



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03818783.3

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1688715A

[22] 申请日 2003.7.3 [21] 申请号 03818783.3

[30] 优先权

[32] 2002.7.4 [33] GB [31] 0215509.1

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007111 2003.7.3

[87] 国际公布 WO2004/005544 英 2004.1.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.4

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 S-D·希布 O·格勒内

G·英伯特 J·克伦

F·施泰特勒 C·D·沃尔夫冈

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 10 页 说明书 42 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于确定肾中毒的标记基因

[57] 摘要

本申请公开了在肾中毒出现前以及用组织病理学检查证实前快速准确的读出肾中毒的方法。最终此方法应可用于初期的化合物筛选。为了根据预期的一般性肾毒性对新化合物进行表征和分级,鉴定的 12 种基因,即,钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT - K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α - 2u 和 C4,被分组并最终可以以试剂盒的形式利用高通量技术 PCR 进行评估。本申请还公布了用于鉴定在肾病治疗中有用的药剂的方法、用于监测肾病治疗效力的方法和包含所公布基因的序列的肾特异性载体,以及用于鉴定与包括肾功能在内的生物学过程相关的候选基因的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 确定个体肾中毒的方法, 包括:

a) 从所说个体获取身体样品,

b) 测定身体样品中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中一种或多种基因的基因表达水平, 获得第一套数值, 和

c) 将第一套数值与在和步骤 b) 相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较, 其中对于钙结合蛋白 - D28k 和/或 EGF 基因表达而言, 第一数值小于第二数值是步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感的一个指征, 和/或其中对于 KIM - 1、骨桥蛋白和/或 Clusterin 基因表达而言, 第一数值大于第二数值是步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感的一个指征。

2. 权利要求 1 的方法, 其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中的至少 2 种或 3 种基因。

3. 确定个体肾中毒的方法, 包括:

a) 从所说个体获取身体样品,

b) 测定身体样品中相应于 α -2u 球蛋白相关蛋白质 (α -2u)、补体成分 4 (C4)、血管内皮生长因子 (VEGF)、肾特异性有机阴离子转运蛋白 - K1 (OAT-K1)、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和 Podocin 中一种或多种基因的基因表达水平, 获得第一套数值, 和

c) 将第一套数值与在和步骤 b) 相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较, 其中对于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和/或 Podocin 基因表达而言, 第一数值小于第二数值, 指示步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感, 和/或其中对于 α -2u 和/或 C4 基因表达而言, 第一数值大于第二数值, 指示步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

4. 权利要求3的方法,其中在步骤b)和c)中使用 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

5. 权利要求 1 或 3 的方法,其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

6. 在接受细胞毒性剂处理的个体中确定肾中毒的方法,包括:

a) 从所说个体获取身体样品,

b) 测定身体样品中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、 α -2u、C4、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和 Podocin 中一种或多种基因的基因表达水平,获得第一套数值,和

c) 将第一套数值与在和步骤 b) 相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较,其中对于钙结合蛋白 - D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和/或 Podocin 基因表达而言,第一数值小于第二数值,指示步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感,和/或其中对于 KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u 和/或 C4 基因表达而言,第一数值大于第二数值,指示步骤 a) 的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

7. 权利要求 6 的方法,其中细胞毒性剂选自环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类和三甲双酮。

8. 权利要求 6 或 7 的方法,其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项的方法,其中步骤 b) 的个体身体样品中钙结合蛋白 - D28k 的 mRNA 表达水平低于 $5.30E+08$ 、KIM - 1 的 mRNA 表达水平高于 $1.50E+07$ 、EGF 的 mRNA 表达水平低于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的 mRNA 表达水平高于 $1.40E+08$ 、Clusterin 的 mRNA 表达水平高于 $1.90E+09$ 和/或 Podocin 的 mRNA 表达水平低于 $3.00E+06$,表明个体患有

肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感，其中 mRNA 的表达水平以绝对值表示。

10. 权利要求 1 至 8 中任一项的方法，其中 EGF 的至少 4 倍抑制、VEGF 的至少 2 倍抑制、OAT-K1 的至少 2 倍抑制、醛缩酶 A 的至少 20 倍抑制和/或醛缩酶 B 的至少 2 倍抑制，和/或其中 KIM-1 的至少 20 倍诱导、OPN 的至少 3 倍诱导、Clusterin 的至少 7 倍诱导、 α -2u 的至少 50 倍诱导和/或 C4 的至少 3 倍诱导，指示所说个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的方法，其中通过检测相应于基因表达产物的蛋白质的存在评估基因表达的水平。

12. 用于确定个体中的肾中毒是否对治疗有反应的检测法，包括步骤：对来自接受药用可接受制剂治疗肾中毒的个体的身体样品实施权利要求 1 至 11 中任一项所述的 a)、b) 和 c) 步骤并确定个体对药物治疗的反应性。

13. 治疗个体肾中毒的方法，包括步骤：对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，所述化合物调节肾脏内钙结合蛋白 - D28k、KIM-1、OPN、EGF 和/或 Clusterin 中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使肾中毒的至少一种症状得到改善。

14. 权利要求 13 的方法，其中在用调制化合物治疗后，按照权利要求 1、2 或 5 至 8 之任一项的方法测定个体的肾中毒，其中个体身体样品中的基因 mRNA 表达水平为钙结合蛋白 - D28k 的 mRNA 表达水平高于 $5.30E+08$ 、KIM-1 的 mRNA 表达水平低于 $1.50E+07$ 、EGF 的 mRNA 表达水平高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的 mRNA 表达水平低于 $1.40E+08$ 和/或 Clusterin 的 mRNA 表达水平低于 $1.90E+09$ ，表明肾中毒的至少一种症状得到改善，其中基因的 mRNA 表达水平以绝对值表示。

15. 治疗个体肾中毒的方法，包括步骤：对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，所述化合物调节肾脏内 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和/或 C4 中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使肾中毒的至少一种症状得到改善。

16. 权利要求 13 或 15 的方法, 其中在用调制化合物治疗后, 按照权利要求 1 至 11 之任一项的方法测定个体的肾中毒, 其中小于 4 倍的 EGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 VEGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 OAT-K1 基因表达阻抑、小于 20 倍的醛缩酶 A 基因表达阻抑和/或小于 2 倍的醛缩酶 B 基因表达阻抑, 和/或小于 20 倍的 KIM-1 基因表达诱导、小于 3 倍的 OPN 基因表达诱导、小于 7 倍的 Clusterin 基因表达诱导、小于 50 倍的 α -2u 基因表达诱导和/或小于 3 倍的 C4 基因表达诱导, 表明肾中毒的至少一种症状得以改善。

17. 在接受细胞毒性剂处理的个体中治疗肾中毒的方法, 包括步骤: 对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物, 所述化合物调节肾脏内钙结合蛋白 - D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和/或 C4 中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性, 从而使肾中毒的至少一种症状得以改善。

18. 权利要求 17 的方法, 其中细胞毒性剂选自环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类和三甲双酮。

19. 鉴定用于治疗肾中毒的候选药剂的方法, 包括如下步骤:

- a) 将中毒的肾组织的样品与候选药剂接触,
- b) 测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM-1、OPN、EGF 和 Clusterin 中一种或多种基因的基因表达水平, 得到第一套数值, 和
- c) 将第一套数值与在步骤 b) 相同的条件下对未受候选药剂诱导的中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较, 其中对于钙结合蛋白 - D28k 和/或 EGF 基因表达而言, 第一数值实质上高于第二数值, 指示候选药剂改善肾中毒症状, 和/或其中对于 KIM-1、骨桥蛋白和/或 Clusterin 基因表达而言, 第一数值实质上小于第二数值, 指示候选药剂改善肾中毒症状。

20. 权利要求 19 的方法, 其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM-1、OPN、EGF 和 Clusterin 中的至少 2 种或 3 种基因。

21. 鉴定用于治疗肾中毒的候选药剂的方法, 包括如下步骤:

a) 将中毒的肾组织的样品与候选药剂接触,

b) 测定肾组织中相应于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中一种或多种基因的基因表达水平, 得到第一套数值, 和

c) 将第一套数值与在步骤 b) 相同的条件下对未受候选药剂诱导的中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较, 其中对于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和/或 Podocin 基因表达而言, 第一数值实质上高于第二数值, 指示候选药剂改善肾中毒症状, 和/或其中对于 α -2u 和/或 C4 基因表达而言, 第一数值实质上低于第二数值, 指示候选药剂改善肾中毒症状。

22. 权利要求 21 的方法, 其中在步骤 b) 和 c) 中使用 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

23. 权利要求 19 或 21 的方法, 其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

24. 权利要求 19、20 或 23 的方法, 其中中毒肾组织中 mRNA 基因表达水平为钙结合蛋白 - D28k 的 mRNA 表达水平高于 $5.30E+08$ 、KIM - 1 的 mRNA 表达水平低于 $1.50E+07$ 、EGF 的 mRNA 表达水平高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的 mRNA 表达水平低于 $1.40E+08$ 、Clusterin 的 mRNA 表达水平低于 $1.90E+09$ 和/或 Podocin 的 mRNA 表达水平高于 $3.00E+06$, 指示候选药剂改善肾中毒, 其中 mRNA 基因表达水平以绝对值表示。

25. 权利要求 19 至 23 中任一项的方法, 其中小于 4 倍的 EGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 VEGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 OAT-K1 基因表达阻抑、小于 20 倍的醛缩酶 A 基因表达阻抑和/或小于 2 倍的醛缩酶 B 基因表达阻抑, 和/或小于 20 倍的 KIM - 1 基因表达诱导、小于 3 倍的 OPN 基因表达诱导、小于 7 倍的 Clusterin 基因表达诱导、小于 50 倍的 α -2u 基因表达诱导和/或小于 3 倍的 C4 基因表达诱导, 是候选药剂改善肾中毒的一个指征。

26. 权利要求 19 至 25 中任一项的方法,其中通过检测相应于基因表达产物的蛋白质的存在评估基因表达的水平。

27. 用于鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法,包括以下步骤:

a) 使未中毒的肾组织的样品与候选药剂接触,

b) 测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中一种或多种基因的基因表达水平,得到第一套数值;和

c) 将第一套数值与在和步骤 b) 相同的条件下对未中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较,其中对于钙结合蛋白 - D28k 和/或 EGF 基因表达而言,第一数值等于或大于第二数值,指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒,和/或其中对于 KIM - 1、骨桥蛋白和/或 Clusterin 基因表达而言,第一数值等于或小于第二数值,指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒。

28. 权利要求 27 的方法,其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中的至少 2 种或 3 种基因。

29. 用于鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法,包括以下步骤:

a) 使未中毒的肾组织的样品与候选药剂接触,

b) 测定肾组织中相应于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中一种或多种基因的基因表达水平,得到第一套数值;和

c) 将第一套数值与在和步骤 b) 相同的条件下对未中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较,其中对于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和/或 Podocin 基因表达而言,第一数值等于或大于第二数值,指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒,和/或其中对于 α -2u 和/或 C4 基因表达而言,第一数值等于或小于第二数值,指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒。

30. 权利要求 29 的方法,其中在步骤 b) 和 c) 中使用 VEGF、OAT-K1、

醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

31. 权利要求 27 或 29 的方法，其中在步骤 b) 和 c) 中使用钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中的至少 2 种或 3 种基因。

32. 权利要求 27、28 或 31 的方法，其中在未中毒肾组织中测定到钙结合蛋白 - D28k 的 mRNA 表达水平高于 $5.30E+08$ 、KIM - 1 的 mRNA 表达水平低于 $1.50E+07$ 、EGF 的 mRNA 表达水平高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的 mRNA 表达水平低于 $1.40E+08$ 、Clusterin 的 mRNA 表达水平低于 $1.90E+09$ 和/或 Podocin 的 mRNA 表达水平高于 $3.00E+06$ ，是候选药剂不会引起或诱发肾中毒的一个指征，其中 mRNA 表达水平以绝对值表示。

33. 权利要求 27 至 31 之任一项的方法，其中与第二数值相比，小于 4 倍的 EGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 VEGF 基因表达阻抑、小于 2 倍的 OAT-K1 基因表达阻抑、小于 20 倍的醛缩酶 A 基因表达阻抑和/或小于 2 倍的醛缩酶 B 基因表达阻抑，和/或小于 20 倍的 KIM - 1 基因表达诱导、小于 3 倍的 OPN 基因表达诱导、小于 7 倍的 Clusterin 基因表达诱导、小于 50 倍的 α -2u 基因表达诱导和/或小于 3 倍的 C4 基因表达诱导，是候选药剂不会引起或诱发肾中毒的一个指征。

34. 权利要求 27 至 33 之任一项的方法，其中通过检测相应于基因表达产物的蛋白质的存在，评估基因表达的水平。

35. 权利要求 27 至 34 之任一项的方法，其中所述方法体外实施，且中毒肾组织获自在细胞毒性条件下与细胞毒性剂接触的培养肾组织。

36. 权利要求 27 至 35 之任一项的方法，其中中毒肾组织是患肾中毒的个体的肾脏样品，所说的样品具有矿化损伤、纤维化损伤、小管损伤(tubular damages)、浸润损伤、坏死损伤或任何其它类型的导致肾功能失调的损伤。

37. 比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法，包括以下步骤：

a) 将未中毒的肾组织的样品与第一候选药物接触，并测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值；和

b) 将未中毒的肾组织的样品与第二候选药物接触, 并测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin 中一种或多种基因的表达水平, 得到第二套数值; 和

c) 比较第一套数值和第二套数值, 其中若对于钙结合蛋白 - D28k 和/或 EGF 基因表达而言, 第一数值实质上小于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾具有较小的细胞毒性, 和/或其中若对于 KIM - 1、骨桥蛋白和/或 Clusterin 基因表达而言, 第一数据实质上大于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾具有较小的细胞毒性。

