

[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 200580026786.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/536 (2006.01)  
G01N 33/537 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/551 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月29日

[11] 公开号 CN 101027556A

[22] 申请日 2005.6.7

[21] 申请号 200580026786.3

[30] 优先权

[32] 2004.6.7 [33] US [31] 60/577,662

[32] 2005.3.31 [33] US [31] 11/096,113

[86] 国际申请 PCT/US2005/019951 2005.6.7

[87] 国际公布 WO2005/121788 英 2005.12.22

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.7

[71] 申请人 儿童医院医疗中心

地址 美国俄亥俄州

共同申请人 哥伦比亚大学受托人

[72] 发明人 普拉萨德·德瓦雷詹

乔纳森·M·巴拉什

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

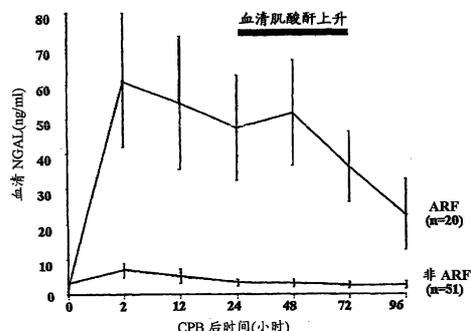
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 10 页

[54] 发明名称

肾脏疾病和损伤的早期检测方法

[57] 摘要

一种用于测定早发肾脏疾病和损伤的方法和试剂盒，所述损伤包括肾小管损伤，其中使用 NGAL 作为早期血清生物标记。NGAL 是小型的分泌多肽，其抗蛋白酶并因此容易在肾小管细胞损伤后在血清中检测。分泌性蛋白的具点细胞质分布表明，在近端小管细胞，NGAL 蛋白表达大部分被检测到。NGAL 在血清中出现与肾缺血和肾毒性的剂量和持续时间有关，并且可诊断肾小管细胞损伤和肾衰竭。NGAL 测定也是监测药物或其他治疗剂的肾毒性副作用的有用的指标。



1、一种检测哺乳动物肾小管细胞损伤的方法，所述损伤包括缺血性肾脏损伤和肾毒性损伤，所述方法包含下列步骤：

1)从哺乳动物受试对象获得血清样品；

2)将血清样品与针对肾小管细胞损伤生物标记的抗体接触，以形成抗体和生物标记的复合物，该生物标记包含 NGAL，和

3)检测抗体-生物标记复合物。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中间歇地，优选连续地从受试对象中获取多份血清样品。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其中检测抗体-生物标记复合物的步骤包括将所述复合物与用于测定生物标记的第二抗体接触。

4、一种监控肾小管细胞损伤治疗有效性的方法，包括下列步骤：

1)向患有肾小管细胞损伤的哺乳动物受试对象提供治疗；

2)从受试对象获得至少一份治疗后的血清样品；和

3)在治疗后的血清样品中检测肾小管细胞损伤生物标记的存在状况，所述生物标记包含 NGAL。

5、根据权利要求 4 所述的方法，还包括获得一份或多份随后的治疗后血清样品步骤，其中提供治疗的步骤一直持续到随后的治疗后的血清样品中检测不到生物标记为止，并且优选其中检测步骤包括下列步骤：

i)将血清样品与针对生物标记的俘获抗体接触，以形成抗体和生物标记的复合物；和

ii)检测所述抗体-生物标记的复合物，优选包括下列步骤：

(1)将血清样品中任何未结合的物质与俘获抗体-生物标记复合物分离；

(2)将俘获抗体-生物标记复合物与用于检测生物标记的第二抗体接触，使得在生物标记和第二抗体间形成复合物；

(3)将任何未结合的第二抗体与生物标记-第二抗体复合物分离；

和

(4)检测生物标记-第二抗体复合物中的第二抗体。

6、试剂盒，优选应急检验试剂盒，用于检测受试对象血清中肾小管细

胞损伤的即时或早发生物标记的存在状况,所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤,包含:

1)获得一定量血清样品的装置,所述量优选小于 1ml,更优选小于 10 微升;

2)附着有俘获抗体的介质,所述俘获抗体能够与肾小管细胞损伤的生物标记复合,所述生物标记包括 NGAL; 和

3)测定装置,优选 ELISA,用于测定生物标记和俘获抗体的复合物,其中优选所述获得装置选自:

i)含有表面的器具,所述表面含有所述介质;

ii)用于接收血清样品的容器,其中与血清接触的容器表面包含所述介质;

iii)包含盒的器具,所述盒含有所述介质; 和

iv)包含标尺的器具,所述标尺表面包含所述介质,

其中测定装置优选包含比色标尺的测定装置。

7、用于测定哺乳动物受试对象中肾小管细胞损伤状况的竞争性酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒,所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤,所述试剂盒包含对 NGAL 特异的第一抗体,用于测定其在受试对象血清样品中的存在状况,所述血清样品优选的流体量约为 1 毫升或更小。

8、一种鉴定肾小管细胞损伤程度的方法,所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤,其由事件引起,所述方法包括下列步骤:

1)从哺乳动物受试对象中获得至少一份血清样品;

2)在血清样品中测定肾小管细胞损伤生物标记的存在状况,所述生物标记包含 NGAL; 和

3)相对于事件发生时间,根据血清样品中生物标记开始出现的时间,测定肾小管细胞损伤的程度,其中所述事件优选选自手术过程、肾脏供血减少、受损的心脏功能、多个手术过程、在重症监护病房中的患者、和给予受试对象药物、放射性对比染料、或其他药物物质。

9、一种测定哺乳动物中肾小管细胞损伤的方法,所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤,所述方法包括下列步骤:

1)从哺乳动物受试对象中得到包含至多 1 毫升血清的血清样品;

---

2)将血清样品与针对肾小管细胞损伤生物标记的抗体接触，形成抗体和生物标记的复合物，所述生物标记包括 NGAL；和

3)测定抗体-生物标记复合物。

## 肾脏疾病和损伤的早期检测方法

### 发明背景

继发于肾小管细胞损伤的急性肾衰竭(ARF)，所述损伤包括缺血性损伤或肾毒性损伤，在临床医学和肾病学上存在普遍和潜在破坏性问题，尽管支持疗法取得显著进步，然而仍具有持续较高的发病率和死亡率。经几十年的先驱研究，表明持续的血管收缩、管闭塞、细胞结构和代谢改变以及炎症反应在 ARF 发病机理中所起的作用。这些研究已提出在动物模型中可能的治疗途径，然而相应在人类中取得的效果却是令人失望的。其原因可能包括肾脏对缺血性损伤和肾毒性的多方面响应，和 ARF 早期的生物标记的缺乏导致延误了开始治疗的时机。

当患者的血清肌酸酐的值或者(1)当基线血清肌酸酐水平小于 2.0 mg/dL 时增加至少 0.5 mg/dL; (2)当基线血清肌酸酐水平大于或等于 2.0 mg/dL 时增加至少 1.5 mg/dL; 或者(3)暴露在放射照相性物质下之后，不论基线血清肌酸酐水平如何，增加至少 0.5 mg/dL，该个体被认为患有急性肾衰竭。

据信，在疾病进程的早期采取治疗能降低 ARF 的死亡率并且缩短治疗各种类型肾小管细胞损伤的时间，所述损伤包括但不限于，缺血性和肾毒性肾脏损伤。对肾小管细胞损伤的可靠的、早期生物标记的鉴定对促进早期治疗介入是有用的，并能通过提供肾毒性的指标帮助指导药物开发。

传统的检测肾脏疾病的实验室方法包括测定血清肌酸酐、血液尿素氮、肌酸酐清除率、尿液电解质、尿沉淀物的显微镜检查以及放射学研究。这些指标非但不灵敏、无特异性，而且也不适用于该疾病的早期检测。确实，血清肌酸酐的上升被广泛认为是检测 ARF 的“最佳标准”，但现已明确，当血清肌酸酐变化时，多达 50%的肾功能已经丧失。

早先已描述一些缺血性肾损伤的尿生物标记，包括肾损伤分子-1(KIM-1)和富半胱氨酸蛋白(Cyr61)。KIM-1 是关于肾脏恢复的一种推定的黏附分子。在大鼠的缺血-再灌注损伤模型中，在最初损伤后的 24-48 小时后发现 KIM-1 上调，表现出可靠但有些迟的肾小管细胞损伤的标志。最近研究表明 KIM-1

可在患有缺血性急性肾小管坏死患者的肾活组织检查和尿中检测到。然而，该检测是用于已确定患有并处于晚期的缺血性肾脏损伤的患者。早期 ARF 或亚临床肾损伤的尿的 KIM-1 测量的应用还远远未被验证。

Cyr61 蛋白是分泌的富半胱氨酸蛋白，其可在动物模型中缺血性肾损伤发生的 3-6 小时后检测到。然而，该检测要求生物亲和的纯化过程以及用肝素琼脂糖珠的浓缩步骤，之后 Western blotting 实验。即使在当生物亲和的纯化过程之后，也出现若干非特异性交叉反应肽。因此，在尿液中检测 Cyr61 因为其特异性和繁琐的步骤成为问题。

因此，迫切需要鉴定针对早期缺血性和肾毒性肾损伤的改良生物标记。

### 发明简述

本发明涉及在哺乳动物受试对象中肾小管细胞损伤的即时(immediate)或早发(early onset)检测方法，其包括步骤：1)从哺乳动物受试对象中获取血清样品；2)测定血清样品中选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、和其混合物的生物标记水平，和 3)评价该受试对象肾小管细胞损伤情况。

本发明涉及在哺乳动物中肾小管细胞损伤的即时或早发检测方法，其包括步骤：1)从哺乳动物受试对象中获取血清样品；2)将血清样品与针对肾小管细胞损伤生物标记的抗体接触，形成抗体和肾小管细胞损伤生物标记的复合物，所述肾小管细胞损伤生物标记包含 NGAL；和 3)检测抗体-生物标记复合物。

本发明还涉及监测对肾小管细胞损伤的治疗有效性的方法，包括步骤：1)从患有肾小管细胞损伤的哺乳动物受试对象中获取血清样品；2)从血清样品测定选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记和其混合物的生物标记水平，和 3)评价该受试对象肾小管细胞损伤情况。

本发明还涉及监测对肾小管细胞损伤的治疗有效性的方法，包括步骤：1)对患有肾小管细胞损伤的哺乳动物受试对象提供治疗；2)从该受试对象中获取至少一份治疗后的血清样品；和 3)测定治疗后的血清样品中选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、和其混合物的肾小管细胞损伤生物标记的存在状况。

本发明涉及针对检测肾小管细胞损伤的即时或早发生物标记的存在状况的试剂盒(kit)，其包括：1)获取一些血清样品的装置；和 2)用于检测早发生物标记的测定装置(assay)。

本发明还涉及用于检测肾小管细胞损伤的即时或早发生物标记在受试对象血清中的存在状况的试剂盒，其包括：1)获取一定量的血清样品的装置；2)附着俘获抗体(capture antibody)的介质，所述俘获抗体能够与选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、和其混合物的生物标记复合；以及 3)用于检测肾小管细胞损伤生物标记和俘获抗体的复合物的测定装置。

本发明还涉及竞争性酶联免疫吸附分析(ELISA)的试剂盒，用于测定哺乳动物受试对象中肾小管细胞损伤状况，所述试剂盒包括对选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、和其混合物的生物标记具有特异性的第一抗体，以测定其在受试对象血清样品中的存在状况。

本发明还涉及鉴定由事件导致的肾小管细胞损伤的程度的方法，包括：1)从哺乳动物受试对象中获取至少一份血清样品；2)测定血清样品中肾小管细胞损伤的早发生物标记的存在状况；和 3)相对于事件发生时间，根据血清样品中选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、和其混合物的生物标记的开始出现的时间，测定肾小管细胞损伤程度。

本发明涉及检测哺乳动物受试对象肾小管细胞损伤的方法，包括步骤：1)在疑似肾小管细胞损伤后从哺乳动物受试对象中获取至多 1 毫升血清样品；2)从血清样品测定选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记和其混合物的生物标记水平，和 3)评价该受试对象肾小管细胞损伤情况。

