



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137870
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2020.05)
G01N 30/7233 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0031182
(22) 출원일자 2023년03월09일
심사청구일자 2023년03월09일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍수중
서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 24동 902호
박윤미
서울특별시 강동구 진향도로29길 23, 401호
이소연
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 서울아산병원
(74) 대리인
특허법인더웨이브

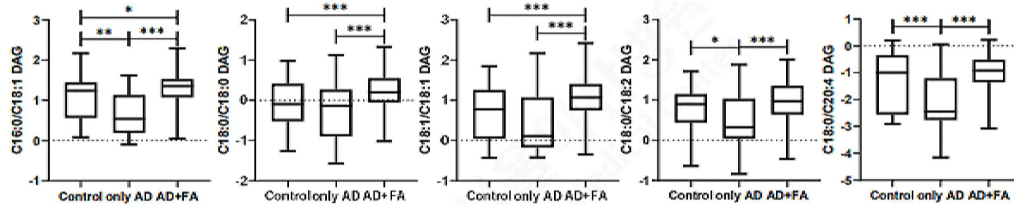
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기 진단용 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기의 진단 방법에 관한 발명으로서 스펅고지질 대사체의 수준에 근거하여 아토피피부염을 동반하는 식품알레르기 발병위험을 간단하고 정확하게 예측할 수 있으므로, 알레르기 행진(atopic march)으로의 이행 여부를 미리 예측할 수 있고, 식품알레르기의 효과적인 예방 및 관리가 가능하다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 2030/027 (2013.01)
 G01N 2030/8813 (2013.01)
 G01N 2405/08 (2013.01)
 G01N 2800/24 (2024.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345349845
과제번호	2021R1I1A1A01056154
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	Sphingolipid 대사체가 식품알레르기 장 점막 면역체계와 점막 장벽에 미치는 영향

규명

기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 �핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 �핑고지질 대사체는 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마이드(ceramide: Cer), �핑고마이엘린(sphingomyeline: SM), �핑고신(sphingosine: SO) 및 �핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 대사체인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 생물학적 시료는 생후 6개월 내지 12개월 이내 소아로부터 분리된 분변인 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 �핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 정상대조군과 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 �핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준이 정상대조군에 비해 증가 또는 감소된 경우, 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 단계는 다이아실글리세롤(DAG), 세라마이드(Cer), �핑고마이엘린(SM) 또는 �핑고신(SO)의 수준이 정상대조군 시료보다 증가하거나, �핑고신 1-인산(S1P)의 수준이 정상대조군 시료보다 감소한 경우 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 대사체의 수준 측정은 LC-MS(liquid chromatograph mass spectrometry), HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin layer chromatography), GC(Gas chromatography), ESI(electrospray ionization), ESI 기반 MRM(multiple reaction monitoring), MALDI 질량 분석법(MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer) 및 NMR(nuclear magnetic resonance) 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하는 것인 방법.

청구항 8

스핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단용 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 �핑고지질 대사체는 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마이드(ceramide: Cer), �핑고마이엘린(sphingomyeline: SM), �핑고신(sphingosine: SO) 및 �핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 대사체인 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 �핑고지질 대사체의 수준이 정상대조군에 비해 증가 또는 감소된 경우, 아토피피부염

동반 식품 알레르기가 발생하는 것으로 진단하는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 아토피피부염 동반 식품 알레르기 발생하는 것으로 진단하는 것은 다이아실글리세롤(DAG), 세라마이드(Cer), 스핑고마이엘린(SM) 또는 스핑고신(SO)의 수준이 정상대조군 시료보다 증가하거나, 스핑고신 1-인산(S1P)의 수준이 정상대조군 시료보다 감소한 경우 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 진단하는 것인 조성물.

청구항 12

스핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기를 진단하기 위한 키트.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 스핑고지질 대사체는 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마이드(ceramide: Cer), 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM), 스핑고신(sphingosine: SO) 및 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 대사체인 키트.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 혈청 총 IgE 또는 음식 특이적 IgE를 측정하는 제제를 더 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기 진단용 바이오마커, 이를 검출하기 위한 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 이용한 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부를 통한 음식 감작(sensitization)은 피부 장벽 손상으로 인한 식품알레르기(Food Allergy: FA)를 발생시킬 수 있으며, 장내 식품알레르겐에 대한 내성을 획득하지 못하는 경우에도 식품알레르기를 발생시킬 수 있다. 식품알레르기(Food Allergy: FA)는 특정 식품에 노출 후 면역반응에 의해 발생하는 이상반응으로 아토피피부염군에서 중등도에 따라 20~80% 정도가 발생하는 것으로 알려져 있고, 식품알레르기를 동반한 아토피피부염군은 알레르기 행진(atopic march)으로 이행될 가능성이 높다.

