



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0117555
(43) 공개일자 2019년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61B 5/0042 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7024715
(22) 출원일자(국제) 2018년02월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/018836
(87) 국제공개번호 WO 2018/152537
국제공개일자 2018년08월23일
(30) 우선권주장
62/461,161 2017년02월20일 미국(US)

(71) 출원인
더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린
스트리트 1111 12층
(72) 발명자
하인만 제이슨 디.
미국 캘리포니아주 90024 로스앤젤레스 10889 월
셔 블러바드 스위트 920 유니버시티 오브 캘리포
니아 테크놀로지 디벨롭먼트 그룹 내
샤오 관씨
미국 캘리포니아주 90024 로스앤젤레스 10889 월
셔 블러바드 스위트 920 유니버시티 오브 캘리포
니아 테크놀로지 디벨롭먼트 그룹 내
(74) 대리인
특허법인아주김장리

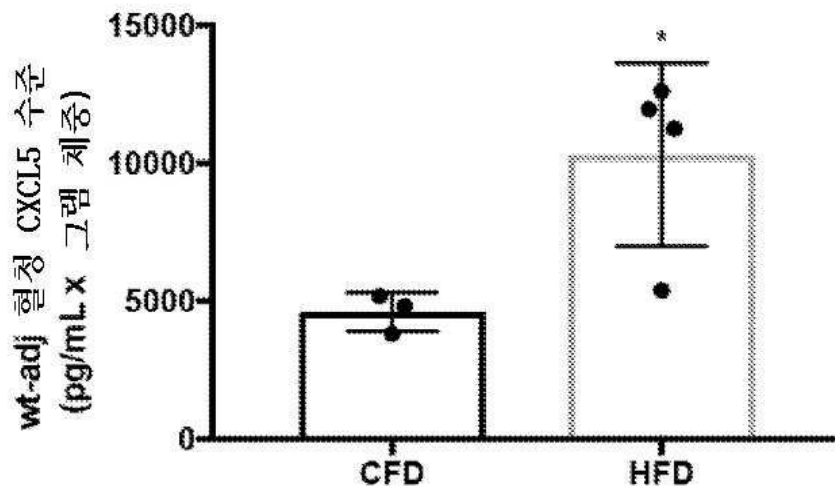
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 무증상 뇌 허혈에 대한 혈청학적 분석

(57) 요약

무증상 뇌 허혈(SBI) 및 뇌혈관 건강상태를 검출 또는 모니터링하기 위한 방법. 본 명세서에 기재된 분석 시약 및 방법은 뇌 미세혈관 질환의 구체적 지표를 제공하여, 임상이가 SBI의 발생에 대한 위험에 있는 환자를 식별하는 것을 가능하게 한다. 무증상 뇌 허혈 및/또는 대사 증후군을 갖는 대상체를 치료하는 방법은 2 이상의 SBI 마커 수준이 상승될 때, 대상체에 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리, 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 비만, 고지혈증, 고혈압 및 글루코스 불내성을 포함하는 만성 혈관 위험 인자에 노출된 뇌 내피세포에 의해 생산된 분자를 기재한다. 뇌 내피세포에 의해 생산된 이들 스트레스 분자는 혈청에서 검출 가능하며, 뇌-특이적 내피세포 손상의 진단 지표로서 작용하고, 무증상 뇌졸중 및 손상된 인지 기능의 MRI 지표와 상관관계가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61B 5/055 (2018.08)

A61B 5/4064 (2013.01)

A61B 5/4836 (2018.08)

G01N 33/53 (2018.05)

G01N 2333/4745 (2013.01)

G01N 2333/521 (2013.01)

G01N 2333/70557 (2013.01)

G01N 2800/2871 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계; 및
- (d) 상기 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 대상체에 대사증후군 및/또는 뇌졸중의 치료를 언급하는 단계

를 포함하는, 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마커는 C-X-C 모티프 케모카인 5(CXCL5) 또는 C-X-C 모티프 케모카인 6(CXCL6)인, 대상체에서 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 마커는 표 1의 마커인, 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 측정하는 단계 (b)는 표 1 및/또는 표 2의 마커 중 적어도 3가지에 대해 수행되는, 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 표 3의 마커를 측정하는 단계를 더 포함하는, 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 CSF 샘플, 소변 샘플, 혈액 샘플 또는 다른 체액인, 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 7

대상체에서 무증상 뇌졸중을 진단하는 방법으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계; 및
- (d) 상기 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 상기 대상체에 대사증후군 및/또는 뇌졸중의 치료를 언급하는 단계

를 포함하는, 무증상 뇌졸중을 진단하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대사 증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 상기 대상체를 치료하는 단계를 더 포함하는, 무증상 뇌졸중을 진단하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료는 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리, 및/또는 식이요법과 운동 프로그램인, 무증상 뇌졸중을 진단하는 방법.

청구항 10

대상체에서 무증상 뇌졸중을 모니터링하는 방법으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계;
- (d) 상기 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 상기 대상체를 대사증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 치료하는 단계;
- (e) 단계 (a) 내지 (c)를 반복하는 단계; 및
- (f) 상기 상태 스코어가 1에 대한 경향이 없을 때 치료를 조절하는 단계를 포함하는, 무증상 뇌졸중을 모니터링하는 방법.

청구항 11

치료가 필요한 대상체에서 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법으로서,

- (a) 표 1로부터 선택된 적어도 하나의 마커 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 마커 수준이 상승될 때, 상기 대상체에게 아스피린 요법, 혈압 요법, 혈당 관리, 콜레스테롤 관리, 체중 관리, 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계를 포함하는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 적어도 하나의 마커는 C-X-C 모티프 케모카인 5(CXCL5) 및/또는 C-X-C 모티프 케모카인 6(CXCL6)을 포함하는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 적어도 하나의 마커는 IGFBP2를 포함하는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 측정하는 단계 (a)는 표 1의 마커 중 적어도 2가지에 대해 수행되는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 측정하는 단계 (a)는 표 1 및/또는 표 2의 마커 중 적어도 3가지에 대해 수행되는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 표 3의 마커를 측정하는 단계를 더 포함하는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 CSF 샘플, 소변 샘플, 혈액 샘플 또는 다른 체액인, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시약은 항체 또는 핵산 프로브인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 측정하는 단계는 면역분석을 포함하는, 무증상 뇌졸중 및/또는 대사 증후군을 치료하는 방법.

청구항 20

CXCL5, CXCL6, IGFBP2, 및 선택적으로, ITGB3의 각각에 특이적으로 결합하는 시약을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2017년 2월 20일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/461,161호의 유익을 주장하며, 이 기초출원의 전 문은 본 출원에 참고로 편입된다.

배경 기술

[0002] 비만은 미국에서 선두적인 공중보건 문제이다. 성인의 1/3 초과가 비만이다. 이는 고혈당, 고지혈증, 고혈압 및 저 고-밀도 지질단백질을 비롯한 다양한 혈관 위험 인자를 생산하는 대사증후군의 발생과 밀접하게 관련된다. 이들 인자는 만성 혈관 질환, 특히 대뇌 혈관 질환이 발생할 위험을 증가시킨다. 연구는 대사 증후군을 갖는 환자가 뇌에서 대부분 치매, 장애 및 심지어 사망을 야기하는 뇌 백질을 손상시키는 미세혈관 경색이 발생할 위험의 6배 증가를 가진다는 것을 나타낸다.

[0003] 수백만명의 미국인은 매년 무증상 뇌졸중을 가지며, 이들 무증상 뇌졸중에 대한 다른 명칭은 뇌에서의 미세혈관 경색이다. 무증상 뇌졸중 동안, 혈류의 중단은 생활 기능을 제어하지 않는 뇌의 부분을 손상시킨다. MRI 또는 CT 스캔 상에서 손상이 검출될 수 있지만, 이는 임의의 분명한 증상을 생성하기에는 너무 작다.

[0004] 현재, 임상적 뇌 미세혈관 질환을 진단하기 위해 임상 증상의 개시 후에 MRI를 이용한다. 이 접근은 고도로 제한되어 있고, 지속적인 뇌 손상이 시작되기 전에 더 공격적인 약학적 개입 및 생활양식 개입이 잠재적으로 유리할 수 있는 위험에 있는 환자를 식별하기보다는 추가적인 손상을 방지하는 것에만 유용하다. 뇌졸중에 대한 예측 분석을 위한 현재 분야 표준은 장애, 치매 및 사망을 포함하는 장기간 결과의 위험을 증가시키는 뇌졸중의 무증상 형태를 식별하기보다는 급성 뇌졸중 시 의료인에게 도달하는 환자에 기반한다. 추가로, 이들 예측 분석 중 어떤 것도 발견 기반 연구에 기반하지 않았고, 오히려 필수적으로 제한되고 일반적으로 다수의 표적보다는 단일 분자 프로파일을 이용하는 사례-통제 방법을 이용한다.

[0005] 뇌졸중의 개개 위험을 예측할 수 있는 진단 검사는 없으며, 뇌 혈관 건강상태를 실제로 나타낼 수 있는 것은 없다. 무증상 뇌졸중의 위험에 있거나 무증상 뇌졸중에 걸린 환자를 식별하고 시기적절하게 치료적 개입을 용이하게 하는 실행적이고 접근 가능한 진단 도구에 대한 필요가 남아있다.

