(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0024919
(43) 공개일자 2021년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0104725
(22) 출원일자 2019년08월26일
심사청구일자 2020년08월27일

(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)
김미정
서울특별시 송파구 성내천로49길 4, 202호(마천동, 대명그린빌)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

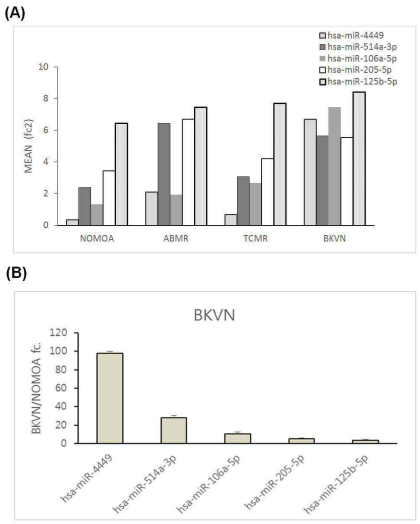
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 소변 엑소좀 유래 miRNA 유전자 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 소변 엑소좀 유래 miRNA 유전자 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy, BKVN)과 관련된 바이오마커, BK 바이러스 신병증 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보제공방법 및 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711046930
과제번호	NRF-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

hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy)을 진단하기 위한 바이오마커 조성물.

청구항 2

hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 조성물을 포함하는, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 실시간 PCR (RT-PCR) 키트, 마이크로어레이 키트 또는 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression) 키트인 것인, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 키트.

청구항 6

(a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 8

제7항에 있어서, (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조구 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로

포함하는, BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 9

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

(b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (a) 단계의 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 바이오마커 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 신장이식 거부반응은 항체 매개성 거부반응(Antibody mediated rejection, ABMR), T 세포 매개성 거부반응(T cell mediated rejection, TCMR), 또는 이들 모두가 복합적으로 나타나는 혼합 거부반응(mixed rejection)인 것인, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 바이오마커 조성물.

청구항 14

hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15의 조성물을 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 키트.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 키트는 상기 키트는 실시간 PCR (RT-PCR) 키트, 마이크로어레이 키트 또는 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression) 키트인 것인, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위

한 키트.

청구항 18

(a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 정보 제공방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 정보 제공방법.

청구항 20

제18항에 있어서, (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, 신장이식 거부반응을 동반하지 않는 BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 정보 제공방법.

청구항 21

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

(b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 (a) 단계의 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀인 것인, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 소변 엑소좀 유래 miRNA 유전자 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy, BKVN)과 관련된 바이오마커, BK 바이러스 신병증 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보제공방법 및 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법에 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 크레아티닌의 농도 증가 또는

새로운 단백뇨의 발현 등이 생길 경우 조직 생검을 통해 진단된다. 혈청 크레아티닌 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 면역반응은 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] BK 바이러스(BKV)는 파포바바이러스(papovavirus)에 속하는 바이러스로서, 원숭이의 파포바이러스인 SV40과 형태적으로 유사하며, 유전체의 유전자구성은 SV40과 동일하다. BK 바이러스는 면역이상이 있는 환자에서 주로 분리되는데, 질환과의 관련성은 분명하지 않다. 그러나, 혈청역학적조사에 따르면 BK 바이러스는 세계 각국에서 광범위하게 침음하고 있다고 한다.

[0004] 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 동종이식 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.

[0005] 한편, 엑소좀(exosome)은 세포에서 유래하는 소포체로서 표면에 마커를 가지며 그의 내부에는 지질, 단백질, 마이크로RNA 등의 핵산 등을 함유하고 있어서 이를 이용한 정상적인 기능과 질병에 대한 기능을 연구가 활발히 진행되고 있다. 엑소좀은 세뇨관 내강 (renal tubule lumen)에 존재하는 상피세포 혹은 사구체 발세포(glomerular podocyte)에서 분비되어 엑소좀에 있는 특이 인자가 이식된 신장세포의 상태를 반영하여 신장 이식 후 거부반응을 진단하기 위한 바이오마커로의 활용 가치가 높은 것으로 알려져 있다 (Hua Zhou, Peter S. T. Yuen, Trairak Pisitkum et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. Kidney International, 2006, 69(8) 1471-76).

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신장이식 후 BK 바이러스 신병증을 진단할 수 있는 miRNA 유전자 바이오마커 및/또는 BK 바이러스 신병증을 신장이식 후 항체 매개성 거부반응 및 T 세포 매개성 거부반응과 같은 신장이식 거부반응과 구분하여 진단할 수 있는 miRNA 유전자 바이오마커를 선별 및 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 miRNA 유전자 바이오마커, 이를 이용하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물, 키트, 정보제공방법 및 BK 바이러스 신병증의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 바이오마커 조성물, 이를 이용하여 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물, 키트, 정보제공방법 및 BK 바이러스 신병증의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 과제를 해결하기 위한 제1 양태로, 본 발명은 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy)을 진단하기 위한 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.

[0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.

[0012] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

[0013] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0014] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계.

[0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0017] (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

[0018] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 상술한 과제를 해결하기 위한 제2 양태로, 본 발명은 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy, BKVN)을 진단하기 위한 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0021] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 키트는 실시간 PCR (RT-PCR) 키트, 마이크로어레이 키트 또는 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression) 키트일 수 있다.

[0024] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병

증을 진단하기 위한 정보 제공방법을 제공한다:

[0025] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0026] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계.

[0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, 신장이식 거부반응을 동반하지 않는 BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 신장이식 거부반응은 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응 또는 이들 모두가 복합적으로 나타나는 혼합 거부반응일 수 있다.

[0030] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0031] (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

[0032] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

[0033] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 시료는 소변 또는 소변 유래 엑소좀일 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 다양한 조합의 miRNA 유전자를 포함하는 바이오마커 조성물은 BK 바이러스 신병증을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, BK 바이러스 신병증을 신장이식 거부반응, 예를 들어, 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응 및/또는 이들 모두가 복합적으로 나타나는 혼합 거부반응과 구분하여 진단하는 것이 가능하여, 환자 맞춤별 치료방법을 제공함으로써 신장이식 후에 나타나는 다양한 증상을 원인에 따라 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 항체 매개성 거부반응군 (ABMR), T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR) 및 BK 바이러스 신병증군 (BKVN)을 대표하는 바이오마커의 선발 과정을 나타낸 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 중요 데이터에 대하여, 발현 수준이 유사한 샘플 및 성숙 miRNA를 그룹화하는 계층적 군집 분석 (유리클리드 방법, 완전 연관)을 수행하고, 이를 히트맵으로 나타낸 것이다.

도 3은 1차 및 2차 선별 과정을 통해 선별된 miRNA 유전자를 나타낸 것으로, 도 3(A)는 정상 대조군 (NOMOA)을 기준으로 발현이 2배 이상 증가한 miRNA 유전자는 빨간색으로 표시하였고, 정상 대조군 (NOMOA)을 기준으로 발현이 2배 이상 감소한 miRNA 유전자는 녹색으로 표시하여 나타낸 것이고, 도 3(B)는 정상 대조군 (NOMOA)과 비교하여 각각 항체 매개성 거부반응군 (ABMR), T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR) 및 BK 바이러스 신병증군 (BKVN)에서 발현 수준이 2배 이상 차이나는 상향 조절된 miRNA 유전자를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4(A)는 항체 매개성 거부반응군 (ABMR)의 바이오마커 후보 중, 항체 매개성 거부반응군 (TCMR) 및 BK 바이러

