



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084435
(43) 공개일자 2020년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G16B 20/00 (2019.01)
G16B 25/00 (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G16B 20/00 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2018-0169490
(22) 출원일자 2018년12월26일
심사청구일자 2018년12월26일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이상호
서울특별시 송파구 양재대로 1218 218동 308호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
서정우
서울특별시 광진구 능동로44길 35 대원스마트빌 나동 201호(중곡동, 나동)
(74) 대리인
특허법인한얼

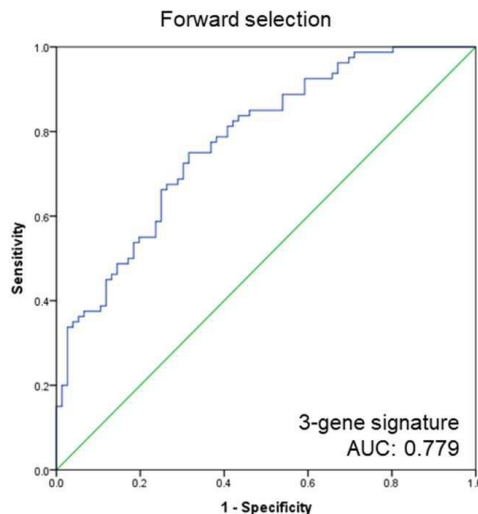
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신장이식 환자의 급성거부반응 진단용 miRNA 바이오 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 8종의 miRNA인 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 마커로 포함하는 신장이식 급성거부반응 진단용 마커 조성물, 상기 마커 조성물을 이용하여 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 상기 마커의 발현 수준을 측정하는 재제를 포함하는 진단용 조성물, 및 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p는 신장이식 급성거부반응 환자의 소변에서 높은 수준으로 존재하므로, 신장이식 급성거부반응을 비침습적인 방법으로 간편히 진단하는데 활용될 수 있다.

대표도 - 도4c



(52) CPC특허분류

G16B 25/00 (2019.02)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H13C1232

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료 기술개발 사업

연구과제명 이식 거부반응 및 장기생존 바이오마커를 이용한 신장이식 면역조절 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 마커로 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 마커 조성물.

청구항 2

신장이식 급성거부반응 의심 개체의 시료로부터 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 시료는 소변인 것인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 조합은 상기 8종 miRNA의 조합인 것인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,
상기 조합은 miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532의 조합인 것인, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,
상기 방법은 측정된 상기 8종의 miRNA 중 miR-4488 및 miR-4532의 발현수준이 정상 대조구 시료의 miRNA 발현수준보다 감소하는 경우, 신장이식 급성거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제2항에 있어서,
상기 방법은 측정된 상기 8종의 miRNA 중 miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p의 발현수준이 정상 대조구 시료의 miRNA 발현수준보다 증가하는 경우, 신장이식 급성거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 방법은 상기 miRNA 발현수준을 측정하여 수득한 결과를 신장이식 급성거부반응 진단과 연관시키는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 연관시키는 단계는 상기 miRNA의 발현수준을 측정하여 수득한 결과를 조합하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 결과의 조합은 선형 또는 비선형 회귀분석방법; 선형 또는 비선형 분류(classification) 분석방법; 분산분석(ANOVA) 방법; 신경망 분석방법; 유전적 분석방법; 서포트 벡터 머신 분석방법; 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법; 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘, 또는 커널 원리요소(Kernel principal components) 분석방법; 마코브 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법; RFE(recursive feature elimination) 분석방법; 전방 또는 후방 FS(floating search) 분석방법; 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 분석방법을 이용하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 결과의 조합은 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 결과의 조합은 8종 miRNA의 발현수준을 선형 또는 비선형 회귀분석방법으로 조합하여 얻어진, 하기 [수학식 1]의 회귀분석모델 형태로 표시되는 것인, 방법:

[수학식 1]

$$i) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.284 + (0.267 \times miR4488) + (-1.361 \times miR4532) + (1.544 \times miR21) + (0.015 \times miR223) + (1 \times miR31) + (-0.497 \times miR146a) + (0.3 \times miR373) + (0.146 \times miR210)$$

상기 식에서,

miR4488은 miR-4488의 발현수준을 나타내고,

miR4532는 miR-4532의 발현수준을 나타내며,

miR21은 miR-21-5p의 발현수준을 나타내고,

miR223은 miR-223-3p의 발현수준을 나타내며,

miR31은 miR-31-5p의 발현수준을 나타내고,

miR146a는 miR-146a-5p의 발현수준을 나타내며,

miR373은 miR-373-3p의 발현수준을 나타내고,
miR210은 miR-210-3p의 발현수준을 나타낸다.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 [수학식 1]의 회귀분석모델의 컷오프 값은 0.572로서, 상기 수학식 1에 8종의 miRNA의 발현수준을 적용하여 얻어진 결과값이 0.572 보다 높은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병할 것으로 예측할 수 있고, 상기 결과값이 0.572 보다 낮은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병하지 않을 것으로 예측할 수 있는 것인, 방법

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 결과의 조합은 miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532의 발현수준을 선형 또는 비선형 회귀분석방법으로 조합하여 얻어진 하기 [수학식 2]의 회귀분석모델 형태로 표시되는 것인, 방법:

[수학식 2]

$$ii) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.158 + (-1.103 \times miR4532) + (1.2 \times miR21) + (1.16 \times miR31)$$

상기 식에서,

miR4532는 miR-4532의 발현수준을 나타내고,

miR21은 miR-21-5p의 발현수준을 나타내며,

miR31은 miR-31-5p의 발현수준을 나타낸다.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 [수학식 2]의 회귀분석모델의 컷오프 값은 0.650으로서, 상기 수학식 2에 3종 miRNA (miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532)의 발현수준을 적용하여 얻어진 결과값이 0.650 보다 높은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병할 것으로 예측할 수 있고, 상기 결과값이 0.650 보다 낮은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병하지 않을 것으로 예측할 수 있는 것인, 방법.

청구항 16

miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 조성물.

청구항 17

miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 정량장치를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장이식 환자의 급성거부반응 진단용 바이오 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 8종의 miRNA인 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 마커로 포함하는 신장이식 급성거부반응 진단용 마커 조성물, 상기 마커 조성물을 이용하여 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법, 상기 마커의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 진단용 조성물, 및 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는 진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 면역체계는 세균이나 바이러스 등과 같이 신체에 침입하여 병을 일으키는 단백질 성분을 파괴시키는 작용을 한다. 그러나, 이러한 면역체계는 이식된 신장 조직과 세균 또는 바이러스 등의 이물질 단백질을 구분하지 못하여, 이식된 신장을 외부 침입물질로 간주하여 공격하게 된다. 이렇게 면역체계가 이식된 신장을 공격하는 과정을 신장이식 거부반응이라고 한다.