발명의 내용

[0006] 본 명세서에 기재된 분석 시약 및 방법은 뇌 미세혈관 질환의 특정 지표를 제공함으로써 이들 필요 및 다른 것들을 충족시킨다. 본 명세서에 기재된 분석은 무증상 뇌 허혈(silent brain ischemia: SBI)의 발생에 대한 위험에 있는 환자를 식별하는데 다수의 전문 임상적에게 극도로 유용할 것이다. 본 명세서에서 무증상 뇌 허혈 및/또는 대사 증후군을 갖는 대상체를 치료하는 방법이 기재된다. 상기 방법은 2 이상의 SBI 마커 수준이 상승될 때 대상체에게 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계를 포함한다.

- [0007] 본 명세서에서 비만, 고지혈증, 고혈압 및 글루코스 불내성을 포함하는 만성 혈관 위험 인자에 노출된 뇌 내피 세포에 의해 생산된 분자를 기재한다. 이들 스트레스 분자는 뇌 내피세포에 의해 생산되고 혈청에서 검출 가능하다. 이들 분자는 뇌-특이적 내피세포 손상의 진단 지표로서 작용하고, 무증상 뇌졸중 및 손상된 인지 기능의 MRI 지표와 상관관계가 있다.
- [0008] 본 명세서에서 이하에 이 분석을 위한 마커의 목록을 제공한다. 티어(Tier) 1 분자(CXCL5/6, IGFBP2, ITGB3, IL-17B)는 바람직한 분자이며, 각각은 무증상 뇌혈관 손상의 독립적 마커로서 작용할 수 있다. 티어 2 분자(IL-17A, GDF-15, FGF-23, MCP-1)는 추가적인 마커를 제공한다. 이들 티어 2 마커뿐만 아니라 다른 마커(예컨대, TNF α , IL-18, IL-6, 피브리노겐, BDNF, ST2, SRAGE, MPO 및 LpPLA2)는 하나 이상의 티어 1 마커와 조합하여 사용될 수 있다. 이들 마커 중 하나 이상과 하나 이상의 티어 1 마커의 조합은 각각의 임의의 하나의 분석 성분 이상으로 추가적인 진단 정확도를 제공할 것이다. 마커의 패널은 종단적 예측치를 제공하고, 다양한 약학적 또는 생활양식 개입에 의해 조절될 수 있다.
- [0009] 일 실시형태에서, 상기 방법, 키트 또는 분석은 대상체로부터 얻은 샘플에서 IGFBP2, ITGB3, CXCL5, 및/또는 CXCL6, 또는 이들의 조합 중 임의의 하나의 검출 및/또는 측정과 관련된다. 일 실시형태에서, 측정될 마커는 CXCL5이다. 일 실시형태에서, 측정될 마커는 CXCL6이다. 다른 실시형태에서, 측정될 마커는 IGFBP2이다. 일 실시형태에서, 측정될 마커는 ITGB3이다. 전형적으로, 적어도 2 또는 3개의 마커가 측정된다. 소정의 실시형태에서, CXCL5와 IGFBP2가 둘 다 측정된다. 일부 실시형태에서, CXCL5, CXCL6 및 IGFBP2가 측정된다. 다른 실시형태에서, CXCL5, IGFBP2 및 ITGB3이 측정된다.
- [0010] 일 실시형태에서, 마커는 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커이다. 일 실시형태에서, 표 1, 2 및/또는 3의 적어도 2 이상의 마커는 조합하여 사용된다. 마커 조합의 예는 하기를 포함한다: CXCL5 및 표 1, 2 또는 3로부터 선택된 추가적인 마커; CXCL6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IGFBP2 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; ITGB3 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-17B 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-17A 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; GDF-15 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; FGF-23 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; CCL2/MCP-1 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; TNF-알파 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; CXCL5 및 CXCL6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; 표 1, 2 및 3으로부터 선택된 3개 이상의 마커의 임의의 조합; 표 1, 2 및 3의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11 마커의 임의의 조합. 일 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터 선택된 2, 3, 4 또는 5개의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 2로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 2로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 각각의 표 1, 2 및 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다.
- [0011] 상기 표 4는 표시한 바와 같이, 신규한 마커와 이전에 보고된 마커를 모두 열거한다. 일부 실시형태에서, 표 4에 열거된 마커 중 둘 이상의 조합은 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법 또는 분석에서 사용된다. 일부 실시형태에서, 표 4에 열거된 마커 중 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 모두 16개는 분석에서 함께 사용된다. 선택적으로, 이들 마커 중 모두 또는 서브세트는 본 명세서에 또는 다른 곳에 기재된 다른 마커와 함께 사용될 수 있다.
- [0012] 본 발명은 대상체에서 무증상 뇌졸중을 진단하기 위해 대상체로부터 얻은 샘플에서 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법뿐만 아니라 무증상 뇌졸중, 뇌혈관 손상 및/또는 대사 증후군을 예측하고/하거나 치료하고/하거나 모니터링하는 방법을 제공한다.
- [0013] 전형적인 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0014] (a) 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- [0015] (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- [0016] (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계;
- [0017] (d) 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 대상체에 대사증후군 및/또는 뇌졸중의 치료를 언급하는 단계.

- [0018] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체를 대사 증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 치료하는 단계를 더 포함한다. 치료의 예는 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0019] 또한 대상체에서 무증상 뇌졸중을 모니터링하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0020] (a) 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- [0021] (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- [0022] (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계;
- [0023] (d) 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 대상체를 대사증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 치료하는 단계;
- [0024] (e) 단계 (a) 내지 (c)를 반복하는 단계; 및
- [0025] (f) 상태 스코어가 1에 대한 경향이 없을 때 치료를 조절하는 단계.
- [0026] 또한 치료가 필요한 대상체에서 무증상 뇌졸중 및/또는 대사증후군을 치료하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0027] (a) 표 1로부터 선택된 적어도 하나의 마커 수준을 측정하는 단계;
- [0028] (b) 마커 수준이 상승될 때, 대상체에게 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리, 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계.
- [0029] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 마커는 C-X-C 모티프 케모카인 5(CXCL5) 및/또는 C-X-C 모티프 케모카인 6(CXCL6)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 마커는 IGFBP2를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 측정은 표 1의 마커 중 적어도 2가지에 대해 수행된다. 다른 실시형태에서, 단계 (a)의 측정은 표 1 및/또는 표 2의 마커 중 적어도 3가지에 대해 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 표 3의 마커를 측정하는 단계를 더 포함한다.
- [0030] 전형적인 실시형태에서, 샘플은 혈청 샘플, CSF 샘플, 소변 샘플, 혈액 샘플 또는 다른 체액이다. 본 명세서에 기재된 방법에서 사용을 위해, 샘플의 대표적인 예는 혈액, 혈장 또는 혈청, 타액, 소변, 뇌척수액, 우유, 자궁 경부 분비액, 정액 및 다른 체액을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0031] 대상체는 전형적으로 포유류 대상체, 예컨대, 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 수의학적 대상체, 예컨대, 애완동물 또는 다른 반려 동물이다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 시약은 항체이다. 다른 실시형태에서, 시약은 검출을 위한 표적과 특이적으로 혼성화할 수 있는 핵산 프로브이다. 시약은 선택적으로 검출 가능한 마커로 표지될 수 있다. 상기 방법은, 예를 들어, 면역 분석 기법, 예컨대, 효소 면역분석, 다중복합분석을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자에게 이해될 것인 바와 같은 다른 분석, 예컨대, 프로브 혼성화가 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 본 명세서에 기재된 시약의 세트, 예컨대, 본 발명의 하나 이상의 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 및 선택적으로, 본 발명의 시약을 함유하는 하나 이상의 적합한 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 시약은 본 발명의 하나 이상의 마커에 특이적으로 결합하는 분자를 포함한다. 시약의 한 가지 예는 마커에 특이적인 항체이다. 시약은 선택적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지는 형광, 발광, 효소, 색소생산성 또는 방사성일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 키트는 선택적으로, 별개로 또는 다른 시약과 함께 분석 표준 또는 분석 표준의 세트를 포함한다. 분석 표준은 건강한 개체를 나타내는 주어진 마커에 대한 정상 발현의 기준 수준을 제공함으로써 정상 대조군으로서 작용할 수 있다.
- [0035] 키트는 단백질 검출을 위한 항체에 추가로 대안의 유전자 발현 산물의 검출을 위한 프로브를 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로 완충제를 포함할 수 있다.
- [0036] 일 실시형태에서, 키트는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3의 발현 산물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 포함한다. 일 실시형태에서, 키트는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및 ITGB3에 특이적으로 결합하는 시약을 포

함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 CXCL5 및 IGFBP2에 특이적으로 결합하는 시약을 포함한다. 이러한 키트는 선택적으로 CXCL6 및/또는 ITGB3에 특이적으로 결합하는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 전형적으로, 키트는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3 중 적어도 2가지에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트의 항체 또는 프로브는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3 중 적어도 3가지 또는 선택적으로 4가지 모두에 특이적으로 결합한다. 선택적으로, 키트는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10까지의 추가적인 발현 산물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 더 포함할 수 있다. 추가적인 발현 산물은 본 명세서의 표 2, 3 또는 4로부터 선택될 수 있다. 선택적으로, 추가적인 산물은 관심 대상의 다른 마커일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037]

도 1은 CXCL5의 가중치-조절된 혈청 수준을 나타내는 막대 그래프이며, 상향 조절된 질환이 있는 내피 마커 중 하나가 마우스에서 분비되고, 대사 증후군이 있는 마우스의 뇌로부터의 안구 뒤 혈액 배출에서 상향조절된다는 것을 확인하는 도면.

