



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105917229 B

(45)授权公告日 2019.04.26

(21)申请号 201480073639.0

(22)申请日 2014.12.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105917229 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(30)优先权数据
61/911,406 2013.12.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.07.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/068337 2014.12.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/084939 EN 2015.06.11

(73)专利权人 阿斯图特医药公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 匹兹堡大学-联邦高等教育系统

(72)发明人 P·麦克弗森 J·A·凯勒姆

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 郝文博 王建秀

(51)Int.Cl.
G01N 33/566(2006.01)

审查员 周洋

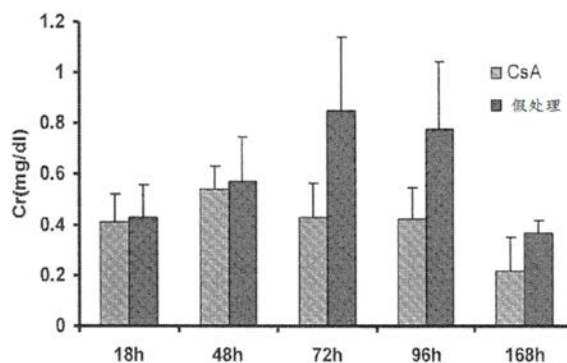
权利要求书2页 说明书25页 附图9页

(54)发明名称

用于肾损伤和肾衰竭的诊断和预后的方法和组合物

(57)摘要

本发明的目的是提供通过使用调节细胞周期的化合物治疗受试者来保护所述受试者免受急性肾损伤的方法和组合物。调节细胞周期可以包括诱导G₀/G₁细胞周期停滞,和/或诱导细胞周期进程。如下所示,即使单独施用诱导G₀/G₁细胞周期停滞的化合物也可以保护受试者免受AKI,并且可以在已知对肾脏有害的各种治疗或病状之前预防使用或之后作为治疗使用,接着任选地解除停滞。一旦AKI开始,细胞周期进程可被诱导以增加损失和损坏的细胞的替换。



1. 用于测定生物标记物IGFBP7和TIMP-2的试剂在制备诊断剂中的用途,所述诊断剂用于评估是否对患者施用调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂和/或调节细胞周期进程的试剂,所述评估包括:

对从所述患者获得的体液样品执行生物标志物测定,其测量IGFBP7以提供IGFBP7测定结果;

对从所述患者获得的体液样品执行生物标志物测定,其测量TIMP-2以提供TIMP-2测定结果;以及

执行下列处理步骤中的一个或两个:

当所述IGFBP7测定结果升高而所述TIMP-2测定结果没有升高时,施用所述调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂;和/或

当所述TIMP-2测定结果升高而所述IGFBP7测定结果没有升高时,施用所述调节细胞周期进程的试剂,

其中,所述体液是血液、血清、血浆和/或尿液。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂选自由环孢霉素A、青蒿琥酯、辛伐他汀、蟾毒灵、NC381、夫拉平度、依维莫司、石蒜碱、TIMP-2、IGFBP7、PAMP和DAMP组成的组。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂是环孢霉素A。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中还对所述患者组合施用抑制细胞凋亡的一种或多种试剂和调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述抑制细胞凋亡的一种或多种试剂包括一种或多种糖皮质激素。

6. 根据权利要求1-3和5中任一项所述的用途,其中调节细胞周期进程的一种或多种试剂选自由曲美替尼、帕利夫明、结合并抑制TIMP-2的抗体和结合并抑制IGFBP7的抗体组成的组。

7. 调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂和/或调节细胞周期进程的试剂在制备用于预防性治疗有急性肾损伤风险的受试者和/或治疗患有急性肾损伤的受试者的药物中的用途,所述预防性治疗或治疗包括:

对从所述受试者获得的体液样品执行生物标志物测定,其测量IGFBP7以提供IGFBP7测定结果;

对从所述受试者获得的体液样品执行生物标志物测定,其测量TIMP-2以提供TIMP-2测定结果;以及

执行下列处理步骤中的一个或两个:

当所述IGFBP7测定结果升高而所述TIMP-2测定结果没有升高时,施用所述调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂;和/或

当所述TIMP-2测定结果升高而所述IGFBP7测定结果没有升高时,施用所述调节细胞周期进程的试剂,

其中,所述体液是血液、血清、血浆和/或尿液。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂选自由环孢霉素A、青蒿琥酯、辛伐他汀、蟾毒灵、NC381、夫拉平度、依维莫司、石蒜碱、TIMP-2、

IGFBP7、PAMP和DAMP组成的组。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂是环孢霉素A。

10. 根据权利要求7-9中任一项所述的用途,其中还对所述受试者组合施用抑制细胞凋亡的一种或多种试剂和调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述抑制细胞凋亡的一种或多种试剂包括一种或多种糖皮质激素。

12. 根据权利要求7-9和11中任一项所述的用途,其中调节细胞周期进程的一种或多种试剂选自由曲美替尼、帕利夫明、结合并抑制TIMP-2的抗体和结合并抑制IGFBP7的抗体组成的组。

用于肾损伤和肾衰竭的诊断和预后的方法和组合物

[0001] 本申请要求于2013年12月3日提交的美国临时专利申请号61/911,406的优先权,其全文以引用方式并入本文。

[0002] 关于联邦政府赞助研究的声明

[0003] 本发明在国家心肺和血液研究所(NHLBI)资助号R01HL080926的政府支持下完成。政府对本发明具有一定的权利。

[0004] 发明背景

[0005] 以下对于发明背景的论述仅提供用来帮助读者理解本发明,且并非承认描述或构成本发明的现有技术。

[0006] 肾负责身体内水和溶质的排泄。其功能包括酸碱平衡的维持、电解质浓度的调节、血量的控制和血压的调节。因此,因损伤和/疾病引起的肾功能丧失导致大量的发病和死亡。肾损伤的详细讨论提供在纽约McGraw Hill公司的第17版Harrison's Principles of Internal Medicine的第1741-1830页中,其全文以引用方式并入本文。肾脏疾病和/或损伤可以是急性的或慢性的。急性的和慢性的肾脏疾病描述如下(选自纽约McGraw Hill公司的2008年第47版Current Medical Diagnosis&Treatment的第785-815页,其全文以引用方式并入本文):“急性肾衰竭是在几小时至几天内的肾功能恶化,导致含氮废物(例如尿素氮)和肌酐在血液中的滞留。这些物质的滞留被称为氮血症。慢性肾衰竭(慢性肾脏疾病)由几个月至几年的肾功能不正常丧失引起”。

[0007] 急性肾衰竭(ARF,又名急性肾损伤或AKI)是肾小球滤过的急剧(通常在约48小时至一周内检测到)降低。滤过能力的丧失导致被肾脏正常排泄的含氮废物(尿素和肌酐)和不含氮废物的滞留、尿排泄量的减少,或者两者。据报道,ARF使约5%的住院治疗、4-15%的心肺旁路手术和高达30%的重症监护进入复杂化。根据病因,ARF可以分为肾前性、肾因性或肾后性的。肾因性疾病可以进一步分为肾小球、肾小管、间质和血管异常。ARF的主要病因如下表所述,所述表格改编自第17版的Merck Manual第22章,其全文以引用方式并入本文:

[0008]

类型	风险因素
肾前性的	
ECF 体积损耗	过度利尿、出血、GI 损失、血管内液到血管外空间的流失(由于腹水、腹膜炎、胰腺炎或烧伤)、皮肤和粘膜的损失、肾脏的盐和水的消耗状态
低心排量	心肌症、MI、心脏压塞、肺栓塞、肺高血压、正压机械通气
低全身血管阻力	败血性休克、肝衰竭、抗高血压药
升高的肾血管阻力	NSAID、环孢霉素、他克莫司、高血钙症、过敏反应、麻醉剂、肾动脉梗阻、肾静脉血栓症、败血症、肝肾综合症
降低的传出小动脉音(由于减少的肾小球毛细血管压导致 GFR 降低,尤其是在双侧肾动脉狭窄的患者中)	ACE 抑制剂或血管紧张素 II 受体阻断剂
肾因性的	
急性肾小管损伤	局部缺血(长期或严重的肾前状态): 手术、出血、动脉或静脉梗阻; 毒素: NSAID、环孢霉素、他克莫司、氨基糖苷类、磷甲酸、乙二醇、血红素、肌红蛋白、异环磷酰胺、重金属、甲氨蝶呤、不透射线造影剂、链脲霉素
急性肾小球肾炎	ANCA-相关: 新月体性肾小球肾炎、结节性多动脉炎、韦格纳氏肉芽肿病; 抗 GBM 肾小球肾炎: 古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome); 免疫复合物: 狼疮性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、冷球蛋白血症性肾小球肾炎
急性肾小管间质性肾炎	药物反应(例如, β -内酰胺类、NSAID、磺胺类、环丙沙星、噻嗪类利尿剂、呋塞米、苯妥英、别嘌醇、肾盂肾炎、乳头状坏死
急性血管性肾病	血管炎、恶性高血压、血栓性微血管病、硬皮病、动脉粥样硬化性血栓
浸润性疾病	淋巴瘤、结节病、白血病

[0009]	肾后性的	
	肾小管沉淀	尿酸(肿瘤溶解)、磺胺类、氨苯喋啶、阿昔洛韦、茚地那韦、氨甲蝶呤、乙二醇摄取、骨髓瘤蛋白、肌红蛋白
	输尿管梗阻	内在的：结石、血块、脱落的肾组织、真菌球、浮肿、恶性肿瘤、先天性缺陷；外在的：恶性肿瘤、腹膜后纤维化、手术或高冲击损伤期间的输尿管损伤
	膀胱梗阻	机械性的：良性前列腺增生、前列腺癌、膀胱癌、输尿管狭窄、包茎、嵌顿、输尿管瓣膜，阻塞的留置导尿管；神经性的：抗胆碱能药物、上或下运动神经元损伤

[0010] 在缺血性ARF的情况下，该疾病的过程可被分为四个阶段。在持续数小时至数天的开始阶段，肾脏减少的灌注正在演变成损伤。肾小球超滤降低，滤液的流量由于小管中碎屑而减少，并且滤液通过损伤的上皮发生回漏。肾脏再灌注可在此阶段期间介导肾损伤。起始阶段后是延伸阶段，其特征是持续缺血性损伤和炎症，并且可能涉及内皮损伤和血管充血。在持续1至2周的维持阶段，发生肾细胞损伤，以及肾小球滤过和排尿量达到最小值。随后是恢复阶段，在此阶段中肾上皮修复并且GFR逐渐恢复。尽管如此，ARF受试者的存活率仍然可能低至约60%。

[0011] 由放射性造影剂(也称为造影介质)和其它肾毒素，如环孢霉素、抗生素(包括氨基糖苷类)和抗癌药物(如顺铂)引起的急性肾损伤在几天到约一周时间内显现。造影剂诱导的肾病(CIN,由放射性造影剂引起的AKI)被认为是由肾内血管收缩(导致缺血性损伤)和由产生对肾小管上皮细胞有直接毒性的活性氧所引起的。CIN典型表现为急性(24-48h内开始)但可逆(3-5天达到峰值,1周之内分解)的血液尿素氮和血清肌酐的上升。

[0012] 通常报道的用于确定和检测AKI的标准是血清肌酐的突然(通常在约2-7天或住院一段时间内)升高。虽然使用血清肌酐的升高来定义和检测AKI是公认的，但是血清肌酐的升高幅度和其被测量以确定AKI的时间在出版物中有很大的差别。传统上，血清肌酐比较大的升高如100%、200%、升高至少100%至超过2mg/dL的值和其它定义用于确定AKI。然而，最近的趋势已经朝向使用更小的血清肌酐的升高来确定AKI。血清肌酐的升高、AKI和相关健康风险之间的关系综述于Praught和Shlipak, Curr Opin Nephrol Hypertens 14:265-270, 2005和Chertow等, J Am Soc Nephrol 16:3365-3370, 2005中，所述文献与本文所列出的参考文献全文以引用方式并入本文。如这些出版物中所描述，现在已知，急性肾功能恶化(AKI)以及死亡和其它有害后果的风险增加，与血清肌酐非常小的升高相关。这些升高可以被确定为相对(百分比)值或公称值。已有报道称，血清肌酐从损伤前的值小到20%的相对升高表明急性肾功能恶化(AKI)和增加的健康风险，但是用来确定AKI和增加的健康风险更常见的值是至少25%的相对升高。已有报道称，小到0.3mg/dL、0.2mg/dL或甚至0.1mg/dL的公称升高表明肾功能恶化和死亡风险的增加。血清肌酐上升到这些阈值的各个时间段已经被用于确定AKI，例如，2天、3天、7天，或可变的时间段，这些时间段定义为患者在医院或重症监护室的时间。这些研究表明，对于肾功能恶化或AKI，不存在特定的血清肌酐上升阈值(或上升的时间段)，而是随着血清肌酐上升幅度的增加存在持续的风险增加。

[0013] 一项研究(Lassnigg等人,J Am Soc Nephrol 15:1597-1605,2004年,全文以引用方式并入本文)研究了血清肌酐的升高和降低。心脏手术后血清肌酐有-0.1至-0.3mg/dL的轻度下降的患者具有最低的死亡率。血清肌酐有较大下降(大于或等于-0.4mg/dL)或血清肌酐有任何升高的患者具有更大的死亡率。这些发现使作者得出结论,肾功能的甚至很细微的变化(如手术48小时内检测到的肌酐的较小变化)严重影响患者的结局。在努力达成在临床试验和临床实践中使用血清肌酐确定AKI的统一的分类系统的共识中,Bellomo等人在Crit Care.8(4):R204-12,2004(全文以引用方式并入本文)中提出了以下用于AKI患者分级的分类方法:

[0014] “风险”:血清肌酐升高至基线1.5倍或6小时的尿量<0.5mL/kg体重/小时;

[0015] “损伤”:血清肌酐升高至基线的2.0倍或12小时的尿量<0.5mL/kg体重/小时;

[0016] “衰竭”:血清肌酐升高至基线3.0倍或肌酐>355 μ mol/l(具有>44的上升)或24h的排尿量低于0.3mL/kg体重/小时,或至少12小时无尿;

[0017] 并且包括两种临床结果:

[0018] “丧失”:持续性需要肾脏替代疗法超过四个星期。

[0019] “ESDR”:终末期肾病一需要透析超过3个月。

[0020] 这些标准被称为RIFLE标准,其提供了一个有用的临床工具以分类肾状态。正如Kellum在Crit.Care Med.36:S141-45,2008中和Ricci等在Kidney Int.73,538-546,2008中(全文分别以引用方式并入本文)所讨论的,RIFLE标准提供了一套已在许多研究中得到验证的AKI的统一定义。

[0021] 最近,Mehta等在Crit.Care 11:R31(DOI:10.1186.cc5713),2007(其全文以引用方式并入本文)中提出以下用于AKI患者分级的类似分类方法,其改进自RIFLE:

[0022] “I期”:血清肌酐的升高大于或等于0.3mg/dL($\geq 26.4\mu$ mol/L),或升高至大于或等于基线的150%(1.5倍)或排尿量小于0.5mL/kg/小时超过6小时;

[0023] “II期”:血清肌酐升高至超过基线的200%(>2倍)或排尿量小于0.5mL/kg/小时超过12小时;

[0024] “III期”:血清肌酐升高至超过基线的300%(>3倍),或血清肌酐 $\geq 354\mu$ mol/L并伴随着至少44 μ mol/L的急性升高或24小时的排尿量小于0.3mL/kg/小时或持续12小时无尿。

