

명세서

발명의 명칭: 중추 신경계 염증성 질환 환자에서 MOG-IGG를 검출하기 위한 세포 기반 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 시료로부터 MOG-IgG를 검출하기 위한 방법으로서, (a) MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; (b) MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염(transfection)시키는 단계; (c) 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약(selection drug)이 포함된 배지에서 배양하여 안정한 형질 감염 세포주를 선별하는 단계; (d) 상기 선별된 세포주와 MOG-IgG를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 함께 인큐베이션하는 단계; (e) 인큐베이션이 완료된 시료에 형광-결합된 2차 항체를 첨가하여 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체를 형성시키는 단계; 및 (f) 상기 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체로부터 형광을 검출 또는 분석하는 단계를 포함하는 방법; MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법; MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단용 조성물; 및 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 자가 항체의 혈청 상태(Serostatus)는 자가면역 질환을 비롯한 광범위한 신경계 질환에서 중요한 진단 기준이다. 수초 회소돌기아교세포 당 단백질(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)을 기질로 사용한 세포 기반 분석(cell-based assay, CBA)의 개발은 다양한 탈수초성 표현형을 갖는 MOG-IgG 양성 환자를 확인하였다. 소아 및 성인의 급성 파종성 뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), 발작, 뇌염(Encephalitis), 아쿠아포린 4(aquaporin 4, AQP4)-IgG 음성 시신경척수염범주질환(NMOSD), 시신경염(optic neuritis, ON), 척수염 및 뇌간 뇌염에서는 MOG-IgG가 존재하였다. 한편 MOG-IgG는 다발성경화증(multiple sclerosis, MS) 환자에게는 존재하지 않았으므로, 다발성경화증과 비-MS 중추 신경계(CNS) 탈수초성 장애를 구별하는 것으로 생각되었다. 또한, MS와 MOG-IgG 관련 질환의 환자들 사이에는 임상적, 방사선학적, 병리학적 및 예후적으로 차이가 있다. 최근 연구에 따르면, MOG-IgG의 지속적인 양성은 면역 요법에도 불구하고 임상적 재발과 관련이 있는 반면, 혈청 음성으로의 전환은 임상적 재발을 초래하지 않았다. 게다가, 혈청학적 소견 및 다른 실험적 접근들은 MOG-IgG가 병원성일 수 있음을 제안하였다. 그럼에도 불구하고, 아직까지 MOG-IgG 관련 질병의 스펙트럼은 완전히 정의되지 않은 상태이다. 따라서, 특정 자가항체를 식별하기 위한 민감하고 매우 특이적인 분석법의 개발은 임상 표현형, 질병 코스 및 예후를

정확하게 정의하여 MOG-IgG 관련 질병의 전체 스펙트럼을 기술하는데 있어 중요하다.

[4]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 하나의 목적은, MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 구축하고 이를 MOG-IgG를 포함할 것으로 예상되는 중추 신경계(CNS) 염증성 질환 환자로부터 분리된 시료와 반응시킨 후, MOG-IgG 특이적으로 결합하는 형광-결합된 2차 항체를 첨가하여 이로부터 형광을 검출 또는 분석함으로써, 혈액 또는 혈청 등 시료로부터 MOG-IgG를 검출하고 나아가 MOG-IgG 관련 질병의 전체 스펙트럼을 밝히기 위함이다.
- [6] 본 발명의 다른 하나의 목적은 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하기 위함으로, 상기 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환은 AQP4-IgG 음성 시신경척수염범주질환(NMOSD), 급성 파종성 뇌척수염(ADEM), 척수염(Myelitis), 뇌염(Encephalitis) 또는 시신경염(ON)일 수 있다.
- [7] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) MOG를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; (b) MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염시키는 단계; 및 (c) 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약이 포함된 배지에서 배양하는 단계에 의해 제조되는, MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 포함하는 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단용 조성물을 제공하기 위함이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단 방법을 제공하기 위함이다.

