



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0175544
(43) 공개일자 2024년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0075620
(22) 출원일자 2023년06월13일
심사청구일자 2023년06월13일

(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
오혜영
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88
(74) 대리인
특허법인더웨이브

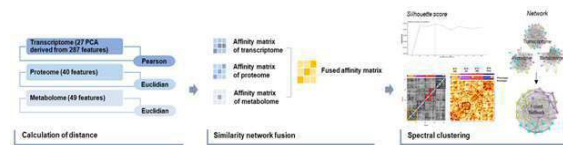
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 아토피성 질환 예측 또는 진단을 위한 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

아토피성 질환 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법에 관한 발명으로서, 일 양상에 따른 아토피피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma) 또는 알레르기행진(allergy march)을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법에 따르면, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군 및 정상대조군에서 발현의 차이를 보이는 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 또는 SIGLEC8 단백질 또는 유전자를 이용하여 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/122 (2013.01)

G01N 2800/202 (2013.01)

G01N 2800/24 (2024.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711179661
과제번호	2021R1A2C2095664
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	혈중 다중오믹스 기반 소아 천식 기전 규명을 통한 내제형 지표 및 개인 맞춤형 치
료 타겟 발굴	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

SERPINF2, SERPINA3 및 COL6A3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 2

APOA1, A2M 및 APOD으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 천식 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 3

PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알레르기행진 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 알레르기행진 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 4에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1내지 4에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1 ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 또는 SIGLEC8 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 아토피성 질환 예측 또는 진단용 키트.

청구항 8

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SERPINF2, SERPINA3 및 COL6A3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

청구항8에 있어서, 상기 SERPINF2 및 SERPINA3의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높고, COL6A3의 발현 수준이 정상대조군에 비해 낮으면 아토피피부염으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 APOA1, A2M 및 APOD으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 천식을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 APOA1, A2M 및 APOD의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면 천식으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알레르기행진을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면 알레르기행진으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 ERBB2, SOS1, PIK3CA의 발현 수준이 정상대조군에 비해 낮고, IL5RA, PTGDR2, SIGLEC8의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면, 알레르기행진으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 15

청구항 8 내지 14에 있어서, 상기 단백질 활성 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 효소 면역분석법(ELISA; enzyme linked immunosorbent assay), 방사능면역분석법(RIA), 방사면역확산법(radioimmunoassay), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역 전기영동, 면역조직화학, 면역침전분석법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

청구항 16

청구항 8 내지 14에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 단계는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNAse protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 아토피성 질환 예측 또는 진단을 위한 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] '아토피'라는 용어는 외부로부터 신체 내로 들어오는 이물질에 대하여 비정상적으로 IgE를 생성하는 성향을 의미한다. 따라서 '알레르기'라는 용어와 동일하지는 않지만 실제적으로는 같은 의미로 혼용하고 있다. 이러한 과민반응이 임상적으로 증상으로 발현되는 경우를 '아토피성 질환' 혹은 '알레르기 질환'으로 부르며, 전통적으로 천식(asthma), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 알레르기성 결막염(allergic conjunctivitis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 담마진(damargin), 아나필락시스(anaphylaxis), 음식 알레르기(food allergy) 등이 아토피성 질환으로 분류되고 있다.

[0003] 현재까지 알려진 아토피성 질환(atopic disease)의 발병 원인은 정확히 밝혀져 있지 않지만, 보편적으로 유전적, 면역학적 요인이 관여하는 것으로 추정되며, 기타 환경적, 정신적 요인 등이 악화 요인으로 작용한다는 것이 전문가들의 보편적인 견해이다. 아토피성 질환은 단일 질환으로 발생하기 보다는 아토피성 피부염, 천식 등이 알레르기행진(allergy march)을 이루어 발생하거나 동시에 나타나는 다중 질환으로 알려져 있다.

[0004] 아토피성 질환은 잘 알려진 바와 같이 신생아 또는 소아에게 발병하며 성인이 될 때까지 지속될 수도 있는 만성 재발성 질환이다. 특히, 아토피 피부염, 천식 및 아토피 피부염에서 천식으로 진행되는 알레르기행진은 소아기 때

적절한 치료가 지연되거나 치료 기회를 상실하게 되면 성인기 질환으로 이행될 가능성이 높은 만성 난치성 질환으로, 각 알레르기질환의 종류 및 질환의 진행 상황을 정확히 판단하여 예방 또는 조기에 치료하는 것이 중요하다.

[0005] 따라서 아토피피부염, 천식, 알레르기행진 등의 예방 또는 치료에 있어서, 상기 질환을 예방하고 치료 경과를 파악하여 치료 전략을 수정하기 위해 질환의 종류, 중증도, 진행 경과 및 완치 여부를 정확하게 반영하는 바이오마커에 대한 요구가 커지고 있었다.

[0006] 아토피피부염, 천식 등 아토피성 질환의 가장 합리적인 바이오마커로 IgE가 제안된 바 있으나, 아토피피부염의 중증도와 총 IgE 수치의 상관성이 높지 않아 신뢰도 있는 표지자로 기능할 수 없음이 밝혀졌다. 대안으로써 호산구양이온단백질(Eosinophil cationic protein, ECP), 젖산탈수효소(lactate dehydrogenase, LDH)와 같은 새로운 바이오마커들이 아토피피부염의 중증도를 추적할 수 있는 대안으로 연구되고 있으나 그 실효성이 검증되지 못하고 있다.

