



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108700600 B

(45) 授权公告日 2022.06.03

(21) 申请号 201780014329.5

CN 101937000 A, 2011.01.05

(22) 申请日 2017.03.02

WO 2010040029 A1, 2010.04.08

(65) 同一申请的已公布的文献号

KOPITAR-JERALA N 等. Monoclonal antibodies to human stefin B and determination of their epitopes.

申请公布号 CN 108700600 A

《BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA》.1993, 第1164卷(第1期), 第75-80页.

(43) 申请公布日 2018.10.23

Premachandra H.K.A. 等. Cystatin B

(30) 优先权数据

homolog from rock bream Oplegnathus fasciatus: Genomic characterization, transcriptional profiling and protease-inhibitory activity of recombinant protein.《Comparative Biochemistry and Physiology, Part B》.2012, 第163卷(第1期), 第138-146页.

62/302299 2016.03.02 US

JORONEN I 等. Detection of low molecular weight cysteine proteinase inhibitors by time-resolved fluoroimmunoassay.《JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS》.1986, 第86卷(第2期), 第243-247页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Lee Mi-Jin 等. Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma.《CLINICAL CANCER RESEARCH》.2008, 第14卷(第4期), 第1080-1089页.

2018.08.30

(续)

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 林晓烨

PCT/US2017/020377 2017.03.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/151871 EN 2017.09.08

(73) 专利权人 艾德克斯实验室公司

地址 美国缅因州

(72) 发明人 M.耶拉米利 G.法拉斯 J.J.奎恩

M.V.S.N.耶拉米利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

专利代理人 任晓华 杨思捷

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2011153469 A1, 2011.12.08

权利要求书3页 说明书29页

CN 101268368 A, 2008.09.17

序列表7页 附图5页

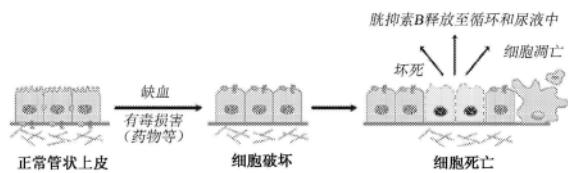
CN 101878426 A, 2010.11.03

(54) 发明名称

CN 108700600 B 用于检测和诊断肾病和牙周病的方法和组合物

(57) 摘要

本公开提供了用于检测哺乳动物的肾病和牙周病的组合物和方法。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Ji NY 等. Development of a fluorescent microsphere immunoassay for cystatin B (CSTB) in serum of patients with

hepatocellular carcinoma.《CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE》.2010, 第49卷(第1期),第151-155页.

1. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法检测样品中的胱抑素B多肽的试剂中的用途,所述方法包括:使所述样品与所述一种或多种抗体在适于使所述胱抑素B多肽与所述一种或多种抗体形成复合物的条件下接触,并检测胱抑素B多肽与所述一种或多种抗体的复合物。

2. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法诊断受试者的肾病的试剂中的用途,所述方法包括:

(a) 测定来自所述受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中所述胱抑素B多肽的量是使用所述一种或多种抗体测定;并且

(b) 将所述样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中所述样品中胱抑素B多肽的含量高于所述对照样品或对照标准指示肾病。

3. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法治疗受试者的肾病的试剂中的用途,所述方法包括:

请求测试,使用所述一种或多种抗体测定来自所述受试者的样品中胱抑素B多肽的量以提供分析结果,并且如果所述样品含有的胱抑素B多肽的量高于所述肾病的对照样品或对照标准,则向所述受试者施用针对肾功能减退治疗。

4. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法诊断受试者的牙周病的试剂中的用途,所述方法包括:

(a) 测定来自所述受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中所述胱抑素B多肽的量是使用所述一种或多种抗体测定;并且

(b) 将所述样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中所述样品中胱抑素B多肽的含量高于所述对照样品或对照标准指示所述受试者有牙周病。

5. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法区分上泌尿道感染与下泌尿道感染的试剂中的用途,所述方法包括:

(a) 测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中所述胱抑素B多肽的量是使用所述一种或多种抗体测定;并且

(b) 将所述样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中所述样品中胱抑素B多肽的含量高于所述对照样品或对照标准指示所述受试者有上泌尿道感染。

6. 特异性结合由SEQ ID N0:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体在制备用于通过以下方法区分急性肾损伤与下泌尿道感染的试剂中的用途,所述方法包括:

(a) 测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中所述胱抑素B多肽的量是使用所述一种或多种抗体测定;并且

(b) 将所述样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中所述样品中胱抑素B多肽的含量高于所述对照样品或对照标准指示所述受试者有急性肾损伤。

7. 根据权利要求2或3所述的用途,其中所述肾病是由慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、进行性慢性肾病、急性肾损伤、活动性肾损伤或细菌感染引起。

8. 根据权利要求2或3所述的用途,其中所述肾病不是由癌症引起的。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述细菌感染是由无形体属、埃里希体属、钩端螺

旋体属、埃希氏菌属或疏螺旋体属细菌引起。

10. 根据权利要求1、2、3、4、5或6所述的用途,其中所述胱抑素B多肽的量是通过检测胱抑素B多肽与所述一种或多种抗体的复合物测定。

11. 根据权利要求1、2、3、4、5或6中任一项所述的用途,其中所述抗体被固定至固体支撑物。

12. 根据权利要求1、2、3、4、5或6中任一项所述的用途,其中所述抗体偶联至一种或多种标记。

13. 根据权利要求10所述的用途,其中所述方法还包括使胱抑素B多肽和所述一种或多种抗体的复合物与指示剂接触。

14. 根据权利要求1、2、3、4、5或6中任一项所述的用途,其中所述一种或多种抗体特异性结合由SEQ ID NO:5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽。

15. 根据权利要求2、3、4、5或6中任一项所述的用途,其中所述受试者是非人类动物。

16. 根据权利要求1、2、3、5或6中任一项所述的用途,其中所述样品是血液、血清、血浆或尿液。

17. 根据权利要求4所述的用途,其中所述样品是唾液、菌斑、龈沟液、牙龈活检样品或舌拭子。

18. 根据权利要求1、2、3、4、5或6中任一项所述的用途,其中所述胱抑素B多肽或胱抑素B多肽的量是通过免疫分析、竞争性免疫分析、夹心免疫分析、酶联结免疫吸附分析、免疫比浊法、颗粒增强免疫比浊法、放射免疫分析或蛋白质印迹分析测定或检测。

19. 一种分离的抗体,其特异性结合至由SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽。

20. 根据权利要求19所述的分离的抗体,其中所述分离的抗体:

(a) 被冻干、干化或干燥;

(b) 偶联至标记;

(c) 固定至固体支撑物;

(d) 特异性结合至由SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12组成的多肽;或

(e) 固定至固体支撑物并且特异性结合至SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12中所陈述的多肽。

21. 一种用于诊断肾病、慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、急性肾损伤、活动性肾损伤、进行性慢性肾病、上泌尿道感染或牙周病的试剂盒,所述试剂盒包含:

(a) 特异性结合至由SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体;和

(b) 有助于所述一种或多种抗体结合至受试者样品中存在的胱抑素B多肽的一种或多种试剂。

22. 一种或多种分离的多肽,由SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12组成。

23. 根据权利要求22所述的一种或多种分离的多肽,其中所述多肽:

(a) 被冻干、干化或干燥;

(b) 偶联至标记;

(c) 固定至固体支撑物;

(d) 特异性结合至一种或多种抗体,所述一种或多种抗体特异性结合SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12中所陈述的一种或多种多肽。

24. 一种免疫复合物,所述免疫复合物包含 (i) 一种或多种分离的抗体,所述分离的抗体特异性结合至由SEQ ID NO:2、3、5、6、7、11或12组成的一种或多种多肽;和 (ii) 被特异性结合至所述一种或多种分离的抗体的一种或多种多肽。

25. 根据权利要求24所述的免疫复合物,其中所述免疫复合物被固定至固体支撑物。

## 用于检测和诊断肾病和牙周病的方法和组合物

### [0001] 优先权

[0002] 本申请要求2016年3月2日提交的美国系列号62/302,299的权益,该案以全文引用的方式并入本文中。

### [0003] 序列表

[0004] 本文件在本文中以引用的方式并入电子序列表文本文件,所述文本文件是通过EFS-Web以电子格式提交。所述文本文件命名为“16-179-WO\_ST25.final.txt”,7.10KB并于2017年3月2日创建。

### 技术领域

[0005] 本申请涉及疾病诊断标记物的领域。

### 背景技术

[0006] 肾病会伴随饮水量增加、尿频、食欲降低、体重减轻及肌肉萎缩。一般来说,当出现肾病的临床症状时,肾脏已发生无法挽回的损伤。早期检测允许早期治疗并随之减慢疾病进展。当前的治疗包括透析以及低磷和低蛋白质饮食。早期检测对于增加寿命和改善生活质量至关重要。

[0007] 在哺乳动物中,肾病的进展分成五个阶段。当前用于检测哺乳动物,例如犬科动物的肾病的方法包括肾脏超声波、活组织检查或尿蛋白/肌酸酐含量测量。活组织检查是创伤性的并且肌酸酐测量值在进展到第三期肾衰竭之前并不准确,而当进展到第三期肾衰竭时,明显组织损伤已经发生。本领域中需要用于检测早期肾病的方法以便能停止疾病进展。

### 发明内容

[0008] 一个实施例提供了一种用于检测样品中的胱抑素B(“Cys B”)多肽的方法。所述方法包括使样品与特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体在适于使胱抑素B多肽与特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体形成复合物的条件下接触。检测胱抑素B多肽与特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体的复合物。

[0009] 另一个实施例提供了一种用于诊断受试者的肾病的方法。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示肾病。

[0010] 又另一个实施例提供了一种用于治疗受试者的疾病病状的方法。所述方法包括请求测试,使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,提供分析结果。如果样品含有的胱抑素B多肽的量高于所述疾病病状的对照样品或对照标准,则向受试者施周针对肾功能减退的治疗。所述疾病病状可以是慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、急性肾损伤、活动性肾损伤、进行性慢性肾病、牙周病、上泌尿道感染、肾病或其组合。

[0011] 又另一个实施例提供了一种用于诊断受试者的牙周病的方法。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有牙周病。

[0012] 另一个实施例提供了一种区分上泌尿道感染与下泌尿道感染的方法。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有上泌尿道感染。

[0013] 另一个实施例提供了一种区分急性肾损伤与下泌尿道感染的方法。所述方法包括(a)测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定;并且(b)将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有急性肾损伤。

[0014] 在一个实施例中,肾病可以由慢性肾病、急性肾损伤或细菌感染引起。在一个实施例中,肾病、慢性肾病或急性肾损伤不是由癌症引起的。细菌感染可以由无形体属(*Anaplasma* sp.)、埃里希体属(*Ehrlichia* sp.)、钩端螺旋体属(*Leptospira* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)或疏螺旋体属(*Borrelia* sp)细菌引起。胱抑素B多肽的量可以通过检测胱抑素B多肽与对由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽具有特异性的一种或多种抗体的复合物测定。

[0015] 在一个实施例中,在检测之前,可以使胱抑素B多肽和对由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽具有特异性的一种或多种抗体的复合物与指示剂接触。所述一种或多种抗体可以特异性结合由SEQ ID NO:5、6、7、11或13组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽。

[0016] 在一个实施例中,受试者可以是非人类动物并且样品可以是血液、血清、血浆、尿液、唾液、菌斑(plaque)、龈沟液、牙龈活检样品或舌拭子。

[0017] 在一个实施例中,胱抑素B多肽或胱抑素B多肽的量可以通过免疫分析、竞争性免疫分析、夹心免疫分析、酶联结免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫比浊法(turbidimetric immunoassay)、颗粒增强免疫比浊法或蛋白质印迹分析(western blot assay)测定。

[0018] 又另一个实施例提供了一种分离的抗体,所述抗体特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽。所述分离的抗体可以被冻干;偶联至标记;固定至固体支撑物;特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的多肽;或固定至固体支撑物并且特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的多肽。

[0019] 在一个实施例中,抗体可以固定至固体支撑物并且可以偶联至一种或多种标记。

[0020] 又另一个实施例提供了用于诊断肾病、慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、活动性肾损伤、进行性慢性肾病、急性肾损伤、上泌尿道感染或牙周病的试剂盒。所述试剂盒可以包含特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的一种或多种抗体;及有助于所述一种或多种抗体结合至受试者样品中存在的胱抑素B多肽的一种或多种试剂。

[0021] 另一个实施例提供了由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种分离的多肽。所述多肽可以被冻干;偶联至标记;固定至固体支撑物;或特异性结合至一种或多种抗体,所述一种或多种抗体特异性结合由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽。

[0022] 又另一个实施例提供了一种用于诊断哺乳动物受试者,如人类、犬科动物或猫科动物受试者的肾病的方法。所述方法包括(a)测定样品(例如尿液、血液、血浆、血清、细胞、组织)中胱抑素B多肽的量;并且(b)将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示肾病。胱抑素B多肽的量可以使用特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成(或包含所述序列)的一种或多种多肽的分离的抗体测定。哺乳动物的肾病可以是例如慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、慢性肾病、进行性慢性肾病、急性肾损伤、活动性肾损伤、上泌尿道感染或肾脏细菌感染。在一个实施例中,肾病不是癌症或肾癌。

[0023] 一个实施例提供了一种免疫复合物,其包含(i)特异性结合至由SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成的一种或多种多肽的一种或多种分离的抗体;和(ii)被特异性结合至所述一种或多种分离的抗体的一种或多种多肽。所述一种或多种多肽可以是例如SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或其组合。免疫复合物是在抗原(如多肽)与抗体之间形成的复合物。免疫复合物可以固定至固体支撑物。

[0024] 具体实施例从以下某些优选实施例的更详细描述及权利要求书将变得显而易见。

## 附图说明

- [0025] 图1显示了正常管状上皮以及近端小管上皮细胞的细胞破坏和细胞死亡。
- [0026] 图2显示在胱抑素C蛋白存在下胱抑素B的蛋白质印迹分析。
- [0027] 图3显示了使用天然犬科动物胱抑素B (MDCK溶解产物), 利用Cys B ELISA分析获得的标准曲线。
- [0028] 图4显示了针对来自犬科动物健大霉素 (gentamycin) 模型的血清和尿液的Cys B ELISA分析。
- [0029] 图5显示了针对来自临幊上呈现炎症或缺血诱发的活动性肾损伤的狗的尿液的Cys B ELISA分析。
- [0030] 图6图A和B显示犬科动物和猫科动物参考范围。
- [0031] 图7图A和B显示相较于健康狗和CKD患者, 被诊断患有AKI的患者的尿和血清胱抑素B含量明显增加。
- [0032] 图8显示健康和下泌尿道感染患者的胱抑素B含量。
- [0033] 图9显示犬科动物AKI样品、人类CKD样品及犬科动物阴性对照样品中Cys B多肽的检测。
- [0034] 图10显示来自健康犬科动物的血清的Cys B值。
- [0035] 从以下结合附图进行的详细描述将更好地理解这些以及其它目的和特征, 其中:

## 具体实施方式

- [0036] 以下更具体地描述本发明并且本文中陈述的实例只打算作为例示性的, 其中的多种修饰和变化将是本领域的技术人员显而易知的。除非上下文另外明确规定, 否则如在本文中的说明中以及在之后的整个权利要求书中所使用, “一个(种) (a/an)”和“所述”的意义包括多个参考物。与数字值相关联的术语“约”意思指所述值在±5%内变化。例如, 对于约100的值, 意思是95至105(或95与105之间的任何值)。
- [0037] 本说明书中使用的术语一般在本文所描述的组合物和方法的上下文内以及各术语使用的具体情形中具有其在本领域中的普通含义。以下更具体地对一些术语作出定义以向从业者提供有关所述组合物和方法的说明的额外指导。
- [0038] 本文所描述的组合物和方法可以用于预测、诊断和监测若干疾病和病症的进展, 包括例如肾病、慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、进行性慢性肾病、急性肾损伤、活动性肾损伤、上泌尿道感染及牙周病。肾病包括(1)使肾功能相较于健康受试者有所减退; 或(2)引起肾脏的物理损伤; 或(3)两者的任何疾病病状。在一个实施例中, 肾病不包含癌症或不包含肾癌。包括肾癌在内的癌症的标记物可以不同于慢性肾病患者的急性肾损伤或活动性肾损伤、慢性肾病、进行性慢性肾病、活动性肾损伤、急性肾损伤、上泌尿道感染或牙周病的标记物。在一个实施例中, 慢性肾病患者的急性肾损伤、进行性慢性肾病、活动性肾损伤、急性肾损伤、上泌尿道感染或牙周病不包含癌症或不包含肾癌。
- [0039] 慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是以肾功能随时间逐渐丧失为特征的病症。CKD又称为慢性肾脏疾病 (chronic renal disease)。CKD不包含肾癌、肾细胞癌、膀胱癌或其它癌症。随着CKD恶化, 废物会大量积累于血液中, 并且可能出现高血压、贫血、骨骼脆弱、营养健康状况变差和神经损伤。CKD增加患心脏和血管疾病的风险并且最终会导致肾

衰竭。CKD可以由糖尿病、高血压和其它病症引起。早期检测和治疗通常可以防止疾病恶化。

[0040] 表1中显示了国际肾脏权益组织 (International Renal Interest Society) 所建立的犬科动物的CKD分期。

[0041] 表1.

