



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113702
(43) 공개일자 2018년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0045104

(22) 출원일자 2017년04월07일

심사청구일자 2017년04월07일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이상호

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 218동 308호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

김명희

서울특별시 강동구 동남로 892 강동경희대학교병원

서정우

서울특별시 광진구 능동로44길 35 대원스마트빌 나동 201호

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

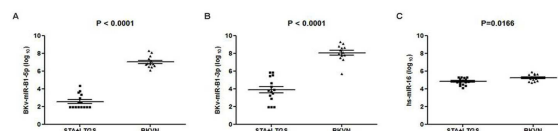
(54) 발명의 명칭 소변 엑소좀 유래 바이러스 miRNA를 이용한 BK 바이러스 신병증 진단 기술

(57) 요약

소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 BK 바이러스 신병증의 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 BK 바이러스 신병증의 진단용 키트, BK 바이러스 신병증 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

본 발명에 따른 'bkv-miR-B1-5p'는 정상군에 비하여 BK 바이러스에 감염된 환자의 소변 엑소좀에서 더 높은 수준으로 존재하며, 소변보다 소변에 포함된 엑소좀에서 더 많이 검출되므로, 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p를 이용하는 본 발명의 조성물은 BK 바이러스에 의한 신병증의 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

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

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 bkv-miR-B1-5p는 소변 유래의 엑소솜 내 포함된 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 제제는 이를 특이적으로 검출하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머는 (a) 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머; (b) 서열번호 5 및 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍; 및 (c) 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트인 것인, 키트.

청구항 7

(a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p를 특이적으로 검출하는 프라이머를 사용하여 BK 바이러스 신병증 의심 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 bkv-miR-B1-5p의 수준을 정상 대조구 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 시료는 소변 유래의 엑소솜인 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단계 (a)의 bkv-miR-B1-5p 수준이 정상 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우, BK 바이러스 신병증으로 진단하는 (c) 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

(a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료는 소변 유래의 엑소솜인 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 단계 (b)의 bkv-miR-B1-5p 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 (a)단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 BK 바이러스 신병증의 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 BK 바이러스 신병증의 진단용 키트, BK 바이러스 신병증 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] BK 바이러스(BKV)는 파포바바이러스(papovavirus)에 속하는 바이러스로서, 원숭이의 파포바이러스인 SV40과 형태적으로 유사하며, 유전체의 유전자구성은 SV40과 동일하다. BK 바이러스는 면역이상인 환자에서 주로 분리되는데, 질환과의 관련성은 분명하지 않다. 그러나, 혈청역학적조사에 따르면 BK 바이러스는 세계각국에서 광범위하게 침범하고 있다고 한다.

[0003] 특히, 신장이식환자에서는 신병증(nephropathy) 및 출혈성 방광염(hemorrhagic cystitis)을 야기하는 주요 원인인데, BK 바이러스성 신병증(BKVN)은 이식된 신장의 기능 약화 및 이식 실패를 야기한다(Pakfetrat M. et al., Int J Organ Transplant Med 2015; 6: 77-84). 신장이식환자에서 BK 바이러스의 감염 비율은 1 내지 10% 사이이며, 이식 결손 빈도는 10 내지 80%로 알려져 있다. 이에, 초기 치료를 위한 BKV 감염의 적절하고 정확한 진단이 매우 중요한 실정이다. 현재, BKV 신병증(BK virus nephropathy; BKVN)은 생체검사 표본에서 얻은 신장 동종 이식 조직에서 BKV의 존재를 확인함으로써 진단한다. 그러나, BKVN의 조직학적 특성은 급성 거부반응과 비슷하여(Li JY. et al, Am J Transplant 2014; 14: 1183-1190), 생체검사를 통한 BKVN의 진단은 약 2/3 정도만의 정확도를 갖는 단점이 있었다.

[0004] 한편, 엑소좀은 세포외적 소낭의 일종으로, 엔도솜 막의 내부 버딩(budding)으로부터 유래한다. 엑소좀은 세포 또는 조직으로부터 유래한 고유의 단백질 및 핵산 등을 포함하고 있기 때문에(Gamez-Valero A, et al., Front Immunol 2015; 6: 6), 이의 내부에 존재하는 RNA, miRNA 등은 진단 분야에서 흥미롭게 다루고 있으며, 특히 엑소좀 내의 miRNA 또는 mRNA는 각각 전립선암 또는 유방암의 바이오마커로 사용될 수 있음이 최근 공지된바 있다(Franzen CA. et al., J Urol 2016; 195:1331-1339, 및 한국 공개등록공보 제10-1335034호). 그러나, 엑소좀 및 이에 포함된 성분을 BKVN의 진단에 이용하기 위한 연구는 전무한 실정이었다.

[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 BK 바이러스 마이크로 RNA인 'bkv-miR-B1-5p'는 신장이식 후 BK 바이러스에 감염된 환자의 소변에 포함된 엑소좀에 다량 존재하며, 전체 소변 보다 엑소좀 분리 분획에서 더 많이 검출됨을 확인하였고, 상기 bkv-miR-B1-5p는 다른 DNA, miRNA 등의 바이오마커에 비하여 검출에 대한 정확도 및 민감도가 높음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p를 특이적으로 검출하는 프라이머를 사용하여 BK 바이러스 신병증 의심 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 bkv-miR-B1-5p의 수준을 정상 대조구 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서는, 마이크로 RNA인 'bkv-miR-B1-5p'는 신장이식 후 BK 바이러스에 감염된 환자의 소변에 포함된 엑소솜에 다량 존재하므로, 상기 소변 엑소솜 내 존재하는 bkv-miR-B1-5p는 BK 신병증의 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0012] 본 발명의 용어, "BK 바이러스 신병증"(BK virus nephropathy; BKVN)은 BK 바이러스에 의해 야기되는 신장병을 의미하며, BK 바이러스 신장병 또는 신장병증 등으로 불린다. 신병증은 신장에 병변이 생긴 상태를 의미하는데, 질환의 단위가 확립되지 않거나 병변이 분류불능인 경우를 모두 총칭한다. 주로, 신장이식 환자에서 면역억제제 투여에 의한 합병증으로 발병되며, BK 바이러스는 이식선의 상피 세포를 침범하여 염증을 일으키고, 결국 이식된 신장의 기능 저하를 야기한다. 본 명세서에서, 상기 BK 바이러스 신병증은 'BKVN'과 혼용되어 명명될 수 있다.

