

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880003595.9

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101678085A

[22] 申请日 2008.1.30

[21] 申请号 200880003595.9

[30] 优先权

[32] 2007.1.30 [33] EP [31] 07101437.7

[86] 国际申请 PCT/NL2008/050053 2008.1.30

[87] 国际公布 WO2008/094037 英 2008.8.7

[85] 进入国家阶段日期 2009.7.30

[71] 申请人 安-法玛公司

地址 荷兰宾尼克

[72] 发明人 鲁洛夫·彼得·皮克斯

苏珊娜·海姆斯凯科

马克温·保罗·韦尔德斯

威兰姆·拉本

马提·贝尔纳杜斯·弗朗西斯库斯·

库尔费林克

[74] 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

代理人 徐江华 王珍仙

权利要求书2页 说明书28页 附图8页

[54] 发明名称

碱性磷酸酶在治疗肾功能减退中的用途

[57] 摘要

本发明涉及医学领域且特别是碱性磷酸酶在治疗如肾功能减退等肾病中的用途。本发明还涉及药学领域且特别是碱性磷酸酶的药物用途。本发明提供通过使用碱性磷酸酶来改善肾功能减退情况的备选治疗。

- 1、碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途。
- 2、如权利要求1所述的用途，其中所述肾功能是由肾衰竭引起减退的。
- 3、如权利要求1或2所述的用途，其中所述肾功能减退是由急性肾衰竭所引起或维持或加重的。
- 4、如权利要求1至3中任一项所述的用途，其中所述肾功能减退是由于肾实质性急性肾衰竭所引起或维持或加重的。
- 5、如权利要求4所述的用途，其中所述肾实质性急性肾衰竭是急性肾小管坏死。
- 6、如权利要求4所述的用途，其中所述肾实质性急性肾衰竭是肾小球肾炎。
- 7、如权利要求1至6中任一项所述的用途，其中所述肾功能减退是由于药物、药剂和/或毒素所引起或维持或加重的。
- 8、如权利要求7所述的用途，其中所述药物或药剂或毒素选自由以下物质组成的组中：抗生素、蛋白酶抑制剂、化疗药剂、抗炎药、血压药、杀虫剂、除草剂、乙二醇、造影剂、重金属和细菌毒素。
- 9、如权利要求1至8中任一项所述的用途，其中所述肾功能减退是由于肾血流减少和/或缺血所引起或维持或加重的。
- 10、如权利要求9所述的用途，其中所述肾血流下降和/或缺血是由于脱水、心力衰竭、感染性休克、严重失血、高血压、动脉粥样硬化和/或血栓形成所引起或维持或加重的。
- 11、如权利要求9所述的用途，其中所述肾血流减少和/或缺血是由于药物或药剂或毒素所引起或维持或加重的。
- 12、如权利要求11所述的用途，其中所述药物或药剂或毒素选自由以下物质组成的组中：血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和非甾体抗炎药(NSAIDs)。
- 13、如权利要求1至12中任一项所述的用途，其中所述AP是哺乳动物AP。

14、如权利要求 1 至 13 中任一项所述的用途，其中所述 AP 是人 AP。

15、如权利要求 1 至 14 中任一项所述的用途，其中所述 AP 是胎盘 AP、胎盘样 AP、肠 AP 或肝/骨/肾 AP。

16、如权利要求 1 至 15 中任一项所述的用途，其中所述 AP 是重组的 AP。

17、治疗患有肾功能减退的受试者(优选人)的方法，包括向需要施用 AP 的受试者施用有效量的 AP。

碱性磷酸酶在治疗肾功能减退中的用途

技术领域

本发明涉及医学领域，且特别是碱性磷酸酶在治疗如肾功能减退等肾病中的用途。本发明还涉及药学领域，且特别是碱性磷酸酶的药物用途。

背景技术

有多种肾病可以导致肾功能减退。急性肾衰竭(ARF)是一种可以导致肾功能减退的肾病。下面对 ARF 进行详述，这些描述并不限制本发明的范围。

急性肾衰竭(ARF)是指导致血清肌酸酐水平升高的急性肾功能损失。

社区获得性 ARF 的年发病率为每一百万人口约 100 例，而其仅在 1% 的住院者中被诊断出。另一方面，医院获得性 ARF 发生在 4% 的住院者和 20% 的重护理住院者中。医院获得性 ARF 发病率的增加有多方面的因素：其与患 ARF 风险增加的老年人群、可能在医院的设置中暴露于对肾脏有害的环境的高度普遍性以及疾病严重性的增加有关。

在过去的 40 年中，急性肾衰竭的存活率并没有得到改善，主要原因是受其影响的患者年龄增大且患有更多的并发症。依据肾衰竭的严重性，其死亡率可以在 7% 至高达 80% 的范围。

在急性肾衰竭中，肾小球滤过率在数天至数周内下降。结果造成含氮废物的排泄降低，并且不能维持体液和电解质平衡。患有急性肾衰竭的患者通常没有症状，而所述病症是通过所观察到的血尿素氮(BUN)和血清肌酸酐水平的上升来诊断的。当血清肌酸酐水平每天增加至少 0.5 mg/dL(等于每天 44 $\mu\text{mol/L}$)且每天的尿排出小于 400 mL(少尿症)时，则出现完全的肾机能停止。

病理生理学：肾小球滤过的驱动力是从肾小球到肾小囊腔的压力梯度。肾小球压力主要依赖于肾血流(RBF)并受控于肾入球和出球微动脉的联合阻

力。不管 ARF 的成因是什么，RBF 的降低代表肾小球滤过率(GFR)减小的共同病理途径。ARF 的病因包括三种主要机制。

- 肾前性肾衰竭定义为具有正常肾小管和肾小球功能的病症。在肾前性急性肾衰竭中，问题是肾血流减少，这种肾血流减少由实际血管内损耗、肾有效循环血容量的下降、或引起肾血流减少使 GFR 下降的药剂所引起。
- 肾实质性急性肾衰竭被细分为四类：肾小管疾病、肾小球疾病、血管疾病和间质疾病。在肾实质性急性肾衰竭中，肾实质受到损伤。
- 梗阻后肾衰竭首先引起肾小管压力增加，从而降低过滤驱动力。肾后性急性肾衰竭仅在两条排尿管均被阻塞，或孤立肾的排出管被阻塞时才会发生。这种病症最通常由下尿路的阻塞造成的。

肾前性肾衰竭

引起肾前性急性肾衰竭的主要药剂是血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和非甾体抗炎药(NSAIDs)。对 ACE 的抑制阻止了血管紧张素 I 向血管紧张素 II 的转化，这导致血管紧张素 II 水平的降低。血管紧张素 II 通过引起出球微动脉收缩来增加肾小球滤过率；其缺乏使肾小球滤过率降低，这是由于出球微动脉的扩张而引起的。

肾实质性急性肾衰竭

肾小管疾病

由 RBF 下降引起的急性肾小管坏死是住院患者患肾实质性急性肾衰竭的最常见病因。肾血流的减少引起肾实质缺血。如果长时间的缺血，就可能发展为急性肾小管坏死。这种最初的缺血损伤引发产生即使在 RBF 恢复后还会继续导致细胞损伤的氧自由基和酶。肾小管细胞损伤导致细胞间紧密连接的断裂，这使得肾小球滤出物回漏并进一步降低有效的 GFR。此外，临终的细胞脱落进入小管，形成阻塞脱落物，这进一步降低 GFR 并导致少尿症。

缺血性急性肾小管坏死通常是可逆的，但是如果缺血严重到足以引起皮质层坏死，则会发生不可逆的肾衰竭。

急性肾小管坏死有三个阶段。肾损伤在持续数小时至数天的起始阶段中发展。在持续数天至数周的维持阶段期间，肾小球滤过率达到其最低点，且尿排出也处于其最低点。恢复阶段持续数天，通常首先出现后急性肾小管坏死多尿症。在此阶段还会出现由于过量尿排出导致的血容量不足。尽管产尿量得到恢复，但由于肾小管功能尚未完全恢复，患者仍面临尿毒症以及电解质和酸的体内平衡的难题。

肾小球疾病

导致 ARF 的最常见肾小球疾病是肾小球肾炎。肾小球肾炎的特征是高血压、蛋白尿和血尿。在肾小球肾炎的众多类型中，大多数与慢性肾疾病有关。大体而言，引起急性肾衰竭的两类肾小球肾炎是急进性肾小球肾炎和急性增殖性肾小球肾炎。后一种类型发生在患有细菌性心内膜炎或其它后传染性病症的患者中。

血管疾病

微血管或大血管疾病(主要肾动脉阻塞或严重腹主动脉疾病)可以引起急性肾衰竭。

间质疾病

急性间质性肾炎通常表现出发热、皮疹和嗜曙红细胞增多。嗜曙红细胞为阳性的尿染色预示患有这种病症。急性间质性肾炎通常是对药物过敏反应的结果，但是其也可以由自身免疫性疾病、感染或浸润性疾病所引起。

ARF 的恢复首先依赖于 RBF 的恢复。RBF 正常化早预示着肾功能恢复的预后更好。在肾前性肾衰竭中，循环血量的恢复通常是充分的。在肾后性肾衰竭中，尿阻塞的快速缓解可使血管收缩迅速下降。对于肾实质性肾衰竭，单独的血量恢复无法恢复肾功能。对于肾小球或肾小管疾病，去除肾小管毒素和开始对其进行治疗会降低肾入球血管收缩并可逆转 ARF。尽管正在探寻急性肾衰竭的病因，但最初的治疗应该关注于纠正体液和电解质平衡和尿毒

