



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109963865 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201780057501.5

(22)申请日 2017.07.18

(30)优先权数据

62/364,103 2016.07.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/042596 2017.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/017569 EN 2018.01.25

(71)申请人 阿雷特发现公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 杰克·B·考伊三世

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 蒋洪之 安玉

(51)Int.Cl.

G07K 14/47(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

权利要求书3页 说明书63页

序列表4页 附图4页

(54)发明名称

用于检测和治疗肥大细胞活性相关病症的生物标记

(57)摘要

本发明提供了用于有效和准确表征肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情的生物标记。特别地,本发明提供了在肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情中表达的生物标记。那些生物标记在单独或组合使用的情况下可允许更准确、更确定地表征肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情,从而更准确地确定其诊断和治疗,特别是预测MS复发的发生。

1. 一种治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,所述方法包括:  
向个体施用肥大细胞活性抑制剂,其中已在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在。
2. 如权利要求1所述的方法,其中个体被诊断为患有或易患肥大细胞活性相关病症。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述肥大细胞活性抑制剂是或包括:T细胞受体配体,其与一种或多种T细胞活化因子竞争或抑制一种或多种T细胞活化因子。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述肥大细胞活性抑制剂是或包括:肥大细胞粘附抑制剂。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述肥大细胞活性抑制剂是或包括:肥大细胞脱粒产物的抑制剂。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述肥大细胞活性抑制剂是或包括:B细胞活性抑制剂。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述肥大细胞活性抑制剂是或包括:基因治疗剂,其可纠正细胞色素P450家族的突变。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。
9. 一种治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,所述方法包括:  
如果已在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在,则向个体施用以下一种或两种:  
第一药剂,选自软骨素、甲基磺酰甲烷(MSM)、葡糖胺、H<sub>1</sub>受体拮抗剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂及其组合;  
和第二药剂,选自选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)及其组合,  
从而用第一药剂和第二药剂组合治疗个体。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述第一药剂和第二药剂同时施用或依次施用。
11. 一种治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,所述方法包括:  
向个体施用纳米机器人药剂,所述纳米机器人药剂适于检测肥大细胞活性生物标记的存在,并递送肥大细胞活性抑制剂,从而在检测到生物标记时施用肥大细胞活性抑制剂。
12. 一种将个体诊断为易患MS复发的方法,所述方法包括:  
检测个体中或来自个体的样品中肥大细胞活性生物标记的存在、水平和/或位置;  
基于检测到的肥大细胞活性生物标记预测MS复发的发生;和  
施用肥大细胞活性抑制剂以治疗MS复发。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述检测步骤包括使个体或样品与分子造影剂接触以使肥大细胞脱粒可视化。
14. 如权利要求12所述的方法,其中所述样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。
15. 一种确定肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的方法,所述方法包括以下步骤:  
确定患有或易患肥大细胞活性相关病症的个体的样品中一种或多种肥大细胞活性因

子的存在、水平和/或位置；

检测所述一种或多种肥大细胞活性因子的确定存在、水平和/或位置与肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应之间的相关性，从而建立用于确定所述发病率、严重性或治疗反应的肥大细胞活性生物标记的确定存在、水平和/或位置。

16. 如权利要求15所述的方法，其中相关的确定存在、水平和/或位置包括多个数据点，每个数据点表示不同肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。

17. 如权利要求16所述的方法，其中至少一个数据点表示相对于特定肥大细胞活性因子的建立阈值的水平。

18. 如权利要求15所述的方法，其中肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、免疫细胞定位、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。

19. 如权利要求15所述的方法，其中所述肥大细胞活性相关病症是MS。

20. 如权利要求19所述的方法，其中MS的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、免疫细胞定位、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。

21. 如权利要求15所述的方法，其中个体是肥大细胞活性相关病症的小鼠模型。

22. 如权利要求15所述的方法，其中所述确定步骤包括使小鼠模型的组织中的T细胞活化因子、B细胞活化因子和/或肥大细胞脱粒因子可视化。

23. 如权利要求15所述的方法，其中所述样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。

24. 一种检测肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的方法，包括：

从人类患者获取样品：

在样品中检测确定为肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。

25. 如权利要求24所述的方法，其中所述方法还包括将一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置与一种或多种肥大细胞活性因子的参考存在、水平和/或位置进行比较的步骤。

26. 如权利要求24所述的方法，其中所述样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。

27. 一种鉴定用于治疗肥大细胞活性相关病症或多发性硬化症 (MS) 的药剂的方法，所述方法包括以下步骤：

提供候选药剂；

针对活性的存在、水平和/或位置对药剂进行评估，所述活性选自稳定肥大细胞活性、抑制肥大细胞增殖、抑制肥大细胞迁移、抑制细胞因子的释放、抑制脂质衍生的代谢物的释放、抑制颗粒相关代谢物的释放、增强水合作用、减少炎症及其组合。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的方法，其中所述肥大细胞活性生物标记和/或肥大细胞活性因子选自细胞因子、预先形成的颗粒相关代谢物、脂质衍生的代谢物、嗜铬粒蛋白A、免疫球蛋白、核酸及其组合。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述细胞因子选自IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-17、IL-33、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、INF  $\gamma$ 、嗜酸性趋化因子及其组合。

30. 如权利要求28所述的方法,其中所述预先形成的颗粒相关代谢物选自组胺、N-甲基组胺、蛋白聚糖、中性蛋白酶及其组合。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述蛋白聚糖是肝素和/或硫酸软骨素。

32. 如权利要求30所述的方法,其中所述中性蛋白酶选自类胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶、组织蛋白酶G及其组合。

33. 如权利要求28所述的方法,其中所述脂质衍生的代谢物是前列腺素、血栓素和/或白三烯。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述白三烯是白三烯E<sub>4</sub>、白三烯B<sub>4</sub>和/或白三烯C<sub>4</sub>。

35. 如权利要求33所述的方法,其中所述前列腺素是前列腺素D<sub>2</sub>、前列腺素E<sub>2</sub>、11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 和/或tetranor-PGDM。

36. 如权利要求28所述的方法,其中所述免疫球蛋白是IgE。

37. 如权利要求28所述的方法,其中所述核酸是RNA。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述RNA是信使RNA。

39. 如权利要求38所述的方法,其中使用表达阵列确定所述RNA。

40. 一种用于确定个体中MS易感性生物标记的试剂盒,所述试剂盒包括:用于确定一种或多种特定肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置的药剂,其中已确定MS易感性的肥大细胞活性生物标记包括一种或多种特定肥大细胞活性因子。

## 用于检测和治疗肥大细胞活性相关病症的生物标记

[0001] 相关申请数据

[0002] 本申请在35U.S.C.119(e)下要求于2016年7月19日提交的美国临时申请62/364,103的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。2017年7月17日创建的所述ASCII副本命名为2012423-0003\_SL.txt,大小为8,299字节。

### 背景技术

[0005] 制药工业已经认识到,非常需要鉴定与特定疾病事件或治疗结果相关和/或预见或预后特定疾病事件或治疗结果的生物标记。事实上,食品药品监督管理局的生物标记资格小组最近已将其许可证扩展到全球在线生物标记数据库(GOBIOM),现在通常批准对已检测到生物标记的群体施用的治疗方案。

[0006] 制药工业进一步认识到,在许多情况下,建立特定疾病、病症或病情的生物标记还可以为该疾病、病症或病情定义合适的治疗方法。

### 发明内容

[0007] 本公开内容包括以下见解:肥大细胞和/或肥大细胞代谢物可在多发性硬化症(MS)和/或其他炎性疾病、病症和/或病情,特别是其他神经炎症性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发中起重要作用。其中,本公开提供了以下见解:肥大细胞代谢物可有助于增强中枢神经系统(CNS)部位的T细胞和/或肥大细胞的定位。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,本公开提出,如本文所述的肥大细胞代谢物可有助于增加穿过血脑屏障(BBB)和/或淋巴管的一种或多种免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞),例如通过增加或调节BBB和/或淋巴管的通透性(至少相对于免疫细胞),这尤其允许免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)流入CNS,将免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)靶向至一个或多个CNS部位(例如靶向至髓鞘、BBB的基底层)等等。

[0008] 在一些实施例中,本公开定义了先前未被理解的生物途径,该生物途径涉及MS和/或其他炎性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发。

[0009] 其中,本公开定义了与MS和/或一种或多种其他脱髓鞘、自身免疫或炎性疾病、病症和/或病情相关的一种或多种有用的生物标记。例如,在一些实施例中,本公开定义了神经炎症的一种或多种生物标记。先前工作对于鉴定有用的生物标记存在问题,问题通常在于努力集中在了错误的生物途径、事件和/或时机,而本公开鉴定了该问题的源头。本公开教导了与肥大细胞活性和/或脱粒相关的某些事件对MS和/或对一种或多种其他炎性疾病、病症和/或病情的相关性和重要性,并且提供了定义这些事件的生物标记的技术。

[0010] 在一些实施例中,本公开提供了鉴定神经炎症性疾病、病症和/或病情的发展和/或复发的一种或多种早期生物标记的技术。

[0011] 在一些实施例中,本文所述的生物标记是肥大细胞活性(例如活化和/或脱粒)标记。在一些实施例中,本文所述的生物标记是或包括肥大细胞代谢物或肥大细胞活性因子的水平和/或活性,例如细胞因子、预先形成的颗粒相关代谢物、脂质衍生的代谢物、嗜铬球蛋白A、免疫球蛋白(例如IgE)、核酸(例如RNA或mRNA)及其组合。在一些实施例中,细胞因子是IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-17、IL-33、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、INF  $\gamma$ 、嗜酸性趋化因子或其组合。在一些实施例中,预先形成的颗粒相关代谢物是组胺、N-甲基组胺、蛋白聚糖、中性蛋白酶或其组合。在一些实施例中,蛋白聚糖是肝素和/或硫酸软骨素。在一些实施例中,中性蛋白酶是类胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶和/或组织蛋白酶G。在一些实施例中,脂质衍生的代谢物是前列腺素、血栓素和/或白三烯。在一些实施例中,白三烯是白三烯E<sub>4</sub>、白三烯B<sub>4</sub>和/或白三烯C<sub>4</sub>。在一些实施例中,前列腺素包括但不限于前列腺素D<sub>2</sub>、前列腺素E<sub>2</sub>、11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、tetranor-PGDM和/或其其他代谢物。

[0012] 在一个方面,本公开提供了治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,包括:向个体施用肥大细胞活性抑制剂,其中已在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在。在一些实施例中,个体被诊断为患有或易患肥大细胞活性相关病症。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是或包括与一种或多种T细胞活化因子竞争或将其抑制的T细胞受体配体、肥大细胞粘附抑制剂、肥大细胞脱粒产物的抑制剂、B细胞活性抑制剂、转粒化(transgranulation)的抑制剂和/或纠正细胞色素P450家族的突变的基因治疗剂。在一些实施例中,样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。

[0013] 在一个方面,本公开提供了治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,包括:如果已在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在,则向个体施用以下一种或两种:第一药剂,选自软骨素、甲基磺酰甲烷(MSM)、葡糖胺、H<sub>1</sub>受体拮抗剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂及其组合;和第二药剂,选自选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)及其组合,从而用第一药剂和第二药剂组合治疗个体。在一些实施例中,第一药剂和第二药剂同时施用或依次施用。

[0014] 在一个方面,本公开提供了治疗需要治疗的个体的肥大细胞活性相关病症的方法,包括:向个体施用纳米机器人药剂,所述纳米机器人药剂适于检测肥大细胞活性生物标记的存在,并递送肥大细胞活性抑制剂,从而在检测到生物标记时施用肥大细胞活性抑制剂。

[0015] 在一个方面,本公开提供了将个体诊断为易患MS复发的方法,包括:检测个体中或来自个体的样品中肥大细胞活性生物标记的存在、水平和/或位置;基于检测到的肥大细胞活性生物标记预测MS复发的发生;以及施用肥大细胞活性抑制剂以治疗MS复发。在一些实施例中,检测步骤包括使个体或样品与分子造影剂接触以使肥大细胞脱粒可视化。在一些实施例中,样品是全血、血浆、血清、尿液、脑脊液或淋巴液。

[0016] 在一个方面,本公开提供了确定肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的方法,包括:确定患有或易患肥大细胞活性相关病症的个体的样品中一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置;检测所述一种或多种肥大细胞活性因子的确定存在、水平和/或位置与肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应之间的相关性,从而建立用于确定所述发病率、严重性或治疗反应的肥大细胞活性生物标记的确定存在、水平和/或位置。在一些实施例中,相关的确定存在、水平和/或位置包括多个数据点,每个数据

点表示不同肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。在一些实施例中,至少一个数据点表示相对于特定肥大细胞活性因子的建立阈值的水平。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。

[0017] 在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症是MS。在一些实施例中,MS的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症的严重性与前列腺素D<sub>2</sub>和/或组胺的存在和/或水平相关。

[0018] 在一些实施例中,确定步骤包括使小鼠模型组织中的T细胞活化因子、B细胞活化因子和/或肥大细胞脱粒因子可视化。

[0019] 在一个方面,本公开提供了检测肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的方法,包括:从人类患者获取样品,并且在样品中检测确定为肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。在一个实施例中,方法包括将一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置与一种或多种肥大细胞活性因子的参考存在、水平和/或位置进行比较的步骤。在一个实施例中,样品选自全血、血浆、血清、尿液、脑脊液和淋巴液。

[0020] 本发明的一些实施例提供了鉴定遗传标记(例如等位基因变体)的方法,所述遗传标记使个体易于发展肥大细胞活性相关病症(例如自身免疫病、MS)。本发明的一些实施例提供了治疗方法,包括修饰遗传标记(例如等位基因变体)以预防或治疗肥大细胞活性相关病症(例如自身免疫病、MS)。

[0021] 在一个方面,本公开提供了鉴定用于治疗肥大细胞活性相关病症或MS的药剂的方法,包括:提供候选药剂,并且针对活性的存在、水平和/或位置对药剂进行评估,例如稳定肥大细胞活性、抑制肥大细胞增殖、抑制肥大细胞迁移、抑制细胞因子的释放、抑制脂质衍生的代谢物的释放、抑制颗粒相关代谢物的释放、增强水合作用和/或减少炎症。

[0022] 在一个方面,本公开提供了用于确定个体中MS易感性生物标记的试剂盒,包括用于确定一种或多种特定肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置的药剂,其中已确定MS易感性的肥大细胞活性生物标记包括一种或多种特定肥大细胞活性因子。

## 附图说明

[0023] 图1描述了显示免疫后9至13天的平均临床EAE评分的示例性数据。

[0024] 图2描述了显示免疫后第0天至第12天的作为初始体重的百分比的体重变化的示例性数据。

[0025] 图3A和3B描述了显示空白(**naïve**)和EAE小鼠的尿液和血清中组胺/N-甲基组胺水平的示例性数据。

[0026] 图4A和4B描述了显示空白和EAE小鼠的尿液和血清中PGDM水平的示例性数据。

[0027] 图5描述了显示空白小鼠和具有由过继细胞转移诱导的EAE的小鼠的尿液和血清中组胺/N-甲基组胺水平的示例性数据。

[0028] 图6描述了显示空白小鼠和具有由过继细胞转移诱导的EAE的小鼠的尿液和血清中PGDM水平的示例性数据。

[0029] 定义

[0030] 活化剂:如本文所用,术语“活化剂”是指某药剂,其存在或水平与比没有该药剂的情况下(或在不同水平的该药剂的情况下)所观察到的水平或活性更高的靶标水平或活性相关。在一些实施例中,活化剂是其存在或水平与某靶标水平或活性相关的那种,该靶标水平或活性比得上或大于特定参考水平或活性(例如在适当参考条件(例如已知活化剂的存在的情况)下观察到的水平或活性,例如阳性对照)。

[0031] 施用:如本文所用,术语“施用”是指向个体或系统施用组合物。本领域技术人员将意识到可以在适当的情况下用于对个体(例如人类)进行施用的各种途径。例如,在一些实施例中,施用可以是眼部、口服、肠胃外、局部施用等。在一些具体实施例中,施用可以是支气管(例如通过支气管滴注)、口腔、皮肤(其可以是或包括例如局部至真皮、皮内、皮间(interdermal)、透皮等中的一种或多种)、肠内、动脉内、皮内、胃内、髓内、肌肉内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、特定器官内(例如肝内)、粘膜、鼻腔、口腔、直肠、皮下、舌下、局部、气管(例如通过气管内滴注)、阴道、玻璃体施用等。在一些实施例中,施用可涉及间歇性给药(例如在时间上分开的多个剂量)和/或定期(例如由共同时间段分开的单个剂量)给药。在一些实施例中,施用可以包括在至少选定的时间段连续给药(例如灌注)。

[0032] 药剂:如本文所用,术语“药剂”是指任何化学类别的化合物或实体,包括例如多肽、核酸、糖、脂质、小分子、金属或其组合或复合物。在适当的情况下,本领域技术人员将从上下文清楚地看出,该术语可用于指是或包括细胞或生物体,或其部分、提取物或组合的实体。替代地或附加地,如上下文将清楚表明,该术语可用于指天然产物,因为其存在于自然界中和/或从自然界获得。在一些情况下,再次将从上下文中清楚地看出,该术语可用于指一个或多个个人造的实体,因为它是通过人手动设计、制造和/或生产和/或在自然界中找不到的。在一些实施例中,药剂可以以分离或纯的形式使用;在一些实施例中,药剂可以以粗制形式使用。在一些实施例中,可以将潜在药剂提供为集合或库,例如可以对其进行筛选以鉴定或表征其中的活性剂。在一些情况下,术语“药剂”可以指是或包括聚合物的化合物或实体;在一些情况下,该术语可以指包括一个或多个聚合物部分的化合物或实体。在一些实施例中,术语“药剂”可以指不是聚合物和/或基本上不含任何聚合物和/或一个或多个特定聚合物部分的化合物或实体。在一些实施例中,该术语可以指缺少或基本上不含任何聚合物部分的化合物或实体。

[0033] 改善(amelioration):如本文所用,术语“改善”是指预防、减轻或缓解状态,或使个体的状态变好。改善包括但不需要完全康复或完全预防疾病、病症和/或病情(例如肥大细胞活性相关病症)。

[0034] 拮抗剂:如本文所用,术语“拮抗剂”是指其存在、水平、程度、类型或形式与另一药剂(即被抑制的药剂,或靶标)的降低的水平或活性相关的药剂、条件或事件。通常,拮抗剂可以是或包括任何化学类别的药剂,包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、金属和/或显示相关抑制活性的任何其他实体。在一些实施例中,拮抗剂可以是直接的(在这种情况下,它直接对其靶标施加其影响);在一些实施例中,拮抗剂可以是间接的(在这种情况下,它通过与其靶标结合之外的其他方法施用其影响;例如,通过与靶标的调整剂相互作用

用,从而改变靶标的水平或活性)。

[0035] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指包括足以赋予对特定靶抗原的特异性结合的典型免疫球蛋白序列元件的多肽。如本领域已知的,天然产生的完整抗体是约150kD四聚体药剂,其由两个相同的重链多肽(每个约50kD)和两个相同的轻链多肽(每个约25kD)组成,其与彼此缔合以形成通常称为“Y形”结构的结构。每条重链由至少四个结构域(每个长约110个氨基酸)组成——氨基末端可变(VH)结构域(位于Y结构的末端),然后是三个恒定结构域:CH1、CH2和羧基末端CH3(位于Y的茎的基部)。称为“开关”的短区域连接重链可变区和恒定区。“铰链”将CH2和CH3结构域连接到抗体其余部分。这个铰链区中的两个二硫键在完整抗体中将两个重链多肽彼此连接。每条轻链由两个结构域组成——氨基末端可变(VL)结构域,接着是羧基末端恒定(CL)结构域,其由另一个“开关”彼此分开。完整抗体四聚体由两条重链-轻链二聚体组成,其中重链和轻链通过单个二硫键彼此连接;另外两个二硫键将重链铰链区彼此连接,使得二聚体彼此连接并形成四聚体。天然产生的抗体也是糖基化的,通常在CH2结构域上。天然抗体中的每个结构域具有特征在于“免疫球蛋白折叠”的结构,所述“免疫球蛋白折叠”由在压缩的反平行 $\beta$ 桶中彼此相对填装的两个 $\beta$ 折叠(例如3-、4-或5-链折叠)形成。每个可变结构域含有称为“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3)的三个高变环和四个稍微不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成为结构域提供结构框架的 $\beta$ 折叠,而来自重链和轻链的CDR环区在三维空间中聚集在一起,使得它们产生了位于Y结构的顶端的单个高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区结合到补体系统的元件,并且还结合到效应细胞上的受体,包括例如介导细胞毒性的效应细胞。如本领域已知的,Fc区对Fc受体的亲和力和/或其他结合属性可通过糖基化或其他修饰来调节。在一些实施例中,根据本发明产生和/或使用的抗体包括糖基化的Fc结构域,包括具有修饰或改造的这种糖基化的Fc结构域。出于本发明的目的,在某些实施例中,包含足够天然抗体中找到的免疫球蛋白结构域序列的任何多肽或多肽的复合物可以称为和/或用作“抗体”,而不论这种多肽是天然产生的(例如由有机体与抗原发生反应而产生),还是由重组工程、化学合成或其他人工系统或方法产生。在一些实施例中,抗体是多克隆的;在一些实施例中,抗体是单克隆的。在一些实施例中,抗体具有恒定区序列,其是小鼠、兔、灵长类动物或人类抗体的特征。在一些实施例中,抗体序列元件是人源化的、灵长类化的、嵌合的等,如本领域已知的。此外,如本文所用,术语“抗体”可以在适当的实施例中(除非另有说明或从上下文中清楚)指任何本领域已知或发展的构建体或形式,用于在替代呈递中使用抗体结构性和功能性特征。例如,在实施例中,根据本发明使用的抗体采用选自但不限于以下各项的形式:完整IgG、IgE和IgM、双特异性或多特异性抗体(例如Zybody®等)、单链Fv、多肽-Fc融合体、Fab、骆驼样抗体(cameloid antibody)、掩蔽抗体(例如Probody®)、小模块免疫药物(“SMIP™”)、单链或Tandem双特异性抗体(TandAb®)、VHH、Anticalin®、Nanobody®、微型抗体(minibody)、BiTE®、锚蛋白重复蛋白或DARPin®、Avimer®、DART、TCR样抗体、Adnectin®、Affilin®、Trans-body®、Affibody®、TrimerX®、MicroProtein、Fynomer®、Centyrin®和KALBITOR®。在一些实施例中,抗体可能缺乏如果是天然生产便会具有的共价修饰(例如聚糖的附着)。在一些实施例中,抗体可含

有共价修饰(例如聚醚、有效负荷[例如可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其他侧基[例如聚乙二醇等]的附着)。

[0036] 抗原呈递细胞:如本文所用,术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指处理抗原并将抗原呈递给T细胞的细胞。示例性抗原细胞包括树突细胞、巨噬细胞、肥大细胞和某些活化的上皮细胞。

[0037] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”可以应用于一个或多个感兴趣的值,是指类似于所述参考值的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”是指在所述参考值的任何方向上(大于或小于所述参考值)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的范围内的值,除非另有说明,或可从上下文中明显看出(除了该数会超过可能值的100%的情况之外)。

[0038] 与……相关联:如本文所用,术语“与……相关联”是指两个或多个事件或实体,其中一者的存在、水平和/或形式与另一者的存在、水平和/或形式相关。例如,特定实体(例如多肽、遗传特征、代谢物、微生物等)被认为与特定疾病、病症或病情相关联,前提是其存在、水平和/或形式与该疾病、病症或病情的发病率和/或易感性(例如在相关群体之中)相关。在一些实施例中,如果两个或更多个实体直接或间接地相互作用,使得它们彼此物理上接近和/或保持物理接近,它们则是彼此物理上“相关联”。在一些实施例中,彼此物理上相关联的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施例中,彼此物理上相关联的两个或更多个实体彼此不共价连接,而是例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁性及其组合非共价地相关联。

[0039] 结合剂:如本文所用,术语“结合剂”指结合至本文所述的感兴趣的靶标的任何实体。在许多实施例中,感兴趣的结合剂是与其靶标特异性结合的结合剂,因为它在特定的相互作用环境中区分其靶标与其他潜在的结合配偶体。通常,结合剂可以是或包括任何化学类别(例如聚合物、非聚合物、小分子、多肽、碳水化合物、脂质、核酸等)的实体。在一些实施例中,结合剂是单一化学实体。在一些实施例中,结合剂是在相关条件下通过非共价相互作用彼此缔合的两种或更多种离散化学实体的复合物。例如,本领域技术人员将理解,在一些实施例中,结合剂可以包括“通用”结合部分(例如生物素/抗生物素蛋白/链亲和素和/或类特异性抗体之一)和连接到通用结合部分的配偶体的“特异性”结合部分(例如具有特定分子靶标的抗体或适体)。在一些实施例中,这种方法可以允许多种结合剂通过不同特异性结合部分与相同的通用结合部分配偶体的连接进行分子组装。在一些实施例中,结合剂是或包括多肽(包括例如抗体或抗体片段)。在一些实施例中,结合剂是或包括小分子。在一些实施例中,结合剂是或包括核酸。在一些实施例中,结合剂是适体。在一些实施例中,结合剂是聚合物;在一些实施例中,结合剂不是聚合物。在一些实施例中,结合剂是非聚合的,因为它们缺乏聚合部分。在一些实施例中,结合剂是或包括碳水化合物。在一些实施例中,结合剂是或包括凝集素。在一些实施例中,结合剂是或包括肽模拟物。在一些实施例中,结合剂是或包括支架蛋白。在一些实施例中,结合剂是或包括模拟表位。在一些实施例中,结合剂是或包括钉合肽(stapled peptide)。在某些实施例中,结合剂是或包括核酸,例如DNA或RNA。

[0040] 生物活性:如本文所用,术语“生物活性”是指由感兴趣的药剂或实体实现的可观察生物效应或结果。例如,在一些实施例中,特异性结合相互作用是生物活性。在一些实施

例中,生物途径或事件的调节(例如诱导、增强或抑制)是生物活性。在一些实施例中,通过检测由感兴趣的生物途径或事件产生的直接或间接产物来评估生物活性的存在或程度。

[0041] 生物标记:如本文所用,术语“生物标记”是指其存在、水平或形式与感兴趣的特定生物事件或状态相关,以使其被认为是该事件或状态的“标记”的实体。仅举几个例子,在一些实施例中,生物标记可以是或包括特定疾病状态,或特定疾病、病症和/或病情可能发展、发生或再发生的可能性的标记。在一些实施例中,生物标记可以是或包括特定疾病或治疗结果或其可能性的标记。因此,对于感兴趣的相关生物事件或状态,在一些实施例中,生物标记是预测性的,在一些实施例中,生物标记是预后的,在一些实施例中,生物标记是诊断性的。生物标记可以是任何化学类别的实体。例如,在一些实施例中,生物标记可以是或包括核酸、多肽、脂质、碳水化合物、小分子、无机药剂(例如金属或离子)或其组合。在一些实施例中,生物标记是细胞表面标记。在一些实施例中,生物标记是细胞内的。在一些实施例中,生物标记在细胞外找到(例如在细胞外分泌或产生或存在,例如在诸如血液、尿液、泪液、唾液、脑脊液等体液中)。

