(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103917869 A

(43)申请公布日 2014.07.09

(21)申请号 201180074742.3

(22)申请日 2011.09.22

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2011/054187 2011.09.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/041913 EN 2013.03.28

(71)申请人 洛斯安第斯大学
地址 智利圣地亚哥

(72)发明人 C.E. 伊拉拉扎巴尔穆诺兹

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 贾静环

(51)Int.Cl.
G01N 33/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
C12Q 1/00(2006.01)

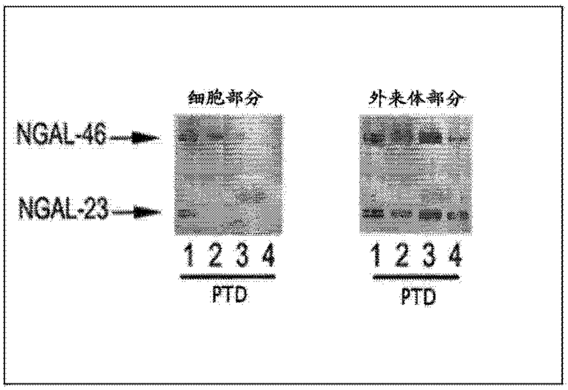
权利要求书2页 说明书30页 附图4页

(54)发明名称

用于监测、诊断和/或预后早期急性肾损伤的方法

(57)摘要

本发明涉及用于在患有早期急性肾损伤的受试者中监测、诊断、预后所述早期急性肾损伤以及确定疗法的方法和试剂盒。该方法包括以下步骤：a)提供尿样；b)使用至少一个免疫纯化步骤使所述尿样富集存在于尿样中的外来体；c)检测外来体中急性肾损伤(AKI)标记物。



CN 103917869 A

1. 用于在患有早期急性肾损伤的受试者中监测、诊断和 / 或预后所述早期急性肾损伤以及确定疗法的方法，所述方法包括以下步骤 ：

(a) 提供尿样 ；

(b) 使用至少一个免疫纯化步骤使所述尿样富集存在于所述尿样中的外来体 ；

(c) 检测和 / 或定量外来体中急性肾损伤 (AKI) 标记物。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述免疫纯化步骤的进行是采用针对优先并差异表达于不同肾脏结构的表面中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中所述用于免疫纯化步骤的抗体选自抗水通道蛋白 1(抗 AQP1)、抗水通道蛋白 2(抗 AQP2) 和抗水通道蛋白 3(抗 AQP3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述用于免疫纯化步骤的抗体针对水通道蛋白 1(AQP1)、水通道蛋白 2(AQP2)、水通道蛋白 3(AQP3)、NKCC2、NHE-3 和 NaPiII 的任意域。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中使所述尿样富集外来体包括在免疫纯化之前，用于富集外来体的至少一个进一步的手段。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中用于使所述尿样富集外来体的进一步的手段为离心步骤、微量过滤步骤或其组合，因此产生脱细胞尿样。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中所述离心是在 5000 至 10000rpm 进行 5 至 30 分钟。

8. 根据权利要求 6 或 7 的方法，其中所述离心步骤是在两阶段中进行。

9. 根据权利要求 8 的方法，其中第二离心步骤是在 30000 至 45000rpm 进行 30 至 120 分钟的超速离心步骤，因此产生总外来体部分。

10. 根据权利要求 6 的方法，其中所述微量过滤步骤使用最高达 0.22 微米的微量过滤器，因此产生脱细胞尿样。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中所述急性肾损伤标记物选自 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18 或其组合。

12. 根据权利要求 1 的方法，其中通过采用抗 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18 的一级抗体的免疫反应来进行检测。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中所述一级抗体是标记的。

14. 根据权利要求 1 的方法，其中通过检测针对一级抗体的经标记二级抗体来进行检测，所述一级抗体针对 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18。

15. 根据权利要求 12 或 13 的方法，其中所述抗体标记物选自酶、荧光化合物、红外化合物、放射性化合物、化学化合物。

16. 根据权利要求 15 的方法，进一步包括在受试者中评价急性肾损伤的步骤，其用于根据所述特定肾损伤标记物的存在和 / 或水平监测、诊断、预后和 / 或确定受试者中的疗法。

17. 用于评价早期急性肾损伤的试剂盒，所述试剂盒包括 ：

(a) 用于使用至少一个免疫纯化步骤使尿样富集外来体的手段 ；

(b) 检测急性肾损伤 (AKI) 标记物的手段。

18. 根据权利要求 17 的试剂盒，进一步包括 (c) 用于获得尿样的手段。

19. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中用于所述免疫纯化步骤的所述抗体选自抗水通

道蛋白 1(抗 AQP1)、抗水通道蛋白 2(抗 AQP2) 和抗水通道蛋白 3(抗 AQP3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合。

20. 根据权利要求 19 的试剂盒，其中用于所述免疫纯化步骤的所述抗体针对水通道蛋白 1(AQP1)、水通道蛋白 2(AQP2)、水通道蛋白 3(AQP3)、NKCC2、NHE-3 和 NaPiII 的任意域。

21. 根据权利要求 20 的试剂盒，其中使所述尿样富集外来体包括在免疫纯化之前，用于富集外来体的至少一个进一步的手段。

22. 根据权利要求 21 的试剂盒，其中所述用于使所述尿样富集外来体的手段选自容器、实验室管、离心管、抗体、免疫反应缓冲液、阻断剂或溶液、特定肾损伤标记物的储备溶液、微量过滤器、用抗体覆盖的 96 孔板或其组合。

23. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中用于检测急性肾损伤标记物的所述手段为抗体，所述抗体选自抗 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18 的抗体或其组合。

24. 根据权利要求 23 的试剂盒，其中所述抗体是标记的。

25. 根据权利要求 23 的试剂盒，进一步包括针对一级抗体的经标记二级抗体，所述一级抗体针对 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18 或其组合。

26. 根据权利要求 24 或 25 的试剂盒，其中所述抗体中的标记物选自酶、荧光化合物、红外化合物、放射性化合物、化学化合物。

27. 根据权利要求 26 的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包括用于使用所述试剂盒的说明。

28. 纯化尿外来体的方法，所述方法包括以下步骤 ：

(a) 采用针对优先并差异表达于不同肾脏结构的表面中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体温育尿样或任选的脱细胞尿样，从而形成外来体 - 抗体复合物 ；

(b) 采用识别所述抗体的任意域并结合至不溶性试剂的标签温育获得自 (a) 的所述外来体 - 抗体复合物，从而形成外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物 ；

(c) 从上清液分离所述外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物 ；

(d) 用充足缓冲液洗涤所述外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中所述抗体选自抗水通道蛋白 1(抗 AQP1)、抗水通道蛋白 2(抗 AQP2) 和抗水通道蛋白 3(抗 AQP3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合。

30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述抗体针对水通道蛋白 1(AQP1)、水通道蛋白 2(AQP2)、水通道蛋白 3(AQP3)、NKCC2、NHE-3 和 NaPiII 的任意域。

31. 针对优先并差异表达于不同肾脏结构的表面中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体或抗体组合的用途，其中所述抗体用于免疫纯化尿外来体。

32. 选自抗水通道蛋白 1(抗 AQP1)、抗水通道蛋白 2(抗 AQP2) 和抗水通道蛋白 3(抗 AQP3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合的抗体或抗体组合的用途，其中所述抗体用于免疫纯化尿外来体。

33. 针对水通道蛋白 1(AQP1)、水通道蛋白 2(AQP2)、水通道蛋白 3(AQP3)、NKCC2、NHE-3 和 NaPiII 的任意域的抗体或抗体组合的用途，其中所述抗体用于免疫纯化尿外来体。

用于监测、诊断和／或预后早期急性肾损伤的方法

技术领域

[0001]　本发明涉及用于在患有早期急性肾损伤的受试者中监测、诊断和／或预后所述早期急性肾损伤和确定疗法的方法和试剂盒。

背景技术

[0002]　肾脏是一种在身体中提供多种功能的器官，其中包括清除代谢期间产生的身体废物和使身体必需的物质回到血液，因此还调节体液的容量和组成。身体水电解质平衡的保持归因于肾功能（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）。

[0003]　在许多国家肾病是最重要的死亡原因中的一种。早在 1994 年，在美国有超过 1500 万人呈现肾病，导致患者生活质量恶化和死亡（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）。

[0004]　肾病的临床表现可被分入良好定义的综合征。一些对于肾小球疾病是特定的而其它的存在于影响任意肾脏结构的疾病中。在许多国家，这些疾病是主要发病和死亡的原因之一（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）。

[0005]　严重肾病可分为两个主要类别：

[0006]　病理学

[0007]　肾衰竭是其中肾脏不能适当运转从而肾小球滤过率减小的临床病症。临床上此缺陷分为两类：急性肾损伤（AKI）和慢性肾衰竭（CRF）（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）。

[0008]　肾衰竭

[0009]　急性肾损伤

[0010]　其症状中包括少尿或无尿（尿排泄减少或消失），伴随氮质血症，其对应于血液中氮化产物的蓄积。代谢废物也因为水潴留而蓄积，该潴留决定了液体和盐类的超负荷，其导致水肿和高血压。

[0011]　此症状一个最大的威胁是钾潴留（高钾血），超过 8mEq/L，其可为致命的。肾脏不分泌正常量的氢离子，导致表现代谢性酸中毒。

[0012]　若此疾病未解决而持续，其可达到完全无尿，其可导致 8 至 14 天内死亡（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）。

[0013]　AKI 被分为 3 个主要类别：肾前性、肾内性和肾后性。

[0014]　表 1. 急性肾损伤的原因（Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana）

[0015]

肾前性急性肾损伤的一些原因	
血管内容量亏损	出血(创伤性、手术性、分娩性、消化性)
	腹泻
	烧伤

[0016]

肾前性急性肾损伤的一些原因	
原发性肾血流动力学障碍	肾动脉狭窄
	肾动脉或静脉栓塞或血栓形成
	前列腺素合成(阿司匹林)的过度阻断
外周血管舒张以及所导致的低血压	过敏性休克、败血症、严重感染
	麻醉
肾内性急性肾损伤的一些原因	
小血管、肾小球或二者的损伤	血管炎(结节性多动脉炎)
	胆固醇栓
	恶性高血压
	急性肾小球肾炎
肾小管上皮细胞损伤(肾小管坏死)	缺血性急性肾小管坏死
	毒素(重金属、乙二醇、杀虫剂、毒蘑菇、四氯化碳)导致的急性肾小管坏死
肾间质损伤	急性肾盂肾炎
	急性过敏性间质性肾炎

[0017]

肾后性急性肾损伤的一些原因	
输尿管或肾盂双侧梗阻	肾结石
	血凝块
膀胱梗阻	
输尿管梗阻	

[0018] 在工业化国家中，AKI 是一种主要在医院中获得并源自若干因素的病理学病症，所述因素例如败血症、外科手术，特别是心脏外科手术、局部缺血、给药肾毒素，因此，存在对于现代诊断技术以及用于预防和减小 AKI 影响的治疗的需求 (Vukusich A.，Alvear F.，Villanueva P.，Gonzalez C.，Olivari F.，Alvarado N.，Zehnder C.2004，Rev.Med.Chile，132:1355-1361)。