症。用盐水复苏体液容量不足的患者。然而，更常见的是体液容量过度负荷，特别是在患者患少尿症或无尿症的情况下。

现有治疗的一个实例是经静脉施用速尿灵(Lasix)。现有治疗中的另一个实例是经静脉施用钙。利用经静脉施用的胰岛素(10个单位)和葡萄糖(25 g)、吸入的 β -激动剂或经静脉施用碳酸氢钠可以使钾临时移入细胞内结构。施用聚苯乙烯磺酸钠(Kayexalate)和/或利尿剂来实现钾的排泄。聚苯乙烯磺酸钠口服给药(25至50 g，混合有100 mL 20%山梨醇)或作为灌肠剂给药(50 g，于50 mL 70%山梨醇和150 mL自来水中)。如果这些方法不能控制钾水平，则开始进行透析。

如果血清碳酸氢盐水平小于15 mEq/L (15 mmol/L)或pH小于7.2，则通常通过静脉或口服施用碳酸氢钠来治疗酸中毒。也可以通过口服碳酸氢钠片剂、30 mL剂量的Shohl溶液或粉末状碳酸氢钠对患者进行治疗。血清碳酸氢钠水平和pH应该密切相关。难以减轻的酸中毒需要进行透析。

应对全部药物做出评价，并应基于药物的肾小球滤过率和血清水平调节它们的剂量。

有20%至60%的患者需要短期透析，特别是当BUN超过100 mg/dL (35.7 mmol/每升尿液)且血清肌酸酐水平超出5-10 mg/dL (442-884 μ mol/L)的范围时。透析的适应症包括对药理学治疗无反应的酸中毒或电解质紊乱、对利尿剂无反应的体液过多、和尿毒症。对于患进行性急性肾衰竭的患者，需要肾病学家的紧急会诊。

一些上述治疗导致(部分)恢复的肾功能。与未经治疗人群相比，其它治疗导致功能的改善。然而，仍需要备选的治疗。

发明内容

本发明的目的是提供改善肾功能的备选治疗，特别是在肾功能至少部分地受损/减退的情况下。

本发明提供使用碱性磷酸酶以改善肾功能减退的情况的备选治疗。

在第一实施方案中,本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途。

术语“改善”包括使延缓减退、终止减退或至少部分地逆转肾功能的减退。

术语“肾功能减退”通常用于表示通过将至少一种肾相关参数的值与所述参数公认的或平均(实验室)值相比,而确定肾功能下降的情况。例如,如果受试者(优选人)尿中蛋白质含量(显著地)大于公认的或平均(实验室)值,则称此人患有“肾功能减退”。相应的分析可以在实验室中进行,也可以在家中进行的。例如,自2006年9月起,荷兰“Nierstichting”已引入了可以在家中进行的,测试肾功能是否正常的简单测试(称为Niercheck)。此测试针对于尿液中蛋白质的含量。

可以测试的参数的其它实例是肾小球滤过率(GFR)、血清肌酸酐水平、电解质紊乱、产尿量、血尿素氮(BUN)、钙、磷、白蛋白水平、或尿中的红细胞和白细胞。可以进行的其它测试是分类全血细胞计数。优选地,对全部可能的患者进行以下尿液检查:浸渍检查法、显微镜检查、钠和肌酸酐水平和尿摩尔渗透压浓度测定。

如本文实验部分所公开,也可以分析尿样品中RNA分子的存在或缺失。优选地,所述RNA分子是mRNA分子。更优选地,所述mRNA分子是iNOS mRNA。在最优选的实施方案中,所述RNA从分泌尿的肾细胞中获得。

基于上述分析,确定是否受试者(优选人)正患有肾功能减退。例如,GFR降低或血清肌酸酐水平升高或产尿量下降或上述指标的任意组合是所测试的受试者需要本文所述治疗的明显指标。

因此,在本文所述的用途之前可以有分析步骤,例如,所述分析步骤包括从疑似患有肾功能减退的受试者中取样,并分析所述样品中任何上述给出的参数(或其组合),并将所获得的结果与平均或公认的值进行比较。适合的样品的实例是尿样品或血液样品。在对尿和/或血液样品的分析之外,还可以附加肾超声检查。在优选的实施方案中,由医生或在医生负责下进行分析。

当很明确有肾功能减退时，则开始如本发明的治疗。

肾功能减退可以是不同疾病的结果。肾功能受损的许多病例导致轻微，无症状的疾病，此疾病未被患者察觉，未引起医学关注且仍未确诊。此轻微肾功能受损事件的发病率和流行程度尚不确定，但认为其是相当大的。然而，此轻微的功能障碍会发展为严重的问题，因此早期治疗(例如如本文所述)很重要。

在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述肾功能减退是由肾衰竭引起的。肾衰竭是肾无法正常发挥功能的病症。生理学上，将肾衰竭描述为肾小球滤过率的下降。在临床上，其表现为血清肌酸酐升高。其大致分为两类：急性肾衰竭和慢性肾衰竭。

慢性肾衰竭(CRF)发展缓慢，并且最初几乎不表现出症状。其可以是大量肾病如肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎和尿潴留的并发症。末期肾衰竭(ESRF)是其最终的结果，在此类病例中通常需要透析直到找到用于肾移植的供体。在急性肾衰竭中，肾功能几乎完全被破坏。在优选的实施方案中，所述肾衰竭是急性肾衰竭。

如其名称的意思，急性肾衰竭(ARF)是肾功能的快速进行性损失，通常的特征为少尿症(产尿量下降，定量表示为成人小于 400 mL/天，儿童小于 0.5 mL/kg/h 或婴儿小于 1 mL/kg/h)、体内水分和体液失调以及电解质紊乱。由于其病症的严重性，患有急性肾衰竭的患者通常需要住院治疗。目前，必需确定根本病因以阻止疾病进程，并且需要透析来弥补治疗这些根本病因所需的时间间隔。基于本发明，即便不知道其根本病因，就可以立即开始使用碱性磷酸酶的治疗，而且不浪费宝贵时间。在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述肾功能减退是由于肾衰竭所引起或维持或加重的，且其中肾衰竭是急性肾衰竭，即在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备治疗由急性肾衰竭(ARF)所引起或维持或加重的肾功能减退的药物中的用途。

急性肾衰竭可以在慢性肾衰竭的基础上存在。这被称为慢性肾衰竭基础上的急性肾功能衰竭(AoCRF)。AoCRF的急性部分是可逆的,且治疗的目的是使患者恢复其原始的肾功能,这通常通过血清肌酸酐来测定。在另一实施方案中,本发明因此提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途,其中所述肾功能(进一步)下降是由于慢性肾衰竭基础上的急性肾功能衰竭引起的。

在另一优选的实施方案中,肾功能减退是可逆的,即通过根据本发明的治疗可以至少使肾功能在某种程度上得到改善。

如 Agrawal 和 Swartz (American Family Physician, April 1, 2000 volume 61, no7; cover story)所述,急性肾衰竭的病因可以通过使用步进式方法来确定。基于此文章,技术人员能够很好地将患者细分到3个ARF类别中的任意一个,即确定是否患者患有肾前性ARF、肾实质性ARF或肾后性ARF。

例如,诊断肾实质性ARF通常基于病史和身体检查、大于3%的钠排泄分数、250-300 mOsm的尿摩尔渗透压浓度、活性尿沉淀物来确定。在肾实质性急性ARF中,肾实质受到损伤。肾小管细胞的损伤导致某些特定的尿显微镜检查结果。实质损伤引起钠再吸收受损并导致上述参数,例如大于3%的钠排泄分数和250-300 mOsm等渗透压的尿摩尔渗透压浓度。肾实质性急性肾衰竭被细分为四类:肾小管疾病、肾小球疾病、血管疾病和间质疾病。

急性肾小管坏死是住院患者中肾实质性急性肾衰竭的最主要病因。此病症通常由缺血或毒素所引起。与肾前性急性肾衰竭不同,在缺血性急性肾小管坏死中,肾小球滤过率不随肾血流的恢复而改善。缺血性急性肾小管坏死通常是可逆的,但是如果缺血严重到足以引起皮质层坏死,则会发生不可逆的肾衰竭。造影剂和抗生素,特别是氨基糖苷是与急性肾小管坏死最相关的药剂。该病症也可以由来自肌红蛋白尿(横纹肌溶解)或血红蛋白尿(溶血)中的色素引起。急性肾小管坏死有3个阶段。肾损伤在持续数小时至数天的起始阶段中发展。在持续数天至数周的维持阶段期间,肾小球滤过率达到其最低点,且尿排出也处于其最低点。恢复阶段持续数天,通常首先出现后急性

肾小管坏死多尿症。在此阶段还会出现由于过量尿排出导致的血容量不足。尽管产尿量恢复，但由于肾小管功能尚未完全恢复，患者仍面临尿毒症和电解质和酸的体内平衡的难题。持续监测应贯穿于急性肾小管坏死的全部阶段。有患急性肾小管坏死风险的患者包括那些患有糖尿病、充血性心力衰竭或慢性肾功能不全的患者。可以通过迅速治疗带有缺血性或肾前性急性肾衰竭的可逆病因的患者，并通过在接受肾毒素的患者中保持适当的水合来预防急性肾小管坏死。一旦急性肾小管坏死发展，则要进行辅助治疗。药物如甘露醇、袪利尿剂、多巴胺和钙通道阻断剂在促进动物利尿上取得了一些成功，但是在人类中并未获得类似的结果。

在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述肾功能减退是由于肾衰竭(优选急性肾衰竭)所引起，且其中所述肾功能减退是由于肾实质性急性肾衰竭(优选急性肾小管坏死)所引起或维持或加重的。即，本发明还提供了碱性磷酸酶(AP)在制备治疗急性肾小管坏死的药物中的用途。

