(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0056285
(43) 공개일자 2023년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/564 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0140135
(22) 출원일자 2021년10월20일
심사청구일자 2021년10월20일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김용길
서울특별시 강남구 선릉로126길 22, 106동 402호 (삼성동, 롯데캐슬프레미어아파트)
이은주
서울특별시 송파구 중대로 24, 201동 501호(문정동, 올림픽훼밀리타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

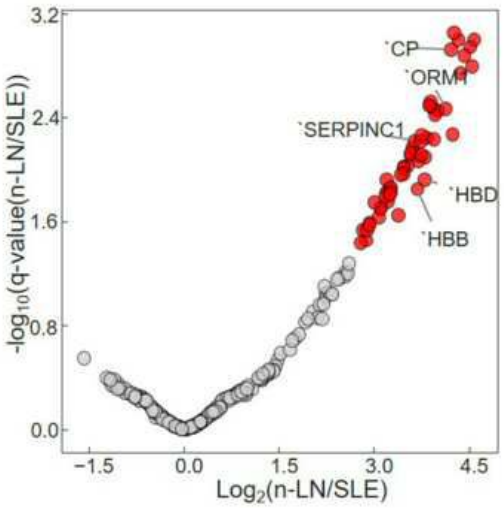
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법**

(57) 요 약

전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 개체의 소변 샘플에서 HBD, SERPINC1 등의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 비침습적이고 간단한 방법을 통하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 정확하게 진단할 수 있으며, 상당한 양의 단백뇨가 발생하지 않은 초기 루푸스 신염의 검출이 가능하고, 증식성과 비증식성을 구별할 수 있으므로, 전신 홍반성 루푸스 환자의 사망률을 증가시키는 주요 부작용인 루푸스 신염의 진단 및 치료에 있어서 유용하게 활용될 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 33/564 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/104 (2013.01)
G01N 2800/347 (2013.01)
(72) 발명자
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호(신천동, 파크리오)
염정훈
서울특별시 강동구 천중로16길 37, 105동 301호(천호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312438
과제번호 2019R1I1A1A01060441
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 루푸스 신염 특이 소변 단백질의 번역 후 조절체에 대한 항체 개발 및 이를 이용한 루푸스 신염 조기 진단 도구 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산대학교 산학협력단
연구기간 2019.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711134241
과제번호 2021M3A9G1026605
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 바이오 Core Facility 구축 사업
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서울아산병원
연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

HBD(Hemoglobin subunit delta) 단백질, SERPINC1(Antithrombin-III) 단백질 또는 이들의 조합, 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematous) 환자의 루푸스 신염(lupus nephritis) 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

ORM1, CP, AFM, ORM2, SERPINA3, SERPINA1, A1BG, CA1, SERPINA6, MSH2, RNF149, HP, HMCN1, HBA1, HBB, LRG1, RCN1, TF, ALB 및 AZGP1으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 개체의 소변 샘플에서 측정하는 것인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 루푸스 신염은 증식성 루푸스 신염 또는 비증식성 루푸스 신염인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 하나의 청구항에 기재된 바이오마커 조성물을 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 HBD 단백질, SERPINC1 단백질 또는 이들의 조합, 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보

를 제공하는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

ORM1, CP, AFM, ORM2, SERPINA3, SERPINA1, A1BG, CA1, SERPINA6, MSH2, RNF149, HP, HMCN1, HBA1, HBB, LRG1, RCN1, TF, ALB 및 AZGP1으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체 또는 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 루푸스 신염으로 진단하는 단계를 추가로 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus, SLE)는 자가항체 생성, 면역 복합체 형성 및 여러 장기의 염증을 특징으로 하는 만성 자가면역 질환이다. 다양한 SLE 증상 중에서, 루푸스 신염(lupus nephritis, LN)이 이환 및 사망의 주요한 원인으로 알려져 있다. 따라서, LN이 SLE 예후에 미치는 임상적 영향, 조기 LN 발견 및 신속한 치료가 중요한 상황이다.

[0003] 임상적으로 신장 침범(renal involvement)이 의심되는 SLE 환자의 경우, LN 진단의 최적 표준인 신장 생검을 수행하여 LN 발병 여부를 확인할 수 있다. 현재 임상적인 LN 의심은 단백뇨 검출, 활성 소변 침전물 존재 및 신장 기능 악화를 기반으로 한다. 단백뇨와 활성 소변 침전물의 존재 여부는 비침습적으로 쉽게 모니터링 및 확인할 수 있지만, LN 진단에 민감하지 않고 조기 신장 침범 검출에 적합하지 않다. 따라서, 조기 LN 검출을 크게 향상시킬 수 있으면서, 비침습적으로 진단 가능한 바이오마커를 발견할 필요가 있다. 또한, 단백뇨 또는 활성 소변 침전물의 존재가 반드시 LN의 심각한 조직학적 특징을 나타내는 것은 아니기 때문에, LN의 조직학적 특징과 높은 상관관계가 있는 바이오마커를 식별하는 것도 중요하다.

[0004] 일반적으로, 바이오마커는 새로운 바이오마커 검출을 제한하는 편향된 접근 방식인 LN 관련 병태생리학적 경로를 기반으로 선택된다. 대조적으로, 프로테옴 분석을 사용하여 여러 단백질을 프로파일링하는 것은 바이오마커를 스크리닝하기 위한 편향적이지 않은 방법이다. 이전 연구에서는 LN에 대한 바이오마커를 편향적이지 않게 스크리닝하기 위해 질량 분석법(MS) 및 electrospray ionisation quadrupole time-of-flight tandem MS14를 활용하였다. 또한, 최근의 LN 바이오마커 연구는 특정 고친화성 리간드를 사용하여 잠재적으로 저농도 단백질을 검출하는 친화성 기반 접근법(예를 들어, 항체 또는 앱타머 기반 분석)을 사용하였다.

[0005] 친화성 기반 접근법과 달리, MS 기반 접근법 일반적으로 고농도 단백질을 검출하고 저농도 단백질은 검출하지 못할 수 있다. 그러나, 새로운 MS 기반 접근 방식인, 액체 크로마토그래피와 결합된 모든 이론적인 질량 스펙트럼(SWATH LC-MS)-기반 프로테옴 분석의 순차적 창(window) 획득은 저농도 단백질을 검출할 수 있다. 본 발명자들은 이러한 프로테옴 분석 플랫폼을 사용하여, 최근 SLE에 대한 진단 바이오마커로서 소변 β-2-glycoprotein 1(Apolipoprotein H, ApoH)를 발견하였다(대한민국 특허출원 10-2021-0031196).

