

1. 一种在个体中诊断或辅助诊断炎性肠病的方法,所述方法包括:

(a) 在从所述个体获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,选自 CSF3 (GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFB1、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、双调蛋白 (AREG) 和 IL-11,

(b) 将 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,提供炎性肠病的诊断。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述一种基因或基因组合或者由所述一种基因或基因组合所编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3 (GCSF)、TMEM158、Co17A1、Co116A1、双调蛋白 (AREG)、IL-11。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述一种基因或基因组合或者由所述一种基因或基因组合所编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3 (GCSF) 和双调蛋白。

4. 一种在个体中诊断或辅助诊断炎性肠病的方法,所述方法包括:

(a) 在从所述个体获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 IL-1 β 、CASP1 和 p20;

(b) 将 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,提供炎性肠病的诊断。

5. 一种在个体中诊断或辅助诊断纤维化克罗恩氏病的方法,所述方法包括:

(a) 在从所述个体获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 COL7A1、COL16A1、双调蛋白、IL-11、AEBP1 和 IL1R1;

(b) 将 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,提供纤维化克罗恩氏病的诊断。

6. 一种在个体中诊断或辅助诊断纤维化克罗恩氏病的方法,所述方法包括:

(a) 在从所述个体获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4 和 TIMP2;

(b) 将 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,提供纤维化克罗恩氏病的诊断。

7. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

8. 根据权利要求 5 或权利要求 6 所述的方法,其中所述纤维化克罗恩氏病是纤维狭窄型克罗恩氏病。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的方法,其中所述生物样品是肠组织。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述一种基因或基因组合的表达使用 PCR 法或微阵列芯片进行测量。

11. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达使用免疫测定或免疫组化测定进行测量。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述免疫测定是 ELISA 测定。

13. 根据权利要求 1-12 任一项所述的方法,其中,通过在从不患有炎症性肠紊乱的个体获得的生物样品中测量相同的一种基因或基因组合或相同的一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平,获得所述参考水平。

14. 根据权利要求 5、6 或 8 中任一项所述的方法,其中,通过测量非纤维化组织中相同的一种基因或基因组合或相同的一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平,获得所述参考水平。

15. 一种在个体中诊断或辅助诊断克罗恩氏病亚型的方法,所述方法包括:

(a) 在从个体肠组织获得的生物样品中测量 IL18 的表达水平;

(b) 将 (a) 中所测量的 IL18 的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的 IL18 的水平高于所述参考水平时,提供纤维化克罗恩氏病的诊断。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,通过测量从不患有炎症性肠紊乱的个体,或患有炎性克罗恩氏病的个体,或患有溃疡性结肠炎的个体的肠组织获得的生物样品中的 IL18 表达水平,获得所述参考水平。

17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述纤维化克罗恩氏病是纤维狭窄型克罗恩氏病。

18. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述表达水平使用免疫测定进行测量。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述免疫测定是 ELISA 测定。

20. 一种在个体中诊断或辅助诊断炎性肠病的方法,所述方法包括:

(a) 在从个体获得的血清样品中测量 GCSF 的表达水平;

(b) 将 (a) 中所测量的 GCSF 的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当 (a) 中所测量的 GCSF 的水平高于所述参考水平时,提供炎性肠病的诊断。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或炎性克罗恩氏病,或纤维化克罗恩氏病。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述纤维化克罗恩氏病是纤维狭窄型克罗恩氏病。

23. 根据权利要求 20-22 中任一项所述的方法,其中 GCSF 的表达水平使用免疫测定进

行测量。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述免疫测定是 ELISA 测定。

25. 根据权利要求 20 所述的方法,其中,通过测量从不患有炎症性肠紊乱的个体获得的血清样品中的 GCSF 表达水平,获得所述参考水平。

26. 一种治疗患者中的炎性肠病的方法,包括:

(a) 在从所述患者获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 CSF3(GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFBR1、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、双调蛋白(AREG)和 IL-11;

(b) 将(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,对所述患者施用抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体或多特异性抗 IL-1 β / 抗 IL-18 抗体。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述一种基因或基因组合或者由所述一种基因或基因组合所编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3(GCSF)、TMEM158、Co17A1、Co116A1、双调蛋白(AREG)、IL-11。

28. 根据权利要求 27 述的方法,其中所述一种基因或基因组合或者由所述一种基因或基因组合所编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3(GCSF) 和双调蛋白。

29. 一种治疗患者中的炎性肠病的方法,包括:

(a) 在从所述患者获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 IL-1 β 、CASP1 和 p20;

(b) 将(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,对所述患者施用抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体或多特异性抗 IL-1 β / 抗 IL-18 抗体。

30. 一种治疗患者中的炎性肠病的方法,包括:

(a) 在从所述个体获得的生物样品中测量一种基因或基因组合的表达水平,或者由所述一种基因或基因组合所编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,其选自 MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4、AEBP1、IL1R1 和 TIMP2;

(b) 将(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平进行比较;和

(c) 当(a)中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,对所述患者施用抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体或多特异性抗

IL-1 β / 抗 IL-18 抗体。

31. 一种治疗患者中的炎性肠病的方法,包括:

(a) 在从患者肠组织获得的生物样品中测量 IL18 的表达水平;
(b) 将 (a) 中所测量的 IL18 的表达水平与参考水平进行比较;和
(c) 当 (a) 中所测量的所述一种基因或基因组合或者所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于所述参考水平时,对所述患者施用抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体或多特异性抗 IL-1 β / 抗 IL-18 抗体。

32. 一种治疗患者中的炎性肠病的方法,包括:

(a) 在从个体获得的血清样品中测量 GCSF 的表达水平;
(b) 将 (a) 中所测量的 GCSF 的表达水平与参考水平进行比较;和
(c) 当 (a) 中所测量的 GCSF 的水平高于所述参考水平时,对所述患者施用抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体或多特异性抗 IL-1 β / 抗 IL-18 抗体。

33. 根据权利要求 26-32 中任一项所述的方法,其中所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或炎性克罗恩氏病,或纤维化克罗恩氏病。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述纤维化克罗恩氏病是纤维狭窄型克罗恩氏病。

35. 根据权利要求 26-30 中任一项所述,其中所述表达水平使用 PCR 法或微阵列芯片进行测量。

36. 根据权利要求 26-32 中任一项所述的方法,其中所述表达水平使用免疫测定进行测量。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述免疫测定是 ELISA 测定。

用于诊断和治疗炎性肠病的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2013 年 5 月 17 日提交的临时美国申请 61/824,661 号的优先权的权益,在此以其整体引入作为参考。

[0003] 领域

[0004] 提供了用于诊断炎性肠病的生物标记和使用所述生物标记的方法,所述炎性肠病包括克罗恩氏病 (Crohn's disease, CD),包括纤维化或纤维狭窄型克罗恩氏病 (Fibrostenotic Crohn's disease),和溃疡性结肠炎。此外,本发明还提供了治疗胃肠炎性病症的方法,所述胃肠炎性病症例如炎性肠病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病,包括纤维化或纤维狭窄型克罗恩氏病。

[0005] 背景

[0006] 炎性肠病 (IBD) 是胃肠 (GI) 道的慢性炎性自身免疫病症,其在临床上表现为溃疡性结肠炎 (UC) 或克罗恩氏病 (CD)。CD 是具有影响整个胃肠道的任意部分的潜能的慢性透壁性炎性疾病,而 UC 是结肠的黏膜炎症。两种病症在临床上都表征为频繁排便、营养不良和脱水,伴随日常生活活动的破坏。慢性炎症在 CD 患者亚组中可导致纤维化,具有并发症,包括狭窄和瘘,并可能需要反复手术。较少见的 UC 可以并发严重的血性腹泻和中毒性巨结肠,也需要手术。两种 IBD 病症都与提高的胃肠道恶性肿瘤风险相关。IBD 的病因复杂,发病机制的许多方面仍不清楚。

[0007] 经由增加的胶原和细胞外基质蛋白质类沉积,肠内成肌纤维细胞的活化可能在肠纤维化中起关键作用。此过程中炎性细胞因子的作用尚未得知。

[0008] 细胞因子白介素-1 (IL-1) 和 IL-18 家族通过起源、受体结构、和所使用的信号转导途径的机制相关联。这些细胞因子作为前体分子合成,在从细胞中释放之前或释放过程中由胱天蛋白酶 1 (caspase-1) 切割。NALP-3 炎性体 (inflammasome) 在产生活性胱天蛋白酶 1 的过程中至关重要 (Cassel 等,2009;Ferrero-Miliani 等,2007)。IL-1 家族包括两种激动剂 IL-1 α 和 IL-1 β ,特异性抑制剂 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra),和两种受体生物活性型 IL-1R 和非活性型 II IL-1R (Arend 等,2008)。IL-1RI 和 IL-33R 两者均使用相同的相互作用辅助蛋白 (IL-1RAcP)。IL-1 和 IL-1Ra 之间的平衡对防止不同器官中的疾病是重要的,在许多人类疾病中均涉及 IL-1 的过量产生。IL-18 家族还包括特异性抑制剂 IL-18-结合蛋白 (IL-18BP),其在液相中结合 IL-18。IL-18 受体与 IL-1 受体复合物相似,包括单条配体结合链和不同的相互作用辅助蛋白。IL-18 提供固有免疫应答和适应性免疫应答之间的重要连接。

[0009] 疾病进展过程中可能涉及炎性体活化和 IL-1 β /IL-18 加工和分泌。基因组范围的关联研究显示炎性体在炎性肠病 (IBD) 中起作用。据报道具有炎性体-化合物 NALP-3 多态性的患者有增加的患克罗恩氏病的风险 (Ferrero-Miliani 等,2007;Villani 等,2009)。此外,控制胱天蛋白酶 1 活化和 IL-1 β /IL-18 加工的自噬组分 Atg1611 和 IRGM 的多态性据报道与克罗恩氏病相关 (Baldassano 等,2007;Cadwell 等,2008;Kuballa 等,2008;Saitoh 等,2008)。独立研究报道了患有 IBD 的患者中 IL-1 β 和 IL-18 血清水平升高 (Ludwiczek

等,2005 ;Ludwiczek 等,2004 ;Monteleone 等,1999)。临床前研究进一步支持了人类中的研究。据报道 IL-18 或 IL-1 β 的封闭导致疾病的临床前模型的临床评分改善 (Ten Hove 等,2001)。

[0010] 中度至严重 IBD 的治疗向治疗医生提出了巨大的挑战,因为使用皮质类固醇的常规疗法和免疫调节剂疗法(例如硫唑嘌呤、6 巯基嘌呤和氨甲喋呤)与副作用和不耐受相关,且未在维持疗法(类固醇)中显示经证明的益处。靶向肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的单克隆抗体(如英利昔单抗 (Infliximab)(嵌合抗体)和阿达木单抗 (adalimumab)(全人抗体))目前用于 CD 的治疗。英利昔单抗还已显示有效性,并被批准用于 UC。但是,约 10% -20% 的 CD 患者对抗 TNF 疗法是初级无响应者,另外 ~ 20% -30% 的 CD 患者随时间推移而失去响应 (Schnitzler 等, Gut58:492-500(2009))。与抗 TNF 相关的其他不良事件 (AE) 包括细菌感染(包括结核病)及更罕见的淋巴瘤和脱髓鞘的比例提高 (Chang 等, Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatology 3:220(2006);Hoentjen 等, World J. Gastroenterol. 15(17):2067(2009))。目前没有可用的疗法在超过 20% -30% 患有慢性疾病的 IBD 患者中达到持续缓解 (Hanauer 等, Lancet359:1541-49(2002);Sandborn 等, N Engl J Med 353:1912-25(2005))。此外,大多数患者未达到持续的无类固醇缓解和黏膜愈合(与真实的疾病改变相关的临床结果)。因此,存在发展针对慢性用途优化的靶向性更强的 IBD 疗法的需要:改善的具有持续缓解(尤其是无类固醇缓解)的安全性谱及在更大比例的患者(包括从未响应抗 TNF 治疗剂或随时间推移失去响应的那些患者)中预防长期并发症。

[0011] 在治疗之前,患者是否会响应特定治疗剂或一类治疗剂通常是不可知的。因此,一般的作为 IBD 患者,特别是 CD 和 UC 患者,在寻求治疗的过程中,在寻找对于特定患者有效的治疗剂(一种或多种)时会涉及大量的试错 (trial and error)。这样的试错对患者而言通常涉及相当的风险和不适,以找到最有效的治疗。因此,需要更有效的测定哪些患者会响应哪些治疗的工具,并将这样的测定整合进对 IBD 患者更有效的治疗方案中。

[0012] 因此有其他诊断生物标记和方法是非常有利的,包括预测诊断生物标记和方法,其可用于客观鉴定最有可能响应使用不同 IBD 治疗剂的治疗的患者,包括靶向 IL-1 β 和/或 IL-18 的疗法,例如多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL18 抗体、或抗 -IL-1 β 抗体和抗 -IL-18 抗体的组合。因此,对于鉴定与溃疡性结肠炎、克罗恩氏病以及其他炎性肠病相关的新生物标记、和预测治疗反应的新生物标记有持续的需求。此外,对于这样的相关性的统计学和生物学显著并可再现的信息可用作鉴定特定 UC 或 CD 患者亚组的努力中的整体部分,所述患者亚群被预期为会从使用某些治疗剂的治疗中显著受益,例如该治疗剂在临床研究中显示或已显示在这样的特定 UC 或 CD 患者亚群中有治疗益处的时候。

[0013] 本文所述的发明满足上述需要的某种,并提供其他益处。

[0014] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请和公开)为了所有目的以其整体引入作为参考。

[0015] 概述

[0016] 本发明至少部分基于鉴定与非 IBD 个体相比,在 IBD 个体肠组织中(在某些情况中,在血清中)差异表达的某些基因。此外,本发明至少部分基于鉴定在例如,克罗恩氏病个体的纤维化肠组织(在某些情况中血清中)差异表达的某些基因,所述差异表达为与非纤维化或炎性组织相比较或血清的情况下,与非 IBD 或非纤维化 / 纤维狭窄型 IBD 个体相

比较。

[0017] 因此,一方面,提供了炎性肠病的诊断或辅助诊断的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从个体获得的生物样品中一种基因或基因组合的表达水平,或所述一种基因或基因组合编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,和 (b) 将 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平相比较,其中所述一种基因或基因组合的水平,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平,高于参考水平则显示个体患有炎性肠病。在某些实施方案中,所述方法还包含提供炎性肠病的诊断,这是当 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于参考水平时。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3 (GCSF), IL-24, SERPINB3, SERPINB4, AMIGO2, SERPINB7, ABAT, PF4, STEAP2, ELN, CCL4, VEGFA, DACT1, KCNMB4, PDLIM4, TGFBR1, KCNE1L, HIF1A, SLC25A45, OSMR, P4HA2, ELF3, TGIF1, TMEM158, COL7A1, COL16A1, 双调蛋白 (AREG), 和 IL-11。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3 (GCSF), TMEM158, COL7A1, COL16A1, 双调蛋白 (AREG), IL-11。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3 (GCSF) 和双调蛋白。在某些实施方案中,所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

[0018] 在一些诊断或辅助诊断炎性肠病的实施方案中,所测量的一种基因或基因组合的表达水平,或所述一种基因或基因组合编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,选自 IL-1 β 、CASP1 和 p20。在某些实施方案中,IL-1 β 、CASP1 和 p20 之一或其组合的表达水平高于参考水平则显示个体患有炎性肠病。在某些实施方案中,所述方法还包含提供炎性肠病的诊断,这是当 IL-1 β 、CASP1 和 p20 之一或其组合的水平高于参考水平时。在某些实施方案中,所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

[0019] 在另一方面,提供了诊断或辅助诊断纤维化克罗恩氏病或纤维狭窄型克罗恩氏病的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从个体获得的生物样品中一种基因或基因组合的表达水平,或所述一种基因或基因组合编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,和 (b) 将 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平相比较,其中所述一种基因或基因组合的水平,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平,高于参考水平则显示个体患有炎性肠病。在某些实施方案中,所述方法还包含提供炎性肠病的诊断,这是当 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于参考水平时。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 COL7A1、COL16A1、双调蛋白、IL-11、AEBP1 和 IL1R1。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 MMP3, INHBA, COL5A2, CHN1, LMCD1, COL12A1, COL7A1, COL18A1, TMEM158, FAM65C, IGFBP5, THY1, TMEM132A, PXDN, GPR68, TWIST1, COL4A1, SERPINH1, AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4 和 TIMP2。在某些实施方案中,所述参考水平通过测量非纤维化组织中同样的一种基因或基因组合,或同样的一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平获得。

[0020] 在某些上述实施方案中,所述生物样品为肠组织。在某些上述实施方案中,所述一种基因或基因组合的表达使用 PCR 方法或微阵列芯片测量。在某些上述实施方案中,所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达使用免疫测定或免疫组织化学测定测量。在一些实施方案中,所述免疫测定为 ELISA 测定。在一些上述实施方案中,所述参考水平通过测量从没有炎性肠病的个体中获得的生物样品中同样的一种基因或基因组合,或同样的一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平获得。

[0021] 在另一方面,提供了诊断或辅助诊断个体中克罗恩氏病亚型的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从个体肠组织获得的生物样品中 IL18 的表达水平,和 (b) 将 (a) 中测量的 IL18 的表达水平与参考水平相比较,其中 IL18 的水平高于参考水平则显示个体患有克罗恩氏病亚型,其中所述亚型为纤维化克罗恩氏病或纤维狭窄型克罗恩氏病。在某些实施方案中,所述方法还包含提供纤维化克罗恩氏病或纤维狭窄型克罗恩氏病的诊断,这是当 (a) 中测量的 IL18 水平高于参考水平时。在某些实施方案中,所述参考水平通过测量从没有炎性肠病的个体的肠组织中获得的生物样品中 IL18 的表达水平获得。在某些实施方案中,所述参考水平通过测量从患有炎性克罗恩氏病的个体的肠组织获得的生物样品中 IL18 的表达水平获得。在某些实施方案中,所述参考水平通过测量从患有溃疡性结肠炎的个体的肠组织获得的生物样品中 IL18 的表达水平获得。在某些实施方案中,表达水平使用免疫测定测量。在某些实施方案中,所述免疫测定为 ELISA 测定。

[0022] 在另一方面,还提供了其他诊断或辅助诊断个体中炎性肠病的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从个体获得的血清样品中 GCSF 的表达水平,和 (b) 将 (a) 中测量的 GCSF 的表达水平与参考水平相比较,其中个体血清样品中 GCS 的水平高于参考水平则显示个体患有炎性肠病。在某些实施方案中,所述方法还包含提供炎性肠病的诊断,这是当 (a) 中测量的 GCSF 水平高于参考水平时。在某些实施方案中,所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或炎性克罗恩氏病,或纤维化克罗恩氏病或纤维狭窄型克罗恩氏病。在某些实施方案中,GCSF 的表达水平使用免疫测定测量。在某些实施方案中,所述免疫测定为 ELISA 测定。在某些实施方案中,所述参考水平通过测量从没有炎性肠病的个体中获得的血清样品中 GCSF 的表达水平获得。

[0023] 一方面,提供了治疗患者中炎性肠病的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从患者处获得的生物样品中一种基因或基因组合的表达水平,或所述一种基因或基因组合编码的一种蛋白质或蛋白质组合的表达,选自 CSF3(GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFBRI、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、双调蛋白 (AREG) 和 IL-11, (b) 将 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的表达水平与参考水平相比较;和 (c) 当 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于参考水平时,对患者施用抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3(GCSF)、TMEM158、Co17A1、Co116A1、双调蛋白 (AREG)、IL-11。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 CSF3(GCSF) 和双调蛋白。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所

述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4、AEBP1、IL1R1 和 TIMP2。在某些实施方案中,所述一种基因或基因组合,或由所述一种基因或基因组合编码的所述一种蛋白质或蛋白质组合,选自 IL-1 β 、CASP1 和 p20。在某些实施方案中,提供了抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体用于治疗患有炎症性肠病的患者,其中当从患者处获得的样品中上述生物标记任意一种的水平高于参考水平时,则对患者进行治疗。在某些实施方案中,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎、或炎症性克罗恩氏病、或纤维化克罗恩氏病、或纤维狭窄型克罗恩氏病。在某些实施方案中,使用 PCR 方法或微阵列芯片测量表达水平。在某些实施方案中,表达水平使用免疫测定或 ELISA 测定测量。

[0024] 在另一方面,提供了治疗患者中炎症性肠病的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从患者肠组织获得的生物样品中 IL18 的表达水平;(b) 将 (a) 中测量的 IL18 的表达水平与参考水平相比较;和 (c) 当 (a) 中测量的所述一种基因或基因组合,或所述一种蛋白质或蛋白质组合的水平高于参考水平时,对患者施用抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体。在某些实施方案中,提供了抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体用于治疗患有炎症性肠病的患者,其中当患者肠组织样品中 IL18 水平高于参考水平时,则对患者进行治疗。在某些实施方案中,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎、或炎症性克罗恩氏病、或纤维化克罗恩氏病、或纤维狭窄型克罗恩氏病。在某些实施方案中,使用 PCR 方法或微阵列芯片测量表达水平。

[0025] 在又一方面,提供了治疗患者中炎症性肠病的方法。在某些实施方案中,所述方法包含 (a) 测量从个体获得的血清样品中 GCSF 的表达水平;(b) 将 (a) 中测量的 GCSF 的表达水平与参考水平相比较;和 (c) 当 (a) 中测量的 GCSF 水平高于参考水平时,对患者施用抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体。在某些实施方案中,提供了抗 -IL-1 β 抗体、抗 -IL-18 抗体、或多特异性抗 -IL-1 β / 抗 -IL-18 抗体用于治疗患有炎症性肠病的患者,其中当患者血清样品中 GCSF 水平高于参考水平时,则对患者进行治疗。在某些实施方案中,所述炎症性肠病是溃疡性结肠炎、或炎症性克罗恩氏病、或纤维化克罗恩氏病、或纤维狭窄型克罗恩氏病。在某些实施方案中,表达水平使用免疫测定或 ELISA 测定测量。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 显示从 IBD 患者或从非 IBD 患者中获得的切除组织中增加的 IL-1 β 水平,如实施例 1 中所述。(A) CD 患者、UC 患者和非 IBD 患者之间 IL-1 β mRNA 水平的比较,疾病状态在横轴显示,相对 mRNA 表达水平在纵轴显示;(B) 由于纤维化或炎症性疾病接受肠切除的 CD 患者中、或来自非 IBD 患者(在横轴显示)的 IL-1 β mRNA 水平的比较;相对 mRNA 表达水平在纵轴显示。所有 mRNA 水平均相对于持家基因 GAPDH 的水平标准化。(C) IL-1 β 蛋白的免疫组织化学染色;上图显示低放大率下的 CD 患者切除组织切片,其显示比周围组织染色更深的区域;下图显示如箭头所示同一切片的高倍率图像。

[0028] 图 2 显示非 IBD、UC 或 CD 活组织检查的免疫印迹分析,如实施例 2 中所述。

[0029] 图 3 显示三种原代上皮成肌纤维细胞系中 mRNA 水平, 其用培养基、IL-1 β 、或 TNF α 刺激后通过 qRT-PCR 测定, 如实施例 1 中所述。在每种情况中, 所得的数据对 GAPDH 标准化。除图 (E) 之外细胞经 24hr 刺激, 图 (E) 中细胞经 6hr 刺激。(A) GCSF ;(B) TMEM158 ;(C) Co17A1 ;(D) Co116A1 ;(E) 双调蛋白 (AREG) ;(F) IL11。

[0030] 图 4 显示用培养基、IL-1 β 、或 TNF α 处理 24 小时的三种原代上皮成肌纤维细胞系处理后, (A) GCSF 和 (B) 双调蛋白的细胞上清 ELISA 结果, 如实施例 1 中所述。

[0031] 图 5 显示 (A) 如所示患有炎症 CD (iCD)、纤维化 / 纤维狭窄型 CD (fCD)、UC、结肠癌、憩室炎的患者中、或健康对照的血清 GCSF 水平 ; LLOD = 检测下限, (B) 结肠裂解物中 IL-1 β 水平和血清 GCSF 之间的相关性, 如实施例 1 中所述。

[0032] 图 6 显示由 qRT-PCR 测定、所示的 CD 组织切片中胶原和纤维化 - 相关基因的 RNA 表达水平, 与 RNA 分离、H&E 染色 (其产生炎症评分)、和 IHC 染色的 SMA 相匹配, 如实施例 1 中所述。切片经病理学家进行 SMA 评分 ; SMA+ 样品被视为有纤维化的证据。(A) 胶原亚型 7A1 ;(B) 胶原亚型 16A1 ;(C) 双调蛋白 ;(D) IL-11 (E) AEBP1 ;(F) IL1R1。

[0033] 图 7 显示来自配对的患者样品肠组织裂解物和血清中 IL18 和 IL18BP 蛋白水平, 如实施例 2 中所述。(A) 肠组织裂解物 IL18 ;(B) 血清 IL18 ;(C) 肠组织裂解物 IL18BP ;(D) 血清 IL18BP ;(E) 肠组织裂解物 IL18:IL18BP 比 ;(F) 炎症 CD (点状圆圈) 和纤维化 CD (虚线边缘的空白圆圈) 的肠组织裂解物 IL18 与血清 IL18BP 比较。