스 신병증군 (BKVN)과 비교하여 현저한 발현 양상의 차이를 보이는 5종의 miRNA 유전자를 나타낸 것이고, 도 4(B)는 상기 5종의 miRNA 유전자가 정상 대조군 (NOMOA) 대비 항체 매개성 거부반응군 (ABMR)에서 2배 이상 증가된 발현 수준을 나타낸다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 5(A)는 T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR)의 바이오마커 후보 중, 항체 매개성 거부반응군 (ABMR) 및 BK 바이러스 신병증군 (BKVN)과 비교하여 현저한 발현 양상의 차이를 보이는 5종의 miRNA 유전자를 나타낸 것이고, 도 5(B)는 상기 5종의 miRNA 유전자가 정상 대조군 (NOMOA) 대비 T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR)에서 2배 이상 증가된 발현 수준을 나타낸다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 6(A)는 BK 바이러스 신병증군 (TCMR)의 바이오마커 후보 중, 항체 매개성 거부반응군 (ABMR) 및 T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR)과 비교하여 현저한 발현 양상의 차이를 보이는 5종의 miRNA 유전자를 나타낸 것이고, 도 6(B)는 상기 5종의 miRNA 유전자가 정상 대조군 (NOMOA) 대비 BK 바이러스 신병증군 (TCMR)에서 2배 이상 증가된 발현 수준을 나타낸다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 7은 통계분석 후 정상 대조군(NOMOA)과 비교하여 항체 매개성 거부반응군(ABMR), T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR) 및 BK 바이러스 신병증군(BKVN)에서 각각 다른 군과 유의적으로 상이하게 발현되는 소변 엑소좀 miRNA 유전자를 확인하여 벤다이어그램으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 상술한 바와 같이, 신장이식 환자에서 나타나는 BK 바이러스 신병증의 조직학적 특성은 급성 거부반응과 비슷하여 생체검사를 통한 BK 바이러스 신병증의 진단은 정확도가 떨어지는 단점이 있었다. 이에, 본 발명자들은 신장이식 후 BK 바이러스 신병증을 진단할 수 있는 miRNA 유전자 바이오마커 및/또는 BK 바이러스 신병증을 신장이식 거부반응과 구분하여 진단할 수 있는 miRNA 유전자 바이오마커를 제공함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다. 본 발명에 따른 다양한 조합의 miRNA 유전자를 포함하는 바이오마커 조성물은 BK 바이러스 신병증을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, BK 바이러스 신병증을 신장이식 거부반응, 예를 들어, 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응 및/또는 이들 모두가 복합적으로 나타나는 혼합 거부반응과 구분하여 진단하는 것이 가능하여, 환자 맞춤별 치료방법을 제공함으로써 신장이식 후에 나타나는 다양한 증상을 원인에 따라 효과적으로 치료할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0039] 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.

[0040] 본 발명의 제1 양태는 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy)을 진단하기 위한 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0041] 상기 12종의 miRNA 유전자 바이오마커에 대한 정보는 표 1과 같다.

표 1

[0042]

성숙 miRNA 유전자	서열	서열번호	Accession Number
hsa-miR-8485	CACACACACACACACGUAU	9	MIMAT0033692
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	10	MIMAT0000278
hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	7	MIMAT0000760
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	8	MIMAT0005880
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	16	MIMAT0000074
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	17	MIMAT0000089
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	18	MIMAT0000070
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	19	MIMAT0000266
hsa-miR-4449	CGUCCCGGGGCUGCGCGAGGCA	20	MIMAT0018968
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	21	MIMAT0000103
hsa-miR-514a-3p	AUUGACACUUCUGUGAGUAGA	22	MIMAT0002883
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	23	MIMAT0000423

[0043] 본 발명에서, 용어 “miRNA”는 특별히 언급하지 않는 한, 헤어핀 모양 구조의 RNA 전구체로서 전사되고, RNase III 절단 활성을 갖는 dsRNA 절단 효소에 의해 절단되어 RISC라고 칭하는 단백질 복합체에 도입되고, mRNA의 번역 억제에 관여하는 15~25염기의 비코딩 RNA를 의도하여 사용된다. 또한, 본 발명에서 사용하는 miRNA는 특정 염기서열(또는 서열번호)로 나타내어지는 miRNA뿐만 아니라 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, primiRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다. 이러한 전구체, 동족체, 변이체 또는 유도체로서는 구체적으로는 miRBase release 20(http://www.mirbase.org/)에 의해 동정할 수 있고, 엄격한 조건 하에서 miRNA의 상보서열과 혼성화되는 염기서열을 갖는 miRNA를 들 수 있다. 또한, 본 발명에 언급된 miRNA는 miR 유전자의 유전자산물일 수 있고, 그러한 유전자산물은 성숙 miRNA(예를 들면, 상기와 같은 mRNA의 번역 억제에 관여하는 15~25염기 또는 19~25염기의 비코딩 RNA) 또는 miRNA 전구체(예를 들면, 상기와 같은 pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 포함한다.

[0044] 본 발명에서, 용어 “핵산”이란 RNA, DNA, 및 RNA/DNA(키메라) 모두 포함하는 핵산에 대하여 사용된다. 또한, 상기 DNA에는 cDNA, 게놈DNA, 및 합성DNA 모두가 포함된다. 또한, 상기 RNA에는 total RNA, mRNA, rRNA, miRNA, siRNA, snoRNA, snRNA, 비코딩(non-coding)RNA 및 합성RNA 모두가 포함된다. 본 발명에 있어서 “합성DNA” 및 “합성RNA”는 소정의 염기서열(천연형 서열 또는 비천연형 서열 중 어느 것이어도 좋음)에 의거하여, 예를 들면 자동핵산 합성기를 사용하여 인공적으로 제작된 DNA 및 RNA를 말한다. 본 발명에 있어서 “비천연형 서열”은 광의의 의미로 사용하는 것을 의도하고 있고, 천연형 서열과 상이한, 예를 들면 1 이상의 뉴클레오티드의 치환, 결실, 삽입 및/또는 부가를 포함하는 서열(즉, 변이 서열), 1 이상의 수식 뉴클레오티드를 포함하는 서열(즉, 수식 서열) 등을 포함한다. 또한, 본 발명에서는 폴리뉴클레오티드는 핵산과 호환적으로 사용된다.

[0045] 본 발명에서 용어 "신장이식 거부반응(renal allograft rejection)"은 공여자의 신장을 이식받은 수여자의 면역체계가 이식된 신장을 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.

[0046] 본 발명에서 상기 신장이식의 거부반응은 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응 및 혼합 거부반응을 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 급성 T 세포 매개 거부 반응(Acute T cell mediated rejection, TCMR), 만성 항체-매개 거부반응(chronic antibody mediated rejection, CAMR), 활성형 항체-매개 거부반응(active antibody mediated rejection), 만성 활성형 T 세포 매개 거부반응(chronic active T cell mediated rejection) 및 혼합 거부반응(mixed rejection)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0047] 본 발명의 용어 "바이오마커"는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 본 발명의 바이오마커는 신장이식 후 거부반응이 나타나는지 또는 BK 바이러스 신병증이 나타나는지 확인할 수 있는 miRNA 유전자 또는 신장이식 후 예후가 양호하거나 불량한 환자를 예측해내는 기준이 되는 유전자를 지칭한다. 이 용어는 마커 서열에 상보적이거나 이에 플랭킹된 핵산 서열, 예컨대 마커 서열을 증폭시킬 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍으로 사용된 핵산을 포함한다.

[0048] 본 발명에 있어서, 용어 "예후"는 의학적 귀추(예컨대, 장기 생존 가능성, 무병생존율 등)에 대한 예상을 의미하며, 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 또는 불량한 예후)를 포함하며, 본 발명에서 상기 음성적 예후는 신장이식 후에 나타나는 다양한 거부반응 또는 질환이 발생하는 것을 포함하고, 양성적 예후는 신장이식 후 거부반응 또는 질환이 발생하지 않는 것을 의미한다.

[0049] 본 발명에 있어서, 용어 "예측"은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 신장이식을 받은 환자의 반응(다양한 신장이식 거부반응, BK 바이러스 감염성 질환 등의 발병 등)을 미리 짐작하는 것을 의미한다.

[0050] 본 발명자들은 신장이식 환자들 중에서 조직검사 상 이상소견이 없는 정상 대조군(no major abnormality, NOMOA)과 비교하여 BK 바이러스 신병증 (BKVN)을 나타내는 환자의 소변에서 전술한 12종의 miRNA 유전자 발현이 2배 이상 증가하며, 통계분석 결과 p-value 값이 0.05 이하로 유의성을 나타내므로, 이들 miRNA 유전자 바이오마커를 BK 바이러스 신병증의 진단 마커로서 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0051] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제

를 포함하는, BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.

