	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0030074 (43) 공개일자 2018년03월21일
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>A61K 31/135</i> (2006.01) <i>A61K 31/198</i> (2006.01) <i>A61K 31/355</i> (2006.01) <i>A61K 31/385</i> (2006.01) <i>G01N 33/92</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>G01N 33/6896</i> (2013.01) <i>A61K 31/135</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7003374 (22) 출원일자(국제) 2016년07월14일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2018년02월02일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/066825 (87) 국제공개번호 WO 2017/009437 국제공개일자 2017년01월19일 (30) 우선권주장 15382366.1 2015년07월14일 유럽특허청(EPO)(EP)</p>		<p>(71) 출원인 편다시오 인스티튜트 드'인베스티가시오 바이오 메디칼 드 벨리비티게 (아이디벨) 스페인 바르셀로나 이-08908-엘' 오스피탈레트 데 요브레가트, 199, 그랜 비아 데 엘' 오스피탈레트, 3에이 프란타, 호스피탈 두란 아이 레이날스</p> <p>인스티튜트 데 레세르카 비오메디카 데 레리다 폰다시오 닥터 피파레 스페인 이-25198 레리다 80 아베니다 알칼데 로비라 로우레 (뒷면에 계속)</p> <p>(72) 발명자 푸홀 오노프레 아우로라 스페인 바르셀로나 이-08860 시체스 레 보티게스 드 시체스 가라프 2 에라프론야 21 포르테로 오틴 마누엘 스페인 이-25003 레리다 1 빅토르 시우라나 플라카 유니베르시타트 데 레리다 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 유미특허법인</p>

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **부신백질이영양증의 진단 및 치료 방법과 조성물**

(57) 요약

본 발명은 여러가지 마커들의 수준 식별에 기초하여 개체에서 부신백질이영양증을 진단하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 부신백질이영양증의 진행을 모니터링하는 방법, 부신백질이영양증 요법의 효과를 모니터링하기 위한 방법, 및 부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한, 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2013.01)
A61K 31/355 (2013.01)
A61K 31/385 (2013.01)
G01N 33/92 (2013.01)
G01N 2405/08 (2013.01)
G01N 2800/285 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)

(71) 출원인

우니베르시타트 데 레리다

스페인 이-25003 레리다 1 빅토르 시우라나 플라카
**인스티튜시오 카탈라나 드 르세르카 아이 에스투디
스 아반카츠**

스페인 이-08010 바르셀로나, 23, 파세이그 루이스
컴패니즈

**아드미니스트라시온 헤네칼 데 라 코무니다드 아우
토노마 데 에우스카디**

스페인 알라바 이-01010 비토리아 - 가스테이스 1
도노스티아 - 산 세바스티안

(72) 발명자

팜플로나 그라스 레이날도

스페인 이-25003 레리다 1 빅토르 시우라나 플라카
우니베르시타트 데 레리다

로페즈 드 무나인 아레기 아돌포 호세

스페인 이-20014 산 세바스티안 - 기푸스코아
에스/엔 파세오 디알. 베지리스타인 세르비시오 드
네우롤로지아 - 에디피시오 아마라 호스피탈 드 도
노스티아

호베 폰트 마리오나

스페인 이-25198 레리다 80 아베니다 알칼데 로비
라 로우레

푸르카드 스테판

스페인 이-08003 바르셀로나 킨토 피소 프린세사
36

명세서

청구범위

청구항 1

개체에서 부신백질이영양증 (adrenoleukodystrophy)을 진단하는 방법으로서,

상기 개체 유래 샘플에서, 하기 인자들로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 확인하는 단계를 포함하며:

- 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준,
- 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- 아디포넥틴의 발현 수준,
- 네오프테린의 수준,
- 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,

상기 방법에서, 기준치 (reference value) 대비,

스펙고신-1-포스페이트의 수준 증가,

스펙고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준 증가,

스펙고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,

아디포넥틴의 발현 수준 감소,

네오프테린의 수준 증가,

표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,

표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는

표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는, 상기 개체가 부신백질이영양증을 앓고 있음을 의미하며,

상기 인자가 종양 괴사 인자 A의 발현 수준일 경우, 부신백질이영양증은 염증성 탈수초화 (inflammatory demyelination)를 동반하지 않고 발생하는, 진단 방법.

청구항 2

부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증의 진행을 모니터링하는 방법으로서,
상기 개체 유래 샘플에서, 하기 인자들로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 확인하는 단계를 포함하며:

- 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준,
- 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- 아디포넥틴의 발현 수준,
- 네오프테린의 수준,
- 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,

상기 방법에서, 동일 개체에 대해 그 이전에 수득한 샘플에서 측정된 인자를 기준으로,

스펙고신-1-포스페이트의 수준 증가,

스펙고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준 증가,

스펙고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,

아디포넥틴의 발현 수준 감소,

네오프테린의 수준 증가,

표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,

표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는

표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 부신백질이영양증의 악화를 의미하거나, 또는

동일 개체에 대해 그 이전에 수득한 샘플에서 측정된 인자를 기준으로,

스펙고신-1-포스페이트의 수준 감소,

스펙고신-2-포스페이트 키나제의 수준 감소,

스펙고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,

아디포넥틴의 발현 수준 증가,

네오프테린의 수준 감소,

표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소
 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,
 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는
 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 부신백질이영양증의 완화를 의미하는, 모니터링 방법.

청구항 3

부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증 요법 (adrenoleukodystrophy therapy)의 효과를 모니터링하는 방법으로서,

상기 개체 유래 샘플에서, 하기 인자들로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 확인하는 단계를 포함하며:

- 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준,
- 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- 아디포넥틴의 발현 수준,
- 네오프테린의 수준,
- 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,

상기 방법에서, 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,

스펙고신-1-포스페이트의 수준 증가,

스펙고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준 증가,

스펙고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,

아디포넥틴의 발현 수준 감소,

네오프테린의 수준 증가,

표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,

표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는

표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 상기 요법이 효과가 없다는 것을 의미하거나, 또는 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,

스핑고신-1-포스페이트의 수준 감소,

스핑고신-2-포스페이트 키나제의 수준 감소,

스핑고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,

아디포넥틴의 발현 수준 증가,

네오프테린의 수준 감소,

표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소

표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,

표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,

표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,

표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는

표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 상기 요법이 효과적이라는 것을 의미하는, 모니터링 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 요법이 항산화제 화합물을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항산화제 화합물이 N-아세틸시스테인, 리포산 (lipoic acid) 및 비타민 E의 조합물인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부신백질이영양증이 염증성 탈수초화의 동반없이 발생하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플이 말초 단핵구 세포를 함유한 샘플인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부신백질이영양증이 성인 부신척수신경병증 (AMN, adult adrenomyeloneuropathy), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN, cerebral adrenomyeloneuropathy) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD, childhood variant of adrenoleukodystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 스핑고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 저해제가 핀골리모드 (fingolimod), 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 핀골리모드 유사체가 시포니모드 (siponimod)인, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부신백질이영양증이 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제.

청구항 13

스펙고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제; 및

α -리포산, 비타민 E 및 N-아세틸시스테인으로부터 선택되는 항산화제, 미토콘드리아 타겟팅 항산화제 (antioxidant targeted to mitochondria), 히스톤 탈아세틸효소 저해제 (histone deacetylase inhibitor), 미토콘드리아 전이공 개방 저해제 (inhibitor of mitochondria transition pore opening), 항-염증제, PPAR 작용제, RXR 작용제, 시르투인 1 작용제 (sirtuin 1 agonist), 지질강하제 (hypolipidemic drug), 헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물 및 자가포식 활성화인자 (autophagy activator)로부터 선택되는 하나 이상의 약물을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제가 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인, 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 핀골리모드 유사체가 시포니모드인, 약학적 조성물.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한, 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 부신백질이영양증이 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 18

제9항 내지 제12항 또는 제16항 또는 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해제는 제1항, 제2항 또는 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용해 진단받은 환자에게 투여되는, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제 또는 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 환자는, 상기 저해제 또는 상기 약학적 조성물의 투여 전에, 제1항, 제2항 또는 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용해 진단된, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제 또는 약학적 조성물.

청구항 20

제9항 내지 제12항 또는 제16항 또는 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 부신백질이영양증이 염증성 탈수초화의 동반없이 발생하는, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제 또는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진단 및 치료 분야에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 부신백질이영양증의 진단 및 치료 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] X-연관된 부신백질이영양증 (X-ALD, OMIM number 300100)은, 신생아 17,000명 중 1명 비율로 발생하는, 가장 흔한 단일유전성 백질위축 및 과산화소체 장애이다. X-ALD는 뇌에서 중추 염증성 탈수초 현상 및/또는 척수에서 축삭변성으로 이어지는 느리게 진행되는 강직성 반신마비가 특징적이다. X-ALD는, 매우 긴 장쇄 지방산 ($C \geq 22:0$)과 매우 긴 장쇄 지방산-CoA 에스테르를 분해하기 위해 퍼옥시좀내로 이송하는데 관여하는 내재된 퍼옥시좀 막 단백질인, ATP-결합 카세트 트랜스포터를 코딩하는 *ABCD1* 유전자 (Xq28)의 돌연변이에 의해 유발된다. *ABCD1* 트랜스포터의 기능이 손상되면, 매우 긴 장쇄 지방산이 축적되고, 장기 및 조직에서 매우 긴 장쇄 지방산, 특히 병리특징적인 질환 마커인 헥사코사노익산 ($C26:0$)의 β -산화 손상이 발생한다.

[0003] 질환의 주된 변형 형태 3종이 알려져 있다. 한가지는 부신척수신경병증 (AMN)으로 알려진, 성인에서 발병하는 후기 발병형이다. 환자는 주 증상으로 척수의 길질척수로와 관련된 말초 신경병증 및 말초 축삭병증 - 과도한 염증성 탈수초화 증상은 없음 -과 강직성 반신마비를 나타낸다. 이 형태는 궁극적으로 치명적인 형태, 성인에서 뇌 염증성 탈수초화, cAMN으로 발전할 수 있다. 아동기 뇌형인 cALD도 발생 증상은 비슷하다. cALD 환자의 경우, 지금까지 유일한 치료법이 동종이계 골수 이식이지만, 이 방법은 이환율과 사망율이 높고, 거의 무증상성 X-ALD 어린이에게만 적용가능하다. 최근 들어, 렌티바이러스 벡터를 이용해 *ABCD1* cDNA를 가진 CD34+ 세포를 교정하는 유전자 요법 방식이 성공적인 것으로 입증된 바 있으며, 이 방법은 침습성이 낮은, 우수한 이식 대안법이다.

[0004] 이와는 대조적으로, AMN 환자의 경우, 지금까지 만족스러운 치료법은 없는 실정이다. 질환의 원인이 되는 병리기전에 대한 연구에서, 과량의 $C26:0$ 가 미토콘드리아 산화 인산화 (OXPHOS) 기능을 파괴하여, 미토콘드리아 ROS를 유도하는 것으로 추측되었다. 이 현상이 미토콘드리아 생물발생 (mitochondrial biogenesis) 및 미토콘드리아와 퍼옥시좀 간의 교차 작용 (cross-talk)의 근간이 되는 미토콘드리아 칼슘 신호전달을 파괴하므로, 이 질환의 요인으로서 이차적인 미토콘드리아의 관여에 주목하게 되었다. 이 경로에서, 약물의 타겟이 될 수 있는, PGC-1 α , Sirt1 또는 mTOR 등의 타겟의 식별은, *Abcd1*-마우스 모델 (AMN 모델)에서 전임상 실험의 성공으로 이어졌으며, 임상 실험이 확보되었다. X-ALD의 전체 임상 스펙트럼은 단일 유전자, *ABCD1*내 돌연변이에 의해 시작되지만, 탈수초화, 염증성 프로세스, 축삭 변성 및 부신기능부전의 병리기전에는 명확한 차이를 보인다. 따라서, X-ALD /XAMN의 임상 징후를 발현하는데 결정적으로 작용하는 부가적인 병리학적 요인들이 존재하여야 한다. 산화적 스트레스 또는 프로테아좀 및 미토콘드리아 구획의 기능부전을 비롯해, 신경 조직에 존재하는 일부 분자 병리학적 측면들은, 과량의 $C26:0$ 와의 인큐베이션을 통해 섬유모세포 또는 다른 세포에서 재현될 수 있다. 이런 성과에도 불구하고, 퍼옥시좀 지방산 대사에서의 한가지 결함이 어떻게 이러한 다양한 신경학적 표현형 (neurologic phenotype)을 발생시킬 수 있는 지에 대해서는 불명확하다.

[0005] 따라서, 질환의 진단이 가능할 뿐만 아니라 질환의 진행과 치료법의 효과를 모니터링할 수 있는 새로운 바이오마커가 필요한 실정이다.

발명의 내용

- [0006] 놀랍게도, 본 발명자들은, X-ALD를 앓고 있는 환자가 스펡고신 키나제 (SPHK) 경로의 증가를 보이며, 이로써 SPHK2 효소 및 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1 뿐만 아니라 SPHK 산물 스펡고신-1-포스페이트 (S1P)의 수준이 증가한다는 것을 확인하였다 (실시예 1). 또한, Abcd1^{-/-} 마우스의 척수에 대한 기능성 게놈 분석을 X-ALD 환자에 대한 비-타겟 대사체 분석과 결합하여, 본 발명자들은 X-ALD 환자에서 수준이 변화되는 바이오마커 시리즈들을 동정하였다 (실시예 2). 이로써, 이러한 분자들의 수준을 이용하여 X-ALD를 진단하고, 질환의 진행을 모니터링 하거나 또는 X-ALD 환자가 치료법에 반응하는 지를 결정할 수 있다.
- [0007] 이에, 제1 측면에서, 본 발명은 하기 인자 (value)로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 샘플에서 확인 하는 단계를 포함하는, 개체에서 부신백질이영양증을 진단하는 방법에 관한 것으로서:
- [0008] - 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- [0009] - 스펡고신 키나제 2의 발현 수준,
- [0010] - 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- [0011] - 아디포넥틴의 발현 수준,
- [0012] - 네오프테린의 수준,
- [0013] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0014] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0015] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0016] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0017] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0018] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0019] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0020] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0021] 상기 방법에서, 기준치 (reference value) 대비,
- [0022] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0023] 스펡고신 키나제 2의 수준 증가,
- [0024] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0025] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0026] 네오프테린의 수준 증가,
- [0027] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0028] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0029] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0030] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0031] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,
- [0032] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0033] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0034] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는, 개체가 부신백질이영양증을 앓고 있음을 의미하는 것이고,

- [0035] 상기 인자가 종양 괴사 인자 A의 발현 수준일 경우, 부신백질이영양증은 염증성 탈수초화를 동반하지 않고 발생한다.
- [0036] 제2 측면에서, 본 발명은, 하기 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 샘플에서 확인하는 단계를 포함하는, 부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증의 진행을 모니터링하는 방법에 관한 것으로서:
- [0037] - 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- [0038] - 스펡고신 키나제 2의 발현 수준,
- [0039] - 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- [0040] - 아디포넥틴의 발현 수준,
- [0041] - 네오프테린의 수준,
- [0042] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0043] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0044] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0045] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0046] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0047] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0048] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0049] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0050] 상기 방법에서, 동일 개체에 대해 그 이전에 취득한 샘플에서 측정된 인자에 대해,
- [0051] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0052] 스펡고신 키나제 2의 수준 증가,
- [0053] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0054] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0055] 네오프테린의 수준 증가,
- [0056] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0057] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0058] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0059] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0060] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,
- [0061] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0062] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0063] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 부신백질이영양증의 악화를 의미하거나, 또는 동일 개체에 대해 그 이전에 취득한 샘플에서 측정된 인자에 대해,
- [0064] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 감소,
- [0065] 스펡고신 키나제 2의 수준 감소,
- [0066] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,
- [0067] 아디포넥틴의 발현 수준 증가,

- [0068] 네오프테린의 수준 감소,
- [0069] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0070] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0071] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소
- [0072] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0073] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,
- [0074] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0075] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는
- [0076] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 부신백질이영양증의 완화를 의미한다.
- [0077] 제3 측면에서, 본 발명은, 하기 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 샘플에서 확인하는 단계를 포함하는, 부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증 요법의 효과를 모니터링하는 방법에 관한 것으로서:
- [0078] - 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- [0079] - 스펡고신 키나제 2의 발현 수준,
- [0080] - 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- [0081] - 아디포넥틴의 발현 수준,
- [0082] - 네오프테린의 수준,
- [0083] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0084] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0085] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0086] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0087] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0088] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0089] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0090] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0091] 상기 방법에서, 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,
- [0092] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0093] 스펡고신 키나제 2의 수준 증가,
- [0094] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0095] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0096] 네오프테린의 수준 증가,
- [0097] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0098] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0099] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0100] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0101] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,

- [0102] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0103] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0104] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 그 요법이 효과가 없다는 것을 의미하거나, 또는 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,
- [0105] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 감소,
- [0106] 스펡고신 키나제 2의 수준 감소,
- [0107] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,
- [0108] 아디포넥틴의 발현 수준 증가,
- [0109] 네오프테린의 수준 감소,
- [0110] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0111] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0112] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소
- [0113] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0114] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,
- [0115] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0116] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는
- [0117] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 그 요법이 효과적이라는 것을 의미한다.
- [0118] 아울러, 본 발명자들은, X-ALD 환자를 항산화제로 치료하면 S1P 수준이 감소한다는 것을 발견하였으며, 이는 예를 들어 핀골리모드 (fingolimod)와 같은 S1PR1의 저해제 등의 S1P 수준을 낮추는 분자를 이용한 X-ALD 치료 기회를 열어준다.
- [0119] 이에, 제4 측면에서, 본 발명은 부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제에 관한 것이다.
- [0120] 제5 측면에서, 본 발명은, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제; 및 α -리포산, 비타민 E 및 N-아세틸시스테인으로부터 선택되는 항산화제, 미토콘드리아 타겟팅 항산화제, 히스톤 탈아세틸효소 저해제, 미토콘드리아 전이공 개방 저해제 (inhibitor of mitochondria transition pore opening), 항-염증제, PPAR 작용제, RXR 작용제, 시르투인 1 작용제 (sirtuin 1 agonist), 지질강하제 (hypolipidemic drug), 헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물 및 자가포식 활성화인자 (autophagy activator)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0121] 제6 측면에서, 본 발명은 부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는데 사용하기 위한 제5 측면의 약학적 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0122] **도 1. A.** 스펡고신-2-포스페이트 키나제 및 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 수준은, 건강한 대조군과 비교해, AMN 환자 유래의 말초 단핵구 세포에서 상승한다. Q-PCR 결과. **B.** 건강한 대조군 대비, 항산화제 처리 전과 후의 AMN 환자 유래 말초 단핵구 세포에서의 스펡고신-1-포스페이트 수준. 수준은 ESI-Q-TOF와 연계된 HPLC 1290 시리즈를 이용해 분석하였다. 대사체 분석 결과. 유의한 차이는 ANOVA 및 후속적인 Tukey HSD *post hoc* (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)으로 측정하였다.

도 2. AMN 환자 유래의 체액내 산화된 고도 불포화된 지방산 에이코사노이드 및 아디포킨의 수준 (n = AMN 환자 13명 및 건강한 개체 13명, 나이 및 성별이 각각 매칭됨). **(A)** 3.5월령 및 12월령에서 *Abcd1*-척수에서의 *B4galnt6*, *Pla2g4c*, *Cept1*, *Rdh11*, *Cyp27a1*, *Ppar α* , *Ppar β/δ* , *Ppar γ* 및 *Gpx4* 유전자 발현. 유전자 발현을 참조 대조군 유전자 마우스 *Rp10*에 대해 표준화하였다. **(B)** AMN 환자 및 건강한 대조군 유래 PBMC에서 *B4GALT6*, *PLA2G4C*, *CEPT1*, *RDH11*, *CYP27A1*, *PPAR α* , *PPAR β/δ* , *PPAR γ* 및 *GPX4* 유전자 발현. 유전자 발현은 참조 대조

군 유전자 인간 *RPL0*에 대해 표준화하였다. (C) 염증-관련 지질 아라키돈산 (AA), 도코사헥사엔산 (DHA), 프로스타글란딘 D2, E2 및 F2 α (PGD2, PGE2, PGF2 α), 6-keto-PGF1 α , (\pm) 9-하이드록시-10E,12Z 옥타데카다이엔산 (9S-HODE), (\pm) 13(S)-하이드록시-9Z, 11E 옥타데카다이엔산 (13S-HODE), (\pm)12-, 및 15-하이드록시-5Z, 8Z, 11Z, 13E 에이코사테트라에노익산 (12S-HETE 및 15S-HETE) 및 트롬복산 B2 (TXB2)의 상대적인 수준. (D) HGF (간세포 성장인자), IL6, IL8, MCP-1 (단핵세포 화학주성인자 단백질-1 또는 CCL2), NGF (신경 성장인자), TNF α , 렙틴, 아디포넥틴, 전체 (total) PAI-1 (플라스미노겐 활성화인자 저해제-1) 및 레시스틴의 수준을 AMN 환자와 대조군 유래의 혈청에서 밀리플렉스 기법을 이용해 정량하였다. 그 값은 평균 \pm SEM이다. 유의한 차이는 단측 스튜던트 t 검정 (* P <0.05 및 ** P <0.01) 또는 윌콕슨의 순위합계검정 ($^{\#}P$ <0.05, $^{\#\#}P$ <0.01 및 $^{\#\#\#}P$ <0.001)에 의해 샤피로-윌크 정규성 검정에 따라 측정하였다.

도 3. AMN 환자 유래 PBMC에서 염증성 사이토카인, 케모카인 및 수용체 관련 신호전달 (n= AMN 환자 13명과 성별 및 나이를 각각 매칭시킨 건강한 개체 13명). (A) 염증성 사이토카인 및 수용체 신호전달 경로 RT2 Profiler Q-PCR Array (Qiagen)의 유전자 84종에 대한 유전자 발현. 유전자 발현은 내부 대조군에 대해 표준화하였다. (B) AMN 환자 및 건강한 대조군 유래 PBMC에서의 IL4, IL6, STAT6, SOCS3 및 STAT1 유전자 발현. 유전자 발현은 참조 대조군 인간 *RPL0*에 대해 표준화하였다. 유전자들은 Th2 및 Th1/Th17 분극화에서의 역할에 따라 분류하였다. 그 값은 평균 \pm SEM으로 나타낸다. 유의한 차이는 단측 스튜던트 t 검정 (* P <0.05 및 ** P <0.01) 또는 윌콕슨의 순위합계검정 ($^{\#}P$ <0.05 및 $^{\#\#}P$ <0.01)에 의해 샤피로-윌크 정규성 검정에 따라 측정하였다.

