

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880012149.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月24日

[11] 公开号 CN 101657721A

[22] 申请日 2008.2.15

[21] 申请号 200880012149.4

[30] 优先权

[32] 2007.2.16 [33] US [31] 60/901,732

[86] 国际申请 PCT/US2008/002047 2008.2.15

[87] 国际公布 WO2008/103292 英 2008.8.28

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.15

[71] 申请人 基酶有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 D·H·马戈林

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 左路 林晓红

权利要求书1页 说明书15页

[54] 发明名称

鉴定甲状腺疾病风险的方法

[57] 摘要

一种用于鉴定具有发生甲状腺疾病的风险的患者的方法，所述的甲状腺疾病在采用消减淋巴细胞的方案治疗后出现，包括确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中，其中若该抗体在该患者中存在，则该患者发生甲状腺疾病的风险升高。具体实施方案是一种用于鉴定具有发生甲状腺疾病的风险的多发性硬化患者的方法，所述的甲状腺疾病在以消减 CD52 - 阳性细胞的方案治疗后出现，该方法包括确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中，其中若该抗体在该患者中存在，则该患者具有发生甲状腺疾病的风险。

1. 一种用于鉴定以消减淋巴细胞的方案治疗后具有发生甲状腺疾病的风险的患者的方法，包括确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中，其中若该抗体在该患者中存在，则该患者具有发生治疗后甲状腺疾病的风险。
2. 权利要求1的方法，其中所述患者患有多发性硬化(MS)。
3. 权利要求1或2的方法，其中消减淋巴细胞的方案包括施用消减CD52-阳性细胞的药物。
4. 权利要求3的方法，其中消减CD52-阳性细胞的药物是与CD52特异性结合的抗体。
5. 权利要求4的方法，其中所述抗体是阿来组单抗(alemtuzumab)。
6. 权利要求4的方法，其中所述抗体包含一个或多个CDR，所述的CDR具有与Campath-1H的CDR氨基酸序列相同的氨基酸序列。
7. 权利要求2的方法，其中所述MS是复发缓解型多发性硬化。
8. 权利要求1或2的方法，其中在用消减淋巴细胞的方案治疗之前确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中。
9. 权利要求1或2的方法，其中在使用消减淋巴细胞的方案至少一个疗程后确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中。
10. 权利要求1或2的方法，其中所述甲状腺疾病选自：甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、格雷夫斯病、自身免疫性甲状腺炎及其组合。
11. 权利要求1或2的方法，其中消减淋巴细胞的方案与骨髓移植操作一起施用。
12. 权利要求1或2的方法，其中使用选自以下一组的测定法检测抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体：酶联免疫吸附测定、放射免疫测定(RIA)、血细胞凝集测定和使用甲状腺过氧化物酶蛋白的一种形式或片段作为意图吸引抗体并与之结合的靶标的其他测定法。
13. 权利要求1的方法，其中所述患者患有选自以下一组的免疫介导的疾病：GVHD、类风湿性关节炎、血管炎、器官移植排异、眼色素层炎、硬皮病、自身免疫血细胞减少症和类风湿性关节炎。

鉴定甲状腺疾病风险的方法

相关申请

本申请要求保护 2007 年 2 月 16 日提交的美国临时申请号 60/901,732 的优先权。上述申请的全部内容通过引用的方式并入本文。

发明背景

甲状腺的一项主要功能是分泌甲状腺激素 L-甲状腺素(T4)和 L-三碘甲状腺原氨酸(T3)。这些甲状腺激素调节代谢的重要方面。当 T3 和 T4 的血液水平异常低下时, 出现甲状腺功能减退症状态, 而当它们的水平异常升高时, 出现甲状腺功能亢进症。未治疗的严重甲状腺功能减退症的特征是体重增加、低活动性(low energy)与抑郁、寒冷耐受不良以及皮肤和毛发的改变。未治疗的严重甲状腺功能亢进症呈现为一种叫做甲状腺毒症的状态, 其特征是体重减轻、神经质或情绪不稳、热耐受不良、震颤和心率加快, 并且可以引起心房颤动。在一些病例中, 甲状腺功能减退症或甲状腺功能亢进症可以在无可察觉症状或征兆情况下出现(例如, 亚临床甲状腺疾病), 尽管在甲状腺功能的实验室检验方面已经存在异常。

T3 和 T4 在本身受下丘脑激素促甲状腺素释放激素(TRH)调节的垂体前叶糖蛋白激素促甲状腺素(甲状腺刺激激素, TSH)的直接控制下产生。TSH 通过膜结合的 G 蛋白偶联受体(TSH-R)发挥激活主要甲状腺功能的作用。T3 和 T4 的合成要求将碘掺入其前体。甲状腺过氧化物酶(TPO)是一种膜结合的、糖基化的含血红素的酶, 此酶催化甲状腺球蛋白中酪氨酸残基的碘化和碘酪氨酸残基偶联以形成 T3 和 T4。一旦合成, T3 和 T4 在激素释放之前以胶体形式贮存在甲状腺球蛋白(Tg)上。

在病理条件下, TPO、TSH-R 和 Tg 蛋白可以变成自身抗原, 即自身免疫应答的靶标, 最简单地, 可通过结合这些蛋白质的自身抗体来确定。以组织学方式, 也检测并研究了与甲状腺组织的微粒体部分反应的抗体。随后, 发现甲状腺过氧化物酶是此类抗甲状腺微粒体抗体的主要靶标。借助这种理解, 已经将甲状腺微粒体抗体和甲状腺过氧化物酶抗体视为基本上等价的术

