



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102300875 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201080005754. 6

G01N 33/566 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 01. 27

G01N 33/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/705 (2006. 01)

61/147, 785 2009. 01. 28 US

C40B 30/00 (2006. 01)

G01N 27/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2011. 07. 28

US 2004009901 A, 2004. 01. 15,

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 03095667 A2, 2003. 11. 20,

PCT/CA2010/000096 2010. 01. 27

WO 2008021431 A3, 2008. 11. 13,

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2007124419 A1, 2007. 11. 01,

W02010/085878 EN 2010. 08. 05

审查员 王宽

(73) 专利权人 财团法人工业技术研究院

地址 中国台湾新竹县

(72) 发明人 曾镗翎 吕静芳 林微雅 徐采薇

叶亚平 陈怡婷 杨垂勋

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

G01N 33/493 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

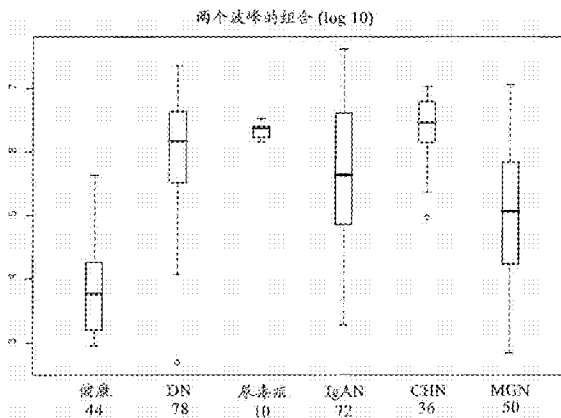
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

肾病相关的生物标记

(57) 摘要

使用尿液生物标记诊断肾病 (nephropathy)、监测肾病发展, 与评估肾病治疗之功效。这些尿液生物标记包括白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 (leukocyte-associated Ig-like receptor-2)、 α -1 酸性糖蛋白 (alpha-1 acid glycoprotein)、其片段与其组合。



1. 选自 (i) 白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段, 以及 (ii) 白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段与 α -1 酸性糖蛋白之片段的组合的生物标记用于制备试剂盒的用途, 其中白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段为 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP(SEQ ID NO:1), 而 α -1 酸性糖蛋白之片段为 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS(SEQ ID NO:2), 所述试剂盒用于于个体中诊断肾病, 包括:

自被怀疑具有肾病之个体取得尿液样本;

测定该尿液样本中所述生物标记的水平; 以及

根据该生物标记的水平评估该个体是否具有肾病, 当与无肾病个体中该生物标记的水平相比较, 该生物标记水平的增加可指出该个体具有肾病。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该生物标记的水平透过质谱分析或免疫分析来测定。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中该质谱分析选自下组: 基质辅助激光解吸电离质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)、液相层析质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), 与液相层析串联质谱(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)。

4. 如权利要求 2 所述的用途, 其中该免疫分析选自下组: 酶联免疫吸附分析(enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)、Western 印迹(Western blot)、放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)、荧光免疫分析(fluorescence immunoassay, FIA) 与冷光免疫分析(luminescence immunoassay, LIA)。

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该个体为人。

6. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该个体为实验动物。

7. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该生物标记为白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中该个体无蛋白尿。

9. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该生物标记为白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段与 α -1 酸性糖蛋白之片段的组合。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中该个体无蛋白尿。

11. 选自 (i) 白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段, 以及 (ii) 白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段与 α -1 酸性糖蛋白之片段的组合的生物标记用于制备试剂盒的用途, 其中白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 之片段为 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP(SEQ ID NO:1), 而 α -1 酸性糖蛋白之片段为 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS(SEQ ID NO:2), 所述试剂盒用于于个体中监测肾病发展, 包括:

自患有肾病的个体取得第一尿液样本;

测定该第一尿液样本中所述生物标记的水平;

在取得该第一尿液样本后 2 周至 12 个月自该个体取得第二尿液样本;

测定该第二尿液样本中该生物标记的水平; 以及

评估该个体中的肾病发展,

其中与该第一尿液样本中该生物标记的水平相比较, 该第二尿液样本中该生物标记的水平增加指出该个体中的肾病恶化。

12. 如权利要求 9 所述的用途,其中该个体为处于早期肾病的人,该第二尿液样本在取得该第一尿液样本后 6 至 12 个月取得。

13. 如权利要求 9 所述的用途,其中该个体为处于晚期肾病的人,该第二尿液样本在取得该第一尿液样本后 3 至 6 个月取得。

14. 如权利要求 9 所述的用途,其中该个体为实验动物,该第二尿液样本在取得该第一尿液样本后 2 至 24 周取得。

15. 选自 (i) 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段,以及 (ii) 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段与 α -1 酸性糖蛋白之片段的组合的生物标记在制备试剂盒中的用途,其中白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段为 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP(SEQ ID NO:1),而 α -1 酸性糖蛋白之片段为 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2)所述试剂盒用于患有肾病的个体中监测肾病治疗功效,包括:

测定在治疗前该个体尿液样本中所述生物标记的水平;

测定在治疗后该个体尿液样本中该生物标记的水平;以及

根据治疗后该生物标记水平的变化评估该治疗的功效,

其中与治疗前该生物标记的水平相比较,若该生物标记水平维持不变或下降则治疗为有效。

16. 选自 (i) 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段,以及 (ii) 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段与 α -1 酸性糖蛋白之片段的组合的生物标记在制备试剂盒中的用途,其中白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 之片段为 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP(SEQ ID NO:1),而 α -1 酸性糖蛋白之片段为 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS(SEQ ID NO:2),所述试剂盒用于评估试剂的肾毒性,包括:

自以该试剂治疗的个体在治疗中在不同时间点取得多个尿液样本;

测定各尿液样本中所述生物标记的水平;以及

根据在治疗中该生物标记水平的变化评估该试剂的肾毒性,

其中在该治疗过程中该生物标记水平的增加指出该试剂具肾毒性。

17. 如权利要求 16 所述的用途,其中该试剂选自下组:化合物、草药产品,与食物产品。

肾病相关的生物标记

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 1 月 28 日提交的美国临时申请 No. 61/147785 的优先权, 将其内容通过提述以其整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 肾病 (nephropathy), 一般已知为糖尿病、高血压、药物毒性, 与发炎所引起之肾损伤 (kidney damage)。

[0005] 肾病通常藉由测定蛋白尿 (proteinuria) (例如尿白蛋白 (urine albumin) 的水平) 的水平或藉由检查肾功能指标 - 肾小球过滤率 (glomerular filtration rate, GFR), 来进行诊断。但目前早期肾病无法显示症状供此两种方法侦测早期肾病。虽然可根据肾组织切片来侦测肾病, 但此侵入式方法并非理想的诊断方式。

[0006] 研发侦测早期肾病的方法非常重要。达成此目标之关键点在于鉴定出与初期肾病相关的可靠生物标记。

发明内容

[0007] 本发明为根据意想不到地发现白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 (leukocyte-associated Ig-like receptor-2)、 α -1 酸性糖蛋白 (alpha-1 acid glycoprotein) 和这两种蛋白质的片段在尿液内的水平, 在肾病 (nephropathy) 患者中显着高于无肾病的患者。这些蛋白质分子因而为早期肾病的诊断的可靠生物标记。

[0008] 因此, 本发明特征之一为肾病诊断的方法。此方法至少包括下列步骤: (a) 自被怀疑具有肾病的个体取得尿液样本, (b) 测定该尿液样本中生物标记的水平, 与 (c) 根据该生物标记的水平评估是否该个体具有肾病。于先前所叙述的方法中使用的生物标记为下列之一: (i) 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 或其具有至少十个氨基酸的片段, 如 DFLELLLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1), (ii) 具有至少十个氨基酸的 α -1 酸性糖蛋白的片段, 如 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGL S (SEQ ID NO:2), (iii) (i) 与 (ii) 的组合, 或 (iv) (i) 与 α -1 酸性糖蛋白的组合。当四个生物标记之一的水平高于无肾病个体, 则可指出该个体具有肾病。在一实施例中, 生物标记水平透过质谱分析 (例如, 基质辅助激光解吸电离质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)、液相层析质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), 与液相层析串联质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)) 来测定。在另一实施例中, 透过免疫分析 (例如, 酶联免疫吸附分析 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)、Western 印迹 (Western blot)、放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA)、荧光免疫分析 (fluorescence immunoassay, FIA) 与冷光免疫分析 (luminescence immunoassay, LIA)) 来测定。

[0009] 上述肾病诊断方法可应用于人与实验动物两者, 例如没有蛋白尿 (proteinuria) 的那些。此使用之术语“实验动物”意指一般使用于动物测试的脊椎动物, 例如, 小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪, 与非人灵长类动物。

[0010] 本发明之另一特征为一种可于个体中监测肾病的发展的方法。此方法包括 (a) 自罹患肾病的个体 (例如,人或实验动物) 取得第一尿液样本, (b) 测定于该第一尿液样本中上列四个生物标记之一的水平, (c) 在取得该第一尿液样本后 2 周至 12 个月自该个体取得第二尿液样本, (d) 测定于该第二尿液样本中该生物标记的水平, 与 (e) 评估该个体中肾病的发展。该第二尿液样本中该生物标记的水平较该第一尿液样本中增加, 可指出该个体中的肾病恶化。当个体为患有早期肾病的人, 该第二尿液样本在该第一尿液样本后 6 至 12 个月取得。对于晚期肾病的人类个体, 该第二尿液样本在该第一尿液样本后 3 至 6 个月取得。当此方法应用于实验动物时, 该第二尿液样本在该第一尿液样本后 2 至 24 周取得。