[0006] 이에, 본 발명자들은 간단하고 편리한 방법으로 전신 홍반성 루푸스 환자들의 루푸스 신염 발병 여부를 조기에 정확하게 진단할 수 있는 바이오마커를 개발하기 위하여, SWATH LC-MS 기반 프로테옴 분석을 사용하여 건강한 대조군(HC), 루푸스 신염이 없는 SLE 환자, 루푸스 신염으로 진단된 SLE 환자의 소변 샘플에 포함된 다양한 단백질을 분석한 결과, 루푸스 신염으로 진단된 SLE 환자에서 유의하게 발현이 증가한 SERPINC1, HBD 등을 확인

및 선별함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 간단하고 편리한 방법으로 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematous, SLE) 환자의 루푸스 신염(lupus nephritis, LN)을 정확하게 조기에 진단할 수 있는 전신 홍반성 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 또 다른 목적은, 상기 바이오마커 조성물을 이용하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 HBD(Hemoglobin subunit delta) 단백질, SERPINC1(Antithrombin-III) 단백질 또는 이들의 조합, 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematous, SLE) 환자의 루푸스 신염(lupus nephritis, LN) 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 용어 "HBD(Hemoglobin subunit delta)"는 헤모글로빈 A2를 구성하는 단백질을 의미한다. HBD는 최근 프로테오믹스 연구에서 초기 당뇨병성 신장 질환에 대한 잠재적인 바이오마커로 제안되었다. 당뇨병성 신장 질환 발병에서 소변 HBD의 가능한 기전은 염증과 산화 스트레스로 예상되고 있다. 하지만, HBD와 LN과의 연관성은 현재까지 알려지지 않았다.

[0012] 용어 "SERPINC1(Antithrombin-III)"는 AT3, AT3D, ATIII, THPH7, serpin family C member 1, ATIII-R2, ATIII-T2 또는 ATIII-T1라고도 불리우며, 트롬빈을 비활성화하는 혈장 내 작은 단백질 분자를 의미한다. SERPINC1은 간에서 생성되는 당단백질로 432개의 아미노산으로 구성되어 있고, 3개의 이황화 결합과 총 4개의 가능한 글리코실화 부위를 포함하는 것으로 알려져 있다.

[0013] 용어 "전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematous, SLE)"는 전신의 다양한 조직에 자가면역으로 인한 염증 반응이 발생하는 질환을 의미한다. 침범 조직에 따라 피부 발진, 광과민성, 관절염, 구강궤양, 신장염, 혈구감소증, 혈관염, 장막염 등 다양한 증상을 나타낸다. 전신 홍반성 루푸스의 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나, 유전적 요인이 발병과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 유전적인 요인 외에도 특정 바이러스 감염, 자외선 노출, 과도한 스트레스, 항생제를 비롯한 일부 약물 또는 여러 호르몬에 의한 환경적인 요인 또한 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[0014] 용어 "루푸스 신염(lupus nephritis, LN)"은 전신 홍반성 루푸스가 신장에 침범하여 일으키는 신장염을 의미한다. 혈액 내에 과도하게 존재하는 여러 가지 자가항체나 면역복합체가 신장의 사구체에 침착하고, 염증 세포가 사구체 내로 침투하여 신장의 사구체에 염증과 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 루푸스 신염의 증상으로, 신장 조직이 파괴되어 소변 검사에서 단백뇨, 현미경적 혈뇨(때로는 육안적 혈뇨)가 나타나며, 소변 침전물에서 적혈구, 백혈구, 다양한 세포성 원주 등의 소견이 나타난다. 또한, 단백뇨가 심해지면서 혈액 내의 단백질이 다량 빠져 나가면 혈액 성분이 조직으로 빠져 나가서 체액의 축적이 생기게 되고, 이로 인해 체중 증가와 부종이 생기게 된다. 루푸스 신염 환자의 대부분은 동맥경화증이 보다 잘 발생하며, 이로 인하여 고혈압, 고지혈증, 고혈당과 같은 증상이 발생한다. 루푸스 신염은 성인 전신 홍반성 루푸스 환자의 30-60%를 차지하고, 어린이의 경우 70%까지 발생하며, 전신 홍반성 루푸스 합병증 중에서 가장 치명적인 사망 원인이 되는 질환이며, 환자의 예후와 관련이 있다. 루푸스 신염의 종류로는 사구체 신염이 가장 많으나, 괴사형 혈관염 및 급성 간질성 신염이 발생하기도 한다.

[0015] 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0016] 용어 "바이오마커"는 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 샘플에서 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 진단할 수 있는 물질을 의미한다. 정상 개체 또는 신염이 없는 루푸스 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에 비하여 루푸스 신염을 갖는 전신 홍반성 루푸스 환자에서 채취한 생물학적 샘플에서 증가 또는 감소를 나타내는 폴리펩타이드 또는 핵산(예를 들어, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(예를 들어, 단

당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.

[0017] 상기 바이오마커 조성물은 ORM1(Alpha-1-acid glycoprotein 1), CP(Ceruloplasmin), AFM(Afamin), ORM2(Alpha-1-acid glycoprotein 2), SERPINA3(Alpha-1-antichymotrypsin), SERPINA1, A1BG(Alpha-1B-glycoprotein; P04217-2), A1BG(Alpha-1B-glycoprotein; P04217), CA1(Carbonic anhydrase 1), SERPINA6(Corticosteroid-binding globulin), MSH2(DNA mismatch repair protein Msh2), RNF149(E3 ubiquitin-protein ligase RNF149), HP(Haptoglobin), HMCN1(Hemicentin-1), HBA1(Hemoglobin subunit alpha), HBB(Hemoglobin subunit beta), LRG1(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein), RCN1(Reticulocalbin-1), TF(Serotransferrin), ALB(Serum albumin) 및 AZGP1(Zinc-alpha-2-glycoprotein)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, ORM1(Alpha-1-acid glycoprotein 1) 및/또는 CP(Ceruloplasmin)를 추가로 포함할 수 있다. A1BG(P04217-2) 단백질과 A1BG(P04217) 단백질은 isoform에 해당한다.