[0013] 본 발명의 용어, "BK 바이러스"(BKV)는 파포바바이러스(papovavirus)에 속하는 바이러스를 의미한다. 주로, 화학요법을 받고 있는 암환자, 비스코트-올드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군 환자의 소변에서 분리되고 있다. 본 명세서에서, 상기 BK 바이러스는 'BKV'와 혼용되어 명명될 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어, "bkv-miR-B1-5p"는 BK 바이러스가 암호화하고 있는 마이크로 RNA(microRNA; miRNA)를 의미한다. 마이크로 RNA는 ~22nt의 작은 비암호화된 RNA(small non coding RNA)로서, 전사 후 레벨(post transcription level)에서 특정 mRNA의 3' UTR에 결합하여 유전자 발현을 조절한다. bkv-miR-B1으로 불리는 전구체 miRNA로부터 bkv-miR-B1-3p 및 bkv-miR-B1-5p의 두 miRNA가 형성되며, 상기 두 miRNA 모두 BK 바이러스가 감염된 세포에서 발현 수준이 상당히 증가한다. bkv-miR-B1-3p는 JCV 및 BKV간에 보존되어 있으나, JCV((JC polyomavirus)와 BKV에 의해 생성된 bkv-miR-B1-5p의 서열은 서로 다른 특징이 있다.

[0015] 본 발명에서, 상기 bkv-miR-B1-5p는 소변 유래의 엑소솜 내 포함된 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어, "엑소솜"은 세포에서 유래된 지질 이중층의 소낭(vesicle)을 의미한다. 엑소솜은 세포 또는 조직으로부터 유래한 고유의 단백질 및 핵산 등을 포함하고 있으며, 다양한 질환의 진단 등에 사용될 수 있는 RNA, miRNA 등의 바이오마커가 다량 포함되어있다.

[0017] 기존 인체 내 BK 바이러스의 활성도 검사는 혈액과 소변의 바이러스 DNA를 검출하는 방법이 임상에 현재 활용되고 있다. 하지만 혈액 바이러스 DNA 검출 방법은 특이도는 높으나 낮은 민감도로 선별 검사에 적합하지 않으며 소변 바이러스 DNA 검출 방법은 민감도는 높으나 특이도가 낮아 높은 위양성(false-positive)율을 나타내어 진단적 정확도가 떨어지는 단점을 가지고 있다.

[0018] 상기 bkv-miR-B1-5p는 BK 바이러스가 감염된 세포에서 그 발현 수준이 상당히 증가하고, 실제 BKVN 혈액에서 bkv-miR-B1-5p의 수준이 상승됨이 최근 보고되었다. 하지만 아직까지 바이러스 bkv-miR-B1-5p를 이용한 임상적용 진단법은 개발되지 않은 상태이며 특히 혈액 내 bkv-miR-B1-5p 검출 방법은 환자의 혈액을 채취하여만 하는 단점이 존재하였는바, 본 발명은 상기 bkv-miR-B1-5p는 소변 엑소솜 내 포함되어 있음을 확인하고, 기존 혈액 바이러스 DNA 및 소변 바이러스 DNA 검출 진단법에 비해 민감도가 특이도가 더 우수하며 혈액이 아닌 소변으로 BK 바이러스 신병증을 간편히 진단할 수 있음을 확인한 것에 그 특징이 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 제제"는 상기 bkv-miR-B1-5p에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 bkv-miR-B1-5p를 증폭시킬 수 있는 제제로서, 구체적인 예로, 이를 특이적으로 검출하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0020] 상기 제제는 상기 bkv-miR-B1-5p의 발현 수준 측정을 위해 직접 또는 간접적으로 표지될 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 베

타 갈락토시다아제 등이 포함되며, 상기 형광물질에는 플루오레세인, 쿠마린, 로다민, 피코에리트린 및 설포로 다민산 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.

[0021] 본 발명의 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 유전자의 mRNA 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머 서열은 상기 bkv-miR-B1-5p의 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.

[0022] 구체적으로, 상기 bkv-miR-B1-5p를 특이적으로 검출하는 프라이머는 (a) 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머; (b) 서열번호 5 및 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍; 및 (c) 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0024] 따라서, 상기 서열번호 1, 및 4 내지 6으로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90%이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0025] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 bkv-miR-B1-5p의 발현량은 다른 환자군에 비하여 BK 바이러스 신병증 환자의 소변 유래 엑소솜에서 특이적으로 높으며(도 1 및 2, 표 3 및 4), 소변 유래 BKV DNA 수치와 상당한 양성 관계를 나타낼뿐만 아니라, 혈액 또는 소변 BKV DNA보다 더욱 높은 민감도 및 특이도로 검출되고(도 3 및 4), 소변보다 소변 유래의 엑소솜에서 bkv-miR-B1-5p의 검출양이 월등히 우수함을 확인하였다(도 7 및 도 9).

[0026] 이는, 소변 유래 엑소솜에 포함된 bkv-miR-B1-5p는 BKVN의 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0027] 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단용 키트를 제공한다.

[0028] 이때, 상기 "BK 바이러스 신병증"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0029] 본 발명의 키트는, 상기 BK 바이러스 신병증 진단용 조성물을 이용하여 상기 bkv-miR-B1-5p의 발현 수준을 측정함으로써 BK 바이러스 신병증을 진단할 수 있다. 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 구체적인 예로, 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는, 상기 bkv-miR-B1-5p에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디데옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 DNA, RNA 또는 miRNA에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0031] 또 다른 하나의 양태는 (a) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, bkv-miR-B1-5p를 특이적으로 검출하는 프라이머를 사용하여 BK 바이러스 신병증 의심 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 상기 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 bkv-miR-B1-5p의 수준을 정상 대조군 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[0032] 이때, 상기 "bkv-miR-B1-5p" 및 "BK 바이러스 신병증"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0033] 본 발명의 용어, "시료"는 소변일 수 있고, 더욱 구체적으로 소변 유래의 엑소솜일 수 있으나, 이에 제한되지

않는다.

