



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105829885 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480068827.4

(22)申请日 2014.10.16

(30)优先权数据

61/892,140 2013.10.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/060908 2014.10.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/057968 EN 2015.04.23

(71)申请人 综合医院公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D.L.富斯特曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 万雪松

(51)Int.Cl.

G01N 33/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书6页 说明书22页 附图4页

(54)发明名称

鉴定响应于用于自身免疫性疾病的治疗的受试者的方法以及用于治疗该疾病的组合物

(57)摘要

在此披露了将患有自身免疫性疾病诸如1型糖尿病的受试者鉴定为可能响应于使用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体II活化剂的治疗方法,这些方法涉及测量自体反应性CD8⁺ T细胞的表面上的CD8蛋白密度并且如果该CD8蛋白密度相对于一种参考CD8⁺ T细胞降低,则将该受试者鉴定为可能响应于该治疗。对于1型糖尿病,该方法可涉及测量来自该受试者的体外生物样品的C肽水平,如果该C肽水平是可检测的,则将该受试者鉴定为可能响应于该治疗,并且如果该C肽水平是基本上不可检测的则将该受试者鉴定为不太可能响应于该治疗。本发明还特征在于用于治疗性用途的一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物。

1. 一种确定患有自身免疫性疾病的受试者将响应于使用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体II(TNFR2)活化剂的治疗的可能性的方法,该方法包括:

(i)使包含来自所述受试者的CD8⁺T细胞群体的体外生物样品与包含TNFR2活化剂的组合物接触;并且

(ii)测量所述群体中自体反应性CD8⁺T细胞的表面上的CD8蛋白密度;

其中相对于参考CD8⁺T细胞,所述自体反应性CD8⁺T细胞的该表面上减小的CD8蛋白密度表明所述受试者可能响应于所述治疗。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述参考CD8⁺T细胞来自于来自患有自身免疫性疾病并且未使用TNFR2活化剂治疗或预治疗的受试者的参考样品。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述参考CD8⁺T细胞来自于来自健康受试者的参考样品。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中使用抗CD8抗体进行所述测量。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述抗体缀合至荧光染料。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述生物样品在所述接触前与达沙替尼一起温育。

7. 如权利要求6所述的方法,其中在所述接触前,所述生物样品与达沙替尼一起温育至少4小时。

8. 如权利要求7所述的方法,其中在所述接触前,所述生物样品与达沙替尼一起温育至多48小时。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自下组,该组由以下各项组成:I型糖尿病、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能减低症、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征、僵人综合征、德维克病、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿以及自身免疫性神经系统病症。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自下组,该组由以下各项组成:I型糖尿病、乳糜泻皮炎、克罗恩病、格雷夫斯病、功能减低症、狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、类肉瘤病、修格连氏综合征以及溃疡性结肠炎。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述自身免疫性神经系统病症是自身免疫介导的对神经元的损伤,即自身免疫性阿尔茨海默病、自身免疫性帕金森病或自身免疫介导的肌萎缩性侧索硬化症。

12. 一种确定患有1型糖尿病的受试者将响应于使用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体II (TNFR2)活化剂治疗的可能性的方法,所述方法包括使来自所述受试者的体外生物样品与能够检测所述样品中的C肽的装置接触,其中所述样品中可检测的C肽水平表明所述受试者可能响应于所述治疗,并且其中基本上不可检测的C肽水平表明所述受试者不太可能响应于所述治疗。

13. 如权利要求12所述的方法,其中基本上不可检测的所述C肽水平表明所述受试者应被排除在所述治疗之外。

14. 如权利要求12或13所述的方法,其中所述基本上不可检测的水平是小于约1.5pmol/L的C肽水平。

15. 如权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述基本上不可检测的水平是小于约1.0pmol/L的C肽水平。

16. 如权利要求12所述的方法,其中所述可检测的水平是大于约1.5pmol/L的C肽水平。

17. 如权利要求12至16中任一项所述的方法,其中如果所述C肽浓度在约1.5pmol/L至约4.0pmol/L的范围内,则所述受试者被鉴定为可能响应于所述治疗。

18. 如权利要求12至17中任一项所述的方法,其中所述接触在所述受试者的所述治疗之前进行。

19. 如权利要求12至18中任一项所述的方法,该方法进一步包括在开始所述治疗之前测量来自所述受试者的血液样品中的参考HbA1c水平。

20. 如权利要求18所述的方法,该方法进一步包括:

(i) 在所述治疗之后测量从所述受试者中提取的血液样品中的HbA1c水平,

(ii) 将所述HbA1c水平与所述参考HbA1c水平进行比较,并且

(iii) 如果所述HbA1c水平等于或大于所述参考HbA1c水平,则将所述受试者鉴定为需要使用所述一种或多种TNFR2活化剂的重复治疗。

21. 如权利要求20所述的方法,其中在所述治疗后至少6个月,从所述受试者中提取所述血液样品。

22. 如权利要求21所述的方法,其中在所述治疗后至少1年,从所述受试者中提取所述血液样品。

23. 如权利要求22所述的方法,其中在所述治疗后至少2年,从所述受试者中提取所述血液样品。

24. 如权利要求23所述的方法,其中在所述治疗后至少3年,从所述受试者中提取所述血液样品。

25. 如权利要求24所述的方法,其中在所述治疗后至少5年,从所述受试者中提取所述血液样品。

26. 如权利要求12至25中任一项所述的方法,其中所述接触包括:

(i) 使所述样品与在其表面上具有固定的捕获剂的所述装置接触,使得所述样品中的所述C肽结合所述固定的捕获剂;

(ii) 使所述表面与检测结合剂接触,使得所述C肽结合所述检测结合剂;并且

(iii) 使用所述检测结合剂测量所述样品中所述C肽的水平。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述检测结合剂包括过氧化物酶。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述测量包括使所述表面与包含过氧化氢和过氧化物酶底物的溶液接触。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述样品包括血液、血液组分或尿样品。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述血液组分是血清或血浆。

31. 如权利要求29所述的方法,其中所述样品包括尿。

32. 如权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述TNFR2活化剂选自下组,该组由以下各项组成:卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体II激动剂、TNF- α 突变蛋白、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素或恶液质素。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述TNFR2活化剂是BCG。

34. 如权利要求10所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是1型糖尿病,并且其中所述方法与权利要求12至33中任一项所述的一种或多种方法组合使用。

35. 一种包含一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物,该药用组合物用于治疗被诊断为可能响应于所述治疗的受试者中的自身免疫性疾病。

36. 如权利要求35所述的药用组合物,其中来自所述受试者的样品包含这样的T细胞群体:在暴露于TNFR2活化剂后,相对于来自参考受试者的样品中参考T细胞的表面上的CD8蛋白密度该T细胞群体在其表面上具有降低的CD8蛋白密度。

37. 如权利要求36所述的药用组合物,其中所述参考受试者是健康受试者。

38. 如权利要求36所述的药用组合物,其中所述参考受试者具有自身免疫性疾病并且未使用一种或多种TNFR2活化剂治疗或预防治疗。

39. 如权利要求35至38中任一项所述的药用组合物,其中所述自身免疫性疾病选自下组,该组由以下各项组成:1型糖尿病、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能减低症、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征、僵人综合征、德维克病、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿以及自身免疫性神经系统病症。

40. 如权利要求39所述的药用组合物,其中所述自身免疫性疾病选自下组,该组由以下各项组成:1型糖尿病、乳糜泻皮炎、克罗恩病、格雷夫斯病、功能减低症、狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、类肉瘤病、修格连氏综合征以及溃疡性结肠炎。

41. 如权利要求39所述的药用组合物,其中所述自身免疫性神经系统病症是自身免疫介导的对神经元的损伤,即自身免疫性阿尔茨海默病、自身免疫性帕金森病或自身免疫介

导的肌萎缩性侧索硬化症。

42. 如权利要求35至41中任一项所述的药用组合物,其中根据权利要求1至11中任一项所述的方法,所述受试者被鉴定为可能响应于所述治疗。

43. 一种包含一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物,该药用组合物在所述治疗前通过确定来自所述受试者的体外样品中的C肽水平而被鉴定为可能响应于所述治疗的受试者的1型糖尿病,其中基本上不可检测的C肽水平表明所述受试者不太可能响应于所述治疗,并且其中可检测的C肽水平表明所述受试者可能响应于所述治疗。

44. 如权利要求43所述的药用组合物,其中所述基本上不可检测的C肽水平表明所述受试者应被排除在所述治疗之外。

45. 如权利要求43或44所述的药用组合物,其中所述基本上不可检测的水平是小于1.5pmol/L的C肽水平。

46. 如权利要求43至44中任一项所述的药用组合物,其中所述可检测的水平是大于1.5pmol/L的C肽水平。

47. 如权利要求43至46中任一项所述的药用组合物,其中如果来自所述受试者的尿样品表现出小于约4.0pmol/mmol的C肽与肌酐比率,则将所述受试者排除在所述治疗之外。

48. 如权利要求43至46中任一项所述的药用组合物,其中如果来自所述受试者的尿样品表现出大于或等于约4.0pmol/mmol的C肽与肌酐比率,则将所述受试者鉴定为可能响应于所述治疗。

49. 如权利要求43至46中任一项所述的药用组合物,其中根据权利要求11至33中任一项所述的方法,所述受试者被鉴定为可能响应于所述治疗。

50. 如权利要求43至46中任一项所述的药用组合物,该药用组合物特征在于在给予所述组合物后约4年内,所述受试者的HbA1c水平减少了至少0.1%。

51. 如权利要求50所述的药用组合物,该药用组合物特征在于在给予所述组合物后约3年内,所述受试者的HbA1c水平减少了至少0.1%。

52. 如权利要求43至49中任一项所述的药用组合物,其中所述组合物用于对所述受试者的1型糖尿病进行第二次或后续次数的治疗,其中所述受试者中的HbA1c水平相对于先前治疗之前所述受试者中的HbA1c水平增加或保持不变。

