



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0147808
(43) 공개일자 2024년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0041859

(22) 출원일자 2023년03월30일
심사청구일자 2023년03월30일

(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 압구정로29길 71, 33동 801호
(압구정동, 현대아파트)

김정현

서울특별시 강남구 현릉로590길 63, 507동 1103호
(세곡동, 강남대시앙파크)

양송이

인천광역시 남동구 서창남순환로 190-15, 712동
901호 (서창동, 서창퍼스트뷰아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

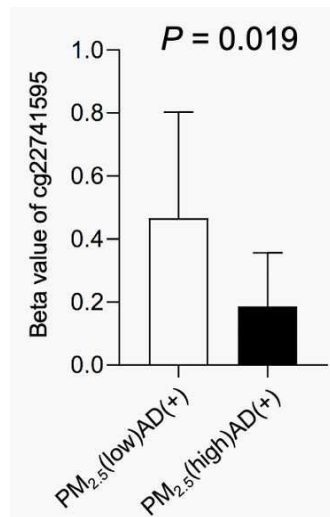
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 RSF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 RSF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 임신 중 산모가 미세먼지에 노출될 경우, 태반의 RSF1의 메틸레이션이 감소되어 발현이 증가됨을 확인하여, 산모로부터 태어난 영유아의 아토피피부염을 진단할 수 있는 것으로, 바이오마커 조성물, 진단 키트 및 약학 조성물 등 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157072
과제번호	2022R1C1C1010928
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한림대학교
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	후성유전체-전사체의 통합 오믹스 기반 임신 중 미세먼지 노출에 의한 아토피피부염
맞춤 의료 바이오마커 발굴 및 개념 증명 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

RSF1(Remodeling And Spacing Factor 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에서,

상기 영유아는 미세먼지에 과노출된 산모에서 태어난 영유아인 것을 특징으로 하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

청구항 1에서,

상기 RSF1은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

청구항 1에서,

상기 RSF1은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에서 유래한 것을 특징으로 하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

청구항 4에서,

상기 시료는 산모에서 분리된 태반, 세포주, 생검체, 포르말린-고정된 파라핀-포매(formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 조직, 신체 유체 (body fluid), 대변, 소변, 혈장, 혈청, 전혈, 단리된 혈액 세포 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

RSF1 단백질의 발현 또는 활성 수준, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 7

청구항 7에서,

상기 RSF1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 서열번호 2 내지 서열번호 33의 염기서열을 가진 프로브로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 8

RSF1 유전자 프로모터 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 9

청구항 8에서,

상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 서열번호 35 내지 37의 염기서열을 가진

상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머인 것을 특징으로 하는 아토피피부염 진단용 조성물.

청구항 10

청구항 6 내지 청구항 9의 조성물을 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 키트.

청구항 11

미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료로부터 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 측정하는 제 1단계;

상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 제 2단계; 및

상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 RSF1 단백질의 발현 수준이 대조군의 시료보다 높거나, 상기 RSF1 유전자의 mRNA 메틸화 수준 또는 RSF1 단백질의 메틸화 수준이 대조군의 시료보다 낮은 경우 미세먼지에 노출된 산모에서 태어난 영유아가 아토피피부염이라고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

RSF1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에 시험물질을 접촉시키는 제 1단계;

상기 시험물질을 접촉한 시료에서 RSF1 단백질의 발현 정도를 측정하는 제 2단계; 및

대조군 시료와 비교하여 상기 RSF1 단백질의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RSF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 이전 다른 연구들에서 출생 후 미세먼지 노출은 다양한 피부 질환의 발생 및 악화에 악영향을 미친다고 보고되었다. 출생 후 미세먼지 노출 뿐 아니라 출생 전 노출도 면역 기능 장애, 산화 스트레스 및 DNA 메틸화와 같은 다양한 메커니즘을 통해 어린 시절의 호흡기 및 알레르기 질환에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 또한, 여러 연구에서 미세먼지에 의한 산화 스트레스, DNA 메틸화 등이 태아 피부 구조의 발달을 방해하고 영향을 미칠 수 있음이 제시되었다.

[0003] 태반과 자궁 조직은 직접적으로 상호 작용하므로 산모의 혈류를 순환하는 물질은 태반을 통해 쉽게 전달되어 태아에 영향을 미칠 수 있다. 출생 전 미세먼지 노출은 태반의 무게, 구조 및 혈관 기능을 변경하는 것으로 알려져 있으며, 이것은 태반 DNA 메틸화 변화를 통해 발생할 수 있다. 태반 DNA 메틸화 변화는 환경 자극에 대한 반응으로 태아의 세포 표현형에 영향을 미칠 수 있으므로 태아의 발달과 건강에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 미세먼지 노출에 의한 이러한 태반 변화의 확인은 소아 아토피피부염 발생의 태아 기원(fetal origin)에 대한 연관성을 제공하고 임신 중 미세먼지 노출로 인한 아토피피부염 환자의 조기 진단 및 잠재적 치료를 위한 새로운 길을 제시할 수 있다.

[0004] 태반은 환경 유해물질들의 노출에 있어서 주요한 접점이 되는 조직이기 때문에, 태반의 DNA 메틸화는 태아 성장과 관련된 후생 유전학적 조절 장애에 영향을 미칠 수 있다. 또한, DNA 메틸화는 유전자형변이에 의해 영향을

받을 수 있으며, 이러한 현상은 태반에서도 보고되었다. 더욱이, 유전자 발현의 조절부위인 프로모터 영역에 있는 CpG 부위에 위치한 변이는 자체(cis-acting) 유전자 전사 조절을 유도할 수 있으며, 만약 이러한 유전자가 다른 유전자들의 발현을 조절하는 전사 조절자라면 관련 신호전달 경로의 하위 인자들의 발현에 영향을 미친다. 한편, 후손들의 건강 궤적과의 연관성에 대한 잠재적 중요성은 아직 충분히 밝혀지지 않았지만, 아동의 성장과 질병과의 연관성을 이해하기 위하여 출생 후 알레르기 발달을 포함한 질환들에서 많은 태반 전사체 분석이 수행되었다. 그러나, 임신 중 태반의 미세먼지 (PM2.5)노출과 유아기의 아토피피부염 발달 사이의 연관성에 대한 통합 오믹스 연구는 보고된 바 없다.

