

• 综 述 •

## FDA 和 EMEA 批准 7 种肾损伤生物标志物正式使用

徐 旭, 汤立达

天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

**摘 要** 药物安全性预测联盟(PSTC)集合众多制药企业的力量,在美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲医药评价署(EMEA)的指导下致力于药物安全性监测的研究,并向FDA和EMEA呈交了7种肾损伤生物标志物的研究结果。目前,FDA和EMEA评估并接受了这7种新的生物标志物,使之用于检测尿中反映肾损伤的信号。这些新的检测指标现在可作为药物评价的一部分,用于实验室探索实验性药物的安全性,从而使药物在安全性上更加可靠。

**关键词** 肾损伤; 生物标志物; FDA; EMEA; PSTC

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2010)05-0347-04

## Official use of seven new biomarkers of renal injury approved by FDA and EMEA

XU Xu, TANG Li-da

Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract** The Predictive Safety Testing Consortium (PSTC) brings pharmaceutical companies together to share and qualify new and improved safety testing methods with US and European regulatory agencies as advisors. And the seven urinary renal safety biomarkers were submitted to the FDA and EMEA by PSTC. Now FDA and EMEA have reviewed and accepted the seven new biomarkers-laboratory tests on urine that signals kidney injury. These new tests can be used in laboratory research to predict the safety of experimental drugs, enabling drugs to be greater confidence in their safety.

**Keywords** renal injury; biomarkers; FDA; EMEA; PSTC

近年来, 新药对肾脏等重要脏器损伤的早期检测受到包括制药企业、临床医生、患者及监管部门的重视。尽早发现新药对这些脏器的损伤, 不仅有利于保障新药受试者的安全, 同时也有利于制药公司和监管部门尽早评估受试药的风险, 以便决定是否继续研究, 以减少不必要的浪费。

传统的检查方法如生化指标或是病理检查, 都是损伤形成后的表现, 对早期发现新药的脏器毒性不够敏感。比如血清肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN), 这些指标往往要在肾功能损失一半以上才会显示异常, 因此无法用于早期诊断。随着生物技术的进展, 许多与肾脏损伤有关的生物标志物被人们发现, FDA 因势利导, 指导多家制药公司与科研单位合

作, 组成战略联盟, 开展了“药物安全性检测”的专项研究, 其中肾脏的损伤标志物的研究已在今年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲医药评价署 (EMEA) 的认可, 可以用于新药的肾脏损伤的早期评估。本文就对这些结果做一简单介绍。

### 1 “药物安全性预测联盟”(PSTC) 集合了众多制药企业的力量<sup>[1-4]</sup>

由于用于药物安全性检测的生物标志物的认定需要大量的非临床和临床研究, 相关费用及工作量是单个制药企业难以承受的, 而且安全性生物标志物的相关技术也由不同公司掌握。即使某个企业取得一些研究成果也因缺乏第三方的评估而不被 FDA 认可。

收稿日期: 2010-08-16

作者简介: 徐旭 (1976—), 男, 助理研究员, 研究方向为中药药理、心血管药理。E-mail: xuxutj@sina.com

为改变这一状况,2006年3月16日在FDA指导下成立了“药物安全性预测联盟”(Predictive Safety Testing Consortium, PSTC)。这是一个公私合作的产物,成员包括16个不同制药公司,以克服费用和技术方面的障碍。由非营利性的“关键技术协会”(critical path institute, C-Path)管理。C-Path作为“值得信任的第三方”致力于收集整理数据,协调科学研究工作。PSTC以不同工作组作为组织形式,包括肾毒性、肝毒性、血管损伤、骨骼肌损伤以及致癌性5个工作组。这些工作组由一个数据处理团队和一个(临床)转化策略团队辅助。其研究信息通过“投递信息自动检索系统”(the voluntary exploratory data submission, VXDS)为联盟成员所共享。VXDS允许PSTC向FDA和EMA呈交唯一的生物标志物应用数据,然后联系2个机构的科学家共同讨论细节,并确定其他的科学问题。2个机构在分别考查其应用后独立的决定这些新的生物标志物的使用。为更好的指导工作,FDA和EMA派出代表作为PSTC指导委员会和各工作组的观察员或顾问。18个FDA和8个EMA科学家参与到250个企业和学院科学家中。

表1 参与PSTC的企业成员

Table 1 Pharmaceutical companies of PSTC

• Abbott	• Eli Lilly, Inc
• Amgen, Inc	• Merck & Co., Inc
• Astra Zeneca	• Novartis
• Beohringer Ingelheim	• Pfizer, Inc
• Bristol-Myers Squibb	• Roche
• GlaxoSmithKline	• Sanofi-Aventis U. S. Inc
• Iconix Pharmaceuticals	• Schering Plough
• Johnson & Johnson	• Wyeth

