



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월10일

(11) 등록번호 10-2554138

(24) 등록일자 2023년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/564 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)(52) CPC특허분류
G01N 33/564 (2013.01)
G01N 33/6854 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0150520

(22) 출원일자 2021년11월04일

심사청구일자 2021년11월04일

(65) 공개번호 10-2023-0064911

(43) 공개일자 2023년05월11일

(56) 선행기술조사문헌

EP02607358 A1

Haerin Jang et al, Identification of biomarkers in food allergy using metabolomics, Yonsei University (2021.02.), pp 1-59.

Elizabeth A Miles et al, Nutrients (2017.), vol 9; 784, pp 1-16.

Jun Miyata et al, Allergology International (2015.), vol 64, pp 27-34.

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김경원

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

장혜린

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

(74) 대리인

특허법인 이룸리온

전체 청구항 수 : 총 11 항

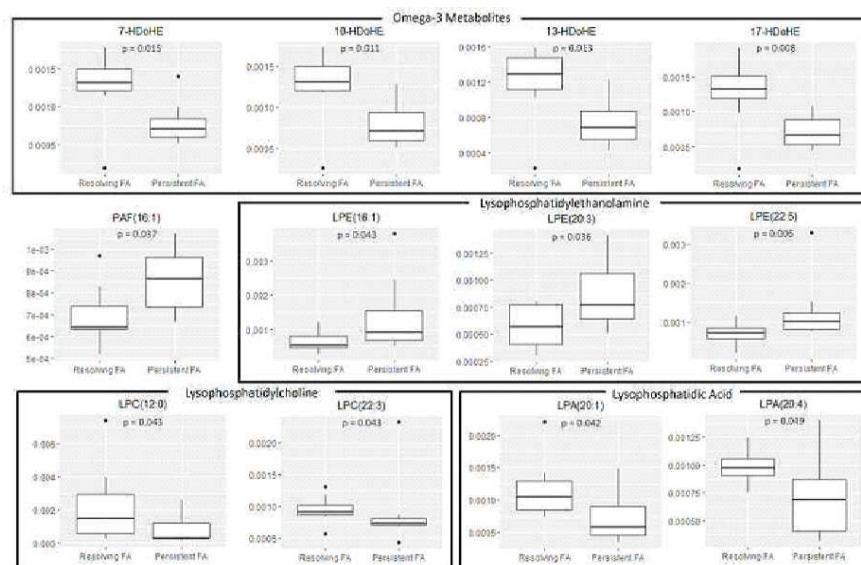
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 식품 알레르기 지속성 판단 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도

(57) 요약

본 발명은 식품 알레르기 지속성 판단 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 진단 당시 수준을 정량하여 향후 식품 알레르기의 지속성 여부를 판단할 수 있는 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 진단시 오메가-3 대사체의 대사량 차이로부터 식품 알레르기 지속성 여부를 평가할 수 있어, 식품 알레르기로 고통받는 환자들에게 식품 알레르기가 지속될지 여부에 대한 정확하고 객관적인 정보를 제공할 수 있고, 이와 같은 정보를 근거로 적절한 임상 치료 계획을 수립할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130764
과제번호	2019R1F1A1058910 (2021-31-0006)
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	대사체 연구를 통한 식품알레르기 맞춤의료 바이오마커 발굴 및 기능규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제제는 오메가-3 대사체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 압타머인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 크로마토그래피 및/또는 질량분석용 제제인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 키트.

청구항 6

식품 알레르기를 가지는 대상체에서 분리된 샘플에서 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 식품 알레르기 지속성 여부 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 오메가-3 대사체의 수준은 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 질량분석, 크로마토그래피 또는 이들의 조합으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 레졸빈 D1이 280 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 레졸빈 D2가 134 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식품 알레르기 지속성 판단 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 진단 당시 수준을 정량하여 향후 식품 알레르기의 지속성 여부를 판단할 수 있는 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 소아에서부터 발병하는 식품 알레르기(FA)의 지속성 여부는 환자마다 상당히 다르다. 일부 소아는 어린 나이에 증상을 극복하는 반면 일부 소아는 평생 식품 알레르기가 지속된다. 식품 알레르기에 대한 광범위한 연구가 수행되었지만, 식품 알레르기에 대처하기 위한 방법으로는 여전히 엄격한 식이 회피가 주류를 이루고 있어, 지속적인 증상이 있는 사람들에게 상당한 부담을 안겨 준다. 식품 알레르기를 치료하기 위한 정확한 메커니즘이 아직까지 완전히 밝혀지지는 않았으며, 따라서 식품 알레르기를 정확히 예측하고, 이를 치료할 수 있는 방법은 아직까지 제한적이다. 원인 알레르겐의 유형과 수, 증상의 심각성을 포함하여 다양한 요인이 식품 알레르기 치료에 영향을 미친다. 식품 알레르기의 수와 알레르겐 특이적 IgE 수준을 통하여 식품 알레르기 치료를 예측하고자 하는 여러 시도가 있었으나 (Foong RX et al., Pediatr Allergy Immunol 2021; 32:223-33), 이에 대한 정확성에는 논란이 있다. 따라서, 식품 알레르기의 기본이 되는 메커니즘에 대한 연구는 해당 질병을 이해하고 더 잘 예측하는데 필수적이라 할 수 있다.

[0004] 최근 각광받는 오믹스 (omics) 연구는 계놈과 인간 질병 사이의 상관관계를 밝히는데 큰 잠재력을 보여주었다. 특히 대사체학은 질병에 기여하는 유전적 기초와 환경적 변화를 모두 반영하기 때문에 커다란 통찰력을 제공한다. 식품 알레르기에 대한 여러 대사체 접근법을 통하여 질병 상태 및 증증도와 관련하여 다양한 생체 샘플에서 대사체를 확인할 수 있다. 예를 들어, 이전 연구에서는 땅콩 알레르기가 있는 환자와 땅콩 알레르기가 없는 환자 간에 기준선 대사 산물 수준의 차이가 있다고 확인한 바 있다. 또 다른 연구에서는 건강한 대조군보다 음식 알레르기를 가지는 소아에서 스펅고지질과 리소인지질 수치가 더 낮다고 보고하였다. 그러나, 아직까지 식품 알레르기 치료를 위한 지침을 제공하는 대사체 연구는 없었다.

[0005] 본 발명자들은 식품 알레르기를 가지는 아동과 건강한 대조군 아동의 혈청 샘플에서 대사체 프로파일링을 진행하여 식품 알레르기의 발병 및 치료와 관련된 대사체를 확인하고자 하였으며, 해당 대사 경로에서 이펙터 분자

를 정량화하여 대사체 수준 차이로부터 아동의 식품 알레르기 지속성 여부를 평가할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Foong RX et al., *Pediatr Allergy Immunol* 2021; 32:223-33

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 식품 알레르기 지속성 여부를 판할 수 있는 신규한 마커로서의 오메가-3 대사체의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 오메가-3 대사체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 압타머인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 상기 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 크로마토그래피 및/또는 질량분석용 체제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 분리된 샘플에서 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 여부 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D1 및/또는 레졸빈 D2의 수준은 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 질량분석, 크로마토그래피 또는 이들의 조합으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D1이 280 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D2가 134 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

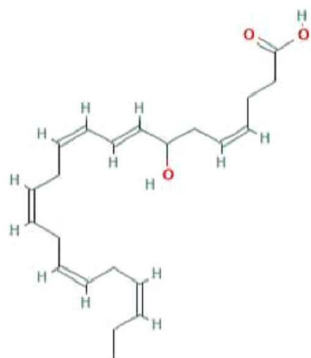
[0020] 본 발명에 따르면, 진단시 오메가-3 대사체의 대사량 차이로부터 식품 알레르기 지속성 여부를 평가할 수 있어, 식품 알레르기로 고통받는 환자들에게 식품 알레르기가 지속될지 여부에 대한 정확하고 객관적인 정보를 제공할 수 있고, 이와 같은 정보를 근거로 적절한 임상 치료 계획을 수립할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 식품 알레르기 및 식품 알레르기 해소에 기반한 식별 코호트 대상체의 sPLS-DA를 나타낸다. 도 1a는 건강한 대조군 (적색) 및 식품 알레르기를 가지는 대상체 (녹색)에 대한 sPLS-DA 모델의 점수 플롯을 나타내고, 도 1b는 식품 알레르기가 지속된 대상체 (적색) 및 식품 알레르기가 해소된 대상체 (녹색)에 대한 sPLS-DA 모델의 점수 플롯을 나타내며, 도 1c는 건강한 대조군 (청색), 식품 알레르기가 지속된 대상체 (녹색) 및 식품 알레르기가 해소된 대상체 (적색)에 대한 sPLS-DA 모델의 점수 플롯을 나타낸다. MetaboAnalyst 5.0을 사용하여 중심 축척으로 플롯이 그려졌으며, sPLS-DA는 회소 부분 최소 제곱 판별 분석, FA는 식품 알레르기를 의미한다.
- 도 2는 식별 코호트에서 확인된 식품 알레르기 및 식품 알레르기 해소와 관련된 대사체를 나타낸다. 도 2a는 식품 알레르기를 가지는 대상체 및 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 대사체의 수준을 나타낸다. 도 2b는 식품 알레르기가 해소된 대상체 및 식품 알레르기가 지속된 대상체 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 대사체의 수준을 나타낸다. 대사체는 생화학적 클래스에 따라 그룹화 하였으며, 클래스 당 표현형과 유의하게 연관된 2개 이상의 대사체를 포함하는 생화학적 클래스 또는 이전에 알레르기 질환과 관련된 것들만 표시하였다. FA, 음식 알레르기; AC, 아실카르니틴; LPA, 리소포스파티딘산; HDoHE, 히드록시도코사헥사엔산; PAF, 혈소판 활성화 인자; LPE, 리소포스파티딜에탄올아민; LPC, 리소포스파티딜콜린.
- 도 3은 식품 알레르기 및 식품 알레르기 해소에 대한 Random Forest 모델의 ROC 곡선을 나타낸다. Random Forest 모델은 (a) 식품 알레르기 (16개 특성) 및 (b) 식품 알레르기 해소 (13개 특성)와 크게 관련된 대사체로 구축되었다. CI, 신뢰 구간.
- 도 4는 식별 코호트 대상체에서 진단부터 추적 관찰까지의 오메가-3 대사 산물 수준의 궤적을 나타낸다. 도 4a는 식품 알레르기 해소 및 식품 알레르기 지속 대상체 간의 진단 및 추적 사이의 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE 수준의 변화를 보여주며, 도 4b는 선형 혼합 모델 분석에서 계산된 표준 오차 및 p-값을 보여주는 오차 막대가 있는 각 오메가-3 대사 산물에 대한 평균 프로필 플롯을 보여준다. 청색은 식품 알레르기 해소, 적색은 식품 알레르기 지속을 나타낸다. HDoHE, 히드록시도코사헥사엔산; FA, 식품 알레르기
- 도 5는 정량 코호트의 대상체에서 레졸빈의 수준을 확인한 결과이다. 도 5a는 식품 알레르기를 가지는 대상체 및 건강한 대조군에서의 RvD1의 수준을, 도 5b는 식품 알레르기가 해소된 대상체 및 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서의 RvD1의 수준을, 도 5c는 식품 알레르기를 가지는 대상체 및 건강한 대조군에서의 RvD2의 수준을, 도 5d는 식품 알레르기가 해소된 대상체 및 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서의 RvD2의 수준을 나타낸다. 레졸빈 수준은 ELISA를 사용하여 정량화하고, 박스 플롯을 위해 자연 로그 변환되었다. *t-검정 또는 ANOVA p-값 < 0.05; FA, 음식 알레르기; RvD1, 레졸빈 D1; RvD2, 레졸빈 D2
- 도 6은 정량 코호트에서 총 혈청 IgE와 레졸빈 수준 간의 상관관계를 나타낸다. 산점도 (Scatter plot)는 (도 5a) RvD1 및 (도 5b) RvD2 자연 로그 변환 값으로 그려졌다. 데이터 분포에 따라 Pearson의 상관분석 또는 Spearman의 상관분석을 사용하여 R 값과 p-값을 계산하였다. 음영 영역은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. IgE, 면역 글로불린 E; RvD1, 레졸빈 D1; RvD2, 레졸빈 D2.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 본 발명에서는 식품 알레르기를 진단받은 소아에서 진단 당시 정량적 차이를 보이는 대사체를 확인하고, 이들 소아를 추적 관찰함으로써 이들 대사체가 식품 알레르기 해소 또는 지속 여부와 유의한 상관관계를 나타내는지 확인하고자 하였다. 그 결과, 소아 식품 알레르기가 해소된 피험자와 소아 식품 알레르기가 지속된 피험자 사이, 진단 당시 혈청 대사체 분석에서 오메가-3 대사체 수준에 유의한 차이가 있음을 확인하였다. 구체적으로 소아 식품 알레르기가 해소된 피험자는 HDoHE의 수준이 상대적으로 낮았고, 레졸빈의 수준은 상대적으로 높은 것으로 확인되어, 이러한 대사체 간의 균형이 식품 알레르기 해소에 기여하고 식품 알레르기 지속성 여부를 판별할 수 있는 바이오마커로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명에서, 7-HDoHE는 PubChem CID: 16061142의 화합물로, 구체적으로 (4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z)-7-하이드록시도코사-4,8,10,13,16,19-헥사엔산((4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z)-7-hydroxydocosa-4,8,10,13,16,19-hexaenoic acid)일 수 있으며, 하기 화학식 (1)로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

