



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102292637 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 05

(21) 申请号 200980155194. X

(22) 申请日 2009. 11. 23

(30) 优先权数据  
61/116, 713 2008. 11. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2011. 07. 21

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/IB2009/055299 2009. 11. 23

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02010/058378 EN 2010. 05. 27

(73) 专利权人 法蒂亚公司  
地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 P·文吉

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002  
代理人 王健

(51) Int. Cl.  
G01N 33/53(2006. 01)  
G01N 33/543(2006. 01) (续)

(56) 对比文件  
W0 2009062520 A1, 2009. 05. 22, 说明书第 5 页第 34 行 - 第 8 页第 10 行, 第 9 页第 25 行 - 第 16 页第 29 行.  
W0 2004088276 A2, 2004. 10. 14, 全文.

WO 2006066587 A1, 2006. 06. 29, 全文.  
CN 101027556A A, 2007. 08. 29, 全文.  
CN 101010001 A, 2007. 08. 01, 全文.  
Michael Zappitelli, et al..Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. 《Critical Care》.2007, 第 11 卷 (第 4 期), R84.  
Jaya Mishra, et al..Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. 《Lancet》. 2005, 第 365 卷 (第 9466 期), 1231-1238.  
蔡林君. HNL/NGAL 用于急性肾损伤早期诊断及其免疫学测定方法研究. 《中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》. 2009, (第 08 期), 第 75 页最后 1 行 - 第 79 页第 7 行, 第 80 页表 6. 1.  
Lars Kjeldsen, et al..Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. 《Journal of Immunological Methods》. 1996, 第 198 卷 (第 2 期), 155-164. (续)

审查员 张绚

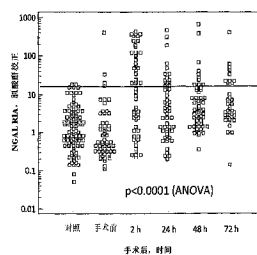
权利要求书1页 说明书16页  
序列表2页 附图12页

(54) 发明名称  
用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒

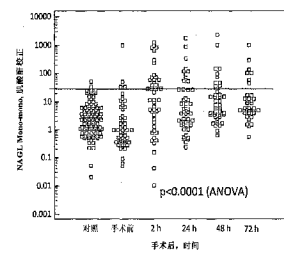
(57) 摘要

检测个体急性肾损伤的方法包括 (a) 将所述个体的体液样品与包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体和可检测标记的测定装置接触, 以使得样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体复合; 和使用可检测的标记确定样品中的 NGAL 蛋白与测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的复合物的量, 其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力, 并且所形成的复合物的量代表急性肾损伤的水平. 确定个体样品中

NGAL 蛋白来源的方法包括确定样品中 NGAL 蛋白的单体、二聚体和异二聚体形式的相对量的步骤, 从而使改进的诊断和更好的靶向治疗成为可能.



2A



2B

CN 102292637 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 33/577*(2006.01)

(56) 对比文件

Linjun Cai, et al..Assays of urine

levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances. 《Clinica Chimica Acta》.2009, 第 403 卷 ( 第 1-2 期 ), 121-125.

1. 嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体在制备用于通过如下方法检测心脏手术 3 小时内的患者中急性肾损伤的测定装置中的用途,所述方法包括

(a) 从所述心脏手术 3 小时内的患者中获得尿液样品;

(b) 将来自所述患者的尿液样品与包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体和可检测标记的测定装置接触,以使得样品中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白与嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体复合;和

(c) 使用可检测的标记来确定样品中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白与测定装置中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体之间形成的复合物的量,其中所述装置中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体具有与超过两种嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白表位结合的能力,并且其中所形成的复合物的量代表急性肾损伤的水平;

其中所述测定装置包括

(i) 多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体和单克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体,或

(ii) 两种不同的多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体,

一种其中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合基质,而其余的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合可检测的标记。

2. 权利要求 1 的用途,其中对在心脏手术后接连相继的时间段所获得的相应样品重复步骤 (b) 和 (c)。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述测定装置包括多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体和单克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体,所述多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合基质,所述单克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合可检测的标记。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述测定装置包括两种不同的多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体,一种其中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合基质,而其余的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体结合可检测的标记。

5. 权利要求 1 的用途,其中通过酶联免疫吸附测定来确定样品中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白与嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体之间形成的复合物的量。

## 用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒；特别是涉及这样的方法和试剂盒，其基于对嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) (亦称作人嗜中性粒细胞脂质运载蛋白 (HNL)) 的测量。

### [0002] 发明背景

[0003] 急性肾损伤 (AKI) 是严重的病症，其可在手术后发生，例如作为心脏手术或肾移植的并发症；作为体内引入诊断剂的副作用，例如 X 光造影剂、或肾中毒治疗剂等；和 / 或与其它医学病症相关联，例如糖尿病、败血病、出血性休克等。举例来说，急性肾损伤在高达 30% 的所有经历心脏手术的患者中发生，并且关联了高死亡率、更复杂的住院过程、透析依赖性、生活质量下降、以及更高的感染性并发症风险。尽管在急性肾衰竭早期引入治疗已经显示降低死亡率和 / 或缩短治疗方案，但通常很难在早期检测到急性肾衰竭。

[0004] 在目前的临床实践中，AKI 的标准诊断被称为 RIFLE (增加 (Rise)、损伤 (Injury)、衰竭 (Failure)、丧失 (Loss)、末期肾病 (End-stage renal disease))，其是基于血清肌酸酐的提升或者尿液输出的减少。血清肌酸酐是一般肾功能的可靠标志物，但它在肾功能的急性变化中是不可靠的并且是延迟的指标。幸运地是，已经发现了数种有希望的新生物标志物，包括 HNL/NGAL (此后称为 NGAL)、肾损伤分子-1、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、和 IL-18。

[0005] NGAL 蛋白作为急性肾损伤标志物的用途已经受到了大量的关注。NGAL 是糖蛋白，最初被鉴定为嗜中性粒细胞特异性颗粒成分以及脂质运载蛋白家族的蛋白成员。该蛋白显示出以 25-kDa 的单体和 45-kDa 二硫键连接的同二聚体存在，它还可以通过分子间二硫桥与嗜中性粒细胞明胶酶 (亦称为基质金属蛋白酶 9, MMP-9) 共价复合成 135-kDa 的异二聚体形式。NGAL 由 Xu 等 (Journal of Immunological Methods, 171 :245-252 (1994)) 首次将描述为 HNL，作为体内和体外的嗜中性粒细胞活性的特异性标志物；并被用做炎症的诊断标志物 (Venge, 美国专利号 6, 136, 526, 其在此引入作为参考)。

[0006] 最近，Devarajan 等人 (美国专利公开号 2004/0219603A1 和 2005/0272101A1) 公开了 NGAL 作为肾小管细胞损伤和其他肾疾病和损伤的生物标志物的用途。BioBorto Diagnostics, Gentofte, Denmark 最近提供了用于急性肾衰竭早期诊断的“NGAL ELISA Kit”、以及小鼠单克隆抗人 NGAL 抗体和小鼠单克隆抗大鼠 NGAL 抗体。此外，Dent 等人 (Critical Care, 11(6) :R127 (2007)) 描述了来自 Biosite Inc., San Diego, CA 的 Triage® NGAL 装置，利用与荧光纳米颗粒缀合的 NGAL 特异性单克隆抗体，用于作为急性肾损伤生物标志物测量 NGAL。

[0007] 然而，在检测和 / 或监测急性肾损伤方面的进一步提高是有需要的。

### [0008] 发明概述

[0009] 因此，本发明提供用于检测急性肾损伤和用于对急性肾损伤治疗的效果进行监测的方法、装置和试剂盒。

[0010] 在一个实施方案中，本发明涉及用于检测个体中急性肾损伤的方法，包括 (a) 将来自所述个体的体液样品与包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体和可

检测标记的测定装置接触,以使得样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体复合;和 (b) 使用可检测的标记来确定样品中的 NGAL 蛋白与测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力,并且其中所形成的复合物的量代表急性肾损伤的水平。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于检测个体中急性肾损伤的方法,包括 (a) 将来自所述个体的体液样品与多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体接触,和 (b) 使用可检测的标记来确定样品中的 NGAL 与多克隆 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中复合物的量代表急性肾损伤的水平。

[0012] 在另外的实施方案中,本发明涉及用于对急性肾损伤治疗的效果进行监测的方法,包括以下步骤:(a) 将来自所述个体的第一体液样品与包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体和可检测标记的第一测定装置接触,以使得第一样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体复合,(b) 使用可检测的标记来确定第一样品中的 NGAL 蛋白与第一测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力,(c) 将治疗开始后从所述个体获得的第二体液样品与包括 NGAL 抗体和可检测标记的第二测定装置接触,以使得第二样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体复合,(d) 使用可检测的标记来确定来自第二样品的 NGAL 与第二测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的第二复合物的量,其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力,和 (e) 比较第一复合物的量与第二复合物的量,其中与第一复合物的量相比第二复合物量的降低表明治疗是有效的。

[0013] 在另外的实施方案中,本发明涉及用于对急性肾损伤治疗的效果进行监测的方法,包括以下步骤:(a) 将治疗前从所述个体获得的第一体液样品与多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体 (NGAL) 接触,(b) 使用可检测的标记来确定来自第一样品的 NGAL 蛋白与多克隆 NGAL 抗体之间形成的第一复合物的量,(c) 将治疗开始后从所述个体获得的第二体液样品与多克隆 NGAL 抗体接触,(d) 使用可检测的标记来确定来自第二样品的 NGAL 与多克隆 NGAL 抗体之间形成的第二复合物的量,和 (e) 比较第一样品中的 NGAL 与多克隆 NGAL 抗体之间形成的第一复合物的量和第二样品中的 NGAL 与多克隆 NGAL 抗体之间形成的第二复合物的量,其中与第一复合物的量相比第二复合物的量降低表明治疗是有效的。

[0014] 在另外的实施方案中,本发明涉及用于检测个体中的急性肾损伤的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包括测定装置,该测定装置包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体和可检测的标记,所述可检测的标记适用于确定体液样品中的 NGAL 与 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力。

[0015] 在另一个实施方案中,试剂盒包括适于与体液样品接触的第一多克隆嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 抗体、适用于确定体液样品中的 NGAL 蛋白与第一多克隆 NGAL 抗体之间形成的复合物的量第二 NGAL 抗体、和适用于确定体液样品中的 NGAL 与第一多克隆 NGAL 抗体之间形成的复合物量的可检测标记。

[0016] 在另外的实施方案中,本发明涉及用于检测个体中急性肾损伤的测定装置,包括固定于基材上并适于与体液样品接触的多克隆 NGAL 抗体、和适于对 NGAL 蛋白与固定的多

克隆 NGAL 抗体的复合物进行结合的可检测标记。

[0017] 由于本发明的这些方法、装置和试剂盒使用具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合能力的 NGAL 抗体,所述方法和试剂盒出人意料地显示出对作为生物标志物的 NGAL 的敏感性的改善,并因而在急性肾损伤的检测中显示出改善的敏感性。这种改善的敏感性可以提供对此类损伤的更早期的检测,从而会使得更早期的治疗应答成为可能。

[0018] 在另外的实施方案中,本发明涉及用于确定来自个体的样品中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 蛋白来源的方法。在更具体的实施方案中,所述方法可以用于区分源自肾的 NGAL 和源自嗜中性粒细胞的 NGAL。在一个具体实施方案中,此类方法包括 (a) 确定样品中 NGAL 蛋白的单体、二聚体和异二聚体形式的相对量,和 (b) 比较所确定的量,其中与二聚体 NGAL 蛋白相比单体和 / 或异二聚体 NGAL 蛋白的量占优势表明 NGAL 蛋白来源于个体的肾,而与单体或异二聚体 NGAL 蛋白相比二聚体 NGAL 蛋白的量相等或占优势则表明 NGAL 蛋白来源于个体的嗜中性粒细胞。NGAL 蛋白的确定或来源将有助于病症的诊断,并且在其它之外特别是使得改善的、靶向治疗成为可能。

[0019] 参考下列详细说明后将更充分地理解这些以及其他的优点和改善。

#### [0020] 附图简述

[0021] 参考附图后将更充分地理解详细说明,其中:

[0022] 图 1 显示了如实施例 1 所述的血浆肌酐的手术前和手术后水平。男性和女性的正常上限水平分别是  $100 \mu\text{mol/L}$  和  $90 \mu\text{mol/L}$ 。与男性和女性的正常水平相比,手术前的水平显著提升 ( $p < 0.001$ )。

[0023] 图 2A 和 2B 分别显示了如实施例 1 所述的,通过使用多克隆抗体的 RIA 测定和使用两种单克隆抗体的测定,所测量的尿液中 NGAL 的手术前和手术后水平。还显示了健康对象的水平。水平线标明上限 97.5,健康对照的百分位数。手术前和手术后水平之间的总体差异由 ANOVA 来评估并显示于图上。对于这两种测定,在所有 3 个时间点手术后水平显著不同于手术前水平 ( $p < 0.001$ )。