38. 比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法, 包括以下步骤:

a) 将未中毒的肾组织的样品与第一候选药物接触, 并测定肾组织中相应于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中一种或多种基因的表达水平, 得到第一套数值; 和

b) 将未中毒的肾组织的样品与第二候选药物接触, 并测定肾组织中相应于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中一种或多种基因的表达水平, 得到第二套数值; 和

c) 比较第一套数值和第二套数值, 其中若对于 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 和/或 Podocin 基因表达而言, 第一数据实质上小于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾具有较小的细胞毒性, 和/或其中若对于 α -2u 和/或 C4 基因表达而言, 第一数值实质上大于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾具有较小的细胞毒性。

39. 前述权利要求的方法, 其中通过选自以下的技术检测 mRNA 的表达水平: RNA 印迹分析、逆转录 PCR 和实时定量 PCR、分支 DNA、基于核酸序列的扩增 (NASBA)、转录介导的扩增、核糖酶保护试验或者目前可用或将来可用于基因表达分析的任何其它方法。

40. 基因多态性在肾中毒诊断中的用途, 其中所述基因选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF 和 Clusterin。

41. 基因多态性在肾中毒诊断中的用途, 其中所述基因选自 VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4。

42. 基因多态性在肾中毒诊断中的用途, 其中所述基因选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4。

43. 诊断个体肾中毒的试剂盒, 其包含用于测定相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中一种或多种标记基因的基因表达水平的手段。

44. 权利要求 43 的试剂盒, 其中个体接受细胞毒性剂处理。

45. 权利要求 43 或 44 的试剂盒, 其中可以测定钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 中至少 2 种或 3 种标记基因的表达。

46. 权利要求 43 至 45 之任一项的试剂盒, 其中用于测定基因表达水平的手段包括特异于标记基因的一种或多种寡核苷酸。

47. 权利要求 43 至 46 之任一项的试剂盒, 其中用于测定基因表达水平的手段包括选自如下的方法: RNA 印迹分析、逆转录 PCR 和实时定量 PCR、分支 DNA、基于核酸序列的扩增 (NASBA)、转录介导的扩增、核糖酶保护试验和微阵列。

48. 权利要求 43 至 45 之任一项的试剂盒, 其中用于测定基因表达水平的手段包括至少一种特异于选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 的标记基因编码的蛋白质的抗体。

49. 权利要求 48 的试剂盒, 其中抗体选自: 多克隆抗体、单克隆抗体、人源化或嵌合抗体、和足以与标记物结合的生物学功能性抗体片段。

50. 权利要求 48 或 49 的试剂盒, 其中用于测定基因表达水平的手段包括免疫测定法。

51. 权利要求 43 至 50 之任一项的试剂盒, 还包含用于获取个体身体样品的手段。

52. 权利要求 43 至 51 之任一项的试剂盒, 还包含容器, 所述容器适于

容纳用于测定基因表达水平的手段和个体身体样品。

53. 权利要求 43 至 52 之任一项的试剂盒, 还包含使用和解释试剂盒结果的说明书。

54. 用于鉴定与包括肾功能、肾中毒和/或肾疾患在内的生物学过程相关的候选基因的方法, 包括以下步骤:

a) 用选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 的至少一种标记物的基因表达水平作为输入值进行运算以获得至少一个数值 I;

b) 将 a) 中所获得的至少一个数值 I 与针对候选基因获得的数值 II 进行比较。

55. 权利要求 54 的方法, 还包括步骤 c), 其中若步骤 b) 中获得的数值 I 以预定关系与数值 II 相关, 则候选基因与所述生物学过程相关。

56. 权利要求 54 或 55 的方法, 其中所述预定关系是 1 或更大。

57. 权利要求 54 或 55 的方法, 其中所述预定关系是 1 或更小。

58. 权利要求 54 至 57 之任一项的方法, 其中选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B、Podocin、 α -2u 和 C4 的至少一种标记物的基因表达水平从诸如肾组织、血液或尿液等不同个体身体样品或从诸如肾细胞系等细胞系获得。

59. 权利要求 54 至 58 之任一项的方法, 其中身体样品或细胞系已与细胞毒性剂接触。

60. 权利要求 54 至 59 之任一项的方法, 其中所述方法是计算机可执行的方法。

用于确定肾中毒的标记基因

发明领域

本发明涉及肾疾患（即，肾疾病、肾损伤或肾中毒）的监测、预后、诊断和/或治疗方法，还涉及诊断肾中毒的试剂盒。具体而言，本发明涉及利用基因表达分析来检测肾疾患和/或帮助选择或监测各种肾疾患疗法的效力。

发明背景

研究个体在应答外源化合物或药物时所涉及的DNA/RNA水平的遗传和基因组因子，将允许选择安全的药剂（如，药物）用于预防性或治疗性治疗中。可以在个体内监测对本发明标记的表达有刺激或抑制作用的因子或调制剂来评估在患者中的肾毒性。治疗物代谢的差异可通过改变药用活性药物的剂量和血液浓度之间的关系导致严重毒性或治疗失败。这样的药物基因组学可进一步用于确定合适的剂量和治疗方案。因此，可以测定个体中本发明标记的表达水平从而选择适当的安全药剂用于对个体进行治疗性或预防性处理。

药理遗传学（pharmacogenetic）涉及由个体体内的药物处置和作用的差异而造成的药物效力或毒性在临床上的显著不同。参阅，如，Linder MW, *Clin Chem* 1997, 卷43（2）：254-266。通常，可以区分两种类型的药理遗传学状态。以改变药物对身体的作用途径的单一因子形式传递的遗传状态被称为“改变的药物作用”。以改变身体对药物的作用途径的单一因子形式传递的遗传状态被称为“改变的药物代谢”。这些药理遗传状态可以作为稀有的缺陷或常见的多态性发生。

可以测定个体中标记的表达水平或功能水平从而选择适当的药剂用于

对个体进行治疗或预防。将此知识用于剂量或药物选择时可避免不利的反应或治疗失败，由此增强用调制标记物表达的调制剂治疗时的治疗或预防效力。

钙结合蛋白 D-28k (calbindin D-28k)是EF-手大家族的钙结合蛋白质成员。它存在于所有类型的脊椎动物中和各种组织中。钙结合蛋白 D-28k被推测具有钙转运分子的功能，该分子可以促进钙通过细胞扩散并可以充当细胞内钙缓冲剂以维持低于毒性水平的离子化钙 (Feher JJ, *Am J Physiol* 1983, 卷44: C303 - C307)。

许多研究者已证明了在肾中最高的钙结合蛋白 D-28k量出现在远端小管,这与远端小管作为钙吸收位点的作用相关(Rhoten WB, 等, *Anat Rec* 1990, 卷227: 145 - 151; Borke JL, 等, *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1989, 卷257: F842 - F849 26)。此外,已证明的还有,随年龄增长钙结合蛋白 D-28k表达的降低可以促成肠和肾中与年龄相关的Ca⁺转运的减少 (Armbrecht HJ, 等, *Endocrinology* 1989, 卷125: 2950 - 2956)。据文献中报道,环孢菌素A-诱导的大鼠肾中钙结合蛋白 - D28k蛋白质的减少是其mRNA减少的结果 (Grenet O, 等, *Biochem Pharmacol* 1998, 卷55(7): 1131 - 1133; Grenet O等, *Biochem Pharmacol* 2000, 卷59(3): 267 - 272)。这意味着可通过PCR监测钙结合蛋白 - D28k mRNA的水平,以反应蛋白质的水平 (Steiner S等, *Biochem Pharmacol* 1996, 卷51(3): 253 - 258)。这些发现证实了钙结合蛋白 D-28k在肾脏的再吸收过程中具有重要作用这一假设。

肾脏损伤分子-1 (kidney injury molecular-1, KIM-1)是含有胞外6个半胱氨酸的免疫球蛋白结构域的I型膜蛋白。KIM-1 mRNA和蛋白质在正常肾中以低水平表达,但在缺血后的肾中却显著增加。KIM-1定位于再生的去分化近端小管上皮细胞,且在间质细胞中缺乏。缺血后肾的形态完整性和功能的恢复涉及KIM-1 (Ichimura T等, *J Biol Chem* 1998, 卷273: 4135 - 4142)。

骨桥蛋白 (osteopontin, OPN), 也称作分泌的磷蛋白1 (SPP1), 是

含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 细胞粘附基元的分泌的、高酸性且糖基化的磷蛋白。OPN最初在成骨细胞中鉴定且被证实具有结合羟磷灰石的能力且在骨吸收、矿化和钙化中起主要作用 (Reinholt FP, 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 卷87: 4473 - 4475)。随后证实了它还定位于钙化的动脉粥样硬化伤口处并被认为参与抑制平滑肌细胞的钙沉积 (Wada T等, *Circ Res* 1999, 卷84: 166 - 178)。此外, 还证实高OPN表达受活性形式的维生素D3调控 (Noda M等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 卷87: 9995 - 9999) 并且已在高细胞更新率的组织中发现OPN。OPN的上调已在数种肾损伤模型中被证实, 提示它有可能在组织重塑和修复中起作用 (Persy VP等, *Kidney Int* 1999, 卷56 (2): 601 - 611)。还发现骨桥蛋白是草酸钙尿石的主要成分 (Kohri K等, *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 卷184: 859 - 864)。此外, OPN高表达于倾向于形成尿石的大鼠的远端小管细胞中 (Kohri K等, *J Biol Chem* 1993, 卷268: 15180 - 15184)。从这些数据中形成这样一种假设, 即, 尿石的形成中涉及骨桥蛋白 (Kohri K等, *J Biol Chem* 1993, 卷268: 15180 - 15184)。

表皮生长因子 (EGF) 是一种小的多肽, 它属于可介导细胞生长、分化和急性期反应的一类分子。EGF mRNA主要在唾液腺和肾细胞中转录。在各种实验诱导形式的急性肾衰竭中, 肾EGF的mRNA和蛋白质水平显著下降并在长时期内保持低水平 (Price PM等, *Am J Physiol* 1995, 卷268 (4 pt2): F664-670)。EGF是重要的上皮促细胞分裂剂。此外, 已知EGF受体水平在正常大鼠肾成纤维细胞的密度依赖型生长调控中起重要作用 (Lahaye DH等, *FEBS Lett* 1999, 卷446 (2-3): 256 - 260)。EGF涉及急性肾损伤之后的内源性组织修复。当从外部施用给患实验性急性肾衰竭的实验室动物时, 此生长因子加速了肾功能的恢复和解剖学上小管完整性的修复 (Wang S和Hirschberg R, *Nephrol Dial Transplant* 1997, 卷12 (8): 1560 - 1563)。而且, EGF还被认为在肾缺血性损伤后肾小管的再生中 (Di Paolo S, 等, *Nephrol Dial Transplant* 1997, 卷12: 2687 - 2693) 和药物诱导的肾中毒后肾组织的修复中 (Morin NJ等, *Am J Physiol* 1992,

卷263: F806 - F811)起主要作用。EGF表达水平已显示出在有慢性排斥反应或药物诱导的肾中毒的肾移植患者中显著下降(Di Paolo S等, *Nephrol Dial Transplant* 1997, 卷12: 2687 - 2693)。此外,还报道了在环孢菌素A(CsA)处理后肾中EGF表达减少(Deng JT等, *Transplant Proc* 1994, 卷26(5): 2842 - 2844; Yang CW等, *Kidney Int* 2001, 卷60: 847 - 857)。

Clusterin, 也称为鞣酮-抑制型前列腺信使2(TRPM-2), 是组织损伤和/或重塑时在包括肾在内的许多器官中诱导的、普遍存在的一种分泌性糖蛋白, 已发现存在于肾小管的上皮管腔中(Jenne DE和Tschopp J, *Trends Biochem Sci* 1992, 卷14: 154 - 159)。它被认为涉及精子成熟、脂质转运(通过与载脂蛋白A-I形成高密度脂蛋白复合物而参与)、膜重塑、补体级联反应的抑制、神经变性和凋亡(Han B.H.等, *Nat Med* 2001, 卷7: 338 - 343; Wong P等, *J Biol Chem* 1993, 卷268, 5021 - 5031; Wong P等, *Eur J Biochem* 1994, 卷331: 917 - 925)。Clusterin是结合C5b-7并抑制膜攻击复合物C5b-9产生的可溶性补体调控蛋白质。在与C5b-9和免疫沉积物相关的人和实验性膜性肾病中已观察到Clusterin的肾小球沉积(Yamada K等, *Kidney Int* 2001, 卷59(1): 137 - 146)。据推测Clusterin对于受到肾损伤干扰的细胞相互作用具有保持作用(Silkensen JR, 等, *J Am Soc Nephrol* 1997, 卷8(2): 302 - 305)。此外,据报道CsA提高大鼠肾中Clusterin mRNA的水平(Darby IA等, *Exp Nephrol* 1995, 卷3(4): 234 - 239)。

α -2u球蛋白相关蛋白质(α -2u), 在人中也称为Lipocalin2(LCN2)或嗜中性粒细胞明胶酶相关Lipocalin(NGAL), 其储存于嗜中性粒细胞的颗粒中且与嗜中性粒细胞明胶酶相关(Kjeldsen L等, *J Biol Chem* 1993, 卷268: 10425 - 10432)。它与小的亲脂性物质结合并被认为在炎症和胚胎发生中起作用(Bundgaard JR等, *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 卷202: 1468 - 1475; Cowland JB和Borregaard N, *Genomics* 1997, 卷45: 17 - 23; Zerega B等, *Eur J Cell Biol* 2000, 卷79, 165 - 172)。