[0018] 상기 바이오마커 조성물은 ORM1, CP, AFM, ORM2, SERPINA3, SERPINA1, A1BG, CA1, SERPINA6, MSH2, RNF149, HP, HMCN1, HBA1, HBB, LRG1, RCN1, TF, ALB 및 AZGP1으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 용어 "ORM1(Alpha-1-acid glycoprotein 1)"은 AGP-A, AGP1, HEL-S-153w, ORM, 또는 orosomucoid 1라고도 불리우며, 급성기 혈장 단백질을 의미한다. 급성기 단백질 패밀리의 구성원인 ORM은 단핵구를 활성화하고 T-세포 증식을 유도하며 종양 괴사 인자 α, 인터루킨(IL)-1 및 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0020] 용어 "CP(Ceruloplasmin)"은 caeruloplasmin이라고도 불리우며, 혈장 중에 있는 구리와 결합하는 a2-당단백질(glycoprotein)을 의미한다. CP는 혈액에서 구리를 운반하는 주요 단백질이며, 철 대사에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0021] 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 개체의 소변 샘플에서 측정할 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 건강한 대조군(HC)과 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스 환자(SLE), 신염이 없는 전신 홍반성 루프스 환자와 루푸스 신염으로 진단된 전신 홍반성 루푸스 환자(n-LN)의 소변 샘플을 SWATH LC-MS 플랫폼을 사용하여 정량적인 프로테옴 분석한 결과, HC 보다 신염이 없는 SLE 환자에서 증가하고, 신염이 없는 SLE 환자보다 n-LN 환자에서 증가하는 것을 양상을 나타내는 공통적인 23종의 단백질을 확인할 수 있다.

[0023] 다른 구현예에서, 상기 23종의 단백질 중에서 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD를 선별하여 추가적인 ELISA 기반 검증을 수행한 결과, 상기 4가지 소변 바이오마커는 신염이 없는 SLE 환자보다 n-LN 환자에서 유의하게 발현이 증가된 것을 확인할 수 있다. 또한, 일부 n-LN 환자는 유의하지 않은 단백뇨(UPCR<500mg/g) 증상을 나타냈으나, 이들 환자의 소변 샘플에서도 상기 4가지 소변 바이오마커는 신염이 없는 SLE 환자보다 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다. 따라서, 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD는 전신 홍반성 환자에서 상당한 단백뇨가 발생하기 전에도 조기 루푸스 신염 검출에 유용하게 활용될 수 있다.

[0024] 상기 루푸스 신염은 증식성 루푸스 신염 또는 비증식성 루푸스 신염일 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 소변 HBD는 증식성 LN과 비증식성 LN을 구별하는 데 높은 정확도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 증식성 LN의 경우에는 고용량 스테로이드제와 면역 억제제의 병용 투여가 필요하며, 비증식성 LN의 경우에는 일반적인 SLE 치료 방법을 선택한다. 따라서, 증식성 LN과 비증식성 LN은 치료 방법에 있어서 차이가 있으므로, 소변 HBD는 증식성 LN과 비증식성 LN을 정확하게 구별하여 적합한 치료 방법의 선택을 가능하게 할 수 있다.

[0026] 또한, 소변 HBD는 조직학적 활성 지수와 유의하게 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 치료 후 조직학적 활성 지수는 LN 예후에 중요하다. 하지만, 임상적 신장 매개변수는 조직학적 활성 지수를 정확하게 반영하지 못하기 때문에 신장 생검을 하지 않고는 활성 지수를 추정하는 것이 어렵다. 한편, 신장 생검은 침습적 절차이며 종종 반복적으로 수행하기 어렵기 때문에, 이를 대신하여 소변 HBD는 간단하고 편리한 방법으로 조직학적 활성 지수를 추측하는 데 유용하게 활용될 수 있다.

[0027] 상기 단백질의 발현 수준의 측정은 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 ApoH 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.

[0028] 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter) 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준의 측정은 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 유전자의 양을 확인하는 것이다.

[0031] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), RNase 보호 분석법(RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 다른 양상은, 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 키트를 제공한다.

[0034] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 이용하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 진단할 수 있다. 구체적으로는, 상기 키트는 개체로부터 채취한 소변 샘플을 이용하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 진단할 수 있다. 개체로부터 용이하게 채취할 수 있는 소변 샘플을 이용함에 따라 보다 간단하고 편리한 방법으로 신장 생검 없이도 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 조기 진단이 가능할 수 있다.

[0035] 상기 키트에는 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.

[0036] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0037] 상기 바이오마커 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0038] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 HBD 단백질, SERPINC1 단백질 또는 이들의 조합, 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 방법은 ORM1, CP, AFM, ORM2, SERPINA3, SERPINA1, A1BG, CA1, SERPINA6, MSH2, RNF149, HP, HMCN1, HBA1, HBB, LRG1, RCN1, TF, ALB 및 AZGP1으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 상기 방법은 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체 또는 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 전신 홍반성 루푸스 환자를 루푸스 신염으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 용어 "생물학적 샘플"은 일 양상에 따른 23종의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수

있는 개체로부터 수득한 모든 샘플을 의미한다. 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 객담, 뇌척수액, 세포 배양액, 조직 추출물 또는 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 상기 생물학적 샘플은 소변일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 해당 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.

[0042] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[0043] 일 양상에 따른 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 진단용 바이오마커 조성물을 이용하면, 개체의 소변 샘플에서 HBD, SERPINC1 등의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 비침습적이고 간단한 방법을 통하여 전신 홍반성 루푸스 환자의 루푸스 신염 발병 여부를 정확하게 진단할 수 있으며, 상당한 양의 단백뇨가 발생하지 않은 초기 루푸스 신염의 검출이 가능하고, 증식성과 비증식성을 구별할 수 있으므로, 전신 홍반성 루푸스 환자의 사망률을 증가시키는 주요 부작용인 루푸스 신염의 진단 및 치료에 있어서 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 일 양상에 의한 SWATH LC-MS 플랫폼을 사용하여 건강한 대조군(HCs)과 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스 환자(SLE)의 소변 샘플에서 차별적으로 발현되는 단백질(FDR: ≤0.05, log2 fold change±1)를 확인하기 위한, 단백질 발현(q-값에 따라 순위가 매겨진 단백질; Log10 스케일, y-축) 및 상대적인 풍부도(Log2 배 변화, x-축)를 나타내는 볼케이노 플롯이다.

도 2는 일 양상에 의한 SWATH LC-MS 플랫폼을 사용하여 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스 환자(SLE)와 새롭게 루푸스 신염으로 진단된 전신 홍반성 환자(n-LN)의 소변 샘플에서 차별적으로 발현되는 단백질(FDR: ≤0.05, log2 fold change±1)를 단백질 발현(q-값에 따라 순위가 매겨진 단백질; Log10 스케일, y-축) 및 상대적인 풍부도(Log2 배 변화, x-축)를 나타내는 볼케이노 플롯이다.