[9]

기술적 해결방법

- [10] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [11] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 시료로부터 MOG-IgG를 검출하기 위한 방법으로서, MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염(transfection)시키는 단계; 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약(selection drug)이 포함된 배지에서 배양하여 MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 선별하는 단계; 상기 선별된 세포주와 MOG-IgG를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 함께 인큐베이션하는 단계; 인큐베이션이

완료된 시료에 형광-결합된 2차 항체를 첨가하여 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체를 형성시키는 단계; 및 상기 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체로부터 형광을 검출 또는 분석하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [12] 본 발명에서 "MOG(myelin oligodendrocyte glycoprotein)"는 중추 신경계(CNS)에서 신경의 수초화에 중요한 역할을 하며, 이는 미엘린초(myelin sheath)의 표면과 희소돌기아교세포의 형질막에 분포하는 당단백질이다. MOG를 기질로 하는 세포 기반 분석(cell-based assay, CBA)의 발달에 따라 다양한 중추 신경계(CNS) 염증성 질환에서 MOG-면역글로불린 G(immunoglobulin G antibody, IgG), 즉 MOG-IgG가 관련이 있음이 알려져 있다. 본 발명에서의 MOG는 전장 인간 MOG (Full-length MOG, FL-MOG)로, 본 발명에서 상기 MOG를 코딩하는 핵산은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [13] 본 발명에서 "안정한 형질 감염 세포주"는 상기 FL-MOG를 발현하는 안정한 세포주(stable cell line)을 의미하는 것으로, MOG를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염(transfection)시키는 단계; 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약(selection drug)이 포함된 배지에서 배양하여 MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주(MOG-HEK293)를 선별하는 단계를 통해 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 형광 단백질은 EGFP, GFP, YFP, DsRed2, Tdtomato 또는 mCherry일 수 있고, 상기 발현 벡터는 pIRES2-EGFP 또는 pIRES-DsRed2 벡터일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 MOG가 클로닝된 발현 벡터는 pIRES2-EGFP 벡터에 서열번호 1로 표시되는 염기서열에 의해 코딩되는 전장 인간 MOG (FL-MOG)가 클로닝된 것일 수 있다. 또한, 상기 형질 감염의 대상이 되는 세포는 mammalian cell, 즉 HEK(human embryonic kidney) 293, HeLa, CHO (chinese hamster ovary) 또는 NIH3T3 세포일 수 있으며, 상기 선별 시약은 히그로마이신(Hygromycin), 푸로마이신(puromycin), 블라스티사이드(blasticidi), 또는 G418(geneticin)일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 본 발명의 일 실시예에서는, FL-MOG/pIRES2-DsRed2 플라스미드로부터 전장 인간 MOG (Full-length MOG, FL-MOG) cDNA를 분리하고, 이를 pIRES2-EGFP 벡터의 XhoI 및 SmaI 부위로 클로닝한 후 이를 Lipofectamine 2000 시약을 사용하여 HEK293 세포에 형질감염시켰으며, 이후 선별 시약으로 G418을 함유하는 배지를 통해 안정한 형질 감염 세포주를 선별하였으며, 여기서 FL-MOG cDNA를 추출 또는 분리하고 발현 벡터에 클로닝하는 과정은 통상의 기술자가 당업계에 알려진 방법을 적절히 선택하여 수행할 수 있다.
- [14] 한편, 상기 FL-MOG를 발현하는 안정한 세포주는 시료 내 MOG-IgG를 검출하고 나아가 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환을 진단하기 위한 것으로, 본 발명에서 상기 "시료"는 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환 환자로부터 분리되었거나, MOG-IgG를 포함하는 것으로 예상되는 환자로부터

분리된 척수액, 혈액 또는 혈청을 의미할 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈액 또는 혈청을 의미할 수 있다. 상기 시료는 당업계의 통상의 기술자가 필요에 따라 적절한 비율로 희석하여 사용할 수 있다.

