명세서

발명의 명칭: 프로바이오틱스 및 IGE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 포함하는 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본원 발명은 알러지 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 식품 알러지는 비병원성 식품 항원(알레르겐)에 대한 면역학적 내성의 저하로 인해 발병하는 질환이다. 상기 질환은 식이 제한으로 인해 삶의 질을 저하시키고 급성 및 만성 아나필락시스(anaphylaxis)가 발병할 경우 생명까지 위협할 수 있다. 이와 같은 식품 알러지 뿐만 아니라, 알러지 비염, 아토피 피부염 등 알러지 질환은 산업화, 서구화된 현대사회에서 높은 속도로 확산 되고 있다. 또한, 중증 알러지 질환인 아나필락시스의 발생도 증가하고 있다. 이러한 면역질환은 삶의 질을 매우 떨어트리며 이에 따른 사회경제적 비용도 급증하고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.

[3] 식품 알러지 질환은 IgE-매개 면역 반응 또는 IgE-비 매개 면역 반응을 통해 발생할 수 있지만 IgE-매개 식품 알러지가 가장 일반적이다. IgE-매개 식품 알러지에서 알레르겐은 IgE에 결합하고, 비만 세포(mast cell) 및 호염기성 과립구(basophils)와 같은 효과 세포의 고친화성 IgE Fc 수용체인 FcεRI에 알레르겐이 결합된 IgE가 교차 결합하여 효과 세포의 활성화를 유도한다. 효과 세포가 활성화되면 조절자를 방출함으로써, 즉각적인 과민증을 일으킨다. 식품 알러지 질환뿐 아니라, 대부분의 알러지 질환은 면역글로불린 E(IgE)에 의한 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상적으로는 혈청 중에 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우에 알러지 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE는 비만 세포(Mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE Fc 수용체(FcεRI)에 결합할 수 있다.

[4] 이러한 IgE와 IgE Fc 수용체의 결합에 의해 비만 세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출하게 된다. 비만 세포나 호염기성 과립구가 화학 매개자를 방출하게 되면 알러지 증상이 발생하게 된다. 특히, IgE 및 FcεRI이 결합할 경우 알러지 증상이 악화될 수 있다. FcεRI-발현 세포는 알러지 환자에서 증가한다고 알려져 있다.

[5] 알러지 질환을 치료하기 위하여, 알레르겐 회피, 항알러지 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항 IgE 항체 개발 등 알러지 질환을 치료하기 위한 다양한 방법이 제안되었다. 그러나 알러지의 근본 원인을 치료할 수 없거나, 약의 효능이 불충분하거나 심각한 부작용이 발생하는 등 많은 단점을 가지고 있다.

[6] 한편, 알러지 질환을 치료하거나 개선하기 위한 목적으로 유산균과 같은 미생물을 이용한 방법이 연구되고 있다. 이와 같은 건강에 유익한 미생물을 프로바이오틱스라고 한다. 그러나 알러지 억제와 같은 면역제어용 프로바이오틱스 발굴 및 평가 기술은 아직 확립되지 않은 상태이다. 특히, 프로바이오틱스의 근본적 작용기작에 대한 연구는 미비한 상태이며 대부분의 연구가 in vitro에서 행해지고 있다. 즉, 프로바이오틱스의 섭취는 구강을 통해 이루어짐에도 불구하고 지금까지의 연구는 대부분 세포주를 이용한 in vitro 실험이 주를 이루었으며 이러한 실험 방법은 사람이 프로바이오틱스 섭취 시 나타낼 수 있는 기능에 대한 연구를 대체할 수 없는 큰 단점이 있다.

[7] 또한, 알러지 질환을 치료하기 위하여 면역글로불린 조성물이 연구되고 있다. 이러한 조성물은 알러지 및 천식을 포함하여 IgE-매개된 장애를 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다(KR10-1783272B1). 특히, IgE 항체의 Fc 일부분을 표적으로 하는 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다. 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 오말리주맙을 고용량으로 투여하여야 하므로 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다(The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925.).

[8] 오말리주맙이 부작용을 일으키는 근본적인 메커니즘은 아직 확인되지는 않았지만, 오말리주맙이 IgG1 항체라는 사실 때문일 것으로 예상할 수 있다. 마우스 모델을 대상으로 한 연구에 따르면, 다량의 항원-특이 IgG1 항체는 항원이 많은 환경에서 저친화성 IgG 수용체인 FcγRIII와 혈소판-활성화 인자를 통해, 수동적 전신성 과민증(passive systemic anaphylaxis, PSA)을 유도할 수 있다. 또한, 이러한 IgG-매개된 아나필락시스는 FcεRI 신호 전달의 부족으로 과장되게 일어난다. 따라서, 높은 수준의 IgE를 나타내는 알러지 질환 환자에게 상당량의 오말리주맙을 주입하게 되면 수동적 전신성 과민증이 야기될 수 있다. 최근에 사람에서 발현되는 저친화성 IgG 수용체인 FcγRIIA도 IgG-매개된 아나필락시스와 관련되어 있다고 보고되었다. 그뿐 아니라 시판 후 연구를 통해 알러지 육아종 혈관염, 특발성 중증 혈소판감소증 등의 이상 반응이 보고되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 알러지 질환에 대해 많은 연구가 진행되고 있으나, 알러지 질환을 획기적으로 개선할 수 있는 방법은 현재 개발되지 못한 실정이다. 본원 발명의 목적은 이러한 알러지 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[10] 본원 발명의 일 측면으로 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공한다.

[11] 또 다른 측면으로 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알러지 질환 치료 및

예방용 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 측면으로 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 알러지 증상 개선 및 완화용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[12] 또 다른 측면으로 프로바이오틱스를 포함하는 제1조성물 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 포함하는 제2조성물을 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[13] 본원 발명에 따른 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 생체 내에서 알러지를 개선하는 효과가 매우 우수하다. 따라서, 상기 조성물은 심각한 알러지 질환을 치료하거나 예방하는 약학 조성물로 사용될 수 있다. 더 나아가, 본원 발명의 조성물은 구강 면역요법을 적용할 수 있어, 부작용을 줄이면서 식품 알러지에 더 효과적일 수 있을 뿐 아니라, IgE-매개된 알러지를 앓는 어린이를 대상으로 한 치료에 이상적일 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 알러지 증상을 개선하거나 완화하기 위한 건강 기능성 식품으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 본원 발명의 폴리펩티드 이량체의 일 구체예(IgE_{TRAP})를 구성하는 단량체의 구성을 도식화한 것이다. IgE_{TRAP}의 일 구체예는 사람 FcεRIα(FcεRIα 세포외도메인의 26번 아미노산부터 205번 아미노산까지의 영역, 180 aa)부터 사람의 IgD/IgG4 하이브리드 Fc(245 아미노산)까지 425개의 아미노산으로 구성될 수 있다. IgD/IgG4 하이브리드 Fc는 FcRn 결합 부위(오른쪽 빗금 선)를 가지고 있지만 FcγR 및 C1q 결합 부위는 결여 되어 있다(왼쪽 빗금 선). 이때, IgD는 133번 아미노산부터 170번 아미노산까지의 영역(38aa)일 수 있으며, IgG4는 121번 아미노산부터 327번 아미노산까지의 영역(207aa)일 수 있다.

[15] 도 2는 IgE_{TRAP} homodimer의 3 차원 구조 모델을 나타낸 것이다. 구조는 FcεRIα 세포외도메인(청색), IgD 경첩(황색) 및 IgG4 Fc(녹색)를 나타낸다.

[16] 도 3은 각 세포주에서 생산된 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 SDS-PAGE 결과이다(도 3a). 이때, 환원성 및 비환원성 모두에서 절단형이 생성되지 않은 것을 알 수 있다(도 3a 및 도 3b).

[17] 도 4는 각 세포주에서 생산된 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 시알산 함량의 증가를 확인하기 위해 실행한 GEL-IEF(Isoelectric focusing) 실험 결과이다. 시알산 전이효소 유전자 도입에 의한 음전하를 띠는 시알산 함량의 증가로 주요 등전점(pI, Isoelectric Point)이 낮아진 단백질의 함량이 증가한 바, 시알산 전이효소 부가를 통해 acidic 단백질의 함량이 증가하였음을 알 수 있다.

[18] 도 5는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})의 비환원된 단백질 및 환원된 단백질의 SDS-PAGE 결과이다. 특히, Input에 해당하는 배양 상등액에서도 폴리펩티드 이량체의 순도가 높은 것을 알 수 있다.

[19] 도 6은 비환원 및 환원 조건 하에서 IgE_{TRAP}의 SDS-PAGE 분석을 수행한 결과를

나타낸 것이다.

[20] 도 7은 오말리주맙의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프이다. 오말리주맙을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다. 사람 IgE와 오말리주맙의 상호 작용을 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 분석하고 각 분자의 결합 친화력을 계산하였다.

[21] 도 8은 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프이다. IgE_{TRAP}을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다. 사람 IgE와 IgE_{TRAP}의 상호 작용을 표면 플라스몬 공명(SPR)을 사용하여 분석하고 각 분자의 결합 친화력을 계산하였다.

[22] 도 9 내지 도 13은 본원 발명의 일 구체예인 이량체 단백질(IgE_{TRAP})과 오말리주맙의 IgG 수용체 FcγRI(도 9), FcγRIIA(도 10), FcγRIIB(도 11), FcγRIIIA(도 12) 및 FcγRIIIB(도 13)와의 상호 작용을 bio-layer interferometry (BLI) 분석법을 사용하여 확인한 결과이다.

[23] 도 14는 IgE_{TRAP}과 IgG 수용체, 및 오말리주맙과 IgG 수용체의 결합력을 수치화한 그래프이다.

[24] 도 15a는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})의 농도에 따른 마우스 유래 비만 세포의 활성 억제력을 보여주는 그래프이다.

[25] 도 15b는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP}) 및 Xolair(오말리주맙)의 농도에 따른 인간 FcεRI 발현 마우스 유래 비만 세포의 활성 억제력을 비교해서 보여주는 그래프이다.

[26] 도 16은 식품 알러지 유발 질환 모델에서 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 효력을 나타낸 것이다.

