



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월16일
(11) 등록번호 10-1686877
(24) 등록일자 2016년12월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0123446
(22) 출원일자 2015년09월01일
심사청구일자 2015년09월01일
- (56) 선행기술조사문헌
Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 793,
142-149 (2015)
KR1019990082292 A
WO01068817 A1
Nephrol. Dial. Transplant. (2012) 27 (1):
70-75.
- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
최대은
대전광역시 중구 서문로 96 센트럴파크아파트 21
1동 502호
김유형
대전광역시 유성구 농대로 41 (궁동) 카이스트아
파트 305-355
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 11 항

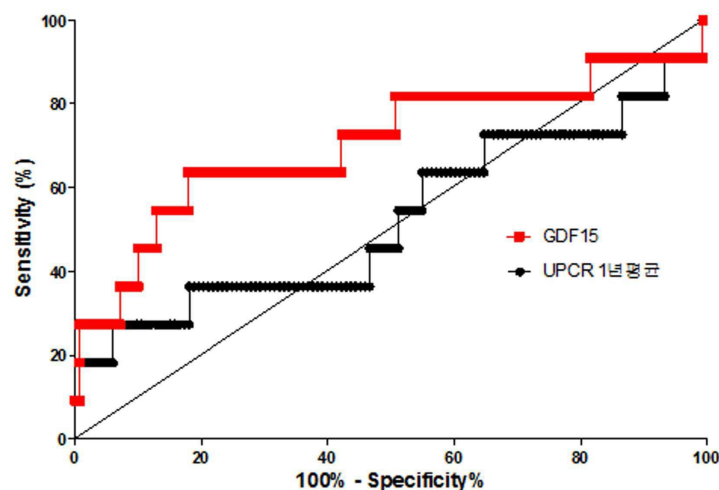
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 GDF15 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트

(57) 요약

본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 분석하고, 1년 및 2년 뒤 추적검사 결과를 분석한 결과, GDF15가 기준에 IgA 신병증 예후 인자로 알려진 단백뇨(UPCR)와 유의한 상관관계를 보이고, 2년간 투석 예측 인자로써 높은 감도 및 특이성을 나타내며, 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명의 GDF15 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트는 IgA 신병증 진단 및 진행 정도 평가에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
G01N 2800/347 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김균순

대전광역시 서구 관저로 83(관저동, 신선마을 아파트) 2011-1404

정효균

대전광역시 중구 수침로 122(태평동, 푸른빛 아파트) 101-602

나기량

대전광역시 유성구 노은서로 124 노은 카운티스 101동 401호

이강욱

대전광역시 유성구 학하로 33 101동 801호 (계산동, 학의뜰아파트)

정진영

대전광역시 중구 보문산로 388번길 7 동양아트빌 102호

송민호

대전광역시 중구 계백로 1716번길 87(문화동 센트럴파크) 306-1202

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-0024594
부처명 교육부(한국연구재단)
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구 유형Ⅱ)
연구과제명 족세포 특이 미토콘드리아 손상 모델의 개발과 사구체 신손상의 기전 규명
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2010.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3A9D8034464
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-바이오 의료기술개발사업(노화제어원천기술)
연구과제명 세포소기관 기능회복을 통한 대사항상성 복원 기술 개발
기 여 율 30/100
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2015.06.26 ~ 2016.06.25

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2058889
부처명 교육부(한국연구재단)
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)
연구과제명 당뇨병 전환/진행에서 미토콘드리아 기능조절분석
기 여 율 10/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 GDF15(Growth differentiation factor 15)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제제는 GDF15 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브, 또는 GDF15 단백질에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항체는 다클론 항체 또는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 키트는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, ELISA 키트 및 면역학적 도트 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 키트는 IgA 신병증에서 급성 신장 손상, 사구체 손상, 세뇨관 손상, 또는 신기능 감소를 평가하는 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 7

1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 GDF15의 농도를 측정하는 단계; 및
2) 상기 단계 1)의 GDF15 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, IgA 신병증으로 판정하거나 위험 심화 정도가 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 단계 1)의 측정은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역염색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

- 1) 시험관 내(*In vitro*)에서 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 GDF15 단백질을 저감시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 11

- 1) 피검시료를 GDF15 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 세포에서 GDF15 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] Growth differentiation factor 15(GDF15)는 Transforming growth factor β (TGF- β) cytokine 의 superfamily이다. 다른 이름으로 macrophage inhibitory cytokine 1, placental TGF- β , prostate-derived factor (PDF), nonsteroidal anti-inflammatory drug-activator gene 불리기도 한다. GDF15는 뇌, 대장, 골수 등의 조직에서 낮은 정도의 발현을 보이지만, 태반에서는 높은 발현을 보이는 것으로 알려져 있고, 위암, 유방암, 대장암, 전립선암 등에서 높은 발현을 보이는 것으로 보고되었다.

- [0004] GDF15의 발현은 다양하지만, 정확한 작용기전이 알려진 바는 많이 없다. 보고된 바에 의하면, GDF15는 류마티스 관절염과 같은 만성 염증상태에서 상승되어 있으며, 심장에서 PI3K-Akt 신호전달을 통한 항-아폽토시스(anti-apoptotic)효과, SMAD 2/3 신호전달을 통한 항-비대(anti-hypertrophic) 효과가 보고되어 있다. 암과 관련하여 두 가지 상반된 연구 보고가 존재하며, 암의 진행된 상태와 연관되어 있다는 보고 및 암 억제 경로(tumor suppressor pathway)인 p53, GSK-3 β 등에 의해 발현된다고 알려진 보고가 있다. 신장에서는 CC1₄를 쥐에게 투여하거나 허혈/재관류(ischemia/reperfusion) 후에 GDF15가 급성기에 상승한다는 연구 결과가 보고되었다.

