



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102221608 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

---

(21) 申请号 201110088180. X

(22) 申请日 2011. 04. 06

(71) 申请人 浙江大学医学院附属第一医院  
地址 310003 浙江省杭州市庆春路 79 号

(72) 发明人 陈江华 彭文翰 茅幼英 寿张飞  
姜虹 陈大进

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

---

(54) 发明名称

一种抗体组合物及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,公开了一种抗体组合物及其应用。本发明抗体组合物,含有 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体。利用本发明抗体组合物,可以一次性诊断急性排斥,并可准确鉴别急性肾小管坏死。利用本发明抗体组合物制备的检测试剂克服了目前对于急性排斥类别的诊断仅限于肾组织活检的缺陷,为临床诊断肾急性排斥反应及急性肾小管坏死区别提供了一种无创性方法。

1. 一种抗体组合物,其特征在于该抗体组合物含有 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特征在于所述的特异抗体为单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体或抗体片段,优选单克隆抗体。
3. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特征在于所述的特异抗体为单克隆抗体。
4. 权利要求 1 所述的抗体组合物在制备移植肾急性排斥反应诊断和 / 或肾小管损伤鉴别试剂中的应用。
5. 一种含有权利要求 1 所述抗体组合物的试剂盒。
6. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于所述的试剂盒是采用 ELISA、放射免疫分析、自动化免疫分析、免疫沉淀、流式微珠测定或液态芯片技术 (LUMINEX) 平台制备和测定的。

## 一种抗体组合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种抗体组合物及其应用,特别涉及可用于制备移植肾急性排斥反应诊断和急性肾小管坏死鉴别诊断的抗体组合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 肾脏移植是治疗终末期肾病最理想的肾脏替代疗法。随着移植手术技术的进步和新型免疫抑制剂的应用,肾移植术后人和肾的存活率都有了很大的提高,但肾移植后的排斥反应仍然是影响肾移植预后的主要因素,并与移植肾和移植受者的长期存活率明显相关。排斥反应的诊断主要依靠肾组织病理活检,然而目前的病理活检还存在很多问题,首先它是有创性检查,不可避免存在活检相关并发症(如出血、移植物破裂)的危险,无法在短期内反复检查,也无法在门诊动态观察随访,而且随着移植术后的时间延长,为了监测移植受者的免疫状态的变化,需要定期的程序活检,但活检的费用和移植受者的接受程度也制约活检的开展;其次目前的移植病理缺乏敏感的手段发现早期的急性排异,诊断往往是在出现明显得移植物损伤后,不能早期指导临床医生抗排异治疗;第三病理检查较难预测抗排异治疗的反应,不能有效预测移植物的长期存活;另外活检标本还存在代表性问题,穿刺局部的组织有时候并不能很好的代表整个移植物的状态。

[0003] 正是由于目前的病理活检还无法满足临床医生的要求,寻求无创性检查来辅助移植肾功能监测,对病理活检进行补充,尿液检查无疑是监测移植肾功能较好的选择,近年来尿蛋白组学研究发现正常尿蛋白除了 30%来自血浆蛋白,其余 70%均来自肾脏本身,能够很好的反映肾脏的病理生理过程,在生理性和病理性刺激下,肾小球和肾小管相应作出反应,引起尿蛋白排出的变化。如果通过对尿液成分研究,找到一个或数个具有较高敏感性和特异性的生物学标记,研制出相应的诊断试剂盒,通过一滴尿液就可以明确移植肾免疫状态,迅速作出急性排异的诊断,区分排异类型,直接指导抗排异治疗,从而建立移植肾免疫状态监测和排异诊断的新模式,取代病理活检,使其具有极大的应用前景。

[0004] 肾移植术后早期的急性肾小管损伤和坏死的最终诊断也是依赖于肾活检,依据病理表现给予诊断。而术后早期急性排斥和急性肾小管损伤临床上易混淆,均可表现为尿量减少,肾功能肌酐反跳或下降缓慢,最终还是需要移植肾活检病理来鉴别诊断。虽然有研究利用 NGAL, IL18 等因子分析来反映移植后肾小管损伤和移植肾复功情况,但尚未有研究鉴别移植肾急性肾小管坏死和急性排斥。Isaac E. Hall 等(J Am Soc Nephrol 21:189-197, 2010)对 91 例肾移植术后 1 天内动态尿液 NGAL 的测定分析结果显示,术后 1 天 NGAL 的高表达可以预测移植肾延迟复功,需要血透治疗;而 NGAL 的低表达则预示移植肾功能恢复良好。

