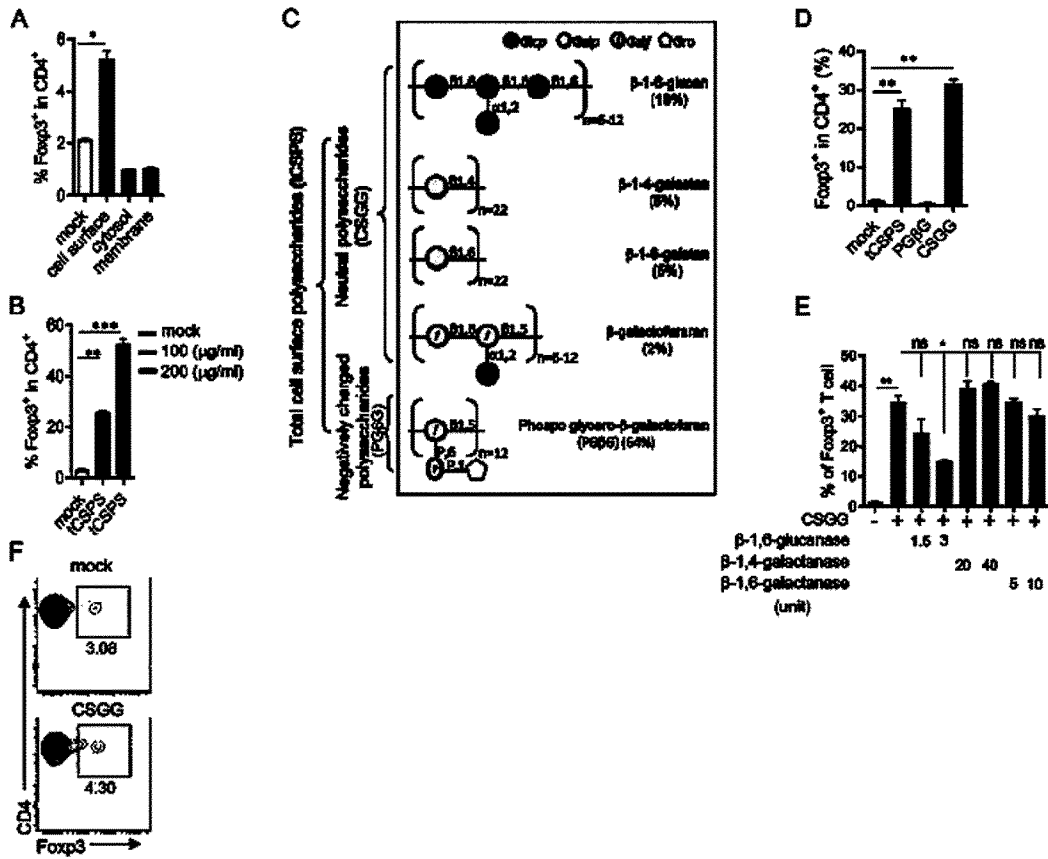
[도9]