[0005] 아토피 피부염은 전세계적으로 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. 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, 가족력 등이 주요 원인으로 여겨지고 있다.

[0006] 따라서, 임신 중 태반의 미세먼지(PM2.5) 노출에 의해 유아기의 아토피피부염 여부를 진단하는 기술의 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 10-2016-0119703호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 RSF1(Remodeling And Spacing Factor 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 RSF1 단백질의 발현 또는 활성 수준, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 RSF1 유전자 프로모터 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 진단용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료로부터 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 RSF1 단백질의 발현 수준이 대조군의 시료보다 높거나, 상기 RSF1 유전자의 mRNA 메틸화 수준 또는 RSF1 단백질의 메틸화 수준이 대조군의 시료보다 낮은 경우 미세먼지에 노출된 산모에서 태어난 영유아가 아토피피부염이라고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 RSF1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에 시험물질을 접촉시키는 제 1단계; 상기 시험물질을 접촉한 시료에서 RSF1 단백질의 발현 정도를 측정하는 제 2단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 RSF1 단백질의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RSF1(Remodeling And Spacing Factor 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 RSF1 단백질의 발현 또는 활성 수준, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 RSF1 유전자 프로모터 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료로부터 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 RSF1 단백질의 발현 수준이 대조군의 시료보다 높거나, 상기 RSF1 유전자의 mRNA 메틸화 수준 또는 RSF1 단백질의 메틸화 수준이 대조군의 시료보다 낮은 경우 미세먼지에 노출된 산모에서 태어난 영유아가 아토피피부염이라고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 RSF1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에 시험물질을 접촉시키는 제 1단계; 상기 시험물질을 접촉한 시료에서 RSF1 단백질의 발현 정도를 측정하는 제 2단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 RSF1 단백질의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 RSF1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 임신 중 산모가 미세먼지에 노출될 경우, 태반의 RSF1의 메틸레이션이 감소되어 발현이 증가됨을 확인하여, 산모로부터 태어난 영유아의 아토피피부염을 진단할 수 있는 것으로, 바이오마커 조성물, 진단 키트 및 약학 조성물 등 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 cg22741595 메틸레이션 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 RSF1 유전자 발현 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 RSF1의 메틸레이션과 유전자 발현 간의 관계를 나타낸 것이다.
- 도 4는 cg22741595 메틸레이션 재검증 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 cg22741595 메틸레이션 부위가 유전자형변이 rs66622455 위치임을 확인한 것이다.
- 도 6은 rs66622455 염기서열 'C' 빈도와 cg22741595 메틸화 빈도의 연관성을 확인한 것이다.
- 도 7은 RSF1의 유전자형변이, 메틸레이션 및 유전자 발현과의 상관관계 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0026] 본 발명은 RSF1(Remodeling And Spacing Factor 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 "바이오마커"는 아토피피부염이 발생한 대상체의 조직 또는 세포를 정상 대조군의 조직 또는 세포와

구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 질환이 발생한 대상체의 조직 또는 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 단백질 또는 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

- [0028] 본 발명의 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0029] 상기 영유아는 미세먼지에 과노출된 산모에서 태어난 영유아일 수 있다.
- [0030] 상기 RSF1은 서열번호 1의 염기서열을 갖을 수 있다.
- [0031] 상기 RSF1은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에서 유래할 수 있다.
- [0032] 상기 시료는 산모에서 분리된 태반, 세포주, 생검체, 포르말린-고정된 파라핀-포매(formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 조직, 신체 유체 (body fluid), 대변, 소변, 혈장, 혈청, 전혈, 단리된 혈액 세포 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명은 RSF1 단백질의 발현 또는 활성 수준, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 RSF1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 서열번호 2 내지 서열번호 33의 염기서열을 가진 프로브로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 RSF1 유전자 프로모터 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 아토피피부염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 서열번호 35 내지 37의 염기서열을 가진 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단용 키트를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 “키트”는 바이오마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소 반응 정지액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료로부터 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 또는 메틸화 수준이나 RSF1 단백질 발현 또는 메틸화 수준을 대조군 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 RSF1 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 RSF1 단백질의 발현 수준이 대조군의 시료보다 높거나, 상기 RSF1 유전자의 mRNA 메틸화 수준 또는 RSF1 단백질의 메틸화 수준이 대조군의 시료보다 낮은 경우 미세먼지에 노출된 산모에서 태어난 영유아가 아토피피부염이라고 판단하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방

법을 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 RSF1 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 영유아의 아토피피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 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, 전분, 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 위텟솔(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.

[0050] 또한, 본 발명은 미세먼지에 과노출된 산모에서 분리된 시료에 시험물질을 접촉시키는 제 1단계; 상기 시험물질을 접촉한 시료에서 RSF1 단백질의 발현 정도를 측정하는 제 2단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 RSF1 단백질의 발현 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 영유아의 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0052] 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.

