(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0145783
(43) 공개일자 2020년12월30일

(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 10-2020-0076061
(22) 출원일자 2020년06월22일
심사청구일자 2020년06월22일
(30) 우선권주장
1020190074073 2019년06월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
신성
서울특별시 강남구 삼성로57길 45, 201동 201호(대치동, 대치삼성2차아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

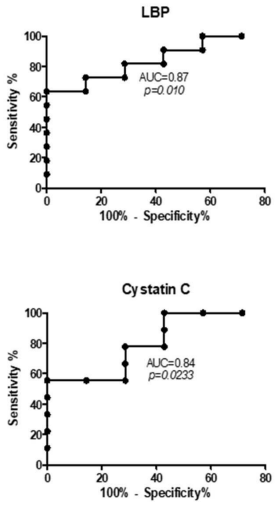
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 예측을 위한 소변 엑소좀 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 비침습적인 신장이식 거부반응 진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 바이오마커 조성물 및 키트, 상기 마커 조성물을 이용하여 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법, 신장이식 후 거부반응의 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 신장이식 후 항체 매개성 거부반응에 대한 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/435 (2013.01)
G01N 2333/4716 (2013.01)
G01N 2333/8121 (2013.01)
G01N 2333/8139 (2013.01)
G01N 2333/918 (2013.01)
G01N 2800/245 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711046930
과제번호 2016M3A9E8941330
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오·의료기술개발사업
연구과제명 신장 이식 후 섬유화에 대한 바이오마커로서의 urinary transglutaminase 2 진단 키트 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2019.04.01 ~ 2020.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 (Antibody mediated rejection, ABMR)의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 올리고펩타이드, 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA), 나노입자 또는 앱타머인, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제2항의 조성물을 포함하는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 키트.

청구항 6

개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법:

a) LBP의 상향 조절; 및

b) CST3의 상향 조절.

청구항 9

개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하고, 항체 매개성 거부반응에 대한 치료법을 적용하는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법:

a) LBP의 상향 조절; 및

b) CST3의 상향 조절.

청구항 12

a) 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 나타낸 개체로부터 분리한 시료에 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

b) LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, c) 상기 b) 단계에서 측정된 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준이 후보물질을 처리하기 전보다 하향 조절되는 경우, 상기 a) 단계의 후보물질을 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신장이식 후 항체 매개성 거부반응(antibody-mediated rejection, ABMR)과 관련된 바이오마커, 항체 매개성 거부반응 진단 또는 신장이식 후 거부반응에 대한 예후 예측용 조성물, 키트 및 이를 이용하여 항체 매개성 거부 반응의 진단 또는 신장이식 후 거부반응의 예후 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 장기이식 분야는 서서히 정밀 의료의 일부가 되고 있다. 현재의 표준 면역 억제 치료를 사용할 때 여전히 신장

이식을 받은 환자의 15 ~ 20%에서 급성 거부 반응이 발생하며, 현재까지는 혈청 크레아틴의 농도 증가 또는 새로운 단백뇨의 발현 등이 생길 경우 조직 생검을 통해 진단된다. 혈청 크레아틴 농도 증가 또는 새로운 단백뇨 발현이 있는 시점에서의 신장 상태는 이미 염증이 꽤 진행된 상태이기 때문에, 무증상의 거부반응(subclinical acute rejection)을 조기 발견할 수 있는 바이오마커의 필요성이 대두된다. 선천적/후천적 면역 반응은 조직학적 수준에서 나타나기 전에 분자 수준에서 먼저 나타난다고 알려져 있다. 따라서 신장이식 후에 임상적 상태를 미리 진단하고 모니터링하기 위한 비침습적 바이오마커의 개발은 정밀 의료에 필수적인 단계이다.

[0003] 과거에는 신장이식 후 거부반응을 거부반응의 발생 시기에 따라 초급성, 급성 및 만성 거부반응으로 각각을 구분하였으나 최근에는 발생기전과 신생검 소견에 따라 거부반응을 분류한 Banff 분류를 주로 사용하고 있다. Banff 분류 이전의 이식신장의 병리진단 분류는 매우 간단하였는데, 특히 급성 및 만성 거부반응은 주로 염증세포 침윤의 위치에 따라 분류하여 간질에서 관찰되면 세포성(cellular), 혈관 내에 침윤한 경우는 혈관성(vascular) 거부반응으로 분류하였다. 즉, 이는 현재의 관점에서 보자면 초급성 거부반응을 제외하고는 모두 T 세포 매개 거부반응에 대한 진단 분류이며, 당시에는 초급성의 임상상이 아닌 ABMR의 존재자체가 인식되지 못하였고 진단적 근거도 없었다. 현재 초급성 거부반응은 급성 ABMR의 가장 심한 형태로 이해되고 있다.

[0004] 신장이식 후 거부반응의 진단과 관련하여 신장이식 후 급성거부반응을 진단하기 위한 소변 바이오마커가 알려져 있다(Suthanthiran et al., Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *The New England Journal of Medicine*(2013) 369;1). 그러나, T 세포 매개성 거부반응과 항체 매개성 거부반응을 구별할 수 있는 바이오마커, 나아가 신장이식 후 합병증인 BK 바이러스 신병증과 이식거부반응을 구별하여 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하고 이를 신장이식 후 치료 방향의 선택 및 치료 경과 판단에 활용하고자 하는 연구는 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 비-침습적이고 정확한 신장이식 거부반응 진단 마커를 발굴하기 위해 예의 노력한 결과, 프로테오믹스 접근법을 통해 신장이식 거부반응의 유무 및 거부반응의 종류를 특정하여 예측할 수 있는 새로운 바이오마커를 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 본 발명에서는 신장 이식 후 주요 이상이 없는 군(NOMOA), 항체 매개성 거부반응군(ABMR), T 세포 매개성 거부반응군(TCMR) 및 BK 바이러스 감염성 신병증군(BKVN)의 소변 엑소좀 내에서 신장이식 거부반응 진단 또는 예후 예측 표지자를 발굴함으로써 신장이식 후 치료 경과를 판단하고 적절한 치료 방법을 선택하는데 기여하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양태로, 본 발명은 LBP, 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양태로서, 본 발명은 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0010] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 올리고펩타이드, 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid, PNA), 나노입자 또는 앱타머일 수 있다.

[0011] 또 다른 양태로서, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 또 다른 양태로서, 본 발명은 개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 항체

매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 감염성 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다:

[0015] a) LBP의 상향 조절; 및 b) CST3의 상향 조절.

[0016] 또 다른 양태로서, 본 발명은 개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 감염성 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하고, 항체 매개성 거부반응에 대한 치료법을 적용하는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다:

[0019] a) LBP의 상향 조절; 및 b) CST3의 상향 조절

[0020] 또 다른 양태로서, 본 발명은 a) 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 나타낸 개체로부터 분리한 시료에 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및 b) LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 c) 상기 b) 단계에서 측정된 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준이 후보물질을 처리하기 전보다 하향 조절되는 경우, 상기 a) 단계의 후보물질을 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는, 신장이식 환자 및 기증자의 소변 샘플에서 특정 엑소좀 단백질의 발견을 위해, 프로테오믹스 분석을 기반으로 후보 단백질을 선택했다. 소변 엑소좀 단백질 정량 분석에서 총 1820개의 단백질이 검출되었고, 이중 "NOMOA 및 DONOR군"과 "ABMR군" 간에 발현 프로파일이 현저하게 차이가 나는 단백질 46종을 선택했다. 마지막으로, 46종 단백질 중 TCMR군 또는 BKVN 군과 유의적으로 서로 다른 발현 양상을 나타내는 8개의 단백질을 확인하였다. 확인된 단백질은 하기 [표 2]에 나타낸 바와 같이, LBP(Lipopolysaccharide-binding protein, UniProt Accession No.P18428), CSRP1(Cysteine and glycine-rich protein 1, UniProt Accession No.P21291), SERPINF2(Alpha-2-antiplasmin, UniProt Accession No.P08697), RBP4(Retinol-binding protein 4, UniProt Accession No.P02753), CST3(Cystatin-C, UniProt Accession No.P01034), CFD(Complement factor D, UniProt Accession No.P00746), SERPINA4(Kallistatin, UniProt Accession No.P29622), PON1(Serum paraoxonase/arylesterase 1, UniProt Accession No.P27169)였다.