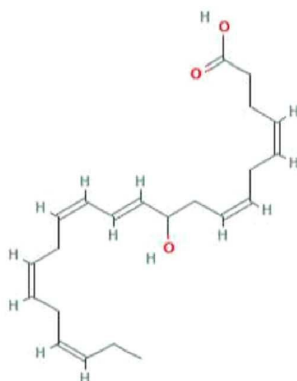
[0031] 화학식 (1)



[0032]

[0034] 본 발명에서, 10-HDoHE는 PubChem CID: 11537494의 화합물로, 구체적으로, (4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z)-10-하이드록시도코사-4,7,11,13,16,19-헥사엔산((4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z)-10-hydroxydocosa-4,7,11,13,16,19-hexaenoic acid)일 수 있으며, 하기 화학식 (2)로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

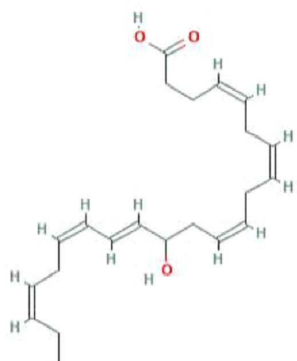
[0035] 화학식 (2)



[0036]

[0038] 본 발명에서, 13-HDoHE는 PubChem CID: 11559259의 화합물로, 구체적으로 (4Z,7Z,10Z,14E,16Z,19Z)-13-하이드록시도코사-4,7,10,14,16,19-헥사엔산((4Z,7Z,10Z,14E,16Z,19Z)-13-hydroxydocosa-4,7,10,14,16,19-hexaenoic acid)일 수 있으며, 하기 화학식 (3)으로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 화학식 (3)

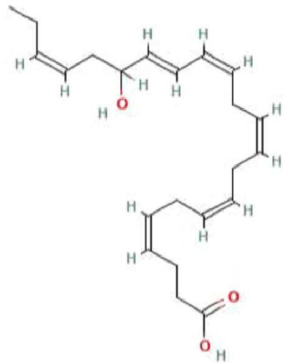


[0040]

[0042] 본 발명에서, 17-HDoHE는 PubChem CID: 6439179의 화합물로, 구체적으로, (4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z)-17-하이드록시도코사-4,7,10,13,15,19-헥사엔산((4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z)-17-hydroxydocosa-4,7,10,13,15,19-hexaenoic acid)일 수 있으며, 하기 화학식 (4)로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

acid)일 수 있으며, 하기 화학식 (4)로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

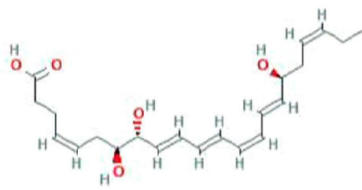
[0043] 화학식 (4)



[0044]

[0046] 본 발명에서, 레졸빈 D1은 PubChem CID: 44251266 의 화합물로, 구체적으로 (4Z,7S,8R,9E,11E,13Z,15E,17S,19Z)-7,8,17-트리하이드록시도코사-4,9,11,13,15,19-헥사에노에이트((4Z,7S,8R,9E,11E,13Z,15E,17S,19Z)-7,8,17-trihydroxydocosa-4,9,11,13,15,19-hexaenoate)일 수 있으며, 하기 화학식 (5)로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

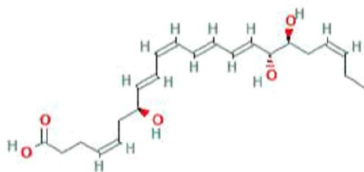
[0047] 화학식 (5)



[0048]

[0050] 본 발명에서, 레졸빈 D2는 PubChem CID: 11383310의 화합물로, 구체적으로 (4Z,7S,8E,10Z,12E,14E,16R,17S,19Z)-7,16,17-트리하이드록시도코사-4,8,10,12,14,19-헥사엔산 ((4Z,7S,8E,10Z,12E,14E,16R,17S,19Z)-7,16,17-trihydroxydocosa-4,8,10,12,14,19-hexaenoic acid) 일 수 있으며, 하기 화학식 (6)으로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0051] 화학식 (6)



[0052]

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 오메가-3 대사체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 압타머인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0055] 다른 양태로서, 상기 제제는 경쟁적 효소 결합 면역 흡착 분석용 (competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay) 제제인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 웰 플레이트 상에 항체를 코팅하고 비오틴(biotin) 표지된 오메가-3 대사체와 비오틴-비표지된 오메가-3 대사체와의 경쟁적 억제반응에 의해 테스트 샘플 내 오메가-3를 정량화하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 항체를 대체하여 항원 결합 단편 또는 압타머를 사용할 수도 있다.

[0058] 다른 양태로서, 상기 제제는 오메가-3에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 압타머인

것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 크로마토그래피 및/또는 질량분석용 제제인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0061] 한편, 본 발명에서는 4 가지 오메가-3 대사체에 대한 식별 코호트의 대상체에서 대사체 수준과 유의하게 연관된 4개의 SNP를 확인하였다.
- [0062] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 p21(RAC1) 활성화된 키나제 5 (p21(RAC1) activated kinase 5, *PAK5*)의 SNP(rs7274775); 말단 없는 호메오박스 6 안티센스 RNA 1 (distal-less homeobox 6 antisense RNA 1, *DLX6-AS1*)의 SNP(rs6957108); 프롤린 풍부 코일드 코일 2C (proline-rich coiled-coil 2C, *PRRC2C*)의 SNP(rs235907); 및 감마-아미노부티르산 A형 수용체 서브유닛 베타3 (gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3, *GABRB3*)의 SNP (rs8039336);로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 SNP를 판별하는 제제를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 조성물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 PAK5 단백질을 암호화하는 유전자의 Gene ID는 57144로, 예를 들어, NM_020341.5, NP_065074.1, NM_177990.4, NP_817127.1, XM_017027960.1, XP_016883449.1, XM_017027961.1, XP_016883450.1, XM_017027962.1, XP_016883451.1, XM_017027964.1, XP_016883453.1, XM_017027965.1, XP_016883454.1, XM_017027963.1, XP_016883452.1 등의 GeneBank Accession No. 또는 Uniprot Accession No.에 따른 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에 의해 식별 가능한 단백질일 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 DLX6-AS1 단백질을 암호화하는 유전자의 Gene ID는 285987로, 예를 들어, NR_015448.1 등의 GeneBank Accession No.에 따른 뉴클레오티드 서열에 의해 식별 가능한 단백질일 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 PRRC2C 단백질을 암호화하는 유전자의 Gene ID는 23215로, 예를 들어, NM_001387844.1, NP_001374773.1, NM_015172.4, NP_055987.2, XM_005245020.2, XP_005245077.1, XM_005245015.2, XP_005245072.1, XM_005245025.2, XP_005245082.1, XM_005245023.2, XP_005245080.1, XM_005245028.2, XP_005245085.1, XM_005245027.2, XP_005245084.1, XM_017000761.1, XP_016856250.1, XM_005245026.2, XP_005245083.1, XM_005245024.2, XP_005245081.1, XM_005245029.2, XP_005245086.1, XM_005245019.2, XP_005245076.1, XM_017000762.1, XP_016856251.1, XM_005245018.3, XP_005245075.1, XM_005245016.5, XP_005245073.1, XM_006711238.4, XP_006711301.1, XM_017000760.2, XP_016856249.1 등의 GeneBank Accession No. 또는 Uniprot Accession No.에 따른 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에 의해 식별 가능한 단백질일 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 GABRB3 단백질을 암호화하는 유전자의 Gene ID는 2562로, 예를 들어, NM_000814.6, NP_000805.1, NM_001191320.2, NP_001178249.1, NM_001191321.3, NP_001178250.1, NM_001278631.2, NP_001265560.1, NM_021912.5, NP_068712.1, XM_011521428.3, XP_011519730.1 등의 GeneBank Accession No. 또는 Uniprot Accession No.에 따른 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에 의해 식별 가능한 단백질일 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 용어 "마커"는 식품 알레르기의 지속성 여부를 구분할 수 있는 물질로, 식품 알레르기 환자에서 진단시 양적 차이에 따라 향후 식품 알레르기 지속 또는 식품 알레르기 해소 여부에서 차이를 보이기 때문에 향후 식품 알레르기가 지속 또는 해소 여부를 판별할 수 있어, 그 정량적 수준을 평가함으로써 식품 알레르기 지속성 여부를 판단하거나 평가할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0068] 본 발명에서 예측이란, 식품 알레르기가 지속될 것인지 또는 해소될 것인지의 여부를 미리 판단하거나 평가하는 것을 의미하며, 예후를 판단하거나 치료 효과를 진단한다는 의미를 모두 포함한다.
- [0069] 바람직하게는, 본 발명은 본 발명에 따른 바이오마커를 이용한 소아 식품 알레르기 환자의 진단을 통해 소아의 식품 알레르기 지속성 여부를 미리 예측할 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 소아는 3 개월 이상 만 18세 미만을 의미할 수 있고, 바람직하게는 6개월 이상 만 12세 미만을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 따라서, 본 발명은 3 개월 이상 만 18세 미만의 식품 알레르기를 가지는 소아를 진단하여 식품 알레르기 지속성 여부를 예측하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이는 식품 알레르기가 소아 시기에 주로 발병하기 때문인 것으로, 성인에서도 식품 알레르기의 지속성 여부를 판단하기 위하여 본 발명이 적용될 수 있을 것이다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 마커는 진단 시점으로부터 1년 이상 경과시 식품 알레르기 지속 가능성을 예측하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 상기 바이오마커는 진단으로부터 1년 내지 10년 경과시,

바람직하게는 1년 내지 5년 경과시, 식품 알레르기 지속 가능성을 예측하는 것을 특징으로 할 수 있고, 일부 양태로서 상기 바이오마커는 진단으로부터 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월, 28개월, 29개월, 30개월, 31개월, 32개월, 33개월, 34개월, 35개월 또는 36개월 경과시 식품 알레르기 지속 가능성을 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0072] 본 발명에서, 상기 오메가-3 대사체는 면역원성 단편에 결합된 것일 수 있다. 즉, 상기 오메가-3 대사체는 항체에 의해 인식될 수 있도록 하는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 단편에 결합된 것일 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미할 수 있다. 일 양상에 따른 항체의 형태는 특별히 한정되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함될 수 있으며, 나아가, 인간화 항체 등의 특수항체도 포함될 수 있다. 일 양태에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편은 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv 등일 수 있다.