本发明还涉及检测哺乳动物肾小管细胞损伤的方法，包括步骤：1)从可能含有选自即时肾小管细胞损伤生物标记、早发肾小管细胞损伤生物标记、或其混合物的生物标记的哺乳动物中获取 1 毫升血清样品，以形成抗体和生物标记的复合物；和 3)测定抗体-生物标记复合物。

优选的早发肾小管细胞损伤生物标记为 NGAL。优选的即时肾小管细胞损伤生物标记为 NGAL。

#### 附图说明

图 1 显示在 CPB 后所示的各个时间点，从受试对象中获取的样品中尿

NGAL 的 Western 分析(左侧带), 该受试对象随后发展为 ARF, 以及(右侧带)重组人 NGAL 标准。分子量以 kDa 列于左侧。

图 2 显示最后发展成 ARF(上方线, ARF)的患者与不发展成 ARF(下方线, 非 ARF)的患者在 CPB 之后的各个时间点的尿 NGAL(ng/ml)。柱形(bar)表示检测到的血清肌酐的首次上升的时间。

图 3 显示用尿肌酐排泄校正的图 2 中的尿 NGAL 值

图 4 显示经 ELISA 测定, 随后发展成 ARF(上方线, ARF)的患者与不发展成 ARF(下方线, 非 ARF)的患者在 CPB 之后的各个时间点的尿 NGAL(ng/ml)。柱形表示检测到的血清肌酐的首次上升的时间。

图 5 显示用尿肌酐排泄校正的图 4 中的尿 NGAL 值

图 6 显示 CPB 后两小时所有尿 NGAL 测定的散点图。50ng/ml 处的阴影线表示将最终发展为 ARF 的患者的值与不发展成 ARF 的患者的值的间隔。

图 7 显示经 ELISA 测定, 随后发展成 ARF(上方线, ARF)的患者与不发展成 ARF(下方线, 非 ARF)的患者在 CPB 之后的各个时间点的血清 NGAL(ng/ml)。柱形表示检测到的血清肌酐的首次上升的时间。

图 8 显示最后发展成 ARF 和不发展成 ARF 的患者在 CPB 后两小时所有血清 NGAL 测量结果的散点图。

图 9 显示受试者操作特征(ROC)曲线, 用 CPB 后两小时的尿 NGAL 的 ROC 曲线确定用于早期诊断急性肾脏损伤的 NGAL 测定的区分能力,。

图 10 显示受试者操作特征(ROC)曲线, 用 CPB 后两小时的血清 NGAL 的 ROC 曲线确定用于急性肾脏损伤早期诊断的 NGAL 测定的区分能力。

### 发明详述

本文中“肾小管细胞损伤”的表述指肾或肾脏衰竭或机能障碍, 无论是突然发生(急性的)或缓慢地在一段时间内衰退(慢性的), 都可由许多疾病或病症过程引发, 所述疾病或病症过程包括(但不限于)肾小管细胞损伤; 缺血性肾脏损伤(IRI), 所述缺血性肾脏损伤包括急性缺血性损伤和慢性缺血性损伤; 急性肾衰竭; 急性肾毒性肾脏损伤(NRI)毒性, 所述急性肾毒性肾脏损伤毒性(包括败血症(感染)、休克、外伤、肾结石、肾感染、药物毒性、毒药或毒素、或注射碘化对比染料后(不良反应)); 以及对于慢性肾毒性肾脏损伤: 长期高血压、糖尿病、充血性心力衰竭、狼疮或镰状细胞性贫血。两种肾衰

竭形式都可导致威胁生命的代谢紊乱。

本文中“即时”的表述涉及一种肾小管细胞生物标记，其是一种生物标记蛋白，可在肾小管细胞损伤发生2小时内出现在血清中。

本文中的“早发”的表述涉及一种肾小管细胞生物标记，其是一种生物标记蛋白，可在肾小管细胞损伤发生后的最初24小时内，更典型地在最初6小时内出现在血清中。

本发明提供一种方法和试剂盒用于分析处于早发肾小管细胞损伤的受试对象的血清中肾小管细胞损伤生物标记的存在状况。损伤发生的早期检测可减少治疗损伤的时间，并能降低发展成临床上急性肾衰竭(ARF)的风险。

一个简单的应急检验(point-of-care)试剂盒采用与广泛使用的血糖测试试剂盒相同的原理，用于在床边快速检测血清 NGAL 使临床医师快速诊断 ARF，并迅速开始证明且有效治疗和预防措施。试剂盒的使用可代表所有有可能发展为 ARF 患者的治疗标准，包括用于心脏手术、肾移植、中风、外伤、败血症、脱水和肾毒素(抗生素、抗炎剂、放射性对比剂和化学治疗剂)。在目前的临床实践中，当 ARF 在上述病症发作时发生，诊断会被延误，发病率和死亡率将高得不可接受。讽刺地，甚至是悲剧性地，有效的预防和治理措施很大程度上是有效的，但因为缺少 ARF 的早期生物标记，几乎从来没有被及时使用。预期，多种 NGAL 测量方法不仅对于诊断和量化初始肾脏损伤，而且对接下来的早期治疗的应答以及对长期结果的预测，都是不可缺少的。

肾小管细胞损伤的生物标记(也称为 RTCI 生物标记)可以是即时 RTCI 生物标记，例如 NGAL，其在肾小管细胞损伤发生的2小时内出现在血清中。如果是 NGAL，即时 RTCI 生物标记可在肾小管细胞损伤发生后几乎立刻在受试对象的血清中出现。RTCI 生物标记也可能为早发 RTCI 生物标记，其在肾小管细胞损伤发生的最初24小时，更典型地在最初6小时内出现。同样，NGAL 也是早发 RTCI 生物标记的一个例子。

有效的 RTCI 生物标记典型地为分泌的蛋白，其可被肾脏分泌至尿液或被转运至血清中。有效的 RTCI 生物标记也可典型地为抗蛋白酶的蛋白，例如 NGAL。然而，RTCI 生物标记也可作为蛋白酶敏感蛋白，只要该蛋白的稳定片段可在尿或血清中被检测出，例如通过下文中描述的 NGAL 的抗体。

RTCI 生物标记可以是缺血性肾脏损伤生物标记(IRI 生物标记)、肾毒性

肾脏损伤生物标记(NRI 生物标记), 或其混合物。NGAL 是 IRI 生物标记和 NRI 生物标记的例子。

本发明的方法可用于检测肾小管细胞损伤的发病, 并且监控其对于各种事件的治疗, 所属事件包括所有种类的肾脏供血减少、受损的心脏功能、手术过程、在重症病房中的患者、和给予受试对象药物、放射对比染料、或其他药物物质。肾小管细胞损伤可以是缺血性肾脏损伤、肾毒性肾脏损伤, 或影响肾小管细胞的其他损伤。事件可包括给药或摄取大量而广泛种类的肾毒素, 包括但不限于癌症化疗(顺铂、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异磷酰胺(isosfamide)、甲氨蝶呤(isosfamide))、抗生素(庆大霉素(gentamicin)、万古霉素(vancomycin)、妥布霉素(tobramycin))、抗真菌剂(两性霉素(amphotericin))、抗炎剂(NSAIDs)、免疫抑制剂(环孢霉素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus))和放射对比剂。该方法可用于评价新发现的和已知化合物的肾毒性。

本发明还提供基于损伤程度与受试对象血清中 NGAL 的量呈比例关系, 评估肾脏损伤的程度的方法和试剂盒, 该损伤程度可为从肾小管细胞损伤的发病至临床上 ARF。本发明为临床医师提供了在最初的评估中评价肾脏损伤的等级的装置, 并且通过检测血清中 NGAL 的量监控损伤状况的变化(恶化、好转或无变化)。

典型地, 临床医师应当建立在经选择的时间间隔收集并分析从患者取样得到的一定量新鲜血液样品的方案。典型地, 血液样品在处方规定的时期内间歇取样。间歇取样的时期可由受试对象的病症决定, 可从每 24 小时取一次样至连续取样, 更典型地每 4 小时至每 30 分钟。然后, 典型地将血清样品通过已知方法从血液样品中分离。

使用本文描述的方法和技术, 可分析并评估血清中出现的 RTCI 生物标记的定性水平, 也可分析并测量出血清中 RTCI 生物标记的定量水平。临床医师可根据患者的状态选自定性法、定量法或两者。典型地, 采集血清的量为小于 1 毫升, 更典型地小于 10 $\mu$ l。典型的样品可为约 1 $\mu$ l 至约 1ml。典型地, 大量血清样品(约 1ml)用于定量分析。典型地, 这些少量血清可轻易从易于发展 ARF, 或已经发展为 ARF 的临床受试对象中获得。

一旦检测到肾小管细胞损伤或急性肾衰竭的指标, 就开始对疾病或病症的介入和治疗, 临床医师可采用本发明的方法或试剂盒来监控治疗或介入的过程。如果计划进行的治疗或手术可能导致肾小管细胞损伤, 临床医师可获

得治疗前的血清样品来测定个体的基线值。典型地,当肾脏损伤发生且继续,可收集一种或多种随后的治疗后血清样品并分析 RTCI 生物标记的存在状况。如果获得基线值,治疗后的值可与基线值对比,以确定患者的相对状态。治疗一直持续直到在随后的治疗后血清样品中不再检测到 RTCI 生物标记为止。当治疗或介入使病症好转,RTCI 生物标记的表达,及其在血清中的存在将相应减少。好转的程度表现为样品中检测到的相应减少的 RTCI 生物标记,例如 NGAL 的水平。当肾脏损伤接近痊愈,该方法可用于检测 RTCI 生物标记的完全不存在,标志治疗过程的完成。对缺血性和肾毒性损伤事件的动物模型的研究表明,在事件发生的几分钟内在肾小管细胞产生 NGAL。如本发明实施例所示,肾小管细胞表达的 NGAL 迅速在血液中蓄积,能比目前指示肾脏细胞损伤的诊断测试更早地被检测出。由于 NGAL 可在肾脏损伤或肾毒性处置的 2 小时内在血清中轻易检测出,本发明适合用于作为早发诊断。来自受试对象的血清样品的 NGAL 测试可在疑似损伤的 30 分钟内开始,因为 NGAL 开始时以低水平在血清中出现,之后持续升高。因此,在疑似损伤的 2 小时内的任何时间开始测试也是很有价值的,因为 NGAL 已明显地出现在血清中。此外,在疑似损伤的最初 24 小时内的其他任何时间测试也是有价值的,因为在可检测的其他参数,例如肌酸酐,改变之前,NGAL 是非常可靠并且容易测量的损伤标记。最优的 NGAL 测试过程是在整个治疗过程中间隔地获取样品,监控肾脏健康状况的即时变化。

能结合 RTCI 生物标记的单克隆和多克隆抗体对本发明的方法和试剂盒是有用的。抗体可用本领域已知的方法制备。优选的 RTCI 生物标记,NGAL 的单克隆抗体,在例如“Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils”, Lars Kjeldsen 等, (1996) Journal of Immunological Methods, Vol. 198, 155-16 中有所描述,在此处引为参考。NGAL 的单克隆抗体的例子为 HYB-211-01、HYB-211-02 和 NYB-211-05,可从 Antibody Shop, Copenhagen, Denmark 购得。典型地, HYB-211-01 和 HYB-211-02 可用于 NGAL 的还原和未还原形式。NGAL 的多克隆抗体的例子在“An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin”, Jun Yang 等, Molecular Cell, (2002), Vol. 10, 1045-1056 中有所描述,在此处引入作为参考。将兔子用重组体凝胶过滤的 NGAL 蛋白免疫,来制备该多克隆抗体。将血清与 GST-Sepharose 4B 珠培养以除去污染物,得到含有多克隆抗体的血清,如