[0034] 发明详述

[0035] 除非另有说明, 本文所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第 2 版, J. Wiley&Sons (New York, N. Y. 1994) 和 March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第 4 版, John Wiley&Sons (New York, N. Y. 1992) 为本领域技术人员提供了本申请中所用的许多术语的一般指导。

[0036] 某些定义

[0037] 为了解释本说明书的目的, 将适用以下定义, 无论何时适当时, 以单数形式使用的术语还将包括复数形式, 反之亦然。在下文所示的任意定义与本文引入作为参考的任意文件冲突时, 将以下文所示的定义为准。

[0038] 除非文中清楚地另有说明, 本说明书和所附权利要求中所用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。因此, 例如提到“一个蛋白质”包括多个蛋白质 ; 提到“一个细胞”包括细胞的混合物等。

[0039] 本说明书和所附权利要求中提供的范围包括两个重点及终点之间的所有点。因此, 例如, 2.0 至 3.0 的范围包括 2.0、3.0 及 2.0 和 3.0 之间的所有点。

[0040] “治疗”及其语法变化形式指改变所治疗的个体或细胞的天然过程的尝试中的临床干预, 且可以为了预防而进行或在临床病理的过程中进行。希望得到的疗效包括预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任意直接或间接的病理结果、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态及缓解或改善预后。

[0041] “治疗方案”指剂量、施用的频率、或治疗的持续时间、加入或不加入第二药物的组合。

[0042] “有效治疗方案”指将向接受该治疗的患者提供有益响应的治疗方案。

[0043] 可以用显示对患者的好处的任意终点来评估“患者响应”或“患者响应性”，其非限制性地包括：(1) 以某种程度抑制疾病进展，包括减慢和完全阻断；(2) 疾病发作和 / 或症状的数目的减少；(3) 损伤大小的减小；(4) 抑制（即减少、减慢或完全阻止）疾病细胞浸润入邻近的外周器官和 / 或组织；(5) 抑制（即减少、减慢或完全阻止）疾病传播；(6) 自身免疫响应的减少，其可以但并非必须导致疾病损伤的消退或消融；(7) 以某种程度减轻与该病症相关的一种或多种症状；(8) 治疗后无疾病呈现的长度增加；和 / 或 (9) 治疗后给点时间点的死亡率降低。术语“响应性”指可测量的响应，包括完全响应 (CR) 和部分响应 (PR)。

[0044] 本文所用的“完全响应”或“CR”意指炎症的所有病征响应治疗而消失或缓解。这并非必然意指该疾病已治愈。

[0045] “部分响应”或“PR”指炎症的严重度响应治疗而降低至少 50%。

[0046] 患者对治疗剂治疗的“有益响应”和类似的用词指来自治疗剂治疗或由于治疗剂治疗而赋予处于胃肠炎性病症风险或患有胃肠炎性病症的患者的临床或治疗益处。这种益处包括来自或由于拮抗剂治疗的患者的细胞或生物学响应、完全响应、部分响应、稳定疾病（无进展或复发）或具有较晚的复发的响应。

[0047] 如此处所使用的，“无响应”或“缺乏响应”或相似表述指对使用治疗剂的治疗不存在完全响应、部分响应、或有益响应。

[0048] 治疗过程中患者的响应性不随时间降低时，“患者保持对治疗的响应性”。

[0049] 如此处所使用的术语“样品”或“试验样品”，指从目的个体获得或衍生的组合物，包含细胞实体和 / 或其他分子实体，有待于例如基于物理，生物化学，化学和 / 或生理学特性进行表征和 / 或鉴定。在一个实施方案中，所述定义涵盖生物来源的血液和其他液体样品及组织样品，例如活检标本或组织培养物或其衍生的细胞。组织样品的来源可以是固体组织，如来自新鲜、冷冻和 / 或防腐器官或组织样品或活组织检查或吸出物；血液或任何血液组分；体液；及来自个体孕育期或发育任意时期或血浆的细胞。术语“样品”或“试验样品”包括在其获得后经过任意方式处理的生物样品，例如用试剂处理，溶解，或富集某些成分，例如蛋白质或多核苷酸，或包埋在半固体或固体基质中用于切片。在此处组织样品的“切片”指组织样品的单个部分或片，例如从组织样品上切下的组织或细胞的薄片。样品包括但不限于、全血、血液来源的细胞、血清、血浆、淋巴液、滑液、细胞抽提物、及其组合。在一个实施方案中，所述样品为临床样品。另一实施方案中，所述样品用于诊断测定。

[0050] 如此处所使用的“参考样品”，指用于比较目的的任何样品、标准、或水平。在一个实施方案中，参考样品从同一个体或患者的身体的健康和 / 或非患病部分（例如，组织或细胞）获得。另一实施方案中，参考样品从同一个体或患者身体的未处理的组织和 / 或细胞获得。在另一实施方案中，参考样品从非个体或患者的身体的健康和 / 或非患病部分（例如，组织或细胞）获得。在另一实施方案中，参考样品从不是个体或患者的单个身体的未处理的组织和 / 或细胞部分获得。

[0051] “胃肠炎性病症”是引起黏膜中的炎症和 / 或溃疡的一组慢性病症。这些病症包括例如炎性肠病（例如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、不确定性结肠炎和感染性结肠炎）、黏膜炎（例如口腔黏膜炎、胃肠黏膜炎、鼻黏膜炎和直肠炎）、坏死性小肠结肠炎和食管炎。

[0052] “炎性肠病”或“IBD”在本文中可互换使用，指引起炎症和 / 或溃疡的肠病，且非限制性地包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

[0053] “克罗恩氏病 (CD)”和“溃疡性结肠炎 (UC)”是未知病因的慢性炎性肠病。与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病可以影响肠的任意部分。克罗恩氏病最突出的特征是肠壁的颗粒状、红紫色水肿增厚。随着炎症的发展,这些肉芽瘤常失去它们的限制边界,并与周围组织结为一体。腹泻和肠梗阻是主要的临床特征。与溃疡性结肠炎一样,克罗恩氏病的过程可以连续的或复发的,轻微的或严重的,但与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病不可通过切除所累及的肠区段治愈。大多数克罗恩氏病患者需要在某个点手术,但随后的复发很常见,通常需要连续的医疗处理。

[0054] 虽然克罗恩氏病可以累及从口至肛门的消化道的任意部分,但它通常出现在回肠结肠、小肠或结肠-肛门直肠区域。在组织病理学上,该疾病表征为不连续的 granulomas、隐窝脓肿、龟裂和口疮性溃疡。炎症性浸润物是混合的,由淋巴细胞 (T 和 B 细胞二者)、浆细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞组成。分泌 IgM 和 IgG 的浆细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞有不成比例的增加。

[0055] 抗炎药物柳氮磺吡啶和 5-氨基水杨酸 (5-ASA) 用于治疗轻度活性的结肠克罗恩氏病,并常在维持疾病的缓解的尝试中使用。Metroidazole 和环丙沙星的功效与柳氮磺吡啶相似,且尤其用于治疗肛周疾病。在更严重的病例中,用皮质类固醇可有效治疗活性恶化,且有时可以维持缓解。硫唑嘌呤和 6-巯基嘌呤也已用于需要长期施用皮质类固醇的患者。已提出这些药物可以在长期预防中发挥作用。不幸的是,在一些患者中发挥作用前,存在非常长的延迟 (长达 6 个月)。抗腹泻药物也可以在一些患者中提供症状减轻。营养疗法或要素膳食可以改善患者的营养状态,并诱导急性疾病的症状改善,但是它不诱导持续的临床缓解。抗生素用于治疗继发性小肠细菌过度生长及治疗化脓性并发症。

[0056] “溃疡性结肠炎 (UC)”伤害大肠。该疾病的过程可以是持续的或复发的,轻微的或严重的。最早的损伤是炎性浸润,在肠腺基部形成脓肿。这些膨胀和破裂的隐窝的合并倾向于将覆盖的黏膜与其血液供应分开,导致溃疡形成。该疾病的症状包括腹部绞痛、下腹痛、直肠出血及频繁的稀排泄物,其主要由具有极少的粪便颗粒的血液、脓和黏液组成。急性、严重或慢性的持续性溃疡性结肠炎可以需要全结肠切除术。

[0057] UC 的临床特征高度可变,且发病可以是潜伏的或突然的,且可以包括腹泻、里急后重和复发性直肠出血。可能发生整个结肠的爆发性累及、中毒性巨结肠、危及生命的紧急情况。肠外表现包括关节炎、脓皮病 gangrenoum、葡萄膜炎和结节性红斑。

[0058] UC 的治疗包括用于轻微病例的柳氮磺吡啶和相关的含水杨酸的药物,用于严重病例的皮质类固醇药物。水杨酸类或者皮质类固醇的局部施用有时是有效的,尤其至在疾病局限于末端肠时,且与全身性使用相比与降低的副作用相关。有时指出需要支持性措施,如施用铁和抗腹泻剂。硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和氨甲喋呤有时也被建议用于顽固性皮质类固醇依赖性病例。

[0059] “有效剂量”指对在必要的剂量和时间内达到希望的治疗或预防结果的有效剂量。

[0060] 本文所用的术语“患者”指希望得到治疗的任意单个个体。在某些实施方案中,本文中的患者是人。

[0061] 本文中的“个体”通常是人。在某些实施方案中,个体是非人哺乳动物。示例性非人哺乳动物包括实验动物、驯养动物、宠物动物、运动动物和家畜动物,例如小鼠、猫、狗、马和牛。通常,该个体符合治疗的条件,例如胃肠炎性病症的治疗。

[0062] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广泛的含义可互换地使用,且包括单克隆抗体(例如,全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,三特异性抗体等,只要它们显示希望的生物学活性),且也可以包括某些抗体片段(如本文更详细地描述)。抗体可以是人、人源化和/或亲和力成熟的抗体。

[0063] “抗体片段”仅包含完整抗体的部分,其中在某些实施方案中,该部分保留与该部分存在于完整抗体中时通常相关的功能的至少一种,一般为多数或全部。在一个实施方案中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合部位,从而保持结合抗原的能力。在另一实施方案中,抗体片段(例如包含Fc区的抗体片段)保留通常与该Fc区存在于完整抗体中时相关的生物学功能的至少一种,如FcRn结合、抗体半寿期调节、ADCC功能和补体结合。在一个实施方案中,抗体片段是单价抗体,其具有基本上类似于完整抗体的体内半衰期。例如,这种抗体片段可以包含与能够赋予该片段体内稳定性的Fc序列连接的抗原结合臂。

[0064] 本文所用的术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可以少量存在的可能的天然存在的突变外,包含该单抗体的群体是相同的。单克隆抗体高度特异,针对单一抗原。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。

[0065] 本文的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体以及这类抗体的片段,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或隶属于特定抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,一条或多条链的其余部分与衍生自另一物种或隶属于另一抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,只要它们显示希望的生物学活性(美国专利号4,816,567;及Morrison等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

[0066] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有来自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中用来自非人物种(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)的具有希望的特异性、亲和力和能力的高变区(供体抗体)的残基取代来自受体的高变区的残基。在一些情况下,用对应的非人残基取代人免疫球蛋白的构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰来进一步改良抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,且全部或基本上全部FR是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节见Jones等,Nature321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。还见以下综述文章及其中引用的参考文献:Vaswani和Hamilton,Ann. Allergy, Asthma&Immunol. 1:105-115(1998);Harris,Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994)。

[0067] “人抗体”是包含对应于人产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或用本文公开的制备人抗体的技术中的任意种制备的抗体。这类技术包括筛选人衍生的组合文库,如噬菌体展示文库(见例如Marks等,J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)及Hoogenboom等,Nucl. Acids Res., 19:4133-4137(1991));用人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系来产生人单克隆抗体(见例如Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal

Antibody Production Techniques and Applications, 55-93 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987; 及 Boerner 等, J. Immunol., 147:86 (1991)); 及在能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的所有组成成分的转基因动物 (例如小鼠) 中产生单克隆抗体 (见例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993); Jakobovits 等, Nature, 362:255 (1993); Bruggermann 等, Year in Immunol., 7:33 (1993))。人抗体的此定义特别排除包含来自非人动物的抗原结合残基的人源化抗体。

[0068] “分离的”抗体是已鉴定并从其天然环境的成分分离和 / 或回收的抗体。它的天然环境的污染成分是将干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质, 且可以包括酶、激素和其他蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在某些实施方案中, 将该抗体纯化至: (1) 通过 Lowry 法测定抗体大于 95wt%, 且常超过 99wt%; (2) 足以通过使用旋杯式测序仪获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度; 或 (3) 考马斯蓝染色或银染的还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 显示同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体, 因为将不存在该抗体的天然环境的至少一种成分。但是, 通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0069] 在本文中使用时, 术语“高变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变结构域的区域, 该区域在序列上高变和 / 或形成结构上确定的环。通常, 抗体包含六个高变区; 三个在 VH(H1、H2、H3) 中, 三个在 VL(L1、L2、L3) 中。许多高变区的描述在使用, 并为本文所涵盖。Kabat 互补决定区 (CDR) 基于序列变异性是最常用 (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。而 Chothia 涉及结构环的定位 (Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM 高变区代表 Kabat CDR 和 Chothia 结构环之间的折衷, 并为 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件所使用。“接触”高变区基于可用的复杂晶体结构的分析。来自这些 HVR 的每一个的残基在下文指出。

[0070]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0071] 高变区可以包含如下的“延伸的高变区”: VL 中的 24-36 或 24-34 (L1)、46-56 或 49-56 或 50-56 或 52-56 (L2) 和 89-97 (L3) 及 VH 中的 26-35 (H1)、50-65 或 49-65 (H2) 和 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。对于这些定义的每一个, 按上文的 Kabat 等编号可变结构域残基。

[0072] “构架”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基外的那些可变结构域残基。

[0073] “人共有构架”是代表人免疫球蛋白 VL 或 VH 构架序列的选择中最常存在的氨基酸残基的构架。通常,人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择来自可变结构域序列的亚型。通常,该序列亚型是如 Kabat 等中的亚型。在一个实施方案中,对于 VL,该亚型是如 Kabat 等中的亚型 κ I。在一个实施方案中,对于 VH,该亚型是如 Kabat 等中的亚型 III。

[0074] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDR 中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,该改变导致抗体对抗原的亲亲和力的改善。在某些实施方案中,亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲亲和力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟的抗体。Marks 等 *Bio/Technology* 10:779-783(1992) 描述了通过 VH 和 VL 结构域改组进行亲和力成熟。Barbas 等 *Proc Nat. Acad. Sci, USA*91:3809-3813(1994); Schier 等 *Gene* 169:147-155(1996); Yelton 等 *J. Immunol.* 155:1994-2004(1995); Jackson 等, *J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995); 和 Hawkins 等 *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992) 描述了 CDR 和 / 或构架残基的随机诱变。

[0075] 本文所用的短语“基本上相似”或“基本上相同”表示两个数值之间的相似性程度足够高,使得本领域技术人员将认为,在通过该值度量的生物学特征的背景中,这两个值之间的差异有很小的或者没有生物学和 / 或统计学显著性。

[0076] “结合亲和力”一般指分子(例如抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,本文所用的“结合亲和力”指内在的结合亲和力,其反映结合对(例如抗体和抗原)的成员之间的 1:1 相互作用。分子 X 对其配偶体 Y 的亲亲和力一般可通过解离常数 (Kd) 来代表。亲和力可以通过本领域公知的方法来测量,包括本文中描述的那些。低亲和力抗体一般缓慢地结合抗原并倾向于容易解离,而高亲和力抗体一般更快地结合抗原并倾向于保持更长久的结合。多种测量结合亲和力的方法为本领域已知。

[0077] 与抗体或免疫球蛋白相关的术语“可变的”指这样的事实,在抗体之间,可变结构域的某些部分的序列差别很大,且用于每种具体抗体对其具体抗原的结合和特异性。但是,可变性并非均匀分布在抗体的整个可变结构域中。它集中在轻链和重链可变结构域中称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个 FR,四个 FR 主要采用 β -折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接 β -折叠结构的环,且在一些情况下形成 β -折叠结构的部分。各条链中的高变区通过 FR 近距离保持在一起,并与来自其他链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 中的参与。

[0078] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合部位和残留的“Fc”片段,其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段,其具有两个抗原结合部位且仍然能够交联抗原。

[0079] “Fv”是包含完整的抗原识别和抗原结合部位的最小抗体片段。此区域由紧密非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。各可变结构域的三个高变区正是在此构型中相互作用来定义 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合部位。六个高变区

共同赋予抗体抗原结合特异性。但是,甚至单个可变结构域(或 Fv 的一半,其仅包含三个对抗原特异的高变区)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力低于整个结合部位。

[0080] Fab 片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同在于,在重链 CH1 结构域的羧基端加入了几个残基,其包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH 是本文对其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基具有至少一个自由巯基的 Fab' 的命名。F(ab')₂ 抗体片段最初作为其间具有铰合部半胱氨酸的 Fab' 片段对产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0081] 根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物物种的抗体的“轻链”分配至称为 κ 和 λ 的两个明显不同的类型之一。

[0082] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体(免疫球蛋白)分配至不同种类。存在五个主要种类的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,这些中的几个可以进一步划分为亚类(同种型),例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。对应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α、δ、ε、γ 和 μ。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型众所周知,且通常描述于例如 Abbas 等 Cellular and Mol. Immunology, 第 4 版(W. B. Saunders, Co., 2000) 中。抗体可以通过该抗体与一种或多种其他蛋白质或多肽的共价或非共价结合形成的更大的融合分子的一部分。

[0083] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指处于其基本上完整的形式抗体,不是下文定义的抗体片段。这些术语尤其指具有含 Fc 区的重链的抗体。

[0084] 为了本文的目的,“裸抗体”是不与细胞毒性部分或放射性标记缀合的抗体。

[0085] 本文所用的术语“Fc 区”用来定义免疫球蛋白重链的 C-端区域,包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可变,但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从 Cys226 位或从 Pro230 位的氨基酸残基延伸至其羧基端。Fc 区的 C-端赖氨酸(EU 编号系统的残基 447) 可以例如在抗体的产生或纯化期间去除,或者通过重组改造编码抗体的重链的核酸来去除。因此,完整抗体的组合物可以包含去除了所有 K447 残基的抗体群体、没有去除 K447 残基的抗体群体及具有含和不含 K447 残基的抗体的混合物的抗体群体。

[0086] 除非另有说明,在本文中,免疫球蛋白重链中的残基的编号是 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991) 中的 EU 指数的编号,其在此明确引入作为参考。“Kabat 中的 EU 指数”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

[0087] “功能性 Fc 区”具有天然序列 Fc 区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括 C1q 结合、依赖补体的细胞毒性、Fc 受体结合、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如 B 细胞受体;BCR) 的下调等。此类效应子功能一般需要 Fc 区与结合结构域(例如,抗体可变结构域) 组合,且可以例如用本文中公开的多种测定来评估。

[0088] “天然序列 Fc 区”包含与见于自然界中的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1Fc 区(非 A 和 A 同种异型);天然序列人 IgG2Fc 区;天然序列人 IgG3Fc 区;天然序列人 IgG4Fc 区;及其天然存在的变体。

[0089] “变体 Fc 区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列 Fc 区的氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,与天然序列 Fc 区或与亲本多肽的 Fc 区相比,变体 Fc

区在天然序列 Fc 区中或在亲本多肽的 Fc 区中具有至少一个氨基酸取代,例如从约一个至约十个氨基酸取代,且在某些实施方案中从约一个至约五个氨基酸取代。在某些实施方案中,本文的变体 Fc 区将与天然序列 Fc 区和 / 或与亲本多肽的 Fc 区具有至少约 80% 同源性,或与之具有至少约 90% 同源性,或与之具有至少约 95% 同源性。

[0090] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整抗体分配至不同“种类”。存在五个主要种类的完整抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 这些中的几个可以进一步划分为亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型众所周知。

[0091] “依赖抗体的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的响应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤 (NK) 细胞、中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体,随后引起靶细胞的裂解。用于介导 ADCC 的主要细胞 (NK 细胞) 仅表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。造血细胞上的 FcR 表达总结在 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991) 的 464 页上的表 3 中。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可以进行体外 ADCC 测定,如描述于美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中的体外 ADCC 测定。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选地,或此外,可以在体内,例如在诸如公开于 Clynes 等 *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998) 中的动物模型中评估目的分子的 ADCC 活性。

[0092] “人效应细胞”是表达一种或多种 FcR 并执行效应子功能的白细胞。在某些实施方案中,该细胞至少表达 Fc γ RIII, 并执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和中性粒细胞。可以从其天然来源,例如从本文所述的血液或 PBMC 分离效应细胞。

[0093] 术语“Fc 受体”或“FcR”用来描述与抗体的 Fc 区结合的受体。在某些实施方案中, FcR 是天然序列人 FcR。此外, FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体), 且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”), 其具有相似的氨基酸序列, 主要在其胞质结构域中不同。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) (见 **Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) 中的综述)。FcR 综述于 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel 等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及 de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中。本文的术语“FcR”涵盖其他 FcR, 包括有待将来鉴定的那些。该术语还包括负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和 Kim 等, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) 并调节免疫球蛋白的稳态的新生儿受体 FcRn。W000/42072 (Presta, L.) 和 US2005/0014934A1 (Hinton 等) 中描述了对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 具有改进的结合和延长的半衰期的抗体。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的 Fc 区, 该取代改善了 Fc 区与 FcRn 的结合。例如, Fc 区可以在位置 238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428 或 434 (残基的 Eu 编号) 的一个或多个上具有取代。在某些实施方案中, 具有改善的 FcRn 结合的包含 Fc 区的抗体变体在其 Fc 区的位置 307、380 和 434 (残

基的 Eu 编号) 的一个、两个或三个上包含氨基酸取代。

[0094] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。在某些实施方案中,Fv 多肽进一步在 V_H 和 V_L 结构域之间包含多肽接头,该多肽接头使得 scFv 能够形成希望的结构用于抗原结合。scFv 的综述见 Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,113 卷,Rosenburg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, 纽约,269-315 页(1994)。HER2 抗体 scFv 片段公开于 W093/16185、美国专利号 5,571,894 和美国专利号 5,587,458 中。

[0095] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合部位的小的抗体片段,该片段包含在同一条多肽链中与可变轻链结构域 (V_L) 连接的可变重链结构域 (V_H) (V_H - V_L)。通过使用太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合部位。双抗体更充分地描述于例如 EP 404,097 ;WO 93/11161 ;和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 中。

[0096] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个高变区中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,该改变导致抗体对抗原的亲合力的改善。在某些实施方案中,亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲合力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟的抗体。Marks 等 *Bio/Technology* 10:779-783(1992) 描述了通过 V_H 和 V_L 结构域改组进行亲和力成熟。Barbas 等 *Proc Nat. Acad. Sci, USA*91:3809-3813(1994) ;Schier 等 *Gene* 169:147-155(1995) ;Yelton 等 *J. Immunol.* 155:1994-2004(1995) ;Jackson 等, *J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995) ; 和 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992) 描述了 CDR 和 / 或构架残基的随机诱变。

[0097] 本文的“氨基酸序列变体”抗体是具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。在某些实施方案中,氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少约 70% 同源性,或者它们将与主要种类抗体具有至少约 80% 或至少约 90% 同源性。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内部或相邻的某些位置上具有取代、缺失和 / 或添加。本文的氨基酸序列变体的实例包括酸性变体(如脱酰胺化的抗体变体)、碱性变体、在其一条或两条轻链上具有氨基端前导序列延伸(例如 VHS-) 的抗体、在其一条或两条重链上具有 C- 端赖氨酸残基的抗体等,且包括重链和 / 或轻链的氨基酸序列的变异的组合。本文的尤其重要的抗体变体是这样的抗体,相对于主要种类抗体,在其一条或两条轻链上包含氨基端前导序列延伸,可选地进一步包含其他氨基酸序列和 / 或糖基化差异。

[0098] 本文的“糖基化变体”抗体是具有附着于该抗体的一个或多个糖类部分的抗体,该糖类部分不同于附着于主要种类抗体的一个或多个糖类部分。本文的糖基化变体的实例包括具有附着于其 Fc 区的 G1 或 G2 寡糖结构而不是 G0 寡糖结构的抗体、具有附着于其一条或两条轻链的一个或两个糖类部分的抗体、没有附着于该抗体的一条或两条重链的糖类的抗体等,以及糖基化改变的组合。在抗体具有 Fc 区时,寡糖结构可以例如在残基 299 (298, 残基的 Eu 编号) 处附着于该抗体的一条或两条重链。

[0099] 本文所用的术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞的功能和 / 或导致细胞的破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和 / 或变体。

[0100] 术语“细胞因子”是由一个细胞群体释放的作为胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通用术语。这类细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和黄体生成素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘促乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;缪勒氏管抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活蛋白;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18;肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;及其他多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。本文所用的术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