- [0034] 본 발명에서, bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 상기 (a) 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) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 (a)의 bkv-miR-B1-5p 수준을 정상 대조구 시료의 것과 비교하는 단계 (b)를 수행한 후, 상기 단계 (a)의 bkv-miR-B1-5p 수준이 정상 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우에 BK 바이러스 신병증으로 진단하는 (c) 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 bkv-miR-B1-5p의 발현량은 다른 환자군에 비하여 BK 바이러스 신병증 환자의 소변 유래 엑소솜에서 특이적으로 높으며(도 1 및 2, 표 3 및 4), 소변보다 소변 유래의 엑소솜에서 bkv-miR-B1-5p의 검출량이 월등히 우수함을 확인하였다(도 7 및 도 9).
- [0037] 이는, 소변 유래 엑소솜에 포함된 상기 bkv-miR-B1-5p는 BKVN의 진단에 유용하게 활용될 수 있으며, 이의 수준이 증가하는 경우에 BK 바이러스 신병증인 것으로 판단할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0038] 또 다른 하나의 양태는 (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 후보 물질이 처리된 시료에서 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 이때, 상기 "bkv-miR-B1-5p" 및 "BK 바이러스 신병증"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0040] 본 발명의 용어, "BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질"은 BK 바이러스 신병증을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 BK 바이러스 신병증을 호전 또는 개선 시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 치료가능 예상물질을 모두 포함한다.
- [0041] 본 발명에서, bkv-miR-B1-5p의 수준을 측정하는 상기 (b) 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), 공동-면역침전 어세이(Co-Immunoprecipitation assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 실시간 RT-PCR 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 단계 (b)의 bkv-miR-B1-5p 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 (a)단계에서 처리한 후보물질을 bkv-miR-B1-5p 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명에 따른 'bkv-miR-B1-5p'는 정상군에 비하여 BK 바이러스에 감염된 환자의 소변 엑소솜에서 더 높은 수준으로 존재하며, 소변보다 소변에 포함된 엑소솜에서 더 많이 검출되므로, 소변 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p를 이용하는 본 발명의 조성물은 BK 바이러스에 의한 신병증의 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 BKV 신병증(BK viral nephropathy; BKVN) 환자에서 증가된 bkv-miR-B1-3p 및 bkv-miR-B1-5p의 수준을 보여주는 그래프이다. STA(stable graft function) 및 LTGS(long-term stable graft function)는 이식된 신장이 안정적인 기능을 나타내는 환자 그룹을 의미한다.
- 도 2는 신장이식 상태에 따른 혈장 유래 BKV DNA(A), 소변 유래 BKV DNA(B), 소변 유래 엑소솜(이하, '소변 엑소솜'으로 명명) 유래 bkv-miR-B1-5p(C) 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16(D)의 수준을 보여주는 그래프이다. bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16는 BKVN 환자에서 가장 높은 수준을 나타내었다($p < 0.0001$). 다만, 혈장 유래 BKV DNA 및 소변 유래 BKV DNA에서 각각 2명 및 1명의 환자가 음성의 결과를 나타내었다. 이때, STA는 안정적인 기능(stable graft function), ACR은 급성 세포 거부반응(acute cellular rejection), aABMR은 급성 항체-매개 거부반응(acute antibody mediated rejection), cABMR은 만성 활성 항체-매개 거부반응(chronic active antibody-mediated rejection), LTGS은 이식편의 장기간의 안정적인 기능(long-term stable graft function), BKVN는 BK 바이러스 신병증(BK viral nephropathy)의 환자 그룹을 의미한다.
- 도 3은 소변 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p 및 BKV DNA 수치의 상관관계를 보여주는 그래프이다. A는 bkv-miR-B1-5p 및 혈장 유래 BKV DNA 수치, B는 bkv-miR-B1-5p/miR-16 및 혈장 유래 BKV DNA 수치, C는 bkv-miR-B1-5p 및 소변 엑소솜 유래 BKV DNA 수치, B는 bkv-miR-B1-5p/miR-16 및 소변 엑소솜 유래 BKV DNA 수치의 양성적인 연

관성을 보여주는 그래프이다. 흰색의 원은 BKV 신병증을 갖는 환자, 및 흑색의 원은 BKV 신병증을 갖지 않은 이외의 환자를 나타낸다. 점선은 각 테스트에서의 컷오프(bkv-miR-B1-5p의 경우 8.75×10^5 카피(copies)/mL, bkv-miR-B1-5p/miR-16의 경우 16, 혈장의 경우 1×10^4 카피/mL, 소변 BKV DNA의 경우 1×10^7 카피/mL를 나타낸다.

도 4는 BKVN의 진단을 위한 ROC(Receiver operating characteristic) 커브를 보여주며, 각각 bkv-miR-B1-5p(A), bkv-miR-B1-5p/miR-16(B), 혈장 유래 BKV DNA(C), 및 소변 유래 BKV DNA(D)를 사용한 결과를 나타낸다. ROC 커브는 AUC(area under the curve)에 의해 BKVN를 갖는 환자를 탐지하기 위한 진단의 정확도를 보여주며, bkv-miR-B1-5p, bkv-miR-B1-5p/miR-16, 혈장 유래 BKV DNA 및 소변 유래 BKV DNA의 AUC는 각각 0.989, 0.985, 0.914 및 0.932을 나타낸다.

도 5는 소변 엑소좀(exosome) 및 소변(소변 상층액; supernatant)에 포함된 토탈(total) RNA의 양을 보여주는 그래프이다.

도 6은 비-BKVN(non-BKVN) 그룹 또는 BKVN 그룹에서 검출한 토탈 RNA의 양을 보여주는 그래프이다. A는 소변 엑소좀 유래 토탈 RNA, B는 소변 상층액 유래 토탈 RNA의 양을 나타낸다.

도 7은 비-BKVN 그룹 또는 BKVN 그룹에서 검출한 bkv-miR-B1-5p의 양을 보여주는 그래프이다. A는 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p, B는 소변 상층액 유래 bkv-miR-B1-5p의 양을 나타낸다.

도 8은 비-BKVN 그룹 또는 BKVN 그룹에서 검출한 소변 엑소좀 유래 miR-16의 양을 보여주는 그래프이다.

도 9는 비-BKVN 그룹 또는 BKVN 그룹에서 검출한 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p/miR-16의 수치를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1. 신장이식환자 집단의 특성 분석

[0047] 2013년 8월부터 2015년 7월까지 5개의 센터(강동 경희대학교 병원, 경북대학교 병원, 삼성의료원, 가톨릭대학교 성모병원)에서 신장이식을 받은 458명의 신장 동종 이식 환자를 대상으로 샘플을 수집하였고, ARTKT-1(assessment of immunologic risk and tolerance in kidney transplantation) 연구를 통해 BKV 신병증(BKV nephropathy; BKVN) 환자를 선택하였다.

[0048] BKVN의 진단은 신장 동종 이식 생검을 통해 확인하였다. 구체적으로, 바이러스 40 면역 조직 화학 염색에 대한 양성반응, 간질 단핵 세포 염증 세포 침윤을 동반한 신 세뇨관 세포에서의 바이러스 세포 변이 효과의 존재 및/또는 동질의 핵내 바이러스 성 개재물의 존재 등의 BKVN의 병리학적 양상을 통해 BKVN를 진단하였다.

[0049] 또한, Banff 2007 점수 체계에 따라 모든 생검 표본에 대하여 점수를 매기고 진단하였다. MDRD(modification of diet in renal disease) 공식을 사용하여 사구체 여과율(eGFR; Estimated glomerular filtration rate)을 계산하였다. 본 연구는 지역기관 검토위원회의 승인을 받았으며(#2012-01-030, KHNMC), 임상연구정보 서비스(KCT0001010)에 등록되었다.

[0050] 실시예 2. 소변 및 혈장 시료(specimens)의 수집

[0051] 생체검사 시, 아침 두 번째의 중간뇨 샘플을 신장이식환자로부터 수집하였다. 소변 시료를 상온에서 2,000g로 20분 동안 원심분리하였고, 상층액과 펠렛을 분리하였다. 상층액을 5개의 분취물로 나누었고, 사용시까지 -80℃에서 보관하였다. 또한, 소변 시료의 수집과 동시에 혈장 샘플을 수집하였고, 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.