[0005]

- [0006] 신장질환은 질환의 시작 초기는 물론 진행하여 거의 말기에 이르기까지 별다른 증상이 없는 경우가 대부분이다. 따라서 정기적인 검사에 의한 예방에 의존할 수 밖에 없는 실정이다. 현재까지도 국내 및 국외의 신장 질환의 진행을 평가하는 마커는 지난 20여년 전과 별다른 진보 없이 단백뇨 및 혈액의 크레아티닌 정도로 마커 개발의 진척이 미미한 상태이다.

- [0007] 단백뇨 및 혈청 크레아티닌 검사는 사구체의 세포들(죽세포, 내피세포, 메산지움등)에서 분비 혹은 발현하는 요소는 아니지만, 거름막의 기능 및 손상의 정도에 따라 일정 부분 비례하여 증가하는 경향이 있어, 주된 신장손상의 평가 인자로 활용되고 있다. 그러나, 많은 경우 단백뇨 및 혈액 내 크레아티닌 수치는 환자의 근육량, 단백질 섭취, 복용 약물 및 기저 질환에 따라 정확하지 않다, 이에, 신장 질환을 다각도로 진단하고 진행 정도를 평가할 수 있는 마커의 개발이 절실하다.
- [0009] IgA 신병증은 성인 사구체 신염 중 가장 흔하게 진단되는 질환이다. 그러나, 어떤 증상도 IgA 신병증을 특이적으로 시사하지 않으며, 현재 신장 조직검사 외에는 다른 진단적 마커가 없는 상황이다. IgA 신병증의 주요 병인은 면역 복합체(immune complex)가 메산지움(mesangium)에 침착하는 것이며, 이것이 신장조직 검사상 발견되면 IgA 신병증임을 시사한다. IgA 신병증의 진행은 굉장히 다양하여, 증상이 없는 혈뇨부터 말기신부전까지 나타날 수 있으며, 임상적 예후인자는 지속되는 단백뇨, 고혈압으로, 초기부터 신장기능의 이상이 있는 경우로 생각할 수 있으나 그 임상적인 중요성은 약하다.
- [0011] IgA 신병증에 특화된 치료법은 없으며 단백뇨를 줄이고 혈압조절을 할 목적으로, 1g/day 이상의 단백뇨가 있을 경우 ACE(angiotensin converting enzyme) 억제제 혹은 ARB(angiotensin receptor blockers)를 사용한다. 면역억제치료는 신장조직검사상 초승달 모양 병변(crescent)이 있는 경우 시행하게 되며, 동반된 사구체 신염이 있을 경우 적절한 면역억제치료를 하게 된다. 이는 IgA 신병증의 병인이 잘 알려지지 않았고, 초기 예후인자가 보고되어 있지 않아 환자의 위험 층화분석이 부족하기 때문이다.
- [0012] IgA의 초기 진단된 환자의 20 내지 40%가 10년 후 말기신부전으로 진행되는 것으로 알려져있으며, 이의 뚜렷한 원인을 파악하지 못한 가운데, 현재 IgA 신병증의 초기 진단을 위한 바이오마커의 필요성이 대두되고 있다.
- [0014] 이에 본 발명자들은 IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화 정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여 노력하던 중, GDF15(Growth differentiation factor 15)가 기존에 IgA 신병증 예후 인자로 알려진 단백뇨(UPCR)와 유의한 상관관계를 보이고, 2년간 투석 예측 인자로써 높은 민감도 및 특이도를 나타내며, 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은,
- [0020] 1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 GDF15의 농도를 측정하는 단계; 및
- [0021] 2) 상기 단계 1)의 GDF15 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, IgA 신병증으로 판정하거나 위험 심화 정도가 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 진단 또는 예후 분석 방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은,
- [0023] 1) 시험관 내(In vitro)에서 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및
- [0024] 2) 상기 GDF15 단백질을 저감시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은,
- [0026] 1) 피검시료를 GDF15 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- [0027] 2) 상기 세포에서 GDF15 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 분석하고, 1년 및 2년 뒤 추적검사 결과를 분석한 결과, GDF15가 기존에 IgA 신병증 예후 인자로 알려진 단백뇨(UPCR)와 유의한 상관관계를 보이고, 2년간 투석 예측 인자로서 높은 감도 및 특이성을 나타내며, 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명의 GDF15 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트는 IgA 신병증 진단 및 진행 정도 평가에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 연구에 포함된 환자들의 나이, 성별, 체질량지수, 과거력, 조직검사 당시 검사결과 및 ELISA를 통해 측정된 GDF15(Growth differentiation factor 15) 값을 나타낸 도이다;

BMI: 체질량지수(Body mass index);

HTN: 고혈압(Hypertension);

DM: 당뇨병(Diabetes mellitus);

HBV: B형 간염(Hepatitis B virus);

BUN: 혈중요소(Blood urea nitrogen);

eGFR: 사구체여과율(estimated Glomerular filtration rate);

UPCR: 단백뇨(Urine protein creatinine ratio); 및

GDF15: Growth differentiation factor 15.

도 2는 UPCR 및 GDF15와 다른 임상변수들과의 상관관계를 통하여 도출된 상관계수를 나타낸 도이다.