[0042] 癌症:如本文所用,术语“癌症”、“恶性肿瘤”、“瘤”、“肿瘤”和“癌”是指表现出相对异常、不受控制和/或自主的生长,因此它们表现出异常生长表型的细胞,所述表型的特征在于显示丧失对细胞增殖的控制。在一些实施例中,肿瘤可以是或包括癌前(例如良性)、恶性、转移前、转移和/或非转移的细胞。本公开具体地鉴定了其教导可能特别相关的某些癌症。在一些实施例中,相关癌症可以以实体瘤为特征。在一些实施例中,相关癌症可以以血液肿瘤为特征。通常,本领域已知的不同类型癌症的实例包括例如造血癌症,包括白血病、淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金)、骨髓瘤和骨髓增生性疾病;肉瘤、黑色素瘤、腺瘤、实体组织癌、口腔、喉咙、喉和肺的鳞状细胞癌、肝癌、泌尿生殖系统癌(例如前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌、子宫内膜癌和肾细胞癌)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、皮肤或眼内黑素瘤、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、头颈癌、乳腺癌、胃肠癌和神经系统癌症、诸如乳头状瘤的良性病变等。

[0043] 载体(carrier):如本文所用,“载体”是指与组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体(vehicle)。在一些示例性实施例,载体可包括无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施例中,载体是或包括一种或多种固体组分。

[0044] 组合治疗:如本文所用,术语“组合治疗”是指个体同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施例中,可以同时施用所述两种或更多种方案;在一些实施例中,这些方案可以依次施用(例如在施用任何剂量的第二方案之前施用第一方案的所有“剂量”);在一些实施例中,这些药剂以重叠给药方案施用。在一些实施例中,组合治疗的“施用”可能包括向接受组合中的其他药剂或方式的个体施用一种或多种药剂或方式。为清楚起见,组合治疗不要求以单一组合物一起施用单独的药剂(甚至不要求必须同时施用),尽管在一些实施例中,可以以组合组合物甚至组合化合物(例如,作为单一化学复合物或共价实体的一部分)一起施用两种或更多种药剂或其活性部分。

[0045] 检测实体:如本文所用,术语“检测实体”是指可检测的任何元件、分子、官能团、化合物、片段或部分。在一些实施例中,单独提供或使用检测实体。在一些实施例中,检测实体与(例如加入)另一药剂相关联地提供和/或使用。检测实体的示例包括但不限于:各种配

体、放射性核素(例如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>19</sup>F、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>135</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>64</sup>Cu、<sup>187</sup>Re、<sup>111</sup>In、<sup>90</sup>Y、<sup>99m</sup>Tc、<sup>177</sup>Lu、<sup>89</sup>Zr等)、荧光染料(具体的示例性荧光染料请见下文)、化学发光剂(例如吡啶酯、稳定的二氧杂环丁烷等)、生物发光剂、光谱可分辨的无机荧光半导体纳米晶体(即量子点)、金属纳米颗粒(例如金、银、铜、铂等)、纳米团簇、顺磁性金属离子、酶(酶的具体实例请见下文)、比色标记(例如染料、胶体金等)、生物素、地高辛、半抗原,以及蛋白质,其中存在抗血清或单克隆抗体。

[0046] 确定:本文所述的许多方法包括“确定”步骤。阅读本说明书的本领域技术人员将理解,这种“确定”可以通过使用本领域人员可用的任何各种技术(包括例如本文明确提供的特定技术)来使用或实现。在一些实施例中,确定涉及物理样品的操纵。在一些实施例中,确定涉及数据或信息的考虑和/或操纵,例如使用适于执行相关分析的计算机或其他处理单元。在一些实施例中,确定涉及从源接收相关信息和/或材料。在一些实施例中,确定涉及将样品或实体的一个或多个特征与可比较的参考进行比较。

[0047] 诊断信息:如本文所用,术语“诊断信息”或“用于诊断的信息”是指对确定患者是否患有疾病、病症和/或病情,和/或将疾病、病症和/或病情分类为表型类别或对于病症、病症和/或病情的预后具有重要意义的任何类别有用的信息,或对疾病、病症和/或病情的治疗(一般治疗或任何特定治疗)的可能反应。类似地,“诊断”是指提供任何类型的诊断信息,包括但不限于个体是否可能患有或发展疾病、病症和/或病情、在个体中表现出的疾病、病症和/或病情的状态、分期或特征、与肿瘤的性质或分类有关的信息、与预后有关的信息和/或在选择适当治疗中有用的信息。治疗的选择可包括特定治疗剂或其他治疗方式(例如手术、放射等)的选择、关于是否不递送还是递送治疗的选择、与给药方案有关的选择(例如特定治疗剂或治疗剂的组合的一个或多个剂量的频率或水平)等。

[0048] 剂型、单位剂型或单位剂量:如本文所用,术语“剂型”、“单位剂型”或“单位剂量”是指以单剂量和/或药物组合物的物理离散单位施用的量。在许多实施例中,单位剂量含有预定量的活性剂。在一些实施例中,单位剂量含有完整单剂量的药剂。在一些实施例中,施用超过一个单位剂量以实现总单剂量。在一些实施例中,为了达到预期的效果,需要或预期需要施用多个单位剂量。单位剂量可以例如是含有预定量的一种或多种治疗剂的一定量液体(例如可接受的载体)、预定量的一种或多种固体形式的治疗剂、含有预定量的一种或多种治疗剂的缓释制剂或药物递送装置等。应当理解,除了治疗剂之外,单位剂量可以存在于包括任何各种组分的制剂中。例如,可包括可接受的载体(例如药物上可接受的载体)、稀释剂、稳定剂、缓冲剂、防腐剂等,如下文所述。本领域技术人员将理解,在许多实施例中,特定治疗剂的适当的每日总剂量可包括单位剂量的部分或多个单位剂量,并且可以由例如主治医师在合理的医学判断范围内决定。在一些实施例中,任何特定个体或生物体的特定有效剂量水平可取决于多个因素,包括所治疗的病症和病症的严重性;所用特定活性化合物的活性;所用的特定组合物;个体的年龄、体重、总体健康、性别和饮食;施用时间和所用特定活性化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所用特定化合物组合或巧合使用的药物和/或附加疗法,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0049] 给药方案:如本文所用,术语“给药方案”是指通常由时间段分开单独地向个体施用的单位剂量(通常多于一个)组。在一些实施例中,给定的治疗剂具有推荐的给药方案,其可以包括一个或多个剂量。在一些实施例中,给药方案包括多个剂量,每个剂量在时间上与

其他剂量分开。在一些实施例中，单独的剂量以相同长度的时间段彼此分开；在一些实施例中，给药方案包括多个剂量和分开单独剂量的至少两个不同的时间段。在一些实施例中，给药方案内的所有剂量具有相同的单位剂量份量。在一些实施例中，给药方案内的不同剂量具有不同的分量。在一些实施例中，给药方案包括第一剂量分量的第一剂量，然后是不同于第一剂量分量的第二剂量分量的一个或多个附加剂量。在一些实施例中，给药方案包括第一剂量分量的第一剂量，然后是与第一剂量分量相同的第二剂量分量的一个或多个附加剂量。在一些实施例中，当在相关群体中施用，给药方案与期望或有益的结果相关（即，是治疗给药方案）。

[0050] 赋形剂：如本文所用，术语“赋形剂”是指可以包含在药物组合物中的非治疗剂，例如以提供或有助于期望的稠度或稳定作用。合适的药物赋形剂包括例如淀粉、葡糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0051] 表达：如本文所用，术语“表达”是指核酸序列的一个或多个以下事件：(1) 从DNA序列（例如通过转录）产生RNA模板（例如信使RNA）；(2) RNA转录物的处理（例如通过剪接、编辑、5'端帽形成和/或3'末端形成）；(3) 将RNA翻译成多肽或蛋白质；和/或(4) 多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0052] 事件：如本文所用，术语“事件”是指肥大细胞活性。在一些实施例中，事件可以反映在组织或器官内的肥大细胞的定位或迁移中。在一些实施例中，事件可以反映在与其他细胞类型的相互作用的程度或类型中。在一些实施例中，相互作用可以是转粒化。在一些实施例中，事件可以反映在与一个或多个特定蛋白质或肥大细胞部位的相互作用的程度或类型中。

[0053] 基因：如本文所用，术语“基因”是指染色体中编码产物的DNA序列（例如诸如信使RNA的RNA产物和/或多肽产物）。在一些实施例中，基因包括编码序列（即，编码特定产物的序列）；在一些实施例中，基因包括非编码序列。在一些特定实施例中，基因可包括编码（例如外显子）和非编码（例如内含子）序列。在一些实施例中，基因可以包括一个或多个调节元件，其例如控制或影响基因表达（例如细胞类型特异性表达、诱导型表达等）的一个或多个方面。

[0054] 基因产物或表达产物：如本文所用，术语“基因产物”或“表达产物”是指从基因转录而来的RNA（预处理和/或后处理）或由从基因转录而来的RNA编码的多肽（修饰前和/或修饰后）。

[0055] 改善、增加或减少：如本文所用，术语“改善”、“增加”或“减少”或其语法等同物是指相对于基线测量的值，例如在本文所述治疗起始之前在同个体中的测量，或在没有本文所述治疗的情况下对照个体中（或多个对照个体）中的测量。在一些实施例中，“对照个体”是患有与所治疗个体相同形式的疾病或损伤的个体。

[0056] 抑制剂：如本文所用，术语“抑制剂”是指其存在、水平、程度、类型或形式与另一种药剂（即被抑制的药剂，或靶标）的水平或活性降低相关的药剂、病症或事件。通常，抑制剂可以是或包括任何化学类别的药剂，包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、金属和/或显示相关抑制活性的任何其他实体、病症或事件。在一些实施例中，抑制剂可以是直接的（在这种情况下，它直接对其靶标施加其影响，例如通过与靶标结合）；在一些实施例

中,抑制剂可以是间接的(在这种情况下,它通过与靶标的调整剂相互作用和/或以他方式改变靶标的调整剂来施加其影响,从而降低靶标的水平和/或活性)。

[0057] 试剂盒:如本文所用,术语“试剂盒”是指用于递送材料的任何递送系统。在反应测定的情况下,此类递送系统包括允许反应试剂(例如在适当容器中的寡核苷酸、酶等)和/或支持材料(例如缓冲液、进行测定的书面说明等)从一个位置到另一个位置的储存、运输或递送的系统。例如,试剂盒包括包含相关反应试剂和/或支持材料的外壳(例如盒子)。如本文所用,术语“片段化试剂盒”是指包括两个或更多个单独容器的递送系统,每个容器包含总试剂盒组份的子部分。容器可以一起或分开地递送到预期的接收者。例如,第一容器可含有用于测定的酶,而第二容器含有寡核苷酸。术语“片段化试剂盒”旨在涵盖联邦食品、药品和化妆品法案第520(e)节规定的分析物特异性试剂(ASR)的试剂盒,但不限于此。实际上,包括两个或更多个单独容器,而每个容器包含总试剂盒组分的子部分的任何递送系统包括在术语“片段化试剂盒”中。相反,“组合试剂盒”是指在单个容器中(例如在容纳每所需组分的单个盒子中)包含反应测定的所有组分的递送系统。术语“试剂盒”包括片段化和组合试剂盒。

[0058] 肥大细胞活性因子:如本文所用,术语“肥大细胞活性因子”是指其存在、水平或位置与肥大细胞活性相关的药剂。在一些实施例中,肥大细胞活性因子由肥大细胞(例如可以是肥大细胞代谢物)产生。在一些这样的实施例中,肥大细胞活性因子可以是其位置(例如颗粒内与释放时)与肥大细胞活性相关的肥大细胞代谢物;替代地或附加地,在一些这样的实施例中,肥大细胞活性因子可以是其产生与肥大细胞活性相关联地触发或增加的肥大细胞代谢物。在一些实施例中,肥大细胞活性因子不是由肥大细胞产生,而是由其存在、水平或位置与肥大细胞活性相关的药剂产生。本领域技术人员将熟悉作为肥大细胞活性因子的各种药剂。本文的表1包括此类药剂的代表性药剂。

[0059] 肥大细胞代谢物:如本文所用,术语“肥大细胞代谢物”是指由肥大细胞产生并通常由肥大细胞释放的化学化合物。在一些实施例中,肥大细胞代谢物以颗粒储存在肥大细胞中,并且通过脱粒释放。替代地或附加地,在一些实施例中,肥大细胞代谢物在肥大细胞活化时合成。本领域技术人员将熟悉作为肥大细胞代谢物的各种药剂;本文的表1包括此类药剂的代表性药剂。

[0060] 肥大细胞部位:如本文所用,术语“肥大细胞部位”是指体内存在肥大细胞或最近存在肥大细胞的部位。在一些实施例中,肥大细胞部位是骨髓、外周血、结缔组织、CNS(例如脑、脊髓、脑膜)、粘膜、淋巴管。

[0061] 调节剂:如本文所用,术语“调节剂”是指某实体,该实体在其中观察到感兴趣的活性的系统中的存在和水平与不存在该调节剂时在其他可比较条件下观察到的相比该活性的水平和/或性质的变化相关。在一些实施例中,调节剂是活化剂,因为与不存在该调节剂时在其他可比较条件下观察到的相比,活性在该调节剂的存在下增加。在一些实施例中,调节剂是拮抗剂或抑制剂,因为与不存在该调节剂时在其他可比较条件下观察到的相比,活性在该调节剂的存在下降低。在一些实施例中,调节剂直接与靶实体相互作用,该靶实体的活性是感兴趣的。在一些实施例中,调节剂间接与靶实体相互作用(即,直接与跟靶实体相互作用的中间剂相互作用),该靶实体的活性是感兴趣的。在一些实施例中,调节剂影响感兴趣的靶实体的水平;替代地或另外地,在一些实施例中,调节剂影响感兴趣的靶实体的活

性,而不影响靶实体的水平。在一些实施例中,调节剂影响感兴趣的靶实体的水平和活性,使得观察到的活性差异不完全由观察到的水平差异解释或与其相称。

[0062] 患者:如本文所用,术语“患者”是指向其施用或可向其施用所提供的组合物(例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的)的任何生物体。典型患者包括动物(例如哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人类)。在一些实施例中,患者是人类。在一些实施例中,患者患有或易患一种或多种病症或病情。在一些实施例中,患者显示病症和/或病情的一种或多种症状。在一些实施例中,患者已被诊断患有的一种或多种病症或病情。在一些实施例中,一种或多种病症或病情是或包括癌症,或一种或多种肿瘤的存在。在一些实施例中,患者正在接受或已接受某些疗法以诊断和/或治疗疾病、病症或病情。在一些实施例中,患者是个体。

[0063] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”是指其中活性剂与一种或多种药学上可接受的载体配制在一起的组合物。在一些实施例中,活性剂以适合于在治疗方案中施用的单位剂量份量存在,其显示当施用于相关群体时实现预定治疗效果的统计学显著概率。在一些实施例中,药物组合物可以特别配制用于以固体或液体形式施用,包括适用于以下的那些:口服施用,例如浸液(水溶液或非水溶液或悬浮液)、片剂(例如用于口腔、舌下和全身吸收的那些)、丸剂、粉末、颗粒、施用于舌头的糊剂;肠胃外施用,例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如作为无菌溶液或悬浮液,或缓释制剂;局部施用,例如作为施用于皮肤、肺部或口腔的乳膏、软膏剂或控释剂贴剂或喷雾剂;阴道内或直肠内施用,例如作为子宫托、乳膏或泡沫;舌下施用;眼部施用;经皮施用;或鼻腔、肺部和其他粘膜表面。

[0064] 药学上可接受的:如本文所用,当术语“药学上可接受的”应用于用于配制本文公开的组合物的载体、稀释剂或赋形剂时,指载体、稀释剂或赋形剂必须与组合物的其他成分相容,并对其接收者无害。

[0065] 药学上可接受的载体:如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料,其涉及将主题化合物从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的另一部分。在与制剂的其他成分相容并且对患者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖类,例如乳糖、葡糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素;粉状黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;和药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0066] 生理状况:如本文所用,术语“生理状况”是某状况,细胞或生活体在该状况下存活和/或繁殖。在一些实施例中,该术语是指生物体或细胞系统在自然界中可能发生的外部或内部环境的状况。在一些实施例中,生理状况是存在于人类或非人动物体内(尤其是存在于手术部位和/或手术部位内)的那些状况。生理状况通常例如20至40°C的温度范围、1的大气压、6至8的pH、1至20mM的葡糖浓度、大气水平的氧浓度,以及在地球上遇到的重力。在一些实施例中,将实验室中的状况操纵和/或维持在生理状况。在一些实施例中,在生物体中遇

到生理状况。

[0067] 预防:如本文所用,术语“预防”是指特定疾病、病症和/或病情的一种或多种症状的发作延迟,和/或频率和/或严重性的降低。在一些实施例中,基于群体评估预防,使得如果在易患疾病、病症和/或病情的群体中观察到该疾病、病症和/或病情的一种或多种症状的发展、频率和/或强度的统计学显著降低,则认为药剂“预防”该特定疾病、病症和/或病情。当疾病、病症和/或病情的发作已经延迟了预定的时间段,则可以认为预防是完全的。

[0068] 参考:如本文所用,术语“参考”是指相对于其进行比较的标准或对照。例如,在一些实施例中,将感兴趣的药剂、动物、个体、群体、样品、序列或值与参考或对照药剂、动物、个体、群体、样品、序列或值进行比较。在一些实施例中,与感兴趣的测试或确定基本上同时地测试和/或确定参考或对照。在一些实施例中,参考或对照是历史参考或对照,其任选地体现在有形介质中。通常,如本领域技术人员所理解的,在与在评估下的那些条件或环境可比较的条件或环境下,确定或表征参考或控制。本领域技术人员将理解,何时存在足够的相似性以证明对于特定可能参考或对照的依赖性和/或比较性。

[0069] 样品:如本文所用,术语“样品”是指从感兴趣的生物来源(例如组织或生物体或细胞培养物)获得或衍生的生物样品,如本文所述。在一些实施例中,感兴趣的来源包括生物,例如动物或人类。在一些实施例中,生物样品是或包括生物组织或流体。在一些实施例中,生物样品可以是或包括骨髓;血液;血细胞;血浆;血清;腹水;组织或细针活检样品;含细胞的体液;自由浮动的核酸;痰;唾液;尿液;脑脊液、腹膜液;胸水;粪便;淋巴;妇科液体;皮肤拭物;阴道拭物;口腔拭物;鼻腔拭物;洗液或灌洗液,例如导管灌洗液或支气管肺泡灌洗液;吸出物(aspirate);刮出物(scraping);骨髓标本;组织活检标本;手术标本;粪便、其他体液、分泌物和/或排泄物;和/或其中的细胞等。在一些实施例中,生物样品是或包括从个体获得的细胞。在一些实施例中,获得的细胞是或包括来自从其获得样品的个体的细胞。在一些实施例中,样品是通过任何适当的方法直接从感兴趣的来源获得的“初级样品”。例如,在一些实施例中,通过选自活组织检查(例如细针抽吸或组织活检)、手术、收集体液(例如血液、淋巴、粪便等)的方法获得初级生物样品。在一些实施例中,如从上下文中显而易见的,术语“样品”是通过处理初级样品(例如,通过除去初级样品的一种或多种组合和/或向初级样品添加一种或多种药剂)而获得的制剂。例如,使用半透膜过滤。这种“经处理的样品”可以包括例如从样品中提取或通过使初级样品经受某些技术(例如mRNA的扩增或逆转录、某些组分的分离和/或纯化等)而获得的核酸或蛋白质。

[0070] 个体:如本文所用,术语“个体”是指生物,通常是哺乳类动物(例如人类,在一些实施例中,包括产前人类形式)。在一些实施例中,个体患有相关疾病、病症和/或病情。在一些实施例中,个体易患疾病、病症或病情。在一些实施例中,个体显示疾病、病症和/或病情的一种或多种症状或特征。在一些实施例中,个体不显示疾病、病症和/或病情的任何症状或特征。在一些实施例中,个体是具有对疾病、病症或病情的易感性或风险的一种或多种特征的人。在一些实施例中,个体是患者。在一些实施例中,个体是对其施用和/或已经施用了诊断和/或治疗的个体。

[0071] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指表现出总或接近总程度或幅度的感兴趣的特征或性质的定性条件。生物学领域的技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)完成和/或继续至完成或实现或避免绝对结果。因此,术语“基本上”用于表现许多生物

和化学现象中固有的完整性的潜在缺乏。

[0072] 易患:如本文所用,“易患”疾病、病症或病情(例如肥大细胞活性相关病症)的个体处于发展该疾病、病症或病情的风险中。在一些实施例中,易患疾病、病症或病情的个体不显示该疾病、病症或病情的任何症状。在一些实施例中,易患疾病、病症或病情的个体未被诊断患有该疾病、病症或病情。在一些实施例中,易患疾病、病症或病情的个体是已经暴露于与该疾病、病症或病情的发展相关的状况的个体。在一些实施例中,发展疾病、病症和/或病情的风险是基于群体的风险(例如个体的家庭成员患有疾病、病症或病情)。

[0073] 症状减轻:如本文所用,术语“症状减轻”是指特定疾病、病症和/或病情在量级(例如强度、严重性等)和/或频率上降低。为清楚起见,延迟特定症状发作被认为是降低该症状的频率的一种形式。

[0074] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”是指施加时产生期望的效果的量。在一些实施例中,该术语是指当根据治疗给药方案施加至患有或易患疾病、病症和/或病情的群体时,足以治疗该疾病、病症和/或病情的量。在一些实施例中,治疗有效量是降低疾病、病症和/或病情的一种或多种症状的发病率和/或严重性和/或延迟其发作的量。本领域技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上不需要在特定个体中实现成功治疗。相反,治疗有效量可以是当施加至需要这种治疗的患者时在相当多个体中提供特定期望药理反应的量。在一些实施例中,对治疗有效量的引用可以是对在一种或多种特定组织(例如受疾病、病症和/或病情影响的组织)或流体(例如血液、唾液、血清、汗液、泪液、尿液等)中测量到的量的引用。本领域的技术人员将理解,在一些实施例中,可以以单剂量配制和/或施用治疗有效量的特定药剂或疗法。在一些实施例中,治疗有效药剂可以多剂量配制和/或施用,例如作为给药方案的一部分。

[0075] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指疗法的任何施用,其部分地或完全地缓解、改善、缓和、抑制特定疾病、病症和/或病情的一种或多种症状、特征和/或原因、延迟其发作、降低其严重性和/或降低其发病率。在一些实施例中,这种治疗可以是未表现出相关疾病、病症和/或病情的体征的个体的治疗,和/或仅表现出疾病、病症和/或病情的早期体征的个体的治疗。替代地或附加地,这种治疗可以是表现出相关疾病、病症和/或病情的一种或多种确定体征的个体的治疗。在一些实施例中,治疗可以是已被诊断患有相关疾病、病症和/或病情的个体。在一些实施例中,治疗可以是已知具有一种或多种易感因子的个体的治疗,所述易感因子与相关疾病、病症和/或病情的发展风险增加在统计学上相关。

## 具体实施方式

[0076] 肥大细胞活性相关病症

[0077] 本发明包括肥大细胞活性与许多疾病的病理有关的见解。因此,本公开将肥大细胞活性相关的疾病、病症和/或病情定义为肥大细胞活性在其病理(例如体征、症状、发作、严重性、进展、复发)中起作用的病症。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症是肥大细胞活化病症。在一些实施例中,肥大细胞活性可包括脱粒。脱粒是细胞过程,其从细胞内找到的分泌小泡(例如颗粒)释放分子(例如代谢物)。

[0078] 其中,本公开教导了肥大细胞活性和/或脱粒可以触发和/或促进不期望和/或破坏性事件,并且还具体地记载,肥大细胞活性和/或脱粒的某些方面可以造成某些炎性疾

病、病症和/或病情的特征和/或与之相关,如本文所述。其中,本公开记载了肥大细胞活性和/或脱粒的某些方面可以造成MS的特征(例如对MS复发的易感性、MS严重性)和/或一种或多种其他炎性疾病、病症和/或病情(例如,特别是一种或多种神经炎症性疾病、病症和/或病情)的特征,和/或与之相关。因此,本公开描述了“不期望的”肥大细胞活性和/或脱粒,并且定义了其某些特征和/或标记(即定义了肥大细胞活性生物标记)。

[0079] 在一些实施例中,肥大细胞活性可以反映在肥大细胞活性因子的水平和/或位置的变化中。在一些实施例中,水平的变化可涉及增加的合成和减少的降解中的一种或两种。在一些实施例中,位置的改变可涉及从细胞释放(例如从肥大细胞释放肥大细胞代谢物,例如通过脱粒释放)。在一些实施例中,位置的改变可涉及增加的存在(例如肥大细胞部位中肥大细胞活性因子的增加的存在,例如由肥大细胞或由肥大细胞以外的细胞释放)。

[0080] 在一些实施例中,肥大细胞活性的确定可涉及检测肥大细胞活性因子基因产物(即编码肥大细胞活性因子的基因的产物)的水平。在一些实施例中,肥大细胞活性因子基因产物是或包括RNA;在一些实施例中,肥大细胞活性因子基因产物是或包括多肽。

[0081] 在一些实施例中,肥大细胞活性因子基因产物的水平在生物样品中。在一些实施例中,生物样品是全血、血浆、血清、尿液、脑脊液(CSF)和淋巴液。

[0082] 在一些实施例中,检测肥大细胞活性因子基因产物的水平涉及确定是否检测到肥大细胞活性因子基因产物(即,检测基因产物的存在)。在一些实施例中,检测肥大细胞活性因子基因产物的水平涉及测量(例如量化)产物的水平。

[0083] 在一些实施例中,肥大细胞活性可以反映在肥大细胞在组织或器官(例如CNS中)内的定位或迁移中。在一些实施例中,检测肥大细胞的定位或迁移可涉及本领域已知的技术,例如体外和体内成像技术和免疫组织化学。

[0084] 在一些实施例中,肥大细胞活性可以反映在与其它细胞类型的相互作用的程度或类型中,例如血脑屏障的内皮细胞、T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和/或周细胞。在一些实施例中,此类相互作用可以是或包括转粒化。在一些实施例中,转粒化包括例如与非肥大细胞的结合和/或缔合,和/或将一种或多种肥大细胞代谢物直接释放到非肥大细胞中。在一些实施例中,非肥大细胞是T细胞或神经元。在一些实施例中,检测肥大细胞与其它细胞类型的相互作用可涉及体外和体内成像技术和免疫组织化学。

[0085] 在一些实施例中,肥大细胞活性反映在与一种或多种特定蛋白质或部位的相互作用的程度或类型中;在一些实施例中,这些蛋白质或部位可以是或包括例如BBB的基层或髓磷脂。在一些实施例中,检测肥大细胞与一种或多种蛋白质或部位的相互作用可涉及体外和体内成像技术和免疫组织化学。

[0086] 癌症

[0087] 其中,本公开教导了肥大细胞活性可以与癌症的一种或多种特征相关联和/或具有其特征。因此,根据本公开的一些实施例,癌症可以被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0088] 在一些实施例中,可以是根据本公开的肥大细胞活性相关病症的癌症可以是或包括膀胱癌、乳腺癌、类癌、结肠癌、直肠癌、成胶质细胞瘤、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、恶性黑素瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、咽喉癌和子宫癌。

[0089] 在一些实施例中,本公开教导了肥大细胞活性和/或脱粒在癌症的病学(例如体征、症状、发作、严重性、进展、复发)中起作用。肥大细胞可通过血管生长、通透性和转移的介导在肿瘤疾病中起作用(Ammendola等,Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie (2016) 43:109-113;Conti等,Ann.Clin.Lab.Sci. (2007) 37:315-322)。

[0090] 在一些实施例中,本公开教导了如本文所述的肥大细胞生物标记可以是癌症的有用生物标记。例如,在一些实施例中,并根据本公开,确定和/或检测了这种可以用作癌症、发展癌症的风险、对治疗干预的反应、癌症进展的可能性和/或癌症的严重性的指标的肥大细胞生物标记。