도 2는 CXCL5 및 CXCL6 데이터를 나타내는 산점도를 도시한 도면.

도 3은 CXCL5 및 CXCL6의 혈청 수준과 트레일 A(Trails A) 수행 간에 상당한 상관관계가 발견되었다는 것을 나타내는 산점도를 도시한 도면.

도 4는 트레일 A 수행에서 500pg/ml 미만 대 500pg/ml 초과 CXCL5 혈청 수준을 갖는 대상체 사이에 유의한 차이가 발견되었다는 것을 나타내는 막대 그래프를 도시한 도면.

도 5는 숫자 검사(Digit Span) A 수행에서 500pg/ml 미만 대 500pg/ml 초과 CXCL5 혈청 수준을 갖는 대상체 사이에 유의한 차이가 발견되었다는 것을 나타내는 막대 그래프를 도시한 도면.

도 6은 백질 병변의 측정인 파제카스(Fazekas) 스코어를 나타내는 막대 그래프를 도시한 도면.

도 7은 건강한 대조군에서의 플레이트 간에 관찰된 변이 계수(coefficient of variation: CoV)를 분석하는 기술적 검증의 결과를 도시한 도면.

도 8은 대상체 간에 관찰된 변이 계수(CoV)를 분석하는 기술적 검증의 결과를 도시한 도면.

도 9는 약하게 상관관계가 있는 파제카스 스코어(Fazekas score: FS)의 함수로서 혈청 미엘로페록시다제(myeloperoxidase: MPO) 수준을 나타내는 산점도를 도시한 도면.

도 10은 IGFBP2 혈청 수준이 FS 스코어와 상당히 상관관계가 있다는 것을 나타내는 산점도를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

본 발명은 비만, 고지혈증, 고혈압 및 글루코스 불내성을 포함하는 만성 혈관 위험 인자에 노출된 뇌 내피세포에 의해 생산된 분자의 예상치 못한 발견에 기반한다. 이들 스트레스 분자는 뇌 내피세포에 의해 생산되고 혈청에서 검출 가능하다. 본 발명은 뇌-특이적 내피세포 손상의 진단 지표로서 그리고 무증상 뇌졸중 및 손상된 인지 기능의 MRI 지표와 상관관계가 있는 이들 분자를 이용하는 분석을 제공한다. 본 명세서에 기재된 분석 시약 및 방법은 뇌 미세혈관 질환의 구체적 지표를 제공한다. 이들 지표는 다수의 전문 임상외에 대해 그들이 다른 방법으로 검출될 수 없는 무증상 뇌 허혈(SBI)의 발생 위험에 있는 환자를 식별하게 하는데 극도로 유용하다. 마커는 또한 소혈관 허혈성 질환(small vessel ischemic disease: SVID) 및 다른 형태의 뇌혈관 질환(cerebrovascular disease: CVD)의 검출 및 치료를 위한 비침습성 선별 도구로서 사용될 수 있다.

[0039]

정의

[0040]

본 출원에서 사용되는 모든 과학적 및 기술적 용어는 달리 구체화되지 않는 한, 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 가진다. 본 출원에서 사용되는 다음의 단어 또는 어구는 구체화된 의미를 가진다.

[0041]

본 명세서에서 사용되는 "대조군" 샘플은 각각의 마커의 정상 측정을 나타내는, 예컨대, 정상, 건강한 대조군 대상체로부터 얻은 샘플 또는 비교를 위해 사용될 마커의 기준 양을 의미한다. 전형적으로, 기준은 동일한 대상체 또는 환자로부터 취한 측정일 것이다. 샘플은 대응하는 마커의 알려진 정상 측정에 기반한, 시험을 위해 사용되는 실제 샘플, 또는 기준 수준 또는 범위일 수 있다.

[0042]

본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태로 뉴클레오타이드, 즉, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체의 서열을 지칭

하며, 달리 제한되지 않는 한, 천연 유래 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 핵산에 혼성화하는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함한다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는, "혼성화하다", "혼성화하는" 및 "혼성화"는 올리고뉴클레오타이드가 표준 조건 하에 표적 DNA 분자와의 비공유적 상호작용을 형성한다는 것을 의미한다. 표준 혼성화 조건은 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 프라이머가 표적 DNA 분자에 혼성화하는 것을 허용하는 해당 조건이다. 이러한 조건은 당업자에게 잘 공지된 기법을 이용하여 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 프라이머 및 표적 DNA 분자에 대해 용이하게 결정된다. 표적 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열은 일반적으로 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 프로브에 대해 상보성인 서열이다. 혼성화 올리고뉴클레오타이드는 비공유 상호작용을 형성하는 것을 방해하지 않는 비-혼성화 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 프로브의 비혼성화 뉴클레오타이드는 혼성화 올리고뉴클레오타이드의 단부에서 또는 혼성화 올리고뉴클레오타이드 내에 위치될 수 있다. 따라서, 표준 혼성화 조건 하에 혼성화된다면, 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 프라이머는 표적 서열의 모든 뉴클레오타이드에 대해 상보성을 갖지 않는다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 "유의한 차이"는 당업자에 의해 믿을 수 있는 것으로 고려되는 방식으로 검출될 수 있는 차이, 예컨대, 통계학적으로 유의한 차이, 또는 상황 하에서 합리적인 수준의 신뢰도로 검출될 수 있는 충분한 규모를 갖는 차이를 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 단수 용어는 달리 분명하게 표시되지 않는 한, 적어도 하나를 의미한다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는, 병태 또는 질환을 "예방하다" 또는 "대해 보호하다"는 병태 또는 질환의 개시 또는 진행을 방해하거나, 감소시키거나 또는 지연시키는 것을 의미한다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 단수 용어는 달리 분명하게 표시되지 않는 한, 적어도 하나를 의미한다.

[0047] 마커

[0048] 본 명세서에서 비만, 고지혈증, 고혈압 및 글루코스 불내성을 비롯한 만성 혈관 위험 인자에 노출된 뇌 내피세포에 의해 생산된 분자를 기재한다. 이들 스트레스 분자는 뇌 내피세포에 의해 생산되고 혈청에서 검출 가능하다. 이들 분자는 뇌-특이적 내피세포 손상의 진단 지표로서 작용하고, 무증상 뇌졸중 및 손상된 인지 기능의 MRI 지표와 상관관계가 있다.

[0049] 이하에 이 분석을 위한 마커의 목록을 제공한다. 티어 1 분자(표 1)는 본 발명자들의 가장 강한 후보이며, 각각은 무증상 뇌혈관 손상의 독립적인 마커로서 작용할 수 있다. 티어 2 분자(표 2)는 추가적인 마커를 제공한다. 이들 마커의 조합은 각각 임의의 하나의 분석 성분 이상으로 추가적인 진단 정확도를 제공할 것이다. 마커의 패널은 종단적 예측치를 제공하고, 다양한 약학적 또는 생활양식 개입에 의해 조절될 수 있다. 심혈관 질환(CVD)의 이전에 공지된 마커, 예컨대, 표 3에 열거된 것은 표 1 및 표 2에 열거된 하나 이상의 마커와 함께 사용될 수 있다.

표 1

단백질 약어	완전한 명칭
CXCL5 (ENA-78)	C-X-C 모티프 케모카인 5
CXCL6 (GCP-2)	C-X-C 모티프 케모카인 6
IGFBP2	인슐린-유사 성장인자-결합 단백질 2
ITGB3 (CD61)	인테그린, 베타 3(혈소판 당단백질 IIIa)
IL-17B	인터류킨-17-B

표 2

단백질 약어	완전한 명칭
IL-17A	인터류킨-17-A
GDF-15	성장/분화 인자 15
FGF-23	섬유아세포 성장 인자-23
CCL2/MCP-1	케모카인(C-C 모티프) 리간드 2

표 3

[0052]

단백질 약어	완전한 명칭
IL-6	인터류킨-6
TNF-알파	중양 괴사 인자-알파

[0053]

일 실시형태에서, 마커는 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커이다. 일 실시형태에서, 표 1, 2 및/또는 3의 적어도 2 이상의 마커는 조합하여 사용된다. 마커 조합의 예는 하기를 포함한다: CXCL5 및 표 1, 2 또는 3로부터 선택된 추가적인 마커; CXCL6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IGFBP2 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; ITGB3 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-17B 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-17A 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; GDF-15 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; FGF-23 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; CCL2/MCP-1 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; IL-6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; TNF-알파 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; CXCL5 및 CXCL6 및 표 1, 2 또는 3으로부터 선택된 추가적인 마커; 표 1, 2 및 3으로부터 선택된 3개 이상의 마커의 임의의 조합; 표 1, 2 및 3의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11 마커의 임의의 조합. 일 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터 선택된 2, 3, 4 또는 5개의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 2로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 1로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 표 2로부터의 적어도 하나의 마커, 및 표 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다. 다른 실시형태에서, 마커의 조합은 각각의 표 1, 2 및 3으로부터의 적어도 하나의 마커이다.

