



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월18일
(11) 등록번호 10-1778734
(24) 등록일자 2017년09월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/164 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2016-0029839
- (22) 출원일자 2016년03월11일
심사청구일자 2016년03월11일
- (56) 선행기술조사문헌
The Journal of Immunology May 2013 vol.190
(1 Supplement) 61.11

- (73) 특허권자
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 유성대로1689번길 70 (전민동,KT대덕2연구센터)
- (72) 발명자
함준상
전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산과학원 축산물이용과
박범영
전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산과학원 축산물이용과
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인이지

전체 청구항 수 : 총 10 항

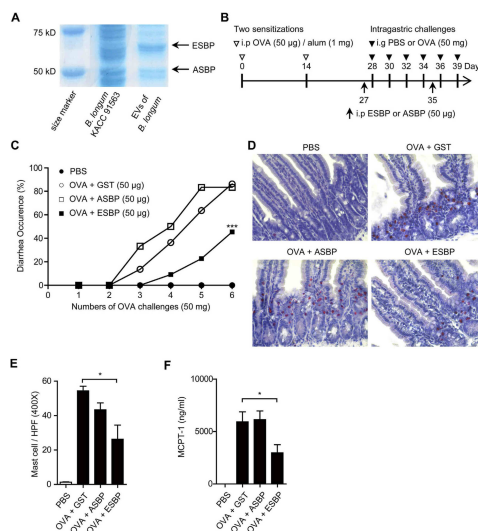
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP 및 이를 이용한 항알레르기 조성물

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein) 및 이를 유효성분으로 함유하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 식품 알레르기, 및 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)과 같은 비만 세포-매개 질환(mast cell-mediated disease)의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



- (52) CPC특허분류
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/304 (2013.01)
- (72) 발명자
정석근
 전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산
 과학원 축산물이용과
오미화
 전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산
 과학원 축산물이용과
설국환
 전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산
 과학원 축산물이용과
장명호
 경상북도 포항시 남구 지곡로 294, 216동 202호
양보기
 경상북도 포항시 남구 지곡로 294, 216동 202호

- 김정환**
 경기도 용인시 수지구 신봉1로48번길 29 101동 40
 2호 (신봉동, 한일아파트)
- 전은지**
 경기도 수원시 장안구 상률로 32 110동 1104호 (울
 전동, 밤꽃마을뜨란채아파트)
- 김경태**
 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 9동 803호 (지곡
 동, 교수아파트)
- 김성훈**
 경상북도 포항시 남구 청암로 77 포항공대 생명과
 학관 210호 (지곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00858504
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 축산물 유래 기능성 펩타이드 탐색 및 이용기술개발
 연구과제명 기능성 펩타이드에 의한 면역반응 조절기작에 관한 연구
 기여율 50/100
 주관기관 국립축산과학원
 연구기간 2012.04.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IBS-R005-S1
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 기초과학연구원
 연구사업명 기초과학연구원 사업
 연구과제명 Regulation of Innate Immunity in the Gut (장점막 조직에서의 선천성 면역의 조절)
 기여율 20/100
 주관기관 기초과학연구원
 연구기간 2015.01.01 ~ 2015.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IBS-R005-D1
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 기초과학연구원
 연구사업명 기초과학연구원 사업
 연구과제명 Immune Homeostasis (면역항상성 연구)
 기여율 30/100
 주관기관 기초과학연구원
 연구기간 2012.07.31 ~ 2015.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 함유하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein)인 것을 특징으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 알레르기는 식품 알레르기인 것을 특징으로 하는 알레르기 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항 기재의 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용이고,

상기 비만 세포-매개 질환은 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용이고,

상기 비만 세포-매개 질환은 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항 기재의 펩타이드를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항 기재의 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용이고,

상기 비만 세포-매개 질환은 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 11

비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용이고,

상기 비만 세포-매개 질환은 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein) 및 이를 이용한 항알레르기 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 식품 알레르기 예방 및 치료 효과가 우수한 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP 및 이를 이용한 항알레르기 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기관지 천식, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염 등의 알레르기 질환은 최근 수십 년 동안에 급격히 증가하였다. 알레르기 치료제의 대부분은 대증요법적인 것으로, 발병 환자수의 증가 및 알레르기 치료제의 장기 복용이 수반하는 부작용 등으로 효과적인 치료법이 요구되고 있다.

[0004] 특히, 식품 알레르기는 식품 또는 식품 첨가제에 의해 생기는 이상 면역 반응에 의한 잠재적으로 심각한 질환이다. 최근 식품 알레르기로 인한 병원 내원환자가 급격히 증가하고 있다. 땅콩, 우유, 조개류, 밀 또는 견과류와 같은 식품이 식품 알레르기를 일으키는 것은 오래 전부터 알려져 있었지만 정확한 병인은 알려져 있지 않다. 식품 알레르기를 치료하기 위해 알레르기 유발 식품 회피와 최근에는 알레르기 유발 항원의 구강 투여를 통한 내성유도 등 몇 가지 치료 방법이 제안되고 있다.

[0006] 대안적으로 유산균을 이용한 치료 방법이 식품 알레르기 환자에게 시도되고 있다. 유산균은 숙주의 세포와 소통하는 직접적 방법이나 다른 장내미생물에 영향을 주는 간접적인 방법으로 숙주에게 이득을 주는 미생물이다. 유산균이 숙주의 면역시스템에 영향을 주어 염증이나 알레르기반응을 억제한다는 것이 최근 연구에 의해 제시되고 있다. 예를 들어 *Bifidobacterium breve*는 Tr1의 IL-10생성의 유도를 통해 장내 항상성을 강화시킨다. 또한 여러 종류 유산균의 혼합물이 장에서 CD4 조절 T세포의 발생을 촉진시켜 실험에 의한 대장염을 억제시킨다. Lactic acid 박테리아에서 나온 이중 나선 RNA은 수지상세포에서 인터페론감마의 생성을 유도해 대장염을 억제한다. 그리고 8가지의 그람 양성 유산균 혼합물인 VSL#3는 Th1과 Th2 반응을 조절하여 식품 알레르기를 억제한다고 알려져 있다.

[0008] 종래 다양한 유산균 제제가 제안되어 있으며, 한국등록특허 제10-1250463호는 신생아 분변에서 분리한 내산소성 비피도박테리움 통검 비피더스 유산균 및 이를 이용한 프로바이오틱 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein)를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체 또는 ESBP를 유효성분으로 포함하는 알레르기 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 비피도박테리움 통검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체 또는 ESBP

를 유효성분으로 포함하는 비만세포-매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 함유하는 비만 세포의 세포사멸을 유도하는 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0024]

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체 또는 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein)를 이용하여 알레르기성 질환, 특히 식품 알레르기를 효과적으로 예방, 치료 및 개선을 할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체 또는 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein)를 이용하여 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)과 같은 비만 세포-매개 질환(mast cell-mediated disease)을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 배양된 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532의 식품 알레르기가 유도된 설사(food allergy-induced diarrhea)에 대한 효과를 나타낸다. A, 마우스에서 식품 알레르기 유도 실험 과정을 나타낸다. B, 식품 알레르기 유도를 위하여, 50 mg의 Ova가 다섯 번 경구 투여되었다. 조합된 실험결과는 세 번의 독립적인 실험결과를 나타낸다(OVA vs OVA + *B. longum*: **P < .01, n = 그룹 당 약 15~17 마우스).

도 2는 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563이 식품 알레르기가 유도된 마우스의 소장 내 점막고유층(small intestinal lamina propria)에서의 비만세포(mast cells) 수를 감소시키는 것을 나타낸다. A, 공장(jejunum)의 파라핀 절편에서 비만세포를 염색하였다. 상기 비만세포의 수는 4개의 독립적인 구역에서 측정되었다(n = 그룹 당 5 마우스, 원본 배율, x400). B, 혈청 내 MCPt-1의 양 (n = 그룹 당 약 6~7). C, OVA 특이적 면역글로불린 E의 혈청 내 양. 값들은 평균±표준오차를 의미한다. Newman-Keuls post test를 적용한 One way

ANOVA를 적용하였다. 통계학적인 유의성은 $**p < .05$, $***p < .001$. 각 실험 결과는 두 번 혹은 세 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 3은 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 이의 세포 밖 소포체(EVs)에 의해 유도된 골수 유래 비만세포(BMNCs)의 세포사멸(apoptosis)을 나타낸다. A, *B. longum* KACC91563 (*B. l*)와 *E. faecalis* KACC91532 (*E. f*) 유래 세포 밖 소포체의 투과전자현미경 사진이다. B, 세포 밖 소포체의 크기이다. 오차막대는 다섯번의 측정에서 얻었고 각 값들은 평균±표준편차를 의미한다. C, 세포사멸 분석결과이다. AnnexinV를 발현하는 세포사멸중인 세포는 유세포 분석기를 이용하여 측정되었다 ($n = 3$). 값들은 평균±표준오차를 의미한다. 통계분석은 Newman-Keuls posttest를 접목한 One way ANOVA를 적용하였다. 통계학적인 유의성은 $**p < .01$ 또는 $***p < .001$ 이다. 각 실험 결과는 두 번 혹은 세 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다. D, 골수 유래 비만세포에 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532와 또는 두 박테리아 유래 세포 밖 소포체를 2시간 동안 배양하였다. 세포사멸 세포는 Deadend Fluorometric TUNEL 시스템을 이용하여 염색하였다. 도 3의 D는 대표하는 결과를 나타내었다(배율 x 400). 세포사멸 세포의 수는 7개의 다른 구역에서 측정되었다(배율 x100, $n =$ 그룹 당 3). 값들은 평균±표준오차를 의미한다. 통계분석은 Newman-Keuls posttest를 접목한 One way ANOVA를 적용하였다. $*p < .05$ 및 $**p < .01$, *B. l*는 *B. longum* KACC91563이고; *E. f*는 *E. faecalis* KACC91532이다.

도 4는 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563으로부터 유래된 세포 밖 소포체(EVs) 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532로부터 유래된 세포 밖 소포체(EVs)가 골수 유래 비만세포(BMNCs)에 의해 내재화된(internalized) 것을 나타낸다. A, 각각의 세포들은 표시된 온도에서 각각의 박테리아에서 유래한 세포 밖 소포체들과 함께 배양되었다. 세포 밖 소포체를 획득한 세포의 비율을 막대그래프로 나타내었다. B, 대표하는 이미지들을 보여주었다. 세포의 핵은 파란색이고, DiI로 염색된 세포 밖 소포체는 빨간색이다. 값들은 평균±표준오차를 의미한다. Student *t* test가 적용되었다. 통계학적인 유의성은 $**P < 0.01$ 이다. 25개의 다른 구역에 있는 세포의 수를 측정하였다 ($n =$ 그룹 당 약 3-4, 원본 배율, x 400). 각 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 5는 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563로부터 유래된 세포 밖 소포체(EVs)의 주요 단백질인 ESBP에 의한 식품 알레르기 반응 억제를 나타낸다. A, *B. longum* KACC91563와 이의 세포 밖 소포체의 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였다. ESBP와 ASBP는 단백질 분석을 통하여 확인되었다. B, 마우스에서 식품 알레르기를 유도하고 ESBP와 ASBP를 투여하는 실험 과정을 나타낸다. C, GST 표지된 제조합 ESBP 혹은 ASBP(50 μ g) 단백질의 알레르기성 설사를 완화시키는 능력을 나타낸다(OVA + GST vs OVA + ESBP: $***P < .001$, $n =$ 그룹 당 약 6~22 마우스). 제조합 GST 단백질을 처리한 마우스는 양성 대조군으로 사용되었다. 실험결과는 세 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다. D, 공장의 파라핀 절편에서 비만세포를 염색하였다(원본배율 x400). E, 4개의 서로 다른 구역에서 비만세포의 수를 측정하였으며, 막대 그래프는 이를 나타낸다($n =$ 그룹 당 4 마우스). 통계적 분석은 Newman-Keuls posttest를 접목한 One way ANOVA를 적용하였다. 통계학적인 유의성은 $*P < .05$ 이다. F는 혈청 내 MCPT-1 수치이다($n =$ 그룹 당 약 3~6). 각 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 6은 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563에 의한 식품 알레르기 완화에 대한 메커니즘을 나타낸다.

