



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월18일
(11) 등록번호 10-2821643
(24) 등록일자 2025년06월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) A61K 31/702 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
A61K 31/702 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7025305(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월19일
심사청구일자 2023년08월22일
- (85) 번역문제출일자 2023년07월24일
- (65) 공개번호 10-2023-0130667
- (43) 공개일자 2023년09월12일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7009764
원출원일자(국제) 2017년09월19일
심사청구일자 2020년09월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/052332
- (87) 국제공개번호 WO 2018/053535
국제공개일자 2018년03월22일
- (30) 우선권주장
62/396,779 2016년09월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2012510476 A*
WO2010105207 A1*
JP2012520325 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
프롤랙타 바이오사이언스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 91010, 두어트, 하이랜드 애비뉴 1800
- (72) 발명자
썬 아담
미국, 캘리포니아 91746, 시티 오브 인터스트리, 757 볼드윈파크 블러바드, 프롤랙타 바이오사이언스, 인코포레이티드 내
리 보우텍 애나벨
미국, 캘리포니아 91746, 시티 오브 인터스트리, 757 볼드윈파크 블러바드, 프롤랙타 바이오사이언스, 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 4 항

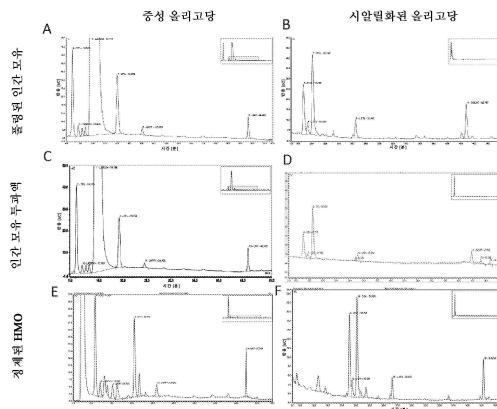
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 정제된 인간 모유 올리고당 조성물

(57) 요약

본 발명은 정제되고 농축된 인간 모유 올리고당 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 31/00 (2018.01)

C12P 19/14 (2013.01)

(72) 발명자

후인 턴 디.

미국, 캘리포니아 91746, 시티 오브 인더스트리,
757 볼드윈파크 블러바드, 프롤랙타 바이오사이언
스, 인코포레이티드 내

트란 킴 수

미국, 캘리포니아 91746, 시티 오브 인더스트리,
757 볼드윈파크 블러바드, 프롤랙타 바이오사이언
스, 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

다수의 인간 모유 올리고당을 포함하는 저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물로서,

다수의 인간 모유 올리고당은 α1-2 연결된 푸코스를 포함하는 하나 이상의 인간 모유 올리고당 및 α1-4 연결된 푸코스를 포함하는 하나 이상의 인간 모유 올리고당을 포함하고, 다수의 인간 모유 올리고당은 적어도 10개의 구조적으로 구별되는 인간 모유 올리고당을 포함하며,

저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물은,

5% 중량/중량 미만의 락토스;

10% 중량/중량 미만의 갈락토스; 및

10% 중량/중량 미만의 글루코스를 포함하는,

저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 5% 중량/중량의 인간 모유 올리고당을 포함하는, 저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 전신성 염증의 감소가 필요한 대상체에서 전신성 염증을 감소시키는 데 사용하기 위한, 저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 감염의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한, 저온살균된, 정제된 인간 모유 올리고당 조성물.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된 2016년 9월 19일자로 출원된 미국 가출원 제62/396,799호에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 실질적으로 정제된 인간 모유 올리고당(HMO) 조성물의 제조 방법, 이에 의해 생성된 실질적으로 정제된 조성물뿐만 아니라 그 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 인간 모유 올리고당(HMO)은 인간 모유에 매우 풍부하고 이에 독특한 구조적으로 다양한 비접합된 글리칸의 부류이다. 본래, HMO는 프리바이오틱(prebiotic) "비피더스 인자(bifidus factor)인 것으로 제안되었거나, 또는 인간 모유 글리칸은 소화관의 비피도박테리아 종의 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌고 조제분유(formula) 수유 영

아와 비교하여 모유 수유 영아의 대변에서 독특하게 발견되었다. 추가의 연구는 다양한 모유 글리칸이 모유 수유와 관련된 건강 상의 이익을 부분적으로 담당한다는 것을 시사하였다. 현재, HMO는 단지 "세균(bug)용 먹이"라기보다 그 이상인 것으로 알려져 있다. 축적된 증거는, HMO가 영아 점막 표면으로의 병원균 부착을 방지하는 가용성 유인 수용체로서 작용하여 바이러스, 박테리아 및 원생동물 기생충 감염에 대한 위험을 낮추는 항접착성 항균물질임을 시사한다. 또한, HMO는 상피 및 면역 세포 반응을 조절하여 과도한 점막 백혈구 침윤 및 염증을 감소시킴으로써 괴사성 장염의 위험을 낮출 뿐만 아니라 뇌 발달 및 인지를 위한 잠재적으로 필수적인 영양소로서 시알산을 영아에게 제공하는 것으로 생각된다.

[0006] HMO는 5개의 단당류인 글루코스(Glc), 갈락토스(Gal), *N*-아세틸글루코사민(GlcNAc), 푸코스(Fuc) 및 시알산(Sia)으로 구성되며, 이때 *N*-아세틸뉴라민산(Neu5Ac)이 유일한 것은 아니더라도 Sia의 지배적인 형태이다. 200개가 넘는 상이한 HMO가 지금까지 확인되었지만, 모든 여성이 동일한 세트의 올리고당을 합성하는 것도 아니고 동일한 양으로 합성하는 것도 아니다(문헌[Kobata 2010]에서 검토됨). 따라서, HMO에 대한 집단 다양성은 종종 임의의 1 명의 여성의 것보다 훨씬 더 크다.

[0007] 더욱이, 올리고당의 조성 및 농도는 또한 수유 과정에 걸쳐 변한다 (문헌[Kunz et al. 2000]). 초유는 20 내지 25 g/L 만큼의 HMO를 함유하지만, 모유 생성이 성숙됨에 따라, 총 HMO 농도는 5 내지 20 g/L로 감소하는데, 이는 종종 여전히 전체 유단백질의 농도를 초과하여, 인간 모유의 HMO 분획을 락토스 및 지방에 이어 3 번째로 가장 풍부한 분획이 되게 한다. HMO에 대해 보고된 넓은 범위의 HMO 농도 및 다양성은 여성들 간의 글라이코실화 경로에서의 공지된 유전적 변이뿐만 아니라 다양한 학교 및 계약 연구 실험실에 의한 HMO의 검출 및 정량화에 사용된 분석 방법에서의 기술적 차이도 반영한다.

[0008] 그러나, 분명한 것은 소, 양 및 염소와 같은 다른 포유류의 모유에 존재하는 올리고당은 인간 모유 내의 올리고당보다 훨씬 덜 풍부하고 이와 구조적으로 구별된다는 것이다. 예를 들어, 올리고당이 가장 풍부한 우유의 부분인 초유조차 단지 대략 50 가지 분자 종의 올리고당을 함유한다. HMO와 가장 구조적으로 유사한 모유 올리고당 프로파일을 함유하는 것으로 생각되는 염소 모유는 HMO의 특성규명된 다양성의 25% 미만인 단지 약 40 가지 분자 종을 함유한다 (문헌[Thum, et al. 2015]).

[0009] 원료의 이용 가능성에 대한 제한에 더하여, 모유 올리고당 조성물의 생성에 대한 다른 주요 장애는 단리 및 농축 동안, 특히 단백질 침전과 대조적으로 한외여과를 사용하여 단백질을 제거하고 수율의 손실 없이 그렇게 하는 경우, 모유의 올리고당 부분과 함께 농축되는 경향이 있는 락토스 및 다른 미네랄의 감소이다. 이는 처리되는 모유의 중에 관계없이 공정 제한요인으로 남아 있지만, 이 문제가 인간 올리고당 조성물의 제조에서보다 더 심각하게 느껴지는 곳은 없는데, 이는 출발 재료가 너무 적어 수율의 손실이 허용될 수 없게 하기 때문이다.

[0010] 다른 이들은 단백질 및 다른 다량영양소를 제거하기 위해 용매 기반 시스템을 사용함으로써 이 문제를 해결하려고 시도하였다. 이 방법은 한외여과 공정과 관련된 락토스와 미네랄의 축적을 방지한다. 사실상, 이 방법은 락토스의 제거에 실제로 도움을 줄 수 있는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌[Sarney, 2000]참조). 그러나, 이 공정은 용매의 사용을 필요로 하고, 인간 모유의 나머지를 효과적으로 파괴하여, 이를 다른 구멍용 제품(lifesaving product)에 사용할 수 없게 한다. 인간 모유와 같이 희귀한 상품인 바, 이는 단순히 허용될 수 없다.

[0011] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 인간 모유 투과액을 생성하는 데 사용되는 한외여과 공정은, 잠재적으로 유해한 유기 용매의 사용을 피하고 다른 구멍용 제품에서 사용하기 위한 단백질 분획을 절약하기는 하지만, 모유에서의 락토스와 미네랄의 문제를 악화시킬 뿐이다. 예를 들어, 농축된 인간 모유 투과액의 락토스 함량은, 모유 내에서 발견되는 농도인 6% 이하의 락토스 수준과 비교하여, 일부 경우에 10% 내지 15% 만큼 높을 수 있다. 이러한 락토스 수준은, 효소적으로 락토스를 분해할 수 없는 사람은 말할 것도 없이 그렇게 할 수 있는 사람의 경우에도 분해하기가 어렵다. 효소적 분해에 이은 분해에 사용된 효소를 제거하기 위한 연속 정용여과를 포함하는 몇몇 접근법이 락토스를 제거하는 데 사용되어 왔다. 락토스와 미네랄을 농축시키는 한외여과와는 대조적으로 유기 용매에 의한 침전에 의해 단백질이 제거된 이러한 샘플에서도, 이러한 조성의 미네랄 함량은 말할 것도 없이 유의한 수준의 락토스가 정용여과 후에 남아 있다. (예를 들어, 문헌[Sarney, 2000 and Grandison, et al 2002] 참조) 더욱이, HMO 조성물의 정용여과는 또한 저분자량 HMO 중, 예를 들어, 2 FL의 허용될 수 없는 손실을 초래한다.