[0019] 大多数发展 AKI 的患者恢复可接受水平的肾功能，因此它们不依赖于透析，尽管 10 至 20％的这些患者最终需要永久性透析 (Fauci，A.2009，Harrison，Principles of intern medicine.Mexico，F.D.Interamericana－McGraw Hill)。介于 5 至 7％的住院患者具有与 AKI 发作相关的并发症，导致 ICU 中 30％的开支 (Fauci，A.2009，Harrison，Principles of intern medicine.Mexico，F.D.Interamericana－McGraw Hill)。AKI 是一种严重的问题，因此，致力于发展病理学的早期干预，特别是在高风险患者，例如 ICU 患者中 (Vukusich A.，Alvear F.，Villanueva P.，Gonzalez C.，Olivari F.，Alvarado N.，Zehnder C.2004，Rev.Med.Chile，132:1355-1361；Schrier R.2010，Nat.Rev.Nephrol，6:56-59)。

[0020] 慢性肾衰竭

[0021] 如前所述，慢性肾衰竭是大量功能性肾单位不可逆损失的结果。

[0022] 肾脏功效使人们可保持大多数电解质的相对正常的血液浓度以及适当的体液容量，此时功能性肾单位的数目保持在正常的 20 至 30％以上。高于此数字时不存在严重的临床症状 (Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana)。

[0023] 其中慢性肾衰竭最重要的原因描述在表 2 中。

[0024] 表 2. 慢性肾机能不全的原因 (Guyton A.，Hall J.E.2001，Medical Physiology Treaty，第 10 版 .Mexico DF，Mexico:McGraw-Hill Interamericana)

[0025]

代谢紊乱	糖尿病
	淀粉样变性
肾血管紊乱	动脉粥样硬化
	肾硬化-高血压
免疫紊乱	肾小球肾炎
	结节性多动脉炎
	红斑狼疮
感染	肾盂肾炎
	结核
原发性肾小管紊乱	肾毒素(镇痛药、重金属)
尿路梗阻	肾结石
	前列腺肥大
	尿道狭窄
先天性疾病	多囊性疾病
	肾组织先天性缺失(肾发育不全)

[0026]　终末期肾病(ESRD)

[0027]　在许多情况下，肾脏的初始损伤导致肾功能的进行性恶化以及肾单位的持续损失，达到患者必须参加透析项目或肾移植以存活的程度。此病症称为慢性肾衰竭(Kumar V.,Cotran R.2000,Structural and Functional Pathology of Robbins,第6版,Madrid,Spain:Elsevier)。

[0028]　表3.ESRD最常见的原因(Kumar V.,Cotran R.2000,Structural and Functional Pathology of Robbins,第6版,Madrid,Spain:Elsevier)

[0029]

原因	具有ESRD的全部患者的百分数(%)
糖尿病	41

高血压	28
肾小球肾炎	11
多囊肾病	3
其它／未知	18

[0030] 肾移植

[0031] 肾移植是对于ESRD最为有效的疗法。移植的成功取决于许多因素例如供体类型。肾移植来自供体，所述供体可为死的或活的。所有移植器官由于与移植相关的局部缺血和再灌注过程而受到急性损伤。

[0032] 活供体移植是用于治疗末期慢性肾衰竭（特别是在年轻患者中）的出色治疗选择。其可遵循确定的移植前规程以帮助器官的更好存活，连同短的局部缺血时间（小于30分钟）。存活变为高于10年且相比于采用来自尸体供体的器官移植而言存活高出17至20％。

[0033] 在尸体供体移植的情况下，患者进入等候名单且选择的进行考虑到ABO和HLA相容程度。选择标准为年龄、供体和受体身体质量指数间的相似性，若其对应于首次移植以及若该移植为一个肾或两个。在此情况下器官局部缺血时间可增加数小时（甚至1或2天），其增加了移植器官的恶化。还存在进一步的并发症，如对于慢性透析患者。

[0034] 肾移植患者需要细心监测，最初在特护病房(ICU)或移植单位中且之后住院或门诊。监测期间可能发生数种手术或医疗并发症。虽然一些并发症是早发的并可当仍禁闭在ICU或移植单位中时得到治疗，但此监测应当延长贯穿患者的一生，因为有些并发症甚至可在接受移植后漫长时间后出现（晚期并发症）。移植物功能期间，有必要给予免疫抑制疗法以增加移植器官的存活、患者的存活以及改善他／她的生活质量。此疗法根据各患者的临床和血清学状况进行调整。连同免疫抑制剂，在肾移植的长期监测内应考虑到其它方面，其包括鼓励患者遵循健康的生活方式、在24小时尿中监测蛋白尿和肌酐、高脂血治疗的给药、血压控制、重新糖尿病的可能发生以及在移植物功能障碍的情况下慢性肾衰竭的可能发生。

[0035] 肾移植患者是人类AKI的良好模型。这些患者具有无可能改变经研究生物标记物的其它病理学的优点。然而，它们具有在免疫抑制药理学下的缺点。

[0036] 急性肾损伤(AKI)的诊断

[0037] 急性肾损伤(AKI)取决于对应于肾功能恶化的阶段而可分为不同水平。

[0038] AKI的分类取决于各种参数，最常见的是血清肌酐(SCR)和多尿(D)的测定，其在该疾病的发展中晚期出现且由此不容许早期诊断AKI。

[0039] 肌酐

[0040] 肌酐是通过降解磷酸肌酸在肌肉组织中形成的代谢副产物，其从身体清除是通过在肾小球水平滤过。肌酐产生总速率将取决于肌肉质量、肌肉活动、性别、年龄和蛋白质总消耗。这些变量还影响肌酐血浆水平。尽管有这些限制，用于诊断AKI的最常使用的方法为当血清肌酐水平高于0.6-1.2mg/dl。

[0041] 肌酐清除

[0042] 肌酐清除是在一段时间内从血流清除的肌酐量。测定此参数以评估肾小球滤过。肌酐清除的通常水平介于125-150ml/min且在女性中略低。

[0043] 少尿

[0044] 少尿定义为尿生成减少，值低于400ml每天，考虑到400ml为在正常代谢状态下应当释放以清除每日产生的溶质的最少尿量。

[0045] 尿毒症

[0046] 尿毒症对应于血液中提高的尿素水平。此参数的测定是通过测定血尿素氮(BUN)，其正常值介于8至18mg/dl。

[0047] 风险期、损伤期、衰竭期、丧失期、终末期肾病(RIFLE)分类

[0048] RIFLE是被提出以分类如下不同AKI阶段的工具：风险期、损伤期、衰竭期、丧失期、终末期肾病。其基于患者的血清肌酐(SCR)和多尿(D)水平(Carrillo R.，Castro J.“009.RIFLE scale.Journal of Mexican association of critic medicine and intensive therapy,23(4):241-244)。如本发明中使用AKI1、AKI2和AKI3分别对应于RIFLE的R、I和L期。

[0049] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin,NGAL)

[0050] 使用基因组学和蛋白质组学已鉴定了一系列作为急性肾损伤的潜在标记物的分子，包括NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂-3(Cystatin-3)、KIM-1、IL-1β 和IL-18。

[0051] NGAL通常以低浓度表达且对于上皮损伤显著生长(Schmidt-Ott K.M.，Mori K.，Kalandadze A.，Li J.Y.，Paragas N.，Nicholas T.，Devarajan P.，Barasch J.2006,Curr Opin Nephrol Hypertens,15:442-449；Cowland J.B.，Borregaard N.1997，Genomics，45:17-23)。

[0052] NGAL是属于脂质运载蛋白家族的小蛋白。人NGAL是单一多肽链，具有二硫桥，具有178个氨基酸残基，质量为23KDa且其二聚体形式为46KDa(Kjeldsen L.，Johnsen A.H.，Sengelov H.，Borregaard N.1993，J Biol Chem,268:10425-10432)。此蛋白质表达在特定上皮细胞的中性粒细胞中，该上皮细胞包括肾近端小管上皮细胞。NGAL是一种分泌蛋白且特征在于其通过β-片层以其结构保守口袋的形式结合小的和疏水性分子以形成大分子复合物的能力(Uttenthal L.O.2005Clin Lab,29:39-41)。

[0053] 如同已述的，在早期很难检测肾损伤。就这个问题NGAL已部分克服了一般障碍并已证明有用于诊断急性肾损伤，显示可在早期进行此诊断(Zappitelli M.，Washburn K.K.，Arikan A.A.，Loftis L.，Ma Q.，Devarajan P.，Parikh C.R.，Goldstein S.L.2007Crit Care,11:R84.)。

[0054] 大量研究显示NGAL在具有急性肾损伤的患者中具有显著增加，但在相应的对照中无增加，此增加产生在最初24至48小时内并在肌酐增加之前。此标记物同时用于血浆和尿液中，但在不同临床领域仍需要完整评估(Mishra J.，Dent C.，Tarabishi R.，Mitsnefes M.M.，Ma Q.，Kelly C.，Ruff S.M.，Zahedi K.，Shao M.，Bean J.，Mori K.，Barasch J.，Devarajan P.2005，Lancet,365:1231-1238；Devarajan P.2007，Contrib Nephrol，156:203-212)。

[0055] 还已显示在外科手术后尿中此标记物的增加，该外科手术例如成人中的心肺分流术（Wagener G.，Jan M.，Kim M.，Mori K.，Barasch J.M.，Sladen R.N.，Lee H.T.2006，Anesthesiology，105:485-491）、经皮冠脉介入（Bachorzewska-Gajewska H.，Malyszko J.，Sitniewska E.，Malyszko J.S.，Dobrzycki S.2006，Am J Nephrol，26:287-292）、冠状动脉造影（Bachorzewska-Gajewska H.，Malyszko J.，Sitniewska E.，Malyszko J.S.，Dobrzycki S.2007，Nephrol Dial Transplant，22:295-296.）以及儿童中的心脏手术（儿童中的冠状动脉架桥术）（Mishra J.，Dent C.，Tarabishi R.，Mitsnefes M.M.，Ma Q.，Kelly C.，Ruff S.M.，Zahedi K.，Shao M.，Bean J.，Mori K.，Barasch J.，Devarajan P.2005，Lancet，365:1231-1238）。

[0056] 述及当前的研究阶段，测定尿和血浆中 NGAL 作为 AKI 标记物的限制是 NGAL 仍被评估为适当的肾脏标记物。此外，据称若 NGAL 是唯一肾源性的，则此生物标记物将为可设想的最好的肾小管细胞损伤标记物之一。在尿中，NGAL 在超过正常水平的更严重的肾损伤中显示 10,000 倍的浓度增加。在血浆中最大增加为约 100 倍。这使得 NGAL 潜在地为不同肾损伤程度的非常敏感的标记物。然而，此宽动态范围的下端由于疾病例如癌症或其它中的肾外性来源而被 NGAL 增加所占据（www.clionline.com）。本发明的创新方法试图通过分析来自肾脏的外来体，特别是来自特定肾结构的特定外来体中的 NGAL 以确立 AKI 的早期和非侵入性诊断，从而解决此问题。

[0057] 水通道蛋白 1（Aquaporin1，AQP1）

[0058] 水通道蛋白 1（AQP1）是一种膜内在蛋白质且是其同类中第一种从人红细胞进行结构和功能表征的类型。该蛋白质具有四聚体结构且其各亚单位单独具备功能（Preston G.M.，Jung J.S.，Guggino W.B.，Agre P.1993，J Biol Chem，268:17-20.）。其分子量为 28KDa（Friedman M.2008，Principles and models of biological transport，第 2 版，New York，USA:Springer）且其表达模式取决于年龄和所检测组织（肾、肺、脑和眼）（Bondy C.，Chin E.，Smith B.L.，Preston G.M.，Agre P.1993，Proc Natl Acad Sci USA，90:4500-4504）。