[0054] <실험 예 1> 대상

[0055] 천식 등 호흡기 및 알레르기 질환 연구를 위한 출생 코호트(Cohort for Childhood Origin of Asthma and Allergic Diseases, COCOA)로부터 임신 중 미세먼지(PM2.5) 고노출군(12명)과 저노출군(12명) 대상자들에서 정기 후속 방문시 두 번 이상의 아토피피부염 증상의 존재 데이터를 기반으로 분석하였다. COCOA 연구는 알레르기 질환의 발병 및 자연적인 과정에 영향을 미칠 수 있는 다양한 유전 및 환경 요인을 조사하기 위해 고안되었다. COCOA 출생 코호트 연구에서, 산모-아동 쌍은 출생시 추적 관찰되었고, 생후 6개월, 생후 1년, 및 그 후 매년 소아 알레르기 전문의의 건강 검진을 통해 최대 12년까지 방문할 때 마다 설문지를 작성하였다. 아토피피부염은 지난 6개월 또는 12개월 동안 의사에 의한 아토피피부염 진단 여부를 설문지로 확인하였다.

[0057] <실험 예 2> 알레르기 증상 테스트

[0058] 세로무늬먼지진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*), 큰다리먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*), 개 비듬, 고양이 상피, 바퀴벌레, 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*), 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 혼합 잔디, 오리 나무, 자작 나무, 참나무, 환삼덩굴(*Humulus japonicus*), 쭉, 및 돼지 풀을 포함하는 14개의 흡입 알레르겐과 땅콩, 우유, 계란 흰자 및 대두를 포함하는 4개의 식품 알레르겐을 포함하는 18개의 알레르겐에 대한 피부 단자 검사(skin prick tests, SPT)를 3세에 수행하였다. Pharmacia UniCAP 시스템(ThermoFisher Scientific, Kalamazoo, MI)을 사용하여 제대혈, 1, 3, 및 6세 소아의 혈액 샘플에서 총 혈청 IgE 및 계란 흰자, 우유, 큰다리먼지 진드기(Der f) (1세 제외)에 대한 특이IgE 항체를 측정하였다. 총 감각은 특이 IgE에 대해 적어도 하나의 양성 결과(IgE $\geq$ 0.35 IU/mL)로 정의되었다. 방문할 때마다, Tewameter TM 300(Courage+Khazaka Electronic, Cologne, Germany)을 사용하여 측정이 기록될 때까지 약 15초 동안 노출된 volar 피부에 프로브를 적용하여 팔뚝의 volar 표면에서 경표피수분손실(TEWL, trans-epidermal water loss) 수준을 측정하였다.

[0059] SCORAD(SCORing Atopic Dermatitis) index를 통해 아토피피부염 증상의 중증도를 확인하였다. 이는 병변의 범위, 심한 정도, 주관적 증상(가려움증, 수면장애)로 나누어 점수를 매기며, 총 점수가 높을수록 중증 증상을 의미하였다.

[0061] <실험 예 3> 미세먼지 측정

[0062] 국립환경과학원의 대기오염측정망 일일자료의 대기오염 물질 실측값을 이용하였다. 주요 도로와 인접도, 버퍼내 주요 도로 총길이, 토지이용, 지형, 인구밀도, 고도, 교통량지표인 총주행거리 등을 설명변수로 하여 선형회귀 분석을 시행하여 LUR(Land use regression) 모형식을 구축하였다. LUR 모형식을 활용하여 연구 참여대상의 거주지 위치(동의서에서 수집된 주소를 활용)에서의 임신 기간 동안 개인별 노출값을 산출하였다.

[0064] <실험 예 4> 태반에서의 메틸레이션 칩 분석

[0065] 아토피피부염 환자의 임신 중 미세먼지(PM_{2.5}) 고노출군(12명)과 저노출군(12명)의 태반조직에서 각각 추출한 DNA로 Infinium HumanMethylationEPIC BeadChip(Illumina, San Diego, CA, USA) 칩을 사용하여 분석하였다. 차별적으로 메틸화된 CpG 사이트에 대한 통계적 유의성에 대한 임계값은 $|\Delta\beta| > 0.2$ 및 P-value < 0.05로 하였다.

[0066] RSF1의 메틸레이션 부위인 cg22741595 경우, 하기 표 1과 같이 Infinium HumanMethylationEPIC BeadChip 칩의 정보를 이용하여 메틸레이션을 측정하였다.

표 1

[0068]

Chromosome [#]	11
Position	77532707
AlleleA_ProbeSeq	TCTATTCAAAAACCAAAATCRAAATATAAACTAAACTCCATTAAAAAAC
Forward_Sequence	GGGGAAGGGCTCTGTTTCAGGGACCAGAATCGGAGTGTGGGCTGGGACTCCATTGAGAGG[CG]GAACATGACAGGAGACGGTGGAGCAGCGAAAAGTTGTTAGAAGACAGGGTTCCACTTCG
SourceSeq	CGCCTCTCAATGGAGTCCCAGCCACACTCCGATTCTGGTCCCTGAACAG

[0070] <실험 예 5> 태반에서의 유전자 발현 분석

[0071] 아토피피부염 환자의 임신 중 미세먼지(PM_{2.5}) 고노출군(12명)과 저노출군(12명)의 태반조직에서 각각 추출한 total RNA로 GeneChip WT 증폭 키트(Affymetrix, Santa Clara, CA)를 사용하여 cDNA를 합성한 후, 제조사의 지침에 따라 GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array(Affymetrix)로 혼성화하였다. GCS3000 스캐너(Affymetrix)를 사용하여 어레이를 스캔한 후, Affymetrix GeneChip Command Console 소프트웨어를 사용하여 데이터 품질

검사, 배경 보정 및 정화 등의 분석을 수행하였다. $|\text{fold change}| > 1.5$ 및 $t\text{-test } P\text{-value} < 0.05$ 를 나타내는 유전자는 유의하게 차별적으로 발현되는 것으로 간주하였다.