[0012] 다량의 정제된 HMO에 대한 접근을 제공하기 위해 이용 가능한 천연 자원이 없기 때문에, 시중의 대부분의 영아용 조제분유는 신생아에게 어떠한 올리고당도 제공하지 못하고, 이를 제공하는 조제분유는 갈락토올리고당(GOS) 및 프룩토올리고당(FOS)을 포함하는 HMO를 모방하도록 의도된 비-천연 올리고당, 또는 더욱 최근에는, 천연 HMO

인 LNnT 및 2'-FL의 화학적으로 합성된 버전 (문헌[Bode, 2015])을 제공한다. 이들 조성물은 완전히 HMO가 없는 조성물에 대한 개선을 나타낼 수 있지만, 이들은 평균 인간 모유보다 HMO의 분자 중에 대하여 실질적으로 덜 다양하고, 집단을 가로질러 살펴볼 때 인간 모유보다 확실히 훨씬 덜 다양하다.

[0013] 필요한 것은 구조적으로 그리고 기능적으로 다양하지만 실질적으로 감소된 락토스 및/또는 미네랄 함량을 갖는 HMO 조성물의 효율적인 회수, 농축 및 정제를 가능하게 하는 방법이다.

발명의 내용

[0014] 실질적으로 감소된 락토스 및/또는 미네랄 농도를 가지면서 인간 모유의 집단을 가로질러 발견되는 올리고당의 구조적 및 기능적 다양성을 보유하는 인간 모유 올리고당 조성물의 제조 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공된 방법은 규모 조정이 가능하다는 이점과, 예를 들어 단백질을 제거하기 위한 용매의 사용에 의해 남아 있는 모유 분획이 파괴되지 않는다는 추가의 이점을 가진다.

[0015] 일 실시 형태에서, 정제된 인간 모유 올리고당(HMO) 조성물의 제조 방법이 제공된다. 일 실시 형태에서, 방법은 인간 모유 투과액과 락토스를 분해할 수 있는 효소를, 상기 투과액 중의 락토스의 분해에 적합한 조건 하에서 그리고 그러한 분해에 충분한 기간 동안, 혼합하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 효소는 락타제 효소이다. 일부 실시 형태에서, 락타제 효소는 분해 후 락타제 분해된 투과액 혼합물로부터 제거된다. 일부 실시 형태에서, 락타제 제거 전에, 투과액/락타제 혼합물은, 예를 들어, 심층 필터(depth filter)를 통해 정화된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 여과에 의해 혼합물로부터 제거된다. 일부 실시 형태에서, 여과는 기공 크기가 약 50,000 달톤인 막을 통한 여과를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 이 방법은 하나 이상의 추가 필터를 통해 혼합물을 여과하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 하나 이상의 추가 필터는 기공 크기가 약 2,000 내지 약 3,000 달톤인 막을 포함한다. 일 실시 형태에서, 하나 이상의 추가 필터는 기공 크기가 약 600 달톤인 막을 포함한다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 투과액으로의 락타제 효소의 첨가 전에 또는 첨가와 동시에, 투과액의 pH 및/또는 열이 조정된다. 일 실시 형태에서, pH는 약 4.3 내지 약 4.7로 조정된다. 일 실시 형태에서, pH는 약 4.5로 조정된다. 일 실시 형태에서, 투과액 혼합물의 열은 락타제의 첨가 전에 또는 첨가와 동시에 조정된다. 일 실시 형태에서, 열은 약 45°C 내지 약 55°C의 온도로 조정된다. 일 실시 형태에서, 열은 약 50°C의 온도로 조정된다. 일 실시 형태에서, 투과액의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7로 조정되고, 열은 약 45°C 내지 약 55°C의 온도로 조정된다.

[0017] 일 실시 형태에서, 락타제는 약 0.1% 내지 약 0.5% w/w의 농도로 첨가된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 약 0.1% w/w의 농도로 첨가된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 약 5 분 내지 약 225 분 동안 투과액과 함께 인큐베이션된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 약 15 분 내지 약 120 분 동안 투과액과 함께 인큐베이션된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 약 30 분 내지 약 90 분 동안 투과액과 함께 인큐베이션된다. 일부 실시 형태에서, 락타제는 약 60 분 동안 투과액과 함께 인큐베이션된다.

[0018] 일 실시 형태에서, 인큐베이션 후, 투과액/락타제 혼합물은 약 20°C 내지 약 30°C의 온도로 냉각된다. 일 실시 형태에서, 투과액/락타제 혼합물은 약 25°C의 온도로 냉각된다. 일 실시 형태에서, 투과액/락타제 혼합물은 정화된다. 일 실시 형태에서, 투과액/락타제 혼합물은 심층 필터를 통해 정화된다. 일 실시 형태에서, 심층 필터는 약 1 마이크로미터 내지 약 5 마이크로미터의 필터를 포함한다.

[0019] 일 실시 형태에서, 락타제는 여과에 의해 제거된다. 일 실시 형태에서, 락타제는 기공 크기가 약 50,000 달톤인 필터를 통한 여과에 의해 제거된다. 일 실시 형태에서, 조성물은 하나 이상의 추가 필터를 통해 추가로 여과된다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 추가 필터는 기공 크기가 약 2,000 내지 약 3,000 달톤인 막을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 추가 필터는 기공 크기가 600 달톤 이하인 막을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 2,000 내지 약 3,000 달톤의 막을 포함하는 필터에 의한 여과, 이어서 600 달톤 이하의 막을 통한 여과 둘 모두를 통해 여과된다.

[0020] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 투과액과 비교하여 감소된 수준의 락토스와 미네랄을 가진다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 5.0% w/w 미만의 락토스를 포함한다. 일부 실시 형태에서, HMO 조성물은 표 1의 미네랄 프로파일을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 0.5% 내지 약 7.5% HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 1.0% 내지 약 2.0% HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 2.0% 내지 약 4.0% HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된

HMO 조성물은 약 4.0% 내지 약 5.0% HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 5.0% 내지 약 7.5% HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 5.0% w/w HMO의 HMO 농도를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 작성된 HMO 프로파일은 도 5의 (E) 및 도 5의 (F)에 도시된 바와 같은 HMO 프로파일을 포함한다.

[0021] 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, NEC의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 NEC를 치료 또는 예방하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 전신성 염증을 감소시키는 방법은 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물을 투여함으로써 제공된다. 일부 실시 형태에서, 감염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 감염을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물을 투여함으로써 바이러스 또는 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 박테리아 감염은 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*) 감염이다. 일부 실시 형태에서, 바이러스 감염은 노로바이러스 또는 로타바이러스이다.

[0022] 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 추가의 약학 제제 또는 치료제의 투여 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 대변, 기관 또는 골수 이식 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 항생제, 항바이러스제, 또는 항진균제 치료 요법 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 프로바이오틱 조성물 투여 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 화학요법 및/또는 방사선 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 예시적인 HMO 생성 공정의 개략도를 도시한다.
- 도 2는 대안적인 HMO 생성 공정의 개략도를 도시한다.
- 도 3은 8배 이상의 농축된 투과액으로부터 20배 농축된 투과액을 생성하는 데 사용되는 공정의 개략도를 도시한다.
- 도 4는 (A) 정제된 HMO 조성물을 제형화하는 데 사용되는 공정 및 (B) 정제된 HMO 조성물을 저온살균 및 충전하는 데 사용되는 공정의 개략도를 도시한다.
- 도 5는 풀링된(pooled) 공여자 모유 (A 및 B), 인간 모유 투과액 (C 및 D) 및 정제된 HMO 조성물 (E 및 F)로부터의 중성 (A, C, 및 E) 및 시알릴화된 (B, D 및 F) HMO의 HPAEC-PAD 크로마토그래피의 결과를 도시한다.
- 도 6은 LC/MS/MS 및 극성 LC를 이용하여 얻은 HMO를 투여한 성인으로부터의 혈청, 대변 및 소변의 포괄적 비표적화 대사체학을 도시한다. 결과는 (A) 혈청, (B) 소변, (C) 대변 및 (D) 모유에서 검출된 장관외(parenteral) HMO 및 HMO 분해 생성물을 도시한다.
- 도 7은 (A) LC/MS/MS 및 극성 LC 를 이용하여 얻은 에이코사노이드의 대사 경로 및 (B 및 C) 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물을 섭취한 대상체에서의 시간 경과에 따른 에이코사노이드 대사산물의 수준을 도시한다.
- 도 8은 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물을 섭취하는 대상체에서의 시간 경과에 따른 LC/MS/MS 및 극성 LC를 이용한 스펙고지질 대사산물의 혈청 수준을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 락토스와 미네랄 함량이 실질적으로 감소된 정제된 인간 모유 올리고당 조성물의 제조 방법, 이에 의해 제조된 신규 조성물뿐만 아니라 그러한 신규한 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 방법은 풀링된 인간 모유의 여과된 부분으로 시작되며, 따라서 본 발명의 정제된 HMO 조성물은 임의의 전형적인 개별 여성과 비교하여 HMO의 별개의 분자 종의 더 다양한 프로파일을 함유할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 조성물은 개개의 인간의 HMO 프로파일을 대표하는 것과 대조적으로 HMO의 집단을 대표한다고 종종 언급된다.