[0052] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 용어 "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 miRNA 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 신장이식의 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 진단하거나 예후를 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 본 발명에서, 상기 유전자의 mRNA 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머 서열은 miRNA 유전자 바이오마커의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.

[0054] 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 miRNA 유전자와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 신장이식의 거부반응을 진단 또는 예후를 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0055] 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.

[0056] 본 발명에서 이용되는 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제의 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, miRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 특정 서열을과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 동일성, 더욱 구체적으로 70%의 동일성, 더더욱 구체적으로 80%의 동일성, 가장 구체적으로 90%의 동일성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0057] 본 발명의 키트는 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)과 같은 실시간 PCR (RT-PCR) 키트, 마이크로어레이 키트 또는 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 예로, 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는, miRNA 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 DNA, RNA 또는 miRNA에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 키트에는 체액, 세포 또는 조직으로부터 핵산(예를 들면, total RNA)을 추출하기 위한 키트, 표지용 형광물질, 핵산 증폭용 효소 및 배지, 사용 설명서 등을 포함시킬 수 있다.

[0059] 본 발명의 키트는 상기 핵산이, 예를 들면 고상에 결합 또는 부착된 파킨슨병 마커 측정을 위한 디바이스이다. 고상의 재질의 예는 플라스틱, 종이, 유리, 실리콘 등이며, 가공의 용이함으로부터 바람직한 고상의 재질은 플라스틱이다. 고상의 형상은 임의이며, 예를 들면 사각형, 원형, 직사각형, 필름형 등이다.

[0060] 본 발명의 키트는 상기 miRNA의 적어도 1개와 특이적으로 결합 가능한 핵산을 포함할 수 있다.

[0061] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[0062] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0063] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계.

[0064] 본 발명의 정보제공방법에 있어서, 용어 "개체"는 신장이식 거부반응이 나타나거나 BK 바이러스 신병증이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 인간, 침팬지를 포함한 영장류, 개, 고양이 등의 애완동물, 소, 말, 양, 염소 등의 가축동물, 마우스, 래트 등의 설치 류 등의 포유동물을 포함하는 의미로 해석된다.

[0065] 본 발명의 정보제공방법에 있어서, 분석을 위해 사용되는 "시료"는 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 질 분비물, 소변, 대변 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 신장이식 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증에 특이적인 miRNA 유전자를 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.

[0066] 본 발명에서 용어 "엑소좀"은 세포에서 유래된 지질 이중층의 소낭(vesicle)을 의미한다. 엑소좀은 세포 또는 조직으로부터 유래한 고유의 단백질 및 핵산 등을 포함하고 있으며, 다양한 질환의 진단 등에 사용될 수 있는 RNA, miRNA 등의 바이오마커가 다량 포함되어 있다.

[0067] 본 발명의 정보제공방법은 공지된 다양한 시험방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 혼성화법, 면역분석(immunoassay) 방법 또는 유전자 증폭방법을 이용하여 실시할 수 있고 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 상기 혼성화법은 프로브를 이용하여 miRNA의 존재를 확인하는 것일 수 있다.

[0069] 본 발명의 정보제공방법이 혼성화 방식 중 마이크로어레이 방식으로 실시되는 경우, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화 된다. 바람직한 기질은 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기의 기질 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예컨대, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0070] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 변경할 수 있다. 또한, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0071] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 또는 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 햅텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0072] 혼성화 방법에서 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생물학적 시료(biosamples)에서 얻은 RNA를 이용하여 제

조할 수 있다. 상기 생물학적 시료는, 바람직하게는 장상피세포이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0073] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

[0074] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2‘-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

[0075] 생물학적 시료에서 상기 miRNA의 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 상향 조절 (up-regulation)되는 경우에는 신장이식 후 BK 바이러스 신병증으로 진단된다.

[0076] 본 발명의 정보제공방법은 면역분석 방법에 의해 실시될 수 있다. 상기 면역분석 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbentassay(ELISA), inMethodsinMolecularBiology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, UsingAntibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0077] 본 발명의 정보제공방법은 유전자 증폭방법에 의해 실시될 수 있다. 유전자 증폭방법을 이용한 miRNA의 검출은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시할 수 있으며, 이 경우 miRNA의 프라이머 또는 프로브가 이용될 수 있다. 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 상기 miRNA의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 miRNA 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 소변 유래 엑소좀)에서 마커의 mRNA 양을 조사하여 마커의 유전자의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 생물학적 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

[0078] 우선, mRNA를 얻기 위하여 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., MolecularCloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold pring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., PlantMol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., CurrentProtocolsinMolecularBiology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다.

[0079] 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA을 용이하게 합성할 수 있다(참조: PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al., Science, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A LaboratoryManual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다. 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형

성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, MolecularCloning, A LaboratoryManual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A PracticalApproach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

[0080] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 Thermus aquaticus(Taq), Thermusthermophilus(Tth), Thermusfiliformis, Thermisflavus, Thermococcus literalis, 및 Pyrococcusfuriosus(Pfu)를 포함한다. 중합반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg2+와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실상, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[0081] 본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 표적 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[0082] 본 명세서의 용어 "증폭 반응" 은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A LaboratoryManual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication) (WO 90/06995), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호) 및 고리-중재 항온성 증폭(loopmediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다. 본 발명의 유전자 증폭방법은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시될 수 있다.

[0083] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)및 멀티플렉스 PCR이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0084] 본 발명에서 유전자 증폭방법에 이용되는 프라이머는 상기 miRNA의 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 하이브리드 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

[0085] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머 세트는 주형인 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 프라이머는 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0086] 이러한 프라이머의 디자인은 상기 miRNA의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0087] 이렇게 증폭된 상기 마커의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다.

[0088] 상기 정상 대조군이란 신장이식을 받지 않은 정상인 또는 신장이식을 받았지만 안정적인 신장 기능이 발휘되며, 조직검사 상 이상소견이 없고, 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응, 혼합 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증이 나타나지 않은 상태의 신장이식 환자 등이며, 이들로부터 채취한 시료와 신장이식의 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증의 존재 또는 예후를 알고자 하는 환자로부터 채취한 시료에서 유전자 발현수준 또는 발현패턴을 수득하고 비교함으로써 환자의 예후를 정확하게 예측할 수 있다.

[0089] 본 발명의 제1 양태와 관련된 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, 신장이식 후 BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0090] 구체적으로, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 100% 이상, 바람직하게는 200% 이상 상향조절 되어 있는 경우, BK 바이러스 신병증으로 진단할 수 있다.

[0091] 제1 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0092] (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

[0093] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

[0094] 본 발명의 치료제 스크리닝 방법에 있어서, 분석을 위해 사용되는 "시료"는 정보제공방법에 사용되는 시료와 동일하다.

[0095] 본 발명의 용어, "항체 매개성 거부반응 치료제의 후보물질", "T 세포 매개성 거부반응 치료제의 후보물질""신장이식 거부반응 치료제의 후보물질" 또는 "BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질"은 항체 매개성 거부반응, T 세포 매개성 거부반응, 신장이식 거부반응 또는 BK 바이러스 신병증을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 신장이식 거부반응 또는 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.

[0096] 본 발명의 치료제 스크리닝 방법에서, miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 상기 (b) 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열복제, 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.

[0097] 본 발명의 제1 양태와 관련된 치료제 스크리닝 방법은 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-8485, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1290, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0098] 본 발명의 제2 양태는 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여

BK 바이러스 신병증 (BK virus nephropathy; BKVN)을 진단하기 위한 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0099] 상기 5종의 miRNA 유전자 바이오마커에 대한 정보는 상기 표 1에 기재된 바와 같다.

[0100] 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.

[0101] 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.

