



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102026655 A

(43) 申请公布日 2011.04.20

(21) 申请号 200980116060.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.04.16

*A61K 38/43*(2006.01)

(30) 优先权数据

*G01N 33/53*(2006.01)

12/113056 2008.04.30 US

*G07K 14/47*(2006.01)

*A61P 9/00*(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2009/000405 2009.04.16

(87) PCT申请的公布数据

W02009/132510 EN 2009.11.05

(71) 申请人 港大科桥有限公司

地址 中国香港数码港

申请人 金永发企业有限公司

(72) 发明人 徐爱民 汪玉 R·任能博

G·W·H·高德礼 陈佩儿 M·莱曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 郭文洁

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54) 发明名称

脂笼蛋白-2 作为心脏和中风风险的预后和  
诊断标记

(57) 摘要

本发明公开了用于通过诸如免疫测定或免疫  
试验的测定来测量体液(包括但不限于血液、血  
清、血浆、尿液、唾液、泪液等)中的脂笼蛋白-2 以  
用于以下目的的方法及仪器:(1) 预测未来心血  
管病的风险;和(2) 测定某些个体自使用设计为  
预防和/或治疗心血管病的某些治疗中获得较大  
或较小程度的益处的可能性。

1. 用于表征受试者心血管病风险或心血管病进展的方法，所述方法包括：  
从所述受试者获得体液样品；  
测量所述样品中的脂笼蛋白 -2 水平；和  
将所述受试者的脂笼蛋白 -2 水平与预测定的参考值比较，其中所述预测定的参考值与群体中的标准脂笼蛋白 -2 水平相关，且其中与所述预测定的参考值比较脂笼蛋白 -2 水平升高预示风险增加。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述预测定值为单一值、多个值、单一范围或多个范围。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述预测定值为多个预测定的标记物水平范围，其中所述受试者脂笼蛋白 -2 水平与所述预测定的参考值比较包括：  
确定所述受试者脂笼蛋白 -2 水平所属的预测定的标记物水平范围。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述心血管病为慢性心脏病、急性冠状动脉症状、心机能不全或中风。
5. 权利要求 1 的方法，所述方法进一步包括：  
测量所述样品中心血管病或炎症的第二标记的水平，并将所述脂笼蛋白 -2 水平与所述第二标记物水平关联，其中所述脂笼蛋白 -2 水平和第二标记物水平的组合预测风险。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述第二标记选自胆固醇部分、C-反应蛋白 (CRP) 和髓过氧化物酶 (MPO)；所述方法进一步包括基于所述脂笼蛋白 -2 水平确立第一风险值，将所述胆固醇、CRP 或 MPO 的水平与第二预测定参考值比较以确立第二风险值；和  
基于所述第一和第二风险值的组合来表征所述受试者的风险。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述第一和第二风险值的组合确立不同于所述第一和第二风险值的第三风险值。
8. 权利要求 1 的方法，其中随时间重复进行所述测量，以监测心血管病风险随时间的变化或进展。
9. 用于评估受试者从用降低心血管病风险的药物治疗获得益处的可能性的方法，所述方法包括：  
从所述受试者获得体液样品；  
测量所述样品中脂笼蛋白 -2 的水平；  
将所测定的脂笼蛋白 -2 浓度与预测定的参考值进行比较，其中若所述样品中脂笼蛋白 -2 浓度与所述预测定的参考值相比降低，则存在从所述治疗获益的可能性。
10. 包含用于预防中风、心脏病发作或心血管病或用于治疗心血管病的药物的药物组合物，所述药物选自抗炎性药物（包括阿司匹林和非阿司匹林抗炎性药物）、抗糖尿病药物 [PPAR  $\gamma$  激动剂噻唑烷二酮类（例如罗格列酮）]、抗血栓药物、抗血小板药物、血纤蛋白溶解药、降脂药物、直接凝血酶抑制剂、糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂、结合细胞粘附分子并抑制白血细胞附着到所述分子的能力的药剂、钙通道阻断药、 $\beta$ -肾上腺素能受体阻滞剂、环加氧酶 -2 抑制剂和血管紧张素系统抑制剂；所述药物组合物还包括能够降低个体脂笼蛋白 -2 浓度的组分。
11. 权利要求 10 的药物组合物，其中所述组分包含针对脂笼蛋白 -2 的中和抗体或阻抑脂笼蛋白 -2 产生或拮抗脂笼蛋白 -2 生物活性的化学化合物。
12. 降低中风、心脏病发作或心血管病风险或治疗心血管病的方法，所述方法包括：

给予受试者能够降低身体中脂蛋白-2浓度的药物。

13. 用于预测发展中风、心脏病发作或心血管病风险的测试试剂盒，所述试剂盒包括：

脂蛋白-2结合组分。

14. 权利要求13的测试试剂盒，其中所述脂蛋白-2结合组分为适配体、抗体或另一脂蛋白-2拮抗剂。

15. 包括包装的测试试剂盒，所述包装包括用于脂蛋白-2的测定物和使用说明书。

16. 权利要求15的测试试剂盒，所述试剂盒进一步包括用于让通过所述测定确定的脂蛋白-2水平与发展未来心血管病的风险或与其它患者标准相关联的数字图表或颜色图表。

17. 权利要求16的测试试剂盒，所述试剂盒进一步包括用于心血管病第二标记的测定物。

18. 权利要求17的测试试剂盒，其中所述第二标记测定物是用于胆固醇、C-反应蛋白或髓过氧化物酶的测定物。

19. 在哺乳动物受试者中治疗心血管疾病或延迟其进展的方法，所述方法包括降低所述受试者循环脂蛋白-2的水平或作用。

20. 权利要求19的方法，其中所述降低包含给予一定量脂蛋白-2拮抗剂。

21. 权利要求20的方法，其中所述拮抗剂为脂蛋白-2的抗体或干扰脂蛋白-2与其受体结合的化合物。

22. 脂蛋白-2在制备用于表征受试者心血管病风险或进展的药物中的用途，其中所述药物经过调配以使所述受试者脂蛋白-2水平与预测定的参考值比较，其中所述预测定的参考值与群体中脂蛋白-2标准水平有关，且其中与所述预测定的参考值相比脂蛋白-2水平升高预示风险增加。

23. 权利要求22的用途，其中所述预测定值为单一值、多个值、单一范围或多个范围。

24. 权利要求23的用途，其中所述预测定值为多个预测定的标记物水平范围，其中让所述受试者脂蛋白-2水平与所述预测定的参考值比较包括：

确定受试者脂蛋白-2水平所属的预测定的标记物水平范围。

25. 权利要求22的用途，其中所述心血管病为慢性心脏病、急性冠状动脉症状、心肌梗不全或中风。

26. 权利要求22的用途，其中所述药物进一步包括第二标记，并经过调配以测量所述样品中心血管病或炎症的第二标记的水平，并且使所述脂蛋白-2水平与所述第二标记物水平相关，其中脂蛋白-2水平和第二标记物水平的组合预示风险。

27. 权利要求26的用途，其中所述第二标记选自胆固醇部分、C-反应蛋白(CRP)和髓过氧化物酶(MPO)；所述用途进一步包括基于所述脂蛋白-2水平确立第一风险值，将胆固醇、CRP或MPO的水平与第二预测定的参考值进行比较以确立第二风险值和基于所述第一和第二风险值的组合表征所述受试者风险。

28. 权利要求27的用途，其中所述第一和第二风险值的组合确立不同于所述第一和第二风险值的第三风险值。

29. 脂笼蛋白-2在制备用于评估受试者从用降低心血管病风险的药物的治疗中获益的可能性的药物中的用途，其中所述药物经过调配以使所测定的脂笼蛋白-2浓度与预测定的参考值进行比较，其中若所述样品中的脂笼蛋白-2浓度与所述预测定的参考值相比降低，则存在从所述治疗获益的可能性。