[0011] 于又另一特征中, 本发明提供一种监测肾病患者中肾病治疗的功效的方法, 包括 (a) 测定在治疗前于来自该肾病患者的尿液样本中上列生物标记之一的水平, (b) 测定在治疗后于来自该患者的尿液样本中该生物标记的水平, 与 (c) 根据在治疗后该生物标记的水平的变化评估该治疗的功效。与治疗前之生物标记水平相较, 当生物标记于治疗后之水平维持相同或下降时, 判定该治疗为有效的。

[0012] 本发明也提供评估试剂的肾毒性的方法, 包括 (a) 自以试剂治疗的个体于治疗中的不同时间点取得多个尿液样本, (b) 测定各尿液样本中上述生物标记之一的水平, 与 (c) 根据该生物标记在治疗中的水平变化评估该试剂的肾毒性。在该治疗过程中该生物标记水平的增加指出该试剂具肾毒性。试剂可为化合物 (例如, 药物或药物候选物)、草药产品, 与食物产品。

[0013] 本发明更进一步提供对于任何上述方法有用的试剂盒。该试剂盒包含特异性结合白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的第一抗体与特异性结合 α -1 酸性糖蛋白的第二抗体。两个抗体皆可为完整的免疫球蛋白分子。在一个实施例中, 该试剂盒仅含有对于欲被侦测的抗原 (如: 肾病的生物标记) 特异性的抗体以供实施此处公开的方法之一。即, 其实质上由此类抗体所组成。

[0014] 在本发明范围中也有一种分离的抗体, 其特异性结合至 DFLELLLVKGTVPGTEASGFDP (SEQ ID NO:1), 或 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2)。此处使用的术语“分离的抗体”意指基本上无天然结合之分子的抗体。可更具体地说, 当制备物中天然结合之分子占至多 20% 干重时, 含此抗体的制备物被视为“分离的抗体”。纯度测量可藉由任何适合的方法, 例如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis), 与高效液相层析 (high-performance liquid chromatography, HPLC)。

[0015] 上述之任何抗体可用于制造对于实施本发明的任何方法有用的试剂盒。

[0016] 本发明之一或多个实施例于下面叙述中列出。本发明的其它特征或优点显示于下列数个实施例的详细叙述与所附的权利要求中。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 为一显示于健康对照与具有不同类型之肾病的患者中, 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的片段与 α -1 酸性糖蛋白的片段的水平的经结合的箱线图 (boxplots)。DN、IgAN、CHN 与 MGN 指糖尿病肾病、IgA 肾病、中草药肾病, 与膜状肾小球肾炎 (membranous glomerulonephritis) 肾病。箱型 (boxes) 的上限、下限及该箱型中的横线分别标示为 25% 数值、75% 数值及中位数值。上方虚线标示上围篱值 (upper fence) 以下的最大值, 其

为 75%数值加 1.5 四分位距 (interquartile range), 而下方虚线标示下围篱值 (lower fence) 以上的最小值, 其为 25%数值减 1.5 四分位距。

[0019] 图 2 为一显示于健康对照与具有中草药肾病 (CHN) 的患者中, 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的片段与 α -1 酸性糖蛋白的片段的水平经结合的箱线图。箱型的上限、下限及该箱型中的横线分别标示为 25%数值、75%数值及中位数值。上方虚线标示上围篱值以下的最大值, 其为 75%数值加 1.5 四分位距, 而下方虚线标示下围篱值以上的最小值, 其为 25%数值减 1.5 四分位距。

[0020] 发明详述

[0021] 在一个方面, 本发明涉及一种根据尿液生物标记的水平诊断肾病 (nephropathy) 的方法, 尿液生物标记可为白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 (leukocyte-associated Ig-like receptor-2) (GenBank 登录号 CAQ08962; 2010 年 1 月 10 日)、 α -1 酸性糖蛋白 (alpha-1 acid glycoprotein) (GenBank 登录号 EAW87416; 2010 年 1 月 10 日)、两蛋白质任一的片段, 或其组合。两蛋白质任一的片段具有十个氨基酸的最小长度且优选为 120 至 200 个氨基酸的最大长度。例如, 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的片段可分别包含多至 125 与 191 个氨基酸。在一实施例中, 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的片段为 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO :1) 而 α -1 酸性糖蛋白的片段为 GQEHFAHL LILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO :2)。