[0025] 본 발명의 추가의 일실시예에서는 상기 8종의 바이오마커 중 추가 단계를 통해 선별된 LBP (Lipopolysaccharide-binding protein) 및 CST3 (Cystatin C)에 대해 웨스턴 블롯 분석으로 검증을 수행하였으며, 그 결과 LBP (Lipopolysaccharide-binding protein)와 CST3 (Cystatin-C)가 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 및/또는 신장이식을 받은 후 주요 이상이 없는 군 (NOMOA) 대비 항체 매개 거부반응군 (ABMR)에서 현저하게 높게 발현되는 것을 확인하였고, 이의 통계적으로 유의성 또한 확인하였다.

[0026] 이에, 본 발명에서는 신장이식 후 불량한 예후에 관여하는 선별된 바이오마커, 즉, LBP (Lipopolysaccharide-binding protein) 및 CST3 (Cystatin-C)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 바이

오마커 조성물을 제공한다. 이를 이용하여 신장이식 후 환자의 예후를 예측하고, 예측된 예후에 따라 적절한 치료방향을 결정할 수 있어 환자 맞춤형 치료방법의 제공이 가능하고, 불량한 예후의 신장이식 환자의 사망률을 감소시킬 수 있다.

[0027] 신장이식의 거부반응(renal allograft rejection)은 공여자의 신장을 이식받은 수여자의 면역 체계가 이식신장을 외부 항원으로 인식하여 일어나는 일련의 면역 반응을 의미하며, 발생기전과 신생검 소견에 따라 항체-매개성 거부반응(Antibody mediated rejection, ABMR), T 세포 매개성 거부반응(T cell mediated rejection, TCMR), 및 이들 모두가 복합적으로 나타나는 혼합 거부반응(mixed rejection)으로 분류될 수 있다.

[0028] 본 발명에서는 발굴된 바이오마커는 항체 매개성 거부반응에 특이적으로 높게 발현되는 단백질이므로, 급성 항체-매개성 거부반응(acute antibody mediated rejection, CAMR) 또는 만성 활성형 항체-매개성 거부반응(chronic active antibody mediated rejection)을 포함하는 항체 매개성 거부반응을 진단하는데 유용하다.

[0029] 본 발명의 용어 "바이오마커"는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 본 발명의 바이오마커는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응이 있는지 확인할 수 있는 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자, 혹은 예후가 양호하거나 불량한 환자를 예측해내는 기준이 되는 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 바이오마커는 게놈 뉴클레오티드 서열로부터 또는 발현된 뉴클레오티드 서열로부터(예를 들어, RNA, nRNA, mRNA, cDNA 등으로부터), 또는 코딩된 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 이 용어는 마커 서열에 상보적이거나 이에 플랭킹된 핵산 서열, 예컨대 마커 서열을 증폭시킬 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍으로 사용된 핵산을 포함한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 신장이식 환자들 중에서 조직검사 상 주요한 이상소견이 없는 군(no major abnormality, NOMOA)과 비교하여 항체 매개성 거부반응(ABMR)을 나타내는 환자의 소변에서 상기 바이오마커들이 특이적으로 높게 발현하였음을 확인함으로써 상기 바이오마커들이 항체 매개성 거부반응의 진단마커로서 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0031] 본 발명에서 상기 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다. '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)' 또는 '핵산'은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 'mRNA'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

[0032] 본 발명에 있어서, '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하여 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 병리 존재 또는 발생 여부를 확인하는 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서, "예후 예측"은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 신장을 이식받은 환자의 병의 경과(병의 진행, 개선, 이식거부반응, 약 저항성)를 미리 짐작하는 것을 의미한다. 또한, 상기 예후는 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 또는 불량한 예후)를 포함하며, 본 발명에서 양성적 예후는 신장이식 후 거부반응 또는 관련 증상 또는 질환이 발생하지 않는 것을 의미하고, 음성적 예후는 신장이식 후 거부반응 또는 관련 증상이 발생하였고, 거부반응의 종류가 항체 매개성 거부반응이라는 것을 의미한다.

[0034] 본 발명은 또한, 본 발명의 2종의 바이오마커의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 진단 또는 예후 예측용 조성물이 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 것일 때에는 mRNA 발현 수준을 측정하는 물질은 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자 또는 이의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3` hydroxyl group)을 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명에서는 전술한 2종의 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 신장이식의 거부반응을 진단하거나 예후를 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형

할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어, "프로브(probe)" 란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 본 발명의 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 진단하거나 예후를 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0038] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0039] 한편, 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0040] 상기 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 바이오마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 바이오마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 예후 예측 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')2, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 다른 측면에서, 본 발명은 상술한 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 조성물을 포함하는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0042] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[0043] 본 발명의 키트에는 상기 2종의 바이오마커 단백질을 인식하는 항체 또는 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA를 인식하는 프라이머, 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분을 포함하는 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0044] 구체적인 양태로서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNAse, RNAse 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0045] 또 다른 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착

되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0046] 또 다른 양태로, 본 발명에서 단백질의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.

[0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명에서, "개체"는 신장이식을 받은 개체로서, 신장이식 후 거부반응이 나타날 가능성이 있거나 또는 거부반응이 나타난 인간, 침팬지를 포함한 영장류, 개, 고양이 등의 애완동물, 소, 말, 양, 염소 등의 가축 동물, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유동물, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 분석을 위해 사용되는 "시료"는 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 질 분비물, 소변, 대변 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응에 특이적 단백질을 확인할 수 있는 생체 시료를 포함한다. 바람직하게는 생물학적 액체 시료, 예를 들어 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변일 수 있으며, 가장 바람직하게는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0050] 본 발명에서, 상기 "단백질의 발현수준 측정"은 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 진단하거나 신장이식을 받은 환자의 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 발현된 바이오마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 존재 여부를 검출하거나 단백질의 양을 측정할 수 있다. 단백질에 특이적인 항체는 본 발명의 진단 또는 예후 예측용 조성물에 서술한 바와 같다. 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 공지되어 있는 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩(chip) 방법 등이 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에서, 상기 "mRNA의 발현수준 측정"은 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 진단하거나 신장이식을 받은 환자의 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RTPCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 칩(DNA chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0053] a) LBP의 상향 조절; 및

[0054] b) CST3의 상향 조절.

[0055] 상기 정상 대조군이란 신장이식을 받지 않은 정상인을 의미하며 신장 기증자 (공여자)를 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 감염성 신병증을 나타내지 않은 환자군은 신장이식을 받았지만 안정적인 신장 기능이 발휘되며 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응, 혼합 거부반응 또는 BK 바이러스 감염성 신병증이 나타나지 않은 상태의 신장이식 환자 등을 의미한다. 이들 정상 대조군 및 환자로부

터 채취한 시료와 신장이식의 거부반응의 존재 또는 예후를 알고자 하는 환자로부터 채취한 시료에서 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준 또는 발현패턴을 수득하고, 비교함으로써 예후를 알고자 하는 환자의 예후를 정확하게 예측할 수 있다.

[0056] 나아가, 본 발명의 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법은 T 세포 매개성 거부반응 및 BK 바이러스 신병증과 구별하여 항체 매개성 거부반응을 특이적으로 진단할 수 있는바, T 세포 매개성 거부반응 및/또는 BK 바이러스 신병증을 나타낸 환자군으로부터 채취한 시료와 신장이식의 거부반응의 존재 또는 예후를 알고자 하는 환자로부터 채취한 시료에서의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현수준 또는 발현패턴을 수득하고, 비교함으로써 거부반응의 원인 및 종류를 명확하게 규명할 수 있다.

[0057] 따라서, 본 발명에 의하면 신장이식 후 거부반응의 종류 및 그 예후를 정확하게 진단 또는 예측할 수 있고, 진단 또는 예측된 예후에 따라 적절한 치료 계획을 세울 수 있는 이점을 얻을 수 있다.