53. 如权利要求52所述的药用组合物,其中根据权利要求20至25中任一项所述的方法,所述受试者被鉴定为需要使用一种或多种TNFR2活化剂的重复治疗。

54. 如权利要求35至53中任一项所述的药用组合物,其中所述受试者是人类。

55. 如权利要求35至54中任一项所述的药用组合物,其中所述受试者是长期糖尿病患者。

56. 如权利要求35至55中任一项所述的药用组合物,其中所述一种或多种TNFR2活化剂选自下组,该组由以下各项组成:卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体II激动剂、TNF- α 突变蛋白、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素或恶液质素。

57. 如权利要求56所述的药用组合物,其中所述一种或多种TNFR2活化剂是BCG。

58. 如权利要求57所述的药用组合物,其中所述组合物包含大于 2×10^6 CFU/剂量的BCG。

59. 如权利要求57或58所述的药用组合物,其中所述组合物包含大于 2.3×10^6 CFU/剂量

的BCG。

60. 如权利要求57至59中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物包含小于 4×10^6 CFU/剂量的BCG。

61. 如权利要求57至60中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物包含冻干的BCG。

62. 如权利要求57至61中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物包含BCG的盐溶液。

63. 如权利要求56至62中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物向所述受试者给予一次或多次。

64. 如权利要求63所述的药用组合物, 其中所述组合物向所述受试者给予两次或更多次。

65. 如权利要求63或64所述的药用组合物, 其中所述组合物向所述受试者给予两次。

66. 如权利要求64或65所述的药用组合物, 其中所述组合物的所述给予的至少两次间隔至少两周。

67. 如权利要求64至66中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物的所述给予的至少两次间隔至少四周。

68. 如权利要求37至67中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物被配制成通过选自下组的路径来给予, 该组由以下各项组成: 皮内、肌内、胃肠外、静脉内、动脉内、颅内、皮下、眼眶内、脑室内、脊柱内、腹膜内以及鼻内。

69. 如权利要求68所述的药用组合物, 其中所述组合物被配制成用于皮内给予。

70. 如权利要求35至69中任一项所述的药用组合物, 其中所述组合物被配制成用于盐溶液形式的给予。

71. 如权利要求70所述的药用组合物, 其中所述溶液具有小于约0.2cc/剂量的体积。

72. 如权利要求71所述的药用组合物, 其中所述溶液具有0.1cc/剂量的体积。

73. 如权利要求35至72中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物被配置成用于两种或更多种TNFR2活化剂的单独给予。

74. 如权利要求35至73中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物被配置成用于两种或更多种TNFR2活化剂的组合给予。

75. 如权利要求35至74中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物特征在于所述组合物能够诱导所述受试者中的TNF- α 的表达。

76. 如权利要求35至75中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物特征在于所述组合物能够诱导所述受试者的自体反应性免疫细胞中NF- κ B通路的活化。

77. 如权利要求76所述的药用组合物, 其中所述自体反应性免疫细胞是自体反应性CD8⁺T细胞。

78. 如权利要求35至75中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物特征在于所述组合物引起所述受试者中自体反应性免疫细胞的死亡。

79. 如权利要求35至78中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物特征在于所述组合物引起所述受试者中调节性T细胞的扩增。

80. 如权利要求79所述的药用组合物, 其中所述调节性T细胞是调节性CD4⁺T细胞。

81. 如权利要求35至80中任一项所述的药用组合物, 该药物组合物特征在于所述组合

物预防所述受试者中由高血糖症引起的并发症。

82. 如权利要求81所述的药用组合物,其中由高血糖症引起的所述并发症选自下组,该组由以下组成:肾损伤、神经系统损伤、心血管损伤、视网膜损伤、脚损伤、腿损伤、心脏损伤以及酮酸中毒。

83. 如权利要求35至82中任一项所述的药用组合物,其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

鉴定响应于用于自身免疫性疾病的治疗的受试者的方法以及 用于治疗该疾病的组合物

技术领域

[0001] 大体上,本发明涉及鉴定可能响应于使用TNF- α 受体II活化剂的治疗的患有自身免疫性疾病的受试者的方法以及治疗被鉴定为可能响应于该治疗的受试者的方法。本发明还提供用于治疗被确定为不太可能响应于单独TNF- α 受体II活化剂治疗的受试者的方法。

背景技术

[0002] 认为自身免疫性疾病涉及对在常规条件下未观察到的身体自身组分的免疫应答,该免疫应答导致引起不同组织病症和/或功能性病症的病理状态。自身免疫性疾病根据它们的特征被广泛地归类为系统性自身免疫性疾病和器官特异性自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的例子包括胰岛素依赖性糖尿病(又称1型糖尿病)、系统性红斑狼疮、慢性类风湿性关节炎、桥本氏病(Hashimoto's disease)、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病(Addison's disease)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎(celiac sprue-dermatitis)、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征(CREST syndrome)、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征(Guillain-Barré)、甲状腺功能减低症(hypothyroidism)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病(Ménière's disease)、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、赖特综合征(Reiter's syndrome)、风湿热、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征(Sjögren's syndrome)、僵人综合征、德维克病(Devic's disease)、高安氏动脉炎(Takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿(Wegener's granulomatosis)以及自身免疫性神经系统病症(例如,自身免疫性阿尔茨海默病、自身免疫性帕金森病或肌萎缩性侧索硬化症)。

[0003] 具体地,1型糖尿病是一种严重的儿童自身免疫性疾病,其特征为妨碍血糖水平的正常调节的胰岛素不足。胰岛素是由胰腺的郎格罕氏岛内的 β 细胞(β 胰岛细胞)产生的一种肽类激素。胰岛素促进葡萄糖利用、蛋白质合成、中性脂质的形成和存储并且是大脑和肌肉组织能量的主要来源。1型糖尿病由导致胰腺的 β -胰岛细胞的完全破坏的自身免疫反应引起,该反应消除了胰岛素产生并且最终导致高血糖症和酮酸中毒。胰岛素注射疗法在预防严重的高血糖症和酮酸中毒中是有用的,但不能完全地使血糖水平正常化。虽然胰岛素注射疗法已非常成功,但现今它不能防止为糖尿病中发病的主要原因的过早的血管退化。包括微血管退化和动脉粥样硬化加速两者的糖尿病相关的血管恶化可最终引起肾衰竭、视网

膜退化、心绞痛、心肌梗塞、周围神经病以及动脉粥样硬化。

[0004] C肽或连接肽是连接胰岛素原分子内的胰岛素的A链和B链的短31氨基酸蛋白。胰腺的β-胰岛细胞分泌含有A链、C肽、B链以及信号序列的前胰岛素原。该信号序列裂解以产生前胰岛素。随后地，C肽裂解以产生成熟的胰岛素蛋白，该胰岛素蛋白含有二硫化物连接的A链和B链。最近诊断的糖尿病患者，基于他们的C肽水平，常常被分成患有1型糖尿病和2型糖尿病的那些患者。受试者中C肽水平的测量构成了对受试者身体中的胰岛素产生的有用的代用指标(proxy)测试，因为受试者循环系统内的由于肝新陈代谢而产生的胰岛素水平的变化性使得胰岛素水平的测量是非确定性的。另一方面，C肽水平最小程度地受到肝新陈代谢的影响。因此，外周C肽浓度反映了比胰岛素浓度更准确的β-胰岛细胞对胰岛素的分泌。

[0005] HbA1c(糖化血红蛋白或糖基化血红蛋白)是通过血浆中血红蛋白的非酶糖化而体内产生的血红蛋白的形式。HbA1c与非糖化形式的血红蛋白的比率与血浆中葡萄糖浓度直接相关联。因此，在来自糖尿病患者的样品中长时间的时间段内所观察到的高水平HbA1c可指示严重的病状，诸如高血糖症(例如，急性高血糖症)。

[0006] 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)是天然发生的细胞因子，该细胞因子在1975年被描述为在作为抗击肿瘤手段的卡介苗(BCG)注射之后所诱导的血清因子(卡斯韦尔(Carswell)等人，美国科学院院报(NatI.Acad.Sci.U.S.A)72:3666-3670,1975)。TNF-α及其两种受体的克隆揭示了与微生物病原体的基因组的序列同源性(例如，勒切尔(Loetscher)等人，细胞(Cell)62:351,1990)。这种出人意料的序列重叠表示用于调整宿主TNF-α分泌及其受体的活性的复杂的微生物应答的系统(拉赫曼(Rahman)等人，公共科学图书馆病原体(PLoSPathogens)2:66,2006)。

[0007] TNF-α表达由多样的细菌、寄生物以及病毒诱导，以作为针对感染的第一道宿主防线。病毒，诸如埃-巴二氏病毒，编码甚至增加TNF-α和TNF-α信号传导的受体和蛋白质(利博维茨(Liebowitz)，新英格兰医学杂志(New EngI.J.Med.)338:1461-1463,1998;瓜斯帕里(Guasparri)等人，血液(Blood)111:3813-3821,2008;王(Wang)等人，细胞43:831-840,1985)。可替代地，多种病毒已显示表达阻遏宿主中的TNF-α信号传导活性和功能的蛋白质(拉赫曼(Rahman)等人，公共科学图书馆病原体2:66,2006)。一些证据表明病毒感染(例如，埃-巴二氏病毒感染)可引起自身免疫性疾病(西连寺(Sairenji)等人，糖尿病学(Diabetologia)34:33-39,1991)。