[0059] 此通道高度表达于肾近端小管中、髓袢下行部分的上皮中以及直小血管的内皮中。下行髓袢中此蛋白质的高浓度（25％总蛋白质）表明在肾浓缩机制中至关重要的作用。这已在生成其中敲除 AQP1 表达基因的转基因小鼠的研究中得到证实，该研究导致近端小管中水渗透性降低，所以它们不能浓缩其尿液（Ma T.，Yang B.，Gillespie A.，Carlson E.J.，Epstein C.J.，Verkman A.S.1998，J Biol Chem，273:4296-4299）。与 AQP1 缺失相关的异常表型增加了其它哺乳动物水通道蛋白具有重要生理机能的可能性，因为在一项 3 个表观正常无 AQP1 患者的报道中，不包括分析流体摄取或对于伴随脱水的一些应激的生理反应（Preston G.M.，Smith B.L.，Zeidel M.L.，Moulds J.J.，Agre P.1994，Science，265:1585-1587）。

[0060] 水通道蛋白 2（AQP2）

[0061] 水通道蛋白 2（AQP2）是一种用作水通道的膜内在蛋白质。此通道通过加压素调节，且位于肾脏心尖区中连接小管和集合管中（Fushimi K.，Uchida S.，Hara Y.，Hirata Y.，Marumo F.，Sasaki S.1993，Nature，361:549-552）。

[0062] 因为此蛋白质的重要性，已进行了转基因小鼠研究。修饰小鼠以选择性在连接小

管中而不在集合管中表达此水通道蛋白。还发展了完全缺乏此蛋白质的小鼠。观测到缺陷小鼠在出生后死亡(5-12 天),而其中仅阻断集合管中的表达的小鼠长至成年,显示出减小的体重、尿生成增加 10 倍且尿渗透压降低。当剥夺水 3 小时时尿渗透压没有显著改变,证实没有补偿机制(RojekA.,Füchtbauer E.M.,Kwon T.H.,Frøkiaer J.,Nielsen S.2006,Proc Natl Acad Sci USA,103:6037-6042)。

[0063] 在不存在加压素的情况下,高渗性在 10 分钟内诱导质膜中 AQP2 蓄积。这发生在大鼠肾脏原位集合管的主细胞中以及还发生在若干肾上皮系中,证实其在肾应激情况下的重要性(Hasler U.,Nunes P.,Bouley R.,Lu H.A.,Matsuzaki T.,Brown D.2008,J Biol Chem,283:26643-26661)。

[0064] 还已知存在多种该蛋白质表达基因的隐性突变(Leduc-Nadeau A.,Lussier Y.,Arthus M.F.,Lonergan M.,Martinez-Aguayo A.,Riveira-Munoz E.,Devuyst O.,Bissonnette P.,Bichet DG.2010,J Physiol,588:2205-2218),以及还有显性突变(Mulders S.M.,Bichet D.G.,Rijss J.P.,Kamsteeg E.J.,Arthus M.F.,Lonergan M.,Fujiwara M.,Morgan K.,Leijendekker R.,Van der Sluijs P.,Van Os C.H.,Deen P.M.1998,J Clin Invest,102:57-66.),其可产生肾性尿崩症。

[0065] 水通道蛋白 3(AQP3)

[0066] 水通道蛋白 3(AQP3)是一种膜内在蛋白质,分子量为 30kDa(Wakayama Y.,Jimi T.,Inoue M.,Kojima H.,Shibuya S.,Murahashi M.,Hara H.,Oniki H.2002,Histochem J,34:331-337)且表达在肾集合管上皮细胞基底外侧膜中。不同于其它水通道蛋白,此蛋白质还可转运甘油(Ma T.,Frigeri A.,Hasegawa H.,Verkman A.S.1994,J Biol Chem,269:21845-21849.)。

[0067] 在小鼠中敲除 AQP3 基因表达的实验中观测到多尿症、AQP2 的减少表达(特别是在肾皮质中)以及减小的尿摩尔渗透压浓度。后来证明 AQP3 在这些变化中的责任是敲击其它水通道蛋白的表达(Ma T.,Song Y.,Yang B.,Gillespie A.,Carlson E.J.,Epstein C.J.,Verkman A.S.2000,Proc Natl Acad Sci U S A,97:4386-4391)。

[0068] 已确认了优先并差异表达于肾脏特定结构中的其它蛋白质,例如,髓袢中的 NKCCC2 以及近端小管中的 NHE-3 和 NaPiII。

[0069] 尿外来体

[0070] Mark Knneper 博士团队已在健康人尿液中开展了蛋白质组学研究。这些研究分析了通过差速离心获得的细胞和外来体尿液部分(Knepper M.A.,Pisitkun T.,Shen R.F.2004,Proc Natl Acad Sci USA,101:13368-13373)。该外来体部分收到特别的关注,因为据信其为肾上皮细胞代表性蛋白质的丰富来源。

[0071] 外来体产生自顶端膜蛋白的内吞作用。此后,该胞内体与多泡体(MVB)融合。因此,顶端膜蛋白被隔离在 MVB 外膜中并通过膜内陷而内化。最后,MVB 外膜与顶端膜融合,将其内部囊泡(称作外来体)释放入肾小囊腔中(Knepper M.A.,Pisitkun T.,Shen R.F.2004,Proc Natl Acad Sci USA,101:13368-13373)。当前在尿外来体中确认的蛋白质对应于质膜蛋白(NKCC2,CD24 等)、胞浆蛋白(GAPDH 等)和核蛋白(AFT3 和 WT-1)(Zhou H.,Cheruvanky A.,Hu X.,Matsumoto T.,Hiramatsu N.,Cho M.E.,Berger A.,Leelahavanichkul A.,Doi K.,Chawla L.S.,Illei G.G.,Kopp J.B.,Balow J.E.,Austin

H.A.3rd,Yuen P.S.,Star R.A.2008,Kidney Int,74:613-621)。

[0072] 现有技术状况

[0073] US2010203529描述了外来体可被用于检测诊断(例如疾病的阶段或进展)中的生物标记物,还描述了来自细胞来源的生物标记物可被用于进一步确定疾病治疗方案以及确立治疗功效。

[0074] 文献EP2191276描述了通过从流体分离外来体的产前诊断方法,其中该外来体的确认通过特定生物标记物,特别是CD24。

[0075] GB2463401描述了通过在来自受试者的样品中确定外来体生物信号来表征表型、诊断疾病的方法。提及的标记物包括miRNA分布或者抗原包括CD63、CD9、CD81、B7H3、EpCam、PSCA、TNFR、MFG-E8、Rab、SETAP、PCMA或5T4。而且,该方法提及其可被用于测定外来体来源细胞用于分析生理状态或测定表型。

[0076] WO2009115561描述了用于确认膜囊泡或外来体的多肽。此外,该发明描述了用于预防和/或治疗由于病原体或肿瘤抗原的感染的免疫制品。

[0077] KR20070058441描述了用于免疫抑制反应的方法和组合物。该组合物包含具有免疫抑制活性的外来体,其中该外来体可获得自不同细胞类型,主要来自免疫系统。此外,该外来体可被暴露至分子以增强免疫抑制活性。该外来体被用于治疗与免疫系统障碍相关的疾病或紊乱。

[0078] US2007254351描述了用于分离丙型肝炎病毒的方法,包括从感染该病毒的个体血浆分离外来体。

[0079] AU2004203482描述了包含分子的膜囊泡(外来体),其中该分子来自主要组织相容性复合体,且其中该外来体被用作免疫原或用于诊断目的。

[0080] US2004197314描述了在囊泡(外来体)的膜中表达多肽的组合物和方法,主要聚焦在合成产生外来体。

[0081] CA2453198描述了可被用于在癌症患者的生物流体中确认和量化免疫抑制因子的外来体。这些外来体可单独使用或与其它免疫测定组合使用作为癌症患者的预后指标。

[0082] EP1523990描述了获得自肿瘤细胞的外来体。这些外来体具有肿瘤特异性抗原以及用于刺激淋巴细胞的分子。

[0083] Zhou等人(2006)描述了携带来自动物急性肾损伤模型的肾功能不全和结构损伤标记物的尿外来体。该外来体通过离心获得且发现肾损伤标记物(Exosomal Fetuin-A identified by proteomics:a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury.Zhou H.,Pititkun T.,Apont A.,Yuen P.S.,Hoffert J.D.,Yasuda H.,Hu.X,Chawla L.,Shen R-F.,Knepper M.A.,Star R.,2006,Kidney Int.70(10):1847-1857)。

[0084] Zhou等人(2008)描述了来自肾单位部分的富集肾损伤生物标记物的尿外来体。他们描述了通过差速离心分离这些外来体,通过蛋白质印迹进一步检测转录因子。他们发现这些标记物在肾病受试者的外来体中而非全尿中可检测到,但在正常健康个体中未发现标记物(Urinary exosomal transcription factors,a new class of biomarkers for renal disease.Zhou H.Cheruvanky A.,Hu X.,Matsumoto T.,Hiramatsu N.,Cho M.E.,Berger A.,Leelahavanichkul A.,Doi K.,Chawla L.S.,Illei G.G.,Kopp J.B.,Balow J.E.,Austin H.A.3rd,Yuen P.S.,Star R.A.2008,Kidney Int.74:613-621)。

[0085] Devarajan(2007) 提出了一组急性肾损伤 (AKI) 标记物用于早期检测损伤，以及预测患者中肾损伤结果 (Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury.Devarajan P.,Williams L.M.2007,Semin.Nephrol.27(6):637-651)。

[0086] Lock(2010) 综述了可被用作肾损伤指示物的肾标记物，聚焦于使用微阵列技术以在肾或肾损伤情况下检测上调的基因 (Sensitive and early markers of renal injury:where are we and what is the way forward ? Lock E.2010，Toxicological Sciences1(116):1-4)。

[0087] Alvarez 等人 (2010) 在会议中描述了 NGAL 可被用作肾衰竭标记物以及此外，其还可被用作肾移植后的恢复预测物 (Pilot study for evaluating urinary exosomal fraction as kidney dysfunction biomarker in renal transplant.Alvarez s.,Suazo C.,Boltansky A.,Urzu M.,Carvajal D.,Innocenti G.,Vukusich A.,Hurtado M.,Campos D.,Yen C.,Villanueva S.,Flores M.,Marquez J.,Rogello A.,Irarrazabal C.E.2010，VII Latin American Congress of Acute Kidney Injury:29.Coquimbo-Chile)。

[0088] Boltansky 等人 (2010) 描述了在肾移植的情况中 NGAL 作为用于器官恢复预测物的潜在生物标记物指示物 (NGAL in urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation.Boltansky A.，Alvarez S.，Vukusich A.，Hurtado M.，Ursu M.，Innocenti G.，Carvajal D.，Suazo C.，Villanueva S.，Carreno J.，Altuzarra R.，Yen C.，Tapia D.，Irarrazabal C.E.2010，Renal Week，Denver，CO，J Am Soc Nephrol21:959)。

[0089] 现有技术中发现的文献显示近期致力于描述和表征来自不同细胞类型的特定外来体的转录因子和生物标记物分子，其中定义肾损伤的肾细胞引人注目。还提出了一系列描述外来体分离的方法，连同生物标记物以及诊断步骤。所述文献描述了与本发明类似的研究，表明外来体作为病理学标记物的用途 (US2010203529、GB2463401、Zhou H. 等人 2006、Devarajan2007 和 Lock2010) 且特别地，急性肾损伤 (Zhou，H. 等人 2008、Zhou H. 等人 2006、Devarajan2007 和 Lock2010)，说明特定标记物例如 KIM-1、NGAL、IL-8 和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的用途。然而，本发明显示出与之前技术的相关差异。特别地，Zhou，H. 等人 (2008) 未描述使用抗体，例如水通道蛋白 -1、水通道蛋白 -2、水通道蛋白 -3(AQP)、NKCC2、NHE-3 和 NaPiII 抗体，其可免疫纯化含有这些分子 (AQP、NCCK2、NHE-3、NapiII) 的外来体，可更好及更特异性确认和诊断肾损伤。Zhou H. 等人 (2006) 既未描述特异性免疫沉淀也未描述本发明中使用的一些外来体标记物。Devarajan(2007) 未描述基于使用抗 AQP、抗 NKCC2、抗 NHE-3 和 / 或抗 NaPiII 而使用特定肾区的特定免疫纯化。Lock(2010) 未描述特异性免疫纯化。