[0042]	血清肌酸酐浓度	第 I 期 非氮质血症性 CKD	第 II 期 轻度肾脏氮质 血症	第 III 期 中度肾脏氮质 血症	第 IV 期 重度肾脏 氮质血症
	mg/dL	<1.4	1.4-2.0	2.1-5.0	>5.0
	Mmol/L	<125	125-179	180-439	>440

[0043] 表2中显示了国际肾脏权益组织所建立的猫科动物的CKD分期。

[0044] 表2.

[0045]	血清肌酸酐浓度	第 I 期 非氮质血症性 CKD	第 II 期 轻度肾脏氮质 血症	第 III 期 中度肾脏氮质 血症	第 IV 期 重度肾脏 氮质血症
	mg/dL	<1.6	1.6-2.8	2.9-5.0	>5.0
	Mmol/L	<140	140-250	251-440	>440

[0046] 本文所描述的方法可以检测第1、2、3或4期CKD的急性肾损伤或活动性肾损伤。在一个实施例中,在肌酸酐分析可以检测出第1、2、3或4期CKD的急性肾损伤或活动性肾损伤之前,所述方法就可以检测出第1、2、3或4期CKD的急性肾损伤或活动性肾损伤。

[0047] 人类的肾病是根据肾小球滤过率 (GFR) 进行分期。使用公式,利用个人的年龄、人种、性别及其血清肌酸酐计算GFR。以下显示CKD的五个分期和每一分期的GFR:

- [0048] ■ 第1期具有正常或高GFR (GFR>90mL/min)
- [0049] ■ 第2期轻度CKD (GFR=60-89mL/min)
- [0050] ■ 第3A期中度CKD (GFR=45-59mL/min)
- [0051] ■ 第3B期中度CKD (GFR=30-44mL/min)
- [0052] ■ 第4期重度CKD (GFR=15-29mL/min)
- [0053] ■ 第5期末期CKD (GFR<15mL/min)

[0054] 本文所描述的方法可以检测第1、2、3A、3B、4或5期CKD的人类急性肾损伤或活动性肾损伤。在一个实施例中,在肌酸酐分析或GFR值可以检测出第1、2、3A、3B、4或5期CKD的急性肾损伤或活动性肾损伤之前,所述方法就可以检测出第1、2、3A、3B、4或5期CKD的人类急性肾损伤或活动性肾损伤。

[0055] 慢性肾病或肾脏疾病可以是肾小球或肾小管疾病。

[0056] 急性肾损伤 (AKI) 定义为肾脏过滤功能的突然或迅速减退。AKI可以导致慢性肾病 (CKD)、需要透析的肾衰竭 (末期肾病)、心脏病或死亡。即使是轻度AKI或从AKI完全恢复也可能会有一些短期和长期的健康问题。AKI可以由因任何原因 (例如低血压、脱水) 使肾脏血流量减少而导致的肾组织损伤、暴露于危害肾的物质、肾脏的抗炎过程、全身性疾病、挤压损伤、抗生素、败血症或泌尿道阻塞所引起。AKI可以导致代谢性酸中毒、高钾含量、尿毒症、体液平衡变化并且影响其它器官系统。在一个实施例中,AKI不包含癌症或不包含肾癌。表3中显示了国际肾脏权益组织所建立的猫科动物和犬科动物的AKI分级。

[0057] 表3.

AKI 等级	血液肌酸酐	临床说明
第 I 级	<1.6 mg/dl (<140 μmol/l)	非氮质血症性 AKI: 证实的 AKI (AKI 的病史、临床、实验室或影像证据、临床乏尿症/无尿症、容量反应性; 和/或 48 小时内血液肌酸酐的进行性非氮质血症性增加 $\geq 0.3 \text{ mg/dL}$ ( $\geq 26.4 \mu\text{mol/l}$ ); 和/或 6 小时内测量的尿量过少 ( $<1 \text{ ml/kg/hr}$ ) 或无尿。
第 II 级	1.7-2.5 mg/dl (141-220 μmol/l)	轻度 AKI: 证实的 AKI 和静止性或进行性氮质血症 血液肌酸酐的进行性氮质血症性增加; 在 48 小时内 $\geq 0.3 \text{ mg/dL}$ ( $\geq 26.4 \mu\text{mol/l}$ ) 或容量反应性; 6 小时内测量的尿量过少 ( $<1 \text{ ml/kg/hr}$ ) 或无尿
第 III 级	2.6-5.0 mg/dl (221-439 μmol/l)	中度至重度 AKI: 证实的 AKI 以及增加的氮质血症严重程度和功能性肾衰竭
第 IV 级	5.1-10.0 mg/dl (440-880 μmol/l)	
第 V 级	>10 mg/dl (>880 μmol/l)	

[0058] 在一个实施例中,本文所描述的方法可以检测第1、2、3、4或5级AKI。在一个实施例中,在肌酸酐分析可以检测出第1、2、3、4或5级AKI之前,本文所描述的方法就可以检测出第1、2、3、4或5级AKI。

[0059] AKI在人类中可以如下分期:

[0060] 表3A

分期	肌酸酐	尿排出量
1	基线的 1.5-1.9 倍 或 $\geq 0.3 \text{ mg/dl}$ ( $\geq 26.5 \mu\text{mol/l}$ ) 增加	在 6-12 小时内 $< 0.5 \text{ ml/kg/h}$
2	基线的 2.0-2.9 倍	在 $\geq 12$ 小时内, $< 0.5 \text{ ml/kg/h}$
3	基线的 3.0 倍 或 血清肌酸酐增加至 $\geq 4.0 \text{ mg/dl}$ ( $\geq 353.6 \mu\text{mol/l}$ ) 或起始肾脏替代疗法 或在 $<18$ 岁的患者中, eGFR 降低 至 $<35 \text{ ml/min/1.73 m}^2$	在 $\geq 24$ 小时内, $< 0.3 \text{ ml/kg/h}$ 或 在 $\geq 12$ 小时内, 无尿

[0061] 在一个实施例中,方法可以检测第1、2或3期人类AKI。在一个实施例中,在肌酸酐分析可以检测出第1、2或3期人类AKI之前,所述方法就可以检测出第1、2或3期人类AKI。

[0062] 在一个实施例中,肾病、CKD或AKI是由细菌感染引起。在一个实施例中,细菌感染

是由元形体属、埃里希体属、钩端螺旋体属、埃希氏菌属或疏螺旋体属细菌引起。

[0065] 活动性肾损伤定义为持续性或进行性肾损伤、肾病症或肾病变。活动性肾损伤引起肾的累积性损伤。

[0066] 多肽

[0067] 脱抑素A和B是脱抑素超家族第1家族的成员并且是大小为约11kDa的相对较小的蛋白质。在人体中,这些蛋白质是单体并且大小为约11kDa。这些蛋白质不被糖基化并且不具有在其它脱抑素超家族中所见的二硫桥。它们还缺乏信号序列并因此一般是被限制于细胞的细胞内蛋白质。参见Ochieng和Chaudhuri,《贫困人口保健服务杂志 (J Health Care Poor Underserved)》2010,21 (1增刊) :51。在细胞外流体中存在一定量的脱抑素B并且已经从人类尿液中纯化出脱抑素B。参见Abrahamson等人,《生物化学杂志 (J Biol Chem)》1986, 261:11282-11289。经显示,脱抑素B可抑制溶酶体半胱氨酸蛋白酶,组织蛋白酶家族,特别是组织蛋白酶B、H和L的成员。参见,Green等人,《生物化学杂志 (Biochem J)》1984218:939; D' Amico等人,《转化医学杂志 (J Transl Med)》2014, 12:350; Jarvinen和Rinne,《生物化学与生物物理学学报 (Biochim Biophys Acta)》1982, 708:210-217。

[0068] 脱抑素B多肽详细地描述于实例1中并且包括:

[0069] QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAAGTPYFIKVQVDDDEFVHLRFQSLPHENKPLALSSYQTNK AKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

[0070] MMCAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:2)

[0071] MMCAPSASQPATADTQAIADQVKAKQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAAGTXYFIKVQVDDDEFVHLR VFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:3) (其中X可以是任何氨基酸或其中X可以是P或N)。

	QTNKAKHDELAYF	( SEQ ID NO:4 ) 脱抑素 B 的 C 末端
	“肽 9”	
	CGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:5)	脱抑素 B 的 N 末端
	“肽 3-20”	
	CGAPSASQ	( SEQ ID NO:6 ) 脱抑素 B 的 N 末端
	“肽 3-10”	
	CAIADQVKA	( SEQ ID NO:7 ) 脱抑素 B 的 N 末端
[0072]	“肽 18-25”	
	FQSLPHENKPLALSS	( SEQ ID NO:8 ) 脱抑素 B “肽 2”
	SQVVAGTPYFIKVQVDDD	( SEQ ID NO:9 ) 脱抑素 B “肽 1”
	KHDELAYF	( SEQ ID NO: 10 )
	MMCAPSASQPATADTQAIADQVKAKQLEE	( SEQ ID NO:11 )
	AIADQVKA	( SEQ ID NO:12 )
	SQVVAGTNYFIKVQVDDD	( SEQ ID NO:13 )

[0073] 一个实施例提供了包含SEQ ID NO:1-27的纯化多肽或其片段。SEQ ID NO:1-27的多肽片段可以由不到约95、90、80、70、60、50、40、35、30、25、20、15、10个(或在约10与约95之间的任何范围)邻接氨基酸组成。在一个实施例中,多肽片段由SEQ ID NO:1-27的超过约

10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90或95个邻接氨基酸组成。在一个实施例中,多肽或其片段是非天然存在的。

[0074] 多肽SEQ ID N0:1至2、4-13及15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27及27小于全长Cys B多肽的事实相当重要,因为较小的多肽可以具有比全长多肽分析更大的特异性和/或敏感性。相较于全长多肽,这些较小多肽制造起来更便宜,并且可以在较大的纯度下获得。此外,这些较小片段和样品中存在的较小片段的含量可以指示疾病状态。片段式多肽(即,小于全长)的含量增加可以作为疾病的标志。

[0075] 多肽是通过酰胺键共价连接的三个或三个以上氨基酸的聚合物。多肽可以经历翻译后修饰。纯化的多肽是基本上不含细胞材料、其它类型的多肽、化学前体、多肽合成中使用的化学试剂或其组合的多肽制剂。基本上不含细胞材料、培养基、化学前体、多肽合成中使用化学试剂的多肽制剂具有小于约30%、20%、10%、5%、1%或更多的其它多肽、培养基、化学前体和/或合成中使用的其它化学试剂。因此,纯化的多肽是约70%、80%、90%、95%、99%或更高纯度。

[0076] 术语“多肽”可以指一种类型的多肽(一组多肽)中的一个或多个。“多肽”还可以指两种或更多种不同类型多肽的混合物(即,包括但不限于全长蛋白质、截短的多肽或多肽片段的多肽混合物)。术语“多个多肽 (polypeptides)”或“一个多肽 (polypeptide)”也可以分别指“一个或多个多肽”。

[0077] 多肽变体与SEQ ID N0:1-27中显示的多肽或其片段有约例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸残基不同(例如氨基酸添加、取代或缺失)。当这一比较需要对准时,将这些序列对准以获得最大同源性。变化的位点可以出现在多肽的任何位置。

[0078] 变体多肽一般可以通过修饰本文所描述的多肽序列之一,并评价修饰后的多肽的特性以确定它是否生物等效来进行鉴别。如果变体在如免疫组织化学分析、酶联结免疫吸附分析(ELISA)、免疫比浊法、颗粒增强免疫比浊法、放射免疫分析(RIA)、免疫酶分析或蛋白质印迹分析之类分析中的反应与本文所描述的多肽基本上相同,例如具有原始多肽的90-110%活性,则所述变体是生物等效的。在一个实施例中,所述分析是竞争分析,其中在生物学上等效的多肽能够使本文所描述的多肽与相应反应性抗原或抗体的结合减少约80%、95%、99%或100%。特异性结合相应多肽的抗体也特异性结合变体多肽。

[0079] 变体多肽与SEQ ID N0:1-27中显示的多肽序列至少约80%,或约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致。例如,SEQ ID N0:1-27的变体多肽可以与SEQ ID N0:1-27约至少99.5%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、90%、87%、84%或81%一致。变体多肽具有一个或多个保守氨基酸变化或其它微小修饰并且保持生物活性,即,是SEQ ID N0 1-27的生物功能等效物。当与相应多肽相比较时,生物活性等效物具有基本上相同的功能。

[0080] 在氨基酸序列中引入突变的方法是本领域的技术人员众所周知的。参见例如, Ausubel (编),《现代分子生物学实验技术 (Current Protocols in Molecular Biology)》, John Wiley and Sons, Inc. (1994); Maniatis 等人,《分子克隆实验指南 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》, Cold Spring Harbor laboratory, 纽约冷泉港 (Cold Spring Harbor, N.Y) (1989)。也可以使用可商购的试剂盒,如“QuikChange<sup>TM</sup>定点诱变试剂盒”(Stratagene) 引入突变。本领域技术人员可以通过置换不影响多肽功能的氨基酸来产