[0008] 虽然针对自身免疫性疾病的多种研究疗法已展示一些减轻或甚至治愈特性，但是这些疗法可能在所有患有自身免疫性疾病诸如1型糖尿病的受试者中不产生一致的有益结果。因此，仍存在对在治疗这些受试者之前，准确地鉴定可能响应于一种治疗或一组治疗的受试者的方法，以及用于治疗被鉴定为可能响应于治疗的受试者的疗法的需要。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一方面中，本发明提供了一种确定患有自身免疫性疾病的受试者将响应于使用肿瘤坏死因子-α(TNF-α)受体II(TNFR2)活化剂的治疗的可能性的方法。该方法包括：

[0011] (i)使来自受试者的包含CD8⁺T细胞群体的体外生物样品与包含TNFR2活化剂的组合物接触；并且

[0012] (ii)测量群体中自体反应性CD8⁺T细胞的表面上的CD8蛋白密度；

[0013] 其中相对于参考CD8⁺T细胞,自体反应性CD8⁺T细胞的表面上CD8蛋白密度减小表明受试者可能响应于治疗。在一些实施例中,参考CD8⁺T细胞来自于来自患有自身免疫性疾病并且未使用TNFR2活化剂治疗或预治疗的受试者的参考样品。在其他实施例中,该参考CD8⁺T细胞来自于来自健康受试者的参考样品。在某些实施例中,使用可缀合至荧光染料的抗-CD8抗体来进行测量。在具体实施例中,在接触前将生物样品与达沙替尼一起温育(例如,将生物样品与达沙替尼一起温育至少4小时并且/或者将生物样品与达沙替尼一起温育至多48小时)。

[0014] 在本发明的方法的一些实施例中,自身免疫性疾病是I型糖尿病、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能减低症、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征、僵人综合征、德维克病、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿或自身免疫性神经系统病症。在某些实施例中,自身免疫性疾病是I型糖尿病、乳糜泻皮炎、克罗恩病、格雷夫斯病、功能减低症、狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、类肉瘤病、修格连氏综合征或溃疡性结肠炎。在具体实施例中,自身免疫性神经系统病症是自身免疫介导的对神经元的损伤,即自身免疫性阿尔茨海默病、自身免疫性帕金森病或自身免疫介导的肌萎缩性侧索硬化症。

[0015] 在第二方面中,本发明提供了一种确定患有I型糖尿病的受试者将响应于使用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体II(TNFR2)活化剂的治疗的可能性的方法。该方法包括使来自受试者的体外生物样品与能够检测该样品中的C肽的装置接触,其中样品中可检测的C肽水平表明受试者可能响应于治疗,并且其中基本上不可检测的C肽水平表明受试者不太可能响应于治疗。在一些实施例中,基本上不可检测的C肽水平表明受试者应被排除在治疗之外。在某些实施例中,基本上不可检测的水平是小于约1.5pmol/L(例如,小于约1.0pmol/L)的C肽水平。在其他实施例中,可检测的水平是大于约1.5pmol/L的C肽水平。在特定实施例中,如果C肽的浓度在约1.5pmol/L至约4.0pmol/L的范围内,则受试者被鉴定为可能响应于治疗。

[0016] 在本发明的此方面的某些实施例中,在治疗受试者之前进行接触。该接触包括:

[0017] (i)使样品与在其表面上具有固定的捕获剂的装置接触,使得样品中的C肽结合固定的捕获剂;

[0018] (ii)使表面与检测结合剂接触,使得C肽结合检测结合剂;并且

[0019] (iii)使用检测结合剂测量样品中C肽的水平。

[0020] 在一些实施例中,检测结合剂包括过氧化物酶。在具体实施例中,测量包括使表面

与含有过氧化氢和过氧化物酶底物的溶液接触。

[0021] 在本发明的此方面的一些实施例中,本发明的方法进一步包括在启动治疗前,测量来自受试者的血液样品中的参考HbA1c水平。该方法包括:

[0022] (i)在治疗之后,测量从受试者中提取的血液样品中的HbA1c水平,

[0023] (ii)将该HbA1c水平与参考HbA1c水平进行比较,并且

[0024] (iii)如果该HbA1c水平等于或大于该参考HbA1c水平,则将受试者鉴定为需要使用一种或多种TNFR2活化剂的重复治疗。

[0025] 在本发明的具体实施例中,在治疗后至少6个月(例如,治疗后至少1年,治疗后至少2年,治疗后至少3年或治疗后至少5年),从受试者中提取血液样品。

[0026] 在本发明的任一个方面的具体实施例中,样品含有血液、血液组分或尿。在某些实施例中,血液组分是血清或血浆。在其他实施例中,样品含有尿。

[0027] 在本发明的任一个方面的一些实施例中,TNFR2活化剂是卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体II激动剂、TNF- α 突变蛋白、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素或恶液质素。在具体实施例中,TNFR2活化剂是BCG。在某些实施例中,自身免疫性疾病是1型糖尿病,并且该方法与本发明的第二方面的一个或多个方法组合使用。

[0028] 在第三方面中,本发明提供了一种含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物,该药用组合物用于治疗被诊断为可能响应于治疗的受试者的自身免疫性疾病。在具体实施例中,来自受试者的样品含有这样的T细胞群体:在暴露于TNFR2活化剂之后,相对于来自参考受试者(例如,健康受试者或患有自身免疫性疾病且未使用一种或多种TNFR2活化剂治疗或预防治疗的受试者)的样品中参考T细胞的表面上的CD8蛋白密度,该T细胞群体在其表面上具有减小的CD8蛋白密度。在一些实施例中,根据本发明的第一方面的方法,受试者被鉴定为可能响应于治疗。

[0029] 在本发明的此方面的一些实施例中,自身免疫性疾病是1型糖尿病、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能减低症、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征、僵人综合征、德维克病、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿或自身免疫性神经系统病症。在一些实施例中,自身免疫性疾病是1型糖尿病、乳糜泻皮炎、克罗恩病、格雷夫斯病、功能减低症、狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、类肉瘤病、修格连氏综合征或溃疡性结肠炎。在具体实施例中,自身免疫性神经系统病症是自身免疫介导的对神经元的损伤,即自身免疫性阿尔茨海默病、自

身免疫性帕金森病或自身免疫介导的肌萎缩性侧索硬化症。

[0030] 在第四方面中,本发明提供了一种含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物,该药用组合物用于治疗在治疗前通过确定来自受试者的体外样品中的C肽水平而被鉴定为可能响应于治疗的受试者的1型糖尿病,其中基本上不可检测的C肽水平表明受试者不太可能响应于该治疗,并且其中可检测的C肽水平表明受试者可能响应于治疗。在具体实施例中,基本上不可检测的C肽水平表明受试者应被排除在治疗之外。在一些实施例中,基本上不可检测的水平是小于1.5pmol/L的C肽水平。在其他实施例中,可检测的水平是大于1.5pmol/L的C肽水平。在某些实施例中,如果来自受试者的尿样品表现出小于约4.0pmol/mmol的C肽与肌酐的比率,则将该受试者排除在治疗之外。在另外的其他实施例中,如果来自受试者的尿样品表现出大于或等于约4.0pmol/mmol的C肽与肌酐的比率,则将该受试者鉴定为可能响应于治疗。在具体实施例中,根据第二方面的方法,受试者被鉴定为可能响应于治疗。

[0031] 在此方面的一些实施例中,药用组合物的特征在于在给予组合物后约4年内,受试者的HbA1c水平降低至少0.1%。在其他实施例中,药用组合物的特征在于在给予组合物后约3年内,受试者的HbA1c水平降低至少0.1%。在特定的实施例中,组合物用于对受试者的1型糖尿病进行第二次或后续次数的治疗,其中受试者中的HbA1c水平相对于先前治疗之前的受试者中的HbA1c水平增加或保持不变。在具体实施例中,根据第二方面的方法,受试者被鉴定为需要使用一种或多种TNFR2活化剂的重复治疗。在一些实施例中,受试者是人。在其他实施例中,受试者是长期的糖尿病患者。

[0032] 在本发明的任一个方面的一些实施例中,一种或多种TNFR2活化剂选自卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体II激动剂、TNF- α 突变蛋白、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素以及恶液质素。在具体实施例中,一种或多种TNFR2活化剂是BCG。在具体实施例中,组合物含有大于 2×10^6 CFU/剂量的BCG(例如, 2.3×10^6 CFU/剂量的BCG)。在特定实施例中,组合物含有小于 4×10^6 CFU/剂量的BCG。在一些实施例中,组合物含有冻干的BCG。在具体实施例中,组合物含有BCG的盐溶液。

[0033] 在本发明的任一个方面的具体实施例中,向受试者给予组合物一次或多次(例如,两次或更多次,诸如两次)。在一些实施例中,组合物的至少两次给予间隔至少两周。在其他实施例中,组合物的至少两次给予间隔至少四周。

[0034] 在本发明的任一个方面的某些实施例中,组合物被配制通过选自以下的路径来给予:皮内、肌内、胃肠外、静脉内、动脉内、颅内、皮下、眼眶内、脑室内、脊柱内、腹膜内以及鼻内。在特定实施例中,组合物被配制用于皮内给予。在具体实施例中,组合物被配制用于盐溶液形式的给予。在一些实施例中,溶液具有小于约0.2cc/剂量,诸如0.1cc/剂量的体积。在一些实施例中,药用组合物被配制用于两种或更多种TNFR2活化剂的单独给予。在其他实施例中,药用组合物被配制用于两种或更多种TNFR2活化剂的组合给予。

[0035] 在本发明的药用组合物的一些实施例中,该药用组合物的特征在于能够诱导受试者中TNF- α 的表达。在具体实施例中,药用组合物的特征在于该组合物能够诱导受试者的自体反应性免疫细胞(例如,自体反应性CD8⁺T细胞)中NF- κ B通路的活化。在特定实施例中,药用组合物的特征在于该组合物引起受试者中自体反应性免疫细胞(例如,自体反应性CD8⁺T细胞)的死亡。在某些实施例中,药用组合物的特征在于该组合物引起受试者中调节性T细