도 4. 핀폴리모드 및 시포니모드는 *Abcd1*⁻/*Abcd2*^{-/-} 마우스에서 운동 장애를 예방한다. (A-B) 트레이드밀 (A) 및 바 크로스 (B) 검사를, 12월령에 시작해 4달간 처리한, 16월령의 *Abcd1*⁻/*Abcd2*^{-/-} (DKO), 핀폴리모드-처리 *Abcd1*⁻/*Abcd2*^{-/-} (DKO + 핀폴리모드), 시포니모드-처리 *Abcd1*⁻/*Abcd2*^{-/-} (DKO + 시포니모드) 및 WT를 대상을 수행하였다. (A) 각 동물의 평균 (Mean) 및 최고 성능 (최고) 점수를 통계 분석하였다. 벨트에서 추락하기까지 걸린 시간 (latency) (충격 시간)과 가해진 쇼크 횟수를 5분 후 산출하였다. (B) 바를 건너는데 걸린 시간 및 떨어진 횟수를 측정하였다. 값은 평균 \pm SD으로 나타내었다 (n=16/조건, A-C; * P <0.05, ** P <0.01 및 *** P <0.001, 일원식 ANOVA 및 이후 Tukey's HSD *post hoc* test).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0123] 본 발명의 진단 방법

[0124] 제1 측면에서, 본 발명은 개체에서 부신백질이영양증 진단 방법에 관한 것으로서, 이하 본 발명의 진단 방법 또는 제1 방법이라 하며, 하기 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 유래의 샘플에서 확인하는 단계를 포함하며:

- [0125] - 스펡고신-1-포스페이트의 수준,
- [0126] - 스펡고신 키나제 2의 발현 수준,
- [0127] - 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- [0128] - 아디포넥틴의 발현 수준,
- [0129] - 네오프테린의 수준,
- [0130] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0131] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0132] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0133] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0134] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0135] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0136] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0137] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,

- [0138] 상기 방법에서, 기준치 대비,
- [0139] 스핑고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0140] 스핑고신 키나제 2의 수준 증가,
- [0141] 스핑고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0142] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0143] 네오프테린의 수준 증가,
- [0144] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0145] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0146] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0147] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0148] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,
- [0149] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0150] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0151] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 상기 개체가 부신백질이영양증을 앓고 있다는 것을 의미하며,
- [0152] 상기 인자가 종양 괴사 인자 A의 발현 수준에 해당될 경우, 부신백질이영양증이 염증성 탈수초화의 동반없이 발병한다는 것을 의미한다.
- [0153] 본원에서, 용어 "진단"은 개체에서 가능성 있는 질병을 확인 및/또는 동정하기 위한 시도 과정, 즉 진단 절차, 및 이러한 과정에 의해 도달된 견해, 즉, 진단 견해 둘 모두를 지칭한다. 이와 같이, 진단은 치료 및 예후에 대한 의학적 결정이 이루어지게 하는 별개의 구분되는 범주로 개체의 상태를 분류하려는 시도로 간주될 수도 있다. 특히, 용어 "부신백질이영양증 진단"은 개체에서 부신백질이영양증의 존재를 확인하거나 검출하는 능력을 의미한다. 이러한 진단은, 당해 기술 분야의 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분석한 샘플에 대한 100%의 정확도를 주장하는 것은 아니다. 그러나, 분석한 샘플들 중 통계적으로 유의한 수준이 정확하게 분류되어야 한다. 통계적으로 유의한 수준은 여러가지 통계학적 틀을 사용해 당해 기술 분야의 당업자에 의해 확립될 수 있으며, 이러한 통계학적 틀에 대한 예시적이고 비-제한적인 예로는 신뢰 구간 결정, p-값 결정, 스튜던트 t-검정 또는 피셔 판별 함수 등 (예, Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983 참조)이 있다. 신뢰 구간은 바람직하게는 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.1 미만, 0.05 미만, 0.01 미만, 0.005 미만 또는 0.0001 미만이다. 본 발명의 내용은 바람직하게는 측정 군 또는 분석 집단에 속하는 개체들 중 적어도 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상을 정확하게 진단할 수 있다.
- [0154] 용어 "부신백질이영양증" 또는 "X-연관된 부신백질이영양증" 또는 "ALD" 또는 "X-ALD"는 본원에서 뇌, 부신, 말초신경계에 점진적인 손상을 야기하여 궁극적으로 죽음에 이르게 하는 단일유전성 백질위축증 (비정상적인 형성, 턴오버 또는 수초 파괴가 특징적인 장애 군)이다. 구체적인 구현예에서, 부신백질이영양증은 하기 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
 - [0155] - 성인 부신척수신경병증 (AMN): 말초 신경병증 및 척수에서의 말초 축삭병증이 특징적이며 염증성 탈수초화 징후는 동반되지 않는 후기 발병형,
 - [0156] - 뇌 염증성 탈수초화 (cAMN)를 동반한 뇌 부신척수신경병증, 및
 - [0157] - 중증의 뇌 염증성 탈수초화가 특징적인 소아 뇌 변이 (childhood cerebral variant, cALD).
- [0158] 보다 바람직한 구현예에서, 부신백질이영양증은 부신척수신경병증 (AMN)이다.
- [0159] 본 발명의 진단 방법에 따라 확인된 인자가 TNFA의 발현 수준일 경우, 즉, 바이오마커가 TNFA일 경우, ALD는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다. 본 발명의 진단 방법에 따라 확인된 인자가 TNFA의 발현 수준이 아닐 경우, 즉, 바이오마커가 TNFA가 아닐 경우, ALD는 염증성 탈수초화와 함께 또는 염증성 탈수초화의 동반없이 발

생할 수 있다. 특정 구현예에서, ALD는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다.

[0160] 용어 "염증성 탈수초화"는, 본원에서, 말초 면역 세포의 뇌 실질로의 유입 및 침윤으로 인해 유발되는 신경 조직의 손상 파괴 (비-제한적인 예로, 중추 신경계의 세포, 예를 들어, 뉴런 세포 또는 신경교 세포 (예, 희소돌기 신경교 세포) 또는 이의 특정 단편, 예를 들어, 신경돌기, 축삭 또는 마이엘린)가 특징적인 병리학적 병태를 지칭한다. 특히, 염증성 탈수초화는 전염증성 사이토카인을 방출하는 미세아교세포의 활성화 및/또는 T 및/또는 B 세포 및/또는 단핵세포/대식세포의 활성화에 의해 촉발될 수 있다.

[0161] 용어 "개체"는 포유류로 분류되는 모든 동물을 지칭하며, 비-제한적으로 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예컨대 인간, 인간을 제외한 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함한다. 바람직하게는, 개체는 임의의 연령, 성별 또는 인종의 남성 또는 여성 인간이다.

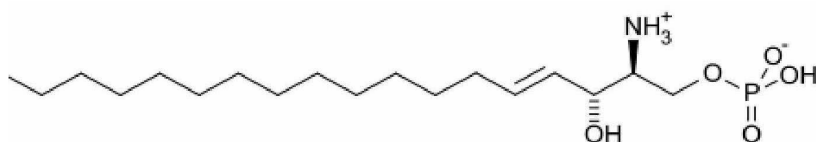
[0162] 용어 "샘플"은 본원에서 개체로부터 분리된 생물학적 물질을 지칭한다. 생물학적 샘플은 RAN, 단백질 또는 지질 수준을 검출하는데 적절한 임의의 생물학적 물질을 포함한다. 특정 구현예에서, 샘플은 실험 중인 개체로부터 유래된 유전 물질, 예컨대 DNA, 게놈 DNA, 상보적 DNA (cDNA), RNA, 이중의 핵 RNA (hnRNA), mRNA 등을 포함한다. 샘플은 임의의 적절한 조직 또는 생물학적 유체, 예컨대 혈액, 타액, 혈장, 혈청, 뇨, 뇌척수액 (CSF), 변, 외과적 검체, 생검으로부터 수득된 검체, 및 파라핀으로 포매된 조직 샘플로부터 분리될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에 따른 개체 유래 샘플은 혈청, 혈장 및 말초혈 단핵구 세포 또는 "PBMC"를 포함하는 샘플로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 구체적인 구현예에서, 샘플은 PBMC를 함유한 샘플이다. 더 구체적인 구현예에서, PBMC 함유 샘플은 혈액이다. 구체적인 구현예에서, 마커가 아디포넥틴이거나 또는 표 1, 표 2, 표 6 또는 표 7에 지정된 마커들 중 하나일 경우, 샘플은 혈청 또는 혈장이다. 다른 구체적인 구현예에서, 샘플이 스펅고신-1-포스페이트, 스펅고신-2-포스페이트 키나제, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 또는 표 3, 표 4, 표 5 또는 표 6에 지정된 마커들 중 하나일 경우, 샘플은 PBMC를 포함하는 샘플이다.

[0163] 용어 "마커" 또는 "바이오마커"는, 본원에서, 생체분자, 예를 들어, 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 또는 대사산물을 지칭하며, 존재 여부 또는 양이 특정 상황, 예를 들어 ALD에 대한 특징이 된다.

[0164] 본 발명의 진단 방법에 유용한 마커들은 다음과 같다:

[0165] * 스펅고신-1-포스페이트

[0166] 용어 "스펅고신-1-포스페이트" 또는 "S1P" 또는 "리소스펅고리피드 (lysosphingolipid)"는, 본원에서 하기 식의 시그널링 스펅고리피드를 지칭한다:



[0167]

[0168] * 스펅고신 키나제 2

[0169] 용어 "스펅고신 키나제 2" 또는 "SPHK2"는, 본원에서, 스펅고신의 인산화를 촉매하여 스펅고신-1-포스페이트를 합성하는 효소의 핵 이소형을 코딩하는 유전자를 지칭한다. 인간에서, 이 유전자는 GenBank Gene ID 56848 (2015년 5월 4일에 공개됨)에 해당되며, 이 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 UniProtKB/Swiss-Prot 데이터베이스에 등재번호 Q9NRA0로 지정된다 (2015년 4월 29일에 공개됨).

[0170] * 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1

[0171] 용어 "스펅고신-1-포스페이트 수용체 1" 또는 "S1PR1"은, 본원에서, 스펅고신-1-포스페이트에 대한 G 단백질-연결된 수용체를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 인간에서, 이 유전자는 GenBank Gene ID 8879 (2015년 5월 4일에 공개됨)에 해당되며, 이 유전자에 의해 코딩된 단백질은 UniProtKB/Swiss-Prot 데이터베이스에 등재번호 P21453로 지정된다 (2015년 4월 29일에 공개됨).

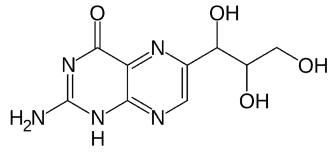
[0172] * 아디포넥틴

[0173] 용어 "아디포넥틴" 또는 "ADIPOQ"는, 본원에서, 지방 대사 및 인슐린 민감성을 조절하는데 참여하는 아디포카인을 코딩하는 유전자를 지칭한다. 인간에서, 이 유전자는 GenBank Gene ID 9370 (2015년 5월 17일에 공개됨)에 해당되며, 이 유전자에 의해 코딩된 단백질은 UniProtKB/Swiss-Prot 데이터베이스에 등재번호 Q15848로 지정된다.

다 (2015년 4월 29일에 공개됨).

* 네오프테린

용어 "네오프테린"은, 본원에서, 하기 식의 프테리딘을 지칭한다:



* 표 1에 지정된 마커

표 1

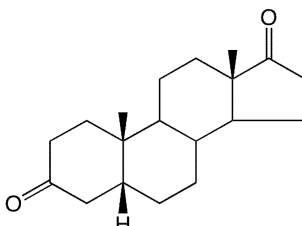
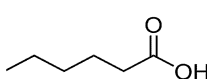
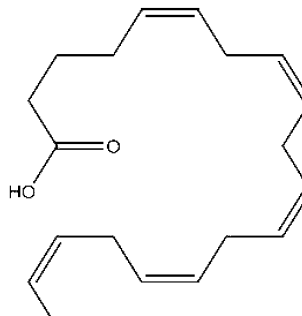
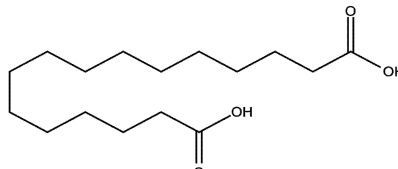
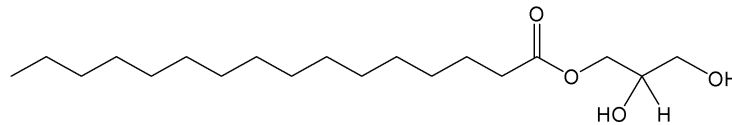
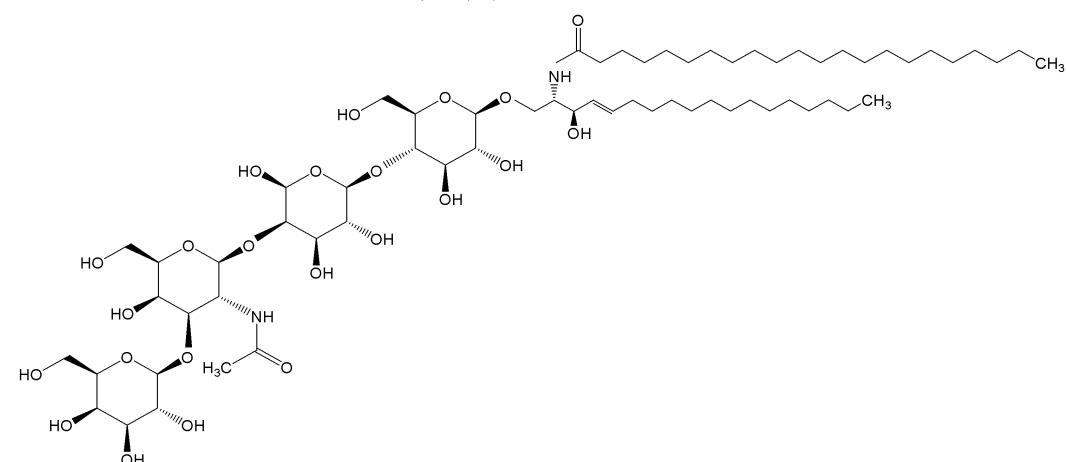
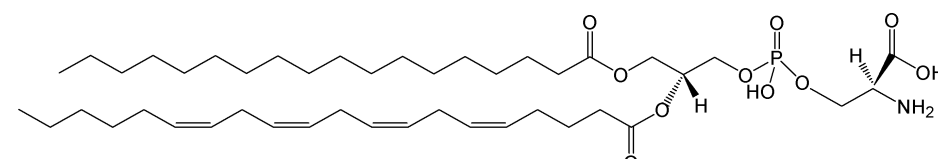
5-β-콜레스탄-3α,7α,12α-트리올
숙신 세미알데하이드
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (43:0)

표 1. 대조군 개체 대비 ALD 환자에서 상향-조절된 혈장 분자.

표 2에 지정된 마커

표 2

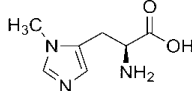
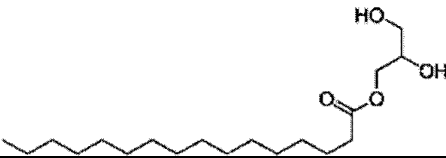
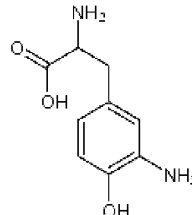
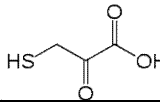
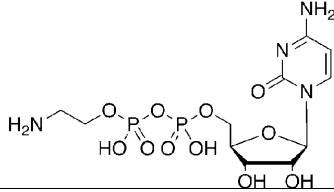
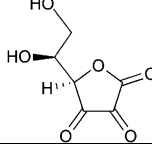
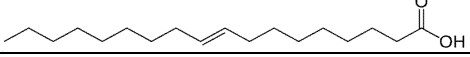
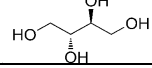
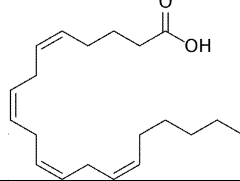
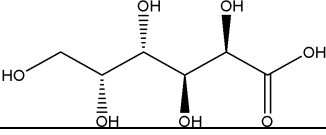
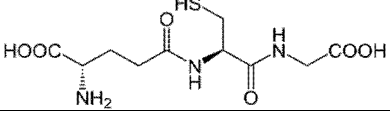
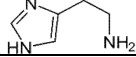
글리코콜산
콜산

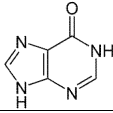


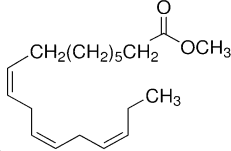
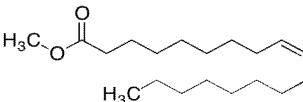
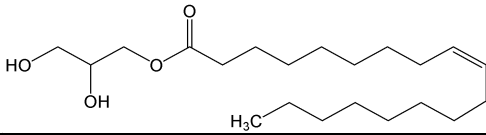
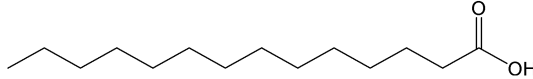
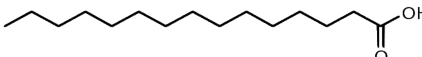
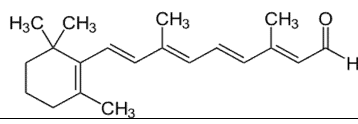
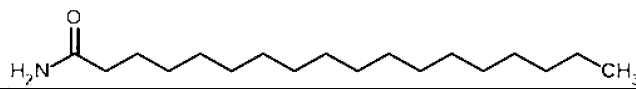
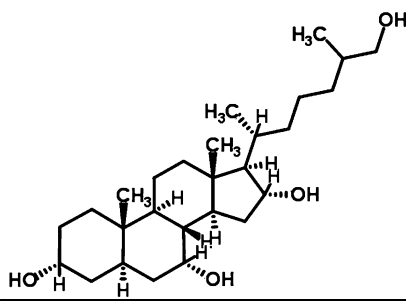
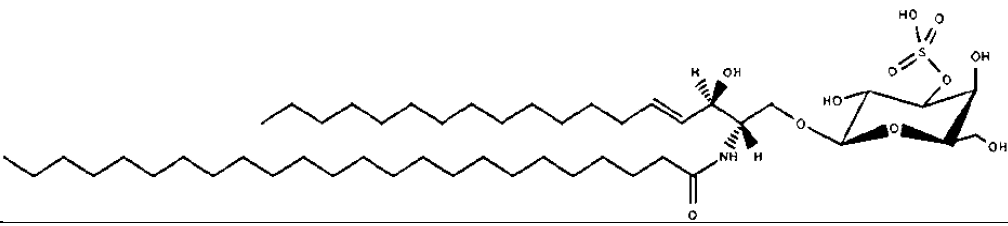
5β-안드로스탄-3,17-다이온

n-헥사노익산

에이코사펜타에노익산

헥사데칸다이오익산

모노아실글리세롤 (16:0)

강글리오사이드 GA1 (d18:1/22:0)

글리세로포스파티딜세린 (38:4)


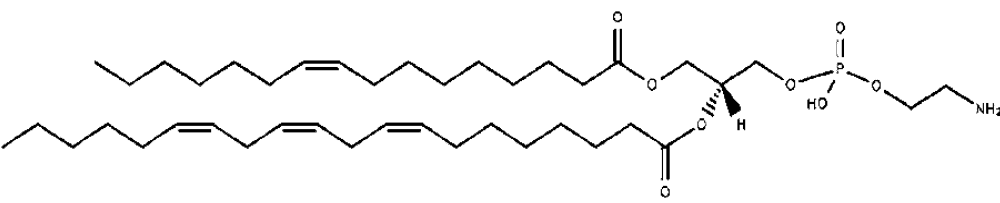
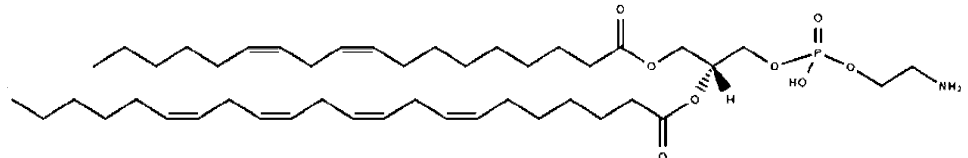
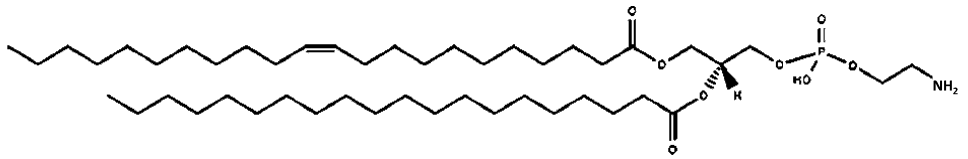
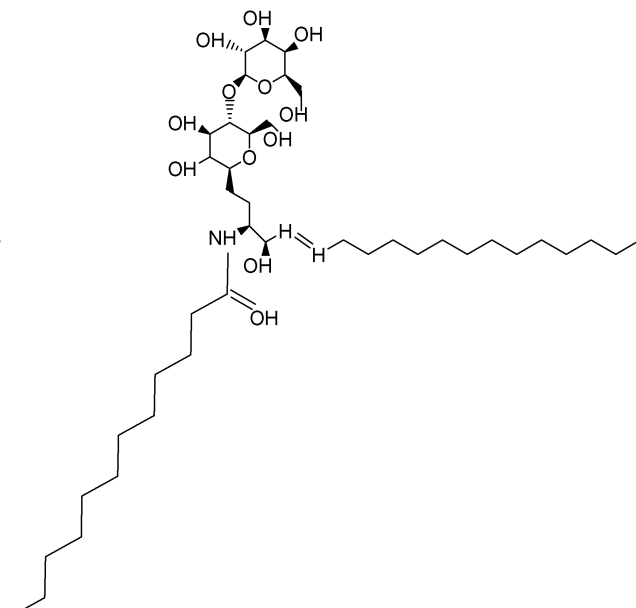
[0182] 표 2. 대조군 개체 대비 ALD 환자에서 하향-조절된 혈장 분자.