[0058] 이에, 본 발명은 또한, 개체로부터 분리한 시료에서 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명의 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법은 측정된 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 신장이식을 받지 않은 정상 대조군 또는 신장이식 후 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 나타내지 않은 환자군 시료와 비교한 결과가 하기 a) 및 b)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 해당하는 경우 항체 매개성 거부반응으로 판정하고, 항체 매개성 거부반응에 대한 치료법을 적용하는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다:

[0060] a) LBP의 상향 조절; 및

[0061] b) CST3의 상향 조절.

[0062] 본 발명의 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 항체 매개성 거부반응에 대한 치료법을 적용하는 것으로 결정된 이후에는, 항체 매개성 거부반응에 대한 치료법을 공지된 다양한 치료법을 단독 또는 조합하여 환자에게 적절하게 적용할 수 있다.

[0063] 예를 들어, Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 가이드라인에서 추천하는 스테로이드, 혈장교환술(plasmapheresis, PP), 정맥면역글로불린(intravenous immunoglobulin, IVIG), 항-CD20 항체, 항림프구 항체, 프로테아좀 억제제 (보르테조밉, bortezomib), C1-억제제 및 보체 인자 5에 대한 모노클로날 항체 (에쿨리주맙, eculizumab) 등을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 대부분의 치료방침은 큰 두 가지 치료전략인 1) 항체를 제거하는 혈장교환술과 B 세포 및 면역기능을 조절하는 치료를 병용하는 것이나, 이에 제한되지 않고, 당해 기술분야의 통상의 기술자 또는 임상의 판단 하에 적절한 치료법을 선택할 수 있으며, 또한, 보르테조밉, 에쿨리주맙 등의 치료법을 추가적으로 고려할 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법에 대한 다른 구체적인 내용은 전술한 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법과 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

[0065] 또 다른 측면에서 본 발명은 a) 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 나타낸 개체로부터 분리한 시료에 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및 b) LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0066] 본 발명의 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제의 스크리닝 방법은 c) 상기 b) 단계에서 측정된 LBP 및 CST3로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 mRNA의 발현 수준이 후보물질을 처리하기 전보다 하향 조절되는 경우, 상기 a) 단계의 후보물질을 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0067] 구체적으로, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료 후보물질의 존재 및 부존재 하에서 마커의 mRNA 또는 단백질 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 신장이식 후 항체 매개성 거부반응에 대한 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다.

[0068] 즉, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응에 대한 치료 후보물질의 부존재 하에 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 나타내었던 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 본 발명의 2종의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하고, 또한 치료 후보물질의 존재 하에서 본 발명의 2종의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 치료 후보물질이 존재할 때의 발현 수준을 부재 하에서의 발현 수준보다 감소시키는 물질을 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 치료제로 선택할 수 있다.

[0069] 본 발명의 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 진단 또는 신장이식 후 환자의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법, 신장이식 후 거부반응에 대한 치료법 결정에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 신장이식 후 항체 매개성 거부반응의 치료제의 스크리닝 방법은 모두 개체로부터 분리된 시료에서 수행되는 생체 외 (in vitro) 방법이므로, 인간 (human) 또는 인체 (human body)를 대상으로 하지 않는다.

[0070] 다만, 생체 내 (in vivo)에서 항체 매개성 거부반응의 치료제 스크리닝 방법이 수행되는 경우, 인간을 제외한 포유동물을 대상으로 하며, 인간 (human) 또는 인체 (human body)를 대상으로 하지 않는다.

발명의 효과

[0071] 본 발명에서 제공하는 바이오마커는 신장이식 후 항체 매개성 거부반응을 나타내는 환자에서 특이적으로 현저하게 발현이 증가하므로, 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 조성물, 키트 또는 검출 방법을 통해 신장이식 거부반응 여부 및 거부반응의 종류를 정확하고 신속하게 진단할 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명의 바이오마커는 다른 종류의 이식거부반응 또는 이식 후 흔히 나타나는 BK 바이러스 감염성 신병증 환자와 차별적으로 항체-매개성 거부반응 환자에서 특이적으로 발현하므로, 항체-매개성 거부반응 여부를 정확하고 신속하게 파악할 수 있으며, 이후 치료방침을 결정하는 데 필요한 정보를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 TCMR, ABMR 및 BKVN 군을 대표하는 바이오마커의 선발 과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 볼케이노 플롯(volcano plot)을 사용하여 NOMOA 군과 비교할 때 발현 수준이 2배 이상 차이가 나는 ABMR 군의 단백질을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 t-테스트 결과와 볼케이노 플롯 결과 교차 부위에 존재하는 총 46개 단백질을 ABMR의 바이오마커 후보물질로 선발한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 t-테스트를 사용하여 주요 이상이 없는 군(NOMOA) 및 공여자군(DONOR)과 비교하여 T 세포 매개성 거부반응군(TCMR), 항체 매개성 거부반응군(ABMR) 및 BK 바이러스 감염성 신병증군(BKVN)에서 각각 63개, 108개 및 53개의 소변 엑소좀 단백질이 다른 군과 유의적으로 상이하게 발현되는 것을 확인한 결과를 벤다이어그램으로 나타낸 것이다.

도 5는 ABMR 바이오마커 후보 물질 중 TCMR군 및 BKVN군 단백질과 비교하여 현저하게 발현 양상이 차이가 나는 단백질 8종을 최종 선정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 실시예 4-4에서 선정한 항체 매개성 거부반응 바이오마커 8종의 발현량을 분석하여 ROC 곡선 분석을 수행한 결과이다.

도 7a 및 7b는 본 발명의 실시예 4-4에서 선정한 항체 매개성 거부반응 바이오마커 8종 중 추가 단계를 통해 선별된 2종에 대해 웨스턴 블롯 분석으로 검증을 수행한 결과를 나타낸 것이다 (7a: LBP 및 7b: CST3 (Cystatin C)).

도 8은 본 발명의 실시예 4-5에서 최종적으로 선정된 2종의 바이오마커 LBP 및 CST3에 대해 ROC 곡선 분석을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0075] **환자의 선발 및 소변 시료의 준비**

[0076] 신장이식 환자의 항체 매개성 거부반응을 진단하기 위한 바이오마커를 발굴하기 위하여, 신장이식 후 5년 이내 징후 생검 (indication biopsy)을 시행받은 환자 및 기증자를 포함하여 전체 60명을 대상으로 생검 2~3 시간 전에 소변 시료를 수집하였다. 또한 생체 신장 기증자로부터 신장 기증수술 직전에 소변 시료를 수집하였다. 환자들은 생검의 병리학적인 진단에 따라 5 군으로 분류되었다: 항체 매개성 거부반응 (ABMR) 군 12개, T 세포 매개성 거부반응 (ABMR) 군 8개, BK 바이러스 신병증 (BKVN) 군 5개, 주요 이상이 없는 (NOMOA) 군 11개, 및 기증자 (DONOR) 군 24개. 혼합된 동종 이병성 병변을 가진 환자의 소변은 제외하였다. 이 연구는 아산 병원 의료기관 평가위원회의 승인을 받아 진행하였으며, 모든 환자에게서 서면 동의를 받았다.

실 시 예 2

[0077] **소변 시료의 가공 및 엑소좀의 분리**

[0078] 준비된 소변 시료로부터 이전에 보고된 Pisitkun et al. (2004) 및 Alvarez et al. (2012)의 방법을 약간 수정하여 계단식 초원심분리(step-wise ultracentrifugation) 방법으로 엑소좀을 분리하였다. 구체적으로, 각 실험 참가자로부터 30 mL 이상의 소변 시료를 수집하였으며, 각각의 소변 시료에 400 μl 프로테아제 저해제 혼합물 [50 μM 4-(2-animoethyl) benzensulfonyl fluoride hydrolchloride(AEBSF-HCl, 시그마 알드리치), 2 μM Leupeptin-hemisulfate(시그마 알드리치), 및 3.3 mM Sodium azide(시그마 알드리치)]를 첨가하였다. 전 세포(whole cell), 거대 막 입자(large membrane particles), 및 다른 잔해를 포함하는 요 침전물(urinary sediments)을 제거하기 위하여, 소변 시료를 4,000 rpm, 4℃에서 15분 간 원심분리하였고, 엑소좀을 추출할 때까지 -80℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

[0079] 그 후, 냉동된 소변 샘플을 각각 15 mL 만큼 해동시키고 1분 동안 볼텍싱 한 다음 상온에서 15분 동안 17,000xg에서 원심 분리하고 상층액 (SN1)을 수집하였다. SN1은 Beckman Coulter Optima L-80xp 초 원심 분리기, 로터 SW40Ti (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 실온에서 70 분 동안 200,000xg에서 초 원심분리시켰다. 상청액을 버리고 펠렛을 11 mL의 DPBS에 용해시켜 세척한 다음 실온에서 70분 동안 200,000xg에서 다시 초 원심 분리시켰다. 상청액을 버리고 엑소좀 펠릿을 단백질 분리 또는 엑소좀 입자 정량화에 사용하였다.

