



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0076571
(43) 공개일자 2014년06월20일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/48</i> (2006.01) <i>G01N 33/493</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>G01N 1/40</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/00</i> (2006.01) <i>A61K 38/00</i> (2006.01)
 <i>C12N 5/07</i> (2010.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7009382
 (22) 출원일자(국제) 2011년09월22일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2014년04월09일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2011/054187
 (87) 국제공개번호 WO 2013/041913
 국제공개일자 2013년03월28일</p> | <p>(71) 출원인
 유니버시다드 데 로스 안데스
 칠레 91003910 산티아고 라스 콘데스 산 카를로스 데 아포르킨도 2200</p> <p>(72) 발명자
 이라라자발 무노즈, 카를로스 에르네스토
 칠레 7830238 산티아고 마쿨 조지 곤잘레즈 바스티아스 3997</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 양영환</p> |
|--|---|

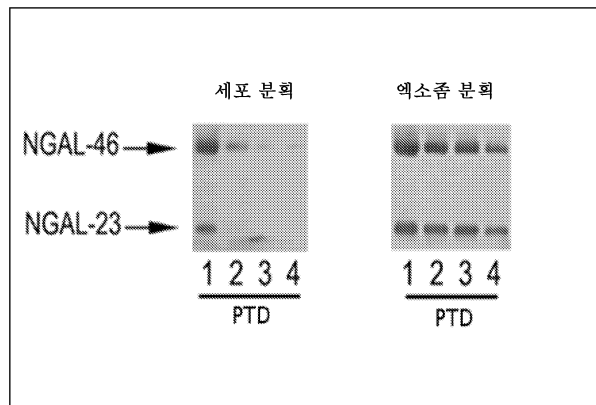
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **급성 신장 손상의 조기 모니터링, 진단 및/또는 예후 방법**

(57) 요약

본 발명은 급성 신장 손상을 조기에 모니터링, 진단, 예후하고, 그를 앓는 대상체에서 치료법을 결정하기 위한 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 방법은 a) 요 샘플을 제공하는 단계; b) 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 요 샘플에 존재하는 엑소솜을 농축시키는 단계; 및 c) 엑소솜 중의 급성 신장 손상 (AKI) 마커를 검출하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 요 샘플을 제공하는 단계;

(b) 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 요 샘플에 존재하는 엑소좀을 농축시키는 단계; 및

(c) 엑소좀 중의 급성 신장 손상 (AKI) 마커를 검출 및/또는 정량하는 단계

를 포함하는, 급성 신장 손상을 조기에 모니터링, 진단 및/또는 예후하고, 그를 앓는 대상체에서 치료법을 결정하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역정제 단계가 상이한 신장 구조의 표면에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 면역정제 단계를 위한 항체가 항-아쿠아포린1 (항-AQP1), 항-아쿠아포린2 (항-AQP2), 및 항-아쿠아포린3 (항-AQP3), 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPiII, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 면역정제 단계를 위한 항체가 아쿠아포린1 (AQP1), 아쿠아포린2 (AQP2), 아쿠아포린3 (AQP3), NKCC2, NHE-3, 및 NaPiII의 임의의 도메인에 대한 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 요 샘플에서 엑소좀의 농축이 면역정제 이전에 엑소좀의 농축을 위한 1개 이상의 추가 수단을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 요 샘플에서 엑소좀의 농축을 위한 추가 수단이 원심분리 단계, 마이크로여과 단계, 또는 이들의 조합이고, 이로써 탈세포화된 요 샘플이 생성되는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 원심분리가 5,000 내지 10,000 rpm으로 5 내지 30분 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 원심분리 단계가 2 단계로 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 제2 원심분리 단계가 30,000 내지 45,000 rpm으로 30 내지 120분 동안 수행되는 초원심분리 단계이고, 이로써 전체 엑소좀 분획이 생성되는 것인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 마이크로여과 단계가 0.22 마이크로미터 이하의 마이크로필터를 사용하고, 이로써 탈세포화된 요 샘플이 생성되는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 급성 신장 손상 마커가 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 검출이 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18에 대한 1차 항체와의 면역 반응에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 1차 항체가 표지된 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 검출이 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18에 대한 1차 항체에 대한 표지된 2차 항체를 검출함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 15

제12항 또는 제13항에 있어서, 항체 표지가 효소, 형광 화합물, 적외선 화합물, 방사성 화합물, 화학 화합물 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 특이적 신장 손상 마커의 존재 및/또는 수준에 기초하여 대상체에서 모니터링, 진단, 예후하고/거나 치료법을 결정하기 위해 대상체에서 급성 신장 손상을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

- (a) 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단; 및
- (b) 급성 신장 손상 (AKI) 마커를 검출하기 위한 수단을 포함하는, 급성 신장 손상을 조기에 평가하기 위한 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, (c) 요 샘플을 수득하기 위한 수단을 추가로 포함하는 키트.

청구항 19

제17항에 있어서, 면역정제 단계를 위한 항체가 항-아쿠아포린1 (항-AQP1), 항-아쿠아포린2 (항-AQP2), 및 항-아쿠아포린3 (항-AQP3), 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPi II, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 키트.

청구항 20

제19항에 있어서, 면역정제 단계를 위한 항체가 아쿠아포린1 (AQP1), 아쿠아포린2 (AQP2), 아쿠아포린3 (AQP3), NKCC2, NHE-3, 및 NaPi II의 임의의 도메인에 대한 것인 키트.

청구항 21

제20항에 있어서, 요 샘플에서 엑소좀의 농축이 면역정제 이전에 엑소좀의 농축을 위한 1개 이상의 추가 수단을 포함하는 것인 키트.

청구항 22

제21항에 있어서, 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단이 용기, 실험실용 튜브, 원심분리 튜브, 항체, 면역 반응 완충제, 차단제 또는 차단액, 특이적 신장 손상 마커의 스톱 용액, 마이크로필터, 항체로 피복된 96 웰 플레이트, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 키트.

청구항 23

제17항에 있어서, 급성 신장 손상 마커를 검출하기 위한 수단이 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18, 또는 이들의 조합에 대한 항체 중에서 선택되는 항체인 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 항체가 표지된 것인 키트.

청구항 25

제23항에 있어서, NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18, 또는 이들의 조합에 대한 1차 항체에 대한 표지된 2차 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 항체 중의 표지가 효소, 형광 화합물, 적외선 화합물, 방사성 화합물, 화학 화합물 중에서 선택되는 것인 키트.

청구항 27

제26항에 있어서, 키트 사용 지침서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 28

(a) 요 샘플 또는 임의로 탈세포화된 요 샘플을, 상이한 신장 구조의 표면에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체와 함께 인큐베이션시켜 엑소솜-항체 복합체를 형성하는 단계;

(b) (a)로부터 생성된 엑소솜-항체 복합체를, 항체의 임의의 영역을 인식하고 불용성 작용제에 결합하는 태그와 함께 인큐베이션시켜 엑소솜-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 형성하는 단계;

(c) 상청액으로부터 엑소솜-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 분리하는 단계; 및

(d) 엑소솜-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 적절한 완충제로 세척하는 단계

를 포함하는, 요 엑소솜을 정제하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 항체가 항-아쿠아포린1 (항-AQP1), 항-아쿠아포린2 (항-AQP2), 및 항-아쿠아포린3 (항-AQP3), 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPi II, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 항체가 아쿠아포린1 (AQP1), 아쿠아포린2 (AQP2), 아쿠아포린3 (AQP3), NKCC2, NHE-3, 및 NaPi II의 임의의 도메인에 대한 것인 방법.

청구항 31

요 엑소솜의 면역정제를 위한, 상이한 신장 구조의 표면에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체 또는 항체들의 조합의 용도.

청구항 32

요 엑소솜의 면역정제를 위한, 항-아쿠아포린1 (항-AQP1), 항-아쿠아포린2 (항-AQP2), 및 항-아쿠아포린3 (항-AQP3), 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPi II, 또는 이들의 조합 중에서 선택되는 항체 또는 항체들의 조합의 용도.

청구항 33

요 엑소솜의 면역정제를 위한, 아쿠아포린1 (AQP1), 아쿠아포린2 (AQP2), 아쿠아포린3 (AQP3), NKCC2, NHE-3, 및 NaPi II의 임의의 도메인에 대한 항체 또는 항체들의 조합의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 급성 신장 손상을 조기에 모니터링, 진단 및/또는 예후하고, 그를 앓는 대상체에서 치료법을 결정하기 위한 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 신체에서 다기능을 수행하는 기관으로서, 그러한 기능 중에는 대사 동안 생산된 체내 노폐물 제거, 및 신체에 필요한 물질을 혈액으로 복귀시키는 것, 그 뿐만 아니라, 상기 기능을 통해 체액의 부피 및 조성을 조절하는 것이 있다. 신체의 수력 전해의 균형은 신장 기능에 기인하여 유지된다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

[0003] 신장 질환은 다수 국가에서 가장 중요한 사망 원인 중 하나이다. 이미 1994년에 미국에서는 환자의 삶의 질을 저하시키고 사망에 이르게 하는 신장 질환을 보이는 사람이 1,500만 명을 초과하였다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

[0004] 신장 질환의 임상적 소견은 매우 잘 정의된 증후군으로 분류될 수 있다. 일부는 사구체 질환에 특이적이고, 나머지는 신장 구조 중 임의의 것에 영향을 미치는 질환에서 나타난다. 이러한 질환은 다수의 국가에서 이환 및 사망의 주요 원인 중 하나이다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

[0005] 중증 신장 질환은 2가지 주요 카테고리로 분류될 수 있다:

[0006] 병리상태

[0007] 신장 부전은 신장이 적절하게 기능을 수행하지 못하는 임상적 병태로서, 이로 인해 사구체 여과율은 감소하게 된다. 임상적으로, 이러한 장애는 2개의 군: 급성 신장 손상 (AKI) 및 만성 신부전 (CRF)으로 나뉜다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

[0008] 신부전

[0009] 급성 신장 손상

[0010] 그의 증상 중에는 혈액 중 질소화된 생성물이 축적된 것에 상응하는 질소혈증과 함께 감뇨증 또는 무뇨증 (요 배설량 감소 또는 요 배설 불능)이 포함된다. 체액 및 염의 과부하를 결정하며, 부종과 고혈압을 유발하는 수분 체류에 기인하여 대사 노폐물 또한 축적된다.

[0011] 상기 증상의 가장 큰 위협 중 하나는 8 mEq/L를 초과하는 칼륨 체류 (고칼륨혈증)인데, 이는 치명적일 수 있다. 신장은 정상량의 수소 이온을 배설하지 못하며, 이로 인해 대사 산증이라는 소견이 유발된다.

[0012] 상기 질병이 해결되지 않고 계속될 경우, 완전 무뇨증에 도달할 수 있으며, 이로써 8 내지 14일 이내에 사망하게 될 수도 있다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

[0013] AKI는 3가지 카테고리: 신전성, 신내성 및 신후성으로 나뉜다.

표 1

급성 신장 손상 원인 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Interamericana]).

신전성 급성 신장 손상의 일부 원인	
혈관내 부피 고갈	출혈 (외상성, 외과적, 산후, 소화성)
	설사
	화상

[0014]

신전성 급성 신장 손상의 일부 원인	
원발성 신장 혈류역학적 장애	신동맥 협착
	신동맥 또는 신정맥의 색전증 또는 혈전증
	프로스타글란딘 합성의 과도한 차단 (아스피린)
말초 혈관확장 및 유발된 저혈압	아나필락시스성 쇼크, 패혈증, 중증 감염
	부감각증
신내성 급성 신장 손상의 일부 원인	
소혈관 손상, 사구체염, 또는 그 둘 모두	혈관염 (결절성 다발동맥염)
	콜레스테롤 색전증
	악성 고혈압
	급성 사구체신염
세뇨관 상피 손상 (세뇨관 괴사)	허혈성 급성 세뇨관 괴사
	독소 (중금속, 에틸렌 글리콜, 살균증제, 독성 버섯, 사염화탄소)에 의한 급성 세뇨관 괴사
신장 간질 손상	급성 신우신염
	급성 알레르기성 간질성 신염

[0015]

신후성 급성 신장 손상의 일부 원인	
요관 또는 신우의 양측성 폐쇄	신장 결석
	혈괴(Hematic clot)
방광 폐쇄	
요관 폐쇄	

[0016]

[0017]

선진국에서 AKI는 주로 병원내에서 감염되고, 수개의 요인, 예컨대 패혈증, 외과적 중재술, 특히 심장 수술, 허혈증, 신장독소 투여에 의해 발생하는 병리학적 병태이며, 그러므로 AKI의 영향을 예방하고 그를 감소시키기 위한 현대적인 진단 기법과 치료법이 요구된다 (문헌 [Vukusich A., Alvear F., Villanueva P., Gonzalez C, Olivari F., Alvarado N., Zehnder C. 2004, Rev. Med. Chile, 132:1355-1361]).