[0072] RSF1의 경우, GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array의 RSF1 transcript (ID: 16742520, 서열번호 1)에서 하기 표 2와 같은 32개 프로브(서열번호 2 내지 서열번호 33)를 이용하여 유전자발현을 측정하였다.

표 2

[0074]

Probe_id	Probe_sequence
2533371	GACCGGGTTCCTTGCAGTAATTAAA
1652404	AAGGCTTAGACACTCCCGGGTTTG
2076746	CCCGGCTTCGTGTCTGCTCATAAGT
2436219	CCCCTCGGGTAACCTGATATCGAAT
359864	CCGCTCATGTGTTTCGCTTCTGAAAG
61785	GGGAGAGCCGGTTACTCCGTCTCGT
698351	GCGGCCGCTAATTTACTAGACCTGT
2569872	CCAGTAGCACCCTTTCTGTAGAGAT
457462	TACTTCGTAACTACTTCGATAACT
1356946	TCTTGCGAACCACATACAACCATAG
1024657	GCGAACCACATACAACCATAGTCAT
85799	AACATGACGGACGATTGATTCTTAC
2463939	GACGAGACACTTTTTAATCTCCTTG
33335	ACGTCCTAAACCTACAACGGAATTT
507323	CACCTATGGTATGACGGACGGAAGC
1051431	CCCAGACCGTCACTTTTAGTAGAC
830600	ACACCGGAAGGTTGGTAGGACTCG
714665	GACGAAATAGAAGGTGGCTCAGCAC
321938	CGAGAGGACTCCGTCGACTTTGAAG
98408	CTCCGTTGTACTATGGTTGAATCAC
1362583	CGGCACAAGGACCATGGAGTCACTT
758545	GAGAAGAGCCCTTTCAGGGTCGAAT
446825	ACGGCTATGATACGCAGAGGTCGGT
2146007	CACAACTTACGTTTGATCGTGAGAA
1670395	ATACGGTTCTCAAATTGTCATGGAC
2446500	CGATCCGGAACAACGAAACGAGTAT
2546415	GGTTTCTTAACCACCTCGAGGTAA
1183995	ACCGTTTAGACAATGACGTCTGTCT
1975195	GACCTCCACCGTCAAGTGGCTTTAA
175927	AGACGAGGAAGAACCTCGCGATGCC
8209	GGACAGCAGACATTCCAACGGAACG
748124	AGGCAGACTGAGCCAAGAGCTGAC

[0076] <실험 예 6> 파이로시퀀싱 검증 및 유전자형 분석

[0077] cg22741595의 검증은 pyro-sequencing 분석법을 이용하였고, 이를 위하여 독립된 미세먼지(PM2.5) 고노출군(33명)과 저노출군(35명)의 태반조직에서 각각 추출한 DNA에 중아황산염(bisulfite) 처리 후, 서열번호 34의 염기서열을 갖는 RSF1 cg22741595 주변 염기서열을 바탕으로 서열번호 35 내지 37의 염기서열을 갖는 하기 표 3의 프라이머들을 이용하였으며, PCR 조건(95℃-10분→[95℃-30초, 56℃-30초, 72℃-30초]x45사이클→72℃-5분)으로 진행하여 메틸레이션을 분석하였다.

[0078] 유전자형 분석의 경우, 메틸레이션 검증과 동일한 파이로 시퀀싱 방법으로 진행하되, 중아황산염(bisulfite)를 처리하지 않고 진행하였다.

표 3

[0079]

cg22741595-F	5' - AGGGGTTTTGTTTAGGGATTAG -3' (정방향)
cg22741595-R	5' biotin- AACCTATCTTCTAACAACTTTT -3' (정방향)
cg22741595-S	5' - GTGGGTGGGATTTTAT -3' (정방향)

[0081]

<실시 예 1> 태반에서의 RSF1 메틸레이션 및 유전자 발현

[0082]

원칙적으로 메틸레이션과 유전자 발현은 상호 반대로 작용하는데, 특히, 메틸레이션은 TSS1500(전사시작부위인 Transcriptional Start Site에서 1500 염기서열 상류 내의 영역)의 CpG(사이토신과 구아닌이 인산염로 연결) 부위에서 일어날 경우 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있어 중요하다.

[0083]

메틸레이션 및 전사체 칩 분석결과, 많은 수의 차이나는 메틸레이션 부위들 중, 메틸레이션의 위치, 유전자 발현 및 상호작용 방향성을 고려했을 때, RSF1을 주요한 후보로 발굴하였다. 특히, RSF1의 경우, 후성적 변화에 중요한 히스톤 변형 (histone modification)에 의한 유전자 발현중지(gene silencing)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 전사체 억제에서의 후성 유전적 역할이 보고되어, RSF1을 주요인자로 선별하였다.

[0084]

RSF1의 메틸레이션 및 유전자 발현 연관성 분석 결과, 하기 표 4 및 도 1과 같이, 임신 중 미세먼지(PM2.5) 저노출군(12명)에 비해 고노출군(12명)의 태반조직에서 RSF1의 TSS1500에 위치한 cg22741595가 28% 저메틸화($\Delta \beta = -0.2799$, $P = 0.019$) 되어 있음을 확인하였다.