실 시 예 3

[0080] **LC-MS 분석 및 단백질 확인**

[0081] 프로테오믹스 분석을 위한 샘플 준비는 동결 건조, 단백질 가용화 및 소화를 거쳤다. 생성된 펩타이드 혼합물을 탈염시키고 C18 역상 크로마토그래피를 사용하여 건조시킨 다음 나노-유동 액체 크로마토그래피(nano-flow liquid chromatography)와 결합된 고분해능 질량 분석(high resolution mass spectrometry)으로 분석하였다.

[0082] Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 서열 데이터베이스 분석 및 라벨 프리 정량(label free quantitation, LFQ) 분석을 적용하여 신장이식 거부반응 진단 또는 예측을 위한 바이오마커 후보 물질을 검색하였다. 이로부터, 1820 개의 소변의 엑소좀 단백질을 확인했다. DAVID 생물정보 데이터베이스를 사용하여 유전자 온톨로지 할당(Gene ontology assignments), 분자 기능 및 Kegg 경로 분석을 수행하였다.

실 시 예 4

[0083] **바이오마커 후보 선발**

[0084] 바이오마커 후보 물질로 단백질을 선택하는 과정을 [도 1]에 요약하였다. 각각의 병리학적 그룹을 대표하는 특정 바이오마커를 선택하기 위해, t-테스트를 사용하여 NOMOA 및 DONOR 그룹과 비교하여 유의하게 다른 평균 존재비 (abundance)를 갖는 단백질을 선택했다. 또한 볼케이노 플롯(volcano plot)을 사용하여 NOMOA 군과 비교할 때 2 배 이상의 차이를 보이는 단백질을 선택했다. 두 가지 분석에서 중복된 단백질을 선택하고 나머지 두 병리학적 군과 다시 비교하여 평균 존재비의 유의한 차이를 비교 하였다. 모든 분석은 $p < 0.05$의 컷 오프(cut off)로 수행되었다.

[0085] 4-1. ABMR 환자의 단백질 바이오마커 확인 및 1차 선별

[0086] 4193개의 소변 단백질로부터 각각의 병리학적 그룹을 대표하는 특정 바이오마커를 선택하고자 하였으며, Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 서열 데이터베이스 분석 및 라벨 프리 정량(label free quantitation, LFQ) 분석을 적용하여 1820개의 소변 엑소좀 단백질을 확인하였다.

[0087] 1820개의 소변 엑소좀 단백질 중에서 ABMR 군을 구별할 수 있는 마커를 선발하기 위하여, 먼저 T 테스트를 사용하여 NOMOA 및 Donor 그룹과 비교하여 ABMR 그룹에서 유의하게 다른 평균 존재비(abundance)를 갖는 단백질을 1차적으로 선발한 결과 108개의 단백질이 ABMR 군에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다($p<0.05$).

[0088] 다음으로, NOMOA 그룹과 ABMR 그룹 만을 비교하여 2배 이상의 발현량 차이를 보이는 단백질을 확인한 결과 834개 단백질이 선별되었다($p<0.05$).

[0089] 상기 1차 선발된 108종의 단백질과 2배 이상의 발현량 차이를 보이는 834개 단백질 중에서 중복되는 단백질 46종을 ABMR 마커 후보로 최종 선발하고, TCMR군 및 BKVN군과 존재비의 유의한 차이를 다시 비교한 결과를 하기 [표 1]에 나타내었다.

표 1

[0090] NOMOA, DONOR 군과 ABMR 군에서 차이를 보이는 단백질 목록(46종)

등록 번호	Protein FDR Confidence: Combined	Abundance Ratio: (ABMR)/(NOMOA)	Abundance Ratio P-Value: (ABMR)/(NOMOA)	T test NOMOA vs ABMR	T test ABMR vs TCMR	T test ABMR vs BKVN	T test ABMR vs donor	설명
Q07000	High	4.276	0.000125	**0.001**	**0.267**	**0.525**	**0.051**	HLA class I histocompatibility antigen
O15144	High	0.423	0.018431	**0.001**	**0.021**	**0.044**	**0.127**	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
P01019	High	6.23	8.81E-10	0.003	0.007	0.324	0.002	Angiotensinogen
Q9NZD2	High	0.273	0.022965	0.003	0.041	0.227	0.000	Glycolipid transfer protein
P08697	High	3.009	0.000109	0.007	0.018	0.023	0.005	Alpha-2-antiplasmin
P02652	High	4.085	9.45E-07	0.007	0.975	0.328	0.005	Apolipoprotein A-II
P01008	High	2.679	0.00045	0.008	0.060	0.138	0.001	Antithrombin-III
P62244	High	0.21	0.00477	0.008	0.129	0.122	0.003	40S ribosomal protein S15a
P02647	High	3.143	6.21E-05	0.009	0.019	0.651	0.001	Apolipoprotein A-I
Q16563	High	0.378	0.009505	0.009	0.005	0.201	0.001	Synaptophysin-like protein 1
Q9UGM5	High	4.342	1.28E-08	0.010	0.580	0.053	0.085	Fetuin-B
P18428	High	3.655	7.69E-06	0.011	0.020	0.004	0.001	Lipopolysaccharide-binding protein
P21291	High	0.395	0.013813	0.012	0.013	0.045	0.047	Cysteine and glycine-rich protein
P15291	High	3.045	9.35E-05	0.014	0.034	0.157	0.010	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
P02753	High	3.902	2.92E-06	0.014	0.037	0.047	0.008	Retinol-binding protein 4
P54709	High	0.27	0.042444	0.016	0.154	0.272	0.030	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3

Q8WWT9	High	0.215	0.004434	0.016	0.004	0.250	0.001	Solute carrier family 13 member 3
P01034	High	4.863	1.24E-08	0.017	0.011	0.026	0.016	Cystatin-C
P00746	High	6.285	7.42E-10	0.018	0.015	0.016	0.008	Complement factor D
P29622	High	3.368	2.45E-05	0.018	0.026	0.048	0.013	Kallistatin
P0DJI8	High	0.353	0.047116	0.020	0.498	#DIV/0!	#DIV/0!	Serum amyloid A-1 protein
P21810	High	2.565	0.000742	0.020	0.255	0.968	0.101	Biglycan
P14174	High	0.133	6.23E-09	0.022	0.085	0.124	0.048	Macrophage migration inhibitory factor
P27169	High	4.935	6.45E-08	0.023	0.045	0.023	0.021	Serum paraoxonase/arylesterase 1
P00734	High	3.597	9.72E-06	0.023	0.078	0.041	0.013	Prothrombin
Q15485	High	2.348	0.000814	0.027	0.405	0.388	0.046	Ficolin-2
Q06033	High	2.086	0.013977	0.031	0.015	0.053	0.036	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
P05546	High	3.667	7.34E-06	0.033	0.123	0.067	0.019	Heparin cofactor 2
Q86Y46	High	0.253	0.00696	0.034	0.626	#DIV/0!	0.061	Keratin, type II cytoskeletal 73
Q92520	High	2.658	0.005751	0.034	0.232	0.630	0.027	Protein FAM3C
P06681	High	3.37	2.43E-05	0.035	0.061	0.057	0.011	Complement C2
P04278	High	2.461	0.000239	0.037	0.442	0.061	0.025	Sex hormone-binding globulin
Q9BZF9	High	0.472	0.049706	0.037	0.778	0.205	0.006	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats
Q9Y512	High	0.402	0.043272	0.038	0.006	0.618	0.003	Sorting and assembly machinery component 50 homolog
Q92845	High	0.329	0.029713	0.038	0.011	0.423	0.000	Kinesin-associated protein 3
O14657	High	2.267	0.017737	0.039	#DIV/0!	0.056	#DIV/0!	Torsin-1B
Q969L2	High	0.439	0.032975	0.040	0.024	0.108	0.000	Protein MAL2
P0DOY2	High	2.562	0.000752	0.041	0.191	0.183	0.003	Immunoglobulin lambda constant 2
P11678	High	0.242	0.023956	0.042	0.343	#DIV/0!	0.166	Eosinophil peroxidase
P01860	High	4.256	7.56E-07	0.044	0.147	0.105	0.022	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
Q99972	High	5.61	6.48E-09	0.046	0.053	0.144	0.038	Myocilin
P20062	High	4.436	0.000954	0.046	0.912	#DIV/0!	#DIV/0!	Transcobalamin-2
P26572	High	3.104	6.07E-06	0.046	0.035	0.198	0.229	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase

O14896	High	4.395	0.000457	0.047	0.176	0.454	0.132	Interferon regulatory factor 6
P14543	High	2.464	0.001158	0.050	0.077	0.127	0.032	Nidogen-1
P00403	High	0.167	0.00137	0.050	0.473	0.331	0.185	Cytochrome c oxidase subunit 2

[0091] 4-2. ABMR 특이적 바이오마커의 최종 선발

[0092] ABMR, TCMR 및 BKVN 군에서 각각 특이적인 엑소좀 단백질을 발견하기 위하여 T 테스트 분석을 기반으로 최종 후보 단백질을 선택했다. 소변 엑소좀 단백질 중에서 NOMOA 군 또는 DONOR 군과 비교하여 ABMR 군에서만 특이적으로 발현되는 단백질 중에서 NOMOR 군과 비교하여 발현 프로파일이 2배 이상 차이가 나는 단백질만 선별하는 과정을 통해 상기 [표 1]의 46종 단백질을 1차 선별하였다.

[0093] 상기 [표 1]의 1차 선별된 46종 단백질 중에서, TCMR 군과 비교하여 ABMR 군에서만 유의하게 다른 평균 존재비(abundance)를 갖는 단백질을 후보 바이오마커로 선택하고, BKVN군과 비교하여 ABMR군에서만 유의하게 다른 평균 존재비(abundance)를 갖는 단백질을 후보 바이오마커로 선택하였고, 마지막으로 상기 각 후보 바이오마커 단백질 중 중복되는 8가지 단백질을 TCMR, BKVN과 ABMR 군에서 차이가 예상되는 최종 ABMR 바이오마커 단백질로 선정하였다. 확인된 단백질은 하기 [표 2]에 나타낸 바와 같이, LBP(Lipopolysaccharide-binding protein, UniProt Accession No.P18428), CSRP1(Cysteine and glycine-rich protein 1, UniProt Accession No.P21291), SERPINF2(Alpha-2-antiplasmin, UniProt Accession No.P08697), RBP4(Retinol-binding protein 4, UniProt Accession No.P02753), CST3(Cystatin-C, UniProt Accession No.P01034), CFD(Complement factor D, UniProt Accession No.P00746), SERPINA4(Kallistatin, UniProt Accession No.P29622), PON1(Serum paraoxonase/arylesterase 1, UniProt Accession No.P27169)이었다.

[0094] 4-3. 선발된 ABMR 특이적 바이오마커의 특성 확인

[0095] 최종 선발된 바이오마커의 특성을 확인하기 위하여, DAVID 생물정보 데이터베이스를 사용하여 유전자 온톨로지 할당(Gene ontology assignments), 분자 기능 및 Kegg 경로 분석을 수행하였으며, 그 결과를 [표 2]에 나타내었다.

표 2

[0096] 선발된 ABMR 특이적 마커의 기능적 특성

등록번호	설명	유전자	BP direct	MF direct	Kegg pathway
P08697	Alpha-2-antiplasmin	SERPINE2	:regulation of blood vessel size by renin-angiotensin :negative regulation of fibrinolysis :fibrinolysis :positive regulation of collagen biosynthetic process :positive regulation of stress fiber assembly :acute-phase response :platelet degranulation :negative regulation of endopeptidase activity	:endopeptidase inhibitory activity :protease binding :serine-type endopeptidase inhibitor activity	:Complement and coagulation cascades
P18428	Lipopolysaccharide-binding protein	LBP	:opsonization :acute-phase response :innate immune response		

P21291	Cystein and glycine-rich protein 1	CSRP1			
P02753	Retinol-binding protein 4	RBP4	:eye development :retinoid metabolic process		
P01034	Cystatin-C	CST3	:negative regulation of proteolysis :eye development :response to nutrient levels :cellular protein metabolic process	:cystein-type endopeptidase inhibitor activity :beta-amyloid binding :protease binding :endopeptidase inhibitor activity	
P00746	Complement factor D	CFD	:complement activation :platelet degranulation :proteolysis	:serine-type endopeptidase activity	:Complement and coagulation cascades
P29622	Kallistatin	SEPINA4	:platelet degranulation :negative regulation of endopeptidase activity	:serine-type endopeptidase inhibitor activity	
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	:response to nutrient levels :cholesterol metabolic process	:phospholipid binding	

[0097] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 선발된 ABMR 특이적 마커는 보체 활성화, 혈소판 탈과립 및 선천적 면역 반응(Innate immune response)과 관련이 있는 것을 알 수 있으며, 선발된 마커 중 CSRP1은 기능적 특성에 대해 아직 보고된 바 없다.

[0098] 4-4. ABMR 특이적 바이오마커 정확도 확인

[0099] 표 2의 8종의 단백질(LBP, CSRP1, SERPINF2, PON1, RBP4, CST3, SERPINA4 및 CFD)에 대해 ROC 분석을 수행하여, NOMOR, TCMR, BKVN 군과 ABMR군을 구별할 수 있는 바이오마커의 잠재력을 평가하여 [도 6]에 나타내었다. 그 결과, 곡선 아래 면적은 모든 바이오 마커에서 0.5 이상이며, 민감도와 특이도에 있어서 매우 높은 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0100] 4-5. ABMR 특이적 바이오마커의 검증

[0101] 실시예 4-4에서 선별된 8종의 바이오마커 중 추가 단계를 통해 선별된 2종 LBP 및 CST3에 대해 검증을 실시하였다.

[0102] 실시예 1과 마찬가지로 신장이식 후 5년 이내 징후 생검 (indication biopsy)을 시행받은 환자 및 기증자를 대상으로 생검 2~3 시간 전에 소변 시료를 수집하였다. 또한, 생체 신장 기증자로부터 신장 기증수술 직전에 소변 시료를 수집하였다. 환자들은 생검의 병리학적인 진단에 따라 5 군으로 분류되었다: 항체 매개성 거부반응군 (ABMR), T 세포 매개성 거부반응군 (ABMR), BK 바이러스 신병증군 (BKVN), 주요 이상이 없는 군 (NOMOA) 및 기증자 (DONOR) 군. 혼합된 동종 이병성 병변을 가진 환자의 소변은 제외하였다. 이 연구는 아산 병원 의료기관 평가위원회의 승인을 받아 진행하였으며, 모든 환자에게서 서면 동의를 받았다.

[0103] 11명의 신장 공여자에 해당하는 정상 대조군 (control), 7명의 주요 이상이 없는 군 (NOMOA), 10명의 항체 매개성 거부반응군 (ABMR)의 각 소변 시료로부터 분리된 엑소좀에 대해 웨스턴 블로팅으로 8종의 ABMR 특이적 마커의 단백질 발현 수준을 측정하였다. 웨스턴 블로팅에 사용된 항체의 정보는 표 3과 같다.