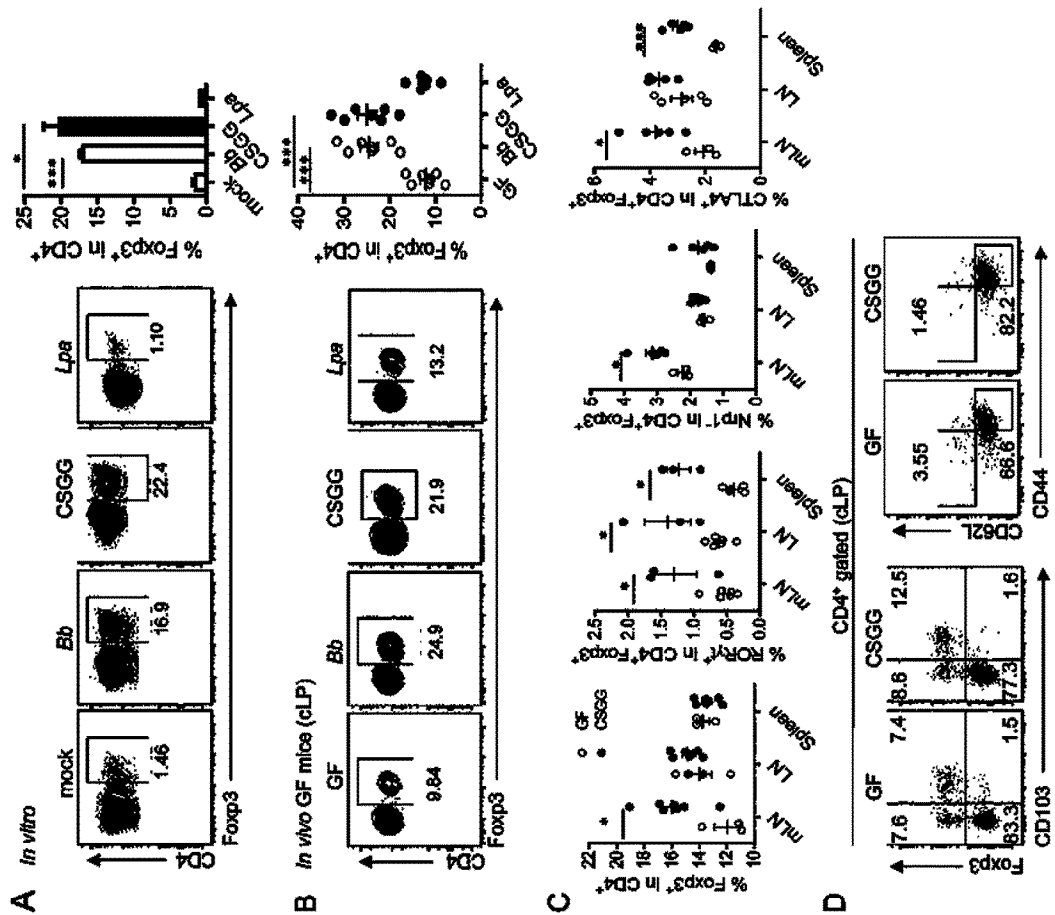
[도10]