[0022] 上述各尿液生物标记可被用来诊断任何类型的肾病, 包括与糖尿病有关的 (即, 糖尿病肾病 (diabetic nephropathy))、起因于 IgA 在肾脏组织中的沉淀的肾小球肾炎 (glomerulonephritis) (即, IgA 肾病)、发炎 (inflammation) (例如, 膜状肾小球肾炎 (membranous glomerulonephritis))、中草药诱发的肾纤维化 (renal fibrosis) (即, 中草药肾病 (Chinese herbal nephropathy))、导致肾衰竭 (renal failure) 的慢性肾小管间质性损伤 (chronic tubulointerstitial damage) (即, 慢性间质性肾炎 (chronic interstitial nephritis)), 与局部性肾小球硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis) 的那些。

[0023] 为了实施本发明之诊断方法, 自被怀疑具有肾病的个体取得尿液样本且上述任何生物标记的水平可藉由一般方法来测定, 例如酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 与 Western 印迹 (Western blot)。当生物标记为肽或肽的组合时, 其水平可藉由质谱分析 (mass spectrometry) 来测定。尿液生物标记的水平可与代表参考点 (reference point) 的无肾衰竭个体中相同的尿液生物标记的水平进行比较。参考点可经由例行操作基于比较肾病患者群组与无肾病个体群组中尿液生物标记的代表性水平来测定。例如, 其可介于这两个群组的平均水平间的中间点。当于个体中尿液生物标记的水平大于参考点时, 其指出个体具有肾病。

[0024] 当需要时, 具有微小变化性肾病 (minimal change nephropathy, MCN) 或微小变化症 (minimal change disease, MCD) 的患者可被做为对照组以测定上述参考点。一般而言, 微小变化性肾病或微小变化症患者展现显著的蛋白尿但肾功能正常。

[0025] 本发明使用白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的片段或 α -1 酸性糖蛋白的片段之诊断方法, 可被应用在侦测初期肾病当无法侦测尿液中蛋白质 (例如, 白蛋白 (albumin)) 的存在时, 即无蛋白尿时。

[0026] 另一方面,本发明叙述可根据任何上述尿液生物标记监测个体中肾病的发展的方法。为实施此方法,可在适合的时间间隔(例如2周至12个月)中取得来自个体的两个尿液样本并检查以测定上述尿液生物标记之一的水平。若较晚取得的尿液样本中尿液生物标记的水平高于较早取得的尿液样本中尿液生物标记的水平,则其指出此个体中有肾病的发展。

[0027] 此监测方法可被应用于罹患或具有肾病风险的人类个体。当人类个体具有肾病风险或于早期肾病时,可每6至12个月测定尿液生物标记水平一次以监测肾病的发展。当人类个体已在肾病晚期时,优选每3至6个月测定尿液生物标记水平一次。早期肾病的患者尽管带有肾损伤但一般无症状且表现正常的肾功能。这些患者具有肾病发展的风险。晚期肾病的特征为肾小球过滤率(glomerular filtration rate, GFR)的逐步下降(例如, $< 15\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$)。

[0028] 上述监测方法亦可根据例行步骤,应用至实验动物以研究肾病。优选每2至24周检查一次实验动物所以测定上述尿液生物标记之一的水平。生物标记水平随着时间增加可指出动物内的疾病发展。

[0029] 在另一方面,本发明提供一种评估于有需要的个体(即,人类肾病患者或带有肾损伤的实验动物)中肾病治疗的功效的方法。在此方法中,上述尿液生物标记之一的水平于治疗前、中及/或后期被测定。若尿液生物标记水平随着治疗过程维持相同或下降,则可指出治疗有效。

[0030] 任何尿液生物标记可用于监测目标试剂的肾毒性,即,试剂是否会诱发肾损伤。目标试剂可为任何用于人施用的化合物或组合物。例子包括,但不限于化学化合物,其可为药物(例如,非类固醇抗炎药物)或药物候选物、食物产品或补充品,与中草药补充品。目标试剂的肾毒性透过其随着时间增加尿液生物标记的水平的能力来判断。

[0031] 本发明也揭露有助于实施任何上述方法的试剂盒。此试剂盒包含至少两种抗体,一种对免疫球蛋白样受体-2为特异性的,例如可结合至其片段DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP(SEQ ID NO:1)或任何包含于其中的表位,与另一种对 α -1酸性糖蛋白为特异性的,例如可结合至其片段GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS(SEQ ID NO:2)或任何包含于其中的表位。在一实施例中,试剂盒包含与相同生物标记结合的两种不同的抗体(即,涂覆抗体(coating antibody)与侦测抗体(detecting antibody))。通常,侦测抗体与可藉由其本身或是经由与其它试剂结合而发出可侦测讯号的分子结合。此处使用的术语“抗体”意指完整的免疫球蛋白或其片段,例如维持抗原结合活性的Fab或F(ab')₂。其可为自然发生或经基因工程改造的(例如单链抗体(single-chain antibody)、嵌合抗体(chimeric antibody),或人源化抗体(humanized antibody))。