표 3

[0104]

항체	제조사	Cata. No
인간 LBP 항체	R&D systems	AF870
인간 시스타틴 C (CST3) 항체	R&D systems	AF1196

항-염소 IgG+HPR	GenDepot	SA007

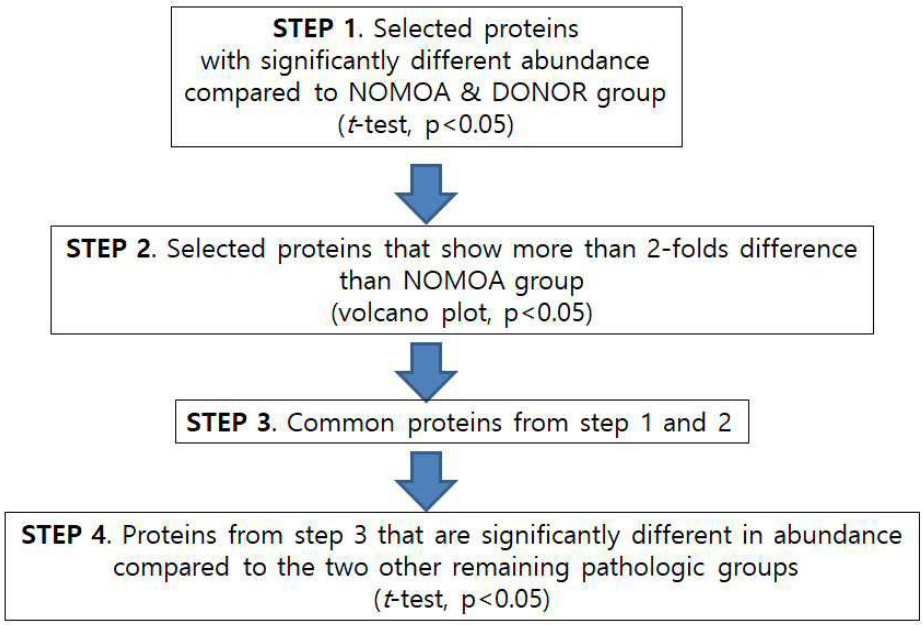
[0105] 항체 매개성 거부반응이 중증도 (severity)로 높게 발생한 환자군에서 평균을 나타내는 2명의 환자를 혼합한 단백질을 양성대조군 (Positive control; PC)으로 사용하였다. Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드의 강도를 수치로 정량화하였고, NOMOA 군 환자의 결과 값 대비 ABMR 군 환자의 결과 값을 정량화하여 결과를 분석하였다.

[0106] 도 7a 및 7b에서 확인되는 바와 같이, LBP는 NOMOA 군 대비 ABMR 군에서 6.4 배 증가하였고, 정상 대조군 대비 ABMR 군에서 10.7배 증가하였다. Cystatin C (CST3)는 NOMOA 군 대비 ABMR 군에서 4.0배, 정상 대조군 대비 ABMR 군에서 4.5배 증가하는 것을 확인하였다.

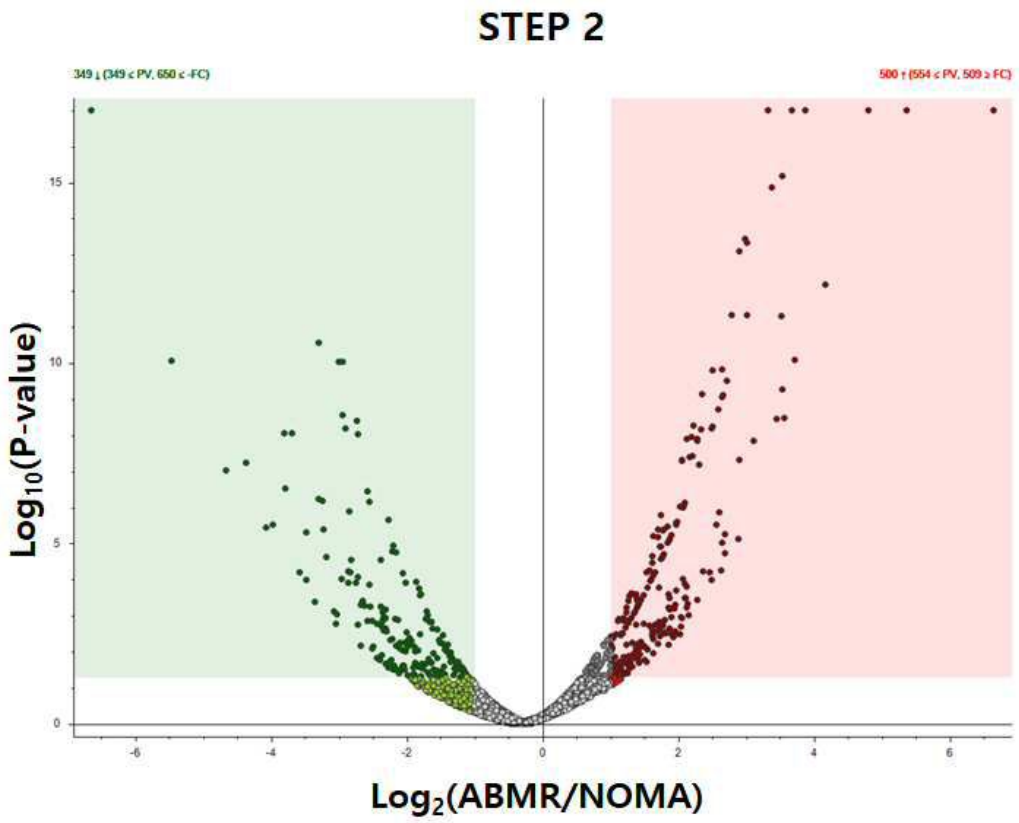
[0107] 이에 따라, ABMR 특이적 마커는 통계적 유의성이 검증된 LBP와 Cystatin C (CST3) 단백질로 최종 선별되었으며, 상기 2종의 마커에 대해 AUC (Area under the ROC curve; AUC) 값을 구한 결과, LBP는 0.87, Cystatin C (CST3)는 0.84로 통계적으로 모두 유의한 값임을 확인하였다. 따라서, 본 실시예를 통해 LBP 및 Cystatin C (CST3) 단백질은 ABMR 환자에서 특이적으로 높게 발현되어 ABMR 반응성 바이오마커로서의 가치가 충분히 입증되었다.