도 7은 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532의 특성을 나타낸다. A, *B. longum* KACC91563와 *E. faecalis* KACC91532의 형태론적 특징이 투과전자현미경을 통하여 분석되었다. B, 2주 동안 *B. longum* KACC91563와 *E. faecalis* KACC91532를 마우스에 투여한 후 분변에서의 FISH 분석을 수행하였다.

도 8은 낮은 복용량의 식품 알레르기 모델에서의 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532의 영향을 나타낸다. 식품 알레르기를 유도하기 위하여, 10 mg의 오브알부민(OVA)을 7번 경구 투여하였다(OVA vs OVA + *B. longum*: $*P < .05$, $n =$ 그룹 당 약 6~8 마우스).

도 9는 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563에 의한 식품 알레르기 완화는 T 세포-매개성 면역반응(T cell-mediated immune responses)과 연관이 없다는 것을 나타낸다. A, 5번째 OVA의 경구 투여 후, 장관막 림프절의 세포들을 OVA와 함께 72시간 동안 배양하였고, 배양액에서 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, 및 IFN- γ 의 농도를 측정하였다. B, 비장과 장관막림프절에서 세포를 분리하여 CD4와 Foxp3를 염색하였다. Foxp3 발현 조절 T세포(Foxp3⁺Treg)의 비율은 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다. 값들은 평균±표준오차를

의미한다(n = 그룹 당 4). 각 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 10은 항상성 조건하에서 장(intestine)의 비만세포의 기준치(basal level)에 대한 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563의 효과를 나타낸다. 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563은 음식알레르기의 유도 없이 마우스에 투여되었다. A, 유세포 분석기를 이용하여 장내 존재하는 비만세포의 비율을 확인하였다(n = 그룹 당 5 마우스). B, 공장의 파라핀 절편에서 비만세포를 염색하였고, 3개의 서로 다른 구역에서 비만세포의 수를 측정하였다(n = 그룹 당 약 4~5 마우스, 원본 배율, x400). 값들은 평균±표준오차를 의미한다.

도 11은 식품 알레르기에 대한 비피도박테리움 롱검(*B. longum*)의 대사 물질인 아세트산(acetate)의 효과를 나타낸다. A 및 C, 마우스에서 식품 알레르기 유도하고 아세트산을 투여하는 실험 과정을 나타낸다. B, 식품 알레르기 증상의 아세트산의 효과를 측정하기 위하여, 실험 시작 후 19일째부터 식수에 아세트산 (150 mmol/L)을 넣어 마우스에 매일 먹였다. 알레르기성 설사의 발생률을 분석하였다(n = 그룹 당 5 마우스). D, 식품 알레르기 증상에서의 아세트산의 효과를 확인하기 위하여, 실험 시작일부터 식수에 아세트산 (150 mmol/L)을 넣어 마우스에 매일 먹였다. 알레르기성 설사의 발생률을 분석하였다(n = 그룹 당 약 5~10 마우스).

도 12는 복용량에 따른(dose-dependent manner) 본 발명에 의한 ESBP의 식품 알레르기 완화효과를 나타낸다. A, GST 표지 재조합 ESBP와 GST 표지 재조합 ASBP의 분리한 것을 나타낸다. B 및 C, 다양한 농도의 ESBP와 ASBP를 식품 알레르기 모델 마우스에 투여하였고(0.5 µg, 5 µg, 50 µg) 설사의 발생률을 측정하였다(OVA + GST 50 µg vs OVA+ ESBP 50 µg: **P<0.1, n = 그룹 당 6 마우스).

도 13은 소장 비만세포, 호산구(eosinophils) 및 Foxp3 발현 조절 T 세포 (Foxp3⁺ Treg cell)에 대한 본 발명에 의한 ESBP 효과를 나타낸다. 점막 고유층에 존재하는 비만세포, 호산구, Foxp3 발현 조절 T 세포는 유세포 분석기를 이용하여 분석되었다. A, 비만세포는 IgE⁺c-kit⁺ 세포를 선택하였다. B, 호산구는 Siglec-F⁺CCR3⁺ 세포를 선택하였다. C, Foxp3 발현 조절 T 세포는 CD4⁺Foxp3⁺ 세포를 선택하였다. 값들은 평균±표준오차를 의미한다. Newman-Keuls posttest를 적용한 One way ANOVA를 적용하였다. 통계학적인 유의성은 **p < .01이다. 실험 결과는 두 번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 14는 작용기간 동안 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563의 투여는 식품 알레르기에 대한 증상을 억제하는(suppressive) 효과가 없음을 나타낸다. A, 마우스에서 식품 알레르기 유도하고 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563을 투여하는 실험 과정을 나타낸다. B, 설사 발생을 나타낸다(n = 그룹당 약 4~9 마우스). C, 소장 내에서 비만세포의 비율은 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다(n = 그룹당 약 4~7 마우스). D, 혈청 내 MCPT-1의 양을 나타낸다. E, 소장의 파라핀 절편에서 비만세포를 염색하였다. 서로 세 구역에서의 비만세포 수를 측정하였다(n = 그룹당 약 3~5 마우스, 원본 배율, x400). 값들은 평균±표준오차를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명을 더 쉽게 이해하기 위해 편의상 특정 용어를 본원에 정의한다. 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명에 이용된 과학 용어 및 기술 용어들은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 특별히 지정하지 않는 한, 단수 형태의 용어는 그것의 복수 형태도 포함하는 것이며, 복수 형태의 용어는 그것의 단수 형태도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 본원에 기재된 약어는 다음과 같다.
- [0031] DC: 수지상세포(Dendritic cell)
- [0032] BMDC: 골수유래 비만세포(Bone marrow derived mast cell)
- [0033] EV: 세포 밖 소포체(Extracellular vesicle)
- [0034] ESBP: 패밀리 5 세포 밖 용질-결합 단백질
(Family 5 extracellular solute-binding protein)
- [0036] ASBP : ABC 운반체 기질-결합 단백질
(ABC transporter substrate-binding protein)
- [0037] TEM: 투과전자현미경(Transmission electron microscopy)

- [0039] FISH: 형광동소혼성화(Fluorescence in situ hybridization)
- [0040] OVA: 오브알부민(Ovalbumin)
- [0041] MLN: 장관막림프절(Mesenteric lymph node)
- [0042] HFP: 고배율시야(high-power field)
- [0043] MCPt-1: 비만세포 프로테아제-1(Mast cell protease-1)
- [0044] DLS: 동적광산란(Dynamic light scattering)
- [0045] GST: 글루타티온 S-전이효소(Glutathione S-transferase)
- [0046] TUNEL: 인-시튜 터미널 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼레이즈-매개된 닉 말단 표지(In situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling)
- [0047] i.p.: 복강내(intraperitoneally)
- [0048] i.g.: 위내(intragastrically)
- [0050] 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 함유하는 비만 세포의 세포사멸을 유도하는 조성물을 제공한다.
- [0051] 상기 펩타이드는 이에 한정되는 것은 아니나, 비피도박테리움 룡검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP(Extracellular Solute Binding Protein)인 것을 특징으로 한다[NCBI-ProteinID: AEI97295].
- [0052] 본 발명의 펩타이드는 항알러지 활성을 가질 뿐 아니라, 비만세포-특이적 세포사멸 유도 및 비만세포 활성 억제를 효과적으로 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 본 발명의 비피도박테리움 룡검(*B. longum*) KACC 91563 세포 밖 소포체(EVs)로부터 식별된 2개의 단백질 ESBP 및 ASBP 중, 오직 ESBP만이 마우스 모델에서 식품 알레르기 현상을 저감시키는 기능을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] *B. longum* KACC 91563이 신생아로부터 분리가 되었고, 알레르기 반응에서 중요한 효과를 발휘하는 세포인 비만세포(혹은 T세포 비 의존적인 면역반응)를 표적으로 작용하기 때문에 식품 알레르기를 치료하는 방법으로서의 유산균의 이용은 꽤 안전하다. 또한, 박테리아 유래 세포 밖 소포체는 매우 작은 사이즈이고 박테리아의 구성물을 그들의 지질 이중 층 안에 잘 감싸서 표적 세포까지 높은 농도, 그리고 보호된 상태로 이동시킨다. 따라서, 본 발명자들은 *B. longum* KACC 91563 유래 세포 밖 소포체가 장내 상피세포를 지나 비만세포 특이적인 세포 사멸사를 유도하는 반응에 대한 작용 메커니즘을 제시한다.
- [0055] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당 업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).
- [0056]
- [0057] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 알레르기 모델 실험 동물에 비피도박테리움 룡검 KACC 91563으로부터 분리된 ESBP를 급여하여 알레르기 저감 효과를 확인할 수 있었다.
- [0059] 본 발명에 있어서 상기 알레르기는 이에 한정되는 것은 아니나, 식품 알레르기인 것을 특징으로 한다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 룡검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명에 의한 비피도박테리움 룡검 KACC 91563의 세포 밖 소포체는 비피도박테리움 룡검 KACC 91563 박테리아 자체보다 훨씬 더 효과적으로 비만세포의 세포 사멸사를 유도하는 것으로 나타났다(도 3C 및 도 3D).
- [0062] 한편, 본 발명의 약제학적 조성물들은 상술한 펩타이드 또는 세포 밖 소포체의 약제학적 유효량; 및 약

제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.

- [0063] 본 명세서에서 용어 약제학적 유효량은 상술한 펩타이드의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0064] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington/s Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0065] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 질환의 중증도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함된 ESBP의 일일 투여량은 양을 기준으로 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 1~6회 투여될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액 현탁액, 시럽제 또는 유화액이거나 액스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0070] 상기 비만 세포-매개 질환은 천식, 비염, 아토피성 피부염, 건선, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 비만, 다발성 경화증, 관상동맥질환(coronary artery disease, CAD), 관절염 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)인 것을 특징으로 한다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 알레르기의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 하는 비만 세포-매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0077] 본 발명의 *B. longum* KACC 91563이 신생아로부터 분리가 되었고, 알레르기 반응에서 중요한 효과를 발휘하는 세포인 비만세포(혹은 T세포 비 의존적인 면역반응)를 표적으로 작용하기 때문에 본 발명의 펩타이드 또는 세포 밖 소포체는 안전하게 식품 알레르기 및 비만 세포-매개 질환을 예방 또는 개선하기 위한 식품 조성물로 이용할 수 있다.
- [0079] 한편, 본 발명의 식품 조성물은 상술한 본 발명의 펩타이드 또는 세포 밖 소포체의 식품학적 유효량; 및 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식품 조성물로 이용될 수 있다.
- [0080] 본 명세서에서 용어 식품학적 유효량은 상술한 본 발명의 조성물의 식품학적 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