[0032] 本发明试剂盒中包含的抗体可获得自商业制造供货商。或可藉由一般方法来制备。参见,例如,Harlow and Lane, (1988)Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。为产生针对如上所列的特定生物标记的抗体,任选地可以将标记与携带蛋白质(carrier protein)(例如, KLH)结合并与佐剂混合后注入宿主动物。产生于动物中的抗体可藉由亲和层析(affinity chromatography)进一步纯化。一般使用的宿主动物包括兔、小鼠、豚鼠,与大鼠。可使用来增加免疫反应的各种佐剂视宿主种类而定,包括弗氏佐剂(Freund's adjuvant)(完全与不完全)、矿物凝

胶 (mineral gel), 例如氢氧化铝, CpG、表面活性物质 (surface-active substance), 例如溶血卵磷脂 (lysolecithin)、多聚醇 (pluronic polyol)、聚阴离子 (polyanion)、肽 (peptides)、油乳剂 (oil emulsion)、匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin), 与二硝基酚 (dinitrophenol)。有用的人用佐剂包括 BCG (卡介苗 (bacille Calmette-Guerin)) 与短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。多克隆抗体, 即抗体分子的异种群体 (heterogeneous population), 存在于经免疫动物的血清中。

[0033] 单克隆抗体, 即抗体分子的同种群体 (homogeneous populations) 可使用标准杂交瘤技术制备 (参见, 例如 Kohler 等 (1975) *Nature* 256, 495; Kohler 等 (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler 等 (1976) *Eur J Immunol* 6, 292; 和 Hammerling 等 (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N. Y.)。具体而言, 单克隆抗体可藉由任何可生产抗体的技术获得, 如叙述于 Kohler 等 (1975) *Nature* 256, 495 和美国专利 No. 4, 376, 110 的持续性细胞系 (continuous cell line); 人 B 细胞杂交瘤 (B-cell hybridoma) 技术 (Kosbor 等 (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole 等 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026), 与 EBV-杂交瘤 (EBV-hybridoma) 技术 (Cole 等 (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。此种抗体可为任何种类的免疫球蛋白, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 与其任何亚类。可在体内 (in vivo) 或在体外 (in vitro) 培养本发明用来生产单克隆抗体是杂交瘤。体内产生高效价单克隆抗体的能力使其成为特别有效的制造方法。

[0034] 此外, 可藉由已知技术产生抗体片段。例如, 此种片段包括, 但不限于 F(ab')₂ 片段, 其可藉由胃蛋白酶 (pepsin) 分解抗体分子产生, 与 Fab 片段, 其可藉由减少 F(ab')₂ 片段的二硫键 (disulfide bridge) 产生。

[0035] 无更进一步详细阐述, 可以相信的是, 本领域技术人员可根据上述内容, 利用本发明至其最大范围。因此, 下述特定实施例仅被建构来说明, 且不论于任何形式中并非为所揭露的限制。所有此处提及之出版物被引用作为本说明书的揭示内容。

[0036] 实施例 1: 使用尿液白细胞相关免疫球蛋白样受体 -2 或 α -1 酸性糖蛋白为生物标记来诊断肾病

[0037] 材料与amp;方法

[0038] (i) 个体

[0039] 下列人类个体群组参与于本研究中:

[0040] (a) 健康受试者: 无糖尿病 (diabetic mellitus) 具正常肾功能,

[0041] (b) DM 患者: 具有第 2 型糖尿病, 但无肾病,

[0042] (c) DN 患者: 具有糖尿病肾病,

[0043] (d) DN 尿毒症 (uremia) 患者: 具有糖尿病肾病伴有尿毒症,

[0044] (e) IgAN 患者: 具有 IgA 肾病

[0045] (f) MGN 患者: 具有膜状肾小球肾炎 (membranous glomerulonephritis)

[0046] (g) CHN 患者: 具有由中草药诱发的肾病, 与

[0047] (h) CIN 患者: 具有慢性间质性肾炎 (chronic interstitial nephritis)。

[0048] 健康受试者与患者的临床特征总整于下方表 1 中:

[0049]

表1、患者特征

	健康	DM	DN	DN尿毒症	IgAN	MGN	CHN	CIN
年纪, 平均(标准差)	67.94 (12.30)	57.33 (10.52)	72.38 (7.44)	58.14 (12.79)	28.33 (12.31)	38.00 (13.11)	47.42 (10.43)	59.88 (7.62)
女性, n (%)	6 (37.5)	2(33.33)	1 (12.5)	2 (28.57)	4 (44.44)	2 (66.67)	14 (73.68)	4 (50.00)
血清肌酸酐(Serum creatinine) (mg/dL), 平均(标准差)	0.86 (0.14)	0.85 (0.24)	1.39 (0.49)	4.23 (4.65)	1.03 (0.48)	0.60 (0.20)	5.39 (5.39)	3.54 (2.28)
MDRD_S_肾小球过滤率, 平均(标准差)	86.28 (13.19)	106.86 (70.47)	58.60 (20.75)	58.02 (61.53)	104.29 (56.19)	144.96 (55.15)	22.70 (17.07)	24.32 (15.91)

