



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0001234
(43) 공개일자 2022년01월05일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/569</i> (2017.01)
 <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/6872</i> (2013.01)
 <i>G01N 33/56972</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0079331
 (22) 출원일자 2020년06월29일
 심사청구일자 2020년06월29일
 기술이전 희망 : 기술양도</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 조치현
 서울특별시 동대문구 약령시로 25, 106동 301호(제기동, 벽산아파트)</p> <p>(74) 대리인
 위병갑</p> |
|---|--|

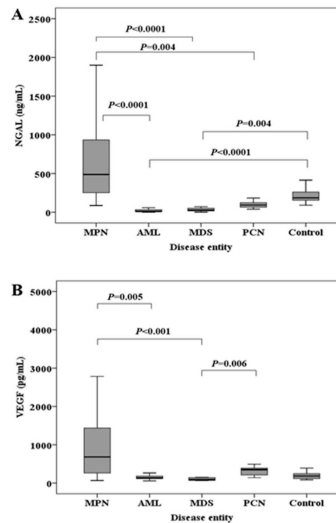
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **혈액 종양에서의 NGAL 및 VEGF**

(57) 요약

본 발명은 골수 흡인액 상청액을 이용하여 측정된 NGAL 및 VEGF의 관련성에 관한 것으로, 본 발명에서 규명한 NGAL 및 VEGF의 관계성을 통해 혈액 종양의 발병 기전을 이해할 수 있으며, 혈액 종양 질환의 진단 또는 혈액 종양 질환 치료제 개발에도 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57426 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 2333/485 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1C1B5029760
과제번호	R1807992
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업(생애 첫 연구 사업)
연구과제명	혈액 중양암에서 말초 혈액과 골수의 염증이 암 발생에 미치는 영향
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 의료원 산학협력팀
연구기간	2018.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 시료에서 VEGF 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, NGAL 수준 추정 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 생물학적 시료에서 측정한 VEGF 수준 및 호중구 수를 하기 수학식 2에 대입하는, NGAL 수준 추정 방법:

[수학식 2]

$$NGAL = X_1 \times VEGF + X_2 \times \text{호중구 수} + X_3$$

상기에서, $X_1 = 0.15$ 내지 2 ; $X_2 = 25$ 내지 30 ; 및 $X_3 = 30$ 내지 60

청구항 3

제 1항에 있어서, 생물학적 시료는 골수 흡인 상청액인, NGAL 수준 추정 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, NGAL 수준은 골수 내 NGAL 수준인, NGAL 수준 추정 방법.

청구항 5

생물학적 시료에서 NGAL 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, VEGF 수준 추정 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 생물학적 시료에서 측정한 NGAL 수준 및 호중구 수를 하기 수학식 3에 대입하는, NGAL 수준 추정 방법:

[수학식 3]

$$VEGF = (NGAL - X_3 - X_2 \times \text{호중구 수}) / X_1$$

상기에서, $X_1 = 0.15$ 내지 2 ; $X_2 = 25$ 내지 30 ; 및 $X_3 = 30$ 내지 60

청구항 7

제 5항에 있어서, 생물학적 시료는 골수 흡인 상청액인, VEGF 수준 추정 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, VEGF 수준은 골수 내 NGAL 수준인, VEGF 수준 추정 방법.

청구항 9

VEGF 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, NGAL 정량 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 골수 내 VEGF 수준 및 호중구 수인, NGAL 정량 키트.

청구항 11

제 9항에 있어서, 골수 내 NGAL 수준을 예측하는, NGAL 정량 키트.

청구항 12

NGAL 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, VEGF 정량 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 골수 내 NGAL 수준 및 호중구 수인, VEGF 정량 키트.

청구항 14

제 12항에 있어서, 골수 내 VEGF 수준을 예측하는, VEGF 정량 키트.

청구항 15

호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 혈액 종양 질환 진단용 키트.

청구항 16

제 15항에 있어서, 골수 흡인 상청액에서 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 검출하는, 혈액 종양 질환 진단용 키트.

청구항 17

제 15항에 있어서, 혈액 종양 질환은 골수 증식성 종양(myeloid proliferative neoplasm, MPN), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS) 또는 형질 세포종양(plasma cell neoplasm, PCN)인, 혈액 종양 질환 진단용 키트.