[0003] 알레르기 행진(atopic march)은 아토피피부염(atopic dermatitis; AD), 식품 알레르기(Food Allergy: FA), 비염(rhinitis), 천식(asthma)과 같은 질환들이 나이에 따라 순차적으로 나타나거나 연령별 경향성과는 무관하게 동시 다발적으로 동반되어 나타나는 것으로, 주로 영아기에 아토피피부염이 발생, 이후 위장관 알레르기 형태로 발생하여, 3-4 세경 이후로 천식이 주로 발생하고, 이후 학령기 중반 이후에는 점차 알레르기 비염이 나타나게 된다. 조기발병하여 지속되는 아토피피부염과 식품에 대한 알레르기는 호흡기 알레르기질환이 발생하는 알레르기 행진 또는 청소년기와 성인기까지 이어지는 만성적인 질환의 위험 인자로 알려져 있다.

[0004] 따라서 아토피피부염이 있는 소아에서 식품알레르기 동반에 대한 기전을 이해하는 것은 향후 호흡기알레르기와 만성적인 알레르기질환 발생을 이해하는데 있어서 중요하며 이러한 기전을 통해 알레르기행진을 예방할 수 있을 것으로 기대한다. 아토피피부염에서 식품알레르기 발생의 확인은 알레르기 행진(atopic march)으로의 이행을 예측하거나, 알레르기 행진을 예방해야 할 대상군을 구분하는 근거가 될 수 있다. 기존의 식품항원 특이 IgE 검사나 임상적인 판단으로 식품알레르기 여부를 판단할 수는 있으나 현재까지 아토피피부염에서 식품알레르기 동반의 기전을 장 대사체 수준에서 구분한 연구는 없었다. 또한, 소아의 경우 혈액 또는 조직 검사를 수행하는 것이 매우 어려운 문제가 있으므로 비침습적인 방법의 검사가 요구되는 바이다.

[0005] 이에, 아토피피부염에서 식품알레르기의 동반 여부에 따른 장내 대사체 연구를 통해 기전을 이해하고 진단을 위한 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 일 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 스핑고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 양상은 스핑고지질 대사체의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또 다른 양상은 스핑고지질 대사체의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기를 진단하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 스핑고지질 대사체(sphingolipid)의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 명세서에서 용어 "알레르기(allergy)"는 면역시스템의 오작동으로 보통 사람에게는 별 영향이 없는 물질이 특정 사람에게만 두드러기, 가려움, 콧물, 기침 등의 이상 과민 반응을 일으키는 것을 말한다. 알레르기반응은 발현시간과 타입에 기초하여 전통적으로 I~IV 형으로 나뉘고, 항체가 관여하는 제 I 형 즉시형 과민반응의 대표적인 예로 아토피성 피부염, 식품알레르기 등이 있다.
- [0011] 상기 식품알레르기(food allergy)는 특정 식품에 노출된 후 면역반응에 의해 발생하는 이상반응으로, 피부, 위장관, 호흡기, 심혈관계, 신경계 등 다양한 기관에 증상을 유발하는 것을 의미할 수 있다. 구체적으로, 식품알레르기는 발생 기전에 따라 면역글로불린 E(Immunoglobulin E: IgE) 매개성 식품알레르기와 비 IgE 매개성 식품알레르기로 분류되고, 이 중 IgE 매개성 식품알레르기가 즉시형 반응을 야기하며 중증 전신 반응인 아나필락시스(anaphylaxis)를 유발할 수 있다.
- [0012] 본 명세서의 용어 "알레르기 행진(atopic march)"은 아토피피부염 동반 식품 알레르기 지속, 천식 또는 비염 등의 알레르기질환이 특징적으로 순서에 따라 또는 동시 다발적으로 다양한 표현형이 나타나는 것을 의미할 수 있다.
- [0013] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"는 알레르기 관련 질병에 걸리거나 걸릴 위험이 있는 개체로부터 분리된 시료, 배양된 세포 또는 분변일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 조직, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계 내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액, 조직, 비장, 비장 세포, 비장 조직, 분변 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0014] 상기 생물학적 시료로부터 대사체를 분리하는 방법은 당업자에게 알려진 것일 수 있다.
- [0015] 일 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 생후 1개월 내지 36개월, 바람직하게는 3개월 내지 18개월, 더욱 바람직하게는 6개월 내지 12개월 이내의 소아로부터 분리된 분변일 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서 용어 "대사체"는 생체 기원의 시료로부터 수득한 대사물질을 말한다. 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 의해 생산된 물질 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 "스핑고지질(sphingolipid) 대사체"는 스핑고이드 염기와 세라마이드 등 단순 스핑고지질에 다양한 작용기가 부착된 구조를 가진 지질 또는 스핑고이드 염기에 인산화가 된 지질을 의미하는 것 일 수 있다. 구체적으로, 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마이드(ceramide: Cer), 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM), 스핑고신(sphingosine: S0) 및 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로, 상기 세라마이드는 세라마이드 NP, 세라마이드 NS, 세라마이드 NG, 세라마이드 EOP, 세라마이드 AS, 세라마이드 AP, 글루코실 세라마이드, 갈락토실세라마이드, 자일로실세라마이드 등일 수 있고, 바람직하게는 C16 세라마이드, C18 세라마이드, C20 세라마이드, C24 세라마이드, C24:1 세라마이드일 수 있다.
- [0018] 일 구체예에 있어서, 상기 스핑고지질(sphingolipid) 대사체는 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마