生功能活性变体多肽。

[0081] 变体多肽可以具有在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处具有保守氨基酸取代。保守取代是一个氨基酸被具有类似特性的另一个氨基酸取代,使得肽化学领域的技术人员预期多肽的二级结构和亲水性质大体上不变的一种取代。一般来说,以下氨基酸分组表示保守变化: (1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr; (2) cys、ser、tyr、thr; (3) val、ile、leu、met、ala、phe; (4) lys、arg、his; 及 (5) phe、tyr、trp、his。在一个实施例中,多肽具有约1、2、3、4、5、10、20个或更少的保守氨基酸取代。

[0082] 如本文所使用,两个氨基酸序列(或两个核酸序列)的一致性百分比是使用Karlin和Altschul(《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》87:2264-2268,1990),如在Karlin和Altschul,《美国国家科学院院刊》90:5873-5877,1993中修改)的演算法测定。此种演算法被并入Altschul等人(《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215:403-410,1990)的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索是利用NBLAST程序,分数=100,字长=12进行。BLAST蛋白质检索是利用XBLAST程序,分数=50,字长=3进行。为了获得带空位的对准以实现比较目的,利用如Altschul等人(《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25:3389-3402,1997)中所描述的GappedBLAST。当利用BLAST和GappedBLAST程序时,使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数来获得与本文所描述的核酸分子同源的核苷酸序列。

[0083] 一致性或一致意思是氨基酸序列相似性并且具有技术认可的含义。具有一致性的序列共有一致或类似的氨基酸。序列一致性是在序列对准并根据需要,适当地引入空位以使序列一致性最大化之后测定的与抗体原始氨基酸序列中的氨基酸一致的氨基酸的百分含量。因此,与参考序列共有85%氨基酸序列一致性的候选序列需要在将候选序列与参考序列对准之后,候选序列中85%的氨基酸与参考序列中的相应氨基酸一致,和/或构成保守氨基酸变化。

[0084] 多肽或抗体可以共价或非共价连接至所述多肽或抗体在自然界通常不结合的氨基酸序列。此外,多肽或抗体可以共价或非共价连接至除氨基酸外的化合物或分子。例如,多肽或抗体可以连接至指示剂、氨基酸间隔子、氨基酸连接子、信号序列、停止转移序列、跨膜结构域、蛋白质纯化配体或其组合。在一个实施例中,蛋白质纯化配体可以是在例如多肽的氨基末端或羧基末端处的一个或多个C氨基酸残基。氨基酸间隔子是在自然界通常不与多肽或抗体结合的氨基酸序列。氨基酸间隔子可以包含约1、5、10、20、100或1,000个氨基酸。

[0085] 多肽还可以包含共翻译或翻译后引导蛋白质转移的信号序列(或前导序列)。多肽还可以包含连接子或便于合成、纯化或鉴别多肽(例如聚His)或促进多肽与固体支撑物的结合的其它序列。例如,多肽可以偶联至免疫球蛋白Fc区或牛血清白蛋白。

[0086] 多肽可以共价或非共价连接至该多肽在自然界通常不结合的氨基酸序列,即,异源氨基酸序列。异源氨基酸序列可以来自不同生物体、合成序列或通常不在多肽的羧基或氨基末端处的序列。此外,多肽可以共价或非共价连接至除氨基酸外的化合物或分子,如指示剂。多肽可以共价或非共价连接至氨基酸间隔子、氨基酸连接子、信号序列、停止转移序列、跨膜结构域、蛋白质纯化配体或其组合。多肽也可以连接至增强免疫反应的部分(即官能团,其可以是多肽或其它化合物)(例如细胞因子如IL-2);有助于纯化的部分(例如亲和标签,如六组氨酸标签、trpE、谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白);或有助于多肽稳定性的部分(例

如聚乙二醇；氨基末端保护基如乙酰基、丙基、琥珀酰基、苯甲基、苯甲氧羰基或叔丁氧基羰基；羧基末端保护基如酰胺、甲酰胺和乙酰胺)。在一个实施例中，蛋白质纯化配体可以是在例如多肽的氨基末端或羧基末端或这两个末端处的一个或多个C氨基酸残基。氨基酸间隔子是在自然界不与多肽结合的氨基酸序列。氨基酸间隔子可以包含约1、5、10、20、100或1,000个氨基酸。

[0087] 必要时，多肽可以是融合蛋白，其也可以含有其它氨基酸序列，如氨基酸连接子、氨基酸间隔子、信号序列、TMR停止转移序列、跨膜结构域，以及可用于蛋白质纯化的配体，如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签及葡萄球菌蛋白A，或其组合。融合蛋白是彼此可操作地连接的两个或更多个不同氨基酸序列。融合蛋白构建体可以使用有机化合物合成技术，通过将个别多肽片段接合在一起成为确定的序列，以化学方式合成。融合蛋白构建体也可以由体外培养的经过基因修饰的宿主细胞(如大肠杆菌(E.coli))表达，所述宿主细胞载有引入的表达载体，该表达载体带有编码呈适当序列的氨基酸残基的指定重组DNA序列。异源多肽可以例如与多肽的N末端或C末端融合。在融合蛋白中可以存在多于一种多肽。融合蛋白中可以存在多肽片段。融合蛋白可以包含例如SEQ ID NO:1-27中的一个或多个、其片段或其组合。多肽可以呈多聚体形式。也就是说，多肽可以包含SEQ ID NO:1-27的两个或更多个拷贝或其组合。

[0088] 在一个实施例中，多肽是来源于人类、兔、小鼠、犬科动物、猫科动物、其它哺乳动物或其组合。多肽可以使用标准蛋白质纯化技术从细胞或组织来源分离。多肽也可以通过化学方式合成或通过重组DNA技术制造。例如，多肽可以使用常规肽合成仪合成。

[0089] 在一个实施例中，多肽被共价或非共价固定至固相或基质。

[0090] 多肽可以通过重组方式制造。可以将编码多肽的聚核苷酸引入重组表达载体中，所述重组表达载体可以使用本领域中众所周知的技术，在适合表达宿主细胞中表达。本领域中有多种细菌、酵母、植物、哺乳动物及昆虫表达系统可利用并且任何此类表达系统都可以使用。任选地，可以在无细胞翻译系统中翻译编码多肽的聚核苷酸。多肽可以冻干、干化(desiccated)或干燥，例如冷冻干燥。

#### [0091] 聚核苷酸

[0092] 一个实施例包括一种分离的聚核苷酸，其编码本文所公开的多肽中的一个或多个。本发明的聚核苷酸含有少于全基因组并且可以是单链或双链核酸。聚核苷酸可以是RNA、DNA、cDNA、基因组DNA、化学合成的RNA或DNA，或其组合。聚核苷酸可以被纯化成不含其它组分，如蛋白质、脂质及其它聚核苷酸。例如，聚核苷酸可以是50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯化的。在本发明的一个实施例中，聚核苷酸编码SEQ ID NO:1-27中显示的多肽或其片段。

[0093] 本发明的聚核苷酸可以包含其它核苷酸序列，如编码连接子、信号序列、TMR停止转移序列、跨膜结构域，或可用于蛋白质纯化的配体如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签及葡萄球菌蛋白A的序列。

[0094] 本发明的聚核苷酸可以被分离。分离的聚核苷酸是不与其天然地结合的5'和3'侧接基因组序列中的一个和两个直接地相邻的天然存在的聚核苷酸。分离的聚核苷酸可以是例如任何长度的重组DNA分子，只要在天然存在的基因组中天然地发现直接地侧接重组DNA分子的核酸序列被移除或不存在。分离的聚核苷酸还包括非天然存在的核酸分子。

[0095] 编码本发明多肽的简并核苷酸序列也是本发明的聚核苷酸。简并核苷酸序列是编码本发明的多肽或其片段,但核酸序列由于遗传密码的简并性而不同于野生型聚核苷酸序列的聚核苷酸。编码生物功能多肽的本发明聚核苷酸的互补DNA (cDNA) 分子、物种同源物及变体也是本发明的聚核苷酸。

[0096] 本发明的聚核苷酸可以包含天然存在的多肽的编码序列或可以编码不存在于自然界中的改变的序列。必要时,可以将聚核苷酸克隆至表达载体中,所述表达载体包含表达控制元件,包括例如复制起点、启动子、增强子或驱动本发明的聚核苷酸在宿主细胞中表达的其它调控元件。表达载体可以是例如质粒,如pBR322、pUC或ColE1;或腺病毒载体,如腺病毒2型载体或5型载体。任选地,也可以使用其它载体,包括但不限于辛德毕斯病毒 (Sindbis virus)、猴病毒40、α病毒载体、痘病毒载体及巨细胞病毒和反转录病毒载体,如鼠类肉瘤病毒、小鼠乳房肿瘤病毒、莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney murine leukemia virus) 和劳氏肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus)。也可以使用微型染色体如MC和MC1、噬菌体、噬菌粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、病毒颗粒、病毒样颗粒、粘质粒(插入了噬菌体λcos位点的质粒)和复制子(能够在细胞中在其自身控制下复制的基因元件)。

[0097] 用于制备可操作地连接至表达控制序列的聚核苷酸并使其在宿主细胞中表达的方法是本领域中众所周知的。参见例如,美国专利第4,366,246号。当本发明的聚核苷酸定位成邻近于或接近引导聚核苷酸转录和/或翻译的一个或多个表达控制元件时,所述聚核苷酸是可操作地连接。

[0098] 本发明的聚核苷酸可以用作例如探针或引物,例如PCR引物,以检测在测试样品,如生物样品中聚核苷酸的存在。探针是能够典型地以序列特异性方式,例如通过杂交与靶核酸相互作用的分子。引物是可以支持酶操作并且可以与靶核酸杂交以使得酶操作发生的一小组探针。引物可以由本领域中可用的不干扰酶操作的核苷酸或核苷酸衍生物或类似物的任何组合制造。

[0099] 探针或引物可以是约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200个或更多个编码本发明多肽的邻接核苷酸。

#### [0100] 抗体

[0101] 抗体包括特异性结合至本文所描述的胱抑素B多肽、本文所描述的变体胱抑素B多肽或其片段的抗体分子。抗体可以特异性结合多个多肽。术语“抗体”是指完整抗体或其与完整抗体竞争抗原结合的抗原结合部分或片段。术语“抗体”还包括特异性结合一个或多个胱抑素B多肽,例如SEQ ID NO:1-27的任何类型的抗体分子或特异性结合分子。抗体可以是天然存在的、非天然存在的、合成的或经过基因工程改造的。如本文所使用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”及类似表述包括特异性结合胱抑素B多肽(例如SEQ ID NO:1-27)以形成复合物的任何天然存在、可通过酶法获得、合成或基因工程改造的多肽、糖蛋白或免疫球蛋白。

[0102] 抗体或其片段结合至本文所描述的多肽的表位。抗体可以在适合实验室动物体内产生或使用重组DNA技术在体外产生。用于制备和表征抗体的方式是本领域中众所周知的。参见例如,Dean,《分子生物学方法 (Methods Mol.Biol.)》80:23-37 (1998); Dean,《分子生物学方法》32:361-79 (1994); Baileg,《分子生物学方法》32:381-88 (1994); Gullick,《分子生物学方法》32:389-99 (1994); Drenckhahn等人《细胞生物学方法 (Methods Cell.Biol.)》

37:7-56 (1993) ;Morrison,《免疫学年评(Ann.Rev.Immunol.)》10:239-65 (1992) ;Wright等人《免疫学评论综述(Crit.Rev.Immunol.)》12:125-68 (1992)。例如,通过对动物,如人类或其它灵长类动物、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、山羊、猪、狗、牛、绵羊、驴或马施用本文所描述的多肽来产生多克隆抗体。从免疫接种的动物收集血清并通过例如用硫酸铵沉淀,随后利用色谱法,如亲和色谱法,从血浆中纯化出抗体。用于制造和加工多克隆抗体的技术是本领域中已知的。

[0103] 抗体可以是任何同型,包括IgG (IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1和IgA2)、IgD及IgE。

[0104] 抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体或其抗原结合片段。单克隆抗体是指从一组大体上均质的抗体获得的抗体。一组大体上均质的抗体可以含有少量突变体或变体。单克隆抗体具有高度特异性并且与单一抗原位点相互作用。每个单克隆抗体典型地靶向单一表位,而多克隆抗体群典型地含有靶向一组不同表位的各种抗体。单克隆抗体可以通过许多方法制造,包括例如杂交瘤方法(Kohler和Milstein,《自然(Nature)》256:495,1975)、重组方法(美国专利第4,816,567号)以及从噬菌体抗体文库分离(Clackson等人,《自然》352:624-628,1991;Marks等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》222:581-597,1991)。

[0105] 嵌合抗体或其抗原结合部分具有来源于特定物种或特定抗体种类或亚类的重链和/或轻链的一部分,并且链的其余部分是来源于另一物种或另一抗体种类或亚类。参见例如,Morrison,《科学(Science)》229:1202 (1985) ;Oi等人,《生物技术(BioTechniques)》4:214 (1986) ;Gillies等人,《免疫方法杂志(J.Immunol.Methods)》125:191-202 (1989) ;美国专利第5,807,715号、第4,816,567号和第4,816,397号。

[0106] 嵌合抗体可以使用多种技术制造,包括例如CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号)、修饰(veneering)或重塑(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,《分子免疫学(Molecular Immunology)》28:489-498 (1991) ;Studnicka等人,《蛋白质工程(Protein Engineering)》7(6):805-814 (1994) ;Roguska等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》96:969-973 (1994) ),和链改组(美国专利第5,565,332号)。

[0107] 在一个实施例中,嵌合抗体可以包含彼此不同的物种的可变区和恒定区,例如,抗体可以包含一种哺乳动物的重链和轻链可变区,及来自不同动物(如小鼠、兔、犬科动物、猫科动物或人类)的重链和轻链恒定区。嵌合抗体可以包含未包括在引入接受体抗体中的CDR中,也未包括在构架序列中的额外氨基酸。引入这些氨基酸可以更准确地优化抗体识别并结合至抗原的能力。例如,必要时,抗体可变区的构架区中的氨基酸可以被取代以使得再成形的抗体的CDR形成适当抗原结合位点。参见Sato等人,《癌症研究(Cancer Res.)》(1993)53:851-856。

[0108] 抗体的抗原结合部分或片段的非限制性实例包括:Fab片段;Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab')<sub>2</sub>片段;Fd片段;Fv片段;单链Fv (scFv)分子;sdAb片段(纳米抗体);Fab样抗体(含有重链和轻链的可变区的抗原结合片段,等效于通过木瓜蛋白酶消化获得的Fab片段);F(ab')<sub>2</sub>样抗体(含有两个抗原结合结构域的抗原结合片段,等效于通过胃蛋白酶消化获得的F(ab')<sub>2</sub>片段、由抗体片段制备的多特异性抗体、双功能抗体、双特异性抗体、多功能抗

体、人源化抗体、犬化抗体 (caninized antibody)、人类抗体、犬科动物抗体、猫科动物抗体、鼠类抗体、兔抗体、合成抗体、CDR移植的抗体, 以及由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单元 (例如分离的互补决定区 (CDR), 如CDR3肽) 或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。其它经过工程改造的分子, 如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失的抗体、CDR移植抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、纳米抗体 (例如单价纳米抗体、二价纳米抗体)、单链 (Fv)<sub>2</sub> (sc (Fv)<sub>2</sub>) ; 二价 (sc (Fv)<sub>2</sub>) ; 四价 ([sc (Fv)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>) scFV抗体, 以及小模块免疫药物 (small modular immunopharmaceutical, SMIP) 和鲨鱼可变IgNAR结构域也被视为如本文所使用的“抗原结合片段或部分”。