肾小球肾炎的特征是高血压、蛋白尿和血尿。肾小球肾炎通常被描述为肾小球发炎。在肾小球肾炎的众多类型中，大多数与慢性肾疾病有关。大体而言，引起急性肾衰竭的两类肾小球肾炎是急进性肾小球肾炎和急性增殖性肾小球肾炎。后一种类型发生在患有细菌性心内膜炎或其它后传染性病症的患者中。急进性肾小球肾炎可以是原发疾病，或其可以在全身疾病后发生。一旦怀疑有此病症，必需通过血清学标记物或肾活检来检查可治疗的全身疾病。肾功能在急进性肾小球肾炎患者中快速下降，且在数天至数周内后会发展为末期肾疾病。通常用糖皮质激素和环磷酰胺(Cytosan)治疗急进性肾小球肾炎患者。人们认为血浆交换对 Goodpasture 综合症患者有利，但尚未证实其也对其它类型的肾小球肾炎患者有利。

此类型的 ARF 也可以使用碱性磷酸酶来治疗，因此，在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述肾功能减退是由于肾衰竭(优选急性肾衰竭)所引起，且其中所

述肾功能减退是由于肾实质性急性肾衰竭(优选肾小球肾炎)所引起或维持或加重的。即,本发明还提供了碱性磷酸酶(AP)在制备治疗肾小球肾炎的药物中的用途。

一般的肾衰竭和具体的急性肾衰竭可以因不同的根本诱因而发生,或在不同疾病的病程中发展,所述疾病如缺血、造影剂色素、系统性红斑狼疮、小血管血管炎、Henoch-Schönlein 紫癜、Goodpasture 综合症、心内膜炎、后链球菌感染、后肺炎球菌感染、糖尿病、高血压、动脉粥样硬化或癌症。已知使用某些抗微生物剂(如两性霉素 B、卡泊芬净、万古霉素、左氧氟沙星和氨基糖苷,如托普霉素和庆大霉素)、其它药物(如化疗药剂(如顺铂、卡铂、甲氨蝶呤)、蛋白酶抑制剂(如茚地那韦和利托那韦)、金、锂、抗炎药(如非甾体抗炎药、环孢菌素、他克莫司、西罗莫司)、血压药(如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和血管紧张素受体阻断剂(ARB))、和某些化学品(如硅酸盐、烃、重金属(如 Cd、Hg、Pb)、杀虫剂、除草剂、乙二醇和细菌毒素(如破伤风、链球菌毒素))也可以引起服用或接触所述药剂或化学品的受试者肾功能减退。

本发明可以用于治疗由任何上述诱因所引起或维持或加重的肾功能减退。因此,在优选的实施方案中,本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途,其中所述肾功能减退是由于药物、药剂和/或毒素所引起或维持或加重的,所述药物、药剂和/或毒素优选自由以下组成的组:抗生素、蛋白酶抑制剂、化疗药剂、抗炎药、血压药、杀虫剂、除草剂、乙二醇、造影剂、重金属和细菌毒素。

在另一优选实施方案中,本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途,其中所获得的肾功能改善并非通过 AP 对 LPS 解毒的结果。

在更优选的实施方案中,本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途,其中所述肾功能减退是由于肾血流下降和/或缺血所引起或维持或加重的。所述肾血流下降和/或缺血优选是由于脱水、心力

衰竭、感染性休克、严重失血、高血压、动脉粥样硬化和/或血栓形成所引起或维持或加重的。

在另一优选实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述肾功能减退是由于肾血流下降和/或缺血所引起或维持或加重的，其中所述肾血流下降和/或缺血优选是由于药物或药剂或毒素所引起或维持或加重的，所述药物、药剂和/或毒素优选自由以下物质组成的组：抗炎药(最优选非甾体抗炎药)和血压药(最优选血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和/或血管紧张素受体阻断剂(ARB))。

本发明还提供了碱性磷酸酶(AP)在制备治疗或预防由于(肾)诱导型 NO 合酶(iNOS)表达增加所引起的肾功能减退的药物中的用途。此治疗在所谓早期肾损伤/衰竭的治疗中十分有用，且因此可以用于如治疗或预防早期肾病。需要此治疗的人群可以很容易通过测定 iNOS 含量并将获得的值与平均水平比较来确定。通过向被诊断为早期肾损伤/衰竭的个人施用有效量的碱性磷酸酶，可以降低肾 iNOS 的含量。本发明人已经确定碱性磷酸酶治疗导致肾细胞中 iNOS mRNA 表达增加的减缓，从而导致 NO 代谢物尿排泄的减少。AP 治疗缓解炎症反应，从而导致对肾 iNOS 表达诱导的减少，这引起 NO 代谢物产量减少和邻近肾小管损伤的减少。

肾衰竭通常伴随有分泌到尿中的肾细胞的结构损伤。从尿样品中分离这些细胞和随后进行 RNA 合成分析为肾功能、肾损伤和损伤最终逆转提供了有用的监测工具。在实施例 1 中，将分泌尿的肾细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 的表达用作为肾衰竭的标志物，且由此可将其用于监测损伤和由 AP 治疗所引起的损伤逆转。损伤的根本机制是 iNOS 诱导活性氧化物产物(reactive oxide species, ROS)，从而导致肾泄漏。使用此方法可以监测通过 iNOS 下调而导致的对 ROS 的诱导的减少。

在另一实施方案中，本发明提供了 AP 在制备改善肾功能减退的药物中的用途，进一步包括分析尿样品中 RNA 分子的存在或缺失。优选地，所述 RNA 分子是 mRNA 分子。更优选地，所述 mRNA 分子是 iNOS mRNA。在

最优的实施方案中，所述 RNA 从分泌尿的肾细胞中获得。

本发明使用碱性磷酸酶(AP)来改善肾功能减退(或损伤)。

碱性磷酸酶(AP) (根据 IUBMB 酶命名法为 EC 3.1.3.1, 常用名为碱性磷酸酶)是催化磷酸单酯和 H₂O 反应生成醇和磷酸盐的酶。AP 的其它名称为碱性磷酸单酯酶、磷酸单酯酶、甘油磷酸酶、碱性磷酸水解酶、碱性苯基磷酸酶、正磷酸单酯磷酸水解酶(最适宜碱性)。AP 的系统名称为磷酸单酯磷酸水解酶(最适宜碱性)。

AP 是广谱特异性酶，其也可以催化转磷酸作用。已知在人和其它动物中至少有四种不同但相关的碱性磷酸酶。它们是肠、胎盘、胎盘样和肝/骨/肾(或组织非特异性)碱性磷酸酶。前三种一起位于 2 号染色体上，而组织非特异性形式则位于 1 号染色体上。尚不知道 AP 具体的生理学功能，但 AP 似乎参与大量生理学过程。

AP 的来源可以是商业的 AP 酶、或包含 AP 酶的任何组合物、和能生产本发明所述功能性 AP 酶的任何手段，如编码 AP 蛋白质的 DNA 或 RNA 核酸。可以将编码 AP 的核酸插入到适合的载体中，如质粒、噬菌粒、噬菌体、(逆转录)病毒、转座子、基因治疗载体和能够诱导或使 AP 产生的其它载体。此外天然或重组微生物，如细菌、真菌、原生动物和酵母也可以用作本发明所述 AP 的来源。

根据本发明所用的包含 AP 的组合物优选包含真核生物 AP，更优选哺乳动物 AP，其类型可以是组织非特异性 AP，如肝-骨或肾类型、或组织特异性，如胎盘 AP、肠 AP、胎盘样 AP。后者也被称为生殖细胞 AP，其位于睾丸、胸腺和某些生殖细胞肿瘤(1)，且与胎盘和肠形式的碱性磷酸酶紧密相关(2)。技术人员能够熟练地搜索核酸文库并选择编码碱性磷酸酶的序列。最优选地，哺乳动物 AP 是人或牛 AP。因此，在优选的实施方案中，本发明提供了碱性磷酸酶(AP)在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述 AP 是哺乳动物 AP，且更优选地所述 AP 是人 AP。人 AP 序列的非限定性实例可以在 NCBI (Genpept)集合中找到，且其包括 NP_001622 (肠 AP)、

NP_001623 (胎盘 AP)、NP_112603 (胎盘样 AP)或 NP_000469 (组织非特异性 AP)。本发明还包括任何所述序列多态性的用途。在另一优选的实施方案中，所述 AP 是胎盘 AP、胎盘样 AP、肠 AP 或肝/骨/肾 AP。

在另一优选的实施方案中，本发明提供了 AP 在制备改善肾功能减退的药物中的用途，其中所述 AP 是重组的 AP。

在构象方面，碱性磷酸酶大致由两个结构域构成：花冠结构域和活性位点结构域。活性位点结构域可以分为单独的部分，如催化残基和三个金属离子位点(Zn1、Zn2 和 Mg3)。从一级结构看，很明显花冠结构域与形成活性位点结构域的氨基酸侧面连接。碱性磷酸酶的氨基酸序列和催化和花冠结构域的相对位置是技术人员已知的。例如，以图 10 作为参考，所述图 10 中显示出四条人碱性磷酸酶的氨基酸序列。这些序列中的花冠结构域用下划线标出。

碱性磷酸酶存在于从细菌到人类的几乎所有生物体中。在优选的实施方案中，提供了根据本发明的方法，其中 AP 是包含花冠结构域和催化结构域的分离或重组的碱性磷酸酶，其中所述花冠结构域和所述催化结构域可以从不同的碱性磷酸酶获得，且其中所述不同的磷酸酶中的至少一个是人磷酸酶。其它磷酸酶是如 ECAP(大肠杆菌(*Escherichia coli*)碱性磷酸酶)或七个已知 BIAP(牛肠碱性磷酸酶)中的一个。在优选的实施方案中，使用包含花冠结构域和催化结构域的分离或重组的碱性磷酸酶，其中所述花冠结构域和所述催化结构域获得自不同的碱性磷酸酶，且其中不同的碱性磷酸酶是人磷酸酶。这一点在将修饰的磷酸酶随后用在人治疗中的情况下特别有用。希望此(遗传)修饰的人源磷酸酶没有免疫原性或免疫原性很低。然而，技术人员清楚如果将修饰的磷酸酶用在如“体外”或“离体”诊断中，修饰的磷酸酶可以由如人和大肠杆菌碱性磷酸酶构成，或可以由牛和大肠杆菌碱性磷酸酶构成。

