



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104204230 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380019432. 0

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 02. 11

(30) 优先权数据

12154917. 4 2012. 02. 10 EP

61/597924 2012. 02. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/052629 2013. 02. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/117751 EN 2013. 08. 15

(71) 申请人 诺和诺德 A/S (股份有限公司)

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 K. S. 弗雷德里克森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 初明明 林森

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书34页

序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

治疗炎性疾病和病症的相关方法

(57) 摘要

本发明涉及基因标记,所述标记与在患有炎性疾病或病症的患者中预测针对抗炎治疗的临床反应的方法相关。

1. 预测患者对抗炎药的反应的方法,包括:在来自所述患者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达改变,预测所述患者对所述抗炎药的反应。

2. 预测患者对抗炎药的反应的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平,和
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述参考水平相比一个或多个所述基因的表达改变,预测所述患者对所述抗炎药的反应。

3. 鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者的方法,包括:在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者。

4. 鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者。

5. 前述权利要求中任一项的方法,

- a. 其中与参考水平相比,图 1A 的基因的改变的表达是增加的,和 / 或
- b. 其中与参考水平相比,图 1B 的基因的改变的表达是降低的。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其中使用 PCR,例如多重 PCR 或 qRT-PCR,或微阵列芯片,基于 mRNA,在血液样品中检测所述表达水平。

7. 前述权利要求中任一项的方法,其中补体因子 D (CFD) 的表达水平高于参考水平。

8. 前述权利要求中任一项的方法,

a. 其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 Assay ID: Hs00157263_ml (Applied Biosystems) 检测转录物具有循环阈值 (Ct) 30,或

b. 其中使用微阵列芯片测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中所述表达水平在 RMA 或 GC-RMA 标准化表达值的 log₂ 标度上超过 9.5,或

c. 其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用针对 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_ml (Applied Biosystems/ Invitrogen),检测转录物的绝对数是至少 0.04 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白 mRNA 拷贝,或

d. 其中根据一个或多个 CFD 表达相关的 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平。

9. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,权利要求 1-8 中任一项的至少一种测试已经显示了在来自所述患者的生物样品中,与参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测所述患者对所述抗炎药的反应。

10. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述受试者或患者患有自身免疫疾病或病症,例如类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD)、银屑病

病性关节炎 (PSA) 或银屑病。

11. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-19、IL-20 和 IL-24 中的一种或多种的拮抗剂。

12. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗炎药是抗人 IL-20 抗体。

13. 治疗自身免疫疾病或病症的抗炎药,其中与图 1 的一个或多个基因的参考水平相比,患者具有图 1 的一个或多个基因的表达改变。

14. 制品,包括包装在一起的药物组合物和标签,所述药物组合物包含抗炎药和药学上可接受的载体,所述标签说明所述药物组合物可用于治疗患有自身免疫疾病或病症并具有图 1 的一个或多个基因的表达改变的患者。

15. 试剂盒,包括:

a. 包含至少一种检测试剂的一种或多种组合物,所述检测试剂用于测定表 1A 和 / 或表 1B 的一个或多个基因的表达水平,和

b. 所述试剂盒的使用说明书,包括如何将表达水平与受试者的反应可能性关联。

16. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述检测试剂用于测定补体因子 D (CFD) 的表达。

治疗炎性疾病和病症的相关方法

技术背景

[0001] 本发明涉及炎性疾病和病症的诊断、预后和治疗优化领域中的方法，目的在于通过提供预测对治疗药的反应性的方法而改进对患者的治疗选项和治疗方案。

[0002] 背景

对于大量患者来说，炎性疾病和病症和尤其是自身免疫疾病严重影响患者健康并且治疗选项是令人不满意的。

[0003] 类风湿性关节炎 (RA) 是临床上重要的，慢性系统性自身免疫 RA 是未知病因的自身免疫病。大多数 RA 患者具有慢性疾病过程，甚至用当前可用的治疗，仍可导致渐进的关节破坏、变形、失能和甚至过早死亡。RA 的诊断通常依赖于对患者体征和症状的临床和实验室评价。通常，对疑似患有 RA 的患者的实验室评价可包括测定血清中的被认为是类风湿因子 (RF) 的某些抗体和环状瓜氨酸化肽抗体 (抗 CCP) 的水平。尽管这些抗体在 RA 患者血清中通常存在，但并非所有 RA 患者都有。还可使用被称为红细胞沉降速率 (ESR) 的额外血液检验。升高的 ESR 表明炎性过程普遍存在，尽管不一定是 RA。进一步血液检验可用于评价其它因子的水平，所述因子例如已知与 RA 相关的 C- 反应蛋白 (CRP)。另外，对受累关节可进行放射照相分析。总之，这样的当前可用的诊断 RA 的实验室检验是不精确和不完善的。

[0004] 美国风湿病学会 (The American College of Rheumatology, ACR) 标准常用于诊断和判定严重程度 (<http://www.rheumatology.org>)。

[0005] 已经进行了尝试以便根据生物标记而改善诊断和预后 (参见例如 Rioja 等人, *Arthritis and Rheum.* 58(8):2257-2267 (2008); Pyrpassopoulou 等人, *Mol. Diagn. Ther.* 14(1):43-48 (2010); WO 2004/0009479; WO 2007/0105133; WO 2007/038501; WO 2007/135568; WO 2008/104608; WO 2008/056198; WO 2008/132176; 和 WO 2008/154423)。目前，已经给出了将 RA 患者分为亚组和鉴定患者组的方法，其基于特定分子谱表明对抗 CD20 治疗的更高反应性 (WO2011028945)。然而，并没有鉴定出能够让临床医生或其他人准确定义类风湿性关节炎的病理生理方面、临床活性、对治疗的反应、预后或发展所述疾病的风险的经临床确证的诊断或预后标记。

[0006] 因此，随着 RA 患者寻求治疗，有重要的试验和误差涉及对特定患者有效的治疗药的探索。为了找到最有效的治疗，这样的试验和误差通常包括相当大的风险并使患者不适。因此，需要更有效手段用于确定哪些患者将对哪些治疗有反应和用于将这样的判定加入到对 RA 患者的更有效的治疗方案中。

[0007] 因此高度有利的是具有额外的方法，用于在患者中客观地鉴定疾病的存在，限定类风湿性关节炎的病理生理方面、临床活性、对治疗的反应、包括对用不同 RA 治疗药的治疗的反应、预后和 / 或发展类风湿性关节炎的风险。

[0008] 因此，一直都需要鉴定与类风湿性关节炎以及其它自身免疫病相关的新的分子诊断或预后标记。

[0009] 概述

如本文所述,本发明人提供用于改善炎性疾病或病症、自身免疫疾病和尤其是 RA 的治疗的多种方法。

[0010] 本发明一方面涉及预测患者对抗炎药的反应的方法,包括:在来自所述患者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测所述患者对所述抗炎药的反应。

[0011] 本发明另一方面涉及预测患者对抗炎药的反应的方法,包括:

- a) 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平,和
- b) 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测所述患者对所述抗炎药的反应。

[0012] 本发明进一步描述了鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者的方法,包括:在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者。

[0013] 一方面本发明涉及鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者。

[0014] 本发明的方法可涉及这样的情况:其中表达改变是与参考水平相比图 1A 的基因的表达增加;和/或其中表达改变是与参考水平相比图 1B 的基因的表达减少。

[0015] 所述方法进一步描述了可以使用 qRT-PCR 或使用微阵列芯片,基于 mRNA,在血液样品中检测所述表达水平。在本发明的具体的实施方案中,测定了补体因子 D (CFD) 的表达水平并发现所述水平高于参考水平,所述参考水平可根据用于检测所述转录物的方法而有不同定义。

[0016] 本发明一方面涉及用于治疗自身免疫疾病或病症的抗炎药,其中与图 1 的一个或多个基因的参考水平相比,患者具有图 1 的一个或多个基因的表达改变。

[0017] 本发明的进一步的方面涉及治疗患有炎性疾病或其中与参考水平相比图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变的受试者的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述受试者。

[0018] 所述方法可包括进一步的步骤,包括:考虑与参考水平相比,在所述患者中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0019] 本发明一方面涉及在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中测定图 1 的一个或多个基因的表达水平
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,
- c. 测定与所述参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变
- d. 将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0020] 在某些情况下,可使用基因表达的信息以确定患者是否实际上给予抗炎药和上述方法可以因此包括对表达数据的评价,例如结论是,与所述参考水平相比,所述生物样品中

图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。考虑到适当考虑与参考水平相比,表 1A 的一个或多个基因的表达水平是否增加和 / 或与参考水平相比,表 1B 的一个或多个基因的表达水平是否降低。

[0021] 在另一方面,本发明涉及制品,包括包装在一起的药物组合物和标签,所述药物组合物包含抗炎药和药学上可接受的载体,所述标签说明所述药物组合物可用于治疗患有自身免疫疾病或病症并具有图 1 的一个或多个基因的表达改变的患者。

[0022] 本发明一方面涉及试剂盒,包括:

a) 包括至少一种检测试剂的一种或多种组合物,所述检测试剂用于测定表 1A 和 / 或表 1B 的一个或多个基因的表达水平,和

b) 所述试剂盒的使用说明书,包括如何将表达水平与受试者的反应可能性关联。

[0023] 基于现有数据,可向患者建议改善的治疗并可使试验的影响和误差最小化。技术人员显而易见的是,除了本文的具体实施例之外,还可以对本发明进行某些改动。

[0024] 序列列表

本申请包括序列列表,包括以下序列:

SEQ ID NO 1: CFD mRNA 探针: CCTGCTGCTACAGCTGTCGGAGAAG

SEQ ID NO 2: 18S rRNA 对照探针: TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG

SEQ ID NO 3: rs1683565:

AGAGCCCAAAGCTCATGGAAAAGAGXATATAAAGGAGTCCCTGCAGTAGA

其中位置 26 的 X 是 A 或 G

SEQ ID NO 4: rs1683591:

TCTGTCCACAGGCGGGGTGGAGGGXATGGCCGGCCTCACACCATCTGCCA

其中位置 26 的 X 是 A 或 G

SEQ ID NO 5: rs1683590:

AATATCTGAAATTTTCCAGTTTACXAGCCTCTGACGTAACCGTCCTCTCT

其中位置 26 的 X 是 A 或 G

SEQ ID NO 6: ACTB 探针:

CCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCA

附图简述

图 1 显示在抗 IL20 RA 试验中,与 28 个关节的疾病活性评分 - C-反应蛋白 (DAS28-CRP) 变化 (在第 8 周) 正相关的转录物列表 (表 1a) 和负相关的转录物列表 (表 1b)。在给药的患者 (不包括安慰剂对照) 中显示明显相关性 (假发现率 (FDR)=5%) 的转录物包括在列表中 (等级次序为每表的顶端具有最显著的相关性)。表 1A 中列出的基因已被鉴定为对在本发明的方法中使用是相关的,其中相对高的表达水平具有影响。

[0025] 表 1B 中列出的基因已被鉴定为对在本发明的方法中使用是相关的,其中相对低的表达水平具有影响。

[0026] 图 2 显示表 2 包括从表 1A 和 1B 中选择基因,所述基因被认为对在本发明的方法和尤其应用多变量分析的方法中使用是相关的。对于基于多变量的 DAS28-CRP 预测而言,所选的转录物 / 基因是相关的。

[0027] 图 3 显示在抗 IL20 试验中,在来自 RA- 患者的 PaxGene 全血样品中的 CFD (补体

因子 D) 转录物的转录水平的分布。强健的多芯片平均 (Robust Multichip Average, RMA) 标准化值示于 Y 轴上 (log₂ 标度 (scale))。来自单个患者的样品以交替颜色 (黑色或白色) 呈现和单个患者被任意编号为 1-82。

[0028] 图 4 显示在 2a 期抗 IL20 试验中的 CFD mRNA 的接受者操作特征 (ROC) 曲线和美国风湿病学会 50% 综合标准 (ACR50) 反应。ROC 曲线上的 X 表明阈值 10.32 (RMA 标准化的表达值)。

[0029] 图 5 显示在 2a 期抗 IL20 试验中的 CFD mRNA 的 ROC 曲线和美国风湿病学会 70 % 综合标准 (ACR70) 反应。

[0030] 图 6 显示在给药前 (第 1 天) 样品中, CFD mRNA 的定量 RT-PCR (qRT-PCR) 检测与来自在更多时间点的基于微阵列检测的数据的关联。将线性标度上的微阵列信号 (反转化的 RMA 数据 (Y 轴)) 与来自 qRT-PCR 分析的 18S 标准化的 CFD 水平比较。

[0031] 图 7 显示在具有基于 CFD 的层化的两个备选阈值 (alternative threshold) 的抗 IL20 的 2a 期试验 (临床试验政府识别号 NCT01282255) 中的 ACR20、ACR50 和 ACR70 反应率。如果使用基于来自图 4 的 ROC 曲线的 CFD mRNA 水平的患者层化 (例如使用的阈值 >10.32 (RMA 标准化的表达值)), 得到高反应的患者群体 (图表 A 的底部)。如果仅包括 CFD 水平低于阈值的个体, 则图表 A 的上部展示反应。当使用 CFD 的备选阈值 (基于 CFD 和 β 肌动蛋白 (ACTB) 的绝对定量测定) 时, 得到有反应患者的类似富集 (图表 B 的下面部分)。

[0032] 图 8 显示在 RA 患者滑液中的 Bb 水平, 显示在 PaxGene 样品中高或低的 CFD 表达水平, 如通过 qPCR 所评价。

[0033] 描述

本发明涉及预测抗炎化合物的治疗效果的方法。正如背景部分所述, 当前可用的治疗至少在某种程度上具有低成功率, 并且治疗通常包括某种程度的试验和误差。本发明提供鉴定患者亚组的方法, 其具有高的治疗成功率, 从而使大量患者可以避免与寻找有效治疗的困难相关的不适的风险。

[0034] 定义

为了解释本申请的目的, 在本文中较少的另外说明以使用以下定义。

[0035] 如本文可互换使用的, 术语“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸聚合物, 并且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物、或可以由 DNA 或 RNA 聚合酶掺入聚合物内的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸, 例如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在的话, 那么对核苷酸结构的修饰可以在聚合物装配之前或之后赋予。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以, 例如通过与标记组分缀合或本领域已知的其它类型修饰, 在聚合后进一步修饰。

[0036] 如本文使用的, “寡核苷酸”指短的单链多核苷酸, 其长度为至少约 7 个核苷酸和小于约 250 个核苷酸。寡核苷酸可以是合成的。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”不是相互排斥的。关于多核苷酸的上文描述同等地和完全地适用于寡核苷酸。

[0037] 术语“引物”指能够与核酸杂交并且一般通过提供游离 3'-OH 基团而允许互补核酸聚合的单链多核苷酸。

[0038] 术语“阵列”或“微阵列”指可在基质上有序排列的可杂交阵列元件, 优选多核苷酸探针 (例如寡核苷酸)。基质可以是固体基质例如玻璃载玻片或半固体基质例如硝酸纤

纤维素膜。

[0039] 术语“扩增”指产生参考核酸序列或其互补体的一个或多个拷贝的过程。扩增可以是线性或指数的（例如 PCR）。“拷贝”不一定意味相对于模板序列的完全序列互补性或同一性。例如，拷贝可以包括核苷酸类似物例如脱氧肌苷、故意的序列改变（例如通过引物引入的序列改变，所述引物包括与模板可杂交但并非完全互补的序列）、和 / 或在扩增过程中出现的序列错误。

[0040] 术语“多重 PCR”指使用超过一个引物组在得自单个样品（例如一个患者）的核酸上进行的单个 PCR 反应，用于在单个反应中扩增 2 个或更多个 DNA 序列的目的。

[0041] 杂交反应的“严格性”可容易地由本领域普通技术人员确定，并且一般是取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度的经验计算。一般而言，更长的探针需要更高的温度用于恰当的退火，而更短的探针需要更低的温度。当互补链存在于低于其解链温度的环境中时，杂交一般取决于变性 DNA 再退火的能力。在探针和可杂交序列之间的所需同源性程度越高，可以使用的相对温度越高。由此，较高的相对温度将趋于使得反应条件更严格，而较低的温度趋于使得反应条件较不严格。关于杂交反应的严格性的另外细节和说明，参见 Ausubel 等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

[0042] 如本文定义的，“严格条件”或“高严格条件”可以通过下述进行定义：(1) 采用低离子强度和高温用于洗涤，例如 0.015 M 氯化钠 / 0.0015 M 柠檬酸钠 / 0.1% 十二烷基硫酸钠，在 50°C；(2) 在杂交过程中采用变性剂，例如甲酰胺，例如，50% (v/v) 甲酰胺与 0.1% 牛血清白蛋白 / 0.1% Ficoll / 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 / 50mM 磷酸钠缓冲液，在 pH6.5 与 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠，在 42°C；或 (3) 在 42°C 在采用 50% 甲酰胺、5 x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5 x Denhardt 溶液、超声处理的鲑精 DNA (50 微克 / ml)、0.1% SDS 和 10% 硫酸葡聚糖的溶液中过夜杂交，在 42°C 在 0.2 x SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 中 10 分钟洗涤，随后在 55°C 由含有 EDTA 的 0.1 x SSC 组成的 10 分钟高严格洗涤。

[0043] “中等严格条件”可以如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, New York : Cold Spring Harbor Press, 1989 所述进行定义，包括使用比上述较不严格的洗涤溶液和杂交条件（例如温度、离子强度和 % SDS）。中等严格条件的实例是在 37°C 在包含下述的溶液中过夜温育：20% 甲酰胺、5 x SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5 x Denhardt 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20mg/ml 变性剪切鲑精 DNA，随后在约 37-50°C 在 1 x SSC 中洗涤滤膜。技术人员知道如何根据需要进行调节温度、离子强度等，以适应例如探针长度等因素。