30. 能够降低身体脂笼蛋白-2浓度的药物在制备用于降低中风、心脏病发作或心血管病风险或治疗心血管病的药物中的用途。

31. 能够降低哺乳动物受试者身体循环脂笼蛋白-2水平或作用的药物在制备用于治疗所述受试者心血管疾病或延迟其进展的药物中的用途。

32. 权利要求31的用途，其中所述药物为一定量的脂笼蛋白-2拮抗剂。

33. 权利要求31的用途，其中所述药物为脂笼蛋白-2抗体或干扰脂笼蛋白-2与其受体结合的化合物。

34. 用于表征受试者心血管病风险或进展的脂笼蛋白-2，其中所述药物经过调配以使所述受试者脂笼蛋白-2水平与预测定的参考值进行比较，其中所述预测定的参考值与群体中脂笼蛋白-2标准水平有关，并且其中与所述预测定的参考值相比脂笼蛋白-2水平升高预示风险增加。

35. 用于评估受试者从用降低心血管病风险的药物的治疗中获益的可能性的脂笼蛋白-2，其中所述药物经过调配以使所测定的脂笼蛋白-2浓度与预测定的参考值进行比较，其中若所述样品中的脂笼蛋白-2浓度与所述预测定的参考值相比降低，则存在从所述治疗获益的可能性。

36. 能够降低身体内脂笼蛋白-2浓度的药物，其用于降低所述中风、心脏病发作或心血管病的风险或治疗心血管病。

37. 能够降低受试者身体内循环脂笼蛋白-2的水平或作用的药物，其用于治疗哺乳动物受试者心血管疾病或延迟其进展。

## 脂笼蛋白 -2 作为心脏和中风风险的预后和诊断标记

### [0001] 发明背景

#### 发明领域

[0002] 本发明涉及脂笼蛋白 -2 (lipocalin-2) 作为心脏风险、慢性心脏病和中风风险的诊断标记的用途。具体地说, 本发明涉及通过测量受试者循环脂笼蛋白 -2 的浓度并与标准化的人群或标准人群的脂笼蛋白 -2 水平比较所测量的水平, 来评估风险和这些风险的发展。

#### [0003] 背景

[0004] 心血管病在发达国家仍然是最普遍的发病和死亡的原因。因此, 预防心血管病是主要的公共卫生重要领域。目前业已阐述未来心血管病的若干风险因子, 并在临床上广泛用于检测高风险个体, 例如评估总胆固醇、高密度脂蛋白 (HDL) 和低密度脂蛋白 (LDL) 水平。然而, 大量心血管病发生在明显具有低到中等风险概况 (risk profile) 的个体中, 鉴定所述患者的能力受到限制。此外, 积累的数据提示, 某些预防性及治疗性治疗对处于心血管病风险中或已知患有心血管病的患者的有益作用, 在不同患者群中变化极大。然而, 目前缺乏阐述确定是否可预期某些治疗更有效或更无效的测定数据。

[0005] 脂笼蛋白 -2 也被称为 24p3 (1) 和中性粒细胞明胶酶相关脂笼蛋白 (NGAL) (2), 是 25kDa 的分泌性糖蛋白, 其最初在小鼠肾细胞和人嗜中性粒细胞颗粒中鉴定。其属于由超过 20 个分泌性小蛋白组成的脂笼蛋白超家族, 所述小蛋白包括 RBP4、脂肪酸结合蛋白 (FABP)、主要尿蛋白 (MUP)、载脂蛋白 D (apoD) 和前列腺素 D 合成酶 (PGDS) (3)。该蛋白家族的共同特征是其结合并运输诸如游离脂肪酸、类视黄醇、花生四烯酸和各种固醇 (4) 等小亲脂物质的能力。尽管先前业已报道脂笼蛋白 -2 与白细胞三烯 B<sub>4</sub> 及脂多糖 (5) 有微弱结合, 但仍有待鉴定其高亲和力的内源配体。脂笼蛋白 -2 除在嗜中性粒细胞中表达之外, 还在若干其它组织中表达, 包括肝、肺、肾、脂肪细胞和巨噬细胞 (6-8)。诸如脂多糖和 “IL-1 $\beta$ ” 等几种炎性刺激物可在这些细胞中显著诱导脂笼蛋白 -2 表达及分泌 (6, 9)。显而易见的是, 业已显示促炎转录因子 NF- $\kappa$ B 通过与在脂笼蛋白 -2 基因启动子区内的共有基序结合来反式激活 (transactivate) 脂笼蛋白 -2 表达 (10), 这表明该分泌性蛋白质可能参与炎症反应。

[0006] 最近发现升高的血浆脂笼蛋白 -2 水平与动脉粥样硬化病变中增加的蛋白水解活性有关, 并表明其为缺血性损伤、顺铂中毒性肾损害或感染后的肾衰竭的起因 (11-15)。脂笼蛋白 -2 与基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的部分结合表明, 脂笼蛋白 -2 可通过保护 MMP-9 免遭降解 (2, 16) 并保留其酶活性而对 MMP-9 发挥调节作用。最近的研究表明, MMP-9 和脂笼蛋白 -2 共同位于人动脉粥样硬化斑的巨噬细胞及平滑肌细胞 (SMC) 中。原位淋巴造影术 (lymphography) 显示脂笼蛋白 -2 表达得越多的地方, MMP-9 活性越高, 这表明脂笼蛋白 -2 在调节 MMP-9 活性及破坏硬化斑的稳定中的潜在作用 (15)。

#### [0007] 发明简述

[0008] 本发明实施方案涉及通过免疫测定或免疫试验来测量体液（包括但不限于血液、血清、血浆、尿液、唾液、泪液等）中的脂笼蛋白-2，以用于：(1) 预测未来心血管病的风险；和 (2) 测定某些个体自使用设计为预防和/或治疗心血管病的某些治疗中获得较大或较小程度的益处的可能性。

[0009] 业已发现脂笼蛋白-2 水平升高预示未来心血管病。例如，明显健康的人脂笼蛋白-2 水平升高预示心肌梗塞 (MI) 风险增加。作为另一实例，脂笼蛋白-2 水平升高预示未来中风的可能性增加。

[0010] 还已发现可从个体的脂笼蛋白-2 基线水平，测定某些个体从使用降低未来心血管病风险的某些治疗剂获得较大或较小程度益处的可能性。本发明部分基于脂笼蛋白-2 具有不依赖于其它未来心血管病指示物的预示值这一意想不到的发现。具体而言，脂笼蛋白-2 不依赖于 C-反应蛋白 (CRP) 和髓过氧化物酶 (MPO) 预测未来有害的心血管病。因此，脂笼蛋白-2 可单独作为未来有害心血管病的指示物使用，或与包括但不限于胆固醇、CRP 和 MPO 等现有技术的指示物联合使用。因此，本发明不包括简单地重复先前可用其它指示物进行的测量。相反，将脂笼蛋白-2 水平添加到现有技术的指示物中。

[0011] 如上所述，这些发现导致新的诊断测试。本发明一个方面提供用于表征个体发展未来心血管病的风险概况的方法。所述方法包括获得个体的脂笼蛋白-2 水平。然后将该脂笼蛋白-2 水平与预测定值比较，然后基于脂笼蛋白-2 水平与预测定值的比较，表征发展未来心血管病的个体风险概况。预测定值可为单一值、多个值、单一范围或多个范围。因此，在一个实施方案中，预测定值是预测定标记水平范围的多个值，而比较步骤包括确定受试者标记水平所属于的预测定标记水平范围。