청구항 18

골수 흡인 상청액에서 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈액 종양 질환의 분류, 진단 또는 예후 판단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골수 흡인액 상청액을 이용하여 측정된 NGAL 및 VEGF의 관련성에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사망 질환의 원인으로 혈액 종양암의 발생빈도는 점차 증가하고 있는 추세이며, 이의 원인으로서는 환자의 유전적 요인뿐 아니라 유해한 환경 노출, 바이러스 감염 등 다양한 요인들이 관여하고 있다. 이 중 감염과 이에 동반되는 염증이 암 발생의 위험 인자 중의 하나로 인식되고 있다. 암과 같은 상태 및 질환들에 대한 생물학적 지표들은 생물학적 분자들 가령, 단백질들, 펩티드들, 지질들, RNAs, DNA 그리고 이의 변이 및 수정과 같은 것을 포함한다. 특이적 생물학적 지표들, 가령 DNA, RNA 및 단백질들의 확인은 이상 또는 질환들의 진단, 예후, 또는 치료진단(theranosis)에 이용되는 생체특징(biosignatures)을 제공할 수 있다.

[0003] 고등생물에 있어서 혈관과 림프관은 혈관형성과정(vasculogenesis)과 혈관신생과정(angiogenesis)에 의해 생성된다. 혈관형성과정은 주로 배아 및 태아의 발달, 자궁의 성숙, 태반의 증식, 황체의 형성 및 상처의 치유와 같은 매우 제한된 상황에서만 일어나며, 조혈전구세포로부터 새로운 혈관이 만들어지는 과정이다. 반면, 혈관신생과정은 기존의 혈관으로부터 혈관 내피세포의 증식, 이동 및 분화를 통하여 새로운 혈관이 생성되는 과정으로, 과도한 혈관신생은 암, 염증성 질환 (건선, 관절염 등), 안과 질환 (당뇨병성 망막증 등), 임파성 증식 질환 (아테롬성 동맥경화증 등), 림프관 전이, 퇴행성 신경질환과 같은 질환의 원인이 된다 (Folkman et al. J. Biol. Chem. 267: 10931-10934 (1992); KIagsbrun et al. Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); and Garner A, Klintworth G K, Eds. 2nd Edition Marcel Dekker, NY, pp 1625-1710 (1994)).

[0004] VEGF(Vascular endothelial growth factor)는 혈관의 생성과 발달을 조절하는 대표적인 혈관내피 성장인자로, 조혈세포, 혈관내피 전구세포, 성숙한 내피세포와 상호작용한다. 포유류에서 VEGF 는 VEGF-A, B, C, D와 PlGF가