표 4

[0085]

아토피피부염 환자의 임신중 미세먼지(PM2.5) 노출에 따른 그룹	대상자	메틸레이션level (Beta_value)
저노출군(< 27.26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Low_1	0.693
	Low_2	0.664
	Low_3	0.233
	Low_4	0.932
	Low_5	0.139
	Low_6	0.112
	Low_7	0.123
	Low_8	0.130
	Low_9	0.926
	Low_10	0.197
	Low_11	0.728
	Low_12	0.721
고노출군 ($\geq 27.26 \mu\text{g}/\text{m}^3$)	High_1	0.101
	High_2	0.715
	High_3	0.202
	High_4	0.106
	High_5	0.157
	High_6	0.138
	High_7	0.143
	High_8	0.115
	High_9	0.131
	High_10	0.110
	High_11	0.125
	High_12	0.196

[0087]

또한, 하기 표 5 및 도 2에 따르면, 동일인들의 태반조직에서 RSF1 유전자 발현이 35.6% 과발현(fold change = 1.355, $P = 0.003$) 되어 있음을 확인하였다.

표 5

아토피피부염 환자의 임신중 미세먼지(PM2.5) 노출에 따른 그룹	대상자	유전자발현level
저노출군 (< 27.26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Low_1	2.735
	Low_2	2.792
	Low_3	2.709
	Low_4	2.644
	Low_5	2.503
	Low_6	2.787
	Low_7	3.262
	Low_8	3.129
	Low_9	2.649
	Low_10	2.946
	Low_11	3.143
	Low_12	2.877
고노출군 ($\geq 27.26 \mu\text{g}/\text{m}^3$)	High_1	3.637
	High_2	3.040
	High_3	2.687
	High_4	3.646
	High_5	3.615
	High_6	3.518
	High_7	3.648
	High_8	2.916
	High_9	3.130
	High_10	3.305
	High_11	3.603
	High_12	2.696

나아가, 이러한 결과는 도 3에 따른, 메틸레이션과 유전자 발현 간의 역 방향성 관계와 일치함을 확인하였다.

<실시 예 2> 메틸레이션과 재검증 및 유전자형변이 연관성 분석

메틸레이션의 재검증을 위하여, 독립된 미세먼지(PM2.5) 저노출군(35명)과 고노출군(33명)의 태반조직 DNA에서 후보 타겟인 cg22741595에 대한 파이로시퀀싱 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 4에 따르면, 미세먼지(PM2.5) 저노출군에 비해 고노출군의 태반조직에서 RSF1 cg22741595에서의 저메틸화가 재검증됨을 확인하였다.

또한, 대립유전자 특이적 DNA 메틸화(allele-specific DNA methylation)의 현상과 같이 유전자형(genotype)은 메틸레이션에 영향을 미치는데, 메틸레이션은 대부분 염기서열 'CG' 에서 일어나며, 유전자형 'C' 의 빈도가 높을수록 저메틸화 된다.

우선 cg22741595 부위가 유전자형 변이가 발생하는 유전자형변이(single nucleotide polymorphism, SNP)인지 여부를 확인한 결과, 도 5에 따르면, rs66622455의 유전자형변이 부위임이 확인되었다.

나아가, 메틸레이션의 재검증에 이용된 동일 샘플인 미세먼지(PM2.5) 저노출군(35명)과 고노출군(33명)의 태반조직 DNA에서 rs66622455에 대한 파이로시퀀싱을 이용한 유전자형 분석을 수행하였다. 그 결과, 하기 표 6에 따르면, 미세먼지(PM2.5) 저노출군에 비해 고노출군의 태반조직에서 RSF1 rs66622455에서의 염기서열 'C' 의 빈도가 높게 확인되었다. (미세먼지 저노출군 = 23.59% vs. 미세먼지 고노출군 = 28.09%).

표 6

[0098]

아토피피부염 환자의 임신중 미세먼지(PM2.5) 노출에 따른 그룹	대상자	cg22741595의 메틸레이션(%)	rs66622455 유전자형변이 'C' 빈도(%)
저노출군(< 27.26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Validation_Low_1	8.73	15.86
	Validation_Low_2	6.17	39.19
	Validation_Low_3	7.08	5.8
	Validation_Low_4	7.68	5.89
	Validation_Low_5	7.94	9.58
	Validation_Low_6	6.39	5.31
	Validation_Low_7	5.97	42.76
	Validation_Low_8	9.43	16.42
	Validation_Low_9	5.22	37.12
	Validation_Low_10	5.5	36.48
	Validation_Low_11	4.83	36.43
	Validation_Low_12	4.96	40.73
	Validation_Low_13	6.55	9.7
	Validation_Low_14	2.82	41.74
	Validation_Low_15	4.32	10.02
	Validation_Low_16	2.64	38.6
	Validation_Low_17	2.63	42.16
	Validation_Low_18	2.68	12.94
	Validation_Low_19	2.23	67.13
	Validation_Low_20	1.8	69.82
	Validation_Low_21	4.14	16.55
	Validation_Low_22	3.08	10.03
	Validation_Low_23	2.3	40.33
	Validation_Low_24	2.86	6.26
	Validation_Low_25	2.52	10.02
	Validation_Low_26	5.02	11.16
	Validation_Low_27	4.35	9.94
	Validation_Low_28	4.75	14.4
	Validation_Low_29	4.02	6.37
	Validation_Low_30	4.06	7.25
	Validation_Low_31	2.49	7.71
	Validation_Low_32	4.31	6.4
	Validation_Low_33	2.89	40.43
	Validation_Low_34	2.29	38.29
	Validation_Low_35	3.36	16.72