[0003] 신장이식 후의 급성거부반응은 일반적으로 무증상이지만, 방치하면 이식 신장의 기능 소실과 연관되어 이식 후 조기에 식욕 부진, 소변량 감소, 부종, 호흡 곤란 등 신장 기능 저하에 따른 요독관련 증상들이 발생할 수 있다. 따라서 이식 후 급성거부반응이 의심이 된다면, 생검(biopsy)을 통한 진단 및 치료가 권장되고 있다. 그러나, 조직을 직접 채취하는 생검은 비용, 시간 또는 회복 측면에서 환자의 부담이 가중되는 단점이 있으며, 또한 진단에 많은 시간이 필요함에 따라 급성거부반응으로 나타나는 경우에는 치료 시간이 절대적으로 부족하여 회복률을 향상시키기 어렵다는 문제점이 있었다.

[0004] 이에 따라, 신장이식 급성거부반응을 간편히 진단하는 다양한 방법이 개발되고 있으며, 그 예로 혈액에 포함된 특정 유전자의 발현 수준을 비교함으로써 신장 동종이식 거부반응을 진단하는 방법이 개발된바 있다(한국공개특허 제2011-0020853호). 그러나, 상기의 방법 역시 채혈의 불편함을 수반함에 따라, 이를 극복한 비침습적인 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이었다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 신장이식 환자에서 비침습적으로 급성거부반응을 진단하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 환자의 소변 내 엑소좀으로부터 유래된 miRNA가 급성거부반응 환자에서 그의 수준이 현저히 변화됨을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 마커로 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 마커 조성물을 이용하여 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마커의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA를 마커로 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 마커 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 용어, "신장이식 급성거부반응"은 특이적인 면역반응에 의해 이식된 신장이 붕괴되는 현상으로서, 이

식 후 약 1주일 내지 3개월 내에 발병한다는 점에서 수개월에서 수년 이후에 서서히 발병하는 만성거부반응과 구별된다.

- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 신장이식 환자의 급성거부반응을 진단하기 위하여 본 발명에서 새롭게 규명한 마커로서, miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 또는 miR-210-3p를 사용할 수 있다.
- [0014] 구체적으로, 상기 각 miRNA는 신장이식 급성거부반응 의심 환자의 소변 시료 내에 포함된, 이식된 신장세포에서 유래된 엑소솜 내에 포함된 miRNA가 될 수 있고, 상기 miRNA는 이식된 신장에서 나타나는 손상 및 상태를 반영하는 것으로 간주될 수 있으며, 본 명세서에서 상기 miRNA는 '바이오 마커' 또는 '바이오 마커 후보'로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0015] 상기 발굴된 miRNA의 효과를 검증하는 방법의 일 예를 다음과 같이 서술한다:
- [0016] 로지스틱 회귀분석 또는 FSS(forward stepwise selection) 방법을 사용하여 개발한 급성거부반응 진단/예측 모델(AR prediction model)에 상기 miRNA의 발현량을 대입한다. 이후, ROC(Receiver Operating Characteristic) 분석을 통해 얻어진 AUC(Area Under the Curve) 값을 cut-off point 값과 비교하고, 상기 miRNA의 민감도와 특이도를 확인함으로써, 상기 마커의 효과를 검증한다.
- [0017] 다른 양태로서, 본 발명은 신장이식 급성거부반응이 의심되는 개체의 시료로부터 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 용어, "개체"는 신장이식 급성거부반응이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0020] 상기 시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 신장이식 개체로부터 분리된 소변일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서, miRNA 발현수준을 측정하는 상기 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열 복제, 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA) 방법 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 본 발명에 따른 상기 8종의 miRNA의 염기서열은 NCBI 등의 데이터베이스에 공지된바, 당업자라면 상기 miRNA 발현수준의 측정에 요구되는 적절한 수단을 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 목적상, 상기 신장이식 급성거부반응 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 측정된 상기 8종의 miRNA 중에서 miR-4488과 miR-4532는 그의 발현수준이 정상 대조구 시료의 miRNA 발현수준보다 감소하는 경우, 신장이식 급성거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 나머지 6종의 miRNA(miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p)는 그의 발현수준이 정상 대조구 시료의 miRNA 발현수준보다 증가하는 경우, 신장이식 급성거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 이때, 상기 정상 대조구는 신장이식을 받은 개체 중에서 안정된 예후를 보이는 정상군일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 신장이식 후 급성거부반응이 발병된 환자의 소변 시료를 수집하여, 바이오 마커 개발용 시료 및 바이오 마커 검증용 시료로 구별하고, 상기 구별된 바이오 마커 개발용 시료를 사용하여 miRNA 형태인 8종의 거부반응 진단/예측용 바이오 마커(miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p)를 발굴하였다(도 2). 이어, 상기 발굴된 바이오 마커를 이용하여 2종의 거부반응 진단/예측 모델을 개발하였다(도 3a 및 3b). 끝으로, 상기 개발된 2종의 거부반응 진단/예측 모델을 이용하여 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로 거부반응을 예측하였다. 그 결과, 첫 번째 모델을 이용할 경우, AUC는 0.766 (95% CI, 694-839)를 나타내고, sensitivity는 67.5% 임을 확인하였으며, specificity는 69.7% 임을 확인하였고, 이의 cut-off point는 0.572 임을 확인하였다(도 4b). 또한, 두 번째 모델을 이용할 경

우, AUC는 0.779 (95% CI, 708-850)를 나타내고, sensitivity는 53.8% 임을 확인하였으며, specificity는 80.3% 임을 확인하였고, 이의 cut-off point는 0.650 임을 확인하였다(도 4c).

[0025] 상기 결과로부터, 본 발명에서 제공하는 8종의 miRNA는 신장이식에 따른 거부반응을 진단 또는 예측하기 위한 마커로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0026] 또한, 본 발명의 목적상, 상기 방법은 상기 각 miRNA의 발현수준을 정량분석한 결과를 신장이식 급성거부반응 진단과 연관시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 이때, 상기 연관시키는 단계는 상기 각 miRNA의 수준을 정량분석한 결과를 조합하여 수행될 수 있다. 즉, 상기 각 miRNA는 정상인 또는 안정된 예후를 보이는 신장이식환자의 소변에서도 검출되기 때문에, 상기 miRNA의 단편적인 수준만으로는 신장이식 급성거부반응을 진단하기가 용이하지 않을 수 있으므로, 상기 각 miRNA의 수준을 조합하여 분석함으로써, 보다 정확하게 신장이식 급성거부반응을 진단할 수 있다.

[0028] 이처럼, 상기 각 miRNA 수준을 정량분석한 결과를 조합하여 분석하는 방법으로는, 통상적인 통계분석방법을 사용할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 통계분석방법은 신장이식 급성거부반응을 진단할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 선형 또는 비선형 회귀분석방법(Lasso panelized logistic regression, Forward stepwise selection, Logistic regression, forward stepwise selection 등); 선형 또는 비선형 분류(classification) 분석방법; 분산분석(ANOVA) 방법; 신경망 분석방법; 유전적 분석방법; 서포트 벡터 머신 분석 방법; 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법; 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘, 또는 커널 원리요소(Kernel principal components) 분석방법; 마코브 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법; RFE(recursive feature elimination) 분석방법; 전방 또는 후방 FS(floating search) 분석방법 등을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0029] 또한, 상기 검출 결과의 조합은 상기 통계방법을 자동적으로 수행할 수 있는 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 수행할 수도 있다.

[0030] 상기 검출 결과의 조합의 구체적인 일 예로서, 상기 8종의 miRNA 전체의 발현수준을 선형 또는 비선형 회귀분석방법으로 조합하여 얻어진, 하기 [수학식 1]의 회귀분석모델이 될 수 있다.

