(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월03일
(11) 등록번호 10-2186420
(24) 등록일자 2020년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2015.01) *A23L 33/135* (2016.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 27/14* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0129443
(22) 출원일자 2019년10월17일
심사청구일자 2019년10월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170041338 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
경기대학교 산학협력단
경기도 수원시 영통구 광교산로 154-42 (이의동, 경기대학교)
(72) 발명자
김태성
서울특별시 중랑구 신내로21길 16, 512동 1203호 (묵동, 신내두산대림아파트)
이종훈
서울특별시 강남구 논현로 213, 101동 1005호 (도곡동, 역삼럭키아파트)
송지선
강원도 원주시 모란1길 51, 106동 1203호(단계동, 단계이안아파트)
(74) 대리인
이명진

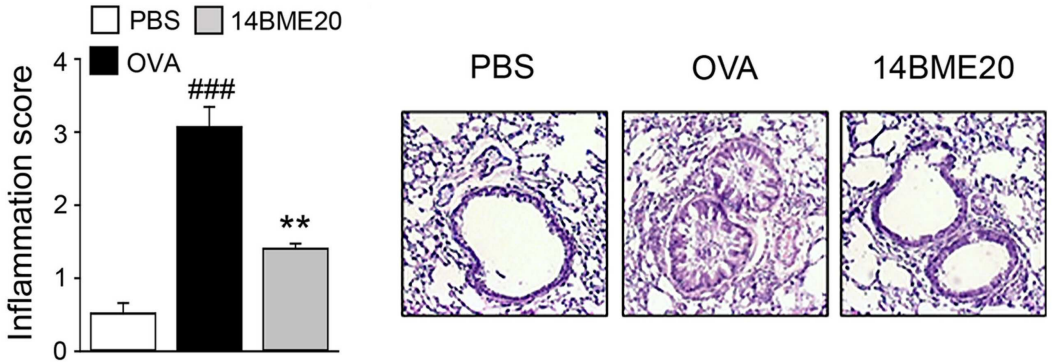
전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **스타필로코커스 석시너스 14BME20 균주를 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*) 14BME20 균주를 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 균주가 알레르기 질환의 발병에 관여하는 T 세포의 면역 반응을 조절한다는 발견에 기초한 것이다. 본 발명에 따른 *S. succinus* 14BME20 균주를 알레르기 질환의 일종인 천식이 유도된 동물에 투여하는 경우, 천식의 증상에 관여하는 T_h2 세포 반응을 감소시키고, 기도 관용을 유발하는 T_{reg} 세포의 분화를 증가시킴으로써 알레르기성 천식을 예방하고 치료하는 효과가 있으므로, 다양한 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 증상 개선용 식품 조성물, 및 화장료 조성물 등으로 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61P 11/06 (2018.01)
A61P 27/14 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/304 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711087849
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구
연구과제명 ARS-interacting multifunction protein 1의 T 세포 분화 및 발달에서 직접적 역할 및 작용 기전 비교 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 조절 T 세포로의 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)로의 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IgE(Immunoglobulin E)의 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 T_h2-관련 사이토카인의 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 아나필락시스(anaphylaxis), 식품 알레르기, 세균 알레르기, 진균 알레르기 바이러스 알레르기, 및 약물 알레르기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 알레르기성 천식인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 균주는 메주 또는 된장으로부터 분리된 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 균주는 생균 또는 사균인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 조절 T 세포로의 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 조성물은 IgE(Immunoglobulin E)의 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 아나필락시스(anaphylaxis), 식품 알레르기, 세균 알레르기, 진균 알레르기 바이러스 알레르기, 및 약물 알레르기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 알레르기성 천식인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 균주는 메주 또는 된장으로부터 분리된 것인, 식품 조성물.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 균주는 생균 또는 사균인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 식품은 건강기능성 식품인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 한국의 전통발효식품인 된장에서 분리된 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*) 14BME20 균주를 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 부작용이 적고, 간편한 경구투여 방식을 통해 전신 면역반응에 영향을 줄 수 있어 다양한 알레르기 질환, 특히 알레르기성 천식의 예방 및 치료제로써 효과적으로 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 알레르기성 천식(Allergic asthma)은 현대 사회에서 지속적으로 증가하고 있는 알레르기성 만성질환으로, 이의 발병에는 항원에 대한 보조 T 세포(Helper T cell), 그 중에서도 특히 T_h2 세포가 상당 부분 관여한다고 알려져 있으며, T_h2 세포 외에도 T_h17 세포, 선천성 림프세포(innate lymphoid cell) 등 다양한 종류의 면역 세포들이 복합적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이처럼 알레르기성 천식은 발병 과정에 다양한 종류의 면역 세포 및 인자들이 관여하기 때문에 질병의 치료를 위해 하나의 타겟을 정하는 것에는 어려움이 따른다. 현재 알레르기 질환의 치료를 위해 사용되는 보편적인 치료제로는 항염증 효과를 지니는 스테로이드 계열의 약물이 있다. 천식의 치료에 사용되는 스테로이드제는 흡입용과 경구용이 있는데, 경구용 스테로이드제는 사용 방법이 간편하다는 이점이 있으나, 전신에 흡수되므로 꾸준히 사용하는 경우 혈압 상승, 골다공증, 위궤양 등과 같은 심각한 부작용이 생길 수 있어 장기간 사용은 좋지 않다. 이와 비교하여 많은 환자들이 사용하는 흡입용 스테로이드제는 전신 흡수가 되지 않아 경구용보다는 부작용이 적지만, 목이 쉬는 부작용이 있을 수 있고, 사용 후 흡입기를 세척해야 하는 부수적인 일이 따르는 등 치료에 어려움이 있다. 나아가 이러한 스테로이드 계열의 치료제가 맞지 않는 환자군도 있다. 따라서 알레르기성 천식에 치료 효과를 보이며 부작용을 최소화 시킬 수 있는 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 프로바이오틱스(probiotics)는 숙주(host)의 건강에 이로운 효과를 내는 미생물 또는 그 성분을 말하며 장 내의 유산균(*Lactobacillus*), 비피더스균 (*Bifidobacterium*)을 포함한다. 프로바이오틱스는 우리 몸의 면역력을 강화시켜주고, 질병이나 독성 물질에 노출되었을 때 우리 몸이 균형을 이루게 도와주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 식품산업에서는 프로바이오틱스가 오랫동안 사용되어 왔는데, 대표적으로 발효된 유제품들을 통해 쉽게 접할 수 있다. 최근에는 다양한 발효식품들로부터 유산균, 비피더스균 등과 같은 다양한 박테리아들이 분리되고 있고, 이러한 박테리아들이 다양한 질병에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있다. 특히, 아직까지 특별한 치료제가 없는 알레르기성 질병에서 유산균들이 새로운 치료제의 후보물질로서 사용될 수 있는지에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 우리나라에서는 대표적인 발효식품인 김치에서 분리한 유산균을 이용하여 T_h2 세포성 면역반응에 미치는 영향, 알레르기성 질병에서 유산균이 미치는 영향 등의 연구가 진행되었다. 예를 들면, 김치에서 분리된 유산균(*Lactobacillus*)은 알레르기성 천식을 예방할 수 있고, 또한 김치에서 얻은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*) FC-K 균주는 T_h1 세포에 영향을 주어 T_h2 세포 매개성 면역 반응을 조절 할 수 있다는 연구가 대표적이다. 이러한 연구들을 통해, 한국의 발효식품에서 분리된 박테리아들은 알레르기 질환으로 인한 다양한 증상을 완화시킬 수 있고, 나아가 치료제로도 작용할 수 있음을 시사하고 있다.

[0005] 한편, 된장은 콩을 발효시켜서 만든 한국의 대표적인 전통 발효식품 중 하나이다. 된장은 숙성된 메주와 고염수를 섞은 후 다시 발효 시킨 것으로서, 다양한 형태의 식재료로 널리 사용되고 있다. 최근 메주와 된장의 발효과

정에 관여하는 다양한 박테리아들이 분리가 되었는데, 그 중 응고효소음성 포도상구균(coagulase-negative *staphylococci*; CNS)이 메주와 된장의 발효 과정에서 산(acid)을 생성하는 박테리아로 규명되었다. 응고효소음성 포도상구균(CNS)은 예전부터 치즈, 건조 소세지 등 다양한 발효식품에서 발견되어 왔다.

[0006] 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*, 이하 '*S. succinus*'라 함) 균주는 응고효소음성 포도상구균에 속하는 박테리아 중 하나로, 많은 발효식품들에서 계속해서 발견되어 왔지만, 한국의 발효식품 중에서는 된장에서 처음으로 분리된 균주이다. 된장에서는 총 14종류의 스타필로코커스 석시너스 균주가 발견되었는데, 그 중 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)는 안정성 및 기능성 테스트를 통해 발효를 위한 잠재적 시작(starter) 배양 후보물질로 선정되었다. 또한 유전자 서열 분석을 통해 잘 알려진 병원균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이 가지고 있는 독성 인자가 *S. succinus* 14BME20 균주에는 존재하지 않는 것이 확인되었다. 따라서 *S. succinus* 14BME20 균주는 식품의 발효에 효과적으로 관여하는 종균으로 그 안전성이 보장되어 있다. 다양한 발효식품에서 분리된 박테리아가 염증의 완화 및 아토피성 피부염과 같은 알레르기 질환의 완화에 도움이 된다는 연구들이 활발히 진행되고 있는 가운데, 실제 된장의 발효에 주요하게 작용하는 것으로 보이는 응고효소음성 포도상구균 중 하나인 *S. succinus* 14BME20 균주는, 김치에서 분리된 유산균처럼, 알레르기성 천식을 포함한 알레르기 질환의 새로운 치료제로서 연구가치가 높은 균주이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-1919756 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명자들은 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*, 이하 '*S. succinus*'라 함) 14BME20 균주가 알레르기 질환을 효과적으로 예방하고, 알레르기 질환에 따른 증상을 개선하며, 알레르기 질환의 치료제로서 사용될 수 있음을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명의 목적은 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*, 이하 '*S. succinus*'라 함) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P) 를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구체예로, 상기 조성물은 조절 T 세포로의 분화를 유도하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구체예로, 상기 조성물은 미성숙 수지상세포를 면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)로 분화를 유도하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 조성물은 IgE(Immunoglobulin E)의 생성을 억제시키는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 조성물은 T_h2-관련 사이토카인의 생성을 억제시키는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구체예로, 상기 알레르기 질환은 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 아나필락시스(anaphylaxis), 식품 알레르기, 세균 알레르기, 진균 알레르기 바이러스 알레르기, 및 약물 알레르기로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으며, 바람직하게는 알레르기성 천식일 수 있으나, 외부로부터 들어온 물질에 대한 신체 면역계의 과도한 반응으로 유발되는 질환이라면 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 균주는 메주 또는 된장으로부터 분리된 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 균주는 생균 또는 사균인 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 조성물은 식품 조성물, 또는 화장료 조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 알레르기 질환의 예방 또는 개선 목적의 조성물이라면, 그 종류에는 제한이 없다. 또한, 상기 식품은 건강기능성 식품을 포함한다.