申请人在 Jun Yang 等, *Molecular Cell* (2002) 中的描述。

典型地, 检测俘获抗体和 RTCI 生物标记复合物的步骤包括使该复合物与用于检测生物标记的第二种抗体接触。

检测 RTCI 生物标记和第一抗体的复合物的方法包括下列步骤, 从俘获抗体-生物标记复合物中分离出血清样品中任何未结合的物质; 将俘获抗体-生物标记复合物与用于检测 RTCI 生物标记的第二种抗体接触, 使 RTCI 生物标记与第二种抗体形成复合物; 从 RTCI 生物标记-第二种抗体复合物中分离出任何未结合的第二种抗体; 并且测定 RTCI 生物标记-第二种抗体复合物中的第二种抗体。

本方法所用的试剂盒典型地包含附着俘获抗体的介质, 由此血清样品与该介质接触使俘获抗体暴露在样品中含有的 NGAL 中。试剂盒包含一个获得装置, 所述装置可包含器具, 例如匙状物(spatula)或简单的棍棒, 其表面含有介质。获得装置还可包含用于接收血清样品的容器, 该容器与血清接触的表面包含介质。在另一个典型的实施方式中, 检测 RTCI 生物标记和抗体的复合物的测定方法可包含 ELISA, 并可用于定量血清样品中 NGAL 的量。在一个可选的实施方式中, 获得装置可包括含有介质的盒(cassette)的器具。

RTCI 生物标记的早期检测可在短时间内提供血清样品中蛋白质的存在标示。通常, 本发明的方法和试剂盒可在肾小管细胞损伤后的 4 小时内, 更典型地 2 小时内, 最典型地 1 小时内检测血清样品中的 RTCI 生物标记。优选地, RTCI 生物标记可在肾小管细胞损伤约 30 分钟内检测。

本发明用于测定 RTCI 生物标记的方法和试剂盒, 可通过修改本领域已知的在生物样品中快速检测其他蛋白和配体的方法或试剂盒而制备。可改造为本发明的方法和试剂盒的例子描述在美国专利 5,656,503, May 等人, August 12, 1997、美国专利 6,500,627, O'Conner 等人, December 31, 2002、美国专利 4,870,007, Smith-Lewis, September 26, 1989、美国专利 5,273,743, Ahlem 等人, December 28, 1993 和美国专利 4,632,901, Valkers 等人, December 30, 1986, 引入上述所有文献作为参考。

检测 RTCI 生物标记的快速的一步法可减少检测肾小管细胞损伤的时间。典型的方法可包含下列步骤: 获取疑似含有 RTCI 生物标记的血清样品; 将一部分样品与特异性结合 RTCI 生物标记的检测抗体混合, 使检测抗体与样品中的 RTCI 生物标记开始结合; 将样品和检测抗体的混合物与固定的俘

获抗体接触，该俘获抗体特异性地结合 RTCI 生物标记，并且不和检测抗体发生交叉反应，使检测抗体结合 RTCI 生物标记，并且 RTCI 生物标记结合俘获抗体，以形成可检测的复合物；从复合物中除去未结合的检测抗体和任何未结合样品，测定复合物的检测抗体。可检测抗体可用可检测标记进行标记，例如本领域熟知的放射活性标记、酶、生物染料、磁珠、或生物素。可检测抗体可连接在支持材料上，例如薄膜、塑料带、塑料的实验室平板例如用于 ELISA 或其他高通量分析所用的那些，或任何其他支持材料，例如那些本领域熟知的用于其他诊断试剂盒的材料。

为了鉴定可能伴随或标志肾小管细胞损伤，例如缺血性和肾毒性肾脏损伤的最早期发作的潜在基因及其蛋白，可使用 cDNA 微点阵分析检测大量潜在基因靶点中哪一个为显著上调。使用该筛选方法，嗜中性白细胞明胶酶相关的脂笼蛋白(lipocalin)(NGAL)被确认为，在小鼠模型中缺血性肾损伤发生后的最初几小时内，其基因表达上调超过 10 倍。

NGAL 属于超过 20 个结构上相关的分泌的蛋白的脂笼蛋白超家族，所述分泌的蛋白被认为在  $\beta$ -折叠桶形萼状结构( $\beta$ -barreled calyx)中转运各种配基。人 NGAL 最初被鉴定为一种与来自人嗜中性白细胞的明胶酶共价结合的 25kDa 蛋白，其中它代表嗜中性白细胞第二颗粒蛋白质(secondary granule proteins)中的一种。分子克隆研究揭示，人 NGAL 与小鼠 24p3 基因相似，所述小鼠 24p3 基因在被诱导增殖的小鼠肾的原代培养物中首次得到鉴定。NGAL 在其它人组织中，包括肾、气管、肺、胃和结肠中以非常低的水平表达。NGAL 表达在受刺激的上皮中被显著地诱导。例如，它在结肠上皮细胞的炎症或瘤形成区域中上调，但是在未进行干预的区域(intervening uninvolved areas)或在转移性病灶中不存在。NGAL 浓度在患有急性细菌感染的患者的血清中，在患有哮喘或慢性阻塞性肺病的受试对象的痰中、及来自肺气肿的支气管流体(bronchial fluid)中上升。在所有这些病例中，假定 NGAL 诱导是炎症细胞和上皮层之间的相互作用的结果，而在嗜中性白细胞和上皮中 NGAL 表达的上调都是显而易见的。

据信，检测到的 NGAL 诱导代表肾近端小管细胞对于肾小管细胞损伤内在的应答，所述损伤包括缺血性和肾毒性损伤的新的，而且并不仅仅源自激活的嗜中性白细胞。首先，所述的应答是快速的，NGAL 出现在肾动脉阻塞之后损伤的 2 小时之内的血清中，而在此缺血性 ARF 的模型中肾嗜中性白

细胞的蓄积通常在损伤后的4小时首次显著。第二, NGAL 诱导和嗜中性白细胞蓄积的时间图型是离散(divergent)的。NGAL mRNA 和蛋白表达在回流的12小时是最显著的, 然而嗜中性白细胞蓄积在24小时达到峰值, 而此时NGAL 表达已经显著地降低。第三, 在待测的肾样品中通过免疫荧光没有检测到表达 NGAL 的嗜中性白细胞。第四, 证明体外缺血后, NGAL mRNA 和蛋白诱导在培养的人近端小管细胞中出现, 在完全不存在嗜中性白细胞的体系中, NGAL 在 ATP 消耗的1小时以内分泌到培养基中。然而, 浸润嗜中性白细胞对于观察到的 NGAL 上调起作用。肾小管细胞中 NGAL 的上调, 可以通过局部释放细胞因子进行诱导, 所述细胞因子来自缺血性损伤后早期在微循环内捕获的嗜中性白细胞。

NGAL 的旧称为 HNL。现有技术专利 6,136,526 教导了一种检测 HNL 用于分辨细菌感染和病毒感染的方法。以通过吸引嗜中性白细胞和其他免疫细胞至感染的部位的免疫系统的诱导的经典的方式, 感染导致炎症,。当免疫细胞浸润被感染区域, 组胺和一系列致炎细胞因子释放入细胞内间隙, 诱导对生物体的吞噬和杀灭。有活性的嗜中性白细胞还分泌出 NGAL 以应答细菌感染但不是病毒感染。该区别应答很可能是因为在细菌表面部分的脂多糖(LPS)部分, 而 NGAL 易于结合 LPS。然后 NGAL 将分散到受感染部位附近的毛细血管, 并且当达到充分的水平, 可在血清或血浆中检测到。嗜中性白细胞何时开始分泌 NGAL 以应答细菌感染, 或需要多长时间从嗜中性白细胞释放的 NGAL 在血清中达到能被检测的水平还不清楚。

这与本发明在几个方面上相反。首先, 缺血性或肾毒性损伤的早期几乎不涉及或根本不涉及嗜中性白细胞或其他免疫细胞。第二, 缺血性或肾毒性损伤诱导受感染组织的细胞中 NGAL 的早期和快速表达, 所述受感染组织例如排列各种肾单位节段(nephron segments)的那些。第三, 肾脏受损细胞将 NGAL 即时释放到尿液中, 其在损伤后的几分钟内出现在尿液中。第四, 缺血性或肾毒性损伤后 6-12 小时发生的典型炎症与感染导致的炎症明显不同。缺血性或肾毒性损伤诱导的细胞死亡诱发主要包括巨噬细胞的浸润(infiltrates), 所述巨噬细胞分泌促炎细胞因子以促进受损组织中细胞碎片的吞噬作用。第五, 尽管在缺血性肾脏损伤的动物模型中, 发现一些嗜中性白细胞的蓄积作用, 其仅在损伤后约 4 小时发生, 在损伤后约 24 小时达到峰值。相反, 尿液 NGAL 的峰值在损伤后的 2-4 小时出现, 并在 24 小时内显

著减少(1-3)。因此,尿的 NGAL 排泄和嗜中性白细胞蓄积作用的不同的时程,证明缺血性损伤后的尿和血清 NGAL 不是来源于炎症。第六,尽管在动物模型中发现有嗜中性白细胞的蓄积作用,但从来未在人类急性肾衰竭中发现或被证实。第七,我们已证明在嗜中性白细胞完全不存在的体系中,缺血性损伤之后的体外培养的肾小管细胞中的 NGAL 的蓄积作用。参见 Rabb H 和 Star R. *Acute Renal Failure*, Molitoris BA 和 Finn WF (编者), WB Saunders, Philadelphia, 2001, pp89-100; Chiao 等人 *J Clin Invest* 1997; 99:1165-1172; 和 Rabb H 等人 *Am J Physiol* 1996; 271 F408-F413。

还缺乏对于通过刺激上皮细胞诱导 NGAL 的适当的解释,而且仍然不清楚 NGAL 对于损伤是否是保护性的或紧密联系的(proximate),或者甚至是一种无作用的相关者。近期的证据显示,至少在细胞类型的一种亚类中,NGAL 可代表前-细胞凋亡分子。在小鼠前-B 淋巴细胞的细胞系中,撤除细胞因子导致显著的 NGAL 诱导以及细胞凋亡的发生。纯化的 NGAL 产生与缺失细胞因子同样的前-细胞凋亡应答,包括 Bax 的激活,这显示出,NGAL 与程序性细胞死亡相关。NGAL 也与生殖组织中的细胞凋亡相关。内卷的(involuting)乳腺和子宫的上皮细胞表达高水平的 NGAL,时间上与最大细胞凋亡期一致。很可能 NGAL 通过诱导细胞凋亡调控细胞群的亚类。受刺激的上皮细胞可以上调 NGAL 以诱导浸润的嗜中性白细胞的凋亡,由此使定居细胞(resident cell)幸免于炎症反应的破坏。或者,上皮细胞可应用此机理调控它们自身的死亡。然而,有趣的是注意到,肾缺血-再灌注损伤之后的 NGAL 诱导主要发生在近端小管细胞中,而同样情况下的细胞凋亡则主要为远端小管细胞现象。

其它的近期研究已经揭示, NGAL 增强了上皮的表型。NGAL 通过穿透大鼠输尿管芽表达,并且通过刺激间质细胞向肾上皮细胞的转化来引发肾发生。已经显示另一种脂笼蛋白,生殖糖蛋白,当其在人乳癌细胞中表达时,诱导上皮细胞的表型。这些发现尤其适合于成熟的肾,其中对于缺血性损伤已充分证明的应答之一是明显出现沿近端小管排列的去分化的(dedifferentiated)上皮细胞。缺血性损伤后,肾再生和修复的一个重要方面包括重新获得上皮细胞表型,此过程概括了正常发育的几个方面。这说明,NGAL 可以由损伤的小管表达以诱导上皮细胞再生。对此观点的支持源自近期将 NGAL 鉴定为一种铁转运蛋白,其在肾发生的过程中与转铁蛋白