- [0081] 본 발명의 펩타이드를 식품조성물로 사용하는 경우, 단독으로 사용하거나 식품 첨가제로 상기 ESBP를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0082] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품은 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질 탄수화물, 지방, 영양소, 향미제 및 조미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 타우마틴, 스테비아 추출물등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0083] 예컨대 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 ESBP 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 추출액등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0084] 상기 외에 본 발명의 ESBP는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 ESBP는 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0086] 이하, 본 발명은 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0088] **실시예**
- [0089] **실험 재료 및 방법**
- [0090] **마우스(Mice)**
- [0091] 알레르기 실험 동물은 6주 내지 8주 연령의 BALB/c 야생형(wild-type) 마우스가 포스텍 생마우스동(POSTECH mouse facility)에서 제공되었다. 모든 실험은 포스텍의 동물실험 운영 위원회(the Animal Care and Use Committee)로부터 승인된 실험절차에 따라 SPF(specific pathogen-free conditions) 시설에서 수행되었다.
- [0093] **식품 알레르기 모델(Food allergy model)**
- [0094] 황산 알루미늄 칼륨 면역증강제(aluminum potassium sulfate adjuvant (Sigma-Aldrich, A-7210; 1 mg))와 함께 오브알부민 등급 V (OVA; 50 µg, grade V; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo)를 마우스의 복강 내 주사를 통해 한번 주입하고, 2주 후에 다시 한 번 주입하여 마우스에 식품 알레르기를 유도하였다. 상기 주입 2주 후에, OVA (10 mg 또는 50 mg)를 격일로 경구 투여하였다(도 5의 B 참조). 마우스들은 OVA 경구 투여 전에 3~4시간 전에 금식을 실시하였다. 식품 알레르기의 정도는, OVA 경구 투여 후 1시간동안 마우스를 육안으로 설사 발생 (diarrhea occurrence)을 관찰하여 평가하였다. 다수의 관찰자들은 맹검실험을 통해 설사 발생 점수를 냈다.
- [0096] **유산균 투여(Administration of probiotics)**
- [0097] 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532는 농촌진흥청(Rural Development Administration, RDA) 국립축산과학원(National Institute of Animal Science, NIAS)으로부터 제공되었다. 상기 유산균들은 건강한 한국인 영아의 분변으로부터 분리되었고, 37 °C에서 12시간 동안 배양되었다. 또한 배양된 박테리아는 탈지유(skim milk)를 보호제로 하여 동결 건조되었으며, 구강을 통한 위관영양법(intragastric gavage)으로 매일 투여되었다(5×10^9 c.f.u/mouse). 일부 실험에 있어서, 분말의 마우스 사료와 함께 혼합된 동결 건조된 박테리아는 3일마다 공급된 신선한 사료와 함께 경구 위관영양 실험법(the oral gavage experiment) 때와 동일한 박테리아 수(c.f.u)로 제공되었다.
- [0099] **형광동소혼성화(Fluorescence in situ hybridization, FISH)**
- [0100] 분변 샘플의 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*)는 제조업체의 지침에 따라 FISH 키트(Ribo Technologies (10MEH001 & 10MEH015))를 이용하여 검출되었다.
- [0102] **소장 내 비단세포 정량(Quantification of mast cell in the small intestine)**

- [0103] 오브알부민 투여를 끝낸 후, 마우스를 희생시키고 소장을 분리하였다. 소장의 공장(Jejunum) 조직의 파란 분획은 제조업체의 지침에 따라 나프톨 AS-D 클로로아세테이트 에스테라아제(naphthol AS-D chloroacetate esterase (Sigma-Aldrich, 91C))로 염색되었다.
- [0104] 비만세포는 마우스 당 최소 3개의 다른 분획에서 수를 측정하였다(배율, x400).
- [0106] **세포 밖 소포체의 분리(Isolation of Extracellular Vesicles(EVs))**
- [0107] MRS 브로스 배지(broth media)에서 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532 배양한 후, 배양 배지는 20분 동안 8000 rpm으로 원심분리 되었다. 상술한 바와 같이, 상청액은 0.22 μm 바틀탑 필터(bottle top filter)를 이용하여 여과되었고, 그런 다음, 0.8 M과 2.5 M의 수크로오스 용액(sucrose solutions)을 이용하여 2시간 동안 100,000 g이 원심분리 되었다. 수크로오스 기울기 원심분리(sucrose gradient centrifugation) 후에, 0.8 M과 2.5 M의 수크로오스 중간층(interlayer)이 수집되었다. 수집된 중간층은 PBS에서 희석되었고, 수크로오스 기울기 원심분리가 다시 한 번 수행되었다. 그런 다음, 상기 수집된 중간층은 2시간동안 150,000 g에서 원심분리 되었다. 단백질 농도는 BCA 분석 키트(BCA assay Kit (Thermo Scientific))를 이용하여 측정되었다. 세포 밖 소포체들(EVs)의 크기 분포는 동적광산란 분석(Dynamic Light Scattering (DLS) assay)로 측정되었고, 소포체(EVs)의 이미지화(imaging)는 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 수행되었다.
- [0109] **세포 분리(Cell preparation)**
- [0110] 소장의 점막고유층(Lamina propria, LP) 세포는 상술한 바와 같이 분리되었다. 소장으로부터 지방조직 및 파이어패치(Peyer's patches)를 제거한 후, 상기 소장은 길이 방향으로 펼쳐지고, PBS로 세척되어 1-2cm 길이로 절단되었다. 상피세포의 제거를 위해, 소장 조각은 10 mM EDTA가 포함된 PBS 용액으로 교반하면서 37°C에서 20분 동안 처리되었다. PBS 세척 후, 상기 소장 조각은 잘게 갈려진 후, 37°C에서 45분 동안 400 U/ml의 콜라게네이즈 D(collagenase D (Roche)) 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 디엔에이즈-1(DNase I (Roche))로 분해되었다.
- [0111] LP세포는 40~75% (v/v) 퍼콜(percoll, GE Healthcare Life Science)에서 밀도경사원심분리를 통해서 농축되었다. 그런 다음, LP세포는 CD11b, CD11c, CD19, MHCII 및 TCR β 항원을 이용하여 염색되어, 호산구(eosinophils, CD11b⁺CD11c^{int}MHCII⁻), T 세포(MHCII⁻,TCR β ⁺CD19⁻) 및 B 세포(MHCII⁻TCR β ⁻CD19⁺)로 분류되었다. 수지상 세포 분리를 위해, 비장을 갈고, 37 °C에서 45분 동안 콜라게네이즈 D(400 U/ml) 및 디엔에이즈-1(DNase I (100 $\mu\text{g/ml}$))로 분해되었다. 17.5% 에쿠덴즈 용액(Accudenz solution, Accurate Chemical & Scientific Corporation))으로 원심분리로 농축된 후, 수지상세포(DCs, MHCII⁺CD11c⁺)가 분류되었다.
- [0112] 비만세포 분리를 위하여, 골수세포는 mIL-3 (R&D; 10 ng/ml) 및 mSCF (R&D; 50 ng/ml)의 존재 하에서 1~2 주 이상 동안 배양되었고, 분화된 비만세포(c-Kit⁺FcεR1⁺)가 분류 되었다. 모든 분류 실험은 모플로 아스트로스(MoFlo Astrios (Beckman Coulter))를 이용하여 수행되었다.
- [0114] **세포사멸 분석 (Apoptosis assay)**
- [0115] 소장으로부터 분리된 골수 유래 비만 세포(BMNCs), T 세포, B 세포, 호산구(eosinophils)는 2시간 동안, 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532의 세포 밖 소포체(2 $\mu\text{g/mL}$) 또는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)의 세포 밖 소포체(2 $\mu\text{g/mL}$), 또는 전체 박테리아와 함께 개별적으로 배양되었다. 사멸세포(Apoptotic cells)는 아넥신 V(Annexin V) 및 7-AAD로 염색되었다.
- [0117] **공초점 현미경 (Confocal microscopy)**
- [0118] 소장에서 분리된 비만세포, 수지상세포, T세포, B세포 및 호산구는 DiI(Invitrogen)-표지된 세포 밖 소포체(10 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 2시간 동안 37°C 및 4°C에서 배양되었다. 세척 후, 세포원심분리(cytospin)를 이용하여 공초점 현미경을 위한 세포의 슬라이드가 준비되었다. 세포의 이미지는 DAPI로 염색 후 $\times 400$ 배율로 LSM 700 공초점 현미경(Carl Zeiss)으로 획득되었다.
- [0120] **단백질체학 분석(Proteomic analysis)**
- [0121] 세포 밖 소포체(EVs)의 단백질은 전기영동(SDS-PAGE)에 의해서 분리되었고, 2개의 주요 단백질 밴드가 추출되었다(excised). 겔 조각(gel pieces)은 인 겔 다이제스트 프로토콜(in-gel digestion protocol)에 따라 트립신으로 처리되었다. 그런 다음, 샘플들은 액체 크로마토그래피 직렬 질량 분석계(liquid chromatography-

tandem mass spectrometry(LC/MS/MS))로 주입되었다. 질량 데이터(Mass data)는 애널리스트 QS 2.0 소프트웨어 (Analyst QS 2.0 software, Applied Biosystems)를 이용하여 자동적으로 획득되었다. 데이터베이스 검색은 비 중복 미국 국립생명공학정보센터(nonredundant National Center for Biotechnology information data base(NCBIInr; October 25, 2002))와 비교하여, 프로테오(Proteome Discoverer(version 1.3))을 이용하여 수행 되었다.

[0123] **단백질 정제(Protein purification)**

[0124] 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563의 ESBP 및 ASBP 유전자가 pGEX-4T-3 벡터로 삽입되었고, 대장균(*E. coli*) 스트레인(strain) BL21에 발현되었다. GST가 표지된(GST-tagged) ESBP 및 ASBP가 IPTG에 의해서 유도되었고, 글루타티온 세파로오스 비드(glutathione sepharose beads(GE Healthcare Life Science))를 이용하여 정제되었다.

[0125]

[0126] **TUNEL 분석(In situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling assay)**

[0127] 골수 유래 비만세포는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 또는 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*) KACC 91532의 세포밖 소포체(2 µg/mL), 또는 전체 박테리아와 함께 2시간 동안 개별적으로 배양되었다(incubated). 비만 세포는 세척되고, 세포의 슬라이드는 세포원심분리기(cytospin)를 이용하여 준비되었다. 제조업체의 지침에 따라 사멸 세포(Apoptotic cells)는 DeadEnd™ 형광 검출기 TUNEL 시스템 (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system, Promega)을 이용하여 염색되었다. 세포의 이미지는 DAPI로 염색된 후, Axio Scope. A1 형광 현미경 (Axio Scope. A1 fluorescent microscopy (Carl Zeiss))을 이용하여 획득되었다.

[0129] **유세포분석기(Flow cytometry)**

[0130] 유세포분석기를 위해 이용하는 항체는 다음과 같다: 형광색소가 결합된 항- FceR1(fluorochrome-conjugated anti-FceR1(eBioscience, MAR-1)), 항-TCRβ (BD Biosciences, H57-597), 항-CD19(BD Biosciences, 1D3), 항-CD11b(eBioscience, M1/70), 항-CD11c(BD Biosciences, HL3), 항-MHCII (eBioscience, M5/114.15.2), 항-c-Kit(eBioscience, 2B8), 항-IgE(eBioscience, 23G3), 항-siglecF(BD Biosciences, E50-2440), 항-CD4(eBioscience, RM4-5) 및 항-Foxp3(eBioscience, FJK-16s) 항체. 사멸 세포를 검출하기 위해, 어 넥신 V(AnnexinV (BDHorizon™)) 및 7-AAD(BD Pharmingen)가 이용되었다. 제조업체 지침에 따라, Foxp3 세포내 염색은 Foxp3/전사인자 염색 버퍼 세트(Foxp3/Transcription factor staining buffer set, eBioscience)를 이용하여 수행되었다. 염색된 세포들은 LSR Fortesssa(BD)로 분석되었고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어(FlowJo software, Tree Star, Inc.)를 이용하여 분석되었다.

[0132] **ELISA**

[0133] 장관막림프절(MLN) 세포는 100 µg/ml의 오브알부민(OVA)을 포함한 배지의 37℃에서 72시간 동안 배양 되었다. 제조업체 지침에 따라, 배양 상청액(culture supernatants) 내 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-13(IL-13), 인터루킨-17A(IL-17A) 및 인터페론 감마(IFN-γ)의 농도는 eBioscience의 ELISA 키트를 이용하여 측정되었다. 또한, 혈청 내의 비만세포 프로테아제-1(MCpt-1) 및 오브알 부민-특이적인 IgE(OVA-specific IgE)는 제조업체의 지침에 따라, ELISA 키트(MCpt-1 ELISA kit from eBioscience and OVA-specific IgE ELISA kit from Chondrex)를 이용하여 측정되었다.