新的肾损伤生物标志物的研究在FDA和EMA指导下,由PSTC肾毒性工作组承担。肾毒性工作组进行了23种尿蛋白分析。其中7种生物标志物于2007年6月15日呈交FDA和EMA,并于近期获得认可。这是第一次由制药公司的研究团队共同努力提出的新的安全性检测指标。

## 2 7种肾损伤生物标志物的特点<sup>[5-19]</sup>

PSTC研究人员通过10余项非临床研究,严格的评估了这7种肾毒性标志物。模型采用10种肾脏毒物导致的不同类型肾损伤。这些肾脏毒物包括不同的经典药物,例如氨基糖苷类、抗生素、化疗药

物、利尿剂、免疫抑制剂及抗躁狂药等。肾损伤程度由组织病理学评定,并准确的描述了损伤的类型和确切的定位。研究结果显示这7种生物标志物比BUN和SCr具有更好的诊断作用。基因和蛋白表达分析、原位杂交和免疫组化提供有力的证据支持这7种标志物来检测肾损伤,指导药物研究方面的决策。这7种生物标志物的具体特点如下。

### 2.1 丛生蛋白(clusterin)

丛生蛋白是相对分子质量为76 000~80 000的糖基化蛋白,具有很强的修饰作用,如糖基化、分裂、形成二聚体等。在肾损伤中,clusterin具有维持脂质转运、细胞的相互作用、补体的防御作用和启动凋亡等功能。当肾毒素、肾切除术后、多囊肝性肾病和肾细胞瘤引起的急性肾损伤时(包括肾小球、肾小管和肾乳头损伤),clusterin能在肾损伤后的去分化肾细胞中表达增加,在鼠、狗和灵长类动物的尿中均可检测出来。clusterin在肾小管损伤部位出现时,肾脏形态学上仍然是正常的,所以它能作为早期肾损伤的标志物。

### 2.2 尿总蛋白(total urinary protein)

尿总蛋白是一个突出的诊断标志物,在临床和非临床研究中可预测肾功能损失的情况。尿中出现蛋白增多,即蛋白尿,说明肾小球足细胞损伤,肾小球滤过率改变。尽管如此,鉴于使用检测试纸定性范围广,并不敏感,因此它的临床实用性仍有争议。

### 2.3 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2-microglobulin, $\beta$ 2-MG)

$\beta$ 2-微球蛋白是相对分子质量12 000的单链多肽低分子蛋白质,人体几乎所有有核细胞均能合成。主要由淋巴细胞产生,经肾小球滤过,99%以胞饮形式被肾小管上皮细胞摄取,并为溶酶体降解为氨基酸。重吸收的 $\beta$ 2-MG不再返回血循环,故正常尿中 $\beta$ 2-MG甚微。尿中的 $\beta$ 2-MG升高,可敏感地反映肾小管功能受损。正常人 $\beta$ 2-MG的合成与释放非常恒定,且与性别、年龄及时间无关。肾小球滤过率(GFR)及肾血流量降低时,血清 $\beta$ 2-MG升高,与GFR呈直线负相关。血清中 $\beta$ 2-MG能较好地反映肾小球滤过功能,且较肌酐升高更早、更显著。但在感染、自身免疫性疾病、肝脏病、肿瘤等血液中 $\beta$ 2-MG的量也升高,尤其在肾移植排斥反应和感染时, $\beta$ 2-MG不能作为监测GFR的理想指标。

## 2.4 胱抑素 C (cystatin C, Cys C)

Cys C 又名半胱氨酸蛋白酶抑制剂蛋白 C, 是相对分子质量为 13 000 的碱性分泌蛋白, 属于半胱氨酸蛋白酶抑制物超家族成员之一。由机体所有有核细胞以恒定速率产生。由于 Cys C 体积小, pH 值稳定, 所以它能自由滤过肾小球, 虽被肾小管上皮重吸收, 但随即被分解, 不会再进入血液循环。尿中的量由肾小球滤过率决定, 血清中浓度恒定, 不受性别、年龄、饮食、炎症等因素的干扰, 而 SCr 至成年后还稳定上升。Cys C 的相对分子质量大于肌酐, 带正电荷, 更容易反映肾小球滤过膜通透性的早期变化, 在 GFR 轻度降低时即可升高, 较肌酐更敏感。可作为简便、精确、灵敏地评价 GFR 的指标, 为临床早期诊断肾小球滤过功能受损提供依据。在方法学上, 以颗粒增强透射免疫比浊法及散射免疫比浊法, 替代了早先的放射免疫 (RIA)、荧光免疫 (FIA) 及酶联免疫 (EIA) 等测定法, 使测定时间缩短至 5 min 左右, 且可在自动生化仪上进行。需要指出的是, Cys C 水平受 HIV 和糖皮质激素使用的影响, 甲状腺素似乎也能使其水平增高, 动脉粥样硬化和主动脉瘤则降低其水平。因此, Cys C 可以敏感地反映 GFR 下降, 却无法预测肾损伤。

