



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149006
(43) 공개일자 2024년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0043804
(22) 출원일자 2023년04월03일
심사청구일자 2023년04월03일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍수중
서울특별시 강남구 압구정로 201, 24동 902호
김봉수
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 8309호
(74) 대리인
이명진

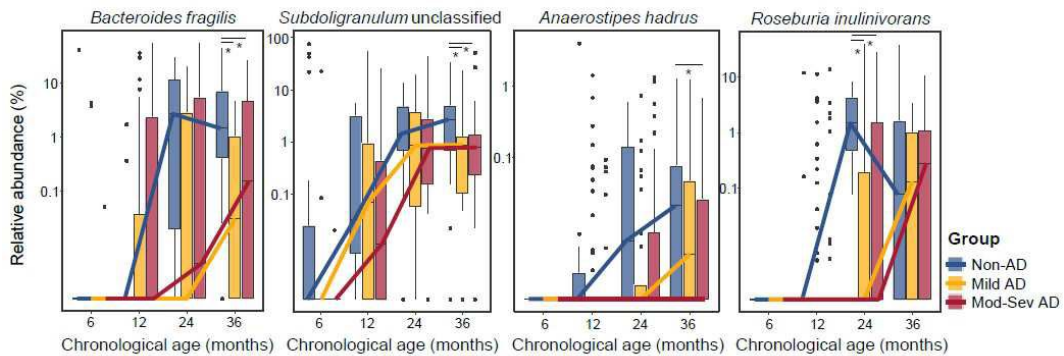
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 및 이의 이용에 관한 것으로서, 본 발명에서는 영유아의 장내 마이크로바이옴 분석을 통해 영유아 시기별로 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(MAZ) 및 짧은 사슬 지방산 변화 수치(SAZ)와 상관관계를 가지고 아토피피부염의 발생에 영향을 주는 장내 마이크로바이옴을 확인하였다. 이를 통해 상기 장내 마이크로바이옴을 생체지표로 활용하여 영유아 분변 시료로부터 상기 마이크로바이옴의 존재 수준을 측정함으로써 영유아의 시기별로 아토피피부염을 진단하고, 다른 알레르기 질환의 진행을 예방하는 데에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132878
과제번호	2017M3A9F3043834
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	아토피피부염 질환군의 면역기전연구를 통한 장내 마이크로바이옴 기반 파마바이오틱스 발굴
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2017.08.08 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129740
과제번호	2017M3A9F3043837
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	아토피피부염 파마바이오틱스 발굴 및 기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2017.05.25 ~ 2022.05.24

명세서

청구범위

청구항 1

박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 조성물.

청구항 2

박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)와 연관성을 가지는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 MAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 짧은 사슬 지방산(SCFA) 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)와 연관성을 가지는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 SAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)는 생후 6개월의 영유아에서 SAZ와 연관성을 가지고,

상기 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 생후 12개월 이후의 영유아에서 SAZ와 연관성을 가지는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 장내 미생물은 영유아의 분변에서 측정되는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 영유아는 생후 6개월 내지 36개월인 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 장내 미생물을 검출하는 제제는 상기 미생물에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 프라이머 또는 프로브는 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 키트.

청구항 13

피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 분변 시료인 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 영유아는 생후 6개월 내지 36개월인 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 장내 미생물의 존재 수준은 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브를 이용하여 각 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양을 측정하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)와 연관성을 가지는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 MAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

생후 12개월 이후의 영유아에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조

균에 비해 낮은 경우 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 20

제13항에 있어서,

상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 짧은 사슬 지방산(SCFA) 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)와 연관성을 가지는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 SAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 22

제20항에 있어서,

생후 6개월의 영유아에서 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우, 또는

생후 12개월 이후의 영유아에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 및 대장균(*Escherichia coli*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 높거나, 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 낮은 경우, 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 및 이의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아토피피부염은 전 세계적으로 유병률이 약 20 % 정도로서 우리나라 영유아기에서 가장 많이 발생하는 알레르기 질환 중 하나이며, 영유아에서 약 80 %가 발생하고 있다. 아토피피부염은 유전 및 환경적 요인의 상호작용으로 인한 복합적 임상 증상으로 다양하게 나타나기 때문에 발병 원인이 어느 한 가지로만 설명될 수는 없으나, 매연 등의 환경 공해, 식품첨가물 등의 사용 증가, 실내 온도 상승으로 인한 집먼지 진드기 등의 알레르기를 일으키는 원인 물질(알레르겐)의 증가 등 환경적인 요인과 유전적인 소인, 면역학적 반응 및 피부보호막의 이상, 가축력 등이 주요 원인으로 여겨지고 있다.

[0004] 어린 시기의 아토피피부염 발생은 향후 천식이나 비염과 같은 호흡기 알레르기 질환으로 이행(알레르기 행진)할 가능성이 있으므로, 아토피피부염 발생 예측은 알레르기 행진에 따른 다른 알레르기 질환의 예방에 도움을 줄

수 있다.

[0005] 한편, 어린 시절의 장내 마이크로바이옴은 노년의 건강에 영향을 미치는 면역 체계 발달에 영향을 미치고, 영유아기 초기의 장내 마이크로바이옴 교란은 어린이의 알레르기 질환 발병 위험을 증가시킨다. 장내 마이크로바이옴과 이들이 생성하는 짧은 사슬 지방산(SCFA)은 점막 Th2 염증을 조절하는 Treg 세포를 유도할 수 있고, Th1/Th2 균형은 면역 조절에 필수적이며 Th1/Th2 불균형은 만성 염증 및 알레르기 질환을 유발할 수 있다.

[0006] 미생물은 태어날 때부터 장에 서식하며, 출생 후 3년 이내는 면역 체계가 발달하며 동시에 면역 발달과 밀접한 관계가 있는 장 마이크로바이옴의 조성이 구축되는 시기이다. 따라서 본 발명자들은 이 시기에 변화하는 장내 마이크로바이옴이 아토피피부염 발생 및 중증도에 어떤 영향을 주는지, 어떻게 상호작용을 하는지를 영유아 시기별로 확인하여, 각 시기별로 유의적으로 변화하는 장내 마이크로바이옴을 아토피피부염 진단을 위한 마커로서 활용하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1975671호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 영유아의 장내 마이크로바이옴 분석을 통해 영유아 시기별로 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ) 및 짧은 사슬 지방산 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)와 상관관계를 가지고 아토피피부염의 발생에 영향을 주는 장내 마이크로바이옴을 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명의 목적은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 엔에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 엔에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 피검체에서 분리된 생물학적 시료에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 엔에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될

수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 짧은 사슬 지방산(SCFA) 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)는 생후 6개월의 영유아에서 SAZ와 연관성을 가지고,
- [0022] 상기 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 생후 12개월 이후의 영유아에서 SAZ와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 장내 미생물은 영유아의 분변에서 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 영유아는 생후 6개월 내지 36개월일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 장내 미생물을 검출하는 제제는 상기 미생물에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 또한, 본 발명은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생

물의 존재 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

- [0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 분변 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 장내 미생물의 존재 수준은 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브를 이용하여 각 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 MAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 정보제공방법은 생후 12개월 이후의 영유아에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 낮은 경우 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 SAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 정상 대조군에 비해 감소할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 정보제공방법은 생후 6개월의 영유아에서 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 높은 경우, 또는
- [0034] 생후 12개월 이후의 영유아에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 및 대장균(*Escherichia coli*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 높거나, 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 낮은 경우, 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 체제 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 영유아의 아토피피부염 진단 용도를 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 체제 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명에서는 영유아의 장내 마이크로바이옴 분석을 통해 영유아 시기별로 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(MAZ) 및 짧은 사슬 지방산 변화 수치(SAZ)와 상관관계를 가지고 아토피피부염의 발생에 영향을 주는 장내 마이크로바이옴을 확인하였다. 이를 통해 상기 장내 마이크로바이옴을 생체지표로 활용하여 영유아 분변 시료로부터 상기 마이크로바이옴의 존재 수준을 측정함으로써 영유아의 시기별로 아토피피부염을 진단하고, 다른 알레르기 질환의 진행을 예방하는 데에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아에서 비-아토피피부염 그룹(Non-AD), 경증 아토피피부염 그룹(Mild

AD), 및 경증을 제외한 중증 아토피피부염 그룹(Mod-Sev AD)의 연령에 따른 장내 미생물군의 지표 종을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a는 본 발명의 일 구현예에 따른 랜덤포레스트 모델링을 통해 영유아 비-아토피피부염 샘플에서 예상 미생물군 연령(estimated microbiota age; EMA)의 예측 모델에서의 종의 중요성을 나타낸 도면이다.