[27] 도 17은 식품 알러지 유발 및 IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 요법에 대한 실험 일정을 나타낸 것이다. i.p., 복막 내; i.g., 위장 내

[28] 도 18은 알러지에 의한 설사 증상을 억제하는 IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 요법의 효력을 나타낸 것이다. n= 16-18 mice per group, OVA vs OVA + IgE_{TRAP} : $*P < .05$, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP} 및 OVA vs PBS : $***P < .0001$

[29] 도 19a는 *B.longum*이 IgE_{TRAP}의 치료 효과를 향상시킨다는 점을 확인하기 위한 실험 계획을 나타낸 것이다. 구체적으로, 식품 알러지 유발 및 IgE_{TRAP}과 *B.longum*에 대한 단독 투여 및 병용 투여에 대한 실험 계획을 나타낸 것이다. i.p., 복막 내; i.g., 위장 내

[30] 도 19b는 식품 알러지 유발 질환 모델에서 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})의 용량 증가에 따른 병용 투여 효과를 확인한 것이다. 식품 알러지성 설사를 억제하기 위한 IgE_{TRAP},*B.longum* 및 그 조합물의 효과를 나타낸 것이다. n=14 mice per group, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP}(20 μg), OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP}(200 μg) 및 OVA vs PBS : $**P < .001$

[31] 도 20은 식품 알러지 유발 질환 모델에서, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 투여시, 각

실험군에서 확보된 혈청내의 비만 세포 프로테아제-1(MCPT-1) 수준을 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[32] 도 21은 식품 알러지 유발 질환 모델에서, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 투여시, 각 실험군에서 확보된 혈청내 전체 IgE (유리 IgE 및 IgE-IgE_{TRAP} 복합체)의 수준을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 것이다. n=16-18 mice per group, OVA vs OVA + IgE_{TRAP}, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP} 및 OVA vs PBS: ***$P < .0001$

[33] 도 22는 식품 알러지 유발 질환 모델에서, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 투여시, 각 실험군에서 확보된 혈청에서 유리 IgE의 수준을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 것이다. n=16-18 mice per group, OVA vs OVA + IgE_{TRAP}, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP} 및 OVA vs PBS: ***$P < .0001$

[34] 도 23은 식품 알러지 유발 질환 모델에서, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 투여시, 각 실험군에서 비만 세포 증식과 술잔 세포(goblet cell) 증식이 억제되는 효과를 확인한 것이다. 각 실험군의 공장(jejunum)의 대표적인 파라핀 절편에서 비만 세포(빨간색)를 염색한 결과를 나타낸 것이다(배율 400x). 장의 확대는 비만 세포를 명확하게 보여준다(빨간색).

[35] 도 24는 도 23에서 비만 세포를 400배 확대하여 공실의 두 부분으로 확인한 결과를 나타낸 것이다. n=10-12 mice per group, OVA vs *B.longum* 및 OVA vs IgE_{TRAP}: **$P < .001$, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP} 및 OVA vs PBS: ***$P < .0001$

[36] 도 25는 식품 알러지 유발 질환 모델에서, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 투여시, 각 실험군에서 비만 세포 증식과 술잔 세포 증식이 억제되는 효과를 확인한 것이다. 각 실험군의 공장(jejunum)의 대표적인 파라핀 절편에서 술잔 세포를 확인하기 위해 염색한 결과를 나타낸 것이다(보라색, 배율 400 배).

[37] 도 26은 도 25에서 술잔 세포를 villus-crypt units(VCU)에서 무작위로 선정하여 10 개를 계수한 결과를 나타낸 것이다. n=5-6 mice per group, OVA vs *B.longum* 및 OVA vs IgE_{TRAP}: *$P < .05$, OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP} 및 OVA vs PBS: ***$P < .0001$

[38] 도 27은 *B.longum*과 IgE_{TRAP} 병용 요법에 의한 음식 알레르기 억제 메커니즘을 도식화한 것이다. 섭취한 식품 알레르겐은 효소 세포의 고친화성 IgE Fc 수용체(FcεRI)에 IgE가 결합함으로써 효과 세포(비만 세포 및 호염기구)의 활성화를 유도할 수 있다. 활성화된 효과 세포는 조절자를 방출하여 즉각적인 과민 반응을 일으키게 된다. *B.longum*은 비만 세포 수를 감소시키는 extracellular vesicle(EV) 분비를 통해 비만 세포의 세포 사멸을 유도한다. 그 사이에 IgE_{TRAP}은 효과 세포에 FcεRI에 IgE 결합을 차단하여 효과 세포의 활성화 및 증식을 억제할 수 있다. *B.longum*과 IgE_{TRAP} 병용 투여를 통해, 식품 알러지 증상과 술잔 세포의 과증식을 효과적으로 완화시킬 수 있었다.

[39] 도 28은 *B.longum* 및 IgE_{TRAP}을 투여 후, 장 조직 내 IL-33 발현의 변화를 확인한 것이다. *B.longum* 및 IgE_{TRAP}의 투여는 식품 알러지 모델 마우스의 공장(jejunum)에서 IL-33 mRNA의 발현을 감소시켰다. n=16-18 mice per group,

OVA vs OVA + *B.longum* + IgE_{TRAP}: *$P < .05$

[40] 도 29는 IgE_{TRAP} 및 *L.casei*를 복강 투여(Intraperitoneal injection) 후 설사(Diarrhea) 빈도를 확인한 것이다. n=7-10 mice per group

[41] 도 30은 IgE_{TRAP} 및 *Lc.lactis*를 복강 투여 후 설사 빈도를 확인한 것이다. n=5 mice per group

[42] 도 31은 IgE_{TRAP} 및 *S.thermophilus*를 복강 투여 후 설사 빈도를 확인한 것이다. n=6-10 mice per group

[43] 도 32는 IgE_{TRAP} 및 *L.rhamnosus*를 복강 투여 후 설사 빈도를 확인한 것이다. n=5-10 mice per group

[44] 도 33은 IgE_{TRAP} 및 *L.reuteri*를 복강 투여 후 설사 빈도를 확인한 것이다. n=5-10 mice per group

[45] 도 34는 IgE_{TRAP} 및 *L.fermentum*을 투여 후 설사 빈도를 확인한 것이다. n=7-10 mice per group

[46] 도 35는 정상 마우스에 IgE_{TRAP}를 구강 투여 후, 마우스의 혈청에서 흡수된 IgE_{TRAP}를 확인한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[47] 본원 발명의 일 측면으로, 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 제공한다.

[48] 본원 발명에서 사용한 용어, "프로바이오틱스"는 적당량을 섭취했을 때 인체에 이로움을 주는 미생물을 총칭하는 말로 우리 몸에 유익한 균을 의미한다. 상기 프로바이오틱스는 유산균 또는 비피도박테리움일 수 있다. 상기 유산균(lactic acid bacteria)은 당을 발효시켜 유산(lactic acid)을 생성하는 균의 총칭이다. 대부분의 장내 유익균은 유산균으로 분류되며, 유산균은 당을 분해시켜 50% 이상을 유산으로 생성시킬 수 있다.

[49] 상기 유산균은 락토바실러스(*Lactobacillus*), 락토코쿠스(*Lactococcus*), 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 또는 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 상기 락토바실러스는 *L.acidophilus, L.casei, L.gasseri, L.delbrueckii ssp. bugaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.paracasei, L.plantarum, L.reuteri, L.rhamnosus, L.pentosus,* 및 *L.salivarius*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있다. 또한, 상기 락토코쿠스는 *Lc.lactis*일 수 있으며, 상기 스트렙토코쿠스는 *S.themophilus*일 수 있다. 또한, 상기 비피도박테리움은 *B.bifidum, B.breve, B.longum* 및 *B.animalis ssp. lactis*로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[50] 바람직하게는 상기 프로바이오틱스는 락토바실러스 카제이 또는 비피도박테리움 롱검일 수 있다. 특히, 비피도박테리움 롱검은 기탁번호 KACC 91563일 수 있다(KR10-1778734B1). 특히, KACC 91563 균주는 알러지 반응에서 중요한 세포인 비만 세포를 표적으로 하기 때문에 알러지를 치료하는

유산균으로 활용가능하다. 통상 프로바이오틱스는 생균 형태로 사용할 수 있으며, 이때 생균은 동결건조시킨 형태로 사용할 수 있다. 또한, 상기 프로바이틱스는 사균 형태로도 사용할 수 있다.

[51] 본원 발명에서 사용한 용어, "IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드"란 IgE에 결합을 할 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE"는 면역글로불린 E로 알려진 항체 단백질을 의미한다. IgE는 비만 세포나 혈중의 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE 항체와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 항체로 알려져 있다.

[52] 구체적으로, IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 항-IgE 항체, IgE Fc 수용체, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 단편, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 또는 이의 단편을 포함하는 재조합 단백질 중 어느 하나일 수 있다.

[53] 이때, 상기 항-IgE 항체는 IgE를 항원으로 인식하여 IgE와 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 이때, IgE와 결합할 수 있다면 항-IgE 항체의 단편은 Fab, scFv, $F(ab)^2$ 및 Fv로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 항체 단편은 항원과의 결합 자극을 세포나 보체 등에 전달하는 기능(effector function)을 하는 결정가능 영역(Fc region)을 제외한 항원결합 도메인들을 의미한다. 항-IgE 항체의 일 구체예는 오말리주맙일 수 있다.

[54] 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE Fc 수용체"란 Fcε수용체라고도 불리우며, IgE의 Fc 부분과 결합한다. 상기 수용체는 2 종류가 존재한다. IgE Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fcε수용체I(FcεRI)이라고 한다. IgE Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fcε수용체II(FcεRII)라고 한다. FcεRI은 비만 세포 및 호염기구에서 발현된다. FcεRI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만 세포 또는 호염 기구에서 탈과립이 생겨 히스타민을 비롯한 여러 가지 화학 전달 물질이 방출된다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알러지 반응이 나타난다.

[55] 상기 FcεRI는 한 개의 α사슬과 한 개의 β사슬 및 2황화 결합한 2개의 γ사슬로 구성된 막단백질이다. 이 중 IgE가 결합하는 부분은 α사슬(FcεRIα)로서, FcεRIα는 60 kDa 정도의 크기를 가진다. FcεRIα는 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히, α사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다.

[56] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP_001992.1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인(FcεRIaECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인은 IgE와 결합을 할 수 있는 한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인의 단편 또는 변이체일 수 있다.