[0090] Alvarez 等人 (2010) 和 Boltansky 等人 (2010) 建议使用 NGAL 作为肾移植情况下的肾损伤指示物以及器官恢复预测物，但对照于本发明，他们都没有描述外来体免疫纯化的阶段以具有对肾损伤标记物更为精确的测定。

[0091] 因此，现有技术未描述足够的背景技术以影响本发明的新颖性或创造性。本发明是基于含有 AQP-1、AQP-2、AQP-3(AQP)、NKCC2、NHE-3 和 / 或 NaPiII 的外来体的免疫纯化。

[0092] 此外，本申请实施例显示该程序精确测定患者中的肾损伤。

发明内容

[0093] 本发明涉及用于在患有早期急性肾损伤的受试者中监测、诊断和／或预后所述早期急性肾损伤以及确定疗法的方法，所述方法包括以下步骤：a) 提供尿样；b) 使用至少一个免疫纯化（immunopurification）步骤使所述尿样富集存在于所述尿样中的外来体（exosome）；c) 检测外来体中急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）标记物。

[0094] 本发明进一步包括用于测定特定肾损伤标记物的存在和／或水平的诊断试剂盒，用于简单和早期测定受试者中 AKI 的起始，该试剂盒包含用于使用至少一个免疫纯化步骤使所述尿样富集外来体的手段以及用于检测某一病症的预定肾损伤标记物的手段。

具体实施方式

[0095] 本发明涉及用于在患有早期急性肾损伤的受试者中监测、诊断和／或预后所述早期急性肾损伤以及确定疗法的方法，所述方法包括以下步骤：a) 提供尿样；b) 使用至少一个免疫纯化步骤使所述尿样富集存在于所述尿样中的外来体；c) 检测外来体中急性肾损伤（AKI）标记物。

[0096] 在一个实施方案中，该尿样获得自插管患者早晨的首次排尿以及其它患者的第二次排尿并保持在 -80℃直至分析。

[0097] 本发明考虑至少一个免疫纯化步骤作为用于使所述尿样富集外来体的手段。特别地，通过使用针对优先并差异表达于特定肾脏结构中的具体蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体，允许富集外来体。因此，本发明方法考虑针对优先并差异表达于特定肾脏结构中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体以及适当的缓冲液以使该抗体与存在于外来体外表面中的蛋白质域相互作用。

[0098] 在一个实施方案中，本发明方法可包括在免疫纯化之前，用于富集外来体的至少一个进一步的手段。

[0099] 本发明中还考虑的用于使所述尿样富集外来体的手段为用于从尿样分离较大成分的实验室方法和装置，该较大成分可能干扰之后的检测阶段。例如，该干扰成分可为来自患者的细胞。可考虑离心管为富集手段，因为实验室离心机中的加工可富集外来体、消除较大颗粒例如细胞。在一个实施方案中，在 5000 至 10000rpm 离心样品 5 至 30 分钟。在另一实施方案中，在 30000 至 45000rpm 超速离心样品 30 至 120 分钟。

[0100] 还可考虑微滤器盒、微滤器柱、或直至（up to）0.22 微米的其它微滤器媒介作为外来体富集手段，因为微量过滤可经由微滤器通过外来体，因此使所述尿样富集外来体。

[0101] 在本发明的另一实施方案中，该方法考虑作为用于检测和／或定量预定肾损伤标记物、针对预定肾损伤标记物的一级抗体以及针对该一级抗体的结合标记物的二级抗体的手段。该二级抗体标记物可为荧光标记物、酶、放射性标记物、化学化合物、红外化合物。

[0102] 任选地，该一级抗体可直接与标记物结合，在此情况下不需要二级抗体。该一级抗体还可结合荧光标记物、酶、放射性标记物、化学化合物、红外化合物。

[0103] 在一个实施方案中，来自特定肾结构的特定外来体部分的免疫纯化的进行是采用选自但不限于以下的抗体：抗水通道蛋白 -1（抗 AQP-1）、抗水通道蛋白 -2（抗 AQP-2）、抗水通道蛋白 -3（抗 AQP-3）、抗 NKCC2、抗 NHE-3 和／或抗 NaPiII 或其组合。

[0104] 在一个实施方案中，该特定肾损伤标记物选自但不限于 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑

制剂 -3、KIM-1、IL-1β 和 / 或 IL-18 或其组合。

[0105] 在一优选实施方案中，来自特定肾结构的特定外来体部分的免疫纯化的进行是采用针对抗 AQP1、抗 AQP2、抗 AQP3、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合的任意域的抗体作为用于使所述尿样富集外来体的手段。

[0106] 在一另外的优选实施方案中，该特定肾损伤标记物选自 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18 或其组合。

[0107] 在一更优选实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 NGAL 和 / 或半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 NGAL，且当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 KIM-1、IL-1β 和 / 或半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3。

[0108] 在一个实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0109] 在一个实施方案中，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于远端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0110] 在一个实施方案中，当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于集合管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0111] 在一个实施方案中，当抗 NKCC2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于髓袢，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0112] 在一个实施方案中，当抗 NHE-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0113] 在一个实施方案中，当抗 NaPiII 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0114] 该方法任选包括在受试者中评价急性肾损伤的步骤，其用于基于特定肾损伤标记物的存在和 / 或水平在受试者中监测、诊断、预后和 / 或确定疗法。

[0115] 本发明进一步包括用于确定特定肾损伤标记物存在和 / 或水平的诊断试剂盒，用于简单和早期确定受试者中 AKI 的发作，该试剂盒包含用于使用至少一个免疫纯化步骤使所述尿样富集外来体的手段以及用于检测某一病症的预定肾损伤标记物的手段。

[0116] 任选地，该诊断试剂盒包含用于从患者获得尿样的手段。在一特别实施方案中，用于获得尿样的手段选自尿探针（在患者自身不能提供尿样的情况下）；或者容器以从患者接受尿样。

[0117] 本发明考虑至少一个免疫纯化步骤作为用于使所述尿样富集外来体的手段。特别地，通过使用针对优先并差异表达于特定肾脏结构中的具体蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体，允许富集外来体。因此，本发明试剂盒考虑针对优先并差异表达于特定肾脏结构中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体以及适当的反应缓冲液以使该抗体与存在于外来体外表面中的蛋白质域相互作用。该试剂盒还包含阻断剂或溶液以及特定肾损伤标记物的储备溶液。

[0118] 在一个实施方案中，该试剂盒包含 96 孔板，其中所述孔涂覆有针对优先并差异表

达于特定肾脏结构中的具体蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体，允许富集外来体。

[0119] 在一个实施方案中，本发明试剂盒可包括在免疫纯化之前，用于富集外来体的至少一个进一步的手段。

[0120] 本发明中还考虑的用于使所述尿样富集外来体的手段为用于从尿样分离较大成分的实验室方法和装置，该较大成分可能干扰之后的检测阶段。例如，该干扰成分可为来自患者的细胞。可考虑离心管为富集手段，因为实验室离心机中的加工可富集外来体、消除较大颗粒例如细胞。还可考虑微滤器盒、微滤器柱、或直至 0.22 微米的其它微滤器媒介作为外来体富集手段，因为微量过滤可经由微滤器通过外来体，因此使所述尿样富集外来体。

[0121] 在本发明另一实施方案中，该试剂盒考虑作为用于检测和 / 或定量预定肾损伤标记物、针对预定肾损伤标记物的一级抗体以及针对该一级抗体的结合标记物的二级抗体的手段。该二级抗体标记物可为荧光标记物、酶、放射性标记物、化学化合物、红外化合物。

[0122] 任选地，该一级抗体可直接与标记物结合，在此情况下不需要二级抗体。该一级抗体还可结合荧光标记物、酶、放射性标记物、化学化合物、红外化合物。

[0123] 在一个实施方案中，试剂盒包含选自但不限于以下的抗体 :抗水通道蛋白 -1(抗 AQP-1)、抗水通道蛋白 -2(抗 AQP-2)、抗水通道蛋白 -3(抗 AQP-3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3 和 / 或抗 NaPiII 或其组合。

[0124] 在一个实施方案中，试剂盒包含结合或不结合标记物的一级抗体用于检测选自但不限于以下的标记物 :NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β 和 / 或 IL-18 或其组合。

[0125] 在一优选实施方案中，当使用免疫纯化作为富集方法时，试剂盒包含针对抗 AQP1、抗 AQP2、抗 AQP3、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合的任意域的抗体作为用于使所述尿样富集外来体的手段。

[0126] 在一另外的优选实施方案中，该试剂盒包含结合或不结合标记物的一级抗体，用于检测检测 NGAL、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3、KIM-1、IL-1β、IL-18。

[0127] 在一更优选实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 NGAL 和 / 或半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 NGAL，且当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定外来体部分时，被确定存在和 / 或水平的肾损伤标记物是 KIM-1、IL-1β 和 / 或半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -3。

[0128] 在一个实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0129] 在一个实施方案中，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于远端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0130] 在一个实施方案中，当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于集合管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0131] 在一个实施方案中，当抗 NKCC2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于髓袢，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0132] 在一个实施方案中，当抗 NHE-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，

该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0133] 在一个实施方案中，当抗 NaPiII 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0134] 本发明试剂盒任选包含用于使用该试剂盒的说明。

[0135] 本发明的方法和试剂盒包含免疫纯化尿外来体的步骤。因此，本发明还描述了用于免疫纯化尿外来体的方法以及抗体用于纯化尿外来体的用途。

[0136] 本发明描述了用于纯化尿外来体的方法，该方法包括以下步骤 :(a) 采用针对优先并差异表达于不同肾脏结构的表面中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体温育尿样或任选的脱细胞尿样 (decellularized urine sample)，从而形成外来体 - 抗体复合物 ;(b) 采用识别所述抗体的任意域并结合至不溶性试剂的标签温育获得自 (a) 的所述外来体 - 抗体复合物，从而形成外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物 ;(c) 从上清液分离所述外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物 ;(d) 用充足缓冲液洗涤所述外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂复合物。

[0137] 在一个实施方案中，在室温在充足缓冲液中采用抗体培养尿样或脱细胞尿样 20 至 60 分钟。

[0138] 在一个实施方案中，尿外来体纯化方法中使用的抗体选自但不限于 :抗水通道蛋白 -1(抗 AQP-1)、抗水通道蛋白 -2(抗 AQP-2)、抗水通道蛋白 -3(抗 AQP-3)、抗 NKCC2、抗 NHE-3 和 / 或抗 NaPiII 或其组合。

[0139] 在一优选实施方案中，尿外来体纯化方法中使用的抗体针对抗 AQP1、抗 AQP2、抗 AQP3、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合的任意域。

[0140] 在一个实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0141] 在一个实施方案中，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于远端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0142] 在一个实施方案中，当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于集合管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0143] 在一个实施方案中，当抗 NKCC2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于髓袢，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0144] 在一个实施方案中，当抗 NHE-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0145] 在一个实施方案中，当抗 NaPiII 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和 / 或水平表明所述结构中的损伤。