이드(ceramide: Cer), 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM), 스펡고신(sphingosine: SO) 및 스펡고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 이의 기능적 동등물을 포함할 수 있다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 스펡고지질 대사체는 아토피피부염 동반 식품알레르기의 바이오 마커일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "마커(marker)" 또는 "바이오마커(biomarker)"란 정상군 개체와 식품알레르기 항원 감작(sensitization)된 개체 또는 식품알레르기 발병 위험이 있는 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 식품알레르기 항원 감작된 개체 또는 식품알레르기 발병 위험이 있는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체분자들을 모두 포함할 수 있다. 상기 감작(sensitization)은 생체 내에 식품 알레르기 항원이 투여되고, 일정 시간 후에 다시 같은 항원이 투여된 경우 아나필라시스(anaphylaxis)가 일어나는데, 첫번째 투여로 생체가 그 항원에 대해 과민성이 되는 것을 의미한다.

[0021] 일 구체예에 있어서, 상기 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단에 대한 정보를 제공하는 방법은 스펡고지질(sphingolipid) 대사체의 수준이 정상대조군에 비해 증가 또는 감소된 경우, 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 단계는 다이아실글리세롤(DAG), 세라마이드(Cer), 스펡고마이엘린(SM) 또는 스펡고신(SO)의 수준이 정상대조군 시료보다 증가하거나, 스펡고신 1-인산(S1P)의 수준이 정상대조군 시료보다 감소한 경우 아토피피부염 동반 식품알레르기가 발생하는 것으로 결정하는 것일 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "수준 측정"이란 아토피피부염 동반 식품알레르기를 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 스펡고지질 대사체의 수준을 확인하는 과정을 의미할 수 있다. 상기 대사체 수준을 측정하는 단계는 당업자에게 알려진 방법으로 수행될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 스펡고지질 대사체의 수준을 측정하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, LC-MS(liquid chromatograph mass spectrometry), HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin layer chromatography), GC(Gas chromatography), ESI(electrospray ionization), ESI 기반 MRM(multiple reaction monitoring), MALDI 질량 분석법(MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer) 및 NMR(nuclear magnetic resonance) 등으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것일 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "대사체의 수준 증가"는 대조군에 비해 개체의 시료 내 대사체의 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 예를 들어 약 1.1배 이상, 예를 들어 1.1배 내지 2.5배, 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 또는 2배 이상 증가된 경우를 의미할 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "대사체의 수준 감소"는 대조군에 비해 개체의 시료 내 대사체의 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 의미하며, 예를 들어 약 0.9배 이하, 예를 들어 0.1배 내지 0.9배, 0.9배, 0.8배, 0.7배, 0.6배, 0.5배, 0.4배, 0.3배, 0.2배, 또는 0.1배 이하로 감소된 경우를 의미할 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 아토피피부염 동반 식품알레르기의 진단에 관한 정보를 제공하기 위해, 상기 스펡고지질 대사체의 수준을 측정 및 분석한 결과에 추가하여, 개체의 상기 마커 이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 임상정보란, 예를 들면 환자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 초음파, 전산화 단층촬영(CT), 자기공명영상(MRI), 혈관조영술 등을 포함한다.

[0026] 다른 양상은 스펡고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기 진단용 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 스펡고지질 대사체, 대사체의 수준 측정은 전술한 바와 같다.

[0028] 상기 조성물은 아토피피부염 동반 식품알레르기의 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다.

[0029] 상기 조성물은 아토피피부염 동반 식품알레르기 지속 여부 진단, 천식(asthma) 또는 비염(rhinitis)으로 진행 여부 진단 및 알레르기 행진(atopic march)으로의 이행 여부 진단 중 어느 하나 이상을 위한 것일 수 있다.

[0030] 또 다른 양상은 스펡고지질(sphingolipid) 대사체의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 아토피피부염 동반 식품알레르기를 진단하기 위한 키트를 제공한다.

[0031] 상기 스펡고지질 대사체, 대사체의 수준 측정은 전술한 바와 같다.

[0032] 상기 키트는 아토피피부염 동반 식품알레르기의 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 아

토피피부염 동반 식품알레르기의 진단에 필요한 시료는 혈청 총 IgE 또는 음식 특이적 IgE를 측정하는 제제 일 수 있다.

[0033] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 통합 자기-전기화학 센서(integrated magneto-electrochemical sensor) 키트 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 통합 자기-전기화학 센서는 자성 비드(magnetic bead)를 사용하여 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭한다. 구체적으로는, 자성 비드에 표적 물질을 검출할 수 있는 물질(예를 들면 항체)을 부착시키고, 상기 표적 물질을 검출할 수 있는 발색 물질(예를 들면 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase: HRP), 알칼리 포스파타제(Alkaline Phosphatase: ALP), α -D-갈락토시다아제(α -D-galactosidase, α -Gal)에 의해서 발생하는 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭할 수 있다.