## 2.5 肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1)

KIM-1 是由 334 个氨基酸残基组成的 I 型跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白基因超家族。在正常的肾组织中几乎不表达, 但是在缺血及肾损伤后的人近曲小管上皮细胞中却呈高表达状态。KIM-1 参与肾脏疾病的损伤及修复过程, 在近端小管上皮细胞黏附、生长及分化中起重要作用。肾损伤发生后组织 KIM-1 胞外功能区被金属蛋白酶介导裂解并释放入尿, 并且尿 KIM-1 水平和组织 KIM-1 水平呈正相关。在诊断药源性肾小管坏死、退化和/或膨胀, 及组织细微变化或肾功能严重紊乱引起的嗜酸性粒细胞增多方面, KIM-1 的检测是高度灵敏、特异和精确的。KIM-1 在尿中性质稳定, 不受尿液理化特性的影响, ELISA 方法检测方便, 实验的灵敏度较高, 快速、高通量、重复性好, 一般实验室都可完成检测, 而且尿液收集方便, 无创伤, 因此 KIM-1 是检测早期肾损伤的理想标志物。

## 2.6 三叶因子 3 (trefoil factor 3, TFF3)

TFF3 是人体粘液生成细胞及多种组织的上皮

细胞分泌的小分子多肽激素。每个 TFF3 分子由 59 个氨基酸组成含有 1 个 P 结构域。TFF3 主要功能是对粘膜表面的维护和修复。TFF3 通过抑制凋亡、保护残存细胞、促进上皮细胞的移行来保护肠上皮。TFF3 的另一作用是诱导气管上皮纤毛细胞的分化。大鼠肾脏也是 TFF3 mRNA 表达的主要场所, 尽管其在肾中的分布不是很清楚。大鼠衰老与 TFF3 在肾中表达的减少有关。无肾损伤时尿 TFF3 水平无变化, 肾小管损伤时, 尿 TFF3 显著降低, 并先于组织毒性病变和 SCr 的升高。

## 2.7 白蛋白 (albumin)

白蛋白是一种主要的血清蛋白质, 在肾损伤时常在尿液中发现。尿液中 albumin 的数量对鉴别肾脏疾病的病因非常重要。尿中 albumin (肾病时 > 3.5 g/d) 与人体肾小球损伤有关。正常情况下血清 albumin 碎片通过肾小球基底膜, 在近曲小管被重吸收。低于 3.5 g/d 可能是发生肾小管疾病, 例如早期糖尿病, 化疗药物、庆大霉素引起的肾小管毒性损伤。在早期发现肾小管毒性方面, albumin 是一个有力的指标, 比 SCr 和 BUN 更敏感。值得注意的是尿中 albumin 对肾脏病不是特异的, 不能单独用作诊断肾损伤, 也可能是下泌尿道炎症、出血及感染, 发烧, 应激的结果, 建议与其他生物标志物联合使用。

## 3 对 7 种肾损伤生物标志物的补充研究<sup>[20]</sup>

PSTC 的后续研究认为, 对这 7 种肾损伤生物标志物的研究存在 2 个不足之处。(1) 生物标志物的研究多倾向于早期肾损伤的检测, 而缺乏肾损伤恢复情况的检测研究。多数药物引起的急性肾毒性主要影响敏感的近曲小管上皮组织。中等数量的近曲小管细胞急性坏死是一个可逆的过程, 可由临近的近曲小管细胞再生修复。PSTC 的研究人员进行了 2 项肾损伤大鼠恢复实验研究。肾损伤由青霉烯 A 或庆大霉素导致。2 项研究均检测了 7 个肾小管安全性标志物的水平, 包括 albumin, GST $\alpha$ , KIM-1, osteopontin (OPN), neutrophil gelatinase-associated lipocalin/lipocalin 2 (NGAL/LCN2), clusterin (CLU) and trefoil factor 3 (TFF3)。其中多数生物标志物可在 VXDS 检索到。研究结果显示所有标志物均不同程度的随肾小管组织病理学改变而变化。经过一段恢复期后, 所有生物标志物均恢复到近似正常水平。(2) 7 种肾损伤生物标志物均为尿液指标, 缺乏血