[57] 상기 변이체는 FcεRI의 α사슬의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형

FcεRIaECD(Extracellular domain)에서 하나 이상의 단백질을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 이러한 다양한 단백질 또는 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 것일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 FcεRIaECD는 서열번호 5의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.

[58] 따라서, IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드로 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 자체 또는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 단편이 사용될 수 있다. 상기 세포외도메인 단편의 일 구체예는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인의 N 말단의 아미노산 일부가 결실된 형태일 수 있다. 일 구체예로서, 상기 세포외도메인 단편 N 말단의 1 내지 30개의 아미노산이 결실될 수 있다. 또한, 상기 세포외도메인 단편 N 말단의 5 내지 25개의 아미노산이 결실될 수 있다. 또한, N 말단의 아미노산이 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개가 결실된 형태일 수 있다. 또한, 상기 세포외도메인 단편의 일 구체예는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인의 C 말단의 아미노산 일부가 결실된 형태일 수 있다. 일 구체예로서, 상기 세포외도메인 단편 C 말단의 1 내지 30개의 아미노산이 결실될 수 있다. 또한, 상기 세포외도메인 단편 C 말단의 5 내지 25개의 아미노산이 결실될 수 있다. 또한, C 말단의 아미노산이 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개가 결실된 형태일 수 있다. 또한, 상기 세포외도메인 단편의 일 구체예는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인의 N 말단 및 C 말단의 아미노산 일부가 결실된 형태일 수 있다. 일 구체예로서, 상기 세포외도메인 단편 N 말단 및 C 말단의 아미노산이 각각 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개가 결실된 형태일 수 있다.

[59] 그러나, 야생형의 IgE 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 또는 이의 단편은 체내에서 지속성이 낮다. 이를 개선하기 위하여, IgE 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인 또는 이의 단편은 다양한 방법을 통해 변형될 수 있다. 개질 방법의 일 구체예로는 PEG(polyethylene glycol)를 결합시킬 수 있다. 또 다른 구체예로는 면역글로불린의 Fc 영역을 결합시킬 수 있다. 이때, 천연형의 면역글로불린 Fc 외에도 변형된 Fc 영역을 이용할 수 있다.

[60] 또한, 본 명세서에서 사용한 용어, "변형된 Fc 영역"은 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 용어 "Fc 영역"는 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.

[61] 또한, 본원 발명의 변형된 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다.

[62] 이때, 본원 발명의 변형된 Fc 영역은 FcγR 또는 C1q에 대한 결합 부위를 갖지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다.

[63] 또한, 상기 FcεRIαECD 또는 이의 단편은 야생형 Fc 또는 변형된 Fc 영역과 링커를 통해 연결될 수 있다. 상기 링커는 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일 구체예로 링커는 하기의 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 링커는 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 하나, 두 개 또는 세 개의 시스테인을 포함할 수 있다. 바람직하게는 하나의 시스테인을 포함한다. 일 구체예로 상기 링커는 IgD 항체 유래의 힌지 영역 일 수 있다. 또한, 상기 링커는 IgD 항체의 힌지 영역을 변형시킨 힌지 변이체일 수 있다. 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD 항체의 힌지 서열에서 일부를 변형한 것일 수 있다.

[64] 일 실시예로, 힌지는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[65] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly 일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 서열번호 3 및 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[66] 힌지의 또 다른 실시예로 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[67] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly 이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[68] 특히, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 링커에 있어서, Thr 중 적어도 하나는 글리코실레이션 될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18의 아미노산 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 Thr이 글리코실레이션 될 수 있다. 바람직하게 4개의 아미노산이 모두 글리코실레이션 될 수 있다. 이때, 상기 글리코실레이션은 O-글리코실레이션일 수 있다.

[69] 본원 발명의 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 일 구체예인 IgE_{TRAP}은 FcεRIα 세포외도메인과 IgD/IgG4 하이브리드 Fc 도메인의 Fc-융합단백질을 의미한다. IgE Fc 수용체 FcεR는 α-사슬, β-사슬 및 2개의 동일한 다이설파이드-γ

사슬(disulfide-linked γ-chains)로 구성된다. FcεRIβ와 FcεRIγ는 세포외도메인이 없지만, FcεRIα에는 두 개의 세포 외 면역 글로불린-관련 도메인이 있으며 IgE 결합에 관여한다. 따라서 더 안전하고 효과적인 IgE 억제제를 만들기 위해, 사람의 FcεRIα 세포외도메인을 사람의IgD/IgG4 하이브리드 Fc 도메인(도 1 및 도 2)과 연결하여 IgE_{TRAP}를 생산하였다. 오말리주맙과는 달리 IgE_{TRAP}는 IgG 수용체에 결합하지 않아 IgG-매개된 아나필락시스의 위험을 감소시킬 수 있는 가능성이 있다(도 9 내지 도 13). 또한, IgE_{TRAP}은 오말리주맙보다 IgE에 대해 69배 더 고친화성을 갖는다. 따라서 IgE_{TRAP}은 식품 알러지 치료제로서 오말리주맙보다 안전하고 효과적 일 것이다.

[70] 상기 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 효과 세포의 FcεRIα와 IgE 결합을 차단하는 역할을 한다. 인간 IgD/IgG4 하이브리드 Fc는 FcγR 또는 C1q에 대한 결합 부위를 갖지 않는 IgD의 상위 CH2 도메인과 IgG4의 마지막 CH2와 CH3 도메인을 포함한다(도 1). 그러나, 이 하이브리드 Fc는 신생아 Fc 수용체에 대한 결합 부위를 가지고 있을 수 있다(도 1). 또한, 호모다이머 형태인 IgE_{TRAP}의 이론적인 분자량은 약 97.6 kDa이지만 실제 분자량은 글리코실화(glycosylation)로 인해 약 150 kDa이다(도 6).

[71] 본원 발명의 일 구체예에 따른 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드 이량체 단백질은 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 안전성 및 체내 지속성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와의 결합력이 기존에 사용되는 항-IgE 항체인 오말리주맙 대비 약 70배로 높아 IgE에 매우 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있다. 또한, 본원 발명에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질은 IgE 만을 단일표적으로 하고, Fc gamma receptor에는 결합하지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 변형된 Fc가 적용된 물질이다. 따라서, IgG1 Fc 영역을 포함하고 있는 기존 항 IgE 항체와 달리 Fc gamma 수용체와 결합하지 않기 때문에 비만 세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있다. 따라서, 본원의 IgE 결합능이 있는 폴리펩티드는 IgG1과 비만 세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 발생 등의 심각한 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, 종래의 항-IgE 항체를 포함하는 치료제를 대체할 수 있는 새로운 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

[72] 또한, 본원 발명에서 제공하는 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 일 구체예는 단량체 형태일 수 있다. 특히, 사용된 링커에 시스테인이 없을 경우에는 단량체 형태로 존재할 수 있다.

[73] 또한, 본원 발명에서 제공하는 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 일 구체예로 폴리펩티드 이량체일 수 있다. 이때, 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 같이, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인과 변형된 Fc 영역이 결합된 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 상기 폴리펩티드 이량체는 동일한 두개의 단량체가 링커 부위에 위치한 시스테인에 의해 결합된 형태일 수 있다. 또한,

상기 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 단량체 두개가 결합된 형태일 수 있다. 예를 들어, 두 개의 단량체가 서로 다른 경우는, 하나의 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인을 포함하고, 다른 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인의 단편을 포함한 형태일 수 있다. 이때, 상기 단량체의 일 구체예는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[74] 본원 발명의 또 다른 측면은 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 알러지 질환 치료용 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[75] 상기 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 상술한 바와 같다. 상기 조성물 내에 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 혼합량은 적절히 정해질 수 있다. 일 구체예로는 상기 조성물 내에 프로바이오틱스는 $1x10^5$ cfu 내지 $1x10^{12}$ cfu가 포함될 수 있다. 또는, 상기 조성물 내에 프로바이오틱스는 $1x10^6$ cfu 내지 $1x10^{11}$ cfu, $1x10^7$ cfu 내지 $1x10^{10}$ cfu, 또는 $1x10^9$ cfu 내지 $5x10^9$ cfu가 포함될 수 있다. 또한, IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 0.1 ug 내지 5 mg, 0.5 ug 내지 1 mg, 1 ug 내지 500 ug, 10 ug 내지 400 ug, 200 ug 내지 300 ug이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물 내에 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 혼합 비율은 적절히 변경될 수 있다.

[76] 본 명세서에서, "알러지 질환"은 비만 세포의 탈과립 등 비만 세포의 활성화가 매개된 알러지 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미하며, 이러한 알러지 질환에는 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 과민성(anaphylaxis), 두드러기, 소양증, 곤충 알러지, 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial) 및 약품 알러지 등이 포함된다. 특히, 상기 알러지 질환은 IgE 매개성일 수 있다.

[77] 본원 발명의 일 구체예로 FcεRIα 세포외도메인을 포함하는 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 IgE와의 결합을 통해 효과 세포의 FcεRI에 IgE이 결합하는 것을 차단하므로 IgE_{TRAP}으로 지칭될 수 있다. 또한 *B.longum*은 IgE_{TRAP}의 치료 효과를 향상시키고 치료에 필요한 IgE_{TRAP}의 복용량을 현저히 줄일 수 있음을 확인하였다.

[78] 본원 발명의 알러지 질환 치료용 또는 예방용 조성물에서 그 유효성분은 항알러지 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 수 있다. 여기서 "유효량"이란 항알러지 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[79] 이때, 상기 약학 조성물은 약학으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다. 특히, 프로바이오틱스 및 IgE 결합능이 있는 폴리펩티드가 안정성을 유지할 수 있는 약학으로 허용 가능한 제형이라면 모두 이용될 수 있다.

[80] 구체적으로, 본원 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.

[81] 본원 발명의 약학 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약학으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 덱스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화활 경우 필요에 따라 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.

[82] 본원 발명의 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다.

[83] 약학 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[84] 본원 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg 내지 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를

제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[85] 본원 발명의 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원 발명의 항알러지용 조성물은 유효성분 이외에, 항알러지 활성의 상승 및 보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항알러지 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 약학 조성물은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 더 포함할 수 있다.

