



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110431424 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201880017669.8

(22) 申请日 2018.03.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110431424 A

(43) 申请公布日 2019.11.08

(30) 优先权数据  
102017105566.5 2017.03.15 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2018/056414 2018.03.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/167157 EN 2018.09.20

(73) 专利权人 诺码锐思股份公司  
地址 德国雷根斯堡

(72) 发明人 约翰内斯·艾格尔施佩格  
欣迪·诺伊曼 菲利普·帕格尔

马克西米利安·朱克

沃尔克·普法勒特

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 顾晋伟 刘振佳

(51) Int.Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2008161228 A1, 2008.07.03  
WO 2012045773 A1, 2012.04.12  
CN 1561205 A, 2005.01.05  
CN 102119224 A, 2011.07.06  
K SUHRE 等.Urine Metabolite Profiles Predictive of Human Kidney Allograft Status.《JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY》.2015,第27卷(第2期),第626-636页.

审查员 林晓烨

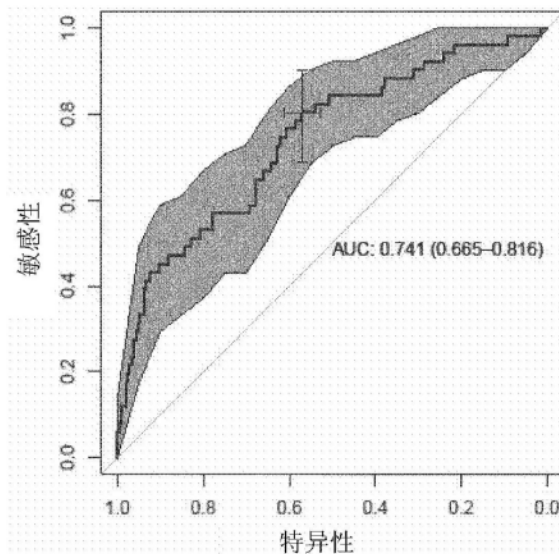
权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

用于确定肾排斥风险的标志物组的用途

(57) 摘要

本发明涉及包含选自3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、丙氨酸、柠檬酸盐/酯、二甲胺、葡萄糖、葡糖醛酸盐/酯、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、苯乙酰谷氨酰胺、牛磺酸、葫芦巴碱和尿素的至少三种物质的标志物组用于确定在已接受肾捐献之后个体的肾排斥风险的用途,前提是所述标志物组包含选自丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素的至少一种物质。本发明还涉及相关方法。



1. 至少包含乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和尿素的标志物组在制备用于确定在已获得肾捐献之后个体的肾排斥风险的体外方法中的试剂盒的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述标志物组另外包含选自丙氨酸、二甲胺和葡糖醛酸盐/酯的至少一种物质。

3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述标志物组不同时包含二甲胺、乙酸盐/酯和丙氨酸。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述方法包括以下步骤:

a) 提供来自自己接受肾捐献的个体的体液样品,

b) 通过用适合的测量技术分析所述体液样品来测定所述体液样品中至少乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和尿素的浓度,以及

c) 从所测定的浓度计算评分,所述评分指示所述个体的肾排斥风险。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述体液样品是尿样品或血液样品。

6. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,所述样品是尿样品,并且所测定的浓度相对于同一样品中肌酸酐的浓度归一化。

7. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,基于所计算出的评分将所述样品分组至至少两个预定的组中的一个。

8. 根据权利要求4所述的用途,其特征在于,通过额外再考虑由以下组成的组中的至少一个值,从所述评分计算扩展评分:指示所述个体的血清中肌酸酐浓度的值、指示所述个体的肾小球滤过率的值以及指示所述个体的估算肾小球滤过率的值。

9. 根据权利要求8所述的用途,其特征在于,基于所计算出的扩展评分将所述样品分组至至少两个预定的组中的一个,从而提供决策支持系统。

## 用于确定肾排斥风险的标志物组的用途

[0001] 本发明涉及用于确定肾排斥风险的标志物组(marker set)的体外用途,相同标志物组的诊断用途,以及用于在体外分析分离的体液样品的方法。

[0002] 通过可容易适用的方法来确定在肾移植之后肾排斥的风险是高度医学有利的。为此,WO 2012/045773 A9公开了非常适合用于确定肾排斥相应风险的某些物质。

[0003] US 9,541,620 B2也公开了可用于确定肾排斥风险的某些物质。其中,其关注于作为最强效的生物标志物的三甲胺-N-氧化物(trimethylamine-N-oxide,TMAO)。

[0004] WO 2002/010755 A2描述了血清中肌酸酐或尿素水平的升高是肾移植失败的指示。

[0005] Malyszko等在出版物中描述了血清肌酸酐水平-虽然与显著的缺点有关-但仍然是评估肾功能的“金标准”(Malyszko,Jolanta等.“Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation.” Scientific Reports 5(2015):11684)。

[0006] 本发明的一个目的是提供适合于确定肾排斥的风险并提高相应分析方法的总体性能的另外标志物质和合适的标志物组合。

[0007] 这个目的是通过使用新的标志物组(即,在用于确定(预测)在已接受肾捐献之后个体的肾排斥风险的体外方法中)来实现的。虽然根据现有技术通常将单独的物质用作标志物,但是本发明人发现,只有使用至少三种物质作为标志物时才能实现相应分析方法的足够高的准确度。因此,本发明要求保护的标志物组的用途要求存在至少三种物质包含在标志物组中。这些物质选自3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、丙氨酸、柠檬酸盐/酯、二甲胺、葡萄糖、葡糖醛酸盐/酯、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、苯乙酰谷氨酰胺、牛磺酸、葫芦巴碱和尿素。

[0008] 在WO 2012/045773 A9中已经公开了这些物质(即3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、柠檬酸盐/酯、葡萄糖、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、牛磺酸和葫芦巴碱)中的一些作为用于确定肾移植之后的肾排斥风险的合适标志物。本发明人出人意料地发现,如果在标志物组中必须存在特定的另外的物质中的至少一种,则可提高相应分析方法的准确度。尤其是,这些物质是丙氨酸、二甲胺(DMA)、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺(PAQ)和尿素。因此,本发明要求保护的标志物组必须包含由丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素组成的组中的至少一种物质。这些物质在下文中也将称为新鉴定的标志物质。将相对于一些示例性实施方案更详细地说明包含这些新鉴定的标志物质中的至少一种的标志物组的更高的性能和因此更好的适合性。