[0026] 또한, 본 발명은 스타필로코커스 석시너스(Staphylococcus succinus) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 스타필로코커스 석시너스(Staphylococcus succinus) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 스타필로코커스 석시너스(Staphylococcus succinus) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)의 알레르기 질환에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*, 이하 '*S. succinus*'라 함) 14BME20 균주를 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 *S. succinus* 14BME20 균주는 경구로 투여하면 알레르기 질환의 발병에 큰 영향을 미치는 T 세포의 활성에 변화를 유도하여, 증상을 효과적으로 완화시킬 수 있으며, 천식을 비롯한 다양한 알레르기 질환의 치료제로서 활용될 수 있다. 특히, 천식에서는 전신에 흡수되지 않는 흡입용 스테로이드제를 표준적으로 치료에 사용하여 부작용의 위험성을 낮춘다. 하지만 본 발명에서 사용된 *S. succinus* 14BME20 균주는 한국에서 자주 섭취하는 발효식품으로부터 분리되었으며, 항생제 내성이 나타나지 않고, 독성인자도 존재하지 않는 것으로 밝혀져 안전성이 높다. 또한 식품에서 분리된 균주이므로 경구용으로 투여해 전신에 흡수되어도 부작용 가능성이 극히 낮으므로 새로운 치료제로서 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a 내지 도 1f는 *S. succinus* 14BME20 균주의 알레르기성 기도 염증 효과를 나타낸 도면으로서, 도 1a 기도 과민성 측정 결과를, 도 1b 및 도 1e는 염증성 세포의 상대적 수를, 도 1c 및 도 1f는 기관지폐포세척액에서 전체 세포의 수와 T_h2 관련 사이토카인의 농도를, 도 1d는 혈청에서 면역글로불린의 수치를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2e는 *S. succinus* 14BME20 균주의 천식 발병 억제 효과와 T_h2 면역 반응의 관계를 나타낸 도면으로서, 도 2a 및 도 2b는 종격림프절(Mediastinal lymph nodes)에서, 도 2c는 폐에서, 도 2d 및 도 2e는 비장(spleen)에서 $CD4^+$ T 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 *S. succinus* 14BME20 균주의 T_{reg} 세포 비율 증가 효과를 나타낸 도면으로서, 도 3a는 종격림프절에서, 도 3b는 장간막림프절(Mesenteric lymph nodes)에서, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 세포의 비율 및 IL-10의 생성량을 나타낸 것이다.

도 4a 및 도 4b는 *S. succinus* 14BME20 균주의 면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)의 생성 효과를 나타낸 도면으로서, 각각 면역관용 수지상세포의 표면분자 및 사이토카인의 발현 정도를 나타낸 것이다.

도 5a 및 도 5b는 *S. succinus* 14BME20 균주에 의한 T_{reg} 세포 분화를 확인한 도면으로서, $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T 세포의 비율 및 IL-10의 생성량을 나타낸 것이다.

도 6은 *S. succinus* 14BME20 균주에 의한 T_{reg} 세포 분화의 매개체를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이에 본 명세서에서는 알레르기 질환에 관여하는 T 세포의 면역 반응을 조절하는 물질로써 스타필로코커스 석시너스(*Staphylococcus succinus*, 이하 '*S. succinus*'라 함) 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P)의 작용을 개시한다.

[0034] 상기 *S. succinus* 14BME20 균주는 본 발명자의 선행 등록특허 제10-1919756호에서 개시된 균주로서, 한국미생물보존센터에 2016년 10월 25일자로 기탁되어, 기탁번호 KCCM11920P를 부여받은 균주와 동일한 균주이다.

[0035] 천식의 발병은 기도과민성, 혈장 내의 많은 IgE 양, 그리고 폐와 기도로 유입되는 면역세포의 수 증가로 알 수 있으며, 이러한 특징들은 모두 T_h2 세포 분화와 관련되어 있다. 또한 조절 T 세포(regulatory T cells, 이하 'T_{reg} 세포'라 함)는 다른 종류의 T 세포의 분화를 억제하여 기도 염증을 감소시키고, 기도 관용을 유발하는 것으로 정의된다. 이에 본 발명자들은 *S. succinus* 14BME20 균주가 천식 증상에 관여하는 T_h2 세포 반응을 감소시키고, 기도 관용을 유발하는 T_{reg} 세포의 분화를 증가시키며, 이러한 효과는 *S. succinus* 14BME20 균주가 수지상세포를 통해 T_{reg} 세포의 분화를 유도함으로써 나타난다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는, *S. succinus* 14BME20 균주가 경구로 투여된 천식 발병 생쥐는 기도과민성, 폐로 유입된 면역세포의 수, 기관지폐포세척액에서 IL-4(Interleukin 4), IL-13, 및 IL-5의 생산이 감소되고, 혈청에서 T_h2 반응에 관련된 IgE, OVA-특이성 IgE, 및 OVA-특이성 IgG1의 수치가 감소함을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0037] 본 발명의 다른 실시예에서는, *S. succinus* 14BME20 균주가 경구투여된 천식 발병 생쥐의 종격림프절에서 T_h2세포의 비율이 감소하고, IL-4, IL-13, 및 IL-5의 생성도 역시 감소함을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여한 마우스의 종격림프절과 장관막림프절에서 모두 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T 세포의 비율과 IL-10의 생성이 증가함을 보여, *S. succinus* 14BME20 균주가 생체내에서 T_{reg} 세포로의 분화를 유도하여 천식 증상이 완화되는 것임을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, *S. succinus* 14BME20 균주가 면역관용 수지상세포로의 분화를 유도하며, 이렇게 분화된 면역관용 수지상세포는 T_{reg} 세포의 분화를 촉진시키고, 이는 면역관용 수지상세포에서 분비되는 IL-10을 매개체로 하는 것임을 확인하여, 상기와 같은 일련의 유도 작용을 통해 알레르기성 천식의 발병이 완화되는 것임을 증명하였다(실시예 5 내지 7 참조).

[0040] 따라서 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0041] 이에, 본 발명은 *S. succinus* 14BME20 균주(기탁번호: KCCM11920P) 를 유효성분으로 포함하는, 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 화장료 조성물 등을 제공할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 알레르기 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 조성물은 알레르기 질환의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 알레르기 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 용어, "유효성분으로 포함하는"이란, 상기의 *S. succinus* 14BME20 균주의 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주는 식품, 바람직하

게는 메주나 된장으로부터 분리한 미생물 균주이므로, 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없어 상기 균주가 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 조절 T 세포로의 분화를 유도할 수 있다. 상기 조절 T 세포 유도는 하기 실시 예에서 입증한 바와 같이 조절 T 세포 전사인자인 Foxp3 발현 증가 및 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T 세포 비율의 증가에 의하여 확인할 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 조성물은 면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)로의 분화를 유도할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 사용하는 용어, "면역관용"이란 특정 항원에 대하여 면역 반응을 나타내지 않는 상태를 의미한다. 본 명세서에 있어서, "면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)"는 자가 항원에 대한 관용을 유도하고 T 세포의 증식을 억제하는 수지상세포를 의미한다.

[0049] 또한 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 IgE(Immunoglobulin E)의 생성을 억제시킬 수 있다.

[0050] 상기 IgE는 비만 세포와 호염기구 표면에 있는 Fc 수용체에 결합하여 IgE 매개 알레르기 반응을 개시시키는 물질로써, 본 발명에 따른 조성물을 경구투여 할 경우 IgE의 발현을 억제시켜 세포 내의 염증 반응을 억제하므로, 본 발명에 따른 조성물은 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 또한 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 T_h2-관련 사이토카인의 생성을 억제시킬 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 사용되는 용어, "T_h2 세포"는 유전자 발현, 단백질 분비 및 기능적 활성 측면에서 특정되는 도움 T 세포 림프구의 서브세트를 의미한다. 예컨대, T_h2 세포는 IL-4, IL-5 및 IL-13 사이토카인(T_h2-관련 사이토카인) 발현 패턴을 나타내며, T_h2 세포는 체액성 면역반응에 관여한다.