- [15] 본 발명에서 "MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환"은 다양한 탈수초성 표현형을 갖는 MOG-IgG 양성 환자에서 나타날 수 있으며, 구체적으로는 AQP4-IgG 음성 시신경척수염범주질환(neuromyelitis optica spectrum disorder, NMOSD), 급성 파종성 뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), 척수염(Myelitis), 뇌염(Encephalitis) 또는 시신경염(optic neuritis, ON)을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [16] 본 발명에 있어서 상기 FL-MOG를 발현하는 안정한 세포주를 상기 분리된 혈액 또는 혈청과 함께 인큐베이션 한 후, 인큐베이션이 완료된 시료에 형광-결합된 2차 항체를 첨가함으로써 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체를 형성시킨다. 본 발명에서 상기 "형광-결합된 2차 항체"는 MOG 또는 MOG-IgG에 대한 세포 기반 분석(CBA)을 위한 것으로, 상기 2차 항체는 특히 항-인간 IgG (H+L)일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 MOG-IgG에 특이적으로 결합하는 2차 항체로서 형광-결합된 IgG (H+L)을 사용하는 경우 CBA-IF 및 CBA-FACS 결과 사이에 강한 양의 상관 관계가 있고, 기존의 IgG1 (Oxford) CBA-IF와 비교하여서도 약 98 %의 높은 일치율을 나타냄을 확인하였으며, 특히 형광-결합된 IgG (H+L)을 사용하는 경우 IgM과 교차반응(cross reaction)을 나타내지 않아 보다 특이도가 높고 명확한 형광 신호를 얻을 수 있는 장점이 있음을 확인하였다.
- [17] 본 발명에서 "형광을 검출 또는 분석"하는 단계는, 이에 특별히 제한되는 것은 아니나, 면역 형광법(immunofluorescence assay, IF) 또는 유세포 분석(flow cytometry assay, FACS)을 수행하는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, MOG-HEK293 세포에 대해 3개의 상이한 2차 항체, Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgG (H+L), Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgG1-Fc, Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgM를 사용하여 CBA-IF(NCC-CBA)를 수행하였으며, CBA-FACS를 통해 3개의 상이한 2차 항체(항-인간 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM)의 MOG에 대한 특이도 및 민감도를 측정하였다.
- [18]
- [19] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, MOG를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염시키는 단계; 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약이 포함된 배지에서 배양하여 MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 선별하는 단계; 상기 선별된 세포주와 MOG-IgG를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 함께 인큐베이션하는 단계; 인큐베이션이 완료된 시료에 형광-결합된 2차 항체를 첨가하여 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체를 형성시키는 단계; 및 상기 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체로부터 형광을 검출 또는 분석하는 단계를

포함하는, MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 용어 'MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환'은 전술한 바와 같다.

- [20] 다양한 탈수초성 표현형을 갖는 MOG-IgG 양성 환자에게서 시신경척수염범주질환(NMOSD), 급성 파종성 뇌척수염(ADEM), 척수염(Myelitis), 뇌염(Encephalitis) 또는 시신경염(ON)을 비롯한 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환이 나타날 수 있는바, 상기 방법을 통해 시료 내 MOG-IgG의 존재 여부 및 수준 등을 확인함으로써 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [21] 구체적으로, 상기 FL-MOG를 발현하는 안정한 세포주와, MOG-IgG를 포함할 것으로 예상되는 시료를 함께 인큐베이션하고 MOG-IgG에 특이적으로 결합하는 2차 항체를 첨가할 시, MOG-IgG가 시료 내 존재할 경우 FL-MOG 및 MOG-IgG 결합에 의해 세포막 주변에 적색 형광이 관찰되며, 시료 내 MOG-IgG가 존재하지 않을 경우 적색 형광이 관찰되지 않는 것을 통해 시료 내 MOG-IgG의 유무를 확인할 수 있으며, 나아가 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환을 갖는 환자 집단의 MOG-IgG 발현 수준 및 임상 표현형, 질병 코스, 예후를 분석하고 환자군의 분류 등에 활용될 수 있다.
- [22]
- [23] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, MOG를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염시키는 단계; 및 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약이 포함된 배지에서 배양하는 단계에 의해 제조되는, MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 포함하는 MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단용 조성물을 제공한다. 상기 용어 'MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환'은 전술한 바와 같다.
- [24]
- [25] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, MOG를 코딩하는 핵산을 형광 단백질 발현 벡터에 클로닝하는 단계; MOG가 클로닝된 상기 발현 벡터를 세포에 형질 감염시키는 단계; 상기 형질 감염된 세포를 선별 시약이 포함된 배지에서 배양하여 MOG를 발현하는 안정한 형질 감염 세포주를 선별하는 단계; 상기 선별된 세포주와 MOG-IgG를 포함하는 것으로 예상되는 시료를 함께 인큐베이션하는 단계; 인큐베이션이 완료된 시료에 형광-결합된 2차 항체를 첨가하여 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체를 형성시키는 단계; 및 상기 MOG-IgG 및 2차 항체 결합체로부터 형광을 검출 또는 분석하는 단계를 포함하는, MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환의 진단 방법을 제공한다. 상기 용어 'MOG-IgG 관련 중추 신경계 염증성 질환'은 전술한 바와 같다.
- [26]

