



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104271197 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201380012919. 6

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 04

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/583, 379 2012. 01. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/020280 2013. 01. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/103811 EN 2013. 07. 11

(71) 申请人 波士顿医疗中心有限公司

地址 美国马萨诸塞州波士顿

(72) 发明人 卫宁·陆 学萍·范 D·J·萨伦特

(74) 专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事

务所 11276

代理人 刘云贵

(51) Int. Cl.

A61P 13/12 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书64页 附图20页

(54) 发明名称

用于诊断和治疗肾脏疾病的 SLIT-ROBO 信号

(57) 摘要

本发明提供治疗慢性肾脏疾病和蛋白尿的方法, 以及诊断慢性肾脏疾病和监测慢性肾脏疾病和蛋白尿进程中治疗效果的方法, 其是基于 SLIT-ROBO 信号通路在调节肾脏足细胞 F- 肌动蛋白细胞骨架和足突结构中意想不到的作用进行的。

1. 一种治疗有需要受治疗者慢性肾脏疾病的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患慢性肾脏疾病风险的受治疗者。

2. 一种降低有需要受治疗者蛋白尿的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患蛋白尿风险的受治疗者。

3. 根据权利要求 1 或 2 任一项所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的小干扰 RNA (siRNA), ROBO2 的小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 任一项所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

5. 根据权利要求 1 ~ 4 任一项所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

6. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,ROBO2 抑制性多肽是 ROBO2 的显性失活融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

7. 根据权利要求 1 ~ 6 任一项所述的方法,其中,患有或具有患慢性肾脏疾病的受治疗者患有糖尿病肾病和高血压。

8. 根据权利要求 1 ~ 7 任一项所述的方法,该方法进一步包括将额外的治疗剂给予受治疗者。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述额外的治疗剂是血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)。

10. 一种方法,包括:

a. 分析受治疗者的生物测试样本以确定 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平;

b. 确定生物测试样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否高于参考阈值水平;以及

c. 对需要处理或治疗的慢性肾脏疾病受治疗者进行诊断。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平的分析是采用 ROBO2 多肽的抗体或其抗原结合段进行。

12. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平的分析采用 PCR 或杂交分析进行。

13. 根据权利要求 10 ~ 12 任一项所述的方法,其中,生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或来自于尿样的颗粒化细胞。

14. 根据权利要求 10 ~ 13 任一项所述的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

15. 根据权利要求 10 ~ 13 任一项所述的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高两个标准差。

16. 一种分析方法,包括:

a. 将从受治疗者分离的生物测试样本与检测 ROBO2 多肽或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的试剂接触;以及

b. 测量 ROBO2 多肽的水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平;

其中,相对于正常生物样本,所述 ROBO2 多肽或所述编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平增强的,鉴定受治疗者患有慢性肾脏疾病和 / 或处于慢性肾脏疾病或蛋白尿的进程中。

17. 根据权利要求 16 所述的分析方法,其中,检测 ROBO2 多肽的表达水平采用特异性于 ROBO2 多肽的抗体或其抗原结合段进行。

18. 根据权利要求 16 所述的分析方法,其中,检测编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平采用 PCR 或杂交分析进行。

19. 根据权利要求 16 ~ 18 任一项所述的分析方法,其中,生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或来自于尿样的颗粒化细胞。

20. 根据权利要求 16 ~ 19 任一项所述的分析方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

21. 根据权利要求 16 ~ 19 任一项所述的分析方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高两个标准差。

22. 根据权利要求 16 ~ 21 任一项所述的分析方法,其中,受治疗者已经被诊断为患有糖尿病或高血压。

23. 一种确定受治疗者是否具有患上慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险,或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统,该系统包括:

a. 确定模块,其配置用以确定受治疗者生物样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平;

b. 比较模块,其配置用以接收通过确定模块确定的所述 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平,并进行至少一次分析以确定 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否大于预先确定的参考水平,进而提供重新取回内容;以及

c. 显示模块,其用于显示基于来自所述比较模块输出数据的内容,其中,该内容包括 ROBO2 多肽或 RNA 的表达水平或比率大于预先确定的参考水平或比率的指示性信号,或 ROBO2 的水平或表达比率不大于参考水平或预先确定的比率的指示性信号。

24. 根据权利要求 23 所述的系统,其中,显示在显示模块上的内容进一步包括推荐受治疗者接收的具体的治疗方案的指示性信号。

25. 一种确定受治疗者是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险,或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统,该系统包括:

a. 确定模块,其配置用以接收来自受治疗者的至少一个测试样本,并对至少一个测试样本进行至少一次分析以确定以下情况中一种情况的存在或不存在:

i. ROBO2 的表达比率大于预先确定比率,或

ii. ROBO2 的表达水平大于预先确定水平;

b. 存储设备,其设置用以储存来自所述确定模块输出的数据;以及

c. 显示模块,其用于显示基于来自所述确定模块输出数据的内容,其中,该内容包括 ROBO2 的表达比率大于预先确定比率或 ROBO2 的水平大于预先确定水平的指示性信号,或 ROBO2 的表达比率不大于预先确定比率或不大于预先确定水平的指示性信号。

26. 根据权利要求 25 所述的系统,其中,在显示模块上显示的内容进一步包括推荐受治疗者接收具体治疗方案的指示性信号。

27. 一种治疗具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的人类治疗者的方法,该方法包括给

予处理或治疗用以预防人类受治疗者慢性肾脏疾病或蛋白尿的发生,这些人类受治疗者被确定为 ROBO2 蛋白水平高于参考阈值水平。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高 20%。

29. 根据权利要求 27 所述的方法,其中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高两个标准差。

30. 根据权利要求 27 ~ 29 任一项所述的方法,其中,用于预防慢性肾脏疾病或蛋白尿发生的处理或治疗包括 ROBO2 抑制剂。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的小干扰 RNA (siRNA), ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

32. 根据权利要求 30 ~ 31 任一项所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

33. 根据权利要求 30 ~ 32 任一项所述的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 Ig1SLIT 的结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

34. 根据权利要求 31 所述的方法,其中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

35. ROBO2 抑制剂在治疗慢性肾脏疾病中的应用。

36. ROBO2 抑制剂在治疗蛋白尿中的应用。

37. 根据权利要求 35 或 36 任一项所述的应用,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的小干扰 RNA (siRNA),ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

38. 根据权利要求 35 ~ 37 任一项所述的应用,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或这两者的结合。

39. 根据权利要求 35 ~ 38 任一项所述的应用,其中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

40. 根据权利要求 37 所述的应用,其中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

41. 根据权利要求 35 ~ 40 任一项所述的应用,其中,慢性肾脏疾病和蛋白尿由糖尿病肾病或高血压引起的。

用于诊断和治疗肾脏疾病的 SLIT-ROBO 信号

相关申请的交叉引用

[0001] 根据美国法典第 35 部分第 119(e) 条,本申请要求美国临时专利申请序列号 61/583379、申请日为 2012 年 1 月 5 日的专利申请的优先权,其内容通过引用整体并入这里。

技术领域

[0002] 本发明涉及慢性肾脏疾病和蛋白尿的治疗方法,以及慢性肾脏疾病的诊断方法,和在慢性肾脏疾病和蛋白尿进程中监测治疗效果的方法。

政府支持

[0003] 本发明获得了美国国立卫生研究院颁布的合同号 DK078226 号的政府支持。政府对本发明具有一定的权利。

发明内容

[0004] 本发明提供治疗慢性肾脏疾病和蛋白尿的新方法,以及诊断慢性肾脏疾病的新方法和在慢性肾脏疾病和蛋白尿进程中监测治疗效果的新方法,这在部分上是基于发明人发现的 SLIT-ROBO 信号通路在调节肾脏足细胞 F-肌动蛋白细胞骨架和足突结构中新的和意想不到的作用。

[0005] 因此,在一些方面,本发明提供治疗有需要的受治疗者的慢性肾脏疾病的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患慢性肾脏疾病风险的受治疗者。

[0006] 在一些方面,本发明还提供降低有需要受治疗者的蛋白尿的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患蛋白尿风险的受治疗者。

[0007] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子 (antisense molecule),特异性于 ROBO2 的短干扰 RNA (siRNA),ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 的结构类似物。

[0008] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

[0009] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2S LIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

[0010] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

[0011] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,患有或具有患慢性肾脏疾病的受治疗者患有糖尿病肾病和高血压。

[0012] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,该方法进一步包

括将额外的治疗剂给予受治疗者。

[0013] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,该额外治疗剂为血管紧张素转换酶抑制剂 (ACE) 或血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)。

[0014] 在一些方面,本发明还提供方法,该方法包括:

a. 分析来自受治疗者的生物测试样本以确定 ROBO2 多肽或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平;

b. 确定生物测试样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否高于参考阈值水平;以及

c. 对需要处理或治疗慢性肾脏疾病的受治疗者进行诊断。

[0015] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,分析 ROBO2 多肽的表达水平采用特异性于 ROBO2 多肽的抗体或其抗原结合段进行。

[0016] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,分析编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平采用 PCR 或杂交分析进行。

[0017] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或来自于尿样的颗粒化细胞。

[0018] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

[0019] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高两个标准差。

[0020] 在一些方面,本发明还提供分析方法,包括:

a. 将从受治疗者分离的生物测试样本与检测 ROBO2 多肽或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的试剂接触;以及

b. 测量 ROBO2 多肽的水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平;

其中,相对于正常生物样本,所述 ROBO2 多肽或所述编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平增强的,鉴定受治疗者患有慢性肾脏疾病和 / 或处于慢性肾脏疾病或蛋白尿的进程中。

[0021] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的一些具体实施方式中,检测 ROBO2 多肽的表达水平采用特异性于 ROBO2 多肽的抗体或其抗原结合段进行。

[0022] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的一些具体实施方式中,检测编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平采用 PCR 或杂交分析进行。

[0023] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的一些具体实施方式中,生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或来自于尿样颗粒化细胞。

[0024] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的具体实施方式中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

[0025] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的具体实施方式中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高两个标准差。

[0026] 在这些分析方法和这里描述的所有这些分析方法的一些具体实施方式中,受治疗者已经被诊断为患有糖尿病或高血压。

[0027] 在一些方面,本发明提供确定受治疗者是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险,或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统,该系统包括:

a. 确定模块,其配置用以确定受治疗者生物样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平;

b. 比较模块,其配置用以接收通过确定模块确定的所述 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平,并进行至少一次分析以确定 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否大于预先确定的参考水平,进而提供重新取回内容;以及

c. 显示模块,其用于显示基于来自所述比较模块输出数据的内容,其中,该内容包括 ROBO2 多肽或 RNA 的表达水平或比率大于预先确定的参考水平或比率的指示性信号,或 ROBO2 的水平或表达比率不大于参考水平或预先确定的比率的指示性信号。

[0028] 在这些系统和这里描述的所有这些系统的一些具体实施方式中,显示在显示模块上的内容进一步包括推荐受治疗者接收具体的治疗方案的指示性信号。

[0029] 在一些方面,本发明提供确定受治疗者是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险,或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统,该系统包括:

a. 确定模块,其配置用以接收来自受治疗者的至少一个测试样本,并对至少一个测试样本进行至少一次分析以确定以下情况中的一种情况的存在或不存在:

i. ROBO2 的表达比率大于预先确定比率,或

ii. ROBO2 的表达水平大于预先确定水平;

b. 存储设备,其设置用以储存来自所述确定模块输出的数据;以及

c. 显示模块,其用于显示基于来自所述确定模块输出数据的内容,其中,该内容包括 ROBO2 的表达比率大于预先确定比率或 ROBO2 的水平大于预先确定水平的指示性信号,或 ROBO2 的表达比率不大于预先确定比率或不大于预先确定水平的指示性信号。

[0030] 在这些系统和这里描述的所有这些系统的一些具体实施方式中,在显示模块上显示的内容进一步包括推荐受治疗者接收具体治疗方案的指示性信号。

[0031] 在一些方面,本发明还提供治疗具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的人类受治疗者的方法,该方法包括给予处理或治疗用以预防人类受治疗者慢性肾脏疾病或蛋白尿的发生,这些人类受治疗者被确定为 ROBO2 蛋白水平高于参考阈值水平。

[0032] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高 20%。

[0033] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高两个标准差。

[0034] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,预防慢性肾脏疾病或蛋白尿发生的处理或治疗包括 ROBO2 抑制剂。

[0035] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的短干扰 RNA (siRNA), ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

[0036] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

[0037] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性于 Ig1SLIT 的结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

[0038] 在这些方法和这里描述的所有这些方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制性多

肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

[0039] 在一些方面,本发明还提供 ROBO2 抑制剂在治疗慢性肾脏疾病中的应用,和 ROBO2 抑制剂在治疗蛋白尿中应用。

[0040] 在这些用途和这里描述的所有这些用途的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的短干扰 RNA (siRNA),ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

[0041] 在这些用途和这里描述的所有这些用途的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

[0042] 在这些用途和这里描述的所有这些用途的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

[0043] 在这些用途和这里描述的所有这些用途的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

[0044] 在这些用途和这里描述的所有这些用途的一些具体实施方式中,慢性肾脏疾病和蛋白尿由糖尿病肾病或高血压引起的。

[0045] 在这些方面或这里描述的所有这些方面的一些具体实施方式中,ROBO2 是指人类 ROBO2,其具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1,通过 mRNA 序列 SEQ ID NO:2 编码。

定义

[0046] 为了方便起见,这里收集了说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语。除非另有说明或上下文暗示,否则下述术语和短语包括下述提供的含义。除非另有明确说明或从上下文可以明确看出,否则下述术语和短语不排除其所在领域已经获得的含义。提供这些定义是为了帮助描述具体实施方式,并不是为了限制所要求保护的发明,因为发明的范围只由权利要求书限定。除另有定义外,这里使用的所有技术术语或科学术语具有与其所在技术领域的技术人员通常理解相同的含义。

[0047] 这里使用的术语“包含 (comprising)”或“包含 (comprises)”用于涉及的组合物、方法及其各自组分,这些组分是本发明必要的,然而还开放地含有非指明的成分,无论是否必需。

[0048] 这里使用的术语“基本包含……”是指给定的具体实施方式所需要的那些成分。该术语允许附加成分的存在,这些附加成分的存在对发明具体实施方式的基本的和新的或功能性的特征不会有实质性的影响。

[0049] 术语“由……组成 (consisting of)”是指这里描述的组合物、方法及其各自组分,其中不包括未记载在说明书具体实施方式中的任何组分。

[0050] 在说明书和所附权利要求书中,使用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数形式,除非上下文明确规定。因此,例如,“该方法”是指包括一种或多种方法,和 / 或这里描述的该类型的多个步骤和 / 或在阅读公开内容等后对本领域技术人员是显而易见的方法。

[0051] 除了操作实施例中的或某处另有说明外,在此使用的表达材料成分的量或反应条件的所有数字,在任何情况下应当理解为被术语“约”修饰。当术语“约”与百分比结合使

用时,可以指 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 或 $\pm 1\%$ 。

[0052] 除非在此另有定义,使用的与本申请相关的科学术语和技术术语具有的含义是这些公开内容所述技术领域的普通技术人员通常理解的含义。应当理解的是,发明并不局限于在此描述的具体的方法、方案和试剂等等,而且这些可以改变。在此采用的术语的目的仅是为了描述具体实施方式,而不是为了限制本发明的范围,本发明的范围只由权利要求书限定。免疫学和分子生物学中普通术语的定义可在下列文献中找到:默克研究实验室 2006 年出版的《默克诊疗手册(第 18 版)》(ISBN 0-911910-18-2)(The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2)); Robert S. Porter 等(编写)、布莱克韦尔科学有限公司 1994 年出版的《分子生物学百科全书》(ISBN 0-632-02182-9)(Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)); 和 Robert A. Meyers(编写)、VCH 出版公司 1995 年出版的《分子生物学与生物技术:综合性案头参考》(ISBN 1-56081-569-8)(Robert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)); 爱思唯尔 2006 年出版、Werner Luttmann 编著的《免疫学》(Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006)。分子生物学中普通术语的定义可在下列文献中找到: Benjamin Lewin, 琼斯 & 巴特利特出版社 2007 年出版的《基因 IX》(ISBN-13:9780763740634)(Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13:9780763740634)); Kendrew 等(编写), 布莱克韦尔科学有限公司 1994 年出版的《分子生物学百科全书》(ISBN 0-632-02182-9)(Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)); 和 Robert A. Meyers(编写), 马尼亚蒂斯等,《分子克隆:实验指南》,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,美国(1982)(Robert A. Meyers(ed.), Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1982)); Sambrook 等,《分子克隆:实验指南(第 2 版)》,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,美国(1989)(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1989)); Davis 等,《分子生物学的基本方法》,爱思唯尔科学出版公司,纽约,美国(1986)(Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986)); 或《酶学方法:分子克隆技术指南》第 152 卷, S. L. Berger 和 A. R. Kimmerl 编写,学术出版公司,圣地亚哥,美国(1987)(Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987));《现代分子生物学实验技术(CPMB)》(Fred M. Ausubel 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司)(Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)),《现代蛋白科学实验技术(CPPS)》(John E. Coligan 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司)(Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.)), 和《现

代免疫学实验技术 (CPI)》((John E. Coligan 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司) (Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.)), 在此通过整体引用将其全部并入本文。

[0053] 应当理解的是, 下面的详细描述和下述实施例只是示例性的, 并不被认为限制本发明的范围。对本领域普通技术人员显而易见的公开的具体实施方式的各种变化和改进, 可以在不脱离本发明的精神和范围内做出。进一步地, 出于描述和公开的目的, 在此通过引用明确并入了所有专利、专利申请和经鉴定的出版物, 例如, 这些出版物中描述的可能与本发明结合使用。这些出版物被单独提供, 因为它们在本申请的申请日之前公开。在这方面, 没有什么应该可解释为对发明人无权凭借在先发明或任何其它原因而先于这些公开的承认。关于日期的所有声明或关于这些文件内容的陈述是基于申请人可获得的信息, 不构成关于日期和这些文件内容正确性的任何承认。

附图说明

[0054] 图 1A-1R 显示了 ROBO2 表达和定位于足细胞的基底细胞表面。在 (图 1A-1Q) : 中所有免疫染色于 600X 放大倍率下在小鼠 E16.5 天进行 (如图 5A-5M 显示的成年小鼠肾小球免疫染色)。(图 1A-1C) : ROBO2 与足细胞裂孔隔膜蛋白 nephrin 共定位。(图 1D-1F) ROBO2 与足细胞裂孔隔膜蛋白 podocin 共定位。(图 1G-1I) : ROBO2 与肾小球中衔接蛋白 Nck 共定位。(图 1J-1L) : ROBO2 表达在与肾小球基底膜巢蛋白 (nidogen) 相邻的基底足细胞表面。(图 1M-1O) : ROBO2 不与肾小球内皮细胞蛋白标志物血小板内皮细胞粘附分子 1 (Pecam1) 共定位。(图 1P) : (图 1L) 中框出的扩大区域表示 ROBO2 主要表达在与肾小球基底膜标记物巢蛋白 (nidogen) 相邻的足细胞 (P) 的基底细胞表面 (箭头)。ROBO2 在足细胞的顶端和侧面的细胞表面 (箭头) 弱表达。(图 1Q) : ROBO2 主要表达在足细胞 (P) 基底细胞表面 (箭头), 在顶端和侧面的细胞表面 (箭头) 弱表达。(图 1R) : 免疫胶体金电子显微镜显示在 3 周龄小鼠足细胞的足突 (FP) 中的金色部分 (gold partials) (箭头) 与 ROBO2 抗体共轭的位置。GBM : 肾小球基底膜。放大倍率 50,000X。也参见于图 5A-5M。

[0055] 图 2A-2J 显示了 ROBO2 与衔接蛋白 Nck 相互作用, 且与肾脏蛋白形成复合物。(图 2A) : 酵母双杂交分析表明 ROBO2 胞内域 (ROBO2-ICD) 和 Nck1 之间有正的相互作用。LacZ 报告子 (reporter) (X-gal) : +++, 酵母转暗 ; ++, 转亮 ; -, 在 24 小时内呈白色。Leu 报告子 (-Leu) : +, 酵母长成 ; -, 酵母未生长。CC, 细胞质保守区。数字表示全长蛋白中的残基位置。(图 2B) : 酵母双杂交分析表明 Nck1 的前两个 SH3 域对于其与 ROBO2-ICD 相互作用是必需的。(图 2C) : 酵母双杂交分析显示了介导 ROBO2 和 Nck1 相互作用的潜在结合域。该序列是 ROBO2 中 Nck1 的潜在结合域。富含脯氨酸的区域突出显示。(图 2D) : ROBO2 和 Nck 的共沉淀。从 his-myc-ROBO2 转染的细胞 (在通道 1 和通道 2 用) 中收集通道 5 的细胞溶解物 ; 从 his-myc-ROBO2- Δ NBD 转染细胞 (在通道 3 和通道 4 用) 中收集通道 6 的细胞溶解物。(图 2E) : ROBO2、Nck 和 Nephrin 的共沉淀。(图 2F) : 与 (图 2E) 相似的共沉淀, 除了使用 his-myc-Nephrin 进行捕获 (pull down) 代替 his-myc-ROBO2。(图 2G) : 肾脏内源性 Robo2, Nck, 和肾脏蛋白 (Nephrin) 的免疫共沉淀。(图 2H) : 与 (图 2G) 相似的分析, 除了用小鼠抗肾脏蛋白 (Nephrin) 抗体制备沉淀物。(I) Slit2 促进了 ROBO2-Nck-Nephrin 复合物的形成。His-myc-ROBO2, Nephrin, 和 Fyn 在用 Slit2 条件培养液培养液 (通道 1, 3) 或

对照条件培养液培养液（通道 2,4）刺激的 HEK 细胞中表达。（图 2J）：（图 2I）的强度量化（intensity quantification）。数据表示为平均值 \pm SEM ;n = 7, Student 氏配对 t- 检验,与对照组成相比,*P<0.05,**P<0.01。另请参见图 6A-6F’。

[0056] 图 3A-3G 显示了 Slit2-ROBO2 信号抑制 Nephin 介导的肌动蛋白的聚合。（图 3A）：CD16/7-NCD 在 Hek 细胞中与 ROBO2 共表达,其在 Slit2 条件培养液培养液 (Slit) 或对照条件培养液培养液 (CTL) 存在下用抗 -CD16 抗体和罗丹明结合的抗 -IgG 抗体处理。然后将细胞固定并用 FITC 结合的鬼笔环肽染色以显示 F- 肌动蛋白。比例尺,5 μ m。NCD :肾脏蛋白 (Nephin) 细胞质域。（图 3B）：与（图 3A）相似的分析,除了 CD16/7-NCD 被 CD16/7-HA 替换和用作对照分析。（图 3C）：每个组中,具有 F- 肌动蛋白尾巴的细胞占具有 CD16/7 簇的总细胞的百分比被定量。数据表示为平均值 \pm SEM,*P<0.01,n = 5。（图 3D）：Slit2 条件培养液培养液刺激（通道 1 和 3）或对照条件培养液培养液（通道 2 和 4）后,（图 3A）中 CD16/7-NCD 被抗 -CD16 抗体免疫沉淀。注意通道 1 中减少的 F- 肌动蛋白。CD16/7-HA 用作阴性对照。（图 3E）：（图 3D）的强度量化。数据表示为平均值 \pm SEM ;Student 氏配对 t- 检验,与对照组相比,n = 4,*P<0.05。（图 3F）：使用抗 -Nephin 抗体对来自于 ROBO2 敲除的纯合子 (ROBO2^{-/-}),杂合子 (ROBO2^{+/-}),和野生型 (ROBO2^{+/+}) 小鼠肾脏的 Nephin 的免疫沉淀。注意通道 3 中增加的 F- 肌动蛋白。（图 3G）：（图 3F）的强度量化。数据表示为平均值 \pm SEM ;ANOVA 分析,与野生型和杂合子相比,n = 4,*P<0.05。另请参见图 7A-7C。

[0057] 图 4A-4W 显示了 ROBO2 纯合缺失 (homozygous null)、ROBO2 足细胞特异性敲除、和 ROBO2 和 Nphs1 双基因敲除小鼠的足细胞结构表型。（图 4A 和 4B）：新生儿肾脏的代表图像显示野生型（图 4A）和 ROBO2 纯合缺失的小鼠（图 4B）中足细胞体（箭头）和肾小囊（箭头）。（图 4C 和图 4D）：（图 4A 和 4B）的高倍率放大图像显示新生儿肾脏的足细胞足突（箭头）。比例尺,1 μ m。（图 4E 和 4F）：3 周的肾脏在低倍放大镜下的代表图像显示与年龄匹配的对照（图 4E）相比,ROBO2 纯合缺失小鼠（图 4F）的足细胞细胞体（箭头）。（图 4G 和 4H）：（图 4E 和 4F）的更高倍率图像显示 3 周的 ROBO2 纯合缺失小鼠（图 4H）的无序的较短的曲折的足突（箭头）,与年龄匹配的对照中有序的拉链般的足突（图 4G）进行对比。比例尺 :2 μ m。（图 4I 和 4J）：代表性的透射电子显微镜图像（放大倍率 5000 倍）描述一月龄 ROBO2 足细胞特异性基因敲除小鼠和正常表型对照组（图 4I）中的局灶节段性足细胞足突消失 (focal foot process effacement)（图 4J 中箭头）。简称 :gc :肾小球毛细血管 ;us :肾小囊腔。（图 4K 和 4L）：高倍的透射电子显微镜图像 (40000 倍) 显示两个月龄 ROBO2 足细胞特异性突变小鼠具有与对照组（图 4K）相比更广泛的足细胞足突（图 4L 中箭头）。简称 :fp :足细胞足突 ;GBM :肾小球基底膜。（图 4M）：一月龄 Robo2^{de15/fllox}、Tg^{Nphs2-Cre+} 足细胞特异性敲除小鼠 (ROBO2KO) 和野生型同窝小鼠对照 (WT) 的足细胞足突宽度的定量。数据表示为平均值 \pm SEM,n = 333,*P<0.01。（图 4N）：酶联免疫吸附分析尿的斑点显示在 Robo2^{de15/fllox}、NPHS2-Cre+(KO) 成年小鼠中白蛋白 / 肌酐比值与对照组野生型 (WT) 相比升高。数据表示为平均值 \pm SEM,n = 20,*P<0.01。（图 4O）：蛋白印迹分析表明尿液中存在白蛋白 ;将各孔中加入 1 μ l 尿液,用 0.2 μ g 白蛋白作阳性对照。WT,三个野生型同窝小鼠 ;ROBO2KO,三个独立的 Robo2^{de15/fllox} ;Nphs2-Cre+ 小鼠。（图 4P 和 4Q）：扫描电子显微镜的代表图像显示破坏的趾状突的足细胞足突,其类似于 Nphs1^{-/-} 单纯合新生小鼠肾脏的杂乱的细胞突起（箭头）。比例尺 :1 μ m。（图 4R 和 4S）：来自于 Nphs1^{-/-}Robo2^{-/-} 双纯

合新生小鼠的肾小球显示恢复的趾状突的足突(箭头),表明通过敲除 ROBO2 减少 Nephrin 缺失表型。(图 4T 和 4U);来自于 ROBO2^{-/-}单纯合新生小鼠的肾小球显示不规则的和更宽广的足突而形成广泛趾状突模式(箭头)。(图 4V 和 4W);具有正常整齐趾状突模式的足突(箭头)的新生野生型小鼠的肾小球。还参见图 8A-8Z 和表 1-4。

[0058] 图 5A-5M 显示 ROBO2 在发育中和成熟的肾小球中的表达。(图 5A 和 5B):原位杂交分析显示 ROBO2 转录物在 E16.5 的正在发育的肾小球(箭头)中表达。放大倍数:60X(图 5A)和 200X(图 5B)。(图 5C-5F):免疫组织化学(IHC)研究揭示 ROBO2 在 E14.5 到 E17.5 的正在发育的肾小球中表达。放大倍率:600X。(图 5G):IHC 显示 ROBO2 在 5 周龄的成年小鼠肾小球中特异性表达(图 5G)。DAPI 标记肾脏的细胞核。放大倍率:400X。(图 5H):5 周龄肾脏的 IHC 共定位染色表明 ROBO2 在具有足细胞标志物 WT1 的肾小球中共表达。放大倍率:600X。(图 5I 和 5K):ROBO2 和 WT1 在 E16.5 的小鼠肾小球中共表达。(图 5L 和 5M):5 周龄肾脏的 IHC 共定位染色表明 ROBO2 在具有肾小球系膜细胞标记物 Pdgfrb(图 5L)和内皮细胞标记物 Pecam1(图 5M)的肾小球中共表达。放大倍率:600X。

[0059] 图 6A-6F' 显示了 ROBO2 与 Nck 相互作用,并形成含有 Nephrin 的复合物,其是通过 Slit2 的刺激而增强。(图 6A):ROBO2 和含有内源性 Nck 的 Nephrin 的免疫共沉淀。ROBO2、Nephrin 和 Fyn 在 Hek 细胞中表达,并通过 Slit2 刺激。内源性 Nck 由抗-Nck 抗体免疫沉淀。以小鼠 IgG 作为对照。含有 Nephrin 的复合物的形成通过 Slit2 和 Fyn 表达增强。(图 6B 和 6C):Slit2 通过免疫过氧化物酶染色而在新生小鼠肾小球中表达(图 6B),并且在肾小球中与足细胞标记物突触极蛋白(Synaptopodin)共表达(图 6C)。放大倍率:600X。(图 6D 和图 6D'):在 Slit2 存在下,CD16/7-NCD 与 ROBO2 在 Hek 细胞中共表达,用抗-CD16 抗体和罗丹明结合的抗-IgG 抗体处理,然后固定并用抗-ROBO2 抗体染色。CD16/7-NCD 簇与 ROBO2 共定位(图 6D)、但在对照的 CD16/7-HA 簇(图 6D')中观察到未共区域化的 CD16/7-NCD 簇。比例尺:5 μm。NCD:Nephrin 细胞质区。(图 6E-6E'):ROBO2 中 Nck 结合域(NBD)的缺失损害了其在 Slit2 存在下与 CD16/7-NCD 的共定位。CD16/7-NCD 簇与 ROBO2 共定位(图 6E)、但在 ROBO2-ΔNBD 簇中观察到未共区域化的 CD16/7-NCD 簇(图 6E')。比例尺:5 μm。(图 6F 和 6F'):Slit2 的刺激增强了 CD16/7-NCD 和 ROBO2 在 Hek 细胞中的共定位。CD16/7-NCD 簇与 ROBO2 在 Slit2 存在下共定位(图 6F),但不在对照条件培养液培养液共定位(图 6F')。比例尺:5 μm。

[0060] 图 7A-7C 显示在 Robo2 中 Nck 结合域(NBD)的缺失折中了 Slit2-ROBO2 对 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合的抑制。(图 7A):CD16/7-NCD 和 ROBO2 在 Hek 细胞中共表达,与抗-CD16 抗体和罗丹明结合的抗-IgG 抗体在 Slit2 条件培养液培养液(Slit2)或对照条件培养液培养液(CTL)存在下聚集。然后将细胞固定,并用 FITC 结合的鬼笔环肽染色,以显示 F-肌动蛋白纤维。CD16/7-NCD 和 F-肌动蛋白纤维的簇通过共聚焦显微镜检查得到的。比例尺,5 μm。NCD:Nephrin 细胞质区。(图 7B):CD16/7-NCD 和 ROBO2-ΔNBD 在 Hek 细胞中共表达。比例尺,5 μm。NBD:Nck 结合域。(图 7C):在每组中,具有 F-肌动蛋白尾巴的细胞占具有 CD16/7-NCD 簇的总细胞的百分比被定量化。数据表示为平均值 ± SEM,ANOVA 分析 *p = 1.436x10⁻⁵, **p = 6.32x10⁻⁵, n = 5。

[0061] 图 8A-8Z 显示在 ROBO2 纯合缺失、ROBO2 足细胞特异性敲除、ROBO2 和 Nphs1 双敲除小鼠中肾小球的表型,和 ROBO2-Nephrin 信号的拟建模式。(图 8A-8F):透射电子显微镜分

析新生的 (NB) $Robo2^{del15/del15}$ 突变小鼠肾脏中肾小球的超微结构。(图 8A, 8C, 8E): 在低倍率 (图 8A, 2200X), 中倍率 (图 8C, 15500X) 和高倍率 (图 8E, 52000X) 下的新生杂合的 $ROBO2$ 对照小鼠的肾小球超微结构。(图 8B, 8D, 8F): 在低倍率 (图 8B, 2200X), 中倍率 (图 8D, 15500X) 和高倍率 (图 8F, 52000X) 下新生杂合的 $ROBO2(-/-)$ (即 $Robo2^{del15/del15}$) 的突变小鼠的肾小球超微结构。箭头表示局灶节段性足细胞足突消失。简称: gc: 肾小球毛细血管; us: 肾小囊腔; GBM: 肾小球基底膜。(图 8G-8N): 在 $ROBO2$ 特异性敲除小鼠中异常的足细胞足突模式。(图 8G-8J): 来自于一月龄 $Robo2^{del15/fllox}$ 、 $Nphs2-Cre^+$ 足细胞特异性敲除小鼠和年龄匹配的 $Robo2^{fllox/+}$ 对照小鼠的肾小球的代表的扫描电子显微镜图像。在一月龄 $ROBO2$ 足细胞特异性敲除小鼠中发现趾状突足细胞足突的轻度不规则 (图 8K 和 8N)。当七个月大时, $Robo2$ 足细胞特异性敲除小鼠发生明显不规则的足突 (图 8L 和 8N)。比例尺: 10 微米 (图 8G, 8H, 8K, 8L, 放大倍率 2000X) 和 2 微米 (图 8I, 8J, 8M, 8N, 放大倍率 13000X)。(图 8O-8T): $Robo2$ 足细胞特异性敲除小鼠的肾小球形态。(图 8O-8R) 希夫氏高碘酸 (PAS) 染色显示 2 月龄和 6 月龄 $Robo2$ 足细胞特异性敲除小鼠的肾小球的系膜基质扩张 (图 8P, 8R), 对照为年龄匹配的小鼠 (图 8O, 8Q)。(图 8S): 肾小球的定量分析表明 12 月龄 $Robo2$ 足细胞特异性敲除小鼠 (MU) 的肾小球系膜基质扩张, 与年龄匹配的野生型 (WT) 对照相比。数据表示为平均值 \pm SEM, $n = 5$, $*P < 0.01$ 。(T): $Robo2$ 足细胞特异性敲除不影响足细胞的数量。使用 WT-1 染色鉴定足细胞。计算 4 个一年龄 $Robo2^{del15/fllox}$ 、 $Tg^{Nphs2-Cre^+}$ 足细胞特异性敲除小鼠 (MU) 中的每个肾小球横截面的足细胞数量, 对照为 4 个年龄匹配的野生型小鼠 (WT)。数据表示为平均值 \pm SEM, $p = 0.645$, t -检验; 突变体: $n = 165$ 肾小球; 对照: $n = 166$ 肾小球。(图 8U-8Y): $Robo2$ 和 $Nphs1$ 双敲除小鼠中肾小球的表型。(图 8U): H&E 染色显示在 $Nphs1^{-/-}$ 单纯合新生小鼠中肾小球具有膨胀鲍曼腔 (星号) 的特性, 放大倍率 400 倍。(图 8V): $Robo2^{-/-}$ 单纯合新生小鼠的肾小球显示没有鲍曼腔的膨胀, 放大倍率 400 倍。(图 8W): 在 $Robo2^{-/-}$ 、 $Nphs1^{-/-}$ 双纯合新生小鼠中显示、正常没有鲍曼腔膨胀 (箭头) 的肾小球样貌, 其表明 $Nphs1^{-/-}$ 肾小球表型的减轻, 放大倍率 400 倍。(图 8X): 作为对照的年龄匹配的野生型新生小鼠的正常肾脏和肾小球的 H&E 染色, 放大倍率 400 倍。(图 8Y): 新生小鼠中具有膨胀鲍曼腔的肾小球的定量分析表明 $Robo2^{-/-}$ 、 $Nphs1^{-/-}$ 双纯合中具有膨胀表型鲍曼腔特性的肾小球显著减少, 对照为 $ROBO2^{-/-}$ 单个纯合 ($Robo2^{+/-}$ 、 $Nphs1^{-/-}$)。数据表示为平均值 \pm SEM, $*p < 0.01$ 。(图 8Z): $Slit2$ - $Robo2$ 信号对 Nephlin 的抑制效应以影响足细胞足突结构的模型: 在生理条件下 (例如, 在足突发育期间), Nephlin 细胞内磷酸化酪氨酸结构域 (YDxV-P) 通过其与 SH2 结构域的相互作用结合 Nck。反过来, Nck 通过其 SH3 结构域与细胞骨架调节器结合, 以促进肌动蛋白聚合。 $Slit2$ 与 $Robo2$ 结合, 用以增加 $Robo2$ 胞内域与 Nck 的 SH3 结构域的相互作用, 这可防止 Nck 结合至细胞骨架调节器, 并导致对 Nephlin 诱导的肌动蛋白聚合的抑制。在足细胞发育为正常足突结构期间可维持均衡的肌动蛋白聚合。在没有 $Slit2$ - $Robo2$ 信号 (例如, 当 $Robo2$ 被敲除时) 时, $Robo2$ 对 Nephlin 诱导聚合的抑制作用消失。Nck 的 SH3 结构域可与下游的细胞骨架调节器相互作用, 以增加肌动蛋白聚合, 其可以解释在 $Robo2$ 突变小鼠中足细胞足突结构的改变。简称: Ig: 免疫球蛋白域; FN3: 纤连蛋白 3 型结构域; SH2: Src 同源 2 结构域; SH3: Src 同源 3 结构域; CC0, CC1, CC2, CC3: 细胞质保守区 0、1、2、3。

具体实施方式

[0062] 以前已经证明 Robo2 是推进导向暗号 Slit (repulsive guidance cue Slit) 的细胞表面受体, 并参与神经系统的轴突导向和神经元迁移。Nephrin 是一种足细胞狭缝隔膜蛋白, 其在肾脏的肾小球过滤屏障中起作用。在此我们证明 Robo2 在足细胞基面上表达, 例如小鼠足细胞, 并与 Nephrin 共定位。生物化学研究表明, 通过衔接蛋白 Nck, Robo2 与 Nephrin 在肾脏中形成复合物。与 Nephrin 促进肌动蛋白聚合的作用形成对照, 在此我们显示了 Slit2-Robo2 信号抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合。例如, 与 Nephrin 相关联的 F-肌动蛋白的数量在 Robo2 敲除小鼠中增加, 其形成改变的足细胞足突结构及微蛋白尿。遗传相互作用的研究进一步揭示 Robo2 缺失减轻 Nephrin 缺失小鼠的异常足细胞表型。在此提供的结果显示 Robo2 信号作为 Nephrin 的负调节因子以影响足细胞足突结构。

