



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083371
(43) 공개일자 2020년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7014752
(22) 출원일자(국제) 2018년12월28일
심사청구일자 2019년05월22일
(85) 번역문제출일자 2019년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2018/016839
(87) 국제공개번호 WO 2020/138561
국제공개일자 2020년07월02일

(71) 출원인
경상대학교병원
경상남도 진주시 강남로 79 (칠암동)
(72) 발명자
조민철
서울시 영등포구 당산로 214, 422동 602호 (당산
동5가, 당산삼성래미안)
(74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법

(57) 요약

본 발명은 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 뇌수막염 진단용 마커로서의 역할에 관한 것으로, 상기 단백질의 마커로서의 특성을 이용하여 정확한 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법, 뇌수막염 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하며, 나아가, 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질의 스크리닝 방법 및 뇌수막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하여, 뇌수막염으로 인해 고통받는 사람들에게 유용한 발명이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/4713 (2013.01)

G01N 2800/7095 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1C1B5040593

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 생애 첫 연구사업

연구과제명 비타민 D 결합단백질의 유전형이 알츠하이머병의 발병기전에 미치는 효과에 대한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리된 시료에서 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 발현 정도가 대조 개체 대비 높으면 뇌수막염(meningitis)이 발병된 것으로 판단하는 단계;를 더 포함하는, 정보제공방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 측정은 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질을 상기 시료에 처리하여 수행되는 것인, 정보제공방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 물질인, 정보제공방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)인, 정보제공방법.

청구항 6

뇌수막염(meningitis)을 지닌 개체로부터 분리된 시료에 피검물질을 처리하여, 처리 전후 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 피검물질의 처리 전 대비 상기 단백질의 발현이 감소하면, 상기 피검물질을 뇌수막염(meningitis)의 예방 또는 치료제 후보물질로 선별하는 단계;를 더 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 시료는 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)인, 스크리닝 방법.

청구항 9

비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오티드의 단편 또는 상기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 뇌수막염 진단용 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 조성물.

청구항 11

청구항 9 또는 10의 조성물을 포함하는 뇌수막염 진단용 키트.

청구항 12

비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현을 감소시키는 물질을 포함하는 뇌수막염 예방

또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)은 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 내에 존재하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법, 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질의 스크리닝 방법, 뇌수막염 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트 및 뇌수막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌수막염은 뇌막을 포함하는 염증성 과정이다. 무균성 뇌수막염은 가장 흔한 형태이다. 과소진고로 인해 연간 발생 빈도는 알려지지 않았지만, 유럽의 연구에 의하면 1세 이하의 아이들 10만명당 70건, 1세 내지 14세의 아이들 10만명당 5.2건 및 성인 10만명당 7.6건이 나타났다. 배양에서 세균의 성장 징후없이 뇌막염증이 있으면, 무균은 세균성 뇌수막염과 구별된다. 세균성 뇌수막염은 항생제의 발전에도 불구하고, 상당한 사망률과 질병물에 의해 특징화되는 중추신경계(central nervous system, CNS)의 전염성 질병이다. 세균성 뇌수막염의 사망률은 생명체 유형에 따라 3 내지 21%로 다양하다. 게다가, 세균성 뇌수막염의 생존자들은 인지 장애 또는 다른 신경학적 후유증의 위험이 높다.

[0003] 뇌수막염을 배제하기 위한 임상 징후의 성능이 좋지 않기 때문에, 뇌수막염과 관련된 증상을 보이는 모든 환자는 확진 진단을 위해 즉각적인 요추천자(lumbar puncture, LP) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)의 평가를 받아야 한다. 전형적인 무균성 뇌수막염의 CSF 소견은 상대적으로 낮고, 대개 림프구성 다구증(lymphocytic pleocytosis), 정상 포도당 수준 및 정상에서 약간 증진된 단백질 수준이다. 세균성 뇌수막염은 고전적으로 매우 높고, 대개 호중구성 다구증, 낮은 포도당 수준 및 높은 단백질 수준을 갖는다. 하지만 이것이 모든 환자들에게 해당되는 것은 아니며, 나이 든 환자 및 뇌수막염을 부분적으로 치료받았거나, 면역억제제를 갖는 환자들에게서는 다양할 수 있다. 또한, CSF의 백혈구 백분율 산정(differential cell count)은 시험자의 숙련도에 따라 달라질 수 있다. 따라서 추가적인 새로운 바이오마커가 뇌수막염의 더욱 정확한 진단에 도움이 될 것이다.

[0004] 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)는 간에서 생산되고 혈장을 순환하는 58-kDa의 다기능성 단백질이다. VDBP는 급성 반응 물질이므로, 그의 수준이 다양한 조건에 따라 변화할 수 있다. 처음에 그룹 특이적 성분 글로불린(group-specific component globulin)으로 명명된 VDBP는 비타민 D 대사 전달에 주로 역할을 하는 것으로 알려졌다. 하지만, 액틴 제거 및 면역 반응의 조절과 같은 다른 다양한 역할들이 최근에 보고되고 있다.

[0005] VDBP를 코딩하는 유전자(GC)는 높은 비율의 다형성을 가지며, 유전형의 빈도는 인종에 따라 다르다. 또한, 유전형에 따른 25(OH)D에 대한 VDBP 친화도의 차이가 보고되고 있다. 두 개의 단일 뉴클레오타이드 다형성(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)인 rs7041 및 rs4588은 VDBP의 세 개의 주요 다형성 동형단백질(polymorphic isoform)(GC1F, GC1S, 및 GC2)을 생기게 하며, 그의 빈도는 인종에 따라 다르다. 동형단백질 GC1F은 비타민 D에 대한 가장 높은 친화도를 가지며, GC1S 및 GC2가 뒤따른다.