밝혀져 있다. VEGF의 생물학적 기능은 VEGF 수용체인 VEGFR1, VEGFR2 및 VEGFR3을 통해 매개된다. VEGFR은 7개의 Ig-유사 도메인(immunoglobulin (Ig)-like domain)으로 구성된 세포외 도메인(extracellular domain); 막관통 도메인(transmembrane domain); 및 세포내 도메인(a regulatory juxtamembrane domain, a intracellular tyrosine kinase domain, several tyrosine residue)으로 구성되어 있다. VEGF는 각각 특정 수용체에 결합하여 활성화되는데, 예를 들어, VEGF-A는 VEGFR1 및 VEGFR2에 결합하여 혈관 내피 세포의 성장, 이동 및 생존에 결정적인 역할을 하며 혈관형성 및 혈관신생에 필수적이다. VEGF-B 및 PlGF는 VEGFR1에 배타적으로 결합하며, 혈관신생과 혈관계 발생에 있어서 VEGF-B의 역할에 대해서는 연구가 계속되고 있다. 반면, VEGFC와 -D는 VEGFR2 및 VEGFR3에 결합하여 활성화됨으로써 림프관 내피 세포의 성장, 이동 및 생존에 결정적인 역할을 하며 림프관형성과 유지에 중요한 역할을 한다. VEGF에 의한 혈관신생은 암의 성장뿐만 아니라 침윤과 전이에도 중요한 역할을 한다 (Ferrara et al. Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)). 폐암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 그리고 자궁암과 같은 다양한 종양에서 VEGF가 과발현되어 있음이 밝혀졌고, VEGF의 발현이 높은 암일수록 예후도 좋지 않음이 보고되었다. 따라서, VEGF의 활성을 억제하거나 VEGF의 세포 수용체인 VEGFR1 또는 VEGFR2의 기능을 억제함으로써 종양의 성장을 억제하거나 전이를 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 한편, 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)은 인간 호중구(neutrophil)의 과립으로부터 분리되어 그 특성이 분석된 당단백질로, 미생물, 특히 호중구의 탈과립 및 과립 단백질의 엑소사이토시스의 원인이 되는 화농성 박테리아에 침입할 때, 혈액으로부터 방출되는 호중구 활성화 표지로서 공개되었었다. 그 때문에 인간의 혈장 또는 혈청 시료에서 NGAL의 상승한 수치의 측정은 개체가 염증, 특히 박테리아 감염에 의한 염증을 앓고 있다는 것을 나타내는 것으로 믿어졌다 (Venge, 2000; 미국 특허 제 6,136,526호; PCT 출원 제W095/29404호). NGAL은 호중구 리포칼린 (NL; 인간 호중구 리포칼린의 경우에는 HNL), 리포칼린 2 (LCN2), 25 kDa 알파 2-마이크로글로불린 관련 단백질(래트에서) 또는 24P3 (마우스에서)으로도 알려져 있으며, 래트에서 NGAL의 유전자가 neu (HER2/c-erbB-2) 발암 유전자 (Stoesz와 Gould, 1995)에 의해 개시된 유방암에서 과잉 발현되기 때문에, neu 관련 리포칼린 (NRL)으로도 지칭되어 왔다. NGAL은 다형핵 백혈구 과립으로부터 첫 번째 분리된 25 kDa 당단백질로 (Triebel 등, 1992; Kjeldsen 등, 1993), 이황가교를 함유하고 이량체 부분과 더 작은 삼량체 부분을 형성한다. NGAL은 또한 기질 금속 단백질 분해효소 9 (MMP-9, matrix metalloproteinase 9) 또는 젤라티나제 B로도 불리는 92 kDa 인간 호중구 타입 IV 콜라게나제와 결합하여, 단량체로서 식별가능한 115 kDa의 복합체를 형성하거나 (Monier 등, 2000; Yan 등, 2001) 이량체로서 식별가능한 125kDa의 복합체를 형성한다 (Yan 등, 2001). 이들 복합체는 전립선암, 방광암, 신장암 및 유방암을 포함하는 각종 암 환자의 소변에서 확인되었다. NGAL은 신장 손상의 바이오마커로서 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 최근 들어 세포 증식을 위한 철(iron)-반응성 유전자의 조절에 관여하고 허혈이나 조직손상과 같은 여러 병리적 상태에 반응하여 다른 조직에서도 발현되는 것으로 밝혀지고 있다. 또한, NGAL 단백질의 발현이 다양한 감염성 질환 및 염증성 질환 하에서 평가된 바 있고, 세포자멸사(아포토시스, apoptosis), 염증(inflammation), 감염(infection), 면역 반응(immune response)와 같은 다양한 과정에 관여하는 지방-유래 인자, 아디포카인(adipokine)의 한 패밀리(family)로 인정되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 NGAL 수준 추정 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 VEGF 수준 추정 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 NGAL 정량 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 VEGF 정량 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 혈액 종양 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 아울러, 본 발명의 목적은 혈액 종양 질환의 분류, 진단 또는 예후 판단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 생물학적 시료에서 VEGF 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, NGAL 수준 추정 방법을 제공한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에서 NGAL 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, VEGF 수준 추정 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 VEGF 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, NGAL 정량 키트를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 NGAL 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, VEGF 정량 키트를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 혈액 종양 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0017] 아울러, 본 발명은 골수 흡인 상청액에서 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈액 종양 질환의 분류, 진단 또는 예후 판단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 사이토카인 폭풍 및 혈액 종양 질환에서 여러 사이토카인들이 작동하므로, 이들의 관계성이 중요하며, 본 발명에서는 NGAL 및 VEGF의 관계성을 통계적인 방법을 이용하여 분명하게 규명하였으므로, 이를 통해 혈액 종양의 발병 기전을 이해할 수 있으며, 혈액 종양 질환의 진단 또는 혈액 종양 질환 치료제 개발에도 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 혈액 종양 질환을 가진 환자에서 NGAL (A) 및 VEGF (B)의 수준을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0021] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "시료(샘플)"는 대상으로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고정 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 세포일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 생물학적 시료에서 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, NGAL(Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) 수준 추정 방법에 관한 것이다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 수준은 발현 수준일 수 있으며, VEGF mRNA 또는 단백질 수준 또는 NGAL mRNA 또는 단백질 수준일 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 생물학적 시료에서 측정한 VEGF 수준 및 호중구 수를 하기 수식 2에 대입하여 NGAL 수준을 추정할 수 있다:

수학식 2

$$NGAL = X_1 \times VEGF + X_2 \times \text{호중구 수} + X_3$$

상기에서, $X_1 = 0.15$ 내지 2 ; $X_2 = 25$ 내지 30 ; 및 $X_3 = 30$ 내지 60

[0028]

[0029]

일 구현예에서, 생물학적 시료는 골수 흡인 상청액일 수 있으며, NGAL 수준은 골수 내 NGAL 단백질 수준일 수 있다.

[0030]

일 측면에서, 본 발명은 생물학적 시료에서 NGAL 수준 및 호중구 수를 측정하는 것을 포함하는, VEGF 수준 추정 방법에 관한 것이다.

[0031]

일 구현예에서, 생물학적 시료에서 측정한 NGAL 수준 및 호중구 수를 하기 수학식 3에 대입하여 VEGF 수준을 추정할 수 있다:

수학식 3

$$VEGF = (NGAL - X_3 - X_2 \times \text{호중구 수}) / X_1$$

상기에서, $X_1 = 0.15$ 내지 2 ; $X_2 = 25$ 내지 30 ; 및 $X_3 = 30$ 내지 60

[0032]

[0033]

일 구현예에서, 생물학적 시료는 골수 흡인 상청액일 수 있으며, VEGF 수준은 골수 내 VEGF 단백질 수준일 수 있다.

[0034]

본 발명에서 사용된 용어, "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정 여부 및, 검출 또는 측정된 대상의 수준을 정량하는 것을 의미한다.

[0035]

본 발명에서 사용된 용어, "골수 흡인 상청액"은 "골수 흡인 상등액" 또는 "골수 상등액(bone marrow supernatant)"으로 혼용되어 사용될 수 있으며, 대상으로부터 수집한 골수를 원심분리하여 얻은 상등액을 의미한다.

[0036]

일 측면에서, 본 발명은 VEGF 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, NGAL 정량 키트에 관한 것이다.

[0037]

일 구현예에서, 상기 VEGF 수준 및 호중구 수는 골수 내 VEGF 수준 및 호중구 수일 수 있다.

[0038]

일 구현예에서, 상기 키트는 골수 내 NGAL 수준을 예측할 수 있다.

[0039]

일 측면에서, 본 발명은 NGAL 수준 및 호중구 수를 검출하는 제제를 포함하는, VEGF 정량 키트에 관한 것이다.

[0040]

일 구현예에서, 상기 NGAL 수준 및 호중구 수는 골수 내 NGAL 수준 및 호중구 수일 수 있다.

[0041]

일 구현예에서, 상기 키트는 골수 내 VEGF 수준을 예측할 수 있다.

[0042]

일 측면에서, 본 발명은 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 혈액 종양 질환 진단용 키트에 관한 것이다.

[0043]

일 구현예에서, 본 발명의 키트는 골수 흡인 상청액에서 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 검출할 수 있다.

[0044]

일 구현예에서, 혈액 종양 질환은 골수 증식성 종양(myeloid proliferative neoplasm, MPN), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS) 또는 형질 세포 종양(plasma cell neoplasm, PCN)일 수 있다.

[0045]

일 구현예에서, 골수 증식성 종양은 골수 흡인 상청액 내 NGAL 및 VEGF 단백질 수준이 AML, MDS, PCN 및 대조군에 비해 높을 수 있다.