[0044] 术语“检测”包括任何检测手段，包括直接和间接检测。

[0045] 术语“表达的水平”或“表达水平”一般而言可互换使用，并且指生物样品中多核苷酸或氨基酸产物或蛋白质的量。“表达”一般指基因编码的信息被转换成细胞中存在和运作的结构的过程。因此，如本文使用的，基因的“表达”可以指转录成多核苷酸、翻译成蛋白质、或甚至蛋白质的翻译后修饰。转录的多核苷酸、翻译的蛋白质或翻译后修饰的蛋白质的片段也应视为表达的，无论它们是源于通过可变剪接生成的转录物或降解的转录物，还是源于蛋白质的翻译后加工例如蛋白质水解。“表达的基因”包括转录为作为 mRNA 的多核苷酸并且随后翻译成蛋白质的那些，以及转录成 RNA 但不翻译成蛋白质的那些（例如转移 RNA

和核糖体 RNA)。

[0046] 术语“表达谱”可用于定义一组基因的表达水平,提供样品中的转录活性的更复杂的图像。

[0047] 如本文使用的,术语“生物标记”指患者状态的指示物,因为这样的生物标记可用于评价患者的疾病状态(包括在个体中诊断和评价治疗的反应)。生物标记是分子实体,可在来自患者的生物样品中对其进行检测。生物标记包括但不限于 DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物和其它生物化学实体或部分,包括其组合,例如基于糖脂或糖蛋白的分子标记。“诊断标记”和“预后标记”是“生物标记”详细说明,其表明分子实体的存在或不存在或水平可提供对诊断和 / 或预后的信息,包括例如对一种或多种治疗类型的反应。某些生物标记可能适于诊断,某些适于后续疾病发展和治疗反应,而其它适于预测对治疗的临床反应。

[0048] 与患者的临床益处增加相关的“预后标记”的“量”或“水平”在来自所述患者的生物样品中是可检测水平。可通过本领域技术人员已知的并且也在本文中公开的方法检测表达水平。所评价的生物标记的表达水平或量可用于判定或预测治疗的反应。

[0049] 术语“表达改变”是指通常在 mRNA 或蛋白水平上检测的增加的或减少的基因表达水平。认为表达水平相对于参考水平而改变,例如表达水平“高于”或“低于”相关的预定水平。基因表达水平改变可以代表其表达“高于”或“低于”其它基因和 / 或其它个体的表达水平的基因。

[0050] 术语“增加的表达”或“增加的水平”是指通常在 mRNA 或蛋白水平上检测的升高的或增加的基因表达水平。认为表达水平相对于参考水平而增加,例如表达水平“高于”相关的预定水平。增加的基因表达水平可以代表与其它基因和 / 或其它个体的表达水平相比,在个体中以“高”水平表达的基因。

[0051] 术语“减少的表达”或“减少的水平”是指通常在 mRNA 或蛋白水平上检测的降低的或减少的基因表达水平。认为表达水平相对于参考水平而减少,例如表达水平“低于”相关的预定水平。减少的基因表达水平可以代表与其它基因和 / 或其它个体的表达水平相比,在个体中以“低”水平表达的基因。

[0052] 术语“类风湿因子”或“RF”指,在患者血清中检测到的并且针对人和动物 IgG 上存在的抗原决定簇的单独或任何组合的 IgM、IgG 或 IgA 同种型抗体。

[0053] 术语“RF 阳性”指用于 RF 的测定例如 ELISA 测定的结果,其中所述结果超过用于被认为可重现地含有可检测水平的 RF 的样品的测定的阈值或截止值。

[0054] 术语“RF 阴性”指用于 RF 的测定例如 ELISA 测定的结果,其中所述结果等于或低于用于被认为可重现地含有不可检测水平的 RF 的样品的测定的阈值或截止值。

[0055] 如本文所用,术语“样品”或“生物样品”指得自或源自目标受试者的组合物,其包含待检测、测定或鉴定的一种或多种分子实体。例如,短语“患者样品”、“受试者样品”及其变体指得自目标患者或受试者的任何样品,其被预期含有或已知含有待表征的细胞和 / 或分子实体,包括但不限于组织样品、细胞样品或血液样品。

[0056] 术语“组织样品”或“细胞样品”或“血液样品”意指包含得自受试者的一种或多种细胞的样品。组织或细胞样品的来源可以是实体组织如来自新鲜、冷冻和 / 或保存的器官或组织样品或活检组织或抽吸物;体液例如脑脊髓液、羊膜液、腹膜液、间质液或血液或任何血液组分。组织样品或细胞样品还可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地,组织或

细胞样品得自疾病组织 / 器官 (例如表现出病理特征)。组织样品可以含有在自然界中不与组织天然地混合的化合物,例如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养素、抗生素等。

[0057] 术语“血清样品”是指得自个体的任何血清样品。从哺乳动物中获得血清的方法是本领域众所周知的。

[0058] 如本文使用的,“对样品”、“对照细胞”或“对照组织”,是指得自己知或被认为未患有待用本发明的方法或组合物鉴定的疾病或病症的来源的生物样品、细胞或组织。在一个实施方案中,对样品、对照细胞或对照组织得自待使用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病症的同一受试者或患者的身体的表面上未受影响的部分。在一个实施方案中,对样品、对照细胞或对照组织得自如下个体的身体的部分,所述个体并非待使用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病症的受试者或患者。

[0059] 术语“诊断”在本文中用于指分子或病理学状态、疾病或病症的鉴定或分类。例如,“诊断”可以指特定类型的炎性疾病或病症或特异性自身免疫疾病例如 RA 的鉴定。

[0060] 术语“预测”或其变体用于指患者对药物或药物组将具有有利或不利反应的可能性。在一个实施方案中,预测涉及所述反应的程度。在一个实施方案中,预测涉及这样的可能性:患者将改善后续治疗,例如用特定治疗药的治疗,和在一定的时间段中无疾病复发。本发明的预测法可以在临床上使用,通过选择对于任何特定患者合适的治疗模式而作出治疗决策。对于判定患者是否可能有利地响应治疗方案例如给定治疗方案,包括例如给予给定的药物或治疗药或其组合,本发明的预测方法是有价值的工具。

[0061] 术语“指示 (indication)”、“指示的 (indicative)”或其变体用于指所得的指导;因为基于如本文所述的基因表达水平改变的“指示”提供以下信息:受试者或患者对抗炎治疗可能有反应。基于这样的指导,本发明的方法可以在临床上使用,通过选择对于任何特定患者合适的治疗模式而作出治疗决策。

[0062] 如本文使用的,“治疗”指试图改变接受治疗的个体的天然过程的临床干预,可以在临床病理学过程之前或期间执行。期望的治疗效果包括阻止疾病或其病况或症状的出现或复发,减轻疾病的病况或症状,减少疾病的任何直接或间接的病理学后果,降低疾病进展速率,改善或缓和疾病状态,和 / 或实现缓解或改善的预后。在某些实施方案中,本发明的方法和组合物在延迟疾病或病症发展的尝试中是有用的。

[0063] “有效量”指以所需剂量和在所需的时间段内有效达到期望的治疗或预防结果的量。治疗药的“治疗有效量”可以根据以下因素而改变:例如疾病状态,个体的年龄、性别和重量,和抗体在个体中引发所需应答的能力。治疗有效量还是其中治疗药的治疗有利效应胜过其任何毒性或有害效应的量。“预防有效量”指以所需剂量和在所需的时间段内有效达到期望的预防结果的量。典型地但不是必须的,因为预防剂量在疾病的早期阶段前或在疾病的早期阶段时在受试者中使用,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0064] 如本文所用的术语“个体”、“受试者”或“患者”,可以互换使用,通常是指脊椎动物。在某些实施方案中,所述脊椎动物是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于灵长类动物(包括人和非人灵长类动物)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。术语“患者”进一步表示并非健康受试者的受试者。在一个实施方案中,“患者”是经诊断或患有与炎性疾病或病症相关的体征或症状的个体。在一个实施方案中,“患者”患有自身免疫疾病或病症,例如 RA。

[0065] “对照受试者”指未曾被诊断和 / 或未患有与炎性疾病或病症相关的任何体征或症状的表面上健康的受试者。

[0066] “关联 (correlate 或 correlating)”意指以任何方式将第一分析或方案的性能和 / 或结果与第二分析或方案的性能和 / 或结果进行对比。例如, 可以将第一分析或方案的结果用于执行第二方案, 和 / 或可以使用第一分析或方案的结果以确定是否应执行第二分析或方案。就基因表达分析或方案的实施方案而言, 可以使用基因表达分析或方案的结果以确定是否应执行特定的治疗方案。

[0067] 术语“患者反应”或“反应”可以使用指示患者受益的任何终点进行评估, 包括但不限于, a) 对疾病进展的抑制 ; b) 疾病发作次数和 / 或症状的减少 ; c) 损伤尺寸的缩小 ; d) 对疾病细胞浸润到邻近周围器官和 / 或组织内的抑制 ; e) 对疾病传播的抑制 ; f) 自身免疫应答的降低, 这可以但不一定导致疾病损伤的消退或消除 ; g) 与所述病症相关的一种或多种症状在一定程度上的缓解 ; h) 在治疗后无疾病表现的时间增加 ; 和 / 或 i) 在治疗后在给定时间点上死亡率减少。为了患者反应的目的, 抑制是指掩蔽、缩小、延迟或完全终止相关症状。

[0068] 当涉及受试者或患者对于先前已给予他们的一种或多种药物的反应时, 表述“对……无反应”描述所述受试者或患者, 在所述药物给予后, 未曾显示出对于所治疗的病症而言任何的或足够的治疗迹象, 或他们显示出了对于所述药物在临床上无法接受的高度毒性, 或他们未维持在第一次施用所述药物后的治疗迹象, 其中在该背景中使用的词语治疗如本文所定义。短语“无反应的”包括描述对于先前给予的一种或多种药物具有抵抗性和 / 或难治性的那些受试者, 并且包括下述情况 : 其中受试者或患者在接受他或她正被给予的药物时已发展, 和其中受试者或患者在完成方案后 12 个月内 (例如 6 个月内) 已发展, 其中所述方案包括他或她不再对其有反应的药物。对于一种或多种药物的无反应性因此包括在先前或当前的对其治疗后继续具有活动性疾病的受试者。例如, 在用患者对其无反应的药物治疗约 1-3 个月后, 患者可以具有活动性疾病活性。这样的反应性可以由在治疗所述病症中熟练的临床医生进行评估。为了对药物的非反应性的目的, 自用一种或多种药物进行的先前或目前治疗中经历“临床上不可接受的高水平的毒性”的受试者经历与之相关的一种或多种不良副作用或不利事件, 所述副作用或不利事件被有经验的临床医生视为是重要的, 例如严重感染、充血性心力衰竭、脱髓鞘 (导致多发性硬化)、显著超敏反应、神经病理学事件、高度自身免疫、癌症例如子宫内膜癌、非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌或黑素瘤、肺结核 (TB) 等。

[0069] 术语“不充分的反应”或“不充分反应者”用于描述经历不满意的给定治疗效果的患者。这可以表征为低治疗效果和 / 或大量副作用。认为所述标准相当于无反应性。术语“不充分的反应”用于涉及其中给定反应被预期或旨在基于先前的试验的治疗。如果一段时间之后未获得“充分的反应”, 则治疗通常被中断, 认为所述患者是“不充分反应者”。也可以是, 所述患者继续治疗, 但与其它治疗组合以改善治疗反应。

[0070] 术语“充分的反应”用于描述当治疗功效的预期实现时患者中的治疗效果。

[0071] “药物”是治疗疾病、病症和 / 或病况的活性药物。在一个实施方案中, 疾病、病症和 / 或病况是 RA 或其症状或副作用。

[0072] “抗炎药”是这样的化合物、药物或药剂 : 其可以或有希望减少炎性疾病或病症的

炎性反应或症状。

[0073] 如本文使用的,“RA 治疗药”或“有效治疗 RA 的治疗药”及其语法变体指这样的药剂:当以有效量提供时,其被已知、临床上证实或被临床医生预期在 RA 受试者中提供治疗益处。

[0074] “拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、废除、减少或干扰特定或指定蛋白质的活性的分子,所述活性包括在配体的情况下其与一种或多种受体的结合或在受体的情况下其与一种或多种配体的结合。拮抗剂包括抗体及其抗原结合片段、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、生物有机分子、拟肽、药理学活性剂及其代谢产物、转录和翻译控制序列等。拮抗剂还包括蛋白质的小分子抑制剂、和融合蛋白、与蛋白质特异性结合从而隔离其与其靶标的结合的受体分子和衍生物、蛋白质的拮抗剂变体、针对蛋白质的反义分子、RNA 适配体、和针对蛋白质的核酶。

[0075] 发明详述

本发明的发明人已经发现,根据某些基因表达谱的检查,可以鉴定具有成功治疗的高可能性的患者。本发明是基于按照实施例中所所述而获得的数据。本发明的患者典型地患有炎症性疾病或病症和尤其是自身免疫疾病或病症。基于所得的数据,可在多种方法中使用所述信息,因为可以选择对治疗的反应具有增加的可能性的患者。

[0076] 本发明一方面涉及预测受试者对抗炎药的反应的方法,包括:在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0077] 可使用不同的措辞来解释评价图 1 的一个或多个基因的基因表达的情况。这同样可用于获得表达水平的信息,评价水平或表达或考虑表达水平。所有这些方法不必包括获得血液样品,因为这可能在先前已发生,因此所述方法详述,为在指定患者中预测临床反应或临床反应的可能性的目的,使用来自生物样品的基因表达的信息。这进一步表明先前也已获得的基因表达水平的信息可以用于本发明的方法。

[0078] 本发明一方面涉及鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者的方法,包括在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述样品中的所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者。

[0079] 正如以上的替代措辞,例如按照本发明的方法可以使用评价表达水平或考虑表达水平,和此外,也如上所述,所述方法不一定包括获得血液样品和在所述血液样品中评价表达水平的步骤。

[0080] 在本发明的其它方面,所述方法确实包括在来自所述患者的生物样品中测定图 1 的一个或多个基因的表达水平和将所述水平与所述基因的参考水平比较的步骤。

[0081] 因此本发明一方面涵盖预测受试者对抗炎药的反应的方法,包括:

- a) 在来自所述受试者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平,和
- b) 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0082] 进一步的方面涉及鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者的方法,包

括：

- a) 在来自所述受试者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平，
- b) 将所述水平与所述基因的参考水平比较，

其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变，表明已经鉴定出对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者。

[0083] 基因表达

许多炎性疾病或病症（包括自身免疫疾病或病症）的分子背景并未完全了解，因此诊断是复杂的并且倾向于不准确的。目前可用的治疗对某些患者有用，但对其它患者无用，这其中的原因尚未阐明。为了增加治疗的成功性，进行了尝试，以便根据各种参数将患者分为亚组。

[0084] 一个选项是表征患者的基因表达谱并据此而将患者分组。通常，在 RNA 水平或在蛋白水平上测定基因表达，因为测定了给定 mRNA 或翻译产物的水平。或者，可以检测或间接确定基因表达，例如通过与其它基因或标记的关联，也包括多态性例如 SNP 的标记。SNP 通常是双等位基因的并且容易被检验。因此可以在不同水平上通过本领域技术人员已知的多种方法来检测基因表达。

[0085] 用于通过 mRNA 水平来检测基因表达的试验可以基于 PCR 技术，例如多重-PCR，其中使用两个以上引物组，用于在分离自生物样品（例如患者的血液样品）的核酸上进行的单个反应中扩增 2 个或更多个 DNA 序列的目的。所述方法可以是两步法，其还包括扩增前的 cDNA 合成的步骤。微阵列芯片也可用于分析大群体的基因，这样的微阵列芯片可以经特别设计，以包括相关探针，或者可以收集来自关于目标基因的标准芯片的信息以评价被认为相关的基因的基因表达谱。

[0086] PCR 和阵列技术的特异性取决于引物和探针与所分析样品中的 mRNA 分子的杂交，可以通过本领域技术人员已知的参数调整严格性。

[0087] 当有证据表明其它基因或标记的检测与目标基因表达水平关联时，通过关联到所述其它基因或所述标记，可以进行基因表达的检测。如本文的实施例 4 所述，技术人员可以进行目标基因的表达数量特征基因座 (eQTL) 分析和鉴定 SNP 与该基因的表达水平的关联或关系。在进一步的替代方案中，通过与其它基因或标记关联可以由此测定表达水平。

[0088] 还考虑了在蛋白水平上测量基因表达，只要翻译产物是在得自患者的样品中可以检测的蛋白质。

[0089] 可使用合适的技术检测蛋白质，其通常是基于抗体的，因为根据本领域已知技术，可以产生和使用对指定蛋白具有特异性的抗体。当使用来自少数基因的基因表达数据时，基于抗体的技术是最可用的。使用蛋白质组分析，可在蛋白质水平上进行更复杂的基因表达分析。

[0090] 对于某些基因产物，功能测定可同样好地用于确定表达水平的目的。功能测定可以是测试生物活性或酶活性的测定，这取决于蛋白质的功能和本领域有关这类蛋白质活性的知识。

[0091] 如上所述，本发明的一个实施方案涉及鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者的方法，包括：

