

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910061639.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 21/51 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101566633A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 21/59 (2006.01)

[22] 申请日 2009.4.17

[21] 申请号 200910061639.X

[71] 申请人 武汉华美生物工程有限公司

地址 430070 湖北省武汉市洪山区关山一路
SBI 创业街特一号二单元 2302 室

[72] 发明人 华权高

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法。该检测方法是使用抗人嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂蛋白(NGAL)的抗体,与待检标本的人 NGAL 反应,所形成的复合物引起浊度变化;用光投射强度或光散射强度表征这种变化;从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量;最后根据检测出的 NGAL 含量来衡量癌症的严重程度,该方法具有灵敏度高、回收率高、重复性好的优点,为癌症病人尿液或血浆中 NGAL 确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段,并使人 NGAL 对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。

1. 一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法。
2. 根据权利要求1所述的方法，其特征是，建立在抗原抗体特异性反应原理基础上，通过包括但不限于免疫比浊法以及酶联免疫（ELISA）法的免疫学方法检测样品中人嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂蛋白（NGAL）的浓度。
3. 根据权利要求1所述的方法，其特征是，包括如下步骤：
 - i) 收集病人样品。
 - ii) 样品中的 NGAL 与抗体接触反应。
 - iii) 检测人 NGAL 的浓度，并根据浓度衡量评价癌症的严重程度。
4. 根据权利要求1所述的癌症，其特征是，包括但不限于其病变与 NGAL 水平变化相关的癌症，例如乳腺癌、基底细胞癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、胰脏癌、卵巢癌、肺癌、皮肤癌、肾癌、前列腺癌、肾细胞癌。
5. 根据权利要求1所述的方法，其特征是根据结果中 NGAL 的含量通过与正常的样品中的 NGAL 浓度比较得出病人是否得癌症或癌症的病情严重性的过程。
6. 根据权利要求2所述的样品，其特征是包括但不限于病人的尿液和血浆。
7. 根据权利要求3所述的抗体，其特征在于是该抗体是通过天然或重组的人 NGAL 免疫动物获得的多克隆抗体或者单克隆抗体。
8. 根据权利要求2所述的免疫比浊法，其特征在于：用抗人 NGAL 的抗体，与待检标本的人 NGAL 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光投射

强度或光散射强度表征这种变化；从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量。

9. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法, 其特征在于: 包括双抗夹心法 ELISA、竞争法 ELISA。
10. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法, 其特征在于: 人 NGAL 预先固相化, 或人 NGAL 抗体预先固相化。
11. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫 (ELISA) 法, 其特征在于, 检测人 NGAL 含量的范围为 1 ng/ml- 500 ng/ml。
12. 根据权利要求 9 所述的竞争法, 其特征在于, 预先固相化人 NGAL 抗体或人 NGAL。
13. 根据权利要求 10 所述的固相化, 其特征在于, 将人 NGAL 或人 NGAL 抗体包被到固相支持物上, 该支持物可以是, 例如用于酶联免疫吸附试验的聚苯乙烯或聚氯乙烯表面, 或胶乳 (聚苯乙烯) 颗粒, 或由压缩的聚乙烯颗粒组成的过滤玻璃棒, 或多孔消化纤维素基质, 或事实上是在免疫化学分析使用中任何合适的支持物。

一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法

技术领域

本发明涉及一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法。具体的来讲，涉及病人尿液中人嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂蛋白（NGAL）含量的测定方法。

背景技术

对于癌症病人的治疗目前没有最好的办法，提高癌症病人生存率最重要的方法就是早期的诊断。寻找癌症早期诊断的目标为防癌提供了不可磨灭的帮助。随着基因分析学和蛋白组学的发展，癌症相关分子及分子标志物的研究也随之取得了较大的进展。例如，在前列腺癌病人的血液中可以检测到前列腺特异抗原 PSA，并且可以指示前列腺癌的存在，这样病人便可以通过血液检测 PSA 的水平来快速的检测出是否患有前列腺癌。

NGAL 蛋白是 1993 年在中性粒细胞内首先被发现的，与炎症、胚胎发育、免疫应答、趋化作用、信号转导以及多种肿瘤的发生与发展等过程相关。近年来国内外的研究表明，NGAL 蛋白在多种疾病发病过程中具有特异性表达变化的特点，使得 NGAL 成为检测疾病的生物标志物。

同源性分析表明，NGAL 与小鼠的 24p3 和大鼠的 neu 相关 lipocalin (neu-related lipocalin, NRL) 具有很高的同源性。小鼠的 24p3 在肝脏中合成，炎症反应时上调，另外 24p3 也见于巨噬细胞和子宫内膜，尤其是生殖期的子宫内膜。用类固醇激素可使相应组织中的 24p3 水平升高，而一些生长因子和肿瘤促进因子也可以使其升高。猴病毒 SV40、多瘤病毒或其他病毒感染可以刺激培养的小鼠肾细胞 24p3 mRNA 的表达增加 7-10 倍。且随着大 T 抗原的合成的增加