[0025] "인간 모유 올리고당(들)" (본 명세서에서 "HMO(들)" 로도 지칭됨)은 인간 모유에서 발견되는 구조적으로 다양한 비접합 글리칸의 부류를 의미한다.

[0026] 인간 모유 올리고당은 환원성 말단에 락토스를 함유하는 탄수화물을, 그리고 전형적으로, 비-환원성 말단에 푸

코스 또는 시알산을 함유하는 탄수화물이다 (문헌[Morrow et al. 2005]). 이러한 말단 당은 박테리아의 선택적 성장, 및 올리고당과, 소화관 내강 내의 박테리아 병원체를 포함하는 다른 분자 또는 세포의 상호작용에 가장 강하게 영향을 미치는 잔기이다. 더욱이, 시알산은 뇌 신경질의 구조적 및 기능적 성분이고, 영아의 신경 발달에 관련되어 있다.

[0027] 올리고당은 유리되어 있거나 당단백질, 당지질 등으로서 접합될 수 있고, 글리칸으로 분류된다. 이러한 올리고당은 락토스 및 지질 다음으로 인간 모유의 3 번째로 가장 많은 고체 성분을 구성한다 (문헌[Morrow, 2005]). 그러나, 대부분의 모유 올리고당은 영아가 소화시킬 수 없고, 영아 대변에서 대부분 온전한 상태로 발견될 수 있다.

[0028] "투과액"은 한외여과의 생성물인 모유 (예를 들어, 폴링된 인간 모유)의 일부를 의미한다. 구체적으로, 이는 (예를 들어, 약 1 내지 1000 KDa의 필터를 통한) 한외여과 후에 남아 있는 액체이다. 이 한외여과 공정을 통과한 액체가 투과액으로 지칭된다. 이 공정의 잔류물은 인간 모유 단백질을 농축하며, 이는 이어서 다른 구멍용 제형을 생성시키는 데, 예를 들어, 미국 특허 제8,377,455호에 기재된 것들과 같은 인간 모유 강화 조성물을 제조하는 데 사용될 수 있다. 따라서, HMO 생성물을 오염시킬 수 있는 용매에 의한 단백질 침전에 의존하는 방법과는 대조적으로, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 실질적으로 단백질이 없는 출발 물질을 얻기 위한 한외여과의 이용은, 유기 용매의 사용을 피하면서 인간 모유 내의 가치 있는 다량영양소의 나머지를 보존한다.

[0029] "모유"는 포유류의 유선에 의해 생성되고 유방에 의해 짜내어지는 유체를 의미한다. 모유는 출산 후 임의의 시점에 취해지는 초유, 전유 및 탈지유를 포함하지만 이로 한정되지 않는 모든 수유 생성물을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "모유"는 전형적으로 인간 전유를 지칭한다.

[0030] "전유" 라는 것은 지방이 제거되지 않은 모유 (예를 들어, 폴링된 인간 모유)를 의미한다.

[0031] "탈지유"는, 지방의 적어도 75%가 제거된 모유 (예를 들어, 폴링된 인간 모유), 또는 대안적으로, 지방을 제거하기 위해 원심분리를 거친 모유를 의미한다.

[0032] "실질적으로 감소된 락토스 및/또는 미네랄 함량"에서와 같은 "실질적으로"는 미네랄 및/또는 락토스의 수준의 감소가 본 발명의 방법을 거치지 않은 농축된 투과액과 비교할 때 통계적 차이를 나타냄을 의미한다. 예로서, 일부 실시 형태에서, 실질적으로 감소된 락토스를 갖는 정제된 HMO 조성물은 5% 이하의 락토스 수준을 포함한다.

[0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "본질적으로 이루어진"은 다른 주요 생물활성 인자를 배제하면서 열거된 특정 성분을 함유하는 조성물을 지칭한다. 예를 들어, HMO로 본질적으로 이루어진 조성물은 단백질, 지방, 외인적으로 첨가된 물질과 같은 것을 배제할 것이지만, 예를 들어, 물, 허용 가능한 수준의 특정 염, 마이크로 RNA(microRNA), 또는 엑소좀과 같은 다른 비활성 또는 미량 물질을 함유할 수 있다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "정제된 HMO 조성물"은 실질적으로 감소된 수준의 락토스 및/또는 미네랄을 가지며 본 명세서에 제공된 방법에 의해 생성된 HMO 조성물 (예를 들어, 농축된 인간 투과액)을 의미한다. 예시적인 정제된 HMO 조성물이 도 5의 (E) 및 도 5의 (F)에 도시되어 있다.

[0035] **정제된 HMO 조성물의 제조 방법**

[0036] 인간 모유 투과액은 본 발명의 정제된 HMO 조성물이 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성되는 출발 물질로서 작용한다. 인간 모유 투과액을 얻는 방법은, 예를 들어, 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제 8,927,027호에서 찾아볼 수 있다.

[0037] 간략하게 말하면, 약물, 오염물질, 병원체, 및 불순물에 대해 스크리닝되고 내열성 박테리아 포자를 제거하기 위해 여과된, 사전적격심사를 받은 공여자로부터의 폴링된 모유가 (예를 들어, 원심분리에 의해) 유지 및 탈지 분획으로 분리된다. 탈지 분획은, 단백질 풍부 잔류물과 HMO 함유 투과액을 얻기 위해, 예를 들어 1 내지 1,000 kDa의 기공 크기를 이용한 한외여과와 같은 추가의 여과를 거친다. 이 공정의 세부사항은, 예를 들어 미국 특허 제8,545,920호; 미국 특허 제7,914,822호; 제7,943,315호; 제8,278,046호; 제8,628,921호; 및 제 9,149,052호에서 확인할 수 있으며, 이들 특허 각각은 그 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0038] 일 실시 형태에서, 실질적으로 감소된 수준의 락토스를 갖는 정제된 HMO 조성물의 제조 방법이 제공된다. 이 방법은, 수율의 손실 또는 인간 모유 투과액의 HMO 함량의 분자 프로파일의 변화 없이, 그리고, 일부 실시 형태에서는, 효소적 분해가 락토스를 감소시키는 데 사용되는 경우 잔류 비활성화 외래 단백질을 남김이 없이, 락토

스 풍부 인간 모유 투과액 분획으로부터의 락토스의 생화학적 및/또는 효소적 제거를 필요로 한다.

- [0039] 일 실시 형태에서, 인간 모유 투과액으로부터, 그리고 그에 따라 정제된 HMO 조성물로부터 락토스를 감소시키는 방법은 a) 투과액 혼합물의 pH를 조정하는 단계; b) pH 조정된 혼합물을 가열하는 단계; c) 가열된 투과액 혼합물에 락타제 효소를 첨가하여 투과액/락타제 혼합물을 생성하고 일정 기간 동안 인큐베이션하는 단계; d) 혼합물로부터 락타제를 제거하고 혼합물을 여과하여 락타제를 제거하는 단계; 및 e) 인간 모유 올리고당을 농축시키는 단계를 포함한다. 본 명세서에 기재된 단계들이 시간 순으로 나열되지만, 당업자는 단계 (a) 내지 단계 (c)가 수행되는 순서가 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 즉, 그리고 단지 예로서, 락타제 효소는 혼합물을 가열하기 전에, 또는 대안적으로 가열 공정 동안 임의의 시점에 첨가될 수 있다. 유사하게, 그리고 또한 단지 예로서, 혼합물은 pH의 조정 전에 가열될 수 있다. 더욱이, 몇몇 단계는 단일 단계로 그룹화될 수 있는데, 예를 들어 "락토스의 효소적 분해" 또는 "락토스의 락타제 분해"는 상기 기재된 바와 같은 단계 (a) 내지 단계 (c)를 포함한다. 이들 단계는 동시에 수행되거나 임의의 순서로 연속적일 수 있다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "락토스 분해"는 적어도 이러한 3개의 단계를, 임의의 순서로 연속적으로, 또는 동시에 수행함을 지칭한다.
- [0040] 일 실시 형태에서, 투과액의 pH는 약 3 내지 약 7.5의 pH로 조정된다. 일 실시 형태에서, pH는 약 3.5 내지 약 7.0의 pH로 조정된다. 다른 실시 형태에서, pH는 약 3.0 내지 약 6.0의 pH로 조정된다. 또 다른 실시 형태에서, pH는 약 4 내지 약 6.5의 pH로 조정된다. 또 다른 실시 형태에서, pH는 약 4.5 내지 약 6.0의 pH로 조정된다. 또 다른 실시 형태에서, pH는 약 5.0 내지 약 5.5의 pH로 조정된다. 또 다른 실시 형태에서, pH는 약 4.3 내지 약 4.7, 바람직하게는 4.5의 pH로 조정된다. pH는 산 또는 염기를 첨가함으로써 조정될 수 있다. 일부 태양에서, pH는 산, 예를 들어 HCl을 첨가함으로써 조정된다. 또 다른 태양에서, pH는 1 N HCl을 첨가하고, 일정 기간 동안, 예를 들어 약 15 분 동안 혼합함으로써 조정된다.
- [0041] 일 실시 형태에서, pH 조정된 투과액은 약 25°C 내지 약 60°C의 온도로 가열된다. 다른 실시 형태에서, 투과액은 약 30°C 내지 약 55°C의 온도로 가열된다. 다른 실시 형태에서, 투과액은 약 40°C 내지 약 50°C의 온도로 가열된다. 다른 실시 형태에서, 투과액은 약 48°C 내지 약 50°C의 온도로 가열된다. 또 다른 실시 형태에서, 투과액은 약 50°C의 온도로 가열된다. 또 다른 실시 형태에서, 투과액은 약 40°C 이하의 온도로 가열된다.
- [0042] 일 태양에서, 투과액/락타제 혼합물을 생성하고 락토스를 단당류로 분해하기 위해, pH 조정되고 가열된 투과액에 락타제 효소가 첨가된다. 일 실시 형태에서, 락타제 효소는 약 0.1% w/w 내지 약 0.5% w/w 농도로 첨가된다. 또 다른 태양에서, 락타제 효소는 약 0.1% w/w, 또는 0.2%, 0.3%, 0.4%, 또는 0.5% w/w로 첨가된다. 사용될 수 있는 많은 구매 가능한 락타제 효소가 존재한다. 이와 같이, 락타제 효소는 임의의 기원 (예를 들어, 진균 또는 박테리아 기원)으로부터 유래될 수 있다.
- [0043] 일부 실시 형태에서, pH 조정되고 가열된 투과액은 약 5 분 내지 약 225 분 동안 락타제 효소와 함께 인큐베이션된다. 일부 실시 형태에서, 인큐베이션 시간은 약 15 분 내지 약 90 분이다. 일부 실시 형태에서, 인큐베이션 시간은 약 30 분 내지 약 90 분이다. 일부 실시 형태에서, 인큐베이션 시간은 약 60 분이다. 당업자는 인큐베이션 시간이 사용된 효소의 공급원, 혼합물의 온도 및 pH, 및 사용된 효소의 농도를 포함하지만 이로 한정되지 않는 수많은 인자에 의존한다는 것을 이해할 것이다. 이들 변수 중 임의의 것은 락타제 효소와의 더 길거나 더 짧은 인큐베이션 시간을 필요로 할 수 있다. 본 명세서에 제공되는 pH, 온도, 및 효소 인큐베이션 조건은 본 명세서에 기재된 방법에 대해 최적으로 작용하는 것이지만, 당업자는 유사한 결과를 달성하기 위해 이들 변수 중 하나 이상에 대해 변경이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 약 0.1% w/w 내지 약 0.5% w/w 보다 적은 효소가 사용되는 경우, 인큐베이션 시간은 동일한 수준의 락토스 분해를 달성하기 위해 연장될 필요가 있을 수 있다. 유사한 조정이 또한 온도와 pH 변수 둘 모두에 대해 이루어질 수 있다.
- [0044] 일 실시 형태에서, 인큐베이션 후, 투과액/락타제 혼합물은 약 20°C 내지 약 30°C의 온도로 냉각된다. 특정 실시 형태에서, 투과액/락타제 혼합물은 약 25°C의 온도로 냉각된다.
- [0045] 일 실시 형태에서, 투과액/락타제 혼합물은 불용성 구성성분을 제거하기 위해 정화된다. 특정한 경우에, 불용성 물질은 pH와 온도의 변화 전체에 걸쳐 형성될 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 이러한 불용성 구성성분을, 예를 들어, 침출 필터를 통해 제거하기 위해 혼합물을 정화하는 것이 필요하거나 유익할 수 있다. 필터는 0.1 내지 10 마이크로미터 필터일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 필터는 약 1 내지 약 5 마이크로미터 필터이다. 대안적으로, 불용성 구성성분의 제거는 원심분리 공정 또는 원심분리와 막 여과의 조합을 통해 달성될 수 있다. 정화 단계는 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양한 HMO 조성물의 제조에 필수적이지 않으며, 오히려,