[0024] 图 3A-3C 分别显示了如实施例 1 所述的,通过使用多克隆抗体的 RIA 测定、使用多克隆和单克隆抗体的 ELISA 测定、和使用两种单克隆抗体的测定,所测量的手术后 2 小时尿液 NGAL 水平与体外循环时间 (ECC 时间) 之间关系的箱线图。统计学差异和中位值的倍数增加被标示出来。

[0025] 图 4A 和 4B 分别显示了如实施例 1 所述的,通过使用多克隆抗体的 RIA 测定和使用两种单克隆抗体的测定,所测量的尿液 NGAL 水平与 GFR(血浆半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C) 之间的关系。显示了线性回归分析的结果。

[0026] 图 5 显示了如实施例 1 所述的,通过使用多克隆 NGAL 抗体的 RIA 和使用两种单克隆抗体的测定,尿液中 NGAL 蛋白的测量之间的关系。线性回归分析:  $r^2 = 0.86, p < 0.0001, n = 331$ 。插入部分显示在浓度下端两次测定之间的关系。

[0027] 图 6 显示了在得自两位经历心脏手术的患者尿液样品 U1 和 U2 中,如实施例 2 所述的 NGAL 的不同分子形式的 Western 印迹结果。

[0028] 图 7 显示了如实施例 2 所述的,利用基于不同抗体的测定,对来自尿液 Superdex™-75 凝胶过滤的级分中 NGAL 的测量。峰 1 和峰 2 中的 NGAL 主要分子形式分别是二聚体和单体。插入部分是峰 1 的放大。

[0029] 图 8 显示了如实施例 2 所述的,在指定时间所确定的由条件培养基中培养的 HK-2 细胞进行 NGAL 合成的时程。值是来自于 3 次独立实验的一式两份测定的平均值  $\pm$ SD。标志 \*和 \*\*分别代表  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ 。

[0030] 图 9A 和 9B 显示在完全培养基或补充了刺激物的完全培养基中生长的 HK-2 细胞所分泌的 NGAL 水平(图 9A),或在角质形成细胞无血清培养基(K-SFM)或补充了刺激物的 K-SFM 中生长的 HK-2 细胞所分泌的 NGAL 水平(图 9B)。值是来自于 3 次独立实验的一式两份测定的平均值  $\pm$ SD。标志 \*、\*\*和 \*\*\*分别代表  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  和  $p < 0.001$ 。

[0031] 图 10 在下栏显示通过 Western 印迹检测用条件培养基培养的 HK-2 细胞所分泌的 NGAL,上栏显示在添加新鲜培养基(C)或添加补充了  $1\text{ng/mL IL-}\beta$  的培养基(S)后在指定时间点收集的 HK-2 细胞的 NGAL mRNA 表达。

[0032] 在参考详细说明后将更充分的理解本发明的各个方面、特征和实施方案。

### [0033] 详细说明

[0034] NGAL 最初从人嗜中性粒细胞分离,先前的工作表明测量血液中的 NGAL 是区分细菌和病毒引起的急性感染的优越方法。最近,已经研究了 NGAL 的排泄(例如在体液样品中如尿液)与急性肾损伤之间的密切联系。出人意料的是,利用单克隆-单克隆测定与使用多克隆抗体测定所进行的 NGAL 测量之间的比较显示,这些测定在临床表现方面有重要差异。该结果表明测定中抗体的选择是非常关键的,特别是具有与超过两种 NGAL 蛋白表位反应的能力的抗体的使用提供了敏感性提高的测定法,证明这些测定所鉴定的是在不同条件下排泄的不同 NGAL 变体。因此所述方法、装置和试剂盒使用具有与超过两种 NGAL 蛋白表位反应的能力的 NGAL 抗体。在这点上,此类 NGAL 抗体可以包括一种或多种多克隆 NGAL 抗体、和/或一种或多种多克隆 NGAL 抗体与一种或多种单克隆 NGAL 抗体的组合,如在下文进一步详细描述。此外,NGAL 抗体可以用于 NGAL 蛋白的捕获和/或具有可检测的标记。

[0035] 用于检测个体中急性肾损伤的方法可应用于任何人类个体,尤其可用于具有急性肾损伤风险的个体。这类个体包括,但不限于:进行心脏手术或肾移植的那些、体内引入诊断剂(例如,X光造影剂、或肾中毒治疗剂等)的那些、和/或患有糖尿病、败血症、出血性休克等的那些。在具体实施方案中,所述个体是心脏手术患者,并且所述样品在心脏手术 3 小时内得自该心脏手术患者。在另外的实施方案中,对在心脏手术后接连相继的时间段所获得的相应样品重复所述检测方法,例如在手术后 2 小时和 5 小时、在手术后 2 小时和 12 小时、在手术后 2、12 和 24 小时,等)。

[0036] 所述方法使用体液样品进行检测。在更具体的实施方案中,样品包括尿液、血液、血清、或血浆、或其纯化的组分。在更具体的实施方案中,样品是尿液。

[0037] 在一个实施方案中,所述方法包括(a)将来自个体的体液样品与包括 NGAL 抗体和可检测标记的测定装置接触,以使得样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体复合;和(b)使用可检测的标记来确定来自样品的 NGAL 蛋白与测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中装置中的 NGAL 抗体具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力,并且其中所形成的复合物的量代表急性肾损伤的水平。正如以上所述,具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力的 NGAL 抗体可以由一或多种不同的 NGAL 抗体来提供。

[0038] 可以用特定装置或技术进行校准,以确定所形成的复合物代表急性肾损伤的定性的量或定量的量。在具体的实施方案中,其中用放射免疫测定(RIA)进行测量,代表急性肾

损伤的量是 60ng/ml 或更多 NGAL 蛋白。在另一个实施方案中,其中用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行测量,代表急性肾损伤的量是 100ng/ml 或更多 NGAL 蛋白。

[0039] 在一个实施方案中,所述方法使用多克隆 NGAL 抗体,例如由 Xu et al, Journal of Immunological Methods, 171:245-252(1994) 所公开的,其援引加入本文。例如,如 Xu 等人所述,通过将总共 72  $\mu$ g 的纯化蛋白(在弗氏完全佐剂和不完全佐剂中均质化)多部位皮内注射入兔,从而在兔中激发出针对 NGAL(HNL) 的多克隆抗体。抗体的特异性可以通过在琼脂糖中的双向免疫扩散 (Devereux et al., Nucleic Acid Research, 12(1): 387-394(1984)) 来进行评价,以及针对嗜中性颗粒的提取物和下列纯化蛋白来进行测试:组织蛋白酶 G、弹性蛋白酶、髓过氧化物酶、溶菌酶、乳铁蛋白、嗜伊红粒细胞阳离子蛋白 (ECP) 和嗜酸性粒细胞蛋白 X (EPX/EDN)。当然也可以使用其它的 NGAL 抗体。

[0040] 在一个实施方案中,本发明的方法包括 (a) 将来自个体的体液样品与多克隆 NGAL 抗体接触,和 (b) 使用可检测的标记来确定样品的 NGAL 与多克隆 NGAL 抗体之间所形成的复合物的量,其中复合物的量代表急性肾损伤的水平。在具体实施方案中,例如,NGAL 抗体包括多克隆抗体,并且通过常规的放射免疫测定技术来确定样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体之间形成的复合物的量。此类技术是本领域公知的,还包括使用双放射性免疫测定技术,其中可以使用两种多克隆抗体或者可以使用一种多克隆抗体和一种单克隆抗体。在另一个实施方案中,通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来确定样品中的 NGAL 蛋白与 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,其中 ELISA 使用至少一种多克隆 NGAL 抗体。ELISA 技术也是本领域公知的。在使用 ELISA 过程的具体实施方案中,测定装置包括多克隆 NGAL 抗体和单克隆 NGAL 抗体,其中一种 NGAL 抗体结合基质,而其它的 NGAL 抗体结合可检测的标记。在更具体的实施方案中,多克隆 NGAL 抗体结合至,即,固定于基质上。在另外的实施方案中,多克隆 NGAL 抗体结合至基质,而单克隆 NGAL 抗体结合可检测的标记。或者,ELISA 可以使用包括两种不同多克隆 NGAL 抗体的测定装置,其中一种 NGAL 抗体结合基质,而其它 NGAL 抗体结合可检测的标记。可以使用本领域已知的其他测定技术,其中例如,将至少一种多克隆 NGAL 抗体固定到基质上,在更具体的实施方案中,将可检测的标记结合至另一 NGAL 抗体,其可以是单克隆 NGAL 抗体或第二多克隆 NGAL 抗体。

[0041] 因此,本发明还涉及用于此类方法的装置和试剂盒。在一个实施方案中,本发明的测定装置包括固定于基质上并适于与体液样品接触的多克隆 NGAL 抗体、和适于对 NGAL 蛋白和固定的多克隆 NGAL 抗体的复合物进行结合的可检测标记。在具体实施方案中,可检测的标记可以与 NGAL 抗体(单克隆或多克隆)复合,用于结合与固定的多克隆 NGAL 抗体复合的 NGAL 蛋白。测定装置可以作为“护理点 (point of care)”装置或试剂盒提供,便于医务人员的使用。

[0042] 显见的是,通过对来治疗方案前和后或者期间的个体的多个样品进行分析,本发明可以进一步用于监测急性肾损伤的治疗。此类方法通常包括将来自个体的第一体液样品与所述的第一测定装置接触,并确定第一样品的 NGAL 蛋白与第一测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的复合物的量,将治疗开始后得自所述个体的第二体液样品与所述的第二测定装置接触,并确定第二样品的 NGAL 与第二测定装置中的 NGAL 抗体之间形成的第二复合物的量,以及比较第一复合物的量与第二复合物的量。与第一复合物的量相比第二复合物的量降低表明治疗是有效的。

[0043] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于确定来自个体的样品中的嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的来源的方法。此类方法对于区分肾 NGAL 蛋白和嗜中性粒细胞 NGAL 蛋白特别有效。在一个实施方案中,所述方法包括 (a) 确定样品中 NGAL 蛋白的单体、二聚体和异二聚体形式的相对量,和 (b) 比较所确定的量,其中与二聚体 NGAL 蛋白相比单体和 / 或异二聚体 NGAL 蛋白的量占优势表明 NGAL 蛋白来源于所述个体的肾,而与单体或异二聚体 NGAL 蛋白相比二聚体 NGAL 蛋白的量相等或占优势表明 NGAL 蛋白来源于所述个体的嗜中性粒细胞。已经发现肾起源的 NGAL 蛋白基本上不含 NGAL 蛋白的二聚体形式,例如 Western 印迹所显示的。在具体实施方案中,样品包括尿液。在另一个具体实施方案中,通过将样品与包括单克隆 NGAL 抗体的测定装置接触来确定 NGAL 蛋白的相应量。在另一个实施方案中,通过将样品与包括多克隆 NGAL 抗体的测定装置接触来确定 NGAL 蛋白的相应量。可以使用如上所述的任意测定装置和技术、Western 印迹、或其他常规技术和 / 或装置。

[0044] 如下文实施例 2 所示,多克隆和单克隆抗体鉴别(即,与其复合)单体、二聚体和异二聚体的 NGAL 蛋白形式。但是,在来源于肾的 NGAL 中,结果基本上不含 NGAL 蛋白的二聚体形式,而在来自嗜中性粒细胞的 NGAL 蛋白的结果中 NGAL 的二聚体形式占优势。虽然不希望受到理论的约束,但是认为不同的 NGAL' s 暴露不同的表位,其然后被例如单克隆抗体差异性识别。因此,所述比较可以区分肾来源的 NGAL 蛋白和嗜中性粒细胞来源的 NGAL 蛋白。

[0045] 本发明的各个方面将在下面实施例中进行说明。

#### [0046] 实施例 1

[0047] 本实施例描述了以下研究:使用具有与超过两种 NGAL 蛋白表位结合的能力的 NGAL 抗体的 NGAL 测定,并与只使用两种单克隆抗体的 NGAL 测定进行比较。

#### [0048] 患者和样品

[0049] 本研究包括在 Uppsala University Hospital 接受心脏手术的总共 59 位成人患者。患者的年龄范围为 27-85,平均年龄为 63,患者包括 42 位男性和 17 位女性。心脏手术包括 23 例冠状动脉旁路移植术、15 例主动脉瓣置换、4 例二尖瓣修复、3 例组合步骤、8 例左心室辅助装置移植、和 6 例其他步骤。

[0050] 在手术前和心脏手术后各个时间点(2、24、48 和 72 小时)收集尿液和血液样品。将尿液样品在 4°C 3,000rpm 立即离心 15 分钟。将血液在 4°C 3,000rpm 离心 15 分钟获得 EDTA- 血浆。所有样品上清立即保存于 -20°C 的等分试样中。此外,从健康雇员和学生收集另外 101 份尿液样品,用做正常对照。

#### [0051] 尿液 NGAL 水平的测定

[0052] 通过 3 种不同的测定来检测 NGAL 水平。通常根据 Xu 等(上文)的教导,第一种测定技术使用基于多克隆的 RIA。第二种测定技术使用基于多克隆-单克隆的 ELISA。第三种测定技术使用基于单克隆-单克隆的测定。因此,前两种技术是根据本发明的,而第三种技术是用于比较目的。