(transferrin)互补。已知向细胞递送铁对于细胞生长和发育是极其重要的，而且这可能对于缺血后的肾再生，正如它在个体发育过程中那样，是非常关键的。由于 NGAL 看来结合并转运铁，NGAL 也很可能作为从损伤的近端小管上皮细胞流出的铁库(sink)。因为已观察到 NGAL 可被近端小管胞吞，该蛋白可能将铁循环进入活细胞。这可刺激生长和发育，以及从组织损伤的部位去除反应分子-铁，由此限制铁-介导的细胞毒性。

NGAL 是顺铂诱导的肾毒性肾损伤的新型的血清生物标记，它比以前描述的生物标记更加敏感。一个实例是肾损伤分子-1 或 KIM-1，一个推定的涉及肾再生的粘附分子。在顺铂肾毒性的大鼠模型中，KIM-1 在初始损伤后的 24-48 小时是可以定量检测的，使其成为肾小管细胞损伤的一种有些晚期的标记物。据信在顺铂以已知导致肾衰竭的剂量给药后 3 小时内，方便而定量地检测到 NGAL。此外，尿和血清 NGAL 检测先于尿中其它标记物如 NAG 的出现。NGAL 在尿和血清中的出现也先于血清肌酸酐的增加，所述血清肌酸酐的增加已广泛地用于诊断肾毒性肾衰竭。

据信，甚至在轻微的“临床症状不明显的”顺铂剂量之后，尿 NGAL 是明显的，尽管血清肌酸酐仍为正常水平。因此，本发明对于经受顺铂治疗的患者的临床管理具有重要的含义。顺铂的有效性是剂量依赖性的，但肾毒性的发生经常阻碍应用更高剂量以使其抗肿瘤的潜力最大化。顺铂治疗后的肾毒性是常见的，并且可在单次剂量后出现急性肾衰竭。虽然已经证明几种治疗方案在动物体内顺铂诱导的肾毒性的治疗中是有效的，但是成功的人体实验很大程度上仍然是轶事奇闻。其中一个原因可能是缺乏肾毒性急性肾衰竭的早期标记物，而因此延迟治疗的开始。在目前的临床实践中，急性肾损伤通常是通过测定血清肌酸酐进行诊断的。然而，众所周知，肌酸酐在肾功能急性变化的过程中，是一种不可靠而且延迟的指标。首先，血清肌酸酐浓度不会变化，直到大约 50% 的肾功能已经丧失。第二，血清肌酸酐不能准确地描述肾功能，直到可能需要几天的时间以达到一种稳态。因此，血清肌酸酐测定的应用削弱检测和定量在肾损伤的早期过程中肾损伤的能力。然而，动物研究表明，虽然肾毒性急性肾衰竭可以预防和/或治疗，但是只有狭窄的“机会窗口”实现它，而且治疗必须在初始损伤后非常早就开始。肾损伤的早期生物标记物的缺乏削弱了临床医生以及时的方式开始可能的有效治疗的能力。在实验体系中，应用 NGAL 对于检测已经存在或形成的治疗干预或预

防干预, 以及对于其它药物的潜在肾毒性的早期评价也有价值。NGAL 检测对于顺铂诱导的肾损伤是新型的、非侵入性的、早期血清生物标记物。早期检测能够使临床医生给予及时的治疗干预, 并建立防止发展成明显的肾毒性肾衰竭的方案。

NGAL 的上调和血清转运可说明肾小管细胞对于各种损伤的快速应答, 而 NGAL 在血清中的检测可提供一种广泛应用的非侵性的临床工具, 用于小管细胞损伤的早期诊断。

NGAL 是一种敏感的、非侵入性的、肾小管细胞损伤的血清生物标记物, 所述的损伤包括肾缺血和肾毒性。检测在患有急性、轻微和早期形式的肾小管细胞损伤的患者的血清中 NGAL 的表达, 应用本发明的快速而简单的检测方法和试剂盒, 能够提醒并使临床医生在患有急性肾衰竭的患者中及时地开始干预努力, 并提醒临床医生实施一些方法, 旨在防止患有轻微的临床症状不明显的肾小管细胞损伤(如肾毒素、肾移植、血管外科和心血管的事件)的患者发展成明显的 ARF。

单在美国, 每年就进行大约 16,000 例肾移植。这个数字还在逐年稳定上升。其中大约 10,000 例是尸体的肾移植, 并有 ARF 的风险。这些患者中的每个人会极大地受益于系列的 NGAL 检测, 其可代表日常护理(routine care)。

缺血性肾损伤也与开放性心脏手术有关, 原因在于此过程中固有的血流的短暂中断。可以估计每年进行的开放性心脏手术的数目。在任何中度繁忙的成人医院中, 每年大约进行 500 例这样的手术。假定单在美国有至少 400 所这样的中度繁忙的医院, 可保守地估计出每年进行 200,000 例开放性心脏手术。这些患者的系列 NGAL 测定将是价值无法衡量的, 并可代表护理的标准。

#### 发明实施例

在本发明下面的实施例中, 对 71 个进行 CPB 儿童作研究。通过 Western 印迹和 ELISA 分析系列的尿样和血样中 NGAL 的表达。原始结果变量为急性肾损伤, 将其定义为血清肌酸酐相对基线水平增长了 50%。20 个患者(28%) 出现了急性肾损伤, 但是使用血清肌酸酐只可能在 CPB 后的 1 至 3 天诊断。与此相比, 尿 NGAL 在 CPB 后的两小时从基线的  $1.6 \pm 0.3$  ng/ml 上升至  $147 \pm 23$

ng/ml。血清的 NGAL 在 CPB 后的两小时从基线的  $3.2 \pm 0.5$  ng/ml 上升至  $61 \pm 10$  ng/ml。单变量分析显示急性肾损伤和下列显著相关：2 小时尿 NGAL，2 小时血清 NGAL 和 CPB 时间。通过多变量分析，认为 CPB 后 2 小时的尿 NGAL 值是急性肾损伤最有效的独立预测变量(independent predictor)。2 小时尿 NGAL 的 ROC 曲线显示，对于 50ng/ml 的截断值(cutoff value)，0.998 的曲线下面积，和 1.00 的敏感性以及 0.98 的特异性。对于心脏手术后急性肾损伤，尿 NGAL 和血清 NGAL 是新颖的，敏感的，特异的，高预测性的早期生物标记。

研究方案：研究经过 Institutional Review Board of the Cincinnati Children's Hospital Medical Center 的批准。书面知情同意书(informed consent)在每个患者登记之前从其法定监护人处得到。对在 2004 年 1 月至 11 月之间，所有接受心肺旁路(CPB)手术治疗先天性心脏病的患者进行预登记。排除的条件包括预成的肾机能不全，糖尿病(diabetes mellitus)，外周血管病，和在研究期之前或期间使用了肾毒性的药物。因此，我们研究同类的患者群，他们极其相似地不具有主要的混杂变量(confounding variable)，仅有的明显肾损伤就是 CPB 后局部缺血-再灌注损伤的结果。为了使术后血容不足降到最低，所有患者在术后最初 24 小时内接受至少 80% 的维持流体需要量，随后是 100% 的维持量。在 CPB 后的五天内在基线并以规律的间隔采集少量的(spot)尿样和血样。尿样在最初的 12 小时内每两小时取一次，随后为每 12 小时取一次。血样在进行 CPB 后 2 小时采集，在第一天中每 12 小时取一次，然后五天每天一次取。当 CPB 时间超过 2 小时，第一个术后尿样和血样在 CPB 结束时取得，并且此样品被看作是 2 小时采集品。同样从健康的成人志愿者处取得尿样和血样，以确立正常的 NGAL 值。样品在 2000g 下离心 5 分钟，并将上层清液于  $-80^{\circ}\text{C}$  分量(aliquot)贮藏。血清肌酸酐在基线处测量，并对那些病危儿童(critically ill)在刚刚手术后的时期常规监测至少一天两次，并在术后三天后至少每天一次。

统计方法：所有结果表示为平均值  $\pm$  SE。使用 SAS 8.2 统计软件进行分析。使用双样品 t-检验或 Mann-Whitney Rank Sum Test 比较连续变量，并使用所述的卡方检验(Chi-square test)或费歇尔精确检验(Fisher's exact test)比较分类(categorical)变量。用 CPB 后 2 小时和 4 小时的尿 NGAL 和 CPB 后 2 小时的血清 NGAL，生成常规接收操作特性(receiver operating characteristic,

ROC)曲线。这些被用于测量尿 NGAL 和血清 NGAL 不同截断水平的敏感性和特异性。计算曲线下的区域以确定 NGAL 为生物标记的性质。0.5 的面积近似表示偶然期望的生物标记，而 1.0 的值意味着完美的生物标记。进行单变量和多变量的逐步回归分析，以评估急性肾损伤的预测变量。潜在的独立预测变量包括年龄，性别，种族，CPB 时间，在先心脏手术，排尿量，CPB 后 2 小时的尿 NGAL，和 CPB 后 2 小时的血清 NGAL。认为小于 0.05 的 p 值是有意义的。

患者特征：100 个患者的监护人提供了他们的孩子参与到此次研究的知情书面同意。排除了 29 个患者，全都是因为在手术前或手术后不久使用了肾毒素(布洛芬，ACE 抑制剂，庆大霉素，万古霉素)。因此，本研究包括 71 个患者，他们的人口统计学特征、诊断和结果变量如下面的表 1 所示。所有受试对象开始都具有正常的肾功能，且在尿和血清中具有基本无法检测水平的 NGAL，与健康对照者类似。此研究方案需要考虑测定 CPB 后在尿液和血清中出现 NGAL 的准确时间。结果显示，NGAL 不仅是有效的用于急性肾损伤的即时早期生物标记，比血清肌酸酐的任何增长要提前 1 至 3 天，而且是在整个研究过程中的有效区别标记。

表 1

表 1. 患者特征和临床结果. \*p<0.05, 和对照相比.

特征	对照	急性肾损伤
	N = 51	N = 20
年龄 (年)	4.0 ± 0.7	2.1 ± 1.2*
性别 (% 男性)	62%	65%
种族 (% 白种人)	88%	85%
在先心脏手术	29%	25%
25%CPB 时间 (分钟)	105 ± 8.6	179 ± 13.6*
血清肌酸酐的变化 (%)	7.7 ± 1.8	99 ± 9.3*
诊断 (n)		
心室中隔缺损	9	3
法乐四联症	3	9

心房中隔缺损	7	0
主动脉缩窄	5	1
主动脉瓣狭窄	6	0
左心发育不良	2	3
AV Canal	3	2
肺动脉狭窄	3	1
主动脉转位	4	0
三尖瓣闭锁	3	0
右心室双出口(Double-outlet right ventricle)	2	0
左冠动脉异常	1	0
三房心(Cor Triatriatum)	0	1
LV 流出道梗塞	1	0
二尖瓣回流	1	0
主动脉回流	1	0

\* $p < 0.05$ , 与对照相比.