[0063] 另外, 已经证明, 患有膀胱输尿管返流 (VUR) 的病人有染色体易位, 其可破坏 ROBO2 基因, 并产生可终止 SLIT2-ROBO2 信号通路的显性失活 ROBO2 融合蛋白。通常地, VUR 是一种尿液从膀胱逆流至输尿管和肾脏的疾病, VUR 患者可出现反流性肾病, 这个状态伴有严重蛋白尿。已经显示, 由 VUR 患者产生的显性失活 ROBO2 融合蛋白封闭 SLIT2-ROBO2 信号通路, 并保护患者免于反流性肾病和蛋白尿, 从而确认并进一步支持发明人的结果, 该结果是在以 SLIT2-ROBO2 信号通路为目标治疗慢性肾脏疾病产生的治疗价值的动物模型中得到的。

[0064] 正常肾脏中, 三层的肾小球毛细血管壁包含网状内皮细胞、基底膜和足细胞其限制了血浆蛋白的渗透性。足细胞是专门的上皮细胞, 其延伸初级和次级突触以覆盖肾小球基底膜的外表面。相邻足细胞中富含肌动蛋白的趾状突的次级突触或足突, 通过半渗透狭缝隔膜桥连建立了过滤缝, 从而形成蛋白渗透的最终屏障。鉴于足细胞狭缝隔膜蛋白如 Nephrin 和其它的基因突变性与蛋白尿肾脏疾病的遗传形式相关 (特里格瓦松 (Tryggvason) 等, 2006) (Tryggvason et al., 2006), 构成狭缝隔膜蛋白和与狭缝隔膜蛋白相关的蛋白不只是简单的结构屏障, 这已经是明显的。这些蛋白形成一种均衡的信号网络, 其通过与 F-肌动蛋白细胞骨相互作用可影响足细胞足突结构和功能 (福勒等, 2007; 琼斯 Jones 等, 2006; 维尔马等, 2006) (Faul et al., 2007; Jones et al., 2006; Verma et al., 2006)。

[0065] 迂回 (roundabout) (Robo) 家族蛋白, Robo1、Robo2、Robo3 和 Robo4, 是分泌性配体 Slit (secreted ligand Slit) 的细胞表面受体 (迪克逊 (Dickson) 和 Gilestro, 2006) (Dickson and Gilestro, 2006)。最初发现, Slit1、Slit2 和 Slit3 在神经系统发育过程中是作为轴突导向和神经元迁移的推进导向暗号 (关 (Guan) 和饶 (Rao), 2003) (Guan and Rao, 2003)。跨膜蛋白 Robo 含有五个 Ig 基序, 三个 III 型纤连蛋白 (FNIII), 在其胞外域中重复 (迪克逊 (Dickson) 和 Gilestro, 2006) (Dickson and Gilestro, 2006)。虽然这两种免疫球蛋白 (Ig) 基序 1 和 2 与 Slit 相互作用, Robo 的第一 Ig1 基序是 Slit 的主要结合位点 (迪克逊 (Dickson) 和 Gilestro, 2006) (Dickson and Gilestro, 2006)。Robo 的胞内域有四个细胞质保守 (CC) 序列, 名为 CC0, CC1, CC2 和 CC3 (伯肖 (Bashaw) 等, 2000; 基德 (Kidd) 等, 1998; 漠尔洛 (Morlot) 等, 2007; 艾伦 (Zallen) 等, 1998) (Bashaw et al., 2000; Kidd et al., 1998; Morlot et al., 2007; Zallen et al., 1998)。CC0 和 CC1 含有酪氨酸, 而 CC2 和 CC3 是富含脯氨酸的延伸。Slit-Robo 信号的推进活性抑制肌动蛋白的聚合 (关 (Guan)

和饶 (Rao), 2003) (Guan and Rao, 2003) 或者诱导的 F- 肌动蛋白解聚 (派珀 (Piper) 等, 2006) (Piper et al., 2006)。

[0066] Slit-Robo 信号在早期肾脏感应和输尿管萌芽生长过程中也起着至关重要的作用。缺少 Slit2 或 Robo2 的小鼠突变体生长出多余的输尿管芽, 从而产生广谱的尿路表型, 包括双肾、输尿管膀胱畸形连接和肾积水 (Grieshammer 等, 2004; 陆 (Lu) 等, 2007) (Grieshammer et al., 2004; Lu et al. 2007)。人类 ROBO2 的破坏引起肾脏和尿路的先天异常 (CAKUT), 膀胱输尿管返流 (VUR) 患者已经确定有 Robo2 点突变 (陆 (Lu) 等, 2007) (Lu et al., 2007)。我们最近的研究表明, Robo2 对正常输尿管口的形成和是维持有效的抗返流机制身至关重要的 (王 (Wang) 等人, 2011) (Wang et al., 2011)。

[0067] 在此我们证明, Robo2 是在肾脏中肾小球足细胞基底表面表达的新型足细胞蛋白, 并与 Nephrin 和 podocin 共定位。Robo2 直接与衔接蛋白 NckSH3 域相互作用, 并与 Nephrin 形成复合物。鉴于 Robo2 敲除小鼠长出的改变的足细胞足突, Robo2 的缺失减轻了 Nephrin 缺失小鼠的足突结构的畸形。在此描述的这些结果表明, Robo2 信号作为 Nephrin 信号的负调节器以影响足细胞足突结构。另外, 如本文所证明的, 业已发现, 患者产生的显性失活 ROBO2 融合蛋白封闭 Slit2-Robo2 信号通路, 保护患者免于返流性肾病和蛋白尿, 从而确认并进一步支持发明人的结果, 该结果在以 SLIT2-ROBO2 信号通路为目标治疗慢性肾脏疾病产生的治疗价值的动物模型中得到的。

[0068] 因此, 在一些方面, 在此提供治疗有需要的受治疗者慢性肾脏疾病的方法, 这样的方法包括将治疗有效量的含有 Slit2-ROBO2 信号通路抑制剂的组合物给予患有或具有患慢性肾脏疾病风险的受治疗者。

[0069] 在一些方面, 在此还提供降低有需要受治疗者蛋白尿的方法, 该方法包括将治疗有效量的含有 Slit2-ROBO2 信号通路抑制剂的组合物给予患有或具有患蛋白尿风险的受治疗者。

[0070] 在另一些方面, 在此还提供预防或促进预防治疗有需要的受治疗者的肾脏疾病的方法, 该方法包括将治疗有效量的含有 Slit2-ROBO2 信号通路抑制剂的组合物给予受治疗者, 以预防或促进预防治疗受治疗者的肾脏疾病。

[0071] 在一些方面, 在此还提供在有需要受治疗者中减轻肾脏疾病影响、降低肾脏疾病严重性、降低肾脏疾病发展的可能性和 / 或减慢肾脏疾病进程的方法。

[0072] 如在此所用, “ROBO2” 是指具有如下氨基酸序列的多肽 :MARRHERVTRRMWTWAPGLLM
MTVVFVWGHQNGQGQGSRLRQEDFPPRIVEHPSDVIVSKGEPTTLNCKAEGRPPTPTIEWYKDERVETDKDDPRSHR
MLLPSGSLFFLRIVHGRRSKPDEGSYVCVARNYLGEAVSRNASLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRG
HPEPTIYWKDKVRIIDDKEERISIRGGKLMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPINQVV
LEEEAVEFRQCQVQGDPTVVRWKKDDADLPRGRYDIKDDYTLRIKKTMDSTDEGTYMCIAENRVGKMEASATLTVRAP
PQFVVRPRDQIVAQGRVTTFPCETKGNPQPAVFWQKEGSQNLLFPNQPQQPNSRCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYI
CQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPPPIILQGPANQTLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPRDPRATI
QEQGTLQIKNLRI SDTGTYT CVATSSSGETSWSAVLDVTESGATISKNYDLSDLPGPPSKPQVTDVTKNSVTLSWQP
GTPGTLPASAYII EAFS QSVSNSWQTVANHVKT TLYTVRGLRPNTIYLFMVRA INPQGLSDPSPMSDPVRTQDISPP
AQGVDRVQKELGDVLRVRLHNPVVLTPTTVQVTWTVDRQPQFIQGYRVMYRQTSGLQATSSWQNLDAKVPTERSA
VLVNLKKGVTYEIKVRPYFNEFQGMSESKTVRTTEEAPSAPPQSVTVLTVGSYNSSTSISVSWDPPPPDHQNGIIQ

EYKIWCLGNETRFHINKTVDAAIRSVIIGGLFPGIQYRVEVAASTSAGVGVKSEPQPIIIGRRNEVVITENNSIT
 EQITDVVVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKKRGLSNYAVTFQRGDGGLMSNGSRPGLLNAGDPSYPWLA
 DSWPATSLPVNNSNSGPNEIGNFGRGDVLPVPGQGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQ
 ILHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNGGKGGKKNKNSKPKQKNGSTWANVPLPPP
 PVQPLPGTELEHYAVEQQENGYSDSWCPPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPTPPVGRVASSPAISFGQQSTATL
 TPSPREEMQMLQAHLDELTRAYQFDIAKQTWHIQSNNQPPQPPVPLGYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALE
 IPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRMDQQPALPHR
 REGMTDEEALVPYSKPSFSPGGHSSSGTASSKGGSTGPRKTEVLRAGHQARNASDLLDIGYMGNSQGGFTGEL(智
 人迁回家族同族体 2 亚型 ROBO2a ;SEQ ID NO:1), 例如通过 NP-001122401.1 描述的和通
 过 NM-001128929.2 (SEQ ID NO:2) 编码 ;或 MSLMFTQLLLCGFLYVRVDGSRLRQEDFPRIVEHPSD
 VIVSKGEPTTLNCKAEGRPPTIEWYKDGERVEYTDKDDPRSHRMLLPSGSLFFLRIVHGRRSKPDEGSYVCVARNYL
 GEAVSRNASLEVALLRDDFRQNP TDVVVAAGEPAILECQPPRGHPPTIYWKDKVRIIDKEERISIRGGKLMISNT
 RKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPINQVVLVEEEAVEFRQCQVQGDQPPTVRWKDDADLPRGRY
 DIKDDYTLRIKKTMTSTDEGTYMCIAENRVGKMEASATLTVRAPPQFVVRPRDQIVAQGRVTVPFCETKGNPQPAVFW
 QKEGSQNLFPNQPPNSRCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDLVTRPPPIILQGP
 ANQTLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGDRPRATIIEQGTLLQIKNLRI SDTGTYTCVATSSSGETSWSA
 VLDVTESGATISKNYDLSLPGPPSKPQVTDVTKNSVTLVSWQPGTPGLPASAYIEAFSQQSVSNVSWQTVANHVKTT
 LYTVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPSPMSDPVRTQDISPPAQGVDRHQVQKELGDVLRVLRHNPVLTPTTVQVT
 WTVDRQPFIQGYRVMYRQTSGLQATSSWQNLDAKVPTERSALVNLKKGVTYIEIKVRPYFNEFQGMDSSEKTVRRT
 EEAPSAPPQSVTVLTVGSYNSTSI SVSWDPPPPDHQNGIIEYKIWCLGNETRFHINKTVDAAIRSVIIGGLFPGIQ
 YRVEVAASTSAGVGVKSEPQPIIIGRRNEVVITENNSITEQITDVVVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKK
 RKGLSNYAVTFQRGDGGLMSNGSRPGLLNAGDPSYPWLADSWPATSLPVNNSNSGPNEIGNFGRGDVLPVPGQGDK
 TATMLSDGAIYSSIDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQILHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQQKTDLMGFGYSLPDQ
 NKGNNGGKGGKKNKNSKPKQKNGSTWANVPLPPPQVQPLPGTELEHYAVEQQENGYSDSWCPPLPVQTYLHQG
 LEDELEEDDDRVPTPPVGRVASSPAISFGQQSTATLTPSPREEMQMLQAHLDELTRAYQFDIAKQTWHIQSNNQPP
 QPPVPLGYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPRPTSPFST
 DSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRMDQQPALPHRREGMTDEEALVPYSKPSFSPGGHSSSGTASSKGGSTGPRKTE
 VLRAGHQARNASDLLDIGYMGNSQGGFTGEL(智人同族体 2 亚型 ROBO2b ;SEQ ID NO:3), 例如通过
 NP_002933.1 描述和通过 NM_002942.4 (SEQ ID NO:4) 编码的, 以及与任何自然发生的等位
 基因, 接合变体及其处理后的形式一起。代表性地, ROBO2 是指人类 ROBO2。ROBO2 基因在
 黑猩猩、猕猴、狗、奶牛、小鼠、大鼠、鸡、斑马鱼、果蝇、蚊子和线虫中是保守的。ROBO2 特定的
 残基被称为, 例如“ROBO2(30)”。

[0073] ROBO2 的特定结构域也可以通过这些术语被提及。包含 5 个免疫球蛋白基序和 3
 个 III 型纤连蛋白 (FNIII) 重复序列的 N- 端或“ROBO2 的胞外域”, 例如, 可被称为 SEQ ID
 NO:1 的 ROBO2(46-848) 或 SEQ ID NO:3 的 ROBO2(30-832)。与 Slit2 相互作用的免疫球
 蛋白 (Ig) 基序 1 和 2, 或“Ig SLIT 结合域”可被称为 SEQ ID NO:1 分别的 ROBO2(46-145)
 和 ROBO2(151-237), 和 SEQ ID NO:3 分别的 ROBO2(30-129) 和 Robo2(135-221)。同样地,
 在此描述的包括“Nek 胞内结合域”的“胞内域”, 其包括 4 个细胞内富含脯氨酸基序, 可被
 称为 SEQ ID NO:3 的 ROBO2(881-1378)。

[0074] 在此使用的术语“ROBO2 抑制剂”、“ROBO2 拮抗剂”、“ROBO2 抑制剂药剂”和“ROBO2 拮抗剂药剂”是指具有显著封闭、抑制、降低或妨碍 ROBO2 (哺乳动物, 如人类 ROBO2) 的体外、原位和 / 或体内生物活性的分子或药剂, 所述生物活性包括由 ROBO2 信号介导的下游通路的活性, 例如 ROBO2 与衔接蛋白 Nck 的相互作用和 / 或与 Nephrin 形成的复合物, 介导的 Nephrin 介导的肌动蛋白聚合的抑制的 SLIT2-ROBO-2, 和 / 或诱导 ROBO2 的细胞应答。在此使用的关于 ROBO2 抑制剂的术语“药剂”, 意思是任何化合物或物质, 例如但不限于, 小分子、核酸、多肽、肽、药物、离子等。“药剂”可为任何化学的、实体、或部分, 包括但不限于, 合成的和自然产生的蛋白实体和非蛋白实体。在此描述的方面的一些具体实施方式中, 药剂为核酸、核酸类似物、蛋白质、抗体、肽、适体、核酸低聚物、氨基酸或碳水化合物, 以及包括但不限于, 蛋白质、寡核苷酸、核酶、脱氧核酶 (DNAzymes)、糖蛋白、反义 RNA、小干扰 RNA (siRNAs)、脂蛋白、适体以及上述的变型和组合。可以知道, 在此描述的用于治疗组合物和方法的化合物具有期望的活性和 / 或性质, 或采用本领域普通技术人员知道的筛选方法可以从各种化合物的化合物库中进行选择。

[0075] 在此描述的各种方面和具体实施方式预期使用的示例性 ROBO2 抑制剂包括, 但不限于, 与 ROBO2 特异性结合的抗 ROBO2 抗体或其抗原结合片段; 定向编码 ROBO2 的核酸的反义分子 (例如, ROBO2a 或 ROBO2b 或两者); 定向编码 ROBO2 的核酸的短干扰 RNA (“siRNA”) (例如, ROBO2a 或 ROBO2b 或两者); 结合到 ROBO2 并且抑制 / 降低 / 封闭 ROBO2 介导信号的 RNA 或 DNA 适体; ROBO2 结构类似物; 和可溶性 ROBO2 蛋白质, 抑制多肽, 如显性失活的多肽, 或其融合多肽。在此描述的这些方面和所有这些方面的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂 (例如抗体或其抗原结合片段) 与 ROBO2 结合 (物理上与其相互作用), 以下游的 ROBO2 信号为目标, 和 / 或抑制 (减少) ROBO2 合成、产生或释放。在此描述的这些方面和所有这些方面的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂结合和抑制其与 SLIT 蛋白配体, 如 SLIT2 的结合。在此描述的这些方面和所有这些方面的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂特异性地减少或消除一种或多种 ROBO2 亚型的表达 (例如转录或转化)。

[0076] 在此使用的 ROBO2 抑制剂或拮抗剂能够降低在细胞 (例如足细胞) 中 ROBO2 的活性和 / 或表达至少 5%, 至少 10%, 至少 15%, 至少 20%, 至少 25%, 至少 30%, 至少 35%, 至少 40%, 至少 45%, 至少 50%, 至少 55%, 至少 60%, 至少 65%, 至少 70%, 至少 75%, 至少 80%, 至少 85%, 至少 90%, 至少 95%, 至少 98%, 至少 99%, 或更多, 与没有 ROBO2 抑制剂存在的活性或表达水平相比。

[0077] 因此, 在在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中, Robo2 抑制剂抑制 Robo2 介导的信号传导。在在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中, Robo2 抑制剂以与衔接蛋白 Nck 相互作用的 Robo2 为目标和 / 或与 Nephrin、Nephrin 介导肌动蛋白聚合的 SLIT2-Robo-2 介导的抑制剂、和 / 或对 Robo2 细胞反应的诱导的络合生成。

[0078] 在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂的结合位点, 例如抗体或其抗原结合片段, 是针对 ROBO2 配体的相互作用位点, 例如 SLIT2 配体相互作用位点。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂的结合位点, 例如抗体或其抗原结合片段, 是针对 ROBO2 适配体结合位点, 例如 Nck 相互作用位点或包括四个 ROBO2 的细胞内富含脯氨酸基序的 NCK 胞内结合域。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中, ROBO2 抑制剂的结合位点是针对配体相互作用位点附近的一个位点目

标,以便于为受体(例如 ROBO2)和其配体(例如 SLIT2)的相互作用提供空间障碍。通过与 ROBO2 配体相互作用位点结合,在此描述的 ROBO2 抑制剂可减少或抑制 ROBO2 的活性或表达,以及下游 ROBO2 信号结果(例如 ROBO2 与衔接蛋白 Nck 相互作用和/或与 Nephrin 形成复合物,介导 Nephrin 介导的肌动蛋白聚合的 SLIT2-ROBO-2 的抑制,和/或对 ROBO2 细胞应答的诱导)。例如,在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂的结合位点封闭或靶向于 ROBO2 上至少 Ig1,并优选 Ig1 和 Ig2 位点,即,例如各自 SEQ ID NO:1 的 ROBO2(46-145)和 ROBO2(151-237),以及各自 SEQ ID NO:3 的 ROBO2(30-129)和 ROBO2(135-221)。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂的结合位点封闭或靶向于含有 Nck 胞内结合域的 ROBO2 胞内域,即 SEQ ID NO:3 的 ROBO2(818-1378)。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂的结合位点封闭或靶向于含有四个 ROBO2 的细胞内富含脯氨酸基序的 ROBO2Nck 胞内结合域。这可由本领域已知的多种方式完成,例如抗体和其抗原结合片段,抑制剂 RNA,等,以及如在此描述的。

[0079] 因此,在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与 ROBO2 选择性结合或与其物理上相互作用。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与 ROBO2 结合并抑制和/或封闭和/或阻止与 Nck 的相互作用和/或与 Nephrin 复合物的生成。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,抗体或其抗原结合片段与 ROBO2 的 Ig SLIT 结合域结合。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,抗体或其抗原结合片段与 ROBO2 的 Ig 1SLIT 结合域结合,或同时与 ROBO2 的 Ig 1 和 Ig2SLIT 结合域结合,即,各自 SEQ ID NO:1 的 ROBO2(46-145)和 ROBO2(151-237),以及各自 SEQ ID NO:3 的 ROBO2(30-129)和 ROBO2(135-221)。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,抗体或其抗原结合片段结合到或封闭 ROBO2 的胞内域,即,SEQ ID NO:3 的 ROBO2(818-1378)。在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,抗体或其抗原结合片段结合到或封闭含有四个 ROBO2 的细胞内富含脯氨酸基序的 Nck 胞内结合域。

[0080] 适用于在此描述的组合物和在此描述的方法的 ROBO2 的特异性的抗体或选择性结合 ROBO2 的抗体,优选为单克隆的,且可包括但不限于,人类抗体,人源化抗体或嵌合抗体,含有单链抗体,Fab 片段,F(ab') 片段,由 Fab 表达库产生的片段,和/或上述任意的结合片段。抗体也可指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即,含有抗原的分子或靶向结合位点或“抗原结合片段”的分子。这里描述的免疫球蛋白分子可为本领域技术人员理解的免疫球蛋白分子的任意类型(IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0081] 因此,在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,在此描述的 ROBO2 抑制剂为单克隆抗 ROBO2 抗体或抗原结合片段。

[0082] 在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,在此描述的 ROBO2 抑制剂是 ROBO2 抗体片段或抗原结合片段。在此所用的术语“抗体片段”、“抗体结合片段”和“抗体衍生物”是指仅含有完整抗体的部分的蛋白质片段,通常包括完整抗体的抗原结合点,并且因此保留了与抗原结合的能力。该术语抗体片段包括的抗体片段或抗原结合片段的实例包括:(i)Fab 片段,具有 V_L 、 C_L 、 V_H 和 C_H1 结构域;(ii)Fab' 片段,其是一种 Fab 片段,在 C_H1 结构域的 C-端具有一个或多个半胱氨酸残基;(iii)Fd 片段,具有 V_H 、 C_H1 域;(iv)Fd' 片段,具

有 V_H 和 C_H1 结构域,以及在 C_H1 结构域的 C-端具有一个或多个半胱氨酸残基;(v) Fv 片段,具有单臂抗体 V_L 和 V_H 结构域;(vi) dAb 片段(沃德等,自然杂志,1989(341):544-546)(Ward et al., Nature 341, 544-546(1989)),由 V_H 或 V_L 结构域组成;(vii) 分离的 CDR 区;(viii) $F(ab')_2$ 片段,其为二价片段,包含两个通过二硫桥键在铰链区连接的 Fab' 片段,(ix) 单链抗体分子(如单链 Fv、scFv)(伯德等,科学杂志,1998,242:423-426,和休斯顿等,美国国家科学院院刊(美国),1988,85:5879-5883)(Bird et al., Science 242:423-426(1988); and Huston et al., PNAS(USA) 85:5879-5883(1988));(x) 具有两个抗原结合点的“双体”,在相同多肽链中包括与轻链可变区 (V_L) 相连的重链可变区 (V_H)(见,例如,EP404097;WO 93/11161;霍林格等,美国国家科学协会公报,美国,1993,90:6444-6448)(EP 404,097; WO 93/11161;and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993));(xi) “线性抗体”,包括一对串联的 Fd 片段 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$),其与互补的轻链多肽形成一对抗原结合域(萨帕塔等.蛋白质工程,1995,8(10):1057-1062;美国专利 5641870)(Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995);and U. S. Pat. No. 5,641,870);以及前述任意的修饰版本(通过聚二醇(聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇)或其它适当聚合物的共价结合的修饰)。

[0083] 在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂或拮抗剂为 ROBO2 拮抗剂抗体或其抗原结合片段的嵌合抗体衍生物。

[0084] 在此所述的 ROBO2 抑制剂或拮抗剂抗体及其抗原结合片段,在一些具体实施方式中,也可为人源化抗体衍生物。

[0085] 在一些具体实施方式中,在此所述的 ROBO2 抑制剂或拮抗剂抗体及其抗原结合片段,包括修饰的衍生物,如被任意类型的分子通过的共价连接与抗体结合,条件是共价结合不会阻止抗体与目标抗原的结合,如 ROBO2。

[0086] 在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,使用完整的人类抗体,其对人类患者的治疗处理是尤为令人满意的。

[0087] 在此描述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂包括至少一种通过靶向于编码 ROBO2 的核酸能够封闭或减少特定功能 ROBO2 的表达的反义分子,例如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4,或两者,或其相关的结构域。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种反义分子靶向于编码 ROBO2 的 Ig SLIT 结合域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种反义分子靶向于编码 ROBO2 的 Ig1SLIT 结合域或 ROBO2 的 Ig1 和 Ig2SLIT 结合域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种反义分子靶向于编码 ROBO2 胞内域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种反义分子靶向于编码包含四个 ROBO2 的胞内富含脯氨酸基序的 Nck 胞内结合域的核酸。反义寡核苷酸的制备方法为本领域普通技术人员已知的,所述的反义寡核苷酸不与其它多核苷酸交叉反应即可特异性地与 ROBO2 mRNA 结合。靶向位点的示例包括但不限于,起始密码子;5' 调节区,包括启动子或增强子编码序列,包括任意保守的共识区;和 3' 非翻译区。在此所述的这些方面和这些所有方面的具体实施方式中,所述反义寡核苷酸的长度约为 10 至约 100 个核苷酸,约 15 至约 50 个核苷酸长度,约 18 至约 25 个核苷酸长度或更多。在某些具体实施方式中,反义寡核苷酸进一步包括化学修饰以提高抗核酸酶等诸如此类,例如,本领域普通技术人员已知的硫代

磷酸酯键和 2'-O-糖基修饰。

[0088] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂包括至少一种小干扰 RNA (siRNA) 分子,该小干扰 RNA 能够封闭或减少功能性 ROBO2 表达的其是通过靶向于编码 ROBO2 的核酸或靶向于 ROBO2 的两种亚型如 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 或其相关域的核酸实现的。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种 siRNA 分子靶向于编码 ROBO2 的 Ig SLIT 结合域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种 siRNA 分子靶向于编码 ROBO2 的 Ig1SLIT 结合域或 ROBO2 的 Ig1 和 Ig2SLIT 结合域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种 siRNA 分子靶向于编码 ROBO2 胞内域的核酸。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述至少一种 siRNA 分子靶向于编码包含四个 ROBO2 的细胞内富含脯氨酸基序的 Nck 胞内结合域的核酸。制备 siRNA 分子是常规的,不与其它多核苷酸交叉反应可特异性地靶向于 ROBO2mRNA。用于在此所述的组合物和方法的 siRNA 分子可由本领域已知方法制成,例如采用典型的固相合成寡核苷酸,并且与化学修饰结合用以提高 siRNA 药剂的半衰期和 / 或功效,和 / 或产生更多的强的递送制剂。做为选择地, siRNA 分子通过编码细胞内转录 siRNA 的表达盒的载体进行递送。

[0089] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂为 RNA 或 DNA 适体,其与一种或多种 ROBO2 亚型结合。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂或拮抗剂为 RNA 或 DNA 适体,其与 ROBO2 结合或与其进行物理上的相互作用,并且封闭 ROBO2 与配体分子或衔接分子之间的相互作用,诸如分别为 SLIT2 或 Nck。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂或拮抗剂为 RNA 或 DNA 适体,其与 ROBO2 结合或与其物理上相互作用,并且降低、阻止或封闭下游的 ROBO2 信号,例如 Nephrin 介导肌动蛋白聚合的抑制介导的 SLIT2-ROBO-2,和 / 或诱导对 ROBO2 的细胞应答。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述为 RNA 或 DNA 适体与 ROBO2 的 Ig SLIT 结合域进行结合或与其进行物理上相互作用。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 RNA 或 DNA 适体与 ROBO2 的 Ig1SLIT 结合域或与 ROBO2 的 Ig1 和 Ig2SLIT 结合域结合或与其物理上相互作用,即 SEQ ID NO:1 各自的 ROBO2 (46-145) 和 ROBO2 (151-237),以及 SEQ ID NO:3 各自的 ROBO2 (30-129) 和 ROBO2 (135-221)。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 RNA 或 DNA 适体与 ROBO2 胞内域例如 SEQ ID NO:3 的 ROBO2 (881-1378) 结合或与其物理上相互作用。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 RNA 或 DNA 适体与 Nck 胞内结合域结合或与其物理上相互作用或封闭 Nck 胞内结合域,所述 Nck 胞内结合域含有四个 ROBO2 细胞内富含脯氨酸基序。

[0090] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂为靶向于 ROBO2 或与其结合的小分子化合物或药剂,包括但不限于,小肽或肽类分子,可溶性肽,以及合成的非肽基有机化合物或合成的非肽基无机化合物。这里使用的术语“小分子”是指以一种化学的药剂,可包括但不限于,肽、拟肽物、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、适体、核苷酸、核苷酸类似物、分子量小于约 10000g/mol 的有机或无机化合物(例如,包括杂有机化合物 (heterorganic compound) 和有机金属化合物)、分子量小于约 5000g/mol 的有机或无机化合物、分子量小于约 1000g/mol 的有机或无机化合物、分子量小于约 500g/mol 的有机或无机化合物、以及这些化合物的盐、酯和其它药学上可接受的形式。小分

子结合位点的示例包括但不限于,与 SLIT2 或适体 Nck 结合的 ROBO2 的部分,即,ROBO2 的 Ig SLIT 结合域或 ROBO2 的 Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,ROBO2 胞内域或含有四个 ROBO2 胞内富含脯氨酸基序的 Nck 胞内结合域。

[0091] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂或拮抗剂含有与 ROBO2 结合或抑制 ROBO2 生物活性的小分子。

[0092] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂或拮抗剂含有至少一种 ROBO2 结构类似物,诸如显性失活 ROBO2 多肽。这里使用的术语 ROBO2 结构类似物是指具有与 ROBO2 的部分的三维结构相似的化合物,并且其与 SLIT2 和 / 或 Nck 在生理条件下在体内或体外结合,其中,结合至少部分地抑制 ROBO2 生物活性,例如 Nephrin 介导肌动蛋白聚合的抑制介导的 SLIT2-ROBO2,和 / 或诱导 ROBO2 细胞应答。例如,可通过 SLIT2-ROBO2 结合的分子模型设计和合成合适的 ROBO2 结构类似物。ROBO2 结构类似物可为单体、二聚体或以相同或不同结构任意希望组合的高阶多聚体以获得改进的亲和力和生物效应。

[0093] 在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制剂或拮抗剂含有至少一种可溶性 ROBO2 受体或其融合多肽,例如,ROBO2 抑制性多肽。在一些这样的具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制性多肽为显性失活的 ROBO2 融合蛋白质。在此所述的组合物和方法的一些具体实施方式中,所述 ROBO2 抑制性多肽含有 ROBO2 胞外域,例如 ROBO2 的 Ig1SLIT 结合域或 ROBO2 的 Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,没有 ROBO2 胞内域。

[0094] 在此所述的组合物和方法中使用的 ROBO2 抑制剂或拮抗剂可采用本领域已知的方法识别或表征,例如,蛋白质-蛋白质结合分析,生化筛选分析,免疫分析和基于细胞的分析,这些是本领域众所周知的,包括但不限于实施例中描述的那些。

[0095] 例如,为了鉴定抑制 ROBO2 与其配体如 SLIT2 相互作用的分子,可使用结合分析。例如,通过共价连接或非共价连接,将 ROBO2 或 SLIT 固定在微量滴定板上。该分析通过将可被检测标签标记的非固定化组分(配体或受体)加入固定化组分中,在存在或不存在检测试剂的情况下。当反应完全时,移出未反应的组分并检测结合复合物。例如,如果结合复合物的形成被存在的检测试剂抑制,那么可认为检测试剂是抑制 ROBO2 与 SLIT 之间结合的候选的拮抗剂。基于细胞的分析或基于膜的分析也可用于鉴定 ROBO2 抑制剂。在其它具体实施方式中,通过检测和 / 或测量 ROBO2 基因的表达水平,可检测出抑制 ROBO2 基因表达的 ROBO2 抑制剂分子。可通过多种方法检测和 / 测量 ROBO2 基因表达,例如实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),酶联免疫吸附分析(ELISA),RNA 印迹分析(Northern blotting)或流式细胞术以及本领域普通技术人员已知的方法。

[0096] 这些被鉴定的 ROBO2 抑制剂可采用慢性肾脏疾病的体内动物模型进一步测试,例如肾小球和间质损伤模型(例如,狼疮性肾炎的动物模型,包括新西兰黑鼠(NZB),(NZB x NZW)第一代杂交体(称为 NZB/W),及其同类系衍生物,MRL/lpr 和 BXSB 菌株),衰老动物模型(例如,老年雄性远交群大鼠和老年 C57BL/6 小鼠);自发性高血压大鼠(SHR);Buffalo/mna 大鼠,其是人类原发性肾病综合征的模型;Munich Wistar Frömter (MWF) 大鼠,其为与先天性肾单元数目缺陷有关的遗传模型,肾单元数目缺陷可使成人有发展为高血压和盐敏感倾向;原发性足细胞特异性遗传性 FSGS 模型;HIV 相关肾病转基因小鼠模型;Alport 综合征动物模型,其包括 IV 型胶原(COL4A3、COL4A4 和 COL4A5)的 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 或 $\alpha 5$

链的突变体；免疫诱导模型，例如 Thy-1 肾炎模型，其为系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 的大鼠实验模型，抗肾小球基底膜 (GBM) 模型；和非免疫诱导模型。

[0097] 关于 ROBO2 抑制剂，在此使用的“选择性结合”或“特异性结合”或“特异性于”是指在此描述的 ROBO2 抑制剂的能力，例如，ROBO2 拮抗剂抗体或其 ROBO2 抗原结合片段，与靶标如 ROBO2 结合的 K_D 为 $10^{-5}M$ (10000nM) 或更小，例如 $10^{-6}M$ 或更小， $10^{-7}M$ 或更小， $10^{-8}M$ 或更小， $10^{-9}M$ 或更小， $10^{-10}M$ 或更小， $10^{-11}M$ 或更小，或 $10^{-12}M$ 或更小。例如，如果在此描述的 ROBO2 抑制剂 / 拮抗剂与 ROBO2 结合的 K_D 为 $10^{-5}M$ 或更低，而不与相关分子如 ROBO 家族的其它成员结合，则可以说该药剂是可特异性结合 ROBO2。例如，特异性结合可受亲和力和亲合性 (affinity and 的影响，例如 ROBO2 抑制剂 / 拮抗剂抗体或其抗原结合片段和多肽试剂的浓度。本领域普通技术人员可确定适当的条件，在该条件下，在此描述的多肽试剂采用适当的方法选择性地与靶标结合，例如在细胞结合分析中多肽试剂的滴定。

[0098] 关于通过抑制 ROBO2 活性治疗慢性肾脏疾病的方法，术语“慢性肾脏疾病”或 CKD 是指肾脏疾病，其由于肾单位逐步缺失以及随后的肾功能缺失，随时间缓慢和逐步恶化的。在开始阶段可能没有症状。功能丧失通常需要几个月或几年才会发生。可能是太缓慢以至于直到肾功能不足正常的十分之一时症状才会出现。慢性肾脏疾病的最终阶段称为终末期肾病 (ESRD)。在这个阶段，肾脏不再能够清除体内足够的废物和多余的液体。患者需要透析或肾脏移植。可引起糖尿病肾病的糖尿病和高血压是慢性肾脏疾病的两种最常见原因，并占大多数。其它可损害肾脏并引起慢性肾脏疾病的疾病和状态包括：自身免疫性紊乱（如系统性红斑狼疮和硬皮病），肾脏先天缺陷（如多囊性肾病），某些有毒化学物质，肾小球性肾炎，损伤或创伤，肾结石和感染，通向肾脏或肾脏中的动脉相关问题，一些止痛药或其它药物（如抗癌药物），返流性肾病（其中尿液逆流至肾脏而损害肾脏），等等。在此使用的“蛋白尿”是指尿液中存在过量的血清蛋白。在一些具体实施方式中，蛋白尿是肾脏疾病的象征，但其本身并不是决定性的。

[0099] 因此，在在此所述的这些方面和所有这些方面的一些具体实施方式中，患有或具有患慢性肾脏疾病风险的受治疗者患有糖尿病肾病。

[0100] 在慢性肾脏疾病和蛋白尿的治疗方法方面，在此描述的“减少”或“抑制”意思是对慢性肾脏疾病给定的参数或症状整体上降低的能力，所述“减少”或“抑制”是指优选可整体下降 20% 或更多，30% 或更多，40% 或更多，45% 或更多，更优选地 50% 或更多，55% 或更多，60% 或更多，65% 或更多，70% 或更多，最优选 75% 或更多，80% 或更多，85% 或更多，90% 或更多，或 95% 或更多。例如，减少或抑制可以是指被治疗的疾病的症状，例如高血压、尿中的蛋白等。

[0101] 高血压几乎一直存在于慢性肾脏疾病的各个阶段。神经系统检查可显示神经损伤的迹象。在用听诊器听的时候，医疗服务人员可能会听到不正常的心脏或肺部声音。慢性肾脏疾病的早期症状也有其它疾病的症状。这些症状在病症更进一步发展之前可能是肾脏疾病的唯一迹象。慢性肾脏疾病的症状可包括：食欲不振，一般不适和疲劳，头痛，痒（瘙痒）和皮肤干燥，恶心，不尝试减肥而体重减少，等等。特别是当肾功能恶化时，可发展的其它症状包括：皮肤异常暗或亮；骨痛；脑和神经系统症状；昏睡和困惑；集中或思考的问题；手脚或其它部分麻木；肌肉抽搐或痉挛；口臭；易瘀伤，出血或便血；烦渴；经常打嗝；性欲低下和阳痿；月经周期停止（闭经）；气息不足；睡眠问题，如失眠，不宁腿综合征和阻塞性

睡眠呼吸暂停；手脚浮肿（水肿）；呕吐，特别是在上午。

[0102] 因此，在此所述方法的一些具体实施方式中，有效量的含有在此描述的 ROBO2 抑制剂的组合物给予受治疗者以减轻慢性肾脏疾病的症状。在此所用的“减轻慢性肾脏疾病的症状”为改善与慢性肾脏疾病相关的任何状态或症状。可选地，减轻慢性肾脏疾病可包括，减少受治疗者的一种或多种慢性肾脏疾病症状，相对于未处理的患有慢性肾脏疾病的对照或相对于受治疗者治疗前。与相当的未处理对照相比，或与用 ROBO2 抑制剂处理前的受治疗者相比，这些减少或预防程度为至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40%，至少 45%，至少 50%，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，或更多，通过任何标准技术测量。理想的是，采用本领域已知的任意标准方法检测，慢性肾脏疾病显著降低或检测不到，这种情况下认为慢性肾脏疾病得到了治疗。正在接受治疗慢性肾脏疾病的患者是医师已经诊断为具有这种状态的人。本领域普通技术人员已知的任何合适的方法均可用于诊断。例如，诊断和监控包括检测尿液、血液或血清样本中特异性蛋白质或分子的水平，例如白蛋白，钙，胆固醇，全血计数（CBC），电解质，镁，磷，钾，钠，或上述任意组合；例如检测分析肌酐清除率，肌酐水平，BUN（血尿素氮）；通过使用特异性的技术或程序，例如腹部 CT 扫描、腹部 MRI、腹部超声波、肾脏活组织切片、肾脏扫描、肾脏超声波；通过分析或测试红细胞生成素、甲状旁腺素（PTH）的结果变化的检测；骨密度检测或维生素 D；或其它这些检测方法和分析的任意组合。