胞(例如,调节性CD4⁺T细胞)的扩增。

[0036] 在本发明的任一个方面的某些实施例中,药用组合物的特征在于该组合物预防受试者中由高血糖症引起的并发症。在一些实施例中,由高血糖症引起的并发症选自肾损伤、神经系统损伤、心血管损伤、视网膜损伤、脚损伤、腿损伤、心脏损伤以及酮酸中毒。在特定实施例中,组合物含有一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0037] 定义

[0038] 如在此所用,关于“约”意指所列举的值的±10%的值。

[0039] 如在此所用,关于“抗体”意指全抗体或免疫球蛋白以及任何抗原结合片段或其单链。如在此所用,抗体可以是哺乳动物的(例如,人类或小鼠)、人源化的、嵌合的、重组的、合成产生或天然分离的。在包括人类的大多数哺乳动物中,全抗体具有由二硫键连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(在此缩写为V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}以及C_{H1}与C_{H2}之间的绞链区构成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域C_L构成。V_H和V_L区可进一步细分为超变区,命名为互补决定区(CDR),分散分布的较保守的区,命名为框架区(FR)。每个V_H和V_L由3个CDR和4个FR组成,从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的不同细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q))的结合。本发明的抗体包括所有已知形式的抗体和具有抗体样特性的其他蛋白支架。例如,抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人源化抗体、双特异性抗体、单价抗体、嵌合抗体或具有抗体样特性的其他蛋白支架,诸如纤维连接蛋白或锚蛋白重复序列。抗体可具有以下同种型中任一种:IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3以及IgG4)、IgM、IgA(例如,IgA1、IgA2以及IgAsec)、IgD或IgE。

[0040] 如在此所用,关于“糖尿病患者”意指被诊断患有1型糖尿病的受试者。具体地,长期糖尿病患者是自从1型糖尿病发作患有1型糖尿病至少约5年(例如,至少约6年、至少约7年、至少约8年、至少约9年、至少约10年、至少约11年、至少约12年、至少约13年,或至少约14年)的受试者。

[0041] 如在此所用,关于“Hox11⁺脾细胞”意指表达Hox11基因并且存在于脾中的多能性CD45⁺细胞。

[0042] 如在此所用,关于“免疫细胞”意指涉及获得性或先天性免疫系统的生成、调节或作用的任何细胞。免疫细胞包括例如,T细胞(例如,CD4⁺细胞或CD8⁺细胞)、B细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突细胞以及嗜中性细胞。

[0043] 如在此所用,关于“突变蛋白”意指由于至少一个或多个氨基酸而不同于其氨基酸序列的多肽。例如,突变蛋白可相对于参考多肽的氨基酸序列具有大于90%但小于100%序列一致性的氨基酸序列。

[0044] 如在此可互换使用的,关于“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”意指除在此所述的化合物(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的运载体)之外的并且在患者中具有无毒性和非炎性特性的任何成分。载体和赋形剂可包括例如:抗粘着剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、软化剂、乳化剂、填料(稀释剂)、成膜剂或包衣剂、调味剂、芳香剂、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印墨、吸附剂、悬浮剂或分散

剂、甜味剂或水合作用的水。示例性载体和赋形剂包括但不限于：丁羟甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二元的)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、蛋氨酸、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯(methyl paraben)、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、羟苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、紫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟基乙酸淀粉钠(sodium starch glycolate)、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C、木糖醇、水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、醋酸盐缓冲盐水(ABS)、林格氏溶液、葡萄糖、丙三醇、乙醇等等以及它们的组合。

[0045] 如在此所用，“样品”意指从受试者中提取的任何试样(例如，血液、血液组分(例如，血清或血浆)、尿、唾液、羊膜液、脑脊液、组织(例如，胎盘或真皮)、胰液、绒毛膜绒毛样品以及细胞)。优选地，样品是血液、血液组分(例如，血清或血浆)或尿。

[0046] 如在此可互换使用的，关于“受试者”或“患者”意指任何动物，诸如哺乳动物(例如，人类)。待使用在此所述的药用组合物治疗的受试者可以是由执业医师诊断为具有此病状(例如，自身免疫性疾病，诸如1型糖尿病)的受试者或具有发展该病状的风险的受试者。可通过本领域已知的任何技术或方法来进行诊断。本领域技术人员将理解使用标准测试或检查，受试者可被诊断为患有自身免疫性疾病，诸如1型糖尿病，或者可由于一个或多个风险因素的存在而未经检查就被鉴定为具有高风险的受试者。对于1型糖尿病，此类风险因素包括例如，自体反应性T细胞，诸如自体反应性CD8⁺T细胞的存在、至少6.1mmol/L的空腹血糖水平、口服75g的葡萄糖负荷后两小时至少11.1mmol/L的血糖水平或下降的C肽的血清水平。在使用本发明的药用组合物治疗之前，患有自身免疫性疾病，诸如1型糖尿病的受试者可经受在此所述的诊断性测试以便确定受试者是可能响应于使用本发明的药用组合物的治疗还是为不太可能响应于治疗。

[0047] 如在此所用，关于“基本上不可检测的C肽水平”意指来自受试者的样品可具有小于约1.5pmol/L，诸如小于约1.0pmol/L或甚至小于约0.5pmol/L的C肽水平。与基本上不可检测的C肽水平对应的C肽水平不取决于获得样品时的受试者的进食状态。例如，样品可来自空腹受试者或来自接受刺激物诸如混合餐耐受性试验或通过胰升糖素试验产生的刺激的受试者。

[0048] 如在此可互换使用的，关于“肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导物质”或“TNF- α 诱导物质”，意指在体内或体外诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的组合物或分子。TNF- α 诱导物质可以是卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素或恶液质素。优选地，TNF- α 诱导物质是BCG。

[0049] 如在此可互换使用的，关于“TNF- α 受体II(TNFR2)激动剂”或“TNFR2激动剂”意指在体内或体外结合后活化TNFR2的组合物或分子。TNFR2激动剂的例子包括特异性结合并且活化TNFR2的TNFR2激动剂抗体和TNF突变蛋白。

[0050] 如在此可互换使用的，关于“TNF- α 受体II(TNFR2)活化剂”或“TNFR2活化剂”意指在体内或体外直接或间接活化TNFR2的组合物。TNFR2活化剂可诸如通过结合TNFR2而直接地或诸如通过诱导TNF- α 的表达而间接地活化TNFR2。TNFR2活化剂包括TNF- α 、TNF- α 诱导物质以及TNFR2激动剂。

[0051] 附图简述

[0052] 图1A是呈现示出了受试者1、受试者2以及受试者3中EBV特异性T细胞出现的时程数据的三张图的系列。在每张图中,时间点0指示基于针对EBV的抗体的出现的计时所估算的EBV感染的发生率。

[0053] 图1B是含有EBV特异性自体反应性CD8⁺T细胞的四聚体染色样品和阴性对照的流式细胞术分析结果的三张点状图的系列。使用装载有不相关的肽序列的四聚体来确定CD8⁺T细胞的非特异性四聚体结合水平(阴性对照,左图)。中间图和右图示出了使用EBV特异性四聚体的正染色的实例。

[0054] 图2是示出了相对于患有1型糖尿病而不具有活动性EBV感染的受试者参考群体,三名EBV感染的受试者中每一名中C肽水平的时程的若干图的系列。与参考群体相比受试者1和2的C肽显示出为统计上显著(分别 $p<0.04$ 和 $p=0.00134$)的瞬时增加。受试者3未显示处增加的C肽水平。

[0055] 图3A是定量胰岛素-B自体反应性T细胞的存在并且证明了与未感染的1型糖尿病受试者中的自体反应性T细胞水平相比,1型糖尿病患者中EBV感染之后循环胰岛素-B自体反应性T细胞的存在增加的图系列。来自使用具有不相关的肽的I类试剂染色的相同受试者的外周T细胞的背景荧光是0.2%。

[0056] 图3B是来自患有1型糖尿病、具有或不具有EBV感染的受试者的样品并且定量T细胞表面上的CD8蛋白密度的流式细胞术直方图的系列。T细胞表面上CD8蛋白密度的减小对EBV感染的受试者的新出现的胰岛素-B自体反应性T细胞是具有特异性的。不具有EBV感染的长期1型糖尿病患者具有较小数目的外周胰岛素-B自体反应性T细胞,但T细胞表面上的CD8蛋白的密度在正常范围内。另外,来自EBV感染的受试者的EBV特异性T细胞也具有正常密度的CD8蛋白。

[0057] 详述

[0058] 已发现了用于确定患有自身免疫性疾病的受试者是可能响应于使用TNF- α 受体II(TNFR2)活化剂的治疗还是不太可能响应于使用TNF- α 受体II(TNFR2)活化剂的治疗的方法。根据本发明的方法,在来自患有自身免疫性疾病的受试者的样品中,在体内或体外暴露于一种或多种TNF- α 受体II(TNFR2)活化剂的自体反应性CD8⁺T细胞中的在其表面上表现出减小的CD8蛋白密度的群体的存在可表明受试者可能响应于使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗。暴露于一种或多种TNFR2活化剂的自体反应性CD8⁺T细胞表面上CD8蛋白密度的降低可以是相对于参考CD8⁺T细胞表面上CD8蛋白密度的。参考CD8⁺T细胞可来自于来自患有自身免疫性疾病并且未使用TNFR2活化剂在体内或体外治疗或预治疗的受试者的样品。可替代地,参考CD8⁺T细胞可来自于来自健康受试者的样品。根据本发明的方法,使用抗CD8抗体可确定CD8⁺T细胞的表面上的CD8蛋白密度。

