



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201736850 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 16 日

(21) 申請案號：106106871

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 02 日

(51) Int. Cl. : G01N33/68 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

(30) 優先權：2016/03/02 美國

62/302,299

(71) 申請人：英代斯實驗公司 (美國) IDEXX LABORATORIES, INC. (US)

美國

(72) 發明人：埃拉米利 瑪哈拉克史密 YERRAMILI, MAHALAKSHMI (US)；法埃克 吉歐
 西 FARACE, GIOSI (GB)；奎因 約翰 約瑟夫 QUINN, JOHN JOSEPH (US)；埃
 拉米利 墨非 VSN YERRAMILI, MURTHY V.S.N. (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：9 共 72 頁

(54) 名稱

用於檢測及診斷腎臟疾病及牙周病之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DETECTION AND DIAGNOSIS OF RENAL DISEASE
 AND PERIODONTAL DISEASE

(57) 摘要

本發明提供用於檢測哺乳動物之腎臟疾病及牙周病之組合物及方法。

The disclosure provides compositions and methods for the detection of renal disease and periodontal disease in mammals.

指定代表圖：

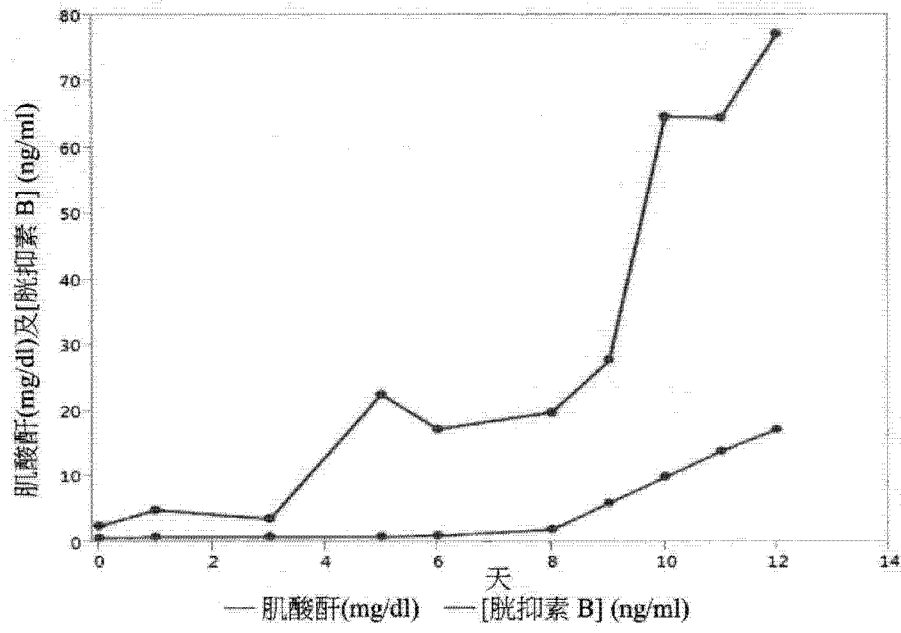


圖 4

發明摘要

※ 申請案號：106106871

※ 申請日：106/03/02

※IPC 分類：**G01N 33/68** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

【發明名稱】

用於檢測及診斷腎臟疾病及牙周病之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DETECTION AND
DIAGNOSIS OF RENAL DISEASE AND PERIODONTAL
DISEASE

【中文】

本發明提供用於檢測哺乳動物之腎臟疾病及牙周病之組合物及方法。

【英文】

The disclosure provides compositions and methods for the detection of renal disease and periodontal disease in mammals.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(4)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於檢測及診斷腎臟疾病及牙周病之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DETECTION AND
DIAGNOSIS OF RENAL DISEASE AND PERIODONTAL
DISEASE

【優先權】

本申請案主張於2016年3月2日提出申請之U.S. Ser. No. 62/302,299之權益，其全文併入本文中。

【先前技術】

腎臟疾病與增加飲水量、尿頻、食慾減退、體重減輕及肌肉萎縮具有相關性。通常，腎臟疾病之臨床症狀發生之前，就已發生無法修補之腎損害。早期檢測可以較早治療，且反過來就可以減緩疾病進展。當前治療包括透析及低磷及蛋白質飲食。早期檢測對於改善壽命及生活品質係至關重要的。

在哺乳動物中，腎臟疾病進展可分成五個等級。用於檢測哺乳動物(例如犬)之腎臟疾病之當前方法包括腎超音波、活組織切片或尿蛋白/肌酸酐含量之量測。活組織切片係侵入性的，且肌酸酐量測並不精確直至第三期腎臟衰竭，此時係在已發生顯著組織損害之後。業內需要於較早期檢測腎臟疾病之方法，以便能夠可阻止疾病進展。

【發明內容】

一個實施例提供用於檢測試樣中之胱抑素B (「Cys B」)多肽之方法。該方法包含在適於形成胱抑素B多肽與一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽之抗體的複合物之條件下，使試樣與一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體接觸。檢測胱抑素B多肽與一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽之抗體的複合物。

另一實施例提供用於診斷個體之腎臟疾病之方法。該方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中使用一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體測定胱抑素B多肽之量。將試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品比較，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示腎臟疾病。

又一實施例提供治療個體之疾病病況之方法。該方法包含請求提供用於使用一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體來測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量之分析結果的測試。若與用於疾病病況之對照試樣或對照標準品相比試樣含有升高量之胱抑素B多肽，則向個體投與針對經降低腎臟功能之治療。疾病病況可為慢性腎病患者中之急性腎損傷、急性腎損傷、活動性腎損傷、進行性慢性腎病、牙周病、上尿路感染、腎臟疾病或其組合。

再一實施例提供用於診斷個體之牙周病之方法。該方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中使用一或多種特異性結合一

或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體測定胱抑素B多肽之量。將試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品比較，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之牙周病。

另一實施例提供區分上尿路感染與下尿路感染之方法。該方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中使用一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體測定胱抑素B多肽之量。將試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品比較，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之上尿路感染。

另一實施例提供區分急性腎損傷與下尿路感染之方法。該方法包含(a) 測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽的抗體測定胱抑素B多肽之量，及(b) 比較試樣與對照試樣或對照標準品中胱抑素B多肽之量，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之急性腎損傷。

在實施例中，腎臟疾病可由慢性腎病、急性腎損傷或細菌感染引起。在一個實施例中，腎臟疾病、慢性腎病或急性腎損傷並非由癌症引起。細菌感染可由微粒孢子蟲屬(*Anaplasma sp.*)、埃利希氏體屬(*Ehrlichia sp.*)、鉤端螺旋體屬(*Leptospira sp.*)、埃希氏菌屬(*Escherichia sp.*)或疏螺旋體屬(*Borrelia sp.*)引起。胱抑素B多肽之量

可藉由檢測胰抑素B多肽與一或多種對一或多種由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組成(或包含其)之多肽具有特異性之抗體的複合物來測定。

在一個實施例中，可在檢測之前使胰抑素B多肽與一或多種對一或多種由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組成(或包含其)之多肽具有特異性之抗體的複合物與指示劑接觸。一或多種抗體可特異性結合一或多種由SEQ ID NO: 5、6、7、11或13組成(或包含其)之多肽。

在實施例中，個體可非人類動物且試樣可為血液、血清、血漿、尿、唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片或舌拭子。

在實施例中，胰抑素B多肽或胰抑素B多肽之量可藉由免疫分析、競爭性免疫分析、三明治免疫分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析或西方墨點分析來測定。

又一實施例提供特異性結合至一或多種由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組成(或包含其)之多肽的經分離抗體。可將經分離抗體凍乾；偶聯至標記；固定至固體載體；特異性結合至由SEQ ID NO: 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組成(或包含其)之多肽；或固定至固體載體且特異性結合至由SEQ ID NO: 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組成(或包含其)之多肽。

在實施例中，可將抗體固定至固體載體且可偶聯至一或多個標

記。

再一實施例提供用於診斷腎病、慢性腎病患者中之急性腎損傷、活動性腎損傷、進行性慢性腎病、急性腎損傷、上尿路感染或牙周病的套組。套組可包含一或多種特異性結合至一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體；及一或多種有利於一或多種抗體與個體試樣中存在之胱抑素B多肽結合的試劑。

另一實施例提供一或多種由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組成(或包含其)之經分離多肽。可將多肽凍乾；偶聯至標記；固定至固體載體；或特異性結合至一或多種特異性結合一或多種由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組成(或包含其)之多肽的抗體。

又一實施例提供用於診斷人類個體之腎臟疾病之方法。該方法包含(a) 測定試樣(例如尿、血液、血漿、血清、細胞、組織)中胱抑素B多肽之量；及(b) 比較試樣與對照試樣或對照標準品中胱抑素B多肽之量，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示腎臟疾病。可使用特異性結合至一或多種由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組成(或包含其)之多肽的經分離抗體測定胱抑素B多肽之量。人類中腎臟疾病可為(例如)慢性腎病患者中之急性腎損傷或活動性腎損傷、慢性腎病、進行性慢性腎病、上尿路感染或腎之細菌感染。在實施例中，腎臟疾病並非癌症或腎癌。

實施例提供免疫複合物，其包含(i) 一或多種特異性結合至一或多種由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組成之多肽之經分離抗體，及(ii) 一或多種特異性結合至一或多種經分離抗體之多肽。一或多種多肽可為(例如) 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、27或其組合。免疫複合物係抗原(例如多肽)與抗體之間形成之複合物。免疫複合物可固定至固體載體。

自某些較佳實施例及申請專利範圍之以下詳細說明將明瞭具體實施例。

【圖式簡單說明】

圖1顯示正常管狀上皮、近端小管之上皮細胞中之細胞破碎及細胞死亡。

圖2顯示在胱抑素C蛋白存在下胱抑素B之西方墨點分析。

圖3顯示利用使用天然犬胱抑素B (MDCK溶解物)之Cys B ELISA分析獲得之標準曲線。

圖4顯示來自犬慶大黴素(gentamycin)模型之血清及尿之Cys B ELISA分析。

圖5顯示向診所提供發炎或缺血誘導之活動性腎損傷之狗之尿的Cys B ELISA分析。

圖6之圖A及B顯示犬及貓參照範圍。

圖7之圖A及B顯示與健康狗及CKD患者相比，在診斷有AKI之患者中，尿及血清胱抑素B含量顯著增加。

圖8顯示健康及下尿路感染患者中之胱抑素B含量。

圖9顯示犬AKI試樣、人類CKD試樣及犬陰性對照試樣中Cys B多肽之檢測。

自結合附圖獲取之以下詳細說明將更好地理解該等及其他目標及特徵，其中：

【實施方式】

本發明更特定而言闡述於下文且本文所述實例意欲僅具有闡釋性，此乃因彼等熟習此項技術者將明瞭其中之各種修改及變化。如本文說明及貫穿以下申請專利範圍所用，除非上下文另外明確指明，否則含義「一」(「a」、「an」)及「該」包括複數個指示物。結合數值之術語「約」意指該值上下變化5%。舉例而言，對於約100之值而言，意指95至105 (或介於95與105之間之任一值)。

在本文所述組合物及方法之上下文內及在使用每一術語之具體上下文中，本說明書中所用術語通常具有業內普通含義。下文更具體定義一些術語以向實踐者提供關於組合物及方法之說明之額外指南。

本文所述組合物及方法可用於預測、診斷及監測若干疾病及病況(包括例如腎病、慢性腎病患者中之急性腎損傷或活動性腎損傷、進行性慢性腎病、上尿路感染及牙周病)之進展。腎病包括引起以下之任何疾病病況：(1) 與健康個體相比下降之腎功能；或(2) 對腎之物理損壞；或(3) 二者。在一個實施例中，腎病不包括癌症或不包括腎癌。癌症(包括腎癌)之標記物可不同於慢性腎病患者中之急性腎損傷或活動性腎損傷、慢性腎病、進行性慢性腎病、活動性腎損傷、急性腎損傷、上尿路感染或牙周病之彼等標記物。在一個實施例中，慢性腎病患者中之急性腎損傷、進行性慢性腎病、活動性腎損傷、急性腎損傷、上尿路感染或牙周病不包括癌症或不包括腎癌。

慢性腎病(CKD)係特徵在於腎功能隨時間逐漸損失之病況。CKD亦稱作慢性腎臟疾病。CKD不包括腎癌、腎臟細胞癌、膀胱癌或其他癌症。隨著CKD惡化，廢物可在血液中累積至高含量且可發生高血

壓、貧血、骨弱、較差營養健康及神經損害。CKD增加心臟及血液血管疾病之風險且可最終導致腎衰竭。CKD可由糖尿病、高血壓及其他病症引起。早期檢測及治療經常可保持疾病免於惡化。

如由國際腎臟權益組織(International Renal Interest Society)確立之犬中之CKD之階段示於表1中。

表1.

血清肌酸酐 濃度	階段I 非氮血症CKD	階段II 輕度腎氮血症	階段III 中度腎氮血症	階段IV 嚴重腎氮血症
mg/dL	<1.4	1.4-2.0	2.1-5.0	>5.0
Mmol/L	<125	125-179	180-439	>440

如由國際腎臟權益組織確立之貓中之CKD之階段示於表2中。

表2.