[0007] 본 발명자는 아토피피부염, 천식, 및 아토피피부염에서 천식으로 진행되는 알레르기행진의 표현형에 기반한 내재형을 발굴하고, 이 내재형이 보유한 생물학적 기능을 조사하여 아토피피부염, 천식 질환 자체 및 알레르기행진으로 질환이 진행되는 과정에 중요한 기전을 찾아 이를 바이오마커로 확보하였다. 이는 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단할 수 있는 바이오마커로서, 이를 기반으로 환자 분류, 감별, 질병의 예후 예측 및 개인 맞춤형 치료방법 개발 등에 이용할 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 SERPINF2, SERPINA3 및 COL6A3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 예측 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 APOA1, A2M 및 APOD으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 천식 예측 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알레르기행진 예측 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 아토피성 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 일 양상은 SERPINF2, SERPINA3 및 COL6A3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피성 질환 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다. 일 구체예에 있어서 상기 아토피성 질환은 아토피피부염일 수 있다.

[0014] 다른 양상은 APOA1, A2M 및 APOD으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피성 질환 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다. 일 구체예에 있어서 상기 아토피성 질환은 천식일 수 있다.

[0015] 다른 양상은 PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피성 질환 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다. 일 구체예에 있어서 상기 아토피성 질환은 알레르기행진일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 아토피성 질환 예측 또는 진단용 조성물은 ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 단백질 또는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0016] 본 명세서의 용어 "아토피성 질환(atopic disease)"은 알레르기성 반응을 발생시키고, 유전되는 경향이 있는 질병의 한 군을 의미한다. 외부에서 신체 내로 들어오는 이물질에 대하여 비정상적으로 IgE를 생성하는 과민반응이 임상적 증상으로 발현되는 경우를 의미할 수 있으며, '알레르기 질환'과 혼용가능하다. 아토피성 질환의 예로

는 아토피피부염, 천식, 알레르기성 비염(건초열), 담마진, 알레르기성 결막염, 아나필락시스, 혈관 부종, 음식 알레르기, 알레르기행진 등을 들 수 있다.

- [0017] 본 명세서의 용어 "아토피피부염(atopic dermatitis)"은 대표적인 아토피성 질환 중 하나로서, 심한 가려움증을 동반하고 만성적으로 재발하는 피부 습진 질환을 의미한다.
- [0018] 본 명세서의 용어, "천식(asthma)"은 알레르기 염증에 의해 기관지가 반복적으로 좁아지는 만성 호흡기 질환을 의미한다.
- [0019] 본 명세서의 용어 "알레르기행진(allergy march)"은 아토피피부염(atopic dermatitis), 식품 알레르기(Food Allergy: FA), 비염(rhinitis), 천식(asthma)과 같은 질환들이 나이에 따라 순차적으로 나타나거나 연령별 경향 성과는 무관하게 동시 다발적으로 동반되어 나타나는 것을 의미한다.
- [0020] 본 명세서의 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 진단은 아토피피부염, 천식 또는 알레르기행진의 발병을 예측하는 것이다. 상기 예측은 병세의 진행, 회복에 관한 전망 내지는 예비적 평가를 의미한다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "바이오마커 (biomarker) 또는 마커(marker)"는 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군 및 정상대조군을 구분할 수 있는 물질로, 아토피피부염, 천식, 알레르기행진 발생 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체분자들을 모두 포함할 수 있다. 일 구체예에서는, 아토피피부염, 천식, 알레르기행진 발생 개체에서 그 발현 수준이 변화되는 단백질, mRNA, 대사물질 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 상기한 SERPINF2(Serpin Family F Member 2), SERPINA3(Serpin Family A Member 3), COL6A3(Collagen Type VI Alpha 3 Chain), APOA1(Apolipoprotein A1), A2M(Alpha-2-Macroglobulin), APOD(Apolipoprotein D), PRG2(Proteoglycan 2), F13B(Coagulation Factor XIII B Chain), SELL(L-Selectin), VCAM1(Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ERBB2(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase2), SOS1(SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1), PIK3CA(Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha), IL5RA(Interleukin 5 Receptor Subunit Alpha), PTGDR2(Prostaglandin D2 Receptor 2) 또는 SIGLEC8(Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 8)은 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군, 정상대조군의 혈액 분석에서 발현의 차이를 보이는 단백질 또는 유전자이다.
- [0023] 본 명세서의 용어 "단백질의 발현 수준을 측정하는 제제"란 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커인 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 상기 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제는 상기 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 명세서의 용어, "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv 등일 수 있다. 또한 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 상기 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 상기 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976)European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 과거 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58,1-597, 1991 참조) 등을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0026] 본 명세서의 용어, "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 의미

한다. 구체적으로 인산-리보스당 골격을 갖는 DNA와는 달리, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가될 수 있다.

[0027] 본 명세서의 용어, "펩타머"는 표적분자에 친화적, 특이적으로 결합할 수 있는 핵산(DNA, RNA) 또는 펩타이드(peptide)를 의미한다.

[0028] 본 명세서에서 용어, "유전자 발현 수준 측정"은 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 수행될 수 있다. 상기 mRNA 수준 측정을 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(Rnase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 칩(DNA 칩) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 명세서의 용어 "유전자의 발현 수준을 측정하는 제제"란 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커인 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 상기 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.