[0006] VDBP의 존재는 혈청, 소변, 모유, 복수(ascitic fluid), 뇌척수액, 타액(saliva), 정액(seminal fluid) 내 림프구(lymphocyte), 호중구(neutrophils) 및 단핵구(monocyte)의 표면 위에서 입증된다. 다른 mRNA 발현이 뇌, 심장, 폐, 신장, 태반(placenta), 비장(spleen), 고환(testes) 및 자궁에서 보고된다. VDBP의 가장 높은 농도가 발견되는 혈액과 비교하여, 낮은 발현 수준이 다른 체액에서 검출되었다. 비록, VDBP가 인간에게서 발견되고 있지만, 그것이 CNS에서 합성되는 것인지는 확실치가 않다. 최근에, 시신경(supraoptic) 및 뇌실결핵 뉴런(paraventricular neuron)의 영역이 VDBP 면역반응성을 나타낸다는 것이 보고되었다. 이전 연구는 VDBP 농도의 변화는 다발성 경화증(multiple sclerosis)을 포함하는 다양한 질병의 병리학(pathology)과 연결되어 있다고 보고해왔다. 또한, Gressner *et al*는 VDBP의 척추강 내 합성이 AD를 포함하는 심각한 신경퇴행을 갖는 환자들에게서 증가된다는 것을 보고하였고, 상향조절된 VDBP가 신경퇴행성 질병에서 액틴 청소부로서 작용할 수 있다는 것을 암시하였다. 하지만, 아직 뇌수막염을 갖는 환자의 CSF 내 VDBP 수준의 조사하는 이전 연구가 없었다. 따라서, 우리는 처음으로 뇌수막염의 진단용 새로운 바이오마커로서 VDBP의 가능성을 여기에 보고한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 뇌수막염 진단을 위한 신규 바이오마커(비타민 D 결합 단백질)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 뇌수막염 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커의 발현을 감소시키는 물질을 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 1. 개체로부터 분리된 시료에서 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법.
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 발현 정도가 대조 개체 대비 높으면 뇌수막염(meningitis)이 발병된 것으로 판단하는 단계;를 더 포함하는, 정보제공방법.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 측정은 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질을 상기 시료에 처리하여 수행되는 것인, 정보제공방법.
- [0015] 4. 위 1에 있어서, 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 물질인, 정보제공방법.
- [0016] 5. 위 1에 있어서, 상기 시료는 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)인, 정보제공방법.
- [0017] 6. 뇌수막염(meningitis)을 지닌 개체로부터 분리된 시료에 피검물질을 처리하여, 처리 후 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질의 스크리닝 방법.
- [0018] 7. 위 6에 있어서, 상기 피검물질의 처리 전 대비 상기 단백질의 발현이 감소하면, 상기 피검물질을 뇌수막염(meningitis)의 예방 또는 치료제 후보물질로 선별하는 단계;를 더 포함하는, 스크리닝 방법.
- [0019] 8. 위 6에 있어서, 상기 시료는 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)인, 스크리닝 방법.
- [0020] 9. 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오티드의 단편 또는 상기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 뇌수막염 진단용 조성물.
- [0021] 10. 위 9에 있어서, 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인, 조성물.
- [0022] 11. 위 9 또는 10의 조성물을 포함하는 뇌수막염 진단용 키트.
- [0023] 12. 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현을 감소시키는 물질을 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [0024] 13. 위 12에 있어서, 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)은 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 내에 존재하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 바이오마커를 통해 뇌수막염을 정확하게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 뇌수막염 및 비뇌수막염 환자들에서의 VDBP 수준을 나타낸다. 중앙 박스는 낮은 값에서 높은 사분위수 값을 나타낸다. 중앙선은 중앙값을 나타낸다. 막대는 2.5번째 및 97.5번째 백분위수를 나타낸다.
- 도 2는 뇌수막염 진단을 위한 CSF 내 VDBP 수준의 수신자 조작 특성(Receiver operating characteristic, ROC) 곡선 분석을 나타낸다.
- 도 3은 CSF와 혈청 VDBP 농도의 상관분석(Correlation analysis)을 나타낸다(r = 피어슨 상관계수(Pearson correlation coefficient)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에서 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0029] 상기 개체는 현재 뇌수막염을 보유하고 있거나 뇌수막염을 보유한 이력이 있는 동물, 뇌수막염 보유가 의심되는 동물, 그외 기타 뇌수막염 진단을 위한 정보를 제공받고자 하는 동물 등으로서, 상기 동물은 인간을 포함한 포유류일 수 있다.
- [0030] 시료는 개체로부터 분리된 것으로서, 그 예로는 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 등일 수 있고, 바람직하게는 혈청 또는 뇌척수액일 수 있고, 보다 바람직하게는 뇌척수액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)은 개체 유래 시료에 존재하는 것으로서, 이는 해당 개체의 비타민 D 결합 단백질이고, 예를 들어 인간의 경우 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0032] 본원에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본원의 목적상, 진단은 뇌수막염의 존재 여부를 확인하거나, 나아가 뇌수막염의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다.
- [0033] 본원에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 정보제공방법에 있어서, 상기 측정은 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질을 상기 시료에 처리하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0035] 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 검출하는 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 물질일 수 있다.
- [0036] 상기 비타민 D 결합 단백질을 검출하는 물질은 비타민 D 결합 단백질을 검출할 수 있다면 제한되지 않으나, 예를 들어, 비타민 D 결합 단백질, 비타민 D 결합 단백질로 번역되는 mRNA, 상기 mRNA로 전사되는 DNA 또는 그의 상보적인 서열의 DNA를 표적으로 하는 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드 등일 수 있다.
- [0037] 본원에서, "항체"란 항원성 부위에 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본원의 목적상, 항체는 상기 마커 단백질인 오스테오칼신 또는 N-캐드헤린에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 모노클로날 항체는 당해 분야에 널리 공지된 하이브리도마 방법, 또는 파지 항체 라이브러리기술을 이용하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0039] 상기 폴리클로날 항체는 상기한 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 것을 포함하는, 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 폴리클로날 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하나, 이에 제한되지 않을

수 있다.

- [0040] 또한, 본원의 항체에는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간항체 등의 특수항체도 포함될 수 있다.
- [0041] 상기 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0042] 상기 "애포타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 애포타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오타이드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0043] 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현정도를 측정하는 방법으로서 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 전사 물질인 mRNA의 시료 내 농도 또는 상기 비타민 D 결합 단백질의 시료 내 농도를 측정하는 방법을 택할 수 있으나, 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법을 택하여 수행할 수 있다.
- [0044] 상기 mRNA의 시료 내 농도를 측정하는 방법으로서 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 단백질의 시료 내 농도를 측정하는 방법으로서 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 면역탁본검사, 샌드위치 측정법(sandwich assay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색(immunohistochemistry), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(fluorescence-activated cell sorting), 웨스턴 블롯팅, 유체 세포 측정법(flow cytometry), 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있고, 바람직하게는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 정보제공방법은 상기 발현 정도가 대조 개체 대비 높으면 뇌수막염(meningitis)이 발병된 것으로 판단하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 정보제공방법은 상기 방법에 따라 비타민 D 결합 단백질의 발현량을 뇌수막염 의심환자의 시료 및 대조군(비의심환자)의 시료로부터 각각 측정하고, 상기 측정한 결과들을 서로 비교한 후, 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현량이 의심환자의 시료에서 대조군의 시료보다 높게 측정되는 경우 뇌수막염이 발병되었다고 판단할 수 있고, 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현량이 의심환자의 시료에서 대조군의 시료보다 비슷하거나 낮게 측정되는 경우 뇌수막염이 발병하지 않았다고 판단할 수 있는 정보를 제공할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 뇌수막염(meningitis)을 지닌 개체로부터 분리된 시료에 피검물질을 처리하여, 처리 전후 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 피검물질은 새롭게 합성된 또는 공지된 물질로 뇌수막염의 예방 또는 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대되는 물질을 제한 없이 포함할 수 있고, 예를 들어 핵산, 뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 아미노산, 당, 지질 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0050] 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 피검물질을 상기 시료에 투여하여 본 발명의 비타민 D 결합 단백질의 발현수준을 측정한 후, 상기 피검물질의 처리 전 대비 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현이 증가하면, 상기 피검물질을 뇌수막염 예방 또는 치료제 후보물질로 선별할 수 있다.
- [0051] 이 외, 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시료, 발현 정도의 측정 등에 관련한 사항은 상술한 바와 같다.
- [0052] 본 발명은 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)을 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편 또는 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 뇌수막염 진단용 조성물을 제공한다.