도면

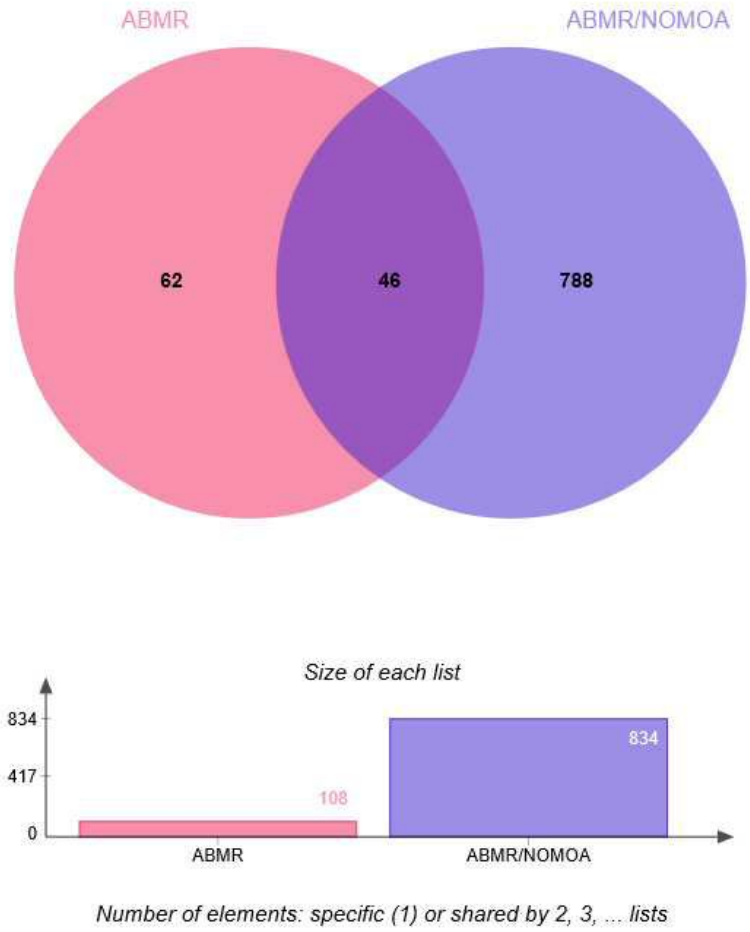
도면1



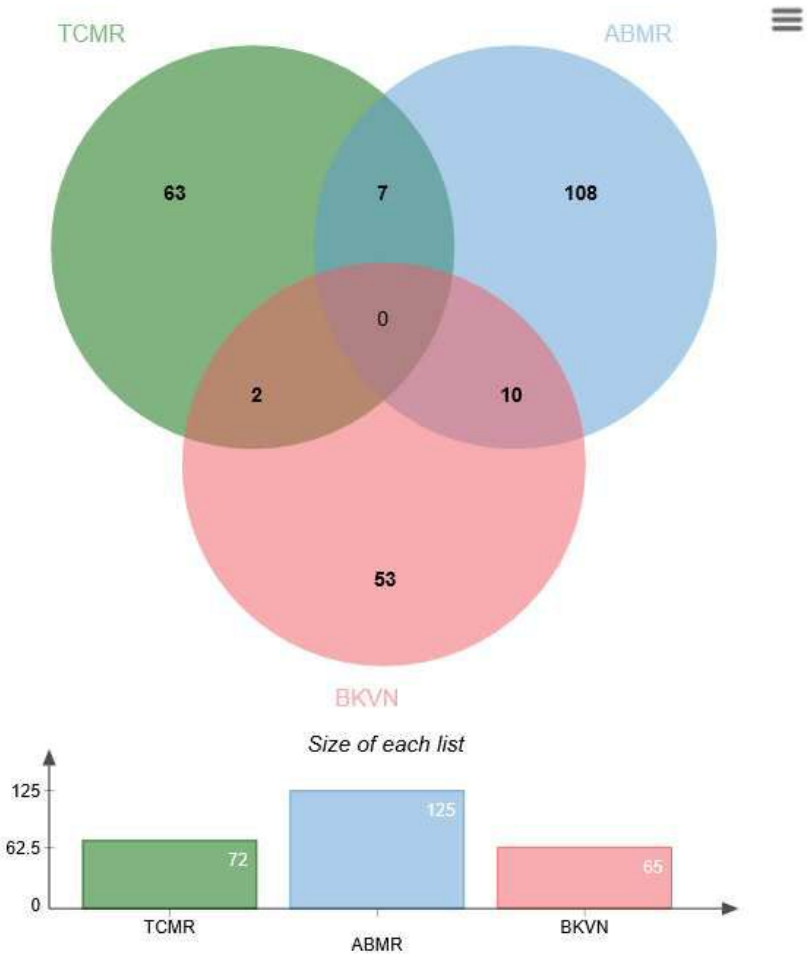
도면2


STEP 2
349 ↓ (349 ≤ PV, 650 ≤ -FC)
500 ↑ (554 ≤ PV, 509 ≥ FC)
Log10(P-value)
Log2(ABMR/NOMA)
15
10
5
0
-6
-4
-2
0
2
4
6

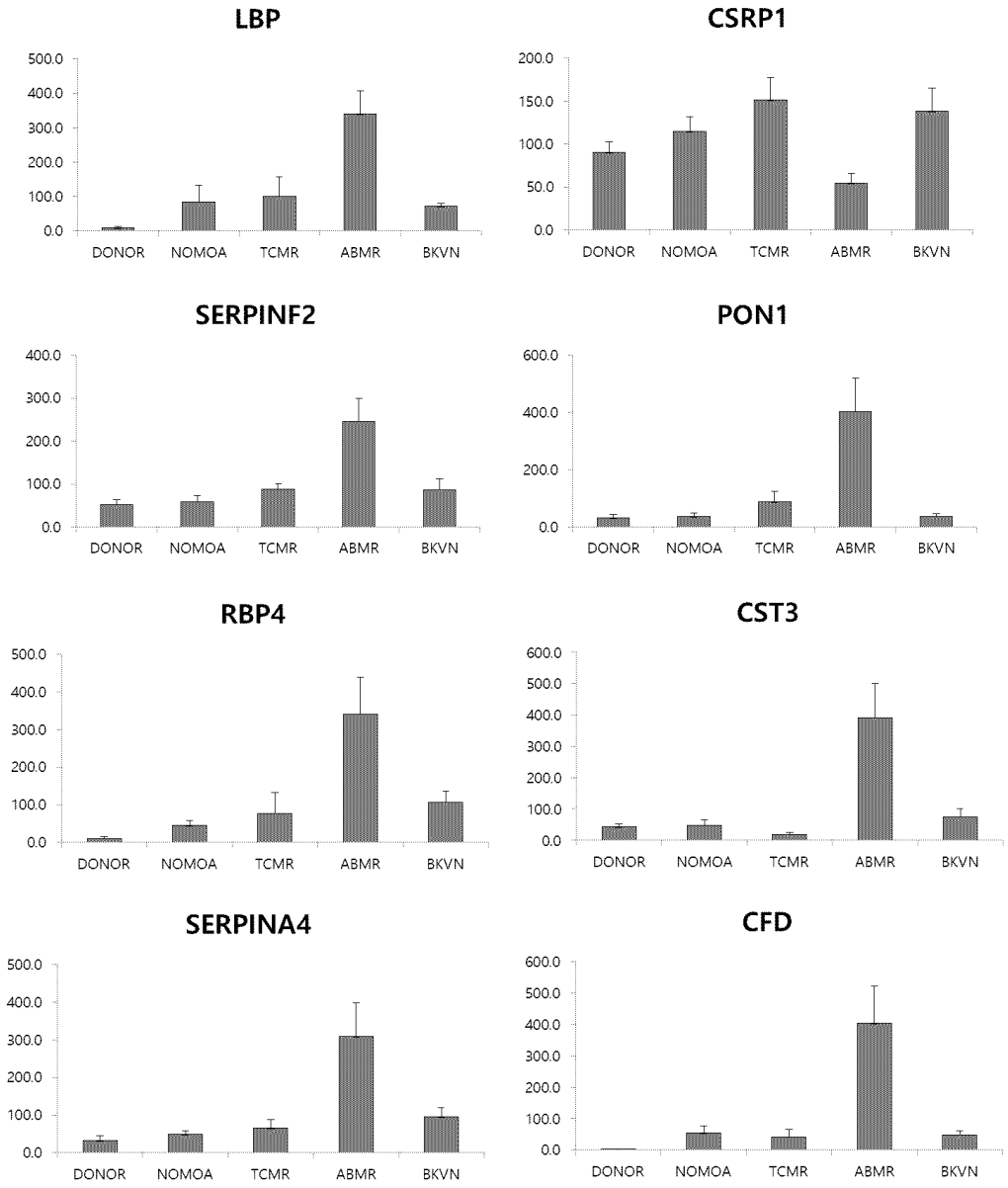
도면3


ABMR
ABMR/NOMOA
62
46
788
Size of each list
834
417
0
108
834
ABMR
ABMR/NOMOA
Number of elements: specific (1) or shared by 2, 3, ... lists

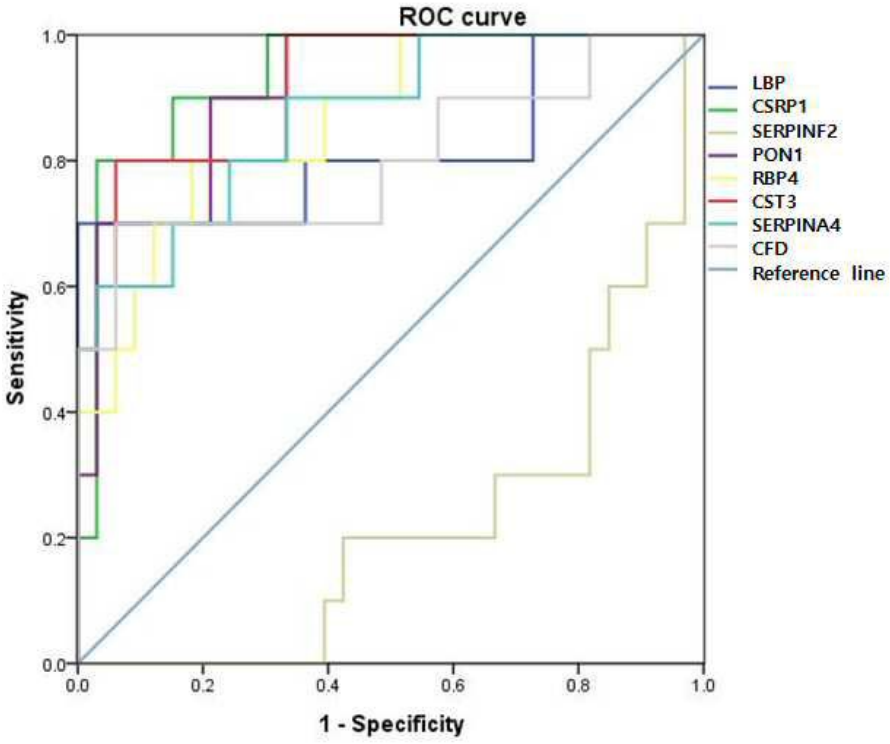
도면4


TCMR
ABMR
63
7
108
0
2
10
53
BKVN
Size of each list
125
62.5
0
72
125
65
TCMR
ABMR
BKVN