[0146] 在一个实施方案中，识别抗体任意域的标签是蛋白质 A 或蛋白质 G 或其部分，其结合琼脂糖或琼脂糖珠。

[0147] 在另一实施方案中，该标签是生物素或其部分并结合至抗体。因此形成外来体 - 抗体 - 生物素复合物。在此实施方案中，不溶性试剂是结合至对于生物素或其部分具有亲和力的化合物的磁珠，该化合物例如但不限于抗体。因此，加入磁珠形成了外来体 - 抗体 - 生物素 - 化合物 (对于生物素 - 磁珠具有亲和力) 复合物并接着在下步中被分离。

[0148] 在一个实施方案中，从上清液分离外来体 - 抗体 - 标签 - 不溶性试剂的进行是通

过离心或沉降。

[0149] 本发明还公开了针对优先并差异表达于不同肾脏结构的表面中的蛋白质的胞内域、胞外域或任意域的抗体或抗体组合以用于免疫纯化尿外来体的用途。

[0150] 在一个实施方案中，用于免疫纯化尿外来体的抗体选自但不限于：抗水通道蛋白-1（抗 AQP-1）、抗水通道蛋白-2（抗 AQP-2）、抗水通道蛋白-3（抗 AQP-3）、抗 NKCC2、抗 NHE-3 和/或抗 NaPiII 或其组合。

[0151] 在一优选实施方案中，用于免疫纯化尿外来体的抗体针对抗 AQP1、抗 AQP2、抗 AQP3、抗 NKCC2、抗 NHE-3、抗 NaPiII 或其组合的任意域。

[0152] 在一个实施方案中，当抗 AQP-1 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0153] 在一个实施方案中，当抗 AQP-2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于远端小管，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0154] 在一个实施方案中，当抗 AQP-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于集合管，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0155] 在一个实施方案中，当抗 NKCC2 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于髓袢，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0156] 在一个实施方案中，当抗 NHE-3 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0157] 在一个实施方案中，当抗 NaPiII 被用于免疫纯化来自特定肾结构的特定部分时，该外来体部分来自于近端小管，且特定标记物的存在和/或水平表明所述结构中的损伤。

[0158] 本发明方法和试剂盒具有提供采用至今应用的标准方法不可能提供的肾损伤标记物的特异、简单和早期检测的优势。本发明方法和试剂盒还提供了确认肾脏中受损的特定结构的优势，因为其使用针对存在于肾脏特定结构中的特定蛋白质的特定抗体。

[0159] 本发明方法和试剂盒可被用于在任意受试者中监测、诊断、预后和/或确定疗法。特别地，本发明的方法和试剂盒可用于在经历肾移植的患者中监测肾损伤的进展，因为局部缺陷-再灌注过程与移植相关。本发明的方法和试剂盒还可用于在特护病房（ICU）中可能发展 AKI 并需要早期检测的患者中监测、诊断、预后和/或确定疗法。

附图说明

[0160] 图 1：比较来自于肾移植患者移植后第 1、2、3 和 4 天的尿样的细胞部分和外来体部分中 NGAL 丰度的代表性蛋白质印迹。

[0161] 图 2：显示来自于移植后第 1 天的患者的全尿（U）和外来体部分（E）中 NGAL-24 和 NGAL-46 丰度的代表性蛋白质印迹。

[0162] 图 3：移植后第 1 天患者尿液总外来体部分中 NGAL 的图示。AU＝任意单位。

[0163] 图 4：NGAL-46 和 AQP1、2 和 3 之间的关系（$*p<0.05$，$n=5$），AU＝任意单位。

[0164] 图 5：肾移植个体中 SCR 和 NGAL 两种水平之间的比较分析。

[0165] 图 6：分类为 AKI1（5 个患者）、AKI2（3 个患者）和 AKI3（5 个患者）的 ICU 患者中无外来体尿（白柱，EF-U）和总外来体部分（黑柱，TE）中 NGAL 的相对丰度（任意单位）。

[0166] 图 7：来自分类为 AKI1（5 个患者）、AKI2（3 个患者）和 AKI3（5 个患者）的 ICU 患

者中的用任意单位表示的 NGAL 丰度的 TE/EF-U 比率。

[0167] 图 8 :分类为 AKI1(5 个患者)的 ICU 患者中无外来体尿 (EF-U)、总外来体 (TE) 和免疫纯化外来体 (IP-E) 中的相对 NGAL 丰度。

[0168] 实验部分

[0169] 在此部分给出示例性实施例作为指导,因此这些实施例不以任何方式解释为限制性的。

[0170] 申请的实施例

[0171] 下面描述本发明的一些实施方案,其基于在经历肾移植的 12 个人类患者组中测定肾脏或肾损伤的研究以及包含 28 个准入 ICU 的个体(其中根据 RIFLE 分类 46% (13/28) 发展了 AKI) 的研究。

[0172] 实施例 1 :研究组的描述

[0173] 通过分析 12 个人类患者组加上用作对照组的健康个体测试本发明的方法和产品。用于健康对照的选择标准为不存在肾症候学且患者的选择标准为在本研究的持续期间经历肾移植的所有个体。患者的准入考虑到知情同意批准。

[0174] 实施例 2 :尿取样

[0175] 从各研究中个体获得 50ml 导尿标本。该样本由训练护士采自早晨的首次排尿。在移植个体的情况下,在移植前一天获得样本并在术后接下来的三天每天一次获得三份样本,其中选择术后首个样本用于分析。将样本保持在 -80℃等待蛋白质印迹分析。

[0176] 实施例 3 :制备尿外来体

[0177] 考虑到两种不同方法获得外来体。第一种,即对应于两步离心分离,第一步使用离心且第二步使用超速离心。第二种方法,即本发明的主要特征,考虑第一步离心且第二步免疫纯化。

[0178] 在两步离心的第一种方法中,采集 10ml 尿样,往其中加入蛋白酶抑制剂片(完全迷你蛋白酶抑制剂混合物片,Roche)。在 17,000g 在 4℃进行第一步离心 15 分钟以用于分离细胞内容物,将其贮存在 -80℃,获得第一上清液部分 (S1)。进一步在 38,000rpm 超速离心 S1 第一部分 1 小时,其产生第二上清液部分 (S2) 和沉淀物(总外来体)。

[0179] 在第一步离心、第二步考虑免疫纯化的情况下,如在 2 步离心法第一步中所述获得的 S1 部分,被用于外来体的免疫纯化,其使用 AQP1、AQP2 或 AQP3 抗体以用于获得来自肾脏不同区域的外来体。将样本重新悬浮在加载缓冲液 (100mM Tris-HCl,pH6.8,200mM 二硫苏糖醇 (DTT),4% SDS,0.2%溴酚蓝,20%甘油)中以在各凝胶样本中加载 100 微克总蛋白质。

[0180] 实施例 4 :蛋白质印迹分析

[0181] 蛋白质印迹可使用特定抗体确认蛋白质的存在。使用 100V 在 7.5%和 12%丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳 90 分钟以根据蛋白质大小分离所述蛋白质。一旦分离,将所有蛋白质在 300mA 转移至硝化纤维素膜 90 分钟。此过程后使用 5%脱脂奶在 1 小时连续搅动中封闭膜,用于以后采用抗 AQP1(Santa Cruz Biotechnology)、抗 AQP2(Santa Cruz Biotechnology)、抗 AQP3(Santa Cruz Biotechnology) 或抗 NGAL(R&D Systems) 一级抗体在 4℃伴随搅拌过夜进行培养。一旦培养结束,采用 1% PBS-Tween20(Winkler) 洗涤膜 3 次,以在室温伴随搅拌采用二级抗体继续培养 2 小时。最后,采用 PBS-Tween201%洗涤膜 3

次以用于进一步处理。

[0182] 通过半定量分析测定蛋白质丰度，使用光密度测定由蛋白质印迹获得的条带，使用 Adobe Photoshop CS4 软件，对于所获的各个条带采用 2 种测定（所有样本的总带以及固定大小带）以标准化所述测定。

[0183] 蛋白质测定

[0184] 在两种细胞部分中均测定总蛋白质浓度，使用商业可购的试剂盒（BCA 蛋白质分析试剂，Pierce）。

[0185] 统计分析

[0186] 使用统计模型 ANOVA 进行描述性和关联性研究。使用 WINKS SDA6.0 软件进行该分析，考虑 p 值＜＝0.05 为显著性差异。

[0187] 实施例 5：根据本发明方法的分析结果

[0188] 研究组特征

[0189] 在本研究中考虑接受肾移植的 12 个患者。

[0190] 患者的年龄范围为 15 至 60 岁，其中大多数患者（12 个中的 7 个）介于 40 至 60 岁。大多数患者是男性（91.6％）。25％从尸体供体接受器官且 75％从活体供体接受器官（表 4）。

[0191] 血清肌酐是测试移植器官存活力的重要参数。移植后第一天，所有患者具有高于正常的血清肌酐值（0.8 至 1.4mg/dl），从尸体供体接受器官的患者显示出更高的数值（表 4）。

[0192] 另一个考虑参数是移植前器官经历的局部缺血时间。时间范围从 27 至 1182 分钟，相比于从活体供体接受器官的患者的时间即 27 至 360 分钟而言，从尸体供体接受器官的那些患者通常时间更长，时间范围从 300 至 1182 分钟（表 4）。

[0193] 表 4. 研究中的患者信息

[0194]

患者编号	年龄(岁)	性别	供体类型	SCR日+1 (mg/dl)	局部缺血时间 (分钟)
1	60	M	CD	12.5	1182
2	57	M	LD	7.4	27
3	16	M	CD	6.1	300
4	34	M	LD	4.8	120
患者编号	年龄(岁)	性别	供体类型	SCR日+1 (mg/dl)	局部缺血时间 (分钟)
5	15	F	LD	2.3	N/A
6	27	M	LD	4.7	90
7	42	M	LD	9.3	360
8	46	M	LD	2.7	N/A
9	46	M	LD	6.1	N/A
10	55	M	LD	5.5	120
11	28	M	LD	2.8	60
12	42	M	CD	9.0	720

[0195]

[0196] 性别 :M =男性，F =女性 ;供体类型 CD =尸体供体，LD =活体供体 ;SCR 日 +1 =移植后 1 天的血清肌酐 ;局部缺血时间 :N/A =无可用数据。

[0197] 肾衰竭生物标记物的分析

[0198] 通过本发明研究团队获得的之前结果以及来自本研究的结果显示，在健康个体中

在尿液的细胞部分或外来体部分中不存在可检测水平的生物标记物 (Flores M., Marquez S. 2009, Research unit:New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile)。而且,外来体部分中的生物标记物表达水平高于细胞部分中表达的生物标记物水平 (图 1)。此外,研究中生物标记物较高水平的表达发生在移植后第一天 (图 1)。最后,使用蛋白质印迹可检测两种 NGAL 亚型,即 23kDa 的 NGAL-23 以及 46kDa 的 NGAL-46(图 1)。因此,本研究集中于测定来自于移植后第一天收集的尿样的外来体部分的生物标记物的分布。

[0199] NGAL

[0200] 在包括于研究中的 12 个患者中使用蛋白质印迹技术从来自移植后第一天的总尿外来体分析了所有 NGAL 亚型的丰度 (NGAL-23 和 NGAL-46),获得了患者中 11 个的信息。这些结果显示 NGAL 几乎在所有情况下表达。表达范围介于 7.3 至 170.3AU,即在极端情况之间差异约 20 倍 (图 3)。