[0005] Fractalkine(FKN)是趋化因子受体 CX3CR1 的配体,CX3CR1 表达于 T 细胞,单核巨噬细胞等表面。发明人的前期研究对 81 例急性排斥和 167 例非排斥者的尿液 Fractalkine 测定分析,结果显示 Fractalkine 诊断急性排斥的敏感性和特异性分别为 80.3%和 81.4%。本发明的目的在于联合 Fractalkine 和 NGAL 可急性排斥,并同时鉴别急性排斥和

急性肾小管坏死,克服病理活检创伤性的局限,达到无创诊断的目的。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种可用于制备无创性肾急性排斥反应同时还能鉴别是否肾小管损伤的鉴别诊断试剂的抗体组合物。

[0007] 本发明的另一目的是提供该抗体组合物的应用。

[0008] 本发明的又一目的是提供含有该抗体组合物的试剂盒。

[0009] 本发明的目的可通过如下技术方案实现：

[0010] 一种抗体组合物,含有 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体。

[0011] 所述的特异抗体为单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体或抗体片段。

[0012] 所述的特异抗体优选单克隆抗体。

[0013] 所述的含有 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体的抗体组合物在制备肾移植急性排斥反应诊断和 / 或肾小管损伤鉴别试剂中的应用。

[0014] 一种含有抗体组合物的试剂盒,所述的抗体组合物为 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体。

[0015] 以上的抗体组合物的试剂盒试剂盒,是采用 ELISA、放射免疫分析、自动化免疫分析、免疫沉淀、流式微珠测定或液态芯片技术 (LUMINEX) 平台制备和测定的。

[0016] 本发明的有益效果：

[0017] 本发明对 167 例非排斥组,81 例急性排斥组和 20 例急性肾小管坏死组的尿液测定分析,Fractalkine 诊断急性排斥的敏感性和特异性分别为 80.3%和 81.4%。联合 FKN 和 NGAL 细胞因子的特异抗体试剂盒,诊断急性排斥反应和急性肾小管坏死的敏感性为 77.8%,特异性为 75%,可用于制备肾

[0018] 急性排斥反应的诊断肾及小管损伤鉴别试剂,克服了现有的无法在诊断急排时同时肾小管损伤鉴别技术问题。

[0019] 本发明提供了制备试剂盒的方法,可以采用 ELISA(酶联免疫吸附测定)、放射免疫分析、自动化免疫分析、免疫沉淀、流式微珠测定或 LUMINEX 微球技术平台制备的。优选 LUMINEX 微球技术平台制备。液态芯片技术 (luminex) 是一种新型生物分子高通量检测技术,也是目前唯一得到权威机构和 FDA 共同认可用于临床诊断应用的生物芯片平台,具有比传统 ELISA 更高的灵敏度和高通量的优势,本发明的抗体组合物运用液态芯片技术 (LUMINEX) 平台制备成试剂盒可进一步提高其敏感度和特异度。

## 具体实施方式

[0020] 实施例 1:联合 FKN 和 NGAL 试剂盒诊断急性排斥和鉴别诊断急性肾小管坏死

[0021] 实验方法：

[0022] 1. ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,Fractalkine (R&D Systems, DY365), NGAL (Cat. No. KIT 037CE, BIOPORTO)。

[0023] 2. 本实验研究对象为:167 例非排斥和 81 例急性排斥和 20 例急性肾小管坏死的尿液样本,尿标本均来自浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心的移植标本库。该中心尿标本留取的原则:移植术后 2、4、6、8 周及术后随访常规留取晨尿;所有移植肾活检者在