在另一优选的实施方案中，提供了根据本发明的方法，其中 AP 是包含花冠结构域和催化结构域的分离或重组的碱性磷酸酶，其中所述花冠结构域

和所述催化结构域可以从不同的碱性磷酸酶获得，且其中所述花冠结构域是胎盘 AP (ALPP)的花冠结构域，且其中所述催化结构域是肠 AP (ALPI)的催化结构域。优选地，所述不同的磷酸酶中的至少一个是人磷酸酶，且在更优选的实施方案中，两个不同的磷酸酶都是人磷酸酶。

基于人碱性磷酸酶的其它优选的结构域交换突变体为：

催化结构域	花冠结构域	名称
ALPI	GCAP	催化 ALPI/花冠 GCAP
	TNAP	催化 ALPI/花冠 TNAP
ALPP	GCAP	催化 ALPP/花冠 GCAP
	TNAP	催化 ALPP/花冠 TNAP
GCAP	ALPI	催化 GCAP/花冠 ALPI
	ALPP	催化 GCAP/花冠 ALPP
	TNAP	催化 GCAP/花冠 TNAP
TNAP	ALPI	催化 TNAP/花冠 ALPI
	ALPP	催化 TNAP/花冠 ALPP
	GCAP	催化 TNAP/花冠 GCAP

为了清楚起见，ALPI 是肠 AP，ALPP 是胎盘 AP，GCAP 是胎盘样 AP，且 TNAP 是组织非特异性 AP。

很明显也可以产生 ECAP 或任何人形式(ALPI、ALPP、GCAP 或 TNAP)的催化结构域与 BIAP 的花冠结构域之间的组合。此外，也可以产生 BIAP 的花冠结构域与 ECAP 或任何人形式的催化结构域的组合。

另一类有用的修饰磷酸酶是指原来在自然条件下通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物与细胞膜连接，但现在经修饰而不再与细胞膜连接的磷酸酶。GPI 锚定的磷酸酶的实例是碱性磷酸酶和 5'-核苷酸酶。全部同工酶均在细胞膜上有功能性活性，且缺乏 GPI 锚定物的形式不以可检测的水平自然存在。虽然已经表明了血清碱性磷酸酶的活性，但是通常认为此酶仍存在于脱落的膜部分或膜囊泡中。奶中 AP 活性也存在于包含膜囊泡的部分中。GPI 锚定物作为前体分子存储在细胞中，在此处其通过转酰胺酶与附着位点连接。GPI 锚定物的骨架在哺乳动物中是相同的，但是已知有依赖细胞类型的

修饰。

发现碱性磷酸酶主要通过其 GPI 锚定物与质膜结合。例如，嗜中性粒细胞将该酶呈递在其带负电荷的细胞膜背景下，而非将其释放进入炎性微环境中。出于此原因，在本发明之前通常认为，为了获得最佳的 AP 体内活性，应将该酶嵌入细胞膜或囊膜中。

对于人受试者中 AP 的药学用途，大多数应用中优选将人形式的该酶用于药物和治疗，这是因为获得自其它物种的 AP 形式在人受试者中具有免疫原性，且治疗会引起免疫反应和病理学上的副作用。在一些受试者中，甚至会发生致死的副作用，即过敏性休克(显示在我们的动物研究中)，因此，优选将免疫副作用的风险降至最低。从人中分离 AP 在实践中并不可行，通常可以在不同的重组表达平台上制备人重组形式的 AP 蛋白质。然而，GPI 修饰和膜锚定的蛋白质的表达和纯化十分困难；GPI 蛋白质很难从膜分离且很难分离和纯化。然而，在本发明之前，通常认为 GPI 锚定物和膜定位是 AP 生物学活性所必需的。

然而在本发明的一个实施方案中，提供了根据本发明的方法，其中 AP 是在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶，其中所述修饰导致分泌性磷酸酶，即磷酸酶未附着到细胞膜上。

在优选的实施方案中，使用在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶，其中所述修饰导致具有生物活性的分泌性磷酸酶，即其显示出对生物学(相关)底物的活性。

负责 GPI 锚定物连接的通用序列并不存在，但是可见明显的共有序列：

- 1) C 末端的氨基酸的疏水延伸(至少 11 个氨基酸，但是优选大于 11 个氨基酸)。
- 2) 疏水区上游，亲水氨基酸间隔区(5-12 个氨基酸)。
- 3) GPI 与小氨基酸(甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、丝氨酸或半胱氨酸)连接。
- 4) GPI 连接位点下游之后的 2 个后续氨基酸必然是小氨基酸，且在多数

情况下其选自于甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、丝氨酸或半胱氨酸。

基于此共有序列,技术人员能够通过如插入一个或多个氨基酸和破坏部分共有序列来突变此共有序列。然而,在优选的实施方案中,使用在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶,其中所述修饰导致有分泌性磷酸酶,且其中所述修饰包括对含共有 GPI 信号序列的氨基酸序列的突变或删除。

对于在人治疗中的应用,希望所得修饰的磷酸酶没有免疫原性或免疫原性很低,即此修饰的磷酸酶主要是人源的。在优选的实施方案中,提供了根据本发明的方法,其中 AP 是在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶,其中所述修饰导致分泌性磷酸酶(优选具有针对生物学相关底物的活性),且其中所述磷酸酶是人磷酸酶。

GPI 锚定的磷酸酶的实例是碱性磷酸酶和 5'-核苷酸酶,因此,在优选的实施方案中,使用在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶,其中所述修饰导致分泌性磷酸酶,且其中所述磷酸酶是碱性磷酸酶,例如人碱性磷酸酶,如人肝-肾-骨磷酸酶、人肠碱性磷酸酶或人胎盘样碱性磷酸酶。

很明显任何所述可分泌的修饰磷酸酶均可通过如以下步骤来产生:向宿主细胞内引入能够编码所述可分泌的磷酸酶的核酸,优选所述核酸与调控序列可操作地连接,且允许所述宿主细胞表达所述可分泌的磷酸酶,并任选地从用于生长和/或维持宿主细胞的培养基中分离所产生的磷酸酶。然而,除了在上述 GPI 连接序列中进行突变之外,还存在制备无 GPI 锚定连接分泌蛋白的其它方法:

- 1) 在作为膜锚定的蛋白质表达后,可以使用磷脂酶来切除 GPI 锚定物。
- 2) 可以通过干扰 GPI 锚定物的产生或使用在 GPI 锚定物产生中存在缺陷的细胞(类型)来产生可分泌形式的 GPI 锚定蛋白。在 GPI 锚定生物化学中存在缺陷的细胞系的实例是,例如 Jurkat、AM-B、C84、BW、S49、CHO 和 Raji。

3) 可以通过干扰转酰胺酶或使用缺乏转酰胺酶的细胞来抑制 GPI 锚定物与蛋白质的连接, 使得蛋白质无锚定且可分泌。可以通过诱变 CHO 来获得此类缺陷性细胞。

技术人员清楚可以对包含花冠结构域和催化结构域的修饰的磷酸酶做进一步修饰并使其可分泌, 其中所述花冠结构域和所述催化结构域获得自不同碱性磷酸酶。因此, 在优选的实施方案中, 提供了根据本发明的方法, 其中 AP 是在糖基磷脂酰肌醇(GPI)信号序列中包含修饰的分离或重组的磷酸酶, 其中所述修饰导致分泌性磷酸酶, 且其中所述重组的磷酸酶还包含从不同磷酸酶获得的花冠结构域和催化结构域。图 10 提供了此(碱性)磷酸酶突变体的非限定性实例。此组合的或“双”突变体产生例如修饰的磷酸酶, 其具有某种特定活性、稳定性或底物特异性, 且同时由于可以从生产细胞周围的培养基中将其分离, 此产物的产量得到极大的提高。

可以通过不同途径, 如静脉、直肠、支气管或口服施用 AP。

在优选的实施方案中, 所用的给药途径是静脉给药。技术人员清楚优选递送有效量的 AP。可以使用 10-500 U/kg/天的初始量。如果使用静脉途径给药, 优选通过连续输注来施用 AP(至少持续一段时间)。

本发明还提供了包含 AP 源的组合物, 其中有包含 AP 源的药物和营养保健品组合物。组合物可以任选地包含药学上可接受的赋形剂、稳定剂、活化剂、载体、渗透剂、抛射剂、消毒剂、稀释剂和防腐剂。适合的赋形剂是药物制剂领域公知的, 且技术人员很容易找到并应用, 参见如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia PA, 17th ed. 1985。在优选的实施方案中, 包含 AP 源的组合物适于口服施用, 且包含肠包衣以保护 AP 免受胃液和低 pH 的不利影响。肠包衣和控释制剂是本领域所公知的(参见上述文献)。本领域的肠包衣组合物可包含混有活性成分如 AP 的水溶性肠包衣聚合物的溶液和其它赋形剂, 将其分散到水溶液中并可以随后干燥和/或成丸。形成的肠包衣为 AP 提供抵抗以免受存储期间空气湿气和氧, 以及在服用后胃液和低 pH 的攻击, 而其在下肠道的碱性条件下很

容易分解。

在优选的实施方案中，向受试者（优选人）提供有效量的 AP（通任何适合的给药途径）和任何适当形式的 AP。优选地，在施用 AP 之前和之后测定指示肾功能的参数，以确定治疗是否成功。通常需要反复施用更多的剂量，优选直到认为肾功能参数可接受为止。适合参数的一个实例是 RNA 分子的存在或缺失。优选地，所述 RNA 分子是 mRNA 分子。更优选地，所述 mRNA 分子是 iNOS mRNA。在最优选的实施方案中，所述 RNA 从分泌尿的肾细胞中获得。