语。

TSH-R 蛋白的信号功能通常仅在结合促甲状腺素时被激活。然而，一些针对 TSH-R 的抗体(下文称为 TSHRA)可以结合在促甲状腺素系泊位点处，并且这种类型的 TSHRA 自身抗体可以充当 TSH-R 的直接激动剂(刺激性抗体)或拮抗剂(阻断性抗体)。因此，甲状腺自身免疫性可以与甲状腺激素分泌的异常调节关联并且引起甲状腺功能减退或亢进症。

在患有又称作格雷夫斯病(Graves' disease)、弥漫性毒性甲状腺肿、von Basedow 病或突眼性甲状腺肿的病症的患者中的一个共有诊断结果是血液中存在 TSHRA。针对 TPO 的抗体(下文为 TPOA)可能存在或不存在于格雷夫斯病中。如上所释，患有该病症的患者可以在临床上呈现为甲状腺功能减退或亢进症，并且给定患者可以在不同时间表现两种病状。除了甲状腺功能异常之外，该病症可以累及其他组织。在格雷夫斯眼病(从技术上是眶病(orbitopathy)，因为变化局限于眼眶结构而不累及眼的内部结构)中，眼外肌束增大和脂肪性肥大引起眼球突出(突眼或突出)，这导致双视(复视)并且在严重病例中导致视力丧失。一些患者发生特征为皮肤水肿和增厚或指骨增厚的皮肤病。经常可以用口服甲状腺抑制药物(如甲硫咪唑或丙硫氧嘧啶)防治甲状腺亢进格雷夫斯病。顽固病例可能需要使用放射性碘的甲状腺去除术或外科甲状腺切除术。由于甲状腺抑制，该患者会需要甲状腺替代激素。严重眼病可能需要对眶进行放射疗法或眶的手术减压术。

在内分泌学家中，自身免疫性甲状腺炎通常称作“沉默甲状腺炎”和桥本甲状腺炎。TPOA 常存在于患有该病症的患者中；往往将临床呈现甲状腺功能减退症的表现并伴有高水平 TPOA 视为对桥本病诊断的证实。TSHRA 通常不存在。在这种病症中，免疫介导的甲状腺损害可以导致贮存的激素泄露，伴以相关的一过性甲状腺毒症，但是通常最终导致欠激活的甲状腺，伴以相关的甲状腺功能减退症。治疗法通常包括甲状腺替代激素。

某些疾病状态或治疗性介入与自身免疫甲状腺疾病的风险的升高相关联。例如，在因丙型肝炎病毒感染而接受干扰素- α 治疗的患者中常发生甲状腺疾病(Preziati, D.等人, *Eur J Endocrinol*, 132(5)587-93 (1995))。在丙型肝炎病毒感染患者中，治疗前存在针对 TPO 或甲状腺微粒体部分的抗体(已知所述抗体的一部分识别 TPO)似乎是随后接受干扰素- α 治疗的患者中甲状腺亢进病和甲状腺减退病风险提高的一种标记(Marazuela, M.等人, *Clin*

Endocrinol 44:635-42 (1996); Watanabe, U. 等人, *Am J Gastroenterol*, 89(3):399-403 (1994); Fernandez-Soto, L. 等人, *Arch Intern Med*, 158:1445-1448 (1998)。类似地, 妊娠期间检测到的 TPOA 似乎预告产后甲状腺疾病的风险 (Vargas, M.T. 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67(2):327-33 (1988))。

自身免疫甲状腺疾病也在先前已经接受淋巴细胞消减疗法的患者中以提高的频率发生。这样一种疗法是阿来组单抗(alemtuzumab)。阿来组单抗 (Campath[®]、MabCampath[®]、Campath-1H[®])是与称作 CD52 的蛋白质抗原选择性结合的人源化单克隆抗体。CD52 是存在于至少 95% 的全部人外周血淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞上的丰富分子(每个细胞大约 5×10^5 个抗体结合位点)(The CAMPATH-1 antigen (CD52). *Tissue Antigens*; 35:178-327 (1990)), 但是不存在于造血干细胞中。除其他作用之外, 使用合适剂量和方案用阿来组单抗治疗人将导致从体内组织和血液中迅速且相对持久地清除正常淋巴细胞和肿瘤性淋巴细胞, 同时不损害对于重新进驻免疫系统所需的造血干细胞。阿来组单抗在美国专利 US 5,846,534 中披露。

阿来组单抗被批准在已经用烷基化剂治疗过并且氟达拉滨疗法无效的患者中用于治疗 B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)。临床研究已经证实阿来组单抗也在其他恶性血液病(如非霍奇金淋巴瘤和白血病)中和在多种免疫介导性病征(包括移植物抗宿主病、器官移植排异、类风湿性关节炎、且特别是多发性硬化)中有效(Hale G.和 Waldmann H., *From laboratory to clinic: the story of CAMPATH-1*. 在 George AJT, Urch CE 编辑的 *Methods in Molecular Medicine: Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. NJ: Humana Press; 2000; 40:243-266)。

Hale 和 Waldmann 首先披露了 Campath-1H 治疗多发性硬化(MS)的用途(见美国专利号 6,120,766)。此后, Campath-1H 的安全性和效力已经成为在 MS 患者中开展的几项临床研究的重点(见例如: T. Moreau 等人, *Lancet* (1994), 344:298-301; T. Moreau 等人, *Brain* (1996), 119:225-237; A. Coles 等人, *Ann. Neurol.* (1999), 46:296-304; A. Coles 等 (2003 年 3 月 *Neurology* 60 (增刊 1); A. Coles 等人, *Clinical Neurology and Neurosurgery* (2004), 106:270-274)。