[0059] 还已发现区分可能响应于使用TNF- α 受体II(TNFR2)活化剂的治疗的患有1型糖尿病的受试者与不太可能响应于使用TNFR2活化剂治疗的患有1型糖尿病的受试者的方法。已发现可使用受试者中的C肽水平来评估该受试者将响应于治疗,具体地响应于使用一种TNFR2活化剂的治疗的可能性。具有可检测的水平(C肽(例如,大于或等于约1.5pmol/L的水平))的患有1型糖尿病的受试者可能响应于使用含有TNFR2活化剂的药用组合物的治疗。具体地,可通过检测在使用TNFR2活化剂治疗之后的受试者中C肽水平的增加来评估对使用

TNFR2活化剂的治疗的应答。另一方面,具有基本上不可检测的C肽水平(例如,小于约1.5pmol/L的水平)的患有1型糖尿病的受试者不太可能响应于使用含有TNFR2活化剂的药用组合物的治疗(例如,该受试者可被排除在此疗法之外或者可被给予TNFR2疗法与细胞疗法诸如使用多能性细胞(例如,Hox11⁺细胞)的疗法的组合)。

[0060] 可使用来自受试者的样品诸如血液、血液组分(血清或血浆)或尿来评估C肽水平。使用本领域中已知的任何方法进行对C肽水平的测量是可行的,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA),该方法在赛默飞世尔皮尔斯测定发展技术手册(Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook),第2版,2011中有所描述,该文献的披露内容通过引用结合在此。

[0061] TNFR2活化剂在治疗例如具有可检测的C肽水平的1型糖尿病患者中的用途是基于以下的发现:如果可减少对胰腺中的 β -胰岛细胞的损伤(例如,通过减少靶向 β -胰岛细胞的自体反应性T细胞的数目),则这些细胞可随时间恢复或再生。与具有可检测的C肽水平的受试者不同,具有基本上不可检测的C肽水平的患有1型糖尿病的受试者可能不能恢复或再生胰腺中的 β -胰岛细胞。这可能是由于疾病而导致的许多或甚至基本上全部的 β -胰岛细胞的丧失(例如,具有基本上不可检测的C肽水平的受试者可能具有不足数目的 β -胰岛细胞保持在他们身体中并且因此甚至在不存在由于自体反应性免疫细胞而导致的细胞损伤的情况下也不能建立正常血糖量)。此外, β -胰岛细胞的恢复或再生可能与驻留在受试者中的多能性细胞(例如,Hox11⁺脾细胞)的分化潜能有关,这些多能性细胞可提供可产生多种细胞类型包括 β -胰岛细胞的细胞来源。受试者中基本上不可检测的C肽水平还可表明该受试者缺乏足够数目的这些多能性细胞,诸如Hox11⁺脾细胞来恢复或再生 β -胰岛细胞和来建立正常血糖量。

[0062] TNFR2活化剂在具有可检测的C肽水平的患有1型糖尿病的受试者中的有益活动与它们杀伤体内的自体反应性CD8⁺T细胞的能力有关(参见,例如,班(Ban)等人,美国国家科学院院报,105:13644-13649,2008,该文献通过引用结合在此),这减少了由这些细胞引起的组织损伤(例如, β -胰岛细胞的丧失)或使其最小化。TNFR2活化剂还促进体内的有益调节性CD4⁺T细胞的扩增,这调整了疾病的炎性组分。不受任何具体理论的束缚,据信TNFR2激动作用(agonism)活化了细胞内NF- κ B信号,认为该信号诱导自体反应性T细胞的细胞凋亡,从而治疗被给予TNFR2活化剂的受试者(例如,人类)的1型糖尿病。

[0063] 本发明的诊断方法

[0064] CD8表面蛋白测定

[0065] 本发明的特征在于将患有自身免疫性疾病的受试者(例如,人类)鉴定为可能响应于使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗的方法。在一些实施例中,该方法包括:(i)使来自受试者的含有一种或多种CD8⁺T细胞的体外生物样品(例如,血液)与含有TNFR2活化剂的组合物接触,并且(ii)使用抗CD8抗体检测自体反应性CD8⁺T细胞。相对于参考CD8⁺T细胞,一种或多种自体反应性CD8⁺T细胞表面上减小的CD8蛋白密度表明受试者可能响应于治疗。参考CD8⁺T细胞,诸如自体反应性CD8⁺T细胞,可来自于来自患有自身免疫性疾病并且未使用TNFR2活化剂在体内或体外治疗或预治疗的受试者的样品。可替代地,参考CD8⁺T细胞(例如,非自体反应性CD8⁺T细胞)可来自于来自健康受试者的样品。

[0066] 含有用于分析其表面上的CD8蛋白密度的一种或多种自体反应性CD8⁺T细胞的样

品(例如,血液)可获自患有自身免疫性疾病的受试者。样品可使用一种酪氨酸激酶抑制剂来保存,诸如达沙替尼(荷兰格罗宁根阿克松生物化学公司(Axon Medchem BV,Groningen,the Netherlands))(参见利斯娜(Lissina)等人,免疫法杂志(J.Immunol.Methods),340:11-24,2009,该文献通过引用结合在此),该酪氨酸激酶抑制剂在新陈代谢上“冻结(freezes)”样品中的细胞。该样品中达沙替尼的最终浓度可以是至少约10nM(例如,至少50nM、至少约100nM、至少约200nM、至少约500nM或至少约1 μ M)。为了保存CD8⁺T细胞,在使用样品中的细胞进行细胞表面的CD8蛋白密度的确定之前,可将含有这些细胞和酪氨酸激酶抑制剂的样品温育至少约4h(例如,至少约6h、至少约8h、至少约10h、至少约12h或至少约14h)并且高达约48h(例如,高达约40h、高达约36h、高达约32h、高达约28h、高达约24h或高达约20h)。达沙替尼是一种不改变细胞表面结构的代谢抑制剂。因此,即使被存储4-48小时,使用达沙替尼保存的细胞也可被准确地染色。

[0067] 可例如通过使样品与缀合至本领域已知的任何荧光染料的抗CD8抗体接触来分析样品(无论是新鲜的还是使用酪氨酸激酶抑制剂,诸如达沙替尼保存的)。荧光染料的非限制性例子包括F1TC、RD1、别藻蓝蛋白(APC)、CFTM染料(加利福尼亚州海沃德的拜奥蒂乌姆公司(Biotium,Hayward,CA))、BOD1PY(加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司(Life Technologies,Carlsbad)的InvitrogenTM)、AlexaFluor®(加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术的InvitrogenTM)、DyLight Fluor(伊利诺斯州罗克福德的赛默飞世尔科技皮尔斯蛋白生物产品公司(Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products,Rockford,IL))、ATTO(德国锡根的ATTO-TEC有限公司(ATTO-TEC GmbH,Siegen,Germany))、荧光探针(FluoProbe)(法国蒙吕松的因特奇姆公司(Interchim SA,Motluçon,France))以及 Abberior探针(德国哥廷根阿巴瑞尔有限公司(Abberior GmbH,Göttingen))。可使用诸如流式细胞术的方法来检测来自缀合至抗CD8抗体的荧光染料的荧光,该抗CD8抗体连接到自体反应性T细胞表面上的CD8蛋白。荧光的强度提供对细胞表面上CD8蛋白密度的定量测量。

[0068] 在暴露于TNFR2活化剂之后,自体反应性CD8⁺T细胞群体的细胞表面CD8蛋白密度的减小的检测表明受试者可能响应于使用TNFR2活化剂的针对自身免疫性疾病的治疗。相对于参考CD8⁺T细胞,自体反应性CD8⁺T细胞上细胞表面CD8蛋白密度的降低表明自体反应性CD8⁺T细胞正经受由使用TNFR2活化剂的治疗产生的细胞凋亡。参考CD8⁺T细胞可以是来自健康受试者的非自体反应性CD8⁺T细胞。可替代地,参考CD8⁺T细胞可以是未在体内或体外暴露于TNFR2活化剂的自体反应性CD8⁺T细胞。因此,使用以上所述的测定所检测到的CD8细胞表面密度的减小表明受试者可能响应于使用TNFR2活化剂的体内疗法,预期该TNFR2活化剂在治疗过程中引起自体反应性CD8⁺T细胞的死亡。有活力的自体反应性CD8⁺T细胞的不存在将促进由这些细胞引起的细胞损伤的减少和损伤组织的可能性再生,这可改善受试者的健康。

[0069] C肽测定

[0070] 本发明的特征还在于将患有1型糖尿病的受试者(例如,人类)鉴定为可能响应于使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗方法。该方法包括使来自受试者(例如,人类)的体外生物样品(例如,血液、血液组分(诸如血清或血浆)或尿)与能够检测该样品中C肽的装置接触。样品中大于约1.5pmol/L(例如,大于约2.5pmol/L)的C肽水平的检测表明受试者(例如,人类)可能响应于治疗。样品中小于约1.5pmol/L的C肽水平的检测表明受试者不太可能响

应于治疗(例如,该受试者可被排除在此疗法之外或者可被给予TNFR2疗法与细胞疗法(例如,多能性细胞,诸如Hox11⁺脾细胞)的组合)。样品中在约1.5pmol/L至约900pmol/L(例如,约500pmol/L、约200pmol/L、约100pmol/L、约50pmol/L或约4.0pmol/L)范围内的C肽水平的检测表明受试者可能响应于治疗。根据本发明的方法,受试者可以是长期的糖尿病患者。大于1.5pmol/L的C肽水平表明受试者可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗。可测量来自空腹受试者的样品(空腹的C肽水平)或来自混合餐耐受试验或通过胰升糖素试验刺激的受试者的样品的C肽水平。如果治疗引起自体反应性CD8⁺T细胞的细胞死亡和/或内源性β-胰岛细胞的扩增或再生,从而使得相对于治疗前的水平,胰岛素水平增加并且平均血糖水平降低(例如,以建立正常血糖量),则受试者将响应于使用TNFR2活化剂的治疗。