도 3은 일 양상에 의한 HCs, 신염이 없는 SLE 환자 및 n-LN 환자의 소변 ORM1(A), 소변 SERPINC1(B), 소변 CP(C), 소변 HBB(D) 및 소변 HBD(E)에 대하여 각각 ELISA 기반 검증을 수행한 결과이다. 도면에 표시된 값은 평균±SEM이다. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

도 4는 일 양상에 의한 소변 ORM1(A), 소변 SERPINC1(B), 소변 CP(C), 소변 HBD(D), 혈청 C3(E), 혈청 C4(F), 혈청 항-dsDNA Ab(G), 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD의 조합(H) 및 혈청 C3 및 소변 ORM1의 조합(I)을 사용하여 신염이 없는 SLE 환자와 n-LN 환자를 구별하기 위한 ROC 곡선을 나타낸 것이다.

도 5는 일 양상에 의한 소변 ORM1(A), 소변 SERPINC1(B), 소변 CP(C), 소변 HBD(D), C3(E), C4(F), 항-dsDNA Ab(G)를 사용하여 증식성 LN과 비-증식성 LN을 구별하기 위한 ROC 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. 실험 대상 선별**

[0047] 실험 대상으로 2019년 1월부터 2020년 8월 동안에 대한민국 서울에 있는 3차 대학 병원인 서울아산병원의 류마티스 클리닉을 방문한 환자 중에서 2012년 Systemic Lupus International Collaborating Clinics에서 정의한 분류 기준을 충족한 SLE 환자 39명을 선별하였다. 실험을 진행하기 전에 모든 환자 및 대조군 피험자로부터 서면 동의를 얻었으며, 소변 샘플은 사전 동의를 얻은 후 서울아산병원 방문 일에 채취하였다. 이 실험은 서울아산병원 기관 심의위원회의 승인을 받았다(IRB No. 2013-0405).

[0048] SLE 환자는 (i) 신염이 없는 SLE 환자(분리된 현미경적 혈뇨(haematuria) 또는 농뇨(pyuria)는 신염으로 간주되지 않음) 22명, (ii) 새롭개 진단된 LN이 있는 SLE 환자 17명의 두 그룹으로 분류하였다. 모든 LN 진단은 국제 신장 학회/신장 병리 학회(Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification) 분류에 따라 신장 생검을 통하여 확인하였다. 또한, 매우 초기 LN을 포함하기 위해 신장 기능이 저하되고 500 mg/g > 요 단백질/크레아티닌 비율(urine protein/creatinine ratio, UPCR) ≥ 300 mg/g ± 활성 소변 침전물의 경우에도 신장

생검을 수행하였다.

[0049] SLE 환자의 성별과 평균 연령은 (i) 신염이 없는 SLE 환자는 여성 18명, 남성 4명, 51.0세(37.5세-56.3세)이고, (ii) 새로 진단된 LN이 있는 SLE 환자는 여성 14명, 남성 3명, 43.0세(23.0세-49.5세)였다. 또한, 건강한 대조군으로 환자군과 성별, 나이를 맞춘 20명의 피험자를 선별하였다.

[0050] **실시예 2. 프로테오믹 분석을 위한 샘플 준비**

[0051] 먼저, 500 ㎕의 소변 샘플을 원심 진공 농축기(LABCONCO, CentriVap, Kansas City, MO, USA)에서 동결 건조하여 부피를 줄였다. 건조된 샘플과 5% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 및 50 mM 트리에틸암모늄 중탄산염(triethylammonium bicarbonate; pH 7.55, Thermo Fisher Scientific)을 혼합하여 100 µL 용해 완충으로 재구성하였다. trypsin/LysC mixture(Promega, Madison, WI, USA)을 제외하고는 이전에 기재된 방법(Lupus 2021, Vol. 30(8) 1306-1313)에 따라 샘플을 S trap-기반 트립신 분해로 처리하였다. 건조된 펩타이드는 0.1% 포름산으로 재구성하였고, 펩타이드 농도를 측정하기 위하여 NanoDrop One 분광 광도계(ThermoFisher Scientific)에서 205 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 각 샘플의 40 ㎍ 펩타이드를 개별 분석에 할당하고 건조하였다. 모든 남아있는 펩타이드는 분광 라이브러리 생성을 위해 조합하였다.

[0052] **실시예 3. *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리를 위한 middle-pH 역상 분획**

[0053] 조합된 샘플의 분획은 Shimadzu Prominence HPLC 기기(Shimadzu, Japan)를 사용하여 XBridge C18 컬럼(4.6 mm i.d., 250 mm 길이, 구멍 크기 130 Å 입자 크기 5 µm; Waters Corporation, USA)에서 0.5 mL/min의 유속으로 수행하였다. 이동상 A로서 10 mM triethylammonium bicarbonate(TEAB, pH 8.5) 및 이동상 B로서 90% 아세토니트릴(acetonitrile; pH 10) 중 10mM TEAB를 펩타이드 분별에 사용하였 다. 샘플을 200 µL 이동상 A에 용해시킨 다음, 2,100 µL의 샘플 루프에 주입하였다. 5-5% B 15분, 5-45% B 62.5분, 45-60% B 5분, 60-60% B 12.5분, 60-5% B 7.5분, 5-5% B 20분의 구배를 적용한 다음 컬럼을 100% 및 50% 이동상 B로 각각 30분 동안 세척하였다. 분획 과정에서 Shimadzu Prominence(Shimadzu, Tokyo, Japan)의 fraction collector를 사용하여, 30초 마다 용리액을 수집하였다. 생성된 168개의 분획을 24개의 분획이 되도록 결합(concatenate) 방식으로 혼합하였다. 각 분획을 건조하고 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 액체 크로마토 그래피-탠덤 질량 분석법(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) 분석 전에, iRT Kit(Biognosys AG, Schlieren, Switzerland)의 펩타이드(라이브러리 샘플 및 개별 샘플)를 LC-MS 분석에 대한 제조업체의 지침에 따라 모든 샘플에 추가하였다.