[0012] 本发明另一方面提供使用脂笼蛋白-2 水平与另一已知心血管病标记一起用于表征个体发展未来心血管病的风险概况的方法，所述已知心血管病标记包括但不限于胆固醇组分 (cholesterol fraction) 或 CRP 或 MPO。获得个体的脂笼蛋白-2 水平。将该脂笼蛋白-2 水平与第一预测定值比较，以确立第一风险值。还获得个体的另一已知心血管病标记（包括但不限于胆固醇或 CRP 或 MPO）的水平。将个体的第二标记（包括但不限于胆固醇或 CRP 或 MPO）水平与第二预测定值比较，确立第二风险值。然后基于第一风险值和第二风险值的组合表征个体发展心血管病的风险概况，其中第一风险值和第二风险值的组合确立了不同于第一风险值和第二风险值的第三风险值。

[0013] 本发明又一方面提供评估个体从用于降低心血管病风险的药物治疗获得益处的可能性的方法。所述药物可选自抗炎性药物、抗血栓药物、抗血小板药物、血纤蛋白溶解药、降脂药物、凝血酶直接抑制剂和糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂和结合细胞粘附分子并抑制白血细胞附着于所述分子能力的药物（例如抗细胞粘附分子抗体）。为实行所述方法，获得个体的脂笼蛋白-2 水平。然后将该水平与预测定值比较，其中与预测定值比较的脂笼蛋白-2 水平预示该个体从用该药物治疗获益的可能性。然后可在通过用所述药物治疗获得的可能净利益方面对个体进行表征。

[0014] 因此，本发明提供评估某些治疗对于候选患者的可能的净利益的信息。

[0015] 本发明还涵盖包括包装的试剂盒，所述包装包括用于脂笼蛋白-2 的测定物 (assay) 和使用说明书及任选相关材料如数字图表或颜色图表，其用于将通过所述测定物而确定的脂笼蛋白-2 水平与发展未来心血管病的风险或与其它上述患者标准关联起来。

在另外的实施方案中，试剂盒还包括用于至少第二标记（包括但不限于胆固醇、CRP、MPO 等）的测定物。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1A 和 1B 显示具有心脏病发作 / 中风高风险的患者中血清和尿液脂蛋白-2 (LCN2)。显示具有心脏病发作 / 中风高风险的患者 ( $n = 46$ ) (y-轴) 和 36 名健康对照受试者 (x-轴) 的浓度。方框里的线条表示中值，同时方框表明第 25 百分位数和第 75 百分位数之间的间隔。细丝线 (whisker) 表示第 10 百分位数和第 90 百分位数之间的间隔。高风险组和健康组之间的血清和尿液 LCN2 浓度之间的差异（分别为  $P < 0.001$  和  $P < 0.05$ ）在统计学上显著。

[0018] 发明详述

[0019] 定义

[0020] 本说明书所用术语“测试样品”指为诊断、预后或评估目标受试者（例如患者）的目的获得的生物液体样品。在某些实施方案中，可为了测定不断进展的病况结果或治疗方案对病况的作用的目的获得所述样品。优选测试样品包括但不限于血液、血清、血浆、尿液、唾液和泪液。另外，本领域技术人员应认识到某些测试样品在分级分离或纯化程序（例如将全血分离为血清或血浆组分）后将更易于被分析。

[0021] 本文所用术语心血管病 (CVD) 和冠状动脉病 (CAD) 可互换，意欲包括但不限于：心脏病、动脉粥样硬化、微血管病、高血压、中风、糖尿病血管病变、心肌梗死、急性冠状动脉综合征、不稳定性心绞痛和糖尿病视网膜病。

[0022] 本说明书所用术语“诊断”指从一系列风险值和 / 或患者症状预测疾病或病况类型。这与疾病预测相反，疾病预测是在疾病发生前预测其发生，而术语“预后”是从一个或多个在前时间点的指示值预测在未来时间点的疾病进展。

[0023] 本文所用术语“标记”是指以下物质，例如蛋白质或多肽或其它物质，其用于筛选从受试者获得的测试样品的靶标。认为本发明用作标记的“蛋白质或多肽”包括任何免疫学可检测片段、其可确认的片段。本领域技术人员应认识到，从脑缺血发作 (cerebral attack) 期间受损的中枢神经系统细胞释放的蛋白质可能被降解或断裂为所述片段。另外，某些标记作为无活性形式合成，随后可例如通过蛋白水解将其激活。所述标记实例包括白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )，很多其它标记为本领域所知。本文所用术语“相关标记”指特定标记的一种或多种片段，它们本身可作为该标记的替代品被检测。这些相关标记可为标记的例如“前”、“原”或“前原”形式，或用以形成成熟标记而除掉的“前”、“原”或“前原”片段。作为“前”、“原”或“前原”形式合成的例示性标记例如 IL-1B 为本领域所知。在优选实施方案中，这些“前”、“原”或“前原”形式或除掉的“前”、“原”或“前原”片段在本文所述方法中以与成熟标记的同等方式被使用。

[0024] 应该注意，除非上下文明确指出不是这样，否则本文及所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“和”及“所述”包括复数指示物。因此，例如对“一种脂蛋白-2 结合组分”的提及包括多种所述结合组分及本领域技术人员已知的其等同物，等等。

[0025] 提供本文讨论的出版物仅为了其在本发明提交日期前公开的内容。此处无论如

何不能解释为承认凭借先前发明本发明就没有资格先于所述出版物。此外，提供的出版日期可能与实际出版日期不同，所述实际出版日期可能需要单独确认。

[0026] 详述

[0027] 为响应本领域需求，本发明提供用于通过采用 LCN2 作为生物标记或筛选工具来评估哺乳动物受试者发展心血管病的风险或评估心血管病进展的方法。本发明提供哺乳动物受试者的 LCN2 水平和心血管病发展或进展的风险水平之间的相关性。

[0028] 本发明一方面提供用于通过采用 LCN2 作为所述疾病的新型生物标记来测定哺乳动物受试者的心血管病风险或进展的诊断方法。因此，本发明方法包括通过测量哺乳动物受试者生物流液中脂蛋白-2 水平来测定心血管病的风险或进展。将所测量的水平与群体中 LCN2 水平标准比较。与标准相比 LCN2 水平升高预示疾病风险增加。在一个实施方案中，LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的最低 25% 预示心血管病风险。在另一实施方案中，若受试者 LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的 50%，则诊断为心血管病中等风险。在又一实施方案中，LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的 75% 预示心血管病高风险或已有的心血管病进展。在另一实施方案中，LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的 80% 预示疾病的最高风险。

[0029] 本发明方法另一方面进一步包括测量样品中心血管病第二生物标记的浓度或第二炎性生物标记的浓度，并将 LCN2 水平与该第二生物标记物水平相关联，其中 LCN2 浓度和第二生物标记浓度的组合预示心血管风险。

[0030] 本发明方法另一方面包括随时间重复测量循环 LCN2，以监测心血管病风险的进展。

[0031] 在这些方法的一个实施方案中，血浆或血清 LCN2 水平预示在无心血管病临床症状和 / 或非糖尿病的哺乳动物受试者中心血管病（例如动脉粥样硬化）的风险。在另一实施方案中，本发明方法预测有代谢综合征症状的哺乳动物受试者的心血管病风险。在又一实施方案中，本发明方法评估糖尿病受试者心血管病的风险。在再一实施方案中，可采用本发明方法来跟踪受试者的所述疾病随时间的风险。

[0032] 本发明再一方面提供用于通过降低受试者循环 LCN2 水平或作用来治疗哺乳动物受试者的炎性疾病或心血管病或延迟其进展的方法。

[0033] 本发明提供用于通过诸如免疫测定或免疫试验等测定来测量生物流液（包括但不限于血液、血清、血浆、尿液、唾液、泪液等）中的脂蛋白-2 的方法和仪器，其用于：(1) 预测未来心血管病的风险；和 (2) 测定某些个体自使用设计为预防和 / 或治疗心血管病的某些治疗中获得较大或较小程度的益处的可能性。