最近, 在名为 CAMMS223 的二期临床研究中, 阿来组单抗以两个剂量水平施用(在第一年 12 mg 或 24 mg/日的一个五日疗程, 累积剂量 60 或 120

mg, 随后在第二年 12 mg 或 24 mg/日的一个三日疗程, 累积剂量 36 或 72 mg, 在第三年可能类似地使用 36 或 72 mg 再次治疗)。在有效比较设计(active comparator design)中, 对照组中的患者接受皮下(SC)注射干扰素 β -1a(Rebif[®]; EMD Serono, Inc.) 44 微克, 每周三次, 如产品标签上所示(O'Donnell, L 等, 在加拿大多伦多 2004 年 6 月 2 日至 6 日多发性硬化中心联合年会上的发言; Compston, A 等人, 西班牙马德里 2006 年 9 月 27 日至 30 日欧洲多发性硬化治疗和研究委员会(ECTRIMS)第 22 届会议发言; Fox, E.等人, 西班牙马德里欧 ECTRIMS 发言(2006))。

阶段性结果源自预先指定的效力和安全性阶段分析, 所述的阶段分析在计划的三年试验中在一年或两年治疗后对全部患者进行。这些分析显示, 在降低 MS 复发风险和减慢持久性劳动能力丧失的增长方面, 阿来组单抗比干扰素 β -1a (Rebif[®]; EMD Serono, Inc.)(一种针对 MS 的注册疗法)更有效。具体而言, 与采用干扰素 β -1a 治疗的患者相比时, 用阿来组单抗方案治疗的患者在至少 1 年和 2 年随访后发生复发的风险降低至少 75%。阿来组单抗治疗的患者在 1 年后还使得发生持久性劳动能力丧失的风险降低至少 60% (相对于 Rebif[®]治疗的患者), 并且在 2 年后再使得该风险降低至少 65%。

在将阿来组单抗作为一种针对 MS 的疗法的初步研究期间, 发现高百分比的个体发生涉及甲状腺的病症。这种现象的首次报告(Coles 等人 *Lancet*, 354:1691-95 (1999))描述了自身免疫甲状腺疾病发展在先前已经接受阿来组单抗作为其 MS 疗法的大约三分之一患者(27 位中有 9 位)中的临床证据及实验室证据。具体而言, 这些患者已经产生针对促甲状腺素受体的抗体和卡比马唑应答性自身免疫甲状腺功能亢进症, 并且他们中的几位也具有表征为自身免疫性甲状腺炎的发作。来自同一研究组(Coles 等, *Neurology*, 60, 2003 年 3 月, 增刊 1)和其他研究组(Compston, A.等人, 在西班牙马德里 2006 年 9 月 27 日至 30 日欧洲多发性硬化治疗和研究委员会(ECTRIMS)第 22 届会议的发言)的后续研究已经证实在阿来组单抗治疗后, 甲状腺病症在 MS 患者中以提高的频率发生。甲状腺疾病一般在首次暴露于阿来组单抗后延迟数月或数年发作。

甲状腺疾病的延迟发作还在特征为淋巴细胞消减和重新进驻的其他环境下出现, 尤其甲状腺疾病在骨髓移植(无论自体或异体移植后或无论因治疗原发性免疫缺损或因医源性骨髓抑制后的重构而言)后延迟发作(Ishiguro H.等

人, *J Clin Endocrinol Metab*, 89(12):5981-6 (2004); Slatter M.A.等人, *Bone Marrow Transplant.*, 33(9):949-53 (2004); Carlson K.等人, *Bone Marrow Transplant.*, 10(2):123-7. (1992); Lee W.Y.等人, *Bone Marrow Transplant.*, 28(1):63-6. (2001)). 化疗方案在这些病例中变动悬殊。它们与阿来组单抗治疗后易患甲状腺疾病的 MS 患者的主要相似性是从天然或医源性消减的初始状态再生淋巴细胞群。

目前对导致淋巴细胞消减疗法复杂化的甲状腺自身免疫病症的发病机制和这些病症延迟发作原因的科学认识是不完整的。

总之, 阿来组单抗似乎对于患有多种病症的患者是一种有效疗法, 不过它在 MS 患者中的使用已经与包括甲状腺病症在内的自身免疫并发症相关联。相似的并发症随其他淋巴细胞消减疗法出现。在一些个体中, 来自涉及淋巴细胞消减的治疗方案的益处可以由副作用抵消。因此, 为了使患者(例如 MS 患者)中伴随利用淋巴细胞消减疗法(如阿来组单抗)而来的效益风险比最大化, 希望获得用于鉴定(例如在启动阿来组单抗治疗前)自身免疫甲状腺疾病的风险升高的那些个体的方法。这样的风险预测将用于支持有依据的医学决策制订, 例如, 基于预测的这种副作用风险, 决定是否在给定个体中启动采用淋巴细胞消减方案的治疗。

发明概述

本发明涉及用于预测甲状腺病症风险的方法, 其中所述的甲状腺病症可能在患者中作为消减淋巴细胞的治疗方案(淋巴细胞消减方案)的并发症出现。该方法基于在接受淋巴细胞消减方案的初次或后续疗程的患者中检测自身抗体的存在或不存在(例如先期评估血液中的自身抗体)。例如, 在阿来组单抗治疗前的验血允许预测阿来组单抗治疗后可能出现的甲状腺疾病的风险。