[0054] **실시예 4. 정량적 프로테오믹스를 위한 질량 분석법 분석**

[0055] *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리 생성의 경우, 샘플은 다음과 같은 LC-MS/MS 설정으로 SCIEX TripleTOF 5600+ 시스템 질량 분석기를 사용하여 분석하였다: LC 분리를 위해, 트랩 칼럼으로 Eksigent 마이크로 트랩 카트리지(ChromXP C18CL, 5 µm, 120 Å)를, 분석 칼럼으로 Eksigent 컬럼(C18-CL, 0.3 x 150 mm, 입자 크기 3 µm, 구멍 크기 120 Å)으로 하고 컬럼 온도는 40℃로 유지한 상태에서 ekspert™ nanoLC 425(Eksigent, Dublin, CA)를 사용하였다. 샘플을 100% 용리액 A(0.1% 포름산)을 사용하여 10 ㎕/min의 유속으로 트랩 컬럼에 로딩하였다. 10분 후, 펩타이드는 용리액 A 및 용리액 B(100% acetonitrile 중 0.1% 포름산)을 사용하여 5 ㎕/min에서 87분 단위(용리액 B는 68분에 걸쳐 3 내지 25%, 5분에 걸쳐 25 내지 35%, 2분에 걸쳐 35 내지 80%, 3분 동안 80% 유지, 1분 동안 80 내지 3% 유지, 8분 동안 3% 유지)로 분리하였다. 질량 분석기는 MS1(400 ~ 1250 m/z) 및 MS2(100 ~ 1500 m/z) 스캔에 대해 각각 250 ms 및 50 ms 수집 시간, 및 15초 동적 제외로 데이터 의존 수집(data dependent acquisition; DDA) top30 모드에서 작동하였다. 롤링 충돌 에너지는 +2에서 +5까지의 전하 상태로 분획에 사용되었다. 다른 매개변수는 다음과 같이 설정하였다: 이온 소스 가스 1(GS1) 15; 이온 소스 가스 2(GS2) 20; 커튼 가스(CUR) 30; 온도 (TEM) 250 ℃; 이온 스프레이 전압 플로팅(ISVF) 5500.

[0056] 개별 샘플의 경우, 모든 질량 분석 실행은 Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra(SWATH) 모드에서 SCIEX 기술 노트에 따라, 100개의 variable windows를 사용하여 작동하였다. LC 설정은 상기에 기재된 구배 시간을 제외하고 동일한 조건에서 수행하였다. 용리액 B의 구배는 38분에 걸쳐 3 내지 25%, 5분에 걸쳐 25 내지 32%, 2분에 걸쳐 32 내지 80%, 3분 동안 80% 유지, 1분 걸쳐 80 내지 3%, 3분 동안 80% 유지가 적용되었다. SWATH 매개변수는 다음과 같이 설정하였다: 하한 m/z 400; 상한 m/z 1250; window overlap(Da) 1.0; CES는 작은 windows에 대해 5, 큰 windows에 대해 8, 가장 큰 windows에 대해 10으로 설정하였다. MS2 스펙트럼은 고감도 모드에서 2.5 ms 동안 100-1500 m/z 범위에서 수집되었으며, 총 사이클 시간은 2.8초였다.

[0057] **실시예 5. *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리 생성**

[0058] 모든 DDA 로우(raw) 파일은 인간 UniProt 데이터베이스(released in January 2020; http://www.uniprot.org)에 대해 Andromeda Search 엔진(PMID: 21254760)을 사용하여 MaxQuant(PMID: 27809316) v1.6.7.0으로 처리하였으며, 다음과 같은 검색 매개변수를 사용하였다: 특정 트립신을 효소로 선택하고, 시스테인의 carbamidomethylation을 고정 변형으로 설정하며, N-말단 단백질 아세화 및 산화(M)를 가변 변형으로 설정하였다. 또한, FDR(false discovery rate)은 단백질 및 PSM(Peptide Spectrum Match) 수준 모두에서 0.01로 설정하고, 하나 이상의 고유한 펩타이드로 확인된 단백질을 사용하였으며, 다른 설정은 기본 값으로 유지하였다. 분광 라이브러리는 기본 설정으로 Spectronaut Enterprise + x64(13.12.200217)를 사용하여 MaxQuant DDA 검색 결과로부터 구축하였다.

[0059] **실시예 6. SWATH Data 분석**

[0060] 개별 샘플에 대한 SWATH-MS 데이터는 *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리와 함께 DIA-NN 1.7.10을 사용하여 처리하였다. 스펙트럼은 기본 설정으로 검색하였으나, m/z 범위는 전구체의 경우 400-1250이고 조각 이온(fragment ion)의 경우 100-1500이였다. diann R 패키지 (https://github.com/vdemichev/diann-rpackage)에 구현된 MaxLFQ 알고리즘(PMID: 24942700)을 사용하여 단백질 정량 값을 수득하였다. 단백질 강도 값은 0.01 이상의 q-값을 통과하는 전구체 및 단백질 그룹에 대하여 필터링하였다. 단백질 강도 값의 정규화는 다음과 같은 식으로 수행하였다:

[0061] $$Normalized\ protein\ intensity = \frac{Protein\ intensity\ on\ MaxLFQ \times \frac{Total\ peptide\ amount}{40}}{Creatine\ concentration}$$

[0062] 단백질 강도 값에 단백질 비율 값을 곱하고, 이 값을 나누어 크레아틴 농도를 계산하였다. 단백질 비율은 정량화된 총 펩타이드 양을 MS 분석을 위해 준비한 펩타이드의 양으로 나눈 값이다.

[0063] **실시예 7. ELISA 검증**

[0064] SWATH LC-MS 기반 프로테옴 분석을 사용하여 스크리닝된 잠재적인 바이오마커 중에서, 5개는 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(ORM1: Abcam; Cambridge, MA, USA; antithrombin-III[SERPINC1]: R&D Systems; Minneapolis, MN, USA; ceruloplasmin [CP], haemoglobin subunit beta [HBB], and HBD: LSBio, Seattle, WA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라서 추가로 검증하였다. 각각의 소변 단백질 농도는 소변 크레아티닌 농도(ENZO Life Science; Lausen, Switzerland)를 사용하여 조정하였다.

[0065] **실시예 8. 통계적 분석**

[0066] 샘플 간 단백질 강도의 차등 분석을 위해 무료 소프트웨어 Perseus(version 1.6.14.0)를 사용하였다. 정규화된 단백질 강도의 값은 log2 스케일로 변환하였다. 각 샘플의 유형을 그룹화하였으며, 하나의 그룹에서 적어도 90% 빈도를 갖는 단백질을 선별하였다. 누락된 값은 기본 매개변수(width: 0.3, downshift: 1.8)를 사용하여 정규분포에서 추출한 난수로 대체하였다. 샘플 간의 통계적으로 유의한 차이를 찾기 위하여, Benjamini-Hochberg FDR(0.05 컷오프)을 사용하여 T-검정을 수행하였다. 볼케이노 플롯(volcano plot)은 InstantClue 소프트웨어를 사용하여 시각화하였다. 잠재적인 바이오마커의 식별 능력을 평가하기 위하여 ROC(Receiver operating characteristics) 분석을 사용하였다. 잠재적인 바이오마커와 조직학적 활성/만성 지수 간의 상관관계는 Spearman's rank correlation coefficient를 사용하여 테스트하였다. 0.05 미만의 P-값은 모든 분석에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. ROC 곡선 생성, 곡선 아래 면적(AUC) 계산, 로지스틱 회귀 및 상관 분석은 Prism7(GraphPad Software; San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0067] **실험예 1. SWATH LC-MS 플랫폼을 사용한 정량적인 소변 프로테옴 분석**