발명의 효과

- [27] 본 발명에서는 MOG-IgG에 특이적으로 결합하는 2차 항체로서 형광-결합된 IgG (H+L)을 사용하는 경우 CBA-IF 및 CBA-FACS 결과 사이에 강한 양의 상관 관계가 있고, 기존의 IgG1 (Oxford) CBA-IF와 비교하여서도 약 98 %의 높은 일치율을 나타냄을 확인하였으며, 특히 본 발명의 방법은 MOG를 발현하는 안정한 세포주(stable cell line)를 제작함으로써 반복적인 형질 감염(transfection)이 요구되지 않으며, 2차 항체 IgM과 교차반응(cross reaction)을 나타내지 않아 특이도가 높고 보다 명확한 형광 신호를 얻을 수 있는 장점이 있다.

[28]

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1의 A 및 B는 각각 FL-MOG로 형질 감염된 hMOG-HEK293 세포주에 대해 웨스턴 블롯 및 유세포 분석법으로 형질 감염 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 1의 C 내지 E는 각각 대조군(HC), MOG-IgG 음성 및 양성 환자 혈청에 대해 2차 항체로 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM를 처리한 경우 형광 신호를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 2의 A는 CNS 염증성 질환 환자 및 대조군(HC)의 혈청에 대해 각각 2차 항체 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM를 사용하여 CBA-FACS를 수행한 결과를 나타내며, 도 2의 B는 IgG (H+L), IgG1-Fc에 대한 각각의 ROC 곡선 및 MFI 비율에 대한 곡선 아래 면적(AUC)을 계산한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 3은 다양한 CNS 염증성 질환 환자에 대해 ROC 곡선에서 최적의 컷오프를 계산하고, 각 질환별 MFI 비율의 분포를 나타낸 것이다.
- [32] 도 4는 40명의 MOG-IgG 혈청 양성 환자의 IF 점수 및 MFI 비율로부터 CBA-IF 점수와 CBA-FACS의 상관 관계를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 5의 A 및 B는 각각 FL-MOG로 형질 감염된 FL-MOG + HEK293 세포주 및 EV-형질 감염된 HEK293 세포주에서 형광 신호를 관찰한 결과, 및 2차 항체 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM를 사용하여 CBA-FACS를 수행한 결과를 나타낸 것이다.

[34]

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[36]

[37] **실시예 1: 실험방법**

[38] **1-1: 환자군**

[39] 국립암센터(NCC)에서 CNS 염증성 질환으로 진단된 355명의 환자 및 대조군(HC)으로 25명의 건강한 사람의 혈청을 사용하였다. 환자군 355명의 인구

통계는 표 1에 나타내었으며, 이들의 혈청 상태는 in-house CBA에 의해 평가되었다. 환자군에는 CNS 염증성 질환을 앓고 NCC에서 치료받은 환자들 중 무작위로 선정된 333명과, IgG1 Oxford CBA(Oxford-CBA)에 의해 이전에 MOG-IgG 양성으로 확인된 22명의 환자가 포함되었다.

[40] [표1]

최종 추시 진단	환자수	남성:여성	샘플링 시 평균 연령	샘플링 시 평균 유병 기간	MOG-IgG 양성 환자 수
AQP4 양성 NMOSD	65	11:54	37 (13-67)	43 (14-73)	0/65 (0%)
AQP4 음성 NMOSD	37	9:28	41 (12-72)	29 (0-351)	4/37 (10.8%)
다발성경화 증	111	34:77	32 (16-65)	24 (0-286)	0/111 (0%)
단일 또는 재발성 척수염	52	32:20	40 (14-74)	18 (0-196)	7/52 (13.5%)
단일 또는 재발성 시신경염	16	6:10	34 (15-63)	2 (0-87)	6/16 (37.5%)
종양성 탈수초화 또는 ADEM-유사 증상을 포함한 다른 탈수초성 질환	55	23:32	34 (7-61)	7 (0-325)	24/55 (43.6%)
다른 신경계 질환	19	11:8	49 (21-68)	6 (0-212)	0/19 (0%)

[41]