血清肌酸酐 濃度	階段I 非氮血症CKD	階段II 輕度腎氮血症	階段III 中度腎氮血症	階段IV 嚴重腎氮血症
mg/dL	<1.6	1.6-2.8	2.9-5.0	>5.0
Mmol/L	<140	140-250	251-440	>440

本文所述方法可檢測階段1、2、3或4 CKD中之急性腎損傷或活動性腎損傷。在一個實施例中，在肌酸酐分析可檢測階段1、2、3或4 CKD中之急性腎損傷或活動性腎損傷之前，該等方法可檢測階段1、2、3或4 CKD中之急性腎損傷或活動性腎損傷。

根據腎小球濾過率(GFR)對人類中之腎病分階段。使用人之年齡、種族、性別及其血清肌酸酐之公式用於計算GFR。下文顯示CKD之5個階段及每一階段之GFR：

- 階段1 具有正常或高GFR (GFR > 90 mL/min)
- 階段2 輕度CKD (GFR = 60-89 mL/min)
- 階段3A 中度CKD (GFR = 45-59 mL/min)
- 階段3B 中度CKD (GFR = 30-44 mL/min)

- 階段4 嚴重CKD (GFR = 15-29 mL/min)
- 階段5 末期CKD (GFR <15 mL/min)

本文所述方法可檢測階段1、2、3A、3B、4或5 CKD中之人類之急性腎損傷或活動性腎損傷。在一個實施例中，在肌酸酐分析或GFR值可檢測階段1、2、3A、3B、4或5 CKD中之急性腎損傷或活動性腎損傷之前，該等方法可檢測人類中階段1、2、3A、3B、4或5 CKD中之急性腎損傷或活動性腎損傷。

慢性腎病或腎臟疾病可為腎小球或管。

急性腎損傷(AKI)定義為腎臟過濾功能突然或快速下降。AKI可導致慢性腎病(CKD)、需要透析之腎衰竭(末期腎病)、心臟疾病或死亡。甚至輕度AKI或自AKI完全恢復可具有一些短效及長效健康問題。AKI可由以下引起：因自任何原因(例如低血壓、脫水)減少之腎臟血液流動對腎組織之損害、暴露於對腎有害之物質、腎中之抗發炎過程、全身性疾病、擠壓損傷、抗生素、敗血症或尿道阻塞。AKI可導致代謝性酸中毒、高鉀含量、尿毒癥、體液平衡變化及對其他器官系統之效應。在一個實施例中，AKI不包括癌症或不包括腎癌。如由國際腎臟權益組織確立之貓及犬中AKI之等級示於表3中。

表3.

AKI 等級	血液肌酸酐	臨床說明
等級 I	<1.6 mg/dl (<140µmol/l)	非氮血症AKI： 有文獻記載之AKI：AKI之歷史、臨床、實驗室或成像證據、臨床少尿/無尿、容量反應性；及/ 或 在48小時內血液肌酸酐中進行性非氮血症增加≥ 0.3 mg/dl (≥26.4 µmol/l)；及/或 在6小時內量測之少尿(<1 ml/kg/hr)或無尿。

等級 II	1.7 -2.5 mg/dl (141-220 μ mol/l)	輕度AKI： 有文獻記載之AKI及靜態或進行性氮血症 血液肌酸酐中進行性氮血症增加； 在48小時內 ≥ 0.3 mg/dl (≥ 26.4 μ mol/l)、或容量反應性； 在6 hr內量測之少尿(< 1 ml/kg/hr)或無尿
等級 III	2.6 -5.0 mg/dl (221-439 μ mol/l)	中度至嚴重AKI： 有文獻記載之AKI及氮血症及功能性腎臟衰竭之增加嚴重程度
等級 IV	5.1 -10.0 mg/dl (440-880 μ mol/l)	
等級 V	> 10 mg/dl (> 880 μ mol/l)	

在實施例中，本文所述方法可檢測等級1、2、3、4或5 AKI。在一個實施例中，在肌酸酐分析可檢測等級1、2、3、4或5 AKI之前，本文所述方法可檢測等級1、2、3、4、或5 AKI。

AKI在人類中可如下分階段：

表3A

階段	肌酸酐	尿輸出
1	基線之1.5-1.9倍 或 ≥ 0.3 mg/dl (≥ 26.5 μ mol/l)增加	< 0.5 ml/kg/h，持續6-12小時
2	基線之2.0-2.9倍	< 0.5 ml/kg/h，持續 ≥ 12 小時
3	基線之3.0倍 或 血清肌酸酐增加至 ≥ 4.0 mg/dl (≥ 353.6 μ mol/l) 或起始腎臟替代療法 或在 < 18 歲之患者中，eGFR減少至 < 35 ml/min/1.73 m ²	< 0.3 ml/kg/h，持續 ≥ 24 小時 或 無尿持續 ≥ 12 小時

在實施例中，方法可檢測人類中之階段1、2或3 AKI。在一個實

施例中，在肌酸酐分析可檢測人類中之階段1、2或3之前，方法可檢測人類中之階段1、2或3 AKI。

在一個實施例中，腎病、CKD或AKI係由細菌感染引起。在一個實施例中，細菌感染係由微粒孢子蟲屬、埃利希氏體屬、鉤端螺旋體屬、埃希氏菌屬或疏螺旋體屬引起。

多肽

胱抑素A及B係胱抑素超家族之家族1之成員且係大小為約11 kDa之相對小蛋白。在人類中，該等蛋白質係單體且大小為約11 kDa。其未經糖基化且不具有在其他胱抑素超家族中觀察到之二硫鍵。其亦無信號序列且因此通常係限於細胞之細胞內蛋白。參見Ochieng及Chaudhuri, *J Health Care Poor Underserved* 2010, 21(增刊1):51。細胞外流體中存在一定量之胱抑素B且其已自人類尿純化。參見Abrahamson等人, *J Biol Chem* 1986, 261:11282-11289。已顯示胱抑素B可抑制溶酶體半胱胺酸蛋白酶、組織蛋白酶家族(尤其組織蛋白酶B、H及L)之成員。參見Green等人, *Biochem J* 1984 218:939；D'Amico等人, *J Transl Med* 2014, 12:350；Jarvinen及Rinne, *Biochim Biophys Acta* 1982, 708:210-217。

胱抑素B多肽詳細闡述於實例1中且包括：

QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAGTPYFIKVQVDDDEF
VHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

MMCGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:2)

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAQLEERENKKYTTFKAVTF
RSQVVAGTXYFIKVQVDDDEFVHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKA
KHDELAYF (SEQ ID NO:3) (其中X可為任何胺基酸或其中X可為P或N)。

QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)胱抑素B C末端「肽9」

CGAPSASQPATADTQAIA (SEQ ID NO:5) 胱抑素B N-末端「肽3-20」

CGAPSASQ (SEQ ID NO:6) 胱抑素B N-末端「肽3-10」

CAIADQVKA (SEQ ID NO:7) 胱抑素B N-末端「肽18-25」

FQSLPHENKPLALSS (SEQ ID NO:8) 胱抑素B 「肽2」

SQVVAGTPYFIKVQVDDD (SEQ ID NO:9) 胱抑素B 「肽1」

KHDELAYF (SEQ ID NO: 10)

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAQLEE (SEQ ID NO:11)

AIADQVKA (SEQ ID NO: 12)

SQVVAGTNYFIKVQVDDD (SEQ ID NO:13)

一個實施例提供包含SEQ ID NO:1-27之純化多肽或其片段。SEQ ID NO:1-27之多肽片段可由小於約95、90、80、70、60、50、40、35、30、25、20、15、10個(或介於約10與約95之間之任何範圍)鄰接胺基酸組成。在一個實施例中，多肽片段由超過約10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90或95個SEQ ID NO:1-27之鄰接胺基酸組成。在一個實施例中，多肽或其片段係非天然存在的。

多肽SEQ ID NO:1-2、4-13及15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27及27小於全長Cys B多肽之事實係重要的，此乃因較小多肽可較全長多肽分析具有較大特異性及/或敏感性。該等較小多肽可製造起來較不昂貴，且可以較全長多肽大之純度獲得。另外，較小片段及試樣中存在之較小片段之含量可指示疾病狀態。片段化多肽(即，小於全長)之增加含量可為疾病之標記物。

多肽係三個或更多個由醯胺鍵共價連接之胺基酸之聚合物。多肽可經轉譯後修飾。純化多肽係實質上不含細胞物質、其他類型之多肽、化學前體、用於合成多肽之化學品或其組合之多肽製劑。實質上不含細胞物質、培養基、化學前體、用於合成多肽之化學品之多肽製

劑具有小於約30%、20%、10%、5%、1%或更多其他多肽、培養基、化學前體及/或用於合成中之其他化學品。因此，純化多肽之純度係約70%、80%、90%、95%、99%或更大。

術語「多肽」可指一或多種一種類型之多肽(多肽之組)。「多肽」亦可指兩種或更多種不同類型之多肽之混合物(即，包括但不限於全長蛋白、經截短多肽或多肽片段之多肽的混合物)。術語「多肽」(「polypeptides」或「polypeptide」)亦可各自意指「一或多種多肽」。

多肽與SEQ ID NO:1-27中所示之多肽或其片段之不同或差異為約(例如) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個胺基酸殘基(例如，胺基酸添加、取代或刪除)。若此比較需要比對，則針對最大同源性比對序列。變化位點可發生在多肽中之任何地方。

變體多肽通常可藉由修飾本文所述一個多肽序列、及評價經修飾多肽之性質以確定其是否生物等效來鑑別。若在分析(例如免疫組織化學分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析、放射性免疫分析(RIA)、免疫酶分析或西方墨點分析)中，變體與本文所述多肽實質上相同地反應，例如具有初始多肽之活性之90-110%，則變體係生物等效物。在一個實施例中，分析係競爭分析，其中生物等效多肽能將本文所述多肽與相應反應性抗原或抗體之結合減少約80、95、99或100%。特異性結合相應多肽之抗體亦特異性結合變體多肽。

變體多肽與SEQ ID NO:1-27中所示之多肽序列至少約80%、或約81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%一致。舉例而言，SEQ ID NO:1-27之變體多肽可與SEQ ID NO:1-27約至少99.5%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、90%、87%、84%或81%一致。變體多肽具有一或多個保守胺基

酸變化或其他微小修飾且保留生物活性，即，與SEQ ID NO1-27在生物功能上等效。在與相應多肽比較時，生物活性等效物具有實質上等效功能。

向胺基酸序列中引入突變之方法為彼等熟習此項技術者熟知。參見(例如) Ausubel (編輯), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); Maniatis等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)。突變亦可使用市售套組(例如「QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit」(Stratagene))來引入。藉由置換不影響多肽之功能之胺基酸來產生功能活性變體多肽可由熟習此項技術者完成。

變體多肽可在一或多個預測非必需胺基酸殘基具有保守胺基酸取代。保守取代係其中用一個胺基酸取代具有相似性質之另一胺基酸者，從而使得肽化學領域技術人員預期多肽之二級結構及親疏水性質不會發生實質性變化。一般而言，胺基酸之以下基團代表保守變化：(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。在一個實施例中，多肽具有約1、2、3、4、5、10、20或更少保守胺基酸取代。

如本文所用，兩個胺基酸序列(或兩個核酸序列)之一致性%係使用Karlin及Altschul之演算法(PNAS USA 87:2264-2268, 1990) (如Karlin及Altschul, PNAS USA 90:5873-5877, 1993中所修飾)來測定。將該演算法納入Altschul等人 (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)之NBLAST及XBLAST程式中。BLAST核苷酸調查係利用NBLAST程式實施，評分=100，字長=12。BLAST蛋白調查係利用XBLAST程式實施，評分=50，字長=3。為出於比較目的獲得空位比對，利用

GappedBLAST，如 Altschul 等人 (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) 中所述。在利用 BLAST 及 GappedBLAST 程式時，使用各別程式 (例如，XBLAST 及 NBLAST) 之缺省參數以獲得與本文所述核酸分子同源之核苷酸序列。

一致性或一致意指胺基酸序列相似性且具有業內公認之含義。具有一致性之序列共用相同或相似胺基酸。序列一致性係與抗體之初始胺基酸序列中之彼等一致之胺基酸的百分比，係在比對序列並視需要近似引入空隙以最大化序列一致性後測定。因此，與參考序列共用 85% 胺基酸序列一致性之候選序列需要在比對候選序列與參考序列後，候選序列中之 85% 胺基酸與參考序列中之相應胺基酸一致，及/或構成保守胺基酸變化。

多肽或抗體可共價性地或非共價性地連接至多肽或抗體通常不自然結合之胺基酸序列。另外，多肽或抗體可共價性地或非共價性地連接至除胺基酸外之化合物或分子。舉例而言，多肽或抗體可連接至指示試劑、胺基酸間隔體、胺基酸連接體、信號序列、停止轉移序列、跨膜結構域、蛋白質純化配體或其組合。在一個實施例中，蛋白質純化配體可為例如多肽之胺基末端或羧基末端之一或多個 C 胺基酸殘基。胺基酸間隔體係通常不與多肽或抗體自然結合之胺基酸之序列。胺基酸間隔體可包含約 1、5、10、20、100 或 1,000 個胺基酸。

多肽可進一步包含以共轉譯或轉譯後方式引導蛋白質轉移之信號(或前導)序列。多肽亦可包含連接體或其他序列以易於多肽(例如，聚-His)之合成、純化或鑑別，或增強多肽與固體載體之結合。舉例而言，多肽可偶聯至免疫球蛋白分子 Fc 區或牛血清白蛋白。

多肽可共價性地或非共價性地連接至多肽通常非自然結合之胺基酸序列，即異源胺基酸序列。異源胺基酸序列可來自不同生物體、合成序列、或通常不位於多肽之羧基或胺基末端之序列。另外，多肽

可共價性地或非共價性地連接至除胺基酸外之化合物或分子，例如指示試劑。多肽可共價性地或非共價性地連接至胺基酸間隔體、胺基酸連接體、信號序列、停止轉移序列、跨膜結構域蛋白質純化配體或其組合。多肽亦可連接至增強免疫反應之部分(即，可為多肽或其他化合物之官能基)(例如，細胞介素，例如IL-2)、有利於純化之部分(例如，親和性標籤，例如六-組胺酸標籤、trpE、麩胱甘肽、麥芽糖結合蛋白)、或有利於多肽穩定性之部分(例如，聚乙二醇；胺基末端保護基團，例如乙醯基、丙基、琥珀醯基、苄基、苄基氧基羰基或第三丁基氧基羰基；羧基末端保護基團，例如醯胺、甲基醯胺及乙基醯胺)。在一個實施例中，蛋白質純化配體可為例如多肽之胺基末端或羧基末端或二者之一或多個C胺基酸殘基。胺基酸間隔體係不與多肽自然結合之胺基酸之序列。胺基酸間隔體可包含約1、5、10、20、100或1,000個胺基酸。