更具体地, 本发明部分地基于这样的发现: 在用阿来组单抗初次治疗之前或治疗时具有抗甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体的 MS 患者在这种治疗后发生甲状腺疾病的风险升高。

因此, 在一个实施方案中, 本发明包括确定患者的方法, 所述患者在用消减淋巴细胞(并且可能还消减其他细胞类型)的治疗方案治疗后发生甲状腺疾病的风险相对较高, 其中所述方法包括测定来自该患者的生物学样品中的

抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOA)的步骤。该预报性自身抗体的检测呈阳性的患者一旦他们接受用这种方案治疗,则发生甲状腺疾病的风险相对提高。该预报性自身抗体的检测呈阴性的患者接受这种治疗后发生甲状腺疾病的风险相对较低。

在另一个实施方案中,本发明包括确定患者的方法,所述患者在用消减携带 CD52 作为表面标志的细胞(即 CD52-阳性细胞)的治疗方案治疗后发生甲状腺疾病的风险相对较高,其中所述方法包括对源自该患者的生物学样品分析抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOA)的步骤。该预报性自身抗体的检测呈阳性的患者一旦他们接受用消减 CD52-阳性细胞的方案治疗,则发生甲状腺疾病的风险相对提高。该预报性自身抗体的检测呈阴性的患者接受这种治疗后发生甲状腺疾病的风险相对较低。

如本文中所示,“消减 CD52-阳性细胞的方案”包括可部分地或完全清除携带 CD52 标记的人细胞的任意分子。例如,消减 CD52-阳性细胞的药物包括,不限于这样的抗体、小干扰 RNA 或小分子,它们降低血液循环中和/或体内组织中的携带 CD52 的细胞的计数。在具体实施方案中,消减 CD52-阳性细胞的治疗方案包括施用与 CD52 特异性结合的抗体。在一些实施方案中,它是人或人源化抗 CD52 抗体,例如或类似于阿来组单抗(Campath[®]、MabCampath[®]、Campath-1H[®])。

在另一个实施方案中,本发明涉及用于鉴定采用消减淋巴细胞的方案治疗(例如用消减 CD52 阳性细胞的药物(如阿来组单抗)治疗)后具有发生甲状腺疾病的风险的多发性硬化患者的方法,包括确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于该患者中,其中若该抗体在该患者中存在,则该患者具有治疗后发生甲状腺疾病的风险。本文所述的方法适用于患有复发缓解型多发性硬化以及原发性和继发性进行性多发性硬化的患者。

在另一个实施方案中,本发明包括确定治疗后发生甲状腺疾病的风险相对较高的患者的方法,其中所述的治疗包括产生医源性淋巴细胞消减作为所需治疗效应之伴随效应的治疗方案。此类方案的实例包括,但不限于,涉及就治疗肿瘤、自身免疫性或骨髓移植或实体器官移植筹备而言施用一种或多种细胞毒性化疗药物;和施用旨在消减 T 淋巴细胞以抑制器官移植排异的抗胸腺细胞球蛋白(例如 Thymoglobulin[®])的那些方案。

预期本发明的方法将用于预测在用消减淋巴细胞的任意治疗方案治疗后

的患者中发生甲状腺疾病的风险，同时其他细胞类型可以或可以不被所述治疗消减。总淋巴细胞群体包含亚类，主要是 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。在一个实施方案中，消减淋巴细胞的治疗方案是以 T 淋巴细胞为靶标的方案。在另一个实施方案中，它是以 B 淋巴细胞为靶标的方案。在另一个实施方案中，它是以 NK 细胞为靶标的方案。在其他实施方案中，它是以 T 和 B 淋巴细胞及 NK 细胞的各种组合(例如 T 和 B 和 NK；T 和 B 但不包括 NK；等)为靶标的方案。

对发生与淋巴细胞消减相关的甲状腺疾病的风险的预知有助于支持有依据的医学决策制订，例如，基于发生甲状腺疾病的预测风险，决定是否在给定个体中启动采用淋巴细胞消减方案的治疗。

可以在用消减淋巴细胞的方案治疗之前或之后进行旨在确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于该患者中的测试。理想地，在给定疗程之前进行 TPOA 的测试，从而可以由医生或患者在作出治疗决定前考虑潜在治疗风险的情况。然而，作为治疗后风险增加的早期指示，在治疗后了解 TPOA 的存在情况也是有用的。

可以因采用淋巴细胞消减疗法治疗患者而出现的自身免疫甲状腺疾病可以表现为甲状腺功能减退症或甲状腺功能亢进症。共有诊断结果包括格雷夫斯病(又称作弥漫性毒性甲状腺肿、von Basedow 病或突眼性甲状腺肿)和自身免疫性甲状腺炎(称作沉默甲状腺炎或桥本甲状腺炎)及其组合。

一般在从患者获得的血液样品(通常血清或血浆)中寻找抗甲状腺过氧化物酶抗体，不过也可在从该患者获得的任何生物学样品(包括淋巴液、尿和组织)中检测到此抗体。

本领域技术人员会理解，用来检测抗 TPO 抗体存在性的具体方法不是本发明的限制性特征。用于检测抗甲状腺过氧化物酶抗体的多种方法是本领域技术人员熟知的。此类方法包括使用酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、血细胞凝集测定及使用甲状腺过氧化物酶蛋白的一种形式或片段作为旨在吸引待测量抗体并与之结合的靶标的多种其他技术，以及使用适于检测和可能量化所结合抗体的任意方法。上文所述的多种方法和其他相似方法也可以用来检测与甲状腺微粒体(一种富含甲状腺过氧化物酶蛋白的组织级份)反应的抗体以产生等价的诊断结果。抗微粒体抗体基本上等同于 TPOA。其他方法包括测量 TPO 的酶活性，其中通过 TPO 酶活性的抑制推测