[42] 105명의 환자에서 3개의 상이한 2차 항체(항-인간 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM)의 특이도 및 민감도를 유세포 분석으로 평가하였고, 2차 항체의 특이도 및 민감도는 10명의 환자에서 CBA-IF에 의해 확인되었다. NCC CBA-IF(NCC-CBA) 및 Oxford-CBA-IF의 일치는 125명의 환자(22명의 MOG-IgG 혈청 양성 환자

포함)에서 평가되었다. 모든 참가자로부터 수집된 혈청은 -80°C에 저장하였으며, NMOSD 및 MS의 진단은 각각 2015년 국제 NMOSD 진단 패널 기준 및 2010년 맥도날드 기준을 기반으로 하였다.

[43]

[44] **1-2: MOG-HEK 293 세포 제작**

[45] 전장 인간 MOG (Full-length MOG, FL-MOG) cDNA를 FL-MOG/pIRES2-DsRed2 플라스미드로부터 분리하고 pIRES2-EGFP 벡터(Clontech, Mountain View, CA, USA)의 XhoI 및 SmaI 부위로 클로닝 하였다. 모든 서열은 자동 시퀀싱에 의해 확인되었다. 이후 클로닝된 FL-MOG 플라스미드 또는 빈 벡터 플라스미드를 Lipofectamine 2000 시약(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 Human Embryonic Kidney 293(HEK293) 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)에 형질 감염시켰다. 48시간 후, 세포를 2 mg/mL G418(Invitrogen)을 함유하는 배지로 나누고, 2주 후에 G418-내성 세포를 분리한 후 한계 희석법에 의해 추가로 클로닝 하였다. 각각의 안정적인 형질 감염체 클론을 유세포 분석을 사용하여 녹색 형광 단백질(GFP) 발현에 대해 스크리닝 하였다. GFP-양성 세포에서 FL-MOG 단백질 발현은 항-MOG 항체(Santacruz, Dallas, TEXAS, USA)를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 확인되었다.

[46]

[47] **1-3: MOG-IgG 세포 기반 간접 면역 형광 분석 (CBA-IF)**

[48] CBA-IF는 MOG-HEK293 세포에 대해 3개의 상이한 2차 항체, Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgG (H+L) (PBS로 1:2000으로 희석됨), Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgG (Fcγ 단편 특이적, PBS로 1:750으로 희석됨), Alexa Fluor-594 결합된 염소 항-인간 IgM (PBS로 1:750으로 희석됨)를 사용하여 수행하였다. 비특이적 백그라운드 염색을 배제하기 위해 빈 벡터(EV)로 안정적으로 형질 감염된 HEK293 세포를 대조군으로 사용하였다. 각 실험은 이중으로 수행되었으며, 혈청 양성(seropositivity)은 환자의 임상적, 실험적 정보 및 서로의 결과에 대해 알지 못하는 2명의 연구자에 의해 결정되었다. 표면 면역 형광의 강도를 아래 표 2와 같이 점수를 매겼고, 최종 점수는 2명 또는 3명의 연구자로부터의 판독값의 중간값이다. 1 이상의 IF 점수는 양성으로 간주되었으며 점수 0.5는 경계선으로 간주되었다.

[49] [표2]

IF 점수	설명
0	세포막 주위에 결합이 없거나 염색이 고리 형태로 세포막을 둘러싸지 않음
0.5	세포막 주위에 약한 결합이 있으나, 가시 세포 ~ 50 %의 전체 막을 둘러싸지 않음
1	가시 세포 > 50 %에서 고리 형태로 전체 막을 둘러싸는, 선명하지만 약한 결합
2	가시 세포 > 75 %에서 전체 막을 둘러싸는, 선명하고 적당한 밝기를 나타냄
3	가시 세포 > 90 %에서 양성 대조군의 밝기와 유사한, 선명하고 밝은 결합
4	가시 세포 > 90 %에서 양성 대조군보다 강한, 매우 밝은 결합

[50]