[0074] 본 명세서에서, 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 한정되지 않고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피이다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 질량분석기는 MALDI-TOF MS 또는 TOF MS이고, 보다 바람직하게는 TOF MS이다.

[0075] 본 명세서에서 용어, "SNP(single nucleotide polymorphism)"는 단일염기다형성을 의미하며, 염색체의 단일부위에서 여러 가지 DNA 염기들 중의 하나에 나타나는 일반적인 돌연변이로 SNP는 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 분포되어 있고 이에 의하여 개인의 유전적 다양성이 발생한다. 본원에서, 상기 "마커"는 ""와 혼용되어 명명될 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 용어 "대립형질" 또는 "대립유전자"는 상동염색체의 동일한 유전자 좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 유형을 의미한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류 이상, 예를 들어 두 종류의 대립형질을 갖는다.

[0077] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어, "SNP를 판별하는 체제"는 상기 SNP 마커 조성물에 포함된 SNP 마커 또는 SNP에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 SNP를 검출하여 증폭시킬 수 있는 체제를 의미하고, "를 검출하여 증폭시킬 수 있는 체제"는 상기 SNP 마커 조성물에 포함된 SNP 마커 또는 SNP의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 체제를 의미하며, 예를 들어 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라아제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 동일할 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 위치 혹은 프라이머 결합부위는 프라이머가 혼성화하는 표적 DNA 절편을 의미할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 유전자의 mRNA의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [0079] 본 명세서에서 용어 "프로브"란 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다.
- [0080] 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 일 양상에 따른 유전자의 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부 및 정도를 통해 방사선 피폭 여부 및 정도를 판단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다
- [0081] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등과 같은 하전되지 않은 연결체 또는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등과 같은 하전된 연결체로의 변형이 있다.
- [0083] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 조성물을 포함하는, 식품 알레르기 지속성 판단용 키트에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 일 양태로서, 경쟁적 효소 결합 면역 흡착 분석용 (competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay) 키트일 수 있고, 다른 양태로서 정량적 샌드위치 ELISA 키트 (Quantitative Sandwich ELISA kit)일 수 있다.
- [0085] 상기 키트는 RvD1 항체-RvD1 항원 또는 RvD2 항체-RvD2 항원 반응에 의한 것일 수 있다.
- [0086] 본 발명에서, 상기 키트는 항체, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 압타머, 프라미어, 프로브 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0087] 예컨대, 본 발명에서 경쟁적 효소 결합 면역 흡착 분석용 (competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay) 키트는 항체 코팅된 웰 플레이트, 비오틴-표지 오메가-3 대사체, HRP-접합 시약 및 TMB 기질로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0088] 다른 양태로서, 상기 키트는 p21(RAC1) 활성화된 키나제 5 (p21(RAC1) activated kinase 5, *PAK5*)의 SNP(rs7274775), 말단 없는 호메오박스 6 안티센스 RNA 1 (distal-less homeobox 6 antisense RNA 1, *DLX6-AS1*)의 SNP(rs6957108), 프롤린 풍부 코일드 코일 2C (proline-rich coiled-coil 2C, *PRRC2C*)의 SNP(rs235907), 및 감마-아미노부티르산 A형 수용체 서브유닛 베타3 (gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3, *GABRB3*)의 SNP (rs8039336);로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 SNP 분석용 키트일 수 있다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 본원의 SNP, 폴리뉴클레오타이드, cDNA 등뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 PCR 키트, RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0091] 상기 키트는 완충액(lysis buffer)을 더 포함할 수 있다. 상기 완충액은 상용화된 제품 등 다양한 물질을 포함할 수 있다. 상기 완충액은 HEPES, MgCl₂, NaCl, 이미다졸, DNase 및 β이 포함될 수 있고, 단백질의 분해를 방지하기 위해 프로테아제 저해제인 PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)가 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0092] 상기 키트는 유전자 또는 단백질을 분해 (Digestion)하는 시약을 더 포함할 수 있다. 상기 유전자 분해 시약은 제한효소 등을 포함할 수 있다. 상기 단백질 분해 시약은 트립신, 트립신/EDTA, 또는 TrypLE 등을 포함할 수 있으나, 상기 유전자 또는 단백질 분해 시약은 이에 한정되지 않는다.
- [0093] 상기 키트는 동위원소로 라벨링된 표준 펩타이드(Isotope labeled standard peptide) 혼합물을 더 포함할 수 있다.
- [0094] 상기 키트는 데이터 분석 또는 통계처리를 할 수 있는 프로그램을 더 포함할 수 있다. 상기 프로그램은 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석하는 것일 수 있다. 상기 데이터 분석 또는 통계처리 프로그램은 Skyline

Software, ProteoWizard Software, SCIEX OS Software, SPSS Statistics Software, MedCalc Software, MultiQuant Software, MasterView Software 또는 Cliquid Software 중에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0095] 상기 키트는 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 항체, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 압타머, 프라미어, 프로브 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [0097] 본 발명의 일 양태로서, 상기 PCR 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 SNP에 대한 특이적인 폴리뉴클레오타이드, 프라이머 또는 프로브 외에도 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) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0098] 본 발명의 일 양태로서, 상기 DNA 칩 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 SNP에 대한 특이적인 폴리뉴클레오타이드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 일 양태로서, 상기 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, RT-PCR 키트는, 상기 SNP에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0101] 또 다른 관점에서, 본 발명은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 분리된 샘플에서 오메가-3 대사체의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 여부 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 오메가-3 대사체는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 17-HDoHE, 레졸빈 D1 (RvD1) 및 레졸빈 D2 (RvD2)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 오메가-3 대사체의 수준은 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 질량분석, 크로마토그래피 또는 이들의 조합으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0104] 다른 양태로서 본 발명은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 분리된 샘플에서 p21(RAC1) 활성화된 키나제 5 (p21(RAC1) activated kinase 5, *PAK5*)의 SNP(rs7274775), 말단 없는 호메오박스 6 안티센스 RNA 1 (distal-less homeobox 6 antisense RNA 1, *DLX6-AS1*)의 SNP(rs6957108), 프롤린 풍부 코일드 코일 2C (proline-rich coiled-coil 2C, *PRRC2C*)의 SNP(rs235907), 및 감마-아미노부티르산 A형 수용체 서브유닛 베타3 (gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3, *GABRB3*)의 SNP (rs8039336);로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 SNP를 판별; 하는 단계를 포함하는, 식품 알레르기 지속성 여부 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 SNP는, 시퀀싱 분석, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 마이크로어레이에 의한 혼성화, PCR_RELP(restriction fragment length polymorphism)법, PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)법, PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide)법, PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA(rolling circle amplification)법, HRM(high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 또는 이들의 조합으로 판별되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비노생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE 및 17-HDoHE로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 오메가-3 대사체가 0.001 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 해소될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수

있다.

- [0108] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D1이 265 pg/ml 이상인 경우, 더 바람직하게는 275 pg/ml 이상인 경우, 가장 바람직하게는 280 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0109] 예컨대, 상기 레졸빈 D1이 280.2 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0110] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D2가 126 pg/ml 이상인 경우, 더 바람직하게는 130 pg/ml 이상인 경우, 가장 바람직하게는 134 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0111] 예컨대, 상기 레졸빈 D2가 134.3 pg/ml 이상인 경우, 상기 대상체는 알레르기가 지속될 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0112] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D1의 수준은 Resolvin D1 (RvD1) ELISA Kit (Cat. No.: MBS053145, Mybiosource, San Diego, CA, USA))를 이용하여 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0113] 본 발명에 있어서, 상기 레졸빈 D2의 수준은 Resolvin D2 (RvD2), ELISA Kit (Cat. No.: MBS051498, Mybiosource, San Diego, CA, USA))를 이용하여 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0114] 본 발명에 있어서,
- [0115] 상기 SNP(rs7274775)의 대립형질이 T를 포함;
- [0116] 상기 SNP(rs6957108)의 대립형질이 T를 포함;
- [0117] 상기 SNP(rs235907)의 대립형질이 C를 포함; 및
- [0118] 상기 SNP(rs8039336)의 대립형질이 T를 포함;로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 경우, 상기 대상체는 식품 알레르기가 해소될 것으로 예측하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0119] 본 발명에 따른 상기 정보 제공 방법에서, 상기 결과들은 당업계에서 일반적으로 사용되는 통계학적 분석 방법을 이용하여 통계처리 할 수 있으며, 예를 들어, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 검정(Chi-square test), 선형 회귀선 분석(linear regression line analysis), 다변량 로지스틱 회귀분석(multiple logistic regression analysis), 메타 분석(meta-analysis) 등을 통해 얻은 연속 변수(continuous variables), 절대 변수 (categorical variables), 대응비(odds ratio, OR) 및 95% 신뢰구간(confidence interval, CI) 등의 변수를 이용하여 분석할 수 있다.
- [0120] 본 명세서에서 용어, "대상체"는 식품 알레르기를 가지는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 대상체는 인간일 수 있으며, 구체적으로 한국인 또는 아시아인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0123] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0125] **실시예 1. 연구 모집단 및 샘플 수집**
- [0126] 1-1. 연구 모집단
- [0127] 두 개의 독립적인 코호트, 즉 식별 코호트 (identification cohort)와 정량 코호트 (quantification cohort)가 식품 알레르기 아동의 대사 프로파일을 연구하는데 사용되었다.
- [0128] 식별 코호트는 식품 알레르기 아동 20명과 건강한 대조군 20명으로 구성되었다. 식품 알레르기는 하나 이상의 특정 식품 알레르겐에 대한 특정 IgE 수치 > 0.7 kU/L와 식품 섭취 2시간 이내에 발생하는 IgE 매개 증상의 병력을 포함하여, 확인된 알레르기 과민 반응의 조합을 기반으로 의사에 의해 진단되었다. 식품 알레르기의 해소(resolution)는 이전에 식품 알레르기를 일으켰던 모든 식품 알레르겐에서 발생하는 국소 및 전신 증상의 상실

로 정의되었으며, 해소는 해당 음식 섭취를 시도해보거나 간병인의 관찰로 확인되었다. 식품 알레르기 소아에 대해 진단 당시와 추적 관찰시 혈청을 채취하였다. 식품 알레르기 해소가 확인된 대상체 (subject)와 식품 알레르기가 지속되는 대상체에 대해 각각 동일한 시간 경과에 따른 추적 관찰이 수행되었다. 지속성은 식품 알레르기 진단 기준과 동일한 기준으로 진료실에서 확인되었다. 대상체 프로파일링이 수행될 때까지 샘플은 -20 °C에서 보관하였다. 식품 알레르기가 지속되는 대상체와 식품 알레르기가 해소된 대상체에 대한 식품 알레르기 및 아토피 피부염의 중증도는 각각 B. Niggemann et al (Allergy 2016; 71:135-6) 및 SCORing Atopic Dermatitis(SCORAD) (Dermatology 1993; 186:23-31)에 의해 확립된 등급 시스템을 사용하여 평가되었다. 대조군은 알레르기 질환의 병력이나 알레르기 과민증의 증상이 없는 대상체로 선정하였다. 유전자형 분석을 위해 상기 40명의 피험자로부터 추가로 전혈 샘플을 수집하였다.