[0053] 更具体地,对 Xu 等先前的描述做一些改变,来进行基于多克隆抗体的放射免疫测定(RIA)。将 50  $\mu$  L 样品或标准品溶液(2  $\mu$  g/L 到 128  $\mu$  g/L)与 50  $\mu$  L  $I^{125}$  标记的 NGA 和 50  $\mu$  L 特异性抗体(用 RIA 测定缓冲液适当稀释)连续混合。室温下温育所述混合物 3 小

时。此后,添加 500  $\mu$  L 固相二抗包被的纤维素悬液 (AA-SAC1, IDS LTD, England), 并在 4 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。通过在 3400rpm 离心 15 分钟, 分离并沉淀与抗兔 IgG 抗体包被的纤维素结合的 NGAL 抗体复合物。倾析后, 测量放射性。测定中和测定之间的变异系数 (CV) 分别小于 6% 和 10%。通过 RIA 测定装置测量到的尿液 NGAL 浓度结果被称为 NGAL RIA。

[0054] 在本研究中开发出基于多克隆和单克隆抗体的 ELISA 装置。简单来说, 将用碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6, Invitrogen Corporation, UK) 稀释的抗 NGAL 单克隆抗体 (100  $\mu$  L/孔, 1  $\mu$  g/mL) 在 4 $^{\circ}$ C 包被微量滴定板 (Nunc Maxsorp, Agogent, Denmark) 过夜。通过用包含 2% 牛血清白蛋白 (200  $\mu$  L/孔, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液在 37 $^{\circ}$ C 封闭其他结合位点 1 小时。一式两份添加 100  $\mu$  L 标准品 (0.1ng/ml 到 6.4ng/ml) 用测定溶液 (PBS, 包含 0.2% 牛血清白蛋白, 0.1% Tween-20, 0.05% CTAB 和 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 稀释的稀释样品。随后, 每孔添加 100  $\mu$  L 稀释的兔抗 NGAL 多克隆抗体, 并在室温下温育 1 小时, 然后是 100  $\mu$  L 稀释的辣根过氧化物酶缀合的抗体 (GE Healthcare, UK), 室温下再温育 1 小时。在室温下用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液 (100  $\mu$  L/孔, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 将板的酶反应显色 20 分钟, 通过添加 100  $\mu$  L/孔 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。在所有步骤之间, 利用 Microplate Washer (Anthos fluído, Salzburg, Austria), 将板用洗涤缓冲液 (包含 0.05% Tween-20 的 PBS) 洗涤四次。通过微板读数器 (SPECTRAMax 250, GMI, Inc., USA) 测量 450nm 处的吸光度, 利用空白孔的 540nm 作为参照读数。平均测定中的 CV 是 2.8% (范围是 0.5% 到 4.7%), 测定之间的 CV 是 6.3 (范围是 2.1 到 10.4%)。平均回收率是 99% (范围是 93 到 105%)。通过 ELISA 测量到的尿液 NGAL 浓度结果被称为 NGAL ELISA。

[0055] 根据制造商的说明在双单克隆测定法中进行 NGAL 的测定。测定中和测定之间的变异系数 (CV%) 小于 6%。通过该装置测量到的尿液 NGAL 浓度结果被称为 NGAL Mono-mono。

[0056] 在 Uppsala University Hospital 的常规临床化学系 (Department of Clinical Chemistry) 的 Architect 装置上测量尿肌酸酐水平, 用于校正尿液稀释物中 NGAL 尿液水平的变异。因此, NGAL 的尿液水平表示为单位是  $\mu$  g/mmol 肌酸酐的 NGAL。所有测量一式两份, 实验室研究者不清楚样品来源和临床结果直至研究结束。

#### [0057] 尿液 NGAL 的 Western 印迹

[0058] 按照 Towbin 等先前的描述 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4(1979)) 进行 Western 印迹。简单来说, 将 20  $\mu$  L 尿液样品用于 Nu-PAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen Corporation, USA)。在 SDS-PAGE 后, 通过使用 Nu-PAGE<sup>®</sup> Transfer Buffer (Invitrogen Corporation, USA) 在 25V 1 小时将蛋白转移到 PVDF 膜。利用封闭液 (GE Healthcare, UK) 将 PVDF 膜的其他结合位点封闭 1 小时。将印迹与小鼠抗 NGAL 单克隆抗体温育 1 小时, 然后与过氧化物酶缀合的二抗 (GE Healthcare, UK) 温育 45 分钟。根据制造商 (Amersham ECL<sup>™</sup> Western Blotting System, GE Healthcare, UK) 的说明, 使用增强的化学发光来检测免疫印迹。

#### [0059] 其他测定法

[0060] 在 Uppsala University Hospital 的临床化学系使用常规步骤测量肌酸酐和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -C 的血浆水平。

### [0061] 统计分析

[0062] 通过 Medcalc 9.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) 和 STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) 进行不配对和配对比较、线性回归分析、单向方差分析 (ANOVA) 的 Mann-Whitney' s 和 Wilcoxon' s 非参数检验。统计显著性被设定为  $p < 0.05$ 。

### [0063] 结果

[0064] 手术前以及手术后直至 78 小时的血浆肌酸酐水平在图 1 中给出, 显示在所述时间段没有差异。临床结果表明, 3 位受试者具有急性肾损伤的症状, 手术后血浆肌酸酐升高  $> 50\%$ 。

### [0065] 尿液 NGAL 水平

[0066] 使用 3 种经描述的技术测量得自健康受试者和经历心脏手术的患者尿液的 NGAL 水平。使用 RIA 和 Mono-mono 技术测定的结果分别显示于图 2A 和 2B。手术前水平类似于正常对照。手术后两小时, 水平显著增加 ( $p < 0.0001$ ), 约一半患者具有高于正常值上限的水平。当用 RIA 检测时, 中位数的增加倍数是 18.7, 当用 ELISA 和 Mono-mono 测定法检测时, 分别是 15.6 和 11.4 倍增加。24 小时后, 所述水平再次降低, 但仍然高于手术前水平。在整个手术后期间水平保持显著更高 ( $p < 0.0001$ )。在第 72 小时, 对 RIA、ELISA 和 Mono-mono 测定法来说, 增加倍数分别是 6.8、8.5 和 5.9。利用所有 3 种测定法观察到随时间的类似模式。

### [0067] 与体外循环时间 (ECC) 的关系

[0068] 当用 RIA 技术 ( $r^2 = 0.30, p < 0.0001$ ) 和 ELISA 技术 ( $r^2 = 0.16, p = 0.006$ ) 检测尿液时, 发现 ECC- 时间与手术后 2 小时获得的 NGAL 水平之间的显著正相关。但是, 利用 Mono-mono 技术未发现这类相关性。当通过 ECC- 时间分组为大于或小于 90 分钟时, 手术后 2 小时样品的 RIA 结果增加 12.6 倍 ( $p = 0.006$ )。ELISA 结果增加 6.5 倍 ( $p = 0.027$ ), Mono-mono 结果增加 5.2 倍 ( $p = 0.07$ ), 如图 3A-3C 所示。

### [0069] 尿液 NGAL 水平与肾功能的关系

[0070] 检测肌酸酐和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -C 的血浆水平作为肾功能的指标。如上所示, 在大部分受试者中肌酸酐水平保持不变, 只有 3 位受试者具有手术后急性肾损伤的症状 (定义为  $> 50\%$  的增加)。使用半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -C 水平计算肾小球滤过率 (GFR)。在单变量分析中, GFR 与 NGAL (RIA) ( $r^2 = 0.28, p < 0.001$ ) 和 NGAL (Mono-mono) ( $r^2 = 0.25, p < 0.001$ ) 有关, 如图 4A 和 4B 所示。还分析了尿液 NGAL 与血浆肌酸酐之间的关系。根据与基准相比手术后 72 小时期间血浆肌酸酐的百分比增加将受试者分为两组 ( $< 120\%$  或  $> 119\%$ )。与未显著提高的 NGAL (Mono-mono) 水平 (结果未显示) 相比, 在肌酸酐水平增加  $> 119\%$  ( $p = 0.03$ ) 的组中手术后 2 小时的 NGAL (RIA) 水平显著更高。

### [0071] 3 种 NGAL 测定之间的相关性

[0072] NGAL (RIA) 和 NGAL (Mono-mono) 之间的总相关性显示于图 5 ( $r^2 = 0.86, p < 0.0001, n = 331$ )。不同时间点的相关性在表 1 给出, 显示  $r^2$ ' s 为 0.952-0.996 的良好相关性, 但除了手术后 2 小时获得的结果。在这个时间点,  $r^2$  是 0.680, 显著低于剩余的 ( $p < 0.0001$ )。在看起来健康的受试者群组中 NGAL (RIA) 和 NGAL (Mono-mono) 之间的关系是  $r^2 = 0.887$ , 其也显著不同于 2 小时结果 ( $p = 0.001$ )。所有 331 个结果的 Passing-Bablok 回归分析显示具有显著的直线离差 ( $p < 0.01$ ) 的等式:

$HNL(RIA) = 0.6553 + 0.5358 \times NGAL(Mono-mono)$ , 这还适用于  $NGAL(Mono-mono)$  测定和  $NGAL(ELISA)$  测定的比较,  $NGAL(ELISA) = 0.0370 + 0.1135 \times NGAL(Mono-mono)$ 。但是,  $NGAL(RIA)$  和  $NGAL(ELISA)$  测定的比较得到没有直线离差的等式  $NGAL(ELISA) = -0.002192 + 0.2002 \times NGAL(RIA)$ 。

#### [0073] 尿液中 NGAL 的分子形式

[0074] 心脏手术前后尿液中发现的 NGAL 主要形式分别具有 25(单体)、45(同二聚体)和 90–130kDa(与 MMP-9 的复合物)的表观分子量。手术前后这些不同形式的存在发生变化。测定同二聚体和单体之间的比例(基于 Western 印迹扫描)。显示同二聚体的相对存在增加直至手术后 24 小时 ( $p = 0.02$ ), 随后该比例具有减少的倾向。

#### [0075] 讨论

[0076] 本文提供的结果表明 NGAL 测定中抗体选择非常重要, 以使得可以鉴定不同疾病条件下分泌到尿液中的众多不同 NGAL 变体。尤其是, 使用具有与超过两种 NGAL 蛋白表位反应的能力的 NGAL 抗体的测定法提供提高的敏感性。

[0077] 本研究包括经历心脏手术的成人患者。急性肾损伤是可能影响这些患者的最严重的手术后并发症之一。在本研究中, 血浆肌酸酐保持不变, 只有 3 位受试者具有  $> 50\%$  的升高(作为急性肾损伤的症状)。尽管如此, 仅仅在手术结束后 2 小时就在约一半的患者中发现尿液 NGAL 水平的 10–100 倍增加。此外, 在整个观察期 NGAL 水平保持升高。通过检测半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 或肌酸酐的血浆水平, 总体尿液 NGAL 水平显示与肾功能的较弱但显著的相关性, 这支持 NGAL 是肾功能异常的更早期和更灵敏标记物的观点。实际上肌酸酐升高  $> 50\%$  的患者中有 2/3 在手术后 2 小时具有高度增加的 NGAL 水平。从本研究显见的是, 在一半患者中 NGAL 的主要增加发生在手术后的早期, 但这种增加只是暂时的, 然后在接下来几天逐渐增加(涉及全部患者)。因此, 尽管不希望受到理论限制, 但是这类模式可能反映涉及 NGAL 尿分泌到尿液中的不同机制。早期阶段可能反映来自不同来源(诸如肾上皮细胞和聚集性嗜中性粒细胞)的预先形成的 NGAL 的分泌, 而延迟的分泌可能反映在肾中的从头合成。不同时间尿液中存在许多不同的 NGAL 分子大小的变异程度的发现也表明涉及不同的机制。

[0078] 3 种不同测定法的比较显示显著差异。总的说来, 所述测定法是高度相关的, 但有一些明显的例外。这些例外显示集中于手术后 2 小时获得的样品, 表明以下事实: 这些情况下 3 种测定法测量 NGAL 的不同分子变体。这些差异通过以下事实进一步例证: 使用多克隆抗体的 RIA 和 ELISA 测定结果显示比 Mono-mono 测定更密切的与临床变量(诸如体外循环时间的长度和肾功能)的关系。因此这些结果显示鉴定尿液中所有形式的 NGAL 对测定的临床表现是重要的。RIA 是基于多克隆的测定, 其可能满足分子的全部可用表位, 而基于单克隆-单克隆的测定只满足挑选的表位, 其中一些可能通过复合物形成和其他分子改变被隐藏或不被隐藏。基于多克隆-单克隆的 ELISA 测定具有稍微位于这两种极端之间的特征, 其可以通过以下事实解释: 这种配置允许识别比双单克隆测定更多的表位, 但稍微少于纯粹基于多克隆的测定。总之, 所述结果证实了当检测尿液时 NGAL 是手术后肾损伤的有效早期生物标志物, 并新近证明了测定的抗体配置对测定的临床表现有影响, 因为具有受限抗体特异性的测定法鉴定不出一些形式的 NGAL。