[86] 본원 발명의 또 다른 측면은 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 알러지 증상 개선 또는 완화용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 식품 조성물은 비피도박테리움 롱검 KACC 91563으로부터 분리된 세포 밖 소포체를 유효성분으로 더 포함할 수 있다.

[87] 한편, 본원 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 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.

[88] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 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 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질 탄수화물, 지방, 영양소, 향미제 및 조미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 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.

[89] 예컨대 본원 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본원 발명의 조성물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 추출액등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[90] 상기 외에 본원 발명의 조성물은 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 본원 발명의 조성물은 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[91] 또한, 본원 발명의 식품 조성물은 법률상/기능상의 구분에 있어서 제조/유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분으로 될 수 있다. 예컨대

건강기능식품에 관한 법률에 따른 건강기능식품이거나, 식품위생법의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다. 본원 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련 하여서는 식품 위생법에 따른 식품 공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.

[92] 본원 발명의 또 다른 측면은 프로바이오틱스를 포함하는 제1조성물; 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 포함하는 제2조성물을 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방용 키트를 제공한다. 이때, 상기 제2조성물은 피하 또는 정맥 투여용 조성물일 수 있다.

[93] 본원 발명의 또 다른 측면은 프로바이오틱스를 투여하는 단계; 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[94] 상기 프로바이오틱스는 상술한 바와 같으며, 경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드는 경구를 통하여 투여할 수도 있으나, 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.

[95] 마우스의 식품 알러지 모델에서 IgE_{TRAP}은 비만 세포 수를 줄이고 유리 IgE 수준을 낮출 뿐만 아니라 비만 세포 수를 감소시켜 식품 알러지 증상을 완화시키는 것으로 나타났다(도 21 내지 도 26). IgE_{TRAP}에 의한 비만 세포의 감소는 IgE가 비만 세포의 생존율을 증가시킴으로써 비만 세포의 수를 증가시킨다는 사실에 기인한 것으로 예상된다. 또한 소장에서의 술잔 세포 과증식은 IgE_{TRAP}과 *B.longum*의 단독 투여에 의해 유의하게 억제되었으며, 조합 투여시에는 훨씬 더 억제되었다(도 23 내지 도 26). IL-13과 같은 Th2 사이토카인(cytokine)들이 술잔 세포의 과증식을 유발시킨다고 알려져 있기 때문에, IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 이들의 조합물이 소장에서의 Th2 사이토카인 환경을 완화시켜 주는 것으로 예상된다. 이를 뒷받침해주듯, IgE_{TRAP}과 *B.longum*은 ILC2(Type 2 Innate Lymphoid Cells)를 활성화시켜 IL-13 분비 촉진에 관여하는 IL-33의 mRNA 발현을 소장에서 감소시키는 경향성을 보였고, 이들의 조합물은 유의미하게 더 효과적으로 IL-33 발현을 감소시켰다(도 28). 그리고, IL-33은 IgE에 의해 활성화된 비만 세포에서도 분비될 뿐만 아니라 비만세포의 탈과립 촉진에 관여하기 때문에 식품 알러지의 심각성과 깊은 관련성을 갖고 있다. 이것은 IgE_{TRAP}과 *B.longum*은 다양한 기전으로 식품 알러지 증상을 개선할 수 있음을 시사한다.

[96] 이전에 *B.longum*은 비만 세포의 세포 사멸을 유도하고 식품 알러지 증상을 호전시키는 것으로 보고되었으며 이는 본 발명자들의 결과와 일치하였다. 그러나 식품 알러지 치료를 위한 *B.longum*의 일일 투여는 IgE_{TRAP}의 단독 투여보다 덜 효과적이었지만, *B.longum*은 IgE_{TRAP}의 치료 효과를 현저하게 향상시켰으며(도 18), *B.longum*과 함께 사용된 IgE_{TRAP}은 IgE_{TRAP} 단독 투여의 10

배 높은 복용량과 유사한 치료 효과를 나타냈다(도 19b). 또한, 일부 장내 세균이 Treg 세포의 증가 또는 IgE와 Th2 사이토카인 수준의 감소를 통해 알레르기 질환을 개선할 수 있다고 보고되었으므로 *B.longum* 이외의 다른 프로바이오틱스도 IgE_{TRAP}의 치료 효과를 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 실제, 다양한 종류의 프로바이오틱스와 IgE_{TRAP}을 병용 투여시 치료 효과가 상승됨을 확인하였다(도 29 내지 도 34).

[97] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드 및 프로바이오틱스를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 상기 개체는 포유 동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 이때, 투여는 경구 또는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드 및 프로바이오틱스는 경구 투여를 위하여 적당한 제형으로 제조될 수 있다. 또한, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[98] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[99] **재료 및 방법(Materials and methods)**

[100] **IgETRAP의 세포주 구성 및 정제**

[101] IgE_{TRAP}의 뉴클레오타이드 서열은 FcεRIα 세포외도메인의 C-말단(26- 205th)과 IgD/IgG4 하이브리드 Fc 도메인(IgD, 133-170th; IgG4, 121st-327th)의 N-말단을 연결하여 제작하였다. 상기 단백질은 디하이드로폴레이트 리덕테이즈(dihydrofolate reductase)가 결핍된 중국 햄스터 난소 DG44 세포에서 발현되었다. IgE_{TRAP}는 HiTrap rProtein A FF 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 정제하고 그 순도를 환원 및 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE로 확인하였다.

[102] **3D 구조 모델링(3D structure modelling)**

[103] IgE_{TRAP}의 구조적 모델은 WinCoot를 사용하여 설계되었으며 단백질 데이터뱅크의 FcεRIα(PDB accession 1F6A) 및 IgD/IgG4 Fc(PDB accession 1ADQ)에 대한 정보를 기반으로 PyMOL소프트웨어로 구축되었다.

[104] **Surface plasmon resonance (SPR) assay**

[105] SPR 분석은 ProteOn XPR36(Bio-Rad) 장치를 사용하여 진행되었다. 오말리주맙과 IgE_{TRAP}의 사람 IgE(Calbiochem)결합 정도를 반응속도분석(kinetic analysis)을 이용하여 확인하였다. 아세테이트 완충액(pH 5.5)에서 오말리주맙의 850 반응단위(Response units, RU)와 아세테이트 완충액(pH 4.0)내에 IgE_{TRAP}의 500 반응단위를 ProteOn™ GLC 센서 칩(Bio-Rad)에 고정시켰다. Tween-20이 포함된 PBS를 완충액(running buffer)으로 사용하고 유속(flow rate)은 30 ul/min으로 설정하였다. 각 데이터 세트의 그래프는 ProteOn 관리자

소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다.

[106] **Biolayer interferometry (BLI) assay**

[107] IgE_{TRAP}와 오말리주맙의 IgG 수용체에 대한 결합 정도는 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 사용하여 확인하였다. 400 mM EDC와 10 mM sulfo-NHS의 조합으로 활성화시킨 AR2G (Amine Reactive 2 Generation) 바이오센서에 300 mM 아세테이트 완충액(pH 5)에 희석된 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 및 FcγRIIIB 재조합 단백질(R&D 시스템, 5 μg/ml)을 고정시켰다. 그런 다음, 다양한 농도의 IgE_{TRAP}과 오말리주맙와의 결합 및 해리를 각각 300초간 측정하였다. 이때 사용된 Kinetic buffer는 0.1 % Tween-20 및 1 % bovine serum을 포함한 PBS이고, 모든 실험은 샘플 플레이트 쉐이커 1,000 rpm 속도로 30℃에서 이루어졌다.

[108] **β-hexosaminidase release assay**

[109] 골수 유래 비만 세포(Bone marrow-derived mast cells, BMMCs)를 10% heat inactivated FBS, 10 ng/mL 마우스 IL-3(PeproTech), 50 ng/mL 마우스 SCF(PeproTech)가 포함된 RPMI에 37℃에서 배양하였다. 분석 전에, 1 ㎍/mL의 항-디니트로페닐 IgE(Sigma-Aldrich)와 다양한 농도의 IgE_{TRAP}을 실온에서 30분 동안 배양하였다. 골수 유래 비만 세포는 항-디니트로페닐 IgE(Sigma-Aldrich)와 IgE_{TRAP}의 혼합물에 37℃에서 30분 동안 배양하고, 0.1 ㎍/mL의 항-디니트로페닐 IgE를 넣고 다시 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 상등액을 채취하고 3 mM p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사민(3 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide)과 37℃에서 20분간 배양하였다. 0.1 M sodium carbonate buffer(pH 10)를 넣어 반응을 멈추고 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 0.1% Triton X-100으로 용해된 BMMCs의 총 세포 내 함유량과 비교하여 방출된 β-hexosaminidase의 비율을 계산하였다.

[110] **식품 알러지 유발 및 *B.longum*의 투여**

[111] 0 일째와 14 일째에 50 ug OVA(Grade V; Sigma-Aldrich) 및 1 mg의 aluminum potassium sulfate adjuvant(Sigma-Aldrich)를 마우스 복강내에 투여하였다. 그리고 14일 이후에, 50 mg OVA(Grade III; Sigma-Aldrich)를 2일 간격으로 마우스에게 5회 경구 투여하였다. 마우스는 OVA 경구 투여 전에 약 4-5 시간 동안 금식을 시켰다. 설사 발생(Diarrhea occurrence)은 OVA 접종 후 최대 1시간 동안 마우스를 모니터링하여 평가하였다. *B.longum*은 동결건조 되어 파우더 상태의 마우스 먹이와 $3x10^9$ cfu/g로 혼합되어 마우스들이 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 그리고, 신선한 상태를 유지하기 위해 *B.longum*과 혼합된 마우스 먹이는 2-3일 마다 교체하였다.

[112] **Histology**

[113] 소장의 공장(jejunum)은 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시키고 파라핀내에 고정하여 블록을 만든 후 파라핀 절편 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드를 탈파라핀화하고 naphthol AS-D chloroacetate esterase

kit(Sigma-Aldrich)를 사용하여 비만 세포를 염색하였다. 술잔 세포(goblet cell)의 경우, 슬라이드는 periodic acid-Schiff stain kit(ScyTek Lab)를 사용하여 염색하였다. 염색된 슬라이드 이미지는 Pannoramic MIDI(3D HISTECH Ltd.)를 이용하여 촬영하였다.