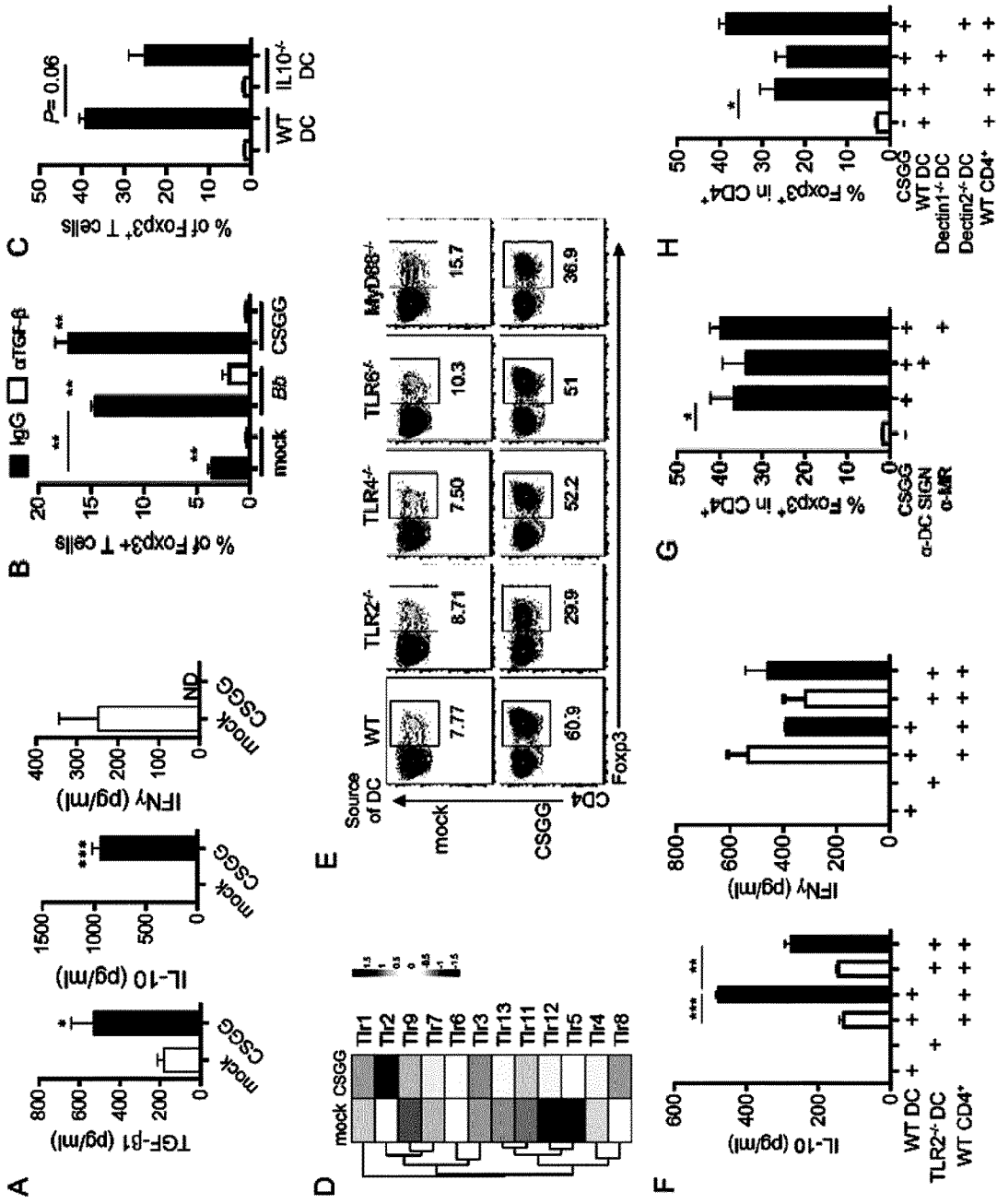
[도11]



