



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월02일
(11) 등록번호 10-2462056
(24) 등록일자 2022년10월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2333/42 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7031499
(22) 출원일자(국제) 2016년04월29일
심사청구일자 2021년02월17일
- (85) 번역문제출일자 2017년10월30일
(65) 공개번호 10-2018-0003549
(43) 공개일자 2018년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/030075
(87) 국제공개번호 WO 2016/176565
국제공개일자 2016년11월03일
- (30) 우선권주장
62/155,175 2015년04월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2004005934 A2*
HARA-KUGE, SAYURI et al., Journal of Biological Chemistry, 2002, Vol. 277, No.18, pp 16332-16339. 1부.*
KAPRON, JAMES T. et al., Protein Science, 1997, Vol. 6, pp 2120-2133. 1부.*
KUNO, ATSUSHI et al., Molecular & Cellular Proteomics, 2009, Vol. 8, pp 99-108. 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
아이텍스 래보러토리즈, 인코포레이티드
미국 메인 04092 웨스트브룩 원 아이텍스 드라이브
- (72) 발명자
퀸, 존 조셉
미국 04105 메인주, 팰머스, 햄락 레인 9
예일밀리, 머티 브이에스엔
미국 04105 메인주, 팰머스, 올드 오크 웨이 7
- (74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 32 항

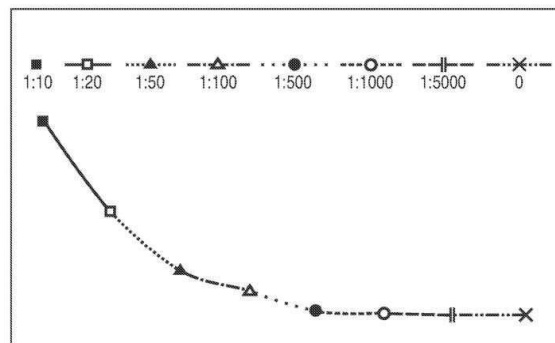
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 클루스테린 아이소폼의 특이적 검출

(57) 요약

본 발명은 특이적 클루스테린 아이소폼을 검출하는 방법 및 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류
G01N 2800/347 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 시료를, (i) 클루스테린(clusterin)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 (ii) 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자와 접촉시키는 단계; 및,

(b) 신장 특이적 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자의 복합체를 검출하는 단계;를 포함하는 신장 특이적 클루스테린을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자는 하나 이상의 렉틴인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자는 N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 분자인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

하나 이상의 렉틴은 N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 렉틴인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

하나 이상의 렉틴은 강낭콩 백혈구응집소(*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin; PHA-L), 맥아응집소(wheat germ agglutinin; WGA), WGA1, WGA2, WGA3, sWGA, 강낭콩 응집소-E(*Phaseolus vulgaris* agglutinin-E; PHA-E), 토마토 렉틴(*Lycopersicon esculentum* lectin; LEL), 독말풀 렉틴(*Datura stramonium* lectin; DSL), 완두콩 응집소(*Pisum sativum* agglutinin; PSA), 자칼린 렉틴(jacalin lectin), STL 렉틴(감자(*Solanum tuberosum*)), LCA 렉틴(렌즈콩(*Lens culinaris*)), 홍두화 렉틴(*Erythina cristagalli* lectin; ECL), 아주까리 렉틴(*Ricin communis* lectin; RCA), SBA 렉틴(대두(soybean)), CONA 렉틴(콘카나발린(concanavlin)), 또는 말콩 렉틴(*Dolichos biflorus* lectin; DBA)인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 지지체에 고정화되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

시료, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 분자가 지지체에 첨가되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 분자는 렉틴인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 분자가 지지체에 고정화되는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

시료, 및 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 지지체에 첨가되는, 방법,

청구항 11

제9항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자는 렉틴인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자, 또는 두 가지 모두가 검출 가능한 표지로 표지되는, 방법.

청구항 13

제2항에 있어서,

하나 이상의 렉틴이 혈청 및 혈장 클루스테린에 특이적으로 결합하지 않는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

시료는 소변 시료인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

검출이 측방유동분석법(lateral flow assay), 화학발광 표지 샌드위치 분석법(chemiluminescent labeled sandwich assay) 및 효소결합 면역흡착분석법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 경쟁분석법(competitive assay), 응집분석법(agglutination assay), 화학발광분석법(chemiluminescent assay), 생물발광 분석법(bioluminescent assay), 겔 전기영동 면역분석법(gel electrophoresis immunoassay method), 면역조직 화학분석법(immunohistochemistry assay), 방사면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 비표지 바이오센서 분석법(label-free biosensor assay) 또는 면역방사선측정법(immunoradiometric assay)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의해 완료되는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

항체가 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린, 제조함 클루스테린, 신장 특이적 클루스테린 또는 MDCK-유래 클루스테린에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서,

신장 특이적 클루스테린이 인간(human), 고양이(feline) 또는 개(canine)의 것인, 방법.

청구항 18

포유류에서의 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해 진단에 대한 정보를 제공하는 방법으로서,

클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 포유류의 시료와 접촉시키는 단계를 포함하고,

신장 특이적 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자의 복합체를 검출하는 단계를 포함하며,

복합체가 검출되는 경우, 포유류는 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 갖는 것으로 판단하며,

상기 시료는 신체로부터 분리된 시료인 것인, 포유류에서의 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

포유류가 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 갖는 경우, 포유류에 신장 요법 또는 신장 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

신장 질환은 요로 감염인, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

포유류가 인간, 고양이 또는 개인, 방법.

청구항 22

하나 이상의 클루스테린 아이소폼을 다른 유형의 클루스테린 아이소폼과 구별하는 방법으로서, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하고,

하나 이상의 클루스테린 아이소폼, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자의 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

하나 이상의 클루스테린 아이소폼은 신장 특이적 클루스테린이고, 다른 클루스테린 아이소폼은 혈청 또는 혈장 클루스테린인, 방법.

청구항 24

제22항에 있어서,

하나 이상의 클루스테린 아이소폼이 인간, 고양이 또는 개 클루스테린 아이소폼인, 방법.

청구항 25

하나 이상의 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 렉틴을 포함하는 복합체.

청구항 26

제25항에 있어서,

하나 이상의 신장 특이적 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 포함하는, 복합체.

청구항 27

제25항에 있어서,

복합체가 고형 지지체에 고정화되는, 복합체.

청구항 28

클루스테린 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 포함하는 키트.

청구항 29

제 28항에 있어서,

하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자, 또는 두 가지 모두가 검출 가능한 표지로 표시되는, 키트.

청구항 30

제29항에 있어서,

검출 가능한 표지는 효소, 효소 접합체, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 방사성 원소, 직접육안표지(direct visual label) 또는 자성 입자인, 키트.

청구항 31

하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 특이적 결합 단편 및 하나 이상의 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 클루스테린 및 클루스테린 아이소폼의 검출을 향상시키는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

하나 이상의 분자는 강낭콩 백혈구응집소(*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin; PHA-L), 맥아응집소(wheat germ agglutinin; WGA), WGA1, WGA2, WGA3, 강낭콩 응집소-E(*Phaseolus vulgaris* agglutinin-E; PHA-E), 독말풀 렉틴(*Datura stramonium* lectin; DSL), 자칼린 렉틴(jacalin lectin), 또는 SBA 렉틴(대두(soybean))인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 출원은 2015년 4월 30일자로 출원된 미국특허번호 제62/155,175호의 이익을 주장하며, 이의 전문이 본원에서 참조로 인용된다.

배경 기술

[0002] 클루스테린 또는 아포리포단백질 J는 75 내지 80kDa의 디설파이드 결합된 헤테로다이머 단백질이다. 클루스테린은 정자 성숙, 지질 수송, 보체 억제, 조직 재형성(remodeling), 멤브레인 재순환(recycling), 스트레스 단백질의 안정화 및 세포사멸 억제의 촉진을 포함하는 많은 생리적 과정의 일부이다. 클루스테린은 신장 근위(proximal) 및 원위 관형(distal tubular) 손상 동안 과발현되고, 다양한 암종에서 발견되며, 신장 손상에서 상향조절된다.

[0003] 혈장, 혈청 및 소변을 포함하는 다양한 체액에서 클루스테린을 측정하기 위해 개발되고 판매되고 있는 다양한 면역분석법이 있다. 신장 특이적 클루스테린은 신장 손상 또는 질병의 마커로 사용될 수 있다. 그러나, 소변 시료의 혈액 오염은 감염, 외상, 신생물, 염증, 및 도관법(catherization) 및 방광천자(cystocentesis) 도중 우발적인 오염으로 인해 흔히 관찰되는 현상이다. 이는 수의학에서 더욱 심각한 문제가 된다. 건강한 집단에서, 클루스테린의 혈청 농도는 소변에서의 농도(<100ng/ml) 보다 1000배 높다(60-100μg/ml). 혈액 오염은 소변으로의 비-신장 특이적 클루스테린을 야기한다. 따라서, 신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 정량화가 혈액으로부터 혈청 클루스테린의 오염에 의한 영향을 받지 않도록 하는 것이 중요하다. 그렇지 않으면 소변 클루스테린 분석에서 거짓양성 검사 결과를 야기할 수 있다. 당업계에서 신체 시료에서의 클루스테린 아이소폼을 구별하는 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 첫 번째 클루스테린 아이소폼을 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 첫 번째 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 첫 번째 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자의 복합체가 검출된다.

[0005] 또한, 본 발명은 신장 특이적 클루스테린을 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성(bloodborne) 비-신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 신장 특이적 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자의 복합체가 검출된다. 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자는 하나 이상의 렉틴 또는 N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자일 수 있다. 하나 이상의 렉틴은 N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 렉틴일 수 있다. 렉틴은 강낭콩 백혈구응집소(*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin; PHA-L), 맥아응집소(wheat germ agglutinin; WGA), WGA1, WGA2, WGA3, sWGA, 강낭콩 응집소-E(*Phaseolus vulgaris* agglutinin-E; PHA-E), 토마토 렉틴(*Lycopersicon esculentum* lectin; LEL), 독말풀 렉틴(*Datura stramonium* lectin; DSL), 완두콩 응집소(*Pisum sativum* agglutinin; PSA) 또는 말콩 렉틴(*Dolichos biflorus* lectin; DBA)일 수 있다.

[0006] 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 지지체에 고정화될 수 있다. 시료, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(렉틴일 수 있음)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 분자가 지지체에 첨가될 수 있다.

[0007] 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(렉틴일 수 있음)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자가 지지체에 고정화될 수 있다. 시료, 및 검출 가능하게 표지된 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 지지체에 첨가될 수 있다.

- [0008] 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자, 또는 두 가지 모두가 검출 가능한 표지로 표시된다.
- [0009] 하나 이상의 렉틴은 혈청 및 혈장 클루스테린에 특이적으로 결합하지 않는 렉틴일 수 있다. 시료는 소변 시료일 수 있다. 검출은 측방유동분석법(lateral flow assay), 화학발광 표지 샌드위치 분석법(chemiluminescent labeled sandwich assay) 및 효소결합 면역흡착분석법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 경쟁분석법(competitive assay), 응집분석법(agglutination assay), 화학발광분석법(chemiluminescent assay), 생물발광분석법(bioluminescent assay), 겔 전기영동 면역분석법(gel electrophoresis immunoassay method), 면역조직화학분석법(immunohistochemistry assay), 방사면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 비표지 바이오센서 분석법(label-free biosensor assay) 또는 면역방사선측정법(immunoradiometric assay)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의해 완료될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 구현에는 포유류에서의 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포유류의 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 신장 특이적 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자의 복합체가 검출된다. 복합체가 검출되는 경우, 포유류는 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 갖는다. 포유류가 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 갖는 경우, 포유류에 신장 요법 또는 신장 치료제가 투여될 수 있다. 신장 질환은 요로 감염일 수 있다. 포유류는 인간, 고양이 또는 개일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 구현에는 하나 이상의 클루스테린 아이소폼을 다른 유형의 클루스테린 아이소폼과 구별하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 하나 이상의 클루스테린 아이소폼, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자의 복합체가 검출된다. 하나 이상의 클루스테린 아이소폼은 신장 특이적 클루스테린이고, 다른 클루스테린 아이소폼은 예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린일 수 있다. 하나 이상의 클루스테린 아이소폼은 인간, 고양이 또는 개 클루스테린 아이소폼일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 구현에는 하나 이상의 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 렉틴을 포함하는 복합체를 제공한다. 상기 복합체는 하나 이상의 신장 특이적 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 혈행성 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다. 복합체는 임의의 유형의 고체 지지체에 고정화될 수 있다. 상기 복합체는 복합체 분자 중 하나 이상과 결합할 수 있는 하나 이상의 검출 가능한 표지를 추가로 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현에는 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포함하는 키트를 제공한다. 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자, 또는 두 가지 모두가 검출 가능한 표지로 표시될 수 있다. 검출 가능한 표지는 효소, 효소 복합체, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 방사성 원소, 직접육안표지(direct visual label) 또는 자성 입자일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현에는 클루스테린 및 클루스테린 아이소폼의 검출을 향상시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 특이적 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린의 탄수화물 잔기에

특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 특이적 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자가 향상된 감도, 특이성, 또는 두 가지 모두로 검출된다.