[0050] (ii) 基质辅助激光解吸电离质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS) 分析

[0051] 自上列人类个体群组于早晨收集中段尿液样本。以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of fly-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析与蛋白酶抑制剂混合的来自健康受试者与患者二者的这些尿液样本。在健康受试者群组 and 各个患者群组中以不同方式存在的肽候选物是根据比较各患者群组与健康受试者群组间的多肽形态 (polypeptide pattern) 并考虑到临床参数 (demographic) 与样本参数的统计评估 (statistical evaluation) 来鉴定的。将这些肽纯化, 经由例行技术测定其氨基酸序列。

[0052] (iii) Western 印迹 (Western blot)

[0053] 根据例行技术, Western 印迹分析使用对白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 片段 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) 与 α -1 酸性糖蛋白片段 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) 特异性的抗体来执行。再对照在相同样本中的肌酸酐 (creatinine) 或蛋白质的水平将结果进行标准化。

[0054] (iv) 酶联免疫吸附分析 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)

[0055] 将尿液样本与蛋白酶抑制剂混合且并与稀释缓冲溶液进行 1:100 倍稀释而将血清样本 1:10 稀释。将稀释后的样本一式三份置于酶联免疫吸附分析盘中。白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的浓度经由标准三明治酶联免疫吸附分析方法测定并与对照在相同样本中的肌酸酐或蛋白质的水平来进行标准化。

[0056] 结果

[0057] 经由上述的基质辅助激光解吸电离质谱分析, 侦测到 DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) 与 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) 在来自肾病患者的尿液样本中的水平高于来自健康对照组的尿液样本。SEQ ID NO:1 与 2 分别为白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的片段。这两种肽在健康受试者群组 and 不同患者群组中的阳性侦测率 (positive rate) 表示于下方表 2 中:

[0058]

种类	群组	患者数目	SEQ ID NO: 2的阳性 性侦测率 N (%)	SEQ ID NO: 1的阳性 性侦测率 N (%)
健康	健康	19	0 (0%)	1 (5.3%)
糖尿病肾病	DM	7	0 (0%)	2 (28.6%)
	DN	8	2 (25%)	8 (100%)
	DN 尿毒症	11	6 (54.5%)	8 (72.7%)
免疫介导肾病 (Immune-mediated Nephropathy)	IgAN	12	0 (0%)	8 (66.7%)
	MGN	3	0 (0%)	2 (66.7%)
间质性肾炎	CHN	18	10 (55.6%)	17 (94.4%)
	CIN	7	3 (42.9%)	7 (100%)
总和		85	21	53

[0059] 该结果也显示,肾病患者尿液中这两种肽的水平与蛋白尿不相关,这指出它们可在尿液中的蛋白质,特别是白蛋白出现前,用以侦测肾脏损伤 (kidney lesions)。

[0060] 此外,于肾病患者中发现尿液内这两种肽的水平与肾小球过滤率 (glomerular filtration rate, GFR) 逆相关,这指出它们可作为监测肾功能改变与肾病发展的标志。

[0061] 经由上述酶联免疫吸附分析与 Western 印迹分析,发现在来自肾病患者 (例如具有中草药诱发肾病的患者) 与来自健康对照组的尿液样本中,白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白有差异表现。参见下方表 3。更明确地,在健康对照组的尿液样本中几乎没有侦测两种蛋白质中任一的存在;尽管于来自肾病患者的尿液样本中发现较高的蛋白质水平。这结果指出两种蛋白质中的任一可被用作诊断肾病的标志。

[0062]

表3、于不同患者群组中 α -1酸性糖蛋白比肌酸酐之比值

	健康	DM	DN	IgAN	MGN	CHN	CIN	DN尿毒症
AGP/Cr (ng/mg) x 1000 平均(标准差)	2.57 (2.52)	2.91 (1.68)	29.18 (30.93)	15.52 (20.87)	139.51 (137.53)	19.55 (39.36)	51.31 (65.46)	97.13 (140.60)

[0063] 实施例 2:使用尿液白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的组合为生物标记来诊断肾病

[0064] 如于上方实施例 1 中所述来测定来自健康对照组与肾病患者 (包括具有糖尿病肾病、尿毒症、IgA 肾病、中草药诱发肾病,与膜状肾小球肾炎 (membranous glomerulonephritis) 肾病的患者) 的尿液白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的水平。

[0065] 如于第 1 图中所示,结合上述两种蛋白质标志的水平,在所有类型的肾病患者中比在健康对照组中远高得多 (AUROC = 0.93)。这指出结合白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白可被做为高灵敏度与特异性的诊断肾病的可靠生物标记。