[0034] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 상기 스펅고지질 대사체 수준을 측정하기 위한 제제, 장치, 및 알고리즘이 내장된 컴퓨터를 포함할 수 있고, 상기 알고리즘을 통해 상기 마커의 수준 측정 결과를 아토피피부염 동반 식품알레르기 및 연관시키는 것인, 키트에 관한 것일 수 있다.

발명의 효과

[0035] 일 양상에 따른 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 아토피피부염을 동반하는 식품 알레르기의 진단 방법에 따르면, 스펅고지질 대사체의 수준에 근거하여 아토피피부염을 동반하는 식품알레르기 발병위험을 간단하고 정확하게 예측할 수 있으므로, 알레르기 행진(atopic march)으로의 이행 여부를 미리 예측할 수 있고, 식품알레르기의 효과적인 예방 및 관리가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 장내 스펅고지질 수준을 비교한 그래프이다; 도 1a는 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 수준을 나타낸 그래프이고, 도 1b는 장내 세라마이드(ceramide: Cer)의 수준을 나타낸 그래프이며, 도 1c는 장내 스펅고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 수준을 나타낸 그래프이고, 도 1d는 장내 스펅고신(sphingosine)의 수준을 나타낸 그래프이며, 도 1e는 장내 스펅고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: SIP)의 수준을 나타낸 그래프이다.

도 2는 혈청 총 IgE와 장내 스펅고지질의 대사체의 상관관계를 확인한 그래프이다; 도 2a는 혈청 총 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 2b는 혈청 총 IgE와 장내 스펅고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 2c는 혈청 총 IgE와 장내 스펅고신(sphingosine: SO)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 2d는 혈청 총 IgE와 장내 스펅고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: SIP)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

도 3은 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펅고지질의 연관성을 확인한 그래프이다; 도 3a는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 3b는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펅고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 3c는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펅고신(sphingosine: SO)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 3d는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펅고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: SIP)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

도 4는 우유 특이적 IgE와 장내 스펅고지질 대사체의 상관관계를 확인한 그래프이다; 도 4a는 우유 특이적 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 4b는 우유 특이적 IgE와 장내 스펅고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 4c는 우유 특이적 IgE와 장내 스펅고신(sphingosine: SO)의 상관관계 나타낸 그래프이고, 도 4d는 우유 특이적 IgE와 장내 스펅고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: SIP)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 대상 피험자의 특성

[0039] 실험에 참여한 158명의 인구통계학적 및 임상적 특성을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	대조군 (Healthy controls ; N = 46)	식품알레르기를 동반하지 않은 아토피피부염군 (Only AD ; N = 30)	식품알레르기를 동반한 아토피피부염군 (AD with FA ; N = 82)	P value* (*Kruskal-Wallis test)
남아 (Male) (%)	27 (58.7%)	19 (63.3%)	55 (67.1%)	> .05
알레르기 질환의 가족력 (Parental history of allergic disease) (%)	19 (41.3%)	19 (63.3%)	63 (76.8%)	<.001
프로바이오틱스 사용(Probiotics use) (%)	13 (29.5%)	15 (50%)	62 (75.6%)	<.001
수유유형 (Feeding type) (%)				.003
모유수유(Breast feeding)	3 (6.5%)	4 (13.3%)	38 (46.3%)	33 (40.3%) 11 (13.4%)
혼합수유(Mixed Feeding)	43 (93.5%)	23 (76.7%)		
분유수유(Bottle feeding)	0	3 (10%)		
분만방식(Delivery mode) (%)				
자연분만(Vaginal)	26 (56.5%)	25 (83.3%)	52 (63.4%)	> .05
제왕절개(Cesarean section)	20 (43.5%)	5 (16.7%)	30 (36.6%)	
SCORAD index	-	15.28±2.24	26.33±1.65	<.001
혈청 총 IgE (Total IgE) (kU/L)	27.62±5.79	114.65±66.82	245.75±85.95	<.001
달걀 흰자 특이적 IgE (Specific IgE to egg white) (kU/L)	0.07±0.01	2.64±1.87	14.60±2.35	<.001
우유 특이적 IgE (Specific IgE to milk) (kU/L)	0.09±0.01	0.15±0.04	4.87±1.82	<.001
호산구(Eosinophil) (%)	2.32±0.21	4.74±0.78	6.4±0.43	<.001

표 1에 나타난 바와 같이, 총 158명의 6개월 내지 12개월 이내의 소아 분변을 코호트를 통해 모집하였다. 구체적으로, 대조군(Healthy controls) 46명, 식품알레르기를 동반하지 않은 아토피피부염군 30명 및 식품알레르기를 동반한 아토피피부염군 82명의 소아의 분변을 코호트를 통해 모집하여 의사진단에 의해 각 대상군을 선별하였다.

실시예 2. 각 대상군별 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체 함량 비교

2.1 시료 내 대사체 분석

실시예 1의 대상 피험자들로부터 얻은 분변 시료로부터 대사체를 분석하기 위해 하기와 같은 방법으로 LC-MS/MS를 사용한 분석을 수행하였다.