[0054]

C-X-C 모티프 케모카인 리간드 5(CXCL5)는 케모카인의 CXC 서브패밀리의 구성원이다. CXCL5는 또한 저 유도성 (small inducible) 사이토카인 서브패밀리 B(Cys-X-Cys), 구성원 5(SCYB5) 및 ENA-78로서 알려져 있다. 백혈구를 모충하고 활성화시키는 케모카인은 기능(염증 또는 항상성)에 의해 또는 구조에 의해 분류된다. 이 단백질은 호중구를 모충하기 위해, 혈관신생을 촉진시키기 위해 그리고 결합 조직을 리모델링하기 위해 G-단백질 결합 수용체 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 2에 결합하도록 제안된다. 이 단백질은 암세포 증식, 이동 및 침습에서 어떤 역할을 하는 것으로 생각된다.

[0055]

C-X-C 모티프 케모카인 리간드 6(CXCL6)은 케모카인의 CXC 서브패밀리의 다른 구성원이다. CXCL6은 또한 과립구 화학주성 단백질 2(GCP2), CKA-3 및 SCYB6로서 알려져 있다. 추가로, 호중구 과립구(그의 수용체의 결합 및 활성화를 통한 신호전달, CXCR1 및 CXCR2), 및 혈관형성에 대해 화학주성이 되는 것에 대해, 그람-양성 및 그람-음성 박테리아에 대해 강한 항박테리아 활성(CXCL5 및 CXCL7과 비교할 때 90배 더 높음)을 가진다.

[0056]

인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 2(IGFBP2)는 IGF-매개 성장 및 발생 속도를 저해한다. IGF-결합 단백질은 IGF의 반감기를 연장시키며, 세포 배양물에 대한 IGF의 성장 촉진 효과를 저해하거나 또는 자극하는 것으로 나타났다. 그들은 IGF와 그들의 세포 표면 수용체의 상호작용을 변경시킨다.

[0057]

인테그린 베타-3(ITGB3) 단백질 산물은 인테그린 베타쇄 3이다. 인테그린은 알파쇄 및 베타쇄로 구성된 통합 세포-표면 단백질이다. 주어진쇄는 다중 상대와 조합되어 상이한 인테그린을 야기할 수 있다. 인테그린 베타 3은 혈소판에서 알파 IIb쇄를 따라서 발견된다. 인테그린은 세포 접촉뿐만 아니라 세포-표면 매개 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0058]

일 실시형태에서, 상기 방법, 키트 또는 분석은 대상체로부터 얻은 샘플에서 IGFBP2, ITBG3, CXCL5 및/또는 CXCL6의 검출 및/또는 측정과 관련된다.

표 4

[0059]

분석물	신규/보고됨
IGFBP2	신규
ITBG3	신규
CXCL5	신규
CXCL6	신규
TNFa	Jefferson et al. Neurology 2007
IL-18	Miwa et al. Stroke 2011
IL-6	Nadkarni et al. Neurology 2016

피브리노겐	Aono et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007
MCP-1	Bettcher et al. Alzheimers Dement 2016
BDNF	Pikula et al. Stroke 2013
GDF-15	Andersson et al. Stroke 2015
ST2	Andersson et al. Stroke 2015
FGF-23	Wright et al. Stroke 2016
SRAGE	Hudson et al. Atherosclerosis 2011
MPO	Shoamanesh et al. Neurology 2015
LpPLA2	Shoamanesh et al. Neurology 2015

- [0060] 상기 표 4는 표시한 바와 같이, 신규한 마커와 이전에 보고된 마커를 모두 열거한다. 일부 실시형태에서, 표 4에 열거된 마커 중 2 이상의 조합이 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법 또는 분석에서 사용된다. 일부 실시형태에서, 표 4에 열거된 마커 중 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 모두 16가지가 분석에서 함께 사용된다. 선택적으로, 이들 마커 중 모두 또는 서브세트는 본 명세서에 또는 다른 곳에 기재된 다른 마커와 함께 사용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 방법
- [0062] 본 명세서에서 무증상 뇌 허혈 및/또는 대사 증후군을 갖는 대상체를 치료하는 방법이 기재된다. 상기 방법은 2 이상의 SBI 마커 수준이 상승될 때 대상체에 아스피린 요법, 혈압 요법, 혈당 제어, 콜레스테롤 관리, 체중 관리 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0063] 본 발명은 대상체에서 무증상 뇌졸중을 진단하기 위해 대상체로부터 얻은 샘플에서 뇌혈관 상태를 모니터링하는 방법뿐만 아니라 무증상 뇌졸중, 뇌혈관 손상, 인지 손상 및/또는 대사 증후군을 예측하고/하거나 치료하고/하거나 모니터링하는 방법을 제공한다.
- [0064] 전형적인 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0065] (a) 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- [0066] (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- [0067] (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계;
- [0068] (d) 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 대상체에 대사증후군 및/또는 뇌졸중의 치료를 언급하는 단계.
- [0069] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 대상체를 대사 증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 치료하는 단계를 더 포함한다. 치료의 예는 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0070] 또한 대상체에서 무증상 뇌졸중을 모니터링하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0071] (a) 대상체로부터 얻은 샘플을 표 1 또는 표 2로부터 선택된 적어도 하나의 마커에 특이적으로 결합하는 시약과 접촉시키는 단계;
- [0072] (b) 상기 마커에 대한 결합 수준을 측정하는 단계;
- [0073] (c) 정상 대조군에 대해 마커의 측정된 양을 반영하는 상태 스코어를 부여하는 단계;
- [0074] (d) 상태 스코어가 1보다 유의하게 더 크다면, 대상체를 대사증후군 및/또는 뇌졸중에 대해 치료하는 단계;
- [0075] (e) 단계 (a) 내지 (c)를 반복하는 단계; 및
- [0076] (f) 상태 스코어가 1에 대한 경향이 없을 때 치료를 조절하는 단계.
- [0077] 또한 치료가 필요한 대상체에서 무증상 뇌졸중 및/또는 대사증후군을 치료하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:
- [0078] (a) 표 1로부터 선택된 적어도 하나의 마커 수준을 측정하는 단계;

- [0079] (b) 마커 수준이 상승될 때, 대상체에게 아스피린 요법, 혈압 요법, 체중 관리, 및/또는 식이요법과 운동 프로그램을 투여하는 단계.
- [0080] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 마커는 C-X-C 모티프 케모카인 5(CXCL5) 및/또는 C-X-C 모티프 케모카인 6(CXCL6)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 마커는 IGFBP2를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 측정은 표 1의 마커 중 적어도 2가지에 대해 수행된다. 다른 실시형태에서, 단계 (a)의 측정은 표 1 및/또는 표 2의 마커 중 적어도 3가지에 대해 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 표 3의 마커를 측정하는 단계를 더 포함한다.
- [0081] 전형적인 실시형태에서, 샘플은 CSF 샘플, 소변 샘플, 혈액 샘플 또는 다른 체액이다. 본 명세서에 기재된 방법에서 사용을 위해, 샘플의 대표적인 예는 혈액, 혈장 또는 혈청, 타액, 소변, 뇌척수액, 우유, 자궁경부 분비액, 정액 및 다른 체액을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0082] 대상체는 전형적으로 포유류 대상체, 예컨대, 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 수의학적 대상체, 예컨대, 애완동물 또는 다른 반려 동물이다.
- [0083] 상기 방법은, 예를 들어, 면역분석 기법, 예컨대, 효소 면역분석을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자에게 이해될 것인 바와 같은 다른 분석이 사용될 수 있다.
- [0084] 키트 및 분석 표준
- [0085] 본 발명은 본 명세서에 기재된 시약의 세트, 예컨대, 본 발명의 하나 이상의 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 및 선택적으로, 본 발명의 시약을 함유하는 하나 이상의 적합한 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 시약은 본 발명의 하나 이상의 마커에 특이적으로 결합하는 분자를 포함한다. 시약의 한 가지 예는 마커에 특이적인 항체이다. 시약은 선택적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지는 형광, 발광, 효소, 색소생산성 또는 방사성일 수 있다.
- [0086] 본 발명의 키트는 선택적으로, 별개로 또는 다른 시약과 함께 분석 표준 또는 분석 표준의 세트를 포함한다. 분석 표준은 건강한 개체를 나타내는 주어진 마커에 대한 정상 발현의 기준 수준을 제공함으로써 정상 대조군으로서 작용할 수 있다.
- [0087] 키트는 단백질을 검출을 위한 항체에 추가로 대안의 유전자 발현 산물의 검출을 위한 프로브를 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로 완충제를 포함할 수 있다.
- [0088] 일 실시형태에서, 키트는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3의 발현 산물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 포함한다. 전형적으로, 키트는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3 중 적어도 2가지에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트의 항체 또는 프로브는 CXCL5, CXCL6, IGFBP2 및/또는 ITGB3 중 적어도 3가지 또는 선택적으로 4가지 모두에 특이적으로 결합한다. 선택적으로, 키트는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10까지의 추가적인 발현 산물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브를 더 포함할 수 있다. 추가적인 발현 산물은 본 명세서의 표 2, 3 또는 4로부터 선택될 수 있다. 선택적으로, 추가적인 산물은 관심 대상의 다른 마커일 수 있다.
- [0089] 실시예
- [0090] 본 발명에 예시하기 위해 그리고 이를 제조하고 이용함에 있어서 당업자를 돕기 위해 다음의 실시예를 제시한다. 본 실시예는 본 발명의 범주를 달리 제한하기 위한 임의의 방법으로 의도하지 않는다.
- [0091] 실시예 1: 대사 증후군을 갖는 마우스에서 미세혈관 복잡성 및 내피세포 유전자 발현의 극적인 변경
- [0092] 본 실시예는 뇌 미세혈관에 대한 대사 증후군 효과를 기재하고, 이들 변화를 조절하는 분자 메커니즘을 밝힌다. 마우스에서 이 증후군은 비만, 상승된 콜레스테롤 및 손상된 글루코스 내성에 의해 나타나는 인간 병태를 모방한다. 이런 무리의 증상은 뇌졸중(6배), 특히 무증상 뇌졸중의 위험을 크게 증가시킨다. 무증상 뇌졸중은 뇌 백질을 손상시키며, 장애, 치매 및 사망을 야기한다.
- [0093] 방법
- [0094] 대사 증후군을 유도하기 위해 유전자이식 마우스(Tie2-Cre:플록스-중단(flox-stop) tdtomato + 플록스-리보 태그(RiboTAG))에 지방식으로부터 60%Cal을 공급하였다. 대상체는 2개월령에 12주 동안 고지방식을 공급하였고, 지방식으로부터 10%Cal을 대조군으로서 사용하였다. Tie2-Cre:플록스-중단 tdtomato 마우스의 내피세포에서 수