另一个优选的施用形式包括使用包含 AP 来源的药物组合物，其可以在延长期中采用每天剂量方案进行递送。优选地，药物组合物包含肠包衣以保护 AP 免受胃液(pH 1.0 至 2.5)的有害影响，并确保 AP 的有效递送。

在另一实施方案中，将 AP 在制备改善肾功能减退的药物中的用途与任何其它治疗相结合(即组合治疗)。例如，这些其它治疗也意在改善肾功能。意在改善肾功能的其它治疗的实例如上所述。非限定性实例是用速尿灵(Lasix)、钙或透析进行的治疗。适合的组合治疗的其它实例是用 AP 和至少一种 iNOS 抑制剂的治疗或用 AP 和至少一种 TNF α 抑制剂的治疗。可以依次或同时施用活性化合物。

在另一优选的实施方案中，本发明提供了治疗患有肾功能减退的受试者(优选为人)的方法，包括向需要 AP 的受试者施用有效量的 AP。在优选的实施方案中，所述肾功能减退是由肾衰竭引起的。可以通过确定患有肾功能降低的受试者将所述方法可以进一步延伸。在优选的实施方案中，本发明提供了治疗患有肾功能减退的受试者(优选为人)的方法，包括向需要 AP 的受试者施用有效量的 AP，其中所获得的肾功能改善并非通过 AP 对 LPS 解毒的结果。

一个实施方案提供了治疗患有肾功能减退的受试者(优选为人)的方法，包括向需要 AP 的受试者施用有效量的 AP，其中所述肾功能减退是由于药物、药剂和/或毒素所引起或维持或加重的。所述药物、药剂和/或毒素优选

自由以下组成的组：抗生素、蛋白酶抑制剂、化疗药剂、抗炎药、血压药、杀虫剂、除草剂、乙二醇、造影剂、重金属和细菌毒素。

本发明还提供了治疗患有肾功能减退的受试者(优选为人)的方法，包括向需要 AP 的受试者施用有效量的 AP，其中所述肾功能减退是由于急性肾衰竭所引起或维持或加重的。所述肾功能减退优选是由于肾实质性急性肾衰竭所引起或维持或加重的。在一个实施方案中，所述急性肾衰竭是由于药物、药剂或毒素所引起或维持或加重的，所述药物、药剂和/或毒素优选自由以下组成的组：氨基糖苷、化疗药剂、造影剂、重金属和细菌毒素。

进一步提供了根据本发明的方法，其中所述肾功能减退是由于肾实质性急性肾衰竭所引起或维持或加重的。所述肾实质性急性肾衰竭优选为急性肾小管坏死和/或肾小球肾炎。优选地，所述急性肾小管坏死和/或肾小球肾炎是由于药物或药剂或毒素所引起或维持或加重的，所述药物或药剂或毒素最优选自由以下组成的组：氨基糖苷、化疗药剂、造影剂、重金属和细菌毒素。

进一步提供了根据本发明的方法，其中所述肾功能减退是由于肾血流降低和/或缺血所引起或维持或加重的。在一个实施方案中，所述肾血流降低和/或缺血是由于脱水、心力衰竭、感染性休克、严重失血、高血压、动脉粥样硬化和/或血栓形成所引起或维持或加重的。优选地，所述肾血流降低和/或缺血是由于药物或药剂或毒素所引起或维持或加重的，所述药物或药剂或毒素最优选自由以下组成的组：血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂和非甾体抗炎药(NSAIDs)。

进一步提供了根据本发明的方法，其中所述 AP 是哺乳动物 AP，优选是人 AP。更优选地，AP 是胎盘 AP、胎盘样 AP、肠 AP 或肝/骨/肾 AP。最优选地，AP 是重组的。

将在以下非限定性实施例中对本发明进行更为详尽的解释。

附图说明

图 1. 肾 iNOS 表达和 NO 和 GST 的尿排泄。(A)安慰剂治疗(空心柱，

n=4)和 AP 治疗(实心柱, n=8)患者的 iNOS mRNA 表达。以管家基因 GAPDH ($C_T = 23.6 \pm 0.3$, $\delta C_T = 12.1 \pm 0.1$)的平均循环阈(C_T)值对照健康志愿者(数据未显示)中 iNOS mRNA 的相对表达进行标准化, 并将其设为 1。在安慰剂(Δ , n=5)和 AP 治疗的患者(\blacksquare , n=10)中, 在干预后多个时间测定的尿中(B) NO 代谢物、(C) GSTA1-1 和(D) GSTP1-1 水平。利用 NO 代谢物和 GST 的尿排泄对肌酸酐排泄进行校正, 并在完整曲线反复测定后通过 ANOVA 进行分析。(A)数据表示为平均数 \pm SE, 且(B+C+D)表示为 25%范围安慰剂和 75%范围 AP 的中值。(*; 与安慰剂组相比差异显著, $P < 0.05$)。

图 2. 对照大鼠、庆大霉素肾毒性大鼠和碱性磷酸酶治疗的庆大霉素肾毒性大鼠中的血清肌酸酐水平。

图 3. 对照大鼠、庆大霉素肾毒性大鼠和碱性磷酸酶治疗的庆大霉素肾毒性大鼠中的血清血尿素氮(BUN)水平。

图 4. 对照大鼠、庆大霉素肾毒性大鼠和碱性磷酸酶治疗的庆大霉素肾毒性大鼠中的尿肌酸酐水平。

图 5. 对照大鼠、庆大霉素肾毒性大鼠和碱性磷酸酶治疗的庆大霉素肾毒性大鼠中的肌酸酐清除率。

图 6. AP 显著降低顺铂肾毒性后的尿蛋白质排泄。假处理: 没有进行顺铂处理; 对照处理: 顺铂+载体; AP: 顺铂+碱性磷酸酶。

图 7. AP 降低顺铂肾毒性后的尿蛋白质排泄。假处理: 没有进行顺铂处理; 对照处理: 顺铂+载体; AP: 顺铂+碱性磷酸酶。

图 8. AP 降低伴有肾功能减退的尿毒症患者的血清肌酸酐。

图 9. AP 降低伴有肾衰竭的尿毒症患者的血清肌酸酐(定义为血清肌酸酐 $> 150 \mu\text{mol/L}$, 或在基线时间已经过肾替代治疗)。

图 10. 四种人碱性磷酸酶同工酶的序列。注意: 这些是成熟蛋白质的序列(即没有信号序列), 但除嵌合 AP 之外, 是在添加 GPI 锚定物并进行 C 末端氨基酸的伴随加工之前的序列。

具体实施方式

实验部分

材料和方法

实施例 1: AP 对败血症患者肾功能的影响

患者

对加护病房中诊断为肾功能减退的 15 名患者进行随机 AP 治疗(2 AP:1 安慰剂)。

治疗后,在 0 至 24 小时时间的若干时间点收集动脉血和导管尿。记录尿量并在进行前述分析(6)前将用于 NO 代谢物测定的样品在 -80°C 冷冻。通过常规临床化学测定肌酸酐和蛋白质。

干预

牛肠碱性磷酸酶(AP, AM-Pharma, Bunnik, 荷兰)源自于 <6 月龄小牛的肠粘膜。符合条件的患者在 24 小时中以 2:1 的比例静脉接受 AP 或匹配的安慰剂(2.5 mM Tris-HCl、2.5 mM 氯化镁、0.05 mM 氯化锌, pH 7.3, 以及 40%甘油作为稳定剂)。随机至 AP 的患者在 10 分钟内接受 67.5 U/kg 体重的初始大剂量注射,随后在剩余的 23 小时 50 分钟内接受 132.5 U/kg 的连续输注。

化学分析

根据 Moshage 等(18),使用 Griess 反应测定稳定 NO 代谢物、硝酸盐和亚硝酸盐的总量,以测定 NO 自由基的产量。将肝素化的血浆和尿样品分别用蒸馏水稀释四倍和四十倍。如前所述(19; 20),测定尿液中谷胱甘肽-S-转移酶 AI-I (GSTAI-I)和 GSTPI-I 的含量以区分近端和末梢的肾小管细胞损伤,并通过 ELISA 进行分析,一式三份。

iNOS mRNA 表达的测定

在 4°C 和 700 g 下将尿样品离心 10 分钟。如前所述(6)，将 RNA 从细胞沉淀物中分离并逆转录成 cDNA。用 Applied Biosystems 提供的预先开发的 Gene Expression Assay 来扩增人 iNOS 和 GAPDH (iNOS; Hs00167248_ml, GAPDH; Hs99999905_ml)。全部实验一式三份进行。参照管家基因 GAPDH 的表达，对样品的量进行标准化。

实施例 2: AP 对庆大霉素引起的肾衰竭的影响

在庆大霉素引起的 Wistar 大鼠肾毒性模型中评价碱性磷酸酶(AP)的影响。连续 7 天以 120 mg/kg 通过肌肉注射向动物提供庆大霉素。在第 6 天 24 小时内收集尿样品以测定尿量、电解质(Na^+ 、 K^+)、肌酸酐、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)和蛋白质。最后，在第 7 天收集血液样品；测定血清肌酸酐、BUN 和电解质(Na^+ 、 K^+)的浓度。在每天施用庆大霉素前，通过缓慢静脉注射向庆大霉素处理组(每组 n=8)提供赋形剂或 AP (100 U/kg)，随后每 12 小时另外给药连续 7 天(14 次 AP 剂量总和 = 1400 U/kg)。对照组(n=8)在第 0 天接受一次腹膜注射生理盐水，并使用与 AP 所述相同的每天两次给药方案缓慢静脉注射赋形剂。