[0018]

AKI 에피소드가 발생한 환자들 대부분은 신장 기능을 허용되는 수준으로 회복하게 되며, 비록 상기 환자 중 10 내지 20%는 최종적으로는 영구적으로 투석을 필요로 하기는 하지만, 대부분은 투석에 의존하지 않는다 (문헌 [Fauci, A. 2009, Harrison, Principles of intern medicine. Mexico, F.D. Interamericana - McGraw Hill]). 입원 환자 중 5 내지 7%는 AKI 에피소드와 관련된 합병증을 앓고 있으며, 이는 ICU에서의 비용의 30%에 대한 원인이 된다 (문헌 [Fauci, A. 2009, Harrison, Principles of intern medicine. Mexico, F.D. Interamericana - McGraw Hill]). AKI는 심각한 문제이며, 그러므로 특별히 고위험 환자, 예컨대 ICU 환자에서의 상기 병리상태에 관한 조기 중재술을 개발하고자 하는 많은 노력이 있었다 (문헌 [Vukusich A., Alvear F., Villanueva P., Gonzalez C, Olivari F., Alvarado N., Zehnder C. 2004, Rev. Med. Chile, 132:1355-1361]; [Schrier R. 2010, Nat. Rev. Nephrol, 6:56-59]).

[0019]

만성 신부전

[0020]

앞서 언급된 바와 같이, 만성 신부전은 다량의 기능성 네프론의 비가역적 손실의 결과이다.

[0021]

신장 효율을 통해 본 발명자들은 기능성 네프론의 개수를 정상보다 20 내지 30% 더 많은 개수 그대로 남겨두면서, 대부분의 전해질을 상대적으로 정상적인 혈액 농도로, 및 체액을 적절한 부피로 유지시킬 수 있다. 중증의 어떤 임상적 증상도 상기 수치 이상으로 존재하지는 않는다 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Inter americana]).

[0022]

만성 신부전의 가장 중요한 원인 중에는 하기 표 2에 기술되어 있는 것이 포함되어 있다.

표 2

만성 신기능부전의 원인 (문헌 [Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, tenth edition. Mexico DF, Mexico: McGraw-Hill Inter americana]).

대사 장애	당뇨병
	아밀로이드증
신장 혈관 장애	아테롬성동맥경화증
	신장경화증-고혈압
면역 장애	사구체신염
	결절성 다발동맥염
	홍반성 루푸스
감염	신우신염
	결핵
원발성 세뇨관 장애	신장독소 (진통제, 중금속)
요로 폐쇄	신장 결석
	전립선 비대
	요도 협착
선천성 장애	다낭성 질환
	신장 조직의 선천성 부재 (신장 발육부전)

[0023]

[0024] **말기 신질환 (ESRD)**

[0025] 많은 경우에서, 신장 초기 병변은 신기능을 진행적으로 악화시키고, 환자가 생존하기 위해서는 투석 또는 신장 이식 프로그램을 시작하여야 하는 지점까지 계속해서 네프론을 손실시킨다. 이러한 병태를 만성 신부전이라 부른다 (문헌 [Kumar V., Cotran R. 2000, Structural and Functional Pathology of Robbins, sixth edition, Madrid, Spain: Elsevier]).

표 3

ESRD의 가장 빈번한 원인 (문헌 [Kumar V., Cotran R. 2000, Structural and Functional Pathology of Robbins, sixth edition, Madrid, Spain: Elsevier]).

원인	ESRD를 갖는 전체 환자의 백분율 (%)
당뇨병	41
고혈압	28
사구체신염	11
다낭성 신장 질환	3
기타/미상	18

[0026]

- [0027] **신장 이식**
- [0028] 신장 이식이 ESRD에 대해 가장 효과적인 치료법이다. 예컨대, 기증자 유형과 같은 많은 인자에 따라 이식의 성공 여부는 달라진다. 신장 이식체의 기원이 되는 기증자는 사망하였거나, 살아있는 대상체일 수 있다. 이식된 모든 기관은 이식과 연관된 허혈증, 및 재관류 과정에 기인하여 급성 손상을 앓게 된다.
- [0029] 살아있는 기증자의 이식은 특별히, 어린 환자에서의 말기 만성 신부전 치료를 위해 탁월한 치료학적 옵션이 된다. 이를 통해서, 짧은 허혈 시간 (30분 미만)과 함께, 기관이 우수한 생존기간을 가질 수 있도록 돕기 위해 정의된 이식 전 프로토콜을 따라 수행할 수 있다. 생존기간은 10년 초과가 되고, 생존율은 사체 기증자로부터의 기관을 받은 이식과 비교하였을 때, 17 내지 20% 더 높다.
- [0030] 사체 기증자의 이식인 경우, 환자는 대기 명단에 기입되고, ABO 및 HLA 적합성 정도와 관련하여 선별된다. 연령, 기증자 및 수혜자의 신체 질량 지수 사이의 유사성, 제1 이식에 상응하는지 여부, 및 이식체가 하나의 신장 또는 둘 모두의 것인지 여부가 선별 기준에 포함된다. 이러한 경우, 기관 허혈 시간은 수시간 (심지어 1 또는 2일)으로 연장될 수 있고, 이는 이식된 기관의 저하를 증가시킨다. 만성 투석 환자인 경우에는 또한 추가로 합병증이 발생할 수 있다.
- [0031] 신장 이식 환자는 초기에는 중환자실 (ICU) 또는 이식 부서에서, 및 추후에는 입원 또는 외래 환자로서 주의깊은 모니터링을 필요로 한다. 모니터링하는 동안 수개의 외과적 또는 의학적 합병증이 발생할 수 있다. 비록 일부 합병증은 미성숙 상태이고, 여전히 ICU 또는 이식 부서에 입원해 있는 동안 치료될 수도 있지만, 이식 후 심지어는 장기간 후에도 발생할 수 있는 합병증 (만성 장애)이 존재하는 바, 상기 모니터링은 환자 평생 동안에 걸쳐 연장될 수 있다. 이식편이 작용하는 동안, 이식된 기관의 생존기간, 환자의 생존기간을 연장시키고, 그의 삶의 질을 개선시키기 위해서는 면역억제 요법을 수행하여야 한다. 이러한 치료법은 각 환자의 임상적 및 혈청학적 상태에 맞게 조정된다. 면역억제제와 함께, 신장 이식에 관한 장기간의 모니터링 내에서 다른 측면도 고려되어야 하며, 그러한 측면으로는 환자가 건강한 생활 방식을 따르도록 격려하는 것, 24시간 요 중 단백뇨 및 크레아티닌을 모니터링하는 것, 고지혈증 치료 수행, 혈압 조절, 새로 당뇨병이 발병될 가능성, 및 이식편 기능 장애인 경우, 만성 신부전이 발병될 가능성을 포함한다.
- [0032] 신장 이식을 받은 환자는 인간에서 AKI에 대한 우수한 모델이 된다. 이들 환자는 연구되는 바이오마커를 변경시킬 수 있는 다른 병리상태가 없다는 이점을 가지고 있다. 그러나, 면역억제 약리학적 상태하에 있다는 단점을 가지고 있다.
- [0033] **급성 신장 손상 (AKI) 진단**
- [0034] 급성 신장 손상 (AKI)은 신장 기능 저하에 상응하는 단계에 따라 상이한 수준으로 분류될 수 있다.
- [0035] AKI는 다양한 파라미터에 따라 분류되는데 가장 일반적인 것은, 상기 질환 발생에서 후기에 나타나는 혈청 크레아티닌 (SCR) 및 이뇨 (D)를 측정하는 것인 바, 이에 AKI를 조기에 진단하지 못한다.
- [0036] **크레아티닌**
- [0037] 크레아티닌은 포스포크레아틴의 분해에 의해 근육 조직에서 형성되는 대사 부산물로서, 이는 여과를 거쳐서 신체로부터 사구체 수준으로 제거된다. 크레아티닌 총 생산율은 근육 질량, 근육 활성, 성별, 연령 및 총 단백질 소비량에 따라 달라질 것이다. 이러한 변수는 또한 크레아티닌 혈장 수준에도 영향을 미친다. 이러한 한계에도 불구하고, 혈청 크레아티닌 수준이 0.6-1.2 mg/dl를 초과할 경우, AKI를 진단하는 데 가장 많이 사용되는 방법이다.
- [0038] **크레아티닌 클리어런스**
- [0039] 크레아티닌 클리어런스는 일정 기간에 혈액으로부터 제거되는 크레아티닌의 양이다. 이 파라미터를 측정함으로써 사구체 여과율을 예측할 수 있다. 보통 크레아티닌 클리어런스 수준은 125-150 ml/min이고, 이는 여성에서 약간 더 낮게 나타난다.
- [0040] **감뇨증**
- [0041] 감뇨증이란, 400 ml가 정상 대사 상태에서 1일 생산된 용질을 제거하기 위해 방출되어야 하는 요의 최소량이라고 고려하면, 요 생산량이 1일당 400 ml 미만인 값으로 감소되는 것으로 정의된다.

- [0042] **요독증**
- [0043] 요독증은 혈중 요소 수준의 상승에 상응한다. 이 파라미터를 측정하는 것은 혈중 요소 질소 (BUN) 측정을 통해 이루어지는데, 그의 정상치는 8 내지 18 mg/dl이다.
- [0044] **위험 손상 부전 손실 말기 신장 질환 (RIFLE) 분류**
- [0045] RIFLE는 AKI의 상이한 단계: 위험, 손상, 부전, 손실, 말기 신장 질환을 분류하는 데 제안되는 도구이다. 이는 환자의 혈청 크레아티닌 (SCR) 및 이노 (D) 수준에 기초한다 (문헌 [Carrillo R., Castro J. "009. RIFLE scale. Journal of Mexican association of critic medicine and intensive therapy, 23(4):241-244]). 본 발명에서 사용되는 바, AKI1, AKI2, 및 AKI3은 각각 RIFLE의 단계 R, I 및 L에 상응한다.
- [0046] **호중구 젤라티나제-관련 리포칼린 (NGAL)**
- [0047] 케노믹스 및 테오믹스를 사용하여 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, 및 IL-18을 포함하는, 급성 신장 손상에 대한 잠재적 마커로서의 일련의 분자를 확인하였다.
- [0048] NGAL은 보통 저농도로 발현되고, 상피 손상의 경우 유의적으로 증가한다 (문헌 [Schmidt-Ott K.M., Mori K., Kalandadze A., Li J.Y., Paragas N., Nicholas T., Devarajan P., Barasch J. 2006, Curr Opin Nephrol Hypertens, 15:442-449]; [Cowland J.B., Borregaard N. 1997, Genomics, 45:17-23]).
- [0049] NGAL은 리포칼린 패밀리에 속하는 소형 단백질이다. 인간 NGAL은 이황화 브릿지를 가지며, 178개의 아미노산 잔기로 구성되고, 질량이 23 KDa이며, 그의 이량체 형태는 46 KDa인 것인, 단일 폴리펩티드 쇠이다 (문헌 [Kjeldsen L., Johnsen A.H., Sengelov H., Borregaard N. 1993, J Biol Chem, 268:10425-10432.]). 상기 단백질은 근위 세뇨관의 상피를 포함하는, 특정 상피의 호중구에서 발현된다. NGAL은 분비 단백질이며, β -병풍 구조를 통해 구조적으로 보존되는 그의 포켓 형태로 소형 소수성 분자에 결합할 수 있는 그의 능력을 특징으로 한다 (문헌 [Uttenthal L.O. 2005 Clin Lab, 29:39-41]).
- [0050] 이미 언급한 바와 같이, 조기에 신장 손상을 검출하는 것은 매우 어려운 일이다. NGAL은 부분적으로는 상기 문제에 관한 일반 장애를 극복하였고, 조기 진단이 가능하다는 것을 제시하였다 (문헌 [Zappitelli M., Washburn K.K., Arikian A.A., Loftis L., Ma Q., Devarajan P., Parikh C.R., Goldstein S.L. 2007 Crit Care, 11:R84.]).
- [0051] NGAL은 상응하는 대조군에서가 아닌, 급성 신장 손상을 앓는 환자에서 유의적으로 증가하였고, 이러한 증가는 크레아티닌이 증가하기 전, 처음 24 내지 48시간 이내에 이루어졌다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀졌다. 상기 마커는 혈장 및 요 둘 모두에서 사용되지만, 상이한 임상 분야에서의 완전한 평가를 여전히 필요로 한다 (문헌 [Mishra J., Dent C, Tarabishi R., Mitsnefes M.M., Ma Q., Kelly C, Ruff S.M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P. 2005, Lancet, 365:1231-1238]; [Devarajan P. 2007, Contrib Nephrol, 156:203-212]).
- [0052] 또한, 수술, 예컨대 성인에서 심폐 우회술 (문헌 [Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J.M., Sladen R.N., Lee H.T. 2006, Anesthesiology, 105:485-491]), 경피적 관상동맥 중재술 (문헌 [Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S. 2006, Am J Nephrol, 26:287-292]), 관상동맥 조영술 (문헌 [Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S. 2007, Nephrol Dial Transplant, 22:295-296.]), 및 또한 아동 심장 수술 (아동 관상동맥 우회술) (문헌 [Mishra J., Dent C, Tarabishi R., Mitsnefes M.M., Ma Q., Kelly C, Ruff S.M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P. 2005, Lancet, 365:1231-1238]) 이후, 요 중 상기 마커는 증가하는 것으로 나타났다.
- [0053] 현 연구 단계를 언급해 주는 것인, AKI의 마커로서 요 및 혈장 중의 NGAL을 측정하는 데 있어서의 한계는 NGAL이 여전히 적절한 신장 마커로서 평가되고 있다는 점이다. 추가로, NGAL이 전적으로 신장 기원일 경우, 상기 바이오마커는 구상될 수 있는 세관 세포의 신장 손상에 대한 최상의 마커 중 하나가 될 것이라고 분명하게 언급될 수 있다. 보다 중증인 신장 손상에서 요 중 NGAL은 정상 수준보다 10,000배 더 높은 농도로 증가된 것으로 나타났다. 혈장 중 최대 증가는 약 100배이다. 이로써 NGAL은 잠재적으로는 상이한 정도의 신손상에 대해 감도가 매우 큰 마커가 된다. 그러나, 상기 광범위한 동적 범위의 하단은 예컨대, 압 등의 질환에서 신장의 근원에 기인하는 NGAL 증가가 차지한다 (www.clionline.com). 본 발명자들의 혁신적인 접근법은 신장으로부터의 엑소솜, 특히 특이적 신장 구조로부터의 특이적 엑소솜 중의 NGAL의 분석 수단에 의해 AKI에 관한 조기의 비침습

성 진단을 확립시킴으로써 상기와 같은 의문을 처리하고자 한다.