[0102] 본 발명자들은 신장이식 환자들 중에서 조직검사 상 이상소견이 없는 정상 대조군(no major abnormality, NOMOA), 항체 매개성 거부반응군 (ABMR) 및 T 세포 매개성 거부반응군 (TCMR)과 비교하여 BK 바이러스 신병증(BKVN)을 나타내는 환자의 소변에서 전술한 5종의 miRNA 유전자 발현이 2배 이상 증가하며, 통계분석 결과 p-value 값이 0.05 이하로 유의성을 나타내므로, 이들 miRNA 유전자 바이오마커를 항체 매개성 거부반응 및/또는 BK 세포 매개성 거부반응을 동반하지 않는 BK 바이러스 신병증의 진단 마커로서 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0103] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.

[0104] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다.

[0105] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 신장이식 거부반응과 구분하여 BK 바이러스 신병증을 진단하기 위한 정보 제공방법을 제공한다:

[0106] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0107] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계.

[0108] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 정보제공방법은 (c) 상기 (a) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우, 신장이식 거부반응을 동반하지 않는 BK 바이러스 신병증으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0109] 구체적으로, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 정상 대조군 시료에서의 발현 수준보다 100% 이상, 바람직하게는 200% 이상 상향조절 되어 있는 경우, 신장이식 거부반응을 동반하지 않는 BK 바이러스 신병증으로 진단할 수 있다.

[0110] 제2 양태와 관련하여, 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 BK 바이러스 신병증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0111] (a) 시료에 BK 바이러스 신병증 치료제의 후보물질을 처리하는 단계; 및

[0112] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에서 hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

[0113] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4449, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-514a-3p 및 hsa-miR-125b-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 후보물질을 처리하지 않은 시료에서 보다 억제되는 경우, 상기 (a) 단계에서 처리한 후보물질을 BK 바이러스 신병증 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명의 제2 양태와 관련하여, 제1 양태와 동일한 부분은 설명을 생략한다.

실 시 예 1

[0115] **시료의 준비**

[0116] 1-1. 환자의 선발 및 소변 시료의 준비

[0117] 신장이식 환자의 항체 매개성 거부반응을 진단하기 위한 바이오마커를 발굴하기 위하여, 신장이식 후 5년 이내 징후 생검 (indication biopsy)을 시행받은 환자 15명을 대상으로 생검 2~3 시간 전에 소변 시료를 수집하였다. 또한 생체 신장 기증자로부터 신장 기증수술 직전에 소변 시료를 수집하였다. 환자들은 표 2와 같이 생검의 병리학적인 진단에 따라 4 군으로 분류되었다; 항체 매개성 거부반응 (ABMR) 군 4개, T 세포 매개성 거부반응 (TCMR) 군 4개, BK 바이러스 신병증 (BKVN) 군 3개 및 주요 이상이 없는 (NOMOA) 군 4개, 혼합된 동종 이병성 병변을 가진 환자의 소변은 제외하였다. 수집된 소변 시료는 프로테아제 저해제 혼합물을 넣어 4,000 rpm, 4℃에서 15분 간 원심분리하였고 상층액을 모아 사용시까지 동결보관하였다. 이 연구는 아산 병원 의료기관 평가위원회의 승인을 받아 진행하였으며, 모든 환자에게서 서면 동의를 받았다.

표 2

[0118]

	시료 이름	그룹	순서
1	Bx579-1	NOMOA	1805KHP-0067
2	Bx613	NOMOA	1808AHP-0002
3	Bx623-1	NOMOA	1808AHP-0002
4	Bx632	NOMOA	1808AHP-0002
5	Bx144	TCMR	1805KHP-0067
6	Bx39-1	TCMR	1805KHP-0067
7	Bx201-1	TCMR	1805KHP-0067
8	Bx175	TCMR	1808AHP-0002
9	Bx107	BKVN	1805KHP-0067
10	Bx650	BKVN	1805KHP-0067
11	Bx98-1	BKVN	1805KHP-0067
12	Bx85	ABMR	1804AHP-0057
13	Bx376	ABMR	1804AHP-0057
14	Bx326	ABMR	1804AHP-0057
15	Bx605	ABMR	1804AHP-0057

[0119] 1-2. 소변 유래 엑소좀 분리 및 엑소좀 내 miRNA 분리

[0120] 동결보관 중인 소변을 실온 (RT)에서 녹이고 4℃에서 17,000xg로 15분 동안 원심분리하여 세포 잔해를 제거한 후 상청액을 450nm 필터로 여과하였다. 초고속 원심분리기를 이용하여 200,000xg에서 1시간 동안 원심분리하여 침전물을 얻은 후 PBS로 200,000xg에서 1시간 동안 원심분리하여 세척하고 200ul 볼륨의 PBS에 풀어 엑소좀을 모은 후 small RNA isolation kit (miRNeasy mini kit, Quiagen)을 이용하여 제시되어 있는 방법에 따라 RNA를 분리하여 80℃에 보관하였다.

실 시 예 2

[0121] **miRNA 유전자 바이오마커 후보 선발 및 확인**

[0122] 각각의 병리학적 그룹을 대표하는 특정 바이오마커를 선발하기 위해, t-테스트를 사용하여 ABMR, TCMR 및 BKVN을 각각 NOMOA 그룹과 비교하였을 때 2배 이상의 차이를 보이고, $P<0.05$인 miRNA 유전자를 선정했다. RNA는 RNA bioanalyzer pico 6000 chip을 이용하여 RNA-seq 수행업체에 의뢰하여 QC 진행 후 Illumnia smarter kit로 라이브러리를 제작했다. RNA-seq은 크기 분할 (size fractionation)을 통하여 20nt 사이즈의 유전체(genome)에

어댑터 결합 (adaptor ligation), RT-RCR 방법으로 증폭 후 Hi-seq으로 시퀀싱 (sequencing) 하였다. 이의 결과로 정상인 그룹에 비해 발현도가 2배 이상이며 통계적으로 유의하게 발현한 miRNA를 선별하였다.

[0123] 보다 구체적인 miRNA 유전자 바이오마커 후보 선발과정은 다음과 같다.

[0124] 도 1에 나타낸 바와 같이, 첫 번째 단계로 상기 실시예 1에서 준비된 15개의 샘플에서 2,588개의 성숙 (mature) miRNA를 선별하였다. 두 번째 단계로 중요 데이터에 대하여, 발현 수준이 유사한 샘플 및 성숙 miRNA를 그룹화하는 계층적 군집 분석 (유리클리드 방법, 완전 연관)을 수행하고, 이를 도 2에 히트맵 (Heatmap)으로 나타내었다. 각 성숙 miRNA 별, 전체 15개 샘플에서 총 2,588개 성숙 miRNA 중에서 모두 0인 카운트 (Count) 값을 가지는 성숙 miRNA는 분석에서 제외하여 892개의 성숙 miRNA를 대상으로 통계분석을 진행하였다.

[0125] 1차 및 2차 선별과정을 통해 NOMOA 그룹을 기준으로 발현이 2배 이상 증가하거나 또는 감소하고, 통계분석 결과 p-value 값이 0.05 이하인 유전자를 선택하여 유전자를 필터링함으로써 NOMOA에 비해 ABMR, TCMR 및 BKVN 환자에서 상향 혹은 하향 조절되는 miRNA를 확인하였다. 발현 수준이 증가한 miRNA는 빨간색으로 표시하고 발현도가 감소한 miRNA는 초록색으로 표시하여 도 3(A)에 나타내었다. 특히 도 3(B)에 나타낸 바와 같이 NOMOA 그룹 대비 ABMR 그룹에서 발현 수준이 증가한 miRNA 유전자는 10개, TCMR 환자에서 11개, BKVN에서 12개를 최종 선발하였고, 그 목록을 표 3에 나타내었다.