- a) 在来自所述患者的生物样品中测定图 1 的一个或多个基因的表达水平

b) 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测了所述患者对所述抗炎药的反应。

[0092] 同样的标准可用于鉴定或选择使用所述抗炎药进行治疗的患者,这基于鉴定对使用所述抗炎药的治疗的反应具有增加的可能性的患者的期望。

[0093] 如本文公开的实施例中可见,图 1 的一个或多个基因的表达水平改变指示对抗炎药的临床反应。此外吸引力集中在与参考水平相比增加的一个或多个基因。或者,重点可在于与参考水平相比减少的一个或多个基因。这些特征的任一个与患者中的改善的反应率关联的基因,分别列于图 1A 和图 1B 中。在另一个实施方案中,本文所述的方法涉及这样的情况:其中与参考水平相比,图 1A 的基因的改变的表达是增加的。在另一个实施方案中,本文所述的方法涉及这样的情况:其中与参考水平相比,图 1B 的基因的改变的表达是降低的。在其它实施方案中,可包括更多基因,例如表达水平高于参考水平的图 1A 的一个或多个基因与表达水平低于参考水平的图 1B 的一个或多个基因的组合,从而使用多个基因的表达信息。在一个实施方案中,将至少两个基因的表达水平与个体参考水平比较。进一步可能的是将以下信息组合:与参考水平相比图 1A 的基因的改变的表达是增加的信息,以及与参考水平相比图 1B 的基因的改变的表达是降低的信息。

[0094] 用于本发明的基于多变量的方法的基因组合举例于表 2 中,在这样的方法中,可以使用 1 个或多个例如至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个基因的表达水平的信息。

[0095] 如下文所进一步描述,参考水平是基因的特性,取决于所述方法的特定目的。

[0096] 参考水平

参考水平可以是在未受影响的或健康受试者中的表达水平,其最可能是这样的基因情况:其中基因的表达改变是炎性疾病或病症的特征,和所述基因可用作诊断标记。在一个实施方案中,参考水平可以是在未受影响的或健康个体中的表达水平。

[0097] 根据本文的数据,显而易见的是,与患者相比,在未受影响的或健康个体中其它生物标记不一定表现出不同的表达。在一个实施方案中,参考水平可以是在健康个体或患者或其混合物的群体中测定的表达水平的平均值。在其它情况下,某些基因的基因表达水平可提供使用抗炎药的患者中能治疗性的预测信息,尽管表达谱与疾病状态或诊断标准可能无关联。这可能是由于以下事实:诊断的疾病不准确,因为诊断工具不反映疾病的变异性。这样的生物标记可能依然具有很大价值,因为它们可根据本文的方法使用,以将治疗指向更可能对指定治疗具有反应的个体患者。

[0098] 基于这样的信息,参考水平可以是预定水平、任意表达水平,其用于筛选对抗炎药具有反应的患者。在本发明的实施方案中,参考水平是预定水平。

[0099] 本文的实例证明根据本发明的方法可使用单个基因的表达水平。该预定水平因此可以是指示给定的反应的表达水平,所述给定的反应例如通过 DAS28-CRP、ACR20、ACR50 和 / 或 ACR70 反应测定的反应。参考水平或预定水平可以认为是阈值,并且可以选择所述阈值,旨在患者组中的某一反应水平。然后,所选阈值将指示在一部分患者中达到 ACR20、ACR50 和 / 或 ACR70 反应的可能性。同样,可以基于 DAS28-CRP 评分选择阈值,旨在患者组中的某一评分。因此,可设定水平,以便对于每一标准,取消选择无反应者,或增加达到阳性反应的一个或多个标准的患者部分。因此,生物标记预测治疗反应,并且如果仅旨在高反应

者的话,甚至可用于预测反应程度。

[0100] 在一个实施方案中,预定参考水平可以基于 ROC 曲线,其经设定以选择在用抗炎药治疗的至少 40% 的患者、例如 45%、例如 50%、例如 55%、例如 60%、例如 65% 或至少 70% 的患者中达到 ACR50 反应的表达水平。

[0101] 在一个实施方案中,预定参考水平可以基于 ROC 曲线,其经设定以选择在用抗炎药治疗的至少 25% 的患者、例如 30%、例如 35%、例如 40%、例如 45%、例如 50% 的患者中达到 ACR70 反应的表达水平。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,补体因子 D (CFD,也称为 adiposin) 的表达水平,用于选择、鉴定和 / 或判定患者对抗炎药的反应是否具有更高的可能性。所述基因列于图 1A (和图 2) 中,并举例说明具有增加的表达水平的基因如何可用于本发明的方法。在本文的实施例中,使用微阵列技术和 qRT-PCR 测定表达水平,但根据本发明其亦合适考虑用于测定 CFD 的 mRNA 水平的替代方法和用于测定 CFD 的蛋白水平或活性的通用方法。

[0103] 因此,本发明的方法可包括,当通过微阵列技术测定时,补体因子 D (CFD) 的表达水平在标准化表达值的 log₂- 标度 (scale) 上超过 9.5。基于本文给出的 ROC 数据,将阈值增加至例如 9.8、10.0、10.2、10.3、10.4 或甚至 10.5 提供了具有更高特异性但同时更低灵敏性的方法。

[0104] 基于 PCR 测定例如 RT-PCR,也可测定表达水平,无论是用内部对照进行的 qRT-PCR,或是使用可同时测定超过一个转录物的多重 PCR,其也通常包括内部对照。

[0105] 因此,本发明的方法可包括以下方法:其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中测定转录物的循环阈值 (Ct) 为 30 (使用 Assay ID: Hs00157263_m1 (Life technologies 的 Applied Biosystems))。在进一步的这类实施方案中,在 PCR 循环 28 或甚至 26 内可检测 CFD 转录物。进一步优选的是在相同时间,在相同的 cDNA 样品上检测 18S RNA 具有循环阈值 (Ct) 12.5,证实了 PCR 分析的质量。

[0106] 也可检测扩增反应的效率,其应当高于 95%,其中 100% 表明每一循环的扩增子的理论倍增。或者,PCR 扩增的效率应当为至少 1.9 或优选地至少 1.93,其中 2.0 代表每一循环的扩增子的理论倍增。

[0107] 在进一步的实施方案中,本发明的方法包括其中间接通过 SNP 检测而测量补体因子 D (CFD) 的表达水平的方法。在这样的方法中,可评价一个或多个 SNP。与基因表达相反,SNP 检测提供是 / 是、是 / 非 (= 非 / 是) 或非 / 非反应,而不是高或低表达的相对尺度 (relative scale),因此所述评价必须集中在对应于目标基因的表达改变的基因型。

[0108] 根据所选的 SNP,参考水平可以是“非 / 非”和与至少一个等位基因应当提供“是”的表达改变相关联。在替代的实施方案中,所述参考水平可以是“是 / 是”或甚至“是 / 非”。

[0109] 在 CFD 的实例中,增加的 CFD 表达与每个 SNP 的特异性参考水平相关。因此,这类方法将包括其中间接通过检测以下的一种或多种而测量补体因子 D (CFD) 的表达水平的方法:rs1683565、rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898。

[0110] 因为这些 SNP 都涉及其是或 A 或 G 的单核苷酸,因此所述参考水平将是 AA、AG 或 GG。

[0111] 对于实施例中描述的 SNP rs1683591,所述参考水平将是 AA 基因型 (低 CFD 表

达),并且 AG 和 GG 基因型将表明 CFD 的表达改变(高 CFD 表达)。

[0112] 本发明的方法因此包括其中间接通过 SNP rs1683591 的 AG 基因型或 GG 基因型的存在而测量 CFD 水平的方法。

[0113] 正如使用微阵列数据和 RT-PCR 数据的方法所示,通过降低阈值可增加所述方法的特异性,尽管因此损失某些灵敏性。

[0114] 如果基因的表达增加与本发明的方法相关,例如对于 CFD,则增加阈值将提供具有更高特异性但同时更低灵敏性的方法。

[0115] 反之亦然,如果基因的表达减少与本发明的方法相关,则减少表达水平阈值将提供具有更高特异性但同时更低灵敏性的方法。也显而易见的是,为了满足该情况下的阈值标准,表达水平低于阈值。

[0116] 根据以上,显而易见的是,如本文所述鉴定的其它基因,可以同样单独或组合用于在患者中预测临床反应可能性的方法,并且藉此根据所选患者对所述治疗具有反应的高可能性而选择患者进行给定的治疗。

[0117] 生物样品

在最初诊断后,对个体患者进行任何分亚组或表征的起点,是生物样品或基于先前已得到的生物样品的信息。根据本发明,所述生物样品可以是在使用本发明之前或期间得自患者的任何样品。所述样品优选地是可通过常规方法容易获取的血液样品,但其它类型的样品也可使用。所述样品也可以是血清样品。在某些情况下,可以使用组织样品例如滑液样品。本领域技术人员将会理解在测定给定基因组的表达水平之前如何处理给定的样品。可采集全血样品作为 PaxGene 样品。

[0118] 如果目标基因在特定细胞类型中表达,这可反映出样品用于表达研究。因此,生物样品可以是来自血液样品的外周血单核细胞样品,也称为 PBMC 部分,或甚至是其仅包括单核细胞的亚部分,例如 CD14+、CD4+ 和 / 或 CD8+ 阳性细胞中的一种或多种。

[0119] 在基因编码可溶性蛋白标记的情况下,表达研究可在血清样品上进行,和可评价蛋白质而非转录物的存在。可使用特异性抗体检测血清中的可溶性蛋白,例如通过本领域已知的 ELISA。如果评价更多蛋白质,可考虑使用蛋白质组分析进行蛋白质水平上的更复杂的基因表达分析。

[0120] 除了表达水平及其变化之外,生物样品也可用于测定患者的类风湿因子 (RF) 状态。

[0121] 患者和患者状态

在一个实施方案中,受试者是患者,例如经诊断或患有与本文所述的炎性疾病或病症相关的体征或症状的个体。在一个实施方案中,所述患者患有自身免疫疾病或病症。在具体的实施方案中,所述患者是 RA 患者或患有 RA 症状。

[0122] 样品可得自从未进行炎性疾病或病症治疗的患者,意思是先前从未将针对炎性疾病或病症的治疗给予所述患者。对于患有可能罕见发生的自身炎性疾病的患者,在考虑本文所述的抗炎药(尤其是对于生物药物类)之前通常考虑多种治疗。在某些情况下,基因表达信息可得自先前获得的样品,因此所述样品可被认为是从未接受治疗的,而患者不再是从未接受给定治疗的。所述样品在某些情况下可以得自正在接受炎性疾病或病症治疗的患者。所述患者可以是处于基本使用任何药物的治疗之中,所述药物不限于本文提出的抗

炎药。

[0123] 通常将用作治疗炎性疾病或病症的一线药物的药物给予患者,然后评价本发明的治疗是否具有高的成功可能性。

[0124] 用于正在治疗或先前已治疗患者的药物可包括以下的一种或多种:非甾体抗炎药 (NSAID) 例如 Aspirin™、Ibuprofen™等、皮质类固醇、疾病-修饰性抗风湿药 (DMARD) 例如 Plaquenil™、Azulfidine™、Methotrexate™等、Copaxone™ (glatirimer acetate)、Gilneya™ (芬戈莫德)、抗生素例如 Flagyl™、Cipro™、局部(皮肤施用)药物包括局部皮质类固醇、维生素 D 类似物乳膏 (Dovonex™)、局部类视色素 (Tazorac™)、保湿剂、局部免疫调节剂(他克莫司和吡美莫司)、煤焦油、地萘酚和其它、Raptiva™、Ustekimumab™、光治疗例如 PUVA、UVB 和 CellCept™ (麦考酚酸吗乙酯)。还包括生物抗炎药,包括但不限于 IFN-β、Orencia™ (CTLA4-Ig)、Humira™ (抗 TNF)、Cimzia™ (抗 TNF、PEG Fab)、Tysabri™ (a4-整联蛋白 mAb)、Simponi™、Rituxan/MabThera™、Actemra/RoActemra™和 Kineret™。

[0125] 如果不使用治疗之前获得的样品,可使用一种或多种宽范围的抗炎药来治疗患者,所述抗炎药包括如上所述的 NSAID、DMARD 和 TNF-α 抑制剂。通常,将用甲氨蝶呤 (MTX) 治疗患者。

[0126] 另外,先前采用的治疗在患者中不提供充分的反应,和因此所述患者不再是从未接受所述治疗,但被认为是不充分反应者。对于诊断和临床反应,用于判定给定的患者是否是不充分反应者的标准将取决于如下所述的待治疗的疾病或病症。

[0127] 因此,患者对于 MTX 治疗和/或对于 TNF-α 抑制剂治疗可以是不充分反应者,其中 TNF-α 抑制剂治疗是指被认为 TNF-α 抑制剂的药物中的一种或多种,包括抗体药物和可溶性受体药物两者。

[0128] 优选的是,在获得所述生物样品之前或同时,选择用于本文所述的鉴定方法的基因的表达不受先前或同时的用任何抗炎药治疗的影响。

[0129] 如上所述,还可涉及到考虑患者的类风湿因子 (RF) 状态和抗环状瓜氨酸化蛋白抗体 (抗 CCP) 状态。确定 RF 和抗 CCP 状态的测定是本领域已知的,技术人员可以按照来自制造商的说明书,毫无困难地使用任何这样的测定。RF 阳性患者的类风湿因子水平超过指示样品中存在 RF 的某一阈值。如果阴性,类风湿因子水平低于所述阈值,指示所述样品中不存在 RF。

[0130] 在一个实施方案中,患者 RF 状态是阳性或阴性。在进一步的具体的实施方案中,患者 RF 状态是要么阳性要么阴性。

[0131] 在一个实施方案中,所述患者抗 CCP 状态是阳性或阴性。在进一步的具体的实施方案中,所述患者抗 CCP 状态是要么阳性要么阴性。

[0132] 适应症

如上所述,本发明涉及各种疾病、尤其包括自身免疫和炎性疾病或病症的治疗。

[0133] 用抗炎药治疗的所述病况或病症是类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊椎炎、斯耶格伦综合征 (Sjogren's syndrome)、多发性硬化、炎性肠病例如溃疡性结肠炎和克罗恩病、系统性红斑狼疮或狼疮性肾炎、其任何组合、以及与这些疾病相关的伴随疾病,其中心血管疾病是所述伴随疾病的非限制性实例。另一方面,其它示例性的病况包括但不限于青少年慢性关节炎、骨关节炎、除强直性脊椎炎之外

的其它脊椎关节病、系统性硬化（硬皮病）、原发性炎性肌病（皮肌炎、多肌炎）、脉管炎、系统性脉管炎、颞动脉炎、动脉粥样硬化、结节病、重症肌无力、自身免疫性溶血性贫血（免疫性全血细胞减少症、阵发性睡眠性血红蛋白尿症）、恶性贫血、自身免疫性血小板减少症（原发性血小板减少性紫癜、免疫-介导的血小板减少症）、甲状腺炎（格雷夫斯氏病、桥本甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎）、糖尿病、II 型糖尿病、免疫-介导的肾病（肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎、自身免疫性卵巢炎）、胰腺炎、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性葡萄膜炎、抗磷脂综合征，除了多发性硬化、原发性脱髓鞘性多神经病或格-巴二氏综合征和慢性炎症性脱髓鞘性多神经病以外的中枢和外周神经系统的脱髓鞘疾病，肝胆疾病诸如传染性肝炎（甲、乙、丙、丁、戊型肝炎和其它非亲肝 (hepatotropic) 病毒）、自身免疫性慢性活动性肝炎、病毒性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、肉芽肿性肝炎、韦格纳氏肉芽肿病、贝赫切特病和硬化性胆管炎，炎性肠疾病诸如乳糜泻、谷蛋白敏感性肠病和惠伯尔病，自身免疫或免疫-介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、特应性皮炎、疱疹样皮炎、寻常天疱疮、白癜风（白斑病），变态反应性疾病诸如哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应和荨麻疹，脓毒病，内毒素血症，肺的免疫性疾病诸如嗜酸性粒细胞性肺炎、原发性肺纤维化和过敏性肺炎、慢性阻塞肺疾病，和器官或骨髓移植有关的疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主病。

[0134] 炎性疾病的原因是多方面的，涉及多个途径和组分。炎症是包括多组分的事件级联，包括管脉系统（例如内皮细胞、周皮细胞、平滑肌细胞）、免疫系统细胞（例如 T 和 B 淋巴细胞；多形核白细胞或粒细胞，例如单核细胞和嗜中性粒细胞；树突细胞、巨噬细胞和 NK 细胞）、细胞衍生的可溶性介质（细胞因子、趋化因子）以及在靶组织中居留的细胞（例如上皮细胞、滑膜成纤维细胞、神经元细胞）。这些元件的每一个（包括其调节物）在疾病发展中都可能具有作用，并且随后也可能作为上述疾病和病症的治疗靶标。炎性疾病因此也可通过受影响的途径来表征，例如作为 B 或 T- 细胞介导的疾病或病症，作为细胞因子介导的病症或受体介导的病症等等。

[0135] 对于本发明，所述适应症因此可以是经抗炎药治疗而得以改善的任何病症，例如由 IL-10 家族例如如下所述的受体和配体的信号转导 / 活性的下调所介导的病症。

[0136] 可使用 IL-10 家族的细胞因子和受体的调节剂治疗的适应症包括自身免疫疾病和病症，例如类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD)、银屑病或银屑病性关节炎 (PSA)。

[0137] 抗炎药

如上所述，多个途径参与炎症，可在多个水平上靶向每个途径。通过阻断受体，通过提供可溶性受体片段或通过阻止配体结合受体或经受体转导信号，可以获得对受体信号转导的抑制，其实例是用于治疗某些自身免疫疾病和 / 或癌症的靶向生物治疗药。例如，癌症患者可以用针对 CD20 的抗体（抗 CD20）来治疗；类风湿性关节炎患者可以用抗 CD20（一种 TNF 拮抗剂）（可溶性 TNFR 或抗 TNF- α ）来治疗；银屑病患者可以用抗 CD11a 来治疗；多发性硬化患者可以用 INF- β 来治疗；溃疡性结肠炎患者可以用抗 TNF- α 来治疗和克罗恩病患者可以用抗 TNF- α 或抗 $\alpha 4$ 整联蛋白来治疗。不幸的是，这些治疗并不完全有效。