[0054] 아쿠아포린 1 (AQP1)

[0055] 아쿠아포린 1 (AQP1)은 내재성 막 단백질이며, 인간 적혈구로부터 구조적으로 및 기능적으로 특징이 규명된 그 종류의 것 중 첫번째 것이었다. 상기 단백질은 사랑체 구조를 가지며, 각각의 그의 서브유닛은 그 자체의 관능성을 가진다 (문헌 [Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B., Agre P. 1993, J Biol Chem, 268:17-20.]). 중량은 28 kDa이고 (문헌 [Friedman M. 2008, Principles and models of biological transport, second edition, New York, USA: Springer]), 그의 발현 패턴은 조사되는 연령 및 조직 (신장, 폐, 뇌, 및 눈)에 따라 달라진다 (문헌 [Bondy C., Chin E., Smith B.L., Preston G.M., Agre P. 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90:4500-4504]).

[0056] 이 채널은 신장 근위 세뇨관에서, 헨레 루프(Henle's loop) 하행부 상피에서, 및 직행 혈관의 내피에서 강력하게 발현된다. 헨레 루프 하행부 중에 상기 단백질이 고농도 (총 단백질의 25%)라는 것은 신장 농축 기전에서의 필수 역할을 제안한다. 이는 AQP1 유전자 발현을 녹아웃시키고, 이로써 근위 세뇨관의 투수성이 감소됨에 따라 요를 농축시킬 수 없게 된 트랜스제닉 마우스를 생성한 연구에서 입증되었다 (문헌 [Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299]). 외관상 정상적인 3명의 비-AQP1 환자에 대한 보고에는 탈수와 같은 일부 스트레스에 대한 생리학적 반응 또는 유체 흡수에 대한 분석이 포함되어 있지 않은 바, AQP1 결핍과 연관된 비정상적인 표현형은 다른 포유동물 아쿠아포린이 중요한 생리학적 작용을 할 수 있을 것이라는 가능성을 증가시킨다 (문헌 [Preston G.M., Smith B.L., Zeidel M.L., Moulds J.J., Agre P. 1994, Science, 265:1585-1587]).

[0057] 아쿠아포린 2 (AQP2)

[0058] 아쿠아포린 2 (AQP2)는 수로용 채널로서의 역할을 하는 내재성 막 단백질이다. 이 채널은 바소프레신에 의해 조절되고, 신장의 연결 세뇨관 및 집합관의 첨단부 영역에 위치한다 (문헌 [Fushimi K., Uchida S., Hara Y., Hirata Y., Marumo F., Sasaki S. 1993, Nature, 361 :549-552]).

[0059] 트랜스제닉 마우스를 이용한 연구는 상기 단백질의 중요성 때문에 수행하였다. 집합관이 아닌, 연결 세뇨관에서 상기 아쿠아포린을 선택적으로 발현하도록 마우스를 변형시켰다. 또한, 상기 단백질이 완전하게 결핍된 마우스도 발생시켰다. 결핍 마우스는 출생 후 (5-12일 경과시) 사망한 반면, 오직 집합관에서의 발현만 차단시킨 마우스는 성체기까지 성장하였고, 이때, 체중 감소, 요 생산 10배 증가, 및 요 오스몰농도 감소를 보인 것으로 관찰되었다. 3시간 동안 물을 제공받지 못했을 때에도 요 오스몰농도에 유의적 변화는 없었으며, 이는 보상 기전이 존재하지 않음을 입증하는 것이다 (문헌 [Rojek A., Fuechtbauer E.M., Kwon T.H., Frøkiaer J., Nielsen S. 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:6037-6042]).

[0060] 바소프레신 부재하에서, 고장성은 10분 이내에 형질막 내의 AQP2의 축적을 유도한다. 이는 래트 신장의 집합관의 주세포 계내에서, 및 또한 수개의 신장 상피 세포주에서도 일어나는데, 이는 신장에 대한 스트레스가 있는 경우에서의 그의 중요성을 입증한다 (문헌 [Hasler U., Nunes P., Bouley R., Lu H.A., Matsuzaki T., Brown D. 2008, J Biol Chem, 283:26643-26661]).

[0061] 상기 단백질을 발현하는 유전자에 대한 열성 돌연변이 다수 (문헌 [Leduc-Nadeau A., Lussier Y., Arthus M.F., Lonergan M., Martinez-Aguayo A., Riveira-Munoz E., Devuyt O., Bissonnette P., Bichet DG. 2010, J Physiol, 588:2205-2218])와, 신원성 요붕증을 유발할 수 있는 우성 돌연변이도 존재한다는 것 또한 알려져 있다 (문헌 [Mulders S.M., Bichet D.G., Rijss J.P., Kamsteeg E.J., Arthus M.F., Lonergan M., Fujiwara M., Morgan K., Leijendekker R., Van der Sluijs P., Van Os C.H., Deen P.M. 1998, J Clin Invest, 102:57-66.]).

[0062] 아쿠아포린 3 (AQP3)

[0063] 아쿠아포린 3 (AQP3)은 중량이 30 kDa인 내재성 막 단백질이며 (문헌 [Wakayama Y., Jimi T., Inoue M., Kojima H., Shibuya S., Murahashi M., Hara H., Oniki H. 2002, Histochem J, 34:331-337]), 신장 집합관의 상피 세포의 기저측막에서 발현된다. 다른 아쿠아포린과 달리, 상기 단백질은 또한 글리세롤을 수송할 수 있다 (문헌 [Ma T., Frigeri A., Hasegawa H., Verkman A.S. 1994, J Biol Chem, 269:21845-21849.]).

[0064] 마우스에서 AQP3 유전자에 대한 발현을 녹아웃시킨 실험에서, 다뇨증, AQP2의 발현, 특히 신장 피질에서의 발현 감소, 및 요 오스몰농도 감소가 관찰된다. 이러한 변화가 AQP3에 원인이 있다는 것은 다른 아쿠아포린의 발

현을 노킹시킴으로써 추후에 입증되었다 (문헌 [Ma T., Song Y., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 97:4386-4391]).

- [0065] 신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 다른 단백질, 예컨대 헨레 루프의 NKCCC2, 및 근위 세뇨관의 NHE-3 및 NaPiIII도 확인되었다.
- [0066] **요 엑소좀**
- [0067] 마크 네퍼(Mark Knneper) 박사의 그룹은 건강한 인간의 요에서 수행되는 프로테옴 연구를 개발하였다. 분별 원심분리에 의해 수득된 세포 및 엑소좀 요 분획을 상기 연구를 통해 분석하였다 (문헌 [Knepper M.A., Pisitkun T., Shen R.F. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101 :13368-13373]). 엑소좀 분획은 신장 상피의 대표적인 단백질의 풍부한 공급원인 것으로 간주되는 바, 상기 분획은 특별한 관심은 받았다.
- [0068] 엑소좀은 침단부 막 단백질의 세포내이입으로부터 생산된다. 이후, 엔도솜은 다소포체 (MVB)와 융합하게 된다. 그 결과, 침단부 막 단백질은 MVB 외막에서 분리되고, 막의 함입에 의해 내재화된다. 마지막으로, MVB 외막은 침단부 막과 융합하게 되고, 이로써 엑소좀이라 불리는, 그의 내부 소포체가 요 공간으로 방출되는 것이다 (문헌 [Knepper M.A., Pisitkun T., Shen R.F. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:13368-13373]). 현재 요 엑소좀 중에서 확인되는 단백질은 형질막 단백질 (NKCC2, CD24 등), 세포질 단백질 (GAPDH 등) 및 핵 단백질 (AFT3 및 WT-1)에 상응한다 (문헌 [Zhou H., Cheruvanky A., Hu X., Matsumoto T., Hiramatsu N., Cho M.E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L.S., Illei G.G., Kopp J.B., Balow J.E., Austin H.A. 3rd, Yuen P.S., Star R.A. 2008, Kidney Int, 74:613-621]).
- [0069] **최근 동향**
- [0070] US2010203529에는 예를 들어, 질환의 병기 또는 진행 상태를 진단하는 데 바이오마커를 검출하기 위해 사용될 수 엑소좀이 기술되어 있고, 이와 함께 세포 기원의 바이오마커는 추가로 질환에 대한 치료 요법을 결정하고, 치료 효능을 확립하는 데에도 사용될 수 있다는 것 또한 기술되어 있다.
- [0071] EP2191276 문헌에는 유체로부터 엑소좀을 단리시킴으로써 수행되는 출생 전 진단 방법으로서, 여기서 엑소좀은 특이적 바이오마커, 특히 CD24에 의해 확인되는 것인 방법이 기술되어 있다.
- [0072] GB2463401에는 대상체로부터의 샘플 중 엑소좀의 바이오시그니처를 측정함으로써 표현형의 특징을 규명하고, 질환을 진단하는 방법이 기술되어 있다. 언급된 마커로는 miRNA 프로파일, 또는 CD63, CD9, CD81, B7H3, EpCam, PSCA, TNFR, MFG-E8, Rab, SETAP, PCMA 또는 5T4를 포함하는 항원을 포함한다. 추가로, 상기 방법은 생리학적 상태를 프로파일링하거나, 표현형을 측정하기 위해 엑소좀의 세포 기원을 측정하는 데 사용될 수 있다고 언급된다.
- [0073] WO2009115561에는 막 소포체 또는 엑소좀의 확인을 위한 폴리펩티드가 기술되어 있다. 추가로, 상기 발명은 병원체 또는 종양성 항원에 기인하는 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 면역원성 제제가 기술되어 있다.
- [0074] KR20070058441에는 면역억제 반응에서 사용하기 위한 방법 및 조성물이 기술되어 있다. 조성물은 면역억제 활성이 있는 엑소좀을 포함하며, 여기서 엑소좀은 상이한 세포 유형으로부터, 주로 면역계로부터 유래될 수 있다. 추가로, 엑소좀을 면역억제 활성을 증진시키는 분자에 노출시킬 수 있다. 엑소좀은 면역계 기능 장애와 연관된 질환 또는 장애 치료에 사용된다.
- [0075] US2007254351에는 C형 간염 바이러스로 감염된 개체로부터의 혈액 혈장으로부터 엑소좀을 분리하는 단계를 포함하는, 상기 바이러스를 단리시키는 방법이 기술되어 있다.
- [0076] AU2004203482에는 분자를 포함하는 막 소포체 (엑소좀)로서, 여기서 분자는 구조적적합성 복합체로부터의 것이고, 여기서 엑소좀은 면역원으로서, 또는 진단용으로 사용되는 것인 막 소포체가 기술되어 있다.
- [0077] US2004197314에는 주로 엑소좀의 합성 제조에서 관심을 받고 있는, 소포체 (엑소좀)의 막에서 폴리펩티드를 발현시키기 위한 조성물 및 방법이 기술되어 있다.
- [0078] CA2453198에는 암 환자의 생물학적 체액 중 면역억제 인자를 확인 및 정량하는 데 사용될 수 있는 엑소좀이 기술되어 있다. 이러한 엑소좀은 암 환자에 대한 예후 지표로서 단독으로, 또는 다른 면역학적 검정법과 함께 사용될 수 있다.
- [0079] EP1523990에는 종양 세포로부터 유래된 엑소좀이 기술되어 있다. 이러한 엑소좀은 종양 특이적 항원, 및 림프

구 자극을 위한 분자를 가진다.