[0101] 本文针对辅助疗法所用的术语“免疫抑制剂”指发挥作用来抑制或掩蔽本文所治疗的受试者的免疫系统的物质。这将包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的物质。这类物质的实例包括2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(见美国专利号4,665,077);非类固醇抗炎药(NSAID);更昔洛韦;他克莫司;糖皮质激素,如皮质醇或醛固酮;抗炎剂,如环加氧酶抑制剂;5-脂加氧酶抑制剂;或白三烯受体拮抗剂;嘌呤拮抗剂,如硫唑嘌呤或麦考酚酸酯(MMF);烷化剂,如环磷酰胺;溴隐亭;达那唑;氨苯砞;戊二醛(其掩蔽MHC抗原,如美国专利号4,120,649中所述);MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体;环孢菌素;6-巯基嘌呤;类固醇,如皮质类固醇或糖皮质激素或糖皮质激素类似物,例如泼尼松、甲泼尼龙,包括SOLU-MEDROL、RTM、琥珀酸钠甲基强的松龙和地塞米松;二氢叶酸还原酶抑制剂,如氨甲喋呤(口服或皮下);抗疟疾剂,如氯喹和羟氯喹;柳氮磺吡啶;来氟米特;细胞因子或细胞因子受体抗体或拮抗剂,包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体,抗肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体(英利昔单抗(REMICADE、RTM)或阿达木单抗),抗-TNF- α 免疫黏附素(依那西普)、抗-TNF- β 抗体、抗白介素-2(IL-2)抗体和抗-IL-2受体抗体,及抗白介素-6(IL-6)受体抗体和拮抗剂;抗-LFA-1抗体,包括抗-CD11a和抗-CD18抗体;抗-L3T4抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;泛-T抗体,抗-CD3或抗-CD4/CD4a抗体;含有LFA-3结合结构域的可溶性肽(W090/08187,1990年7月26日公开);链激酶;转化生长因子- β (TGF- β);链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;苯丁酸氮芥;脱氧精胍菌素;雷帕霉素;T-细胞受体(Cohen等,美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等,Science,251:430-432(1991));W090/11294;Janeway,Nature,341:482(1989);和W091/01133);BAFF拮抗剂,如BAFF或BR3抗体或免疫黏附素和zTNF4拮抗剂(综述见Mackay和Mackay,Trends Immunol.,23:113-5(2002),也参见下文的定义);干扰T细胞辅助信号的生物活性剂,如抗-CD40受体或抗-CD40配体(CD154),包括CD40-CD40配体的封闭抗体(例如Durie等,Science,261:1328-30(1993));Mohan等,J.Immunol.,154:1470-80(1995))和CTLA4-Ig(Finck等,Science,265:1225-7(1994));及T-细胞受体抗体(EP340,109),如T10B9。

[0102] 本文所用的术语“改善”指病况、疾病、病症或表型（包括异常或症状）的减少、降低或消除。

[0103] 疾病或病症（例如炎症肠病，例如溃疡性结肠炎或克罗恩氏病）的“症状”是个体经历并指示疾病的任意病态现象或结构、功能或感觉偏离正常。

[0104] 表述“治疗有效量”指对预防、改善或治疗疾病或病症（例如炎症肠病，例如溃疡性结肠炎或克罗恩氏病）有效的量。例如，抗体的“治疗有效量”指对预防、改善或治疗指定的疾病或病症有效的抗体的量。类似地，抗体和第二化合物的组合的“治疗有效量”指组合起来对预防、改善或治疗指定的疾病或病症有效的抗体的量和第二化合物的量。

[0105] 应理解，术语两种化合物的“组合”不意味着该化合物必须在相互的混合物中施用。因此，这种组合的治疗或用途涵盖化合物的混合物或化合物的分开施用，且包括在同一天或不同天施用。因此，术语“组合”意指将两种或多种化合物单独或在相互的混合物中用于治疗。在例如对个体组合施用抗体和第二化合物时，无论该抗体和第二化合物是单独对个体施用还是在混合物中对个体施用，在该第二化合物存在于该个体中时，该抗体也存在于该个体中。在某些实施方案中，在该抗体之前施用抗体以外的化合物。在某些实施方案中，在该抗体之后施用抗体以外的化合物。

[0106] 为了本文的目的，“肿瘤坏死因子- α (TNF- α)”指包含 Pennica 等, *Nature*, 312:721 (1984) 或 Aggarwal 等, *JBC*, 260:2345 (1985) 中所述的氨基酸序列的人 TNF- α 分子。

[0107] 本文的“TNF- α 抑制剂”是一般通过与 TNF- α 结合并中和其活性来以某种程度抑制 TNF- α 的生物学功能的物质。本文特别考虑的 TNF 抑制剂的实例是依那西普 (**ENBREL®**)、英利昔单抗 (**REMICADE®**)、阿达木单抗 (**HUMIRA®**)、戈利木单抗 (SIMPONITM) 和赛妥珠单抗 (**CIMZIA®**)。

[0108] “皮质类固醇”指模拟或扩大天然存在的皮质类固醇的作用的具有类固醇的一般化学结构的几种合成或天然存在的物质中的任意一种。合成的皮质类固醇的实例包括强的松、强的松龙（包括甲基强的松龙）、地塞米松、曲安西龙和倍他米松。

[0109] “拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、废止、降低或干扰具体的或指定的蛋白质的活性（包括其在配体的情况下与一种或多种受体的结合，或在受体的情况下与一种或多种配体的结合）的分子。拮抗剂包括抗体及其抗原结合片段、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、生物有机分子、拟肽、药物制剂及其代谢物、转录和翻译控制序列等。拮抗剂还包括蛋白质的小分子抑制剂、融合蛋白质、与蛋白质特异性结合从而隔离其与它的靶标的结合的受体分子和衍生物、蛋白质的拮抗变体、针对蛋白质的反义分子、RNA 适体和抗蛋白质的核酶。

[0110] 如此处所使用的“寡核苷酸”，指短的单链多核苷酸，至少约 7 个核苷酸的长度，少于约 250 个核苷酸的长度。寡核苷酸可以是合成的。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并非相互排斥的。上述对多核苷酸的描述同样完全适用于寡核苷酸。

[0111] 术语“引物”指单链多核苷酸，其能够与核酸杂交并使得互补核酸聚合，通常通过提供 3'-OH 基进行。

[0112] 术语“扩增”指产生一个或多个拷贝参考核酸序列或其互补序列的过程。扩增可

以是线性或呈指数进行（例如，PCR）。“拷贝”不一定指相对于模板序列完美的序列互补性或同一性。例如，拷贝可包括核苷酸类似物例如脱氧次黄苷，有意的序列改变（例如通过使用包含与模板可杂交、但并非完全互补的序列的引物引入的序列改变），和 / 或在扩增过程中产生的序列错误。

[0113] 术语“检测”包括检测的任何手段，包括直接和间接检测。

[0114] “升高的表达”或“升高的水平”指患者 mRNA 或蛋白质增加的表达，所述增加指相对于对照，例如未患有自身免疫病（例如 IBD）的个体或多位个体，或相对于预先确定的阈值或截断值，或相对于患者和 / 或个体群体的中位数。

[0115] “低表达”或“低表达水平”指患者 mRNA 或蛋白质降低的表达，所述降低指相对于对照，例如未患有自身免疫病（例如 IBD）的个体或多位个体，或相对于预先确定的阈值或截断值，或相对于患者和 / 或个体群体的中位数。

[0116] 术语“多重 PCR”指在从单一来源（例如患者）获得的核酸上进行的单个 PCR 反应，使用多于一个引物组，目的在于在单个反应中扩增两种或多种 DNA 序列。

[0117] 如此处所使用的术语“生物标记”指患者表型的指示物，例如病理状态或对治疗剂可能的响应性，其可在患者的生物样品中检测。生物标记包括但不限于，DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物、或基于糖脂的分子标记。

[0118] 术语“诊断”此处用于指分子或病理状态、疾病或病况的鉴定或分类。例如，“诊断”可指鉴定特定类型的 IBD，例如，UC 或克罗恩氏病。“诊断”还可指 IBD 特定亚型的分类，例如，通过组织病理学标准或分子特征进行（例如，以表达特定基因或由所述基因编码的蛋白质之一或组合为特征的亚型）。

[0119] 术语“辅助诊断”在此用于指协助对特定类型的症状或病况的存在或性质进行临床决定的方法。例如，辅助诊断 IBD 的方法可包含测量来自个体的生物样品中某些基因的表达。

[0120] 如此处所使用的术语“提供诊断”指使用生成的与患者样品中的如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合的水平或存在相关的信息或数据诊断患者中的炎症肠病，包括溃疡性结肠炎，克罗恩氏病，炎性克罗恩氏病，纤维化 / 纤维狭窄型克罗恩氏病。所述信息或数据可为任意形式，书面、口头或电子的。在一些实施方案中，使用生成的信息或数据包括传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配，或其组合。在一些实施方案中，通过计算设备、分析器单元或其组合进行传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配，或其组合。在另一些实施方案中，通过实验室或医学专业人员进行传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配，或其组合。在一些实施方案中，所述信息或数据包括如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合的水平与参考水平的比较。在一些实施方案中，所述信息或数据包括如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合在样品中存在或缺乏的指示。在一些实施方案中，所述信息或数据包括患者被诊断为炎症肠病的指示。在一些实施方案中，所述信息或数据包括患者被诊断为溃疡性结肠炎，克罗恩氏病，炎性克罗恩氏病，或纤维化 / 纤维狭窄型克罗恩氏病的指示。

[0121] 如此处所使用的术语“建议治疗”指使用生成的与患者样品中的如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合的水平或存在相关的信息或数据鉴定患者为用疗法适当治疗或不当治疗的。在一些实施方案中，所述治疗可包含抗 -IL-1 β 抗体和 / 或

抗-IL-18 抗体。所述信息或数据可为任意形式,书面、口头或电子的。在一些实施方案中,使用生成的信息或数据包括传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配,或其组合。在一些实施方案中,通过计算设备、分析器单元或其组合进行传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配,或其组合。在另一些实施方案中,通过实验室或医学专业人员进行传达、展示、报告、储存、发送、转移、提供、传输、分配,或其组合。在一些实施方案中,所述信息或数据包括如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合的水平与参考水平的比较。在一些实施方案中,所述信息或数据包括如此处描述的任一种或多种生物标记或生物标记组合在样品中存在或缺乏的指示。在一些实施方案中,所述信息或数据包括患者的治疗为适当治疗或不当治疗的指示,所述治疗包含抗-IL-1 β 抗体和 / 或抗-IL-18 抗体。

[0122] 术语“预后”在此用于指预测由自身免疫疾病(例如 IBD)的由自身免疫病病症导致的疾病症状的可能性。

[0123] 术语“预测”在此用于指患者将有利或不利响应药物(治疗剂)或药物组或治疗方案的可能性。在一个实施方案中,预测涉及这些响应的程度。在一个实施方案中,预测涉及患者是否将存活和 / 或存活的可能性,或是否改进后续治疗,例如用特定治疗剂治疗和 / 或改进后续治疗,例如用特定治疗剂治疗的可能性,或是否在某段时间疾病不会复发和 / 或在某段时间疾病不会复发的可能性。可在临床上使用如此处描述的预测方法从而通过选择对任意特定患者最合适的治疗形式制定治疗决策。如此处描述的预测方法在预测患者是否可能顺利响应治疗方案(例如给定的治疗方案,包括例如,施用给定的治疗剂或组合、手术干预、类固醇治疗等),或在采用治疗方案后患者是否可能长期存活或缓和或持久缓和中是有价值的工具。

[0124] “对照个体”指未被诊断为具有特定疾病,例如 IBD,且未患有与该疾病相关的任意病症或症状的健康个体。

[0125] “相关”或“相关联”指以任意方式比较第一种分析或方案的性能和 / 或结果和第二种分析或方案的性能和 / 或结果。例如,可使用第一种分析或方案的结果进行第二种方案,和 / 或可使用第一种分析或方案的结果决定是否应进行第二种分析或方案。关于基因表达分析或方案的实施方案,可使用基因表达分析或方案的结果决定是否应进行特定治疗方案。

[0126] 使用“包装说明书”指通常包含在治疗产品或药物的商业包装中的说明书,其包括有关包装产品的指示、用量、剂量、施用、禁忌、可与其组合的其他治疗产品,和 / 或有关这样的治疗产品或药物的使用的警告等等的信息。

[0127] “试剂盒”是包含至少一种试剂,例如治疗 IBD,例如 UC 或克罗恩氏病的药物,或特异性检测例如生物标记基因或蛋白质的探针的任意制品(例如包装或容器)。在某些实施方案中,以单位形式促销、分发或销售所述制品以进行本发明的方法。

[0128] “靶向受众”是对其促销或计划对其促销特定药物的人群或机构,例如通过营销或广告,特别是针对特定用途、治疗或适应证,例如个体患者,患者群体,报纸、医学文献和杂志的读者,电视或互联网观众,广播或互联网听众、医生、药物公司等等。

[0129] 术语“血清样品”指从个体获得的任意血清样品。从哺乳动物获得血清的方法是本领域熟知的。

[0130] 术语“全血”指从个体获得的任意全血样品。一般全血包含所有血液成分,例如,细胞成分和血浆。从哺乳动物获得全血的方法是本领域熟知的。

[0131] 表述“不响应”、“无响应”及其语法变体当涉及个体或患者对之前对其施用的一种或多种药物(治疗剂)的反应时,描述这些个体或患者在施用了这样的药物后没有显示任何或足够的对其治疗中的病症的治疗迹象,或他们显示了临床上不可接受的对药物的高度毒性,或他们在第一次施用这样的药物后没有维持治疗迹象,在此上下文中使用的词语治疗如本文定义。术语“不响应”包括对之前施用的药物抵抗和/或抗拒的那些个体的描述,也包括下述情况,其中个体或患者在接受提供给他/她的药物期间病情进展,和其中个体或患者在涉及他或她不再响应的药物的方案完成后12个月内(例如6个月内)病情进展。因此对一种或多种药物的无响应性包括在以前或现在用所述药物治疗后继续患有活动性疾病的个体。例如,患者在用他们不响应的药物治疗约1-3个月,或3-6个月,或6-12个月可能具有活动性活动。这样的响应性可由擅长治疗所述疾病的临床医生评估。

[0132] 出于对药物无响应的目的,经历来自用一种或多种药物的以前或现在的治疗的“临床上不可接受的高毒性水平”的个体经历有经验的临床医生认为显著的一种或多种与所述药物相关的不利副作用或不良事件,例如,严重感染,充血性心力衰竭,脱髓鞘(导致多发性硬化),显著的超敏性,神经病理事件,高度自身免疫性,癌症例如子宫内膜癌、非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌或黑色素瘤,肺结核(TB),等等。

[0133] 与对患有某些疾病或病症的患者具有增加的临床益处相关的,或与预测对特定治疗剂或治疗方案的响应相关的生物标记的“量”或“水平”是在生物样品中可检测的水平。这可通过本领域技术人员已知的方法以及此处公开的方法测量。评估的生物标记的表达水平或量可用于测定对治疗或治疗剂的响应或预计响应。

[0134] 术语“表达的水平”或“表达水平”一般可互换使用,一般指生物样品中多核苷酸或氨基酸产物或蛋白质的量。“表达”一般指将基因编码信息转化为在细胞中存在和运行的结构的过程。因此,如此处所使用的,基因的“表达”可指转录为多核苷酸、翻译成蛋白质或甚至蛋白质的翻译后修饰。转录的多核苷酸、翻译的蛋白质或翻译后修饰的蛋白质的片段也应被视为表达的,不论其来自通过选择性剪接产生的转录物或降解的转录物,或来自蛋白质的翻译后加工,例如,通过蛋白质水解。“表达的基因”包括转录为mRNA形式的多核苷酸然后翻译成蛋白质的基因,也包括转录为RNA但不翻译成蛋白质(例如,转运和核糖体RNA)的基因。

[0135] 取决于上下文,短语“抗-IL-1 β 抗体和/或抗-IL-18抗体”指,(1)抗-IL-1 β 抗体,或(2)抗-IL-18抗体,或(3)抗-IL-1 β 抗体和抗-IL-18抗体的组合(即两种抗体),或(4)结合IL-1 β 和IL-18二者的抗体。

[0136] 术语“抗-IL-1 β 抗体”和“结合IL-1 β 的抗体”指能够以足够的亲和力结合IL-1 β 的抗体,从而所述抗体可用作靶向IL-1 β 的诊断和/或治疗剂。在一个实施方案中,通过例如放射免疫测定(RIA)测量的抗-IL-1 β 抗体与无关的非IL-1 β 蛋白的结合程度低于抗体与IL-1 β 的结合的约10%。在某些实施方案中,抗-IL-1 β 抗体结合在来自不同物种的IL-1 β 中保守的IL-1 β 表位。

[0137] 术语“抗-IL-18抗体”和“结合IL-18的抗体”指能够以足够的亲和力结合IL-18的抗体,从而所述抗体可用作靶向IL-18的诊断和/或治疗剂。在一个实施方案中,通过

例如放射免疫测定 (RIA) 测量的抗 -IL-18 抗体与无关的非 IL-18 蛋白的结合程度低于抗体与 IL-18 的结合的约 10%。在某些实施方案中,抗 -IL-18 抗体结合在来自不同物种的 IL-1 β 中保守的 IL-18 表位。

[0138] “炎性体介导的疾病”指相对正常的非发炎组织,IL-1 β 和 / 或 IL-18 升高的任意疾病。相对未诱导的对照细胞,一般在炎性体介导的疾病中涉及胱天蛋白酶 1 的加工和 / 或活化,或胱天蛋白酶 1 的加工和 / 或活化升高。可使用市售的测定试剂盒,例如,胱天蛋白酶 1 荧光测定试剂盒 ((货号 ab394120 ;AbCam, Cambridge, MA), 胱天蛋白酶 1 比色测定 (货号 BF14100 ;R&D Systems) 等测量胱天蛋白酶 1 活性。

[0139] 一般来说,如果疾病或病况与体液或组织中升高的 IL-1 β 水平相关或如果从身体取得的细胞或组织在培养时产生升高的 IL-1 β 水平,则将其视为 IL-1 β 相关疾病或病况。类似地,如果疾病或病况与体液或组织中升高的 IL-18 水平相关或如果从身体取得的细胞或组织在培养时产生升高的 IL-18 水平,则将其视为 IL-18 相关疾病或病况。因此,IL-1 β /IL-18 相关疾病或病况是与体液或组织中升高的 IL-1 β 和 IL-18 水平相关或是如果从身体取得的细胞或组织在培养时产生升高的两种细胞因子水平。

[0140] IL-1 β 相关疾病的例子是急性胰腺炎 ;ALS ;恶病质 / 厌食,包括 AIDS 诱发的恶病质 ;哮喘和其他肺部疾病 ;自身免疫性血管炎 ;CIAS1 相关周期性综合征 (CAPS) ;新生儿多系统炎症性疾病 (NOMID/CINCA),幼年特发性关节炎全身型 (systemic onset juvenile idiopathic arthritis),斯提耳氏病 (Stills disease),穆-韦二氏综合征 (Muckle-Wells syndrome),慢性疲劳综合征 ;梭菌属 (Clostridium) 相关疾病,包括梭菌属相关腹泻 ;冠脉病症和适应症,包括充血性心力衰竭,冠状动脉再狭窄,心肌梗死,心肌功能障碍 (例如,与败血症相关的),和冠状动脉旁路移植 ;癌症,例如多发性骨髓瘤和骨髓性 (例如,AML 和 CML) 及其他白血病,以及肿瘤转移 ;糖尿病 (例如,胰岛素糖尿病) ;子宫内膜异位症 ;家族性冷因性自体发炎综合征 (familial Cold Autoinflammatory Syndrome, FCAS) ;家族性地中海热 (FMF) ;发热 ;纤维肌痛 ;肾小球肾炎 ;移植物抗宿主病 / 移植排斥 ;出血性休克 ;痛觉过敏 ;炎性肠病 ;关节的炎性病征,包括银屑病关节炎 (以及骨关节炎和类风湿性关节炎) ;炎性眼病,如可能与例如角膜移植相关的 ;局部缺血,包括脑局部缺血 (例如,由创伤、癫痫、出血或中风引起的脑损伤,均可导致神经变性) ;川崎病 ;学习障碍 ;肺病 (例如,ARDS) ;肌病 (例如,肌肉蛋白代谢,尤其是在败血症中) ;神经毒性 (例如,由 HIV 诱发的) ;骨质疏松症 ;疼痛,包括癌症相关的疼痛 ;帕金森病 ;牙周疾病 ;早产 ;牛皮癣 ;再灌注损伤 ;放射治疗副作用 ;睡眠障碍 ;颞下颌关节疾病 ;肿瘤坏死因子受体相关周期热综合征 (TRAPS) ;眼色素层炎 ;或由拉伤,扭伤,软骨损伤,创伤,整形手术,感染或其他疾病过程导致的炎性病征。

[0141] 白介素 18 在与多种涉及免疫和炎性因素的疾病相关的病理学中发挥重要作用。这些疾病包括但不限于,类风湿性关节炎,骨关节炎,幼年慢性关节炎,莱姆关节炎,银屑病关节炎,反应性关节炎,脊椎关节病,狼疮 (例如,系统性红斑狼疮和狼疮性肾炎),克罗恩氏病,溃疡性结肠炎,炎性肠病,胰岛素依赖性糖尿病,甲状腺炎,哮喘,变应性疾病,银屑病,1 型银屑病,2 型银屑病,皮炎硬皮病,移植物抗宿主病,器官移植排斥,与器官移植相关的急性或慢性免疫疾病,结节病,动脉粥样硬化,弥散性血管内凝血,川崎病,格雷夫斯病,肾病综合征,慢性疲劳综合征,韦格纳肉芽肿, Henoch-Schoenlein purpura,肾显微性血

管炎,慢性活动性肝炎,眼色素层炎,败血症性休克,中毒性休克综合症,脓毒病综合征,恶病质,感染性疾病,寄生虫病,急性横贯性脊髓炎,亨廷顿氏舞蹈症,帕金森病,阿尔茨海默病,中风,原发性胆汁性肝硬化,溶血性贫血,恶性肿瘤,心力衰竭,心肌梗死,艾迪生病,散发性 I 型多腺体缺陷和 II 型多腺体缺陷,施密特氏综合征,成人型呼吸窘迫综合征,脱发, alopecia greata,血清阴性关节病,关节病,赖特尔病,银屑病性关节炎,溃疡性结肠炎关节炎病,肠病性滑膜炎,衣原体、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节炎,脊柱关节炎、动脉粥样硬化疾病 1 动脉硬化,特应性变态反应,自身免疫性大疱病,寻常型天疱疮,落叶性天疱疮,类天疱疮,线状 IgA 疾病,自身免疫性溶血性贫血,库姆斯阳性溶血性贫血,获得性恶性贫血,青少年恶性贫血,肌痛性脑炎/肌痛性脑脊髓炎 (Royal Free Disease),慢性皮肤粘膜念珠菌病,巨细胞动脉炎,原发性硬化性肝炎,原因不明的自身免疫性肝炎,获得性免疫缺陷病综合征,获得性免疫缺陷病相关疾病,丙肝,常见变异性免疫缺陷,常见变异型低丙种球蛋白血症,扩张型心肌病,女性不孕症,卵巢衰竭,卵巢早衰,纤维化肺病,隐源性纤维化肺泡炎,炎症后间质性肺病,间质性肺炎,结缔组织病相关的间质性肺病,混合性结缔组织病相关的肺病,系统性硬化相关的间质性肺病,类风湿性关节炎相关的间质性肺病,系统性红斑狼疮相关的肺病,皮炎/多肌炎相关的肺病,舍格伦病 (**Sjögren's** disease) 相关的肺病,强直性脊柱炎相关的肺病,血管炎性弥漫性肺病,铁质沉着出血相关的肺病,药物诱发的间质性肺病,放射纤维化,闭塞性支气管炎,慢性嗜酸粒细胞性肺炎,淋巴细胞渗透性肺病,感染后间质性肺病,痛风性关节炎,自身免疫性肝炎,1 型自身免疫性肝炎,经典自身免疫性肝炎或狼疮样肝炎,2 型自身免疫性肝炎,抗 LKM 抗体肝炎,自身免疫介导的低血糖症, B 型胰岛素抵抗伴随黑棘皮症,甲状旁腺功能减退,与器官移植相关的急性免疫疾病,与器官移植相关的慢性免疫疾病,骨关节炎,原发性硬化性胆管炎,特发性白细胞减少,自身免疫性中性粒细胞减少,肾病 NOS,肾小球肾炎 (Glomerulonephritis),肾显微性血管炎,莱姆病,盘状红斑性狼疮,特发性或 NOS 男性不育,精子自身免疫,所有亚型的多发性硬化,交感性眼炎,继发于结缔组织病的肺动脉高压,肺出血肾炎综合症,结节性多动脉炎的肺部表现,急性风湿热,类风湿性脊椎炎,斯蒂尔病,系统性硬化,干燥综合征,高安病/动脉炎,自身免疫性血小板减少,特发性血小板减少,自身免疫性甲状腺病,甲状腺功能亢进,甲状腺肿自身免疫性甲状腺功能减退或桥本病,萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退,原发性粘液水肿,晶状体源性葡萄膜炎,原发性血管炎,白斑,急性肝病,慢性肝病,过敏和哮喘,精神障碍,抑郁,精神分裂症, Th2 型和 Th1 型介导的疾病,慢性阻塞性肺病 (COPD),炎性、自身免疫和骨病。

[0142] “分离的”核酸分子是经鉴定的且与在抗体核酸的天然来源中通常与其相关的至少一种污染的核酸分子分离的核酸分子。分离的核酸分子与其在自然界被发现的形式或设置不同。因此分离的核酸分子与天然细胞中存在的核酸分子不同。然而,分离的核酸分子包括在通常表达抗体的细胞中包含的下述核酸分子,例如,其中所述核酸分子位于和天然细胞的核酸分子不同的染色体位置上。