补体成分4(C4)由肾小管上皮细胞组成型表达且参与间质炎症的调

节 (Welch TR等, *Clin Immunol* 2001, 卷101, 366 - 370)。其表达的下降与系统性红斑狼疮患者中肾病活性的提高相关 (Ho A等, *Arthritis Rheum* 2001, 卷44: 2350 - 2357)。

血管内皮生长因子 (VEGF) 已知促进血管发生、增加血管的通透性, 可以用作单核细胞的趋化因子, 并且在糖尿病、伤口愈合、炎症反应和组织重塑中发挥作用 (Benjamin LE, *Am J Pathol* 2001, 卷158: 1181 - 1184)。

肾特异的有机阴离子转运蛋白 - K1 (organic anion transporter-k1, OAT-K1), 也称为溶质载体家族21成员a4 (SLC21A4), 与人的溶质载体家族21成员a3 (SLC21A3) 同源。OAT-K1表达于肾小管的基底外侧膜并参与肾脏将药物从血液中清除 (Saito H等, *J Biol Chem* 1996, 卷271: 20719 - 20725)。

醛缩酶A催化果糖 - 1, 6 - 二磷酸转变成甘油醛3 - 磷酸和二羟丙酮磷酸。它已被发现存在于发育的胚胎和成年肌肉中, 并在成年肝、肾和肠中被抑制。醛缩酶A缺乏与肌病和溶血性贫血相关 (Kishi H等, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987, 卷84: 8623 - 8627; Kreuder J等, *N Engl J Med* 1996, 卷334: 1100 - 1104)。

醛缩酶B具有与醛缩酶A相似的功能, 且二者是由不同基因编码的同工酶。不过, 与醛缩酶A不同的是, 醛缩酶B表达于成年肝、肾和肠中。醛缩酶B的缺乏与肾小管酸中毒和遗传性果糖不耐症相关 (Cross NC等, *Cell* 1988, 卷53: 881 - 885; Kranhold JF等, *Science* 1969, 卷165: 402 - 403; Mass RE等, *Am J Med Sci* 1966, 卷251: 516 - 523), 表明醛缩酶B可能在肾中毒中起作用。

Podocin, 也称为PDCN、SRN1、nephrosis 2 (特发的), 是表达于肾足细胞中的一种蛋白质, 在肾小球通透性的调控中发挥作用, 并可能作为质膜和细胞骨架之间的连接物。它几乎只表达于胎儿和成年肾小球的足细胞中。诸如podocin等足细胞蛋白质的突变会导致先天性病灶性节段肾小球硬化症 (Komatsuda A等, *Ren Fail.* 2003, 卷25 (1): 87 - 93) 且主要涉及类固醇抗性的肾病综合症。

尽管上述一些标记据推测与肾病相关，但是这些标记实际上从未单独或联合用作诊断剂，用于选择剂量或药物或确定肾病，且它们的表达水平也从未与各种肾疾患状况联系在一起。

然而，在肾病领域内，需要能够选择适当的治疗或预防性药剂、预测个体的药物反应性表型以及为了避免副反应或治疗失败而进行剂量或药物的选择。

环孢菌素A (CsA; Neoral[®]) 是过去15年在器官移植中用于预防移植排斥的一种特征性免疫抑制剂。不过，CsA已显示出会诱导肾中毒，从而导致肾移植患者中慢性的同种异体移植肾病。现认为CsA - 诱导的肾中毒是由以下事件联合引起的：肾脏内肾素浓度的增高(Masson J等, *Kidney Int Suppl* 1991, 卷32, S28 - S32)、TGF β 在远曲小管上皮中的表达(Langham RG等, *Transplantation* 2001, 卷72: 1826 - 1829)、血管平滑肌细胞中胞内钙的增加(Masson J等, *Kidney Int Suppl* 1991, 卷32, S28 - S32)、前列腺素释放的增加(Oriji GK, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999, 卷61, 119 - 123)以及肾脏内血栓烷产量的提高(Gonzalez - Correa JA等, *Thromb Res* 1996, 卷81: 367 - 381)。

发明概述

本发明涉及确定个体肾中毒的方法，包括以下步骤：(a)从个体采集身体样品，(b)测定身体样品中相应于选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、 α -2u、C4、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和Podocin的一种或多种基因的基因表达水平，获取第一套数值，和(c)将第一套数值与第二套数值进行比较，所述第二套数值相应于在与步骤b)相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的基因表达水平，其中对于钙结合蛋白 - D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言，第一数值低于第二数值，指示步骤a)的个体正患有或正在形成肾中毒或对肾中毒敏感，和/或其中对于KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值

大于第二数值，指示所述个体正患有或正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

根据本发明的另一方面，个体在接受诸如环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类或三甲双酮等细胞毒性剂的处理。

本发明还包括用于确定个体中的肾中毒是否对治疗产生反应的检测法，包括步骤：从接受药用可接受药剂治疗肾中毒的个体获得身体样品，对样品实施本发明的a)、b)和c)步骤并确定个体对药物治疗的反应性。

本发明还涵盖了用于确定个体中的肾中毒对于治疗性处理是否产生反应的另一检测法，包括步骤：从接受药用可接受药剂治疗肾中毒的个体获得身体样品，进行本发明的a)、b)和c)步骤并确定个体对药物治疗的反应性。

另一方面，本发明涵盖了治疗个体肾中毒的方法，包括对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，其中所述化合物在肾脏中调节钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和/或C4中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使肾中毒的至少一种症状得到改善。

根据本发明的另一方面，个体在接受诸如环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类或三甲双酮等细胞毒性剂的处理。

在另一方面，本发明涵盖了鉴定用于治疗肾中毒的候选药剂的方法，包括步骤：(a)使中毒的肾组织的样品与候选药剂接触，(b)测定此肾组织中相应于钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值，以及(c)将第一套数值与在步骤b)相同的条件下对未接受候选药剂诱导的中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于钙结合蛋白-D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言，第一数值实质性地高于第二数值，指示候选药剂改善肾中毒症状，和/或其中对于KIM-1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值实质性地低于第二数值，指示候选药剂改善肾中毒症状。

在另一方面，本发明涵盖了用于鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法，包括以下步骤：(a)使未中毒的肾组织的样品与候选药剂接触，(b)测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值，以及(c)将第一套数值与在步骤b)相同的条件下对未中毒的肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于钙结合蛋白 - D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言，第一数值等于或大于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒，和/或其中对于KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值等于或小于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒。

另一方面，本发明涵盖了比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法，包括步骤：(a)将未中毒的肾组织的样品与第一候选药物接触，并测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值，(b)将未中毒的肾组织的样品与第二候选药物接触，并测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，得到第二套数值，以及(c)比较第一套数值和第二套数值，其中若对于钙结合蛋白 - D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言，第一数值实质性地大于第二数值，则指示第二候选药物比第一候选药物对肾的细胞毒性小，和/或其中若对于KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值实质性地小于第二数值，则指示第二候选药物比第一候选药物对肾的细胞毒性小。

在另一方面，本发明提供了基因多态性在肾中毒诊断中的用途，其中的基因选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、

OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4。

在另一方面，本发明包括用于诊断个体中肾中毒的试剂盒，其包含用于测定相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种标记基因的基因表达水平的手段。

在本发明的其它方面，个体在接受细胞毒性剂的处理。

本发明的最后一方面涵盖了用于鉴定与包括肾功能、肾中毒和/或肾疾患在内的生物学过程相关的候选基因的方法，包括：a) 用至少一种选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4的标记基因的表达水平作为输入值进行运算以得到至少一个数值I；和b) 将a) 中所获得的至少一个数值I与针对候选基因获得的数值II进行比较。

附图简述

图1：描述了与肾病理学状态相关的基因标记表达变化的进程。病理学记分定义如下：1 = 最小，非常少；2 = 轻微的，少的；3 = 中等的，中等数目的；4 = 显著的，许多的；5 = 严重的，大数目的。

图2：描述了与经典生化终点（肌酸酐水平）相对比，肾基因表达变化的发生。病理学记分定义如下：1 = 最小，非常少；2 = 轻微的，少的；3 = 中等的，中等数目的；4 = 显著的，许多的；5 = 严重的，大数目的。

图3：描述了用两种待测化合物（TC1和TC2）和环孢菌素（CsA）处理的大鼠肾中相对的标记基因表达变化倍数。A.U.：任意单位。

发明详述

用于本文时，词组“肾中毒(renal toxicity)”或“肾损伤”或相似地“肾疾患”应都指突然的（急性的）或随时间缓慢衰退的（慢性的）肾或肾脏衰竭或功能失调，它可以由许多疾病或病症过程引发，包括（但不局限于），对于肾中毒而言：脓毒症（感染）、休克、创伤、肾结石、肾感染、药物

毒性、毒药或毒素，或注射碘化对照染料(contrast dye)后(副作用)；以及对于慢性肾中毒而言：长期存在的高血压、糖尿病、充血性心力衰竭、狼疮或镰状细胞性贫血。两种形式的肾衰竭都导致威胁生命的代谢紊乱。

词组“身体样品”应包括但不局限于，活组织检查物(优选肾脏的)和诸如血液、血浆、血清、淋巴、脑脊髓液、胆囊液(cystic fluid)、腹水、尿液、粪便和胆汁等体液。本发明的一个优势是标记物可以在诸如血浆等体液中得到尤其好的监测。例如，可以特别好地在血浆中测定clusterin的表达水平。

用于本文时，术语“个体”应指人、动物个体或个体群或集合。

用于本文时，术语“候选药剂”或“候选药物”可以是天然的或合成的分子，诸如蛋白质或其片段、抗体、小分子抑制剂或激动剂、核酸分子(如反义核苷酸)、核酶、双链RNA、有机和无机化合物等等。

以绝对值表示的mRNA表达水平是按标准曲线计算的给定基因的分子数。为了进行定量测定，在各实验中包含了cDNA(标准)的系列稀释物，以便制备准确定量mRNA所必需的标准曲线。从标准曲线外推后得到绝对值(分子数)。

用于本文时，被称为“钙结合蛋白-D28k”、“KIM-1”、“OPN”、“EGF”、“Clusterin”、“VEGF”、“OAT-K1”、“醛缩酶A”、“醛缩酶B”、“Podocin”、“ α -2u”或“C4”的各标记物包括与下表1中所标识的标记物基本上相似的基因或基因产物(包括mRNA和蛋白质)。

术语“基本上相似”在本文中就核苷酸序列而言，最广义地指参照核苷酸序列的对应核苷酸序列，其中该对应序列编码的多肽具有与参照核苷酸序列所编码的多肽基本上相同的结构和功能，例如，其中只存在不影响多肽功能的氨基酸改变。理想的情况是基本上相似的核苷酸序列编码参照核苷酸序列所编码的多肽。基本上相似的核苷酸序列和参照核苷酸序列之间的同一性百分率理想的状况是至少80%，更理想的是至少85%，优选至少90%，更优选至少95%，还更优选至少99%。序列比较用Smith-Waterman序列比对运算法则进行(参阅，例如，Waterman, M.S.计算生

物学入门：图谱、序列和基因组。Chapman&Hall.伦敦：1995.ISBN 0 - 412 - 99391 - 0)。将以下参数用于1.16版本的localS程序中：匹配：1，错配罚分：0.33，开放缺口罚分：2，延长缺口罚分：2。

与参照核苷酸序列“基本上相似的”核苷酸序列还可以与参照核苷酸序列于如下条件下杂交：于50℃在7%十二烷基硫酸钠（SDS）、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中杂交，在50℃于2XSSC、0.1%SDS中漂洗；更理想的是于50℃在7%十二烷基硫酸钠（SDS）、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中杂交，在50℃于1XSSC、0.1%SDS中漂洗；还更理想的是于50℃在7%十二烷基硫酸钠（SDS）、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中杂交，在50℃于0.5XSSC、0.1%SDS中漂洗；优选于50℃在7%十二烷基硫酸钠（SDS）、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中杂交，在50℃于0.1XSSC、0.1%SDS中漂洗；更优选于50℃在7%十二烷基硫酸钠（SDS）、0.5M NaPO₄、1mM EDTA中杂交，在65℃于0.1XSSC、0.1%SDS中漂洗，并且仍然编码功能上等价的基因产物。

本发明提供了一起或单独用作或可以用作肾中毒标记的多种标记物（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）。在特别有用的实施方案中，可选择多个这些标记并同时监测它们的mRNA表达以提供可用于各方面的表达谱。

在本发明方法优选的实施方案中，选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中的至少2或3种，或至少5或7种，或至少9、10、11或12种标记可用于确定它们的基因表达谱。

由于每一标记可能与不同的肾病理学发现相关，所以可以测定与肾病理学具体相关的这些标记的基因表达谱。例如，钙结合蛋白 - D28k mRNA水平可以用作预测矿化中钙失调的早期标志。KIM - 1 mRNA水平是一般性肾损伤的标志。OPN mRNA水平是常常与肾中毒相关的巨噬细胞浸润的早期标志和肾损伤后组织重塑的标志。EGF mRNA水平是一般性肾中毒的

早期标志。Clusterin mRNA水平是免疫介导的肾中毒的早期标志。

在本发明方法更优选的实施方案中，用以下技术评估身体样品或肾组织中mRNA的表达：RNA印迹分析、逆转录PCR、实时定量PCR、NASBA、TMA或任何其它可获得的扩增技术。