도 3은 도 2의 결과를 산점도로 그린 것으로, 사구체여과율과 GDF15의 상관관계를 직선으로 나타낸 도이다.

도 4는 사구체여과율에 따라 5가지 군으로 분류하고 각각의 군에 대해 평균값을 비교한 후 통계적인 유의성을 나타낸 도이다.

도 5는 UPCR 과 GDF15의 상관관계 및 산점도를 나타낸 도이다.

도 6은 UPCR을 3가지 군으로 나누어 각각의 군에 대해 평균값을 비교한 후 통계적인 유의성을 나타낸 도이다.

도 7은 GDF15 및 UPCR이 2년 내에 투석을 예측하는 예후인자로서, 감도(Sensitivity) 및 특이성(specificity)을 보여주는 ROC curve를 나타낸 도이다.

도 8은 1년 후 추적검사 결과에서 GDF15 와 UPCR을 비교한 ROC curve를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0034] 본 발명은 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.

[0035] 상기 GDF15(Growth differentiation factor 15)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0036] 상기 제제는 GDF15 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브, 또는 GDF15 단백질에 대한 항체인 것을 특징으로 한다.

[0037] 상기 항체는 단일클론항체 또는 다클론항체인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0038] 상기 키트는 면역크로마토그래피 스트립 키트, 루미넥스 어세이 키트, 단백질 마이크로어레이 키트, ELISA 키트 및 면역학적 도트 키트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

- [0039] 상기 발명의 키트는 추가로 상기 GDF15 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 포함할 수 있다. 상기 검출체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등으로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 바람직하게는 상기 GDF15 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체일 것이다. 예를 들어, 상기 발색효소는 퍼옥시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)[예: 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)]일 수 있고; 형광물질인 경우, 콜로이드 골드(Colloid gold), 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 등을 사용하는 것이 가능하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 상기 키트는 IgA 신병증에서 급성 신장 손상, 사구체 손상, 세뇨관 손상, 또는 신기능 감소를 평가하는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여, IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 확보하여 분석하고, 1년 및 2년 뒤 추적한 혈액 검사결과를 분석하였다(도 1 참조). 그 결과, IgA 신병증 환자에서 UPCR 및 GDF15 모두 임상 변수들과 우수한 상관관계를 보였고, 2년간 투석 예측 인자로서 GDF15는 UPCR 값보다 민감도(Sensitivity) 및 특이도(Specificity)에서 높은 수치를 보였으며(도 7 참조), 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써(도 8 참조), 본 발명의 GDF15(Growth differentiation factor 15) 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석용 키트가 IgA 신병증 진단 및 예후 분석에 유용하게 이용될 수 있음을 개시하고 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은,
- [0045] 1) 실험군 및 정상 대조군으로부터 각각 분리된 시료로부터 GDF15의 농도를 측정하는 단계; 및
- [0046] 2) 상기 단계 1)의 GDF15 농도가 정상 대조군보다 높은 경우, IgA 신병증으로 판정하거나 위험 심화 정도가 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 진단 또는 예후 분석 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 단계 1)의 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 상기 단계 1)의 측정은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역염색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여, IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 확보하여 분석하고, 1년 및 2년 뒤 추적한 혈액 검사결과를 분석하였다(도 1 참조). 그 결과, IgA 신병증 환자에서 UPCR 및 GDF15 모두 임상 변수들과 우수한 상관관계를 보였고, 2년간 투석 예측 인자로서 GDF15는 UPCR 값보다 민감도(sensitivity) 및 특이도(Specificity)에서 높은 수치를 보였으며(도 7 참조), 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써(도 8 참조), 본 발명의 IgA 신병증 진단 또는 예후 분석 방법이 IgA 신병증 진단 및 예후 분석에 유용하게 이용될 수 있음을 개시하고 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은,
- [0053] 1) 시험관 내(In vitro)에서 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및
- [0054] 2) 상기 GDF15 단백질을 저감시키거나 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0055] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 피검시료는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0056] 상기 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 당업자에 게 알려진 단백질의 발현량 및 활성 정도를 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은,
- [0059] 1) 피검시료를 GDF15 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- [0060] 2) 상기 세포에서 GDF15 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계를 포함하는, IgA 신병증 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법.
- [0061] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 피검시료는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 상기 단계 2)의 GDF15 발현 정도는 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여, IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 확보하여 분석하고, 1년 및 2년 뒤 추적한 혈액 검사결과를 분석하였다(도 1 참조). 그 결과, IgA 신병증 환자에서 UPCR 및 GDF15 모두 임상 변수들과 우수한 상관관계를 보였고, 2년간 투석 예측 인자로서 GDF15는 UPCR 값보다 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)에서 높은 수치를 보였으며(도 7 참조), 1년 후 추적검사에서 GDF15가 UPCR보다 사구체여과율 변동에 높은 감도 및 특이성을 나타냄을 확인함으로써(도 8 참조), 본 발명의 스크리닝 방법이 IgA 신병증 진단 및 예후 분석에 유용하게 이용될 수 있음을 개시하고 있다.
- [0066] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0067] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0069] <실시예 1> IgA 신병증 환자 선별 및 기본 정보 분석
- [0070] IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화 정도를 확인하는 바이오 마커를 개발하기 위하여, IgA 신병증 환자를 선별하여 혈액 샘플을 확보하여 분석하였다(충남대학교병원 IRB-2014-12-014, 사구체 신장 손상의 진단 및 예후에 대한 생물학적 마커 발굴 및 적용).
- [0071] 구체적으로, 2010년 3월 1일부터 2014년 6월 30일까지 신장조직검사를 통해 IgA 신병증으로 진단된 환자들을 후향적으로 모집하였다. 포함된 모든 환자는 신장조직검사 당시에 인체자원의 제공에 대한 서면동의를 하였고, 충남대학교병원 임상시험심사위원회에 의하여 승인되었다. 환자들은 신장 조직 검사 전 혈액을 채혈하였으며, 채취된 혈액샘플은 혈장 형태로 충남대학교 병원 인체자원은행 내에 있는 보관실에서 -70℃로 보관되었다. 또한, 환자의 나이, 성별, 체질량지수, 과거력, 혈액 검사결과(혈중 요소, 혈중 크레아티닌, 혈중 알부민, 요중 단백질, 요중 크레아티닌)는 의무기록을 통해 분석하였으며, 1년 및 2년 뒤 추적한 혈액 검사결과를 분석하였다.
- [0072] 사구체여과율(GFR)은 MDRD(the Modification of Diet in Renal Disease) 방정식에 의하여 계산하고, 하루 동안 배설되는 요중 단백질의 양은 요중 단백질과 요중 크레아티닌 수치의 비율을 통해 UPCR(Urine protein creatinine ratio)로 분석하였다. GDF15 값은 GDF15 Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit로 공지된 프로토콜을 따라 수행하였으며, 3번 검사하여 평균치를 값으로 구하였으며, GDF15의 해당부위 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0073]