- [0053] 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0054] 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 물질은 구체적으로 항체일 수 있고, 상기 항체는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미하는 것으로서, 상기 항체는 비타민 D 결합 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자를 발현 벡터에 클로닝하여 비타민 D 결합 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태 온전한 항체의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위(결합 도메인)를 가져 항원 결합 기능을 보유하고 있는, 항체 분자의 기능적 단편 또한 포함한다. 본 발명의 조성물을 이용한 뇌수막염의 진단에 있어, 비타민 D 결합 단백질과 상기 항체를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 비타민 D 결합 단백질의 발현량을 측정함으로써 뇌수막염을 진단할 수 있다. 적절한 항체의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0055] 상기 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편에 특이적으로 결합하는 물질은 구체적으로 프로브 또는 프라이머일 수 있다.
- [0056] 상기 프로브는 mRNA 등의 뉴클레오타이드와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 뉴클레오타이드 단편을 의미하며, 방사성 원소 등으로 표지되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 함량(발현량)을 확인할 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일 가닥 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중 가닥 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 뇌수막염을 진단할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0057] 상기 프라이머는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 뉴클레오타이드 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 뉴클레오타이드 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제/중합 효소 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있고, 상기 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 비타민 D 결합 단백질의 발현량의 측정을 통해 뇌수막염을 진단할 수 있다. PCR 조건, 및 프라이머 세트의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0058] 상기 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오타이드의 단편에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머는 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 알려져 있으므로, 당업자는 상기 서열을 바탕으로 상기 프라이머 또는 프로브를 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 디자인할 수 있다.
- [0059] 상기 프로브 또는 프라이머는 포스포라미디트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있고, 길이가 10 내지 100 뉴클레오타이드(이하, 'nt'라고함), 10 내지 90 nt, 10 내지 80 nt, 10 내지 70 nt, 10 내지 60 nt, 10 내지 50 nt, 10 내지 40 nt, 10 내지 30 nt, 10 내지 25 nt, 20 내지 100 nt, 30 내지 90 nt, 40 내지 80 nt, 50 내지 70 nt, 20 내지 60 nt, 20 내지 50 nt, 30 내지 40 nt, 20 내지 30 nt, 또는 20 내지 25 nt인 것일 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 뇌수막염 진단용 키트를 제공한다.
- [0061] 상기 키트는 비타민 D 결합 단백질의 발현량을 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 비타민 D 결합 단백질의 발현량의 측정을 통해 측정함으로써 뇌수막염을 진단할 수 있다. 상기 키트는 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편 또는 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질을 포함할 뿐만 아니라, 그 키트가 이용하는 비타민 D 결합 단백질 발현량을 측정하는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 키트는 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현량을 측정하기 위한 키트일 경우, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시리보뉴클레오

티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(dEPC water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0063] 상기 키트는 비타민 D 결합 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오티드의 단편 또는 상기 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 물질의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질은 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(ABTS) 또는 o-페닐렌디아민(OPD), 테트라메틸 벤지딘(TMB) 등이 사용될 수 있다.

[0064] 상기 키트는 비타민 D 결합 단백질 또는 이의 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 발현양을 측정할 수 있는 뇌수막염 진단용 마이크로어레이(microarray)일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 상기 지표인자를 이용하여 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있으며, 일 구체예에 따르면 상기 SIRT1, SIRT3 또는 SIRT6 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 그의 단편에 해당하는 서열의 cDNA가 프로브로서 기판에 부착되어 있는 마이크로어레이일 수 있다.

[0065] 또한, 본원의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0066] 본원의 키트는 환자 시료 내 비타민 D 결합 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 발현 수준 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 검출 라벨로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0067] 구체적인 일례로, 상기 키트는 ELISA 키트, 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 구현하기 위하여, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. 이러한 ELISA 키트는 상기 단백질들에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 비타민 D 결합 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0068] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴 블롯, 면역침전분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석, 또는 단백질 칩 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다. 이 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체 형성량을 비교함으로써 뇌수막염을 진단할 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)의 발현을 감소시키는 물질을 포함하는 뇌수막염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0070] "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감(부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 늘이는 것을 의미할 수도 있다. 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다.

[0071] "예방"은 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본원의 조성물은 초기 증상, 또는 나타나기 전에 투여할 경우 관련 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0072] 또한, 상기 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D binding protein, VDBP)은 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 내에 존재하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0073] 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현을 감소시키는 물질은 저분자량 약물, 유전자 약물, 단백질 약물, 추출물, 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 항체, RNA, DNA, PNA, 압타머, 화학약품, 효소, 아미노산, 당, 지질, 화합물(천연화합물 및/또는 합성화합물) 및 이들을 구성하는 요소로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 비타민 D 결합 단백질의 발현을 감소시키는 효능을 가진 물질이라면 특별히 제한되지 아니한다.
- [0074] 한편, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 조성물은 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현을 감소시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육 내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0076] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 상기 비타민 D 결합 단백질의 발현을 감소시키는 물질의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인비모 동물모델 및 인비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC50을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 µg 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 조성물은 뇌수막염의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 선택적으로, 화학치료제, 항염증제, 항바이러스제 및/또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0080] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0081] **실시예**
- [0082] **1. 재료 및 방법**
- [0083] **(1) 실험 대상**
- [0084] 이 전향적인 실험은 2017년 9월부터 2018년 5월까지 진단 목적으로 요추천자(lumbar puncture)를 시행한 총 102명의 피험자를 대상으로 하였다. 환자들의 CSF 및 혈액 샘플은 동일한 일자에 쌍으로 수집되었다. 우리는 연령, 성별, CSF의 세포 백분율 계수, 포도당 및 단백질 수준을 포함하는 CSF의 화학적 분석 및 전자 의무 기록으로부터의 최종 진단을 포함하는 임상적 및 실험실 데이터를 수집하였다.
- [0085] 등록된 환자는 CSF 분석 및 최종 진단의 결과에 따라 비신경학적 질병, 뇌수막염 및 다른 신경학적 질병의 3개

그룹으로 분류되었다. CSF 분석의 결과가 정상이고, 최종 진단이 신경학적 병리와 관련되지 않은 경우, 환자는 비신경학적 질병으로 분류되었다. 우리는 CSF 분석의 결과 또는 임상적 증상이 뇌수막염을 강하게 암시하는 경우, 환자들을 뇌수막염으로 분류하였다. 그리고, CSF 분석의 결과가 정상이고, 최종 진단이 다른 신경학적 병리를 암시하는 경우, 환자들은 다른 신경학적 질병으로 분류되었다. CSF에 대한 백분율 계수에서 적혈구의 수가 1,000개를 초과하는 경우, 그것은 트라우마성 태핑(trumatic tapping)으로 간주되어 실험에서 제외되었다.