TPOA 的存在和浓度。

发明详述

CAMMS223 是一项 2 期临床试验的名称,该临床试验研究与干扰素 β -1a (Rebif[®])相比,两个剂量水平的阿来组单抗在治疗早期 MS、活跃 MS、复发缓解型 MS 患者中的安全性和效力。参与 CAMMS223 的患者在进入之前筛查抗甲状腺刺激激素(TSH)受体抗体(下文为 TSHRA),并且若患者呈抗体阳性,则拒绝接纳。也对患者测试抗甲状腺过氧化物酶抗体(下文为 TPOA),然而这不影响其入选资格或治疗。总体上,将 334 位患者随机分配至 IFN- β -1a 组(44 微克 SC,每周三次)或阿来组单抗高剂量组(24mg/日,静脉内(IV))或低剂量组(12mg/日 IV)。在第 0 月逐日给予阿来组单抗,持续 5 日,并在第 12 月逐日给予阿来组单抗,持续 3 日,并且对于一些患者,在第 24 月再次逐日给予阿来组单抗,持续 3 日。

在接下来的 3 年期间,记录与甲状腺相关的不良事件,并且在固定间隔期上测试全部患者的甲状腺相关激素和甲状腺自身抗体:每季度测试 TSH、L-甲状腺素 (T3)和 L-三碘甲腺原氨酸 (T4)和 TSHRA,并且每年测试甲状腺过氧化物酶抗体(TPOA)两次。使用由 Sweden Diagnostics 制造并由 Somagen 分销的目录号 12396 的市售试剂盒 Varelisa TPO 抗体(试验方法在实施例 1 中描述)测试 TPOA。

该分析的一个重点是几个甲状腺相关的实验室参数异常之间的相关性。阶段分析以 2.2 年中值随访期(1st四分位数= 2.0; 3rd = 2.5)进行。甲状腺相关的不良事件(AE)和实验室异常出现在全部 3 个治疗组中(见前面引用的文献 Compston 等, 2006)。

根据上文提到的阶段分析,具有甲状腺临床 AE 的阿来组单抗治疗的患者比例是 11.1 %而在接受 IFN- β -1a 的患者中该比例是 1.9%。更多的甲状腺 AE 出现在低剂量组中,但这种差异在阿来组单抗剂量之间是不显著的。在 216 位阿来组单抗治疗的患者中报道了 14 位格雷夫斯病或甲状腺功能亢进症患者(6.5%),而在 106 位 IFN- β -1a 治疗的患者中报道 0 位格雷夫斯病或甲状腺功能亢进症患者($p < 0.0001$)。在阿来组单抗治疗后的 216 患者中发现 47 例有 TSHRA (21.8%),而在 IFN- β -1a 治疗后的 103 患者中发现 2 例有 TSHRA (1.9%)。在阿来组单抗治疗后的 16.7%患者中在无临床甲状腺 AE 的情况下出

现甲状腺自身免疫性的实验室标记(TSHRA 和/或 TPOA), 而在 IFN- β -1a 治疗的患者中该比例是 11.3%。

如本文所述, 这些甲状腺相关的事件在基线(治疗前)实验室评估的环境下检验(见实施例 1)。发现在基线处 TPOA 测试为阴性的 176 位阿来组单抗治疗的患者中报道了 17 例(9.7%)甲状腺临床 AE, 而初始测试为阳性的 16 位患者中报道了 5 例(31.1%)甲状腺临床 AE (相对风险 = 3.2, $p=0.029$), 而在基线处 TPOA 测试为阴性的 87 位 IFN- β -1a 治疗的患者中报道了 2 例(2.3%)甲状腺临床 AE, 同时初始测试为阳性的 3 位患者中报道了 0 例(0%)甲状腺临床 AE。令人震惊地, 在基线处 TPOA 测试为阴性的 176 位阿来组单抗治疗的患者中仅 24 位患者(13.6%)产生 TSHRA, 而初始测试为阳性的 16 位患者中 9 位患者(56.3%)产生 TSHRA (相对风险 = 4.1, $p<0.0001$), 并且在基线处 TPOA 测试为阴性的 87 位 IFN- β -1a 治疗的患者中 2 位患者(2.3%)产生 TSHRA, 而初始测试为阳性的 3 位患者中 0 位患者(0%)产生 TSHRA。

因此, 在用阿来组单抗治疗的 MS 患者的回顾性分析中, 与在基线处抗 TPO 抗体测试为阴性的患者相比, 在初次暴露于阿来组单抗之时或之前具有抗 TPO 抗体的患者发生后续甲状腺疾病的风险升高 3 倍或 4 倍。

应当指出在研究中确实发生甲状腺异常的大部分患者在参与时 TPOA 测试为阴性。因此, TPOA 试验似乎具有还算高的特异性, 但是敏感性低。这可能反映 TPOA 测定敏感性不良或可能表明一些患者具有阿来组单抗相关的甲状腺疾病的风险, 即便在基线处无 TPOA。

因此, 本发明包括用于鉴定采用消减淋巴细胞的方案治疗后具有发生甲状腺疾病的风险的患者的方法, 所述方法包括确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于该患者中, 其中若此抗体存在该患者中存在, 则该患者具有治疗后发生甲状腺疾病的风险。