[0009] 在标志物组中可以只存在一种新鉴定的标志物质。在标志物组中同样可以存在两种、三种、四种、五种或六种新鉴定的标志物质。标志物组也可仅包含新鉴定的标志物质。

[0010] 使用标志物组中存在的单独物质使得在样品中这些物质的浓度是被测定的。然后,该物质浓度可用于计算评分。该评分指示先前经历肾移植(即先前接受了肾捐献)的个体的肾排斥风险。

[0011] 在一个实施方案中,可以限定在肾移植之后对肾排斥的某些风险组。因此,可以对高风险组、中等风险组、低风险组和极低风险组进行限定,以便以可容易利用的方式对确定的或预测的肾排斥风险进行分类。也可以使用仅这些组中的一些(例如,高风险、中等风险、低风险;或高风险、低风险、极低风险)或者限定另外的组。

[0012] 当为利用某些标志物质的特定模型限定这些组(特别是基于训练数据集)时,适合将高风险组限定为使得分配给该组的样品的至少40%,特别是至少45%,特别是至少50%是来自显示出肾排斥的个体的样品。在一个实施方案中,将中等风险组限定为使得分配给该组的所有样品的8%至20%,特别是10%至17%,特别是11%至15%是来自遭遇肾排斥的个体的样品。在一个实施方案中,将低风险组限定为使得分配给该组的所有样品的2%至5%,特别是2.5%至4.5%,特别是3%至4%是来自遭遇肾排斥的个体的样品。在一个实施方案中,将极低风险组限定为使得分配给该组的所有样品的不多于1.5%,特别是不多于1%,特别是不多于0.5%是来自遭遇肾排斥的个体的样品。通过这样的分组,可容易地将计算出的评分分配给这些组中的一个以便可容易地利用计算出的评分的医学相关性。

[0013] 在一个实施方案中,标志物组包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21种单独的物质。如已说明的,由丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素组成的组中的1、2、3、4、5或6种物质可存在于标志物组中,其中这些物质中的至少一种必须存在于标志物组中。

[0014] 在一个实施方案中,标志物组必须包含选自由丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯和尿素组成的新鉴定的标志物质亚组的至少一种物质。已经证明这些新鉴定的标志物质特别适合于增强用于确定肾排斥风险的标志物组的总体性能。

[0015] 在另一个实施方案中,标志物组必须包含尿素。尿素被证明是最适合提高标志物组的总体性能的物质之一。

[0016] 在另一个实施方案中,标志物组必须包含尿素和丙氨酸。在另一个实施方案中,标志物组必须包含尿素和葡糖醛酸盐/酯。在另一个实施方案中,标志物组必须包含尿素、丙氨酸和葡糖醛酸盐/酯。在另一个实施方案中,标志物组必须包含尿素、丙氨酸和二甲胺。

[0017] 在一个实施方案中,标志物组包含乳酸盐/酯和柠檬酸盐/酯作为适合的标志物质,其中一种标志物质选自丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素。

[0018] 在一个实施方案中,标志物组不同时包含二甲胺、乳酸盐/酯、乙酸盐/酯和丙氨酸。

[0019] 在一个实施方案中,标志物组不是仅包含二甲胺、乳酸盐/酯和乙酸盐/酯。

[0020] 在一个实施方案中,标志物组不是仅包含二甲胺、乳酸盐/酯和丙氨酸。

[0021] 在一个实施方案中,标志物组不是仅包含二甲胺、乙酸盐/酯和丙氨酸。

[0022] 在一个实施方案中,标志物组不是仅包含乳酸盐/酯、乙酸盐/酯和丙氨酸。

[0023] 以下的标志物组实例是特别适合的标志物组:

[0024] • 乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和尿素。

[0025] • 乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸。

[0026] • 乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和葡糖醛酸盐/酯。

[0027] • 乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素、丙氨酸和葡糖醛酸盐/酯。

[0028] • 乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素、丙氨酸和二甲胺。

[0029] 本发明在一方面还涉及用于诊断已接受移植肾之后个体的肾排斥风险的相同标志物组的用途。因此,在这方面,本发明涉及包含选自3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、丙氨酸、柠檬酸盐/酯、二甲胺、葡萄糖、葡糖醛酸盐/酯、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、苯乙酰谷氨酰胺、牛磺酸、葫芦巴碱和尿素的至少三种物质的标志物组,其用于诊断在已接受肾捐献之后个体的肾排斥风险,前提是标志物组包含选自丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素的至少一种物质。

[0030] 以上说明的标志物组的体外用途的一些实施方案同样可适用于在任何期望的组合中的标志物组的体内用途或诊断用途。

[0031] 要求保护的标志物组在诊断中的用途构成了该标志物组的另一个医学指征 (medical indication)。因此,标志物组中总是存在至少一种新鉴定的标志物质,即丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素中的一种。

[0032] 在一个方面,本发明还涉及在体外分析分离的体液样品的方法。该方法包括以下说明的步骤。在第一步中,提供来自已接受肾捐献的个体的体液样品。该体液样品可在肾移植之后的任何时间采集,例如在移植之后0天至400天、特别是在移植之后1天至365天、特别是在移植之后2天至350天、特别是在移植之后3天至340天、特别是在移植之后4天至330天、特别是在移植之后5天至320天、特别是在移植之后6天至310天、特别是在移植之后7天至300天、特别是在移植之后8天至290天、特别是在移植之后10天至280天、特别是在移植之后11天至270天、特别是在移植之后12天至260天、特别是在移植之后13天至250天、特别是在移植之后14天至240天、特别是在移植之后15天至230天、特别是在移植之后16天至220天、特别是在移植之后17天至210天、特别是在移植之后18天至200天、特别是在移植之后19天至190天、特别是在移植之后20天至180天、特别是在移植之后25天至170天、特别是在移植之后30天至160天、特别是在移植之后40天至150天、特别是在移植之后50天至140天、特别是在移植之后60天至130天、特别是在移植之后70天至120天、特别是在移植之后80天至110天、特别是在移植之后90天至100天。在那方面,“0天”意指在肾移植之后少于24小时。

[0033] 然后,用合适的测量技术测定选自3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、丙氨酸、柠檬酸盐/酯、二甲胺、葡萄糖、葡糖醛酸盐/酯、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、苯乙酰谷氨酰胺、牛磺酸、葫芦巴碱和尿素的至少三种物质的浓度。这些物质用作标志物质。因此,必须测定选自丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素的至少一种物质的浓度。