실험 등록 당시, CSF 및 혈액 샘플은 수집되었고, 혈청 및 백혈구들이 분리되었고, -80℃에서 보관되었다.

(2) VDBP 및 총 25(OH)D 분석

CSF와 혈청 샘플에 대해, VDBP 및 총 25(OH)D 분석이 측정되었다. VDBP는 제조사의 프로토콜에 따라 효소결합 면역흡착 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정되었다.

총 25(OH)D는 엘렉시스 비타민 D 총 전자화학발광 결합 분석(Elecsys Vitamin D Total electrochemiluminescence binding assay) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 및 Cobas 8000 e602 분석기(analyzer) (Roche Diagnostics)를 이용하여 측정되었다.

(3) GC 유전형 결정

유전체 DNA는 제조사의 지침에 따라 DNeasy 혈액 및 조직 키트(Blood and Tissue Kit) (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 말초 혈액 백혈구로부터 분리되었다. rs7041 및 rs4588에 대한 GC 유전형 결정은 제조사의 지침에 따라 TaqMan SNP 유전형 결정 분석(Genotyping Assay) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 ABI ViiA 7 Real-Time PCR 시스템(system) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행되었다. 공통 GC 대립형질은 하기와 같이 결정되었다: Gc1f (c.1296T; c.1307C), Gc1s (c.1296G; c.1307C), and Gc2 (c.1296T; c.1307A).

(4) 통계학적 분석

빈도는 범주별 변수에 대한 백분율(%)로 표현되고, 연속형 변수는 중앙값 및 범위로 표현된다. 우리는 범주별 변수들에 대한 Pearson의 카이제곱 검정법(Pearson's Chi-square test)를 이용하여 그룹간의 비타민 D 관련 데이터 및 GC 유전형을 비교하였다. 정상 분포 변수의 유의미성은 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)에 의해 계산된 후, post hoc Tukey's test에 의해 계산되었다. CSF VDBP 및 혈청 VDBP 간의 상관관계는 단순 상관 분석(simple correlation analysis)에 의해 평가되었다. ROC 곡선 및 ROC 곡선 하 면적(area under ROC curve, AUC)은 CSF VDBP의 성능을 평가하기 위해 사용되었다. 기준 간격은 Clinical and Laboratory Standards Institute의 지침에 따라 계산되었다. Tukey 방법을 사용하여 특이수치들을 제외한 후, 데이터 세트는 비모수적 분석(nonparametric analysis)을 이용하여 나타냈다 (2.5 내지 97.5 번째 백분위수 간격).

모든 통계 분석은 PAWS 통계 소프트웨어(Statistics software), version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 및 MedCalc 통계 소프트웨어(Statistical software), version 17.2 (Mariakerke, Belgium)을 이용하여 수행되었다. P 값 < 0.05는 통계적으로 유의미하다고 간주되었다.

2. 실험 결과

(1) 실험 대상의 일반적인 특징

본 실험 대상의 특징은 표 1에 나타내었다. 본 실험에 102명의 환자들이 등록되었다. 남성 및 여성의 비율은 0.79:1이었다. 실험 대상자의 중간 연령은 50.5였다. 102명의 환자 중에, 58 (56.9%), 17 (16.7%) 및 27 (26.4%)의 환자들이 각각 비신경학적 질병, 뇌수막염 및 다른 신경학적 질병 그룹으로 분류되었다. 뇌수막염 그룹에서, 3 (17.6%), 13 (76.5%) 및 1 (5.9%)은 각각 세균성 뇌수막염, 바이러스성 뇌수막염 및 결핵성 뇌수막염(tuberculosis meningitis)이었다. 다른 신경학적 질병 그룹에서, 중양, 운동신경세포 질병(motor neuron disease), 발작(seizure), 뇌수종(hydrocephalus) 등을 가진 환자들이 있었다.

표 1

특징	결과
환자의 총 수	102
성비 (남성:여성)	0.79 : 1 (45 : 57)
연령, 중간값 (IQR)	50.5 (11.5-66)

연령, 경우의 수	
< 1 세	15
1 ~ 17 세	16
18 ~ 65 세	44
> 65 세	27
질병, 경우의 수	
비신경학적 질병	58
뇌수막염	17
세균성 뇌수막염	3
바이러스성 뇌수막염	13
결핵성 뇌수막염	1
다른 신경학적 질병	27
중양	7
운동 신경세포 질병	5
발작	5
뇌수종	3
뇌병증(Encephalopathy)	2
신경얼기병증(Plexopathy)	2
불안심리(Decreased mentality)	1
모야모야 증후군(Moyamoya syndrome)	1
파킨슨 증후군(Parkinson syndrome)	1

[0099] IRQ = 사분위수(Interquartile range)

[0100] (2) 환자들의 질병 상태에 따른 CSF 및 혈청 내 비타민 D 결합 단백질(vitamin D-binding protein, VDBP) 및 총 25(OH)D 수준의 비교

[0101] 표 2는 환자의 질병 상태에 따른 비타민 D 변수들의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. 모든 환자의 CSF 및 혈청 내 총 25(OH)D 농도의 평균은 각각 37.42 ± 7.58 및 26.29 ± 12.84 ng/mL이었다. 모든 환자의 CSF VDBP 및 혈청 VDBP의 평균은 각각 1.48 ± 1.32 및 181.28 ± 56.90 ug/mL이었다. 총 25(OH)D의 경우, 혈청에 비해 1.42배 높았다. 평균 혈청 VDBP 수준은 모든 실험 대상에 있어서, 평균 CSF VDBP 수준에 비해 약 122배 높았다. CSF VDBP 수준은 뇌수막염 그룹에서 가장 높았고(3.20 ± 1.49 ug/mL), 다른 질병 그룹과 비교하여 유의미한 차이를 나타냈다($P < 0.001$). 뇌수막염 유형에 따른 VDBP 수준의 차이는 없었다(데이터 없음). CSF 총 25(OH)D, 혈청 총 25(OH)D 및 혈청 VDBP 농도는 각 그룹에 따라 유의미하지 않았다. 그리고, 우리는 3개의 질병 상태 그룹 간의 CSF VDBP 농도 박스 plot 그래프를 도시하였다(도 1).