在本发明方法的另一优选实施方案中，可替代地通过检测相应于基因表达产物的蛋白质的存在评估基因表达的水平。

必须注意的是，本发明中（见下文）以绝对值表示的钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4 mRNA表达水平通常存在于大多数群体类型或物种中。不过这些数值也可能会随各群体类型或物种而变化。因此可能必需再次测定未患肾中毒的靶群体类型或物种中各标记物的标准基因表达水平，在此水平之上或之下，适当的情况下，可以发现肾中毒的症状。

本发明的第一个具体方面是提供确定个体肾中毒的方法，其步骤包括（a）从个体采集身体样品，（b）测定身体样品中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin中一种或多种基因的基因表达水平，获取第一套数值，和（c）将第一套数值与在和步骤b）相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于钙结合蛋白 - D28k和/或EGF基因表达而言，第一数值小于第二数值，指示步骤a）的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感，和/或其中对于KIM - 1、骨桥蛋白和/或Clusterin基因表达而言，第一数值大于第二套数值，指示个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

本发明的另一方面提供确定个体肾中毒的方法，其步骤包括（a）从个体采集身体样品，（b）测定身体样品中相应于 α -2u球蛋白相关蛋白质（ α -2u）、补体成分4（C4）、血管内皮生长因子（VEGF）、肾特异性有机阴离子转运蛋白 - K1（OAT-K1）、醛缩酶A、醛缩酶B和Podocin中一种或多种基因的基因表达水平，以获取第一套数值，和（c）将第一套数值与在和步骤b）相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行

评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较,其中对于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言,第一数值小于第二套数值,指示步骤a)的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感,和/或其中对于 α -2u和/或C4基因表达而言,第一数值大于第二数值,指示个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

本发明的再一方面提供在接受细胞毒性剂处理的个体中确定肾中毒的方法,其包括步骤(a)从所述个体采集身体样品,(b)测定身体样品中相应于钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin α -2u、C4、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和Podocin中一种或多种基因的基因表达水平,以获取第一套数值,和(c)将第一套数值与在步骤b)相同的条件下对未患肾中毒的个体的身体样品中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较,其中对于钙结合蛋白-D28K、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言,第一数值小于第二数值,指示步骤a)的个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感,和/或其中对于KIM-1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4基因表达而言,第一数值大于第二数值,指示个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。所说的细胞毒性剂可以是已知对肾具有毒性的任何分子,且可以有利地选自许多例子,包括:环孢菌素、顺氯氨铂、氨基糖苷类、磺胺类、藤霉素、三甲双酮,等等。如WO99/18120和WO03/033527中所述,环孢菌素可以是诸如环孢菌素A或ISAtx247等免疫抑制性环孢菌素。

对于钙结合蛋白-D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin而言,以绝对值测定的mRNA表达水平可能低于 $1.0E+06$,对于KIM-1、骨桥蛋白、Clusterin、 α -2u和/或C4而言,它可能高于 $1.0E+06$ 。对于钙结合蛋白-D28k、EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin而言表达水平可能低于 $1.0E+07$ 或低于 $1.0E+08$,和/或对于KIM-1、骨桥蛋白、Clusterin、 α -2u和/或C4而言可能高于 $1.0E+07$ 或高于 $1.0E+08$ 。这些数值对于某些标记基因而言可能也取决于群体类型或

物种，mRNA表达水平高于或低于 $1.0E+09$ 。

在此类方法的优选实施方案中，步骤a)的个体身体样品中mRNA表达水平如下时：钙结合蛋白 - D28k的mRNA表达水平低于 $5.30E+08$ 、KIM - 1的mRNA表达水平高于 $1.50E+07$ 、EGF的mRNA表达水平低于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的mRNA表达水平高于 $1.40E+08$ 、Clusterin的mRNA表达水平高于 $1.90E+09$ 和/或Podocin的mRNA表达水平低于 $3.00E+06$ ，表明该个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感，其中mRNA的表达以绝对值测定。不过这些数值可能随各群体类型或物种而变化。因此可能必需再次测定未患肾中毒的靶群体类型或物种中各标记物的标准基因表达水平，在此水平之上或之下，适当情况下，可以发现肾中毒的症状。

也可以以相对值的形式测定钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4的mRNA表达水平。不过这些数值可能随各群体类型或物种而变化。因此可能必需再次测定未患肾中毒的靶群体类型或物种中各标记物的标准基因表达水平。当EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin的mRNA表达值至少低2倍，和/或KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4的mRNA表达值至少高2倍时，个体可能患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。与未患肾中毒的个体身体样品中的表达相比较，EGF、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin的表达可以低5倍和/或KIM - 1、OPN、Clusterin、 α -2u和/或C4的表达可以高5倍，表达还可以分别低或高10、20、30、40、50或60倍。

在该方法的优选实施方案中，与第二数值相比，EGF的第一数值至少低4倍、VEGF的第一数值至少低2倍、OAT-K1的第一数值至少低2倍、醛缩酶A的第一数值至少低20倍和/或醛缩酶B的第一数值至少低2倍，和/或KIM-1的第一数值至少高20倍、OPN的第一数值至少高3倍、Clusterin的第一数值至少高7倍、 α -2u的第一数值至少高50倍和/或C4的第一数值至少高3倍，说明该个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

在本发明的另一优选实施方案中，与第二数值相比，EGF的第一数值

至少低4.5倍、VEGF的第一数值至少低2.6倍、OAT-K1的第一数值至少低2.3倍、醛缩酶A的第一数值至少低26倍和/或醛缩酶B的第一数值至少低2.1倍, 和/或KIM-1的第一数值至少高26倍、OPN的第一数值至少高3.9倍、Clusterin的第一数值至少高7.6倍、 α -2u的第一数值至少高60倍和/或C4的第一数值至少高3.3倍, 说明该个体患有肾中毒、正在形成肾中毒或对肾中毒敏感。

在本发明的另一具体方面, 这些标记基因中一种或多种的表达谱可以提供有价值的分子手段用于检测肾中毒中药物反应性的分子基础以及用于评估治疗肾中毒的药物的效力或它们对肾的副作用。当将细胞暴露于各种修饰条件下, 诸如与药物或其它活性分子接触时, 表达谱相对于基线谱的变化可用作这些作用的一个指征。

因此, 本发明提供可用于确定个体中的肾中毒对于疗法是否有反应的检测法, 包括步骤: 从接受药用可接受制剂治疗肾中毒的个体和未患肾中毒的个体分别获取身体样品, 针对这些样品进行上述方法的a)、b)和c)步骤和确定对药物治疗的反应性。

监测药剂(如, 药物化合物)对本发明标记物表达水平的影响可方便的应用于临床试验中。例如, 可在接受肾病或肾中毒治疗的个体的临床试验中监测药剂影响标记物表达的效力。在优选的实施方案中, 本发明提供了监测药剂(如, 兴奋剂、拮抗剂、拟肽(peptidomimetic)、蛋白质、肽、核酸、小分子或其它候选药物)治疗个体的效力的方法, 包括以下步骤: (i) 在施用该药剂前从个体采集给药前的样品; (ii) 检测给药前样品中一种或多种选定的本发明标记物的表达水平; (iii) 从个体采集一个或多个给药后的样品; (iv) 检测给药后样品中标记物的表达水平; (v) 将给药前样品中的标记物表达水平与给药后样品(一个或多个)中标记物的表达水平相比较; 和(vi) 据此改变该药剂施用于个体的方案。例如, 可能期望修改药剂的施用法以将标记物的表达增加至高于所检测到的水平, 即, 提高该药剂的效力。或者, 可能期望增加/减少该药剂的施用以分别提高/降低该药剂的效力。

在本发明的另一具体方面，提供了预防性和治疗性方法用于治疗患有或有危险患有肾病或肾中毒的个体。可在肾病的特征性症状显露前施用预防性药剂，从而阻止肾病的发生或延缓肾病的进程。适宜的治疗剂例子包括，但不局限于，反义核苷酸、核酶、双链RNA、配体、小分子和拮抗剂。（下文有更详细的描述）。

在特定的实施方案中，本发明提供了治疗或预防个体肾中毒的方法，包括步骤：对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，所述化合物调节肾脏中钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF和/或Clusterin中的一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使至少一种肾中毒症状得以改善。

另一方面，本发明提供了治疗个体肾中毒的方法，包括步骤：对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，所述化合物调节肾脏中VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和/或C4中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使至少一种肾中毒症状得以改善。

根据本发明的另一方面，提供了在接受细胞毒性剂处理的个体中治疗肾中毒的方法，包括步骤：对所说的个体施用治疗有效量的调制化合物，所述化合物调节肾脏中钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和/或C4中一种或多种基因或基因表达产物的合成、表达或活性，从而使至少一种肾中毒症状得以改善。细胞毒性剂优选选自环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类和三甲双酮。

在本发明的一个具体实施方案中，用调制化合物处理后个体身体样品中基因的mRNA表达如下时：钙结合蛋白 - D28k的mRNA表达高于 $5.30E+08$ 、KIM - 1的mRNA表达低于 $1.50E+07$ 、EGF的mRNA表达高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的mRNA表达低于 $1.40E+08$ 、Clusterin的mRNA表达低于 $1.90E+09$ 和/或Podocin的mRNA表达高于 $3.00E+06$ ，表明肾中毒的至少一种症状有所改善，其中基因的mRNA表达以绝对值测定。不过这些值

可能随各群体类型或物种而变化。

在另一具体的实施方案中，用调制化合物处理后个体身体样品中检测到小于4倍的EGF基因表达阻抑、小于2倍的VEGF基因表达阻抑、小于2倍的OAT-K1基因表达阻抑、小于20倍的醛缩酶A基因表达阻抑和/或小于2倍的醛缩酶B基因表达阻抑，和/或用调制化合物处理后个体身体样品中检测到小于20倍的KIM-1基因表达诱导、小于3倍的OPN基因表达诱导、小于7倍的Clusterin基因表达诱导、小于50倍的 α -2u基因表达诱导和/或小于3倍的C4基因表达诱导，表明肾中毒的至少一种症状有所改善。不过这些值可能随各群体类型或物种而变化。

在本发明的另一具体方面，借助于标记物的差异表达，可以利用这些标记物来增加对具体药物治疗法在患者中的肾毒性预测的确定性。因此，本发明提供了鉴定用于治疗肾中毒的候选药剂的方法，包括以下步骤：a) 将中毒的肾组织的样品与候选药剂接触；b) 测定肾组织中相应于钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF和Clusterin中一种或多种基因的基因表达水平，以得到第一套数值；和c) 将第一套数值与和在步骤b) 相同的条件下对未受候选药剂诱导的中毒肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于钙结合蛋白-D28k和/或EGF基因表达而言，第一数据实质上等于或大于第二数据，指示候选药剂改善肾中毒症状，和/或其中对于KIM-1、骨桥蛋白和/或Clusterin基因表达而言，第一数据实质上等于或小于第二数据，指示候选药剂改善肾中毒症状。

在本发明的另一具体方面，提供了用于鉴定肾中毒治疗中可用的候选药剂的方法，包括以下步骤：(a) 将中毒的肾组织的样品与候选药剂接触；(b) 测定肾组织中相应于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，以得到第一套数值；和c) 将第一套数值与和在步骤b) 相同的条件下对未受候选药剂诱导的中毒肾组织中相同基因进行评估得到的且相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表

达而言，第一数值实质上大于第二数值，指示候选药剂改善肾中毒症状，和/或其中对于 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值实质上小于第二数值，指示候选药剂改善肾中毒症状。

在优选的实施方案中，中毒肾组织中钙结合蛋白 - D28k的mRNA基因表达高于 $5.30E+08$ 、KIM - 1的mRNA基因表达低于 $1.50E+07$ 、EGF的mRNA基因表达高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的mRNA基因表达低于 $1.40E+08$ 、Clusterin的mRNA基因表达低于 $1.90E+09$ 和/或Podocin的mRNA基因表达高于 $3.00E+06$ ，是候选药剂改善肾中毒的一个指征，其中mRNA基因表达以绝对值测定。不过这些数值可能随各群体类型或物种而变化。

在另一优选实施方案中，小于4倍的EGF基因表达阻抑、小于2倍的VEGF基因表达阻抑、小于2倍的OAT-K1基因表达阻抑、小于20倍的醛缩酶A基因表达阻抑和/或小于2倍的醛缩酶B基因表达阻抑，和/或小于20倍的KIM - 1基因表达诱导、小于3倍的OPN基因表达诱导、小于7倍的Clusterin基因表达诱导、小于50倍的 α -2u基因表达诱导和/或小于3倍的C4基因表达诱导，是候选药剂改善肾中毒的一个指征。

在本发明的另一具体方面，提供了鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法，包括步骤：a)使未中毒的肾组织的样品与候选药剂接触；b)测定肾组织中相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值；和(c)将第一套数值与在和步骤b)相同的条件下对未中毒的肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于钙结合蛋白 - D28k和/或EGF基因表达而言，第一数值实质上等于或大于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒，和/或其中对于KIM - 1、骨桥蛋白和/或Clusterin基因表达而言，第一数值实质上等于或小于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒。

在本发明的另一具体方面，提供了鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法，包括步骤：a)使未中毒的肾组织的样品与候选药剂接触；b)测定肾组织中相应于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α