서열번호	서열
GDF15(서열 번호 1)	RRRARNGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVL IQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI

[0075] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 환자는 평균 39.51 ± 14.79 세였으며, 남성은 103명으로 49.3%를 차지하였다. 체질량지수는 $23.814 \pm 4.66 \text{ kg/m}^2$ 로 나타났고, 처음 사구체여과율은 $86.09 \pm 36.46 \text{ ml/min}$ 이었으며, 하루 $1.7 \pm 2.58 \text{ g/day}$ 의 단백뇨 값을 나타내었다.

[0077] <실시예 2> 추적관찰 검사

[0078] 본 실험에 포함된 환자군의 경우, 입원하여 신장조직검사를 시행하였고 질병의 심화도에 따라 매달, 3개월, 6개월, 1년 등의 주기로 외래추적관찰을 하였다.

[0079] 구체적으로, 혈액검사 및 소변검사는 외래추적관찰 주기에 따라 시행하였고 이를 후향적으로 분석하였다. Blood urea nitrogen(BUN), serum creatinine(Cr), Glomerular filtration rate(GFR)을 환자별로 각각 1년과 2년 후 결과를 수집하였다. 뿐만 아니라 추적관찰 기간 내에 혈액투석을 시작한 환자들을 따로 분석하였다.

[0080] 그 결과, 1년 후 추적관찰 결과에서 BUN은 $20.86 \pm 22.60 \text{ mg/dL}$, Cr은 $1.51 \pm 2.76 \text{ mg/dL}$ 이었으며, GFR은 $82.59 \pm 34.65 \text{ ml/min}$ 로 baseline 보다 악화되는 경향을 보였으나 큰 차이를 보이지는 않았다. 2년 후 추적관찰 결과는 BUN $17.68 \pm 11.76 \text{ mg/dL}$, Cr $1.26 \pm 1.99 \text{ mg/dL}$ 및 GFR $86.23 \pm 32.56 \text{ ml/min}$ 으로 분석되었으며 1년 후 추적관찰 결과와 비슷하게 baseline과 비슷한 결과를 보였다.

[0082] <실험예 1> 관련 인자 분석

[0083] GDF15 값이 IgA 신병증 예후인자 및 질병의 심화 정도를 판단할 수 있는 인자로 이용될 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 <실시예 1>에서 얻어진 GDF15 값 및 임상 변수를 분석하였다.

[0085] <1-1> 사구체여과율(GFR) 분석

[0086] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 사구체여과율(GFR) 값을 분석하였다.

[0087] 구체적으로, MDRD 방정식으로 계산된 사구체여과율(GFR)은 값을 만성 신장질환 단계 1부터 5까지 5가지 군으로 나누고, One way ANOVA를 이용하여 각 군의 GDF15 값의 평균값을 비교하였다.

[0088] 그 결과 하기 표 2에 나타난 바와 같이, CKD stage 1은 $232.127 \pm 158.06 \text{ pg/ml}$, CKD stage 2는 $418.434 \pm 311.07 \text{ pg/ml}$, CKD stage 3는 $663.604 \pm 371.67 \text{ pg/ml}$, CKD stage 4는 $1019.088 \pm 616.07 \text{ pg/ml}$ CKD stage 5는 $1491.021 \pm 410.53 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며 각각은 통계적으로 유의한 평균의 차이를 보였다.

표 2

만성 신장질환(Chronic kidney disease, CKD) 단계	GFR 범위
stage 1	$90 \text{ ml/min} \leq \text{GFR}$
stage 2	$60 \leq \text{GFR} < 90 \text{ ml/min}$
stage 3	$30 \leq \text{GFR} < 60 \text{ ml/min}$
stage 4	$15 \leq \text{GFR} < 30 \text{ ml/min}$
stage 5	$\text{GFR} < 15 \text{ ml/min}$

[0092] <1-2> 단백뇨(UPCR) 분석

[0093] 상기 <실시예 1>에서 얻어진 UPCR 값을 분석하였다.