[0025] CIN共识工作小组(McCollough等,Rev Cardiovasc Med.2006;7(4):177-197,全文以引用方式并入本文)使用25%的血清肌酐上升来确定造影剂诱导的肾病(AKI的一种类型)。虽然不同群体提出稍有不同的使用血清肌酐检测AKI的标准,但是共识是,血清肌酐的微小变化,如0.3mg/dL或25%,都足以检测AKI(肾功能恶化),并且血清肌酐的变化幅度是AKI的严重程度和死亡风险的指标。

[0026] 近来,在一项前瞻性的多中心研究中,在危重成年患者的调查组中鉴定出两个新颖AKI生物标志物,并随后使用临床试验验证,并且与在不均一的危重患者的独立验证组中现有的AKI标记相比较。当与用于检测AKI风险的现有方法直接比较时,尿胰胰岛素样生长因子结合蛋白7(IGFBP7)和金属蛋白酶2组织抑制剂(TIMP-2)强力标记物具有改进的性能特征,而且还为临床数据提供重要的附加信息。值得注意的是,IGFBP7和TIMP-2各自涉及到细胞损伤的非常早期阶段期间的G₁细胞周期停滞现象,已经表明,肾小管细胞在实验性败血症或缺血导致的损伤之后进入短时间的G₁细胞周期停滞。参见,例如Yang等,J.Infect.58:

459-464, 2009; Witzgall等, J.Clin. Invest. 93: 2175-2188, 1994。

[0027] (AKI) 仍然是一个令人头痛的临床问题, 在某种程度上, 是因为它在器官功能丧失之前难以确定, 可能进而成为不可逆的损伤。此外, 现有的疗法主要是根据配套措施和肾毒性药物的去除来预测。这些限制强调需要更好的方法来检测、评估和治疗AKI, 最好在不可逆的损伤发生之前。

[0028] 发明概述

[0029] 本发明的目的是提供通过使用调节细胞周期的化合物治疗受试者来保护所述受试者免受急性肾损伤的方法和组合物。调节细胞周期可以包括诱导G₀/G₁细胞周期停滞, 和/或诱导细胞周期进程。如下所示, 即使单独施用诱导G₀/G₁细胞周期停滞的化合物也可以保护受试者免受AKI, 并且可以在已知对肾脏有害的各种治疗或病状之前预防使用或之后作为治疗使用, 接着任选地解除停滞。一旦AKI开始, 细胞周期进程可被诱导以增加损失和损坏的细胞的替换。

[0030] 在某些实施方案中, 这类治疗可以与一种或多种与细胞周期状态相关的生物标志物组合使用, 以评估受试者的肾脏状态。这些生物标志物可以用于评估肾脏的当前细胞周期状态, 并且可以被用来评估在已经遭受急性肾损伤的受试者的肾脏状态的改善。当尿TIMP-2和/或IGFBP7水平升高, 并且推测的产生AKI的曝光是最近的(例如, 48小时以内, 优选36小时以内, 更优选24小时以内)时, 诱导G₀/G₁细胞周期停滞可以是保护性的。相反, 当尿TIMP-2和/或IGFBP7水平升高, 并且推测的产生AKI的曝光是久远的(>36小时)时, 细胞周期进程的诱导剂因可减轻延长的导致细胞衰老的细胞周期停滞是有益的。

[0031] 仅以举例的方式, 使用通过诱导G₀/G₁细胞周期停滞来调节细胞周期的化合物(如环孢霉素A)治疗动物, 可保护或改善如血浆肌酐水平测量的动物的肾状态。环孢霉素A治疗后, 在动物中IGFBP7和/或TIMP-2的尿测量值最初升高, 然后在24小时后减少, 并且进展为AKI的风险降低。相反, 这表明晚增加的IGFBP7和/或TIMP-2的测量值对于进展为AKI的动物是指示性的。

[0032] 一方面, 本发明涉及预防性治疗有急性肾损伤风险的患者的方法。这些方法包括对患者施用有效量的调节肾上皮细胞G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂一段时间, 所述时间足以诱导肾上皮细胞群的细胞周期停滞, 但不足以诱导如患者进展为急性肾衰竭所测定的肾毒性。

[0033] 仅以举例的方式, 调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂可以选自由环孢霉素A、青蒿琥酯、辛伐他汀、蟾毒灵、NC381、夫拉平度、依维莫司、石蒜碱、TIMP-2和IGFBP7组成的组。这个清单并非意味着要限制。在本文所述示例性实施方案中, 调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂包括环孢霉素A或由环孢霉素A组成。

[0034] 在某些实施方案中, 受试者也可以用一种或多种化学试剂治疗, 所述一种或多种化学试剂减轻调节G₀/G₁细胞周期停滞的试剂的肾毒性作用。优选地, 对受试者组合施用抑制细胞凋亡的一种或多种试剂和调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂。此类抑制细胞凋亡的一种或多种试剂包括一种或多种糖皮质激素或由一种或多种糖皮质激素。

[0035] 另一方面, 本发明涉及治疗患有急性肾损伤患者的方法。这些方法包括对患者施用有效量的调节肾上皮细胞周期进程的一种或多种试剂一段时间, 所述时间足以诱导肾上皮细胞群的细胞周期进程。

[0036] 仅以举例的方式,所述调节细胞周期进程的一种或多种试剂可以选自由曲美替尼、帕利夫明、结合并抑制TIMP-2的抗体和结合并抑制IGFBP7的抗体组成的组。这个清单并非意味着要限制。

[0037] 如下文所述,共同使用细胞周期停滞调节剂与生物标志物可以为急性肾损伤提供一种新的潜在的治疗模式。因此,在某些实施方案中,本文所描述的方法还包括:

[0038] 对从患者获得的第一体液样品执行第一生物标志物测定,其测量IGFBP7和/或TIMP-2以提供第一测定结果,其中所述第一体液样品在施用步骤之前从患者获得;

[0039] 对从患者获得的体液样品执行第二生物标志物测定,其测量IGFBP7和/或TIMP-2以提供第二测定结果,其中所述第一体液样品在施用步骤后48小时从患者获得;以及

[0040] 对比第一测定结果和第二测定结果。

[0041] 在某些实施方案中,当IGFBP7水平升高而TIMP-2的水平不升高时, G_0/G_1 细胞周期停滞的诱导剂可以是保护性的。相反地,当TIMP-2水平升高而IGFBP7的水平不升高时,细胞周期进程的诱导剂可以是有益的。

[0042] 如上所讨论的,本文所描述的方法可以在已知对肾脏有害的各种治疗或病状之前预防使用,或之后作为治疗使用。因此,在某些实施方案中,所述方法还可以包括,在施用步骤的48小时内对受试者进行血管手术、冠状动脉旁路、其它心脏手术或施用一种或多种不透射线造影剂。受试者可以基于受试者的肾前性、肾因性或肾后性ARF的一个或多个已知风险因素的先存性来选择。在某些情况下,在施用步骤时,受试者具有败血症和/或受试者处于RIFLE 0期或R期。

[0043] 健康状态的其它临床指标,并且尤其是肾机能完全,可以与在本文所述的方法中的IGFBP7和/或TIMP-2测量组合。此类临床指标可包括以下中的一个或多个:患者的基线排尿量值;患者的血清肌酐基线变化;人口统计信息(例如,体重、性别、年龄、种族);病史(例如,家族病史,手术类型,先天性疾病如动脉瘤、充血性心力衰竭、先兆子痫、子痫、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病、蛋白尿、肾功能不全或败血症,毒素暴露类型如NSAID、环孢霉素、他克莫司、氨基糖苷类、膦甲酸、乙二醇、血红蛋白、肌红蛋白、异环磷酰胺、重金属、甲氨蝶呤、不透射线造影剂或链脲霉素);其它的临床变量(例如,血压、体温、呼吸速率);风险评分(APACHE评分,PREDICT评分,UA/NSTEMI的TIMI风险评分,Framingham风险评分,Thakar等(J. Am. Soc. Nephrol. 16:162-68, 2005)、Mehran等(J. Am. Coll. Cardiol. 44:1393-99, 2004)、Wijeyesundera等(JAMA 297:1801-9, 2007)、Goldstein和Chawla (Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 5:943-49, 2010)或Chawla等(Kidney Intl. 68:2274-80, 2005)的风险评分);肾小球滤过率;估计肾小球滤过率;尿液产生速率;血清或血浆肌酐浓度;尿肌酐浓度;钠排泄分数;尿钠浓度;尿肌酐与血清或血浆肌酐的比率;尿比重;尿重量摩尔渗透压浓度;尿液尿素氮与血浆尿素氮的比率;血浆BUN与肌酐的比率;由尿钠/(尿肌酐/血浆肌酐)计算的肾衰竭指数;血清或血浆嗜中性粒细胞明胶酶(NGAL)的浓度;尿NGAL的浓度;血清或血浆半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的浓度;血清或血浆心肌肌钙蛋白浓度;血清或血浆BNP浓度;血清或血浆的NTproBNP浓度;和血清或血浆proBNP浓度。可以与IGFBP7和/或TIMP-2测定结果组合的其它肾功能测量方法在下文和纽约McGraw Hill公司第17版Harrison's Principles of Internal Medicine的第1741-1830页,和纽约McGraw Hill公司2008年第47版Current Medical Diagnosis&Treatment的第785-815页(其全文分别以引

用方式并入本文)中描述。

[0044] 多种方法可以用于评估IGFBP7和/或TIMP-2生物标记物的结果。例如,可以选择已预先确定的生物标志物或生物标志物的组合的截断值,用于将相关群体分成两个或多个组。第一组,为方便起见通常被称为“非患病”群体,代表那些具有高AKI风险的患者。第二组代表那些由生物标志物结果测量的AKI风险较小的患者。第二组的AKI的相对风险是相对于第一组中的风险来测定。相对风险为1意味着两组之间的风险没有差异;而相对风险 >1 是指第二组中的风险更高。

[0045] 区分两个群体的特定测试的能力可以使用ROC分析来确定。例如,ROC曲线从预先倾向发生一种或多种肾状态的未来变化的“第一”亚群中建立,而预先未有如此倾向的“第二”亚群可以用于计算ROC曲线,并且曲线下面积提供了测试质量的量度。优选地,本文所述的测试提供大于0.5、优选至少0.6、更优选0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9和最优选至少0.95的ROC曲线面积。

[0046] 在某些方面中,所测量的IGFBP7和/或TIMP-2浓度可被视为连续变量。例如,任何特定的浓度都可以转换成相应的受试者肾功能未来减少、损伤的发生、分类等的可能性。在另一替代方面,阈值可以在将受试者群体分割成“库”,如“第一”亚群(例如,预先倾向于发生一种或多种肾状态的未来变化、发生损伤、分类等)和预先未有如此倾向的“第二”亚群时,提供可接受的特异性和灵敏度水平。阈值被选择通过以下测试精度的一种或多种测量方法来分割此第一和第二群体:

[0047] 优势比大于1、优选至少约2或更大或约0.5或更小、更优选至少约3或更大或约0.33或更小、还更优选至少约4或更大或约0.25或更小、甚至更优选至少约5或更大或约0.2或更小、并且最优选至少约10或更大或约0.1或更小;

[0048] 特异性大于0.5、优选至少约0.6、更优选至少约0.7、还更优选至少约0.8、甚至更优选至少约0.9并且最优选至少约0.95,伴随相应的灵敏度大于0.2、优选大于约0.3、更优选大于约0.4、还更优选至少约0.5、甚至更优选约0.6、还更优选大于约0.7、还更优选大于约0.8、更优选大于约0.9、并且最优选大于约0.95;

[0049] 灵敏度大于0.5、优选至少约0.6、更优选至少约0.7、还更优选至少约0.8、甚至更优选至少约0.9并且最优选至少约0.95,伴随相应的特异性大于0.2、优选大于约0.3、更优选大于约0.4、还更优选至少约0.5、甚至更优选约0.6、还更优选大于约0.7、还更优选大于约0.8、更优选大于约0.9、并且最优选大于约0.95;

[0050] 至少约75%的灵敏度,与至少约75%的特异性组合;

[0051] 阳性似然比(以灵敏度/(1-特异性)形式计算)大于1,至少约2,更优选至少约3,还更优选至少约5,并且最优选至少约10;或者

[0052] 阴性似然比(以(1-灵敏度)/特异性形式计算)小于1,小于或等于约0.5,更优选地小于或等于约0.3,并且最优选小于或等于约0.1。

[0053] 上下文中的任何上述测量中的术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0054] 多个阈值也可以用于评估受试者的肾状态。例如,预先倾向于一种或多种肾状态的未来变化、发生损伤、分类等的“第一”亚群,和预先未有如此倾向的“第二”亚群可以组合成一个单一组。然后,该单一组被细分成三个或更多相等的部分(称为三分位数、四分位数、五分位数,等等,取决于细分数目)。根据受试者所在的分单元分配优势比。如果考虑三分位

数,最低或最高三分位可以用作对其它分单元进行比较的参照。此参照分单元分配1的优势比。第二个三分位分配相对于第一三分位的优势比。也就是说,与在第一三分位的某受试者相比,在第二三分位的某受试者3倍可能遭受一种或多种肾状态的未变化。第三三分位也分配相对于第一三分位的优势比。

[0055] 在某些实施方案中,受试者可以基于受试者的肾前性、肾因性或肾后性ARF的一个或多个已知风险因素的先存性被挑选用于风险分级。例如,经历或已经经历重大血管手术、冠状动脉旁路或其它心脏手术的受试者;具有预先存在的充血性心力衰竭、先兆子痫、子痫、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病、蛋白尿、肾功能不全、肾小球滤过低于正常范围、肝硬化、血清肌酐高于正常范围或败血症的受试者;或暴露于NSAID、他克莫司、氨基糖苷类、膦甲酸、乙二醇、血红蛋白、肌红蛋白、异环磷酰胺、重金属、甲氨蝶呤、不透射线造影剂或链脲霉素的受试者,都是根据本文描述的方法用于监控风险的优选受试者。

[0056] 附图简述

[0057] 图1描述了CLP后各个时间的肌酐水平。

[0058] 图2描述了CLP后各个时间的存活。

[0059] 图3描述了CLP后各个时间的[TIMP2]_x[IGFBP7]。

[0060] 图4A描述了CLP后各个时间的[IGFBP7]。

[0061] 图4B描述了CLP后各个时间的[TIMP2]。

[0062] 图5描述了在败血症大鼠中环孢霉素(CsA)对血浆白介素(IL)-6的影响。CLP后18小时,将动物(每组n=16-24)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。CLP后18小时,所有动物开始接受氨苄青霉素/舒巴坦持续三天。*P<0.05,CsA相对媒介物(数据用平均值±SE表示,pg/ml)。

[0063] 图6A-6C描述了在败血症大鼠中单次剂量的CsA对肾功能的影响。CLP后18小时,将动物(每组n=16-24)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。CLP后18小时,所有动物开始接受氨苄青霉素/舒巴坦持续三天。*P<0.05,CsA相对媒介物。A. 血浆肌酐(平均值±SE,mg/dl);B. 尿NGAL(平均值±SE,U/ml);C. 通过RIFLE分类测定的AKI的不同严重性的百分比。R, I, F=AKI RIFLE分级:风险(肌酐变化150-199%),损伤(肌酐变化200-299%),和衰竭(肌酐变化≥300%)。CsA中的8/24(33.33%)具有RIFLE-R,相对媒介物中的16/24(66.67%)具有RIFLE-R(P<0.05)。