[0103] 关于在此所述任一方法使用的术语“受治疗者”和“个体”在此中可交换使用，并且是指动物，如人类，是在此所述 ROBO2 抑制剂的接受者。为了治疗对特定动物如人类受治疗者特定的病态，术语“受治疗者”是指特定的动物。术语“非人类动物”和“非人类哺乳动物”在此中可交换使用，包括哺乳动物如大鼠、小鼠、兔子、羊、猫、狗、牛、猪和非人灵长类动物。术语“受治疗者”也包括任何脊椎动物，包括但不限于，哺乳动物、爬行动物、两栖类动物和鱼。然而，有利的是，受治疗者是哺乳动物如人类，或其它哺乳动物例如家养的哺乳动物，如狗、猫、马等等。

[0104] 在此描述的这些方法和所有这些方法的一些具体实施方式中，该方法进一步包括，除 ROBO2 抑制剂外，给予受治疗者额外的治疗剂。这种额外的治疗剂可与 ROBO2 抑制剂共同给药。如在此使用的短语“共同给药（co-administering）”或“共同给予（co-administer）”是将在此所述的 ROBO2 抑制剂和另一种化合物如治疗剂单独地、同时地和 / 或经过一段由有资格的护理人员确定的时间连续地给药。

[0105] 在一些这样的具体实施方式中，额外的治疗剂为血管紧张素转换酶（ACE）抑制剂，血管紧张素 II 受体拮抗剂（ARB）或盐皮质激素受体（MR）拮抗剂。

[0106] 在此所述的与 ROBO2 抑制剂使用的 ACE 抑制剂包括但不限于，贝那普利（benazepril）（在美国以 Lotensin™ 销售），卡托普利（captopril）（在美国以 Capoten™ 销售），依那普利（enalapril）/ 依那普利拉（enalaprilat）（在美国以口服和注射的 Vasotec™ 销售），福辛普利（fosinopril）（在美国以 Monopril™ 销售），赖诺普利（lisinopril）（在美国以 Zestril™ 或 Prinivil™ 销售），莫西普利（moexipril）（在美国以 Univasc™ 销售），培哌普利（perindopril）（在美国以 Aceon™ 销售），喹那普利（quinapril）（在美国以 Accupril™ 销售），雷米普利（ramipril）（在美国以 Altace™ 销售）和群多普利

(trandolapril) (在美国以 Mavik™ 销售)。与在此所述的 ROBO2 抑制剂使用的 ARB 类包括：坎地沙坦 (candesartan) (在美国以 ATACAND™ 销售)，厄贝沙坦 (irbesartan) (在美国以 AVAPRO™ 销售)，奥美沙坦 (olmesartan) (在美国以 BENICAR™ 销售)，洛沙坦 (losartan) (在美国以 COZAAR™ 销售)，缬沙坦 (valsartan) (在美国以 DIOVAN™ 销售)，替米沙坦 (telmisartan) (在美国以 MICARDIS™ 销售)，依普沙坦 (eprosartan) (在美国以 TEVETEN™ 销售)。

[0107] 在此所述这些方法和所有这些方法的一些具体实施方式中，该方法进一步包括，除 ROBO2 抑制剂外，给予受治疗者有效量的利尿剂。利尿剂包括但不限于：托拉塞米 (torsemide) (在美国以 DEMADDEX™ 销售)，呋塞米 (furosemide) (在美国以 LASIX™ 销售)，布美他尼 (bumetanide) (在美国以 BUMEX™ 销售)，依他尼酸 (ethacrynic acid) (在美国以 EDECRIN™ 销售)，托拉塞米 (torsemide) (在美国以 DEMADDEX™ 销售)，阿米洛利 (amiloride) (在美国以 MIDAMOR™ 销售)，乙酰唑胺 (acetazolamide) (在美国以 DIAMOX™ 销售)，帕马溴 (pamabrom) (在美国以 AQUA-BAN™ 销售)，甘露醇 (mannitol) (在美国以 ARIDOL™ 或 OSMITROL™ 销售)，氨苯蝶啶 (traimterene) (在美国以 DYRENIUM™ 销售)，螺内酯 (spironolactone) (在美国以 ALDACTONE™ 销售)，阿米洛利 (amiloride) (在美国以 MIDAMOR™ 销售)，吲达帕胺 (indapamide) (在美国以 LOZOL™ 销售)，氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide) (在美国以 HYDRODIURIL™ 销售)，美托拉宗 (metolazone) (在美国以 ZAROXOLYN™ 或 MYKROX™ 销售)，甲氯噻嗪 (methylclothiazide) (在美国以 AQUATENSEN™ 或 ENDURON™ 销售)，氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide) (在美国以 AQUAZIDE H™ 或 ESIDRIX™ 或 MICROZIDE™ 销售)，氯噻嗪 (chlorothiazide) (在美国以 DIURIL™ 销售)，苄氟噻嗪 (bendroflumethiazide) (在美国以 NATURETIN™ 销售)，泊利噻嗪 (polythiazide) (在美国以 RENESE™ 销售)，氢氟甲噻嗪 (hydroflumethiazide) (在美国以 SALURON™ 销售)，氯噻酮 (chlorthalidone) (在美国以 THALITONE™ 销售)。为了获得完整的列表，还参见例如《医生案头参考》(Physician's Desk Reference)，2012 编著，PDR, Network, (2011)。

[0108] 如在此所用，关于在此所述包括 ROBO-2 抑制剂或其联合治疗的任意组合物和方法，术语“治疗 (treat)”、“疗法 (treatment)”、“治疗 (treating)”或“改善 (amelioration)”是指治疗方法，其中，目的是逆转、减轻、改善、抑制、减慢或停止与疾病或失调有关的状态的进程或严重程度。术语“治疗 (treating)”包括减少或缓解与慢性肾脏疾病有关的状态、疾病或失调的至少一种不利的效果或症状，例如，但不限于，糖尿病肾病。如果一种或多种临床症状减少，治疗通常是“有效的”。可选地，如果疾病的进程被缩减或停止，则治疗是“有效的”。也就是说，“治疗 (treatment)”不只包括症状或标记的改善，也包括中断在预期没有治疗的情况下发生的至少缓慢进程或症状恶化。有益的或期望的临床结果包括，但不限于，一种或多种症状缓和，疾病程度减小，疾病状态稳定（即不恶化），疾病进程的推迟或减慢，疾病状态的改善或减轻，以及缓解（无论是部分或全部），无论是可检测的或不可检测的。术语疾病的“治疗 (treatment)”还包括提供疾病的症状或副作用安慰（包括缓和和治疗）。

[0109] 在此使用的术语“有效量”是指减轻至少一种或多种需要治疗的疾病或失调的症状所需要的在此所述 ROBO-2 抑制剂的量，并与为了提供期望的效果使用的足够量的药理成分相关。因此，术语“治疗有效量”是指在此描述的 ROBO-2 抑制剂的量，采用在此公开的

方法,当给予典型的受治疗者时足以提供特殊效果。在此所用的有效量也包括足以推迟疾病症状发展、改变疾病症状进程(例如,但不限于,减慢疾病症状进程)或逆转疾病症状的量。因此,不可能指定精确的“有效量”。然而,对于任何给定的情况,适当的“有效量”可由本领域普通技术人员仅仅通过常规实验确定。

[0110] 有效量、毒性和治疗效果可通过标准制药程序在细胞培养和试验用动物中确定,例如,确定 LD50(半数致死量)和 ED50(半数有效量)。这些剂量可根据所采用的剂型和所用给药途径而变化。毒性效应和治疗效果的剂量比为治疗指数,其可以用 LD50/ED50 的比值表达。呈现大的治疗指数的组合物和方法是优选的。治疗有效剂量最初可根据细胞培养试验分析估算。另外,剂量可以在动物模型中配制,以获得包括在细胞培养或适当的动物模型中确定的 IC₅₀(即,获得测量功能或活性的半数最大抑制的在此描述的 ROBO-2 抑制剂的浓度)的循环血浆浓度范围。例如,血浆中的水平可通过高效液相色谱法测量。任何具体剂量的效果可以通过由合适的生物试验监控到。必要时,剂量可由医师为适应治疗的观察效果进行调整而确定。根据慢性肾脏疾病的类型和严重程度,在此描述的约 1 μg/kg 至 100mg/kg(例如 0.1-20mg/kg)的 ROBO-2 抑制剂的量是给予受治疗者的最初候选剂量范围,例如,无论是一个或多个分开给药或是连续输注。

给药模式

[0111] 在此所述 ROBO2 抑制剂或其联合治疗可通过任意合适途径给予受治疗者,使受治疗者得到有效治疗。如在此所用的术语“给予(administering)”和“采用(introducing)”可交换使用,并且是指将 ROBO2 抑制剂配置给受治疗者,其通过可使这些药剂至少部分定位在期望位点的方法或途径进行配置,以产生期望效果。

[0112] 在一些具体实施方式中,ROBO2 抑制剂通过任意给药模式给予给患有慢性肾脏疾病的受治疗者,所述给药模式可全身性递送药剂或将药剂递送至所需表面或目标,并包括但不限于,注射给药、输注给药、滴注给药和吸入给药。为了保护多肽药剂不在肠道中失活,也可以考虑口服给药形式。“注射”包括但不限于,静脉内注射、肌肉注射、动脉内注射、鞘内注射、室内注射、囊内注射、眶内注射、心内注射、皮内注射、腹膜内注射、经气管注射、皮下注射、表皮下注射、关节内注射、子囊注射、蛛网膜下腔注射、椎管内注射、内脑脊髓注射以及胸骨内注射和灌输。在一些具体实施方式中,用于在此所述方法的 ROBO2 抑制剂是通过静脉灌输或注射给药的。

[0113] 在此所用短语“肠胃外给药”和“非肠道给药”是指与肠内或局部给药不同的给药模式,通常通过注射给药。在此所用短语“全身用药”、“全身给药”、“全身地给予”和“外周给药”是指 ROBO-2 抑制剂的给药而不是直接给予靶点、组织或器官,例如肿瘤部位,而是 ROBO-2 抑制剂可进入受治疗者的循环系统,并因此经历代谢和其它相似过程。

[0114] 对于在此所述方法的临床使用,在此 ROBO-2 抑制剂的给药包括配制成药物组合物或用于肠胃外给药的药物制剂,例如静脉内的,粘膜的如鼻内的,眼睛的或其它给药模式。在一些具体实施方式中,在此描述的 ROBO-2 抑制剂可以连同任何药学上可接受的载体化合物、材料或组合物给药,其可使受治疗者得到有效治疗。因此,在此所述方法使用的药物制剂可包含在此描述的 ROBO-2 抑制剂,与一种或多种药学上可接受的成分的组合。

[0115] 短语“药学上可接受的”是指那些化合物、材料、组合物和 / 或剂型,它们在合理的医学判断范围内,适用于与人类或动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或

其它问题或并发症,具有相当的的利益 / 风险比。在此所用短语“药学上可接受的载体”意为药学上可接受的材料、组合物或载体,如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂、媒介、封装材料、制造助剂(如润滑剂、滑石镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂封装材料,它们参与维持 ROBO-2 抑制剂的稳定性、溶解性或活性。每种载体必须是“可接受的”的意思是与制剂中的其它成分相容并不会伤害病人。可作为药学上可接受的载体的材料的一些示例包括:(1) 糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素;(4) 黄蓍胶粉末(powdered tragacanth);(5) 麦芽糖;(6) 明胶;(7) 赋形剂,如可可油和栓状蜡(suppository waxes);(8) 油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;(9) 二醇类,如丙二醇;(10) 多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(11) 酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(12) 琼脂;(13) 缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(14) 海藻酸;(15) 无热原水;(16) 等渗盐水;(17) 林格氏溶液;(19) pH 缓冲溶液;(20) 多元酯、聚碳酸酯和 / 或聚酸酐;(21) 膨胀剂,如多肽和氨基酸;(22) 血清成分,如血清白蛋白,高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL);(23) C2-C12 的醇,如乙醇;以及(24) 药物制剂中使用的其它无毒相容物质。脱模剂、被膜剂、防腐剂和抗氧化剂也可用于该制剂。如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”或类似的术语在此中可交换使用。

[0116] 在此描述的 ROBO-2 抑制剂可专门制成用于以固体、液体或凝胶形式的化合物给予受治疗者,包括以下适用的形式:(1) 肠胃外给药,例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射如无菌溶液或悬浮液,或缓释制剂;(2) 局部给药,如乳膏、油膏或控释贴剂或应用于皮肤的喷雾;(3) 阴道内或直肠内,如阴道药栓、乳膏或泡沫;(4) 通过眼睛;(5) 透皮;(6) 粘膜;以及(7) 鼻。此外,ROBO-2 抑制剂可通过药物递送系统植入或注射给受治疗者。例如,可参见厄克特(Urquhart)等,《药理学与毒理学年度回顾》(Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.)24:1984:199-236;路易斯编辑,《农药和医药的控释》(普雷纳姆出版社,纽约,1981);美国专利申请 NO. 3773919,和美国专利申请 NO. 353270960。

[0117] 可用于在此描述的方法的、包括在此描述的 ROBO-2 抑制剂的该组合物的制剂和给药模式的进一步的具体实施方式,描述如下。

[0118] 肠胃外剂型。ROBO-2 抑制剂的肠胃外剂型也可通过多种途径给予患有慢性肾脏疾病的受治疗者,包括但不限于,皮下、静脉内(包括弹丸注射)、肌肉内和动脉内。由于肠胃外剂型给药一般绕过了受治疗者对污染物的天然防御屏障,所以肠胃外剂型优选无菌或能够在给药于受治疗者前灭菌。肠胃外剂型的示例包括但不限于,随时可以注射的溶液,随时可以溶解或悬浮在药学上可接受的载体中用于注射的干燥产品,随时可以注射的悬浮液,控释肠胃外剂型以及乳剂。

[0119] 可用于提供公开的肠胃外剂型的合适的载体是本领域技术人员众所周知的。示例包括但不限于,无菌水;USP 注射用水;盐水;葡萄糖溶液;水性载体例如但不限于氯化钠注射液,林格注射液,葡萄糖注射液,葡萄糖和氯化钠注射液和乳酸钠林格注射液;水混溶载体,例如但不限于,乙醇,聚乙二醇和聚丙二醇;以及非水溶性载体,例如但不限于,玉米油,棉籽油,花生油,芝麻油,油酸乙酯,肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0120] 在一些具体实施方式中,含有有效量 ROBO-2 抑制剂的组合物可适合于口服给药,如离散剂型,例如,但不限于,片剂(包括但不限于刻痕片剂或包衣片剂),丸剂,囊片,

胶囊,咀嚼片,粉末包,扁囊剂,锭剂,糯米纸囊剂,喷雾剂,或液体例如但不限于,以水液体、非水液体、水包油乳剂或油包水乳剂形式的糖浆剂、酏剂、溶液或悬浮液。这些组合物含有预定量的所公开的化合物的药学上可接受盐,并可通过本领域技术人员公知的制造方法制成。一般可参考,雷明顿制药科学,第18版,麦出版公司,伊斯顿,宾夕法尼亚州,1990(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1990))。

[0121] 由于其易于给药,使用固体药物赋形剂的片剂和胶囊剂代表最有利的固体口服单位制剂。如果需要,可通过标准的水或非水化技术将片剂包衣。这种剂型可通过任意制药方法制成。一般而言,药物组合物和剂型这样制得:将活性成分与液体载体、良好分散的固体载体或两者均匀地并充分地混合,然后如果需要的话,将产品成型为所需形式。在一些具体实施方式中,口服剂型不适用于抗生素药剂。

[0122] 含有有效量 ROBO2 抑制剂的组合物的典型的口服剂型可根据传统制药复合技术制成,将紧密混合物(intimate admixture)中 ROBO2 抑制剂的药学上可接受的盐与至少一种赋形剂结合制成。赋形剂可根据给药所需组合物的形式而采取各种各样的形式。例如,适用于口服液体或气雾剂剂型的赋形剂包括,但不限于,水、二醇类、油类、醇类、调味剂、防腐剂 and 着色剂。适用于固体口服剂型(例如散剂、片剂、胶囊剂和囊片)的赋形剂的示例包括,但不限于,淀粉、糖、微晶纤维素、高岭土、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂。

[0123] 适用于在此所述的药物制剂的粘合剂包括,但不限于,玉米淀粉、土豆淀粉或其它淀粉,明胶,天然或合成的树胶例如阿拉伯树胶,藻酸钠,海藻酸,其它藻酸盐,黄耆胶粉末,瓜尔胶,纤维素及其衍生物(如乙基纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠),聚乙烯吡咯烷酮,甲基纤维素,预糊化淀粉,羟丙基甲基纤维素(如编号 2208、2906、2910),微晶纤维素,以及上述混合物。

[0124] 适用于在此所述的药物制剂的填充剂包括,但不限于,滑石,碳酸钙(例如颗粒或粉末),微晶纤维素,粉末纤维素,葡萄糖结合剂,高岭土,甘露醇,硅酸,山梨醇,淀粉,预糊化淀粉,以及上述混合物。在此所述药物组合物中的粘合剂或填充剂通常占药物组合物重量的约 50% 至约 99%。

[0125] 用在在此的口服药物制剂中的崩解剂是当片剂暴露于含水环境时,使其碎裂。既不是太少也不是太多以致破坏性地改变活性成分释放的有效量的崩解剂可用于形成在此描述的 ROBO2 抑制剂的固体口服剂型。所用崩解剂的量根据制剂的类型而不同,其是易被本领域普通技术人员辨别。可用于形成口服药物制剂的崩解剂包括,但不限于,琼脂、海藻酸、碳酸钙、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、波拉克林钾、羧基乙酸淀粉钠、土豆或木薯淀粉、其它淀粉、预糊化淀粉、黏土、其它藻胶、其它纤维素、树胶,以及上述混合物。

[0126] 可以用于形成在此描述的 ROBO2 抑制剂的药物制剂的润滑剂包括,但不限于,硬脂酸钙,硬脂酸镁,矿物油,轻矿物油,甘油,山梨醇,甘露醇,聚乙二醇,其它二醇,硬脂酸,月桂基硫酸钠,滑石,氢化植物油(如花生油、棉籽油、葵花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油),硬脂酸锌,油酸乙酯,月桂酸乙酯,琼脂,以及上述混合物。其他的润滑剂,包括,例如,syloid 硅胶(AEROSIL[®] 200,由马里兰州巴尔的摩的 W. R. Grace Co. 生产),合成二

氧化硅的凝聚型气溶胶（由德克萨斯州普莱诺的 Degussa Co. 销售），CAB-O-SIL®（一种由马萨诸塞州波士顿的 Cabot Co. 销售的热解二氧化硅产品），以及上述混合物。如果使用的話，润滑剂通常以小于其所掺入的药物组合物或剂型重量的约 1% 的量使用。

[0127] 在其它具体实施方式提供了不含乳糖的药物制剂和剂型，其中，这些组合物优选含有少量，如果有的話，乳糖或其它单糖或二糖。如在此所用的术语“不含乳糖”是指乳糖的存在量，如果有的話，不足以实质上增加活性成分的降解速率。在此公开的不含乳糖的组合物可包含本领域公知的赋形剂，以及被引入在此作为参考的 USP (XXI) / NF (XVI) 所列举的赋形剂。

[0128] 在一些具体实施方式中，ROBO2 抑制剂的口服制剂进一步涵盖含有以在此的 ROBO2 抑制剂为活性成分的无水药物组合物和剂型，因为水可以促进某些化合物降解。例如，为了确定制剂随时间变化的性质，如保质期或稳定性，加入水（例如 5%）作为一种模拟长期贮存的方式在制药领域是被广泛接受的。参见例如延斯 T. 卡斯滕森 (Jens T. Carstensen)，《药物稳定性：原则和实践》(Drug Stability: Principles & Practice)：379-380 (第二版，马塞尔德克尔出版社 (Marcel Dekker)，纽约州纽约，1995) (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N. Y. : 1995)。在此描述的无水药物组合物和剂型可采用无水或低水分材料在低水分或低湿度条件下制成。如果预计在生产、包装和 / 或储存期间会与水分和 / 或湿气发生大量接触，那么包含乳糖和至少一种含有伯胺或仲胺的活性成分的药物组合物和剂型优选是无水的。无水组合物优选已知可防止暴露于水的材料来包装，因此可将它们装在合适的制剂盒中。合适的包装的例子包括但不限于密封的薄膜、塑料、带有干燥剂或没有干燥剂的单位剂量容器（如药瓶）、水泡包装和窄条包装。

[0129] 气溶胶剂型。ROBO-2 抑制剂可与合适的推进剂一起装在加压气溶胶容器中，推进剂例如碳氢化合物推进剂，如丙烷、丁烷或异丁烷与常规助剂。ROBO-2 抑制剂也可在非加压形式下如喷雾器或雾化器中给药。ROBO-2 抑制剂也可以干粉形式直接给予呼吸道，例如，通过使用吸入器。

[0130] 通过举例说明的方式，合适的粉末组合物包括 ROBO-2 抑制剂与乳糖或其它适于支气管给药的情性粉末充分混合的粉末制剂。粉末组合物可通过气溶胶分配器给药或装在易碎胶囊中，受治疗者可以插入装置，该装置可刺穿胶囊并将粉末源源不断吹出以适于吸入。该组合物可能包括推进剂、表面活性剂和共溶剂，并装入传统气溶胶容器中，其上有适当的计量阀关闭。

[0131] 递送至呼吸道的气溶胶是本领域已知的。参见例如阿杰伊，A. 和格连 J.，《药学与临床研究》，1:565-569 (1990) (Adjei, A. and Garren, J. Pharm. Res., 1:565-569 (1990))；扎嫩 P. 和拉姆，J. -W. J.，《国际药理学杂志》，114:111-115 (1995) (Zanen, P. and Lamm, J. -W. J. Int. J. Pharm., 114:111-115 (1995))；贡达 I.，“用于递送治疗剂和诊断剂至呼吸道的气溶胶”在治疗性药物载体系统中的关键回顾，6:273-313 (Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990))；安德森等，《美国呼吸疾病评论》，140:1317-1324 (1989) (Anderson et al., Am. Rev. Respir. Dis., 140:1317-1324 (1989)) 并具有肽和蛋白质全身递送潜能（巴顿和普拉茨，《高等药物输送评论》，8:179-196 (1992) (Patton and Platz, Advanced Drug

Delivery Reviews, 8:179-196(1992)) ;Timsina 等,《国际药学杂志》,101:1-13(1995) (Timsina et al., Int. J. Pharm., 101:1-13(1995)) ; 以及坦西 I.P.,《喷雾技术市场》,4:26-29(1994) (Tansey, I. P., Spray Technol. Market, 4:26-29(1994)) ; 弗伦奇 D.L., 爱德华 D.A. 和尼文 R.W.,《气溶胶科学与技术》,27:769-783(1996) (French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., Aerosol Sci., 27:769-783(1996)) ; 维萨 J.,《粉体工程》,58:1-10(1989) (Visser, J., Powder Technology 58:1-10(1989)) ; 路德 S. 和 R.H. 穆勒,《控释杂志》,22:163-172(1992) (Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22:263-272(1992)) ; 塔巴达 Y. 和 Y. Ikada,《生物医学材料研究杂志》,22:837-858(1988) (Tabata, Y. and Y. Ikada, Biomed. Mater. Res., 22:837-858(1988)) ; 沃尔 D.A.,《给药杂志》,2:101-120,1995 (Wall, D. A., Drug Delivery, 2:101-201995)) ; 巴顿和普拉茨,《先进药物输送评论》,8:179-196(1992) (Patton, J. and Platz, R., Adv. Drug Del. Rev., 8:179-196(1992)) ; 布里翁 P.,《先进药物输送评论》,5:107-132(1990) (Bryon, P., Adv. Drug. Del. Rev., 5:107-132(1990)) ; 巴顿 J.S., 等,《控释杂志》,28:1579-1585(1994) (Patton, J. S., et al., Controlled Release, 28:1579-85(1994)) ; 达蒙 B. 和贝恩斯 W.,《生物自然技术》(1996) (Damms, B. and Bains, W., Nature Biotechnology(1996)) ; 尼文 R.W. 等,《药学与临床研究》,12(9) :1343-1349(1995) (Niven, R. W., et al., Pharm. Res., 12(9) ;1343-1349(1995)) ; 以及小林 S. 等,《药学与临床研究》,13(1) :80-83(1996) (Kobayashi, S., et al., Pharm. Res., 13(1) :80-83(1996)) , 在此通过引入将其整体作为参考并入本文。

[0132] 在此所述 ROBO-2 抑制剂制剂进一步涵盖包括以公开的化合物作为活性成分的无水药物组合物和剂型,因为水可以促进某些化合物降解。例如,为了确定制剂随时间变化的性质,如保质期或稳定性,加入水(例如 5%)作为一种模拟长期贮存的方式在制药领域是被广泛接受的。参见例如延斯 T. 卡斯滕森 (Jens T. Carstensen),《药物稳定性:原则和实践》(Drug Stability:Principles&Practice) :379-380 页(第二版,马塞尔德克尔出版社 (Marcel Dekker), 纽约州纽约,1995) (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N. Y. :1995)。在此描述的无水药物组合物和剂型可采用无水或低水分材料在低水分或低湿度条件下制成。如果预计在生产、包装和/或储存期间会与水分和/或湿气发生大量接触,那么包含乳糖和至少一种含有伯胺或仲胺的活性成分的药物组合物和剂型优选是无水的。无水组合物优选已知可防止暴露于水的材料来包装,因此可将它们装在合适的制剂盒中。合适的包装的例子包括但不限于密封的薄膜、塑料、带有干燥剂或没有干燥剂的单位剂量容器(如药瓶)、水泡包装和窄条包装。

[0133] 控制释放剂型和延迟释放剂型。在在此所述方面的一些具体实施方式中,ROBO-2 抑制剂可通过控制或延迟释放的形式给予受治疗者。理想地,在医疗中使用最优设计的控释制剂的特征在于:采用最少药物,在短时间内治愈或控制病症。控释制剂的优点包括:1) 延长药物活性;2) 降低给药频率;3) 提高受治疗者依从性;4) 使用更少的总药物;5) 减少局部或全身副作用;6) 最小化药物积累;7) 减少血液水平波动;8) 提高疗效;9) 减少增强作用或药物活性损失;以及 10) 改善的疾病或状态的控制速度(吉姆,朱成,《控释剂型设计》(Technomic 出版,兰开斯特,宾夕法尼亚州,2000 年))(Kim, Cherg-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2(Technomic Publishing, Lancaster, Pa. :2000))。控释制

剂可用于控制式 (I) 化合物的起始作用、作用持续时间、治疗窗内的血浆水平和峰值血液水平。特别地,控制或延迟释放剂型或制剂可用于保证实现式 (I) 化合物的最大效果,同时最小化潜在的负面影响和安全隐患,这可以在从剂量下给药的药物(即,低于最小治疗水平)以及超过该药物毒性水平时发生。

[0134] 各种已知的控制或延迟释放剂型、制剂或装置适于与在此所述 ROBO-2 抑制剂共同使用。示例包括但不限于以下文件中描述的那些:美国专利号 3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556、5,733,566 和 6,365,185B1,每一个文件通过引入作为参考将其整体并入本文。例如通过使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、可渗透性膜、等渗系统(例如 **OROS®**(阿尔扎公司,山景城,加利福尼亚州,美国))、多层包衣、微颗粒、脂质体或微球体或其组合来产生不同比例的理想释放效果,这些剂型可用于缓释或控释一种或多种活性成分。另外,离子交换材料可用于制备所公开化合物的固定化形式、吸附盐形式,从而实现药物的控制递送。特异性的离子交换材料的示例包括但不限于, **Duolite®** A568 和 **Duolite®** AP143(罗门哈斯公司,春之楼,宾夕法尼亚州,美国)(Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA)。

[0135] 在在此所述方法的一些具体实施方式中,用于在此描述方法的 ROBO-2 抑制剂通过持续释放或脉冲形式给予受治疗者。脉冲疗法不是一种相同量组合物随时间推移的不连续给药的形式,而是包括在降低频率或降低给药剂量时进行相同剂量组合物的给药。当受治疗者持续发生失调时,持续释放或脉冲给药是特别优选的,例如,当受治疗者患有慢性肾脏疾病。可以减少每个脉冲的剂量,并且在此所述给予的 ROBO-2 抑制剂的总量随着受治疗者或患者治疗过程中减至最小。

[0136] 必要时,脉冲之间的间隔可由本领域普通技术人员确定。经常地,脉冲间的间隔一般可通过在下一脉冲递送之前,受治疗者体内不再检测到组合物或该组合物的活性组分时,给予组合物的另一剂量计算。间隔也可根据组合物在体内的半衰期计算。间隔可以计算为大于体内的半衰期,或 2、3、4、5 甚至 10 倍以上的该组合物的半衰期。美国专利号 4,747,825、4,723,958、4,948,592、4,965,251 和 5,403,590 公开了用于脉冲组合物通过输注或其它形式递送至受治疗者的多种方法和装置。

[0137] 在一些具体实施方式中,可制备包含 ROBO-2 抑制剂的持续释放制剂。持续释放制剂的合适示例包括含有抑制剂的固体疏水性聚合物的半渗透基质,其中基质以成型制品如膜或微胶囊存在。持续释放基质的示例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚乙烯醇)、聚乳酸(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸(γ ethyl-L-glutamate)共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如醋酸亮丙瑞林(LUPRON DEPOT)(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0138] 用于体内给药的含有 ROBO-2 抑制剂的制剂优选是无菌的。例如,采用无菌过滤膜过滤或其它本领域技术人员已知的方法可轻易实现无菌。

[0139] 在此一些方面还提供了分析方法、方法和系统,其依照指示慢性肾脏疾病的生物标志物或慢性肾脏疾病或蛋白尿的预倾向,基于 ROBO2 的表达谱或序列信息,确定个体是否具有慢性肾脏疾病或慢性肾脏疾病或蛋白尿的预倾向。如在此所示,ROBO2 作为生物标

志物对鉴定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病或是否具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的高风险,或监控慢性肾脏疾病或蛋白尿进程的治疗效果是有用的。

[0140] 如在此所用的“生物标志物”是指一种有机生物分子,其区别地存在于样品中使一种表型状态 (phenotypic status) 受治疗者 (例如患有某种疾病) 与另一种表型状态受治疗者 (例如没有患病) 区分开。如果计算得到的不同群组中的生物标志物的平均或中位表达水平具有统计显著性,则生物标志物区别存在于不同表型状态中。统计显著性一般检验,除其它外还包括, t- 检验、方差分析 (ANOVA)、Kruskal-Wallis 秩和检验、Wilcoxon 秩和检验、曼 - 惠特尼 U 检验和机率比。生物标志物,单独或组合,提供受治疗者属于一种表型状态或另一种的相对风险的测量。照这样,它们作为标志物对疾病 (诊断)、药物和药物毒性的治疗效果 (诊疗) 是有用的。

[0141] 用于在此所述分析方法的 ROBO2 表达可由任何合适方法检测,包括蛋白质水平检测或 mRNA 表达水平检测。ROBO2 多肽可以以任何可从受治疗者获得的生物样本中找到的形式检测,或者任何操纵生物样本引起的形式 (例如样本处理引起的)。ROBO2 修饰形式可包括如下方式获得的产品:等位基因变异体、剪接变异体、翻译后修饰 (例如糖基化、溶蛋白质水解裂解 (如母本蛋白质片段)、糖基化、磷酸化、脂化、氧化、甲基化、半胱氨酰化 (cysteinylation)、磺化、乙酰化等等)、低聚反应、解低聚反应 (以使单体从蛋白质多聚体形式中分离)、变性作用等等。

[0142] 设计的在此所述分析方法用以检测 ROBO2 的所有形式或特殊形式。在需要时,不同形式 ROBO2 之间进行区分,例如不同亚型,可通过使用基于区分不同形式的物理特性的检测方法完成,物理特性例如,不同分子量、不同分子大小、存在 / 不存在不同表位等等。

[0143] 因此,在此一些方面提供了用于诊断受治疗者患有慢性肾脏疾病或具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的分析方法,该分析方法包括:测量从受治疗者获得的生物样本中 ROBO2 蛋白质或核酸水平,其中,如果从受治疗者取得的生物样本中 ROBO2 的水平等于或高于 (例如统计量上明显高于) ROBO2 阈值参考水平,受治疗者极有可能具患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险,或具有慢性肾脏疾病。例如, ROBO2 水平增加大于约 10%,或大于约 20%,或大于约 30%,或大于约 40%,或大于约 50%,或大于约 60%,或更多,与 ROBO2 阈值参考水平相比。在一些具体实施方式中, ROBO2 水平的增加高于中值或平均 ROBO2 阈值参考水平至少一个标准偏差或至少两个标准偏差,或更多。例如,所述中值或平均 ROBO2 阈值参考水平可从 5 个或更多个没有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的受治疗者取得的样本、或 5 个或更多个从相同受治疗者在不同时间点取得的样本中获得。

[0144] 在这些分析方法的一些具体实施方式中,将生物样本中测得的 ROBO2 的量与参考阈值水平或参考生物样本进行相比,参考生物样本例如从年龄匹配的正常对照 (例如不具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的年龄匹配的受治疗者) 得到的生物样本,或健康的受治疗者,例如健康个体。

[0145] 在的一些具体实施方式中,在此公开的分析方法、系统和试剂盒可也用于监测给予受治疗者的治疗进程。例如,可以测量受治疗者的生物样本中第一时间点 (如 t1) 的 ROBO2 的水平,并与 ROBO2 生物标志物参考阈值水平相比,如果测得的 ROBO2 水平等于或高于参考阈值水平,可以给予受治疗者合适的治疗性疗法或养生法,以延迟或降低慢性肾脏疾病或蛋白尿的发生,例如,如在此公开方法的增加锻炼,降低心脏压力,调整饮食等等,然

后, ROBO2 的生物标志物蛋白质面板水平可在第二时间点(如 t_2) 和随后时间点(如 t_3 、 t_4 、 t_5 等等)测得,并与一个或多个时间点(如 t_1 或任何随后时间点)的 t ROBO2 水平或 ROBO2 的参考阈值水平相比,以确定治疗性治疗或药物治疗或养生法对于降低慢性肾脏疾病或蛋白尿风险、延迟或减少慢性肾脏疾病或蛋白尿发生的是否有效。在一些这样的具体实施方式中,在此公开的分析方法、系统或试剂盒可能用于监测有症状的受治疗者(例如,已知患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的受治疗者)的治疗性治疗,这里有效的治疗是可以减少受治疗者的 ROBO2,可选择地,在此公开的分析方法、系统或试剂盒可能用于监测有症状的受治疗者的预防性治疗(例如,用于预防受治疗者慢性肾脏疾病或蛋白尿的发生)效果,例如,根据在此公开的方法,或其它本领域已知的方法或因为遗传原因,已经鉴定这里的受治疗者具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险。

[0146] 在此使用的术语“样本”一般是指含有核酸、DNA 或 RNA,或氨基酸的任何材料。一般而言,这样的材料会以下面的形式存在:血液样本、大便样本、组织样本、细胞、细菌、组织切片或口腔拭子。样本是可以被制备的,例如样本可以是新鲜的、固定的、冷冻的或嵌入石蜡中。在此使用的术语“生物样本”是指从受治疗者取得的细胞或细胞群或一些组织或液体。最经常的是,样本可以脱离受治疗者,但术语“生物样本”也可是指体内分析的细胞或组织,即不需要脱离受治疗者。经常地,“生物样本”含有来自动物的细胞,但该术语也可是指非细胞生物材料,例如血液、唾液或尿液中的非细胞组分,其可用于测量基因表达水平。生物样本包括但不限于,活组织切片、刮片(scrapes)、全血、血浆、血清、尿液、唾液、细胞培养或脑脊液。生物样本还包括活组织切片、细胞培养液。生物样本或组织样本可以是指脱离个体的组织或液体样本,例如包括但不限于,尿液、血液、血浆、血清、肾脏活组织切片、大便、痰液、脊髓液、胸膜液、乳头吸出物(nipple aspirates)、淋巴液、皮肤外部、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪水、唾液、奶、细胞(包括但不限于血细胞)、肿瘤、器官以及体外细胞培养物组分的样本。在一些具体实施方式中,当获得尿液样本时,离心尿液样本以沉淀任何肾脏细胞,基于此可进行在此所述的分析方法和方法。在一些具体实施方式中,样本来自肾脏活组织切片,例如肾脏或其部分的芯针活组织切片,例如足细胞样本。另外,使用细针抽吸样本。在一些具体实施方式中,生物样本是可以制备的,例如生物样本可以是新鲜的、固定的、冷冻的或嵌入石蜡中。可通过将细胞样本脱离受治疗者而得到样本,但也可以通过使用预先分离的细胞(例如,由另一人分离)来完成,或在此描述的体内的方法。

[0147] 如在此使用的术语“表达”可交换地是指多肽或蛋白质的表达或多核苷酸的表达或基因的表达。表达也指预转译修饰蛋白的表达和翻译后修饰的蛋白质的表达,以及前体 mRNA 分子,或者剪接或成熟的 mRNA 分子的表达。例如,多核苷酸的表达可通过测量 RNA 转录分子的产生来确定,如信使 RNA(mRNA) 转录水平。例如,蛋白质或多肽的表达可采用与多肽结合的抗体通过免疫分析确定。应用于多核苷酸的术语“编码”是指一种可以“编码”多肽或蛋白质的多核苷酸,如果以其天然状态或当采用本领域技术人员公知的方法进行操作时,它可以被转录以产生可以被翻译成氨基酸序列而生成多肽和/或其片段的 RNA。反义链是这些核酸的补体,由此可推导出编码序列。术语“内源地表达”或“内源性表达”是指基因产物在正常水平和在正常调节该细胞类型中的表达。

[0148] 可以用于在此所述分析方法、方法和系统的用于测量样本或生物样本中 ROBO2 蛋白质或核酸水平的检测方法,包括光学方法,电化学方法(伏安法和电流分析技术),原子

力显微镜技术和射频方法,例如多级共振光谱。光学方法包括显微镜检查,包括共焦和非共焦两者,荧光检测,发冷光,化学发光,吸光度,反射比,透射比,双折射或折射率(例如表面等离子体共振,椭圆测量术,共振镜法,光栅耦合器波导法或干涉量度法)。