[0094] 구체적으로, UPCR은 1 g/day 이상일 경우 IgA 신병증에서 예후와 관련있는 것으로 되어있고, UPCR 이 3.5 g/day 이상을 신증후군 단백뇨라고 부른다. 따라서 하기 표 3와 같이 세가지 군으로 나누어 각각의 평균을 One way ANOVA로 평균값을 비교하였다.

[0095] 그 결과 하기 표 3에 나타난 바와 같이, $\text{UPCR} \leq 1$ 그룹은 $309.774 \pm 306.050 \text{ pg/ml}$, $1 < \text{UPCR} \leq 3.5 \text{ g/day}$ 그룹은 $503.109 \pm 357.126 \text{ pg/ml}$, $3.5 \text{ g/g} < \text{UPCR}$ 그룹은 $789.371 \pm 569.728 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며 평균값은 그룹별로 유의한 차이를 보였다.

표 3

그룹	UPCR 범위
1 그룹	$\text{UPCR} \leq 1 \text{ g/day}$

2 그룹	$1 < \text{UPCR} \leq 3.5 \text{ g/day}$
3 그룹	$3.5 \text{ g/day} < \text{UPCR}$

[0099] <1-3> GDF15 분석

[0100] 기존에 알려진 IgA 예후인자들과 GDF15의 상관관계를 분석하고자, GDF15 값의 절단값(cutoff value), 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 설정하였다.

[0101] 구체적으로, 도 7과 같이 2년 내에 투석치료를 예측하는 인자로서 GDF15과 UPCR 비교를 위해 각각의 ROC curve를 그린 다음(도 7), 이를 통해 절단값, 민감도 및 특이도를 추정하였다. GDF15의 ROC curve의 경우 Area under curve(AUC) 값이 0.848 이며 $p=0.000$ 으로 유의하였다. UPCR의 경우 $\text{AUC}=0.704(p=0.030)$ 으로 투석치료를 예측할 수 있으나 GDF15보다 낮은 값을 보였다. 그 외에도 BUN의 경우 $\text{AUC}=0.829(p=0.000)$, Cr의 경우 $\text{AUC}=0.783(p=0.003)$ 의 값을 보였다. 이 경우 GDF15이 496.32 pg/ml 이상일 경우 2년 내 투석을 예측하는 민감도는 90%, 특이도는 72.9%로 나타났다.

[0102] 앞서 말한 바와 같이 CKD stage 구간별 차이는 30 ml/min 이다. 따라서 1년내 신장기능의 평가를 분석하기 위해 GFR 이 30 ml/min 이상 감소한 경우에 대하여 다시 ROC curve를 그렸으며, 이 때 GDF15은 $\text{AUC}=0.706(p=0.023)$ 로 나왔고, UPCR 은 $\text{AUC}=0.569(p=0.444)$ 로 나와, 1년 뒤 CKD stage가 변할 정도의 신기능 악화를 예측하는데 있어 GDF15는 유효하나 UPCR은 유효하지 않음을 알 수 있었다. 또한, 이 때, GDF15 409.27 pg/ml 이상일 경우 민감도 72.7%, 특이도 57.9%의 결과를 보였다.

[0104] <실험예 2> 관련 인자 비교

[0105] 상기 <실험예 1>에서 분석된 사구체여과율(GFR) 및 단백뇨(UPCR)와 GDF15를 비교하여, 상관관계를 확인하였다

[0107] <2-1> 사구체여과율(GFR) 및 GDF15 비교 분석

[0108] 상기 <실험예 1>에서 분석된 사구체여과율(GFR) 및 GDF15의 상관관계를 산점도로 나타내었으며, 5가지 군으로 분류한 사구체여과율 각각의 군과 GDF15를 비교하여 분석하였다.

[0109] 구체적으로, GFR의 경우, 하기 수학적 식 1로 계산하여 표시하였으며, 계산된 GFR과 <실험예1>에서와 같은 방법으로 구한 GDF15의 산점도를 그려 상관계수 및 설명계수를 확인하였다.

수학적 식 1

[0110] $\text{MDRD equation, GFR}(\text{ml/min/1.73m}^2) = 175 \times (\text{Scr})^{-1.154} \times (\text{Age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.212 \text{ if African American})$

[0112] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, -0.649 의 상관계수, 그리고 0.422 의 높은 설명계수를 나타내었다(도 3). 이는 도 2에서 나타난 것과 같이 UPCR과 GFR의 상관계수가 -0.257 인 것과 비교한다면 높은 상관관계를 보여주고 있음을 알 수 있다.

[0113] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, CKD stage 단계별로 구분한 경우, CKD stage 1은 $\text{GDF15} = 228.1 \pm 158.9 \text{ pg/ml}$, CKD stage 2는 $\text{GDF15} = 411.9 \pm 313.0 \text{ pg/ml}$, CKD stage 3은 $\text{GDF15} = 663.6 \pm 371.7 \text{ pg/ml}$, CKD stage 4는 $\text{GDF15} = 1019 \pm 616.1 \text{ pg/ml}$, CKD stage 5는 $\text{GDF15} = 1458 \pm 384.7 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며 이 결과는 CKD stage 별로 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(도 4).

[0115] <2-2> 단백뇨(UPCR) 및 GDF15 비교 분석

[0116] 상기 <실험예 1>에서 분석된 단백뇨(UPCR) 및 GDF15 상관관계를 분석하고, GDF15가 IgA 신병증의 질병 정도를 판별할 수 있는 인자로 이용될 수 있는지 확인하였다.