[0201] 使用蛋白质印迹以确认 NGAL-46 和 NGAL-24,这两种标记物仅表达于尿外来体部分中,而上清液仅显示非特异性条带 (图 2)。

[0202] 11 个患者中具有较高 NGAL 值的是患者 5 和 7,NGAL 值分别为 170.3 和 83.8AU。

[0203] 在患者 10 和患者 2 中发现最低水平,NGAL 值分别为 12.6AU 和 7.9AU。

[0204] 免疫纯化外来体中生物标记物的表达

[0205] Pisitkun 在 2004 年 (Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:13368-13373) 描述了在来自正常患者的尿外来体中存在水通道蛋白 (AQP)。因此,本研究在来自接受肾移植的患者的免疫纯化外来体中寻找 AQP(AQP1、AQP2、AQP3) 表达。选出各个这些成分是因为其表达与肾单位中的特定区域相关。AQP1 通常与近端小管相关 (Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12)、AQP2 与远端小管和集合管相关 (Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299) 且 AQP3 与来自肾单位的集合管相关 (Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F. 1998, Annu Rev Physiol, 60:199-220)。

[0206] 此分析允许测定存在于特定外来体类型中的每个生物标记物的丰度。因此,该方法确立经分析的肾损伤生物标记物的潜在来源间的关系。

[0207] NGAL-46

[0208] 图 4 显示了通过具有阳性信息的患者尿外来体中 AQP 水平的 NGAL-46 亚型的标准化。选择 NGAL-46 是因为 NGAL-46 的表达高于 NGAL-23(图 1)。

[0209] 该结果显示 NGAL 丰度与 AQP1 丰度的关系在统计学上高于其它 AQP(图 4, $p<0.05$)。这些结果表明含有 AQP1 的外来体具有更高的 NGAL 丰度 (图 4)。基于这些结果,其显示 NGAL-46 主要与优先表达 AQP1 的肾脏区域相关,即集合管的近端区。

[0210] 血清肌酐水平与 NGAL 的比较

[0211] 比较 NGAL 和血清肌酐 (SCR) 水平的结果显示,个体 SCR 水平低于 3mg/dl(患者 5、8 和 11) 或高于 6mg/dl(患者 1、2、3、7、9 和 12),这与 NGAL 不具有相关性 (图 5)。

[0212] 该数据表明肾小球过滤标记物 (SCR) 与肾损伤标记物 (NGAL) 不相关。

[0213] 讨论

[0214] 肾损伤生物标记物分析

[0215] NGAL

[0216] Flores 和 Marquez(2009)(Flores M.，Marquez S.2009，Research unit:New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction,Universidad de los Andes,Santiago,Chile) 显示在来自健康个体的尿外来体部分中不具有可检测水平的 NGAL。可获得信息的本研究 11 个患者显示在接受肾移植的患者的 100％尿外来体中检测到 NGAL 而在不含尿细胞部分的上清液中未检测到 NGAL。表达水平介于 7.9 至 170.3AU，极端个体间超过 22 倍。因此，该数据表明尿外来体中 NGAL 检测构成了肾损伤的优异生物标记物，因为分析部分相比于全尿更具代表性。

[0217] NGAL 与供体类型的关系

[0218] 已知当供体是活体时相比于尸体供体而言移植器官的质量更好，其应被反映为更低的肾损伤标记物表达。此类行为显示在患者 2、6、9 和 10 中，其具有较低水平的 NGAL 并也从活体供体接受移植器官。在相同背景下患者 1 显示较高水平的 NGAL，其可因为此患者从尸体供体接受移植而得到解释。然而，患者 3 未显示此 NGAL 表达模式，其从尸体供体接受移植并显示出中等 NGAL 水平，且因此可被解释为器官的质量。

[0219] 患者 5 和 7 虽然从活体供体接受肾脏，但却显示较高的 NGAL 水平。患者 7 显示移植肾的迟缓功能，在移植后第一周期间需要血液透析。因此，NGAL 是一种优异的肾损伤标记物。

[0220] NGAL 与局部缺血时间的关系

[0221] 器官局部缺血时间是移植前器官经受损伤的决定因素，因为此时间越长，其将具有越低的功能。这在患者 1 和 7 中观测到，其具有与 360 和 1182 分钟的局部缺血值相关的高 NGAL 表达。在局部缺血值为 27 和 90 分钟的患者 2 和 6 中观测到相反的结果。此关系可在大多数情况中建立，除了患者 11 以外，该患者具有低局部缺血时间值和高 NGAL 水平 (表 4，图 3)。患者 5 显示出组中较高的 NGAL 水平，但不存在局部缺血时间可用数据。

[0222] NGAL 与年龄和性别的关系

[0223] 根据本研究中获得的结果，年龄似乎与各患者的 NGAL 水平不具有关系，因为例如患者 5 显示出最高的 NGAL 水平 (图 3)，即便其为研究中最年轻的人。也不可能建立患者性别和该标记物之间的关系，因为该研究仅包括一个女性。

[0224] 免疫纯化外来体中生物标记物的表达

[0225] AQP1、AQP2 和 AQP3

[0226] 在采用不同 AQP 类型的免疫纯化的外来体中分析生物标记物的丰度。

[0227] Knepper1997(Knepper M.A.1997，Am J Physiol,272:F3-F12) 显示 AQP1 优先与近端小管相关，而 AQP2 与远端小管和集合管相关 (Ma T.，Yang B.，Gillespie A.，Carlson E.J.，Epstein C.J.，Verkman A.S.1998，J Biol Chem,273:4296-4299)，且 AQP3 与来自肾单位的集合管相关 (Sasaki S.，Ishibashi K.，Marumo F.1998，Annu Rev Physiol,60:199-220)。

[0228] Pisitkun 在 2004 年 (Pisitkun T.，Shen R.F.，Knepper M.A.2004，Proc Natl Acad Sci USA,101:13368-13373) 显示 AQP 存在于正常患者的尿外来体中。

[0229] 本研究显示 AQP 除了存在于来自正常患者的尿外来体中以外还存在于经受肾移植的所有患者中，这与移植时器官或供体的状况无关 (表 4)。

[0230]　膜成分和生物标记物之间的关系

[0231]　考虑到AQP1与肾单位中近端小管相关((Knepper M.A.1997,Am J Physiol,272:F3-F12)、AQP2与远端小管相关且AQP3与集合管相关,在采用AQP1、AQP2和AQP3免疫纯化的外来体中分析NGAL的丰度。

[0232]　NGAL

[0233]　各免疫纯化外来体中NGAL的表达表明膜中具有AQP1的外来体中显著更高的NGAL丰度(p<0.05,图4),然后是具有AQP2和AQP3的外来体,后两者之间不具有显著性差异。该数据表明来自肾近端小管的外来体具有更高的肾损伤标记物NGAL丰度。

[0234]　结论

[0235]　移植后第一天肾损伤生物标记物的分析可使用蛋白质印迹技术检测尿外来体部分而非全尿的生物标记物。使用此技术在健康患者中无法检测到这些生物标记物。

[0236]　NGAL存在于所有分析患者中肾移植后第一天获取的尿样的外来体部分中,这表明外来体中分子因子的表达是由于移植中与移植过程相关的肾损伤的发展。有趣的是,患者1、4和7共同显示高NGAL水平。在这些患者中,1和7显示出移植的迟缓功能,在移植后第一周期间需要透析治疗。这些初步结果显示尿外来体中增加的NGAL水平在肾移植中确立肾功能不全中发挥了临床作用。

[0237]　使用用于确定这些标记物丰度的定量方法,例如使用ELISA,可确立与肾移植相关的肾损伤程度的确定范围以及它们在移植功能和存活力中的影响。

[0238]　基于该分析,NGAL主要表达在获得自近端小管的尿外来体中。

[0239]　实施例6:研究组的描述

[0240]　在统计分析、样本制备、蛋白质印迹方案、总尿、总外来体、免疫纯化外来体方面使用之前实施例中使用的相同程序。

[0241]　在此实施例中,从来自准入特护病房(ICU)的患者的第二次排尿获得30ml尿样并将其保持在无菌容器中。将样品保持在-80℃直至进一步的处理和蛋白质印迹分析。

[0242]　研究组

[0243]　研究组包括准入ICU的28个个体,年龄范围从21至95岁,19个男性以及9个女性。根据RIFLE分类46%(13/28)发展了AKI。

[0244]　下表5中显示了年龄、性别以及根据通常方法测定的AKI阶段。

[0245]　表5研究中患者信息

患者编号	年龄(岁)	性别	AKI阶段
1	64	M	AKI3
2	75	M	AKI3
3	34	M	N
4	59	F	N
5	95	M	AKI1
6	82	F	N
7	23	M	AKI3

[0246]

患者编号	年龄(岁)	性别	AKI阶段
8	21	M	AKI3
9	74	M	AKI1
10	79	F	AKI2
11	87	F	N
12	34	M	N
13	40	F	N
14	76	M	N

[0247]

15	27	M	N
16	39	M	AKI2
17	57	F	N
18	82	M	N
19	37	M	N
20	55	F	N
21	54	F	N
22	41	M	AKI1
23	44	F	AKI1
24	22	M	AKI2
患者编号	年龄(岁)	性别	AKI阶段
25	48	M	AKI1
26	38	M	N
27	85	M	AKI1
28	86	M	N

[0248] M:男性,F:女性,N:无 AKI

[0249] 28 个患者中的 46%被诊断具有 AKI,9 个为女性(32%)以及 19 个男性(68%)。

根据AKI阶段的分类显示更高数目的男性是该组的主要组成。

[0250] 57％(16个患者)年龄超过45岁,虽然依据AKI阶段和年龄未观测到关系。

[0251] 实施例7:总外来体、无外来体尿和免疫纯化外来体中肾损伤生物标记物的分析.

[0252] 通过蛋白质印迹技术在无外来体尿(EF-U)、总外来体部分(TE)和免疫纯化外来体(IP-E)中分析了AKI生物标记物NGAL。来自该研究中的28个患者,17个使用蛋白质印迹技术显示出可检测水平的NGAL。下表6显示了在研究患者中生物标记物检测的结果。

[0253] 表6.患者中生物标记物的检测.

[0254]

患者编号	NGAL	AKI阶段
1	+	AKI3
2	+	AKI3
3	-	N
患者编号	NGAL	AKI阶段
4	+	N
5	+	AKI1
6	+	N
7	+	AKI3
8	+	AKI3
9	+	AKI1
10	+	AKI2

[0255]

11	-	N
12	+	N
13	-	N
14	-	N
15	-	N
16	+	AKI2
17	+	N
18	-	N
19	-	N
20	+	N
患者编号	NGAL	AKI阶段
21	-	N
22	+	AKI1
23	+	AKI1
24	+	AKI2
25	+	AKI1

[0256]

26	-	N
27	+	AKI1
28	-	N

[0257] +:存在生物标记物,-:不存在生物标记物

[0258] 诊断具有AKI(13/28)的100%(13/13)患者在至少一个研究部分中具有可检测的NGAL。至于具有AKI阴性诊断的患者,33%显示阳性NGAL。

[0259] 此外,在采用AKI分类的患者中,在85%的情况下相比于EF-U部分而与,外来体部分中的NGAL丰度更高。诊断AKI的5个患者显示在外来体部分中优先表达NGAL(患者5、8、9、12和16),而其EF-U部分中NGAL水平非常低。只有2个具有阳性AKI诊断和NGAL的患者显示在两部分中相等的NGAL丰度(患者2和7)。

[0260] 在具有阴性AKI诊断的组中,60%显示不可检测的NGAL水平。所有采用阴性AKI诊断和阳性NGAL分类的患者在外来体部分中显示更高的NGAL水平。

[0261] 表7:患者中经分析尿液部分中NGAL的相对丰度.