[0091] 炎性病征

[0092] 本公开提供了可以与炎性疾病、病症和/或病情的一种或多种特征相关和/或具有其特征的肥大细胞活性。因此,根据本公开的一些实施例,炎性病征可以被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0093] 在一些实施例中,可以是根据本公开的肥大细胞活性相关病症的炎性病征可以是或包含神经炎症病症,例如MS、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病。神经炎症病症的特征在于包括脑和脊髓的CNS的慢性炎症,并且可能是由于例如自身免疫反应、衰老、传染剂(例如细菌、病毒)和/或创伤。在CNS的急性炎症发作期间,CNS内的小胶质细胞被活化以反应神经损伤或损害的来源。

[0094] 在不希望受到任何特定理论束缚的情况下,通常,由紧密连接、厚基底膜、周细胞和星形胶质细胞彼此连接的内皮细胞组成的BBB限制了分子(包括免疫细胞)从外周血进入CNS的细胞外液的通道。然而,随着时间的推移,炎症变成慢性,BBB可能会受到损害,从而导致循环免疫细胞能够进入CNS,并直接与神经元、神经胶质细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞)和内皮细胞相互作用。

[0095] 在一些实施例中,本公开提供了以下见解:肥大细胞代谢物可有助于调节或增强血脑屏障的通透性,其尤其允许免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)流入CNS。在一些实施例中,本公开提供了免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)通过CNS内的淋巴管流入CNS。在一些实施例中,本公开提供了肥大细胞代谢物可有助于调节或增强淋巴管的通透性。

[0096] 在一些实施例中,本公开提供了增强淋巴管的通透性导致T细胞和/或肥大细胞在CNS中(特别是在神经元或附近)的定位。在一些实施例中,本公开提供增强BBB的通透性导致T细胞和/或肥大细胞在CNS中(特别是在神经元或附近)的定位。在一些实施例中,本公开提供了以下见解:免疫细胞流入CNS导致神经炎症和/或神经变性疾病、病症和/或病情的起始、恶化或复发。在一个实施例中,复发是MS复发。

[0097] 在一些实施例中,进入CNS的免疫细胞可包括B细胞、T细胞、巨噬细胞、浆细胞和肥大细胞。在一些实施例中,这些细胞通过释放细胞因子和透过BBB募集额外的免疫细胞来延长炎症。在一些实施例中,慢性神经炎症反应导致最终的神经变性,其特征在于脱髓鞘、斑块的形成、神经原纤维结的形成等。CNS的慢性炎症通常与神经变性疾病相关,例如MS、阿尔茨海默病和帕金森病。

[0098] 在一些实施例中,本公开教导了如本文所述的肥大细胞生物标记可以是炎性疾病的有用生物标记。例如,在一些实施例中,根据本公开,确定和/或检测这种可以用作炎性病

症、发展炎性病证的风险、对治疗干预的反应、炎性病证进展的可能性和/或炎性病证的严重性的指标的肥大细胞生物标记。

#### [0099] 多发性硬化症

[0100] 其中,本公开教导了肥大细胞活性可以与MS的一种或多种特征相关联和/或其具有其特征。因此,根据本公开的一些实施例,MS可以被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0101] MS是一种影响CNS的自身免疫病,其特征在于可变的症状,例如疲劳、步态困难、身体麻木或刺痛、肌肉无力、头晕、眩晕、疼痛、肌肉痉挛和视力问题。美国超过40万人患有这种病症。在MS中,CNS神经纤维周围的髓磷脂涂层和神经纤维本身受损,导致脑、脊髓和外周之间神经传递的破坏。损伤的严重性和位置因患者而异,导致症状不同。

[0102] 大量证据表明,MS最初是免疫引发的疾病,导致CNS内继发性脱髓鞘和轴突损伤。MS的特征在于疾病的首10至15年期间的复发或发作,其由炎性细胞波引起。在此阶段之后,许多患者经历缓慢的进行性恶化,称为“继发进展”,这可能是由于CNS本身内部的炎性和神经退行性机制所致。MS治疗的总体目标是预防复发或发作,并减缓或预防继续进展的发作。

[0103] 已经鉴定了四种不同类型或过程的MS:临床孤立综合症(CIS)、复发缓解型MS(RRMS)、原发进行型MS(PPMS)和继发进行型MS(SPMS)。CIS的特征在于具有神经症状的脱髓鞘和CNS炎症的初始发作。初始发作可以持续长达12小时,接着可能是或不是MS的进一步发作和发展。RRMS是最常见的MS类型,其特征在于其中观察到新的或更高严重性的神经系统的发作或发病。在发作或发病期间,可以在MRI上观察到新的病变。在发作之间(即在缓解期间),症状可以完全解决或持续并变为永久性的。与RRMS不同,PPMS患者经历神经功能恶化和累积的残疾,而没有缓解期。随着疾病的进展,患者可能经历活动性疾病(active disease)(即,偶尔复发)、非活动性疾病、症状和残疾恶化或没有进展的进行性疾病。最后,SPMS描述了疾病过程,其中神经功能逐渐恶化,类似于PPMS中观察到的,但接着复发和缓解MS的初始过程。在SPMS中,可能偶尔会出现复发和不稳定时期。

[0104] MS的原因尚不完全清楚,但是据信是由于至少几种因素的相互作用,包括:免疫、环境、传染和/或遗传因素。已经鉴定了超过200种MS易感基因,表明MS在遗传易感宿主中较为常见,但是有相当多的证据表明,环境因素促成并可能相互作用以引起疾病的发作。许多相同的因素,包括维生素D水平和吸烟与复发的起始有关,表明在炎症细胞活化和迁移到CNS中的波的起始的共同病理生理学。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,这个过程的关键步骤是免疫细胞向中枢神经系统迁移,特别是活化的T细胞。活化的T细胞通过血管进入CNS并直接攻击髓磷脂,分泌损害轴突的因子(例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等),并募集额外的促进炎症的免疫细胞(例如髓磷脂细胞、巨噬细胞等)。MS中T细胞活化的病因尚不完全清楚。本领域需要确定MS患者中T细胞活化的病因、T细胞活化的生物标记、MS复发的生物标记和用于预测MS严重性的生物标记。

[0105] 在一些实施例中,本公开教导了如本文所述的肥大细胞生物标记可以是MS的有用生物标记。例如,在一些实施例中,并根据本公开,确定和/或检测这种可以用作MS、发展MS的风险、对治疗干预的反应、MS进展的可能性和/或MS的严重性和/或MS复发的易感性的指标的肥大细胞生物标记。

#### [0106] MS和过敏

[0107] 以上证据可能导致一个假定:由环境过敏导致的肥大细胞脱粒可能触发MS。两项

研究调查了这种关系。195个成人MS病例和对照组的病例对照研究证明,呼吸道过敏和食物过敏与MS风险之间存在反比关系。成肤过敏没有表现出任何关系(Sahraian等, Clin.Neurol.Neurosurg. (2013) 115:2099-2102)。同样,儿科MS患者的病例对照研究证明,环境过敏(12.8%与20.4%, $p=0.013$ )和食物过敏(5.2%与9.4%, $p=0.05$ )与儿科对照组个体相比呈反比关系。对抗生素过敏(5.9%与3.3%, $p=0.161$ )或过敏反应发病率(27.7%与29.7%, $p=0.591$ )观察不到统计学差异(Neiderer等,Neurology (2016) 2016年4月16日, P1.380)。

[0108] 另一项研究调查了有和没有环境过敏的患者的复发率(Diaz-Cruz等,Neurology (2016) 2016年4月176,P2.187)。报告任何食物过敏的患者的调整复发率(ARR)高于从未过敏的患者(0.2398与0.1893;Wald  $p=0.048$ )。当比较环境组( $p=0.1255$ )或药物( $p=0.4339$ )组与从未过敏组时,未发现ARR的显著差异,但是在这些组中注意到复发率更高的趋势。

#### [0109] 阿尔茨海默氏病

[0110] 其中,本公开教导了肥大细胞活性可以与阿尔茨海默氏病(AD)的一种或多种特征相关联和/或具有其特征。因此,根据本公开的一些实施例,AD可能被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0111] 淀粉样 $\beta$ (A $\beta$ )肽25至35通过泛连接蛋白1(pannexin1)半通道依赖性机制引起培养的肥大细胞的快速脱粒(Haracha等,J.Neurosci. (2015) 35:9526-9538)。在AD动物模型,A $\beta$ 肽25至35促进连接蛋白43和泛连接蛋白1半通道依赖性肥大细胞染料摄取和组胺释放,表明肥大细胞在疾病的发病机理中的作用。Mastinb是一种选择性口服酪氨酸激酶抑制剂,可有效抑制肥大细胞的存活、迁移和活性。对AD使用mastinib进行的第二阶段研究显示对于减缓AD患者的认知衰退方面有一些益处(Piette等,Alzheimers Res.Ther. (2011) 3:16)。

[0112] 在一些实施例中,本公开教导了如本文所述的肥大细胞生物标记可以是AD有用的生物标记。例如,在一些实施例中根据本公开,确定和/或检测这种可以用作AD、发展AD的风险、对治疗干预的反应、AD进展的可能性和/或AD的严重性的指标的肥大细胞生物标记。

#### [0113] 偏头痛

[0114] 其中,本公开教导了肥大细胞活性可以与偏头痛的一种或多种特征相关联和/或具有其特征。因此,根据本公开的一些实施例,偏头痛可以被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0115] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下,位于硬脑膜的肥大细胞据称在触发脑膜血管中的疼痛伤害性感受器中起关键作用。5-羟色胺、前列环素(PGI<sub>2</sub>) (以及在较小程度上组胺和类胰蛋白酶)可能作为介质,而硬脑膜肥大细胞通过这些介质促进脑膜伤害性感受器的活化(Levy等,Curr.Pain Headache Rep. (2009) 13:237-240;Zhang等,J.Pharmacol.Exp.Ther. (2007) 322:806-812)。垂体腺苷酸环化酶活化肽38(PACAP38)与偏头痛的诱导和肥大细胞脱粒的触发有关(Baun等,Cephalagia (2012) 32:337-345)。有趣的是,动物模型已经证明女性硬脑膜肥大细胞的密度在动情周期中波动并总体上高于男性,并且突出了对雌激素诱导的肥大细胞活化或迁移的作用(Boes等,Cephalalgia (2012) 32:924-931)。

[0116] 在一些实施例中,本公开教导了本文所述的肥大细胞生物标记可以是偏头痛的有

用生物标记。例如,在一些实施例中和根据本公开,确定和/或检测这种可以用作偏头痛、发展偏头痛的风险、对治疗干预的反应、偏头痛进展的可能性和/或偏头痛的严重性的指标的肥大细胞生物标记。

[0117] 自身免疫和自身免疫相关疾病

[0118] 其中,本公开教导了肥大细胞活性可以与自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情的一种或多种特征相关和/或具有其特征。因此,根据本公开的一些实施例,自身免疫和自身免疫相关的疾病、病症和/或病情可以被认为是肥大细胞活性相关病症。

[0119] 在一些实施例中,可以是根据本公开的肥大细胞活性相关病症的自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情可以是或包括例如:急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、艾迪生氏病、无丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、强直性脊柱炎、抗GBM/TBM肾炎、抗MAG外周神经病变、抗磷脂综合症、抗合成酶综合症、哮喘、特应性过敏、特应性皮炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴增生综合症、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性外周神经病变、自身免疫性多内分泌综合症、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、Balo病/Balo同心圆硬化、贝赫切特综合症(Bechets Syndrome)、Berger病、比克斯塔夫脑炎、Blau综合症、大疱性类天疱疮、Castleman病、乳糜泻、进行性神经性腓骨肌萎缩症、慢性疲劳综合症(CFS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、克隆氏病、肠易激综合症、查格-施特劳斯综合症、瘢痕性类天疱疮、Cogan综合症、冷凝集素疾病、补体成分2缺乏症、颅动脉炎、CREST综合症、库兴氏综合症、皮肤白细胞碎裂性血管炎、Dego病、Dercum病、疱疹样皮炎、皮炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、盘状红斑狼疮、Dressler综合症、湿疹、附着点炎相关性关节炎、嗜酸性筋膜炎、嗜酸性胃肠炎、大疱性表皮松解症、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症、伊文氏综合症、进行性骨化性纤维发育不良、纤维肌痛、纤维化性肺炎、胃炎、胃肠类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、古德巴斯捷氏综合症、Graves病、格林-巴利综合症(GBS)、溶血性贫血、Hailey-Hailey病、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、过敏性紫癜、妊娠期疱疹、HIV、低丙种球蛋白血症、特发性炎症性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特登性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎症性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年特发性关节炎、幼年类风湿性关节炎、川崎病、Lambert-Eaton肌无力综合症、白细胞破碎性血管炎、扁平苔癣、硬化性苔癣、线性IgA病(LAD)、卢·贾里格症、狼疮样肝炎、莱姆病、Majeed综合症、美尼尔氏综合症、显微镜下多血管炎、米勒费雪综合症、混合性结缔组织病、硬斑病、Mucha-Habermann病、MS、肌痛性脑脊髓炎、重症肌无力、肌炎、视神经脊髓炎(也称为Devic病)、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、眼阵挛-肌阵挛综合症、奥尔德甲状腺炎、帕金森病、复发性风湿病、与链球菌相关的小儿自身免疫性神经精神疾病(PANDAS)、副肿瘤性小脑变性、阵发性夜间血红蛋白尿症、Parry-Romberg综合症、睫状体扁平炎(pars planitis)、Parsonnage-Turner综合症、天疱疮、寻常性天疱疮、静脉周围脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS综合症、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性神经病变、牛皮癣、银屑病关节炎、纯红细胞再生障碍、坏疽性脓皮病、拉斯穆森脑炎、雷诺现象、Reiter综合症、复发性多软骨炎、不宁腿综合症、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、类风湿热、结节病、施密特综合症、

Schnitzler综合症、巩膜炎、硬皮病、Sjögren综合症、脊柱关节病、僵人综合症、Still病、亚急性细菌性心内膜炎、Susac综合症、Sweet综合症、Sydenham舞蹈病、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎(又称巨细胞动脉炎)、Tolosa-Hunt综合症、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病和血管炎白癜风(vasculitis vitiligo)。

[0120] 在一些实施例中,本公开教导了本文所述的肥大细胞生物标记可以是用于自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情的有用生物标记。例如,在一些实施例中根据本发明,确定和/或检测了这种可用作自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情、发展自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情的风险、对治疗干预的反应、自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情进展的可能性和/或自身免疫和自身免疫相关疾病、病症和/或病情的严重性的指标的肥大细胞生物标记。

[0121] 中风

[0122] 在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症包括中风。肥大细胞缺陷小鼠在中风后3天在粒细胞和巨噬细胞群体中(CD11b<sup>high</sup> CD45<sup>high</sup>细胞)显示出比其相应的野生型小鼠更少的细胞(Arac等,Am.J.Pathol.(2014)184:2493-2504)。将肥大细胞植入肥大细胞缺陷小鼠的脑膜中恢复与在野生型小鼠中观察到的相同的表型。粒细胞和巨噬细胞群体增加与中风大小和严重性增加有关。此外,敲除肥大细胞产生的IL-6恢复了较温和的中风表型。

[0123] 肥大细胞

[0124] 肥大细胞(mast cell或mastocyte)是源自髓系的粒细胞,其作为前体细胞在血液中循环并在外周组织中成熟。肥大细胞与嗜碱性粒细胞有关,并且在骨髓中共享共同的前体,称为CD34细胞。肥大细胞发展的主要生长因子是干细胞因子(SCF),也称为c-kit的配体,其在肥大细胞表面上表达。肥大细胞的特征在于丰富的细胞内颗粒,包括预先形成的炎性代谢物(例如前列腺素、白三烯、组胺和细胞因子)。与其他单核细胞不同,肥大细胞存活数周至数月,并在分化后具有一些增殖潜力(Galli等,Annu.Rev.Immunol.(2005),23:749-786)。

[0125] 肥大细胞存在于大多数组织,包括结缔组织、脑和脊髓、并定位在血管、淋巴管和神经周围。在大脑内,肥大细胞存在于介导内脏感觉或神经内分泌功能的区域(例如垂体柄、松果腺、丘脑和下丘脑)或血脑屏障或血脑脊液屏障(例如最后区(postrema)、脉络丛、脑膜)。

[0126] 它们通常存在于与外部环境相互联系的组织(例如皮肤、消化系统的粘膜、肺系统的粘膜、泌尿生殖道、结膜)中,这与免疫反应的起始和传播高度相关(Bischoff等,Nat.Rev.Immunol.(2007)7:93-104)。

[0127] 肥大细胞通过脱粒在炎症过程(例如超敏和过敏反应)中发挥作用,其中细胞被刺激以释放肥大细胞代谢物,其中许多是炎症的介质。

[0128] 在一些实施例中,肥大细胞代谢物可以分为预先形成的颗粒相关代谢物或脂质衍生的代谢物。在一些实施例中,预先形成的颗粒相关代谢物包括例如丝氨酸蛋白酶(例如类胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶A3、组织蛋白酶G)、组胺、蛋白聚糖(例如肝素、硫酸软骨素)、细胞因子(例如白细胞介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8)、TNF- $\alpha$ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞炎症蛋白 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )、巨噬细胞蛋白 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ )、干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ))和生长因子(例如血管内皮生长因子A)。在一些实施例中,脂质衍生的

代谢物包括例如血栓素、前列腺素(例如前列腺素D<sub>2</sub>、前列腺素E<sub>2</sub>)、白三烯(例如白三烯C<sub>4</sub>)、血小板活化因子)。

[0129] 肥大细胞刺激导致编码免疫调节剂的基因的表达,例如糜蛋白酶、TNF- $\alpha$ 、CXCL2、蛋白酶和IL-1 $\beta$ 。肥大细胞能够通过伪足的转粒化将预先形成的颗粒转移到免疫系统和神经系统的相邻细胞中(Wilhelm等,Eur.J.Neurosoci.(2005)22:2238-2248)。

[0130] 肥大细胞活性和/或脱粒的刺激通过许多机制发生,包括免疫球蛋白的结合。在一些实施例中,肥大细胞表达IgE Fc区的高亲和力受体。在过敏反应期间,与肥大细胞结合的IgE结合过敏源,导致肥大细胞脱粒。在一些实施例中,肥大细胞通过其他受体活化,包括结合IgG、细胞因子、补体、神经肽、激素和热休克蛋白的那些。在一些实施例中,脱粒和所产生的活性肥大细胞代谢物流入周围组织,其中导致血管通透性增加,淋巴管通透性增加、平滑肌收缩和粘液分泌增加。

[0131] 肥大细胞表达允许差异活性的受体,包括肥大细胞代谢物的差异释放。例如,肥大细胞表达细胞因子、趋化因子、补体成分3a、补体成分C5a和病原体相关分子模式(PAMP)的受体(Constanza等,Int.J.Mol.Sci.(2012)13:15107-15125)。在一些实施例中,肥大细胞结合刺激肥大细胞活性的配体,该肥大细胞活性在肥大细胞活性相关病症的发病机理中是重要的。在一些实施例中,肥大细胞活性是肥大细胞代谢物的脱粒和释放。在一些实施例中,肥大细胞代谢物增加血脑屏障的通透性。在一些实施例中,肥大细胞代谢物活化T细胞以分解髓磷脂。在一些实施例中,肥大细胞代谢物增加淋巴管的通透性。在一些实施例中,淋巴管通透性的增加导致T细胞和/或肥大细胞在CNS中的定位,特别是在神经元的髓鞘或附近。除了在过敏和过敏反应中起关键作用外,肥大细胞还参与伤口愈合、血管生成、免疫耐受、防御病原体和BBB功能。

[0132] 在一些实施例中,本公开提供了以下见解:肥大细胞活性可以有助于增强CNS部位T细胞和/或肥大细胞定位。在一些实施例中,T细胞和/或肥大细胞在CNS部位增强的定位是由于例如通过CNS中存在的血管的通透性增加而增强的血脑屏障的通透性,其尤其容许免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)流入CNS。在一些实施例中,本公开提供了以下见解:活化的肥大细胞是存在于脑膜中的肥大细胞。在一些实施例中,本公开提供了以下见解:活化的肥大细胞是存在于软脑膜和硬脑膜物质中的肥大细胞。

[0133] 肥大细胞能够通过以下方法影响免疫反应:通过作为抗原呈递细胞和表达I类和II类MHC分子,通过活化T细胞,通过增强B细胞增殖和活化,以及通过刺激同种型转换(Russi等,Clin.Immunol.(2016),印刷中)。

[0134] 肥大细胞和MS

[0135] 在一些实施例中,本公开定义先前未被理解为涉及MS和/或其他炎性疾病、病症和/或病情(例如神经炎症性疾病、病症和/或病情)的起始、发展、维持和/或复发的生物途径。在一些实施例中,先前未被理解为涉及MS和/或其他炎性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发的生物途径是由肥大细胞活性或通过肥大细胞活性对BBB通透性的调节(例如增加、减少或调整)。在一些实施例中,先前未被理解为涉及MS和/或其他炎性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发的生物途径是由肥大细胞活性或通过肥大细胞活性对免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)定位的调节(例如增加、减少或调整)。在特定实施例中,T细胞由肥大细胞活性或通过肥大细胞活性定位于CNS。

[0136] 肥大细胞存在于大脑和脊髓中,并定位于血管、淋巴管和神经周围。在大脑内,肥大细胞存在于介导内脏感觉或神经内分泌功能的区域或血脑屏障或脑脊液屏障(例如最后区、脉络丛、脑膜硬脑膜层)。在一些实施例中,留在脑膜中的肥大细胞群体可以在血脑屏障通透性的调节中起作用。最近的发现是在硬脑膜窦附近的脑膜层内存在淋巴管(Louveau等,Nature (2015) 523:337-341)。这些结构表达淋巴管内皮细胞的所有分子标志,已显示能够携带两种液体和来自脑脊液的免疫细胞,并且连接至颈深淋巴结。肥大细胞据报存在于这些淋巴管附近,并且可能在指导对其他免疫细胞(包括T细胞)的募集和教育中起关键作用(Louveau等,Trends Immunol. (2015) 36:569-577)。

[0137] 慢性和复发性多发性硬化症(即实验性自身免疫性脑脊髓炎或EAE)的动物模型的研究显示了肥大细胞缺陷小鼠的疾病严重性显著降低,但保留了复发-缓解过程,其透过选择性重建肥大细胞来逆转(Piconese等,Lab. Investig. (2011) 91:627-641;Sayed等,J. Immunol. (2011) 186:3234-3298;Secor等,J. Exp. Med. (2000) 191:813-822)。大多数这些研究,包括较近期的研究提出,EAE可以在没有肥大细胞的情况下进行,但疾病严重性可能会降低(Sayed等,J. Immunol. (2011) 186:8234-3298;Bennett等,J. Immunol. (2009) 182:5507-5514)。研究表明,脑膜肥大细胞在诱导后数小时内被活化,并导致编码糜蛋白酶、TNF- $\alpha$ 、CXCL2、蛋白酶和IL-1 $\beta$ 的基因的表达(Christy等,J. Autoimmun. (2013) 42:50-61)。此外,有证据表明MS中的肥大细胞脱粒,并且在MS患者的CSF中可以发现高水平的类胰蛋白酶和组胺,它们是脱粒时由肥大细胞释放的两种化合物(Ibrahim等,J. Neuroimmunol. (1996) 70:131-138;Rozniecki等,Ann. Nuerol. (1995) 37:63-66)。已经在MS患者的白质斑块中显示了肥大细胞和编码组胺1受体、类胰蛋白酶和Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 的基因的表达增加(Lock等,Nat. Med. (2002) 8:500-508)。

[0138] 肥大细胞对MS免疫细胞的继发作用

[0139] 在一些实施例中,肥大细胞可以对其他CNS免疫细胞群体施加作用。一项研究表明肥大细胞的IL-1 $\beta$ 表达促进T细胞的GM-CSF表达,这对于T细胞的致脑炎作用是必需的(Russi等,Clin. Immunol. (2016) 印刷中)。小胶质细胞涉及进行性疾病的发病机理。已经显示肥大细胞通过PAR-2-MAPK-NF- $\kappa$ B信号途径诱导小胶质细胞活化和促炎代谢物释放(Zhang等,Cell Physiol. Biochem. (2012) 29:931-940)。最近,假定了应激反应通过促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)在活肥大细胞中的作用(Esposito等,Brain Res. (2001) 888:117-127;Esposite等,J. Pharmacol. Exp. Ther. (2002) 303:1061-1066)。

[0140] MS病变中的肥大细胞

[0141] 对多发性硬化症患者的研究已经鉴定了MS脑损伤内的肥大和肥大细胞转录物,包括在血管周围浸润中(Toms等,J. Neuroimmunol. (1990) 30:169-177;Olsson,Acta Neurol. Scand. (1974) 50:611-618;Ibrahim等,J. Neuroimmunol. (1996) 70:131-138;Couturier等,J. Neuroimmunol. (2008) 195:176-185)。从MS患者收集的脑脊液已显示了类胰蛋白酶水平升高,这是由肥大细胞产生的蛋白水解酶(Rozniecki等,Ann. Neurol. (1995) 37:63-66),表明肥大细胞产物可能涉及MS。

[0142] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下,本公开提出如本文所述的肥大细胞活性或因子可促成来自循环系统和/或淋巴系统的免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)的更多遍历或迁移中的一种或多种。在一些实施例中,来自循环和/或淋巴系统的免疫细胞(例如T细

胞、肥大细胞)的遍历增加是由于血管和/或淋巴管的通透性(至少相对于免疫细胞)的调节,这尤其允许免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)流入CNS中和将免疫细胞靶向至一个或多个特定CNS部位(例如靶向至髓鞘, BBB的基底层、淋巴管)。在一些实施例中,肥大细胞活性可包括以下任何一种或组合:脱粒、转粒化、肥大细胞活性因子水平和/或位置的变化、检测肥大细胞活性因子基因产物的水平、组织或器官内肥大细胞的定位或迁移、与其他细胞类型的相互作用的程度或类型、与一种或多种特定蛋白质(例如髓磷脂)或部位(例如BBB的基底层)的相互作用的程度或类型。

[0143] 在一个实施例中,与其他细胞类型的相互作用是致脑炎性T细胞的活化。在一些实施例中,硬脑膜层内的肥大细胞活性通过活化致脑炎性T细胞有助于MS复发的起始和/或传播。

[0144] 肥大细胞和淋巴系统

[0145] CNS是免疫特权部位,在健康实质(parenchyma)内发现不到外周免疫细胞。然而,CNS的边界(例如脑膜衬里)含有大量免疫细胞。最近发现的排出CNS的脑膜淋巴管确保脑膜免疫通过直接连接到颈深淋巴结而与周边相互作用。

[0146] 脑膜免疫在健康和疾病的脑功能中起主要作用。在MS、EAE的小鼠模型中,脑膜在神经炎症的调节中具有重要作用。有证据表明炎症过程始于脑膜,而外周免疫细胞(例如T细胞)通过脑膜血管渗出。在本发明之前,尚未认识到免疫细胞(例如T细胞)被活化和允许穿透软脑膜并继续攻击脑实质的机制。

[0147] 本公开包括以下见解:在脑膜内发现的肥大细胞和/或肥大细胞代谢物改变免疫细胞(例如T细胞)的表型并影响它们攻击CNS实质(特别是髓磷脂)的能力。在一些实施例中,肥大细胞可以通过脱粒和触发免疫过程来改变脑膜T细胞的表型。本公开认识到由肥大细胞活性活化的免疫细胞表达独特的活化生物标记。在一些实施例中,免疫细胞是活化的T细胞。