[0129] 정량 코호트는 식품 알레르기가 있는 48명의 대상체와 30명의 건강한 대조군으로 구성되었다. 피험자(즉, 대상체)는 식별 코호트와 동일한 포함 기준으로 모집되었으며, 혈청 샘플을 사용하여 선택된 대상체를 정량화하였다. 모든 피험자는 상호 관계가 없었고, 서면 동의서를 제공받아 실험이 진행되었다. 모든 연구는 세브란스병원 기관심사위원회(서울, 한국, IRB 번호 4-2019-1271)의 승인을 받아 진행되었다.

[0131] 1-2. 임상평가

[0132] 식품 알레르기로 진단하기 위해 확인된 식품 알레르기(FA) 증상에는 입안의 따끔 거림 또는 가려움증; 두드러기; 얼굴, 입 또는 기타 신체 부위의 붓기; 천명; 호흡 곤란; 메스꺼움; 구토; 복통; 설사가 포함되었다. 식품 알레르기가 있는 일부 대상체는 여러 음식에 알레르기가 있었고, 모든 대상체는 달걀 알레르기가 있었다. 우유와 견과류에 대한 알레르기는 다중 알레르기가 있는 대상체에게 가장 흔하게 나타났다. 비-IgE 매개 또는 만성 염증성 위장 장애의 병력과 지난 6주 이내에 면역억제제 사용한 병력이 있는 대상체는 피험자에서 제외되었다.

[0134] 1-3. 샘플 준비 및 대상체 분석

[0135] 식품 알레르기가 있는 대상체로부터 20개의 쌍을 이루는 혈청 샘플과 대조군으로부터 20개의 쌍을 이루지 않은 혈청 샘플을 수집하였다. 식별 코호트에 대한 정보는 표 1에 요약되어 있다.

표 1

	식품 알레르기 (n = 20)	대조군 (n = 20)	p-value**
진단시 연령	2.74 ± 2.30	2.70 ± 2.28	0.95
남성	11 (55)	10 (50)	0.75
총 혈청 IgE, kU/L	676.49 ± 1059.48	17.72 ± 14.73	0.01
식품 알레르기 해소*	8 (44.4)	-	-

[0138] 데이터는 n (%) 또는 평균 ± 표준 편차로 제공됨

[0139] * 식품 알레르기 해소에 대한 정보가 충분하지 못한 2명을 제외하고, 식품 알레르기를 가지는 총 18명을 대상으로 계산한 비율임

[0140] ** 카테고리 값에 대한 카이 제곱 검정 및 연속 값에 대한 Welch의 t-검정으로 계산된 p-값

[0142] 피험자들의 평균 연령은 2.72세 (표준 편차: 2.29)였으며 식품 알레르기를 가지는 대상체와 대조군 간에 유의한 연령 차이는 없었다. 총 혈청 IgE 수치는 예상한 바와 같이 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 대조군보다 평균적으로 더 높았다. 진단 당시 식품 알레르기 환자들은 원인이 되는 알레르겐을 피하는 식사를 하고 있었다 (표 2).

표 2

환자 No.	식품 알레르기 그룹	식품 알레르기
1	식품 알레르기 지속	달걀, 우유, 땅콩
2	식품 알레르기 지속	달걀
3	식품 알레르기 지속	달걀, 우유
4	식품 알레르기 지속	달걀, 우유, 땅콩, 돼지고기, 밀
5	식품 알레르기 지속	달걀
6	식품 알레르기 지속	달걀, 밀

7	식품 알레르기 지속	달걀, 밀
8	식품 알레르기 지속	달걀, 우유
9	식품 알레르기 지속	달걀, 땅콩
10	식품 알레르기 지속	달걀
11	식품 알레르기 해소	달걀, 땅콩
12	식품 알레르기 해소	달걀, 우유
13	식품 알레르기 해소	달걀
14	식품 알레르기 해소	달걀
15	식품 알레르기 해소	달걀, 우유
16	식품 알레르기 해소	달걀, 우유
17	식품 알레르기 해소	달걀, 우유
18	식품 알레르기 해소	달걀

[0146] 식품 알레르기 환자 중 10명은 지속적인 증상을 보였고, 8명은 식품 알레르기가 해소되었다. 2명의 피험자는 예 후에 대한 정보가 충분하지 않아 식품 알레르기 해소 여부에 대한 분석에서 제외시켰다. 이들 대상체에 대한 추적 관찰 기간 및 질병 속성은 표 3에 요약되어 있다.

표 3

	식품 알레르기 지속 (n = 10)	식품 알레르기 해소 (n = 8)	p-value*
진단시 연령	4.06 ± 2.63	1.38 ± 0.44	0.02
남성	5 (50)	6 (75)	0.28
총 혈청 IgE, kU/L	761.90 ± 567.64	345.73 ± 275.93	0.09
샘플 수집 사이 시간 범위, 개월	18.39 ± 9.06	15.45 ± 4.52	0.44
다수 식품 알레르기	8 (80)	4 (50)	0.18
아토피 피부염 동반	4 (40)	4 (50)	0.67
SCORAD	18.5 ± 15.04	23.75 ± 6.22	0.62
식품 관련 증상			
두드러기	10 (100)	8 (100)	-
혈관 부종	6 (60)	4 (50)	0.67
아나필락시스	4 (40)	2 (25)	0.50

[0149] SCORAD, SCORing Atopic Dermatitis 데이터는 n (%) 또는 평균 ± 표준 편차로 제공됨

[0150] * 카테고리 값에 대한 카이 제곱 검정 및 연속 값에 대한 Welch의 t-검정으로 계산된 p-값

[0152] 진단을 위한 샘플 수집과 추적 관찰 사이의 평균 시간 간격은 16.5개월이었고, 추적 관찰 시 아동은 4세에서 5세 사이였다. 대상체들은 식품 알레르기의 심각도에서 유사한 분포를 보였다. 지속적인 식품 알레르기를 나타내는 7명의 대상체와 식품 알레르기가 해소된 6명의 대상체는 2A 등급(피부 또는 위장관 침범을 동반한 경증에서 중등도의 전신 반응)을 나타내었다. 지속적인 식품 알레르기를 나타내는 2명의 대상체와 식품 알레르기가 해소된 1명의 대상체는 심각한 전신 반응을 경험하였다. 아토피 피부염을 동반하는 대상체들은 모두 경증 또는 중등도의 아토피 피부염 증상을 경험하였으며 그룹 간에 SCORAD에 유의한 차이는 없었다.

[0153] 정량 코호트는 식품 알레르기가 지속되는 25명, 식품 알레르기가 해소된 23명, 대조군 30명으로 구성되었다 (표 4). 평균 연령과 총 혈청 IgE 수치는 동일 집단의 IgE 수치와 유사하였다. 식품 알레르기 해소 여부를 추적하는데 소요된 평균 추적 기간은 18.5개월이었다.

표 4

	식품 알레르기 지속 (n = 25)	식품 알레르기 해소 (n = 23)	대조군 (n = 30)
진단시 연령	3.07 ± 3.02	1.38 ± 1.40	3.53 ± 2.98
남성	14 (56)	19 (83)	15 (50)
총 혈청 IgE, kU/L	719.73 ± 1222.67	368.20 ± 538.80	76.26 ± 80.70
다수 식품 알레르기	22 (88)	5 (22)	-
추적 기간*, 개월	68.74 ± 32.18	81.21 ± 47.21	-

해소의 최초 확인까지의 시간, 개월	-	19.9 ± 13.5	-
---------------------	---	-------------	---

[0156]

* 진단과 가장 최근의 해소 또는 지속 확인 사이의 시간

[0157]

데이터는 n (%) 또는 평균 ± 표준 편차로 제공됨

[0159]

실시예 2. 대사체 프로파일링

[0160]

두 가지 모드(양이온 및 음이온 대사 산물)에서 LC-MS(liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 사용하여 식별 코호트의 혈청 샘플로부터 대사체 프로파일링을 수행하였다.

[0161]

LC-MS 분석을 위해 각 100 µL 샘플을 내부 표준물질을 함유한 메탄올 (0.1% 포름산 포함) 300 µL 와 혼합하고 원심분리(9,100 x g, 4°C, 10분)하였다. 다음으로, 250 µL의 상청액과 550 µL의 0.1% 포름산 수용액을 혼합하고 SPE 컬럼 (MonoSpin C18, 5010-2170, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 여과하였다. 여과액을 0.1% 포름산 용액 및 0.1% 포름산 - 25% 메탄올 용액으로 정제하였다. 정제된 지질 대사체는 측정 직전 메탄올 (0.1% 포름산 포함) 200 µL에 용해하였다. LC-MS 분석에서 검출된 피크는 m/z, 머무름 시간 및 피크 면적을 포함한 정보를 얻기 위해 자동 통합 소프트웨어 MultiQuant(AB Sciex, Framingham, MA, USA)를 사용하여 추출되었다. 그런 다음 피크 면적을 상대 피크 면적으로 변환하고 표준 라이브러리 (Human Metabolome Technologies, Inc., Tsuruoka, Japan)를 사용하여 다음과 같이 주석을 달았다: [생화학적 분류] [아실 사슬 탄소 원자의 수]:[지방산 부분의 이중 결합 수].

[0162]

유리지방산 (free fatty acid), 아실카르니틴 (acylcarnitine), 옥시리핀 (oxylipin), 리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine), 리소포스파티딜에탄올아민 (lysophosphatidylethanolamine), 리소포스파티딜이노시톨 (lysophosphatidylinositol), 리소포스파티딜세린 (lysophosphatidylserine), 리소포스파티딜글리세롤 (lysophosphatidylglycerol), 리소포스파티딘산 (lysophosphatidic acid), 혈소판 활성화 인자 (platelet-activating factor), 아실에탄올아민 (acylethanolamine), 스펡가닌 (sphinganine), 스펡고신 (sphingosine), ganglioside (ganglioside), glucosylceramide (glucosylceramide), lactosylceramide (lactosylceramide), ceramide-1P (ceramide-1P) 및 steroid (steroid)를 포함한 여러 클래스의 총 344개 대사체가 확인되었다.

[0163]

대사체 수준에 대해 결측값 대체 (missing value imputation) 및 일반 품질 관리 절차를 수행하였다. 각 대사체와 대상체 연령 간의 상관 관계는 진단 시 건강한 대조군과 식품 알레르기 대상체의 로그 변환 대사체 데이터를 사용하여 Pearson의 상관 관계를 계산하여 결정되었다. 연령과 유의하게 관련된 대사체 (p-값 < 0.05) (표 5 참조)는 추가 분석에서 제외되었다.