[0149] 在此所述分析方法、方法和系统的这些具体实施方式中,其中,ROBO2 蛋白质水平是可以测量的,例如,SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的蛋白质水平,人们可以使用任何本领域普通技术人员公知的蛋白质组学方法来测量生物样本中生物标志物蛋白的水平。测量可以是定量的或定性的,只要测量能够确定或指示生物样本中 ROBO2 蛋白质的水平是否等于、高于或低于 ROBO2 蛋白的参考阈值水平。

[0150] 在一些具体实施方式中,测得的 ROBO2 蛋白质水平可以是测定 ROBO2 蛋白质本身数量的 ROBO2 蛋白质水平的初始测量,例如,通过测量样本中 ROBO2 蛋白质分子数量),或者在一些具体实施方式中,它可以是 ROBO2 蛋白质二级测量(从该测量可以,但不必然,推导出 ROBO2 蛋白质的数量,例如功能活性的测量或核酸的测量,如编码 ROBO2 蛋白质的 mRNA)。可从初始测量导出或得到定性数据。

[0151] 在此所述分析方法和方法的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白质水平可采用基于亲和力的测量技术测得。与抗体相关的“亲和力”是本领域很好理解的术语,且意思是抗体与结合伴侣结合的程度或强度,结合伴侣例如在此所述的生物标志物(或其抗原决定部位)。亲和力可通过本领域已知的多种方法测量和/或表达,包括但不限于,平衡解离常数(K_D 或 K_d),表观平衡解离常数(K_D 或 K_d),以及 IC_{50} (竞争分析方法中实现 50%抑制的所需量,与在此的“ I_{50} ”可交换使用)。可以理解的是,基于本发明的目的,亲和力是结合至表位的给定数量的抗体的平均亲和力。

[0152] 基于亲和力的测量技术利用特异性结合至测量中的生物标志物蛋白质(一种“亲和试剂”,例如抗体或适体)的分子,虽然也可使用其它技术,如基于光谱的技术(例如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法, MALDI-TOF 光谱),或测量生物活性的分析方法(例如测量生长因子丝裂原活性的分析方法)。用于在此所述分析方法和方法的基于亲和力的测量技术可包括基于抗体的分析方法(免疫分析法)和利用适体(与其它分子特异性结合的核酸分子)的分析方法,例如酶联寡聚核苷酸吸附试验(ELONA)。此外,利用抗体和适体两者的分析方法预期也是可以的(例如利用抗体捕获和适体检测的夹心格式分析)。各种各样基于亲和力的试验也是本领域公知的。

[0153] 基于亲和力的分析方法使用至少一种源于生物标志物蛋白质的表位,即 ROBO2,且多种基于亲和力的分析方法的格式使用一种以上的表位(即“夹心”格式分析方法涉及两种或多种表位;至少一种表位用于捕获生物标志物蛋白质,和至少一种不同表位用于检测标志物)。

[0154] 基于亲和力的分析方法可以是竞争或直接反应格式,使用夹心型格式,且可进一步是多相的(如利用固体支持物)或同质的(如在单相中发生),和/或使用免疫沉淀反应。多种分析方法包括使用标记亲和试剂(例如抗体、多肽或适体);该标签可以是,例如,酶的、荧光的、化学发光的、放射性的或染料分子。放大探针信号的分析方法也是已知的,这些分析方法的示例为利用生物素和抗生物素蛋白的分析方法,以及酶标记和介导的免疫分析方法,例如酶联免疫吸附测定方法(ELISA)和 ELONA 分析方法。例如,生物液体样本的生物标志物浓度可由 LUMINEX® 分析方法或 ELISA 测量。生物标志物或特异性于生物标

志物的试剂可附于表面,并可直接或间接测量水平。

[0155] 在在此所述分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白质水平可采用基于亲和力的免疫分析测定技术测量。

[0156] 免疫分析技术可包括任何定性或定量测量生物样本中 ROBO2 蛋白质水平的免疫分析技术。合适的免疫分析技术包括但不限于,放射免疫测定法,ELISA(酶联免疫吸附分析)、“夹心”免疫分析法,免疫放射测定法,免疫扩散分析法,原位免疫分析法(例如采用胶体金、酶或放射性同位素标记),Western 印迹分析,免疫沉淀反应法,免疫荧光分析法,免疫电泳分析法,荧光免疫分析(FIA),免疫放射测定法(IRMA),免疫酶测定法(IEMA),免疫发光测定法以及免疫荧光测定法(Madersbacher S.,伯杰 P.,《抗体与免疫确定法》,方法,21:41-50,2000年)(Madersbacher S,Berger P.Antibodies and immunoassays.Methods 2000 ;21:41-50),化学发光法,免疫-PCR技术和 Western 印迹分析。同样地,可定性或定量测量生物样本中生物标志物水平的基于适体的分析方法可用于在此所述的分析方法、方法和系统中。通常,在免疫分析几乎所有格式中,抗体可代替适体,尽管适体允许额外的分析方法格式(例如采用核酸放大技术如 PCR(美国专利号 4,683,202)的结合适体的放大)或与合成引物的等温放大(美国专利号 6,251,639 和 6,692,918)。

[0157] 在此所述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白水平可采用基于亲和力的免疫分析技术进行测量,免疫分析法可通过测量生物标志物/抗体相互作用的蛋白质/抗体相互作用程度完成。可使用任何已知的免疫分析方法。

[0158] 在一些具体实施方式中,结合伴侣,如在结合分析方法中结合至 ROBO2 蛋白的抗体或配体,优选标记的特异性结合伴侣,但不一定是抗体。结合伴侣通常标记本身,但可替换地,其可通过产生信号的二次反应而被检测到,信号例如是从另一标记的物质产生的。

[0159] 因此,特异性结合至 ROBO2 蛋白的抗体可用于在此的分析方法、方法和系统中,用于确定生物样本中 ROBO2 蛋白的存在和/或其量,其可用于检测诊断样本中存在的 ROBO2 蛋白浓度的增加或降低。这样的抗体可通过任何免疫诊断领域熟知的方法找到。抗体可以是蛋白质生物学相关状态的任何抗 ROBO2 蛋白抗体。因此,例如,它们可以针对 ROBO2 蛋白的以糖基化形式存在于人体中的非糖基化形式而被找到,或针对携带 ROBO2 蛋白相关表位的缩氨酸。

[0160] 在此的这些分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,可使用放大的分析方法格式,由此检测的相对低的蛋白质水平的可产生增强的“信号”。放大的免疫分析法的一种具体格式是增强的化学发光法。例如,抗体用辣根过氧化物酶标记,参与与鲁米诺、过氧化物底物和增强发射光强度和持续时间的化合物的化学发光反应,特别是 4-碘苯酚或 4-羟基肉桂酸。

[0161] 在此的这些分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,可使用包括免疫-PCR 的放大的免疫分析法。在这个技术中,抗体与任意含有 PCR 引物的 DNA 分子共价连接,由此,连接有抗体的 DNA 用聚合酶链反应进行放大。参见 E. R. 亨德里克森等,《核酸研究》,23:522-529(1995)(E. R. Hendrickson et al.,Nucleic Acids Research 23:522-529(1995))。

[0162] 因此,在此描述的分析方法、方法和系统的所有具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平可采用蛋白结合剂确定,在此也可称为“蛋白质结合实体”或“亲和试剂”,具体来说,是抗

体。例如,具体来说是抗体如抗-生物标志物抗体的亲和试剂可用于免疫分析法中,特别是ELISA(酶联免疫吸附分析法)。在具体实施方式中,生物标志物蛋白的水平可在生物样本中采用本领域公知的方法测量,例如包括但不限于,同种型蛋白质的同种型特异性化学或酶分解,免疫印迹法,免疫组织化学分析,ELISA以及质谱分析法。

[0163] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROB02蛋白的水平可采用“酶联免疫吸附分析法(ELISA)”测量。ELISA是一种采用标记(如酶联)形式的抗体检测和测量抗原浓度的技术。本领域技术人员公知的ELISA有不同形式。以下文献中描述了本领域已知的ELISA标准技术:《免疫诊断方法》,第二版,罗斯和比格茨编辑,约翰威利&伞斯,1980(*Methods in Immunodiagnosis*”, 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley&Sons, 1980);坎贝尔等,《方法与免疫学》,W. A. 本杰明公司,1964(Campbell et al., “*Methods and Immunology*”, W. A. Benjamin, Inc., 1964);和 Oellerich M. 1984, 《临床化学和临床生物化学》, 22:895-904(Oellerich, M. 1984, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22:895-904.)。

[0164] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROB02蛋白的水平可采用夹心ELISA分析方法测量。“夹心ELISA”中,抗体(例如抗-酶)连接至固相(即微量滴定板),并暴露在含有抗原(例如酶)的生物样本中。然后清洗固相以除去未结合的抗原。随后标记的抗体(例如酶联)结合至结合抗原(如果存在)以形成抗体-抗原-抗体的夹心。因此,采用这种方法,ROB02的第一抗体与例如塑料微量滴定板的孔的固相结合,并与样本一起培养,分析ROB02蛋白特异性的标记第二抗体。与抗体连接的酶的示例为碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,荧光素酶,脲酶和 β -半乳糖苷酶。连接抗体的酶与底物反应,生成可以测量的有色反应产物。

[0165] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROB02蛋白的水平采用抗体捕获分析方法或竞争ELISA测量。在“竞争ELISA”中,抗体与含有抗原(即酶)的样本一起培养。然后抗原-抗体混合物与覆盖抗原(即酶)的固相(例如微量滴定板)接触。样本中存在的抗原越多,可用于与固相结合的自由抗体就越少。然后将标记的(例如酶联)第二抗体加至固相中,以确定与固相结合的初始抗体的量。因此,在一些这样的具体实施方式中,生物测试样本可以与固相结合,并且可添加抗ROB02蛋白抗体(例如与ROB02特异性结合的抗体)并使其结合。清洗未结合材料后,与固相结合的抗体的量可采用与第一抗体相反的标记的第二抗体确定。

[0166] 在这些分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,标记物优选酶。例如,酶的底物可为显色的、荧光的或化学发光的。

[0167] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROB02蛋白的水平可采用免疫组织化学法测量。在“免疫组织化学法”中,通过将组织暴露在被检测蛋白特异性的抗体中,将组织切片用于测试特异性蛋白。然后,通过多种方法中的任一种将抗体可视化,以确定蛋白的存在和存在蛋白的量。用于可视化抗体的方法的示例,例如,通过将连接至抗体的酶(例如荧光素酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶),或化学方法(例如DAB/底物发色体)。然后将样本经显微镜分析,优选采用光学显微镜分析被可在可见光谱中检测的着色剂染色的样本,采用本领域技术人员已知的多种染色方法和试剂中的任一种方法。

[0168] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平可采用放射免疫测定法测量。放射免疫测定法是一种采用抗原的标记(如放射性或荧光性标记)形式检测和测量抗原即 ROBO2 浓度的技术。抗原的放射性标记物的示例包括 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{125}I 。生物样本中 ROBO2 的浓度通过将生物样本中的 ROBO2 与标记(例如放射性)的 ROBO2 竞争地与 ROBO2 抗体结合。为了保证标记的 ROBO2 和未标记的 ROBO2 之间的竞争性结合,标记的 ROBO2 存在的浓度足以使抗体的结合位点饱和。样本中 ROBO2 浓度越高,结合至抗体的标记的 ROBO2 的浓度越低。

[0169] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平可采用免疫放射测定法(IRMA)测量。IRMA 是一种免疫分析方法,其中,抗体试剂被放射性地标记。IRMA 需要多价抗原缀合物,采用技术与蛋白质缀合,所述蛋白质例如兔血清白蛋白(RSA)。多价抗原缀合物的每个分子必须具有至少 2 个抗原残基,并且抗原残基必须有足够的分开距离,以使至少 2 个抗体结合至抗原。例如,在 IRMA 中,多价抗原缀合物可与固体表面如塑料球相连。与放射性标记的抗原结合的未标记的抗原和抗体“样本”被加至含有多价抗原缀合物覆盖的球的试管中。样本中的抗原与多价抗原缀合物竞争抗原抗体结合位点。适当的潜伏期后,清洗掉未结合的反应物,并确定固体球表面的放射性量。结合的放射性抗体的量与样本中抗原的浓度成反比。

[0170] 其它用于检测生物样本中 ROBO2 蛋白水平的技术可依据医生喜好进行,并根据在此的公开内容和生物样本种类(即,血浆、尿液、组织样本等)进行。Western 印迹(托宾等,《美国国家科学院学报》,76:4350(1979))(Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350(1979))是这种技术中的一种,其中,适当处理的样本在 SDS-PAGE 凝胶中运行,之后转移至固体支持物载体上,如硝化纤维滤器。可检测地标记的抗 ROBO2 抗体或蛋白结合分子用于评定 ROBO2 蛋白水平,可检测标记物的信号强度与 ROBO2 蛋白的量对应。存在的 ROBO2 蛋白的量的水平也可被量化,例如通过光密度测定法。

[0171] 在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白的水平可采用质谱分析法如 MALDI/TOF(飞行时间),SELDI/TOF,液相色谱-质谱法联用(LC-MS),气相色谱-质谱法联用(GC-MS),高效液相色谱-质谱法联用(HPLC-MS),毛细管电泳-质谱法联用,核磁共振谱或串联质谱(例如 MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MS 等)测量。参见例如美国专利申请号 20030199001、20030134304、20030077616,通过引用将其整体并入本文中。

[0172] 在一些这样的具体实施方式中,这些方法可与机器、计算机系统和媒体结合,以产生用于测量和分析生物样本中 ROBO2 蛋白水平的自动化系统,并产生识别生物样本中 ROBO2 蛋白的水平的可打印报告。在一些实例中,ROBO2 水平的测量是通过确定模块和比较模块远程完成的。

[0173] 质谱法是本领域众所周知的,并用于定量和/或鉴定生物分子,例如蛋白质(参见例如, Li 等(2000), Tibtech, 18:151-160; Rowley 等(2000), 方法, 20:383-397; 和 Kuster 和 Mann(1998), 《结构生物学当代进展》, 8:393-400)(see, e.g., Li et al. (2000) Tibtech 18:151-160; Rowley et al. (2000) Methods 20:383-397; and Kuster and Mann(1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8:393-400)。此外,质谱技术已经发展至能够对分离蛋白质的至少部分的从头测序。Chait 等,《科学》,262:89-92(1993); Keough 等,《美国科学院院刊》,96:7131-6(1999)(Chait et al., Science 262:89-92(1993); Keough et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA. 96:7131-6(1999)) ;Bergman 评论, EXS 88:133-44(2000) (reviewed in Bergman, EXS 88:133-44(2000))。

[0174] 在某些具体实施方式中使用气相离子分光光度法。在其它具体实施方式中,采用激光解吸/电离质谱分析样本。现代激光解吸/电离质谱(“LDI-MS”)可以以两种主要变型实施:基质辅助激光解吸/电离(“MALDI”)质谱和表面增强激光解吸/电离(“SELDI”)。在MALDI中,分析物与含有基质的溶液混合,并将一滴液体放在底物表面。然后将基质溶液与生物分子共结晶。将底物放入质谱仪中。激光能直接作用于底物表面,在此吸收和电离生物分子,没有将其明显分散。参见例如,美国专利号 5, 118, 937(Hillenkamp 等)和美国专利号 5, 045, 694(Beavis&Chait),通过引用将其整体并入本文中。

[0175] 在 SELDI 中,修饰底物表面以使其成为解吸过程的积极参与者。一种变体的表面用吸附剂和/或捕获试剂衍生化以使其选择性地结合至感兴趣的蛋白。另一种变体的表面用能量吸收分子衍生化,当用激光照射时,能量吸收分子不被吸收。另一种变体的表面用结合有感兴趣蛋白和含有激光应用时断裂的光解键的分子进行衍生化。在这些方法的每一种方法中,衍生剂定一般位于底物表面的特异性位置,其上施加样本。参见例如美国专利号 5, 719, 060 和 WO 98/59361,通过引用将其整体并入本文中。例如,这两种方法可以组合,通过使用 SELDI 亲和表面来捕获分析物,以及将含有基质的液体加入捕获的分析物中以得到能量吸收材料。

[0176] 关于质谱的更多信息,参见例如《仪器分离原理(第3版)》,Skoog,桑德斯学院出版,费城,1985;和《化学技术柯克奥斯莫默百科全书(第4版)》,第15卷(John Wiley&Sons,纽约,1995),第1071-1094页(Principles of Instrumental Analysis,3rd edition.,Skoog,Saunders College Publishing,Philadelphia,1985;and Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology,4th ed.Vol.15(John Wiley&Sons,New York 1995),pp. 1071-1094)。

[0177] ROBO2 蛋白水平的检测通常取决于信号强度的检测。反过来,这可以反映出结合至底物的多肽的数量和特征。例如,在某些具体实施方式中,比较第一样本和第二样本的光谱中峰值的信号强度(例如视觉上地、通过计算机分析等),以确定具体生物分子的相对量。可使用软件程序,例如生物标记向导程序(赛弗吉生物系统公司,弗里蒙特,加利福尼亚州),帮助分析质谱图。质谱仪及其相关技术是本领域技术人员是熟知的。

[0178] 在在此所述分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白水平可采用凝胶电泳技术测量,具体为 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳),特别是二维 PAGE(2D-PAGE),优选二维 SDS-PAGE(2D-SDS-PAGE)。根据具体实施例,该分析方法是基于 2D-PAGE,具体采用优选 4-9 的 pH 范围的固相 pH 梯度(IPGs)。

[0179] 在在此描述的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白水平可采用凝胶电泳技术测量,具体地,上述提到的技术与其它蛋白质分离方法组合,特别是本领域技术人员已知的方法,具体为色谱分析和体积排阻法。

[0180] 在在此所述分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白水平可采用共振技术测量,具体为表面等离子体共振。

[0181] 在在此所述分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中,ROBO2 蛋白水平可采用蛋白质生物芯片测量。生物芯片一般包括具有基本平坦表面的固体底物,其上连接有捕

获试剂（例如，一种吸附剂或亲和剂）。通常，生物芯片表面包括多个结合有捕获试剂的可寻址位置。生物芯片还可包括作为对照的结合捕获试剂。蛋白质生物芯片是可适用于捕获多肽的生物芯片。本领域中有多种蛋白质生物芯片。例如，这些包括以下公司生产的蛋白质生物芯片：赛弗吉生物系统公司（弗里蒙特，加利福尼亚），Zyomyx（海沃市，加利福尼亚），英杰公司（卡尔斯巴德，加利福尼亚），Biacore（乌普萨拉，瑞典）和通用电器医疗生物学有限公司（伯克郡，英国）（CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, Calif.), Zyomyx (Hayward, Calif.), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), Biacore (Uppsala, Sweden) and Procognia (Berkshire, UK)）。以下专利或公开的专利申请中描述了这些蛋白质生物芯片的示例：美国专利号 6, 225, 047 (Hutchens&Yip)，美国专利号 6, 537, 749 (Kuimelis and Wagner)，美国专利号 6, 329, 209 (Wagner 等)，PCT 国际公开号 W000156934 (Englert 等)，PCT 国际公开号 W0031048768 (Boutell 等) 和美国专利号 5, 242, 828 (Bergstrom 等)。

[0182] 用于与来自受治疗者 ROBO2 蛋白水平对比的 ROBO2 蛋白水平的参考阈值水平或数值，根据在此实施的方面或具体实施方式可以变化，通过本说明书和下述内容可理解。参考阈值取决于单个样本值，例如从测试受治疗者取得的生物样本得到的值，但在较早的时间点（例如在第一时间点 (t1)，例如测量的第一生物标志物水平，或在第二时间点 (t2)）。参考阈值也可能取决于样本组，例如从测试受治疗者样本组中得到的值。例如，在一些具体实施方式中，ROBO2 蛋白的参考阈值取决于已知患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的受治疗者中测量的 ROBO2 蛋白值的 50% 的值（例如，中值）。例如，ROBO2 蛋白在 50% 以上（例如等于或高于中值水平）的受治疗者可能具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险。参考阈值也可能取决于包括或排除待测样本的样本组。参考值可能取决于大量样本，例如来自按时间顺序排列的年龄匹配组的健康受治疗者人群的样本，或来自那些有或没有具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的受治疗者的样本。在一些具体实施方式中，参考值比任何分析方法的平均值或中值，或预定的平均值或中值高至少一个，多个通常是至少两个标准差。

[0183] 通过在此所述分析方法、方法和系统用于评估受治疗者极有可能经历或患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，“参考阈值”通常是预先确定的参考阈值水平，例如，从与测试受治疗者时间顺序年龄匹配的时间顺序年龄组的健康受治疗者人群获得的尿液、血清或血液的中值 ROBO2 蛋白。如前面指出的，在一些情况下，参考样本也可以是性别匹配和 / 或基于种族匹配的。在一些具体实施方式中，ROBO2 蛋白的参考阈值是一种生物样本中生物标志物的中值水平，例如相同种族受治疗者组的尿液、血液、血清，例如白种人，黑种人，西班牙人，亚洲人，以及亚洲 - 印第安人，巴基斯坦人，中东和 / 或太平洋岛民。

[0184] 通过在此所述分析方法、方法和系统用于评估受治疗者极有可能经历或患有的慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，ROBO2 蛋白的参考阈值水平可能是预先确定的水平，例如从与测试受治疗者时间顺序年龄匹配的时间顺序年龄组的健康受治疗者人群获得的平均或中值水平。可选地，ROBO2 蛋白的参考阈值水平可以是特定受治疗者的历史参考水平，其是从相同受治疗者的样本中得到的，但在早些时间点，和 / 或当受治疗者没有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的时候。在一些例子中，ROBO2 蛋白的参考阈值水平可以是特定受治疗者群组的历史参考水平，这些受治疗者均具有例如糖尿病引起的慢性肾脏疾病或蛋白尿。

[0185] 在一些具体实施方式中，选择健康受治疗者作为对照受治疗者。在一些具体实施方式中，对照组为年龄匹配的对照组。健康受治疗者可用于获得例如尿液样本或血清样本

中 ROBO2 蛋白的参考阈值水平。在此所用“健康”受治疗者或从“健康”受治疗者或个体中获得的样本与本领域技术人员通常理解的相同。例如,如在此描述的,人们可以使用公知的方法评估肾脏功能,选择健康受治疗者为对照组受治疗者,用于在此描述的诊断和治疗方法。在一些具体实施方式中,身体健康、没有慢性肾脏疾病迹象或症状的受治疗者可作为健康对照受治疗者。通过临床医生、实验室测试进行的广泛测试评价这些受治疗者,包括病史、家族病史、身体和肾脏测试。慢性肾脏疾病和 / 或蛋白尿的分析示例包括但不限于,检测尿液、血液或血清样本中的特异性蛋白质和 / 或分子,如白蛋白、钙、胆固醇、全血计数 (CBC)、电解质、镁、磷、钾、钠或其任意组合;检测的分析方法,例如检测肌酐清除率的分析方法;肌酐水平;BUN(尿素氮);通过使用特异性的技术或程序,例如腹部 CT 扫描,腹部 MRI,腹部超声波,肾脏活组织切片,肾脏扫描,肾脏超声波;通过检测红细胞生成素、PTH 的分析方法或测试结果的变化;骨密度测试或维生素 D;或这些检测方法和分析方法的任意组合。

[0186] 理想的年龄匹配的人群(从中可以得到参考值)是与测试受治疗者或个体具有相同年龄顺序,但相近年龄匹配的人群也是可以接受的。相近年龄匹配的人群可能是测试受治疗者年龄顺序的 1、2、3、4 或 5 年内,或可以是包括测试个体年龄顺序的不同年龄顺序群组。

[0187] 与其“年龄顺序匹配组”相比的受治疗者通常是指,与年龄顺序匹配在 5-20 年范围内的受治疗者相比。相近的年龄匹配的人群可以是 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 年增量(例如“5 年增量”组可以是,62 岁受治疗者的参考值的来源可能包括 58-62 岁个体、59-63 岁个体、60-64 岁个体、61-65 岁个体或 62-66 岁个体)。在更广泛的定义中,不同年龄顺序群组间存在较大差异,例如,当存在用于参考值的少数不同年龄顺序群组 and 不同年龄顺序群组间的差异超过在此所述 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 15 或 20 年时,“年龄顺序匹配组”是指年龄组接近匹配受治疗者的年龄顺序(例如用于较高年龄组(例如 80-90 岁)和较低年龄组(例如 20-30 岁)的参考值时,51 岁的年龄顺序匹配组可使用较低年龄组(20-30 岁)作为参考水平,其更接近测试受治疗者的年龄顺序)。

[0188] 选择对照组受治疗者需要考虑的其它因素,包括但不限于,物种,性别,种族等等。因此,在一些具体实施方式中,参考水平可以是预先确定的参考水平,例如从健康对照组受治疗者组得到的平均或中值水平,这些受治疗者的性别与测试受治疗者的性别是性别匹配的。在一些具体实施方式中,参考水平可以是与先确定的参考水平,例如从健康对照组受治疗者组得到的平均或中值水平,这些受治疗者的种族与测试受治疗者的种族是种族匹配的(例如白种人,黑种人,西班牙人,亚洲人,以及亚洲-印第安人,巴基斯坦人,中东和 / 或太平洋岛民)。在其它具体实施方式中,健康受治疗者组的年龄顺序和性别与测试受治疗者的年龄顺序和性别是分别匹配的。在其它具体实施方式中,健康受治疗者组的年龄顺序和种族与测试受治疗者的年龄顺序和种族是分别匹配的。在其它具体实施方式中,健康对照受治疗者组的年龄顺序、性别和种族与测试受治疗者的年龄顺序、性别和种族是分别匹配的。

[0189] 受治疗者生物样本中 ROBO2 蛋白水平与 ROBO2 参考阈值水平的比较过程可采用本领域技术人员已知的任何和任何适当的方便方式进行。通常,采用在此所述分析方法、方法和系统确定的 ROBO2 蛋白水平值可以上定量值(例如浓度定量值,如每升样本中 ROBO2 蛋白的毫克数(如 mg/L),或绝对量)。选择地,ROBO2 蛋白水平值可以根据测量技术可以是定性的,因此,从受治疗者得到的值与参考值的比较的模式可以根据所用测量技术而变化。

例如,该比较可通过检测数值数据,通过检测该数据的表达(例如检测图形表示如条形图或线形图)而进行,并使用例如标准差中至少一个或至少两个标准差。在一个实施例中,当定性分析用于测量 ROBO2 蛋白水平时,该水平可通过可视比较有色反应产物的强度,或通过比较密度计数值或有色反应产物的光谱测量(例如比较来自测量装置中的数值数据或例如条形图的图解数据)而被比较。

[0190] 如在此所述,ROBO2 蛋白水平可定量(绝对值)或定性(相对值)测量。在一些具体实施方式中,生物样本中 ROBO2 蛋白水平的定量值可以表明慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的特定水平(或等级)。

[0191] 在一些具体实施方式中,进行比较以确定受治疗者数值与参考值之间区别的大小(例如比较测得的受治疗者 ROBO2 蛋白水平与 ROBO2 蛋白参考阈值之间的“倍数”或百分比不同)。倍数差异可通过测量 ROBO2 蛋白水平的绝对浓度确定,并将其与 ROBO2 蛋白的水平参考阈值的绝对值进行比较而确定,或者,倍数差异可通过参考值和样本值之间的相对差异确定,其中这两个值都不是绝对浓度的测量,和/或两个值可以同时测量。例如,ELISA 测量蛋白质的绝对含量或浓度,其与参考的相同蛋白质的绝对浓度相比可确定倍数变化。如另一实施例,抗体阵列测量相对浓度,从而可确定倍数变化。因此,暗示或指示具体诊断的测量值和参考值之间区别的大小取决于所用的方法。

[0192] 本领域技术人员显而易见的是,当采用重复测量法测量 ROBO2 蛋白水平时,测得的受治疗者的值可与 ROBO2 蛋白水平参考阈值比较,并考虑重复测量法。通过使用测量值中的均值或中值中的一个考虑重复测量法。

[0193] 在一些具体实施方式中,比较方法可以是手动的,或者也可以优选为自动的。例如,分析装置(如测量化学发光信号的光度计)可能含有可比较受治疗者 ROBO2 蛋白值与参考 ROBO2 蛋白值的电路和软件。可选地,分开的装置(如数字电脑)可用于比较测得的受治疗者的 ROBO2 蛋白水平和 ROBO2 蛋白参考阈值水平。用于比较的自动装置可包括存储的 ROBO2 蛋白参考值,或可比较测得的受治疗者 ROBO2 蛋白水平和同时测得的参考样本得到的 ROBO2 蛋白参考阈值水平。

[0194] 在一些具体实施方式中,基于在此所述分析方法、方法和系统的结果,测试 ROBO2 蛋白水平的受治疗者被分配至两组或多组(情况)中的一组。在此所述的诊断分析方法、方法和系统可用于在多种不同状态间进行分类。

[0195] 因此,在一些具体实施方式中,采用在此所述诊断分析方法、方法和系统可确定受治疗者是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的高风险。可鉴别以如高、中、低的不同风险状态为特征确定的 ROBO2 蛋白的生物标识物量和形式。发展为慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险通过测量单独 ROBO2 蛋白或与其它已知标志物的结合而确定,然后,或将其提交给分类算法将其和与特定风险水平相关的参考量(如在此公开的分离参考量)比较。

[0196] 在一些具体实施方式中,在此提供了用于确定受治疗者患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的严重性、阶段或风险的诊断分析方法、方法和系统。例如,慢性肾脏疾病的每一阶段具有特征性的 ROBO2 蛋白量或 ROBO2 蛋白相对量。疾病的阶段通过测量单独 ROBO2 蛋白或测量与其它标志物的结合而确定,然后或将其提交到分类算法将其与特定阶段相关生物标志物的参考量和/或模式比较,例如受治疗者有多久将会发展成慢性肾脏疾病或蛋白尿。例如,人们可以对一年内极有可能患有的慢性肾脏疾病或蛋白尿(不良预后),或在接

下来的 5 年受治疗者极有可能患有慢性肾脏疾病或蛋白尿分类。

[0197] 诊断分析方法、方法和系统的其他具体实施方式与结果或诊断或两者对技术人员、医生或受治疗者的交流相关。在某些具体实施方式中，使用计算机以将分析方法结果或诊断结果或两者的结果交流给感兴趣的方面，例如医生或他的患者。在一些具体实施方式中，例如，在一个国家或地区进行的分析方法或分析的分析方法结果，不同于与其沟通的国家或地区得到的结果或诊断。在一些具体实施方式中，基于受治疗者生物样本中 ROBO2 蛋白水平的患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，在获得水平或预后后交流给受治疗者。受治疗者的治疗医生将预后或诊断交流给受治疗者。可选地，预后和诊断可通过电子邮件或电话交流给受治疗者。计算机通过电子邮件或电话用于交流预后或诊断，或通过互联网使用安全网关患者登录服务。在某些的具体实施方式中，含有预后或诊断测试结果的信息，通过联合使用通讯领域技术人员熟悉的计算机硬件和软件，自动产生并递送给受治疗者。在此所述的分析方法、方法和系统的某些具体实施方式中，所有或部分方法步骤，包括样本分析方法、疾病诊断和分析方法结果或诊断的交流，可在不同地区（例如国外）进行。

[0198] 用于确定或评估在此描述的慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的诊断分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中，所述分析方法、方法和系统进一步包括基于患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的确定的管理受治疗者的治疗。这种管理包括医生或临床医生在确定受治疗者患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险后的行为。例如，如果医生诊断受治疗者具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，则接下来会给出一个特定的养生治疗方案。合适的养生治疗方案包括但不限于，监督下的锻炼计划，血压的控制、糖摄入量和 / 或体液水平，以及药物治疗。在一些具体实施方式中，患有慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的诊断后，还要进一步测试以确定病人是否患有慢性肾脏疾病，或患者是否患有相关疾病。另外，如果诊断测试对主要不良事件状态风险的结果是不确定，则需要进一步测试。在在此所述用于确定或评估慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的分析方法、方法和系统的一些具体实施方式中，如果医生诊断受治疗者不具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，则不提供治疗。

[0199] 在此所述分析方法和 ROBO2 的检测方法可采用机器人和计算机指挥系统自动化实现。可将生物样本，如尿液、血清或血液样本注入系统中，如微流体装置，从样本输入至结果输出完全由自动工作站运行。

[0200] 因此，在此提供在一些方面进一步提供了系统（和用于计算机系统的计算机可读介质），其基于表达谱或序列信息，执行检测个体是否患有慢性肾脏疾病或蛋白尿或是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的倾向的方法。

[0201] 在一些方面，在此提供系统，用于评估受治疗者患有或具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的增加的风险，该系统包括：(a) 确定模块，其配置用于接收至少一种生物样本并针对所述生物样本进行至少一次分析，以测量生物样本中 ROBO2 水平或确定相对于预先确定或参考阈值水平的 ROBO2 的表达比率，并输出所述测量水平或表达比率；(b) 存储设备，其配置用于储存确定模块输出的数据信息；(c) 比较模块，适合用于接收存储设备的输入，并将存储在存储设备的数据与至少一个 ROBO2 水平的参考阈值进行比较，其中，如果测量的 ROBO2 蛋白水平至少等于或高于参考阈值水平，比较模块提供信息给输出模块，生物样本与偏离参考阈值生物标志物水平的受治疗者相关；以及 (d) 输出模块，用于将信息显示给用户。

[0202] 在发明的所有方面中,确定 ROBO2 蛋白水平的方法可采用自动化机器或系统进行。所述机器和系统产生报告,例如在可见屏幕中显示报告或打印的报告,所述报告表明了 ROBO2 蛋白的水平,和 / 或报告了与 ROBO2 蛋白参考阈值相同或增加,和 / 或获得样本的受治疗者是否具有患有慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险。

[0203] 因此,在此所述的一些具体实施方式也提供机器、计算机系统和计算机可读媒介,用于进行以下步骤:(i) 确定 ROBO2 蛋白水平;以及(2) 表明或报告受治疗者是否具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险。

[0204] 这些方面的具体实施方式通过功能模块进行描述,这些具体实施方式由记录在计算机可读媒介上的计算机可执行指令定义,并在执行时使计算机进行方法步骤。出于清晰性的考虑,模块按功能进行分离。然而应该理解的是,模块不必对应严格的代码块,并且所述功能可以通过存储在不同媒介中的不同代码部分的执行,以及在不同时间执行来完成。另外,应当理解的是,模块可执行其它功能,因此,模块并不限于具有具体的功能或功能集。

[0205] 计算机可读媒介可为任何可被计算机存取的有形媒介。计算机可读媒介包括易失性的或非易失性的、可移动的或不可移动的有形媒介,其通过用于存储信息的任何方法或技术实施,例如计算机可读指令,数据结构,程式模块或其它数据。计算机可读媒介包括但不限于,RAM(随机存取存储器),ROM(只读存储器),EPROM(可擦可编程只读存储器),EEPROM(电可擦可编程只读存储器),闪存存储器,和其他的存储技术,CD-ROM(只读压缩光盘存储器),DVDs(数字全能磁盘)或其它光存储媒介,磁带盒,磁带,磁盘存储器或其它磁存储器媒介,其它易失或非易失性存储器,以及其它用于存储所需信息的有形媒介,其可通过包括前述任何合适组合的计算机进行存取。

[0206] 呈现在一个或多个计算机可读媒介或计算机可读介质的计算机可读数据,例如可定义指令作为一个或多个程序的一部分作为计算机执行的结果,指令指导计算机执行在此所述的一种或多种功能(例如与系统、或计算机可读媒介有关的),和 / 或不同具体实施方式、变形或其组合。这些指令可用多种编程语言中的任意一种编写,例如 Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, COBOL 汇编语言等等,或这些多种组合中的任何一种。呈现这些指令的计算机可读媒介可驻留在一个或多个在此所述系统或计算机可读媒介的组件中,可分布在一个或多个这样的组件中,并可在它们之间转变。

[0207] 计算机可读媒介可以是可传输的,从而存储其中的指令可被加载至任何计算机资源,以实施本发明所讨论的方面。另外,需要理解的是,存储在上述计算机可读介质或计算机可读媒介中的指令并不限于作为主机上运行的应用程序中的一部分呈现的指令。当然,指令可作为任何一种用于编制计算机完成在此方面的电脑编码(例如软件或微码)呈现。计算机可执行指令可以以合适的计算机语言或几种语言的组合进行编写。下面参考资料中描述了本领域普通技术人员已知的基本计算生物学方法:例如 Setubal and Meidanis 等,《计算生物学方法介绍》(PWS 出版公司,波士顿,1997)(Setubal and Meidanis et al., Introduction to Computational Biology Methods(PWS Publishing Company, Boston, 1997));Salzberg、Searles、Kasif,(编),《分子生物学计算方法》,(爱思唯尔,阿姆斯特丹,1998)(Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), Computational Methods in Molecular Biology, (Elsevier, Amsterdam, 1998));Rashidi 和 Buehler,《生物信息学基础知识:应用生物科学与医学》(CRC 出版,伦敦,

2000) (Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000)) 以及 Ouelette 和 Bzevanis, 《生物信息学: 基因和蛋白质分析实用指南》(Wiley&Sons 公司, 第 2 版, 2001) (Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley&Sons, Inc., 2nd ed., 2001))。

[0208] 在此所述方面的某些具体实施方式的功能模块包括确定模块, 存储设备, 比较模块和显示模块。功能模块可通过一个或多个计算机完成, 或通过使用一个或多个计算机网络或计算机系统完成。

[0209] 在一些方面, 在此提供了计算机系统, 其可用于确定受治疗者是否极有可能患有或具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险。在一些具体实施方式中, 计算机系统与确定模块连接, 其配置用于获得确定模块关于生物样本的输出数据, 在此确定模块配置用于检测从受治疗者获得的生物样本中 ROBO2 蛋白水平; 并且这里计算机系统包括: (a) 存储设备, 其配置用以储存确定模块的信息输出和参考数据, 其中, 存储设备连接至 (b) 比较模块, 在一些具体实施方式中, 其用于比较在存储设备中的输出数据和存储的参考数据, 并且在可选的具体实施方式中, 其适合用于将输出数据与其自身比较, 在此比较模块生成报告数据, 并连接至 (c) 显示模块, 其用于向用户的客户端计算机显示重新取回内容的页面 (即比较模块生成的报告数据), 其中重新取回内容可以显示 Robo2 的水平, 和 / 或受治疗者在将来经历慢性肾脏疾病或蛋白尿的可能性。