[0030] 일 구체예에 있어서 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 명세서의 용어 "프라이머"는 타겟 유전자 서열을 인지하는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 쌍을 포함하며, 바람직하게는 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍을 의미하는 것일 수 있다. 상기 프라이머는 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트, 중합반응 효소 존재, 온도, 완충액 등)하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15~30 뉴클레오타이드이다.

[0032] 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한 상기 프라이머는 표적 유전자의 mRNA(즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머의 디자인은 표적 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있다.

[0033] 본 명세서의 용어 "프로브"는 생물학적 시료 내의 검출하고자 하는 타겟 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 타겟 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 구체적으로, 상기 프로브는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 구체적으로 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편일 수 있고, 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현 양을 확인할 수 있다.

[0034] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 상기 프라이머 또는 프로브는 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0035] 본 명세서의 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 유전자 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다.

- [0036] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 아토피피부염, 천식, 알레르기행진 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0037] 상기 아토피피부염, 천식, 알레르기행진, 유전자 또는 단백질 발현의 수준을 측정하는 제제 등은 전술한 바와 같다.
- [0038] 상기 키트는 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 키트는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성성분, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [0039] 예를 들어, 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함할 수 있으며, 그 외 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 상기 DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관 및 형광 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있으며, 상기 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단 (chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 상기 단백질 칩 키트는 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고정되어 있는 키트일 수 있다. 상기 단백질 칩은 생물학적 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜 항원-항체 복합체를 형성하고, 이를 판독하여 단백질의 존재 또는 발현수준을 확인하는 방식으로 사용할 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다. 상기 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체 및/또는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 또한, 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 니트로셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등의 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0041] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 통합 자기-전기화학 센서(integrated magneto-electrochemical sensor) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 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.
- [0042] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 상기 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단하기 위한 제제, 장치, 및 알고리즘이 내장된 컴퓨터를 포함할 수 있고, 상기 알고리즘을 통해 상기 마커의 수준 측정 결과를 아토피피부염, 천식, 알레르기행진과 연관시키는 키트에 관한 것일 수 있다.
- [0043] 더욱 구체적으로, 상기 키트는 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 아토피피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알레르기행진(allergy march)의 예측 또는 진단용 조성물을 포함할 수 있다.
- [0044] 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SERPINF2, SERPINA3 및 COL6A3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 상기 정보 제공 방법은 상기 SERPINF2 및 SERPINA3의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높고, COL6A3의 발현 수준이 정상대조군에 비해 낮으면 아토피피부염으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 APOA1, A2M 및 APOD으로 이루어진 군으로부터 선택

된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 천식을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 상기 APOA1, A2M 및 APOD의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면 천식으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 및 SIGLEC8으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알레르기행진을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다. 일 구체예에 있어서, 상기 PRG2, F13B, SELL 및 VCAM1의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면 알레르기행진으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 청구항 12에 있어서, 상기 ERBB2, SOS1, PIK3CA의 발현 수준이 정상대조군에 비해 낮고, IL5RA, PTGDR2, SIGLEC8의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면, 알레르기행진으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0047] 본 명세서의 용어, "목적하는 개체"란 아토피피부염, 천식 또는 알레르기행진 발병여부가 불확실한 개체를 의미한다.

[0048] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"는 아토피피부염, 천식 또는 알레르기행진 발병가능 개체로부터 분리된 시료, 배양된 세포 또는 분변일 수 있다. 구체적으로, 상기 생물학적 시료는 기관지 생검, 폐 생검, 비강 생검, 부비동 생검, 객담(sputum), 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF), 비강 세척액(nasal lavage fluid), 비강 도말(nasal swap), 비강 흡인액(nasal aspirate), 비인두 도말(nasopharyngeal swab), 비인두 흡인액(nasopharyngeal aspirate), 비인두 세척액(nasopharyngeal lavage fluid), 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 점액(mucus), 호흡(breath), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 이들의 조합일 수 있고, 바람직하게는 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis), 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 또는 LC-MS를 활용한 DDA(Data dependent acquisition) 방법 또는 SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 칩(DNA 칩) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "단백질 발현의 수준 증가"는 정상대조군, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 시료 내 단백질의 발현이 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 분류가 가능할 정도로 특정군에서 유의하게 높게 발현됨을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 높은 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배, 1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배 또는 2.5배 높은 경우를 의미할 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 용어 "유전자 발현의 수준 증가"는 정상대조군, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 시료 내 mRNA의 농도가 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 분류가 가능할 정도로 특정군에서 유의하게 높게 분포함을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 높은 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배, 1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배 또는 2.5배 높은 경우를 의미할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "단백질 발현의 수준 감소"는 정상대조군, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 시료 내 단백질의 발현이 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 분류가 가능할 정도로 이들 특정군에서 유의하게 낮게 발현됨을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 낮은 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배, 1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배,

2.4배 또는 2.5배 낮은 경우를 의미할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 용어 "유전자 발현의 수준 감소"는 정상대조군, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 시료 내 mRNA의 농도가 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군의 분류가 가능할 정도로 이들 특정군에서 유의하게 낮게 분포함을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 낮은 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배, 1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배 또는 2.5배 낮은 경우를 의미할 수 있다.

[0055] 일 구체예에 있어서, 상기 아토피성 질환을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법은 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단 하기 위한 정보 제공을 위해, 상기 단백질 또는 유전자의 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.