[0183] * 표 3에 지정된 마커

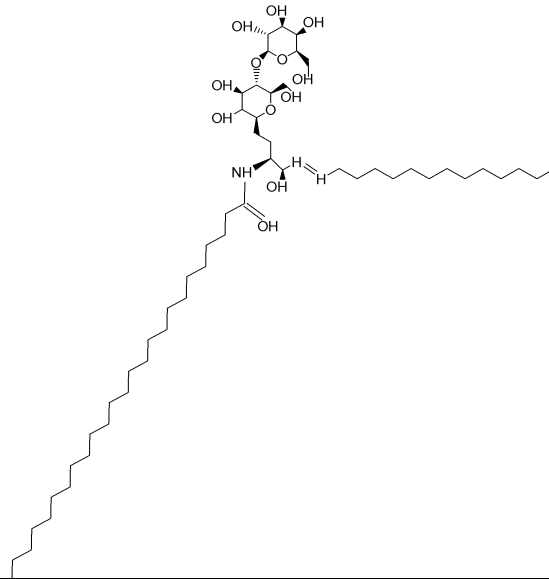
표 3

마커	구조/분자 조성
1-메틸히스티딘	
1-모노팰미틴	
3-아미노-1-티로신	
3-머캅토피루베이트	
시티딘다이포스페이트-에탄올아민	
테하이드로아스코르브산	
엘라이드산	
에리트리톨	
아라키돈산	
갈락톤산	
글루타티온	
히스타민	

하이포크산틴	
카프로락톤	
락타미드	
메틸 리놀레네이트	
메틸 올리에이트	
<p>모노올레인</p> 	
<p>미리스트산</p> 	
<p>펜타데실산</p> 	
<p>레틴알데하이드</p> 	
<p>스테아르아미드</p> 	
<p>5β-콜레스탄-3α,7α,24,26-테트롤</p> 	
<p>C24 설펜티드</p> 	
<p>콜레스테릴 에스테르 19:0 C₄₆H₈₂O₂</p>	

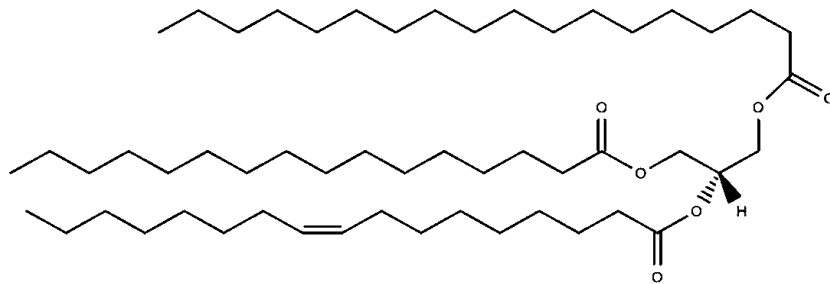
글리세로포스파티딜에탄올아민 (26:0) $C_{31}H_{62}NO_8P$
<p>글리세로포스파티딜에탄올아민 (36:3)</p> 
<p>글리세로포스파티딜에탄올아민 (40:6)</p> 
<p>글리세로포스파티딜에탄올아민 (42:1)</p> 
글리세로 포스파티딜에탄올아민 (43:6) $C_{49}H_{84}NO_8P$
<p>락토실세라마이드 (d18:1/12:0)</p> 

락토실세라마이드 (d18:1/25:0)

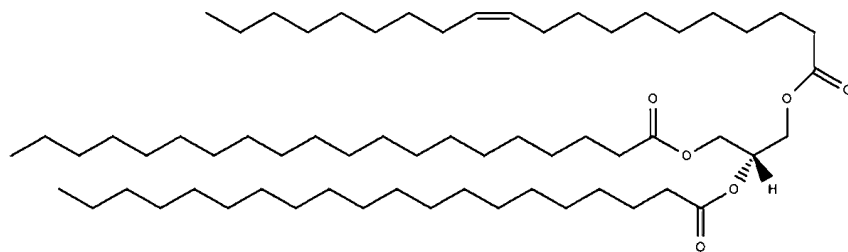


트리아실글리세롤 (40:0) $C_{43}H_{83}O_6$

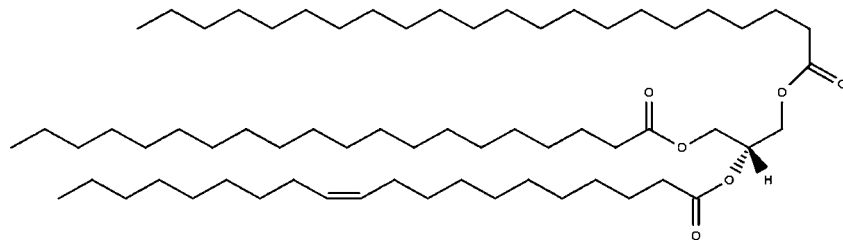
트리아실글리세롤 (51:2)



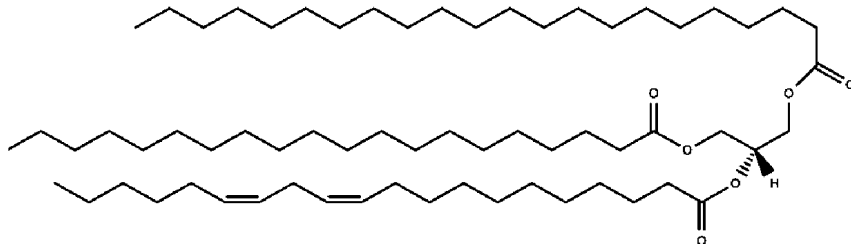
트리아실글리세롤 (60:1)

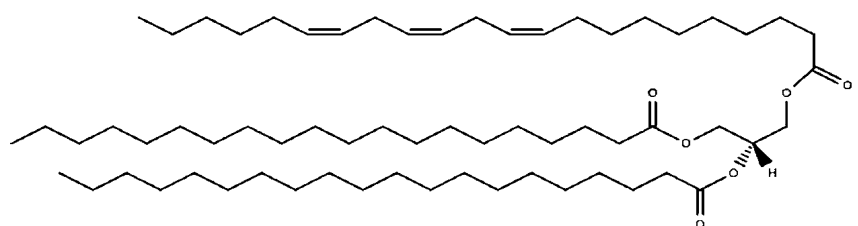
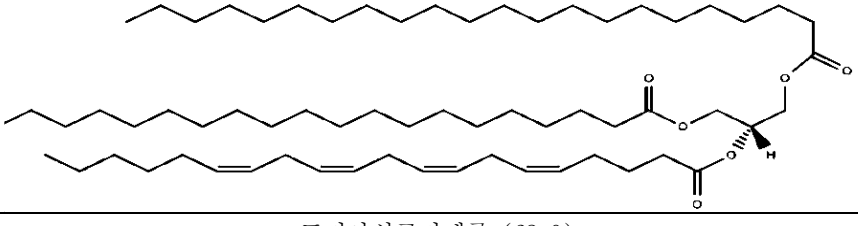
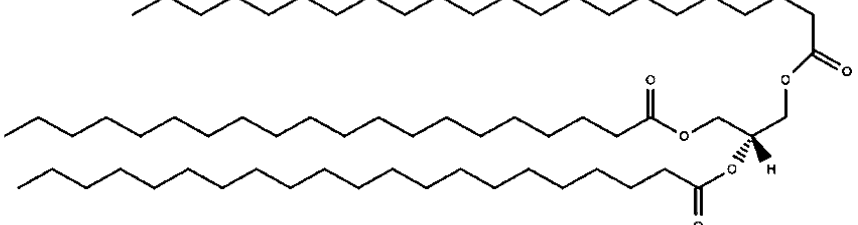
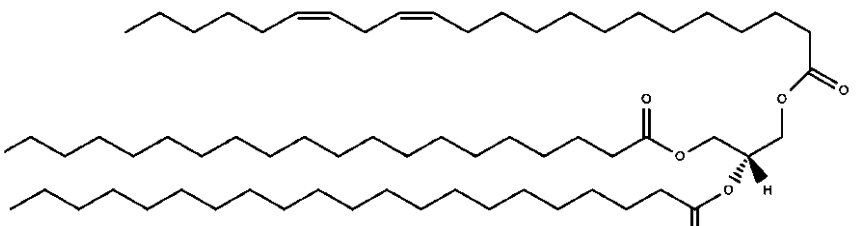
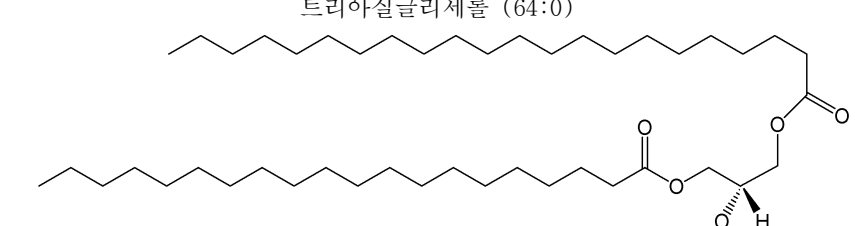
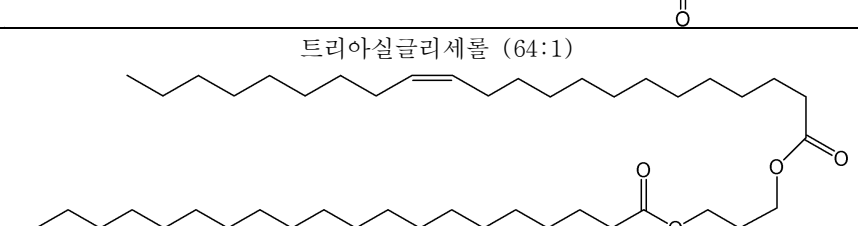


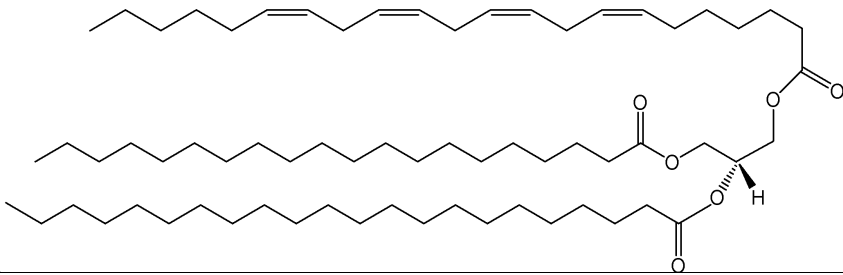
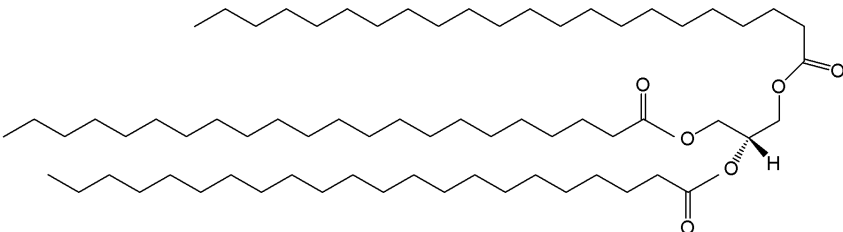
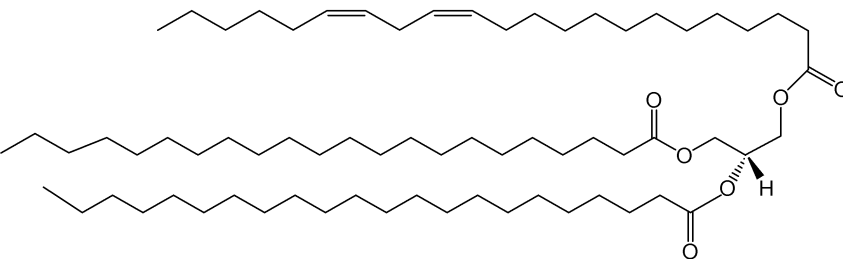
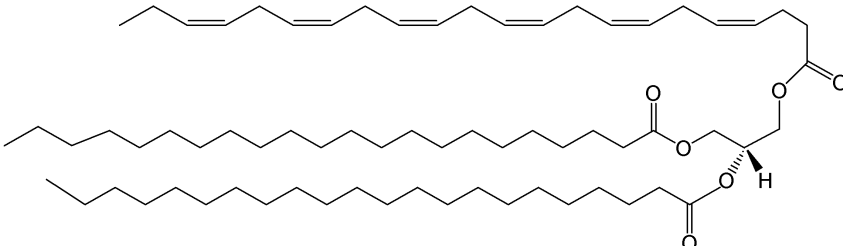
트리아실글리세롤 (62:1)



트리아실글리세롤 (62:2)



<p>트리아실글리세롤 (62:3)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (62:4)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (63:0)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (63:2)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (64:0)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (64:1)</p> 

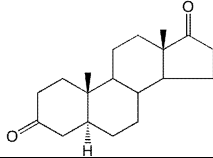
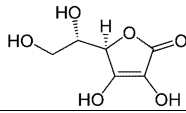
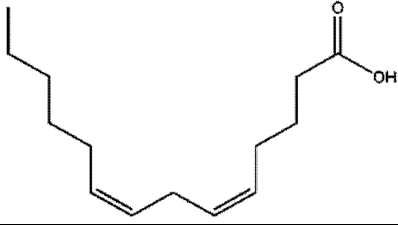
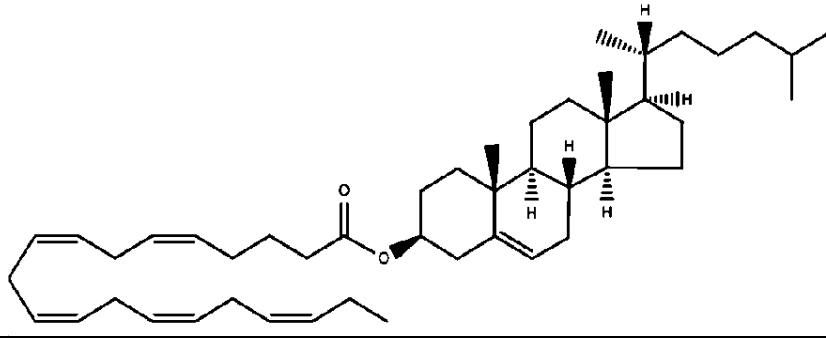
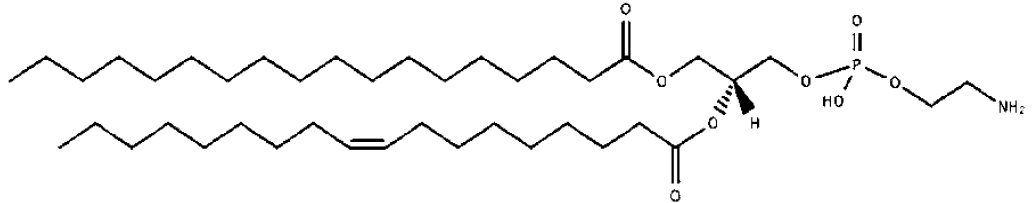
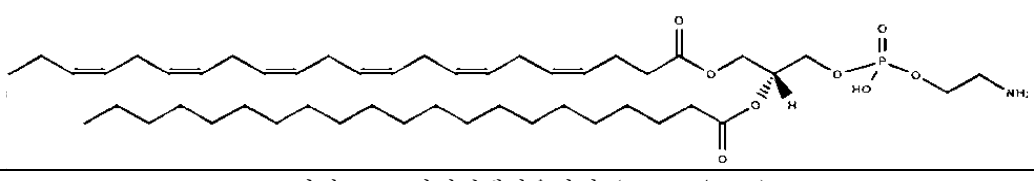
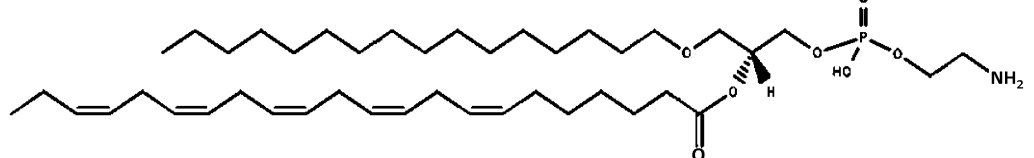
<p>트리아실글리세롤 (64:4)</p> 
트리아실글리세롤(64:5) $C_{67}H_{100}O_6$
트리아실글리세롤(64:8) $C_{67}H_{114}O_6$
트리아실글리세롤 (65:1) $C_{68}H_{130}O_6$
트리아실글리세롤 (65:2) $C_{68}H_{128}O_6$
<p>트리아실글리세롤 (66:0)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (66:2)</p> 
<p>트리아실글리세롤 (66:6)</p> 

[0185] 표 3. 대조군 개체 대비 ALD 환자의 PBMC에서 상향-조절된 분자.

[0186] * 표 4에 지정된 마커

표 4

[0187]

5 α -안드로스탄-3,17-다이온

아스코르브산

5Z,8Z-테트라데카다이엔산

콜레스테릴 에스테르 20:5

글리세로포스파티딜에탄올아민 (36:1)

글리세로포스파티딜에탄올아민 (43:6)

글리세로포스파티딜에탄올아민 (0-16:0/22:5)


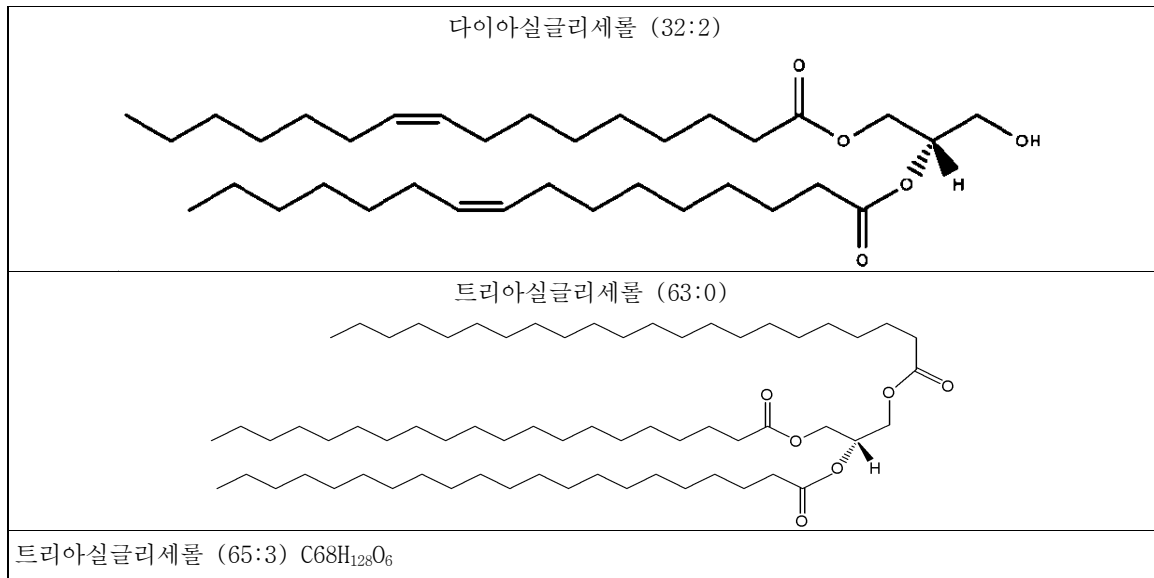


표 4. 대조군 개체 대비 ALD 환자의 PBMC에서 하향-조절된 분자.

* 표 5에 지정된 마커

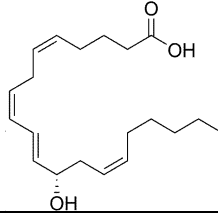
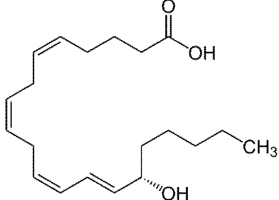
표 5

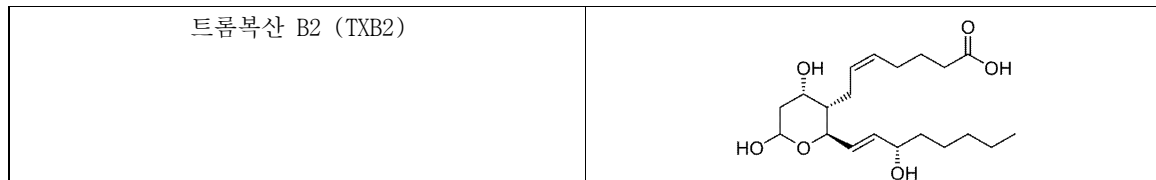
마커 (유전자 기호)	Human GenBank Gene ID (공개일)	Human UniProtKB/Swiss-Prot 등재번호 (공개일)
레티놀 탈수소효소 (RDH11)	51109 (2015년 5월 4일)	Q8TC12 (2015년 4월 29일)
스테롤 26 수산화효소 (CYP27A1)	1593 (2015년 5월 12일)	Q02318 (2015년 4월 29일)
퍼옥시좀 증식인자-활성화된 수용체 delta (PPAR β / δ)	5467 (2015년 5월 17일)	Q03181 (2015년 4월 29일)

표 5. 대조군 개체 대비 ALD 환자의 PBMC에서 상향-조절된 분자.

* 표 6에 지정된 마커

표 6

화합물	구조
12-하이드록시에이코사테트라에노익산 (12S-HETE)	
15-하이드록시에이코사테트라에노익산 (15S-HETE)	



[0194] 표 6. 대조군 개체 대비 ALD 환자에서 상향-조절된 혈장 마커.

[0195] * 표 7에 지정된 마커

표 7

[0196]

마커 (유전자 기호)	Human GenBank Gene ID (공개일)	Human UniProtKB/Swiss-Prot 등재 번호 (공개일)
간세포 성장인자 (<i>HGF</i>)	3082 (2015년 5월 17일)	P14210 (2015년 4월 29일)
인터루킨 6 (<i>IL6</i>)	3569 (2015년 5월 18일)	P05231 (2015년 4월 29일)
인터루킨 8 (<i>IL8</i>)	3576 (2015년 5월 17일)	P10145 (2015년 4월 29일)
단핵세포 화학주성인자 단백질-1 또는 c-c 모티프 케모카인 2 (<i>CCL2</i> 또는 <i>MCP-1</i>)	6347 (2015년 5월 17일)	P13500 (2015년 4월 29일)
종양 괴사 인자 A (<i>TNFA</i>)	7124 (2015년 5월 17일)	P01375 (2015년 4월 29일)

[0197] 표 7. 대조군 개체 대비 ALD 환자에서 상향-조절된 혈청 마커.

[0198] * 표 8에 지정된 마커

표 8

[0199]

마커 (유전자 기호)	Human GenBank Gene ID (공개일)	Human UniProtKB/Swiss-Prot 등재 번호 (공개일)
보체 성분 5 (<i>C5</i>)	727 (2015년 5월 17일)	P01031 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 11 (<i>CXCL11</i>)	6373 (2015년 5월 3일)	014625 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 5 (<i>CXCL5</i>)	6374 (2015년 5월 12일)	P42830 (2015년 5월 4일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 6 (<i>CXCL6</i>)	6372 (2015년 5월 4일)	P80162 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 9 (<i>CXCL9</i>)	4283 (2015년 5월 3일)	Q07325 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C) motif 수용체 6 (<i>CCR6</i>)	1235 (2015년 5월 4일)	P51684 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 1 (<i>CXCR1</i>)	3577 (2015년 5월 4일)	P25024 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 5 (<i>CCL15</i>)	6359 (2015년 5월 17일)	Q16663 (2015년 6월 24일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 16 (<i>CCL16</i>)	6360 (2015년 5월 4일)	015467 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 21(<i>CCL21</i>)	6366 (2015년 5월 17일)	000585 (2015년 4월 29일)

케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 21(CXCL13)	10563 (2015년 5월 3일)	043927 (2015년 4월 29일)
인터페론 α -2 (IFNA2)	3440 (2015년 5월 3일)	P011563 (2015년 4월 29일)
인터루킨-36 α (IL36A)	27179 (2015년 5월 4일)	Q9UHA7 (2015년 4월 29일)
인터루킨-36 β (IL36B)	27177 (2015년 5월 4일)	Q9NZH7 (4 February 2015)
인터루킨-36 γ (IL36G)	56300 (2015년 5월 4일)	Q9NZH8 (2015년 4월 29일)
인터루킨-22 (IL22)	50616 (2015년 5월 17일)	Q9GZX6 (2015년 4월 29일)
림포톡신- β (LTB)	4050 (2015년 5월 12일)	Q06646 (2015년 4월 29일)
아미노아실 tRNA 신타제 컴플렉스-상호작용 다중기능성 단백질 1 (AIMP1)	9255 (2015년 5월 17일)	Q12904 (2015년 4월 29일)
C 반응성 단백질 (CRP)	1401 (2015년 5월 17일)	P02741 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 2 (CXCR2)	3579 (2015년 5월 17일)	P25025 (2015년 4월 29일)
루코트리엔 B4 수용체 (LTB4R)	1241 (2015년 5월 17일)	Q15722 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 14 (CXCL14)	9547 (2015년 5월 17일)	O95715 (2015년 4월 29일)
카스파제 동원 도메인 패밀리아, 멤버 18 (CARD18)	59082 (2015년 5월 4일)	P57730 (2015년 4월 29일)
Toll 상호작용 단백질 (TOLLIP)	54472 (2015년 5월 4일)	Q6FIE9 (2015년 4월 29일)
인터루킨 10 (IL10)	3586 (2015년 5월 17일)	P22301 (2015년 4월 29일)
인터루킨 13 (IL13)	3596 (2015년 5월 4일)	P35225 (2015년 4월 29일)
인터루킨 17C (IL17C)	27189 (2015년 5월 12일)	Q9POM4 (2015년 4월 29일)
인터루킨 36 수용체 길항제 (IL36RN)	26525 (2015년 5월 4일)	Q9UBH0 (2015년 4월 29일)
인터루킨 37 (IL37)	27178 (2015년 5월 17일)	Q9NZH6 (2015년 4월 29일)
인터루킨 5 (IL5)	3567 (2015년 5월 10일)	P05113 (2015년 4월 29일)
인터루킨 5 수용체 α (IL5RA)	3568 (2015년 5월 12일)	Q01344 (2015년 4월 29일)
인터루킨 9 (IL9)	3578 (2015년 5월 12일)	P15248 (2015년 4월 29일)
인터루킨 9 수용체 (IL9R)	3581 (2015년 5월 10일)	Q01113 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 11 (CCL11)	6356 (2015년 5월 10일)	P51671 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 13 (CCL13)	6357 (2015년 5월 4일)	Q99616 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 17 (CCL17)	6361 (2015년 5월 12일)	Q92583 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 19 (CCL19)	6363 (2015년 5월 17일)	Q99731 (2015년 4월 29일)

케모카인 (C-C 모티프) 리간드 26 (CCL26)	10344 (2015년 5월 17일)	Q9Y258 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 7 (CCL7)	6354 (2015년 5월 12일)	P80098 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 8 (CCL8)	6355 (2015년 5월 4일)	P80075 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 12 (CXCL12)	6387 (2015년 5월 17일)	P48061 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 수용체 3 (CCR3)	1232 (2015년 5월 12일)	P51677 (2015년 4월 29일)
케모카인 (C-C 모티프) 수용체 8 (CCR8)	1237 (2015년 5월 4일)	P51685 (2015년 4월 29일)
STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1)	6772 (2015년 5월 17일)	P42224 (2015년 4월 29일)
인터루킨 4 (IL4)	3565 (2015년 5월 17일)	P05112 (2015년 4월 29일)
STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6)	6778 (2015년 5월 12일)	P42226 (2015년 4월 29일)
SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3)	9021 (2015년 5월 4일)	O14543 (2015년 4월 29일)

표 8. 대조군 개체 대비 AMN 환자 유래 PBMC에서 상향-조절된 사이토카인, 케모카인 및 수용체.