이 선택적 단계는 더 정제된 HMO 조성을 얻는 데 도움이 된다. 더욱이, 정화 단계는 여과 막의 재사용성 및 이에 따른 공정의 규모 조정 가능성에 있어서 중요하다. 적절한 정화가 없다면, 실질적으로 더 많은 필터 재료가 필요할 것이며, 이는 임상 규모로 HMO 조성을 제조하는 것을 어렵고 비용이 많이 들게 한다. 그러나, 제형 및 응용에 따라, 더 정제되거나 덜 정제된 HMO 조성을 생성하기 위해 이 단계에서 더 엄격하거나 덜 엄격한 정화가 수행될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 침전된 미네랄은 액체 제형 또는 연약한 집단 (예를 들어, 신생아)에 사용하기 위한 제형과 비교하여, 동결건조되도록 예정된 제형 또는 건강한 성인에 사용되도록 예정된 제형에 대해 문제가 덜할 수 있다.

[0046] 더욱이, 일부 경우에, 정화된 투과액/락타제 혼합물로부터 소비된 및 과량의 락타제 효소를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 비활성화 외래 단백질은 생물학적 위험을 지니지 않을 것이고 이에 따라 락타제 제거 또는 심지어 비활성화의 추가 단계가 필요하지 않을 수 있는 일부 경우가 있을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 소비된 및 과량의 락타제는, 예를 들어 높은 온도, 압력 또는 둘 모두에 의해 비활성화된다. 일부 실시 형태에서, 비활성화된 락타제는 조성물로부터 제거되지 않는다.

[0047] 그러나, 다른 실시 형태에서, 외래 단백질을 제거하기 위한 추가의 정제가 요구될 것이다. 그러한 실시 형태에서, 락타제 효소 제거는 한외여과에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 한외여과는 한외여과 막을 사용하여, 예를 들어 분자량 컷오프가 50,000 달톤 이하인 막, 예를 들어 BIOMAX-50K 를 사용하여 달성된다. (예를 들어, 도 1 참조)

[0048] 일부 실시 형태에서, 추가의 한외여과는 분자량 컷오프가 50,000 달톤 이하인 초기 막보다 작은 막을 통해 수행된다. 일부 실시 형태에서, 추가의 한외여과는 분자량 컷오프가 약 2,000 내지 3,000 달톤인 막으로 수행된다. 임의의 이러한 추가의 여과 단계는 더 작은 잠재적으로 생물활성 및/또는 면역원성인 인자, 예를 들어 마이크로 RNA 및 엑소좀의 제거를 보조함으로써 HMO 생성물의 전체 순도에 추가로 도움을 준다. 도 3은 이러한 추가의 여과 단계를 갖는 실시 형태를 도시한다.

[0049] 일 실시 형태에서, 적어도 1 회, 그리고 일부 경우에는 2 회 이상의 한외여과 (또는 대안적인 락타제 제거 수단)를 거친 정화된 혼합물은, 인간 모유 올리고당을 정제하고 농축시키고 미네랄 및 단당류 함량을 감소시키기 위해 추가로 여과된다.

[0050] 일부 실시 형태에서, 여과는 나노여과 막을 사용하여 달성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 막은 분자량 컷오프가 1,000 달톤 이하이다. 일부 실시 형태에서, 막은 분자량 컷오프가 600 달톤 이하이다. 또 다른 실시 형태에서, 막은 분자량 컷오프가 약 400 내지 약 500 달톤이다. 이러한 추가의 나노여과는, 최종 정제된 HMO 조성을 생성하기 위해 단당류, 미네랄, 특히 칼슘, 및 더 작은 분자를 제거하는 데 있어서 중요한 단계이다.

[0051] 일부 실시 형태에서, 추가의 또는 대안적인 단계가 미네랄의 제거를 위해 취해질 수 있다. 그러한 추가의 단계는, 예를 들어, 가열된 (40°C 이상) HMO 농축물 또는 냉장/냉동되고 해동된 HMO 농축물의 원심분리, 막 정화 (0.6 마이크로미터 이하), 또는 원심분리와 막 여과의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이러한 추가의 또는 대안적인 단계의 수집된 상청액 또는 여과액은 나노여과 막을 사용하여 추가로 농축된다. 일부 실시 형태에서, 나노여과는 분자량 컷오프가 600 달톤 이하인 막을 통한 여과를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 이러한 추가의 단계는 저온살균 전 또는 그 후를 포함하지만 이로 한정되지 않는 공정의 임의의 단계에서 수행될 수 있다.

[0052] 일부 실시 형태에서, 시알릴화된 HMO를 선택적으로 농축시키기 위해, 나노여과 막의 물리적 특성이 개질, 예를 들어 화학적으로 개질될 수 있으며, 이는 예를 들어, 농축된 시알릴화된 HMO가 바람직한 경우, HMO 농축물로부터의 중성 HMO 제거 효율을 더 높일 수 있다.

[0053] 일 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 멸균된다. 멸균은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 행해질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 저온살균된다. 일부 태양에서, 저온살균은 63°C 이상에서 최소 30 분 동안 달성된다. 저온살균 후에, 조성물은 약 25°C 내지 약 30°C로 냉각되고, 임의의 잔류 침전 물질을 제거하기 위해 0.2 마이크로미터 필터를 통해 정화된다.

[0054] **정제된 HMO 조성물**

[0055] 본 발명의 정제된 HMO 조성물은 실질적으로 감소된 수준의 락토스 및/또는 미네랄을 가진다. 락토스 수준에 관한 것인 경우, 그리고 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로 감소된"은 5% w/w 이하의 락토스 수준을 갖는 것을 의미한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성된 정제된 HMO 조성물은

약 4.5 내지 약 8.5 그램의 HMO, 약 5% w/w 이하의 락토스 및 표 1에 나타낸 미네랄 조성을 포함한다:

[표 1]

미네랄이 감소된 HMO 조성물의 예시적인 미네랄 조성

미네랄	농도
칼슘(Ca)	< 1000 mg/100g
구리(Cu)	< 5 mg/100g
철(Fe)	< 100 mg/g
마그네슘(Mg)	< 800 mg/100g
인(P)	< 800 mg/100g
칼륨(K)	< 1500 mg/100g
나트륨(Na)	< 10 g/100 g
아연	< 100 mg/100g

[0056]

[0057]

[0058]

[0059]

[0060]

[0061]

[0062]

[0063]

당업자는 일부 경우, 예를 들어 정제된 HMO 생성물이 분말로서 제형화되어야 하는 경우, 예를 들어 미네랄의 감소가 덜 중요할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이와 같이, 상기에 제시된 값은 단지 예시적인 제형으로서, 그리고 특히 예시적인 액체 제형으로서 제공되지만, 이 제형이 분말화될 수 없는 이유는 없다.