[0143] 此处提及的术语“突起入孔 (knob-into-hole)”或“KnH”指通过在两条多肽相互作用的界面上在一条多肽中引入凸起(突起)且在另一条多肽中引入腔(孔),在体外或体内引导两条多肽选择性配对在一起的技术。例如,KnH 已被引入抗体的 Fc:Fc 结合界面, C₁:C_H1 界面或 V_H/V_L界面(例如,US20007/0178552,WO 96/027011,WO 98/050431 和 Zhu 等 (1997)Protein Science 6:781-788)。在制造多特异性抗体时,这对驱动两条不同重链配

对在一起尤其有用。例如,在其 Fc 区具有 KnH 的多特异性抗体还可包含与每个 Fc 区相连的单个可变结构域,或还包含与相似的或不同的轻链可变结构域配对的不同的重链可变结构域。事实上,KnH 技术可用于将 2 种不同的受体细胞外结构域配对在一起,或配对任意其他包含不同靶向识别序列的多肽序列(例如,包括亲和体 (affibodies),肽体 (peptibodies) 和其他 Fc 融合物)。

[0144] 在最广泛的意义上使用术语“多特异性抗体”,其指具有多表位特异性的抗体。这样的多特异性抗体包括但不限于,包含重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL) 的抗体,其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性,具有两个或多个 VL 和 VH 结构域的抗体,其中每个 V_HV_L 单元结合不同的表位,具有两个或多个单个可变结构域的抗体,其中至少两个单个可变结构域结合不同的表位,全长抗体,抗体片段例如 Fab, Fv, dsFv, scFv, 双抗体,串联抗体,线性抗体和三抗体,共价连接或通过非共价相互作用彼此结合的抗体片段。已用于或可用于制造多特异性抗体的其他抗体形式的例子包括但不限于,双抗体,串联抗体,和单链抗体(例如, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3 和 (scFV)₄-Fc) 的 Fc 融合物,突起 -N- 孔 (KnH) 抗体,章鱼抗体和 DAF 抗体。

[0145] 如此处所使用的“多特异性分子”指具有多表位特异性的分子。“多表位特异性”指特异性结合一种靶向分子上或不同靶向分子上的至少 2 个不同表位的能力(例如,抗 -IL-1 β /IL-18 多特异性抗体)。“单特异性”指仅结合一个表位的能力。根据一个实施方案,多特异性分子以 5 μ M-0.001pM, 3 μ M-0.001pM, 1 μ M-0.001pM, 0.5 μ M-0.001pM 或 0.1 μ M-0.001pM 的亲和力结合每一个表位。如此处所使用的术语“双特异性”指结合 2 个表位的能力。具有或可经改造具有多表位特异性的分子的例子包括但不限于,抗体、亲和体、免疫粘附素、肽体和其他 Fc 融合物。

[0146] 如此处所使用的术语“章鱼”抗体指包含 Fc 区和 Fc 区氨基端的两个或多个抗原结合位点的多价抗体(例如, W001/77342, Wu 等 (2007) Nature Biotechnology, 和 W0 2007/024715)。在一个实施方案中,抗体多肽的结构是 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, 其中 VD1 是第一可变结构域,VD2 是第二可变结构域,Fc 是 Fc 区的一条多肽链,X1 和 X2 代表氨基酸或多肽, n 是 0 或 1。在一个实施方案中, X1 或 X2 是 CH1 结构域, CH1 结构域的一部分,某些其他接头序列,例如 GS 接头或一些其组合(例如, W0 2007/024715 的第 5 页)。

[0147] 如此处所使用的,当核酸被置于与另一核酸序列具有功能关系时,其是“有效连接的”。例如,如果前序列或分泌前导肽的 DNA 被表达为参与抗体分泌的前蛋白,则其与抗体的 DNA 是有效连接的;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则其与编码序列是有效连接的;或如果核糖体结合位点的位置能够促进翻译,则其与编码序列是有效连接的。一般来说,“有效连接”表示连接的 DNA 序列是连续的,在分泌前导肽的情况下是连续且依阅读相的。然而,增强子不一定是连续的。通过在方便的限制性位点连接实现连接。如果这样的位点不存在,依照常规操作使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0148] “肽体”指具有 Fc 结构域的肽序列的融合物。见 2003 年 12 月 9 日发布的美国专利号 6,660,843, Feige 等(以其整体引入作为参考)。其包括与 N-端、C-端、氨基酸侧链或多于一个这些位点连接的一种或多种肽。肽体技术使得能够设计包含靶向一种或多种配体或受体、肿瘤引导肽 (tumor-homing peptides)、膜转运肽等的肽的治疗剂。已证实肽技术在设计多种这样的分子中 useful, 包括线性和二硫化物限制的肽,“串联肽多聚体”(即,

超过一种肽在 Fc 结构域的单链上)。见,例如,美国专利号 6,660,843;在 2003 年 10 月 16 日公开的美国专利申请号 2003/0195156(对应 2002 年 11 月 21 日公开的 WO 02/092620);在 2003 年 9 月 18 日公开的美国专利申请号 2003/0176352(对应 2003 年 4 月 17 日公开的 WO 03/031589);在 1999 年 10 月 22 日提交的美国序列号 09/422,838(对应 2000 年 5 月 4 日公开的 WO 00/24770);在 2003 年 12 月 11 日公开的美国专利申请号 2003/0229023;在 2003 年 7 月 17 日公开的 WO 03/057134;在 2003 年 12 月 25 日公开的美国专利申请号 2003/0236193(对应 2004 年 4 月 8 日提交的 PCT/US04/010989);在 2003 年 9 月 18 日提交的美国序列号 10/666,480(对应 2004 年 4 月 1 日公开的 WO 04/026329),以上每个文件在此以其整体引入作为参考。

[0149] 在此处,“药物组合物”是适应和适合对哺乳动物,尤其是人施用的组合物。因此,所述组合物可用于治疗哺乳动物中的疾病或病症。而且,在所述组合物中的蛋白质已经过一个或多个纯化或分离步骤,使得可能干扰其治疗用途的污染物已与其分离。一般来说,药物组合物包含治疗蛋白质和可药用的载体或稀释剂。所述组合物通常是无菌的且可被冻干。下面更详细地描述药物制剂。

[0150] 本文互换使用的“多核苷酸”或“核酸”指任意长度的核苷酸聚合物,且包括 DNA 和 RNA。该核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰核苷酸或碱基和 / 或它们的类似物,或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶或通过合成反应掺入聚合物中的任意底物。多核苷酸可以包含修饰核苷酸,如甲基化核苷酸和它们的类似物。若存在,对核苷酸结构的修饰可以在组装聚合物之前或之后进行。核苷酸序列可以由非核苷酸成分中断。可以在合成之后如通过与标记缀合来进一步修饰多核苷酸。其他类型的修饰包括,例如“帽”;用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸;核苷酸间修饰,例如具有不带电荷的键(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酰胺、氨基甲酸酯(cabamate)等)和具有带电荷的键(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、包含悬垂部分例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)的那些、具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等)的那些、含有烷化剂(alkylator)的那些、具有修饰键(例如 α 异头核酸等)的那些、以及未修饰形式的多核苷酸。此外,通常存在于糖类中的任意羟基可以例如通过磷酸酯基、磷酸基来取代,通过标准保护基来保护,或活化以制备与其他核苷酸的其他键,或可以与固相或半固相支持体缀合。可以磷酸化或用胺或 1 至 20 个碳原子的有机帽化基团部分取代 5' 和 3' 端的 OH。还可以将其他羟基衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以包含一般为本领域已知的类似物形式的核糖或脱氧核糖糖类,其包括例如 2'-O-甲基-2'-O-烯丙基,2'-氟-或 2'-叠氨基-核糖,碳环糖类似物, α -异头糖类,差向异构糖类如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖类,呋喃糖类,景天庚酮糖,无环类似物和无碱基核苷类似物如甲基核苷。可以通过其他连接基团来取代一个或多个磷酸二酯键。这些其他连接基团包括但不限于其中通过 P(O)S(“硫代酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫代酯(dithioate)”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂(“formacetal”)取代磷酸的实施方案,其中 R 或 R' 独立地是 H 或任选地包含醚(--O--)键的取代或非取代烷基(1-20C)、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。无需多核苷酸中的所有键都相同。前述适用于本文提到的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0151] 术语“受体结合结构域”用于表示受体的任意天然配体,包括细胞粘附分子,或至

少保留对应的天然配体的定性的受体结合能力的这样的天然配体的任意区域或衍生物。特别地,此定义具体包括上述受体的配体的结合序列。

[0152] “分泌信号序列”或“信号序列”指编码短信号肽的核酸序列,所述短信号肽可用于引导新合成的目的蛋白穿过细胞膜,通常是原核细胞的内膜或内膜和外膜二者。这样,目的蛋白例如免疫球蛋白轻链或重链多肽被分泌进原核宿主细胞的周质或培养基中。分泌信号序列编码的信号肽相对宿主细胞可为内源的,或其可为外源的,包括待表达的多肽的天然信号肽。分泌信号序列一般位于待表达的多肽的氨基端,且一般在多肽的生物合成和从细胞质分泌之间被酶促去除。因此,信号肽通常在成熟的蛋白质产物中不存在。

[0153] 词语“单结构域抗体”(sdAb)或“单可变结构域(SVD)抗体”一般指下述抗体,其中单个可变结构域(V_H 或 V_L)可赋予抗原结合。换句话说,单可变结构域不需要与另一可变结构域相互作用以结合靶向抗原。单结构域抗体的例子包括但不限于,天然来源,例如骆驼科(美洲驼和骆驼)和软骨鱼(例如,护士鲨)的抗体和通过重组方法来源于人和小鼠抗体的抗体(Nature(1989)341:544-546;Dev Comp Immunol(2006)30:43-56;Trend Biochem Sci(2001)26:230-235;Trends Biotechnol(2003):21:484-490;WO 2005/035572;WO 03/035694;Febs Lett(1994)339:285-290;W000/29004;WO 02/051870)。

[0154] 如此处所使用的,“治疗抗体”是在患有或易患疾病或病症的哺乳动物中对治疗疾病或病症有效的抗体。

[0155] “靶向分子”指能够结合靶向识别位点的分子。靶向分子:靶向识别位点相互作用的例子包括抗原:抗体可变结构域相互作用,受体:配体相互作用,配体:受体相互作用,粘附素:粘附素相互作用,生物素:链霉抗生物素相互作用等。在一个实施方案中,靶向分子是生物分子。

[0156] 如此处所使用的术语“载体”旨在指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种载体类型是“质粒”,一种环状双链DNA环,其中可连接其他DNA片段。另一种载体类型是噬菌体载体。另一种载体类型是病毒载体,其中可将其他DNA片段连接进病毒基因组。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自我复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞时整合进宿主细胞的基因组,从而与宿主基因组一起复制。此外某些载体能够引导与其有效连接的基因的表达。这样的载体在此处被称为“重组表达载体”(或简称为“重组载体”)。一般来说,在重组DNA技术中使用的表达载体经常为质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。

[0157] “选择性结合”靶向分子的抗体以比其与非靶向分子的其他分子结合显著更高的亲和力结合靶向分子。在本领域接受的多种方法中证明相对结合和/或结合亲和力,包括但不限于:酶联免疫吸附测定(ELISA)和荧光激活细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,通过ELISA测定,抗体以比其与非靶向分子结合高至少约1log浓度的反应性结合靶向分子。

[0158] 在本文中定义或另外表征了多种其它术语。

[0159] 示例抗体

[0160] 可使用可溶性人IL-1 β 或人IL-18,或其片段(任选地与其他分子缀合)作为免疫原用于产生抗体。可选地或另外,可使用表达人IL-1 β 或人IL-18的细胞作为免疫原。这样的细胞可来源于天然来源或可为通过重组技术转化的用于表达人IL-1 β 或人IL-18

的细胞。可用于制备抗体的人 IL-1 β 或人 IL-18 的其他形式对本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0161] a. 多克隆抗体

[0162] 通常通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来在动物中产生多克隆抗体。用双功能剂或衍生剂 (例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、SOCl₂ 或其中 R 和 R¹ 是不同烷基的 R¹N = C = NR) 将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质 (例如匙孔藻血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂) 缀合可以是有益的。

[0163] 通过将例如 100 μ g 或 5 μ g 的蛋白质或缀合物 (分别对于兔或小鼠) 与 3 体积的弗氏完全佐剂组合, 并在多个部位皮内注射该溶液来针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。大约一个月后, 通过在多个部位皮下注射来用弗氏完全佐剂中的初始量的 1/5 至 1/10 的肽或缀合物加强免疫动物。7 至 14 天后, 对动物进行采血, 并测定血清的抗体效价。加强免疫动物, 直至效价平台期。通常, 用同一抗原的缀合物加强免疫动物, 但该抗原与不同的蛋白质缀合和 / 或通过不同的交联剂缀合。缀合物还可以作为蛋白质融合物在重组细胞培养物中制备。另外, 适宜地用诸如明矾的聚集剂来增强免疫响应。

[0164] b. 单克隆抗体

[0165] 单克隆抗体可以用最先由 Kohler 等, Nature, 1975, 256:495 描述的杂交瘤法制备, 或者可以通过重组 DNA 法制备 (见例如美国专利号 4,816,567)。

[0166] 在杂交瘤法中, 按上文所述免疫小鼠或其他适宜的宿主动物 (如仓鼠或猕猴) 来引出淋巴细胞, 该淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体。备选地, 可以体外免疫淋巴细胞。然后将淋巴细胞用适宜的融合剂 (如聚乙二醇) 与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞 (Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页 (Academic Press))。

[0167] 将这样制备的杂交瘤细胞接种和培养在适宜的培养基中, 该培养基通常包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基), 这些物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞的生长。

[0168] 在某些实施方案中, 骨髓瘤细胞是高效融合、通过所选择的产抗体细胞支持抗体的稳定高水平产生, 且对培养基 (例如 HAT 培养基) 敏感的那些。在这些中, 示例性骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系, 如可从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA 获得的衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些, 及可从 American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA 获得的 SP-2, 或 X63-Ag8-653 细胞。还针对人单克隆抗体的产生描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤 (heteromyeloma) 细胞系 (Kozbor, 1984, J. Immunol., 133:3001; Brodeur 等, 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York))。

[0169] 针对抗该抗原的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。在某些实施方案中, 通过免疫沉淀或通过诸如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的体外结合测定来测定杂交瘤产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0170] 鉴定出产生想要的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,即可以通过有限稀释法亚克隆该克隆,并通过标准方法培养 (Goding, 见上文)。适用于此目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,在动物中作为腹水肿瘤体内培养杂交瘤细胞。

[0171] 通过常规免疫球蛋白纯化方法 (例如 A 蛋白 Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析) 从培养基、腹水或血清适宜地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0172] 编码该单克隆抗体的 DNA 易于用常规方法分离和测序 (例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可作为这种 DNA 的一般来源。一旦分离,即将该 DNA 放入表达载体中,然后将该表达载体转染入诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不以其他方式产生免疫球蛋白蛋白质的骨髓瘤细胞的宿主细胞中,以获得单克隆抗体在该重组宿主细胞中的合成。将在下文中更详细描述重组产生抗体。

[0173] 在另一实施方案中,可以从用描述于 McCafferty 等, 1990, *Nature*, 348:552-554 中的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段。Clackson 等, 1991, *Nature*, 352:624-628 和 Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 分别描述了用噬菌体文库分离鼠抗体和人抗体。随后的公开描述了通过链改组产生高亲和力 (nM 范围) 人抗体 (Marks 等, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783, 以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse 等, 1993, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266)。因此,这些技术是除传统单克隆抗体杂交瘤技术之外用于分离单克隆抗体的可行选择。

[0174] 还可以修饰 DNA, 例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列 (美国专利号 4, 816, 567 ;和 Morrison 等, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851), 或通过免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白材料 (例如蛋白质结构域) 的编码序列的全部或部分共价连接。

[0175] 通常,此类非免疫球蛋白材料取代抗体的恒定结构域,或者它们取代抗体的一个抗原结合部位的可变结构域以产生嵌合二价抗体,该嵌合二价抗体包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合部位和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合部位。

[0176] c. 人源化和人抗体

[0177] 人源化抗体具有一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。所述非人氨基酸残基常称为“输入”残基,且通常取自“输入”可变结构域。通常可以按照 Winter 及其同事的方法 (Jones 等人, 1986, *Nature*, 321:522-525 ;Riechmann 等人, 1988, *Nature*, 332:323-327 ; Verhoeyen 等人, 1988, *Science*, 239:1534-1536), 通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代对应的人抗体序列来进行人源化。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4, 816, 567), 其中用对应的来自非人物种的序列取代了基本上不再完整的人可变结构域。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中用来自非人,例如啮齿动物抗体中类似位点的残基取代了一些 CDR 残基,且可能取代一些 FR 残基。

[0178] 用于制备人源化抗体的人可变结构域 (轻链的和重链的二者) 的选择对降低抗原性非常重要。按照所谓的“最佳适合”法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后将最接近于啮齿动物的人序列接受为人构架 (FR) 用于人源化抗体 (Sims 等, 1987, *J. Immunol.* 151:2296 ;Chothia 等, 1987, *J. Mol.*

Biol., 196:901)。另一种方法使用衍生自特定亚型的轻链或重链的所有人抗体的共有序列的特定构架区。同一构架可以用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 ;Presta 等, 1993, J. Immunol. 151:2623)。

[0179] 保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性来人源化抗体也很重要。为了达到此目的, 根据一个实施方案, 通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可得, 并为本领域技术人员所熟悉。说明和显示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序也可得。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中可能的作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样, 可以从受体序列和输入序列选择和组合 FR 残基, 使得达到希望的抗体特征, 如提高的对一种或多种靶抗原的亲和力。通常, CDR 残基直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0180] 可选地, 现在可能产生转基因动物 (例如小鼠), 其在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的所有组成成分。例如, 已描述了嵌合和种系突变体小鼠中抗体重链连接区 (J_H) 基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转入这类种系突变体小鼠将导致在抗原攻击时产生人抗体。见例如 Jakobovits 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 ;Jakobovits 等人, 1993, Nature, 362:255-258 ;Bruggermann 等人, 1993, Year in Immuno., 7:33 ; 和 Duchosal 等人, 1992, Nature 355:258。人抗体还可以来自噬菌体展示文库 (Hoogenboom 等人, 1991, J. Mol. Biol., 227:381 ;Marks 等人, J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597 ;Vaughan 等人, 1996, Nature Biotech 14:309)。

[0181] i. 嵌合抗体和人源化抗体

[0182] 在某些实施方案中, 本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号 4,816,567 ;和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) 中。在一个实例中, 嵌合抗体包含非人可变区 (例如衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、或非人灵长类 (如猴) 的可变区) 和人恒定区。在另一实例中, 嵌合抗体是“种类转换”抗体, 其中种类或亚类已从亲本抗体的种类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0183] 在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 人源化非人抗体来降低对人类的免疫原性, 同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常, 人源化抗体包含一个或多个可变结构域, 其中 HVR, 例如 CDR (或其部分) 衍生自非人抗体, FR (或其部分) 衍生自人抗体序列。人源化抗体还将可选地包含至少部分人恒定区。在一些实施方案中, 用对应的来自非人抗体 (例如从其衍生 HVR 残基的抗体) 的残基取代人源化抗体中的一些 FR 残基, 例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0184] 人源化抗体和制备它们的方法综述于例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) 中, 并进一步描述于例如 Riechmann 等, Nature 332:323-329 (1988) ;Queen 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989) ;美国专利号 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 和 7,087,409 ;Kashmiri 等, Methods 36:25-34 (2005) (描述 SDR(a-CDR) 移植) ;Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (描述“表面重建”) ;Dall'Acqua 等, Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR 改组”) ;Osborn 等, Methods 36:61-68 (2005) ;及 Klimka 等, Br.

J. Cancer, 83:252-260(2000) (描述 FR 改组的“指导选择”方法) 中。

[0185] 可以用来进行人源化的人构架区包括但不限于:用“最适”法选择的构架区(参见例如 Sims 等 J. Immunol. 151:2296(1993));衍生自具体亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的构架区(参见例如 Carter 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992);和 Presta 等 J. Immunol., 151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)构架区或人种系构架区(参见例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008));和衍生自筛选 FR 文库的构架区(参见例如 Baca 等, J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 和 Rosok 等, J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996))。

[0186] 人抗体

[0187] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体一般地描述于 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001) 及 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008) 中。

[0188] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,该转基因动物已修饰为响应抗原攻击而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物通常包含全部或部分人免疫球蛋白基因座,其取代内源免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外,或随机整合入动物的染色体。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已失活。用于从转基因动物获得人抗体的方法的综述参见 Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)。还参见例如描述 XENOMOUSE™技术的美国专利号 6,075,181 和 US 6,150,584;描述 **HuMab®** 技术的美国专利号 5,770,429;描述 K-M **MOUSE®**技术的美国专利号 7,041,870;描述 **VelociMouse®**技术的美国专利申请公开号 2007/0061900。可以例如通过与不同的人恒定区组合来进一步修饰来自这类动物产生的完整抗体的人可变区。

[0189] 还可以通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系(参见例如 Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等, J. Immunol., 147:86(1991))。通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于 Li 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006) 中。其他方法包括描述于例如美国专利号 7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人 IgM 抗体) 和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006) (描述人-人杂交瘤) 中。人杂交瘤技术(三元杂交瘤技术)也描述于 Vollmers 和 Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005) 及 Vollmers 和 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005) 中。

[0190] 还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后将这类可变结构域序列与希望的人恒定区组合。下文描述用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0191] d. 多特异性抗体

[0192] 多特异性抗体具有针对至少 2 种不同抗原的结合特异性。尽管这样的分子可能仅结合 2 种抗原(例如,双特异性抗体, BsAb),当在此处使用时此表达也包括具有其

他特异性的抗体,例如三特异性抗体。BsAb 的例子包括具有一种针对 IL-1 β 的抗原结合位点和针对 IL-18 的另一抗原结合位点的抗体。在一些实施方案中,BsAb 包含针对 IL-1 β 或 IL-18 的第一结合特异性和针对具有细胞质 ITAM 基序的活化受体的第二结合特异性。ITAM 基序结构具有 2 个被 9-11 个氨基酸间隔区隔开的酪氨酸。一般的共有序列是 YxxL/I(x)₆YxxL(Isakov, N., 1997, *J. Leukoc. Biol.*, 61:6-16)。示例的活化受体包括 Fc ϵ RI, Fc γ RIII, Fc γ RI, Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIC。其他活化受体包括,例如, CD3, CD2, CD10, CD161, DAP-12, KAR, KARAP, Fc ϵ RII, Trem-1, Trem-2, CD28, p44, p46, B 细胞受体, LMP2A, STAM, STAM-2, GPVI 和 CD40(见,例如, Azzoni 等, 1998, *J. Immunol.* 161:3493; Kita 等, 1999, *J. Immunol.* 162:6901; Merchant 等, 2000, *J. Biol. Chem.* 74:9115; Pandey 等, 2000, *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng 等, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst 等, 2000, *J. Immunol.* 165:2214)。

[0193] 在一个实施方案中,多特异性抗体包含针对 IL-1 β 的第一结合特异性和针对 IL-18 的第二结合特异性。多特异性(包括双特异性)抗体可制备为全长抗体或抗体片段(例如, F(ab')₂ 双特异性抗体)。双特异性抗体可另外制备为突起入孔或无铰链抗体。在 Segal 等, 2001, *J. Immunol. Methods* 248:1-6 中综述了双特异性抗体。

[0194] 用于制备双特异性抗体的方法为本领域已知。全长双特异性抗体的传统产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein 等, 1983, *Nature* 305:537-539)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(quadromas)产生 10 种不同抗体分子的可能的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)非常麻烦,且产物产率低。WO 93/08829 和 Traunecker 等, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659 中公开了类似的方法。

[0195] 根据不同的方法,将具有希望的结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。该融合可以是与包含至少部分铰链区、CH2 区和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。在某些实施方案中,包含轻链结合所必需的部位的第一重链恒定区(C_{H1})存在于该融合的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果希望)免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染入适宜的宿主生物。在用于构建的不等比例的三条抗体链提供最佳产率时,这在实施方案中调整三个抗体片段的相互比例提供了极大的灵活性。但是,在表达等比例的至少两种抗体链导致高产率时,或在该比例无特定显著性时,可能将两种或全部三种抗体链的编码序列插入一个表达载体中。

[0196] 在本方法的另一个实施方案中,该双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现此不对称结构便于从不想要的免疫球蛋白链组合分离希望的双特异性化合物,因为免疫球蛋白轻链仅存在于该双特异性分子的一半中提供了容易的分离方法。此方法公开于 WO 94/04690 中。产生双特异性抗体的方法的进一步细节见例如 Suresh 等, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210。

[0197] 根据 WO96/27011 中所述的另一种方法,可以改造抗体分子对间的界面来最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比。在一个实施方案中,该界面至少包含抗体恒定结构域的部分 C_{H3} 结构域。在此方法中,用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自

第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。通过用更小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）取代大的氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生与一个或多个大的侧链相同或相似大小的补偿“空洞”。这提供了增加异二聚体的产率超过其他不想要的终产物（如同源二聚体）的机制。