[0034] 非常适合的用于测定单独物质的浓度的测量技术是核磁共振波谱法 (NMR波谱法)。

[0035] 所测定的浓度后来用于计算评分。因此,该评分指示个体的肾排斥风险。

[0036] 通常可以以任何期望的方式计算评分。WO 2012/045773 A9第25至27页公开了计算评分的合适方法。另一种计算评分的合适方法如下:

$$[0037] \quad \text{评分} = \frac{1}{1+e^{-\omega}},$$

[0038] 其中

$$[0039] \quad \omega = a + \sum_{x=1}^n b_x \cdot I_x$$

[0040] a=常数

[0041]  $b_x$ =物质特定系数

[0042] I=指示物质x浓度的参数

[0043] 因此,个体因子(individual factor)a、b需要根据基础模型进行调整,并且可根据标志物组中考虑到的特定物质而变化。参数“I”可以是例如在所评价的测量结果中观察到的相应信号的信号强度。举例来说,如果使用NMR波谱作为测量技术,则“I”可以是NMR波谱中NMR信号的信号强度。

[0044] 在一个实施方案中,输出计算出的评分并呈现给个人和/或第三人,例如医生或医务人员。输出可在显示器上(即,以电子的方式)或以印刷的形式进行。因此,也可以生成指示评分(任选地组合对于在肾移植之后肾排斥风险的可能评分及其意义的比较量表)的报告。

[0045] 在一个实施方案中,基于计算出的评分将样品分组至至少两个预定的组中的一个。相应的分组也可在相应的报告中显示。

[0046] 在一个实施方案中,体液样品是尿样品或血液样品。在那方面,术语“血液”涉及全血、血清、血浆或者来源于全血或其他血液制剂的任何其他血液制剂。

[0047] 使用尿样品作为体液样品特别适合于实施该方法,因为尿样品易于从个体收集并且不需要任何与个体的身体更密切的相互作用。

[0048] 为了补偿不同样品中总体标志物浓度的不同,在一个实施方案中,将所测定的浓度相对于另外测定的肌酸酐浓度归一化。这特别适用于尿样品的情况。如果从其获得所分析样品的人已摄入大量液体,则他或她的总尿量也很大。同时,在这样的情况下,尿中标志物质(和其他物质)的总浓度通常低于从摄入较少量液体且总尿量较低的人采集的样品中的总浓度。如果以所测定的标志物浓度除以同一尿样品中的肌酸酐浓度(即,相对于肌酸酐浓度归一化),则消除了这些作用。

[0049] 以上提及的评分可形成基于至少三种代谢物的诊断测试的基础。

[0050] 在一个实施方案中,通过另外考虑至少一个另外的值,从所述评分开始计算扩展评分。这可进一步提高基于本发明所述方法的诊断测试的性能。该另外的值选自指示个体的血清中肌酸酐浓度的值、指示个体的肾小球滤过率(glomerular filtration rate,GFR)的值和指示个体的估算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate,eGFR)的值。因此,如果对个体的尿样品进行分析,则其特别适合于通过考虑指示血清中肌酸酐浓度的值来计算扩展评分。在此过程中,将与个体(患者)的尿中单独的标志物质浓度相关的信息以及与个体的血清中肌酸酐浓度相关的信息二者考虑在内。这另外提高了关于计算出的扩展评分的正确性的整个方法的可靠性。

[0051] 基于代谢物的评分与基于血清中肌酸酐浓度、GFR和/或eGFR的另外的信息的组合得到决策支持系统(decision support system)。这样的决策支持系统特别适合于将不同的样品分成不同的组(例如,针对特定疾病或适应证如已接受肾捐献的个体在肾移植之后肾排斥风险的不同风险的组)。基于这样的分组,可辅助医生评估所获得结果的医学相关性

或做出诊断。

[0052] 所述的体外方法也可被认为是用于提供后来可被医生用来做出关于在肾移植之后肾排斥风险的诊断的原始数据的方法。通常,该诊断步骤不构成要求保护的方法的一部分。然而,在一个实施方案中,该方法可涵盖这样的诊断步骤。

[0053] 在另一方面,本发明涉及用于评估或预测已获得肾捐献的个体在肾移植之后肾排斥风险的方法。该方法包括以下步骤:

[0054] 在第一步中,测定已获得肾捐献的个体的体液样品中选自3-羟基异戊酸盐/酯、乙酰肉碱、丙氨酸、柠檬酸盐/酯、二甲胺、葡萄糖、葡糖醛酸盐/酯、马尿酸盐/酯、乳酸盐/酯、丙二酸盐/酯、甲基胍、丙二酸甲酯、琥珀酸甲酯、对甲酚、乙酸苯酯、苯乙酰甘氨酸、苯乙酰谷氨酰胺、牛磺酸、葫芦巴碱和尿素的至少三种物质的浓度。这是通过在存在或不存在个体的情况下用适合的测量技术对体液样品进行分析来完成的,前提是选自丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素的至少一种物质的浓度是被测定的。

[0055] 在第二步中,从所测定的浓度计算评分,其中该评分指示个体的肾排斥风险。

[0056] 然后,基于对具体的肾排斥风险的个体评分的预定的分配计算出的评分获得具体的肾排斥风险。因此,计算出的评分可分组成指示肾排斥不同风险的不同的预定的组中的一个。

[0057] 然后,将这种肾排斥风险输出给个人或第三人如医生或医务人员。

[0058] 在一个实施方案中,如上说明的,肾排斥的风险是根据扩展评分确定的。由此,该方法构成决策支持系统的一部分或组成这样的决策支持系统。

[0059] 在一方面,本发明涉及实施如上说明的方法的决策支持系统。

[0060] 在一方面,本发明涉及将尿样品中肌酸酐浓度用于将在同一尿样品中测定的至少一种其他物质的浓度进行归一化,特别是通过将其他物质的浓度除以肌酸酐的浓度。这种归一化方法构成了单独要求保护的本公开内容的一部分,在一个实施方案中,其可与本文中所述或要求保护的任何其他方法或用途组合。

[0061] 因此,关于用于分析分离的体液样品的方法所说明的所有实施方案同样可以以任何期望的组合应用于所述的用于评估肾排斥风险的方法中。这对于以上说明的关于用于分析分离的体液样品的体外方法的输出报告尤其正确。

[0062] 所述用途的所有说明的实施方案可以以任何期望的组合应用于所述方法中,并且反之亦然。

[0063] 现在将关于示例性实施方案和附图更详细地说明本发明的多个方面。在图中:

[0064] 图1A示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和葫芦巴碱作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的接受者操作特征(receiver operating characteristic,ROC)图(比较例);