清检测指标。临床前药物研究通常包括血液采集, 血清生物标志物能在动物研究中反复检测, 而且动物血清生物标志物数据不像临床病人那样复杂。PSTC 研究人员研究了 8 种肾脏毒物和 2 种肝脏毒物造成的大鼠肾损伤, 发现血清 Cys C 在检测总体肾功能方面较 SCr 和 BUN 更敏感、更特异。

此外, PSTC 认为生物标志物应联合运用。生物标志物的检测作用覆盖了 2 种不同的肾毒性, 即近曲小管损伤和肾小球损伤。检测这 2 种损伤是很关键的。因为, 一方面近曲小管损伤是最频繁的、直接或间接的药源性损伤。另一方面, 肾小球损伤很少是可逆的。单一的标志物不可能运用在多种肾损伤中。只有采用多种标志物才能更大范围的、灵敏的检测肾脏各部分的安全性。

PSTC 除肾毒性工作组外, 其他工作组也取得一些进展。致癌性工作组鉴定了 2 个潜在的基因信号, 用于预测化学方法诱发的肿瘤。肝损伤工作组鉴定了 4 个检查方法。骨骼肌工作组鉴定了 8 个候选方法。总之, 随着这些新的安全性标志物在临床前和临床中运用的增加, 以及检测方法的改进, 它们的优势及不足将得到进一步明确, 药物安全性标志物的运用将开启一个新篇章。

#### 参考文献

- [1] Federico M G, Felix W F, William M, *et al.* The predictive safety testing consortium: A synthesis of the goals, challenges and accomplishments of the Critical Pat [J]. *Drug Discov Today: Technology*, 2007, 4 (2): 47-50.
- [2] Mattes W B, Walker E G. Translational toxicology and the work of the predictive safety testing consortium [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2009, 85 (3): 327-330.
- [3] Christopher D. FDA, European Medicines Agency to consider additional test results when assessing new drug safety collaborative effort by FDA and EMEA expected to yield additional safety dat [EB/OL]. FDA, (2008-07-12) [2009-06-18]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116911.htm>.
- [4] EMEA 临床试验用生物技术药物病毒安全性评价指导原则[J]. *药物评价研究*, 2010, 33 (1): 70-74.
- [5] Bonventre J V, Vaidya V S, Schmouder R, *et al.* Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicit [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 436-440.
- [6] Ishii A, Sakai Y, Nakamura A. Molecular pathological evaluation of clusterin in a rat model of unilateral ureteral obstruction as a possible biomarker of nephrotoxicity [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35 (3): 376-382.
- [7] Dieterle F, Perentes E, Cordier A, *et al.* Urinary clusterin, cystatin C, beta 2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injur [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 463-469.
- [8] Schaub S, Wilkins J A, Antonovici M, *et al.* Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allograft [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5 (4 Pt 1): 729-738.
- [9] Zahran A, El-Husseini A, Shoker A. Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature revie [J]. *Am J Nephrol*, 2007, 27 (2): 197- 205.
- [10] 胡中慧, 王全军, 廖明阳. 肾损伤的生物标志物研究进展[J]. *毒理学杂志*, 2009, 23 (6): 490-493.
- [11] 侯振江, 孟晨阳, 李红岩, 等. 肾小球滤过率标志物应用评价[J]. *医学与哲学 (临床决策论坛版)*, 2007, 28 (10): 31-32.
- [12] Vaidya V S, Ozer J S, Dieterle F, *et al.* Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studie [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 478-485.
- [13] Ichimura T, Asseldonk E J, Humphreys B D, *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cell [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (5): 1657-668.
- [14] Vaidya V S, Ozer J S, Dieterle F, *et al.* Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studie [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 478-485.
- [15] Yu Y, Jin H, Holder D, *et al.* Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injur [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 470-477.
- [16] Debata P R, Panda H, Supakar P C. Altered expression of trefoil factor 3 and cathepsin L gene in rat kidney during agin [J]. *Biogerontology*, 2007, 8 (1): 25-30.
- [17] Yu Y, Jin H, Holder D, *et al.* Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injur [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 470-477.
- [18] Christensen E I, Birn H, Rippe B, *et al.* Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts! [J]. *Kidney Int*, 2007, 72 (10): 1192-1194.
- [19] 周敏捷, 倪兆慧. 生物学标志物在慢性肾脏病中的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10 (2): 175-178.
- [20] Ozer J S, Dieterle F, Troth S, *et al.* A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal functio [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (5): 486-494.