표 2

질병 그룹	CSF 총 25(OH)D (ng/mL)	CSF VDBP (ug/mL)	혈청 총 25(OH)D (ng/mL)	혈청 VDBP (ug/mL)
비신경학적 질병	37.78 ± 7.75	0.91 ± 0.71	27.37 ± 14.05	177.17 ± 58.51
뇌수막염	37.94 ± 7.46	3.20 ± 1.49	24.79 ± 11.40	199.29 ± 35.81
다른 신경학적 질병	36.34 ± 7.44	1.62 ± 1.29	24.91 ± 10.99	178.78 ± 63.47
총	37.42 ± 7.58	1.48 ± 1.32	26.29 ± 12.84	181.28 ± 56.90
P 값	0.69	<0.001	0.623	0.361
데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현되었다.				
CSF = 뇌척수액(Cerebrospinal fluid); VDBP = 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D-binding protein); 25(OH)D = 25-하이드록시 비타민 D(25-hydroxyvitamin D)				

[0103] (3) 비타민 D 결합 단백질 유전형의 분포 및 유전형에 의한 혈청 및 CSF 내 비타민 D 및 VDBP 수준의 비교

[0104] 총 실험 환자들에게서 Gc1f-1s (N=38, 37.3%)는 가장 흔한 유전형이었고, 다음으로 Gc2-1f type (18, 17.6%) 및 Gc1f-1f type (16, 15.7%) 순이었다. 가장 빈번한 3개의 유전형은 비신경학적 질병 그룹에서 Gc1f-1s, Gc2-1f 및 Gc1f-1f 순이었고, 뇌수막염 그룹에서는 Gc1f-1s, Gc1s-2, Gc2-1f 순이었고, 다른 신경학적 질병 그룹에서는 Gc1f-1s, Gc1f-1f, Gc1s-2 순이었다. 3개 그룹 간의 유전형 분포에 있어서 유의미한 차이는 없었다($P=0.374$, 표 3). CSF 총 25(OH)D 및 CSF VDBP 농도는 Gc1s-1s 유전형을 갖는 사람에서 가장 높았으나, Gc1s-2

유전형을 가진 CSF 총 25(OH)D와 Gc 1f-1f 유전형을 가진 CSF VDBP가 가장 낮았다. 혈청 총 25(OH)D 및 혈청 VDBP 농도는 Gc1s-2 유전형을 가진 사람이 가장 높았다. 하지만 VDBP 유전형에 따라 CSF/혈청 총 25(OH)D 및 VDBP 수준에 유의미한 차이가 있지는 않았다(표 4).

표 3

유전형 그룹	Gc1f-1f	Gc1f-1s	Gc1s-1s	Gc2-1f	Gc1s-2	Gc2-2
비신경학적 질병	11	17	5	13	5	7
뇌수막염	1	6	1	3	4	2
다른 신경학적 질병	4	15	1	2	3	2
총	16	38	7	18	12	11

표 4

유전형 그룹	CSF 총 25(OH)D (ng/mL)	CSF VDBP (ug/mL)	혈청 총 25(OH)D (ng/mL)	혈청 VDBP (ug/mL)
Gc1f-1f (N=16)	36.57±8.84	0.89±0.50	23.31±12.16	184.36±74.37
Gc1s-1f (N=38)	36.56±8.31	1.77±1.60	26.54±11.91	187.90±56.29
Gc1s-1s (N=7)	40.73±2.47	1.90±1.46	24.45±14.11	180.44±47.78
Gc2-1f (N=18)	38.45±7.33	1.20±1.27	27.49±13.51	162.34±50.51
Gc2-1s (N=12)	36.16±8.76	1.51±1.19	33.55±14.81	190.70±59.51
Gc2-2 (N=11)	39.25±2.92	1.52±1.07	21.05±11.54	175.18±45.61
총 (N=102)	37.42±7.58	1.48±1.32	26.29±12.84	181.28±56.90
P 값	0.373	0.232	0.282	0.445
데이터는 평균 ± 표준편차로 표현되었다.				
CSF = 뇌척수액(Cerebrospinal fluid); VDBP = 비타민 D 결합 단백질(Vitamin D-binding protein); 25(OH)D = 25-하이드록시 비타민 D(25-hydroxyvitamin D)				

(4) CSF VDBP 수준을 이용한 뇌수막염의 진단을 위한 수신자 조작 특성(Receiver Operating Characteristic, ROC) 분석

우리는 ROC 곡선 분석으로부터 파생된 뇌수막염 검출을 위한 CSF VDBP의 최적의 컷오프(cut-off) 값을 계산하였다. ROC 곡선 분석에 따라, 뇌수막염의 진단을 위한 CSF VDBP의 적절한 컷오프 값은 82.4%의 민감도 및 85.9%의 특이도와 함께 1.96 ug/mL였다. CSF VDBP의 AUC는 0.879였다(95% CI: 0.789 - 0.962, 도 2).

3. 실험 결과 분석

VDBP는 비타민 D 대사물의 운송, 액틴 제거 및 면역 반응의 조절과 같은 많은 기능을 가진 단백질이다. VDBP는 간실질세포(hepatic parenchymal cell) 내에서 주로 합성되며, 일부는 신장, 고환(testis), 난황낭(yolk sac) 및 복부 지방(abdominal fat)에서 합성되는 것으로 알려져 있다. 동물의 경우, VDBP는 쥐 시상하부에서 합성되는 것으로 확인되었고, VDBP는 인간 CSF에 존재하는 것으로 알려졌다. VDBP가 CSF에서 합성되는 것인지는 명확하지 않다. 또한, CSF VDBP는 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 일부 신경학적 질병에서 연구되고 있으나, 뇌수막염에서 연구된 바는 없다. 우리가 아는 한, 우리의 실험은 뇌수막염 환자에서의 VDBP 수준을 조사하는 최초의 보고이다.

본 실험에서, 우리는 CSF VDBP 수준이 뇌수막염을 갖지 않는 환자에 비해 뇌수막염에서 상당히 증가함을 입증하였다($P < 0.001$). 또한, ROC 곡선 분석은 뇌수막염 환자에서의 CSF VDBP 수준에 대해 각각 82.4% 및 85.9%의 민감도 및 특이도를 갖는 우수한 예측치를 나타냈다. 이 발견은 CSF VDBP 수준이 뇌수막염을 진단하기 위한 유용한 새로운 바이오마커가 될 수 있다는 것을 의미한다. 흥미롭게도, 모든 CSF 샘플은 증상이 발생한 후 1~2일 이내에 환자들에게서 수집하였으므로, CSF VDBP는 뇌수막염의 과정 중 매우 초기 단계에서 증가하기 시작한 것으로 추론될 수 있다. CSF VDBP가 뇌수막염에서 증가하기 시작하는 시기를 결정하기 위해 추가적인 조사가 필요하지만, 예상보다 빨리 증가한다면, 보다 임상적으로 유용한 뇌수막염의 조기 진단을 위한 훌륭한 바이오마커로 기대할 수 있다.