而升高。因此 24p3 被认为是癌基因产物。这同时表明 NGAL 可能是人类的一种新的癌基因。

实验证明，在卵巢癌细胞系、结肠肿瘤和乳腺癌等中的 NGAL 的表达明显增强。免疫组化证明在肺癌组织中的 NGAL 强阳性，而支气管肺泡细胞癌和粘液细胞癌染色最强，NGAL 在胰腺癌中会从阴性增加到强阳性。

这样，这些发现的事实为不同病期的癌症病人的快速有效诊断提供了客观可能性。作为癌症的特征分子，NGAL 成为有效的临床检测工具。

发明内容

本发明提供了用于诊断或监测癌症的方法，所述方法包含以下步骤：

- i) 使用相关器械收集病人尿液。
- ii) 病人尿液与抗体接触反应。
- iii) 检测人 NGAL 的浓度，并根据浓度衡量评价癌症的严重程度。

优选通过免疫化学方法来测定 NGAL 水平，这种方法的例子包括但绝不限于免疫比浊法、夹心法 ELISA、竞争法 ELISA。

对病人尿液样本，可以用任何提供满意的分析特异性、灵敏度和精确度的方法来进行。检测实验中，使用 NGAL 的单克隆抗体、多克隆抗体或任何可与 NGAL 特异性结合的分子。结合分子首先固相化捕捉样品中的 NGAL 形成复合物，而另外一个标记可检测的结合分子再结合上述复合物，最后通过特定方法显示出复合物量的值从而间接反应出样品中 NGAL 的含量获得病情的严重性。另外可以直接利用游离的 NGAL 抗体或偶联乳胶颗粒以胶体形式存在的抗体与样品中的 NGAL 直接结合所形成的复合物引起浊度变化；用光投射强度或光散

射强度表征这种变化；从人 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人 NGAL 的含量。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1 乳胶增强免疫比浊法检测病人尿液中的 NGAL 含量

实现本实例的技术方案：一种检测人嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂蛋白（NGAL）的免疫比浊法，用抗 NGAL 的多克隆抗体首先与乳胶交联，然后用交联后的乳胶溶液与待检标本的 NGAL 反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光投射强度或光散射强度表征这种变化；从 NGAL 标准品的浓度与相应光散射强度或光投射强度的标准曲线查出待检样本的 NGAL 含量；其中所用的 NGAL 的多克隆抗体效价至少为 1: 500，不含杂抗体，具有识别 NGAL 多种抗原决定簇；待检标本用稀释剂做 1: 200-1: 1000 稀释。

上述方法中，所述 NGAL 标准品是纯 NGAL，其浓度为 0.2mg/ml，先用稀释剂做 1: 200 倍稀释，再做倍比稀释，做成系列标准品，供作标准曲线用。

实施例 2 用夹心法 ELISA 确定病人尿液 NGAL 浓度

具体步骤是：包被 NGAL 抗体 A；配制系列 NGAL 标准品；准备病人尿液；将系列标准品或待定值的病人尿液加入 96 微孔板孔内，再使已标记的、结合位点不同于包被在 96 微孔板上抗体 A 的抗体 B 结合，用基质液显色 20-30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的病人尿液中 NGAL 反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待定值

的病人尿液的 NGAL 的浓度。

实施例 3 用竞争法 ELISA 确定病人尿液 NGAL 浓度

具体步骤是：包被 NGAL 多克隆抗体；配制系列 NGAL 标准品；准备病人尿液；使系列标准品或待定值的病人尿液和已标记的 NGAL 标准品混合；用基质液显色 20-30 分钟后终止显色，10 分钟后测定上述系列标准品和待检测的病人尿液中 NGAL 反应后的吸光度；建立系列标准品的浓度和吸光度的标准曲线并从曲线中查出待定值的病人尿液的 NGAL 的浓度。

专利名称(译)	一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法		
公开(公告)号	CN101566633A	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200910061639.X	申请日	2009-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
[标]发明人	华权高		
发明人	华权高		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/542 G01N21/51 G01N21/31 G01N21/59		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种诊断评价或测定癌症并预知所述疾病严重性的方法。该检测方法是使用抗人嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂蛋白(NGAL)的抗体，与待检标本的人NGAL反应，所形成的复合物引起浊度变化；用光投射强度或光散射强度表征这种变化；从人NGAL标准品的浓度与相应光散射强度或光透射强度的标准曲线查出待检标本的人NGAL的含量；最后根据检测出的NGAL含量来衡量癌症的严重程度，该方法具有灵敏度高、回收率高、重复性好的优点，为癌症病人尿液或血浆中NGAL确定了一个简便、重现性好、适应性强的检测手段，并使人NGAL对临床的指导作用及进一步研究其功能提供了可能。