[0198] 双特异性抗体包括交联抗体或“异缀合物”抗体。例如，异缀合物中的抗体之一可以与抗生物素蛋白偶联，另一种与生物素偶联。例如，已提出这类抗体将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞（美国专利号 4,676,980），并用于治疗 HIV 感染（WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089）。可以用任意方便的交联方法产生异缀合物抗体。适宜的交联剂为本领域公知，并连同许多交联技术一起公开于例如，美国专利号 4,676,980 中。

[0199] 还考虑超过二价的抗体。例如，可以制备三特异性抗体。根据 Tutt 等，1991，*J. Immunol.* 147:60。

[0200] 此处也包括具有 3 个或多个功能性抗原结合位点的改造抗体，包括“章鱼抗体”（见，例如 US 2006/0025576A1）。

[0201] 此处的抗体或片段也包括“双重作用 Fab”或“DAF”，其包含结合两种靶的抗原结合位点，例如，IL-1 β 以及 IL-18（见，例如 US 2008/0069820）。

[0202] e. 具有可变铰链区的抗体

[0203] 如此处描述的抗体也可包含变体重链，例如如在 2003 年 10 月 30 日提交的申请序列号 10/697,995 中所述。包含变体重链的抗体包含至少一个形成二硫化物的半胱氨酸残基的改变，使得所述半胱氨酸残基不能形成二硫键。一方面，所述半胱氨酸残基在重链的铰链区中（因此，这样的铰链区在此处被称为“变体铰链区”并可被另称为“无铰链的”）。

[0204] 在一些方面，这样的免疫球蛋白缺乏通常能够形成分子间（例如两条重链之间）或分子内（例如单条多肽链中的 2 个半胱氨酸残基之间）二硫键的完整的重链半胱氨酸库。一般来说，改变（即，使得不能形成二硫键）的半胱氨酸残基形成的二硫键是这样的，即当其不存在于抗体中时不导致免疫球蛋白的正常物理化学和 / 或生物学特性的实质损失。在某些实施方案中，使得不能形成二硫键的半胱氨酸残基是重链铰链区的半胱氨酸。

[0205] 一般通过在宿主细胞中表达下述抗体并从宿主细胞中回收所述抗体产生具有变体重链或变体铰链区的抗体，所述抗体中去除了至少 1 个，至少 2 个，至少 3 个，至少 4 个，或 2-11 个重链间的二硫键。可从多核苷酸编码抗体表达所述抗体，所述抗体包含具有减少的二硫键能力的变体重链，接着从包含多核苷酸的宿主细胞中回收所述抗体。在一个实施方案中，所述重链包含免疫球蛋白重链的变体铰链区，其中使得所述变体铰链区的至少一个半胱氨酸不能形成二硫键。

[0206] 和此处描述的铰链半胱氨酸类似，还预期可使得免疫球蛋白重链中的任意半胱氨酸不能形成二硫键，只要这样的改变不实质减少免疫球蛋白的生物学功能。例如，IgM 和 IgE 缺乏铰链区，但分别包含额外的重链结构域；可使得重链的至少 1 个（在一些实施方案中，所有）半胱氨酸不能形成二硫键，只要其不实质减少重链和 / 或包含所述重链的抗体的生物学功能。

[0207] 重链铰链半胱氨酸是本领域熟知的，例如，在 Kabat, 1991, “Sequences of Proteins of immunological interest”, 同上, 中描述。如本领域公知的，铰链半胱氨酸的数目取决于免疫球蛋白的类型和亚类而变化。见例如，Janeway, 1999, *Immunobiology*, 第四

版, (Garland Publishing, NY)。例如, 在人 IgG1 中, 2 个铰链半胱氨酸被 2 个脯氨酸间隔开, 在分子间二硫键中它们一般与相邻重链的对应物配对。其他例子包括包含 4 个铰链半胱氨酸的人 IgG2, 包含 11 个铰链半胱氨酸的 IgG3, 和包含 2 个铰链半胱氨酸的 IgG4。

[0208] 因此, 在某些实施方案中, 所述方法包括在宿主细胞中表达包含变体铰链区的免疫球蛋白重链, 其中使得变体铰链区的至少一个半胱氨酸不能形成二硫键, 从而允许重链与轻链复合形成生物活性抗体, 并从宿主细胞中回收抗体。

[0209] 可选实施方案包括下述实施方案, 其中使得至少 2, 3, 或 4 个半胱氨酸不能形成二硫键; 其中使得约 2- 约 11 个半胱氨酸不能形成二硫键; 和其中使得变体铰链区的所有半胱氨酸不能形成二硫键。

[0210] 根据此处描述的方法产生的由轻链和重链构成的抗体可由单个多核苷酸或由分开的多核苷酸编码。

[0211] 可通过本领域公知的多种方法中的任意方法, 或鉴于此处描述的标准对本领域技术人员显而易见的方法使得通常参与二硫键形成的半胱氨酸不能形成二硫键。例如, 可将铰链半胱氨酸取代为另一氨基酸, 例如不能形成二硫键的丝氨酸。可通过标准分子生物学技术实现氨基酸取代, 例如定点诱变要修饰的编码铰链区的核酸序列。合适的技术包括在 Sambrook 等, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版中描述的技术, 产生具有变体铰链区的免疫球蛋白的其他技术包括合成编码铰链区的寡核苷酸, 其中要取代的半胱氨酸的密码子被替换为取代氨基酸的密码子。然后可将此寡核苷酸连接进包含其他合适抗体序列, 例如可变区和 Fc 序列 (视情况而定) 的载体骨架。

[0212] 另一实施方案中, 可缺失铰链半胱氨酸。可通过标准分子生物学技术实现氨基酸缺失, 例如定点诱变要修饰的编码铰链区的核酸序列。合适的技术包括在 Sambrook 等, 同上, 中描述的技术。产生具有变体铰链区的免疫球蛋白的其他技术包括合成包含编码铰链区的序列的寡核苷酸, 其中要修饰的半胱氨酸的密码子被缺失。然后可将此寡核苷酸连接进包含其他合适抗体序列, 例如可变区和 Fc 序列 (视情况而定) 的载体骨架。

[0213] f. 使用“凸起入腔”策略形成的双特异性抗体

[0214] 在一些实施方案中, 使用“凸起入腔”策略, 又称“突起入孔”形成双特异性抗体, 所述策略用于在第一和第二多肽间改造界面用于异源寡聚化。在一个实施方案中, 所述界面至少包含抗体恒定结构域的 CH3 结构域的一部分。已报道在 Fc 序列的 CH3 结构域中的“突起入孔”突变大大降低了同源二聚体的形成 (见, 例如, Merchant 等, 1998, *Nature Biotechnology*, 16:677-681)。通过将第一多肽界面上的小氨基酸侧链替换为较大的侧链 (例如酪氨酸或色氨酸) 构建“凸起”。任选地, 通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链 (例如丙氨酸或苏氨酸) 在第二多肽的界面上构建与凸起相同或类似大小的互补“腔”。当在第一或第二多肽的界面上存在位置和空间合适的凸起或腔时, 仅需要在相邻界面上分别改造对应的腔或凸起。可通过合成方法, 例如改变编码多肽的核酸, 或通过肽合成制造凸起和腔。有关突起入孔的详细描述见美国专利号 5, 731, 168 ; 5, 807, 706 ; 5, 821, 333。

[0215] 在一些实施方案中使用“突起入孔”技术促进异源二聚化以产生全长双特异性抗 Fc γ RIIB 和抗“活化受体” (例如, IgER) 抗体。在一个实施方案中, 通过在 Fc 区引入“突起”突变 (T366W) 制备抗 Fc γ IIB 部分 (例如, p5A6. 11. 突起) 的构建体, 通过引入“孔突变” (T366S, L368A, Y407V) 制备抗 IgER 部分 (例如, p22E7. 11. 孔) 的构建体。在另一实

实施方案中,通过在其 Fc 区中引入“孔”突变制备抗 Fc γ IIB 部分(例如,p5A6.11.孔)的构建体,通过在其 Fc 区中引入“突起”突变制备抗 IgE 部分(例如,p22E7.11.突起)的构建体,例如通过此处公开的步骤或在 Merchant 等,(1998),同上,或美国专利号 5,731,168 ; 5,807,706 ;5,821,333 中公开的步骤。

[0216] 使用“凸起入腔”策略制备异源二聚体的一般方法包括在一种或分别的宿主细胞中表达已从原始多核苷酸改造为编码凸起的编码第一多肽的多核苷酸,和已从原始多核苷酸改造为编码腔的编码第二多肽的多核苷酸。在共同的宿主细胞中表达多肽,从宿主细胞培养物中回收异源多聚体,或在分别的宿主细胞中表达多肽,回收和纯化后形成异源多聚体。在一些实施方案中,形成的异源多聚体是多聚体抗体,例如双特异性抗体。又见在 2011 年 4 月 22 日提交的美国专利申请序列号 13/092,708。

[0217] 在一些实施方案中,抗体组合了突起入孔策略和变体较链区构建体以产生无铰链的双特异性抗体。

[0218] 载体、宿主细胞和重组方法

[0219] 还提供分离的编码本文公开的抗体的多核苷酸、包含该多核苷酸的载体和宿主细胞及用于产生该抗体的重组技术。

[0220] 为了重组产生抗体,分离编码抗体的多核苷酸,并将其插入可复制载体用于进一步克隆(DNA 的扩增)或用于表达。编码抗体的 DNA 易于用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的基因的寡核苷酸探针)。许多载体可用。载体成分一般包括但不限于以下一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0221] (i) 信号序列组件

[0222] 此处描述的抗体可重组产生,不仅可直接重组产生,而且可以与异源抗体的融合抗体形式重组产生。在一个实施方案中,异源抗体是信号序列或在成熟蛋白质或抗体的 N-端具有特异性切割位点的其他抗体。选定的异源信号序列通常是宿主细胞识别和加工(即通过信号肽酶切割)的信号序列。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,将信号序列替换为例如,选自碱性磷酸酶、青霉素酶、1pp 或热稳定肠毒素 II 前导的原核信号序列。对于酵母分泌,可将天然信号序列替换为例如,酵母转化酶前导、 α 因子前导(包括酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) α -因子前导),或酸性磷酸酶前导、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导或在 WO 90/13646 中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,可使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导,例如,单纯疱疹 gD 信号。将这样的前体区 DNA 连接进编码抗体的 DNA 阅读框中。

[0223] 另一实施方案中,可在宿主细胞的细胞质中产生抗体,因此不需要在每个顺反子中存在分泌信号序列。在该种情况下,免疫球蛋白轻和重链在细胞质中表达、折叠并组装以形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌(*E. coli*)trxB 菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质环境,因此允许表达的蛋白质亚基的正确折叠和组装(Proba 和 Plukthun,1995, *Gene*, 159:203)。

[0224] g. (ii) 复制起点组件

[0225] 表达和克隆载体都包含使载体能够在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。一般来说,在克隆载体中此序列是使载体能够独立于宿主染色体 DNA 复制的序列,

其包括复制起点或自主复制序列。对多种细菌、酵母和病毒这样的序列是熟知的。质粒 pBR322 的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 质粒起点适用于酵母, 多种病毒起点 (SV40, 多瘤病毒, 腺病毒, VSV 或 BPV) 可用于哺乳细胞中的克隆载体。一般来说, 哺乳动物表达载体不需要复制起点元件 (一般使用 SV40 起点仅因为其包含早期启动子)。

[0226] h. (iii) 选择基因组件

[0227] 表达和克隆载体可包含选择基因, 又称可选标记。一般选择基因编码 (a) 赋予对抗生素或其他毒素例如, 氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素的抗性, (b) 补足营养缺陷, 或 (c) 提供从复合培养基得不到的关键营养素 (例如, 编码芽胞杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因) 的蛋白质。

[0228] 选择方案的一个实例利用药物阻止宿主细胞的生长。成功转化了异源基因的那些细胞产生赋予药物抗性的蛋白质, 因此在选择方案下存活。这样的显性选择的例子使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0229] 用于哺乳动物细胞的合适的可选标记的另一实施例是使得能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的标记, 例如 DHFR, 胸苷激酶, 金属硫蛋白 -I 和 II, 例如, 灵长类动物金属硫蛋白基因, 腺苷脱氨酶, 鸟氨酸脱羧酶等等。

[0230] 例如, 首先通过在包含甲氨蝶呤 (Mtx), 一种 DHFR 的竞争性拮抗剂的培养基中培养所有转化体鉴定用 DHFR 选择基因转化的细胞。当使用野生型 DHFR 时, 合适的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0231] 可选地, 可通过在含有针对可选标记, 例如氨基糖苷抗生素, 例如, 卡那霉素、新霉素或 G418 的选择剂的培养基中培养细胞选择用编码抗体、野生型 DHFR 蛋白和另一可选标记例如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列转化的或共转化的宿主细胞 (特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主)。见美国专利号 4, 965, 199。

[0232] 用于酵母的合适的选择基因是在酵母质粒 YRp7 中存在的 trp 1 基因 (Stinchcomb 等, 1979, Nature, 282:39)。trp1 基因提供用于缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株, 例如, ATCC No. 44076 或 PEP4-1 的选择标记。Jones, 1977, Genetics, 85:12。在酵母宿主细胞基因组中的 trp1 损伤的存在随后为通过在缺乏色氨酸下生长检测转化提供了有用的环境。类似地, 通过具有 Leu2 基因的已知质粒补足 Leu2 缺陷型酵母菌株 (例如, 具有 ATCC 登记号 20, 622 或 38, 626 的菌株)。

[0233] 此外, 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 衍生的载体可用于克鲁维酵母的转化。可选地, 有研究报导了在乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。见 Van den Berg, 1990, Bio/Technology, 8:135。用于通过克鲁维酵母工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体也已被公开。见 FLeer 等, 1991, Bio/Technology, 9:968-975。

[0234] i. (iv) 启动子组件

[0235] 表达和克隆载体通常包含宿主生物识别的且与抗体核酸有效连接的启动子。适用于原核宿主的启动子包括 phoA 启动子, β -内酰胺酶和乳糖启动子系统, 碱性磷酸酶, 一种色氨酸 (trp) 启动子系统, 和杂合启动子, 例如 tac 启动子。然而, 其他已知的细菌启动子是合适的。用于细菌系统的启动子也将包含与编码抗体的 DNA 有效连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0236] 用于真核细胞的启动子序列是公知的。实际上所有真核基因都具有位于转录起始位点上游约 25-30 碱基的 AT 富集区。在许多基因的转录起始上游 70-80 碱基发现的另一序列是 CNCAAT 区,其中 N 可为任意核苷酸。大多数真核基因的 3' 末端为 AATAAA 序列,其可能是用于在编码序列的 3' 末端添加多聚 A 尾巴的信号。所有这些序列都适合插入真核表达载体中。

[0237] 用于酵母宿主的合适的启动序列的例子包括 3- 磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶,例如烯醇酶,甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖 -6- 磷酸异构酶,3- 磷酸甘油酸变位酶,丙酮酸激酶,磷酸丙糖异构酶,磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶的启动子。

[0238] 作为通过生长条件控制的具有其他转录优势的诱导型启动子的其他酵母启动子是乙醇脱氢酶 2,异细胞色素 (isocytochrome)C,酸性磷酸酶,与氮代谢相关的降解酶,金属硫蛋白,甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。用于酵母表达的合适的载体和启动子在 EP 73,657 中进一步描述。也有利地与酵母启动子一起使用酵母增强子。

[0239] 在哺乳动物宿主细胞中抗体从载体的转录是受启动子控制的,例如,从病毒基因组得到的启动子,所述病毒例如多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒(例如腺病毒 2),牛乳头瘤病毒,禽肉瘤病毒,巨细胞病毒,逆转录病毒,乙肝病毒和猿猴病毒 40(SV40);异源哺乳动物启动子,例如,肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子;热休克启动子,只要这样的启动子与宿主细胞系统相容。

[0240] 以 SV40 限制性片段形式方便地得到也包含 SV40 病毒复制起点的 SV40 病毒的早期和晚期启动子。以 HindIII E 限制性片段形式方便地得到人巨细胞病毒的立即早期启动子。在美国专利号 4,419,446 中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体用于在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。在美国专利号 4,601,978 中描述了此系统的修饰形式。又见 Reyes 等,1982, Nature297:598-601,其描述了人 β -干扰素 cDNA 在小鼠细胞中的表达,以来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制。可选地,可使用劳氏肉瘤病毒的长末端重复作为启动子。

[0241] j. (v) 增强子元件组件

[0242] 在高等真核生物中编码抗体的 DNA 的转录常常通过在载体中插入增强子序列增强。现在已知许多来自哺乳动物基因(球蛋白,弹性蛋白酶,白蛋白, α -胎蛋白和胰岛素)的增强子。然而,一般将使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括在复制起点后侧(bp 100-270)的 SV40 增强子,巨细胞病毒早期启动子增强子,在复制起点后侧的多瘤病毒增强子,和腺病毒增强子。又见 Yaniv,1982, Nature 297:17-18,其描述了活化真核启动子的增强元件。可将增强子在抗体编码序列的 5' 或 3' 位置剪接进载体,但一般位于启动子的 5' 位置。

[0243] k. (vi) 转录终止组件

[0244] 在真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物的有核细胞)中使用的表达载体将也包含转录终止和稳定 mRNA 所必需的序列。这样的序列通常可从真核生物或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' (偶尔 3') 非翻译区得到。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译部分中被转录为多聚腺苷酸片段的核苷酸片段。一种有用的转录终止组件是牛生长激素多聚腺苷酸化区。见 W094/11026 和其中公开的表达载体。

[0245] l. (vii) 翻译强度的调节

[0246] 也可在下述表达系统中表达此处描述的免疫球蛋白,其中可调节表达的轻链和重链的数量比以最大化分泌的和正确组装的全长抗体的产量。通过同时调节轻链和重链的翻译强度实现这样的调节。

[0247] 在 Simmons 等,美国专利号 5,840,523 和 Simmons 等,2002, *J. Immunol. Methods*, 263:133-147 中公开了一种用于调节翻译强度的技术。其利用顺反子内翻译起始区 (TIR) 的变体。对给定的 TIR,可构建一系列具有翻译强度范围的氨基酸或核酸序列变体,因此提供了调节此因子的便利方法用于特定链的预期表达水平。可通过常规的诱变技术产生 TIR 变体,其导致可改变氨基酸序列的密码子变化,尽管在核苷酸序列中的沉默变化是常见的。在 TIR 中的改变可包括,例如,Shine-Dalgarno 序列的数量或间隔的改变,以及信号序列中的改变。产生突变的信号序列的一种示例方法是在编码序列的起点生成不改变信号序列的氨基酸序列(即,变化是沉默的)的“密码子库”。这可通过改变每个密码子的第三位核苷酸实现;另外,一些氨基酸,例如亮氨酸、丝氨酸和精氨酸具有多重第一和第二位,这可增加构建库的复杂性。在 Yansura 等人,1992, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.*, 4:151-158 中详细描述了此诱变方法。

[0248] 在一些实施方案中,构建了一组对其中每个顺反子具有一系列 TIR 强度的载体。此有限组合提供了在不同 TIR 强度组合下每条链的表达水平以及全长产物的产量的比较。可通过对如 Simmons 等,美国专利号 5,840,523 和 Simmons 等,2002, *J. Immunol. Methods*, 263:133-147 中详细描述的报告基因的表达水平的定量测定 TIR 强度。在某些实施方案中,将载体内特定 TIR 配对的翻译强度组合表示为 (N-轻, M-重),其中 N 是轻链的相对 TIR 强度, M 是重链的相对 TIR 强度。例如, (3-轻, 7-重) 的意思是载体提供约 3 的相对 TIR 强度的轻链表达和约 7 的相对 TIR 强度的重链表达。基于翻译强度比较,选择在表达载体构建体中组合的期望的个体 TIR。

[0249] m. (viii) 选择和转化宿主细胞

[0250] 适合用于克隆或表达本文的载体中的 DNA 的宿主细胞是上文所述的原核生物、酵母或高级真核生物细胞。适合用于此目的的原核生物包括古生菌纲 (Archaeobacteria) 和真细菌界 (Eubacteria), 如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 如埃希氏菌属 (*Escherichia*), 例如大肠杆菌, 肠杆菌属 (*Enterobacter*), 欧文氏菌属 (*Erwinia*), 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*), 变形杆菌属 (*Proteus*), 沙门氏菌属 (*Salmonella*), 例如, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*), 沙雷氏菌属 (*Serratia*), 例如 *Serratia marcescans*, 志贺氏菌属 (*Shigella*), 以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*), 如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如, 1989 年 4 月 12 日公开的 DD 266, 710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一个大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446), 虽然诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27, 325) 的其他菌株也适宜。这些实例是说明性的而非限制性的。还有用的是宿主细胞分泌最小量的蛋白裂解酶, 并且另外的蛋白酶抑制剂可能理想地被掺入到细胞培养物中。原核宿主细胞也可以包含在硫氧还蛋白和 / 或谷胱甘肽途径中的一个或多个突变。

[0251] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是适合用于编码抗体的载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常见的面包酵母是低级真核宿主微生物中最常用的。但是,许多其他属、种和菌株是通常可得到的,并在本文中使用的,如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、瓦尔提克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*);耶氏酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属 (*Candida*);里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*),如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,例如脉孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0252] 适合用于表达糖基化的抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定了来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的宿主的许多杆状病毒株和变体及对应的受纳昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株是公开可得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 病毒株,且可以将这类病毒用作本文的病毒,尤其是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0253] 脊椎动物宿主细胞被广泛使用,且在培养物(组织培养物)中繁殖脊椎动物细胞已成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系 (293 或为在悬浮培养物中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.* 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216);小鼠支持细胞 (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243-251);猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34);buffalo 大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75);人肝细胞 (Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51);TRI 细胞 (Mather 等, 1982, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68);MRC 5 细胞;FS4 细胞;小鼠骨髓瘤细胞,例如 NS0 (例如 RCB0213, 1992, *Bio/Technology* 10:169) 和 SP2/0 细胞 (例如 SP2/0-Ag14 细胞, ATCC CRL 1581);大鼠骨髓瘤细胞,例如 YB2/0 细胞 (例如 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞, ATCC CRL 1662);和人肝细胞瘤系 (Hep G2)。CHO 细胞是用于实施本文描述的方法的示例性细胞系,有 CHO-K1, DUK-B11, CHO-DP12, CHO-DG44 (*Somatic Cell and Molecular Genetics* 12:555(1986)), 且 Lec13 是示例性宿主细胞系。在 CHO-K1、DUK-B11、DG44 或 CHO-DP12 宿主细胞的情形中,这些可以被改变,从而它们在果糖基化其中表达的蛋白质的能力方面有缺陷。

[0254] 也可使用杂交瘤细胞。术语“杂交瘤”指通过融合免疫来源的永生细胞系和抗体生成细胞产生的杂交细胞系。术语涵盖异源杂交骨髓瘤融合物的后代,所述融合物是人细胞和鼠骨髓瘤细胞系融合,随后与浆细胞融合的结果,通常被称为三源杂交瘤细胞系。此外,术语旨在包括任意产生抗体的永生杂交细胞系,例如,四源杂交瘤(见,例如, Milstein 等,1983, Nature, 537:3053)。杂交细胞系可为任意物种的,包括人和小鼠。

[0255] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞是非杂交瘤哺乳动物细胞,其已被编码目的抗体的外源分离核酸转化。“外源核酸”或“异源核酸”指与细胞异源的核酸序列,或与细胞同源但处于宿主细胞核酸内通常不存在所述核酸的位置上。

[0256] n. (ix) 培养宿主细胞

[0257] 用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在根据诱导启动子、选择转化体或扩增编码希望的序列的基因的需要改变的常规营养培养基中培养。

[0258] 可以在多种培养基中培养用于产生抗体的宿主细胞。诸如 Ham's F10(Sigma)、Minimal Essential Medium(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma) 和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Sigma) 的市售培养基适合用于培养宿主细胞。此外,可以将 Ham 等,1979, Meth. Enz. 58:44; Barnes 等,1980, Anal. Biochem. 102:255; 美国专利号 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或 5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利公开 30,985 中所述的培养基中的任意种用作宿主细胞的培养基。可以根据需要向任意这些培养基中补充激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如 HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如 GENTAMYCIN. TM. 药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围内的终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等同的能量来源。还可以按本领域技术人员已知的适当浓度包含任意其他必需的补充物。诸如温度、pH 等的培养条件是之前用于所选择的表达宿主细胞的那些,且对普通技术人员而言显而易见。

[0259] 所有培养基一般提供一个或多个以下类别中的至少一种成分:

[0260] 1) 能量来源,通常以糖类例如葡萄糖的形式;

[0261] 2) 所有必需氨基酸,通常是 20 种氨基酸的基本组加胱氨酸;

[0262] 3) 维生素和/或其他低浓度需要的有机化合物;

[0263] 4) 游离脂肪酸;和

[0264] 5) 微量元素,其中微量元素被定义为一般以极低浓度需要的无机化合物或天然存在元素,通常在微摩尔范围内。

[0265] 在某些实施方案中,培养基不含血清,例如低于约 5%,或低于 1%,或 0-0.1% 血清和其他动物来源蛋白质。然而,如需要可使用它们。在一个实施方案中,细胞培养基包含过量氨基酸。过量提供的氨基酸可为,例如,选自 Asn, Asp, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr 和 Val。在一个实施方案中,过量提供 Asn, Asp, Lys, Met, Ser 和 Trp。例如,可以在欧洲专利 EP 307,247 或美国专利号 6,180,401 中指定的范围的 1 或 2 倍使用氨基酸、维生素、微量元素和其他培养基成分。此处引入这两份文件作为参考。