[0053] 따라서 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주는 알레르기 질환을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있다. 상기 알레르기 질환에는 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 아나필락시스(anaphylaxis), 식품 알레르기, 세균 알레르기, 진균 알레르기 바이러스 알레르기, 및 약물 알레르기 등이 포함되며, 바람직하게는 알레르기성 천식일 수 있으나, 외부로부터 들어온 물질에 대한 신체 면역계의 과도한 반응으로 유발되는 질환이라면 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어, "알레르기"는 인체의 어떤 물질에 대한 과민증, 즉 외부로부터 들어온 물질에 대한 신체 면역계의 과도한 반응으로 유발되는 다양한 질환, 질병 또는 이상 상태를 의미한다. 본 발명의 조성물에 적용되는 알레르기 질환으로는, 바람직하게는, 제Ⅰ형 즉시형 과민반응 및 제Ⅳ형 지연형 과민반응이다. 제Ⅰ형 즉시형 과민반응은 알레르기성 기관지 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 중이염, 두드러기 및 아나필락시스(anaphylaxis)이고, 제Ⅳ형 지연형 과민반응은 접촉성 과민증, 알레르기성 접촉성 피부염, 세균 알레르기, 진균 알레르기, 바이러스 알레르기, 약물 알레르기이다. 제Ⅰ형 즉시형 과민반응은 2 단계로 나뉘는데 제1단계는 알레르겐의 체내 침입에 의하여 IgE 및 IgG1의 분비를 억제하고, IgG2a의 분비를 증가시키는 IL-12 및 IFN-ã를 생산하는 T_h1 세포반응과 IL-4, IL-5 및 IL-13 등을 생산하는 T_h2 세포반응의 균형이 T_h2 쪽으로 기울어지게 되면 T_h2의 과도한 면역반응으로 IL-4 및 IL-13 등이 분비되고 그 영향으로 B 세포가 생산한 IgE 특이항체들이 비만세포(mast cell) 및 호염기구(basophil)의 표면에 부착됨으로써 알레르기 발증이 준비된 단계이다. 이를 알레르겐에 감작되었다고 한다. 알레르기 발증의 제2단계는 초기반응과 후기반응으로 나뉘며, 초기반응은 알레르겐이 체내에 재침입하여 비만세포를 자극하고 탈과립 반응을 유발하여 이때 방출된, 히스타민, 지질대사물, 사이토카인 등에 의한 혈관확장 등이 일어나는 것이고, 후기반응은 해당 조직에 호중구, 호산구, 대식세포, Th2 세포, 호염기구 등이 침윤하여 활성화됨으로써 염증이 유발되어 아토피피부염, 비염, 천식 등을 일으키는 것이다.

[0055] 본 발명의 상기 *S. succinus* 14BME20 균주는 메주 또는 된장으로부터 분리된 균주이며, 생균 또는 사균일 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주의 약제학적 유효량; 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 *S. succinus* 14BME20 균주의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0057] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 *S. succinus* 14BME20 균주를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 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. 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있다.

[0060] 본 발명의 조성물이 건강기능성 식품 조성물로 제조되는 경우, 조성물은 담체, 희석제, 부형제, 및 첨가제 중 하나 이상을 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 조성물에 첨가 할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 상기 본 발명에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충진제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등))를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 담체, 부형제, 희석제, 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토오스, 덱스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐키롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피로리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.

[0061] 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주를 유효성분 포함하는 항알레르기용 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우에는, 유효성분으로서의 *S. succinus* 14BME20 균주 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0062] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징크림, 클

렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0063] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용 될 수 있다.

[0065] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0067] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0070] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0071] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0072] 또한, 하기 실시예에서는 알레르기성 천식 모델에서 면역반응과 염증반응에 대한 실험을 중심으로 하였으나, 이는 일례에 불과한 것으로, 본 발명은 알레르기성 천식에만 제한되는 것이 아니라 만성적이고 지속적인 알레르기 염증반응으로 인해 발병되는 각종 만성 알레르기 질환에 적용할 수 있는 것이다.

[0074] **[실시예]**

[0075] **실시예 1: 실험 재료 및 방법**

[0076] **1.1. *S. succinus* 14BME20 균주**

[0077] 본 발명의 실시예에서 사용한 *S. succinus* 14BME20 균주는 경기대학교 이종훈 교수 연구팀으로부터 분양 받아 사용하였다. 상기 균주는 한국미생물보존센터에 2016년 10월 25일자로 기탁되어, 기탁번호 KCCM11920P를 부여받은 균주와 동일한 균주이다.

[0079] **1.2. 천식 유발 및 *S. succinus* 14BME20의 경구 투여**

[0080] 알레르기성 천식을 유발하기 위해, 7주령 BALB/c 생쥐에 난백알부민(OVA; Sigma-Aldrich, 미국)을 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide)에 녹여 7일과 14일에 복강주사로 주입하였다. *S. succinus* 14BME20 균주는 생쥐 당 5×10^7 CFU로 20일 동안 격일로 경구투여 하였다. 이후, 21일 째에 네블라이저(Nebulizer; Devilbiss, Sunrise Medical Corp., 미국)를 이용하여 4일 동안 OVA를 생쥐에게 흡입시켜 천식을 유도하였다. 음성대조군으로는 천식 유발 과정에서 OVA 대신 PBS(Phosphate-buffered saline)를 주입한 생쥐가 사용되었으며, 양성대조군으로는 OVA로 천식을 유발하고 PBS를 경구투여한 생쥐가 사용되었다. 실험군으로는 OVA로 천식을 유발하고 *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여한 생쥐가 사용되었다.

[0082] **1.3. 기도과민성 측정**

[0083] 천식이 유발된 생쥐에게 다양한 농도의 메타콜린(acetyl β-methycholine chloride; Sigma-Aldrich, 미국)을 3분 동안 흡입시켰다. 그 후, 전신체적기록법(non-invasive whole body plethysmography)에 의해 기도저항을 측정하는 OCP-3000(Allmedicus, 대한민국)을 이용하여 3분 동안 호흡에 대한 체적 변화를 측정하였다.

[0085] **1.4. 기관지폐포세척과 폐의 조직학적 분석**

[0086] 기관지폐포세척은 1.5 ml의 차가운 PBS를 기도에 투여하는 방식으로 진행되었다. 이렇게 획득한 기관지폐포세척액은 4℃, 2500 rpm으로 원심분리를 하여 상층액은 사이토카인 분석에 사용하고, 세포는 트리판블루(trypan blue)를 이용하여 염색한 후, 살아있는 세포의 개수를 세었다.

[0087] 조직학적 분석 위해, 폐는 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde) 용액에서 고정되었고, OCT(optimum cutting temperature) 컴파운드(Tissue-Tek®, SAKURA, 미국)에 폐를 박아 고정시켰다. 그 후, 동결박편기(cryotome)를 이용하여 5 μm 두께로 자른 폐 조직을 헤마톡실린 (Haematoxylin)과 에오신(Eosin)을 이용하여 염색하였다. 폐의 조직학적 특징은 광학현미경(Olympus IX71; Olympus, 일본)을 이용하여 조사하였고, 시각화를 위해 RS 이미지 소프트웨어를 사용하였다. 염증 스코어는 종래의 알려진 방법(Tong J et al., 2006)을 이용하여 측정하였다.

[0089] **1.5. 종격림프절과 장간막림프절의 분리 및 $CD4^+$ 림프절 T 세포 분석**

[0090] 천식을 유발한 생쥐의 종격림프절(Mediastinal lymph nodes)과 장간막림프절(Mesenteric lymph nodes)에서 $CD4^+$ T 세포를 분리하여 24-웰 플레이트에서 3×10^6 cells/ml로 시딩하여 배양하였다. 분리된 모든 $CD4^+$ T 세포는 100 μg/ml의 OVA를 처리하여 재자극 시켰다. 배양 4일 후, 세포에서 IFN-γ, IL-4, IL-13, IL-17의 발현 정도를 유세포분석법으로 확인하였고, 세포 배양액은 T_h2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)과 T_{reg} 사이토카인(IL-10)의 생성량을 ELISA를 통해 확인하였다.

[0092] **1.6. 혈청에서 면역글로불린(immunoglobulin) 측정**

[0093] 혈청은 천식 유발 생쥐의 심장에서 얻은 혈액으로부터 원심분리를 통해 분리하였다. IgE와 OVA-특이적 IgE, IgG1, IgG2a의 수치는 ELISA를 통해 확인하였다. OVA-특이적 IgE, IgG1, IgG2a를 탐지하기 위해서 10 μg/ml OVA를 96-well 플레이트에 코팅하고 혈청을 추가한 후, 바이오틴화 (biotinylation)된 항-IgE, IgG1, IgG2a 항체를 넣어 탐지하였다.

[0095] **1.7. 수지상세포의 분리 및 배양**

[0096] 7주령 BALB/c 생쥐에서 획득된 골수세포는 10% FBS, 50 μM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 100 U/ml 페니실린(penicillin), 0.1 mg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 첨가된 RPMI1640 배지(Thermo Fisher Scientific, 미국)에 성장인자 GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; ProSpec, 이스라엘) 10 ng/ml을 첨가하여 배양하였고, 3일과 5일에 GM-CSF 10 ng/ml을 새로운 RPMI1640 배지 5 ml과 함께 추가하여 7일 까지 배양하여 미성숙 수지상세포로 분화시켰다.

[0098] **1.8. 시험관 내 수지상세포의 표면 활성 표지 인자 측정**

[0099] 분화된 미성숙 수지상세포는 24-웰 플레이트에서 2×10^6 cells/ml 로 24시간 배양되었다. 음성대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성대조군으로 LPS(lipopolysaccharide) 처리군이 사용되었으며, 실험군에는 열 비활성화 된 *S. succinus* 14BME20을 다양한 감염다중도(Multiplicity of infection; MOI) 1, 2, 5, 10으로 처리되었다. 24시간 후, 수지상세포 표면에 존재하는 PD-L1 발현정도를 유세포분석법으로 측정하였다.