[0065] 图1B示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和马尿酸盐/酯作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图(比较例);

[0066] 图1C示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和尿素作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图;

[0067] 图2A示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱和葡萄糖作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图(比较例);

[0068] 图2B示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、马尿酸盐/酯和葡萄糖作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图(比较例)；

[0069] 图2C示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱和马尿酸盐/酯作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图(比较例)；

[0070] 图2D示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图；

[0071] 图2E示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和葡糖醛酸盐/酯作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图；

[0072] 图2F示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸作为标志物质考虑在内并另外考虑了个体的血清中肌酸酐浓度的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图；

[0073] 图2G示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸作为标志物质考虑在内并另外考虑了个体的估算肾小球滤过率的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图；

[0074] 图3A示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱、马尿酸盐/酯和葡萄糖作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图(比较例)；

[0075] 图3B示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素、丙氨酸和葡糖醛酸盐/酯作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图；并且

[0076] 图3C示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素、丙氨酸和二甲胺作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的敏感性与特异性的ROC图。

[0077] 在图1A至3C中描述的结果是基于对来自已获得肾捐献的患者的超过4200份尿样品的分析。在移植之后14天至移植之后365天的时间窗中从这些患者采集尿样品。因此，在第一步中，已经对训练样品组(基于超过870份样品)进行了分析以鉴定适合的标志物质。随后，对验证样品组(超过580份样品)测试了鉴定的适合的标志物质以评估利用这些标志物质确定肾排斥风险的性能。

[0078] 样品处理和准备

[0079] 将中段尿样品收集在标准的塑料尿杯中，并将1ml的等分试样转移到1.5ml样品管中。在收集之后8小时内于-20℃下将等分试样冷冻。为了储存，将管保持在-80℃。为了NMR测量，在室温下使等分试样解冻。一经完全解冻，将600μl等分试样与120μl Axinon<sup>®</sup>尿添加剂溶液混合。将混合物以20000g离心10分钟，并将600μl上清液转移至5mm NMR管并保持在4至8℃直至测量。

[0080] NMR测量

[0081] 所有测量均使用PATXI 1H/D-13C/15N Z-GRD探针在Bruker Avance II+600MHz NMR波谱仪上进行。所有样品在SampleJet中保持在5℃至7℃，并使其在测量之前在集成预热块中达到目标温度。使用具有30度激发脉冲和用于水抑制的预饱和的标准脉冲程序(zgpr30)。

[0082] 以每次运行多至93个样品分批地对样品进行测量。除分析样品之外，每次运行包含一个 Axinon<sup>®</sup>尿校准样品和两个 Axinon<sup>®</sup>尿对照样品(分别在分析尿样品之前和之后)，以便确保整个运行的理想测量条件。

[0083] 信号分析

[0084] 对NMR谱进行自动参照、相位校正和基线校正,然后进行进一步分析。

[0085] 随后,对NMR谱进行自动标准化和校准程序以使设备之间、每天之间和运行之间的影响最小化。通过自定义波谱定性算法来评估这些波谱中每一个的质量,该算法分析一般的波谱特性(例如,在所选波谱区域中基线的偏移和倾斜),以及所选指示信号的特性(例如信号位置、形状和宽度)。不符合预定的质量标准的波谱被排除在进一步分析之外。

[0086] 将成功定性的波谱划分成定位的宽度为0.04ppm的403个区域(bin),其中在覆盖0.96至9.04ppm波谱范围的连续区域之间有50%重叠。在分析中未考虑4.5至5.0ppm(水信号)的区域。因此,剩余总共377个区域用于后续分析。

[0087] 通过将表示高斯函数和洛伦兹函数(Gaussian and a Lorentzian function)的线性组合的Pseudo-Voigt函数拟合到每个目的峰来完成特点信号峰的量化。检查所得信号拟合的拟合优度,以便剔除拟合质量不足的结果。

[0088] 标志物质鉴定

[0089] 通过将NMR信息与另外的信息组合,借助于获得的NMR波谱以迭代方式鉴定适合的标志物质,所述附加信息为基础样品是从显示出肾排斥的个体还是从未显示出肾排斥的个体采集。

[0090] 从肾移植中恢复良好并且未显示任何明显异常的个体被认为是未显示肾排斥的个体。对在肾移植之后遭遇肾问题的个体进行活检,其是用于确定捐献的肾是否被排斥的金标准。如果这样的活检的结果是已发生或即将发生肾排斥,则这些个体被认为是显示肾排斥的个体。

[0091] 由于活检可导致血尿并可能潜在地直接影响肾功能,因此只有在最大限度内采集的尿样品。活检之前7天包含在评估中。因此,如果从随后经历活检的个体采集尿样导致发现肾排斥即将发生或已经发生,则将样品分配成具有高的肾排斥风险的个体。如果活检未提供任何指示肾排斥的结果,则相应的个体被认为是没有重大的肾排斥风险的人。

[0092] 鉴定标志物质的测试

[0093] 在不同的组合中测试鉴定的标志物质以评估它们用于确定在肾移植之后个体的肾排斥风险的适合性。在此过程中,已针对肾排斥和/或移植功能障碍的临床症状以及进行活检的结果(组织学证明的肾排斥)检查了基于标志物质的测定结果(预测风险)。

[0094] 结果总结在接受者操作特征(ROC)图中。在这些图中,曲线下面积(area under the curve,AUC)指示预测的适合度。如果AUC是0.5,则认为预测是随机的并因此不太适合。AUC越高,预测模型越好。

[0095] 图1A示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯和葫芦巴碱作为标志物质考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的ROC图(比较例)。从现有技术已知这些物质被用于确定肾排斥风险的物质,但迄今为止尚未以这种特定组合进行描述。为了补偿浓度差异,在本实施例和以下实施例中所测定的所有物质浓度已相对于尿中肌酸酐的浓度归一化。因此,将尿中肌酸酐的浓度用作内标。所得AUC是0.714。该AUC比简单的随机预测好得多,并且也好于用于确定肾排斥风险的标志物的单独的物质相应AUC。尽管如此,期望进一步增强预测模型的可靠性。

[0096] 如从图1B可看出的,如果葫芦巴碱被马尿酸盐/酯替代,则AUC为0.706并因此甚至

更低(比较例)。从现有技术也已知马尿酸盐/酯用作用于确定肾排斥风险的标志物。

[0097] 然而,如果葫芦巴碱被新鉴定的标志物质(即,尿素)替代,则AUC显著提高至0.741。这在图1C中示出。因此,两种“旧”标志物质(乳酸盐/酯和柠檬酸盐/酯)与新鉴定的标志物质(尿素)的组合实现了各预测模型高得多的性能。