용체 유전자 발현에 의해 백질에서의 뇌 혈관구조의 용적을 평가하였다. 리보태그 리보솜 면역침전 기법(Tie2-Cre:플록스-리보태그)을 이용하여 뇌 내피세포로부터의 전사체를 단리시켰다. 리보솜 연관 전사체 단리 후에, RNA-seq를 수행하였다.

[0095] 결과

[0096] 식이요법-유도 비만은 다음의 표에 나타내는 바와 같이 대사 증후군 혈청학적 프로파일을 생성한다.

[0097]

식이요법	총 콜레스테롤	HDL	트라이글리세라이드	LDL	글루코스	HgbA1c
대조군 (n=3)	110.7	56.0	88.7	37.0	162.0	5.6
고지방(n=3)	187.3* *p<0.007	68.3*	96.0	99.7*	373.3*	6.6

[0098]

대사증후군은 거대혈관($30 \pm 2.2\%$, $P < 0.04$)과 미세 혈관($23 \pm 3.7\%$, $P < 0.01$) 둘 다에서 백질 혈관 용적의 유의한 감소를 야기한다. 백질 내피세포의 전사 프로파일링은 정상 마우스와 대사 증후군을 갖는 마우스 사이에 발현 프로파일의 차이를 나타낸다. 내피세포 유전자 발현의 유의한 변화(실시예 2 참조)는 혈관형성 수용체 리간드에서의 변화를 통해 대사증후군이 있는 백질에서의 혈관의 감소된 용적과 관련된다.

[0099]

대사증후군은 백질에서 거대혈관 및 미세혈관의 용적을 감소시키며, 내피세포 유전자 발현을 유의하게 변화시킨다. 이들 발견은 뇌졸중을 포함하는 뇌 미세혈관 합병증을 예방하기 위해 대사증후군을 갖는 환자에 대한 분자적 치료 접근을 개발하도록 한다.

[0100]

실시예 2: 뇌 내피 혈관 손상의 마커에 대한 면역분석

[0101]

이 실시예는 실시예 1에 기재한 '대사 증후군'을 생성하는 비만의 마우스 모델을 이용한다. 이런 비만의 마우스 모델에 의한 새로운 유전자식 마우스 기법을 이용하여, 본 발명자들은 비만 및 이런 통상적인 대사 장애 상황에서 생기는 초기 뇌 혈관 손상의 일련의 분자 지표를 동정하였다. 다수의 이들 유전자는 혈액에서 분비되는 단백질 백질을 암호화하며, 따라서 초기 뇌 혈액 손상을 표시하기 위해 사용될 수 있다.

[0102]

이는 뇌 내피 혈액 혈관 손상을 표시하는 본 명세서에 기재된 내피 데이터 세트에서 분비된 분자에 대한 멀티스팟 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA)의 개발을 유도하였다.

[0103]

방법

[0104]

환자 혈장의 샘플을 연속 희석시키고 나서, 마이크로타이터 플레이트의 개개 웰에 피펫팅하였다. 본 발명자들의 독특한 비만-유도 뇌 내피 유전자 중 5 내지 10가지에 대해 생성된 신규한 항체를 주로 형광 지표로 표시한다. 비중복 형광 지표를 갖는 4개까지의 상이한 항체를 각각의 환자 샘플과 함께 제대로 인큐베이션시킨다. 플레이트를 반복해서 세척하여 비특이적 결합을 제거하고, 이어서, 다중채널 형광 분광광도계에서 스캐닝하고 나서, 각각의 웰에 대한 각각의 채널의 형광 강도를 기록한다. 프로파일의 모든 분자를 측정할 때까지 이 접근을 반복한다. 모든 표적에 대해 누적 형광 강도를 평균내고, 규범적 값과 비교한다.

[0105]

이하는 내부 대조군으로서 작용하는 일부 이전에 동정된 분자를 포함하는, 이 분석에서 사용할 수 있는 마커의 목록이다. 표 1 분자는 바람직한 분자이며, 각각은 무증상 뇌혈관 손상의 독립적 마커로서(예를 들어, 단독으로 사용됨) 작용할 수 있다. CXCL5 및 CXCL6은 실험 연구에서 독립적인 예측 능력을 입증하였다. 표 2 분자는 본 명세서에 기재된 무증상 뇌졸중의 지표로서 사용하기 위한 혈청에서 검출될 수 있는 병에 걸린 내피 및 뇌혈관 손상과 관련된 추가적인 마커를 포함한다. 표 3 분자는 본 명세서에 기재된 무증상 뇌졸중의 지표로서 사용하기 위한 혈청에서 검출될 수 있는 병에 걸린 내피 및 뇌혈관 손상과 관련된 추가적인 공지된 마커를 포함한다. 이들 마커 조합물의 사용은 단일 분석 시약의 사용 이상으로 추가적인 진단 정확도를 제공할 것이다. 마커의 패널은 종단적 예측치를 제공하고, 다양한 약학적 또는 생활양식 개입에 의해 조절될 수 있다.

[0106]

[표 1]

단백질 약어	완전한 명칭
CXCL5 (ENA-78)	C-X-C 모티프 케모카인 5
CXCL6 (GCP-2)	C-X-C 모티프 케모카인 6
IGFBP2	인슐린-유사 성장인자-결합 단백질 2
ITGB3 (CD61)	인테그린, 베타 3 (혈소판 당단백질 IIa)
IL-17B	인터류킨-17-B

[0107]

[0108] [표 2]

단백질 약어	완전한 명칭
IL-17A	인터류킨-17-A
GDF-15	성장/분화 인자 15
FGF-23	섬유아세포 성장 인자-23
CCL2/MCP-1	케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2

[0109]

[0110] [표 3]

단백질 약어	완전한 명칭
IL-6	인터류킨-6
TNF-알파	종양 괴사 인자-알파

[0111]

[0112] 실시예 3: 뇌 내피 혈관 손상의 마커에 대한 개발

[0113] 본 실시예는 소 혈관 뇌혈관 질환(small vessel cerebrovascular disease: SVD)의 신규한 뇌 내피 바이오마커의 동정을 야기하는 연구를 기재한다. 비만, 고혈압, 고지혈증 및 당뇨병은 모두 백질 손상의 유병률을 증가시키며, 뇌 미세혈관 내에서 변경된 신호전달에 상승적으로 기여한다. 또한, 이들 만성 병태에 의해 뇌 미세혈관에서 활성화된 정확한 분자 경로는 알려지지 않은 채로 남아있다. 이런 지식 격차를 처리하기 위해, 비만/대사 증후군의 마우스 모델에서 백질 내의 뇌 내피의 세포-특이적 전사 프로파일을 동정하기 위해 신규한 번역 접근을 이용하였다. 세포-특이적 Cre-loxP 유전자이식 모델링과 조합하여 주요 리보솜 단백질이 혈구응집소 항원에 의해 유전자 변형되는 리보태그 유전자이식 기술을 이용하여, 뇌 내피의 전사 프로파일이 단리될 수 있다. 이 비편향 접근은 만성 혈관 병태, 예컨대, 비만, 글루코스 불내성 및 고지혈증(이들 모두 SVD와 직접적으로 관련됨)의 제1의 직접적인 그리고 단리된 뇌혈관 특징을 동정한다. 새로운 SVD 바이오마커를 합리적으로 동정하기 위한 이런 모델링 접근을 이용하여, 실시예는 혈청에서 검출될 수 있는 분비된 분자 및 세포 표면을 포함하는 비만-유도 뇌혈관 특징을 동정한다.