-2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一套数值；和(c)将第一套数值与在和步骤b)相同的条件下对未中毒的肾组织中相同基因进行评估得到的相应于基因表达水平的第二套数值进行比较，其中对于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言，第一数值等于或大于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒，和/或其中对于 α -2u和/或C4基因表达而言，第一数值等于或小于第二数值，指示候选药剂不会引起或诱发肾中毒。

在优选的实施方案中，在未中毒肾组织中测定到钙结合蛋白-D28k的mRNA表达水平高于 $5.30E+08$ 、KIM-1的mRNA表达水平低于 $1.50E+07$ 、EGF的mRNA表达水平高于 $2.80E+08$ 、骨桥蛋白的mRNA表达水平低于 $1.40E+08$ 、Clusterin的mRNA表达水平低于 $1.90E+09$ 和/或Podocin的mRNA表达水平高于 $3.00E+06$ ，是候选药剂不会引起或诱发肾中毒的一个指征，其中mRNA的表达以绝对值测定。不过这些数值可能可以随各群体类型或物种而变化。

按照本发明的另一优选实施方案，与第二数值相比，小于4倍的EGF基因表达阻抑、小于2倍的VEGF基因表达阻抑、小于2倍的OAT-K1基因表达阻抑、小于20倍的醛缩酶A基因表达阻抑和/或小于2倍的醛缩酶B基因表达阻抑，和/或小于20倍的KIM-1基因表达诱导、小于3倍的OPN基因表达诱导、小于7倍的Clusterin基因表达诱导、小于50倍的 α -2u基因表达诱导和/或小于3倍的C4基因表达诱导，是候选药剂不会引起或诱发肾中毒的一个指征。这些数值也可能随各群体类型或物种而变化。

在本发明的另一具体方面，提供了比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法，包括：a)将未中毒的肾组织的样品与第一候选药物接触，并测定肾组织中相应于钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF和Clusterin中一种或多种基因的基因表达水平，得到第一数值；和b)将未中毒的肾组织的样品与第二候选药物接触，并测定肾组织中相应于钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF和Clusterin中一种或多种基因的基因表达水平，得到第二数据；以及c)比较第一数值和第二数值，其中若对于钙结合

蛋白 - D28k和/或EGF基因表达而言, 第一数值实质上小于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾的细胞毒性较小, 和/或其中若对于KIM - 1、骨桥蛋白和/或Clusterin基因表达而言, 第一数值实质上大于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾的细胞毒性较小。

在本发明的另一具体方面, 提供了比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法, 包括: a) 将未中毒的肾组织的样品与第一候选药物接触, 并测定肾组织中相应于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平, 得到第一套数值; 和b) 将未中毒的肾组织的样品与第二候选药物接触, 并测定肾组织中相应于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种基因的基因表达水平, 得到第二套数值; 以及c) 比较第一套数值和第二套数值, 其中若对于VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B和/或Podocin基因表达而言, 第一数值实质上小于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾的细胞毒性较小, 和/或其中若对于 α -2u和/或C4基因表达而言, 第一数值实质上大于第二数值, 则指示第二候选药物比第二候选药物对肾的细胞毒性较小。

对于以上方法, 即, (i) 用于鉴定候选药剂的方法, (ii) 用于比较两种候选药物的肾细胞毒性潜力的方法和 (iii) 用于鉴定不会引起或诱发肾中毒的候选药剂的方法, 一个特别优势是它们可以体外实行。所用的肾组织优选从已与细胞毒性剂接触过的培养肾组织或细胞获得。肾组织还可以是患肾中毒的个体的肾样本, 但这可能限制了此类方法的广泛的体外应用。

培养的肾组织或细胞可以有利地以模拟人细胞和组织病症(优选肾的)的体内动物模型为基础。它还可以是诸如人肾上皮293T细胞或人胚胎肾细胞系等单肾细胞或肾细胞集合。细胞毒性剂可以是已知对肾具有毒性的任何分子, 且可以有利地从包括如下的许多实例中选择: 环孢菌素、顺氯氨铂、氨基糖苷类、磺胺类、藤霉素、三甲双酮, 等等。由于肾脏的功能特性, 它对药物的肾毒性作用特别敏感, 其中所述功能特性包括: a) 大量的

肾血流，这带来了大量的毒素；b) 在肾小球或小管上皮中大面积地接触药物，这使得可以实现对毒素的相互作用或摄取；c) 肾转移活性物质的能力，这提供了可以介导细胞摄取的特殊转移机制；d) 药物分解，这可以发生于肾小管内并导致从非毒性母体物质形成毒性代谢物；e) 肾的浓缩机制，这可以增高未被吸收产物在尿和间质中的浓度；f) 正常功能所需的小管细胞的高代谢率，而这容易受到干扰。

在体外研究中，环孢菌素（如，Neoral®）的浓度可在 $10E-11$ 至 $10E-5M$ 之间变动。不过这些值可能随各群体的细胞类型或培养条件变化。

本发明再一具体的方面提供了用于诊断个体肾中毒的试剂盒，包括用于测定相应于钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中一种或多种标记基因的基因表达水平的手段。

优选的实施方案提供了用于诊断接受细胞毒性剂处理的个体中的肾中毒的试剂盒。环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类和/或三甲双酮是优选的细胞毒性剂。

在本发明一个具体的实施方案中提供了一种试剂盒，其中可以测定钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中至少2种或3种基因的基因表达水平。

在优选的实施方案中，用于测定基因表达水平的手段包括特异于标记基因的寡核苷酸。尤其优选以下方法：RNA印迹分析、逆转录PCR或实时定量PCR、分支DNA、基于核酸序列的扩增（NASBA）、转录介导的扩增、核糖核酸酶保护试验和微阵列。

另一具体的实施方案提供了一试剂盒，其中用于测定基因表达水平的手段包括至少一种对选自钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4的标记基因所编码的蛋白质具有特异性的抗体。抗体优选选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化或嵌合抗体以及足以结合标记物的生物学功能性抗体

片段。尤其优选用于测定基因表达水平的免疫测定法。

在本发明的另一优选实施方案中提供了还包括获取个体身体样品的手段的试剂盒。特别优选的实施方案还包括适于容纳测定基因表达水平的手段和个体的身体样品的容器。在另一优选的实施方案中，试剂盒还包含使用和解释试剂盒结果的说明书。

检测方法

对于检测从标记基因（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）获得的mRNA转录物的水平，尤其有用的方法包括标记的mRNA与寡核苷酸有序阵列的杂交。这些方法使得可以同时测定多种基因的转录水平以产生基因表达谱或模式。在另一实施方案中。可以将个体样品的基因表达谱与未患病个体的样品的基因表达谱进行比较，从而确定个体是否患有或有危险发生肾病或肾中毒。

标记基因（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）的基因表达可以优选以试剂盒的形式用RT - PCR（一种高通量技术）进行评价。众所周知的技术RT - PCR反应在PCR过程中利用AmpliTaq Gold DNA聚合酶的5'核酸酶活性切割TaqMan探针。探针由带有5' - 报道染料和3' - 猝灭染料的寡核苷酸（通常约为20mer）组成。将诸如FAM（6 - 羧基荧光素）等荧光报道染料与寡核苷酸的5'末端共价连接。该报道分子被位于3'末端通过连接臂附着的TAMRA（6 - 羧基 - N, N, N', N' - 四甲基罗丹明）淬灭。

用于各标记基因（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）的寡核苷酸探针应基于标记基因的核苷酸序列产生，对于本领域技术人员而言，适当的寡核苷酸序列的选择目前是一种标准的常规技术。下表1给出了人类、大鼠和/或小鼠中标记基因序列的Genbank数据库登录号。

表 1: 标记基因的序列

基因名称	钙结合蛋白 -D28k (CALB1)	KIM-1	骨桥蛋白 (尿桥蛋白, SPP-1)	Clusterin (TRPM-2; 载脂蛋白.J)
Genbank #	大鼠: M31178	大鼠: AF035963	大鼠: AB001382 M99252	大鼠: U02391 M64723
Genbank #	人: NM_004929 AC004612 AF049895 AF068862 AF070717 BC006478 M19878 M19879 X06661	人: AL159977 AC073225.5 AC025449.6 AF165926 AL449103	人: AF052124 D14813 J04765 M83248 U20758 X13694	人: AF311103 J02908 L00974 M25915 M63379 M64722 M74816 X14723
Genbank #	小鼠: AK002635 AK005081 AK005243 D26352 D26353 D26354 D26355 D26356 D26357 M21531 M23663	小鼠: AI662116	小鼠: J04806 M38399 S78177 X13986 X14882 X16151 X51834	小鼠: AF182509 D14077 L05670 L08235 S70244
基因名称	EGF	α -2u (Lipocalin 2)	C4	VEGF
Genbank #	大鼠: AF187818	大鼠: NM_130741 AA946503	大鼠: U42719 BI285347 AA800942 AI103841	大鼠: AA850734 AF080594 M32167
Genbank #	人: J02548 X04571	人: NM_005564.1 BC033089 X83006 X83006.1 X99133.1 XM_209970	人: NM_000592 NM_007293 K02403 AI983615 R37128	人: AF024710 AF022375 AF091352 M27281 AF022375 AW024572 M27281 M32977

基因名称	EGF	α -2u (Lipocalin 2)	C4	VEGF
Genbank #	小鼠: J00380 U69534 V00741 X08047	小鼠: AK002932 AV230461 NT_039205 X14607 X81627 XM_130171	小鼠: AV259769 X06454 AI661626 NM_009780 AV259769 M11729	小鼠: U43836
基因名称	OAT-K1	醛缩酶 A	醛缩酶 B	Podocin
Genbank #	大鼠: D79981	大鼠: U20643 NM_012495 M12919 AA924326 AI102716	大鼠: X02284 M10149 X02291	大鼠: NM_130828 AY039651
Genbank #	人: NM_021094 AF085224 U21943 N62948	人: NM_000034 AK026577 X05236 AI921586 X12447	人: NM_000035 AK026411 X02747 AI469183 H91325	人: NM_014625.1 AJ279246.1 AJ279254 AJ279254.1 BC029141
Genbank #		小鼠: Y00516 AA717247		小鼠: AJ302048 AW106985 AY050309

还可分析由正常细胞和疾病细胞分泌的标记基因（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）表达的蛋白质，这对于本发明的方法而言是有价值的。可分离上清液且可用MWT - CO滤器简化蛋白质混合物。然后可用胰蛋白酶消化蛋白质。再然后用微毛细管HPLC柱分离上样的胰蛋白酶消化的肽，直接将其洗脱入离子阱质谱仪，通过定制的电喷射离子化源。在整个梯度中，可通过对柱上洗脱下来的四种最强的离子（肽）进行片段化获取序列数据，而从动力学上排除那些早已经片段化的肽。以这种方式，可以从多次扫描中获取序列数据，相应于样品中约50 - 200种不同蛋白质。用诸如MS - Tag等相关性分析工具在数据库中搜索这些数据，从而鉴定上清液中标记基因的蛋白质表达。

还可通过可检测标记的探针或可随后标记的探针检测标记基因所编码

的蛋白质的表达。一般而言，探针是识别表达的蛋白质的抗体。

用于此处时，术语抗体包括，但不局限于：多克隆抗体、单克隆抗体、人源化或嵌合抗体和足以结合蛋白质的生物学功能性抗体片段。

然后通过利用上述抗体的免疫测定法测定样品中已知蛋白质的表达程度。这样的免疫测定法包括，但不局限于：点印迹、蛋白质印迹、竞争性和非竞争性蛋白质结合试验、酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫组织化学、荧光激活细胞分选术（FACS）以及其它通常使用且在科学和专利文献中被广泛描述的方法，还有许多商品化应用的方法。

或者，可通过双向凝胶电泳系统分离标记蛋白质（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）。双向凝胶电泳是本领域众所周知的，通常包括沿着第一向进行等电聚焦随后沿着第二向进行SDS - PAGE电泳。可用多种技术分析产生的电泳图谱，包括质谱分析技术、蛋白质印迹以及利用多克隆和单克隆抗体进行的免疫印迹分析，还有内部和N - 末端的微测序。

药物筛选方法

除了上述药物筛选方法之外，还可用无细胞试验鉴定能与标记基因（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）所编码的蛋白质相互作用从而改变蛋白质或其结合配偶体活性的化合物。无细胞试验还可用于鉴定调制编码蛋白质和其结合配偶体（诸如靶肽）间相互作用的化合物。

在一个实施方案中，用于鉴定所说化合物的无细胞试验包括反应混合物，其中，在存在或缺乏结合配偶体（如生物学失活的靶肽）或小分子的情况下，混合物中含有标记蛋白质（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）和待测化合物或待测化合物文库。还可通过使用检测表面等离子体共振（一种光学现象）的实时BIA（生物分子相互作用分析，Pharmacia

Biosensor (AB)) 对分子间的相互作用进行评估。可通过利用可检测标记的蛋白质诸如放射标记、荧光标记或酶标记的蛋白质或其结合配偶体, 用免疫测定法或色谱检测法检测蛋白质和其结合配偶体之间复合物的形成。