[0034] 根据一个实施方案，用于表征个体发展中风、心脏病发作或心血管病风险的方法包括从个体获得生物流液样品，测定样品中的脂蛋白-2 浓度，和将所测定的脂蛋白-2 浓度与预测定的和健康个体相关的参考值进行比较。与参考值比较若样品中脂蛋白-2 的浓度升高，则存在发展中风、心脏病发作或心血管病的风险。预测定值可为单一值、多个值、单一范围或多个范围。在其中预测定值为多个预测定的标记物水平范围的实施方案中，测定的脂蛋白-2 浓度与预测定的参考值的比较可包括确定个体的脂蛋白-2 水平所属的预测定的标记物水平范围。

[0035] 被用作风险评估的心血管病可为慢性心脏病、急性冠状动脉症状或心机能不



全。

[0036] 在另一实施方案中，除了通过脂蛋白-2 浓度测定的风险值外，还可测定胆固醇组分（包括 HDL、LDL 或二者）、C-反应蛋白（CRP）、髓过氧化物酶（MPO）或其它风险标记的浓度，并与他们的相应预测参考值（与健康个体有关）进行比较，以确立第二风险值。可基于第一风险值（通过脂蛋白-2 浓度测定）和第二风险值表征个体的风险。在一个实施方案中，可基于第三风险值表征个体风险值，该第三风险值是基于联合第一风险值和第二风险值的风险评估。

[0037] A. 测定各种标记的方法

[0038] 本领域一般技术人员熟悉用于检测和分析本发明标记的若干方法及设备。就患者测试样品中的多肽或蛋白质而言，通常使用免疫测定设备和方法。作为备选或另外地，可选择适配体用于以甚至更高特异性结合，这在本领域众所周知。在各种夹心测定、竞争性测定或非竞争性测定形式中，这些设备和方法可利用标记的分子，以产生与目标分析物的存在或量有关的信号。另外，可采用某些方法和设备（例如生物传感器和光学免疫测定）来测定分析物的存在情况或量而无需标记的分子。

[0039] 优选免疫测定来分析标记，但其它方法为本领域技术人员所熟知（例如标记 RNA 水平的测量）。通常用针对各标记的抗体并检测特异性结合来测定标记的存在情况或量。可利用任何合适的免疫测定，例如酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）、竞争性结合测定等。可直接或间接检测抗体与标记的特异性免疫结合。连接到抗体的直接标记包括荧光或冷光标签、金属、染料、放射性核素等。间接标记包括本领域众所周知的各种酶，例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等。举一个怎样在仪器上实施该程序的实例，人们可使用被称为 Clinical Reader sup.TM. 的 RAMP Biomedical 设备，其利用荧光标签方法，但技术人员应知道实施同一测定的很多不同的仪器及操作方案。将稀释的全血加到样品孔中。红血细胞留在样品垫上，分离的血浆沿条带移动。让荧光染色的乳胶颗粒结合分析物，并将其固定在检测区。在内部对照区固定另外的粒子。在 RAMP Clinical Reader sup.TM. 上测量检测区和内部对照区的荧光，然后计算这些值之间的比率。该比率用于测定分析物浓度，即通过将该比率插入（interpolation）指定批号的标准曲线（lot-specific standard curve）来测定，该标准曲线由制造商在每批测试试剂盒中为每一测定提供。

[0040] 本发明亦涵盖针对标记的固定化抗体的用途，其为本领域一般技术人员所熟知。可将抗体固定到多种固相支持体上，所述固相支持体例如磁粒或色谱基质颗粒、测定场所表面（例如微量滴定孔）、固相基底材料片（例如塑料、尼龙、纸）等。可通过在固相支持体上以阵列包被一种或多种抗体来制备测定条。然后可将该测定条浸入测试样品中，然后通过洗涤和检测步骤快速处理，以产生可测量的信号，例如色斑。

[0041] 可单独或同时用一个测试样品进行多种标记分析。为了有效处理多个样品，可将若干种标记组合到一个测试中。另外，本领域技术人员应能识别来自同一个体的多个样品的测试值（例如在连续的时间点）。所述系列样品的测试应使得能鉴定标记物水平随时间的变化。标记物水平的增加或降低以及标记物水平不发生变化，将提供关于疾病状态的有用信息，所述信息包括但不限于确定事件发生的大约时间、可抢救的组织的存在情况或量、药物治疗的恰当性、各种疗法的有效性、确定事件的严重程度、确定疾病

严重程度和确定患者结果（包括未来事件的风险）。

[0042] 可创建由本发明所提及的标记组合构成的测定，以提供关于鉴别诊断的相关信息。可用 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多种标记或各别的标记来构建这样的小组，但是最优选数目低于 4 种标记的实施方案。可用本发明所述方法进行单标记或包含较大标记小组的标记集的分析，以使各种临床设置中的临床灵敏度或特异性最优化。将测定的临床灵敏度定义为所述测定正确预测的疾病患者的百分数，测定的特异性定义为所述测定正确预测的无疾病患者的百分数（Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 第 2 版, Carl Burtis 和 Edward Ashwood 编辑, W.B.Saunders 和 Company, 第 496 页）。

[0043] 也可以多种物理形式进行标记分析。例如，可使用微量滴定板或自动操作来帮助处理大量测试样品。或者，可开发单样品形式来促进以实时方式的即时治疗和诊断，例如，在移动运输或急救室设施（setting）中。尤其有用的物理形式包含具有用于检测多种不同分析物的多个可寻址的离散位置的表面。所述形式包括蛋白微阵列或“蛋白芯片”（参见例如 Ng 和 Ilag, J.Cell Mol.Med.6 : 329-340 (2002)）和毛细管装置。

[0044] 在另一实施方案中，本发明提供用于分析标记的试剂盒。所述试剂盒优选包括用于分析至少一个测试样品的装置和试剂以及用于实施所述测定的使用说明书。试剂盒可含有针对靶标记的适配体。任选试剂盒可含有一种或多种工具，所述工具用于用从对标记小组实施的免疫测定获得的信息来确定或排除某些诊断。可将标记抗体或抗原纳入到免疫测定诊断试剂盒中，这视所测量的标记自身抗体或抗原而定。第一容器可包括包含抗原或抗体制备物的组合物。应该优选以合适滴定形式（titrated form）提供的抗体制备物和抗原制备物二者，且所给抗原浓度和 / 或抗体效价易于在定量测定应用中作为参考。

[0045] 试剂盒还可包括用于检测所提供的抗原和 / 或抗体（如果是在该情况下）与诊断样品之间的特异性免疫反应的免疫检测试剂或标记。合适的检测试剂在本领域众所周知，例如放射性配体、酶配体或其它发色配体，其通常与抗原和 / 或抗体联合使用，或与对第一抗体具有特异性的第二抗体联合使用。因此，借助检测或定量所述标记来检测或定量所述反应。适合于与本发明新型方法联系使用的免疫检测试剂和过程通常在本领域众所周知。

[0046] 试剂也可包括辅助剂，例如缓冲剂和蛋白质稳定剂，例如多糖等。诊断试剂盒必要时可进一步包括：用于降低测试中的背景干扰的试剂；用于增加信号的试剂；用于联合和插入标记值以产生目标临床结果预测的软件和算法；用于实行测试的仪器；标定曲线和图表；标准曲线和图表等。

[0047] 可通过任何测定方法测量样品中的脂蛋白-2 浓度，优选通过适配体结合或通过免疫学方法，优选通过免疫测定或免疫试验，更优选通过酶联免疫吸附测定（ELISA）或测试条（dipstick）。