특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래의 샘플에서 스펅고신-1-포스페이트의 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커들의 임의 조합의 수준을 개체 유래 샘플에서 확인하는 단계를 포함한다:

- 스펅고신-1-포스페이트,
- 스펅고신-2-포스페이트 키나제,
- 스펅고신-1-포스페이트 수용체,
- 아디포넥틴,
- 네오프테린
- 표 1에 지정된 마커,
- 표 2에 지정된 마커,
- 표 3에 지정된 마커,
- 표 4에 지정된 마커,
- 표 5에 지정된 마커,
- 표 6에 지정된 마커,
- 표 7에 지정된 마커, 및
- 표 8에 지정된 마커.

특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 TAG(63:2)의 수준을 확인하는 단계를 포함한다.

특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 스펅고신-1-포스페이트 및 TAG(63:2)의 수준을 확인하는 단계를 포함한다.

특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 12-S-HETE 및 아디포넥틴의 수준을 확인하는 단계를 포함한다.

- [0218] 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 15-S-HETE의 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 MCP-1의 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0219] 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 및 아디포넥틴의 발현 수준으로부터 선택되는 인자를 확인하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 마커의 수준과 아디포넥틴의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0220] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에 지정된 마커의 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0221] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0222] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 진단 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0223] 용어 "수준"은, 본원에서, 샘플에서 검출가능한 바이오마커의 양을 의미한다.
- [0224] 용어 "발현 수준"은, 본원에서, 개체의 샘플에서 유전자에 의해 만들어지는 유전자 산물의 측정 가능한 양을 의미하며, 여기서 유전자 산물은 전사 산물 또는 번역 산물일 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자가 이해하는 바와 같이, 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 측정함으로써 정량할 수 있다.
- [0225] 본 발명의 진단 방법에 따라 마커의 수준을 확인하는 방법은 마커의 유형, 즉, 지질, 극성 대사산물 또는 유전자에 따라 결정될 것이다.
- [0226] 본 발명의 진단 방법의 마커가 지질일 경우, 마커의 수준은 샘플내 지질을 확인 및 정량하는데 적합한 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법으로 확인할 수 있다. 비-제한적인 예로는, 특정 지질의 수준은 크로마토그래피, 질량 분광측정, 핵 공명 분광측정, 형광 분광측정 또는 듀얼 편광 간섭측정 (dual polarization interferometry), 고 성능 분리법, 예를 들어, HPLC 및/또는 면역학적 방법을 이용해 측정할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 제1 방법에 따른 마커가 지질일 경우, 바이오마커의 수준은 지질 마커의 동정 및 정량화 방법과 연계된 분리 기법을 이용해 확인한다. 더 구체적인 구현예에서, 분리 기법은 클로로포름:메탄올을 이용한 추출이며, 지질 바이오마커의 동정 및 정량화 방법은 크로마토그래피, 바람직하게는 질량 분광측정과 연계된 RPLC, 바람직하게는 QqTOF이다.
- [0227] 용어 "RPLC" 또는 "역상 액체 크로마토그래피"는, 본원에서, 극성 이동상 및 비-극성 정지상을 이용해 혼합물의 구성 성분을 분리, 동정 및 정량하는 기법을 의미한다.
- [0228] 용어 "MS" 또는 "질량-분광측정"은, 본원에서, 탠덤 질량 분광측정 (tandem mass spectrometry), 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI), 비행 시간 (time-of-flight, TOF) 질량 분광측정, MALDI-TOF-TOF 질량 분광측정, MALDI 사중극자-비행 시간 (Quadrupole-time-of-flight, Q-TOF) 질량 분광측정, 전자분무 이온화 (ESI)-TOF 질량 분광측정, ESI-Q-TOF, ESI-TOF-TOF, ESI-이온 포집 질량 분광측정, ESI 트리플 사중극자 질량 분광측정, ESI 푸리에 변환 질량 분광측정 (FTMS), MALDI-FTMS, MALDI-Ion Trap-TOF 및 ESI-Ion Trap TOF 등의 다양한 방법들을 지칭한다. 이들 질량 분광측정 방법은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 가장 기초적인 수준에서, 질량 분광측정은 분자를 이온화한 다음 제조된 이온의 질량을 측정하는 과정을 수반한다. 분자는 충분히 공지된 방식으로 이온화되기 때문에, 분자의 분자량은 일반적으로 이온의 중량으로부터 정확하게 결정할 수 있다. MS^n 은 측정된 이온의 정체를 추가로 확인하기 위해 입수한 이온을 후속적으로 분절 (fragmentation)하는 것을 의미한다. 예를 들어, MS^2 또는 탠덤 질량 분광측정 (MS/M S)은, 모 이온 분자량과 함께 정보를 제공할 수 있어, 단백질을 동정하는데 이용할 수 있다. 탠덤 질량 분광측

정은 먼저 대상 이온 (모 이온)의 질량 스펙트럼을 입수한 다음 이온을 분절 처리하고, 분절 (생성 이온)의 질량 스펙트럼을 수득하는 과정을 수반한다. 특정 모 이온으로부터 파생된 생성 이온의 양을 정량하는 것을 트랜지션 (transition)이라고 한다. 따라서, 탠덤 질량 분광측정은, 펩타이드 또는 단백질의 실제 서열 또는 규명된 대사산물의 화학적 구조를 동정하기 위해 분자량과 더불어 사용될 수 있는 분절 패턴과 분자량 정보를 둘다 제공해준다. MS³의 경우, 예를 들어, 생성된 생성 이온의 분절화 (즉, 모 이온에서 이의 변환)로, 정량화 및/또는 특정 규명을 위해 사용가능한 새로운 생성 이온 세트가 제공될 것이다. 용어 "ESI-Q-TOF" 또는 "전자분무 사중극자-비행 시간"은 본원에서 특정 이온의 질량 대 전하량 비를 제1 사중극자에서 검출기까지 이동하는데 소요된 시간을 측정함으로써 결정하는 장치 또는 질량 분광측정기를 사용하여 이루어지는, 질량 분광측정 기법을 지칭한다. 결정된 조건에서 기체 (통상 질소) 흐름 하에 공지된 전기장 소스를 적용함으로써, 크로마토그래피 용리제로부터 이온을 생성시킨다. 이러한 이온화 과정을 전자분무라 한다. 생성된 이온은 고 진공 시스템으로 도입하여 이온을 특정 전위로 조정된 전기장에 노출시킴으로써 제1 사중극자에 의해 이온을 가속화한다. 그 후, 동일하게 하전된 이온들은 모두 동일한 운동 에너지를 가지게 될 것이다. 따라서, 고 진공 장치에서 이온의 속도는 질량 대 전하량 비에 의존할 것이다. 이들 이온의 공지된 거리 및 "비행 시간"을 측정함으로써, 동일 조건에서 보고된 공지된 질량 대 전하량 비를 가진 실험 물질을 기준으로, 질량 대 전하량 비를 추정할 수 있다. 용어 "ESI-QqQ" 또는 "전자분무 트리플 사중극자"는, 3개의 사중극자를 연속적으로 사용하여 전술한 바와 같이 특정 질량 분광측정 트랜지션을 선택할 수 있는, 유사한 질량 분광측정 시스템으로 구성된, 질량 분광측정 기법을 지칭한다.

[0229] 본 발명의 진단 방법에서 마커가 극성 대사산물일 경우, 이 마커의 수준은 샘플에서 극성 대사산물을 확인 및 정량하는데 적합한 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법으로 확인할 수 있다. 비-제한적인 예로, 특정 극성 대사산물의 수준은 크로마토그래피, 질량 분광측정, 핵 공명 분광계, 형광 분광계 또는 듀얼 편광 간섭계, 고 성능 분리 방법, 예를 들어, HPLC 및/또는 면역학적 방법을 이용해 확인할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법에서 마커가 극성 대사산물일 경우, 이 마커의 수준은 극성 대사산물의 동정 및 정량화 방법과 연계된 분리 방법을 이용해 측정한다. 보다 구체적인 구현예에서, 분리 기법은 메탄올을 이용한 추출이며, 극성 대사산물의 동정 및 정량화 방법은 질량 분광측정, 바람직하게는 ESI-Q-TOF 또는 ESI-QqQ 또는 유사 MSn (MS/MS 또는 MS/MS/MS) 기법과 연계된 크로마토그래피, 바람직하게는 HPLC이다.

[0230] 용어 "HPLC" 또는 "고 성능 액체 크로마토그래피"는, 본원에서, 지지 매트릭스, 전형적으로 고 밀도로 충전된 컬럼에서 이동상을 가압 하에 정지상을 통과하게 함으로써 분리도를 높이는, 혼합물의 구성 성분을 분리, 동정 및 정량하기 위해 분석 화학에서 사용되는 기법을 지칭한다.

[0231] 본 발명의 진단 방법에서 마커가 유전자일 경우, 유전자의 발현 수준은 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 수준을 측정함으로써 정할 수 있다.

[0232] 메신저 RNA의 수준은 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 결정할 수 있다. 예를 들어, 함유된 핵산을 먼저 표준 방법에 따라, 예를 들어 세포분해 효소 또는 화학 용액으로 추출하거나 또는 제조사의 설명서에 따라 핵산 결합 레진으로 추출함으로써, 측정할 수 있다. 추출한 mRNA는 이후 혼성화 (예, 노던 블롯 분석 또는 mRNA를 표지된 cDNA로 변환한 다음 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이에 의해) 및/또는 증폭 (예, RT-PCR)에 의해 검출한다. 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR이 바람직하다. 실시간 정량 또는 반-정량적 RT-PCR이 특히 바람직하다. 바람직하게는, 측정의 게놈 혼합물로부터 cDNA 증폭을 구분하기 위해 인트론을 증폭하도록 프라이머 쌍을 설계한다. 적절한 프라이머는 당해 기술 분야의 당업자가 쉽게 설계할 수 있다. 다른 증폭 방법으로는, 리가제 연쇄 반응 (LCR), 전사-매개 증폭 (TMA), 기닥 치환 증폭 (SDA) 및 핵산 서열에 기초한 증폭 (NASBA) 등이 있다. 바람직하게는, mRNA의 양은 정량 또는 반-정량적인 RT-PCR 또는 실시간 정량 또는 반-정량적인 RT-PCR을 통해 측정한다.

[0233] 특정 구현예에서, 본 발명의 진단 방법에서 마커가 스펅고신 키나제 2 및/또는 스펅고신-1-포스페이트 수용체일 경우, 마커의 발현 수준은 각각의 mRNA 수준을 측정함으로써 결정된다.

[0234] 단백질의 수준은 샘플에서 단백질을 확인 및 정량하는데 적합한 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법에 의해 결정할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 단백질의 수준은 분석한 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 (또는 항원 결정기를 포함하는 이의 단편)를 사용한 다음 형성된 항원-항체 복합체를 정량하는 기법을 이용하거나, 또는 다른 예로, 예를 들어, 질량 분광측정에 기초한 기법에 의해서와 같이 항체 사용을 포함하지 않는 기법을 이용해 결정할 수 있다. 항체는 단일클론, 다클론 또는 이의 단편, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, scFv, 다이아바디, 트리아마디, 테트라마디 및 인간화된 항체일 수 있다. 마찬가지로, 항체는 표지될 수 있다. 본원에 사용될 수

있는 마커에 대한 예시적인, 비-제한적인 예로는, 방사성 동위원소, 효소, 형광단 (fluorophore), 발광 물질, 효소 조인자 또는 기질, 효소 저해제, 입자 또는 염료 등이 있다. 비-표지된 항체 (1차 항체) 및 표지된 항체 (2차 항체)를 함께 사용하는 방법, 웨스턴 블롯 또는 면역블롯, ELISA (효소-연계된 면역흡착 분석), RIA (방사성 면역분석), 경쟁적인 EIA (효소 면역분석), DAS-ELISA (더블 항체 샌드위치 ELISA), 2차원 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 면역세포화학적 및 면역조직화학적 기법, 면역비탁법, 면역형광법, 특히 항체 등의 바이오칩 또는 단백질 마이크로어레이를 이용하는 기법, 또는 반응제 스트립 등의 형태의 콜로이드형 침전에 기반한 분석 및 항체-연결된 양자점 (quantum dot)을 이용한 분석과 같이, 본 발명에 따라 사용할 수 있는 공지된 방법들이 매우 다양하게 존재한다. 단백질을 검출 및 정량하는 다른 형태로 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 기법 또는 리간드-결합 분석 등이 있다.

[0235] 본 발명의 진단 방법은 마커의 수준을 기준치와 비교하는 단계를 포함한다.

[0236] 용어 "기준치"는, 본원에서, 개체로부터 채집한 샘플에서 수득한 값 또는 데이터에 대한 기준으로서 사용되는 미리 결정된 기준이다. 기준치 또는 기준 수준은 절대값, 상대값, 상한 또는 하한이 있는 값, 범위 값, 평균 값 (average value, mean value), 중앙 값 또는 특정 대조군 또는 베이스라인 값과 비교되는 값일 수 있다. 기준치는 개별 샘플 수치, 예를 들어 실험 대상 개체 유래의 샘플로부터 수득한 수치이지만 보다 앞선 시점에 수득한 수치에 기초할 수 있다. 기준치는 생활 연령 매칭 그룹의 개체 집단 등의 다수의 샘플을 기반으로 하거나 또는 검사할 샘플이 포함되거나 또는 배제된 샘플 풀에 기반할 수 있다.

[0237] 본 발명의 제1 방법에 따른 기준치는 ALD를 앓지 않는 하나 이상의 개체 (즉, 대조군 개체)로부터 입수할 수 있다. 개체는, ALD로 진단되지 않았다면 ALD를 앓고 있지 않은 것으로 간주된다. ALD 진단은 다음과 같은 기준으로 행해질 수 있다. ALD가 남성에서 의심되는 경우, ALD 진단은 혈장에서 VLCFA (매우 긴 장쇄 지방산) 수준 증가가 검출되면 ALD로 진단되며, ABCD1 유전자에서 돌연변이가 식별되면 확증된다. ALD가 여성에서 의심되는 경우, ALD를 앓고 있는 여성의 15%는 혈장내 VLCFA 수준이 정상이기 때문에, 선택되는 진단 검사는 ABCD1 유전자의 돌연변이 분석이다.

[0238] 본 발명의 진단 방법에서, 마커의 수준 또는 발현 수준은, 샘플내 마커의 수준/발현 수준이 기준치 보다 낮을 경우, "감소된" 것으로 간주된다. 마커의 수준/발현 수준이, 기준치 보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150% 또는 그 이상 낮은 경우, 기준치 보다 낮은 것으로 간주된다.

[0239] 마찬가지로, 본 발명의 진단 방법에 있어서, 마커의 수준 또는 발현 수준은, 샘플내 마커의 수준/발현 수준이 기준치 보다 높을 경우, "증가된" 것으로 간주된다. 바이오마커의 수준/발현 수준이, 기준치 보다 적어도 1.5%, 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150% 또는 그 이상의 수준으로 높을 경우, 기준치 보다 높은 것으로 간주된다.

[0240] 부신백질이영양증의 진행을 모니터링하는 방법

[0241] 제2 측면에서, 본 발명은, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 유래 샘플에서 확인하는 단계를 포함하는, 부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증의 진행을 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 이하 이를 본 발명의 제2 방법이라 하며:

[0242] - 스팅고신-1-포스페이트의 수준,

[0243] - 스팅고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준,

[0244] - 스팅고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,

[0245] - 아디포넥틴의 발현 수준,

[0246] - 네오프테린의 수준,

[0247] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,

[0248] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,

- [0249] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0250] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0251] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0252] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0253] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0254] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0255] 상기 방법에서, 상기 개체에서 앞선 시점에 수득한 샘플에서 확인된 인자와 비교해,
- [0256] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0257] 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준 증가,
- [0258] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0259] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0260] 네오프테린의 수준 증가,
- [0261] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0262] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0263] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0264] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0265] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,
- [0266] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0267] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0268] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는, 부신백질이영양증의 악화를 의미하는 것이거나, 또는 상
기 샘플에서 앞선 시점에 수득한 샘플에서 결정된 인자와 비교해,
- [0269] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 감소,
- [0270] 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 수준 감소,
- [0271] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,
- [0272] 아디포넥틴의 발현 수준 증가,
- [0273] 네오프테린의 수준 감소,
- [0274] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0275] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0276] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소
- [0277] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0278] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,
- [0279] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0280] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는
- [0281] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 부신백질이영양증의 완화를 의미한다.
- [0282] 용어 "부신백질이영양증", "샘플", "수준", "발현 수준", "마커", "증가" 및 "감소"는 본 발명의 제1 방법에 따
라 정의된다. 마커, 즉 스펡고신-1-포스페이트, 스펡고신-2-포스페이트 키나제, 스펡고신-1-포스페이트 수용체,
아디포넥틴, 네오프테린 및 표 1-8에 지정된 마커, 뿐만 아니라 이들 마커의 수준을 결정하기 위한 기법들 역시

본 발명의 제1 방법에 따라 정의된다. 이들 용어와 관련하여 본 발명의 제1 방법에 대한 구체적인 바람직한 구현예들 역시 본 발명의 제2 방법에 적용가능하다.

- [0283] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 스팅고신-1-포스페이트의 수준을 확인하는 단계를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커들의 임의 조합의 수준을 결정하는 단계를 포함한다:
- [0284] - 스팅고신-1-포스페이트,
- [0285] - 스팅고신-2-포스페이트 키나제,
- [0286] - 스팅고신-1-포스페이트 수용체,
- [0287] - 아디포넥틴,
- [0288] - 네오프테린,
- [0289] - 표 1에 지정된 마커,
- [0290] - 표 2에 지정된 마커,
- [0291] - 표 3에 지정된 마커,
- [0292] - 표 4에 지정된 마커,
- [0293] - 표 5에 지정된 마커,
- [0294] - 표 6에 지정된 마커,
- [0295] - 표 7에 지정된 마커, 및
- [0296] - 표 8에 지정된 마커.
- [0297] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 TAG(63:2)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0298] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 스팅고신-1-포스페이트 및 TAG(63:2)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0299] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 12-S-HETE 및 아디포넥틴의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0300] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 15-S-HETE의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 MCP-1의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0301] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 및 아디포넥틴의 발현 수준으로부터 선택되는 인자를 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 마커의 수준 및 아디포넥틴의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0302] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에 지정된 마커의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0303] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0304] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

- [0305] 특정 구현예에서, 부신백질이영양증은 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0306] ALD는 염증성 탈수초화와 함께 또는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생할 수 있다. 특정 구현예에서, 부신백질이영양증은 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다.
- [0307] 특정 구현예에서, 본 발명의 제2 방법에 따른 마커가 스핑고신 키나제 2 및/또는 스핑고신-1-포스페이트 수용체일 경우, 마커의 발현은 해당 mRNA의 수준을 측정함으로써 결정된다.
- [0308] 더 구체적인 구현예에서, 샘플은 PBMC 함유 샘플이다. 보다 더 구체적인 구현예에서, PBMC 함유 샘플은 혈액이다.
- [0309] 용어 "ALD를 앓고 있는 환자"는, 본원에서, ALD로 진단받은 개체를 지칭한다. ALD의 진단은 본 발명의 진단 방법에서 설명된 진단 기준을 토대로 행해질 수 있다.
- [0310] 용어 "진행을 모니터링하는"은 본원에서 ALD로 진단된 개체에서 질환의 진행, 즉 ALD가 악화되었는지 또는 완화되었는지를 확인하는 것을 의미한다.
- [0311] 용어 "ALD 악화"는, 본원에서, 질환이 1차 측정 시기의 단계 보다 후기 단계로 질환이 진행되는, 즉, 운동력 저하 또는 경직 증가를 의미한다. 특정 구현예에서, ALD 악화는 뇌 염증성 탈수초화의 발현을 의미한다. 또 다른 특정 구현예에서, ALD 악화는 AMN에서 cAMN으로의 진행을 의미한다.
- [0312] 용어 "완화"는, 본원에서, 장애, 병태 또는 질환, 예를 들어 한가지 이상의 ALD 증상의 경감을 의미한다.
- [0313] 본 발명의 제2 방법은 개체 유래 샘플에서 하나 이상의 마커의 수준 또는 발현 수준을, 값, 즉 보다 앞선 시점의 개체 샘플에서 결정된 동일 마커 또는 마커들의 수준 또는 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 샘플에서 마커의 수준/발현 수준은 동일 타입의 샘플에서의 상기 마커의 수준/발현 수준과 비교한다.
- [0314] 부신백질이영양증 요법의 효능을 모니터링하는 방법
- [0315] 제3 측면에서, 본 발명은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자를 개체 유래 샘플에서 확인하는 단계를 포함하는, 부신백질이영양증을 앓고 있는 개체에서 부신백질이영양증 요법의 효능을 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 이하 이를 본 발명의 제3 방법이라 하며:
- [0316] - 스핑고신-1-포스페이트의 수준,
- [0317] - 스핑고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준,
- [0318] - 스핑고신-1-포스페이트 수용체의 발현 수준,
- [0319] - 아디포넥틴의 발현 수준,
- [0320] - 네오프테린의 수준,
- [0321] - 표 1에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0322] - 표 2에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0323] - 표 3에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0324] - 표 4에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0325] - 표 5에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0326] - 표 6에서 지정된 하나 이상의 마커의 수준,
- [0327] - 표 7에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준, 및
- [0328] - 표 8에서 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준,
- [0329] 상기 방법에서, 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,
- [0330] 스핑고신-1-포스페이트의 수준 증가,
- [0331] 스핑고신-2-포스페이트 키나제의 발현 수준 증가,