[114] **ELISA**

[115] 마우스 혈청(serum) 내 총 IgE 및 MCPT-1의 농도를 측정하기 위하여, mouse total IgE ELISA 키트(BioLegend)와 MCPT-1 ELISA 키트(Invitrogen)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하였다. 유리된 IgE를 측정하기 위해 플레이트를 1 mg/mL IgE_{TRAP}으로 코팅하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. 나머지 분석은 마우스 전체 IgE ELISA 키트에 대한 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다.

[116] **Statistical analysis**

[117] 모든 데이터의 통계 분석은 GraphPad Prism 5 소프트웨어(GraphPad Software Inc.)를 사용하였다. 설사 발생을 계산하기 위해 log-rank(Mantel-Cox) 검정을 이용한 Kaplan-Meier 생존 곡선 분석을 사용하였다. 테스트의 의미 있는 차이를 확인하기 위해, Newman-Keuls multiple comparison test를 이용한 one-way ANOVA를 사용하였다.

[118] **I. IgETRAP 제조 및 특성 확인**

[119] **실시예 1. FcεRIαECD와 변형된 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조**

[120] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외도메인(FcεRIαECD)의 C 말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.

[121] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FcεRI의 α사슬의 세포외도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 포함된 융합 단백질을 제조하였다. 구체적으로, 서열번호 19의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc1), 서열번호 3의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc2) 및 서열번호 4의 힌지로 연결된 단백질(FcεR1αECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 pAD15 벡터(제넥신)에 클로닝하여, FcεRIαECD-Fc 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 벡터를 각각 CHO DG44(from Dr. Chasin, Columbia University, USA) 세포에 형질주입하였다.

[122] 이때, 세포주에 형질 주입시 pCI Hygro 벡터(Invitrogen)에 α-2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현 벡터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2ST 및 FcεRIαECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다.

[123] 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytrypamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+(Gibco, USA, 11067-030)) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase) 시스템을 이용하여 생산성을 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메토트렉사트(MTX) 증폭을 수행하였다.

[124] MTX 증폭이 완료된 후 생산성 평가를 위한 세포 안정화를 위해 1 내지 5회

정도 계대배양하였다. 그 후, MTX 증폭이 된 세포의 단위 생산성 평가를 수행하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[125] [표1]

Version	Media	MTX conc.	Productivity		
			3-day culture		Batch culture(mg/ml)
			ug/mL	ug/10^6cells	
FcεRIαECD-Fc2	Ex-cell DHFR	500nM	37.23	20.9	225
FcεRIαECD-Fc2+ a2,6-ST		100nM	45.4	25.1	338.2
FcεRIαECD-Fc3		2uM	27.0	16.9	180.4
FcεRIαECD-Fc3+ a2,6-ST		1uM	17.5	10.2	101.7

[126] 표 1에 기재된 바와 같이, FcεRIαECD-Fc3 세포주는 2 uM 메토트렉사트 증폭 후 16.9 ug/10^6 cells 생산성을 나타내었다. 반면, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc3 세포주(FcεRIαECD-Fc3ST)는 1 uM 메토트렉사트 증폭후 17.5 ug/10^6 cells 생산성을 나타내었다. 또한, FcεRIαECD-Fc2 세포주는 0.5 uM 메토트렉사트 증폭 조건에서 20.9 ug/10^6 cells 생산성을 나타내었다. 또한, 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc2 세포주(FcεRIαECD-Fc2ST)는 0.1 uM 메토트렉사트 증폭 후 25.1 ug/10^6 cells 생산성을 나타내었다. 즉, 0.1 uM 메토트렉사트 증폭 조건에서 선별된 2,6-시알산 전이효소가 공동 형질주입된 FcεRIαECD-Fc2 세포주가 생산성이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[127] **실시예 2. FcεRIα ECD 융합 단백질의 정제 및 순도 확인**

[128] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중, i) FcεRIαECD-Fc3, ii) FcεRIαECD-Fc3ST, iii) FcεRIαECD-Fc2ST를 60 ml 규모에서 배치배양법으로 배양하였다. 상기 배양된 배양액을 Protein-A affinity column을 이용하여 정제한 후, 정제된 단백질을 SDS-PAGE 및 크기-배제(Size-Exclusion) HPLC(SE-HPLC)를 수행하여 단백질의 순도를 확인하였다.

[129] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, SE-HPLC 방법으로 정제된 각 단백질의 순도는 모두 93% 이상인 것을 확인하였다. 또한, SDS-PAGE 분석결과, 비환원 조건 및 환원 조건에서 각각 약 150 kDa, 약 75 kDa 크기의 단백질이 검출되는 것으로 확인되었으며(도 3a, Lane 1 내지 6), 이를 통해 Fc와 결합된 FcεRIαECD가 이량체를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 또한, SDS-PAGE 결과에서 절단된 형태 등의 불순물이 나타나지 않았으며, 특히, 해동(thawing)/냉동(freezing)의 과정을 거친 후에도(도 3a, Lane 7 내지 9) 모두 순도가 93% 이상이었고 불순물이 없는

것을 확인하였다. 이때, 시알산 전이효소 도입에 따른 단백질 시알산 함량 정도를 확인하기 위해 Gel-IEF를 아래의 시험조건으로 수행하였으며, 이를 통해 시알산 함량 증가로 인해 acidic 단백질의 함량이 증가되었음을 확인하였다.

[130] [표2]

시험 조건	
Gel	pH3-10 IEF gel 1.0mm
Sample buffer	IEF sample buffer(2X)
Loading condition	100V 1hr, 200V 1hr, 500V 2hr

[131] 또한, 정제 수율 재현성을 확인하기 위하여, FcεRIαECD-Fc2ST 세포주를 1L 플라스크에서 250 ml 규모에서 배치 배양하고, Protein-A affinity column을 이용하여 정제하였다. 그 후, 배양 상등액 및 정제물에 대해 4-15% TGX™ 겔(BIO-RAD사)에 트리스글라이신 SDS(TGS) 버퍼, 200V 조건으로 30분 동안 러닝 후 SDS PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 1 단계 정제만으로도 매우 높은 순도(98% 이상)의 단백질이 정제되었을 뿐 아니라, 배양 상등액에서도 매우 높은 순도로 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 이는 해당 세포주에서 발현된 FcεRIαECD-Fc 단백질을 의약품으로 개발하는 데 있어, 공정 개발 단계가 간소화될 수 있고 결과적으로 의약품으로의 개발 비용이 현저히 절감될 수 있는 가능성이 매우 높음을 의미한다.

[132] **실험예 1. FcεRIα ECD 융합 단백질의 IgE 결합능 확인**

[133] 상기 실시예 2의 방법을 통해 정제된 i) FcεRIαECD-Fc2, ii) FcεRIαECD-Fc2ST, iii) FcεRIαECD-Fc3 및 iv) FcεRIαECD-Fc3ST의 4종 단백질과 시중에 판매되고 있는 항 IgE 항체인 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))에 대하여 IgE 결합능을 비교 측정하였다. 구체적으로, IgE 결합능은 Protein GLC sensor chip(Bio-Rad)의 채널에 IgE를 코팅하고, 오말리주맙 혹은 FceR1αECD-Fc 단백질 각각을 여러 농도로 분당 30 ul의 속도로 흘려주었다.

[134] 실험은 재생 버퍼인 25 mM NaOH를 이용하여 제로베이스를 확인한 후, 상기 단계를 반복하여 진행하였다. 그 후, 단백질 결합 분석기기(Proteon XPR36, BIO-RAD, USA)를 이용하여 결합곡선을 확인하였으며, 그 결과를 표 3, 도 7 및 도 8에 나타내었다. 도 8의 IgE_{TRAP}은 본 발명의 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드의 일 구체예인 FceR1αECD-Fc2ST를 의미한다.

[135] [표3]

Samples Items		FcεRIα ECD-Fc		오말리주맙	비고
Drug type		Fc 융합 단백질		Anti-IgE Ab	
Bindingaffinity	ka(Association rate)	Fc2	2.14 x 10^{5}	4.05 x 10^{5}	오말리주맙 대비 1.9배 약함
		Fc2ST	2.64 x 10^{5}		오말리주맙 대비 1.5배 약함
		Fc3	1.98 x 10^{5}		오말리주맙 대비 2.0배 약함
		Fc3ST	2.40 x 10^{5}		오말리주맙 대비 1.7배 약함
	kd(Dissociation rate)	Fc2	8.29 x 10^{-5}	6.02 x 10^{-3}	오말리주맙 대비 73배 좋음
		Fc2ST	5.69 x 10^{-5}		오말리주맙 대비 106배 좋음
		Fc3	1.33 x 10^{-4}		오말리주맙 대비 45배 좋음
		Fc3ST	1.49 x 10^{-4}		오말리주맙 대비 40배 좋음
	KD(kd/ka)	Fc2	3.88 x 10^{-10}	1.49 x 10^{-8}	오말리주맙 대비 38배 좋음
		Fc2ST	2.16 x 10^{-10}		오말리주맙 대비 69배 좋음
		Fc3	6.72 x 10^{-10}		오말리주맙 대비 22배 좋음
		Fc3ST	6.21 x 10^{-10}		오말리주맙 대비 24배 좋음

[136] 표 3에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 결합상수(Association rate, ka) 값은 오말리주맙과 비교하여 1.5배 내지 2.0배 작은 것으로 측정되었다. 즉, IgE 외의 물질과의 결합력이 오말리주맙에 비해 1.5배 ~ 2.0배 정도 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 해리상수(Dissociation rate, kd) 값은 오말리주맙과

비교하여 40배 내지 106배 큰 것으로 측정되었다.또한, 도 7 및 도 8에서 개시된 바와 같이, 오말리주맙은 IgE와 결합한 후 일정 시간이 지나면 결합이 떨어지는 반면, 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질의 폴리펩티드 이량체는 일단 IgE와 결합한 후에는 IgE와 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 본원 발명의 폴리펩티드 이량체는 IgE와 쉽게 분리되지 않고, 결합된 상태로 유지되는 능력이 오말리주맙에 비해 월등히 좋은 것을 알 수 있다. 결과적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 평형상수(Equilibrium dissociation constant, KD <kd/ka>) 값은 오말리주맙과 비교하여 22배 내지 69배 높은 것을 알 수 있었다.