实施例 3: AP 对顺铂引起的肾衰竭的影响

在以 7.5 mg/kg 单次腹膜注射顺铂后(指定为第 0 天)，在 Wistar 大鼠中评价碱性磷酸酶(AP)对肾功能的影响。在第 2 天和第 5 天的 24 小时内收集尿样品以测定尿量、电解质(Na^+ 、 K^+)、肌酸酐和蛋白质。在第 3 天和第 6 天收集血液样品；测定血清肌酸酐、BUN 和电解质(Na^+ 、 K^+)的浓度。在接受顺铂注射前 30 分钟，通过缓慢静脉注射向顺铂处理组(每组 n=8)提供赋形剂或 AP (200 U/kg)，随后在 12 小时后第二次给药；静脉给药将在第 1 天(x 2)和第 2 天(x 1)继续，总共 5 次给药(总 AP 剂量为 1000 U/kg)。对照组(n=8)在第 0 天接受一次腹膜注射生理盐水，并使用与 AP 所述相同的每日两次给药方案缓慢静脉注射赋形剂。

实施例 4: AP 对患有肾衰竭的败血症患者的影响

患者

对 8 所独立的医院加护病房中诊断为败血症的 36 名患者进行随机 AP 治疗(2 AP:1 安慰剂)。在治疗后 0 至 48 小时时间的若干时间点收集动脉血和导管尿。将 AP 治疗组和安慰剂处理组作为整体或小组进行分析, 所述小组限于表现出肾衰竭(定义为基线血清肌酸酐 $> 150 \mu\text{mol/L}$)或已经进行肾移植治疗的患者。分析各组的血清肌酸酐(通过常规临床化学)、死亡率和对肾移植治疗的需求。

干预

牛肠碱性磷酸酶(AP, AM-Pharma, Bunnik, 荷兰)源自于 < 6 月龄小牛的肠粘膜。符合条件的患者在 24 小时中以 2:1 的比例静脉接受 AP 或匹配的安慰剂(2.5 mM Tris-HCl、2.5 mM 氯化镁、0.05 mM 氯化锌, pH 7.3, 以及 40%甘油作为稳定剂)。随机至 AP 的患者在 10 分钟内接受 67.5 U/kg 体重的初始大剂量注射, 随后在剩余的 23 小时 50 分钟内接受 132.5 U/kg 的连续输注。

可以用于进一步体现碱性磷酸酶在治疗肾功能减退中功效的其它适合模型的实例是:

(1) 内毒素诱导的大鼠急性肾衰竭(J. Nephrol. 2005; 18: 374- 381)

通过静脉注射 LPS (1 mg/kg, 来自 E. coli O111:B4, Sigma, 德国)在雌性 Sprague-Dawley 大鼠中诱发急性肾衰竭。此模型的特点是肾小球滤过率降低、血压降低和 NO_x 排泄增加。

(2) 实验性系膜增生性肾小球肾炎的抗 Thy-1.1 模型

如 Jefferson 等所述(J. Nephrol. 1999; 12: 297-307), 可以通过用 Lewis 大鼠胸腺细胞(每次注射 2×10^8 个细胞)多次免疫山羊来制备山羊-抗-大鼠胸腺细胞血清。在第二次和第三次注射后收集血清, 合并, 并使用辛酸法获得

富集 IgG 的部分。随后使用 20 mg/100 g 体重的单次静脉给药来引起 180-230 g 雄性 Wistar 大鼠患病。

(3) 钙诱导的肾小球肾炎

如 Jacquillet 等所述(Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2006; 290: 127-137), 通过在 5 天中每日腹腔注射 500 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{kg}$ 使其中毒, 并随后不做任何处理被放置 15 天的大鼠显示出肾小球滤过率降低。

在这些实验模型中, 将通过静脉途径施用碱性磷酸酶, 以预防、减缓、终止或逆转疾病过程。可以在疾病引发前或在疾病建立早起或后期施用碱性磷酸酶。可以单次施用碱性磷酸酶, 或在疾病建立期间, 可以施用多次或连续输注碱性磷酸酶。例如以 10 U/kg/天至 500 U/kg/天的剂量范围施用碱性磷酸酶。

功效参数可以选自但不限于: 炎性参数(浸润、白细胞和巨噬细胞的活化态、细胞因子产生、补体活化)、氧化应激(H_2O_2 产生、肾中髓过氧化物含量、iNOS 诱导、 NO_x 产生等)、肾损伤(抗体处理、凝血、组织学)和血液化学, 如肌酸酐水平。

结果

实施例 1: AP 对败血症患者肾功能的影响

患者

在 15 个月的周期中随机分配肾功能减退的 15 名患者(AP, $n=10$; 安慰剂, $n=5$)。

AP 减弱肾 iNOS 诱导

在基线时间和干预后最初 24 小时内的 3 个独立时间点的尿样品中分离细胞沉淀物, 使用 Q-PCR (或定量 RT-PCR) 来测定细胞沉淀物中 iNOS mRNA 的水平。如前所述(6), 参照相对于管家基因 GAPDH ($C_T = 23.6 \pm 0.3$, $\delta C_T = 12.1 \pm 0.1$) 的平均循环域(C_T) 值, 对照健康志愿者($n=4$, 数据未显示)中 iNOS 的相对表达进行标准化, 并设为 1。与对照相比, 患者组中 iNOS 表达被诱

导提高了 42 倍，且施用 AP 在最初 24 小时内将此诱导降低了 $80\pm 5\%$ 。与此相反，与基准水平相比，安慰剂处理的患者在治疗后的最初 24 小时内 iNOS 水平进一步增加($840\pm 85\%$ ，图 1A)。

血液中 NO 代谢物在 AP 和安慰剂处理的患者之间未有显著差异(数据未显示)。然而，在施用 AP 24 小时后，NO 代谢物的尿排泄降低了 $80\% [-85-75]$ ，从基准的 $227 [166-531]$ 降至 $41 [28-84]$ $\mu\text{mol}/10\text{mmol}$ 肌酸酐, ($P<0.05$)。在安慰剂治疗后，尿 NO 代谢物的含量进一步增加了 $70\% [45-570]$ (从 $81 [64-419]$ 增至 $628 [65-1479]$ $\mu\text{mol}/10 \text{ mmol}$ 肌酸酐, $P<0.05$)。此外，在 AP 治疗的患者中累积的尿 NO 代谢物排泄显著降低(图 1B)。

AP 减弱肾损伤

在 28 天的随访期患者均不需要肾替代治疗。如表 1 所示，全部患者显示出带有轻微蛋白尿症的肾功能损伤。如表 1 所示，在最初 24 小时，血浆肌酸酐清除率在 AP 治疗的患者中改善了 $45\% [30-180]$ ，而在安慰剂治疗的病人中恶化了 $25\% [-35- -15]$ 。在随访期，中间血浆肌酸酐水平在 AP 治疗的患者中显著下降，而在安慰剂治疗的患者中未观察到显著变化(表 1)。

在全部患者中，GSTA1-I 和 GSTP1-I 的尿排泄均升高，分别表明近端和末梢的肾小管损伤。在最初 24 小时，与安慰剂治疗的患者中增加 $200\% [45-525]$ (从 $26.9 [15.2-32.8]$ 增至 $38.9 [33.0-205.8]$, $P<0.05$) 相比，在 AP 治疗的患者尿中 GSTA1-I 的含量降低了 70% ，从 $32.7 [11.5-131.1]$ 降至 $6.5 [5.4-15.7]$ $\mu\text{g}/10 \text{ mmol}$ 肌酸酐($P<0.05$)。在 AP 治疗的患者中累积的尿 GSTA1-IA 排泄显著降低(图 1C)。此外，基于 AP 治疗，尿 GSTP1-I 排泄的增加有减缓的趋势(在 24 小时后从基准的 $22.7 [13.6-41.3]$ 至 $11.9 [8.5-82.5]$ $\mu\text{g}/10 \text{ mmol}$ 肌酸酐, $P=0.072$)。然而，在治疗的最初 24 小时，在两个治疗组间未观察到累积的尿 GSTP1-I 排泄的显著差异(图 1D)。

实施例 2: AP 对庆大霉素引起的肾衰竭的影响

庆大霉素($120 \text{ mg}/\text{kg}\times 7$)引起严重的大鼠肾损伤，表现为多尿症、蛋白尿

症、电解质排泄降低、 FE_{Na} 增加、酶尿(NAG)、血清肌酸酐和 BUN 升高、肌酸酐清除率减少、肾小球滤过率的测量值和肾重量增加。

每日两次 AP 注射(100 U/kg 每天两次 × 14) (第一次给药在每天施用庆大霉素之前)导致血清肌酸酐(图 2)和 BUN (图 3)水平降低, 以及尿中肌酸酐排泄的增加(图 4)。这些改善是 AP 治疗所导致的肌酸酐清除率增加的结果(图 5)。在此实施例中, 在 BUN、 S_{Cr} 、 C_{Cr} 和 U_{Cr} 方面, AP (100 U/kg IV 每天两次 × 7)显示出对庆大霉素引起的大鼠肾毒性具有保护作用。

实施例 3: AP 对顺铂引起的肾衰竭的影响

顺铂(7.5 mg/kg, 经腹腔)引起肾功能减退, 体现为以下参数: 多尿症、蛋白尿症、电解质排泄降低、血清肌酸酐和 BUN 升高、肌酸酐清除率减少、肾小球滤过率的测量值。

在此实施例中, AP (200 U/kg × 5, 经静脉)显示出保护大鼠免于产生顺铂引起的蛋白尿症(图 6)(测定此模型中肾小管损伤的方式), 并改善内源性肌酸酐清除率。

实施例 4: AP 对患有肾衰竭的败血症患者的影响

患者

将 36 名败血症患者随机分配进行安慰剂(n=11)或 AP (n=25)治疗, 并分析血清肌酸酐水平、对肾替代治疗的需要和死亡率。此外, 对在基线时间表现出肾衰竭的小组(安慰剂 n=5; AP n=11)进行这些结果的分析。

血清肌酸酐

在基线时间和干预后 12 小时、24 小时和 48 小时测定血清肌酸酐水平。图 8 显示了败血症患者组在基线时间血清肌酸酐水平增加, 说明肾功能减退。图 8 还显示了 AP 能够在治疗开始后 48 小时内降低血清肌酸酐水平, 而安慰剂治疗则不能。如果分析仅局限于表现出肾衰竭的患者(定义为血清肌酸酐 $> 150 \mu\text{mol/L}$, 或在基线时间已经过肾替代治疗), 则此效果会更加