표 5

[0165]

	상관 계수	상관관계 p-value
Lactosylceramide(d18:1/16:0)	0.572128	0.000115
LPS(22:4)	-0.56264	0.000157
GM3(d18:1/14:0)	-0.55314	0.000214
TXB2	-0.53315	0.000397
LPS(20:4)	-0.49013	0.001326
Glucosylceramide(d18:1/14:0)	-0.48004	0.001721
LPS(20:3)	-0.47532	0.001938
Sphingosine-1P(d16:1)	-0.45419	0.003241
LPS(22:6)	-0.43521	0.005006
GM3(d18:1/12:0)	-0.42841	0.005816
LPS(18:1)	-0.41726	0.007391
FFA(12:0)	-0.41384	0.007942
Lactosylceramide(d18:1/24:1)	0.411492	0.00834
Lactosylceramide(d18:1/24:2)	0.407275	0.009099
FFA(10:0)	-0.40572	0.009393
LPS(22:5)	-0.39489	0.011679
LPE(24:0)	-0.37923	0.015808
LPS(20:1)	-0.37432	0.017334
12-HETE	-0.37101	0.018430

LPE(20:0)	-0.36771	0.019580
Sphinganine-1P(d18:0)	-0.36602	0.020191
LPS(22:0)	-0.36423	0.020857
LPA(12:0)	-0.35242	0.025727
PAF(22:4)	-0.35082	0.026453
LPG(22:4)	-0.34367	0.029913
LPS(18:0)	-0.33690	0.033526
AC(24:1)	-0.33543	0.034350
LPG(20:2)	-0.33520	0.034487
FFA(22:3)	-0.33423	0.035040
LPS(17:0)	-0.33421	0.035051
LPC(14:0)	-0.33278	0.035888
LPA(20:2)	-0.31999	0.044125
FFA(14:0)	-0.31841	0.045239
Sphingosine(d16:1)	-0.31581	0.047128
LPA(22:4)	-0.31386	0.048579
GD3(d18:1/16:0)	-0.31328	0.049023

- [0166] LPS, 리소포스파티딜세린; GM3, 모노시알로디헥소실강글리오시드; TXB2, 트롬복산 B2; FFA, 유리 지방산; LPE, 리소포스파티딜에탄올아민; HETE, 히드록시에이코사테트라엔산; LPA, 리소포스파티딘산; PAF, 혈소판 활성화 인자; LPG, 리소포스파티딜글리세롤; AC, 아실카르니틴; LPC, 리소포스파티딜콜린
- [0168] 대사체 데이터의 품질 관리를 위하여, 샘플의 10% 이상에서 정량되지 않은 대사체는 배제하였다. 대사체에 대한 누락 값은 k-최근접 이웃 알고리즘 (k-nearest neighbor algorithm)을 사용하여 대체하였다. 10개의 가장 근접한 이웃의 중앙값이 계산에 사용되었다. 대사체 데이터의 정규화에는 확률 지수 정규화법 (probabilistic quotient normalization method)이 사용되었다.
- [0169] 데이터 패턴을 관찰하기 위해 진단 당시 식품 알레르기를 가지는 대상체와 대조군에서 얻은 대사체 데이터에 대해 MetaboAnalyst를 사용하여 희소 부분 최소 제곱 판별 분석 (sparse partial least-squares discriminant analysis, sPLS-DA)을 수행하였다. sPLS-DA 모델의 희소성을 제어하기 위해 5가지 구성요소를 사용하고 예측 능력을 평가하기 위해 5중 교차 검증을 사용하였다. sPLS-DA 모델의 처음 5개 구성요소를 연령과의 상관관계에 대해 테스트하여 연령이 그룹 분리에 미치는 영향을 평가하였다.
- [0170] 식품 알레르기를 가지는 그룹과 대조군, 또는 식품 알레르기가 지속 또는 식품 알레르기가 해소되는 그룹 사이에서 상이하게 발현되는 대사체를 확인하기 위하여, 식품 알레르기 해소와 유의하게 연관된 오메가-3 대사체에 대하여 진단에서 추적 관찰까지 paired t-test 또는 Wilcoxon 부호 순위 테스트를 수행하였다. 0.05 미만의 p-값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. MetaboAnalyst를 사용하여 트리 수를 500으로 설정하고 각 분할에서 시도된 변수 수를 7로 설정한 Random Forest 모델로 발현 수준이 유의하게 상이한 대사체가 구축되었다. ROC (Receiver operating characteristic) 곡선은 균형 잡힌 하위 샘플링 (balanced sub-sampling)을 사용하여 Monte Carlo 교차 검증에 의해 생성되었다.
- [0171] 또한, 선형 혼합 모델(LMM)을 사용하여 평균 대사체 수준에서 지속적인 식품 알레르기가 있는 대상체와 식품 알레르기가 해소된 대상체 간의 경향 변화를 평가하였다. LMM에는 구조화되지 않은 공분산 행렬이 적용되었다.
- [0172] 품질 관리 결과에 따라 또는 대상체 연령과 관련된 대사체를 제거한 후, 총 275개의 대사체가 확인되었다. 도 1은 식품 알레르기 및 식품 알레르기 해소된 그룹의 지도모델(supervised model)에서 데이터 패턴과 함께 sPLS-DA 플롯을 보여준다. sPLS-DA 모델에서 처음 두 구성 요소의 가중치는 식품 알레르기 그룹의 경우 16.5% 및 13%, 식품 알레르기가 해소된 그룹의 경우 9.5% 및 8.4%였다. 식품 알레르기 그룹과 식품 알레르기가 해소된 그룹에 대한 대상체의 클러스터링은 그룹 간 분리되는 경향을 보였고, 특히, 식품 알레르기가 해소된 그룹과 식품 알레르기가 지속된 그룹의 경계는 약간만 오버랩되며 뚜렷하게 구별되었다. 도 1c는 세 그룹을 모두 사용하여 확인된 sPLS-DA 모델에 대한 점수 플롯을 보여준다. 대조군과 식품 알레르기가 지속된 그룹이 상대적으로 잘 분리되는 것과 비교하여 식품 알레르기가 해소된 그룹은 다른 그룹의 경계 내에 위치하여, 식품 알레르기가 해소되는 경우는 식품 알레르기가 지속되는 경우 및 대조군에서의 대사 특징 모두와 오버랩 된다는 것을 알 수 있었다. 모든 플롯에서, 대상체의 분포는 연령별 클러스터링을 나타내지 않았으며 처음 5개 구성요소 중 어느 것도 연령과 유의한 상관관계가 없었다 (p-값 > 0.05).

[0173] 식품 알레르기를 가지는 대상체와 대조군을 비교한 결과, 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 유의하게 높은 수준의 8개 대사체와 유의하게 낮은 수준의 8개 대사체가 확인되었다. 도 2a는 생화학적 클래스에 따른 분류와 함께 이러한 대사체 중 12가지를 보여준다. 모든 스펙고지질 대사 산물의 수준은 대조군보다 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 일관되게 더 높게 나타났다. 탄소 수가 많고 이중 결합이 적은 6개의 아실카르니틴 (acylcarnitine) 대사체는 대조군보다 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 더 낮은 수준을 보이는 경향이 일반적이었다. 두 개의 리소포스파티딘산 (lysophosphatidic acid) 수준은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 더 높았다.

[0174] 도 2b는 식품 알레르기가 지속되는 대상체보다 식품 알레르기가 해소된 대상체에서 8개의 대사체가 유의하게 더 높고 4개의 대사체가 유의하게 더 낮음을 보여준다. 4 가지 오메가-3 대사체, 특히 식품 알레르기가 해소된 대상체에서 히드록시도코사헥사엔산(HDoHE)의 지속적으로 더 높은 수치가 관찰되었다. 식품 알레르기가 해소된 대상체의 오메가-3 대사산물 수준은 식품 알레르기가 지속되는 대상체보다 평균 1.66배 높았다. 2개의 리소포스파티딜콜린(LPC) 수치도 식품 알레르기가 해소된 피험자에서 더 높게 나타났다. 식품 알레르기 및 식품 알레르기 해소와 관련된 대사체의 전체 목록은 표 6과 같다.

표 6

[0176]

	평균 대사체 수준		p-value*
식품 알레르기와 연관	식품 알레르기 그룹	대조군	
LPG(22:5)	0.001017	0.000696	0.007995
AC(18:0)	0.000703	0.001035	0.009484
Glucosylceramide(d18:1/24:2)	0.000972	0.000663	0.009484
AC(22:0)	0.000824	0.001456	0.021077
LPA(20:5)	0.001491	0.00104	0.032643
PGH2	0.000724	0.001013	0.03493
5,15-diHETE	0.000651	0.000965	0.035011
AC(20:0)	0.00072	0.001017	0.035011
AC(19:0)	0.000696	0.000917	0.036855
LPA(22:5)	0.001128	0.000809	0.040175
Glucosylceramide(d18:1/24:1)	0.000937	0.000713	0.042985
Sphinganine(d18:0)	0.001156	0.000762	0.042985
Glucosylceramide(d18:1/22:2)	0.001077	0.000777	0.045954
LPC(24:1)	0.000966	0.000792	0.045954
AC(22:1)	0.000671	0.001067	0.04909
AC(24:0)	0.00082	0.001098	0.04909
식품 알레르기 해소와 연관	식품 알레르기 지속	식품 알레르기 해소	p-value*
LPE(22:5)	0.001254	0.000725	0.006216
17-HDoHE	0.000714	0.00126	0.007518
10-HDoHE	0.000776	0.00125	0.011286
13-HDoHE	0.000741	0.001194	0.013186
7-HDoHE	0.000773	0.001269	0.015457
LPE(20:3)	0.000861	0.000578	0.035942
PAF(16:1)	0.000849	0.000695	0.036515
LPA(20:1)	0.000722	0.00117	0.041768
Glucosylceramide(d18:1/14:0)	0.000906	0.001153	0.043421
LPC(12:0)	0.000757	0.002272	0.043421
LPC(22:3)	0.000873	0.000941	0.043421
LPE(16:1)	0.001337	0.00065	0.043421
LPS(20:0)	0.0008	0.001083	0.043421
LPS(20:4)	0.000747	0.001134	0.043421
LPA(20:4)	0.000697	0.000975	0.048788

[0177] FA, 식품 알레르기; LPG, 리소포스파티딜글리세롤; AC, 아실카르니틴; LPA, 리소포스파티딘산; PGH2, 프로스타글란딘 H2; diHETE, 디히드록시도코사테트라엔산; LPC, 리소포스파티딜콜린; LPE, 리소포스파티딜에탄올아민; HDoHE, 히드록시도코사헥사엔산; PAF, 혈소판 활성화 인자; LPS, 리소포스파티딜세린