[0210] 在一些具体实施方式中, 确定模块具有计算机可执行指令, 以提供表达数据、序列信息、与计算机可读形式信息有关的信息。如在此所用的“序列信息”是指任何核苷酸和 / 或氨基酸序列, 包括但不限于, 全长核苷酸和 / 或氨基酸序列, 部分核苷酸和 / 或氨基酸序列, 或突变序列。另外, 与序列信息“相关的”信息包括存在或不存在的序列的检测 (例如突变或缺失的检测), 样本中序列浓度的确定 (如氨基酸序列表达水平, 或核苷酸 (RNA 或 DNA) 表达水平), 等等。术语“序列信息”意在包括存在或不存在的翻译后修饰 (例如磷酸化作用, 糖基化作用, 仿真化 (summylation), 法尼基化, 等等)。

[0211] 例如, 用于确定 ROBO2 序列或核酸表达信息的确定模块包括自动序列分析的已知系统, 包括但不限于, 日立 **FMBIO®** 和日立 **FMBIO®II** 荧光扫描仪 (购买于日立遗传系统公司, 阿拉米达, 加利福尼亚州) (available from Hitachi Genetic Systems, Alameda, California); **Spectrumedix®** SCE 9610 全自动 96- 毛细管电泳遗传分析系统 (购买于 SpectruMedix LLC, 州立学院, 宾夕法尼亚州) (available from SpectruMedix LLC, State College, Pennsylvania); ABI **PRISM®** 377DNA 测序仪, ABI **PRISM®** 373DNA 测序仪, ABI **PRISM®** 310 遗传分析仪, ABI **PRISM®** 3100 遗传分析仪以及 ABI **PRISM®** 3700DNA 分析仪 (购买于美国应用生物系统公司, 福斯特城, 加利福尼亚州) (available from Applied Biosystems, Foster City, California); 分子动力学 FluorImager™575, SI 荧光扫描仪, 和分子动力学 FluorImager™595 荧光扫描仪 (购于英国安玛西亚生物科学有限公司, 白金汉郡, 英格兰) (available from Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, England); GenomyxSC™DNA

测序仪（购于 Genomx 公司（福斯特城，加利福尼亚州））；以及 Pharmacia ALF™DNA 测序仪和 Pharmacia ALFexpress™（购于英国安玛西亚生物科学有限公司，小都，白金汉郡，英格兰）（available from Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, England）。

[0212] 在用于确定序列或蛋白质信息的一些具体实施方式中，确定模块包括用于蛋白质和 DNA 分析的系統。例如，质谱系統，包括基质辅助光解电离 - 飞行时间 (MALDI-TOF) 系統；SELDI-TOF-MS 蛋白芯片阵列分析系統，例如具有赛弗吉蛋白生物系統 II™ (CIPHERGEN PROTEIN BIOLOGYSYSTEM II™) 软件的机器；分析基因表达数据的系統（参见例如 US2003/019711）；基于数组的表达分析，例如 HT 数组系統和墨盒阵列系統，购于美国昂飞公司（圣克拉拉，加拿大 95051）（see for example U.S. 2003/0194711）；systems for array based expression analysis, for example HT array systems and cartridge array systems available from Affymetrix (Santa Clara, CA 95051)，自动装卸机，COMPLETE **GENECHIP**® 仪表系統，孵育装置 450，杂交箱 645，QC 工具箱软件工具包，扫描仪 30007G，扫描仪 30007G 靶向基因分型系統，扫描仪 30007G 全基因组关联系統，GENETITAN™ 仪器，**GeneChip**® 组合测站，HT 数组；自动化 ELISA 系統（例如 Dynax 的 **DSX**® 或 **DS2**® form，尚蒂伊，维吉尼亚，或 **ENEASYSTEM III**®, **TRITURUS**®, **THE MAGO**® Plus）；光密度计（例如 X-Rite-508-Spectro **Densitometer**®, **The HYRYS**™2 光密度计）；自动化荧光原位杂交系統（参见例如美国专利 6,136,540）；耦合 2-D 成像软件的 2D 凝胶成像系統；微量盘式光谱仪，荧光激活细胞分选器 (FACS)（例如流式细胞仪 FACS Vantage SE，美国 BD 公司）；放射性同位素分析仪（如闪烁计数器），或上述组合。

[0213] 在本发明的该方面或所有其它方面的一些具体实施方式中，各种软件程序和格式可用于储存存储设备中的生物标志物蛋白水平信息。任何数量的数据处理器的结构化格式（如文本文件或数据库）可用于获取或创建具有记录在其上的序列信息或表达水平信息的媒介。

[0214] 确定模块上确定的 ROBO2 表达信息或与 ROBO2 表达信息相关的信息可被存储设备读取。如在此使用的“存储设备”意在包括任何计算或处理设备或其它配置并适合用于存储数据或信息的装置。适合用于本发明的电子设备的示例包括单机计算设置；数据通信网络，包括局域网 (LAN)，广域网 (WAN)，云存储系統，因特网，内联网和外联网；以及局部或分布式计算机处理系統。存储设备还包括但不限于，磁存储介质，例如软盘、硬盘存储介质，磁带，光存储介质如 CD-ROM、DVD，电子存储介质如 RAM、ROM、EPROM、EEPROM 等等，云存储系統，一般硬盘和这些种类如磁 / 光存储介质的混合。存储设备适合于或配置其用于记录其上的序列信息或表达水平信息。这些以数字形式提供的信息可被电子地传输和读取，例如通过因特网，通过云系統，在磁盘上通过 USB（通用串行总线）或通过其它合适的通信方式。

[0215] 如在此使用的“表达水平信息”是指任何核苷酸和 / 或氨基酸表达水平信息，包括但不限于，全长核苷酸和 / 或氨基酸序列，部分核苷酸和 / 或氨基酸序列，或突变序列。另外，与序列信息“相关的”信息包括存在或不存在序列的检测（例如存在或不存在的氨基酸序列、核苷酸序列或翻译后修饰），样本中序列浓度的确定（如氨基酸序列水平，或核苷酸

(RNA 或 DNA) 表达水平,或翻译后修饰水平),以及等等。

[0216] 如在此使用的“存储”是指在存储设备上编码信息的过程。本领域技术人员可以容易想到采用任何本领域已知的方法在已知媒介上编码信息,以产生包含序列信息或表达水平信息的制成品。

[0217] 各种软件程序和格式可用于存储存储设备中的序列信息或表达水平信息。任何数量的数据处理器的结构化格式(如文本文件或数据库)可用于获取或创建具有记录在其上的序列信息或表达水平信息的媒介。

[0218] 通过提供计算机可读形式的序列信息或表达水平信息,人们可以在比较模块中使用计算机可读形式的序列信息或表达水平信息,以在存储设备中将特异序列或表达谱与参考数据进行比较。例如,搜索程序可用于识别序列的片段或区域,该序列与特定序列(参考数据,例如从对照样本中获得的序列信息)匹配,或将测得的表达水平的直接对比与参考数据表达水平(例如从对照样本中获得的表达水平信息)对比。以计算机可读形式进行的对比提供了计算机可读对比结果,该结果可由多种方法进行处理。基于对比结果的内容可以从比较模块重新取回,用以指示特定疾病或病症,如慢性肾脏疾病或蛋白尿。

[0219] 在一些具体实施方式中,存储在存储设备中、由比较模块读取的参考数据是从与待测生物样本类型相同的对照生物样本获得的 ROB02 序列或表达信息数据。可选地,参考数据是数据库,例如生物体全基因组序列的部分,或蛋白质家族的序列,或表达水平谱(RNA,蛋白质或肽)。在一些具体实施方式中,参考数据是序列信息或表达水平谱,其指示特定疾病或病症,如慢性肾脏疾病或蛋白尿。

[0220] 在一些具体实施方式中,参考数据被电子地或数字地记录,并从数据库中标明,包括但不限于,基因库(NCBI)蛋白质或DNA数据库如基因组,ESTs,SNPS,Traces,Celara,Ventor Reads,Watson reads,HGTS等等;生物信息学数据库瑞士研究所(Swiss Institute of Bioinformatics databases),例如 ENZYME,PROSITE,SWISS-2DPAGE,Swiss-Prot 和 TrEMBL 数据库;梅兰妮软件包或 ExPASy WWW 服务器等等;SWISS-MODEL,Swiss-Shop 和其它基于网络的计算工具;综合微生物资源数据库(购于基因组研究学院)(available from The Institute of Genomic Research)。由此产生的信息可存储在相关数据库中,用于确定其中蛋白质或基因的参考数据与基因组间的同源性。

[0221] 通过在比较模块提供可读形式的 ROB02 水平,其可用于比较在存储设备中的 ROB02 参考阈值水平。以计算机可读形式进行的对比提供计算机可读内容,其可由多种方法处理。

[0222] “比较模块”可使用多种可用的软件程序和格式的比较操作,以比较确定模块确定的 ROB02 序列或表达水平信息与参考 ROB02 序列或表达水平数据。在一些具体实施方式中,配置比较模块用于采用模式识别技术,以比较一个或多个记录的 ROB02 序列或表达水平数据与一个或多个参考数据模式。比较模块可使用现有市售的或者可免费获得的对比模式软件进行配置,并可以为所进行的比较特定数据进行优化。比较模块提供与序列信息相关的计算机可读信息,包括例如,存在或不存在序列的检测(突变或缺失(蛋白质或DNA)的检测,关于不同等位基因的信息,翻译后修饰检测,或序列的遗漏或重复);样本中序列浓度的确定(如氨基酸序列/蛋白质表达水平,或核苷酸(RNA或DNA)表达水平,或翻译后修饰水平),或表达谱确定。

[0223] 在一些具体实施方式中,比较模块对确定模块输出数据的 ROBO2 水平与每一个 ROBO2 参考阈值水平间进行对比。

[0224] 在一些具体实施方式中,比较模块进行质谱对比,例如肽片段序列信息的对比可通过采用具有脚本称为“Qpeaks”(参见例如 W02007/022248,本发明引用作为参考)或“Qpeaks”(光谱联营公司,伊萨卡岛,纽约)或 CIPHERGEN Peaks 2.1™ 软件的 MATLAB 处理的光谱进行。处理后的光谱随后使用比对算法比对,比对算法利用最小熵法,通过取基线校正数据,将样本数据与对照数据进行比对(参见例如 WIPO 公开专利 W02007/022248,本发明引用作为参考)。对比结果可由计算比率进一步处理。可以看出蛋白质表达谱。

[0225] 任何可利用的对比软件均可使用,包括但不限于,赛弗吉表达 (CIPHERGEN Express) (CE) 和生物标志模型软件 (BPS) 包,赛弗吉生物系统公司,美国 (CIPHERGEN Biosystems, Inc., CA, USA)。对比分析可以用蛋白质芯片系统软件(例如 Bio-Rad 实验室的蛋白质芯片套件)完成。

[0226] 比较模块,或其它在此所述的模块,可包括操作系统(例如 UNIX),其上运行相关的数据库管理系统,万维网应用程序,以及万维网服务器。万维网应用程序包括数据库语言语句产生所需的可执行代码(例如结构化查询语言 (SQL) 语句)。通常,可执行文件包括嵌入式 SQL 语句。另外,万维网应用程序包括配置文件,配置文件含有组成服务器以及各种内部和外部数据库的各种软件实体的指针和地址,各种内部和外部数据库是对服务用户请求可访问。配置文件还指示请求服务器资源到相应的硬件—如是必要的,服务器可被分布在两个或多个独立的计算机。在一些具体实施方式中,万维网服务器支持 TCP/IP 协议。这种局域网有时被称为“企业内部网”。这种局域网的优势是它们允许与驻留在万维网(例如基因数据库或瑞士专业万维网站点)(e.g., the GenBank or Swiss Pro World Wide Web site) 上的公共领域数据库进行简单交流。因此,在一些优选的具体实施方式中,用户可通过采用 Web 浏览器和网络服务器提供的 HTML 界面,直接访问驻留在网络数据库上的数据。

[0227] 在一些具体实施方式中,比较模块对基因表达谱进行比较。例如,基因表达谱的确定可使用美国昂飞公司的微阵列套件软件 5.0 版 (MAS 5.0) (购于美国昂飞公司,圣克拉拉,加利福尼亚) (available from Affymetrix, Santa Clara, California) 检测,基于来自探针组的信号强度分析基因或基因组的相对丰度,并且 MAS 5.0 数据文件可转移至数据库,并用 Microsoft Excel 和 GeneSpring 6.0 软件(购于安捷伦科技公司,圣克拉拉,加利福尼亚) (available from Agilent Technologies, Santa Clara, California) 分析。MAS 5.0 软件的检测算法可用于获得给定样本中多少个转录本被检测到的全面概述,并且可进行两个或多个微阵列数据集的比较分析。

[0228] 在一些具体实施方式中,比较模块对蛋白质表达谱进行比较。任何可利用的对比软件均可使用,包括但不限于,赛弗吉表达 (CIPHERGEN Express) (CE) 和生物标志模型软件 (BPS) 包(购于赛弗吉生物系统公司,美国 (available from CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, California))。对比分析可以用蛋白质芯片系统软件(例如蛋白质芯片套件(购于 Bio-Rad 实验室,大力神,加利福尼亚州)) (e.g., The Proteinchip Suite (available from Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 完成。识别表达谱的算法可包括使用优化算法,如均方差算法(例如 JMP 基因组学算法,购于 JMP 软件,北卡罗来纳州) (e.g. JMP Genomics algorithm available from JMP Software Cary, North Carolina)。

[0229] 比较模块提供计算机可读的比对结果,其可通过预定义的标准或用户定义的标准以计算机可读形式进行处理,以提供部分基于比较结果的内容,比较结果可以利用显示模块根据用户请求进行存储和输出。显示模块能够为用户提供基于对比结果的内容的显示部分,其中,所述内容为慢性肾脏疾病或蛋白尿的指示性信号。这些信号,例如可以是电脑显示器上指示存在或不存在慢性肾脏疾病或蛋白尿的内容的显示,打印机中指示存在或不存在慢性肾脏疾病或蛋白尿的内容的打印页面,或存在或不存在慢性肾脏疾病或蛋白尿的光的或声音的指示。

[0230] 基于对比结果的内容可包括一种或多种蛋白质的表达谱,或一种或多种基因的表达谱。在一些具体实施方式中,基于对比结果的内容仅仅是存在或不存在基于 ROBO2 蛋白水平的慢性肾脏疾病或蛋白尿的指示性信号。

[0231] 在一些具体实施方式中,基于对比结果的内容显示在电脑显示器上。在本发明的一个具体实施方式中,基于对比结果的内容通过打印媒介显示。在本发明的一个具体实施方式中,基于对比结果的内容作为指示灯或指示声音进行显示。显示模块可为任何合适装置,配置其以接受来自计算机并向用户显示计算机可读信息。非限制性示例包括,例如,通用计算机如那些基于英特尔奔腾处理器,苹果电脑和平板设备,摩托罗拉 PowerPC, Sun UltraSPARC, 惠普 PA-RISC 处理器,多种购于加利福尼亚州森尼维尔市超微半导体公司 (AMD) 的处理器中的任何一种,或其它类型的处理器,视频显示设备如平板设备,智能手机移动设备,平板显示器,阴极射线管等等,以及各种类型的电脑打印机。

[0232] 在一些具体实施方式中,万维网浏览器用于向用户提供基于对比结果的内容的显示界面。应当理解的是,本发明的其它模块可以适于具有 Web 浏览器的界面。通过 Web 浏览器,用户可以构造来自比较模块中重新取回数据的请求。因此,该用户通常会指向和点击用户界面元素,如图形用户界面常规使用的按钮,下拉菜单,滚动条之类。用户 Web 浏览器制定的请求传输至网络应用程序,其将请求格式化以生成用于提取与序列信息相关的相关信息的查询,例如指示存在或不存在突变或缺失 (DNA 或蛋白质) 的显示;氨基酸序列 (蛋白质) 表达水平的显示;核苷酸 (RNA 或 DNA) 表达水平的显示;表达、SNP 或突变谱或单倍型的显示,或基于上述的信息的显示。在一个具体实施方式中,参考样本数据的序列信息也可以显示。

[0233] 在一些具体实施方式中,显示模块显示比较结果和比较结果是否指示疾病,例如 ROBO2 表达谱是否指示慢性肾脏疾病或蛋白尿。

[0234] 在一些具体实施方式中,基于显示的比较结果的内容是指示存在或不存在慢性肾脏疾病或蛋白尿的信号 (如正或负信号),因此只显示正或负指示。

[0235] 因此,在此提供的系统 (和计算机可读媒介而产生的计算机系统),其是基于表达谱或序列信息,用以确定个体是否具有慢性肾脏疾病或蛋白尿或具有患慢性肾脏疾病或蛋白尿倾向的分析方法和方法。

[0236] 系统和计算机可读媒介仅是本发明示例性的具体实施方式,其是基于表达谱或序列信息,用以确定个体是否具有特定疾病或失调,或具有患特定疾病或失调倾向的分析方法和方法,并不限制本发明的保护范围。系统和计算机可读媒介的变型是可能的,并落入本发明的保护范围。

[0237] 系统的模块或用于计算机可读媒介的模块可以设想多种配置。例如,功能的提供

可以是一台机器,或分布于多台机器。

Robo2 是定位于小鼠足细胞基底细胞表面的足细胞蛋白

[0238] 肾脏发育过程中,Robo2mRNA 表达于围绕分叉输尿管芽的后肾间质,随后表达于 S 形主体的近端 (Piper 等,2000) (Piper et al., 2000),原始足细胞位置。为了研究 Robo2 是否参与足细胞的成熟,除了其在早期肾感应中的作用,我们进行了原位杂交,并发现 Robo2mRNA 表达于胚胎第 16.5 天 (E16.5) 的小鼠胚胎肾小球发育中的毛细血管袢阶段 (图 5A 和图 5B)。通过 E14.5 左右对发育中肾小球进行免疫荧光染色使 Robo2 蛋白成为可检测到的,在 E16.5 达到峰值表达 (图 5C-5E)。虽然表达在发育期的 E17.5 后降低 (图 5F),特异性的 Robo2 表达一直保持到出生后的肾小球,并在 5 周龄的成年小鼠可检测到 (图 5G、5H、5L-5M)。

[0239] 为了确定 Robo2 在发育的肾小球中的细胞定位,我们用肾小球细胞类型特异性标志物进行了双标记免疫组织化学。我们发现 Robo2 蛋白与 Nephrin (图 1A-1C) 和 podocin (图 1D-1F) 共定位,两种足细胞缝隔膜相关的蛋白质。Robo2 与 Nephrin 相互作用的衔接蛋白共表达于肾小球中,Nck 和 WT1 是足细胞细胞核的组成成分 (图 5H-5K)。采用抗巢蛋白 (nidogen) (图 1J-1L 和 1P) 和 Pecam1 (图 1M-1O, 5M) 的抗体进行双标记显示 Robo2 定位于靠近肾小球基底膜外表面,不存在于内皮细胞,其中巢蛋白 (nidogen) 是一种基底膜标志物,Pecam1 是一种内皮细胞标志物。高分辨率共焦显微镜进一步显示在足细胞基底面具有最丰富的亚细胞的 Robo2 (图 1Q)。具有胞浆结合域抗体的出生后小鼠肾脏的免疫胶体金电镜显示,Robo2 定位于接近狭缝隔膜胞质面的足细胞足突 (图 1R)。这些结果显示,Robo2 为足细胞蛋白,且其在足突中的基底亚细胞定位表面,其在调节足细胞足突结构中发挥作用。

Robo2 胞内域与衔接蛋白 Nck 的 SH3 域的直接相互作用

[0240] Nephrin 胞外域的衔接导致其通过 Src 激酶对其胞内域的酪氨酸磷酸化,和衔接蛋白 Nck 的 SH2 域的引入,这反过来又引起肌动蛋白聚合 (Jones 等,2006 ;Verma 等,2006) (Jones et al., 2006 ;Verma et al., 2006)。Nck 在 C-端具有一个 SH2 域,在邻近 N-端具有三个 SH3 域。肌动蛋白通过 Nck 的 SH3 结合域进行介导的 (Rivera 等,2004) (Rivera et al., 2004),这可以引入含有 N-WASP 和 Pak 的各种细胞骨架调节剂 (Jones 等,2006) (Jones et al., 2006)。先前的研究表明,果蝇同族体 Dreadlock 的 Nck 的 SH3 域也可与 Robo 胞内域直接相互作用,以抑制肌动蛋白的聚合 (Fan 等,2003 ;Yang 和 Bashaw,2006) (Fan et al., 2003 ;Yang and Bashaw, 2006)。

[0241] 我们测试哺乳动物 Nck 是否也可以与足细胞中的 Robo2 直接相互作用以调节 F-肌动蛋白细胞骨架。为了回答这个问题,我们采用酵母双杂交分析以检测 Robo2 是否与 Nck 相互作用。由于两种哺乳动物 Ncks (即 Nck1, Nck2) 在肾脏发育中具有相同的结构和功能 (Jones 等,2006) (Jones et al., 2006),在此时研究中我们使用 Nck1,观察到 Robo2 胞内域可与 Nck1 直接相互作用 (图 2A-2C)。Robo2 和 Nck1 的结合位点图表明,含有 4 个富含脯氨酸基序的氨基酸序列 1085-1301,对相互作用是至关重要的 (图 2A 和 2C)。这种富含脯氨酸基序的缺失阻止其与 Nck 的相互作用 (图 2A)。Robo2 和 Nck1 的结合位点图表明,前两个 SH3 域在其与 Robo2 的相互作用中是必需的,因为删除它们中的一个或两个都会使相互作用消失 (图 2B)。因此,Robo2 与 Nck1 的相互作用可通过两个非常有特点的蛋白结构

域 SH3 域和富含脯氨酸的基序介导的图 2C)。CD2AP, 另一种足细胞衔接蛋白, 也在其 N- 端具有三个 SH3 域 (Shih 等, 2001) (Shih et al., 2001), 但我们没有检测到 CD2AP 与 Robo2 在酵母双杂交或共沉淀分析中有任何相互作用。这些观察结果表明, 足细胞中 Robo2 和 Nck1 之间的结合是特异性的相互作用。

全长 Robo2 通过 Nck 与 Nephrin 形成复合物

[0242] 我们通过体外结合捕获试验 (pull down) 和共沉淀分析确认了 Robo2 与 Nck 之间的相互作用。将 His- 和 myc- 标记的人类全长 Robo2 (His-myc-Robo2) 或 his- 和 myc- 标记的 Nck1 结合域缺失的人类 Robo2 (His-myc-Robo2- Δ NBD) 在 HEK 细胞中表达。转染的 HEK 细胞在 Slit2 条件培养液培养液 (从 Slit2 稳定转染的细胞制备的) 刺激, 以激活 Robo2 并增加 Nck 结合 (Fan 等, 2003) (Fan et al., 2003)。利用 Ni-NTA 磁珠, 将 Nck 与 His-myc-Robo2 从 HEK 细胞裂解物拉出, 而不是与 His-myc-Robo2- Δ NBD (图 2D)。因为 Nck 的 SH2 域与 Nephrin 细胞质区 (NCD) 中的磷酸酪氨酸相互作用 (Jones 等, 2006; Verma 等, 2006) (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006), 我们利用共沉淀分析检查 Robo2 是否通过 Nck 与 Nephrin 形成复合物。为了建立原理性的证明, 我们利用 Fyn 激酶将 Robo2 与 Nephrin 在 HEK 细胞中共表达, 以增加 Nephrin 磷酸化。当 Fyn 被表达时, 利用 Ni-NTA 磁珠从 HEK 细胞裂解物中拉出与 Nck 和 Nephrin 共沉淀的 His-myc-Robo2 (图 2E)。以相反的顺序, 当 Fyn 被表达时, 拉出与 Nck 和 Robo2 共沉淀的 His-myc-nephrin (图 2F)。此外, 当 Fyn 被过表达时, 用抗 Nck 抗体制备的沉淀物含有 Robo2 和 Nephrin 两者 (图 6A)。这些数据表明 Nephrin、Nck 和 Robo2 在体外形成复合物。为了在体内证实这些发现, 我们从新生小鼠肾脏溶解物免疫沉淀 Robo2, 并且发现 Nck 与 Nephrin 是共沉淀的 (图 2G)。相反地, 用抗 Nephrin 抗体制备的沉淀物也含有 Nck 和 Robo2 (图 2H)。由于 Nephrin 独特地表达在足细胞中, Nck 和 Robo2 也定位在肾脏的这些细胞中, 这些结果表明, Nephrin、Nck 和 Robo2 能够在足细胞中形成复合物。

[0243] 为了确定 Slit2 在 Robo2-Nck-Nephrin 蛋白复合物形成中的作用, 将 His-myc-Robo2、Nephrin 和 Fyn 在 HEK 细胞中共表达, 其中 HEK 细胞在共沉淀前通过 Slit2 条件培养液或不含 Slit2 的对照条件培养液刺激 (图 2I)。我们观察到, Slit2 的刺激增加了 Robo2 与 Nck 的结合及与 Nephrin 复合物的形成。Nck1 对 Robo2 的比值以及 Nephrin 对 Robo2 的比值均在 Slit2 刺激后增加 (图 2J)。与该发现一致的是, 我们观察到 Slit2 在新生小鼠肾小球中强烈表达 (图 6B、6C)。

Slit2-Robo2 信号抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合

[0244] 由于 Slit 与 Robo 结合引入 Dock 和 srGAPs, 从而抑制肌动蛋白聚合 (Fan 等, 2003) (Fan et al., 2003), 我们希望测试哺乳动物细胞中 Robo2 是否也能引入 Nck 以抑制肌动蛋白聚合, 与 Nephrin 促进肌动蛋白聚合的作用相反。为了说明这个问题, 如前所述, 我们通过分析表达 CD16/7-NCD 嵌合蛋白的细胞中的肌动蛋白尾巴研究了肌动蛋白聚合 (Jones 等, 2006; Verma 等, 2006) (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006)。该模型利用与 Nephrin 细胞质区 (NCD) 融合的人类免疫球蛋白 Fc 受体 CD16 和 CD17 的细胞外结构域和跨膜结构域。CD16/7-HA, 其中的 NCD 用 HA 标签蛋白替代, 用作负控制。这些嵌合蛋白在 HEK 细胞中与 Robo2 共表达, 用抗-CD16 抗体和与若丹明结合的第二抗体处理后成簇。我们首先检查 Nephrin 细胞质结构域的成簇是否可以引入 Robo2。我们观察到, CD16/7-NCD 的参与

将 Robo2 带入该簇中,因为大多数 Robo2 与 CD16/7-NCD 簇共定位(图 6D-6F)。然而,没有观察到 Robo2 与 CD16/7-HA 对照(图 6D')或与 Robo2- Δ NBD 构建体(图 6E')的共定位,其中 Robo2Nck 结合域(NBD)被删除。有趣的是,在没有 Slit2 情况下,CD16/7-NCD 和 Robo2 的共定位显著减少(图 6F')。这些数据提供了进一步的证据证明,Nephrin 细胞质结构域是能够在 Slit2 存在下与 Robo2 胞内域复合的,并验证该模型以确认 Robo2-Nck-Nephrin 复合物的形成是否影响肌动蛋白聚合。

[0245] 表达 CD16/7-NCD 和 Robo2 的 HEK 细胞用 Slit2 或不含 Slit2 的条件培养液刺激,而通过抗 CD-16 抗体成簇。肌动蛋白聚合通过定量具有可见 F-肌动蛋白尾巴的 HEK 细胞数量来评价(Rivera 等,2004)(Rivera et al.,2004)。我们观察到,~80%的 CD16/7-NCD 簇细胞形成 F-肌动蛋白尾巴,如先前报道,其可以通过鬼笔环肽染色显现(Jones 等,2006;Verma 等,2006)(Jones et al.,2006;Verma et al.,2006)。然而,由于 Slit2 刺激,具有 F-肌动蛋白尾巴的细胞数目显著减少至约 40%(图 3A 和 3C)。当对照 CD16/7-HA 蛋白聚合时,观察到只有少量细胞含有较短 F-肌动蛋白尾巴(图 3B 和 3C)。为了进一步研究肌动蛋白聚合的这种抑制是否需要 Nck,我们采用没有 Nck 结合域的 Robo2(Robo2- Δ NBD)重复该试验,以确定封闭结合至 Robo2 的 Nck 是否可以阻止 Slit2-Robo2 对 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合的抑制。CD16/7-NCD 与全长 Robo2(图 7A)或 Robo2- Δ NBD(图 7B)在 HEK 细胞中共表达。我们观察到,Robo2 中 Nck 结合域的删除显著折中了 Slit2-Robo2 对 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合的抑制(图 7C)。

[0246] 前期研究已经表明,Nephrin 连接至 F-肌动蛋白细胞骨架(Yuan 等,2002)(Yuan et al.,2002)。为了确定 Slit2-Robo2 信号是否能抑制与 Nephrin 相关的 F-肌动蛋白,我们采用抗 CD-16 抗体对 CD16/7-NCD 和 CD16/7-HA 进行免疫沉淀反应,并用蛋白质印迹法检查沉淀物中 F-肌动蛋白的数量。我们观察到,当 Slit2 刺激时,与 Nephrin 相关的 F-肌动蛋白的丰度显著降低(图 3D 和 3E)。相反地,体内免疫沉淀反应分析显示,与野生型或 Robo2 杂合小鼠肾脏获得的 F-肌动蛋白相比,通过从无 Robo2 新生小鼠肾脏取得的抗-Nephrin 抗体进行免疫沉淀的 Nephrin 相关 F-肌动蛋白显著增加(图 3F 和 3G)。综合起来,这些结果表明,Slit2-Robo2 信号抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合。

足细胞中 Robo2 的缺失引起小鼠足突结构改变

[0247] 我们和其他人以前已经证实几乎所有混合遗传背景的 Robo2 纯合缺失小鼠在出生不久后死亡,归因于严重的 CAKUT 表型(Grieshammer 等,2004;Lu 等,2007;Wang 等,2011)(Grieshammer et al.,2004;Lu et al.,2007;Wang et al.,2011)。用 Robo2^{de15} 突变等位基因饲养小鼠五代至具有 C57BL/6 遗传背景后,与 Robo2^{de15/+} 杂合父母交配可产生三个存活 3 周的 Robo2^{de15/de15} 纯合缺失小鼠(在断奶分析总的 160 小鼠中)。为了确定发育过程中足细胞足突形成中对 Robo2 是否必需,我们检查了刚出生和 3 周龄 Robo2 缺失小鼠的肾小球超微结构。虽然足细胞本体、足突和 Slit-隔膜在出生时形成,但透射电子显微镜显示,新生 Robo2^{de15/de15} 纯合缺失小鼠中局灶性足突消失(图 8A-8F)。使用扫描电镜,我们观察到刚出生和 3 周龄 Robo2^{de15/de15} 纯合缺失小鼠中的不规则趾状突足突(图 4A-4H)。这些发现表明,Robo2 中肾脏发育过程中对正常足细胞足突图案是必需。

[0248] 为了检测成熟肾小球中 Robo2 在足突结构保持中的作用,通过杂交具有 Robo2^{de15/+} 的条件 Robo2^{fllox/fllox} 小鼠和携带膜蛋白-Cre(podocin-Cre)转基因的 Tg^{Nphs2-Cre/+} 杂合小鼠,

我们产生足细胞特异性 Robo2 敲除小鼠。具有 Robo2^{del15/flox}、Tg^{Nphs2-Cre/+} 的 20 只足细胞特异性 Robo2 突变小鼠与 20 只同窝出生对照小鼠被分析至 1 岁龄。足细胞特异性 Robo2 敲除小鼠是可存活的并是可育的。然而,在一个月时,它们异乎寻常地表现出宽的足细胞足突和局灶节段性足突消失(图 4I-4M)。6 周龄时,突变小鼠形成显著的微白蛋白尿,由 ELISA 和蛋白质印迹分析法检测(图 4N 和图 4O)。另外,扫描电镜显示,在 Robo2 足细胞特异性敲除小鼠中出现足突图案缺陷。与野生型有序拉链状趾状突的二次足突不同,Robo2 足细胞特异性敲除小鼠在一个月时显示不规则和紊乱的足突趾状突图案(图 8G-8J)。随时间推移,这些缺陷越来越明显。在 7 个月龄时,Robo2 足细胞特异性敲除小鼠中明显观察到紊乱的、较短的和曲折的足突(图 8K-8N),这与 3 周龄 Robo2 缺失小鼠的表型相似。虽然 Robo2 足细胞特异性敲除小鼠显示了正常的足细胞数量,但肾小球中基质沉积显著增加(图 8O-8T,表 1 和表 2)。这些形态变化表明,Robo2 在调节和维持肾小球足细胞足突结构中的作用。

Robo2 的缺失减轻 Nephrin 缺失小鼠中足细胞结构缺陷

[0249] Nephrin 纯合小鼠形成特有的表型,其具有扩张肾小囊腔的异常宽的足突,肾小球 slit- 隔膜缺失,和显著蛋白尿(Done 等,2008;Hamano 等,2002)(Done et al.,2008;Hamano et al.,2002)。由于 Robo2 与 Nephrin 形成复合物,以及 Slit2-Robo2 信号抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合,我们怀疑 Robo2 的缺失是否会修饰 Nephrin 缺失小鼠的足细胞表型。为了检验 Robo2 和 Nephrin 之间存在可能的基因相互作用这个假设,我们生成 Robo2^{-/-} 种系;Nphs1^{-/-} 和足细胞特异性 Robo2^{flox/flox},Tg^{Nphs2-Cre/+},Nphs1^{-/-} 双 Robo2-Nephrin 缺失小鼠。与 Nphs1^{-/-} 单一纯合类似,Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}(4/4;100%) 以及 Robo2^{flox/flox};Tg^{Nphs2-Cre/+};Nphs1^{-/-}(3/3,100%) 双敲除小鼠均在出生后 10 小时内死亡。然而,组织学分析揭示 Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-} 双纯合小鼠中肾小球的形态,与 Nphs1^{-/-} 单一 Nephrin 纯合小鼠的表型相比,看起来相对正常,其具有扩大的肾小囊腔(图 8U-8X)。具有扩大肾小囊腔的肾小球的数量,与 Nephrin 单一缺失小鼠(31/122,25.4%) 相比,在 Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-} 双纯合小鼠(2/55,3.6%) 中显著减少(图 8Y 和表 3)。另外,扫描电镜显示的肾小球超微结构分析表明,与 Robo2^{-/-} 单一纯合(图 4T 和 4U) 和野生型对照组(图 4V 和 4W) 的 100% 相比,只在来自 Nephrin 单一纯合小鼠的 1/15(6.67%) 的肾小球观察到趾状突足细胞足突结构(图 4P 和 4Q)。显著地,足细胞足突的趾状突图案在 Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-} 双合新生小鼠肾脏的 12/16(75%) 的肾小球中恢复(图 4R 和 4S,表 4),表明 Robo2 和 Nephrin 同时缺失减轻这些小鼠中足细胞足突结构的表型。这些发现表明,当 Robo2 和 Nephrin 的表达水平被从遗传上改变时,上述的 Robo2-Nck-Nephrin 物理相互作用对体内足细胞足突形态具有巨大影响。

[0250] 足细胞显示了相当大程度的适应性。在发育过程中,它们区分简单立方上皮细胞进入到我们认为是成熟足细胞复杂的轴突细胞(Reeves 等,1978)(Reeves et al.,1978)。该适应性被保留到成熟后。用硫酸鱼精蛋白进行表面电荷中和和用肝素恢复试验后(Seiler 等,1975)(Seiler et al.,1975),以及在患有微小病变的蛋白尿儿童的复发期和缓解期(Nachman 等,2008)(Nachman et al.,2008) 内,它被认为是最生动的可逆足突消失。足突中更细微的变化可能会发生用以在生理条件下响应以血液动力学、激素或旁分泌刺激形式的正和负信号。考虑到足突中 F- 肌动蛋白的丰度,不希望受到理论的约束或限制,这些刺激引起那些细微变化以响应转换到 F- 肌动蛋白细胞骨架的正和负信号

是有可能的。过多和不平衡的正信号可能导致疾病表型。事实上,虽然尚未确定生理性配体,很显然, Nephrin 的成簇和磷酸化作用通过引入 Nck 诱导肌动蛋白聚合,机制是通过致肾炎单克隆抗体引入到 Nephrin 胞外域诱导大鼠的蛋白尿有关 (Topham 等,1999) (Topham et al., 1999),以及在肾移植后先天性肾病综合征情况下发展成抗 Nephrin 同种抗体的 (Patrakka 等,2002) (Patrakka et al., 2002)。

[0251] 在此我们的研究显示了足细胞肌动蛋白聚合的负调控的另一个水平,其中,当 Robo2 与 Slit 结合时, Robo2 抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合。不希望被理论束缚或限制,我们认为 Slit-Robo2 信号可以抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白聚合,以维持如下正常的足细胞足突结构:在生理条件下(例如足突发育过程中), Nephrin 参与引起细胞内的 Y1191/1208/1232 磷酸化, Nck 的 SH2 结合域与其结合 (Jones 等,2006 ;Verma 等,2006) (Jones et al., 2006 ;Verma et al., 2006)。Nck 反过来引入如 N-WASP 的细胞骨架调节器中,通过其 SH3 域促进肌动蛋白聚合,以使足突扩展或延伸(图 8Z)。局部分泌的 Slit 和结合的 Slit 通过其富含脯氨酸区域和 Nck 的前两个 SH3 域增加 Robo2 与 Nck 的相互作用。用 Robo2 分离 Nck 的前两个 SH3 域可抑制 Nephrin-Nck 介导的肌动蛋白聚合,并且降低与 Nephrin 相关的 F-肌动蛋白以保持动态的和平衡的 F-肌动蛋白细胞骨架和正常足细胞足突结构(图 8Z)。除了通过 Nck 直接抑制 Nephrin 诱导肌动蛋白聚合外, Slit-Robo2 信号可通过其它途径灭活肌动蛋白的聚合,例如,如前述报道,引入 Ena、Abl、srGAPs 以负向地调节 F-肌动蛋白细胞骨架 (Bashaw 等,2000 ;Wong 等,2001) (Bashaw et al., 2000 ;Wong et al., 2001)。在没有 Slit-Robo2 信号情况下(例如当 Robo2 被敲除时), Robo2 对 Nephrin 诱导的聚合的抑制作用消失。Nck 的 SH3 域能够与下游的细胞骨架调节剂相互作用,以增加肌动蛋白聚合(图 8Z),这可解释在 Robo2 突变小鼠中确认的足细胞足突结构的改变。因此,在此我们的所述的结果支持这样一个机制:Slit-Robo2 信号可通过负调节 F-肌动蛋白细胞骨架而调节足细胞适应性,这与 Slit-Robo2 信号在轴突生长锥寻路 (axon growth cone pathfinding) 中的作用相似 (Guan 和 Rao,2003) (Guan and Rao, 2003)。在 Robo2 突变小鼠肾小球中增加基质沉积的病理发现极有可能显示了再次应答。