[0098] 通常,可通过提高预测模型中包含的标志物质的总数来提高预测模型的质量。图2A示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱和葡萄糖考虑在内的用于确定肾排斥风险的模型的ROC图(比较例)。使用这四种已知物质作为标志物质,产生0.732的AUC。

[0099] 如图2B中所示,通过使用马尿酸盐/酯代替葫芦巴碱,AUC下降至0.717(比较例)。

[0100] 如图2C中所示,当在用于确定肾排斥风险的模型中使用乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱和马尿酸盐/酯的组合作为标志物质时,产生0.716的AUC(比较例)。

[0101] 因此,利用四种已知标志物质的模型使得AUC为0.716至0.732不等。

[0102] 通过在模型中包含两种新鉴定的标志物质,可显著提高用于预测肾排斥风险的相应模型的性能。如图2D中所示,如果该模型是基于乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸,则产生0.752的AUC。

[0103] 对于将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和葡糖醛酸盐/酯考虑在内的模型可观察到类似的高AUC。这在图2E中示出,其显示AUC为0.748。

[0104] 如果在模型中包含另外的患者信息,则可以甚至更多地提高用于确定在肾移植之后肾排斥风险的相应模型的预测质量。图2F示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸作为标志物质考虑在内的模型的(如图2D强调的模型)ROC图。如图2F中所示,通过另外考虑同一个体的血清中的肌酸酐浓度,AUC可从0.752(参见图2D)提高至0.830。在那方面,预测的肾排斥风险的计算出的评分已经乘以同一个体(已对其尿样品进行分析)的血清中的肌酸酐浓度。

[0105] 当将预测模型与基于估算肾小球滤过率(eGFR)的另外的信息组合时,可以观察到同样高的性能提高。图2G示出了将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸作为标志物质考虑在内(参见图2D)并另外考虑将估算肾小球滤过率作为进一步的参数的模型的性能。在此过程中,如在图2G中示出的,AUC从0.752(参见图2D)提高至0.836。由此,基于乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素和丙氨酸计算出的用于预测肾排斥风险的评分已经除以同一个体(已对其尿样品进行分析)的所测定的估算肾小球滤过率。

[0106] 如果在用于预测肾移植之后肾排斥风险的模型的标志物组中使用五种而不是四种已知的标志物质,则AUC只能几乎没有提高。这在描绘将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱、马尿酸盐/酯和葡萄糖作为标志物质考虑在内的模型的ROC图(比较例)的图3A中示出。所得AUC为0.733并因此仅略高于将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、葫芦巴碱和葡萄糖作为标志物质考虑在内的模型的AUC(参见图2A)。

[0107] 然而,如果两种已知的标志物质(乳酸盐/酯和柠檬酸盐/酯)与三种新鉴定的物质组合,则可显著提高模型的预测质量,如显著提高的AUC所表明的。具体地,如果将乳酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、尿素、丙氨酸和葡糖醛酸盐/酯作为标志物质考虑在内的模型用于预测肾移植之后的肾排斥风险,则获得0.756的AUC,如图3B中示出的。

[0108] 如果葡糖醛酸盐/酯被二甲胺替代,则所得AUC为0.749并因此略低,但仍然比没有这些新鉴定的标志物质时高得多。相应的ROC图示于图3C中。

[0109] 总之,如果为了这个目的单独或与已知的标志物质联合使用,则新鉴定的标志物质丙氨酸、二甲胺、葡糖醛酸盐/酯、苯乙酰谷氨酰胺和尿素强烈地提高用于评估肾移植之后肾排斥风险的预测模型的可靠性和性能。因此,通过(另外)使用这些标志物质,可以以高得多的准确性和可靠性进行用于确定或预测肾移植之后肾排斥风险的方法。这对于提供随后可由医生用于作出关于肾排斥风险的诊断的原始数据的方法同样如此。