[0064] 图7A-7B描述了在败血症大鼠中单次剂量的CsA对一周存活的影响。CLP后18小时,将动物(每组n=16-24)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。CLP后18小时,所有动物开始接受氨苄青霉素/舒巴坦持续三天。评估存活时间至多七天。A. Kaplan—Meier存活曲线;B. 存活与AKI严重性之间的关系。

[0065] 图8A-8C描述了在败血症大鼠中CsA对尿中细胞周期停滞的生物标志物的影响。

[0066] CLP后18小时,将动物(每组n=16-24)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。CLP后18小时,所有动物开始接受氨苄青霉素/舒巴坦持续三天。数据表示为平均值±SE,*P<0.05,CsA相对媒介物。A. TIMP-2(μg/ml);B. IGFBP7(μg/ml);C. [TIMP-2]_x[IGFBP7](μg²/ml²)。

[0067] 图9描述了在败血症大鼠中单次剂量的CsA对肾组织中细胞凋亡的影响。CLP后18小时,将动物(每组n=6)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。CLP后18小时,所有动物开

始接受氨苄青霉素/舒巴坦。治疗6或24小时后,将动物处死并收集肾组织用于测量半胱天冬酶3和半胱天冬酶9(数据表示为平均值±SE)。

[0068] 图10A-10C描述了在健康大鼠中单次剂量的CsA对肾功能的影响。

[0069] 将健康的动物(接受了剖腹手术但没接受CLP,每组n=6)随机分配接受单次剂量的CsA或媒介物。A. 血浆IL-6(平均值±SE,pg/ml);B. 血浆肌酐(平均值±SE,mg/dl);C. 肾组织中的半胱天冬酶3和半胱天冬酶9(平均值±SE,OD)。

[0070] 发明详述

[0071] 急性肾损伤(AKI)定义为肾滤过功能的突然或迅速下降,并且是与显著发病率和死亡率相关联的临床综合征。AKI的发病率已经在过去十年间增加了一倍以上,并且预计将继续增加。AKI患者被众多专家,包括但不限于,急诊医学医生、内科医生、儿科医生、外科医生、重症医生和肾病专家护理。发展为AKI的患者往往需要肾脏替代疗法(RRT),但临床医生经常关于RRT启动的最佳时机意见不一。

[0072] 纠正AKI的根本原因的措施应该在尽可能早的时间点开始。血清肌酐是当前肾状态的前导,其直到肾脏大部分被破坏才会上升到异常水平,因为肾小球滤过率(GFR)和血清肌酐水平之间的关系不是线性的,尤其是在疾病早期。的确,在GFR丧失50%之前血清肌酐的上升可能并不明显。由于当前AKI的治疗本质上主要是支持性的(迄今没有治疗形式在治疗病状中显示功效),所以预防AKI的能力将拥有巨大的临床用途。

[0073] 本发明提供通过使用化合物预防性治疗受试者来保护受试者免受急性肾损伤的方法和组合物,所述化合物通过诱导G₀/G₁细胞周期停滞来调节细胞周期。这种化合物的施用可以保护受试者免受AKI,并且可以在已知对肾脏有害的各种治疗或病状之前或之后使用。这些包括治疗措施:如心脏手术,包括冠状动脉旁路移植术(CABG)和瓣膜病手术(经历心脏或心胸手术患者的AKI发生率为约30%;需要心肺旁路(CPB)的心脏手术是在重症监护病房中AKI的第二常见原因),造影剂的施用(在住院患者中新AKI的第三最常见原因),非甾体抗炎药的使用,和如败血症的病状(在ICU中占AKI病例的50%或以上)。

[0074] 在某些实施方案中,这类治疗可以与一种或多种与细胞周期状态相关的生物标志物组合使用,以评估受试者的肾脏状态。这些生物标志物可以用于评估肾脏的当前细胞周期状态,并且可以被用来评估在已经遭受急性肾损伤的受试者中的肾脏状态的改善。

[0075] 就本文件而言,以下定义适用:

[0076] 如本文所用,“肾功能损伤”是在测量肾功能时突然的(在14天内,优选7天内,更优选72小时内,并且还更优选48小时内)可测量的降低。这种损伤可以被鉴定,例如通过肾小球滤过率或估计GFR的降低、排尿量的减少、血清肌酐的增加、血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂C的增加、对肾替代疗法的需要等等。“改善肾功能”是在测量肾功能时突然的(在14天内,优选7天内,更优选72小时内,并且还更优选48小时内)可测量的升高。用于测量和/或估计GFR的优选方法在下文中描述。

[0077] 如本文所用,“肾功能减退”是突然的(在14天内,优选7天内,更优选72小时内,并且还更优选48小时内)肾功能降低,所述肾功能降低通过血清肌酐大于或等于0.1mg/dL($\geq 8.8\mu\text{mol/L}$)的绝对增加、血清肌酐大于或等于20%(基线的1.2倍)的百分比增加或排尿量的降低(记录的少尿小于0.5ml/kg/小时)来鉴定。

[0078] 如本文所用,“急性肾衰竭”或“ARF”是突然的(在14天内,优选7天内,更优选72小

时内,并且还更优选48小时内)肾功能降低,所述肾功能降低通过血清肌酐大于或等于0.3mg/dl($\geq 26.4\mu\text{mol/l}$)的绝对增加、血清肌酐大于或等于50%(基线的1.5倍)的百分比增加或排尿量的降低(记录的少尿小于0.5ml/kg/小时持续至少6小时)来鉴定。该术语与“急性肾损伤”或“AKI”同义。

[0079] “调节G₀/G₁期停滞的试剂”在本文中是指这样一种化学剂,当其施用于动物时,诱导在细胞周期G₀/G₁期的肾上皮细胞的百分比增加。这不意味着所有肾上皮细胞都在G₀/G₁期。此类试剂包括但不限于,环孢霉素A、青蒿琥酯、辛伐他汀、蟾毒灵、NC381和石蒜碱。可被用于调节G₀/G₁期停滞的其它试剂包括影响(直接或间接地)分子细胞周期蛋白依赖性激酶的分子,如PAMP(病原体相关分子模式)和DAMP(损伤相关的分子模式)。

[0080] “抑制细胞凋亡的试剂”在本文中是指这样一种化学试剂,当其施用于动物时,降低经历细胞凋亡的肾小管上皮细胞的百分比。这并不意味着没有肾上皮细胞将经历细胞凋亡。此类试剂包括但不限于,糖皮质激素类、白介素6(IL-6)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0081] “施用”在本文中关于人、哺乳动物、哺乳动物受试者、动物、兽医受试者、安慰剂受试者、研究受试者、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体使用时,是指但不限于外源性配体、试剂、安慰剂、小分子、药剂、治疗剂、诊断剂或组合物与受试者、细胞、组织、器官或生物流体等接触。“施用”可意指例如治疗、药代动力学、诊断、研究、安慰剂和实验方法。细胞的处理涵盖试剂与细胞接触,以及试剂与流体接触,其中流体与细胞接触。“施用”也涵盖通过试剂、诊断剂、结合组合物或由另一个细胞体外和离体处理例如细胞。“一起施用”不意味着暗指两种或更多种试剂以单一组合物来施用。虽然本发明涵盖以单一组合物来施用,但是这类试剂可以单独施用来递送至单一受试者,这些施用可在相同或不同时间,并且可通过相同施用途径或不同施用途径。

[0082] “治疗有效量”定义为足以展示患者益处,即,导致所治疗的病状的症状减少、预防或改善的试剂或药物组合物的量。当试剂或药物组合物包括诊断剂时,“诊断有效量”定义为足以产生信号、图像或其它诊断参数的量。药物制剂的有效量根据因素如个体的易患病程度,个体的年龄、性别和体重,和个体的特质反应而变化。“有效量”涵盖不限于可改善、逆转、减轻、预防或诊断医学病状或病症的症状或病征或其致病过程的量。除非另外明确地或通过上下文来规定,否则“有效量”不限于足以改善病状的最小量。

[0083] “治疗(treatment)”或“治疗(treating)”(关于病状或疾病)是获得包括并且优选地临床结果的有利或所需结果的方法。出于本发明目的,关于疾病的有利或所需结果包括但不限于以下中的一个或多个:预防疾病、改善与疾病相关联的病状、治愈疾病、减轻疾病的严重性、延缓疾病进程、减轻与疾病相关联的一个或多个症状、增加患有疾病的人的生活质量和/或延长存活。同样地,出于本发明目的,关于病状的有利或所需结果包括但不限于以下中的一个或多个:预防病状、改善病状、治愈病状、减轻病状的严重性、延缓病状的进程、减轻与病状相关联的一个或多个症状、增加患有病状的人的生活质量和/或延长存活。例如,在其中本文所述的组合物用于治疗癌症的实施方案中,有利或所需结果包括但不限于以下中的一个或多个:减少赘生或癌细胞的增殖(或对其进行破坏)、减少在癌症中发现的赘生细胞的转移、缩小肿瘤的尺寸、减少由癌症产生的症状、增加患有癌症的人的生活质量、减少治疗疾病所需要的其它药物的剂量、延缓癌症的进程和/或延长患有癌症的患者的

存活。取决于上下文，“治疗”受试者可暗示受试者需要治疗，例如，在受试者包括预期通过施用试剂来改善的病症的情况中。

[0084] 如本文使用的术语“受试者”是指人或非人生物体。因此，本文所述的方法和组合物可适用于人和兽医疾病。此外，尽管受试者优选是活的有机体，本文所述的发明也可以在死后分析中使用。优选的受试者是人，最优选是“患者”，本文所使用的“患者”是由于指疾病或病状正在接受医疗护理的活的人。这包括针对病理体征进行研究的未患有所定义疾病的人。

[0085] 优选地，分析物是在样品中测得的。此种样品可以从受试者中获得，或者可以从意欲被提供给受试者的生物材料中获得。例如，样品可以从被评估可能移植入受试者的肾脏和用于评估肾脏预先存在的损伤的分析物测量中获得。优选的样品是体液样品。

[0086] 如本文所用的术语“体液样品”，是指为了相关受试者（例如患者或移植供体）的诊断、预后、分类或评估的目的所获得的体液样品。在某些实施方案中，此种样品可为了确定持续病状的结果或治疗方案对病状的影响的目的而获得。优选的体液样品包括血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液、痰和胸腔积液。此外，本领域的技术人员将认识到，某些体液样品在分级或纯化程序（例如将全血分离成血清或血浆组分）之后更容易地分析。

[0087] 如本文所用的术语“诊断”是指本领域技术人员能够估计和/或确定患者是否患有给定疾病或病状的概率（“似然性”）的方法。在本发明的情况下，“诊断”包括将测定（最优选免疫测定）的结果用于本发明的肾损伤标记物，任选地与其它临床特征一起达成从其中获得样品并测定的受试者的急性肾损伤或ARF的诊断（即发生或不发生）。此种诊断是“确定”，并不意味着该诊断100%准确。许多生物标志物指示多种病状。熟练的临床医生并不会在信息真空时使用生物标志物的结果，而是将测试结果与其它临床指标一起使用以达成诊断。因此，在预定的诊断阈值一侧的所测量的生物标志物水平相对于所述预定的诊断阈值的另一侧的测量水平，表示受试者疾病发生的可能性更大。

[0088] 同样，预后风险表示给定的过程或结果将会出现的概率（“可能性”）。反过来与发病率（例如，肾功能恶化、将来的ARF或死亡）增加的可能性相关的预后指标的水平或水平变化被称为患者不良结果的“增加的可能性的指示”。

[0089] 药物组合物

[0090] 本发明的化学试剂（例如，调节G₀/G₁细胞周期停滞的一种或多种试剂、抑制细胞凋亡的一种或多种试剂等等）优选以药物组合物形式提供。如本文使用的术语“药物”是指意欲用于治愈、治疗或预防疾病并且经受美国食品和药物管理局（或其非美国的相应部门）批准成为处方或非处方药物产品的过程的化学物质。配制并施用这类组合物的技术的详细资料可见于Remington, The Science and Practice of Pharmacy第21版 (Mack Publishing Co., Easton, PA) 以及Nielloud和Marti-Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: 第2版 (Marcel Dekker, Inc, New York)。

[0091] 出于本公开目的，药物组合物可通过包括口服、肠胃外、吸入喷雾、局部或经直肠的各种手段以含有药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的制剂形式来施用。如本文使用的术语肠胃外包括但不限于使用各种输注技术来皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、皮内、鞘内和硬膜外注射。如本文使用的动脉内和静脉内注射包括经由导管来施用。也涵盖经由冠状动脉内支架和冠状动脉内储集器来施用。如本文使用的术语口服包括但不限于口服摄取，或

通过舌下或口腔途径来递送。口腔施用包括流体饮料、能量棒以及丸剂制剂。

[0092] 药物组合物可呈适合于预定施用方法的任何形式。例如,当用于口服使用时,可制备诸如片剂、糖锭剂、锭剂、水性混悬液或油性混悬液、可分散粉末或颗粒、乳液、硬或软胶囊、糖浆或酞剂。可根据本领域已知的用于制造药用组合物的任何方法制备欲用于口服使用的组合物,而且这样的组合物可包含一种或多种试剂(包括甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂)以提供可口的制剂。含有与适合于制造片剂的无毒药学上可接受的赋形剂掺合的药物化合物的片剂是可接受的。这些赋形剂可为例如惰性稀释剂,如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒剂和崩解剂,如玉米淀粉或褐藻酸;粘合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯树胶;和润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未经包衣或通过已知技术进行包衣的,所述技术包括肠溶包衣、结肠包衣或微囊封以延缓胃肠道内的崩解和吸收且/或提供较长时间的持续作用。例如,可以单独使用如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯这样的延时材料或将其同蜡一起使用。

[0093] 用于口服使用的制剂也可呈现为硬明胶胶囊,其中所述药物化合物与惰性固体稀释剂(例如磷酸钙或高岭土)混合,或呈现为软明胶胶囊,其中所述活性成分与水或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0094] 药物组合物可配制成与适合于制造水性混悬液的赋形剂掺合的水性混悬液。此种赋形剂包括:混悬剂如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶及阿拉伯树胶;以及分散剂或湿润剂,如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪族醇(例如十七烷乙烯氧十六醇)的缩合产物、环氧乙烷与由脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬液还可含有一种或多种防腐剂如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂以及一种或多种甜味剂如蔗糖或糖精。

[0095] 可以通过将活性成分悬浮在植物油(例如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中或矿物油如液体石蜡中来配制油性混悬液。口服混悬液可以包含增稠剂如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂,如上文所提到的那些甜味剂,及调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来保存。

[0096] 适合用于通过添加水来制备水性混悬液的可分散的粉剂和颗粒剂提供了与分散剂或润湿剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂混合的活性成分。通过以上已经提到的那些来举例说明适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂。还可以存在额外的赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0097] 本公开的药物组合物也可水包油型乳液形式。所述油相可为植物油,诸如橄榄油或花生油;矿物油,诸如液体石蜡;或这些油类的混合物。适合的乳化剂包括天然存在的树胶,诸如阿拉伯树胶和黄蓍胶;天然存在的磷脂,诸如大豆卵磷脂,由脂肪酸和己糖醇酐衍生的酯类或偏酯类,诸如单油酸山梨醇酐酯;以及这些偏酯与环氧乙烷的缩合物,诸如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。所述乳液还可包含甜味剂和调味剂。