[0262]

患者编号	NGAL EF-U	总外来体	AKI阶段
1	+	++	AKI3
2	++	++	AKI3
3	-	-	N
4	+	++	N
5	-	+	AKI1
6	+	++	N
7	++	++	AKI3
8	-	+	AKI3

9	-	+	AKI1
10	+	++	AKI2
11	-	-	N
12	-	++	N
13	-	-	N
14	-	-	N
15	-	-	N
16	-	+	AKI2

[0263]

患者编号	NGAL EF-U	总外来体	AKI阶段
17	-	+	N
18	-	-	N
19	-	-	N
20	-	+	N
21	-	-	N
22	+	++	AKI1
23	+	++	AKI1
24	+	++	AKI2

[0264]

25	+	++	AKI1
26	-	-	N
27	+	++	AKI1
28	-	-	N

[0265] +:存在 NGAL,-:不存在 NGAL

[0266] 患者被分为 3 个 AKI 阶段，AKI3 最为严重。来自诊断具有 AKI 的 13 个患者,5 个被分类为 AKI1 且该 5 个 (100%) 在外来体部分中显示更高的 NGAL 丰度。来自诊断具有 AKI2 的 3 个患者,3 个在外来体部分中显示更高的 NGAL 丰度。来自诊断具有 AKI3 的 5 个患者,3 个 (60%) 在外来体部分中显示更高的 NGAL 丰度 (表 7)。

[0267] 此外,分析了无外来体尿 (EF-U) 和总外来体 (TE) 部分之间 NGAL 的相对丰度。

[0268] 分别测定了准入 ICU 并被诊断具有 AKI1、AKI2 和 AKI3 的患者尿液中的 NGAL 水平。结果清楚显示随着损伤水平增加，NGAL 丰度也增加,虽然在 AKI1 和 AKI2 的情况下 TE 中的 NGAL 丰度相比于 EF-U 更高 (图 6)。

[0269] 在具有阴性 AKI 诊断的患者组中,33% (5/15) 在 TE 部分中显示出可检测的 NGAL 水平。此部分中的 NGAL 丰度水平平均为 13.5±9.8AU。这些水平显著低于在 AKI1 患者 TE 中发现的水平 (79.6±22AU,图 6)。这可被解释为通过血清肌酐水平不被检测的初期肾损伤。

[0270] 之前数据显示测定 TE 中的 NGAL 是在使用血清肌酐测定 AKI24 小时前对于 AKI 诊断具有更高灵敏度的方法。

[0271] 为比较 TE 和 EF-U 部分中的 NGAL 相对丰度,计算了 TE/EF-U 比率。结果 (图 7) 显示在 AKI1 的情况下 TE 中 NGAL 丰度相比于 EF-U 高 45 倍,在 AKI2 的情况下高 13 倍。然而,诊断具有 AKI3 的患者未显示出显著差异。数据显示尿外来体中 NGAL 在使用血清肌酐法确立 AKI 诊断前 24 小时期间内在 AKI(AKI1 和 AKI2) 的早期检测中具有高灵敏度。

[0272] 因为之前结果显示具有 AKI1 患者中总外来体 (TE) 中更高的 NGAL 丰度,进一步分析了免疫纯化外来体 (IP-E) 中 NGAL 的丰度。AQP1 用于免疫纯化诊断有 AKI1 的患者中的外来体。将 IP-E 部分中 NGAL 的丰度与 TE 和 EF-U 部分相比较。结果显示 IP-E 中 NGAL 丰度高于 TE 且甚至高于 EF-U 部分 (图 8)。

[0273] 数据显示来自肾单位近端小管部分的免疫纯化外来体增加了 NGAL 丰度且因此增加了在危重病人早期 AKI 检测中的灵敏度。

[0274] 对于此实施例 28 个患者组的分析可确立尿中 NGAL 的测定是在血清肌酐水平通常方法可诊断前 24 小时期间内用于 AKI 诊断的良好方法。

[0275] 外来体部分中 NGAL 丰度高于无外来体尿部分中 NGAL 丰度,因此显示了一种用于早期 AKI 诊断,特别是用于 AKI1 和 AKI2 期的更高灵敏度方法。

[0276] 外来体的免疫纯化可增加AKI检测的灵敏度，归因于采用AQP1免疫纯化的外来体中更高的NGAL丰度。

[0277] 考虑到其它病理学可增加尿中NGAL水平，免疫纯化外来体分析可确立所测NGAL来自于肾脏，这增加了用于早期AKI检测的外来体生物标记物测定的特异性。

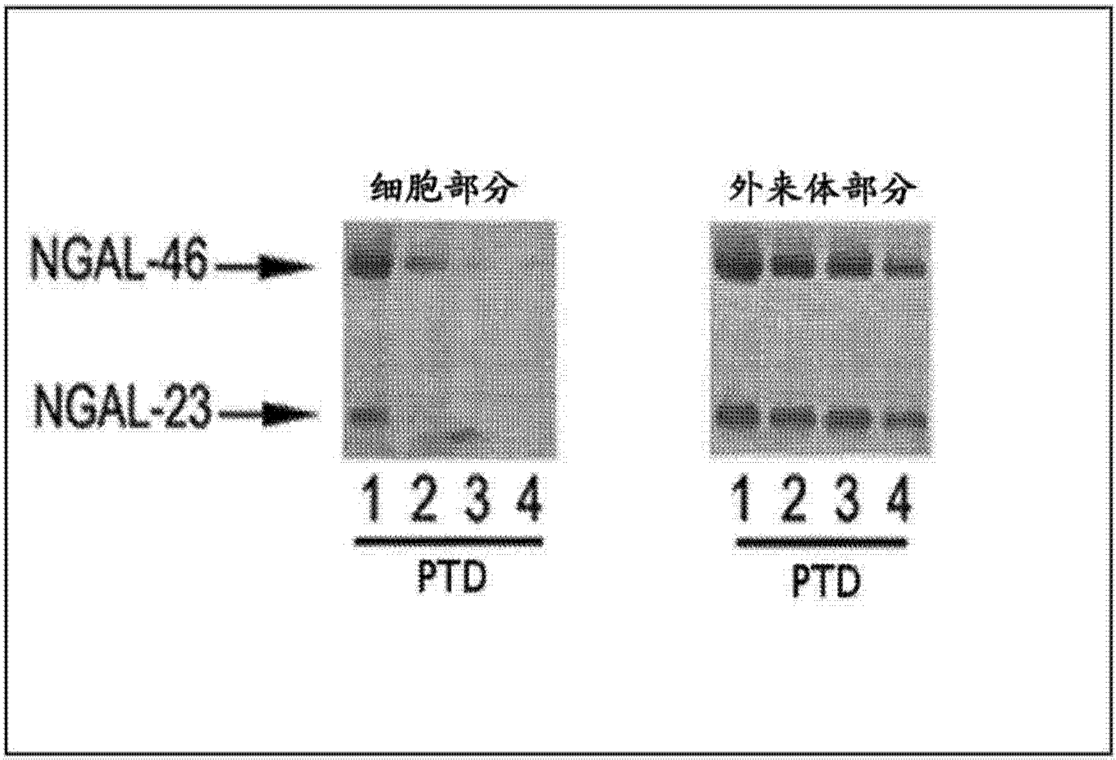


图 1

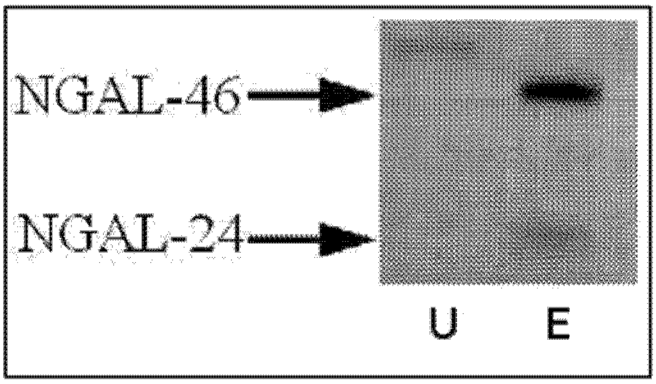


图 2

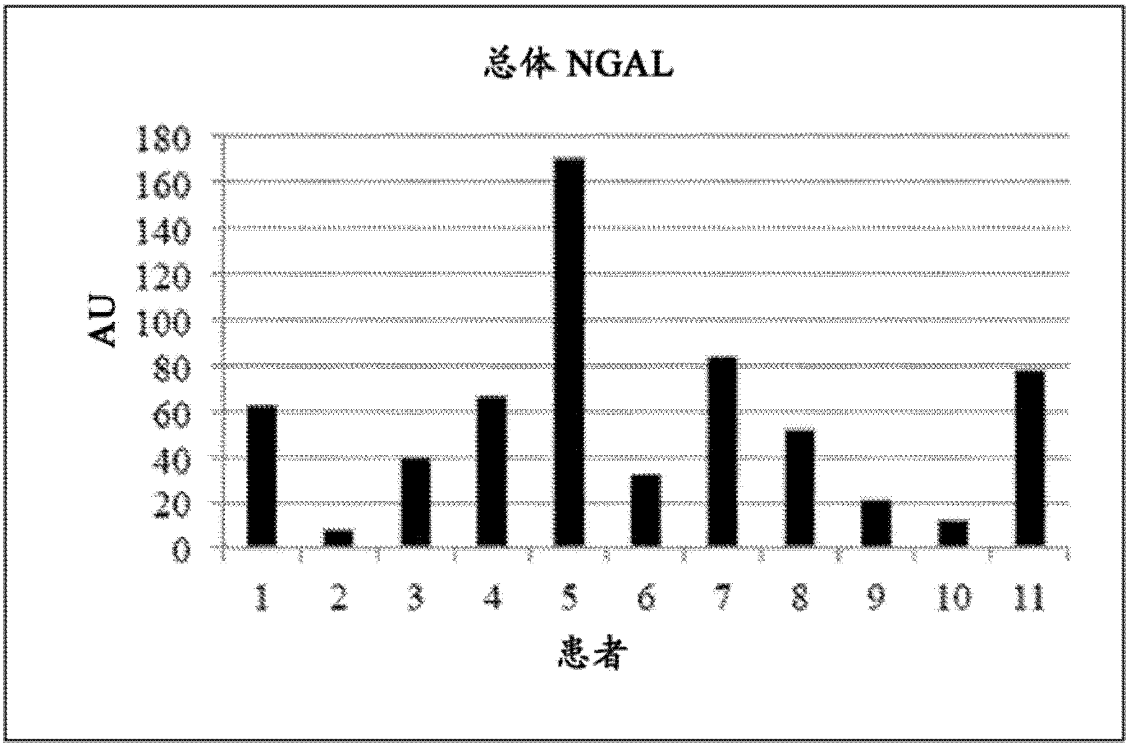

总体 NGAL
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
AU
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
患者