[0101] **1.9. 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 분석**

[0102] 분화된 미성숙 수지상세포는 24-웰 플레이트에서 2×10^6 cells/ml 로 24시간 배양되었다. 음성대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성대조군으로 LPS 처리군이 사용되었으며, 실험군에는 열 비활성화 된 *S. succinus* 14BME20이 MOI 10으로 처리되었다. 자극된 수지상세포로부터 RNA를 분리하여 역전사 반응으로 cDNA를 획득하였다. TGF-β1와 IL-10을 발현 정도를 확인하기 위해 획득된 cDNA를 주형(template)으로 사용하고, TGF-β1 및 IL-10에 특이적인 프라이머를 이용해 RT-PCR로 TGF-β1과 IL-10의 mRNA 발현을 비교하였다. 사용된 프라이머의 서열은 다

음과 같다:

[0103] TGF-β1, 전방향, 5'-TATAGCAACAATTCCTGGCG-3'(서열번호 1), 및 역방향, 5'-TCCTAAAGTCAATGTACAGC-3'(서열번호 2);

[0104] IL-10, 전방향, 5'-AGAAATCAAGGAGCATTTGA-3'(서열번호 3), 및 역방향, 5'-CTGCAGGTGTTTTAGCTTTT-3'(서열번호 4).

[0106] **1.10. 시험관 내 T_{reg} 세포의 분화 측정**

[0107] 24-웰 플레이트에 2 X 10^6 cells/ml로 배양한 미성숙 수지상세포는 100 μg/ml OVA를 2시간 처리하여 세포를 항원에 적응시킨 후, 음성대조군은 배지만 첨가하고, 양성대조군은 LPS를 처리, 실험군은 열 비활성화 된 *S. succinus* 14BME20을 MOI 10으로 처리하고 24시간 배양하였다. 림프절세포는 100 μg OVA를 주사한 후, 8주령 BALB/c 생쥐의 림프절을 균질화해 획득되었다. 이어서 항-CD4-표지 마그네틱 비드(Miltenyi Biotech GmbH, 독일)를 이용해 자기활성 세포분리법(Magnetic-activated cell sorting; MACS)으로 $CD4^+$ T 세포를 분리하였다. 분리된 T 세포는 *S. succinus* 14BME20 균주가 24시간 동안 처리된 수지상세포와 RPMI1640 배지에서 4일 동안 공동 배양되었다. T_{reg} 세포의 분화에 IL-10이 영향을 미치는지 확인하기 위해서 *S. succinus* 14BME20이 처리된 수지상세포와 $CD4^+$ T 세포의 공동배양에 IL-10 중화항체를 같이 처리하였다.

[0109] **1.11. 유세포분석(Flow cytometry)**

[0110] 세포 표면 분자의 경우, FACS(Fluorescence-activated cell sorter) 완충액에 단일세포 혼탁액을 준비하고, 형광 항체를 1/250 비율로 첨가해 상온에서 15분 동안 염색하였다. 세포내 염색이 필요한 경우, 표면 분자 염색 후 Cytofix/Cytoperm 키트와 Perm/Wash 버퍼(BD Bioscience, 미국)을 이용해 세포고정 및 세포막 투과화(permeabilization)를 하였다. 이어서, 형광 항체를 1/250 비율로 첨가해 4℃에서 1시간 동안 염색하였다. 유세포분석은 FACSCalibur, FACS Accuri C6 (BD Bioscience)를 이용하여 수행하였다.

[0112] **1.12. 통계적 분석**

[0113] 실험군과 대조군의 차이는 paired Student's t-test에 의해서 평가되었고, p-values<0.05 인 경우 유의한 차이로 고려되었다. (*** 또는 ###, p<0.001; ** 또는 ##, p<0.01; * 또는 #, p<0.05)

[0115] **실시예 2: *S. succinus* 14BME20의 경구투여에 따른 천식 증상 억제 효과 확인**

[0116] *S. succinus* 14BME20 균주가 알레르기성 기도 염증의 발병을 억제시키는지 알아보기 위해 *S. succinus* 14BME20 균주를 5 × 10^7 CFU로 생쥐에게 20일 동안 격일로 경구투여 하였다. 그리고 4일 동안 PBS 또는 OVA를 이용하여 천식을 유발하였다.

[0117] 마지막 천식 유발 24시간 후, 기도과민성을 측정한 결과, *S. succinus* 14BME20 균주를 투여한 생쥐는 기도과민성이 유의하게 감소되었음을 확인하였다(도 1a). 그리고 기관지 주변과 혈관 주변으로 유입된 염증성 세포가 감소된 것을 확인하였다(도 1b).

[0118] 또한, 기관지폐포세척액에서 전체 세포의 수와 T_h2 관련 사이토카인 IL-4, IL-13, 및 IL-5의 생산이 감소되는 것을 확인하였다(도 1c). 게다가 알레르기성 천식의 지표인 혈청 내 면역글로불린의 수치를 확인 한 결과, *S. succinus* 14BME20 균주를 투여한 군에서 T_h2 반응과 관련된 총 IgE, OVA-특이적 IgE, 및 IgG1의 수치가 감소된 것이 확인되었다(도 1d). 추가적으로, 열 불활성화 처리 된 *S. succinus* 14BME20 균주 또한 기도의 염증을 현저하게 저해하는 효과를 나타냈다(도 1e 및 도 1f).

[0119] 반면 T_h1 반응과 관련된 OVA-특이적 IgG2a 수치는 대조군과 실험군 간의 차이가 없음을 확인하였다(도 1d의 우측 하단 그래프). 상기와 같은 결과는 *S. succinus* 14BME20 균주의 투여에 의해 천식의 발병을 억제할 수 있음을 보여주는 것이다.

[0121] **실시예 3: *S. succinus* 14BME20의 T_h2 면역반응 억제 효과 확인**

[0122] 다양한 종류의 T 세포는 기도의 염증 반응에 주요하게 관여 한다고 알려져 있는바, 상기 실시예 2에서 나타난 *S. succinus* 14BME20 균주의 천식 발병 억제 효과가 T 세포를 매개해서 일어나는 현상인지 여부를 확인하였다.

이를 위해 PBS 또는 *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여하고, OVA로 천식을 유발한 생쥐의 종격림프절을 분리하여, 100 μg/ml OVA로 재자극하고 4일 동안 배양하였다.

[0123] 이어서 기도염증의 발병에 관여하는 T 세포의 비율을 유세포분석법으로 확인한 결과, *S. succinus* 14BME20 균주 처리군에서 IL-4와 IL-13을 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 비율이 유의성 있게 감소한 반면, IFN-γ와 IL-17을 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 비율은 영향을 받지 않았다(도 2a). 또한, 종격림프절에서 분리된 T 세포 배양액에서 IL-4, IL-5, IL-13의 생성량을 ELISA를 통해 확인 한 결과, 알레르기성 천식의 발병에 관여하는 T_h2 사이토카인의 생성이 감소되는 것을 확인하였다(도 2b). 추가적으로, 항원 미접촉(naive) 조건 하에서, *S. succinus* 14BME20 균주의 투여는 폐에서 T_h2 세포 집단의 비율에 영향을 미치지 않았다. 그러나 동물이 알레르겐(allergen)에 노출되면 *S. succinus* 14BME20 균주를 투여한 생쥐의 폐에서 T_h2 세포 집단이 감소함을 확인하였다(도 2c). 이러한 결과와 일맥상통하게, 비장세포에서도 IL-4 및 IL-13를 발현하는 $CD4^+$ T 세포 집단의 수준은 대조군과 비교하여 *S. succinus* 14BME20 균주를 투여한 마우스에서 극적으로 감소되었다. 또한, 비장세포에서의 T_h2 사이토카인, IL-4, IL-13 및 IL-5의 수준도 대조군과 비교하여 *S. succinus* 14BME20 균주를 투여한 마우스에서 극적으로 감소되었다(도 2d 및 도 2e). 그러나, *S. succinus* 14BME20 균주의 경구투여는 종격림프절에서와 같이 비장세포에서 IFN-γ 및 IL-17을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 집단의 수준에 영향을 미치지 않았다(도 2d). 종합하면, 이러한 결과는 *S. succinus* 14BME20 균주가 T_h2 반응을 감소시킴으로써 천식의 발병을 억제함을 보여주는 것이다.

[0125] **실시예 4: *S. succinus* 14BME20의 T_{reg} 세포 분화 유도 효과 확인**

[0126] 천식의 발병에는 T_h2 세포가 주로 관여하며, 이러한 T_h2 세포의 반응은 기도 관용(airway tolerance)을 유지하는 T_{reg} 세포에 의해 억제될 수 있으며, 다양한 종류의 박테리아들이 T_{reg} 세포의 분화 유도를 통해 알레르기성 질병을 완화시킨다고 알려져 있다. 이에 본 발명의 *S. succinus* 14BME20 균주도 T_{reg} 세포의 분화를 유도하는지 알아보기 위해, 천식이 유도된 생쥐로부터 종격림프절과 장간막림프절을 분리하여 100 μg/ml OVA로 재자극하고 4일 동안 배양하였다. 음성대조군으로는 PBS를 경구투여하고 PBS로 천식을 유발한 생쥐를 사용하였고, 양성대조군으로는 PBS를 경구투여하고 OVA로 천식을 유발한 생쥐를 사용하였으며, 실험군은 *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여하고 OVA로 천식을 유발한 생쥐를 사용하였다.

[0127] 4일 동안 배양한 후, *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여한 생쥐의 림프절에서 T_{reg} 세포가 분화되는지 여부를 유세포분석법으로 확인한 결과, *S. succinus* 14BME20 균주를 경구투여한 생쥐의 종격림프절(도 3a)과 장간막림프절(도 3b)에서 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 세포의 비율이 증가하였다. 또한, ELISA를 통해 T_{reg} 세포에서 분비되는 IL-10의 생성량이 증가함을 확인하였다(도 3a 및 도 3b). 즉, *S. succinus* 14BME20 균주의 경구투여에 의해 천식의 발병이 감소되는 효과는 T_{reg} 세포 분화 유도에 의해 T_h2 세포의 분화가 감소됨으로서 나타나는 것임을 확인하였다.