- [0178] * 정규 분포 데이터에 대한 Welch의 t-검정 및 비모수 데이터에 대한 Mann-Whitney U 검정으로 계산된 p-값.
- [0180] 다음으로 분류의 정확성을 평가하기 위하여 유의하게 연관된 대사체를 사용하여 Random Forest 모델을 구축하였다 (도 3). 식품 알레르기 모델의 ROC 곡선 아래 면적은 0.708 (95% CI: 0.483 - 0.926)이고 식품 알레르기 해소 모델의 면적은 0.947 (95% CI: 0.748 - 1)이다. 식품 알레르기 해소 모델은 식품 알레르기 모델보다 더 높은 민감도와 전반적으로 더 나은 성능을 보였다. 식품 알레르기 해소의 대사 프로파일은 식품 알레르기 모델보다 더 독특하고 표현형에 더 특이적일 수 있음을 시사한다.
- [0182] **실시예 3. 식품 알레르기 지속성 여부에 따른 오메가-3 대사체 수준 차이**
- [0183] 식별 코호트 대상체의 오메가-3 대사체 수준 변화를 면밀히 조사하고자 식품 알레르기 진단 후 대사체 수준 변화에 대한 추적 관찰을 진행하였다.
- [0184] 식품 알레르기 해소와 유의하게 연관된 오메가-3 대사체의 진단에서 추적까지 대사체 수준 변화를 테스트하기 위해 paired t-test 또는 Wilcoxon signed-rank 테스트를 수행하였으며, 선형 혼합 모델(LMM)을 사용하여 평균 대사체 수준에서 식품 알레르기가 지속되는 대상체와 식품 알레르기가 해소된 대상체 간의 경향 변화를 평가하였다. LMM에는 구조화되지 않은 공분산 행렬이 적용되었다.
- [0185] 도 4는 진단 당시 식품 알레르기 해소와 유의하게 연관된 4 가지 오메가-3 대사체를 보여준다. 식품 알레르기가 해소된 대상체에서 4 가지 오메가-3 대사체 수준이 감소되는 추세와 대조적으로, 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서는 4 가지 오메가-3 대사체 수준이 증가하는 것으로 나타났다. 진단에서 추적 관찰까지의 평균 배수 변화는 7-HDoHE, 10-HDoHE, 13-HDoHE, 및 17-HDoHE에 대해 각각 식품 알레르기가 해소된 대상체에서 -1.47, -1.49, -1.44 및 -1.40로 확인되었고, 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서 1.38, 1.42, 1.77 및 1.34로 확인되었다. 비록 대사체 수준이 진단에서 추적 관찰까지 현저히 변화된 것은 아니지만 (작이론 t-검정 또는 Wilcoxon 부호 순위 검정 p-값 < 0.05), 식품 알레르기가 지속되는 대상체와 식품 알레르기가 해소된 대상체 사이의 경향은 유의하게 상이한 것으로 나타나 (선형 혼합 모델 p-값 < 0.05), 오메가-3 수준의 궤적이 정반대의 경향성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0187] **실시예 4. 오메가-3 대사체 수준에 영향을 미치는 SNP 분석**
- [0188] 오메가-3 대사체의 수준에 영향을 미치는 유전적 영향을 고려하여, 식별 코호트에서 파생된 데이터를 사용하여 유전자형 변이 및 4 가지 오메가-3 대사체의 수준에 대한 정량적 특성 연관성 분석을 진행하였다.
- [0189] 유전자형 분석은 식별 코호트의 전혈 샘플을 이용하여 Infinium Omni5Exome-4 BeadChip(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)로 수행되었다. 품질 관리 후 얻은 1,841,897 SNP에서 PLINK v.1.0.712를 사용하여 4개의 오메가-3 대사 산물에 대한 Wald 테스트를 사용하여 정량적 형질 연관 분석을 수행하였다. 0.05 미만의 Bonferroni 보정 p-값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 유전자형 데이터의 품질 관리를 위하여 결측률이 5% 보다 높거나, Hardy-Weinberg 평형 p-값이 10^{-5} 미만인 경우, 사례와 대조군 간의 결측률이 유의하게 다르거나(p-값 < 0.001), 소수 대립 유전자 빈도가 1% 미만인 경우는 SNP에서 배제하였다. 데이터는 R 버전 3.3(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 및 SAS 버전 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였다.
- [0190] 4 가지 오메가-3 대사체에 대한 식별 코호트의 대상체에서 대사체 수준과 유의하게 연관된 SNP가 확인되었다. 1,841,897개의 SNP 중 4개는 하나 이상의 오메가-3 대사체 수준과 유의하게 연관되어 있었다 (Bonferroni 보정 p-값 < 0.05)(표 7).

표 7

[0192] SNP 및 오메가-3 대사체 수준의 정량적 특성 연관 분석

SNP	Location	Gene	Minor allele	MAF	Metabolite	Bonferroni corrected p-value	Mean metabolite level by genotype		
							mm	Mm	MM

rs7274775	20:9742727	PAK5	T	0.10	7-HDoHE	0.00155	0.004243	0.001725	0.0008027
					10-HDoHE	0.005272	0.00412	0.001638	0.0008121
					13-HDoHE	0.002903	0.004271	0.001689	0.000777
					17-HDoHE	0.03749	0.004284	0.001628	0.0007791
rs6957108	7:96996807	DLX6-AS1	T	0.18	7-HDoHE	0.03427	0.004243	0.00146	0.0007158
					17-HDoHE	0.02822	0.004284	0.001442	0.000673
rs235907	1:171592086	PRRC2C	C	0.08	13-HDoHE	0.03533	0.004271	0.001712	0.0008265
rs8039336	15:26680254	GABRB3	T	0.08	13-HDoHE	0.01411	0.004271	0.001753	0.008218

[0193] SNP, 단일 뉴클레오티드 다형성; HDoHE, 히드록시도코사헥사엔산; MAF, 마이너 대립유전자 빈도; mm, 소수 대립유전자 동형 집합체; Mn이형 집합체; MM, 주요 대립 유전자 동형 집합체SNP 위치는 GRCh38/hg38 게놈 어셈블리에 해당함

[0195] PAK5 내에 위치하는 SNP rs7274775는 4 가지 오메가-3 대사 산물 모두와 연관이 있는 것으로 확인되었다. DLX6-AS1에서의 SNP는 7-HDoHE 및 17-HDoHE와 연관되었고 PRRC2C 및 GABRB3의 SNP는 13-HDoHE와 연관되었다. 4개의 SNP는 모두 다른 유전자좌에 위치하였다.

[0197] 실시예 5. 레졸빈 정량 분석

[0198] 생물학적 시스템 내에서 HDoHE 대사체는 아라키도네이트 15-리폭시게나제(ALOX15) 및 아라키도네이트 5-리폭시게나제(ALOX5)와 반응하여 D-시리즈 레졸빈이라고 하는 효과기 분자 그룹을 생성하는 것으로 알려져 있다. 이에, 오메가-3 대사체와 식품 알레르기 해소 사이의 연관성에 대한 상기 결과를 추가로 검증하기 위하여 정량 코호트의 대상체에서 RvD1 및 RvD2의 수준을 정량화하였다.

[0199] 정량 코호트의 혈청 샘플을 사용하여 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)을 수행하여 제조사의 지침에 따라 레졸빈 D1 (RvD1)과 레졸빈 D2 (RvD2) (Mybiosource, San Diego, CA, USA)의 수준을 측정하였다. 한 샘플에서 음성 분석 결과가 나오면 추가 분석에서 배제하였다. 그룹 간의 대사체 수준과 효소 활성의 차이를 평가하기 위하여 데이터의 정규성에 따라 Welch의 2-표본 t-검정 또는 Mann-Whitney U 검정을 사용하였다. 대사체 수준과 식품 알레르기 중앙 표현형 간의 상관관계를 조사하기 위하여 데이터 분포에 따라 Pearson의 상관분석 또는 Spearman의 상관분석을 사용하여 총 혈청 IgE 수준을 평가하였다. 데이터의 정규성은 Shapiro-Wilk 테스트를 사용하여 확인되었다.

[0200] 그 결과, 도 4에서와 같이 RvD1 및 RvD2 수준은 식품 알레르기가 해소된 대상체 및 식품 알레르기가 지속되는 대상체 간에 유의하게 차이가 있을 뿐 아니라, 식품 알레르기가 있는 대상체와 건강한 대조군 사이에서도 차이가 있었다. 두 레졸빈은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 높게 나타났고, 특히 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서 더 높게 나타났다.

[0201] RvD1의 중앙값은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 295.7pg/mL(IQR: 248.0-334.4), 대조군에서 250.0pg/mL(IQR: 225.3-259.0) 이었다. 또한, 식품 알레르기가 해소되는 대상체에서 RvD1의 중앙값은 260.1pg/mL (IQR: 234.0-326.0)이었고 식품알레르기가 지속되는 대상체에서 RvD1의 중앙값은 300.2pg/mL (IQR: 259.9-334.9)이었다.

[0202] RvD2의 중앙값은 식품 알레르기를 가지는 대상체에서 137.9pg/mL (IQR: 122.1-161.8), 대조군에서는 122.0pg/mL (IQR: 114.7-134.7) 이었다. 또한, 식품 알레르기가 해소되는 대상체 (125.9pg/mL (IQR:116.0-152.5)와 비교하여, 식품 알레르기가 지속되는 대상체 (149.3pg/mL (IQR:130.5-176.7)) 에서 RvD2 수준이 훨씬 더 높은 것으로 관찰되었다. RvD1 및 RvD2 수준 모두 대조군보다 식품 알레르기가 지속되는 대상체에서 유의하게 더 높았다.

[0203] 총 혈청 IgE 수준과 RvD1 또는 RvD2 사이에는 상관 관계가 관찰되지 않았다 (도 5).

[0205] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이

러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

[0207]

FA: 식품 알레르기 (food allergy)

IgE: 면역글로불린 E (immunoglobulin E)

SNP: 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphism)

LC-MS: 액체 크로마토그래피-질량 분석법 (liquid chromatography-mass spectrometry)

sPLS-DA: 희소 부분 최소 제곱 판별 분석 (sparse partial least squares-discriminant analysis)

ROC: 수신자 조작 특성 (receiver operating characteristic)

LMM: 선형 혼합 모델 (linear mixed model)

ELISA: 효소 면역 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay)

SD: 표준편차 (standard deviation)

HDoHE: 하이드록시도코사헥사엔산 (hydroxydocosahexaenoic acid)

LPC: 리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine)

CI: 신뢰 구간 (confidence interval)

PAK5: p21(RAC1) 활성화된 키나제 5 (p21 (RAC1) activated kinase 5)

DLX6-AS1: 말단 없는 호메오박스 6 안티센스 RNA 1 (distal-less homeobox 6 antisense RNA 1)

PRRC2C: 프롤린 풍부 코일드 코일 2C (proline-rich coiled-coil 2C)

GABRB3: 감마-아미노부티르산 A형 수용체 서브유닛 베타3 (gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3)

ALOX15: 아라키도네이트 15-리폭시게나제 (arachidonate 15-lipoxygenase)

ALOX5: 아라키도네이트 5-리폭시게나제 (arachidonate 5-lipoxygenase)

IQR: 사분위수 범위 (interquartile range)

EPA: 에이코사펜타엔산 (eicosapentaenoic acid)

DHA: 도코사헥사엔산 (docosahexanoic acid)

IFN: 인터페론 (interferon)

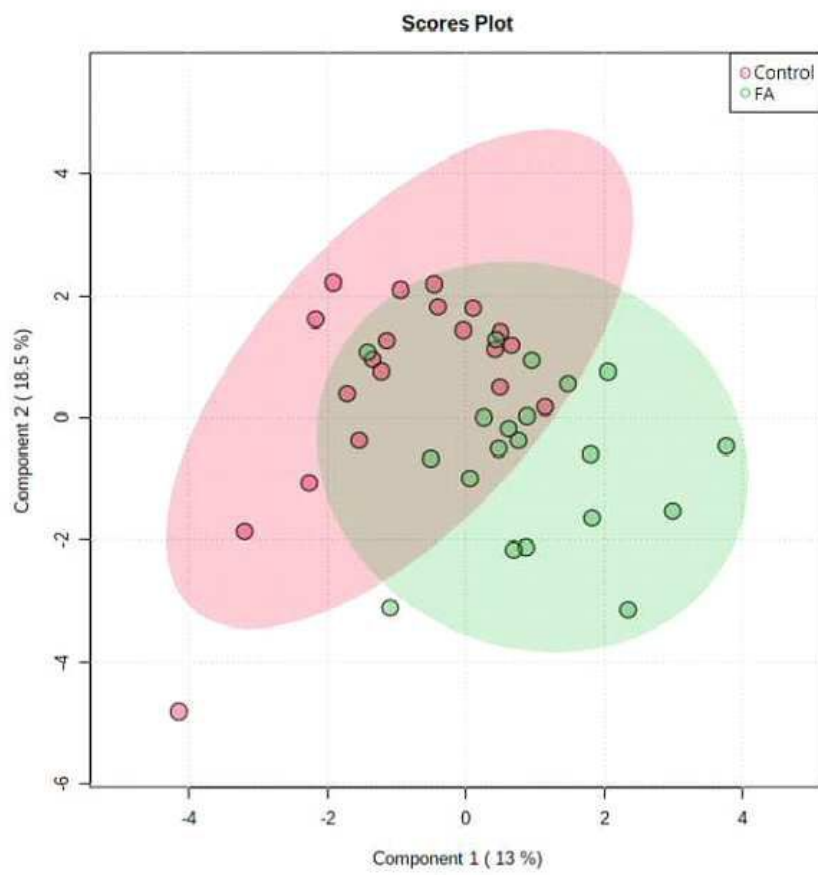
Th2: T 헬퍼 2 (T helper 2)

ORMDL3: ORMDL 스핑고리피드 생합성 조절제 3 (ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3)