발명의 효과

[0056] 일 양상에 따른 아토피피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma) 또는 알레르기행진(allergy march)을 예측 또는 진단하기 위한 정보 제공 방법에 따르면, 아토피피부염군, 천식군, 알레르기행진군 및 정상대조군에서 발현의 차이를 보이는 SERPINF2, SERPINA3, COL6A3, APOA1, A2M, APOD, PRG2, F13B, SELL, VCAM1, ERBB2, SOS1, PIK3CA, IL5RA, PTGDR2 또는 SIGLEC8 단백질 또는 유전자를 이용하여 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 다중분석비교 결과 유의한 차이를 보이는 전사체, 단백질체, 대사체 자료를 선별하고, 상기 자료를 이용한 통계 분석 통해 4가지 오믹스 내재형을 발굴하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 다중분석결과 발굴된 내재형에서 알레르기성 질환의 표현형 비율을 보여주는 그래프이다.

도 3은 다중분석비교를 통해 내재형 간 유의한 차이를 보이는 전사체, 단백질체, 대사체를 도시한 것이다.

도 4는 각 내재형 별 생물학적 기전을 통해 아토피피부염(AD), 천식(As), 알레르기행진(AM) 바이오 마커를 도출한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1. 대상 피험자의 선별 및 다중오믹스 분석을 위한 샘플 준비

[0060] 아토피피부염(Atopic Dermatitis, AD) 천식(Asthma, As) 알레르기행진(Allergy March, AM)의 구분을 위한 바이오 마커를 선별하기 위해, 6~8세의 41명의 소아 임상 자료를 추적하여 아토피피부염군(11명), 천식군(8명), 알레르기행진군(13명), 정상군(9명)으로 분류하였다. 아토피피부염군은 유아기부터 8세까지 지속되는 아토피피부염 증상이 있고 샘플링 시간 이전에 천식 증상이나 진단 기록이 없는 대상자로 정의하였다. 천식은 2~3세 이후 지속적으로 반복되는 쌽쌽거림 또는 5~6세 이후 의사의 천식 진단이 있는 대상자로 정의하였다. 알레르기 행진은 1~2세까지 지속적인 아토피피부염 증상이나 의사 진단이 있었고 5~6세 이후 천식 또는 2~3세 이후 지속적으로 반복되는 천명이 있는 대상자로 정의하였다. 대조군은 출생 후부터 7~8세까지 위와 같은 질환이 없었던 대상으로 정의하였다.

[0061] 구체적으로, 실험에 참여한 피험자의 인구통계학적 및 임상적 특성을 표 1에 나타내었다. 평균 연령은 6.4세이며, 남자 아이의 비율이 73.7% 이고, 부모 알레르기질환력이 있는 대상자가 78.1% 이었다. 정상군의 나이가 다른 질환군보다 조금 높지만 통계적으로 유의하지 않았고, 성별과 부모 알레르기질환력은 그룹 간의 차이가 없었다.

표 1

[0062]

Characteristics	Total (n = 41)	Control (n = 9)	AD (n = 11)	As (n = 8)	AM (n = 13)	P-value
Age	6.46±0.84	7.11±0.60	6.36±0.67	6.13±0.64	6.31±1.03	0.057
Boys	22 (53.7)	3 (33.3%)	5 (45.5%)	6 (75.0%)	8 (61.5%)	0.310
Family history of allergic diseases	32 (78.1)	7 (77.8%)	8 (72.7%)	5 (62.5%)	12 (92.3%)	0.415
P-values from ANOVA test, chi-square tests.						

[0063]

상기 피험자의 혈액을 채취하여 혈액세포에서 전사체, 단백질, 대사체를 추출하였다. DNA 분석을 위해 처리하기 전에 -80° C에서 PAXgene 튜브(PreAnalytiX, Qiagen/BD, Hilden, Germany)에 말초 혈액 샘플을 수집하여 제조사 프로토콜에 따라 PAXgene Blood RNA Kit(PreAnalytiX)를 사용하여 말초 혈액에서 총 mRNA를 분리하였다. 단백질 분석을 위해 혈장 40 µl를 MARS14 고갈 컬럼(Agilent, CA, USA)에 주입하여 가장 풍부한 혈장 단백질 상위 14개(알부민, IgA, IgG, IgM, α1-안티트립신, α1산 당단백질, 아포지단백 A1, 아포지단백 A2, 보체 C3, 트랜스페린, α2-마르코글로불린, 트랜스티레틴, 합도글로빈 및 피브리노겐)을 면역친화성 크로마토그래피로 분석하였다. 혈장을 "Buffer A"로 4배 희석하고 Shimadzu HPLC 시스템의 MARS14 컬럼에 로드하였다. 결합되지 않은 분획을 용해 버퍼(50mM TEAB(pH 7.1)의 5% SDS)에 첨가하여 혈장 프로테아제 활성을 방지하고, 콜드 트랩(CentriVap Cold Traps, LABCONCO)으로 동결 건조하고, 사용할 때까지 -80° C에서 보관하였다. 동결건조된 혈장 단백질을 200 µL의 용해 완충액과 100 µL의 물을 통해 재현탁시켰다. 추가로 디티오프레이톨을 최종 농도 20mM이 되도록 단백질 용액에 첨가하고 95°C에서 10분 동안 가열하였다. 그런 다음, 단백질 샘플을 iodoacetamide(IAA)를 첨가하여 40mM의 최종 농도로 알킬화하고 어두운 곳에서 30분 동안 실온에서 배양하였다. 제조사의 지침(PMID: 29754492)에 따라 S-Trap 기반 분해 플랫폼을 사용하여 Lys-C/트립신 혼합물(6 µg; Promega V5071)을 사용하여 37° C에서 16시간 동안 알킬화된 혈장 단백질을 트립신 펩티드로 분해하였다. 분해된 펩타이드는 콜드 트랩으로 동결건조하여 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 인간 혈장 대사산물은 메탄올과 이소프로필 알코올로 추출되었다. 메탄올 추출은 준비된 혈청을 80% 메탄올과 1:6 비율로 균질화한 후 4° C에서 60분간 배양하였다. 이소프로필 알코올 추출에서 혈청을 이소프로필 알코올과 1:4 비율로 균질화한 다음 -20°C에서 60분 동안 배양하였다.