일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 0.5% 내지 약 7.5% w/w HMOs를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 1.0% 내지 약 2.0% w/w HMOs를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 2.0% 내지 약 4.0% w/w HMOs를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 4.0% 내지 약 5.0% w/w HMOs를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 5.0% 내지 약 7.5% w/w HMOs를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 2,000 mOsm/kg 미만의 삼투압을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 약 10% w/w 이하의 글루코스를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물은 약 10% w/w 이하의 갈락토스를 포함한다. 단당류, 글루코스 및 갈락토스의 존재는 락토스의 분해의 결과이고, 락토스 수준이 감소함에 따라 단당류 수준이 증가한다. 대부분의 단당류 함량이 미네랄 및 잔류 락타제를 제거하는 동일한 여과 공정을 통해 제거될 수 있지만, 정제된 HMO 생성물 내에 낮은 수준의 단당류가 남아있다. 그러나, 이당류 락토스와는 달리, 이러한 단당류의 존재는, 특히 이러한 낮은 수준에서, 방대한 수의 개체에 대해 임상 문제를 나타내지 않는다.

본 발명의 인간 모유 올리고당 조성물은 인간 전유 집단을 가로질러 관찰되는 HMO의 프로파일과 구조적으로나 기능적으로나 실질적으로 유사하다. 즉, 조성물이 개별 공여자보다는 공여자의 풀(pool)로부터 유래되기 때문에, HMO의 어레이는 임의의 하나의 전형적인 개체에서보다 더 다양할 것이다. 도 5는 풀링된 인간 모유 (A 및 B), 인간 모유 투과액 (C 및 D) 및 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물 (E 및 F)의 대표적인 크로마토그램을 도시한다.

HMO 다양성에서 가장 큰 변수들 중 하나는 모체의 루이스 혈액군으로부터 유래되며, 구체적으로, 활성 푸코실트랜스퍼라아제 2 (FUT2) 및/또는 푸코실트랜스퍼라아제 3 (FUT3) 유전자를 갖는지 여부이다. 활성 FUT2 유전자가 존재하는 경우, α1-2 연결된 푸코스가 생성되는 반면, FUT3 유전자가 활성이면 푸코스 잔기는 α1-4 연결된다. 이러한 "분비자(secretor) 상태"의 결과는 일반적으로 "분비자" (즉, 활성 FUT2 유전자를 갖는 모체)가 α1-2 연결된 올리고당이 지배하는 HMO의 훨씬 더 다양한 프로파일을 생성하는 반면, "비분비자(nonsecretor)" (즉, 활성 FUT2 유전자가 없는 모체)는, (분비자와 비교하여) 예를 들어 α1-4 연결된 올리고당의 더 변화된 어레이를 포함할 수 있지만, 분비자의 HMO 레퍼토리의 주요 성분을 합성할 수 없기 때문에 다양성의 전체적인 감소를 포함할 수 있다.

일부 실시 형태에서, 모유의 풀은, 예를 들어, 분비자 상태에 기초하여 구성될 수 있다. 즉, 일부 실시 형태에서, 분비자가 아닌 모체로부터의 모유의 풀과는 별도로 분비자인 모체로부터 모유의 풀을 수집하는 것이 유익할 수 있다. 분비자인 모체로부터의 모유의 풀은 상당한 백분율의 α1-2 연결된 HMO를 포함할 것이고, 예를 들어, 소화관 건강을 촉진하거나 염증을 감소시키는 데 유용할 수 있다. 비분비자인 모체로부터의 모유의 풀은 α1-4 연결된 올리고당의 훨씬 더 다양한 어레이를 포함할 것이고, 예를 들어 노로바이러스 또는 로타바이러스를 비롯한 특정 위장 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 가능한 한 가장 다양하고 대표적인 HMO 프로파일을 보장하기 위해, 비분비자에 대해 분비자로부터 유래되거나 그 반대로도 유래되는 본 명세서에 기재된 정제된 HMO 조성물을 제조하는 데 사용되는 특정 비율의 임의의 인간 모유 풀이 존재함을 보장하는 것이 유익할 수 있다. FUT2 및 FUT3에서의 다형성은 특정 풀을 위한 공여자를 선택하는 데 사용될 수 있는 다형성의 단지 일반적인 예이다. 당업자는 특정 HMO 프로파일을 갖는 모유 풀을 구성하기 위한 임의의 다

형성에 기초하여 모유 풀을 분류하는 것이 임의의 다형성에 대해 행해질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

- [0064] 모체는 공여 전에 분비자 또는 비분비자인 것으로 결정될 수 있으며, 대안적으로 또는 추가적으로, 모체의 분비자 상태는 공여자로서의 모체의 사전적격심사 동안, 그리고/또는 일단 기증된 모유가 접수되면 얻어질 수 있다. 분비자 상태에 대한 스크리닝은 일상적이고, 임의의 일상적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0065] **정제된 HMO 조성물의 용도**
- [0066] 본 발명의 정제된 HMO 조성물은, 영양 및/또는 면역학적 가치를 증가시키기 위해, 인간 모유 강화 조성물, 인간 모유, 영아용 조제분유, 비-인간 모유 등에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 정제된 인간 모유 올리고당 조성물은 영아, 연령이 더 높은 소아, 및 성인에 의한 소비를 위해 경구 용액으로 제형화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물은 동결건조되거나 냉동 건조되거나 그렇지 않으면 분말화될 수 있다.
- [0067] 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물의 항감염, 면역조절 및 프리바이오틱 효과로 인해, 조성물은 매우 다양한 생물학적 및 임상적 맥락에서 사용된다. 그러한 용도는 항접착성 항균물질로서, 장 상피 세포 반응의 조절제로서, 면역 조절제로서, 및/또는 괴사성 장염(NEC)에 대한 보호제로서의 용도를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.
- [0068] 본 발명의 정제된 인간 모유 올리고당 조성물은 항염증성 매개체의 생성에 영향을 미치는 인간 점막 (예를 들어, 위장관 또는 비노생식관)의 미생물총을 긍정적으로 변경시키거나, 장 상피 표면 상으로의 병원성 박테리아의 부착을 방지하는 데 유용하다.
- [0069] 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 제조된 정제된 HMO 조성물을 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 조기출산 또는 만기출산 인간 영아이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 소아이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 성인이다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 국소적으로, 경구로, 또는 직장으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 영양관을 통해 경구로 투여된다.
- [0070] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 정제된 HMO 조성물은 다른 활성제로의 처리 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 정제된 HMO 조성물은 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 및/또는 프로바이오틱 치료 과정의 일부로서 그리고 항생제 및 프로바이오틱 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 일 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 화학요법 또는 방사선과 관련하여 투여될 수 있다.
- [0071] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물은 항생제와 조합하여 투여될 때 상승 효과를 가진다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 대변 이식편과 함께 투여될 수 있거나, 대변 이식편이 투여 중이거나 투여될 것이거나 최근 투여된 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0072] 본 발명은 감염되었거나 감염될 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 정제된 인간 모유 올리고당 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 감염의 증상은 박테리아, 박테리아 독소, 진균, 또는 바이러스에 의해 유발된다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 감염은 박테리아에 의해 유발된다. 일부 실시 형태에서, 박테리아는 클로스트리듐 디피실레이다. 일부 실시 형태에서, 감염은 바이러스에 의해 유발된다. 일부 실시 형태에서, 바이러스는 노로바이러스 또는 로타바이러스이다. 다른 실시 형태에서, 바이러스는 염증성 폭발(inflammatory burst)에 의해 증상을 유발하는 출혈성 바이러스이다. 일부 실시 형태에서, 바이러스는 에볼라 바이러스 또는 다른 출혈열 바이러스이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간 신생아, 영아, 소아 또는 성인이다. 일부 실시 형태에서, 치료는 감염의 적어도 하나의 증상을 개선시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 치료는 유익한 장내 박테리아의 발생을 촉진시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 유익한 장내 박테리아는 비피도박테리아, 락토바실리, 스트렙토코커스 또는 엔테로코커스 중 하나 이상이다.
- [0073] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 정제된 HMO 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게 항염증제로서 투여될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 염증성 질환을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 염증성 장질환을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 대장염을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 궤양성 대장염을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 낭염을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 크론병을 가진다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 자가면역 질환을 가진다.
- [0074] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물은 이식과 관련하여 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 정제된 HMO 조성물은 이식 중인 환자에서 거부 위험 또는 이식편 대 숙주 질병을 앓을 위험

을 감소시킨다. 일부 실시 형태에서 이식은 고품 장기 이식이고, 일부 실시 형태에서, 이식은 골수 이식이다.

[0075] **실시예**

[0076] **실시예 1: 인간 모유 올리고당 생성**

[0077] 정제된 HMO 조성물의 제조 방법은 해동되고 폴링된 상기에 정의된 바와 같은 투과액으로 출발한다. 출발 투과액 온도는 23°C 내지 28°C였다. 1 N HCl 을 첨가하여 투과액의 pH를 4.3 내지 4.7 (목표 4.5)로 조정하고, 약 15 분 동안 혼합하였다. 이어서, 투과액을 약 48°C 내지 약 55°C, 바람직하게는 50°C로 가열하였다. 락타제 효소 (0.1% w/w)를 첨가하여 락토스를 단당류로 분해하고, 이어서 용액을 약 60 분 동안 혼합하였다. 이어서, 투과액/락타제 효소 혼합물을 약 20°C 내지 약 30°C, 바람직하게는 25°C로 냉각시키고, 심층 필터 (CUN060SP)를 통해 정화하였다. 한외여과 막 (Biomax-50K)을 사용하여 CUNO 정화된 처리 스트림으로부터 락타제를 제거하였다. Biomax-50K로부터 수집된 투과액을 공칭 400 내지 500 분자량 컷오프를 갖는 나노여과 막 (GE G-5 UF)을 사용하여 농축하였다. 투과액 농축물(PC)이 인간 모유 올리고당의 5% (w/w)의 목표에 도달할 때 G-5 UF 농축 공정을 종료하였다. 제형화된 PC를, 충전하기 전에, 저온살균하고 0.2 um 멸균 필터를 통해 정화하였다. PC를 -20°C 이하에서 용기에 보관하고, 라벨링하고, 생성물 선적 전에 포장하였다. 이러한 공정은 도 1에 그래프로 나타나 있다. 대안적인 공정은 도 2에 도시되어 있다.