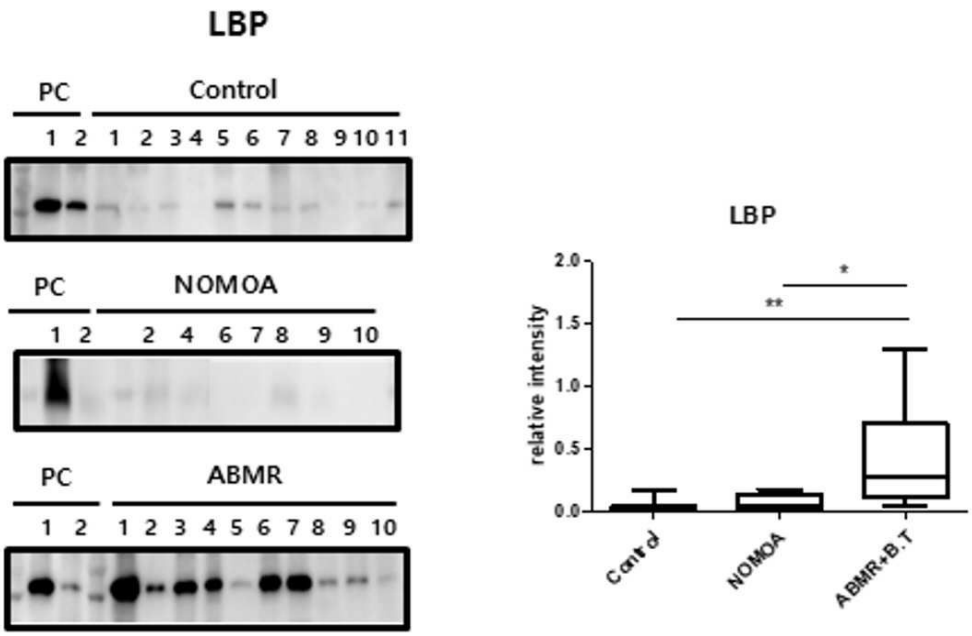
도면5


LBP
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
CSRP1
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
SERPINF2
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
PON1
600.0
400.0
200.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
RBP4
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
CST3
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
SERPINA4
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN
CFD
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
DONOR
NOMOA
TCMR
ABMR
BKVN

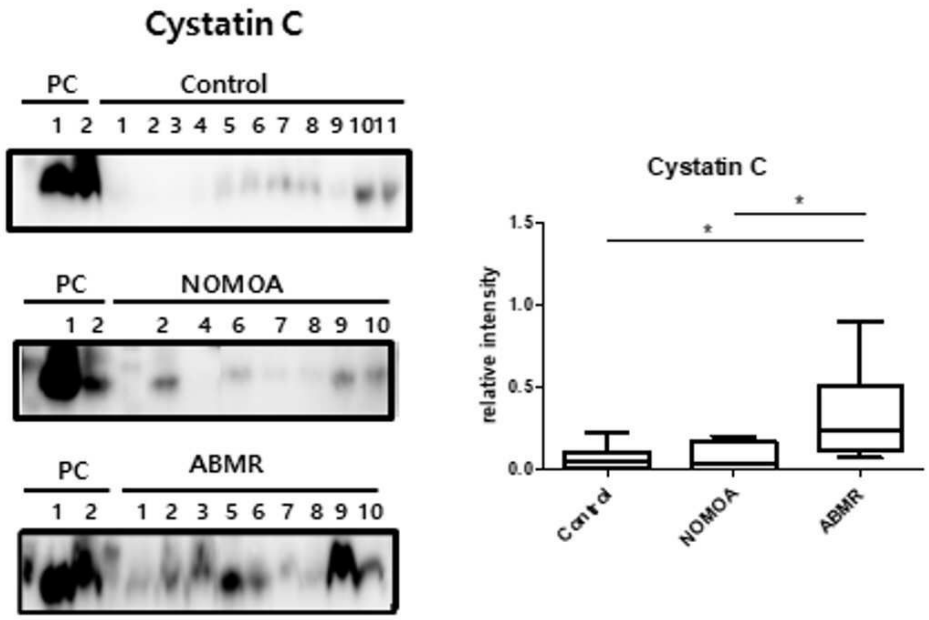
도면6


ROC curve
Sensitivity
1 - Specificity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
LBP
CSRP1
SERPINF2
PON1
RBP4
CST3
SERPINA4
CFD
Reference line

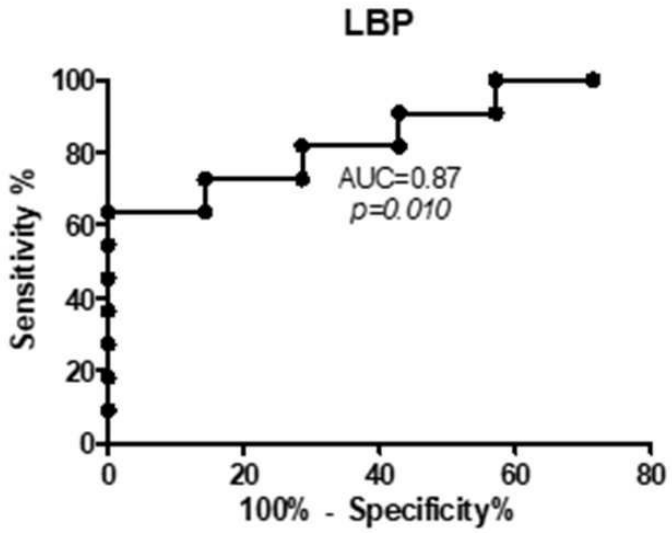
도면7a

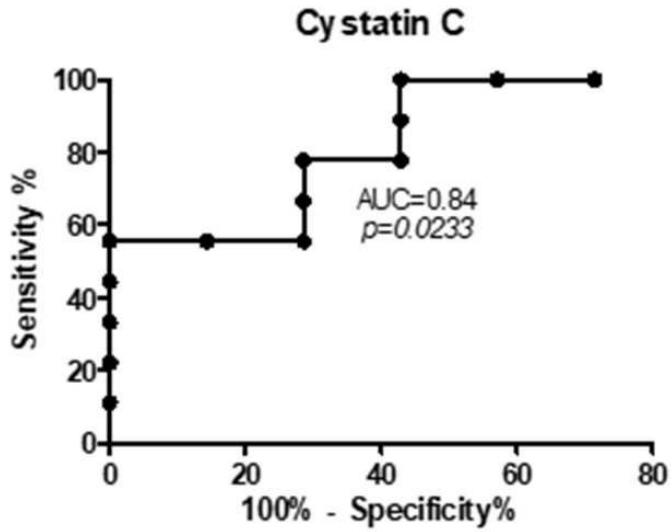

LBP
PC
Control
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
PC
NOMOA
1 2 2 4 6 7 8 9 10
PC
ABMR
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
LBP
relative intensity
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
Contrd
NOMOA
ABMR+B.T

도면7b


Cystatin C
PC
Control
1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
PC
NOMOA
1 2 2 4 6 7 8 9 10
PC
ABMR
1 2 1 2 3 5 6 7 8 9 10
Cystatin C
relative intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Contrd
NOMOA
ABMR

도면8


LBP
Sensitivity %
100
80
60
40
20
0
AUC=0.87
p=0.010
0
20
40
60
80
100% - Specificity%


Cystatin C
Sensitivity %
100
80
60
40
20
0
AUC=0.84
p=0.0233
0
20
40
60
80
100% - Specificity%