[0114] 병에 걸린 뇌 내피 내에서 상향조절된 주요 유전자의 경로 분석은 혈전증(ITGB3), 알츠하이머병(IGFBP2) 및 염증 신호전달(CXCL5)에 대한 직접적인 연결을 나타내며, 이에 의해 만성 혈관 위험을 알츠하이머 및 혈관 치매와 직접적으로 연결한다. 분비될 가능성이 있는 것 또는 혈류에 보관된 세포 표면 분자를 동정하기 위해 상향 조절된 유전자(충분히 낮은 위발견율(false discovery rate)을 가짐, 또는 FDR<0.1)의 목록을 추려내었다(표 1 참조). 표 5는 mRNA 수준에 의해 검출된 바와 같이 상향조절된 유전자를 열거한다. LogFC는 mRNA 검출에서 변화 차이 배수의 log 전환을 지칭한다. 이 목록으로부터, 분비될 가능성이 있고 인간 혈청에서 이전에 검출된 적이 있는 유전자를 선택하였다.

표 5

[0115]

유전자	명칭	LogFC
Itgb3	인테그린 베타 3	10.65
Ttc21a	테트라트라이코펩타이드 반복부 도메인 21a	13.06
Foxm1	포크헤드 박스 M1	11.62
Odf21	정자 꼬리 2-유사의 외부 치밀 섬유	12.00
Cxcl5	케모카인 리간드 5	11.67
Igfbp2	인슐린-유사 성장인자 결합 단백질 2	6.96
Gnpda2	글루코사민-6-인산염 데아미나제 2	6.87

[0116] 본 발명자들은 상향 조절된 질환이 있는 내피 마커 중 하나가 마우스에서 분비되고, 대사 증후군이 있는 마우스의 뇌로부터의 안구 뒤 혈액 배출에서 상향조절된다는 것을 확인하였다(도 1). 따라서, 이들 데이터는 뇌 내피가 혈류에서 측정될 수 있는 질환 특징을 생산할 수 있다는 것을 입증한다.

[0117] 실시예 4: 인간에서 뇌 내피 혈관 손상의 마커 검출

[0118] 이런 뇌 내피 분자 특징의 적절성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 프리서퍼(Freesurfer)를 이용하여 백질의 낮은 강도의 볼륨에 의해 색인된 바와 같은 다양한 정도의 백질 질환을 갖는 UCSF MAC(기억 및 노화 센터(Memory and Aging Center))로부터의 15명의 인지적으로 정상인 대상체에서 CXCL5 및 CXCL6(마우스 CXCL5에 대한 인간 오솔로그)의 수준을 결정하였다. 적어도 경증의 SVD를 갖는 대상체에서, 백질 낮은 강도 볼륨과 본 발명자들의

신호전달 인자는 본 발명자들의 작은 샘플에서조차 유의도에 접근하였다(CXCL5=.56에 대한 스피어만 로 (Spearman rho); CXCL6=.57; p 's < .10). CXCL5 및 CXCL6 데이터를 나타내는 산점도를 도 2에 나타낸다. 이들 데이터는 이들을 이용하는 것의 번역 타당성이 최근에 내피세포 수준에서 뇌 미세혈관 질환을 반영하는 인간 바이오마커로서 마우스에서 뇌 내피 분자를 발견하였다는 것을 입증한다.

[0119] CXCL5 및 CXCL6은 CXC 수용체 2에 결합하는 케모카인 리간드의 ELR 패밀리에 속한다. 이들 분자는 손상 부위에 대한 호중구 호밍에서 어떤 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 따라서, 손상 부위에서 세포에 의해 상향 조절된다. 최근 몇 년에, 정확한 메커니즘이 공지되어 있고 호중구 이동의 조절보다는 면역조절 역할을 수반할 가능성이 있지만, 분자는 둘 다 죽상동맥경화증과 SVD 위험 인자 둘 다의 발병 및 진행과 관련되었다. 케모카인의 CXC 패밀리에, 특히 CXCL5는 전혈관형성 특성을 갖는 것으로 나타났고, 따라서 혈관신생에 대한 독특한 뇌 SVD 신호를 제공할 수 있다.

[0120] 인테그린 알파-V/베타-3(ITGB3)은, 1차 기능이 가용성 피브리노겐에 결합하고, 이에 의해 혈소판을 활성화시켜 혈전증을 야기하는 다기능 내피 수용체이다. 피브리노겐 수준의 증가는 백질 병변 및 혈관 치매와 관련된 것으로 이미 확립되었다. 그러나, 혈청 피브리노겐 수준은 매우 다양한 자극에 의해 변형될 수 있고, 이전에 동정된 OR은 낮기 때문에(<2), 피브리노겐에 대한 잠재적 리간드로서 뇌 내피 ITGB3의 동정은 혈청 피브리노겐 수준보다 더 큰 민감도를 갖는 바이오마커를 야기할 가능성이 있을 것이다.

[0121] 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질-2(IGF-BP2)는 혈청에서 다른 단백질과 복합체화되고 인슐린-유사 성장 인자(IGF)의 반감기를 조절하는 작용을 하는 펩타이드 호르몬이다. IGF-BP2는 또한 전혈관형성 특성을 가질 수 있다. IGF-BP2는 이전에 알츠하이머병 및 연령-특이적 인지 감퇴에서 피질 위축과 관련되었다. 백질 병변에 대한 그의 관련은 연구하지 않았다.

[0122] 본 발명자들은 최근에 사고 뇌졸중 및 SVD에 대한 GDF-15 혈청 수준의 영향을 평가하기 위해 프래밍햄 심장 연구(Framingham Heart study)로부터의 3374 뇌졸중 및 무치매 개체의 거의 12년에 걸쳐 종단적 후속조치를 수행하였다. 전통적인 심혈관 위험 인자, 예컨대, B-형 나트륨 이뇨 펩타이드에 대한 조절 후에, 고 민감도 C-반응성 단백질 및 소변 알부민 수준, 더 높은 GDF-15 수준을 시각 기억 검사에 대해 악화된 성능(GDF-15에 대해 Q4 대 Q1에 대한 $\beta = -0.62$, $p=0.009$) 및 더 큰 log-전환된 백질 고강도 볼륨(Q4 대 Q1에 대한 $\beta=0.19$, $p=0.01$)과 횡단적으로 관련된다. 이 증거는 GDF-15가 초기 SVD에 대한 우수한 마커일 수 있지만, 이 가설을 시험하기 위한 종단적 연구는 수행되지 않았다는 것을 시사한다.

[0123] 순환 염증 인자: 본 발명자들의 실험실 및 다른 곳으로부터의 사전 작업은 잘 연구된 사이토카인 유사 C-반응성 단백질(CRP) 및 인터류킨-6(IL-6)이 SVD와 관련된다는 증거를 제공한다.

[0124] 본 발명자들은 이제 내피 기능의 더 직접적인 마커로서 작용할 수 있는 사이토카인 및 케모카인을 연구 중이다. 단핵구 화학주성 단백질(CCL-2; MCP-1)은, 예를 들어, 내강으로부터 그들이 거품 세포를 형성하는 내피하 공간으로 단핵구의 혈구누출을 야기하고, 죽상경화반 형성을 야기하는 지방 도말 형성을 개시함으로써 혈관 질환의 발생에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 발명자들은 종단적 3T 구조 MRI를 갖는 131명의 기능적으로 무손상인 노인 대상체(평균 연령=72.7)를 연구하였다. MCP-1은 중규모 브이플렉스(Mesoscale vplex) 케모카인 패널을 이용하여 혈장에서 측정하였다. 본 발명자들은 백질 무결성의 일반적 마커로서 뇌량의 총 용적을 사용하였고, 본 발명자들의 주된 의존적 변수는 뇌량 용적의 변화 비율을 연간으로 환산하였다. 연령 및 두개내 용적에 대한 다중 회귀 통계를 이용하여, 본 발명자들은 더 고수준의 MCP-1이 시간에 따른 뇌량 용적의 더 가파른 감소와 관련된다는 것을 발견하였다. 이들 데이터는 뇌혈관 건강에서 내피-특이적 염증 분자의 가능한 역할을 뒷받침한다.

[0125] 본 발명자들은 초기 SVD에 대한 민감도를 개선시키고 SVD 진행의 예측자로서 작용할 수 있는 뇌 내피 기능장애의 몇몇 중요한 단백질체학적 마커를 동정하였다.

[0126] 실시예 5: 인지 장애 및 소 혈관 허혈성 질환과 마커의 연관

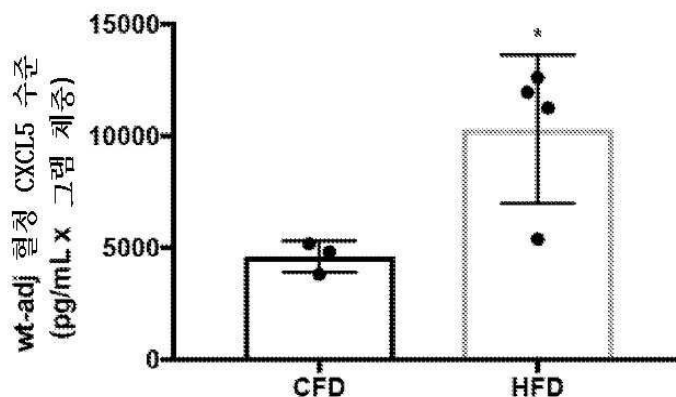
[0127] 본 실시예는 인지 장애와 표 1에 열거한 마커의 연관을 뒷받침하며, 또한 무증상 뇌졸중의 영상화 증거와 마커 IGFBP2의 연관을 뒷받침한다. 이들 초기 손상 혈청 지표는 또한 소 혈관 허혈성 질환(SVID)으로서 지칭되는 뇌 소 혈관 질환(CSVD)의 영상화 지표와 상관관계가 있다.