[0117] 구체적으로, 신장조직검사 전 시행한 UPCR 수치와 당시 채취된 혈액으로 측정된 GDF15를 산점도와 상관계수, 설명계수로 표시하였으며, UPCR을 <실험예 1> 및 <실험예 2>에서와 같이 3가지 그룹으로 나누었고, 각각 그 결과를 확인하였다.

[0118] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, UPCR과 GDF15는 0.497 의 상관계수, 0.247 의 설명계수를 가졌다(도 5). 이는 UPCR과 GDF15이 일정부분 상관관계를 가지고 있음을 알 수 있다. 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, $\text{UPCR} \leq 1$

그룹은 309.774 ± 306.050 pg/ml, $1 < \text{UPCR} \leq 3.5$ g/day 그룹은 503.109 ± 357.126 pg/ml, $3.5 \text{ g/g} < \text{UPCR}$ 그룹은 789.371 ± 569.728 pg/ml로 나타났으며 평균값은 그룹별로 유의한 차이를 보였다. 도 5 및 도 6에서 나타난 바와 같이 UPCR 및 GDF15 모두 임상 변수들과 우수한 상관관계를 보였다. 다만, UPCR의 경우에는 Albumin, BUN, serum creatinine, eGFR과 유의한 상관관계를 보이며, 진단 당시 질병의 정도는 잘 반영하였으나, 추적검사 결과와는 큰 상관관계를 보이지 않았다.

[0119]

또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 2년간 투석 예측 인자로서 GDF15는 UPCR 값 보다 민감도 및 특이도에서 높은 수치를 보였으며, 도 8에 나타난 바와 같이, 1년 후 추적검사에서 사구체여과율이 <30 ml/min 이상 변동하는 것에 대해서도 GDF15가 UPCR 값 및 UPCR 1년 평균값보다 높은 감도 및 특이성을 보였다.

도면

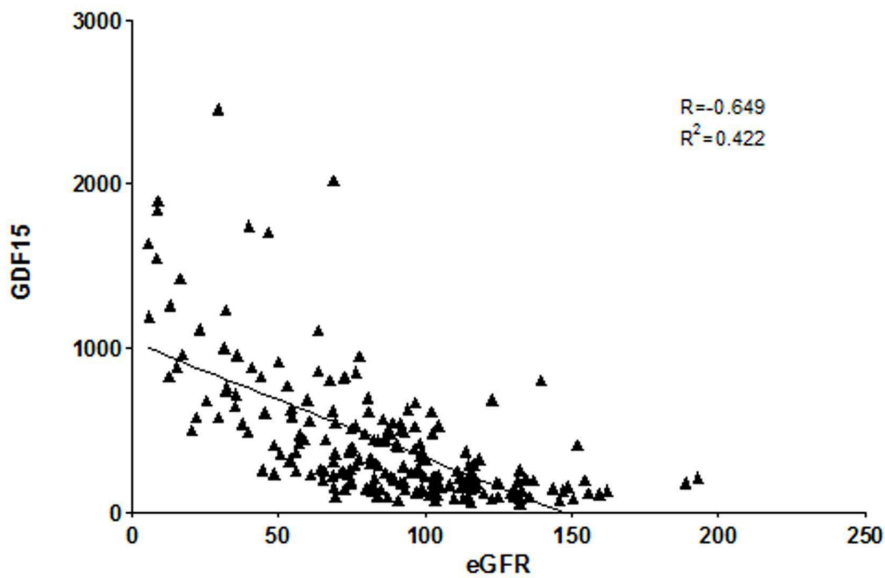
도면1

N=209	
Age (Mean $\pm$ SD)	39.51 $\pm$ 14.79
Male (n, %)	103, 49.3%
BMI (Mean $\pm$ SD)	23.814 $\pm$ 4.66
Past medical history (n, %)	
HTN	32, 15.3%
DM	19, 9.1%
HBV carrier	4, 1.9%
Solid cancer	10, 4.8%
Initial laboratory data	
BUN (mg/dL)	17.84 $\pm$ 10.02
Creatinine (mg/dL)	1.24 $\pm$ 1.25
eGFR (MDRD)	86.09 $\pm$ 36.46
UPCR (mg/g)	1.7 $\pm$ 2.58
GDF15 (pg/mL)	426.34 $\pm$ 398.57