[0252] 虽然从在此描述的我们的研究中,清楚的得出 Robo2 定位于足细胞的基底面,并通过其胞内域与其它既定的足突 Slit-隔膜蛋白质形成复合物,但其本身实际上是否形成部分的 Slit-隔膜仍是不确定的。有趣的是,Robo2 的胞外域与 Nephrin 相似,其具有 8 种类免疫球蛋白 (Ig) 基序和 1 个纤连蛋白域,而 Robo2 具有 5 个类 Ig 基序和 3 个纤连蛋白域(图 8Z) (Tryggvason 等,2006) (Tryggvason et al., 2006)。我们在酵母双杂交试验中检测到 Robo2 胞内域和 Nephrin 细胞质域之间的相互作用。我们得到的生物化学数据(图 2E 和 2F) 也不支持体外这两个受体的直接相互作用。然而,这是可能的,Robo2 胞外域可在相邻足突细胞膜上通过 Slit-隔膜中的反式相互作用与体内 Nephrin 胞外域关联。

[0253] 我们发现 Robo2 纯合缺失和足细胞特异性敲除小鼠形成改变的足突趾状突图案,表型不同于 Nephrin 缺失小鼠的表型 (Hamano 等,2002 ;Done 等,2008) (Hamano et al., 2002 ;Done, 2008)。这并不奇怪,因为 Nephrin 和 Robo2 在调节足细胞 F-肌动蛋白细胞骨架中的作用相反。在 Nephrin 信号诱导局部肌动蛋白的聚合时,而 Slit-Robo2 信号作为肌动蛋白聚合的负调节剂,以维持足细胞足突的适应性和动态。值得注意的是,在小鼠中观察到类似的足突组织缺陷,这些小鼠缺少肌动蛋白解聚因子 Cofilin-1,足细胞中另一种

F-肌动蛋白细胞骨架负调节剂 (Garg 等, 2010) (Garg et al., 2010)。这表明, 肌动蛋白聚合促进因子如 Nephrin 信号或抑制因子如 Robo2 信号两个中任何一个的缺失都会影响足细胞的正常结构。因此, 足细胞中正和负 F-肌动蛋白细胞骨架调节剂间的平衡对维持正常足突结构是重要的。通过同时敲除正 (Nephrin) 和负 (Robo2) 信号获得这种平衡可以解释在 Robo2-Nephrin 双缺失小鼠中足细胞足突交错结合的恢复和更轻微的肾小球表型。在此描述的我们的研究证明 Nephrin 的双重作用, 一方面, 其作为 Slit2- 隔膜控制肾小球选择渗透性的主要组分 (Tryggvason 等, 2006) (Tryggvason et al., 2006), 另一方面, 通过其与肌动蛋白细胞骨架的相互作用作为足突形态调节器 (Jones 等, 2006; Verma 等, 2006) (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006)。虽然 Robo2 信号可以明显抵制 Nephrin 对足突的正信号影响, 但仍然要确定其是否也影响 slit- 隔膜的完整性。

[0254] 因此, 如在此所述, 我们已经确认 Robo2 作为一种肾脏中足细胞的细胞间结合的新组分。我们采用生物化学、泛函和基因技术已经证明 Robo2 和 Nephrin 间的相互作用, 并表明 Slit-Robo2 信号抑制 Nephrin 诱导的肌动蛋白动态。我们的结果表明 Robo2 信号作为 Nephrin 的负调节剂用以调节足细胞足突结构。该结果延伸了我们对 Slit-Robo 信号作用的理解, 并确定一种新型的串扰机制, 通过这种机制, 导向暗示受体 Robo 可能会影响 F-肌动蛋白细胞骨架的动态。

[0255] 除非在此另有定义, 使用的与本申请相关的科学术语和技术术语具有的含义是这些公开内容所述技术领域的本领域普通技术人员通常理解的含义。应当理解的是, 发明并不局限于在此描述的具体方法、方案和试剂等等, 并且这些可以变化。在此采用的术语的目的仅是为了描述具体实施方式, 而不是为了限制本发明的范围, 本发明的范围只由权利要求书限定。免疫学和分子生物学中普通术语的定义可在下列文献中找到: 默克研究实验室 2006 年出版的《默克诊疗手册 (第 18 版)》(ISBN0-911910-18-2) (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2)); Robert S. Porter 等 (编写)、布莱克韦尔科学有限公司 1994 年出版的《分子生物学百科全书》(ISBN 0-632-02182-9) (Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)); 和 Robert A. Meyers (编写)、VCH 出版公司 1995 年出版的《分子生物学与生物技术: 综合性案头参考》(ISBN1-56081-569-8) (Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)); 爱思唯尔 2006 年出版、Werner Luttmann 编著的《免疫学》(Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006)。分子生物学中普通术语的定义可在下列文献中找到: Benjamin Lewin, 琼斯 & 巴特利特出版社 2007 年出版的《基因 IX》(ISBN-13:9780763740634) (Benjamin Lewin, Genes IX, published by Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13:9780763740634)); Kendrew 等 (编写), 布莱克韦尔科学有限公司 1994 年出版的《分子生物学百科全书》(ISBN 0-632-02182-9) (Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN0-632-02182-9)); 和 Robert A. Meyers (编写), 马尼亚蒂斯等, 《分子克隆: 实验指南》, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约, 美国 (1982) (Robert

A. Meyers (ed.), Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1982)); Sambrook 等, 《分子克隆: 实验指南 (2 版)》, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约, 美国 (1989) (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1989)); Davis 等, 《分子生物学的基本方法》, 爱思唯尔科学出版公司, 纽约, 美国 (1986) (Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986)); 或《酶学方法: 分子克隆技术指南》第 152 卷, S. L. Berger 和 A. R. Kimmerl 编写, 学术出版公司, 圣地亚哥, 美国 (1987) (*Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152*, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)); 《现代分子生物学实验技术 (CPMB)》(佛 Fred M. Ausubel 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司) (*Current Protocols in Molecular Biology (CPMB)* (Fred M. Ausubel, et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)), 《现代蛋白科学实验技术 (CPPS)》(John E. Coligan 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司) (*Current Protocols in Protein Science (CPPS)* (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.)), 和《现代免疫学实验技术 (CPI)》((John E. Coligan 等主编, John Wiley 和 Sons 出版公司) (*Current Protocols in Immunology (CPI)* (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.)), 在此通过整体引用将其全部并入本文。

[0256] 在此使用的术语“包含 (comprising)”是指除了存在的定义的组分外, 也可存在的其它组分。使用“包括”表明包含而不限于。

[0257] 在此使用的术语“基本包含……”是指给定具体实施方式所需要的那些组分。该术语允许附加元素存在, 这些附加组分对本发明具体实施方式的基本的和新的或功能性的特征不会产生实质性影响。

[0258] 在此使用的术语“由……组成 (consisting of)”是指在此描述的组合物、方法及其各自组分, 其中不包括未记载在说明书具体实施方式中的任何组分。

[0259] 另外, 除非上下文另有要求, 单数术语可包括复数, 复数术语可包括单数。如在说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”, 除非上下文明确规定, 否则均包括复数形式。因此, 例如, “该方法”是包括一种或多种方法, 和 / 或在此所述的该类型的多个步骤和 / 或在阅读公开内容等后对本领域技术人员是显而易见的方法。

[0260] 除了操作实施例中的或某处另有说明外, 在此使用的表达材料成分的量或使用的反应条件的所有数字, 在任何情况下应当理解为被术语“约”修饰。当术语“约”与百分比结合使用时, 术语“约”可以指 $\pm 1\%$ 。

[0261] 应当理解的是, 本发明并不局限于本发明描述的具体方法、方案和试剂等等, 并因此可以变化。在此采用的术语仅是为了描述具体实施方式, 不是为了限制本发明的范围, 本发明的范围只由权利要求书限定。

[0262] 出于描述和公开的目的, 在此通过引用明确并入了所有专利和经鉴定的其它出版物, 例如, 这些出版物中描述的方法可以与本发明结合使用。这些出版物被单独提供, 因为它们在本申请的申请日之前公开。在这方面, 没有什么可解释为对发明人无权凭借在先发明或任何其它原因而先于这些公开的承认。关于日期的所有声明或关于这些文件内容的陈

述是基于申请人可获得的信息,不构成关于日期和这些文件内容正确性的任何承认。

[0263] 在此所述不同方面的具体实施方式可由以下编号的段落说明:

2. 一种治疗有需要受治疗者慢性肾脏疾病的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患慢性肾脏疾病风险的受治疗者。

3. 一种降低有需要受治疗者蛋白尿的方法,该方法包括将治疗有效量的含有 ROBO2 抑制剂的组合物给予患有或具有患蛋白尿风险的受治疗者。

4. 根据段 1 或 2 任一项的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 反义分子,特异性于 ROBO2 小干扰 RNA (siRNA), ROBO2 的小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

5. 根据段 1-3 任一项的方法,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

6. 根据段 1-4 任一项的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

7. 根据段 3 的方法,其中 ROBO2 抑制性多肽是 ROBO2 显性失活融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

8. 根据段 1-6 任一项的方法,其中,患有或具有患慢性肾脏疾病的受治疗者患有糖尿病肾病和高血压。

9. 根据段 1-7 任一项的方法,该方法进一步包括将额外的治疗剂给予受治疗者。

10. 根据段 8 的方法,其中,所述额外的治疗剂为血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)。

11. 一种方法,包括:

a. 分析受治疗者的生物测试样本以确定 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平;

b. 确定生物测试样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否高于参考阈值水平 (reference threshold level);以及

c. 对需要处理或治疗的慢性肾脏疾病的受治疗者进行诊断。

12. 根据段 10 的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平的分析采用 ROBO2 多肽抗体或其抗原结合段进行。

13. 根据段 10 的方法,其中,编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平的分析采用 PCR 或杂交分析进行。

14. 根据段 10-12 任一项的方法,其中,生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或尿样颗粒化细胞。

15. 根据段 10-13 任一项的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

16. 根据段 10-13 任一项的方法,其中,ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高两个标准差。

17. 一种分析方法,包括:

a. 将从受治疗者分离的生物测试样本与检测 ROBO2 多肽或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的试剂接触;以及

b. 测量 ROBO2 多肽的水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平；

其中，相对于正常生物样本，所述 ROBO2 多肽或所述编码 ROBO2 多肽的 RNA 的水平增强的，鉴定受治疗者患有慢性肾脏疾病和 / 或处于慢性肾脏疾病或蛋白尿的进程中。

18. 根据段 16 的分析方法，其中，检测 ROBO2 多肽的表达水平采用特异性于 ROBO2 多肽的抗体或其抗原结合段进行。

19. 根据段 16 的分析方法，其中检测编码为 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平采用 PCR 或杂交分析进行。

20. 根据段 16-18 任一项的分析方法，其中，生物测试样本为肾脏活组织切片、尿、血液、血清样本或来自于尿样颗粒化细胞。

21. 根据段 16-19 任一项的分析方法，其中，ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少比参考阈值水平高 20%。

22. 根据段 16-19 任一项的分析方法，其中，ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平至少高于考阈值水平的两个标准差。

23. 根据段 16-21 任一项的分析方法，其中，受治疗者被诊断为患有糖尿病或高血压。

24. 一种确定受治疗者是否具有患上慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统，该系统包括：

a. 确定模块，其配置用以确定受治疗者生物样本中 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平；

b. 比较模块，其配置用以接收通过确定模块确定的所述 ROBO2 多肽的表达水平或编码 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平，并进行至少一次分析以确 ROBO2 多肽的表达水平或编码为 ROBO2 多肽的 RNA 的表达水平是否大于预先确定的参考水平，进而提供重新取回内容；以及

c. 显示模块，其用于显示基于来自所述比较模块输出数据的内容，其中，该内容包括 ROBO2 多肽或 RNA 的表达水平或比率大于预先确定的参考水平或比率的指示性信号，或 ROBO2 的水平或表达比率不大于参考水平或预先确定的比率的指示性信号。

25. 根据段 23 的系统，其中，显示在显示模块上的内容进一步包括推荐受治疗者接收的具体的治疗方案的指示性信号。

26. 一种确定受治疗者是否具有患上慢性肾脏疾病或蛋白尿的风险，或确定受治疗者是否患有慢性肾脏疾病的系统，该系统包括：

a. 确定模块，其配置用以接收来自受治疗者的至少一个测试样本，并对至少一个测试样本进行至少一次分析以确定以下情况中的一种情况的存在或不存在：

i. ROBO2 的表达比率大于预先确定比率，或

ii. ROBO2 的表达水平高于预先确定水平；

b. 存储设备，其设置用以储存所述确定模块输出的数据；以及

c. 显示模块，用于显示基于来自所述确定模块输出数据的内容，其中，该内容包括 ROBO2 的表达比率大于预先确定比率或 ROBO2 的水平大于预先确定水平的指示信号，或 ROBO2 的表达比率不大于预先确定比率或不大于预先确定水平的指示性信号。

27. 根据段 25 的系统，其中，显示在显示模块上的内容进一步包括推荐受治疗者接收的具体的治疗方案的指示性信号。

28. 一种治疗具有患上慢性肾脏疾病或蛋白尿风险的人类受治疗者的方法，该方法包

括给予处理或治疗以预防人类受治疗者慢性肾脏疾病或蛋白尿的发生,这些人类受治疗者被确定为 ROBO2 蛋白水平高于参考阈值水平。

29. 根据段 27 的方法,其中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高 20%。

30. 根据段 27 的方法,其中,ROBO2 蛋白的水平至少比参考水平高两个标准差。

31. 根据段 27-29 任一项的方法,其中,用于预防慢性肾脏疾病或蛋白尿发生的处理或治疗包括 ROBO2 抑制剂。

32. 根据段 30 的方法,其中 ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,特异性于 ROBO2 的反义分子,特异性于 ROBO2 的小干扰 RNA (siRNA), ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

33. 根据段 30-31 任一项的方法,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或两者的结合。

34. 根据段 30-32 任一项的方法,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 Ig1SLIT 结合域,Ig1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

35. 根据段 31 的方法,其中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

36. ROBO2 抑制剂在治疗慢性肾脏疾病中的应用。

37. ROBO2 抑制剂在治疗蛋白尿中的应用。

38. 根据段 35 或 36 任一项的应用,其中,ROBO2 抑制剂是特异性于 ROBO2 的封闭抗体或其抗原结合段,ROBO2 的反义分子,ROBO2 的小干扰 RNA (siRNA), ROBO2 小分子抑制剂,ROBO2 抑制性多肽,或 ROBO2 结构类似物。

39. 根据段 35-37 任一项的应用,其中,ROBO2 抑制剂封闭或降低 ROBO2 与 SLIT、Nck、或这两者的结合。

40. 根据段 35-38 任一项的应用,其中,ROBO2 抑制剂是特异性的 Ig1SLIT 结合域,Ig 1 和 Ig2SLIT 结合域,Nck 胞内结合域,或上述任意组合。

41. 根据段 37 的应用,其中,ROBO2 抑制性多肽是显性失活 ROBO2 融合蛋白,含有 ROBO2 胞外域不含胞内域的多肽,或含有 ROBO2 胞内域不含胞外域的多肽。

42. 根据段 35-40 任一项的应用,其中,慢性肾脏疾病和蛋白尿由糖尿病肾病或高血压引起。

[0264] 本发明由以下实施例进一步说明,这些实施例不应该解释对本发明的限制。

实施例

组织的原位杂交,免疫组织化学和免疫胶体金电镜

[0265] 如前所述,用地高辛标记的 Robo2 核糖核酸探针 (riboprobes) 完成原位杂交分析 (Grieshammer 等,2004) (Grieshammer et al., 2004)。免疫组织化学法在固定在 4% 多聚甲醛的小鼠胚胎肾组织上和固定在甲醇中的成年小鼠肾组织中进行的。为了进行免疫胶体金电镜,野生型小鼠肾脏被解剖并固定于多聚甲醛-赖氨酸-高碘酸盐 (PLP) 中。制备小鼠肾脏超薄切片,并用山羊抗-Robo2 抗体 (DAKO 公司) 并结合 10nm 胶体金的第二抗体进行培养 (Ted Pella)。

酵母的双杂交,共沉淀和肌动蛋白聚合分析

[0266] 根据制造商的说明书,用 DUPLEX-A™ 酵母双杂交系统 (OriGene Tech) 来表征

Robo2 和 Nck1 的相互作用。细胞的培养, His- 标记蛋白的共沉淀, 以及免疫共沉淀是依据前述报道进行 (Fan 等, 2003) (Fan et al., 2003)。利用新生肾脏进行内源性免疫沉淀反应。CD16 抗体介导 CD16/7 融合蛋白的交联与肌动蛋白聚合分析根据前述进行的 (Jones 等, 2006 ;Rivera 等, 2004 ;Verma 等 2006) (Jones et al., 2006 ;Rivera et al., 2004 ;Verma et al., 2006)。

缺失小鼠研究, 透射电镜和扫描电镜以及肾脏肾小球分析

[0267] 小鼠方案获得在波士顿大学医学中心 (#14388) 的实验动物管理委员会 (IACUC) 的批准。Robo2^{fl^{ox}} 条件等位基因、Robo2^{de15} (在本文中也可交换地称为 Robo2⁻) 生殖细胞系突变等位基因和 Robo2⁺ 野生型等位基因的产生和基因分型在前面已经描述 (Lu 等, 2007 ; Wang 等, 2011) (Lu et al., 2007 ;Wang et al., 2011)。为了产生 Robo2-Nephrin 双敲除小鼠, 以前使用 Robo2^{+/-} 小鼠与 Nphs1^{+/-} 小鼠杂交 (Hamano 等, 2002) (Hamano et al., 2002)。为了进行透射电镜分析, 肾脏被固定并在含有 2% 戊二醛的 0.15M 二甲砷酸钠中培养, 乙醇梯度脱水, 嵌入环氧树脂 (Epon) 中, 切片, 并用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色。用 JEM-1011 电镜检测超薄肾脏切片。为了进行扫描电镜分析, 用下述标准方案准备肾脏。为了进行肾脏病理研究, 肾脏固定在 4% 多聚甲醛中, 嵌入石蜡中, 切片, 并用标准的希夫氏高碘酸 (PAS) 或苏木精伊红 (H&E) 方法染色。为了量化足细胞数量, WT1 被用作足细胞的核标记物, 根据标准方法对肾切片进行免疫过氧化物酶染色。对每个肾小球截面中的 WT1 阳性足细胞核进行计数。为了分析蛋白尿, 采用鼠科动物尿蛋白 ELISA 定量试剂盒 (Exocell) 根据制造商的指导对从 6 周龄小鼠取得的“现货的”尿液样本进行检查, 并用尿液试纸 (Multistix, 拜耳, IN) 作为筛选方法。

组织的原位杂交和免疫组织化学法

[0268] 如前所述, 用地高辛标记的 Robo2 核糖核酸探针完成原位杂交分析 (Grieshammer 等, 2004) (Grieshammer et al., 2004)。Robo2cDNA 用 NotI 线性化, 并使用 DIG DNA 标记和检测试剂盒 (罗氏应用科学部) (Roche Applied Science) 生成探针。杂交在由 4% 多聚甲醛固定的 OCT 嵌入的小鼠胚胎肾脏冰冻切片上进行。免疫组织化学法在经过 4% 多聚甲醛固定后用 30% 蔗糖抗冻剂处理的小鼠胚胎肾脏组织, 以及在甲醇中固定的成年小鼠肾脏组织上进行 (Mugford 等, 2008) (Mugford et al., 2008)。OCT 化合物嵌入的小鼠肾脏被冻结, 并在低温恒温器切成 8-10 微米切片。切片用第一抗体和随后用适当的 FITC 或 Cy3 共轭第二抗体染色。用于该研究的第一抗体包括抗 Robo2 抗体 (研发体系, Abnova, 圣克鲁兹生物技术公司) (R&D System, Abnova, Santa Cruz Biotechnology), Nephrin (定制合成) (Topham 等, 1999) (Topham et al., 1999), Nck (北部 / 密理博) (Upstate/Millipore), podocin (西格玛) (Sigma), nidogen (圣克鲁兹生物技术公司) (Santa Cruz Biotechnology), Pecam1 (BD 生物科学) (BD Biosciences), WT1 (圣克鲁兹生物技术公司), SLIT2 (圣克鲁兹生物技术公司), PDGFR beta (细胞信号) (Cell Signaling), 突触极蛋白 (圣克鲁兹生物技术公司)。用 Perkin Elmer 公司 UltraView LCI 多点旋转光盘激光扫描共聚焦显微镜和具有 60 倍油浸物镜的 Zeiss LSM 510 共聚焦激光扫描显微镜获得图像。

免疫胶体金电镜

[0269] 切开野生型小鼠肾脏, 并固定在多聚甲醛-赖氨酸-高碘酸盐 (PLP) 中 4°C 条件下过夜。该组织在 1x PBS 中洗涤, 梯度乙醇脱水并嵌入 LR 白树脂中 (电子显微镜科学)。准备

小鼠肾脏超薄切片并转移至聚醋酸甲基丙烯酸酯包的金格中,在 1x PBS 中用 1%牛血清白蛋白和 5%正常山羊血清封闭。然后将切片用山羊抗 Robo2 抗体 1:50 稀释液在 DAKO(DAKO 公司)4℃条件下过夜培养。未免疫的血清用作对照。用 1x PBS 清洗 3 次后,切片用连接有 10nm 胶体金 (Ted Pella) 的 IgG 第二抗体在室温下培养 2 小时。最后,将切片用 1%戊二醛后固定,与乙酸铀酰对比。用 JEM-1011 透射电镜 (JEOL, 东京, 日本) 在 80kV 下检查切片,用 AMT 数字成像系统 (先进显微镜技术, 丹弗斯, 马萨诸塞州) (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA.) 获得图像,并输入 Adobe Photoshop。与用未免疫血清染色的对照显微图相比,用金色颗粒染色的 Robo2 在肾小球中的亚细胞定位显示在数字电子显微图中。

酵母的双杂交分析

[0270] 用 DUPLEX-A™ 酵母双杂交系统 (OriGene Tech, 罗克维尔市, 马里兰州) 表征 Robo2 和 Nck1 的相互作用。编码人类 Robo2 胞内域的 cDNA 及其截短形式被克隆至 EcoRI/XhoI 位点的 pJG4-5 载体中,将它们融合到 B42 的转录激活域。人类 Nck1 的 cDNA 及其截短形式被克隆至 EcoRI/XhoI 的 pEG202 载体,以将它们融合到 LexA 蛋白的 DNA 结合域中。构建体 pSH18-34 的 lacZ 基因和 EGY48 菌株酵母基因组中的 LEU2 基因被用作报告基因。pEG202、pSH18-34 和 pJG4-5 构建体被共转化至酵母 EGY48 细胞中。如果酵母细胞在 X-gal 存在下变成蓝色并在缺乏亮氨酸时生长,该相互作用被认为是阳性的。

细胞培养, DNA 构建体, 转染, 共沉淀以及分子印迹分析

[0271] 使用磷酸钙转染 HEK (239T) 细胞为 60%汇合 (confluency) 转染。为了得到 C-端 his- 和 myc- 标记的融合蛋白,全长的人类 Nephrin 和 Robo2 被分别克隆到 HindIII/ECORI 和 EcoRI/XhoI 限制性位点的 pSecTag 载体 (英杰公司) (Invitrogen)。根据制造商的说明,使用 QuikChange 位点定向诱变试剂盒 (Stratagene) 删除 Nck 结合域 (图 2C) 从而获得 Robo2-ΔNBD。非标记的 Robo2 和 Nck1 被克隆到 EcoRI/XhoI 位点的 PCS2 载体 (Addgene), HindIII/EcoRI 位点的 Nephrin。先前已经报道人类 Fyn- 和 myc- 标记的 Slit2 构建体 (Li 等, 2008; Wong 等, 2001) (Li et al., 2008; Wong et al., 2001)。先前也已有报道 CD16/7-NCD 和 CD16/7-HA 构建体 (Verma 等, 2006) (Verma et al., 2006)。为了检测 Robo2 和 Nck1 的相互作用,将 C-端 His- 和 myc- 标记的人 Robo2 或 Robo2-ΔNBD 在 HEK 细胞表达。转染后 48 小时,将细胞裂解在裂解缓冲液中 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 咪唑, 0.5% TX100, 1x 蛋白酶抑制剂 [pH8.0])。细胞裂解物在 4℃下离心 10 分钟;上清液用 Ni-NTA 树脂 (Qiagen) 在 4℃下培养 2 小时以沉淀 His-Robo2,用无 Ni 的 NTA 树脂作对照。用洗涤缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 咪唑, 0.5% TX100 [pH8.0]) 洗涤该树脂三次,并加热至 95℃保持 10 分钟。将沉淀物溶解在 SDS-PAGE 凝胶上,并用 1:1000 稀释的兔抗 myc、兔单克隆抗 Nck1 (Cell Signaling 公司) 的抗体印迹。为了检查 Robo2, Nck1 和 Nephrin 三者的相互作用,将 his-myc-Robo2 或 His-myc-Robo2-ΔNBD 与人类 Nephrin 和人类 Fyn 共表达于 HEK 细胞。如上所述,用 Ni-NTA 微珠沉淀 His-myc-Robo2。为了确认该三者相互作用,His-myc-Nephrin 与 Robo2 和 Fyn 在 HEK 细胞中共表达,His-myc-Nephrin 被 Ni-NTA 微珠拉出。沉淀物用 1:1000 稀释的兔多克隆抗 -myc、兔单克隆抗 -Nck1,兔多克隆抗 -Nephrin,小鼠单克隆抗 -Robo2 (R&D Systems 公司) 和兔多克隆抗 -Fyn (圣克鲁兹生物技术公司) (Santa Cruz Biotechnology) 抗体进行印迹。对于内源性蛋白质的免疫共沉淀,

新生小鼠肾脏均质在冰上的RIPA缓冲液中(50mM的Tris[pH 7.4],150mM NaCl,0.1% SDS,1% NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,1mM Na_3VO_4 ,1mM NaF,1x蛋白酶抑制剂)。将样本在4℃下离心10分钟,并将上清液与1μg小鼠单克隆抗-Robo2抗体(R&D Systems公司)在4℃下培养1小时。空白山羊IgG(圣克鲁兹生物技术公司)(Santa Cruz Biotechnology)作为对照。然后将样本与30μl蛋白A/G Plus琼脂糖微珠浆液(圣克鲁兹生物技术公司)(Santa Cruz Biotechnology)混合,并进一步在4℃下培养12小时。然后将微珠在RIPA缓冲液中洗涤三次,通过加热至95℃保持10分钟,将蛋白质洗脱在1x蛋白载样缓冲液中。将沉淀物溶解在SDS-PAGE凝胶上,如上所述,并用小鼠抗-Robo2,兔抗-Nephrin和兔抗-Nck1抗体进行印迹。肌动蛋白用Sigma的抗-β-肌动蛋白小鼠抗体进行印迹。条带的强度使用ImageJ进行测量。为了蛋白尿的检测,收集小鼠现尿,并以1:100的稀释比例用1x蛋白载样缓冲液稀释。然后,将尿蛋白溶解在SDS-PAGE凝胶上,纯化白蛋白用作对照(MP Biomedicals公司)。凝胶用兔抗白蛋白多克隆抗体(MP Biomedicals公司)进行印迹。

CD16/7-NCD 交联和肌动蛋白聚合分析

[0272] 先前已经描述过CD16抗体介导的CD16/7融合蛋白的交联(Jones等,2006;Rivera等,2004;Verma等2006)(Jones et al.,2006;Rivera et al.,2004;Verma et al.,2006)。简单地说,CD16/7-NCD或CD16/7-HA与Robo2在HEK细胞中共表达。24小时后,将细胞转移并接种在涂有聚赖氨酸的玻璃盖玻片上过24小时。然后将细胞用1μg/ml的小鼠单克隆抗-CD16(Beckman Coulter公司)在37℃下培养30分钟,用DMEM洗涤一次,在稀释在Slit2条件培养液(Wong等,2001)或空白条件培养液中与罗丹明共轭的第二抗体(Thermo Scientific)培养30分钟,并用4%多聚甲醛的1xPBS固定。根据制造商的说明,用FITCF-偶联的鬼笔环肽(Invitrogen)染色肌动蛋白。新形成的F-肌动蛋白束粘在成簇的Nephrin(CD16/7-NCD)上,在荧光显微镜下看起来像彗星尾巴(即正文中的肌动蛋白尾巴)。在这个实验中,我们只分析了通过CD16/7-NCD簇而形成的并附着在该簇的F-肌动蛋白束。计数具有F-肌动蛋白尾巴的细胞,并与总CD16/7-NCD转染细胞进行比较。量化公式为:百分比(%)=(具有F-肌动蛋白尾巴的转染细胞数量/总转染细胞数)×100。采用具有60倍油浸物镜的LSM510共聚焦显微镜获得图像。

Robo2足细胞特异性敲除小鼠以及Robo2-Nephrin双敲除小鼠的产生和表征

[0273] 先前已经描述过Robo2^{flox}条件等位基因,Robo2^{del15}(在本文中也可互换地称为Robo2⁻)生殖细胞系的突变等位基因和Robo2⁺野生型等位基因的产生和基因分型(Lu等,2007;Wang等,2011)(Lu et al.,2007;Wang et al.,2011)。根据标准育种方案产生Robo2足细胞特异性Robo2^{del15/FLOX};Tg^{Nphs2-Cre/+}敲除小鼠,其携带一个Robo2^{del15}等位基因和一个Robo2^{flox}等位基因。在这种化合物突变体中,由podocin启动子驱动的足细胞特异性Cre重组酶仅删除Robo2^{flox}等位基因,以促进表型的外显,因为其它等位基因,Robo2^{del15},已从生殖细胞系的表达中全部删除。Robo2^{del15/FLOX};Tg^{Nphs2-Cre/+}小鼠的真实性通过存在Robo2^{del15}和Robo2^{flox}等位基因以及Tg^{Nphs2-Cre}转基因的尾部DNA的基因分型确定。以不具有Robo2^{del15}等位基因和Tg^{Nphs2-Cre}转基因的F2同窝出生Robo2^{flox/+}小鼠作为对照。为了得到Robo2-nephrin的双敲除小鼠,将先前已经产生Robo2^{+/-}杂合小鼠与Nphs1^{+/-}的杂合小鼠杂交(Hamano等,2002)(Hamano et al.,2002)。在Robo2^{+/-};Nphs1^{+/-}双杂合小鼠产生后,进行双杂合小鼠的杂交以产生Robo2^{-/-};Nphs1^{-/-}双纯合小鼠以及Nphs1^{-/-}单纯合,Robo2^{-/-}单

纯合,和 Robo2^{+/+};Nphs1^{+/+} 野生型对照。小鼠方案获得在波士顿大学医学中心 (#14388) 的实验动物管理委员会 (IACUC) 的批准。

[0274] 透射电镜和扫描电镜

[0275] 为了进行透射电镜分析,切开 Robo2 纯合缺失小鼠和足细胞特异性敲除小鼠的肾脏,固定在多聚甲醛-赖氨酸-高碘酸盐 (PLP) 中在 4°C 条件下过夜,并在含有 2% 戊二醛的 0.15M 二甲砷酸钠中培养 6 小时。在 1x PBS 中洗涤后,对固定的肾脏用梯度乙醇进行脱水,嵌入 Epon 中,切片,并用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色。制备得到超薄肾脏切片,并用 JEM-1011 电镜检查。野生型同窝出生小鼠用作对照。为了进行扫描电镜分析,根据以前 (Friedman 和 Ellisman, 1981) (Friedman and Ellisman, 1981) 描述的方法稍作修改后的方法,从 Robo2 纯合缺失小鼠,足细胞特异性敲除小鼠, Nephin 纯合缺失小鼠和 Robo2-Nephin 双纯合小鼠制备肾脏样本。简单的说,肾脏用 2.5% 的戊二醛和 2% 多聚甲醛溶液在 0.1M 二甲砷酸盐缓冲液 (Karnovsky 固定剂,电子显微镜科学) (Karnovsky's fixative, Electron Microscopy Sciences) 中灌注,随后用 Karnovsky 固定剂固定 24 小时,然后在 2% 四氧化钬溶液中进行后固定 (电子显微镜科学)。使用六甲基二硅氮烷对肾脏样本低温破碎、脱水和干燥 (电子显微镜科学)。使用 Amray 1000A 和 Jeol 6340F 扫描电镜对肾脏样本成像。检查从每个动物取得的三个肾小球以提供有代表性的图像。

小鼠肾脏的病理学研究,足细胞数量的定量,以及蛋白尿分析

[0276] 为了进行肾脏的病理学研究,将肾脏切开,并固定在 4% 多聚甲醛中过夜,然后用梯度乙醇处理后用嵌入石蜡。使用 MT-920 切片机 (MICROM) 将肾蜡块切成 4 μm 切片,并使用标准的希夫氏高碘酸 (PAS) 或伊红苏木精 (H&E) 的方法进行染色。使用配备 SPOT 数码相机系统的 Olympus BHT 光学显微镜检查和评估肾小球基质沉积,节段性肾小球硬化,以及肾小囊腔的扩张。为了定量足细胞的数量,WT1 被用作足细胞的核标记物,按照以前的方法 (Sanden 等, 2003) (Sanden et al., 2003) 对肾脏切片进行免疫过氧化物酶染色。简单来讲,将从 4 个 1 岁龄的 Robo2^{de15/FLOX};Tg^{Nphs2-Cre⁺} 足细胞特异性敲除小鼠和 4 个年龄匹配的野生型对照小鼠取得的嵌入石蜡的肾脏切成 4 μm 切片,并在微波抗原修复后用 WT1 抗体 (圣克鲁兹生物技术公司) (Santa Cruz Biotechnology) 染色。用生物素化的第二抗体和 Vectastain ABC 试剂盒 (载体实验室) (Vector Laboratories) 检测 WT1 信号。对来自于 4 个突变小鼠的共 165 个肾小球和 4 个对照组小鼠的 166 个肾小球中每个肾小球横截面的 WT1 阳性足细胞细胞核计数。为了进行蛋白尿分析,根据制造商的说明,使用灵敏的鼠蛋白尿 ELISA 定量试剂盒 (Exocell) 检查 6 周龄小鼠的“现货”尿标本,以尿液试纸 (MULTISTIX, 来自拜耳, IN) (Multistix from Bayer, IN) 作为筛查方法。尿白蛋白用肌酐酞标准化,以提供白蛋白 / 肌酐酞比值。根据制造商的说明,使用肌酐酞检测试剂盒 (Sigma 公司) 确定尿液中的肌酐酞。也采用 12% SDS-PAGE 检查尿白蛋白,并用抗白蛋白抗体印迹尿白蛋白 (MP 生物医学)。突变体和对照组的数据采用单因素 ANOVA、Student 氏 t- 检验和卡方检验进行分析。

表 1 在 2-9 月龄 Robo2 足细胞特异性敲除小鼠 (突变体) 中具有增加的基质扩张的肾小球的定量分析与对照组 (野生型) 对比

基因型	小鼠 编号#	年龄(月)	肾小球总 数	具有系膜基质 扩张的肾小球	具有系膜基质扩 张的肾小球的%*
突变体	4048	2	96	13	12.35%
突变体	1721	3	107	18	16.82%
突变体	4005	6	103	17	16.51%
突变体	1190	7	102	20	19.61%
突变体	2396	9	80	14	17.50%
总突变体			488	82	16.80%
野生型	4058	2	90	4	4.44%
野生型	4052	3	105	6	5.71%
野生型	3919	6	107	4	3.74%
野生型	1191	7	103	5	4.85%
野生型	2385	9	106	5	4.72%
总野生型			511	24	4.70%

* $p < 0.01$, $n = 5$, t-检验。

表 2 在 12 月龄 Robo2 足细胞特异性敲除小鼠（突变体）中具有增加的基质扩张的肾小球的定量分析与对照组（野生型）对比

基因型	小鼠 编号#	年龄 (月)	肾小球总 数	具有系膜基质 扩张的肾小球	具有系膜基质扩张的 肾小球的%*
突变体	1844	12	136	17	12.50%
突变体	1847	12	125	18	14.40%
突变体	1877	12	127	11	8.66%
突变体	1878	12	132	20	15.15%
突变体	1948	12	142	28	19.72%

总突变体			662	94	14.20%
野生型	1901	12	125	5	4.00%
野生型	2429	12	179	8	4.47%
野生型	2834	12	154	9	5.84%
野生型	2836	12	159	7	4.40%
野生型	2837	12	124	5	4.03%
总野生型			741	34	4.59%

* $p < 0.01$, $n = 5$, t-检验。

表 3 通过组织学对中 $Nphs1^{-/-}$ 单纯合 ($Robo2^{+/-}; Nphs1^{-/-}$) 小鼠中具有扩张的肾小囊腔的肾小球进行形态分析与 $Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$ 双纯合新生小鼠对比

基因型	肾小球总数	具有肾小囊腔扩张的肾小球	具有肾小囊腔扩张的肾小球的%
$Robo2^{+/-}; Nphs1^{-/-}$	122	31	25.4%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$	55	2	3.6%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{+/-}$	158	3	1.9%
$Robo2^{+/+}; Nphs1^{+/+}$	271	1	0.4%

注:如果观察到肾小球显示与图 S4U 显示相似的表现型,则具有扩张的肾小囊腔的肾小球被记录为阳性,如果观察到如图 8V-8X 显示相似的肾小球则记录为阴性。分析各基因型的三只小鼠。 $Robo2^{-/-}$ 单纯合 ($Robo2^{-/-}; Nphs1^{+/-}$) 和野生型 ($Robo2^{+/+}; Nphs1^{+/+}$) 用作对照。

表 4 用扫描电镜对 $Nphs1^{-/-}$ 单纯合 ($Robo2^{+/-}; Nphs1^{-/-}$) 小鼠的肾小球足细胞趾状突足突 (FP) 表现型进行形态分析与 $Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$ 双纯合新生小鼠对比

基因型	肾小球总数	具有趾状突 FP 结构的肾小球	具有趾状突 FP 结构的肾小球的%
$Robo2^{+/-}; Nphs1^{-/-}$	15	1	6.67%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{-/-}$	16	12	75%
$Robo2^{-/-}; Nphs1^{+/-}$	13	13	100%
$Robo2^{+/+}; Nphs1^{+/+}$	13	13	100%

参考文献

Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., 和 Goodman, C. S. (2000), 排斥轴突导

向:Abelson 和 Enabled 对下游的迂回受体发挥相反的作用。《细胞》第 101 期,第 703-715 页。

(Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C. S. (2000). Repulsive axon guidance:Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.)