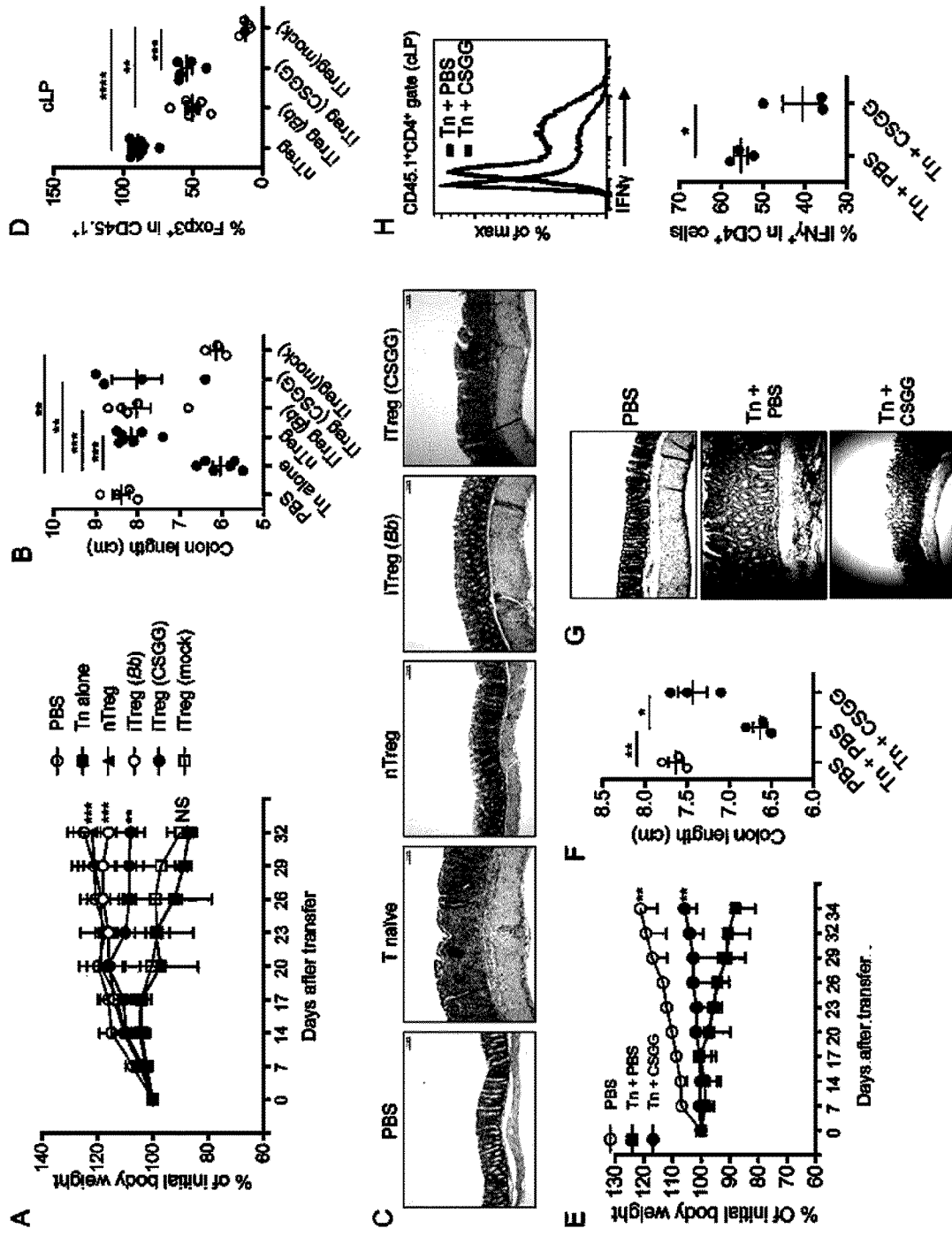
[도12]



[13]

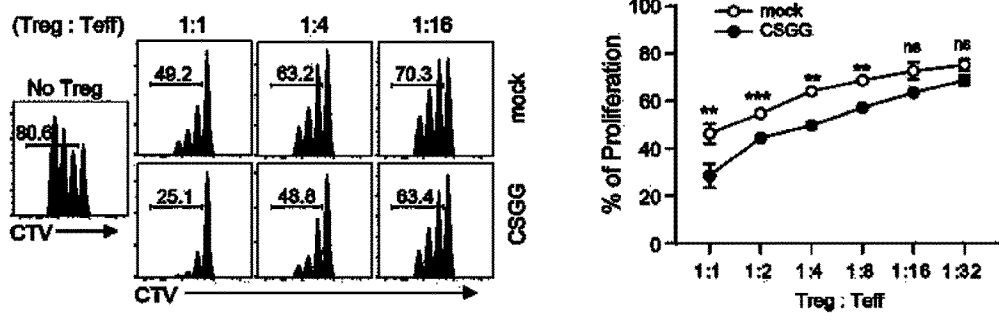


[도 14]

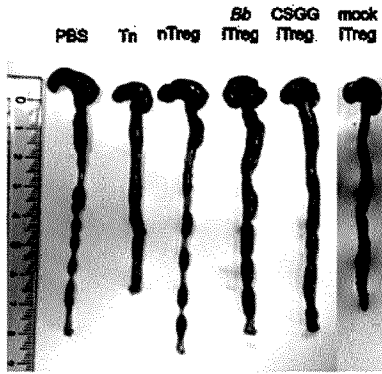


[도 15]

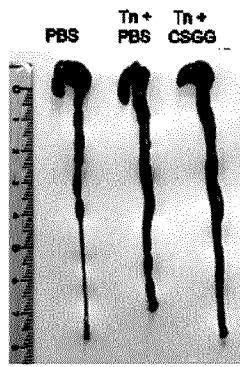
A



B



C



D