[0098] 可以使用甜味剂诸如甘油、山梨醇或蔗糖来配制糖浆和酞剂。这些制剂还可包含缓和剂、防腐剂、调味剂或着色剂。

[0099] 本公开的药物组合物可以呈无菌可注射制剂的形式,诸如无菌可注射水性或油性

混悬液。可根据已知技术,使用上述那些适合的分散剂或润湿剂以及悬浮剂来配制所述混悬液。所述无菌可注射制剂还可以是处于无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂之中的无菌可注射溶液或混悬液,如处于1,3-丁二醇中的溶液或制备为冻干粉末。可接受的媒介物和溶剂中可以使用的是水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油可以按照惯例被用作为溶剂或悬浮介质。出于这个目的,可以使用包括合成的单甘油酯或二甘油酯的任何温和的不挥发性油。另外,脂肪酸(例如油酸)可类似地用于注射物的制备。

[0100] 可以与载体材料组合以生成单一剂型的活性成分的量将取决于所治疗的宿主和特定施用模式而改变。例如,意图对人口服施用的延时释放制剂可含有大约20至500mg的与合适且适宜量的载体材料相混合的活性材料,所述载体材料可能在总组合物的约5%至约95%之间变化。优选地,制备提供便于施用的容易测量的量的药物组合物。典型地,全身施用的有效量是约0.1mg/kg至约100mg/kg并且取决于许多因素,包括例如受试者(例如,哺乳动物如人)的年龄和体重、需要治疗的确切病状和其严重性、施用途径并且最终由主治医师或兽医酌处。然而,应了解,任何特定患者的具体剂量水平取决于各种因素,包括所使用的具体化合物的活性,所治疗的个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间和途径;排泄速率;以前施用的其它药物;和经历治疗的特定病状的严重性,如已得到本领域技术人员充分认识。

[0101] 如上所述,适于经口施用的本文公开的制剂可呈现为如各自含有预定量的活性成分的胶囊、扁囊剂或片剂的离散单位;粉末或颗粒;在水性液体或非水性液体中的溶液或混悬液;或水包油液体乳液或油包水液体乳液。药物组合物还可以大丸剂、药糖剂或糊剂形式施用。

[0102] 片剂可通过压制或模制来制备,任选地含有一种或多种辅助成分。压制的片剂可通过在适合的机器中对自由流动形式(如粉末或颗粒)的活性成分进行压制来制备,所述活性成分任选与粘合剂(例如,聚维酮、明胶、羟丙乙基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟乙酸淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)表面活性剂或分散剂混合。模塑的片剂可以通过在合适的机器中用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物来制备。片剂可任选地包衣或刻痕并且可使用例如提供所需释放特征的不同比例的羟基丙基甲基纤维素来配制以便提供其中活性成分的缓慢或控制释放。片剂可任选被提供有肠溶或结肠包衣以在肠的部分而不是胃内提供释放。当式1化合物对酸水解敏感时,这对于这类化合物是尤其有利的。

[0103] 适于在口中局部施用的制剂包括锭剂,其在调味的基剂(通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中包含活性成分;软锭剂(pastille),其在惰性基剂如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中包含活性成分;以及漱口剂,其在适合的液体载体中包含活性成分。

[0104] 直肠施用的制剂可以呈现为以包括例如可可脂或水杨酸盐的合适基剂形成的栓剂。

[0105] 适于经阴道施用的制剂可呈现为除活性成分之外还含有如本领域中已知作为适当的载体的阴道栓剂、棉塞、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0106] 用于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性等张无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和致使制剂与预定接受者的血液等张的溶质;及水性和非水性无菌混悬

液,其可包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以单剂量或多剂量密封容器呈现,例如安瓿和小瓶,并且可以储存于冷冻干燥(冻干)条件下,仅需在使用前即刻添加无菌液体载体(例如注射用水)。注射溶液及混悬液可从先前所述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0107] 如本文使用,药学上可接受的盐包括但不限于:醋酸盐、吡啶、铵、哌嗪、二乙胺、烟酰胺、甲酸盐、尿素、钠、钾、钙、镁、锌、锂、肉桂酸盐、甲氨基、甲磺酸盐、苦味酸盐、酒石酸盐、三乙氨基、二甲氨基和三(羟甲基)氨基甲烷。额外药学上可接受的盐是本领域技术人员已知的。

[0108] 特定患者的有效量可取决于因素如所治疗的病状、患者的总体健康状况、施用途径和剂量以及副作用的严重性来变化。可获得治疗和诊断方法的指导(参见,例如,Maynard等人(1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK)。

[0109] 有效量可以一个剂量给出,但是不限于一个剂量。因此,施用可为两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次施用药物组合物。当在本发明方法中存在药物组合物的一次以上施用,施用可隔开一分钟、两分钟、三分钟、四分钟、五分钟、六分钟、七分钟、八分钟、九分钟、十分钟或更多分钟的时间间隔,约一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、七小时、八小时、九小时、十小时、十一小时、十二小时、十三小时、十四小时、十五小时、十六小时、十七小时、十八小时、十九小时、二十小时、二十一小时、二十二小时、二十三小时、二十四小时等的间隔。在小时情况下,术语“约”意指加上或减去30分钟内的任何时间间隔。施用也可隔开一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十三天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天、二十天、二十一天和其组合的时间间隔。本发明不限于在时间上相等地隔开的给药间隔,而是涵盖不相等间隔的给药。

[0110] 例如一次/周、两次/周、三次/周、四次/周、五次/周、六次/周、七次/周、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次等的给药方案可用于本发明。给药方案涵盖例如一周、两周、三周、四周、五周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月和十二个月的给药总时间。

[0111] 提供上述给药方案的循环。循环可约例如每七天;每14天;每21天;每28天;每35天;42天;每49天;每56天;每63天;每70天等来重复。非给药的间隔可在循环之间出现,其中间隔可为约例如七天;14天;21天;28天;35天;42天;49天;56天;63天;70天等。在这种情况下,术语“约”意指加上或减去一天、加上或减去两天、加上或减去三天、加上或减去四天、加上或减去五天、加上或减去六天或加上或减去七天。

[0112] 与另外的治疗剂共同施用的方法在本领域中是熟知的(Hardman等人(编)(2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第10版, McGraw-Hill, New York, NY; Poole和Peterson(编)(2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner和Longo(编)(2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA)。

[0113] 如所述,本发明的组合物优选地配制成肠胃外或肠内递送的药物组合物。施用至

动物的典型药物组合物包括药学上可接受的媒介物如水溶液、无毒赋形剂,包括盐、防腐剂、缓冲剂等。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,Easton编,MackPublishing Co.,pp 1405-1412和1461-1487(1975);The National Formulary XIV,第14版,American Pharmaceutical Association,Washington,DC(1975)。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、盐水溶液、肠胃外媒介物(如氯化钠、林格氏葡萄糖等)。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。药物组合物的各种组分的pH和精确浓度根据在本领域中的常规技能来调节。

[0114] IGFBP7和IMP-2测定

[0115] 一般来说,免疫测定是涉及将含有或疑似含有相关生物标志物的样品与可以特异性结合到所述生物标志物的至少一种抗体接触的特异性结合测定法。然后,产生指示样品中的多肽与所述抗体结合所形成的复合物的存在或量的信号。然后所述信号与样品中的生物标志物的存在或量相关。许多用于生物标志物的检测和分析的方法和装置对于本领域技术人员是熟知的。参见,例如美国专利6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792;以及The Immunoassay Handbook,David Wild编.Stockton Press,New York,1994,其全文包括所有表格、图片和权利要求书分别以引用方式并入本文。

[0116] 本领域中已知的测定装置和方法可以利用在各种夹心的、竞争的或非竞争的测定形式中的标记分子,生成与相关生物标志物的存在或量相关的信号。合适的测定形式也包括色谱的、质谱的和蛋白质“印迹”的方法。另外,某些方法和装置,例如生物传感器和光学免疫分析,可以用来确定分析物的存在或量而不需要标记分子。参见,例如美国专利5,631,171和5,955,377,其全文包括所有表格、图片和权利要求书分别以引用方式并入本文。本领域的技术人员还认识到,机器人设备,包括但不限于Becton Dickinson ACCESS®、Abbott AXSYM®、Roche ELECSYS®、Dade Behring STRATUS®系统,是能够执行免疫测定的免疫分析仪。不过,任何合适的免疫测定法都可以利用,例如,酶联免疫测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、竞争性结合测定等等。

[0117] 抗体或其它多肽可被固定在各种固体支撑物上在测定中使用。可用于固定特异性结合成分的固相包括那些在固相结合测定中开发和/或使用的固相。合适的固相的实例包括膜过滤器、纤维素基纸、珠(包括聚合物、胶乳和顺磁性颗粒)、玻璃、硅片、微粒、纳米颗粒、TentaGels、AgroGels、PEGA凝胶、SPOCC凝胶和多孔板。可以通过在固体支撑物上以阵列涂布抗体或多种抗体来制备测定条。然后,可以将此测定条浸入试验样品中,然后通过洗涤和检测步骤快速加工以产生可测量的信号,例如色斑。通过直接缀合到测定装置表面或通过间接结合可以将抗体或其它多肽结合到测定装置的特定区域。在后一种情况的实例中,抗体或其它多肽可以固定于颗粒或其它固体支撑物上,并且所述固体支撑物被固定到装置表面。

[0118] 此类测定需要检测方法,并且最常用的对结果进行定量的方法之一是将可检测的标记缀合到对所研究的生物系统中的组分之一有亲和力的蛋白质或核酸上。可检测的标记可以包括,本身可检测的分子(例如,荧光部分、电化学标记、金属螯合物等)以及通过产生可检测反应产物被间接检测到的分子(例如酶,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)或通过

本身可被检测的特异性结合分子间接检测到的分子(如,生物素、地高辛、麦芽糖、寡聚组氨酸、2,4-二硝基苯、苯基砷酸盐、ssDNA、dsDNA、等等)。

[0119] 固相和可检测标记缀合物的制备通常包括化学交联剂的使用。交联试剂包含至少两个反应基团,并且一般被分为同功能交联剂(含有相同的反应基团)和异功能交联剂(含有不相同的反应基团)。通过胺、巯基偶联或非特异性反应的同双功能交联剂都可以从许多商业来源购买。马来酰亚胺、烷基和芳基卤、 α -卤代酰基和吡啶基二硫化物是硫醇反应基团。马来酰亚胺、烷基和芳基卤和 α -卤代酰基与巯基反应形成硫醇醚键,而吡啶基二硫化物与巯基反应产生混合的二硫化物。所述吡啶基二硫化物产物是可裂解的。亚氨酸酯对于蛋白质-蛋白质交联非常有用。为了成功缀合每个都组合了不同属性的各种异双交联剂是市售的。

[0120] 在某些方面,本发明为IGFBP7和/或TIMP-2的分析提供试剂盒。所述试剂盒包括用于至少一个测试样品分析的试剂,该试剂包括结合了待测定的每个生物标记的至少一种抗体。所述试剂盒还可以包括用于执行一个或多个本文所述的诊断和/或预后相关性的装置和说明书。优选的试剂盒将包含用于对分析物执行夹心测定的抗体对,或用于对分析物执行竞争测定的标记物。优选地,抗体对包括缀合到固相的第一抗体和缀合到可检测标记的第二抗体,其中第一抗体和第二抗体的每个都结合肾损伤标志物。最优选每个抗体都是单克隆抗体。使用所述试剂盒和执行相关性的说明可以是以标签的形式,是指在其制造、运输、销售或使用附着或伴随着试剂盒的任何书面或记录的材料。例如,所述术语标签包括广告传单和小册子、包装材料、说明书、录音或录像带、电脑光盘、以及直接印在试剂盒上的文字。

[0121] 抗体

[0122] 如本文使用的术语“抗体”是指源自一种或多种免疫球蛋白基因或其片段、对其进行仿效或基本上由其编码的肽或多肽,所述肽或多肽能够特异性结合抗原或表位。参见,例如Fundamental Immunology,第3版,W.E.Paul编,Raven Press,N.Y.(1993);Wilson(1994; J.Immunol.Methods 175:267-273;Yarmush(1992) J.Biochem.Biophys.Methods 25:85-97。术语抗体包括保持结合抗原的能力的抗原结合部分,即“抗原结合位点”(例如,片段、子序列、互补决定区(CDR)),包括:(i) Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其为由包含由在铰链区的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人(1989) Nature 341:544-546);和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。单链抗体也包括于术语“抗体”中供参考。

[0123] 在本文中描述的免疫测定法中使用的抗体优选特异性结合至本发明的肾损伤标志物。所述术语“特异性结合”并不意欲指抗体排他地结合到其预期的靶标,如上所述,抗体与显示该抗体结合的表位的任何多肽结合。相反,如果当与未显示合适表位的非靶标分子的亲和力相比,抗体对预期靶标的亲和力为约5倍以上时,抗体“特异性结合”。优选地,抗体对靶标分子的亲和力将至少约5倍、优选10倍、更优选25倍、甚至更优选50倍、并且最优选100倍或更多大于其对非靶标分子的亲和力。在优选的实施方案中,优选的抗体结合亲和力为至少约 10^7M^{-1} ,优选介于约 10^8M^{-1} 至约 10^9M^{-1} 、约 10^9M^{-1} 至约 10^{10}M^{-1} 或约 10^{10}M^{-1} 至约 10^{12}M^{-1} 之间。

[0124] 亲和力以 $K_d = k_{\text{解离}}/k_{\text{缔合}}$ ($k_{\text{解离}}$ 是解离速率常数, $K_{\text{缔合}}$ 是缔合速率常数, 并且 K_d 是平衡常数) 计算。亲和力可在平衡状态下通过测量各种浓度 (c) 下的标记配体的结合分率 (r) 来确定。数据使用斯卡查德方程来绘制: $r/c = K(n-r)$; 其中 r = 平衡状态下的结合配体的摩尔数/受体的摩尔数; c = 平衡状态下的游离配体浓度; K = 平衡缔合常数; 并且 n = 每个受体分子的配体结合位点的数目。通过图解分析, r/c 相比于X轴上的 r 来在Y轴上作图, 由此产生斯卡查德 (Scatchard) 绘图。通过斯卡查德分析来测量抗体亲和力在本领域中是熟知的。参见, 例如van Erp等, *J. Immunoassay* 12:425-43, 1991; Nelson和Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27:65-8, 1988。

[0125] 术语“表位”是指能够特异结合至抗体的抗原决定子。表位通常由分子的化学活性的表面基团分组 (如氨基酸或糖侧链) 组成且通常具有特定三维结构特征, 以及特定电荷特征。构象性以及非构象性表位差别在于: 在变性溶剂存在下, 与构象性表位的结合丧失, 而不是非构象性表位。

[0126] 许多出版物讨论使用噬菌体展示技术来生产和筛选用于结合到所选择的分析物的多肽文库。参见, 例如Cwirla等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin等, *Science* 249, 404-6, 1990; Scott和Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; 和Ladner等, 美国专利号5, 571, 698。噬菌体展示法的基本概念是建立编码待筛选多肽的DNA与所述多肽之间的物理联系。所述物理联系由噬菌体颗粒提供, 其展示的多肽作为包封编码多肽的噬菌体基因组的衣壳的一部分。多肽与其遗传物质之间的物理联系的建立使得承载不同多肽的非常多的噬菌体得以同时大量筛选。展示对靶标具有亲和力的多肽的噬菌体结合到靶标, 并且这些噬菌体通过与靶标的亲和筛选而富集。这些噬菌体展示的多肽的身份可以从它们各自的基因组来确定。然后, 使用这些方法, 鉴定为具有对所需靶标的结合亲和力的多肽可以通过常规方式大批合成。参见, 例如美国专利号6, 057, 098, 其全文包括所有表格、图和权利要求书分别以引用方式并入本文。