[0148] 在一些实施例中,本公开定义了先前未被理解为涉及MS和/或另一种炎性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发的生物途径。在一些实施例中,先前未被理解为涉及MS和/或另一种炎性疾病、病症和/或病情的起始、发展、维持和/或复发的生物途径是肥大细胞活性因子对在CNS部位的T细胞的增强定位的贡献。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,本公开提出如本文所述的肥大细胞活性或因子可导致来自淋巴系统的免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)的一次或多次遍历增加,例如通过(至少相对于免疫细胞)增加淋巴管的通透性,这尤其允许免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)流入CNS并将免疫细胞(例如T细胞、肥大细胞)靶向至一个或多个特定CNS部位(例如靶向至髓鞘、BBB的基底层)。在一些实施例中,肥大细胞活性可以包括以下任何一种或组合:脱粒、转粒化、肥大细胞活性因子水平和/或位置的变化、检测肥大细胞活性因子基因产物的水平、组织或器官内肥大细胞的定位或迁移、与其他细胞种类的相互作用的程度或类型、与一种或多种特定蛋白(例如髓磷脂)或部位(例如BBB的基底层)的相互作用的程度或类型。在一些实施例中,脱粒发生在脑膜的硬脑膜层中发生。在一个实施例中,与其他细胞类型的相互作用是致脑炎性T细胞的活化。在一些实施例中,硬脑膜层内的肥大细胞的脱粒通过活化致脑炎性T细胞有助于MS复发的起始和/或传播。

[0149] 肥大细胞活性相关病症的生物标记

[0150] 其中,本公开定义了肥大细胞活性相关病症的一种或多种生物标记。也就是说,本公开定义了肥大细胞活性生物标记,并确定它们与如本所述的特定疾病、病症和/或病情的相关性。如上所述,在一些实施例中,肥大细胞生物标记可以是或包括以下的一种或多种:脱粒、转粒化、肥大细胞代谢物、肥大细胞活性因子、肥大细胞活性因子水平和/或位置的变化、组织、器官或肥大细胞活性部位内肥大细胞的定位或迁移、肥大细胞与其他细胞类型之间的相互作用的程度或类型、肥大细胞与特定蛋白质或肥大细胞活性部位之间相互作用的程度或类型等。先前工作对于鉴定有用的生物标记存在问题,因为努力通常集中在了错误的生物途径、事件和/或时机上,而本公开鉴定了该问题的源头。本公开教导了与肥大细胞活性和/或脱粒相关的某些事件对MS和/或对一种或多种其他炎性疾病、病症和/或病情的相关性和重要性,并且提供了定义这些事件的生物标记的技术。

[0151] 在特定实施例中,本公开定义与MS复发易感性相关的一种或多种生物标记。一旦定义,此类生物标记可用于通过检测来自患者的样品中的一种或多种肥大细胞活性因子或生物标记来评估MS患者的复发风险的方法。替代地或附加地,这些生物标记可用于评估或预测MS患者中复发的严重性。

[0152] 在一些实施例中,生物标记可以是或包含其存在、水平、位置或形式与特定生物事件或感兴趣状态相关的实体或事件,使得其被认为是该事件或状态(例如肥大细胞活性相关病症)的“标记”。在一些实施例中,生物标记可以用作疾病、发展疾病的风险、载体状态、对治疗干预的反应、疾病进展的可能性和/或疾病的严重性的指标。生物标记可以包括单一标记(例如代谢物、肥大细胞代谢物)或可包括超过一个标记(例如多个标记)。在一些实施例中,生物标记包括标记的存在和/或不存在。在一些实施例中,生物标记包括标记的水平。在一些实施例中,生物标记包括多个标记的存在和/或不存在、多个标记的特定水平或其组合。在一些实施例中,生物标记可以是生物标记的谱(profile)或模式。通常,合适的生物标记具有可以客观地测量和评估作为指标的特征。在一些实施例中,生物标记可以是肥大细胞活性生物标记。在一些实施例中,生物标记可以是肥大细胞活性因子。

[0153] 如果不同组中生物标记的平均或中值表达水平被计算为是统计学显著的,则生物标记可以在不同表型状态之间差异存在。统计显著性的常见测试包括t-检验、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney、优势比、线性判别分析、二次判别分析和K-最近邻算法。单独或组合的生物标记提供个体属于一种表型状态或另一种的相对风险的量度。因此,它们可用作疾病(诊断学)、药物治疗有效性(治疗诊断学)和药物毒性的生物标记。例如,适用于肥大细胞活性相关病症的生物标记在肥大细胞活性相关病症患者和健康个体之间差异表达。

[0154] 在一些实施例中,“差异表达谱”可用于鉴定肥大细胞活性相关病症的生物标记。如本文所用,术语“差异表达谱”是指比较两种或更多种样品(例如从肥大细胞活性相关病症患者获得的样品与从健康对照个体获得的样品)中的基因、蛋白质或脂质衍生的代谢物表达水平或模式的方法。通常,如果两个样品之间的表达水平或模式的差异(例如增加或减少)在统计学上显著(即,差异不是由随机变化引起),则差异地表达基因、蛋白质或脂质衍生的代谢物。在一些实施例中,如果两个样品(例如生物样品和参考或对照样品)之间的表达水平的差异超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、4倍、5倍、10倍或100倍,则差异地表达基因、蛋白质或

脂质衍生的代谢物或蛋白质。

[0155] 表1列出了根据本发明的肥大细胞活性相关病症的示例性肥大细胞活性因子。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括肥大细胞活性(例如活化、脱粒、迁移、结合等)的肥大细胞活性因子或标记。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括肥大细胞活性因子,用于诊断肥大细胞活性相关病症,或可能发展肥大细胞活性相关病症的可能性。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括特定种类的肥大细胞活性相关病症(例如癌症、炎症病症、神经炎症病症或自身免疫病)的肥大细胞活性因子。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括治疗结果或其可能性的肥大细胞活性因子。因此,在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括预测肥大细胞活性相关病症发展的肥大细胞活性因子。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以是或包括预后肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性因子。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以包括用于预测肥大细胞活性相关病症的严重性或肥大细胞活性相关病症的复发的肥大细胞活性因子。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记可以包括可以用于预测MS复发的肥大细胞活性因子。

[0156] 在一些实施例中,可以使用本文描述的个体肥大细胞活性因子或肥大细胞活性生物标记。在一些实施例中,选自表1的至少两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、十三种、十四种、十五种、十六种、十七种、十八种、十九种或更多种肥大细胞活性因子可以组合使用作为一个小组。

[0157] 在一些实施例中,本文所述的本发明的肥大细胞活性生物标记可以与一种或多种另外的标记联合使用,特别是已知与肥大细胞活性相关病症相关的那些标记。在一些实施例中,本文所述的肥大细胞活性生物标记可以与一种或多种另外的标记联合使用,特别是已知与神经炎症疾病(特别是MS)相关的那些标记。在一些实施例中,一种或多种另外的生物标记包括临床发现、MRI发现和/或诱发电位测试。

[0158] 肥大细胞活性生物标记或肥大细胞活性因子可以是任何化学类别的实体。例如,在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括核酸、多肽、脂质、碳水化合物、小分子、无机药剂(例如金属或离子)或其组合。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括丝氨酸蛋白酶、蛋白聚糖、细胞因子、生长因子、趋化因子、核酸、免疫球蛋白或脂质衍生的肥大细胞代谢物,如表1所提供。

[0159] 在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括细胞表面标记,例如存在于T细胞上的细胞表面标记。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括存在于B细胞、巨噬细胞、神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞、周细胞和/或血脑屏障的内皮细胞上的细胞表面标记。在一些实施例中,细胞表面标记是受体。在一些实施例中,细胞表面标记是I类和II类MHC分子。

[0160] 在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子是细胞内的。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括存在于预先形成的颗粒中的肥大细胞代谢物。在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括脂质衍生的肥大细胞代谢物。

[0161] 在一些实施例中,肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括核酸,例如RNA或信使RNA(mRNA)。在一些实施例中,在肥大细胞活性或活化期间表达的信使RNA谱与特定肥大细胞活性相关病症相关。在一些实施例中,在肥大细胞活性或活化期间表达的信使RNA谱用

于判断特定的肥大细胞活性相关病症。在一些实施例中，信使RNA可以由编码肥大细胞的肥大细胞代谢物的一种或多种基因表达。在一些实施例中，信使RNA可以从编码c-kit(也称为CD117或肥大/干细胞生长因子受体)的基因表达。在一些实施例中，信使RNA可以从编码P450酶家族成员的基因表达，例如信使RNA可以从编码CYP21A2的基因(SEQ ID NO:1)表达。

[0162] 在一些实施例中，生物标记可以是与肥大细胞活性相关病症相关的基因的等位基因变体，例如P450家族的基因成员(例如CYP21A2)。在一些实施例中，等位基因变体可以是点突变，其改变单个核苷酸并导致表达的蛋白质内的氨基酸发生变化。在一些实施例中，单个核苷酸变化是沉默的，因为表达的蛋白质内的氨基酸不发生变化。在一些实施例中，单个核苷酸导致mRNA剪接的变化。在一些实施例中，等位基因变体可以例如是小插入或缺失、基因转换、大插入或重复。本发明的一些实施例提供了鉴定遗传标记(例如等位基因变体)的方法，所述遗传标记使个体易于发展肥大细胞活性相关病症(例如自身免疫疾病、MS)。本发明的一些实施例提供了治疗方法，包括修饰遗传标记(例如等位基因变体)以预防或治疗肥大细胞活性相关病症(例如自身免疫疾病、MS)。

[0163] 在一些实施例中，肥大细胞活性生物标记或因子在细胞外发现(例如被分泌或被产生或存在于细胞外)。在一些实施例中，肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包含预先形成的颗粒相关代谢物或脂质衍生的代谢物。在一些实施例中，预先形成的颗粒相关代谢物可以是或包括例如丝氨酸蛋白酶。在一些实施例中，丝氨酸蛋白酶可以是或包括例如类胰蛋白酶、糜蛋白酶或羧肽酶。在一些实施例中，预先形成的颗粒相关代谢物可以是或包括例如蛋白聚糖。在一些实施例中，蛋白聚糖可以是或包括肝素或硫酸软骨素。在一些实施例中，预先形成的颗粒相关代谢物可以是或包括组胺。在一些实施例中，预先形成的颗粒相关代谢物可以是或包括细胞因子。在一些实施例中，细胞因子可以是或包括例如白细胞介素、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 和INF- $\gamma$ 。在一些实施例中，白细胞介素可以是或包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6或IL-8。在一些实施例中，预先形成的颗粒相关代谢物可以是或包括生长因子。在一些实施例中，生长因子可以是或包括血管内皮生长因子A。

[0164] 在一些实施例中，肥大细胞活性生物标记或因子可以是或包括脂质衍生的代谢物。在一些实施例中，脂质衍生的代谢物可以是例如血栓素、前列腺素、白三烯和/或血小板活化因子。在一些实施例中，前列腺素可以是前列腺素D<sub>2</sub>、前列腺素E<sub>2</sub>和/或11- $\beta$ -前列腺素F<sub>2</sub>- $\alpha$ 。在一些实施例中，白三烯可以是白三烯C<sub>4</sub>。

[0165] 在一些实施例中，肥大细胞活性生物标记或因子可以包括直接从肥大细胞释放的生物标记的代谢物。代谢物可以存在尿液中，例如N-甲基组胺。

[0166] 表1示例性肥大细胞活性生物标记或因子

	<b>组胺</b>
	<b>N-甲基组胺</b>
	<b>嗜铬粒蛋白A</b>
	<b>细胞因子</b>
[0167]	白细胞介素-1 (IL-1)
	白细胞介素-2 (IL-2)
	白细胞介素-3 (IL-3)
	白细胞介素-4 (IL-4)

[0168]

白细胞介素-5 (IL-5)
白细胞介素-6 (IL-6)
白细胞介素-8 (IL-8)
白细胞介素-10 (IL-10)
白细胞介素-17 (IL-17)
白细胞介素-33 (IL-33)
TNF- $\alpha$
TGF- $\beta$
粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)
巨噬细胞炎症蛋白 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )
巨噬细胞炎症蛋白 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ )
干扰素- $\gamma$ (INF $\gamma$ )
嗜酸性趋化因子
趋化因子
CC-趋化因子-配体2
生长因子
血管内皮生长因子A (VEGFA)
神经生长因子(NGF)
蛋白聚糖
肝素
硫酸软骨素
中性蛋白酶
类胰蛋白酶
糜蛋白酶
羧肽酶A3
组织蛋白酶G
前列腺素
前列腺素D <sub>2</sub> (PGD <sub>2</sub> )
前列腺素E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )
11- $\beta$ -前列腺素F <sub>2</sub> - $\alpha$ (11 $\beta$ -PGF <sub>2</sub> $\alpha$ )
tetranor-前列腺素D <sub>2</sub> 代谢物(tetranor-PGDM)

[0169]	白三烯
	白三烯E <sub>4</sub>
	白三烯B <sub>4</sub>
	白三烯C <sub>4</sub>
	免疫球蛋白
	免疫球蛋白E (IgE)
	血栓素
	核酸

[0170] 生物标记确定

[0171] 在一些实施例中,本发明提供了用于鉴定或确定肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情的有用生物标记的方法或系统。可以使用多种方法来确定肥大细胞活性相关病症的生物标记。在一些实施例中,方法可以包括以下步骤:确定患有或易患肥大细胞活性相关病症的个体的样品中一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。在一些实施例中,个体可以新诊断出患有肥大细胞活性相关病症。在一些实施例中,个体可能患有该病症的急性发作或可能处于该病症的慢性期。在一些实施例中,个体可能患有该病症的复发和缓解过程。在一些实施例中,个体可能患有CIS、RRMS、PPMS或SPMS。在一些实施例中,本公开提供了用于鉴定疾病的特定阶段或严重性的一种或多种因子或生物标记的系统。在一些实施例中,样品是全血、血浆、血清、尿液、脑脊液或淋巴液。

[0172] 在一些实施例中,所提供的方法包括检测所述一种或多种肥大细胞活性因子的确定存在、水平和/或位置与肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应之间的相关性,并且建立用于确定所述发病率、严重性或治疗反应的肥大细胞活性生物标记的确定存在、水平和/或位置。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症是MS,而MS的发病率、严重性或治疗反应与肥大细胞活性、肥大细胞增殖、肥大细胞迁移、细胞因子的释放、脂质衍生的代谢物的释放、颗粒相关代谢物的释放、水合作用、炎症及其组合的存在、水平和/或位置相关。

[0173] 在一些实施例中,相关确定存在、水平和/或位置包括多个数据点,每个数据点表示不同肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。在一些实施例中,多个数据点是至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少50个或至少100个。在一些实施例中,不同肥大细胞活性因子可以包括选自表1的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个肥大细胞活性因子。

[0174] 在一些实施例中,至少一个数据点表示相对于特定肥大细胞活性因子的建立阈值的水平。在一些实施例中,特定肥大细胞活性因子是选自表1的肥大细胞活性因子。在一些实施例中,建立的阈值是在参考或对照样品中确定的阈值。在一些实施例中,参考样品衍生自健康个体(例如未患有肥大细胞活性相关病症的个体)。在一些实施例中,参考样品衍生自健康个体组。在一些实施例中,参考样品衍生自在疾病发作之前患有肥大细胞活性相关

病症的个体。在一些实施例中，参考样品是历史参考。在一些实施例中，至少一个数据点表示高于或低于特定肥大细胞活性因子的确定阈值超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、4倍、5倍、10倍或100倍的水平。

[0175] 在一些实施例中，肥大细胞活性相关病症的小鼠模型可以用于确定肥大细胞活性生物标记。在一些实施例中，小鼠模型是MS、炎性病症（例如神经炎性病症）、癌症或自身免疫疾病的模型。在一些实施例中，自身免疫疾病的小鼠模型是非肥胖糖尿病(NOD)小鼠(1型糖尿病和斯耶格伦综合症的模型)、(NZBxNZW) F1, MRL/Ipr (系统性红斑狼疮的模型)、SJL小鼠中的实验性自身免疫脑炎(MS模型)、DBA/1小鼠中的胶原诱导的关节炎(类风湿性关节炎)、Bcl-2转基因小鼠(系统性红斑狼疮的模型)和/或Apcs<sup>-/-</sup>小鼠(系统性红斑狼疮的模型)。在一些实施例中，收集和分析小鼠的组织(例如脑、脊髓、神经、肺、肌肉、肝脏、肾脏)或体液(血液、淋巴组织、CNS、尿液)来确定肥大细胞活性因子或肥大细胞活性生物标记。在一些实施例中，通过使从小鼠获得的组织或体液中的T细胞活化因子、B细胞活化因子和/或肥大细胞脱粒因子可视化，确定因子或生物标记。

[0176] 检测生物标记

[0177] 在一些实施例中，本公开提供了用于检测、测量和/或表征有用的生物标记的系统 and/或方法。可以使用多种方法来测量生物样品中的生物标记水平。通常，指示生物标记的表达或活性水平的任何特征可用于实施本发明。在一些实施例中，测量样品中生物标记的蛋白质表达水平。在一些实施例中，测量脂质衍生的肥大细胞代谢物表达水平。在一些实施例中，测量样品中生物标记的核酸表达水平。在一些实施例中，测量组胺水平。在一些实施例中，发明涉及检测肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的方法。在一些实施例中，方法包括从人类患者获得样品，并在样品中检测确定为肥大细胞活性相关病症的肥大细胞活性生物标记的一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。在一些实施例中，方法包括将一种或多种肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置与肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置进行比较的步骤。

[0178] 生物样品

[0179] 本发明的方法可以应用于允许测定一种或多种本发明的生物标记的任何类型的生物样品。合适的生物样品的示例包括但不限于脑脊液(CSF)、淋巴液、细胞、组织、全血、漱口口水、血浆、血清、尿液、粪便、唾液、脐带血、绒膜绒毛样品、绒膜绒毛样品培养物、羊水、羊水培养物、经宫颈灌洗液。适用于本发明的生物样品可以是个体收集的新鲜或冷冻样品，或具有已知诊断、治疗和/或结果历史的档案样品。可以通过任何侵入性或非侵入性手段收集生物样品，例如通过从个体抽取CSF或血液，或使用细针抽吸或针吸活组织检查，或通过手术活组织检查。

[0180] 在某些实施例，可以在没有或有限地处理样品的情况下使用生物样品。例如，蛋白质生物标记可以从生物样品制备的。在一些实施例中，蛋白质提取物含有总蛋白质含量。在一些实施例中，可以制备含有膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白中的一种或多种的蛋白质提取物。例如，胞质蛋白可以包括存在于肥大细胞的预先形成的颗粒中的蛋白质。蛋白质提取的方法在本领域中是熟知的(参见，例如“蛋白质方法”，D.M.Bollag等，第2版，1996，Wiley-Liss; “蛋白质纯化方法：实用方法”，E.L.Harris和S.Angal(编辑)，1989; “蛋白质纯化技

术:实用方法”,S.Roe,第2版,2001,牛津大学出版社;“蛋白质提取、纯化和表征的原理和反应”,H.Ahmed,2005年,CRC出版社:佛罗里达州博卡拉顿)。许多不同和通用的试剂盒可用于从体液和组织中提取蛋白质,并且可从例如BioRad实验室(加州赫拉克勒斯)、BD生物科学克隆技术(加州山景城)、Chemicon国际公司(加州蒂梅丘拉)、Calbiochem(加州圣地亚哥)、Pierce生物科技(伊利诺伊州罗克福德)和Invitrogen公司(加州卡尔斯巴德)购买得到。所有这些试剂盒中通常包括详细描述要遵循的协议的用户指南。灵敏度、处理时间和成本可能因试剂盒而异。本领域技术人员可以容易地选择最适合特定情况的试剂盒。在获得蛋白质提取物后,优选地将提取物的蛋白质浓度标准化至与对照样品相同的值,以允许定量蛋白质标记的信号。这种标准化可以使用光度法或光谱法或凝胶电泳进行。

[0181] 在一些实施例中,可以从生物样品中提取核酸。例如,可以在分析之前从样品中提取RNA。在一些实施例中,所提取的RNA是从CYP21A2基因表达的mRNA。在一些实施例中,所提取的RNA是从c-kit基因表达的mRNA。RNA提取方法在本领域中是熟知的(参见,例如J.Sambrook等,“分子克隆:实验室手册”,1989年,第2版,冷泉港实验室出版社:纽约州冷泉港)。从体液或组织中分离RNA的大多数方法基于在蛋白质变性剂存在下组织的破坏,以快速有效地灭活RNase。然后,分离的总RNA可以从蛋白质污染物中进一步纯化,并通过选择性乙醇沉淀、苯酚/氯仿提取,然后异丙醇沉淀或氯化铯、氯化锂或三氟乙酸铯梯度离心来浓缩。试剂盒也可用于从体液或组织中提取RNA(即总RNA或mRNA),并且可从例如Ambion公司(得州奥斯汀)、Amersham生物科学(新泽西州皮斯卡特维)、BD生物科学克隆技术(加州帕罗奥图)、BioRad实验室(加州赫拉克勒斯)、GIBCO BRL(马里兰州盖瑟斯堡)和Qiagen公司(加州瓦伦西亚)购买得到。

[0182] 在某些实施例中,在提取后,扩增mRNA,并转录成cDNA,然后可以通过适当的RNA聚合酶作为多轮转录的模板。扩增方法在本领域中是熟知的(参见,例如A.R.Kimmel和S.L.Berger,Methods Enzymol.1987,152:307-316;J.Sambrook等,“分子克隆:实验室手册”,1989年,第2版,冷泉港实验室出版社:纽约;“分子生物学中的短协议”,F.M.Ausubel(编辑),2002年,第5版,John Wiley&Sons;美国专利4,683,195;4,683,202和4,800,159号)。逆转录反应可以使用非特异性引物进行,例如锚定的oligo-dT引物,或随机序列引物,或对于每个被监测的探针使用与RNA互补的靶特异性引物,或使用热稳定DNA聚合酶(例如禽类成髓细胞瘤逆转录酶或莫洛尼鼠白血病毒逆转录酶)。

[0183] 在一些实施例中,脂质衍生的生物标记可以从生物样品制备。在一些实施例中,脂质提取物含有总脂质含量。在一些实施例中,可以制备含有一种或多种膜脂质、核脂质和胞质脂质的脂质提取物。例如,胞质脂质可包括存在于肥大细胞的预先形成的颗粒中的脂质衍生的代谢物。

[0184] 检测方法

[0185] 测量蛋白质生物标记

[0186] 可以通过任何合适的方法测量或检测生物样品中的蛋白质生物标记表达水平(参见,例如E.Harlow和A.Lane,“抗体:实验室手册”,1988年,冷泉港实验室:纽约州冷泉港)。

[0187] 通常,蛋白质表达水平通过以下方式确定:使从个体获得的生物样品与一种或多种蛋白质生物标记的结合剂接触;在样品中检测与结合剂结合的一种或多种蛋白质生物标记的水平;以及将样品中一种或多种蛋白质生物标记的水平与对照样品中相应蛋白质生物

标记的水平进行比较。如本文所用,术语“结合剂”是指特异性结合本发明的蛋白质生物标记的实体,例如多肽或抗体。如果实体在可检测水平与多肽进行反应/相互作用,但未与含有不相关序列或不同多肽的序列可检测地进行反应/相互作用,则该实体“特异性结合”多肽。

[0188] 在某些实施例中,合适的结合剂是核糖体,具有或不具有肽组分、RNA分子或多肽(例如,包括蛋白质标记的多肽序列、其肽变体或这种序列的非肽模拟物的多肽)。

[0189] 在其他实施例中,合适的结合剂是对本文所述的蛋白质生物标记特异的抗体(例如对表1所列出的任何蛋白质生物标记特异的抗体)。在一些实施例中,合适的抗体可以特异性结合特定形式的蛋白质生物标记,例如细胞因子蛋白质(例如IL-1、INF- $\gamma$ )。适用于本发明方法的抗体包括单克隆和多克隆抗体、免疫活性片段(例如Fab或(Fab)<sub>2</sub>片段)、抗体重链、人源化抗体、抗体轻链和嵌合抗体。抗体(包括单克隆和多克隆抗体)、片段和嵌合体可以使用本领域已知的方法制备(参见,例如R.G.Mage和E.Lamoyi,“单克隆抗体生产技术和应用”,1987年,Marcel Dekker公司:纽约,pp.79-97;G.Kohler和C.Milstein,自然,1975年,256:495-497;D.Kozbor等,J.Immunol.Methods,1985年,81:31-42;和R.J.Cote等,Proc.Natl.Acad.Sci.1983年,80:2026-203;R.A.Lerner,自然,1982,299:593-596;A.C.Nairn等,自然,1982年,299:734-736;A.J.Czernik等,Methods Enzymol.1991年,201:264-283;A.J.Czernik等,Neuromethods:调节蛋白修饰:技术和协议,1997年,30:219-250;A.J.Czernik等,Neuroprotocols,1995年,6:56-61;H.Zhang等,J.Biol.Chem.2002年,277:39379-39387;S.L.Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1984年,81:6851-6855;M.S.Neuberger等,自然,1984年,312:604-608;S.Takeda等,自然,1985年,314:452-454)。可以通过本领域熟知的方法纯化用于本发明方法的抗体(参见,例如,S.A.Minden,“单克隆抗体纯化”,1996年,IBC Biomedical Library Series:马萨诸塞州绍斯布里奇)。例如,可以通过在蛋白质标记或其片段结合的柱上的通道亲和纯化抗体。然后,可以使用具有高盐浓度的缓冲液从柱上洗脱结合的抗体。

[0190] 可以从科学或商业来源(例如Cayman Chemical)获得用于本发明方法的抗体,而不用制备。

[0191] 标记的结合剂在某些实施例中,结合剂用可检测部分直接或间接标记。可检测药剂的作用是通过使由结合剂与蛋白质标记(或其类似物或片段)结合形成的复合物可视化,从而促进诊断方法的检测步骤。优选地,可检测药剂被选择为使得其产生可以测量的信号,并且该信号的强度与待分析的样品中存在的蛋白质标记的量相关(优选成比例)。用于标记诸如多肽和抗体的生物分子的方法是本领域熟知的(参见,例如“亲和技术。酶纯化:B部分”,Methods in Enzymol.,1974年,Vol.34,W.B.Jakoby和M.Wilneck(编辑),Academic Press:纽约州纽约;以及M.Wilcheck和E.A.Bayer,Anal.Biochem.,1988年,171:1-32)。

[0192] 多种可检测药剂中的任何一种都可用于本发明的实践中。合适的可检测药剂包括但不限于:各种配体、放射性核素、荧光染料、化学发光剂、微粒(例如量子点、纳米晶体、磷光体等)、酶(例如,用于ELISA的那些,即辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、比色标记、磁性标记和生物素、地高辛或其他可获得抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白质。在一些实施例中,通过使个体或样品与分子造影剂接触以使肥大细胞脱粒可视化,从而检测蛋白质肥大细胞活性生物标记。

[0193] 在某些实施例中,结合剂(例如抗体)可以固定在载体或支撑体(例如珠子、磁性颗粒、胶乳颗粒、微量滴定板孔、比色皿或其他反应容器)上。合适的载体或支撑材料的示例包括琼脂糖、纤维素、硝酸纤维素、葡聚糖、Sephadex、Sepharose、脂质体、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、辉长岩、滤纸、磁铁矿、离子交换树脂、塑料膜、塑料管、玻璃、多胺-甲基乙烯基醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝等。可以使用对第一结合剂特异的第二结合剂来间接固定结合剂(例如可以使用涂覆在载体或支撑物上的绵羊抗小鼠IgG Fc片段特异性抗体固定对蛋白质标记特异的小鼠抗体)。