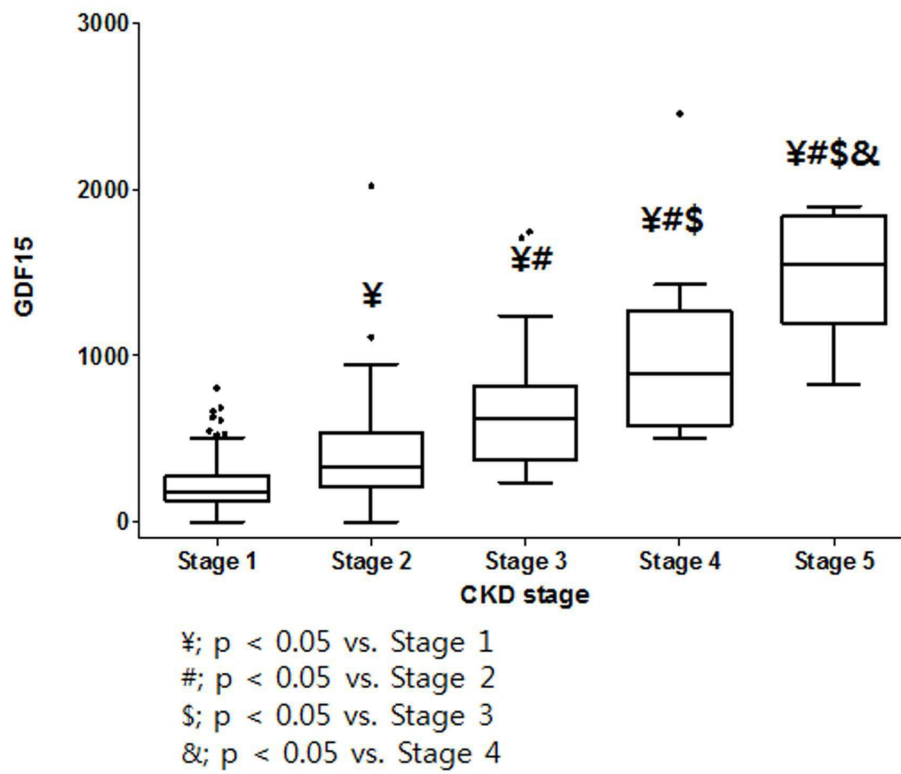
도면2

Pearson`s coefficient	UPCR	UPCR [#]	p [#]	GDF15	GDF15 [#]	p [#]
Age	0.247**			0.468**		
BMI	0.069			-0.023		
Albumin	-0.587**	-0.549	0.000	-0.472**	-0.384	0.000
BUN	0.219**	0.158	0.023	0.646**	0.605	0.000
Cr	0.166**	0.141	0.042	0.623**	0.651	0.000
eGFR	-0.257**	-0.159	0.022	-0.649**	-0.549	0.000
BUN at 1y	0.109	0.170	0.075	0.278**	0.392	0.000
Cr at 1y	0.155	0.109	0.256	0.353**	0.410	0.000
eGFR at 1y	-0.186*	-0.146	0.128	-0.510**	-0.371	0.000
ΔeGFR at 1y	-0.141	-0.106	0.269	-0.207*	-0.309	0.001
BUN at 2y	0.174	0.142	0.120	0.418**	0.377	0.000
Cr at 2y	0.163	0.155	0.090	0.371**	0.418	0.000
eGFR at 2y	-0.079	-0.052	0.568	-0.431**	-0.323	0.000
ΔeGFR at 2y	-0.267**	-0.245	0.007	-0.335**	-0.388	0.000