[0109] “特异性结合 (Specifically binds/specifically bind)” 或“对……具有特异性” 意思指第一抗原, 例如SEQ ID N0:1-27的多肽以比其它非特异性分子高的亲和力识别并结合至本文所描述的抗体。“特异性结合”或“对……具有特异性”也指第一抗体, 例如针对SEQ ID N0:1-27产生的抗体, 以比其它非特异性分子高的亲和力识别并结合至SEQ ID N0:1-27。非特异性分子是与第一抗原不共有共同表位的抗原。特异性结合可以使用例如酶联结免疫吸附分析 (ELISA)、放射免疫分析 (RIA)、免疫比浊法、颗粒增强免疫比浊法或蛋白质印迹分析, 使用本领域中众所周知的方法进行测试。

[0110] 在一个实施例中, 抗体或其抗原结合片段特异性结合至如SEQ ID N0:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或27所陈述的多肽上的表位。在一个实施例中, 表位是AYF、LAYF (SEQ ID N0:20)、ELAYF (SEQ ID N0:21)、DELAYF (SEQ ID N0:22)、HDELAYF (SEQ ID N0:23)、KHDELAYF (SEQ ID N0:10)、AKHDELAYF (SEQ ID N0:24)、KAKHDELAYF (SEQ ID N0:25)、NKAKHDELAYF (SEQ ID N0:26)、TNKAKHDELAYF (SEQ ID N0:27) 或QTNKAKHDELAYF (SEQ ID N0:4)。

[0111] 在一个实施例中, 抗体或其抗原结合片段与第二或参考抗体竞争结合至SEQ ID N0:1-27或其片段。可以使用任何竞争性结合分析测量针对同一抗原的两个抗体之间的竞争。例如, 夹心ELISA分析可以用于此目的。关于交叉反应性的分析方法是本领域的技术人员众所周知的 (参见例如, Dowbenko等人 (1988)《病毒学杂志 (J.Virol.)》62:4703-4711)。

[0112] 如果使用了用于评估竞争性结合的任一分析测定, 在第一抗体存在下, 第二抗体与抗原的结合减少至少约30%、40%、50%、60%、75%、90%或超过90%, 则认为所述第一抗体竞争性抑制第二抗体的结合。

[0113] 可以通过提供附接至固体支撑物的SEQ ID N0:1-27中所示的一个或多个分离的多肽并分析抗体结合至所述多肽或与本文所描述的抗体竞争结合至所述多肽的能力来测定竞争性结合。

[0114] 抗体包括这样一些抗体及其抗原结合片段, 其 (a) 与参考抗体竞争结合至SEQ ID N0:1-27或其抗原结合片段; (b) 与参考抗体结合至SEQ ID N0:1-27或其抗原结合片段的相同表位; (c) 以与参考抗体基本上相同的Kd结合至SEQ ID N0:1-27或其抗原结合片段; 和/或 (d) 以与参考抗体基本上相同的解离速率结合至SEQ ID N0:1-27或其片段, 其中所述参考抗体是以 $10^7$ 1/mol或更高结合亲和力 $K_a$ 特异性结合至SEQ ID N0:1-27的多肽或其抗原结合片段的抗体或其抗原结合片段。

[0115] 抗体或其抗原结合片段对其多肽搭配物的亲和力可以由解离常数 (Kd) 表示。平衡解离常数 (Kd) 是以 $k_{off}/k_{on}$ 的比率计算。参见Chen, Y.等人, 1999, 《分子生物学杂志》293:

865-881。本领域中已知多种用于测量亲和常数的方法。在一个特定实施例中,参考抗体是对SEQ ID NO:1-27的多肽具有结合亲和力及特定 $K_{on}$ 速率/缔合速率或 $K_{off}$ 速率的抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中,抗体以 $6 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 或更佳的 $K_{on}$ 特异性结合;抗体以 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 或更佳的 $K_{off}$ 速率特异性结合;或抗体以500pM、400pM、300pM、200pM、100pM、50pM、40pM、30pM、20pM或更佳的结合亲和力特异性结合。

[0116] 特异性结合SEQ ID NO:1-27的抗体特别适用于检测来自动物的样品,如血清、血液、血浆、细胞、组织、唾液、菌斑、龈沟液、牙龈活检样品、舌拭子或尿液样品中存在的胱抑素B多肽及其片段的存在。免疫分析可以利用一种抗体或若干抗体。免疫分析可以使用例如对一个表位具有特异性的单克隆抗体、对一个多肽的表位具有特异性的单克隆抗体的组合、对不同多肽的表位具有特异性的单克隆抗体、对同一抗原具有特异性的多克隆抗体、对不同抗原具有特异性的多克隆抗体,或单克隆抗体与多克隆抗体的组合。免疫分析方案可以基于例如竞争、直接反应或使用例如标记抗体的夹心型分析。抗体可以用本领域中已知的任何类型的标记进行标记,包括例如荧光标记、化学发光标记、放射性标记、酶标记、胶态金属标记、放射性同位素标记及生物发光标记。

[0117] 抗体或其抗原结合片段可以结合至支撑物并用于检测某些疾病和病症的样品中多肽的存在或存在量。支撑物包括例如玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、耐纶(nylon)、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖及磁铁矿。抗体或其抗原结合片段可以被冻干、干化或干燥,例如冷冻干燥。

[0118] 还可以使用抗体,通过免疫亲和柱分离多肽。抗体可以通过例如吸收或通过共价键附连到固体支撑物以使得抗体保持其免疫选择性活性。任选地,可以包括间隔基团以使得抗体的抗原结合位点保持可接近。接着,可以使用固定的抗体特异性结合生物样品中的SEQ ID NO:1-27或其片段,所述生物样品包括但不限于唾液、菌斑、龈沟液、牙龈活检样品、舌拭子、血清、血液及尿液。

[0119] 抗体也可以用于免疫定位研究中以在各种细胞事件或生理情况期间分析本文所描述的多肽的存在和分布。还可以使用抗体鉴别被动免疫接种中所涉及的分子以及鉴别非蛋白质抗原的生物合成中所涉及的分子。此类分子的鉴别可用于疫苗开发中。抗体,包括例如单克隆抗体和单链抗体,可以用于监测某些疾病或病症的改善过程。通过测量来自动物的测试样品中SEQ ID NO:1-27或其片段的量增加或减少,可以确定旨在改善病症的特定治疗方案是否有效。抗体可以使用例如直接结合分析如RIA、ELISA或蛋白质印迹分析进行检测和/或定量。

[0120] 检测方法

[0121] 一个实施例提供了用于检测样品中的胱抑素B多肽的方法,所述方法包括使样品与对SEQ ID NO:1-27具有特异性的一种或多种抗体在适于使胱抑素B多肽与对SEQ ID NO:1-27具有特异性的一种或多种抗体形成复合物的条件下接触。检测胱抑素B多肽与对SEQ ID NO:1-27具有特异性的一种或多种抗体的复合物。

[0122] 在一个实施例中,提供了用于检测包含SEQ ID NO:1-27的多肽及其片段的方法。任选地,可以检测出样品中包含SEQ ID NO:1-27的多肽的量。可以使用所述多肽的相对含量诊断或检测若干疾病或病症。本领域中已知用于检测多肽的任何方法都可以用于本文所描述的方法中。

[0123] 与本文所描述的抗体结合使用的分析方法可以包括直接和间接标记技术、免疫亲和柱、免疫磁珠、荧光活化细胞分选术(FACS)、酶联结免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、凝集分析、浊度分析、定量浊度分析以及检测一次抗体的标记的二次抗体。

[0124] 抗体可以用例如荧光标记以可检测方式进行标记,所述荧光标记具有适于使用可商购的仪器如荧光活化细胞分选器检测的激发和发射波长。荧光标记的实例包括藻红蛋白(PE)、异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明(rhodamine, RH)、德克萨斯红(Texas Red, TX)、Cy3、赫斯特(Hoechst)33258及4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)。此类标记可以使用标准技术偶联至抗体(Maino等人,1995,《细胞分析(Cytometry)》20:127-133)。

[0125] 本文所描述的方法可以用于检测SEQ ID NO:1-27或其片段,其中抗体或抗原结合抗体片段特异性结合SEQ ID NO:1-27。生物样品可以包括例如来自哺乳动物如狗、猫或人类的血清、血液、细胞、血浆、唾液、菌斑、龈沟液、牙龈活检样品、舌拭子或尿液。测试样品可以未处理、沉淀、部分分离、分离、稀释、浓缩或纯化。

[0126] 如本文所使用,“患者”或“受试者”可以指人类或非人类动物,包括猫科动物、牛科动物、猪科动物、马科动物或犬科动物。

[0127] 如本文所使用,术语“样品”、“测试样品”、“患者样品”或“受试者样品”包括但不限于从受试者获得的血液、血清、血浆、唾液、菌斑、龈沟液、牙龈活检样品、舌拭子或尿液样品。

[0128] 分析包括但不限于基于竞争、直接反应或夹心型分析的分析,包括但不限于酶联结免疫吸附分析(ELISA)、蛋白质印迹、IFA、放射免疫分析(RIA)、血凝反应(HA)、免疫比浊法、颗粒增强免疫比浊法、荧光偏振免疫分析(FPIA)及微量滴定板分析(在微量滴定板的一个或多个孔中进行的任何分析)。一种分析包含逆流色谱结合分析,例如SNAP®分析。参见例如美国专利第5,726,010号。

[0129] 分析可以使用固相或基质,或者可以通过免疫沉淀或不利用固相的任何其它方法进行。当使用固相或基质时,将一种或多种多肽或抗体直接或间接地附接至固体支撑物或基质如微量滴定孔、磁珠、非磁性珠粒、柱、基质、膜、由合成或天然纤维(例如玻璃或纤维素类材料或热塑性聚合物,如聚乙烯、聚丙烯或聚酯)构成的纤维垫、由微粒材料(例如玻璃或各种热塑性聚合物)构成的烧结的结构,或由硝化纤维素、耐纶、聚砜等(一般是合成的)构成的浇铸膜。在一个实施例中,基质是烧结的聚乙烯细粒,通常称为多孔聚乙烯,例如来自Chromex Corporation(新墨西哥州阿尔伯克基(Albuquerque, NM))的10-15微米多孔聚乙烯。所有这些基质材料可以呈适合形状,如膜状、薄片状或盘状使用,或其可以涂布至或粘结或层压至适当惰性载体,如纸、玻璃、塑料膜或织物上。适合用于将抗体固定于固相上的方法包括离子相互作用、疏水性相互作用、共价相互作用等。

[0130] 在一个实施例中,方法包括使测试样品与特异性结合至SEQ ID NO:1-27的一种或多种抗体在允许形成多肽/抗体复合物,即免疫复合物的条件下接触。也就是说,抗体特异性结合至位于样品中的SEQ ID NO:1-27的一种或多种多肽。本领域的技术人员熟悉用于检测抗体/多肽复合物结合的分析和条件。检测样品中多肽与抗体之间复合物的形成。形成抗体/多肽复合物指示在患者样品中存在多肽。

[0131] 在一个实施例中,当结合至抗体的指示剂,如酶偶联物催化可检测反应时,检测到多肽/抗体复合物。任选地,可以在允许形成多肽/抗体/指示剂复合物的条件下,将包含信

号产生化合物的指示剂施加至多肽/抗体复合物。检测多肽/抗体/指示剂复合物。任选地，多肽或抗体可以在多肽/抗体复合物形成之前，用指示剂标记。所述方法可以任选地包括阳性或阴性对照。阳性对照可以含有将特异性结合至对Cys B具有特异性的抗体并且提供阳性结果的一种或多种多肽。阴性对照不含任何Cys B多肽或会特异性结合对Cys B具有特异性的抗体或与其交叉反应的任何多肽或其它组分。

[0132] 在一个实施例中，将一种或多种抗体共价或非共价固定至固相或基质。将可能包含Cys B多肽的样品添加至基质。将对Cys B具有特异性的一种或多种抗体添加至基质。所述抗体可以与固相上使用的抗体相同或可以来自不同来源或物种并且可以连接至指示剂，如酶偶联物。在每次添加之前，可以执行洗涤步骤。添加发色团或酶底物并使其显色。停止颜色反应并且可以使用例如分光光度计定量颜色。

[0133] 在另一个实施例中，将一种或多种抗体固定至固相或基质。将可能含有Cys B多肽的测试样品添加至基质。添加特异性结合Cys B多肽的第二种抗物种抗体。这些第二种抗物种抗体是来自与固定至固相的抗体不同的物种。添加特异性结合第二种抗物种抗体并且不特异性结合固定至固相的抗体的第三种抗物种抗体。第三种抗物种抗体可以包含指示剂，如酶偶联物。在每次添加之前，可以执行洗涤步骤。添加发色团或酶底物并使其显色。停止颜色反应并且可以使用例如分光光度计定量颜色。

[0134] 在一个实施例中，一种或多种捕捉抗体可以特异性结合至本文所描述的多肽的一个或多个表位。可以使用一种或多种捕捉抗体将SEQ ID NO:1-27的一种或多种多肽固定至例如固体支撑物。一种或多种检测抗体可以特异性结合至所述多肽的相同的一个或多个表位或不同的一个或多个表位。检测抗体可以用于检测或观察多肽在固体支撑物上的固定情况。这一实施例是有利的，因为它比仅使用一种抗体用于捕捉和检测两种功能的分析特异性高并且更敏感。

[0135] 在一种类型的分析形式中，可以将一种或多种抗体涂布于固相或基质上。将疑似包括含SEQ ID NO:1-27的多肽或其片段的测试样品与包含信号产生化合物并且偶联至对所述多肽具有特异性的抗体或抗体片段的指示剂一起培育，培育的时间和条件足以使所述固相的任一抗体与测试样品多肽或偶联至对所述多肽具有特异性的抗体的指示剂化合物形成抗原/抗体复合物。偶联至抗多肽抗体的指示剂与固相的结合可以定量地测量。信号相较于由对照样品或对照标准产生的信号的明显变化指示存在包含SEQ ID NO:1-27的多肽或其片段。这一分析类型可以定量出测试样品中多肽的量。

[0136] 在另一类型的分析形式中，将一种或多种抗体涂布至支撑物或基质上。将抗体偶联至指示剂并添加至测试样品中。将这一混合物施加至支撑物或基质。如果在测试样品中存在Cys B多肽，则其将结合偶联至指示剂的一种或多种抗体以及固定于支撑物上的一种或多种抗体。接着，可以检测多肽/抗体/指示剂复合物。这一类型的分析可以定量出测试样品中多肽的量。

[0137] 在另一类型的分析形式中，将一种或多种抗体涂布至支撑物或基质上。将测试样品施加至支撑物或基质上并培育。通过用洗涤溶液洗涤固体支撑物，洗掉样品中未结合的组分。如果测试样品中存在包含SEQ ID NO:1-27的多肽或其片段，则其将结合至涂布于固相上的抗体。这一多肽/抗体复合物可以使用偶联至指示剂的第二种抗物种特异性抗体检测。接着，可以检测多肽/抗体/抗物种抗体指示剂复合物。这一类型的分析可以定量出测试