고노출군 ($\geq 27.26 \mu\text{g}/\text{m}^3$)	Validation_High_1	1.81	40.59
	Validation_High_2	2.66	8.35
	Validation_High_3	7.55	11.76
	Validation_High_4	2.05	49.47
	Validation_High_5	2.97	11.44
	Validation_High_6	3.03	16
	Validation_High_7	2.35	39.81
	Validation_High_8	1.94	40.64
	Validation_High_9	2.2	40.18
	Validation_High_10	4.66	10.44
	Validation_High_11	2.04	11.14
	Validation_High_12	1.67	38.28
	Validation_High_13	1.67	42.2
	Validation_High_14	3.5	11.26
	Validation_High_15	2.89	40.99
	Validation_High_16	3.31	7.17
	Validation_High_17	3.45	20.82
	Validation_High_18	2.73	41.72
	Validation_High_19	2.06	68.56
	Validation_High_20	2.53	41.08
	Validation_High_21	2.34	69.78
	Validation_High_22	2.39	67.16
	Validation_High_23	3.34	14.68
	Validation_High_24	4.75	9.7
	Validation_High_25	2.5	12.49
	Validation_High_26	2.97	8.71
	Validation_High_27	3.99	13.18
	Validation_High_28	2.59	6.21
	Validation_High_29	2.03	39.31
	Validation_High_30	5.5	2.7
	Validation_High_31	3.93	8.63
	Validation_High_32	2.3	41.43
	Validation_High_33	4.07	41.18

[0100] 더우기, 각 대상자들에서의 rs66622455의 염기서열 ‘C’ 빈도와 cg22741595에서의 메틸화 빈도를 매칭시킨 연관성 분석 결과, 도 6에 따르면, 미세먼지 저노출군 ($r = -0.362$, $P = 0.033$)에 비해 고노출군에서 ‘C’의 빈도가 높을수록 저메틸화되는 더 높은 역상관성을 보여주었다. ($r = -0.545$, $P = 0.001$).

[0101] 이러한 결과를 통해, 도 7의 모식도와 같이, rs66622455의 유전자형 변이인 ‘C’ 염기서열을 가지고 태어난 태아일수록 임신 중 미세먼지 노출에 의한 cg22741595에서의 메틸화 감소 및 RSF1 유전자 과발현의 영향을 받음으로써, 출생 후 아토피피부염 발생 위험성이 높아짐을 알 수 있었다.

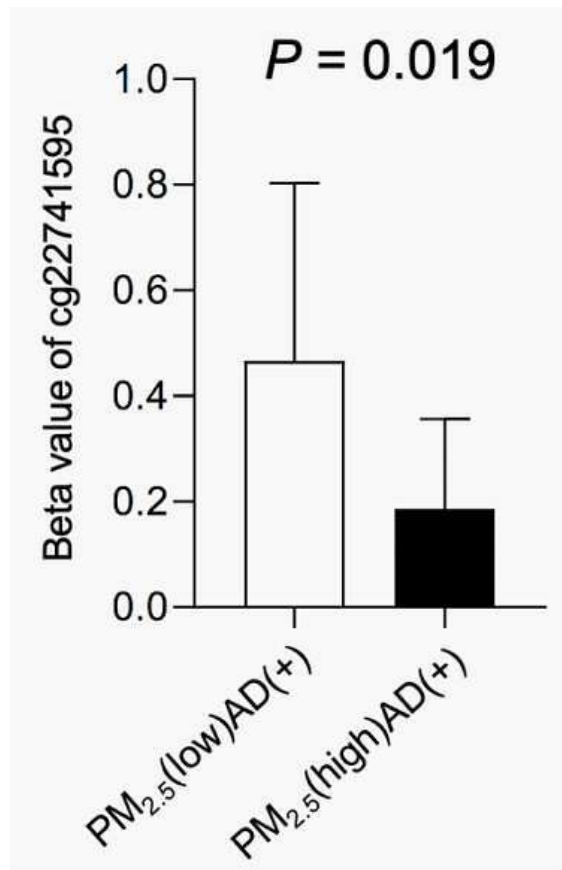
[0102]

[0103] 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.

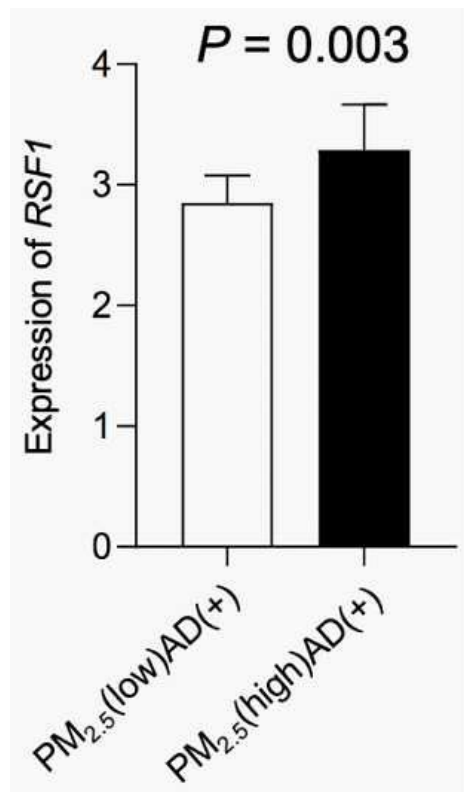
[0104] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