[51] **1-4: 세포 기반 유세포 분석 (CBA-FACS)**

[52] HEK293 세포를 수확하고 염색 버퍼(0.5 % 소 혈청 알부민이 보충된 2 mM EDTA-1X PBS)에서 세척하였다. 2×10^5 세포를 얼음상의 96웰 U-bottom 플레이트(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 30분 동안 환자 혈청(염색 버퍼로 1:40으로 희석됨, $200 \mu\text{l}$)과 배양하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 알로피코시아닌(allophycocyanin) 결합된 염소 항-인간 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, PA, USA; PBS로 1:2000으로 희석됨) 또는 피코에리트린(phycoerythrin) 결합된 마우스 항-인간 IgG1 Fc (SouthernBiotech, 미국 버밍엄; PBS로 1:1000으로 희석됨) 또는 blue-violet 421 결합된 마우스 항-인간 IgM (BD Bioscience, CA, USA; PBS로 1:50으로 희석됨)과 함께 얼음 상에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 세척하고 $400 \mu\text{l}$ 의 차가운 PBS에 재현탁시킨 후, 획득 전에 viability dye 7-AAD(BD Biosciences, CA, USA; 샘플 당 $5 \mu\text{l}$)를 세포에 첨가하여 죽은 세포를 배제시켰다. FACSVerse에서 총 10,000개의 세포를 획득하고, Flow Jo 소프트웨어(TreeStar, Ashland, OR, USA)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 결합은 평균 형광 강도(MFI)로 표현하였으며, MFI 비율은 MOG-형질 감염된 HEK293 세포의 MFI를 EV-형질 감염된 HEK293 세포의 MFI로 나눈 값에 의해 결정하였다.

[53] CBA-IF를 기준 표준으로 사용하여, MOG-IgG 혈청 양성 반응을 결정하기 위한 MFI 비율의 유용성을 결정하기 위해 ROC(Receiver-operating characteristic) 곡선 분석을 사용하였다. ROC 곡선 분석을 통해 가장 높은 특이도 및 민감도의 최적 컷오프를 결정하였다. 특이도는 [(AQP4-IgG 양성 NMOSD, MS 및 기타 신경계

질환 (OND) 환자 중 MOG-IgG 음성의 수) / 총 AQP4-IgG 양성 NMOSD, MS 및 OND 환자의 수] x 100으로 계산되었다.

[54]

[55] 실시예 2: 실험결과

[56] **2-1: In-house MOG-IgG CBA-IF**

[57] In-house CBA-IF를 구축하기 위해 FL-MOG로 안정적으로 형질 감염된 HEK293 세포를 사용하였고, 웨스턴 블롯 및 유세포 분석법에 의해 성공적인 형질 감염을 확인하였으며, 형광 수준은 형광 현미경에 의해 측정되었다(도 1의 A 및 B).

[58] 이전의 연구에서는 특히 MS 환자 샘플에서 IgG 항체와 IgM 항체의 교차 반응성으로 인해, MOG-IgG를 검출하기 위한 항-인간 IgG (H+L) 2차 항체의 사용 시 낮은 특이도에 대한 우려가 있었다. 한편, IgG Fc 또는 IgM 2차 항체는 제한된 수의 샘플(n = 10; AQP4-IgG 음성 NMOSD 1명, 단일 또는 재발성 척수염 2명, 중양성 탈수초화 또는 ADEM-유사 증상(ODD)을 포함한 다른 탈수초성 질환 4명, 및 및 건강한 대조군 3명)과 함께 CBA-IF에 사용되었다.

[59] 그 결과, IgG (H+L)와 IgG Fc 사이의 형광에는 차이가 없었으며, 특히 IgM 2차 항체가 사용될 때 형광 신호가 보이지 않음을 확인하였다(도 1의 C 내지 E). 구체적으로, MOG-형질 감염된 세포의 세포질(cytosol)에서 녹색 형광이 관찰되었고, MOG-IgG를 포함하는 환자 혈청이 첨가되었을 때 MOG-IgG가 FL-MOG에 결합됨으로써 세포막 주위에서 적색 형광이 관찰되었다(도 1의 E). 한편, 환자 혈청에 MOG-IgG가 포함되어 있지 않은 경우 적색 형광이 관찰되지 않음을 확인하였다(도 1의 C 및 D).