[0129] **실시예 5: *S. succinus* 14BME20에 의한 면역관용 수지상세포의 유도 효과 확인**

[0130] $CD4^+$ T 세포는 항원제시세포를 통해 효과 T 세포(effector T cell)로 분화가 되는데, 특히 박테리아는 면역관용 수지상세포를 통해 T_{reg} 세포의 분화를 유도한다고 알려져 있다. 이에 *S. succinus* 14BME20 균주가 T_{reg} 세포의 분화를 유도하는 경로가 면역관용 수지상세포를 통하는 것인지 여부를 알아보기 위해, 분화된 미성숙 수지상세포에 열 불활성화 처리 된 *S. succinus* 14BME20 균주를 각각 MOI 1, 2, 5, 10으로 처리하여 24시간 배양한 후, 면역관용 수지상세포의 표면분자는 유세포분석을 통해 측정하였고, 사이토카인은 mRNA발현 정도와 ELISA로 측정하였다.

[0131] 그 결과, *S. succinus* 14BME20 균주를 처리한 MOI에 따라 PD-L1의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 4a).

[0132] 또한 *S. succinus* 14BME20 균주가 처리된 수지상세포로부터 RNA를 분리하여 cDNA를 수득하고, TGF-β와 IL-10의 특이적 프라이머를 이용해 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

[0133] 그 결과, mRNA 수준에서 IL-10의 발현량이 증가되었고, ELISA를 통해 IL-10의 생성량이 증가하였음을 확인하였다(도 4b). 이러한 결과는 *S. succinus* 14BME20 균주가 미성숙 수지상세포를 면역관용 수지상세포로 분화시킨다

는 사실을 보여주는 것이다.

[0135] **실시예 6: *S. succinus* 14BME20가 처리된 면역관용 수지상세포 의한 T_{reg} 세포로의 분화 유도 효과 확인**

[0136] 상기 실시예 5에서 *S. succinus* 14BME20 균주에 의해 면역관용 수지상세포(tolerogenic dendritic cell)로의 분화가 유도되는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 *S. succinus* 14BME20 균주에 의해 분화된 면역관용 수지상세포가 항원 미접촉(antigen-naive) $CD4^+$ T 세포를 T_{reg} 세포로 분화시키는지 알아보았다. 미성숙 수지상세포는 100 μg/ml OVA로 2시간 동안 활성화를 시키고, MOI 10의 *S. succinus* 14BME20 균주 또는 100 ng/ml LPS를 처리하여 24 시간 배양한 후, 100 μg OVA가 주사된 생쥐의 림프절에서 분리한 $CD4^+$ T 세포와 공동배양 한 후, 유세포분석기를 통하여 측정하였다.

[0137] 그 결과 도 5a 및 도 5b 에서 나타난 바와 같이, *S. succinus* 14BME20 균주를 처리한 수지상세포와 공동배양 시, T_{reg} 세포의 비율이 증가됨을 확인하였다(도 5a). 또한 ELISA를 통해 IL-10의 생성량 역시 증가함을 확인하였다(도 5b). 이러한 결과는 *S. succinus* 14BME20 균주에 의한 T_{reg} 세포로의 분화는 면역관용 수지상세포를 통해 유도된다는 다는 사실을 시사하는 것이다.

[0139] **실시예 7: *S. succinus* 14BME20에 의한 T_{reg} 세포 유도의 매개체 확인**

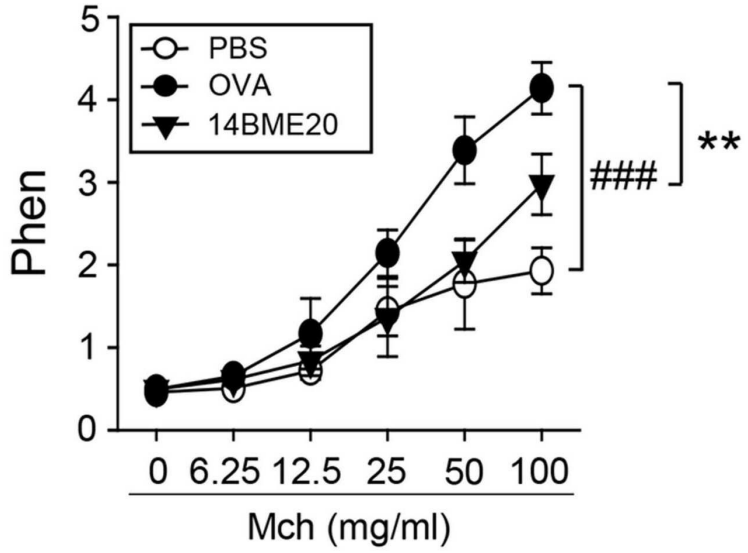
[0140] *S. succinus* 14BME20 균주에 의한 T_{reg} 세포 유도가 면역관용 수지상세포에서 분비되는 IL-10을 통해 발생하는 것인지 여부를 확인하기 위하여, *S. succinus* 14BME20 균주가 처리된 수지상세포와 $CD4^+$ T 세포의 공동배양에 IL-10 중화항체(각각 0.1, 1, 10 μg/ml)를 처리하고 4일 간 배양 하였다. 양성대조군으로는 동종형(isotype) 항체(10 μg/ml) 처리군을 사용하였다.

[0141] 그 결과 도 6에서 나타난 바와 같이, IL-10 중화항체를 처리하지 않은 공동배양에 비해 IL-10 중화항체(10 μg/ml)를 처리한 공동배양에서 T_{reg} 세포의 비율이 감소되는 것이 확인되었다. 이에 반해, 동종형 항체를 처리한 공동배양에서는 T_{reg} 세포의 비율이 항체를 처리하지 않은 공동배양과 차이가 없었다. 이러한 결과는 *S. succinus* 14BME20 균주가 면역관용 수지상세포에서 분비되는 IL-10을 매개체로 하여 T_{reg} 세포 분화를 유도함을 보여주는 것이다.

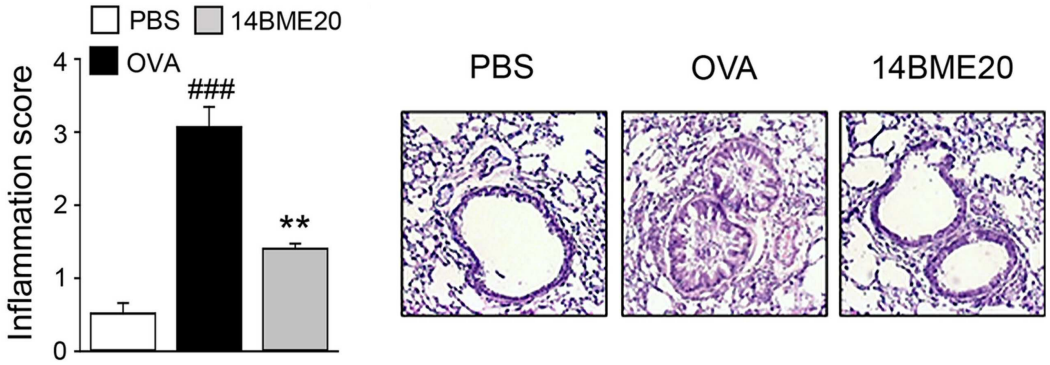
[0143] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