- [0332] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 증가,
- [0333] 아디포넥틴의 발현 수준 감소,
- [0334] 네오프테린의 수준 증가,
- [0335] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0336] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0337] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0338] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0339] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가,
- [0340] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0341] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가, 및/또는
- [0342] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 증가는 그 요법이 효과가 없다는 것을 의미하거나, 또는
- [0343] 상기 요법의 투여 전에 측정된 인자와 비교해,
- [0344] 스펡고신-1-포스페이트의 수준 감소,
- [0345] 스펡고신-2-포스페이트 키나제의 수준 감소,
- [0346] 스펡고신-1-포스페이트 수용체의 수준 감소,
- [0347] 아디포넥틴의 발현 수준 증가,
- [0348] 네오프테린의 수준 감소,
- [0349] 표 1에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0350] 표 2에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0351] 표 3에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소
- [0352] 표 4에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 증가,
- [0353] 표 5에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소,
- [0354] 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 감소,
- [0355] 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소, 및/또는
- [0356] 표 8에 지정된 하나 이상의 마커의 발현 수준 감소는 그 요법이 효과적이라는 것을 의미한다.
- [0357] 용어 "부신백질이영양증", "샘플", "수준", "발현 수준", "마커", "증가" 및 "감소"는 본 발명의 제1 방법에 따라 정의된다. 마커, 즉, 스펡고신-1-포스페이트, 스펡고신-2-포스페이트 키나제, 스펡고신-1-포스페이트 수용체, 아디포넥틴, 네오프테린 및 표 1-8에 지정된 마커 뿐 아니라 이들 마커의 수준을 결정하는 기법들 역시 본 발명의 제1 방법에 따라 정의된다. 용어 "ALD를 앓고 있는 개체"는 본 발명의 제2 측면에 따라 정의된다. 이들 용어와 관련하여 본 발명의 제1 방법 및 본 발명의 제2 방법에 대한 구체적인 바람직한 구현예들 역시 본 발명의 제3 방법에 적용가능하다.
- [0358] 특정 구현예에서, 부신백질이영양증은 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0359] ALD는 염증성 탈수초화와 함께 또는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생할 수 있다. 특정 구현예에서, ALD는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다.
- [0360] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 스펡고신-1-포스페이트의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 하기 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의 조합을 개체 유래 샘플에서 결정하는 단계를 포함한다:

- [0361] - 스펡고신-1-포스페이트,
- [0362] - 스펡고신-2-포스페이트 키나제,
- [0363] - 스펡고신-1-포스페이트 수용체,
- [0364] - 아디포넥틴,
- [0365] - 네오프테린,
- [0366] - 표 1에 지정된 마커,
- [0367] - 표 2에 지정된 마커,
- [0368] - 표 3에 지정된 마커,
- [0369] - 표 4에 지정된 마커,
- [0370] - 표 5에 지정된 마커,
- [0371] - 표 6에 지정된 마커,
- [0372] - 표 7에 지정된 마커 및
- [0373] - 표 8에 지정된 마커.
- [0374] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 TAG(63:2)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0375] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 스펡고신-1-포스페이트 및 TAG(63:2)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0376] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 12-S-HETE 및 아디포넥틴의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0377] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 15-S-HETE의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 MCP-1의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0378] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 하나 이상의 마커의 수준 및 아디포넥틴의 발현 수준으로부터 선택되는 인자를 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 표 7에 지정된 마커의 수준 및 아디포넥틴의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0379] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에 지정된 하나 이상의 마커의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 표 6에 지정된 마커의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0380] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 IL9, IL9R, IL4, IL5, IL5RA, IL10, CCL11, CCL13, CCL19, CCL26, CXCL12 및 CCR8의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0381] 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 본 발명의 제3 방법은 개체 유래 샘플에서 IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IFNA2, CXCL11, CXCL6, CXCR1, CCL15, CCL16, CCL21, CXCL13, CXCL14 및 CARD18의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0382] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법에 따른 마커는 아디포넥틴, TNF, IL-8, 12S-HETE, 15S-HETE, TXB2, INF2, IL4, IL10, IL36, CCR3, CXCL9 및 네오프테린으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0383] 특정 구현예에서, 본 발명의 제3 방법에 따른 마커가 스펡고신 키나제 2 및/또는 스펡고신-1-포스페이트 수용체 일 경우, 이들 마커의 발현 수준은 해당 mRNA의 수준을 측정함으로써 결정한다.
- [0384] 더 구체적인 구현예에서, 샘플은 PBMC 함유 샘플이다. 보다 더 구체적인 구현예에서, PBMC 함유 샘플은 혈액이

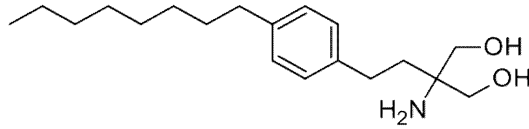
다.

- [0385] 용어 "부신백질이영양증 요법"은, 본원에서, 통상적으로 진단 이후에, 또는 건강 문제 발생을 예방하기 위해 건강 문제에 대해 시도되는 교정 (remediation)을 지칭한다. 이와 같이, 치유 (cure), 즉, 질환의 완전한 관해이어야 하는 것은 아니다. 요법은 특정 질환에 대해 긍정적인 효과를 가지는 것으로 공지되거나 또는 공지되지 않을 수 있다. 이 용어는 치료학적 처치 및 원치않은 생리학적 변화 또는 장애, 예를 들어 암을 방지 또는 중단 (감소)하기 위한 목적의 예방학적 또는 방제적 조치를 모두 포함한다. 본 발명의 목적에서, 유리한 또는 원하는 임상 결과로는, 비-제한적인 예로, 검출가능한 및 검출불가능한, 증상 저하, 질환 전과 저하, 생리학적 상태의 안정화 (특히 악화되지 않음), 질환의 진행 속도 서행 또는 정지, 생리학적 상태 개선 또는 완화 및 관해 (부분 관해 및 완전 관해) 등이 있다. 또한, 이는, 치료하지 않을 경우 예상되는 생존성과 비교해, 생존 연장, 무질환성 생존 연장 및 무증상성 생존 연장을 수반할 수 있다. 치료가 필요한 개체로는 병태 또는 장애를 이미 앓고 있는 개체 뿐만 아니라 병태 또는 장애가 예방되어야 하는 개체 또는 병태 또는 장애를 앓을 소양을 가진 개체 등이 있다.
- [0386] ALD 요법에 대한 비-제한적인 예시적인 예로는, 항산화제, 미토콘드리아 타겟팅 항산화제, 히스톤 탈아세틸효소 저해제, 미토콘드리아 전이공 개방 저해제, 항-염증제, PPAR 작용제, RXR 작용제, 시르투인 1 작용제, 지질강화제, 헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물 및 자가포식 활성화인자 등이 있다.
- [0387] 용어 "항산화제"는, 본원에서, 반응성 산소 종의 수준을 줄이는 물질, 예를 들어, 반응성 산소 종의 형성을 예방하거나 또는 임의의 손상을 야기하기 전에 이를 제거하는 물질을 의미한다. 항산화제의 예로는 α -리포산, 비타민 E 및 N-아세틸시스테인이 있다.
- [0388] 용어 "미토콘드리아 타겟팅 항산화제"는, 본원에서, 생체내에서 미토콘드리아 내부에 선택적으로 농축되는 항산화제를 의미한다. 미토콘드리아 타겟팅 항산화제의 예는 미토퀸 (MitoQ) 및 [2-(3,4-다이하이드로-6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸-2H-1-벤조피란-2-일)에틸]트리페닐닐포스포늄 브로마이드 (MitoVitE)이다.
- [0389] 용어 "히스톤 탈아세틸효소 저해제"는, 본원에서, 히스톤 탈아세틸효소의 기능을 간섭하는 물질을 지칭한다. 히스톤 탈아세틸효소 저해제의 예로는 보리노스타트 (vorinostat), 로미덱신 (romidepsin), 파노비노스타트 (panobinostat), 발프로익산 (valproic acid), 벨리노스타트 (belinostat), 모세티노스타트 (mocetinostat), PCI-24781, 엔티노스타트 (entinostat), SB939, 레미노스타트 (reminostat), 기비노스타트 (givinostat), CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, ACY-1215, 설향라판 (sulforaphane) 및 케베티린 (kevetrin)이 있다. "미토콘드리아 전이공 개방 저해제"는, 본원에서, 내부 막 채널의 개방에 의해 유발되는 미토콘드리아의 내부 막의 비-특이적인 투과성 증가를 차단하는 물질을 지칭한다. 미토콘드리아 전이공 개방 저해제의 예로는 사이클로스포린 A와 B의 유도체, NIM811, 2-아미노에톡시다이페닐 보레이트 및 봉크렉산 (bongkrelic acid)이 있다.
- [0390] 용어 "항-염증제"는, 본원에서, 염증을 줄여주는 물질을 지칭한다. 항-염증제의 예로는 살리실레이트, 예를 들어, 아세틸살리실산, 디플루니살 (diflunisal) 및 살살레이트 (salsalate); 프로피온산 유도체, 예를 들어 이부프로펜, 나프록센 (naproxen), 페노프로펜 (fenopropen), 케토프로펜 (ketoprofen), 텍스케토프로펜 (dexketoprofen), 플루르비프로펜, 옥사프로진 (oxaprozin), 록소프로펜 (loxoprofen); 아세트산 유도체, 예를 들어, 인도메타신 (indomethacin), 설린닥 (sulindac), 에토돌락 (etodolac), 케톨락 (ketorolac), 디클로페낙 (diclofenac), 나부메톤 (nabumetone); 에놀산 유도체, 예를 들어, 피록시캄 (piroxicam), 멜록시캄 (meloxicam), 테녹시캄 (tenoxicam), 드록시캄 (droxicam), 로르녹시캄 (lornoxicam) 및 이속시캄 (isoxicam); 페남산 유도체, 예를 들어, 메페남산 (mefenamic acid), 메클로페남산 (meclofenamic acid), 플루페남산 (flufenamic acid) 및 톨페남산 (tolfenamic acid); 선택적인 COX-2 저해제, 예를 들어, 셀레코싯 (celecoxib), 로페코싯 (rofecoxib), 발데코싯 (valdecoxib), 파레코싯 (parecoxib), 루미라코싯 (lumiracoxib), 에토리코싯 (etoricoxib) 및 피로코싯 (firocoxib); 설폰아닐리드, 예를 들어, 니메술리드 (nimesulide); 및 기타 화합물, 예를 들어, 리코펠론 (licofelone)이 있다.
- [0391] 용어 "PPAR 작용제"는, 본원에서, 피옥시즘 증식인자-활성화된 수용체를 자극하는 물질을 지칭한다. PPAR 작용제의 예로는 GW-9662, 티아졸리딘디온, 예를 들어, 로시글리타존 (rosiglitazone), 피오글리타존 (pioglitazone) 및 그 유도체; 피브레이트 (fibrate), 예를 들어, 베자피브레이트 (bezafibrate), 시프로피브레이트 (ciprofibrate), 클로피브레이트 (clofibrate), 겐피브로질 (gemfibrozil) 및 페노피브레이트 (fenofibrate); 및 글리타자르 (glitazar), 예를 들어, 무라글리타자르 (muraglitazar), 테사글리타자르 (tesaglitazar) 및 알레글리타자르 (aleglitazar)가 있다.

- [0392] 용어 "RXR 작용제"는, 본원에서, 레티노이드 X 수용체를 자극하는 물질을 지칭한다. RXR 작용제의 예로는 CD 3254, 도코사헥사엔산, 플루오로벡사로텐 (bexarotene), 벡사로텐 (bexarotene), 레티노익산 및 SR 11237이 있다.
- [0393] 용어 "시르투인 1 작용제"는, 본원에서, 시르투인 1 효소를 자극하는 물질을 지칭한다. 시르투인 1 작용제의 예로는 레스베라트롤 (resveratrol)과 SRT-1720이 있다.
- [0394] 용어 "지질강하제"는, 본원에서, 혈중 저밀도 지단백질 (LDL)을 낮추거나 및/또는 고밀도 지단백질 (HDL)을 높이는, PPAR 작용제 및 피브레이트 이외의 물질을 지칭한다. 지질강하제의 예로는 스타틴 (statin), 예를 들어, 아토르바스타틴 (atorvastatin), 세리바스타틴 (cerivastatin), 플루바스타틴 (fluvastatin), 로바스타틴 (lovastatin), 메바스타틴 (mevastatin), 피타바스타틴 (pitavastatin), 프라바스타틴 (pravastatin), 로수바스타틴 (rosuvastatin) 및 심바스타틴 (simvastatin); 니아신; 담즙산 격리제, 예를 들어, 콜레스티라민 (cholestyramine), 콜레세벨람 (colesevelam) 및 콜레스티폴 (colestipol); 기타 화합물, 예를 들어, 피토스테롤 (phytosterol), 에제티미브 (ezetimibe), 오를리스타트 (orlistat) 및 니아신이 있다.
- [0395] 용어 "헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물"은, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 기법에 의해 결정될 수 있는, 헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준의 저하를 야기할 수 있는 지방산 조성물을 지칭한다. 이러한 지방산 조성물에 대한 예시적인 비-제한적인 예로는, 글리세릴 트리올리레이트와 글리세릴 트리에루게이트 4:1 비율로 제조된 로렌조 오일이 있으며, 이는 올레산과 에루크산의 트리아실글리세롤 형태이며, 올리브 오일과 유채 오일로부터 제조된다.
- [0396] 특정 구현예에서, ALD 요법은 항산화제 화합물을 포함한다. 더 구체적인 구현예에서, 항산화제 화합물은 N-아세틸시스테인, 리포산 및 비타민 E의 조합물이다.
- [0397] 핀콜리모드의 용도
- [0398] 제4 측면에서, 본 발명은 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제에 관한 것이다.
- [0399] 다른 예로, 본 발명은 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제에 관한 것이다.
- [0400] 다른 예로, 본 발명은 개체에게 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제를 치료학적인 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0401] 용어 "부신백질이영양증" 및 "개체" 뿐만 아니라 이의 구체적인 바를 포함한 구현예들은 전술한 바와 같이 정의된다.
- [0402] 용어 "스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제" 또는 "S1PR1의 저해제"는, 본원에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 생체내 또는 시험관내 활성을 저해하는 화합물을 지칭하며, 비-제한적인 예로는 길항제, 저해성 항체, 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 방지하는 화합물 및 mRNA 또는 단백질 수준 저하를 야기하는 화합물 등이 있다. 특정 구현예에서, S1PR1 저해제는 S1PR1의 세포내 분해를 야기할 수 있다. 용어 "스펅고신-1-포스페이트 수용체 1" 또는 "S1PR1"은 전술한 바와 같이 정의된다.
- [0403] 당업자는, 특정 화합물이 S1PR1의 저해제인지를 임의의 적절한 분석, 예를 들어, EP2364976 A1에 기술된 분석에 의해 결정할 수 있다. 특정 구현예에서, S1PR1 저해제는 SP1 수용체의 활성을 생체내 또는 시험관내에서 검출가능한 수준으로의 감소를 야기할 수 있다 (예, EP2364976 A1에 기술된 분석 등의 분석으로 측정시, SP1 수용체 활성에 적어도 10% 감소). 특정 구현예에서, S1PR1 저해제는 S1P의 순환 수준을 낮출 수 있다. S1P의 순환 수준은 전술한 바와 같이 질량 분광측정으로 결정할 수 있다. 또 다른 특정 구현예에서, S1PR1 저해제는 말초 림프구에서 S1PR1의 발현 수준을 낮출 수 있다. S1PR1의 발현 수준은 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 수준을 전술한 바와 같이 측정함으로써 결정할 수 있다.
- [0404] S1PR1 저해제에 대한 예시적이고 비-제한적인 예는 다음과 같다: 오자니모드 (ozanimod), FTY720, AAL(R), KRP-203, 세라리피모드 (ceralifimod), 포네시모드 (ponesimod), 시포니모드, CYM-5442, RP-001, BAF312, ONO-4641, CS-0777, RPC-1063, SEW2871, VPC2309, VPC4416, W146, VPC25239, GSK2018682, 핀콜리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염.
- [0405] 특정 구현예에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제는 핀콜리모드, 또는 이의 유사체, 대사산물 또는

유도체이거나, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염이다.

[0406] 용어 "핀콜리모드" 또는 "FTY720"은, 본원에서, 하기 식의 화합물을 지칭한다.

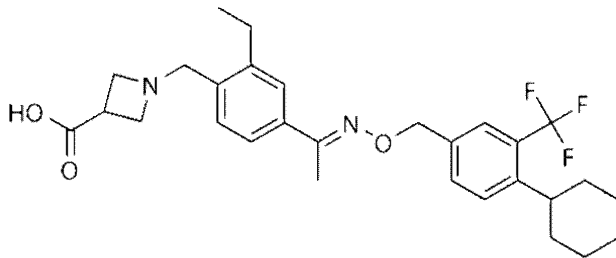


[0407]

[0408] 핀콜리모드는 스핑고신-1 포스페이트 (S1P)의 유사체이며, 스핑고신 키나제 2 (SPHK2)에 의해 핀콜리모드 포스페이트로 인산화된다. S1P와 마찬가지로, 핀콜리모드-포스페이트는 스핑고신-1 포스페이트 수용체 1 (S1PR1)에 결합할 수 있으며, 그런 후 내재화된다. 이후, S1P 수용체는 분해되므로, 세포 표면 신호전달이 방지된다. 그래서, 핀콜리모드는 S1P 수용체의 기능에 대해 간접적인 길항작용을 유발한다.

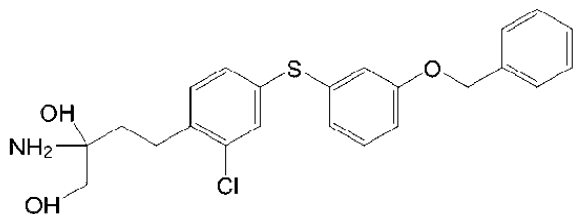
[0409] 용어 "유사체"는 본원에서 대사 화합물과 유사한 생화학적 활성을 가진, 화합물로부터 구조적으로 유래되거나 또는 상동한 임의의 물질을 지칭한다. 특정 구현예에서, 핀콜리모드 유사체는 스핑고신 1 포스페이트 수용체, 특히 S1PR1에 결합할 수 있으며, 이의 세포내 분해를 촉진한다. 핀콜리모드 유사체에 대한 예시적이고 비-제한적인 예는 다음과 같다: 시포니모드, KRP-203, 포네시모드 (ponesimod), RPC-1063 및 미국 특허 8,673,982에 언급된 화합물들. 특정 구현예에서, 핀콜리모드 유사체는 시포니모드, KRP-203, 포네시모드 및 RPC-1063로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더 구체적인 구현예에서, 핀콜리모드 유사체는 시포니모드 (siponimod)이다.

[0410] 용어 "시포니모드" 또는 "BAF312"는 하기 식의 화합물이다:



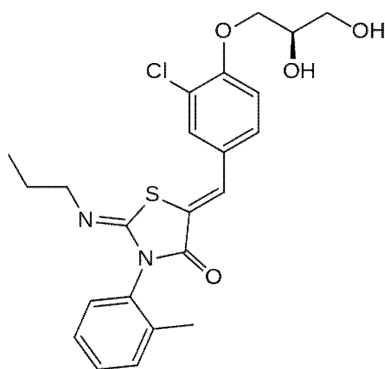
[0411]

[0412] 용어 "KRP-203"는 하기 식의 화합물이다:

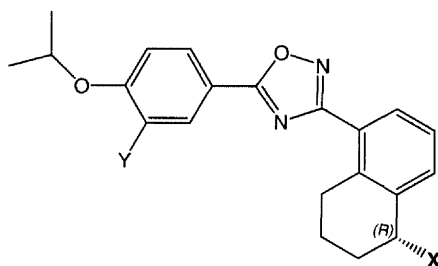


[0413]

[0414] 용어 "포네시모드"는 하기 식의 화합물이다:

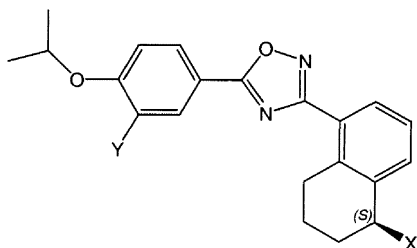


[0415]



[0416] 용어 "RPC-1063"는 식

I-R



[0417] 또는 **I-S**의 화합물이다.

[0418] 용어 "유도체"는, 본원에서, 해당 화합물로부터 구조적으로 파생된 물질, 즉 용해성 또는 생체이용성과 같은 물리-화학적 특성 중 임의의 것을 (약제학적 용도를 위해) 변환시키기 위해 추가적인 화학 기의 치환 또는 부가 등과 같은 화학적 유도체화가 이행된 화학적 화합물을 포함한다. 유도체는 소위 프로드럭을 포함한다.

[0419] 용어 "대사산물"은 본원에서 효소 반응으로부터 생성되는 임의의 화합물, 즉, 효소가 참여한 프로세스에 의해 합성된 화합물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 핀글리모드의 대사산물은 핀글리모드 포스페이트이다.

[0420] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 수여체에게 투여시 본원에 기술된 화합물을 (직접 또는 간접적으로) 공급할 수 있는 임의의 염을 지칭한다. 바람직하게는, 본원에서, 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 주 정부 또는 연방 전부의 규제 기관으로부터 승인되거나 또는 미국 약전 또는 동물, 특히 인간 사용에 대해 통상적으로 인지된 기타 약전에 열거된 것을 의미한다. 염의 제조는 당해 기술 분야에 공지된 방법으로 수행할 수 있다.

[0421] 예를 들어, 핀글리모드의 약제학적으로 허용가능한 염은 산 부가 염, 염기 부가 염 또는 금속 염일 수 있으며, 이는 통례적인 화학적 방법을 통해 염기성 또는 산성 모이어티를 포함하는 모 화합물로부터 합성할 수 있다. 일반적으로, 이들 염은, 예를 들어, 화합물의 자유 산 또는 염기 형태를 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 수용액에서 또는 유기 용매 중에서 또는 이들의 혼합물 중에서 반응시켜, 제조된다. 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비-수성 매질이 바람직하다. 특정 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 산 부가 염이다. 적절한 염의 예로는 하이드로클로라이드, 카보네이트, 하이드로겐 카보네이트, 아세테이트, 락테이트, 부티레이트, 프로피오네이트, 설페이트, 메탄 설포네이트, 사이트레이트, 타르트레이트, 나이트레이트, 설포네이트, 옥살레이트 및/또는 숙시네이트 등이 있다.

[0422] 더 구체적인 구현예에서, 핀글리모드의 약제학적으로 허용가능한 염은 하이드로클로라이드 염이다.

[0423] 특정 구현예에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀글리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염은 신경전달물질 수용체 조절 물질 (neurotransmitter receptor modulating agent)과 함께 투여되지 않는다. 더 구체적인 구현예에서, 신경전달물질 수용체 조절 물질은 벤트트로핀 (benztropine), 카르베탭펜탄 (carbetapentane), 클레마스틴 (clemastine), 핀돌롤 (pindolol), 이프라트로피우른 (ipratropium), 아트로핀 (atropine), GBR12935, Snc-80, BD-1 047, 살메테롤 (salmeterol), 알부테롤 (albuterol), 트리플루오페라진 (trifluoperazine) 또는 이들의 염으로부터 선택된다. 보다 더 구체적인 구현예에서, 신경전달물질 수용체 조절 물질은 벤트트로핀 또는 이의 염 (예, 벤트트로핀 메실레이트)으로부터 선택된다.