[0065]

실시예 2. 정량적 단백질, 전사체, 대사체 분석

[0066]

2.1. 정량적 전사체 분석

[0067]

실시예 1의 방법으로 피험자의 혈액에서 추출한 mRNA를 Affymetrix Power Tools 기반의 멀티칩 분석을 이용하여 분석하였다.

[0068]

구체적으로, 상보적 DNA(cDNA)를 GeneChip WT PLUS Reagent Kit(Affymetrix, Santa Clara, CA)를 사용하여 합성한 후 프로토콜에 따라 GeneChip Human Gene 2.0 ST Array(Affymetrix)에 혼성화하였다. GCS3000(Affymetrix)으로 어레이 스캐닝 후 Affymetrix Power Tools 기반의 강력한 멀티칩 분석으로 데이터 전처리 및 품질 검사(백그라운드 빼기, 정규화 및 프로브셋 요약)를 완료하고 Affymetrix GeneChip 명령 콘솔 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하였다. 대조군 프로브를 필터링하고 44,629개의 프로브를 분석하였다.

[0069]

2.2. 정량적 단백질 분석

[0070]

실시예 1의 방법으로 피험자의 혈액에서 추출한 단백질을 Nano-Liquid chromatography/mass spectrometry를 이용하여 분석하였다.

[0071]

구체적으로, 폴 플라즈마 혼합물 분리는 Shimadzu Prominence HPLC 기기(Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 XBridge C18 컬럼(직경 4.6 mm X 길이 250 mm, 기공 크기 130 Å, 입자 크기 5 µm, Waters Corporation, USA)에서 수행되었다. 0.5mL/분의 유속으로 하였다. 이동상 A로 2% 아세트오니트릴과 98% 물에 녹인 4.5mM 포름산암모늄(pH 10)을 사용했고, 이동상 B로 90% 아세트오니트릴(pH 10)에 녹인 4.5mM 포름산암모늄을 사용하였다. A상에 주입한 다음 2100 µl 시료 루프에 주입하였다. 7분 동안 0-0% B, 5분 동안 0-5% B, 60분 동안 5-40% B, 5분 동안 40-44% B, 4분 동안 44-60% B, 60% B의 구배 12분 동안, 60-65% B를 4분 동안 적용한 다음 컬럼을 100 및

50% 이동상 B로 30분 동안 세척하였다. 분획을 통해 용출액을 Shimadzu FRC-10A 분획 수집기의 96-웰 플레이트에 매분 수집하였다. 생성된 96개의 분획을 연결 방식으로 혼합하여 48개의 분획을 형성하였다. 각 분획을 건조하고 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0072] Nano-LC-ESI-MS/MS 분석: 펩타이드 샘플의 액체 크로마토그래피/질량 분석(LCMS) 분석은 라이브러리 구축을 위한 DDA(데이터 의존적 수집) 모드와 순차 분석을 위한 DIA(데이터 독립적 수집) 모드 모두에서 수행되었다. TripleTOF 5,600+ 기기(SCIEX, USA) 및 Digital Pico View 나노스프레이 소스(New Objective, USA)와 결합된 Eksigent nanoLC-Ultra 2D plus에서 각각 수집된 모든 이론 질량 스펙트럼(SWATH) 데이터의 창 획득하였다. 자세한 작동 매개변수는 다음과 같다. 가스 1, 질소(20psi); 이온 분무 전압, 2300; 이온 소스 온도, 150° C; 커튼 가스, 질소(35psi); 디클러스터링 전위, 60eV; 및 충돌 에너지, 롤링 eV. Acclaim PepMap™ 100 C18 트랩 컬럼(직경 100 μm X 길이 250mm, 기공 크기 100 Å, 입자 크기 3 μm, Thermo Scientific, USA)에서 펩타이드 샘플을 분리했다. 길이 20 mm, 입자 크기 5 μm, 기공 크기 100 Å, Thermo Scientific) 완충액 A(H₂O 중 0.1% 포름산) 및 완충액 B(아세트오니트릴 중 0.1% 포름산)에서 유속 300 μl/min, 130 최소 샘플을 3 μl/min 유속으로 10분 동안 포획한 후, 완충액 B에 대해 다음 구배 설정으로 분석 컬럼에 주입하였다: 0-10분, 5%; 10-110분, 30%로 증가; 110-112분, 95%까지 증가; 112-122분, 95% 유지; 122-123분, 5%로 감소; 및 123-135분, 5%에서 유지. DDA에서 MS1 측량 스펙트럼은 100ms 충전 시간 캡으로 m/z 350-1,800 범위에 대해 수집되었다. 전하 상태 2-5의 가장 강한 전구체 상위 30개를 CID 단편화를 위해 선택했으며, MS2 스펙트럼은 m/z 100-2,000 범위에서 수집했으며, 50ms 충전 시간 캡과 10초 동안 재선택에서 전구체 이온의 동적 배제를 사용하였다.