[0031] [수학식 1]

$$i) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.284 + (0.267 \times miR4488) + (-1.361 \times miR4532) + (1.544 \times miR21) + (0.015 \times miR223) + (1 \times miR31) + (-0.497 \times miR146a) + (0.3 \times miR373) + (0.146 \times miR210)$$

[0032]

[0033] 상기 식에서,

[0034] miR4488은 miR-4488의 발현수준을 나타내고,

[0035] miR4532는 miR-4532의 발현수준을 나타내며,

[0036] miR21은 miR-21-5p의 발현수준을 나타내고,

[0037] miR223은 miR-223-3p의 발현수준을 나타내며,

[0038] miR31은 miR-31-5p의 발현수준을 나타내고,

[0039] miR146a는 miR-146a-5p의 발현수준을 나타내며,

[0040] miR373은 miR-373-3p의 발현수준을 나타내고,

[0041] miR210은 miR-210-3p의 발현수준을 나타낸다.

[0042] 상기 [수학식 1]의 회귀분석모델의 컷오프 값은 0.572로서, 상기 수학식 1에 8종의 miRNA의 발현수준을 적용하여 얻어진 결과값이 0.572 보다 높은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병할 것으로 예측할 수 있고, 상기 결과값이 0.572 보다 낮은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병하지 않을 것으로 예측할 수 있다.

[0043] 상기 검출 결과의 조합의 구체적인 다른 예로서, 3종 miRNA (miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532)의 발현수준을 선형 또는 비선형 회귀분석방법으로 조합하여 얻어진 하기 [수학식 2]의 회귀분석모델이 될 수 있다.

- [0044] [수학식 2]
- [0045] ii) $\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.158 + (-1.103 \times \text{miR4532}) + (1.2 \times \text{miR21}) + (1.16 \times \text{miR31})$
- [0046] 상기 식에서,
- [0047] miR4532는 miR-4532의 발현수준을 나타내고,
- [0048] miR21은 miR-21-5p의 발현수준을 나타내며,
- [0049] miR31은 miR-31-5p의 발현수준을 나타낸다.
- [0050] 상기 [수학식 2]의 회귀분석모델의 컷오프 값은 0.650으로서, 상기 수학식 2에 3종 miRNA (miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532)의 발현수준을 적용하여 얻어진 결과값이 0.650 보다 높은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병할 것으로 예측할 수 있고, 상기 결과값이 0.650 보다 낮은 경우에는 신장이식 후 급성거부반응이 발병하지 않을 것으로 예측할 수 있다.
- [0051] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 용어, "miRNA의 발현수준을 측정하는 체제"는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 miRNA를 증폭시킬 수 있는 체제를 의미한다. 구체적인 예로, 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업자라면 발명의 목적에 맞게 적절한 체제를 선택할 수 있을 것이다.
- [0053] 상기 체제는 상기 유전자의 발현 수준 측정을 위해 직접 또는 간접적으로 표시될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지에는 리간드, 비드(bead), 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광물질(fluorescer), 화학발광물질, 자성 입자, 합텐 및 염료 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 예로, 상기 리간드에는 바이오틴, 아비딘 및 스트렙토아비딘 등이 포함되고, 상기 효소에는 루시페라아제, 퍼옥시다아제 및 베타 갈락토시다아제 등이 포함되며, 상기 형광물질에는 플루오레세인, 쿠마린, 로다민, 피코에리트린 및 설포로다민산 클로라이드(텍사스 레드: Texas red) 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 검출 가능한 표지물로 공지의 표지물 대부분이 사용될 수 있고, 당업자라면 발명의 목적에 맞게 적절한 표지물을 선택할 수 있을 것이다.
- [0054] 상기 용어, '프라이머'는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 본 발명에서, 상기 miRNA 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머 서열은 상기 유전자의 miRNA의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.
- [0055] 상기 용어, '프로브'는 miRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는, 라벨링(labeling)된 핵산 단편 또는 펩타이드를 의미한다. 구체적인 예로, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브, 올리고펩타이드(oligonucleotide peptide) 프로브, 폴리펩타이드 프로브(polypeptide) 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0056] 또 다른 하나의 양태는 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA에 대한 정량장치를 포함하는, 신장이식 급성거부반응 진단용 키트를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 진단 키트에 포함된 정량장치는 상기 8종 miRNA의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다. 구체적인 예로, RT-PCR 키트일 수 있으나, miRNA의 발현량을 측정할 수 있는 한, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 이때, 상기 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는, 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너,

반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0059] 본 발명에 따른 miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p는 신장이식 급성거부반응 환자의 소변에서 높은 수준으로 존재하므로, 신장이식 급성거부반응을 비침습적인 방법으로 간편히 진단하는데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1a는 Nanostring nCounter system을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 11개 중 검출되지 않은 3개를 제외한 8개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 생물정보학 기법을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 10개 중 검출되지 않은 1개를 제외한 9개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1c는 문헌리뷰를 통해 발굴한 바이오 마커 후보 5개 중 검출되지 않은 2개를 제외한 3개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 8종의 miRNA (miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, and miR-210-3p)를 대상으로 ROC 커브를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 첫 번째 모델을 이용하여 108개의 바이오 마커 개발용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 두 번째 모델을 이용하여 108개의 바이오 마커 개발용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 260개의 바이오 마커 검증용 시료에서 실시예 4에서 도출된 8종의 miRNA를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 첫 번째 모델을 이용하여 260개의 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4c는 두 번째 모델을 이용하여 260개의 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 실시예 1: 생물정보학 기법을 이용한 신장이식 거부반응 진단용 바이오마커 후보의 발굴

[0063] 소변의 엑소솜에서 유래된 신장이식 거부반응 진단용 miRNA 바이오마커 후보는 생물정보학 기법에 기반한 두가지 방법을 사용하여 발굴하였다.

[0064] 실시예 1-1: 데이터베이스를 이용하는 방법

[0065] 먼저, miRNA 타겟 데이터베이스를 miRTarBase, TargetScan 및 microRNA 에서 다운로드 받았다. 상기 microRNA 와 TargetScan의 데이터베이스는 계산적 방법으로 예측된 타겟을 포함하고, 상기 miRTarBase의 데이터베이스는 실험적으로 확인된 타겟만을 포함하는 것으로 알려져 있다. 상기 데이터베이스를 사용하여 하나의 miRNA와 이에 대한 다수의 유전자로 구성된 복수개의 타겟 쌍 중에서, 가장 높은 score를 가진 타겟 쌍을 선발하여, 총 1,802 개의 miRNA에 대하여 1,110,357 개의 타겟 쌍을 1차 선발하였다.

[0066] 상기 1차 선발된 각각의 타겟 쌍에 대해서 각 miRNA 타겟 데이터베이스의 score를 표시하도록 통합하였는데, 해당 miRNA 타겟 데이터베이스에 없는 경우 score를 0으로 설정하고, microRNA와 TargetScan 둘 다 포함되어 있거나 miRTarBase에 포함된 타겟을 최종 타겟으로 선정하여, 1,760개의 miRNA에 대하여 405,092 개의 타겟 쌍을 2

차 선발하였다.