[0194] 可以使用免疫测定来确定生物样品中的蛋白质表达水平。这些测定的示例是时间分辨荧光免疫测定(TR-FIA)、放射免疫测定、酶免疫测定(例如ELISA)、免疫荧光免疫沉淀、乳胶凝集、血细胞凝集、蛋白质印迹和组织化学测试,这些是本领域熟知的常规方法。如本领域技术人员所理解的,免疫测定可以是竞争性或非竞争性的。由结合剂与蛋白质标记结合形成的复合物产生的信号的检测和定量方法将取决于测定和可检测部分(例如荧光部分)的性质。

[0195] 替代地,蛋白质标记表达水平可以使用本领域已知的用于检测蛋白质的基于质谱法的方法或基于图像(包括使用标记配体)的方法来确定。其他合适的方法包括2D凝胶电泳、基于蛋白质组学的方法。研究样品中蛋白质表达的全局变化的蛋白质组学可包括以下步骤:(1)通过电泳(1-D PAGE)分离样品中的各个蛋白质,(2)鉴定从凝胶中回收的各个蛋白质(例如通过质谱法或N-末端测序),以及(3)使用生物信息学分析数据。

[0196] 测量核酸生物标记

[0197] 测量或检测生物样品中核酸的表达水平可以通过任何合适的方法进行,包括但不限于杂交(例如南方和北方墨点法)、聚合酶链式反应(PCR)(参见,例如美国专利4,683,195号;4,683,202号和6,040,166号;“PCR协议:方法和应用指引”,Innis等人(编辑),1990年,Academic Press:纽约)、逆转录酶PCR(RT-PCT)、锚定PCR、竞争性PCR(参见,例如美国专利5,747,251号)、cDNA末端的快速扩增(RACE)(参见,例如“基因克隆和分析:当前创新”,1997年,pp.99-115);连接酶反应(LCR)(见例如EP 01 320 308)、单侧PCR(Ohara等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1989年,86:5673-5677)、原位杂交、基于Taqman的测定(Holland等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1991年,88:7276-7280)、差异显示(见例如Liang等,Nucl.Acid.Res.,1993年,21:3269-3275)和其他RNA指纹技术、基于核酸序列的扩增(NASBA)和其他基于转录的扩增系统(见例如美国专利5,409,818号和5,554,527号)、Q $\beta$ 复制酶、链替代扩增反应(SDA)、修复链式反应(RCR)、核酸酶保护分析、基于减法的方法、Rapid-Scan<sup>TM</sup>等。

[0198] 可以使用本领域已知常规方法构建用于检测生物样品中多核苷酸序列的核酸探针。合适的探针可以基于编码来自编码生物标记的核苷酸区域的至少5个连续氨基酸的核酸序列,并且优选地包含约15至约50个核苷酸。可以如上所述在结合剂的情况下,用可检测部分标记核酸探针。核酸探针和可检测部分之间的缔合可以是共价的或非共价的。可检测部分可以直接连接到核酸探针上或通过接头间接连接(E.S.Mansfield等,Mol.Cell.Probes,1995年,9:145-156)。用于标记核酸分子的方法是本领域熟知的(关于标记方案、标记检测技术和该领域的最新发展的综述,参见例如L.J.Kricka,Ann.Clin.Biochem.2002年,39:114-129;R.P.van Gijlswijk等,Expert

Rev.Mol.Diagn.2001年,1:81-91;和S.Joos等,Biotechnol.1994年,35:135-153)。

[0199] 核酸探针可以用于杂交技术以检测编码生物标记的多核苷酸。该技术通常涉及在核酸探针和核酸分子中的互补序列之间发生特异性杂交的条件下使从个体获得的生物样品中的核酸分子与核酸探针接触和温育。通常,使用严格的杂交条件。在一些实施例中,“严格的杂交条件”是指至少与以下各项同样严格的杂交条件:在50%甲酰胺、5XSSC、50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 6.8、0.5%SDS、0.1mg/mL超声处理鲑鱼精子DNA和5XDenhart溶液中于42℃杂交过夜;在45℃用2XSSC、0.1%SDS洗涤;和在45℃用0.2XSSC、0.1%SDS洗涤。在一些实施例中,严格的杂交条件不应允许在20个连续核苷酸的段上相差超过两个碱基的两个核酸的杂交。温育后,除去未杂交的核酸,检测并定量与探针杂交的核酸的存在和量。

[0200] 检测包含生物标记的多核苷酸序列的核酸分子可涉及使用扩增方法(例如PCR(例如RT-PCR))扩增特定多核苷酸序列,然后使用本领域已知的技术分析扩增的分子。合适的引物可由本领域技术人员常规设计。为了在测定条件下最大化杂交,用于本发明方法的引物和探针通常与编码生物标记的核酸的一部分具有至少60%、优选最少75%和更优选至少90%的同一性。

[0201] 本文所述的杂交和扩增技术可用于测定包含编码本文所述的本发明生物标记的多核苷酸序列的核酸分子的表达的定性和定量方面。

[0202] 替代地,衍生自编码每种生物标记的核酸的寡核苷酸或更长片段可用作微阵列中的靶标。

[0203] 许多不同的阵列配置和其制造方法是本领域技术人员已知的(参见例如美国专利5,445,934号;5,532,128号;5,556,752号;5,242,974号;5,384,261号;5,405,783号;5,412,087号;5,424,186号;5,429,807号;5,436,327号;5,472,672号;5,527,681号;5,529,756号;5,545,531号;5,554,501号;5,561,071号;5,571,639号;5,593,839号;5,599,695号;5,624,711号;5,658,734号;和5,700,637号)。微阵列技术允许同时测量大量多核苷酸序列的稳态水平。目前广泛使用的微阵列包括cDNA阵列和寡核苷酸阵列。使用微阵列的分析通常基于从标记探针接收的信号强度的测量,该标记探针用于检测来自样品的cDNA序列,该cDNA序列与固定在微阵列上的已知位置的核酸探针杂交(参见例如美国专利6,004,755号;6,218,114号;6,218,122号;和6,271,002号)。

[0204] 基于阵列的基因表达方法是本领域已知的,并且已在许多科学出版物和专利中进行了描述(参见例如M.Schene等,Science,1995年,270:467-470;M.Schena等,Proc.Natl.Acad.Sci.美国1996年,93:10614-10619;J.J.Chen等,Genomics,1998年,51:313-324;美国专利5,143,854号;5,445,934号;5,807,522号;5,837,832号;6,040,138号;6,045,996号;6,284,460号;和6,607,885号)。

[0205] 测量脂质衍生的生物标记

[0206] 脂质衍生的生物标记可以通过本领域技术人员已知的方法容易地分离和/或定量,包括但不限于利用以下各项的方法:质谱(MS)、高效液相色谱(HPLC)、等度HPLC、梯度HPLC、正相色谱、反相HPLC、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、毛细管电泳、微体、色谱、气相色谱(GC)、薄层层析(TLC)、固定化金属离子亲和层析(IMAC)、亲和层析、免疫测定和/或比色测定。在一些实施例中,本发明的方法利用MS来确定脂质衍生的生物标记存在。在一些实施例中,本发明的方法利用免疫测定来确定脂质衍生的生物标记存在。在一个实施例中,本发明

的方法利用MS来确定生物标记的水平。在一个实施例中,本发明的方法利用免疫测定来确定生物标记的水平。在一些实施例中,通过使个体或样品与分子造影剂接触以使肥大细胞脱粒可视化,从而检测脂质衍生的肥大细胞活性生物标记。

[0207] 测量组胺

[0208] 组胺及其代谢物(例如N-甲基组胺)可以通过本领域技术人员已知的方法容易地分离和/或定量,包括但不限于利用以下各项的方法:使用测量其细胞外存在、水平和/或位置的荧光和比色技术。可以使用高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、基于荧光玻璃纤维的组胺方法或通过放射免疫测定来检测和量化组胺及其代谢物(Granderus等, Agents Actions (1984) 14:341-345; Andersson, J. Allergy Clin. Immunol. (1990) 86:815-820)。在一些实施例中,通过使个体或样品与分子造影剂接触以使肥大细胞脱粒可视化,从而检测组胺。

[0209] 等位基因变体的分析方法

[0210] 本发明的方法包括分析基因的等位基因变异以确定等位基因变异是否与肥大细胞活性相关病症的存在、易感性或严重性相关的方法。

[0211] 基因或多核苷酸的来源通常是包括基因组DNA和/或RNA的生物样品。可以处理生物样品以获得DNA或RNA以作分析。

[0212] 多核苷酸的分析方法在本领域中是众所周知的,并且在一些方面包括扩增多核苷酸以形成扩增的多核苷酸,优选包括对应于来自感兴趣的基因(例如CYP21A2)的外显子的扩增的核苷酸,并且检测扩增的多核苷酸。优选地,通过PCR扩增核苷酸。通过PCR扩增多核苷酸的条件根据所用引物的核苷酸序列而变化,并且用于确定这些条件的方法在本领域中是常规的。

[0213] 各种类型的扩增技术是已知和常规使用的,例如等位基因特异性PCR、冷PCR、热PCR、逆转录酶PCR等。这些和其他扩增技术是本领域已知并且常规使用的。鉴于SEQ ID NO: 1的公开内容,技术人员可以容易地使用扩增技术来鉴定CYP21A2多核苷酸中的突变。

[0214] 扩增后,可以确定扩增的多核苷酸的大小(例如通过凝胶电泳确定),并进行比较。扩增的多核苷酸可以通过染色(例如使用溴化乙锭)或用本领域技术人员已知的合适标记物(包括放射性和非放射性标记)标记来可视化。

[0215] 典型的放射性标记包括<sup>33</sup>P。非放射性标记包括例如配体(例如生物素或洋地黄毒苷)和酶(例如磷酸酶或过氧化物酶,或各种化学发光剂(例如荧光素),或荧光化合物(例如荧光素及其衍生物)。任选地,可以确定扩增的多核苷酸的核苷酸序列。

[0216] 在用于分析含有突变的多核苷酸或等位基因变体的方法的另一方面,使用与多核苷酸杂交的多核苷酸探针。如本文所用,“杂交”是指探针在标准条件下与靶多核苷酸形成非共价相互作用。标准杂交条件是允许探针与靶多核苷酸杂交的那些条件。探针和靶多核苷酸的这些条件很容易通过使用本领域熟知的技术确定,例如参见Sambrook等,分子克隆:实验室手册;冷泉港实验室:纽约(1989年)。

[0217] 在本发明这方面的一个实施例中,方法包括用限制性内切核酸酶消化个体的基因组DNA以获得多核苷酸,并在杂交条件下用可检测标记的探针探测多核苷酸。用内切核酸酶消化基因组DNA在本领域中是常规的,并且已知很多内切核酸酶。通常,将由消化产生的多核苷酸被分级(例如通过凝胶电泳),变性以产生单链多核苷酸,然后在杂交条件下暴露于

探针。然后检测与多核苷酸杂交的探针，然后可以确定杂交的多核苷酸的大小。突变的存在或不存在可以通过检测到的多核苷酸的近似分子量来推断。突变存在表明该人已经或正处于风险中，而突变不存在表明该人没有风险。

[0218] 可使用其他方法分析多核苷酸。示例包括但不限于连接酶介导的检测技术、荧光原位杂交、直接DNA测序、PFGE分析、南方和北方墨点法、单链构象分析(SSCA)、RNA酶保护测定、等位基因特异性寡核苷酸、斑点印迹分析、变性梯度凝胶电泳、RFLP、PCR-SSCP和下一代测序。

[0219] 与参考相比

[0220] 在本发明的一些实施例中，一旦确定了被测量的生物样品的肥大细胞活性因子和/或生物标记(例如选自表1的生物标记)的存在或表达水平(如上所述)，存在和/或表达水平可以与一种或多种参考或对照样品中的存在和/或表达水平进行比较。在一些实施例中，根据本发明的方法进行的存在和/或表达水平的比较优选在获得的存在和/或表达水平已经校正了样品测定量和所用的样品的质量变化的差异之后进行(例如，所提取的蛋白质或脂质衍生的代谢物的量，或所测试的mRNA的量和质量)。在一些实施例中，可以使用本领域熟知的不同方法进行校正。例如，可以在分析样品之前使用光度法或光谱法或凝胶电泳标准化样品的蛋白质浓度。在一些实施例中，可以使用在分析样品前添加到样品中的内标来标准化样品的脂质衍生的代谢物浓度。在一些实施例中，可以通过在相对于同一样品中的参考基因(例如管家基因)标准化水平来校正含有核酸分子的样品。替代地或附加地，标准化可以基于所有测定基因或其大个体(全局标准化方法)的平均或中值信号(例如在RT-PCR的情况下的Ct)。

[0221] 在一些实施例中，参考或对照样品衍生自健康个体(例如未患有肥大细胞活性相关病症的个体)。在一些实施例中，参考样品衍生自健康个体组。在一些实施例中，参考样品衍生自在疾病发作之前患有肥大细胞活性相关病症的个体。在一些实施例中，参考样品是历史样品。在一些实施例中，生物样品中肥大细胞活性因子和/或生物标记的水平表示高于或少于参考样品中肥大细胞活性标记或生物标记的水平超过大约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或500倍的水平。在一些实施例中，生物样品中的肥大细胞活性因子和/或生物标记的水平表示高于或低于参考样品中肥大细胞活性标记或生物标记的水平约20%至约98%、约20%至约90%、约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约30%至约98%、约30%至约90%、约30%至约80%、约30%至约70%、约30%至约60%、约30%至约50%、约40%至约98%、约40%至约90%、约40%至约80%、约40%至约70%、约40%至约60%或约40%至约50%的水平。在一些实施例中，生物样品中肥大细胞活性因子和/或生物标记的水平表示高于或低于参考样品中肥大细胞活性标记或生物标记的水平约2倍至500倍、2倍至约100倍、2倍至约50倍、2倍至约10倍或2倍至约5倍的水平。

[0222] 治疗肥大细胞活性相关病症的方法

[0223] 本公开包括以下见解：与肥大细胞活性相关病症(例如MS、对MS复发的易感性、自身免疫病、神经炎症性疾病、癌症)相关的因子和生物标记的确定有用于鉴定和/或施用对本文所述的肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情的特定疗法。例如，已经了解或确定了

特定疾病、病症和/或病情是与肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情,和/或以其存在、水平和/或位置与本文所述的肥大细胞活性生物标记相关的一个或多个特征为特征,本领域技术人员将意识到靶向相关肥大细胞活性的治疗方式,其可以施用以治疗该疾病、病症和/或病情。

[0224] 其中,本公开提供了治疗方法,其包括在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记时向个体施用肥大细胞抑制疗法。在一些实施例中,肥大细胞抑制疗法与一种或多种治疗疾病、病症和/或病情的其他疗法组合施用。

[0225] 在具体的实施例中,本公开提供了在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在时,治疗个体的MS、MS复发和/或另一种神经炎症性疾病、病症和/或病情的组合物和/或方法,例如通过施用如本文所述的肥大细胞抑制疗法(例如施用肥大细胞活性抑制剂)。在一些实施例中,个体被诊断为患有或易患肥大细胞活性相关病症。在一些实施例中,本公开定义了对本文所述的肥大细胞活性抑制剂的疗法敏感的患者群体。在一些实施例中,本公开提供了通过向这样定义的患者群体施用疗法的治疗方法。

[0226] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下,肥大细胞活性抑制剂可以包括各类型的分子,其对治疗肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情具有治疗效果。例如,肥大细胞活性抑制剂可以包括与一种或多种T细胞活化病症竞争或抑制一种或多种T细胞活化病症的T细胞受体配体。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是或包括肥大细胞粘附抑制剂、肥大细胞脱粒产物的抑制剂和/或B细胞活化抑制剂。在一些实施例中,肥大细胞脱粒产物的抑制剂是羟嗪,这是组胺受体1拮抗剂,已显示其抑制EAE的进展和严重性,以及丘脑内肥大细胞的脱粒(Dimitriadou等, *Int. J. Immunopharmacol.* (2000) 22:673-684)。在20名MS患者中对羟嗪进行的小型开放标记研究显示了神经学上的稳定性或改善(Logothetis等, *Int. J. Immunopath. Pharmacol.* (2005) 18:771-778)。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是或包括基因治疗剂,其校正细胞色素P450家族中的突变,特别是CYP21A2基因中的等位基因变异。

[0227] 在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是肥大细胞的存活、迁移和/或活性的抑制剂。例如,马赛替尼(masitinib)是选择性口服酪氨酸激酶抑制剂,其可有效抑制肥大细胞的存活、迁移和活性,并在35名进行性MS患者的II期试验中显示出一定的疗效(Vermersch等, *BMC Neurol.* (2012) 12:36)。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是伊马替尼(Imatinib)(即Gleevec),其是酪氨酸激酶抑制剂,其通过消除涉及自身免疫疾病的发病机理的多种信号转导途径,在淋巴细胞、巨噬细胞、肥大细胞和树突细胞中施加抗增殖活性和免疫调节作用,例如抑制促炎症细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-17以及MMP分泌。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂是MS疾病改善治疗(DMT),例如那他珠单抗(Natalizumab)可以影响肥大细胞(Kritas等, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* (2014) 27:331-335),而富马酸二甲酯在体外诱导肥大细胞的凋亡(Foster等, *Exp. Dermatol.* (2013) 22:719-724)。

[0228] 本领域技术人员将理解,适当的制剂、适应症和给药方案通常由政府监管机构(例如美国食品药品监督管理局)分析和批准。在许多实施例中,根据这种批准的方案,根据本发明施用肥大细胞活性抑制剂。然而,本公开提供了用于鉴定、表征和/或选择可以理想地施用肥大细胞活性抑制剂的特定患者的某些技术。在一些实施例中,本公开提供的见解允

许将给定的肥大细胞活性抑制剂以相对于基于包括本文所述鉴定的个体(例如表达肥大细胞活性因子和/或生物标记)和其他个体的群体研究推荐或批准较高频率和/或更大单个剂量(例如,由于对不良作用的易感性和/或不良作用的发病率或强度降低)给药。在一些实施例中,本公开提供的见解允许将给定的肥大细胞活性抑制剂以相对于基于包括本文所述鉴定的个体(例如表达肥大细胞活性因子和/或生物标记)和其他个体的群体研究推荐或批准较低频率和/或较小单个剂量(例如,由于增加的反应性)给药。

[0229] 在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂以药物组合物施用,其还包括生理学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施例中,药物组合物是无菌的。在许多实施例中,为了特定的给药方式而配制药物组合物。

[0230] 合适的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液(例如NaCl)、盐水、缓冲盐水、醇、甘油、乙醇、阿拉伯树胶、植物油、苜蓿醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(例如乳糖、直链淀粉或淀粉)、糖类(例如甘露醇、蔗糖等)、右旋糖、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、香油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚烯吡咯烷酮等,以及其组合。如果需要,药物制剂可以包含一种或多种助剂(例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等),其不会与活性化合物发生有害反应或干扰其活性。在一些实施例中,使用适于静脉内施用的水溶性载体。

[0231] 在一些实施例中,如果需要,药物组合物或药物可含有一定量(通常是少量)的润湿剂或乳化剂,和/或pH缓冲剂。在一些实施例中,药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末。在一些实施例中,药物组合物可以配制成栓剂,具有传统的粘合剂和载体,例如甘油三酯。口服制剂可包括标准载体,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0232] 在一些实施例中,药物组合物可以根据常规配制为适于施用于人类的药物组合。例如,在一些实施例中,用于静脉内施用的组合物通常是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂以缓解注射部位的疼痛。通常,成分以单位剂型单独提供或一起混合(例如作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物)在表明活性剂的量的密封容器(例如安瓿或小袋)中。当要通过输注施用组合物时,可以使用含有无菌药用级水、盐水或右旋糖/水的输注瓶来分配。当通过注射施用组合物时,可以提供安瓿的无菌注射用水或盐水,使得可在施用前混合成分。

[0233] 在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂可以配制成中性形式。在一些实施例中,它可以配制成盐形式。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成的那些,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及形成有游离羧基的那些,例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0234] 根据本发明使用的药物组合物可以通过任何适当的途径施用。在一些实施例中,静脉内施用药物组合物。在一些实施例中,皮下施用药物组合物。在一些实施例中,通过直接施用至靶组织,例如心脏或肌肉(例如肌肉内)或神经系统(例如直接注射入脑;心室内;鞘内)来施用药物组合物。替代地或附加地,在一些实施例中,通过胃肠外、透皮或经粘膜(例如口服或经鼻)施用药物组合物。如果需要,可以同时使用多个途径。在本发明的一些实施例中,通过纳米机器人将肥大细胞活性抑制剂递送给个体。例如,治疗个体的肥大细胞活性相关病症的方法包括:向个体施用纳米机器人药剂,所述纳米机器人药剂适于检测肥大

细胞活性生物标记的存在,并递送肥大细胞活性抑制剂,从而在检测到生物标记时施用肥大细胞活性抑制剂。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂调节肥大细胞活性,并在肥大细胞的脱粒或活化之前、期间或之后由纳米机器人药剂递送。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂中和在脱粒期间或之后释放的肥大细胞代谢物,并且由纳米机器人药剂递送。在一些实施例中,肥大细胞活性调节剂与肥大细胞代谢物中和剂联合递送,或者在递送肥大细胞代谢物中和剂之前或之后递送。

[0235] 在来自个体的样品中检测到肥大细胞活性生物标记的存在时,肥大细胞活性抑制剂(或含有肥大细胞活性抑制剂的组合物或药物)可以单独施用,或者与其他肥大细胞活性抑制剂联合施用。术语“与……联合”指第一肥大细胞活性抑制剂在另一肥大细胞活性抑制剂之前、之后或大致同时施用。例如,可以将第一肥大细胞活性抑制剂混入含有一种或多种不同肥大细胞活性抑制剂的组合物中,从而同时施用;替代地,可以在不混合的情况下同时施用药剂(例如通过在静脉线上“捎载”(piggybacking)递送药剂,借以施用第二肥大细胞活性抑制剂,反之亦然)。在另一个示例中,可以单独施用(例如不混合)肥大细胞活性抑制剂,但是在施用第二肥大细胞活性抑制剂的短时间范围内(例如在24小时内)。

[0236] 在本发明的一些实施例中,第一药剂选自软骨素、甲基磺酰甲烷(MSM)、葡糖胺、H<sub>1</sub>受体拮抗剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂及其组合。在一些实施例中,第二药剂选自选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)及其组合。

[0237] 在一些实施例中,对使用肥大细胞活性抑制剂治疗的个体施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施例中,施用一种或多种免疫抑制剂以减少、抑制或预防不期望的自身免疫反应(例如小肠结肠炎、肝炎、皮炎(包括中毒性表皮坏死松解症)、神经病和/或内分泌病),例如甲状腺功能减退症。示例性免疫抑制剂包括类固醇、抗体、免疫球蛋白融合蛋白等。在一些实施例中,免疫抑制剂抑制B细胞活性(例如利妥昔单抗)。在一些实施例中,免疫抑制剂是诱饵多肽抗原。

[0238] 在一些实施例中,以治疗有效量(例如某剂量和/或根据某剂量方案,其已被证明在施用给相关群体时足以治疗肥大细胞活性相关病症,例如通过改善肥大细胞活性相关病症,预防或延迟肥大细胞活性相关病症的发作,和/或减轻肥大细胞活性相关病症症状的严重性或频率,预测、预防或治疗MS复发)施用肥大细胞活性抑制剂(或包含肥大细胞活性抑制剂的组合物或药物)。在一些实施例中,在使用肥大细胞活性抑制剂治疗后观察到长期临床益处。本领域技术人员将理解,对于给定患者的肥大细胞活性相关病症治疗而言治疗有效的剂量可至少在一定程度上取决于肥大细胞活性相关病症的性质和程度,并且可以通过标准临床技术确定。在一些实施例中,可任选地使用一种或多种体外或体内测定来帮助鉴定最佳剂量范围。在一些实施例中,在给定个体的治疗中采用的特定剂量可以取决于施用途径、肥大细胞活性相关病症的程度,和/或与医师根据患者情况的判断相关的一种或多种其他因素。在一些实施例中,可以从源自体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线外推有效剂量(例如,如美国卫生与公众服务部、食品药品监督管理局和药物评估和研究中心在“业界指南:估计成人健康志愿者治疗初始临床试验中最大安全起始剂量”,*Pharmacology and Toxicology*,2005年7月中所述)。

[0239] 在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的治疗有效量可以是例如超过大于约0.01mg/kg、超过大于约0.05mg/kg、超过大于约0.1mg/kg、超过大于约0.5mg/kg、超过大于

约1.0mg/kg、超过大于约1.5mg/kg、超过大于约2.0mg/kg、超过大于约2.5mg/kg、超过大于约5.0mg/kg、超过大于约7.5mg/kg、超过大于约10mg/kg、超过大于约12.5mg/kg、超过大于约15mg/kg、超过大于约17.5mg/kg、超过大于约20mg/kg、超过大于约22.5mg/kg或超过大于约25mg/kg体重。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的治疗有效量可为约0.01至25mg/kg、约0.01至20mg/kg、约0.01至15mg/kg、约0.01至10mg/kg、约0.01至7.5mg/kg、约0.01至5mg/kg、约0.01至4mg/kg、约0.01至3mg/kg、约0.01至2mg/kg、约0.01至1.5mg/kg、约0.01至1.0mg/kg、约0.01至0.5mg/kg、约0.01至0.1mg/kg、约1至20mg/kg、约4至20mg/kg、约5至15mg/kg、约5至10mg/kg体重。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的治疗有效量为约0.01mg/kg、约0.05mg/kg、约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1.0mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、约1.9mg/kg、约2.0mg/kg、约2.5mg/kg、约3.0mg/kg、约4.0mg/kg、约5.0mg/kg、约6.0mg/kg、约7.0mg/kg、约8.0mg/kg、约9.0mg/kg、约10.0mg/kg、约11.0mg/kg、约12.0mg/kg、约13.0mg/kg、约14.0mg/kg、约15.0mg/kg、约16.0mg/kg、约17.0mg/kg、约18.0mg/kg、约19.0mg/kg、约20.0mg/kg体重或更多。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的治疗有效量不大于约30mg/kg、不大约20mg/kg、不大于约15mg/kg、不大于约10mg/kg、不大于约7.5mg/kg、不大于约5mg/kg、不大于约4mg/kg、不大于约3mg/kg、不大于约2mg/kg,或不大于约1mg/kg体重或更低。