지금까지, 뇌수막염을 진단하기 위한 CSF 관련 바이오마커들에 관해 보고된 연구들은 매우 적었다. Savonius *et al*은 소아 세균성 뇌수막염 내 CSF 카텔리시딘(cathelicidin)을 12-24 시간 간격으로 측정하였고, 혈청 25(OH)D

값과 비교하였으나, 유의한 상관관계는 찾지 못했다. 또 다른 연구는 CSF 프로칼시토닌(procalcitonin) 농도 > 0.085 ng/ml는 55.17%의 민감도 및 95.83%의 특이도를 갖는 세균성 뇌수막염의 확실한 지표인 것을 나타냈다. 우리 실험의 CSF VDBP 수준은 이러한 이전 연구들의 결과와 비교해서 82.4%의 민감도, 85.9%의 특이도 및 0.875의 AUC를 갖는 매우 우수한 진단 성능을 보였다. 사실, CSF 내 VDBP 수준을 검출하기 위한 몇 가지 이전 연구가 존재한다. CSF VDBP 농도는 대부분의 이전 연구에서는 전기영동 방법을 이용하여 정성적 또는 반정량적 방법에 의해 측정되었다. 하지만, 우리 실험에서는 CSF VDBP 농도는 보다 신뢰있는 정량적 결과를 나타낼 수 있는 ELISA 방법을 이용함으로써 정량적으로 측정하였다.

[0113] 우리의 실험에서, 평균 혈청 VDBP 수준은 모든 실험 대상에서의 평균 CSF VDBP 수준보다 약 122배 높았다. 또한, CSF와 혈청 VDBP 수준간의 유의한 상관관계는 존재하지 않았다(도 3). 이러한 결과들은 혈청에서 BBB를 통해 CSF로의 VDBP의 이동은 매우 제한적이라는 이전의 연구와 일치한다. 또한, 우리의 실험은 혈청 및 CSF VDBP 농도는 다른 그룹에서와 비해 뇌수막염 그룹에서 높았음을 나타냈고, CSF VDBP 내 질병 그룹간의 유의미한 차이를 나타냈다. 혈액 단백질은 BBB 장벽에 의해 CSF로부터 크게 배제된다. 염증은 CNS 내 BBB 기능의 손실에 기여하는 융합막 제거의 메커니즘에 본질적으로 연결되어 있다. CNS 감염의 경우, 증진된 CSF 단백질 농도는 대개 세정맥(venule)의 내피세포(endothelial cell)와 다른 작은 뇌막 혈관(small meningeal vessel) 사이의 융합막의 붕괴의 결과로서 혈액 단백질의 확산으로부터 발생된다. 이 실험의 결과는 뇌수막염 내 높은 CSF VDBP 수준이 이러한 메커니즘에 의해 유발될 수 있다는 것을 암시한다. 비록 아직 명확하지는 않지만, VDBP가 뇌에서 합성된다면, 뇌에서의 VDBP 합성이 뇌수막염과 같은 염증성 반응을 조절하기 위해 증가될 수 있을 가능성이 있다. 이 이론을 설명하기 위해서는 추가적인 조사가 더 필요할 것이다.

[0114] 본 실험에서, 평균 CSF 총 25(OH)D 수준은 혈청 총 25(OH)D 수준보다 일반적으로 1.4 배 높다. 이러한 뇌의 비타민 D의 상대적으로 높은 농도는 이전 연구에서 시사된 염증을 조절하고, 뉴런의 재생을 유도하는 비타민 D의 역할의 가능성을 지지할 수 있다. 또한, 우리의 발견은 보다 높은 척추강 내 비타민 D 상태를 유지하기 위해 BBB 내 일반적인 순환으로부터 뇌로의 특별한 단향성 수송 시스템이 있음을 암시할 수 있다. 혈청 내 대부분 (85-90%)의 순환 25(OH)D는 58kDa 크기의 비타민 D 결합 단백질(VDBP)에 단단하게 결합되어 있고, 적은 양(10-15%)은 알부민에 느슨하게 결합되어 있다. 순환 비타민 D의 1% 보다 적은 양만이 자유 비결합 형태로 존재한다. 그리고, 혈청 내 비타민 D의 가장 풍부한 형태인 25(OH)D에 결합된 VDBP는 오직 비타민 D에 결합된 VDBP에 대한 수송 시스템으로 발견된 메갈린/큐빌린(megalin/cubilin) 수송 시스템에 의해 수송될 수 있다는 것이 보고되었다. 그러므로, 이러한 메갈린/큐빌린(megalin/cubilin) 수송 시스템이 BBB 내 존재할 가능성이 있을 수 있다. 이것을 밝히기 위해서, 동물 모델 조사를 포함하는 추가적인 실험이 필요할 것이다.

[0115] 주요 GC 유전형 및 대립형질 빈도는 민족에 따라 다양하다고 알려져 있다. 예를 들어, Nielson *et al.*은 거의 모든 아프리카계 미국인과 모든 감비아 사람들은 Gc1f 대립형질(Gc1f-Gc1f, Gc1f-Gc1s 또는 Gc1f-Gc2)을 가졌다는 것을 보고하였다. 대조적으로, 대부분의 백인들은 Gc1f 대립형질을 가지지 않았고, Gc1s-Gc1s 및 Gc1s-Gc2가 이 그룹에서 가장 빈번한 유전형이었다. 한국인은 아프리카계 미국인 또는 백인들에 비해 다른 GC 대립형질 빈도를 가진다. 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)을 가진 203명의 환자 및 157명의 대조군 대상을 등록한 Jung *et al.*에 의한 연구는 Gc1f-Gc2 (25%)가 가장 빈번한 유전형이고, 그 다음으로 Gc1f-Gc1f (22%), Gc1f-Gc1s (20%) 및 Gc1s-Gc2 (18%) 순이었다는 것을 보고하였고, 우리의 결과와 정확히 일치하는 것은 아니지만, 3개의 가장 빈번한 유전형이 Gc1f 대립형질을 갖는다는 점에서 유사하다. 아마도, GC 유전형의 분포에서의 차이는 우리의 실험의 상대적으로 적은 숫자의 실험 대상에 의해 설명될 수 있다.

[0116] 최근에, 다양한 질병들에 관련된 VDBP 다형성에 대한 연구가 꾸준히 실험되고 있다. 이전 연구에서, VDBP Gc1f-1f 유전형은 긍정적으로 잠재적 교란요인을 조절한 후, 45세 이상의 대상에서 급성 심근경색의 위험과 양의 상관관계가 있다. 또 다른 연구는 비타민 D 결핍(<20 ng/ml), VDBP SNP rs7041의 GT 대립형질 및 VDBP 대립형질의 조합 Gc1f-1f인 여성은 다낭성난소증후군(Polycystic ovarian syndrome)의 발병의 위험의 증가와 관련되어 있다는 것을 나타냈다. 우리의 실험에서, 하나의 Gc1f-1f 유전형의 환자만이 뇌수막염에 존재하였고, 다른 그룹에 비해 매우 낮은 비율로 존재하였다. 우리의 실험에서 경우의 수는 매우 적기 때문에, 우리는 뇌수막염과 VDBP 유전형 사이의 어떠한 유의미한 차이를 발견할 수 없었다.