[0424] 특정 구현예에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀글리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염은 메틸글리옥살 비스(구아닐하이드라존) (MGBG 또는 미토구아존 (mitoguanzone))과 함께 투여되지 않는다. 용어 "메틸글리옥살 비스(구아닐하이드라존)" 또는 "MGBG" 또는 "미토구아존 (mitoguanzone)"은, 본원에서, 플라아민인 스페르미딘의 합성을 촉매하는, S-아데노실 메티오

닌 데카르복실라제 (SAMDC, AMD-1)의 경쟁적인 폴리아민 저해제를 지칭한다.

- [0425] 특정 구현예에서, 부신백질이영양증은 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0426] ALD는 염증성 탈수초화와 함께 또는 염증성 탈수초화없이 발생할 수 있다. 특정 구현예에서, ALD는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다.
- [0427] 용어 "치료 및/또는 예방"은, 본원에서, 부신백질이영양증, 바람직하게는 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 또는 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD), 보다 더 바람직하게는 부신척수신경병증 (AMN)을 앓고 있거나 또는 앓을 위험이 있는 환자에서 건강을 유지하기 위해, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하거나, 또는 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 이 용어는 또한 부신백질이영양증, 바람직하게는 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 또는 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD) 부신백질이영양증, 보다 더 바람직하게는 부신척수신경병증 (AMN)과 관련된 한가지 이상의 증상을 예방, 완화 또는 제거하기 위해, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하거나, 또는 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 제형을 투여하는 것을 포함한다.
- [0428] 약물 또는 약리학적인 활성 물질에 대한 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 무독성이지만, 원하는 효과를 제공하기에 충분한 약물 또는 물질의 양을 의미한다. 본 발명의 조합 요법에서, 조합물 중 한가지 성분의 "유효량"은, 조합물의 다른 성분과 조합하여 사용되었을 때 원하는 효과를 달성하는데 효과적인, 화합물의 양이다. "효과적인" 양은 개체의 나이 및 전체적인 상태, 구체적인 활성 물질 또는 물질들 등에 따라 개체별로 다를 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 명시하기는 늘 불가능하다. 그러나, 임의 개체 사례에 대한 적절한 "유효량"은 일반적인 실험을 통해 당해 기술 분야의 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0429] 일반적으로, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 투여되는 유효량은, 장애의 중증도 또는 나이, 체중 또는 투여 방식에 따라 결정될 것이다. 실제, 의사가 부신백질이영양증, 바람직하게는 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 또는 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD), 더 바람직하게는 부신척수신경병증 (AMN)을 앓고 있는 환자 또는 앓을 위험이 있는 환자에게 가장 적합한 실제 투여량과 투약 용법을 결정할 것이다.
- [0430] 다른 측면에서, 본 발명은 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로서, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염이, 본 발명의 진단 방법으로 진단받은 환자에게 투여된다. 특정 구현예에서, 환자는, 본 발명의 진단 방법을 이용해, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하기 전에, 진단된다.
- [0431] 약학적 조성물
- [0432] 제5 측면에서, 본 발명은, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제; 및 α -리포산, 비타민 E, 및 N-아세틸시스테인으로부터 선택되는 항산화제, 미토콘드리아 타겟팅 항산화제, 히스톤 탈아세틸효소 저해제, 미토콘드리아 전이공 개방 저해제, 항-염증제, PPAR 작용제, RXR 작용제, 시르투인 1 작용제, 지질강화제, 헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물 및 자가포식 활성인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물을 포함하는, 약학적 조성물에 관한 것으로서, 이하 본 발명의 약학적 조성물로 지칭된다.
- [0433] 용어 "스펙고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는", " α -리포산, 비타민 E, 및 N-아세틸시스테인으로부터 선택되는 항산화제", "미토콘드리아 타겟팅 항산화제", "히스톤 탈아세틸효소 저해제", "항-염증제", "PPAR 작용제", "RXR 작용제", "시르투인 1 작용제", "지질강화제" 및 "헥사코사노익산 (C26:0)의 순환 수준을 낮출 수 있는 지방산 조성물"은 상기에서 정의된다.
- [0434] 특정 구현예에서, 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는

유도체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 특정 구현예에서, 핀골리모드 유사체는 시포니모드, KRP-203, 포네시모드 및 RPC-1063로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더 구체적인 구현예에서, 핀골리모드 유사체는 시포니모드이다. 용어 "조합"은, 본원에서, 부신백질이영양증, 바람직하게는 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 또는 소아 변형형 부신백질이영양증 (cALD), 보다 더 바람직하게는 부신척수신경병증 (AMN)을 앓거나 앓을 위험이 있는 환자에게, 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 상기에 기술된 다른 언급된 치료학적 물질을 동일한 또는 별개의 약학적 제형으로, 동시에 또는 서로 다른 시기에 투여하는 것을 포괄하는 의미이다.

- [0435] 조합 약물들은, 하나의 조합된 단위 투약 형태 또는 2개의 분리된 단위 투약 형태로 함께, 순차적으로 또는 별개로 투여될 수 있다. 단위 투약 형태는 고정 복합제 (fixed combination)일 수도 있다.
- [0436] 동시 사용 (투여)는, 예를 들어, 2종 이상의 활성 성분으로 된 하나의 고정 복합제 형태로 이루어지거나, 또는 각각 제형화된 2종 이상의 활성 성분을 동시에 투여함으로써 이루어질 수 있다.
- [0437] 순차적인 사용 (투여)은 바람직하게는 한 시점에 조합물의 1종 (또는 1종 이상의) 성분을 투여하고, 그외 다른 성분은 다른 시기에, 즉 시간적으로 교차하는 방식 (chronically staggered manner)으로 투여하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이로써 단일 화합물을 독립적으로 투여한 경우에 비해 우수한 효능을 나타내도록 조합물을 투여하는 것을 의미한다.
- [0438] 별개 사용 (투여)는 조합물의 성분들을 서로 다른 시점에 투여하는 것을 의미한다.
- [0439] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 동일 조성물의 다른 약물 형태 파트를 포함한다.
- [0440] 다른 바람직한 구현예에서, 스펅고신-1-포스페이트 수용체 1의 저해제, 보다 상세하게는 핀골리모드, 이의 유사체, 대사산물 또는 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 다른 약물은, 동일 시점에 또는 서로 다른 시점에 투여하기 위한 별개의 조성물로서 제공된다.
- [0441] 특정 구현예에서, 약학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- [0442] 용어 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 활성 성분과 함께 투여되는 희석제, 보강제, 담체 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약제학적 부형제는 무균 액체, 예를 들어, 물 및 오일일 수 있으며, 그 예로, 페트롤륨 오일, 동물성 오일, 식물성 오일 또는 합성 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등이 있다. 물 또는 수성 용액, 식염수 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 바람직하게는 담체로, 특히 주사용 용액제의 담체로서 사용되며, 또한 완충제, 등장제 또는 용해성을 높일 수 있는 물질로서 사용된다. 적합한 약제학적 담체는 "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin 또는 "Tratado de Farmacia Galenica", C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A. de Ediciones, 1993에 기술되어 있다.
- [0443] 본 발명의 약학적 조성물은 여러가지 제제 형태로 투여될 수 있다. 약학적 조성물의 예로는 경구, 국소 또는 비경구 투여를 위한 임의의 고체 (정제, 환제, 캡슐제, 과립제 등) 또는 액체 (용액, 현탁액, 시럽 또는 유제) 조성물 등이 있다.
- [0444] 바람직한 구현예에서, 약학적 조성물은 경구 형태이다. 약학적 조성물의 경구 형태는 고체 또는 액체일 수 있다. 경구 투여용으로 적합한 투약 형태는 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 시럽제 또는 용액제가 있을 수 있다. 바람직하게는, 약학적 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 및 과립제로 이루어진 군으로부터 선택되는 고체 형태이며, 더 바람직하게는 정제이다.
- [0445] 경구용 고체 약학적 조성물은, 결합제, 예를 들어 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트라가칸트 또는 폴리비닐피롤리돈; 충전제, 예를 들어 락토스, 슈가 (sugar), 옥수수 전분, 칼슘 포스페이트, 소르비톨 또는 글리신; 타정용 윤활제 (tableting lubricant), 예를 들어 마그네슘 스테아레이트; 붕해제, 예를 들어 전분, 폴리비닐피롤리돈, 소듐 전분 글리콜레이트, 하이드록시프로필셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 또는 미세결정 셀룰로스; 또는 약제학적으로 허용가능한 습윤제, 예를 들어 소듐 라우릴 설페이트와 같은, 당해 기술 분야에 공지된 통상적인 부형제를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 부형제는 락토스 일수화물, 하이드록시프로필셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 칼슘 및 마그네슘 스테아레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0446] 경구용 고체 조성물은 블렌딩, 충전 또는 타정과 같은 통상적인 방법으로 제조할 수 있다. 다량의 충전제를 사용해 조성물 전체로 활성 물질을 분산시키기 위한 반복적인 블렌딩 조작을 적용할 수 있다. 이러한 조작은 당해

기술 분야에서 통례적이다. 정제는, 예를 들어, 통상적인 제약 실무에서 널리 공지된 방법에 따라, 습식 또는 건식 조립화에 의해 제조할 수 있으며, 선택적으로 특히 장 코팅제로 코팅할 수 있다.

[0447] 다른 측면에서, 본 발명은 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조성물에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어 본 발명의 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 치료학적인 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 부신백질이영양증을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0448] 특정 구현예에서, 부신백질이영양증은 성인 부신척수신경병증 (AMN), 뇌 부신척수신경병증 (cAMN) 및 소아 변형 부신백질이영양증 (cALD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0449] ALD는 염증성 탈수초화와 함께 또는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생할 수 있다. 특정 구현예에서, ALD는 염증성 탈수초화의 동반없이 발생한다.

[0450] 다른 측면에서, 본 발명은, 약학적 조성물을 본 발명의 진단 방법을 이용해 진단된 환자에게 투여하는, 부신백질이영양증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 약학적 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물을 투여하기 전에 본 발명의 진단 방법을 이용해 환자를 진단한다.

[0451] **실시예 1: 스펡고신-2-포스페이트 키나제 및 스펡고신-1-포스페이트 수용체 1의 수준은 AMN 환자 유래 말초 단핵구 세포에서 증가된다**

[0452] 도 1A에서, 본 발명자들은 스펡고신-1-P의 합성을 조절하는 효소 2종, 즉 SPHK2 (스펙고신 키나제 2) 및 S1PR1 (스펙고신 1-P 수용체)의 증가를 식별하기 위해 AMN 환자의 PBMC에서 Q-PCR 실험을 수행하여, AMN 환자에서 증가됨을 확인하였다. 도 1B에서, 본 발명자들은 HPLC / ESI-Q-TOF 방법으로 AMN 환자의 혈장에서 스펡고신 1-P의 수준을 측정하였다. AMN 환자에서, 스펡고신 1-P (S1P)의 수준은 비정상적으로 증가하였으며, 전염증성 S1P 경로의 상향 조절이 드러났다. 이 결과는 AMN과 또한 X-ALD를 치료하기 위해, 핀골리모드, 핀골리모드 유사체, 대사산물, 유도체 및 분자와 같은 S1P 경로에 대한 저해제의 사용에 확실한 근거가 된다.

[0453] 더욱이, 도 1B의 실험 결과, 항산화제의 조합물 (N-아세틸시스테인, 비타민 E 및 리포산)로 3달간 치료시 S1P의 수준을 정상화할 수 있는 것으로 보이며, 이는 X-ALD에서 이 경로의 기존에 보고된 바 없는 레독스 의존성 (redox dependence)을 시사한다.

[0454] **실시예 2. 변형된 당지질 및 글리세로포스포리피드 신호전달은 부신척수신경병증에서 염증성 케스케이드를 유도한다.**

[0455] 본 발명자들은, 환자 및 대조군으로부터 수득한 PBMC 및 혈장에 대해 대사체/지질체 분석을 수행함으로써, AMN에 대한 분자 시그니처 동정에 착수하였다. 그 결과, 여러가지 질환 진행 단계에서 *Abcd1*-마우스 모델의 척수로부터 입수한 트랜스크립톰 데이터와 통합 생물정보 분석을 이용해 통합하였다. 독립적인 보완 기법들에 의해 후속적으로 실험적으로 검증된 탈조절된 몇가지 주 경로들이 정확하게 포착되었다.

[0456] AMN 환자 유래 혈장 및 PBMC에서의 대사체 및 지질체 분석

[0457] AMN 환자와 성별과 연령을 매칭시킨 건강한 대조군으로부터 혈장 및 PBMC를 채취하였다. 질량 분광측정법을 이용한 지질체 및 대사체 분석을 통해 분자 프로파일을 규명하였다. 대사체를 추출하기 위한 보편적인 단일 방법이 없어, 2가지의 독립적인 프로토콜을 사용해 극성 (대사체)에서 무극성(지질체) 분자에 이르는 넓은 범위의 분자들을 평가하였다. 즉, 혈장 및 PBMC에서 AMN-관련 변화를 규명하기 위해, 비-타겟 대사체 및 지질체 분석을 LC-Q-TOF 시스템을 사용해 수행하였다.

[0458] 혈장의 경우, 동일 군에 속하는 샘플들 중 50% 이상에서 존재하는 분자 특징을 이용해 (대사체 분석 및 지질체 분석에서 각각 3008 및 5579), 클러스터링 분석을 수행하였다. 이 방법을 통해, AMN이 혈장의 대사체 프로파일과 지질체 프로파일 둘다를 결정하는 주요 인자라는 것이 입증되었다. 대조군과 AMN 개체 간의 대사 차이를 추가로 확인하기 위해, PCA (자율 기법) 및 PLS-DA (비-자율 기법) 등의 다변량 통계 분석을 적용하였다. 이 2가지 기법으로 AMN-특이적인 혈장 대사체 및 지질체 시그니처를 식별하였다. 혈장 샘플에 대한 통계적 분석으로, 대사산물 및 지질 종을 비롯한 348종의 분자가 유전자형에 따라 현저하게 차이가 있다는 것을 밝혀냈으며, 이들 분자들 중 일부를 동정하였다.

표 9

화합물	조절 (AMN vs 대조군)	보정한 p-값	배수 변화 ¹
글리코콜산	감소	0.029	>10
콜산	감소	0.045	>10
5-β-콜레스탄-3α,7α,12α-트리올	증가	0.024	>10
5β-안드로스탄-3,17-다이온	감소	4.81E-03	>10
숙신 세미알데하이드	증가	0.045	>10
N-헥사노익산*	감소	1.65E-05	1-5
에이코사펜타에노익산	감소	0.027	>10
헥사데칸다이오익산	감소	0.017	>10
모노아실글리세롤(16:0)	감소	0.032	>10
강글리오사이드 GA1 (d18:1/22:0)	감소	0.042	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(43:0)	증가	0.017	>10
글리세로포스파티딜세린 (38:4)	감소	0.028	1-5

표 9. 부신척수신경병증과 대조군 (CTL) 개체 간에 통계학적으로 유의한 혈장 분자. 동정한 화합물들 모두 실제 질량 및 체류 시간을 기초로 검증하였다. *이들 화합물은 실제 질량, 체류 시간 및 MS/MS 스펙트럼을 기초로 하였다. ¹배수 변화는 log 변환된 원 데이터 밀도로부터 계산한다. 스튜던트 t 검정, p<0,05을 벤자미니-호크버그의 다중 검증 보정 (Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction)과 함께 사용하였다.

분자를 추정된 정제와 조합하는 경로 분석을 통해 수종의 타겟을 발견하였으며, 그 예로는 지질-유도성 염증-관련 경로, 예를 들어, 세라마이드 분해 및 스펅고마이엘린 대사 등이 있다.

담즙산 생합성 경로에 참여하는 대사산물 (콜산, 글리코콜산 및 5-β-콜레스탄-3α,7α,12α-트리올)은 PBMC 분석에서 물론 확인되는 바와 같이 AMN과 대조군 개체 간에 현저한 차이가 있었다. AMN 그룹에서 3종의 유리 지방산 (n-헥사노익산, 에이코사펜타에노익산 및 헥사데칸다이오익 산)의 수준 감소도 발견되었다 (표 9). 마지막으로, 신경전달과 관련있는 γ-아미노부티레이트의 이화작용에서 중간산물인 숙신 세미알데하이드가 AMN 환자의 샘플에서 상향 조절되었다.

혈장 분석에 사용된 방법과 유사한 방법을 적용하여, PBMC 대사체 프로파일이 지질체 프로파일에 비해 양쪽 군에서 더 잘 구별된다는 것을 관찰하였다. 통계 분석에서는 793종의 분자가 양쪽 군 간에 현저한 차이가 있는 것으로 드러났다.

표 10

화합물	조절 (AMN vs 대조군)	보정된 p-값	배수 변화 ¹
1-메틸히스티딘	증가	6.15E-04	>10
1-모노팔미틴	증가	0.042	1-5
3-아미노-1-티로신	증가	3.59E-09	1-5
3-머캅토피루베이트	증가	0.044	1-5
5α-안드로스탄-3,17-다이온	감소	6.23E-07	>10
시티딘다이포스페이트-에탄올아민	증가	2.67E-03	>10
데하이드로아스코르브산	증가	0.043	1-5
엘라이드산	증가	1.33E-03	>10
에리트ρί톨	증가	6.7E-03	>10
아라키돈산	증가	0.022	>10
갈락톤산	증가	8.19E-03	1-5
글루타티온*	증가	0.045	1-5
히스타민	증가	0.012	>10
하이포크산틴*	증가	4.92E-03	>10
카프트롤락톤	증가	2.19E-03	1-5
락타미드	증가	0.018	>10
메틸 리놀레네이트	증가	2.08E-03	>10
메틸 올리에이트*	증가	7.05E-07	>10

모노올레인	증가	8.06E-03	1-5
미리스트산	증가	7.28E-05	>10
펜타데실산	증가	1.75E-05	>10
레틴알데하이드	증가	9.29E-05	>10
스테아르아미드	증가	5.32E-10	1-5
아스코르브산	감소	0.042	1-5
5 β -콜레스탄-3 α ,7 α ,24,26-테트롤	증가	0.019	>10
5Z,8Z-테트라데카다이에노익산	감소	0.034	>10
C24 설파티드	증가	3.93E-03	>10
콜레스테릴 에스테르 19:0	증가	1.35E-04	>10
콜레스테릴 에스테르 20:5	감소	0.011	>10
포스파티딜글루코스 (38:4)	감소	0.020	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(26:0)	증가	0.048	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(36:1)	감소	0.020	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(36:3) ^a	증가	0.016	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(36:3) ^a	증가	0.038	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(40:6)	증가	0.011	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(40:6)	증가	0.023	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(42:1)	증가	5.28E-03	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(43:6)	감소	0.020	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(43:6)	증가	4.33E-03	>10
글리세로포스파티딜에탄올아민(0-16:0/22:5)	감소	9.37E-03	>10
락토실세라마이드 (d18:1/12:0)	증가	0.023	>10
락토실세라마이드 (d18:1/25:0)	증가	5.95E-03	>10
다이아실글리세롤(32:2)	감소	0.027	>10
트리아실글리세롤(40:0)	증가	0.019	>10
트리아실글리세롤(51:2)	증가	0.028	>10
트리아실글리세롤(60:1)	증가	0.014	>10
트리아실글리세롤(62:1)	증가	0.021	5-10
트리아실글리세롤(62:2)	증가	5.12E-03	5-10
트리아실글리세롤(62:3)	증가	0.016	>10
트리아실글리세롤(62:4)	증가	0.042	>10
트리아실글리세롤((63:0) ^b	감소	0.05	>10
트리아실글리세롤((63:0) ^b	증가	9.29E-04	>10
트리아실글리세롤(63:2)	증가	5.37E-09	>10
트리아실글리세롤(64:0)	증가	9.31E-03	>10
트리아실글리세롤(64:1)	증가	8.42E-04	>10
트리아실글리세롤(64:10)	증가	8.10E-05	>10
트리아실글리세롤((64:4) ^c	증가	3.29E-03	>10
트리아실글리세롤((64:4) ^c	증가	0.033	>10
트리아실글리세롤((64:4) ^c	증가	0.013	>10
트리아실글리세롤(64:8)	증가	1.05E-03	>10
트리아실글리세롤(65:1)	증가	6E-03	>10
트리아실글리세롤(65:2)	증가	0.013	>10
트리아실글리세롤(65:3)	감소	0.033	>10
트리아실글리세롤(66:0)	증가	6.07E-03	>10
트리아실글리세롤(66:2)	증가	8.13E-15	>10
트리아실글리세롤(66:6)	증가	2.54E-04	>10

[0465] 표 10. 부신척수신경병증 및 대조군 (CTL) 개체 간에 통계학적으로 유의한 말초혈 단핵구 세포 분자. 동정된 화합물 모두 실제 질량 및 체류 시간을 기초로 검증하였다. *이들 화합물은 실제 질량, 체류 시간 및 MS/MS 스펙트럼을 토대로 한다. ^a, ^b, ^c: 서로 다른 체류 시간을 가진 동중핵 분자. ¹배수 변화는 log 변환된 원 데이터 밀도

로부터 계산한다. 대사체 및 지질체 분석시, 스튜던트 t 검정, $p < 0.05$ 을 벤자미니-호크버그의 다중 검증 보정과 함께 사용하였다.

[0466]

표 10은 분자의 추정되는 정체를 열거한다. 특히, AMN PBMC 샘플에는 대조군 샘플에 비해 히스타민의 농도가 더 높으며, 크산틴 옥시다제의 산물인 하이포크산틴 역시 증가된 수준으로 존재하였다. AMN의 경우, 담즙산 대사에 문제가 있다는 의견에 맞게, 대조군 샘플에 비해 AMN 환자의 PBMC 샘플에서 5β -콜레스탄- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -테트롤 수준이 현저하게 높았다. 홍미롭게도, 락토실세라마이드 (LacCer)와 같은 당지질, 대부분의 글리세로포스포티딜에탄올아민 경로 대사산물 (포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민 및 CDP-에탄올아민) 및 트리글리세라이드 종들이 AMN 환자에서 증가하였다 (표 10). 컨센서스-패스 플랫폼 (Consensus-Path platform)을 이용한 추정의 분자들에 대한 경로 분석에서는, 루코트리엔, 프로스타글란딘 및 트롬복산 서브패밀리로부터 유래되는 대사산물을 비롯해, 세라마이드 분해, 스펅고마이엘린 대사 및 에이코사노이드 생합성과 같은 생활성 지질 경로에 의해 유도되는 전염증성 케스케이드를 포함하는 몇가지 노드 (node)가 밝혀졌다. 요컨대, 동정된 대사산물 거의 대부분이 염증 및/또는 레독스 항상성과 관련있을 수 있다.