转录物阵列

在本发明的优选实施方案中使用了“寡核苷酸阵列”(本文也称“微阵列”)。微阵列可用于分析细胞中的转录情况, 尤其是用于测量肾细胞的转录情况。

在一个实施方案中, 通过将代表细胞中所存在的mRNA转录物的可检测标记的多核苷酸(如, 合成自全细胞mRNA的荧光标记cDNA或标记的cRNA)与微阵列杂交, 产生转录物阵列。本发明的微阵列是具有有序排列的结合(如, 杂交)位点的表面, 所述位点针对至少一种标记基因(钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4)的产物。可以用多种方式制备微阵列。不管用何种方式制备, 微阵列共有某些特征: 微阵列是可复制的, 从而可以制备多拷贝的给定阵列并容易进行相互间的比较。优选小的微阵列, 通常小于5cm^{sup.2}, 且它们制备自在结合(如, 核酸杂交)条件下稳定的材料。微阵列中给定的结合位点或独一无二的一套结合位点将特异结合细胞中单一基因的产物。尽管每个特定mRNA可能具有一个以上的物理结合位点(下文中的“位点”), 但为了清楚, 以下的讨论假设只有单一的位点。在一个特别的实施方案中, 使用在各位置含有固定的已知序列核酸的可寻址定位的阵列。

应当理解, 当与细胞RNA互补的cDNA被制备好并在合适的杂交条件下与微阵列杂交时, 与阵列中相应于任何特定基因的位点杂交的水平将反映转录自此基因的mRNA在细胞中的丰度。例如, 当互补于总细胞mRNA的可检测标记(如, 带有荧光团)的cDNA或cRNA与微阵列杂交时, 阵列中相应于细胞内不转录的基因的位点(所谓“相应于”即位点能特异结合基因的产物)将具有微弱的信号或无信号(如, 荧光信号), 而相应于所编码mRNA在细胞中丰富的基因的位点将具有相对较强的信号。

数据库

本发明还提供了建立数据库的方法，所述数据库中包含至少一种本发明中提及的标记物（表1）的基因表达谱。例如，各标记物的基因表达谱可存储于数据储存介质中，从而编译出可以标准化表示如下标记基因谱的数据处理系统，该标记基因谱单独或联合地鉴定特定肾病或毒性细胞。

执行本发明分析法的可选择使用的计算机系统和方法对于本领域技术人员来说是显而易见的并旨在包括于后附权利要求中。具体而言，所附权利要求旨在包括对于本领域技术人员显而易见的可用于实施本发明方法的可选程序结构。

本发明的一方面提供了鉴定与肾功能、肾中毒和/或肾疾患等生物学过程相关的候选基因的方法，包括：a) 以钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中至少一种标记基因的基因表达水平作为输入值进行运算得到至少一个数值I；和b) 将a)中获得的至少一个数值I与针对候选基因获得的数值II进行比较。优选的，此方法进一步包括步骤c)，其中如果步骤b)中获得的数值I以预定的关系与数值II相关，则候选基因是与生物学过程相关的。在本发明的一个具体实施方案中，预定的关系是1或更大。在此方法的另一实施方案中，此预定关系是1或更小。

按照另一具体的实施方案，钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4中至少一种标记基因的基因表达水平是从诸如肾组织、血液或尿液等至少一种个体身体样品或肾细胞系获得的。所述至少一种身体样品在优选的实施方案中是两种或两种以上不同的身体样品，诸如肾组织和血液。在一个具体的优选实施方案中，身体样品或细胞系已与细胞毒性剂接触。优选细胞毒性剂选自环孢菌素、顺氯氨铂、藤霉素、氨基糖苷类、磺胺类和三甲双酮。

在本发明一个具体的实施方案中，所说的方法是计算机可执行的方法。

反义分子

在另一实施方案中，靶RNA（优选mRNA）种类的活性，尤其是它的翻译速率可以通过反义核酸的可控性应用而被可控地抑制。用于本文中的“反义”核酸是指，凭借与编码和/或非编码区互补的一些序列，能与靶RNA的序列特异（如，非-polyA）部分（例如其翻译起始区）杂交的核酸。本发明的反义核酸可以是双链或单链、RNA或DNA的寡核苷酸或其修饰分子或衍生物，它们可以直接以可控形式施用于细胞或可以通过以足以干扰靶RNA翻译的可控量转录引入的外源序列而在细胞内产生。

优选的，反义核酸有至少6个核苷酸且优选是寡核苷酸（6至约200个寡核苷酸）。

如上所述，可以通过各种技术将反义核苷酸投递至体内表达所述基因的细胞中，如，直接注射入肾组织部位、在脂质体中捕获反义核苷酸、通过将反义核苷酸与特异结合细胞表面所表达的受体或抗原的肽或抗体连接来施用定向于肾细胞的已修饰反义核苷酸。

不过，利用上文提及的递送方法，可能难以达到足以抑制内源mRNA翻译的细胞内浓度。因此，在替代实施方案中，将含反义核苷酸序列的核酸置于启动子（即，起始特定基因转录所需的DNA序列）的转录控制下，从而形成表达构建体。本发明的反义核酸通过从外源序列转录可控地在细胞内表达。如果表达被控制在高水平，就会造成饱和的干扰或改变。

总之，可以按常规设计反义核酸，以靶向包括本文所列标记基因（钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4）在内的几乎任何mRNA序列，而且细胞可以用编码所述反义序列的核酸进行常规转化或暴露于此核酸，从而表达可控有效量的或饱和量的反义核酸。这样细胞中几乎任何RNA的翻译都可被改变或干扰。

小分子药物或配体

此外，通过暴露于外源药物或配体，标记蛋白质（钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶

B、Podocin、 α -2u和C4)的活性也可以以可控或饱和方式被修饰或干扰。由于本发明的方法常用于测试或验证各种药物治疗肾疾患的有效性，所以药物暴露是修饰/干扰细胞组分(mRNA和表达的蛋白质二者)的一种重要方法。

优选地，已知药物只与细胞中的一种标记蛋白质相互作用且只改变那种标记蛋白质的活性，使活性增高或降低。这样，将细胞分级暴露于不同浓度的该药物可以造成以此标记蛋白质为输入值的分级干扰网络模型。而饱和暴露引起饱和修饰/干扰。

抗体和拮抗剂

术语“拮抗剂”指在结合基因编码的蛋白质时抑制其活性的分子。拮抗剂可以包括，但不局限于：肽、蛋白质、碳水化合物和小分子。

在一个具体有用的实施方案中，拮抗剂是特异于标记物(钙结合蛋白-D28k、KIM-1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT-K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α -2u和C4)的抗体。抗体可以单独用作治疗的效应物或可以募集其它细胞以实际实施细胞杀死作用。

治疗方式

在用反义核苷酸治疗时，所说的方法包括施用治疗有效量的分离核酸分子，该分子包含衍生自上表1中至少一种标记基因的反义核苷酸序列，其中该反义核苷酸具有改变该至少一种基因的转录/翻译的能力。

在用拮抗剂治疗时，所说的方法包括对个体施用治疗有效量的拮抗剂，所说的拮抗剂抑制或激活上表1中至少一种标记基因编码的蛋白质。

对于包含反义核苷酸的分离核酸分子、编码核酶的核苷酸序列、双链RNA或拮抗剂，“治疗有效量的”指这些治疗剂任一的量足以治疗肾病或肾中毒。本领域技术人员有能力确定治疗有效量。对于任何治疗剂而言，治疗有效剂量开始都可以在细胞培养试验(如，肿瘤细胞的)或在动物模型中(通常为大鼠、小鼠、兔子、狗或猪)中进行估计。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和给药途径。然后这些信息可用于确定施用于人

时的有用剂量和途径。

可用标准的药理学方法在细胞培养物或实验动物中测定治疗效力和毒性，如，ED50（在50%群体中有疗效的剂量）和LD50（致使群体的50%死亡的剂量）。在毒性和疗效之间的剂量比率是治疗指数，它可以表示为LD50/ED50比率。优选显示出大治疗指数的反义核苷酸、核酶、双链RNA和拮抗剂。从细胞培养试验和动物试验中获取的数据可用于制定人使用的剂量范围。这样的组合物中所含的剂量优选在包括ED50在内的低毒性或无毒性的循环浓度范围内。剂量在此范围内变化，取决于所用的制剂形式、患者的敏感度和施药的途径。

确切的剂量将由医师根据需治疗个体的相关因素确定。可以调整给药量和施药方式以提供足够水平的活性成分或维持期望的效果。可能需要考虑的因素包括疾病的严重程度、个体的一般健康状况、个体的年龄、体重和性别、饮食、施药的时间和频率、药物组合、反应敏感性以及对治疗的耐受性/应答。

正常的给药量可以在0.1-100000微克范围内变化，可高达约1g总剂量，这取决于给药的途径。对具体剂量和投递方法的指导在文献中有描述，且是本领域的医师通常可获得的。对于核苷酸和拮抗剂，本领域的技术人员将使用不同制剂。

对于治疗上的应用而言，反义核苷酸、编码核酶的核苷酸序列、双链RNA（无论是包裹于脂质体中或包含于病毒载体中）和抗体优选以含有一种或多种药用可接受载体及此治疗剂的药物组合物形式施用。组合物可以单独施用或与至少一种其它药剂（诸如起稳定作用的化合物）联合施用，所述药剂可以在任何无菌的、生物相容的药用载体（包括，但不局限于：盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水）中给药。组合物可以单独施用于患者或与其它药剂、药物或激素联合施用。

药物组合物可以通过许多途径施用，包括但不局限于：口服、静脉内、肌内、关节内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下或直肠方式。除了活性成分以外，这些药物组合物还包含包括赋形剂和助剂的在内的适宜的药用可接受载体，它们将有利于

活性化合物被加工成制药学上可使用的制剂。

口服的药物组合物可以用本领域众所周知的药用可接受载体以适于口服的剂量配制。这样的载体使药物组合物可配制成片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆、混悬液，等等，便于患者摄取。

引用的文献

本文中引用的所有文献为所有目的全文收编于此作为参考，就如同具体单独指出为所有目的将各出版物或专利或专利申请分别地全文收编作为参考一样。此外，本文所引的所有Gen Bank录入号也为所有目的全部收编于此作为参考，就如同具体单独指出为所有目的将各编号完整地收编于此作为参考一样。

本发明并不局限于本申请所述的具体实施方案，它们只意图作为本发明各方面的单一举例说明。正如对本领域技术人员显而易见的，可以不脱离本发明的精神和范围对本发明进行许多修改和改变。除了本文所列的那些具体实施方案外，本发明范围内的功能等价方法和设备对于本领域技术人员来说在阅读前面的说明书和附图后将是显而易见的。这样的修饰和变化也意图落在所附权利要求的范围内。本发明只受所附权利要求以及这些权利要求的等价方案的完整范围的限制。

在实施本发明时，利用了分子生物学、微生物学和重组DNA方面的许多常规技术。这些技术是众所周知的且在文献中有描述，例如，分子生物学通用方法 (*Current Protocols in Molecular Biology*)，第I、II和III卷，1997 (F.M.Ausubel编辑)；Sambrook等，1989，分子克隆：实验室手册 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约；DNA克隆：实用方法 (*DNA Cloning: A Practical Approach*)，第I和II卷，1985 (D.N.Glover编辑)；寡核苷酸合成 (*Oligonucleotides Synthesis*)，1984 (M.L.Gait编辑)；核酸杂交 (*Nucleic Acid Hybridization*)，1985，(Hames和Higgins)；转录和翻译 (*Transcription and Translation*)，1984 (Hames和Higgins编辑)；动物细胞培养 (*Animal Cell Culture*)，1986 (R.I.Freshney编辑)；固定化细胞和酶 (*Immobilized*

Cells and Enzymes), 1986 (IRL出版社); Perbal, 1984, 分子克隆的实用指导(*A Practical Guide to Molecular Cloning*); 丛书, 酶学方法(*Methods in Enzymology*) (Academic Press, Inc.); 用于哺乳动物细胞的基因转移载体 (*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*), 1987 (J.H.Miller和M.P.Calos编辑, 冷泉港实验室); 以及, 酶学方法(*Methods in Enzymology*), 第154和155卷 (分别由Wu和Grossman, 和Wu编辑)。

实施例 1

为了鉴定包括环孢菌素 (CsA; Neoral®) 在内的免疫抑制剂的毒性和效力的标记物, 进行2周体内研究, 之后获取大鼠的肾样品。CsA在临床应用方面以及研究模型方面用作免疫抑制的参照化合物。CsA抑制T细胞激活后的早期事件, 阻断数种细胞因子的转录激活。

肾作为毒性的主要靶目标而被研究, 利用来自 Affymetrix 的高密度 DNA - 阵列系统监测所有组中的RNA表达变化。本研究的活体部分 (in-life part) 进行如下:

实验动物

动物种类和品系: 大鼠, Crl: WI (GLX/BRL/HAN) IGS BR.