[0073] SWATH 데이터 획득: SWATH 데이터 획득은 인간 HeLa 단백질 다이제스트 표준(Thermo Scientific) 및 MS 신호 밀도(SWATH 2.0)를 사용하여 최적화된 64개의 가변 크기 전구체 공동 분리 창의 업데이트된 체계를 통해 수행되었다. SWATH 주기(64 X 50ms 누적 시간)는 50ms 충전 시간 캡이 있는 m/z 400-1,250에 대한 MS1 측량 스캔과 함께 배치되어 전체 주기 주기 시간이 3,128ms가 되었다. MS2 질량 범위는 m/z 50-1,800으로 설정되었다.

[0074] 스펙트럼 라이브러리 생성: 48개의 DDA-MS/MS 스펙트럼 데이터에서 인간 SwissProt 참조 데이터베이스(2019년 9월 구축)와 함께 ProteinPilot 소프트웨어 패키지(버전 5.0.2, SCIEX)를 사용하여 단백질 식별 및 정량화를 수행하였다. 라이신 및 아르기닌 잔기를 절단 부위로 설정하고, 시스테인 카르바미도메틸을 안정한 변형으로 설정하였다. 펩타이드와 단백질 모두에 대한 허위 발견율(FDR)은 1% 미만으로 유지되도록 제어되었다. 확인된 모든 단백질은 소프트웨어로 계산된 미사용 Protscore > 1.0을 가졌으며, 이는 > 90% 신뢰도로 확인된 단백질에 해당하고, 전체 FDR ≤ 1%는 Proteomics System Performance Evaluation Pipeline(PSPEP) 소프트웨어에 의해 단백질 수준에서 결정되었다.

[0075] 연산: SWATH 단편 이온 크로마토그램과 PeakView 소프트웨어(버전 2.2.0.11391, SCIEX)용 결합 사내 라이브러리를 사용하여 표적 펩타이드 중심 접근법을 통해 SWATH 데이터 및 정규화된 SWATH 데이터를 분석하였다. 펩타이드 필터의 경우 2개의 펩타이드와 펩타이드당 6개의 전이가 있었고 신뢰 임계값은 99%이고 FDR은 1%이었다. XIC 필터에서 추출 창은 5분이고 너비는 50ppm 이었다. 단백질 양의 정규화는 NormFinder 소프트웨어(PubMed: 15289330)에 의해 6개의 가장 안정한 혈장 단백질(OAF, FAP, PTPRG, NAGLU, GP1BA 및 ENG)을 기반으로 계산되었다.

[0076] 잠재적인 proteomic 특징을 추출하기 위해 탐색 분석을 수행하였다. 통제 그룹과 알레르기 행진 그룹의 차이는 인간 질병과 그 유전자의 포괄적인 발견 플랫폼인 DisGeNET 데이터베이스를 통해 확인되었다. 그룹 간에 차등적으로 풍부한 값을 나타내는 프로테오를 식별하기 위해 Benjamini-Hochberg 조정(P < 0.05)을 사용한 다중 쌍 순위 합계 테스트가 적용되었다.

[0077] 상기한 방법으로 얻은 펩타이드의 질량정보를 통해서 아미노산 염기서열을 맞추어서 감별하고 정량화한 값을 기반으로 통계 분석하였다.

[0078] 2.3. 정량적 대사체 분석

[0079] 실시예 1의 방법으로 피험자의 혈액에서 추출한 대사물질을 사중극자 비행시간(Q-TOF) 질량 분석기(Synapt G2-Si, Waters)와 결합된 Waters Acquity UPLC 시스템(Waters, Milford, MA)을 이용하여 분석하였다.

[0080] 구체적으로, 추출된 시료를 15,000 x g에서 15분 동안 원심분리한 후, 5 μl의 상등액을 UPLC-MS/MS 시스템에 주입하였다. 모든 샘플은 기술적 편견을 줄이기 위해 무작위로 배열되었다. 크로마토그래피 시스템은 사중극자 비행시간(Q-TOF) 질량 분석기(Synapt G2-Si, Waters)와 결합된 Waters Acquity UPLC 시스템(Waters, Milford, MA)으로 구성되었다. 메탄올로 추출한 시료의 분리를 위해 이동상(0.4mL/분으로 전달)은 (A) 물에 포함된 0.1%