[0138] 先前已经描述过，IL-10 家族成员是治疗炎性疾病或病症的有用靶标 (WO 2001/46261)。

[0139] IL-10 家族包括 IL-10、IL19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26,其与以下受体异源二聚体结合:

IL-10: 与 IL-10R1 / IL-10R2 结合

IL-19: 与 IL-20R1 / IL-20R2 结合

IL-20: 与 IL-20R1 / IL-20R2 和 IL-22R / IL-20R2 结合

IL-22: 与 IL-22R / IL-10R2 结合

IL-24: 与 IL-20R1 / IL-20R2 和 IL-22R / IL-20R2 结合

IL-26: 未知受体

该受体重叠表明,尽管某些功能对每个家族成员是特异性的,但也有某些共享的效应。每种配体和受体在炎症疾病中的准确作用尚未确定,但若干已经关联到疾病。实例包括:IL-20,其可通过抗体或受体片段来靶向,用于治疗某些炎症疾病(WO 2001/45261);IL-22 和 IL-19、IL-17 (WO10025369、WO2010102251),其是 IL-10 家族细胞因子的所有成员。

[0140] 白介素 -19 (IL-19)、IL-20 和白介素 -24 (IL-24) 是白介素 -10 (IL-10) 细胞因子家族成员。正如以上所见,这 3 种白介素与 IL-20R1/IL-20R2 异源二聚体受体结合并通过所述受体而转导信号。IL-20 和 IL-24 (而不是 IL-19) 也是受体复合物的配体,所述受体复合物由 IL-20R2 和 IL-22R1 组成(Parrish-Novak 等人, J Biol Chem 2002 ;277: 47517- 47523 ;Dumoutier 等人, J Immunol 2001 ;167:3545-3549)。已经提出,IL-19 和 IL-20,以及其它 IL-10 家族成员,构成螺旋状细胞因子的独特亚家族,其中至少 IL-19 和 IL-20 具有类似的三维结构(Chang 等人, J Biol Chem 2003 ;278: 3308-13)。

[0141] 因此已经描述了使用受体片段或单克隆抗体来拮抗 IL-20 活性,作为治疗多种炎症病况的有希望的方法。也已描述了人 IL-20 (hIL-20) 的抗原性表位以及结合 huIL-20 的大鼠或鼠单克隆抗体(例如 WO2005052000、US20060142550 和 WO2007081465)。在一个或多个物种(包括人)中可以降低 IL-20- 介导的 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2 受体复合物的活化的抗 IL-20 单克隆抗体已经描述于 WO 2010/000721。

[0142] 因此抗炎药可以是能够降低 IL-20 介导的 IL-20R1 / IL-20R2 以及 IL-22R / IL-20 受体这两者的活化的 IL-20 拮抗剂。所述抗炎药可以通过不经 IL-19 或 IL-24 受体降低受体活化而具有特异性。

[0143] 基于至少共享的作用方式,靶向每一配体和受体可提供类似的生物学效应。本发明的抗炎药因此可以是 IL-10 家族成员及其受体的拮抗剂,例如通过结合配体或受体而调节上述受体的信号转导的化合物,因此降低了所述配体或受体的生物活性。测定 IL-10 家族成员的拮抗活性的测定法是本领域已知的,也描述于 WO 2010/000721。

[0144] 本发明的抗炎药可以在药物组合物中,例如包含抗炎药和药学上可接受的载体和标签的药物组合物。所述抗炎药或药物组合物可以是适于口服、i. v. 和 / 或 s. c. 给药。所述抗炎药或药物组合物可以重复给予,例如每月一次或每周一次。

[0145] 本文的方法也考虑到给药途径或方案,因为所述反应可能取决于所用的治疗方案。在一个实施方案中,所述反应的预测或指示是基于每周一次给予抗 IL-20 抗体。在一个实施方案中,所述抗体经皮下给予。

[0146] 临床反应

根据适应症,可以通过各种方法确定诊断和临床反应。在给予给定的抗炎药后,不表现

出所治疗的病症的任何或足够的治疗体征的患者被认为是无反应的。相反,在给予给定的抗炎药后,通过表现出所治疗的病症的足够的治疗体征而有反应的患者就被认为是有反应的。足够的治疗体征因疾病的不同和患者的不同而异,并不暗示患者经历“完全”治疗,而仅仅是观察到一种或多种临床参数的改善。可在给予抗炎药之后的不同时间点来考虑反应性,并且患者可在一次或多次给予后短时间内或长时间内具有反应,但只要得到阳性结果,就认为该患者是有反应的。

[0147] 根据本发明,可以增加成功率(例如将抗炎药给予将有反应的患者的频率),而且使用本发明在被给予的患者中可获得达到不仅高成功率而且强反应的频率。

[0148] 可通过本领域已知方法测定临床反应。优选使用由政府主管部门批准的官方疾病评分。据说这样的疾病评分随时间而发展,所以获得临床评分的未来方法被认为与本发明相关。

[0149] 考虑的是本领域技术人员能够鉴定给定的疾病或病症的相关的临床参数,因此本文包括的仅是少量关键的临床参数。根据不同标准诊断自身免疫疾病。

[0150] 本文的方法涉及患者对抗炎药的反应的指示和预测,这取决于适应症和症状,可在不同时间点预测预期反应。在个别的实施方案中,所述指示和预测涉及在 12 个月内、10 个月内、8 个月内、6 个月内、5 个月内、4 个月内、3 个月内或 2 个月内获得的反应。

[0151] 类风湿性关节炎 (RA)

类风湿性关节炎可根据美国风湿病学会 (ACR) 等所定义的标准来诊断。当使用所述标准时,对治疗的反应可以基于 degrease 评分。放射照相损伤的预防或延迟也是 RA 治疗的目标。美国风湿病学会 (ACR) 20% 综合改善标准描述了如果在触痛 (tender) 和肿胀关节计数中存在 20% 改善和在 5 个另外的量度 (疼痛、身体功能、患者的综合健康评估、医生的综合健康评估和急性期反应物水平) 的至少 3 个中存在 20% 改善,那么将患者归为“改善的”。类似地,ACR50 和 ACR70 代表甚至更高程度的患者改善。

[0152] 根据获得 ACR20、ACR50 和 / 或 ACR70 的患者数量或患者部分,抗炎药作为 RA 治疗药的有效性可以因此而量化。

[0153] 除了 ACR 评分之外,也可使用 28 关节的疾病活性评分 (DAS28) 追踪类风湿性关节炎的发展。它是 1980 年代在 Nijmegen 开发的综合指数,已广泛用作 RA 疾病活性和对治疗的反应的指示物,以及基于 DAS 的欧洲抗风湿病联盟 (European League Against Rheumatism, EULAR) 反应标准。DAS28 中包括的关节是 (双侧): 近端指间关节 (10 关节)、掌指关节 (10)、腕 (2)、肘 (2)、肩 (2) 和膝 (2)。当考虑这些关节时,同时统计触痛 (TJC28) 和肿胀 (SJC28) 的关节数量。可以包括 C- 反应蛋白 (CRP) 水平 (以 mg/l 计) 的测定,并且患者还在前面 7 天期间在 0-100 的数值范围上对疾病活性进行主观评价 (SA),其中 0 是“无活性”,100 是“最高活性可能”。据此计算 DAS28。

[0154] 使用所述 DAS,对于高疾病活性、低疾病活性或甚至缓解,已经开发了若干阈值。所述评分也可用作反应标准,当在两个时间点 (例如治疗开始前和治疗后) 测定患者 DAS,可以评价患者的临床反应。

[0155] 本发明涉及改善 RA 治疗的有效性。尽管若干化合物已获批准并用于 RA 治疗,但治疗结果对于所有患者而言很少是优化的,并包括一些方面的试验和误差 (arrow),因为没有使用预测 RA 治疗的有效性的方法。

[0156] 最近,已经描述了使用针对 CD20 的抗体疗法(利妥昔单抗)增加 RA 治疗有效性的方法(WO2011/028945, Owczarczyk 等人 2011, Science translational medicine)。在 WO2011/028945 中,基于患者的表达谱定义了不同亚组的 RA 患者,并且还通过鉴定对抗 CD20 疗法不可能发生反应的 RA 患者亚组而包括了一些与临床反应的关联。FcRH5 和 CXCL13 中的一种或多种的高(超过阈值) mRNA 水平增加了 RA 患者的 ARC50 率。根据 RF 状态的进一步的亚组分类允许进一步细分,由此对于大约 40% 患者获得 ARC50 标准,其可以反映依赖于 B 细胞途径的亚组,所述 B 细胞途径是淋巴样亚组的标志和利妥昔单抗的靶标。

[0157] 本发明表明图 1 和 2 的基因的表达水平改变,指示高于 RA 患者的平均临床反应的临床反应。

[0158] 系统性红斑狼疮(SLE)

对于 RA, SLE 治疗效果可以是基于美国风湿病学会(ACR)分类标准的基础。建立这些标准,主要是用于科学研究和临床试验,而不是为了诊断目的,所以并非所有 SLE 患者都通过全部标准。

[0159] 多发性硬化(MS)

存在着所述疾病的若干亚类并观察到不同的预后和进展。

[0160] 美国国立多发性硬化学会(The United States National Multiple Sclerosis Society)于 1996 年标准化 4 个亚类定义:1) 复发-缓解型,2) 继发进展型,3) 原发进展型,和 4) 进展复发型。对于诊断和评价,使用不同标准,使得对 MS 治疗潜在有效的药物的测试极大地复杂化。基于 MS 是自身免疫疾病,免疫调节剂包括抗炎药可用于治疗或控制 MS。

[0161] 银屑病性关节炎(PSA)

银屑病性关节炎可通过美国风湿病学会(ACR)等所定义的标准来诊断。当使用所述标准时,对治疗的反应可以基于 degrease 评分。放射照相损伤的预防或延迟也是 PSA 治疗的目标。美国风湿病学会(ACR)20% 综合改善标准描述了如果在触痛(tender)和肿胀关节计数中存在 20% 改善和在 5 个另外的量度(疼痛、身体功能、患者的综合健康评估、医生的综合健康评估和急性期反应物水平)的至少 3 个中存在 20% 改善,那么将患者归为“改善的”。类似地,ACR50 和 ACR70 代表甚至更高程度的患者改善。

[0162] 根据获得 ACR20、ACR50 和 / 或 ACR70 的患者数量或患者部分,抗炎药作为 PSA 治疗药的有效性可以因此而量化。

[0163] 除了 ACR 评分之外,还可使用 28 关节的疾病活性评分(DAS28)追踪银屑病性关节炎的发展。它是 80 年代在 Nijmegen 开发的综合指数,已广泛用作 PSA 疾病活性和对治疗的反应的指示物以及 EULAR 反应标准。DAS28 中包括的关节是(双侧):近端指间关节(10 关节)、掌指关节(10)、腕(2)、肘(2)、肩(2)和膝(2)。当考虑这些关节时,同时统计触痛(TJC28)和肿胀(SJC28)的关节数量。

[0164] 可以包括 C-反应蛋白(CRP)水平(以 mg/l 计)的测定,并且患者还在前面 7 天期间在 0-100 的数值范围上对疾病活性进行主观评价(SA),其中 0 是“无活性”,100 是“最高活性可能”。据此计算 DAS28。

[0165] 使用所述 DAS,对于高疾病活性、低疾病活性或甚至缓解,已经开发了若干阈值。所述评分还可用作反应标准,当在两个时间点(例如治疗开始前和治疗后)测定患者的 DAS

时,可以评价患者的临床反应。

[0166] 皮肤银屑病是 PsA 的主要方面,尽管皮肤中的活性程度不一定与关节活性相关。已经开发出用于评价皮肤银屑病的多种手段。一种广泛使用的手段是银屑病面积和严重程度指数 (PASI)。PASI 评价单个银屑病性损伤的红斑、厚度 / 硬结和范围,然后使用公式来计算所涉及皮肤的体表面积的范围,其评分范围为 0-72。

[0167] 银屑病性关节炎反应标准 (PsARC) 经专门开发用于 PSA 临床试验。PsARC 由 4 项测量组成:1) 患者疾病活性综合评价 (反应需要在 5 点李克特量表 (Likert scale) 上改善为 1),2) 医生疾病活性综合评价 (反应需要在 5 点李克特量表上改善为 1),3) 关节疼痛 (反应需要在总评分上减少 30% 或以上,评价或 68 或 78 个关节,使用 4 点量表),和 4) 关节肿胀 (反应需要在总评分上减少 30% 或以上,评价或 66 或 76 个关节,使用 4 点评分量表)。为了成为“PsARC 反应者”,患者在 4 项测量中必须达到 2 项改善,其中之一必须是关节疼痛或肿胀,其在任何测量中无恶化。

[0168] 治疗

本发明一方面涉及基于来自本文的实例的信息的治疗方法。预测抗炎药的临床成功的方法随后提供用所述方法鉴定的患者的治疗方法。因为可以容易地进行鉴定满足某一预定标准的患者的方法,其与患者的实际治疗分开 (所用的方法不一定包括确定患者满足某些预定标准的步骤,尽管它是本发明的优选的实施方案)。当使用本发明的治疗方法时,预期患者将以高确定度反应,这不是没有预先了解患者满足某一预定标准的事实的情况。

[0169] 本发明的一个实施方案涉及在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,其中与参考水平相比图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变,所述方法包括将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0170] 再一个实施方案涉及在患者中治疗炎性疾病或病症的方法:

- a. 与参考水平相比,在所述患者中考考虑图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变,
- b. 包括将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0171] 此外,在一个实施方案中,本发明涉及在患者中治疗炎性疾病或病症的方法

- a. 在来自所述患者的生物样品中测定与参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变,
- b. 包括将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0172] 甚至进一步,在一个实施方案中,本发明涉及在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中测定图 1 的一个或多个基因的表达水平
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,
- c. 判定与所述参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变
- d. 将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0173] 在上述方法的替代方案中,所述参考水平可以是预定水平。

[0174] 在另外的实施方案中,所述方法的每一种可包括与所述参考水平相比,在所述生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0175] 参考本文以上的描述,包括预测方法的更详细的信息,其涉及本发明的治疗方法。

[0176] 本发明一方面涉及在受试者中治疗炎性疾病或病症的抗炎药,其中所述受试者表现出与图 1 的一个或多个基因的参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达改变。

[0177] 对于治疗方法,参考本文以上的描述,包括预测或鉴定方法的更详细信息,其明显地同样涉及定义抗炎药的特征及其药学用途。

[0178] 制品

本发明在另一方面涉及制品,包括包装在一起的药物组合物和标签,所述药物组合物包含抗炎药和药学上可接受的载体,所述标签说明所述药物组合物用于治疗患有自身免疫疾病或病症并具有图 1 的一个或多个基因的表达改变的患者。

[0179] 参考本文以上的描述,包括预测方法的更详细的信息,其涉及本发明的制品。

[0180] 检测试剂和试剂盒

本发明进一步涉及组合物,包括至少一种检测试剂,用于测定图 1 的一个或多个基因、尤其是图 2 的一个或多个基因和尤其是 CFD 的表达水平。所述检测试剂可以是对每个基因包括 mRNA 及其所编码的蛋白具有特异性的抗体、探针或引物。

[0181] 本发明另一方面涉及试剂盒,其包括如上所述的检测试剂或包含所述检测试剂的组合物和使用说明书。在使用内部对照的情况下,试剂盒可以进一步包含参考基因组合物。所述试剂盒还可包含用于表达标准化的检测试剂,所述检测试剂用于检测球蛋白基因。本发明的进一步的部分包括关于如何将表达水平与对本文所述的抗炎药的反应可能性关联的描述。尤其是考虑到试剂盒,其用于检测补体因子 D (CFD) 的表达水平及其评价。

[0182] 治疗靶标

抗炎药是炎性疾病或病症的表型所需途径的调节剂。根据本文的数据,显而易见的是,所选基因可被单独考虑为迄今为止用于治疗炎性疾病或病症的新的治疗靶标,因为对于自身免疫疾病和尤其是 RA,先前未描述过它们。

[0183] 实施方案

如本文所述的本发明概述于、但不限于以下实施方案。

[0184] 1. 预测受试者对抗炎药的反应的方法,包括:在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0185] 2. 预测患者对抗炎药的反应的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平,和
- b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较

其中与所述参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,预测了所述患者对所述抗炎药的反应。

[0186] 3. 鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者的方法,包括:在来自所述受试者的生物样品中获得图 1 的一个或多个基因的表达水平的信息,其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达水平改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的受试者。

[0187] 4. 鉴定对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者的方法,包括:

- a. 在来自所述患者的生物样品中检测图 1 的一个或多个基因的表达水平
- b. 将所述表达水平与所述基因的参考水平比较,

其中与所述基因的参考水平相比的一个或多个所述基因的表达改变,表明已经鉴定了对抗炎药的反应具有增加的可能性的患者。

[0188] 5. 先前实施方案中任一项的方法,其中在生物样品中测定补体因子 D (CFD) 的表达。

[0189] 6. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B, 成员 9 (SERPINB9) 的表达。

[0190] 7. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B, 成员 9 (SERPINB9) 和/或锌指, CCHC 域含有 24 (ZCCHC24) 的表达。

[0191] 8. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或果糖胺 3 激酶相关蛋白 (FN3KRP) 和/或间质同源框 1 (MEOX1) 的表达。

[0192] 9. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B, 成员 9 (SERPINB9) 和/或锌指, CCHC 域含有 24 (ZCCHC24) 和/或果糖胺 3 激酶相关蛋白 (FN3KRP) 的表达。

[0193] 10. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B, 成员 9 (SERPINB9) 和/或锌指, CCHC 域含有 24 (ZCCHC24) 和/或果糖胺 3 激酶相关蛋白 (FN3KRP) 和/或间质同源框 1 (MEOX1) 的表达。