도 2b는 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아 장내 마이크로바이옴 발달과 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(MAZ)와의 상관관계를 확인한 도면이다.

도 2c는 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아 아토피피부염 그룹에서 지연된 MAZ 점수와 연관된 종의 상대적 존재비를 확인한 도면이다.

도 3a는 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아 비-아토피피부염 그룹에서 SCFA 변화의 예측 모델에 대한 부티르산염 및 프로피온산염의 중요도를 확인한 도면이다.

도 3b는 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아 장내 마이크로바이옴과 연령에 따른 SCFA 변화 수치(SAZ)와의 상관관계를 확인한 도면이다.

도 3c는 본 발명의 일 구현예에 따른 SAZ와 MAZ 사이의 상관관계를 확인한 도면이다.

도 3d는 본 발명의 일 구현예에 따른 영유아 아토피피부염 그룹에서 연령별로 SAZ 점수와 유의하게 연관된 종의 상대적 풍부도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명의 일 실험예에서는 아토피피부염을 가진 영유아의 연령에 따른 장내 미생물군을 확인한 결과, 3세 이전의 장내 마이크로바이옴은 각 연령별(6개월, 7-12개월, 13-24개월, 25-36개월)로 그 구성이 다르고, 아토피피부염을 가진 영유아의 경우 장내 마이크로바이옴이 무분별하게 변화하는 것을 알 수 있었다(실험예 1 참조).

[0042] 본 발명의 다른 실험예에서는 아토피피부염 그룹의 무분별한 장내 미생물군 발달과 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)의 연관성을 확인한 결과, 장내 미생물군은 6개월에 비-아토피피부염 그룹에 비해 아토피피부염 그룹에서 매우 성숙한 반면, 12개월 이후로는 아토피피부염 그룹에서 MAZ가 감소되어 장내 마이크로바이옴의 성숙도가 지연되는 것을 확인하였다. 또한, *Bacteroides fragilis*, *UC_Subdoligranulum*, *Anaerostipes hadrus*, 및 *Roseburia inulinivorans*는 12개월 후 아토피피부염 그룹에서 낮은 MAZ와 유의한 상관관계를 가지는 것을 확인하였다 (실험예 2 참조).

[0043] 본 발명의 또 다른 실험예에서는 아토피피부염 그룹의 무분별한 미생물군 발달에 의한 연령에 따른 SCFA 프로파일 변화를 확인한 결과, 아토피피부염 그룹의 SCFA 프로파일은 12개월 이전에 비-아토피피부염 그룹에 비해 고도로 성숙된 반면, 12개월 후에 성숙이 지연되었으며, 아토피피부염 그룹에서 *B. breve*의 상대적 풍부도는 6개월에 높은 SAZ와 유의하게 연관되었고, 통성 혐기성 세균(*K. pneumoniae*, *C. freundii* 및 *E. coli*), *B. fragilis*, 및 *F. prausnitzii*의 상대적 풍부도는 12개월 후 아토피피부염 그룹에서 낮은 SAZ와 연관성을 보이는 것을 확인하였다(실험예 3 참조).

[0045] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0047] 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 마커 조성물을 제공한다.

[0048] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium*

prausnitzii)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.

- [0049] 본 발명에 있어서, “영유아”는 생후 6개월에서 36개월까지의 아동을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명에 있어서, “마이크로바이옴(microbiome)”은 인간의 몸속에서 함께 공존하고 있는 미생물들이 구성하는 생태계를 일컫는 용어로, 본 발명에서 장내 마이크로바이옴은 장내 존재하는 미생물들과 이들의 유전체 정보를 의미한다.
- [0051] 본 발명에 있어서, “아토피피부염(atopic dermatitis)”은 강렬한 소양감(예를 들면, 심한 가려움) 및 각질과 마른 습진성 병변을 특징으로 하는 염증성 피부 질환을 의미하며, 피부 장벽 이상, 알레르기(예를 들면, 특정 음식, 꽃가루, 곰팡이, 먼지 진드기, 동물 등에 대한 알레르기), 방사선 노출, 및/또는 천식에 기인하거나 연관된 아토피피부염을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 아토피피부염은 중증도에 따라 학문적으로 경증(mild), 중등증(moderate), 중증(severe)로 분류하며, 일반적으로 경증 및 경증을 제외한 중증(moderate to severe)으로 나눌 수 있다. “경증을 제외한 중증(moderate to severe) 아토피피부염”이란 아토피피부염이 심한 상태에서 흔히 지속적인 세균, 바이러스 또는 진균 감염이 합병된 심하게 소양감을 일으키는 광범위하고 심한 피부 병변을 특징으로 한다. 또한 경증을 제외한 중증 아토피피부염이란 환자의 만성 아토피피부염을 포함한다. 많은 경우에, 상기 만성 병변은 피부의 두꺼워진 플라크(plaque), 태선화 및 섬유성 구진을 포함한다. 또한 경증을 제외한 중증 아토피피부염에 걸린 환자들은 일반적으로 신체 피부 면적의 20 % 이상이 감염되거나, 눈, 손 및 신체의 접히는 곳의 침범 이외에도 피부 면적의 10 % 이상이 감염된다. 경증을 제외한 중증 아토피피부염은 또한 국소 코르티코스테로이드제로 빈번하게 치료를 받아야 하는 환자에게 존재하는 것으로 간주된다. 환자가 국소 코르티코스테로이드제 또는 칼시뉴린 저해제에 내성이거나 불응성인 경우도 이 환자는 경증을 제외한 중증 아토피피부염을 갖는다고 말할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 아토피피부염의 중증도에 따라 미생물군에 미치는 영향이 다르게 나타나 장내 마이크로바이옴 성숙도에 차이가 있을 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 영유아의 아토피피부염 발병 여부를 확인하는 것이나 이에 제한되지 않고, 영유아의 아토피피부염의 중증도를 확인하는 것도 모두 포함한다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 MAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 감소할 수 있으며, 상기 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 생후 12개월 이후, 생후 12 내지 36개월, 13 내지 36개월, 16 내지 36개월, 20 내지 36개월, 24 내지 36개월, 25 내지 36개월, 30 내지 36개월, 12 내지 30개월, 13 내지 30개월, 16 내지 30개월, 20 내지 30개월, 24 내지 30개월, 25 내지 30개월, 12 내지 24개월, 13 내지 24개월, 16 내지 24개월, 20 내지 24개월, 12개월, 13개월, 24개월, 또는 36개월에 낮은 MAZ와 연관성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 “연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ)”는 장내 마이크로바이옴의 성숙도를 나타내는 수치로서, MAZ 수치가 정상 대조군에 비해 감소할 경우 장내 마이크로바이옴의 성숙도가 지연되는 것을 의미할 수 있다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 정상 대조군의 6개월 시기에는 통성 혐기성 세균(facultative anaerobes)이 장내 주로 존재하였다가 연령이 증가함에 따라 완전 혐기성 세균(obligate anaerobes)으로 변화하며, 이 때 시기별 장내 우점 균주의 변화를 볼 수 있는데, 이러한 과정을 장내 마이크로바이옴의 성숙이라고 표현할 수 있다. 반면, 아토피피부염이 있는 영유아의 경우 이러한 장내 마이크로바이옴이 무분별하게 변화하는 것을 확인하였으며, 상기 MAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아

에서 정상 대조군에 비해 감소하여 장내 마이크로바이옴의 성숙도가 지연되는 것을 확인하였다.

- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로바이옴의 성숙도는 다음과 같은 계산식으로 정의될 수 있다:
- [0059] 상대적인 미생물군 성숙도 = 영유아의 미생물군 연령 - 유사한 연령의 건강한 영유아의 미생물군 연령
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 MAZ는 다음과 같은 계산식으로 정의될 수 있다:
- [0061] $MAZ = (\text{미생물군 연령} - \text{동일한 연령의 건강한 영유아의 평균 미생물 연령}) / (\text{동일 연령의 건강한 영유아의 미생물군 연령의 표준 편차})$
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 연령에 따른 짧은 사슬 지방산(SCFA) 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 SAZ는 아토피피부염을 가진 생후 12개월 이후의 영유아에서 감소할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)는 생후 6개월의 영유아에서 높은 SAZ와 연관성을 가지고,
- [0065] 상기 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물은 생후 12개월 이후, 생후 12 내지 36개월, 13 내지 36개월, 16 내지 36개월, 20 내지 36개월, 24 내지 36개월, 25 내지 36개월, 30 내지 36개월, 12 내지 30개월, 13 내지 30개월, 16 내지 30개월, 20 내지 30개월, 24 내지 30개월, 25 내지 30개월, 12 내지 24개월, 13 내지 24개월, 16 내지 24개월, 20 내지 24개월, 12개월, 13개월, 24개월, 또는 36개월의 영유아에서 낮은 SAZ와 연관성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 본 발명에 있어서, “연령에 따른 짧은 사슬 지방산(SCFA) 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)”는 비-아토피 피부염 그룹과 아토피피부염 그룹 간의 장내 미생물군 발달 변화에 따라 SCFA 생성 정도를 연령에 따라 측정 한 후 SCFA 프로파일을 분석하여 나타냄으로써 장내 대사체의 성숙도를 나타내는 수치로서, SAZ 수치가 정상 대조군에 비해 감소할 경우 장내 대사체의 성숙이 지연되는 것을 의미할 수 있다. 상기 SCFA는 장내 마이크로바이옴의 주요 대사 산물로, 탄소수가 6개 이하로 적은 지방산을 의미한다. SCFA는 소장까지 소화, 흡수되지 않은 탄수화물을 장내 미생물들이 대사하는 과정 중에 생성된다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 SCFA는 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 부티르산, 이소발레르산, 및 발레르산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 SAZ는 다음과 같은 계산식으로 정의될 수 있다:
- [0068] $SAZ = (\text{미생물군 SCFA 생성량} - \text{동일한 연령의 건강한 영유아의 평균 SCFA 생성량}) / (\text{동일 연령의 건강한 영유아의 미생물군 SCFA 생성량의 표준 편차})$
- [0069] 본 발명에 있어서, 미생물군 연령 및 SCFA 연령은 머신러닝 알고리즘으로 트레이닝하여 수치화 할 수 있으며, 예컨대 랜덤포레스트를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 장내 미생물은 영유아의 분변에서 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 장내 미생물을 검출하는 제제는 상기 미생물에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명에 있어서, “검출”이란 목적하는 물질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 상기 검출은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 상기 미생물의 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다.

- [0073] 본 발명에 있어서, “프라이머(primer)”란 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T_m)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 mRNA 또는 이의 cDNA의 염기서열을 참조하여 프라이머 쌍을 용이하게 디자인할 수 있다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다.
- [0074] 본 발명에 있어서, “프로브(probe)”는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA), DNA, miRNA 등에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 것은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오타이드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질(또는 대립유전자, allele)을 검출하기 위한 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출 방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기관에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.
- [0075] 본 발명에서, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출하고자 하는 표적이 되는 폴리뉴클레오타이드와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 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), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 상기 미생물을 검출할 수 있는 것이라면 특정 서열로 한정되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, “16S rRNA”는 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 모든 종에 공통적인 보존 영역(conserved region)과 특정 종을 분류할 수 있는 초가변 영역(hypervariable region)이 존재하므로 염기서열분석을 통하여 미생물을 동정할 수 있다. 특히 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종 간에는 다양성이 나타나므로 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 유용하게 동정할 수 있다. 또한 16S rDNA는 16S rRNA를 코딩하는 유전자이므로, 16S rDNA를 활용하여 미생물을 동정할 수도 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명에 있어서, “항체(antibody)”란 항원성 부위에 대해서 지시되어 특이적으로 결합하는 단백질 분자를 의미한다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법, 재조합 DNA 방법, 또는 파아지 항체 라이브러리 방법 등에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 또는 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있으며, 예컨대 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편, 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 또는 키메라 항체 등일 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 항체는 본 발명의 단백질을 검출할 수 있는 것이라면 특정 항체의 종류로 한정되지 않는다.
- [0080] 본 발명에 있어서, “압타머(aptamer)”란 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미하며, SELEX(Systematic Evolution of Ligands of Exponential enrichment)라는 방법으로 원하는 다양한 목적 물질(단백질, 당, 염색물질, DNA, 금속이온, 세포 등)에 대한 압타머를 개발할 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단용 키트를 제공한다.

- [0083] 본 발명에 있어서, “키트”는 상기 미생물의 존재 수준을 검출하는 제제를 포함함으로써, 영유아의 아토피피부염을 진단할 수 있도록 하는 도구를 의미한다. 본 발명의 키트에는 상기 제제 외에도 이들의 측정 또는 검출 방법에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 이때, 상기 미생물의 존재 수준을 측정하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 작용시킬 수 있으며, 각 물질을 적용하는 전후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너; 지시서; 및 상기 미생물의 존재 수준을 검출하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 상기 제제를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있고, 이들은 부분적 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있으며, 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 지시서를 포함할 수 있다.
- [0086] 또한, 본 발명은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 피험자는 생후 6개월 내지 36개월의 영유아일 수 있고, 생물학적 시료는 분변 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 장내 미생물의 존재 수준은 상기 미생물의 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브를 이용하여 각 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때 상기 미생물 특이적인 유전체 또는 유전자 양은 역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semiQuantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 실시간 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 디지털 PCR(Digital PCR), 액적 디지털 PCR(Droplet Digital PCR), 인 시투 하이브리드화(in situ hybridization), 형광 인 시투 하이브리드화(FISH), RNase 보호 분석법(RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(Southern blotting), RNA 염기서열분석(RNA sequencing) DNA 칩(chip) 및 RNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 정보제공방법은 생후 12개월 이후의 영유아에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 및 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 비-아토피피부염 영유아에 비해 낮은 경우 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 정보제공방법은 생후 6개월의 영유아에서 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)의 존재 수준이 정상 대조군(비-아토피 피부염 영유아)에 비해 높은 경우, 또는
- [0091] 생후 12개월 이후의 영유아에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 및 대장균(*Escherichia coli*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 높거나, 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물의 존재 수준이 정상 대조군에 비해 낮은 경우, 아토피피부염인 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(*UC_Subdoligranulum*), 언에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비

피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 영유아의 아토피피부염 진단 용도를 제공한다.

[0093] 또한, 본 발명은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 앤에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물을 검출하는 제제 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의, 영유아의 아토피피부염 진단을 위한 제제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0094] 또한, 본 발명은 아토피피부염이 의심되는 영유아 피험자와 대조군에서 분리된 생물학적 시료에서 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), UC_서브돌리그라눌룸(UC_Subdoligranulum), 앤에어로스티페스 하드루스(*Anaerostipes hadrus*), 로세부리아 이누리니보란스(*Roseburia inulinivorans*), 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 대장균(*Escherichia coli*), 및 패칼리박테리움 프라우스니치(*Faecalibacterium prausnitzii*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 장내 미생물 존재 수준을 측정한 후, 이 수준 차이가 (2배 이상으로) 증가한 경우 아토피피부염을 가진 피험자임을 가리키는 것으로 보는, 영유아의 아토피피부염 진단에 대한 감수성이 높은 피험자인지 결정/분석하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0096] 본 발명에 있어서, “포함하는”이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.