[0068] 건강한 대조군(HC) 20명과 새롭게 루푸스 신염으로 진단(n-LN)되거나 신염이 없는 전신 홍반성 루푸스(SLE) 환자 39명의 소변 샘플에서 잠재적인 바이오마커 후보를 스크리닝하였다. 스펙트럼 라이브러리를 생성하기 위하여, 프로테옴 복잡성 때문에 두 가지 형태의 소변 샘플을 사용하였다. HCs 및 신염이 없는 SLE 환자의 샘플을 n-LN 환자보다 적은 펩타이드 함량으로 모으고, n-LN 환자의 샘플을 수집하였다. 스펙트럼 라이브러리에서, DDA 분석을 사용하여 2,323개의 단백질과 8,371개의 펩타이드를 확인하였다. in-house 분광 라이브러리를 사용하여 개별 샘플에서 총 1,157개의 단백질 그룹(HC는 581±31, 신염이 없는 SLE 환자는 506±25, 및 n-LN 환자는

457±22)을 정량화하였다.

[0069] 1,157개의 단백질 그룹 중에서, 143개 단백질 그룹(FDR≤0.05, log2 fold change±1)은 HCs와 비교하여 신염이 없는 SLE 환자에서 증가하였고(도 1), 67개 단백질 그룹은 신염이 없는 SLE 환자와 비교하여 n-LN 환자에서 증가하였다(도 2). 이들 차별적으로 발현되는 단백질 그룹 중에서, 하기 표 1에 기재된 바와 같이, 두 비교 분석 간에 공통적인 23개의 단백질 그룹을 확인하였다. 이들 단백질의 발현은 HC 보다 신염이 없는 SLE 환자에서 증가하였고, 신염이 없는 SLE 환자보다 n-LN 환자에서 증가하는 것을 양상을 나타내었다.

표 1

[0070]

No.	Protein ID	`Gene	Description	DEPs (SLE/HC)	DEPs (n-LN/SLE)
1	P43652	`AFM	Afamin	UP	UP
2	P02763	`ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	UP	UP
3	P19652	`ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	UP	UP
4	P01011	`SERPINA3	Alpha-1-antichymotrypsin	UP	UP
5	P01009	`SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	UP	UP
6	P04217-2	`A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	UP	UP
7	P04217	`A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	UP	UP
8	P01008	`SERPINC1	Antithrombin-III	UP	UP
9	P00915	`CA1	Carbonic anhydrase 1	UP	UP
10	P00450	`CP	Ceruloplasmin	UP	UP
11	P08185	`SERPINA6	Corticosteroid-binding globulin	UP	UP
12	P43246	`MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2	UP	UP
13	Q8NC42	`RNF149	E3 ubiquitin-protein ligase RNF149	UP	UP
14	P00738	`HP	Haptoglobin	UP	UP
15	Q96RW7	`HMCN1	Hemicentin-1	UP	UP
16	P69905	`HBA1	Hemoglobin subunit alpha	UP	UP
17	P68871	`HBB	Hemoglobin subunit beta	UP	UP
18	P02042	`HBD	Hemoglobin subunit delta	UP	UP
19	P02750	`LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	UP	UP
20	Q15293	`RCN1	Reticulocalbin-1	UP	UP
21	P02787	`TF	Serotransferrin	UP	UP
22	P02768	`ALB	Serum albumin	UP	UP
23	P25311	`AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	UP	UP

[0071] **실험예 2. 잠재적인 바이오마커의 선별 및 검증**

[0072] 신염이 없는 SLE 환자와 HCs, 및 신염이 없는 SLE 환자와 n-LN 간에 공통적인 차별적으로 발현되는 23개의 소변 단백질 중에서, 5개의 단백질(ORM1, SERPINC1, CP, HBB 및 HBD)을 추가적인 검증을 위해 선별하였다. 선별된 각 단백질의 소변에서 발현 수준은 신염이 없는 SLE 환자 및 n-LN 환자 간에 비교하였다. 검증 연구에 포함된 신염이 없는 SLE 환자(n=22)와 n-LN 환자(n=17) 간의 특성을 비교한 결과는 하기 표 1에 기재된 바와 같다.

표 2

[0073]

	SLE without nephritis (N = 22)	n-LN (N = 17)	P value
Age, years, median (IQR)	51.0 (37.5-56.3)	43.0 (23.0-49.5)	0.036
Female sex, n (%)	18 (81.8)	14 (82.4)	>0.999
Disease duration, months, median (IQR)	32.5 (17.1-57.8)	36.9 (1.9-78.1)	0.790
SLE manifestations, n (%)			
Mucocutaneous	5 (22.7)	3 (17.6)	>0.999
Musculoskeletal	8 (36.4)	3 (17.6)	0.288
Serositis	2 (9.1)	0 (0.0)	0.495
Neuropsychiatric	2 (9.1)	2 (11.8)	>0.999
Hematologic	3 (13.6)	3 (17.6)	>0.999
C3, mg/dL, median (IQR)	97.6 (76.7-110.8)	53.9 (43.0-91.9)	0.005
C4 mg/dL, median (IQR)	20.8 (12.9-25.6)	9.4 (5.5-23.0)	0.048

Anti-dsDNA Ab, IU/mL, median (IQR)	7.5 (5.4-19.8)	121.0 (5.7-377.0)	0.021
Positive anti-Sm Ab, n (%)	4 (18.2)	5 (31.3)	0.450
Positive anti-Ro Ab, n (%)	10 (45.5)	9 (56.3)	0.511
Positive anti-La Ab, n (%)	2 (9.1)	3 (18.8)	0.632
Positive anti-U1RNP Ab, n (%)	5 (22.7)	5 (31.3)	0.713
ESR, mm/h, median (IQR)	19.0 (12.0-33.8)	29.0 (18.0-36.0)	0.267
CRP, mg/dL, median (IQR)	0.15 (0.10-0.23)	0.18 (0.10-0.65)	0.878
Serum creatinine, mg/dL, median (IQR)	0.60 (0.55-0.76)	0.72 (0.56-0.99)	0.098
UPCR, mg/g, median (IQR)	92.2 (64.8-175.0)	970.9 (585.6-2328.1)	<0.001
UPCR<500 mg/g, n (%)	22 (100.0)	3 (17.6)	<0.001
Urine RBC≥5/HPF, n (%)	3 (13.6)	4 (23.5)	0.677
Urine WBC≥5/HPF, n (%)	2 (9.1)	5 (29.4)	0.205
SLEDAI, median (IQR)	5.0 (2.0-8.0)	12.0 (7.0-12.0)	0.003
Renal SLEDAI, median (IQR)	0.0 (0.0-0.0)	4.0 (4.0-8.0)	<0.001
Extra-renal SLEDAI, median (IQR)	4.0 (2.0-8.0)	4.0 (1.0-7.0)	0.989
Renal histology			
ISN/RPS class, n (%)			
I	N/A	1 (5.9)	N/A
II		5 (29.4)	
III		4 (23.5)	
IV		1 (5.9)	
V		5 (29.4)	
III + V		1 (5.9)	
Activity index, median (IQR)	N/A	1.0 (1.0-4.0)	N/A
Chronicity index, median (IQR)	N/A	2.0 (1.0-3.5)	N/A