[137] 이를 통해, 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질은 오말리주맙과 비교하여 IgE에 대한 결합능이 현저히 증가한 것을 알 수 있다. 특히, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2(FceR1αECD-Fc2ST)가 오말리주맙 대비 69배로 IgE 결합력이 가장 우수함을 확인하였다. 특히, FceR1αECD-Fc2ST의 경우, IgE_{TRAP}의 결합 속도 상수(Ka)와 해리 속도 상수(Kd)는 각각 오말리주맙보다 약 1.5배와 94.5배 낮았다(도 7, 도 8 및 표 4). 이전에 IgE가 FcεRIα로부터 매우 천천히 해리(dissociation)된다는 것은 이전부터 보고되어왔고, IgE_{TRAP} 또한 매우 천천히 해리되는 것을 확인하였다(도 8). 결과적으로, IgE_{TRAP}의 사람 IgE에 대한 결합능은 오말리주맙보다 69배 높았다(도 8 및 표 4).

[138] [표4]

	Ka($M^{-1}S^{-1}$)	Kd(S^{-1})	Kd(M)
IgE_{TRAP}	2.64 X 10^{5}	5.69 X 10^{-5}	2.15 X 10^{-10}
Omalizumab	4.05 X 10^{5}	6.02 X 10^{-3}	1.49 X 10^{-8}
Comparison of Kd[Omalizumab/IgE_{TRAP}]			약 69배

[139] **실험예 2.IgETRAP 및 IgG-매개 IgG 수용체의 결합능 확인**

[140] IgE_{TRAP}은 IgG-매개된 아나필락시스와 연관된 저친화성 IgG 수용체에는 결합하지 않는다. 오말리주맙의 주요 부작용인 아나필락시스는 저친화성 IgG 수용체에 결합할 수 있는 가능성으로 인해 유발될 수 있는 것으로 예상되기 때문에, 오말리주맙을 대조군으로 BLI 분석법을 사용하여 IgG 수용체에 대한 IgE_{TRAP}의 결합능을 검사하였다. 구체적으로, IgE_{TRAP}과 오말리주맙의 IgG 수용체에 대한 결합 정도는 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 사용하여 확인하였다.

[141] 400 mM EDC와 10 mM sulfo-NHS의 조합으로 활성화시킨 AR2G (Amine Reactive 2 Generation) 바이오 센서에 300 mM 아세테이트 완충액(pH 5)에 희석된 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 및 FcγRIIIB 재조합 단백질(R&D 시스템; 5 μg/ml)을 고정시켰다. 그런 다음, 다양한 농도의 IgE_{TRAP}과 오말리주맙와의 결합 및 해리를 각각 300초간 측정하였다. 이때 사용된 Kinetic buffer는 0.1% Tween-20

및 1% bovine serum을 포함한 PBS이고, 모든 실험은 샘플 플레이트 쉐이커 1,000 rpm 속도로 30℃에서 이루어졌다.

[142] 예상대로, 오말리주맙은 고친화성 IgG 수용체인 FcγRI뿐만 아니라 FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 및 FcγRIIIB와 같은 저친화성 IgG 수용체에 유의한 결합능을 보였다(도 9 내지 도 14). 이는 오말리주맙과는 달리 IgE_{TRAP}은 FcγRIIA와 FcγRIII와 같은 IgG 수용체와 결합할 수 없으므로 IgG-매개된 아나필락시스를 유발할 위험이 매우 낮음을 의미한다(도 9 내지 도 14). 오말리주맙과 IgE_{TRAP}의 IgG 수용체와의 결합능을 수치화하여 도 14에 나타내었다.

[143] **실험예 3. 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 통한 FcεRIα ECD 융합 단백질의 활성 확인**

[144] 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질의 in vitro 활성 분석을 위하여 베타 헥소사미니다제 분석을 수행하였다. 구체적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 FcεRIαECD-Fc2 단백질을 농도별로 마우스 IgE(1 ug/mL)와 혼합하여 상온(20℃)에서 30분간 인큐베이션(incubation)시켜 시료를 준비하였다. 비만 세포 활성화를 위해 배양중인 마우스 골수 유래 비만 세포(mast cell)를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 버퍼로 세척하여 배지를 제거하였으며, 세포수를 측정한 후 $5x10^5$ 개의 세포들이 40 uL의 HBSS 버퍼에 주입되도록 조절하였다.

[145] 그 후, 상기 프리(pre)-인큐베이션을 통해 준비된 시료 용액 50 uL를 활성화된 비만 세포에 첨가하였다. 그 후, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 외래 항원인 DNP(2,4-dinitrophenol, 100 ng/mL)를 10 uL씩 첨가한 후, 다시 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30분간 배양시킨 다음 상층액을 30 uL 분리하였다. 분리된 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37℃에서 20분간, 5% CO_2에서 배양하였다. 그 후, 정지용액(Stop solution)인 0.1 M 소디움 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer)(pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다. 이 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 활성화된 비만 세포에서 외래 항원에 의해 분비되는 베타-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase)의 분비량을 확인하였고, 그 결과를 도 15a에 나타냈다.

[146] IgE_{TRAP}은 1 ㎍/ml 마우스 IgE의 존재 하에 0.45 ㎍/ml의 IC_{50}(50%의 억제효과를 보이기 위해 필요한 약물의 농도)으로 용량 의존적으로 비만 세포 탈과립을 억제하였다(도 15a). IgE_{TRAP}은 0.79 IgE: IgE_{TRAP}의 분자비로 골수 유래 비만 세포 탈과립을 완전히 억제하였다(표 5).

[147] [표5]

Anti-DNP IgE	1 ug/mL(=5.26 nM)							
IgE_{TRAP}(ug/mL)	0	0.016	0.063	0.25	0.5	1	2	4
IgE_{TRAP}(nM)	0	0.11	0.42	1.67	3.33	6.67	13.3	26.7
[IgE/IgE_{TRAP}] molar ratio	0	47.8	12.5	3.15	1.58	0.79	0.40	0.20
Average Inhibition ratio (%)	0	2.12	12.4	13.8	49.4	99.3	99.4	99.8

[148] 구체적으로, 도 15a에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예의 폴리펩티드 이량체의 농도가 마우스 IgE의 절반(0.5 ug/mL)일 때 약 49.4%의 억제율을 보여주었으며, 마우스 IgE와 동일한 농도(1 ug/mL)일 때 약 99.4%의 비만 세포 억제율을 보여주었다. 즉, 본원 발명의 FcεRIaECD 폴리펩티드 이량체에 의해 IgE에 의한 골수 유래 비만 세포의 활성이 크게 억제되는 것을 알 수 있다.

[149] **실험예 4. 인간 FcεRI 발현 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 이용한 FcεRIα ECD 융합 단백질 및 anti-human IgE 항체의 활성 비교**

[150] in vitro 활성 분석을 통해 FcεRIα ECD 융합 단백질의 Xolair 대비 우수성을 확인하기 위하여 베타-헥소사미니다제 분석을 진행하였다. 각 약물 FcεRIαECD-Fc2ST(IgE_{TRAP})과 Xolair를 농도별로 준비한 후 인간 IgE(1 ug/mL)와 혼합한 후 상온에서 30분간 인큐베이션 시켰다. 약물을 프리(pre)-인큐베이션 하는 동안 인간 FcεRI 유전자가 도입되고, 마우스 FcεRI 유전자가 제거된 마우스의 골수로부터 유래 및 분화된 비만 세포를 준비하였다. 준비한 비만 세포들을 HBSS 버퍼로 세척해준 후, $5x10^5$ 개의 세포들을 60 uL의 HBSS 버퍼에 주입하였다. 준비가 끝난 비만 세포에 프리(pre)-인큐베이션한 시료 20 uL를 비만 세포에 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30분 동안 배양하였다.

[151] 이후 외래 항원과 유사한 반응 유발을 위해, anti-human IgE 항체(Biolegend, Cat No. 325502, 0.5 ug/mL)를 20 uL 첨가한 후 다시 37℃ 5% CO_2 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 1,500 rpm, 4℃, 원심분리 한 후 상층액 30 uL를 분리하였다. 분리한 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-glucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37℃ 5% CO_2 배양기에서 25분 동안 배양하였다. 그 후, 0.1 M 소디움 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer)(pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다.

[152] 이 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 분비된 베타-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase)의 상대량을 비교하여 각 약물의 농도에 따른 비만 세포 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 15b에 나타냈다. 도 15b에 표시한 바와 같이, FcεRIα ECD 융합 단백질의 IC_{50}은 대략 11.16 ng/mL로 측정되었고, Xolair 단백질의 IC_{50}은 대략 649.8 ng/mL로 측정되었다. 따라서, FcεRIα ECD 융합 단백질은 Xolair에 비해 58배 정도 높은 비만 세포 활성

억제력이 있음을 확인하였다.

[153] **실험예 5. FcεRIα ECD 융합 단백질의 in vivo assay: 식품 알러지 모델**

[154] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 ug 및 알럼(Alum) 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다.

[155] 상기 OVA를 경구 투여 2회 후 즉, 31일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제 1 그룹인 FcεRIαECD-Fc2ST 융합 단백질을 고농도(200 ug)로 투여하는 군, 제 2 그룹인 저농도(20 ug)로 투여하는 군 및 제 3 그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다. 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였으며, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다.

[156] 도 16에 나타난 바와 같이, FcεRIαECD-Fc2ST인 폴리펩티드 이량체를 고농도로 투여한 군에 속한 마우스에서, 아무것도 투여하지 않은 군에 속한 마우스에 비하여 농도 의존적으로 식품 알러지가 완화되는 효과가 나타남을 확인하였다.

[157] **II. IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드 및 프로바이오틱스 콤보 제조 및 효과 확인**

[158] **실시예 3. 프로바이오틱스 배양 및 투여**

[159] *L.casei* (*Lactobacillus casei;* KACC 12413), *Lc.lactis* (*Lactococcus lactis*; KACC 13877), *L.fermentum* (*Lactobacillus fermentum;* KACC 11441), 그리고 *L.rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus;* KACC 11953)는 MRS broth 또는 Brain Heart Infusion(BHI) 배지에 접종하여 37℃ 배양기(N-Biotek Cat#NB201L)에서 24시간 동안 배양하였다. *L.reuteri* (*Lactobacillus reuteri;* KACC 11452)와, *S. thermophilus* (*Streptococcus thermophilus;* KACC 11857)는 호기적 특성상 진탕배양기(N-biotek)에서 37℃, 50 rpm으로 24시간 배양하였다.