[0117] 이 실험은 몇몇의 한계가 있다. 첫 째로, 이 실험은 단면 연구법(cross-sectional study)이다. 둘째로, 질병 그룹은 다양한 환자 질병들을 포함하였고, 각 그룹에 포함된 환자들의 수는 상대적으로 작았다. 각 그룹에 대한 더 큰 규모의 추가 실험이 필요할 것이다. 셋 째로, 우리는 총 25(OH)D 수준을 측정하기 위한 표준 방법인, 액체 크로마토그래피-이중 질량 분석법(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)을 이용하지 않았다. 하지만, 이 실험에 사용된 분석법인 Cobas e602 모듈(module)과 엘렉시스 비타민 D 총 키트(Elecsys

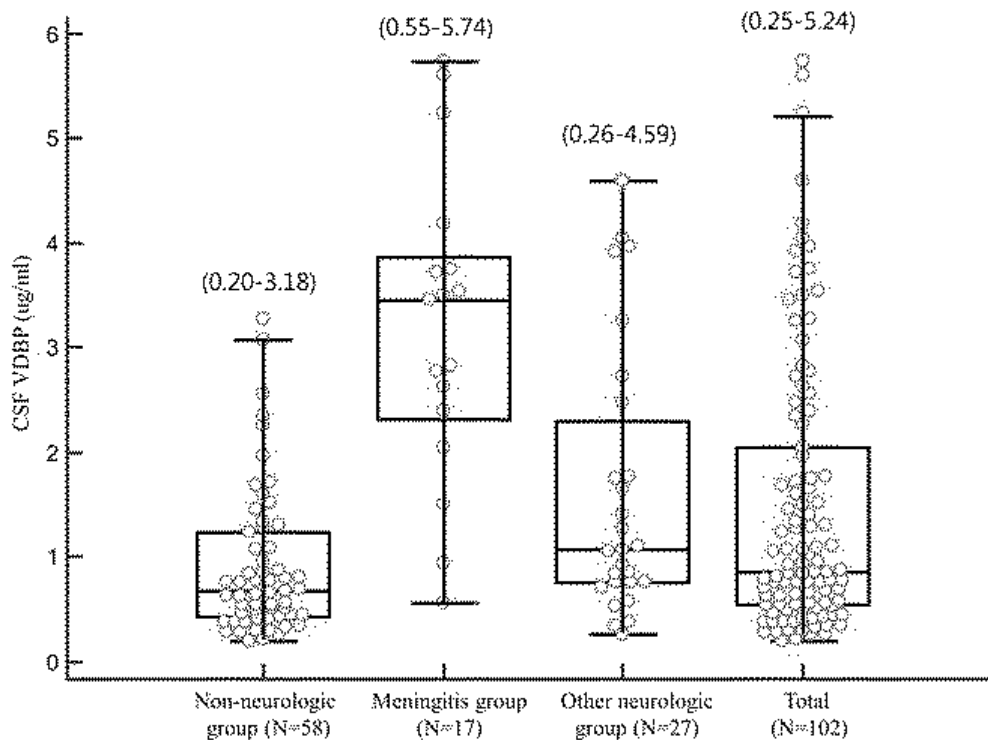
Vitamin D Total Kit) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)는 LC-MS/MS 방법에 상당하는 분석법으로서 이전에 평가되고 보고되었다.

4. 결론

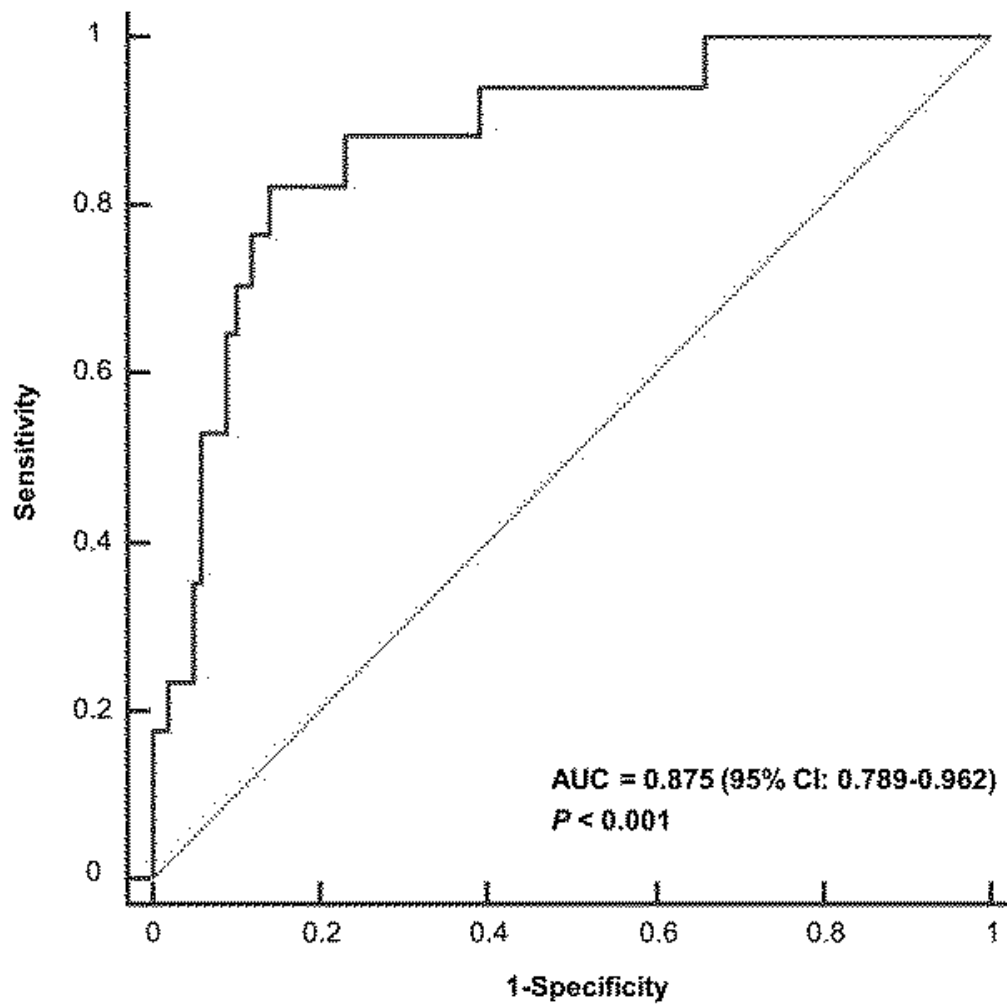
본 실험에서는 뇌수막염의 한국인 환자들의 CSF VDBP 수준에서 상당한 증가를 관찰하였다. 또한, 우리는 뇌수막염 진단을 위해 CSF VDBP 수준의 최적의 컷오프 값을 제시하였다. ROC 분석에서, CSF VDBP 수준은 82.4%의 민감도, 85.9%의 특이도 및 0.875에서의 AUC에서 매우 우수한 진단 성능을 보였다. 우리는 또한, VDBP 유전형의 분포를 보여주었지만 VDBP 유전형과 뇌수막염 사이에 유의미한 상관관계는 없었다. 따라서, CSF VDBP는 뇌수막염의 진단을 위한 잠재적 바이오마커가 될 수 있다.