- [0080] 조우(Zhou) 등은 (2006년) 동물 급성 신장 손상 모델로부터의 신장 기능 장애 및 구조 손상 마커를 보유하는 요 엑소솜을 기술하였다. 원심분리에 의해 엑소솜을 수득하고, 신장 손상 마커를 발현하였다 (문헌 [Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. Zhou H., Pititkun T., Apont A., Yuen P. S., Hoffert J.D., Yasuda H., Hu. X, Chawla L., Shen R-F., Knepper M.A., Star R., 2006, Kidney Int. 70(10):1847-1857]).
- [0081] 조우 등은 (2008년) 신장 손상 바이오마커가 풍부한 네프론 세그먼트로부터의 요 엑소솜을 기술하였다. 이들은 분별 원심분리에 의한 상기 엑소솜의 단리, 및 웨스턴 블롯팅에 의한 전사 인자에 관한 추가 검출을 기술하였다. 이들 마커는 엑소솜에서는 검출가능하였지만, 신질환을 앓는 대상체의 전체 요에서는 발견되지 않았고, 어떤 마커도 정상적인 건강한 개체에서는 발견되지 않았다는 것을 상기 문헌에서 살펴볼 수 있다 (문헌 [Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. Zhou H. Cheruvanky A., Hu X., Matsumoto T., Hiramatsu N., Cho M.E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L.S., Illei G.G., Kopp J.B., Balow J.E., Austin H.A. 3rd, Yuen P.S., Star R.A. 2008, Kidney Int. 74:613-621]).
- [0082] 데바라얀(Devarajan) (2007년)은 손상의 조기 검출 뿐만 아니라, 환자에서 신장 손상의 결과를 예측하기 위한 급성 신장 손상 (AKI) 마커의 패널을 제안하였다 (문헌 [Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. Devarajan P., Williams L.M. 2007, Semin. Nephrol. 27(6):637-651]).
- [0083] 록(Lock)은 (2010년) 신장 손상의 지표로서 사용될 수 있는 신장 마커를 리뷰하고, 신손상 또는 신장 손상의 사례에서 상향조절되는 유전자를 검출하는 마이크로어레이 기술의 용도에 집중하였다 (문헌 [Sensitive and early markers of renal injury: where are we and what is the way forward? Lock E. 2010, Toxicological Sciences 1(116):1-4]).
- [0084] 알바레즈(Alvarez) 등은 (2010년) NGAL이 신장 부전 마커로서 사용될 수 있고, 추가로 신장 이식 후의 회복 예측기로서도 사용될 수 있다고 회의에서 언급하였다 (문헌 [Pilot study for evaluating urinary exosomal fraction as kidney dysfunction biomarker in renal transplant. Alvarez s., Suazo C., Boltansky A., Urzu M., Carvajal D., Innocenti G., Vukusich A., Hurtado M., Campos D., Yen C., Villanueva S., Flores M., Marquez J., Rogello A., Irarrazabal C.E. 2010, VII Latin American Congress of Acute Kidney Injury: 29. Coquimbo-Chile]).
- [0085] 볼탕스키(Boltansky) 등은 (2010년) 신장 이식을 받은 경우에 기관 회복 예측기에 대한 잠재적인 바이오마커 지표로서의 NGAL을 기술하였다 (문헌 [NGAL in urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. Boltansky A., Alvarez S., Vukusich A., Hurtado M., Ursu M., Innocenti G., Carvajal D., Suazo C, Villanueva S., Carreno J., Altuzarra R., Yen C, Tapia D., Irarrazabal C.E. 2010, Renal Week, Denver, CO, J Am Soc Nephrol 21:959]).
- [0086] 당업계에서 발견되는 문헌들에서는 최근에 상이한 유형의 세포 (그중에서도 신손상을 보이는 신세포가 두드러진다)로부터 유래된 특이적 엑소솜으로부터의 전사 인자 및 바이오마커에 관해 설명 및 특징 규명하는데 집중적으로 노력하였다는 것을 볼 수 있다. 바이오마커 및 진단 방법과 함께, 엑소솜 단리를 기술하는 일련의 방법 또한 다뤄졌다. 상기 문헌들에는 엑소솜의 병리학적 마커로서의 용도를 제안 (US2010203529, GB2463401, 문헌 [Zhou H. et al., 2006], [Devarajan 2007], 및 [Lock 2010]) 및 특히, 급성 신손상 (문헌 [Zhou, H. et al., 2008], [Zhou H. et al., 2006], [Devarajan 2007], 및 [Lock 2010])에서의 것을 제안하고, 특정 마커, 예를 들어 KIM-1, NGAL, IL-8, 및 시스타틴의 용도를 언급하는, 본 발명과 유사한 연구가 기술되어 있다. 본 발명은 종래 분야와의 관련된 차이를 보인다. 특히, 문헌 [Zhou, H. et al., 2008]에는 항체, 예컨대 아쿠아포린-1, 아쿠아포린-2, 아쿠아포린-3 (AQP), NKCC2, NHE-3, 및 NaPiII 항체 (이를 통해 신손상을 더 우수하고 더 특이적으로 확인 및 진단할 수 있도록 허용하는 상기 분자 (AQP, NKCC2, NHE-3, NaPiII)를 함유하는 엑소솜을 면역정제할 수 있게 된다)의 용도가 기술되어 있지 않다. 문헌 [Zhou H. et al., 2006]에는 특이적인 면역침강도, 본 발명에서 사용되는 일부 엑소솜 마커도 기술되어 있지 않다. 2007년 데바라얀은 항-AQP, 항-NKCC2, 항-NHE-3, 및/또는 항-NaPiII의 사용에 기초한 특이적 신장 부위의 특이적 면역정제의 용도를 기술한 바 없다. 2010년 록은 특이적 면역정제를 기술하지 않았다.
- [0087] 알바레즈 등 (2010년) 및 볼탕스키 등 (2010년)은 신장 손상의 지표로서, 및 신장 이식을 받은 경우에 기관 회

복 예측기로서의 NGAL의 용도를 제안한 바 있지만, 그들 중 어느 누구도 상기 발명과는 대조적으로, 신장 손상 마커를 보다 정확하게 측정하기 위해서 엑소좀을 면역정제하는 단계에 관해서는 기술하지는 않았다.

[0088] 따라서, 종래 분야에는 본 발명의 신규성 또는 진보성에 영향을 미치는 충분한 배경기술이 기술되어 있지 않다. 본 발명은 AQP-1, AQP-2, AQP-3 (AQP), NKCC2, NHE-3, 및/또는 NaPiIII를 함유하는 엑소좀의 면역정제에 기초한다.

[0089] 추가로, 본 출원의 실시예는 본 방법이 환자에서 신손상을 측정하는 데 정확하다는 것을 보여준다.

발명의 내용

[0090] **본 발명의 개요**

[0091] 본 발명은 a) 요 샘플을 제공하는 단계; b) 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 요 샘플에 존재하는 엑소좀을 농축시키는 단계; 및 c) 엑소좀 중의 급성 신장 손상 (AKI) 마커를 검출하는 단계를 포함하는, 급성 신장 손상을 조기에 모니터링, 진단 및/또는 예후하고, 그를 앓는 대상체에서 치료법을 결정하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0092] 본 발명은 대상체에서 AKI의 발병을 간단하게 조기에 측정하기 위해 특이적인 신장 손상 마커의 존재 및/또는 수준을 측정하기 위한 진단용 키트로서, 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단 및 병태의 사전결정된 신장 손상 마커를 검출하기 위한 수단을 포함하는 진단용 키트를 추가로 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] **본 발명의 상세한 설명**

[0094] 본 발명은 a) 요 샘플을 제공하는 단계; b) 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 요 샘플에 존재하는 엑소좀을 농축시키는 단계; 및 c) 엑소좀 중의 급성 신장 손상 (AKI) 마커를 검출하는 단계를 포함하는, 급성 신장 손상을 조기에 모니터링, 진단 및/또는 예후하고, 그를 앓는 대상체에서 치료법을 결정하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0095] 한 실시양태에서, 요 샘플은 카테터를 삽입 받은 환자의 경우, 아침 첫 배뇨로부터, 및 다른 환자의 경우에는 두번째 배뇨로부터 획득되고, 이는 분석시까지 -80°C 에서 유지된다.

[0096] 본 발명은 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단을 고려한다. 특히, 신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 특정 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체를 사용함으로써 엑소좀을 농축시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체, 및 항체가 엑소좀의 외부 표면에 존재하는 단백질의 상기 도메인과 상호작용할 수 있도록 하는 적합한 완충제를 고려한다.

[0097] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 면역정제 이전에 엑소좀의 농축을 위한 1개 이상의 추가 수단을 포함할 수 있다.

[0098] 또한 본 발명에서 고려되는 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단은 추후 검출 단계에서 개입할 수 있는, 보다 큰 요소를 요 샘플로부터 분리시키는 데 유용한 실험실용 방법 및 장치이다. 예를 들어, 방해 요소는 환자로부터의 세포일 수 있다. 실험실 원심분리 프로세스를 통해 엑소좀을 농축시킬 수 있고, 보다 큰 입자, 예컨대 세포를 제거할 수 있기 때문에, 원심분리 튜브가 농축 수단인 것으로 간주될 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플을 5,000 내지 10,000 rpm으로 5 내지 30분 동안 원심분리시킨다. 또 다른 실시양태에서, 샘플을 30,000 내지 45,000 rpm으로 30 내지 120분 동안 초원심분리시킨다.

[0099] 마이크로여과로 엑소좀을 마이크로필터를 통해 통과시킴으로써 요 샘플에서 엑소좀을 농축시킬 수 있기 때문에, 0.22 마이크로미터 이하의 마이크로필터 카트리지, 마이크로필터 칼럼, 또는 다른 마이크로필터 매체 또한 엑소좀 농축 수단인 것으로 간주된다.

[0100] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 사전결정된 신장 손상 마커를 검출 및/또는 정량하기 위한 수단으로서, 사전결정된 신장 손상 마커에 대한 1차 항체, 및 1차 항체에 대한 것으로서, 표지와 접합된 2차 항체를 고려한다. 2차 항체의 표지는 형광 마커, 효소, 방사성 마커, 화학 화합물, 적외선 화합물일 수 있다.

- [0101] 임의로, 1차 항체는 표지와 직접적으로 접합될 수 있는데, 이러한 경우, 2차 항체는 필요 없다. 1차 항체는 또한 형광 마커, 효소, 방사성 마커, 화학 화합물, 적외선 화합물과 접합될 수 있다.
- [0102] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 것은, 비제한적으로 항-아쿠아포린-1 (항-AQP-1), 항-아쿠아포린-2 (항-AQP-2), 항-아쿠아포린-3 (항-AQP-3), 항-NKCC2, 항-NHE-3 및/또는 항-NaPiII 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 항체를 이용함으로써 수행된다.
- [0103] 한 실시양태에서, 특이적 신장 손상 마커는, 비제한적으로 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, 및/또는 IL-18, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0104] 바람직한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 것은 항-AQP1, 항-AQP2, 항-AQP3, 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPiII, 또는 이들의 조합의 임의의 도메인에 대한 항체를 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단으로서 이용함으로써 수행된다.
- [0105] 추가의 바람직한 실시양태에서, 특이적 신장 손상 마커는 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0106] 더욱 바람직한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 NGAL 및/또는 시스타틴-3이고, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 NGAL이고, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 KIM-1, IL-1베타 및/또는 시스타틴-3이다.
- [0107] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0108] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 원위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0109] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 집합관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0110] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NKCC2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 헨레 루프로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0111] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NHE-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0112] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NaPiII가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0113] 본 방법은 임의로 특이적 신장 손상 마커의 존재 및/또는 수준에 기초하여 대상체에서 모니터링, 진단, 예후하고/거나 치료법을 결정하기 위해 대상체에서 급성 신장 손상을 평가하는 단계를 포함한다.
- [0114] 본 발명은 대상체에서 AKI의 발병을 간단하게 조기에 측정하기 위해 특이적 신장 손상 마커의 존재 및/또는 수준을 측정하기 위한 진단용 키트로서, 하나 이상의 면역정제 단계를 이용하여 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단 및 병태의 사전결정된 신장 손상 마커를 검출하기 위한 수단을 포함하는 진단용 키트를 추가로 포함한다.
- [0115] 임의로, 진단용 키트는 환자로부터 요 샘플을 수득하기 위한 수단을 포함한다. 특정 실시양태에서, 요 샘플을 수득하기 위한 수단은 환자가 본인 스스로 요 샘플을 제공할 수 없는 경우, 요 프로브; 또는 환자로부터 요 샘플을 수용하기 위한 용기 중에서 선택된다.
- [0116] 본 발명은 하나 이상의 면역정제 단계를 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단으로서 고려한다. 특히,

신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 특정 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체를 사용함으로써 엑소좀을 농축시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 키트는 신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체, 및 항체가 엑소좀의 외부 표면에 존재하는 단백질의 상기 도메인과 상호작용할 수 있도록 하는 적합한 완충제를 고려한다. 키트는 또한 차단체 또는 차단액, 및 특이적 신장 손상 마커의 스톱 용액을 포함한다.