[160] 배양된 프로바이오틱스는 10% skim milk와 10% sucrose를 포함하는 동결건조배지에 녹여, 동결 건조기(Labcono)를 사용하여 동결건조 시킨 다음, 파우더로 만들었다. 완성된 프로바이오틱스는 연속 희석법에 의해 1 g당 존재하는 집락형성단위(cfu)를 측정하였다.

[161] 동결 건조된 프로바이오틱스는 경구용 존대를 이용하여 마우스 한 마리 당 1 $X10^9$ ~ $2.5X10^9$ cfu를 실험 진행되는 동안 계속 2~3일 간격으로 먹였다. 음성 대조군에는 동결건조한 동결건조배지를 동량 먹였다.

[162] **실시예 4. 프로바이오틱스 및 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 제조**

[163] 실시예 1에서 수득한 IgE에 결합능이 있는 폴리펩티드와 실시예 3에서 수득한 프로바이오틱스를 혼합하여 알러지 치료용 조성물을 제조하였다.

[164] **실험예 6. FcεRIα-Fc 융합 단백질이 알러지 개선에 미치는 효과 확인**

[165] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 ug 및 알럼(Alum) 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28일, 30일, 32일, 34일, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다. 음식물 알러지가 유발된 상기 마우스를 7마리씩 5개의 그룹으로 분류하였다. 제 1 그룹인 FcεRIαECD 재조합 단백질을 고농도(200 ug)로 투여하는 군, 제 2 그룹인 FcεRIαECD 재조합 단백질을 저농도(20 ug)로 투여하는 군, 제 3 그룹은 FcεRIαECD 재조합 단백질 고농도(200 ug)에 *B.longum*을 투여하는 군, 제 4 그룹은 FcεRIαECD 재조합 단백질 저농도(20 ug)에 *B.longum*을 투여하는 군, 및 제 5 그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다.

[166] 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였으며, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각 그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만 세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만 세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)을 분석하였다. 도 19b에 나타난 바와 같이, FcεRIαECD 폴리펩티드 이량체와 *B.longum*을 병용 투여한 군에 속한 마우스가 아무것도 투여하지 않은 군에 속한 마우스에 비하여 식품 알러지가 완화되는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[167] **실험예 7. IgETRAP과 프로바이오틱스의 병용 투여가 알러지 개선에 미치는 효과 확인**

[168] 식품 알러지에 대한 IgE_{TRAP}의 효과를 평가하기 위해, BALB/c 마우스에서 용량-의존 급성 설사를 유도하여 알레르겐-유도된 식품 알러지 마우스 모델을 만들었다. 구체적으로, 상기 실험예 6과 동일한 방법으로 실험을 하되, FcεRIαECD 재조합 단백질인 IgE_{TRAP}을 100 ug/head로 투여하여 실험을 진행하였다. 또한, 프로바이오틱스 *B.longum*은 동결건조 되어 파우더 상태의 마우스 먹이와 $3x10^9$ cfu/g로 혼합되어 마우스들이 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 그리고, 신선한 상태를 유지하기 위해 *B.longum*과 혼합된 마우스 먹이는 2~3일 마다 교체하였다. 그 결과, 하기 표 6 및 도 18에 나타난 바와 같이 프로바이오틱스인 *B.longum*과 FcεRIαECD 폴리펩티드 이량체인 IgE_{TRAP}을 동시에 투여한 실험군에서 알러지가 완화되는 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[169] [표6]

그룹	최종 마리 수	특징	1st OVA challenge	2nd OVA challenge	3rd OVA challenge	4th OVA challenge	5th OVA challenge
1	17	Disease Ctrl	0/17(0.00 %)	0/17(0.00 %)	2/17(11.76 %)	14/17(82.35%)	15/17(88.24%)
2	17	B.longum only	0/17(0.00 %)	0/17(0.00 %)	2/17(11.11 %)	11/17(61.11%)	11/17(64.71%)
3	18	IgE trap + B.longum	0/18(0.00 %)	0/18(0.00 %)	1/18(5.56%)	2/18(11.11 %)	4/18(22.22 %)
4	17	IgE trap only	0/17(0.00 %)	0/17(0.00 %)	3/17(17.65 %)	6/17(35.29 %)	9/17(52.94 %)
5	16	Normal Ctrl	0/16(0.00 %)	0/16(0.00 %)	0/16(0.00%)	0/16(0.00 %)	0/16(0.00%)

[170] 이 모델을 이용하여 본 발명자들은 IgE_{TRAP}의 단독 투여가 설사 발생을 효과적으로 감소시킨다는 것을 발견하였고, 또한 *B.longum*과 함께 IgE_{TRAP}를 투여하였을 때 IgE_{TRAP} 단독보다 설사의 발생을 현저하게 감소시킴을 확인하였다(도 18). *B.longum*은 아포토시스(apoptosis)를 통해 비만 세포 수를 줄이고 식품 알러지 증상을 완화시키는 것으로 보고되어왔으나, IgE_{TRAP}을 복강 내 주사한 그룹이 *B.longum*을 매일 투여한 그룹 보다 우수한 치료 효과를 나타냈다(도 18). 흥미롭게도, IgE_{TRAP}과 *B.longum*의 병용 요법은 IgE_{TRAP}의 농도가 10배 감소한 경우에도 IgE_{TRAP} 단독 치료와 비슷한 효과를 나타냈다 (도 19b).

[171] **실험예 8. IgETRAP과** *B.longum* 병용 투여시 효과 확인: MCPT-1 및 IgE 수준

[172] 또한 비만 세포 탈과립을 확인하기 위해 혈청 MCPT-1 수준을 측정했다. IgE_{TRAP}과 *B.longum*을 단독으로 투여하였을 때 MCPT-1의 수준을 감소시키지 않았지만, IgE_{TRAP}과 *B.longum* 조합물은 MCPT-1 수준을 유의하게 감소시켰다(도 20). 따라서, *B.longum*과 IgE_{TRAP}은 비만 세포 탈과립을 억제하기 위해 협력하는 것을 알 수 있다. 식품 알러지 마우스 모델에서 IgE를 감소시키는 치료제의 효력을 조사하기 위해, ELISA를 이용하여 혈청내 전체의 IgE 및 유리된 IgE의 수준을 분석하였다. IgE_{TRAP} 및 IgE_{TRAP}과 *B.longum*의 조합은 전체 IgE 수준을 약간 증가시켰다(도 21). 그러나, 유리된 IgE 수준은 크게 감소시켰다(도 22). 대조적으로 *B.longum* 단독 투여는 전체 IgE 및 유리 IgE 수준에 영향을 미치지 않았다(도 21 및 도 22). 따라서, IgE_{TRAP}과 *B.longum*은 식품 알러지 증상을 여러 가지 방식으로 완화시키고 이 조합이 식품 알러지에 효과적인 치료 효과를 발휘할 수 있음을 시사한다.

[173] **실험예 9.IgETRAP과** *B.longum* 조합의 비만 세포 수와 술잔 세포 과형성 억제

효과 확인

[174] IgE_{TRAP}과 *B.longum* 그리고 이 조합이 비만 세포 수를 크게 감소 시키는지를 조사하기 위해 클로로아세테이트 에스테라아제 활성(chloroacetate esterase activity)을 이용하여 비만 세포를 염색 하였다. 그 결과 IgE_{TRAP}과 *B.longum*을 단독으로 투여하였을 때 비만 세포 수가 현저하게 감소되었고 두 가지의 조합이 훨씬 더 효과적이라는 것을 보여주었다(도 23 및 도 24). *B.longum*에 대한 결과는 이전에 보고되던 것과 일치하는 것을 알 수 있다. Th2 사이토카인 환경에 의해 유도된 술잔 세포 과형성이 IgE_{TRAP}, *B.longum* 및 병용 요법에 의해 억제될 수 있는지를 조사하였다. 예상대로 식품 알러지 마우스의 소장에 있는 술잔 세포의 크기가 증가하였고 숫자가 증가하면서 과증식 되는 것을 확인하였다(도 25 및 도 26).

[175] IgE_{TRAP}과 *B.longum*의 투여는 술잔 세포의 크기와 수를 현저하게 줄었으며 이러한 효과는 IgE_{TRAP}과 *B. longum*을 조합하여 투여했을 때 더 큰 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(도 25 와 도 26). 또한, IgE_{TRAP}과 *B.longum*에 의해 IL-33의 mRNA 발현이 감소되는 경향이 보였고, 이 효과는 조합하여 투여할 경우에 유의미하게 더 크게 나타났다(도 28). 이러한 결과들은 IgE_{TRAP}과 *B.longum* 이 장내 비만 세포 수와 술잔 세포 과증식을 유의하게 억제하며 병용 요법으로 투여될 때 효과가 더 향상되는 것을 의미한다.