样品中多肽的量。

[0138] 多肽/抗体复合物或多肽/抗体/指示剂复合物的形成可以通过例如放射性测量法、比色法、荧光测定法、尺寸分离法或沉淀法检测。任选地,通过添加偶合至包含信号产生化合物的指示剂的二次抗体检测多肽/抗体复合物。与多肽/抗体复合物结合的包含信号产生化合物(标记)的指示剂可以使用上文所描述的方法检测并且包括显色剂;催化剂如酶偶联物;荧光化合物如荧光素和罗丹明;化学发光化合物如二氧杂环丁烷、吖啶、菲啶、钌和鲁米诺(luminol);放射性元素;直接可见标记;以及辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。酶偶联物的实例包括碱性磷酸酶、辣根过氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等。特定标记的选择并不重要,但它应能够单独产生信号或与一种或多种额外物质结合产生信号。

[0139] 如本文所使用,短语“测定……量”是指测量或鉴别样品中一种或多种多肽的含量。这可以通过本领域中众所周知的用于检测多肽的方法实现,包括使用抗体的方法,包括例如酶联结免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫比浊法、颗粒增强免疫比浊法或蛋白质印迹分析,或免疫组织化学法。或者,可以通过质谱法或本领域的技术人员已知的类似方法测定SEQ ID NO:1-27的多肽。测定样品中存在的多肽的量是通过此类体外分析和实验操作实现。

[0140] 诊断方法

[0141] 一个实施例提供了用于诊断受试者的肾病的方法。所述方法包括测定来自所述受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中所述胱抑素B多肽的量是使用特异性结合SEQ ID NO:1-27的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示肾病。

[0142] 其它方法可以诊断CKD患者的AKI或AKI。在一个实施例中,所述方法可以诊断由癌症或肾癌引起的肾功能减退或肾脏物理损伤。在另一个实施例中,所述方法可以诊断由细菌感染引起的肾病、肾功能减退或肾脏物理损伤。细菌感染可以由例如无形体属、埃里希体属、钩端螺旋体属、埃希氏菌属或疏螺旋体属细菌引起。

[0143] 本发明的一个实施例提供了一种用于诊断或检测由细菌感染引起的肾病、肾功能减退或肾脏物理损伤的方法。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量,其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较,其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示存在由细菌感染引起的肾病、肾功能减退物理肾脏物理损伤。

[0144] 如本文所公开,在患病受试者样品中发现的多肽的量或含量高于来自未患病受试者的对照受试者样品。受试者样品中本文所描述的多肽的相对含量可以指示疾病的进展和疾病严重程度。也就是说,在一些实例中,较高的胱抑素B多肽量或含量意味着较严重的疾病状态。

[0145] 较高的胱抑素B多肽含量是比对照样本或对照标准高约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%或更高百分比的含量。较高的胱抑素B多肽含量是比对照样本或对照标准高约10%至500%或更高百分比;约20%至500%或更高百分比;约30%至500%或更高百分比;约40%至500%或更高百分比;约50%

至500%或更高百分比;约60%至500%或更高百分比;约100%至500%或更高百分比的含量。

[0146] 较高的胱抑素B多肽含量也可以是当与对照样本或对照标准相比较时呈统计学显著增加的量的含量。

[0147] 较高的胱抑素B多肽含量也可以是约10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000ng/ml或更高。胱抑素B多肽的对照含量或对照标准可以是约400、350、300、250、200、150、100、50、20、10ng/ml或更低。

[0148] 可以将较高的胱抑素B多肽含量与使用未患任何类型的肾病或病症、细菌感染或牙周病的正常对照受试者测定的对照样品或对照标准相比较。

[0149] 在一些实施例中,将测试样品中胱抑素B多肽的含量与来自一个或多个正常对照受试者的对照样品中胱抑素B的含量相比较。典型地,接着将在对照样品中测量的对照含量与在测试样品中测量的胱抑素B多肽含量相比较。或者,将测试样品中胱抑素B多肽的含量与先前测定的或预先限定的对照含量(“对照标准”)相比较。例如,胱抑素B多肽的对照标准可以由数据计算,如由包括来自多个正常或健康对照受试者的对照样品中胱抑素B多肽的含量的数据计算。正常或健康对照受试者和待评估的测试受试者可以属于同一物种。

[0150] 特定实施例提供了用于鉴别哺乳动物,并且更确切地说狗、猫和人类的某些疾病或病症的试剂和方法。某些实施例提供了用于向患者提供诊断和预后的方法。鉴别受试者样品中的Cys B多肽可以是肾病的独立预测方法或是慢性肾病分期(例加第1-4期)中的急性肾损伤或活动性肾损伤的鉴别方法。所述方法有利地允许诊断和鉴别慢性肾病中的急性肾损伤或活动性肾损伤并且不被患者年龄或身体质量影响或混淆。因此,另外的实施例是针对使用以多肽测定的所述肾脏患者预后来选择适当肾脏疗法。

[0151] 鉴别受试者样品中的Cys B多肽可以是AKI等级(例加第1-5级)的独立预测方法。本文所描述的方法和组合物有利地允许诊断和鉴别在第三级之前的AKI分期并且不被患者年龄或身体质量影响或混淆。

[0152] 抗体可以用于通过从疑似患有肾病的动物,例如人类、猫或狗获得测试样品来诊断肾病的方法中。使测试样品与抗体在能够形成抗体-抗原复合物(即,免疫复合物)的条件下接触。本领域的技术人员了解能够并且适合于形成抗原/抗体复合物的条件。抗体-抗原复合物的存在或量可以通过本领域中已知的方法测定。

[0153] 实施例进一步包括通过鉴别患者样品中特定多肽的含量来预测患者健康状况、监测疾病进展和/或评估/监测治疗功效的方法。一方面,所述方法可以在多个时间点执行以评价疾病进展或治疗功效。在一个特定实施例中,所述方法可以在诊断时并且接着在治疗后的特定时间点执行,其中特定疗法应当引起疾病进展的减慢或改善。

[0154] 本文所描述的方法也可以指示包含SEQ ID N0:1-27的多肽的量或数量。在一个特定实施例中,某些多肽的量或数量提供了对疾病分期(即,第1-4期)、疾病进展和/或预后性指标的指示。在许多指示剂,如酶偶联物存在下,存在的多肽量与产生的信号成比例。取决于测试样品的类型,可以用适合缓冲剂对其进行稀释,浓缩,或在无任何操作情况下,使其与固相接触。例如,可以使用预先稀释的血清或血浆样品,或浓缩的试样如尿液,测定多肽的存在和/或存在量。

[0155] 本文所描述的多肽和分析可以与其它多肽或分析组合以检测肾病的存在。例如，多肽和分析可以与适于检测或测量肌酸酐或总体蛋白质含量的试剂组合。

[0156] 一个实施例还提供了区分上泌尿道感染与下泌尿道感染的方法。上泌尿道感染是肾感染(肾盂肾炎)。下泌尿道感染是膀胱感染(膀胱炎)。这些病症很难分辨。由于治疗方法可能不同，故医护人员宜分辨上泌尿道感染与下泌尿道感染之间的差异。本领域中需要用于区分这些感染的方法。

[0157] 所述方法包括使用特异性结合SEQ ID NO:1-27的一种或多种抗体测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较，其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有上泌尿道感染。

[0158] 一个实施例提供了一种区分急性肾损伤与下泌尿道感染的方法。这些病症很难分辨。由于治疗方法可能不同，故医护人员宜分辨急性肾损伤与下泌尿道感染之间的差异。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量，其中胱抑素B多肽的量是使用特异性结合由SEQ ID NO:1-27组成的一种或多种多肽的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较，其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有急性肾损伤。

[0159] 一个实施例提供了一种用于诊断受试者的牙周炎的方法。牙周病包括齿龈炎(牙龈炎症)和牙周炎。牙周炎是导致牙周附连丧失和牙槽骨破坏的牙周组织疾病。牙周病的临床诊断是通过识别提示疾病的牙周组织的各种病征和症状进行。所述病征和症状通常在疾病发作之后以及支撑骨和组织发生明显损伤之后很久才出现。此外，就动物患者来说，牙周病通常不能在不全身麻醉情况下适当地评价或治疗。本领域中需要早期检测牙周病的方法。所述方法包括测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量。胱抑素B多肽的量是使用对SEQ ID NO:1-27具有特异性的一种或多种抗体测定。将样品中胱抑素B多肽的量与对照样品或对照标准相比较，其中样品中胱抑素B多肽的含量高于对照样品或对照标准指示受试者有牙周病。

[0160] 治疗方法.

[0161] 某些实施例提供了用于治疗受试者的疾病病状的方法。所述方法包括请求测试，使用对NO:1-13具有特异性的一种或多种抗体测定来自受试者的样品中胱抑素B多肽的量，提供分析结果。如果样品含有的胱抑素B多肽的量高于所述疾病病状的对照样品或对照标准，则向受试者施用针对所述疾病病状的治疗。

[0162] 疾生病状包括AKI、牙周病、上泌尿道感染及肾病。在一个实施例中，疾病病状不是癌症或肾癌。

[0163] CKD、AKI及肾病的治疗包括例如针对阻塞性肾元/输尿管结石的手术、针对肾脏赘瘤的化学疗法、膳食管理、肠溶磷酸盐结合剂、抗蛋白尿剂(例如血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)、ω-3脂肪酸)、抗高血压药(例如ACEI、钙通道拮抗剂(CCA))、校正脱水的液体疗法、酸中毒管理、施用利尿剂、透析、电解质异常的校正、止吐药和解酸剂、重组促红细胞生成素。上泌尿道感染可以用抗生素治疗。牙周病可以通过彻底清洁、刮治和牙根整平、牙龈移植手术、激光治疗、再生手术(在牙周袋中使用膜(过滤器)、骨移植物或组织刺激蛋白质)、种植牙、牙周袋缩小术(向后折叠牙龈组织并且在将组织紧固回适当位置之前去除致病细菌)。

[0164] 在一个替代实施例中,可以使用本文所描述的方法评估组合物或治疗方案(无论是组合物还是饲料)改善疾病进展的功效。类似地,可以使用本文所描述的方法,基于包含SEQ ID NO:1-27的多肽含量,评估组合物或治疗方案对患者的活性。

[0165] 试剂盒

[0166] 一个实施例提供了用于执行本文所公开的方法的试剂盒。在某些实施例中,试剂盒包括对包含SEQ ID NO:1-27的一种或多种多肽具有特异性的一种或多种抗体。在试剂盒的某些实施例中可以任选地包括使用说明书,以及可用于例如夹心分析中的二次抗体。试剂盒中还可以存在区别地标记的抗体,以及用于标记抗体的试剂。

[0167] 在其它实施例中,试剂盒包含分别特异性结合至包含SEQ ID NO:1-27的一种或多种多肽的一种或多种抗体。在某些实施例中,抗体被提供于固体支撑物或基质上,包括但不限于芯片、微阵列、珠粒等。

[0168] 试剂盒(例如制品)可以用于检测患者样品中本文所描述的多肽或其蛋白质片段。试剂盒包含用于测定抗体与本文所描述的全长蛋白质或蛋白质片段的结合的一种或多种抗体和组合物。试剂盒或制品还可以包含用于测定抗体或抗体片段与样品中多肽的结合的一种或多种抗体或抗体片段和组合物。试剂盒可以包括含有一种或多种多肽或抗体的装置及有关使用所述一种或多种多肽或抗体例如鉴别哺乳动物的肾病的说明书。试剂盒还可以包括含标签的包装材料,所述标签指示试剂盒中的一种或多种多肽或抗体可以用于鉴别肾功能异常。在此类测试用试剂盒中可以包括本领域普通技术人员已知的其它组分,如缓冲剂、对照物等。本文所描述的多肽、抗体、分析及试剂盒可用于例如诊断患者的肾病的个体病例。

[0169] 试剂盒可用于诊断、预测或监测肾病,特别是犬科动物、猫科动物及人类肾病的治疗。

[0170] 本文例示性描述的实施例可以在无本文未具体公开的任一种或多种要素、一种或多种限制存在下适当地实施。因此,例如,在本文中的每一种情况下,术语“包含”、“主要由…组成”和“由……组成”中的任一个可以用其它两个术语中的任一个替代,同时仍保持其普通含义。所采用的术语和表述是作为描述而非限制性术语使用,并且在使用此类术语和表述时不打算排除所示出和描述的特征的任何等效物或其部分,但应认识到,在所要求的实施例的范围内的各种修改都是可能的。因此,应理解,虽然已经通过实施例和可选的特征明确地公开本发明,但本领域的技术人员可以对本文中所公开的观点进行修改和变化,并且这些修改和变化被视为在所述说明和所附权利要求书界定的这些实施例的范围内。

[0171] 预期包含以上所提到的特征的方法的实施例在本公开的范围内。

[0172] 实例

[0173] 以下实例说明了本公开的具体实施例及其各种用途。这些实例的陈述仅用于说明目的,而不应被视为限制。

[0174] 实例1:犬科动物Cys B的蛋白质序列

[0175] 先前认为,犬科动物Cys B具有如SEQ ID NO:1中所示的77个aa的蛋白质序列。

[0176] QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAGTPYFIKVQVDDDEFVHLR  
VFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

[0177] 然而,这一想法是不对的。使MDCK细胞系生长至汇合并收集粘附细胞,并且用含有

清洁剂的生理缓冲液溶解。溶解之后,将细胞以10000rpm离心30分钟以使细胞碎片沉淀。使用上清液作为尿液特异性犬科动物胱抑素B的来源。使用上清液,使用胰蛋白酶消化和LC-MS鉴别对犬科动物Cys B的N末端缺失的21个aa进行测序。

[0178] MMCGAPSASQPATADTQAIAD ( SEQ ID NO:2 )

[0179] 因此,确定犬科动物Cys B(FL-Cys B)的完整氨基酸序列是:

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQQV

[0180] VAGTNYFIKVQVDDDEFVHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDE  
LAYF ( SEQ ID NO:3 )

[0181] 实例2:针对犬科动物胱抑素B的抗体

[0182] A.针对重组蛋白产生的抗体

[0183] 根据标准方法,通过使用具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3的重组蛋白作为免疫原,在兔体内产生多克隆抗体。由此产生的抗体各自在ELISA分析中特异性结合其相应的重组免疫原。

[0184] 根据标准方法,通过使用具有SEQ ID NO:3的重组蛋白作为免疫原,用CPG作为佐剂,在小鼠体内产生单克隆抗体。产生的七个单克隆抗体在ELISA分析中特异性结合其相应的重组免疫原。使用HRP-山羊抗小鼠IgG H&L链二次抗体检测单克隆结合。所测试的所有克隆都结合至涂布有5 $\mu$ g/ml重组FL胱抑素B(SEQ ID NO:3)的板。表4显示了三个克隆的示例性结合数据。

[0185] 表4:筛选针对rFL-Cys B的单克隆抗体。来自3个克隆的代表性连续稀释数据

FL-Cys B ( $\mu$ g/ml)	10 $\mu$ g/ml 的 Cys B 单克隆抗体		
	9A3	5E1	3H4
[0186]	10	2.79	2.77
	1	2.38	2.32
	0.5	1.94	1.87
	0.25	1.54	1.46
	0.125	1.12	1.04
	0.0625	0.69	0.62
	0.03125	0.44	0.42
	0	0.11	0.11