[0098] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0100] [실시예]

[0101] 실시예 1. 샘플 수집

[0102] 그룹당 샘플 수의 통계적 검정력은 PERMANOVA(순열 다변량 분산 분석)에 기반한 마이크로파워 R 패키지를 사용하여 추정하였다. PERMANOVA 검정력은 이전 연구에서 영유아 장내 미생물 데이터의 가중 UniFrac 거리를 기반으로 계산하였으며, 효과 크기(ω^2)는 그룹당 다양한 샘플 수에 대해 80 % 및 90 % 검정력의 시뮬레이션된 매트릭스를 사용하여 계산하였다(표 1).

표 1

Sample numbers in each group	Simulated omega2 (ω^2)	
	power 80%	power 90%
20	0.3489	0.5773
40	0.0624	0.2551
60	0.0013	0.0409
80	< 0.0001	0.0010
100	< 0.0001	< 0.0001
120	< 0.0001	< 0.0001

[0103]

[0105] 검정력 및 효과 크기를 추정하기 위해 0.05의 유의 수준을 사용하여 100번의 부트스트랩 반복을 수행하였다. 효과 크기는 90%의 변별력에 대해 그룹당 100개 이상의 샘플에서 0.0001보다 작았다. 따라서, 본 발명에서는 그룹당 100개 이상의 샘플을 수집하는 것을 목표로 하였다.

[0106] 본 연구의 피험자는 소아 천식 및 알레르기 질환 연구를 위한 출생 코호트(Cohort for Childhood Origin of Asthma and Allergic Disease, COCOA) (등록된 영유아 3,000명 이상)와 서울아산병원의 소아 천식 아토피에 대한 계통적 코호트에서 모집되었다. COCOA 연구에서 데이터 및 생물학적 샘플 수집은 등록된 모든 소아를 대상으로 알레르기 질환 발생 여부와 관계없이 6개월부터 20세까지 매년 실시하였다. 아토피피부염의 진단은 Hanifin과 Rajka의 기준에 따라 아토피피부염을 진단하였고(Hanifin JM, Rajka G. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1980;92:44-47.), SCORAD 지수(경증 < 25 및 경증을 제외한 중증 ≥ 25)를 사용하여 대변 수집 시 아토피피부염 중증도를 동시에 평가하였다.

[0107] COCOA 코호트에서 생후 6개월에서 36개월 사이의 총 346개 분변 샘플(비-아토피피부염 112명, 경증 아토피피부염 110명, 경증을 제외한 중증 아토피피부염 124명)을 수집하였다. 분변은 서울 소재 5개 대학병원에서 수집하였으며, 각 센터는 시료 채취 후 4시간 이내에 아이스박스에 담아 실험실로 이송하였다. 샘플은 DNA 추출을 위해 처리되기 전에 즉시 -80 °C에 보관하였다.

[0108] 본 연구는 서울아산병원(IRB no. 2008-0616 및 2015-1031), 삼성서울병원(IRB no. 2009-02-021), 세브란스병원(IRB no. 4-2008-0588), 차병원(IRB no. 2010-010), 및 서울대학교병원(IRB no. H-1401-086-550)의 IRB(Institutional Review Boards)에 의해 승인을 받았으며, 각 영유아의 부모로부터 서면 동의서를 얻었다.

[0110] 실시예 2. 16S rRNA 유전자 앰플리콘 시퀀싱

[0111] 제조업체의 지침에 따라 RNeasy PowerMicrobiome Kit(Cat #26000-50, Qiagen, Valencia, CA, 미국)를 사용하여 분변 샘플에서 Metagenomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit(Cat #12997-50, Qiagen)를 사용하여 정제하고 μ Cuvette G1.0(Eppendorf, Hamburg, 독일)이 장착된 BioPhotometer D30을 사용하여 정량화하였다. 16S rRNA 유전자의 V1-V3 영역은 16S metagenomics 시퀀싱 라이브러리(Illumina, Inc., San Diego, CA, 미국)를 준비하기 위한 MiSeq 시스템 프로토콜에 따라 C1000 열 순환기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 증폭시켰다. 제조업체의 지침에 따라 Illumina MiSeq 시스템(300-bp 쌍 말단)을 사용하여 각 샘플의 등물 농도를 풀링하고 시퀀싱하였다.

[0112] QIIME2 파이프라인을 사용하여 앰플리콘(amplicon) 서열을 분석하였다. raw 서열은 품질을 필터링하고 DADA2를 사용하여 노이즈를 제거했으며, 대표적인 서열의 분류학적 위치는 EzTaxon-e 데이터베이스로 지정하였다. 다양성 지수는 교체 없이 희박화한 후 계산하였다. 인간 분변 샘플에서 총 28,804,166개의 리드(샘플당 중앙값 68,045개의 리드)를 서열 분석으로부터 얻었다.

[0114] 실시예 3. 전체 메타게놈 샷건(shotgun) 시퀀싱

[0115] 346개 샘플에서 추출한 DNA를 NEBNext dsDNA Fragmentase(Cat #0348 L, New England Biolabs, Ipswich, MA, 미국)를 사용하여 단편화하였다. 그런 다음, 제조업체의 지침에 따라 ACCEL-NGS 2S PLUS DNA 라이브러리 키트(Cat #21096, Swift Biosciences, Ann Arbor, MI, 미국)를 사용하여 metagenomic 라이브러리를 준비하였다.

[0116] 라이브러리의 크기는 Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 미국)을 사용하여 확인하였으며, 라이브러리의 농도는 PicoGreen dsDNA 분석 키트(Cat #P11496, Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 측정하였다. GenNext NGS 라이브러리 정량화 키트(Cat #NLQ-101, Toyobo, Osaka, 일본)와 함께 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Real Time System III(TaKaRa Bio, Inc., Shiga, 일본)를 사용하여 qPCR로 각 라이브러리의 등물 농도를 계산하였다.

[0117] Illumina HiSeq 2500 시스템(250-bp 쌍 말단)을 사용하여 총 343개의 라이브러리를 풀링하고 시퀀싱하였다.

[0118] WMS는 이전 연구에서 설명한대로 분석하였다(Lee MJ et al. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(4):1310-

1319.). 간단히 말해서, 어댑터 제거 및 품질 필터링은 기본 옵션(선행 및 후행: 3, 슬라이딩 윈도우 크기: 4, 품질: 15, 최소 길이: 150)과 함께 Trimmomatic을 사용하여 수행하였다. 쌍방향 서열은 PEAR v.0.9.11을 사용하여 병합되었다. 같이 검출될 수 있는 인간 유전자는 참조 인간 게놈과 함께 BbMap(<http://sourceforge.net/project/bbmap>)을 사용하여 제거하였다. MetaPhlAn2 v.2.7을 사용하여 분류학적 특징을 얻었으며, HUMAnN2 v.2.8.0.을 사용하여 기능적 특징을 얻었다.

[0120] **실시예 4. 총 세균량의 정량화**

[0121] 분변 샘플에서 박테리아의 상대적인 양은 16S rRNA 유전자에 기반한 정량적 실시간 PCR에 의해 추정되었다. 16S rRNA 유전자는 Thermal Cycle Dice Real-Time System III(TaKaRa Bio, Inc.)을 사용하여 프라이머 340 F(5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3', 서열번호 1) 및 518 R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3', 서열번호 2)로 증폭시켰다.