- [0117] 한 실시양태에서, 키트는 엑소좀이 농축될 수 있도록 허용하는, 신장의 특이적 구조에서 바람직하게 및 차별적으로 발현되는 특정 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체로 웰이 피복된, 96웰 플레이트를 포함한다.
- [0118] 한 실시양태에서, 본 발명의 키트는 면역정제 이전에 엑소좀의 농축을 위한 1개 이상의 추가 수단을 포함할 수 있다.
- [0119] 본 발명에서 고려되는 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단은 추후 검출 단계에서 개입할 수 있는, 보다 큰 요소를 요 샘플로부터 분리시키는 데 유용한 실험실용 방법 및 장치이다. 예를 들어, 방해 요소는 환자로부터의 세포일 수 있다. 실험실 원심분리 프로세싱을 통해 엑소좀을 농축시킬 수 있고, 보다 큰 입자, 예컨대 세포를 제거할 수 있기 때문에, 원심분리 튜브가 농축 수단인 것으로 간주될 수 있다. 마이크로여과로 엑소좀을 마이크로필터를 통해 통과시킴으로써 요 샘플에서 엑소좀을 농축시킬 수 있기 때문에, 0.22 마이크로미터 이하의 마이크로필터 카트리지를, 마이크로필터 칼럼, 또는 다른 마이크로필터 매체 또한 엑소좀 농축 수단인 것으로 간주된다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 키트는 사전결정된 신장 손상 마커를 검출 및/또는 정량하기 위한 수단으로서, 사전결정된 신장 손상 마커에 대한 1차 항체, 및 1차 항체에 대한 것으로서, 표지와 접합된 2차 항체를 고려한다. 2차 항체의 표지는 형광 마커, 효소, 방사성 마커, 화학 화합물, 적외선 화합물일 수 있다.
- [0121] 임의로, 1차 항체는 표지와 직접적으로 접합될 수 있는데, 이러한 경우, 2차 항체는 필요 없다. 1차 항체는 또한 형광 마커, 효소, 방사성 마커, 화학 화합물, 적외선 화합물과 접합될 수 있다.
- [0122] 한 실시양태에서, 키트는, 비제한적으로 항-아쿠아포린-1 (항-AQP-1), 항-아쿠아포린-2 (항-AQP-2), 항-아쿠아포린-3 (항-AQP-3), 항-NKCC2, 항-NHE-3 및/또는 항-NaPiIII 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 항체를 포함한다.
- [0123] 한 실시양태에서, 키트는, 비제한적으로 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, 및/또는 IL-18, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 마커를 검출하기 위한 것으로서, 표지와 접합되거나 또는 접합되지 않은 1차 항체를 포함한다.
- [0124] 바람직한 실시양태에서, 키트는 농축 방법으로서 면역정제를 사용할 경우, 항-AQP1, 항-AQP2, 항-AQP3, 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPiII, 또는 이들의 조합의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체를 요 샘플에서 엑소좀을 농축시키기 위한 수단으로서 포함한다.
- [0125] 추가의 바람직한 실시양태에서, 키트는 NGAL, 시스타틴-3, KIM-1, IL-1베타, IL-18을 검출하기 위한 것으로서, 표지와 접합되거나 또는 접합되지 않은 1차 항체를 포함한다.
- [0126] 더욱 바람직한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 NGAL 및/또는 시스타틴-3이고, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 NGAL이고, 특이적 신장 구조로부터 특이적 엑소좀 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 그의 존재 및/또는 수준에 대하여 측정되는 신장 손상 마커는 KIM-1, IL-1베타 및/또는 시스타틴-3이다.
- [0127] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0128] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 원위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.

- [0129] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 집합관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0130] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NKCC2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 헨레 루프로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0131] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NHE-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0132] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NaPiIII가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0133] 본 발명의 키트는 임의로 키트 사용 지침서를 포함한다.
- [0134] 본 발명의 방법 및 키트는 요 엑소좀을 면역정제하는 단계를 포함한다. 그러므로, 본 발명은 또한 요 엑소좀을 면역정제하는 방법, 및 요 엑소좀을 정제하기 위한 항체의 용도도 기술한다.
- [0135] 본 발명은 (a) 요 샘플 또는 임의로 탈세포화된 요 샘플을, 상이한 신장 구조의 표면에서 바람직하게 및 차별적으로 발견되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체와 함께 인큐베이션시켜 엑소좀-항체 복합체를 형성하는 단계; (b) (a)로부터 생성된 엑소좀-항체 복합체를, 항체의 임의의 영역을 인식하고 불용성 작용제에 결합하는 태그와 함께 인큐베이션시켜 엑소좀-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 형성하는 단계; (c) 상청액으로부터 엑소좀-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 분리하는 단계; 및 (d) 엑소좀-항체-태그-불용성 작용제 복합체를 적절한 완충제로 세척하는 단계를 포함하는, 요 엑소좀을 정제하는 방법을 기술한다.
- [0136] 한 실시양태에서 요 샘플 또는 탈세포화된 요 샘플을 실온하에 20 내지 60분 동안 적절한 완충제 중에서 항체와 함께 인큐베이션시킨다.
- [0137] 한 실시양태에서, 요 엑소좀 정제 방법에 사용되는 항체는, 비제한적으로 항-아쿠아포린-1 (항-AQP-1), 항-아쿠아포린-2 (항-AQP-2), 항-아쿠아포린-3 (항-AQP-3), 항-NKCC2, 항-NHE-3 및/또는 항-NaPiII 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0138] 바람직한 실시양태에서, 요 엑소좀 정제 방법에 사용되는 항체는 항-AQP1, 항-AQP2, 항-AQP3, 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPiII, 또는 이들의 조합의 임의의 도메인에 대한 것이다.
- [0139] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0140] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 원위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0141] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 집합관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0142] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NKCC2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 헨레 루프로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0143] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NHE-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0144] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NaPiIII가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0145] 한 실시양태에서, 항체의 임의의 영역을 인식하는 태그는 아가로스 또는 세파로스 비드에 결합된, 단백질 A 또는 단백질 G 또는 이들의 분획이다.

- [0146] 또 다른 실시양태에서, 태그는 비오틴 또는 그의 분획이고, 항체에 결합된 것이다. 따라서, 복합체 엑소좀-항체-비오틴이 형성된다. 상기 실시양태에서, 불용성 작용제는 비오틴 또는 그의 분획에 대하여 친화성을 가진 화합물, 예컨대 비제한적으로 항체에 결합된 자기 비드이다. 따라서, 자기 비드를 첨가하면, 복합체 엑소좀-항체-비오틴-비오틴에 대하여 친화성을 가진 화합물-자기 비드가 형성되고, 이어서 이는 다음 단계에서 분리된다.
- [0147] 한 실시양태에서, 상청액으로부터 엑소좀-항체-태그-불용성 작용제를 분리시키는 것은 원심분리 또는 침강에 의해 수행된다.
- [0148] 본 발명은 또한 요 엑소좀을 면역정제하기 위한, 상이한 신장 구조의 표면에서 바람직하게 및 차별적으로 발견되는 단백질의 세포내, 세포외 또는 임의의 도메인에 대한 항체 또는 항체 조합의 용도를 개시한다.
- [0149] 한 실시양태에서, 요 엑소좀의 면역정제에 사용되는 항체는, 비제한적으로 항-아쿠아포린-1 (항-AQP-1), 항-아쿠아포린-2 (항-AQP-2), 항-아쿠아포린-3 (항-AQP-3), 항-NKCC2, 항-NHE-3 및/또는 항-NaPiII 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0150] 바람직한 실시양태에서, 요 엑소좀의 면역정제에 사용되는 항체는 항-AQP1, 항-AQP2, 항-AQP3, 항-NKCC2, 항-NHE-3, 항-NaPiII, 또는 이들의 조합의 임의의 도메인에 대한 것이다.
- [0151] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-1이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0152] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 원위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0153] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-AQP-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 집합관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0154] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NKCC2가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 헨레 루프로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0155] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NHE-3이 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0156] 한 실시양태에서, 특이적 신장 구조로부터 요 엑소좀 특이적 분획을 면역정제하는 데 항-NaPiII가 사용될 경우, 엑소좀 분획은 근위 세뇨관으로부터 유래된 것이고, 특이적 마커의 존재 및/또는 수준이 상기 구조 중의 손상을 시사한다.
- [0157] 본 발명의 방법 및 키트는 지금까지 적용된 표준 방법에서는 불가능한, 신장 손상 마커를 특이적으로 간단하게 조기에 검출할 수 있다는 이점을 가지고 있다. 본 발명의 방법 및 키트는 또한 신장의 특이적 구조에 존재하는 특이적 단백질에 대한 특이적 항체를 사용하기 때문에, 신장에서 손상된 특이적 구조를 확인할 수 있다는 이점을 제공한다.
- [0158] 본 발명의 방법 및 키트는 임의의 대상체에서 모니터링, 진단, 예후하는 데, 및/또는 치료법을 결정하는 데 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 방법 및 키트는 신장 이식과 연관된 허혈증-재관류 과정에 기인하여 상기 이식을 받은 환자에서 신손상의 발병을 모니터링하는 데 유용하다. 본 발명의 방법 및 키트는 또한 AKI가 발병될 수 있고 조기 검출을 필요로 하는 중환자실 (ICU) 환자에서 모니터링, 진단, 예후하는 데, 및/또는 치료법을 결정하는 데 유용하다.
- [0159] **도면 설명**
- [0160] 도 1은 이식 후 1, 2, 3, 및 4일째 신장 이식 환자의 요 샘플로부터의 세포 분획 및 엑소좀 분획 중 NGAL의 존재를 비교하는 대표적인 웨스턴 블롯이다.
- [0161] 도 2는 이식 후 1일째 환자로부터의 전체 요 (U) 및 엑소좀 분획 (E) 중 NGAL-24 및 NGAL-46의 존재를 보여주는

대표적인 웨스턴 블롯이다.

- [0162] 도 3은 이식 후 1일째 환자 요의 전체 엑소좀 분획 중 NGAL을 그래프로 나타낸 것이다 (AU= 임의 단위).
- [0163] 도 4는 NGAL-46과 AQP 1, 2, 및 3 사이의 관계를 나타낸 것이다 (* p<0.05, n=5) (AU= 임의 단위).
- [0164] 도 5는 신장 이식을 받은 개체에서 SCR 및 NGAL의 두 수준 사이의 비교 분석을 나타낸 것이다.
- [0165] 도 6은 AKI1 (5명의 환자), AKI2 (3명의 환자), 및 AKI3 (5명의 환자)으로 분류된 ICU 환자에서 엑소좀 무함유 요 (흰색 막대, EF-U) 및 전체 엑소좀 분획 (검은색 막대, TE) 중 NGAL의 상대적 존재비 (임의 단위)를 나타낸 것이다.
- [0166] 도 7은 AKI1 (5명의 환자), AKI2 (3명의 환자), 및 AKI3 (5명의 환자)으로 분류된 ICU 환자에서 NGAL 존재 (임의 단위)의 TE/EF-U 비를 나타낸 것이다.
- [0167] 도 8은 AKI1 (5명의 환자)로 분류된 ICU 환자에서 엑소좀 무함유 요 (EF-U), 전체 엑소좀 (TE) 및 면역정제된 엑소좀 (IP-E) 중 NGAL의 상대적 존재비를 나타낸 것이다.
- [0168] **실험부**
- [0169] 본 실험부에서는 예시적인 실시예를 가이드선로서 제공하며, 따라서 본 실시예에는 어느 방식으로든 제한적인 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0170] **본 출원의 실시예**
- [0171] 신장 이식을 받은 12명의 인간 환자군에서 신손상 또는 신장 손상을 측정하는 연구, 및 ICU에 입원한 28명의 개체로 이루어진 것으로서, 여기서 46% (28명 중 13명)에서는 RIFLE 분류에 따른 AKI가 발병된 것인 연구에 기초하여 본 발명의 실시양태 중 일부를 하기 기술한다.
- [0172] **실시예 1: 연구 중인 군에 관한 설명**
- [0173] 대조군으로서의 역할을 하는 건강한 개체와 함께, 12명의 인간 환자군을 분석함으로써 본 발명의 방법 및 생성물을 시험하였다. 건강한 대조군에 대해 사용된 포함 기준은 신장에 관한 종합적 증상 부재였고, 환자에 대한 포함 기준은 본 연구 지속 기간 동안 신장 이식을 받은 모든 개체였다. 환자는 사전 동의 승인을 고려하여 등록하였다.
- [0174] **실시예 2: 요 샘플링**
- [0175] 연구 중에 있는 각 개체로부터 50 ml의 요 카테터를 삽입 받은 표본을 수득하였다. 숙달된 간호사가 아침 첫 배뇨로부터 샘플을 채취하였다. 이식받은 개체인 경우에는, 이식 전달 샘플을 수득하고, 수술 후 다음 3일 동안 1일 1회에 걸쳐 3개의 샘플을 수득하였는데, 그 중 수술 후 첫번째 샘플을 분석을 위해 선택하였다. 웨스턴 블롯 분석시까지 샘플을 -80°C에서 유지시켰다.
- [0176] **실시예 3: 요 엑소좀 제조**
- [0177] 상이한 2가지 접근법을 고려하여 엑소좀을 수득하였다. 첫번째 접근법은 제1 단계에서 원심분리를 사용하고, 제2 단계에서는 초원심분리를 사용하는 2개의 단계로 이루어진 원심 분리에 상응하였다. 본 발명의 주요 특징인 두번째 방법은 제1 단계 원심분리, 및 제2 단계 면역정제를 고려하였다.
- [0178] 2개의 원심분리 단계를 포함하는 첫번째 방법에서, 10 ml의 요 샘플을 채취하고, 여기에 프로테아제 억제제 정제 (컴플리트 미니(Complete Mini) 프로테아제 억제제 각테일 정제, 로슈(Roche))를 첨가하였다. -80°C에서 보관되었던 세포 내용물을 분리하기 위해 4°C에서 15분 동안 17,000 g으로 제1 원심분리를 수행하여 제1 상청액 분획 (S1)을 수득하였다. S1의 제1 분획을 1시간 동안 38,000 rpm으로 추가로 초원심분리함에 따라, 이로써 제2 상청액 분획 (S2) 및 침전물 (전체 엑소좀)이 생성되었다.
- [0179] 제1 단계는 원심분리이고, 제2 단계는 면역정제인 것으로 고려되는 경우, 신장의 상이한 영역으로부터 엑소좀을 수득하기 위하여 AQP1, AQP2, 또는 AQP3 항체를 사용하여 엑소좀을 면역정제하기 위해, 2개의 원심분리 단계를 포함하는 방법에 대한 제1 단계에서 기술된 바와 같이 수득된 S1의 분획을 사용하였다. 각 샘플의 총 단백질 100 µg씩을 겔에 로딩하기 위하여 샘플을 로딩 완충제 (100 mM 트리스-HCl (pH 6.8), 200 mM 디티오프레이틀 (DTT), 4% SDS, 0.2% 브로모페놀 블루, 20% 글리세린) 중에 재현탁시켰다.
- [0180] **실시예 4: 웨스턴 블롯 분석**