표 3

[0126]

그룹	바이오마커 수	선발된 miRNA 유전자
ABMR	10	hsa-miR-8485 hsa-miR-221-3p hsa-miR-331-3p hsa-miR-1290 hsa-miR-192-5p hsa-miR-126-5p hsa-miR-328-5p hsa-miR-103a-3p hsa-miR-455-3p hsa-miR-126-3p
TCMR	11	hsa-miR-8485 hsa-miR-221-3p hsa-miR-19b-3p hsa-miR-31-5p hsa-miR-17-5p hsa-miR-192-5p hsa-miR-345-5p hsa-miR-215-5p hsa-miR-1273g-3p hsa-miR-19a-3p hsa-miR-223-3p
BKVN	12	hsa-miR-8485 hsa-miR-221-3p hsa-miR-331-3p hsa-miR-1290 hsa-miR-19b-3p hsa-miR-31-5p hsa-miR-17-5p hsa-miR-205-5p hsa-miR-4449 hsa-miR-106a-5p hsa-miR-514a-3p hsa-miR-125b-5p

실 시 예 3

[0127] **선발된 miRNA 유전자 바이오마커에 따른 병리학적 그룹의 확인**

[0128] 3-1. TCMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 ABMR 그룹에서 증가된 발현 수준을 나타내는 miRNA 유전자 바이오마커의 확인

[0129] 실시예 2에서 선발된 NOMOA 그룹 대비 ABMR 그룹에서 발현 수준이 증가한 miRNA 유전자 중에서, TCMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 현저한 발현 양상 차이를 나타내는 5종의 miRNA 유전자를 선발하였고, 그 결과를 도 4(A)에 나타냈다. 도 4(A)에서 확인되는 바와 같이, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-328-5p, hsa-miR-455-3p 및 hsa-miR-103a-3p의 5종의 miRNA 유전자는 TCMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 현저한 발현 양상의 차이가 있었다. 또한, 도 4(B) 및 표 4에 나타낸 바와 같이 상기 5종의 miRNA 유전자는 NOMOA 그룹 대비 ABMR 그룹에서 발현 수준이 2배 이상 증가하고, $p<0.05$ 로 통계적 유의성이 있음을 확인하였다.

표 4

[0130] NOMOA 그룹 대비 ABMR 그룹에서 발현 수준이 증가한 5종의 miRNA 유전자에 대한 fc 및 p 값

성숙 miRNA	ABMR/NOMOA.fc	ABMR/NOMOA. raw.pval
hsa-miR-126-3p	68.50836132	0.001521504
hsa-miR-328-5p	18.95670412	0.028949512
hsa-miR-126-5p	6.349283058	0.04204756
hsa-miR-455-3p	4.462248233	0.030123151
hsa-miR-103a-3p	3.468801322	0.041345617

[0131] 이와 같은 결과를 통해, 상기 5종의 miRNA 유전자는 정상 그룹뿐만 아니라 TCMR 또는 BKVN과 구분하여 ABMR을 진단하는 바이오마커로서 활용 가능함을 확인할 수 있다.

[0132] 3-2. ABMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 TCMR 그룹에서 증가된 발현 수준을 나타내는 miRNA 유전자 바이오마커의 확인

[0133] 실시예 2에서 선발된 NOMOA 그룹 대비 TCMR 그룹에서 발현 수준이 증가한 miRNA 유전자 중에서, ABMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 현저한 발현 양상 차이를 나타내는 5종의 miRNA 유전자를 선발하였고, 그 결과를 도 5(A)에 나타냈다. 도 5(A)에서 확인되는 바와 같이, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-1273g-3p, hsa-miR-19a-3p 및 hsa-miR-223-3p의 5종의 miRNA 유전자는 ABMR 그룹 및 BKVN 그룹 대비 현저한 발현 양상의 차이가 있었다. 또한, 도 5(B) 및 표 5에 나타낸 바와 같이 상기 5종의 miRNA 유전자는 NOMOA 그룹 대비 TCMR 그룹에서 발현 수준이 2배 이상 증가하고, $p<0.05$ 로 통계적 유의성이 있음을 확인하였다.

표 5

[0134] NOMOA 그룹 대비 TCMR 그룹에서 발현 수준이 증가한 5종의 miRNA 유전자에 대한 fc 및 p 값

성숙 miRNA	TCMR/NOMOA.fc	TCMR/NOMOA. raw.pval
hsa-miR-223-3p	32.74820417	0.048789474
hsa-miR-215-5p	15.7181011	0.000681271
hsa-miR-345-5p	4.382669986	0.027876534
hsa-miR-19a-3p	3.350489467	0.038075117
hsa-miR-1273g-3p	2.611936568	0.021783891

[0135] 이와 같은 결과를 통해, 상기 5 종의 miRNA 유전자는 정상 그룹뿐만 아니라 ABMR 또는 BKVN과 구분하여 ABMR을 진단하는 바이오마커로서 활용 가능함을 확인할 수 있다.

[0136] 3-3. ABMR 그룹 및 TCMR 그룹 대비 BKVN 그룹에서 증가된 발현 수준을 나타내는 miRNA 유전자 바이오마커의 확인

[0137] 실시예 2에서 선발된 NOMOA 그룹 대비 BKVN 그룹에서 발현 수준이 증가한 miRNA 유전자 중에서, ABMR 그룹 및 TCMR 그룹 대비 현저한 발현 양상 차이를 나타내는 5종의 miRNA 유전자를 선발하였고, 그 결과를 도 6(A)에 나타냈다. 도 6(A)에서 확인되는 바와 같이, hsa-miR-4449, hsa-miR-514a-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-205-5p 및 hsa-miR-125b-5p의 5종의 miRNA 유전자는 ABMR 그룹 및 TCMR 그룹 대비 현저한 발현 양상의 차이가 있었다. 또한, 도 6(B) 및 표 6에 나타낸 바와 같이 상기 5종의 miRNA 유전자는 NOMOA 그룹 대비 BKVN 그룹에서 발현 수준이 2배 이상 증가하고, $p<0.05$ 로 통계적 유의성이 있음을 확인하였다.

표 6

[0138] NOMOA 그룹 대비 BKVN 그룹에서 발현 수준이 증가한 5종의 miRNA 유전자에 대한 fc 및 p 값

성숙 miRNA	BKVN/NOMOA.fc	BKVN/NOMOA. raw.pval
hsa-miR-4449	97.73931542	0.002109469
hsa-miR-514a-3p	27.83153494	0.04499645
hsa-miR-106a-5p	10.65524582	0.02574265
hsa-miR-205-5p	5.24474511	0.035616063
hsa-miR-125b-5p	3.278234589	0.049386561

[0139] 이와 같은 결과를 통해, 상기 5 종의 miRNA 유전자는 정상 그룹뿐만 아니라 ABMR 또는 TCMR과 구분하여 BKVN을 진단하는 바이오마커로서 활용 가능함을 확인할 수 있다.

[0140] 3-4. 병리학적 그룹에 따른 바이오마커의 그룹핑

[0141] 상기 결과를 바탕으로, 표 7의 바이오마커 목록을 표 9와 같이 재그룹핑하였고, 이를 도 7에 벤다이어그램으로 나타내었다.

표 7

[0142]

그룹	바이오마커 수	선발된 miRNA 유전자
ABMR BKVN TCMR	2	hsa-miR-8485 hsa-miR-221-3p
ABMR BKVN	2	hsa-miR-331-3p hsa-miR-1290
BKVN TCMR	3	hsa-miR-19b-3p hsa-miR-31-5p hsa-miR-17-5p
ABMR TCMR	1	hsa-miR-192-5p
ABMR	5	hsa-miR-126-5p hsa-miR-328-5p hsa-miR-103a-3p hsa-miR-455-3p hsa-miR-126-3p
TCMR	5	hsa-miR-345-5p hsa-miR-215-5p hsa-miR-1273g-3p hsa-miR-19a-3p hsa-miR-223-3p
BKVN	5	hsa-miR-205-5p hsa-miR-4449 hsa-miR-106a-5p hsa-miR-514a-3p hsa-miR-125b-5p

[0143] 상기 표 7에 기재된 23종의 miRNA 유전자 바이오마커에 대한 정보는 표 8에 나타내었다.