若有需要，多肽可為融合蛋白，其亦可含有其他胺基酸序列，例如胺基酸連接體、胺基酸間隔體、信號序列、TMR停止轉移序列、跨膜結構域、以及可用於蛋白質純化之配體，例如麩胱甘肽-S-轉移酶、組胺酸標籤及葡萄球菌(staphylococcal)蛋白A或其組合。融合蛋白係以操作方式將兩個或更多個不同胺基酸序列彼此連接。融合蛋白構築體可使用化學方式有機化合物合成技術藉由將個別多肽片段以固定序列接合在一起加以合成。融合蛋白構築體亦可由在活體外培養之經遺傳修飾之宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*))表現，該宿主細胞帶有具有以適當序列編碼胺基酸殘基之指定重組DNA序列的引入表現載體。異源多肽可融合至(例如)多肽之N-末端或C-末端。融合蛋白中可存在一種以上多肽。融合蛋白中可存在多肽之片段。融合蛋白可包含(例如) SEQ ID NO:1-27中之一或多者、或其片段或組合。多肽可呈多聚體形式。亦即，多肽可包含SEQ ID NO:1-27或其組合之兩個或更多

個拷貝。

在一個實施例中，多肽係源自人類、兔、小鼠、犬、貓、其他哺乳動物或其組合。多肽可使用標準蛋白質純化技術自細胞或組織來源分離。多肽亦可藉由重組DNA技術化學合成或產生。舉例而言，多肽可使用習用肽合成器來合成。

在一個實施例中，多肽係以共價性地或非共價性地固定至固相或基材。

多肽可經重組產生。可使用業內熟知之技術將編碼多肽之多核苷酸引入可在適宜表現宿主細胞系統中表現之重組表現載體中。業內可獲得多種細菌、酵母、植物、哺乳動物及昆蟲表現系統且可使用任何該表現系統。視情況，可在無細胞之轉譯系統中轉譯編碼多肽之多核苷酸。可將多肽凍乾、烘乾或乾燥，例如冷凍乾燥。

多核苷酸

實施例包括編碼本文揭示之多肽中之一或多者之經分離多核苷酸。本發明之多核苷酸含有小於整個基因體且可為單鏈或雙鏈核酸。多核苷酸可為RNA、DNA、cDNA、基因體DNA、化學合成之RNA或DNA或其組合。多核苷酸可經純化而不含其他組份，例如蛋白質、脂質及其他多核苷酸。舉例而言，多核苷酸可經50%、75%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%純化。在本發明之一個實施例中，多核苷酸編碼SEQ ID NO:1-27中所示之多肽或其片段。

本發明之多核苷酸可包含其他核苷酸序列，例如編碼連接體之序列、信號序列、TMR停止轉移序列、跨膜結構域或可用於蛋白質純化之配體，例如麩胱甘肽-S-轉移酶、組胺酸標籤及葡萄球菌蛋白A。

可分離本發明之多核苷酸。經分離多核苷酸係不與其天然結合之5'及3'側接基因體序列中之一者或二者緊密鄰接的天然多核苷酸。經分離多核苷酸可為(例如)任何長度之重組DNA分子，前提係天然發

現緊密側接天然存在之基因體中之重組DNA分子之核酸序列經移除或不存在。經分離多核苷酸亦包括非天然存在之核酸分子。

編碼本發明之多肽之簡併核苷酸序列亦係本發明之多核苷酸。簡併核苷酸序列係編碼本發明之多肽或其片段之多核苷酸，但由於遺傳代碼之簡併性，與野生型多核苷酸序列之核酸序列不同。編碼生物功能多肽之本發明多核苷酸之互補DNA (cDNA)分子、物質同源物及變體亦係本發明之多核苷酸。

本發明之多核苷酸可包含天然存在之多肽之編碼序列或可編碼自然界中不存在之改變序列。若期望，可將多核苷酸選殖至包含表現控制元件(包括例如複製起點、啟動子、增強子或驅動本發明多核苷酸在宿主細胞中表現之其他調控元件)的表現載體中。表現載體可為(例如)質體(例如pBR322、pUC或ColE1)或腺病毒載體(例如腺病毒2型載體或5型載體)。視情況，可使用其他載體，包括但不限於辛德畢斯病毒(Sindbis virus)、猿猴病毒40、 α 病毒載體、痘病毒載體、及巨細胞病毒及逆轉錄病毒載體，例如鼠類肉瘤病毒、小鼠乳房腫瘤病毒、莫洛尼(Moloney)鼠類白血病毒及勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)。亦可使用微型染色體(例如MC及MC1)、噬菌體、噬菌粒、酵母人工染色體、細菌人工染色體、病毒粒子、病毒樣粒子、黏粒(噬菌體 λ *cos*位點插入其中之質體)及複製子(能在其自身控制下在細胞中複製之遺傳元件)。

製備可操作連接至表現控制序列之多核苷酸並使其在宿主細胞中表現之方法為業內熟知。參見(例如)美國專利第4,366,246號。本發明之多核苷酸在毗鄰或接近一或多個表現控制元件定位時可操作連接，該等表現控制元件引導多核苷酸之轉錄及/或轉譯。

本發明之多核苷酸可作為(例如)探針或引子(例如PCR引子)用於檢測測試試樣(例如生物試樣)中多核苷酸之存在。探針係能與靶核酸

通常以序列特異性方式、例如經由雜交相互作用的分子。引子係可支持酶操作且可與靶核酸雜交使得進行酶操作之探針之亞組。引子可自業內可獲得之不干擾酶操作之核苷酸或核苷酸衍生物或類似物之任何組合製得。

探針或引子可為約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或更多個編碼本發明多肽之鄰接核苷酸。

抗體

抗體包括特異性結合至本文所述朮抑素B多肽、本文所述變體朮抑素B多肽或其片段之抗體分子。抗體可特異性結合多種多肽。術語「抗體」係指完整抗體或與完整抗體競爭抗原結合之其抗原結合部分或片段。術語「抗體」亦包括特異性結合一或多種朮抑素B多肽(例如 SEQ ID NO:1-27)之任何類型之抗體分子或特異性結合分子。抗體可為天然存在的、非天然存在的、合成的或經遺傳改造的。如本文所用術語抗體之「抗原結合部分」、抗體之「抗原結合片段」及諸如此類包括任何天然存在、可以酶方式獲得、合成或經遺傳改造之多肽、醣蛋白或免疫球蛋白分子，其特異性結合朮抑素B多肽(例如，SEQ ID NO:1-27)以形成複合物。

抗體或其片段結合至本文所述多肽之表位。抗體可在活體內在適宜實驗室動物中或在活體外使用重組DNA技術來製得。製備及表徵抗體之方式為業內熟知。參見(例如) Dean, *Methods Mol. Biol.* 80:23-37 (1998) ; Dean, *Methods Mol. Biol.* 32:361-79 (1994) ; Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32:381-88 (1994) ; Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32:389-99 (1994) ; Drenckhahn 等人 *Methods Cell. Biol.* 37:7-56 (1993) ; Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10:239-65 (1992) ; Wright 等人, *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-68 (1992)。舉例而言，多株抗體可藉

由向動物(例如人類或其他靈長類動物、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、山羊、豬、狗、牛、綿羊、驢或馬)投與本文所述多肽來產生。收集來自經免疫動物之血清並藉由(例如)與硫酸銨一起沈澱、之後層析(例如親和力層析)自血漿純化抗體。產生及處理多株抗體之技術為業內所知。

抗體可為任何同種型，包括IgG (IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1及IgA2)、IgD及IgE。

抗體可為單株抗體、多株抗體、嵌合抗體或其抗原結合片段。單株抗體係自實質上均相抗體之組獲得之抗體。實質上均相抗體之組可含有少量突變體或變體。單株抗體具有高度特異性且與單一抗原位點相互作用。每一單株抗體通常靶向單一表位，而多株抗體群體通常含有靶向不同表位之組之各種抗體。單株抗體可藉由許多方法產生，該等方法包括(例如)雜交瘤方法(Kohler及Milstein, *Nature* 256:495, 1975)、重組方法(美國專利第4,816,567號)及自噬菌體抗體文庫分離(Clackson等人, *Nature* 352:624-628, 1991; Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991)。

嵌合抗體或其抗原結合部分具有源自特定物種或特定抗體類別或亞類之重鏈及/或輕鏈之一部分，且鏈之其餘部分係源自另一物種、或另一抗體類別或亞類。參見(例如) Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi等人, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies等人, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); 美國專利第5,807,715; 4,816,567號及第4,816,397號。

嵌合抗體可使用多種技術產生，該等技術包括(例如)CDR移植(EP 239,400; PCT公開案WO 91/09967; 美國專利第5,225,539號; 第5,530,101號及第5,585,089號)、鑲飾或表面重塑(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489-498 (1991);

Studnicka 等人, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska 等人, *PNAS* 96:969-973 (1994))及鏈改組(美國專利第5,565,332號)。

在一個實施例中, 嵌合抗體可包含彼此不同之物種之可變及恆定區, 例如, 抗體可包含一種哺乳動物之重鏈及輕鏈可變區及來自不同動物(例如小鼠、兔、犬、貓或人類)之重鏈及輕鏈恆定區。嵌合抗體可包含引入接受者抗體中之CDR中不包括、框架序列中亦不包括之額外胺基酸。可引入該等胺基酸以更精確地優化抗體識別並結合至抗原之能力。舉例而言, 若需要, 抗體可變區之框架區中之胺基酸可經取代, 使得整形之抗體之CDR形成適當抗原結合位點。參見Sato 等人, *Cancer Res.* (1993) 53:851-856。

抗體之抗原結合部分或片段之非限制性實例包括: Fab片段; Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab')₂片段; Fd片段; Fv片段; 單鏈Fv(scFv)分子; sdAb片段(奈米抗體); Fab樣抗體(含有重鏈及輕鏈之可變區的抗原結合片段, 其等效於藉由木瓜蛋白酶消解獲得之Fab片段); F(ab')₂樣抗體(含有兩個抗原結合結構域之抗原結合片段, 其等效於藉由胃蛋白酶消解獲得之F(ab')₂片段)、自抗體片段製備之多特異性抗體、雙價抗體、雙特異性抗體、多功能抗體、人類化抗體、犬源化抗體、人類抗體、犬抗體、貓抗體、鼠類抗體、兔抗體、合成抗體、CDR移植抗體、及由模擬抗體之超變區之胺基酸殘基組成之最小識別單位(例如, 經分離互補測定區(CDR), 例如CDR3肽)、或限制FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用之其他經改造分子(例如結構域特異性抗體、單一結構域抗體、結構域缺失抗體、CDR移植抗體、二價抗體、三價抗體、四價抗體、單價抗體、奈米抗體(例如, 單價奈米抗體、二價奈米抗體)、單鏈(Fv)₂(sc(Fv)₂); 二價(sc(Fv)₂); 四價([sc(Fv)₂]₂) scFV抗體、及小模數免疫醫藥品(SMIP)、及鯊可變IgNAR結構域亦被視為「抗原結合片段或部分」。

「特異性結合」(「specifically binds」、「specifically bind」)或「對.....具有特異性」意指第一抗原(例如SEQ ID NO:1-27之多肽)識別並以較與其他非特異性分子大之親和力結合至本文所述抗體。「特異性結合」(「specifically binds」、「specifically bind」)或「對.....具有特異性」亦意指第一抗體(例如，針對SEQ ID NO:1-27之抗體)識別並以較與其他非特異性分子大之親和力結合至SEQ ID NO:1-27。非特異性分子係與第一抗原不共享共用表位之抗原。可使用(例如)酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析或西方墨點分析使用業內熟知之方法測試特異性結合。

在實施例中，抗體或其抗原結合片段特異性結合至如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、27或27所述之多肽上之表位。在實施例中，表位係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)或QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)。

在一個實施例中，抗體或其抗原結合片段與第二或參考抗體競爭結合至SEQ ID NO:1-27或其片段。可使用任何競爭性結合分析以量測兩種抗體之間與相同抗原之競爭。舉例而言，三明治ELISA分析可用於此目的。分析交叉反應之方式為彼等熟習此項技術者熟知(參見(例如) Dowbenko等人 (1988) *J. Virol.* 62: 4703-4711)。

若在第一抗體存在下使用評定競爭性結合所用之任何分析，第二抗體與抗原之結合減少至少約30%、40%、50%、60%、75%、90%

或更多，則認為第一抗體競爭性抑制第二抗體之結合。

競爭性結合可藉由提供一或多種示於SEQ ID NO:1-27中且附接至固體載體之經分離多肽及分析抗體結合至多肽或與本文所述抗體競爭結合至多肽之能力來確定。

抗體包括如下抗體及其抗原結合片段：(a) 與參考抗體競爭結合至SEQ ID NO:1-27或其抗原結合片段；(b) 與參考抗體結合至SEQ ID NO:1-27或其抗原結合片段之相同表位；(c) 以與參考抗體實質上相同之 K_d 結合至SEQ ID NO:1-27或其抗原結合片段；及/或(d) 以與參考抗體實質上相同之解離速率結合至SEQ ID NO:1-27或其片段，其中參考抗體係以 10^7 l/mol或更大之結合親和力 K_a 特異性結合至SEQ ID NO:1-27之多肽或其抗原結合片段的抗體或其抗原結合片段。

抗體或其抗原結合片段對其多肽配偶體之親和力可由解離常數(Kd)代表。以比率 k_{off}/k_{on} 來計算平衡解離常數(Kd)。參見Chen, Y.等人, 1999, J. Mol. Biol. 293: 865-881。業內已知用於量測親和力常數之多種方法。在特定實施例中，參考抗體係以特定 K_{on} 速率/締合速率或 K_{off} 速率對SEQ ID NO:1-27之多肽具有結合親和力之抗體或其抗原結合片段。在一個實施例中，抗體以 6×10^5 M⁻¹s⁻¹或更佳之 K_{on} 特異性結合；抗體以 5×10^{-6} s⁻¹或更佳之 K_{off} 速率特異性結合；或抗體以500pM、400pM、300pM、200 pM、100pM、50pM、40pM、30 pM、20 pM或更佳之結合親和力特異性結合。