[0078] **실시예 2: 투과액 농축물(PC)의 투과액 농축물-농축물(PC-C)로의 처리**

[0079] 실시예 1에 따라 생성된 냉동된 투과액 농축물 (8배 이상, "PC"로 지칭됨)을 약 20°C 내지 약 30°C의 온도 범위, 바람직하게는 25°C를 유지하면서 해동시키고 폴링하고, 약 10 분 동안 혼합하였다. PC를, 예를 들어 GE G-5 UF를 사용하는, 한외여과에 의해 추가로 농축하여 20배 이상의 농축 목표를 달성하였다. 투과액 농축액-농축물(PC-C)을 모유 보관 용기 내로 옮기고, 나중에 계속 처리하기 위해 -20°C 이하의 냉동고에 보관하였다. 이러한 공정은 도 3에 그래프로 나타나 있다.

[0080] **실시예 3: HMO 제형화**

[0081] 약 20°C 내지 약 30°C의 온도 범위, 바람직하게는 25°C를 유지하면서 PC-C를 해동시키고 폴링하였다. 계산된 양의 P2-OneA 또는 정제수를 PC-C에 첨가하여 5% w/w HMO의 최종 목표를 달성하였다. 이러한 단계는 PC-C 샘플 내의 HMO 농도의 조정이 불필요한 경우 필요하지 않다. 이러한 공정은 도 4 (A)에 그래프로 나타나 있다.

[0082] **실시예 4: 최종 용기 저온살균 및 여과**

[0083] 냉동된 경우, 농축된 HMO를 약 20°C 내지 약 30°C, 바람직하게는 25°C로 해동시켰다. 이어서, 이를 63°C 이상에서 약 30 분 동안 저온살균하였다. 저온살균 후에, 0.2 마이크로미터 멸균 필터를 통한 정화를 위해 농축된 HMO를 약 20°C 내지 약 30°C, 바람직하게는 25°C의 온도로 냉각시키고, 이어서 약 2°C 내지 약 8°C에서 보관하였다. 시각적 검사, 총 HMO 계산, pH, 삼투압, 미네랄, 및 당 분석을 위해 대표적인 샘플을 취하였다.

[0084] 총 HMO 결과가 이용 가능한 경우, 각각의 용량에 대한 목표 HMO 범위를 달성하기 위해 총 HMO 결과에 기초하여 충전 부피를 계산하였다.

[0085] HMO 결과가 완료되고 라벨이 생성될 때, 생성물을 냉동고로부터 꺼내고, ISO 8 클린룸(cleanroom)으로 옮겼다. 라벨을 각각의 병에 부착시키고, 각각의 라벨링된 병을 기밀 백(airtight bag) 또는 기밀 탬퍼 저항성(airtight tamper resistant) 병에 넣고, 나무 상자(crate)에 넣었다. 일단 나무 상자가 완성되면, 생성물이 선적을 위해 준비될 때까지, 나무 상자를 이중으로 자루로 싸고 -20°C 이하에서 냉동고로 다시 복귀시켰다. 이러한 공정은 도 4 (B)에 그래프로 나타나 있다.

[0086] **실시예 5: 정제된 인간 모유 올리고당(HMO) 최종 상품 규격**

[0087] 만료 및 보관: 만료일은 저온살균일로부터 1 년째 되는 날의 전날이었고; 보관은 -20°C 또는 그 미만에서 냉동시키는 것이었다.

[0088] 0.2 마이크로미터 필터를 통한 정화 단계 동안 멸균 필터 용기 중 하나로부터 하나의 대표적인 샘플을 취하였다. 이 샘플을 시각적 검사, pH, 삼투압, 당 프로파일, 미네랄 함량 및 총 HMO 계산을 위해 사용하였다. 그 시험의 결과가 표 2에 요약되어 있다:

[0089] [표 2]

정제된 HMO 조성물에 대한 품질 제어 시험 결과

시험		규격
시각적 검사		황색계 액체, 침전이 있을 수 있음
pH		4.0 내지 6.5
삼투압 (연속 희석된 샘플의 외삽에 기초함)		< 2000 mOsm/kg
당 프로파일	락토스	≤ 5% (w/w)
	글루코스	≤ 10% (w/w)
	갈락토스	≤ 10% (w/w)
미네랄 함량	칼슘(Ca)	< 1000 mg/100g
	구리(Cu)	< 5 mg/100g
	철(Fe)	< 100 mg/100g
	마그네슘(Mg)	< 800 mg/100g
	인(P)	< 800 mg/100g
	칼륨(K)	< 1500 mg/100g
	나트륨(Na)	< 10 mg/100g
	아연(Zn)	< 100 mg/100g
총 HMO	0.1X 목표 용량	0.53 g 내지 0.71 g
	0.2X 목표 용량	1.1 g 내지 1.4 g
	0.5X 목표 용량	2.7 g 내지 3.6 g
	1.0X 목표 용량	5.3 g 내지 7.1 g

[0090]

[0091] 생물부하(bioburden) 최종 용기 이형 시험

[0092] 대표적인 샘플을 충전 공정으로부터 취하였다. 각각의 최종 벌크 로트 충전(bulk lot fill)에 대해 단지 하나의 생물부하 샘플이 필요하였다. 예: 1개의 최종 벌크 로트를 0.1X 및 0.2X 목표 용량으로 충전하는 경우, 충전된 0.1X 및 0.2X 목표 용량 둘 모두를 나타내기 위해 단지 1개의 샘플을 취하였다. 그 시험의 결과가 표 3에 제시되어 있다.

[0093] [표 3]

정제된 HMO 생성물의 생물부하 시험

시험	규격
총 호기성 플레이트 카운트(TAC)	< 100 CFU/mL ¹
대장균	< 1 CFU/mL ²
콜리폼(Coliform)	< 1 CFU/mL ²
살모넬라	ELFA 에 의한 네거티브/25mL

¹ 결과가 100 CFU/mL 이상인 경우, 예외적인 조건을 개시하고, 추가의 2 개의 샘플을 시험할 것이다.

최종 보고된 결과는 3 개의 샘플의 평균이다.

² 결과가 100 CFU/mL 이상인 경우, 예외적인 조건을 개시하고, 추가의 2 개의 샘플을 시험할 것이다.

최종 보고된 결과는 3 개의 샘플의 평균이다.

[0094]

[0095] 실시예 6: 정제된 HMO의 생체이용률 및 생체활성의 평가

[0096] 18 세 내지 50 세 사이의 32 명의 건강한 성인에서 증가형 용량 제어 초기 실험(initial phase trial)을 수행하여, 본 발명의 방법에 의해 제조되고 이전 실시예에 기재된 정제된 HMO 조성물의 생체이용률 및 면역계에 대한 잠재적 효과를 평가하였다.

[0097] 연구 대상체는 이전 실시예에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 농축물을 연속 7 일 (1 일째 내지 7 일째) 동안 1일 3 회로 경구 섭취하였다. 남성 및 여성 연구 대상체의 4개의 별개의 그룹은 0.1x, 0.2x, 0.5x 및 1x 농도의 정제된 HMO 조성물을 투여받았으며, 여기서 x는 인간 모유에서의 농도 및 조산 영아에 대한 체중별 기준으로 주어진 용량에 기초하여 70 kg 성인에게 주어지도록 계산된 HMO의 총 중량을 나타낸다. 현재, 이는 150 mL/kg/일의 영아용 공급 부피를 기초로 0.75 g/kg에 달한다. 그 결과, 1X를 투여받는 70 kg 성인은 본 명세서에서 제조된 52.5 g의 정제된 HMO 조성물을 투여받을 것이다.

[0098] 모든 대상체로부터의 혈액, 소변, 대변 및 타액 샘플 및 여성 대상체로부터의 질 스왑(vaginal swab) 샘플을 -1 일째 (여기서, 1 일은 정제된 HMO 조성물을 섭취한 첫 날임), 7 일째, 14 일째 및 28 일째에 취하였다. 소변, 혈액 및 대변을 장관의 HMO 3-시알락토스뿐만 아니라 HMO 염기, 글루코스, 푸코스, N-아세틸글루코사민 및 시알산의 존재에 대하여 시험하였다. 장관의 HMO 3-시알락토스는 소변에서만 무손상 상태로 발견되었고, 이는 HMO의 재순환을 시사하지만, HMO의 분해 생성물은 소변, 혈액 및 대변 3 가지 모두에서 발견되고 (도 6), 이는 경구 전달된 정제된 HMO 조성물이 생체이용 가능함을 확인해 준다.