포름산(v/v) 및 (B) 0.1% 포름산(v/v)으로 구성되었다. 아세토니트릴. 크로마토그래피 분리는 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1mm x 100mm, 1.7 μ m)에서 수행되었다. 이소프로필 알코올로 추출한 샘플에서 이동상(0.4mL/min으로 전달됨)은 (A) 0.1% 포름산(v/v) 및 10mM 포름산 암모늄 아세토니트릴/물(60/40, v/v)로 구성되었다. (B) 이소프로필 알코올/아세토니트릴(90:10, v/v) 중 0.1% 포름산(v/v) 및 1mM 포름산암모늄. 크로마토그래피 분리는 Acquity UPLC CSH C18 컬럼(2.1mm x 100mm, 1.7 μ m)에서 수행되었다. 질량 분석법(MS) 분석은 m/z 50에서 1500까지 포지티브 및 네거티브 스캔 모드에서 수행되었다. MS 매개변수는 모세관 전압, 2,000V; 콘 전압, 20V; 소스 온도, 110° C; 탈용매화 온도, 550°C 및 탈용매화 가스 흐름, 900L/h. 측정된 질량의 정확성을 보장하기 위해 류신-엔세팔린을 기준 잠금-질량 화합물로 사용했다(포지티브 모드에서 m/z 556.2771 및 네거티브 모드에서 m/z 554.2615). 품질 관리(QC)를 위해, 폴딩된 혈청 샘플은 분석할 모든 샘플의 동일한 분취량을 혼합하여 준비되었다. QC 샘플은 분석 실행 내내 6개 샘플마다 주입되었다. 데이터는 MassLynx 4.1 소프트웨어(Waters, UK)로 처리되었다. 총 45개의 대사체를 대조군과 알레르기 행진군을 비교하여 추출하였고(P < 0.05), 동일성을 확인한 후 선별하였다.

실시예 3. 다중오믹스 자료 통합 분석을 통한 내재형 발굴 및 상기 내재형과 아토피피부염, 천식, 알레르기행진과의 상관관계 규명

3.1 아토피피부염, 천식, 알레르기행진의 내재형 발굴

실시예 2의 방법으로 수집한 전사체, 단백질체, 대사체 자료를 통합하기 위해서 알레르기행진군과 정상군 사이에 다중분석비교(multiple comparison test)을 수행하였다. 상기 다중분석비교 결과 유의한 차이를 보이는 287개의 전사체, 40개의 단백질체, 48개의 대사체 자료를 선별하여 통계 분석에 활용하였다.

구체적으로, 287개 전사체는 주성분분석(PCA, principle component analysis)을 통해 27개 PC(principle component)로 축약하여 통합자료에 활용하였고, Similarity network fusion 후 Spectral clustering 분석을 통해 4가지 다중오믹스 내재형을 발굴하였다. 4가지 다중오믹스 내재형을 발굴하는 과정을 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 과정을 통하여 발굴된 내재형 사이의 유의한 차이를 보이는 전사체, 단백질체, 대사체를 추출하여 functional annotation(GO, KEGG, Reactome)을 수행하였다. 상기 functional annotation은 David functional annotation analysis와 STRING을 활용하였고, 이를 통해 각 내재형의 생물학적 기능을 해석하였다.

3.2 각 내재형과 알레르기성 질환의 상관관계 규명

실시예 3.1을 통해 발굴된 내재형 1,2,3,4의 표현형을 조사하여 내재형과 알레르기성 질환의 상관관계를 규명하였고, 그 결과를 표 2 및 도 2에 나타내었다. 표 2는 각 내재형별 알레르기성 질환의 표현형(phenotype) 비율을 나타낸 것이고, 도 2는 다중분석결과 발굴된 내재형에서 알레르기성 질환의 표현형 비율을 보여주는 그래프이다.

표 2

		Atopic dermatitis n (%)	Asthma n (%)	Allergic march n (%)	Control n (%)	Sum
Multio- mics endo- type	Endotype 1	6 (54.5)	2 (25.0)	0 (0)	1 (1.1)	9
	Endotype 2	1 (9.1)	6 (75.0)	3 (27.1)	0 (0)	10
	Endotype 3	2 (18.2)	0 (0)	9 (69.2)	1 (11.1)	12
	Endotype 4	2 (18.2)	0 (0)	1 (7.7)	7 (77.8)	10
Total		11	8	13	9	41

표 2 및 도 2에 나타난 바와 같이, 내재형 1은 아토피피부염(AD)을 앓고 있는 대상자 비율이 높았고(54.5%), 내재형 2는 천식(Asthma)을 앓고 있는 대상자 비율이 높았으며(75.0%), 내재형 3은 알레르기행진(AM)이 진행된 대상자의 비율이 높았고(69.2%), 내재형 4는 건강한 대상자(control) 비율(77.8%)이 높았다.

실시예 4. 아토피피부염, 천식, 알레르기행진 바이오마커 도출

실시예 3.1의 다중분석비교(Multiple comparison test) 결과, 유의하게 상향, 하향 조절된 오믹스 자료를 추출하고, 내재형 간 유의한 차이를 보이는 전사체, 단백질체, 대사체를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 내재형 간

유의한 차이를 보이는 전사체, 단백체, 대사체를 이용하여 각 내재형의 생물학적 기전을 규명하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0093] 또한 상기 생물학적 기전을 이용하여 실시예 3.2에서 분석한 각 내재형별 상관관계가 있는 소아 아토피피부염(AD), 천식(As), 알레르기행진(AM)을 예측 또는 진단할 수 있는 바이오마커 후보를 도출하였다.

[0094] 도 3는 다중분석비교를 통해 내재형 간 유의한 차이를 보이는 전사체, 단백체, 대사체를 도시한 것이다.

[0095] 도 3에 나타난 바와 같이, 내재형 별 더 높은 수준을 보인 단백질들은 내재형 1은 SERPINF2, SERPINA3, APP 등이고, 내재형 2는 APOA1, A2M, APOD 등이며, 내재형 3은 PRG2, F13B, SELL, VCAM1 등임을 확인하였다. 내재형 별 더 높은 수준을 보인 대사체로는 내재형1은 LysoPC, choline 등이고, 내재형 2는 dinitrophenol, pentacosanolyglycine 등이며, 내재형 3은 choline 임을 확인하였다.