[0074] SLE는 전신 홍반성 루푸스; n-LN은 새롭게 루푸스 신염으로 진단된 전신 홍반성 루프스; 항-dsDNA Ab는 항-이중가닥 DNA 항체; ESR(erythrocyte sedimentation rate)은 적혈구 침강 속도; CRP(C-reactive protein)는 C 반응성 단백질; UPCR(urine protein creatinine ratio)은 소변 단백질 크레아티닌 비율; RBC(red blood cell)는 적혈구; HPF(high power field)는 고전력 필드; WBC(white blood cell)는 백혈구; SLEDAI(systemic lupus erythematosus disease activity index)는 전신 홍반성 루푸스 질환 활성 지수; ISN/RPS(International Society of Nephrology/Renal Pathology Society)는 국제신장학회/신장병리학회를 의미한다.

[0075] ELISA 결과는 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD가 신염이 없는 SLE 환자보다 n-LN 환자에서 유의하게 상향 조절되었음을 나타내었다(도 3). 한편, 본 발명에서는 가이드라인([Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64(6):797-808.] 및 [Fanouriakis A, Kostopoulou M, Cheema K, et al. 2019 Update of the Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of lupus nephritis. Ann Rheum Dis. 2020;79(6):713-723.])에서 권장된 것보다 더 엄격한 지침을 사용하여 신장 생검을 수행하였다. 상기 표 2에 기재된 바와 같이 n-LN 일부 환자(17.6%)는 유의하지 않은 단백뇨(UPCR<500mg/g)를 나타냈다. 만약, 신장 생검에 널리 사용되는 지침을 적용했다면 이러한 환자는 생검을 받지 않았을 것이고 따라서 LN으로 진단되지 않았을 것이다. 엄격한 신장 생검을 통해 초기 LN 환자도 식별할 수 있었다. 이를 통하여, 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD는 상당한 단백뇨가 발생하기 전에도 조기 루푸스 신염 검출이 가능한 것을 알 수 있었다.

[0076] **실험예 3. 소변 바이오마커와 종래의 혈청학적 인자의 판별 능력 비교**

[0077] 신염이 없는 SLE와 n-LN을 구별하기 위한 소변 바이오마커와 종래의 혈청학적 인자(C3, C4 및 항-dsDNA 항체)의 정확도를 비교하기 위하여, ROC 분석을 사용하였다. 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD의 AUC는 각각 0.914, 0.874, 0.896 및 0.757이었다(도 4). 한편, 종래의 혈청학적 인자의 AUC는 각각 C3, 0.759; C4, 0.689; 항 dsDNA 항체, 0.715이었다(도 4). 즉, 소변 ORM1, SERPINC1 및 CP는 종래의 혈청학적 인자보다 신염이 없는 SLE와 n-LN을 구별함에 있어서 더 높은 정확도를 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0078] 추가로, 바이오마커의 조합이 정확도를 향상시키는지 평가하였다. 구체적으로, 2가지 복합 매개변수를 평가하였다: 4가지 모든 소변 바이오마커(소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD)의 조합, 및 단계적 전진 선택으로 로지스틱

회귀 분석을 사용하여 선택된 요인의 조합(C3 및 소변 ORM1)이다. 그 결과, 소변 ORM1, SERPINC1, CP 및 HBD 조합의 AUC는 0.901이고 C3 및 소변 ORM1 조합의 AUC는 0.920이었다(도 4). 즉, AUC는 C3와 소변 ORM1이 복합 매개변수로 결합되었을 때 가장 높았지만(AUC=0.920), 이 값은 소변 ORM1 단독보다 약간 높은 값이다. 따라서, 소변 ORM1은 C3와의 조합 여부에 관계없이 신염이 없는 SLE 환자와 n-LN 환자를 정확하게 구별한다는 것을 알 수 있었다.

[0079] **실험예 4. 소변 바이오마커와 조직학적 특징 사이의 연관성 확인**

[0080] 소변 바이오마커와 LN의 조직학적 특징 사이의 연관성을 확인하였다. 증식성 LN과 비증식성 LN을 구별하기 위한 소변 바이오마커의 능력을 평가하기 위하여, ROC 분석을 수행하였다. 유일하게, 소변 HBD는 증식성 LN과 비증식성 LN을 구별하는 데 높은 정확도(AUC=0.964)를 나타냈다(도 5).

[0081] 또한, 소변 바이오마커와 활성/만성 지수 사이의 상관관계를 평가한 결과는 하기 표 3에 기재한 바와 같다.

표 3

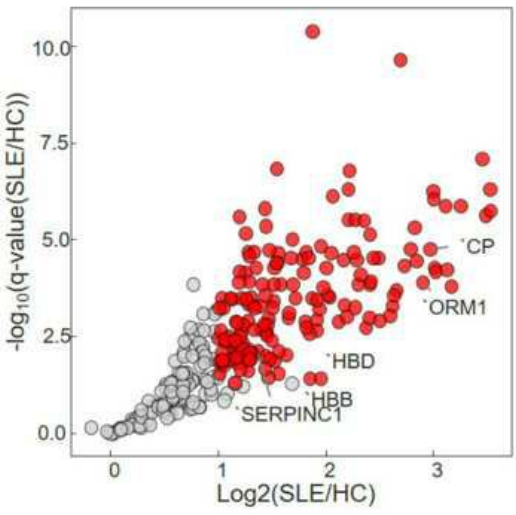
[0082]

	Activity index		Chronicity index	
	r	P value	r	P value
Urine CP	-0.065	0.804	-0.258	0.315
Urine SERPINC1	0.307	0.229	0.218	0.398
Urine ORM1	0.172	0.506	0.119	0.647
Urine HBD	0.549	0.024	-0.024	0.929