每组的动物数目: 6 只雄性

年龄: 8 周 (在给药开始时)

体重范围: 100 - 300g (在给药开始时)

室内相对湿度: 约 40 - 70% (目标范围)

照明周期: 荧光灯 12 小时照明/12 小时黑暗周期

动物笼养: 在最佳卫生条件下将同性别的动物以组为单位养在 IV 型 Macrolon® 笼子的无菌软木颗粒垫 (Rettenmaier&Söhne, Ellwangen - Holzmühle, 德国生产) 上。

食物: 除了为临床病理学采集血样前的整夜外, 随意取食 NAFAG, 编号 890, 标准颗粒饲料 (来自 NAFAG, Gossau, SG, Switzerland) (在即时原始数据中给出批号)。

食物分析: 微生物污染物由供应商分析, 化学污染物由供应商和 RCC

Ltd., Environmental chemical/pharmaceutical Analytics (Itingen, 瑞士) 分析。

水: 随意从聚乙烯瓶中获得当地供应的自来水

水的分析: 由市政当局和 RCC Ltd. Environmental chemical/pharmaceutical Analytics (Itingen, 瑞士) 每年定期检查化学和细菌污染物以符合瑞士饮用水规范。

研究中所应用的CsA浓度是:

组号: 1: 对照组; 2: 处理组

试验项目: Neoral® - Sandimmun (CsA): 剂量 (mg/kg): 5; 体积 - 剂量 (mL/kg): 5

处理期后, 收集大鼠肾脏并提取总RNA。用TRIzol试剂 (Life Technologies) 按照制造商说明书从冷冻的肾中提取总RNA。通过波长260nm处的吸收值 (A_{260nm}) 对总RNA定量, 并通过 A_{260nm}/A_{280nm} 比率估计纯度。通过变性凝胶电泳检查完整性。将RNA储存于 -80°C 待分析。

通过Superscript choice系统 (Life Technologies) 用良好质量的总RNA合成双链cDNA。然后将cDNA体外转录 (MEGAscript™ T7试剂盒, Ambion) 形成生物素标记的cRNA。接着, 在 45°C 将 $12 - 15 \mu\text{g}$ 标记的cRNA与探针阵列杂交16小时。然后按照EukGE - WS2方案 (Affymetrix) 洗阵列, 并用 $10 \mu\text{g/ml}$ 链霉亲和素 - 藻红蛋白缀合物 (Molecular Probes) 染色。信号用 2mg/ml 乙酰化BSA (Life Technologies)、 100mM MES、 $1\text{M}[\text{Na}^+]$ 、 0.05% Tween 20、 0.005% Antiofoam (Sigma)、 0.1mg/ml 山羊IgG和 0.5mg/ml 生物素化抗体进行抗体放大且用链霉亲和素溶液进行复染。洗后, 用Gene Array®扫描仪 (Affymetrix) 扫描阵列两次。

分析基因组数据后, 在各组中使用的实验条件下, 在各探针阵列上发现数个基因有大于2倍的差异表达, 选择其进行实时PCR验证。用GeneSpring™软件比较处理组中的表达水平并通过聚类算法将基因分类。这些计算将基因按照它们的表达变化分开并将共有相似变化模式的基因归为一组 (分级群聚、K - means聚类)。还将特定组中的表达水平分布与总体分布进行比较并计算对于给定组属于总体分布的概率。选择其表达变化

与病理学分级相关的基因。五种基因标记，钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin，组成了用此药剂处理后在DNA阵列上观察到的特异谱的一部分。

表2中所列的引物序列被用于进行实时定量PCR分析。

表 2: 用于实时定量 PCR 分析的引物和探针序列

基因描述	引物名称	引物序列
肾脏损伤分子 1 (KIM-1)	rKIM1. 正向	5'- CAC TCC ACT TCT GTC TTG ATG CTC -3'
	rKIM1. 反向	5'- GCA CGT CTC CTC CCT GCA -3'
	rKIM1. 探针	FAM5'- TGT TCC TAA ACT CAC CCA CTG AGC TCT GAA TT -3'TAMRA
钙结合蛋白 -D28k	rCABP28. 正向	5'-ACA CTG TTG GTT CAA GCT GGC-3'
	rCABP28. 反向	5'-CTT GGA AAT ATA GGC ATA GTA TCA GAC AGA T-3'
	rCABP28. 探针	FAM5'-TGG TGG CAA GGG AAG GTA GCC AGA- 3'TAMRA
骨桥蛋白	rOSTEO. 正向	5'-GAC AGT CAG GCG AGT TCC AAA-3'
	rOSTEO. 反向	5'- CTT GTC CTC ATG GCT GTG AAA C -3'
	rOSTEO. 探针	FAM5'- CCA GCC TGG AAC ATC AGA GCC ACG - 3'TAMRA
表皮生长 因子前体	rEGFp. 正向	5'- GCA CGA CAT CAC TGT GGT GTC -3'
	rEGFp. 反向	5'- ATC CCC AAG AGG AGC AGC A -3'
	rEGFp. 探针	FAM5'- TCT GTG TGG TGG CGC TGG CC - 3'TAMRA
Clusterin	rTRPM2. 正向	5'- AAG GAG GGA ATC TCC CAG CTT -3'
	rTRPM2. 反向	5'- GCG CTG GAG ACA TGT GGA GT-3'
	rTRPM2. 探针	FAM5'- CCG AGG TTG CTG CAG ACC CCT AGA- 3'TAMRA
α -2u (Lipocalin 2)	rLPC2. 正向	5'- GGT CGG TGG GAA CAG AGA AA-3'
	rLPC2. 反向	5'- AAG GAG CGA TTC GTC AGC TTT-3'
	rLPC2. 探针	FAM5'- TGT TGT TAT CCT TGA GGC CCA GAG ACT TGG-3'TAMRA

Clusterin作为标记可能特别令人感兴趣，因为此基因的产物是分泌型

蛋白质。事实上，用无肾毒性的化合物（A）和三种肾毒性化合物（B、C、D；表3）处理后这些动物的血清样品的蛋白质印迹分析证实了Clusterin蛋白质水平被提高。

表3: 化合物（A、B、C、D）处理后 Clusterin 蛋白质血清水平的蛋白质印迹测量

处理	处理/对照 平均值（%）*	CV（%）
对照	100	11.5
化合物 A	122	16.0
化合物 B	92	21.0
化合物 C	127	20.0
化合物 D	116	28.0

* = (处理样品的平均带体积/对照的平均带体积) x100

图1显示了与肾小管嗜碱粒细胞增多(kidney tubular basophilia)相关的基因标记物（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin）表达改变（倍数变化）进展。为了进行比较，在图2中显示了肌酸酐（一种经典标记物）排泄的发展，以便说明本文件中所述新基因标记物（钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin）受到更大的影响，因而与肾中毒有更紧密的联系并由此更相关和更有价值。

实施例 2:

在向大鼠给药14天和42天的时候，开始进行非临床研究以确立待测化合物（TC1）的毒理学效应。设计本研究来评估待测化合物的潜在肾毒性。

通过管饲法将环孢菌素A（CsA；Neoral®）安慰剂微乳化预浓缩物中溶液形式的待测化合物通过口服途径给予 IGS Wistar Hannover[CrI:WI(Glx/BRL/Han) IGS BR]大鼠组（N = 5/性别/组），剂量分别为20mg/kg/天、60mg/kg/天共14天以及10mg/kg/天、25mg/kg/天共42天。另有一组大鼠（雄性）接受5mL/kg等价给药体积的赋形药（CsA

(Neoral®) 安慰剂微乳化预浓缩物) 并用作对照。在开始给药时, 动物约8周龄。在尸体解剖当天收集肾脏样品。

通过PCR监测本发明中所述的基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin), 这些基因一起或单独用作肾中毒的标记, 从而允许评估待测化合物的肾毒性。

只以本发明所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 的表达监测为基础, 就可以在进行肾显微镜载片病理检查前推断出待测化合物对肾的毒性作用比CsA (20mg/kg/天) 低, 如5种基因标记物的表达所显示的, 其仅对肾造成轻微的损伤。不过在与CsA表达谱进行比较后, 这种肾中毒看上去特异于该待测化合物。此外, 在以10mg/kg/天的剂量处理42天后, 本发明中所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 的基因表达谱未显示出显著的肾中毒(图3)。在此图中, “相对于对照的倍数变化” 为处理组中本发明所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 的分子个数除以相应对照组中本发明所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 的分子个数。

这些结论稍后得到了验证并证实了通过监测本发明所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 的表达所做的预测是有效的。待测化合物的肾毒性的特征为小管胞质空泡形成(它不同于通过监测本发明所述基因(钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF和Clusterin) 早期预测的CsA - 诱发的肾中毒)。

实施例 3:

通过口服管饲法用环孢菌素A衍生物(TC3) 以5或20mg/kg/天的剂量每天处理大鼠一次, 共2周。然后收集肾脏并用实时定量PCR分析法利用表4中所列引物序列测量Podocin表达。表5显示了Podocin基因在用TC3处理的大鼠中的表达。

表 4: 用于实时定量 PCR 分析的引物和探针序列

Podocin	rPODO. 正向	5'-CACTCTTCAGTCCTTGTCCACAGA-3'
	rPODO. 反向	5'- AAGGTTTCAGCATGTCAAAGGGTAA-3'
	rPODO. 探针	FAM5'-AGCCGTCCACCGTGGTTTTGCC-3'TAMRA

表 5: Podocin mRNA 水平的 PCR 测量

	对照	TC3 (5mg/kg/天)	TC3 (20mg/kg/天)
标准化后的表达	65.766	64.500	35.917
标准差 (STDEV)	11.130	15.656	12.097

大鼠展示了与同等剂量CsA处理后所观察到的结果相似的肾副作用，因此TC3（20mg/kg/天）是对肾脏有毒的。

实施例 4:

为了 (a) 研究环孢菌素 A (CsA, Neoral®) 所引起的药物诱导的肾中毒的机制和 (b) 鉴定基因表达模式以确定可以作为肾中毒潜在早期标志的特定基因 (和它们的蛋白质产物)，利用环孢菌素 A 进行了 2 周的大鼠研究。通过口服管饲法以 5 或 20mg/kg/天的剂量给雄性大鼠 (Crl: Wist Han 株系) 每天喂食环孢菌素 A 一次, 共 2 周。然后收获肾脏并用 TRIzol 试剂 (Life Technologies) 按制造商说明书从冷冻组织中提取总 RNA。通过波长 260nm 处的吸收值 (A_{260nm}) 对总 RNA 定量, 并通过 A_{260nm}/A_{280nm} 比值估计纯度。通过变性凝胶电泳检查完整性。将 RNA 储存于 -80°C 待分析。用 Superscript Choice 系统 (Life Technologies) 对 RNA 进行逆转录。然后将 DNA 体外转录 (MEGAscript™ T7 试剂盒, Ambion) 形成生物素标记的 cRNA。随后, 将标记后的 cRNA 与 GeneChip™ 探针阵列 (大鼠阵列 RU34A) 杂交。按制造商说明书进行与探针阵列的杂交、洗涤、染色和扫描。用 Affymetrix RU34A 大鼠基因芯片分析 RNA 表达谱。

用 Compare 和 GeneChip 分析程序进行表达谱分析。用运算法则 1, 平

均信号对平均信号，进行比较分析，列出具有 ± 2.5 倍或更高比值的基因。用 SigmaStat2.03 进行统计分析。将所有为负值的原始平均差异值调整为 1。对于表 6 中所列的基因而言，不同处理组间的总体差异在统计学上是显著的 ($p < 0.001$)。

表 6: 通过 Affymetrix RU34A 大鼠基因芯片测量的 KIM-1、OPN、Clusterin、 α -2u、C4、EGF 前体、VEGF、OAT-K1、醛缩酶 A、醛缩酶 B 的 RNA 表达谱

KIM-1	对照	环孢菌素 A (5mg/kg/天)	环孢菌素 A (20mg/kg/天)
平均差异值	6.5	5.9	168
平均标准误差	1.5	2	24
测试样品的数目	16	4	7
OPN			
	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	705	1088	2730
平均标准误差	61	70	260
测试样品的数目	16	4	7
Clusterin			
	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	305	302	2309
平均标准误差	12	26	198
测试样品的数目	16	4	7
α-2u			
	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	4.2	5.6	252
平均标准误差	2	4	53
测试样品的数目	16	4	7
C4			
	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	143	96	468
平均标准误差	13	22	74
测试样品的数目	16	4	7

EGF	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	1007	1007	224
平均标准误差	63	187	34
测试样品的数目	16	4	7
VEGF	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	166	157	65
平均标准误差	10	16	4.9
测试样品的数目	16	4	7
OAT-K1	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	668	681	287
平均标准误差	51	39	38
测试样品的数目	16	4	7
醛缩酶 A	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	192	211	7.3
平均标准误差	22	28	3.8
测试样品的数目	16	4	7
醛缩酶 B	对照	CsA (5mg)	CsA (20mg)
平均差异值	3222	2906	1523
平均标准误差	97	111	68
测试样品的数目	16	4	7

通过环孢菌素 A (CsA) 处理上调的基因

肾脏损伤分子-1 (KIM-1)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著上调的一种基因是肾脏损伤分子-1 (KIM-1) (探针对AF035963_at)。如表6中所示, 与对照大鼠相比, 用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中诱发了26倍的KIM-1表达 ($p < 0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对KIM-1的诱导。与CsA (5mg) 相比, CsA (20mg) 引起的KIM-1表达改变在统计学上是显著的 ($p < 0.004$)。

骨桥蛋白 (OPN)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著上调的第二基因是骨桥蛋白 (OPN) (探针对M14656_at)。如表6中所示,与对照大鼠相比,用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中诱导了3.9倍的骨桥蛋白表达 ($p<0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对骨桥蛋白的诱导。与CsA (5mg)相比, CsA (20mg)引起的骨桥蛋白表达改变在统计学上是显著的 ($p<0.001$)。

Clusterin/睾酮-抑制型前列腺信使2 (TRPM-2)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著上调的第三基因是Clusterin,也称为睾酮-抑制型前列腺信使2 (TRPM-2) (探针对M64733mRNA_s_at)。与对照大鼠相比,用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中诱导了7.6倍的Clusterin表达 (表6; $p<0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对Clusterin的诱导。与CsA (20mg)相比, CsA (5mg)引起的Clusterin表达改变在统计学上是显著的 ($p<0.001$)。