[0187] B:针对合成肽产生的抗体

[0188] 使以下来源于犬科动物胱抑素B的肽偶联至KLH。使用这些偶联物作为免疫原用于在兔体内产生抗体。

[0189]	胱抑素 B 的 C 末端 “肽 9”	QTNKAKHDELAYF	( SEQ ID NO:4 )
	胱抑素 B 的 N 末端 “肽 3-20”	CGAPSASQPATADTQAI	( SEQ ID NO:5 )
	胱抑素 B 的 N 末端 “肽 3-10”	CGAPSASQ	( SEQ ID NO:6 )
	胱抑素 B 的 N 末端 “肽 18-25”	CAIADQVKA	( SEQ ID NO:7 )
	胱抑素 B “肽 2”	FQSLPHENKPLALSS	( SEQ ID NO:8 )
	胱抑素 B “肽 1”	SQVVAGTPYFIKVQVDDD	( SEQ ID NO:9 )

[0190] 此外,根据标准方法,通过使用肽SEQ ID NO:2(N末端)和SEQ ID NO:5(肽3-20)作为免疫原,利用弗氏佐剂(Freund's adjuvant)在小鼠体内产生多克隆抗体和单克隆抗体。由此产生的抗体各自在ELISA分析中特异性结合其相应的重组免疫原。

[0191] 由此产生的抗体各自特异性结合其相应的肽免疫原。例如,下表5显示了针对肽1、2和9的兔抗肽多克隆抗体与其相应免疫原的典型结合曲线。全部三个多克隆抗体都以高亲和力结合至其靶并且可以用于在胱抑素B ELISA中形成夹心。

[0192] 表5:兔抗胱抑素B肽与相应免疫原的结合

Ab 效价	肽	肽	肽
	1	2	9
[0193]	10	2.55	4.00
	1	1.00	3.79
	0.5	0.31	2.15
	0.25	0.08	0.50
	0.125	0.05	0.11
	0.0625	0.04	0.06
	0	0.04	0.04
			0.05

[0194] 此外,抗肽9抗体和抗肽1抗体在ELISA分析中特异性结合重组FL-Cys B (SEQ ID NO:3)和受刺激的MDCK细胞的溶解产物中的天然细胞内蛋白质。经显示,抗肽9抗体在竞争性ELISA分析中特异性结合肽KHDELAYF (SEQ ID NO:10)。

[0195] 根据标准方法,使用SEQ ID NO:11、12和13对兔免疫接种。各抗体在ELISA分析中特异性结合至其相应的免疫原。

[0196] 实例3:用于检测犬科动物胱抑素B的免疫分析

[0197] 展开胱抑素B ELISA如下。

[0198] 固相和捕捉抗体:

[0199] 在4°C下,用10μg/ml亲和纯化的兔抗肽9涂布96孔4BX微量滴定板过夜。用含有0.05%TWEEN®(聚山梨醇酯)20的1×PBS (pH 7.4)洗涤板3次。接着,用含有1%BSA的1×PBS (pH 7.4)阻断板2小时。在如上所述洗涤之后,在37°C下,在真空下干燥板4小时。接着,在4°C下干化储存各板。

[0200] 检测抗体的制备:

[0201] 由用全长重组胱抑素B (rFL-Cys B) (SEQ ID NO:3)免疫接种的小鼠产生七个单克隆抗体。基于与rFL Cys B的结合性能选出一个克隆(3H4),用蛋白质G纯化,并使用SMCC方法,用辣根过氧化酶(HRP)对1.0mg纯化抗体进行标记,并脱盐以移除过量的HRP。对标记的抗体滴定并以0.25-2.0μg/ml用于ELISA分析中。

[0202] 胱抑素B夹心ELISA方案:血清和尿液

[0203] 胱抑素B是一种细胞内蛋白质并且一般不会以较大浓度自由循环。在从应激犬科动物肾细胞收集的上清液中未发现蛋白质的事实进一步证实了这一点。然而,从破裂的犬科动物肾细胞中纯化出胱抑素B。因此,在血清或尿液中检测到的任何胱抑素B可能是由细胞破裂和死亡得到。在活动性肾损伤中,近端小管中的上皮细胞发生细胞凋亡和坏死可能导致血清和尿液胱抑素B的增加(图1)。

[0204] 脲抑素B并未与伴侣动物的肾病相关联。如上文所描述,产生针对重组胱抑素B的单克隆抗体并使用蛋白质印迹分析,在胱抑素C蛋白存在下确定其特异性(图2)。另外,使用这些抗体开展夹心ELISA。

[0205] 对于夹心ELISA,标准品是rFL-Cys B或由MDCK细胞团得到的清洁剂溶解产物。通过LCMS方法对两种标准制剂定量。尿液样品用缓冲液A(0.1M PO4<sup>2-</sup>, pH 7.4, 含有至少0.1% 肌氨酰)以至少1:10稀释。血清样品在缓冲液A中以至少1:100稀释并如上所述,一式两份,取100μL添加至孔中。一式两份,取一百微升(100μL)添加至多克隆抗体捕捉孔中并在室温下,振荡培育1小时。接着,用PETCHEK®洗涤液(美国缅因州(Maine, USA)的IDEXX实验室, Inc.)洗涤各板6次,并添加100μL的0.25-2μg/ml HRP单克隆检测抗体。将检测抗体振荡培育30分钟,随后洗涤6次,并将100μL底物TMB添加至孔中。显色5分钟,随后添加100μL终止溶液(1N HCl)。在VMAX®微板读数仪中读取各板。在Sigma plot中使用4PL参数拟合以定量未知情况。

[0206] 如上文所描述,使用天然犬科动物胱抑素B(MDCK溶解产物),利用Cys B ELISA分析获得标准曲线(图3)。

[0207] 患者样品中犬科动物胱抑素B的检测

[0208] 如上文所描述,使用胱抑素B ELISA分析测定狗尿液中的胱抑素B含量,并显示于表6中。

[0209] 表6.患有肾病的狗的胱抑素B含量.

样品	状态	胱抑素 B (ng/ml)
[0210]	1	356
	2	382
	3	292
	4	6022
	5	7920
[0211]	6	9559
	7	453
	8	1595
	9	3372

[0212] 如表6中所示,当与急性(活动性)肾损伤(AKI)和慢性肾病(CKD)相比较时,健康狗的尿液中具有较低胱抑素B含量。AKI样品展现的胱抑素B含量高于CKD样品。

[0213] 胱抑素B是使用ELISA,在来自狗健大霉素模型的血清和尿液(图4)以及在临幊上呈现炎症或缺血诱发的活动性肾损伤的狗的尿液(图5)中测量。在模型系统中,每8小时对狗给与10mg/kg健大霉素,直到血清肌酸酐达到1.5mg/dL。就这只狗来说,该点是在第8天达到;而血清胱抑素B在第1天相对于基线增加。这些初步结果表明,对于活动性肾损伤来说,胱抑素B是比肌酸酐更早的标记物。在患者样品中,健康患者与诊断患有活动性肾损伤的患者之间存在明显的差别。

[0214] 实例4:用口腔拭子进行胱抑素B检测

[0215] 使用棉拭子对进行牙科检查的狗的牙龈取样。狗呈现齿龈炎、牙龈疾病以及重度

蛀牙。将拭子放入塑料试管中并在4°C下储存待用。将拭子平衡至室温,保持30分钟,接着放入0.5ml含有清洁剂的胱抑素B分析缓冲液中,保持30分钟。取出拭子并将其用于如上文所描述的胱抑素B分析中。使用不含样品的对照拭子测定背景信号。对照拭子低于平均OD为0.04的检测限 (LOD),而来自进行大范围牙科程序的狗的拭子的OD是1.04。由此得到信噪比S/N比是26。参见下表7:

[0216] 表7.口腔拭子中胱抑素B的检测。

[0217] 胱抑素B(在450nm下的O.D) S/N

[0218]	对照拭子	0.04	--
	狗拭子	1.04	26

[0219] 用棉拭子抹拭患有牙周病的两只狗的牙齿并在胱抑素B ELISA缓冲液中提取胱抑素,并将其用作胱抑素B分析的样品。使用外加有1000ng/ml重组全长狗胱抑素B蛋白质的标准品作为阳性对照。信号(在450nm下的O.D.)对于重组全长胱抑素B蛋白质阳性对照是0.322,对于狗1是1.8485,对于狗2是1.444。这两只患有牙周病的狗的值是1000ng/ml rCanine FL-Cys B标准品的超过五倍。因此,Cys B是哺乳动物如犬科动物的牙周病的标记物。

[0220] 实例5:改良的ELISA

[0221] 在4°C下,用5μg/ml亲和纯化的兔抗肽9涂布96孔4BX微量滴定板过夜。用含有0.05%TWEEN®(聚山梨醇酯)20的1×PBS(pH 7.4)洗涤板3次。接着,用含有1%BSA的1×PBS(pH 7.4)阻断板2小时。在如上所述洗涤之后,在37°C下,在真空下干燥板4小时。接着,在4°C下干化储存各板。

[0222] 对于夹心ELISA,标准品是rFL-Cys B或由MDCK细胞团得到的清洁剂溶解产物。通过LCMS方法对两种标准制剂定量。尿液样品用缓冲液A(0.1M磷酸盐,pH 7.2,含有至少1.0%N-十二烷酰基-N-甲基甘氨酸钠盐(肌氨酸,Sigma))以1:20稀释。血清样品在缓冲液A中以至少1:50稀释并如上所述,一式两份,取100μL添加至孔中。一式两份,取一百微升(100μL)添加至多克隆抗体捕捉孔中并在室温下,振荡培育1小时。接着,用PETCHEK®洗涤液(美国缅因州维斯特布鲁克(Westbrook,Maine,USA)的IDEXX Laboratories Inc.)洗涤板6次,并且添加100μL的0.25-2μg/ml HRP标记的单克隆检测抗体。在振荡下,将检测抗体培育30分钟,随后洗涤6次,并将100μL底物TMB添加至孔中。显色5分钟,随后添加100μL终止溶液(1N HCl)。在VMAX®微板读数仪中读取各板。在Sigma plot中使用4PL参数拟合以定量未知情况。

[0223] 实例6:人类Cys-B的检测

[0224] 本实例展示了使用抗犬科动物Cys B抗体检测人类Cys B的ELISA的构造。从美国Genscript获得重组人类胱抑素B(rH FL Cys B)蛋白质(SEQ ID NO:14)。

>sp|P04080|CYTB\_HUMAN Cystatin-B OS=Homo sapiens  
GN=CSTB PE=1 SV=2

[0225] MMCGAPSATQPATAETQHIADQVRSQLEEKENKKFPVFKAVSFKSQV  
VAGTNYFIKVHVG  
DEDVFVHLRVFQSLPHENKPLTLSNYQTNKAKHDELAYF [SEQ ID  
NO: 14]

[0226] 通过夹心ELISA评价rh FL Cys B蛋白质与针对犬科动物胱抑素B产生的抗体的交叉反应性。简单点说,使用针对重组全长犬科动物胱抑素B序列(rC FL胱抑素B)产生的小鼠单克隆抗体作为捕捉试剂并在ELISA中针对其结合多个重组FL Cys B抗原的能力进行筛选。筛选的检测试剂是兔多克隆N末端抗犬科动物胱抑素B抗体和辣根过氧化酶抗物种IgG (H&L)。发现一系列成对的试剂在ELISA中提供剂量依赖性曲线。如下表8中所示,在小鼠中产生的针对犬科动物C末端“肽9”(QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4))的三个单克隆抗体(IF10、2B5和9A10)与抗犬科动物N末端胱抑素B多克隆抗体327(在兔中针对CAIADQVKA (SEQ ID NO:7)产生)、328(在兔中针对CGAPSASQPATADTQAIA (SEQ ID NO:5)产生)或329(在兔中针对CGAPSASQ (SEQ ID NO:6)产生)配对形成夹心ELISA。此外,这些对结合大鼠和小鼠rFL胱抑素B蛋白质。

[0227] 表8:犬科动物试剂与人类、大鼠和小鼠重组胱抑素B蛋白质配对形成夹心

固相单克隆	检测多克隆	犬科动物 rFL Cys B	人类rFL Cys BL	大鼠rFL Cys B	小鼠rFL Cys B
IF10	327	<u>3.8</u>	<u>0.7</u>	<u>2.8</u>	<u>3.2</u>
	328	<u>3.4</u>	0.1	<u>1.9</u>	<u>2.8</u>
	329	0.0	0.1	0.1	0.1
2B5	327	<u>3.8</u>	<u>1.0</u>	<u>3.2</u>	<u>3.5</u>
	328	<u>3.5</u>	0.3	<u>2.3</u>	<u>3.4</u>
	329	0.1	0.1	0.1	0.1
9A10	327	<u>3.6</u>	<u>0.6</u>	<u>2.6</u>	<u>3.5</u>
	328	<u>3.3</u>	0.1	<u>1.8</u>	<u>3.3</u>
	329	0.1	0.2	0.1	0.2

[0229] 使用N末端兔多克隆抗体327作为固相捕捉剂,分析针对犬科动物胱抑素B的C末端“肽9”QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)产生的单克隆小鼠抗体与rH FL胱抑素B的结合。参见表9。如下表10中所示,一个C末端单克隆抗体(9A10)形成夹心,而另一个C末端单克隆抗体(2B5)则不形成夹心。定位这些单克隆抗体的特异性并且9A10单克隆抗体识别人类和犬科动物胱抑素B的同源序列。针对rFL犬科动物胱抑素B产生的3H4单克隆抗体与固相结合的多克隆抗体327配对显示都结合至人类和犬科动物rFL胱抑素B(表11)。

[0230] 表9.