[0467]

X-ALD에서 '-omics' 데이터의 통합 분석

[0468]

여러가지 종 및 세포 타입들에서 질환 발병과 관련있을 수 있는 질환의 코어 분자 풋프린트를 밝히기 위해, 대사체 결과와 지질체 결과를 다음으로 *Abcd1*-마우스의 척수로부터 수득한 트랜스크립톰 데이터와 통합하였다. 3.5월령, 12월령 및 22월령의 X-ALD 마우스의 척수에 대한 트랜스크립톰과 AMN 환자의 대사체 간의 공통된 조절 이상 경로를 PBMC 및 혈장에서 분석하였다. 3가지 조절 이상 경로가 확인되었다: i) 지질 및 지단백질의 대사, ii) GPCR (G-단백질 커플링된 수용체)에 의한 신호전달 및 iii) 스펅고리피드 대사. 경로 i) 및 ii)는 또한 혈장에서도 조절 이상을 나타내었다. 대사 반응을 정확하게 시각화하기 위해, Kegg (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map01100v)에서 대사 맵을 사용해, 발명자 자신의 AMN 대사체 맵을 구축하였다. 이러한 통합 분석 방식에서, 효소 발현 (*Abcd1*-마우스 척수) 및 이의 반응 산물 또는 기질 (AMN 환자의 혈장 또는 PBMC)이 모두 동일한 방향성을 나타내는, 수개의 교란 노드를 입수하였다. 효소 대사산물 쌍들의 일치된 조절 이상 부위가 4개 동정되었다. 첫번째는 β -1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (B4GALT6)를 경유한 글루코실세라마이드로부터 락토실세라마이드 (LacCer)를 합성하는 경로이다. 이 효소는 트랜스크립톰 분석에서 발현이 증가되었으며, 또한 척수에서 Q-PCR 검증 분석에서도 증가하였다 (도 2A). 2번째 노드는 기질로서 CDP-에탄올아민, 산물로서 포스파티딜에탄올아민 및 촉매 효소로서 에탄올아민 포스포트랜스퍼라제 CEPT1을 이용한 글리세로포스포리피드 대사의 조절 장애이다. 또한, 포스파티딜에탄올아민은 포스파티딜세린 신타제에 의해 포스파티딜세린으로 변환된다. CEPT1은 또한 CDP 콜린에서 다이아실글리세롤로 포스포콜린을 이동시켜 포스파티딜콜린을 합성하는 최종 단계를 촉매한다. 제조된 포스파티딜콜린은 칼슘-독립적인 사이토졸 포스포리파제 2 γ , cPLA $_2\gamma$ (PLA2G4C)에 의해 아라키돈산으로 대사된다. 이것은 글리세로포스포리피드를 가수분해하여 유리 지방산과 리소포스포리피드를 합성하는 효소 패밀리이며, 제조된 지방산과 리소포스포리피드는 신호전달 분자 생산과 에이코사노이드 및 다이아실글리세롤과 같은 염증 프로세스의 2차 메신저를 생산하는데 전구체로서 이용된다. *Pla2g4c* 및 *Cept1* 전사체는 척수의 트랜스크립톰 분석에서 증가되었으며 (도 2A), 3월령 시기에 생애 초기에 해당되는 *Abcd1*-척수에 대한 검증 Q-PCR 분석에서 검증되었다 (도 2A). 일치된 조절 이상이 확인된 3번째 지점은 레티놀 (비타민 A)로부터 레티노익산 생합성 경로에서 레티놀 탈수소효소 11 (RDH11)에 의한 레티날(레티알데하이드)의 형성이다. 이러한 레티날 증가는 *Abcd1*-척수의 트랜스크립톰; 및 AMN 환자의 Q-PCR 검증 분석 (도 2B) 및 *Abcd1*-마우스의 척수 (도 2A)에서의 *Rdh11* 전사체 수준의 발현 증가와 상호 연관되어 있다. RDH11은 스테롤-조절 인자 결합 단백질 (SREBP)에 의해 유도되는 막 결합형 효소로서, 레티날 외에도 다른 독성 지방 알데하이드, 예를 들어 인간 X-ALD 샘플에서 발견된 산화 산물 4-하이드록시노네알 (4-HNE)을 낮추는 것으로 추정된다. RDH11 기능 부전은 뇌 및 망막 발생과 관련된 인간 증후군을 유발하는데, 이는 이 효소의 중요성을 부각시킨다. 4번째 노드는 담즙산 생합성으로, 퍼옥시좀 β -산화의 최종 산물인 콜산과 글리코콜산의 수준이 낮다. 이는, *Abcd1*-마우스 척수에서 퍼옥시좀의 2중 기능성 단백질과 라세마제 AMACR 효소의 조절 이상성 발현과 일치한다. 동일 경로에서 상류, 담즙 합성 경로에서 5β -콜레스탄- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -트리올 및 5β -콜레스탄- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -테트롤, 콜레스테롤 중간산물의 축적을 관찰하였다. 5β -콜레스탄- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -트리올에서 5β -콜레스탄- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -테트롤로의 산화 과정을 촉매하는 효소는, 미토콘드리아의 시토크롬 P450 슈퍼패밀리에 속하는 스테롤 27 하이드록실라제 (CYP27A1)이다. CYP27A1 전사체 수준은, 척수 트랜스크립톰 분석에서 예측된 바와 같이, PBMC에서 증가하였다 (도 2B). 특히, 이 효소의 불활화는, 중추 탈수초화, 운동실조 및 강직성대마비와 관련된 희귀 상염색체 열성 지질 저장 질환인, 뇌힘줄황색종증 (OMIM 213700)의 원인이 된다. 또한, 아세틸-CoA 아실트랜스퍼라제 2 (미토콘드리아의 3-옥소아실-코엔자임 A 티올라제) (*Acaa2*); 아세틸-CoA 카르복실라제 α (*Acaca*); 아실-CoA 탈수

소효소; 짧은/분지형 체인 (Acadshb); 하이드록시아실-CoA 탈수소효소 (Hadh); 및 하이드록시아실-CoA 탈수소효소/3-케토아실-CoA 티올라제/에노일-CoA 하이드라타제 (3중 기능성 단백질), α 서브유닛 (Hadh α) 등의, 몇몇 지방산 대사 (합성 및 산화) 효소들이 트랜스크립톰 분석에서 탈조절된 것으로 관찰되었다. 대사체 분석에서 확인되는 바와 같이, 핵사노익산 및 미리스트산 등의 수종의 지방산의 동시적인 수준 변형 역시 오리지널 Kegg 맵에서 나타나지 않지만 관련있는 것으로 여겨진다.

[0469] AMN 환자의 혈액에서의 염증 및 산화 스트레스

[0470] 염증성 케스케이드를 지배하는 글리코스포고리피드 및 글리세로포스포리피드의 탈조절성 대사를 시사하는, -omics 데이터의 통합 분석으로부터 도출된 가설을 검증하기 위해, 몇가지 보완 방법들을 이용하였다. 이는, i) 혈장에서 염증의 지질 매개인자 및 지질 과산화 마커, 주로 아라키돈산의 유도체를 평가하기 위한 정량적인 질량 분광측정 패널 (Biocrates); ii) PBMC에서 염증성 사이토카인 및 이의 동족 수용체의 발현을 측정하기 위한 Q-PCR 분석; 및 iii) 혈장에서 아디포카인 및 사이토카인을 동정하기 위한 MILLIPLEX™ 기술을 이용한 면역분석. Biocrates MS/MS 분석에서는, AMN 샘플에서 증가된 3종의 염증 산물, 아라키돈산 대사산물이 발견되었다: 에이코사노이드 트롬복산 B2, 및 12- 및 15- 하이드록시에이코사테트라에노익산 (TXB2, 12S-HETE 및 15S-HETE) (도 2C). 루코트리엔 B4, 1-팔미토일-2-올레오일sn-글리세로-3-포스포콜린, 4-하이드록시-2-노네날 (4-HNE), 15S-HETE 및 9/13-HODE 등의 아라키돈산 대사 산물은 피옥시좀 증식인자-활성화된 수용체 PPAR α , PPAR β / δ 및 PPAR γ 의 강력한 리간드이므로, 이들의 지질 대사 및 염증의 마스터 조절인자 발현을 Q-PCR로 분석하였다. 그 결과, PPAR β / δ 는 AMN 환자의 PBMC에서 상향-조절되었지만 PPAR α 또는 PPAR γ 는 그렇지 않았으며 (도 2B), PPAR γ 는 12월령의 마우스의 *Abcd1*- 척수에서 감소되었다 (도 2A).

[0471] 다음으로, 본 발명자들은 'omics' 통합 분석에서 시사된 염증성 프로세스를 강조하는 사이토카인들의 상호 수준을 조사하는데 착수하였다. Milliplex 기술을 이용함으로써, 일부 염증성 사이토카인 (HGF, IL6, IL8, MCP-1 및 TNF α)의 수준 증가 및 아디포넥틴의 수준 감소를 AMN 환자 유래 혈장에서 관찰하였다 (도 2D). 이는 AMN 혈장에서의 명백한 전-염증성 프로파일을 의미한다. 아디포카인은 신경퇴행에서 관련성이 새롭게 드러난 지방 조직에서 분비되는 항-염증성 호르몬으로서, 본 발명자들은 *Abcd1*- 마우스 모델의 혈장에서 감소됨을 확인하였다. 다음으로, AMN 환자의 혈장에서 수종의 사이토카인과 이의 수용체의 발현을 평가하였다. 사이토카인 분석을 이용하였으며, T 헬퍼 1 (Th1) (전-염증성) 및/또는 Th2 (보다 방어적) 분극화에 참여하는 수종의 분자들이 AMN 환자의 PBMC에서 증가된 것을 확인하였다 (도 3A). 사이토카인 신호전달 (SOCS)의 억제인자 멤버와, 신호 전이인자 및 전사 활성인자 (STAT) 패밀리 (STAT1, STAT6 및 SOCS3)의 발현을 분석하기 위해, 타겟 Q-PCR을 이용해 전염증성 프로파일 데이터를 보완하였다 (도 3B). SOCS 및 STAT 패밀리 유전자는, 염증성 사이토카인의 발현 조절 외에도, 또한 Th1 세포의 Th1, Th2 또는 Th17 표현형으로의 분극화를 조절하며, 따라서 오토크린 및 파라크린 면역조절력을 갖춘 후천적인 면역 반응에 중요한 역할을 수행한다. 흥미롭게도, AMN 환자의 PBMC에서, 면역 세포에 의한 전염증성 Th1 분화 반응을 유도하는 *STAT1*은 상향-조절되는 것으로 확인된 반면, Th2 성숙화에 참여하는 *SOCS3* 및 *STAT6*는 *IL4*와 더불어 증가된 수준을 나타내었다 (도 3B). PBMC의 사이토카인 발현 프로파일에서는, 고전적인 IL1/TNF α /IL6 경로가 아닌 IL36 경로 (*IL36A*, *IL36B* 및 *IL36G*)를 통한 염증의 활성화가 확인되었다. 또한, Th2 마커인, *IL9/IL9R* 뿐만 아니라 *IL4*, *IL5/IL5R*, *IL10* 및 *IL13*도 상향-조절이 검출되었다 (도 3A). 결론적으로, AMN 환자에서 사이토카인 유전자 프로파일은 Th1, Th17 또는 Th2 반응 방향으로 작용하진 않았지만, 보다 일반화된 염증성 불균형이 시사되었다.

[0472] 실시예 3: *Abcd1*^{-/-}/*Abcd2*^{-/-} 마우스에서 핀폴리모드 및 시포니모드 처리 효과

[0473] 방법

[0474] 운동 검사

[0475] 트레드밀 검사

[0476] 트레드밀 장치는 속도 및 경사도를 다양하게 변경가능한 가변성 속도 벨트로 구성되었다. 벨트의 후미에는, 마우스가 벨트에서 떨어질때마다 사지 충격 (0.2 mA)을 가하는 전기 그리드가 위치되어 있다. 트레드밀 장치 (Panlab, Barcelona, Spain)는 플렉시글라스 챔버 안에 위치한 속도 (5 내지 150 cm/s) 및 경사도 (0-25°) 측면에서 가변적인 벨트 (길이 50 cm 및 폭 20 cm)로 구성된다. 벨트에서 떨어지기까지의 시간 (충격 시간, 초) 및 충격 횟수를 측정하였다. 마우스를 전기 그리드에서 반대 방향으로 이동 중인 벨트의 정상부에 벨트의 이동과 반대 방향으로 배치시켰다. 즉, 사지 충격을 피하기 위해, 마우스는 앞쪽으로 움직여야 했다.

[0477] 마우스는 1일 섹션으로 5번의 실험으로 평가하였다. 1차 실험에서, 벨트 속도 20 cm/s, 경사도 5°로 설정하였

다. 2차 및 3차 실험에서, 벨트 속도는 10 cm/s였으며, 슬로프는 각각 10° 및 20° 로 높였다. 그런 후, 4차 및 5차 실험에서, 경사도는 20° 로 유지하고, 벨트 속도를 각각 20 및 30 cm/s로 높였다. 3번의 1차 실험에서, 마우스는 1분을 뛰었다. 4차 및 5차 실험에서는, 실험 시간이 각각 3분 및 7분이었다. 각 실험 간의 간격은 각각 1분, 1분, 5분 및 20분이었다. 속도와 경사도를 각각 최대 20 cm/sec 및 20° 까지 높이면서 마우스를 대상으로 연속적인 실험을 수행하였을 때, WT 마우스와 *Abcd1^{-/-}/Abcd2^{-/-}* 마우스 간에 실험 섹션별 차이는 검출되지 않았다. 그러나, 벨트 속도를 최대 30 cm/sec로 높이고, 경사도를 20° 로 설정하였을 경우, 이 시도에서는 보다 우수한 협업이 요구되기 때문에, *Abcd1^{-/-}/Abcd2^{-/-}* 마우스와 대조군 간에 차이가 검출되었다. 따라서, 이 조건을 핀골리모드와 시포니모드의 효과를 평가하기 위해 선택하였다.

[0478] 트레이닝 섹션 성능은 모든 그룹들에서 정상이었었는데, 이는 숙련자가 올바르게 습득하였다는 것을 의미한다 (테이타 도시 안함). 충격 시간과 충격 횟수 간의 비율을 운동 결함 지수 (locomotor deficit index)로 사용하였다.

[0479] 수평 바 횡단 검사

[0480] 길이 100 cm, 폭 2 cm의 목재 바를 사용해 바 횡단 검사를 수행하였다. 이 바는 마우스가 조금만 옆으로 잘못 디디면 미끄러지도록 에지 위에 달려있는 뒷발로 서있을 만큼만 충분한 크기이다. 바는 벤치 표면으로부터 50 cm 높이여서, 동물은 뛰어 내리지 못하지만, 바에서 추락하더라도 다치지 않는다. 마우스를 바 한쪽 끝에 두어, 다른쪽 끝까지 횡단하기를 기대하였다. 미끄러짐의 원인으로서는 과체의 새로운 측면을 없애기 위해, 검사 기간의 시작 전날과 시작 당일에 바에서 검사를 4번 수행하였다. 실험시, 뒷발이 옆으로 미끄러지는 횟수와 바에서 추락 횟수를 4번의 연속 실험으로 카운팅하였다. 동물이 추락하면, 추락한 지점으로 바로 다시 되돌려두었으며, 임무를 완료하게 하였다. 바는 각 동물이 사용하기 전에 에탄올로 청결히 하였다.

[0481] 통계 분석

[0482] 테이타는 평균 \pm 표준편차 (SD)로 나타낸다. 통계학적 차이는 스튜던트 t 검정 또는 일원식 ANOVA와 후속적인 Tukey HSD *post hoc*에 의해, 정규도 (normality) 검증 후 확인하였다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 통계 분석은 소프트웨어 프로그램 SPSS 12.0을 사용해 수행하였다.

[0483] 결과

[0484] 가장 많이 사용되는 X-ALD 모델, *Abcd1^{-/-}/Abcd2^{-/-}* null 마우스에서 운동 결함을 기존에 공지된 바와 같이 (Morato et al, Cell Death Differ. 2015 Nov;22(11):1742-53; Morato et al, Brain. 2013 Aug;136(Pt 8):2432-43), 핀골리모드 및 시포니모드 처리 후 트레드밀 및 바 횡단 실험을 이용해 평가하였다 (도 4). 트레드밀 실험에서, 더블 넥 아웃 마우스가 WT 마우스에 비해 더 긴 충격 시간과 더 많은 충격 횟수를 나타내었다. 놀랍게도, 핀골리모드 및 시포니모드를 4달간 처리한 후, 이 비율은 WT 비율과 구분불가하였다 (도 4A). 바 횡단 실험에서, 더블 넥아웃 돌연변이는 종종 균형을 유지하지 못하였고, 바에서 미끄러져 내리는 경향이 더 많았으며, 바의 반대쪽 끝 부분의 플랫폼에 도달하기까지 걸리는 시간이 더 길었다. 미끄러진 횟수와 바 횡단 시간을 또한 핀골리모드 및 시포니모드 처리 후 표준화하였다 (도 4B). 요컨대, 이들 테이타는, 핀골리모드 및 시포니모드 처리는 X-ALD 마우스에서 발생하는 질병의 진행을 정지시키는 것으로 보인다.

[0485] 실시예 4: AMN 환자에서 표현형 심각 및 보통 수준 간의 바이오마커의 농도 차이

표 12

[0486]

	보통	심각
임상 결과		
EDSS	1-4.5	4.5-6
6MWT (1차 방문)	350-550	150-250
개선	1-10%	20-60%
사이토카인		
아디포넥틴	↓	↑
IL36A	↑	↓
CXCL9	↓↓	↑↑

[0487] 표 12: 항산화제를 이용한 II상 임상 실험에 포함된 AMN 환자 13명에서 표현형 심각 및 중간 군 간에 차별적으로 발현되는 바이오마커. 아디포넥틴 및 CXCL9 수준은, EDSS 및 6MWT 파라미터를 이용하여 평가한 바와 같이, 중간 수준의 표현형을 가진 환자들에서 낮고, 보다 중증인 환자에서 더 높다. IL36A는 중간 수준의 환자들에서 보다 상승된, 차별적인 프로파일을 나타낸다. EDSS는 임상적인 경직 스케일이고; 6MWT는 6분 동안 걷는 거리를 측정하는 임상 검사이다. 데이터는 단측 대응표본 t 검정 또는 단측 윌콕슨의 순위합계검정으로 분석하였다. 실험은 ClinicalTrial.gov (NCT01495260)에 등록하였다.

표 13

[0488]

종속 변수	독립 변수		피어슨 상 관관계	P 값	LRT: Null 가설	LRT: p.값
6mtWT 분석 종료	12S-HETE+ADIPO (처리 전)	6mtWT 처리 전	0.98	4.71E-06	6mtWT 처리 전	3.53E-03
6mtWT 분석 종료	15S-HETE (6개월간 처리)	6mtWT 처리 전	0.94	1.51E-04	6mtWT 처리 전	0.09286
6mtWT 분석 종료	MCP-1 (6개월간 처리/처리 전 비율)	6mtWT 처리 전	0.96	3.48E-05	6mtWT 처리 전	1.95E-02

[0489] 표 13: 패널티형 회귀 방법을 이용한 중증성 예측인자로서 최상의 바이오마커 조합. 모델 예측 정확성 수단으로서 피어슨의 상관관계.

[0490] lmtest 패키지를 이용한 우도비 검정 (likelihood ratio test)을 적용하여, 처리전 6mtWT에서 걸은 거리 및 연령 등의 혼재 변수 (confounding variable)로부터 패널티형 회귀 방법에 의해 선정된 변수의 영향을 차별화하였다 (<http://cran.r-project.org/doc/Rnews/>). 테스트 모델로서, 오직 연령과 6mtWT만 이용함으로써, 감소된 (또는 null) 네스티드 모델에 대항하는 선택 변수를 이용해 일반 선형 회귀 (generalized linear regression)를 수행하였다. X-ALD와 대조군의 식별력은 ROC (receiver operating characteristic) 곡선의 곡선하 면적 (AUC)을 계산함으로써 평가하였다. R에서 pROC 패키지를 이용해 AUC를 표준 오차 및 95% 신뢰구간과 함께 계산하였다. 모든 통계 분석은 R 프로그래밍 환경에서 Bioconductor 패키지를 사용해 수행하였다. 처리 전과 6개월간 처리 후 측정된 변수를 이용해, 예측한 6mtWT와 분석 종료시 측정된 실제 6mtWT 간에 강력한 상관 관계가 확인되었다. 처리 전 12S-HETE 및 아디포넥틴의 조합 수준은 처리 전 표현형의 중증도를 예측하는 인자이다. 처리 후 15S-HETE 수준은 처리 후 표현형의 중증도를 예측하는 인자이다 (개선 또는 이의 결핍). 처리 전과 처리 후의 MCP-1 수준 비율은 처리에 대한 반응 예측 인자이다. 실험은 ClinicalTrial.gov (NCT01495260)에 등록하였다.

[0491] 모든 통계 분석들은 R 프로그래밍 환경에서 Bioconductor 패키지를 사용해 수행하였다.

[0492] 실시예 5: 염증성 마커에 대한 항산화제 처리 효과

표 14

[0493]

	마커	대응표본 t 검정 또는 WSR 검정
염증성 매개인자	아디포넥틴 ↑	1.8E-03
	TNF ↓	3.9E-02
	IL8 ↓	3.0E-02
	네오프테린 ↓	1.6E-02
지질 대사산물	12S-HETE ↓	1.9E-0.3
	15S-HETE ↓	4.9#-03
	TXB2 ↓	1.4#-02
유전자 발현	INFA2 ↓	9.7E-03
	IL4 ↓	1.9E-0.3
	IL10 ↑	4.8E-03
	IL36A ↓	4.8E-03
	CCR3 ↓	4.8#-03
	CXCL9 ↑	3.2E-02

- [0494] **표 14: 염증성 마커에 대한 항산화제 처리 효과.** 6개월간 항산화제 처리 후, 처리 전 대비, 염증성 마커 TNF, IL8, 네오프테린, 12S-HETE, 15S-HETE, TXB2, IFNA2, IL4, IL36A, CCR3의 현저한 감소 및 방어적 사이토카인 아디포넥틴, IL10 및 CXCL9의 증가. 단측 대응표본 t 검정 또는 단측 윌콕슨 순위합계검정으로 분석 (n=개별 환자 11명). 실험은 ClinicalTrial.gov (NCT01495260)에 등록하였다.
- [0495] **실시예 6: 바이오마커의 수준에 기반한 AMN 예측 모델의 정확성**
- [0496] AMN의 잠재적인 바이오마커로서 제시된 분자들의 유효성을 뒷받침하기 위해, 수신자 조작 특성 (receiver operating characteristic, ROC) 곡선 분석을 메타볼아날리스트 플랫폼을 이용해 수행하였다 (Xia, J., Sinelnikov, I., Han, B., and Wishart, D.S. (2015) *MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful*. *Nucl. Acids Res.* 43, W251-257). 이 플랫폼은 양성 및 음성 이온화 둘다에서 세포 용해물 및 혈장에 존재하는 대사산물을 이용해 적용하였다. 그 결과, 스펙고신 1 포스페이트의 경우 ROC 곡선 하 면적은 0.976 (95% 신뢰 구간, CI 0.882-1)인 것으로 확인되는데, 이는 이러한 목적에서의 가능성을 보여준다. 상기 측정 결과로부터 계산된 바와 같이, 특정 m/z 값 및 내부 표준물질에 의해 조정된 스펙고신-1-포스페이트의 체류 시간에서의 최적 컷오프 값 21900 ms 카운트는, 100% 민감도 (또는 100% 진성 양성률) 및 84% 특이성 (위 양성률 15.4%)을 나타낸다.
- [0497] 교차-검증 분석 (100, 선형 벡터 지지형 방법 (linear vector supported method))을 이용해, 대부분의 샘플이 정확한 것으로 보이며, 대조군 샘플 단 하나만 AMN 군인 것으로 나타났다. 또한, 100회 교차 검증에 기초한 평균 정확도는 0.892 (거의 90% 정확성)이며, 홀드 아웃 데이터 (held out data)의 정확도는 0.8이다.
- [0498] 추가의 변수들이 모델의 전체 품질을 개선하기 위해 필요한 지를 평가하기 위해, 데이터베이스에 존재하는 그외 바이오마커를 이용해 비슷한 테스트를 수행하였다. 데이터베이스에서, 균형된 부표본 (balanced subsampling)을 이용한 몬테-카를로 교차검증 (MCCV)에 의해 ROC 곡선을 구하였다. 각 MCCV에서, 샘플의 3분의 2 (2/3)를 이용해 피쳐 중요성 (feature importance)을 평가한다. top 2, 3, 5, 10 ...100 (최대) 중요 변수를 사용해 분류 모델을 구축하여, 나머지 샘플 1/3에서 검증하였다. 이 과정을 수회 반복하여 각 모델의 성능 및 신뢰 구간을 계산하였다. 선형 지지형 벡터 장치 방식 (linear supported vector machine approach, SVM)를 분류 방법으로 선택하였으며, 피쳐 순위 방법으로서 소프트웨어 빌트-인 지지형 벡터 장치 방식을 선택하였다.
- [0499] 발견 데이터세트 (표 15, 제시된 바이오마커에 대해 예측된 ROC 값)에 존재하는 그외 변수를 이용함으로써, 정확도가 높은 모델을 설계할 수 있었다 (2 변수 모델의 AUC: 0.95 CI 0.75-1; 3변수 모델의 AUC: 0.976 CI 0.764-1; 5변수 모델의 AUC: 0.986 CI 0.827-1; 10변수 모델의 AUC: 0.999 CI 1-1).