[0052] 실시예 3. BKV RNA의 분리 및 BKV miRNA의 정량

[0053] 소변 유래 엑소좀(이하, '소변 엑소좀'으로 명명) 유래의 토탈 RNA는 exoRNeasy Serum/Plasma midi 키트(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였고, DNA 오염 정도, RNA의 순도는 아가로스 겔 전기영동 및 Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 확인하였다. 이후, BKV miRNA 발현양은 human TaqMan miRNA 어레이(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용한 정량적 실시간 역전사 PCR(quantitative real-time reverse transcriptase PCR; qRT-PCR)을 통해 확인하였다.

[0054] 구체적으로, 3 μ l의 RNA, TaqMan miRNA 역전사 키트 및 TaqMan miRNA-특이적 프라이머(어세이 IDs: hsa-miR-16:000391, bkv-miR-B1-5p:007796, bkv-miR-B1-3p:006801; Applied Biosystems)를 이용하여 반응을 수행하였다. 상기 qRT-PCR 반응에는 1 μ l의 역전사 생성물, 1x TaqMan Universal PCR mastermix, no AmpErase UNG, 및 1 μ l의 프라이머 믹스를 포함하도록 하였다. 상보적 DNA(complementary DNA; cDNA)의 증폭에는 ABI StepOnePlus real-time PCR system(Applied Biosystems)을 이용하였고, 이를 위해 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 60초에서 60초의 반응을 40회 수행하였다.

[0055] 이때, 검출된 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p, bkv-miR-B1-3p 및 miR-16의 서열은 하기 표 1에 기재하였고, 상기 miRNA의 검출에 사용한 프라이머의 서열은 하기 표 2에 기재하였다.

표 1

이름	서열	구분
bkv-miR-B1-5p	AUCUGAGACUUGGAAGAGCAU	서열번호 1
bkv-miR-B1-3p	UGCUUGAUCCAUGUCCAGAGUC	서열번호 2
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	서열번호 3

표 2

이름	프라이머 서열 (5'→3')	구분
bkv-miR-B1-5p	bkv-miR-B1 stem-loop RT primer: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACATGCTC	서열번호 4
	bkv-miR-B1-5p Forward primer: GGGATCTGAGACTTGGGAA	서열번호 5
	Universal Reverse primer: GTGCAGGGTCCGAGGT	서열번호 6
bkv-miR-B1-3p	bkv-miR-B1 stem-loop RT primer: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGACTCT	서열번호 7
	bkv-miR-B1-3p Forward primer: GGTTGCTTGATCCATGTCC	서열번호 8
	Universal Reverse primer: GTGCAGGGTCCGAGGT	서열번호 9
miR-16	Hsa-miR-16 stem-loop RT primer: GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGCCAA	서열번호 10
	Hsa-miR-16-5p Forward primer: GTTTGGTAGCAGCACGTAAATA	서열번호 11
	Universal Reverse primer: GTGCAGGGTCCGAGGT	서열번호 12

[0058] 또한, 절대정량법을 이용하기 위하여 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(double stranded oligonucleotides) 형태의 BKV miRNA를 합성하여 사용하였다. 10배의 단계-희석된 농도(10^{-1} 내지 10^{-8} ng/ μ l)를 갖는 5'-AUCUGAGACUUGGAAGAGCAU (서열번호 1) 또는 5'-UGCUUGAUCCAUGUCCAGAGUC (서열번호 2)의 합성된 BKV miRNA로 표준 곡선(standard curve)을 그렸고, 상기 BKV miRNA의 양을 카피 수(copy number)로 계산하여 환자의 샘플에서 BK 바이러스의 양을 측정하였다.

[0059] 실시예 4. BKV DNA의 분리 및 정량

[0060] 소변 또는 혈장 유래의 BKV DNA는 AccuPrep[®] Viral DNA Extraction 키트(Bioneer Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 추출하였다. 이후, AccuPower[®] BKV Quantitative PCR 어세이(Bioneer Co.)를 위해, 5 μ l의 상기 DNA 추출물을 45 μ l의 마스터 믹스(master mix)와 혼합하였고, PCR thermocycler(Exicycler 96 Real-Time Quantitative Thermal Block; Bioneer Co.)를 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 구체적으로, 95℃에서 5분간의 전-변성 반응을 수행한 이후, 95℃에서 5초간의 변성 반응 및 55℃에서 5초간의 어닐링/연장 반응을 45회 반복하였다. 샘플에 의해 PCR이 방해되는지 여부를 확인하기 위해, BKV 타겟 서열과 관련없는 DNA 서열로 이루어

진 내부적 양성 대조군을 각 반응과 함께 증폭하였다.

[0061] 실시예 5. 통계학적 분석

[0062] 환자 특성의 평균을 비교하기 위하여, 편도분석을 사용하였다. BKV miRNA 발현과 BKV DNA 바이러스 수치(viral load) 간의 상관관계를 분석하기 위하여, Spearman's Rho 비모수적 상관계수(Spearman's Rho nonparametric correlation coefficient)를 사용하였다. 7개의 임상 그룹간에 BKV miRNA 발현을 비교하기 위하여, Kruskal-Wallis 비모수 테스트를 사용하였다. BKV miRNA, BKV DNA 수치, 및 BKVN의 탐지 간의 상관관계를 평가하기 위하여, ROC(receiver operating characteristic) 커브의 아래 영역을 분석하였다. 높은 민감도 및 특이도를 제공하기 위하여, 각 측정값에서 적정의 컷오프 점수를 측정하였다. $p < 0.05$ 일 때, 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0063] 실험예 1. 신장이식환자 집단의 특성 분석

[0064] 실험예 1-1. 신장이식환자에서 BKV miRNA 검출 여부 확인

[0065] 소변 엑소좀 유래 miRNAs를 이용하여 BKVN을 진단하는 방법의 유효성을 판단하기 위하여, 먼저 상기 실시예 1 내지 5에 따른 방법으로 임상시험에 참여하는 환자의 특성을 분석하여 BKVN 환자와 다른 신장 이식 환자를 분류하였다. 이후, 상기 환자 집단에서 검출되는 소변 엑소좀 유래 miRNA를 분석하여 그 결과를 하기 표 3에 정리하였다.

[0066] 한편, 하기 표 3에서, BKVN는 BK 바이러스 신병증(BK viral nephropathy); eGFR은 추정된 사구체 여과율(estimated glomerular filtration rate); PCR은 단백질 및 크레아틴의 비율(protein-to-creatinine ratio); ACR은 급성 세포 거부반응(acute cellular rejection); ABMR은 급성 항체-매개 거부반응(acute antibody mediated rejection); ATN은 급성 관상 괴사(acute tubular necrosis); GN은 사구체 신염(glomerulonephritis); CNI는 칼시뉴린 억제제(calcineurin inhibitor)를 의미한다.