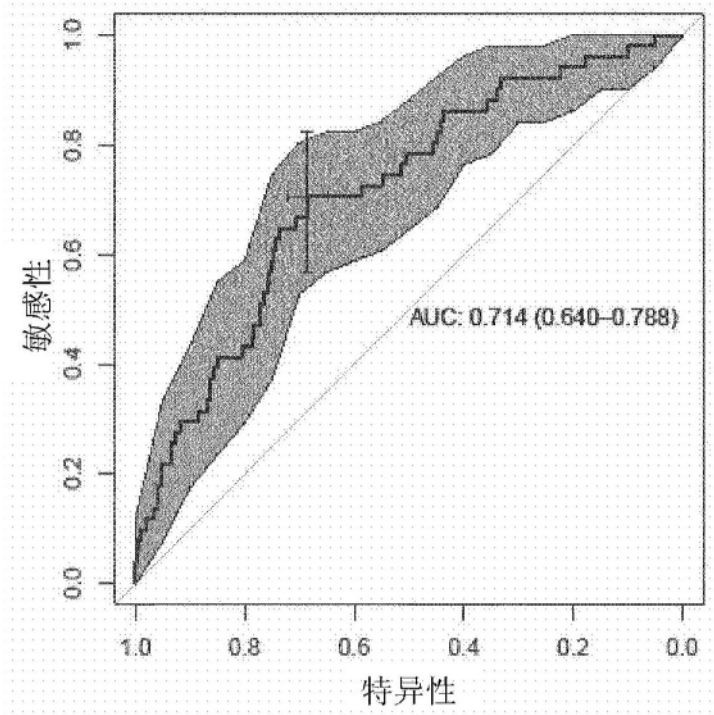


图1A

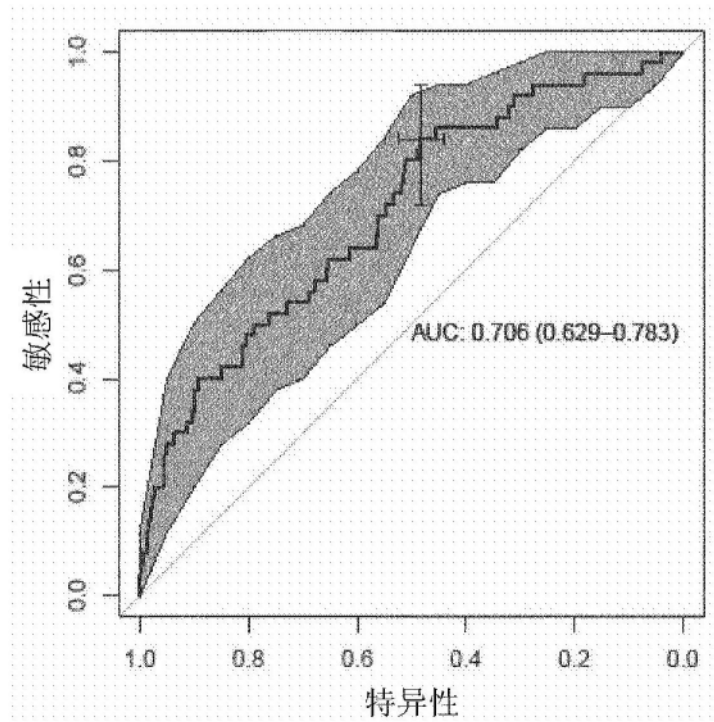


图1B

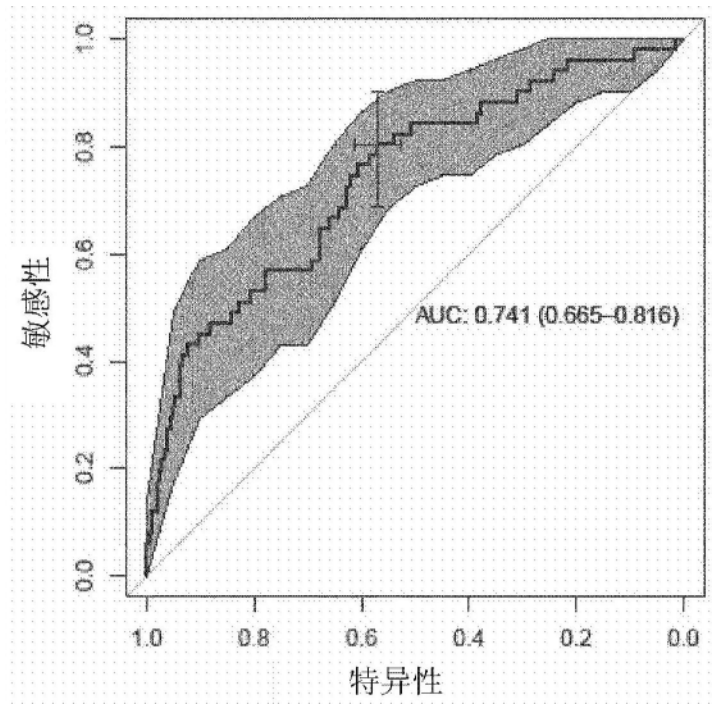


图1C

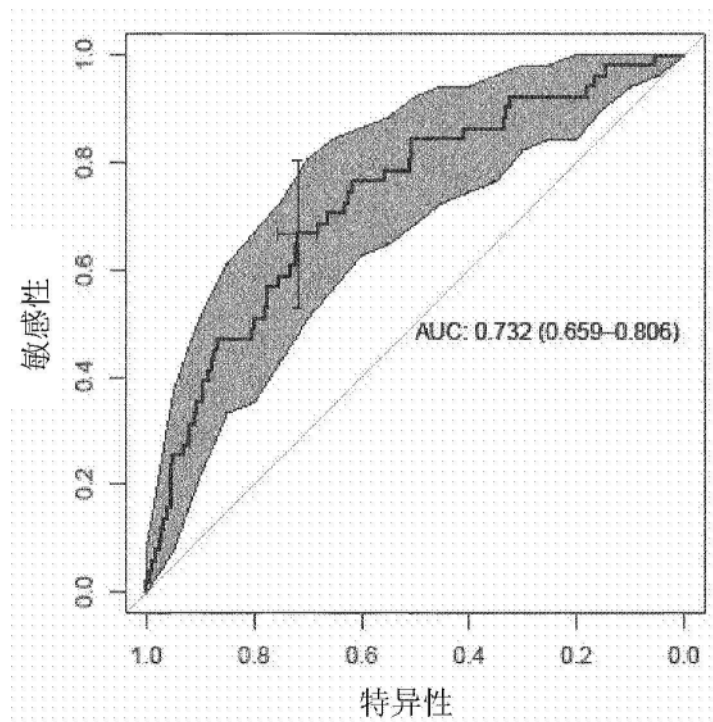


图2A