活检之前即刻留取尿标本。留取的尿标本尽快放入  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存。

[0024] 3. ELISA 测定按照试剂盒说明书操作。

[0025] 4. 所有排斥诊断依据肾组织活检标准 (Banff2003 诊断标准)。

[0026] 5. 统计学方法:利用软件 SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), ROC 曲线分析评价单个因子诊断价值,平行诊断试验(串联)评价两个因子联合诊断价值。

[0027] 结果:

[0028] 急性排斥时 Fractalkine 含量显著高于非排斥组,诊断急性排斥的敏感度和特异度分别为 80.3%和 81.4%。

[0029] 联合 Fractalkine 和 NGAL 诊断急性排斥和急性肾小管坏死的敏感性和特异性分别为敏感性 77.8%,特异性为 75%。

[0030] 实施例 2:制备含 FKN 特异抗体和 NGAL 特异抗体的试剂盒

[0031] 试剂盒中抗体微珠的制备:(试剂盒中常用试剂由商业化途径购买或用常规技术配置)

[0032] 1、清洗微珠 (MicroPlex bead, Luminex), (涡旋,真空超声 30s);

[0033] 2、取 2 种不同微珠各  $5 \times 10^6$  个微珠(约 400ul)到离心管中;

[0034] 3、8000g 离心 2min

[0035] 4、弃上清,加 100ul ddH<sub>2</sub>O,涡旋,真空超声 30s;

[0036] 5、8000g 离心 2min;

[0037] 6、弃上清,加 80ul 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,,10ul 50mg/ml Sulfo-NHS,10ul 50mg/ml EDC,涡旋,真空超声 30s;

[0038] 7、避光室温放置 20min(每隔 10min 涡旋一下);

[0039] 8、8000g 离心 2min;

[0040] 9、250ul 50mM MES 缓冲液清洗两次;

[0041] 10、弃上清,加 100ul 50mM MES 缓冲液,加入相应 10ul NGAL 抗体 (MAB 17571, R&Dsystems, USA), Fractalkine 抗体 (MAB 3652, R&D systems, USA) 和 350ul 50mM MES 缓冲液,涡旋,真空超声 30s

[0042] 11、在震荡仪 (500-600rpm) 上避光室温放置 2h;

[0043] 12、8000g 离心 2min;

[0044] 13、弃上清,加入 500ul PBS-TBN,涡旋,真空超声 30s;

[0045] 14、8000g 离心 2min;

[0046] 15、弃上清,加入 1ml PBS-TBN,涡旋,真空超声 30s;

[0047] 16、8000g 离心 2min;

[0048] 17、弃上清,加 1ml PBS,1% BSA,0.05%叠氮钠;

[0049] 18、4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

[0050] 试剂盒组成部分:

[0051]

蛋白标准品 (NGAL、Fractalkine) 1ml  $\times$  2管

[0052]

|  |           |
|--|-----------|
| 抗体微珠 (10×)                                       | 0.5ml×1 管 |
| 生物素标记的抗体浓缩液 (10×)                                | 1ml×1 管   |
| 洗液 (10×) 即 PBS, 10%BSA 含 150mMsodium azide (10×) | 30ml×1 瓶  |
| Biotin 稀释液                                       | 12ml×1 瓶  |
| Streptavidin-RPE 浓缩液 (10×)                       | 1ml×1 管   |
| Streptavidin-RPE 稀释液                             | 12ml×1 管  |
| 96 空板  | 1 盒       |

[0053] 上述“(10×)”表示 10 倍浓度的浓缩液。

[0054] 试剂盒的使用

[0055] 1、已制备好的抗体微珠 (100 个珠子 /u1) 超声涡旋 20s ;

[0056] 2、1× 洗液预湿实验所需要的孔,真空抽吸 ;

[0057] 3、每孔加 50u1 抗体珠子稀释液 ;

[0058] 4、Std 组按浓度梯度每孔均加入 2 种蛋白标准品 :NGAL 和 Fractalkine,对照组加入 PBS-1% BSA,设立复孔 ;实验组每孔加入 50u1 尿液 ;轻轻混匀 ;

[0059] 5、避光震荡仪 (500-600rpm) 上震荡 30min ;

[0060] 6、真空抽吸上清 ;