这个研究主要长处是预先募集同类的儿童, 这些儿童在先天性心脏病的外科修复手术期间出现了肾缺血再灌注损伤。这些实施例中的患者都没有相同的共病变量(co-morbid variables), 例如动脉粥样硬化病, 糖尿病, 以及使用肾毒素, 所有这些变量都会混淆并破坏用早期生物标记来鉴定缺血急性肾损伤。

临床结果: 原始结果, 急性肾损伤, 定义为血清肌酸酐从基线有 50% 或更多的增长, 在 3 天内在 71 个患者中的 20 人中出现, 发病率是 28%。除了这些患者, 8 个患者在 CPB 后的 24 至 48 小时内出现了血清肌酸酐的增长, 但是另外 12 个患者, 增长进一步推迟到 CPB 后的 48 至 72 小时。因此, 使用现有的临床操作只能在刺激事件发生后数天, 诊断出急性肾损伤。

根据原始结果, 把试验受试对象分为“对照”或“急性肾损伤”两组。两组在性别, 种族, 或排尿量上没有不同。采集的其它变量包括年龄, CPB 时间, 在先心脏手术, 排尿量, 和尿肌酸酐。如上面的表 1 所示, 发生急性

肾损伤的儿童趋向于具有更小的年龄以及更长的 CPB 时间。急性肾损伤更多的发生在具有左心发育不良，法乐四联症，和 AV canal 病症的潜在诊断的患者身上，而较少发生或不发生在患有心房中隔缺损，心室中隔缺损，或瓣膜性心脏病的患者身上。原始结果变量为急性肾损伤的发生，定义为血清肌酐相对基线有 50% 或更多的增长。

### 实施例 1

用作 NGAL 表达和定量的 Western 分析法：各尿样的等份(30 $\mu$ l)在变性缓冲剂中煮沸 10 分钟，并且用抗人 NGAL 的亲合纯化山羊多克隆抗体(F-19, Santa Cruz Biotechnology)进行标准 Western 印迹分析。如以前 Mishra 等人在 Am J Nephrol 2004;24:307-315 中所述，用已知量的重组人 NGAL 作为定量尿 NGAL 的标准，在相同转移和接触的条件下进行同时印迹。实验室研究人员直到研究结束都无法得知样品来源和临床结果。

尿 NGAL 测量 - Western 分析法：事实上，在手术前的所有患者以及健康的志愿者(n = 10)的尿中 NGAL 都是无法检测的。图 1 显示了进行 CPB 的患者的此类情况的典型 Western 印迹。NGAL 在 CPB 0 小时或之前检测不到，但是在 2 小时或更短的时间迅速出现，并且保持 Western 印迹可检测至少 12 小时。

用作 NGAL 定量的 ELISA：针对 NGAL 的敏感和可重现的 ELISA 是提供样品的准确定量并证实 Western 分析法所得数据的方法的实例。当然，ELISA 结果与 Western 分析法获得的结果接近平行，只有少于 20% 的差别。用于急性肾损伤生物标记的快速检测的基于免疫印迹技术的临床应用，受到时间因素和试验条件变更的限制。我们修改了在前出版的用于检测嗜中性白细胞来源的 NGAL 的操作规程，所述操作规程如 Kjeldsen 等人在 J Immunol Methods 1996;198:155-164 中所述。简而言之，用抗人 NGAL 的小鼠单克隆抗体(#HYB211-05, Antibody Shop)在 4 $^{\circ}$ C 包被微滴板过夜。随后的所有的步骤都在室温下进行。所述板用含 1% BSA 的缓冲液封闭，用 100 $\mu$ l 的样品(尿或血清)或标准品(NGAL 浓度在 1 - 1000ng/ml 的范围)包被，并与生物素化的抗人 NGAL 的单克隆抗体(#HYB211-01B, Antibody Shop)温育，然后与亲和素偶联的 HRP(Dako)温育。添加 TMB 底物(BD Biosciences)来显色，在 30 分钟后用微滴板读出器(Benchmark Plus, BioRad)在 450 纳米读取数据。所有

测定一式三份, 并以盲形式(blinded fashion)进行。

### 实施例 2

在那些从没有发生过急性肾损伤的患者中, CPB 后两小时或 CPB 后第一个可用样品的尿 NGAL 具有小量但有统计学显著意义的增加( $4.9 \pm 1.5$  ng/ml 比基线的  $0.9 \pm 0.3$  ng/ml,  $p < 0.05$ )以及 CPB 后 4 小时的尿 NGAL 具有小量但有统计学显著意义的增加( $4.9 \pm 1.2$  ng/ml, 与基线相比,  $p < 0.05$ )。与此形成显著对比, 如图 2 所示, 随后发展为急性肾损伤的患者的尿 NGAL, 在所有的测试时间点上都显示出显著的增加。尿 NGAL 分泌图的特征在于其在促发事件(precipitating event)后(CPB 后 2 - 6 小时)很早出现的峰, 紧接着在研究的全过程中是较小但是持续的增加。当尿 NGAL 浓度因为尿肌酸酐分泌而标准化时, 整体的图形保持不变(图 3)。

### 实施例 3

在健康志愿者体内尿 NGAL 水平始终低( $2.2 \pm 0.5$  ng/ml,  $n=10$ ), 并且在所有受试者中位于基线( $1.6 \pm 0.3$  ng/ml,  $n=71$ )。在那些从没有发生过急性肾损伤的患者中, CPB 后两小时的尿 NGAL 具有小量但有统计学显著意义的增加( $5.9 \pm 1.4$  ng/ml, 与基线相比,  $p < 0.05$ ), 以及 CPB 后 4 小时的尿 NGAL 具有小量但有统计学显著意义的增加( $5.6 \pm 1.2$  ng/ml, 与基线相比,  $p < 0.05$ )。如图 4 所示, 随后发生急性肾损伤的患者的尿 NGAL, 在所有的测试时间点上都显示出明显的增加。尿 NGAL 分泌在 CPB 后很快达到峰值, 紧接着在整个研究过程中保持较小但持续的增加。急性肾损伤组中的尿 NGAL 水平在 CPB 后 2 小时或第一个可得样品中为  $147 \pm 23$  ng/ml, 在 CPB 后 4 小时为  $179 \pm 30$  ng/ml, 在 CPB 后 6 小时为  $150 \pm 30$  ng/ml。当尿 NGAL 浓度用尿肌酸酐分泌标准化时, 整体的图形保持一致, 也就是尿 NGAL 比肌酸酐在 CPB 后 2 小时为  $138 \pm 28$  ng/mg, 在 CPB 后 4 小时为  $155 \pm 40$  ng/mg, 在 CPB 后 6 小时为  $123 \pm 35$  ng/mg(图 5)。首次可用的手术后尿 NGAL 测定的散点图显示, 所有 20 个随后发生急性肾损伤的患者显示了超出 50ng/ml 的任意截断值(arbitrary cutoff value)的水平, 然而, 对照组的 51 个患者中只有 1 个患者显示了超过该任意截断值的尿 NGAL 值(图 6)。

#### 实施例 4

血清 NGAL 测定 - ELISA: 血清 NGAL 是缺血肾损伤的新型早期生物标记, 类似于心肌缺血中的肌钙蛋白, 而血清 NGAL 的检测是本发明的实例。正常健康志愿者( $2.5 \pm 0.8$ ,  $n=6$ )和手术前所有研究受试对象( $3.2 \pm 0.5$  ng/ml,  $n=71$ )的血清 NGAL 水平始终低。在那些从没有发生过急性肾损伤的患者中, CPB 后两小时或 CPB 后第一个可用样品中的血清的 NGAL 有小量但有统计学显著意义的增加( $7.0 \pm 1.1$  ng/ml, 与基线相比,  $p < 0.05$ ), 以及 CPB 后 12 小时的血清的 NGAL 有小量但有统计学显著意义的增加( $5.2 \pm 0.8$  ng/ml, 与基线相比,  $p < 0.05$ )。如图 7 所示, 随后发生急性肾损伤的患者显示, 血清 NGAL 在所有的测试时间点上都显示出惊人的增加。类似于尿 NGAL, 血清的 NGAL 在 CPB 后很快达到峰值, 紧接着在整个研究过程中保持较小但持续的增加。急性肾损伤组中的血清 NGAL 水平在 CPB 后 2 小时为  $61 \pm 10$  ng/ml, 在 CPB 后 12 小时为  $54.7 \pm 7.9$  ng/ml, 在 CPB 后 24 小时为  $47.4 \pm 7.9$  ng/ml。所有的最早血清 NGAL 测定值(CPB 后 2 小时)的散点图显示, 对照组的所有 51 个患者都没有超出 50ng/ml 的任意截断值的水平, 然而, 发生急性肾损伤的大多数患者显示了超过该截断值的血清 NGAL 值(图 8)。本发明所述的 ELISA 是针对 NGAL 的应急检验诊断试剂盒的一个实例。

#### 实施例 5

用于急性肾损伤预测的 NGAL: 数据的单变量分析法揭示, 下面的结果并不是急性肾损伤的前兆: 年龄, 性别, 种族, 在先手术, 和排尿量。急性肾损伤(血清肌酸酐有 50% 或更多)与下述值具有显著的相关: CPB 后 2 小时或第一个可用样品的尿 NGAL( $R=0.79$ ,  $p < 0.001$ ), CPB 后 2 小时或第一个可用样品的血清 NGAL( $R=0.64$ ,  $p < 0.001$ ), 以及 CPB 持续期间( $R=0.49$ ,  $p < 0.001$ )。但是, 通过多元(multiple)逐步回归分析法, 显示出在这些数值(cohort)中只有在 CPB 后 2 小时的尿 NGAL 是对于急性肾损伤最有力的独立预测变量( $R=0.76$ ,  $p < 0.001$ )。

制作 ROC 曲线以确定测定尿 NGAL 和血清 NGAL 对于急性肾损伤早期诊断的区别作用。对于尿 NGAL, 曲线下的面积在 CPB 后 2 小时为 0.998(图 9), 在 CPB 后 4 小时为 1.000(未示出)。对于血清 NGAL, 曲线下的面积在 CPB 后 2 小时为 0.906(图 10)。这些值表明, 尿 NGAL 和血清 NGAL 对于急

性肾损伤的早期诊断是优良的检验。在不同截断水平得到的敏感性,特异性,和预测值列于表2。对于尿 NGAL, 25 或 50 ng/ml 的截断值在 CPB 后 2 小时和 4 小时可以产生突出的敏感性和特异性。对于 CPB 后 2 小时的血清 NGAL, 敏感性和特异性在 25 ng/ml 的截断值的时候是最佳的。

表 2.不同截断值的 NGAL 检验特征

2 小时尿 NGAL 的截断值 (ng/ml)	敏感性	特异性	正预测值	负预测值
25	1.00	0.98	0.95	1.00
50	1.00	0.98	0.95	1.00
80	0.90	1.00	1.00	0.96
100	0.70	1.00	1.00	0.89
4 小时尿 NGAL 的截断值 (ng/ml)	敏感性	特异性	正预测值	负预测值
25	1.00	0.96	0.91	1.00
50	0.95	1.00	0.95	0.98
80	0.70	1.00	1.00	0.89
100	0.65	1.00	1.00	0.88
2 小时血清 NGAL 的截断值 (ng/ml)	敏感性	特异性	正预测值	负预测值
25	0.70	0.94	0.82	0.89
50	0.50	1.00	1.00	0.84
80	0.20	1.00	1.00	0.76

通常, NGAL 在几种人组织中以很低的水平表达, 所述组织包括肾, 气管, 肺, 胃, 和结肠(Cowland 等人, Genomics 1997;45:17-23.)。在受损的上皮细胞中明显诱导 NGAL 的表达。例如, NGAL 的浓度在患有急性细菌感染的患者血清中, 在患哮喘或慢性阻塞性肺病的受试对象的痰液中, 以及在气

肿性肺的支气管流体中升高(Xu 等人, *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:298-307)。文中所述的本发明来自于对动物模型的观察,其中 NGAL 是缺血损伤后肾脏中最早和最有力的诱导基因和蛋白质之一,而且 NGAL 可以在缺血后不久轻易地从尿中检测出来。见 Supavekin 等人, *Kidney Int* 2003;63:1714-1724; Mishra 等人, *J Am Soc Nephrol* 2003; 4:2534-2543; 和 Devarajan 等人, *Mol Genet Metab* 2003;80:365-376。在缺血后的肾脏中, NGAL 在一些肾单位节段(segment)中显著上调,而且该蛋白质主要蓄积在它与增殖上皮细胞共定位(co-localizes)的近端小管内。这些发现提示损伤的小管可以表达 NGAL,以诱导表皮细胞再生。最近鉴定 NGAL 为培养肾小管细胞中的上皮形态发生调节物和为肾发生过程中的铁转运蛋白(Gwira 等人, *J Biol Chem* 2005, 和 Yang 等人, *Mol Cell* 2002;10:1045-1056)可支持该假设。众所周知的,铁传递到细胞中对于细胞的生长和发育是很重要的,而这大概对于缺血损伤后的肾再生同样重要。的确,最近的发现表明,通过使小管细胞命运的平衡向存活倾斜,外源施用 NGAL 改善小鼠的缺血急性肾损伤(Mishra 等人, *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3073-3082)。因此,NGAL 在 ARF 领域起中枢阶段(center-stage)的作用,不仅作为新型的生物标记,还作为一种新颖的治疗方法。