[0048] 可采用用以检测所述蛋白的任何合适的 LCN2 抗体或适配体来测量生物样品中 LCN2 的浓度。所述适配体或抗体可为本领域目前现存的或目前可市购使用的，或可通过免疫学领域目前常用的技术开发。本文所用术语“抗体”指具有两条轻链和两条重链的完整的免疫球蛋白或其任何片段。因此，分离的单一抗体或片段可为多克隆抗体、高亲和力的多克隆抗体、单克隆抗体、合成抗体、重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗

体。术语“抗体片段”指小于完整抗体的结构，包括但不限于分离的单抗体链、Fv 构建体、Fab 构建体、轻链可变区序列或互补决定区 (CDR) 序列等。在本发明诊断测定中还可使用荷有抗- LCN2 抗体的结合部分的重组分子 (例如携带结合 LCN2 的一个或多个可变链 CDR 序列的重组分子)。在适当情况下，本文所用术语“抗体”亦可指结合 LCN2 的不同抗体或抗体片段的混合物。所述不同的抗体可结合 LCN2 的不同部分，而不是混合物中的其它抗体。抗体可变区的 CDR 序列可反映所述测定中所用抗体的所述差异。例如，如果抗体本身为含有人 CDR 序列的非人抗体或含有非人来源序列的嵌合抗体或某些其它重组抗体片段，那么也可由抗体主链产生所述差异。用于本发明方法的抗体或片段可用常规技术合成或重组产生，或可从血浆分离并纯化，或进一步处理以提高其结合亲和力。应该理解，在本发明方法中可采用如上所述的结合 LCN2 或 LCN2 的特定序列的任何抗体、抗体片段或其混合物，而不管所述抗体或抗体混合物如何产生。

[0049] 同样地，可用能够提供检测信号的试剂对抗体作标签或将其标记，这视测定形式而定。这些标记能够单独或与其它组合物或化合物一起提供检测信号。当在诊断方法中使用不止一种抗体时，期望所述标记相互作用以产生可检测的信号。最期望的是，可肉眼 (例如通过比色) 检测标记。在测定中多种酶系统起作用而显示比色信号，例如葡萄糖氧化酶 (其用葡萄糖作为底物) 在过氧化物酶和氢供体存在下释放作为产物的过氧化物，所述氢供体例如是四甲基联苯胺 (TMB)，TMB 产生可肉眼看见蓝色的氧化 TMB。其它实例包括辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP) 和与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶联用的己糖激酶，所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与 ATP、葡萄糖和 NAD<sup>+</sup> 反应产生 NADH 等产物，可因 340nm 波长处的吸光度增加而检测 NADH。

[0050] 可在本发明方法中利用的其它标记系统可通过其它方式检测，所述方式例如是在适合的检测中，可用其中埋入染料的彩色乳剂微粒 (Bangs Laboratories, Indiana) 代替酶来提供表示存在所得到的 LCN2- 抗体复合体的肉眼可见信号。其它标记还包括荧光化合物、放射性化合物或元素。优选抗- LCN2 抗体与可检测荧光的荧光染料结合或缀合，所述荧光染料例如异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红素 (PE)、别藻蓝蛋白 (APC)、coriphosphine-O (CPO) 或串联染料、PE- 花色素苷-5 (PE-Cy5) 和 PE- 德克萨斯红 (ECD)。常用荧光染料包括异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红素 (PE)、别藻蓝蛋白 (APC)，还包括串联染料、PE-Cy5、PE- 花色素苷-7 (PE-Cy7)、PE- 花色素苷-5.5 (PE-Cy5.5)、ECD、罗丹明、多甲藻素-叶绿素-蛋白 (PerCP)、FITC 和 Alexa 染料。可根据测定方法来使用所述标记组合，例如德克萨斯红和罗丹明、FITC+PE、FITC+PE-Cy5 和 PE+PE-Cy7 等等。

[0051] 用于与本发明诊断测定所用的抗体连接的可检测标记可易于自多种已知组合物中选择，并易于为诊断测定领域的技术人员获得。用于本发明的抗- LCN2 适配体、抗体或片段不受所采用的特定可检测标记或标记系统限制。因此，选择和 / 或产生用于本发明的具有任选的标记的合适抗- LCN2 抗体和适配体，在本领域、本说明书提供的、本文引作参考的文献和常规免疫学教导的范围内。

[0052] 同样地，用于测量生物样品中的 LCN2 的特定测定形式可选自多种免疫测定，例如酶联免疫吸附测定，例如以下实施例所述测定；夹心免疫测定；均相法测定或其它常规测定形式。本领域技术人员可易于从任何种类的常规免疫测定形式中选择测定方法

以实施本发明。

[0053] 用于检测生物样品中的蛋白质的其它试剂（例如肽模拟物、能够检测 LCN2 的合成化学化合物），可在用于定量检测生物样品中的 LCN2 的其它测定形式（例如蛋白质印迹、流式细胞术等）中使用。

[0054] LCN2（优选在血浆或血清中）的测量起作为 CVD 风险的生物标记的作用。根据本发明方法，为了测定心血管病的风险或进展，测量哺乳动物受试者的生物流液中 LCN2 的水平，并将之与群体中的 LCN2 水平的参考标准比较。与所述标准比较 LCN2 水平升高预示疾病风险增加。

[0055] 参考标准通过测量正常群体样品的 LCN2 值来确立，所述正常群体固然由不同心血管健康程度（从健康到各种渐增的 CVD/CAD 风险到罹患 CVD/CAD）的哺乳动物受试者组成。因此，优选通过使用测量受试者 LCN2 水平所用的相同的测定技术来提供标准，以在标准化中避免任何误差。如以下实施例所证明，可基于与群体的 LCN2 水平比较 LCN2 的增加来测定相对 CVD 风险水平。

[0056] 因此，在一个实施方案中，当受试者 LCN2 水平在形成群体的 LCN2 水平的最小 25% 的范围内时，受试者具有“正常” LCN2 水平或低心血管病风险。因此，当受试者 LCN2 水平高于群体 LCN2 水平的最低 25% 时，该测量值表示一定程度的心血管病风险。例如，在另一实施方案中，当受试者 LCN2 水平在形成群体的 LCN2 水平的最低 25-50% 的范围内时，受试者具有低的中间值，但心血管病风险增加。在其中受试者 LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的 50% 的情况下，诊断受试者具有中等心血管病风险。同样地，当受试者 LCN2 水平高于形成群体的 LCN2 水平的 75% 时，受试者具有发展心血管病的高风险，或显示已有的心血管病在进展。最后，当受试者 LCN2 水平高于标准群体的 LCN2 水平的 80% 时，受试者具有疾病最高风险和 / 或进行性心血管病最高风险。

[0057] 评估用心血管药物或用降低中风、心脏病发作或心血管病风险的药物治疗的个体从特定治疗中获益的可能性的方法包括：从该个体获得生物流液样品，测定样品中脂蛋白 -2 的浓度，并将所测定的脂蛋白 -2 浓度与预测定的参考值进行比较。在一个实施方案中，预测定的参考值可为从先前测试或用特定药物治疗前的测试中获得的值。与参考值相比，若样品中脂蛋白 -2 浓度降低，则存在从治疗获益的可能性。在某些实施方案中，所述药物可选自：抗炎性药物、抗血栓药物、抗血小板药物、血纤蛋白溶解药、降脂药物、直接凝血酶抑制剂和糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂和结合细胞粘附分子并抑制白血细胞附着所述分子的能力的药物。

[0058] 本发明实施方案可使用脂蛋白 -2 作为用于预测个体发展中风、心脏病发作或心血管病风险的体外诊断标记。

[0059] 在某些实施方案中，待预测的心血管病可为慢性心脏病、急性冠状动脉症状或心机能不全。

[0060] 本发明实施方案可使用能够降低个体脂蛋白 -2 浓度的组分用于制备预防中风、心脏病发作或心血管病的药物或治疗心血管病的药物。在一个实施方案中，可使用针对脂蛋白 -2 的中和抗体或抑制脂蛋白 -2 生产或拮抗脂蛋白 -2 生物活性的化学化合物。