[0071] 根据本发明的方法,接触步骤可通过以下方式进行:(i)使样品与在其表面上具有固定的捕获剂(例如,结合C肽的抗体)的装置接触,使得样品中的C肽结合固定的捕获剂;(ii)使表面与检测结合剂接触,使得C肽结合检测结合剂(例如,特异性地结合C肽的抗体);并且(iii)使用检测结合剂检测样品中C肽的水平。检测结合剂可对C肽具有特异性。检测结合剂可缀合至过氧化物酶,可通过使装置的表面与过氧化氢溶液接触来检测该过氧化物酶。过氧化氢溶液可进一步含有过氧化物酶底物。根据本发明的方法,可使用本领域已知的任何过氧化物酶底物。一些普通的过氧化物酶底物是2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、邻苯二胺二盐酸盐(OPD)、10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪(ADHP)、鲁米诺(luminol)、对硝基苯磷酸二钠(PNPP)、邻硝基苯-β-半乳糖苷(ONPG)、QuantaBlu荧光过氧化物酶底物(伊利诺斯州罗克福德的赛默飞世尔科技皮尔斯蛋白生物产品公司)、QuantaRed增强型化学荧光过氧化物酶底物(伊利诺斯州罗克福德的赛默飞世尔科技皮尔斯蛋白生物产品公司)、SuperSignal ELISA毫微微最高灵敏度底物(伊利诺斯州罗克福德的赛默飞世尔科技皮尔斯蛋白生物产品公司)以及SuperSignal ELISA微微化学发光基板(伊利诺斯州罗克福德的赛默飞世尔科技皮尔斯蛋白生物产品公司)。可以分光光度法检测过氧化物酶底物与过氧化物酶的反应。

[0072] 可使用本领域中已知的任何测定来进行对来自受试者的样品中C肽的检测。例如,诸如由默克迪亚公司(Merckodia AB)(瑞典乌普萨拉市(Uppsala, Sweden))制造的超灵敏C肽酶联免疫吸附测定(ELISA)提供了用于定量测定样品中C肽的固相双位点酶免疫测定。免疫测定基于直接夹心技术(direct sandwich technique),在该技术中,两种单克隆抗体是针对C肽分子上不同的抗原决定簇的。在温育过程中,样品中的C肽与结合到微量滴定孔的抗C肽抗体反应。在洗涤之后,添加过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶)缀合的抗C肽抗体。在第二次温育和简单洗涤步骤之后,可通过过氧化氢与3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的反应检测结合的缀合物。通过添加酸停止该反应以得到用分光光度法读取的端点。可替代地,在第二次温育后,可通过本领域已知的任何其他过氧化物酶底物,诸如以上列出的底物检测结合的缀合物。

[0073] 根据本发明的方法,来自患有1型糖尿病的受试者的样品中的基本上不可检测的C肽水平,具体地,如果C肽水平低于约1.5pmol/L,则可表明该受试者丧失了再生β-胰岛细胞的能力。基本上不可检测的C肽水平还可表明该受试者缺乏能够再生β-胰岛细胞的Hox11⁺脾细胞。

[0074] 可通过受试者再生β-胰岛细胞和/或相对于治疗前该受试者的高血糖症和低血糖

症的发病率降低高血糖症和低血糖症的发病率的能力来估量使用TNFR2活化剂的1型糖尿病治疗的长期效力,(例如,可通过受试者处于正常血糖量状态的持续时间的增加来估量效力)。治疗包括向受试者给予本发明的药用组合物,诸如含有一种或多种TNFR2活化剂的组合物、含有一种或多种多能性细胞(例如,Hox11⁺脾细胞)的组合物或它们的组合。可将C肽水平用作评估使用本发明的药用组合物的治疗在受试者中的效力的代用指标。使用本发明的药用组合物治疗的受试者中C肽水平的变化(例如,增加)表明该受试者已响应于该治疗。在治疗受试者后至少1个月(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年或至少6年),该受试者中C肽水平增加约1%(例如,约2%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约100%、约200%、约500%、约1000%、约2000%、约5000%或约7000%)可表明该受试者的治疗成功并且该受试者没有必要重复治疗。在治疗受试者后至少1个月(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年或至少6年),该受试者中C肽水平的减小或缺少的变化可表明该受试者需要本发明的药用组合物的重复给予。在治疗受试者后至少一个月(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年或至少6年),可检测C肽水平。可相对于参考C肽水平评估C肽水平的变化。参考C肽水平可以是在使用本发明的药用组合物第一次(或后续)治疗前从受试者中提取的样品中所检测到的C肽水平。

[0075] HbA1c测定

[0076] 本发明的特征还在于在治疗受试者之前、过程中或之后,通过测量从受试者中提取的血液样品中的HbA1c水平来确定受试者是响应于还是可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗(单独地或与包含一种或多种多能性细胞诸如Hox11⁺脾细胞的组合物组合)的方法。在治疗该受试者之前测量的HbA1c水平可用作参考HbA1c水平。在治疗受试者后至少1个月(例如,至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年或至少6年),可对从受试者中提取的血液样品中HbA1c水平进行的另外的测量。本发明的方法可进一步包括将治疗后测量的HbA1c水平与参考HbA1c水平进行比较,并且如果该HbA1c水平等于或大于该参考HbA1c水平,则将受试者鉴定为需要使用本发明的药用组合物的重复治疗。在给予一种或多种TNFR2活化剂后,可测量来自受试者的样品中的HbA1c水平以确定端点并且评估治疗的长期成功度。相对于参考HbA1c水平,HbA1c水平的至少约0.1%(例如,0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4%或0.5%)的减少将指示治疗的可能的长期成功度。相比于参考HbA1c水平,HbA1c水平至少约0.1%(例如,0.2%、0.3%、0.4%或0.5%)的增加可表明应向受试者给予使用本发明的药用组合物的一次或多次重复治疗。

[0077] 可根据本领域已知的方法测量血液样品中的HbA1c水平,诸如高效液相色谱法、免疫测定、酶法测定(直接酶法HbA1c测定,加利福尼亚州波韦(Poway)市的Diasyme实验室)、毛细管电泳(佐治亚州诺克罗斯的赛比亚公司(Sebia,Norcross,GA))或硼酸亲和色谱法(爱尔兰布雷的三一生物科技公司(Trinity Biotech Plc,Bray,Ireland))。测量来自受试者的样品中HbA1c的方法在例如,李特尔(Little)等人,临床化学(Clin.Chem.)54:1277-1282,2008中有所描述,该文献通过引用结合在此。用于描述HbA1c水平的标准规格在例如,古多尔(Goodall),1.,临床生物化学评论(Clin.Biochem.Rev.)26:5-20,2005中有所描述,该文献通过引用结合在此。

[0078] 本发明的药用组合物

[0079] 本发明的特征还在于含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物,该药用组合物用于治疗患有自身免疫性疾病(例如,1型糖尿病)的受试者(例如,人类),并且具体地,用于治疗通过本发明的一种或多种诊断方法而被鉴定为可能响应于该治疗(例如,可能经历CD8⁺T细胞死亡和/或可能经历由该自身免疫性疾病所损伤的组织(例如,患有1型糖尿病的受试者中的β-胰岛细胞)的恢复和/或再生)的受试者。

[0080] 可将含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物用于治疗可能响应于该治疗的受试者的自身免疫性疾病,诸如1型糖尿病。相对于参考T细胞表面上CD8蛋白的密度,来自患有自身免疫性疾病的受试者的样品中自体反应性CD8⁺T细胞表面上CD8蛋白的密度的降低表明受试者可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗。该参考T细胞可从待治疗的受试者或从不同的受试者获得。该参考T细胞可以是来自健康受试者或来自尚未使用一种或多种TNFR2活化剂治疗的患有自身免疫性疾病的受试者的T细胞。

[0081] 根据本发明的一种或多种诊断方法而被鉴定为可能响应于治疗的受试者的可使用本发明的药用组合物治疗的自身免疫性疾病的例子包括1型糖尿病、斑形脱发、僵直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻皮炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经疾病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、肢端硬化综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、牛皮癣性关节炎、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、甲状腺功能减低症、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、青少年关节炎、扁平苔藓、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎以及皮肤肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、夏科氏肝硬变、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特综合征、风湿热、类风湿性关节炎、类肉瘤病、硬皮病、修格连氏综合征、僵人综合征、德维克病、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癫风、韦格纳氏肉芽肿以及自身免疫性神经系统病症。具体地,可治疗根据本发明的诊断方法而被鉴定为可能响应于疗法的患有1型糖尿病、乳糜泻皮炎、克罗恩病、格雷夫斯病、功能减低症、狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、类风湿性关节炎、类肉瘤病、修格连氏综合征或溃疡性结肠炎的受试者。自身免疫性神经系统病症可以是对神经元诸如运动神经元造成损伤的自身免疫介导的病症。具体的自身免疫性神经系统病症包括自身免疫性阿尔茨海默病、自身免疫性帕金森病以及自身免疫介导的肌萎缩性侧索硬化症(ALS)。

[0082] 来自患有1型糖尿病的受试者的样品(例如,血液、血液组分(诸如血清或血浆)或尿)中的基本上不可检测的C肽水平表明该受试者不太可能响应于使用含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物的治疗(例如,该受试者可被排除在此疗法之外或者可被给予TNFR2疗法与细胞疗法诸如多能性细胞(例如,Hox11⁺细胞)的组合)。来自患有1型糖尿病的受试者的样品中的可检测的C肽水平(例如,大于约1.5pmol/L的水平)表明该受试者可能响应于含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物的治疗。受试者可以是长期的糖尿病患者。本发明的组合物可用于治疗患有1型糖尿病和根据本发明的任何一种或多种方法而被鉴定为可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗的受试者。