[0266] 为了培养表达期望蛋白质且能够在特定位置添加期望的糖类的哺乳动物细胞,可特别注意要培养的宿主细胞使用多种培养条件。合适的哺乳动物细胞培养条件是本领域熟知的(W. Louis Cleveland 等,1983, J. Immunol. Methods 56:221-234) 或可由熟练技术人

员容易地确定(见,例如,Animal Cell Culture:A Practical Approach 第二版,Rickwood, D. 和 Hames, B. D. 编, Oxford University Press, New York(1992)),并根据选定的特定宿主细胞而变化。

[0267] 6. (x) 抗体纯化

[0268] 在使用重组技术时,抗体可以在胞内产生,产生在周质空间中,或者直接分泌进入培养基。如果抗体在胞内产生,作为第一步骤,例如通过离心或超滤去除颗粒碎片(宿主细胞或裂解片段)。Carter 等,1992,Bio/Technology 10:163-167 描述了用于分离分泌至大肠杆菌的周质空间的抗体的方法。简言之,在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下融化细胞糊约 30 分钟。通过离心去除细胞碎片。在抗体分泌进入培养基时,通常首先用市售蛋白质浓缩滤器(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元)浓缩来自这类表达系统的上清。可以在任意前述步骤中包含蛋白酶抑制剂(如 PMSF)来抑制蛋白水解,且可以包含抗生素来防止外来污染物的生长。

[0269] 可以用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析纯化从细胞制备的抗体组合物,亲和层析是示例性的纯化技术。A 蛋白作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任意免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。可以用 A 蛋白来纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark 等,1983,J. Immunol. Meth. 62:1-13)。建议 G 蛋白用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss 等,1986,EMBO J. 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用琼脂糖,但其他基质也可用。与用琼脂糖可以达到的流速和处理时间相比,机械稳定的基质(如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯)允许更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含 $C_{\mu}3$ 结构域时,用 Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。取决于待回收的抗体,用于蛋白质纯化的其他技术(如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、二氧化硅上的层析、肝素 SEPHAROSE™上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀)也可用。

[0270] 在一个实施方案中,可使用凝集素基质(例如凝集素亲和柱)吸附纯化糖蛋白以从制品中去除含果糖的糖蛋白,从而富集不含果糖的糖蛋白。

[0271] p. (xi) 抗体活性测定

[0272] 可通过本领域公知的多种测定表征免疫球蛋白的物理/化学性能和生物学功能。一方面,比较抗体结合免疫原相对其他结合靶的选择性很重要。

[0273] 在某些实施方案中,分析了此处产生的免疫球蛋白的生物学活性。在一些实施方案中,检测了免疫球蛋白的抗原结合活性。本领域公知的且可在此处使用的抗原结合测定包括但不限于任意直接或竞争性结合测定,使用例如蛋白质印迹,放射免疫测定,ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定,免疫沉淀测定,荧光免疫测定和蛋白质 A 免疫测定技术。在下面的实施例章节提供了说明性的抗原结合测定。

[0274] 可通过一系列测定进一步表征纯化的免疫球蛋白,包括但不限于,N-端测序,氨基酸分析,非变性大小排阻高压液相色谱(HPLC),质谱,离子交换层析和木瓜蛋白酶消化。用于蛋白质定量的方法是本领域熟知的。例如,可在考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 上比较表达的蛋白质样品的定量强度。可选地,可通过例如,蛋白质印迹凝胶分析和/或 AME5-RP 测定检测特定目的条带(例如全长条带)。

[0275] 药物制剂

[0276] 通过将具有希望的纯度的抗体与可选的生理可用载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 编辑 (1980)) 混合, 以冻干制剂或水溶液的形式制备抗体 / 多种抗体的治疗制剂用于保存。可用载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对受体无毒性, 且包括缓冲剂, 如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六甲双铵; 苯扎氯铵、苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (小于约 10 个残基) 抗体; 蛋白质, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他糖类, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 如 EDTA; 糖, 如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐抗衡离子, 如钠; 金属络合物 (例如, Zn-蛋白质络合物); 和 / 或非离子型表面活性剂, 如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇 (PEG)。此处的示例可药用载体还包括间质 (insterstitial) 药物分散剂, 例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP), 例如, 人可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白, 例如 rHuPH20 (**HYLENEX®**, Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号 2005/0260186 和 2006/0104968 中描述了某些示例 sHASEGP (包括 rHuPH20) 及其使用方法。一方面, sHASEGP 与一种或多种其他糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

[0277] 示例的冻干抗体制剂在美国专利号 6, 267, 958 中描述。水性抗体制剂包括在美国专利号 6, 171, 586 和 WO2006/044908 中描述的那些, 后一种制剂包括组氨酸 - 醋酸盐缓冲液。

[0278] 本文的制剂还可以包含所治疗的具体适应症必需的一种以上活性化合物, 例如是相互无不利影响的具有互补活性的那些。例如, 制剂还可以包含其他抗体或化疗剂。这类分子适宜地以对预期目的有效的量组合存在。

[0279] 活性成分还可以包载在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊 (例如, 分别为羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯) 微囊) 中、胶体药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊 (nanocapsule)) 中或粗滴乳状液中。这类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 编辑 (1980) 中。

[0280] 待用于体内施用的制剂必须无菌。这易于通过滤过无菌滤膜来实现。

[0281] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜的实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质, 该基质是成形物品的形式, 例如膜或微囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶 (例如聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯) 或聚(乙烯醇))、聚交酯 (美国专利号 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、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 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) 和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物使得能够释放分子超过 100 天, 而某些水凝胶释放蛋白质较短时期。包封的抗体长时间存留在体内时, 它们可由于在 37°C 暴露于湿度而变性或聚集, 导致生物学活性的丧失和可能的免疫原性改变。取决于所涉及的机制, 可以设计合理的策略来稳定。例如, 如果发现聚集机制是通过硫代二硫化物 (thio-disulfide) 交换形成分子间 S-S 键, 那么可以通过修饰硫氢残基、从酸性溶液冻干、控制含水量、使用适当的添加剂和发展特异性聚合物基质组合物来达到稳定。

[0282] 抗体的非治疗用途

[0283] 抗体可用作亲和纯化剂。在此方法中,使用本领域熟知的方法将抗体固定在例如 Sephadex™ 树脂或滤纸的固相上。将固定的抗体与包含待纯化抗原的样品接触,之后用合适的溶剂清洗支持物,这将去除基本上所有样品中的物质,除了与固定的抗体结合的待纯化的抗原。最后,用另一种合适的溶剂,例如甘氨酸缓冲液, pH 5.0 清洗支持物,这将从抗体上释放抗原。

[0284] 抗体也可用于诊断测定,例如,用于检测目的抗原在特定细胞,组织或血清中的表达。用于诊断应用,一般用可检测部分标记抗体。可使用的多种标记,其一般可分为以下类别:

[0285] (a) 放射性同位素,例如 ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 和 ^{131}I 。可使用例如在 *Current Protocols in Immunology*, 第 1 和 2 卷, Coligen 等编, Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs. (1991) 中描述的技术用放射性同位素标记抗体,可使用闪烁计数测量放射性。

[0286] (b) 荧光标记,可用例如稀土螯合物(钆螯合物)或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰,丽丝胺,藻红蛋白和德克萨斯红。可用例如在 *Current Protocols in Immunology*, 同上,中公开的技术将荧光标记缀合至抗体。可使用荧光计定量荧光。

[0287] (c) 可用多种酶-底物标记,美国专利号 4, 275, 149 提供了一些标记的综述。酶一般催化显色底物的化学变化,可使用多种技术测量。例如,酶可催化底物的颜色变化,这可通过分光光度计测量。可选地,酶可改变底物的荧光或化学发光。上文描述了定量荧光变化的技术。化学发光底物通过化学反应被电子激发,然后可发射可被测量的光(例如使用化学光度计)或将能量转移至荧光受体。酶标记的例子包括荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;美国专利号 4, 737, 456), 荧光素, 2, 3- 二氢双酮酞嗪, 苹果酸脱氢酶, 脲酶, 过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRPO), 碱性磷酸酶, β - 半乳糖苷酶, 葡糖淀粉酶, 溶菌酶, 糖氧化酶(例如, 葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶和葡萄糖-6- 磷酸脱氢酶), 杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶), 乳过氧化物酶, 微过氧化物酶等等。用于将酶缀合至抗体的技术在 O' Sullivan 等, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, *Methods in Enzym.* (J. Langone and H. Van Vunakis 编), Academic press, New York, 73:147-166(1981) 中描述。

[0288] 酶-底物组合的例子包括,例如:

[0289] 1) 辣根过氧化物酶(HRPO) 利用过氧化氢氧化染料前体(例如,邻苯二胺(OPD) 或 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

[0290] 2) 碱性磷酸酶(AP) 利用对硝基苯磷酸盐作为显色底物;和

[0291] 3) β -D- 半乳糖苷酶(β -D-Gal) 利用显色底物(例如, p- 硝基苯- β -D- 半乳糖苷酶)或荧光底物 4- 甲基伞型- β -D- 半乳糖苷酶。

[0292] 本领域技术人员可使用许多其他的酶-底物组合。有关这些的一般综述见美国专利号 4, 275, 149 和 4, 318, 980。

[0293] 有时候,标记间接地与抗体缀合。熟练技术人员将知道用于实现此目的的不同技术。例如,可将抗体与生物素缀合,将上述三大类中的任意标记与抗生物素蛋白缀合,或反之亦然。生物素选择性结合抗生物素蛋白,因此,标记可以此间接方式与抗体缀合。可选地,为了实现标记与抗体的间接缀合,将抗体与小的半抗原(例如,地高辛)缀合,将上述不同

类型中的任意标记与抗半抗原抗体（例如，抗地高辛抗体）缀合。因此可实现标记与抗体的间接缀合。

[0294] 在另一实施方案中，不需要标记抗体，可使用与抗体结合的标记抗体检测其存在。

[0295] 抗体可应用于任意已知测定方法，例如竞争性结合测定，直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 47-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0296] 抗体可也用于体内诊断测定。一般来说，用放射性核素（例如 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 或 ^{35}S ）标记抗体，从而可使用免疫闪烁法定位抗原或表达其的细胞。

[0297] 抗体的体内（治疗）用途

[0298] 治疗抗体已被开发用于治疗多种疾病并证明有效。在某些实施方案中，抗-IL-1 β 和/或抗-IL-18抗体与治疗剂共同施用以增强治疗剂的功能。

[0299] 对于疾病的预防或治疗，抗体的适当剂量将取决于待治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、为了预防还是治疗的目的而施用抗体、之前的治疗、患者的临床病史和对抗体的响应及主治医生的判断。抗体在一个时间或在一系列治疗期间被适当地施用给患者。

[0300] 取决于疾病的类型和严重程度，约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 15mg/kg（例如 0.1-20mg/kg）抗体是对患者施用的初始候选剂量，例如，是否通过一次或多次分开施用，或通过连续输注。通常的日剂量范围在大约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 100mg/kg 或更多，取决于上述提及的因素。对于在几天或更长时间内反复施用，取决于病况，治疗持续至出现希望的疾病症状的抑制。但是，可以使用其他给药方案。这一治疗的进展可以通过常规技术和测定被容易地监控。

[0301] 应以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用抗体组合物。在此上下文中的考虑因素包括待治疗的特定疾病，待治疗的特定哺乳动物，个体患者的临床病症，疾病的原因，活性剂的递送位点，施用方法，施用方案和医师公知的其他因素。根据这些考虑因素制定要施用的抗体的“治疗有效量”，其是预防、减轻或治疗疾病或病症所需的最少量。抗体不一定，但任选地与一种或多种目前用于预防或治疗目的疾病的活性剂一起配制。这样的其他活性剂的有效量取决于制剂中存在的抗体量，疾病或治疗的类型和上述其他因素。一般以相同的剂量和如上文中使用的施用途径或约 1-99% 的迄今使用剂量使用这些活性剂。

[0302] 例如，为了治疗涉及炎性细胞（例如，白细胞）粘附，迁移和活化的自身免疫病，例如类风湿性关节炎和狼疮，可将此处的抗体与例如，抗-LFA-1抗体（例如抗-CD11a或抗-CD18抗体）或抗-ICAM抗体，例如 ICAM-1, -2, 或 -3 共同施用。用于与此处的抗体组合治疗类风湿性关节炎的其他活性剂包括 Enbrel™, DMARDs, 例如，甲氨蝶呤和 NSAID（非甾体抗炎性药物）。也可应用除了此处的抗体以外的多于一种这样的其他活性剂。另外，可使用胰岛素治疗糖尿病，抗-IgE 治疗哮喘，抗-CD 11a 治疗牛皮癣，抗- $\alpha 4\beta 7$ 和生长激素 (GH) 治疗炎性肠病。

[0303] 制成品

[0304] 另一实施方案中，提供了包含用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料的制成品。所述制成品包含容器和在容器上或与容器相连的标签或包装说明书。合适的容器包括例如，瓶、小瓶、注射器、静脉注射溶液袋等。容器可由多种材料例如玻璃或塑料制成。容器包含组合物自身，或与另一有效用于治疗、预防和/或诊断病况的组合物组合，并可具有无菌接入口（例如容器可为静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺破的塞子的小瓶）。

组合物中的至少一种活性剂是抗体。标签或包装说明书指示组合物用于治疗特定病症。此外,制成品可包含(a)其中装有组合物的第一容器,其中所述组合物包含抗体;和(b)其中装有组合物的第二容器,其中所述组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。在此实施方案中制成品可还包含指示组合物可用于治疗特定病症的包装说明书。可选地或另外地,制成品可还包含第二(或第三)容器,其包含可药用的缓冲液,例如用于注射的抑菌水(BWFI),磷酸缓冲盐溶液,林格氏溶液和葡萄糖溶液。其可还包括从商业和用户立场想要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针和注射器。

[0305] 一般将治疗抗体组合物置于具有无菌接入口的容器中,例如,静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺破的塞子的小瓶。

[0306] 也提供了包含用于治疗炎症肠病,例如 CD 或 UC 的材料的制成品和试剂盒。所述制成品包含具有标签的容器。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶和试管。容器可由多种材料制成,例如玻璃或塑料。容器装有包含此处描述的抗体的组合物。组合物中的活性剂是特定抗体。容器上的标签指示组合物用于治疗或预防特定的疾病或病症,也可指示体内用法,例如上述用法。

[0307] 在某些实施方案中,所述试剂盒包含上述容器和包含缓冲液的第二容器。其可还包括从商业和用户立场想要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针、注射器和具有使用说明书的包装说明书。

[0308] 常规生物标记技术

[0309] 除非另外指示,本发明的实践将应用分子生物学(包括重组技术),微生物学,细胞生物学,生物化学和免疫学的常规技术,这是本领域技术范围内的。这样的技术在文献中被充分说明,例如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M. J. Gait, 编,1984);“Animal Cell Culture”(R. I. Freshney, 编,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F. M. Ausubel 等编,1987,且定期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis 等编,1994)。

[0310] 可使用本领域公知的标准技术产生在本发明中应用的引物、寡核苷酸和多核苷酸。

[0311] 此处提供了与预测 IBD 患者,包括患有 UC 或克罗恩氏病的患者对某些治疗剂的响应性相关的基因表达生物标记。这些基因编码的 mRNA 或个体蛋白质的表达水平构成预测对 IBD 治疗剂,UC 治疗剂,和 / 或克罗恩氏病治疗剂的响应性的生物标记。因此,此处公开的发明可用于多种情况,例如,与诊断和治疗炎症肠病相关的方法和组合物。

[0312] 基因表达水平的检测

[0313] 根据本文所述的任何方法,核酸可以是基因组 DNA 转录的 RNA 或者是从 RNA 或 mRNA 生成的 cDNA。核酸可以源自脊椎动物,例如哺乳动物。核酸被认为是“源自”特定来源,如果该核酸是从那个来源直接获得的,或者如果该核酸是在那个来源找到的核酸的拷贝。

[0314] 核酸包括核酸的拷贝,例如,扩增所得的拷贝。在某些情况下扩增可能是有利的,例如,为了获得所需量的材料用于检测变异。然后,扩增子可以被提交至变异检测方法,例如下面所述的那些变异检测方法,以确定某些基因的表达。

[0315] mRNA 的水平可以通过本领域技术人员公知的各种方法,包括使用市售的试剂盒和试剂,进行测量和定量。一种这样的方法是聚合酶链式反应 (PCR)。用于定量用途的另一种方法是实时定量 PCR,或 qPCR。参见,例如,“PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications”, (M. A. Innis 等人编著, Academic Press, Inc., 1990); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel 等人编著, 1987, 并且定期更新); 和 “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis 等人编著, 1994)。

[0316] 微阵列是这样一种多路技术,该多路技术通常使用成阵列的一系列数千个核酸探针,以在高严格性条件下与例如 cDNA 或 cRNA 样品杂交。通常,通过检测荧光团、银或化学发光标记的靶标来检测和定量探针-靶标杂交,从而确定靶标中核酸序列的相对丰度。在典型的微阵列中,探针通过键至化学基质的共价键而被附着到固体表面(经由环氧硅烷,氨基硅烷,赖氨酸,聚丙烯酰胺或其他)。固体表面是例如玻璃、硅芯片或微珠。各种微阵列是市售的,包括那些例如由 Affymetrix, Inc. 和 Illumina, Inc. 制造的。

[0317] 生物样品可以使用本领域技术人员已知的某些方法获得。生物样品可以从脊椎动物并且特别是哺乳动物获得。在某些情况下,生物样品是滑膜组织、血清或外周血单核细胞 (PBMC)。通过筛选这些身体样品,可以实现对疾病例如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的简单早期诊断。此外,通过测试这些身体样品关于目标核酸(或者所编码的多肽)的表达水平的变化,可以更容易地监测治疗的进展。

[0318] 继确定个体或者组织或细胞样品包含基因表达特征 (gene expression signature) 或本文公开的某些生物标记的相对水平之后,可以预期有效量的适当治疗剂可以被施用给个体以治疗个体的特定疾病,例如, UC 或克罗恩氏病。本文所述的哺乳动物的各种病理状况的临床诊断可以由熟练的从业人员进行。允许例如诊断或检测哺乳动物的炎性肠病例如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的临床诊断技术在本领域中是可用的。

[0319] 诊断测定试剂盒

[0320] 为了在本文所描述或提出的应用中使用,还提供了诊断测定试剂盒或制成品。这样的试剂盒可以包括载体工具,该载体工具被分区以严密限制地容纳一个或多个容器工具例如小瓶、管等,每个容器工具包括将在方法中使用的不同元件之一。例如,容器工具之一可以包括被可检测地标记或可以被可检测地标记的探针。这样的探针可以是这样的多核苷酸,该多核苷酸特异于包括基因表达特征中一个或多个基因的多核苷酸。当试剂盒利用核酸杂交来检测目标核酸时,该试剂盒还可以具有包含用于扩增该目标核酸序列的一个或多个核苷酸的容器,和/或包含结合至报道子分子(例如酶标记、荧光标记或放射性同位素标记)的报道子工具(例如生物素结合蛋白,该生物素结合蛋白例如亲和素或链霉亲和素)的容器。

[0321] 诊断测定试剂盒将通常包括上述容器以及包括从商业和用户角度希望的材料的一个或多个其他容器,该从商业和用户角度希望的材料包括缓冲液,稀释剂,过滤器,针头,注射器,以及含有使用说明书的包装。标签可以存在于容器上以指示该组合物用于特定治疗或非治疗性应用,并且还可以指示体内或体外使用的指导,例如上面所述的那些。试剂盒中的其他可选组分包括一种或多种缓冲液(例如,封闭缓冲液,洗涤缓冲液,底物缓冲液,等等),其他试剂例如由酶标记化学地改变的底物(例如,色原),表位修复溶液,对照样品(阳性和/或阴性对照),一个或多个对照玻片等。

[0322] 销售方法

[0323] 本发明在此还包括用于销售治疗剂或其可药用组合物的方法,包括向目标受众推广 (promote)、指导 (instruct) 和 / 或详细说明 (specify) 药剂或其药物组合物用于治疗患有特定疾病例如 UC 或克罗恩氏病的患者或患者群体的用途,已从这类患者或患者群体中获得的样品显示如本文所公开的基因表达特征或血清生物标记水平或外周血生物标记水平或检测到组织生物标记。

[0324] 销售通常是通过非个人媒介的付费沟通,其中标明赞助人并控制信息。为了本文目的的销售包括宣传、公共关系、产品放置、赞助、承销 (underwriting) 和促销。此术语还包括出现在任意印刷信息交流媒体中的赞助信息公告,其设计用于吸引广大受众来说服、告知、促进、激发或另外向着采购、支持或认可本文的发明的有利模式而改变行为。

[0325] 本文的诊断方法的销售可以通过任意方法完成。用来传递这些信息的销售媒介的实例包括电视、广播、电影、杂志、报纸、互联网和广告牌,包括广告 (commercials), 其是出现在广播媒体中的信息。

[0326] 所使用的销售类型将取决于许多因素,例如要影响的目标受众的性质,例如医院、保险公司、诊所、医生、护士和患者,以及成本考虑及管理药物和诊断的销售的相关管辖法律和法规。销售可以基于通过服务互动和 / 或其他数据 (例如用户人口统计数据 and 地理位置数据) 定义的用户特征来个体化或定制。

[0327] 认为前述书面说明和以下实施例足以使本领域技术人员能够实施本发明。除本文所显示和描述的那些之外,对本领域技术人员而言,本发明的多种修改将从前述描述和以下实施例变得显而易见,并落在所附权利要求的范围之内。

[0328] 应理解,按照本文所含的教导下,本发明的教导在具体问题或情况中的应用将在本领域普通技术人员的能力范围之内。

[0329] 通过以下非限制性实施例来阐明本发明的其他细节。说明书中所有引文的公开内容在此明确引入作为参考。

实施例

[0330] 在该实施例中提及的可商购试剂按照制造商的说明书来使用,除非另有指明。

[0331] 材料和方法

[0332] 人体切除组织样品

[0333] 患有溃疡性结肠炎,克罗恩氏病,憩室炎或结肠癌而进行肠切除术的患者知情同意参与这项研究。在手术前,获得血液样品,并且,新鲜地连夜送往 Genentech 或按照标准临床实验室程序处理并存储为血清或血浆。手术后,超出临床分析所需的组织被收获。一小部分被快速冷冻用于蛋白质分析,并且,其余组织被连夜送往 Genentech。

[0334] 原发性肠上皮肌成纤维细胞 (MFs) 从患者的肠切除样品中分离得到。简言之,表面上皮细胞采用 1mmol EDTA 通过三次相继处理而从粘膜样品上脱离下来,并且,在 10% 胎牛血清 (FCS) -RPMI (Gibco-Invitrogen, Calsbad, 美国) 中培养 (在 37°C 和 5% CO₂) 剥去上皮细胞的组织样品。MFs 转移出固有层的上皮区域以建立组织培养皿中的集落。除去组织样品后,原发 MFs 增殖从而建立能够保持若干传代的单层。通过流式细胞术确认培养物是原发 MFs (α -平滑肌肌动蛋白阳性,波形蛋白阳性,结蛋白阴性)。原发 MFs 在补充

有具有 10% FBS 的高葡萄糖、1% 非必需氨基酸和抗生素混合物 (100ug/ml 青霉素 / 链霉素, 20ug/ml 庆大霉素, 2.5ug/ml 两性霉素 B 和 1ug/ml 甲硝唑) 的 DMEM 中培养并且用于第 3 至 5 代的实验。

[0335] 以 65,000 细胞每孔对 MF (来自三个不同的患者) 进行铺板 (6 孔板) 过夜, 并且使用加入或不加入 IL-1 β (10ng/ml) (目录号 201-LB-CF, R&D systems, Minneapolis, MN) 或 TNF α (10ng/ml) (目录号 210-TA-CF, R&D systems, Minneapolis, MN) 的上述补充的 DMEM 根据实验于 37 $^{\circ}$ 刺激 6 小时或 24 小时, 然后收集用于 RNA 分离。根据制造商的方案, 使用 RNeasy 柱 (Qiagen) 分离 RNA, 包括柱上 DNA 酶消化步骤, 并且然后制备用于微阵列 (Agilent, Santa Clara, CA)。

[0336] 在液氮预冷的 Bessman 组织粉碎机 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA; 目录号 189475) 中处理快速冷冻切除组织样品。在 **FastPrep[®]**-24 仪中使用 1ml 裂解缓冲液 (1 \times TBS, 1% 的 Triton-X 100, 2 \times 完全蛋白酶抑制剂混合物) 采用 2 \times 45 秒震荡对组织块进行匀浆。然后, 在冷冻微量离心机中对匀浆组织 14,000g 离心 10 分钟。将上清液等分成小份并存储于 -80 $^{\circ}$ C。