[0096] 도 4는 각 내재형 별 생물학적 기전을 통해 아토피피부염(AD), 천식(As), 알레르기행진(AM) 바이오 마커를 도출한 것이다. 도 4에서 전사체는 노드(nodes)부분을 녹색(green)으로 표시하였고, 단백질은 노드(nodes)부분을 빨간색(red)으로 표시하였으며, 대사체는 노드(nodes)부분을 노란색(yellow)으로 표시하였다. 각 노드를 연결한 선(edges)은 상관계수(Spearman correlation test)를 의미하고, 상관계수가 양성(positive)인 경우 빨간색(red)으로, 음성(negative)인 경우에는 파란색(blue)으로 표시하였으며, 노드 부분의 가장자리 선(borderline of nodes)의 빨간색(red)은 상향 조절됨을, 남색(navy)은 하향 조절됨을 의미한다.

[0097] 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 도 3에서 추출한 각 내재형 별 유의하게 상향 또는 하향 조절된 오믹스 자료를 이용하여 생물학적 기전을 도출하였을 때, 각 내재형 별로 상이한 생물학적 신호가 형성됨을 확인하였다. 따라서 각 내재형과 상관관계가 있는 알레르기성 질환(아토피피부염, 천식, 알레르기행진)을 상기 생물학적 기전과 관련된 바이오마커를 통해 예측 또는 진단 할 수 있다.

[0098] 구체적으로, 아토피피부염(AD)은 내재형 1의 생물학적 기전을 통해 구분할 수 있고, 다른 알레르기성 질환과의 대표적인 차이는 급성염증반응 단백질의 상향 조절(SERPINF2, SERPINA3)과 Collagen을 포함하고 있는 세포외기질 단백질의 하향 조절(COL6A3)이 동반되고 있으며, 대사물질로 염증성 지질대사체(Choline, LysoPC)의 분포가 높게 나타나고 있음을 확인하였다.

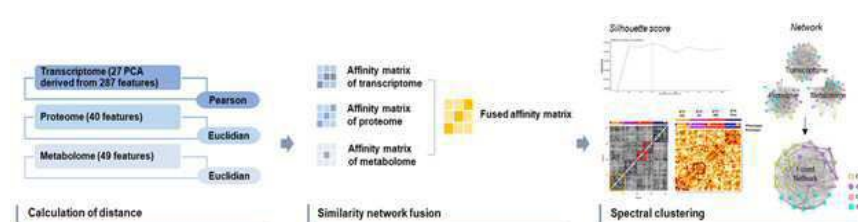
[0099] 천식(Asthma)은 내재형 2의 생물학적 기전을 통해 구분할 수 있고, 다른 알레르기성 질환과의 대표적인 차이는 SLC9A7, CAMK2D 및 Glutathione S-transferase(MGST3)의 활성화, 혈중 지질산화 대사체(pentacosanolyglycine) 분포 및 2,4-dinitro-6-(1-methylpropyl)-phenol 대사체 농도가 높은 것으로 확인하였다(adjusted p-value = 0.0032). 또한, APOA1, A2M, APOD 등 염증반응 완화 역할이 있는 HDL assembly 단백질 발현이 높은 특징이 있음을 확인하였다.

[0100] 알레르기행진(AM)은 내재형 3의 생물학적 기전을 통해 구분할 수 있고, IL5RA-PTGDR2-SIGLEC8 전사체 발현 상향, PRG2-VCAM1-SELL 단백질 발현 상향, ERBB2-SOS1-PIK3CA 신호전달 개체들의 전사체 발현 하향 및 F13B 단백질 발현 상향 조절됨을 확인하였고, 불포화지방산인 gamma-linolenic acid 농도는 낮고(Kwallis test, p=0.014) 포화지방산인 palmitic acids 농도는 높음을 확인하였다(p=0.067).

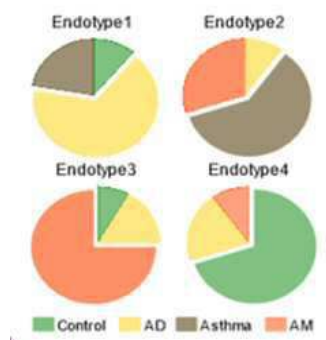
[0101] 이는 내재형 별 상관관계가 있는 아토피성 질환(아토피피부염, 천식, 알레르기행진)과 내재형 별 차이를 보인 오믹스 지표들을 바이오마커로 이용하여 아토피피부염, 천식, 알레르기행진을 예측 또는 진단할 수 있음을 의미한다.

도면

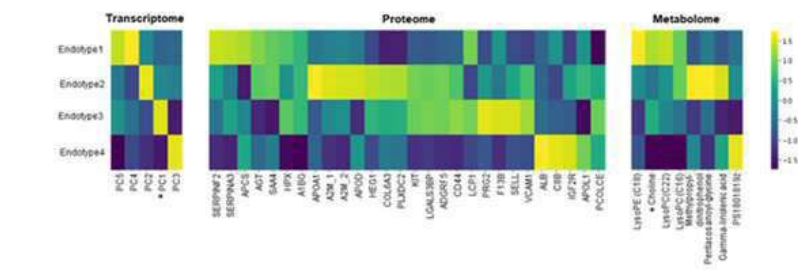
도면1



도면2



도면3



도면4