[0067] 병리학적 진단의 기타에는 비 특이성 간질 섬유증(nonspecific interstitial fibrosis), 관상 위축(tubular atrophy), 고혈압성 신증 경화증(hypertensive nephrosclerosis), 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy) 및 급성 간질 신염(acute interstitial nephritis)이 포함된다.

[0068] 아울러, BKVN의 패턴은 공지된 방법(Drachenberg RC, *American journal of transplantation*. 2001;1:373-381)에 따라 평가하였다.

표 3

	BKVN (n=13)	BKVN 외 (n=445)	p 값
연령 (연)	46.7 ± 15.8	46.9 ± 11.7	0.9
성별 (남성: 여성)	9:4	296:149	0.8
이식된 기간(일)	321 ± 314	748 ± 1377	<0.001
병리학적 진단 (수, %)	-	정상 (142, 31.9%) ACR (76, 17.2%) ACR-의심 (55, 12.4%) ABMR (64, 14.3%) ATN (31, 7.0%) GN (29, 6.5%) CNI 독성 (26, 5.8%) 기타 (22, 4.9%)	
BKVN의 병리학적 형태 ⁹ (수, %)	Pattern A (4, 30.8%) Pattern B (6, 46.1%) 정의되지 않음 (3, 23.1%)	-	
크레아틴 (Creatinine, mg/dL)	2.30 ± 0.92	2.05 ± 1.69	0.6
eGFR (ml/분/1.73m ²)	30.96 ± 9.00	46.57 ± 24.85	<0.001
소변 PCR (mg/gCr)	407.8 ± 482.7	890.4 ± 1781.7	0.4
소변 유래 엑소좀 miRNA	bkV-miR-B1-5p (카피/mL) bkV-miR-B1-3p (카피/mL)	- -	
	3.3x10 ⁷ ± 5.7x10 ⁷ 3.9x10 ⁸ ± 5.7x10 ⁸		

[0070] 그 결과, 상기 표 3에서 볼 수 있듯이, 신장 이식 후, BKNV 진단의 평균 기간은 45.9 ± 44.9 주(321 ± 314 일)이었고, 생검 당시의 평균 혈청 크레아틴은 2.30 ± 0.92 mg/dL임을 확인하였다.

[0071] 또한, 병리 확인에 의해 BKNV로 진단된 13명의 모든 BKNV 환자에서는 bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-3p 수준이 높게 나타났으며, 소변 엑소좀 유래 miRNA-B1-5p의 수준은 $3.3 \times 10^7 \pm 5.7 \times 10^7$ 카피/mL, 및 miRNA-B1-3p의 수준은 $3.9 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^8$ 카피/mL임을 확인하였다. 그러나, BKNV 환자가 아닌 것으로 판명된 다른 신장 이식 환자에서는 bkv-miR-B1-5p 또는 bkv-miR-B1-3p가 검출되지 않음을 확인하였다.

[0072] 상기 결과를 통해, bkv-miR-B1-5p 또는 bkv-miR-B1-3p는 BKNV 환자에서만 검출되므로, 신장 이식 환자의 BKNV 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0073] 실험예 1-2. 신장이식환자에서 BKNV DNA 또는 BKNV miRNA 검출 여부 확인

[0074] 소변 엑소좀 유래 miRNAs를 이용하여 BKNV를 진단하는 방법의 유효성을 판단하기 위하여, 먼저 실시예 1에 따른 방법으로 임상시험에 참여하는 환자의 특성을 분석하였고, BKNV 환자와 다른 신장 이식 환자의 임상 특성을 비교하였다. 이후, 실시예 3에 따른 방법으로 상기 환자 집단에서 검출되는 BKNV DNA 또는 BKNV miRNA를 분석하여 그 결과를 하기 표 4에 정리하였다.

표 4

	BKNV	정상	ACR	급성 ABMR	만성 ABMR	p 값
환자의 수	13	15	27	9	16	
연령 (연)	46.7 ± 15.8	51.7 ± 10.9	47.6 ± 10.7	47.0 ± 8.0	49.5 ± 9.2	0.7
성별 (남성: 여성)	9:4	10:5	18:9	7:2	11:5	0.9
이식된 기간(일)	321 ± 314	138 ± 46	479 ± 662	1129 ± 1038	3257 ± 1895	<0.001
혈청 크레아틴 (mg/dL)	2.30 ± 0.92	0.85 ± 0.10	2.88 ± 2.57	3.08 ± 1.50	2.88 ± 1.59	<0.001
eGFR (mL/분/1.73 m ²)	23.3 ± 3.0	77.5 ± 18.3	33.7 ± 17.2	26.6 ± 13.4	27.2 ± 13.0	<0.001
혈장 BKNV DNA (카피/mL)	$1.3 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	$6.7 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10 \pm 7.5 \times 10$	<0.001
소변 BKNV DNA (카피/mL)	$6.4 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^9$	$1.4 \times 10^2 \pm 2.7 \times 10^2$	$2.0 \times 10^5 \pm 9.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^9$	$6.6 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^6$	<0.001
소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p	$3.3 \times 10^7 \pm 5.7 \times 10^7$	$2.3 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^3$	$1.5 \times 10^4 \pm 7.5 \times 10^4$	$2.9 \times 10^6 \pm 8.4 \times 10^6$	$2.2 \times 10^3 \pm 7.1 \times 10^3$	<0.001
소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-3p	$3.9 \times 10^8 \pm 5.7 \times 10^8$	$1.4 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^6$	$9.5 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^7$	$1.7 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^5$	<0.001
소변 엑소좀 유래 miR-16	$2.5 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^5$	$9.0 \times 10^4 \pm 6.8 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$	$7.6 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^5$	0.08

[0076] 그 결과, 상기 표 4에서 볼 수 있듯이, BKNV 환자와 다른 그룹 간에 연령이나 성별에는 유의한 차이가 없으며, BKNV 및 이식거부(급성 및 만성)를 보이는 환자들은 증가된 혈청 크레아틴(creatinine; Cr) 수준 및 감소된 eGFR를 나타냄을 확인하였다.

[0077] 또한, 혈장 유래 BKNV DNA를 이용한 BKNV의 진단 결과, BKNV 환자의 대부분에서 혈장 유래 BKNV DNA는 높은 수준으로 검출되었으나, 현재 권장되는 컷오프 값(cut-off value)보다 낮은 값($\geq 1 \times 10^4$ 카피/mL)을 나타냄을 확인

하였고, 13명의 BKVN 환자 중에서 3명이 거짓 음성(false negative)을 나타냄을 확인하였다. 아울러, 소변 유래 BKVN DNA를 이용한 BKVN의 진단 결과, 13명의 BKVN 환자 중에서 1명이 거짓 음성을 나타내며, 67명의 BKVN이 아닌 환자 중에서 3명이 거짓 양성(false positive)을 나타냄을 확인하였다.