[0046]

일 측면에서, 본 발명은 골수 흡인 상청액에서 호중구 수, NGAL 단백질 수준 및 VEGF 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 혈액 종양 질환의 분류, 진단 또는 예후 판단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0047] 본 발명에서, 사용된 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis) (예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0049] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1. 환자 분류 및 시료 수집

[0052] 혈액 종양 진단을 위해 골수 천자 검사를 받은 73명의 환자들로부터 골수(bone marrow, BM) 흡인 상청액(aspirate supernatants)을 수집하였다. 상기 73명의 환자들은 세계 보건기구(WHO) 진단 기준에 기반하여, 골수 도말 및 병리학적 검토에 따라 골수 증식성 종양(myeloid proliferative neoplasm, MPN; n=23), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML; n=13), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome, MDS; n=12), 형질 세포 종양(plasma cell neoplasm, PCN; n=11)으로 분류되었다. 상기에서 대조군 환자(n=14)는 골수 침습(bone marrow involvement)이 없는 림프종 환자(n=12) 또는 혈액학적 악성 종양이 없는 정상 골수(normocellular marrow)인 것으로 확인된 환자(n=2)를 포함한다. 상기 73명의 환자들 중 아무도 감염, 신부전 증상 또는 염증성 질환이 없는 상태였다. 상기 환자들로부터 골수 흡인 상청액을 수집하여 2399 X g로 10분 간 원심분리 후 에틸렌 디아민 테트라 아세트산을 포함하는 BD Vacutainer® plastic tubes (Becton Dickinson, Franklin, NJ, USA에 넣어 -80℃에 보관하였다. 또한, 환자들의 기본 인구 통계학적 데이터 및 헤모글로빈, 백혈구(WBC) 수, 호중구 및 혈소판 수 및 CRP(C-reactive protein)와 같은 혈액학적 변수(parameter)를 전자 의료 기록에서 수집하였으며, CKD-EPI(Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation)를 이용하여 eGFR (estimated glomerular filtration rate)을 계산하였다. 상기 환자들로부터 수집한 데이터들 중 범주형 데이터 (성별 변수)의 경우 Pearson's 카이-제곱 검정을 수행하였고, 숫자 데이터의 경우 Kruskal-Wallis H-검정을 수행하여 그룹 간의 통계적 차이를 평가하고 이에 대한 결과는 하기 표 1에 기재하였다. 그 결과, 9개의 변수 (유의한 변수를 알려주시기 바랍니다.)가 상기 5개의 그룹 간에서 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다.

표 1

	MPN† (n=23)	AML (n=13)	MDS (n=12)	PCN (n=11)	Control‡ (n=14)	p-value*
Age	51 (39, 63)	53 (42, 73)	70 (58, 80)	71 (59, 78)	61 (44, 71)	0.031
Gender	12 males 11 females	11 males 2 females	5 males 7 females	7 males 4 females	12 males 2 females	0.057
Hb (g/L)	124 (105, 146)	78 (60, 84)	87 (68, 95)	98 (87, 121)	134 (119, 151)	<0.0001
WBC count [median (range)] (109/L)	16.84 (10.29, 106.17)	3.17 (1.89, 13.74)	2.46 (1.42, 3.60)	5.19 (4.46, 6.64)	6.66 (4.59, 7.86)	<0.0001
Neutrophil count [median (range)] (109/L)	14.23 (7.37, 67.95)	0.43 (0.21, 1.71)	0.91 (0.49, 1.43)	3.19 (2.02, 4.42)	4.10 (2.80, 4.56)	<0.0001
Platelet count (109/L)	634 (404, 836)	34 (24, 124)	75 (29, 133)	194 (122, 200)	301 (237, 319)	<0.0001
CRP (mg/dL)	0.100 (0.030, 0.460)	8.320 (0.685, 12.820)	0.649 (0.291, 1.593)	0.165 (0.083, 0.815)	0.140 (0.070, 0.176)	<0.0001
eGFR (mL/min/1.73 m2)	91.85 (72.26, 112.41)	86.74 (68.77, 97.35)	85.50 (54.80, 101.88)	67.18 (32.39, 88.91)	92.62 (85.63, 108.81)	0.012
sRAGE (pg/mL)§	973.36 (677.58, 1204.59)	1181.88 (859.61, 1463.91)	800.33 (618.40, 1151.06)	1190.01 (664.56, 1677.85)	1080.90 (888.67, 1324.54)	0.391
VEGF (pg/mL)§	681.67 (262.15, 1502.33)	135.14 (106.74, 222.02)	88.58 (69.30, 144.77)	349.91 (204.86, 399.98)	184.30 (116.68, 271.23)	<0.0001
NGAL (ng/mL)§	487.55 (241.15, 1020.70)	10.85 (7.95, 40.90)	26.93 (15.84, 60.53)	93.10 (61.65, 125.70)	185.78 (144.20, 262.98)	<0.0001