[0128] 선행 연구로부터 레가시(Legacy) 혈청 샘플을 얻어서, 혈관 질환의 상대적으로 낮은 부담을 갖는 65명의 대상체의 작은 서브코호트를 선택하였다. 대상체는 선로 잇기 검사(Trail Making Test)에 대한 트레일 A 수행, 시주의 신경심리검사 및 숫자 검사 수행, 단기간 기억 평가 도구를 이용하여 인지적으로 표현형화하였다.

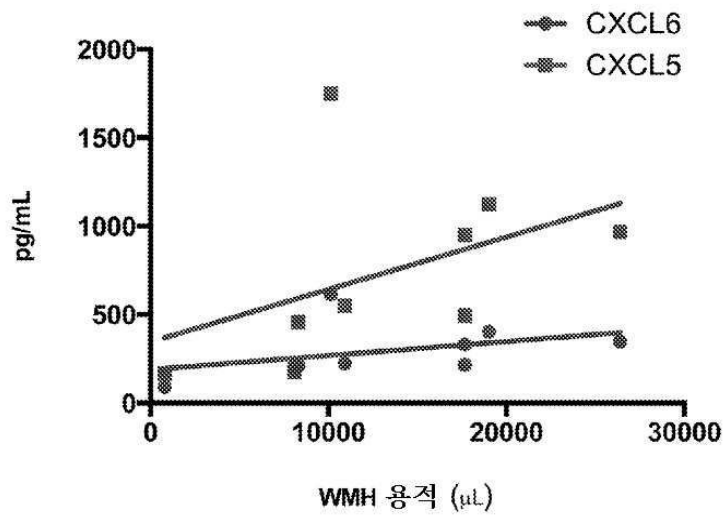
- [0129] CXCL5 및 CXCL6의 혈청 수준과 트레일 A 수행 간에 유의한 상관관계를 발견하였다(도 3). 트레일 A 수행(도 4)과 숫자 검사 수행 둘 다에서 500pg/ml 미만 대 500pg/ml 초과 CXCL5 혈청 수준을 갖는 대상체 간에 유의한 차이를 또한 발견하였다(도 5).
- [0130] 최근의 뇌졸중 환자 연구는 (이전의 24시간 이내) 급성 신경학적 증상을 갖는 6개월의 기간에 걸쳐 응급부서에 제출된 18세 이상의 동의 환자를 포함하였다. 변형된 파제카스 스코어링을 이용하여 축 T2-가중치 부여된 유체-감쇠 역전 회복(FLAIR) 영상에 대해 백질 고강도를 측정하였다. 초기에 등록된 202명의 대상체 중에서 168명만이 MRI를 촬영하였다. 이들(MRI 촬영) 중에서, 100명은 급성 허혈성 뇌졸중을 검출한 확산 강조 영상에 대해 부정적이었다. 이들 100명의 대상체 중에서, 42명은 뇌졸중/TIA의 영상에 대한 증거를 나타낸 반면, 58명은 뇌졸중의 증거를 나타내지 않았다. 도 6은 백질 병변의 측정인 파제카스 스코어를 나타내는 막대 그래프를 도시한 도면.
- [0131] 도 7 및 도 8은 건강한 대조군에서의 플레이트 간에(도 7) 그리고 대상체 간에(도 8) 관찰된 변이 계수(CoV)를 분석하는 기술적 검증의 결과를 도시한 도면. 이들 도면은 샘플 변화에 대한 샘플 수준을 나타낸다.
- [0132] 도 9는 약하게 상관관계가 있는 파제카스 스코어(FS)의 함수로서 혈청 미엘로페록시다제(MPO) 수준을 나타낸다. 도 10에 나타내는 바와 같이, IGFBP2 혈청 수준은 FS 스코어와 유의하게 상관관계가 있었다.
- [0133] 이들 결과는 혈청 마커, 예컨대, CXCL5/6 및 IGFBP2가 무증상 뇌졸중을 검출하기 위해 사용될 수 있다는 것을 확인한다. 이들 분석은 뇌졸중 및 다른 유해한 결과의 내피 질환의 위험을 감소시키기 위한 조기 치료를 가능하게 할 수 있다.
- [0134] 본 출원의 전체를 통해서 다양한 간행물이 언급되어 있다. 이들 간행물의 개시내용은 본 발명이 속하는 기술 상태를 더 완전하게 기재하기 위해 본 출원에 그들의 전문이 참고로 편입된다.
- [0135] 당업자라면 앞서 언급한 설명에 개시된 개념 및 구체적 실시형태가 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위한 다른 실시형태를 변형하거나 또는 설계하기 위한 기반으로 용이하게 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 당업자라면 또한 이러한 동등한 실시형태가 첨부하는 청구범위에 제시된 본 발명의 정신과 범주로부터 벗어나지 않는다는 것을 인식할 것이다.