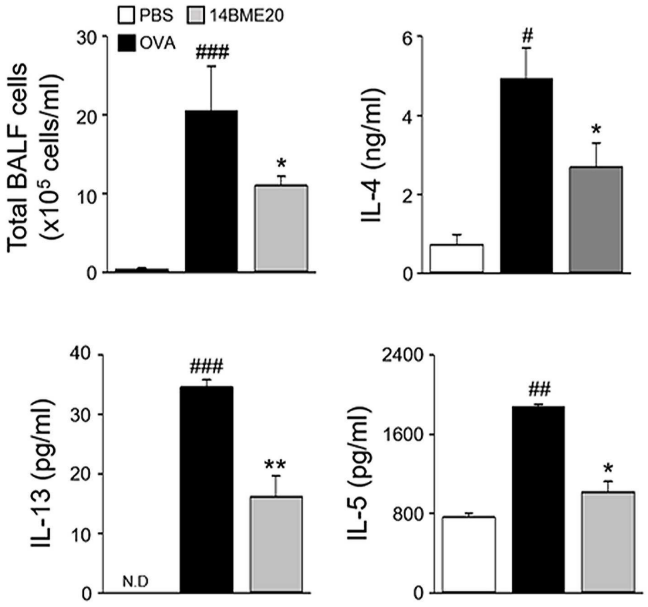
도면1a


PBS
OVA
14BME20
Phen
Mch (mg/ml)
0
6.25
12.5
25
50
100
###
**

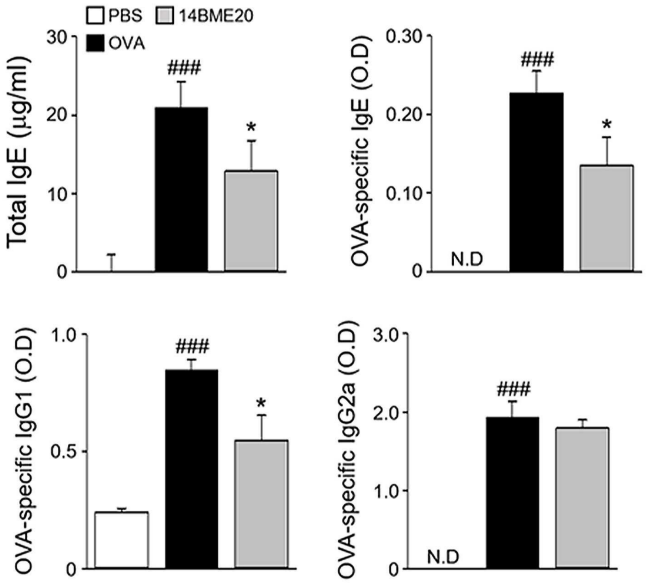
도면1b


PBS
14BME20
OVA
Inflammation score
###
**
PBS
OVA
14BME20

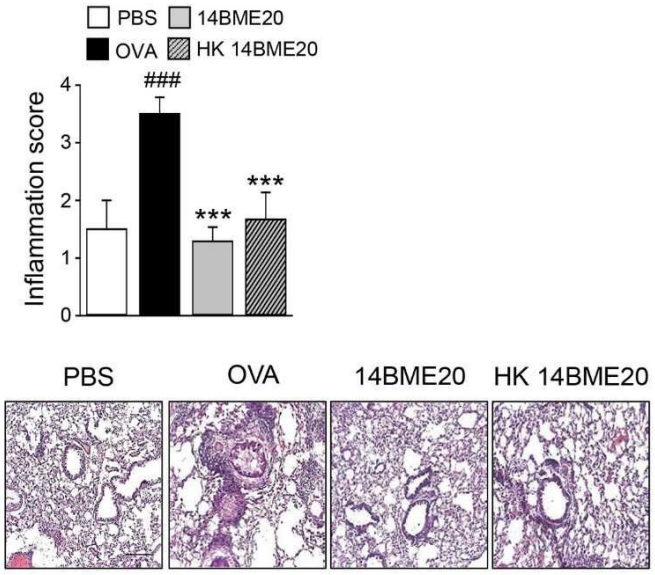
도면1c


PBS
14BME20
OVA
Total BALF cells (x10⁵ cells/ml)
IL-4 (ng/ml)
IL-13 (pg/ml)
IL-5 (pg/ml)
N.D
###
##
#
*
**

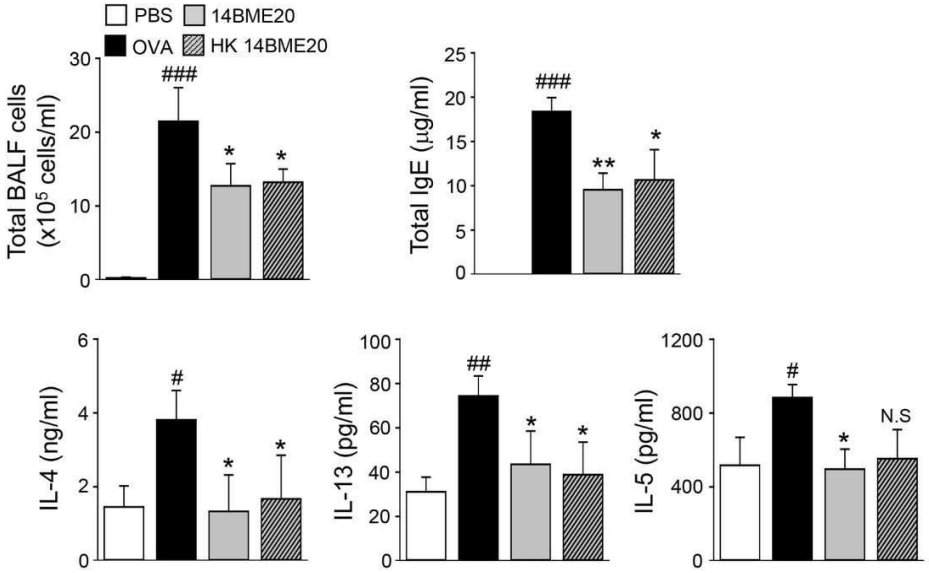
도면1d


PBS
14BME20
OVA
Total IgE (μg/ml)
OVA-specific IgE (O.D)
OVA-specific IgG1 (O.D)
OVA-specific IgG2a (O.D)
N.D
###
*

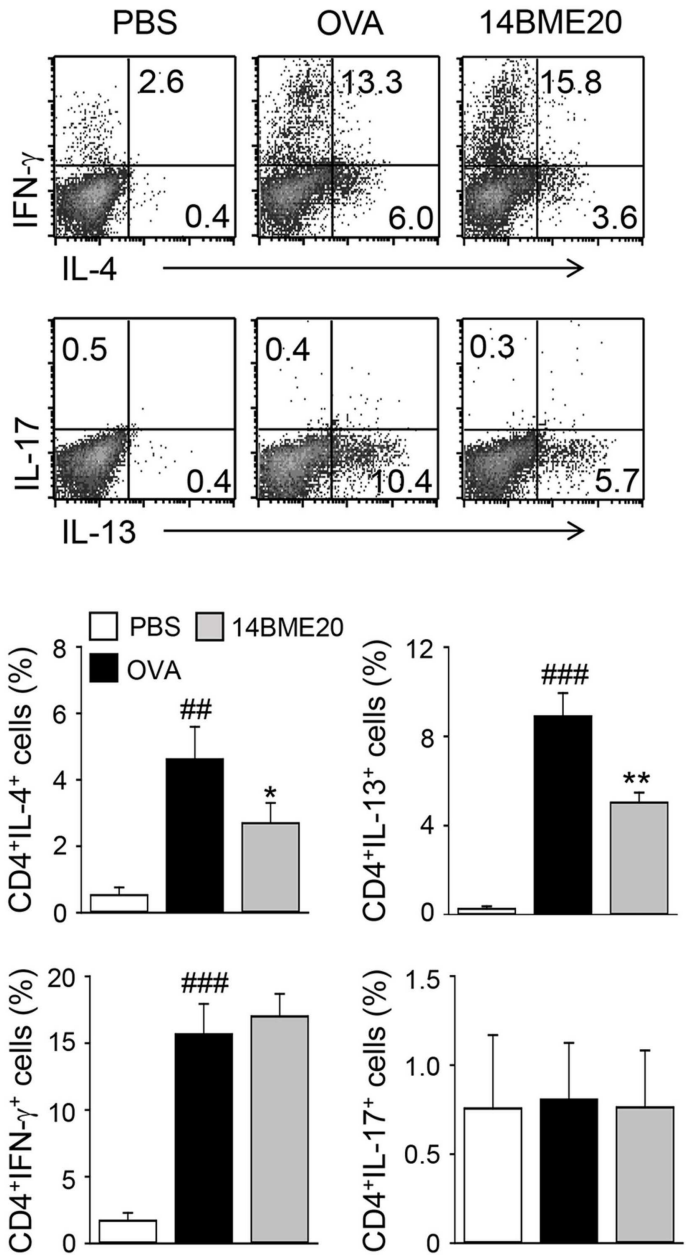
도면1e


PBS
14BME20
OVA
HK 14BME20
Inflammation score
###
***
***
PBS
OVA
14BME20
HK 14BME20

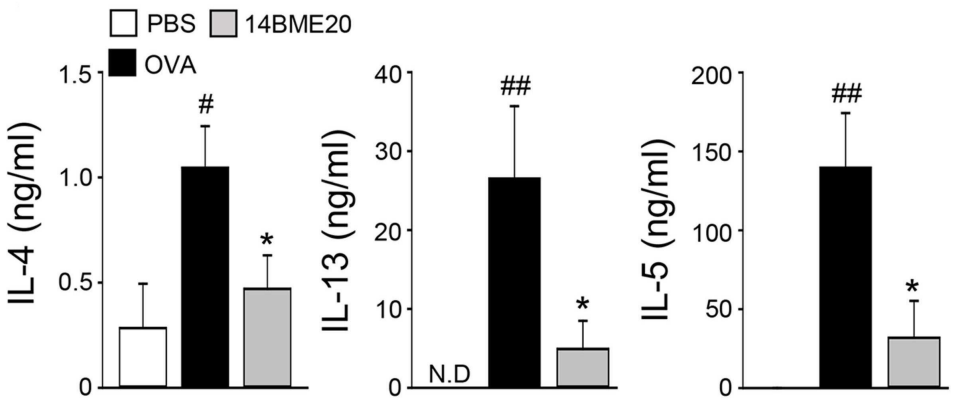
도면1f


PBS
14BME20
OVA
HK 14BME20
Total BALF cells (x10⁵ cells/ml)
Total IgE (μg/ml)
IL-4 (ng/ml)
IL-13 (pg/ml)
IL-5 (pg/ml)
N.S