- [0181] 웨스턴 블롯을 통해 특이적 항체를 사용함으로써 단백질의 존재를 확인할 수 있었다. 100 V에서 90분 동안 7.5% 및 12% 아크릴아미드 겔 (SDS-PAGE) 중에서의 전기영동을 사용하여 단백질을 그의 크기에 따라 분리하였다. 일단 분리되고 나면, 모든 단백질을 300 mA에서 90분 동안 니트로셀룰로스 막으로 옮겨 놓았다. 상기 공정을 수행한 후, 교반시키면서 4℃에서 밤새도록 수행되는 1차 항-AQP1 (산타 크루즈 바이오테크놀로지 (Santa Cruz Biotechnology)), 항-AQP2 (산타 크루즈 바이오테크놀로지), 항-AQP3 (산타 크루즈 바이오테크놀로지), 또는 항-NGAL (R&D 시스템즈(R&D Systems)) 1차 항체와의 후속 인큐베이션을 위해, 1시간 동안 일정하게 교반시키면서 5% 탈지유로 막을 차단시켰다. 일단 인큐베이션이 종료되고 나면, 막을 1% PBS-트윈(Tween) 20 (윈클러(Winkler))으로 3회에 걸쳐 세척하고, 교반시키면서 실온에서 2시간 동안 2차 항체와의 인큐베이션을 진행시켰다. 마지막으로, 추가 프로세싱을 위해 막을 PBS-트윈 20 1%로 3회에 걸쳐 세척하였다.
- [0182] 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) CS4 소프트웨어를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 수득된 밴드의 농도 측정 측정을 사용함으로써 반정량적 분석에 의해 단백질의 존재를 확인하였으며, 측정을 표준화하기 위해 각 밴드에 대해 2개의 측정값 (모든 샘플에 대하여 총 밴드 및 고정 크기 밴드)을 수득하였다.
- [0183] **단백질 측정**
- [0184] 상업적으로 이용가능한 키트 (BCA 프로테인 어세이 리에이전트(BCA Protein Assay Reagent), 피어스(Pierce))를 이용하여 두 세포 분획 모두에서 총 단백질 농도를 측정하였다.
- [0185] **통계학적 분석**
- [0186] 통계학적 모델 ANOVA를 사용하여 기술 및 연합 연구를 수행하였다. 유의차를 p 값 ≤ 0.05 인 것으로 감안하여, WINKS SDA 6.0 소프트웨어를 사용함으로써 분석을 수행하였다.
- [0187] **실시예 5: 본 발명의 방법에 따른 분석 결과**
- [0188] **군 연구의 특징**
- [0189] 본 연구에서는 신장 이식을 받은 12명의 환자를 고려하였다.
- [0190] 환자 연령은 15 내지 60세 범위였고, 환자 대부분 (12명 중 7명)은 40 내지 60세였다. 환자 대부분은 남성이었다 (91.6%). 25%는 사체 기증자로부터의 기관을 받았고, 75%는 살아있는 기증자로부터 받았다 (하기 표 4).
- [0191] 혈청 크레아티닌은 이식된 기관의 생존력을 시험하는 데 있어 중요한 파라미터이다. 이식 후 1일째, 모든 환자의 혈청 크레아티닌 값은 정상치보다 높았으며 (0.8 대 1.4 mg/dl), 이는 사체 기증자로부터의 기관을 받은 환자의 값이 더 높은 것으로 나타났다 (표 4).
- [0192] 고려되는 다른 파라미터는 이식 이전에 기관이 겪은 허혈 시간이었다. 시간 범위는 27 내지 1,182분이었고, 일반적으로는 살아있는 기증자로부터의 기관을 받은 환자로부터의 시간이 27 내지 360분인 것과 비교하였을 때, 사체 기증자로부터의 기관을 받은 환자인 경우, 그 시간은 범위가 300 내지 1,182분인 것으로 더 높았다 (표 4).

표 4

연구 중인 환자에 관한 정보

환자 번호	연령 (세)	성별	기증자 유형	+ 1일째 SCR (mg/dl)	허혈 시간 (분)
1	60	M	CD	12.5	1182
2	57	M	LD	7.4	27
3	16	M	CD	6.1	300
4	34	M	LD	4.8	120
5	15	F	LD	2.3	N/A
6	27	M	LD	4.7	90
7	42	M	LD	9.3	360
8	46	M	LD	2.7	N/A
9	46	M	LD	6.1	N/A
10	55	M	LD	5.5	120
11	28	M	LD	2.8	60
12	42	M	CD	9.0	720

성별: M=남성, F=여성; 기증자 유형 CD= 사체 기증자, LD= 살아있는 기증자; +1일째 SCR = 이식 후 1일째 혈청 크레아티닌; 허혈 시간: N/A= 이용가능한 데이터 없음.

[0193]

[0194] **신부전 바이오마커 분석**

[0195] 본 발명자들의 연구팀에 의해 수득된 이전 결과, 및 본 연구로부터 얻은 결과를 통해 건강한 개체에서 요의 세포 분획 중 또는 엑소좀 분획 중에는 검출가능한 수준의 바이오마커가 없는 것으로 나타났다 (문헌 [Flores M., Marquez S. 2009, Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile]). 또한, 엑소좀 분획 중 바이오마커 발현 수준이 세포 분획에서 발견된 것보다 더 높았다 (도 1). 추가로, 이식 후 1일째 연구 중인 바이오마커가 더 높은 수준으로 발현되었다 (도 1). 마지막으로, 웨스턴 블롯을 이용함으로써 2가지 NGAL 이소형, 23 kDa인 NGAL-23과 46 kDa인 NGAL-46을 검출할 수 있었다. 따라서, 본 연구는 이식 후 1일째 수집된 요 샘플의 엑소좀 분획으로부터의 바이오마커의 프로파일을 측정하는 데 중점을 두었다.

[0196] **NGAL**

[0197] 본 연구에 포함된 12명의 환자에서 웨스턴 블롯 기법을 이용함으로써 이식 후 1일째부터 전체 요 엑소좀으로부터의 모든 NGAL 이소형 (NGAL-23 및 NGAL-46) 존재에 관해 분석하여, 상기 환자 중 11명에 대한 정보를 수득할 수 있었다. 상기 결과를 통해 보면, NGAL이 거의 모든 경우에서 발현된 것으로 나타났다. 발현 범위는 7.3 내지 170.3 AU였고, 즉, 양 극단 경우 사이에 나타나는 차이는 약 20배 정도였다 (도 3).

[0198] NGAL-46 및 NGAL-24를 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 사용하였을 때, 상기 두 마커는 모두 단지 요 엑소좀 분획에서만 발현된 반면, 상청액은 오직 비-특이적인 밴드만을 나타내었다 (도 2).

[0199] 11명의 환자로부터, 더 높은 NGAL 값을 가지는 환자는 환자 5 및 7이었으며, 그 값은 각각 170.3 및 83.8 AU였다.

- [0200] 최저 수준은 환자 10의 경우, 12.6 AU이고, 환자 2의 경우, 7.9 AU인 것으로 나타났다.
- [0201] **면역정제된 엑소솜에서의 바이오마커 발현**
- [0202] 2004년 피짓쿤(Pisitkun) (문헌 [Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:13368-13373])은 정상적인 환자로부터의 요 엑소솜 중에 아쿠아포린 (AQP)이 존재한다고 기술하였다. 따라서, 본 연구는 신장 이식을 받은 환자로부터의 면역정제된 엑소솜 중에서의 AQP (AQP1, AQP2, AQP3) 발현을 찾았다. 각각의 상기 성분들을 선택한 것은 그의 발현이 네프론의 특이적 영역과 관련이 있기 때문이다. AQP1은 보통 근위 세뇨관과 관련이 있고 (문헌 [Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12]), AQP2는 원위 세뇨관 및 집합관과 관련이 있으며 (문헌 [Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299]), AQP3은 네프론으로부터의 집합관과 관련이 있다 (문헌 [Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F. 1998, Annu Rev Physiol, 60:199-220]).
- [0203] 본 분석을 통해 특정 유형의 엑소솜 중에 존재하는 각 바이오마커의 존재를 측정할 수 있다. 따라서, 접근법은 분석되는 신손상의 바이오마커의 잠재적 기원 사이의 관계를 확립하고자 하는 것이다.
- [0204] **NGAL-46**
- [0205] 도 4는 양성인 정보를 가지는 환자의 요 엑소솜 중의 AQP 수준에 의해 NGAL-46 이소형을 정규화한 것을 보여주는 것이다. NGAL-46의 발현이 NGAL-23보다 높기 때문에 (도 1), NGAL-46을 선택하였다.
- [0206] AQP1의 존재와 관련하여 NGAL 존재는 다른 AQP보다 통계학상 더 높았다는 결과가 나왔다 (도 4, $p < 0.05$). 이러한 결과는 AQP1을 함유하는 엑소솜의 존재가 NGAL의 존재보다 더 높다는 것을 제안한다 (도 4). 이러한 결과에 기초하여, AQP1이 우선적으로, 즉, 집합관의 근위 영역에서 발현되는 경우, NGAL-46은 주로 신장 영역과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0207] **혈청 크레아티닌 수준과 NGAL과의 비교**
- [0208] NGAL 및 혈청 크레아티닌 (SCR) 수준 비교 결과는 SCR 수준이 3 mg/dl보다 낮은 개체 (환자 5, 8, 및 11), 또는 6 mg/dl보다 높은 개체 (환자 1, 2, 3, 7, 9, 및 12)는 NGAL과는 상관 관계가 없다는 것을 나타낸다 (도 5).
- [0209] 본 데이터는 사구체 여과의 마커 (SCR)가 신손상 마커 (NGAL)와는 상관 관계가 없다는 것을 제안한다.
- [0210] **논의**
- [0211] **신손상 바이오마커 분석**
- [0212] **NGAL**
- [0213] 플로레스(Flores)와 마르케스(Marquez) (2009년) (문헌 [Flores M., Marquez S. 2009, Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile])는 건강한 개체로부터의 요의 엑소솜 분획 중에는 검출가능한 수준의 NGAL이 없다고 밝혔다. 그의 정보가 이용가능한, 본 연구의 환자 중 11명의 환자에서는 NGAL이 신장 이식을 받은 환자의 요 엑소솜 100%에서 검출되었지만, 요의 세포 분획을 함유하지 않는 상청액 중에서는 검출되지 않았다는 것으로 나타났다. 발현 수준은 7.9 내지 170.3 AU였고, 양 극단 개별치 사이에는 22배 초과 차이가 있었다. 따라서, 본 데이터는 분석된 분획이 전체 요보다 더 대표적이기 때문에, 요 엑소솜 중 NGAL을 검출하는 것이 신손상에 대한 탁월한 바이오마커를 구성한다는 것을 제안한다.
- [0214] **NGAL과 기증자 유형 사이의 관계**
- [0215] 이식받은 기관의 품질은 사체 기증자와 비교하여 기증자가 살아있는 경우에 더 우수한 것으로 알려져 있는데, 이는 신손상 마커의 더 낮은 발현으로서 반영되어야 한다. 이러한 유형의 거동은 환자 2, 6, 9, 및 10에서 나타났다. 여기서 NGAL 수준은 더 낮았고, 또한 살아있는 기증자로부터 이식 기관을 받은 경우였다. 같은 맥락으로, 환자 1은 보다 높은 수준의 NGAL을 나타내었고, 이 환자는 사체 기증자로부터의 이식을 받았다는 이유로 설명이 가능할 수 있었다. 그럼에도 불구하고, 이러한 NGAL 발현 패턴은 환자 3에서는 나타나지 않았는데, 이 환자는 사체 기증자로부터의 이식을 받았고 중간 수준의 NGAL을 나타내었으므로, 따라서 이는 기관의 품질로서 해석될 수 있었다.
- [0216] 환자 5 및 7은 비록 살아있는 기증자로부터 신장을 받기는 하였지만, 보다 높은 수준으로 NGAL을 나타내었다.