[0078] 한편, 상기 표 4 및 도 1에서도 볼 수 있듯이, 소변 엑소좀 유래 miRNAs인 bkv-miR-B1-3p 및 bkv-miR-B1-5p 수준은 BKVN 환자에서 모두 유의하게 증가하지만, 소낭성 miRNA(vesicular miRNA)의 대리 마커(surrogate marker)로 알려진 miR-16의 수준은 BKVN 환자와 정상 신장 기능을 가진 환자간에 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 이에 따라, 검출된 bkv-miR-B1-5p 또는 bkv-miR-B1-3p의 발현양을 miR-16으로 표준화하는 것은 혈장 및 소변 BKV DNA와의 상관관계, 및 민감도, 특이도 등에 영향을 미치지 않을 것임을 알 수 있었다.

[0079] 상기 결과를 통해, bkv-miR-B1-5p 또는 bkv-miR-B1-3p는 거짓 음성 또는 거짓 양성을 나타내지 않으므로, BKVN의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0080] 실험예 2. 혈장 유래 BKV DNA, 소변 유래 BKV DNA, 및 소변 엑소좀 유래 BKV miRNAs의 비교

[0081] 실험예 2-1. 신장이식 상태에 따른 BKV DNA 및 BKV miRNAs 발현양의 비교

[0082] 소변 엑소좀 유래 miRNAs를 이용하여 BKVN을 진단하는 방법의 유효성을 판단하기 위하여, 먼저 실시예 3에 따른 방법으로 신장이식 상태에 따른 소변 엑소좀 유래 BKV miRNAs의 발현양을 비교하였다.

[0083] 먼저, bkv-miR-B1-5p는 JVC(JC virus)와 BKV를 구분하기 위해 사용되는 특정한 서열이며(Li JY, et al. Am J Transplant 2014; 14: 1183-1190), BKV에 대한 특이도가 bkv-miR-B1-3p보다 더 높음에 따라, BKVN를 특이적으로 확인하기 위하여 bkv-miR-B1-5p를 검출하는 PCR 어세이를 수행하였다. 구체적으로, 혈장 유래 BKV DNA, 소변 유래 BKV DNA, 및 소변 엑소좀 유래 BKV miRNAs인 bkv-miR-B1-5p의 발현양을 비교하였다.

[0084] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, BKVN 환자에서는 bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16의 수준이 높게 나타남을 확인하였다.

[0085] 상기 결과를 통해, 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p의 검출은 BKVN의 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0086] 실험예 2-2. BKV DNA 및 소변 유래 BKV miRNAs의 상관관계 분석

[0087] 소변 엑소좀 유래 miRNAs를 이용하여 BKVN을 진단하는 방법의 유효성을 판단하기 위하여, 먼저 실시예 3 및 4에 따른 방법으로 측정된, 신장이식 상태에 따른 혈장 유래 BKV DNA, 소변 유래 BKV DNA, 및 소변 엑소좀 유래 BKV miRNAs의 발현양의 상관관계를 분석하였다.

[0088] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16은 소변 유래 BKV DNA 수치와 상당한 양성 관계를 나타냄을 확인하였다($r=0.886$ 및 0.974). 그러나, bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16는 혈장 유래 BKV DNA와는 상관관계가 낮음을 확인하였다($r=0.809$ 및 0.808). 또한, 혈장 유래 BKV DNA는 세 개의 거짓 양성을 나타냄을 확인하였다. 아울러, BKV DNA가 BKVN을 갖는 대부분의 환자에서 높은 수준으로 탐지되었음에도 불구하고, 현재 BKV 신병증의 진단에 권고되는 BKV 혈장 바이러스 수치의 컷오프는 $\geq 1 \times 10^4$ 카피/mL로서 과소평가되고 있음을 알 수 있었다(Gonzalez S, et al. Transplant Proc 2015; 47: 1777-1785.).

[0089] 또한, 도 4에서 볼 수 있듯이, 80개의 시료로부터의 데이터를 사용한 ROC 커브 분석을 통해, bkv-miR-B1-5p, bkv-miR-B1-5p/miR-16, 혈장 유래 BKV DNA 및 소변 유래 BKV DNA의 AUC(areas under the curve)는 각각 $0.989(95\% \text{ CI } 0.934-1.000)$, $0.985(95\% \text{ CI } 0.928-0.999)$, $0.914(95\% \text{ CI } 0.830-0.965)$ 및 $0.932(95\% \text{ CI } 0.853-0.976)$ 임을 확인하였다. 또한, bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16의 컷오프 수준은 각각 8.75×10^5 카피/mL(민감도 100%; 특이도 98.51%) 및 16(민감도 100%; 특이도 98.51%)임을 확인하였다. 또한, 소변 유래 BKV DNA PCR 테스트를 위한 컷오프 값은 1×10^7 카피/mL(민감도 92.31%; 특이도 97.01%)로서 이는 현재 권고되는 바이러스 수치의 컷오프와 동일함을 확인하였다. 반면, 혈장 유래 BKV DNA PCR 테스트를 통해 확인한 수치는 2.9×10^3 카피/mL(민감도 84.62%; 특이도 98.51%)로서, 현재 권고되는 컷오프 값인 1×10^4 카피/mL보다 낮음을 확인하였고, 민감도 또한 bkv-miR-B1-5p 및 bkv-miR-B1-5p/miR-16를 검출하는 경우보다 낮음을 확인하였다.

[0090] 상기 결과를 통해, 혈장 유래 BKV DNA 또는 소변 유래 BKV DNA보다 소변 엑소좀 유래 bkv-miR-B1-5p의 검출이 BKVN의 진단에 더욱 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0091] 실험예 3. 소변 유래 BKV miRNAs 및 소변 엑소솜 유래 BKV miRNAs의 비교

[0092] 실험예 3-1. 토탈 RNA 검출량의 비교

[0093] 상기 실험예 2를 통해, 동일하게 소변에서 유래한 시료이더라도 BKV DNA보다 엑소솜 유래 miRNAs, 즉 bkv-miR-B1-5p가 BKVN의 진단에 더 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 이에, 상기 소변 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p가 소변, 즉 소변 상층액에 포함된 bkv-miR-B1-5p보다 BKVN의 진단에 더 유용하게 사용될 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0094] 먼저, 소변 엑소솜 및 소변(소변 상층액)에 포함된 토탈 RNA의 양을 비교하였다. 구체적으로, 총 11개의 샘플(비-BKVN 그룹: 1개의 정상 신기능(STA) 샘플, 2개의 세포 급성 거부반응(ACR) 샘플, 2개의 급성 항체-매개 거부반응(aABMR) 샘플, 1개의 장기 생존군(LTGS) 샘플; 및 BKVN 그룹: 5개의 BK 바이러스 신병증(BKVN) 샘플)을 분석에 사용하였다. 각 샘플에서 소변 상층액 1 ml 및 소변 엑소솜 1 ml를 각각 확보하였다. 이후, 소변 상층액 유래 RNA는 TRIzol LS를 이용하여 추출하였고, 소변 엑소솜 유래 RNA는 exoRNeasy Serum/Plasma midi kit(Qiagen 사)을 사용하여 추출하였다.