[0061] 7、每孔加 100u1 洗液,清洗两次 ;

[0062] 8、每孔加 50u1 洗液,轻轻混匀 ;

[0063] 9、抗体先用 biotin 稀释液稀释,每孔加入 50u1 4ug/ml 生物素标记的 NGAL 抗体 (Cat. noBAF1757, R&D systems, USA), Fractalkine 抗体 (Cat. no BAF3652, R&D systems, USA) 轻轻混匀 ;

[0064] 10、避光,震荡仪 (500-600rpm) 上震荡 30min ;

[0065] 11、真空抽吸上清 ;

[0066] 12、每孔加 100u1 洗液,清洗两次 ;

[0067] 13、每孔加 50u1 洗液,轻轻混匀 ;

[0068] 14、Streptavidin-RPE 浓缩液先用 Streptavidin-RPE 稀释液稀释,每孔加 50u1 稀释好的 Stretavidin-RPE (1×), (Cat. no 405203, Biolegend, USA), 轻轻混匀 ;

[0069] 15、避光,震荡仪 (500-600rpm) 上震荡 30min ;

[0070] 16、真空抽吸上清 ;

[0071] 17、每孔加 100u1 洗液,清洗两次 ;

[0072] 18、每孔加 100u1 洗液,轻轻混匀 ;

[0073] 19、每孔吸 50u1,在 Luminex 上检测。

[0074] 检测结果导入 Luminex 分析软件,按软件说明书操作,确定尿液中各因子的含量 (Luminex 给出的结果是各因子的含量),再利用 SPSS 统计分析,判断结果。

[0075] 实施例 3 :

[0076] 基于实施例 2 制备的试剂盒 (每个单抗用量为 50ug/ml 10u1),检测肾移植术后受者发生肾急性排斥反应的情况。

[0077] 1. 研究对象为肾移植术后受者, 并且具有明确病理诊断, 移植肾功能稳定者 (no-AR) 30 例, 急性排斥 30 (AR) 例, 急性肾小管坏死 (ATN) 10 例。

[0078] 2. 检测样本为以上受者的尿液标本 1ml, 同时利用生化仪测定尿液中肌酐浓度。

[0079] 3. 按照试剂盒说明书检测分析, 判断标准如下:

[0080] Fractalkine 能检测浓度为 0-20ng/ml, NGAL 为 0-200ng/ml。

[0081] 区分 AR 和 no-AR 的 cutoff 值分别为: Fractalkine 为 300ng/mmol creatinin;

[0082] 区分 AR 和 ATN 的 cutoff 值分别为: Fractalkine 为 350ng/mmol creatinine, NGAL 为 90ng/mmol creatinine。

[0083] 4. 结果如下表:

[0084] 表 1

|        |             | 敏感度   | 特异度 | P 值   |
|--------|-------------|-------|-----|-------|
| [0085] | AR vs no-AR | 86.7% | 90% | <0.01 |
|        | AR vs ATN   | 86.7% | 80% | <0.01 |

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种抗体组合物及其应用                                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102221608A</a>                   | 公开(公告)日 | 2011-10-19 |
| 申请号            | CN201110088180.X                               | 申请日     | 2011-04-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 浙江大学医学院附属第一医院                                  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 浙江大学医学院附属第一医院                                  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 浙江大学医学院附属第一医院                                  |         |            |
| [标]发明人         | 陈江华<br>彭文翰<br>茅幼英<br>寿张飞<br>姜虹<br>陈大进          |         |            |
| 发明人            | 陈江华<br>彭文翰<br>茅幼英<br>寿张飞<br>姜虹<br>陈大进          |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/577                           |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，公开了一种抗体组合物及其应用。本发明抗体组合物，含有FKN特异抗体和NGAL特异抗体。利用本发明抗体组合物，可以一次性诊断急性排斥，并可准确鉴别急性肾小管坏死。利用本发明抗体组合物制备的检测试剂克服了目前对于急性排斥类别的诊断仅限于肾组织活检的缺陷，为临床诊断肾急性排斥反应及急性肾小管坏死区别提供了一种无创性方法。