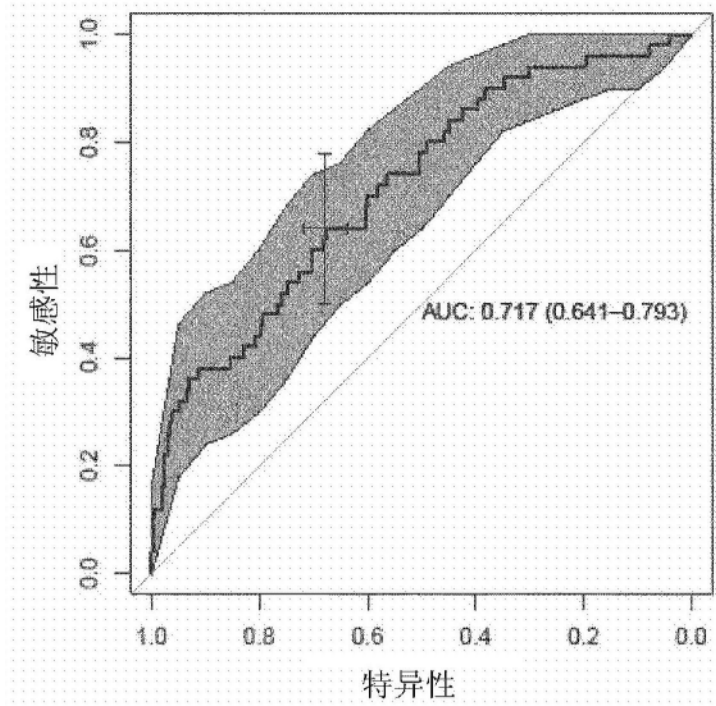


图2B

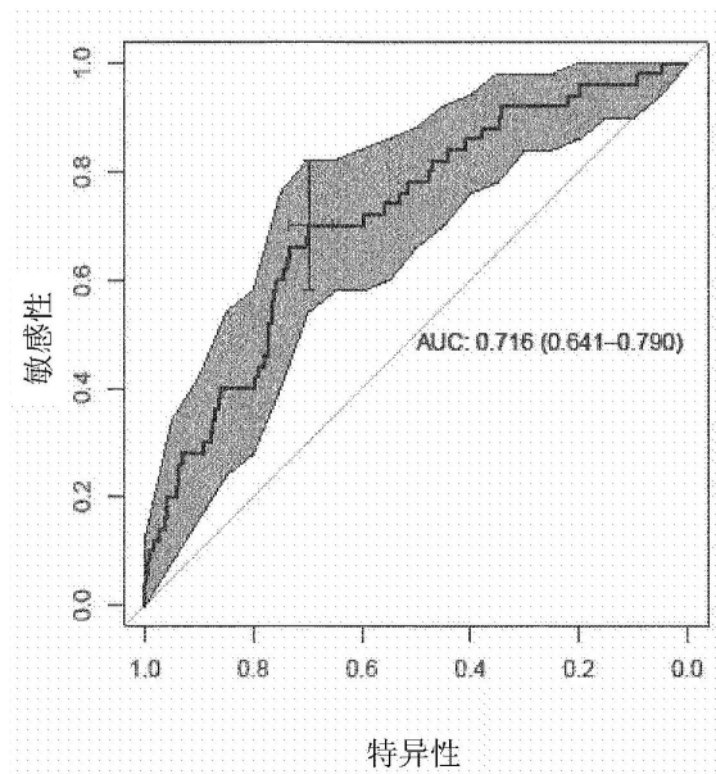


图2C

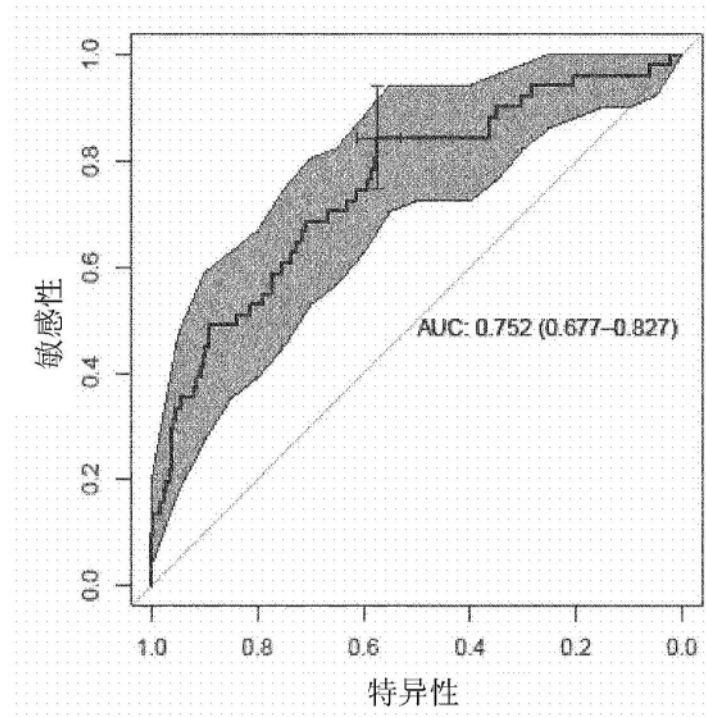


图2D

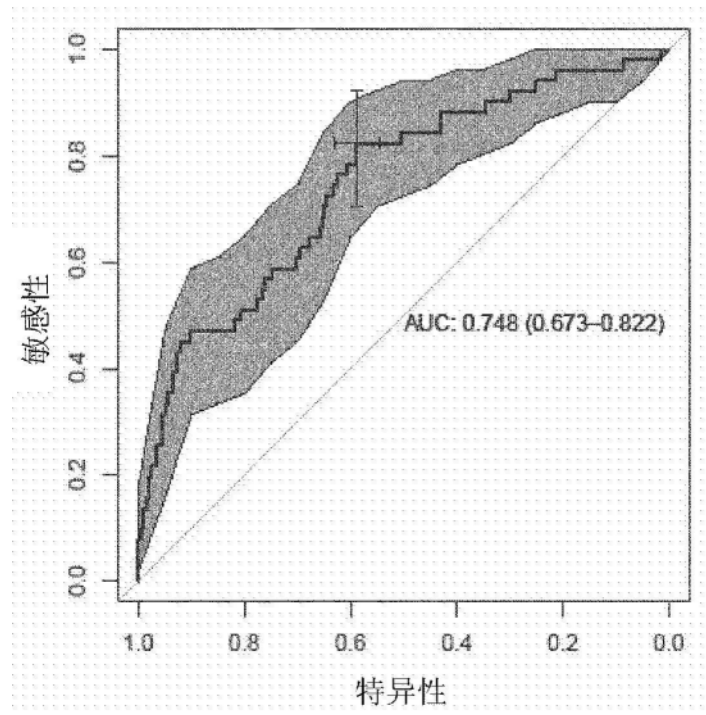


图2E

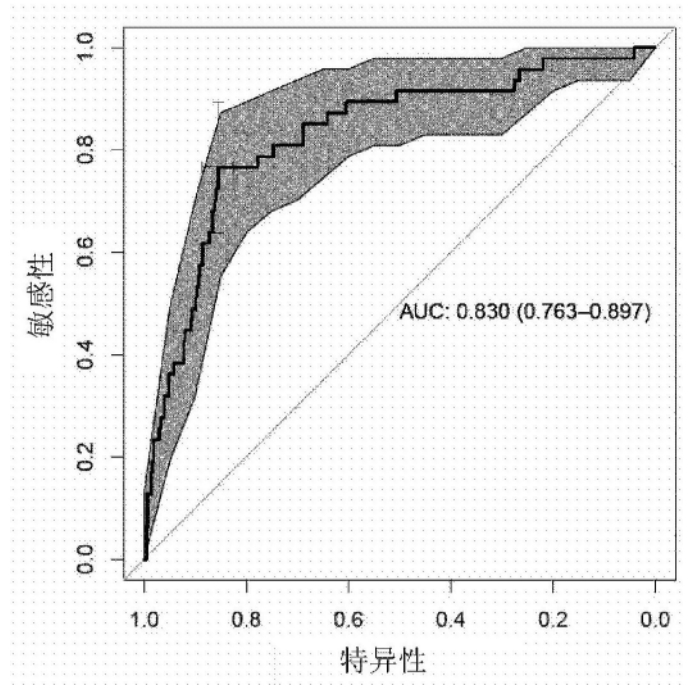