[0061] 按照实施方案，本发明涵盖降低中风、心脏病发作或心血管病风险的方法或治

疗心血管病的方法，所述方法通过将能够在受试者中降低循环脂蛋白-2浓度的药物给予有此需要的受试者来实现。

[0062] 在本发明方法的再一实施方案中，可通过与测量一种或不止一种 CVD/CAD 生物标记联合测量 LCN2 水平，来进行 CVD 或 CAD 的风险评估。所述另外的生物标记包括但不限于冠状动脉钙化、超敏 C-反应蛋白 (CRP)、髓过氧化物酶 (MPO)、炎症标记、脂蛋白、高半胱氨酸、溶纤维蛋白和止血功能标记 (例如纤维蛋白原、D-二聚体、组织纤溶酶原激活物 (tPA)、纤溶酶原激活物抑制剂 1 抗原)、炎性标记 (包括但不限于肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、脂蛋白-相关磷脂酶 (LpPLA2)、脑利尿钠肽 (BNP)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-18、IL-14、IL-6、可溶性 TNF 受体-1 (solTNFR1) 和 CD40 配体 (CD40L) 等等) 以及胆固醇组分 (HDL、LDL 或二者) 和 CVD 的其它传统风险因子 (例如本领域众所周知的那些因子) 的测量值。LCN2 水平和指示 CVD 风险水平的已知第二生物标记之间的相关性进一步确证 CVD 的风险或进展。因此，测量 LCN2 可起确证对已知生物标记的测定所提供的 CVD 迹象的作用。或者，测量 LCN2 可起比已知生物标记 (例如 CRP) 更准确地诊断 CVD/CAD 风险的作用。

[0063] 在再一实施方案中，本发明方法可包括经给定时间期间重复测量 LCN2 水平的步骤，藉此起监测 CVD 患者进展的作用。所述方法可用于测定 CVD/CAD 的特定治疗方案的成功程度，并可指出其中需要改变疗法的情况。

[0064] B. 用于治疗心血管病或炎症的治疗方法

[0065] 作为本发明人测定作为 CAD/CVD 生物标记的 LCN2 水平的必然结果，本发明进一步提供用于延迟 CVD/CAD 和 / 或炎性疾病进展的新型治疗。所述炎性疾病包括但不限于糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗和起因于动脉粥样硬化心血管病的疾病，例如中风、肾衰竭、失明和栓塞等。所述方法提供治疗方案，该治疗方案包括给予患者足以降低循环 LCN2 或抑制其作用的量的化合物 (例如 LCN2 中和抗体或 LCN2 拮抗剂)。因为如上所述，相对于标准群体 CVD/CAD 风险水平随血浆或血清中的 LCN2 增加而增加，所以该方法试图降低 LCN2 水平以连续降低风险水平值。例如，对于基于血清 LCN2 水平归类为极高风险的患者，即标准群体最高的 75% 中的值，该方法涉及将血清 LCN2 中和到落入下一级标准最低水平范围内的浓度。然而，就胆固醇水平而言，人们认为将高 LCN2 水平降低到起始时的高 LCN2 风险水平值以下的任何值是理想的。重复治疗以使 LCN2 水平渐进式持续降低，直到 LCN2 水平稳定在标准群体的最小百分位数，即对于特定患者尽可能低于或接近正常 / 低风险 / 标准群体的第一个 25%。

[0066] 因此，在一个实施方案中，本发明方法涉及通过降低受试者循环 LCN2 的水平或作用，来治疗或延迟哺乳动物受试者中炎性疾病或心血管疾病的进展。理想情况是，将所述水平降低至少显示水平的 10%。更为理想的是，将所述水平降低至少显示水平的 20%。用本文所述测定，人们可通过将受试者水平与标准群体中的 LCN2 水平进行比较，来测量受试者 LCN2 水平。因此，同样理想的是让受试者水平降低到低于所述标准群体的最高四分位数的水平，即 75% 截点 (cut point)。根据本方法，可继续治疗以将受试者 LCN2 水平降低到在标准群体的 50-75% 四分位数内的水平或比其更低的水平。按照本发明另一实施方案，采用所述方法将受试者 LCN2 水平降低到小于标准群体的最高的 50% 的水平。当然，当将受试者水平降低到标准群体的最低的 25% 范围内的水平时，该方

法的实行最为理想。

[0067] 这些方法可涉及重复给予拮抗剂，或为患者提供在其中循环 LCN2 水平保持在所期需阈值水平的治疗疗程，其如本文所述。在某些实施方案中，使用包含用于预防中风、心脏病发作或心血管病或用于治疗心血管病的药物的药物组合物，所述药物选自抗炎性药物（包括阿司匹林 (aspirin) 和非阿司匹林抗炎性药物）、抗糖尿病药物 [PPAR  $\gamma$  激动剂噻唑烷二酮类 (Thiazolidinediones) (例如罗格列酮 (ROSIGLITAZONE))]、抗血栓药物、抗血小板药物、血纤蛋白溶解药、降脂药物、直接凝血酶抑制剂、糖蛋白 IIb/IIIa 受体抑制剂、结合细胞粘附分子并抑制白血细胞附着到所述分子的能力的药剂、钙通道阻断药、 $\beta$ -肾上腺素能受体阻滞剂、环加氧酶-2 抑制剂和血管紧张素系统抑制剂；所述药物组合物还包含能够降低个体脂蛋白-2 浓度的组分。

[0068] 所述治疗方法用于已有 CVD/CAD 的患者或用于循环 LCN2 水平高于循环 LCN2 正常值的无临床症状患者。

[0069] 术语“LCN2 拮抗剂”意指治疗后与治疗前所存在的比较，可将循环 LCN2 降低到上述较低的风险水平的任何化合物。在一个实施方案中，拮抗剂预防 LCN2 与其天然存在的受体结合。因此，所述化合物可为合成药物、抗-LCN2 抗体或其片段或降低 LCN2 表达的治疗组合物。所述用于该治疗方法的 LCN2 拮抗剂可为市售已知化合物或现有技术已知化合物。

[0070] 根据本方法，可由主治医生根据相关因素选择给予患者（优选人患者）所选择的 LCN2 拮抗剂的合适的量和制剂，以实现所期需的循环 LCN2 降低。例如，所选择的降低 LCN2 的化合物的剂量随以下因素变化而变化：所用的特定组合物（拮抗剂性质，例如蛋白质类、合成化学药品等）、化合物的半衰期、心血管病或炎症疾病的特性和 / 或阶段、患者现有的 LCN2 水平、患者年龄、体重、性别、一般体质条件、给药途径、任何其它药物和治疗以及受试者病史。可通过主治医生基于在治疗过的个体受试者方面的经验来确定准确剂量。有效治疗剂量含有足以降低循环 LCN2 水平的量，并优选足以将起始 LCN2 水平降低约 20% 或更多的量。

[0071] 同样地，给药途径、给药方案和给药频率取决于上述鉴定的因子和患者对该治疗的反应，其如通过周期性评估 LCN2 水平所测定。

[0072] 按照另一实施方案，提供测试试剂盒用于发展中风、心脏病发作或心血管病的风险的预测。所述试剂盒可包括脂蛋白-2 结合组分。在优选实施方案中，试剂盒可包括中和抗体或另一种脂蛋白-2 拮抗剂。可将试剂盒用于对中风、心脏病发作或心血管病进行风险评估、诊断和 / 或预测。