特異性結合SEQ ID NO:1-27之抗體尤其可用於檢測試樣(例如動物之血清、血液、血漿、細胞、組織、唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片、舌拭子或尿試樣)中存在之胱抑素B多肽及其片段之存在。免疫分析可利用一種抗體或若干抗體。免疫分析可使用(例如)對一個表位具有特異性之單株抗體、對一種多肽之表位具有特異性之單株抗體之組合、對不同多肽之表位具有特異性之單株抗體、對相同

抗原具有特異性之多株抗體、對不同抗原具有特異性之多株抗體、或單株及多株抗體之組合。免疫分析方案可基於(例如)使用(例如)經標記之抗體之競爭、直接反應或三明治型分析。抗體可經業內已知之任何類型之標記(包括例如螢光、化學發光、放射性、酶、膠狀金屬、放射性同位素及生物發光標記)來標記。

抗體或其抗原結合片段可結合至載體且用於檢測某些疾病及病況中試樣中多肽之存在或存在之量。載體包括(例如)玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、耐綸(nylon)、澱粉酶、天然及經修飾纖維素、聚丙烯醯胺、瓊脂糖及磁石。可將抗體或其抗原結合片段凍乾、烘乾或乾燥，例如冷凍乾燥。

可進一步使用抗體以藉由免疫親和力管柱分離多肽。抗體可藉由(例如)吸收或藉由共價連接附著至固體載體，以使抗體保留其免疫選擇性活性。視情況，可包括間隔體基團，以使抗體之抗原結合位點保持可及。經固定抗體隨後可用於特異性結合生物試樣(包括但不限於唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片、舌拭子、血清、血液及尿)之SEQ ID NO:1-27或其片段。

抗體亦可用於免疫定位研究中以分析在各種細胞事件或生理病況期間本文所述多肽之存在及分佈。抗體亦可用於鑑別參與被動免疫之分子及鑑別參與非蛋白抗原之生物合成之分子。該等分子之鑑別可用於疫苗研發中。抗體(包括例如單株抗體及單鏈抗體)可用於監測某些疾病或病況之改善之過程。藉由量測動物之測試試樣中SEQ ID NO:1-27或其片段之量的增加或減少，可確定旨在改善病症之特定治療方案是否有效。可使用(例如)直接結合分析(例如RIA、ELISA或西方墨點分析)檢測及/或量化抗體。

檢測方法

一個實施例提供檢測試樣中胱抑素B多肽之方法，其包含在適於

形成朊抑素B多肽與一或多種對SEQ ID NO:1-27具有特異性之抗體之複合物的條件下使試樣與一或多種對SEQ ID NO:1-27具有特異性之抗體接觸。檢測朊抑素B多肽與一或多種對SEQ ID NO:1-27具有特異性之抗體之複合物。

在實施例中，提供檢測包含SEQ ID NO:1-27及其片段之多肽之方法。視情況，可檢測試樣中包含SEQ ID NO:1-27之多肽之量。可使用相對含量之多肽以診斷或檢測若干疾病或病況。業內已知用於檢測多肽之任何方法可用於本文所述方法中。

結合本文所述抗體使用之分析方法可包括直接及間接標記技術、免疫親和力管柱、免疫磁性珠粒、螢光活化細胞分選(FACS)、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、凝集分析濁度計分析、量化濁度計分析以及檢測一級抗體之經標記之二級抗體。

可用(例如)具有適於使用市售儀器(例如螢光活化之細胞分選器)檢測之激發及發射波長的螢光標記可檢測地標記抗體。螢光標記之實例包括藻紅蛋白(PE)、螢光素異硫氰酸酯(FITC)、羅丹明(rhodamine)(RH)、德克薩斯紅(Texas Red)(TX)、Cy3、Hoechst 33258及4',6-而脒基-2-苯基吲哚(DAPI)。該等標記可使用標準技術偶聯至抗體(Maino等人, 1995, *Cytometry* 20: 127-133)。

本文所述方法可用於檢測SEQ ID NO :1-27或其片段，其中抗體或抗原結合抗體片段特異性結合SEQ ID NO:1-27。生物試樣可包括(例如)哺乳動物(例如狗、貓或人類)之血清、血液、細胞、血漿、唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片、舌拭子或尿。測試試樣可未經處理、經沈澱、分級分離、分離、稀釋、濃縮或純化。

如本文所用「患者」或「個體」可意指人類或非人類動物，包括貓、牛、豬、馬或犬。

如本文所用術語「試樣」、「測試試樣」、「患者試樣」或

「個體試樣」包括(但不限於)自個體獲得之血液、血清、血漿、唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片、舌拭子或尿試樣。

分析包括(但不限於)基於競爭、直接反應或三明治型分析之彼等，包括但不限於酶聯免疫吸附分析(ELISA)、西方墨點、IFA、放射性免疫分析(RIA)、血球凝集(HA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析、螢光極化免疫分析(FPIA)、及微量滴定板分析(任何分析皆係在微量滴定板之一或多個孔中進行)。一種分析包含逆流層析結合分析，例如SNAP®分析。例如，參見美國專利第5,726,010號。

分析可使用固相或基材或可藉由免疫沈澱或不利用固相之任何其他方法來實施。若使用固相或基材，則一或多種多肽或抗體直接或間接附接至固體載體或基材，例如微量滴定孔、磁性珠粒、非磁性珠粒、管柱、基質、膜、由合成或天然纖維構成之纖維墊(例如，玻璃或纖維素基材料或熱塑性聚合物，例如聚乙烯、聚丙烯或聚酯)、由微粒材料構成之經燒結結構(例如，玻璃或各種熱塑性聚合物)、或由硝化纖維素、耐綸、聚砒或諸如此類(通常天然合成)構成之澆注膜。在一個實施例中，基材經燒結之聚乙烯之微小粒子，通常稱作多孔聚乙烯，例如來自Chromex Corporation (Albuquerque, NM)之10-15微米多孔聚乙烯。所有該等基材材料皆可以適宜形狀(例如膜、片或板)使用，或可將其塗佈或鍵結或層壓至適當惰性載體(例如紙、玻璃、塑膠膜或織物)上。適於將抗體固定於固相上之方法包括離子、疏水、共價性地相互作用及諸如此類。

在一個實施例中，方法包含在容許形成多肽/抗體複合物(即免疫複合物)之條件下使測試試樣與一種或複數種特異性結合至SEQ ID NO:1-27之抗體接觸。亦即，抗體特異性結合至一種或複數種位於試樣中之SEQ ID NO:1-27之多肽。熟習此項技術者熟悉用於檢測抗體/

多肽複合物結合之分析及條件。檢測試樣中多肽與抗體之間之複合物的形成。抗體/多肽複合物之形成指示患者試樣中存在多肽。

在一個實施例中，在指示試劑(例如結合至抗體之酶偶聯物)催化可檢測之反應時，檢測多肽/抗體複合物。視情況，可在容許形成多肽/抗體/指示劑複合物之條件下將包含信號產生化合物之指示試劑施加至多肽/抗體複合物。檢測多肽/抗體/指示劑複合物。視情況，可在形成多肽/抗體複合物之前用指示試劑標記多肽或抗體。方法可視情況包含陽性或陰性對照。陽性對照可含有一或多種多肽，其將特異性結合至對Cys B具有特異性之抗體且提供陽性結果。陰性對照不含任何Cys B多肽或可與對Cys B具有特異性之抗體特異性結合或交叉反應的任何多肽或其他組份。

在一個實施例中，一或多種抗體共價性地或非共價性地固定至固相或基材。向受質中添加潛在地包含Cys B多肽之試樣。向受質中添加一或多種對Cys B具有特異性之抗體。抗體可為固相上所用之相同抗體或可來自不同來源或物種且可連接至指示試劑，例如酶偶聯物。可在每次添加之前實施洗滌步驟。添加發色團或酶受質且使顏色顯影。停止顏色反應且可使用(例如)分光光度計量化顏色。

在另一實施例中，一或多種抗體固定至固相或基材。向受質中添加潛在地含有Cys B多肽之測試試樣。添加特異性結合Cys B多肽之第二抗物種抗體。該等第二抗物種抗體來自與固定至固相之抗體不同之物種。添加特異性結合第二抗物種抗體之第三抗物種抗體，且添加不特異性結合固定至固相之抗體。第三抗物種抗體可包含指示試劑，例如酶偶聯物。可在每次添加之前實施洗滌步驟。添加發色團或酶受質且使顏色顯影。停止顏色反應且可使用(例如)分光光度計量化顏色。

在一個實施例中，一或多種捕獲抗體可特異性結合至本文所述

多肽之一或多個表位。一或多種捕獲抗體可用於將一種或複數種SEQ ID NO:1-27之多肽固定至(例如)固體載體。一或多種檢測抗體可特異性結合至多肽之一或多個相同表位或一或多個不同表位。檢測抗體可用於檢測或可視化多肽至固體載體之固定。此實施例係有利的，此乃因其較僅使用一種抗體用於捕獲及檢測兩種功能之分析更具特異性且更敏感。

在一種類型之分析格式中，可將一或多種抗體塗佈於固相或基材上。在足以形成固相之任一抗體與測試試樣多肽或偶聯至對多肽具有特異性之抗體之指示試劑化合物的抗原/抗體複合物之持續時間及條件下將懷疑含有包含SEQ ID NO:1-27或其片段之多肽的測試試樣與包含偶聯至對該等多肽具有特異性之抗體或抗體片段之信號產生化合物的指示試劑一起培育。可定量地量測偶聯至抗多肽抗體之指示試劑與固相之結合。與自對照試樣或對照標準品產生之信號相比，信號之可量測變化指示包含SEQ ID NO:1-27或其片段之多肽的存在。此類型之分析可量化測試試樣中多肽之量。

在另一類型之分析格式中，將一或多種抗體塗佈於載體或基材上。抗體偶聯至指示試劑且添加至測試試樣。將此混合物施加至載體或基材。若測試試樣中存在Cys B多肽，則其將結合一或多種偶聯至指示試劑之抗體並結合至固定於載體上之抗體。隨後可檢測多肽/抗體/指示劑複合物。此類型之分析可量化測試試樣中多肽之量。

在另一類型之分析格式中，將一或多種抗體塗佈於載體或基材上。將測試試樣施加至載體或基材並培育。藉由用洗滌溶液洗滌固體載體洗掉試樣之未結合之組份。若測試試樣中存在包含SEQ ID NO:1-27或其片段之多肽，則其將結合至塗佈於固相上之抗體。可使用偶聯至指示試劑之第二抗物種特異性抗體檢測此多肽/抗體複合物。隨後可檢測多肽/抗體/抗物種抗體指示劑複合物。此類型之分析可量化測

試樣中多肽之量。

多肽/抗體複合物或多肽/抗體/指示劑複合物之形成可藉由(例如)放射測定、比色法、螢光測定、大小分離或沈澱方法來檢測。視情況，多肽/抗體複合物之檢測係藉由添加偶聯至包含信號產生化合物之指示試劑之二級抗體來進行。包含與多肽/抗體複合物相關之信號產生化合物(標記)之指示試劑可使用上述方法檢測，且包括顯色劑、觸媒，例如酶偶聯物螢光化合物(例如螢光素及羅丹明)、化學發光化合物(例如二噁二酮、吡啶、菲啶、鈉及魯米諾(luminol))、放射性元素、直接可視標記、以及共因子、抑制劑、磁性粒子及諸如此類。酶偶聯物之實例包括鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶及諸如此類。特定標記之選擇並不至關重要，但其將能自身或結合一或多種其他物質產生信號。

如本文所用片語「測定量」係指量測或鑑別試樣中一或多種多肽之含量。此可藉由用於檢測多肽之業內熟知之方法來完成，包括使用抗體，該等方法包括(例如)酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析或西方墨點分析或免疫組織化學。或者，可藉由質譜或彼等熟習此項技術者已知之相似方法測定SEQ ID NO:1-27之多肽。測定試樣中存在之多肽之量係藉由該活體外分析及實驗操作來完成。

診斷方法

一個實施例提供診斷個體之腎臟疾病之方法。方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中胱抑素B多肽之量係使用一或多種特異性結合SEQ ID NO:1-27之抗體來測定。將試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品進行比較，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示腎臟疾病。

其他方法可診斷CKD患者中之AKI或AKI。在一個實施例中，方

法可診斷由癌症或腎癌引起之降低之腎功能或對腎之物理損壞。在另一實施例中，方法可診斷由細菌感染腎引起之腎臟疾病、降低之腎功能或對腎之物理損壞。細菌感染可由(例如)微粒孢子蟲屬、埃利希氏體屬、鈎端螺旋體屬、埃希氏菌屬或疏螺旋體屬引起。

如本文所揭示，發現與未患病個體之對照個體試樣相比，患病個體試樣中多肽之量或含量較高。個體試樣中本文所述多肽之相對含量可指示疾病之進展及疾病之嚴重程度。亦即，在一些情況下，較大量或含量之胱抑素B多肽意味著更嚴重疾病狀態。

胱抑素B多肽之升高含量係較對照試樣或對照標準品大約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500%或更大之含量。胱抑素B多肽之升高含量係較對照試樣或對照標準品大約10%至500%或更大、約20%至500%或更大、約30%至500%或更大、約40%至500%或更大、約50%至500%或更大、約60%至500%或更大、約100%至500%或更大的含量。

胱抑素B多肽之升高含量亦可為在與對照試樣或對照標準品相比時在統計上顯著增加之量的含量。

胱抑素B多肽之升高含量亦可為約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、10,000或更大ng/ml。胱抑素B多肽之對照含量或對照標準品可為約400、350、300、250、200、150、100、50、20、10或更小ng/ml。

可比較胱抑素B多肽之升高含量與對照試樣或對照標準品，該等對照係使用不具有任何類型之腎病或病況、細菌感染或牙周病之正常對照個體來測定。

在一些實施例中，比較測試試樣中胱抑素B多肽之含量與一或多個正常對照個體之對照試樣中胱抑素B之含量。通常，隨後比較對照

試樣中量測之對照含量與測試試樣中量測之胱抑素B多肽含量。或者，比較測試試樣中胱抑素B多肽之含量與先前測定或預定之對照含量(「對照標準」)。舉例而言，胱抑素B多肽之對照標準可自數據(例如包括來自複數個正常或健康對照個體之對照試樣中胱抑素B多肽之含量的數據)計算。評定下之正常或健康對照個體及測試個體可屬相同物種。