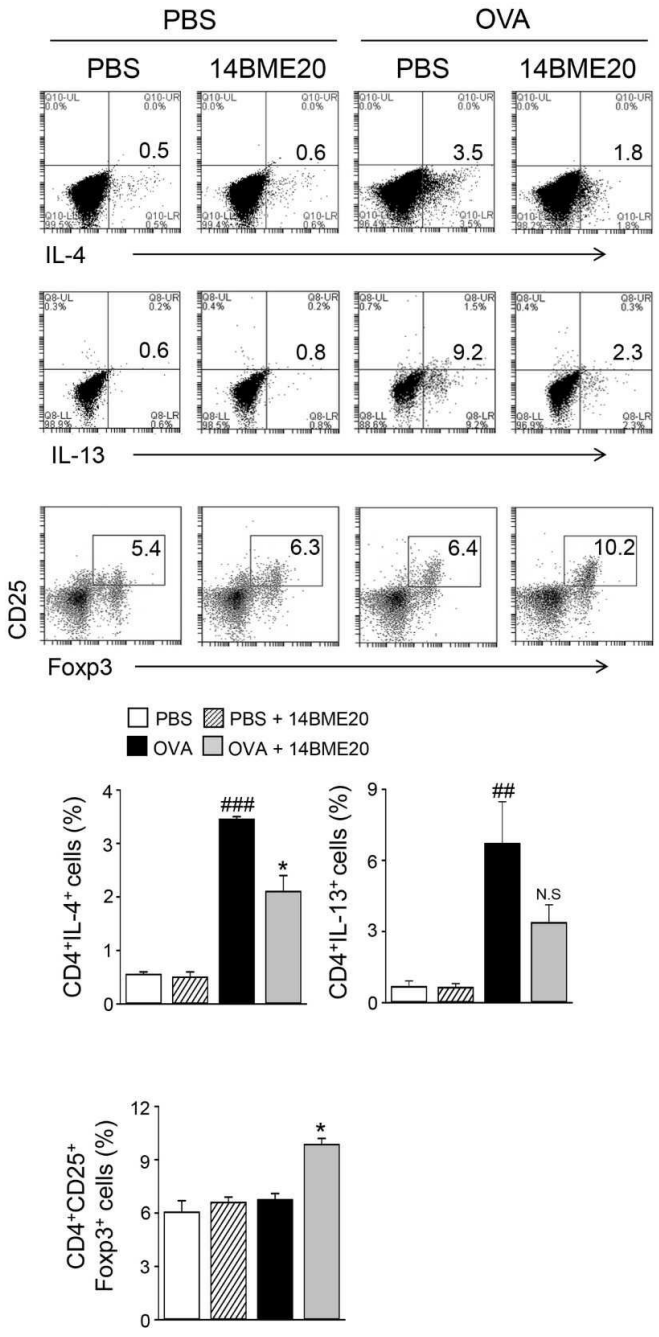
도면2a


PBS
OVA
14BME20
IFN-γ
IL-4
2.6
0.4
13.3
6.0
15.8
3.6
IL-17
IL-13
0.5
0.4
0.4
10.4
0.3
5.7
PBS
14BME20
OVA
CD4+IL-4+ cells (%)
CD4+IL-13+ cells (%)
CD4+IFN-γ+ cells (%)
CD4+IL-17+ cells (%)
##
*
###
**
###

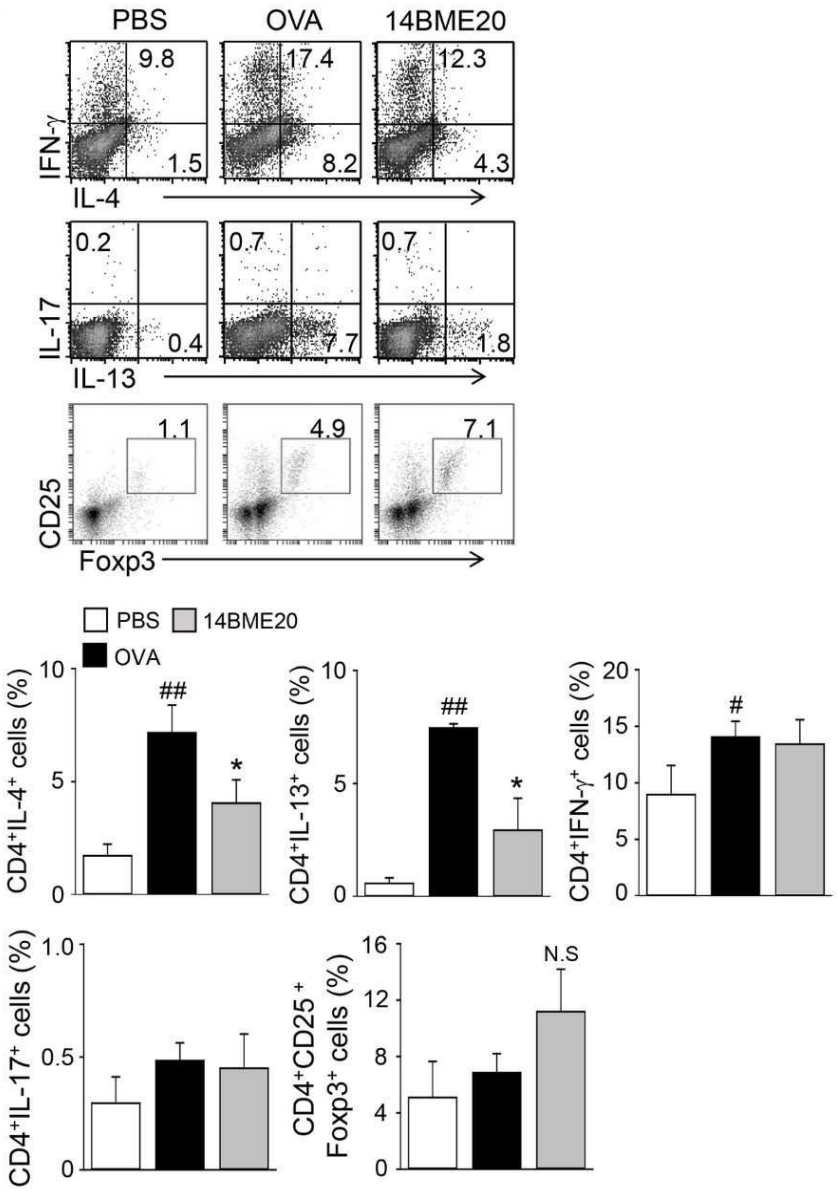
도면2b


PBS
14BME20
OVA
IL-4 (ng/ml)
1.5
1.0
0.5
0
#
*
IL-13 (ng/ml)
40
30
20
10
0
N.D
##
*
IL-5 (ng/ml)
200
150
100
50
0
##
*

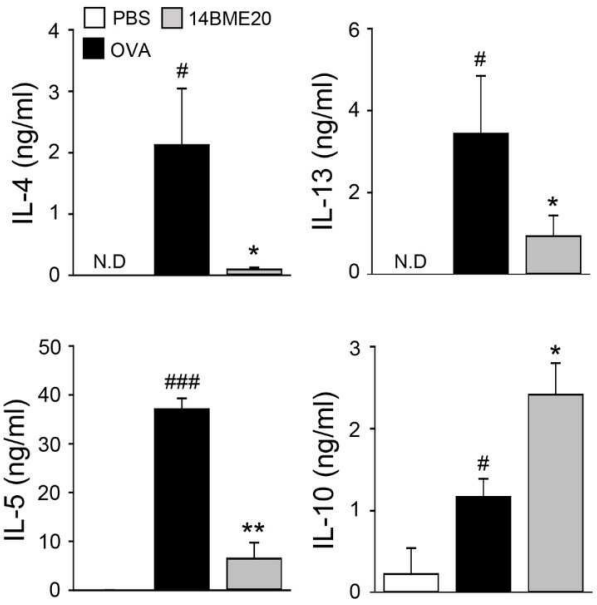
도면2c


PBS
OVA
PBS
14BME20
PBS
14BME20
0.5
0.6
3.5
1.8
IL-4
0.6
0.8
9.2
2.3
IL-13
5.4
6.3
6.4
10.2
CD25
Foxp3
PBS
PBS + 14BME20
OVA
OVA + 14BME20
CD4+IL-4+ cells (%)
###
*
CD4+IL-13+ cells (%)
##
N.S
CD4+CD25+ Foxp3+ cells (%)
*

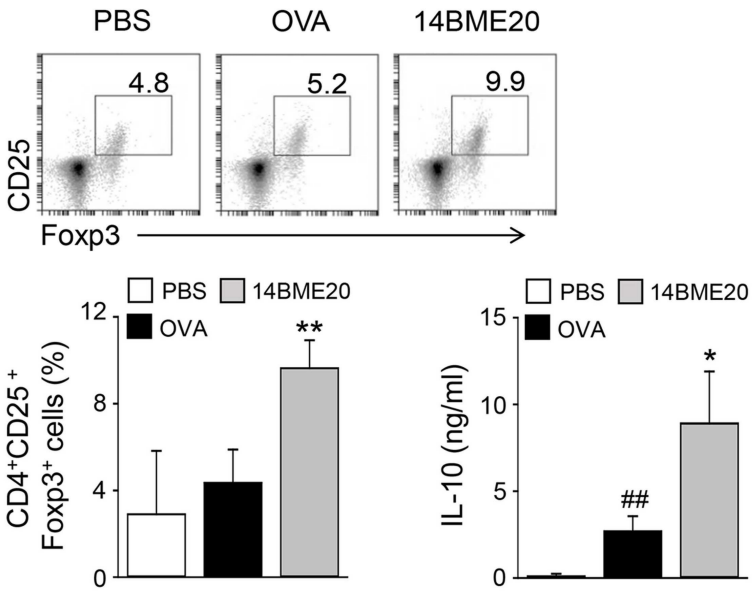
도면2d


PBS
OVA
14BME20
IFN-γ
IL-4
9.8
1.5
17.4
8.2
12.3
4.3
IL-17
IL-13
0.2
0.4
0.7
7.7
0.7
1.8
CD25
Foxp3
1.1
4.9
7.1
PBS
14BME20
OVA
CD4+IL-4+ cells (%)
CD4+IL-13+ cells (%)
CD4+IFN-γ+ cells (%)
CD4+IL-17+ cells (%)
CD4+CD25+ Foxp3+ cells (%)
##
*
#
N.S