[0135] **통계적 분석(Statistical analysis)**

[0136] 모든 분석은 프리즘 소프트웨어(Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA))를 이용하여 수행되었다. 설사 개시(onset) 데이터에 대해서는 프리드먼 분산분석(Friedman's ANOVA)가 이용되었다. 유의적 차이를 측정하기 위해, Newman-Keuls comparison posttest를 적용한 one way ANOVA 및 Student's t test가 이용되었다.

[0138] **결과**

[0139] **마우스 모델에서 비피도박테리움 롱검 KACC 91563의 식품 알레르기 증상완화 효과**

[0140] 건강한 한국인 신생아의 분변 샘플에서 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532를 분리하였다. 투과전자현미경(TEM) 분석에 따르면, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532는 각각 막대 모양(rod-shaped) 및 구형(round-shaped)의 박테리아였다(도 7의 A 참

조). 두 종류의 미생물(microbiota)이 마우스의 장으로 직접 도달할 수 있을지 불명확하였으므로, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532은 2 주간 경구 투여하였으며, 이번 샘플 내의 박테리아는 형광동소혼성화(FISH)를 통해 관찰하였다. 그 결과 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532가 검출되었다. 따라서, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532는 소화되지 않고, 마우스의 장까지 도달할 수 있다는 것을 보여준다(도 7의 B 참조). 식품 알레르기에 대한 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532의 효과를 평가하기 위하여, BALB/c 마우스에서 농도 의존적으로 급성 설사를 일으키는 알레르기 항원(allergen) 유도 식품 알레르기 마우스 모델을 채택하였다. 식품 알레르기가 유도되는 동안, 혐기적 조건(anaerobic condition)에서 배양된 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532를 매일 경구로 투여하였으며(도 1의 A 참조), 이를 통하여, 설사 발생을 확실하게 억제시키는 것은 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532가 아닌 비피도박테리움 롱검 KACC 91563이라는 것을 발견하였다(도 1의 B 참조). 이와 유사하게, 위를 통한(intragastric route) 낮은 투여량의 오브알부민을 마우스에 처리했을 때, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563와 함께 처리된 마우스의 설사개시가 연기되었다(도 8 참조). 매일 한 마리의 마우스에게 5×10^9 c.f.u. 미만의 박테리아를 투여하였을 때는 설사 억제 효과가 없기 때문에, 박테리아의 수는 억제효과에 있어서 중요한 것으로 생각되었다. 결론적으로, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563는 식품 알레르기의 증상을 개선(ameliorate)시키는 기능이 있다는 것을 보여준다.

[0142] **비피도박테리움 롱검 KACC 91563에 의한 T 세포 반응에 대한 효과**

[0143] 식품 알레르기 모델에 있어서, Th2 면역반응이 유도되었으며, 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-9(IL-9) 및 인터루킨-13(IL-13) 같은 Th2 사이토카인이 분비되었다. Th2 면역반응의 감소가 설사의 억제와의 관련성을 조사하기 위해, 장관림프절(MLN)에서 분비되고, 오브알부민으로 유도된 Th1, Th2 및 Th17의 사이토카인을 측정하였다. 식품 알레르기 그룹에서 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-9(IL-9) 및 인터루킨-13(IL-13) 같은 Th2 사이토카인은 강하게 유도되는 반면, Th1 사이토카인인 인터페론 감마(IFN- γ) 및 Th17 사이토카인인 인터루킨-17(IL-17)은 검출되지 않았다. 특히하게, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563에 의해 설사를 완화되었지만, Th2의 사이토카인은 감소되지 않았다(도 9의 A 참조). 나아가, 어떤 박테리아는 Foxp3 발현 조절 T세포를 통하여 식품 알레르기를 조절한다는 보고가 있어, 본 발명인은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532이 이들 세포 분포(cell population)에 영향을 미치는지에 대한 여부를 조사하였다. 도 9의 B는 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532가 장관림프절(MLN) 및 비장(spleen)에서 Foxp3발현 조절 T세포의 비율(proportions)에는 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 또한, 항-염증 사이토카인인 인터루킨-10(IL-10)이 알레르기 질환을 억제하기 위한 경구 항원 투여(oral antigen challenge)에 의해 Foxp3 발현 조절 T세포로부터 발생하였음에도 불구하고, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532은 이 사이토카인의 생성에는 영향을 주지 않았다(도 9의 A). 이 결과는 비피도박테리움 롱검 KACC 91563에 의한 식품 알레르기 조절이 Foxp3 발현 조절 T세포의 증가 또는 Th1 반응에 의한 Th2 면역반응으로 전환(shifting)되어 일어나는 것이 아님을 의미한다.

[0145] **비피도박테리움 롱검 KACC 91563에 의한 소장 내 비만세포의 수의 감소 효과**

[0146] 비만세포는 식품 알레르기 반응 동안 중요한 효과기 세포(effector cell)이므로, 본 발명인은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563의 투여가 장 내 비만세포의 수를 감소시키는지를 조사하였다. 소장 내 비만세포는 클로로아세테이트 에스테라아제(chloroacetate esterase) 활성에 의해 염색되었고, 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532와 달리 비피도박테리움 롱검 KACC 91563은 상기 비만세포의 수를 현저하게 감소시킨다는 것을 발견하였다(도 2의 A 참조). 또한, 장의 비만세포로부터 분비된 비만 세포 프로테아제-1(MCPT-1)의 수치는 현저하게 감소하였다(도 2의 B 참조). 비피도박테리움 롱검 KACC 91563이 비만세포의 기본적인 수에 영향을 줄 가능성을 배제하기 위하여, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563을 안전하게 정착(stable colonization) 할 수 있도록 충분한 시간인 한 달 동안, 경구로 투여 하였다. 비피도박테리움 롱검 KACC 91563를 투여한 후, 소장의 점막고유층(lamina propria) 기본적인 비만세포의 수는 감소하지 않았다(도 10 참조). 상기 모델에서 나타나는 식품 알레르기 증상인 설사는 Fc ϵ RI 및 IgE의 가교(cross-linking)를 통하여 비만세포의 탈과립(degranulation)에 의해 유도되었다. 따라서 본 발명인은 혈청(serum) 내 오브알부민-특이적인 IgE의 수치를 조사하였다. 그러나 오브알부민-특이적인 IgE의 생산에 대하여 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532는 둘 다 측정할 만한 영향을 미치지 않았다(도 2의 C 참조). 전체적으로, 상기 데이터는 비피도박테리움 롱검 KACC 91563는 소장 내의 비만 세포의 선택적인 감소를 통하여, 알레르기 설사를 억제한다는 것을 보여준다.

[0148] **비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532의 골수 유래 비만세포(BMCS)의**

세포자살 유도 효과

[0149] 비피도박테리움 롱검은 아세테이트(acetate)와 같은 짧은 사슬 지방산(short chain fatty)의 생산을 통해 감염으로부터 장내 방어작용을 강화시키고 숙주(host)를 보호한다. 따라서 본 발명인은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 생산된 아세테이트에 의해 식품 알레르기가 예방(prevention)될 것이라는 가설을 세웠으나, 식품 알레르기의 전기간 또는 반응기(effector phase) 동안 아세테이트의 투여하였음에도 설사는 완화되지 않았다(도 11). 본 발명인은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563만이 비만세포의 수를 감소시켜 식품 알레르기를 완화했기 때문에, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563의 세포 밖 소포체가 골수유래 비만세포(BMNCs)의 사멸을 유도할 수 있다는 가설을 세웠다. 따라서 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532에서 세포 밖 소포체가 만들어지는 확인하였다. 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532로부터 생산된 세포 밖 소포체의 적절한 분리를 확인하기 위해, DLS 분석(DLS assay) 및 투과전자현미경(TEM)을 이용하여, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 유래의 세포 밖 소포체 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532 유래의 세포 밖 소포체의 형태 및 크기를 확인하였다. 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532의 세포 밖 소포체는 구형(spherical morphology)(도 3의 A) 및 가우시안 분포를 가진 크기의 다양성을 보이며, 각각 평균 지름이 60 nm 및 25 nm 인 것을 보여준다(도 3의 B). 특이하게, 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532에서 유래된 세포 밖 소포체와는 달리, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 자체뿐만 아니라 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 유래의 세포 밖 소포체도 골수 유래 비만세포(BMNCs)에서 어넥신 V 발현 사멸 세포(Annexin V⁺ apoptotic cells)를 증가시켰다. 그러나, 두 종류의 EV는 T 세포, B 세포, 또는 호산구의 세포 사멸을 유도하진 못하였다(도 3의 C).

[0150] 활성화된 비만세포는 어넥신 V의 발현을 증가시키므로, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 유래의 세포 밖 소포체가 골수 유래 비만세포(BMNCs)에서 세포 사멸사를 유도함을 확인하기 위해 튜넬 분석(TUNEL assay)을 수행하였다. 비피도박테리움 롱검 KACC 91563의 세포 밖 소포체는 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 그 자체보다 훨씬 더 효과적으로 비만세포의 세포 사멸사를 유도하였다(도 3C 및 도 3D). 하지만, 테로코커스 패칼리스 KACC 91532의 세포 밖 소포체는 유의한 비만세포의 세포 사멸사를 유도하지 못했다. 이들 데이터는 골수 유래 비만세포(BMNCs)의 세포 사멸사가 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 유래 세포 밖 소포체 및 전체 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 박테리아에 의해 선택적으로 유도된다는 것을 보여준다.

[0152] 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532로부터 유래된 세포 밖 소포체의 골수 유래 비만세포(BMNCs)에 의한 특이적 내재화

[0153] 골수 유래 비만세포(BMNCs)가 직접적으로 세포 밖 소포체에 상호작용을 하는지 여부를 확인하기 위해, 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532에서 유래된 DiI-표지 세포 밖 소포체와 함께 골수 유래 비만세포(BMNCs), 비장의 수지상세포(splenic DCs), 호산구(eosinophils), T 세포 및 B 세포를 배양하였다. 골수 유래 비만세포(BMNCs)는 다른 세포들과 비교하여 높은 획득능(uptake ability)을 나타냈다(도 4). 사실상, 수지상 세포(DCs)는 식세포(phagocytes)로 알려져 있음에도 불구하고, 골수 유래 비만세포(BMNCs)는 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 유래 세포 밖 소포체뿐만 아니라, 표지된 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532 유래 세포 밖 소포체도 수지상 세포(DCs)보다 쉽게 획득하였다.

[0154] 식세포 작용의 가능성을 배제하기 위하여, 본 발명자들은 각각의 세포들에 세포 밖 소포체를 식세포 작용을 억제하는 조건인 4 °C에서 처리하였다. 4 °C에서 세포 밖 소포체가 들어간 수지상세포의 양이 유의하게 감소한 것에 반하여 비만세포는 온도에 의해 큰 영향을 받지 않았다(도 4). 이는 골수 유래 비만세포(BMNCs)가 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 또는 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532 뿐만 아니라 어떤 종류의 세균 유래의 세포 밖 소포체를 흡수할 수 있는 능력을 가질 수 있으며, 그들의 표면에 있는 알려지지 않은 수용체(receptor)를 통해 비피도박테리움 롱검 KACC 91563 및 엔테로코커스 패칼리스 KACC 91532의 세포 밖 소포체가 흡수될 수 있음을 암시한다.

[0156] 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563으로부터 분리된 ESBP의 식품 알레르기 저감 효과

[0157] 본 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563로부터 유래된 세포 밖 소포체(EVs)가 골수 유래 비만세포(BMNCs)의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 유래 세포 밖 소포체의 어떤 성분이 비만세포의 세포 사멸사를 유도하는지 검증하기 위하여 세포 밖 소포체의 단백질 구성을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563의 세포 밖 소포체(EVs)는 도 5의 A에 나타난 바와 같이 2개의 단백질을 포함하고 있다. 상기 2개의 단백질은 단백질 분석(proteomic

analysis)을 통해 ESBP와 ABC 트랜스포터 기질-결합 단백질(ABC transporter substrate-binding protein, ASBP)로 밝혀졌다. 두 단백질의 기능 연구를 수행하기 위하여, 도 12의 A에 나타난 바와 같이, ESBP 및 ASBP의 GST-표지된 재조합(recombinant) 단백질을 대장균에서 발현시키고, 글루타티온 세파로오스 비드를 이용하여 분리하였다(도 12의 A 참조).