[0194] 11. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或成纤维细胞生长因子 13 (FGF13) 和/或微管蛋白, β 2A (TUBB2A) 和/或溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白, 成员 11) (SLC39A11) 和/或跨膜通道 - 样 4 (TMC4) 的表达。

[0195] 12. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或核孔复合物相互作用蛋白 - 样 2 (NPIPL2) 和/或锌指蛋白 880 (ZNF880) 和/或醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1 (ALDH5A1) 的表达。

[0196] 13. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或成纤维细胞生长因子 13 (FGF13) 和/或微管蛋白, β 2A (TUBB2A) 和/或溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白, 成员 11) (SLC39A11) 和/或跨膜通道 - 样 4 (TMC4) 和/或核孔复合物相互作用蛋白 - 样 2 (NPIPL2) 和/或锌指蛋白 880 (ZNF880) 和/或醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1 (ALDH5A1) 的表达。

[0197] 14. 实施方案 1-4 中任一项的方法,其中在生物样品中测定了补体因子 D (CFD) 和/或丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B, 成员 9 (SERPINB9) 和/或锌指, CCHC 域含有 24 (ZCCHC24) 和/或果糖胺 3 激酶相关蛋白 (FN3KRP) 和/或间质同源框 1 (MEOX1) 和/或成纤维细胞生长因子 13 (FGF13) 和/或微管蛋白, β 2A (TUBB2A) 和/或溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白, 成员 11) (SLC39A11) 和/或跨膜通道 - 样 4 (TMC4) 和/或核孔复合物相互作用蛋白 - 样 2 (NPIPL2) 和/或锌指蛋白 880 (ZNF880) 和/或醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1 (ALDH5A1) 的表达。

[0198] 15. 前述实施方案中任一项的方法,其中与参考水平相比,图 1A 的基因的表达改变是增加。

[0199] 16. 前述实施方案中任一项的方法,其中与参考水平相比,图 1B 的基因的表达改变是降低。

[0200] 17. 前述实施方案中任一项的方法,其中将至少两个基因的表达水平与所述至少两个基因的个体参考水平比较。

[0201] 18. 前述实施方案中任一项的方法,其中将至少两个基因的表达水平与所述至少两个基因的个体参考水平比较,并且其中与参考水平相比图 1A 的基因的表达改变是增加,并且其中与参考水平相比图 1B 的基因的表达改变是降低。

[0202] 19. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述参考水平是预定水平。

[0203] 20. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述预定水平是指示使用 DAS28-CRP、ACR20、ACR50 和 / 或 ACR70 测量的反应的阈值。

[0204] 21. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述生物样品是血液样品或血清样品。

[0205] 22. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述生物样品是 Paxgene 全血样品。

[0206] 23. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述生物样品是来自血液样品的 PBMC 部分。

[0207] 24. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述生物样品是来自血液样品的细胞亚组。

[0208] 25. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述生物样品是来自血液样品的细胞亚组,其中在所述亚组中可以是 CD14+、CD4+ 和 CD8+ 阳性细胞中的一种或多种。

[0209] 26. 前述实施方案中任一项的方法,其中基于 mRNA 而测定所述表达水平。

[0210] 27. 前述实施方案中任一项的方法,其中使用 PCR 来测定所述表达水平。

[0211] 28. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述 PCR 选自多重 PCR 和 qRT-PCR。

[0212] 29. 前述实施方案中任一项的方法,其中使用微阵列芯片测定所述表达水平。

[0213] 30. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems) 测定转录物的循环阈值 (Ct) 为 30。

[0214] 31. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 和 ACTB 的 Assay ID: Hs99999903_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 检测转录物的绝对数为至少 0.03 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白 mRNA (基因符号 ACTB) 拷贝。

[0215] 32. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 和 ACTB 的 Assay ID: Hs99999903_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 检测转录物的绝对数为至少 0.04 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白 mRNA (基因符号 ACTB) 拷贝。

[0216] 33. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 和 ACTB 的 Assay ID: Hs99999903_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 检测转录物的绝对数为至少 0.05 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白 mRNA (基因符号 ACTB) 拷贝。

[0217] 34. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平和其中使用 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems/

Invitrogen) 和 ACTB 的 Assay ID: Hs99999903_ml (Applied Biosystems/ Invitrogen) 检测转录物的绝对数为至少 0.06 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白 mRNA (基因符号 ACTB) 拷贝。

[0218] 35. 前述实施方案中任一项的方法,其中当使用微阵列芯片测定时,补体因子 D (CFD) 的表达水平在 RMA 或 GC-RMA 标准化表达值的 log₂ 标度上超过 9.5。

[0219] 36. 前述实施方案中任一项的方法,其中根据一个或多个 SNP 间接测定所述表达水平。

[0220] 37. 前述实施方案中任一项的方法,其中根据一个或多个 CFD 表达相关的 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平。

[0221] 38. 前述实施方案中任一项的方法,其中根据在 CFD 单倍体块 (haploblock) 中的一个或多个 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平。

[0222] 39. 前述实施方案中任一项的方法,其中根据选自以下的一个或多个 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平:rs1683565、rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898。

[0223] 40. 前述实施方案中任一项的方法,其中通过 SNP rs1683591 的 AG 或 GG 基因型的存在而间接测定 CFD 的表达水平。

[0224] 41. 前述实施方案 1-25 中任一项的方法,其中在蛋白质水平上测定所述表达水平。

[0225] 42. 实施方案 41 的方法,其中使用抗体测定所述表达水平。

[0226] 43. 实施方案 41 的方法,其中使用蛋白质组分析测定所述表达水平。

[0227] 44. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述受试者或患者是患有炎症疾病或病症的患者。

[0228] 45. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述患者患有自身免疫疾病或病症。

[0229] 46. 实施方案 44 或 45 的方法,其中所述患者患有类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD)、银屑病性关节炎 (PSA) 或银屑病性关节炎。

[0230] 47. 实施方案 46 的方法,其中所述患者患有 RA。

[0231] 48. 实施方案 44-47 中任一项的方法,其中所述患者正在接受或已经接受 MTX 治疗。

[0232] 49. 实施方案 44-48 中任一项的方法,其中所述患者是对 MTX 治疗的不充分反应者。

[0233] 50. 前述实施方案 44-49 中任一项的方法,其中所述患者正在接受 TNF- α 抑制剂治疗。

[0234] 51. 实施方案 44-50 中任一项的方法,其中所述患者从未接受 TNF- α 抑制剂治疗。

[0235] 52. 实施方案 44-51 中任一项的方法,其中所述患者是对 TNF- α 抑制剂治疗的不充分反应者。

[0236] 53. 实施方案 44-52 中任一项的方法,其中所述患者是对用于所述炎症疾病或病症的一种或多种治疗的不充分反应者。

[0237] 54. 实施方案 44-53 中任一项的方法,其中所述患者是对 MTX 和 TNF- α 抑制剂治疗的不充分反应者。

[0238] 55. 实施方案 44-54 中任一项的方法,其中所述患者是 RF 阳性。

[0239] 56. 实施方案 44-55 中任一项的方法,其中所述患者是 RF 阴性。

[0240] 57. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是抗体。

[0241] 58. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是受体拮抗剂。

[0242] 59. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-10 家族的一个或多个成员的拮抗剂。

[0243] 60. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-10、IL19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26 中的一种或多种的拮抗剂。

[0244] 61. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-19、IL-20 和 IL-24 中的一种或多种的拮抗剂。

[0245] 62. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂。

[0246] 63. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂,其降低 IL-20 介导的 (medicated) IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R/IL-20R2 受体两者的活化。

[0247] 64. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂,其降低 IL-20 介导的 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R/IL-20R2 受体两者的活化,而不是 IL19 或 IL24 介导的受体活化。

[0248] 65. 前述实施方案中任一项的方法,其中所述抗炎药是抗人 IL-20 抗体。

[0249] 66. 在受试者中治疗炎性疾病或病症的方法,在所述受试者中与参考水平相比图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变,所述方法包括将治疗量的抗炎药给予所述受试者。

[0250] 67. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括:

a. 在所述患者中考虑与参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变,

b. 将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0251] 68. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括:

a. 在来自所述患者的生物样品中测定与参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变,

b. 将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0252] 69. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括:

a. 在来自所述患者的生物样品中测定图 1 的一个或多个基因的表达水平,

b. 将所述水平与所述基因的参考水平比较,

c. 测定与所述参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达水平是否被改变,和

d. 将治疗量的抗炎药给予所述患者。

[0253] 70. 前述实施方案 68-69 中任一项的方法,其中与所述参考水平相比,所述生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0254] 71. 前述实施方案 68-70 中任一项的方法,其中所述方法的特征在于前述实施方案 15-65 的特征中的任何一种或多种。

[0255] 72. 制品,包括包装在一起的药物组合物和标签,所述药物组合物包含抗炎药和

药上可接受的载体,所述标签说明所述药物组合物用于治疗患有自身免疫疾病或病症并具有图 1 的一个或多个基因的表达改变的患者。

[0256] 73. 实施方案 72 的制品,其中所述制品的特征在于前述实施方案 5-46 的特征中的任何一种或多种。

[0257] 74. 在受试者中治疗炎性疾病或病症的抗炎药,其中所述受试者表现出与所述基因的参考水平相比,图 1 的一个或多个基因的表达改变。

[0258] 75. 实施方案 74 的抗炎药,特征在于前述实施方案 15-65 的特征中的任何一种或多种。

[0259] 76. 组合物,包括至少一种检测试剂,其用于测定表 1 的一个或多个基因的表达水平。

[0260] 77. 实施方案 76 的组合物,其中所述检测试剂用于测定补体因子 D (CFD) 的表达。

[0261] 78. 实施方案 76 的组合物,其中所述检测试剂是 CFD 探针。

[0262] 79. 实施方案 76 的组合物,其中所述检测试剂是 CFD 引物。

[0263] 80. 实施方案 76 的组合物,其中所述检测试剂是用于检测 CFD 表达相关的 SNP 的引物。

[0264] 81. 实施方案 76 的组合物,其中所述检测试剂是用于检测选自以下的 CFD 表达相关的 SNP 的一种或多种引物:rs1683565、rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898。

[0265] 82. 试剂盒,包括:实施方案 76-81 中任一项的组合物和使用说明书。

[0266] 83. 实施方案 82 的试剂盒,进一步包括参考样品。

[0267] 84. 实施方案 82-83 的试剂盒,进一步包括用于标准化的检测试剂。

[0268] 85. 实施方案 82-84 的试剂盒,其中所述使用说明书包括关于如何将表达水平与反应可能性关联的描述。

[0269] 86. 实施方案 82-85 的试剂盒,其中所述试剂盒用于测定患者对抗炎药将具有反应的可能性。

[0270] 87. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0271] 88. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0272] 89. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0273] 90. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或

多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0274] 91. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,实施方案 1-43 中任一项的至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0275] 92.

93. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,实施方案 1-43 中任一项的至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0276] 94. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,实施方案 1-43 中任一项已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0277] 95. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前实施方案 1-43 中任一项已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0278] 96. 实施方案 87-94 中任一项的方法,其中所述受试者或患者是患有炎性疾病或病症的患者。

[0279] 97. 实施方案 87-94 中任一项的方法,其中所述患者患有自身免疫疾病或病症。

[0280] 98. 实施方案 87-96 中任一项的方法,其中所述患者患有类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD)、银屑病性关节炎 (PSA) 或银屑病性关节炎。

[0281] 99. 实施方案 97 的方法,其中所述患者患有 RA。

[0282] 100. 实施方案 87-98 的方法,其中所述患者正在接受或已经接受 MTX 治疗。

[0283] 101. 实施方案 87-99 的方法,其中所述患者是对 MTX 治疗的不充分反应者。

[0284] 102. 前述实施方案 87-100 中任一项的方法,其中所述患者正在接受 TNF- α 抑制剂治疗。

[0285] 103. 实施方案 87-101 的方法,其中所述患者从未接受 TNF- α 抑制剂治疗。

[0286] 104. 实施方案 87-103 的方法,其中所述患者是对 TNF- α 抑制剂治疗的不充分反应者。

[0287] 105. 实施方案 87-103 中任一项的方法,其中所述患者是对用于所述炎性疾病或病症的一种或多种治疗的不充分反应者。

[0288] 106. 实施方案 87-104 的方法,其中所述患者是对 MTX 和 TNF- α 抑制剂治疗的不充分反应者。

[0289] 107. 实施方案 87-105 的方法,其中所述患者是 RF 阳性。

[0290] 108. 实施方案 87-106 的方法,其中所述患者是 RF 阴性。

[0291] 109. 实施方案 87-107 的方法,其中所述抗炎药是抗体。

- [0292] 110. 实施方案 87-108 的方法,其中所述抗炎药是受体拮抗剂。
- [0293] 111. 实施方案 87-109 的方法,其中所述抗炎药是 IL-10 家族的一个或多个成员的拮抗剂。
- [0294] 112. 实施方案 87-110 的方法,其中所述抗炎药是 IL-10、IL19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26 中的一种或多种的拮抗剂。
- [0295] 113. 实施方案 87-111 的方法,其中所述抗炎药是 IL-19、IL-20 和 IL-24 中的一种或多种的拮抗剂。
- [0296] 114. 实施方案 87-112 的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂。
- [0297] 115. 实施方案 87-113 的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂,其降低 IL-20 介导的 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R/IL-20R2 受体两者的活化。
- [0298] 116. 实施方案 87-114 的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂,其降低 IL-20 介导的 IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R/IL-20R2 受体两者的活化,而不是 IL19 或 IL24 介导的受体活化。
- [0299] 117. 实施方案 87-115 的方法,其中所述抗炎药是抗人 IL-20 抗体。
- [0300] 118. 治疗炎性疾病的方法,包括将药理学有效量的抗炎药给予炎性疾病患者,所述患者具有这样的表达谱:其中相对于在对所述抗炎药无反应的人中的第一生物标记的表达而言,第一生物标记的表达是增加的,其中所述第一生物标记是补体因子 D (CFD)。
- [0301] 119. 实施方案 118 的方法,其中所述炎性疾病患者中的 CFD 的表达比在对所述抗炎药无反应的人中的 CFD 的表达高至少一个标准偏差。
- [0302] 120. 实施方案 118 的方法,其中所述炎性疾病是自身免疫疾病或病症。
- [0303] 121. 实施方案 120 的方法,其中所述自身免疫疾病或病症选自类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD) 和银屑病性关节炎 (PSA)。
- [0304] 122. 实施方案 121 的方法,其中所述自身免疫疾病是 RA。
- [0305] 123. 实施方案 118 的方法,其中所述炎性疾病患者具有这样的表达谱:其中相对于在对所述抗炎药无反应的人中的第二生物标记的表达而言,第二生物标记的表达是增加的,其中所述第二生物标记是 SERPINB9 (丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂和进化枝 B (卵清蛋白), 成员 9)。
- [0306] 124. 实施方案 118 的方法,其中所述炎性疾病患者具有这样的表达谱:其中相对于在对所述抗炎药无反应的人中的第二生物标记的表达而言,第二生物标记的表达是增加的,其中所述第二生物标记选自以下的一种或多种:SERPINB9 (丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵清蛋白) 成员 9) 和 ZCCHC24 (锌指, CCHC 域含有 24)。
- [0307] 125. 实施方案 118 的方法,其中所述炎性疾病患者具有这样的表达谱:其中相对于在对所述抗炎药无反应的人中的第二生物标记的表达而言,第二生物标记的表达是增加的,其中所述第二生物标记选自以下的一种或多种:SERPINB9 (丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵清蛋白) 成员 9)、ZCCHC24 (锌指, CCHC 域含有 24)、FN3KRP (果糖胺 3 激酶相关蛋白)、FN3KRP (果糖胺 3 激酶相关蛋白)、MEOX1 (间质同源框 1)、FGF13 (成纤维细胞生长因子 13)、TUBB2A (微管蛋白, β 2A)、SLC39A11 (溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白), 成员 11)、TMC4 (跨膜通道 - 样 4)、NPIPL2 (核孔复合物相互作用蛋白 - 样 2)、ZNF880 (锌指蛋白 880) 和 ALDH5A1 (醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1)。

[0308] 126. 实施方案 118-125 的方法,其中所述抗炎药是 IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26 中的一种或多种的拮抗剂。

[0309] 127. 实施方案 118-126 的方法,其中所述抗炎药是 IL-19、IL-20 和 IL-24 中的一种或多种的拮抗剂。

[0310] 128. 实施方案 118-127 的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂。

[0311] 129. 治疗自身免疫疾病的方法,包括:

鉴定自身免疫疾病患者;

判定所述患者表达第一生物标记,其中第一生物标记是补体因子 D (CFD);

基于以下认识,选择抗炎药作为患者的治疗:所述抗炎药在自身免疫疾病患者中有效,相对于在对所述抗炎药无反应的受试者中的第一生物标记的表达而言,在所述患者中第一生物标记的表达谱是增加的;和

将所述抗炎药给予所述患者。

[0312] 130. 实施方案 129 的方法,其中所述自身免疫疾病或病症选自类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、多发性硬化 (MS)、炎性肠病 (IBD) 和银屑病性关节炎 (PSA)。