표 8

[0144]

성숙 miRNA 유전자	서열	서열 번호	Accession Number
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	1	MIMAT0000445
hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	2	MIMAT0000444
hsa-miR-328-5p	GGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGG	3	MIMAT0026486
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC	4	MIMAT0004784
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	5	MIMAT0000101
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	6	MIMAT0000222
hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	7	MIMAT0000760
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA	8	MIMAT0005880
hsa-miR-8485	CACACACACACACACACGUAU	9	MIMAT0033692
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	10	MIMAT0000278
hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	11	MIMAT0000772
hsa-miR-215-5p	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	12	MIMAT0000272
hsa-miR-1273g-3p	ACCACUGCACUCCAGCCUGAG	13	MIMAT0022742
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	14	MIMAT0000073
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	15	MIMAT0000280
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	16	MIMAT0000074
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	17	MIMAT0000089
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	18	MIMAT0000070
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	19	MIMAT0000266
hsa-miR-4449	CGUCCCGGGGCUGCGCGAGGCA	20	MIMAT0018968
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	21	MIMAT0000103
hsa-miR-514a-3p	AUUGACACUUCUGUGAGUAGA	22	MIMAT0002883
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	23	MIMAT0000423

[0145] 상기와 같이 그룹핑된 바이오마커를 활용하여, 신장이식 후 항체 매개성 거부반응, T 세포 거부반응 및 BK 바이러스 신병증을 각각 구분하여 진단할 수 있다.

도면

도면1

1단계. Original Raw Data

- Raw data : 15개의 샘플에서 2,588 Mature miRNAs를 선별함

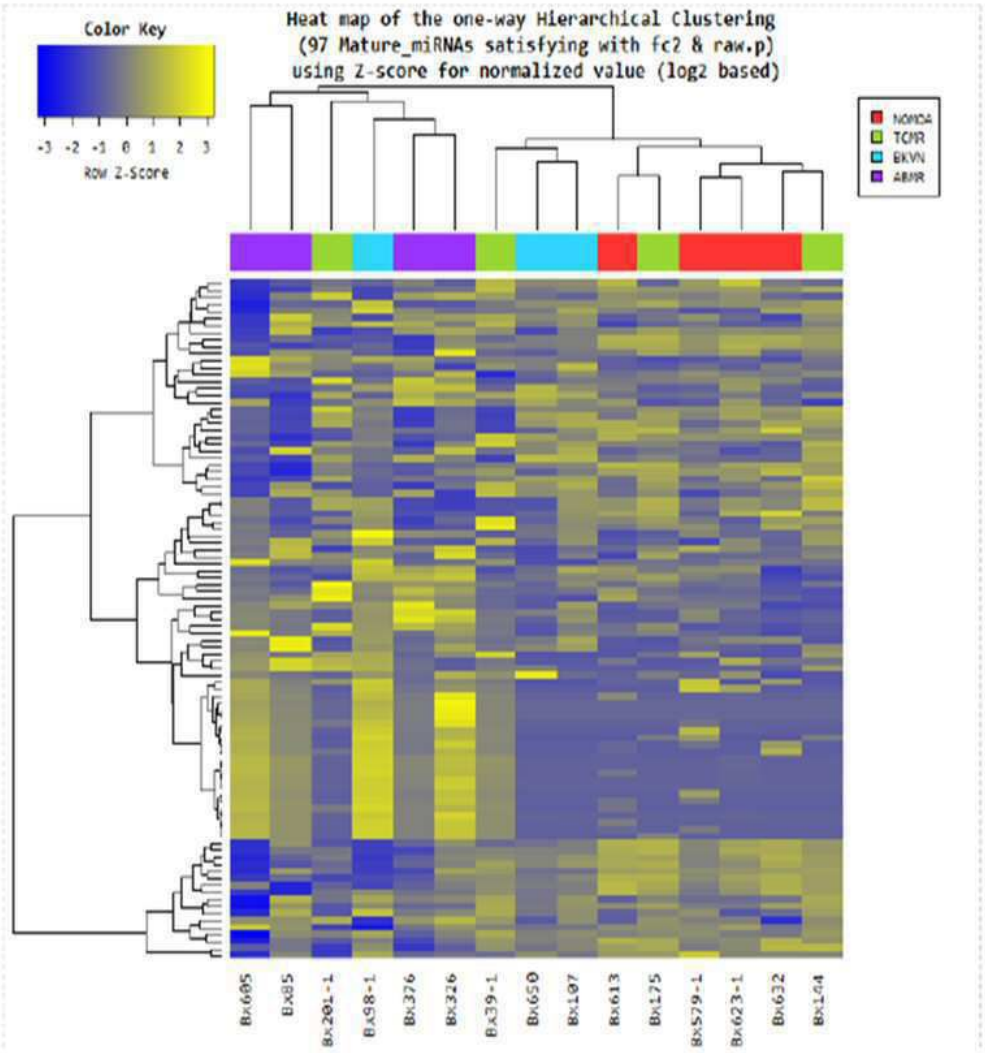
2단계. Data Pre-processing & Quality Check :

Filtering → Signal+1 → Logarithm → RLE Normalization → SVA 분석을 통한

892 Mature_miRNAs를 선정함

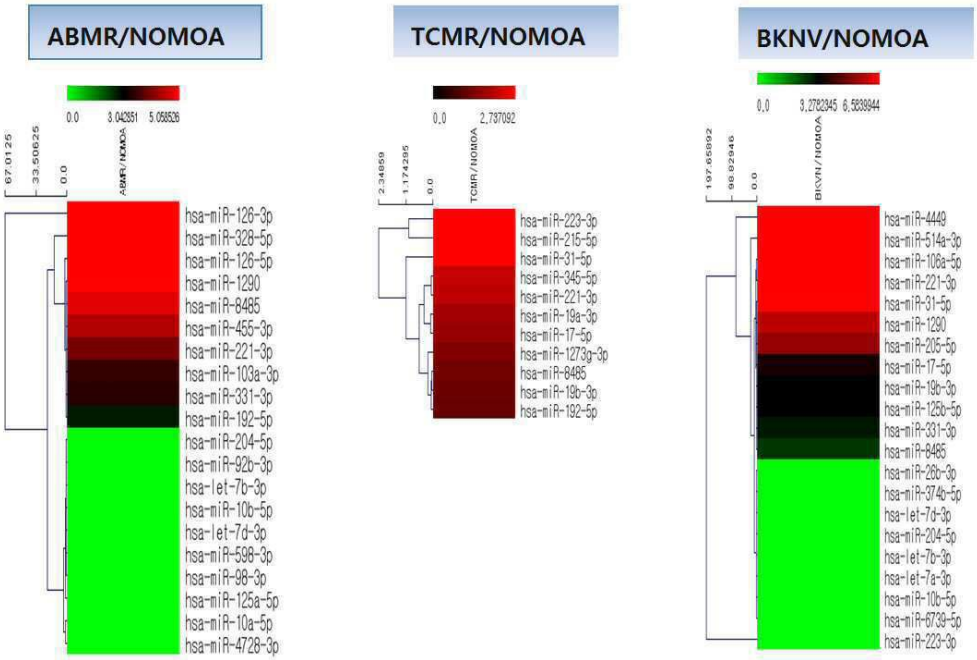
3단계. Statistical Test를 통해 |fc|≥2 & raw.p<0.05값을 만족하며 상향 조절되며 결과에 있어 신뢰도가 높은 miRNA를 선정하여 각 환자군에서 발현이 증가하는 miRNA를 선정함