#### [0079] 实施例 2

[0080] 本实施例描述了在确定 NGAL 蛋白来源时,确定 NGAL 单体、二聚体和异二聚体形式的研究。

[0081] 尿液样品和凝胶过滤分离

[0082] 总共收集了手术前以及心脏手术后 2h 和 24h 时间点的 33 份尿液样品。立即将尿液样品在 4℃、3,000rpm 离心 15 分钟,并于 -20℃ 储存于等分试样中。使用 FPLC 系统 (Amersham PharmaciaBiotech AB, Uppsala, Sweden),在 Superdex™75HR 10/30 预包装柱上对一份手术后 2h 尿液样品进行凝胶过滤。收集 250L 的级分并保存于 -20℃。洗脱缓冲液是 PBS。如下所述使用 RIA 和 ELISA 确定级分中的 NGAL。

[0083] 用于 NGAL 定量的灵敏 ELISA

[0084] 使用了用于 NGAL 定量的基于不同抗体的 6 种 ELISA,即 1)Mab697- 多克隆 (如实施例 1 所述的单克隆 - 多克隆 ELISA)、2)Mab764-Mab765、3)Mab764- 多克隆、4) 多克隆 -Mab765、5) 多克隆 - 多克隆、和 Mab-697-Mab765。这 5 种 ELISA 的基本方案与实施例 1 所述的相同,除了用于测定的具体抗体之外。简单来说,用针对人 NGAL% 的兔多克隆或小鼠单克隆抗体 (Mab697 和 Mab764) (Diagnostics Development, Uppsala, Sweden) 来包被 96 孔微量滴定板 (Nunc Maxsorp, Agogent, Danmark)。将样品和标准品 (范围是 0.039-5 μg/L) (100 μL/孔) 在室温下 (RT) 温育 60min (尿液样品和凝胶过滤级分) 或 90min (细胞培养上清液)。随后,添加 100 μL/孔稀释的生物素化的针对人 NGAL 的兔多克隆抗体或小鼠单克隆抗体 (Mab765),并在 RT 温育 60min,然后添加 100 μL/孔稀释的缀合了抗生蛋白链菌素的辣根过氧化物酶 (GE Healthcare, United Kingdom) (室温 30min)。在所有步骤之间,利用 Microplate Washer (Anthos fluido, Salzburg, Austria),在洗涤缓冲液 (包含 0.05% Tween-20 的 PBS) 中将板洗涤四次。由 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺溶液 (100 μL/孔) (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) 作为底物在室温 15min 来使酶反应可视化,并通过添加 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 μL/孔) 终止该反应。通过分光光度计 (SPECTRAMax 250, GMI, Inc., USA) 读取 450nm 处的吸光度。

[0085] 用于 NGAL 定量的基于多克隆抗体的 RIA

[0086] 如上所述进行 RIA。简单来说,将 50 μL 样品或标准品 (2 μg/L-128 μg/L) 与 50 μL I<sup>125</sup>标记的 NGAL 和 50 μL 特异性抗体混合。室温下温育所述混合物 3h。此后,添加 500 μL 固相二抗包被的纤维素悬液 (AA-SAC1, IDSLTD, United Kingdom),并在 4℃温育 1h。通过离心沉淀与抗兔 IgG 抗体包被的纤维素结合的 NGAL 抗体复合物。倾析后,测量放射性。

[0087] HK-2 培养和 NGAL 蛋白的表达

[0088] HK-2 (人肾 2, CRL-2190) 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。它是源自正常肾的人肾近端肾小管上皮细胞系。通过用人乳头状瘤病毒 16 (HPV-16) E6/E7 基因转导来使该细胞永生化。在补充了 0.05mg/ml 牛垂体提取物 (BPE) 和 5ng/ml 人重组表皮生长因子 (EGF) (Invitrogen-Gibco ®, United Kingdom) 的完全生长培养基 (Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM)) 中,或在不完全生长培养基中,于 37℃含 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿空气中培养细胞。此外,细胞的培养中使用特异性的刺激物包括细胞因子 (IL-1β 或 TNF-α) (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) 和 LPS (Invitrogen-Gibco ®, United Kingdom)。在 24 孔板 (FALCON ®, USA) 中每孔接种 0.5 × 10<sup>5</sup> 个细胞和 1ml 完全生长培养基。传代培养 48h 后,去除完全生长培养基,用 PBS (Invitrogen-Gibco ®, United Kingdom) 将单层

细胞（约 90% 铺满）洗涤两次。将细胞用条件培养基培养 72h 的时间段。在 2h、12h、24h、48h 和 72h 分别收集培养基上清液用于 NGAL 定量。

#### [0089] 通过 RT-PCR 评价 NGAL 基因表达

[0090] 在 2h、4h、6h、8h、12h 和 24h 收集正常培养的和 1ng/mL IL-1 $\beta$  诱导的 HK-2 细胞用于分离总 RNA。根据制造商的方案使用 RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, United Kingdom) 提取 RNA。利用 200ng 总 RNA 通过 SuperScript III 反转录酶 (Invitrogen, United Kingdom) 合成第一链 cDNA。在 PCR 仪 (PTC-200) (Bio-Rad, USA) 中使用 Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen, United Kingdom) 进行聚合酶链反应 (PCR)。根据文献选择了用于 NGAL (5' -TCACCTCCGTCCTGTTTAGC-3' 和 5' -CGAAGTCAGCTCCTTGTTTC-3') 和  $\beta$ -肌动蛋白 (5' -TTCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3' 和 5' -GTGTTGAAGGTCTCAAACATGAT-3') 的特异性寡核苷酸引物的序列,并由 Thermo SCIENTIFIC(Germany) 合成。初始变性条件是 94 $^{\circ}$ C 2min。如下进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 30sec,随后是 60 $^{\circ}$ C (对于 NGAL) 或 59 $^{\circ}$ C (对于  $\beta$ -肌动蛋白) 30sec 退火步骤,和 72 $^{\circ}$ C 30sec 延伸。对于这两种基因进行总共 30 个循环,然后是 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10min。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,并通过溴乙锭染色进行检测。通过参照 50-bp DNA ladder (DirectLoad<sup>TM</sup> DNA Marker) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 验证了 PCR 产物的预期大小 (对于 NGAL 和  $\beta$ -肌动蛋白来说分别是 242bp 和 119bp)。

#### [0091] Western 印迹

[0092] 按照描述获得嗜中性颗粒释放产物。在 72-h 时间点收集 HK-2 条件培养基上清液,并补充 0.1mM PMSF (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 和 Complete<sup>TM</sup> 蛋白酶抑制剂混合片剂 (Roche, Mannheim, Germany)。使用 Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 离心过滤装置 (10,000MW) (Millipore, USA) 浓缩上清液。根据制造商的说明进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹。简单来说,在非还原性条件下将 25  $\mu$ L 尿液或浓缩的条件上清液或嗜中性粒细胞释放产物应用于 Nu-PAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, USA)。通过使用 Nu-PAGE<sup>®</sup> Transfer Buffer (Invitrogen, USA) 在 25V、1 小时将蛋白转移到 Hybond-P PVDF 膜 (GE Healthcare, United Kingdom)。利用封闭液 (GE Healthcare, United Kingdom) 将 PVDF 膜的其他结合位点封闭 1h。在室温下将印迹与兔多克隆抗体或小鼠单克隆抗体 (Mab 697、Mab 699、Mab 763、Mab 764、或 Mab 765) 或抗人 NGAL 的混合物温育过夜,然后与缀合了过氧化物酶的二抗 (GE Healthcare, United Kingdom) 温育 1h。根据制造商 (Amersham ECL<sup>TM</sup> Western Blotting System, GE Healthcare, United Kingdom) 的指示,使用增强的化学发光来检测免疫印迹。

#### [0093] 统计分析

[0094] 通过 STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) 和 Medcalc 9.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) 进行斯氏 t-检验和单向方差分析 (ANOVA)。结果表示为平均值  $\pm$  SD 和具有四分位数间距的中位数。p < 0.05 被认为是显著的。

#### [0095] 结果

##### [0096] 通过 Western 印迹检测尿液中的 NGAL 分子形式

[0097] 使用针对 NGAL 的一种兔多克隆抗体和五种小鼠单克隆抗体鉴定存在于得自心脏手术患者的尿液中的 NGAL 分子形式。通过 Biacore 实验证实所述五种单克隆抗体与不同

的表位反应。如图 6 所示,在两种代表性的尿液样品 (U1 和 U2) 中,发现抗体性能之间的显著差异。3 个主要条带被多克隆抗体正常识别,经鉴定为 NGAL 的单体和二聚体形式以及 NGAL 的复合异二聚体形式。这 3 种形式还被 Mab764 和 765 检测到。但是,利用这两种抗体之一还观察到其他条带。但是,与这两种单克隆抗体相比,多克隆抗体看起来对二聚体具有更强的亲和力以及对异二聚体有较弱的亲和力。在检测所有 3 种分子形式方面 Mab764 和 765 具有非常类似的性能。Mab764 和 Mab765 对 NGAL 从高到低的亲和力分别是单体、异二聚体、和二聚体形式。还显示出 Mab763、699 和 697 对异二聚体形式具有强亲和力,而对二聚体和单体形式的亲和力较弱。但是,多克隆抗体与 Mab765 和 697 在检测受刺激的嗜中性粒细胞上清液中的单体和二聚体形式的能力方面看起来非常类似。

[0098] RIA 和 5 种 ELISA 测量尿液中 NGAL 的表现

[0099] RIA 和 5 种 ELISA 的表现特征显示于表 1 :

[0100] 表 1. 通过不同的测定法测量从经历心脏手术的患者收集的尿液样品的 HNL/NGAL

[0101]

测定	手术后 µg/L	手术后 2 h µg/L	手术后 24 h	倍数增加 (手术前/ 手术后 2h)	斯氏 t-检验 p-值	ANOVA p-值
RIA	7.19 (2.9-20.3)	248.20 (109-316.1)	26.96 (16.3-50.71)	34.5	0.000011	0.0000020
ELISA 1 (Mab697- 多克隆)	0.94 (0.15-3.13)	28.82 (23.32-37.96)	4.75 (2.59-9.89)	30.7	0.00035	0.00027
ELISA 2 (Mab764- Mab765)	6.22 (1.16-12.8)	192.80 (78.2-287)	15.50 (9.55-40.7)	31.0	0.000055	0.00002
ELISA 3 (Mab764- 多克隆)	3.08 (1.08-10.81)	239.10 (61.6-296.40)	19.80 (6.25-55.35)	77.6	0.000053	0.00015
ELISA 4 (多克隆- Mab765)	2.26 (0.79-7.84)	164.10 (45.9-207.1)	13.05 (5.89-40.2)	72.6	0.00010	0.000094
ELISA 5 (多克隆- 多克隆)	2.96 (1.13-12.68)	220.00 (58.4-249.9)	19.00 (7.5-58.15)	74.3	0.000024	0.000079
ELISA 6 (Mab697- Mab765)	1.27 (0.32-3.46)	30.00 (6.4-30)	3.46 (2.07-10.35)	23.6	0.00099	0.00012

[0102] 值表示为中位数和四分位数间距。在手术前和手术后 2h 组之间进行斯氏 t- 检验,在手术前和手术后 2h 和 24h 组中进行 ANOVA。

[0103] 测量手术前以及手术后 2h 和 24h 所获得尿液的 NGAL 水平,通过测定法获得的 NGAL 中值水平显示于表 1。在 7 种测定法中,通过 RIA 测量的手术前和手术后 2h NGAL 中

值水平是最高的。另一方面,通过基于 Mab697 的 ELISA (ELISA 1 和 ELISA 6) 获得的水平显著低于其他测定法。表 1 显示手术前和手术后 2h 水平的差异以及 24 小时期间的总体差异。对所有测定法都观察到手术前和手术后高度显著的差异。当通过 ELISA 3 (Mab764-多克隆)、ELISA 5 (多克隆-多克隆) 和 ELISA 4 (多克隆-Mab765) 测量时,手术前对手术后 2h 的中值水平的倍数增加是最高的并且  $> 70$ , 当通过 ELISA 2 (Mab764-Mab765)、ELISA 1 (Mab 697-多克隆) 或 ELISA 6 (Mab697-Mab765) 测量时,是 23-34 倍。

#### [0104] 尿液凝胶过滤后通过不同的测定法测量 NGAL

[0105] 基于 Western 印迹结果,通过下列两组实验来研究所述测定法在检测 NGAL 不同形式方面的表现。在 Superdex™ 75HR 柱上进行 1 份手术后 2h 尿液样品的凝胶过滤。通过 RIA 和五种 ELISA 测量级分的 NGAL 水平,显示于图 7。通过五种 ELISA 分别获得对应于单体和二聚体形式洗脱体积的两个峰,而用 RIA 则只有一个峰。后者可能归因于 RIA 的敏感性不高。利用 RIA 获得峰 2 的最高 NGAL 水平,利用 ELISA 1 (基于 Mab697-多克隆的 ELISA) 获得最低水平。除了 ELISA 1 之外的所有 ELISA 测定测量到峰 1 的类似水平,即二聚体 NGAL (图 2 插入部分)。ELISA 1 测量到二聚体 NGAL 的更高水平。