[0066] 在尿液白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 与 α -1 酸性糖蛋白的组合中发现,其在侦测由中草药所诱发的肾病中特别可靠。参见第 2 图。本研究所得的 AUROC 达到 1.0,可指出当使用此生物标记诊断具有中草药诱发肾病的患者时,诊断准确度为 100%。

[0067] 其它实施方式

[0068] 本说明书揭露之所有特征可结合成任何组合。本说明书所揭露各特征可藉由具有相同、等同或相似目的之特征可取代。除非以别的方式特别叙述,所揭露之各特征仅为一系列相等或相似特征之实施例。

[0069] 从以上叙述,本领域技术人员可轻易地确定本发明之必要特征,且在不违反本发明精神与范围下,可为本发明做各种改变与修饰以适应各种用法与情况。因此,其它实施例也包含于权利要求中。

[0001]

序列表

<110> 财团法人工业技术研究院
 Yeh Mary Ya-Ping
 Tseng, Tzu-Ling
 Lu, Ching-Fang
 Lin, Wei-Ya
 Hsu, Tsai-Wei
 Chen, Yi-Ting
 Yang, Chwei-Shiun

<120> 肾病相关的生物标记

<130> 70006-009001

<150> 61/147, 785

<151> 2009-01-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 的片段

<400> 1

Asp Phe Leu Glu Leu Leu Val Lys Gly Thr Val Pro Gly Thr Glu Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Phe Asp Ala Pro
 20

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -1 酸性糖蛋白的片段

<400> 2

Gly Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg Asp Thr Lys Thr
 1 5 10 15

Tyr Met Leu Ala Phe Asp Val Asn Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu Ser
 20 25 30