特定實施例提供用以鑑別哺乳動物(且更特定而言狗、貓及人類)某些疾病或病況的試劑及方法。某些實施例提供用於提供患者之診斷及預後之方法。鑑別個體試樣中之Cys B多肽可為腎病之獨立性預測因子或慢性腎病階段(例如，階段1-4)中之急性腎損傷或活動性腎損傷之鑑別因子。該等方法有利地允許診斷及鑑別慢性腎病中之急性腎損傷或活動性腎損傷且不受患者年齡或體重影響或干擾。因此，其他實施例係關於使用利用多肽以選擇適當腎臟療法測定之該腎臟患者預後。

鑑別個體試樣中Cys B多肽為AKI等級(例如，等級1-5)之獨立性預測因子。本文所述方法及組合物能夠有利地在等級3之前診斷及鑑別AKI階段且不受患者年齡或體重影響或干擾。

抗體可用於藉由從懷疑患有腎臟疾病之動物(例如，人類、貓或狗)獲得測試試樣診斷腎臟疾病之方法中。在能形成抗體-抗原複合物(即，免疫複合物)之條件下使測試試樣與抗體接觸。熟習此項技術者應明瞭能夠且適於形成抗原/抗體複合物之條件。抗體-抗原複合物之存在或量可藉由業內已知之方法測定。

實施例進一步包括藉由鑑別患者試樣中特異性多肽之含量預後患者健康、監測疾病進展及/或評定/監測治療功效的方法。在一個態樣中，該等方法可於多個時間點實施以評價疾病進展或治療功效。在特定實施例中，該等方法可在診斷時實施且隨後在治療後具體時間點

實施，其中具體療法應導致疾病進展之減輕或改善。

本文所述方法亦可指示包含SEQ ID NO:1-27之多肽之量或數量。在特定實施例中，某些多肽之量或數量提供進步階段(即，階段1-4)、疾病進展及/或預後指示因子之指示因子。利用許多指示試劑(例如酶偶聯物)，所存在多肽之量與所產生信號成正比。端視測試試樣之類型而定，可將其用適宜緩衝液試劑稀釋，濃縮，或與固相接觸而無須進行任何操作。舉例而言，可使用先前經稀釋之血清或血漿試樣或濃縮樣品(例如尿)以測定多肽之存在及/或存在之量。

本文所述多肽及分析可與其他多肽或分析組合以檢測腎臟疾病之存在。舉例而言，多肽及分析可與適於檢測或量測肌酸酐或一般蛋白質含量之試劑組合。

實施例亦提供區分上尿路感染與下尿路感染之方法。上尿路感染係腎之感染(腎盂腎炎)。下尿路感染係膀胱之感染(膀胱炎)。該等病況可難以區分。健康提供者有利地辨別上尿路感染與下尿路感染之間之差異，此乃因治療可不同。業內需要需要區分該等感染之方法。

方法包含使用一或多種特異性結合SEQ ID NO:1-27之抗體測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量。比較試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之上尿路感染。

實施例提供區分急性腎損傷與下尿路感染之方法。該等病況難以區分。健康提供者有利地辨別急性腎損傷與下尿路感染之間之差異，此乃因治療不同。方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中使用一或多種特異性結合一或多種由SEQ ID NO:1-27組成之多肽之抗體測定胱抑素B多肽之量。比較試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之急性腎損傷。

實施例提供診斷個體之牙周炎之方法。牙周病包括牙齦炎(齒齦發炎)及牙周炎。牙周炎係引起牙槽骨之附著損失及破壞之牙周組織之疾病。牙周病之臨床診斷係藉由識別指示疾病之牙周組織中之各種體徵及症狀來進行。體徵及症狀通常在疾病發作後及在發生對支持骨及組織較大損害後較長時間出現。另外，在家畜患者中，在不進行全身麻醉情況下，牙周病經常不可經適當地評價或治療。業內需要早期檢測牙周病之方法。該等方法包含測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量。使用一或多種對SEQ ID NO:1-27具有特異性之抗體測定胱抑素B多肽之量。比較試樣中胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與對照試樣或對照標準品相比，試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示個體之牙周病。

治療方法

某些實施例提供治療個體之疾病病況之方法。該等方法包含要求提供用於使用一或多種對SEQ ID NO: 1-13具有特異性之抗體測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量之分析結果的測試。若與用於疾病病況之對照試樣或對照標準品相比，試樣含有升高量之胱抑素B多肽，則向個體投與針對疾病病況之治療。

疾病病況包括AKI、牙周病、上尿路感染及腎臟疾病。在一個實施例中，疾病病況並非癌症或腎臟癌症。

CKD、AKI及腎臟疾病之治療包括(例如)阻塞性腎單元/輸尿管結石之手術、腎臟贅瘤形成之化學療法、飲食管控、腸溶磷酸鹽黏合劑、抗蛋白尿劑(例如，血管緊張素轉化酶抑制劑(ACEI)、 ω -3脂肪酸)、抗高血壓藥(例如ACEI、鈣通道拮抗劑(CCA))、用以校正脫水之流體療法、酸中毒之管控、利尿藥之投與、透析、電解質異常之校正、止吐藥及抗酸藥、重組紅細胞生成素。上尿路感染可用抗生素治療。牙周病可用徹底清潔、潔治及根面平整、牙齦移植手術、雷射治

療、再生性程序(使用囊袋中之膜(過濾器)、骨移植物或組織刺激蛋白)、種植牙、囊袋減少手術(在將組織固定回位置之前反向摺疊牙齦組織及移除引起疾病之細菌)來治療。

在替代實施例中，本文所述方法可用於評定組合物或治療方案(組合物或飲食)用於改善疾病進展之功效。相似地，本文所述方法可用於評定組合物或治療方案對包含SEQ ID NO:1-27之多肽之患者含量的活性。

套組

實施例提供用於實施本文揭示之方法之套組。在某些實施例中，套組包含一種或複數種對一種或複數種包含SEQ ID NO:1-27之多肽具有特異性之抗體。某些實施例中視情況包括套組之使用說明書、以及用於(例如)三明治分析中之二級抗體。套組中亦可存在具有區別性經標記之抗體、以及用於標記抗體之試劑。

在其他實施例中，套組包含一種或複數種各種特異性結合至一或多種包含SEQ ID NO:1-27之多肽的抗體。在某些實施例中，抗體提供於固體載體或基材(包括但不限於晶片、微陣列、珠粒及諸如此類)上。

套組(例如，製品)可用於檢測患者試樣中之本文所述多肽或其蛋白質片段。套組包含一或多種抗體及用於測定抗體與本文所述全長蛋白質或蛋白質片段之結合的組合物。套組或製品亦可包含一或多種抗體或抗體片段及用於測定試樣中抗體或抗體片段與多肽之結合的組合物。套組包含含有一或多種多肽或抗體及使用一或多種多肽或抗體以(例如)鑑別哺乳動物之腎臟疾病之說明書的裝置。套組亦可包含包含指示套組之一或多種多肽或抗體可用於鑑別腎功能障礙之標記的包裝材料。該等測試套組中可包括彼等熟習此項技術者已知之其他組份(例如緩衝液、對照及諸如此類)。本文所述多肽、抗體、分析及套組

可用於(例如)診斷患者之腎臟疾病之個別病例。

套組可用於診斷、預後或監測腎臟疾病、特定而言犬、貓及人類腎臟疾病之治療。

可在不存在本文中未具體揭示之任一或多個要素或一或多個限制之情形下實踐本文中合適地以說明性方式闡述之實施例。因此，舉例而言，在本文中之每一情況中，術語「包含」、「基本上由...組成」及「由...組成」中之任一者皆可用另兩個術語中之任一者來替換，同時保留其常見含義。已採用之術語及表達係用作說明性而非限制性術語，且並非意欲藉由使用此等術語及表達來排除所展示及所闡述特徵或其部分之任何等效形式，而是應認識到，在所主張之實施例之範疇內可存在各種修改形式。因此，應瞭解，儘管本說明已藉由實施例、可選特徵具體揭示，但熟習此項技術者可對本文中所揭示之概念採取修改及變化，並且該等修改及變化視為在由說明及隨附申請專利範圍所界定之該等實施例之範疇內。

包含上文所提及特徵之方法之實施例意欲在本揭示內容之範疇內。

實例

以下實例闡釋本揭示內容之具體實施例及其各種用途。其僅出於解釋目的進行闡述，且不應理解為具有限制性。

實例1：犬Cys B之蛋白質序列

先前相信犬Cys B具有如SEQ ID NO:1中所示之77胺基酸之蛋白質序列。

QVKAQLEERENKKYTTFKAVTFRSQVVAGTPYFIKVQVDDDEF
VHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:1)

然而，此信念並不正確。使MDCK細胞系生長至鋪滿且收集黏著細胞並用含有洗滌劑之生理緩衝液溶解。在溶解後，將細胞以10000

rpm旋轉30分鐘以將細胞碎片製成團塊。使用上清液作為尿特異性犬胱抑素B之來源。使用上清液，使用胰蛋白酶消解及LC-MS鑑別對犬Cys B之缺失21 aa N-末端進行測序。

MMCGAPSASQPATADTQAIAD (SEQ ID NO:2)

因此，犬Cys B (FL-Cys B)之完全胺基酸序列經測定為：

MMCGAPSASQPATADTQAIADQVKAQLEERENKKYTTFKAVTF
RSQVVAGTNYFIKVQVDDDEFVHLRVFQSLPHENKPLALSSYQTNKA
KHDELAYF (SEQ ID NO:3)

實例2：針對犬胱抑素B之抗體

A. 針對重組蛋白之抗體

根據標準方法在兔中藉由使用SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:3之重組蛋白作為免疫原生成多株抗體。在ELISA分析中，由此生成之抗體中之每一者會特異性結合其各別重組免疫原。

根據標準方法在小鼠中藉由使用具有SEQ ID NO:3之重組蛋白作為免疫原、利用CPG作為佐劑生成單株抗體。在ELISA分析中，所產生7種單株抗體特異性結合其各別重組免疫原。使用HRP-山羊抗小鼠IgG H及L鏈二級抗體以檢測單株結合。所有測試之純系結合至經5 ug/ml重組FL胱抑素B (SEQ ID NO: 3)塗佈之板。表4顯示三個純系之實例性結合數據。

表4：針對rFL-Cys B之單株抗體之篩選，來自3個純系之代表性連續稀釋數據

FL-Cys B (ug/ml)	10 ug/ml下之Cys B單株		
	9A3	5E1	3H4
10	2.79	2.77	2.74
1	2.38	2.32	2.36
0.5	1.94	1.87	1.79

0.25	1.54	1.46	1.43
0.125	1.12	1.04	0.97
0.0625	0.69	0.62	0.64
0.03125	0.44	0.42	0.43
0	0.11	0.11	0.13

B：針對合成肽之抗體

將源自犬胰抑素B之以下肽偶聯至KLH。使用偶聯物作為兔中抗體生成之免疫原。

胰抑素B C末端「肽9」 QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)

胰抑素B N-末端「肽3-20」 CGAPSASQPATADTQAIA (SEQ ID NO:5)

胰抑素B N-末端「肽3-10」 CGAPSASQ (SEQ ID NO:6)

胰抑素B N-末端「肽18-25」 CAIADQVKA (SEQ ID NO:7)

胰抑素B 「肽2」 FQSLPHENKPLALSS (SEQ ID NO:8)

胰抑素B 「肽1」 SQVVAGTPYFIKVQVDDD (SEQ ID NO:9)

另外，根據標準方法在小鼠中藉由使用肽SEQ ID NO:2 (N-末端)及SEQ ID NO:5 (肽3-20)作為免疫原利用氟氏佐劑(Freund's adjuvant)生成多株及單株抗體。在ELISA分析中，由此生成之抗體中之每一者特異性結合其各別重組免疫原。

由此生成之每一抗體特異性結合其各別肽免疫原。舉例而言，下表5顯示針對肽1、2及9之兔抗肽多株抗體與其各別免疫原之典型結合曲線。所有三種多株抗體皆以高親和力結合至其靶標且可在胰抑素B ELISA中用於形成三明治。

表5：兔抗胰抑素B肽與各別免疫原之結合

抗體	肽	肽	肽
效價	1	2	9

10	2.55	4.00	4.00
1	1.00	3.79	4.00
0.5	0.31	2.15	3.95
0.25	0.08	0.50	2.41
0.125	0.05	0.11	0.57
0.0625	0.04	0.06	0.12
0	0.04	0.04	0.05

另外，在ELISA分析中，抗肽9抗體及抗肽1抗體特異性結合重組FL-Cys B (SEQ ID NO:3)及經刺激MDCK細胞之溶解物中的天然細胞內蛋白。顯示在競爭性ELISA分析中，抗肽9抗體可特異性結合肽KHDELAYF (SEQ ID NO:10)。

根據標準方法使用SEQ ID NO:11、12及13對兔進行免疫。在ELISA分析中，每一抗體特異性結合至其各別免疫原。

實例3：用於犬朮抑素B之檢測之免疫分析

如下研發朮抑素B ELISA。

固相及捕獲抗體：

於4°C下將96孔4BX微量滴定板用10 ug/ml親和力純化兔抗肽9塗佈過夜。將板用含有0.05% TWEEN® (聚山梨醇酯) 20之1×PBS (pH 7.4)洗滌3次。隨後將板用含有1% BSA之1×PBS (pH 7.4)封阻2小時。在如上所述洗滌後，將板於37°C下在真空下乾燥4小時。隨後於4°C下將板乾燥儲存。

檢測抗體之製備：

自經全長重組朮抑素B (rFL-Cys B)(SEQ ID NO:3)免疫之小鼠生成7種單株抗體。基於純系與rFL Cys B之結合性能選擇一種純系(3H4)，用蛋白質G純化，且使用SMCC方法用辣根過氧化物酶(HRP)標記1.0 mg純化抗體，且使其脫鹽以移除過量HRP。滴定經標記抗體