#### [0106] 当在应激条件下生长时,NGAL 在 HK-2 细胞中被上调

[0107] 利用角化细胞无血清培养基 (K-SFM),补充了 0.05mg/mL 牛垂体提取物 (BPE) 或 5ng/mL 人重组表皮生长因子 (EGF) 的 K-SFM,或 ATCC 推荐的完全生长培养基 (补充了 0.05mg/mL BPE 和 5ng/mL EGF 的 K-SFM),培养 HK-2 细胞不同的时间长度,然后在标准条件下培养 48h。在 72h 时段内通过 ELISA 4 在不同的时间点 (2h、12h、24h、48h 和 72h) 测定培养上清液中的 NGAL 水平。培养 12h 到 72h 后, K-SFM 培养上清液中的 NGAL 水平高于其他 3 种培养基 (图 8)。在完全生长培养基生长的细胞中发现最低的水平。该结果还表明与在补充了 rEGF 的 K-SFM 中生长的细胞相比,在补充 BPE 的 K-SFM 中生长的细胞上清液中 NGAL 水平更高。总的说来,这些结果显示了在应激条件下 (其中细胞被剥夺必需的生长因子) NGAL 产生的上调。

#### [0108] HK-2 细胞中 NGAL 被 IL- $\beta$ 、LPS 和 TNF- $\alpha$ 上调

[0109] HK-2 细胞在完全生长培养基中生长 48h,随后细胞在补充了 IL- $\beta$  (1ng/mL,人)、LPS (125ng/mL,肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumonia*)) 或 TNF- $\alpha$  (20ng/mL,人) 的完全生长培养基条件下进一步生长不同的时间长度。如图 9A 所示,IL- $\beta$  诱导上清液中 NGAL 水平高度显著地升高 (增加 8.9- 到 41.9- 倍)。与 TNF- $\alpha$  和 LPS 的温育也诱导上清液中 NGAL 的一些升高 (分别为 2.2 和 1.6 倍),但显著低于 IL- $\beta$  ( $p < 0.001$ )。还用补充了 IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  或 LPS 的 K-SFM 培养 HK-2 细胞。利用 IL- $\beta$  (1.3- 到 12.8- 倍增加) 观察到 NGAL 的显著升高,但用 TNF- $\alpha$  或 LPS 没有观察到 NGAL 显著升高 (图 9B)。但是,与在完全生长培养基中生长的细胞相比,这些升高是显著更低的 ( $p < 0.001$ )。

#### [0110] HK-2 细胞产生的 NGAL 分子形式

[0111] 使用混合的单克隆抗体 (Mab697、Mab764 和 Mab765) 作为检测抗体,通过 Western 印迹检测 HK-2 细胞分泌的 NGAL 分子形式。图 10 (下栏) 显示的结果表明,在完全培养基中或 K-SFM 中应激条件下或补充了细胞因子 (IL- $\beta$  或 TNF- $\alpha$ ) 或 LPS 的培养基中生长的 HK-2 细胞分泌的主要 NGAL 形式是单体形式。用 IL- $\beta$  刺激后 NGAL 的异二聚体形式也是明显的,而与人嗜中性粒细胞上清液中的发现不同,不存在二聚体形式 (图 6)。在图 10 中,

用 IL- $\beta$  温育后在 HK-2 中显示 NGAL 的 mRNA 水平。该结果显示表达增加,说明 HK-2 细胞有效合成 NGAL。

#### [0112] 讨论

[0113] NGAL 最初分离自人嗜中性粒细胞,先前我们已经证明测量血液中的 NGAL 是区分细菌或病毒引起的急性感染的优越方式。后续研究发现,在一定条件下 NGAL 还可能在其他细胞(诸如肾、肝和上皮组织)中表达,并且尿液和血浆中的 NGAL 测量可以作为急性肾损伤的生物标志。实施例 1 显示 NGAL 测定法的抗体配置对该测定法的临床表现有影响。在 AKI 患者的尿液中鉴定出 NGAL 的数种形式。该实施例进一步显示,单体形式和某种程度上异二聚体形式是肾小管上皮细胞产生的主要形式,而二聚体形式似乎是嗜中性粒细胞独有的(参见图 6)。嗜中性粒细胞也产生单体形式。本研究一个有趣的发现是所用抗体在对这些不同形式识别方面的差异,因为源于嗜中性粒细胞的单体和二聚体形式被所有单克隆抗体以及多克隆抗体鉴别。与此相反, Mab697 几乎完全不能识别尿液中的这些形式。此外, Mab765 显示与嗜中性粒细胞上清液中这些形式的强反应,但对尿液中的二聚体形式只有弱识别。虽然不希望受到理论束缚,但是认为其原因是不同 NGAL 形式表位暴露的差异以及由此造成的分子结构差异。

[0114] 尿液中 NGAL 不同分子形式的存在以及抗体表位识别的差异还表现在所用测定法对尿液中 NGAL 定量的巨大差异。尽管测定中使用相同的校准物,但不仅手术前的水平明显不同,而且手术后的相对变化也明显不同。很明显使用单独的多克隆抗体或多克隆抗体结合 Mab764 或 Mab765 的 ELISA 的倍数增加是最高的。这两种 mab 还是 Western 印迹中识别尿液中大部分形式的那些抗体。但是,这两种 mab 的组合识别较少,表明其他的分子形式被多克隆抗体识别。根据凝胶过滤实验,看起来各种形式识别方面的这些差异主要与单体 NGAL 识别的差异有关,因为只有一种测定法似乎有区别地识别二聚体形式。所述差异不能用测定法的总体分析性能来解释,因为所有的都显示类似的敏感性、不精密性、回收率(recovery)等。

[0115] 基于人 NGAL 的分级分泌(CNGAL/CCr)、小鼠的原位杂交、以及 NGAL 是急性期蛋白的事实,先前的报道声称尿液中的 NGAL 积聚可能来自于局部肾合成(其包括尿 NGAL 的主要组分),和远端器官和免疫细胞。但是,这类结果被与 NGAL 的肾处理(就肾小球滤过率,肾小管重吸收和尿液稀释而言)有关的若干不确定性和以下事实(原位杂交在小鼠中进行并且这类技术很难反映细胞产生蛋白的能力)所削弱。但是,我们的发现实际上支持以下观点:人肾小管上皮细胞具有产生 NGAL 的能力,因为 mRNA 表达和蛋白产生被若干与在应激或炎性条件下存活的肾(诸如体外循环期间观察到的)有关的数个条件所诱导。我们发现细胞因子 IL-1R 是最有效的刺激物,其与使用肺上皮细胞系的其他研究相容。先前的许多研究在心脏手术期间和心脏手术后观察到高水平的嗜中性粒细胞分泌蛋白和细胞因子诸如 IL- $\beta$  和 TNF- $\alpha$ 。因此当前结果证明 NGAL 以许多不同的形式存在于尿液中,并且用于定量尿液中导致这种多样性的 NGAL 的测定法是有益的。因此,在一个实施方案中,本发明涉及一种优越的鉴定来源于肾小管上皮细胞的 NGAL 的测定法,因为所述 NGAL 的分子结构似乎与来自嗜中性粒细胞的 NGAL 结构稍有不同。因此这类测定法在 AKI 的检测方面更特异和更灵敏,主要有利于具有患受损的肾功能风险的患者。

[0116] 已经参照具体实施方案描述了本发明的方法、装置和试剂盒,并且实施例显示了

本发明的具体方面。但是,应理解本领域普通技术人员能够完成本发明的其他实施方案、方面、变化和改变,而不脱离要求的本发明范围。

[0117] 序列表

[0118] <110>Phadia AB

[0119] Venge, Per

[0120] <120>用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒

[0121] <130>4007763-174371

[0122] <150>US 61/116, 713

[0123] <151>2008-11-21

[0124] <160>4

[0125] <170>PatentIn version 3.5

[0126] <210>1

[0127] <211>20

[0128] <212>DNA

[0129] <213>人工序列

[0130] <220>

[0131] <223>NGAL 的引物

[0132] <400>1

[0133] tcacctccgt cctgttttagc 20

[0134] <210>2

[0135] <211>20

[0136] <212>DNA

[0137] <213>人工序列

[0138] <220>

[0139] <223>NGAL 的引物

[0140] <400>2

[0141] cgaagtcagc tccttggttc 20

[0142] <210>3

[0143] <211>22

[0144] <212>DNA

[0145] <213>人工序列

[0146] <220>

[0147] <223>Beta- 肌动蛋白的引物

[0148] <400>3

[0149] ttctacaatg agctgcgtgt gg 22

[0150] <210>4

[0151] <211>23

[0152] <212>DNA

[0153] <213>人工序列

- 
- [0154] <220>  
[0155] <223>Beta-肌动蛋白的引物  
[0156] <400>4  
[0157] gtggtgaagg tctcaaocat gat 23

[0001]

## 序列表

<110> 法蒂亚公司  
P·文吉

<120> 用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒

<130> 4007763-174371

<150> US 61/116,713

<151> 2008-11-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for NGAL

<400> 1

tcacctcagt cctgttttagc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for NGAL

<400> 2

cgaagtcagc tcttgggtc

20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0002]