显著(图 9)。因此,从此实施例中可以得出 AP 能够改善败血症患者的肾功能,且此影响在表现出肾衰竭的败血症患者中更加显著。

肾替代治疗

表 II 显示了在研究中所包括的全部患者中,36%的安慰剂治疗患者需要肾替代治疗(透析),然而 24%的 AP 治疗的患者需要此治疗。在基线时间已表现出肾衰竭的患者中,此比例分别为 80%和 27%。因此,此实施例中显示的数据表明 AP 能够降低表现出肾衰竭的败血症患者对透析的需要。

死亡率

在 90 天观察期中,在研究的群体中全因死亡率是 28% (表 II)。AP 治疗的死亡率(24%)相对安慰剂治疗的死亡率(36%)略有优势。然而,在败血症中,肾衰竭是最常见的末梢器官衰竭,在此研究中体现为表现出肾衰竭的小组中死亡率较高(肾衰竭组为 36%,而全部患者中为 28%)。令人感兴趣的是,在肾衰竭组中 AP 对降低死亡率的影响更加显著(安慰剂组为 60%,AP 治疗组为 27%)。

在此实施例中,显示出 AP 治疗(200 U/kg/24 h)改善表现出肾功能减退的败血症患者的肾功能,因此降低死亡率和对肾替代治疗的需要。

表 I: 肾功能

肾功能参数	时间	AP (n=10)	安慰剂(n=5)
总尿量(ml)	0-24 小时	1876 (940-2227)	1470 (1115-2775)
蛋白质排泄(mg/天)	0-24 小时	454 (323-533)	447 (414-769)
肌酸酐清除率 (ml/分钟)	基线	54 (24-48)	80 (77-91)
	24 小时	76 (25-101)*	59 (45-59)
血清肌酸酐 ($\mu\text{mol/l}$)	基线	91 (73-138)	99 (86-114)
	1 天	83 (58-135) ^{##}	125 (71-129)
	7 天	70 (60-90) ^{##}	106 (73-141)

数据以中值表示(25-75%范围)。与安慰剂组相比有显著差异, * $P < 0.05$, 或与基线时间相比, ^{##} $P < 0.01$ 。

表 II: 死亡率和肾替代治疗

	安慰剂 n (%)	活性 n (%)	全部 n (%)
全部患者	11 (31)	25 (69)	36 (100)
死亡率	4 (36)	6 (24)	10 (28)
需要 RRT	4 (36)	6 (24)	10 (28)
败血症伴有肾衰竭*	5 (45)	11 (44)	16 (44)
死亡率	3 (60)	3 (27)	6 (38)
需要 RRT	4 (80)	3 (27)	7 (44)

RRT: 肾替代治疗

*在基线时间血清肌酸酐 $>150\mu\text{mol/L}$ 或在基线时间已经过 RRT

参考文献

1. Hendrix PG, Hoylaerts MF, Nouwen EJ and De Broe ME. Enzyme immunoassay of human placental and germ-cell alkaline phosphatase in serum. Clin Chem 1990;36(10):1793-1799.
2. Le Du M-H, Millan JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. J Biol Chem 2002;51:49808-49814.
6. Heemskerk S, Pickkers P, Bouw MP, Draisma A, van der Hoeven JG, Peters WH et al. Up-regulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. Clin J Am Soc Nephrol 2006; 1:853-62.
18. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin.Chem. 1995;41(6 Pt 1):892-6.
19. Mulder TP, Peters WH, Court DA, Jansen JB. Sandwich ELISA for glutathione S-transferase Alpha 1-1: plasma concentrations in controls and in patients with gastrointestinal disorders. Clin.Chem. 1996;42(3):416-9.
20. Mulder TP, Peters WH, Wobbes T, Witteman BJ, Jansen JB. Measurement of glutathione S-transferase Pl-I in plasma: pitfalls and

significance of screening and follow-up of patients with gastrointestinal carcinoma. *Cancer* 1997;80(5):873-80.

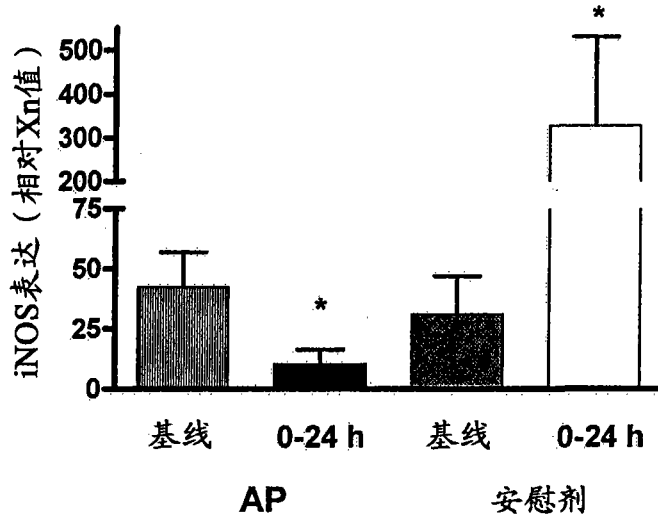


图 1 (A)

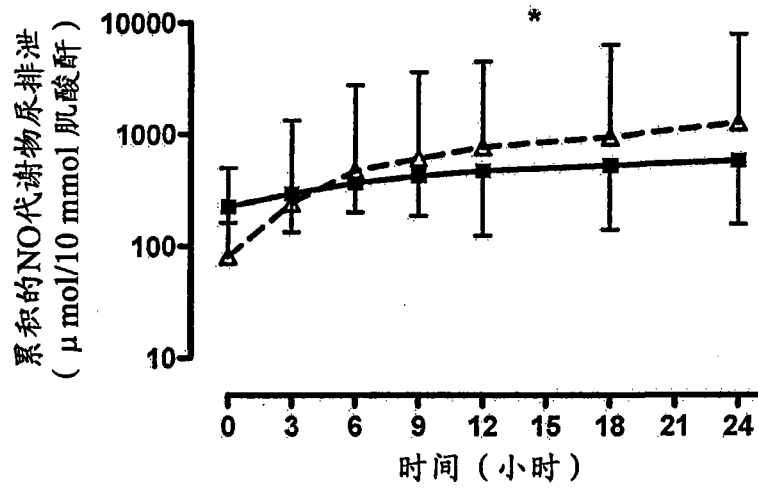


图 1 (B)

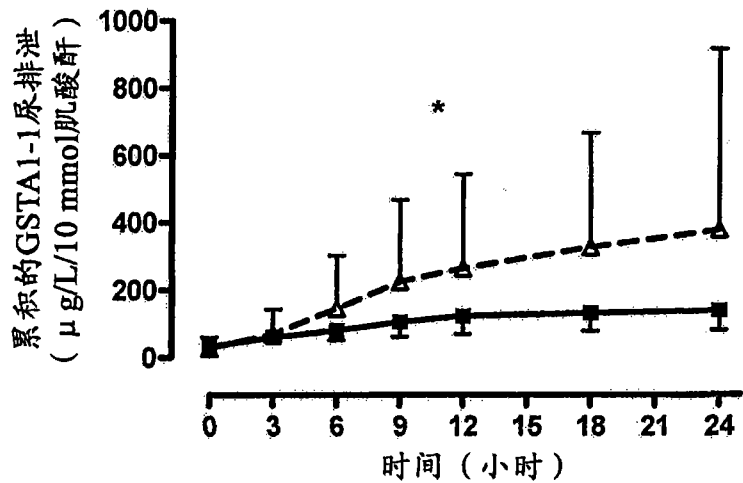


图 1 (C)

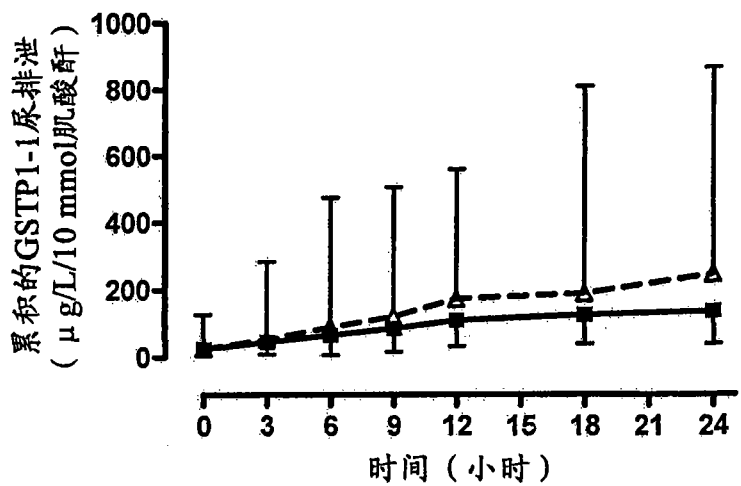


图 1 (D)