[0122] 각 샘플은 다음 증폭 조건으로 12.5 μ L의 TB Green Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(Cat #RR820B, TaKaRa Bio, Inc.), 각 프라이머 2 μ M 및 DNA 주형 1 μ L(샘플 DNA의 10배 희석 시리즈)를 함유하는 25 μ L 반응에서 3회 측정되었다: 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 그 다음 95 $^{\circ}$ C에서 5초 동안 변성 및 60 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 어닐링(40 cycle). 역치 주기(Ct) 값을 *Escherichia coli* K12 w3110 균주의 16S rRNA 유전자의 연속 희석($1 \times 10^1 - 1 \times 10^7$)의 병렬 반응에서 생성된 표준 곡선과 비교하여 박테리아 양을 정량화하였다. 모든 표준 곡선에 대한 회귀 계수(r^2)는 0.98 이상이었다.

[0124] **실시예 5. SCFA 분석**

[0125] 분변 짧은 사슬 지방산(short-chain fatty acid, SCFA)은 이전 연구에서 설명한 방법을 변형하여 추출하였다(Fava F et al, Int J Obes (Lond). 2013;37(2):216-223). 아세트산(Cat #338826, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국), 프로피온산(Cat #81910, Sigma), 이소부티르산(Cat #58360, Sigma), 부티르산(Cat #W222100, Sigma), 이소발레르산(Cat #129542, Sigma), 및 발레르산(Cat #240370, Sigma)을 표준 화합물로 사용하였다. 4-메틸발레르산(Cat #277827, Sigma)은 샘플의 각 화합물 양에 대한 최종 조정을 위한 내부 표준(IS)으로 사용되었다. 간략하게, 분변 샘플 20 mg을 추출 용액(450 μ L의 메틸렌 클로라이드, 5 μ L의 IS(10 ppm), 및 25 μ L의 0.6 M HCl)에 현탁시켰다. 현탁액은 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 볼텍싱 및 원심분리(14,000 x g) 후 10분 동안 유도 체화하였다. 마지막으로, 메틸렌 클로라이드 층을 테스트 바이알로 옮기고 기체 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS)에 주입하기 전에 잠시 볼텍싱시켰다.

[0126] GC-MS 분석은 Agilent 7000 삼중 쿼드 질량 분석 검출기(MSD, Cat #G7000-90038, Agilent Technologies)에 연결된 Agilent 7890A 가스 크로마토그래프에서 수행되었다. 유도체는 VF-WAXms 모세관 컬럼(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m 필름 두께, Agilent J & W Scientific, Folsom, CA, 미국)을 이용하여 2.5 mL/분의 유속으로 운반 가스(헬륨)를 사용하여 분리하였다. 샘플 1마이크로리터를 시스템에 주입하였으며, 오븐 프로그램은 80 $^{\circ}$ C에서 2분 동안으로 설정하고, 20 $^{\circ}$ C/분의 속도로 160 $^{\circ}$ C까지, 3 $^{\circ}$ C/분의 속도로 180 $^{\circ}$ C까지, 10 $^{\circ}$ C/min의 속도로 5분 동안 230 $^{\circ}$ C의 최종 온도까지 상승시켰다. 이동 라인 온도는 200 $^{\circ}$ C로 설정하였다. MS 소스는 230 $^{\circ}$ C에서, 사중극자는 150 $^{\circ}$ C에서 유지되었다. 전자 이온화 에너지는 70 eV로 설정하였으며, 질량 스펙트럼 데이터는 선택된 이온 모니터링 모드에서 수집되었다.

[0127] 정량 분석 소프트웨어(MSD, Agilent Technologies)를 사용하여 피크 선택, 표준 곡선 구성 및 SCFA 정량화를 위해 GC-MS 데이터를 처리하였다. 샘플의 각 SCFA 농도는 해당 SCFA 표준의 GC-MS 데이터로 구성된 검정 곡선을 사용하여 계산하였다.

[0129] **실시예 6. 예측 SCFA 대사산물 프로파일링**

[0130] HUMAnN2(UniRef90 유전자 패밀리)에서 얻은 장내 마이크로바이옴의 분변 샘플 및 기능적 유전자 특징에서 측정된 SCFA를 기반으로 SCFA 프로파일을 예측하기 위해 미생물 커뮤니티 대사 프로파일의 모델 기반 게놈 정보 고차원 예측기(MelonnPan v.0.99.0)를 사용하였다.

[0131] raw 측정값을 상대적 풍부도로 정규화한 후, 상대적 풍부도(> 0.01 %) 및 유비율(> 샘플의 10 %)로 기능(유전자

패밀리 및 SCFA)을 필터링 하였다. 트레이닝 세트를 구성하기 위해 41개 샘플에서 SCFA 및 기능적 유전자 특징을 측정하였으며, SCFA는 탄성망 정규화 및 교차 검증을 사용하여 302개 샘플의 기능적 유전자 특징을 기반으로 예측되었다. 샘플간에 측정 및 예측된 대사체 농도 사이의 Spearman 상관 계수(r)를 사용하여 각 대사체의 예측 가능성을 평가하였다.

[0132] 잘 예측된 대사체($r > 0.3$)의 유의성을 테스트하기 위해 대사체 및 유전자 패밀리 테이블 둘 다에서 동일한 레이블을 반복적으로 섞었고, 무작위 데이터에 MelonnPan 모델을 적용하여 유전자와 대사체를 연결하고 원본 데이터와 무작위 데이터에서 예측된 대사체를 비교하였다.

[0133] 부티르산 염(butyrate) 및 프로피온산 염(propionate)은 현재 연구에서 예측된 대사의 10배 교차 검증을 평가한 후 성공적으로 예측되었으며, 예측된 대사체의 정확도는 PCA(Principal Component Analysis) 기반 RTSI(Representative Training Sample Index) 점수로 평가하였다.

[0135] 실시예 7. 통계 분석

[0136] R 소프트웨어 v.4.0.2를 사용하여 통계 분석을 실시하였다. 마이크로바이옴 데이터에 대한 모든 통계 테스트는 양면적이었다.

[0138] 실시예 8. 임상 데이터

[0139] Kruskal-Wallis 테스트는 그룹 간 연속 변수를 비교하는데 사용되었으며, 카이 제곱 테스트는 그룹 간 범주 변수를 비교하는데 사용되었다. 무조건적 로지스틱 회귀 모델을 사용하여 교차비(odds ratio, OR) 및 해당 95 % 신뢰 구간(confidence intervals, CI)을 계산하였다.

[0141] 실시예 9. 미생물 분석

[0142] 비-아토피피부염 그룹과 아토피피부염 그룹 간의 Shannon 다양성 지수의 차이는 Mann-Whitney-Wilcoxon 테스트를 사용하여 분석되었다. 베타 다양성의 차이는 NMDS 플롯을 사용하여 시각화되었고 Bray-Curtis 거리를 기반으로 PERMANOVA(999 순열이 포함된 비건 패키지의 Adonis)로 추론을 테스트하였다.

[0143] 세 그룹 비교를 위해 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 미생물군(microbiota)의 상대적 풍부도 차이를 분석하고, Dunn 테스트를 사용하여 그룹 간의 쌍별 차이를 식별하였다. Dunn의 테스트는 R의 'dunn.test' 패키지를 사용하여 수행되었으며, 근사 정규 분포를 사용하여 p-값을 계산하였다. P-값은 Benjamini-Hochberg 거짓 발견율(false discovery rate, FDR) 다중 테스트, 수정을 사용하여 조정되었다. q (조정된 p-값) < 0.05 인 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. WMS 데이터는 누적 합 스케일링(CSS) 방법을 사용하여 정규화되었으며, 선형 모델(MaAsLin2)과의 다변량 연관을 사용하여 그룹 간 CSS에 의한 정규화된 풍부도의 차이를 분석하였다.

[0144] Bray-Curtis 비유사성을 기반으로 한 LOESS(Locally Weighted Scatterplot Smoothing) 회귀 분석을 통해 연령에 따른 동일 집단 내 장내 미생물군 이질성을 결정하였으며, Kruskal-Wallis 테스트 및 Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 이질성을 평가하였다. 또한, Mann-Whitney U 테스트 및 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 그룹 간 정량적 실시간 PCR 결과의 유의성을 계산하였다.

[0146] 실시예 10. DMM 클러스터링

[0147] R 패키지 DirichletMultinomial과 함께 DMM 모델링을 사용하여 모든 샘플에서 장내 미생물군의 분산을 분석하였다. 16S 및 WMS 간의 결과를 비교하기 위해 속 수준에서 DMM 클러스터링을 수행하였다. 가장 낮은 Laplace 근사 점수가 클러스터 수를 결정하였다.

[0149] 실시예 11. 지표 종(species) 분석

[0150] R 소프트웨어의 indicpecies 패키지의 'multipatt' 기능을 사용하여 각 연령의 지표 종을 결정하였다. 지표 종을 식별하기 위해 적어도 하나의 그룹에서 유병률이 10 %보다 크고 평균 상대적 풍부도가 0.01 %보다 큰 종을 선택

하였다. 이 절차는 동일한 종을 임의로 그룹에 할당할 때보다 사전 정의된 그룹에서 특정 종이 훨씬 더 풍부한 지 여부를 결정하는 통계적 방법이다. 비-아토피피부염 미생물군은 각 연령에서 지표 종을 결정하였다. 연령과 지표의 연관성의 유의성은 10,000 순열을 사용하여 테스트되었다. $p < 0.05$ 인 결과는 각 연령의 지표로 간주되었다. 결과 지표는 공변량 조정 후 MaAsLin2의 다변량 분석으로 평가되었다.

[0152] 실시예 12. 랜덤포레스트 모델

[0153] R 패키지 Ranger를 사용하여 112개의 비-아토피피부염 샘플(6-36개월)의 WMS에서 얻은 박테리아 종의 상대적 풍부도를 기반으로 장내 미생물군 연령을 모델링하기 위해 랜덤포레스트 회귀를 수행하였다. 아토피피부염이 없는 영유아의 미생물군 생활나이(chronological age)는 예상 미생물군 연령(estimated microbiota age, EMA)을 예측하기 위한 트레이닝 세트로 사용되었다. 박테리아 종의 변화로 정의된 결과 예측 모델은 이후 Ranger의 '예측' 기능을 사용하여 모든 피험자에게 적용되었다. 이러한 추정치는 장내 미생물군 성숙에 대한 프록시(proxy)로 사용되었다. 다음으로 트레이닝 세트의 독립성을 확인하기 위해 모델 구축에 포함되지 않은 샘플로 모델을 제한하여 민감도 분석을 수행하였다.

[0154] 미생물군 연령을 추정하기 위해, 랜덤포레스트 패키지의 'rfcv' 기능으로 N 상위 차별 종을 식별하였으며, 이전 연구에서 설명한 대로 그룹 간 장내 미생물군의 성숙도를 비교하기 위해 MAZ(microbial-by-age z-score)를 계산하였다(Galazzo G et al, Gastroenterology. 2020;158(6):1584-1596.). 낮은 MAZ는 미생물군 발달의 지연을 나타낸다.

[0155] 또한, 유사한 프로세스를 사용하여 비-아토피피부염 그룹과 아토피피부염 그룹 간의 장내 미생물군 발달 변화에 따라 SCFA 프로파일의 장내 미생물 불균형을 분석하기 위한 SAZ(SCFAs-by-age z-score)를 추정하고 트레이닝 세트를 사용하여 SCFA 연령 점수를 예측하였다. SAZ 및 MAZ 간의 연관성을 분석하기 위해 선형 회귀 모델과 Pearson 상관 테스트를 사용하였다. 또한 각 표현형 그룹에서 SAZ와 관련된 종을 식별하기 위해 Spearman 상관 관계를 사용하였다.

[0157] 실시예 13. 기능적 특징 분석

[0158] 장내 마이크로바이옴의 기능적 특징은 KO 범주를 사용하여 분석되었다. 연령에 따라 크게 다른 특징은 공변량($q < 0.05$)에 대한 조정 후 MaAsLin2에 의해 선택되었다. N 상위 차별 KO는 랜덤포레스트 패키지의 'rfcv' 기능으로 선택되었다.

[0159] butyrate 및 propionate 대사에 관여하는 유전자 패밀리를 각 연령에서 표현형 그룹 간에 비교하였으며, MaAsLin2는 공변량을 조정한 후 각 연령에서 표현형 그룹 간의 유전자 패밀리의 차이를 평가하였다. Kruskal-Wallis 테스트와 Dunn 테스트를 사용하여 각 연령에서 표현형 그룹 간에 서로 다른 KO 및 유전자 패밀리의 유의성을 평가하였다. P-값은 Benjamini-Hochberg 방법을 사용하여 조정되었다. $q < 0.05$ 인 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0161] [실험예]

[0162] 실험예 1. 아토피피부염을 가진 영유아의 연령에 따른 장내 미생물군 확인

[0163] 영유아의 장내 미생물군은 GMT(gut microbiota)1 및 GMT2 두 가지 유형으로 분류하였으며, 각 표현형 그룹의 연령에 따른 장내 미생물군의 변화를 연구하기 위해 각 연령별 지표 종을 분석하였다. 적어도 하나의 그룹에서 유병률이 10 %보다 크고 평균 상대적 풍부도가 0.01 %보다 큰 종을 지표 종으로 선택하였으며, 각 표현형 그룹의 연령에 따른 지표 종을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Indicator species	Indicator Age	R-squared	P value	Non-AD		Mild AD		Moderate to Severe AD	
				Mean relative abundance (%)	Prevalence (%)	Mean relative abundance (%)	Prevalence (%)	Mean relative abundance (%)	Prevalence (%)
<i>Bifidobacterium longum</i>	6 months	0.546	0.0002	39.22	100.0	40.49	100.0	62.11	100.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	6 months	0.364	0.0066	1.24	74.2	0.93	76.9	2.14	66.7
<i>Streptococcus mitis oralis pneumoniae</i>	6 months	0.335	0.0034	0.14	64.5	0.06	61.5	0.07	66.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 months	0.329	0.0118	1.20	71.0	1.56	61.5	0.60	44.4
<i>Escherichia coli</i>	6-12 months	0.369	0.0071	7.35	91.3	5.15	93.5	7.20	89.1
<i>Klebsiella_unclassified</i>	6-12 months	0.330	0.0120	0.10	54.3	0.09	45.2	0.06	28.3
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	7-12 months	0.355	0.0048	1.41	26.7	0.34	38.8	0.23	35.1
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	7-12 months	0.320	0.0213	18.36	53.3	11.77	65.3	8.24	48.6
<i>Bifidobacterium breve</i>	7-12 months	0.318	0.0180	6.72	73.3	13.06	89.8	8.53	75.7
<i>Bacteroides ovatus</i>	13-24 months	0.389	0.0018	5.36	41.7	2.70	31.3	1.27	30.6
<i>Oscillibacter_unclassified</i>	13-24 months	0.352	0.0065	1.49	50.0	0.25	21.9	0.15	22.4
<i>Alistipes finegoldii</i>	13-24 months	0.330	0.0033	3.08	66.7	0.03	6.3	0.12	6.1
<i>Alistipes_unclassified</i>	13-24 months	0.323	0.0020	1.98	33.3	0.07	3.1	0.09	8.2
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	13-36 months	0.529	0.0001	14.15	90.9	11.24	84.4	13.37	87.2
<i>Bacteroides fragilis</i>	13-36 months	0.358	0.0075	6.26	89.4	2.00	53.3	4.65	57.7
<i>Ruminococcus bromii</i>	13-36 months	0.341	0.0150	4.95	63.6	4.26	42.2	4.53	48.7
<i>Dialister invisus</i>	13-36 months	0.303	0.0217	6.27	48.5	2.13	24.4	2.10	26.9

[0164]

[0166]

지표 중 분석 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 지표 종은 비-아토피피부염(non-AD) 그룹에서 연령에 따라 점진적으로 이동한 반면, 아토피피부염(AD) 그룹에서는 급격한 변화를 보였다. 비-아토피피부염에서는 통성 혐기성 세균(facultative anaerobes)이 12개월까지의 지표였고, 완전 혐기성 세균(strict anaerobes)은 12개월 이후의 지표였다.

[0167]

또한, 6개월째에 *Bifidobacterium longum*은 모든 그룹에서 우세한 지표였으며, 아토피피부염의 중증도에 따라 유의적으로 차이나는 종은 없었다($q > 0.05$). *B. bifidum* 및 *B. breve*는 7-12개월에서 우세한 지표였으며, 대장균의 상대적 풍부도는 이 연령에서 경증 아토피피부염 그룹보다 경증을 제외한 중증 아토피피부염 그룹에서 더 높았다($q < 0.05$). *Alistipes finegoldii*, 분류되지 않은(unclassified, UC)_*Oscillibacter*, 및 UC_*Alistipes*의 비율은 13-24개월에 아토피피부염 그룹보다 비-아토피피부염에서 더 높게 검출되었다($q < 0.05$). *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus bromii* 및 *Dialister invisus*는 13-36개월에서 지표 종이었으며, *B. fragilis* 및 *D. invisus*의 상대적 풍부도는 25-36개월에 아토피피부염 그룹보다 비-아토피피부염 그룹에서 더 높았다($q < 0.05$).

[0169]

실험예 2. 예상 미생물군 연령 분석을 통한 아토피피부염 그룹의 무분별한 장내 미생물군 발달 확인

[0170]

랜덤포레스트 모델링을 통해 아토피피부염의 중증도에 따른 생애 초기 동안의 장내 마이크로바이옴 발달을 분석하기 위해 연령별로 종(species) 프로파일을 비교하였다. 도 2a는 112개의 비-아토피피부염 샘플에서 EMA의 예측 모델에서의 종의 중요성을 나타낸 것으로, 교차 검증 오차가 가장 낮은 16종을 선정하였다(내부 그래프). 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 *Bacteroides fragilis* 및 *F. prausnitzii*는 예측 모델에서 가장 영향력 있는 종임을 확인하였다.

[0171]

또한, 도 2b에 나타난 바와 같이 아토피피부염 그룹의 장내 미생물군은 6개월에 비-아토피피부염 그룹에 비해 매우 성숙한 반면, 장내 미생물군 성숙의 지연이 12개월 후에 연령에 따른 마이크로바이옴의 변화 수치(microbial-by-age z-score, MAZ) 분석에서 관찰되었다. 즉, 12개월 이후부터 장 성숙도에 차이가 나기 시작하는 것을 알 수 있었다.

[0172]

도 2c에 나타난 바와 같이 *Bacteroides fragilis*, UC_*Subdoligranulum*, *Anaerostipes hadrus* 및 *Roseburia inulinivorans*는 12개월 후 아토피피부염 그룹에서 낮은 MAZ와 유의한 상관관계를 가지는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

[0173]

또한, 미생물군에 미치는 영향은 중증도에 따라 아토피피부염 그룹에서 다르게 나타났다. 이는 아토피피부염 그룹에서 *B. fragilis* 및 UC_*Subdoligranulum*의 상대적 풍부도가 낮은 무분별한 장내 마이크로바이옴 발달과 관련이 있을 수 있다.

[0174]

이러한 결과로부터 장내 마이크로바이옴의 성숙 지연이 아토피피부염 발생 및 중증도에 영향을 줄 수 있으며, 12개월에 *B. fragilis*, UC_*Subdoligranulum*, *Anaerostipes hadrus*, 및 *Roseburia inulinivorans*가 질환을 예측하는 바이오마커 및 근거로 작용 가능성을 알 수 있었다.

[0176] **실험예 3. 아토피피부염 그룹의 무분별한 미생물군 발달에 의한 연령에 따른 SCFA 프로파일 변화 확인**

[0177] 아토피피부염인 영유아의 장내 마이크로바이옴 발달의 차이로 인한 SCFA 프로파일 변화를 확인하기 위해, 기계 학습 알고리즘을 트레이닝하여 그룹 간 SCFA 프로파일을 비교하였다. 연령에 따른 SCFA 변화 수치(SCFA-by-age z-score, SAZ)는 연령과 함께 아토피피부염 그룹에서 SCFA 프로파일의 장내 세균 불균형을 분석하기 위해 계산되었다. 도 3a에 나타난 바와 같이 부티르산 염은 프로피온산 염보다 예측 모델에 더 유의적으로 기여하는 것을 확인하였다.

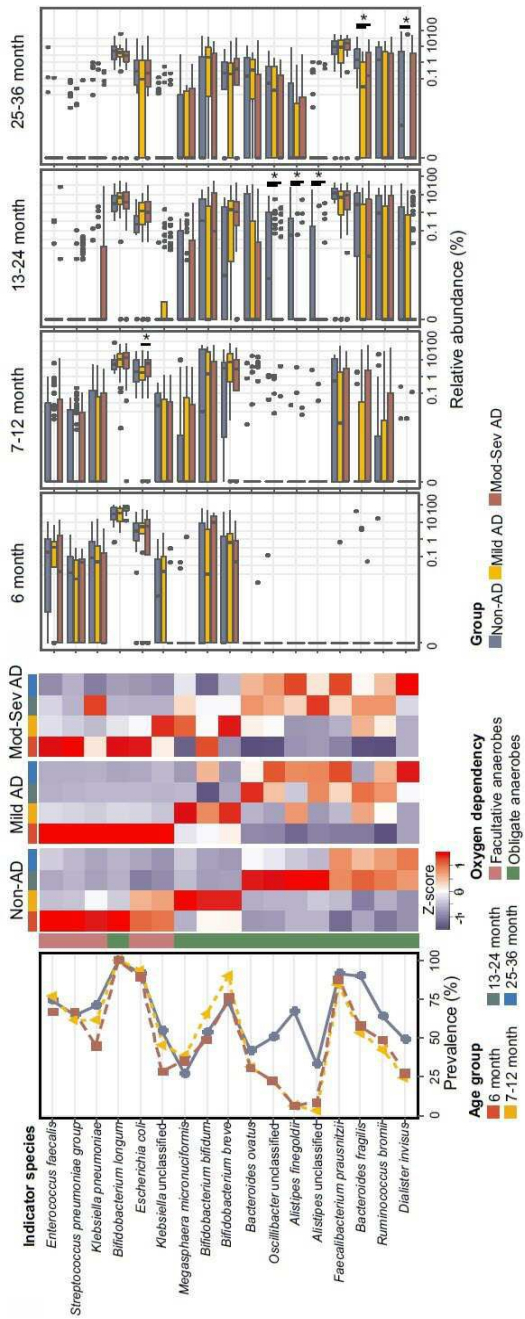
[0178] 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이 아토피피부염 그룹의 SCFA 프로파일은 12개월 이전에 비-아토피피부염 그룹에 비해 고도로 성숙되었다. 그러나 아토피피부염 그룹은 12개월 후에 성숙이 지연되었으며, 도 3c에 나타난 바와 같이 이는 장내 미생물군 발달과 일치한다(SAZ와 MAZ 사이의 상관계수 R 값 ≥ 0.77 , $p < 0.001$). 이러한 결과는 무분별한 장내 미생물군 발달이 조절되지 않은 SCFA 생성과 관련이 있음을 나타낸다.