[0053]

[0054]

*약어: ET, essential thrombocythemia; Hb, hemoglobin; MPN-U, MPN-unclassifiable; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PMF, primary myelofibrosis; PV- polycythemia vera; 및 sRAGE, soluble receptor for advanced glycation end-products.

[0056]

실시예 2. NGAL 및 VEGF의 발현량 면역분석

[0057]

2-1. NGAL 발현 면역분석

[0058]

상기 실시예 1의 환자들로부터 수집한 BM 흡인 상청액에서 NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin) 수준을 확인하기 위해, Cobas 8000 자동화 플랫폼 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland)에서 사용되는 NGAL particle-enhanced turbidimetric 면역분석 키트 (BioPorto Diagnostics, Gentofte, Denmark)를 이용하여 면역 분석을 수행하였다. BM 상청액 시료를 희석하지 않았고, 자동 시퀀스는 시료 (3 μ L) 및 반응 버퍼 (150 μ L)의 5분 인큐베이션 후 면역입자 현탁액 (50 μ L)의 5 분 인큐베이션으로 진행되었다. NGAL 농도는 공지된 농도 (0-3,000 ng/mL)의 보정 결과를 이용하여 준비된 보정 곡선을 기반으로 흡광도 변화로부터 계산되었다. 분석-내부 정밀도 [변이 계수 (CV)]는 0.5-1.7%인 반면, 분석-간 정밀도는 0.7-2.8%였다. 상기 분석은 2회 반복되었으며, 이를 평균화하여 결과를 도출하였다. 그 결과, AML 및 MDS의 NGAL 수준은 MPN 및 대조군보다 통계적으로 낮은 것으로 나타났다, PCN의 NGAL 수준은 MPN보다 통계적으로 낮은 것으로 나타났다 (도 1A).

[0060] 2-2. VEGF 발현 분석

[0061] 상기 실시예 1의 환자들로부터 수집한 BM 흡인 상청액에서 VEGF(Vascular endothelial growth factor)의 수준을 확인하기 위해, Luminex assay human XL cytokine discovery base kit (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA)를 사용하였다. 구체적으로, 시료 중의 VEGF를 마그네틱 마이크로입자 상에 코팅된 VEGF-특이적 항체로 포획하고, 포획된 VEGF를 비오티닌 항체에 결합시켰다. 100 μ L Wash Buffer로 3회 세척한 뒤, 마이크로입자를 스트렙타비딘-피코에리트린 컨주게이트(Streptavidin-PE)와 인큐베이션시켰다. 100 μ L Wash Buffer로 3회 세척한 뒤, 마이크로입자를 버퍼에 재부유시키고 Luminex® MAGPIX® 분석기로 분석하였다. 표준 곡선에 따르면 분석 작업 범위는 6 내지 4422 pg/mL였으며, 분석-내부 정밀도 (CV)는 1.6-3.5%인 반면, 분석-간 정밀도는 13.0-15.1%였다. 상기 분석은 2회 반복되었으며, 이를 평균화하여 결과를 도출하였다. 그 결과, 각 혈액 악성 종양과 대조군 사이에는 통계적으로 유의 한 차이가 없었으며, AML 및 MDS의 VEGF 수준은 MPN보다 통계적으로 낮았고, MDS의 VEGF 수준은 PCN보다 통계적으로 낮은 것으로 나타났다 (도 1B).