[0158] 상기 ESBP 및 ASBP이 식품 알레르기를 저감시키는지 확인하기 위해, 도 5의 B에 나타난 바와 같이 1번 째와 5번째의 오브알부민(OVA) 경구 투여 전에 분리된 단백질을 2번 복강 내로 주사하였다. ASBP가 아닌 ESBP만이 투여 용량에 비례하여 설사 발생을 급격히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 5C, 도 12의 B 및 C 참조).

[0159] 또한, 도 5D 및 도 13에 나타난 바와 같이, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563과 같이 재조합 ESBP 단백질도 소장 내의 Foxp3 발현 조절 T 세포 및 호산구의 구성에는 영향을 미치지 않고 소장 내 비만세포의 수를 감소시켰다.

[0160] 나아가 GST 및 ASBP 단백질과 비교했을 때, 혈청내 비만세포 프로테아제-1(MCPT-1) 수치도 ESBP 단백질에 의해서만 감소되었다(도 5의 F 참조). 이러한 데이터는 특히 ESBP가 식품 알레르기 모델에서 비만세포(mast cells)의 수를 감소시키고, 설사를 완화시켰다는 것을 보여준다.

[0161] 상술한 바와 같이, 본 발명의 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 세포 밖 소포체(EVs)로부터 식별된 2개의 단백질 ESBP 및 ASBP 중, 오직 ESBP만이 마우스 모델에서 식품 알레르기 현상을 저감시키는 기능을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

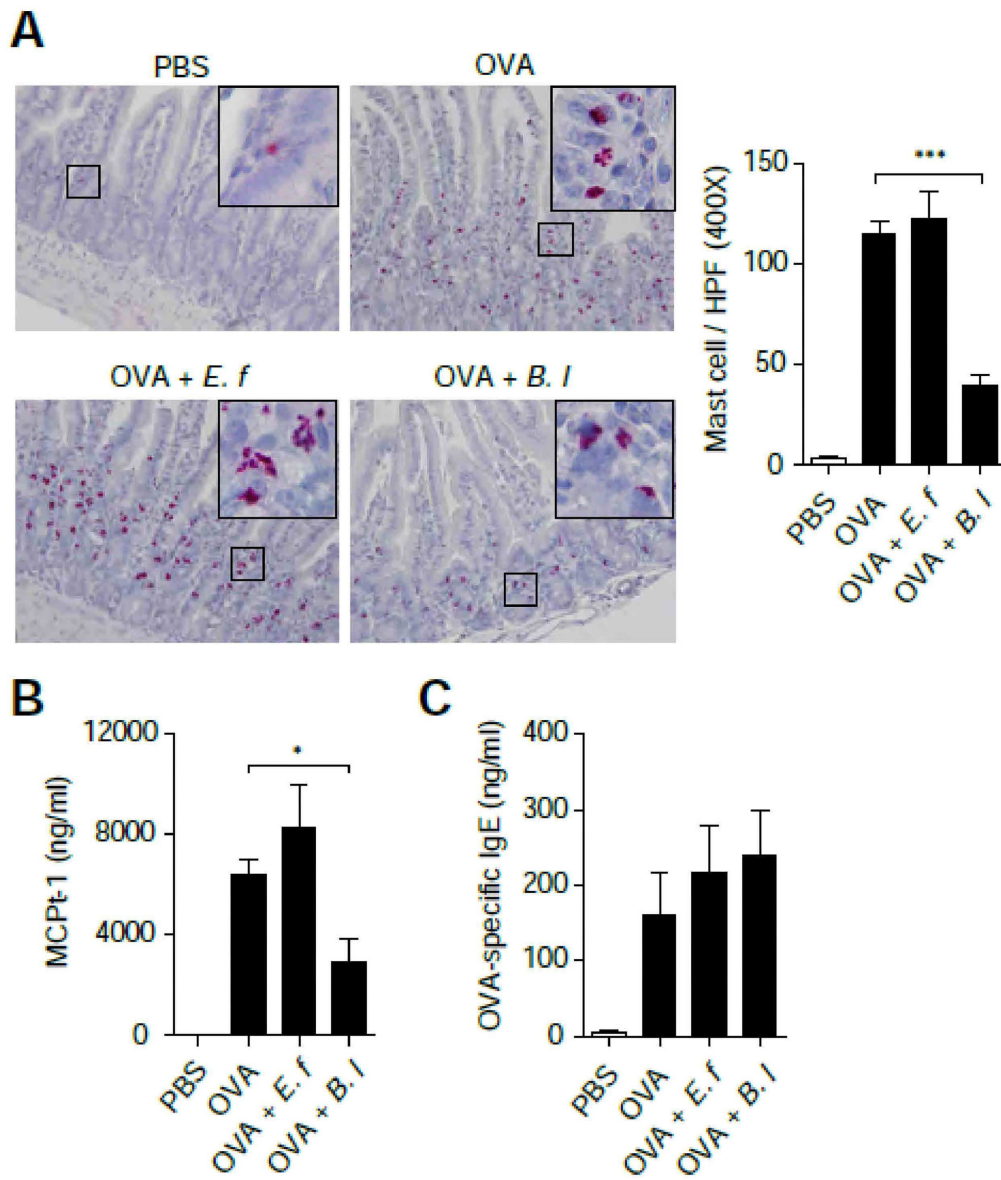
[0162] *B. longum* KACC 91563이 신생아로부터 분리가 되었고, 알레르기 반응에서 중요한 효과를 발휘하는 세포인 비만세포(혹은 T세포 비 의존적인 면역반응)를 표적으로 작용하기 때문에 식품 알레르기를 치료하는 방법으로서의 유산균의 이용은 꽤 안전하다. 또한, 박테리아 유래 세포 밖 소포체는 매우 작은 사이즈이고 박테리아의 구성물을 그들의 지질 이중 층 안에 잘 감싸서 표적 세포까지 높은 농도, 그리고 보호된 상태로 이동시킨다. 따라서, 본 발명자들은 *B. longum* KACC 91563 유래 세포 밖 소포체가 장내 상피세포를 지나 비만세포 특이적인 세포 사멸사를 유도하는 반응에 대한 작용 메커니즘을 제시한다(도 6). 나아가, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563으로부터 분리된 ESBP는 식품 알레르기 모델의 작용기간 동안 비만세포의 감소를 유도하고, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563와 같은 정도로 식품 알레르기를 완화시켰다. 도 12의 B에 나타난 바와 같이, 식품 알레르기를 효과적으로 완화시키는 ESBP의 양은 50 µg이었다.

[0164] **단백질 분석 결과**

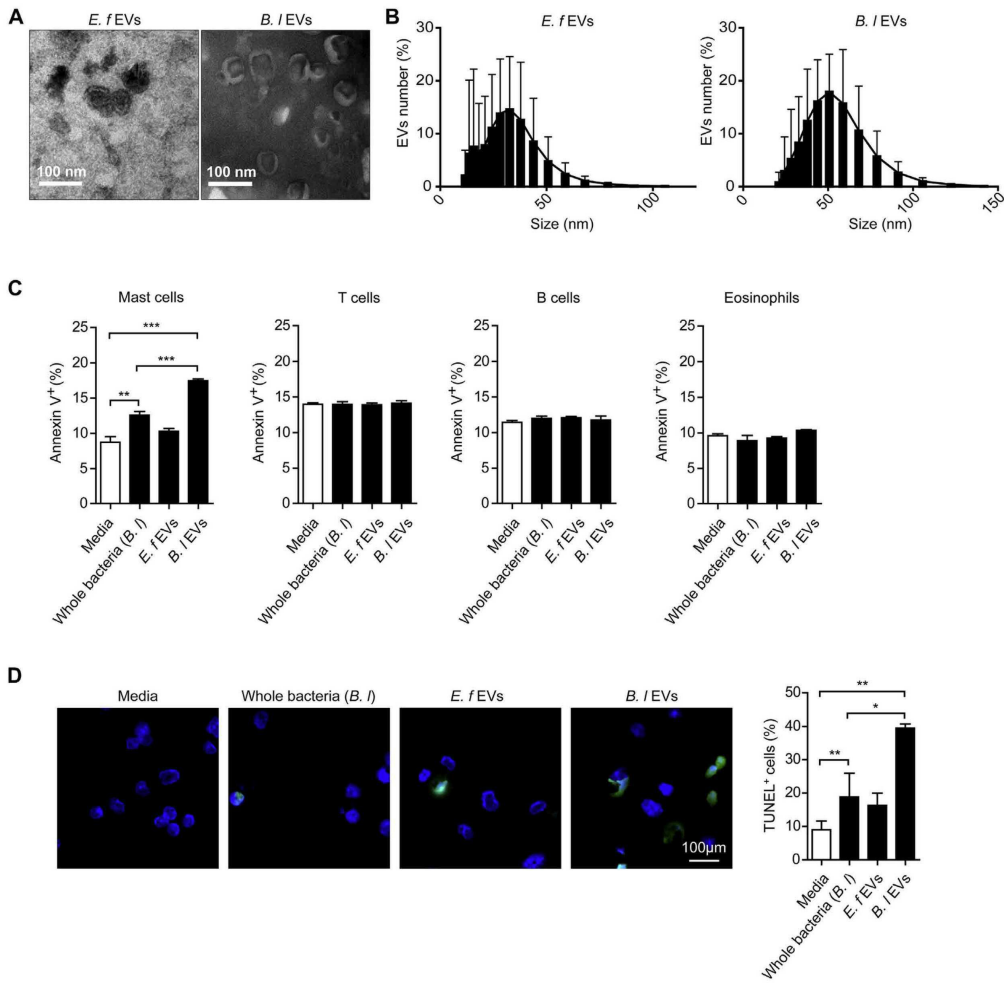
[0165] 알레르기 질환을 치료하기 위한 다양한 임상적 시도 및 이에 대한 상업적 시장의 규모 증가에 있어서, 본 발명의 ESBP는 식품 알레르기, 및 아토피성 피부염, 또는 천식과 같은 비만세포-매개 질환(mast cell-mediated disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 제공될 수 있다. 본 발명의 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) KACC 91563 세포 밖 소포체(EVs)로부터 유래된 ESBP는 비만세포를 타겟으로 하는 알레르기 질환에 대한 신규한 치료 조성물로 이용될 수 있다.