도면2

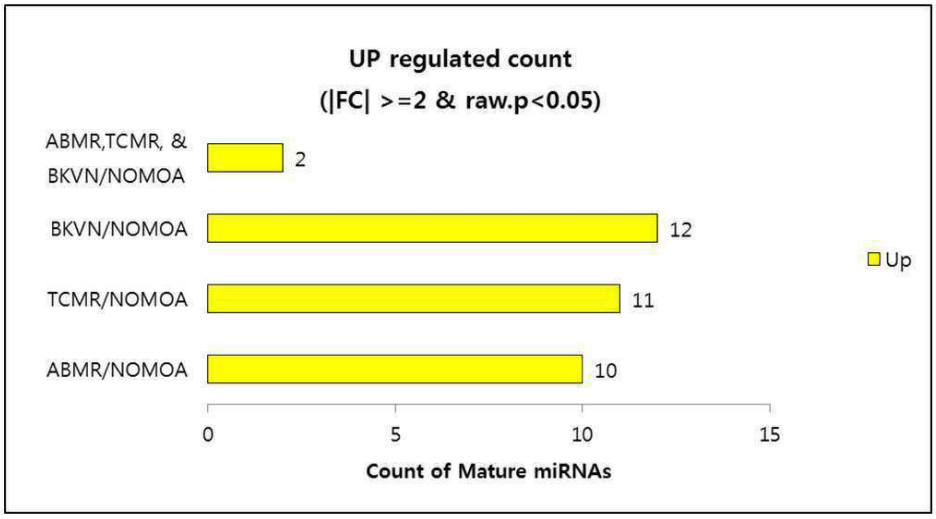

Color Key
-3 -2 -1 0 1 2 3
Row Z-Score
Heat map of the one-way Hierarchical Clustering
(97 Mature_miRNAs satisfying with fc2 & raw.p)
using Z-score for normalized value (log2 based)
NORDA
TCMR
BKVN
ABMR
Bx605
Bx85
Bx201-1
Bx58-1
Bx376
Bx326
Bx39-1
Bx650
Bx107
Bx613
Bx175
Bx579-1
Bx623-1
Bx632
Bx104

도면3

(A)

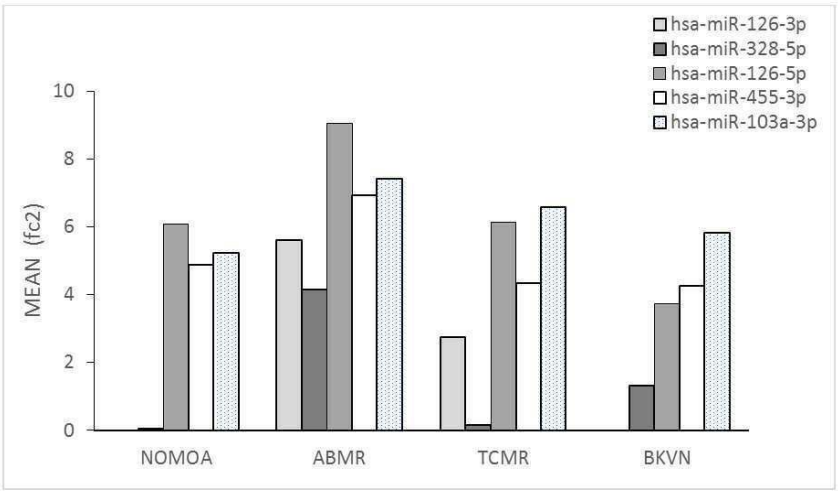

ABMR/NOMOA
TCMR/NOMOA
BKNV/NOMOA
hsa-miR-126-3p
hsa-miR-328-5p
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-1290
hsa-miR-8485
hsa-miR-455-3p
hsa-miR-221-3p
hsa-miR-103a-3p
hsa-miR-331-3p
hsa-miR-192-5p
hsa-miR-204-5p
hsa-miR-92b-3p
hsa-let-7b-3p
hsa-miR-10b-5p
hsa-let-7d-3p
hsa-miR-598-3p
hsa-miR-98-3p
hsa-miR-125a-5p
hsa-miR-10a-5p
hsa-miR-4728-3p
hsa-miR-223-3p
hsa-miR-215-5p
hsa-miR-31-5p
hsa-miR-345-5p
hsa-miR-221-3p
hsa-miR-19a-3p
hsa-miR-17-5p
hsa-miR-1273g-3p
hsa-miR-8485
hsa-miR-19b-3p
hsa-miR-192-5p
hsa-miR-4449
hsa-miR-514a-3p
hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-221-3p
hsa-miR-31-5p
hsa-miR-1290
hsa-miR-205-5p
hsa-miR-17-5p
hsa-miR-19b-3p
hsa-miR-125b-5p
hsa-miR-331-3p
hsa-miR-8485
hsa-miR-26b-3p
hsa-miR-374b-5p
hsa-let-7d-3p
hsa-miR-204-5p
hsa-let-7b-3p
hsa-let-7a-3p
hsa-miR-10b-5p
hsa-miR-6739-5p
hsa-miR-223-3p

(B)

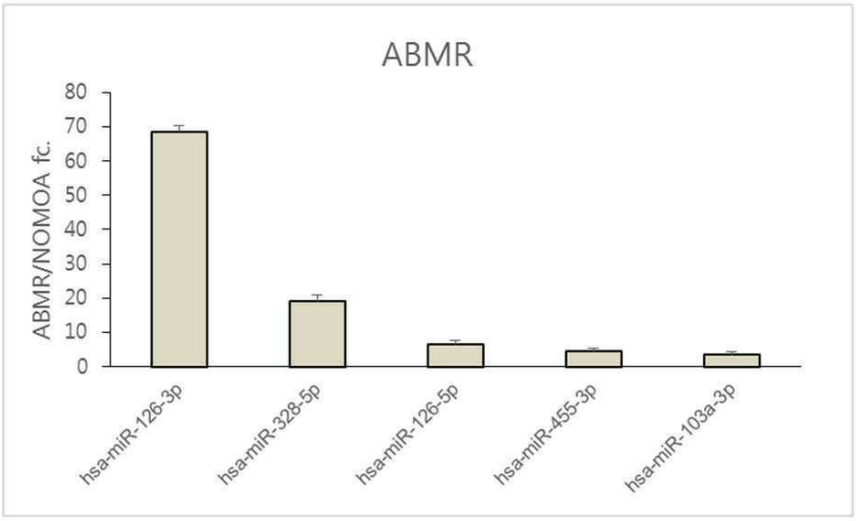

UP regulated count
(|FC| >=2 & raw.p<0.05)
ABMR,TCMR, & BKVN/NOMOA
2
BKVN/NOMOA
12
TCMR/NOMOA
11
ABMR/NOMOA
10
Up
0
5
10
15
Count of Mature miRNAs

도면4

(A)

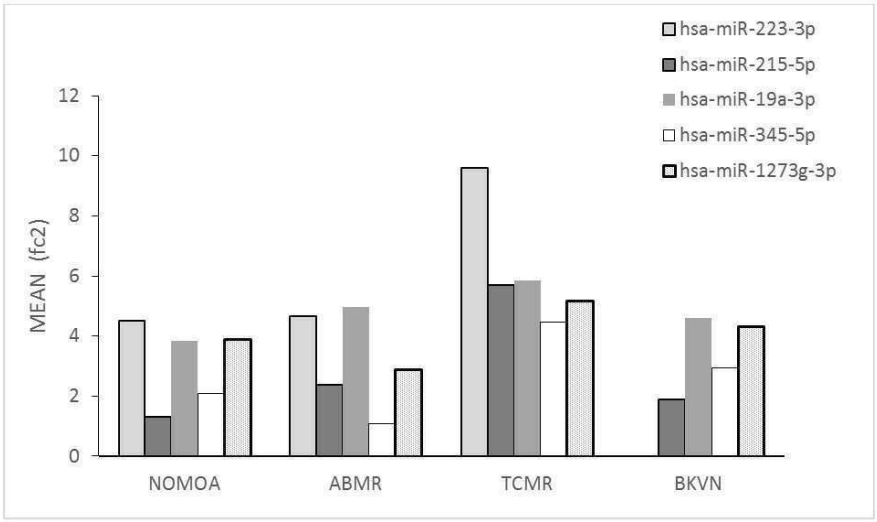

hsa-miR-126-3p
hsa-miR-328-5p
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-455-3p
hsa-miR-103a-3p
MEAN (fc2)
10
8
6
4
2
0
NOMOA
ABMR
TCMR
BKVN

(B)