[0015] 그러므로, 본 발명은 임의적으로 하나 이상의 두 번째 클루스테린 아이소폼의 존재하에서 첫 번째 특이적 클루스테린 아이소폼의 검출 및/또는 정량화를 위한 방법 및 조성물을 제공함으로써, 하나 이상의 두 번째 클루스테린 아이소폼이 첫 번째 특이적 클루스테린 아이소폼의 검출 및/또는 정량화를 유의하게 간섭하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1A-B는 정상(즉, 건강한) 개 혈청의 다양한 희석액에 첨가되는 정상 개 소변에서의 클루스테린 수준을 나타낸 것이다.

도 2는 렉틴 고체상에 대한 클루스테린 결합을 나타낸 것이다.

도 3은 완전 혈액 및 혈청 모두에서 상업용 클루스테린 EIA 및 신장 특이적 클루스테린 면역분석을 비교한 것을 나타낸 것이다.

도 4는 개 젠타마이신 모델의 소변에서 신장 특이적 클루스테린을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 염증성 또는 허혈성 유도 활성 신장 손상을 갖는 개의 소변에서 신장 특이적 클루스테린을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 요로 감염(UTI) 환자에서 신장 특이적 클루스테린을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 고양이 클루스테린의 SDS-PAGE 은염색 및 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다. 패널 A는 ATCC의 MDCK 및 CRFK 세포주의 세포 배양 상청액의 은염색을 나타낸 것이고, B는 항-클루스테린 개 단클론 항체의 레인 2 및 3 MDCK (개) 클루스테린, 4 및 5 혈장(개) 클루스테린, 및 6 및 7 CRFK(고양이) 클루스테린과의 반응성을 보여주는 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다.

도 8은 다양한 스트레스 조건하에서 성장한 세포에서의 인간 클루스테린 발현을 나타낸 것이다.

도 9는 MDCK(레인 2, 4), HEK 293 세포 상청액(레인 3) 및 양성 대조 재조합 개 클루스테린 베타 사슬 항원(레인 5)의 클루스테린에 결합하는 토끼 항-베타 사슬 클루스테린을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본원에서 사용된 단수 형태 "일", "하나" 및 "상기"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 수치와 관련된 용어 "약"은 수치의 5% 이하의 상하폭으로 수치가 변화할 수 있다는 것을 의미한다.

[0018] 신장 특이적 클루스테린은 개, 고양이 및 인간과 같은 포유류에서의 신장 손상 동안 증가하고 그 결과로 증가하는 급성 신장 손상(AKI) 바이오마커이다. Biovendor의 상업용 EIA 키트는 혈청과 소변 모두에서 개 클루스테린을 정량화할 수 있다. 최근 연구에 의하면 리슈마니아증(leishmaniasis)에 걸린 개에서 이 키트를 사용하는 바이오마커의 유효성이 입증되었다. 그러나, 소변 시료의 혈청 오염은 혈청 내 클루스테린이 고농축으로 인해 거짓 양성 결과를 초래할 수 있다. 소변 시료의 혈액 오염은 혈청 클루스테린에 의한 오염으로 인해 신장 특이적 클루스테린의 검출에서 특이성이 결여된다.

[0019] 일반적인 총 클루스테린 측정에서 거짓 양성률의 합병증을 입증하기 위해, 음성 개 소변 시료는 상업용 키트(Biovendor)를 사용하여 값을 할당하고, 이어서 음성 개 혈청(0.002% 내지 10% v/v)을 첨가하였다. 생성된 혼탁물을 상업용 키트를 사용하여 분석하였고 수득된 결과를 하기 표에 나타내었다:

표 1

시료	% 오염	관찰된 [신장 특이적 클루스테린] ng/ml
순수한(neat) 음성 소변	0	13
소변+10% 혈청	10	4869
소변+5% 혈청	5	2587
소변+2% 혈청	1	1142
소변+1% 혈청	0.5	623
소변+0.2% 혈청	0.1	113

소변+0.01% 혈청	0.05	62
소변+0.002% 혈청	0.001	23

- [0021] 상업적 컷오프는 약 70ng/ml이다. 총 클루스테린(모든 아이소폼)을 측정할 때, 육안으로 볼 수 없거나 통상의 소변검사(딥스틱)으로 검출할 수 없는 미세한 양의 혈액조차도 거짓양성을 유발할 수 있다. 이는 잘못된 임상 진단을 야기하는 거짓양성의 가능성이 증가하기 때문에 혈액 오염에 대한 암시가 있는 환자 시료는 매우 조심스럽게 평가해야 한다는 것을 의미한다. 본 발명은 체액 내의 특이적 아이소폼을 확인하는 방법, 예를 들어 혈청 클루스테린에 의한 간섭이 없는 신장 특이적 클루스테린의 존재 및/또는 정량화를 결정하는 방법을 제공한다. 즉, 본 발명은 특이적 클루스테린 아이소폼, 예를 들어 다른 클루스테린 아이소폼의 존재에서 신장 특이적 클루스테린의 검출 및/또는 정량화하는데 사용될 수 있다.
- [0022] 모든 클루스테린 아이소폼의 주요 구조는 매우 유사하다. 그러나, 다양한 클루스테린 아이소폼 사이의 번역후 번역 패턴이 상이할 것으로 간주되었다. 클루스테린 아이소폼 상의 특정 올리고당 구조는 조직 원천, 생리 상태, 질병 상태 및 종과 관련이 있다. 본 발명의 방법은 환자 시료(예를 들어, 소변 시료)에 존재하는 특이적 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 손상 특이적 클루스테린 아이소폼)에 대한 검출 방법에 대한 개발에 있어서 이러한 차이점이 이용된다.
- [0023] 클루스테린 아이소폼
- [0024] 본원에서 사용된 "클루스테린 아이소폼"은 글리코실화된 유전자 스플라이싱 또는 복제 이벤트의 생성물인 클루스테린 분자다(예를 들어, 문헌 [Rizzi *et al.*, Adv. Cancer Res. 104:9 (2009); Prochnow *et al.*, PLOS One, 8:e75303 (2013)] 참조). 클루스테린 아이소폼은 핵, 세포질 및 분비된 형태를 포함한다. 또한, "클루스테린 아이소폼"은 클루스테린 글리코폼을 포함하며, 이는 예를 들어, 특정 조직 유형에서의 발현, 특정 생리 상태에서의 발현, 특정 종 유형에서의 발현, 특정 질환 상태에서의 발현 또는 세포 손상 조건으로 인해 차별적으로 글리코실화되는 클루스테린의 형태이다
- [0025] "신장 특이적 클루스테린" 또는 "신장 특이적 클루스테린 아이소폼"은 소변을 포함하여 신장계에 존재할 수 있는 신장계(즉, 신장, 요관, 요도 및 방광)에서 생성되는 클루스테린이다. 그러나, 소량의 신장 특이적 클루스테린은 혈액, 혈청 또는 혈장으로 누출될 수 있다. 증가된 수준의 신장 특이적 클루스테린은 신장 손상, 신장 상해 및/또는 신장 질환을 갖지 않은 동물 및 인간과 비교하여 신장 손상, 신장 상해 및/또는 신장 질환을 가진 동물 및 인간의 소변을 포함하여 신장계에 존재할 수 있다.
- [0026] "혈청 클루스테린" 및 "혈장 클루스테린"은 혈액, 혈장 또는 이의 분획물로 순환되어 방출되는 심장, 간 및 폐와 같은 조직에서 합성되는 클루스테린 아이소폼이다. "혈청 클루스테린" 및 "혈장 클루스테린"은 신장계에서 유래되는 신장 특이적 클루스테린 또는 신장계에서 유래되고 이후에 혈액, 혈청, 혈장 또는 이의 분획물로 순환되어 누출되는 신장 특이적 클루스테린은 포함하지 않는다.
- [0027] 분비된 클루스테린은 초기 단백질 전구체인 전분비 psCLU(~60kDa)로부터 생성되고, 과도하게 글리코실화되고, 이어서 소포체(ER)에서 분해된다. 생성된 알파-펩타이드 사슬 및 베타-펩타이드 사슬은 성숙한 분비 헤테로다이며 단백질 형태(~75 내지 80kDa)에서 5개의 디설파이드 결합에 의해 함께 유지된다.
- [0028] 클루스테린의 글리코실화는 다른 클루스테린 아이소폼에 대해 상이할 수 있다. 예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 및 혈청 또는 혈장 클루스테린은 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있다. 클루스테린의 아이소폼 사이에서 글리코실화의 차이는 하나의 클루스테린 아이소폼을 다른 클루스테린 아이소폼과 구별하는데 사용될 수 있다.
- [0029] 클루스테린 아이소폼은 예를 들어, 포유류, 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양, 원숭이 및 다른 동물에서 본 발명의 방법을 사용하여 구별할 수 있다. 구별은 예를 들어, 하나 이상의 두 번째 유형의 클루스테린 아이소폼의 존재에서 첫 번째 클루스테린의 아이소폼의 존재 또는 부재를 확인하는 것을 포함한다.
- [0030] 항체
- [0031] 본 발명의 항체는 클루스테린에 특이적으로 결합하는 항체 분자 또는 이의 항원 결합 단편이다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양 또는 원숭이 클루스테린에 대해 특이적일 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 임의의 유형의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린, 혈장 클루스테린 또는 혈청 클루스테린)에 대해 특이적일 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

신장 특이적 클루스테린에 대해 특이적으로 결합한다. 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 클루스테린 아이소폼, 모든 클루스테린의 아이소폼, 혈청 클루스테린 또는 혈장 클루스테린에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 단일 사슬 항체(scFv), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 키메라 항체, 일가 항체, 이가 항체, 다가 항체, 항-이디오타입 항체, 또는 항체의 항원 또는 특이적 결합 단편일 수 있다. 항체의 항원 결합 단편 또는 특이적 결합 단편은 온전한 항체의 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 일부이다. 항원 결합 항체 단편의 예로는 Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fd, 단일 사슬 Fvs(scFv), 디설파이트-결합 Fvs(sdFv), V_L 또는 V_H 도메인 또는 V_L 도메인 및 V_H 도메인을 포함하는 단편, 및 F_v 단편이 포함된다.

[0032] 본 발명의 항체는 예를 들어, IgG(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4), IgM, IgA(IgA1, IgA2), IgD 및 IgE를 포함하는 임의의 항체 부류일 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 신장 특이적 클루스테린 분자, 혈장 클루스테린 분자 또는 혈청 클루스테린 분자와 같은 클루스테린 분자의 하나 이상의 에피토프에 결합한다. 항체는 생체내 적절한 실험 동물에서 또는 시험관내에서 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 항체를 제조하고 특성화하기 위한 수단은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998)]; 문헌 [Dean, *Methods Mol. Biol.* 32:361-79 (1994)]; 문헌 [Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994)]; 문헌 [Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994)]; 문헌 [Drenckhahn *et al. Methods Cell. Biol.* 37:7-56 (1993)]; 문헌 [Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239-65 (1992)]; 문헌 [Wright *et al. Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992)]가 참조된다. 예를 들어, 인간 또는 다른 영장류, 마우스, 랫트, 토끼, 기니아피그, 염소, 돼지, 개, 소, 양, 당나귀 또는 말과 같은 동물에 클루스테린 분자 또는 클루스테린 일부를 투여하여 다클론 항체를 생성할 수 있다. 면역화된 동물의 혈청을 채취하고 항체를 예를 들어, 암모니아 설페이트로 침전시킨 후, 친화 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피로 혈장으로부터 정제한다. 다클론 항체를 생산하고 가공하는 기술은 당업계에 공지되어 있다.

[0033] "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로"는 첫 번째 항원, 예를 들어, 클루스테린 또는 이의 일부가 다른 비특이적 분자보다 큰 친화력으로 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인식하고 결합한다는 것을 의미한다. 비특이적 분자는 첫 번째 항원과 공통 에피토프를 공유하지 않는 항원이다. 본 발명의 구현예에서, 비특이적 분자는 클루스테린 아이소폼이 아니며, 클루스테린과 관련이 없다. 예를 들어, 비특이적 항원보다 더욱 효율적으로 결합하는 첫 번째 항원(예를 들어, 클루스테린 분자)에 대해 생성되는 항체는 첫 번째 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 기술될 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10⁷ l/mol 이상의 결합 친화도 K_a로 결합할 때 클루스테린 분자 또는 이의 일부에 특이적으로 결합한다. 본 발명에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 2 개 이상의 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합할 수 있거나 단지 하나의 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합할 수 있다. 특이적 결합은 예를 들어, 당업계에 공지된 방법을 사용하는 효소-결합 면역흡착분석(ELISA), 방사면역측정법(RIA) 또는 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 시험할 수 있다.