[0167] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

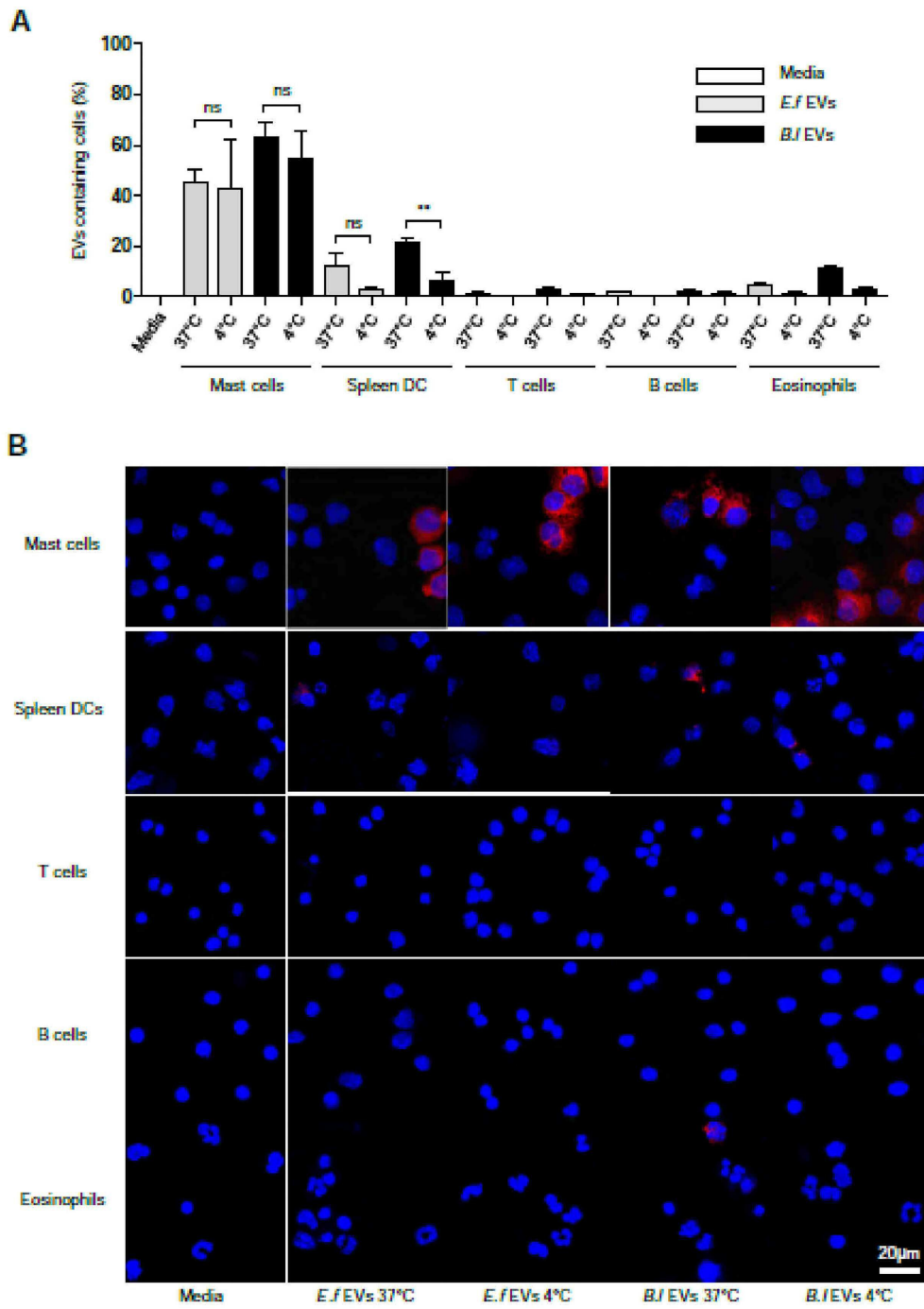
도면2



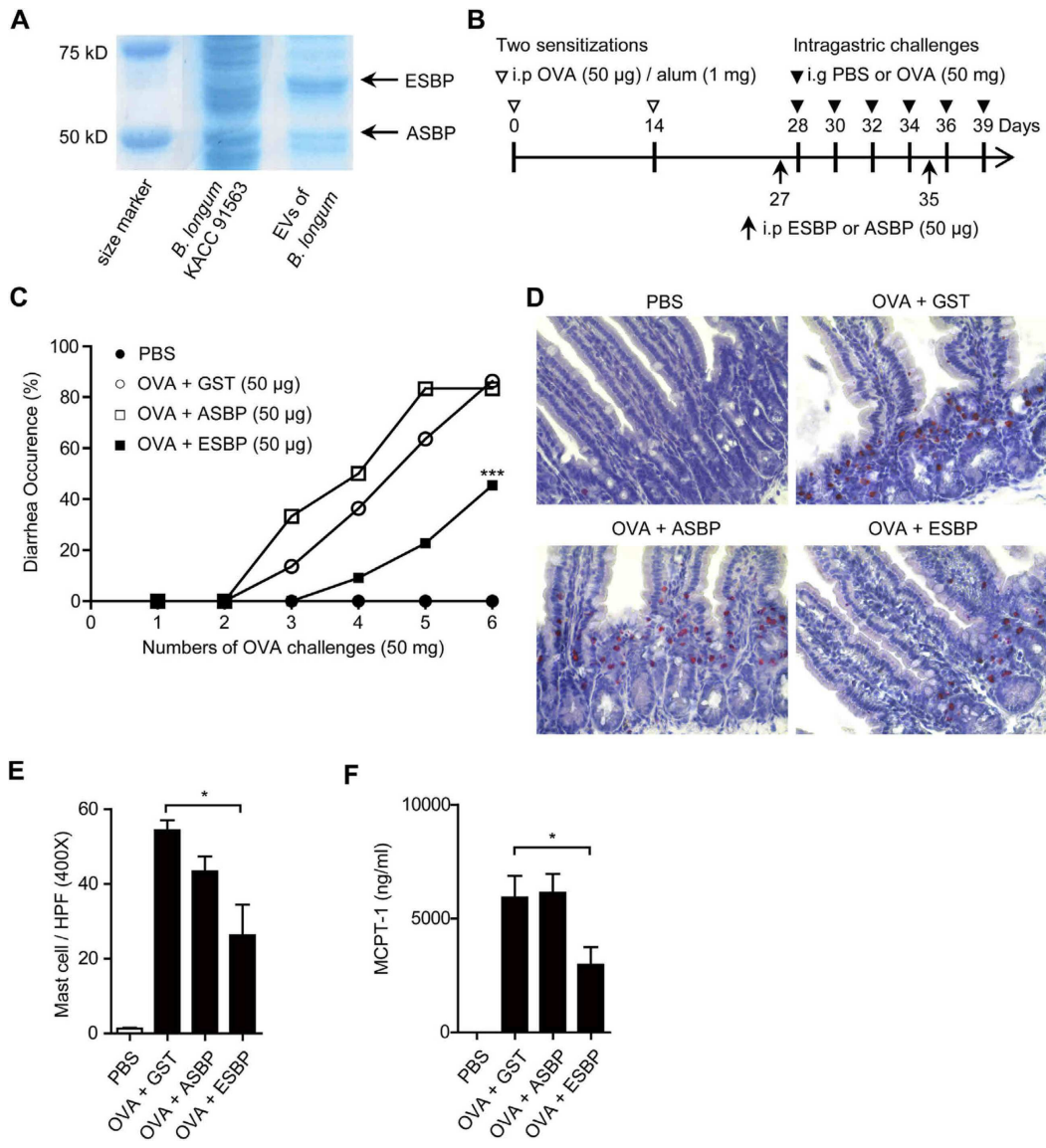
도면3



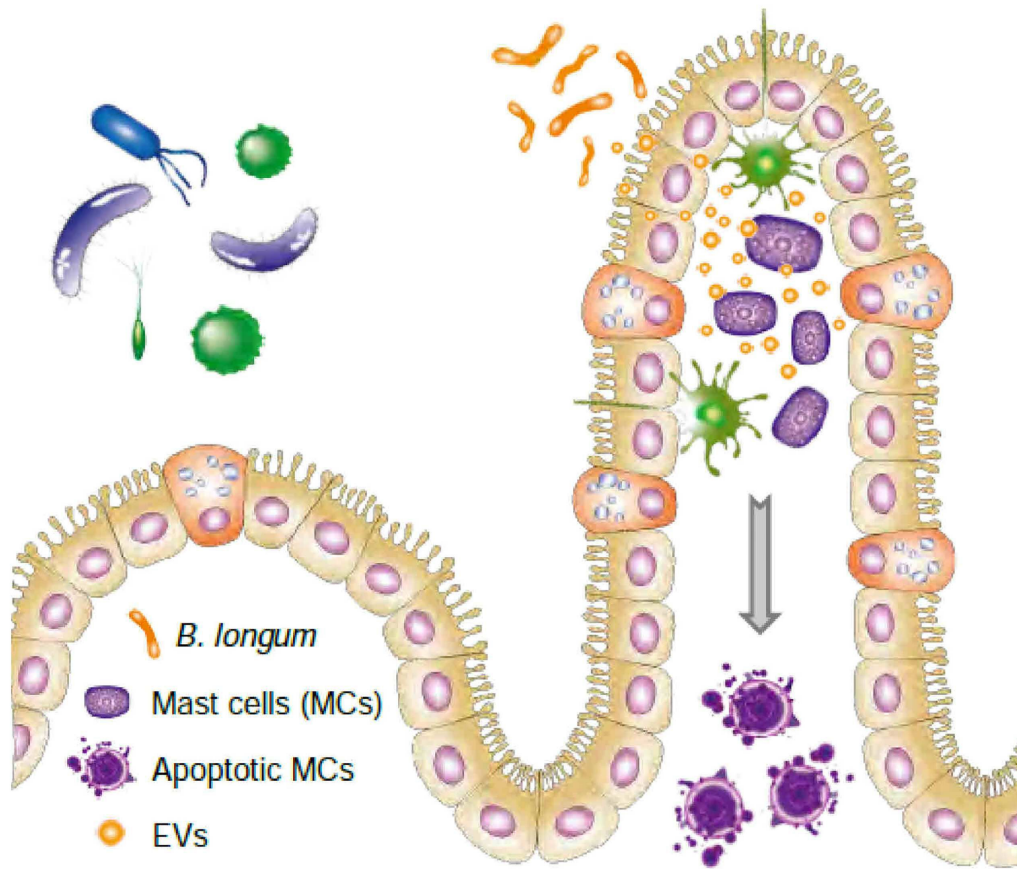
도면4



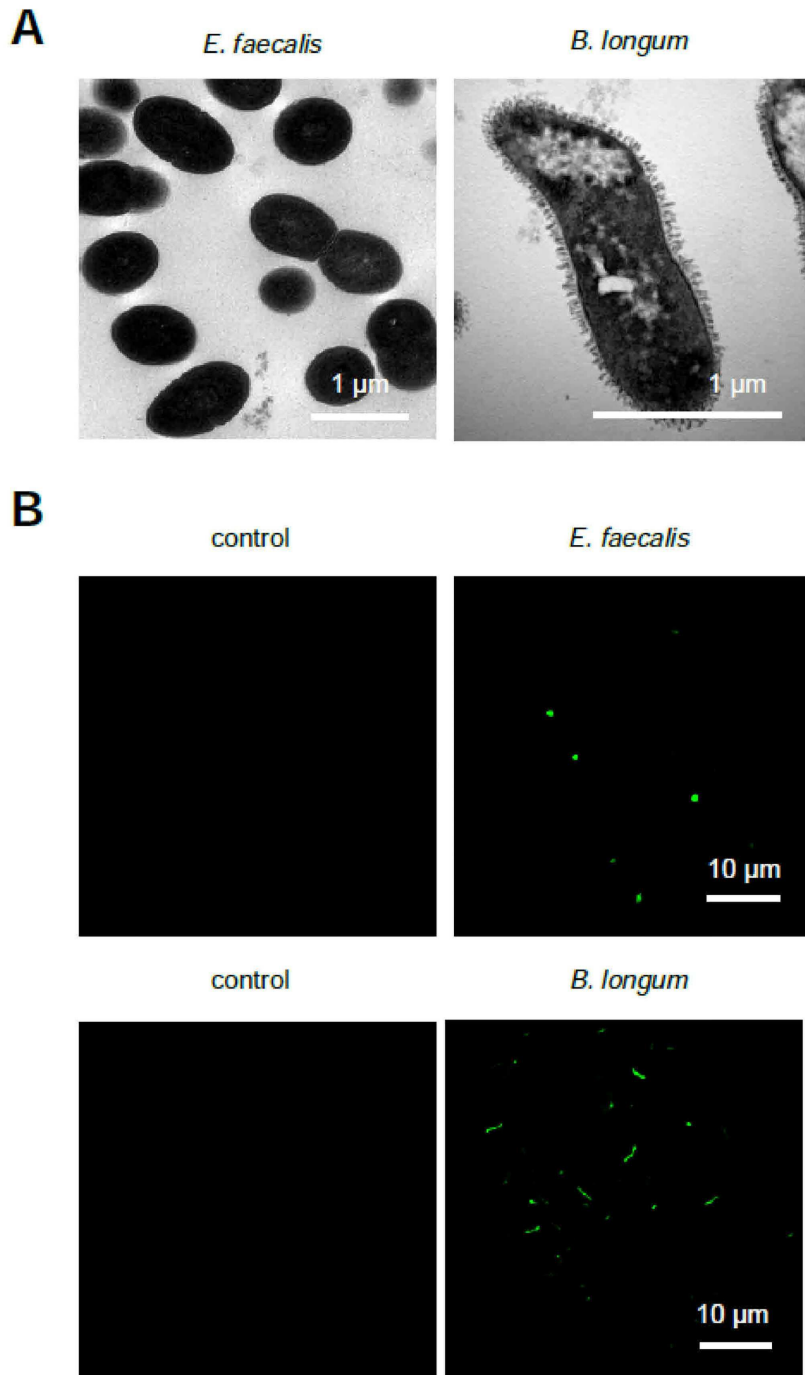
도면5



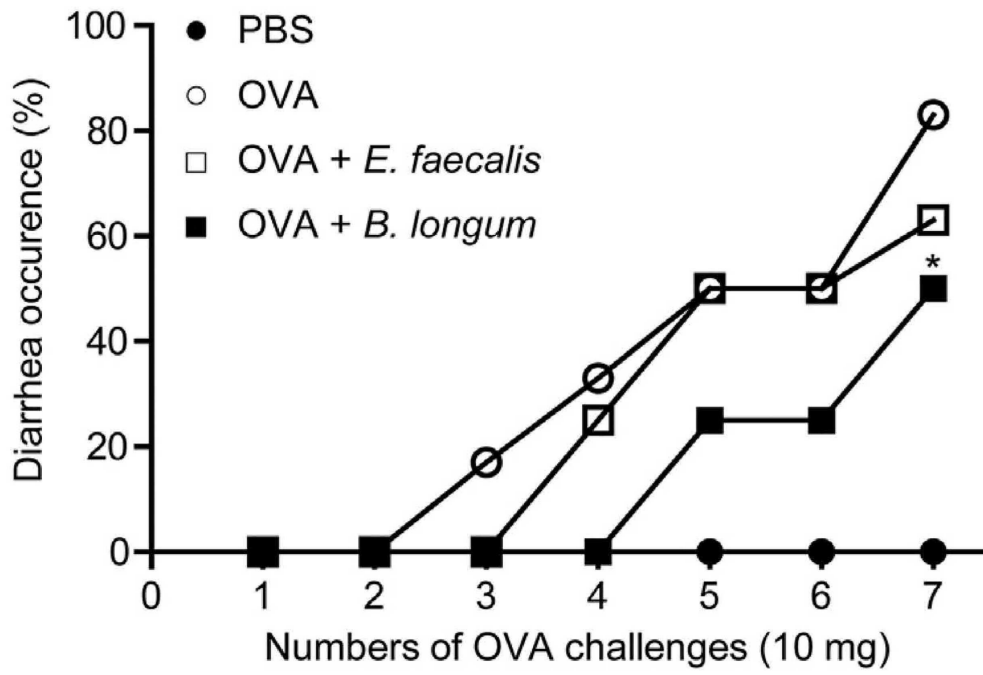
도면6



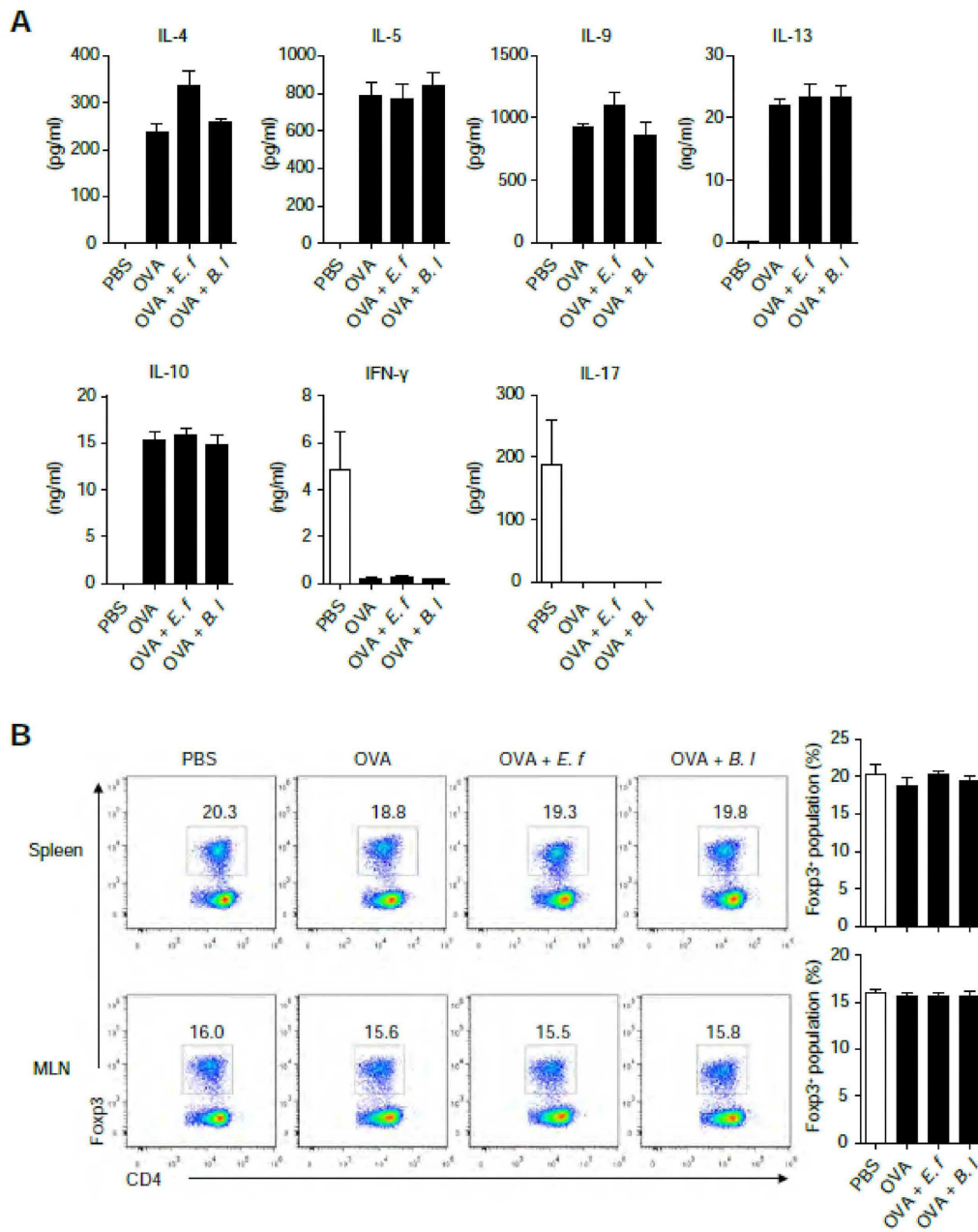
도면7



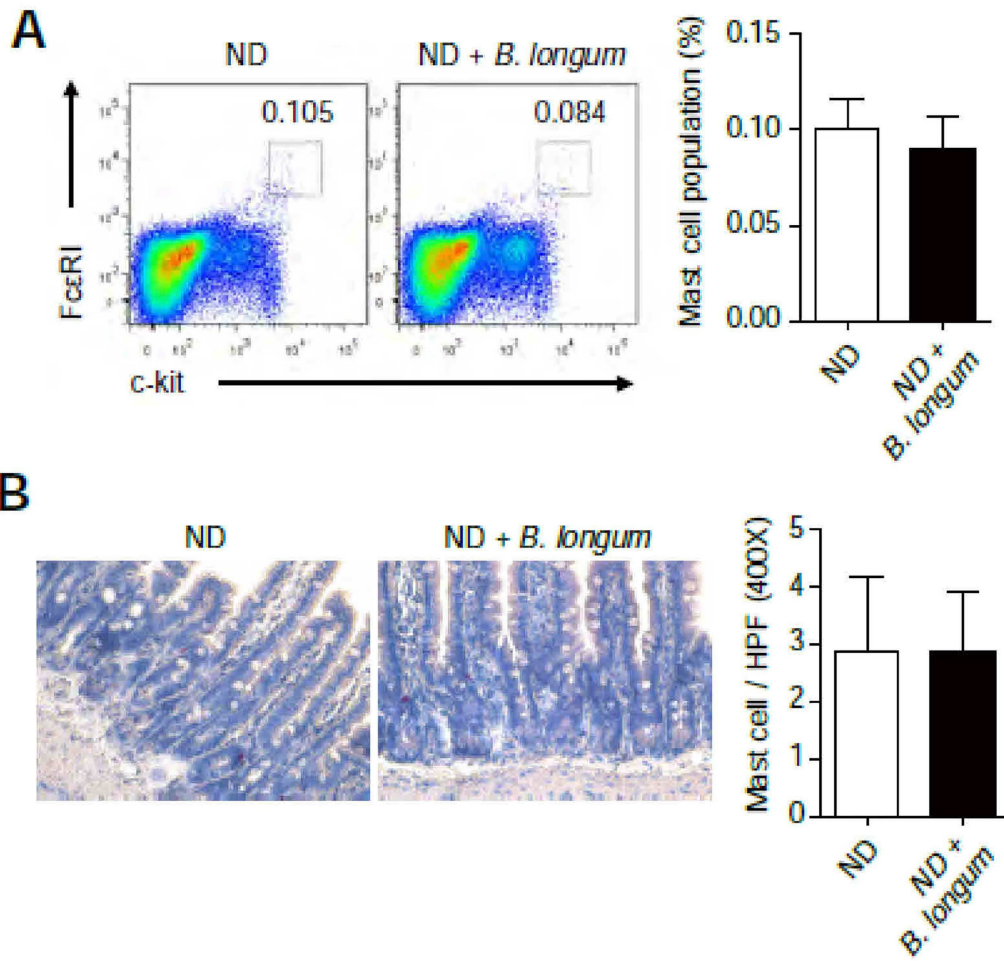
도면8



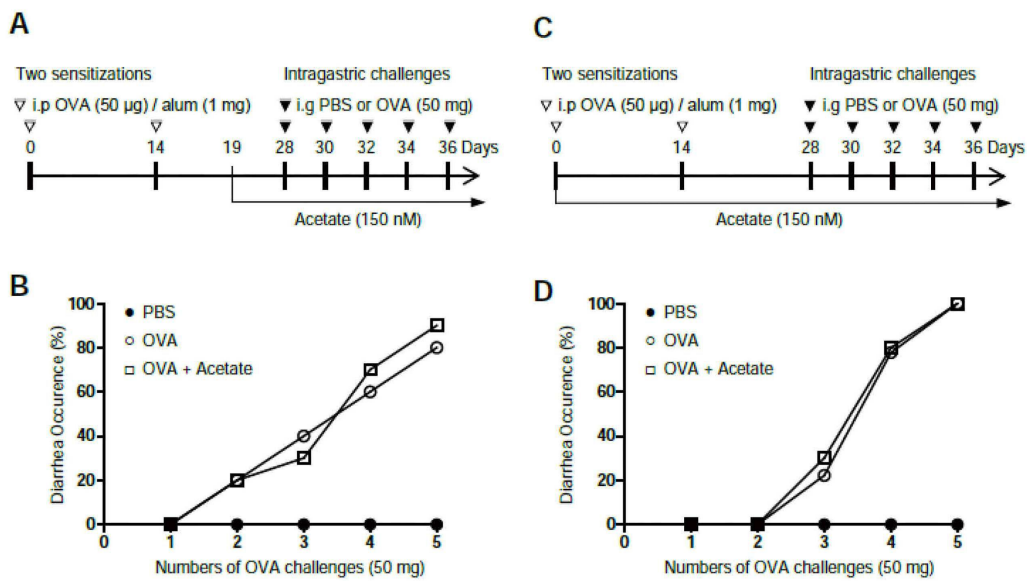
도면9



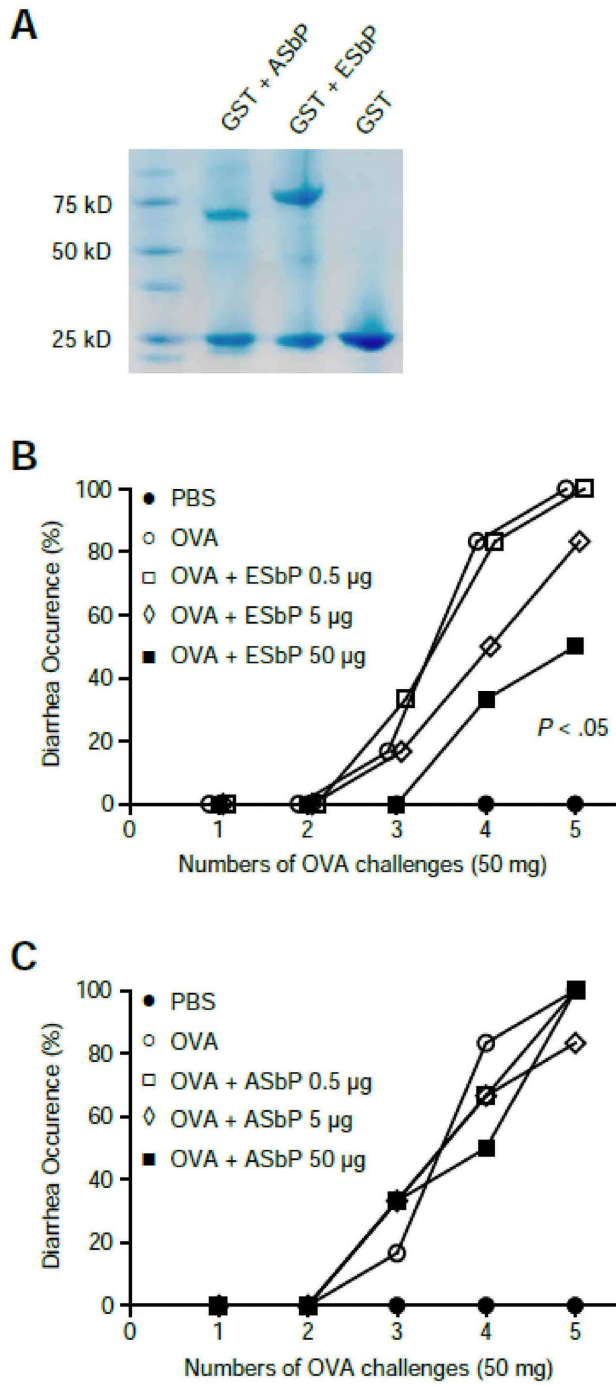
도면10



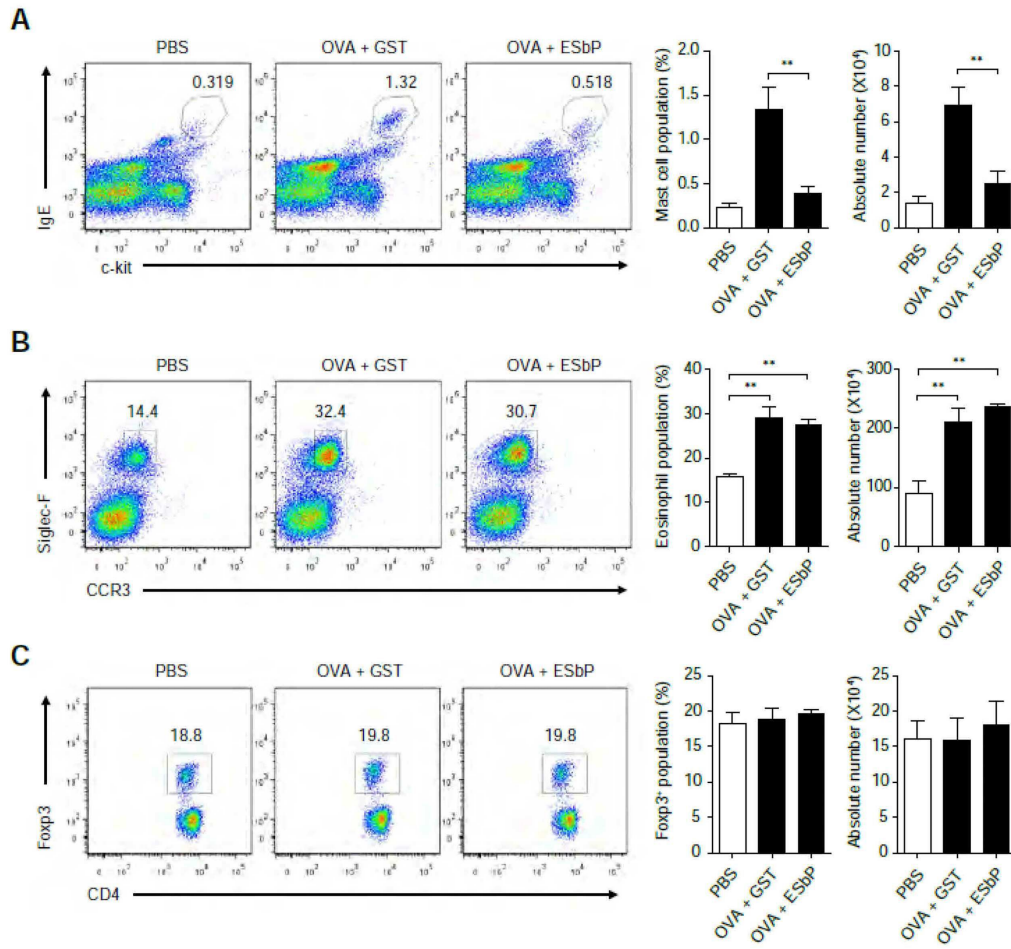
도면11



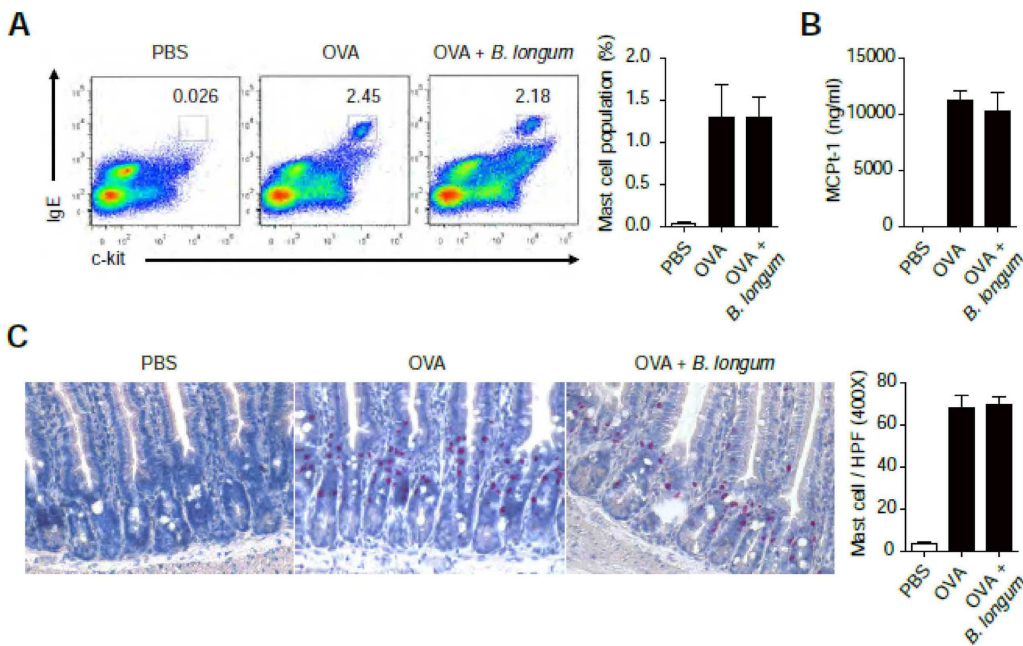
도면12



도면13



도면14



서열목록

<110> RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION
 <120> Extracellular Solute Binding Protein (ESBP) derived from
 Bifidobacterium longum KACC 91563 and Anti-allergy Composition
 using the Same
 <130> NPF28143
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium longum
 <400> 1

Met Lys Lys Lys Ala Leu Ala Phe Ala Ala Met Ala Cys Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Ser Ala Cys Gly Gly Ser Asn Ser Asn Ala Ala Ser Gly