α -2u 球蛋白相关蛋白质 (α -2u)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著上调的第四基因是 α -2u球蛋白相关蛋白质 (α -2u) (探针对rc_AA946503_at),人体中也称为Lipocalin2 (LCN2)或嗜中性粒细胞明胶酶相关Lipocalin (NGAL)。与对照大鼠相比,用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中诱导了60倍的 α -2u表达 (表6; $p<0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对 α -2u的诱导。与对照以及CsA (5mg)相比, CsA (20mg)引起的 α -2u表达改变在统计学上是显著的 ($p<0.001$)。

补体成分4 (C4)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著上调的第五基因是补体成分4 (C4) (探针对U42719_at)。与对照大鼠相比,用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中诱导了3.3倍的C4表达 (表6, $p<0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对C4的显著诱导。与CsA (5mg)相比, CsA (20mg)引起的C4表达变化在统计学上是显著的 ($p<0.001$)。

通过环孢菌素 A (CsA) 处理下调的基因 表皮生长因子 (EGF)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著下调的第一基因是表皮生长因子 (EGF) (探针对X12748cds_s_at)。与对照大鼠相比, 用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠显示出EGF表达下降4.5倍(表6, $p < 0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到EGF表达的显著变化。与CsA (5mg) 相比, CsA (20mg) 引起的EGF表达变化在统计学上是显著的 ($p = 0.004$)。

血管内皮生长因子 (VEGF)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著下调的第二基因是血管内皮生长因子 (VEGF) (探针对rc_AA850734_at)。与对照大鼠相比, 用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中VEGF被抑制了2.6倍(表6, $p < 0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到对VEGF的显著抑制。与CsA (5mg) 相比, CsA (20mg) 引起的VEGF表达变化在统计学上是显著的 ($p < 0.001$)。

肾特异性有机阴离子转运蛋白 - K1 (OAT-K1)

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著下调的第三基因是肾特异性有机阴离子转运蛋白 - K1 (OAT-K1) (探针对D79981_at), 也称为溶质载体家族21成员a4 (SLC21A4)。与对照大鼠相比, 在用20mg/kg/天剂量的CsA处理的大鼠中OAT-K1的表达被抑制了2.3倍(表6, $p < 0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到OAT-K1表达的显著变化。与CsA (5mg) 相比, CsA (20mg) 引起的OAT-K1表达变化在统计学上是显著的 ($p \leq 0.019$)。

醛缩酶 A

已发现用20mg/kg/天剂量CsA处理能显著下调的第四基因是醛缩酶A (探针对U20643_at)。与对照大鼠相比, 在用20mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中醛缩酶A的表达被抑制了26倍(表6; $p < 0.001$)。在用5mg/kg/天剂量CsA处理的大鼠中未检测到醛缩酶A表达的显著变化。与CsA (5mg) 相

比, CsA (20mg) 引起的醛缩酶A表达变化在统计学上是显著的 ($p \leq 0.042$)。

醛缩酶 B

已发现用 20mg/kg/天剂量 CsA 处理能显著下调的第五基因是醛缩酶 B (探针对 X02284_at)。与对照大鼠相比, 在用 20mg/kg/天剂量 CsA 处理的大鼠中醛缩酶 B 的表达被抑制了 2.1 倍 (表 6; $p < 0.001$)。在用 5mg/kg/天剂量 CsA 处理的大鼠中未检测到 OAT-KI 表达的显著变化。与 CsA (5mg) 相比, CsA (20mg) 引起的醛缩酶 B 表达变化在统计学上是显著的 ($p < 0.001$)。

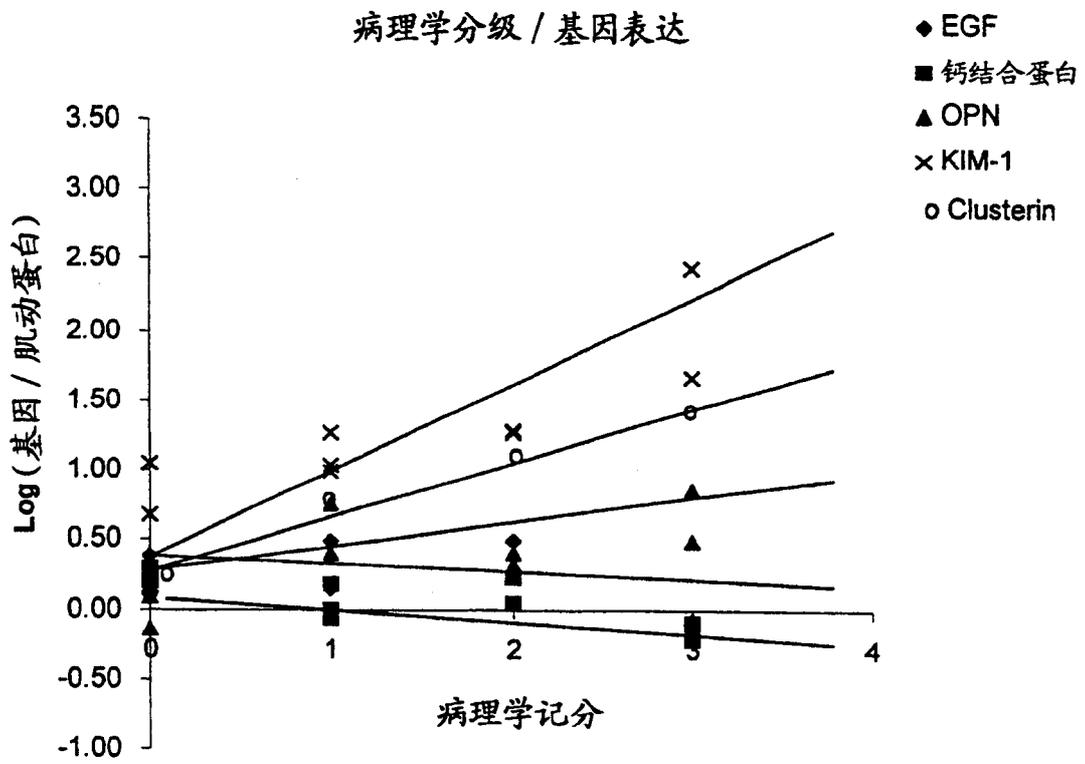
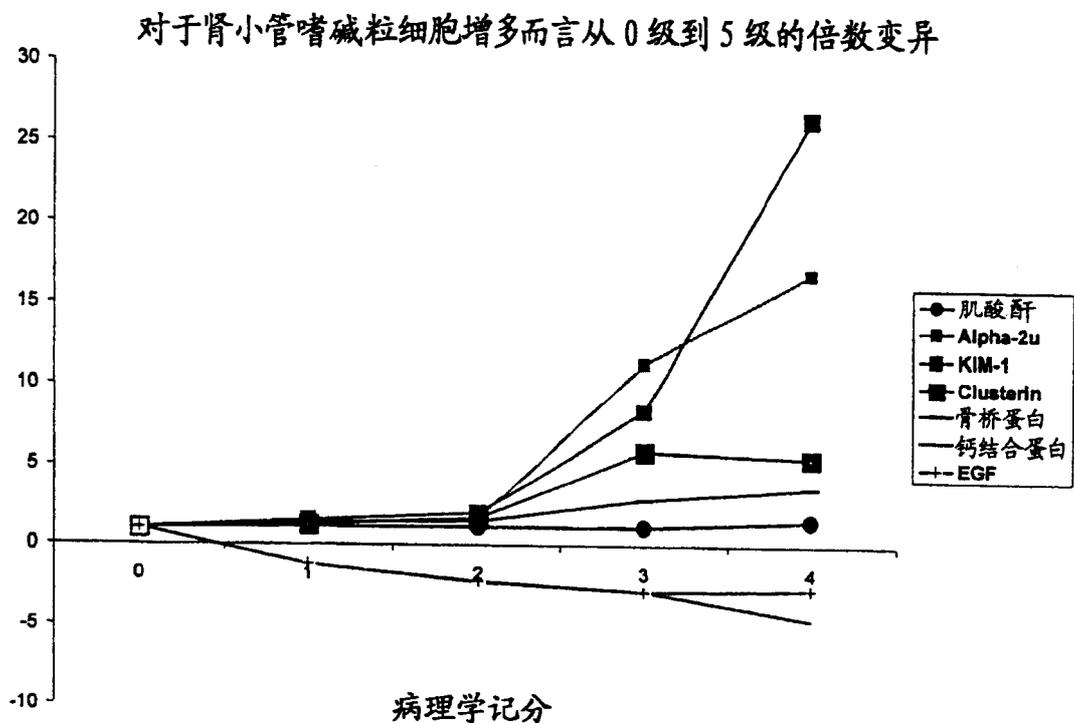


图 1



病理学记分

图 2

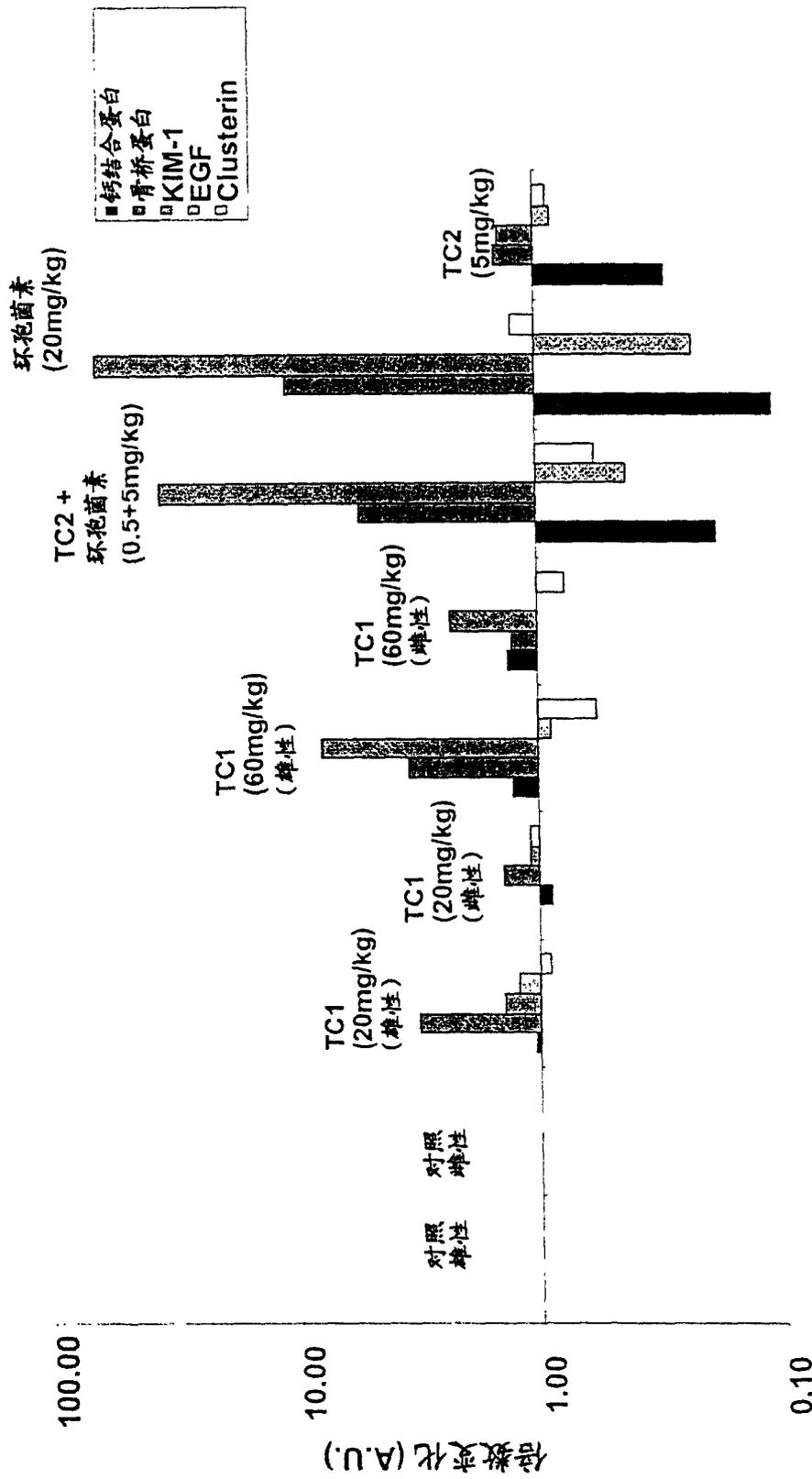


图 3

专利名称(译)	用于确定肾中毒的标记基因		
公开(公告)号	CN1688715A	公开(公告)日	2005-10-26
申请号	CN03818783.3	申请日	2003-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
[标]发明人	S D希布 O格勒内 G英伯特 J克伦 F施泰特勒 CD沃尔夫冈		
发明人	S-D·希布 O·格勒内 G·英伯特 J·克伦 F·施泰特勒 C·D·沃尔夫冈		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P13/12 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q2600/158 C12Q1/6883 A61P13/12		
优先权	2002015509 2002-07-04 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开了在肾中毒出现前以及用组织病理学检查证实前快速准确的读出肾中毒的方法。最终此方法应可用于初期的化合物筛选。为了根据预期的一般性肾毒性对新化合物进行表征和分级，鉴定的12种基因，即，钙结合蛋白 - D28k、KIM - 1、OPN、EGF、Clusterin、VEGF、OAT - K1、醛缩酶A、醛缩酶B、Podocin、 α - 2u和C4，被分组并最终可以以试剂盒的形式利用高通量技术PCR进行评估。本申请还公布了用于鉴定在肾病治疗中有用的药剂的方法、用于监测肾病治疗效力的方法和包含所公布基因的序列的肾特异性载体，以及用于鉴定与包括肾功能在内的生物学过程相关的候选基因的方法。