[0034] 본 발명의 항체는 키메라(예를 들어, 미국특허번호 제5,482,856호 참조), 인간화(예를 들어, 문헌 [Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988)]; 문헌 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992)] 참조), 개화된(caninized), 개 또는 인간 항체일 수 있다. 인간 항체는 예를 들어, 직접 불멸화, 파지 디스플레이, 형질전환 마우스 또는 트리메라(Trimer) 방법론에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Reisener *et al.*, *Trends Biotechnol.* 16:242-246 (1998)] 참조).

[0035] 클루스테린 분자의 검출을 위한 분석은 하나의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 하나 이상의 항체 또는 단편(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10개 또는 그 이상의 항체)을 이용할 수 있다. 클루스테린에 대한 분석은 예를 들어, 클루스테린 에피토프에 특이적인 단클론 항체, 하나의 클루스테린 분자의 에피토프에 특이적인 단클론 항체의 조합, 다른 클루스테린의 에피토프에 특이적인 단클론 항체, 동일한 클루스테린 에피토프에 특이적인 다클론 항체, 다른 클루스테린 에피토프에 특이적인 다클론 항체, 또는 단클론 및 다클론 항체의 조합을 사용할 수 있다. 분석 프로토콜은 예를 들어, 경쟁, 직접 반응 또는 예를 들어 표지된 항체를 사용하는 샌드위치 유형 분석을 기반으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명의 항체는 예를 들어, 형광, 화학발광, 방사성, 효소, 콜로이드성 금속, 방사성 동위원소 및 생물발광 표지를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 유형의 표지로 표지될 수 있다.

[0037] 클루스테린에 특이적으로 결합하는 항체는 예를 들어, 9H7, 3A4, 2F2, 클루스테린의 알파 사슬에 대해 특이적인 항체, 클루스테린의 베타 사슬에 대해 특이적인 항체, 항-클루스테린 소변 아이소폼, Hs-3; 3R3-2; CLI-9;

1A11; 2F12; A4; 7D1; 3R3/2, 클루스테린 C-말단 항체, 클루스테린 아이소폼 I 항체, CLU(AA 1-333)(N-말단) 항체, CLU N-말단(AA 79-99) 항체, CLU(AA 312-325) 항체, CLU(AA 44-58) 항체, CLU(AA 402-501) 항체, CLU(AA 75-501) 항체, CLU(AA 312-325) 항체; 항체 LS-B6759, 항체 LS-B3762, 항체 LS-B2937 및 LS-B2852, 항체 16B5를 포함한다. 항체는 신장 특이적 클루스테린 또는 신장 특이적 클루스테린 및 다른 형태의 클루스테린(예를 들어, 혈청 또는 혈장 클루스테린) 모두에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0038] 렉틴

[0039] 렉틴은 특정 단당류 또는 올리고당 구조(탄수화물)를 인식하고 결합하는 단백질이다. 렉틴은 대개 탄수화물 단위에 대한 2개 이상의 결합 부위를 함유한다. 특정 렉틴의 탄수화물-결합 특이성은 탄수화물에 결합하는 아미노산 잔기에 의해 결정된다. 탄수화물에 대한 렉틴의 결합력은 분자 상호작용 횟수와 함께 증가할 수 있다. 탄수화물에 대한 렉틴의 결합에 대한 해리 상수는 약 10^{-5} 내지 10^{-7} 의 K_d 이다. "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로"는 첫 번째 렉틴 예를 들어, WGA가 특정 유형의 탄수화물(예를 들어, WGA의 경우 N-아세틸글루코사민)을 다른 비특이적 유형의 탄수화물보다 더욱 큰 친화도로 인식하고 결합한다는 것을 의미한다. 특정 유형의 탄수화물은 특이적 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 또는 종 특이적 클루스테린)과 관련이 있고 하나 이상의 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 클루스테린)과 유의한 관련이 없다. 예를 들어, 비특이적 탄수화물에 비해 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 보다 효율적으로 결합하는 렉틴은 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합하는 것으로 기술될 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 렉틴은 비특이적 탄수화물의 결합과 비교할 때 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60% 또는 그 이상으로 낮은 K_d 로 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 결합 시, 비특이적 탄수화물에 비해 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 보다 효율적으로 결합한다. 본 발명의 구현예에서, 렉틴은 약 10^{-5} 내지 10^{-7} 의 해리 상수 K_d 로 결합할 때 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합한다. 본 발명에서, 렉틴은 2개 이상의 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합할 수 있거나, 단지 하나의 특정 유형의 탄수화물에만 특이적으로 결합할 수 있다.

[0040] 렉틴은 예를 들어, 형광, 화학발광, 방사성, 효소, 콜로이드성 금속, 방사성 동위원소 및 생물발광 표지를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 유형의 표지로 표지될 수 있다.

[0041] 본 발명의 구현예에서, 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하고 혈장 또는 혈청 클루스테린에 특이적으로 결합하지 않는 렉틴이 사용된다. 본 발명의 구현예에서, N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 렉틴이 본 발명에 사용된다. 이러한 렉틴은 예를 들어, WGA(맥아응집소), WGA1, WGA2, WGA3, sWGA, DSL 렉틴(독말폴 렉틴), 만노스 결합 렉틴, PHA-L(강낭콩 백혈구응집소), PHA-E(강낭콩 적혈구응집소) 및 LEL(토마토 렉틴)을 포함한다. 예를 들어, 자칼린, STL 렉틴(감자), LCA 렉틴(렌즈콩), PSA 렉틴(완두콩 응집소), ECL 렉틴(홍두화), RCA 렉틴(아주까리), DBA 렉틴(말콩), SBA 렉틴(대두), 및 CONA 렉틴(콩카나발린)을 포함하는 다른 렉틴이 사용될 수 있다. 렉틴은 Vector Laboratories로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0042] 렉틴은 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양 또는 원숭이 클루스테린 아이소폼 상에서 탄수화물과 특이적으로 결합하는데 사용될 수 있다. 또한, 렉틴은 하나 이상의 혈장, 혈청 또는 신장 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼에는 결합하지 않는 데 사용될 수 있다.

[0043] 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 분자

[0044] 본 발명의 구현예에서, 첫 번째 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 또는 종 특이적 클루스테린, 예를 들어 개, 고양이 또는 인간 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자가 본 발명의 분석에 사용될 수 있다. 다른 클루스테린 아이소폼은 예를 들어, 혈청 클루스테린 또는 혈장 클루스테린일 수 있다. 일례로, 신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자가 본 발명의 분석에 사용될 수 있다. 이러한 분자의 예로는 상기 기재한 렉틴 및 N-아세틸글루코사민에 특이적으로 결합하는 분자가 포함된다.

[0045] "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로"는 첫 번째 분자가 첫 번째 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 또는 종 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 하나 이상의 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 첫 번째 분자는 첫 번째 클루스테린 아이소폼상에서 발생하고 하나 이상의 두 번째 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 박테리아 키틴-결합 도메인

3 단백질에 대한 N-아세틸글루코사민으로, 여기서 N-아세틸글루코사민은 신장 특이적 클루스테린 아이소폼상에서 발생하고 혈청 클루스테린 아이소폼상에서 유의하게 발생하지 않는 탄수화물이다) 상에서 유의적으로 발생하지 않는 특정 유형의 탄수화물을 다른 비특이적 탄수화물 보다 더욱 큰 친화도로 인식하고 결합한다. 예를 들어, 비특이적 탄수화물에 비해 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 보다 효율적으로 결합하는 첫 번째 분자는 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합하는 것으로 기술될 수 있다.

[0046] 본 발명의 구현예에서, 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 첫 번째 분자는 비특이적 탄수화물에 대한 결합과 비교할 때 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60% 또는 그 이상으로 낮은 K_d 로 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 결합 시, 비특이적 탄수화물에 비해 첫 번째 특정 유형의 탄수화물에 보다 효율적으로 결합한다. 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 첫 번째 분자는 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 특정 탄수화물 잔기를 통해 특이적으로 결합하고 두 번째 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합하지 않는 분자를 의미하는 것으로, 첫 번째 클루스테린 아이소폼에 대한 결합은 두 번째 클루스테린 아이소폼의 존재에서 검출 및/또는 정량화할 수 있고, 여기서 두 번째 클루스테린 아이소폼의 존재는 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 검출 및/또는 정량화를 유의하게 간섭하지 않는다. 본 발명의 구현예에서, 첫 번째 분자는 약 10^{-5} 내지 10^{-7} 의 해리 상수 K_d 로 결합할 때 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합한다. 본 발명에서, 첫 번째 분자는 2개 이상의 특정 유형의 탄수화물에 특이적으로 결합할 수 있거나, 단지 하나의 특정 유형의 탄수화물에만 특이적으로 결합할 수 있다.

[0047] 본 발명의 구현예에서, N-아세틸글루코사민에 결합하는 하나 이상의 분자는 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는데 사용될 수 있다. N-아세틸글루코사민에 결합하는 하나 이상의 분자는 예를 들어, 야생형 WGA(맥아응집소), WGA의 돌연변이 형태(예를 들어, WGA1, WGA2, WGA3, 문헌 [Parasuraman et al. J. Mol. Recognit. (2014) 27:482-92] 참조), 보리 렉틴(barley lectin; BL), 쌀 렉틴, 애기췌기폴 응집소(*Uritica dioica* agglutinin, UDA), 헤베인(hevein), 강낭콩 키틴분해효소(*Phaseolus vulgaris* chitinase; PVC), 감자 상처-유도성 단백질 1(potato wound-inducible protein 1; WIN1), 감자 상처-유도성 단백질 2(WIN2), 감자 키틴분해효소(*Solanum tuberosum* chitinase; STC), 담배 키틴분해효소(tobacco chitinase; TC), 포플러 상처-유도성 단백질(poplar wound-inducible protein; POP), 박테리아 N-아세틸글루코사민-결합 단백질 A(GbpA)(예를 들어, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*), 쉬와넬라 오네덴시스(*Shewanella oneidensis*), 쉬와넬라 발티카(*Shewanella baltica*), 비브리오 피셔리(*Vibrio fischeri*), 비브리오 타페티스(*Vibrio tapetis*), 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 예르시니아 몰라레티(*Yersinia mollaretii*), 예르시니아 알도베(*Yersinia aldovae*)로부터 얻음) CBP70, 열대열원충(*Plasmodium falciparum*) Pf120, Pf83 및 Pf45 GlcNAc-결합 단백질, 아르세노포누스 나소니에(*Arsenophonus nasoniae*) n-아세틸글루코사민-결합 단백질, 박테리아 키틴-결합 도메인 3 단백질(예를 들어, 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 버크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*)로부터 얻음), 인디안타마린드(*Tamarindus indica*)의 N-아세틸 글루코사민 키틴분해효소 유사 렉틴, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 체관부 단백질 2(PP2, PP2-1A1), 스트렙토마이세스 올리바케오비리디스(*Streptomyces olivaceoviridis*) NgcE, 우로키나아제 플라스미노겐(urokinase plasminogen) 활성 수용체-관련 단백질/ENDO180, 에메로제닌(amelogenin) 및 약화된 쥐과 사이토메갈로바이러스(attenuated murine cytomegalovirus)를 포함한다.

[0048] 분석법

[0049] 본 발명의 방법은 생물학적 시료 또는 실험실 시료와 같은 시험 시료에서 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 또는 종 특이적 클루스테린, 예를 들어, 개, 인간 또는 고양이 신장 특이적 클루스테린)을 검출하는데 사용될 수 있다. 시험 시료는 (1) 신장 특이적 클루스테린, (2) 신장 특이적 클루스테린 및 혈청 클루스테린, (3) 신장 특이적 클루스테린 및 하나 이상의 다른 유형의 비-신장 특이적 클루스테린, (4) 하나 이상의 유형의 다른 비-신장 특이적 클루스테린; 또는 (5) 클루스테린 없음을 잠재적으로 포함할 수 있다. 생물학적 시료는 말, 소, 양, 고양이, 개, 마우스, 랫트, 원숭이 또는 인간과 같은 포유류의 조직, 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 대변, 뇌척수액, 양수 또는 상처 삼출물을 포함할 수 있다. 시험 시료는 미처리, 침전, 분획, 분리, 희석, 농축 또는 정제될 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 신장 특이적 클루스테린은 혈액, 혈장 또는 혈청으로 누출되어 그 중에서 검출될 수 있다.