淋巴细胞是在个体的淋巴组织中形成并分成三个主要类别的白血细胞: T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。因此, 在一个方面, 所述方案消减了 T 细胞。在另一个方面, 该方案消减了 B 细胞。在另一个方面, 该方案消减了 NK 细胞。在又一个方面, 该方案消减了 T 和 B 及 NK 细胞的各种组合。该方案包括导致在治疗期间或之后部分地或完全清除患者淋巴细胞的任意治疗计划。在一个实施方案中, 该方案包括施用一种或多种细胞毒性剂(例如药物)。在一个实施方案中, 该方案包括施用这样的药物, 所述的药物消减表达 CD52

作为细胞表面标记的细胞(即 CD52-阳性细胞)。

因此,在一个实施方案中,本发明包括用于鉴定以消减 CD52-阳性细胞的药物治疗后具有发生甲状腺疾病的风险的患者的方法,所述方法包括确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于该患者中,其中若该抗体在该患者中存在,则该患者具有治疗后发生甲状腺疾病的风险。

在具体方面,本发明涉及用于鉴定以消减 CD52-阳性细胞的药物治疗后具有发生甲状腺疾病的风险的 MS 患者的方法,所述方法包括确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于该患者中,其中若该抗体在该患者中存在,则该患者具有发生此甲状腺疾病的风险。

如本文中所示,“消减 CD52-阳性细胞的方案”包括部分地或完全清除携带 CD52 标记的人细胞的任意方案。例如,消减 CD52-阳性细胞的方案包括,不限于施用这样的抗体、小干扰 RNA 或小分子,它们降低血液循环中和/或体内组织中的携带 CD52 的细胞的计数。

在具体实施方案中,消减 CD52-阳性细胞的药物是 CD52 特异性抗体。CD52 特异性抗体是与 CD52 选择性结合,但与样品中(例如含有 CD52 的生物学样品中)的其他分子基本上不结合。如本文中所示,术语“抗体”指免疫球蛋白或其部分并且包括含有抗原结合位点的任意多肽,而不论其来源、产生方法和其他特征。该术语包括,但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性、多特异性、人源化、人的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂交的、突变的、缀和及 CDR 移植的抗体。术语“抗原结合位点”指抗体分子的部分,所述部分包含与局部或完整抗原特异性结合或互补的区域。抗原结合位点可以包含抗体轻链可变区(V_L)和抗体重链可变区(V_H)。抗原结合位点可以由提供一个或多个抗体可变区(例如,由 V_H 区组成的 Fd 抗体片段、由 V_H 区和 V_L 区组成的 Fv 抗体片或由接头连接的 V_H 区和 V_L 区组成的 scFv 抗体片段)。术语“抗 CD52 抗体”或“针对 CD52 的抗体”指与 CD52 的至少一个表位特异性结合的任意抗体。

可以使用多种技术(见例如, Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); *Current Protocols in Immunology*, 编者 Coligan 等人, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1994); Cabilly 等人, 美国专利号 4,816,567; Cabilly 等人, 欧洲专利号 0,125,023 B1; Boss 等人, 美国专利号 4,816,397; Boss 等人, 欧洲专利号 0,120,694 B1; Neuberger, M.S.等人, WO 86/01533; Neuberger,

M.S.等人, 欧洲专利号 0,194,276 B1; Winter, 美国专利号 5,225,539; Winter, 欧洲专利号 0,239,400 B1; Queen 等人, 欧洲专利号 0 451 216 B1;和 Padlan, E.A.等人, EP 0 519 596 A1; Newman, R.等人, *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992); Ladner 等人, 美国专利号 4,946,778; Bird, R.E.等人, *Science*, 242: 423-426 (1988))中的任何一种产生多种抗体及其部分。

在具体实施方案中, 所述 CD52 抗体是阿来组单抗, 一种来自重组 DNA 的人源化抗 CD52 的单克隆抗体。在美国专利号 5,846,534 中披露了阿来组单抗(Campath-1H[®])的包括其中所含三个 CDR 的序列, 所述专利中描述了与抗原 CD52 有效结合的人源化抗体以及用这种抗体治疗患有恶性淋巴瘤的人患者的方法。还披露了用于制备和测试这种抗体的方法。

除了多发性硬化(复发缓解型和原发与继发进行性)之外, 已经用阿来组单抗治疗的疾病还包括恶性血液病如 B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、非霍奇金淋巴瘤和白血病, 以及多种免疫介导性病征, 包括移植物抗宿主病、器官移植排异、血管炎、眼色素层炎、硬皮病、自身免疫血细胞减少症和类风湿性关节炎。然而, 本发明的方法不限于对患有这些具体疾病的患者开展。反而, 该方法用于患有任意疾病的患者, 只要该疾病是用消减淋巴细胞的治疗可处理的, 并且这种治疗与甲状腺疾病发生相关, 在至少一些患者中是如此。

可以因采用淋巴细胞消减疗法治疗患者而出现的自身免疫甲状腺疾病可以表现为甲状腺功能减退症或甲状腺功能亢进症。常见的诊断包括格雷夫斯病(又称作弥漫性毒性甲状腺肿、von Basedow 病或突眼性甲状腺肿)和自身免疫性甲状腺炎(称作沉默甲状腺炎或桥本甲状腺炎)及其组合。

可以在用淋巴细胞消减方案治疗之前或之后进行旨在确定抗甲状腺过氧化物酶抗体是否存在于患者中的测试。理想地, 在初次疗程之前确定抗体的存在, 从而医生或患者可以考虑潜在治疗风险的情况并相对于治疗益处进行权衡。然而, 在初次治疗患者后开展本发明的方法也是有用的, 例如, 旨在确定后续疗程的风险/收益或旨在在治疗后的任一时间监测发生甲状腺疾病的风险的任何递增。