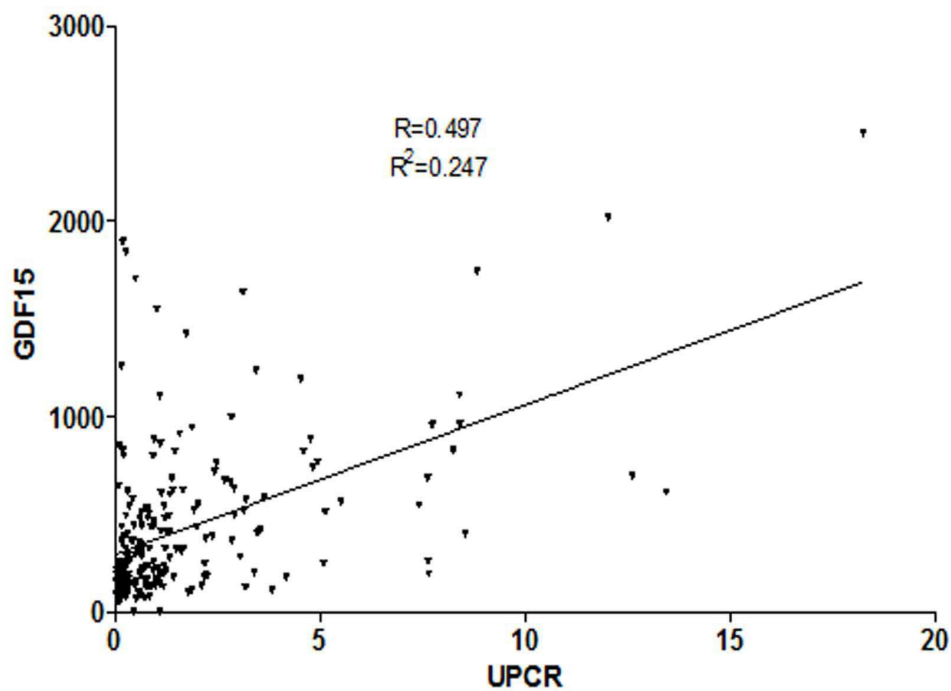
도면3



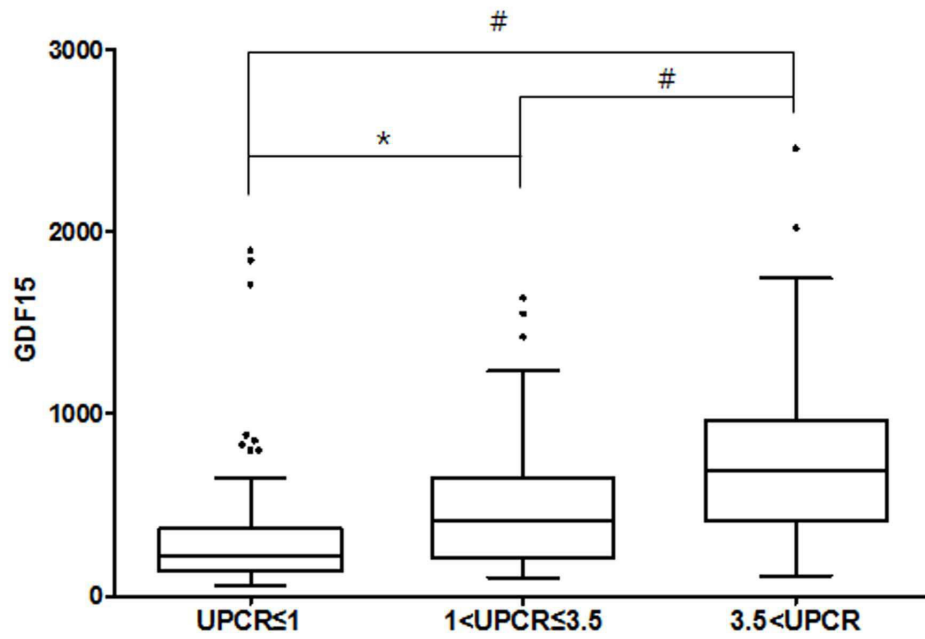
도면4



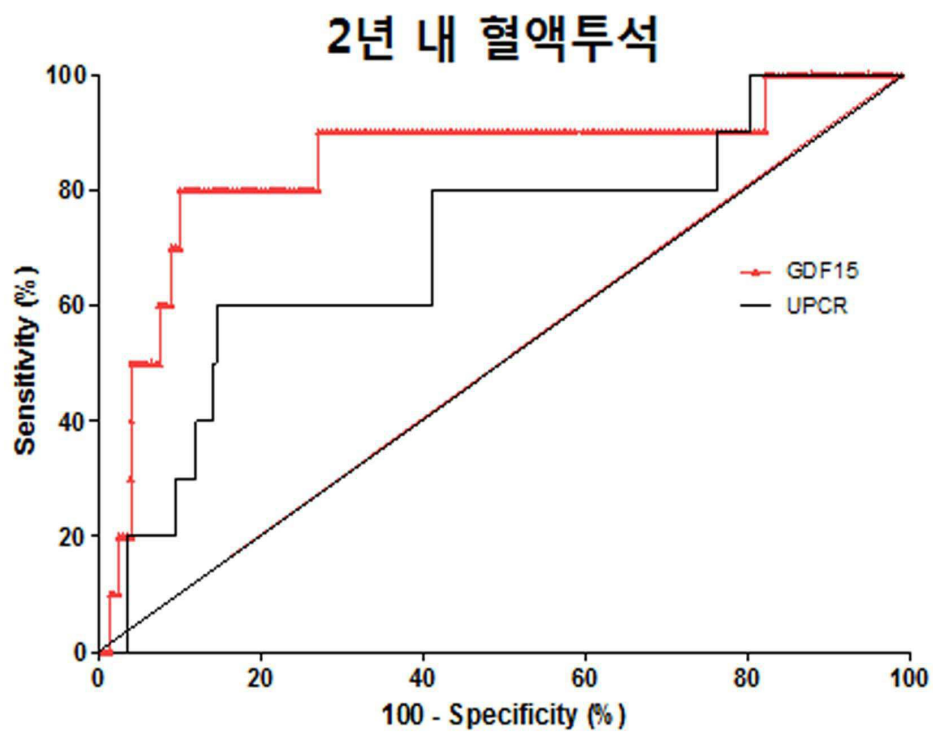
도면5



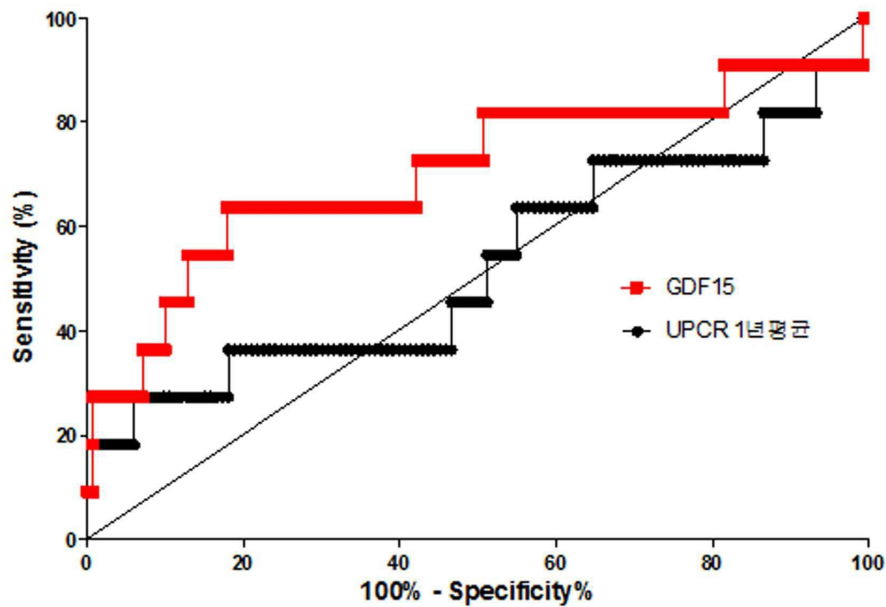
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Chungnam National University - Industry Collaboration Foundation

<120> A kit for Diagnosing or Prognostic Analysis of IgA nephropathy,
including agent measuring the GDF15 expression level

<130> 2015P-07-034

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly

1 5 10 15

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly

20 25 30

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys

35 40 45

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln

50				55				60							
Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro
65				70				75				80			
Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr
				85				90				95			
Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp
100								105				110			
Cys	His	Cys	Ile												
115															