[0067] 상기 2차 선발된 타겟 쌍에 포함된 유전자를 대상으로 메타분석을 수행하여 $FDR < 0.1$ 과 $FC > 1.25$ 를 만족하는 중요 유전자 806개를 3차 선발하였다. 다만, 면역 형질 관련 HLA, Immunoglobulin 등의 유전자와 예측된 가상의 유전자는 제외하였다.

[0068] 상기 3차 선발된 유전자 중에서 신장 거부 반응의 중요 유전자에 해당하는 유전자를 선발하고자, 통계적 방법을 수행하였다. 대략적으로, Fisher test를 통하여 p-value와 odd ratio를 계산하고, multiple hypothesis test를 위해 p-value는 false discovery rate으로 변환하였다. 그 결과, $FDR < 0.05$ 인 바이오 마커 후보를 발굴하였다(표 1).

표 1

바이오 마커 후보							
miRNA	N1	N2	N3	N4	P	Odd	FDR
miR-335	177	629	2573	17254	4.742678e-12	1.887040	8.347113e-09
miR-124	88	718	1312	18515	6.228241e-06	1.729549	5.480852e-03
miR-146a-5p	34	772	357	19470	1.235519e-05	2.401762	7.248377e-03
miR-21-5p	54	752	706	19121	1.733904e-05	1.944757	7.629180e-03
miR-30a	98	708	1597	18230	5.357803e-05	1.580011	1.885947e-02
miR-7107	17	789	133	19694	8.118225e-05	3.190130	2.381346e-02

[0069]

[0070] **실시예 1-2: GSEA(Gene set enrichment analysis)를 이용하는 방법**

[0071] 상기 실시예 1-1의 메타분석에 사용된 4개의 데이터 셋(GSE9489, GSE25902, GSE36059, GSE50058)에 대한 MSigDB의 miRNA gene set (C3)을 이용하여 GSEA(Gene set enrichment analysis)를 수행하였다.

[0072] 그 결과, $FDR < 0.1$ 이하의 gene set은 GSE25902에서만 확인되었으므로, GSE25902에서 유의하게 발현수준이 높은 것으로 확인된 miRNA ($FDR < 0.1$) 중 높은 수준의 NES를 나타내는 바이오 마커 후보를 발굴하였다(표 2).

표 2

바이오 마커 후보						
miRNA	size	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
miR-186	230	-0.4363128	-1.67860	0.005952381	0.09981297	0.203
miR-324-3P	81	-0.4077800	-1.67639	0.020790020	0.09264262	0.207
miR-518A-2	178	-0.4638104	-1.67244	0.014170040	0.09074996	0.214
miR-154, MIR-487	55	-0.5133539	-1.67019	0.032653060	0.08558552	0.216
miR-373-3p	197	-0.4090277	-1.66033	0.003976143	0.08820397	0.230
miR-31-5p	61	-0.4981911	-1.65483	0.015936255	0.08674568	0.238

[0073]

[0074] 상기 실시예 1-1에서 발굴한 바이오 마커 후보 중에서 FDR 값이 낮은 5개의 miRNA(miR-335, miR-124, miR-146a-5p, miR-21-5p 및 miR-30a) 및 실시예 1-2에서 발굴한 바이오 마커 후보 중에서 miRNA가 명확히 규명된 5개의 miRNA(miR-186, miR-324-3P, miR-518A-2, miR-373-3p 및 miR-31-5p)를 생물정보학 기법을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보로 확정하였다.

[0075] **실시예 2: 환자의 선발**

[0076] 2013년 9월부터 2017년 3월까지 6개의 센터 (강동경희대학교병원, 경북대학교병원, 경희의료원, 삼성서울병원, 서울성모병원, 인제대백병원)에서 신장이식을 받은 615명의 신장 동종 이식 환자를 대상으로 말초혈액단핵구, 혈장, 혈청, 혈액 RNA, 소변 상층액, 소변 RNA 등 각각의 시료 758개를 수집하였고, ARTKT-1 (assessment of immunologic risk and tolerance in kidney transplantation) 연구를 통해 실험목적에 맞는 대상 환자들을 선택하였다.

[0077] 상기 선택된 환자의 시료 중에서 정상대조군 (정상신기능군(NP)과 장기생존 정상신기능군(LGS), n=48) 과 급성 거부반응군 (급성 세포매개거부반응군(acute TCMR)과 급성 항체거부반응군(acute ABMR), n=60)의 108개의 시료는 거부반응 소변 엑소좀 miRNA 바이오마커 개발에 사용하였다(표 3).

표 3

바이오 마커 개발용 시료

	NP	acute TCMR	acute ABMR	LGS	p value
환자 수 (n)	19	40	20	29	-
Age (years)	47.3 ± 9.8	47.6 ± 12.0	47.5 ± 9.1	57.4 ± 9.5	0.001
Sex (male, %)	11 (57.9)	25 (62.5)	14 (70.0)	8 (27.6)	0.009
이식경과일 (days)	190 ± 223	385 ± 510	833 ± 1485	5907 ± 2084	<0.001
ABO incompatible KT (n, %)	2 (10.5)	8 (20.0)	9 (45.0)	0 (0.0)	0.003
HLA mismatching (n)	3.5 ± 2.0	3.5 ± 1.5	3.9 ± 1.4	2.2 ± 1.4	0.005
Indication for renal biopsy					
Protocol biopsy (n, %)	18 (94.7)	11 (27.5)	3 (15.0)	0 (0)	
Elevated creatinine levels (n, %)	1 (5.3)	27 (67.5)	15 (75.0)	0 (0)	<0.001
Proteinuria (n, %)	0 (0)	2 (5.0)	2 (10.0)	0 (0)	
Not done (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	29 (100)	
eGFR (ml/min)	71.1 ± 15.6	37.2 ± 21.8	37.4 ± 18.0	74.1 ± 12.5	<0.001
Urine PCR (mg/g)	90 ± 43	801 ± 1228	1587 ± 2014	224 ± 360	0.003
Maintenance immunosuppression					
Steroid (n, %)	17 (89.5)	34 (85.0)	18 (90.0)	13 (44.8)	<0.001
Tacrolimus (n, %)	19 (100)	31 (77.5)	13 (65.0)	10 (34.5)	<0.001
Cyclosporine (n, %)	0 (0)	6 (15.0)	7 (35.0)	15 (51.7)	<0.001
Mycophenolate mofetil (n, %)	19 (100)	26 (65.0)	19 (95.0)	10 (34.5)	<0.001
mTOR inhibitor (n, %)	2 (10.5)	4 (10.0)	0 (0)	3 (10.3)	0.535
Donor information					
Age (years)	40.5 ± 15.1	48.6 ± 11.3	43.4 ± 10.5	32.9 ± 10.1	<0.001
Sex (Male, %)	12 (63.2)	25 (62.5)	9 (45.0)	16 (55.2)	0.534
Deceased donor (n, %)	8 (42.1)	22 (55.0)	3 (15.0)	4 (13.8)	<0.001

[0078]

[0079]

나머지 650개의 시료 중에서 정상신기능군 (NP), 급성거부반응군 (acute TCMR/acute ABMR), 장기생존 정상신기능군 (LGS), BK virus 신증군 (BKVN), 다른 질환(OGIs) 등의 환자로부터 얻어진 260개의 시료를 사용하여 개발된 거부반응 소변 엑소좀 miRNA 바이오마커를 검증하였다(표 4).