환자 7에서는 이식받은 신장의 기능이 지연되는 것으로 나타났고, 이식 후 처음 1주 동안 혈액 투석을 필요로 하였다. 따라서, NGAL은 신손상에 대하여 탁월한 마커가 된다.

[0217] **NGAL과 허혈 시간 사이의 관계**

[0218] 기관의 허혈 시간은 그 시간이 길수록 기관의 기능은 저하되기 때문에, 이식 이전 기관의 손상을 결정짓는 인자이다. 환자 1과 7에서는 360 내지 1,182분의 허혈 값과 관련하여 NGAL이 높게 발현되는 것으로 관찰되었다. 그 반대 결과는 환자 2와 6에서 관찰되었는데, 허혈 값은 27 및 90분이었다. 이러한 관계는 대부분의 경우에서 확립될 수 있었는데, 단, 예외적으로 환자 11에서는 허혈 시간 값은 낮고, NGAL 수준은 높았다 (표 4, 도 3). 환자 5는 군 중 보다 높은 수준의 NGAL을 보였지만, 허혈 시간과 관련해서는 이용가능한 데이터는 없었다.

[0219] **NGAL과 연령 및 성별 사이의 관계**

[0220] 본 연구에서 얻은 결과에 따르면, 예를 들어 환자 5의 경우, 비록 연구 중인 사람 중 가장 어렸지만, 최고 수준의 NGAL (도 3)을 보였는 바, 연령은 각 환자에 대한 NGAL 수준과는 관련이 없는 것처럼 보였다. 본 연구에는 단 1명의 여성만이 포함되어 있었는데, 환자의 성별과 마커 사이의 관계를 확립한다는 것은 불가능하였다.

[0221] **면역정제된 엑소좀 중에서의 바이오마커 발현**

[0222] **AQP1, AQP2, 및 AQP3**

[0223] 상이한 유형의 AQP를 이용하여, 면역정제된 엑소좀 중의 바이오마커의 존재를 분석하였다.

[0224] 1997년 네퍼 (문헌 [Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12])는 AQP1이 우선적으로 근위 세뇨관과 관련이 있는 반면, AQP2는 원위 세뇨관 및 집합관과 관련이 있고 (문헌 [Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299]), AQP3은 네프론으로부터의 집합관과 관련이 있다고 밝혔다 (문헌 [Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F. 1998, Annu Rev Physiol, 60:199-220]).

[0225] 2004년 피짓쿤은 (문헌 [Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:13368-13373]) AQP가 정상적인 환자의 요 엑소좀 중에 존재하였다고 밝혔다.

[0226] 본 연구를 통해서 AQP는 정상적인 환자로부터의 요 엑소좀 중에 존재하는 것 이외에도, 이식 시점의 기관 또는 기증자의 상태와는 상관 없이, 신장 이식을 받은 모든 환자에도 또한 존재하는 것으로 밝혀졌다 (표 4).

[0227] **막 성분 및 바이오마커 사이의 관계**

[0228] AQP1이 네프론 중의 근위 세뇨관과 관련이 있고 (문헌 [Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12]), AQP2는 원위 세뇨관과 관련이 있으며, AQP3은 집합관과 관련이 있다는 점을 고려하여, AQP1, AQP2, 및 AQP3을 이용함으로써, 면역정제된 엑소좀 중의 NGAL의 존재를 분석하였다.

[0229] **NGAL**

[0230] 각 면역정제된 엑소좀 중의 NGAL의 발현은 그의 막에 AQP1을 포함하는 엑소좀 중에서의 NGAL의 존재가 유의적으로 더 높았고 ($p < 0.05$, 도 4), 그 다음은 AQP2 및 AQP3을 포함하는 엑소좀이었는데, 이 둘 사이에는 어떤 유의적인 차이는 없었다는 것을 제안한다. 상기 데이터는 신장의 근위 세뇨관으로부터 유래된 엑소좀에서의 신손상 마커 NGAL의 마커가 더 높다는 것을 제안한다.

[0231] **결론**

[0232] 이식 후 1일째, 전체 요가 아닌, 요의 엑소좀 분획에 대한 웨스턴 블롯 기법을 사용하여 신손상 바이오마커를 분석함으로써 바이오마커를 검출할 수 있었다. 건강한 환자에서는 상기 기법을 이용해서는 상기 바이오마커를 검출할 수 없다.

[0233] NGAL은 이식 후 1일째 분석되는 모든 환자의 신장에서 채취된 요 샘플의 엑소좀 분획에 존재하는 데, 이는 엑소좀에서의 분자 인자의 발현은 이식 수술과 관련된 이식체에서의 신손상 발생에 기인하는 것이라는 점을 제안한다. 흥미롭게도, 환자 1, 4, 및 7은 함께 고수준의 NGAL을 보였다. 이들 환자 중, 환자 1과 7에서는 이식체의 기능 지연을 보였으며, 이식 후 처음 1주 동안에는 투석 요법을 필요로 하였다. 이러한 예비 결과는 요 엑소좀 중의 NGAL의 수준 증가가 신장 이식에서 신장 기능 장애를 확립하는 데 있어서 임상적 역할을 한다는 결과를 보여준다.

[0234] 상기 마커의 존재비를 측정하기 위한 정량적 방법, 예를 들어 ELISA를 사용함으로써 신장 이식과 연관된 신손상

정도, 및 그가 이식체의 기능 및 생존력에 미치는 영향을 측정하는 데 있어서의 한도를 확립할 수 있었다. 분석에 기초하여, NGAL은 근위 세뇨관으로부터 수득되는 요 엑소솜 중에서 주로 발견된다.

[0235] **실시예 6: 연구 중인 군에 관한 설명**

[0236] 통계학적 분석, 샘플 제조, 웨스턴 블롯팅 프로토콜, 전체 요, 전체 엑소솜, 면역정제된 엑소솜에 있어서는 이전 실시예에서 사용된 것과 동일한 방법을 사용하였다.

[0237] 본 실시예에서는 중환자실 (ICU)에 입원한 환자의 두번째 배뇨로부터 30 ml의 요 샘플을 수득하고, 멸균 용기에서 보관하였다. 추가 프로세싱 및 웨스턴 블롯 분석시까지 샘플을 -80°C에서 보관하였다.

[0238] **연구군**

[0239] 본 연구군에는 ICU에 입원한 28명의 개체가 포함되어 있었는데, 연령 범위는 21 내지 95세였고, 남성은 19명 및 여성은 9명이었다. 46% (28명 중 13명)에서는 RIFLE 분류에 따른 AKI가 발병되었다.

[0240] 하기 표 5에는 일반 방법에 따라 측정된 연령, 성별, 및 AKI 단계가 제시되어 있다.

표 5

연구 중인 환자에 관한 정보

환자 번호	연령 (세)	성별	AKI 단계
1	64	M	AKI3
2	75	M	AKI3
3	34	M	N
4	59	F	N
5	95	M	AKI1
6	82	F	N
7	23	M	AKI3

[0241]

환자 번호	연령 (세)	성별	AKI 단계
8	21	M	AKI3
9	74	M	AKI1
10	79	F	AKI2
11	87	F	N
12	34	M	N
13	40	F	N
14	76	M	N
15	27	M	N
16	39	M	AKI2
17	57	F	N
18	82	M	N
19	37	M	N
20	55	F	N
21	54	F	N
22	41	M	AKI1
23	44	F	AKI1
24	22	M	AKI2

[0242]

환자 번호	연령 (세)	성별	AKI 단계
25	48	M	AKI1
26	38	M	N
27	85	M	AKI1
28	86	M	N

[0243]

성별: M=남성, F=여성; N: AKI를 앓지 않음.

[0244]

9명은 여성 (32%)이고, 19명은 남성 (68%)인, 28명의 환자 중 46%가 AKI 진단을 받았다. AKI 단계에 따른 분류는 더 많은 수의 남성이 상기 군의 주 구성 요소라는 것을 나타낸다.

[0245]

비록 AKI 단계와 연령면에서는 어떤 관계도 관찰되지는 않았지만, 57% (16명의 환자)는 45세보다 고령이었다.

[0246]

실시예 7: 전체 엑소좀, 엑소좀 무함유 요, 및 면역정제된 엑소좀 중의 신장 손상 바이오마커 분석

[0247] 웨스턴 블롯 기법에 의해 엑소좀 무함유 요 (EF-U), 전체 엑소좀 분획 (TE) 및 면역정제된 엑소좀 (IP-E) 중의 AKI 바이오마커 NGAL을 분석하였다. 웨스턴 블롯 기법을 사용하였을 때, 본 연구의 28명의 환자로부터 17명이 검출가능한 수준의 NGAL을 보였다. 하기 표 6에는 본 연구의 환자에서의 바이오마커 검출 결과가 제시되어 있다.

표 6

환자에서 바이오마커 검출

환자 번호	NGAL	AKI 단계
1	+	AKI3
2	+	AKI3
3	-	N

[0248]

환자 번호	NGAL	AKI 단계
4	+	N
5	+	AKI1
6	+	N
7	+	AKI3
8	+	AKI3
9	+	AKI1
10	+	AKI2
11	-	N
12	+	N
13	-	N
14	-	N
15	-	N
16	+	AKI2
17	+	N
18	-	N
19	-	N
20	+	N

[0249]

환자 번호	NGAL	AKI 단계
21	-	N
22	+	AKI1
23	+	AKI1
24	+	AKI2
25	+	AKI1
26	-	N
27	+	AKI1
28	-	N

+: 바이오마커 존재, -: 바이오마커 부재

[0250]

[0251]

AKI 진단을 받은 환자 (28명 중 13명) 100% (13명 중 13명)는 연구된 분획 중 1개 이상에서 검출가능한 NGAL을 가졌다. AKI에 대해 음성 진단을 받은 환자인 경우에는 33%가 NGAL에 대하여 양성인 것으로 나타났다.

[0252]

추가로, AKI로 분류된 환자인 경우 85%에서 NGAL 존재비는 EF-U 분획과 비교하여 엑소솜 분획 중에서 더 높았다. AKI 진단을 받은 5명의 환자에서는 엑소솜 분획 중 NGAL이 우선적으로 발현된 것으로 나타난 반면 (환자 5, 8, 9, 12, 및 16), EF-U 분획 중 그의 NGAL 수준은 극도로 낮았다. AKI에 대해 양성 진단을 받고, NGAL 양성인 단 2명의 환자 (환자 2 및 7)만이 두 분획 모두에서 증가인, NGAL 존재비를 보였다.

[0253]

AKI에 대해 음성 진단을 받은 군에서, 60%는 검출불가능한 수준의 NGAL을 보였다. AKI에 대해 음성 진단을 받고, NGAL 양성인 것으로 분류된 환자들은 모두 엑소솜 분획 중에서 더 높은 수준의 NGAL을 보였다.

표 7

환자에서 분석된 요 분획중 NGAL의 상대적 존재비

환자 번호	NGAL EF-U	전체 엑소좀	AKI 단계
1	+	++	AKI3
2	++	++	AKI3
3	-	-	N
4	+	++	N
5	-	+	AKI1
6	+	++	N
7	++	++	AKI3
8	-	+	AKI3
9	-	+	AKI1
10	+	++	AKI2
11	-	-	N
12	-	++	N
13	-	-	N
14	-	-	N
15	-	-	N
16	-	+	AKI2

[0254]

환자 번호	NGAL EF-U	전체 엑소좀	AKI 단계
17	-	+	N
18	-	-	N
19	-	-	N
20	-	+	N
21	-	-	N
22	+	++	AKI1
23	+	++	AKI1
24	+	++	AKI2
25	+	++	AKI1
26	-	-	N
27	+	++	AKI1
28	-	-	N

+: NGAL 존재, -: NGAL 부재

[0255]

[0256]

환자를 3 단계의 AKI로 분류하였는데, AKI3이 가장 중증인 것이었다. AKI 진단을 받은 13명의 환자로부터 5명은 AKI1로 분류되었고, 이 5명 (100%)은 엑소좀 분획 중 보다 높은 NGAL의 존재비를 보였다. AKI2 진단을 받은 3명의 환자로부터, 3명은 엑소좀 분획 중 보다 높은 NGAL의 존재비를 보였다. AKI3 진단을 받은 5명의 환자로부터, 3명 (60%)은 엑소좀 분획 중 보다 높은 NGAL의 존재비를 보였다 (표 7).