胱抑素 B 的 C 末端序列		
犬科动物	QTNKAKHDELAYF	SEQ ID NO:4
人类	QTNKAKHDELTYF	SEQ ID NO:15

[0232] 表10:胱抑素B兔多克隆抗体和小鼠单克隆抗体的表位定位。

[0233]	肽序列	抗肽抗体	
		多克隆	单克隆
[0234]	抗肽 9	2B5	9A10
	QTNKAKHDELAYF SEQ ID NO:4	<u>3.4</u>	<u>2.5</u>
	QTNKAKHDELAY SEQ ID NO:16	<u>3.4</u>	<u>2.8</u>
	QTNKAKHDELA SEQ ID NO:17	<u>3.1</u>	<u>2.4</u>
	QTNKAKHDEL SEQ ID NO:18	<u>2.3</u>	0.1
	QTNKAKHDE SEQ ID NO:19	<u>2.3</u>	0.1
表位必需的残基		YF	AYF

[0235] 表11：

		rFL-胱抑素 B	
捕捉		人类	犬科动物
[0236]	327	3H4	<u>0.911</u>
		9A10	<u>0.829</u>
		2B5	0.065
		327	0.077
			<u>1.211</u>

[0237] 对犬科动物Cys B具有特异性的抗体可以用于检测人类Cys B。确切地说,可以使用结合至包含AYF、LAYF (SEQ ID NO:20)、ELAYF (SEQ ID NO:21)、DELAYF (SEQ ID NO:22)、HDELAYF (SEQ ID NO:23)、KHDELAYF (SEQ ID NO:10)、AKHDELAYF (SEQ ID NO:24)、KAKHDELAYF (SEQ ID NO:25)、NKAKHDELAYF (SEQ ID NO:26)、TNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:27) 及QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4) 的表位或其部分的抗体或其特异性结合片段检测人类和犬科动物Cys B。

[0238] 实例7:犬科动物和猫科动物尿液中参考范围的测定

[0239] 在当地兽医院,经2年时间收集犬科动物和猫科动物的尿液样品。将尿液等分并冷冻待用。使用实例3中所描述的ELISA分析,测量解冻的尿液样品中的胱抑素B。由兽医检查时未提示肾脏病症的健康动物建立参考范围,如提示CKD的血清肌酸酐或SDMA含量、泌尿道结石或泌尿道感染史或表现。因此,使用总计280只健康狗和42只健康猫并且对各物种使用平均值+3个标准差 (Std Dev),测定参考范围是257ng/ml。参看图6。因此,正常、健康范围是从约0ng/ml至约257ng/ml (例如从约0、5、10、20、50、75、100至约200、210、225、250或257ng/ml)。超过257ng/ml (例如从约257、260、270、280、290、300ng/ml及以上)的值指示肾病。

[0240] 实例8:犬科动物AKI群中的胱抑素B

[0241] 在胱抑素B ELISA (实例5) 中使用来自临幊上确定患有AKI的狗和健康狗的二十五份相配的尿液和血清样品。AKI患者的病因包括例如肾毒性药物、蛇咬、中暑、乙二醇暴露及感染性疾病。如图7A-B和表12-13中所示,相较于健康狗和CKD患者,被诊断患有AKI的患者的尿和血清胱抑素B含量明显增加。

[0242] 表12

sCysB 的变化概述, ng/mL										
	平均值	标准差	平均值 的标准 误差	下限 95%	上限 95%	最小值	最大值	范围	中值	观察结果
sCysB ng/mL	1076.048	1225.574	267.4422	518.1729	1633.922	113	4175	4062	642	21
诊断[AKI]	2065.625	1509.591	533.7209	803.5756	3327.674	604	4175	3571	1763	8
诊断[CKD]	628	353.9148	125.1278	332.1198	923.8802	200	1348	1148	608	8
诊断[健康]	209.6	67.21086	30.05761	126.1467	293.0533	113	291	178	206	5

[0244] 表13

uCysB 的变化概述, ng/ml										
	平均值	标准差	平均值 的标准 误差	下限 95%	上限 95%	最小值	最大值	范围	中值	观察结果
uCysB ng/ml	525.8	676.3851	151.2443	209.242	842.358	14	2803	2789	289.5	20
诊断[AKI]	928.2857	1001.605	378.5712	1.955283	1854.616	14	2803	2789	704	7
诊断[CKD]	449.25	264.6473	93.56696	227.9993	670.5007	87	862	775	461	8
诊断[健康]	84.8	86.8833	38.49987	-22.0928	191.6928	20	236	216	52	5

[0246] 实例9:感染性疾病中的胱抑素B

[0247] 动物泌尿系统的大部分感染性疾病都是好氧细菌感染。常见生物体包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、肠球菌 (*Enterococcus*) 及链球菌 (*Streptococcus*)。不太常见的致感染生物体包括克雷伯氏菌 (*Klebsiella*)、变形杆菌 (*Proteus*) 及假单胞菌 (*Pseudomonas*)。支原体是引起泌尿道感染的一种不常见的致病因素并且通常被发现与细菌共感染。钩端螺旋体病是由丝状钩端螺旋体细菌引起的感染肾脏和许多其它器官的一种世界性动物疾病。立克次氏体(立克次氏体病)和相关疾病(边虫病、埃立克体病、Q热、丛林斑疹伤寒)是由一组革兰氏阴性、专性细胞内球杆菌引起。巴倍虫,即一种蜱传疾病,也涉及肾病。

[0248] 在胱抑素B ELISA中使用从通过ELISA、PCR和显微镜检凝集试验 (Microscopic Agglutination Test, MAT) 效价>1:800 (IDEXX Laboratories, Inc.) 确定对钩端螺旋体呈阳性的二十个犬科动物患者得到的血清样品。也操作确定的健康犬科动物血清样品以测定血清中的平均胱抑素B含量。如下表14中所示,九份钩端螺旋体病阳性样品 (45%) 超过来自健康犬科动物的血清的相对截止值 (平均值+3SD) (149.1ng/ml) (图10)。这一数据指示,45%的钩端螺旋体病测试患者具有肾脏损伤。因此,胱抑素B血清含量升高指示感染钩端螺旋体的患者存在肾脏损伤。

[0249] 表14:钩端螺旋体属的胱抑素B ELISA结果.阳性样品

样品 ID	胱抑素 B ( ng/ml )
1304	99
2648	375
4282	241
4318	171
4558	411
4567	82
4628	133
4650	145
4873	767
4972	276
5242	65
5369	54
5529	292
5614	75
5646	65
5651	81
5659	203
5663	167
5664	111
5679	59
5694	141

[0251] 实例10:泌尿道感染中的胱抑素B

[0252] 在胱抑素B分析中使用来自10只分别在临幊上被确定患有泌尿道感染(UTI)的狗和10只健康群体的尿液样品。通过阳性培养物和临幊检查确定UTI。来自UTI的干扰是先前已知的AKI标记物的特异性的一个主要问题。图8展示,健康患者与下泌尿道感染患者之间的胱抑素B含量未显示出明显差异。因此,胱抑素B标记物可以用于区分AKI与UTI。

[0253] 实例11:猫科动物肾病中的胱抑素B

[0254] 从当地兽医诊所获得来自四只被诊断患有肾病的猫和三只健康对照的尿液样品,并用于胱抑素B分析中。这四只患有肾病的猫各自的尿胱抑素B浓度都超出257ng/ml的参考范围。三只健康对照各自的尿胱抑素B浓度在参考范围内。参见表15。胱抑素B是猫肾病的标记物。

[0255] 表15.

尿胱抑素 B ng/mL	血清肌酸酐 mg/dL	SDMA ( μg/dL ) 或 所指示的其它测试	诊断
[0256]	3062	3.0 (03/02/2016) 2.9 (04/01/2016) 2.6 (08/27/2016)	N/D (3/2/2016) 16 (4/1/2016) 26 (8/27/2016) 肾病
	1513	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿蛋白 30 mg/dL; 尿液 250 个红细胞 /μL 肾病
	903	1.3 (7/17/2015) 3.6 (11/16/2015) 2.4 (11/23/2015) 2.0 (12/10/2015) 3.8 (02/01/2016)	N/D 肾病
	329	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿蛋白 30 mg/dL; 尿液 250 个红细胞 /μL 肾病
	73	N/D	N/D 健康
	50	N/D	N/D 健康
	48	N/D	N/D 健康

[0257] N/D=未测定。

[0258] 实例12:绵羊中的胱抑素B抗体

[0259] 使用两只绵羊,产生针对SEQ ID NO:4的绵羊多克隆抗体。将肽偶联至KLH并在弗氏完全佐剂中乳化。使用标准的200天方案。比较绵羊血清与兔血清中的抗体反应。在绵羊中观察到类似的效价,即使绵羊处于免疫接种方案的早期。在绵羊体内产生的抗体可以用于检测Cys B多肽。

[0260] 表16.

稀释度	兔	绵羊
100	2.832	2.804
1000	2.753	2.986
10000	1.56	0.797
100000	0.296	0.076
1000000	0.04	0.017
10000000	0.008	0.001

[0262] 实例13:CKD患者中人类尿液胱抑素B检测:

[0263] 从诊断患有第4期CKD的人类患者收集尿液。对尿液进行连续稀释并用于胱抑素B尿液ELISA中。比较两种抗胱抑素B单克隆抗体(3H4(参见实例2和3)和9A10(参见实例6))。如图9中所示,人类尿液样品产生的胱抑素B含量高于犬科动物AKI样品并且高于犬科动物阴性对照的含量。此外,不同的抗胱抑素B单克隆抗体可能由于供结合的表位的可用性而显示出不同的反应。因此,可以使用对胱抑素B具有特异性的抗体诊断人类的肾病,包括CKD。

<110> Yerramilli, Mahalakshmi  
 Farace, Giosi  
 Quinn, John J  
 Yerramilli, Murthy V. S. N.

<120> 用于检测和诊断肾病和牙周病的方法和组合物

<130> 16-179-W0

<150> 62/302, 299  
 <151> 2016-03-02

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 1

Gln Val Lys Ala Gln Leu Glu Glu Arg Glu Asn Lys Lys Tyr Thr Thr  
 1 5 10 15

Phe Lys Ala Val Thr Phe Arg Ser Gln Val Val Ala Gly Thr Pro Tyr  
 20 25 30

[0001] Phe Ile Lys Val Gln Val Asp Asp Asp Glu Phe Val His Leu Arg Val  
 35 40 45

Phe Gln Ser Leu Pro His Glu Asn Lys Pro Leu Ala Leu Ser Ser Tyr  
 50 55 60

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
 65 70 75

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 2

Met Met Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln Pro Ala Thr Ala Asp Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Ile Ala Asp  
 20

<210> 3  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (52)..(52)  
 <223> X代表任何氨基酸

<400> 3

Met Met Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln Pro Ala Thr Ala Asp Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala Gln Leu Glu Glu Arg Glu Asn  
 20 25 30

Lys Lys Tyr Thr Thr Phe Lys Ala Val Thr Phe Arg Ser Gln Val Val  
 35 40 45

Ala Gly Thr Xaa Tyr Phe Ile Lys Val Gln Val Asp Asp Asp Glu Phe  
 50 55 60

Val His Leu Arg Val Phe Gln Ser Leu Pro His Glu Asn Lys Pro Leu  
 65 70 75 80

Ala Leu Ser Ser Tyr Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala  
 85 90 95

[0002] Tyr Phe

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 4

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 5

Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln Pro Ala Thr Ala Asp Thr Gln Ala  
 1 5 10 15

Ile Ala

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> 狗

<400> 6

Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 狗

<400> 7

Cys Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala  
1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 狗

<400> 8

Phe Gln Ser Leu Pro His Glu Asn Lys Pro Leu Ala Leu Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 18

[0003] <212> PRT

<213> 狗

<400> 9

Ser Gln Val Val Ala Gly Thr Pro Tyr Phe Ile Lys Val Gln Val Asp  
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 狗

<400> 10

Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> 狗

<400> 11

Met Met Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln Pro Ala Thr Ala Asp Thr  
1 5 10 15

Gln Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala Gln Leu Glu Glu  
20 25

<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 12

Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala  
1 5

<210> 13  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 13

Ser Gln Val Val Ala Gly Thr Asn Tyr Phe Ile Lys Val Gln Val Asp  
1 5 10 15

Asp Asp

[0004] <210> 14  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 14

Met Met Cys Gly Ala Pro Ser Ala Thr Gln Pro Ala Thr Ala Glu Thr  
1 5 10 15

Gln His Ile Ala Asp Gln Val Arg Ser Gln Leu Glu Glu Lys Glu Asn  
20 25 30

Lys Lys Phe Pro Val Phe Lys Ala Val Ser Phe Lys Ser Gln Val Val  
35 40 45

Ala Gly Thr Asn Tyr Phe Ile Lys Val His Val Gly Asp Glu Asp Phe  
50 55 60

Val His Leu Arg Val Phe Gln Ser Leu Pro His Glu Asn Lys Pro Leu  
65 70 75 80

Thr Leu Ser Asn Tyr Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Thr  
85 90 95

Tyr Phe

<210> 15  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 15

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Thr Tyr Phe  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 16

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 17

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala  
 1 5 10

[0005]