표 4

바이오 마커 검증용 시료

	NP	acute TCMR	acute ABMR	LGS	chronic ABMR	BKVN	OGI	p value
환자 수 (n)	50	50	30	30	20	20	60	-
Age (years)	45.6 ± 13.4	46.6 ± 12.4	48.5 ± 9.0	50.9 ± 8.5	47.9 ± 12.3	45.9 ± 15.8	47.9 ± 12.2	0.591
Sex (male, %)	27 (54.0)	38 (76.0)	19 (63.3)	15 (50.0)	12 (60.0)	16 (80.0)	44 (73.3)	0.053
이식경과일 (days)	164 ± 370	689 ± 808	2169 ± 1758	5324 ± 1511	2969 ± 1633	292 ± 292	1226 ± 1844	<0.001
ABO incompatible KT (n, %)	4 (8.0)	5 (10.0)	2 (6.7)	1 (3.3)	1 (5.0)	3 (15.0)	3 (5.0)	0.659
HLA mismatching (n)	3.1 ± 1.5	3.4 ± 1.6	3.5 ± 1.5	3.1 ± 1.5	3.1 ± 1.4	3.4 ± 1.8	3.5 ± 1.9	0.933
Indication for renal biopsy								
Protocol biopsy (n, %)	40 (80.0)	6 (12.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	17 (28.3)	
Elevated creatinine levels (n, %)	10 (20.0)	42 (84.0)	28 (93.3)	0 (0)	15 (75.0)	20 (100)	37 (61.7)	<0.001
Proteinuria (n, %)	0 (0)	2 (4.0)	2 (6.7)	0 (0)	5 (25.0)	0 (0)	6 (10.0)	
Not done (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	30 (100)				
eGFR (ml/min)	78.9 ± 24.4	35.0 ± 13.9	33.9 ± 14.8	79.0 ± 20.9	32.3 ± 18.3	37.9 ± 14.1	40.1 ± 16.7	<0.001
Urine PCR (mg/g)	228 ± 423	984 ± 1576	2161 ± 2380	243 ± 241	2112 ± 1901	269 ± 170	1615 ± 2701	<0.001
Maintenance immunosuppression								
Steroid (n, %)	49 (98.0)	44 (88.0)	29 (96.7)	21 (70.0)	16 (80.0)	19 (95.0)	55 (91.7)	0.601
Tacrolimus (n, %)	49 (98.0)	40 (80.0)	24 (80.0)	17 (56.7)	15 (75.0)	19 (95.0)	51 (95.0)	0.619
Cyclosporine (n, %)	0 (0)	6 (12.0)	3 (10.0)	11 (36.7)	4 (20.0)	0 (0)	7 (11.7)	0.379
Mycophenolate mofetil (n, %)	48 (96.0)	43 (86.0)	27 (90.0)	23 (76.7)	14 (70.0)	13 (65.0)	51 (85.0)	0.014
mTOR inhibitor (n, %)	3 (6.0)	2 (4.0)	3 (10.0)	2 (6.7)	2 (10.0)	2 (10.0)	3 (5.0)	0.896
Donor information								
Age (years)	45.6 ± 12.9	49.6 ± 11.6	51.3 ± 12.9	35.0 ± 10.7	45.1 ± 13.7	52.5 ± 8.7	48.2 ± 13.4	<0.001
Sex (Male, %)	29 (58.0)	25 (50.0)	13 (43.3)	15 (50.0)	10 (50.0)	9 (45.0)	32 (53.3)	0.906
Deceased donor (n, %)	16 (32.0)	22 (44.0)	9 (30.0)	4 (13.3)	8 (40.0)	8 (40.0)	27 (45.0)	0.081

[0080]

[0081]

상기 소변 상층액으로는 환자로부터 얻어진 소변시료를 상온에서 2,000g로 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상층액을 사용하였고, 상기 소변 RNA는 상기 소변 상층액 1 ml를 Qiagen제품의 exoRNeasy serum/plasma midi kit에 적용하여 수득하였다(표 5). 수득한 RNA의 정량분석 및 정성분석은 Nanodrop ND-2000 UV spectrophotometer (Thermo Scientific)를 사용하여 수행하였다. 상기 수집된 각 시료들은 -80℃에서 보관하였다.

표 5

소변 RNA의 총량 및 순도

	개발용 시료	검증용 시료	P value
RNA 총량	0.391±0.136	0.294±0.127	< 0.0001
RNA 순도	1.49±0.189	1.46±0.082	0.1285

소변 RNA의 총량의 평균은 약 320 ng 정도이며 순도는 약 1.47 정도로 확인되었다. 이는 1ml의 소변에서 분리하여 얻은 핵산의 양은 낮아 다양한 실험방법이나 high-throughput analysis에 제한적이다. 그러나 최근 nanstring 방법은 기존의 전사체 분석 방법 (enzymes or library) 과 다르게 개별 전사체의 barcode를 hybridization 방법으로 붙이는 방법으로 적은 핵산의 양으로도 절대적 count분석이 가능하도록 개발되었다. 따라서 본 실험자는 적은 핵산의 양으로 miRNA를 확인할 수 있는 nanstring 분석방법을 사용하였다.

실시예 3: Nanostring nCounter system을 이용한 miRNA 분석

바이오마커 개발용 108개의 시료에 포함된 각각의 소변 RNA 시료 60 ng을 nCounter 시스템의 Human V3 panel with 798 unique miRNA barcodes에 적용하여 miRNA를 분석하였다. 정상군 (NP+LGS; STA) 과 거부반응군 (acute TCMR+acute ABMR; AR)을 통계적 방법인 Differential expression gene 분석으로 비교하였고, 상기 소변 RNA 시료에 대한 데이터 정규화(normalization)는 positive control과 5개의 housekeeping genes (Ribosomal protein lateral stalk subunit P0, RPLP0; beta-actin, ACTB; beta-2-microglobulin, B2M; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; ribosomal protein L19, RPL19)을 이용한 nSolver 프로그램을 사용하여 진행하였다. 그 결과, fold change 2배 이상 p value 이 0.05 이하인 miRNAs는 총 14개 가 발굴되었다(표 6).

표 6

Nanostring nCounter system을 통해 발굴된 바이오 마커 후보

No.	Gene Name	Fold change (AR vs STA)	p-value
1	miR-1268a	-2.22	1.38E-05
2	miR-1305	-2.76	6.35E-05
3	miR-187-3p	-2.55	2.93E-06
4	miR-1915-3p	-8.79	0.00E+00
5	miR-3158-3p	-4.99	3.00E-08
6	miR-3185	-2.03	1.74E-04
7	miR-3195	-4.39	0.00E+00
8	miR-320e	-3	2.66E-04
9	miR-4488	-5.39	0.00E+00
10	miR-4516	-5.09	1.13E-06
11	miR-4532	-12.47	0.00E+00
12	miR-489-3p	-6.1	0.00E+00
13	miR-575	-3.45	1.04E-06
14	miR-197-5p	2.17	7.09E-04

상기 표 6에서 보듯이, 14개의 miRNAs중 miR-197-5p만 정상군에 비해 거부반응군에서 증가하였고 나머지 13개의 miRNAs은 거부반응군에서 감소하는 것으로 나타났다.