[0127] 然后, 由这些方法所产生的抗体可通过纯化的相关多肽的亲和力和特异性的首次筛选, 和 (如果需要的话) 将抗体与期望被排除在结合外的多肽的亲和力和特异性结果进行比较来选择。筛选程序可涉及在微量滴定板的分开的孔中固定纯化的多肽。然后将含有潜在的抗体或抗体组的溶液放入各别微量滴定孔中, 并孵育约30min至2h。然后洗涤微量滴定孔, 并在孔中加入标记的第二抗体 (例如, 缀合到碱性磷酸酶的抗小鼠抗体, 如果产生的抗体是小鼠抗体) 并孵育约30min, 然后洗涤。将底物加入孔中, 并且在抗体到固定的多肽存在的情况下, 将发生显色反应。

[0128] 然后, 如此鉴定的抗体可进一步在选择测定设计中分析亲和力和特异性。在靶标蛋白质的免疫测定的开发中, 纯化的靶标蛋白质充当标准, 用以判断使用已选择的抗体的免疫测定的灵敏度和特异性。由于各种抗体的结合亲和力可以不同; 某些抗体对 (例如在夹心测定中) 可以与另一抗体对在空间上干扰等, 抗体的测定性能可以是比抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0129] 虽然本申请详细描述了基于抗体的结合测定法, 但在测定法中抗体的替代物作为结合物质在本领域中是熟知的。这些替代物包括特定靶标的受体、适体等。适体是结合至特定靶标分子的寡核苷酸或肽分子。适体通常是通过从大的随机序列池中进行选择来创建的, 但自然的适体也存在。含有修饰核苷酸的高亲和力的适体赋予配体改进的特性, 如改善

的体内稳定性或改善的递送特性。此类修饰的实例包括在核糖和/或磷酸盐和/或碱基位置的化学取代,并且可包括氨基酸侧链官能团。

[0130] 测定相关性

[0131] 如本文关于使用生物标志物所使用的术语“相关”是指将患者中所述生物标志物的存在或量与已知遭受给定病状或已知处于给定病状风险中的人中,或在已知没有给定病状的人中所述生物标志物的存在或量进行比较。通常,这采取将以生物标志物浓度形式的测定结果与预定阈值进行比较的形式,该阈值被选定为疾病发生或不发生的指示或某一未来结果可能性的指示。

[0132] 除其它事项外,选择诊断阈值涉及疾病可能性的考虑、在不同的测试阈值下真假诊断的分布和基于所述诊断的治疗(或治疗失败)的结果估计。例如,当考虑施用高度有效并具有低风险水平的特定疗法时,需要很少的测试,因为临床医生能够接受大量的诊断不确定性。另一方面,在治疗方案不太有效且更危险的情况下,临床医生常常需要更程度的诊断确定性。因此,成本/效益分析与选择诊断阈值有关。

[0133] 合适的阈值可以按照各种方式来确定。例如,一个使用心肌肌钙蛋白诊断急性心肌梗塞的推荐诊断阈值是在正常群体中观察到的浓度的97.5个百分点。另一方法可以是查看同一患者的系列样品,其中先前的“基线”结果被用于监视在一个生物标志物水平中的时间变化。

[0134] 群体研究也可用于选择判定阈值。接受者工作特征(“ROC”)从第二次世界大战期间对雷达图像的分析而开发的信号检测理论领域中产生,并且ROC分析通常用于选择能够最佳区分“患病”亚群和“非患病”亚群的阈值。当人测试呈阳性但实际上不具有疾病的情况下,出现假阳性。另一方面,当人测试呈阴性表明他们是健康的,但他们实际上患有疾病时,出现假阴性。为绘制ROC曲线,当判定阈值连续地变化时确定真阳性率(TPR)和假阳性率(FPR)。因为TPR相当于与灵敏度,并且FPR等于1-特异性,ROC图有时被称为灵敏度相对于(1-特异性)的图。完美测试将有1.0的ROC曲线下面积;随机测试将具有0.5的面积。阈值被选择用来提供可接受水平的特异性和灵敏度。

[0135] 在此背景下,“患病”意指具有一种特性(疾病或病状的存在或某一结果的发生)群体,并且“未患病”意指缺乏所述特性的群体。尽管单一的判定阈值是这种方法最简单的应用,但仍可以使用多个判定阈值。例如,低于第一阈值、没有疾病可以被分配相对高的置信度,并且高于第二阈值存在疾病也以被分配相对高的置信度。两个阈值之间可以认为是不确定的。这意味着在本质上仅为示例性的。

[0136] 除了阈值比较,将测定结果与患者分类(疾病的发生或不发生、结果的可能性等等)相关联的其它方法包括决策树、规则集、Bayesian方法和神经网络方法。这些方法可以产生表示受试者属于多个分类中一个分类的的概率值。

[0137] 根据Fischer等Intensive Care Med.29:1043-51,2003的描述可以得到测试精度的测量,并将其用于确定给定生物标志物的有效性。这些测量包括灵敏度和特异性、预测值、似然比、诊断优势比和ROC曲线面积。ROC图的曲线下面积(“AUC”)等于分类评价随机选择的正实例高于随机选择的负实例的概率。ROC曲线下的区域可以被认为是等同于检验两组得分之间的中位数差异(考虑如果组具有连续的数据)的Mann-Whitney U检验,或等同于Wilcoxon秩检验。

[0138] 如上所讨论的,合适的检验可以显示出关于这些测量的如下的一种或多种结果:大于0.5、优选至少0.6、更优选至少0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9、并且最优选至少0.95的特异性,和大于0.2、优选大于0.3、更优选大于0.4、还更优选至少0.5、甚至更优选0.6、还更优选大于0.7、还更优选大于0.8、更优选大于0.9、并且最优选大于0.95的相应灵敏度;大于0.5、优选至少0.6、更优选至少0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9、并且最优选至少0.95的灵敏度,和大于0.2、优选大于0.3、更优选大于0.4、还更优选至少0.5、甚至更优选0.6、还更优选大于0.7、还更优选大于0.8、更优选大于0.9、并且最优选大于0.95的相应特异性;至少75%的灵敏度,组合至少75%的特异性;大于0.5、优选至少0.6、更优选为0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9、并且最优选至少0.95的ROC曲线面积;优势比不同于1、优选至少约2或更大或约0.5或更小、更优选至少约3或更大或约0.33或更小、还更优选至少约4或更大或约0.25或更小、甚至更优选至少约5或更大或约0.2或更小、并且最优选至少约10或更大或约0.1或更小;大于1、至少2、更优选至少3、还更优选至少为5、并且最优选至少10的阳性似然比(以灵敏度/(1-特异性)计算);和或小于1、小于或等于0.5、更优选小于或等于0.3、且最优选小于或等于0.1的阴性似然比(以(1-灵敏度)/特异性计算)。

[0139] 可以与本发明的肾损伤标记物测定结果组合的临床指标包括:人口统计信息(例如,体重、性别、年龄、种族);病史(例如,家族病史,手术类型,先天性疾病诸如动脉瘤、充血性心力衰竭、先兆子痫、子痫、糖尿病、高血压、冠状动脉疾病、蛋白尿、肾功能不全或败血症,毒素暴露类型诸如NSAID、环孢霉素、他克莫司、氨基糖苷类、磷甲酸、乙二醇、血红蛋白、肌红蛋白、异环磷酰胺、重金属、甲氨蝶呤、不透射线造影剂或链脲霉素);临床变量(例如,血压、体温、呼吸速率);风险评分(APACHE评分、PREDICT评分、UA/NSTEMI的TIMI风险评分、Framingham风险评分);尿总蛋白测量;肾小球滤过率;估计肾小球滤过率;尿液产生速率;血清或血浆肌酐浓度;肾乳头抗原1(RPA1)测量;肾乳头抗原2(RPA2)测量;尿肌酐浓度;钠排泄分数,尿钠浓度;尿肌酐与血清或血浆肌酐的比率;尿比重;尿重量摩尔渗透压浓度;尿液尿素氮与血浆尿素氮的比率;血浆BUN与肌酐的比率;和/或由尿钠/(尿肌酐/血浆肌酐)计算的肾衰竭指数。可以与本发明的方法组合的其它肾功能测量在下文和Harrison's Principles of Internal Medicine,第17版,McGraw Hill,New York,第1741-1830页,以及Current Medical Diagnosis&Treatment 2008,第47版,McGraw Hill,New York,第785-815页(其全文分别以引用方式并入本文)中描述。

[0140] 以这种方式组合测定结果/临床指标可包括使用多元逻辑回归、对数线性建模、神经网络分析、m-n分析(n-of-m analysis)、决策树分析等。该列表并不意味着要限制。

[0141] 急性肾衰竭的诊断

[0142] 如上所述,如本文所用的术语“急性肾(或肾脏)损伤”和“急性肾(或肾脏)衰竭”部分根据血清肌酐从基线值的变化定义。ARF的大多数定义具有共同的要素,包括使用血清肌酐和排尿量(通常)。患者可能呈现肾功能不全,但没有可用的肾功能的基线测量用于这种比较。在这种情况下,人们可以通过假设患者最初有正常的GFR来估计血清肌酐的基线值。肾小球滤过率(GFR)是每单位时间从肾(肾脏)小球毛细血管过滤到肾小囊(bowman's capsule)的流体体积。肾小球滤过率(GFR)可以通过测量在血液中有稳定水平,并自由地过滤不会被肾重吸收或分泌的任何化学物质进行计算。GFR通常以ml/min的单位表示:

$$[0143] \quad GFR = \frac{\text{尿浓度} \times \text{尿流量}}{\text{血浆浓度}}$$

[0144] 通过使GFR归一化为身体表面积,可以假定GFR为每1.73m²大约75-100ml/min。因此测得的速率是源自可计算的血液体积的尿中物质的量。

[0145] 有几种不同的技术用来计算或估计肾小球滤过率(GFR或eGFR)。然而,在临床实践中,肌酐清除率是用来测量GFR的。肌酐是身体自然产生的(肌酐是在肌肉中发现的肌酸的代谢物)。它通过肾小球自由过滤,而且非常少量地被肾小管主动分泌,以致于肌酐清除率高估实际GFR 10-20%。考虑到肌酐清除率测量的难易程度,这个误差界限是可以接受的。

[0146] 如果肌酐尿浓度(U_{Cr})、尿流率(V)和血浆肌酐浓度(P_{Cr})值是已知的,那么可以计算肌酐清除率(CCr)。由于尿浓度和尿流率的乘积得出肌酐的排泄率,肌酐清除率也说是其排泄率(U_{Cr}×V)除以其血浆浓度。通常在数学上表示为:

$$[0147] \quad C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times V}{P_{Cr}}$$

[0148] 一般地,收集24小时的尿液,从第一个早晨空膀胱到第二天早晨的膀胱内容物,然后采取可比较的血液检验:

$$[0149] \quad C_{Cr} = \frac{U_{Cr} \times 24\text{-小时体积}}{P_{Cr} \times 24 \times 60\text{min}}$$

[0150] 为了允许不同尺寸的人之间的结果比较,CCr经常针对体表面积(BSA)来校正,并且与平均尺寸的人ml/min/1.73m²相比来表示。虽然大多数成年人有接近1.7(1.6-1.9)的BSA,但极度肥胖或者苗条的患者应该将他们的CCr针对他们实际的BSA来校正:

$$[0151] \quad C_{Cr-校正} = \frac{C_{Cr} \times 1.73}{BSA}$$

[0152] 肌酐清除率测量的精度(甚至当收集完成时)是有限的,因为随着肾小球滤过率(GFR)下降肌酐分泌增加,并且因此血清肌酐的上升较小。因此,肌酐排泄比过滤负载大得多,从而导致潜在的GFR大幅度的高估(多达两倍差异)。然而,出于临床目的,重要的是确定肾功能是否稳定或者变差或变好。这通常是由单独监测血清肌酐来确定。像肌酐清除率一样,血清肌酐在非稳态条件的ARF下不会准确反映GFR。尽管如此,血清肌酐从基线变化的程度将会反映GFR的变化。血清肌酐被迅速容易地测量,并且它对于肾功能是特定的。

[0153] 就基于以mL/kg/hr计的排尿量测定排尿量而言,每小时尿液采集和测量是足够的。例如,在仅累积24h的输出可得但没有提供患者重量的情况下,对RIFLE排尿量标准的微小修改进行了描述。例如,Bagshaw等,Nephrol.Dial.Transplant.23:1203-1210,2008,假定患者的平均体重为70kg,并且患者按下列标准进行RIFLE分类:<35mL/h(风险),<21mL/h(损伤)或<4mL/h(衰竭)。

[0154] 选择治疗方案

[0155] 一旦获得诊断,临床医生可以容易地选择与诊断相容的治疗方案,例如开始肾替代疗法、撤回已知对肾脏有害的化合物的递送、肾脏移植、延迟或避免已知对肾脏有害的程序、变更利尿剂的施用、开始目标导向疗法,等等。本领域技术人员意识到对讨论的许多疾

病的适当治疗与到本文描述的诊断方法有关。参见,例如Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第17版.Merck Research Laboratories,Whitehouse Station,NJ,1999。另外,由于本文描述的方法和组合物提供预后信息,因此本发明的标志物可用于监测治疗的疗程。例如,改善的或恶化的预后状态可以表明特定的治疗是不是有效。

[0156] 肾前性AKI与肾因性AKI之间的区别是重要的临床评估,其指导治疗性干预。肾前性的患者需要针对血流动力学疗法以改善肾血流量。这些疗法通常涉及强心剂、静脉注射液和/或血管加压药。这些干预每种都有潜在的副作用(例如心律失常、容量超负荷、血管收缩),如果它们不是肯定会改善肾功能,实施这些疗法并不可取的。因此,肾前性AKI与肾因性AKI之间的区别有助于确定应该指定的疗法。如果不存在肾前性AKI,疗法应该针对减轻AKI并提供支持性护理。

[0157] 当血液流向肾腔(kidney camera)突然减少(肾灌注不足)引起肾功能的丧失时,发生肾前性急性肾功能衰竭。原因可能包括低血容量、低血压、肾脏血液分流、心力衰竭和肾供血血管的局部变化。在肾前性急性肾功能衰竭中,肾脏本身没有任何问题。治疗集中在肾前性急性肾衰竭的原因纠正上。

[0158] 在无流体超载的肾前性AKI中,静脉注射液的施用通常是改善肾功能的第一步。这尤其用在由血管内容量不足发展的肾前性AKI患者中,用来恢复正常循环血量。如本文所述,可以监测容量状态以避免流体的过高或过低更换。含有胶体颗粒如白蛋白的流体优于简单的盐水灌注。在顺流会受到影响的肾前性条件下,通常采用针对增加心输出量的药物。

[0159] 在充血性心力衰竭患者中,由于过度利尿发展为AKI,利尿剂的控制和谨慎的容量替换可足以恢复肾功能。可给予强心剂如去甲肾上腺素和多巴酚丁胺来改善心脏输出并提高肾灌注。