[0095] 각 유래의 RNA를 정량한 결과, 하기 표 5 및 도 5에서 볼 수 있듯이, 소변 상층액에는 소변 엑소솜보다 더 많은 양의 RNA가 포함되어 있음을 확인하였다.

표 5

샘플 종류	농도 (ng/ul)	260/280	260/230	Total amount (ug/ul)
엑소솜 유래 RNA	26.0 ± 13.64	1.49 ± 0.04	0.72 ± 0.39	0.390 ± 0.21
상층액 유래 RNA	39.6 ± 15.14	1.52 ± 0.03	0.42 ± 0.14	2.373 ± 0.91

[0097] 다만, 도 6에서 볼 수 있듯이, 소변 엑소솜 유래 RNA의 양은 비-BKVN 그룹과 BKVN 그룹 간에 큰 차이가 없으며, 소변 상층액 유래 RNA의 양 또한 비-BKVN 그룹과 BKVN 그룹 간에 큰 차이가 존재하지 않음을 확인하였다.

[0098] 실험예 3-2. bkv-miR-B1-5p 검출량의 비교

[0099] 소변 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p가 소변(소변 상층액)에 포함된 bkv-miR-B1-5p보다 BKVN의 진단에 더 유용하게 사용될 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 실험예 3-1의 각 샘플에서 추출한 토탈 RNA 3 μ l로부터 키트(TaqMan microRNA Reverse Transcription kit)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 이후 상기 실시예 3에 기재된 바에 따라 소변 엑소솜 또는 소변 상층액에 포함된 bkv-miR-B1-5p를 검출하였다.

[0101] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, BKVN 그룹에서 검출되는 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p의 양은 비-BKVN 그룹에서 검출되는 양보다 현저히 많음을 확인하였다. 그러나, 상층액 유래 bkv-miR-B1-5p의 양은 비-BKVN 그룹과 BKVN 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 나지 않음을 확인하였다.

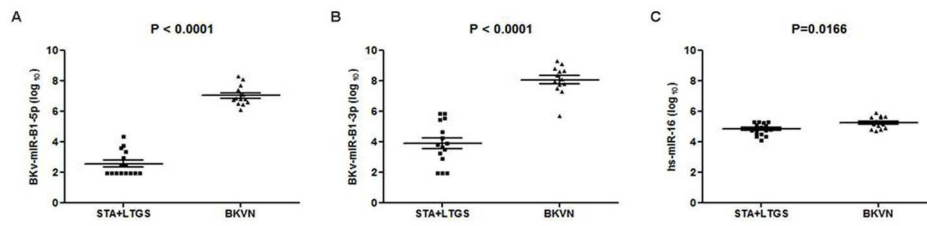
[0102] 한편, 도 8에서 볼 수 있듯이, 소변 엑소솜 유래 miR-16의 양은 비-BKVN 그룹과 BKVN 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 나지 않음을 확인하였으며, 이에 따라, 도 9에서 볼 수 있듯이, 소변 유래 엑소솜에서 검출된 bkv-miR-B1-5p를 miR-16으로 표준화하는 경우에도 비-BKVN 그룹과 BKVN 그룹이 잘 구별됨을 확인하였다.

[0103] 상기 결과를 통해, 소변 유래 bkv-miR-B1-5p보다 소변 엑소솜 유래 bkv-miR-B1-5p의 검출이 BKVN의 진단에 더욱 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

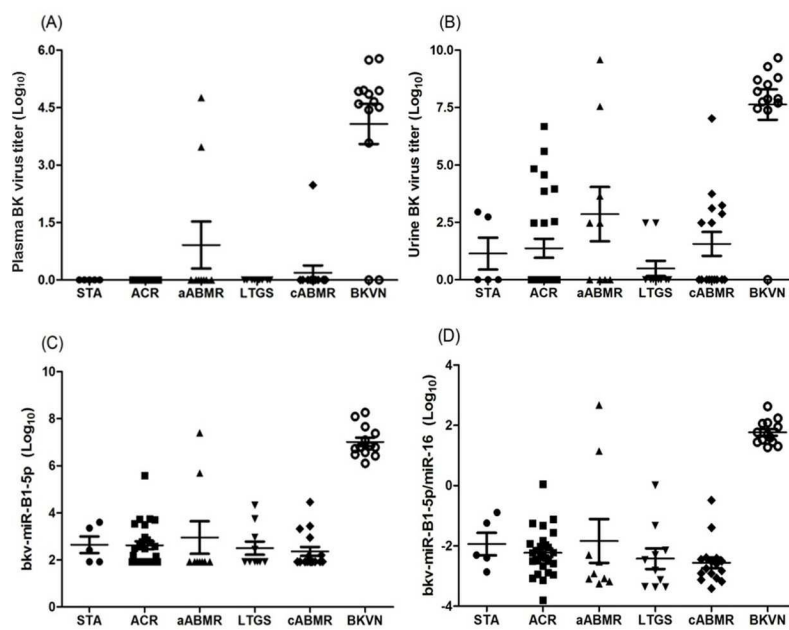
[0104] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