<210> 18  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 18

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 19

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu  
 1 5

<210> 20  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 狗

<400> 20

Leu Ala Tyr Phe

1

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 21

Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 22

Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 23

[0006] His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 24

Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 25

Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5 10

<210> 26  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 26

Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5 10

[0007] <210> 27  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 狗

<400> 27

Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe  
1 5 10

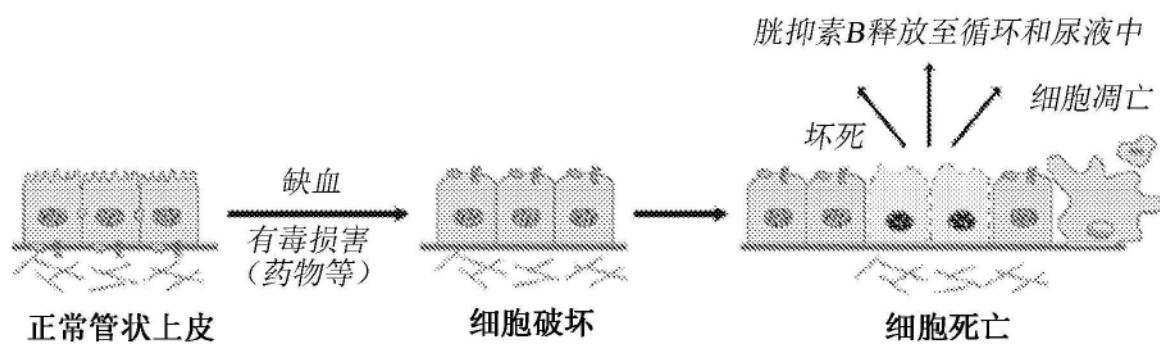


图1

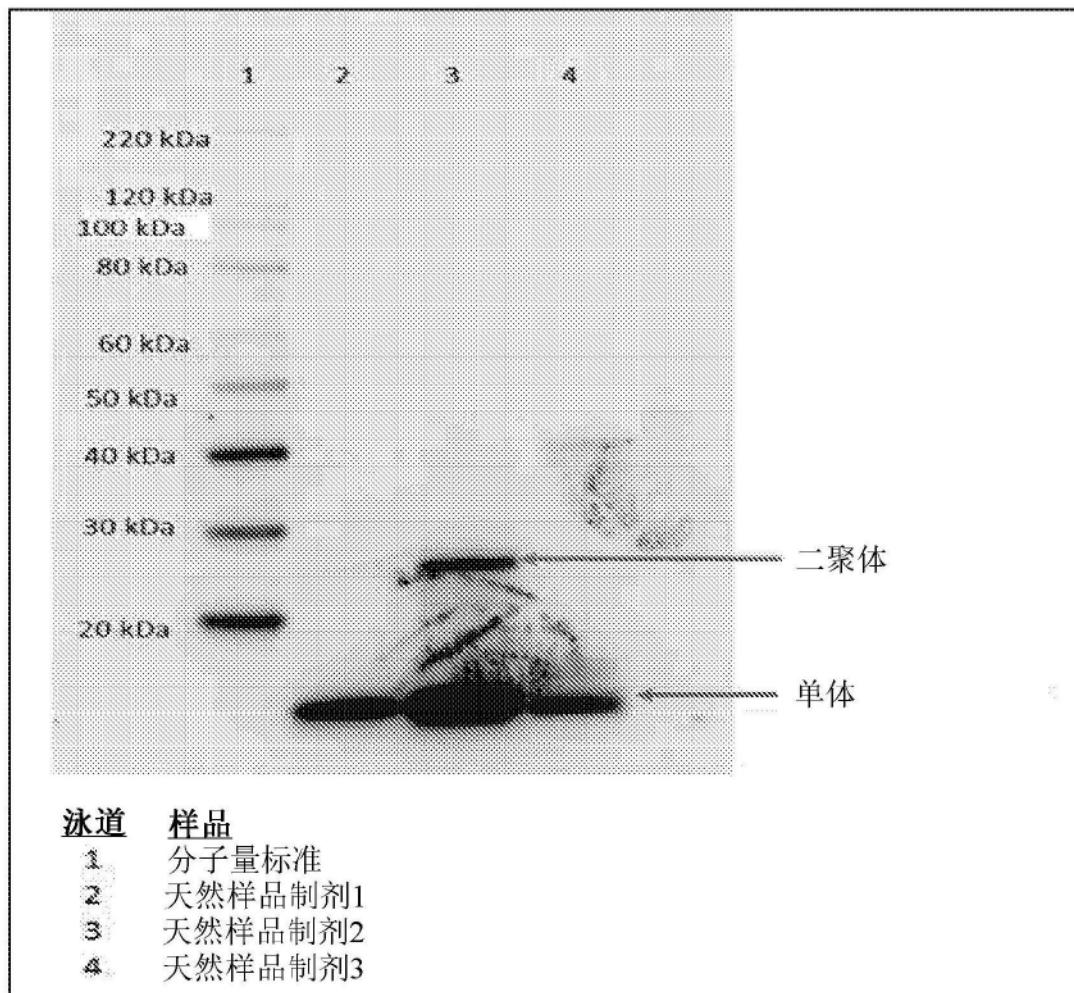


图2

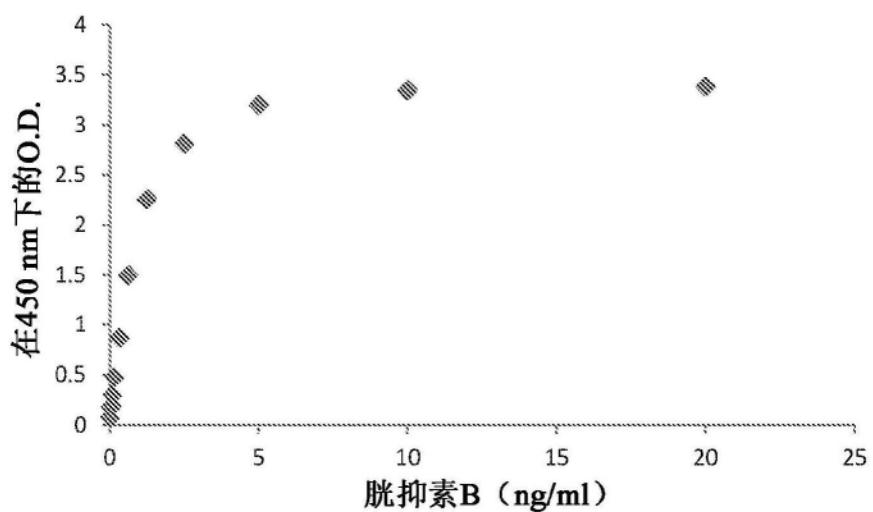


图3

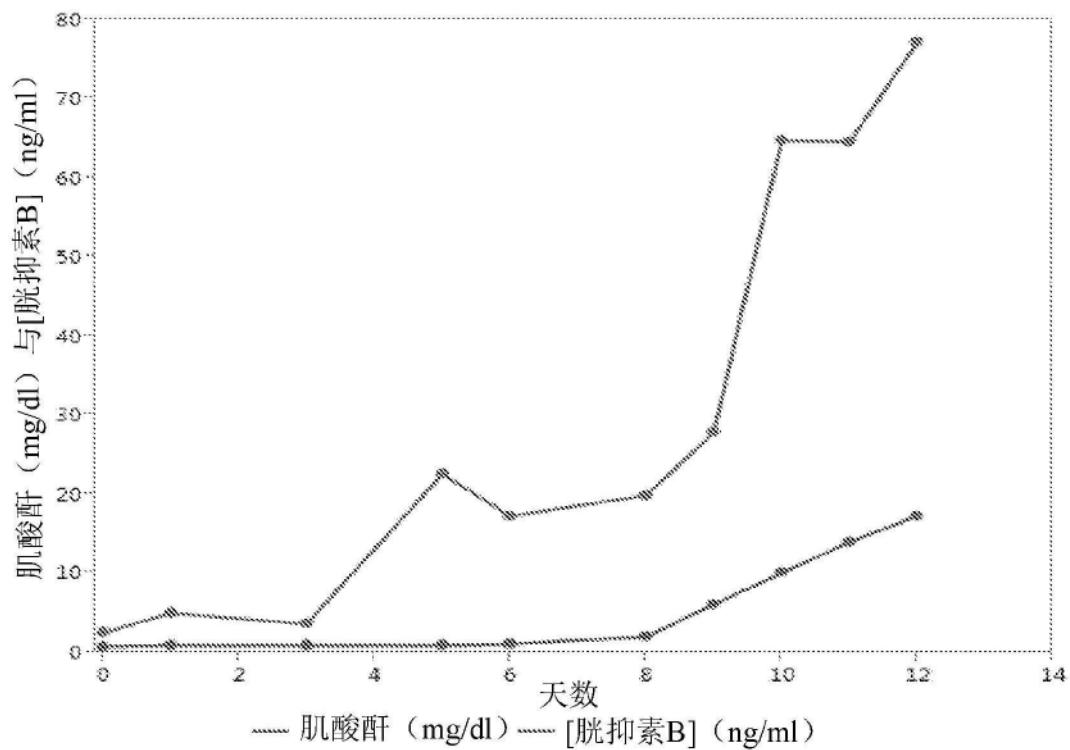


图4

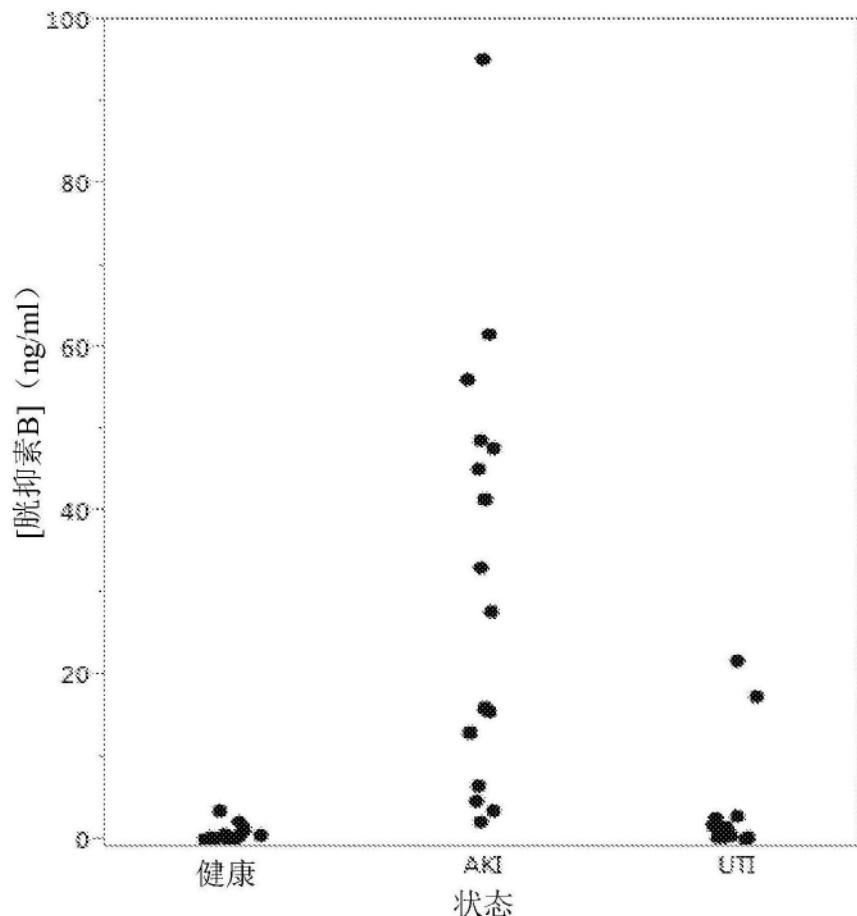
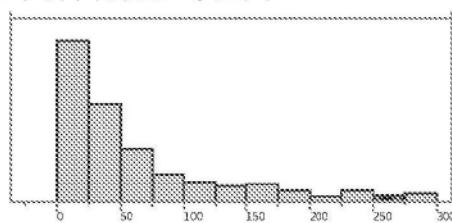


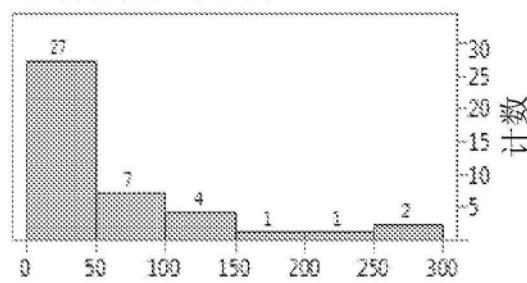
图5

A: 犬科动物参考范围



平均值	59.757143
标准差	66.055464
平均值的标准误差	3.947569
上限95%平均值	67.527945
下限95%平均值	51.986341
N	280

B: 猫科动物参考范围



平均值	56.642857
标准差	67.102696
平均值的标准误差	10.354171
上限95%平均值	77.553529
下限95%平均值	35.732185
N	42

图6

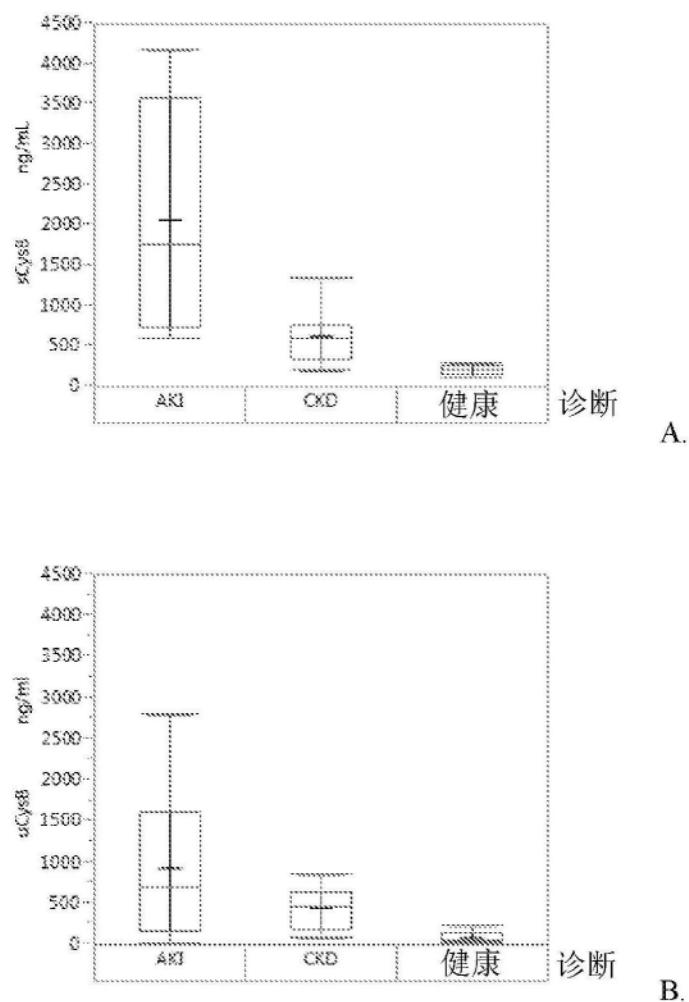


图7

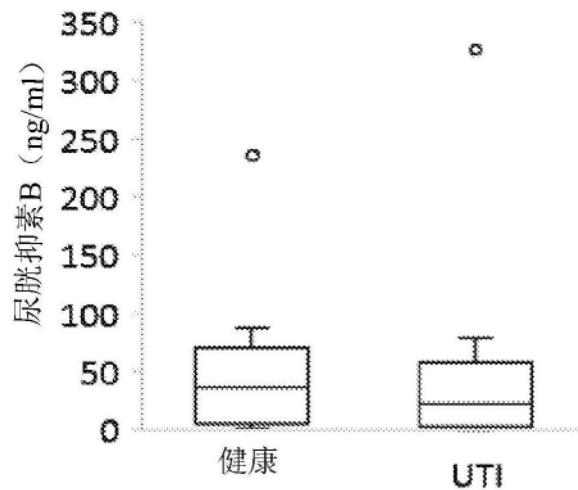


图8

胱抑素B (ng/ml) 的变化图

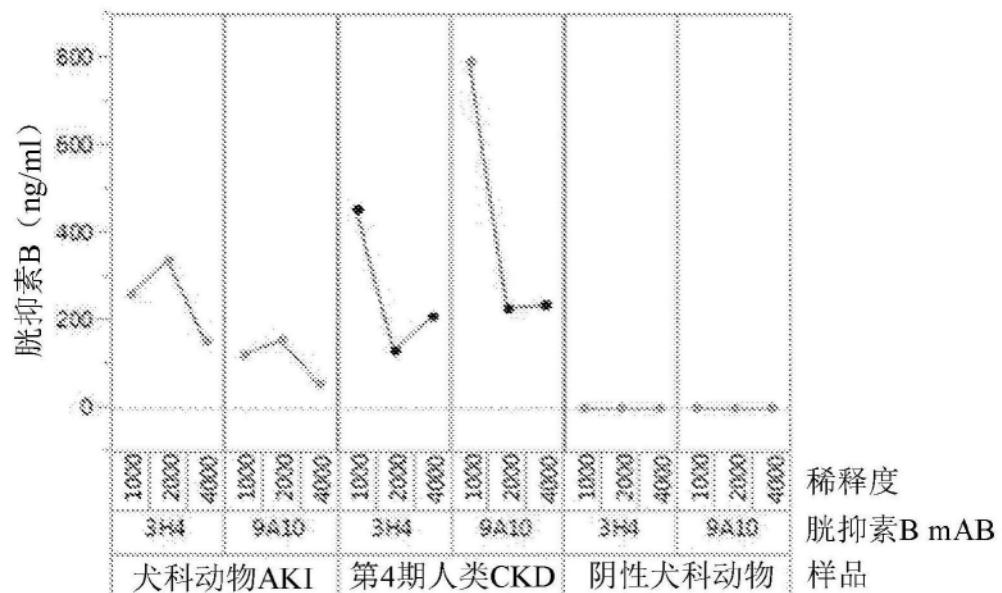
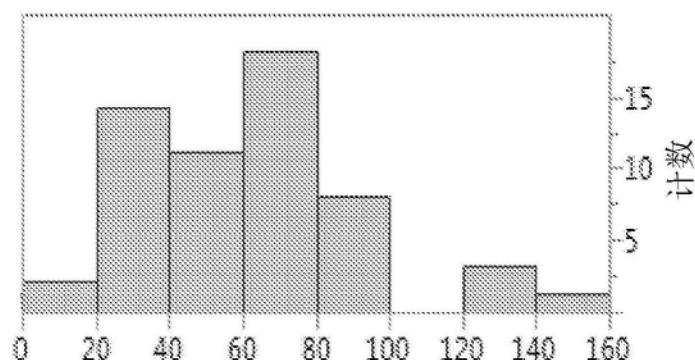


图9

胱抑素B阴性群 (n=58)



平均值: 60.927313

标准差 29.473122

平均值的标准误差 3.8700105

上限95%平均值 68.676875

下限95%平均值 53.177751

N: 58

图10