[0337] 微阵列分析

[0338] 使用快速扩增标记试剂盒 (Quick Amp labeling kit) (Agilent, Santa Clara, CA) 对 RNA 进行扩增和标记, 以从 1ug 总 RNA 生成标记的 cRNA。实验样品用 Cy5 标记; 通用人类参考 RNA (Universal Human Reference RNA) (Stratagene, La Jolla, CA) 被用于参考通道并且用 Cy3 进行标记。Cy5 和 Cy3 标记的 cRNA 竞争地杂交至双色完整人类基因组 4 \times 44K 基因表达微阵列平台。已杂交的微阵列按照制造商的方案 (Agilent, Santa Clara, CA) 洗涤, 并且使用安捷伦 (Agilent) 微阵列扫描仪收集所有特征强度。使用特征提取软件 (Agilent, Santa Clara, CA)、方案 GE2-v5_95 (Agilent, Santa Clara, CA) 分析所扫描的玻璃片 (slides) 的 TIFF 图像。所有数据都报告为染料归一化的 Cy5/Cy3 比率的 log₂ 值。

[0339] IL1 β 和 TNF α 诱导基因的鉴定

[0340] 线性模型被拟合到 IL-1 β , TNF α 和培养基对照 (media control) 处理中的每一个和时间点。我们鉴定出了显示出偏离基线的变化和各处理之间的差异为至少 1.5 倍 (假发现率或 FDR = 0.001) 的基因。由 IL-1 β 和 TNF- α 唯一上调的基因就重叠进行了评价。

[0341] 纤维化相关基因的鉴定

[0342] 从整个厚度的取自切除组织样品的钻取活检分离 RNA, 并进行微阵列分析。通过比较来自接受关于纤维狭窄 (fibrostenosis) 切除的患者的活检与所有其他患者之间的基因表达, 鉴定了纤维化相关基因。因为纤维化与克罗恩氏病中的炎症联合出现, 所以许多纤维狭窄性活检呈现不同水平的免疫浸润。为了评估免疫细胞浸润的量, 我们计算了关于一组细胞类型特异性基因集的基因表达值的第一特征向量 (参见 Abbas 等人, Genes Immun. 6(4):319-31 (2005))。该特征向量被用作在那个样品内那种细胞类型的浸润度的估计值。这些估计值被用作线性模型中的协变量, 其也可以解释诊断、纤维化和活检位置。基因基于 FDR 为 0.1 时的这个模型而被选择。

[0343] qRT-PCR

[0344] 从体外 MF 刺激实验、从来自组织切除样品的活检以及从与用于组织学分析的那些切片相邻的 OCT 切片分离 RNA, 用于在 qPCR 研究中使用。使用

iScript (Bio-Rad, Hercules, CA) 从 200ng 总 RNA 生成第一链 cDNA。根据制造商的建议, 使用 Taqman PreAmp Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) 对 12.5ng cDNA 进行预扩增并进行稀释的 Taqman 分析 (Life Technologies, Carlsbad, CA)。使用 Biomark HD 系统 (Fluidigm96.96 格式) 和包括从微阵列数据鉴定的基因以及若干管家基因的一组 48Taqman 分析执行 qPCR。所得数据被归一化至 GAPDH 以得到 ΔC_t 值。

[0345] ELISA

[0346] 来自刺激的上清液被收集并通过 ELISA 按照制造商的方案和指南来测定 GCSF (目录号 HSTCS0, R&D systems, Minneapolis, MN) 和双调蛋白 (ab99975, Abcam, Cambridge, MA)。

[0347] 在患者的血清样品中按照制造商的方案和指南测量 IL-11 (ab100551, Abcam, Cambridge, MA), IL1Ra (DRA00B, R&D systems, Minneapolis, MN), IL18BP (DY119, R&D systems, Minneapolis, MN), 双调蛋白 (ab99975, Abcam, Cambridge, MA) 和 GCSF (HSTCS0, R&D systems, Minneapolis, MN)。

[0348] 在组织裂解物中按照制造商的方案和指南测量 IL-1 β (HSLB00C, R&D systems, Minneapolis, MN), IL1Ra (DRA00B, R&D systems, Minneapolis, MN), IL18 (7620, R&D systems, Minneapolis, MN) 和 IL18BP (DY119, R&D systems, Minneapolis, MN)。

[0349] 实施例 1: IL-1 β 诱导的人原发性肠肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达

[0350] 肠上皮肌成纤维细胞 (MFs) 的活化可能通过胶原蛋白和胞外基质蛋白的沉积增加在肠纤维化中起关键作用。因为炎性细胞因子例如 IL-1 β 的作用在该过程中还不太清楚, 我们研究了来自接受肠切除术的患者的组织样品中的基因表达, 并且研究了原发 MFs 中的 IL-1 β 基因诱导。所研究的病人的特征示出于表 1。

[0351] 表 1 患者特征

[0352]

	手术原因	以往的手术 (是/否)	生物治疗 (是/否)
非 IBD (n=10)	憩室炎(n=4)	1/3	0/4
	结肠癌(n=6)	2/4	0/6
CD (n=15)	非梗阻性炎症 (n=5)	4/1	2/3
	纤维狭窄(n=10)	5/5	7/3
UC	发育异常(n=2)	0/2	0/2

[0353]

(n=18)	难治性疾病(n=16)	0/16	13/3
---------------	--------------------	-------------	-------------

[0354] 我们首先检查来自接受肠切除术的 IBD 患者和非 IBD 患者的组织中的 IL-1 β mRNA 水平是否有差异。如图 1A 所示,来自 CD 患者和来自 UC 患者的组织样品中的 IL-1 β mRNA 水平显著高于来自非 IBD 患者的样品中的 IL-1 β mRNA 水平(分别地,CD 患者和 UC 患者中的中值相对表达水平约为 0.01, $p = 0.0222$,与之相比,非 IBD 患者中的中值相对表达水平约为 0.001, $p = 0.0409$)。此外,接受关于纤维狭窄疾病手术的 CD 患者中的 IL-1 β mRNA 的水平趋于比接受关于炎症疾病手术的 CD 患者中的 IL-1 β mRNA 高。我们发现 IL-1 β mRNA 水平与非 IBD 患者组织相比的差异还要更高,如图 1B 所示(来自 CD 患者的纤维组织中的中值相对表达水平约为 0.015,与之相比,来自非 IBD CD 患者的组织中的中值相对表达水平约为 0.001, $p = 0.0012$)。此外,通过免疫组化,我们观察到在切除的 CD 组织中的增加的 IL-1 β 蛋白表达(图 1C)。

[0355] 我们还执行了获自非 IBD 患者、UC 患者或 CD 患者的切除组织的免疫印迹分析。如图 2 所示,该分析表明与炎性体活化相关联的蛋白, CASP1 和 p20,以及促 IL-1 β 和成熟 IL-1 β ,高度表达于来自 CD 患者的组织中,并且特别是在 UC 患者中,但是在非 IBD 组织中几乎检测不到。这些数据提供了关于下面的证据:与来自 CD 患者的非纤维化或炎症组织相比,或者与非 IBD 结肠组织相比,在 CD 患者的纤维组织中的 IL-1 β 的增加的表达。流式细胞术和 qRT-PCR 分析表明 IL1R1 和 TNFR1 存在于从切除组织中分离的原发性肠上皮 MFs 中(数据未示出)。

[0356] 接下来,使用上面描述的方法,我们研究了原发 MFs 中通过 IL-1 β 但不通过 TNF α 的基因调节。我们发现 MF 中通过 IL-1 β 特异性地诱导但不通过 TNF α 特异性地诱导的一组基因,包括胶原蛋白。通过微阵列分析评估的显示出通过 IL-1 β 处理最高诱导并且通过 TNF α 处理不诱导的基因示出于下面的表 2。基因表达通过经刺激的 MF 的 qRT-PCR 来验证,如图 3 所示。IL-1 β 处理,而不 TNF α 处理,刺激 GCSF(图 3A)、TMEM158(图 3B)、Co17A1(图 3C)、Co116A1(图 3D)、双调蛋白(图 3E)和 IL-11(图 3F)的表达,从而验证了微阵列的结果。

[0357] 表 2 MF 的微阵列分析。

[0358]

标志	通过 IL1b 诱导	通过 TNFa 诱导
CSF3	12.38	无
IL24	4.50	无
SERPINB3	3.43	无
IL11	3.03	无
SERPINB4	2.75	无
AMIGO2	2.58	无
SERPINB7	2.46	无

ABAT	2.46	无
PF4	2.19	无
STEAP2	2.03	无
ELN	2.00	无
CCL4	1.99	无
VEGFA	1.96	无
TMEM158	1.95	无
DACT1	1.92	无
KCNMB4	1.88	无
COL16A1	1.85	无
PDLIM4	1.85	无
TGFBR1	1.62	无
KCNE1L	1.57	无
HIF1A	1.56	无
SLC25A45	1.55	无

[0359]

OSMR	1.51	无
P4HA2	1.51	无
ELF3	1.48	无
TGIF1	1.32	无
AREG	1.16	无

[0360] 来自以培养基、IL-1 β 或 TNF α 刺激的 MF 培养物的上清液通过 ELISA 对 GCSF 和双调蛋白进行分析。如图 4A-B 所示, IL-1 β 处理后, GCSF 和双调蛋白 (amphiregulin) 蛋白质在上清液中增加, 但是 TNF α 或培养基处理后上述蛋白不增加, 与 qRT-PCR 结果一致。

[0361] 由于上面的结果表明我们可以通过 ELISA 在细胞上清液中测量和定量 GCSF 和双调蛋白水平, 并且表明, 在 IL-1 β 刺激后, 通过测量 RNA 表达来观察的同时, 我们可以在蛋白水平观察到类似的增加, 因此我们测试了在人血清中测量 GCSF 的可行性。图 5A 示出了血

清 GCSF 水平在 CD 和 UC 患者中比起健康对照都上调了。虽然我们不能在任何癌症或健康对照患者中检测到血清 GCSF,但我们可以一些 fCD 患者和 iCD 患者中容易地检测到血清 GCSF。只有两个 DVT 患者在他们的血清中显示了可检测水平的 GCSF。使用相同的样品,我们将肠组织裂解物中的 IL-1 β 水平与血清 GCSF 关联起来,并且发现在肠组织裂解物中具有较高 IL-1 β 表达的患者具有较高可检测水平的血清 GCSF(图 5B,相关系数 $r = 0.500, p = 0.1777$)。这些数据表明,血清 GCSF 是肠组织中 IL-1 β 蛋白水平的有用的替代标志物。

[0362] 我们发现,多个基质和肌肉基因在纤维化组织中相比起非纤维化组织上调了,例如,INHBA 和 LMCD1。此外,胞外基质翻新 (turnover) 和组织重塑基因 (例如,MMP3,PXDN),胶原蛋白基因 (例如,Co17A1,Co15A2,Co112A1,Co118A1) 和 Wnt 信号传导目标基因 (例如, TMEM158, CHN1) 在纤维化组织中相比起非纤维化组织上调了。下面的表 3 示出了通过微阵列分析确定的纤维化基因的鉴定结果;在表中还指出了蛋白质的位置。我们还发现了 MFs 中的来自多个路径的 IL-1 β 调节基因,包括细胞因子 (例如, IL24, IL11),胶原蛋白 (例如, Co17A1, Co116A1),以及 WNT 信号传导基因 (例如, TMEM158, DACT1)。MFs 中 TNF α 诱导基因包括趋化因子 (例如, IL-8, CXCL3) 和粘附分子基因 (例如, ICAM1)。MFs 的 IL-1 β 刺激被观察到诱导胶原蛋白和 WNT 信号传导基因,这与肠纤维化中上调的基因有重叠 (例如, TMEM158, Co17A1)。与此相反,与肠纤维化相关联的基因没有被发现在 MFs 中由 TNF- α 唯一地上调。

[0363] 表 3 纤维化基因

[0364]

标志	变化倍数	功能	蛋白位置
MMP3	7.41	基质相关蛋白	分泌
INHBA	3.25	基质细胞	分泌
COL5A2	2.73	胶原蛋白	分泌
CHN1	2.50	WNT 信号传导	细胞质
LMCD1	2.48	肌细胞	未知
COL12A1	2.45	胶原蛋白	分泌
COL7A1	2.43	胶原蛋白	分泌
COL18A1	2.38	胶原蛋白	分泌
TMEM158	2.38	WNT 信号传导	膜蛋白
FAM65C	2.30	基质细胞	未知
IGFBP5	2.28	生长	分泌

THY1	2.28	肌成纤维细胞	膜蛋白
TMEM132A	2.28	WNT 信号传导	膜蛋白
PXDN	2.13	基质相关蛋白	分泌
GPR68	2.08	肌细胞	膜蛋白
TWIST1	2.08	EMT	核, 转录因子
COL4A1	2.07	胶原蛋白	分泌

[0365]

SERPINH1	2.03	WNT 信号传导	分泌
AEBP1	2.00	肌细胞	分泌, 转录因子
NAB2	1.99	生长	核, 转录因子
TMEM45A	1.81	WNT 信号传导	膜蛋白
TMEM121	1.72	WNT 信号传导	膜蛋白
VIM	1.68	丝 (filament)	细胞质
NOTCH4	1.68	生长	膜蛋白
TIMP2	1.67	金属蛋白酶抑制剂	分泌

[0366] 为了证实我们的微阵列发现, 我们通过 IHC 分析了与那些用于 SMA 染色的切片相邻的 OCT 切片。由病理学家关于 SMA 对切片进行评分; 通常, SMA+ 样品被认为具有纤维化证据。qRT-PCR 结果显示于图 6A-F。我们发现, 胶原蛋白亚型 7A1 和 16A1 以及双调蛋白、IL-11、AEBP1 和 IL1R1 在 CD SMA+ 切片中与 CD SMA- 切片或对照切片相比具有增加的表达, 这表明这些 IL-1 β 诱导的基因在纤维化组织中被上调了。

[0367] 实施例 2: 其他生物标记

[0368] 使用表 4 中所述的队列, 我们使用 UC 和 DVT 作为比较者 (comparators) 研究了对区分纤维化 / 纤维狭窄 (fCD) 和炎症性 CD (iCD) 可能有用的其他生物标记。使用匹配的肠组织裂解物和血清样品, 我们通过 ELISA 测定了每个样品的 IL18 和 IL18BP 水平。我们发现 fCD 患者在肠组织中比起 iCD 患者表达略高水平的 IL18 (图 7A, $p < 0.05$, 由 Kruskal-Wallis 检验), 但是在血清水平中没有显著差异 (图 7B)。我们发现, 在任何患者组之间组织和血清 IL18BP 水平没有显著差异 (图 7C 和 7D)。我们还检查了肠组织裂解物中 IL18 对 IL18BP 的比值。如图 7E 所示, IL18:IL18BP 的比值在 fCD 患者中相比起 iCD 患者略高 ($p < 0.05$, 由 Kruskal-Wallis 检验)。此外, 图 7F 示出了关于 fCD 患者和 iCD 患者的肠 IL18 水平对血清 IL18BP 的绘图。

[0369] 表 4 患者特征

[0370]

	手术原因	以往的手术 (是/否)	生物治疗 (是/否)
非 IBD (n=6)	憩室炎(n=4)	1/3	0/4
	结肠癌(n=2)	1/1	0/2
CD (n=15)	非梗阻性炎症 (n=7)	5/2	5/2
	纤维狭窄(n=9)	4/5	8/1
UC	难治性疾病(n=10)	5/5	8/2

[0371] 参考文献

[0372] Arend, W. P., G. Palmer, 和 C. Gabay. 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 223:20-38.

[0373] Baldassano, R. N., J. P. Bradfield, D. S. Monos, C. E. Kim, J. T. Glessner, T. Casalunovo, E. C. Frackelton, F. G. Otieno, S. Kanterakis, J. L. Shaner, R. M. Smith, A. W. Eckert, L. J. Robinson, C. C. Onyiah, D. J. Abrams, R. M. Chiavacci, R. Skraban, M. Devoto, S. F. Grant, 和 H. Hakonarson. 2007. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut.* 56:1171-3.

[0374] Cadwell, K., J. Y. Liu, S. L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J. K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J. A. Carrero, S. Hunt, C. D. Stone, E. M. Brunt, R. J. Xavier, B. P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T. S. Stappenbeck, 和 H. W. Virgin. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 456:259-63.

[0375] Carter, K. W., J. Hung, B. L. Powell, S. Wiltshire, B. T. Foo, Y. C. Leow, B. M. McQuillan, M. Jennens, P. A. McCaskie, P. L. Thompson, J. P. Beilby, 和 L. J. Palmer. 2008. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with central obesity and metabolic syndrome in a coronary heart disease population. *Hum Genet.* 124:199-206.

[0376] Cassel, S. L., S. Joly, 和 F. S. Sutterwala. 2009. The NLRP3 inflammasome: A sensor of immune danger signals. *Semin Immunol.*

[0377] Ferrero-Miliani, L., O. H. Nielsen, P. S. Andersen, 和 S. E. Girardin. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol.* 147:227-35. Kowluru, R. A., 和 S. Odenbach. 2004. Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J*

Ophthalmol. 88:1343-7.

[0378] Kuballa, P., A. Huett, J. D. Rioux, M. J. Daly, 和 R. J. Xavier. 2008. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1variant. PLoS One. 3:e3391.

[0379] Larsen, C. M., M. Faulenbach, A. Vaag, A. Volund, J. A. Ehses, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen, 和 M. Y. Donath. 2007. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2diabetes mellitus. N Engl J Med. 356:1517-26.

[0380] Lewis, E. C., 和 C. A. Dinarello. 2006. Responses of IL-18-and IL-18receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:16852-7.

[0381] Ludwiczek, O., A. Kaser, D. Novick, C. A. Dinarello, M. Rubinstein, 和 H. Tilg. 2005. Elevated systemic levels of free interleukin-18(IL-18)in patients with Crohn's disease. Eur Cytokine Netw. 16:27-33.

[0382] Ludwiczek, O., E. Vannier, I. Borggraefe, A. Kaser, B. Siegmund, C. A. Dinarello, 和 H. Tilg. 2004. Imbalance between interleukin-1agonists and antagonists:relationship to severity of inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 138:323-9.

[0383] Monteleone, G., F. Trapasso, T. Parrello, L. Biancone, A. Stella, R. Iuliano, F. Luzzi, A. Fusco, 和 F. Pallone. 1999. Bioactive IL-18expression is up-regulated in Crohn's disease. J Immunol. 163:143-7.

[0384] Perrier, S., F. Darakhshan, 和 E. Hajduch. 2006. IL-1receptor antagonist in metabolic diseases:Dr Jekyll or Mr Hyde? FEBS Lett. 580:6289-94.

[0385] Saitoh, T., N. Fujita, M. H. Jang, S. Uematsu, B. G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, 和 S. Akira. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1enhances endotoxin-induced IL-1beta production. Nature. 456:264-8.

[0386] Sandberg, J. O., A. Andersson, D. L. Eizirik, 和 S. Sandler. 1994. Interleukin-1receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice. Biochem Biophys Res Commun. 202:543-8.

[0387] Sidhu, S. S., B. Li, Y. Chen, F. A. Fellouse, C. Eigenbrot, 和 G. Fuh. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. J Mol Biol. 338:299-310.

[0388] Ten Hove, T., A. Corbaz, H. Amitai, S. Aloni, I. Belzer, P. Graber, P. Drilenburg, S. J. van Deventer, Y. Chvatchko, 和 A. A. Te Velde. 2001. Blockade of endogenous IL-18ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. Gastroenterology. 121:1372-9.

[0389] Villani, A. C., M. Lemire, G. Fortin, E. Louis, M. S. Silverberg, C. Collette, N. Baba, C. Libioulle, J. Belaiche, A. Bitton, D. Gaudet, A. Cohen, D. Langelier, P. R. Fortin, J. E. Wither, M. Sarfati, P. Rutgeerts, J. D. Rioux, S. Vermeire, T. J. Hudson, 和