[0050] 본 발명의 방법은 하나 이상의 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 분자(예를 들어, 렉틴)와 조합된 클루스테린 항체 또는 이의 특이적 결합 단편 모두를 사용하는 분석을 제공함으로써 클루스테린 및 클루스테린 아이소폼의 검출을 향상시키는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 특

이적 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하는 분자와 시료를 접촉시키는 단계를 포함한다. 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 특이적 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린의 탄수화물 잔기와 결합하는 하나 이상의 분자의 복합체는 향상된 감도, 특이성 또는 두 가지 모두로 검출된다. 감도 또는 특이성은 약 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50% 또는 그 이상으로 향상될 수 있다.

[0051] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 특이적 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린 또는 중 특이성 클루스테린)을 검출하는데 사용될 수 있다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 다른 분자(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 분자)와 신장 특이적 클루스테린, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 다른 분자의 복합체를 형성하도록 하는 조건하에서 시험 시료를 접촉시키는 단계를 포함한다. 이어서, 복합체가 검출된다. 복합체의 존재는 신장 특이적 클루스테린의 존재를 나타낸다. 복합체의 부재는 신장 특이적 클루스테린의 부재를 나타낸다. 당업자는 복합체 결합을 검출하는데 사용되는 분석 및 조건을 잘 알고있다. 복합체는 예를 들어, 하나 이상의 신장 특이적 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체, 및 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자를 포함할 수 있다. 클루스테린의 다른 형태는 예를 들어, 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼일 수 있다. 복합체의 양을 확인할 수 있으며 질병의 중증도를 확립하는데 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 분석은 예를 들어, 신장 특이적 클루스테린을 다른 유형의 클루스테린 아이소폼과 구별하기 위해, 시료 내의 신장 특이적 클루스테린을 검출하기 위해, 시료 내의 신장 특이적 클루스테린을 정량화하기 위해, 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린, 혈청 클루스테린, 혈장 클루스테린, 종 특이적 클루스테린 아이소폼)을 다른 클루스테린 아이소폼과 구별하기 위해, 시료 내의 클루스테린을 정량화하기 위해, 또는 시료 내의 특이적 클루스테린 아이소폼을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 구현예는 하나 이상의 클루스테린 아이소폼을 다른 유형의 클루스테린 아이소폼과 구별하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 하나 이상의 클루스테린 아이소폼, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포함하는 복합체가 검출된다. 하나 이상의 클루스테린 아이소폼은 포유류, 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양 또는 원숭이 클루스테린 아이소폼일 수 있다.

[0054] 경쟁분석법이 본 발명의 방법으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지지체에 고정시킬 수 있다. 검출 가능하게 표지된 렉틴에 결합된 신장 특이적 클루스테린 및 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 비표지된 렉틴으로 처리된 시료가 지지체에 첨가된다. 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합되지 않는 검출 가능하게 표지된 렉틴-신장 특이적 클루스테린의 양이 검출된다. 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편에 결합되지 않는 검출 가능하게 표지된 렉틴-신장 특이적 클루스테린의 양은 시료 내에 신장 특이적 클루스테린의 양에 비례한다. 대안적으로, 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편에 결합되지 않는 검출 가능하게 표지된 렉틴-신장 특이적 클루스테린을 세척하고 남은 검출 가능하게 표지된 렉틴-신장 특이적 클루스테린이 검출된다. 대안적으로, 분석은 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 렉틴으로 시작하며 지지체에 고정화될 수 있다. 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 비표지된 항체로 처리된 시료와 함께 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 검출 가능하게 표지된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합된 신장 특이적 클루스테린이 지지체에 첨가된다. 검출은 전술한 바와 같이 완료된다.

[0055] 본 발명의 방법은 예를 들어, 신장 질환 또는 신장 손상을 가진 것으로 의심되는 인간 또는 포유류의 시험 시료를 수득하여 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해의 진단 또는 검출에 사용할 수 있다. 상기 방법은 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 혈행성 클루스테린 아이소폼)에 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포유류의 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 당업자는 복합체의 형성을 가능하는 적절한 조건을

인지하고 있다. 신장 특이적 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체, 및 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 다른 클루스테린 아이소폼에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자의 복합체가 검출된다. 복합체가 검출되는 경우, 포유류는 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 갖는 것으로 진단된다. 복합체의 양은 당업계에 공지된 임의의 방법론에 의해 확인할 수 있다. 대조 시료에서 형성되는 수준보다 높은 수준은 신장 손상, 신장 상해 또는 신장 질환을 나타낸다. 대조 시료는 신장 특이적 클루스테린 또는 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해가 없는 인간 또는 포유류에서 관찰되는 수준에서의 신장 특이적 클루스테린을 함유하지 않는 시료이다. 두 가지 유형의 대조 시료 모두 분석에 사용할 수 있다. 포유류가 신장 질환 또는 신장 손상을 갖는 경우, 신장 요법 또는 신장 치료제를 포유류에게 투여할 수 있다.

[0056] 구현예에서, 개 신장 특이적 클루스테린은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 PHA-L, WGA, sWGA, STL, LEL, PHA-E 또는 DSL 렉틴 중 하나 이상으로 검출될 수 있다. 구현예에서, 고양이 신장 특이적 클루스테린은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 자칼린, ECL, LCA, RCA, PHA-E, WGA, PSA, DSL, DBA, PHA-L, SBA, 또는 CONA 렉틴 중 하나 이상으로 검출될 수 있다. 구현예에서, 고양이 및 개 신장 특이적 클루스테린은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 WGA, sWGA, DSL, PHA-L 또는 PHA-E 렉틴 중 하나 이상으로 검출될 수 있다. 구현예에서, 인간 및 고양이 신장 특이적 클루스테린은 하나 이상의 클루스테린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 PSA 또는 DBA 렉틴 중 하나 이상으로 검출될 수 있다.

[0057] 신장 상해, 신장 손상 및 신장 질환으로는 예를 들어, 급성 신장 손상(AKI; 혈액 및 소변 검사에서의 임의의 결합 또는 3개월 미만의 조직 영상을 포함하는 기능적 및 구조적 장애 또는 신호), 진행성 또는 악화된 급성 신장 손상, 초기 AKI, 경증 AKI, 중증 AKI, 심한 AKI, 만성 신장/신장 질환, 당뇨병성 신병증, 급성 관상 피사, 급성 간질 신염, 사구체신병증(glomerulonephropathy), 사구체신염(glomerulonephritis), 근위 및 원위 관형 손상, 신장 맥관염, 신장동맥폐쇄(obstruction of the renal artery), 신장 허혈성 손상, 종양 용해 증후군, 횡문근 용해, 요로 폐쇄, 콩팥전질소혈증, 신정맥혈전증, 심근경색 증후군(cardiorenal syndrome), 간신증후군(hepatorenal syndrome), 폐-신장 증후군(pulmonary-renal syndrome), 복부구획증후군(abdominal compartment syndrome), 요로 감염증(urinary tract infection), 상부 요로 감염증(upper urinary tract infection), 하부 요로 감염증(lower urinary tract infection), 신독성 제제로 인한 손상, 방광암, 신장암, 비뇨기암(urological cancer) 또는 대조 신장병(contrast nephropathy)이 포함된다.

[0058] 본 발명의 방법은 공지된 방법(예컨대, 혈청 크레아티닌 분석)보다 조기에 신장 질환, 신장 상해 및 신장 손상을 검출할 수 있다. 본 발명의 방법은 검출 신장 질환, 신장 상해 및 신장 손상의 발병 약 5, 4, 3, 2, 1 일 이내에 신장 질환, 신장 상해 및 신장 손상을 검출할 수 있다.

[0059] 본 발명의 구현예에서, 복합체는 하나 이상의 항체에 결합된 효소 접합체 또는 다른 검출 가능한 표지와 같은 검출 가능한 표지, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 클루스테린, 혈장 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자, 또는 두 가지 모두가 촉매 반응을 일으키거나 검출 가능한 반응을 제공한다. 임의적으로, 신호 발생 화합물을 포함하는 하나 이상의 검출 가능한 표지가 검출 가능한 표지 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 복합체에 적용될 수 있다. 검출 가능한 표지 복합체는 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자, 및 하나 이상의 검출 가능한 표지 분자를 포함한다. 검출 가능한 표지 복합체가 검출된다. 임의적으로, 하나 이상의 항체, 또는 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자는 검출 가능한 표지 복합체의 형성 전에 검출 가능한 표지로 표지될 수 있다. 이 방법은 임의적으로 양성 또는 음성 대조군을 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 클루스테린, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자를 포함하는 복합체는 표지 또는 검출 가능한 표지 시약을 필요로 하지 않는 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 표면 플라스몬 공명 바이오센서, Corning EPIC® 바이오센서, 또는 비색 공진 반사 바이오센서(colorimetric resonant reflectance biosensor)를 사용하여 본 발명의 복합체를 표지를 사용하지 않는 방식으로 검출할 수 있다.

- [0061] 본 발명의 일 구현예는 하나 이상의 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 렉틴을 포함하는 복합체를 포함한다. 상기 복합체는 하나 이상의 신장 특이적 클루스테린 분자, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편, 및 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다. 복합체는 임의적으로 복합체의 임의의 성분에 공유 결합 또는 비공유 결합된 하나 이상의 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 복합체는 고체 지지체에 고정될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 구현예에서, 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체는 고체상 또는 기질에 고정화된다. 시험 시료가 기질에 첨가된다. 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자는 시험 시료 전에 기질에 첨가되거나, 시험 시료와 함께 또는 시험 시료 이후에 기질에 첨가된다. 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자는 검출 가능하게 표지될 수 있다. 세척 단계는 기질에 각각 첨가하기 전에 수행될 수 있다. 검출 가능한 표지는 예를 들어 검출 가능한 표지와 반응하도록 첨가된 발색단(chromophore) 또는 효소 기질을 통해 직접적으로 검출되거나 간접적으로 검출될 수 있다. 검출 가능한 반응(예를 들어, 발색)이 전개될 수 있다. 반응이 중지되고 검출 가능한 반응은 예를 들어 분광광도계를 사용하여 정량화될 수 있다. 이러한 유형의 분석은 시험 시료 내에 신장 특이적 클루스테린의 양을 정량화할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 구현예에서, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자는 고체상 또는 기질에 부착된다. 시험 시료가 기질에 첨가된다. 신장 특이적 클루스테린에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체는 시험 시료 전에 기질에 첨가되거나, 시험 시료와 함께 또는 시험 시료 이후에 기질에 첨가된다. 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출 가능하게 표지될 수 있다. 세척 단계는 기질에 각각 첨가하기 전에 수행될 수 있다. 항체 표지는 예를 들어 검출 가능한 표지와 반응하도록 첨가된 발색단 또는 효소 기질을 통해 직접적으로 검출되거나 간접적으로 검출될 수 있다. 검출 가능한 반응(예를 들어, 색상)이 전개될 수 있다. 검출 가능한 반응이 중지되고 반응은 예를 들어 분광광도계를 사용하여 정량화될 수 있다. 이러한 유형의 분석은 시험 시료 내에 신장 특이적 클루스테린의 양을 정량화할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 구현예에서, 시료는 두 번째 클루스테린 아이소폼(또는 다수의 다른 클루스테린 아이소폼)을 더욱 잘 검출하기 위해 첫 번째 클루스테린 아이소폼(또는 다수의 클루스테린 아이소폼)을 고갈시킨다. 시료는 첫 번째 클루스테린 아이소폼에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 렉틴과 접촉하여 하나 이상의 렉틴 및 하나 이상의 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 복합체가 형성된다. 일례로, DC-SIGN 렉틴은 정맥 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하지만, 혈청 클루스테린의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는다. 대안적으로, 시료는 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 두 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자와 접촉하여 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 두 번째 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자 및 하나 이상의 첫 번째 클루스테린 아이소폼의 복합체가 형성된다. 이어서, 복합체는 예를 들어 침전에 의해 임의적으로 제거될 수 있다. 두 번째 클루스테린에 대한 분석은 예를 들어, 본 발명의 임의의 분석을 사용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 두 번째 클루스테린 아이소폼에 대한 임의의 분석은 첫 번째 클루스테린 아이소폼이 시료로부터 고갈되면 수행될 수 있다(예를 들어, 클루스테린에 특이적인 하나 이상의 항체와의 접촉 및 클루스테린/항체 복합체의 검출). 두 개의 항체를 사용한 샌드위치 분석 또는 하나의 항체를 사용한 직접 분석이 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 구현예에서, 시료는 신장 특이적 클루스테린을 더욱 잘 검출하기 위해 비-신장 특이적 클루스테린을 고갈시킨다. 시료는 하나 이상의 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 또는 혈장 클루스테린 아이소폼)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 렉틴과 접촉하여 하나 이상의 렉틴 및 하나 이상의 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 복합체가 형성된다. WGA는 혈장 클루스테린에 결합하지 않고 신장 특이적 클루스테린에 결합한다. 대안적으로, 시료는 비-신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자와 접촉하여 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄

수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자, 및 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 복합체가 형성된다. 이어서, 복합체는 시료로부터 제거된다. 신장 특이적 클루스테린에 대한 분석은 예를 들어 본 발명의 임의의 분석으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 신장 특이적 클루스테린에 대한 임의의 분석은 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼이 고갈되면 수행될 수 있다(예를 들어, 클루스테린에 특이적인 하나 이상의 항체와의 접촉 및 클루스테린/항체 복합체의 검출). 두 개의 항체를 사용한 샌드위치 분석 또는 하나의 항체를 사용한 직접 분석이 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 분석은 효소결합면역흡착측정법(ELISA), 경쟁분석법, 웨스턴 블롯, IFA, 방사면역측정법(RIA), 혈구 응집분석법(HA), 응집분석법, 형광편광면역분석법(FPIA) 및 미량정량관 분석(미량정량관의 하나 이상의 웰에서 수행되는 임의의 분석)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 경쟁, 직접 분석 또는 샌드위치-유형 분석을 기반으로 하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 하나의 분석은 가역 유동 크로마토그래피 결합 분석, 예를 들어, SNAP® 분석을 포함한다. 미국특허번호 제5,726,010호가 참조된다.