 20 25 30
 Asp Thr Ala Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ala Tyr Asn Ser Glu Pro Gln
 35 40 45
 Asn Pro Leu Ile Pro Gly Asn Thr Asn Glu Thr Gly Gly Gly Lys Pro
 50 55 60
 Val Asp Leu Leu Phe Ser Arg Leu Val Ser Phe Asp Lys Asp Gly Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Asn Glu Val Ala Glu Ser Ile Thr Pro Asn Asp Asp Ala Thr
 85 90 95
 Gln Tyr Thr Ile Lys Ile Lys Ser Gly Trp Lys Phe Thr Asp Gly Thr
 100 105 110
 Pro Val Thr Ala Glu Ser Phe Thr Lys Ala Trp Ser Tyr Val Ala Asn
 115 120 125
 Val Lys Asn Ala Gln Lys Cys Ser Ser Phe Phe Ser Thr Ile Lys Gly
 130 135 140
 Tyr Asp Gly Leu Gln Ala Asp Gly Leu Lys Gly Asp Glu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Gly Leu Lys Val Val Asp Asp Thr Thr Phe Thr Val Asp Leu Asn Gln
 165 170 175
 Ser Asp Ser Val Phe Pro Ile Lys Val Gly Tyr Ser Ala Phe Ala Pro
 180 185 190
 Leu Pro Glu Ser Phe Tyr Lys Asp Pro Lys Ala Phe Gly Glu Ala Pro
 195 200 205