且在ELISA分析中使用0.25-2.0 ug/ml。

胱抑素B三明治ELISA方案：血清及尿

胱抑素B係細胞內蛋白且通常不以大濃度自由循環。此係藉由在自應激犬腎細胞收集之上清液中未發現蛋白質來進一步確認。然而，自破裂犬腎細胞純化胱抑素B。因此，血清或尿中檢測之任何胱抑素B可能因細胞之破裂及死亡而產生。在活動性腎損傷中，近端小管中上皮細胞之細胞凋亡及壞死可能引起血清及尿胱抑素B增加(圖1)。

在伴侶動物中，胱抑素B尚未與腎病相關聯。單株抗體係針對如上文所述重組胱抑素B且在胱抑素C蛋白存在下使用西方墨點分析確認其特異性(圖2)。亦使用該等抗體研發三明治ELISA。

對於三明治ELISA而言，標準品係rFL-Cys B或來自MDCK細胞沈澱之洗滌劑溶解物。藉由LCMS方法量化兩種標準製劑。將尿試樣用緩衝液A (0.1M PO₄⁻, pH 7.4, 至少含有0.1 % Sarkosyl)至少1:10稀釋。將血清試樣在緩衝液A中至少1:100稀釋且如上所述一式兩份地向孔中添加100 ul。一式兩份地向多株抗體捕獲孔中添加100微升(100ul)並培育1小時，於RT下振盪。隨後將板用PETCHEK®洗滌液(IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA)洗滌6次並添加100 ul 0.25-2 ug/ml之HRP單株檢測抗體。將檢測抗體振盪培育30分鐘，之後6次洗滌，並向孔中添加100 ul基材TMB。使顏色顯影5分鐘，之後100 ul停止溶液(1N HCL)。在VMAX®微板讀數器中對板進行讀數。使用Sigma曲線中之4PL參數擬合量化未知元。

使用天然犬胱抑素B (MDCK溶解物)利用如上文所述Cys B ELISA分析獲得標準曲線(圖3)。

患者試樣中犬胱抑素B之檢測

使用如上文所述胱抑素B ELISA分析測定狗之尿中之胱抑素B含量且其示於表6中。

表6. 患有腎病之犬中之胱抑素B含量.

試樣	狀態	胱抑素B (ng/ml)
1	健康	356
2	健康	382
3	健康	292
4	AKI	6022
5	AKI	7920
6	AKI	9559
7	CKD	453
8	CKD	1595
9	CKD	3372

如表6中所示，在與急性(活動性)腎損傷(AKI)及慢性腎病(CKD)相比時，健康狗之尿中具有胱抑素B之低含量。AKI試樣呈現較CKD試樣高之胱抑素B含量。

在犬慶大黴素模型之血清及尿(圖4)及向診所呈現發炎或缺血誘導之活動性腎損傷之狗之尿(圖5)中使用ELISA量測胱抑素B。在模型系統中，每8小時向狗給予10mg/kg慶大黴素直至血清肌酸酐達到1.5mg/dL。在此狗中，在第8天達到此程度；而血清胱抑素B在第1天增加超過基線。該等初步結果表明，胱抑素B係較肌酸酐早之用於活動性腎損傷之標記物。在患者試樣中，健康患者與診斷患有活動性腎損傷之彼等之間存在明顯分離。

實例4：利用口拭子之胱抑素B檢測

使用棉拭子以對經歷牙科檢查之犬之牙齦進行取樣。狗呈現牙齦炎、牙齦疾病以及嚴重齲齒。將拭子置於塑膠測試管中並儲存於4℃下直至使用。將拭子平衡至室溫並保持30分鐘，隨後於0.5 ml含有洗滌劑之胱抑素B分析緩衝液中放置30分鐘。將拭子移出並用於如上文所述胱抑素B分析。使用無試樣之對照拭子以測定背景信號。對照

拭子低於具有0.04之平均OD之檢測限值(LOD)，而經歷廣泛牙科程序之犬之拭子的OD係1.04。此產生26之信號對噪音S/N比率。參見下表7：

表7. 口拭子中胱抑素B之檢測.

胱抑素B (450nm下之O.D) S/N

對照拭子	0.04	--
犬拭子	1.04	26

將患有牙周病之兩隻狗之牙齒用棉拭子擦拭且在胱抑素B ELISA緩衝液中萃取胱抑素B並在胱抑素B分析中作為試樣運行。摻有1000 ng/ml重組全長犬胱抑素B蛋白之標準品作為陽性對照運行。重組全長胱抑素B蛋白陽性對照之信號(450 nM下之O.D.)係0.322，犬1係1.8485，犬2係1.444。患有牙周病之兩隻犬之值較1000 ng/ml rCanine FL-Cys B標準品高5倍以上。因此，Cys B係哺乳動物(例如犬)之牙周病之標記物。

實例5：經改良ELISA

於4°C下將96孔4BX微量滴定板用5 ug/ml親和力純化兔抗肽9塗佈過夜。將板用含有0.05% TWEEN® (聚山梨醇酯) 20之1×PBS (pH 7.4)洗滌3次。隨後將板用含有1% BSA之1×PBS (pH 7.4)封阻2小時。在如上所述洗滌後，將板於37°C下在真空下乾燥4小時。隨後於4°C下將板乾燥儲存。

對於三明治ELISA而言，標準品係rFL-Cys B或來自MDCK細胞沈澱之洗滌劑溶解物。藉由LCMS方法量化兩種標準製劑。將尿試樣用緩衝液A (0.1M磷酸鹽，pH 7.2，至少含有1.0% *N*-正十二烷醯基-*N*-甲基甘胺酸鈉鹽(Sarkosyl, Sigma))1:20稀釋。將血清試樣在緩衝液A中至少1:50稀釋且如上所述一式兩份地向孔中添加100 ul。一式兩份地向多株抗體捕獲孔中添加100微升(100ul)並培育1小時，於RT下振

盪。隨後將板用 PETCHEK® 洗滌液 (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) 洗滌6次並添加100 ul 0.25-2 ug/ml之HRP標記之單株檢測抗體。將檢測抗體在振盪下培育30分鐘，之後6次洗滌，並向孔中添加100 ul基材TMB。使顏色顯影5分鐘，之後100 ul停止溶液(1N HCL)。在VMAX®微板讀數器中對板進行讀數。使用Sigma曲線中之4PL參數擬合量化未知元。

實例6：人類Cys-B之檢測

此實例展現使用抗犬Cys B抗體之人類Cys B之檢測的ELISA之構築。自Genscript, USA獲得重組人類胱抑素B (rH FL Cys B)蛋白(SEQ ID NO:14)。

```
>sp|P04080|CYTB_人類胱抑素-B OS=智人 GN=CSTB PE=1 SV=2
MMCGAPSATQPATAETQHIADQVRSQLEEKENKKFPVFKAVSF
KSQVVAGTNYFIKVHVG
DEDFVHLRVFQSLPHENKPLTLSNYQTNKAKHDELT YF [SEQ
ID NO:14]
```

藉由三明治ELISA評價rH FL Cys B蛋白與針對犬胱抑素B之抗體之交叉反應。簡言之，針對重組全長犬胱抑素B序列(rC FL胱抑素B)之小鼠單株抗體用作捕獲試劑且針對ELISA中結合多個重組FL Cys B抗原之能力進行篩選。所篩選檢測試劑係兔多株N-末端抗犬胱抑素B抗體及辣根過氧化物酶抗物種IgG (H及L)。發現提供ELISA中之劑量依賴性曲線之一系列成對試劑。如下表8中所示，在小鼠中針對與抗犬N-末端胱抑素B多株抗體327 (兔中針對CAIADQVKA (SEQ ID NO:7))、328 (兔中針對CGAPSASQPATADTQAIA (SEQ ID NO:5))或329 (兔中針對CGAPSASQ (SEQ ID NO:6))配對以形成三明治ELISA之犬C-末端「肽9」(QTNKAKHDELT YF (SEQ ID NO:4)) (IF10、2B5及9A10)中生成三種單株抗體。另外，該等對結合Rat及小鼠rF1胱抑

素B蛋白。

表8：犬試劑之配對以與人類、大鼠及小鼠重組胰抑素B蛋白形成三明治

固相單株	檢測多株	犬rFL Cys B	人類rFL Cys BL	大鼠rFL Cys B	小鼠rFL Cys B
IF10	327	3.8	0.7	2.8	3.2
mAb	328	3.4	0.1	1.	2.
	329	0.0	0.1	0.1	0.1
2B5	327	3.8	1.0	3.2	3.5
mAb	328	3.5	0.3	2.	3.
	329	0.1	0.1	0.1	0.1
9A10	327	3.6	0.6	2.6	3.5
mAb	328	3.3	0.1	1.	3.
	329	0.1	0.2	0.1	0.2

使用N-末端兔多株抗體327作為固相捕獲，分析針對犬胰抑素B C-末端「肽9」 QTNKAKHDELAYF (SEQ ID NO:4)產生之單株小鼠抗體與rH FL胰抑素B之結合。參見表9。如下表10中所示，一種C-末端單株抗體(9A10)形成三明治，而另一C-末端單株抗體(2B5)不形成三明治。定位該等單株抗體之特異性且9A10單株識別人類及犬胰抑素B二者之同源序列。針對與固相結合之多株抗體327配對之rFL犬胰抑素B的3H4單株抗體顯示與人類及犬rFL胰抑素B二者之結合(表11)。

表9.

胰抑素B C-末端序列		
犬	QTNKAKHDELAYF	SEQ ID NO:4
人類	QTNKAKHDELTYF	SEQ ID NO:15

表10：胰抑素B兔多株及小鼠單株抗體之表位定位。

肽序列	抗肽抗體		
	多株	單株	
	抗Pep 9	2B5	9A10
QTNKAKHDELAYF SEQ ID NO:4	3.4	2.5	2.8
QTNKAKHDELAY SEQ ID NO:16	3.4	0.2	2.8
QTNKAKHDELA SEQ ID NO:17	3.1	0.2	2.4
QTNKAKHDEL SEQ ID NO:18	2.3	0.1	0.1
QTNKAKHDE SEQ ID NO:19	2.3	0.2	0.1
對於表位必需之殘基		YF	AYF

表11：

		rFL-胰抑素B	
捕獲	偶聯物	人類	犬
327	3H4	0.911	2.102
	9A10	0.829	1.584
	2B5	0.065	0.065
	327	0.077	1.211

可使用對於犬Cys B具有特異性之抗體以檢測人類Cys B。具體而言，可使用結合至包含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)或其部分之表位之抗體或其特異性結合片段以檢測人類及犬Cys B。

實例7：犬及貓尿中參考範圍之測定

在2年期限內在本地家畜醫院收集犬及貓之尿試樣。將尿分成等份並冷凍直至使用。使用實例3中所述之ELISA分析針對胱抑素B量測解凍之尿試樣。自健康動物確立參考範圍，該等健康動物在家畜檢查時無腎臟病症之適應症，例如表明CKD、尿道結石之病史或顯現、或尿道感染之血清肌酸酐或SDMA含量。因此，使用總共280隻健康犬及42隻健康貓且對於每一物種使用平均值+ 3標準偏差(Std Dev)測定257 ng/ml之參考範圍。參見圖6。因此，正常、健康範圍係約0 ng/ml至約257 ng/ml (例如約0、5、10、20、50、75、100至約200、210、225、250或257 ng/ml)。高於257 ng/ml之值(例如約257、260、270、280、290、300 ng/ml及以上)指示腎臟疾病。

實例8：犬AKI群體中之胱抑素B

在胱抑素B ELISA中運行25個來自患有臨床確認之AKI之狗及健康狗之匹配尿及血清試樣(實例5)。AKI患者之病因包括(例如)腎中毒藥物、蛇咬傷、日射病、乙二醇暴露及傳染病。如圖7A-B及表12-13中所示，與健康狗及CKD患者相比，在診斷患有AKI之患者中，尿及血清胱抑素B含量顯著增加。

表 12

sCysB 之變異性概述		ng/mL									
		平均值	標準 偏差	標準誤差 平均值	95%之 下限	95%之 上限	最小值	最大值	範圍	中值	觀察
sCysB	ng/mL	1076.048	1225.574	267.4422	518.1729	1633.922	113	4175	4062	642	21
診斷	[AKI]	2065.625	1509.591	533.7209	803.5756	3327.674	604	4175	3571	1763	8
診斷	[CKD]	628	353.9148	125.1278	332.1198	923.8802	200	1348	1148	608	8
診斷	[HEALTHY]	2096	67.21086	30.05761	126.1467	293.0533	113	291	178	206	5

表 13

uCysB 之變異性概述		ng/ml									
		平均值	標準 偏差	標準誤差 平均值	95%之 下限	95%之 上限	最小值	最大值	範圍	中值	觀察
uCysB	ng/ml	525.8	676.3851	151.2443	209.242	842.358	14	2803	2789	2895	20
診斷	[AKI]	928.2857	1001.605	378.5712	1.955283	1854.616	14	2803	2789	704	7
診斷	[CKD]	449.25	264.6473	93.56696	227.9993	670.5007	87	862	775	461	8
診斷	[HEALTHY]	84.8	86.08833	38.49987	-22.0928	191.6928	20	236	216	52	5

實例9：傳染病中之胱抑素B

動物中之尿系統之大部分傳染病係好氧性細菌感染。常見生物體包括大腸桿菌、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、腸球菌(*Enterococcus*)及鏈球菌(*Streptococcus*)。引起感染之較不常見生物體包括克留氏菌(*Klebsiella*)、變形桿菌(*Proteus*)及假單胞菌(*Pseudomonas*)。支原體(*Mycoplasma*)係尿道感染之不常見病因且通常發現為與細菌共感染。鉤端螺旋體病(*Leptospirosis*)係由侵襲腎及許多其他器官之絲狀鉤端螺旋體(*Leptospira*)細菌引起之世界範圍內之動物傳染病。立克次體(*Rickettsial*) (立克次體病)及相關疾病(邊蟲病(*anaplasmosis*)、埃利希氏體症(*ehrlichiosis*)、Q熱、叢林斑疹傷寒(*scrub typhus*))係由革蘭氏陰性、轉性細胞內球桿菌之群引起。巴貝蟲(*Babesia*)、即蜱傳播之疾病亦參與腎臟疾病。

實例10：尿道感染中之胱抑素B

在胱抑素B分析中運行來自各自具有臨床確認之尿道感染(UTI)之10隻狗及10隻健康隊列之尿試樣。藉由陽性培養物及臨床檢查確認UTI。來自UTI之干擾係先前已知AKI標記物之特異性之主要問題。圖

8展現胱抑素B含量顯示健康與下尿路感染患者之間無顯著差異。因此，可使用胱抑素B標記物以區分AKI與UTI。

實例11：貓腎病中之胱抑素B

自本地家畜診所獲得來自4隻診斷患有腎臟疾病之貓及3個健康對照之尿試樣，且將其在胱抑素B分析中運行。4隻患有腎臟疾病之貓中之每一者中之尿胱抑素B濃度皆超過257 ng/ml之參考間隔。3個健康對照中之每一者中之尿胱抑素B濃度皆在參考間隔內。參見表14。胱抑素B係貓中腎臟疾病之標記物。

表14.