구체적으로, 인체 분변은 동결 건조하여 대사체 분석 수행전까지 -80° C에 보관하여 사용하였다. 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 분석은 10mg의 동결 건조된 분변을 스탠다드용액 (200 μl의 1 μM C17 sphingosine 1-phosphate 용액)에 넣어 잘 분쇄한 후, 300 μl chloroform, 200 μl methanol, 50 μl 정제수, 그리고 10 μl 10N NaOH에 넣어 잘 섞었다. 상기 혼합물을 원심분리하여 물층을 잘 분리하여 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)이 함유된 분리층을 얻었다. 이후 400 μl의 chloroform과 20 μl의 10M HCl을 첨가하여 산성 상태에서 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)를 재추출하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 그리고 Chloroform을 증발시켜 methanol에 녹여 LC-MS/MS 분석하였다.

스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 LC-MS/MS 분석은 Ultimate3000(Dionex)과 LTQ-Orbitrap XL(Thermo Fischer Scientific)이 장착된 LC-MS/MS 시스템을 사용하여 측정하였다. reverse 컬럼(Jupiter 5μM C4 column(50 x 1 mm))은 mobile phase A (정제수에 녹인 포름산 0.1%) 및 mobile phase B(메탄올에 녹인 포름산 0.1%)을 사용하였고, LC는 300 μl/min 및 35° C에서 수행하였다. LC gradient는 0분 동안 B에서 10%, 5분 동안 B에서 10~90%, 10분 동안 B에서 90%, 0.1분 동안 B에서 90~10%, 4.9분 동안 B에서 10%였다. 정량은 음이온 모드에서 선택이온모니터링(SRM)을 사용하였으며, 정량은 S1P에 대한 특정 전이(인산이온, PO3-, m/z

78.9585)에 해당하는 추출이온 크로마토그램을 사용하였다. 교정 범위는 0.01~10 μM , $R^2 > 0.99$ 이었다. 데이터 분석은 Xcalibur 2.2 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0048] 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)을 포함하는 다른 스핑고지질은 40mg의 동결건조 분변을 활용하였다. 내부 스탠다드 용액 (50 μl 의 100 nM C18 ceramide-d7, C18:1 SM-d9, 200 μl 의 1 μM 1,3-19:0-d5)을 섞고 지질이 함유된 오가닉 솔루션을 진공 원심분리를 활용하여 건조 시킨 후 LC-MS/MS 분석하였다. 모든 시약은 Sigma-Aldrich 및 Aventi-Polar Lipids에서 구입하여 사용하였다.

[0049] 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)을 제외한 스핑고지질은 1290 HPLC(Agilent, Waldbronn, Germany)와 QTRAP 5500(AB Sciex, Toronto, Canada)이 장착된 LC-MS/MS 시스템을 사용하여 측정하였다. reverse 컬럼(Jupiter 5uMC4 column(50 x 1 mm))은 mobile phase A(5 mM ammonium formate/MeOH/tetrahydrofuran (500/200/300, v/v/v)) 및 mobile phase B(5 mM ammonium formate/MeOH/tetrahydrofuran (100/200/700, v/v/v))을 사용하였고, LC는 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 및 35° C에서 구동하였다.

[0050] 세라마이드(ceramide: Cer) 및 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 경우, LC gradient는 0분 동안 A에서 50%, 5분 동안 A에서 50%, 3분 동안 A에서 50%, 7분 동안 A에서 30%, 7분 동안 A에서 30%, 3분 동안 A에서 10%, 0.1분 동안 A에서 10%, 4.9분 동안 A에서 50%였다. 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 경우, LC gradient는 0분 동안 A에서 10%, 6분 동안 A에서 10%, 0.6분 동안 A에서 10~5%, 3.4분 동안 A에서 50%, 0.1분 동안 A에서 5~10%, 1.9분 동안 A에서 10%였다. 정량은 양이온 모드에서 MRM(Multiple reaction monitoring)을 실시하고, 추출된 이온 크로마토그램을 지질별 특이전이에 대응하여 정량하였다. 각 지질에 대한 교정 범위는 0.1~1000nM($r^2 \geq 0.99$)이었다. 데이터 분석은 Analyst 1.5.2 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0051] 2.2 각 대상군 별 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체 함량을 비교

[0052] 각 대상군 별 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체 함량을 비교하기 위해, 상기 실시예1의 대조군 (Healthy controls ; N = 46), 식품알레르기를 동반하지 않은 아토피피부염군 (Only AD ; N = 30) 및 식품알레르기를 동반한 아토피피부염군 (AD with FA ; N = 82)의 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체의 함량을 실시예 2.1과 같은 방법으로 측정하고, 그 결과를 도 1a 내지 도 1e에 나타내었다.

[0053] 도 1a는 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 수준을 나타낸 그래프이고, 도 1b는 장내 세라마이드(ceramide: Cer)의 수준을 나타낸 그래프이며, 도 1c는 장내 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 수준을 나타낸 그래프이고, 도 1d는 장내 스핑고신(sphingosine)의 수준을 나타낸 그래프이며, 도 1e는 장내 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 수준을 나타낸 그래프이다.