[0240] 在一些实施例中,特定个体的施用剂量随时间变化(例如增加或减少),取决于该个体的需要。

[0241] 在另一示例中,可以在治疗过程开始时施用负荷剂量(例如初始较高剂量)的治疗组合物,然后施用较低维持剂量(例如随后的较低剂量)的治疗组合物。

[0242] 应当理解,治疗的负荷剂量和维持剂量的量、间隔和持续时间可以通过任何可用的方法确定,例如本文中举例说明的那些和本领域已知的那些。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的负荷剂量的量是约0.01至1mg/kg、约0.01至5mg/kg、约0.01至10mg/kg、约0.01至10mg/kg、约0.1至20mg/kg、约0.1至25mg/kg、约0.1至30mg/kg、约0.1至5mg/kg、约0.1至2mg/kg、约0.1至1mg/kg,或约0.1至0.5mg/kg体重。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的维持剂量的量是约0至10mg/kg、约0至5mg/kg、约0至2mg/kg、约0至1mg/kg、约0至0.5mg/kg、约0至0.4mg/kg、约0至0.3mg/kg、约0至0.2mg/kg、约0至0.1mg/kg体重。在一些实施例中,以规律的间隔向个体施用负荷剂量的肥大细胞活性抑制剂和/或给定的剂量数量(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或更多剂量)一段给定的时间(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个月),然后施用维持剂量。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的维持剂量范围为0至2mg/kg、约0至1.5mg/kg、约0至1.0mg/kg、约0至0.75mg/kg、约0至0.5mg/kg、约0至0.4mg/kg、约0至0.3mg/kg、约0至0.2mg/kg,或约0至0.1mg/kg体重。在一些实施例中,肥大细胞活性抑制剂的维持剂量是约0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8或2.0mg/kg体重。在一些实施例中,施用维持剂量的肥大细胞活性抑制剂1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个月。在一些实施例中,施用维持剂量1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多年。在一些实施例中,无限期施用维持剂量(例如终身施用)。

[0243] 治疗有效量的肥大细胞活性抑制剂可以作为一次剂量施用或间隔施用,这取决于肥大细胞活性相关病症的性质和程度,并取决于持续进行的基础。如本文所用,“间隔”施用表示定期施用治疗有效量(而不同于一次性剂量)。间隔可以通过标准临床技术确定。在一些实施例中,可以每两个月、每月、每月两次、每三周、每两周、每周、每周两次、每周三次或每天施用肥大细胞活性抑制剂。单个个体的施用间隔不需要是固定的间隔,而是可以随时间变化,这取决于个体的需要和恢复速率。

[0244] 如本文所用,术语“每两个月”是指每两个月施用一次(即,每两个月一次);术语“每月”是指每个月施用一次;术语“每三周”是指每三周施用一次(即,每三周一次);术语“每两周”是指每两周施用一次(即,每两周一次);术语“每周”是指每周施用一次;术语“每天”是指每天施用一次。

[0245] 本发明还涉及包含本发明所述的肥大细胞活性抑制剂的药物组合物,其在具有标签的容器(例如用于静脉内施用的小瓶、瓶、袋、注射器等)中,该标签包括用于治疗肥大细胞活性相关病症的组合物的施用说明。

[0246] 肥大细胞活性相关病症的诊断方法

[0247] 预期其表达谱与肥大细胞活性相关病症相关的一种或多种肥大细胞活性因子和/或生物标记可以诊断病症、区分病症的不同阶段、确定病症的严重性和/或评估发展疾病的风险。因此,在一些实施例中,本发明提供了分析从怀疑患有肥大细胞活性相关病症的个体获得的生物样品的方法,以测量本文所述的生物标记的表达水平、确定个体是否患有肥大细胞活性相关病症、处于发展肥大细胞活性相关病症的风险,或确定肥大细胞活性相关病症的严重性。在一些实施例中,本发明提供了将个体诊断为易患MS复发的方法,该方法包括在个体中或来自个体的样品中检测肥大细胞活性生物标记的存在、水平和/或位置,并且基于检测到的肥大细胞活性生物标记预测MS复发的发生。在一些实施例中,施用本文所述的肥大细胞活性抑制剂来治疗MS复发。

[0248] 通常,在此类方法中,将从个体获得的生物样品的测定或测量的生物标记水平与一个或多个对照水平进行比较。可以使用各种对照水平的生物标记。例如,合适的对照水平可以指示未患有肥大细胞活性相关病症的对照个体中一种或多种生物标记的水平。可以通过在相同条件下从一个或多个健康对照个体获得的对照样品中同时测量相应的一种或多种肥大细胞活性因子和/或生物标记,获得这样的对照水平。合适的对照样品可以从一个健康对照个体获得,或者从多个健康对照个体汇集。在一些实施例中,可以从显著数量的个体确定指示健康个体中因子或生物标记的水平的对照水平,并获得平均值或均值。通常,健康对照个体处于相当年龄或其他发展状态。在一些实施例中,因子或生物标记的合适对照水平是基于历史数据的数字参考,也称为历史对照(即先前进行的测试或测定的,或先前已知的量或结果)。在一些实施例中,对照水平是或包括印出来或以其他方式保存的记录。在一些实施例中,一种或多种生物标记具有与合适的对照水平相比统计显著的升高水平表示个体患有肥大细胞活性相关病症,处于发展肥大细胞活性相关病症的风险。在一些实施例中,一种或多种生物标记具有与合适的对照水平相比统计显著的降低水平表示个体患有肥大细胞活性相关病症,处于发展肥大细胞活性相关病症的风险。可以使用各种统计技术和分析方法来确定生物标记是否具有带统计显著性(即,差异不是由随机变化引起的)的升高或降低的水平。示例性统计技术和方法包括但不限于线性和二次判别分析、K-最近邻算法。在

一些实施例中,如果在生物样品中测量到的因子或生物标记的水平高于对照水平超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍或3倍,则因子或生物标记具有升高的水平。在一些实施例中,如果在生物样品中测量到的因子或生物标记与对照水平相比减少了超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0249] 在一些实施例中,可以使用指示患有肥大细胞活性相关病症的对照个体中相应的一种或多种因子或生物标记水平的对照水平。这样的对照水平可以通过同时测量在相同条件下从对照个体获得或从多个对照个体汇集的对照样品中相应的一种或多种因子或生物标记来确定。在一些实施例中,可以从显著数量的个体确定指示患有肥大细胞活性相关病症的个体中的因子或生物标记水平的对照水平。通常,合适的对照个体患有相同类型的肥大细胞活性相关病症并且处于基本相同的疾病和发展阶段(例如,相同年龄和具有相似疾病症状)。在一些实施例中,合适的对照水平可以是基于历史数据(即,先前进行的测试或测定的,或先前已知的量或结果)建立的数字阈值,其与患有肥大细胞活性相关病症、处于发展肥大细胞活性相关病症的风险,或是肥大细胞活性相关病症的携带者的个体相关。在这些实施例中,在生物样品中测量到的一种或多种因子或生物标记与合适对照水平相比的统计学误差范围内的基本相似水平或具有统计显著性的升高或降低的水平表明个体患有肥大细胞活性相关病症,或处于发展肥大细胞活性相关病症的风险。诸如本文描述的那些的各种统计方法和技术可用于确定统计误差范围和统计显著性。在一些实施例中,如果生物样品中测量到的因子或生物标记的水平高于对照水平超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍或3倍,则因子或生物标记具有升高的水平。在一些实施例中,如果生物样品中测量到的因子或生物标记的水平与对照水平相比降低了超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍或3倍,则因子或生物标记具有降低的水平。

[0250] 在一些实施例中,生物样品中一种或多种因子或生物标记的升高或降低水平可用于确定肥大细胞活性相关病症的严重性。在一些实施例中,肥大细胞活性相关病症的严重性是MS的严重性。在一些实施例中,量化一种或多种生物标记的升高或降低的水平,从而确定病症的严重性和/或阶段。

[0251] 鉴定用于治疗肥大细胞活性相关病症的药剂的方法

[0252] 其中,本发明提供了一种鉴定用于治疗肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情的药剂的方法。因此,根据本发明鉴定的药剂可以用于治疗肥大细胞活性相关病症(例如MS)。方法涉及对于本文公开的任何肥大细胞活性测量这些药剂,并确定这些药剂对于肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情提供的保护程度。在一些实施例中,本发明考虑评估用于调节以下各项的候选药剂:脱粒、转粒化、肥大细胞活性因子的水平和/或位置、肥大细胞活性因子基因产物的水平、肥大细胞在组织或器官内的定位或迁移、与其他细胞类型的相互作用程度或类型、与一种或多种特定蛋白质(例如髓磷脂)或部位(例如BBB的基层)的相互作用的程度或类型。

[0253] 稳定肥大细胞活性.例如,药剂可以通过将肥大活性恢复到正常生理状态来稳定肥大细胞活性,从而治疗疾病。在一些实施例中,可以评估候选药剂抑制肥大细胞增殖、抑

制肥大细胞迁移、抑制细胞因子释放、抑制脂质衍生的代谢物释放,抑制颗粒相关代谢物释放、增强个体的水合作用、减少炎症及其组合的能力。可以在体外或体内(例如在肥大细胞活性相关病症的小鼠模型中)测试药剂的任何这些活性。

[0254] 在一些实施例中,通过比较候选药剂的肥大细胞活性的存在、水平和/或位置与对照药剂的肥大细胞活性的存在、水平和/或位置,从而评估候选药剂的肥大细胞活性的存在、水平和/或位置。控制剂可以是例如磷酸盐缓冲盐水、安慰剂、水、载体(vehicle)、载体(carrier)。在一些实施例中,候选药剂的肥大细胞活性的水平高于或低于对照试剂的肥大细胞活性水平超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、4倍、5倍、10倍、100倍。因此,所要求保护的方法可用于鉴定可治疗肥大细胞相关疾病、病症和/或病情的药剂。

[0255] 试剂盒

[0256] 在一些实施例中,本公开提供了用于确定和检测如本文所述的生物标记的试剂盒。在一些实施例中,试剂盒有用于确定个体中的肥大细胞活性相关病症生物标记。在一些实施例中,试剂盒包括用于确定一种或多种特定肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置的药剂、在一些实施例中,已确定肥大细胞活性相关病症(例如MS易感性)的肥大细胞活性生物标记包括一种或多种肥大细胞活性因子。

[0257] 本发明提供了包括有用于执行根据本发明的发明方法的各种试剂和材料的试剂盒。本文描述的诊断和治疗程序可以由诊断实验室、实验性实验室或从业者进行。本发明提供了可用于这些不同设置的试剂盒。

[0258] 例如,根据本发明方法用于确定因子和生物标记、测量因子和生物标记水平(例如蛋白质、脂质、组胺或核酸水平)、诊断肥大细胞活性相关病症、鉴定亚型、表征严重性、分期疾病和/或监测个体的治疗反应的材料和试剂可以组合在试剂盒中。在某些实施例中,本发明的试剂盒包含特异性检测一种或多种因子、或生物标记(例如选自表1的那些)的蛋白质、脂质、组胺或核酸表达水平的至少一种或多种试剂,以及使用根据本发明方法的试剂盒的说明书。

[0259] 每个试剂盒可以优选地包括使程序特异的试剂。因此,为了检测/定量蛋白质标记(或其类似物或片段),特异性检测蛋白质表达水平的试剂可以是与蛋白质标记(或其类似物或片段)特异性结合的抗体。为了检测/定量包含编码生物标记的多核苷酸序列的核酸分子,特异性检测表达水平的试剂可以是与多核苷酸序列(例如cDNA或寡核苷酸)互补的核酸探针。核酸探针可以或不固定在基质表面(例如珠子、微阵列等)上。

[0260] 根据本发明的试剂盒或其他制品可包括一个或多个容器以容纳各种试剂。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器(例如预填充注射器)、安瓿。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。

[0261] 在一些实施例中,本发明的试剂盒可包括合适的参考水平或用于确定本文所述的参考水平的参考样品。在一些实施例中,本发明的试剂盒可以包括使用根据本发明一种或多种方法的试剂盒的说明书,并且可以包括处理从个体获得的生物样品和/或进行测试的说明书、用于解释结果的说明书,以及由管制药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构(例如FDA)规定的通知。

[0262] 通过参考以下实施例将更全面地理解本发明。然而,它们不应被解释为限制本发

明的范围。所有文献引用均以引用方式并入。

[0263] 示例

[0264] 示例1: EAE中硬脑膜肥大细胞与T细胞的相互作用

[0265] 本示例探讨了实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 动物模型中硬脑膜肥大细胞与T细胞的相互作用。将衍生自具有和不具有肥大细胞小鼠中引流颈深淋巴结的T细胞的转录组特征与来自经历诱导的肥大细胞脱粒的小鼠的T细胞的转录组特征进行比较。本示例还证明了各组小鼠之间B细胞和单核细胞谱的比较。

[0266] EAE在野生型 (使用Mog35-55EAE模型) 和肥大细胞缺陷小鼠 (sash/sash) 中诱导。另外两个实验组是: (1) 重建有肥大细胞的肥大细胞缺陷小鼠 (sash/sash), 确定观察到效果是由肥大细胞引起, 而不是由突变的副作导致肥大细胞功能障碍而引起; 和 (2) 使用导致肥大细胞脱粒的化合物局部治疗的野生型小鼠 (CSF)。

[0267] 从四个实验组的5个组织区室分离T细胞、B细胞和单核细胞。区室包括: 脑膜间隙、脑膜淋巴管、实质、颈深淋巴结和血液。细胞在4个时间点分离: i) 免疫后7天 (临床症状之前)、ii) 免疫后10至12天 (出现第一次临床症状)、iii) 免疫后18至20日 (临床症状的高峰), 以及iv) 免疫后30日后 (临床评分稳定在最低标记)。

[0268] 从来自4个治疗组中的每一个的至少18只小鼠中分离细胞。将来自6只小鼠的细胞和组织汇集成一个样品, 即每个器官每种条件3个样品, 并通过深度RNA测序进行分析。分析来自RNA测序研究的数据以鉴定与未暴露于肥大细胞的细胞 (即, 来自肥大细胞缺陷小鼠的T细胞) 相比暴露于正常或脱粒肥大细胞的T细胞的功能差异。鉴定T细胞上的独特生物标记。

[0269] 同时, 对从MS患者获得的血液样品中分离的T细胞提取的RNA进行深度RNA测序。比较人类和小鼠T细胞分析的结果, 以评估相似标记或预测致病性的标记组的表达。

[0270] 示例2: 来自人类MS外周T细胞与来自诱导肥大细胞脱粒的小鼠的T细胞的转录组特征的比较

[0271] 本示例证明了衍生自人类MS外周T细胞中转录组特征与从示例1的小鼠研究获得的那些的比较。

[0272] 分析了参加CLIMB研究 (MS综合纵向调查) 的两组MS患者的血液样品。这些组包括 1) 早期MS的患者: 在疾病发作后一年内从MS患者收集样品 (n=10) 以及 2) 复发患者: 在复发前7天前从MS患者收集样品 (n=10)。第一实验组的对照组是年龄和性别匹配的健康对照 (n=10)。第二实验组 (复发MS) 的对照组是处于缓解期的相同患者。

[0273] 使用MACsBead分离从外周血单核细胞 (PBMC) 分离T细胞。通过使用CD45和CCR7抗体和流式细胞术, 将T细胞从PBMC分选, 然后进一步分选以分离初始(naïve)、效应、中央和效应记忆细胞群。使用RNA-seq和变体调用衍生T细胞转录谱。将转录谱与从示例1的小鼠研究获得的谱进行比较。

[0274] B细胞和单核细胞也从PBMC分离。使用RNA-seq和变体调用衍生B细胞和单核细胞转录谱。将转录谱与从示例1的小鼠研究获得的谱进行比较。

[0275] 示例3: 评估肥大细胞活性的体外触发和激素对T细胞致脑炎作用的诱导

[0276] 本示例证明了激素增强了肥大细胞脱粒的触发, 并且其次增强了T细胞的致脑炎表型。特别是, 通过分析RNA-Seq转录谱来证明性激素和应激激素对肥大细胞脱粒和T细胞

致脑炎作用的诱导的影响。

[0277] 皮质醇刺激的肥大细胞与T细胞一起温育。收集T细胞并提取RNA。通过RNA-Seq分析RNA,并将谱与初始T细胞进行比较。将雌二醇刺激的肥大细胞与T细胞一起温育。收集T细胞并提取RNA。通过RNA-Seq分析RNA,并将谱与初始T细胞进行比较。将孕酮刺激的肥大细胞与T细胞一起温育。收集T细胞并提取RNA。通过RNA-Seq分析RNA,并将谱与初始T细胞进行比较。

[0278] 示例4:在MS复发时增加肥大细胞活性和脱粒因子。

[0279] 本示例证明了肥大细胞活化和脱粒因子在MS复发时增加并且相对于缓解期增加。

[0280] 患有RRMS的成年患者参与本研究,以确定肥大细胞活性和脱粒因子在急性MS复发时是否增加。纳入标准包括:1) RRMS符合麦当劳准则,2) 年龄18至40岁,3) 登记在CLIMB研究中,4) 在复发发作后7天内,如研究医师证实,5) 复发前30天内未进行类固醇治疗,6) 可接受的平台DMT:INF、GA、Tysabri、Gilenya。共研究了30名个体。

[0281] 缓解期样品在复发样本后3至6个月收集。在先前的类固醇治疗的30天内不收集样品。患者正在接受与复发期间相同的平台DMT。

[0282] 在急性复发的7天内,患者进行静脉输注类固醇,并收集血液和尿液样品。三至六个月后,收集第二血液和24小时尿液样品。还收集来自健康对照个体的血液和尿液样品。收集CSF样品。

[0283] 血清从血液中分离并对于细胞因子(IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-17、IL-33、TNF- $\alpha$ 、嗜酸性趋化因子)、类胰蛋白酶、糜蛋白酶、组胺、肝素、嗜铬粒蛋白A、白三烯E4、前列腺素(前列腺素E2、前列腺素D2、11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、tetranor-PGDM和其他前列腺素代谢物)、CRH、皮质醇和IgE进行测试。对血清样品进行代谢组学分析,以确定样品内发现的一整套小分子代谢物(例如代谢中间体、激素和其他信号分子,以及次级代谢物)。

[0284] 从全血样品中分离RNA并进行RNA测序。评估样品的肥大细胞活化标记转录物,包括CD117,其也称为肥大/干细胞生长因子受体或c-Kit。分析CSF样品的PGE-2、白三烯、CSF细胞转录物和通过代谢组学分析。在尿液样品中测量前列腺素E<sub>2</sub>、白三烯、11- $\beta$ -前列腺素F<sub>2</sub>- $\alpha$ 和N-甲基组胺的水平。对尿液样品进行代谢组学分析,以确定样品内发现的一整套小分子代谢物(例如代谢中间体、激素和其他信号分子,以及次级代谢物)。

[0285] 比较从健康对照、复发MS患者和缓解MS患者收集的血液、尿液和CSF样品中存在的生物标记的水平。

[0286] 示例5:评估与MS复发严重性相关的肥大细胞活性和脱粒触发

[0287] 示例将证明肥大细胞脱粒的程度与MS复发的严重性相关。

[0288] MS复发的严重性由患者的医生评估。复发恢复由患者的医生评估。示例4中确定的血液和尿液中肥大细胞活性因子的水平与复发和恢复期间的临床发现相关。

[0289] 示例6:验证肥大细胞诱导的T细胞活性转录组

[0290] 本示例证明了先前示例中鉴定的转录组与BBB和淋巴管系统中的基因表达的关联。使用了CRISPR-Cas9系统和动物敲除模型。

[0291] 示例7:与MS中的RNA-seq转录组特征相关的遗传标记

[0292] 本示例证明了与MS中的RNA-seq转录组特征相关的遗传标记。使用全基因组测序证明了MS患者与健康对照中的肥大细胞相关等位基因变体(例如CYP21A2)的存在。

[0293] 示例8:癌症中的肥大细胞活性因子和生物标记

[0294] 本示例证明了癌症中的肥大细胞活性因子和生物标记的鉴定。

[0295] 获得来自癌症患者的肿瘤样品和匹配的正常组织样品。研究了以下癌症类型的样品:膀胱癌、乳腺癌、类癌、结肠癌、直肠癌、成胶质细胞瘤、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、恶性黑素瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、咽喉癌和子宫癌。从肿瘤样品和正常组织样品中提取表1中鉴定的RNA、DNA和肥大细胞活性因子。通过RNA-Seq分析RNA,并比较肿瘤样品与匹配的正常组织样品的转录谱,并鉴定相关的生物标记。通过全外显子组测序和对于特定变体(包括P450酶家族基因的等位基因变体(例如CYP21A2))分析DNA。比较从肿瘤样品和匹配的正常组织样品获得的结果,并鉴定相关的生物标记。在肿瘤样品和匹配的正常组织样品中确定肥大细胞活性因子的存在、水平和/或位置。比较从肿瘤样品和匹配的正常组织样品获得的结果,并鉴定相关的生物标记。

[0296] 示例9: SJL小鼠中的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)研究

[0297] 本示例证明了在多发性硬化症的小鼠模型中检测肥大细胞活性因子和生物标记。

[0298] 测量了小鼠的尿液和血清中通过主动免疫发展EAE的PGDM (PGD<sub>2</sub>的代谢物)和组胺和/或N-甲基组胺的存在。SJL小鼠的髓磷脂蛋白脂蛋白(PLP)<sub>139-151</sub>/完全弗氏佐剂(CEFA)免疫诱导了EAE。

[0299] 表2研究设计

[0300]	<b>模型</b>	
	描述	SJL小鼠中的EAE
	动物品种和性别	SJL小鼠，雌性
	第0天	免疫日
	研究长度	16天 ( 从第0天到第15天 )
	<b>动物和组别</b>	
	动物总数	23
	动物来源	杰克逊实验室 ( 饲养者 )
	研究开始时的年龄 ( 第0天 )	8到9周
	组别数目	1
	组别大小	23只动物 ( 见表3 )
	组别分配日	第0天
	<b>读数</b>	
	评分开始	免疫后第9天
	评分结束	第15天
	评分频率	每天
称重开始	第0天	
称重结束	研究结束	
称重频率	3x/周 ( 周一、周三、周五 )	
组织收集和分析	每天从3只小鼠( 根据表3 )收集尿液、血清、脑、脊髓、颈淋巴结	

[0301] EAE诱导

[0302] 在研究开始前,使小鼠在测试设施中适应4周。通过用PLP<sub>139-151</sub>/CFA免疫在所有小鼠中诱导EAE。具体地,用含有PLP<sub>139-151</sub>的乳液在背部的四个部位皮下注射小鼠,该乳液来自Hook Kit的PLP<sub>139-151</sub>/CFA乳液,目录号是EK-0120(马萨诸塞州劳伦斯Hooke实验室)。两个注射部位位于颈线下约1cm的上背部。另外两个部位位于尾巴底部上约2cm的下背部。每个部位的注射体积0.05mL。

[0303] 23只小鼠全部都在单个组别中。在免疫后第9天开始,每天对小鼠的瘫痪(EAE)迹象进行评分。根据下面表3中的时间表处死小鼠。

[0304] 表3处死时间表

[0305]

处死	动物数量
第4天	3

第5天	3
第6天	3
第7天	3
第8天	3
第9天	3
第13天	5

[0306] 在第4、5、6、7、8和9天每天处死三 (3) 只小鼠, 并如下面表4中所述收集组织。在第11天预期EAE发作, 因此预期小鼠在第9天没有EAE迹象。剩余的5只小鼠在EAE出现的第一天或第二天(第13天)处死。

[0307] 组织收集

[0308] 在处死时并如表4所示, 从每只小鼠收集下列组织和流体。从四个空白小鼠(即, 没有EAE诱导)收集尿液和血清以提供基线对照。

[0309] • 尿液

[0310] • 血清

[0311] • OCT冷冻的颈淋巴结 (2)

[0312] • OCT冷冻的脑

[0313] • 固定在4%福尔马林中24小时, 然后OCT冷冻的脊髓

[0314] 表4标本收集

笼子 #	小鼠 #	小鼠 ID#	免疫后第3天收集尿液	免疫后第几天收集/处死	尿液	血液 (血清)	脑 (整个)	颈淋巴结	脊髓
1	1	1-1		4	+	+	+	+	+
	2	1-2		4		+	+	+	+
	3	1-3		4		+	+	+	+
	4	1-4		5	+	+	+	+	+
	5	1-5		6	+	+	+	+	+
	6	1-6		13	+	+			
2	1	2-1		8	+	+	+	+	+
	2	2-2		13	+	+			
	3	2-3	+	8	+	+	+	+	+
	4	2-4		13	+	+			
	5	2-5	+	13	+	+			
	6	2-6	+						
3	1	3-1	+	5	+	+	+	+	+
	2	3-2	+	5	+	+	+	+	+
	3	3-3	+	7	+	+	+	+	+
	4	3-4		9	+	+	+	+	+
	5	3-5	+	8	+	+	+	+	+
	6	3-6		9	+	+	+	+	+
4	1	4-1	+	6	+	+	+	+	+
	2	4-2	+	7	+	+	+	+	+
	3	4-3	+	7	+	+	+	+	+
	4	4-4	+	6	+	+	+	+	+
	5	4-5		9	+	+	+	+	+

[0316] 流体分析(尿液和血清)

[0317] 对每种尿液和血清样品进行N-甲基组胺和/或组胺(Enzo, ENZ-KIT140)的比色ELISA。ELISA方法灵敏度低至0.03ng/mL。由于总样品大小较小,每个样品都是单独(in unicate)测试的。

[0318] 对每个尿液和血清样品进行tetranor-PGDM(前列腺素D2代谢物)(Cayman, Cat# 501001)的竞争性ELISA。Tetranor-PGDM是PGD2的主要代谢物,并存在于人类和小鼠尿液。ELISA方法将tetranor-PGDM转化为可以定量的稳定衍生物tetranor-PGJM。该方法检测6.4

至4,000pg tetranor-PGDM/ml。

[0319] 读数

[0320] 从第9天开始至研究结束每天针对EAE对小鼠进行评分,并且从第0天开始每周测量体重三次(周一、周三和周五)。研究的最后一天是第15天。由对治疗和每只小鼠的先前分数不知情的人盲目地进行评分。读数是在0至5的范围2内单位增量为0.5的EAE分数,并且是体重变化(表5)。

[0321] 表5 EAE评分

[0322]

评分	临床观察
0.0	与未免疫的小鼠相比,运动功能没有明确变化。 当从尾巴底部抬起时,尾巴有张力并且直立。后腿通常分开。当小鼠行走时,没有步态或头部歪斜。
0.5	尾巴的尖端是柔软(limp)的。 当从尾巴底部抬起时,尾部除了尖端外都有张力。尾巴中感觉到肌肉紧张,而尾巴继续移动。
1.0	柔软尾巴。 当从尾巴底部抬起时,整个尾巴随意搭在手指上,而不是直立的。后腿通常分开。没有观察到尾部运动的迹象。
1.5	柔软尾巴和后腿抑制。 当从尾巴底部抬起时,整个尾巴随意搭在手指上。 当小鼠放在线架上时,至少有一条后腿持续地落下。 行走稍稍摇摆不定。

2.0	<p>柔软尾部和后腿无力。</p> <p>当从尾巴底部抬起时，腿不会分开，而是靠得更近。当观察到小鼠行走时，它行走时显然地有明显的摇晃。一只脚可能有脚趾拖动，但另一只腿没有明显的运动抑制。</p> <p>或者</p> <p>小鼠似乎是0.0的分数，但是观察到步行时有明显头部歪斜迹象。平衡很差。</p>
2.5	<p>柔软尾部和拖后腿。</p> <p>两只后腿都有一些动作，但两只都拖动脚部（小鼠后脚绊倒）。</p> <p>或者</p> <p>一条腿没有动作/完全拖动一条腿，而另一条腿有动作。</p> <p>或者</p> <p>抬起时EAE严重性显得较轻（评分为0.0至1.5），但有强烈的头部歪斜，使小鼠偶尔翻倒。</p>

[0323]

[0324]