[0313] 131. 实施方案 130 的方法,其中所述自身免疫疾病是 RA。

[0314] 132. 实施方案 129 的方法,其中选择抗炎药作为患者的治疗进一步包括以下的认识:所述抗炎药在自身免疫疾病患者中有效,相对于在对所述抗炎药无反应的受试者中的第二生物标记的表达而言,在所述患者中第二生物标记的表达谱是增加的;和其中第二生物标记选自以下的一种或多种:SERPINB9 (丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂,进化枝 B (卵清蛋白) 成员 9)、ZCCHC24 (锌指, CCHC 域含有 24)、FN3KRP (果糖胺 3 激酶相关蛋白)、FN3KRP (果糖胺 3 激酶相关蛋白)、MEOX1 (间质同源框 1)、FGF13 (成纤维细胞生长因子 13)、TUBB2A (微管蛋白, β 2A)、SLC39A11 (溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白), 成员 11)、TMC4 (跨膜通道 - 样 4)、NPIPL2 (核孔复合物相互作用蛋白 - 样 2)、ZNF880 (锌指蛋白 880) 和 ALDH5A1 (醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1)。

[0315] 133. 实施方案 129-132 中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24 和 IL-26 中的一种或多种的拮抗剂。

[0316] 134. 实施方案 129-133 中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-19、IL-20 和 IL-24 中的一种或多种的拮抗剂。

[0317] 135. 实施方案 129-134 中任一项的方法,其中所述抗炎药是 IL-20 的拮抗剂。

[0318] 136. 实施方案 129 的方法,其中对所述患者表达第一生物标记的判定包括 mRNA 的检测。

[0319] 137. 实施方案 136 的方法,其中对 mRNA 的检测包括多重 PCR 和 qRT-PCR。

[0320] 138. 实施方案 129 的方法,其中根据一个或多个 CFD 表达相关的 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平。

[0321] 139. 实施方案 129 的方法,其中根据在 CFD 单倍体块 (haploblock) 中的一个或多个 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平。

[0322] 140. 实施方案 138-139 的方法,其中根据选自以下的一个或多个 SNP 间接测定补体因子 D (CFD) 的表达水平:rs1683565、rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898。

[0323] 141. 实施方案 140 的方法,其中通过 SNP rs1683591 的 AG 或 GG 基因型的存在而间接测定 CFD 的表达水平。

[0324] 142. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0325] 143. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,至少一种测试已经显示了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0326] 144. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变。

[0327] 145. 在患者中治疗炎性疾病或病症的方法,包括将治疗量的抗炎药给予所述患者,其中,在给予所述抗炎药之前,已经测定了与参考水平相比,在来自所述患者的生物样品中图 1 的一个或多个基因的表达水平被改变;和其中与所述基因的参考水平相比一个或多个所述基因的表达水平改变,预测了所述受试者对所述抗炎药的反应。

[0328] 通用方法

总 RNA 纯化

可通过本领域技术人员已知的多种方法自任何类型的生物样品得到总 RNA。

[0329] 本文的实施例是基于使用 PaxGene blood RNA KIT IVD (QIAGEN) 而获得的数据,所述试剂盒特别适合延长采集并随后分析的样品。按照制造商 (Qiagen) 说明书处理 PaxGene 血液样品并按照 PaxGene PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) 的方案分离总 RNA。

[0330] 球蛋白 mRNA 减少

按照制造商的说明书,使用 GLOBINclear 试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),可获得总 RNA 样品中的球蛋白 mRNA 的减少。

[0331] RNA 完整性证实

在进行进一步分析之前,证实 RNA 样品的完整性是合适的。

[0332] 可以按照制造商说明书,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和总 RNA Nano 芯片 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。通常 RNA 完整性计数 (RIN- 评分) 高于 7 的样品就被认为可以接受用于进一步分析。

[0333] AffyMetrix GeneChip 杂交、扫描和分析

通过 3' IVT Express 试剂盒 (Affymetrix, Santa Clara, Ca, USA),按照制造商说明书,使用总 RNA 样品,自 50 毫微克总 RNA 制备标记的 cRNA (靶)。按照制造商所述,制备杂交合剂并在杂交炉 640 (Affymetrix) 中在 45°C 杂交到人类基因组 U133 Plus 2.0 GeneChips® (Affymetrix) 达 17h (60 RPM)。杂交后,使用 fluidics 方案 “EukGE-WS2v5_450” (Affymetrix),将基因芯片在 GeneChip®fluidics station 450 中洗涤和染色。将 GeneChips® 在 GeneChip® 扫描仪 3000 (Affymetrix) 中扫描。通过使用 R 环境和可在以下 URL: cran.r-project.org & bioconductor.org 中找到的 Bioconductor 包 “Affy”,将输出 “*.cel 文件”用于基因芯片数据的 RMA (Robust Multiarray Average) 标

准化。

[0334] 用可得自统计学编程环境R的开源工具(可得自URL: cran.r-project.org)以及 QluCore Omics explorer 2.2 (QluCore AB, Sweden) 进行微阵列数据的统计学分析。微阵列通过RMA (Robust Multiarray Average) 而标准化,使用Affy包(可得自URL: cran.r-project.org)和定制芯片定义文件(custom Chip Definition File) (HG133Plus2_Hs_ENSG),其可得自URL: brainarray.mbni.med.umich.edu)。

[0335] 使用Simca-P +11 软件(Umetrics, Umeå, Sweden)和偏最小二乘(PLS)工具进行多变量预测。

[0336] 使用GraphPad Prism 5 (GraphPad 软件, CA, USA) 制备ROC (接受者操作特征) 曲线。

[0337] 定量 RT-PCR

按照制造商的说明书,使用随机引物和TaqMan 逆转录试剂(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),通过自200 ng 总RNA 制备25 微升cDNA,进行定量RT-PCR 分析。

[0338] 以总体积25 微升进行qPCR 分析,每个样品一式两份(6,95 微升的10 倍稀释的cDNA),使用TaqMan PCR core 试剂(Applied Biosystems)和ABI PRISM® 7900HT 序列检测系统(Applied Biosystems)。

[0339] 使用CFD mRNA 和18S rRNA 的引物和FAM 标记的探针,检测CFD mRNA、ACTB mRNA 和18S rRNA 的表达水平。引物和探针以按需检测(Assays-on-Demand) (Applied Biosystems) 的方式订购。这些测定的探针序列如下:CFD (CCTGCTGCTACAGCTGTCGGAGAAG (Assay ID: Hs00157263_m1)), ACTB (CCTTTGCCGATCCGCCCGCCGTCCA (Assay ID: HsHs99999903_m1) 和18S rRNA (TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG ;assay Hs99999901_s1)。使用ABI Prism SDS 2.2 软件(Applied Biosystems) 分析数据,并将表达水平标准化至18S rRNA 或ACTB mRNA。

[0340] PCR 产物的可靠检测应在CFD 测定(ID: Hs00157263_m1) 中在循环(Ct- 值) 26 内可检测到,和18S rRNA 的检测(assay ID Hs99999901_s1) 应在Ct=12,5 时获得。还可通过以下进行标准化:通过计算 Δ -Ct 值,或通过使用稀释的质粒编码的CFD、ACTB 和18S 的标准曲线,和将定量测定的CFD 拷贝数与定量测定的ACTB 或18S 拷贝数相关联。

[0341] 在上文,正式基因符号标识用于分析的转录物。

实施例

[0342] 实施例 1- 预测性转录物的鉴定

在以下时间点自患者采集来自1b 期和2a 期试验的血液样品,所述试验检查抗IL-20 在类风湿性关节炎(RA) 患者中的安全性、耐受性和功效(临床试验政府识别号: NCT01038674 和 NCT01282255):在1b 期试验中给药前(第1 天)和给药后第8、15、29、43 和99 天,以及在2a 期试验中给药前(第1 天)和给药后第15、36 天。分别在6 周期间每周一次给予患者(总共7 剂)和在11 周期间每周一次给予患者(总共12 剂)。

[0343] 如上所述地获取总RNA。在球蛋白mRNA 减少和RNA 完整性证实后,按照上述程序通过AffyMetrix GeneChip 杂交,分析RNA 样品。

[0344] 为了在全血PaxGene 样品中鉴定转录物(其与在DAS28-CRP 和其它疾病评分测定

例如 ACR20、ACR50 和 ACR70 中的变化相关),我们对来自单个患者的表达谱进行了回归分析,所述患者纳入 1b 和 2a 期试验,所述试验检查抗 IL20 抗体在 RA 患者中的功效。根据主要在给药前(基线)和在第 8、15、29、36 和 43 天得到的样品,选择随时间表现出相对稳定性并因此合适作为给药前层化标记的转录物。

[0345] 还进行了将所获微阵列数据点与临床功效关联的多变量方法。通过使用偏最小二乘(PLS)推测潜在结构,鉴定用于在接受抗 IL20 的单个患者中预测临床效果的转录物的最佳组合。经鉴定的 PLS 模型通过排列检验(将观察数据与预测数据间相关性的 R^2 -系数从 0.8 降至 0.1)而得以交叉验证。这表明 PLS 模型是有效的而非不适合的(over-fitted)。使用任何多变量分析软件工具(Like Simca-P +11 (Umetrics) 或 Unscrambler (CAMO 软件 AS, Oslo, Norway) 可以进行基于 PLS 的预测。首先使用来自 AffyMetrix 微阵列的 18954 数据点,进行多变量预测。一组 14 种预测性转录物的实例示于图 2。

[0346] 基于多变量的预测模型中的目标基因是补体因子 D(CFD),也称为 Adipsin。RA 患者中的 CFD 转录物水平见图 3。单个患者中的 mRNA 表达水平是随时间而稳定的,但患者之间具有明显差异。具有最低水平的 CFD mRNA 的患者与具有最高水平的患者之间的差异为大约 8 倍。

[0347] 如图 1 所示,在单变量回归分析中,CFD 也在阳性相关的转录物中。同时,这些发现促使对 CFD 作为高反应预测物在给予抗 IL20 抗体的 RA-患者中的有用性的检查。这通过制备接受者操作特征(ROC)曲线来完成,见图 4 (ACR50 反应)和图 5 (ACR70 反应)。发现 ACR50 反应的曲线下面积(AUC)为 0,81 ($p=0,00068$),指示基于 CFD mRNA 水平的 ACR50 反应的良好预测。

[0348] 为了测试 CFD mRNA 在抗 IL20 RA-试验中是否是高反应的预测物,在 ACR50 反应者和无反应者、以及对 ACR70 反应者和无反应者定义了患者的最佳分类的阈值。使用得自在第 1 天(给药前)和在给药后第 15 和 36 天采集的 4 个样品的平均 CFD-mRNA 水平进行这样的定义。如前所述,在这些访问中发现 CFD mRNA 水平是随时间而稳定的。对于 ACR50 分类,发现 CFD mRNA 阈值为 10.32 (RMA 标准化 AffyMetrix 微阵列水平的 \log_2 标度)(在图 4 中通过 X 表示)。

[0349] 当在 2a 期试验数据中在给予抗 IL20 抗体的 RA 患者中使用该阈值(10.32 或以上)时,发现 ACR50 反应率从 37% 明显增加至 65% (图 7)。当使用 10.32 或以上的入选阈值时,将包括大约半数的纳入 2a 期试验中的患者。同样对于 ACR70 反应,发现在给药的 RA 患者中的阈值 10.32 将反应率从 25% 增加至 45%。当使用阈值 10.32 时的反应率的改进(enrichment)示于图 7。

[0350] 在 2a 期试验的给予安慰剂的个体中,CFD mRNA 水平为 10.32 或以上的患者的 ACR50 反应率是 17%,相比之下,CFD mRNA 水平低于 10.32 的患者的反应率为 11%。对于 ACR70,CFD mRNA 水平为 10.32 或以上的给予安慰剂的患者的反应率为 8%,相比之下,CFD mRNA 水平低于 10.32 的患者的反应率为 0%。

[0351] 基于以上分析,结论是 CFD mRNA 水平是在 RA 患者中针对抗 IL-20 的高反应的良好预测物,和如果仅包括 CFD mRNA 水平为 10.32 或以上的 RA 患者时,可获得尤其 ACR50 和 ACR70 反应的明显增加。

[0352] 实施例 2 - qRT-PCR 与阵列数据的关联

为了检测单用 CFD mRNA 基线（给药前）测定是否与来自在微阵列分析中评价的不同时间点的 CFD mRNA 水平关联，在可用的给药前样品上对 CFD mRNA 进行 qRT-PCR，并且将这些与来自微阵列的记录的 CFD 水平关联。如上所述地进行定量 RT-PCR 分析和自每个 cDNA 样品的重复分析获得数据。将来自 qRT-PCR 平台的 CFD mRNA 水平标准化到也通过 qRT-PCR 检测的 18S rRNA 水平。为了将微阵列水平与 qRT-PCR 水平关联，将 RNA 标准化的微阵列水平转化到线性尺度。如图 6 所示，在基线的 qRT-PCR 测定和来自若干访问的微阵列测定之间发现高度关联 ($R^2 = 0.86$)。这表明在基线（给药前）的基于 CFD 的 RA- 患者层化是可行的，因为图 1 和图 2 中所述的其它预测性转录物例如 CFD 经鉴定不仅与基线样品关联，而且与 2a 期试验中的若干时间点关联，这些也被选择以展示随时间的稳定性（正如在图 6 中通过 CFD 的相关性所示例）。本文所述的转录物因此特别适合于高度反应的患者的给药前预测性层化。

[0353] 为了获得基于 qRT-PCR 数据的层化（类似使用微阵列数据用阈值 10.32 而得到的层化），在 CFD 测定 (ID: Hs00157263_m1) 中 PCR 产物应在循环 (Ct- 值) 26 内检测到，和 18S rRNA 的检测 (assay Hs99999901_s1) 应在 Ct=12.5 时获得。这些值相当于根据来自单个患者的样品而估计的在微阵列值的 RMA 标度上的大约 10.25，其中两次阵列检测接近 10.32，平均为 10.24。使用 qRT-PCR 测定，在该患者中的 CFD 的检测用 Ct- 值 26 得到，和 18S 对照的 Ct 值为 12.5。

[0354] 还可能通过 qRT-PCR 测定补体因子 D (CFD) 的表达水平，其中使用 CFD 的 Assay ID: Hs00157263_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen) 和 ACTB 的 Assay ID: Hs99999903_m1 (Applied Biosystems/ Invitrogen)，对于改善的反应的阈值是至少 0.04 个 CFD 拷贝 / β -肌动蛋白拷贝的绝对数。

[0355] 实施例 3 - 在 PaxGene 样品中 CFD mRNA 水平的疾病关联性

为了评价 RA 患者的外周血中的 CFD 水平是否可与局部关节中的相关活性标记相关联，采集成对的 PaxGene（全血）和滑液样品。补体因子 D 在替代补体途径活化中是起始的丝氨酸蛋白酶，并切割与因子 B 络合的 C3b 为 C3bBb 和 Ba。C3bBb 是 C3 转化酶，将其切割其它 C3 分子为 C3a 和 C3b。因为 Bb 分子对于替代补体活化是独特的，Bb 蛋白水平用作该途径的活性标记。有力证据支持经典和替代补体活化两者参与类风湿性关节炎的病理生理学。

[0356] 按照试剂盒方案准备 Bb plus EIA (MicroVue cat# A027) 测定（测定人血浆或血清中补体片段 Bb 的量的一种测定法）。

[0357] 将洗涤缓冲液 (x20) 在去离子水中稀释。将 1% HBR1（一种嗜异染封闭试剂 (HBR1) 18,42mg/ml, 来自 Scantibodies Lab. Part 3KC533) 加入到保湿试剂，并将 1% HBR 加入到补体标本稀释剂 (80 μ l HBR1 + 7,92ml)。将重配的标准和对照在 1ml 保湿试剂 / HBR1 中稀释并静置 15min。将样品在补体标本稀释剂 +1% HBR1 中稀释 10 倍 (45 μ l+405 μ l) 和 20 倍 (22 μ l+418 μ l)。

[0358] 将样品预洗涤 3 次并与 100 μ l 标准孵育 30 min，洗涤 5 次，与 50 μ l 缀合物孵育 30 min，洗涤 5 次，与 100 μ l 底物孵育 15 min，最后用 100 μ l 终止液终止。

[0359] 通过 ELISA 阅读器测定吸光度，将阅读器设置在 450 nm (ref 在 600-690nm)，用线性曲线拟合。

[0360] 通过使用 MicroVue Bb Plus EIA 测定和 HBR1，我们能够在 RA 患者滑液中测定 Bb

水平。当将这些水平针对来自同一患者的成对 PaxGene 样品中的 CFD mRNA 水平作图时,发现显著相关,如图 8 所示。

[0361] 该发现证明,来自 RA 患者的全血中的 CFD mRNA 水平指示在局部关节中的替代补体途径的活化状态。

[0362] 因为来自 RA 患者的全血中的 CFD mRNA 水平与局部关节中的替代补体途径的活化状态相关 (PaxGene 样品中的 CFD mRNA 与成对滑液水平中的 Bb 水平之间相关),吸引人的是推测来自 RA 患者的 PaxGene 样品中的 CFD mRNA 水平还可能是靶向补体活化的治疗的预测物。

[0363] 实施例 4 - 使用单核苷酸多态性 (SNP) 的分析

作为检测 PaxGene 样品中的 CFD mRNA 水平的替代方法,对 CFD 单倍体块中的某些单核苷酸多态性 (SNP) 的分析可提供预测反应的便利方法。在 PaxGene 和其它样品中的 CFD mRNA 的双峰分布清楚表明遗传多态性可能是 CFD mRNA 表达模式的基础解释。本领域技术人员可以对 CFD 进行表达数量特征基因座 (eQTL) 分析,并鉴定 SNP 与 CFD 表达水平的相关性或关联。显示与 CFD 及其邻近基因的单倍体块中的 CFD mRNA 表达水平强烈相关的 SNP 的实例具有身份 rs1683565。可以通过多种不同方法进行该 SNP 或显示与 rs1683565 强烈连锁不平衡的其它 SNP 的测定,所述方法包括但不限于,基于杂交的方法 (例如 SNP 微阵列) 和基于酶的方法 (例如 PCR 和限制性片断长度多态性方法)。显示与 rs1683565 强烈连锁不平衡的其它 SNP 包括但不限于具有以下身份的 SNP :rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898。