[0054] 도 1a 내지 도 1d에 나타낸 바와 같이, 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 세라마이드(ceramide: Cer), 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM) 및 스핑고신(sphingosine: SO)의 경우에는 식품알레르기를 동반하지 않은 아토피피부염군(Only AD)에서보다 식품알레르기를 동반한 아토피피부염군(AD with FA)에서 더 높음을 확인하였다.

[0055] 또한, 도 1e에서 나타낸 바와 같이, 장내 스핑고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)은 식품알레르기를 동반하지 않은 아토피피부염군(Only AD)에서보다 식품알레르기를 동반한 아토피피부염군 (AD with FA)에서 더 낮음을 확인하였다.

[0057] 실시예 3. 혈청 총 IgE와 장 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체 의 상관관계 확인

[0058] 스핑고지질(Sphingolipid ; SPL) 대사체와 식품알레르기와의 관계를 확인하기 위하여, 혈청 총 IgE와 장 스핑고지질 대사체와 상관관계를 확인하였고, 그 결과를 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다.

[0059] 구체적으로, 혈청 총 IgE는 1세 시기의 혈액을 ImmunoCAP-CAP 1000시스템 (Phadia AB, Uppsala, Sweden)을 활용하여 측정하였다. 측정된 수치와 스핑고지질 대사체의 상관관계는 spearman correlation test를 사용하여 분석했고, SPSS statistical 소프트웨어 (ver 24.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 활용하였다.

[0060] 도 2a는 혈청 총 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 2b는 혈청 총 IgE와 장내 스핑고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 2c는 혈청 총 IgE와 장내 스핑고신(sphingosine: SO)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 2d는 혈청 총 IgE와 장내 스핑고신

1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

[0061] 도 2a 내지 도 2c에 나타난 바와 같이, 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM) 및 스펡고신(sphingosine: SO)은 혈청 총 IgE와 양의 상관관계가 있음을 확인하였다. 또한 도 2d에 나타난 바와 같이, 장내 스펡고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)은 혈청 총 IgE와 음의 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0062] 이 결과는 아토피피부염이 있는 영유아에서 장내 스펡고지질 대사체가 음식 감작과 식품알레르기와의 연관성이 있고, 스펡고지질이 아토피피부염 표현형에서 식품알레르기 동반 여부를 구분 지을 수 있는 마커로서 활용 가능함을 의미한다.

[0064] 실시예 4. 식품 알레르겐 특이 IgE와 장내 스펡고지질 대사체의 간의 상관관계 확인

[0065] 4.1 달걀 흰자 특이적 IgE와 장 스펡고지질 대사체의 상관관계 확인

[0066] 스펡고지질 대사체와 식품알레르기와의 관계를 확인하기 위하여, 달걀 흰자 특이적 IgE와 장 스펡고지질(Sphingolipid; SPL) 대사체의 상관관계를 확인하기 위해, 실시예 3에서와 같이 분석을 수행하고, 그 결과를 도 3a 내지 도 3d에 나타내었다.

[0067] 구체적으로, 달걀 흰자 특이적 IgE는 1세 시기의 혈액을 ImmunoCAP-CAP 1000시스템(Phadia AB, Uppsala, Sweden)을 활용하여 측정하였다. 상관관계 분석방법은 실시예 3의 혈청 총 IgE 분석방법과 동일하다.

[0068] 도 3a는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 3b는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 3c는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펡고신(sphingosine: SO)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 3d는 달걀 흰자 특이적 IgE와 장내 스펡고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

[0069] 도 3a 내지 도 3c에 나타난 바와 같이, 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG), 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM) 및 스펡고신(sphingosine: SO)은 달걀 흰자 특이적 IgE와 양의 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0070] 이 결과는 아토피피부염이 있는 영유아에서 장내 스펡고지질 대사체가 음식 감작과 식품알레르기와의 연관성이 있고, 스펡고지질이 아토피피부염 표현형에서 식품알레르기 동반 여부를 구분 지을 수 있는 마커로서 활용 가능함을 의미한다.

[0071] 4.2 우유 특이적 IgE와 장 스펡고지질 대사체의 상관관계 확인

[0072] 스펡고지질 대사체와 식품알레르기와의 관계를 확인하기 위하여, 우유 특이적 IgE와 장 스펡고지질(Sphingolipid; SPL) 대사체의 상관관계를 확인하기 위해, 실시예 3에서와 같이 분석을 수행하고, 그 결과를 도 4a 내지 도 4d에 나타내었다.

[0073] 구체적으로, 우유 특이적 IgE는 1세 시기의 혈액을 ImmunoCAP-CAP 1000시스템(Phadia AB, Uppsala, Sweden)을 활용하여 측정하였다. 상관관계 분석방법은 실시예 3의 혈청 총 IgE 분석방법과 동일하다.