3.0	<p>柔软尾部和后腿完全瘫痪 ( 最常见 )。</p> <p>或者</p> <p>柔软尾部和后腿几乎完全瘫痪。一条或两条后腿能够摆动，但两条后腿都不能移动到后臀部前。</p> <p>或者</p> <p>柔软尾巴，一条前腿和一条后腿瘫痪。或者</p> <p>以下全部：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 严重的头部歪斜，</li> <li><input type="checkbox"/> 只沿着笼子的边缘走，</li> <li><input type="checkbox"/> 推着笼壁，</li> <li><input type="checkbox"/> 当从尾巴底部抬起时旋转。</li> </ul>
3.5	<p>柔软尾部和后腿完全瘫痪。加上：</p> <p>小鼠在笼子周围移动，但当侧面摆放时，无法自行调整。后腿都在身体的一侧。</p> <p>或者</p> <p>小鼠在笼子里移动，但后肢像煎饼一样扁平，在小鼠的前肢呈现出驼峰的外观。</p>
4.0	<p>柔软部分、整个后腿和部分前腿瘫痪。</p> <p>小鼠在笼子里以最小程度移动，但显得越渐警觉 (feeding)。通常建议在小鼠有2天的评分为4.0后使用安乐死。但是，在每天皮下注射流体的情况下，大多数C57BL/6</p>

	<p>小鼠可能恢复到3.5或3.0，而SJL小鼠可能完全康复，即使它们在疾病高峰时达到4.0分。</p> <p>当由于严重瘫痪而使小鼠安乐死时，在剩下的实验为该小鼠输入5.0的评分。</p>
<p>[0325]</p> <p>4.5</p>	<p>整个后腿和部分前腿瘫痪，不在笼子里运动。小鼠并不警觉。</p> <p>小鼠的前腿运动极小。小鼠对接触几乎没有反应。</p> <p>推荐使用安乐死。当由于严重瘫痪而使小鼠安乐死时，在剩下的实验为该小鼠输入5.0的评分。</p>
<p>5.0</p>	<p>小鼠在笼子里自发滚动（推荐使用安乐死）。</p> <p>或者</p> <p>发现老鼠因瘫痪而死亡。</p> <p>或者</p> <p>小鼠因严重瘫痪而被安乐死。</p>

[0326] 结果

[0327] 在研究第13天处理的5只小鼠中测量EAE评分(表6)。5只小鼠中有四只在免疫后13天出现显著发展EAE迹象(图1)。

[0328] 表6 EAE评分

[0329]

笼子 #	小鼠 #	天	9	10	11	12	13	MM S	平均 发作 日	EAE 发病 率	发作 时 评 分	最终 评分
		小鼠 ID#										

[0330]

1	1	1-1										
	2	1-2										
	3	1-3										
	4	1-4										
	5	1-5										
	6	1-6	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	13		3.5	3.5
2	1	2-1										
	2	2-2	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0	13		3.0	3.0
	3	2-3										
	4	2-4	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.5	13		3.5	3.5
	5	2-5	0.0	0.0	0.0	1.5	3.5	3.5	12		1.5	3.5
	6	2-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				0.0
3	1	3-1										
	2	3-2										
	3	3-3										
	4	3-4										
	5	3-5										
	6	3-6										
4	1	4-1										
	2	4-2										
	3	4-3										
	4	4-4										
	5	4-5										
		<b>平均</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.30</b>	<b>2.70</b>	<b>2.70</b>	<b>12.8</b>	<b>17.4%</b>	<b>2.88</b>	<b>2.70</b>
		<b>标准 偏差</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.67</b>	<b>1.52</b>	<b>1.52</b>	<b>0.5</b>		<b>0.95</b>	<b>1.52</b>
		<b>SEM</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.30</b>	<b>0.68</b>	<b>0.68</b>	<b>0.3</b>			

[0331] 在研究第0、4、5、7、10和12天测量小鼠的体重(表7),并确定相对于研究第0天的体重的体重百分比(表8和图2)。

[0332] 表7体重

		天	0	0	0	4	5	7	10	12
笼子 #	小鼠 #	小鼠 ID#								
[0333] 1	1	1-1	19.8	19.6	19.7	20.6				
	2	1-2	19.9	19.8	19.9	20.6				
	3	1-3	18.6	18.4	18.5	18.1				
	4	1-4	19.3	19.3	19.3	20.5	21.1			
	5	1-5	18.4	18.2	18.3	18.5	18.8			

	6	1-6	21.0	21.2	21.1	21.2	21.6	22.0	21.6	19.4
[0334] 2	1	2-1	18.6	18.5	18.6	19.8	20.2	20.2		
	2	2-2	18.9	18.8	18.9	20.2	20.4	20.3	21.0	20.4
	3	2-3	18.9	18.7	18.8	19.5	19.6	19.9		
	4	2-4	19.5	19.5	19.5	19.7	20.4	21.3	22.1	20.2
	5	2-5	23.1	23.0	23.1	23.6	23.5	23.2	21.6	18.7
	6	2-6	18.0	17.7	17.9	17.7	18.7	19.0	20.7	20.6
[0334] 3	1	3-1	19.0	18.8	18.9	19.0	18.3			
	2	3-2	18.8	18.6	18.7	17.5	18.4			
	3	3-3	19.7	19.6	19.7	20.7	21.7	21.4		
	4	3-4	22.3	22.3	22.3	21.8	21.7	21.8		
	5	3-5	18.9	18.7	18.8	18.9	18.8	19.5		
	6	3-6	19.8	19.7	19.8	19.5	19.8	19.8		
[0334] 4	1	4-1	17.8	17.7	17.8	18.1	18.4			
	2	4-2	21.8	21.7	21.8	22.7	21.9	21.4		
	3	4-3	20.3	20.1	20.2	19.5	19.5	19.4		
	4	4-4	20.9	20.8	20.9	21.6	21.7			
	5	4-5	17.5	17.4	17.5	18.1	18.4	18.5		
		<b>平均</b>			<b>19.5</b>	<b>19.9</b>	<b>20.1</b>	<b>20.6</b>	<b>21.4</b>	<b>19.9</b>
		<b>标准偏差</b>			<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	<b>1.5</b>	<b>1.3</b>	<b>0.6</b>	<b>0.8</b>
		<b>SEM</b>			<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.4</b>

[0335] 表8体重百分比

笼子 #	小鼠 #	天	0	4	5	7	10	12	结束% 体重	
		小鼠 ID#								
[0336] 1	1	1-1	100.0%	104.6%					104.6%	
	2	1-2	100.0%	103.8%					103.8%	
	3	1-3	100.0%	97.8%					97.8%	
	4	1-4	100.0%	106.2%	109.3%				109.3%	
	5	1-5	100.0%	101.1%	102.7%				102.7%	
	6	1-6	100.0%	100.5%	102.4%	104.3%	102.4%	91.9%	91.9%	
2	1	2-1	100.0%	106.7%	108.9%	108.9%			108.9%	
	2	2-2	100.0%	107.2%	108.2%	107.7%	111.4%	108.2%	108.2%	
	3	2-3	100.0%	103.7%	104.3%	105.9%			105.9%	
	4	2-4	100.0%	101.0%	104.6%	109.2%	113.3%	103.6%	103.6%	
	5	2-5	100.0%	102.4%	102.0%	100.7%	93.7%	81.1%	81.1%	
	6	2-6	100.0%	99.2%	104.8%	106.4%	116.0%	115.4%	115.4%	
3	1	3-1	100.0%	100.5%	96.8%				96.8%	
	2	3-2	100.0%	93.6%	98.4%				98.4%	
[0337] 4	3	3-3	100.0%	105.3%	110.4%	108.9%			108.9%	
	4	3-4	100.0%	97.8%	97.3%	97.8%			97.8%	
	5	3-5	100.0%	100.5%	100.0%	103.7%			103.7%	
	6	3-6	100.0%	98.7%	100.3%	100.3%			100.3%	
	1	4-1	100.0%	102.0%	103.7%				103.7%	
	2	4-2	100.0%	104.4%	100.7%	98.4%			98.4%	
	3	4-3	100.0%	96.5%	96.5%	96.0%			96.0%	
	4	4-4	100.0%	103.6%	104.1%				104.1%	
	5	4-5	100.0%	103.7%	105.4%	106.0%			106.0%	
			<b>平均</b>	<b>100.0%</b>	<b>101.8%</b>	<b>103.0%</b>	<b>103.9%</b>	<b>107.4%</b>	<b>100.1%</b>	<b>102.1%</b>
			<b>标准偏差</b>	<b>0.0%</b>	<b>3.5%</b>	<b>4.2%</b>	<b>4.5%</b>	<b>9.2%</b>	<b>13.6%</b>	<b>7.0%</b>
			<b>SEM</b>	<b>0.0%</b>	<b>0.7%</b>	<b>0.9%</b>	<b>1.2%</b>	<b>4.1%</b>	<b>6.1%</b>	<b>1.5%</b>

[0338] 在免疫后第3、4、5、6、7、8、9和13天从空白小鼠和EAE小鼠收集尿液。在免疫后第4、5、6、7、8、9和13天从空白小鼠和EAE小鼠收集血清。使用如上所述的ELISA方法测量尿液和血清中的组胺(图3A和3B)。表9中提供了各个小鼠的数据。

[0339] 表9组胺值

[0340]

	样品	组胺 ng/mL	
		尿液	血清
组别	小鼠ID		
空白	N1	37.2	34.3
	N2	13.9	35.0
	N3	37.2	30.6
	N4	34.0	32.0
平均		30.6	33.0
标准偏差		11.2	2.0
SEM		5.6	1.0
第3天	2-3	86.9	未收集
	2-5	49.9	未收集
	2-6	68.4	未收集
	3-1	73.2	未收集
	3-2	58.4	未收集
	3-3	59.7	未收集
	3-5	65.4	未收集
	4-1	57.1	未收集
	4-2	54.5	未收集
	4-3	73.2	未收集
	4-4	53.3	未收集
平均		63.6	
标准偏差		11.0	
SEM		3.3	

[0341]

t检验*		<b>0.0002</b>	
第4天	1-1	51.1	35.8
	1-2	未收集	34.3
	1-3	未收集	35.8
平均		51.1	35.3
标准偏差			0.9
SEM			0.5
t检验*			0.1288
第5天	1-4	62.5	37.5
	3-1	51.1	40.1
	3-2	47.7	41.1
平均		53.7	39.6
标准偏差		7.7	1.8
SEM		4.5	1.1
t检验*		<b>0.0287</b>	<b>0.0071</b>
第6天	1-5	33.2	38.4
	4-1	21.1	28.6
	4-4	22.6	36.7
平均		25.6	34.6
标准偏差		6.6	5.2
SEM		3.8	3.0
t检验*		0.5337	0.5951
第7天	3-3	36.4	40.1
	4-2	40.7	37.5
	4-3	24.4	38.4
平均		33.8	38.7
标准偏差		8.4	1.3
SEM		4.9	0.8
t检验*		0.6920	<b>0.0088</b>
第8天	2-1	38.0	37.5
	2-3	49.9	30.6
	3-5	97.3	36.7
平均		61.7	34.9
标准偏差		31.4	3.8
SEM		18.1	2.2
t检验*		0.1183	0.4120
第9天	3-4	19.0	46.0
	3-6	12.4	34.3
	4-5	39.8	38.4
平均		23.7	39.6
标准偏差		14.3	5.9
SEM		8.3	3.4
t检验*		0.5083	0.0878
第13天	1-6	77.8	30.6
	2-2	18.2	29.2
	2-4	29.9	33.5
	2-5	23.3	39.2

[0342]	平均		37.3	33.1
	标准偏差		27.4	4.4
	SEM		13.7	2.2
	t检验*		0.6651	0.9534

[0343] \*EAE组与空白组的t检验比较 ( $p < 0.05$ 被认为是显著的)。

[0344] 在第3天和第5天检测到与空白小鼠的水平相比尿液组胺/N-甲基组胺水平显著增加。在第5天和第7天检测到与空白小鼠的水平相比血清组胺水平显著增加。

[0345] 使用如上所述的ELISA方法测量尿液和血清中PGDM的水平(图4A和4B)。表10中提供了各个小鼠的数据。

[0346] 表10 PGDM值

	样品	PGDM ng/mL	
		尿液	血清
组别	小鼠ID		
空白	N1	8.622	0.148
	N2	9.568	0.104
	N3	8.622	0.050
	N4	8.989	0.164
平均		8.950	0.117
标准偏差		0.447	0.051
SEM		0.2	0.0
第3天	2-3	26.544	未收集
	2-5	10.399	未收集
	2-6	14.352	未收集
	3-1	16.261	未收集
	3-2	14.962	未收集
	3-3	13.483	未收集
	3-5	14.352	未收集
	4-1	15.926	未收集
	4-2	15.598	未收集
	4-3	15.926	未收集
	4-4	15.598	未收集
平均		15.764	
标准偏差		3.939	
SEM		1.188	
t检验*		<b>0.0050</b>	
第4天	1-1	10.185	0.271
	1-2	未收集	0.905
	1-3	未收集	0.410
平均		10.185	0.529
标准偏差			0.333
SEM			0.192

[0348]

t检验*			0.0534
第5天	1-4	15.598	0.294
	3-1	10.399	0.347
	3-2	9.568	0.320
平均		11.855	0.320
标准偏差		3.268	0.027
SEM		1.887	0.015
t检验*		0.1293	<b>0.0016</b>
第6天	1-5	10.185	0.378
	4-1	7.934	0.720
	4-4	8.804	0.609
平均		8.974	0.569
标准偏差		1.135	0.174
SEM		0.655	0.101
t检验*		0.9702	<b>0.0039</b>
第7天	3-3	8.989	0.410
	4-2	9.371	0.300
	4-3	4.987	0.394
平均		7.782	0.368
标准偏差		2.428	0.059
SEM		1.402	0.034
t检验*		0.3759	<b>0.0018</b>
第8天	2-1	9.371	0.810
	2-3	9.371	0.609
	3-5	23.920	0.635
平均		14.221	0.685
标准偏差		8.400	0.109
SEM		4.850	0.063
t检验*		0.2515	<b>0.0002</b>
第9天	3-4	4.784	0.224
	3-6	4.311	0.622
	4-5	9.568	0.475
平均		6.221	0.440
标准偏差		2.908	0.201
SEM		1.679	0.116
t检验*		0.1145	<b>0.0245</b>
第13天	1-6	17.245	0.055
	2-2	4.402	0.064
	2-4	3.575	0.092
	2-5	4.222	0.190
平均		7.361	0.100
标准偏差		6.599	0.062
SEM		3.299	0.031
t检验*		0.6478	0.6983

[0349] \*EAE组与空白组的t检验比较 ( $p < 0.05$ 被认为是显著的)。

[0350] 在第3天检测到与空白小鼠的水平相比尿液PGDM水平显著增加。在第5至9天检测

到与空白小鼠的水平相比血清PGDM水平显著增加。

[0351] 这些数据证明了组胺(和其代谢物N-甲基组胺)和PGD<sub>2</sub>(和其代谢物tetranor-PGDM)是肥大细胞活性相关病症(例如MS)的肥大细胞活性生物标记。通过确定患有或易患肥大细胞活性相关病症的个体的样品(例如尿液或血清)中一种或多种肥大细胞活性因子(例如组胺和PGD<sub>2</sub>)的存在、水平和/或位置,可以确定肥大细胞活性相关病症的发生、发病率、严重性或治疗反应。

[0352] 示例10:C57BL/6小鼠中的实验性自身免疫性脑脊髓(EAE)研究本示例证明了在多发硬化症的小鼠模型中检测肥大细胞活性因子和生物标记。

[0353] 测量了小鼠的尿液和血清中因为过继细胞转移发展EAE的PGDM(PGD<sub>2</sub>的代谢物)和组胺和/或N-甲基组胺的存在。在这EAE模型中,免疫仅发生在供体小鼠。将完全致脑炎的细胞转移到受体小鼠中,在那里它们诱导EAE(EAE的效应期)。

[0354] 表11研究设计

<b>模型</b>	
描述	C57BL/6小鼠中的EAE
动物品种和性别	C57BL/6小鼠, 雌性
第0天	细胞转移日
研究长度	16天(从第0天到第15天)
<b>动物和组别</b>	
动物总数	3
动物来源	杰克逊实验室(饲养者)
研究开始时的年龄(第0天)	8到9周
组别数目	1
组别大小	3只动物

[0355]

	组别分配日	第0天
	<b>读数</b>	
	评分开始	免疫后第6天
	评分结束	第15天
[0356]	评分频率	每天
	称重开始	第0天
	称重结束	研究结束
	称重频率	3x/周 (周一、周三、周五)
	组织收集和分析	从3只小鼠收集尿液、血清、脑、脊髓、颈淋巴结

[0357] EAE诱导

[0358] 在EAE的过继转移模型中,雌性C57BL/6供体小鼠被免疫并用作致脑炎T细胞的来源。一旦供体小鼠对髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)<sub>35-55</sub>/CFA乳液产生免疫反应(通常在免疫后11天),将它们处死并收获它们的脾脏。在MOG<sub>35-55</sub>存在下培养脾细胞以活化致脑炎性T细胞,然后将其转移至雌性C57BL/6受体小鼠以诱导EAE。转移细胞的日子被认为是研究的第0天。EAE发作通常在细胞转移后6至9天。

[0359] 三只小鼠在单个组别中。在免疫后第6天开始,每天对小鼠的瘫痪迹象(EAE)进行评分。细胞转移后第15天处死小鼠。

[0360] 组织收集

[0361] 在处死时并如表12所示,从每只小鼠收集以下流体。小鼠1-4没有接受细胞转移,并且作为空白对照。

[0362] • 尿液

[0363] • 血清

[0364] 表12标本收集

笼子#	小鼠#	小鼠ID#	收集细胞转移后第几天	尿液	血液(血清)
1	1	1-1	1	+	+
	2	1-2	1	+	+
	3	1-3	1	+	+
	4	1-4	1	+	+

[0367] 流体分析(尿液和血清)

[0368] 对每个尿液和血清样品进行N-甲基组胺和/或组胺(Enzo, ENZ-KIT140)的比色ELISA。ELISA方法灵敏度低至0.03ng/mL。由于总样品大小较小,每个样品都是单独测试的。

[0369] 对每个尿液和血清样品进行tetranor-PGDM(前列腺素D<sub>2</sub>代谢物)(Cayman, Cat#

501001)的竞争性ELISA。Tetranor-PGDM是PGD<sub>2</sub>的主要代谢物,并存在于人类和小鼠尿液。ELISA方法将tetranor-PGDM转化为可以定量的稳定衍生物tetranor-PGJM。该方法检测6.4至4,000pg tetranor-PGDM/mL。

[0370] 结果

[0371] 在细胞转移后第15天从空白和EAE小鼠收集尿液和血清。如示例9中所述测量组胺/N-甲基组胺和PGDM(图5和6)。表13中提供了各个小鼠的组胺数据。

[0372] 表13组胺值

	样品	组胺 ng/mL	
		尿液	血清
组别	小鼠ID		
过继转移	A1	91.2	32.7
	A2	31.0	35.0
	A3	35.6	29.2
平均		52.6	32.3
标准偏差		33.5	2.9
SEM		19.3	1.7
t检验*		0.2634	0.7467
空白B6	N1 B6	27.1	35.0

[0374] \*EAE组与空白组的t检验比较(p<0.05被认为是显著的)。

[0375] 表14中提供了各个小鼠的PGDM数据。

[0376] 表14 PGDM值

	样品	PGDM ng/mL	
		尿液	血清
组别	小鼠ID		
过继转移	A1	16.890	0.131
	A2	9.975	0.133
	A3	6.578	0.145
平均		11.148	0.136
标准偏差		5.255	0.008
SEM		3.034	0.004
t检验		0.4286	0.5452
空白B6	N1 B6	9.371	0.307

[0379] \*EAE组与空白组的t检验比较(p<0.05被认为是显著的)。

[0380] 这些数据证明了组胺(和其代谢物N-甲基组胺)和PGD<sub>2</sub>(和其代谢物tetranor-PGDM)是肥大细胞活性相关病症(例如MS)的肥大细胞活性生物标记。通过确定患有或易患肥大细胞活性相关病症的个体的样品(例如尿液或血清)中一种或多种肥大细胞活性因子(例如组胺和PGD<sub>2</sub>)的存在、水平和/或位置,可以确定肥大细胞活性相关病症的发生、发病率、严重性或治疗反应。

[0381] 等同物

[0382] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的发明的实施例的许多等同物。本发明的范围不旨在限于以上描述，而是在于以下权利要求。

[0383] 序列表

[0384] CYP21A2细胞色素P450家族21亚家族A成员2基因[智人(人类)]X58906.1 (SEQ ID NO:1)

[0385]

```

1  tggggctctt  gagctataag  tggcacctca  gggccctgac  gggcgtcttg  ccatgctgct
61  cctgggcctg  ctgctgctgc  tgcccctgct  ggctggcgcc  cgctgctgtg  ggaactggtg
121  gaagctccgg  agcctccacc  tcccgcctct  tgccccgggc  ttcttgcact  tgctgcagcc
181  cgacctccca  atctatctgc  ttggcctgac  tcagaaatc  gggcccatct  acaggctcca
241  ccttgggctg  caaggtgaga  ggctgatctc  gctctggccc  tcaccatagg  agggggcgga
301  ggtgacggag  agggctctct  ctccgctgac  gctgctttgg  ctgtctccca  gatgtggtgg
361  tgctgaactc  caagaggacc  attgaggaag  ccatggtcaa  aaagtgggca  gactttgctg
421  gcagacctga  gccacttacc  tgtaagggct  gggggcattt  tttctttctt  aaaaaattt
481  ttttttaaga  gatgggttct  tgctatgctg  cccaggctgg  tcttaaattc  ctagtctcaa
541  atgatcctcc  cacctcagcc  tcaagtgtga  gccaccttg  gggcatcccc  aatccaggtc
601  cctggaagct  cttggggggg  catatctggt  ggggagaaag  caggggttgg  ggaggccgaa
661  gaaggtcagg  ccctcagctg  cttcatcag  tccccacct  ccagcccca  cctcctctg
721  cagacaagct  ggtgtctagg  aactaccgg  acctgtcctt  gggagactac  tcctgctct
781  ggaaagccca  caagaagctc  acccgctcag  ccctgctgct  gggcatccgt  gactccatgg
841  agccagtgg  ggagcagctg  acccaggagt  tctgtgaggt  aaggctgggc  tctgaggcc
901  acctcgggtc  agcctcgct  ctacagtag  cccccccct  gcccgctgca  cagcggcctg
961  ctgaactcac  actgtttctc  cacagcgc  gagagcccag  cccggcacc  ctgtggccat
1021  tgaggaggaa  ttctctctcc  tcacctgcag  catcatctgt  tacctcacct  tcggagacaa
1081  gatcaaggtg  cctcacagcc  cctcaggccc  acccccagcc  cctccctgag  cctctccttg
1141  tcctgaactg  aaagtactcc  ctcttttct  ggaggagcga  caacttaatg  cctgcctatt
1201  acaaatgtat  ccaggaggtg  ttaaaaacct  ggagccactg  gtccatccaa  attgtggacg
1261  tgattccctt  tctcagggtg  aggacctgga  gcctagacac  ccctgggttg  taggggagag
1321  gctgggggtg  agggagaggc  tccttcccac  agctgcattc  tcatgcttcc  tgccgcagtt
1381  cttccccaat  ccaggtctcc  ggaggctgaa  gcaggccata  gagaagaggg  atcacatcgt
1441  ggagatgcag  ctgaggcagc  acaaggtggg  gactgtacgt  ggacggcctc  cctcggccc
1501  acagccagtg  atgtaccgg  cctcagcatt  gctatgagge  gggttctttt  gcatacccca
1561  gttatgggcc  tgttgccact  ctgtaactct  ctccccagge  cagccgctca  gcccgctcct
1621  ttcaccctct  gcaggagagc  ctogtggcag  gccagtggag  ggacatgatg  gactacatgc
1681  tccaaggggt  ggcgagccg  agcatggaag  agggctctgg  acagctcctg  gaagggcacg
1741  tgcacatggc  tgcagtggac  ctctgatcg  gtggcactga  gaccacagca  aacaccctct
1801  cctgggccgt  ggttttttg  cttcaccacc  ctgaggtgcg  tcctggggac  aagcaaaagg
1861  ctcttccca  gcaacctggc  cagggcggtg  ggcaccctca  ctcagctctg  agcactgtgc
1921  ggctggggct  gtgcttgct  caccggcact  caggctcact  gggttgctga  gggagcggt
1981  ggaggctggg  cagctgtggg  ctgctggggc  aggactccac  ccgatcattc  ccagattca
2041  gcagcgactg  caggaggagc  tagaccacga  actgggccct  ggtgcctcca  gctcccgggt
2101  cccctacaag  gaccatgcac  ggctgccctt  gctcaatgcc  accatcgccg  aggtgctgcy
2161  cctcggccc  gttgtgcct  tagccttgcc  ccaccgcacc  acacggcca  gcaggtgact
2221  cccgagggtt  ggggatgagt  gaggaaagcc  cgagcccagg  gaggtoctgg  ccagcctcta
2281  actccagccc  cctcagcat  ctccggctac  gacatccctg  agggcacagt  catcattccg
2341  aacctccaag  gcgccacct  ggatgagacg  gtctgggaga  ggccacatga  gttctggcct
2401  ggtatgtggg  ggccgggggc  ctgcccgtca  aatgtggtgg  aggtggtcc  ccgctgccgc
2461  tgaacgcctc  cccaccacc  tgtccaccgc  cccgcagatc  gcttctctgga  gccaggcaag
2521  aactccagag  ctctggcctt  cggctgcggt  gcccgctgtg  gcctggggca  gccgctggcg
2581  cgctgggagc  tctctgtggt  gctgaccgca  ctgctgcagg  ccttcaagct  gctgtcctcc
2641  ggggacgccc  tgccctccct  gcagcccctg  cccactgca  gtgtcatcct  caagatgcag
2701  ccttccaag  tgcggctgca  gccccggggg  atggggggcc  acagcccggg  ccagagccag
2761  tgatggggca  g

```

[0386]

[0387] CYP21A2蛋白质序列P08686 (CP21A\_HUMAN) (SEQ ID NO:2)

	10	20	30	40	50
	MLLLGLLLLP	LLAGARLLWN	WWKLRSLHLP	PLAPGFLHLL	QPDLPIYLLG
	60	70	80	90	100
	LTQKFGPIYR	LHLGLQDWV	LNSKRTIEEA	MVKKWADFAG	RPEPLTYKLV
	110	120	130	140	150
	SKNYPDLSLG	DYSLLWKAHK	KLTRSALLLG	IRDSMEPWE	QLTQEFCEM
	160	170	180	190	200
	RAQPGTPVAI	EEEFSLTCS	IICYLTFGDK	IKDDNLMPAY	YKCIQEVLKT
	210	220	230	240	250
[0388]	WSHWSIQIVD	VIPFLRFFPN	PGLRRLKQAI	EKRDHIVEMQ	LRQHKESLVA
	260	270	280	290	300
	GQWRDMMDYM	LQGVAQPSME	EGSGQLLEGH	VHMAAVDLLI	GGTETTANTL
	310	320	330	340	350
	SWAVVFLHLLH	PEIQQLQEE	LDHELPGAS	SSRVPYKRA	RLPLLNTIA
	360	370	380	390	400
	EVLRLRPVVP	LALPHRTTRP	SSISGYDIPE	GTVIIPNLQG	AHLDETVWER
	410	420	430	440	450
	PHEFWPDRFL	EPGKNSRALA	FGCGARVCLG	EPLARLELFV	VLTRLLQFT
	460	470	480	490	
	LLPSGDALPS	LQPLPHCSVI	LKMQPFQVRL	QPRGMGAHSP	GQNQ