[0063] 실시예 3. BM 상청액 희석 배수에 따른 회수 시험 및 선형성 검증

[0064] 대조군 시료에 대한 NGAL 및 VEGF의 회수 시험 및 선형성 검증(recovery and linearity tests)을 수행하였다. 구체적으로, turbidimetric immunoassay kit (BioPorto Diagnostics, Denmark) 및 Cobas 8000 platform (Roche Diagnostics, Switzerland)를 이용한 BM 상청액에서의 NGAL의 측정 시 모든 회수 시험 결과가 수용 가능한 범위 내에 있는 것으로 나타났다. 구체적으로, 회수 시험은 3개의 BM 상청액 시료가 사용되었으며, 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 시료의 경우 %Recovery (1:1), %Recovery (1:2), %Recovery (1:4), 및 %Recovery (1:8)가 각각 98.25%, 99.60%, 103.96% 및 108.44%; 각각 85.08%, 103.06%, 105.71% 및 110.12%; 및 각각 104.42%, 96.91%, 95.07% 및 90.94%로 나타났다.

[0065] 또한, VEGF의 경우, %Recovery은 98.66%로 나타났으며, 선형성 검증 결과는 %Recovery (1:2), %Recovery (1:4) 및 %Recovery (1:8)가 각각 98.60%, 97.89% 및 103.00%로 나타났다. 구체적으로, 회수 시험은 3개의 BM 상청액 시료가 사용되었으며, 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 시료의 경우 %Recovery (1:1), %Recovery (1:2), %Recovery (1:4), 및 %Recovery (1:8)가 각각 106.00%, 94.37%, 109.02% 및 111.51%; 각각 77.52%, 83.42%, 87.28% 및 92.95%; 및 각각 99.26%, 87.78%, 100.89% 및 91.45%로 나타났다. 2개의 BM 상청액 시료의 경우, 회수 시험 결과가 허용 가능한 범위 내에 들어갔으나, 다른 BM 상청액 시료의 경우, 1:2, 1:4 및 1:8로 희석된 경우에만 회수 시험 결과가 허용 가능한 범위 내에 속하였다.

[0066] 따라서, BM 상청액 시료를 1: 2로 희석되었다.

[0068] 실시예 4. NGAL과 중요한 변수 선별 및 관련성 분석

[0069] NGAL과 중요한 관계를 보이는 독립 변수를 찾기 위해, NGAL과 VEGF, sRAGE(soluble receptor for advanced glycation end-products) 및 다른 혈액학적 변수들 간의 단순 회귀 분석을 수행하였다. 그 결과, BM NGAL 수준에 중요한 5가지 예측 변수를 선별할 수 있었다 (표 2) ($p < 0.05$). 이 후, 이들 5가지 변수에 대한 다중 회귀 분석이 수행되었으며 (표 3), 오직 2 개의 독립적인 변수 VEGF 및 호중구 수만이 남았다 (p -value < 0.0001). 이에 따른 다중 회귀 모델은 하기 수학적 1과 같다.

수학적 1

$$\text{BM NGAL} = 0.075 \times \text{VEGF} + 17.473 \times \text{neutrophil count} + 45.213$$

[0070]

표 2

Clinical parameters	R2	p-value
Age	0.098	0.007†
Gender	0.012	0.356
Hb (g/L)	0.038	0.097
WBC count (109/L)	0.549	0.000†
Neutrophil count (109/L)	0.778	0.000†
Platelet count (109/L)	0.067	0.027†
CRP (mg/dL)	0.025	0.191
eGFR‡ (mL/min/1.73 m2)	0.034	0.120
sRAGE (pg/mL)	0.006	0.501
VEGF (pg/mL)	0.168	0.000†

[0071]

[0072]

† 통계학적 유의성 ($p < 0.05$); 및

[0073]

‡ eGFR은 CKD-EPI 방정식으로 계산됨.

표 3

	Coefficient (95% CI)	t-value	p-value	Adjusted R2
Constant	45.213 (-25.044~ 115.470)	1.284	0.204	0.785
VEGF	0.075 (0.004~0.147)	2.095	0.040†	
Neutrophil count	17.473 (15.063~19.882)	14.464	<0.0001†	

[0074]

[0075]

† 통계학적 유의성 ($p < 0.05$).

도면

도면1