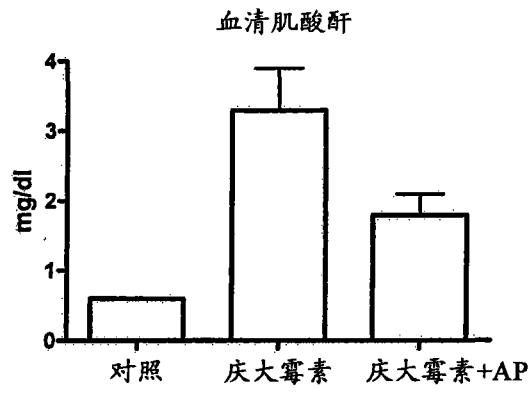


图 2

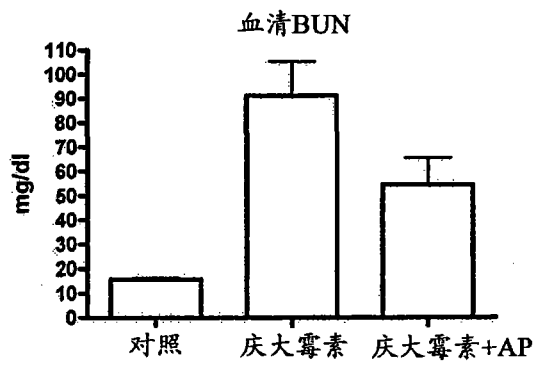


图 3

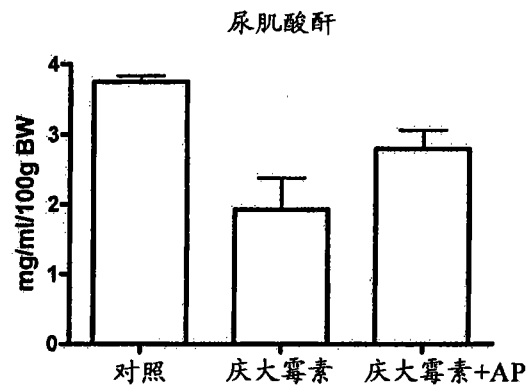


图 4

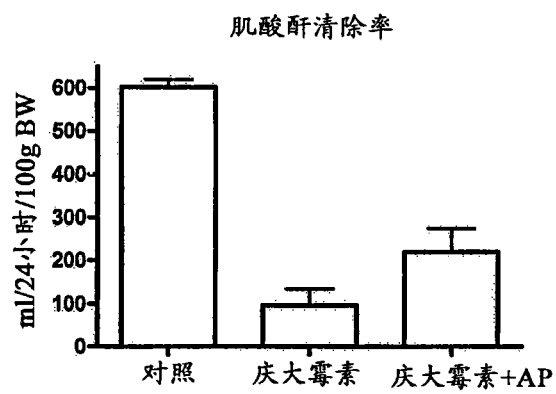


图 5

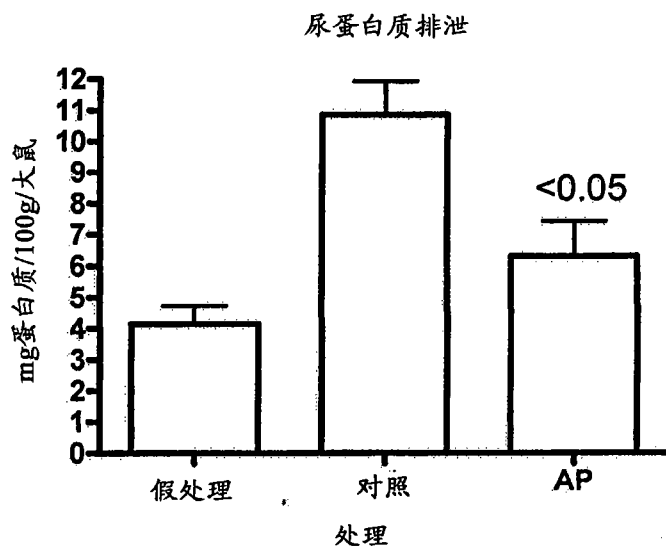


图 6

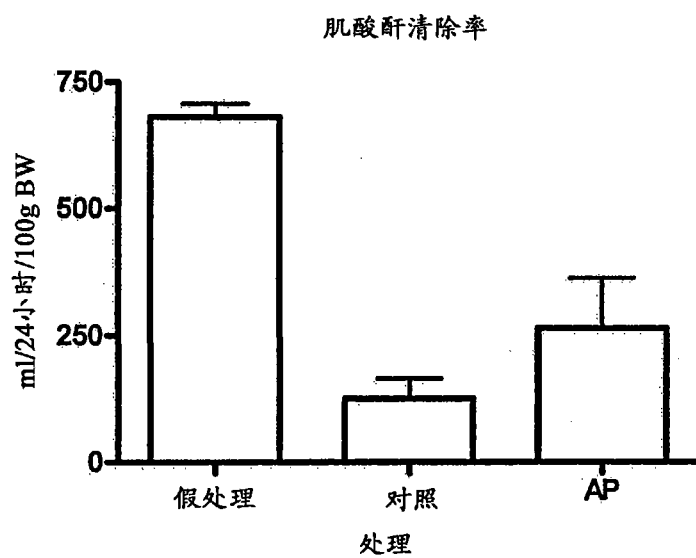


图 7

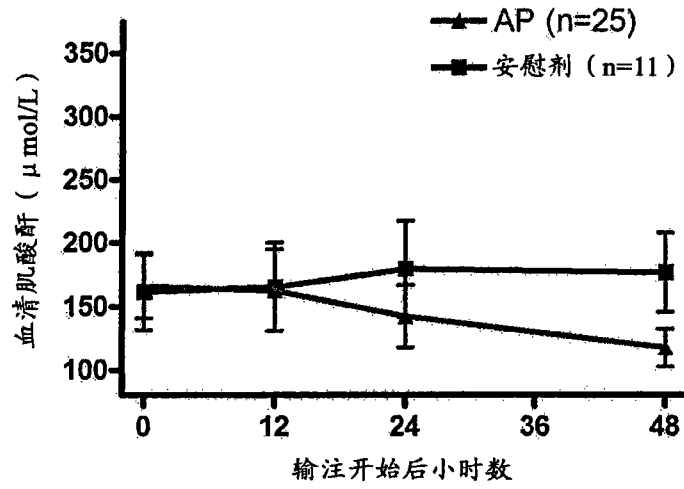


图 8

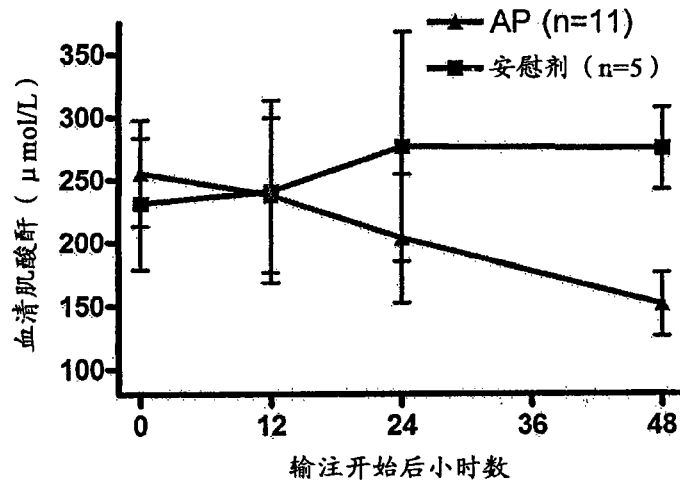


图 9

NP_001623 ALPP (胎盘)

1 IIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQPAQTAANKLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 RQGARYVWNRTTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFLLFVEGGRIDHGHHESTRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QOQSAVELDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 GTTDAAHPGRSVVPALLPLLGLAGTLLLLLETATAP 513

AAI32679 ALPI (肠)

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
 61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSHTYNVDRQVPDSAAATATAYLCGVKANFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMGTPDPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGAWYVWNRTTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLLTADHSH 360
 361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAODSKAYTSILYGNPGYVENSQVSRPDVNESESGSPDYQ 420
 421 QQAAVPLSSETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 CTTDAHPVAASLPLLGLAGTLLLLGASAAP 509

P10696 GCAP (生殖细胞或胎盘样)

1 IIPVEEENPDFWNRQAAEALGAAKKLQPAQTAANKLII FLGDGMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNSVDKHPDSGATATAYLCGVKGNFQTI GLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGYAHVNRNWYSADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGARYVWNRTTELLQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALLLS 300
 301 RNPRGFLLFVEGGRIDHGHHESTRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QOQSAVPLDGETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLAPRA 480
 481 GTTDAAHPGPSVVPALLPLLGLAGTLLLLGTATAP 513

AAI10910 (组织非特异性)

1 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNNTVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQL 60
 61 HHNPGETRLEMDKFFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERS 120
 121 RCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGI VTTTRVNHATPSAAYAHSAARDWYSDNEMPPEAL 180
 181 SQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKT DVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWK 240
 241 SFKPRHKHSHFIWNRTTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRRNVTDPSLSEMVVAI 300
 301 QILRKNPKGFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI GOAGSLTSSSEDTLVVTA 360
 361 DHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTKKPEATILYGNPGYKVVGGERENVSMDVYA 420
 421 HNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGH 480
 481 APASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF 507

具有PLAP的花冠结构域的可分泌ALPI(嵌合体)

1 VIPAEENPAFWNRQAAEALDAAKKLQPIQKVAKNLILFLGDGLGVPTVTATRILKGQKN 60
 61 GKLGPETPLAMDRFPYLALSKTYNVDRQVPSAATATAYLCGVKANFQTIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADMPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMTDPPEYPADASQNGIRLDGKNLVQEWLAK 240
 241 HQGAWYVWNRTELMQASLDQSVTHLMGLFEPGDTKYEIHRDPTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHEGVAYQALTEAVMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYR 420
 421 QSAVPLDEETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQSFVAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 CTTD 484

具有ALPI的花冠结构域的可分泌ALPP(嵌合体)

1 IIPVEENPDFWNREAAEALGAAKKLQPAQTAANKLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKK 60
 61 DKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDRQVPSAATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQ 120
 121 CNTTRGNEVISVMNRAKQAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPASARQ 180
 181 EGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTDPPEYPDDYSQGGTRLGKNLVQEWLAK 240
 241 RQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLS 300
 301 RNPRGFYLFVEGGRIDHGHHESTRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLTLVTADHSH 360
 361 VFSFGGYTLRGSSIFGLAPSKAQDSKAYTSILYGNPGYVFNNSGVRPDVNESESGSPDYQ 420
 421 QAAVPLSSETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA 480
 481 GTTD 484

图 10