## 序列表

- <110> 阿雷特发现公司  
 <120> 用于检测和治疗肥大细胞活性相关病症的生物标记  
 <130> 2012423-0003  
 <150> 62/364,103  
 <151> 2016-07-19  
 <160> 2  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 2771  
 <212> DNA  
 <213> 智人()  
 <400> 1

tggggctctt gagctataag tggcacctca gggccctgac gggcgtcttg ccatgctgct	60
cctgggcctg ctgctgctgc tgcccctgct ggctggcgcc cgctgctgt ggaactggtg	120
gaagctccgg agcctccacc tcccgcctct tgccccgggc ttcttgcaact tgctgcagcc	180
cgacctcca atctatctgc ttggcctgac tcagaaattc gggcccatct acaggctcca	240
ccttgggctg caaggtgaga ggctgatctc gctctggccc tcaccatagg agggggcgga	300
ggtgacggag agggctctct ctccgctgac gctgctttgg ctgtctcca gatgtggtgg	360
tgctgaactc caagaggacc attgaggaag ccatggtcaa aaagtgggca gactttgctg	420
gcagacctga gccacttacc tgtaagggtt gggggcattt tttctttctt aaaaaattt	480
ttttttaaga gatgggttct tgctatgctg cccaggctgg tcttaaattc ctagtctcaa	540
atgatcctcc cacctcagcc tcaagtgtga gccacctttg gggcatcccc aatccaggtc	600
cctggaagct cttggggggg catactggtt ggggagaaag caggggttgg ggaggccgaa	660
gaaggtcagg ccctcagctg cttcatcag ttcccacct ccagcccca cctcctcctg	720
cagacaagct ggtgtctagg aactaccgg acctgtcctt gggagactac tccctgctct	780
ggaaaagcca caagaagctc acccgctcag cctgctgct gggcatccgt gactccatgg	840
agccagtggg ggagcagctg acccaggagt tctgtgaggt aaggctgggc tctgaggcc	900
acctcgggtc agcctcgct ctacagtag cccccgctt gcccgctgca cagcggcctg	960
ctgaactcac actgtttctc cacagcgcag gagagcccag cccggcacc ctgtggccat	1020
tgaggaggaa ttctctctcc tcacctgcag catcatctgt tacctacct tcggagacaa	1080
gatcaaggtg cctcacagcc cctcagccc acccccagcc cctcctgag cctctccttg	1140
tctgaactg aaagtactcc ctcttttct ggcaggacga caacttaatg cctgcctatt	1200
acaaatgtat ccaggaggtg ttaaaaacct ggagccactg gtccatcaa attgtggacg	1260
tgattccctt tctcagggtg aggacctgga gcctagacac ccctgggttg taggggagag	1320
gctgggggtg agggagagc tccttcccac agctgcattc tcatgcttcc tgccgcagtt	1380
cttccccaat ccaggtctcc ggaggctgaa gcaggccata gagaagagg atcacatcgt	1440
ggagatgcag ctgaggcagc acaaggtggg gactgtacgt ggacggcctc ccctcggccc	1500

acagccagtg atgctaccgg cctcagcatt gctatgaggc gggttctttt gcatacccca 1560  
 gttatgggcc tgttgccact ctgtactcct ctccccaggc cagccgctca gcccgtcct 1620  
 ttcaccctct gcaggagagc ctctgtggcag gccagtggag ggacatgatg gactacatgc 1680  
 tccaaggggt ggcgcagccg agcatggaag agggctctgg acagctcctg gaagggcacg 1740  
 tgcacatggc tgcagtggac ctctgatcg gtggcactga gaccacagca aacaccctct 1800  
 cctgggccgt ggtttttttg cttcaccacc ctgaggtgcg tcctggggac aagcaaaagg 1860  
 ctccctccca gcaacctggc cagggcgggt ggcaccctca ctcagctctg agcactgtgc 1920  
 ggctggggct gtgcttgccct caccggcact caggctcact gggttgctga gggagcggct 1980  
 ggaggctggg cagctgtggg ctgctggggc aggactccac ccgatcattc cccagattca 2040  
 gcagcgaactg caggaggagc tagaccacga actgggacct ggtgcctcca gctcccgggt 2100  
 cccctacaag gaccatgcac ggetgcctt gctcaatgcc accatgcccg aggtgctgcg 2160  
 cctgcggccc gttgtgcctt tagcettgcc ccaccgacc acacggcca gcaggtgact 2220  
 cccgagggtt ggggatgagt gaggaaagcc cgagcccagg gaggtcctgg ccagcctcta 2280  
 actccagccc ccttcagcat ctccggtac gacatcctg agggcacagt catcattccg 2340  
 aacctcaag gcgcccacct ggatgagacg gtctgggaga ggccacatga gttctggcct 2400  
 ggtatgtggg ggccgggggc ctgccgtcaa aatgtggtgg aggctggtcc ccgctgccgc 2460  
 tgaacgcctc cccaccacc tgtccaccg cccgcagatc gttcctgga gccaggcaag 2520  
 aactccagag ctctggcctt cggctgcggt gcccgcgtgt gcctgggca gccgctggcg 2580  
 cgcttgagc tctctgtggt gctgaccga ctgctgcagg ccttcacgct gctgtcctcc 2640  
 ggggacgcc tgcctcctt gcagcccctg cccactgca gtgtcatcct caagatgcag 2700  
 cctttccaag tgcggctgca gccccggggg atgggggcc acagcccggg ccagagccag 2760  
 tgatggggca g 2771

<210> 2

<211> 494

<212> PRT

<213> 智人()

<400> 2

Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Trp Asn Trp Trp Lys Leu Arg Ser Leu His Leu Pro Pro Leu  
 20 25 30  
 Ala Pro Gly Phe Leu His Leu Leu Gln Pro Asp Leu Pro Ile Tyr Leu  
 35 40 45  
 Leu Gly Leu Thr Gln Lys Phe Gly Pro Ile Tyr Arg Leu His Leu Gly  
 50 55 60  
 Leu Gln Asp Val Val Val Leu Asn Ser Lys Arg Thr Ile Glu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Met Val Lys Lys Trp Ala Asp Phe Ala Gly Arg Pro Glu Pro Leu Thr  
 85 90 95

Tyr Lys Leu Val Ser Lys Asn Tyr Pro Asp Leu Ser Leu Gly Asp Tyr  
 100 105 110  
 Ser Leu Leu Trp Lys Ala His Lys Lys Leu Thr Arg Ser Ala Leu Leu  
 115 120 125  
 Leu Gly Ile Arg Asp Ser Met Glu Pro Val Val Glu Gln Leu Thr Gln  
 130 135 140  
 Glu Phe Cys Glu Arg Met Arg Ala Gln Pro Gly Thr Pro Val Ala Ile  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Glu Phe Ser Leu Leu Thr Cys Ser Ile Ile Cys Tyr Leu Thr  
 165 170 175  
 Phe Gly Asp Lys Ile Lys Asp Asp Asn Leu Met Pro Ala Tyr Tyr Lys  
 180 185 190  
 Cys Ile Gln Glu Val Leu Lys Thr Trp Ser His Trp Ser Ile Gln Ile  
 195 200 205  
 Val Asp Val Ile Pro Phe Leu Arg Phe Phe Pro Asn Pro Gly Leu Arg  
 210 215 220  
 Arg Leu Lys Gln Ala Ile Glu Lys Arg Asp His Ile Val Glu Met Gln  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Gln His Lys Glu Ser Leu Val Ala Gly Gln Trp Arg Asp Met  
 245 250 255  
 Met Asp Tyr Met Leu Gln Gly Val Ala Gln Pro Ser Met Glu Glu Gly  
 260 265 270  
 Ser Gly Gln Leu Leu Glu Gly His Val His Met Ala Ala Val Asp Leu  
 275 280 285  
 Leu Ile Gly Gly Thr Glu Thr Thr Ala Asn Thr Leu Ser Trp Ala Val  
 290 295 300  
 Val Phe Leu Leu His His Pro Glu Ile Gln Gln Arg Leu Gln Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp His Glu Leu Gly Pro Gly Ala Ser Ser Ser Arg Val Pro Tyr  
 325 330 335  
 Lys Asp Arg Ala Arg Leu Pro Leu Leu Asn Ala Thr Ile Ala Glu Val  
 340 345 350  
 Leu Arg Leu Arg Pro Val Val Pro Leu Ala Leu Pro His Arg Thr Thr  
 355 360 365  
 Arg Pro Ser Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Ile Pro Glu Gly Thr Val Ile  
 370 375 380  
 Ile Pro Asn Leu Gln Gly Ala His Leu Asp Glu Thr Val Trp Glu Arg  
 385 390 395 400  
 Pro His Glu Phe Trp Pro Asp Arg Phe Leu Glu Pro Gly Lys Asn Ser

	405		410		415										
Arg	Ala	Leu	Ala	Phe	Gly	Cys	Gly	Ala	Arg	Val	Cys	Leu	Gly	Glu	Pro
	420		425		430										
Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Leu	Phe	Val	Val	Leu	Thr	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala
	435		440		445										
Phe	Thr	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu
	450		455		460										
Pro	His	Cys	Ser	Val	Ile	Leu	Lys	Met	Gln	Pro	Phe	Gln	Val	Arg	Leu
465			470		475									480	
Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Ala	His	Ser	Pro	Gly	Gln	Asn	Gln		
	485		490												

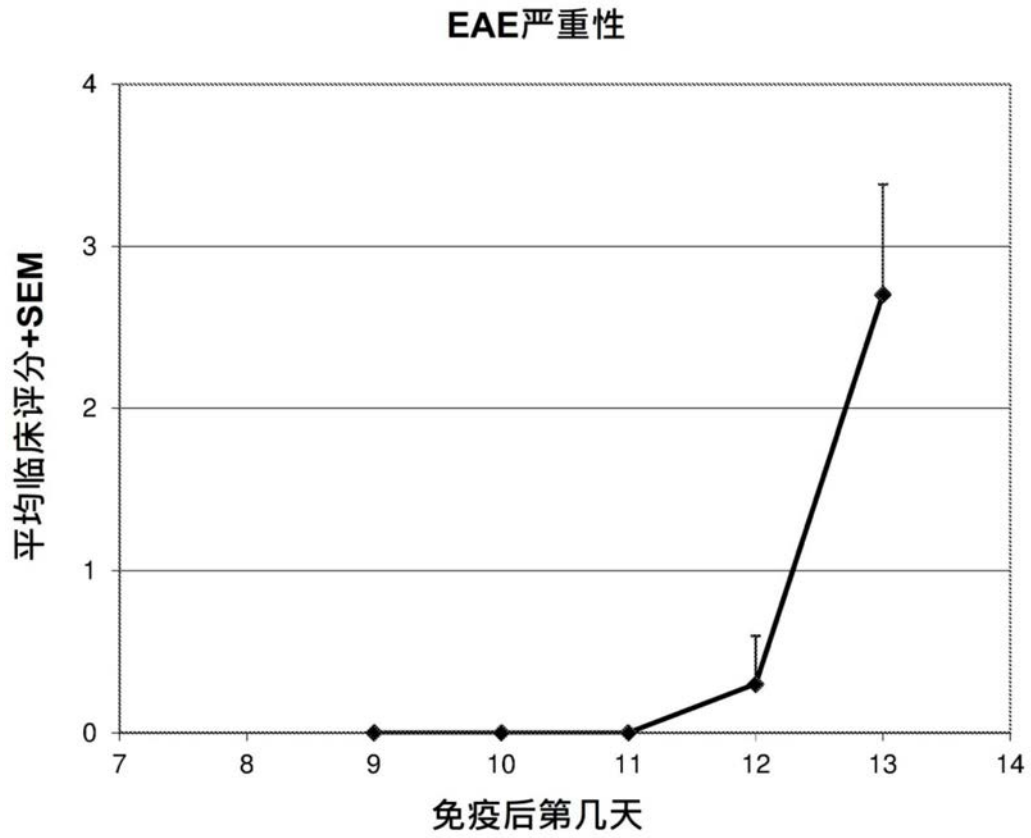


图1

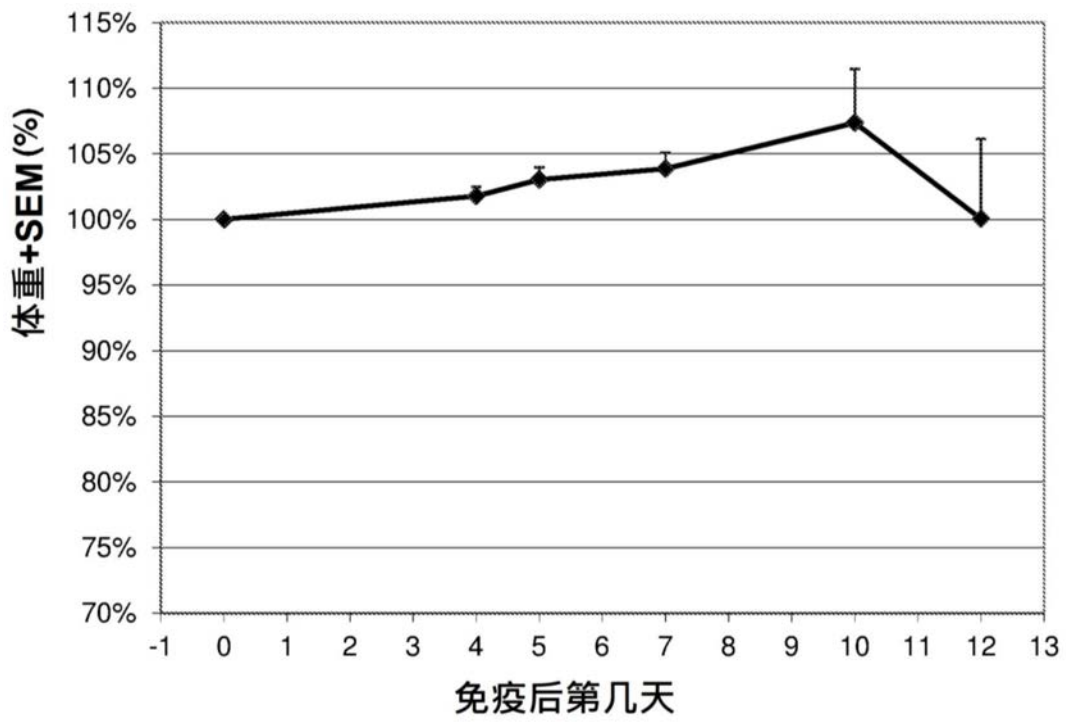


图2

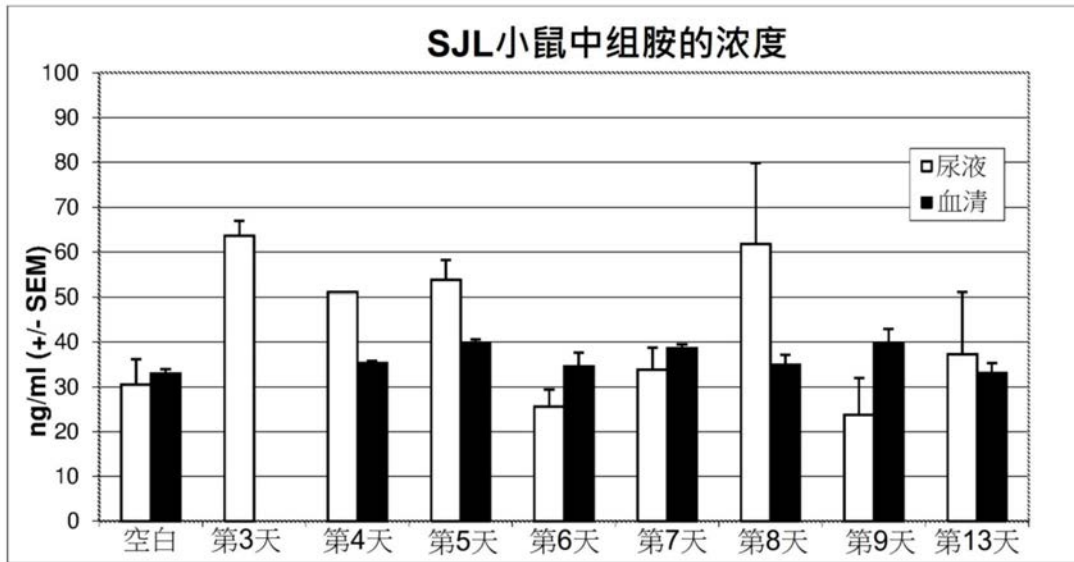


图3A

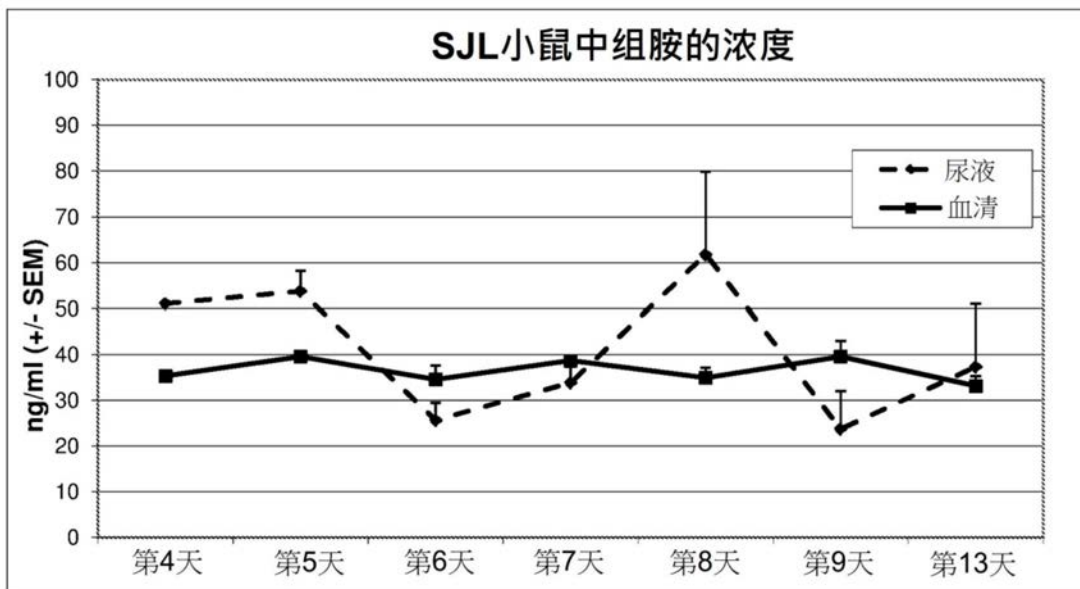


图3B

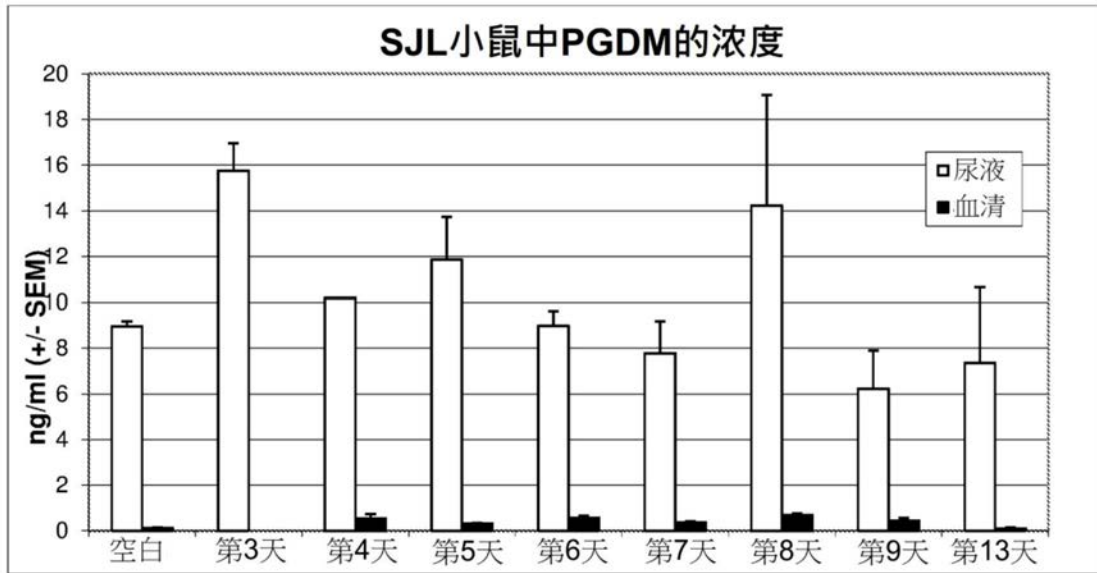


图4A

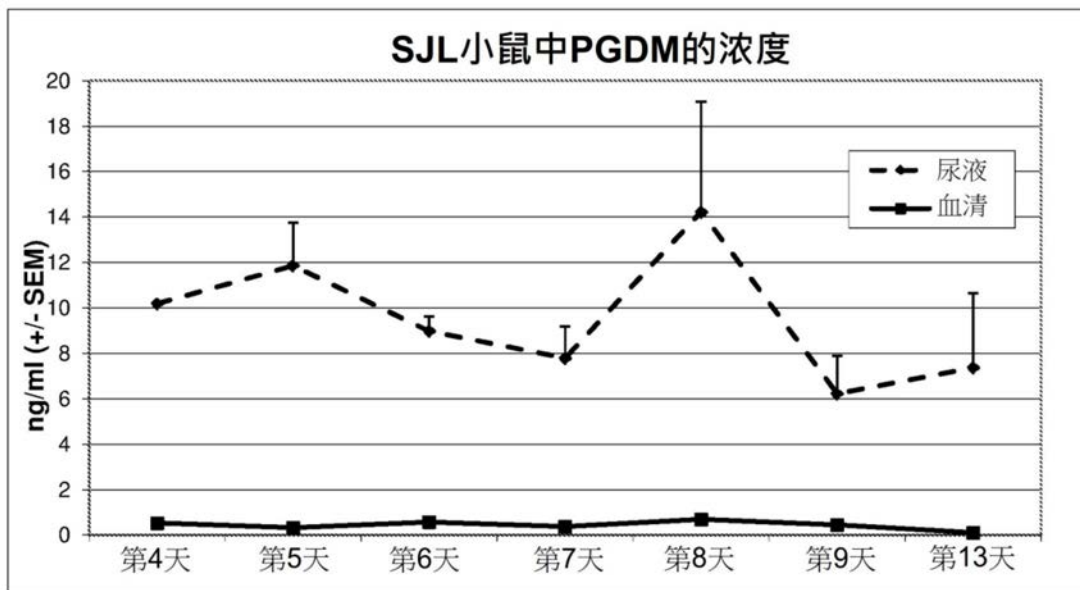


图4B

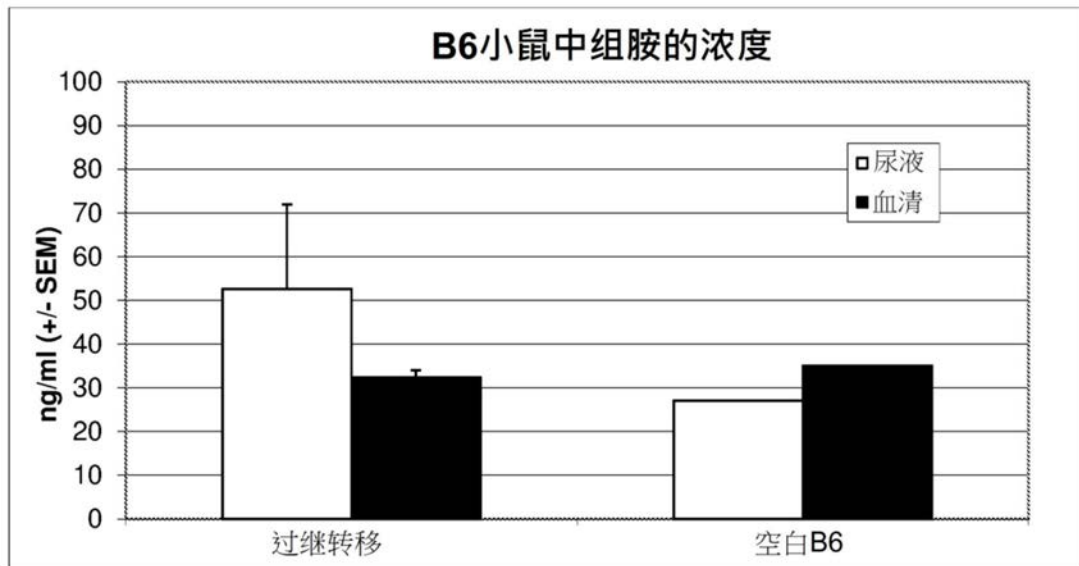


图5

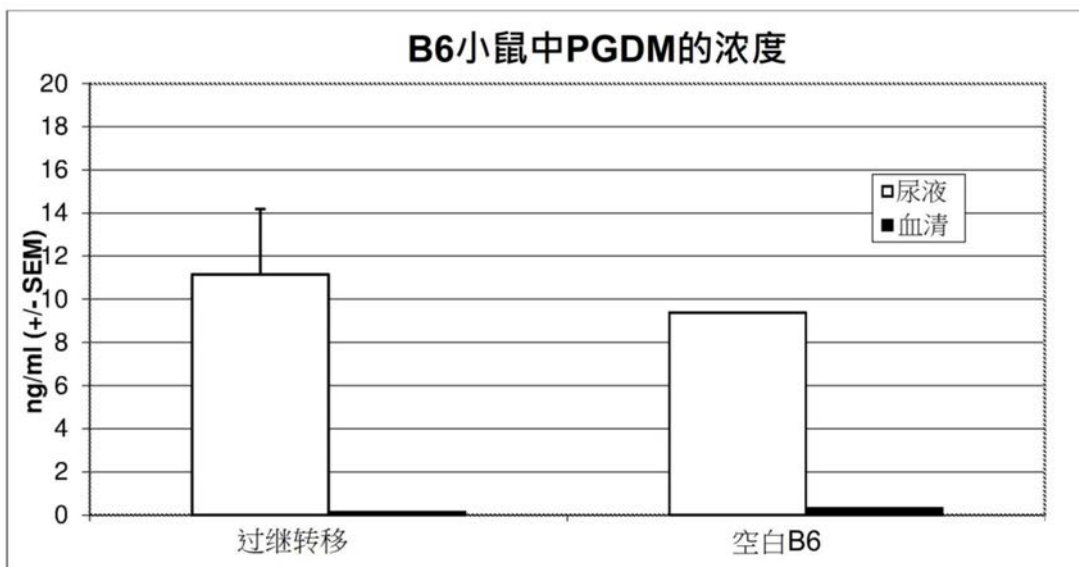


图6

专利名称(译)	用于检测和治疗肥大细胞活性相关病症的生物标记		
公开(公告)号	<a href="#">CN109963865A</a>	公开(公告)日	2019-07-02
申请号	CN201780057501.5	申请日	2017-07-18
发明人	杰克·B·考伊三世		
IPC分类号	C07K14/47 A61K39/00 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	A61K31/10 A61K31/7008 A61K31/737 A61K45/06 A61P25/28 G01N33/564 G01N2800/285 G01N2800/52 G01N2800/54 A61K2300/00 G01N2800/60		
代理人(译)	安玉		
优先权	62/364103 2016-07-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于有效和准确表征肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情的生物标记。特别地，本发明提供了在肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情中表达的生物标记。那些生物标记在单独或组合使用的情况下可允许更准确、更确定地表征肥大细胞活性相关疾病、病症和/或病情，从而更准确地确定其诊断和治疗，特别是预测MS复发的发生。

组胺
N-甲基组胺
嗜铬粒蛋白A
细胞因子
白细胞介素-1 (IL-1)
白细胞介素-2 (IL-2)
白细胞介素-3 (IL-3)
白细胞介素-4 (IL-4)