[0160] 住院的流体超载的患者通常用流体限制、IV利尿剂、强心剂(例如,米力农或多巴酚丁胺)与组合疗法来治疗。袢利尿剂呋塞米是在HF中治疗容量超载最常见的处方利尿剂。有运动性呼吸困难和容量超载迹象却没有急性住院适应症的患者,施用的初始口服剂量应该为20至40mg,每天一次。严重超载和肺水肿是住院治疗和静脉注射呋塞米的适应症。一些轻度HF患者可以用噻嗪类利尿剂有效地治疗。那些对噻嗪类利尿剂持续容量超载的患者,应改用口服袢利尿剂。对于严重肾损伤患者,利尿剂可能不会引起显著的利尿。超滤也称为水分置换疗法(aquapheresis)可以用以治疗流体超载。

[0161] 对比肾前性AKI,治疗急性肾小管坏死(ATN)的主要目标是为了防止对肾脏的进一步损伤。当肾脏长时间未充分灌注(例如,由于肾动脉狭窄)或休克时,会引起缺血性ATN。败血症在ATN患者中引起30%至70%的死亡;因此,建议避免静脉注射管、膀胱导管和呼吸器。因为败血症患者血管扩张,大量施用的流体聚集在这些患者的肺间质中。应及时评估细胞外液体积,任何的不足都应该立即开始补充。应当通过适当的流体疗法、血管加压药和/或强心剂施用和任何潜在的败血症的治疗改善血液动力学状态。停用所有可能的肾毒性药物。此外,应调整由肾脏消除的所有药物的剂量。

[0162] 本领域技术人员易于理解,本发明充分适于执行目标并且获得所提到的以及其中固有的结果和优点。本文中提供的实施例代表优选实施方案,为示例性的,并且并非意欲作为对本发明的范围的限制。

[0163] 实施例1

[0164] 先前已表明,施用叶酸诱导损伤后,一种剂量(1和5mg/kg体重)的环孢霉素A(CsA)在叶酸诱导AKI 2天后的小鼠中显著减少肾小管细胞凋亡、血清肌酐、血尿素、血清IL-6和尿NGAL。参见,例如Wen等,Nephrol.Dial.Transplant.27:3100-109,2012。

[0165] 在本研究中,成年SD大鼠中的败血症由盲肠结扎穿孔(CLP)诱导。CLP后18小时,大鼠随机通过中央静脉接受单次剂量的CsA(5mg/kg)或媒介物(每组n=12)。同时,所有的动物接受氨苄青霉素/舒巴坦(125mg/kg每12小时)作为支持疗法,持续3天。

[0166] 采集血液和尿液用于测量血浆肌酐(Cr)、尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、尿胰岛素样生长因子结合蛋白7(IGFBP7)和尿金属蛋白酶-2组织抑制剂(TIMP-2)。CLP后血浆Cr浓度增加,在干预前该变化在两组中相似。使用RIFLE标准基于SCr的变化对急性肾损伤的严重性进行评估:R(风险)=SCr增加>50%;I(损伤)=SCr增加>100%;F(衰竭)=SCr增加>200%。还测量存活时间长达七天。

[0167] CsA治疗两天后,血浆Cr开始下降,而对照组中Cr继续增加(0.43 ± 0.13 相对于 0.85 ± 0.28 mg/dl, $p < 0.05$)。尿中NGAL随时间的变化与血浆Cr的变化相似,但增加的更早(在治疗24小时后 5852 ± 50 相对于 3702 ± 114 IU/ml, $p < 0.05$)。与假(媒介物)处理的动物相比,CsA处理的动物在72h和96h显示出显著更高的血清肌酐($P < 0.05$) (图1)。与假处理的动物相比,CsA处理的动物AKI严重性也显著降低(AKI-I/F 32%相对于68%) ($P < 0.05$)。在此小样本量中,CsA对存活7天并没有显著影响。

[0168] TIMP-2和IGFBP7测量组合成单一的综合评分 $[TIMP-2] \times [IGFBP7]$,如Kashani等,Critical Care 2013,17:R25doi:10.1186/cc12503所描述。CLP后18小时,所有动物都展示综合得分增高的表现。在接受CsA的动物中,细胞周期停滞的尿液生物标志物IGFBP7和TIMP-2,在治疗后6小时升高,再经过24小时后下降。与此相反,对照动物展示预示AKI的生物标志物增加较晚,在处理6小时(0.064 ± 0.01 相对于 0.028 ± 0.002)和24小时(0.014 ± 0.001 相对于 0.072 ± 0.020), $P < 0.05$),各组之间的尿 $[TIMP-2] \times [IGFBP7]$ 显著不同(图3)。

[0169] 这些数据组合以上所呈现的对肾损伤的影响表明,使用CsA诱导细胞周期停滞可以防止预示急性肾损伤的“天然发生的”细胞周期停滞。所述数据也表明,共同使用细胞周期停滞调节剂与生物标志物可以为急性肾损伤提供新的潜在的治疗模式。

[0170] 实施例2.

[0171] 下面的实例描述了根据本发明的生物标志物的示例性使用。患者因肺炎被收治住院。血清肌酐水平一开始是正常的,但组合TIMP-2和IGFBP7的评分(由 $[TIMP-2] \times [IGFBP7]$ 计算)水平升高。因为患者生病<36小时,损伤被推定为新近的。单独来看,IGFBP7水平升高,但TIMP-2水平是正常的。患者给予单次剂量环孢霉素A,而其血肌酐水平仍然低。

[0172] 第二个患者也因肺炎被收治住院。这次,不清楚病情已经发展了多久,并且血清肌酐呈现小幅升高。单独来看,TIMP-2和IGFBP7水平都升高,所以环孢霉素没有指示性。第二天,血清肌酐进一步升高,并在第二天肌酐达到基线水平的两倍。TIMP2平保持增长,但IGFBP7水平已恢复正常。在这个时候,给予患者细胞周期进程的诱导剂。

[0173] 实施例3.

[0174] 本研究的目的是要确定CsA治疗结合抗生素是否可以减轻盲肠结扎穿孔(CLP)后的大鼠的AKI,并且表征其对炎症、细胞凋亡和细胞周期停滞的标志物的影响。

[0175] 72个成年(24-28周龄,体重400-600g)健康的雄性Sprague-Dawley大鼠通过吸入异氟烷麻醉。盲肠结扎穿孔(CLP)使用预定33%盲肠的结扎长度使用18号针头进行:在回盲瓣之下三次穿刺。关腹,并且为了复苏而皮下注射20ml/kg的生理盐水。在手术伤口施用局部麻醉剂,并且让大鼠回笼并允许食物和水随意供应。

[0176] CLP后18小时,动物返回到实验室和随机分配到CsA(Sigma-Aldrich,St Louis,MI)一次剂量组(5mg/kg)或媒介物静脉注射组(每组n=24)。CLP后18小时,所有动物开始接受氨苄青霉素/舒巴坦(150mg/kg每12小时),并持续三天。还放置中央静脉导管用于抽血,并且存活时间评估长达7天。在一项单独研究中,治疗后6小时或24小时处死动物,并收集肾组织用于进一步分析(每组n=6)。为了排除环孢霉素对肾功能测量的任何可能的影响,我们给另外12只健康(剖腹但没有CLP)动物相同剂量的CsA或媒介物作为对照并获取相同的测量值(每组n=6)。

[0177] 在CLP后的0、18、24(治疗后6小时)、42(治疗后24小时)和66小时(治疗后48小时)时从中央静脉导管中抽取血液(0.8ml)。在相同的时间点从膀胱中获得尿液样品(1-2ml)。血浆通过离心分离并保存在-80°,用于随后分别使用酶联免疫吸附测定(ELISA)(R&D系统,Minneapolis,MN)和酶测定试剂盒(BioVision Technologies,Mountain View,CA)进行的白细胞介素(IL)-6和肌酐的测量。尿液样品使用商业ELISA(BioPorto Diagnostics,Gentofte,Denmark)分析中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白(NGAL),并且使用由Astute Medical(San Diego,CA)提供的定制ELISA分析金属蛋白酶-2的组织抑制剂(TIMP-2)和胰岛素样生长因子结合蛋白7(IGFBP7)。从CLP起以天数记录存活时间。

[0178] AKI的存在和严重性使用RIFLE标准的血清肌酐部分(13)分别评估,所述标准基于在CLP后在7天内肌酐最大值分别升高150%、200%和300%分类为风险(R)、损伤(I)和衰竭(F)。

[0179] 肾半胱天冬酶3和半胱天冬酶9用比色法测量。简单来说,将大鼠肾脏在0.9%的盐水浴中冲洗,并切开以得到100mg的截面。将所述100mg肾脏样品匀浆,并在离心机中旋转以沉淀出纤维组织。然后收集上清液并由Pierce BCA蛋白质测定仪(Thermo Scientific:23227,Rockford,IL)测定蛋白质浓度。使用从Pierce BCA蛋白质测定仪所获得的值,将所述裂解物用细胞裂解缓冲液稀释至每100uL 100-200ug。然后使用所述稀释样品根据所建议的程序准备半胱天冬酶-3(BioVision:K113-100,Milpitas,CA)和半胱天冬酶-9(BioVision:K113-100,Milpitas,CA)的测定。吸光度使用设定为405nm的BioTek Synergy HT多重检测酶标仪(Multi-Detection Microplate Reader)来读取,使用关联的Gen5软件分析,并由组织重量索引。

[0180] 将描述数据表示为平均值±标准误差(SE)。重复测量值的方差分析用于比较在不同的时间点不同的干预下的变量。Mann-Whitney U检验用于比较两组之间非正态分布的数据。分类变量表示为比例并用卡方检验对比。存活分析采用Kaplan-Meier统计法进行评估,并使用对数秩对比。我们主要的终点是使用CsA和媒介物处理的组之间严重AKI(RIFLE-F)的比例。样本大小根据主要结果,并为了检测大约30-40%的RIFLE-F AKI比例变化将其设定为每组24只动物。认为双侧P<0.05为统计上显著的。

[0181] CLP后血浆IL-6水平增加,并且在用CsA(或媒介物)和抗生素后连续增加6个小时。然而,在治疗后48小时,用CsA的组的血浆IL-6显著低于媒介物组((28.46相对于407.53pg/

ml,图5, $p<0.001$)。严重AKI (RIFLE-F)可能几乎两倍于(66.7%相对于33.3%,相对风险1.63,95%CI:1.17-1.99, $p<0.05$,图2)接受媒介物的动物。CLP后两组中血浆肌酐都升高。然而,在治疗后48小时,CsA治疗的动物的肌酐浓度显著低于那些接受媒介物的动物。尿中的NGAL的变化与血浆肌酐的变化相似,但早在治疗后24小时,使用CsA的NGAL水平显著较低(7849相对于16049IU/ml, $p<0.05$,图6B)。

[0182] CsA的治疗有助于存活到CLP后七天(治疗后150小时)(54.17%相对于29.17%, $p=0.04$,存活时间也一样;风险比:0.41,95%CI:0.18-0.94, $P=0.03$,图7A)。当我们将存活率和AKI的严重性相比时,我们发现,只有13%的RIFLE-F动物存活,而其余动物的67%存活(图7B, $P<0.05$)。

[0183] CsA对[TIMP-2]、[IGFBP7]和[TIMP-2]·[IGFBP7]的影响示于图8A-8C。CLP后两组中尿[TIMP-2]·[IGFBP7]均增加。然而,CsA相比于媒介物在6小时造成更高的[TIMP-2]·[IGFBP7] $P<0.05$,但治疗后24小时观察到浓度开始下降($P<0.05$,图8C)。为探索CsA的肾保护作用的其它机制,我们在治疗后6小时和24小时测量了肾组织中的半胱天冬酶3和半胱天冬酶9。CsA不改变组织半胱天冬酶(图9)。

[0184] 为了排除在健康动物中CsA可能的神经毒性作用,我们在健康大鼠中进行相同的测量。血浆IL-6、肌酐和半胱天冬酶3和半胱天冬酶9有较小变化,但伴随时间或在CsA与媒介物之间没有显著差异($P>0.05$,图10A-10C)。

[0185] 这些结果表明,单次剂量的CsA减弱败血症诱导的AKI,如通过更少的动物到达基于血浆肌酐标准的RIFLE-F,以及尿生物标志物来证明。另外,单次剂量的CsA减少由IL-6测量出的炎症反应,并提高一周存活。有趣的是,我们发现,CsA早期增加细胞周期停滞的生物标志物([TIMP-2]·[IGFBP7]),但后期会减少这些标志物(以及减少严重AKI)。最后,CsA不降低由半胱天冬酶3和半胱天冬酶9测量出的肾细胞凋亡。

[0186] CsA减弱AKI,如通过RIFLE-F速率降低,以及更低的尿生物标志物浓度来证明。重要的是,与多种其它研究一致,[TIMP-2]·[IGFBP7]和NGAL都比血清肌酐提前24小时增加。CsA导致更少的炎症,如通过血浆IL-6测定。我们选择IL-6,是因为该标志物是常见的促炎介质,并在自然和实验败血症中都容易被检测。相反,CsA治疗后六小时,尿[TIMP-2]·[IGFBP7]显著更大。与随后的12-24小时的AKI风险的增加相关的G₁细胞周期停滞的诱导,不失为一种避免细胞在损伤甚至在不利的环境中时进入细胞周期的保护机制。因此,期望早期的[TIMP-2]·[IGFBP7]增加与更少AKI相关。观察到的确实如此。然而,我们还观察到在CLP后和治疗前,两组中的[TIMP-2]·[IGFBP7]都有很大的增加。为了进一步表征所述反应,[TIMP-2]和[IGFBP7]分别单独确定(图8A-8B)。早期的增加(只使用CLP)仅见于[IGFBP7],而[TIMP-2]没有。此外,在6小时时,这两种分子在CsA组中均展现出朝向更高表现的非显著趋势(当两个标志物一起增加时导致显著差异)。

[0187] 虽然本发明以使得本领域技术人员能够制得并使用它的足够细节来描述并例示,但是各种替代方案、变化和改进应是显而易见的,而不背离本发明的精神和范围。本文中提供的实施例代表优选实施方案为示例性的,并且并非意欲作为本发明的范围的限制。本领域技术人员可想到这些方法和组合物的改变和其它用途。这些都涵盖在由权利要求的范围所界定的本发明的精神范围内。

[0188] 本领域技术人员将易于显而易见的是,在不脱离本发明的范围和精神的情况下可

对本文中所公开的发明进行可变的替换和修改。

[0189] 说明书中提到的所有专利和公布指示本发明所属领域中的普通技术人员的水平。所有专利和公布以引用方式并入本文,其程度等同于仿佛特定且个别地指示每一单独的公布以引用的方式并入。

[0190] 本文中适当地说明性地描述的发明可在缺少在本文中并未具体公开的任何一个或多个元件、一个或多个限制的情况下实践。因此,例如,在本文中的每一个例子中,术语“包括”、“主要由……组成”和“由……组成”中的任何术语可由其它两个术语中的任何一个代替。已使用的术语和措辞是用作描述而非限制的术语,并且在使用这类术语和措辞时并非意欲排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物,但是应认识到,各种修改在本发明要求的范围内是可能的。因此,应理解,尽管本发明已由优选实施方案和任选特征具体公开,但是本领域技术人员可采用本文中公开的概念的修改和变化,并且应理解,所述修改和变化被视为在如由所附权利要求书界定的本发明的范围内。