[0073] 在实施方案中，试剂盒可包括包含用于脂蛋白-2 的测定物和使用说明和任选相关材料的包装，所述相关材料例如数字或颜色图表，其用于将通过所述测定确定的脂蛋白-2 水平与发展未来心血管病风险或与如上所述其它患者标准相关联。在另外的实施方案中，试剂盒还包括对胆固醇、CRP、MPO 或其它 CVD/CAD 标记的测定。

## 实施例

[0074] 实施例 1

[0075] 人受试者

[0076] 募集 46 名患者（平均年龄  $52 \pm 22$  岁；中间年龄 50 岁；年龄范围 18-96 岁；48% 女性）进行研究。如果患者具有以下疾病则将其分为心脏病发作 / 中风高危组：(i) 冠状动脉病：先前 MI（在征得同意前  $> 2$  天），或稳定或先前不稳定性心绞痛（在征得同意前  $> 30$  天）且有文件证明的多血管冠状动脉病或阳性应激试验，或多血管经皮冠状动脉腔内成形术（PTCA）（在征得同意前  $> 30$  天），或无心绞痛（若手术在征得同意前  $> 4$  年进行）或手术后有周期性心绞痛的先前 15 多血管冠状动脉旁路移植术（CABG）；(ii) 外周动脉病：先前肢旁路手术（limb bypass surgery）或血管成形术或切断术，间歇性跛行历史且在至少一侧踝 / 手臂血压比率  $< 0.8$ ，或非侵入性检查；(iii) 先前中风；(iv) 在征得同意前  $> 7$  天且  $< 1$  年短暂性缺血发作（TIA）；(v) 糖尿病（I 型或 II 型）：有证据显示终末器官损伤（视网膜病、左心室肥大、微量白蛋白尿（micro albuminuria）或大量白蛋白尿（macro albuminuria）），或先前心脏病或血管病的任何证据。

[0077] 包括 36 名年龄和性别匹配的健康受试者对照组（平均年龄  $65 \pm 18$  岁；中间年龄 72 岁；年龄范围 23-87 岁；78% 女性）。

[0078] 图 1A 和 1B 显示具有心脏病发作 / 中风高风险的患者和健康对照的血清和尿液脂蛋白-2 (LCN2) 的框线图。具有心脏病发作 / 中风高风险的患者的血清 LCN2 浓度中值显著高于健康受试者 ( $51.6$  对比  $35.5 \mu\text{g/L}$ ； $P < 0.001$ )。具有心脏病发作 / 中风高风险的患者的尿液 LCN2 浓度中值亦显著高于健康受试者 ( $6.6$  对比  $1.6 \mu\text{g/L}$ ； $P < 0.05$ )。

#### [0079] 实施例 2

##### [0080] 用于定量测定鼠和人脂蛋白-2 的抗体的产生和夹心 ELISA 的开发

[0081] 如上文所述在新西兰雌性兔中产生针对重组人或鼠脂蛋白 2 的多克隆抗体 (17)。用蛋白 A/G 珠粒接着用其各自的抗原作为配体进行亲和色谱，从免疫接种的兔血清纯化抗-人或鼠脂蛋白 2IgG。用 Pierce 的试剂盒使经亲和纯化的抗-人或抗-鼠脂蛋白 2IgG 生物素化，并作为检测抗体使用。用未标记的抗-人或抗-鼠脂蛋白-2IgG 在  $4^\circ\text{C}$  过夜包被 96-孔微量滴定板。将人或小鼠血清稀释 (1 : 50) 到 PBS 中，将  $100 \mu\text{l}$  的稀释样品或重组标准施加到每一孔中，在  $37^\circ\text{C}$  保温 1 小时。将板洗涤 3 次，然后用  $100 \mu\text{l}$  的检测抗体再保温 2 小时。用 PBS 再次洗涤 3 次后，让孔与链霉抗生物素缀合的辣根过氧化物酶保温 1 小时，随后与四甲基联苯胺试剂反应 15 分钟。将总共  $100 \mu\text{l}$  的  $2\text{MH}_2\text{SO}_4$  加到各孔中以终止反应，测量  $450\text{nm}$  处的吸光度。通过在总共 6 个独立测定中一式二份测量 5 份血清样品，来确定测定内和测定间的差异系数。

[0082] 本领域技术人员易于明白，可恰当改变本发明来实现目的，并获得所提及的结果和优点以及其中原有的结果和优点。本文提供的实施例是优选实施方案的代表，为例示性的，并非意欲限制本发明范围。本领域技术人员可想到对其中的修改以及其它用途。这些修改涵盖在本发明精神内，由所附权利要求范围来限定。

[0083] 本领域技术人员将易于明白，可对本文公开的发明进行不偏离本发明范围和精神的不同的代替和修改。

[0084] 本说明书中所提及的所有专利及出版物皆表明了本发明所属领域的一般技术人员的水平。所有专利及出版物在此引作参考，其引用程度如同每一个出版物被明确及个别地声明在此用作参考一样，引用到不与本文的明确教导不一致的程度。

##### [0085] 参考文献

- [0086] 1.Hraba-Renevey, S., Turler, H., Kress, M., Salomon, C. 和 Weil, R.1989.SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves apost-transcriptional mechanism(SV40- 诱导的小鼠基因 24p3 的表达涉及转录后机理).*Oncogene*.4 : 601-608.
- [0087] 2.Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengelov, H. 和 Borregaard, N.1993.Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase(与人嗜中性粒细胞明胶酶有关的新蛋白 NGAL 的分离及一级结构).*J Biol Chem*.268 : 10425-10432.
- [0088] 3.Akerstrom, B., Flower, D.R. 和 Salier, J.P.2000.Lipocalins : unity in diversity(脂笼蛋白 : 多样性中的统一性).*Biochim Biophys Acta*.1482 : 1-8.
- [0089] 4.Flower, D.R.1996.The lipocalin protein family : structure and function(脂笼蛋白蛋白家族 : 结构和功能).*Biochem J*.318 : 1-14.
- [0090] 5.Bratt, T., Ohlson, S. 和 Borregaard, N.1999.Interactions between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and natural lipophilic ligands(中性粒细胞明胶酶相关脂笼蛋白和天然亲脂配体之间的互相作用).*Biochim Biophys Acta*.1472 : 262-269.
- [0091] 6.Liu, Q. 和 Nilsen-Hamilton, M.1995.Identification of a new acute phase protein(急性期的新蛋白的鉴定).*J Biol Chem*.270 : 22565-22570.
- [0092] 7.Kratchmarova, I., Kalume, D.E., Blagoev, B., Scherer, P.E., Podtelejnikov, A.V., Molina, H., Bickel, P.E. 和 ersen, J.S., Fernandez, M.M., Bunkenborg, J. 等 .2002.A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes(用于在 3T3-L1 前脂肪细胞分化为脂肪细胞期间鉴别分泌性蛋白质的蛋白质组方法).*Mol Cell Proteomics*.1 : 213-222.
- [0093] 8.Meheus, L.A., Fransen, L.M., Raymackers, J.G., Blockx, H.A., Van Beeumen, J.J., Van Bun, S.M. 和 Van de Voorde, A.1993.Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages(通过微序列测定鉴定由小鼠巨噬细胞分泌的脂多糖诱导的蛋白质).*J Immunol*.151 : 1535-1547.
- [0094] 9.Jayaraman, A., Roberts, K.A., Yoon, J., Yarmush, D.M., Duan, X., Lee, K. 和 Yarmush, M.L.2005.Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) as a discriminatory marker of the hepatocyte-secreted protein response to IL-1 $\beta$  : a proteomic analysis(作为因响应 IL-1 $\beta$  的肝细胞分泌的蛋白质可识别标记的中性粒细胞明胶酶相关脂笼蛋白(NGAL)的鉴定 : 蛋白质组分析).*Biotechnol Bioeng*.91 : 502-515.
- [0095] 10.Fujino, R.S., Tanaka, K., Morimatsu, M., Tamura, K., Kogo, H. 和 Hara, T.2006.Spermatogonial Cell-mediated Activation of AnI $\{\kappa\}$ B $\{\zeta\}$ -independent NF- $\{\kappa\}$ B Pathway in Sertoli Cells Induces Transcription of the Lipocalin-2 Gene(精原细胞诱导的 I $\{\kappa\}$ B $\{\zeta\}$ - 独立性 NF- $\{\kappa\}$ B 途径的激活在塞尔托利细胞中诱导脂笼蛋白-2 基因转录).*Mol Endocrinol* 20 : 904-915.
- [0096] 11.Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S.M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., et al.2005.Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac



surgery(中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白(NGAL)作为生物标记用于心脏手术后的急性肾损伤).Lancet.365 : 1231-1238.