[60]

[61] **2-2: MOG-IgG 혈청 상태**

[62] CNS 염증성 질환 집단으로부터 25명의 HC 및 355명의 환자(AQP4-IgG 양성 NMOSD 65명, AQP4-IgG 음성 NMOSD 37명, MS 111명, 단일 또는 재발성 척수염 52명, 단일 또는 재발성 시신경염(ON) 16명, ODD 55명, OND 7명)의 혈청 상태를 평가하였다. 환자 355 명의 특성 및 MOG-IgG 혈청 양성률은 표 1에 나타내었다. 총 355명의 환자 중, 41/355명 (11.5%)이 혈청 양성 반응을 나타내었는데, AQP4-IgG 음성 NMOSD 환자 4/37명 (10.8 %), 단일 또는 재발성 척수염 환자 7/52명 (13.5 %), 단일 또는 재발성 ON 6/16명 (37.5 %) ODD 환자 24/55명 (43.6 %)가 혈청에 MOG-IgG를 갖는 것으로 확인되었다. 또한, AQP4-IgG 양성 NMOSD, MS, OND 환자 183명 및 건강한 대조군 샘플 중 어느 것도 MOG-IgG에 대해 양성인 41명의 환자들은 모두 MOG-IgG 관련 질환의 알려진 임상 스펙트럼 내의 임상 표현형을 나타내었다.

[63] 여성 대 남성의 비율은 28:13 이었으며, 질병 발병 시의 평균 연령은 28세(범위: 3 내지 60세)였다. 발병 시 임상 표현형에는 시신경염(37%), 척수염(29%), 뇌의 염증병변(brain attacks, 24%) 및 다 구역 침범(poly-regional involvement, 10%)이

포함되었다. 평균 유병 기간인 78개월(범위: 3 내지 298개월) 동안, 10명의 환자는 단발성(monophasic)이었고, 31명의 환자는 재발하였다: 26/41명(63 %)의 환자는 적어도 한번의 뇌침범(brain attack)을 경험하였으며, 23/41명(56 %)의 환자는 적어도 하나의 시신경염 attack, 20/41명(49 %)의 환자는 적어도 하나의 척수염 attack을 경험하였다. 뇌의 염증병변(brain attacks) 환자 26명 중 17명(65 %)은 ADEM 유사 병변이 있었고, 7명(27 %)의 환자가 플러피(fluffy)한 뇌간 병변이 있었으며, 2명(8 %)의 환자는 피질 병변이 있었다. 척수염 환자 20명 중 13명(65 %)에서 종단광범위 횡단성척수염(longitudinally extensive transverse myelitis)이 관찰되었으며, 시신경염 환자 23명 중 8명(35 %)이 양측성 침범(bilateral involvement)을 보였다. 마지막 추적 관찰에서, 25/41명(61 %)의 환자에서 동시 또는 연속적인 다 구역 침범이 관찰되었다. 이 환자들에서 가장 흔한 임상적 증상은 시신경염과 뇌의 염증병변(brain attacks)의 조합(12/25명, 48 %)에 이어 척수염과 뇌의 염증병변의 조합(7/25명, 28 %), 시신경염과 척수염(3/25명, 12 %)의 조합으로 나타났다. 3명(12 %)의 환자는 시신경염, 척수염 및 뇌의 염증병변을 나타내었으며, 나머지 16명의 환자는 isolated 척수염(n=7), 시신경염(n=5) 및 뇌의 염증병변(n=4)과 같은 단독 임상적 증후군(isolated clinical syndrome)을 경험하였다.

[64]

[65] **2-3: CBA-FACS에 의한 혈청 양성의 측정**

[66] FL-MOG 안정한 세포주(stable cell line)에서 IgG (H+L)의 유용성을 추가로 확인하기 위해, CNS 염증성 질환 환자 중 105/355명(65/105명의 환자가 무작위로 선택되었고, 40명은 MOG-IgG 혈청 양성 환자) 및 HC 25명의 혈청에 대해 CBA-FACS를 사용하여 실험하였으며, 3개의 다른 2차 항체 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM이 사용되었다(도 2의 A). CBA-IF에 의해 발견된 105명의 환자의 혈청 상태는 MOG-IgG 혈청 양성 및 혈청 음성으로 분류되었고, 각 환자의 MFI 비율은 CBA-FACS에 의해 결정되었다. ROC 곡선 분석을 사용하여, IgG (H+L)의 MFI 비율에 대한 곡선 아래 면적은 1.00이고 IgG1-Fc는 0.97이었다(도 2의 B).