用于检测抗甲状腺过氧化物酶抗体的多种方法是本领域技术人员已知的。在具体实施方案中, 可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)(Premawardhana, L. 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:71-75 (2000); Stagnaro-Green, A.等人,

J. Clin. Endocrinol Metab., 74(3):645-653 (1992))。在本方法的常见应用中,用标准化量的纯化甲状腺过氧化物酶蛋白包被塑料基材。精确地稀释待分析的血液样品并施加到包被的基材上,持续一段时间,在此期间血液样品中的TPOA抗体将因与粘附于基材的TPO相互作用而与该塑料结合。在标准化洗涤步骤以除去与TPO不结合的全部血液组分后,添加会识别并与任何结合抗体(特别包括TPOA)结合的试剂。设计该试剂以具有双重功能:除了与抗体结合外,该试剂还提供与所结合的量成正比的(通常是生色或化学发光的)信号。因此,该信号间接地表示原始样品中TPOA的量。

用于检测抗甲状腺过氧化物酶抗体的多种方法是本领域技术人员已知的,并且一些方法已经广泛使用,如放射免疫测定(Kung, V.T. 等人, *Clin. Chem.*, 27(1):39-42(1981); 血细胞凝集测定(上文 Marazuela 等人)和由 Siemens Medical Solutions Diagnostics 出售的具有化学发光检测术的 Immulite 2000 抗 TPOAb 免疫测定。这些和多种其他技术的相同之处在于它们使用甲状腺过氧化物酶蛋白的一种形式或片段作为旨在吸引待测量的抗体并与之结合的靶标,并且使用适于检测和可能量化所结合抗体的任意方法。在另一个实施方案中,上文所述的多种方法和其他相似方法用来检测与甲状腺微粒体(一种富含甲状腺过氧化物酶蛋白的组织级份)反应的抗体。

在本发明的方法中,可以通过分析从患者获得的样品确定在该患者中存在抗甲状腺过氧化物酶抗体。如本文中所示,“样品”包括可能含有抗甲状腺过氧化物酶抗体的任意适宜的生物学样品。例如,样品包括从个体获得(例如分离)的组织、细胞、生物流体及其提取物。生物流体包括血液(例如全血、浓缩红细胞)、血清、血浆、淋巴液、尿和精液。

本文中所述的方法还可以包括将患者中存在的抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOA)的量(水平、滴度)与适宜对照样品中 POA 的量比较。例如,该对照样品可以取自据信没有发生甲状腺疾病的风险的个体(例如,来自健康个体的样品)。或者,该对照样品可以取自患有相同或相似疾病的患者,其中对所述患者施用不消减淋巴细胞的替代性治疗方案,其中所述的替代性方案与提高的甲状腺疾病的风险不相关。或者,TPOA 的量值可以与已确认的标准比较,其中所述的标准不基于对照生物学样品,例如预期不产生阳性试验结果的稀释物或其他溶液。

以下实施例提供本发明的说明性实施方案。一名本领域普通技术人员会

认识到可以对本发明进行各种修改和变化而不改变本发明的实质或范围。本发明的范围包括这类修改和变化。所述实施例无论如何不限制本发明。

实施例 1: 用于分析与甲状腺过氧化物酶反应的抗体的方法

一种涉及对 TPO 蛋白特异的间接非竞争性酶免疫测定的定性方法用于实施例 2 中所述的 TPOA 测量。该方法包括使用市售试剂盒(Varelisa) TPO 抗体试验, 该试剂盒由 Phadia GmbH (前 Sweden Diagnostics)制造并由 Somagen 分销, 目录号 12396。简而言之, 使用提供的稀释剂, 1/100 稀释患者血清样品, 并将 100 微升稀释的样品置于事先用纯化的 TPO 蛋白包被的塑料孔中。使样品温育 30 分钟, 并且随后用 300 微升所提供的洗涤溶液洗涤 3-5 次。随后向各孔添加 100 微升所提供的试剂, 其中所述试剂包含与抗免疫球蛋白 G (IgG)同种型特异性抗体共价连接的辣根过氧化物酶(HRP)。在另一个 30 分钟温育步骤后, 所述缀合物用 300 微升所提供的洗涤溶液洗涤 3-5 次。随后向各孔添加 100 微升含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的溶液, 其中所述的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺是由 HRP 催化的化学反应的有效底物, 所述的化学反应产生与粘附的 HRP 缀合物的量和该反应持续时间成正比的肉眼可见的比色信号。在一个 10 分钟温育步骤后, 通过添加 50 微升硫酸溶液终止该比色反应。使用分光光度计测量比色信号以测定添加硫酸溶液后 10 至 30 分钟之间在 450nm 波长的吸光度。将结果定性地解读为阴性(阳性对照的吸光度/样品的吸光度<1)、阳性(阳性对照的吸光度/样品的吸光度>1.4)或不肯定(>1.0, 但<1.4)。

实施例 2: 在阿来组单抗治疗复发缓解型多发性硬化(RRMS)后针对甲状腺不良事件风险的自身抗体预测

本研究的目的是检验治疗前甲状腺过氧化物酶抗体(TPOA)作为首次药物暴露后 2 年内阿来组单抗相关的自身免疫甲状腺疾病的风险的预测物。与上文所述的 CAMMS223 临床试验有关, 使用实施例 1 中所述的试验方法和试剂盒, 在全部患者中每季度测试 TSH、游离 T3、游离 T4 和 TSHRA, 并且每年测试抗甲状腺过氧化物酶(TPOA)两次。