虽然尿诊断具有几个优点,包括样品采集的非侵入性和相对少的干扰蛋白,但其同样存在一些缺点。这包括很难从严重的少尿患者取得尿样品,所有流体状态和利尿剂疗法诱导的尿生物标记浓度的潜在变化,以及一些尿生物标记过去表现出的敏感性或特异性不足的事实(Rabb H. *Am J Kidney Dis* 2003;42:599-600)。基于血清的诊断已经彻底改变了重症监护药物。最近的实例包括用于急性心肌梗塞的早期诊断和及时介入的肌钙蛋白的测定,和急性冠状综合症患者体内 B-型尿钠排泄肽的预后值的测定(Hamm 等人, *N Engl J Med* 1997;337:1648-1653; 和 De Lemos 等人, *N Engl J Med* 2001;345:1014-1021)。据我们所知,NGAL 是唯一的在血清和尿中都能测定用于缺血肾损伤的早期诊断的生物标记。

本发明的方法和用途优于或超过了几种针对缺血肾损伤的其它生物标记的有用性,所述其它的生物标记例如那些在 Hewitt 等人, *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1677-1689; Herget-Rosenthal 等人, *Kidney Int* 2004;66:1115-1122; 和 Rabb, *Am J Kidney Dis* 2003;42:599-600 中所讨论的生物标记。已经回顾了迄

今为止的大多数研究报告,已经在 ARF 确定阶段检验了生物标记,并且已被限制到只是尿以及仅仅一种检测方法。已经在尿中测定了几种小管蛋白,具有矛盾和不令人满意的结果(Westhuyzen 等人, *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:543-551; Herget-Rosenthal 等人, *Clin Chem* 2004;50:552-558; Han 等人, *Kidney Int* 2002;62:237-244)。肾损伤分子-1(KIM-1),一种新颖的肾特异性粘附分子,可以在诊断有急性小管坏死的患者的尿中通过 ELISA 进行检测。同样的,Western 印迹所示的钠氢交换体同工型(isoform)3(NHE3)在确定 ARF 的受试对象的尿的膜级分中增加(du Cheyron 等人, *Am J Kidney Dis* 2003;42:497-506)。但是,没有报道用于肾损伤检测的这些生物标记的敏感性和特异性。在那些做过尸体肾脏移植(35, 36)具有迟发性移植功能的患者体中,已经证实,在 ARF 相关的炎症细胞因子中,尿 IL-6, IL-8 和 IL-18 的水平提高。除了 NGAL 以外,没有在缺血 ARF 的进展过程中从尿中预测检验出来的生物标记。最近的预测研究表明,在那些已选择处于发生 ARF 的高风险的患者群中,血清抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 的增加早于血清肌酐的增加(Herget-Rosenthal 等人, *Kidney Int* 2004;66:1115-1122)。但是,由于局部缺血,肾前(prerenal),肾毒和脓毒性病因的组合,这些受试对象发生 ARF 是多因素性的。此外,由于抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 主要是肾小球过滤速率(GFR)的标记,因此可以推断出血清抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 水平的上升只能在 GFR 开始下降之后。另一方面,NGAL 在肾小管细胞中应缺血损伤而被快速诱导,并且它在尿和血清中的较早出现并不依赖于 GFR,而是可能在几天之后发生的 GFR 减少的预测指标。没有发生 ARF 的患者的尿 NGAL 和血清 NGAL 有小的瞬时增加,这与之前的观察一致,心肺旁路手术导致 NGAL 释放到循环中,这可能继发于通过体外循环引发白细胞的炎性激活(Herget-Rosenthal 等人, *Kidney Int* 2004;66:1115-1122)。

尽管已结合优选的实施方案描述了本发明,但本领域的普通技术人员在阅读了前述的说明书之后,能够对在这里列出的主题作各种改变,等同替代和更改。因此,本发明可以通过在此具体描述的方式之外的方式实施。因此,此处的保护仅受附加的权利要求和其等同内容所限。