[176] **실험예 10. IgETRAP을 마우스에 구강 투여한 후 혈청에서 IgETRAP의 존재 여부 확인**

[177] 마우스에 IgE_{TRAP}(300 ug)을 구강투여하고 2시간 후에 안와채혈법으로 혈청을 채취한다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 4℃에서 1,300 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상층액(혈청)을 얻었다. 96 well immuno plate에 Anti-FcεRI항체(Abcam, ab54411)를 코팅하고 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Washing buffer(0.05% tween 20을 포함하는 PBS)로 씻어준 뒤 blocking buffer(1% Bovine serum albumin을 포함하는 PBS)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 다시 Washing buffer로 씻어주고 standard 샘플과 희석된 마우스의 혈청 샘플을 플레이트에 넣어주었다. 2시간 동안 반응 시키고 washing buffer로 다시 씻어주었다. Anti-human IgG4 Fc항체 (Abcam, ab99823)를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer를 넣어 씻어주고 TMB substrate(Supmodics)을 넣었다. 빛을 차단한 채로 20분 동안 반응시킨 후, stop solution(1 M H_2SO_4)을 넣어 반응을 멈춘다. 마이크로 플레이트 리더(Epoch microplate spectrophotometer)로 450 nm 파장으로 설정하여 농도 값을 측정하였다. 그 결과 정상 마우스의 혈청에서 IgE_{TRAP}이 검출되었다(도 35). 이러한 결과를 통해 IgETrap 단백질을 구강으로 투여하는 경우 점막 내 FcRn 결합을 통해 혈청 내로 전달됨으로써 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[178] **실험예 11. 식품 알러지 모델에서 IgETRAP과 다양한 프로바이오틱스의 병용 투여시 효과 확인**

[179] 식품 알러지에 대한 IgE_{TRAP}와 프로바이오틱스의 효과를 평가하기 위해, BALB/c 마우스에서 용량-의존 급성 설사를 유도하여 알레르겐-유도된 식품 알러지 마우스 모델을 만들었다. 구체적으로, 상기 실험예 7과 동일한 방법으로 실험을 하되, FcεRIαECD 재조합 단백질인 IgE_{TRAP}은 도 17의 실험 스케줄처럼 100 ug/head로 마우스에 복강 투여하였다. 또한, 동결 건조된 프로바이오틱스는 경구용 존대를 사용하여 마우스 한 마리 당 $1X10^9$~$2.5X10^9$ cfu를 실험 진행되는 동안 계속 2~3일 간격으로 먹였고, 음성 대조군에는 동결건조한 동결건조배지를 동량 먹였다.

[180] IgE_{TRAP} 및 *L.casei*를 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 29에 나타냈다. IgE_{TRAP} 및 *Lc.lactis*를 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 30에 나타냈다. IgE_{TRAP} 및 *S.thermophilus*를 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 31에 나타냈다. IgE_{TRAP} 및 *L.rhamnosus*를 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 32에 나타냈다. IgE_{TRAP} 및 *L.reuteri*를 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 33에 나타냈다. IgE_{TRAP} 및 *L.fermentum*을 투여 후 설사 빈도를 확인한 결과는 도 34에 나타냈다.

[181] <약어의 설명>

[182] *B.longum*: *Bifidobacterium longum*

[183] OIT: Oral immunotherapy

[184] PSA: Passive systemic anaphylaxis

[185] SPR: Surface plasmon resonance

[186] BLI: Bio-layer interferometry

[187] BMMC: Bone marrow-derived mast cell

[188] cfu: colony-forming unit

[189] MCPT-1: Mast cell protease 1

[190] OVA: Ovalbumin

[191] Treg cell: Regulatory T cell

[192] Th2 cell: Type 2 helper T cell

[193] ILC2: Group 2 innate lymphoid cell

서열목록 Free Text

[194] 서열번호 1:

[195] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVWQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ

[196] 서열번호 2:

[197] SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE

SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

[198] 서열번호 3:

[199] RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP

[200] 서열번호 4:

[201] AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECP

[202] 서열번호 5:

[203] gtgccccaga agcccaaggt gagcctgaac cctccctgga acagaatctt caagggcgag aacgtgaccc tgacctgcaa cggcaacaac ttcttcgagg tgagcagcac caagtggttc cacaatggca gcctgagcga ggagaccaac agctccctga acatcgtgaa cgccaagttc gaggacagcg gcgagtacaa gtgccagcac cagcaggtga acgagagcga gcccgtgtac ctggaggtgt tcagcgactg gctgctgctg caggccagcg ccgaggtggt gatggagggc cagcccctgt tcctgagatg ccacggctgg agaaactggg acgtgtacaa ggtgatctac tacaaggatg gcgaggccct gaagtactgg tacgagaacc acaacatctc catcaccaac gccaccgtgg aggacagcgg cacctactac tgcacaggca aggtgtggca gctggactac gagagcgagc ccctgaacat caccgtgatc aaggctccca gagagaagta ctggctgcag

[204] 서열번호 6:

[205] tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat cccgaagtgc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag agcagttcaa ctccacctac agagtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaagg cctgcccagc tccatcgaga agaccatcag caaagccaaa ggccagccca gagaacccca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggaaga gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat tacaagacaa cccctcccgt gctggatagc gatggcagct tctttctgta cagcagactg accgtggaca agagcagatg gcaggaaggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgtccctga gcctgggcaa g

[206] 서열번호 7:

[207] aggaacaccg gcagaggagg cgaggaaaag aaaggaagca aggagaagga ggagcaggag gaaagagaaa ccaagacccc cgagtgcccc agccacaccc agcccctggg cgtgttcctg ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagaa cccccgaggt gacc

[208] 서열번호 8:

[209] gcccagcccc aggccgaggg cagcctggct aaggccacca cagctcccgc caccaccagg aacaccggca gaggaggcga ggaaaagaaa ggaagcaagg agaaggagga gcaggaggaa agagaaacca agacccccga gtgccccagc cacacccagc ccctgggcgt gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaaccc ccgaggtgac c

[210] 서열번호 9:

[211] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHA

[212] 서열번호 10:

[213] atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg tcccctagcc acgcc

[214] 서열번호 11:

[215] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT CNGNNFFEVS STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYYCTGKV WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQRNTGR GGEEKKGSKE KEEQEERETK TPECPSHTQP LGVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

[216] 서열번호 12:

[217] atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaaccctcc ctggaacaga atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtgagc agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag agcgagcccg tgtacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcaggc cagcgccgag gtggtgatgg agggccagcc cctgttcctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg tacaaggtga tctactacaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag aagtactggc tgcagaggaa caccggcaga ggaggcgagg aaaagaaagg aagcaaggag aaggaggagc aggaggaaag agaaaccaag acccccgagt gccccagcca cacccagccc ctgggcgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaaccccc gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac tccacctaca gagtggtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaaggc ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccccag gtgtacaccc tgcctcccag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgaag ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag

[218] 서열번호 13:

[219] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT CNGNNFFEVS STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQQVNE SEPVYLEVFS DWLLLQASAE VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN ISITNATVED SGTYYCTGKV WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQAQPQA EGSLAKATTA PATTRNTGRG GEEKKGSKEK EEQEERETKT PECPSHTQPL GVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE

YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

[220] 서열번호 14:

[221] atggacgcca tgctgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaaccctcc ctggaacaga atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtgagc agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag agcgagcccg tgtacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgctgcaggc cagcgccgag gtggtgatgg agggccagcc cctgttcctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg tacaaggtga tctactacaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcac aggcaaggtg tggcagctgg actacgagag cgagcccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag aagtactggc tgcaggccca gccccaggcc gagggcagcc tggctaaggc caccacagct cccgccacca ccaggaacac cggcagagga ggcgaggaaa agaaaggaag caaggagaag gaggagcagg aggaaagaga aaccaagacc cccgagtgcc ccagccacac ccagcccctg ggcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aaccccgag gtgacctgcg tggtcgtgga tgtgagccag gaagatcccg aagtgcagtt caactggtac gtggatggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaagagca gttcaactcc acctacagag tggtgagcgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtgtccaa caaaggcctg cccagctcca tcgagaagac catcagcaaa gccaaaggcc agcccagaga accccaggtg tacaccctgc ctcccagcca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg aaagcaacgg ccagcccgag aacaattaca agacaacccc tcccgtgctg gatagcgatg gcagcttctt tctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagatggcag gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacacccag aagagcctgt ccctgagcct gggcaag

[222] 서열번호 15:

[223] MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS LGKLAMGSDS QSVSSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLIPRLQ KIWKNYLSMN KYKVSYKGPG PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFPF NTSEWEGYLP KESIRTKAGP WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR LMNSQLVTTE KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN QPFYILKPQM PWELWDILQE ISPEEIQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT DVCYYYQKFF DSACTMGAYH PLLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

[224] 서열번호 16:

[225] atgatccaca ccaacctgaa gaagaagttc agctgctgcg tgctggtgtt cctgctgttc gccgtgatct gcgtgtggaa ggagaagaag aaaggcagct actacgacag cttcaagctg cagaccaagg agttccaggt

gctgaagagc ctgggcaagc tggccatggg cagcgacagc cagagcgtgt ccagctcctc cacccaggat ccccacagag gcagacagac cctgggcagc ctgagaggcc tggccaaggc caagcccgag gccagcttcc aggtgtggaa caaggacagc agcagcaaga acctgatccc cagactgcag aagatctgga agaactacct gagcatgaac aagtacaagg tgagctacaa aggacccgga cccggcatca agttcagcgc cgaggccctg aggtgccacc tgagagacca cgtgaacgtg agcatggtgg aagtgaccga cttccccttc aacaccagcg agtgggaagg ctacctgccc aaggagagca tcaggaccaa ggctggcccc tggggcagat gcgccgtggt gagcagcgct ggcagcctga agagctccca gctgggcaga gagatcgacg accacgatgc cgtgctgagg ttcaatggcg ctcccaccgc caacttccag caggacgtgg gcaccaagac cacaatccgg ctgatgaaca gccagctggt gacaaccgag aagcggttcc tgaaggacag cctgtacaac gagggcatcc tgatcgtgtg ggatcccagc gtgtaccaca gcgacatccc caagtggtac cagaatcccg actacaactt cttcaacaac tacaagacct atagaaagct gcaccccaac cagcccttct acatcctgaa gccccagatg ccctgggagc tgtgggacat cctgcaggag atcagccctg aagagatcca gcccaaccct ccctccagcg gcatgctggg cattatcatc atgatgaccc tgtgcgacca ggtggacatc tacgagttcc tgcccagcaa gagaaagacc gacgtgtgct actactatca gaagttcttc gacagcgcct gcaccatggg cgcctaccac cccctgctgt acgagaagaa cctggtgaag cacctgaacc agggcaccga cgaggacatc tacctgctgg gcaaagccac cctgcccggc ttcagaacca tccactgc

[226] 서열번호 17:

[227] RNTGRGGEEK KXXKEKEEQE ERETKTPECP

[228] 서열번호 18:

[229] AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK XXKEKEEQEE RETKTPECP

[230] 서열번호 19

[231] RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP

[232] 서열번호 20:

[233] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVWQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

[234] 서열번호 21:

[235] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVWQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE

VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

[236] 서열번호 22:

[237] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVWQLDY ESEPLNITVI KAPREKYWLQ AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECPS HTQPLGVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK