



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049117
(43) 공개일자 2024년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 8/99 (2017.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0013378
(22) 출원일자 2023년02월01일
심사청구일자 2023년02월01일
(30) 우선권주장
1020220128307 2022년10월07일 대한민국(KR)

(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
(압구정동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

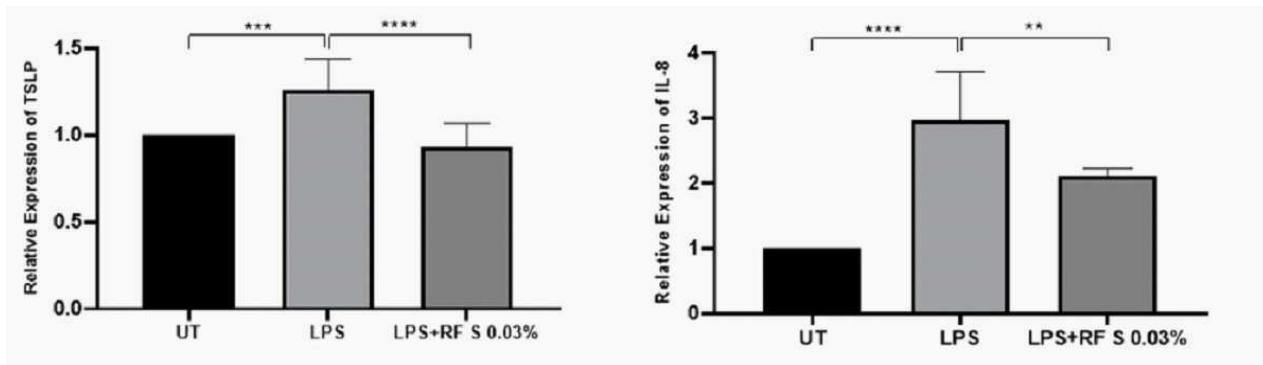
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 루미노코커스 그나부스 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액이 TSLP 및 IL-8의 발현을 억제시키고, 대사물질인 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine) 및 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol)이 포함되어 있음을 확인한 바, 보다 안전하게 염증성 피부질환에 대한 약학 조성물, 건강기능식품 조성물 및 화장품 조성물 등 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/99 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (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	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.05.24

명세서

청구범위

청구항 1

루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 배양액은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양과정에서 생성되는 대사물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 대사물질은 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine) 및 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 염증성 피부질환은 아토피 피부염, 알러지성 피부염, 건선, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 홍반성 루프스 및 구진상 두드러기로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액은 TSLP 또는 IL-8의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 약학 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 약학 조성물은 조성물 총 100 중량부에 대해 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 0.01 내지 10 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선

용 화장품 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 화장품 조성물은 용액, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 보습 크림, 영양 에센스, 젤 및 로션으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 루미노코커스 그나부스 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 아토피피부염은 전 세계적으로 유병률이 약 20% 정도로서 학동전기 소아에서 약 80%가 발생하고 있으며, 지속적으로 증가하고 있으나, 아직까지 증가의 원인을 알지 못하고, 발생 기전 또한 여러 가지 가설로만 이루어져 있다. 출생 후 3년 이내는 면역 체계가 발달하며 동시에 면역 발달과 밀접한 관계가 있는 장 마이크로바이옴의 조성이 구축되는 시기인데, 이 시기의 장내 마이크로바이옴의 변화가 아토피피부염 발생에 결정적인 영향을 줄 것으로 보고되고 있다.

[0003] 아토피 피부염은 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] 아토피 피부염의 기본적인 치료로 피부의 청결과 건조 방지를 위해 보습제의 사용, 피부염증을 완화시키기 위해 경구용 항히스타민제, 스테로이드제, 면역억제제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 생균제 등의 치료제제의 사용 및 광화확요법 등 무수히 많은 치료 요법을 사용하고 있으나, 이러한 체제를 장기간 사용 시 피부 위축 및 팽창, 혈관 및 모공 확장, 피부 변색 등의 부작용이 유발될 뿐 아니라, 아토피 피부염의 특성상 만성적이거나 재발을 자주하면서 질환에 대한 회의와 스테로이드제와 같은 약물의 부작용에 대한 우려도 커 제대로 된 치료가 이루어지지 못하거나, 검증되지 않은 치료 방법에 의존하여 결국 악화와 호전을 반복하는 만성질환이 되는 경우도 많다.

[0005] 따라서, 부작용이 없고 인체에 안전한 천연물 유래 아토피 피부염 치료제가 꾸준히 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 일본 공개특허 32536865 (2020.12.17)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액이 TSLP 및 IL-8의 발현을 억제시키고, 대사물질인 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine) 및 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol)이 포함되어 있음을 확인한 바, 보다 안전하게 염증성 피부질환에 대한 약학 조성물, 건강기능식품 조성물 및 화장품 조성물 등에 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 루미노코커스 그나부스 균주 배양액에 의한 Caco-2 세포에서의 TSLP 및 IL-8의 변화를 확인한 결과이다.

도 2는 장 모사 시스템의 배양액에서 대사체 프로파일링 결과이다.

도 3은 사람 혈액에서 대조군과 아토피피부염군의 대사체 프로파일링 결과이다. (A는 리소포스파티딜콜린, B는 리소포스파티딜에탄올아민)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 배양액은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양과정에서 생성되는 대사물질을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 대사물질은 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine) 및 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 염증성 피부질환은 아토피 피부염, 알러지성 피부염, 건선, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 홍반성 루프스 및 구진상 두드러기로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액은 TSLP 또는 IL-8의 발현을 억제시킬 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 경구용 제제, 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화될 수 있다.

[0023] 상기 약학 조성물은 조성물 총 100 중량부에 대해 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 0.01 내지 10 중량부로 포함될 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전

분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0026] 또한, 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0027] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 화장료 조성물은 용액, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 보습 크림, 영양 에센스, 젤 및 로션으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 상기 화장료 조성물은 용액, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 보습 크림, 영양 에센스, 젤 및 로션으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물인 경우, 상기 화장료 조성물은 상기 유효성분 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 상기 화장료 조성물의 제형은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 화장료 조성물은 유액, 스킨, 토너, 선 스크린, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 팩, 연고, 패치,

스틱, 샴푸, 린스, 스프레이, 메이크업 제거제 및 세정제 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아님을 명시한다.

[0034] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0035] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0036] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0037] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 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 이해해야만 한다.

[0043] <실시 예 1> 루미노코커스 그나부스 배양액에 의한 사람 세포에서의 사이토카인 발현 확인

[0045] 1. 사람 결장 상피 세포의 배양

[0046] Caco-2 세포를 60 π 셀 걸쳐 디쉬에 1.0x10⁵ 개/dish을 넣고 FBS(10% Fetal Bovine Serum)과 1x 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium)에 70~80%정도의 수율로 키웠다.

[0048] 2. 루미노코커스 그나부스 균주의 배양액의 습득

[0049] 루미노코커스 그나부스는 제한 배지(defined media)에서 37℃ 혐기배양 하였다. 배양 후 10,000xg에서 1시간 원심분리하여 박테리아를 최대한 제거한 후 0.2 μm 필터에 여과하여 내독소를 제거하여 균주 배양액을 얻었다.

[0051] 3. 사람 결장 상피 세포와 루미노코커스 그나부스 배양액의 공배양

[0052] 사람 결장 상피 세포를 FBS 스타베이션(starvation) 시켰다. 방법은 3% FBS와 DMEM, 1x 페니실린-스트렙토마이신을 넣은 배지에 1시간 적응시킨 후, FBS가 없고 DMEM, 1x 페니실린-스트렙토마이신에 넣어 3시간 키웠다. 지질다당류(LPS; 1 μg/ml)와 균주 배양액 0.03%를 조건에 맞추어 처리하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃ 배양조건으로 키웠다.

[0054] 4. qRT-PCR

[0055] TSLP(Thymic stromal lymphopoietin)와 IL-8의 상대정량을 측정하였다. 배양된 셀은 RNeasy Kit(Qiagen)의 프로토콜에 따라 RNA를 추출하였다. cDNA는 1µg RNA를 cDNA synthesis Kit(Wizbiosolutions, Korea)를 활용하여 합성했다. qPCR은 ABI 7900 system(Applied Biosystems, Piscataway, NJ)의 TaqMan 방법을 활용하여 분석하고, 정규화는 GAPDH를 활용하여 수행했다.

[0057] 5. 결과

[0058] 루미노코커스 그나부스 배양액에 의한 사람 세포에서의 사이토카인 발현 확인하기 위해, Caco-2 세포에 루미노코커스 그나부스 배양액을 처리하여 TSLP 및 IL-8 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 1에 따르면, TSLP 및 IL-8 발현이 루미노코커스 그나부스 배양액을 처리한 군(LPS+RF)이 그렇지 않은 군(LPS)에 비해 모두 유의하게 감소함을 확인하여 루미노코커스 그나부스 배양액이 아토피 피부염의 치료제로 활용할 수 있음을 알아냈다.

[0060] <실시 예 2> 배양액 및 사람 혈액에서 대사체 프로파일링 방법

[0062] 1. 대사산물 추출

[0063] 인간 혈장 및 배양 배지 대사산물은 각각 두 가지 다른 용매(메탄올 및 이소프로필알코올)로 추출하였다. 메탄올 추출에서 제조된 샘플을 80% 메탄올로 1:6 비율로 균질화한 후 4℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이소프로필알코올 추출에서 제조된 샘플을 이소프로필알코올과 1:4 비율로 균질화한 후 -20℃에서 60분간 배양하였다. 추출된 샘플을 15,000 xg에서 15분 동안 원심분리한 후, 5µl의 상청액을 UPLC-MS/MS 시스템에 주입했다. 모든 샘플은 기술적 편향을 줄이기 위해 배열이 무작위로 지정되었다.

[0065] 2. UPLC-MS를 사용한 대사산물 프로파일링

[0066] 크로마토그래피 시스템은 Q-TOF 질량 분석기(Synapt G2-Si, Waters, USA)와 결합된 Waters Acquity UPLC 시스템(Waters, USA)으로 구성되었다. 메탄올로 추출한 시료의 분리를 위해 이동상(0.4ml/min으로 제공)은 (A) 0.1% 포름산(v/v)이 포함된 물 및 (B) 0.1% 포름산(v/v)이 포함된 아세트오니트릴로 구성되었다. Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1mm x 100mm, 1.7µm)에서 크로마토그래피 분리를 수행했다. 이소프로필 알코올을 사용한 샘플 추출에서 이동상(0.4ml/min으로 제공)은 (A) 0.1% 포름산(v/v)과 10mM 포름산 암모늄이 포함된 아세트오니트릴/물(60/40, v/v) 및 (B) 0.1% 포름산(v/v) 및 1mM 포름산암모늄이 포함된 이소프로필 알코올/아세트오니트릴(90:10, v/v)로 구성되었다. 크로마토그래피 분리는 Acquity UPLC CSH C18 컬럼(2.1mm x 100mm, 1.7µm)에서 수행되었다. MS 분석은 m/z 50에서 1500까지 포지티브 및 네거티브 스캔 모드 모두에서 수행되었다. 질량 분석 매개변수는 다음과 같이 설정되었다. 모세관 전압 = 2,000V; 콘 전압 = 20V; 소스 온도 = 110℃; 탈용매 온도 = 550℃; 및 탈용매 가스 흐름 = 900L/h. 측정된 질량의 정확성을 보장하기 위해 류신-뇌세팔린을 참조했습니다(포지티브 모드에서 m/z 556.2771, 네거티브 모드에서 m/z 554.2615). 품질 관리(이하 QC 라함.) 샘플은 분석할 모든 샘플의 동일한 분취량을 혼합하여 준비된 풀링된 샘플이었다. QC 샘플은 분석 실행 전체에 걸쳐 6개 샘플마다 주입되었다. 데이터는 MassLynxTM4.1software(Waters, USA)를 사용하여 처리되었다.

[0068] 3. 데이터 처리 및 통계 분석

[0069] 원시 MS 데이터는 Progenesis QI 소프트웨어(Nonlinear Dynamics, USA)를 사용하여 처리되었다. 추출 방법 및 전자분무 이온화(esi) 모드(추출 방법-esi 모드: MeOH-양성, MeOH-음성, IPA-양성, IPA-음성)에 따라 MS 스펙트럼 데이터를 각각 분석했다. MS 전처리에는 머무름 시간, 피크 피킹, 디콘볼루션 및 피크 품질 평가를 사용한 자동 정렬이 포함되었다. 결측값이 50% 이상인 특징(대사체)은 분석에서 제외되었다. 확인된 대사산물의 피크 면적은 MetaboAnalyst 4.0을 사용하여 통계 분석되었다. 데이터 세트는 합계에 의해 정규화되고, 로그 변환되고, 파레토 스케일링을 사용하여 스케일링되었다. MetaboAnalyst 4.0 도구를 사용하여 전체 대사체학 데

이더 세트에 대해 단변량(양측 스튜던트 t-검정) 및 다변량(PLS-DA) 통계 분석을 수행했다.

4. 대사산물의 식별 및 분류

선택된 대사산물의 질량 스펙트럼 단편화 패턴은 탠덤 질량 분석법(MS/MS)을 사용하여 얻었다. 대사산물 주석은 CFM-ID 3.0 및 MyCompoundID를 사용하여 대사산물 공개 데이터베이스와 측정된 단편화 패턴 및 정확한 질량 대전하 비율(m/z) 값을 일치시켜 수행되었다. 검색에서 여러 히트가 반환되는 경우 HMDB(Human Metabolome Database) 및 메틸린(METILIN)을 사용하여 피크 패턴 일치를 수동으로 확인하고 검증했다. 주석이 달린 대사산물의 분류는 HMDB를 기반으로 결정되었다.

5. 결과

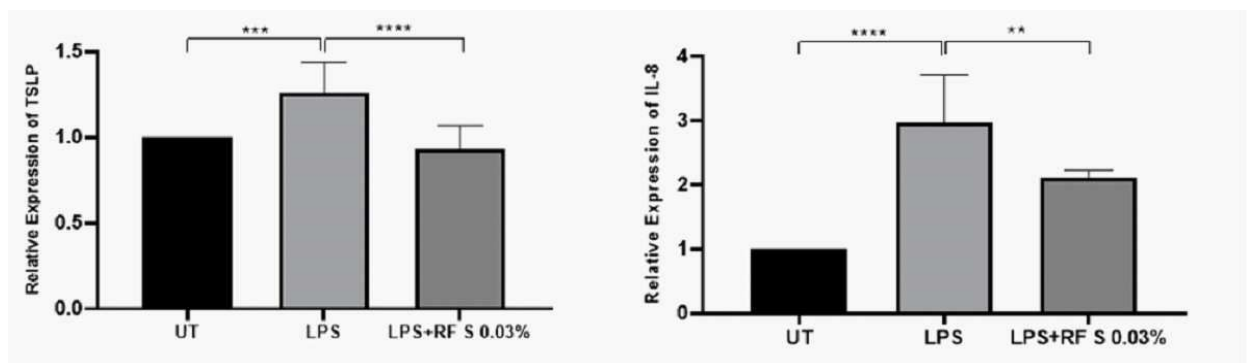
장 모사 시트칩 배양액에서 대사체 프로파일링 결과, 도 2에 따르면, 루미노코커스 그나부스 배양액이 대조군에 비해 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜세린(Phosphatidylserine) 및 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol)의 양이 증가했음을 알 수 있었다. 또한, 도 3에 따르면, 사람 혈액에서 아토피 피부염 환자는 대조군에 비해 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine) 및 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine)이 감소함을 확인하였다.

즉, 아토피 피부염 환자군에서 부족한 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine) 및 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine)을 루미노코커스 그나부스 배양액 투여시 보완해 줄 수 있으며 아토피 피부염을 치료할 수 있음을 확인하였다.

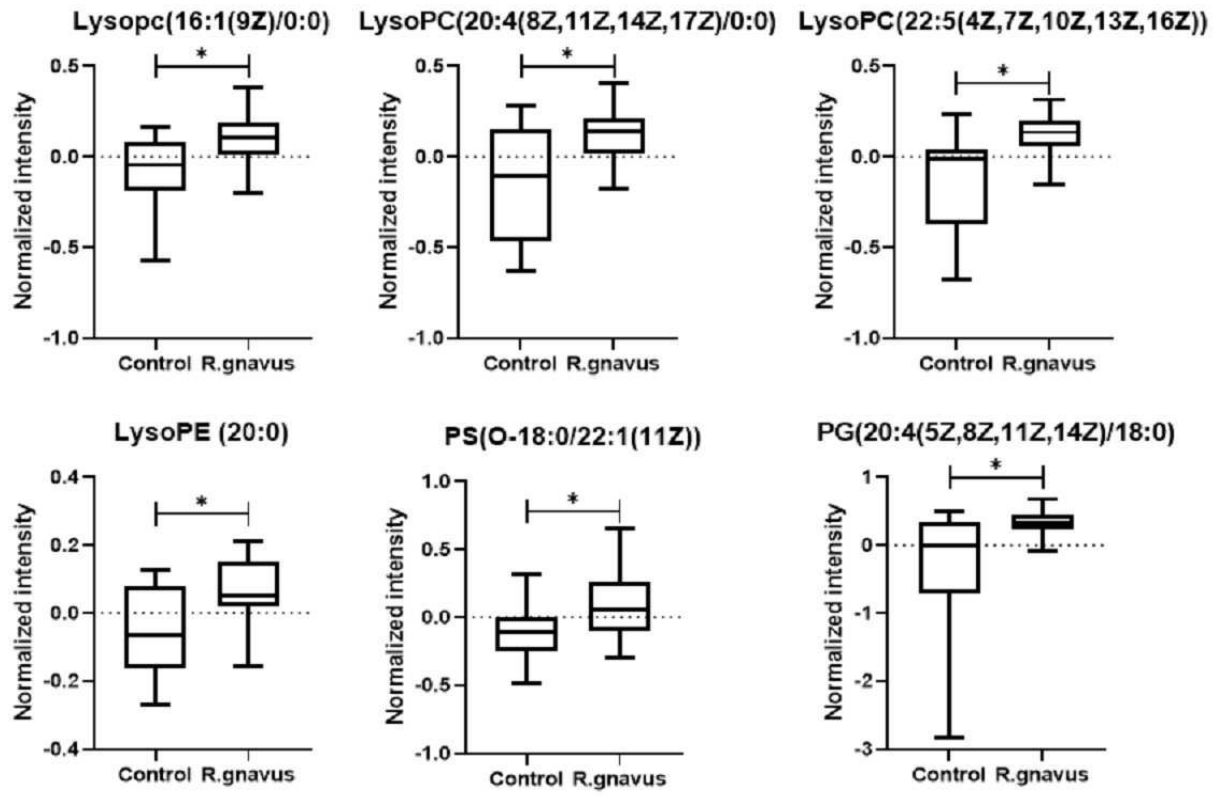
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