[0067] 분석은 고체상, 기질 또는 지지체를 사용할 수 있거나 면역침전 또는 지지체를 사용하지 않는 임의의 다른 방법으로 수행할 수 있다. 고체상, 기질 또는 지지체가 사용되는 경우, 하나 이상의 항체, 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자, 또는 이들의 조합이 미량정량웰, 자성비드, 비-자성비드, 컬럼, 매트릭스, 멤브레인, 유리, 폴리스티렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라아제, 천연 및 개질된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 아가로오스, 자철석, 합성 섬유 또는 천연 섬유로 구성된 섬유질 매트(예를 들어, 유리 또는 셀룰로오스-기재 물질 또는 열가소성 폴리머, 예컨대, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 폴리에스테르), 미립자 물질로 구성된 소결 구조(예를 들어, 유리 E는 다양한 열가소성 폴리머) 또는 니트로셀룰로오스, 나일론, 폴리설폰 등(일반적으로 자연적으로 합성되는 것)으로 구성된 캐스트 멤브레인 필름과 같은 지지체 또는 기질에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 본 발명의 구현예에서, 기질은 폴리에틸렌의 소결된 미립자이며, 일반적으로 다공성 폴리에틸렌, 예를 들어, Chromex Corporation(Albuquerque, NM)의 10 내지 15마이크론 다공성 폴리에틸렌으로 알려져 있다. 이들 기질 물질은 모두 필름, 시트 또는 플레이트와 같은 적합한 형상으로 사용될 수 있거나, 이들은 종이, 유리, 플라스틱 필름 또는 직물과 같은 적절한 불활성 담체에 코팅되거나 결합되거나 라미네이트될 수 있다. 고체상에서 항체, 단백질 및 핵산을 고정화시키는 적합한 방법은 이온성, 소수성, 공유결합 상호작용 등이 포함된다.

[0068] 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 항체, 핵틴 또는 분자는 이들의 선택적 결합 활성을 유지하도록 예를 들어, 흡착 또는 공유결합에 의해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 임의적으로, 분자의 결합 부위가 접근 가능하도록 스페이서기가 포함될 수 있다. 이어서, 고정된 분자는 타액, 혈청, 객담, 혈액, 소변, 대변, 뇌척수액, 양수액, 상처 삼출물 또는 조직을 포함하는 생물학적 시료와 같은 시료의 클루스테린 분자에 결합시키는데 사용될 수 있다.

[0069] 복합체(예를 들어, 다음 중 하나 이상의 복합체: (1) 클루스테린, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 아이소폼)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)에는 특이적으로 결합하지 않는 분자; (2) 검출 가능한 표지, 클루스테린, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자)가 예를 들어, 방사측정, 비색분석, 형광분석, 크기-분리, 바이오센서 방법, 침전법 또는 비-표지 방법에 의해 검출될 수 있다. 임의적으로, 복합체의 검출은 검출 가능한 표지에 커플링된 이차 항체의 첨가에 의해 이루어질 수 있다. 복합체와 관련된 신호 발생 화합물을 포함하는 검출 가능한 표지는 전술된 방법을 사용하여 검출될 수 있으며, 발색제, 효소 예컨대 효소 접합체, 형광 화합물 예컨대 플루오레세인 및 로다민, 화학발광 화합물 예컨대 디옥세탄, 아크리디늄, 페난트리디늄, 루테늄 및 루미늄, 방사성 원소, 직접육안표지 이외에도 보조인자, 억제제, 자기 입자 등이 포함된다. 효소 접합체의 예로는 알칼린 포스파타아제, 홀스래디쉬 퍼옥시다아제, 베타-갈락토시다아제 등이 포함된다. 특정 표지의 선택은 중요하지 않지만, 단독 또는 하나 이상의 추가 물질과 함께 신호를 생성할 수 있다.

[0070] 복합체의 형성은 시험 시료에서 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 존재를 나타낸다. 본 발명의 방법은 시험 시료에서 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루

스테린)의 양 또는 정량화를 나타낼 수 있다. 효소 접합체와 같은 많은 검출 가능한 표지와 함께, 존재하는 클루스테린의 양은 생성되는 신호에 비례한다. 시험 시료의 종류에 따라 적합한 버퍼로 희석하거나, 농축하거나, 임의의 조작없이 고체상과 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 클루스테린의 존재 및/또는 양을 확인하기 위해 시험 시료를 희석하거나 농축시킬 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명의 분석은 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해의 개선 과정을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 피검체의 시험 시료에서 신장 특이적 클루스테린의 증가 또는 감소를 측정함으로써, 질병 또는 손상의 개선을 목적으로 하는 특정 치료적 섭생이 효과적인지 여부를 결정할 수 있다.

[0072] **키트**

[0073] 본 발명은 신장 특이적 클루스테린을 검출하기 위한 분석 키트(예를 들어, 제조품)를 추가로 포함한다. 키트는 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 혈행성 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자, 및 시료 내 항체의 특이적 결합을 확인하기 위한 조성물, 하나 이상의 다른 분자 및 클루스테린을 시료 내에 포함할 수 있다. 이들 성분은 하나 이상의 검출 가능한 표지(즉, 검출 가능한 표지는 하나 이상의 성분에 고정화될 수 있다)가 포함될 수 있거나 검출가능한 표지가 별도로 제공될 수 있다. 키트는 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 아이소폼)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 또는 혈장 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자 및 예를 들어, 포유류에서의 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해의 확인을 위한 분자의 사용에 대한 지침서가 함유된 장치를 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편 또는 하나 이상의 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 신장 특이적 아이소폼)의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 또는 혈장 클루스테린)의 탄수화물 잔기에는 결합하지 않는 하나 이상의 분자, 또는 두 가지 모두 지지체에 고정화되는 지지체가 포함될 수 있다. 또한, 키트는 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자를 나타내는 표지를 포함하는 포장재가 포함될 수 있고, 키트의 항체는 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해를 확인하는데 사용될 수 있다. 당업자에게 공지된 버퍼, 대조군(예를 들어, 신장 특이적 클루스테린과 같은 양성 대조군; 혈장 클루스테린, 혈청 클루스테린 또는 버퍼와 같은 음성 대조군) 등과 같은 다른 성분이 상기 시험 키트에 포함될 수 있다. 본 발명의 신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 다른 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 다른 분자, 항체, 분석 및 키트는 예를 들어 환자에서의 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해의 개개의 경우에 대한 진단 뿐만 아니라 신장 질환, 신장 손상 또는 신장 상해의 역학 연구에 유용하다.

[0074] 또한, 키트는 하나 이상의 렉틴 및 하나 이상의 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼을 형성하기 위한 하나 이상의 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼(예를 들어, 혈청 또는 혈장 클루스테린 아이소폼)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 렉틴이 포함된다. 또한, 키트는 하나 이상의 비-신장 특이적 클루스테린 아이소폼 및 하나 이상의 분자 간 복합체를 형성하기 위한 비-신장 특이적 클루스테린의 탄수화물 잔기에 특이적으로 결합하고 신장 특이적 클루스테린 아이소폼의 탄수화물 잔기에는 특이적으로 결합하지 않는 하나 이상의 분자가 포함될 수 있다.

[0075] 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 기타 과학적 또는 기술적 문헌은 그 전문이 본문에 참고로 포함된다. 본문에 예시적으로 기술된 본 발명은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들이 없는 경우에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본원의 각각의 경우에서, "포함하는", "본질적으로 이루어지는" 및 "구성되는"과 같은 임의의 용어는 통상의 의미를 유지하면서 다른 두 용어들 중 하나로 대체될 수 있다. 적용되는 용어 및 표현은 설명의 용어로서 사용되는 것이지 제한하기 위한 것이 아니며, 도시된 기재 및 그 일부의 등가물을 배제하는 용어 및 표현의 사용에 있어 의도는 없지만, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하다는 것을 인식해야 한다. 따라서, 본 발명은 구현예에 의해 구체적으로 기술되었지만, 본 명세서에 개시된 개념의 선택적인 특징, 수정 및 변형이 당업자에게 재구분될 수 있으며, 그러한 수정 및 변형은 발명의 상세한 설명 및 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 있다는 것으로 고려된다.

[0076] 또한, 본 발명의 특징 또는 양태가 마쿠시 군 또는 대안의 다른 군의 관점에서 기술되는 경우, 당업자는 본 발

명이 또한 마쿠시 군 또는 다른 군의 구성원의 임의의 개별 구성원 또는 하위군의 관점에서 기술된다는 것을 인식할 것이다.

[0077] 다음은 단지 예시를 목적으로 제공되며, 상기 넣은 의미로 기술된 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다.

[0078] **실시예**

[0079] **실시예 1**

[0080] **혈액 오염**

[0081] 정상적인 개 혈청을 음성 소변(즉, 건강한 개로부터 얻은 소변)에 첨가하고 상업용 클루스테린 EIA(Biovendor)를 사용하여 클루스테린의 양을 측정하였다. 도 1A-B에 나타난 바와 같이, 유의한 클루스테린 수준을 1:1000 희석액(mL 당 $1\mu\text{L}$)에서도 측정하였다. 그러므로, 혈청 또는 혈장 클루스테린 아이소폼의 검출을 배제시키면서도 신장 특이적 클루스테린 아이소폼을 검출할 수 있다는 것이 중요하다.

[0082] **실시예 2: 재료**

[0083] **클루스테린 분자의 분리**

[0084] 개 클루스테린의 서열을 재조합 his 태그 개 클루스테린 분자(Life Technologies)를 발현하는 벡터를 설계하고 합성하는데 사용하였다. 단백질의 발현 및 정제 후, 서열을 LC-MS로 확인하였다. 이 분자는 본원에서 재조합 클루스테린 또는 his-태그 재조합 클루스테린으로 지칭된다.

[0085] 혈장 클루스테린을 친화성 크로마토그래피로 30마리의 개로부터 모은(pooled) 혈장으로부터 정제하였다. 마딘-다바이 개 신장(Madin-Darby canine kidney; MDCK) 세포-유래 클루스테린(신장 특이적 클루스테린)을 성장 MDCK 세포로부터 수득하여 항생제가 함유된 1X MEM 보충 배지에서 37°C , 7.5% CO_2 에서 125mL T 플라스크에 합류시켰다. 상청액을 수확하고 클루스테린을 AKTA 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 사용하여 항-클루스테린 컬럼으로 친화성 정제하였다.

[0086] 신장 특이적 클루스테린을 급성 신장 손상을 가진 것으로 의심되는 개로부터 모은 소변으로부터 친화력 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0087] **항체 제조**

[0088] 혈장-유래 클루스테린에 대한 다클론 항체를 토끼에서 생성시켰다. 단클론 항체를 여러 형태의 클루스테린을 면역원(Immunoprecise, Inc. Vancouver, BC)으로 사용하여 마우스에서 생성시켰다. 다양한 형태는 재조합 전체 분자 클루스테린, 클루스테린의 알파-사슬, 클루스테린의 베타-사슬, 혈장-유래 클루스테린, MDCK-유래 클루스테린 및 소변-유래 클루스테린(신장 특이성 클루스테린)을 포함한다.

[0089] **면역친화성 크로마토그래피**

[0090] 재조합 클루스테린을 토끼를 면역화하는데 사용하였다. 항-클루스테린 IgG를 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 항-재조합 클루스테린 IgG 항체를 사용하여 친화 크로마토그래피로 개 혈장 풀(pool)로부터 천연 혈장 클루스테린을 정제하였다. 단클론 항체를 혈장 클루스테린으로 마우스를 면역화시켜 제조하였으며, 생성된 항-클루스테린 IgG 항체를 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다.

[0091] **검출 항체**

[0092] 항-클루스테린(혈장-천연) 단클론 또는 다클론 항체를 표준 SMCC 화학(Thermo-Pierce)을 사용하여 홀스래디쉬 퍼옥사이드(HRP)로 표지하였다.