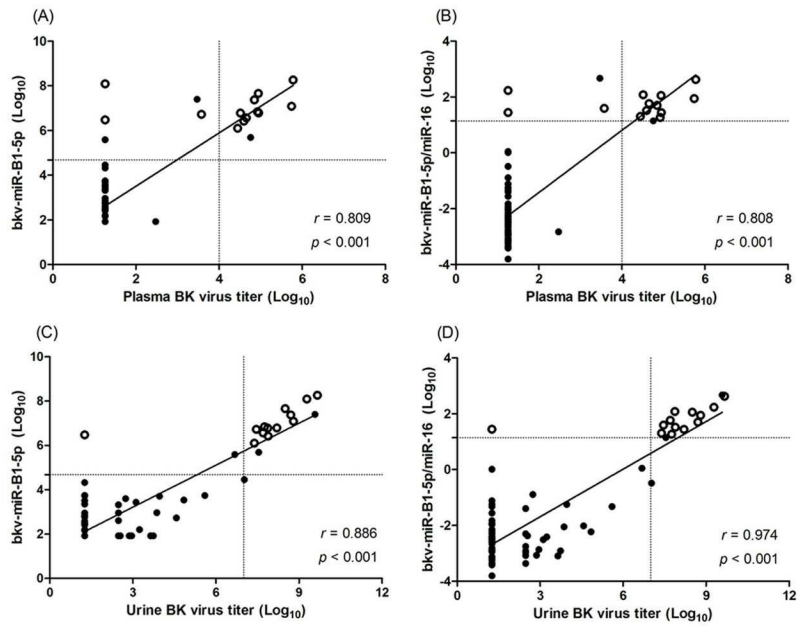
도면1



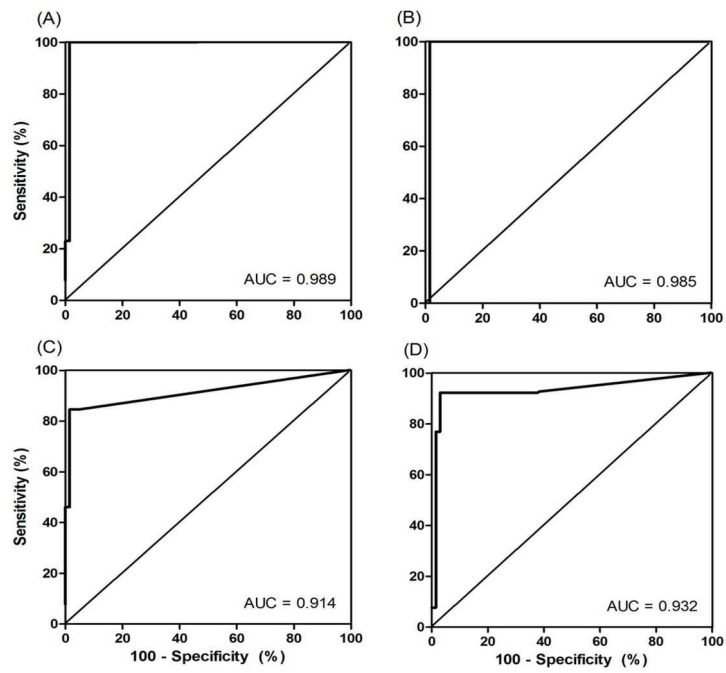
도면2



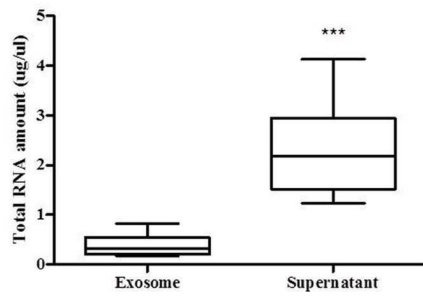
도면3



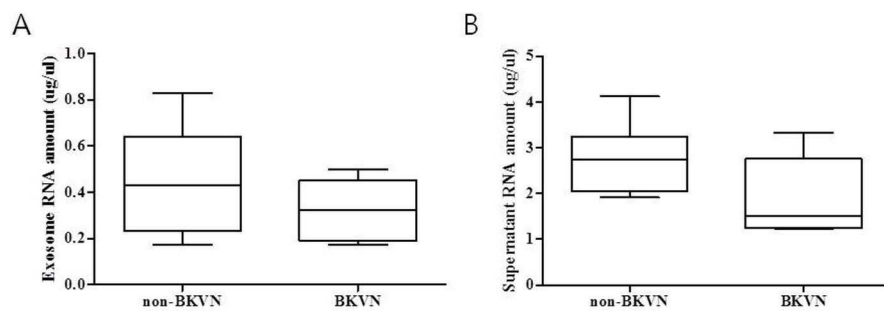
도면4



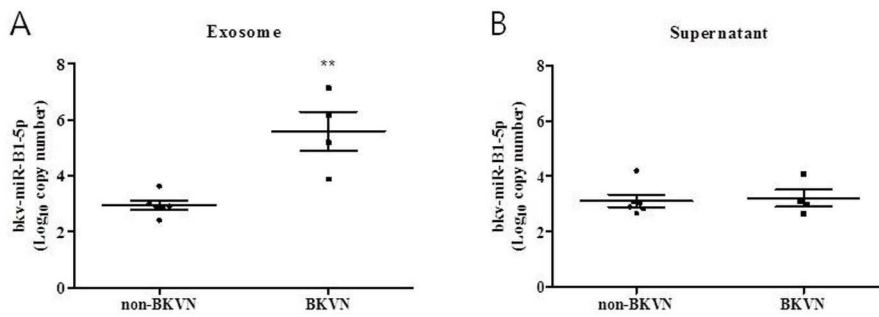
도면5



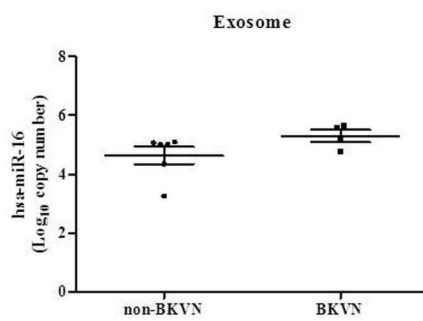
도면6



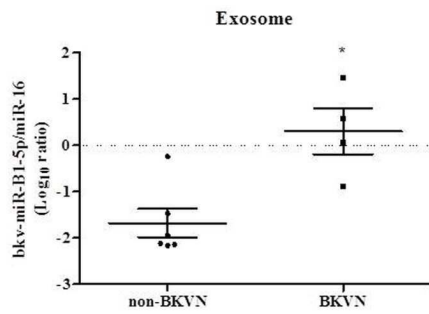
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A method for diagnosis of BK virus nephropathy using urine
exosome-derived virus miRNA

<130> KPA161499-KR

<160> 12

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> BK virus

<400> 1

aucugagacu uggaagagc au 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> BK virus

<400> 2

ugcuugauc auguccagag uc 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> BK virus

<400> 3

uagcagcacg uaaaauuugg cg 22

<210> 4

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bkV-miR-B1 stem-loop RT primer
 <400> 4
 gttggctctg gtgcagggtc cgaggtattc gcaccagagc caacatgctc 50
 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bkV-miR-B1-5p Forward primer
 <400> 5
 gggatctgag acttgggaa 19

 <210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Universal Reverse primer
 <400> 6
 gtgcagggtc cgaggt 16
 <210> 7
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bkV-miR-B1 stem-loop RT primer
 <400> 7
 gttggctctg gtgcagggtc cgaggtattc gcaccagagc caacgactct 50
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bkV-miR-B1-3p Forward primer
 <400> 8

ggttgcttga tccatgtcc	19
<210> 9	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Universal Reverse primer	
<400> 9	
gtgcagggtc cgaggt	16
<210> 10	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hsa-miR-16 stem-loop RT primer	
<400> 10	
gttgctctg gtgcagggtc cgaggtattc gcaccagagc caaccgccaa	50
<	
210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Hsa-miR-16-5p Forward primer	
<400> 11	
gtttgtagc agcacgtaaa ta	22
<210> 12	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Universal Reverse primer	
<400> 12	
gtgcagggtc cgaggt	16