[67] 105명의 CNS 염증성 질환 환자의 혈청 양성을 검출하기 위해 ROC 곡선에서 최적의 컷오프를 계산하였으며, 항-인간 IgG (H+L) 및 IgG1-Fc 2차 항체에 대한 최적 컷오프는 각각 3.4 및 2.3이었다. 환자 105명의 최종 추시 진단(diagnosis at last follow-up) 및 각 환자군의 혈청 양성이 결정되었다(도 3). AQP4-IgG 양성 NMOSD, MS 및 OND를 가진 모든 환자는 MOG-IgG 음성이었다. 한편 항-인간 IgG1-Fc 2차 항체는 AQP4-IgG 혈청 양성 NMOSD 환자 1명 및 MS 환자 2명에서 MOG-IgG를 검출하였다(특이도 = 95%). HC 25명 모두의 혈청의 MFI 비율은 IgG (H+L) 및 IgG1-Fc 항체 모두에 대해 컷오프 미만이었으며, IgM 항체에 결합된 샘플은 없었다.

[68]

[69] **2-4: CBA-IF 점수와 CBA-FACS의 상관 관계**

[70] CBA-IF 점수는 전술한 바와 같이 결정되었고, CBA-IF 점수와 CBA-FACS 결과 사이의 상관 관계 또한 결정되었다. 40명의 MOG-IgG 혈청 양성 환자의 IF 점수는 다음과 같았다: 10명의 환자는 1점, 13명은 2점, 10명은 3점, 7명은 4점이었다. 항-인간 IgG (H+L) 2차 항체는 IgG1-Fc 2차 항체보다 CBA-IF 점수와 더 강한 양의 상관 관계를 나타내었다(도 4). (IgG (H+L): $r=0.87$, $p<0.0001$ vs IgG1-Fc: $r=0.81$, $p<0.0001$)

[71]

[72] **2-5: Oxford CBA-IF와 NCC CBA-IF의 높은 일치율**

[73] 분석 결과를 보다 더 검증하기 위해, 환자 125명(AQP4-IgG 양성 NMOSD를 가진 36명, AQP4-IgG 음성 NMOSD를 가진 13명, MS를 가진 27명, 단일 또는 재발성 척수염을 가진 21명, 단일 또는 재발성 시신경염을 가진 6명 및 ODD를 가진 22명)의 혈청 상태를 IgG1 (Oxford) CBA-IF와 비교하였다. 항-인간 IgG (H+L) 이차 항체를 (NCC) CBA-IF에 사용하였다. 그 결과, 두 가지 방법 모두 122/125명(98 %)의 샘플($\kappa=0.919$, $p<0.0001$)에 대해 일치하는 결과를 보였으며, 두 방법에서 모두 21/125명의 환자가 MOG-IgG 양성, 101/125명의 환자가 MOG-IgG 음성으로 확인되었다. 3/125명(2 %)의 환자는 오직 하나의 분석, (NCC) CBA-IF에서 2명, 그리고 (Oxford) CBA-IF에서 1명(표 3)에 대해서만 양성이었다. (NCC) CBA-IF에 의해서만 MOG-IgG 양성인 2명의 환자는 AQP4-IgG 음성 NMOSD 환자였다. 다른 하나의 샘플(환자 5)은 AQP4-IgG에 대해 강한 양성, (Oxford) CBA-IF에 의한 MOG-IgG에 대해 경계선 양성인 반면, AQP4-IgG에 대해서는 양성이고 (NCC) CBA IF에 의한 MOG-IgG에 대해서는 음성이었다.

[74] [표3]

		NCC-CBA		합계
		양성	음성	
Oxford-CBA	양성	21	1	22
	음성	2	101	103
합계		23	102	125

[75] ($\kappa=0.919$, $p<0.0001$)

[76]

[77] 또한, 본 발명자들은 MOG-형질 감염된 세포뿐만 아니라 (NCC) CBA-IF 및 CBA-FACS에 의해 EV-형질 감염된 세포에서도 양성 결합을 발견 하였다(도 5의 A 및 B). MOG-IgG 양성 결합은 항-인간 IgG (H+L) 및 IgG-Fc 2차 항체 모두에서 관찰되었다. MOG-IgG MFI 비율은 3가지 2차 항체(항-인간 IgG (H+L), IgG1-Fc 및 IgM) 모두에서 컷오프보다 낮았다(도 5의 B).

[78]

[79] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그

기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.