[0093] **클루스테린 표준**

[0094] 클루스테린을 MDCK 세포주(ATCC) 또는 모은 개 혈장의 배양 상청액으로부터 친화 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 생성된 클루스테린을 LCMS로 정량화하였다. 값(mg/mL)을 할당하고 표준 곡선 및 대조군을 결정하였다.

[0095] **실시예 3: 일반적인 클루스테린 분석 프로토콜**

[0096] 클루스테린의 표준 곡선을 500ng/mL 표준으로 계열희석하여 분석 버퍼(1% BSA 및 0.5% Tween®(폴리소르베이트) 20 함유 1x PBS)에서 준비하였다. 소변 시료를 분석 버퍼에서 1:100로 희석시키고, 100 μL 를 플레이트 상에서 주

위 온도로 1시간 동안 중복하여 배양하였다. PetChek® 버퍼(IDEXX Laboratories)로 3회 세척한 후, 홀스래디쉬 퍼옥사이드로 표지한 100 μ l의 항-클루스테린 항체를 주위 온도에서 30분 동안 배양하였다. 상기와 같이 3회 세척한 후, 50 μ l의 TMB 기질(IDEXX Laboratories)dmf 첨가하고 5분 동안 발색시켰다. 비색반응을 100 μ l의 산(1N HCL)을 첨가하여 wnd지시켰다. 즉시 플레이트를 450nm에서 판독하였다.

[0097] **클루스테린 코팅 플레이트**

[0098] 미량정량관을 0.05M 카보네이트 버퍼, pH 9.5에서 5 μ g/ml의 혈장 클루스테린, MDCK-유래 클루스테린, 제조합 His-태그 클루스테린 및 BSA로 밤새 4℃에서 코팅시켰다. PBS-Tween®(폴리소르베이트) 20(0.1%)으로 3회 세척한 후, 플레이트를 PBST 중 1% 소혈청 알부민(BSA)으로 2시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 PBST로 3회 추가 세척한 후 4시간 동안 진공하에서 건조시켰다.

[0099] **렉틴 코팅 플레이트**

[0100] 비오틴닐화 렉틴(Vector Labs, Burlingame, CA)을 PBS, pH 7.4에서 5 μ g/ml로 희석시키고 100 μ l를 스트렙타아비딘 코팅 플레이트(IDEXX Laboratories) 웰에 첨가하였다. 4℃에서 밤새 결합시킨 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 사용하기 전까지 4℃에서 모든 플레이트를 보관하고 건조시켰다.

[0101] **실시예 4: 클루스테린 렉틴 특이성**

[0102] 클루스테린 코팅 미량정량관을 1시간 동안 PBST 중 1 μ g/ml의 비오틴닐화 렉틴으로 배양하였다. PBST로 3회 세척한 후, 100 μ l의 HRP-표지 스트렙타아비딘을 플레이트 셰이커상에서 주위 온도로 30분 동안 배양하였다. PBST로 3회 추가 세척한 후, 100 μ l TMB 기질을 첨가하고 5분 동안 배양하고 100 μ l의 1N HCL로 반응을 중지시켰다. 플레이트를 450nm에서 판독하였다.

표 2

[0103] 클루스테린 제제의 탄수화물 특이성

렉틴	클루스테린 제제				비율
	혈장	MDCK	His-Tag	BSA	MDCK/혈장
PHA-L	0.3	2.3	0.1	0.3	8.8
WGA	0.5	2.6	0.1	0.1	5.5
sWGA	0.1	0.2	0.1	0.1	3.0
STL	0.1	0.3	0.1	0.1	2.2
LEL	0.7	1.5	0.1	0.1	2.2
PHA-E	1.7	3.6	0.1	0.4	2.1
DSL	1.7	3.2	0.1	0.3	1.9
자칼린	1.5	2.6	0.2	0.4	1.7
PNA	0.1	0.1	0.1	0.1	1.5
SBA	0.1	0.1	0.1	0.1	1.4
UEL	0.1	0.2	0.1	0.1	1.4
GSL-I	0.3	0.3	0.2	0.1	1.2
DBA	0.2	0.2	0.1	0.1	1.2
GSL-II	0.1	0.2	0.1	0.1	1.2
VVL	0.3	0.3	0.1	0.2	1.1
Con A	3.5	3.4	0.1	0.2	1.0
ECL	0.6	0.6	0.2	0.7	1.0
SJA	0.3	0.3	0.1	0.3	1.0
LCA	1.8	1.6	0.1	0.3	0.9
PSA	1.5	1.3	0.2	0.4	0.8
RCA	2.9	2.3	0.2	0.2	0.8

[0104] 특정 렉틴에 대한 클루스테린 제제의 반응성을 표 2에 O.D. 450 단위로 나타내었다. OD>0.5를 렉틴에 대한 양성 반응으로 사용하였다. 비-글리코실화 단백질, His-태그 클루스테린 및 BSA의 결합이 ≤ 0.4 O.D. 단위 값을 나타

내기 때문에 이 O.D.를 선택하였다. MDCK/혈장 결합의 비율을 얻었고 추가의 특성화를 위해 >2.0의 비율을 선택하였다. 이 기준에 부합하는 4개의 렉틴은 PHA-E, PHA-L, WGA 및 LEL이다. 추가 특성화를 위해 맥아 렉틴(WGA)을 선택하였다.

[0105] 실시예 5: 신장 특이적 클루스테린의 검출 가능성

[0106] 다양한 형태의 클루스테린(MDCK-유래 클루스테린, 천연 혈장 클루스테린 및 재조합 his-태그 클루스테린)을 분석 버퍼로 계열희석하고 항-클루스테린 HRP-표지 단클론 항체로 검출하였다. 도 2는 MDCK-유래 클루스테린 제제만이 용량 의존적 방식으로 결합한다는 것을 나타낸다. 탄수화물을 갖지 않는 his-태그 재조합 클루스테린 및 탄수화물을 함유하는 천연 혈장 클루스테린은 시험한 어떠한 농도에서도 렉틴 고체상에 결합하지 않는다.

[0107] 신장 특이적 클루스테린에 대한 렉틴 특이성

[0108] 천연 혈장 클루스테린, MDCK-유래 클루스테린 및 소변-유래 클루스테린 시료를 분석 버퍼에서 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석시키고 다른 렉틴 고체상에서 항-클루스테린 HRP 단클론 항체로 검출하였다. 하기 표 3은 MDCK-유래 클루스테린 및 소변으로부터 정제된 클루스테린만이 WGA 고체상과 결합한다는 것을 나타낸다. 숙시닐화 WGA(sWGA)에 대한 결합이 감소되었으며, 이는 시알산 잔기가 결합에 대한 역할을 하지 않는다는 것을 시사한다.

표 3

고체상 클루스테린 항원

	음성(P)	MDCK	소변	버퍼
WGA	0.08	1.29	0.98	0.17
sWGA	0.06	0.21	0.13	0.05
Buffer	0.05	0.05	0.05	0.05

[0110] 다클론 및 단클론 항-클루스테린 항체 모두 여러 렉틴 고체상에 결합된 MDCK-유래 클루스테린에 결합할 수 있고 혈장 원천의 클루스테린에는 결합하지 않으며, 이는 혈장-유래 클루스테린이 렉틴 고체상에 결합할 수 없기 때문이다. WGA는 신장 특이적 클루스테린(MDCK 유래 및 소변)에 특이적이다.

[0111] 이어서 렉틴을 단클론 또는 다클론 항체에 의해 고체상에 포획된 클루스테린 항원에 대해 스크리닝하였다. 3A4 단클론 항체, 9H7 단클론 항체, 2E2 단클론 항체, 2F2 단클론 항체, 항-알파 사슬 클루스테린 다클론 항체, 항-베타 사슬 클루스테린 다클론 항체 또는 항-소변 클루스테린 다클론 항체를 고체상으로 고정화시켰다. MDCK-유래 또는 혈장-유래 클루스테린($1\mu\text{g}/\text{mL}$)을 비오틴닐화 WGA, sWGA, Pha-L, Pha-E 또는 버퍼 대조군과 함께 고체상에 첨가하였다. 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

클루스테린 항원	고체상 Ab	비오틴화 렉틴 또는 대조군				
		WGA	sWGA	Pha-L	Pha-E	버퍼
MDCK (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3A4	<u>0.5</u>	0.1	0.2	<u>0.8</u>	0.0
	9H7	<u>1.4</u>	0.2	<u>0.9</u>	<u>1.9</u>	0.0
	2F2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
	항-알파	<u>0.4</u>	0.1	0.3	<u>1.0</u>	0.1
	항-베타	<u>1.2</u>	0.2	<u>0.7</u>	<u>1.7</u>	0.0
	항-소변	<u>0.9</u>	0.1	0.3	<u>1.4</u>	0.1
혈장 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3A4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	9H7	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0
	2F2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
	항-알파	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
	항-베타	0.1	0.1	0.1	0.4	0.0
	항-소변	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1

[0112]

[0113]

단클론 항체 9H7 및 다클론 클루스테린 항-베타 사슬 및 다클론 클루스테린 항-소변이 가장 우수한 감도를 나타낸다. WGA, Pha-L, Pha-E는 MDCK-유래 클루스테린과 특이 적으로 결합하고 혈장-유래 클루스테린과는 특이적으로 결합하지 않았다.

[0114]

WGA(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sWGA(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 다클론 항-혈장 클루스테린 항체 또는 버퍼를 고체상에 결합시켰다. 혈장 유래 클루스테린(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), MDCK-유래 클루스테린(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 소변-유래 클루스테린(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 버퍼를 첨가하였다. 그 결과를 표 5에 나타내었다. 그 다음, 홀스래디쉬 퍼옥시다아제에 접합된 단클론 항체 9H7(100ng/ml)을 첨가하였다. 특이적 결합이 검출되었다. MDCK-유래 클루스테린 및 소변-유래 클루스테린은 고정화된 WGA에 특이적으로 결합하고 9H7 항체에 의해 검출되었다. 혈장-유래 클루스테린은 고정된 WGA에 특이적으로 결합하지 않았고 9H7 항체에 의해 검출되지 않았다. 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

[0115]

고체상 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	클루스테린 제제(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	혈장	MDCK	소변	버퍼
WGA	0.08	1.29	0.98	0.17
sWGA	0.06	0.21	0.13	0.05
Poly	0.06	0.06	0.08	0.06
버퍼	0.05	0.05	0.05	0.05

[0116]

신선하게 준비된 혈청을 소변에 첨가하고 샌드위치 면역 복합체의 형성을 고정화된 WGA 렉틴 및 sWGA 렉틴을 포함하는 고체상으로 시험하였다. 렉틴 및 신장 특이적 클루스테린 복합체를 HRP-접합 9H7 단클론 항체로 검출하였다. 그 결과를 표 6에 나타내었다. 결과는 MDCK-유래 클루스테린은 혈청이 소변에 0.1 내지 10% 사이의 범위로 첨가될 때 소변에 유의한 반응성을 일으키지 않고 첨가되는 경우에만 복합체(WGA, 신장 특이적 클루스테린 및 항체)가 형성된다는 것을 시사한다. 따라서, 혈청 클루스테린은 분석에 의해 검출되지 않는다.

표 6

[0117]

고체상	정상 혈청 스파이크					MDCK (500ng)
	0	0.10%	1.00%	5.00%	10.00%	
WGA	0.05	0.04	0.05	0.08	0.12	0.62

sWGA	0.04	0.05	0.05	0.07	0.09	0.08
------	------	------	------	------	------	------

[0118] His-태그 재조합 클루스테린, 혈장-유래 클루스테린 및 MDCK-유래 클루스테린 시료를 DDT로 환원시켜 클루스테린의 알파 및 베타 사슬을 분리시키거나 비-환원 상태로 유지시켰다. 웨스턴 블롯에서, 단클론 항체 9H7이 MDCK-유래 클루스테린 및 혈장-유래 클루스테린 모두와 결합한다는 것을 입증하였다. 그러나, WGA 렉틴은 비-환원되지 않거나 환원된 MDCK-유래 클루스테린에만 결합한다. 표 7이 참조된다. WGA는 비-환원되거나 환원된 his-태그 재조합 클루스테린 또는 비-환원되거나 환원된 혈장-유래 클루스테린과 결합하지 않았다.