 Val Gly Asn Gly Pro Tyr Lys Phe Ser Lys Trp Asp His Asn Lys Glu
 210 215 220
 Ile Ala Leu Val Lys Asn Pro Asp Tyr Lys Gly Asn Glu Asp Val Lys
 225 230 235 240
 Asn Asp Gly Val Thr Phe Lys Val Tyr Thr Asp Asp Ser Ala Ala Tyr
 245 250 255
 Arg Asp Ile Gln Ala Gly Asn Leu Asp Val Met Glu Ser Val Pro Ala
 260 265 270
 Ala Phe Thr Lys Thr Phe Lys Thr Asp Lys Lys Val Gln Ala Tyr Ser
 275 280 285
 Glu Ala Gly Ser Val Ile Gln Thr Phe Thr Ile Pro Ser Ser Leu Asp
 290 295 300
 His Phe Lys Asn Asp Glu Glu Gly Gln Leu Arg Arg Gln Ala Ile Ser
 305 310 315 320
 Met Ala Ile Asn Arg Asp Gln Leu Ile Asp Lys Val Leu Asn Gly Asn
 325 330 335
 Ala Thr Ala Ala Thr Glu Phe Thr Ser Pro Lys Thr Pro Gly Tyr Ser
 340 345 350
 Asp Ser Leu Lys Gly Ala Asp Asn Leu Lys Phe Asn Ala Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Glu Leu Trp Ala Lys Ala Asp Ala Ile Ser Lys Tyr Asp Gly Gln
 370 375 380
 Leu Thr Phe Ser Tyr Asn Ala Asp Ser Gly Ala Lys Pro Leu Tyr Asp
 385 390 395 400
 Ala Val Val Asn Gln Leu Lys Asn Asn Leu Gly Ile Asp Ala Ala Thr