[0179] 도 3d에 나타난 바와 같이, 아토피피부염 그룹에서 *B. breve*의 상대적 풍부도는 6개월에 높은 SAZ와 유의하게 연관되었다($p = 0.012$). 반대로, 통성 혐기성 세균(*K. pneumoniae*, *C. freundii* 및 *E. coli*), *B. fragilis*, 및 *F. prausnitzii*의 상대적 풍부도는 12개월 후 아토피피부염 그룹에서 낮은 SAZ와 연관성을 보이는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

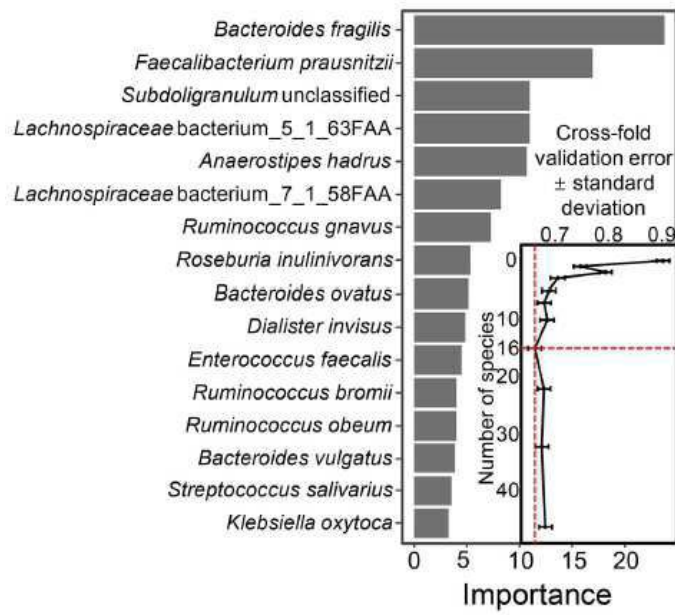
[0181] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

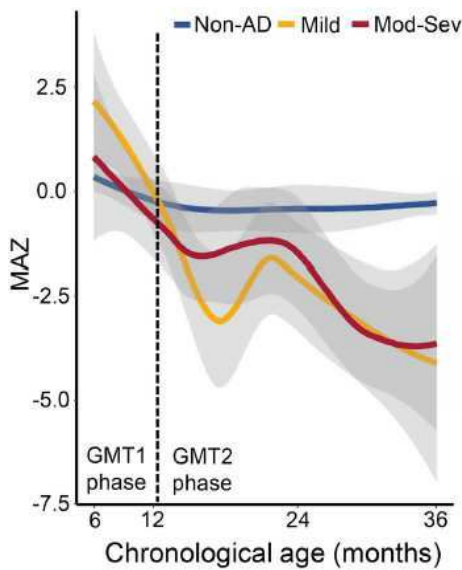
도면1



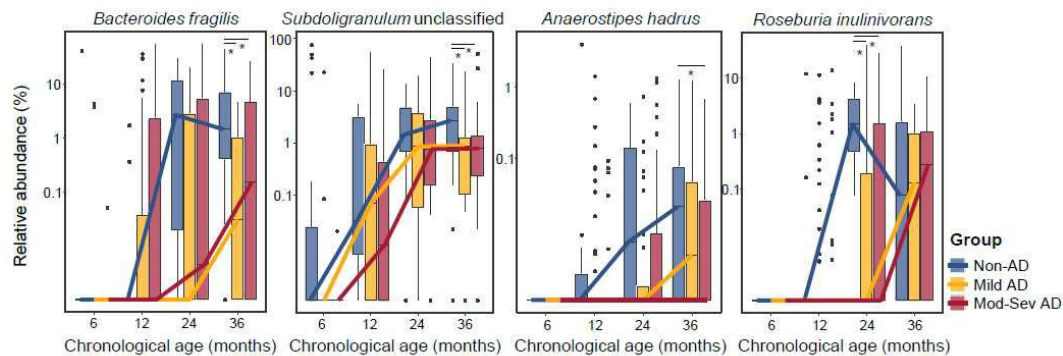
도면2a



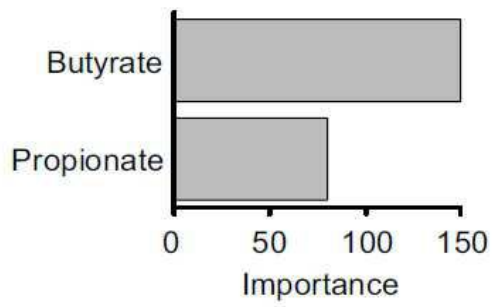
도면2b



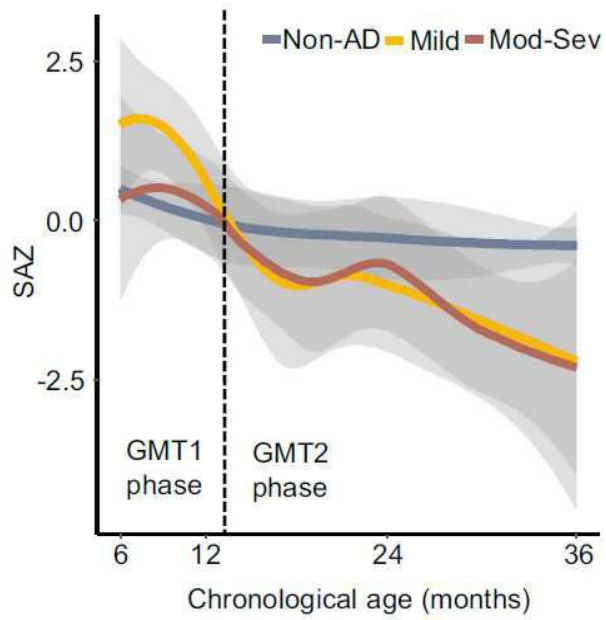
도면2c



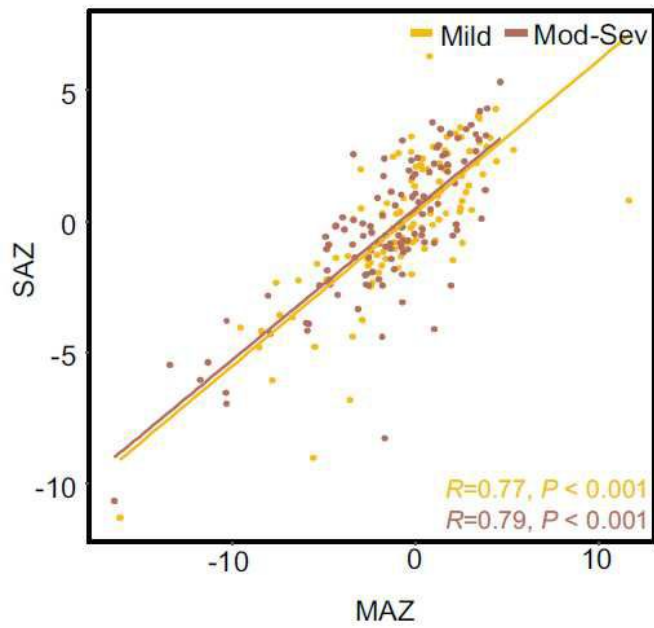
도면3a



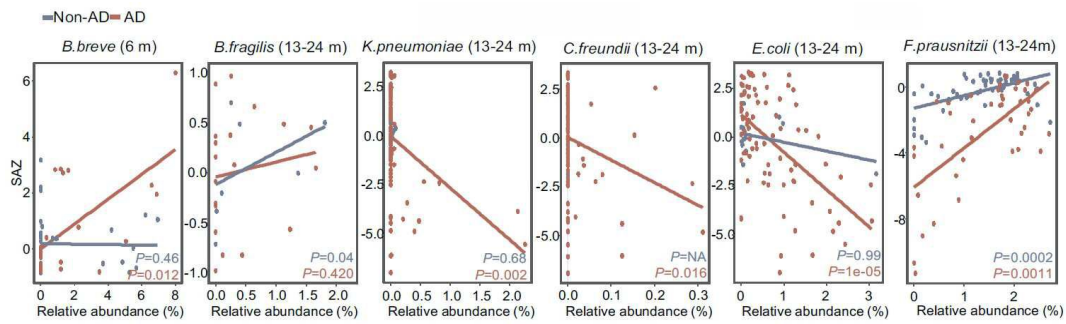
도면3b



도면3c



도면3d



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.