표 7

	비-환원			환원		
	His-태그 재조합 클루스테린	혈장-유래 클루스테린	MDCK-유래 클루스테린	His-태그 재조합 클루스테린	혈장-유래 클루스테린	MDCK-유래 클루스테린
9H7	+	+	+	+	-	+
WGA	-	-	+	-	-	+

[0120] 실시예 6: 혈뇨를 가진 들개의 클루스테린 수준

[0121] 건강한 개의 소변을 UA 덤스틱(IDEXX Laboratories, Inc.)으로 혈액의 존재 여부를 확인하였다. 신장 특이적 클루스테린 수준을 제조업체의 지침(Biovendor Research and Diagnostic Products)에 따라 상업용 클루스테린 EIA를 사용하여 측정하였다. 하기와 같이, 소변에서 검출 가능한 혈액을 갖지 않는 건강한 개는 기준 범위(70ng/ml) 내에서 클루스테린 수준을 보인 반면에 혈액 오염을 갖는 개(시료 5 내지 8)에서는 정상 기준 범위를 10 내지 100배 초과하는 클루스테린 수준을 보였다(표 8). 이 결과는 소변에서 혈액의 존재가 높은 클루스테린 측정을 초래할 있고, 이는 거짓양성으로 이어질 수 있음을 나타낸다.

표 8

시료	상업용 클루스테린 EIA	UA 덤스틱 혈액
1	<LOQ	음성
2	<LOQ	음성
3	29	음성
4	<LOQ	음성
5	1045	3
6	1015	3
7	760	3
8	65000	3

[0123] 실시예 7: 신장 특이적 클루스테린 면역분석의 특이성

[0124] 신장 특이적 클루스테린 면역분석(KSCI)을 혈장 및 맥아 렉틴(WGA)으로부터 정제된 개 클루스테린에 대해 생성된 단클론 항체(IgG2a, kappa)를 사용하여 설계하였다. WGA를 미량정량판 웰에 코팅하였다. 단클론 항체를 HRP로 표지하였다. KSCI의 특이성을 설명하기 위해, 건강한 개의 신선한 완전 혈액 또는 혈장을 버퍼에 첨가하고 KSCI 및 상업용 클루스테린 EIA(Biovendor) 분석법을 모두 사용하여 분석하였다.

[0125] 도 3에 나타난 바와 같이, 클루스테린은 상업용 클루스테린 EIA에 의해 완전 혈액 및 혈장 모두에서 고농도로 검출되었지만 KSCI에서는 검출되지 않았다. 건강한 개 및 고양이의 소변 시료에서 혈액 오염이 많다는 사실을 고려하면, 클루스테린을 정확하게 측정할 수 있는 유일한 방법은 신장 특이적 클루스테린 면역분석을 사용하는 것이다.

[0126] 실시예 8: 개 젠타마이신 모델에서의 신장 특이적 클루스테린

[0127] 개 젠타마이신 모델의 소변에서 신장 특이적 클루스테린을 측정하였다(도 4). 이 모델 시스템에서, 개에게 5일 동안 40mg/kg 젠타마이신을 투여하였다. 개 모델에서, 혈청 크레아티닌은 연구 기간 동안 본질적으로 변하지 않은 반면에 소변에서의 신장 특이적 클루스테린은 급속히 증가하여, 투약이 중지되었을 때 약 5배의 기준선에 도달하였고, 11일에 기준선의 약 10배로 정점을 나타내었다. 이는 신장 특이적 클루스테린이 활성 신장 손상에 대

한 혈청 크레아티닌 보다 더욱 빠르고 민감한 마커라는 것을 나타낸다.

실시예 9: 활성 신장 손상을 갖는 환자에서의 신장 특이적 클루스테린

신장 특이적 클루스테린을 염증성 또는 허혈성 유도 활성 신장 손상으로 임상에 제시된 개의 소변에서 측정하였다(도 5). 이 데이터는 건강한 환자와 활성 신장 손상으로 진단된 환자간에 신장 특이적 클루스테린의 농도가 명확하게 분리되었음을 보여준다. 결론적으로, 신장 특이적 클루스테린은 활성 신장 손상에 민감하고 특이적인 마커이다.

실시예 10: 요로 감염 환자에서의 신장 특이적 클루스테린

신장 특이적 클루스테린을 요로 감염(UTI)을 갖는 고양이 및 개에서 측정하였다(도 6). 신장 특이적 클루스테린 수준은 UTI 환자의 아집단에서 극적으로 증가하였다. 신장 특이적 클루스테린은 UTI에 대한 마커이다.

실시예 11: 고양이에서의 신장 특이적 클루스테린

고양이 클루스테린을 고양이 신장 세포(ATCC, Manassas, VA)로부터 분리하였다. 가용성 고양이 클루스테린의 분석을 SDS-PAGE 웨스턴 블롯팅 및 락틴 스크리닝 분석을 사용하여 수행하였다.

개 및 고양이 신장 세포주(각각, MDCK 및 CRFK)의 상청액 및 개 혈장으로부터 정제된 클루스테린 제제를 SDS-PAGE에서 처리하고 니트로셀룰로오스 상에서 블롯팅하였다. 블롯을 개 클루스테린에 대해 생성된 항-클루스테린 단클론 항체로 프로빙하였다. 그 결과는 단클론 항체가 CRFK에 의해 생성된 고양이 클루스테린과 교차반응성이 있음을 나타낸다(도 7). 따라서, 단클론 항체는 양부위 면역분석(ELISA) 형식으로 고양이 신장 클루스테린을 검출하는데 사용할 수 있다.

고양이 임상 시료에 대한 락틴 스크리닝

비오틴화 락틴(Vector Labs)을 스트랩다아비틴 코팅 플레이트에 PBST(Tween 20®(폴리소르베이트)의 0.01%) 중 1 μ g/ml로 4°C에서 밤새 코팅시켰다. 플레이트를 3회 세척하고 혈장(1 μ g/ml)으로부터 친화-정제한 고양이 클루스테린 또는 1:10로 희석시킨 고양이 임상 소변을 1시간 동안 주위 온도에서 배양하였다. 3회 세척한 후, 개 클루스테린(250ng/ml)에 대해 생성된 100 μ l의 HRP 표지 단클론 항체를 첨가하고 상기와 같이 30분 동안 배양하였다. 다시 3회 세척한 후, 100 μ l TMB를 첨가하고 5분 동안 발색시킨 후, 100 μ l 1N HCL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 흡광도를 450nm에서 판독하였다. 그 결과를 표 9에 나타내었다.

표 9

락틴 약어	락틴 원천	고양이 시료	
		정제된 혈장 클루스테린 (1 μ g/ml)	소변 1:10 희석
자칼린	자칼린(Jacalin)	0.00	0.51
GSL-I	그리포니아(반데이라에아) 심플리시폴리아 I(Griffonia(Bandeiraea) simplicifolia I)	0.00	0.14
LCA	렌즈콩(Lens culinaris)	0.33	2.04
ECL	홍두화(Erythina cristagalli)	0.30	1.36
LEL	토마토(Lycopersicon esculentum)	-0.01	-0.23
STL	감자(Solanum tuberosum)	0.00	0.19
RCA	아주까리(Ricin communis)	0.44	2.39
VVA	헤어리베치(Vicia villosa)	-0.01	-0.45
GSL-II	그리포니아(반데이라에아) 심플리시폴리아 II	0.00	0.01
SJA	회화나무(Sophora japonica)	-0.01	0.12
PHA-E	강낭콩 적혈구응집소(Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)	0.10	2.53
sWGA	숙시닐화 맥아(Succinylated wheat germ)	0.01	0.72
WGA	밀 완두균(Wheat Pisum sativum germ)	0.05	2.1
PSA	완두콩 응집소(Pisum sativum agglutinin)	1.04	2.62
DSL	독말풀(Datura stratonium)	0.36	2.90
DBA	말콩(Dolichos biflorus)	0.08	1.59
PHA-L	강낭콩 백혈구응집소(Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin)	0.07	1.93
UEA	가시금작화 I(Ulex europaeus I)	-0.01	0.18

SBA	대두(Soybean)	0.04	2.06
CONA	콘카나발린 A(Concanavlin A)	0.65	3.12
PNA	땅콩(Peanut)	0.02	0.60

[0138] 12개의 렉틴(굵은 글씨)은 고양이 클루스테린 및 항-클루스테린 단클론 항체와 샌드위치를 형성할 수 있었다. 나타낸 바와 같이, WGA는 고양이 클루스테린에 결합한다. 따라서 KSCI 분석은 개 및 고양이 모두에서 클루스테린을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0139] 렉틴 방식을 사용한 임상 시료에서의 요로 클루스테린의 검출

[0140] 소변을 지역 동물병원에 오는 고양이로부터 채취하고, 1:100으로 희석하고, KSCI 분석을 하였다. 나타낸 바와 같이, 동물은 개를 위해 전개된 KSCI 분석이 고양이 임상 시료와 교차 반응성이 있다는 것을 입증하는 분석 범위를 나타낸다(<LOD=검출 한계 이하; >ULOQ=정량화 상한 초과). 표 10이 참조된다.

표 10

[0141]

고양이	신장 클루스테린 (ng/mls)
1	31
2	53
3	144
4	<LOD
5	<LOD
6	208
7	325
8	>ULOQ
9	141
10	640
11	<LOD
12	125
13	<LOD
14	687
15	283
16	100
17	125
18	169
19	20

[0142] 실시예 12: 인간에서의 신장 특이적 클루스테린

[0143] 부착성 인간 배아 상피 신장 세포주 HEK293, 개 신장 세포주 MDCK 및 사바나원숭이 신장 상피 세포주 Vero(ATCC, Manassas, VA)를 공급자의 지침에 따라 성장시켰다. 세포가 합류될 때, 신독성 약물인 젠타마이신 0.2mg/ml를 사용하여 스트레스를 가하고 40℃에서 가열하거나, 열과 약물을 병용하여 처리하였다. 상업적으로 이용 가능한 인간 클루스테린 ELISA(Biovendor)에서 상청액을 수확하고, 이들의 반응성에 대해 시험하였다. 그 결과는 ELISA가 HEK293 세포에 의해 발현되는 클루스테린과 반응성이 있다는 것을 나타낸다(표 11).

표 11

[0144]

클루스테린 발현에 사용되는 인간 세포주의 특이성

세포주	종/조직	기관	상업용 인간 클루스테린 분석 반응성
MDCK	개 상피	신장	-
Vero	사바나원숭이 상피	신장	-
HEK293	인간 상피	신장 (배아)	+/-

[0145] 신장 세포주에 신독성 약물인 젠타마이신 0.2mg/ml를 사용하여 스트레스를 가하고 40℃에서 24시간 동안 가열하

거나, 약물(0.2mg/ml)과 열(40℃에서 24시간)을 병용하여 처리하였다. 상청액을 1:100으로 희석하고 인간 클루스테린 ELISA(Biovendor)에서 처리하였다. 하기 도 8에 나타난 바와 같이, 개 신장 세포 대조군(MDCK)에서는 아무런 반응도 보이지 않았다. 사바나원숭이 신장 Vero 계통에서 약간의 반응이 나타났다. 인간 계통인 HEK 293이 가장 강한 반응성을 보였다. 이는 HEK2993 세포주가 다양한 조건하에서 성장할 때 인간 클루스테린을 분비한다는 것을 확인할 수 있다.

[0146] 인간 신장-발현 클루스테린과 반응성이 있는 항체

[0147] 양부위 ELISA(샌드위치 ELISA)를 전개하기 위해, 재조합 개 클루스테린에 대해 생성된 단클론 및 다클론 항-개-클루스테린 항체의 라이브러리를 스크리닝하여 인간 클루스테린에 대한 결합을 측정하였다. 그 결과는 재조합 개 클루스테린에 대한 다수의 항-클루스테린 항체가 인간 클루스테린에 결합할 수 있었다는 것을 나타낸다. 웨스턴 블롯을 확인한 도 9는 MDCK(레인 2, 4), HEK 293 세포 상청액(레인 3) 및 양성 대조군 재조합 개 클루스테린 베타 사슬 항원(레인 5)에 결합하는 토끼 항-베타 사슬 클루스테린을 나타낸다.

[0148] 인간 클루스테린 ELISA

[0149] 플레이트를 10μg/ml의 정제된 항-베타 사슬 클루스테린 다클론 항체로 밤새 4℃에서 코팅시켰다. 플레이트를 3회 세척하고 0.1% BSA로 밤새 차단한 후 3회로 최종 세척하였다. 플레이트를 진공하에서 2시간 동안 건조시키고 사용시까지 4℃에서 보관하였다. 인간 신장 세포주 및 MDCK(개) 대조군에 대한 상청액을 PBS로 1:10으로 희석하고 100μl를 웰에 중복하여 넣었다. 상청액을 주위 온도에서 교반하면서 1시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 후, PBS 중 100μl의 비오틴화 렉틴(1μg/ml)을 첨가하고, 상기와 같이 1시간 동안 배양하였다. 3회 추가 세척한 후, 플레이트를 PBS 중 스트렙타아비딘-HRP(1:5000)와 함께 30분 동안 배양하였다. 3회 최종 세척한 후, 플레이트를 100μl TMB 기질로 5분 동안 전개시키고 100μl 1M HCl로 반응을 중지시켰다. 흡광도를 450nm에서 판독하였다. 표 12가 참조된다. 2개의 렉틴(PSA, DBA)이 인간 클루스테린 및 개 항-베타 사슬 다클론 항체와 함께 샌드위치를 형성하는 것으로 나타났다.