[0257]

추가로, 엑소좀 무함유 요 (EF-U)와 전체 엑소좀 (TE) 분획 사이의 NGAL의 상대적 존재비를 분석하였다.

[0258]

ICU에 입원하고, AKI1, AKI2, 및 AKI3 진단을 받은 환자의 요 중 NGAL 수준을 따로따로 측정하였다. 결과를 통해, 비록 AKI1 및 AKI2의 경우에는 NGAL 존재비가 EF-U와 비교하여 TE에서 더 높기는 하지만, 손상 수준이 증가할수록, NGAL 존재비 또한 증가하는 것으로 뚜렷하게 나타났다 (도 6).

[0259]

AKI에 대해 음성 진단을 받은 환자군에서, 33% (15명 중 5명)는 TE 분획 중 검출가능한 수준의 NGAL을 보였다. 상기 분획 중의 NGAL 존재비 수준은 평균 13.5 ± 9.8 AU였다. 이 수준은 AKI1 환자의 TE에서 발견되는 것보다 유의적으로 더 낮은 수준이었다 (79.6 ± 22 AU, 도 6). 이는 혈청 크레아티닌 수준으로는 검출되지 않는 초기 신장 손상으로서 해석할 수 있었다.

[0260]

이전 데이터에서는 TE 중의 NGAL을 측정하는 것이 혈청 크레아티닌을 사용하여 AKI를 진단하기 전 24시간 동안 수행되는 보다 고감도의 AKI 진단 방법인 것으로 나타났다.

[0261]

TE 및 EF-U 분획 중 NGAL의 상대적 존재비를 비교하기 위해, TE/EF-U 비를 계산하였다. 그 결과 (도 7), AKI1인 경우에는 NGAL 존재비가 EF-U와 비교하여 TE에서 45배 더 높게 나타났고, AKI2인 경우에는 13배 더 높게 나타났다. 그럼에도 불구하고, AKI3 진단을 받은 환자에서는 어떤 유의적인 차이도 없었다. 본 데이터를 통해 요 엑소좀 중의 NGAL은 혈청 크레아티닌 방법을 사용하여 AKI 진단을 확립하기 전 24시간의 기간 동안 AKI (AKI1, 및 AKI2)를 조기에 검출하는 데 있어 고감도인 것으로 밝혀졌다.

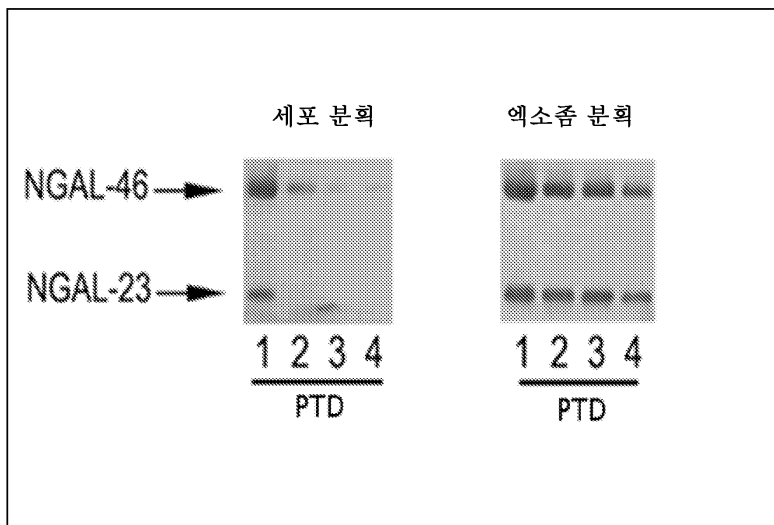
[0262]

이전 결과에서는 AKI1 환자의 전체 엑소좀 (TE) 중 NGAL의 존재비가 더 높게 나타났기 때문에, 면역정제된 엑소좀 (IP-E) 중 NGAL의 존재비를 추가로 분석하였다. AKI1 진단을 받은 환자에서 엑소좀을 면역정제하는 데 AQP1을 사용하였다. IP-E 분획 중의 NGAL 존재비를 TE 및 EF-U 분획 중의 것과 비교하였다. 그 결과, IP-E 중의 NGAL 존재비가 TE 중의 것보다 더 높고, 심지어는 EF-U 분획 중의 것보다도 더 높은 것으로 나타났다 (도 8).

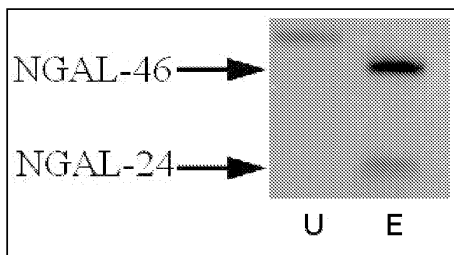
- [0263] 네프론의 근위 세뇨관 부분으로부터 엑소솜을 면역정제하는 것이 NGAL의 존재비를 증가시키며, 이로써 임상 환자에서 AKI를 조기 검출하는 데 있어서의 감도도 증가시킨다는 것이 본 데이터를 통해 밝혀졌다.
- [0264] 본 실시예의 28명의 환자로 이루어진 군에 대해 분석을 수행함으로써 혈청 중의 크레아티닌 수준에 대한 일반 방법을 허용하기 전 24시간의 기간 동안 요 중 NGAL을 측정하는 것이 우수한 AKI 진단 방법이라는 것을 확립할 수 있었다.
- [0265] 엑소솜 분획 중의 NGAL 존재비가 엑소솜 무함유 요 분획 중의 것보다 더 높은 바, 이는 조기 AKI, 특히 AKI1 및 AKI2 단계를 진단하는 보다 고감도의 진단 방법이라는 것을 나타낸다.
- [0266] 엑소솜을 면역정제함으로써 AQP1의 경우, 면역정제된 엑소솜 중 NGAL의 존재비가 더 높은 것에 기인하여 AKI 검출 감도를 증가시킬 수 있었다.
- [0267] 다른 병리상태가 요 중 NGAL 수준을 증가시킬 수 있다는 점을 고려하면, 면역정제된 엑소솜을 분석함으로써, 측정된 NGAL은 신장으로부터 유래된 것이라는 것을 확립할 수 있고, 이로써 조기 AKI 검출을 위해 엑소솜 바이오마커를 측정하는 데 있어서 특이성을 증가시킬 수 있다.

도면

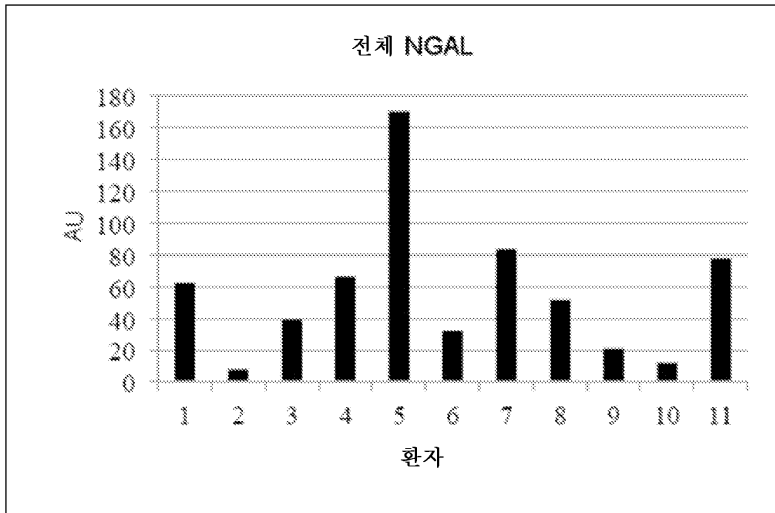
도면1



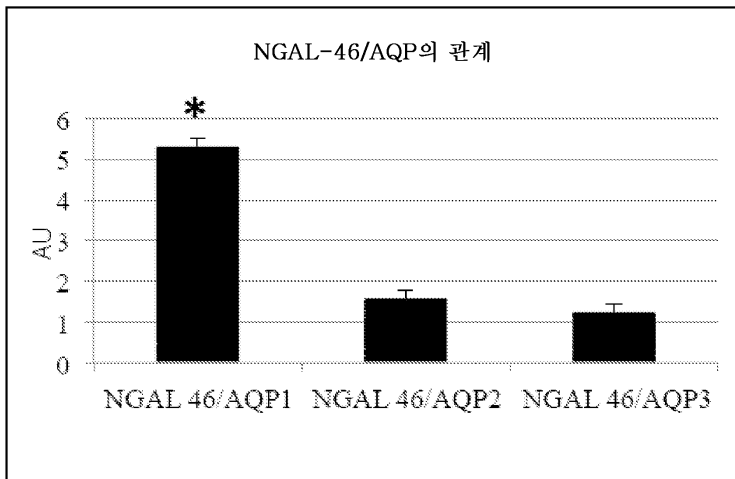
도면2



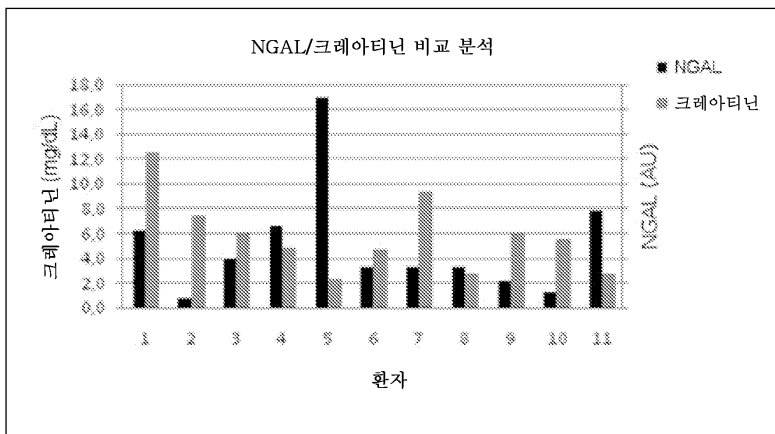
도면3



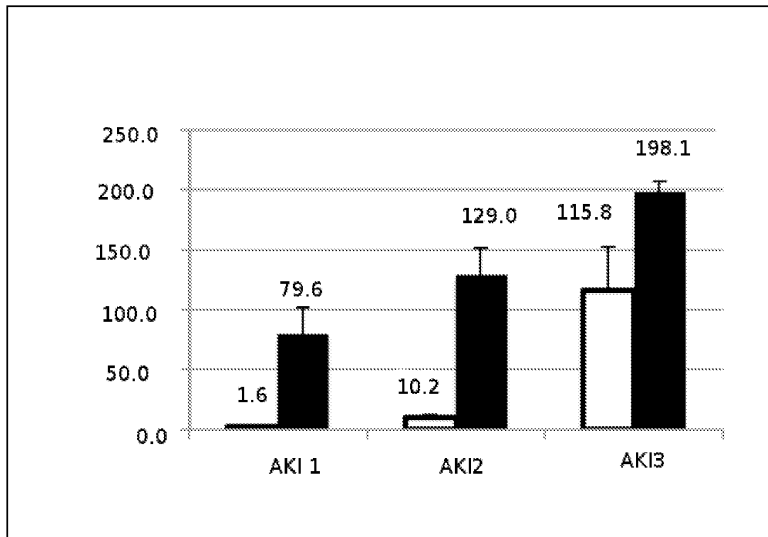
도면4



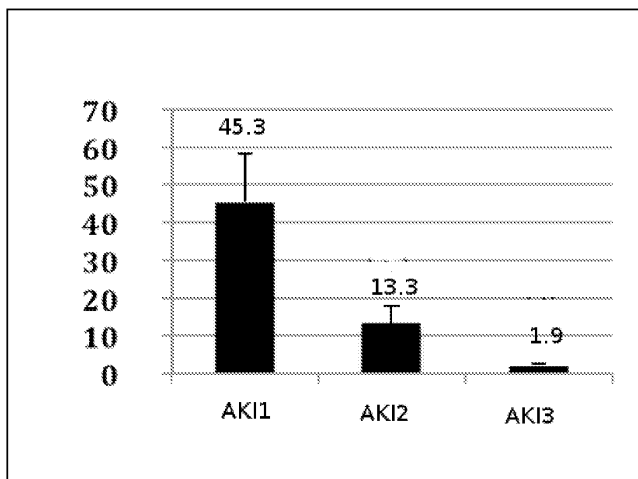
도면5



도면6



도면7



도면8