실시예 4: miRNA 발현수준 분석

TaqMan Advanced miRNA assays (Applied Biosystems, ABI)를 사용한 real-time PCR 분석을 통해, 소변 RNA 시료에 포함된 miRNA의 발현수준을 분석하였다.

대략적으로, 실시예 2에서 설정한 108개의 바이오 마커 개발용 시료에서 수득한 각각의 소변 RNA 2 ul를 TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit에 적용하여 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA 5 ul를 universal primers 와 master mix를 사용한 PCR에 적용하여, cDNA의 수준을 증폭시켰다. 증폭된 cDNA에 10배의 TE 완충액을 가하여 희석하고, 희석된 cDNA 5ul와 10 ul TaqMan Fast Advanced Master Mix, 1 ul miRNA primer(표 7), 그리고 4 ul

RNase-free water를 혼합하여 ABI stepOnePlus real-time PCR system을 수행하였다. 이때, 증폭시키고자 하는 바이오 마커 후보는 상기 실시예 1에서 생물정보학 기법을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 10개, 상기 실시예 3에서 Nanostring nCounter system을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 11개(14개 중 miR-1268a, miR-1305 및 miR-3195는 프라이머 및 프로브를 입수하지 못하여 제외함) 및 문헌리뷰를 통해 발굴한 바이오 마커 후보 5개(miR-142-5p, miR-142-3p, miR-155-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p)를 포함한 총 26개이고, PCR thermal cycling condition은 다음과 같다: 95℃에서 20초, 95℃에서 1초 및 60℃에서 20초 반응을 40회 수행. 얻어진 증폭산물로부터 miRNA의 발현수준을 산출하기 위하여, human universal reference miRNA 와 miR-16-5p의 Ct 값으로 보정하는 방법인 comparative threshold cycle method를 사용하였다. (도 1a 내지 도 1c). 이때, 내부대조군으로는 miR-16-5p를 사용하였고, 6개의 바이오 마커 후보(miR-1915-3p, miR-3158-3p, miR-197-5p, miR-518a-2, miR-142-5p 및 miR-142-3p)의 경우에는 90%이상의 검체에서 검출되지 않아 제외하고, 나머지 20개의 바이오 마커 후보를 분석한 결과만을 도시하였다.

표 7

miRNA 분석에 사용한 primer

No.	Gene Name	Assay ID	Brand
1	miR-197-5p	478748_mir	ABI
2	miR-187-3p	477941_mir	ABI
3	miR-1915-3p	478740_mir	ABI
4	miR-3158-3p	479643_mir	ABI
5	miR-3185	478018_mir	ABI
6	miR-320e	478022_mir	ABI
7	miR-4488	478906_mir	ABI
8	miR-4516	478303_mir	ABI
9	miR-4532	480831_mir	ABI
10	miR-489-3p	478130_mir	ABI
11	miR-575	479056_mir	ABI
12	hsa-miR-124-3p	477879_mir	ABI
13	miR-146a-5p	478399_mir	ABI
14	miR-21-5p	477975_mir	ABI
15	miR-30a-3p	478273_mir	ABI
16	miR-335-5p	478324_mir	ABI
17	miR-186-5p	477940_mir	ABI
18	miR-324-3p	478023_mir	ABI
19	miR-518a-5p	479249_mir	ABI
20	miR-373-3p	478363_mir	ABI
21	miR-31-5p	478015_mir	ABI
22	miR-142-5p	477911_mir	ABI
23	miR-142-3p	477910_mir	ABI
24	miR-155-5p	477927_mir	ABI
25	miR-223-3p	477983_mir	ABI
26	miR-210-3p	477970_mir	ABI
27	내부대조군	477860_mir	ABI

[0091]

[0092]

도 1a는 Nanostring nCounter system을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 11개 중 검출되지 않은 3개를 제외한 8개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 1b는 생물정보학 기법을 이용하여 발굴한 바이오 마커 후보 10개 중 검출되지 않은 1개를 제외한 9개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 1c는 문헌리뷰를 통해 발굴한 바이오 마커 후보 5개 중 검출되지 않은 2개를 제외한 3개를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0093]

상기 도 1a 내지 1c에서 보듯이, 26종의 miRNA real-time PCR 분석결과 정상군과 거부반응군과의 통계적으로 유의한 miRNA로서 10종의 miRNA(miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, miR-210-3p, miR-324-3p 및 miR155-5p)가 확인되었는데, 이중에서 2종의 miRNA(miR-324-3p 및 miR155-5p)는 전체 시료중에서 약 20% 정도의 시료에서만 부분적으로 검출되어, 매우 낮은 빈도를 나타낸다는 문제점이 있음을 확인하였다.

[0094]

이에 따라, 상기 10종의 miRNA 중에서 낮은 빈도를 나타내는 2종의 miRNA를 제외한 총 8종의 miRNA(miR-4488,

miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p 및 miR-210-3p)를 신장이식 거부반응 진단용 miRNA 바이오마커로서 최종 선발하였다.

[0096] 실시예 5: 통계분석

[0097] 상기 실시예 4에서 최종 선발된 8종의 miRNA를 대상으로, 환자 특성의 평균을 비교하기 위하여, 편도분석을 수행하였다. 후보군(training set)에서 급성 거부 반응 그룹(acute rejection; AR)과 정상 그룹(stable graft function; STA) 간에 각각의 소변 전사체의 발현량을 비교하기 위해 Mann-Whitney 비모수 데이터(non-parametric) 테스트를 사용하였다. 또한, 검증 군(validation set)에서 4개의 임상 그룹 간에 mRNA 발현을 비교하기 위하여, Kruskal-Wallis 비모수 테스트를 사용하였다.

[0098] 급성 거부 반응을 진단 및 예측하기 위하여, 로지스틱 회귀분석(logistic regression) 방식으로 모델 일치(model fitting)를 사용하여 ROC(receiver operating characteristic) 커브의 아래 영역을 분석하였다(도 2). 아울러, 높은 민감도 및 특이도를 제공하기 위하여, 각 측정값에서 적정의 컷오프 점수를 측정하였다. $p < 0.05$ 일 때, 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0099] 도 2는 8종의 miRNA (miR-4488, miR-4532, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-373-3p, miR-31-5p, miR-223-3p, and miR-210-3p)를 대상으로 ROC 커브를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0100] 도 2에서 보듯이, 8종의 miRNA 각각의 AUC값은 0.614 내지 0.732의 값을 나타내었다. AUC 값이 높을수록 정상군으로부터 거부반응환자를 잘 구별할 수 있는것을 나타낸다. 8종의 miRNA중 거부반응 구별능력이 높은 순서는 miR-31-5p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-4532, miR-373-3p, miR-4488, miR-210-3p, and miR-146a-5p (AUC 0.732, 0.697, 0.679 0.676, 0.659, 0.638, 0.626, and 0.614, respectively) 로 확인 되었다.