표 12

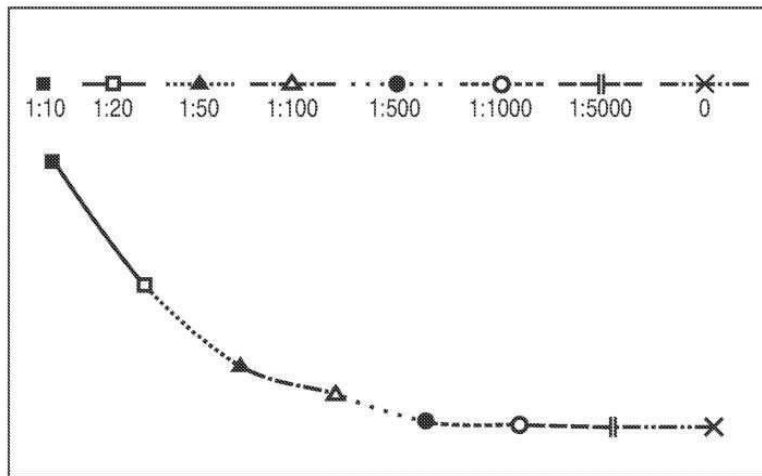
렉틴 특이성

	PSA	DBA	WGA
MDCK	0.43	2.95	2.66
HEK 293	0.38	1.06	0.12
VERO	0.50	1.02	0.06

[0150]

도면

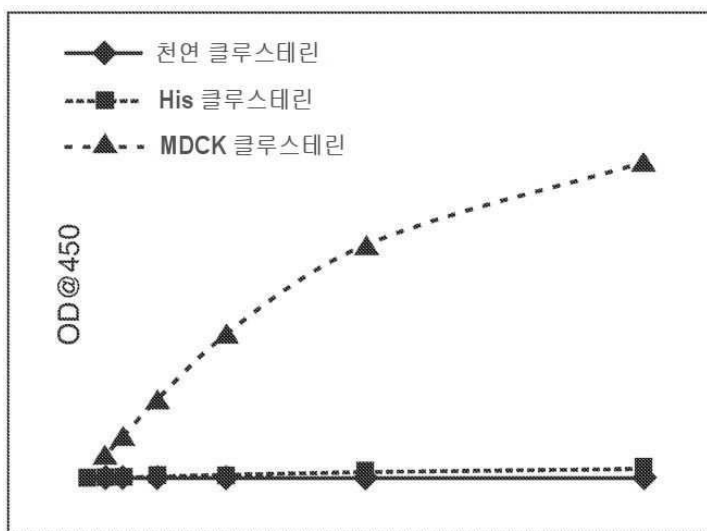
도면1a



도면1b

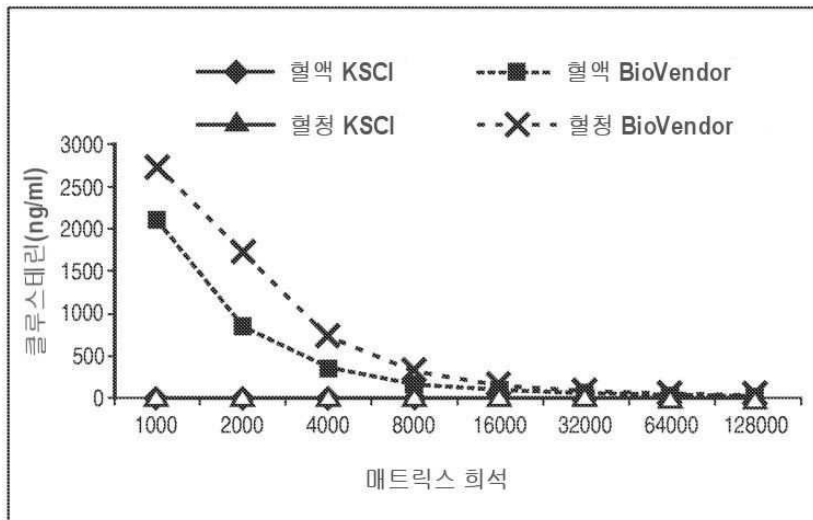
희석 할정: 음성 소변	클루스테린 (ng/ml)
1:10	4869
1:20	2597
1:50	1142
1:100	623
1:500	113
1:1000	62
1:5000	23
0	13

도면2

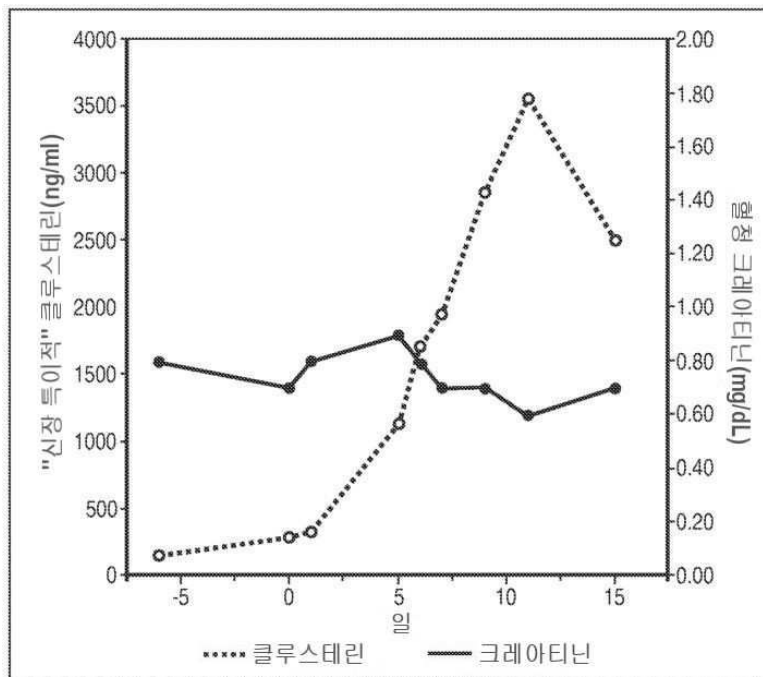


렉틴 고체상에 대한 클루스테린의 결합

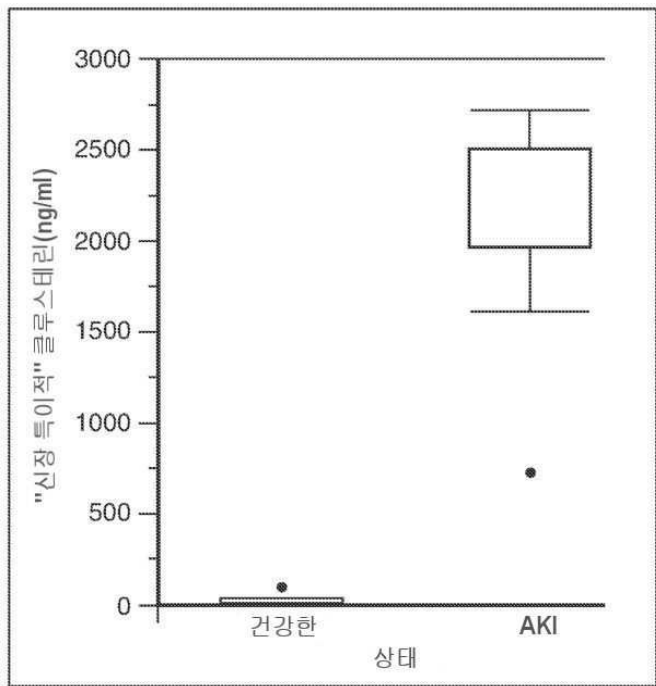
도면3



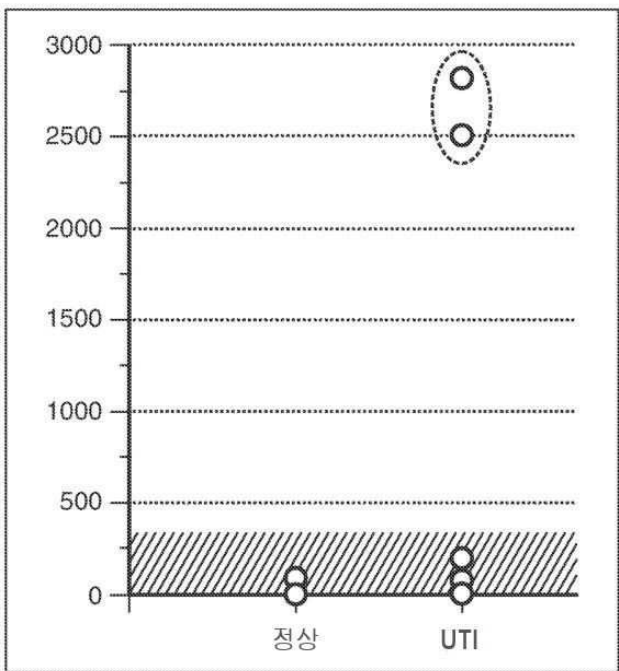
도면4



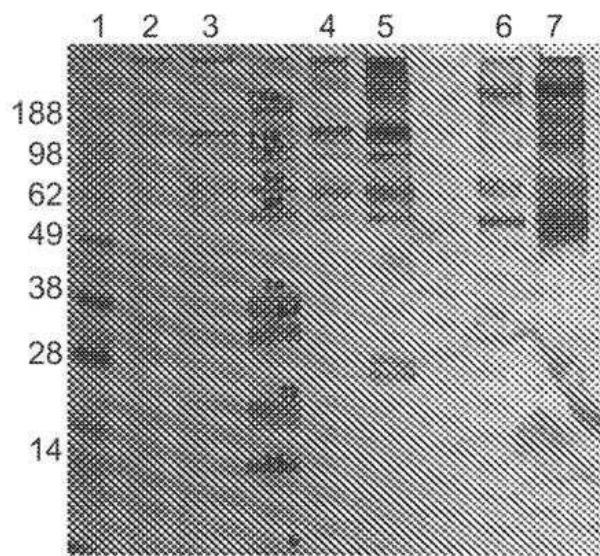
도면5



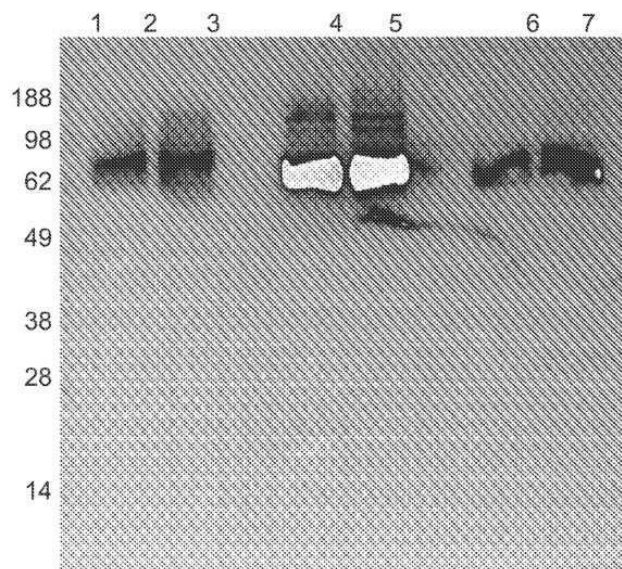
도면6



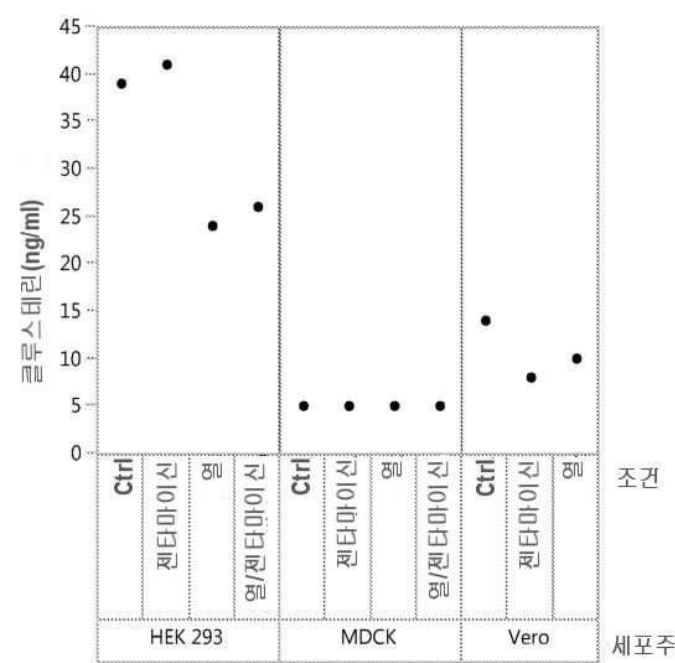
도면7a



도면7b



도면8



도면9