도면

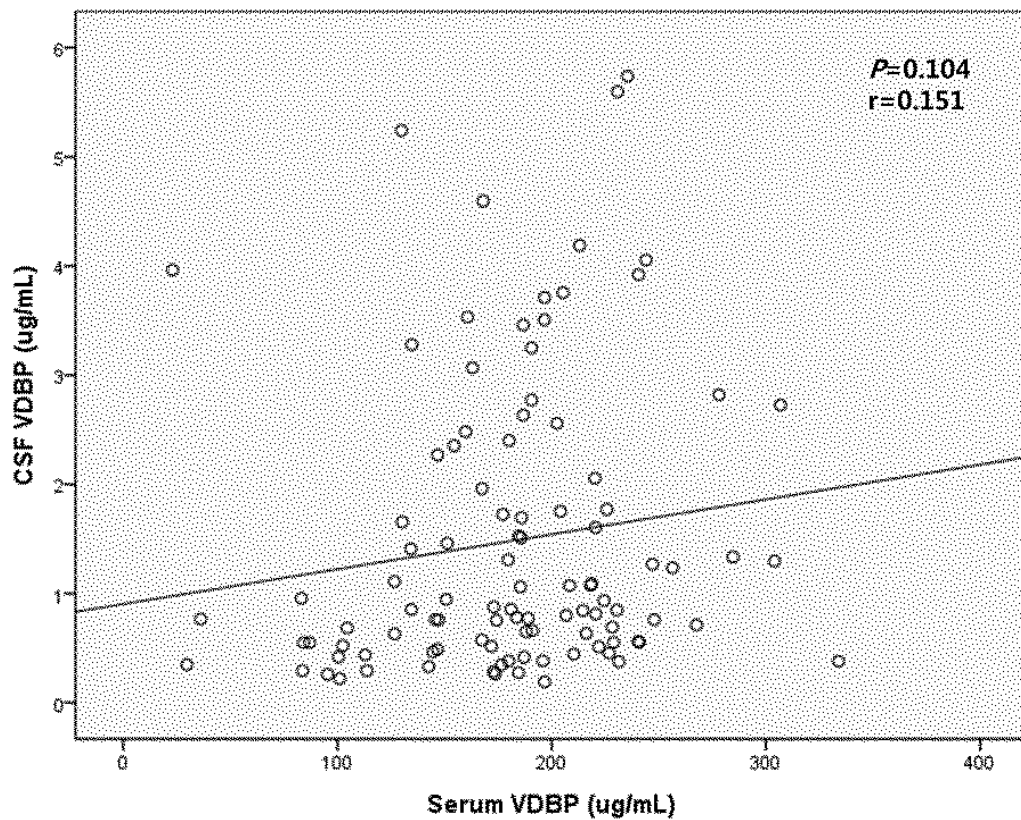
도면1



도면2



도면3



서열목록

<110> GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL
 <120> METHOD FOR PROVIDING INFORMATION OF DIAGNOSING MENINGITIS
 <130> 180P11021PCT
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Lys Arg Val Leu Val Leu Leu Leu Ala Val Ala Phe Gly His Ala

1 5 10 15

Leu Glu Arg Gly Arg Asp Tyr Glu Lys Asn Lys Val Cys Lys Glu Phe

20 25 30

Ser His Leu Gly Lys Glu Asp Phe Thr Ser Leu Ser Leu Val Leu Tyr

35 40 45

Ser Arg Lys Phe Pro Ser Gly Thr Phe Glu Gln Val Ser Gln Leu Val
50 55 60

Lys Glu Val Val Ser Leu Thr Glu Ala Cys Cys Ala Glu Gly Ala Asp
65 70 75 80

Pro Asp Cys Tyr Asp Thr Arg Thr Ser Ala Leu Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

Glu Ser Asn Ser Pro Phe Pro Val His Pro Gly Thr Ala Glu Cys Cys
100 105 110

Thr Lys Glu Gly Leu Glu Arg Lys Leu Cys Met Ala Ala Leu Lys His
115 120 125

Gln Pro Gln Glu Phe Pro Thr Tyr Val Glu Pro Thr Asn Asp Glu Ile
130 135 140

Cys Glu Ala Phe Arg Lys Asp Pro Lys Glu Tyr Ala Asn Gln Phe Met
145 150 155 160

Trp Glu Tyr Ser Thr Asn Tyr Gly Gln Ala Pro Leu Ser Leu Leu Val
165 170 175

Ser Tyr Thr Lys Ser Tyr Leu Ser Met Val Gly Ser Cys Cys Thr Ser
180 185 190

Ala Ser Pro Thr Val Cys Phe Leu Lys Glu Arg Leu Gln Leu Lys His
195 200 205

Leu Ser Leu Leu Thr Thr Leu Ser Asn Arg Val Cys Ser Gln Tyr Ala
210 215 220

Ala Tyr Gly Glu Lys Lys Ser Arg Leu Ser Asn Leu Ile Lys Leu Ala
225 230 235 240

Gln Lys Val Pro Thr Ala Asp Leu Glu Asp Val Leu Pro Leu Ala Glu
245 250 255

Asp Ile Thr Asn Ile Leu Ser Lys Cys Cys Glu Ser Ala Ser Glu Asp
260 265 270

Cys Met Ala Lys Glu Leu Pro Glu His Thr Val Lys Leu Cys Asp Asn
275 280 285

Leu Ser Thr Lys Asn Ser Lys Phe Glu Asp Cys Cys Gln Glu Lys Thr
290 295 300

Ala Met Asp Val Phe Val Cys Thr Tyr Phe Met Pro Ala Ala Gln Leu
305 310 315 320

Pro Glu Leu Pro Asp Val Glu Leu Pro Thr Asn Lys Asp Val Cys Asp
325 330 335

Pro Gly Asn Thr Lys Val Met Asp Lys Tyr Thr Phe Glu Leu Ser Arg
340 345 350

Arg Thr His Leu Pro Glu Val Phe Leu Ser Lys Val Leu Glu Pro Thr
355 360 365

Leu Lys Ser Leu Gly Glu Cys Cys Asp Val Glu Asp Ser Thr Thr Cys
370 375 380

Phe Asn Ala Lys Gly Pro Leu Leu Lys Lys Glu Leu Ser Ser Phe Ile

385 390 395 400

Asp Lys Gly Gln Glu Leu Cys Ala Asp Tyr Ser Glu Asn Thr Phe Thr
405 410 415

Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Ala Glu Arg Leu Lys Ala Lys Leu Pro Glu
420 425 430

Ala Thr Pro Thr Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn Lys Arg Ser Asp Phe
435 440 445

Ala Ser Asn Cys Cys Ser Ile Asn Ser Pro Pro Leu Tyr Cys Asp Ser
450 455 460

Glu Ile Asp Ala Glu Leu Lys Asn Ile Leu

465 470