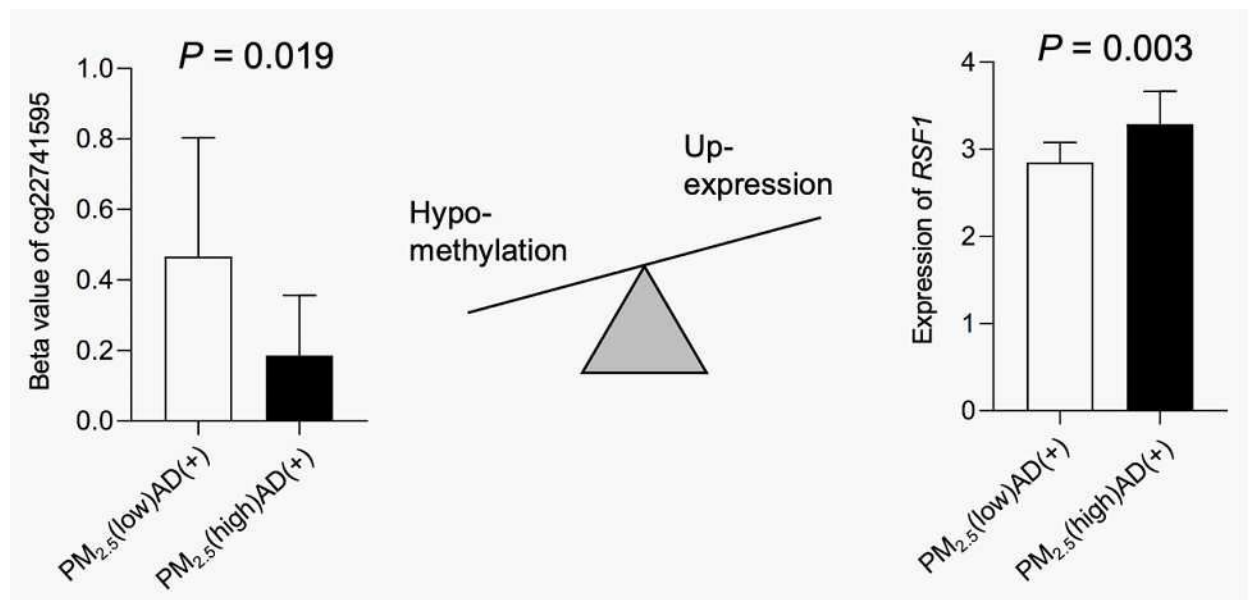
도면1



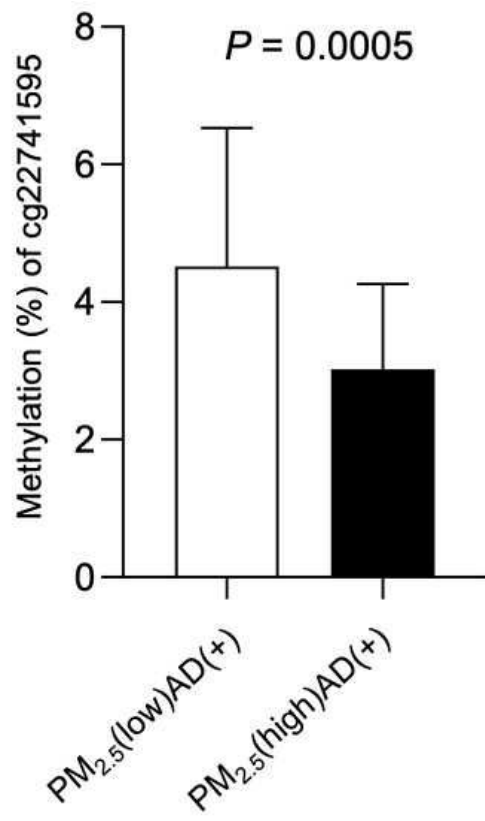
도면2



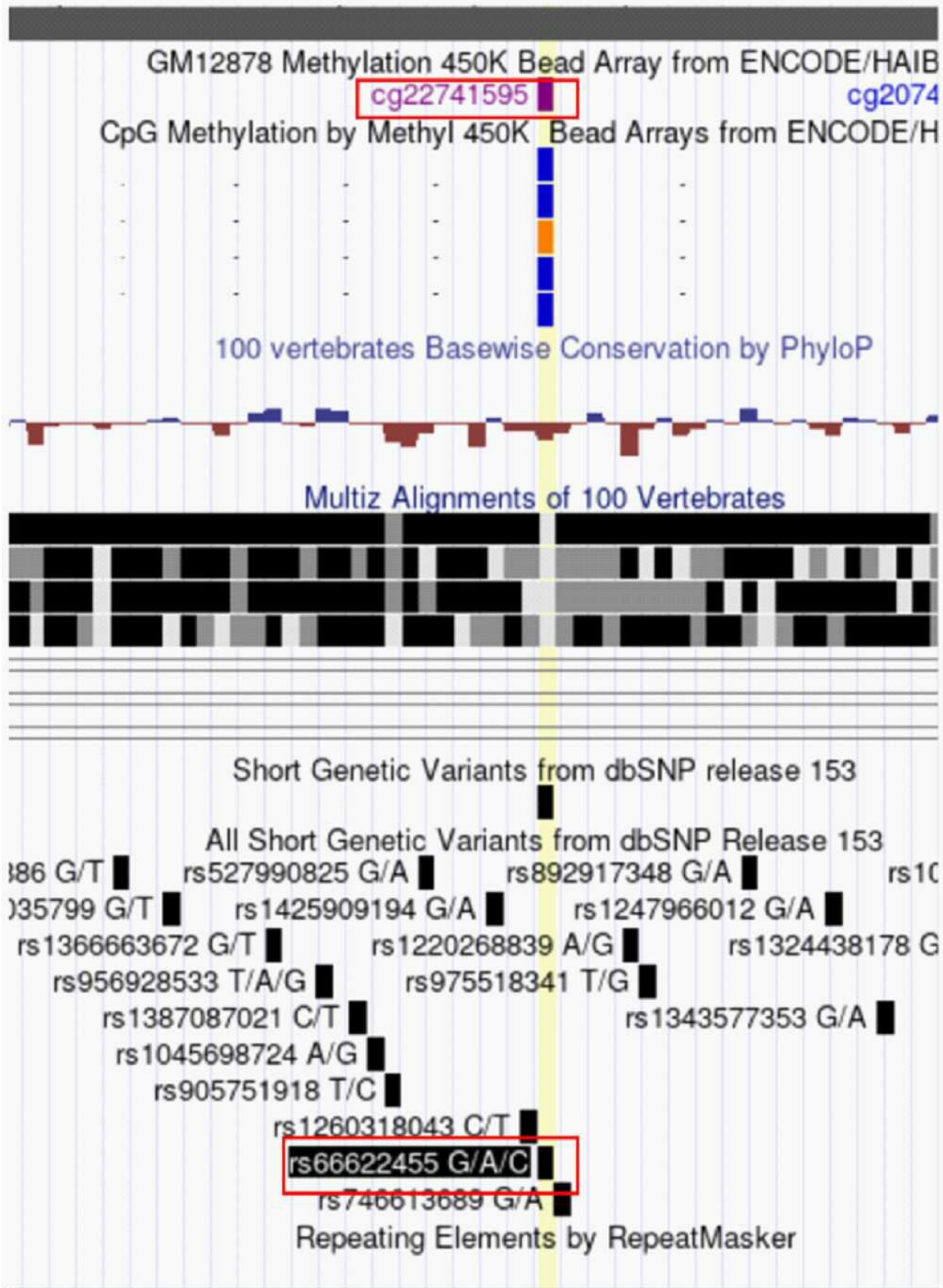
도면3