표 15

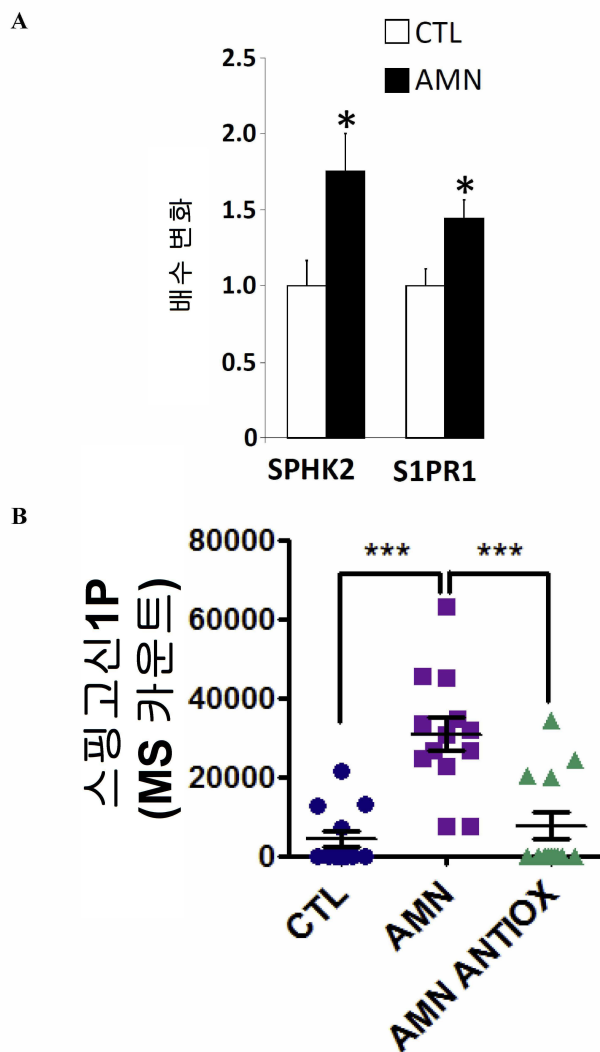
마커	AUC	AUC의 95% CI	컷오프 값 (ms 카운트)	민감도 (해당 컷오프)	특이도 (해당 컷오프)
스펙고신-1-포스페이트	0.976	0.882-1	21900	1	0.8
5-β-콜레스탄-(3α,7α,12α) 트리올	0.75	0.583-0.875	2780	1	0.5
숙신 세미알데하이드	0.731	0.509-0.917	3300	0.83	0.75
글리세로포스파티딜에탄올아민 (43:0)	0.849	0.677-0.972	2250	0.9	0.74
글리코콜산	0.75	0.625-0.875	2450	0.5	1
콜산	0.774	0.625-0.917	10900	0.6	1
5-β-안드로스탄-3,17-다이온	1	1-1	55700	1	1
n-헥사노익산	1	0.972-1	254000	0.9	1
에이코사펜타에노익산	0.618	0.34-0.854	9940	0.6	1
헥사데칸다이오익산	0.903	0.745-1	15600	0.8	1
모노아실글리세롤 (16:0)	0.792	0.667-0.917	3300	0.6	1
강글리오사이드 GA1 (d18:1/22:0)	0.948	0.826-1	8680	0.9	0.9
글리세로포스파티딜세린 (38:4)	0.854	0.674-0.986	261000	0.8	0.8
1-메틸히스티딘	0.911	0.745-1	205000	0.8	0.8
1-모노팔미틴	0.611	0.343-0.877	3420	0.7	0.8
3-아미노-1-티로신	0.882	0.719-0.982	77600	0.7	1
3-머캅토포루베이트	0.781	0.568-0.941	175000	0.7	0.8
스티딘다이포스페이트-에탄올아민	0.811	0.627-0.964	5980	0.8	0.8

데하이드로아스코르브산	0.769	0.527-0.911	68100	0.7	0.8
엘라이드산	0.947	0.827-1	12700	0.9	0.9
에리트ρί톨	0.899	0.763-1	13900	1	0.8
아라키돈산	0.722	0.55-0.849	3660	0.9	0.5
갈락토닉산	0.852	0.669-0.979	130000	0.8	0.8
글루타티온	0.893	0.725-1	204000	1	0.8
히스타민	0.873	0.679-1	51400	0.9	0.8
하이포크산틴	0.858	0.671-0.976	19300	0.7	0.9
카프로락톤	0.893	0.718-1	686000	0.9	0.8
락타미드	0.719	0.527-0.888	13200	0.8	0.6
메틸 리놀레네이트	0.864	0.66-0.991	14100	0.8	0.9
메틸 올리에이트	0.893	0.74-1	3250	0.9	0.9
모노올레인	0.781	0.544-0.926	1970	0.6	0.9
미리스트산	0.982	0.914-1	14000	0.9	0.9
펜타데실산	0.953	0.856-1	11000	1	0.8
레틴알데하이드	0.994	0.947-1	24000	1	0.9
스테아르아미드	1	1-1	235000	1	1
5β-콜레스탄-(3α,7α),24,26-테트롤	0.769	0.654-0.923	2950	1	0.5
C24 설파티드	0.917	0.775-1	9610	0.8	0.8
콜레스테릴 에스테르 19:0	0.885	0.769-0.982	2970	1	0.8
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (26:0)	0.722	0.516-0.908	7500	0.8	0.7
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (36:3)	0.769	0.654-0.923	4040	1	0.5
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (40:6)	0.71	0.495-0.901	5760	0.9	0.7
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (42:1)	0.808	0.654-0.962	4610	1	0.6
글리세로포스파티딜 에탄올아민 (43:6)	0.834	0.669-0.959	4760	1	0.7
락토실세라마이드 (d18:1/12:0)	0.808	0.609-0.938	4340	0.8	0.7
락토실세라마이드 (d18:1/25:0)	0.808	0.692-0.923	2260	1	0.6
트리아실글리세롤 (40:0)	0.701	0.65-0.84	2300	0.5	1
트리아실글리세롤 (51:2)	0.769	0.615-0.885	2580	1	0.5
트리아실글리세롤 (60:1)	0.929	0.754-1	33000	1	0.9
트리아실글리세롤 (62:1)	1	1-1	62500	1	1
트리아실글리세롤 (62:2)	0.858	0.69-0.969	2260	0.8	0.8
트리아실글리세롤 (62:3)	0.82	0.65-0.89	2400	0.8	0.7
트리아실글리세롤 (62:4)	0.817	0.602-0.941	1620	0.8	0.8
트리아실글리세롤 (63:0)	0.769	0.615-0.885	1850	0.5	1
트리아실글리세롤 (63:2)	1	1-1	6090	1	1
트리아실글리세롤 (64:0)	0.982	0.92-1	9390	1	0.9
트리아실글리세롤 (64:1)	1	1-1	11700	1	1
트리아실글리세롤 (64:4)	0.947	0.843-1	12100	0.8	0.8
트리아실글리세롤 (64:5)	0.855	0.68-0.963	2830	0.8	0.8
트리아실글리세롤 (64:8)	0.953	0.834-1	7250	0.8	0.9
트리아실글리세롤 (65:1)	0.864	0.74-0.962	2830	0.9	0.8
트리아실글리세롤 (65:2)	0.808	0.692-0.923	2790	1	0.6
트리아실글리세롤 (66:0)	0.885	0.734-0.982	5860	1	0.8
트리아실글리세롤 (66:2)	1	1-1	6620	1	1
트리아실글리세롤 (66:6)	0.885	0.769-0.962	4300	1	0.8
5-α-안드로스탄-3,17-다이온	1	1-1	7060	1	1
아스코르브산	0.828	0.642-0.964	326000	0.7	0.9
5Z,8Z-테트라데카다이엔산	0.941	0.822-1	93800	0.8	0.9
콜레스테릴 에스테르 20:5	0.851	0.676-0.97	1760	0.8	0.9
글리세로포스파티딜에탄올아민 (36:1)	0.817	0.627-0.964	4700	0.7	0.9
글리세로포스파티딜에탄올아민 (43:6)	0.808	0.675-0.92	4420	0.5	1
글리세로포스파티딜에탄올아민(0-16:0/22:5)	0.837	0.698-0.936	3030	0.6	1
다이아실글리세롤 (32:2)	0.858	0.66-0.976	15600	0.8	0.8
트리아실글리세롤 (63:0)	0.769	0.654-0.885	1850	0.5	1
트리아실글리세롤 (65:3)	0.846	0.669-0.974	9350	0.8	0.8

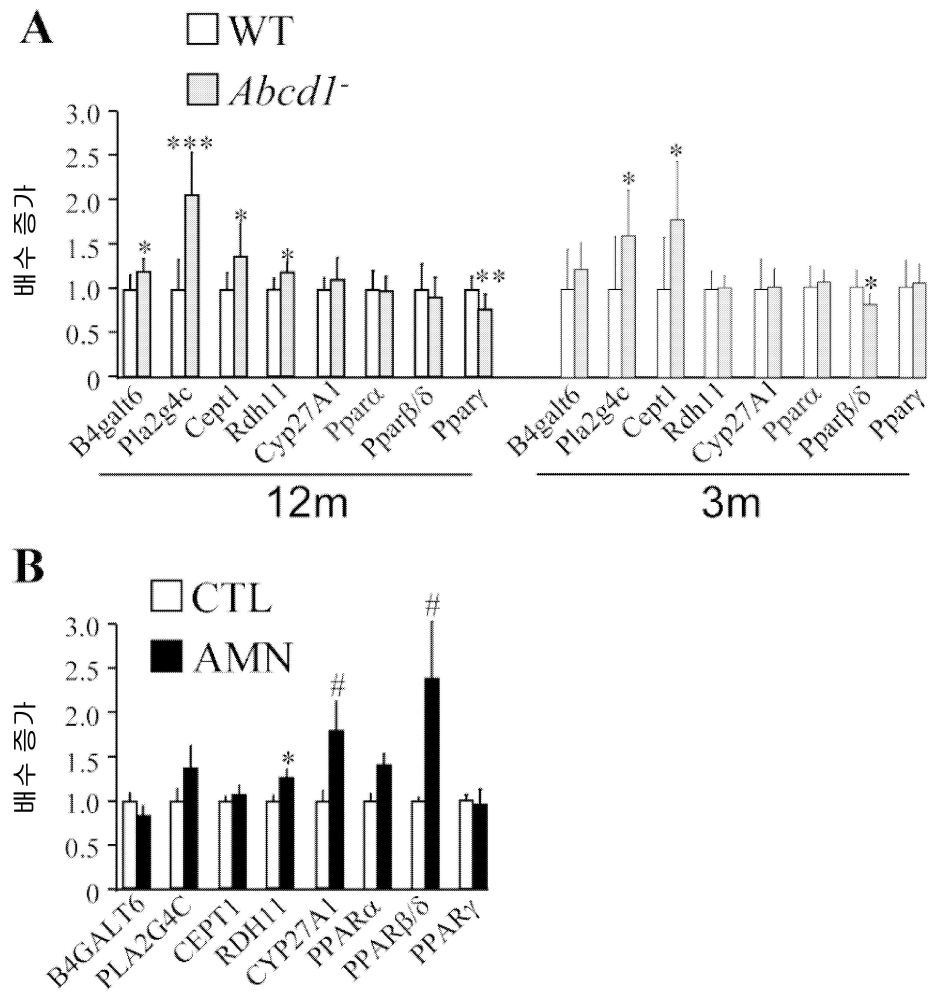
- [0501] 표 15. 집단 분석 데이터에 기초한, 제시된 대사체 및 지질체 마커의 ROC 면적 수치, ROC 면적 수치의 95% 신뢰 구간, 최적 컷오프 및 이 컷오프에서의 민감도와 특이도.
- [0502] 즉, 잠재적인 바이오마커 10개를 이용한 다변량 모델의 정확도는 100%이다. 마찬가지로, 교차-검증 분석 (100, 선형 벡터 지지된 방법에 의함)을 이용함으로써, 샘플 100%가 정확한 결과임을 확인하였다.
- [0503] 또 다른 변수의 도입이 예측 정확도를 높일 수 있는지를 평가한 결과, 정확도가 2변수 모델에서 44변수 모델을 이용한 경우 증가한 것으로 나타났다 (89.8%에서 99.2%).
- [0504] 예를 들어, 2 변수 시스템에 포함시킬 변수를 감안하면, 스핑고신 1 포스페이트와 TAG (63:2)가 가장 정확도가 높은 2개의 변수인 것으로 확인된다.

도면

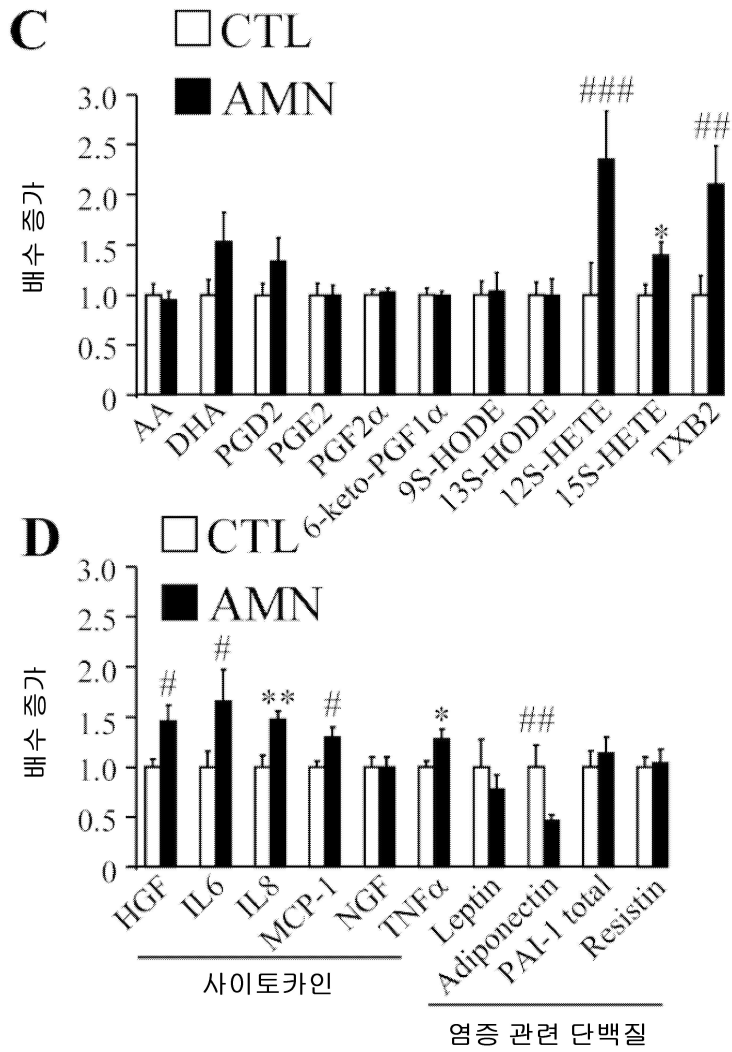
도면1



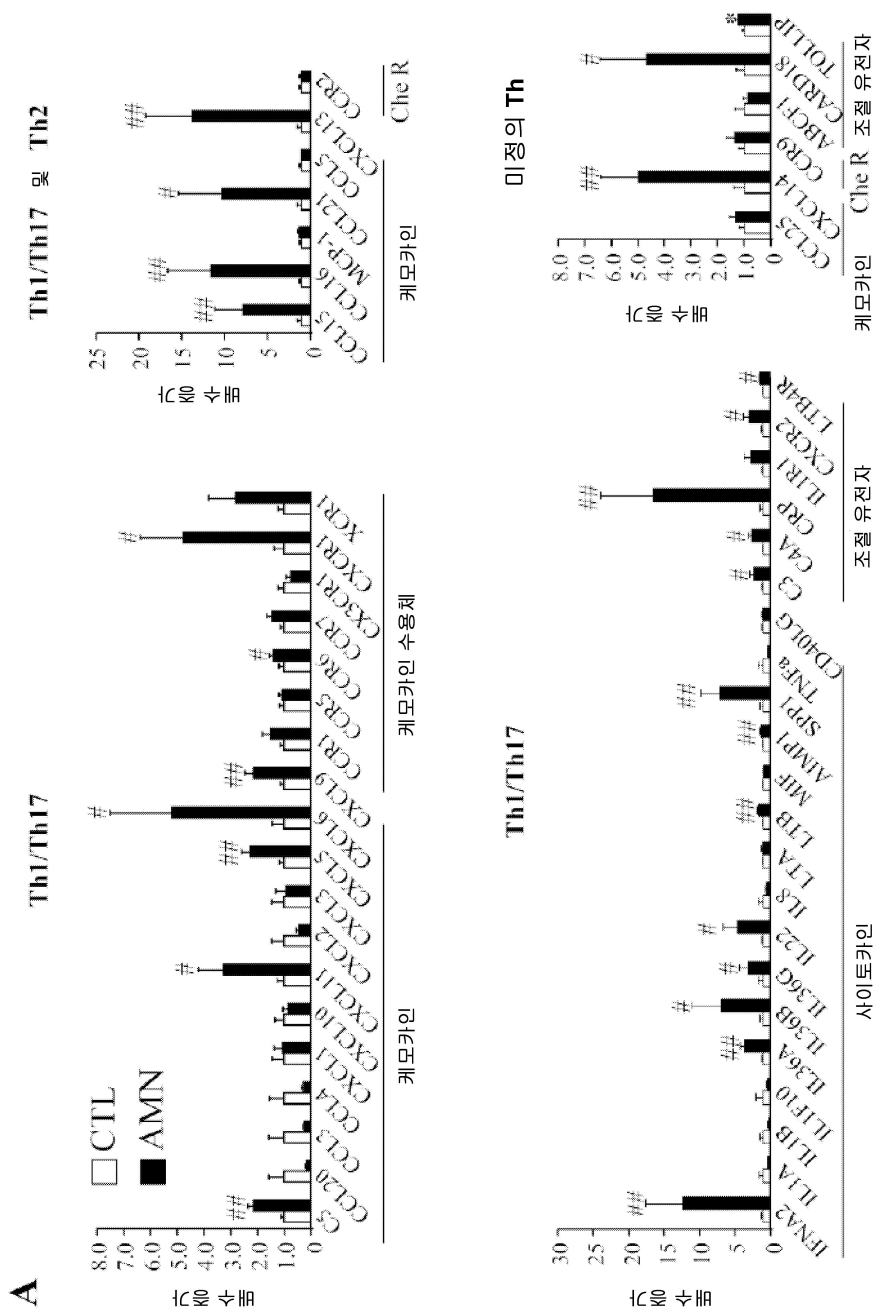
도면2ab



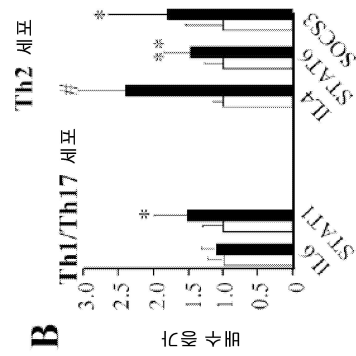
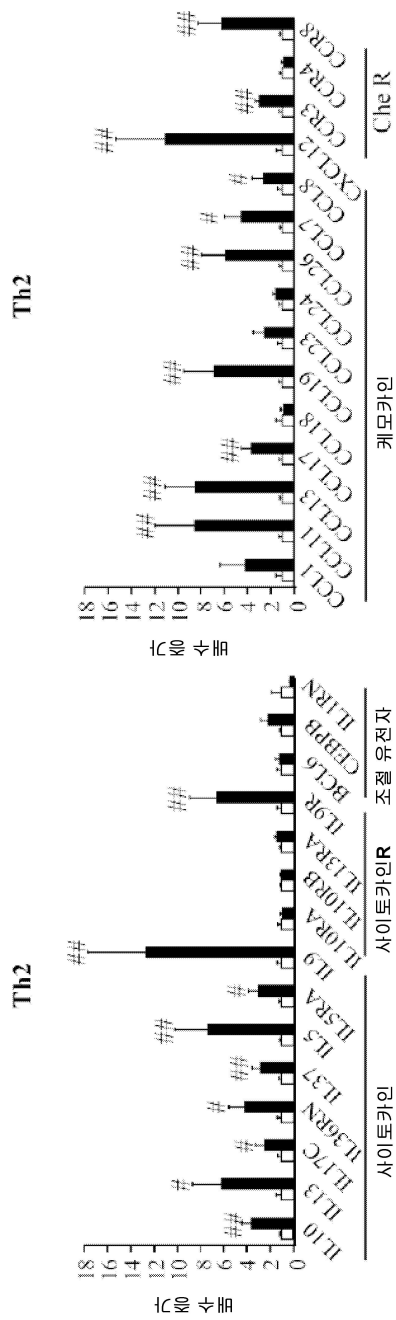
도면2cd



도면3a

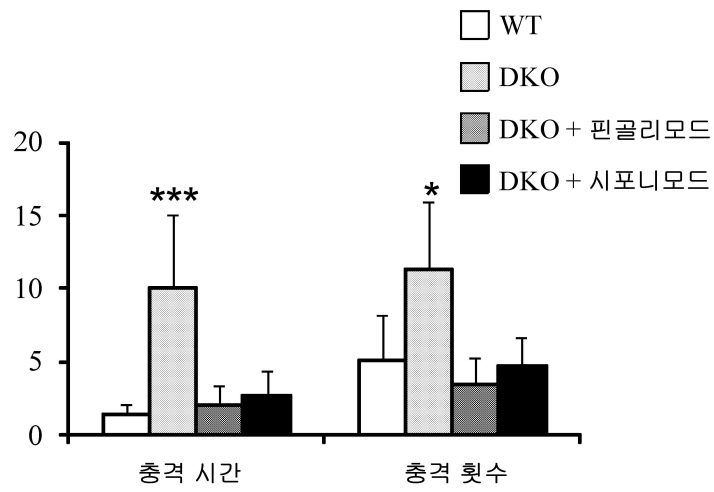


도면3ab



도면4

A



B