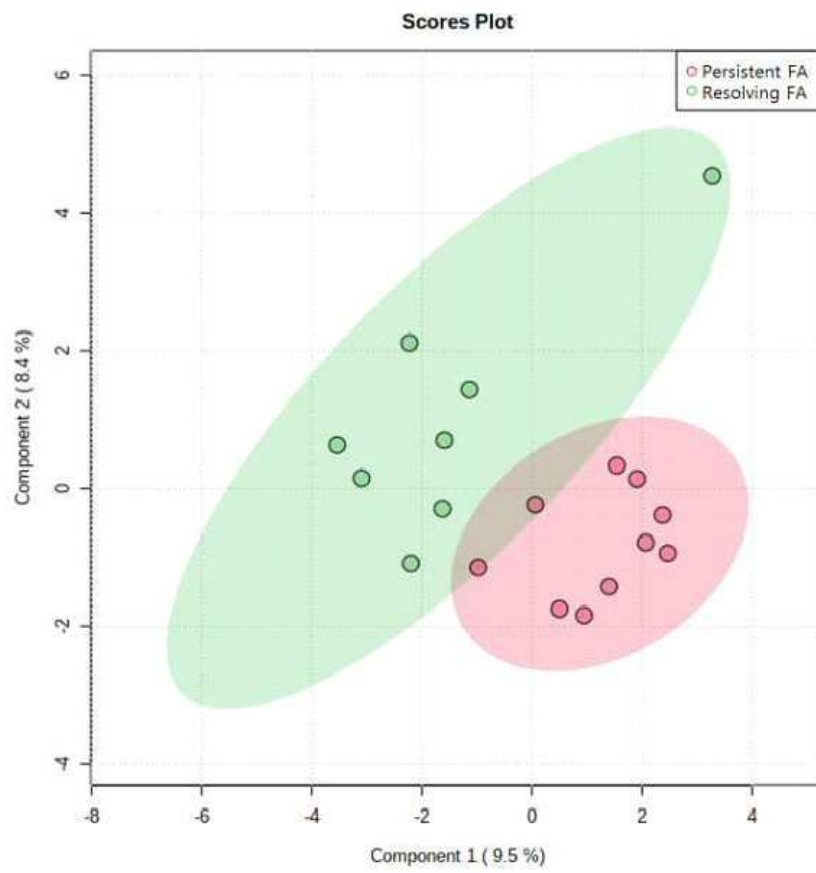
AD: 아토피 피부염 (atopic dermatitis)