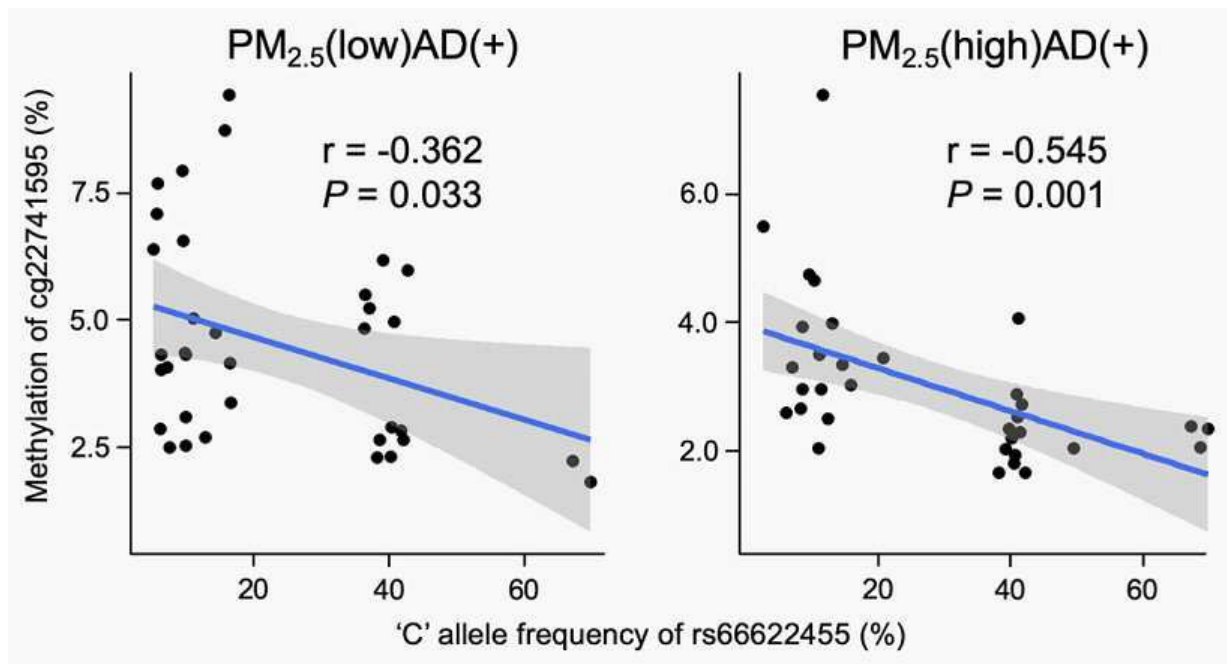
도면4



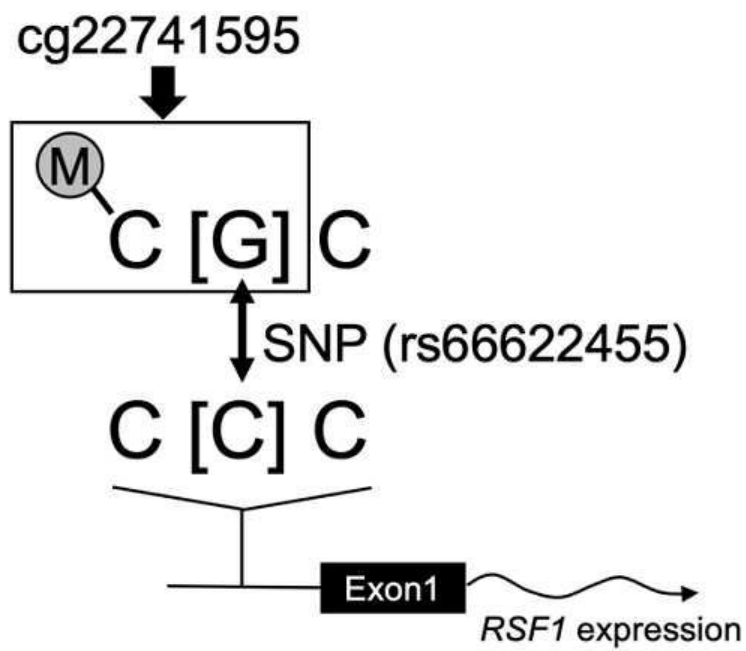
도면5



도면6



도면7



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.