[0101] 실시예 6: 거부반응 진단/예측 모델 개발

[0102] 상기 실시예 4에서 최종 선발된 8종의 miRNA는 각각 개별적으로는 거부반응 분별능력이 뛰어나지 않은 것으로 분석되었으므로, 통계적 방법을 통해 거부반응 진단 예측 모델을 개발하였다.

[0103] 첫 번째 모델은 8종 miRNAs 전체를 사용하여 로지스틱 회귀분석(logistic regression) 방법으로 개발하였다:

$$i) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.284 + (0.267 \times miR4488) + (-1.361 \times miR4532) + (1.544 \times miR21) + (0.015 \times miR223) + (1 \times miR31) + (-0.497 \times miR146a) + (0.3 \times miR373) + (0.146 \times miR210)$$

[0105] 두 번째 모델은 3종 miRNA (miR-21-5p, miR-31-5p 및 miR-4532)를 사용하여 FSS(forward stepwise selection) 방법으로 개발하였다:

$$ii) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -1.158 + (-1.103 \times miR4532) + (1.2 \times miR21) + (1.16 \times miR31)$$

[0107] 상기 개발된 2종의 모델을 이용하여 108개의 바이오 마커 개발용 시료를 대상으로 거부반응을 예측하였다(도 3a 및 3b).

[0108] 도 3a는 첫 번째 모델을 이용하여 108개의 바이오 마커 개발용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0109] 도 3a에서 보듯이, AUC는 0.868 (95% Confidence Interval (CI), 802-934)를 나타내었고, 이는 정상군으로부터 거부반응을 나타내는 시료를 명확히 구별함을 알 수 있었다.

[0110] 도 3b는 두 번째 모델을 이용하여 108개의 바이오 마커 개발용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0111] 도 3b에서 보듯이, AUC는 0.859 (95% CI, 792-927)를 나타내었고, 이 또한 정상군으로부터 거부반응을 나타내는 시료를 명확히 구별함을 알 수 있었다.

[0112] 상기 도 3a 및 3b에서 보듯이, 상기 개발된 2개의 모델은 정상군으로부터 거부반응을 나타내는 시료를 명확히 구별할 수 있었고, 2개 모델 간의 거부반응 구별능력은 별다른 차이를 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

[0113] 실시예 7: 거부반응 진단/예측 모델의 검증

[0114] **실시예 7-1: 바이오 마커 검증용 시료에서 real-time PCR 분석**

[0115] 상기 실시예 2에서 설정한 260개의 바이오 마커 검증용 시료에서 상기 실시예 4에서 도출된 8종의 miRNA를 대상으로 real-time PCR 분석을 수행하였다(도 4a). 이때, 260개의 바이오 마커 검증용 시료는 정상군 (NP/LGS, n=80), 거부반응군 (ACR/AMR, n=80), 만성이식신기능장애군 (CAD, n=20), BK virus 신증군 (BKVN, n=20), 그리고 다른 신이식 손상군 (n=60)을 포함한다.

[0116] 도 4a는 260개의 바이오 마커 검증용 시료에서 실시예 4에서 도출된 8종의 miRNA를 real-time PCR system으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0117] 도 4a에서 보듯이, 8종의 miRNA 중 바이오 마커 검증용 시료에서 통계적으로 유의한 결과를 나타내는 miRNA는 miR-21-5p, miR-4488 및 miR-4532의 3종 임을 확인하였다.

[0118] **실시예 7-2: 바이오 마커 검증용 시료를 사용한 거부반응 진단/예측 모델 분석**

[0119] 상기 실시예 2에서 설정한 260개의 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로, 실시예 6에서 개발된 2종의 거부반응 진단/예측 모델을 사용한 분석을 수행하였다(도 4b 및 4c).

[0120] 도 4b는 첫 번째 모델을 이용하여 260개의 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0121] 도 4b에서 보듯이, AUC는 0.766 (95% CI, 694-839)를 나타내고, sensitivity는 67.5% 임을 확인하였으며, specificity는 69.7% 임을 확인하였고, 이의 cut-off point는 0.572 임을 확인하였다.

[0122] 도 4c는 두 번째 모델을 이용하여 260개의 바이오 마커 검증용 시료를 대상으로 거부반응을 예측한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0123] 도 4c에서 보듯이, AUC는 0.779 (95% CI, 708-850)를 나타내고, sensitivity는 53.8% 임을 확인하였으며, specificity는 80.3% 임을 확인하였고, 이의 cut-off point는 0.650 임을 확인하였다.

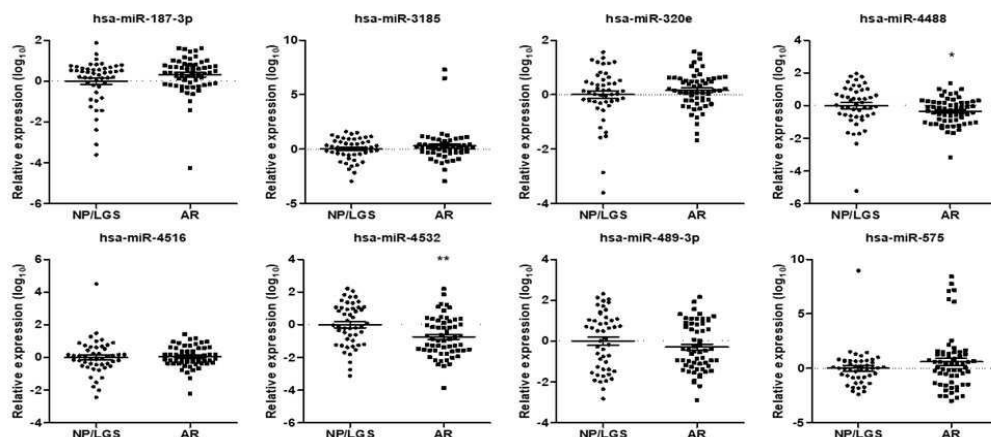
[0124] 상기 도 4b 및 4c의 cut-off point를 기준으로 할 때, 바이오 마커 검증용 시료에 대하여는 첫 번째 모델 보다 두 번째 모델이 보다 효과적인 것으로 분석되었다.

[0125] 상술한 실시예의 결과를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 8종의 miRNA는 신장이식에 따른 거부반응을 진단 또는 예측하기 위한 마커로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

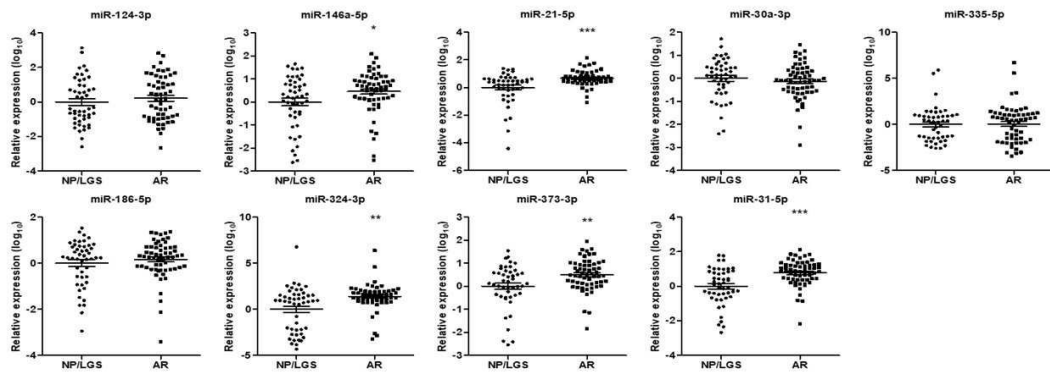
[0126] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