尿胱抑素B ng/mL	血清肌酸酐 mg/dL	SDMA (ug/dL) 或其 他測試，如所指示	診斷
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)	腎臟疾病
1513	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿蛋白30 mg/dL；尿 250個紅血球/uL	腎臟疾病
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	腎臟疾病
329	2.0 (02/13/2013) 2.4 (03/20/2014) 3.1 (10/06/2015)	尿蛋白30 mg/dL；尿 250個紅血球/uL	腎臟疾病
73	N/D	N/D	健康
50	N/D	N/D	健康
48	N/D	N/D	健康

N/D = 未測定.

實例12：綿羊中之抗胱抑素B抗體

使用兩隻綿羊以產生針對SEQ ID NO:4之綿羊多株抗體。將肽偶聯至KLH並在氟氏完全佐劑中乳化。使用標準200天方案。比較綿羊血清中之抗體反應與兔血清之抗體反應。即使綿羊處於免疫方案之早期階段，亦在綿羊中觀察到相似效價。綿羊中生成之抗體可用於Cys B多肽之檢測。

表15.

稀釋度	兔	綿羊
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

實例13：CKD患者中之人類尿胱抑素B檢測：

自診斷有階段4 CKD之人類患者收集尿。將尿連續稀釋並在胱抑素B尿ELISA中運行。比較兩種抗胱抑素B單株抗體(3H4 (參見實例2及3)及9A10 (參見實例6))。如圖9中所示，人類尿試樣產生較犬AKI試樣高含量之胱抑素B、及較犬陰性對照高之含量。另外，不同抗胱抑素B單株顯示不同反應，此推測係由於表位結合之利用度。因此，可在人類中使用對胱抑素B具有特異性之抗體診斷腎臟疾病(包括CKD)。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 瑪哈拉克史密 埃拉米利
吉歐西 法埃克
約翰 約瑟夫 奎因
墨非 VSN 埃拉米利

<120> 用於檢測及診斷腎臟疾病及牙周病之方法及組合物

<130> 16-179-TW

<150> 62/302,299

<151> 2016-03-02

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 77

<212> PRT

<213> 家犬

<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

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> 家犬

<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> 家犬

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> X代表任何胺基酸

<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

Tyr Phe

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

<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> 家犬

<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> 家犬

<400> 6

Cys Gly Ala Pro Ser Ala Ser Gln
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 7

Cys Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala
1 5

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 家犬

<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
<212> PRT
<213> 家犬

<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> 家犬

<400> 10

Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe
1 5

<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 家犬

<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> 家犬

<400> 12

Ala Ile Ala Asp Gln Val Lys Ala
 1 5

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

<400> 13

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

Asp Asp

<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> 家犬

<400> 16

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

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 家犬

<400> 17

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

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 家犬

<400> 18

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

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 家犬

<400> 19

Gln Thr Asn Lys Ala Lys His Asp Glu
1 5

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 家犬

<400> 20

Leu Ala Tyr Phe
1

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 家犬

<400> 21

Glu Leu Ala Tyr Phe
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 22

Asp Glu Leu Ala Tyr Phe
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 23

His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 24

Ala Lys His Asp Glu Leu Ala Tyr Phe
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 25

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

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 26

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

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 家犬

<400> 27

201736850

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

申請專利範圍

1. 一種檢測試樣中胱抑素B多肽之方法，其包含以下步驟：在適於形成該等胱抑素B多肽與該一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽抗體的複合物之條件下，使該試樣與一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽的抗體接觸；及檢測胱抑素B多肽與該一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之抗體的該等複合物。
2. 一種診斷個體之腎臟疾病之方法，其係藉由以下實施：
 - (a) 測定該個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中該等胱抑素B多肽之量係使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之抗體測定；及
 - (b) 比較該試樣中該等胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與該對照試樣或對照標準品相比，該試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示腎臟疾病。
3. 一種治療個體之腎臟疾病之方法，其包含：需要提供可用於使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之抗體測定該個體之

試樣中胱抑素B多肽之量之分析結果的測試，及若與用於該腎臟疾病之對照試樣或對照標準品相比，該試樣含有升高量之胱抑素B多肽，則向該個體投與針對經降低腎功能之治療。

4. 一種診斷個體之牙周病之方法，其係藉由以下來實施：

(a) 測定該個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中該等胱抑素B多肽之量係使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之抗體測定；及

(b) 比較該試樣中該等胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與該對照試樣或對照標準品相比，該試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示該個體之牙周病。

5. 一種區分上尿路感染與下尿路感染之方法，其包含：

(a) 測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中該等胱抑素B多肽之量係使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之抗體測定；及

(b) 比較該試樣中該等胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與該對照試樣或對照標準品相比，該試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示該個體之上尿路感染。

6. 一種區分急性腎損傷與下尿路感染之方法，其包含：

(a) 測定個體之試樣中胱抑素B多肽之量，其中該等胱抑素B多肽之量係使用一或多種特異性結合一或多種由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組成之多肽之

抗體測定；及

(b) 比較該試樣中該等胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與該對照試樣或對照標準品相比，該試樣中胱抑素B多肽之升高含量指示該個體之急性腎損傷。

7. 如請求項2或3之方法，其中該腎臟疾病係由慢性腎病患者中之急性腎損傷或活動性腎損傷、進行性慢性腎病、急性腎損傷或細菌感染引起。
8. 如請求項2或3之方法，其中該腎臟疾病並非由癌症引起。
9. 如請求項7之方法，其中該細菌感染係由微粒孢子蟲屬 (*Anaplasma sp.*)、埃利希氏體屬 (*Ehrlichia sp.*)、鉤端螺旋體屬 (*Leptospira sp.*)、埃希氏菌屬 (*Escherichia sp.*)或疏螺旋體屬 (*Borrelia sp.*)引起。
10. 如請求項1、2、3、4、5或6之方法，其中該等胱抑素B多肽之量係藉由檢測胱抑素B多肽與該一或多種特異性結合一或多種由 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組成之多肽之抗體的複合物來測定。
11. 如請求項1、2、3、4、5或6中任一項之方法，其中該等抗體固定至固體載體。
12. 如請求項1、2、3、4、5或6中任一項之方法，其中該等抗體偶聯至一或多種標記。
13. 如請求項10之方法，其進一步包含使胱抑素B多肽與一或多種對一或多種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之多肽具有特異性之抗體的該等複合物與指示劑接觸。
14. 如請求項1、2、3、4、5或6中任一項之方法，其中該一或多種

抗體特異性結合一或多種由SEQ ID NO: 5、6、7、11或13組成之多肽。

15. 如請求項1、2、3、4、5或6中任一項之方法，其中該個體係非人類動物。
16. 如請求項1、2、3、5或6中任一項之方法，其中該試樣係血液、血清、血漿或尿。
17. 如請求項4之方法，其中該試樣係唾液、血小板、溝縫滲出液、牙齦活組織切片或舌拭子。
18. 如請求項1、2、3、4、5或6中任一項之方法，其中該等胰抑素B多肽或胰抑素B多肽之量係藉由免疫分析、競爭性免疫分析、三明治免疫分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、濁度計免疫分析、粒子增強之濁度計免疫分析、放射性免疫分析(RIA)或西方墨點分析來測定或檢測。
19. 一種經分離抗體，其特異性結合至一或多種由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組成之多肽。
20. 如請求項19之經分離抗體，其中該抗體特異性結合至一或多種由SEQ ID NO: 4、5、6、7、8、9、11或13組成之多肽。
21. 如請求項19之經分離抗體，其中該經分離抗體：
 - (a) 經凍乾、烘乾或乾燥；
 - (b) 偶聯至標記；
 - (c) 固定至固體載體；
 - (d) 特異性結合至由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組成之多肽；或
 - (e) 固定至固體載體且特異性結合至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中所示之多肽。
22. 一種用於診斷腎病、慢性腎病患者中之急性腎損傷或活動性腎損傷、急性腎損傷、進行性慢性腎病、上尿路感染或牙周病之套組，該套組包含：
- (a) 一或多種抗體，該抗體特異性結合至一或多種由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組成之多肽；及
 - (b) 一或多種有利於該一或多種抗體與個體試樣中存在之胱抑素B多肽之結合的試劑。
23. 一或多種經分離多肽，其由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組成。
24. 如請求項23之一或多種經分離多肽，其中該等多肽：
- (a) 經凍乾、烘乾或乾燥；
 - (b) 偶聯至標記；
 - (c) 固定至固體載體；
 - (d) 特異性結合至一或多種抗體，該抗體特異性結合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中所示之一或多種多肽。
25. 一種診斷人類個體之腎臟疾病之方法，其係藉由以下來實施：
- (a) 測定該個體之試樣中胱抑素B多肽之量；及
 - (b) 比較該試樣中該等胱抑素B多肽之量與對照試樣或對照標準品，其中與該對照試樣或對照標準品相比，該試樣中胱抑素B

多肽之升高含量指示腎臟疾病。

26. 一種免疫複合物，其包含：(i) 一或多種經分離抗體，該抗體特異性結合至一或多種由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組成之多肽，及(ii) 一或多種特異性結合至該一或多種經分離抗體之多肽。
27. 如請求項26之免疫複合物，其中該免疫複合物固定至固體載體。