D. Franchimont. 2009. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet. 41:71-6.

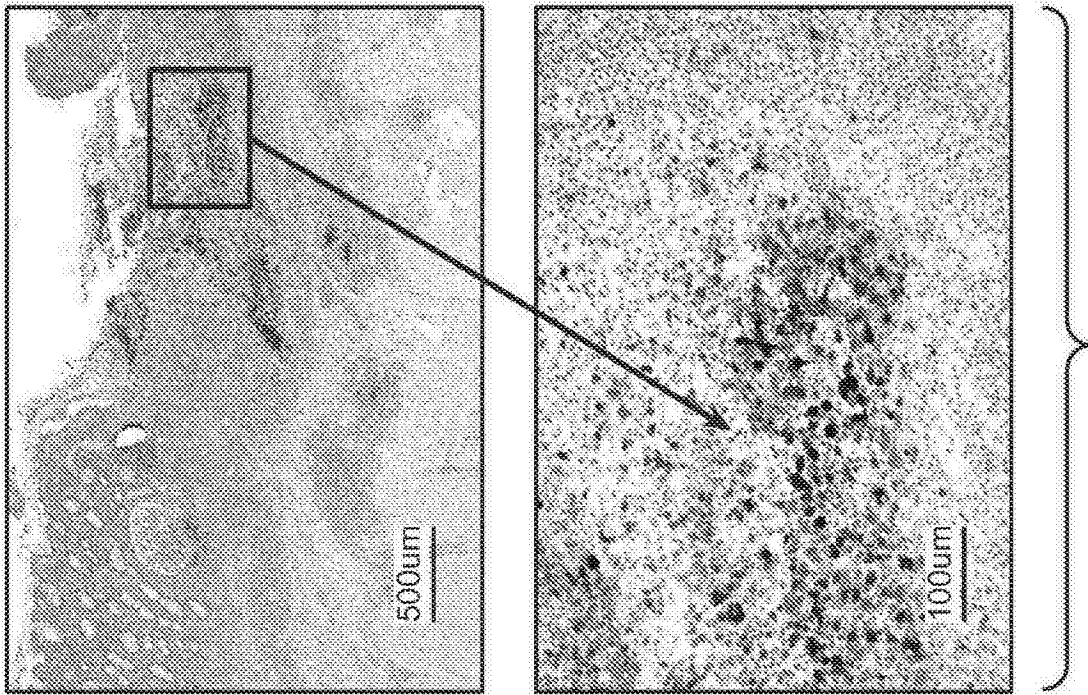


图 1C

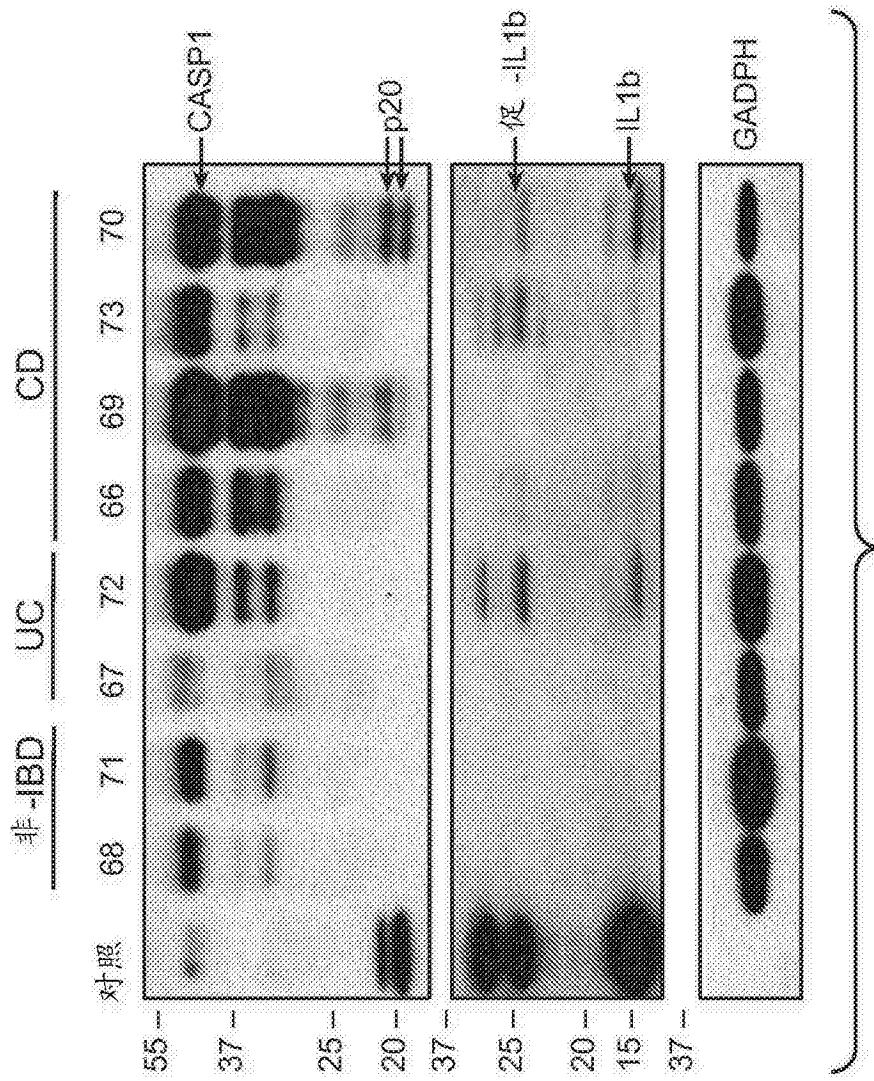


图 2

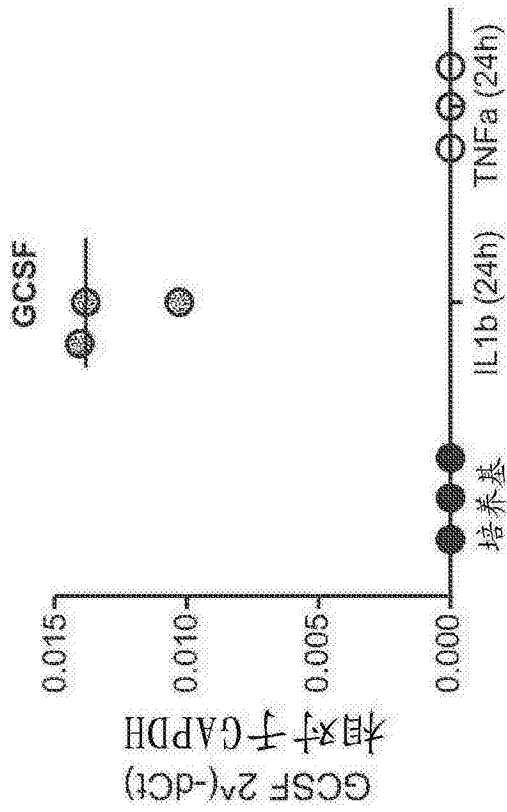


图 3A

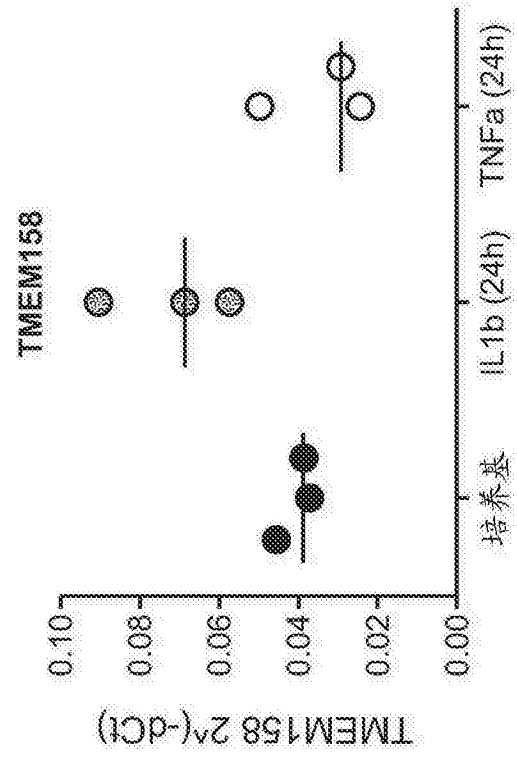


图 3B

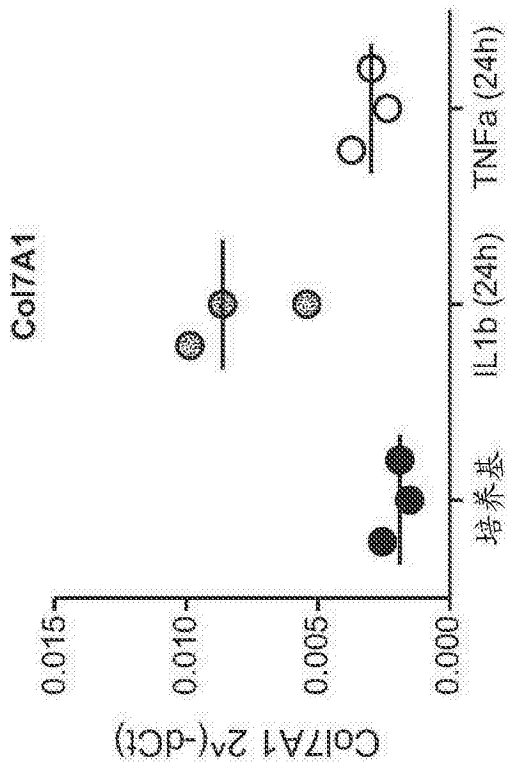


图 3C

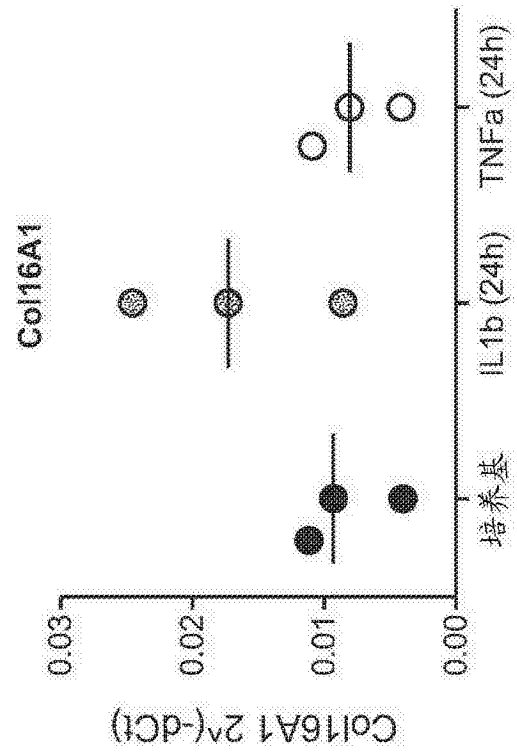


图 3D

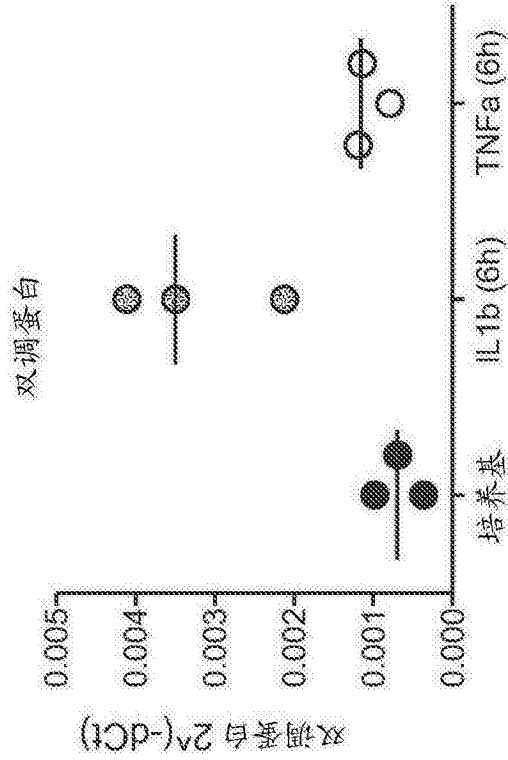


图 3E

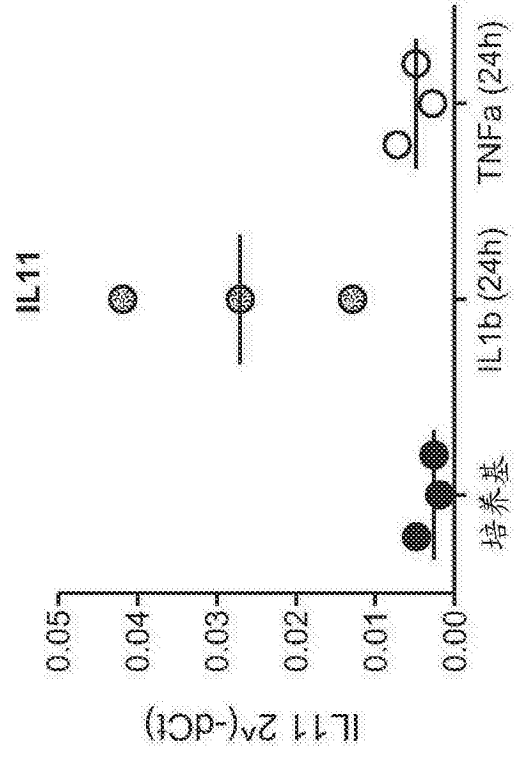


图 3F

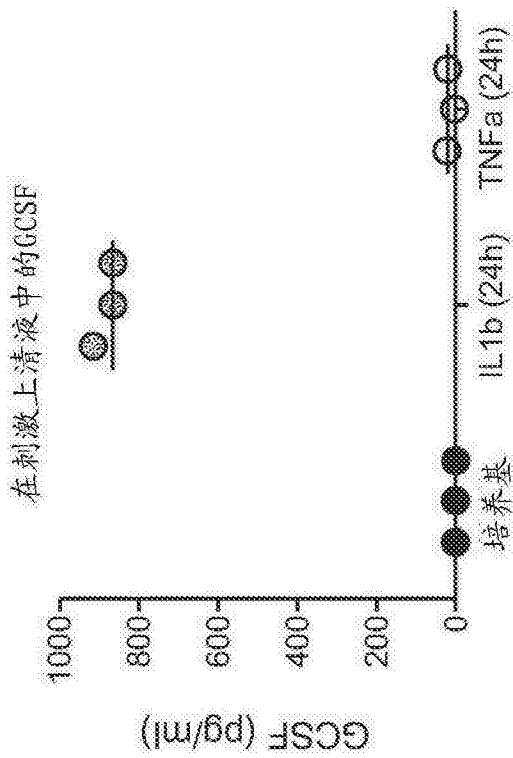


图 4A

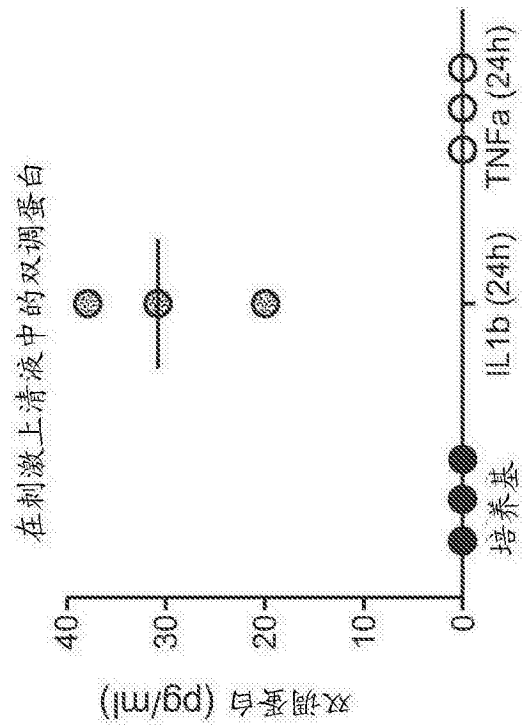


图 4B

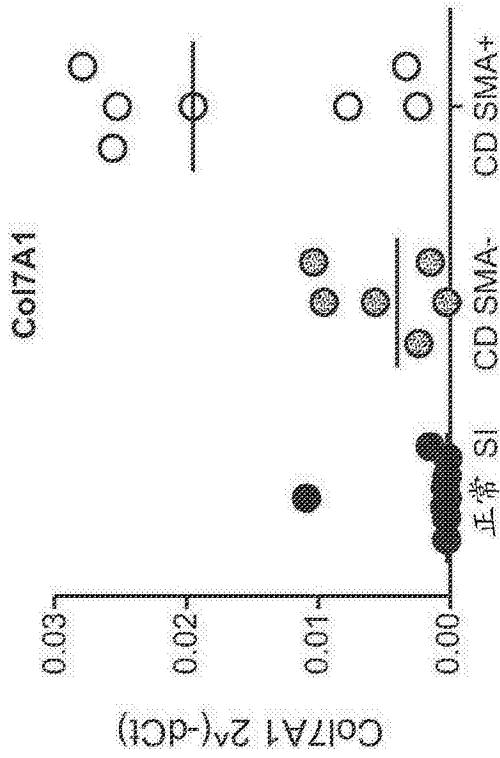


图 6A

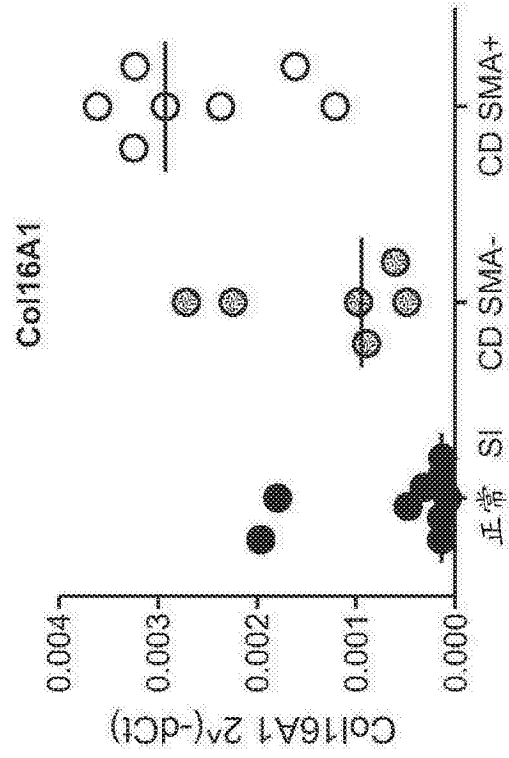


图 6B

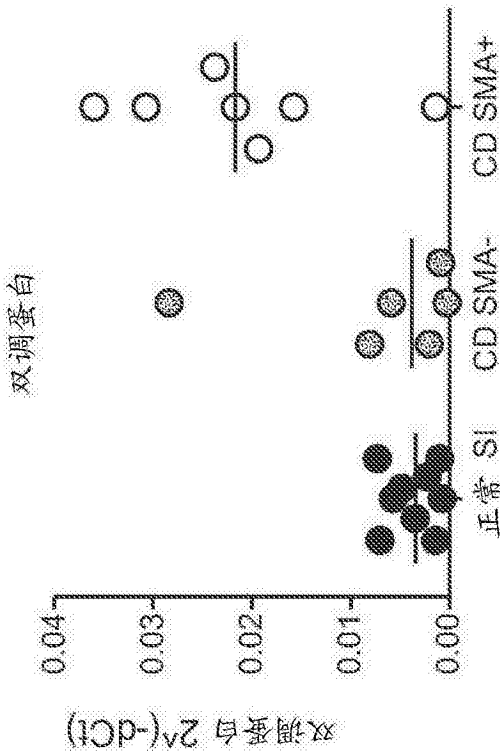


图 6C

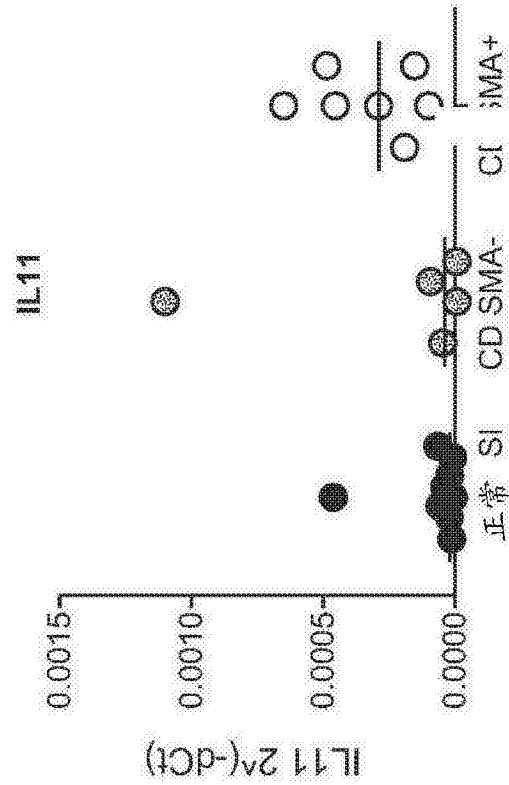


图 6D

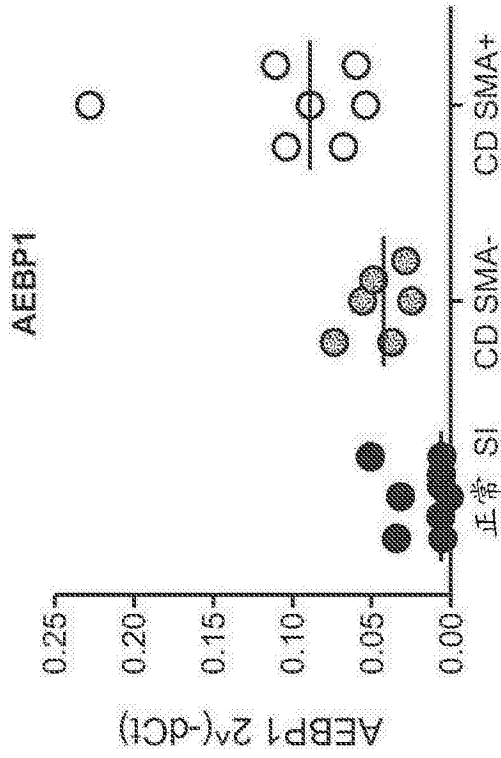


图 6E

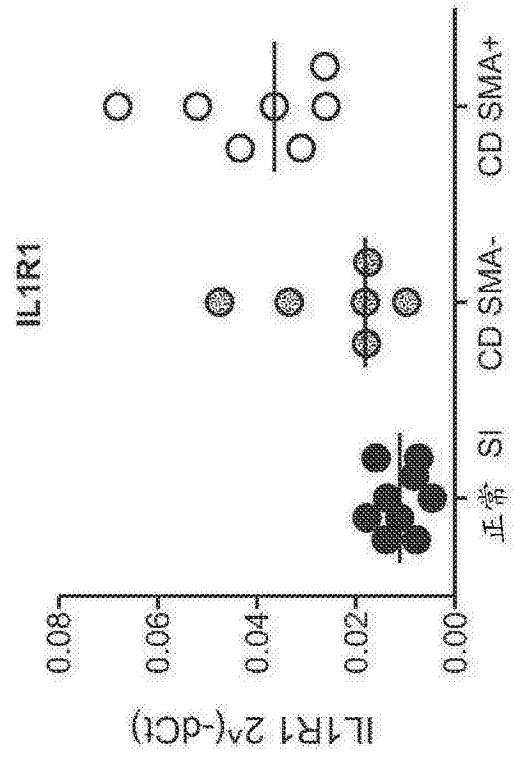


图 6F

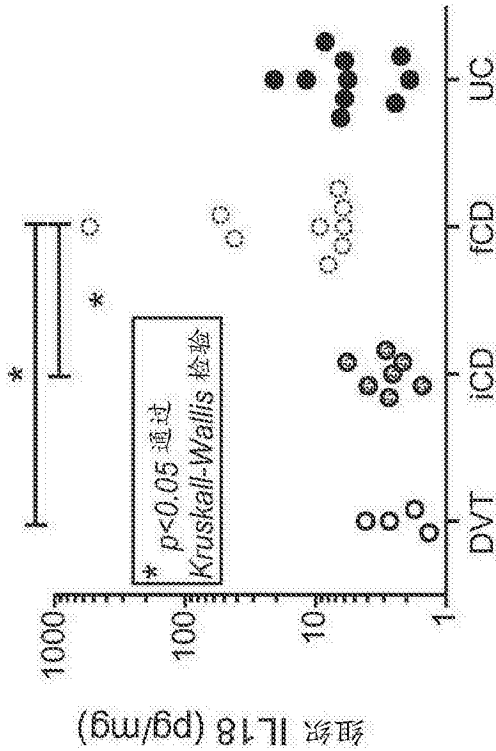


图 7A

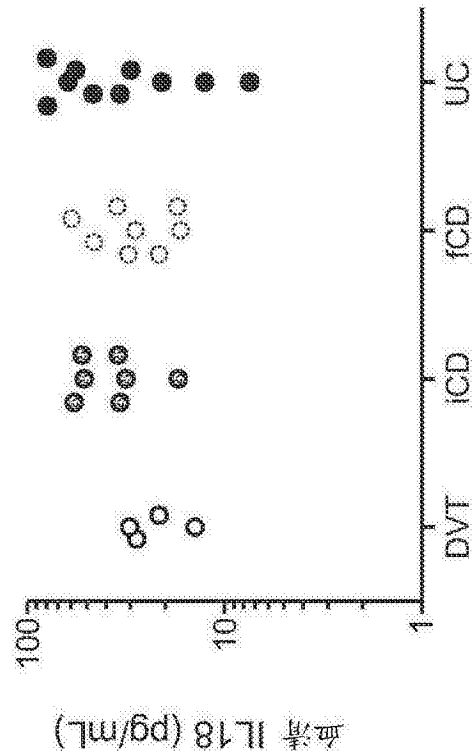


图 7B

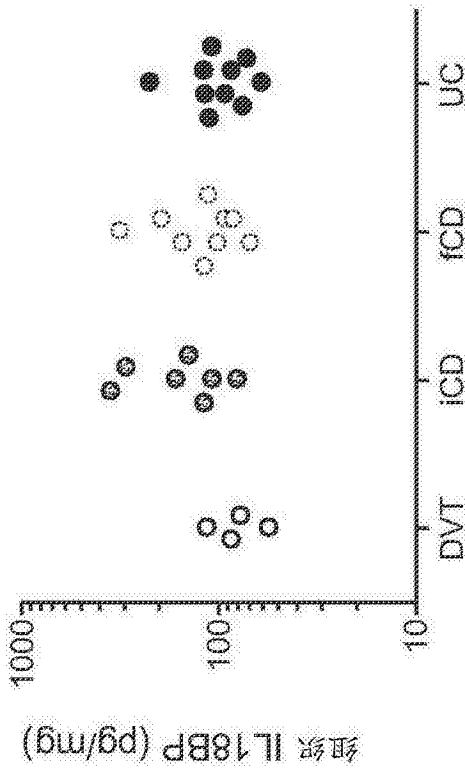


图 7C

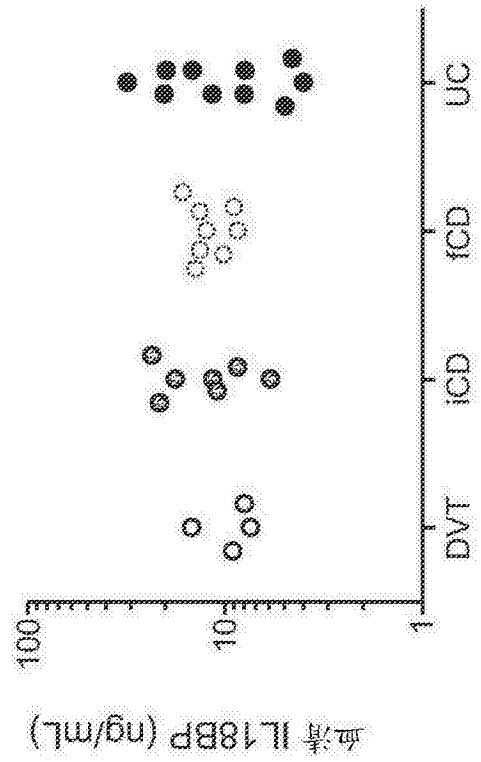


图 7D

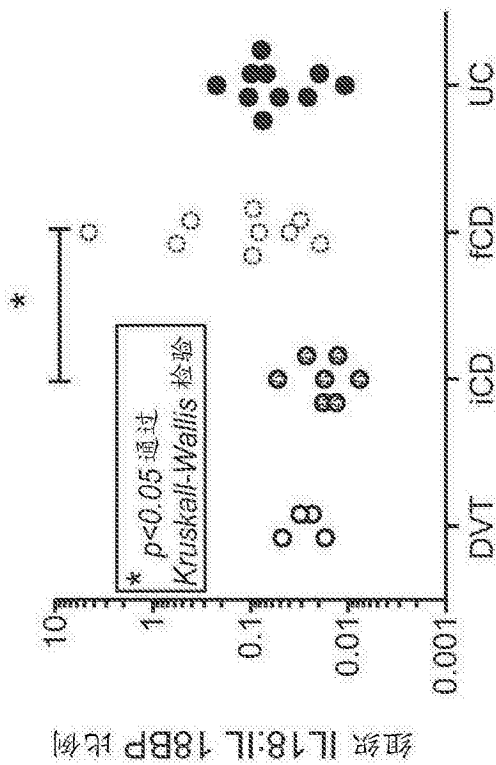


图 7E

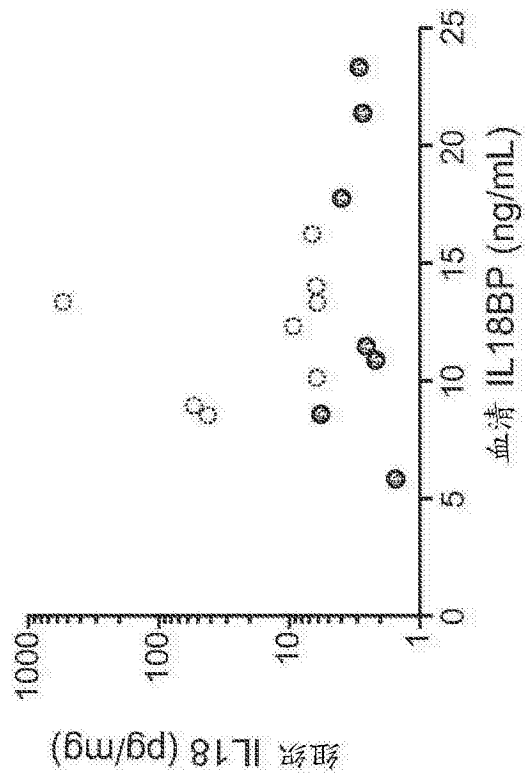


图 7F