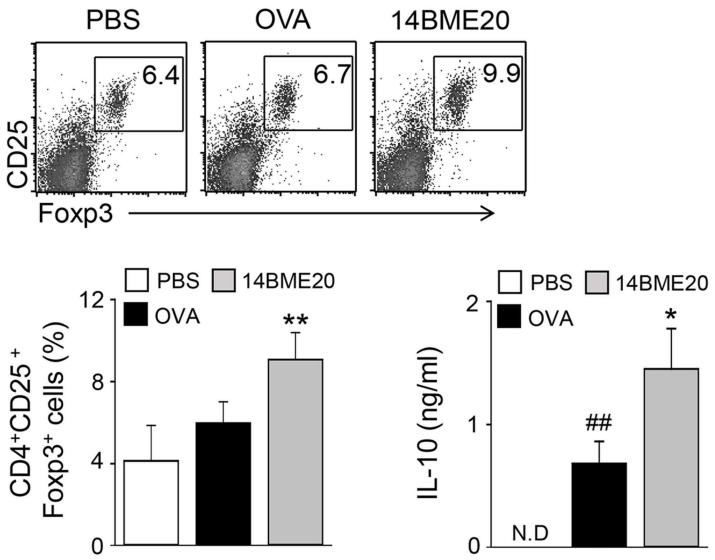
도면2e


PBS
14BME20
OVA
IL-4 (ng/ml)
IL-13 (ng/ml)
IL-5 (ng/ml)
IL-10 (ng/ml)
N.D
N.D
#
*
###
**

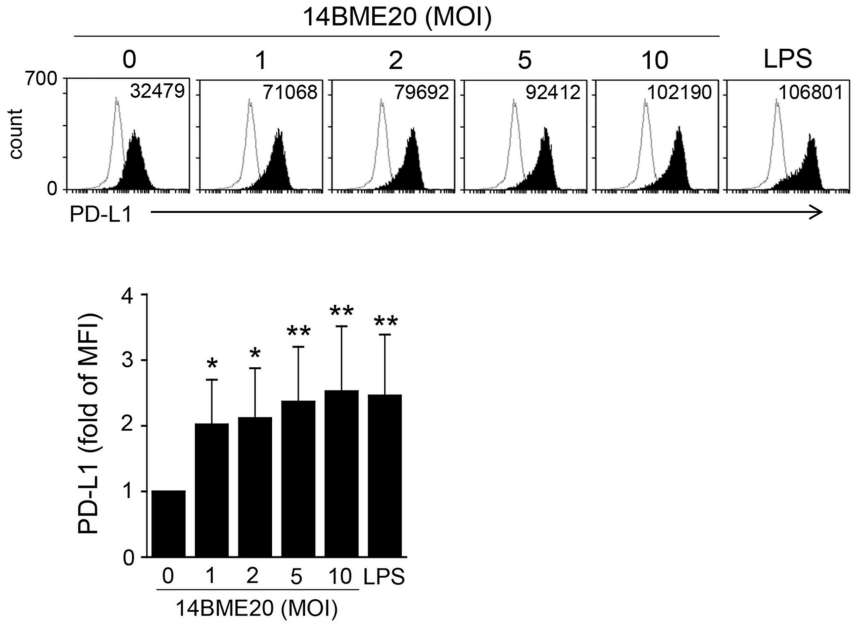
도면3a


PBS
OVA
14BME20
4.8
5.2
9.9
CD25
Foxp3
PBS
14BME20
OVA
CD4+CD25+ Foxp3+ cells (%)
IL-10 (ng/ml)
**
*
##

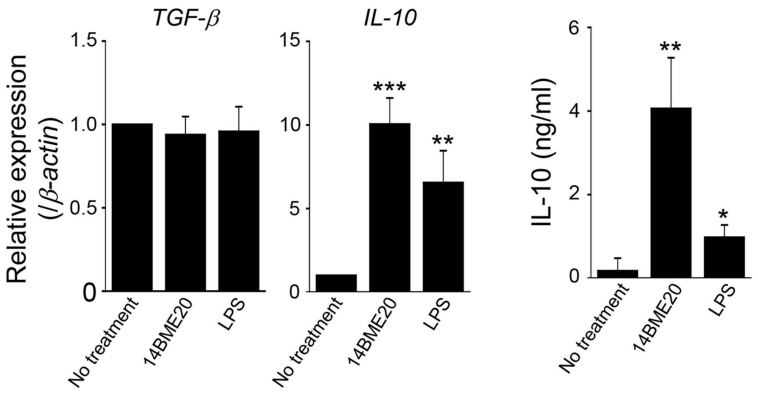
도면3b


PBS
OVA
14BME20
6.4
6.7
9.9
CD25
Foxp3
PBS
14BME20
OVA
CD4+CD25+ Foxp3+ cells (%)
12
8
4
0
**
IL-10 (ng/ml)
2
1
0
*
##
N.D

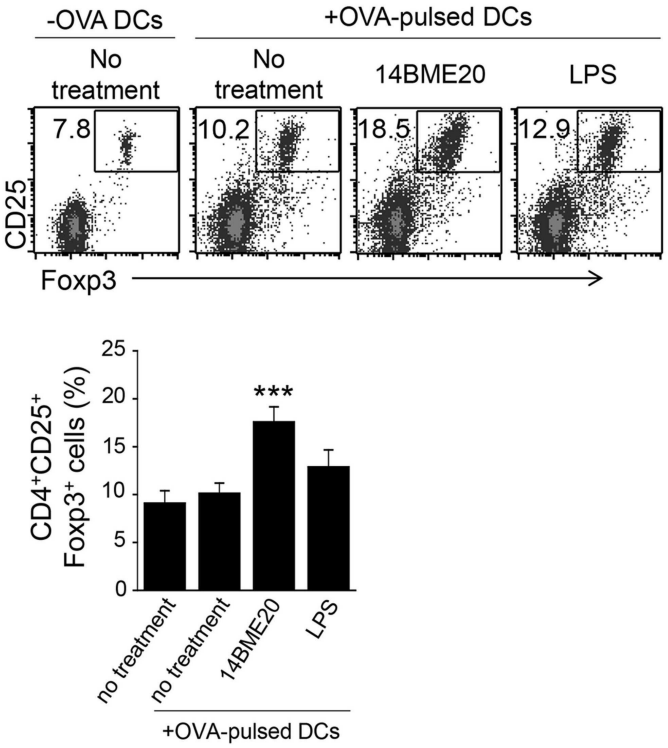
도면4a


14BME20 (MOI)
0
1
2
5
10
LPS
700
count
0
32479
71068
79692
92412
102190
106801
PD-L1
PD-L1 (fold of MFI)
4
3
2
1
0
*
*
**
**
**
0 1 2 5 10 LPS
14BME20 (MOI)

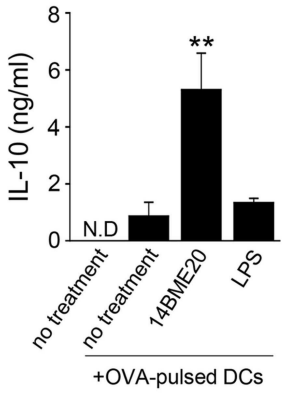
도면4b


TGF-β
IL-10
Relative expression (/β-actin)
IL-10 (ng/ml)
1.5
1.0
0.5
0
15
10
5
0
6
4
2
0
***
**
**
*
No treatment
14BME20
LPS

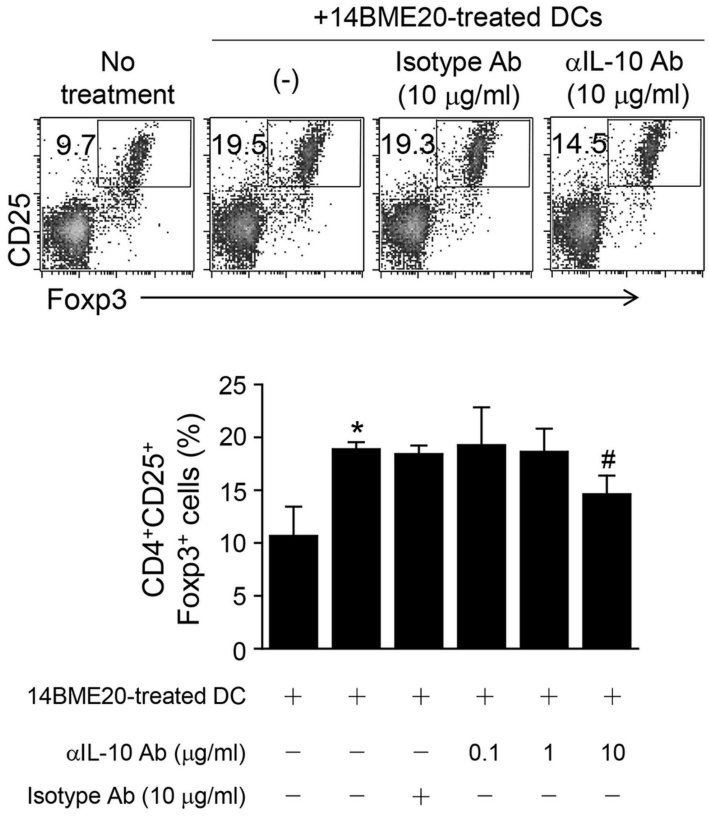
도면5a


-OVA DCs
+OVA-pulsed DCs
No treatment
No treatment
14BME20
LPS
7.8
10.2
18.5
12.9
CD25
Foxp3
CD4+CD25+ Foxp3+ cells (%)
25
20
15
10
5
0
***
no treatment
no treatment
14BME20
LPS
+OVA-pulsed DCs

도면5b



도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

Kyonggi University Industry & Academia Cooperation Foundation

<120> Composition for preventing, improving or treating of allergic diseases comprising Staphylococcus succinus 14BME20 as an active ingredient

<130> MP19-179

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of TGF-beta1

<400> 1

tatagcaaca attcctggcg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of TGF-beta1

<400> 2

tcctaaagtc aatgtacagc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of IL-10

<400> 3

agaaatcaag gagcatttga 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of IL-10

<400> 4

ctgcaggtgt tttagctttt 20