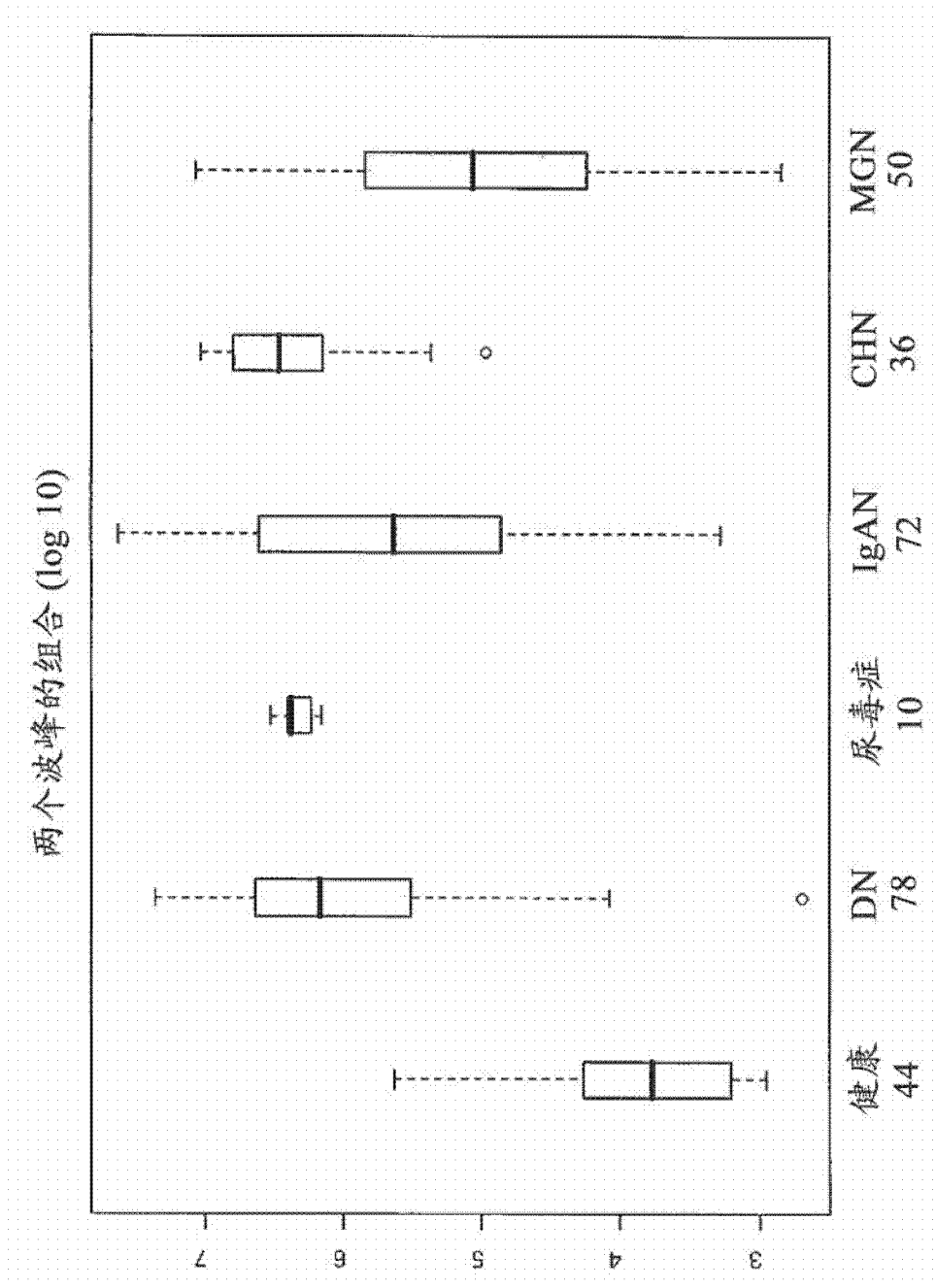


图 1

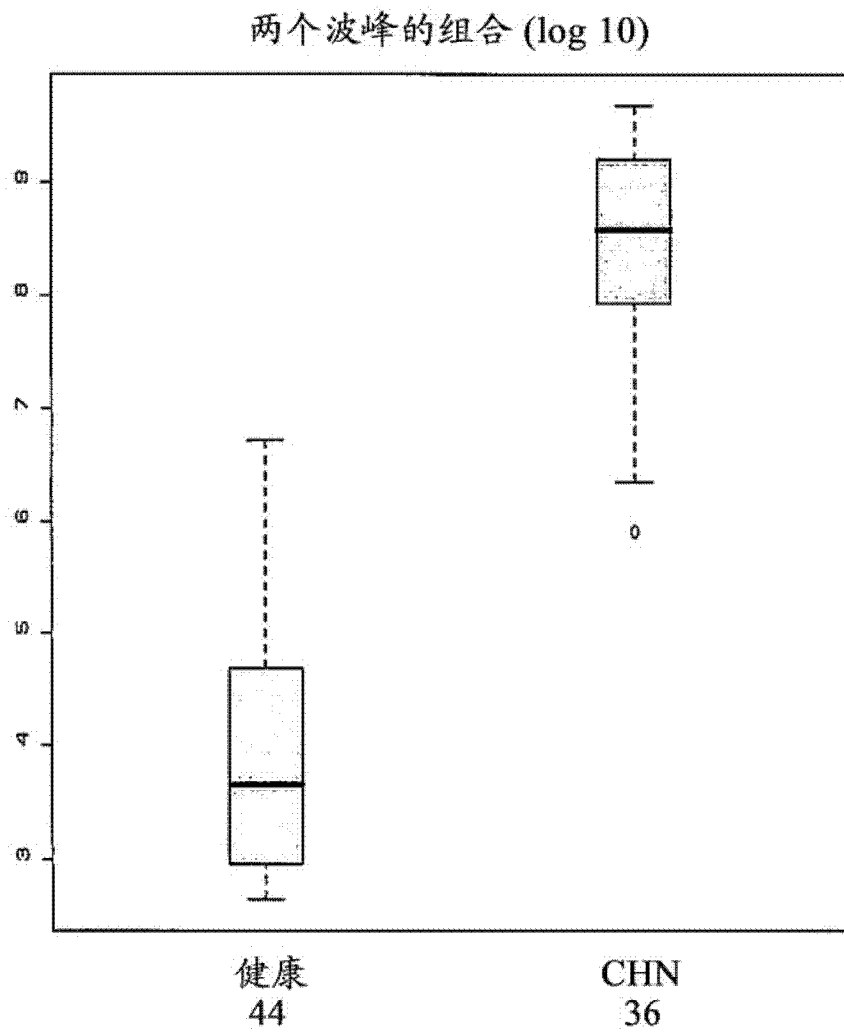


图 2

专利名称(译)	肾病相关的生物标记		
公开(公告)号	CN102300875B	公开(公告)日	2014-07-16
申请号	CN201080005754.6	申请日	2010-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
[标]发明人	曾镛翎 吕静芳 林微雅 徐采薇 叶亚平 陈怡婷 杨垂勋		
发明人	曾镛翎 吕静芳 林微雅 徐采薇 叶亚平 陈怡婷 杨垂勋		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/493 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/68 C07K14/705 C40B30/00 G01N27/00		
CPC分类号	C07K14/70503 G01N2333/70503 G01N33/6893 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N2333/4728 G01N2800/347 C07K16/2803		
审查员(译)	王宽		
优先权	61/147785 2009-01-28 US		
其他公开文献	CN102300875A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

使用尿液生物标记诊断肾病(nephropathy)、监测肾病发展，与评估肾病治疗之功效。这些尿液生物标记包括白细胞相关免疫球蛋白样受体-2 (leukocyte-associated Ig-like receptor-2)、 α -1酸性糖蛋白(alpha-1acid glycoprotein)、其片段与其组合。