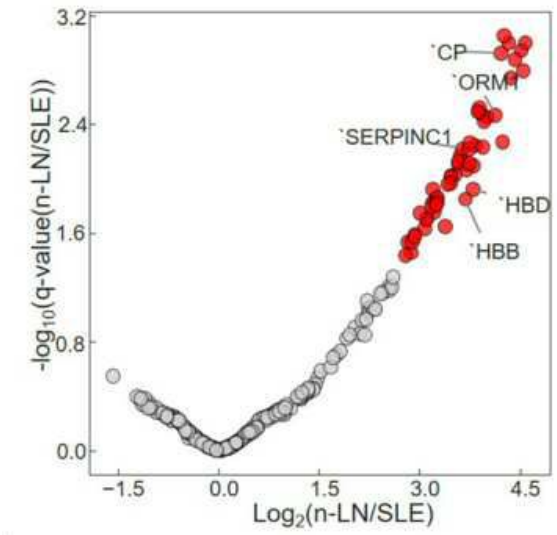
[0083] 즉, 4개의 소변 바이오마커 중 오직 소변 HBD만이 활성 지수와 유의하게 양의 상관관계를 나타내었다(r=0.549, p=0.024). 반면에, 어떤 소변 바이오마커도 만성 지수와 유의한 상관관계를 나타내지 않았다. 따라서, 소변 HBD는 증식성 LN과 비증식성을 정확하게 구별하여 적합한 치료 방법을 선택하고, LN 예후에 중요한 치료 후 조직학적 활성 지수를 추측하는데 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

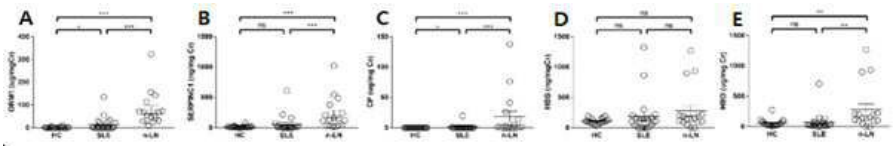
도면1



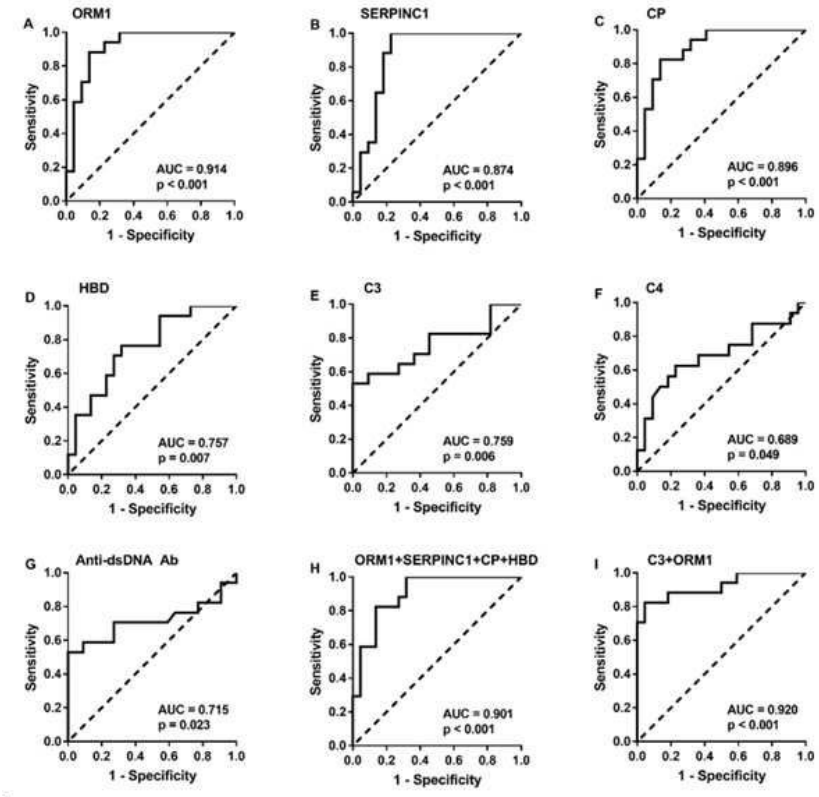
도면2


CP
ORM1
SERPINC1
HBD
HBB
-log10(q-value(n-LN/SLE))
Log2(n-LN/SLE)

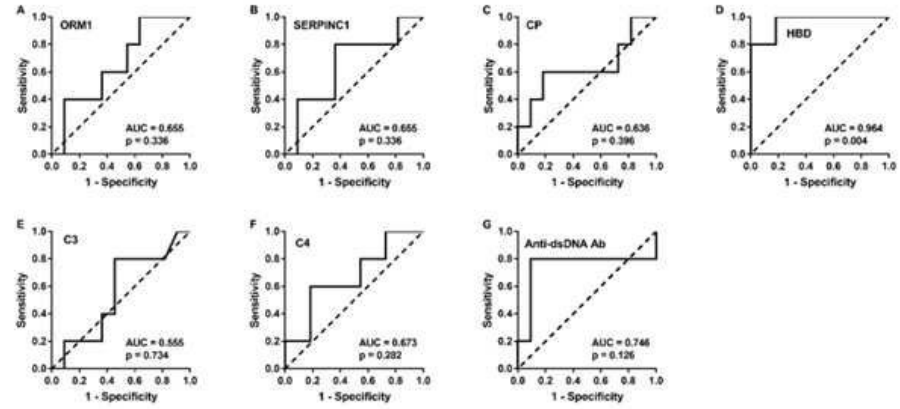
도면3


A
B
C
D
E

도면4


ORM1
AUC = 0.914
p < 0.001
SERPINC1
AUC = 0.874
p < 0.001
CP
AUC = 0.896
p < 0.001
HBD
AUC = 0.757
p = 0.007
C3
AUC = 0.759
p = 0.006
C4
AUC = 0.689
p = 0.049
Anti-dsDNA Ab
AUC = 0.715
p = 0.023
ORM1+SERPINC1+CP+HBD
AUC = 0.901
p < 0.001
C3+ORM1
AUC = 0.920
p < 0.001
Sensitivity
1 - Specificity

도면5


A
ORM1
AUC = 0.655
p = 0.336
B
SERPINC1
AUC = 0.655
p = 0.336
C
CP
AUC = 0.636
p = 0.396
D
HBD
AUC = 0.964
p = 0.004
E
C3
AUC = 0.555
p = 0.734
F
C4
AUC = 0.673
p = 0.282
G
Anti-dsDNA Ab
AUC = 0.746
p = 0.126
Sensitivity
1 - Specificity