[0191] 在以下权利要求书内阐述其它实施方案。

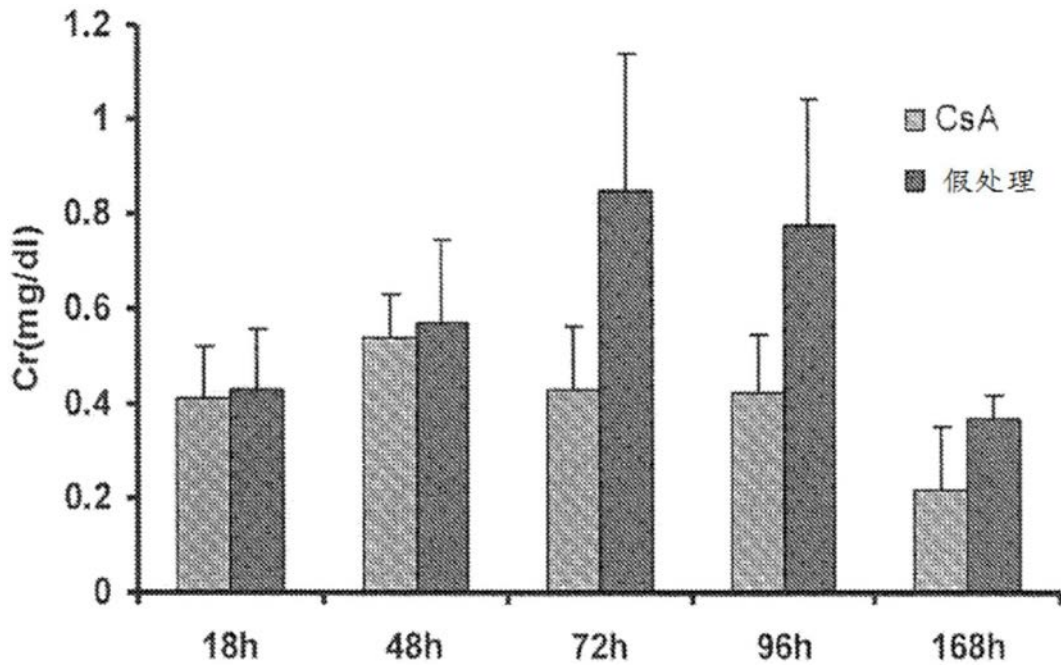


图1

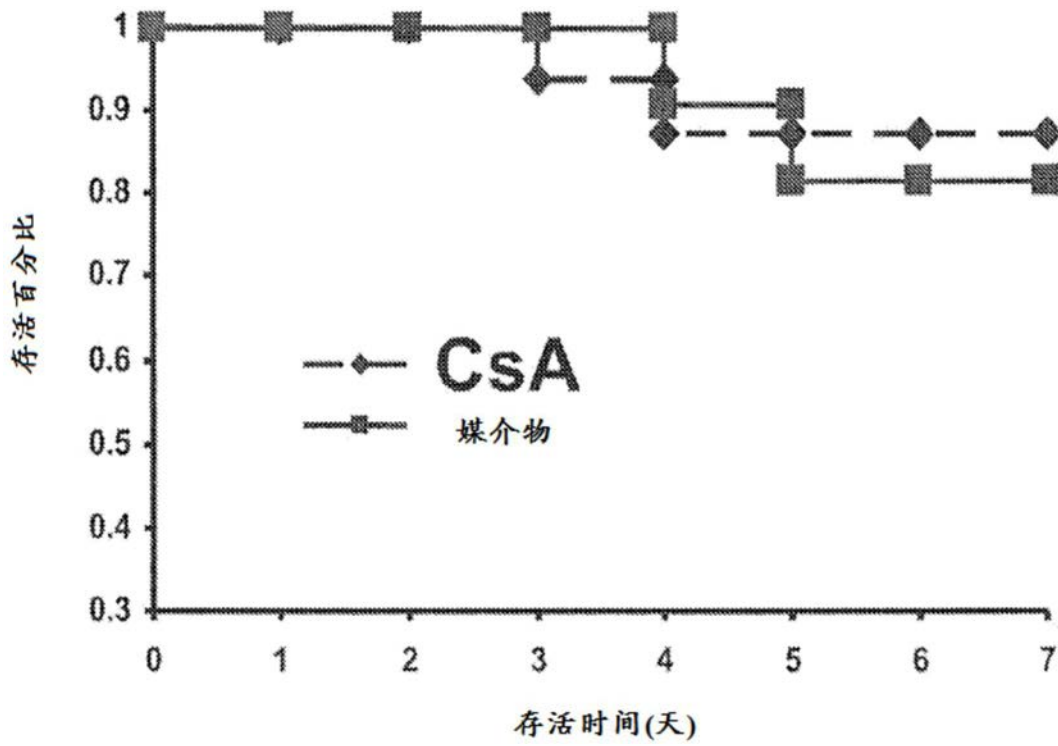


图2

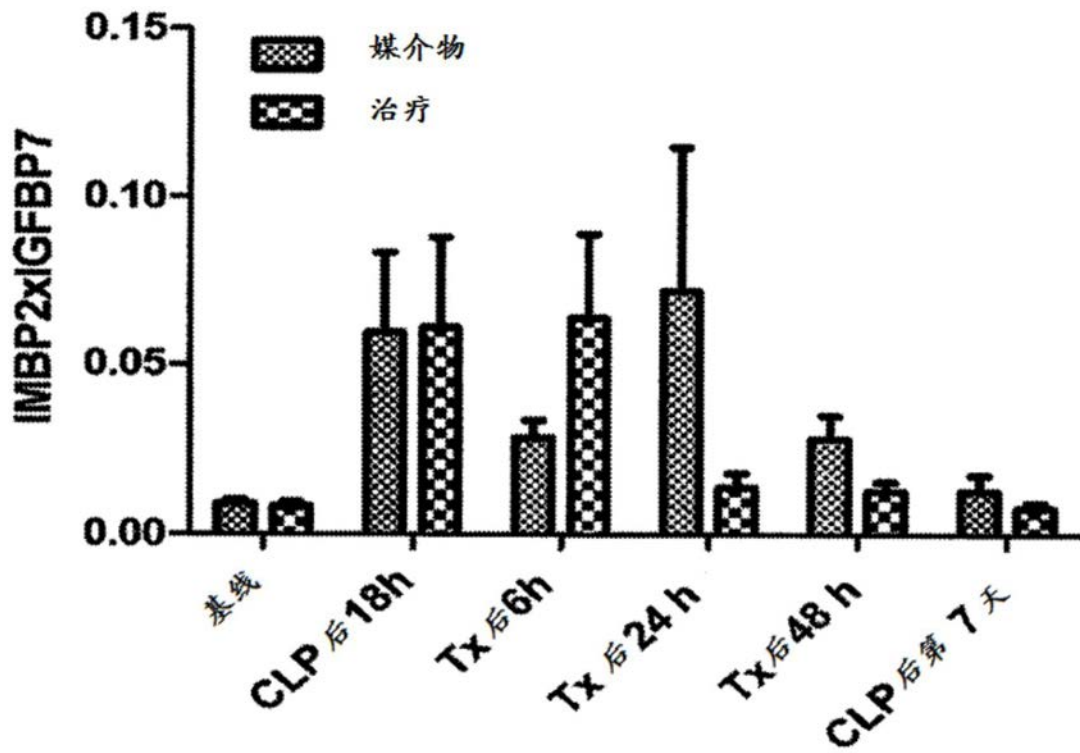


图3

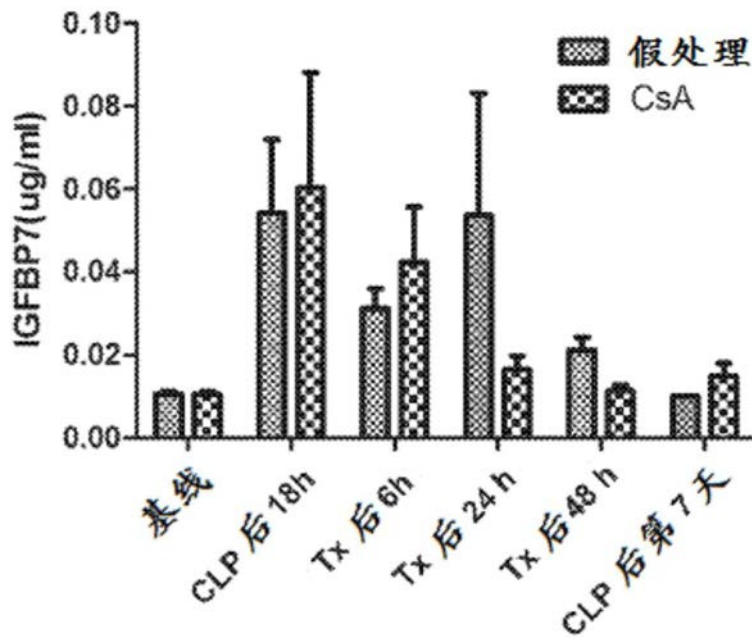


图4A

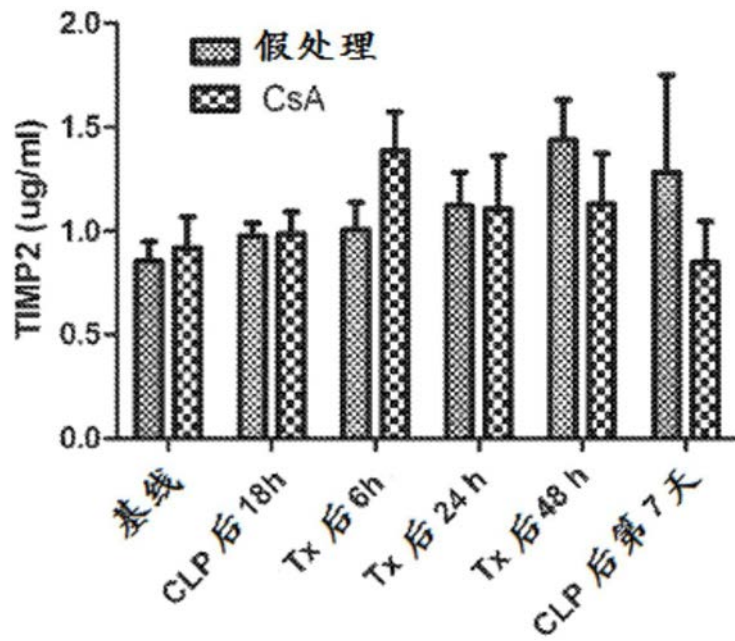


图4B

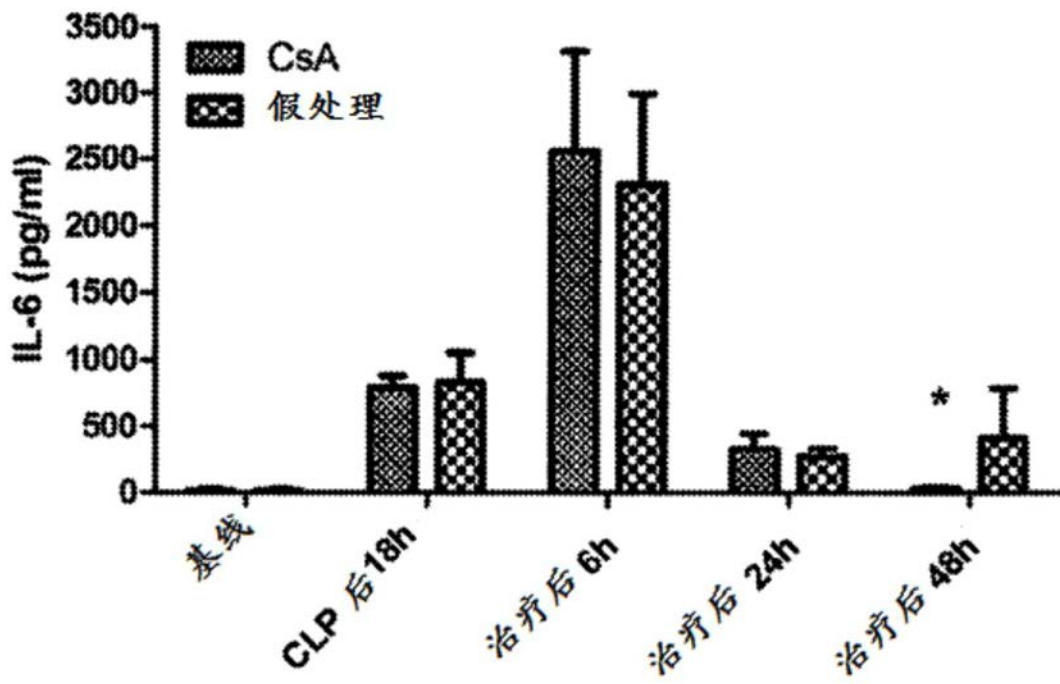


图5

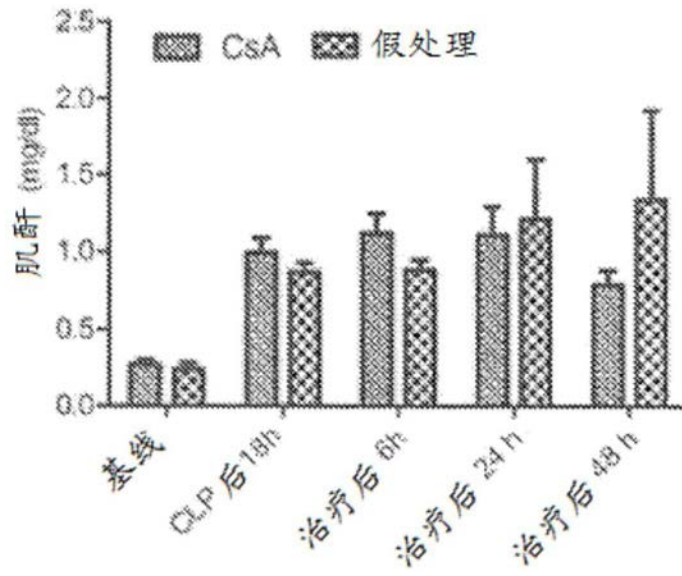


图6A

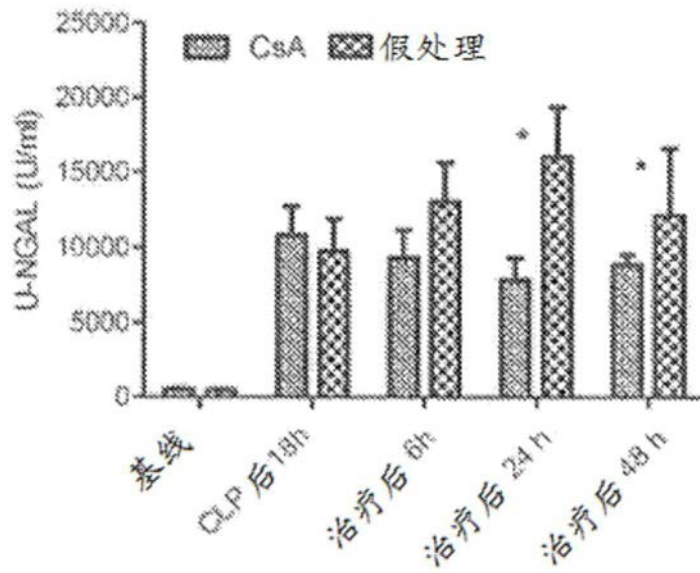


图6B

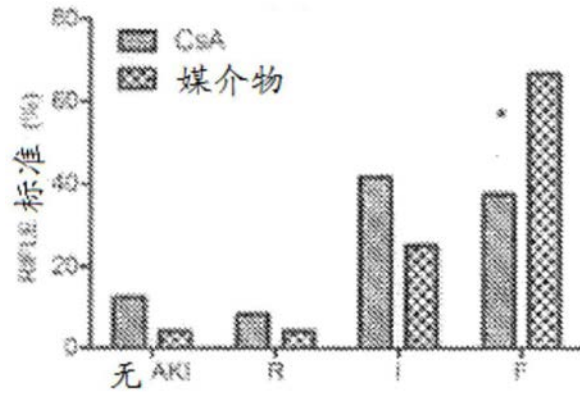