<220>

<223> Primer for Beta-actin

<400> 3

ttctacaatg agctgcgtgt gg

22

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for Beta-actin

<400> 4

gtgttgaagg tctcaaacat gat

23

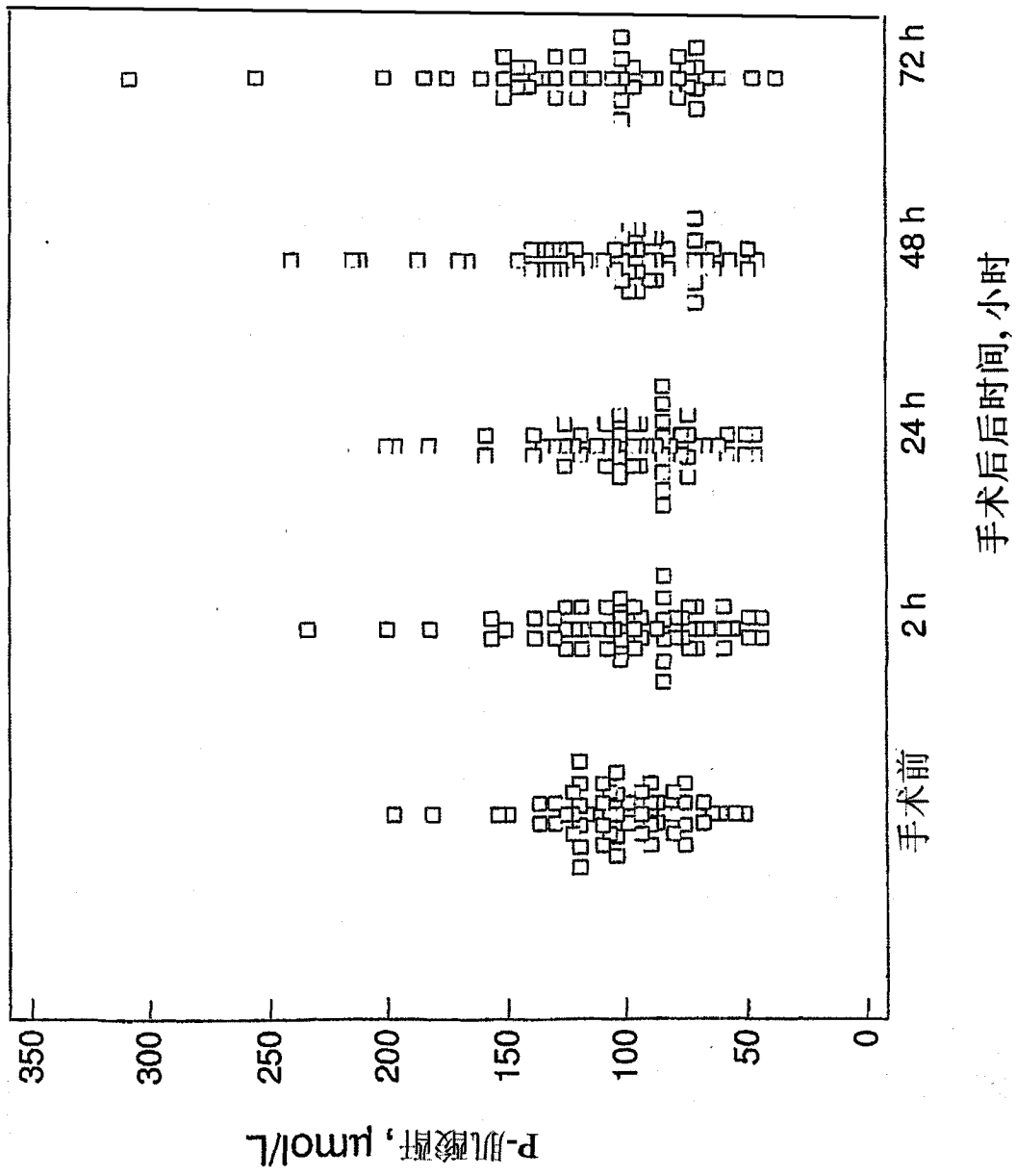


图 1

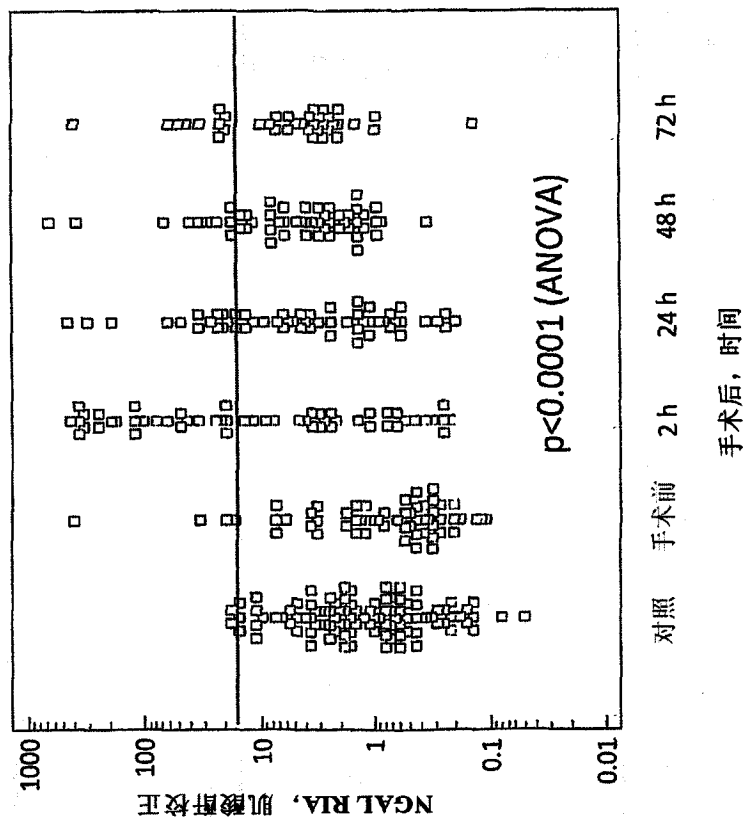


图 2A

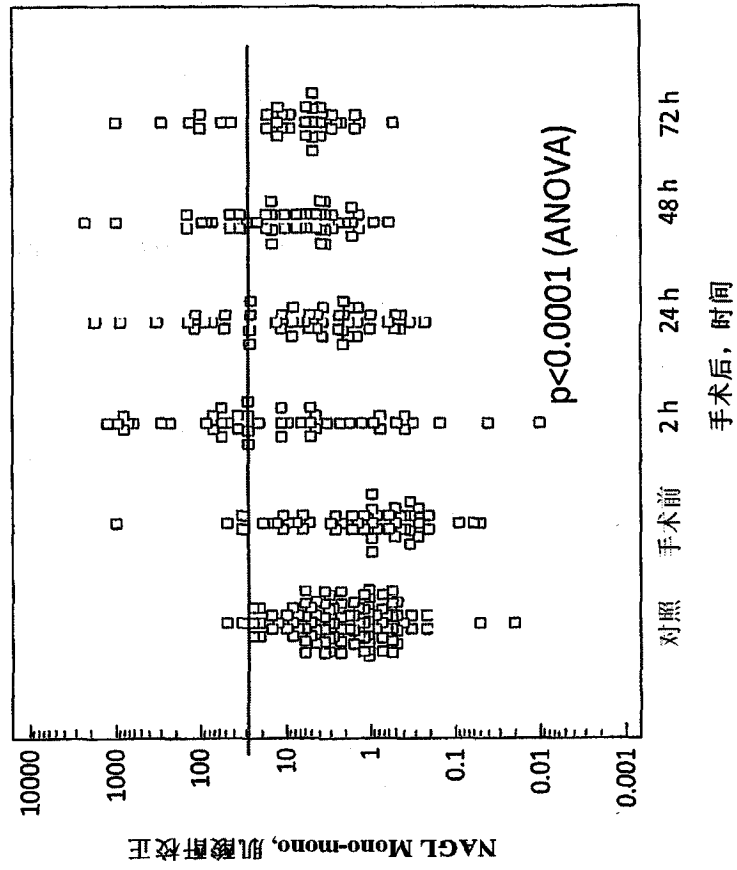


图 2B

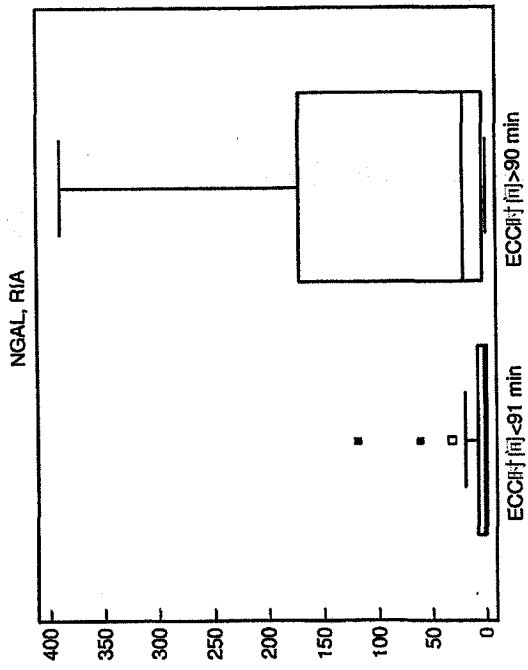


图 3A

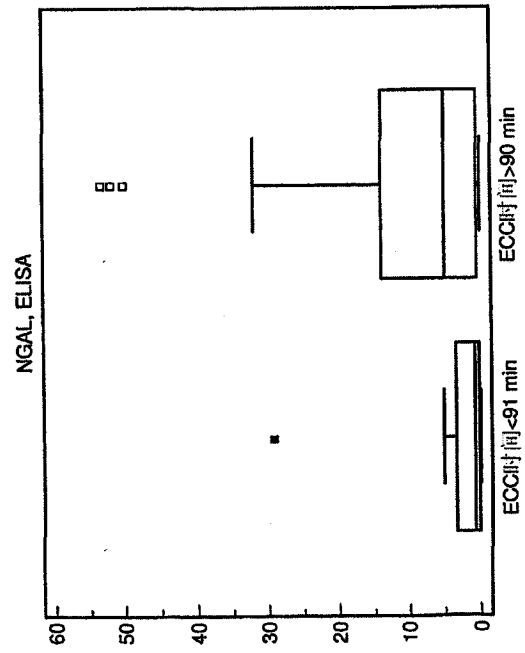


图 3B

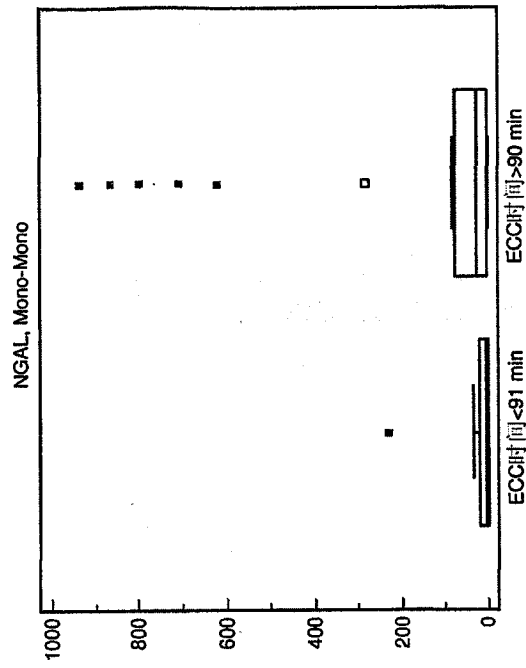


图 3C

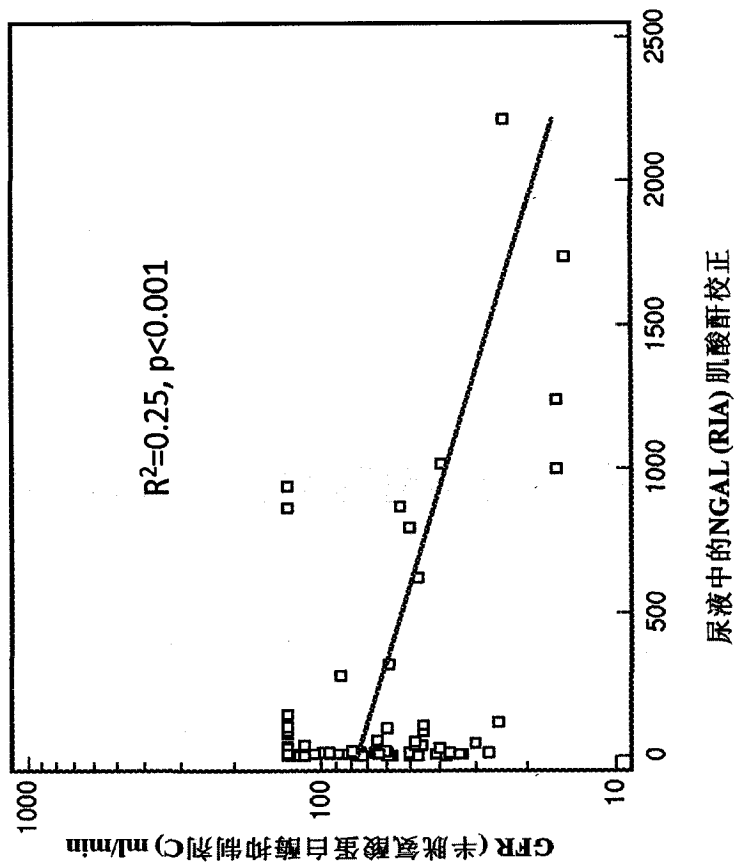


图 4A

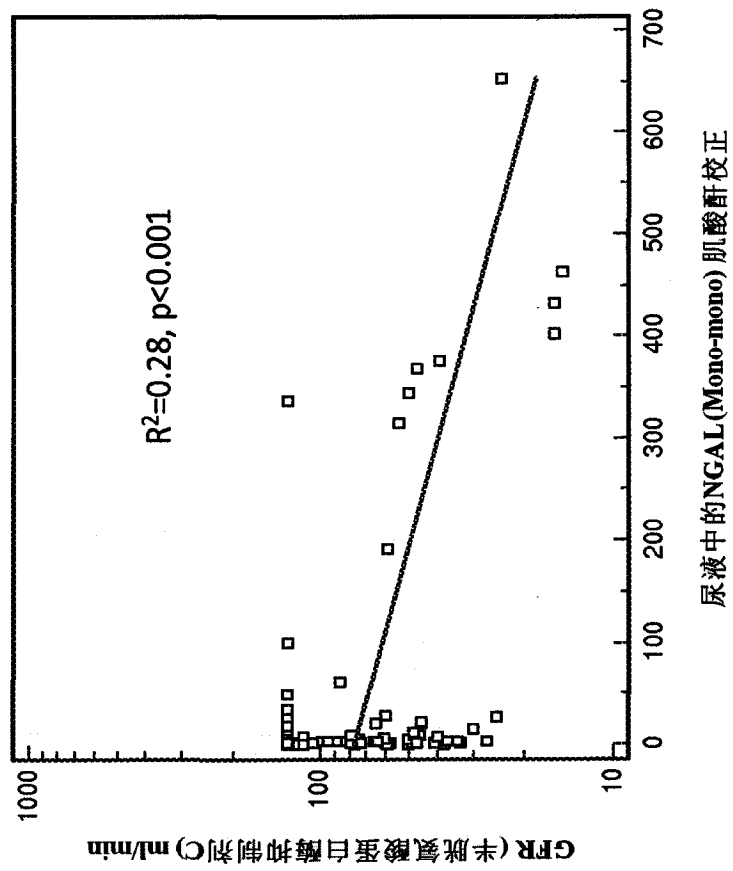


图 4B