圖式

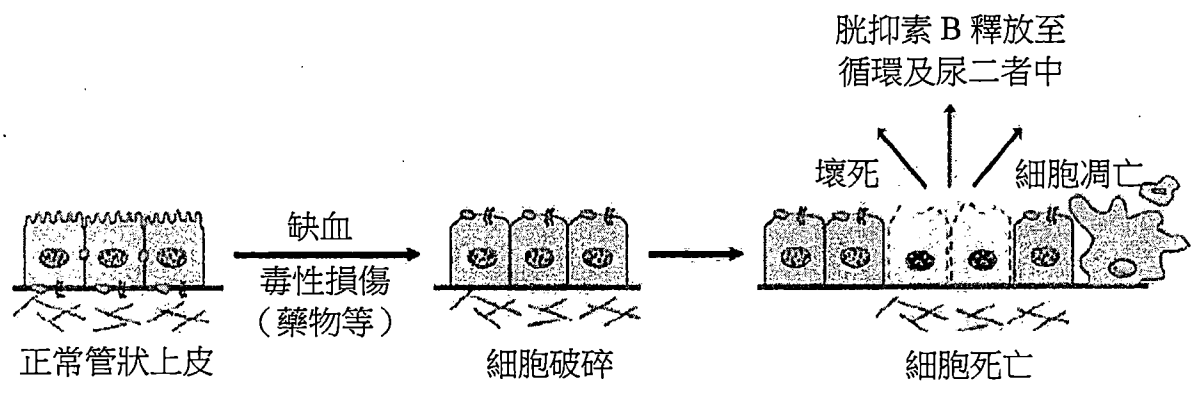


圖 1

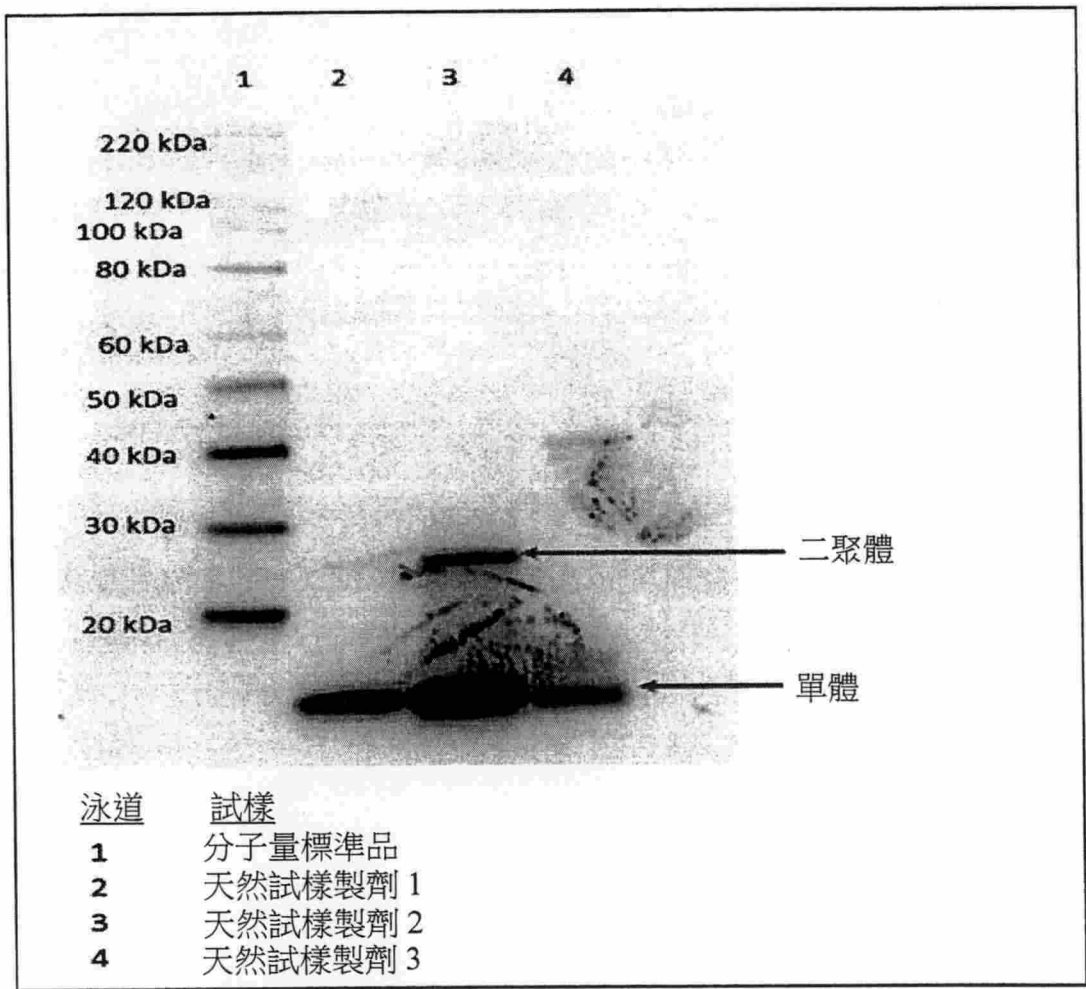


圖 2

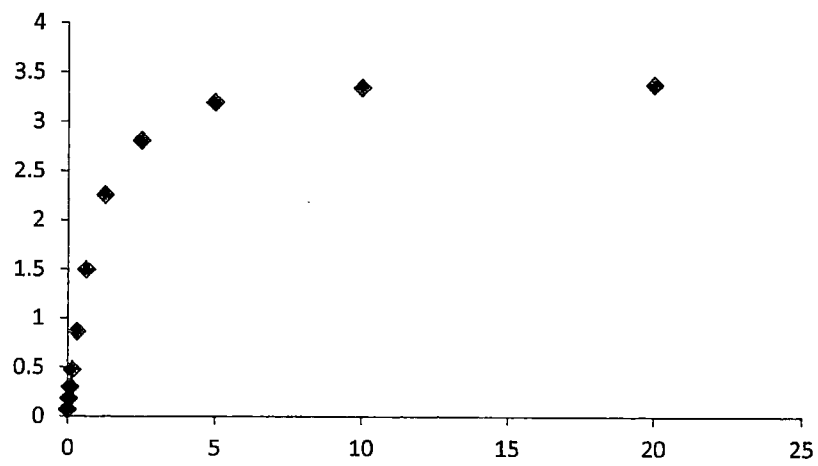


圖 3

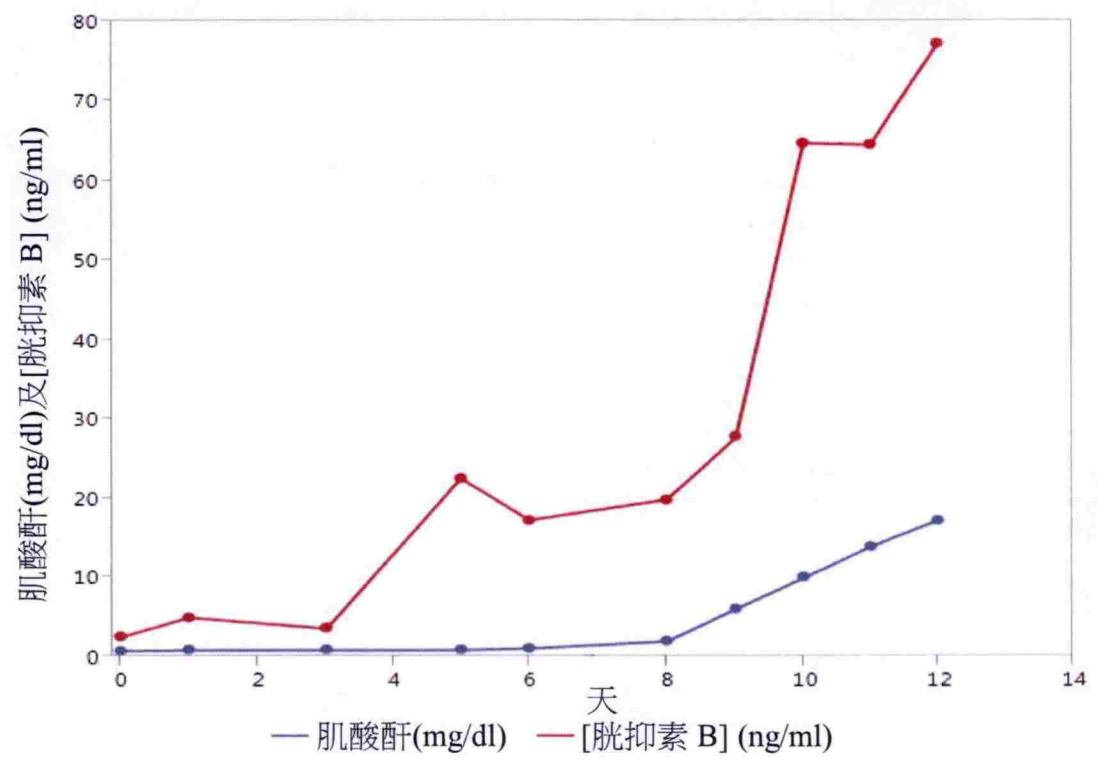


圖 4

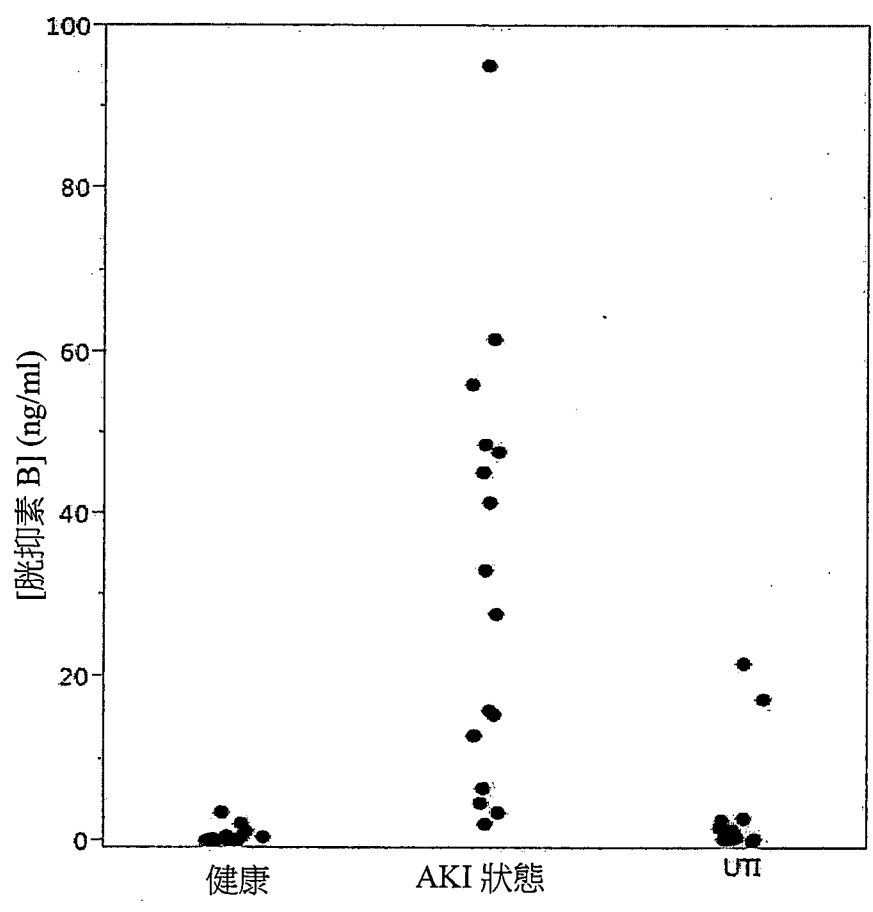
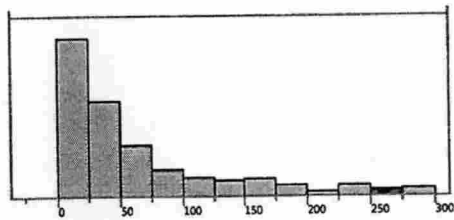


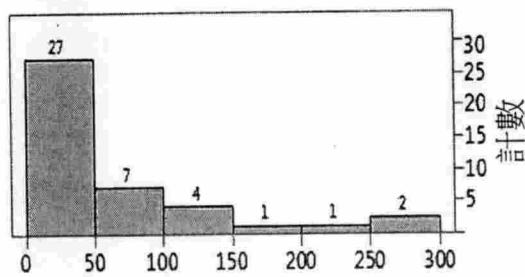
圖 5

A: 犬參考範圍



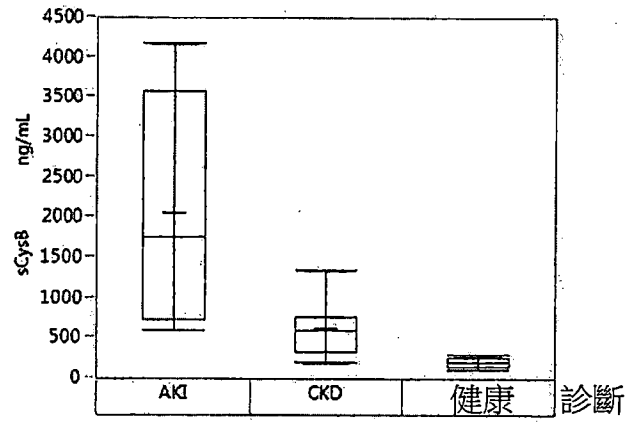
平均值	59.757143
標準偏差	66.055464
標準誤差平均值	3.947569
平均值之 95%之上限	67.527945
平均值之 95%之下限	51.986341
N	280

B: 貓參考範圍

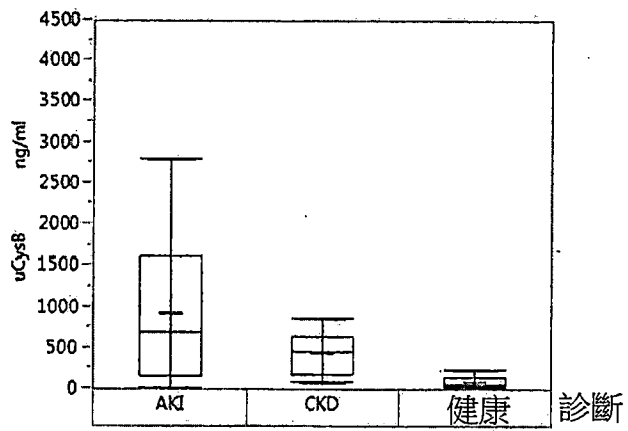


平均值	56.642857
標準偏差	67.102696
標準誤差平均值	10.354171
平均值之 95%之上限	77.553529
平均值之 95%之下限	35.732185
N	42

圖 6



A.



B.

圖 7

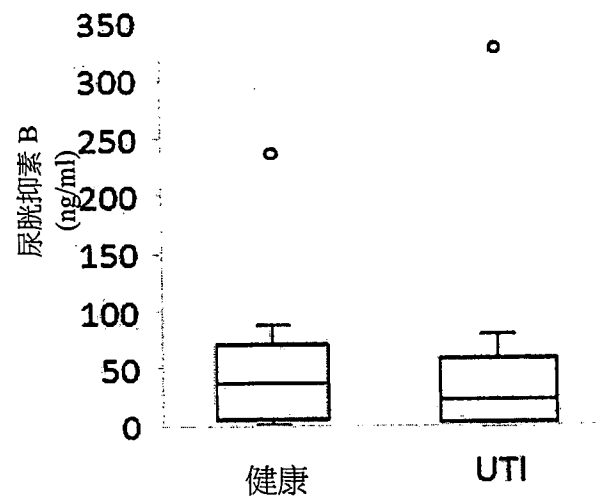


圖 8

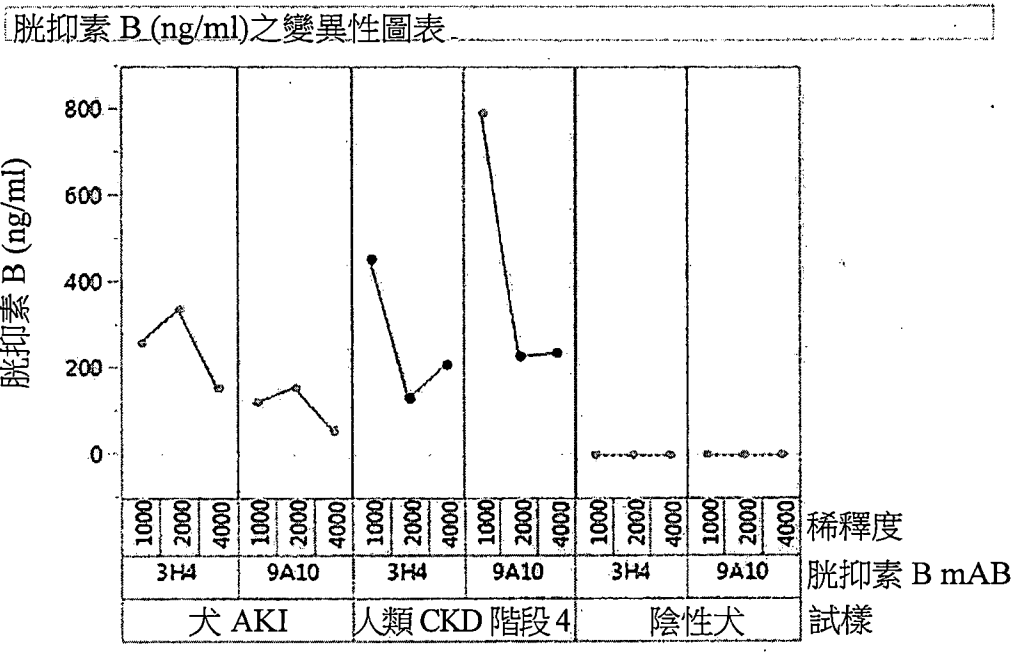


圖 9