图2F

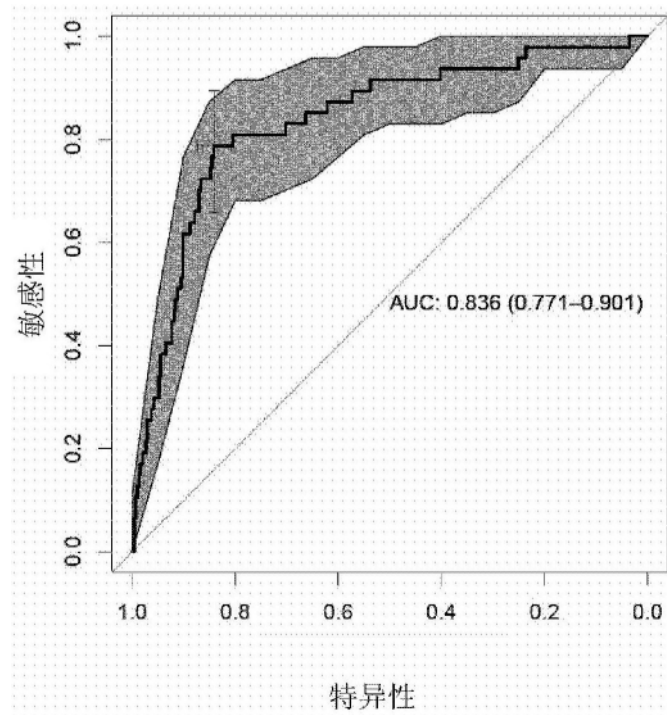


图2G

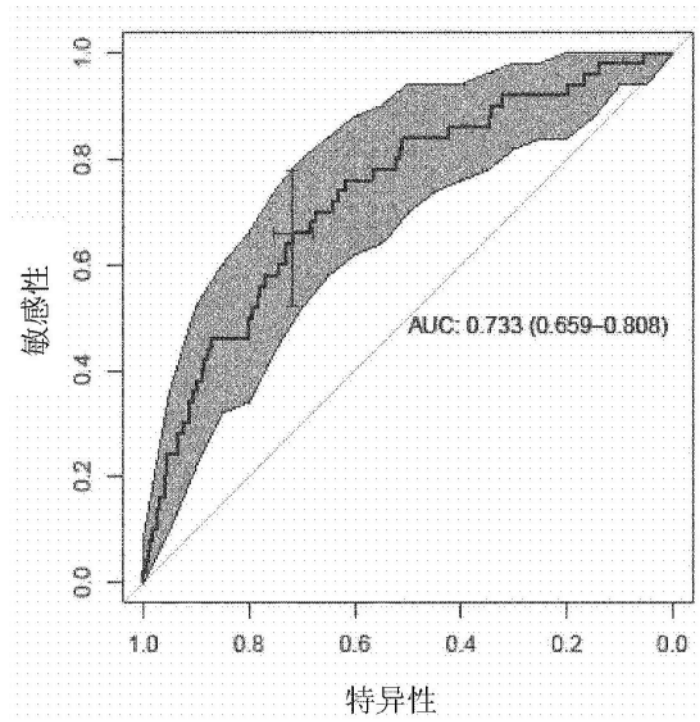


图3A

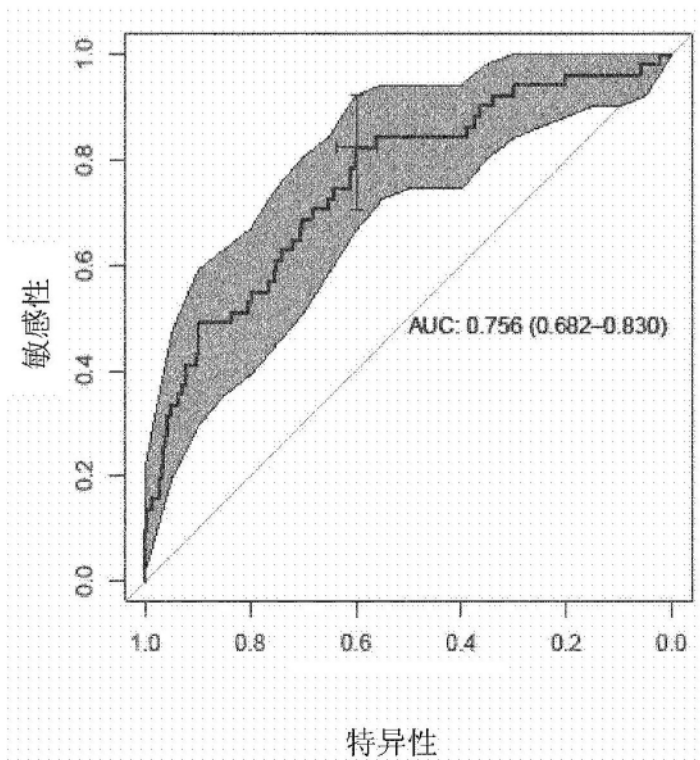


图3B

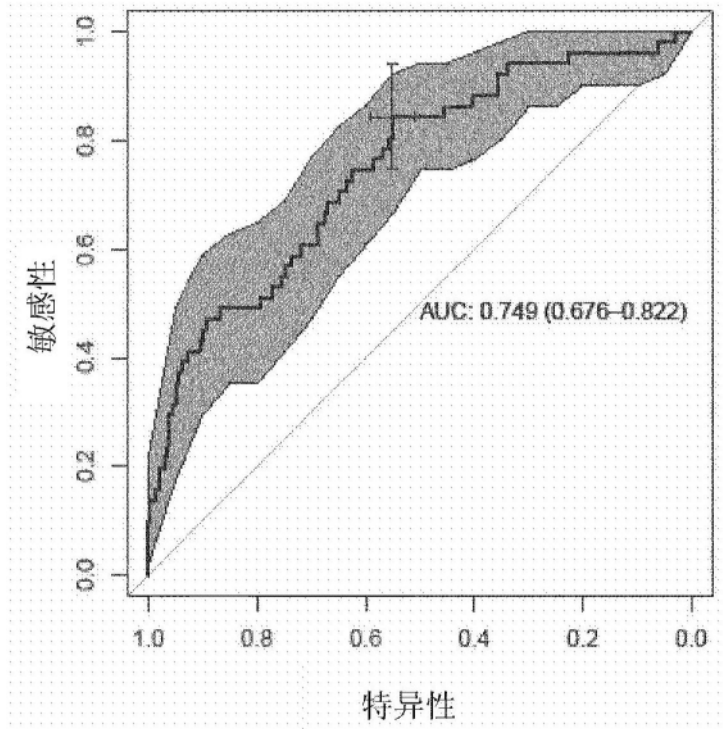


图3C