图6C

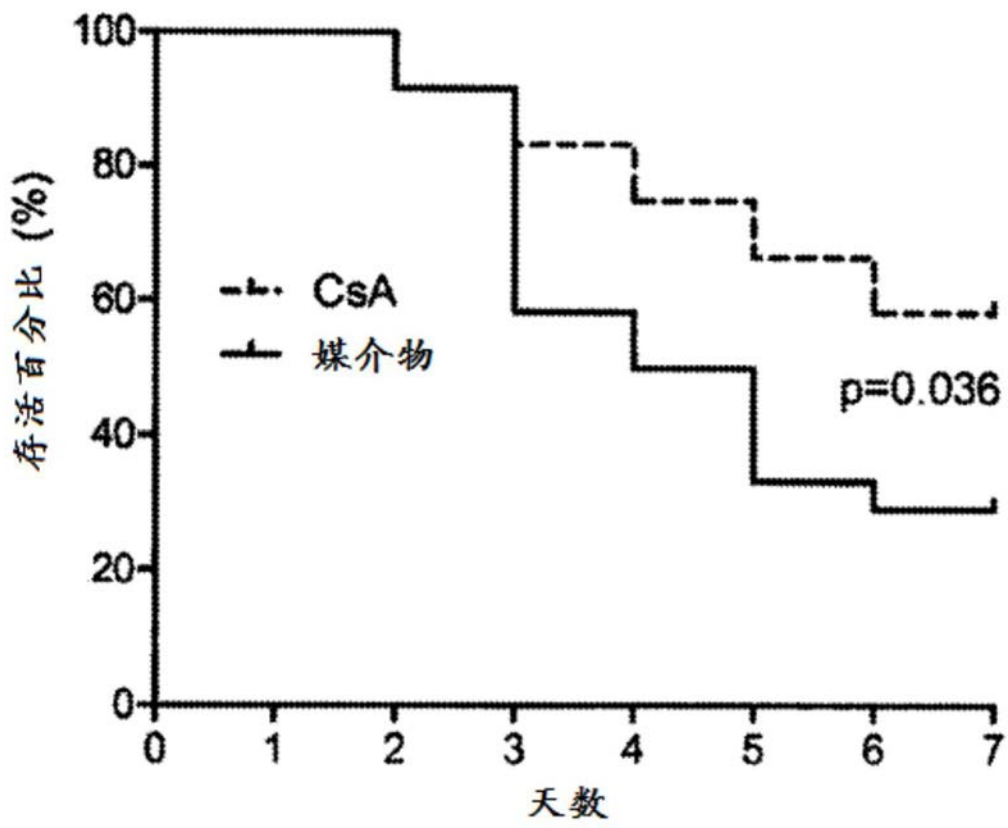


图7A

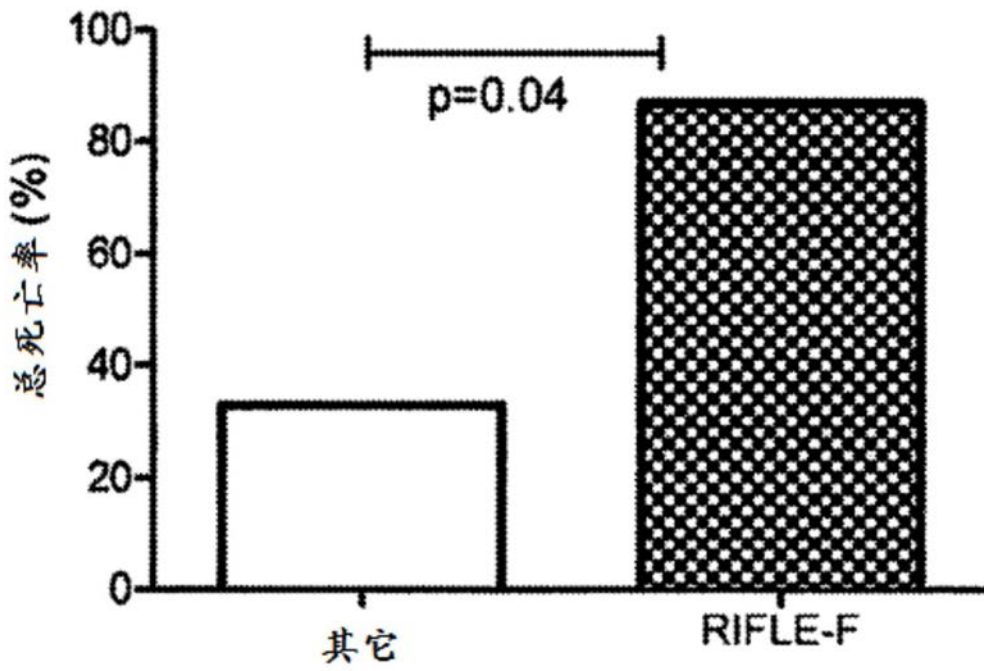


图7B

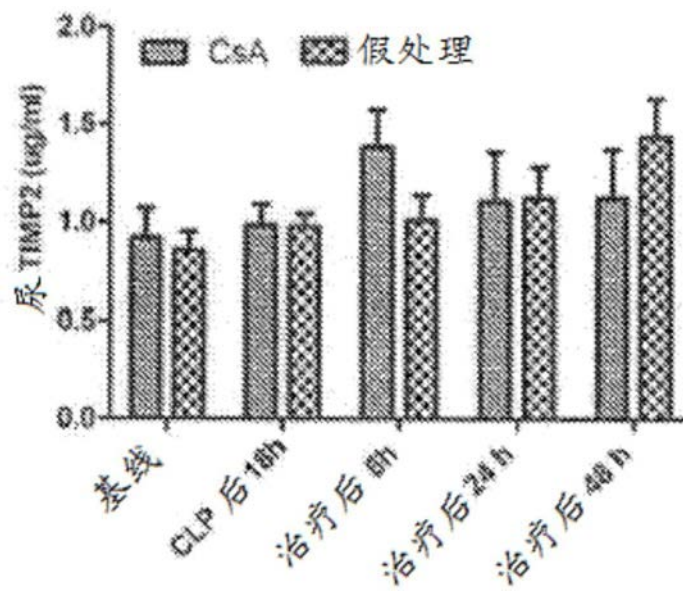


图8A

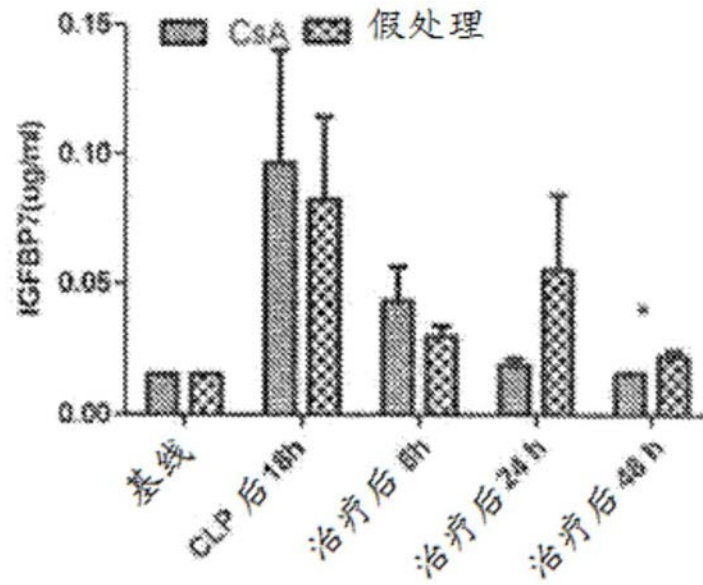


图8B

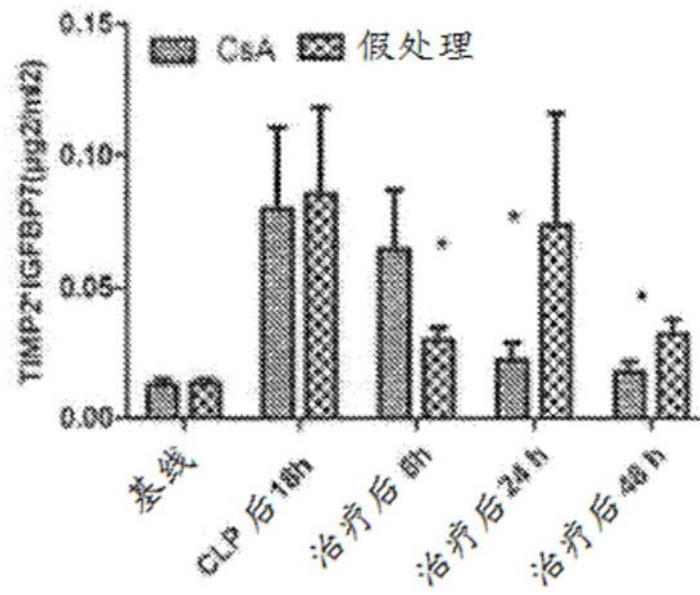


图8C

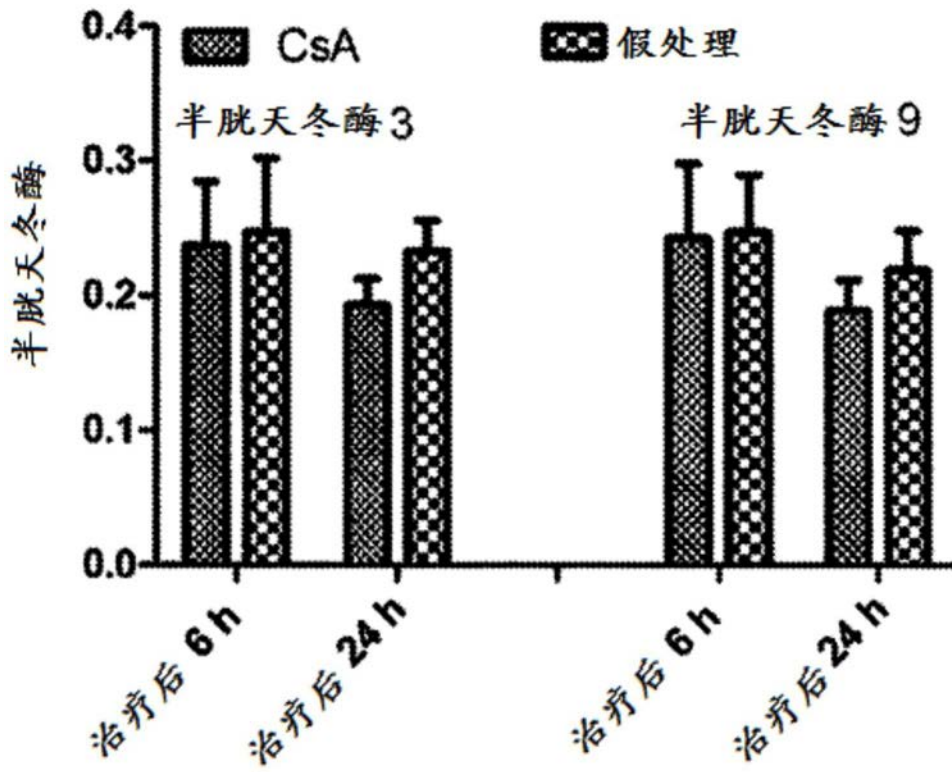


图9

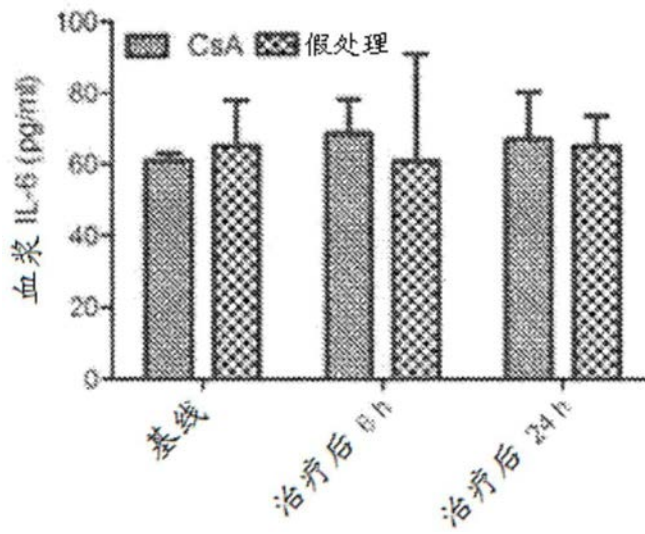


图10A

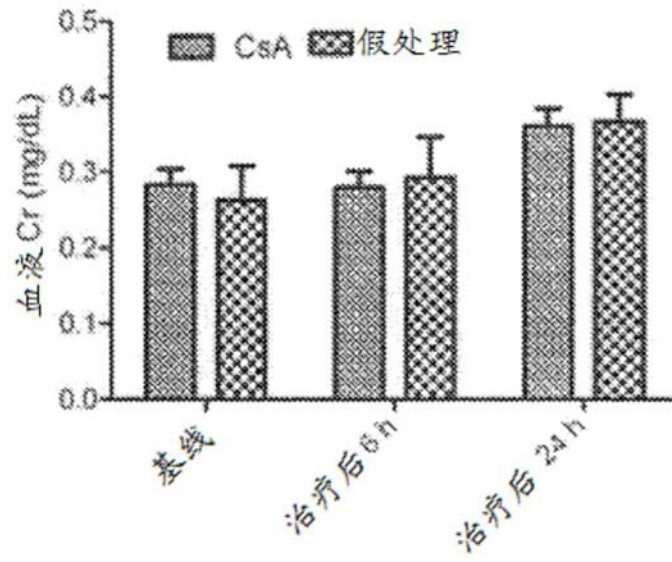


图10B

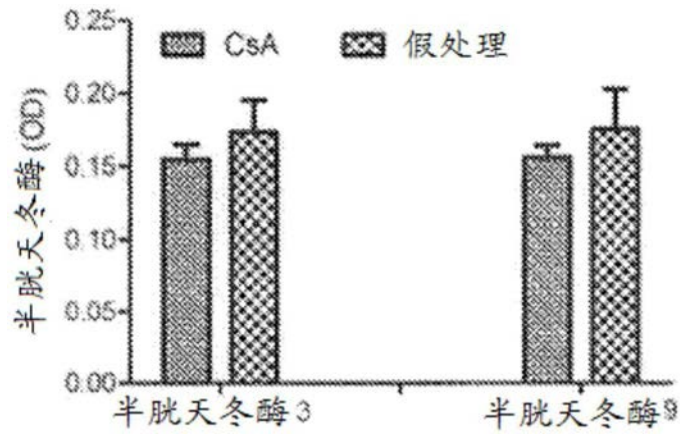


图10C