Dickson, B. J., 和 Gilestro, G. F. (2006)。通过 slit 及其 Robo 受体对连合轴突寻路的调节。《细胞发育生物学年度回顾》,第 22 期,第 651-675 页。

(Dickson, B. J., and Gilestro, G. F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 651-675.)

Done, S. C., Takemoto, M., He, L., Sun, Y., Hultenby, K., Betsholtz, C., 和 Tryggvason, K. (2008)。Nephrin 参与足细胞成熟,但在肾小球发育过程中不能存活。《美国国际肾脏疾病杂志》,第 73 期,第 697-704 页。

(Done, S. C., Takemoto, M., He, L., Sun, Y., Hultenby, K., Betsholtz, C., and Tryggvason, K. (2008). Nephrin is involved in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int* 73, 697-704.)

Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H., 和 Bashaw, G. J. (2003)。Slit 刺激将 Dock 和 Pak 引入交叉受体,并增加 Rac 的活性以调节中枢神经系统中线的轴突排斥。《神经元》,第 40 期,第 113-127 页。

(Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H., and Bashaw, G. J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40, 113-127.)

Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., 和 Mundel, P. (2007)。肌动蛋白:通过肌动蛋白细胞骨架的组件调节足细胞结构和功能。《趋势细胞生物学杂志》,第 17 期,第 428-437 页。

(Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., and Mundel, P. (2007). Actin up:regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 17, 428-437.)

Furness, P. N., Hall, L. L., Shaw, J. A., 和 Pringle, J. H. (1999)。Nephrin 的肾小球表达在获得性人类肾病综合征中降低。《透析肾移植杂志》,第 14 期,第 1234-1237 页。

(Furness, P. N., Hall, L. L., Shaw, J. A., and Pringle, J. H. (1999). Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 14, 1234-1237.)

Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., 和 Holzman, L. B. (2010)。肌动蛋白解聚因子丝切蛋白 -1 在维持成熟足细胞结构是必要的。《生物化学杂志》,第 285 期,第 22676-22688 页。

(Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., and Holzman, L. B. (2010). Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem* 285, 22676-22688.)

Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., 和 Martin, G. R. (2004). SLIT2 介导的 Robo2 信号限制肾脏对单一位点的感应。《发育细胞》, 第 6 期, 第 709-717 页。

(Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G. R. (2004). SLIT2-mediated Robo2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6, 709-717.)

Guan, K. L., 和 Rao, Y. (2003)。介导神经元的信号机制对导向因子的反应。《自然 - 神经性评论》, 第 4 期, 第 941-956 页。

(Guan, K. L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.)

Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H., 和 Kalluri, R. (2002)。肾脏肾小球中血管通透性的决定因素。《生物化学杂志》, 第 277 期, 第 31154-31162 页。

(Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2002). Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 277, 31154-31162.)

Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano, T., 等, (2006)。Nck 衔接蛋白连接 Nephrin 至肾脏足细胞的肌动蛋白细胞骨架。《自然杂志》, 第 440 期, 第 818-823 页。

(Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano, T., et al. (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818-823.)

Lu, W., van Eerde, A. M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H. L., Kim, H., Fan, Y., Xi, Q., Li, Q. G., 等, 2007。Robo2 的破坏与泌尿道异常有关, 并具有膀胱输尿管反流的危险。《美国人类遗传学杂志》, 第 80 期, 第 616-632 页。

(Lu, W., van Eerde, A. M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H. L., Kim, H., Fan, Y., Xi, Q., Li, Q. G., et al. (2007). Disruption of Robo2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. *Am J Hum Genet* 80, 616-632.)

Nachman, P. H., Jennette, J. C., 和 Falk, R. J. (2008)。原发性肾小球疾病。《Brenner & Rector: 肾脏疾病学》, B. M. Brenner 编, (费城, Saunders), 第 987-1066 页。

(Nachman, P. H., Jennette, J. C., and Falk, R. J. (2008). Primary glomerular disease. In Brenner & Rector's *The Kidney*, B. M. Brenner, ed. (Philadelphia, Saunders), pp. 987-1066.)

Patrakka, J., Ruotsalainen, V., Reponen, P., Qvist, E., Laine, J., Holmberg, C., Tryggvason, K., 和 Jalanko, H. (2002)。受治疗者肾移植中肾病综合征与芬兰型先天性肾病综合征的复发: Nephrin 的作用。《移植杂志》, 第 73 期, 第 394-403 页。

(Patrakka, J., Ruotsalainen, V., Reponen, P., Qvist, E., Laine, J., Holmberg, C., Tryggvason, K., and Jalanko, H. (2002). Recurrence of nephrotic syndrome in kidney

grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type:role of nephrin. *Transplantation* 73, 394-403.)

Piper, M. , Anderson, R. , Dwivedy, A. , Weinl, C. , van Horck, F. , Leung, K. M. , Cogill, E. , 和 Holt, C. (2006)。以 Slit2 诱发的爪蟾视网膜生长视锥细胞的崩塌为基础的信号机制。《神经元》, 第 49 期, 第 215-228 页。

(Piper, M. , Anderson, R. , Dwivedy, A. , Weinl, C. , van Horck, F. , Leung, K. M. , Cogill, E. , and Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49, 215-228.)

Piper, M. , Georgas, K. , Yamada, T. , 和 Little, M. (2000)。脊椎动物 Slit 基因家族及其假定的受体, Robo 基因, 在老鼠肾脏发育过程中的表达。《衰老与发育机制》, 第 94 期, 第 213-217 页。

(Piper, M. , Georgas, K. , Yamada, T. , and Little, M. (2000). Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94, 213-217.)

Reeves, W. , Caulfield, J. P. , 和 Farquhar, M. G. (1978)。在肾小球发育过程中, 上皮足突和过滤狭缝的分化: 连续出现闭合连接, 上皮聚阴离子和狭缝膜。《实验室研究》, 第 39 期, 第 90-100 页。

(Reeves, W. , Caulfield, J. P. , and Farquhar, M. G. (1978). Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39, 90-100.)

Rivera, G. M. , Briceno, C. A. , Takeshima, F. , Snapper, S. B. , 和 Mayer, B. J. (2004)。衔接蛋白 Nck 的膜靶向 SH3 结合域的诱导聚集引发局部肌动蛋白聚合。《当代生物学》, 第 14 期, 第 11-22 页。

(Rivera, G. M. , Briceno, C. A. , Takeshima, F. , Snapper, S. B. , and Mayer, B. J. (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr Biol* 14, 11-22.)

Seiler, M. W. , Venkatachalam, M. A. , 和 Cotran, R. S. (1975)。肾小球上皮细胞: 聚阳离子诱导的结构改变。《科学》, 第 189 期, 第 390-393 页。

(Seiler, M. W. , Venkatachalam, M. A. , and Cotran, R. S. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science* 189, 390-393.)

Shih, N. Y. , Li, J. , Cotran, R. , Mundel, P. , Miner, J. H. , 和 Shaw, A. S. (2001)。CD2AP 定位于 slit 隔膜并通过新的 C-端结合域结合 Nephrin。《美国人体病理学杂志》, 第 159 期, 第 2303-2308 页。

(Shih, N. Y. , Li, J. , Cotran, R. , Mundel, P. , Miner, J. H. , and Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.)

Topham, P. S. , Kawachi, H. , Haydar, S. A. , Chugh, S. , Addona, T. A. , Charron, K. B. , Holzman, L. B. , Shia, M. , Shimizu, F. , 和 Salant, D. J. (1999)。致肾炎单克隆抗体 5-1-6 指

向大鼠 Nephrin 的胞外域。《临床研究杂志》，第 104 期，第 1559-1566 页。

(Topham, P. S. , Kawachi, H. , Haydar, S. A. , Chugh, S. , Addona, T. A. , Charron, K. B. , Holzman, L. B. , Shia, M. , Shimizu, F. , and Salant, D. J. (1999). Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 104, 1559-1566.)

Tryggvason, K. , Patrakka, J. , 和 Wartiovaara, J. (2006)。遗传性蛋白尿综合征和蛋白尿的机制，《新英格兰医学杂志》，第 354 期，第 1387-1401 页。

(Tryggvason, K. , Patrakka, J. , and Wartiovaara, J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-1401.)

Verma, R. , Kovari, I. , Soofi, A. , Nihalani, D. , Patrie, K. , 和 Holzman, L. B. (2006)。Nephrin 的结合引起 Src 蛋白激酶的活化, Nephrin 磷酸化, Nck 引入和肌动蛋白聚合。《临床研究杂志》，第 116 期，第 1346-1359 页。

(Verma, R. , Kovari, I. , Soofi, A. , Nihalani, D. , Patrie, K. , and Holzman, L. B. (2006). Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116, 1346-1359.)

Wang, H. , Li, Q. , Liu, J. , Mendelsohn, C. , Salant, D. J. , 和 Lu, W. (2011)。小鼠胎儿肾积水无创评估揭示 Robo2 在保持抗反流机制的重要作用。《公共科学图书馆综合》，第 6 期，第 24763 条。

(Wang, H. , Li, Q. , Liu, J. , Mendelsohn, C. , Salant, D. J. , and Lu, W. (2011). Noninvasive assessment of antenatal hydronephrosis in mice reveals a critical role for Robo2 in maintaining anti-reflux mechanism. *PLoS One* 6, e24763.)

Wong, K. , Ren, X. R. , Huang, Y. Z. , Xie, Y. , Liu, G. Saito, H. , Tang, H. , Wen, L. , Brady-Kalnay, S. M. , Mei, L. , 等。神经元迁移的信号转导 ;Slit-Robo 通路中 GTP 酶激活蛋白和小 GTP 酶 Cdc42 的作用。《细胞》，第 107 期，第 209-221 页。

(Wong, K. , Ren, X. R. , Huang, Y. Z. , Xie, Y. , Liu, G. , Saito, H. , Tang, H. , Wen, L. , Brady-Kalnay, S. M. , Mei, L. , et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.)

Yuan, H. , Takeuchi, E. , 和 Salant, D. J. (2002)。足细胞 slit- 隔膜蛋白 Nephrin 与肌动蛋白细胞骨架连接。《美国泌尿学与肾脏疾病学期刊》，第 282 期，第 585-591 页。

(Yuan, H. , Takeuchi, E. , and Salant, D. J. (2002). Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F585-591.)

Friedman, P. L. , 和 Ellisman, M. H. (1981)。扫描电镜中, 使用冷冻断裂和钨 - 硫代对称二氨基脲 - 钨浸渍提高外周神经和感觉感受器可视化。《神经细胞学杂志》，第 10 期，第 111-131 页。

(Friedman, P. L. , and Ellisman, M. H. (1981). Enhanced visualization of peripheral nerve and sensory receptors in the scanning electron microscope

using cryofracture and osmium-thiocarbohydrazide-osmium impregnation. *J Neurocytol* 10, 111-131.)

Li, X. , Gao, X. , Liu, G. , Xiong, W. , Wu, J. , 和 Rao, Y. (2008)。有吸引力的信号中, Nephlin 信号转导和鸟嘌呤核苷酸交换因子 DOCK180。《自然神经科学》, 第 11 期, 第 11, 28-35 页。

(Li, X. , Gao, X. , Liu, G. , Xiong, W. , Wu, J. , and Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11, 28-35.)

Mugford, J. W. , Sipila, P. , Kobayashi, A. , Behringer, R. R. , 和 McMahon, A. P. (2008)。Hoxd11 指定小鼠胚胎中间中胚层内后肾发育的程序。《发育生物学》, 第 319 期, 第 396-405 页。

(Mugford, J. W. , Sipila, P. , Kobayashi, A. , Behringer, R. R. , and McMahon, A. P. (2008). Hoxd11 specifies a program of metanephric kidney development within the intermediate mesoderm of the mouse embryo. *Dev Biol* 319, 396-405.)

Sanden, S. K. , Wiggins, J. E. , Goyal, M. , Riggs, L. K. , 和 Wiggins, R. C. (2003)。以 Wilms 肿瘤-1 蛋白作为足细胞的核标记物的大鼠肾脏中, 用于估计足细胞数目, 肾小球体积, 肾小球体积每个足细胞的厚和薄切片方法的评价。《美国肾脏疾病学会杂志》, 第 14 期, 第 2484-2493 页。

(Sanden, S. K. , Wiggins, J. E. , Goyal, M. , Riggs, L. K. , and Wiggins, R. C. (2003). Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol* 14, 2484-2493.)

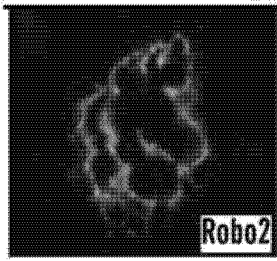


图 1A

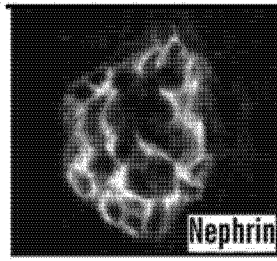


图 1B

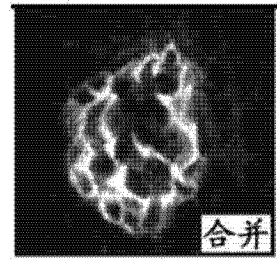


图 1C

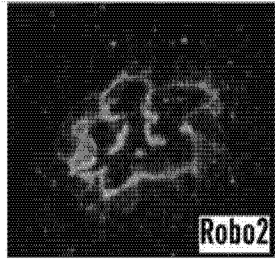


图 1D



图 1E

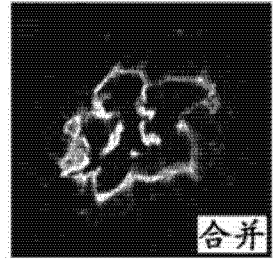


图 1F

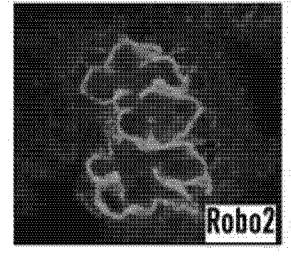


图 1G

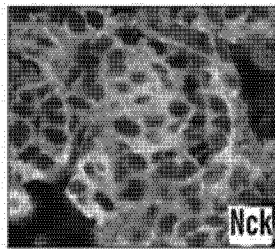


图 1H

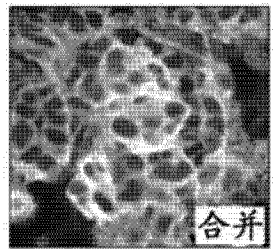


图 1I

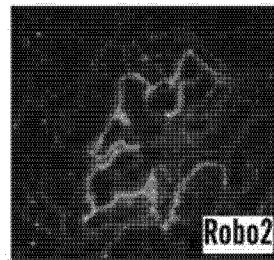


图 1J

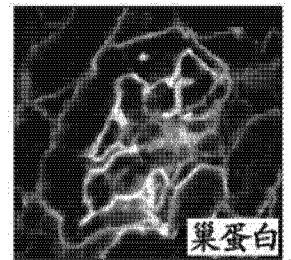


图 1K

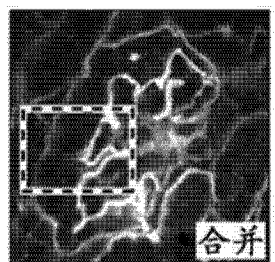


图 1L

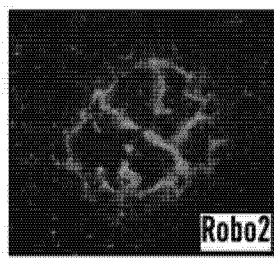


图 1M

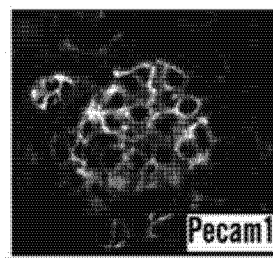


图 1N

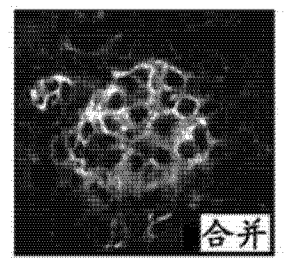


图 1O

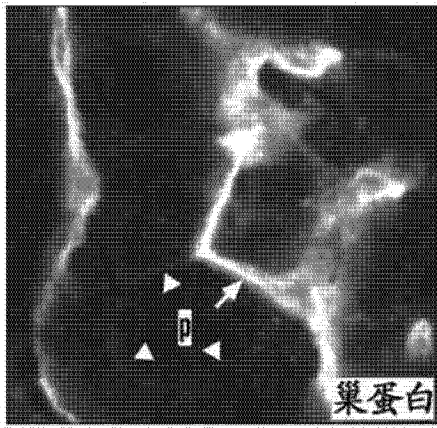


图 1P

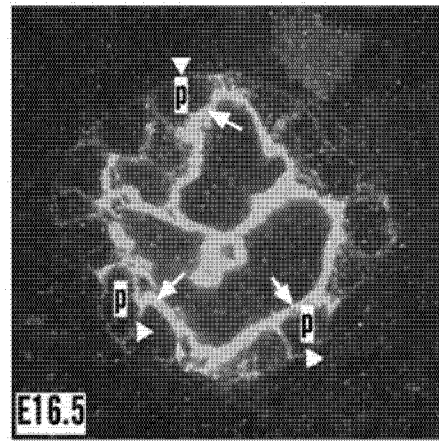


图 1Q

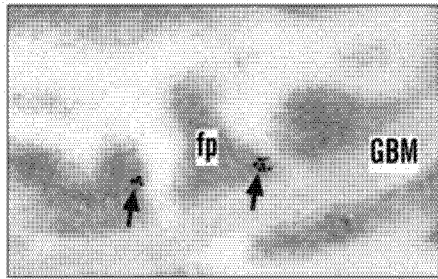


图 1R

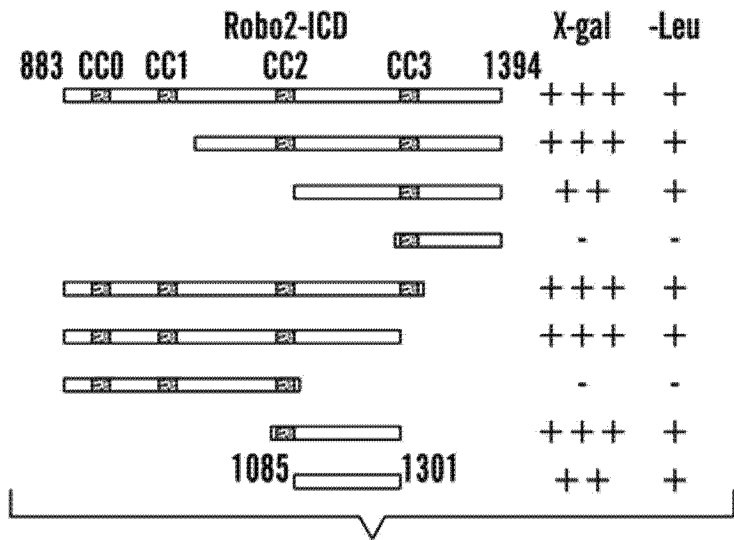


图 2A

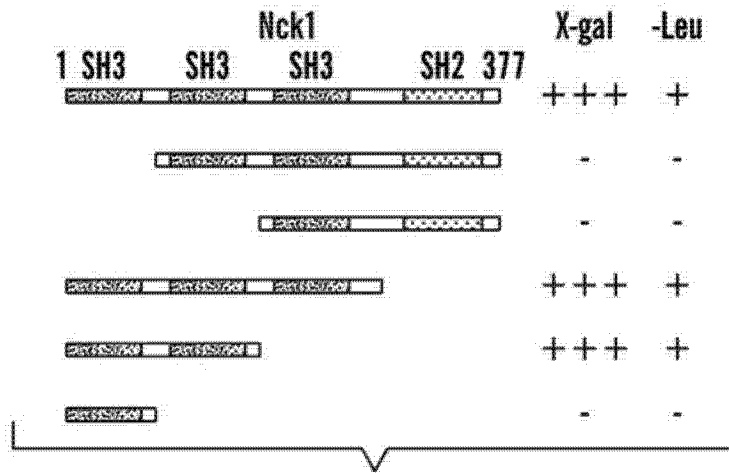


图 2B

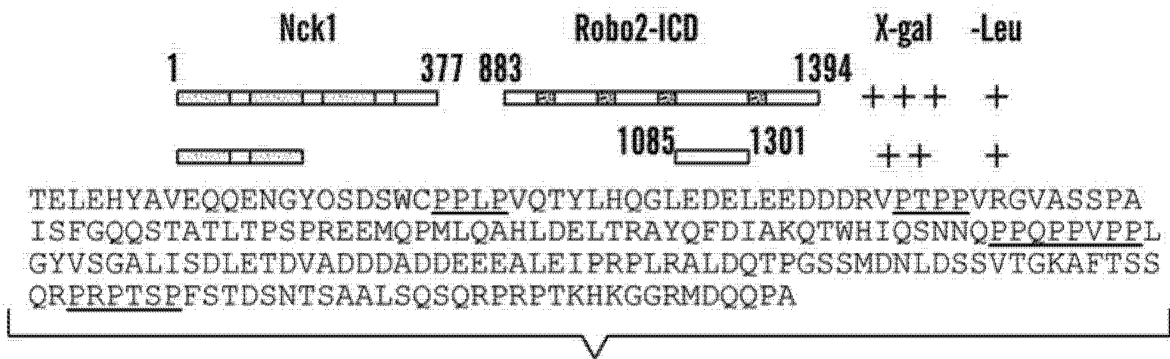


图 2C

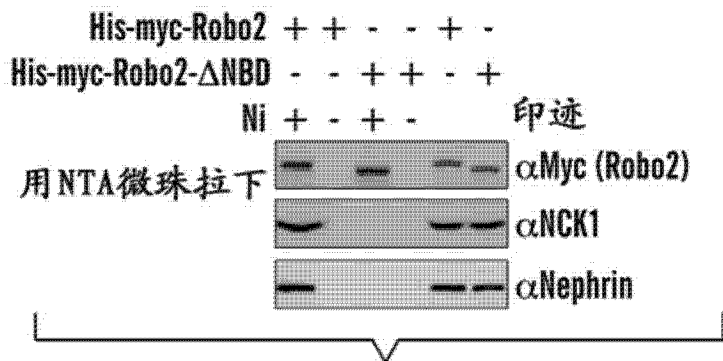


图 2D

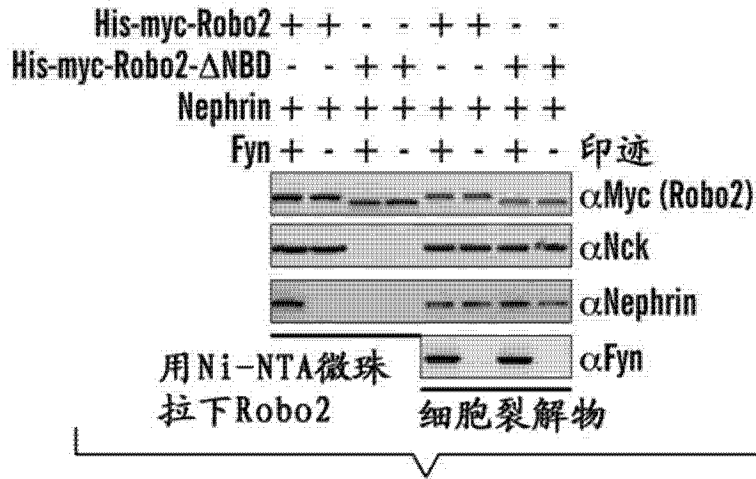


图 2E

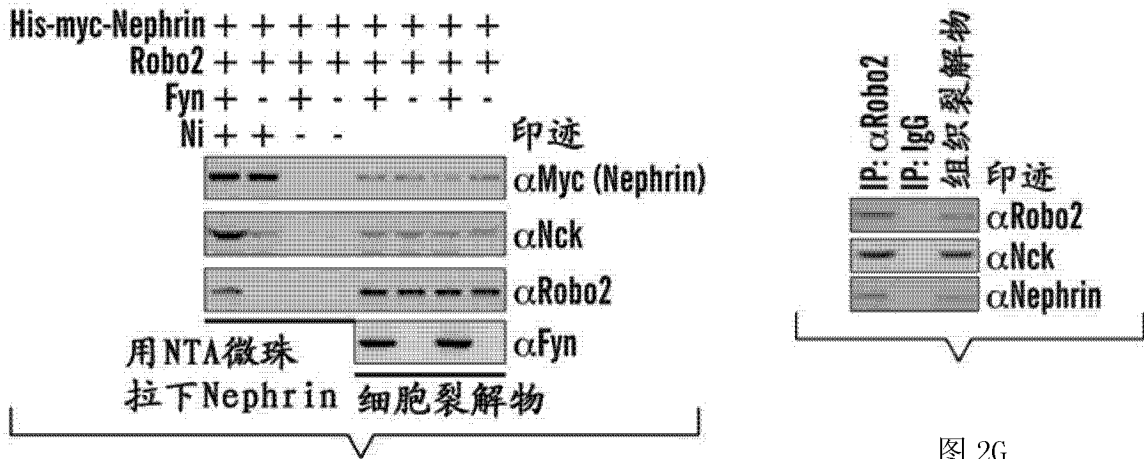


图 2G

图 2F

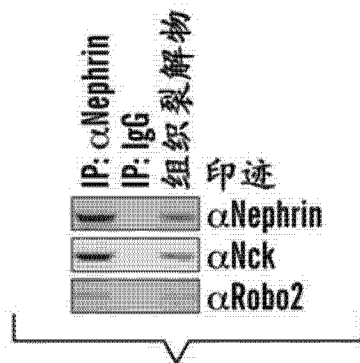


图 2H

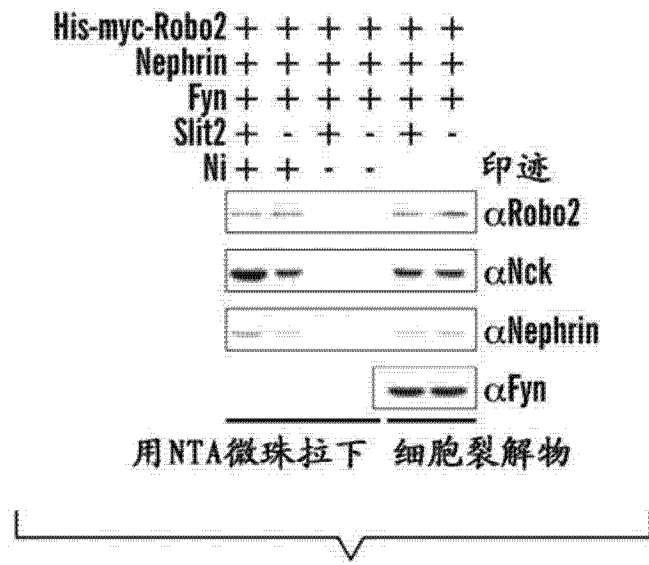


图 2I

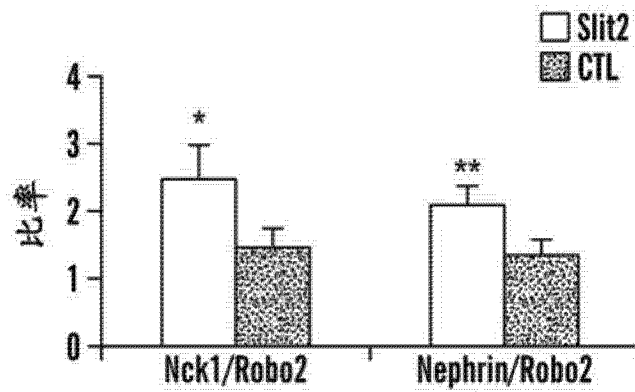


图 2J

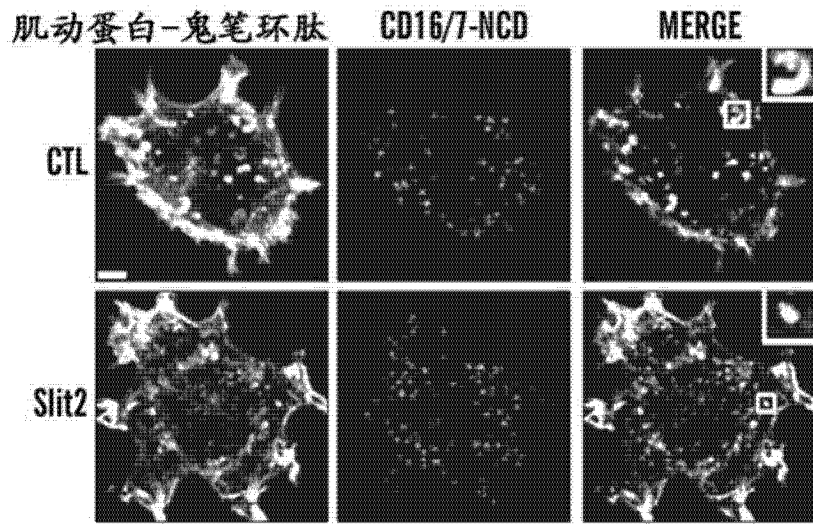


图 3A

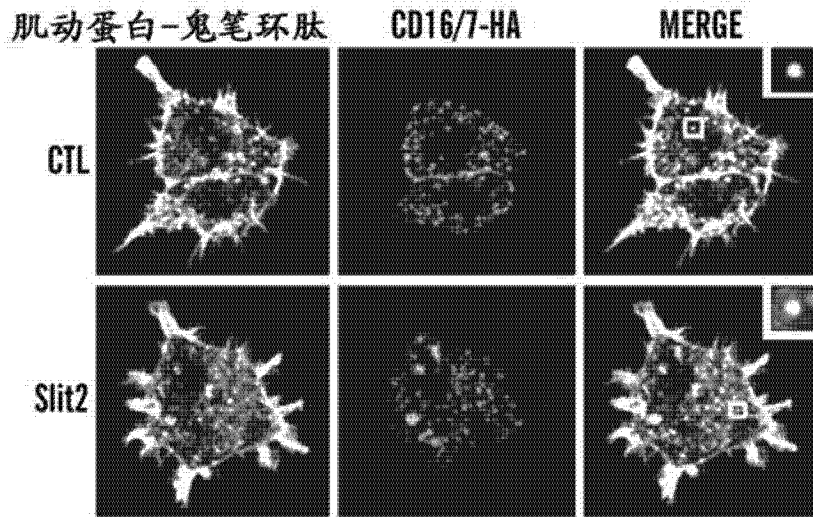


图 3B

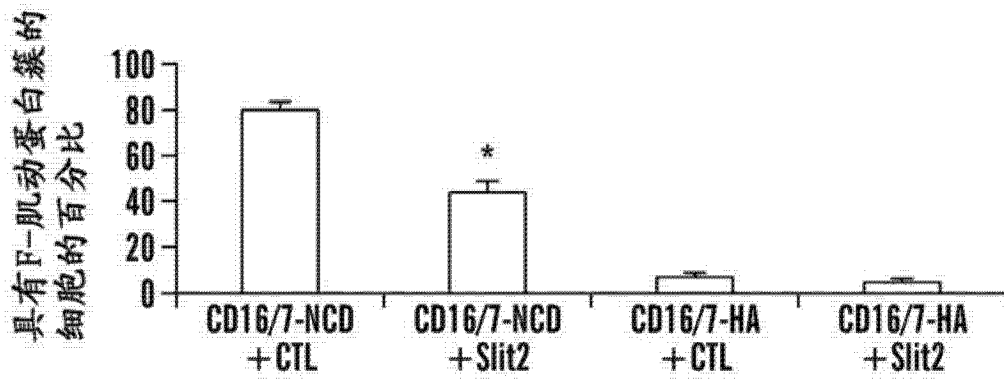


图 3C

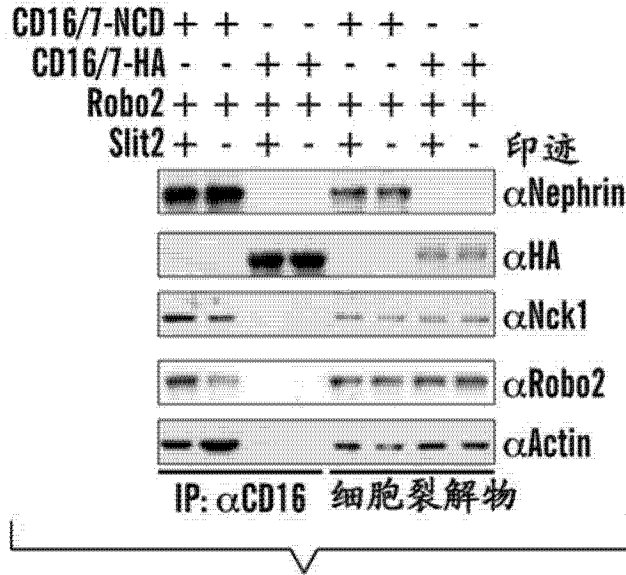


图 3D

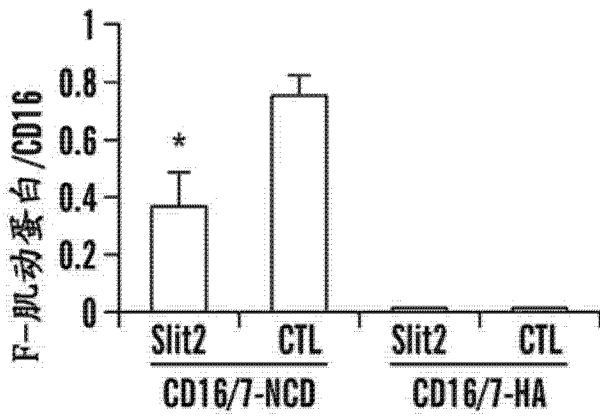


图 3E

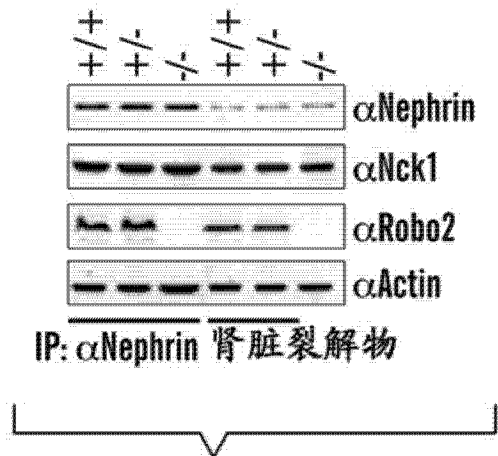


图 3F

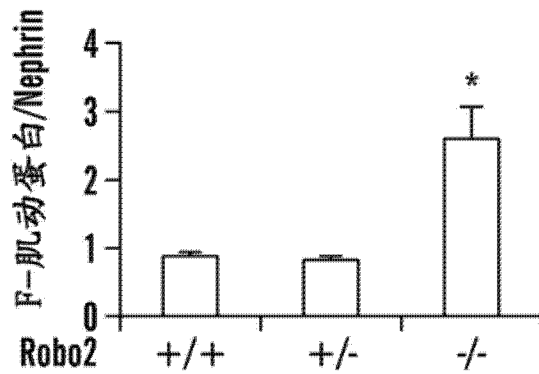
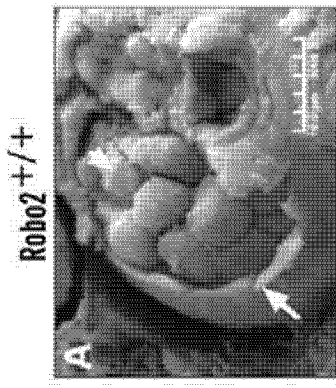
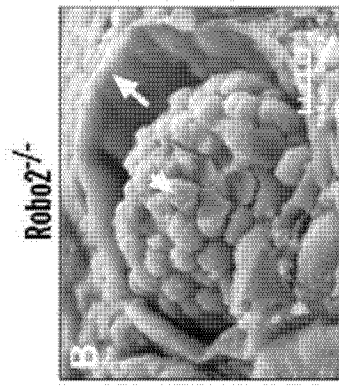