[0083] 此外,来自患有1型糖尿病的受试者的尿样品中的小于约4pmol/mmol的C肽与肌酸

酞比率也可表明该受试者不太可能响应于使用含有一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物的治疗(例如,该受试者可被排除在此疗法之外或者可被给予TNFR2疗法与细胞疗法诸如多能性细胞(例如,Hox11⁺细胞)的组合)。来自患有1型糖尿病的受试者的尿样品中的大于约4pmol/mmol的C肽与肌酐比率可表明受试者可能响应于使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗。来自患有1型糖尿病的受试者的尿样品中的从约4pmol/mmol至约11pmol/mmol的C肽与肌酐比率可表明受试者可能响应于使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗。尿样品中C肽与肌酐比率可如贝瑟(Besser)等人,(糖尿病治疗(Diabetes Care)34:607-609,2011)中所述的来确定,该文献通过引用结合在此。被鉴定为可能响应于使用TNFR2活化剂(例如,BCG)的治疗的那些受试者可随后使用TNFR2活化剂诸如BCG治疗一次或多次。

[0084] 本发明的药用组合物可含有一种或多种TNFR2活化剂,这些活化剂包括卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体11激动剂(TNFR2激动剂的非限制性例子,诸如抗体,在美国专利号7,582,313、美国专利号8,017,392以及美国专利号8,173,129中有所描述,这些专利通过引用结合在此)、TNF- α 突变蛋白(TNF- α 突变蛋白的非限制性例子在美国专利号5,597,899中有所描述,该专利通过引用结合在此)、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素以及恶液质素。本发明的一些药用组合物在给予后可以能够诱导受试者中TNF- α 的表达。本发明的其他组合物在给予后可特异性地活化受试者的自体反应性免疫细胞(例如,自体反应性CD8⁺T细胞)中TNF- α 受体11(作为激动剂)和/或诱导NF- κ B通路的活化。优选地,本发明组合物的给予还引起受试者中一种或多种自体反应性免疫细胞的死亡。本发明的组合物还可引起受试者中调节性T细胞(例如,调节性CD4⁺T细胞)的扩增。本发明的组合物还可减少或治疗患有1型糖尿病的受试者的由高血糖症引起的并发症(例如,肾损伤、神经系统损伤、心血管损伤、视网膜损伤、脚损伤、腿损伤、心脏损伤或酮酸中毒)。

[0085] 如果在第一次治疗之后,来自受试者的样品(例如,血液、血液组分(诸如血清或血浆)或尿)中的HbA1c水平相对于来自先前治疗之前的受试者的参考HbA1c水平增加或保持不变,则可使用本发明的含有TNFR2-活化剂的药用组合物对受试者(例如,人类)的1型糖尿病进行第二次或后续次数的治疗。治疗的受试者中HbA1c水平的减小可表明该受试者响应于TNFR2活化剂治疗(例如,该受试者可不需要第二次或后续的治疗)。在向受试者给予TNFR2活化剂后约4年内(例如,约3年内),受试者中减少至少约0.1%(例如,至少约0.15%、至少约0.2%、至少约0.25%、至少约0.3%、至少约0.4%、至少约0.5%、至少约0.6%、至少约0.7%、至少约0.8%、至少约0.9%、至少约1.0%)的HbA1c水平表明该受试者响应于该治疗。

[0086] 细胞疗法

[0087] 根据本发明的方法鉴定患有1型糖尿病的受试者具有基本上不可检测的C肽水平(例如,小于约1.5pmol/L的C肽水平)可表明该受试者将得益于或需要使用 β -胰岛细胞或能够再生 β -胰岛细胞的细胞诸如多能性细胞(例如,Hox11⁺脾细胞)的治疗。Hox11⁺脾细胞是可在受试者体内再生 β -胰岛细胞的细胞的内源性来源,如国际公布号WO 2005/042727中所述,该专利通过引用结合在此。因此,如果使用一种或多种TNFR2活化剂的治疗杀伤自体反应性T细胞并且使得受试者再生内源性 β -胰岛细胞(例如,通过内源性 β -胰岛细胞的扩增或由于多能性细胞诸如Hox11⁺脾细胞分化为 β -胰岛细胞),则患有1型糖尿病的受试者可从细

胞治疗中得到长期益处(例如,4年内,诸如3年内)。可向受试者给予可在受试者中分化为 β -胰岛细胞的其他类型的多能性细胞,其包括例如美国专利号7,432,104和8,008,075中所述的那些细胞,这些专利通过引用结合在此。来自患有1型糖尿病的受试者的样品中的基本上不可检测的C肽水平(例如,小于约1.5pmol/L)可表明该受试者丧失了从例如Hox11⁺脾细胞区室再生 β -胰岛细胞的能力。因此,受试者可得益于 β -胰岛细胞的外源性来源的给予。

[0088] 可向根据本发明对其有需要的受试者给予的多能性细胞的非限制性例子包括例如,在WO 2002/059278、WO 2003/026584、WO 2005/042727、WO 2006/074308、WO 2012/152717、U.S.7,432,104以及U.S.8,008,075中所述的那些,这些专利通过引用结合在此。含有一种或多种多能性细胞(例如,Hox11⁺脾细胞)的组合物可在含TNFR2活化剂的组合物之前、继其之后或与其同时给予,或者两种组合物可被组合成用于呈单剂型的给予。

[0089] 本发明的药用组合物的配制品

[0090] 含有一种或多种TNFR2活化剂的本发明药用组合物可被配制成通过任何路径来给予,例如,皮内、肌内、胃肠外、静脉内、动脉内、颅内、皮下、眼眶内、心室内、脊柱内、腹膜内或鼻内。本发明的组合物可被配制成用于皮内给予。

[0091] 本发明的药用组合物可含有药学上可接受的载体或赋形剂。此类载体或赋形剂可选自例如,水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、醋酸盐缓冲盐水(ABS)、林格氏溶液、葡萄糖、丙三醇、乙醇或等等以及它们的组合。此外,如果希望,用于向受试者给予的组合物可含有增强该组合物的有效性的少量的辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0092] 另外,TNFR2活化剂可在多个不同的时间和/或频率下给予。例如,一种或多种(例如,1、2、3、4或5或更多种)剂量的TNFR2活化剂可每天地、每周地、每月地或每年地(例如,每天两次地、每周两次地、每年四次地、每年两次地或每年三次地)进行给予。

[0093] 可向患有1型糖尿病并且根据在此所述的诊断方法而被鉴定为可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗的受试者给予一次或多次(例如,两次或更多次,诸如两次)本发明的含有TNFR2-活化剂(例如,BCG)的组合物。含有TNFR2-活化剂的组合物可被给予两次或更多次,给予之间的间隔为例如,约1周(例如,约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周或约8周或更长)。在一些实施例中,TNFR2活化剂组合物的给予可间隔至少两周(例如,隔四周)。

[0094] TNFR2活化剂可以是一种TNF- α 诱导物质,诸如BCG。药用组合物可含有大于 2×10^6 CFU/剂量的BCG(例如,大于 2.3×10^6 CFU/剂量的BCG)。该组合物可含有小于 4×10^6 CFU/剂量的BCG。该组合物可含有从约 2×10^6 至约 2.5×10^6 、从约 2.5×10^6 至约 3×10^6 CFU/剂量的BCG、从约 3×10^6 至约 3.5×10^6 CFU/剂量的BCG或从约 3.5×10^6 至约 4×10^6 CFU/剂量的BCG。该组合物可含有从约 2×10^6 至约 4×10^6 CFU/剂量的BCG。该组合物可含有从约 2.3×10^6 至约 4×10^6 CFU/剂量的BCG。该组合物可含有从约 2.5×10^6 至约 4×10^6 CFU/剂量的BCG。在一个实施例中,BCG组合物可以是冻干的。可替代地,该组合物可含有BCG的盐溶液。BCG的盐溶液可通过将冻干的BCG在盐溶液中进行重构来制成。溶液可具有小于约0.2cc/剂量(例如,约0.1cc/剂量)的体积。

[0095] 可在受试者被鉴定为不太可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗之后给予含有一种或多种多能性细胞的本发明组合物。向对其有需要的受试者给予的含有多能性细胞的组合物可被配制成通过任何路径来给予,例如,皮内、肌内、胃肠外、静脉内、动脉内、颅内、皮下、眼眶内、心室内、脊柱内、腹膜内或鼻内。优选地,以胃肠外方式诸如通过注射(例如,静脉内

或肌内)或手术移植给予含有一种或多种多能性细胞的组合物。可向对其有需要的受试者给予一次或多次(例如,1、2、3、4或5或更多次)含有多能性细胞的组合物。一次或多次的给予可间隔1周、2周、3周、4周、5周、6周、2个月、6个月、1年、1.5年、2年或3年或更长。在给予含有多能性细胞的组合物后1周、2周、3周、4周、5周、6周、2个月、6个月、1年、1.5年、2年或3年或更长,可进行TNFR2活化剂的给予。可替代地,TNFR2活化剂可通过上述的任何路径(例如,路径可以是相同或不同的)与含有多能性细胞的组合物同时、或继其之后给予,或者两种组合物可被组合成用于呈单剂型的给予。