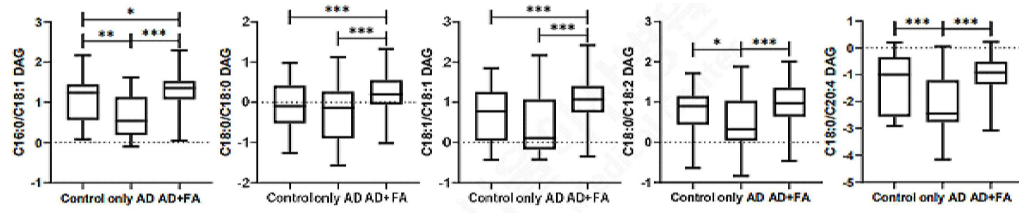
[0074] 도 4a는 우유 특이적 IgE와 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG)의 상관관계를 나타낸 그래프이고, 도 4b는 우유 특이적 IgE와 장내 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM)의 상관관계를 나타낸 그래프이며, 도 4c는 우유 특이적 IgE와 장내 스펡고신(sphingosine: SO)의 상관관계 나타낸 그래프이고, 도 4d는 우유 특이적 IgE와 장내 스펡고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

[0075] 도 4a 내지 도 4c에 나타난 바와 같이, 장내 다이아실글리세롤(diacylglycerol: DAG) 및 스펡고마이엘린(sphingomyeline: SM)은 우유 특이적 IgE와 양의 상관관계가 있음을 확인하였다. 또한 도 4d에 나타난 바와 같이, 장내 스펡고신 1-인산(sphingosine 1-phosphate: S1P)은 우유 특이적 IgE와 음의 상관관계가 있음을 확인하였다.

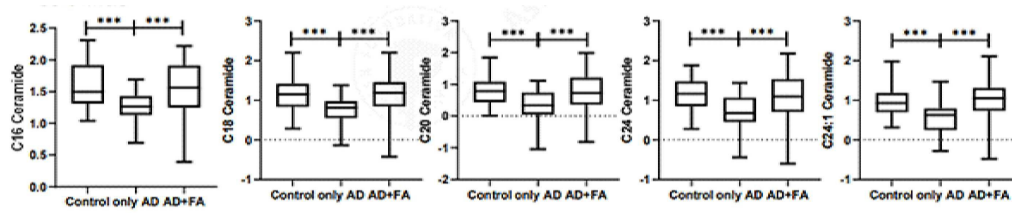
[0076] 이 결과는 아토피피부염이 있는 영유아에서 장내 스펡고지질 대사체가 음식 감작과 식품알레르기와의 연관성이 있고, 스펡고지질이 아토피피부염 표현형에서 식품알레르기 동반 여부를 구분 지을 수 있는 마커로서 활용 가능함을 의미한다.