图 3G



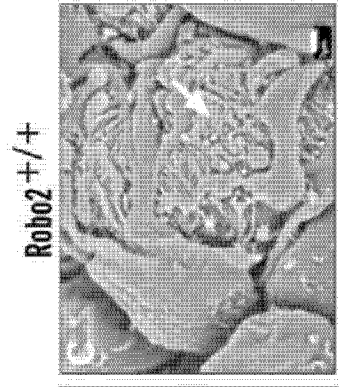
新生

图 4A



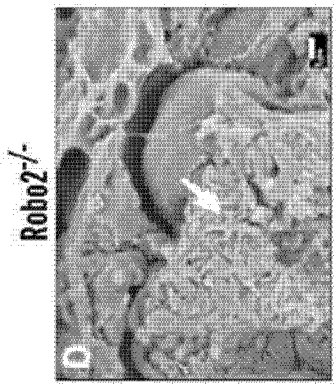
新生

图 4B



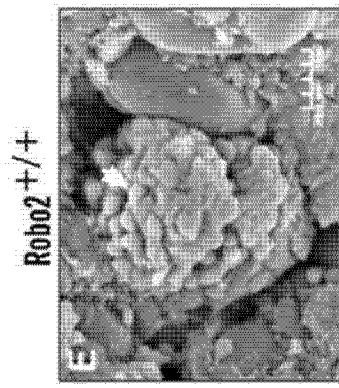
新生

图 4C



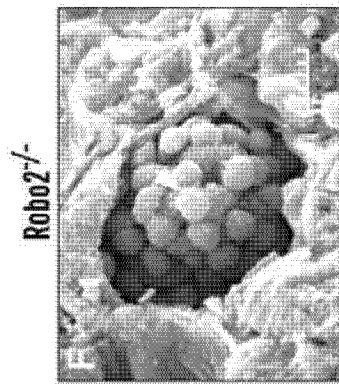
新生

图 4D



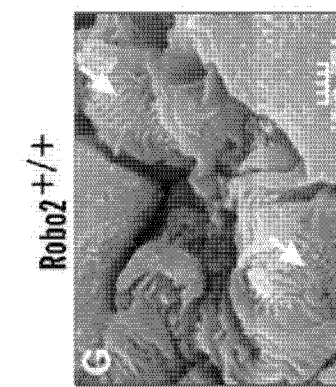
3周

图 4E



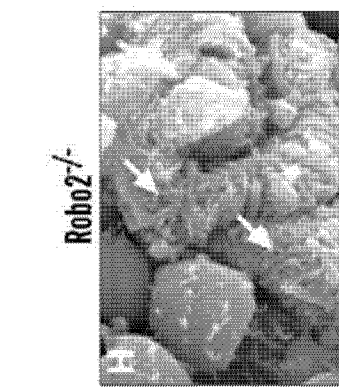
3周

图 4F



3周

图 4G



3周

图 4H

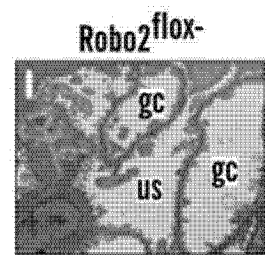


图 4I

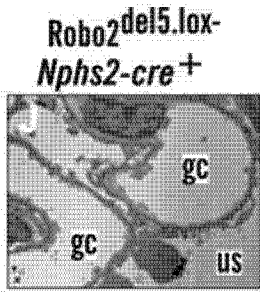


图 4K

图 4L

图 4J

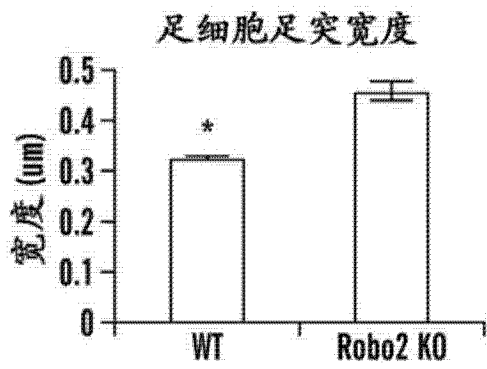


图 4M

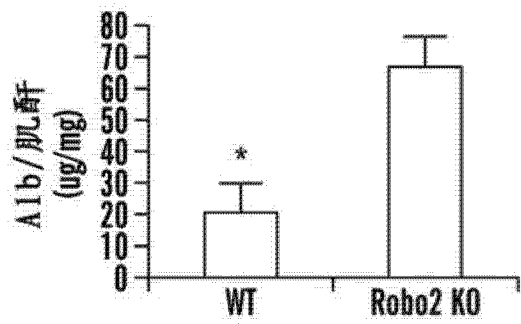


图 4N

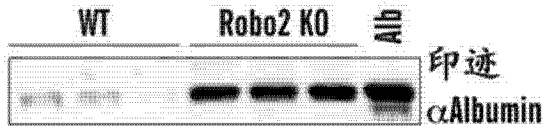


图 4O

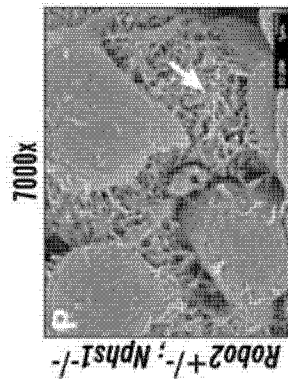


图 4P

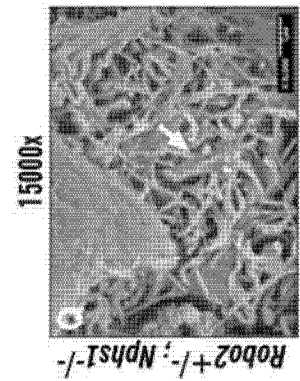


图 4Q

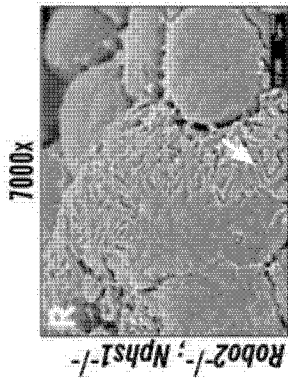


图 4R

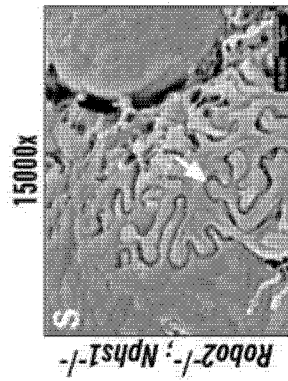


图 4S

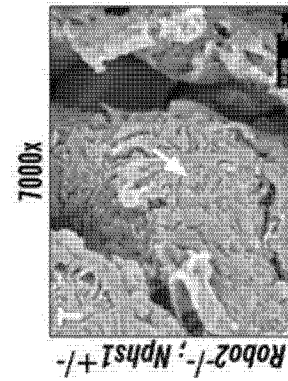


图 4T

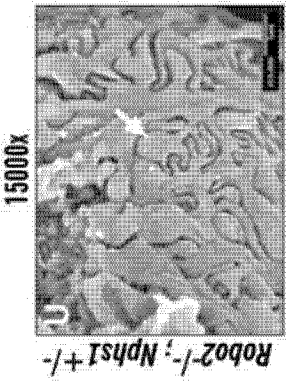


图 4U

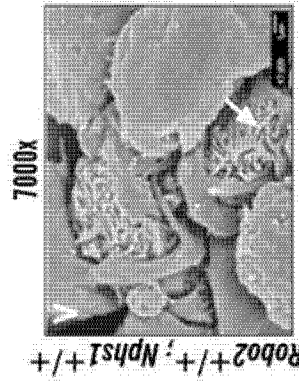


图 4V



图 4W



图 5A

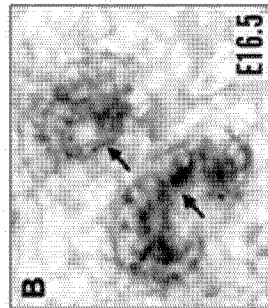


图 5B

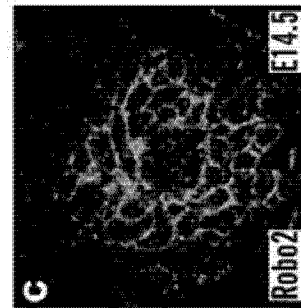


图 5C

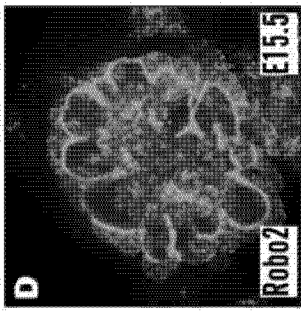


图 5D

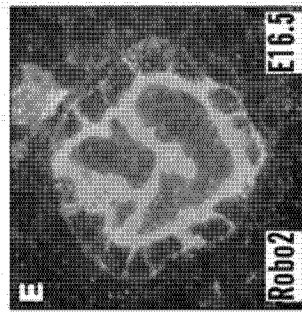


图 5E

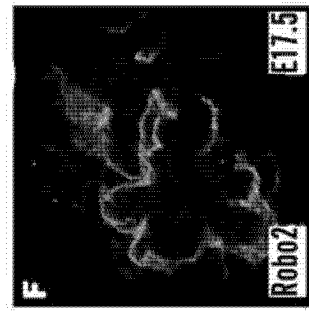


图 5F

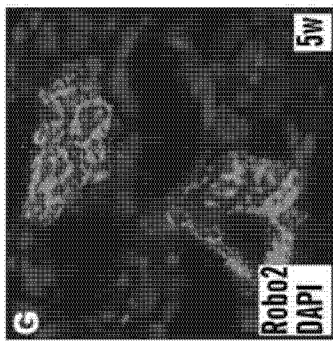


图 5G

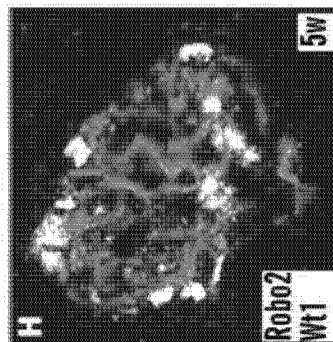


图 5H

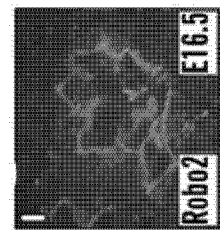


图 5I

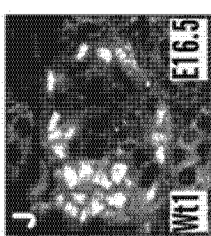


图 5J

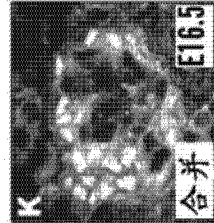


图 5K

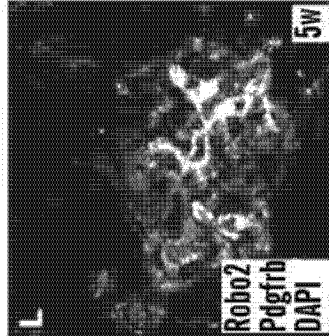


图 5L

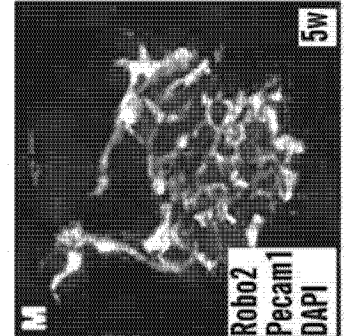


图 5M

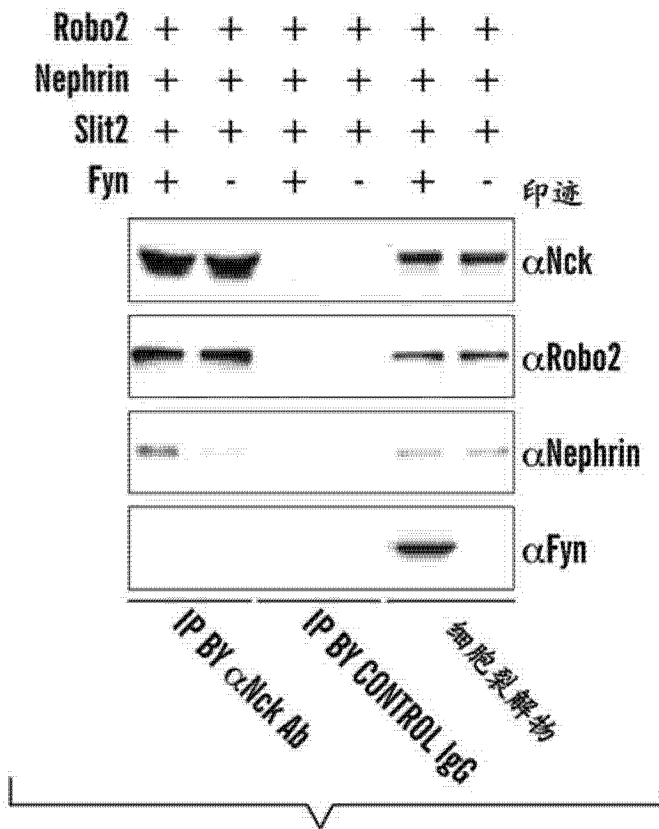


图 6A

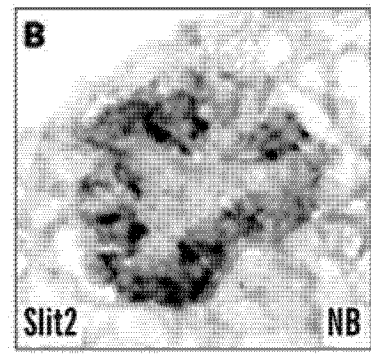


图 6B

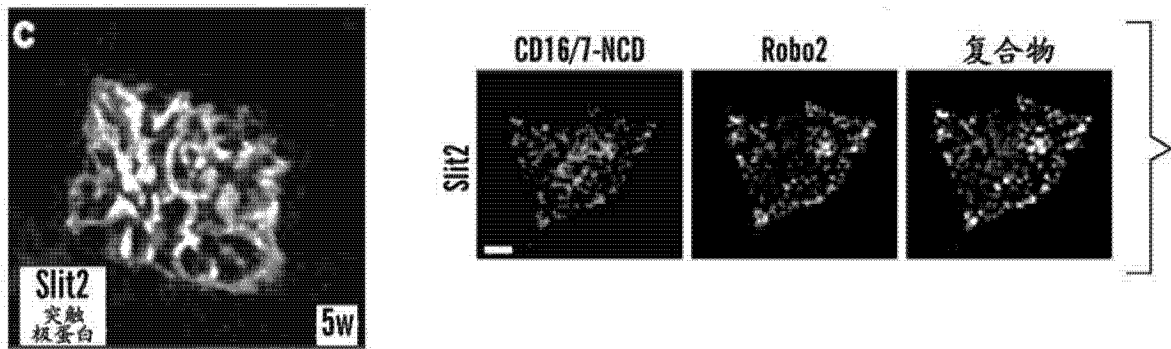


图 6C

图 6D

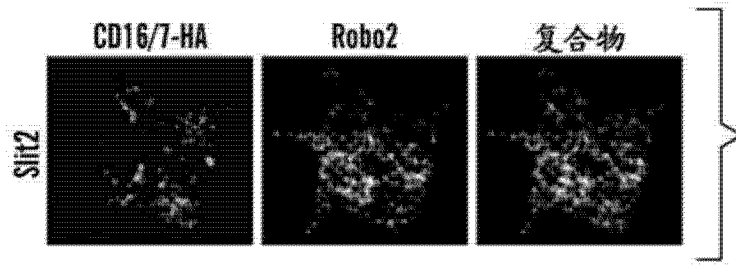


图 6D'

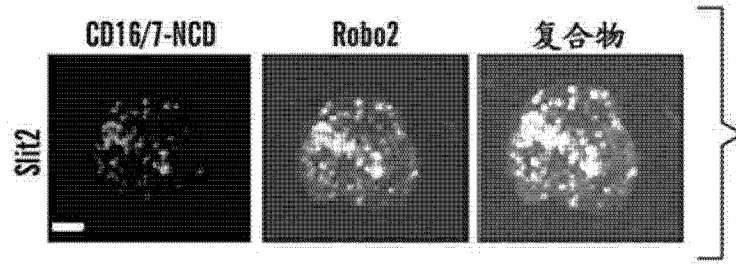


图 6E

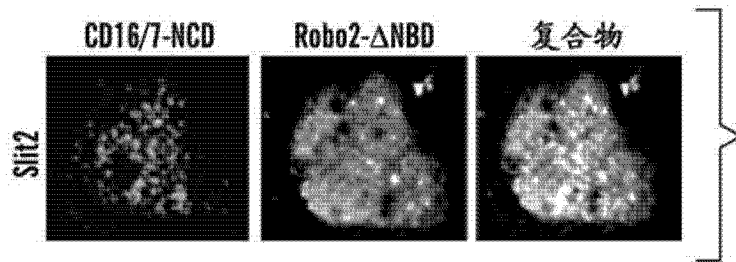


图 6E'

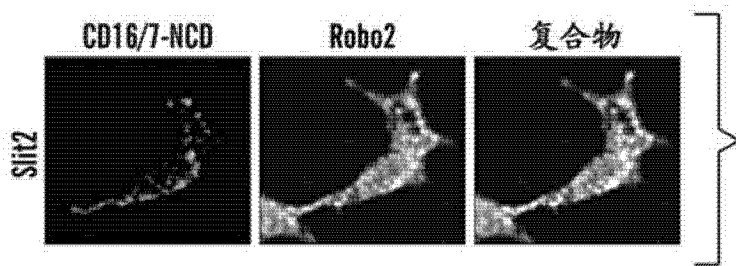


图 6F

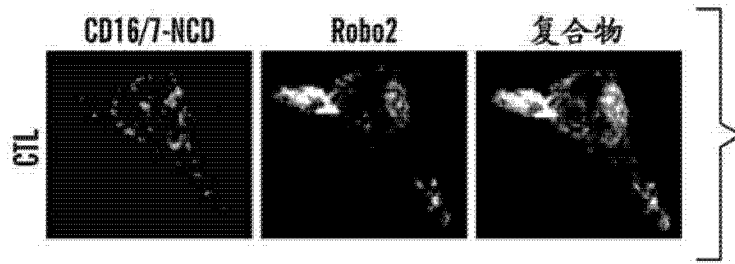


图 6F'

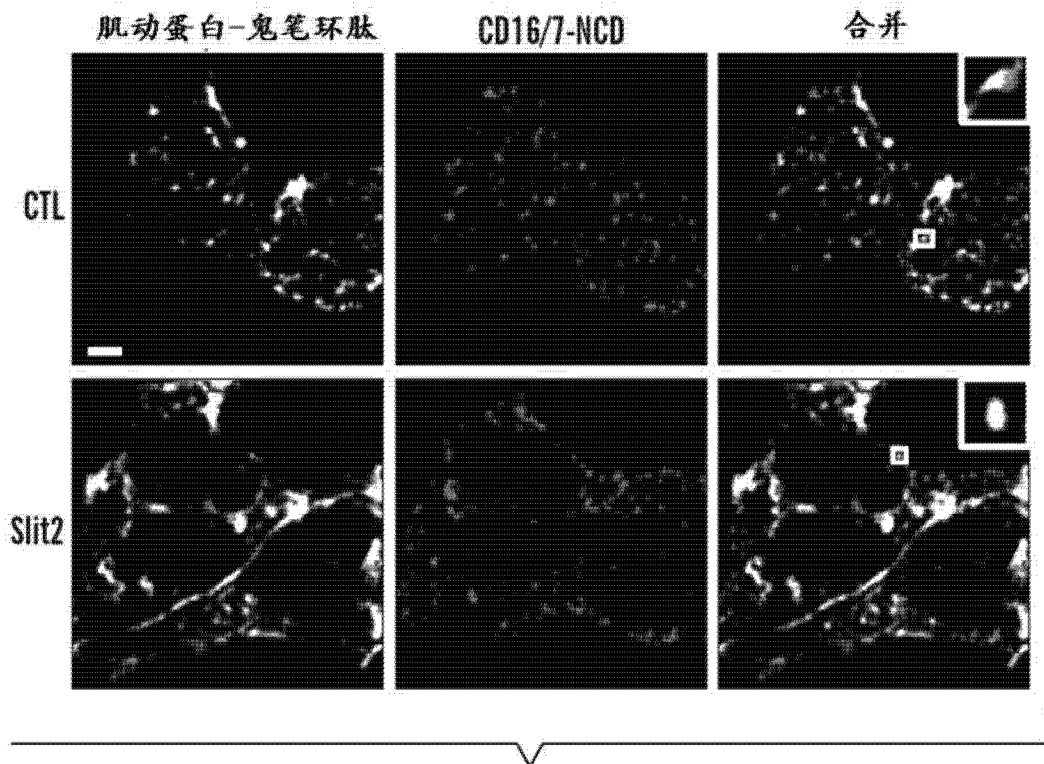


图 7A

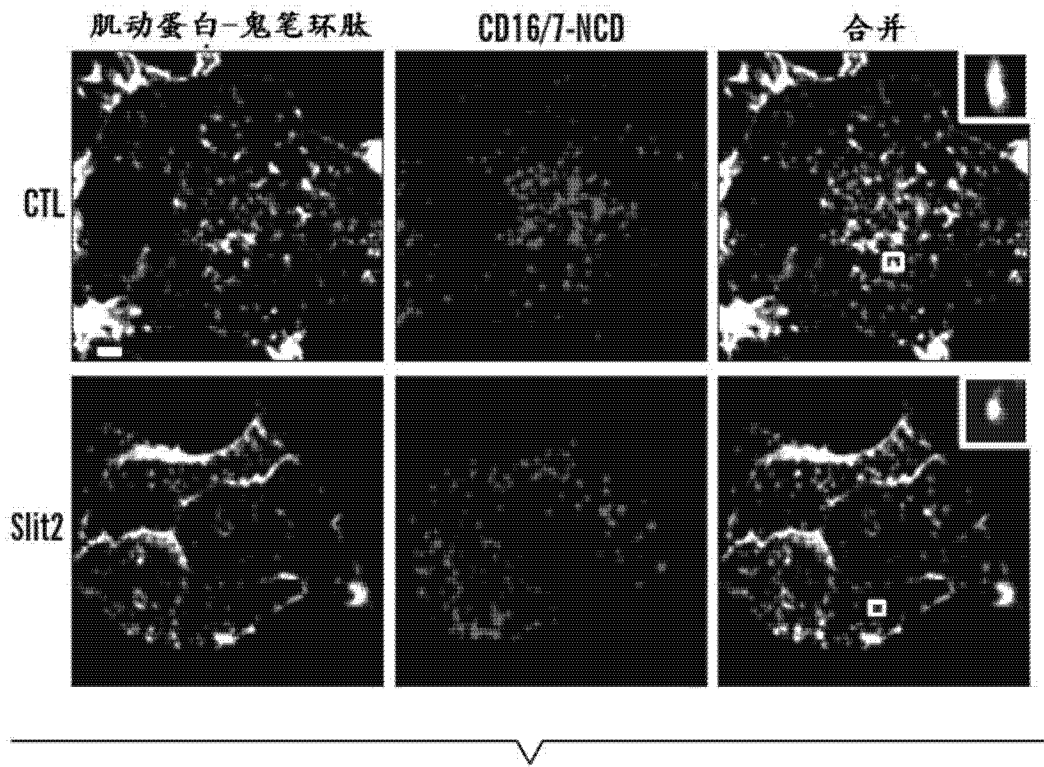


图 7B

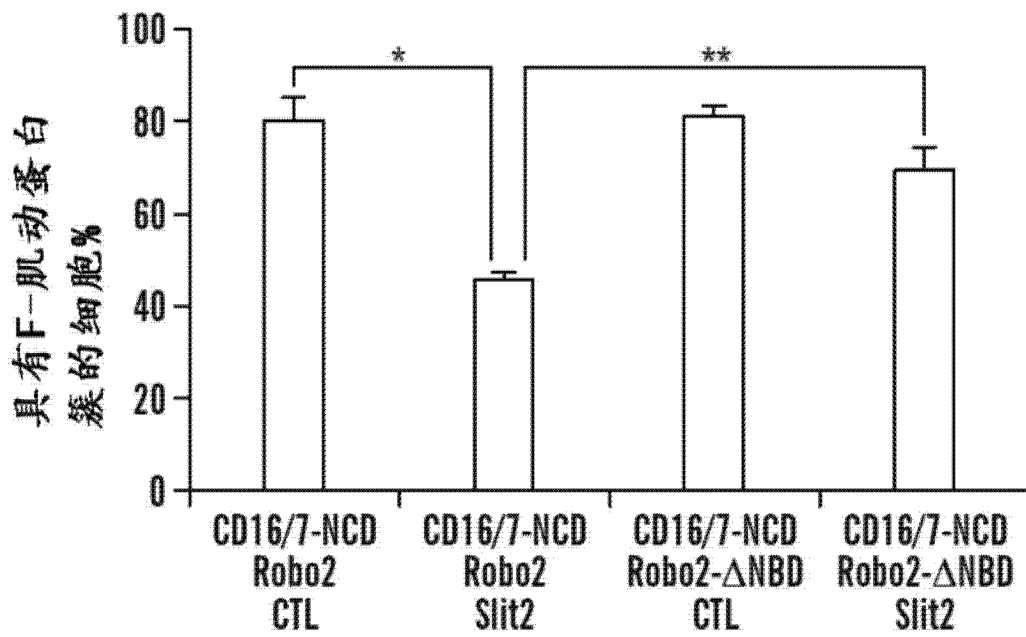


图 7C

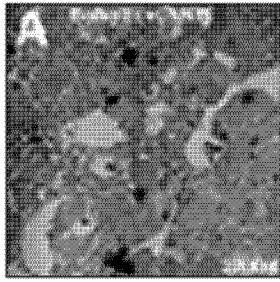


图 8A

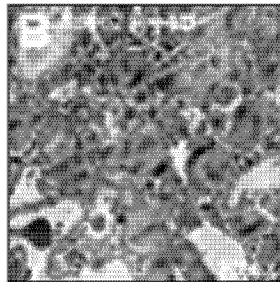


图 8B

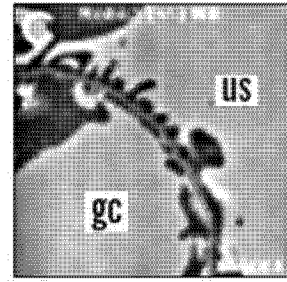


图 8C

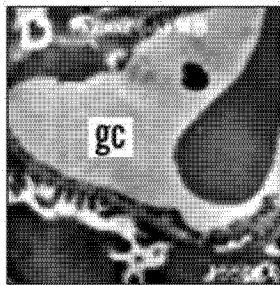


图 8D

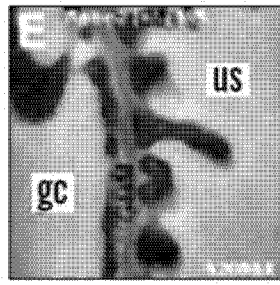


图 8E

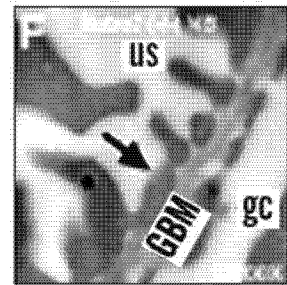


图 8F

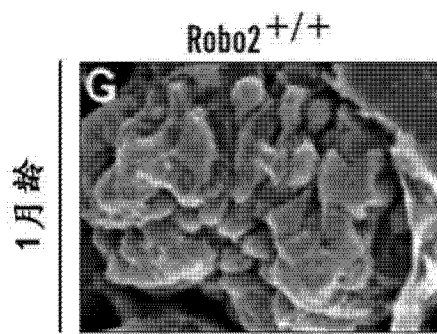


图 8G

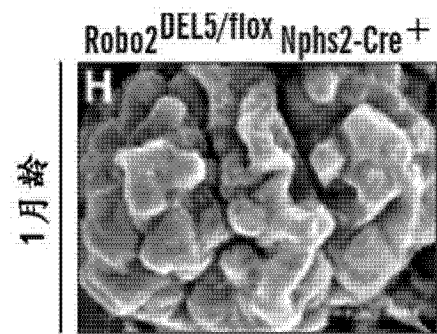


图 8H

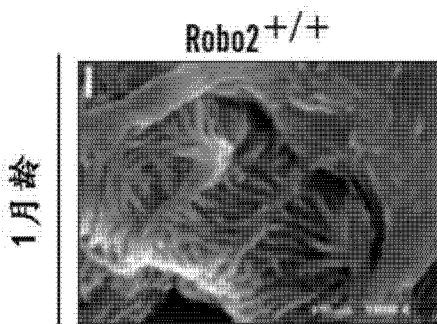


图 8I

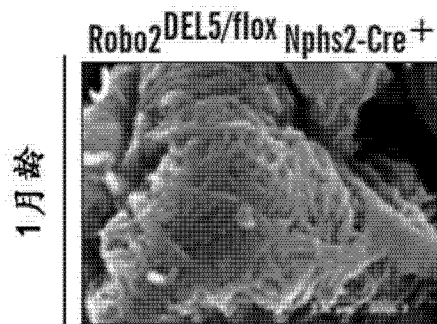


图 8J

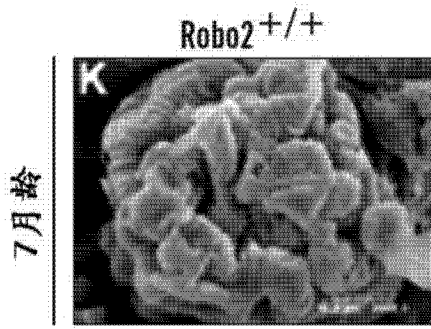


图 8K

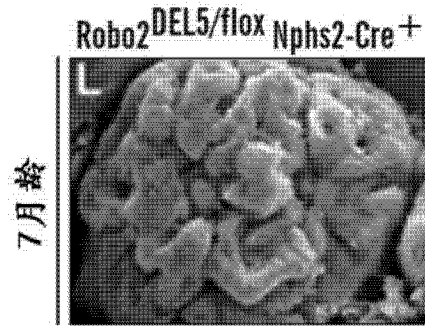


图 8L

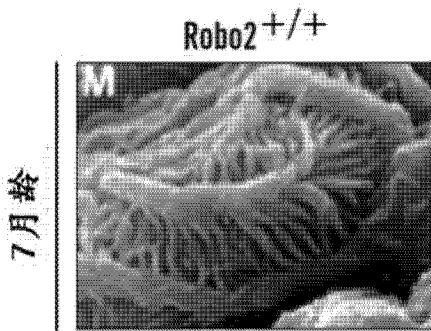


图 8M

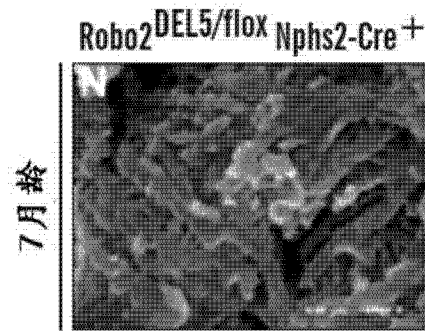


图 8N

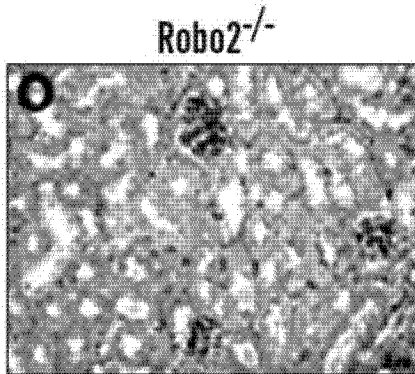


图 8O

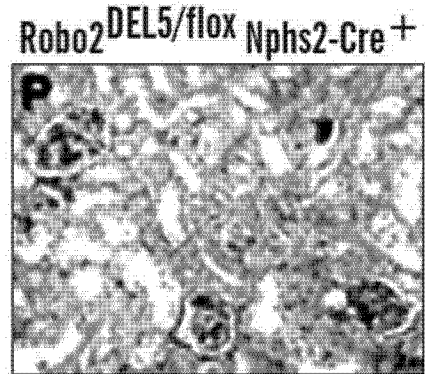


图 8P

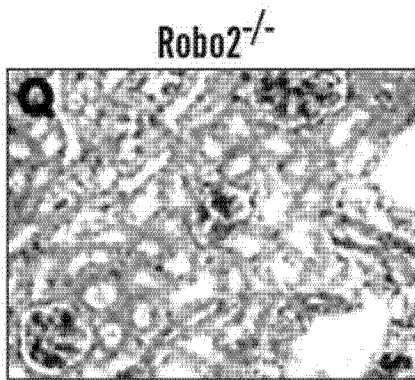


图 8Q

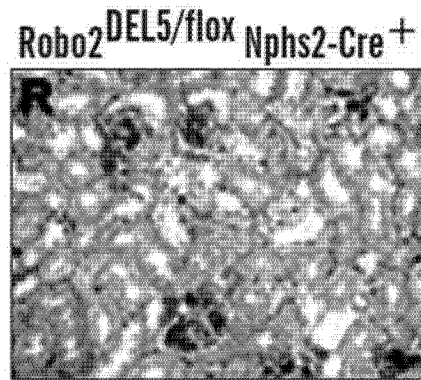


图 8R

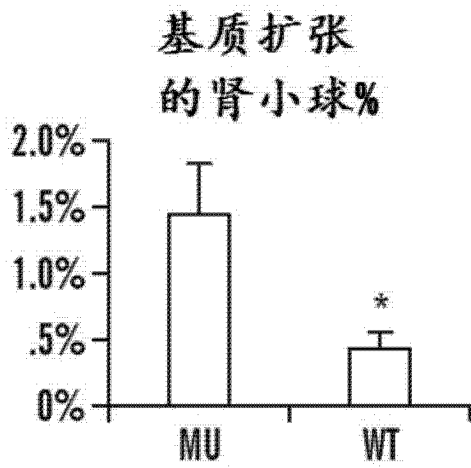


图 8S

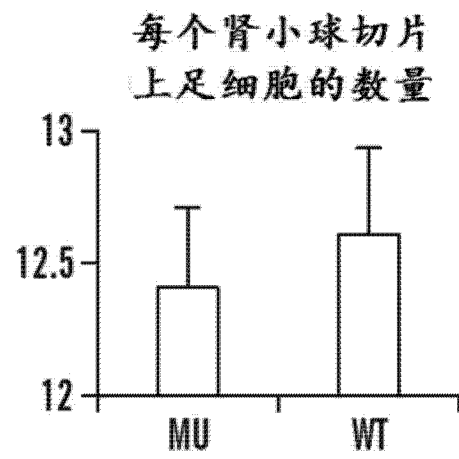


图 8T

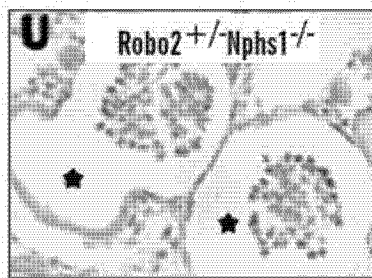


图 8U

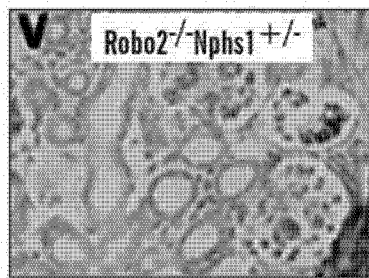


图 8V

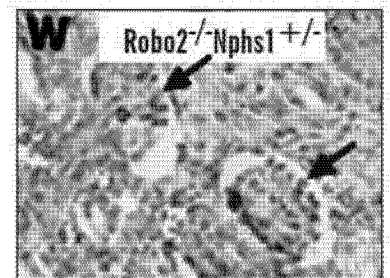


图 8W

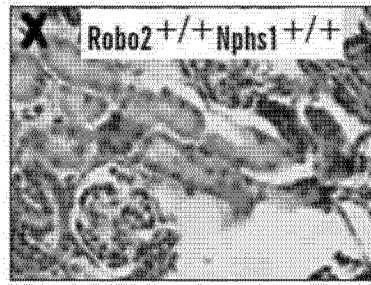


图 8X

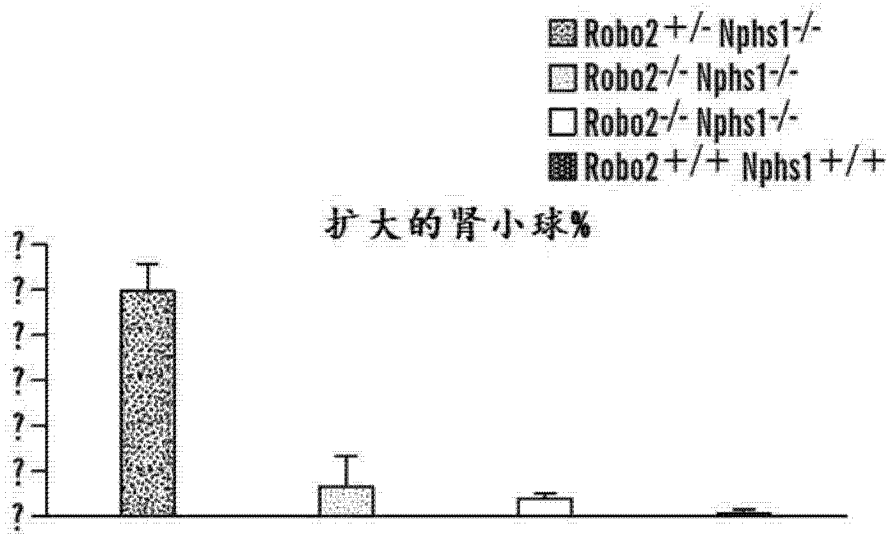


图 8Y

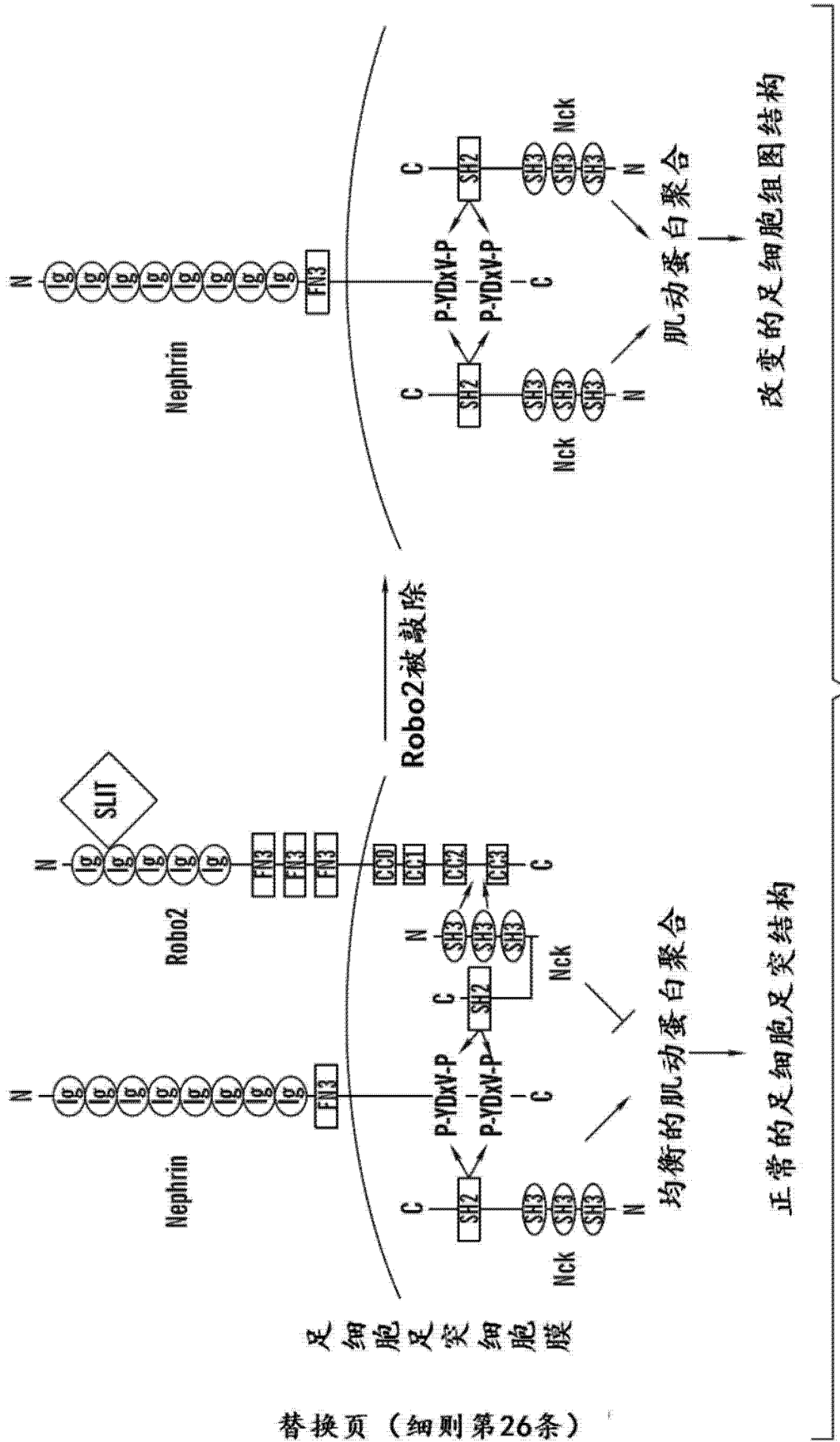


图 8Z