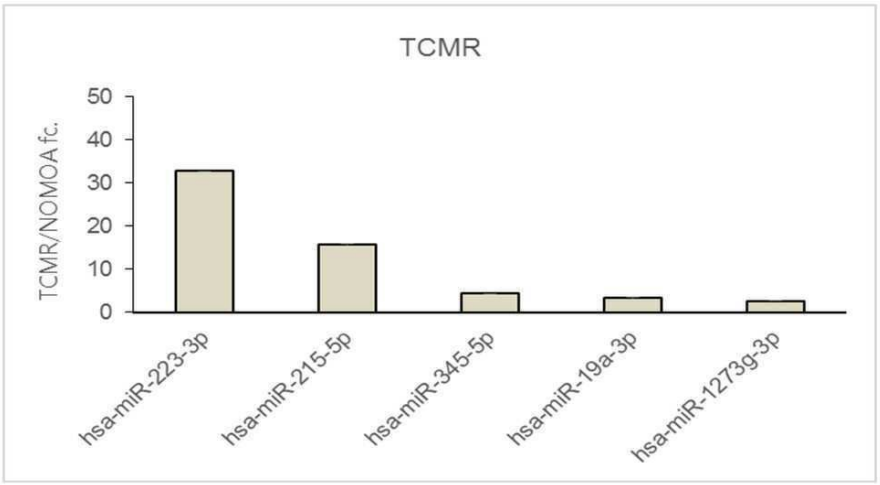

ABMR
ABMR/NOMOA fc.
80
70
60
50
40
30
20
10
0
hsa-miR-126-3p
hsa-miR-328-5p
hsa-miR-126-5p
hsa-miR-455-3p
hsa-miR-103a-3p

도면5

(A)

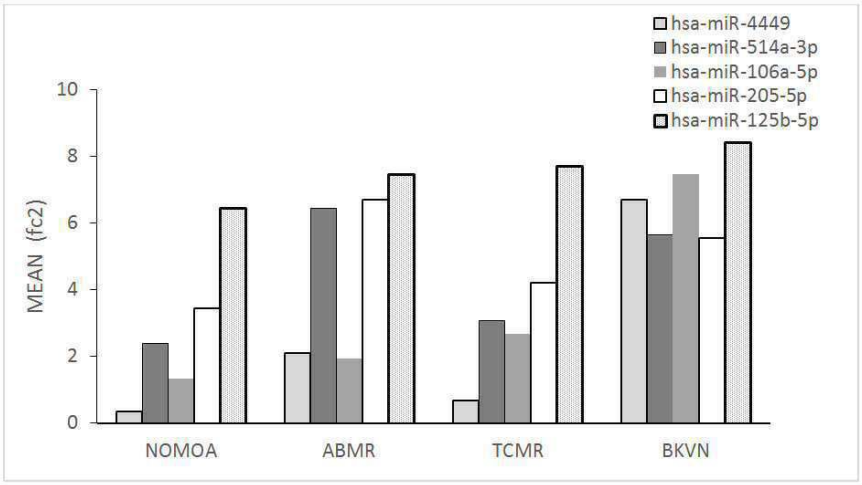

hsa-miR-223-3p
hsa-miR-215-5p
hsa-miR-19a-3p
hsa-miR-345-5p
hsa-miR-1273g-3p
MEAN (fc2)
12
10
8
6
4
2
0
NOMOA
ABMR
TCMR
BKVN

(B)

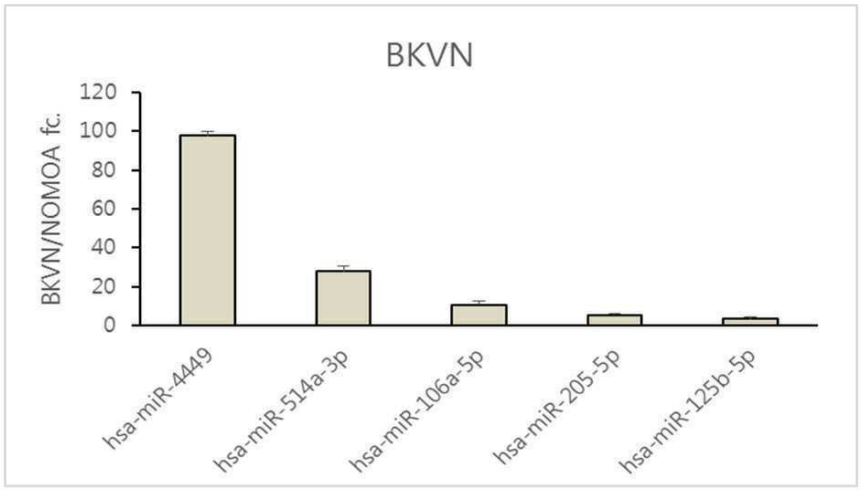

TCMR
TCMR/NOMOA fc.
50
40
30
20
10
0
hsa-miR-223-3p
hsa-miR-215-5p
hsa-miR-345-5p
hsa-miR-19a-3p
hsa-miR-1273g-3p

도면6

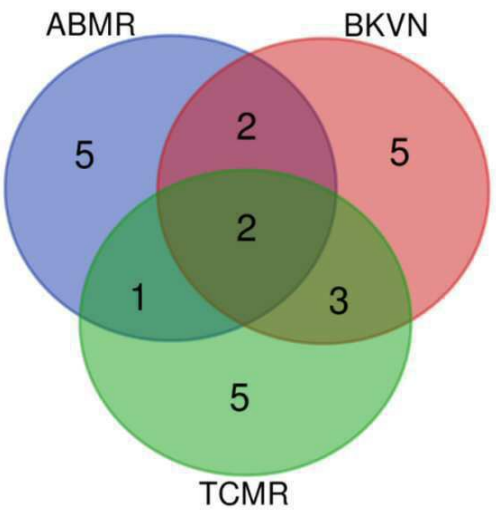
(A)


hsa-miR-4449
hsa-miR-514a-3p
hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-205-5p
hsa-miR-125b-5p
MEAN (fc2)
10
8
6
4
2
0
NOMOA
ABMR
TCMR
BKVN

(B)


BKVN
BKVN/NOMOA fc.
120
100
80
60
40
20
0
hsa-miR-4449
hsa-miR-514a-3p
hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-205-5p
hsa-miR-125b-5p

도면7


ABMR
BKVN
5
2
5
2
1
3
5
TCMR

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Urinary exosome-derived miRNA gene biomarkers for diagnosis of BK virus nephropathy in kidney allografts and use thereof

<130> 1065626

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-126-3p

<400> 1

ucguaccgug aguaauaaug cg 22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-126-5p

<400> 2

cauuauuacu uuugguacgc g 21

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-328-5p

<400> 3

gggggggcag gaggggcuca ggg 23

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-455-3p

<400> 4

gcaguccaug ggcauauaca c 21

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-103a-3p

<400> 5

agcagcauug uacagggcua uga 23

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-192-5p

<400> 6

cugaccuaug aauugacagc c 21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-331-3p

<400> 7

gccccugggc cuauccuaga a 21

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-1290

<400> 8

uggauuuuug gaucaggga 19

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-8485

<400> 9

cacacacaca cacacacgua u 21

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-221-3p

<400> 10

agcuacauug ucugcugggu uuc 23

<210> 11

<211> 22

<

212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-345-5p

<400> 11

gcugacuccu aguccagggc uc 22

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-215-5p

<400> 12

augaccuaug aauugacaga c 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-1273g-3p

<400> 13

accacugcac uccagccuga g 21

<210> 14

<211>

23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-19a-3p

<400> 14

ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 15

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-223-3p

<400> 15

ugucaguuug ucaaauaccc ca 22

<210> 16

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-19b-3p

<400> 16

ugugcaaauc caugcaaaac uga 23

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-31-5p

<400> 17

aggcaagaug cuggcauagc u 21

<210> 18

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-17-5p

<400> 18

caaagugcuu acagugcagg uag 23

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-205-5p

<400> 19

uccuucauuc caccggaguc ug 22

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-4449

<400> 20

cgucccgggg cugcgcgagg ca 22

<210> 21

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-106a-5p

<400> 21

aaaagugcuu acagugcagg uag 23

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-514a-3p

<400> 22

auugacacuu cugugaguag a 21

<210> 23

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial

<220><223> hsa-miR-125b-5p

<400> 23

ucccugagac ccuaacuugu ga 22