도면

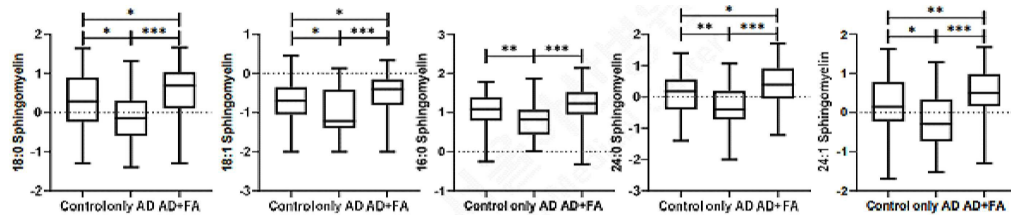
도면1a



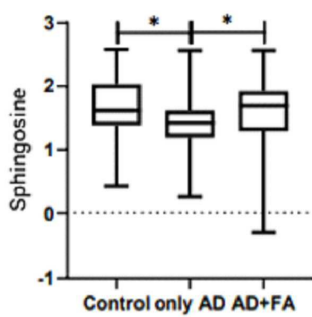
도면1b



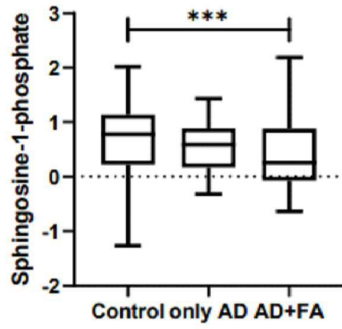
도면1c



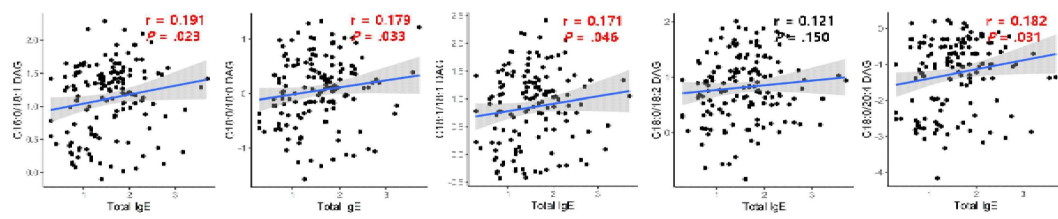
도면1d



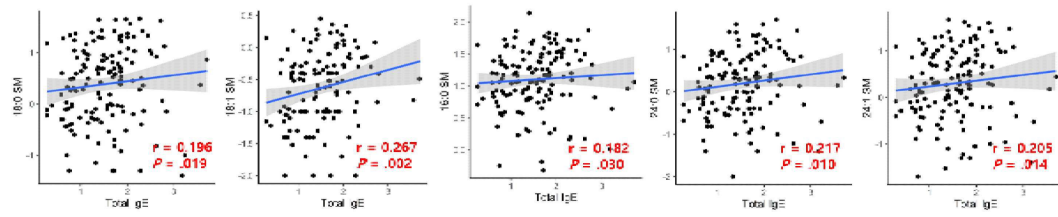
도면1e



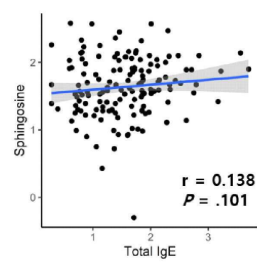
도면2a



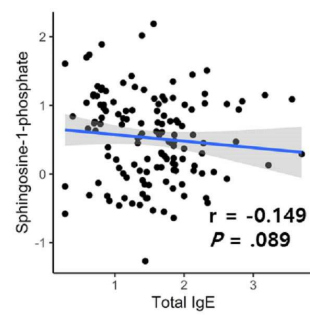
도면2b



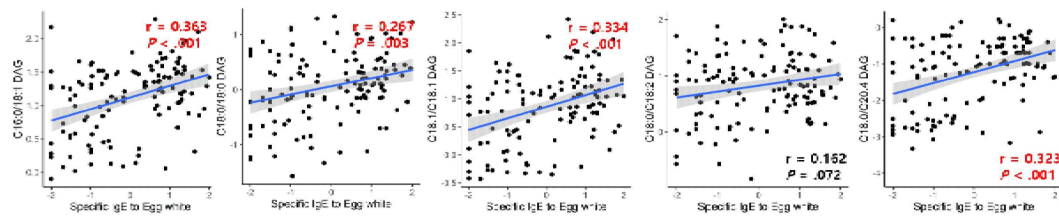
도면2c



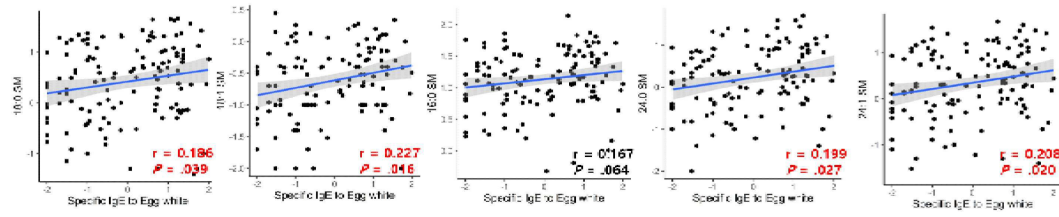
도면2d



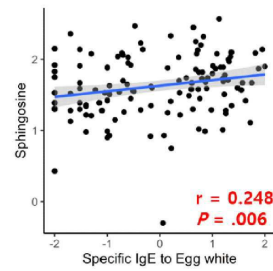
도면3a



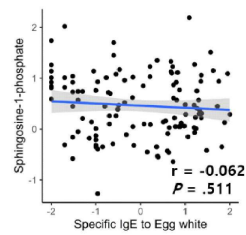
도면3b



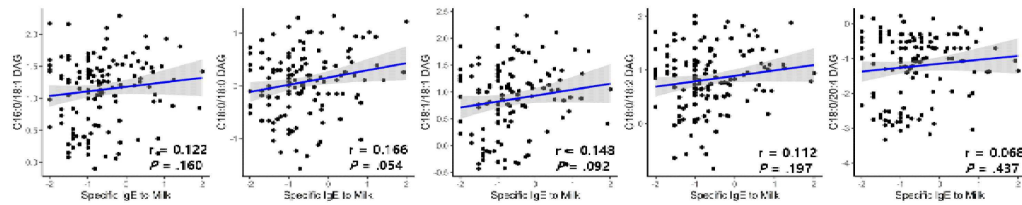
도면3c



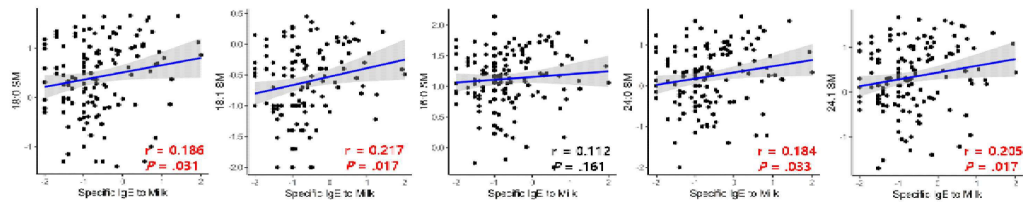
도면3d



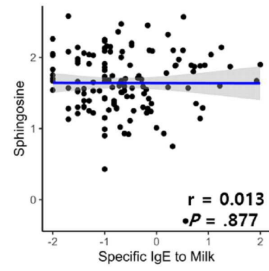
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d