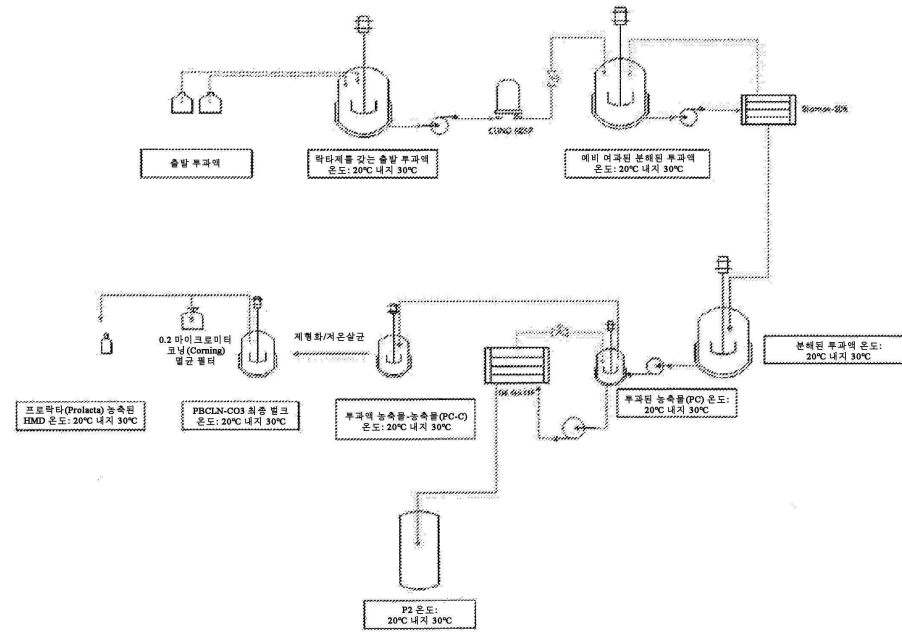
- [0099] 본 연구에서 투여된 경구 섭취된 정제된 HMO 조성물이 생물활성인지 여부, 그리고 특히 정제된 HMO 조성물이 염증의 전신 마커에 대해 생리학적 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위하여, 혈청 에이코사노이드를 검정하였다. 에이코사노이드는 세포 막 인지질에 대한 포스포리파아제 A의 작용에 의해 생성되는 다양한 부류의 면역 활성제이고 (도 7의 (A) 참조), 그의 혈청 내 상승은 면역 반응의 지표를 나타낸다.
- [0100] 도 7의 (B) 및 도 7의 (C)에 도시된 바와 같이, 연구 대상체의 혈청에 존재하는 에이코사노이드 및 그의 대사산물의 수준이 감소되었고, 이러한 감소는 단지 시간 경과에 따라 더 유의하게 되었으며, 이는 정제된 HMO 조성물이 생체이용 가능할뿐만 아니라 또한 생물활성이고, 조성물을 투여받는 대상체의 전체 염증 시그니처 (inflammatory signature)를 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다.
- [0101] 이러한 생물활성을 추가로 검증하기 위하여, 염증의 다른 마커인 스펡고지질 대사의 혈청 대사산물을 또한 검정하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 에이코사노이드와 유사하게, 몇몇 스펡고지질 대사산물이 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 정제된 HMO 조성물을 투여받는 대상체에서 또한 시간 경과에 따라 감소된다.
- [0102] 종합해 볼 때, 본 명세서에서 최초로 제시되는 것은, 락토스 및/또는 미네랄 함량이 실질적으로 감소된, HMO의 완전한 보완물을 포함하는 정제된 HMO 조성물을 효율적으로 생성하는 방법이다. 더욱이, 이러한 신규한 정제된 HMO 조성물은 면역계에 대한 현저한 효과를 가지며 생물활성인 것으로뿐만 아니라 생체이용 가능한 것으로 본 명세서에 나타나 있다.
- [0103] 1. 문헌[Bao Y, Zhu L, Newburg DS. Simultaneous quantification of sialyloligosaccharides from human milk by capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* 2007;370:206–214].
- [0104] 2. 문헌[Bode, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology.* 2012 Sep; 22(9): 1147–1162. Published online 2012 Apr 18].
- [0105] 3. 문헌[14. Bode, et al. (2016) *Nutritional Reviews*, 74(10):635–644]
- [0106] 4. 문헌[Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology.* 2001;11:365–372].
- [0107] 5. 문헌[Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr.* 1999;88:89–94].
- [0108] 6. 문헌[Davidson B, Meinzen-Derr JK, Wagner CL, Newburg DS, Morrow AL. Fucosylated oligosaccharides in human milk in relation to gestational age and stage of lactation. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:427–430].
- [0109] 7. 문헌[Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, Giuliani F, Bertino E, Fabris C, Coppa GV. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics.* 2011;128:e1520–1531].
- [0110] 8. 문헌[German, JB et al. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2008. 62:205–18].
- [0111] 9. 문헌[Grandison, et al (2002) *Songklanakar J. Sci. Technol.* 24(Suppl):91–928].
- [0112] 10. 문헌[Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:699–722].
- [0113] 11. 문헌[Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: Comparison with human milk. *Br J Nutr.* 1999;82:391–399].
- [0114] 12. 문헌[Kunz et al. "Bioactivity of Human Milk Oligosaccharides" page 5 in Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity, First Edition. Edited by Dr. F. Javier Moreno and Dr. **María Luz Sanz**]
- [0115] 13. 문헌[Morrow Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS., Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J. Nutri.* 135:1304–07, 2005].
- [0116] 14. 문헌[Newburg DS, Shen Z, Warren CD. Quantitative analysis of human milk oligosaccharides by

capillary electrophoresis. Adv Exp Med Biol. 2000;478:381-382].

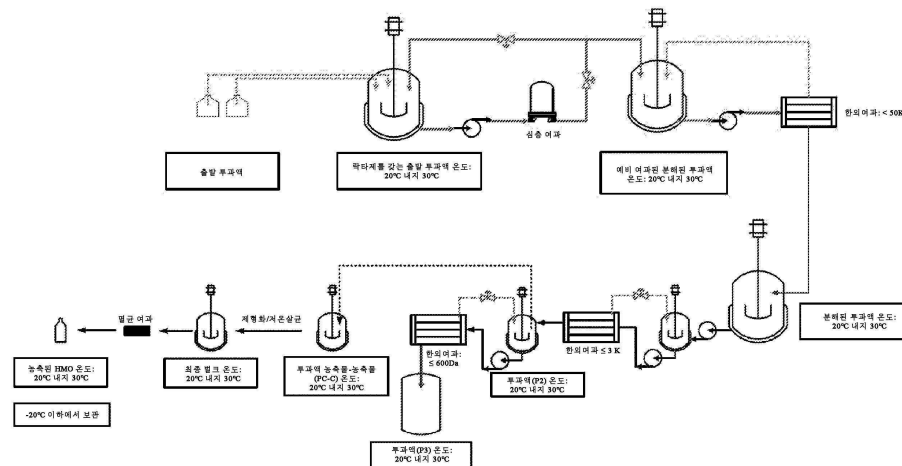
- [0117] 15. 문헌[Sarney, et al (2000) Biotechnol. Bioeng. 69:461-467]
- [0118] 16. 문헌[Thum, et al. (2015) J Food Comp and Anal., 42:30-37].
- [0119] 17. 문헌[Ward (2009) Open Glycoscience 2: 9-15]
- [0120] 18. 문헌[Zivkovic, et al (2011) Proc. Natl. Acad. Sci., 108(s1):4653-4658].