도면

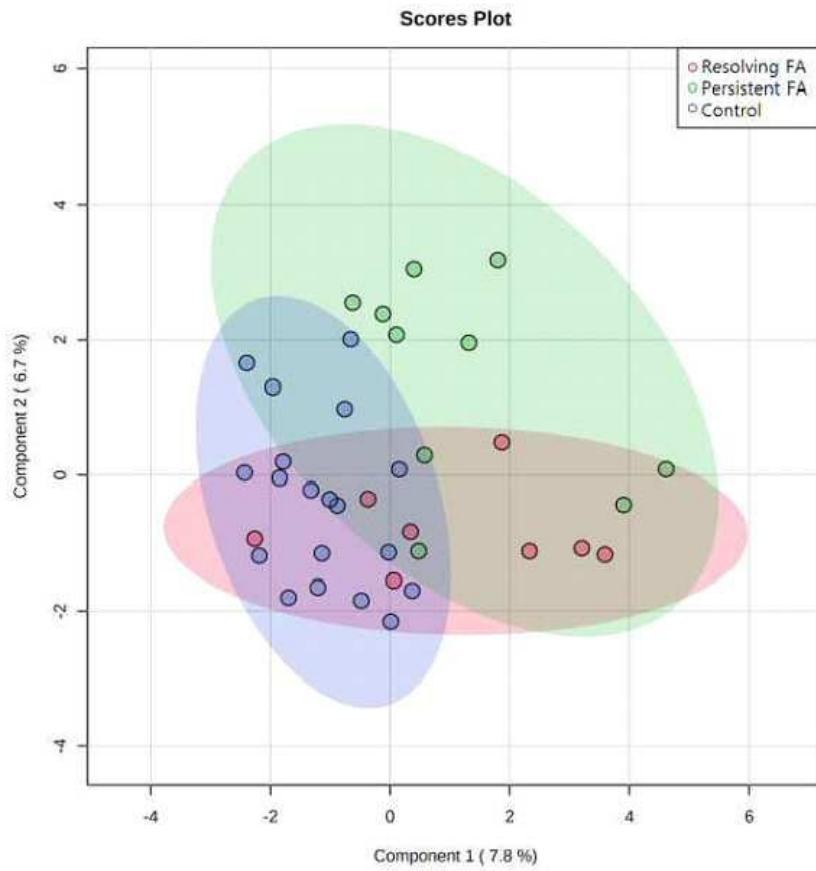
도면1a



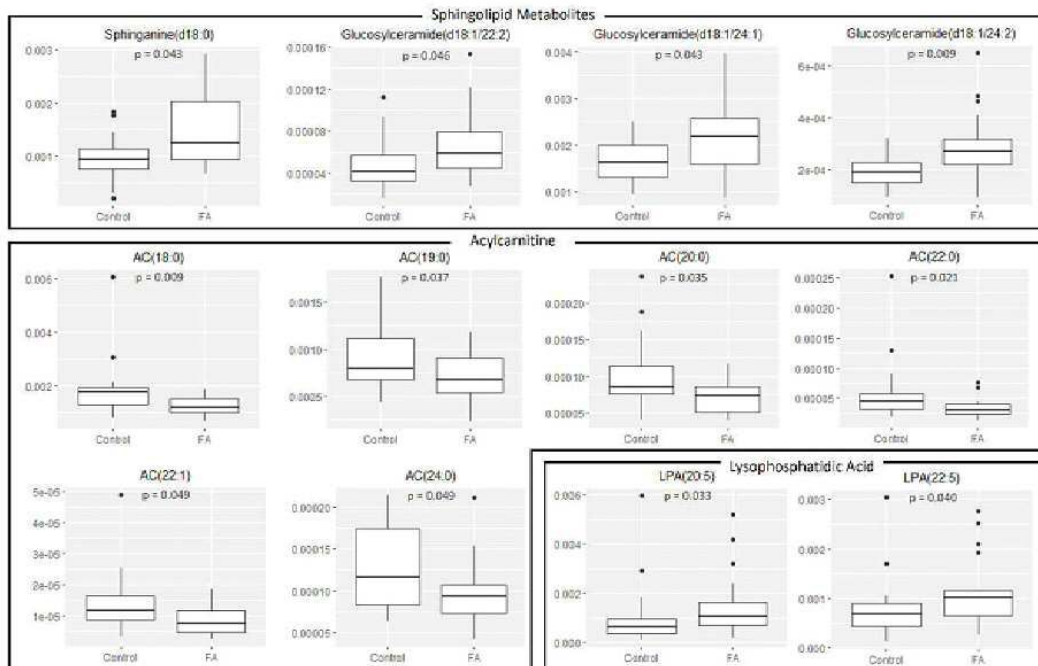
도면1b



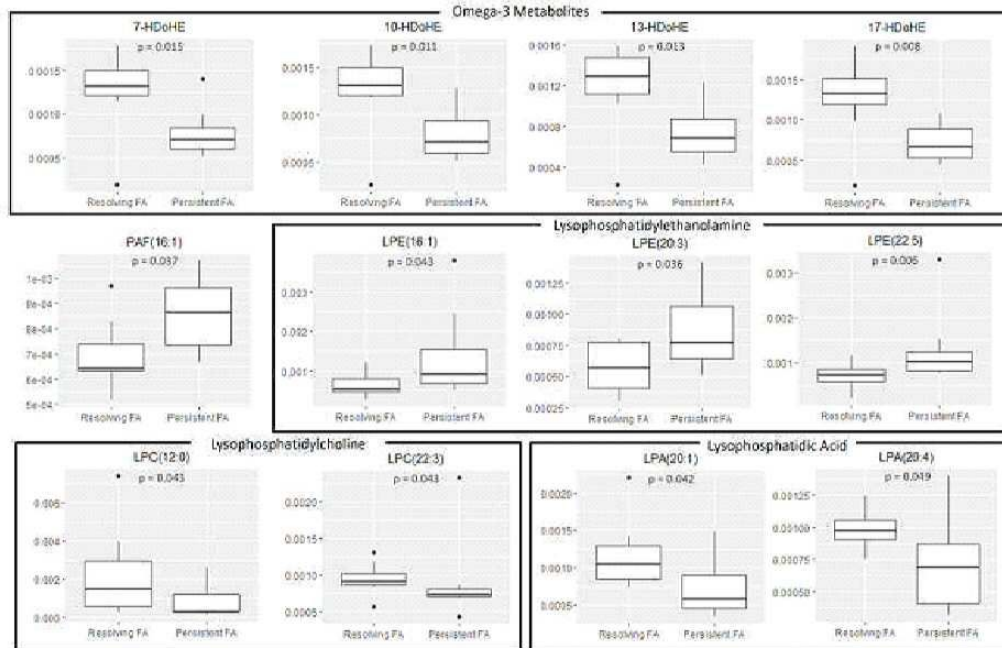
도면1c



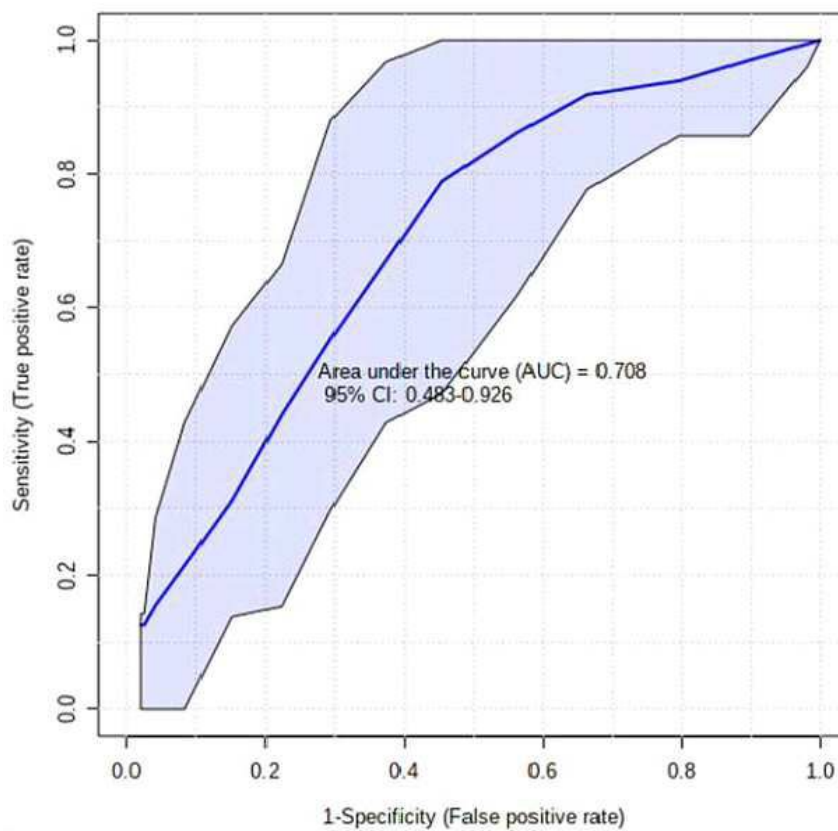
도면2a



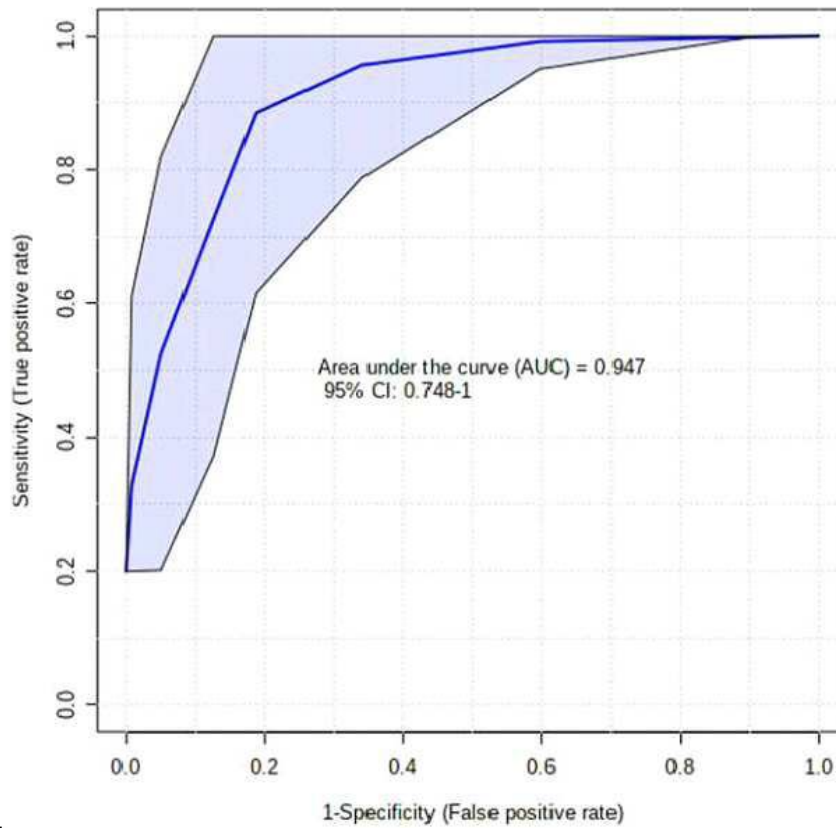
도면2b



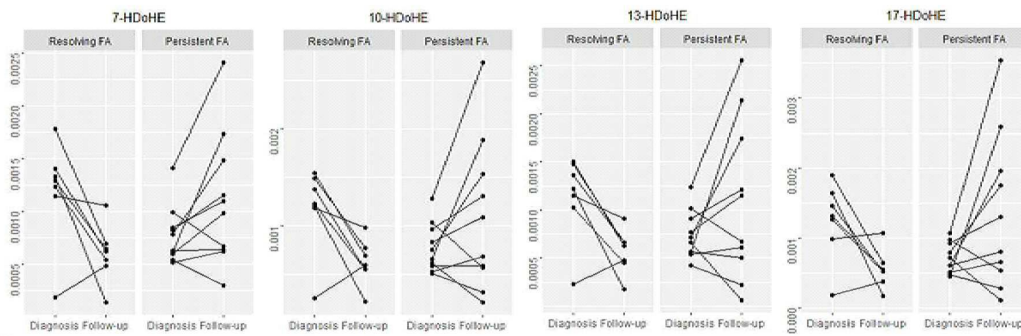
도면3a



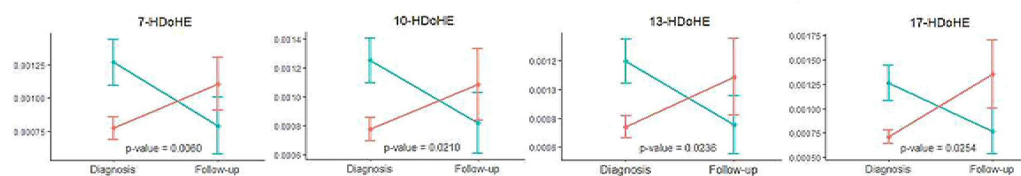
도면3b



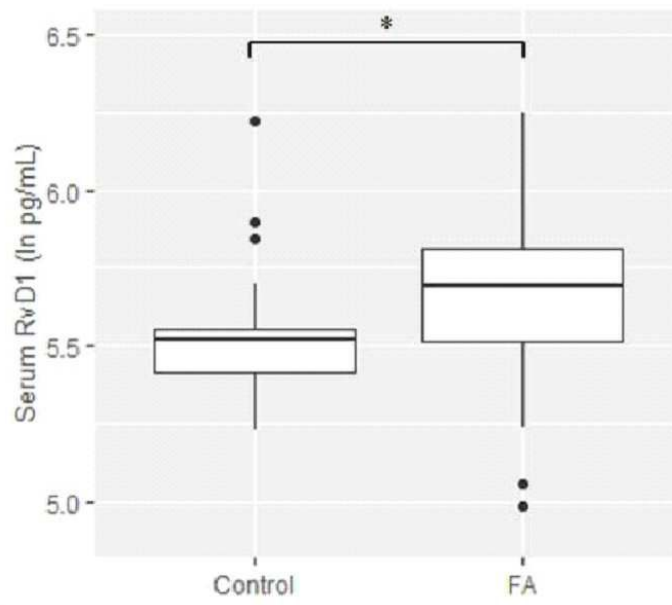
도면4a



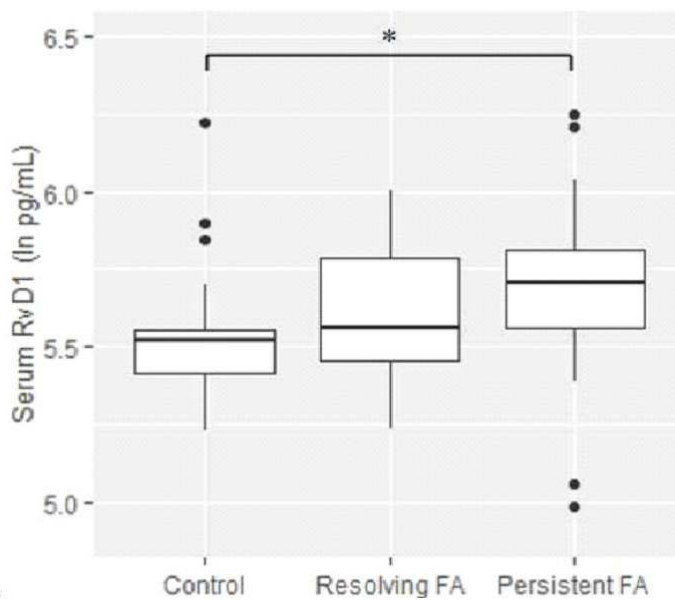
도면4b



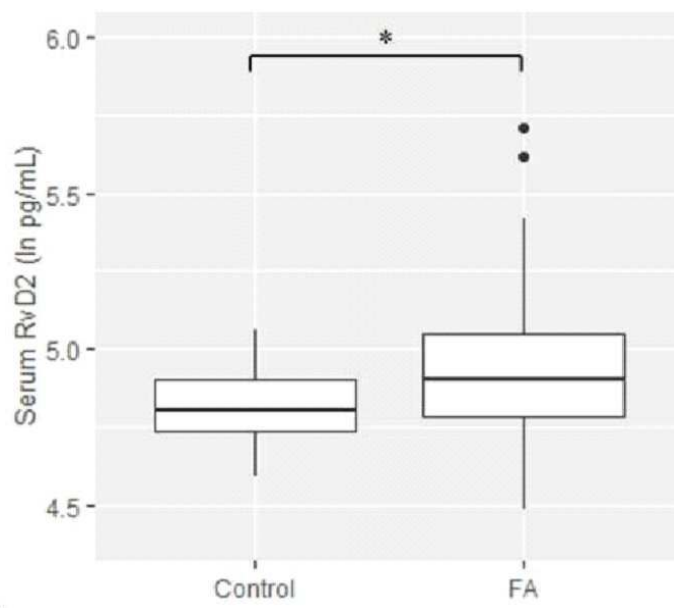
도면5a



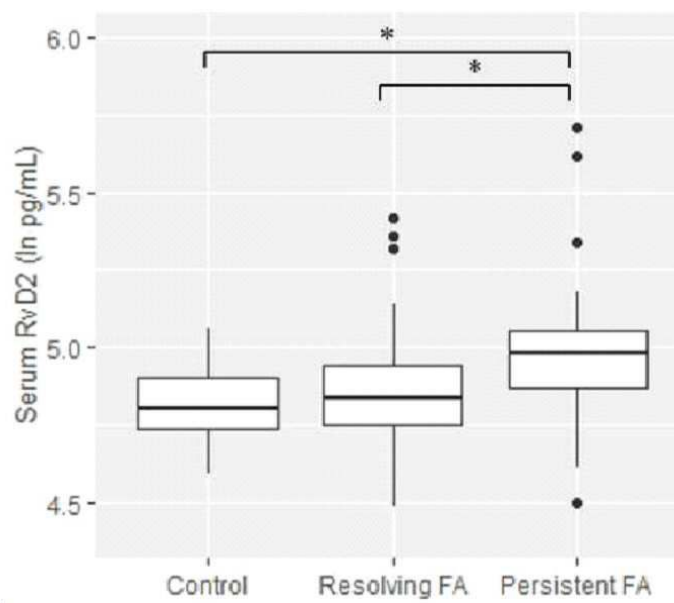
도면5b



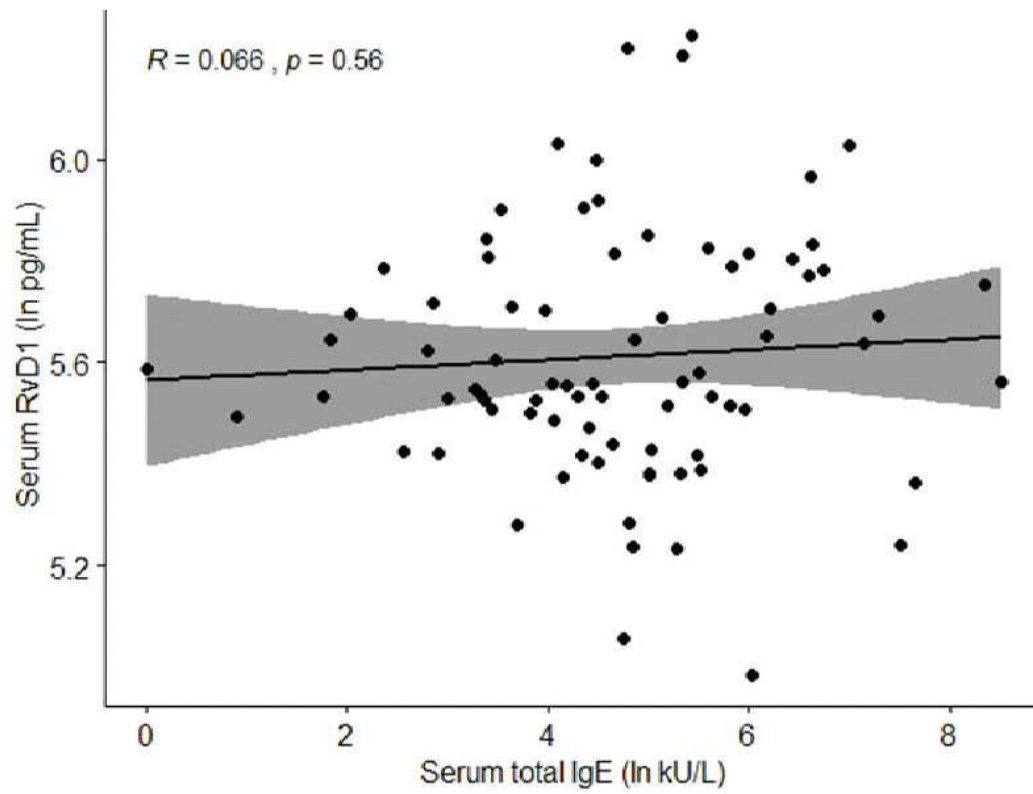
도면5c



도면5d



도면6a



도면6b