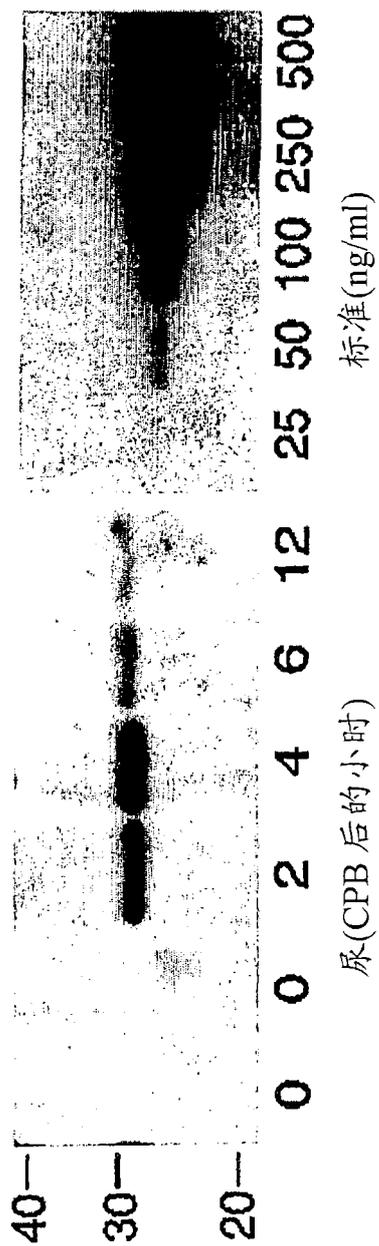


图 1

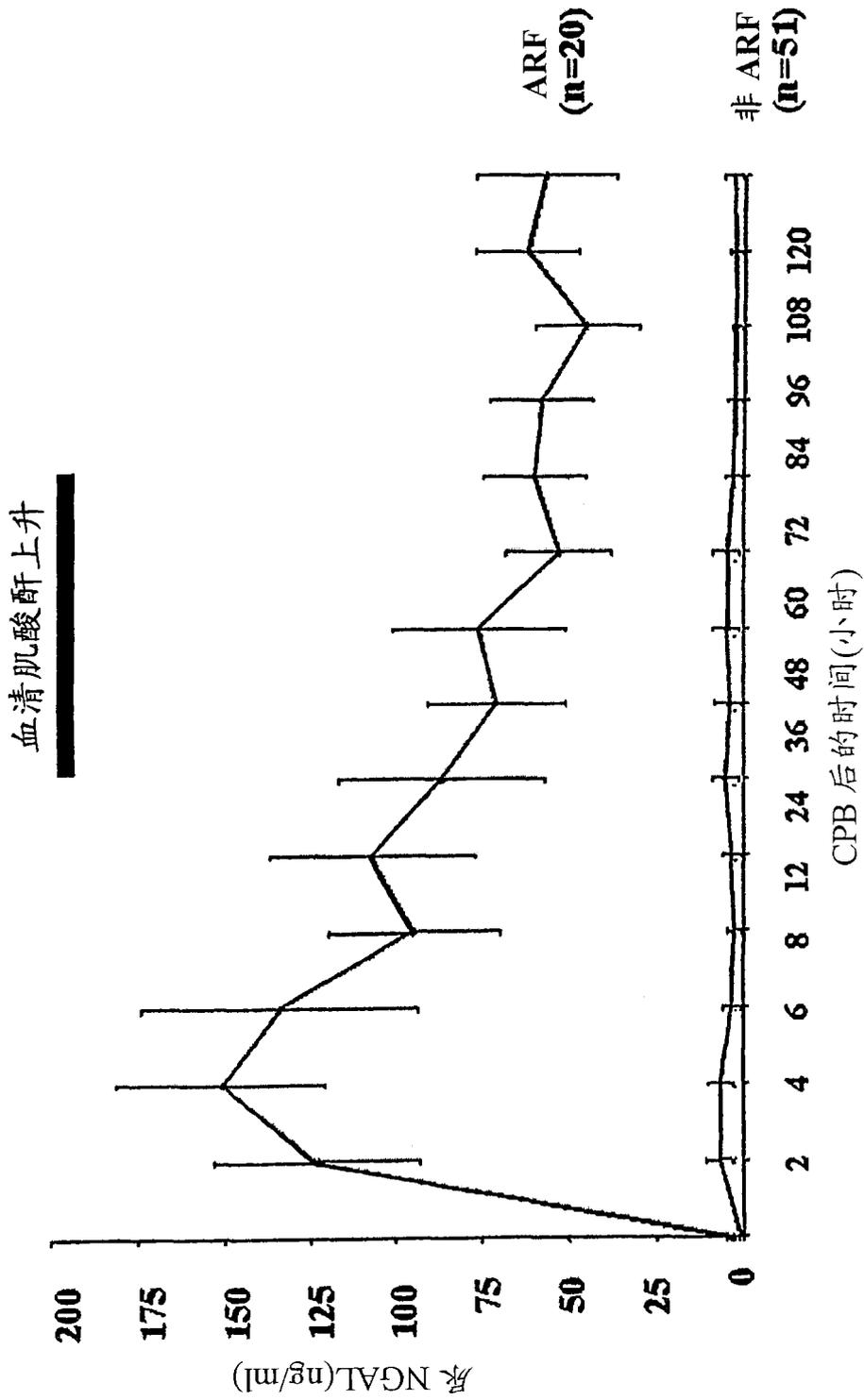


图 2

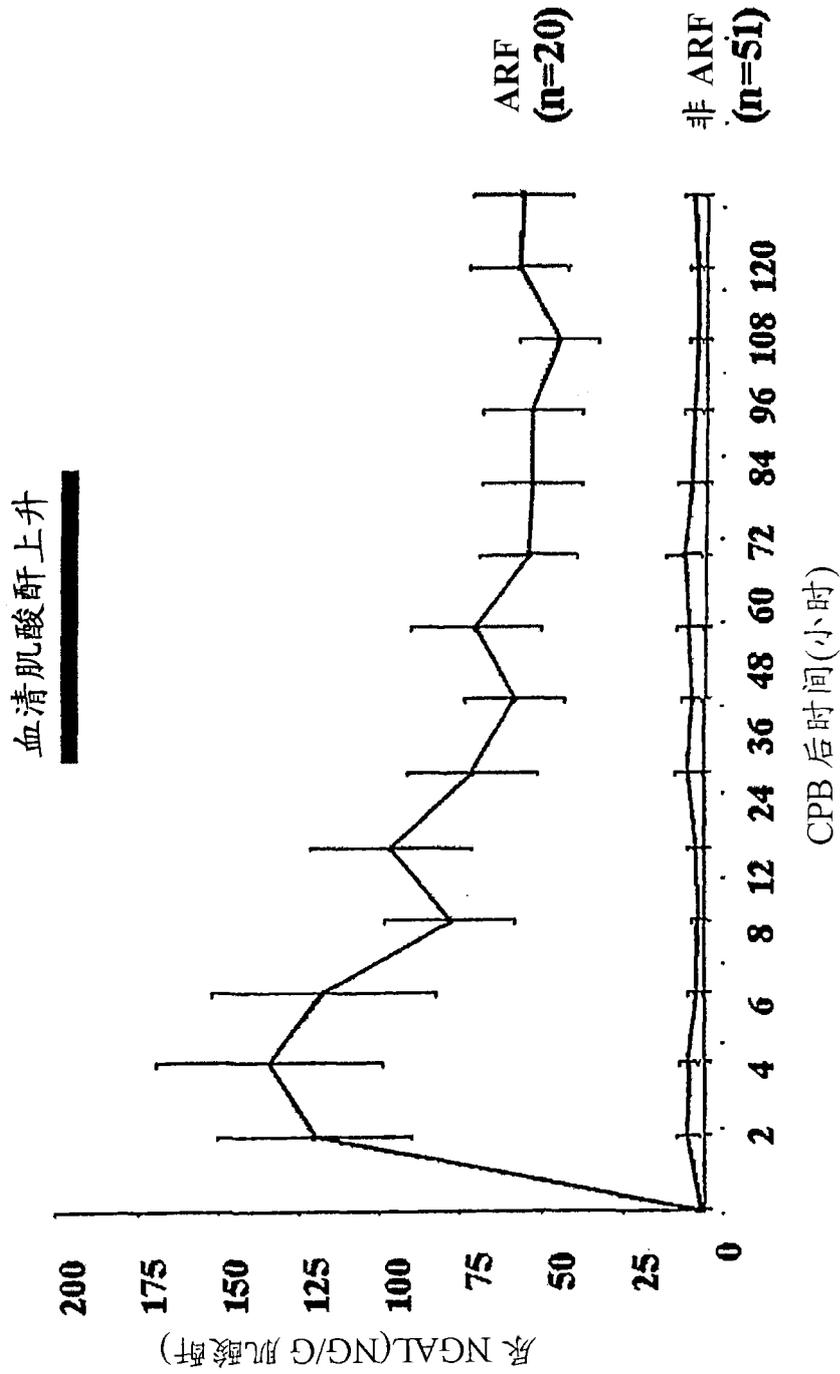


图 3

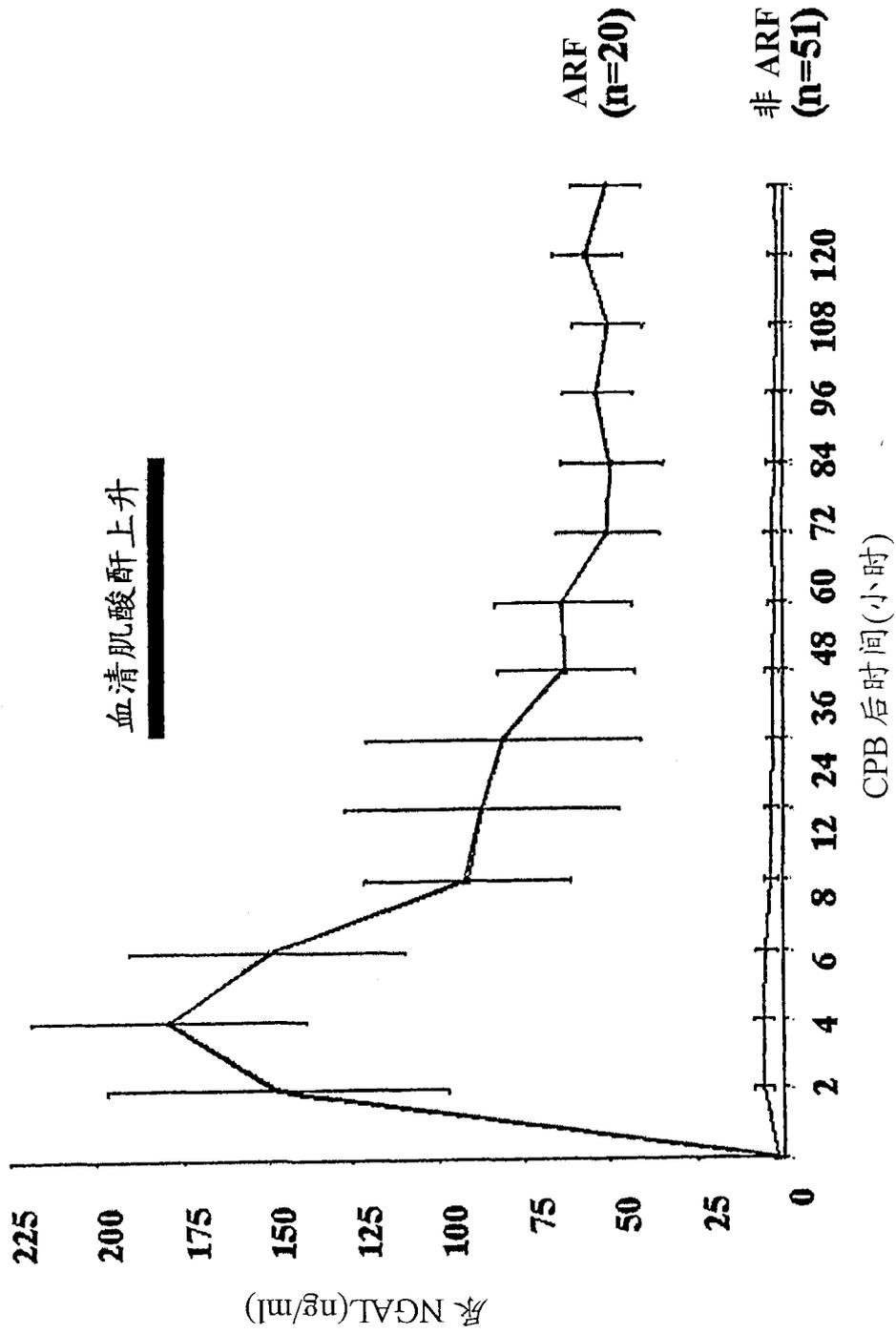


图 4

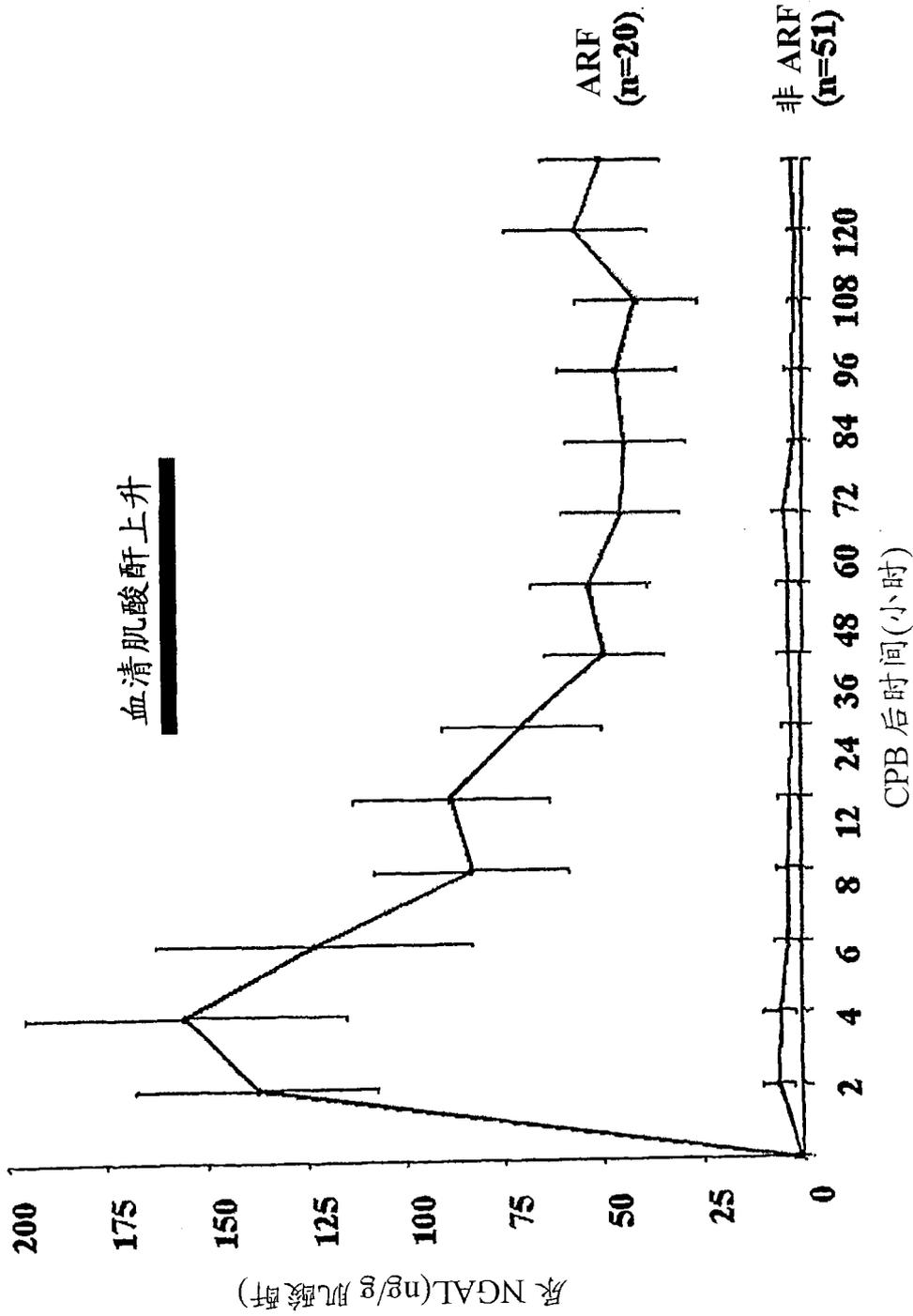


图 5

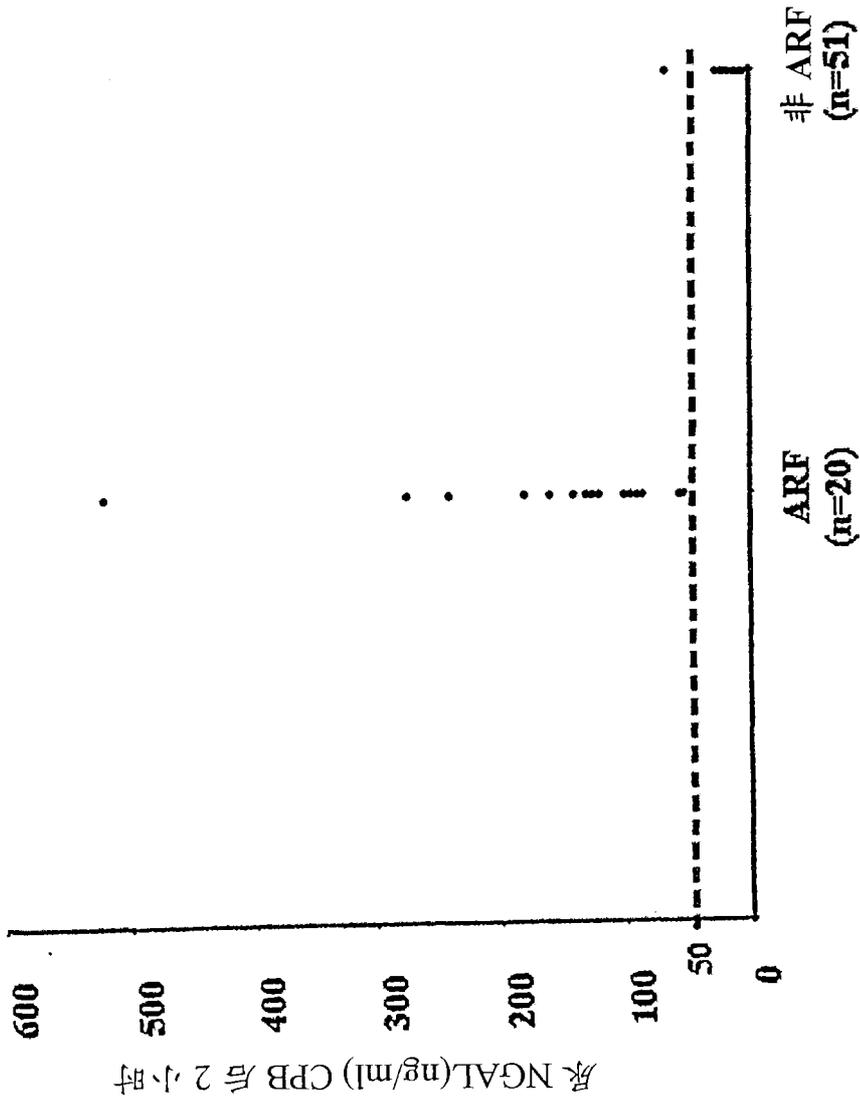


图 6

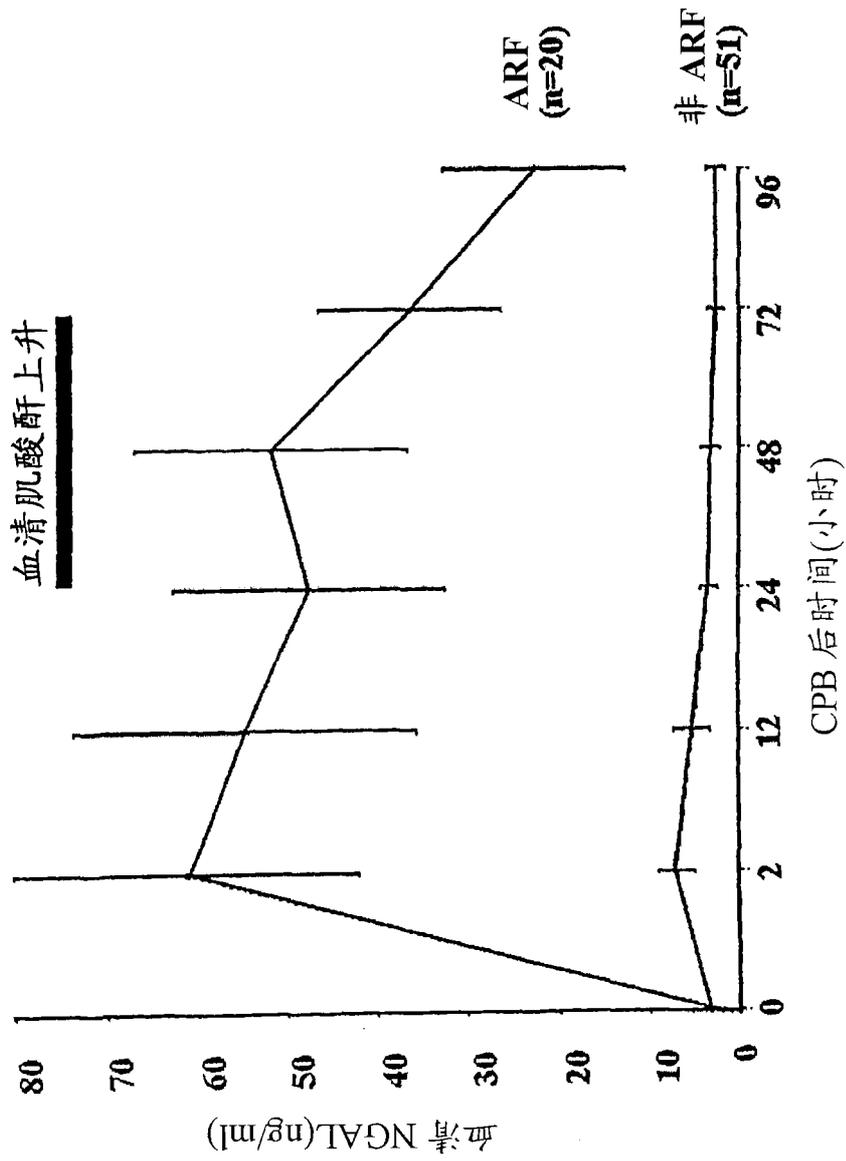


图 7



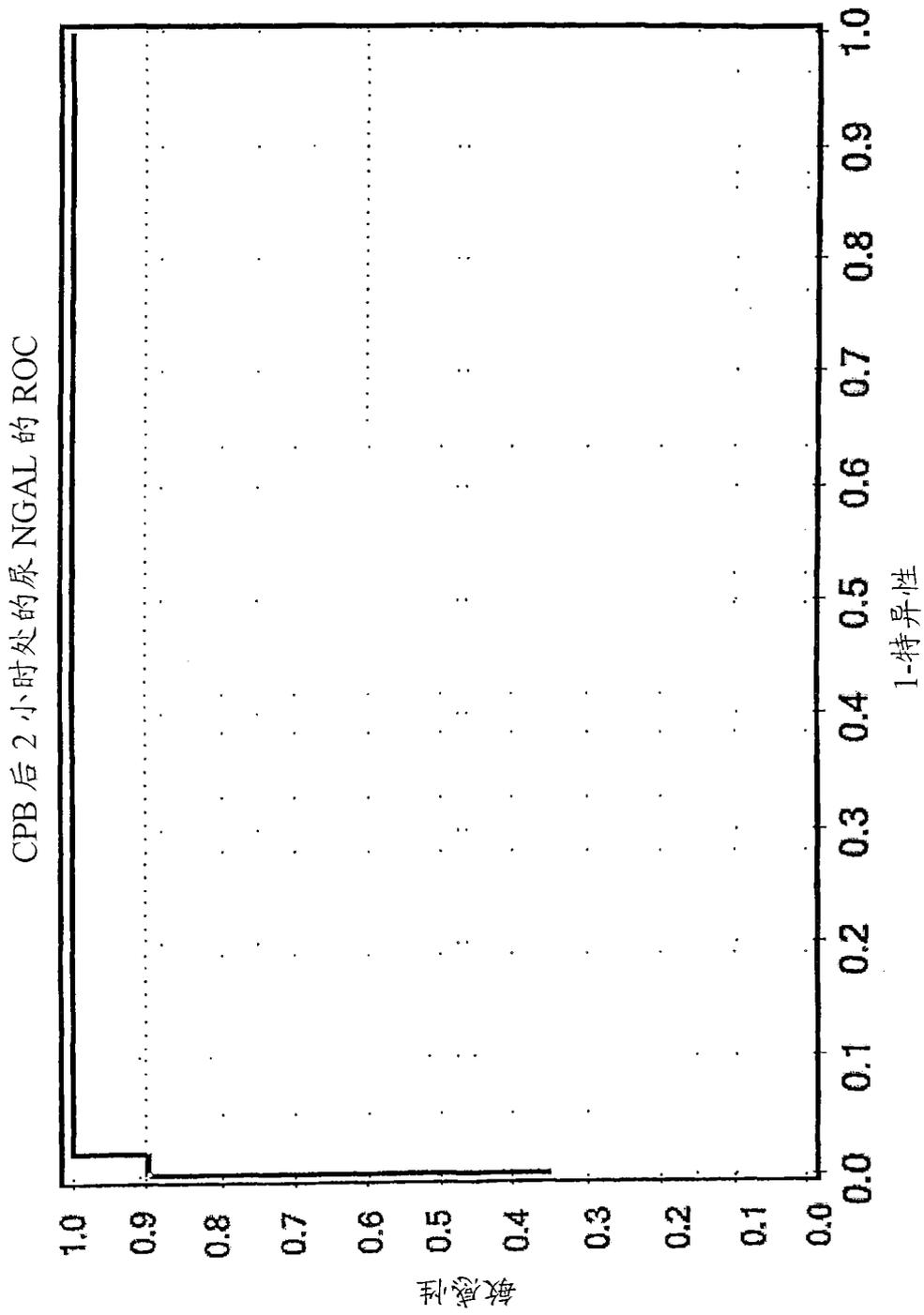


图 9

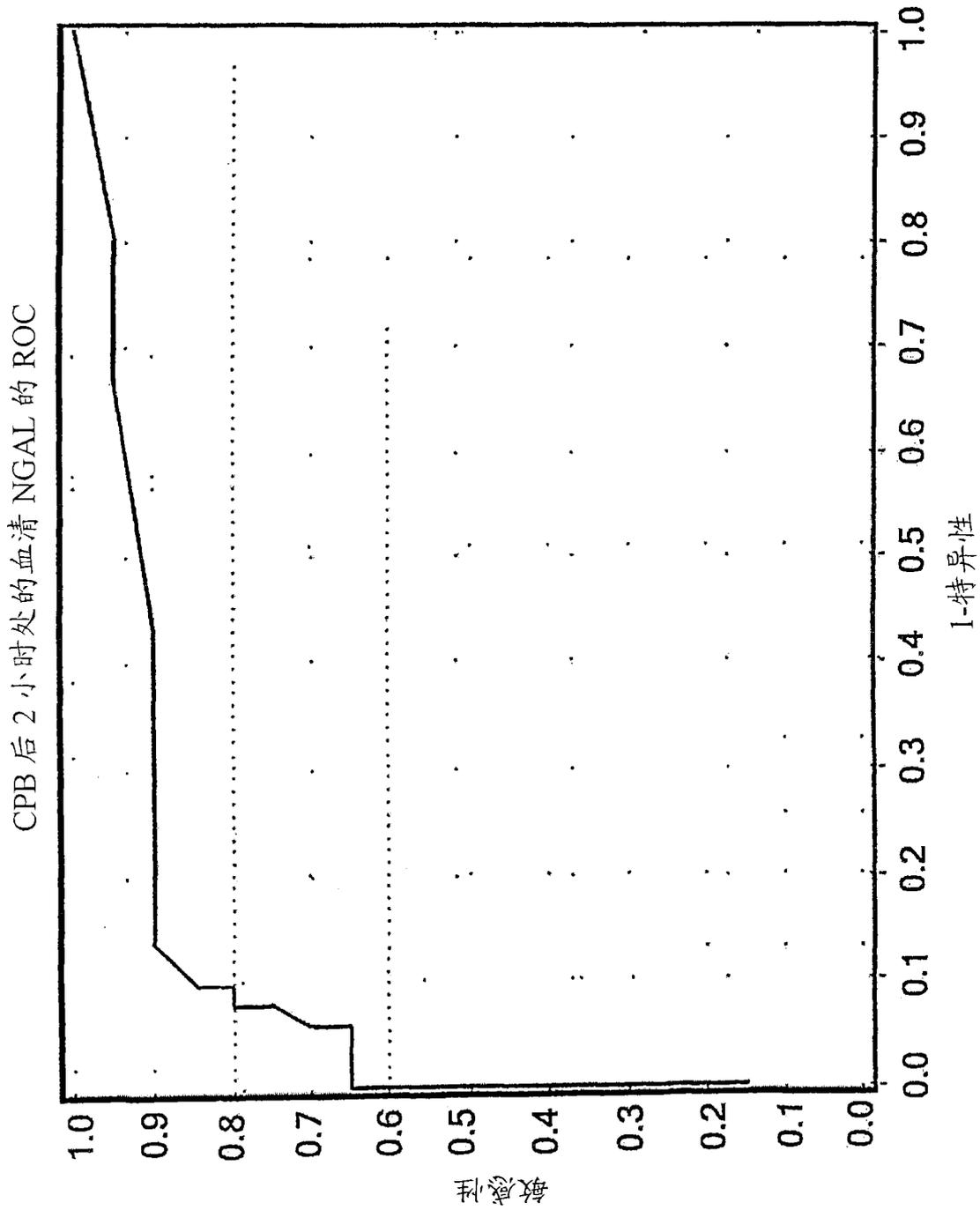


图 10

专利名称(译)	肾脏疾病和损伤的早期检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101027556A</a>	公开(公告)日	2007-08-29
申请号	CN200580026786.3	申请日	2005-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医院医疗中心		
申请(专利权)人(译)	儿童医院医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	儿童医院医疗中心		
[标]发明人	普拉萨德德瓦雷詹 乔纳森M巴拉什		
发明人	普拉萨德·德瓦雷詹 乔纳森·M·巴拉什		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/551 G01N33/542 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/82 G01N2800/52 G01N2800/347 G01N33/573		
优先权	60/577662 2004-06-07 US 11/096113 2005-03-31 US		
其他公开文献	CN101027556B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于测定早发肾脏疾病和损伤的方法和试剂盒，所述损伤包括肾小管损伤，其中使用NGAL作为早期血清生物标记。NGAL是小型的分泌多肽，其抗蛋白酶并因此容易在肾小管细胞损伤后在血清中检测。分泌性蛋白的具点细胞质分布表明，在近端小管细胞，NGAL蛋白表达大部分被检测到。NGAL在血清中出现与肾缺血和肾毒性的剂量和持续时间有关，并且可诊断肾小管细胞损伤和肾衰竭。NGAL测定也是监测药物或其他治疗剂的肾毒性副作用的有用的指标。