도면

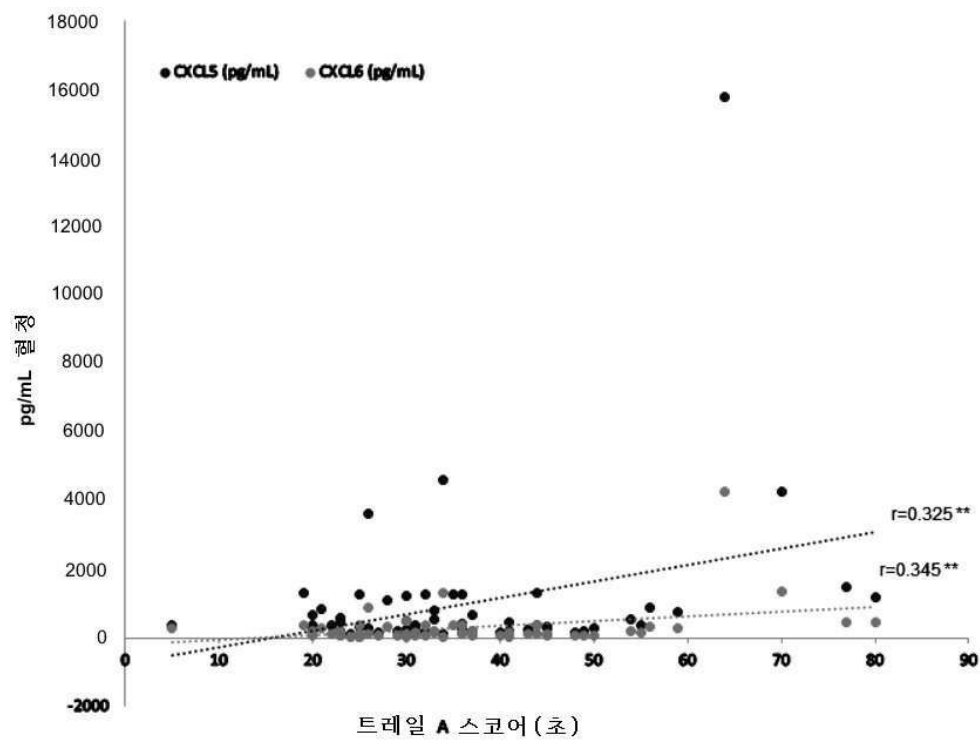
도면1



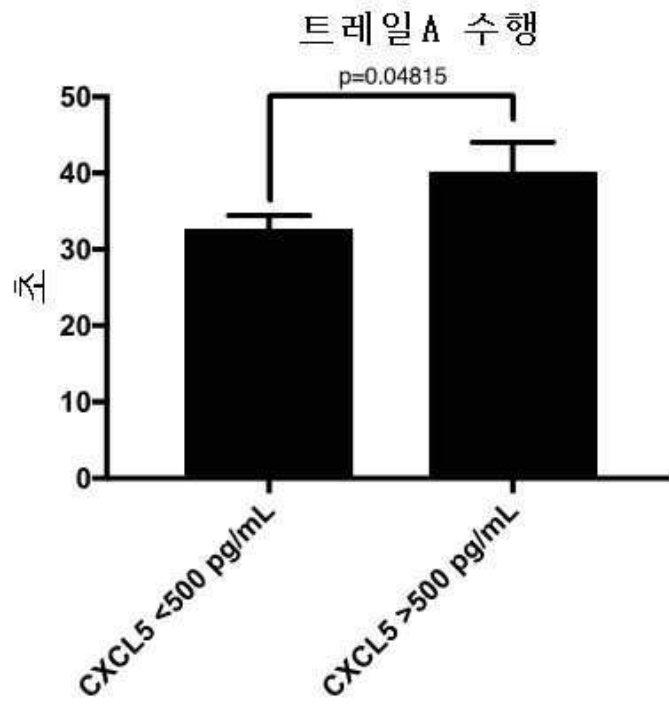
도면2



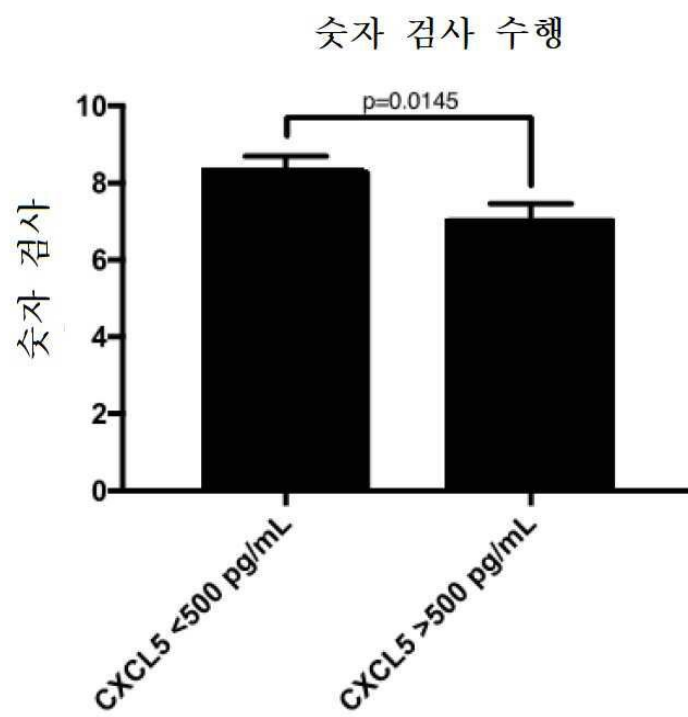
도면3



도면4

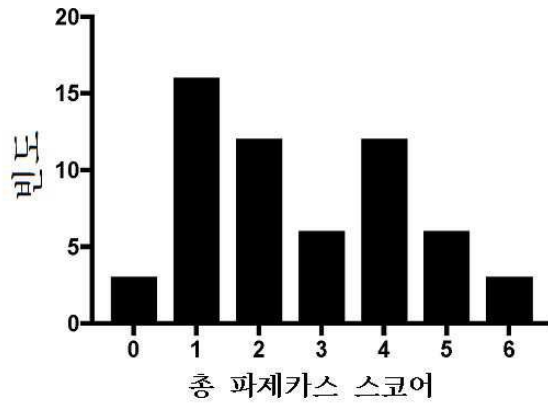


도면5

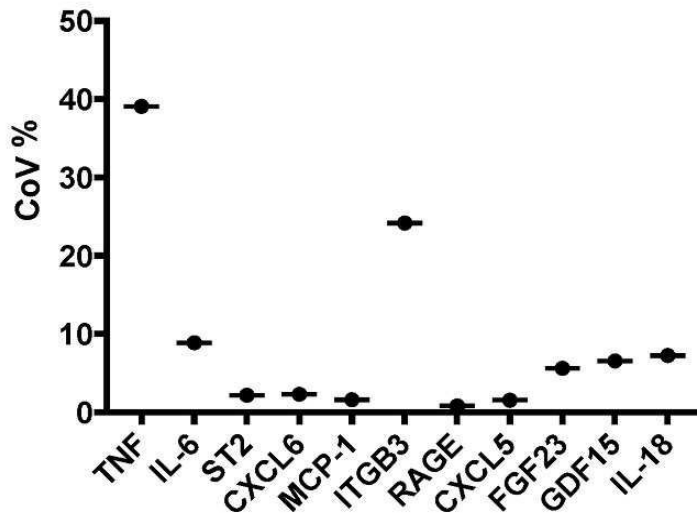


도면6

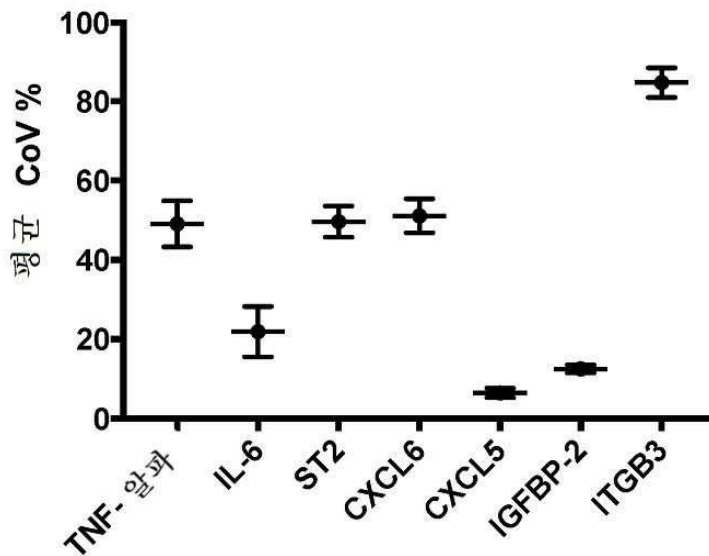
파제카스 스코어의 분포(모방 코호트)



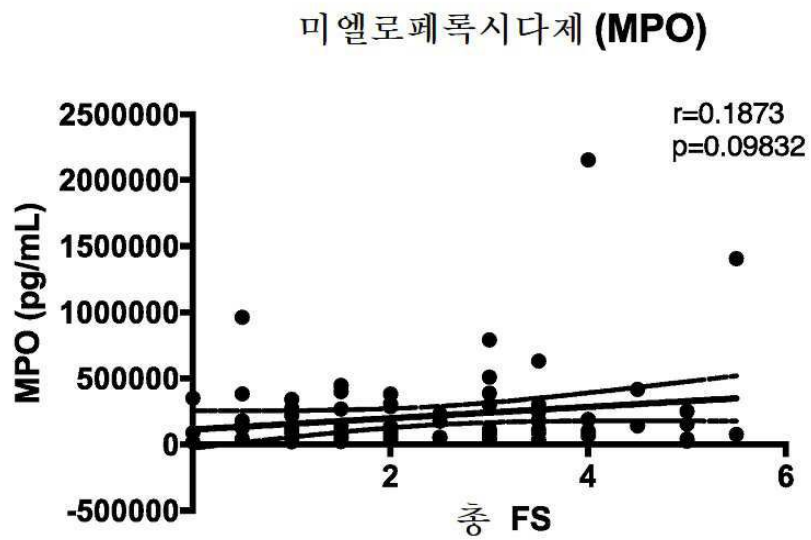
도면7



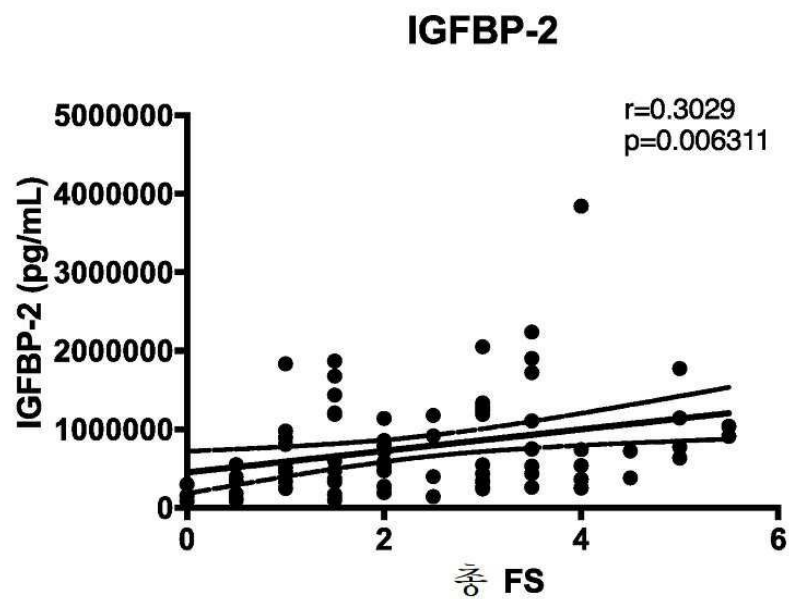
도면8



도면9



도면10



专利名称(译)	无症状性脑缺血的血清学分析		
公开(公告)号	KR1020190117555A	公开(公告)日	2019-10-16
申请号	KR1020197024715	申请日	2018-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	더리전트오브더유니버시티오브캘리포니아		
发明人	하인만 제이슨 디. 샤오 관씨		
IPC分类号	G01N33/68 A61B5/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 A61B5/0042 A61B5/055 A61B5/4064 A61B5/4836 G01N33/53 G01N2333/4745 G01N2333/521 G01N2333/70557 G01N2800/2871 G01N2800/52 A61B5/0071 A61P9/10 C07K14/522 G01N2800/04 G01N33/5091 G01N33/6869		
优先权	62/461161 2017-02-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于检测或监视静默性脑缺血 (SBI) 和脑血管健康状况的方法。本文所述的测定试剂和方法提供了脑微血管疾病的特异性指标, 使临床医生能够识别有发生SBI风险的患者。一种治疗患有沉默性脑缺血和/或代谢综合征的受试者的方法, 包括当所述两种或多种SBI标志物的水平升高时, 向所述受试者施用阿司匹林疗法, 血压疗法, 体重管理和/或饮食和运动计划。本文描述的是由暴露于慢性血管危险因素 (包括肥胖, 高脂血症, 高血压和葡萄糖耐受不良) 的脑内皮细胞产生的分子。由脑内皮细胞产生的这些应激分子可在血清中检测到, 并作为脑特异性内皮细胞损伤的诊断指标, 并与静默中风和认知功能受损的MRI指标相关。