[0097] 12.Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zabedi K., Yang J., Barasch J., Devarajan P., 2003.Identification of neutrophilgelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker forischemic renal injury(作为缺血性肾损伤的新的早期尿液生物标记的中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白的鉴定).Journal of the AmericanSociety of Nephrology.14(10) : 2534-43.

[0098] 13.Mishra J., Mori K., Ma Q., Kelly C., Barasch J., Devarajan P., 2004. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin : a novel early urinarybiomarker for cisplatin nephrotoxicity(中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白:顺铂中毒性肾损害的新型早期尿液生物标记).American Journal ofNephrology.24(3) : 307-15.

[0099] 14.Reghunathan R., Jayapal M., Hsu L.Y., Chng H.H., Tai D., Leung B.P., Melendez A.J., 2005.Expression profile of immune responsegenes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome(在严重急性呼吸综合征的患者中免疫反应基因的表达概况).BMC Immunology.6 : 2.

[0100] 15.Hemdahl A.L., Gabrielsen A., Zhu C., Eriksson P., Hedin U., Kastrup J., Thoren P., Hansson G.K., 2006.Expression of neutrophilgelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardialinfarction(在动脉粥样硬化和心肌梗死中中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白的表达).Atherosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.26(1) : 136-42.

[0101] 16.Tschesche H., Zolzer V., Triebel S., Bartsch S., 2001.The humanneutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrixmetalloproteinases(人嗜中性粒细胞脂蛋白有助于基质金属蛋白酶的变构激活).European Journal of Biochemistry.268(7) : 1918-28.

[0102] 17.Xu, A., Lam, M.C., Chan, K.W., Wang, Y., Zhang, J., Hoo, R.L., Xu, J.Y., Chen, B., Chow, W.S., Tso, A.W., et al.2005.Angiopietin-likeprotein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance butinduces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice(血管生成素样蛋白4在小鼠中降低血液葡萄糖并改进葡萄糖耐受性但诱导高血脂及肝性脂肪变性).Proc Natl Acad Sci U S A 102 : 6086-6091.

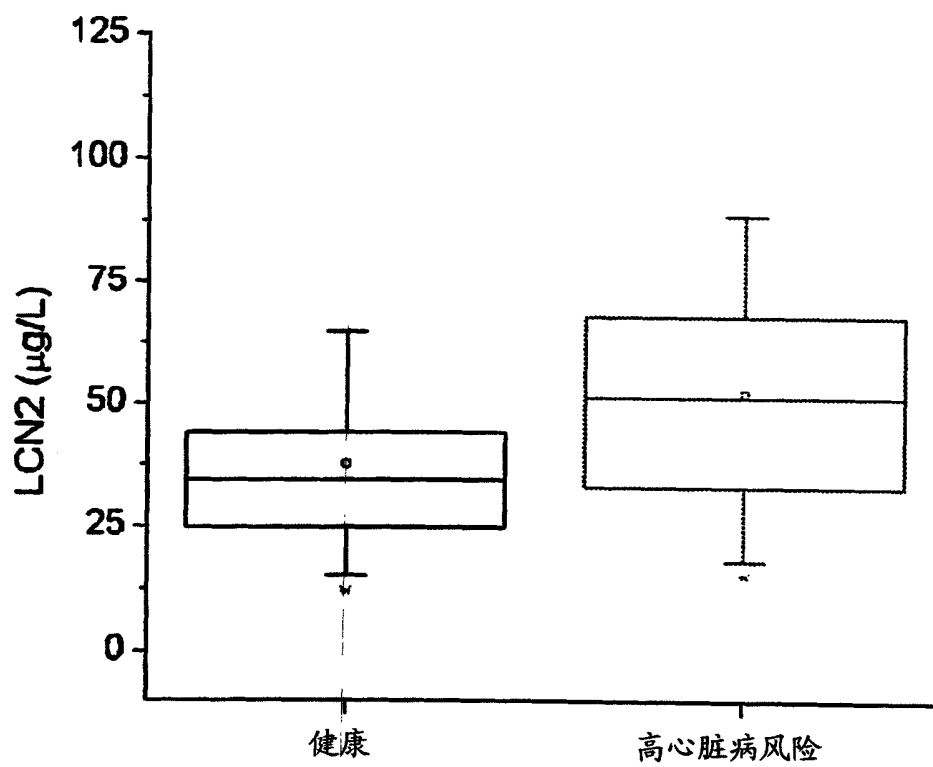


图 1A

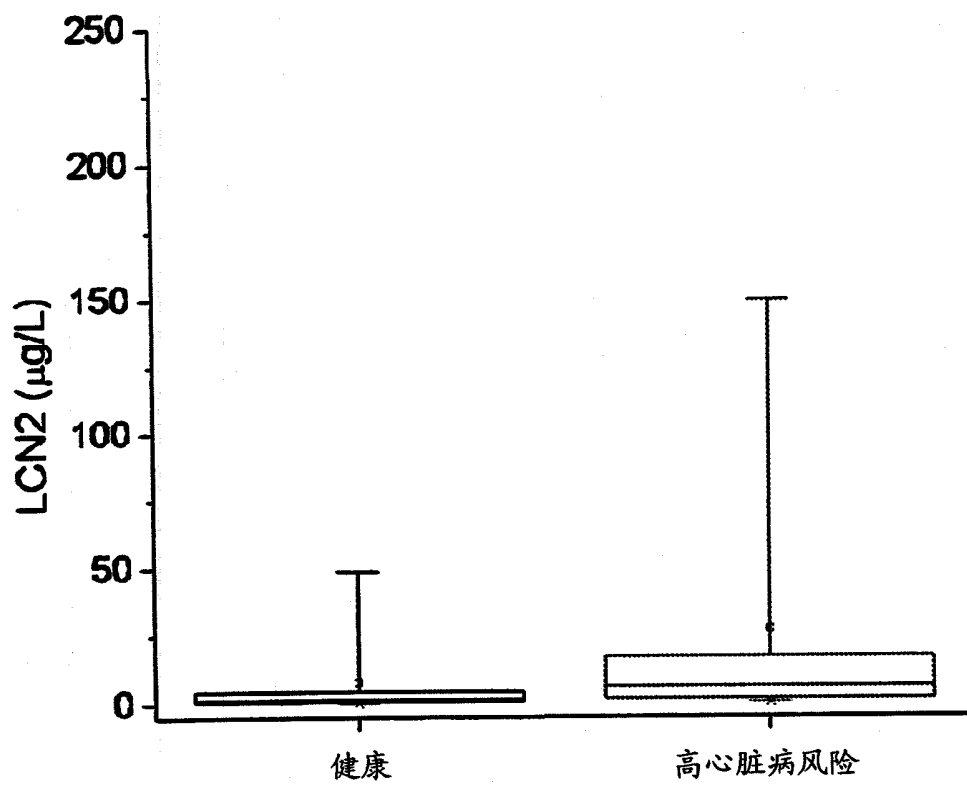


图 1B