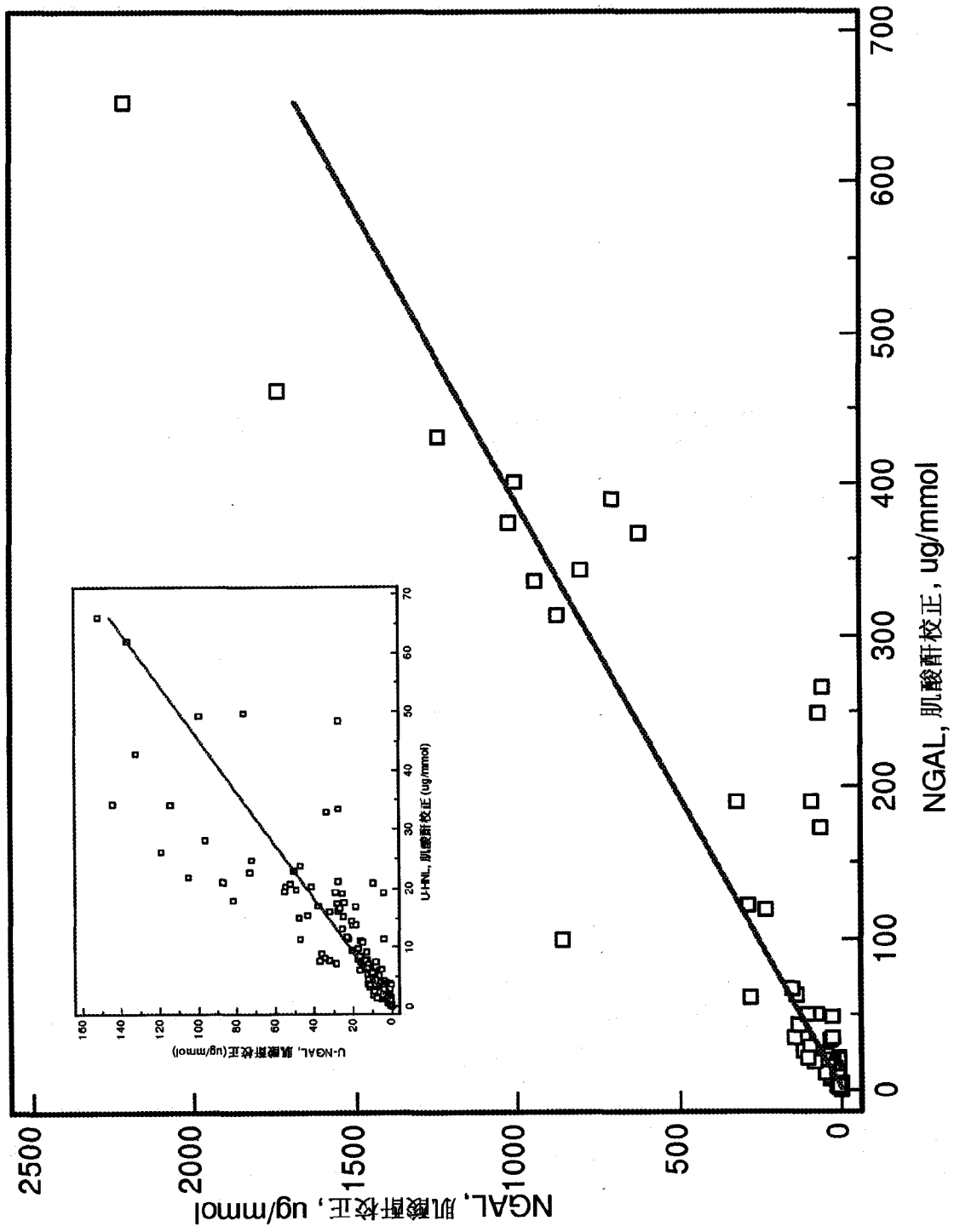


图 5

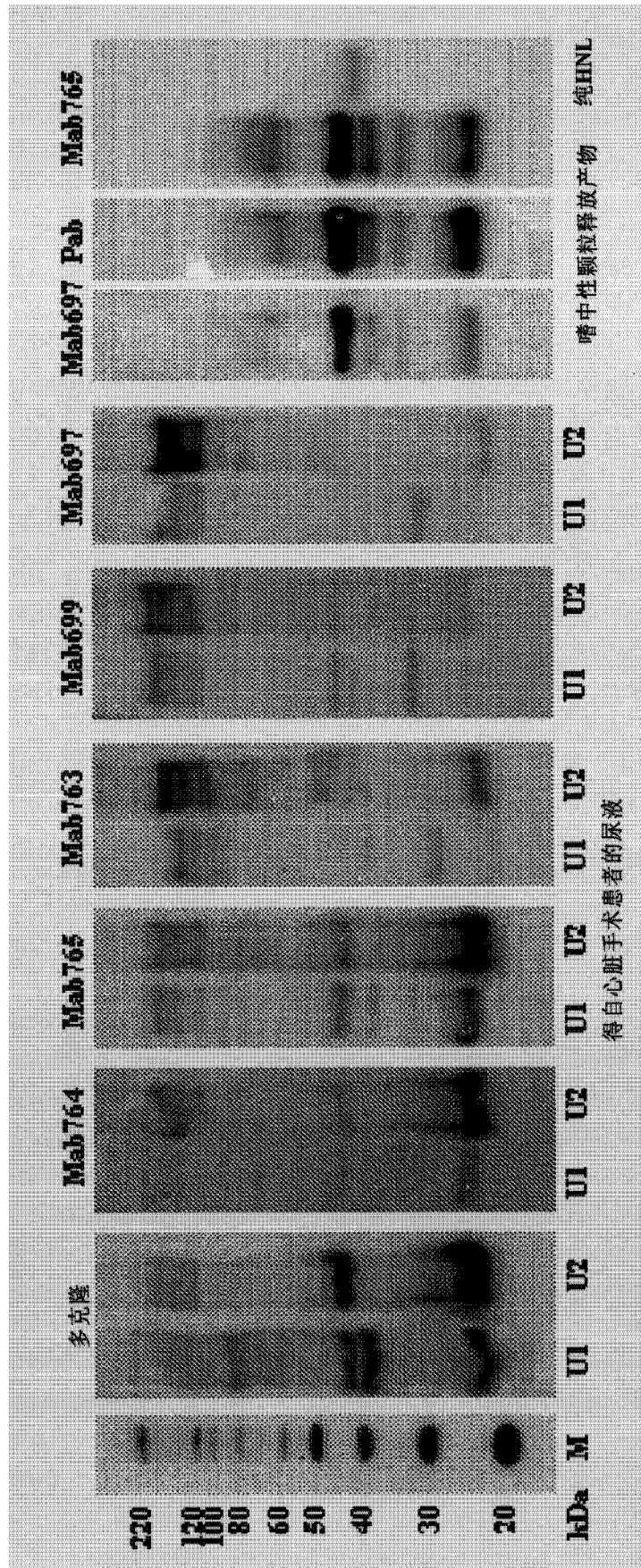


图6

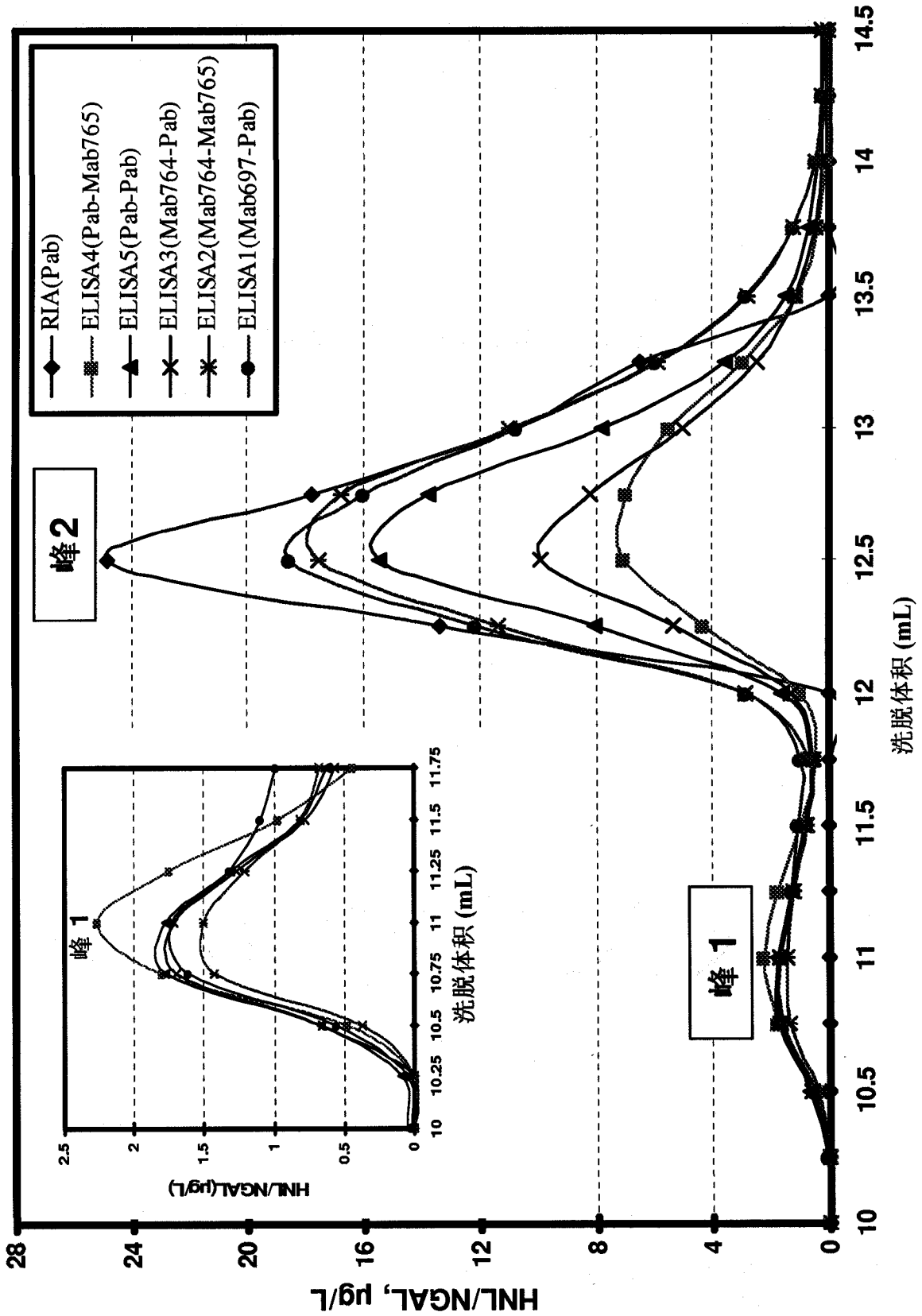


图 7

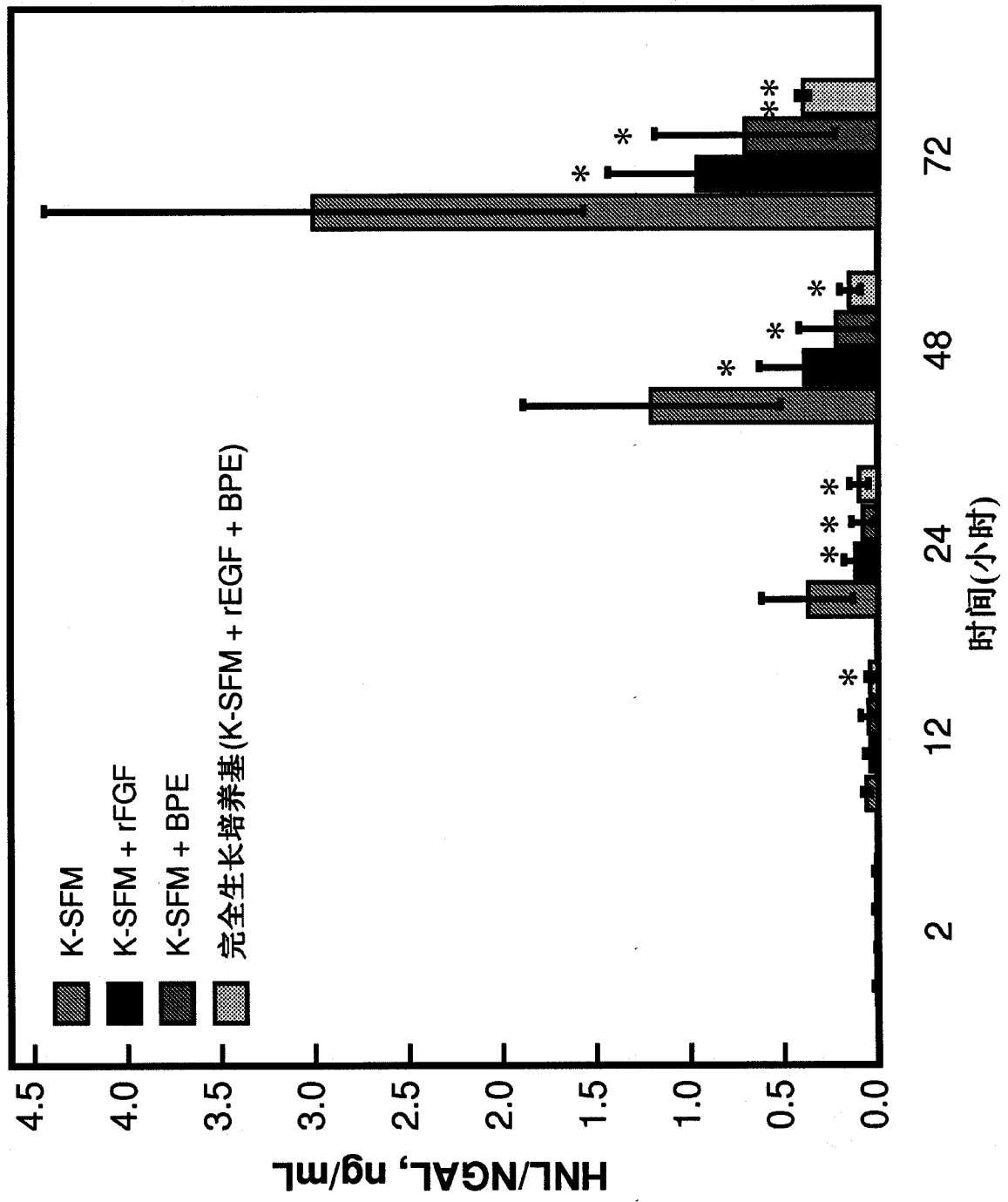


图 8

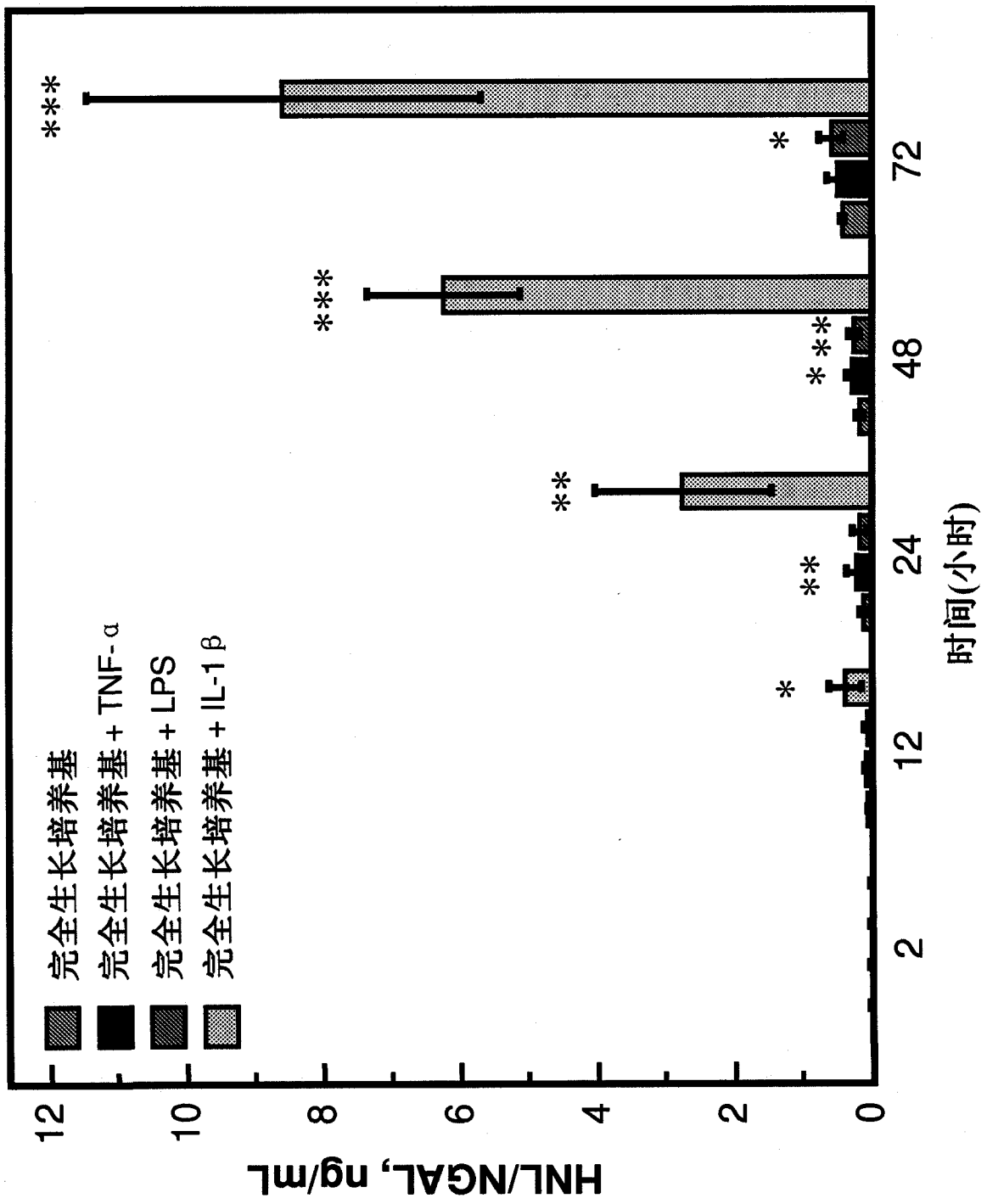


图 9A

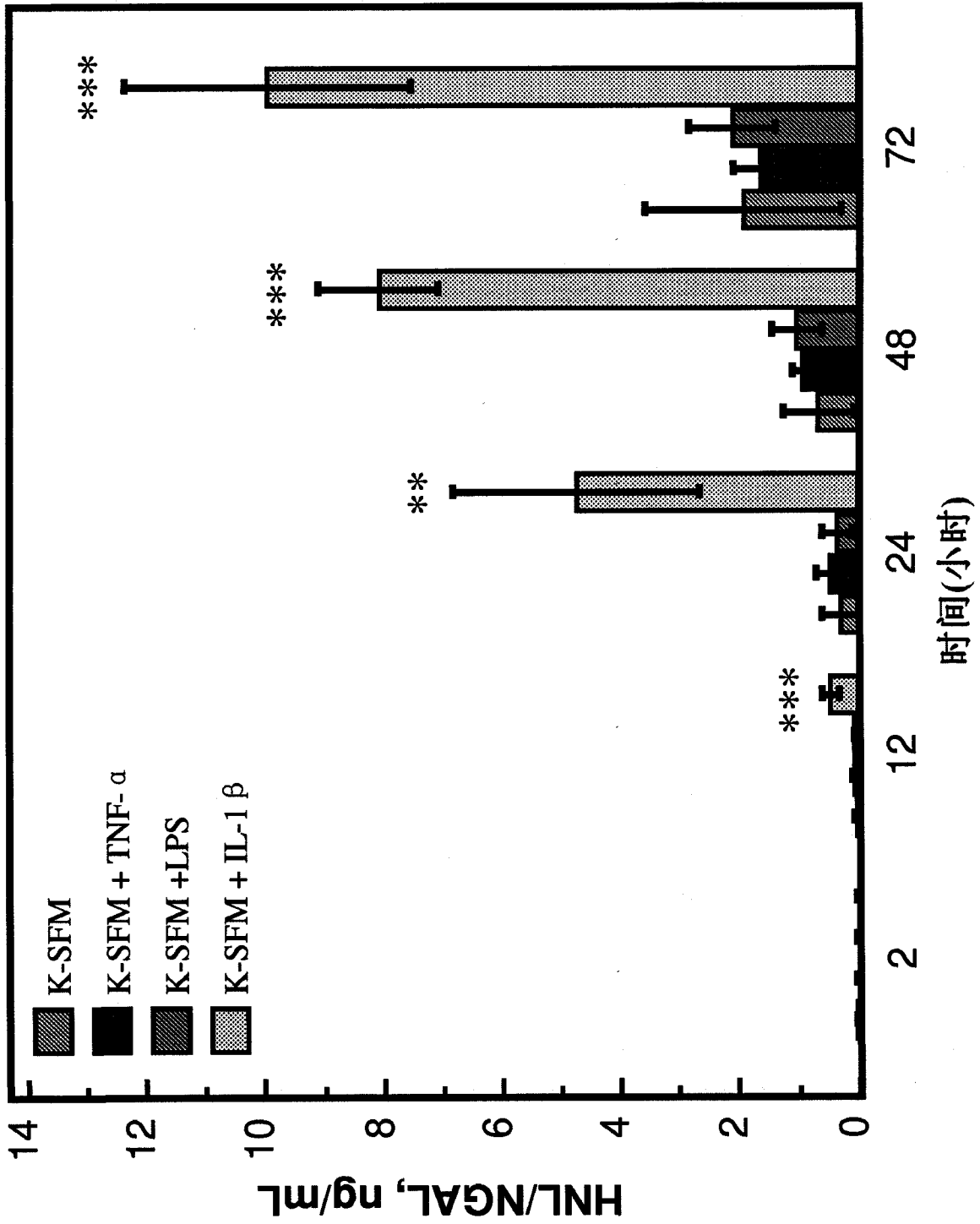


图 9B

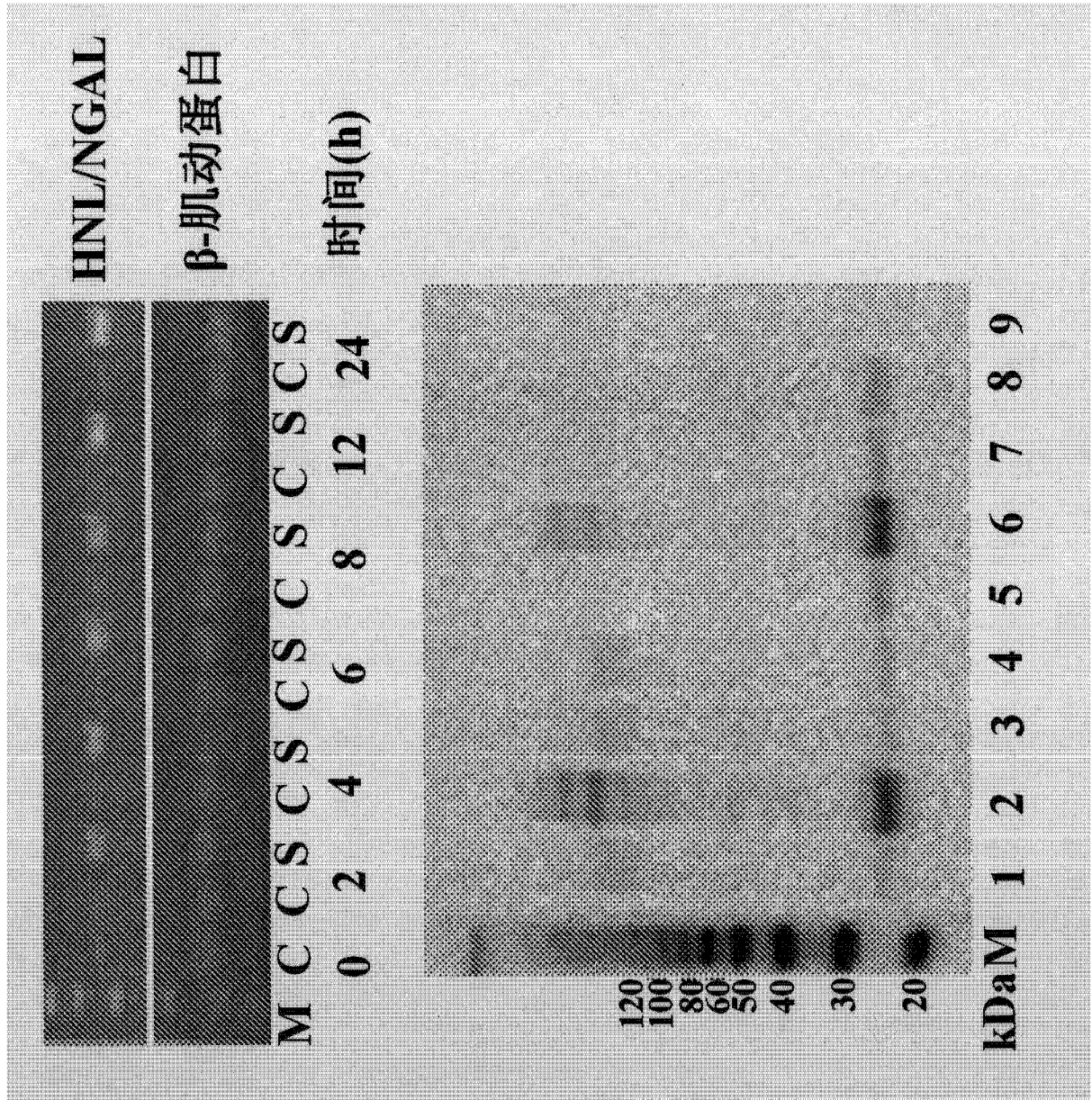
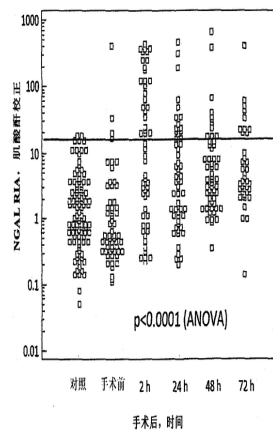


图 10

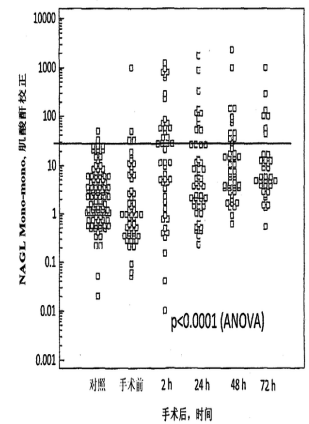
专利名称(译)	用于检测或监测急性肾损伤的方法、装置和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102292637B</a>	公开(公告)日	2015-08-05
申请号	CN200980155194.X	申请日	2009-11-23
申请(专利权)人(译)	法蒂亚公司		
当前申请(专利权)人(译)	法蒂亚公司		
[标]发明人	P文吉		
发明人	P·文吉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/573 G01N2800/347		
代理人(译)	王健		
审查员(译)	张绚		
优先权	61/116713 2008-11-21 US		
其他公开文献	CN102292637A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

检测个体急性肾损伤的方法包括(a)将所述个体的体液样品与包括嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)抗体和可检测标记的测定装置接触,以使得样品中的NGAL蛋白与NGAL抗体复合;和使用可检测的标记确定样品中的NGAL蛋白与测定装置中的NGAL抗体之间形成的复合物的量,其中装置中的NGAL抗体具有与超过两种NGAL蛋白表位结合的能力,并且所形成的复合物的量代表急性肾损伤的水平。确定个体样品中NGAL蛋白来源的方法包括确定样品中NGAL蛋白的单体、二聚体和异二聚体形式的相对量的步骤,从而使改进的诊断和更好的靶向治疗成为可能。



2A



2B