图 3

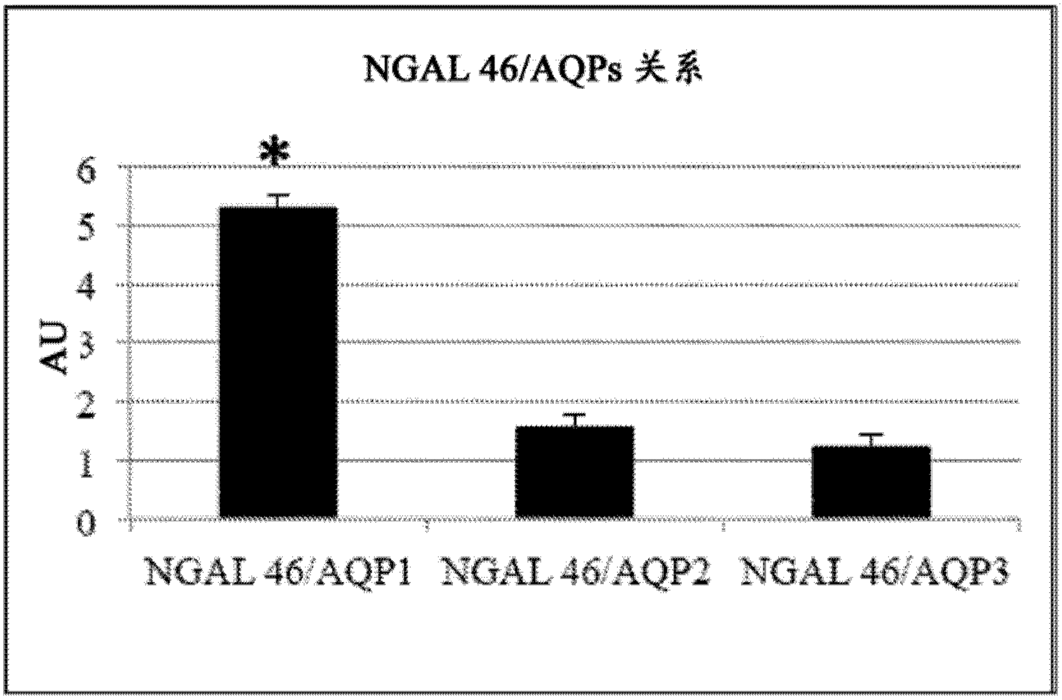

NGAL 46/AQPs 关系
*
6
5
4
3
2
1
0
AU
NGAL 46/AQP1
NGAL 46/AQP2
NGAL 46/AQP3

图 4

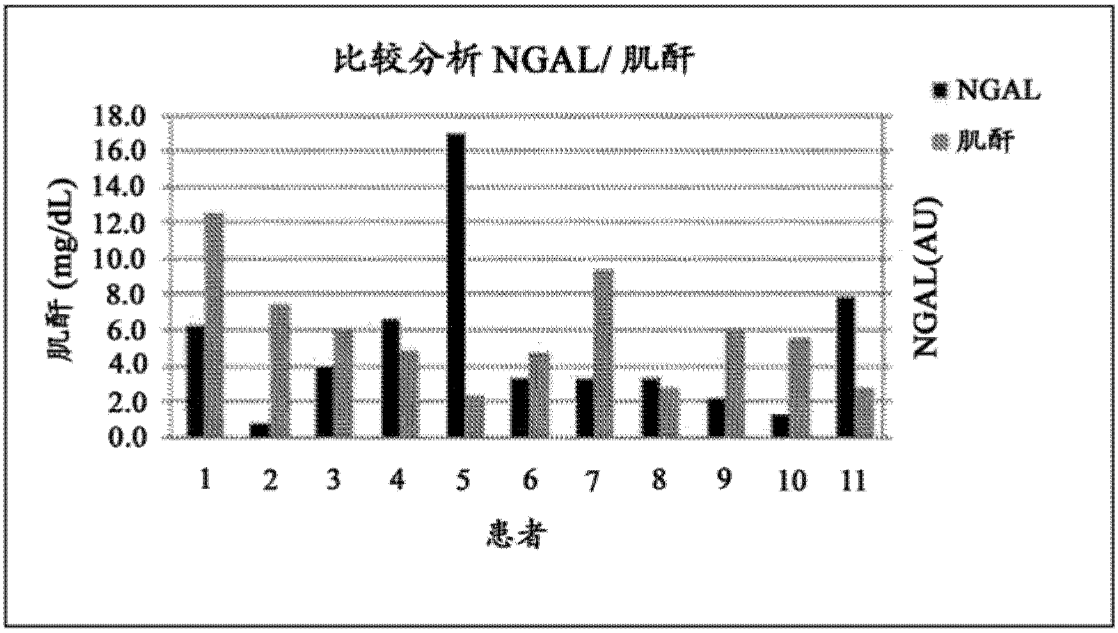

比较分析 NGAL/ 肌酐
NGAL
肌酐
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
肌酐 (mg/dL)
NGAL(AU)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
患者

图 5

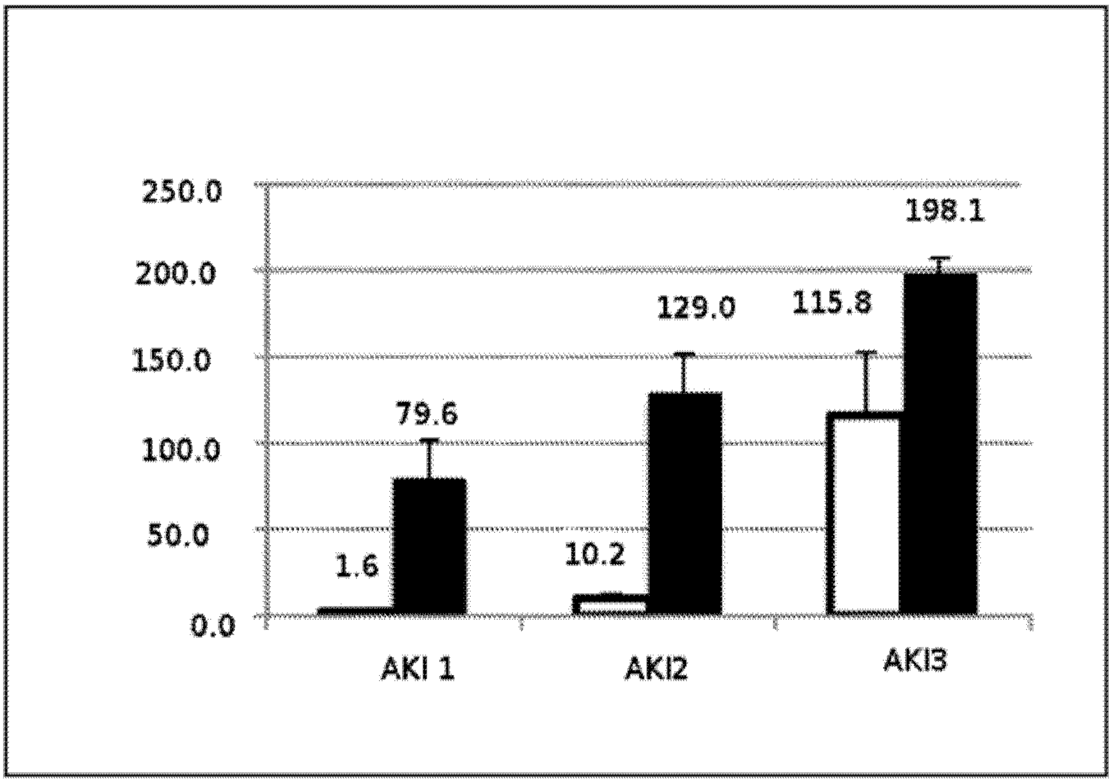

250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
1.6
79.6
10.2
129.0
115.8
198.1
AKI 1
AKI2
AKI3

图 6

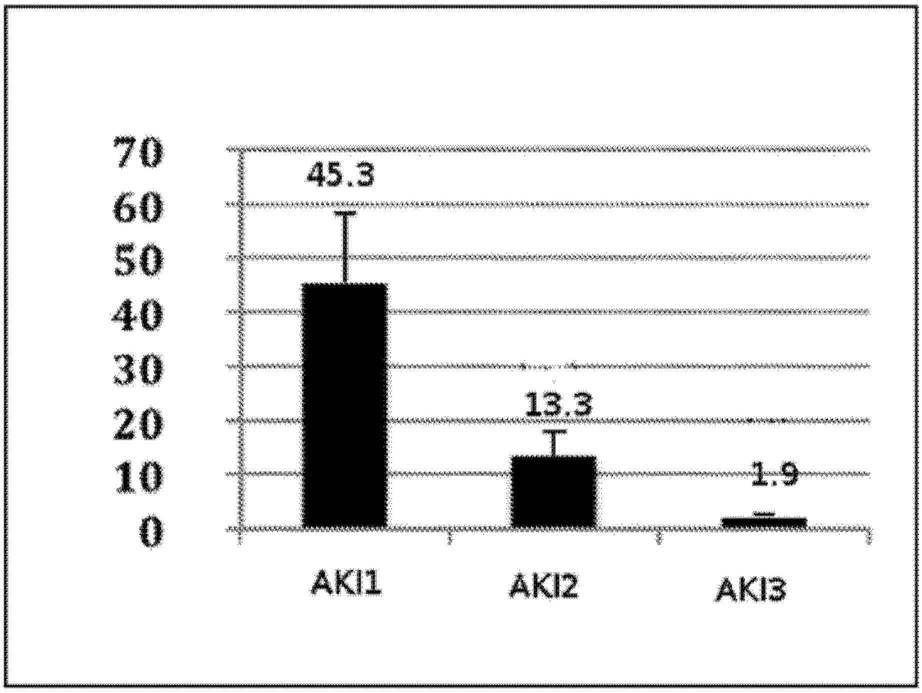

70
60
50
40
30
20
10
0
45.3
13.3
1.9
AKI1
AKI2
AKI3

图 7

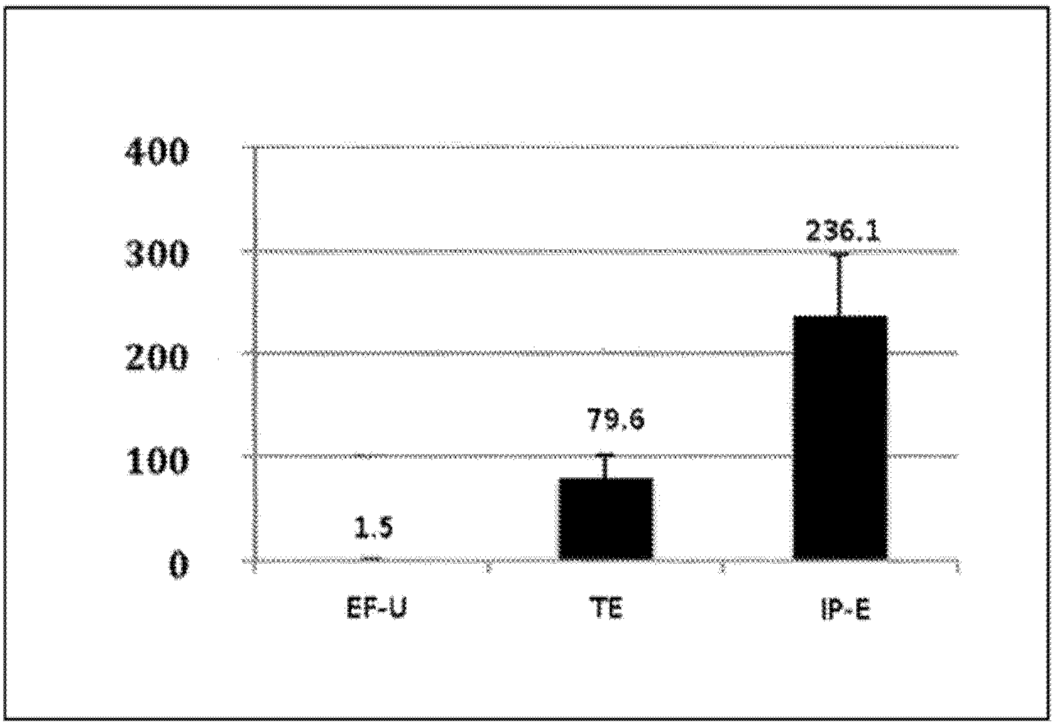

400
300
200
100
0
1.5
79.6
236.1
EF-U
TE
IP-E

图 8