[0364] 作为实例,SNP rs1683591 提供 AA、AG 或 GG 基因型。基于与 CFD 表达的关联,AA 基因型对应于低 CFD 表达 (具有相对低的反应率),而 AG 和 GG 基因型对应于更高水平的 CFD 表达和因此对抗炎药的反应具有高的可能性。

[0365] 可通过许多充分描述的方法,检测上述 SNP、它们的组合或显示与上述 SNP (rs1683565、rs1683591、rs1683590、rs1683569、rs1683574、rs1651888、rs2930894、rs2930891、rs4417648、rs1651891、rs1651890 和 rs2930898) 强烈连锁不平衡的其它 SNP,所述方法包括但不限于基于杂交的方法 (例如 SNP 微阵列) 和基于酶的方法 (例如 PCR 和限制性片断长度多态性方法)。

[0366] 在一个实例中,从患者中采集血液样品,和按照制造商说明书,通过试剂 DNAzol® (Becton Dickinson) 分离基因组 DNA。简而言之,通过涡旋或手工混合,将 1 ml DNAzol® 与 0.5 ml 全血混合。通过将 0.4 ml 异丙醇加入到 DNAzol® BD- 血液裂解物中,从样品中沉淀 DNA。将所得混合物涡旋并将其在室温下存放 5 min。通过在 6,000 × g 离心 6 min 将沉淀的 DNA 离心下来。去除上清液并将 0.5 ml DNAzol 加入到 DNA 沉淀物中。涡旋或振摇 DNA 沉淀物,直到完全溶解。将所得混合物在 6,000 × g 离心 5 min。然后,去除上清液和通过与 1 ml 75% 乙醇混合而洗涤 DNA 沉淀物,然后在 6,000 × g 离心 5 min。去除乙醇,无需干燥,向 DNA 沉淀物中加入 200 μl 8 mM NaOH 并通过在室温下温育 3-5 min,然后涡旋震荡,使 DNA 溶解。将碱性 DNA 溶液用 0.1 M HEPES 中和。从分离的 DNA 中,制备具有特异性测定所需 SNP 的定量聚合酶链式反应 (qPCR)。qPCR 设置可以根据经设计用于特异性检测所需 SNP 的 TaqMan 探针。作为实例,将通过

任何探针和 / 或引物组合来检测具有身份 rs1683565 的 SNP, 所述组合可以区分以下序列: AGAGCCCAAAGCTCATGGAAAAGAG [A/G] ATATGAAAGGAGTCCCTGCAGTAGA。这可通过来自 Invitrogen 的市售的测定 (目录号: 4351379 ID: C__9612061_10) 而进行。在另一实例中, 将通过任何探针和 / 或引物组合来检测具有身份 rs1683591 的 SNP, 所述组合可以区分以下序列: TCTGTCCACAGGCGGGGTGGAGGG [A/G] ATGGCCGGCCTCACACCATCTGCCA。这可通过来自 Invitrogen 的市售的测定 (目录号: 4351379 ID: C__9612100_10) 而进行。在第三个实例中, 将通过任何探针和 / 或引物组合来检测具有身份 rs1683590 的 SNP, 所述组合可以区分以下序列: AATATCTGAAATTTTCCCAGTTTAC [A/G] AGCCTCTGACGTAACCGTCCTCTCT。这可通过来自 Invitrogen 的市售的测定 (目录号 4351379 ID: C__3153459_10) 而进行。对于 TaqMan® 基因分型测定, 你必须在每个反应孔中添加相当于 1-10 ng 的 DNA 模板。为了定量测定基因组 DNA, 使用可靠方法例如 A260 测定。如制造商所述, 通过旋转瓶子而彻底混合 TaqMan® GTXpress™ Master Mix (Invitrogen (目录号 4403311)) 并与 TaqMan® 基因分型测定和基因组 DNA 模板混合。在可兼容的 PCR 仪器 (例如 ABI PRISM® 7900HT 序列检测系统, 具有 FAST 组件) 中进行 PCR 达 40 循环 (首先 95°C 20 秒, 然后 40 循环与引物退火并在 60°C 延伸 20 秒, 然后在 95°C 变性 3 秒。PCR 扩增后, 你在实时 PCR 上进行终点读板。使用来自 Invitrogen 的 SDS 软件, 其使用读板期间进行的来自各孔的荧光测定, 然后对信号值作图。所述软件确定哪个等位基因在各孔样品中, 用于随后的等位基因区别分析。

[0001]

序列表

- <110> Novo Nordisk A/S
 Frederiksen, Klaus S.
- <120> 治疗炎性疾病和病症的相关方法
- <130> 8452.204-W0
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> CFD 探针
- <400> 1
 cctgctgcta cagctgtcgg agaag 25
- <210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 18S rRNA 探针
- <400> 2
 tggagggcaa gtetggtgce agcag 25
- <210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成序列

[0002]

<220>

<221> 变化

<222> (26)..(26)

<223> n 是 A 或 G

<220>

<221> 其它特征

<222> (26)..(26)

<223> n 是 a, c, g 或 t

<400> 3

agagcccaaa gctcatggaa aagagnatat gaaaggagtc cctgcagtag a

51

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> 变化

<222> (26)..(26)

<223> n 是 A 或 G

<220>

<221> 其它特征

<222> (26)..(26)

<223> n 是 a, c, g 或 t

<400> 4

tctgtccaca ggcgggggtg gaggnatgg ccggcctcac accatctgcc a

51

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> 变化

<222> (26).. (26)

<223> n 是 A 或 G

<220>

<221> 其它特征

<222> (26).. (26)

<223> n 是 a, c, g 或 t

<400> 5

aatatctgaa attttcccag ttacnagcc tctgacgtaa ccgtcctetc t

51

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 6

cccttgccga tccgcccgcc gtcca

25

表 1A

Ensembl ID	基因名称	基因
ENSG00000197766	补体因子 D (adipsin)	CFD
ENSG00000165424	锌指, CCHC 域含有 24	ZCCHC24
ENSG00000170542	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵清蛋白), 成员 9	SERPINB9
ENSG00000167608	跨膜通道-样 4	TMC4
ENSG00000142733	有丝分裂原-活化蛋白激酶激酶激酶 6	MAP3K6
ENSG00000162924	v-reticuloendotheliosis 病毒癌基因同源物(鸟类)	REL
ENSG00000156414	Tudor 域含有 9	TDRD9
ENSG00000011454	RAB GTP 酶活化蛋白 1	RABGAP1
ENSG00000100106	TRIO 和 F-肌动蛋白结合蛋白	TRIOBP
ENSG00000153094	BCL2-样 11 (细胞凋亡促进剂)	BCL2L11
ENSG00000133195	溶质载体家族 39 (金属离子转运蛋白), 成员 11	SLC39A11
ENSG00000226747	NA	NA
ENSG00000137267	微管蛋白, β 2A	TUBB2A
ENSG00000122692	Mec-8 和 unc-52 同源物的 Smu-1 阻遏蛋白(C. elegans)	SMU1
ENSG00000147526	转化, 酸性卷曲螺旋含有蛋白 1	TACC1
ENSG00000183570	聚(rC)结合蛋白 3	PCBP3
ENSG00000171853	三十四肽重复域 15	TTC15
ENSG00000053254	叉头框 N3	FOXN3
ENSG00000106012	IQ 基序含有 E	IQCE
ENSG00000198624	卷曲螺旋域含有 69	CCDC69
ENSG00000168038	Unc-51-样激酶 4 (C. elegans)	ULK4
ENSG00000171812	胶原, VIII 型, α 2	COL8A2
ENSG00000131187	凝血因子 XII (Hageman 因子)	F12
ENSG00000130304	溶质载体家族 27 (脂肪酸转运蛋白), 成员 1	SLC27A1
ENSG00000196436	核孔复合物相互作用蛋白-样 2	NPIPL2
ENSG00000139218	剪接因子, 富含精氨酸/丝氨酸 2, 相互作用蛋白	SFRS2IP
ENSG00000181982	卷曲螺旋域含有 149	CCDC149
ENSG00000100014	Cytospin A	CYTSA
ENSG00000008083	Jumonji, 富含 AT 相互作用域 2	JARID2
ENSG00000169919	葡萄糖醛酸酶, β	GUSB
ENSG00000112367	FIG4 同源物, SAC1 脂质磷酸酶域含有(酿酒酵母)	FIG4
ENSG00000071246	血管抑制蛋白 1	VASH1

图 1

表 1B

Ensembl ID	基因名称	基因
ENSG00000141560	果糖胺 3 激酶相关蛋白	FN3KRP
ENSG00000005102	间质同源框 1	MEOX1
ENSG00000161980	聚合酶(RNA)III (DNA 指导)多肽 K, 12.3kDa	POLR3K
ENSG00000129682	成纤维细胞生长因子 13	FGF13
ENSG00000204856	不典型蛋白 C12orf24	C12orf24
ENSG00000127995	CAS1 域含有 1	CASD1
ENSG00000183172	UPF0466 蛋白 C22orf32, 线粒体前体	C22orf32
ENSG00000101255	Tribbles 同源物 3 (果蝇)	TRIB3
ENSG00000172687	锌指蛋白 738	ZNF738
ENSG00000143353	溶血磷脂酶-样 1	LYPLAL1
ENSG00000186462	核小体装配蛋白 1-样 2	NAP1L2
ENSG00000174136	RGM 域家族, 成员 B	RGMB
ENSG00000103995	中心体蛋白 152kDa	CEP152
ENSG00000221923	锌指蛋白 880	ZNF880
ENSG00000164930	Frizzled 同源物 6 (果蝇)	FZD6
ENSG00000106341	G-底物	C7orf16
ENSG00000231369	NA	NA
ENSG00000115446	Unc-50 同源物(C. elegans)	UNC50
ENSG00000179941	Bardet-Biedl 综合征 10	BBS10
ENSG00000133731	肌醇 (肌肉) -1 (或 4) -单磷酸酶 1	IMPA1
ENSG00000117748	复制蛋白 A2, 32kDa	RPA2
ENSG00000106460	跨膜蛋白 106B	TMEM106B
ENSG00000155970	NA	NA
ENSG00000173041	锌指蛋白 680	ZNF680
ENSG00000197776	Kelch 域含有 1	KLHDC1
ENSG00000147138	G 蛋白偶联受体 174	GPR174
ENSG00000169507	溶质载体家族 38, 成员 11	SLC38A11
ENSG00000163811	WD 重复域 43	WDR43
ENSG00000155100	OTU 域含有 6B	OTUD6B
ENSG00000145331	RNA (鸟嘌呤-9-) 甲基转移酶域含有 2	RG9MTD2
ENSG00000107669	精氨酸转移酶 1	ATE1
ENSG00000106392	核心 1 合成酶, 糖蛋白-N-乙酰半乳糖胺 3-β-半乳糖基转移酶 1	C1GALT1
ENSG00000074935	微管蛋白, ε 1	TUBE1
ENSG00000111328	细胞周期蛋白-依赖性激酶 2 相关蛋白 1	CDK2AP1
ENSG00000134884	富含精氨酸和谷氨酸 1	ARGLU1
ENSG00000101751	聚合酶 (DNA 指导) iota	POLI
ENSG00000197056	锌指, MYM-型 1	ZMYM1
ENSG00000198039	锌指蛋白 273	ZNF273
ENSG00000117155	滑膜肉瘤, X 断裂点 2 相互作用蛋白	SSX2IP
ENSG00000197888	UDP glucuronosyl 转移酶 2 家族, 多肽 B17	UGT2B17
ENSG00000069712	KIAA1107	KIAA1107
ENSG00000143674	有丝分裂原-活化蛋白激酶激酶激酶(EC	RP5-
	2.7.11.25)(混合谱系激酶 4)	862P8.2

图 1 (续)

表 2

Ensembl ID	基因名称	基因符号
ENSG00000011028	甘露糖受体, C 型 2	MRC2
ENSG00000103502	CDP-二酰基甘油-肌醇 3-磷脂酰转移酶	CDIPT
ENSG00000112294	醛脱氢酶 5 家族, 成员 A1	ALDH5A1
ENSG00000115758	鸟氨酸脱羧酶 1	ODC1
ENSG00000118777	ATP-结合盒, 亚家族 G (WHITE), 成员 2	ABCG2
ENSG00000133808	MICAL C-端样	MICALCL
ENSG00000140403	DnaJ (Hsp40)同源物, 亚家族 A, 成员 4	DNAJA4
ENSG00000143164	DDB1 和 CUL4 相关因子 6	DCAF6
ENSG00000161980	聚合酶(RNA)III(DNA 指导)多肽 K, 12.3kDa	POLR3K
ENSG00000167608	跨膜通道-样 4	TMC4
ENSG00000170542	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂,进化枝 B(卵清蛋白),成员 9	SERPINB9
ENSG00000171657	G 蛋白偶联受体 82	GPR82
ENSG00000197766	补体因子 D (adipsin)	CFD
ENSG00000204613	Tripartite 基序-含有蛋白 10 (RING 指蛋白 9) (B30-RING 指蛋白)	TRIM10

图 2

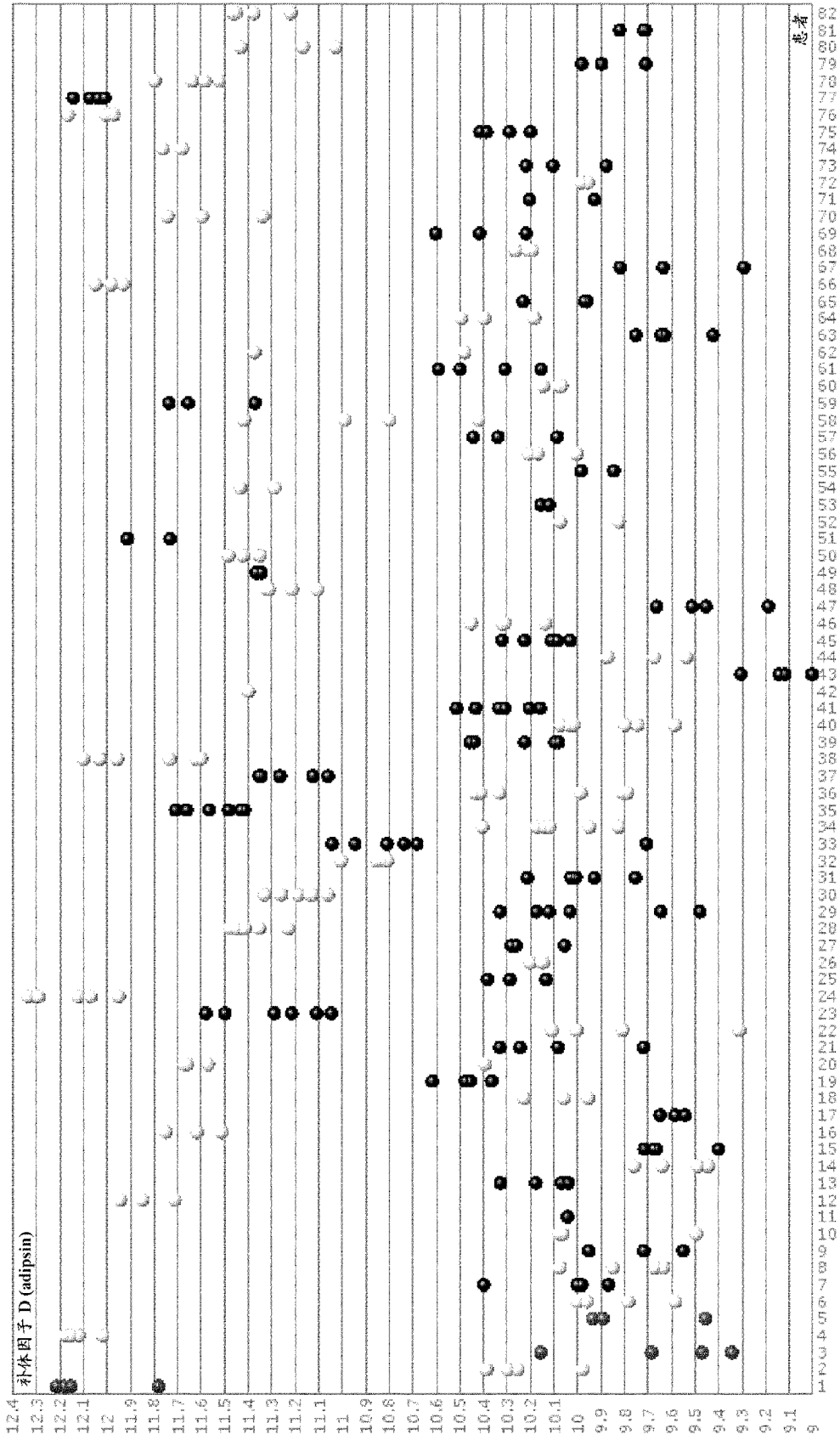


图 3

对于 ACR50, CFD mRNA 水平的 ROC (已给药的患者)