如下表中所述, 在 2.2 年中值的随访下, 在基线处 TPOA 测试为阴性的 176 位阿来组单抗治疗的患者中报道了 17 例(9.7%)甲状腺 AE, 而初始测试

为阳性的 16 位患者中报道了 5 例(31.1%)甲状腺临床 AE (RR = 3.2, $p=0.029$), 并且在基线处 TPOA 测试为阴性的 87 位 IFN- β -1a 治疗的患者中报道了 2 例 (2.3%)甲状腺临床 AE, 而初始测试为阳性的 3 位患者中报道了 0 例(0%)甲状腺临床 AE。令人震惊地, 在 TPOA 测试为阴性的 176 位阿来组单抗治疗的患者中 24 位患者(13.6%)产生 TSHRA, 而初始测试为阳性的 16 位患者中 9 位患者(56.3%)产生 TSHRA (RR = 4.1, $p<0.0001$), 而在基线处 TPOA 测试为阴性的 87 位 IFN- β -1a 治疗的患者中 2 位患者(2.3%)产生 TSHRA, 同时初始测试为阳性的 3 位患者中 0 位患者(0%)产生 TSHRA。

表 1

		数目	%
可分析的阿来组单抗患者		192	100
基线抗 TPO -		176	91.7
	甲状腺 AE	17/176	9.7
	TSH-R Ab	24/176	13.6
基线抗 TPO +		16	8.3
	甲状腺 AE	5/16	31.3
	TSH-R Ab	9/16	56.3

这些数据清楚地表明, 在基线处的 TPOA 存在可能导致用阿来组单抗治疗后的甲状腺疾病的风险升高。

实施例 3: 在阿来组单抗治疗复发缓解型多发性硬化(RRMS)后针对甲状腺不良事件风险的自身抗体预测

通过 3 年中值随访后对相同试验的数据分析延续了来自实施例 2 中所示 CAMMS223 的数据的初步分析。如下表中所述, 在基线处 TPOA 测试为阴性的 182 位阿来组单抗治疗的患者中报道了 35 例(19.2%)因阿来组单抗暴露而在 3 年内发生的甲状腺 AE, 而初始测试为阳性的 16 位患者中报道了 8 例 (50%)(RR =2.6, $p=0.0087$), 并且在基线处 TPOA 测试为阴性的 93 位 IFN- β -1a 治疗的患者中报道了 2 例((2.2%)因阿来组单抗暴露在 3 年内发生甲状腺 AE, 而初始测试为阳性的 6 位患者中报道了 0 例(0%)。令人震惊地, 在 TPOA 测

试为阴性的 182 位阿来组单抗治疗的患者中仅 46 位患者(25.3%)产生 TSHRA，相比之下初始测试为阳性的 16 位患者中 10 位患者(62.5%)产生 TSHRA (RR = 2.47, $p < 0.0031$), 而在基线处 TPOA 测试为阴性的 93 位 IFN- β -1a 治疗的患者中 2 位患者(2.2%)产生 TSHRA，同时初始测试为阳性的 3 位患者中 0 位患者(0%)产生 TSHRA。

表 2

		数目	%
可分析的阿来组单抗患者		198	100
基线抗 TPO -		182	91.9
	甲状腺 AE	35/182	19.2
	TSH-R Ab	46/182	25.3
基线抗 TPO +		16	8.1
	甲状腺 AE	8/16	50
	TSH-R Ab	10/16	62.5

这些长期数据继续支持如下结论：在基线处的 TPOA 存在可能导致用阿来组单抗治疗后的甲状腺疾病的风险升高。

通过引用的方式将本说明书中引用的全部出版物(包括专利)完整并入本文。

尽管已经参考本发明的实例实施方案具体地显示和描述了本发明，本领域技术人员会理解可以在其中进行形式和细节方面的多种改变而不脱离由所附权利要求书包括的本发明范围。

专利名称(译)	鉴定甲状腺疾病风险的方法		
公开(公告)号	CN101657721A	公开(公告)日	2010-02-24
申请号	CN200880012149.4	申请日	2008-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	建新公司		
申请(专利权)人(译)	基酶有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基酶有限公司		
[标]发明人	DH马戈林		
发明人	D·H·马戈林		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/74		
CPC分类号	G01N2333/70592 G01N33/6893 G01N2800/046 G01N33/5047 G01N2333/635 G01N33/6854 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/901732 2007-02-16 US		
其他公开文献	CN101657721B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于鉴定具有发生甲状腺疾病的风险的患者的方法，所述的甲状腺疾病在采用消减淋巴细胞的方案治疗后出现，包括确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中，其中若该抗体在该患者中存在，则该患者发生甲状腺疾病的风险升高。具体实施方案是一种用于鉴定具有发生甲状腺疾病的风险的多发性硬化患者的方法，所述的甲状腺疾病在以消减CD52 - 阳性细胞的方案治疗后出现，该方法包括确定抗甲状腺过氧化物酶或甲状腺微粒体抗体是否存在于该患者中，其中若该抗体在该患者中存在，则该患者具有发生甲状腺疾病的风险。

	数目	%
可分析的阿来组单抗患者	192	100
基线抗 TPO -	176	91.7
	甲状腺 AE	17/176
	TSH-R Ab	24/176
基线抗 TPO +	16	8.3
	甲状腺 AE	5/16
	TSH-R Ab	9/16