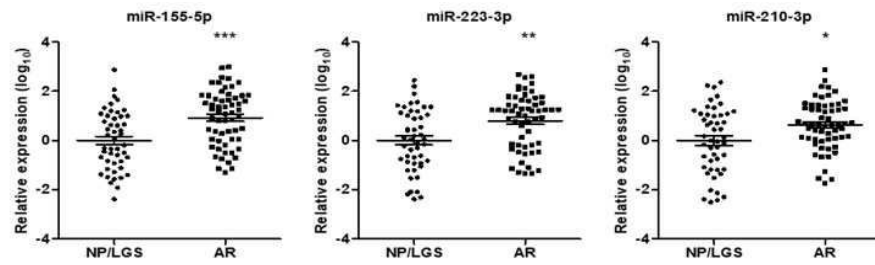
도면1a



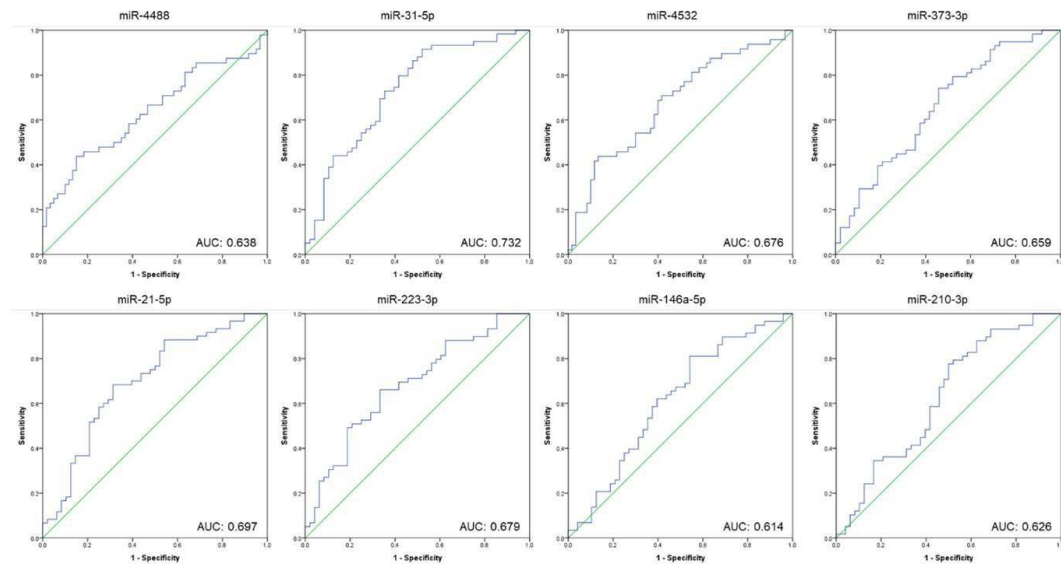
도면1b



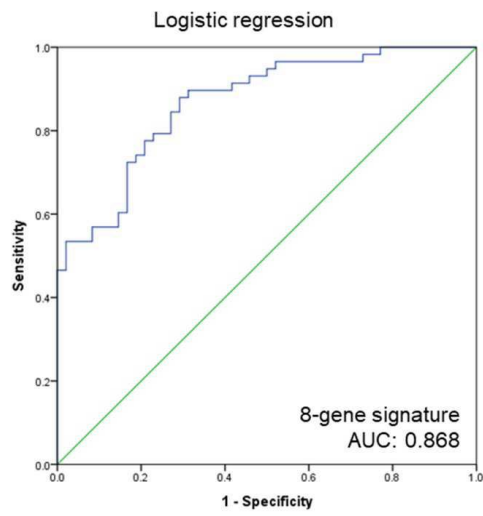
도면1c



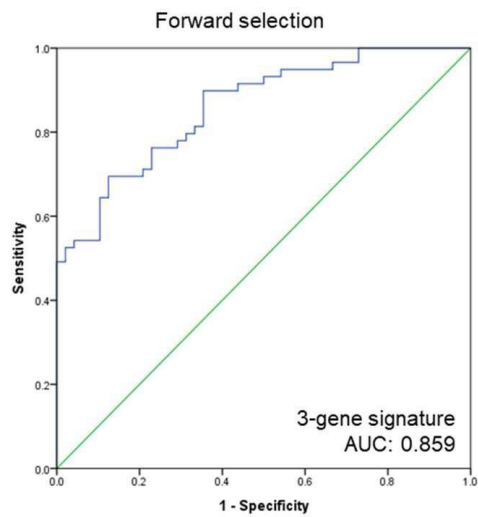
도면2



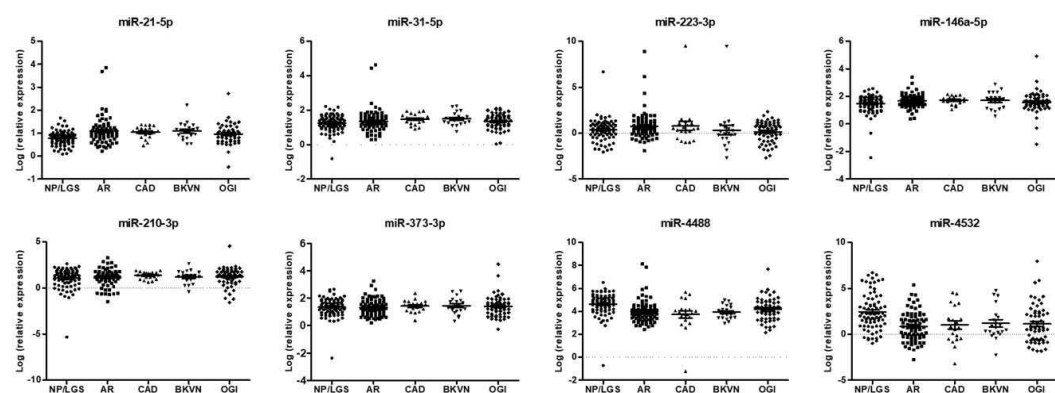
도면3a



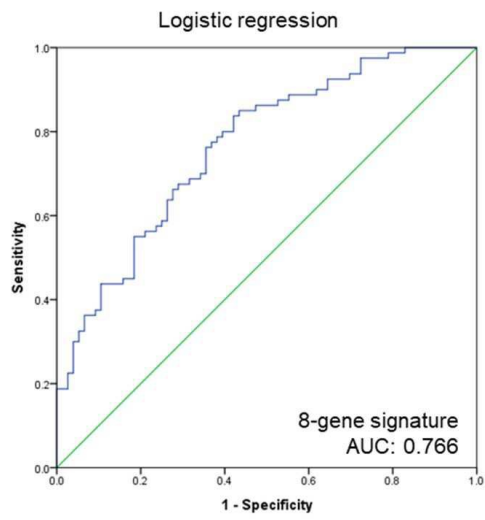
도면3b



도면4a



도면4b



도면4c