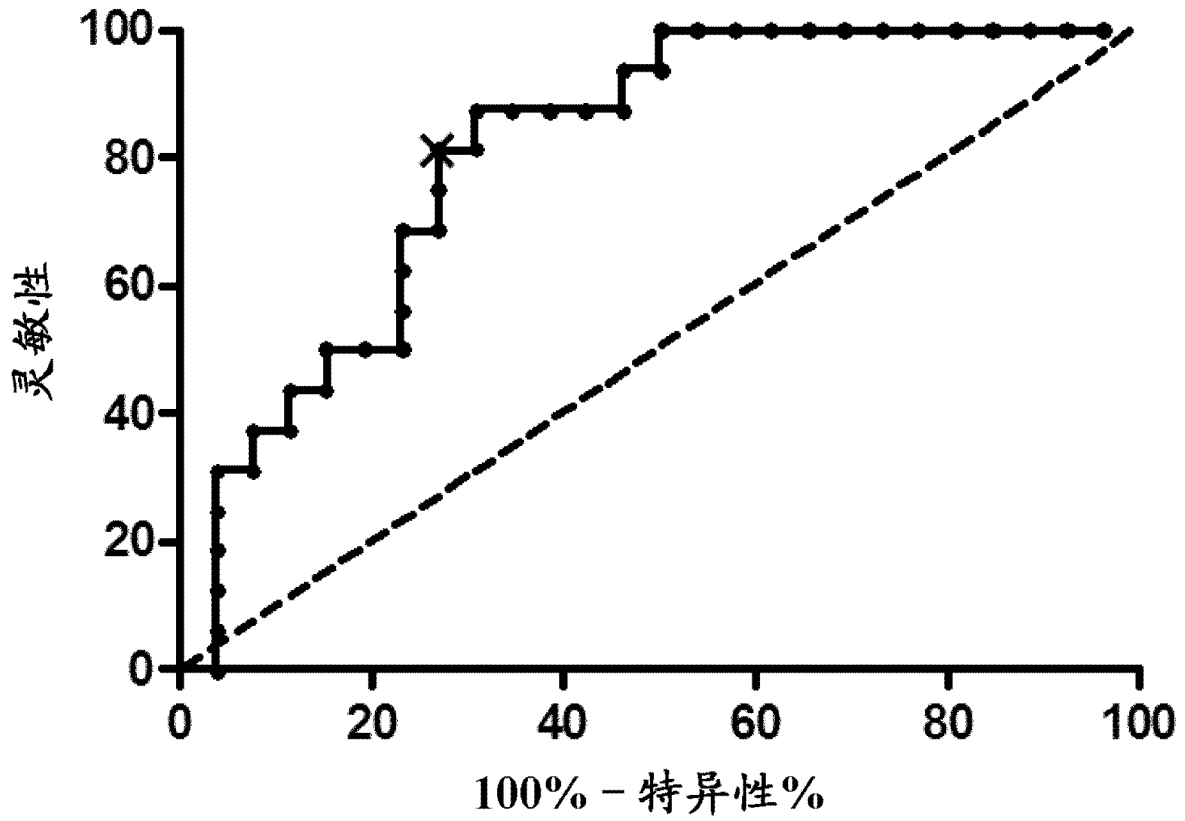


图 4

对于 ACR70, CFD mRNA 水平的 ROC (已给药的患者)

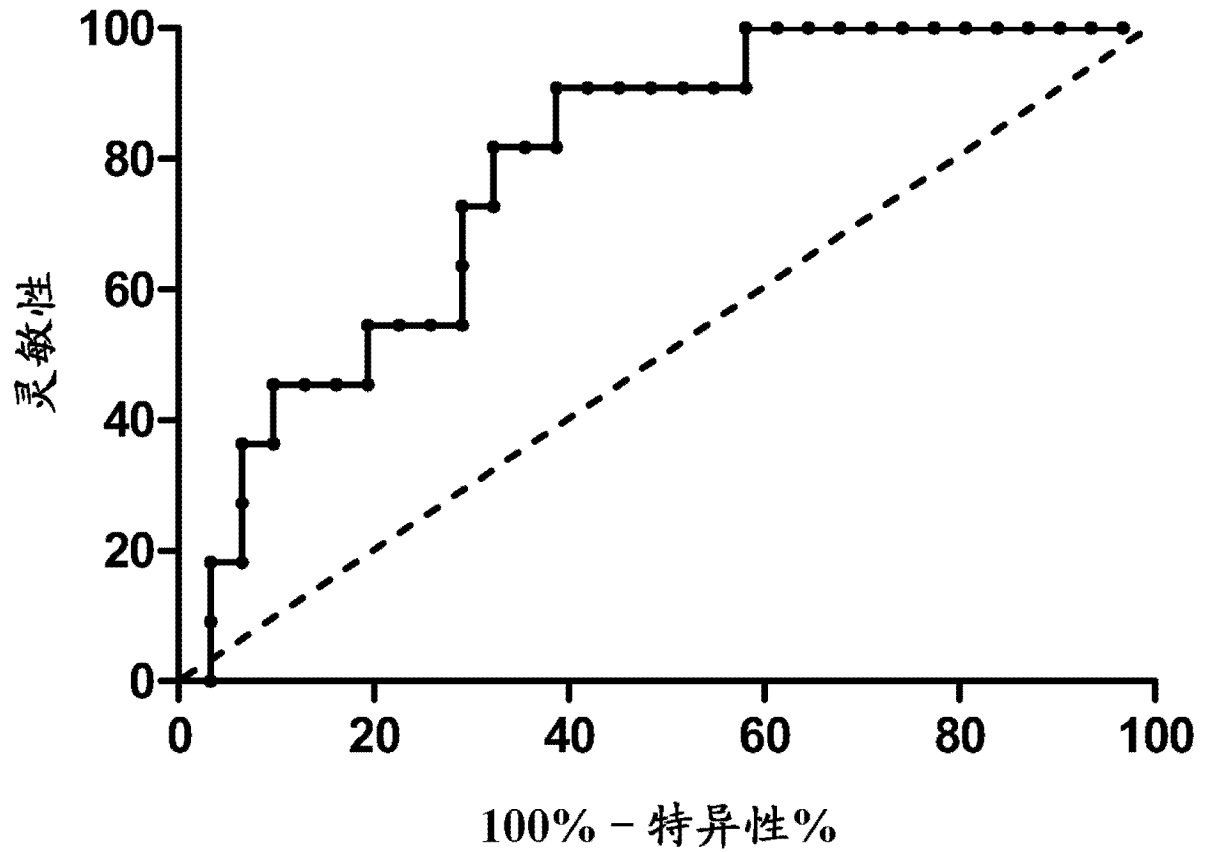


图 5

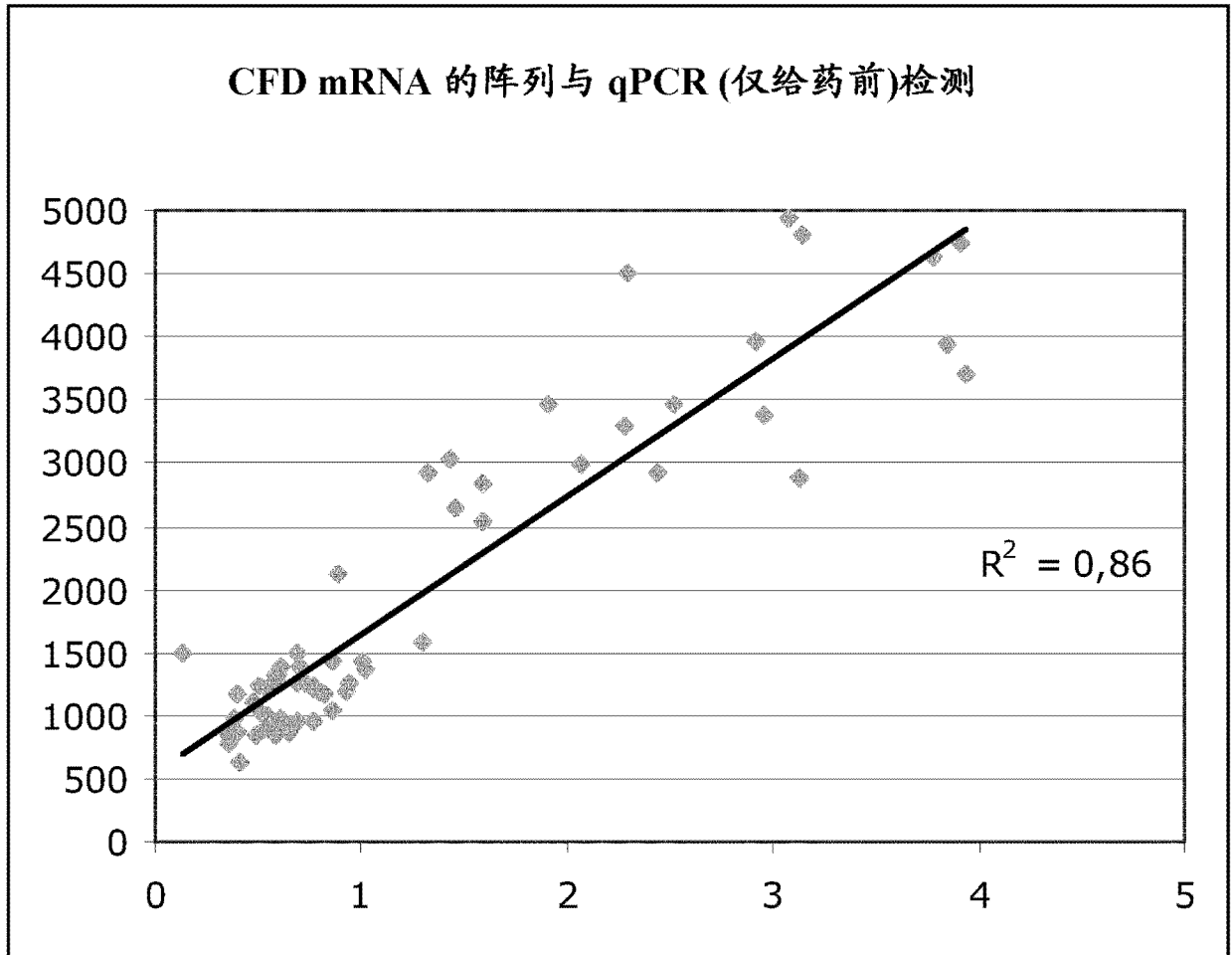


图 6

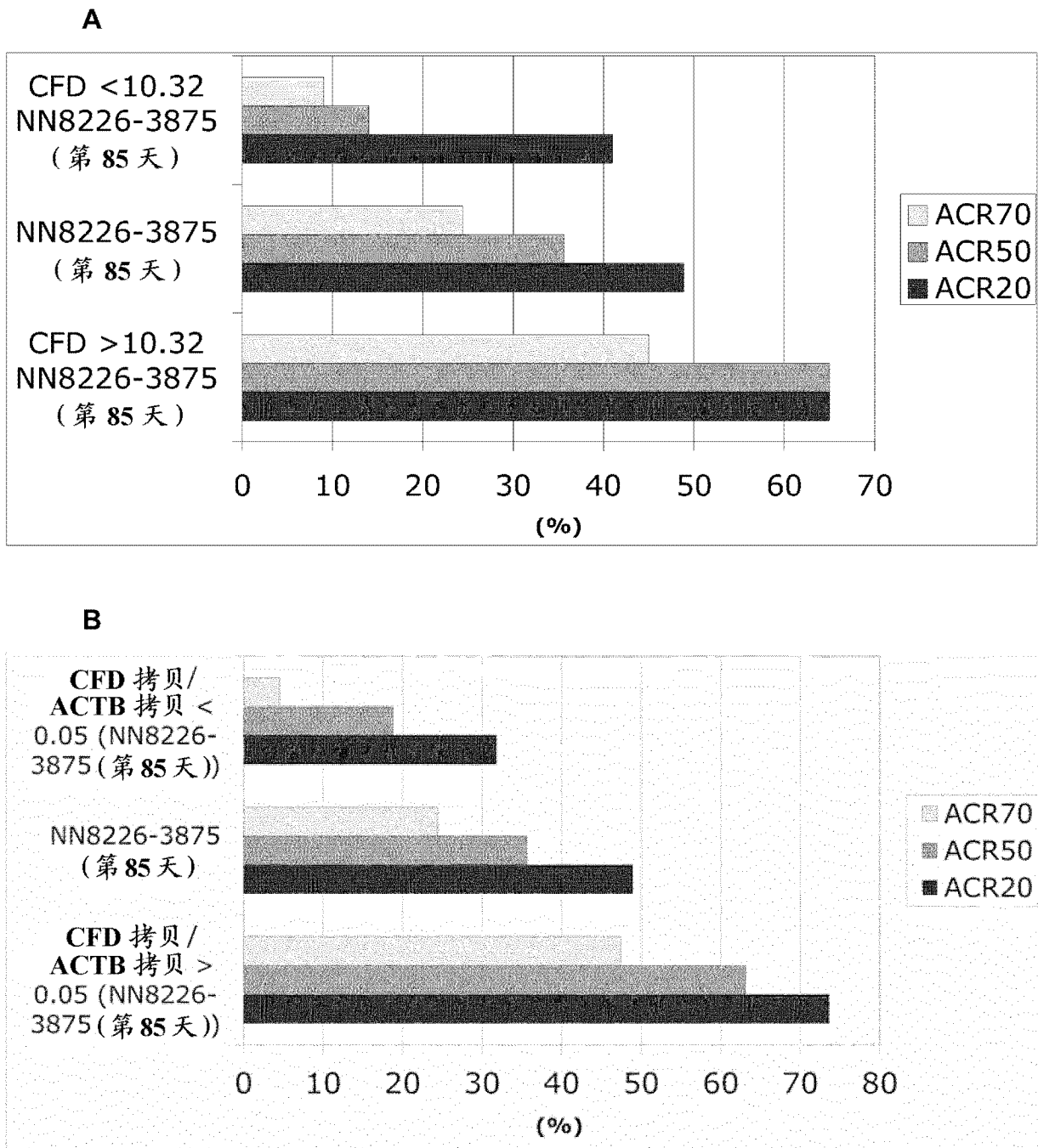


图 7

RA 患者 SF 中的 Bb 水平

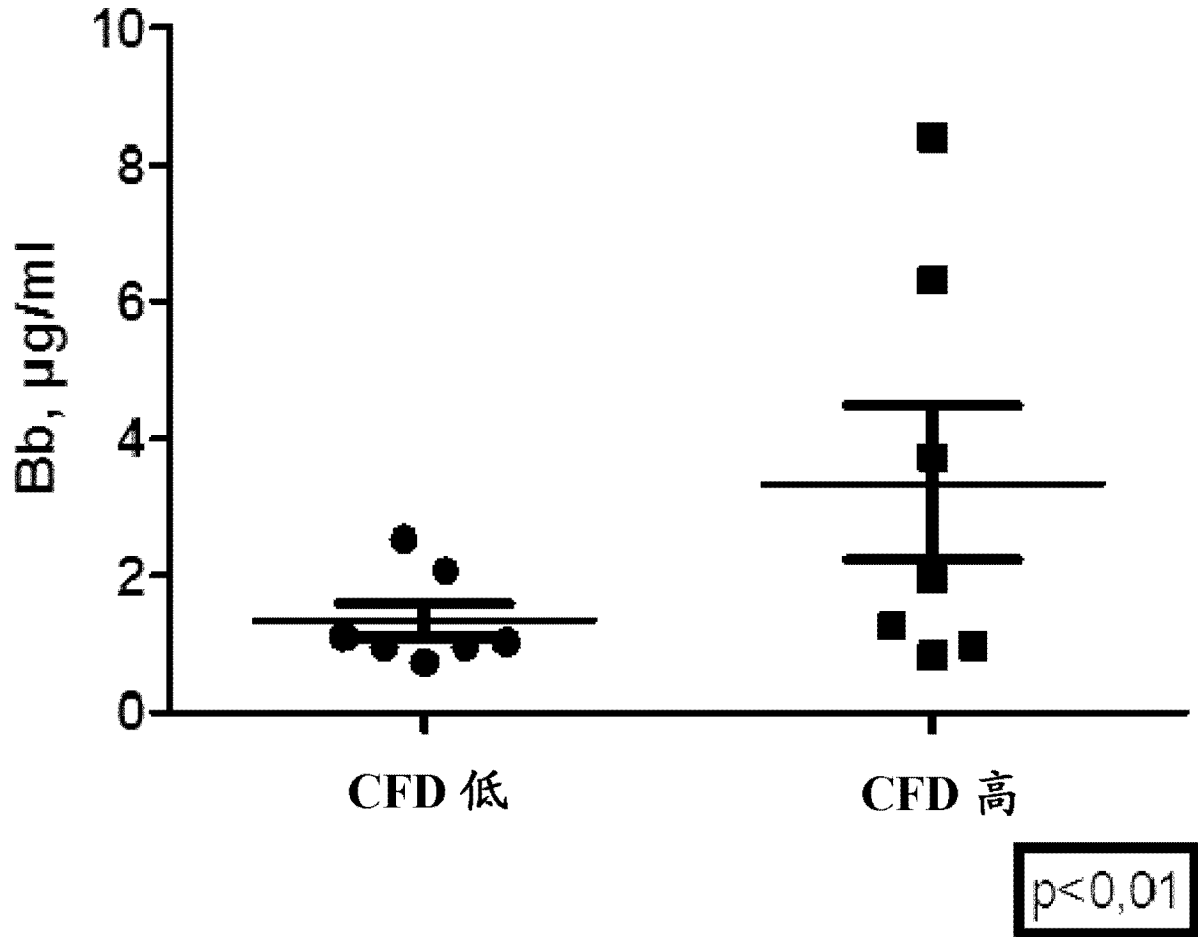


图 8

专利名称(译)	治疗炎性疾病和病症的相关方法		
公开(公告)号	CN104204230A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201380019432.0	申请日	2013-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
申请(专利权)人(译)	诺和诺德A/S(股份有限公司)		
当前申请(专利权)人(译)	诺和诺德A/S(股份有限公司)		
[标]发明人	K S 弗雷德里克森		
发明人	K.S.弗雷德里克森		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q1/6809 C07K16/244 C12Q2600/106 C12Q1/6883 C12Q1/6844		
代理人(译)	林森		
优先权	2012154917 2012-02-10 EP 61/597924 2012-02-13 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基因标记，所述标记与在患有炎性疾病或病症的患者中预测针对抗炎治疗的临床反应的方法相关。