도면

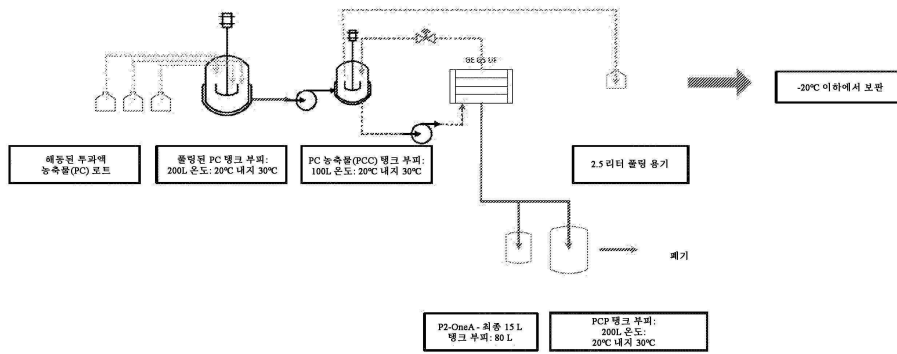
도면1



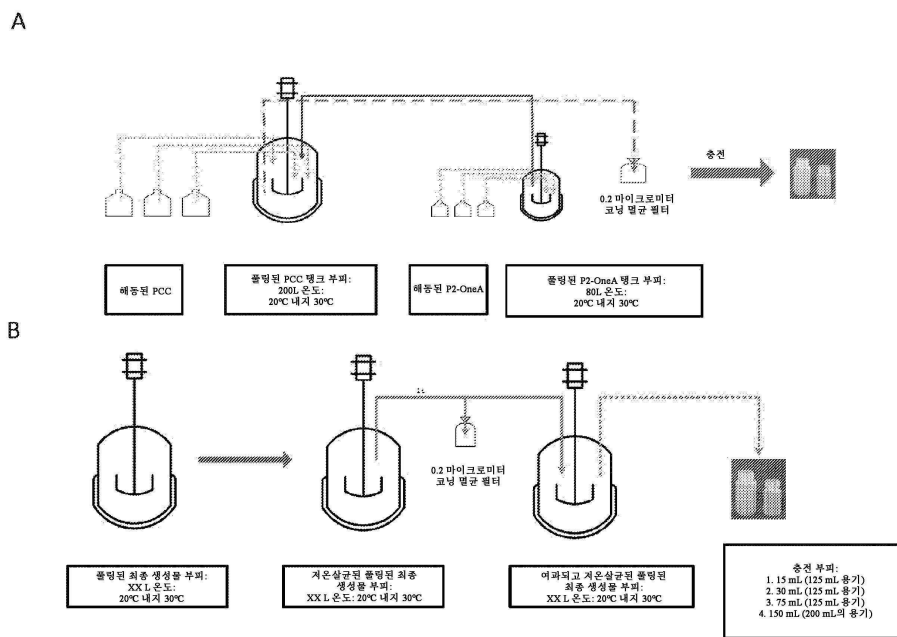
도면2



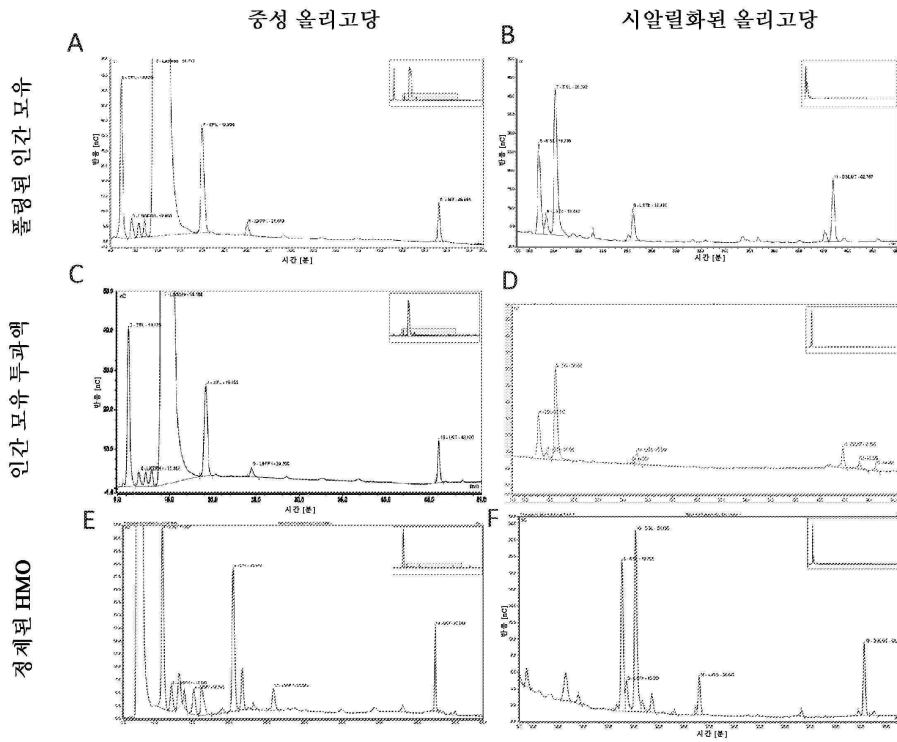
도면3



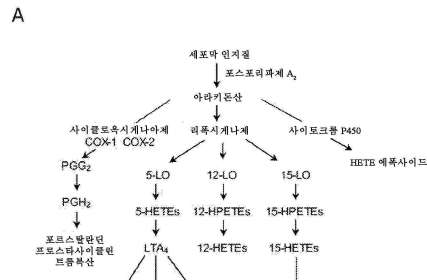
도면4



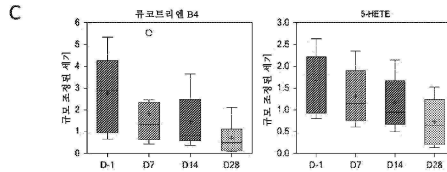
도면5



도면7



하위 경로	생화학명	혈청		
		D7 D-1	D14 D-1	D28 D-1
에이코사노이드	류코트리엔 B4	0.66	0.53	0.25
	5-HETE	0.83	0.71	0.54
	6-HETE	0.79	0.69	0.44
	9-HETE	1.09	0.52	0.17
	12-HETE	0.93	0.65	0.27
	15-HETE	1.2	0.42	0.17
	12-HHTe	0.22	0.51	0.39
	5-KETE	0.9	0.55	0.32
	류코트리엔 B5	0.61	0.67	0.37



도면8

하위 경로	생화학명	혈청		
		D7 D-1	D14 D-1	D28 D-1
스핑고지질 대사	스핑가린	6.77	4.72	1.73
	스핑가린-1-포스페이트	6.12	4.77	1.54
	N-팔미토일-스핑가린 (d18:0/16:0)	0.87	0.82	1.12
	N-팔미토일-스핑가리다이에인 (d18:2/16:0)*	0.22	0.05	0.8
	N-스테아로일-스핑가리다이에인 (d18:2/22:0)*	1.56	0.88	0.53
	미리스토일 다이하이드로스핑고마이엘린 (d18:0/14:0)*	0.83	0.76	0.89
	팔미토일 다이하이드로스핑고마이엘린 (d18:0/16:0)*	0.81	0.57	0.81
	베헤노일 다이하이드로스핑고마이엘린 (d18:0/22:0)*	0.87	0.89	0.88
	팔미토일 스펡고마이엘린 (d18:1/16:0)	0.87	0.96	0.82
	스테아로일 스펡고마이엘린 (d18:1/18:0)	0.88	0.96	0.81
	베헤노일 스펡고마이엘린 (d18:1/22:0)*	0.94	1.03	0.97
	라우리코사노일 스펡고마이엘린 (d18:1/23:0)*	0.98	1.02	0.98
	리그노세로일 스펡고마이엘린 (d18:1/24:0)	0.97	0.92	0.9
	스핑고마이엘린 (d18:1/14:0, d16:1/16:0)*	0.99	0.91	0.97
	스핑고마이엘린 (d18:2/14:0, d18:1/14:1)*	1.01	0.9	0.87
	스핑고마이엘린 (d18:1/16:0, d18:1/15:0, d16:1/17:0)*	0.99	0.89	0.94
	스핑고마이엘린 (d18:2/16:0, d18:1/16:1)*	0.97	0.89	0.94
	스핑고마이엘린 (d18:1/17:0, d17:1/18:0, d19:1/16:0)	0.98	0.82	0.84
	스핑고마이엘린 (d18:1/18:1, d18:2/18:0)	0.94	0.98	0.94
	스핑고마이엘린 (d18:1/20:1, d16:1/22:0)*	0.95	0.88	0.97
	스핑고마이엘린 (d18:1/20:1, d18:2/20:0)*	0.98	1	0.91
	스핑고마이엘린 (d18:1/21:0, d17:1/22:0, d16:1/23:0)*	0.94	0.96	0.93
	스핑고마이엘린 (d18:1/22:1, d18:2/22:0, d16:1/24:1)*	0.99	1.01	0.98
	스핑고마이엘린 (d18:2/23:0, d18:1/23:1, d17:1/24:1)*	0.96	0.97	0.95
	스핑고마이엘린 (d18:1/24:1, d18:2/24:0)*	0.88	0.94	0.93
	스핑고마이엘린 (d18:2/24:1, d18:1/24:2)*	0.94	1	0.94
	스핑고신	0.9	0.96	0.94
	스핑고신 1-포스페이트	0.74	0.96	0.77
	스핑고마이엘린 (d18:2/23:1)*	0.94	0.93	0.98
	스핑고마이엘린 (d18:2/21:0, d16:0/23:0)*	0.97	0.92	0.97
	스핑고마이엘린 (d18:1/20:2, d18:2/20:1, d16:1/22:2)*	0.99	1.02	0.94
	스핑고마이엘린 (d18:2/24:2)*	0.97	1.06	0.93
스핑고마이엘린 (d18:1/22:2, d18:2/22:1, d16:1/24:2)*	0.94	1.02	0.91	
스핑고마이엘린 (d18:0/20:0, d16:0/22:0)*	0.8	0.76	0.81	
스핑고마이엘린 (d18:0/18:0, d19:0/17:0)*	0.77	0.79	0.82	
스핑고마이엘린 (d17:2/16:0, d18:2/15:0)*	0.96	0.92	0.88	
스핑고마이엘린 (d18:2/18:1)*	0.98	0.98	0.98	
스핑고마이엘린 (d18:1/19:0, d19:1/18:0)*	0.98	0.96	0.97	
N-팔미토일-팔미테카스핑고신 (d17:1/16:0)*	0.84	0.77	0.6	
N-스테아로일-스핑가린 (d18:0/18:0)*	0.76	0.67	1.12	

하위 경로	생화학명	혈청		
		D7 D-1	D14 D-1	D28 D-1
세라미드	N-팔미토일-스핑고신 (d18:1/16:0)	0.85	0.57	0.82
	N-스테아로일-스핑고신 (d18:1/18:0)*	0.88	0.85	0.91
	N-스테아로일-스핑가리다이에인 (d18:2/18:0)*	0.83	0.73	0.73
	세라미드 (d16:1/24:1, d18:1/22:1)*	0.97	0.82	0.75
	세라미드 (d18:1/14:0, d16:1/16:0)*	1.06	1.09	1.01
	세라미드 (d18:1/17:0, d17:1/18:0)*	1.01	0.87	0.86
	세라미드 (d18:1/20:0, d16:1/22:0, d20:1/18:0)*	0.95	0.89	0.91
	세라미드 (d18:2/24:1, d18:1/24:2)*	1.01	0.9	0.78
	글라이코실-N-팔미토일-스핑고신 (d18:1/16:0)	0.94	0.91	0.85
	글라이코실-N-스테아로일-스핑고신 (d18:1/18:0)	0.9	0.89	0.84
	글라이코실-N-베헤노일-스핑가리다이에인 (d18:2/22:0)*	0.97	0.87	0.82
	글라이코실-N-(2-하이드록시테르노노일)-스핑고신 (d18:1/16:0)	0.99	0.71	0.73
	글라이코실-N-드라이코사노일-스핑가리다이에인 (d18:2/23:0)*	0.97	0.81	0.82
	락토실-N-팔미토일-스핑고신 (d18:1/16:0)	0.95	0.96	0.9
	락토실-N-베르노노일-스핑고신 (d18:1/24:1)*	0.85	0.9	0.86
	글라이코실 세라미드 (d16:1/24:1, d18:1/22:1)*	0.84	0.7	0.68
	글라이코실 세라미드 (d18:1/20:0, d16:1/22:0)*	0.97	0.91	0.83
	글라이코실 세라미드 (d18:1/23:1, d17:1/24:1)*	0.94	0.79	0.86
	글라이코실 세라미드 (d18:2/24:1, d18:1/24:2)*	0.91	0.94	0.82