[0096] 本发明的试剂盒

[0097] 用于CD8表面蛋白测定的试剂盒

[0098] 本发明提供了这样的试剂盒:这些试剂盒包括用于来自受试者的样品的容器、防腐剂(例如,达沙替尼,诸如足以在样品中产生至少约10nM(例如,至少约50nM、至少约100nM、至少约200nM、至少约500nM或至少约1 μ M)的达沙替尼的最终溶液的量;例如,具有至少约10mM达沙替尼的1mL溶液或具有至少约1.0 μ g至约25mg的呈固体形式的达沙替尼的容器)、用于收集样品并且/或者将样品放入容器中的仪器以及用于收集和保存样品的说明书。该试剂盒可进一步含有缀合至荧光染料和/或TNFR2活化剂(例如,卡介苗(BCG)、完全弗氏佐剂、TNF- α 、TNF- α 受体11激动剂、TNF- α 突变蛋白、白介素-1、白介素-2、组织型纤维蛋白溶酶原因子、脂多糖(LPS)、淋巴毒素或恶液质素)的CD8抗体。上述试剂盒中的说明书还可说明实际工作者(例如,医师、护士或实验室助手)可如何使用来自受试者的样品来确定受试者是可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗还是不太可能响应于该治疗。该试剂盒可进一步含有用于收集样品并且将样品转移到容器中的工具(例如,针或导管),用于将细胞保持在限定温度(例如,在约4 $^{\circ}$ C与约27 $^{\circ}$ C之间)下的组分,诸如冷却剂(例如,冰袋、干冰、冷却盒或冷却板)。必要的话,该试剂盒还可包括冷箱或绝缘载体以用于运输细胞样品。

[0099] 用于C肽检测的试剂盒

[0100] 本发明还提供了这样的试剂盒:这些试剂盒包括具有在其表面上固定有捕获剂(例如,结合C肽的抗体)的装置、缀合至过氧化物酶(例如,选择性地结合C肽的抗体)的检测结合剂、过氧化物酶底物以及说明书,这些说明书说明了实际工作者(例如,医师、护士或实验室助手)可如何使用用于分析来自受试者的样品的试剂盒内容物来确定受试者是可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗还是不太可能响应于该治疗。

[0101] 用于HbA1c测定的试剂盒

[0102] 本发明还提供了这样的试剂盒:这些试剂盒包括用于存储来自受试者的样品的容器以及用于确定该样品中的HbA1c水平和使用该HbA1c水平来确定受试者是需要含有TNFR2-活化剂的组合物的给予还是不需要该给予的说明书。

[0103] 下面的实例意在说明本发明。这些实例不意欲以任何方式限制本发明。

[0104] 实例

[0105] 实例1.将患有1型糖尿病的受试者鉴定为可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗

[0106] 在使用本发明的药用组合物(例如,TNFR2活化剂)治疗前,可测试受试者(例如,人类)以确定受试者是否可能响应于该治疗。可使用从受试者收集的样品(例如,血液、血液组分或尿)来进行该测试。例如,为了制备血清样品,可通过静脉穿刺收集血液、使其凝结并且可通过离心来分离血清。为了制备血浆样品,可通过静脉穿刺将血液收集到含有作为抗凝

剂的肝素或EDTA的管中;然后可将血浆部分从该样品中分离。为了制备尿样品,可收集24小时尿样品(没有防腐剂)。在测试前,可通过过滤或离心将细胞碎片从样品中除去。

[0107] 然后可使用例如默克迪亚超灵敏C肽ELISA试剂盒(由瑞典乌普萨拉市的由默克迪亚公司制造的)测定来自受试者的制备好的样品以得到来自受试者的样品中的C肽水平。如果测量的C肽水平低于约1.5pmol/L,则受试者被鉴定为不太可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗。被鉴定为具有基本上不可检测的C肽水平的受试者可被排除在使用含有TNFR2-活化剂的组合物的治疗之外。具体地,此受试者可被确定为具有不足数目的内源性β-胰岛细胞剩余或不足量的用于分化为β-胰岛细胞的多能性细胞(诸如Hox11⁺脾细胞)剩余,并且因此在使用TNFR2活化剂的治疗后,不太可能表现出正常血糖量的恢复或改善。确定受试者具有基本上不可检测的C肽水平还可表明受试者将得益于β-胰岛细胞或可分化为β-胰岛细胞的多能性细胞,诸如Hox11⁺脾细胞的移植。如果测量的C肽水平大于约1.5pmol/L,则受试者可被确定为可能响应于使用TNFR2活化剂的治疗;可使用本发明的TNFR2活化剂组合物治疗此受试者,预期此疗法将使得β-胰岛细胞再生和/或正常血糖量恢复或改善。

[0108] 测试可重复一次或多次以校正数据的可能的单次测量的变化性。

[0109] 实例2. 使用本发明的药用组合物治疗人类的1型糖尿病

[0110] 在使用TNFR2活化剂(例如,BCG)的治疗之前,可从在实例1中被鉴定为可能响应于治疗的受试者中提取样品(例如,血液)。可分析该样品的HbA1c水平以确定研究的基准HbA1c水平。

[0111] 可以含有 $1.0-2.3 \times 10^6$ CFU/给予(体积=0.1cc/给予)的剂量、以间隔四周的两次皮内注射形式向受试者给予含有在盐水中重构的BCG的药用组合物。在治疗后,可通过使用功能性测定(自体反应性CD8⁺T细胞测定和调节性CD4⁺T细胞测定)测试从受试者获得的样品来对受试者进行随时监测,这些测定在下文进一步描述。

[0112] 在治疗后,在给予TNFR2活化剂诸如BCG后1年(例如,2年、3年、4年、5年或6年),可评估来自受试者的样品的HbA1c水平以确定端点并且以证实治疗的长期成功度。相对于基准HbA1c水平,HbA1c水平的至少约0.1%(例如,0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4%或0.5%)的减少将指示治疗的可能的长期成功度。

[0113] 可继续监测受试者的HbA1c水平的变化。相比于基准HbA1c水平,HbA1c水平至少约0.1%(例如,0.2%、0.3%、0.4%或0.5%)的增加可表明受试者应再次被给予本发明的药用组合物。

[0114] 免疫监测

[0115] 1. T细胞测定

[0116] 可使用Dyna1 CD4阳性分离试剂盒和Dyna1 CD8阳性分离试剂盒(加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad)的英杰公司(Invitrogen))从静脉穿刺1.5h内的新鲜人类血液中分离CD4⁺和CD8⁺T细胞。在产生既不含磁性颗粒又不含用抗体的正向选择的细胞方面,此方法是独特的。

[0117] 2. 对1型糖尿病的自体反应性CD8⁺T细胞的检测

[0118] 高度纯化、有活力的和高产量的CD8⁺T细胞可用于四聚体染色,如先前所述的(韦尔金斯(Verginis)等人,美国科学院院报105:3479-3484,2008)。四聚体是由特异性HLA 1类蛋白与外部结合槽(binding groves)中装载的肽的结合区构成的诊断试剂。然后四聚体

被制成荧光的并且充当可结合对呈递的肽片段具有特异反应性的T细胞的诊断试剂。为了检测针对胰岛素的自体反应性T细胞,可使用针对具有HLVEALYLV片段的HLA*0210胰岛素 β 10-18的四聚体(贝克曼库尔特(Beckman Coulter)#T02001)。对于阴性对照四聚体,可使用以下四聚体试剂:具有KIFGSLAFL序列的HLA*0201 Her-2/neu(贝克曼库尔特(#T02001))、乳腺癌肽、不具有非特异性肽片段的HLA*0201空(贝克曼库尔特#T01010))和/或针对具有NLVPMVATV序列的CMV病毒HLA-A*0201CMGPP65的四聚体(贝克曼库尔特#T01009))。

[0119] 在26°C下培养12h,然后在37°C下培养6h之后和/或在26°C下静置1h,然后在37°C下静置12h之后,均可进行四聚体试剂染色。然后可使用Sytox-绿色(马塞诸塞州沃本MBL国际公司(MBL International Co., Woburn, MA))和/或CD8抗体(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司(BD Biosciences, San Jose)对细胞进行染色。可将所有细胞在4°C下在黑暗中染色30分钟,并且然后可使用具有2%热灭活的牛血清的汉克(Hank)缓冲液洗涤两次。平均地,可分析100,000个高纯的CD8⁺T细胞以确保数据点清楚并且允许对稀薄的自体反应性T细胞的检测。所有细胞可以是新鲜的以防止固定人为假象(fixation artifacts)并且允许相对于活细胞定量死细胞。可通过以荧光标记死细胞的两种染色即的Sytox(马塞诸塞州沃本MBL国际公司)或碘化丙啶(P1)中任一个来定量细胞活力。

[0120] 3. 对1型糖尿病患者中T_{reg}CD4⁺细胞的检测

[0121] 可使用两种不同的方法来检测T_{reg}细胞。可使用CD4、CD25^亮以及Foxp3染色法或使用CD4、CD25^亮以及CD127^低抗体染色法来检测T_{reg}细胞。简而言之,可在室温下,将分离的CD4阳性细胞与CD4-PE-Cy5(克隆RPA-T4)和CD25-PE(克隆BC96)抗体一起温育20分钟。在洗涤后,可在室温下,使用Foxp3固定/透化溶液(赛泰克(Biolegend))固定细胞,持续20分钟。可洗涤细胞并且在室温下使用赛泰克的Foxp3透化缓冲液透化15分钟。然后可使用Foxp3亚历克萨荧光(Alexa Fluor)477抗体(克隆259D)对细胞染色30分钟。在进行流式细胞术分析之前,可针对每个样品进行同型对照。可替代地,对于T调节性细胞的检测,还可使用CD4抗体(克隆RPA-T4,加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)和抗人类CD127抗体(克隆h1L-7R-M21, BD生物科学公司)进行染色。用于检测T_{reg}细胞的其他方法在美国序列号61/763,217中有所描述,该文献通过引用以其全文结合在此。

[0122] 实例3. 对来自患有EBV感染的受试者的样品中的CD8⁺T细胞的检测

[0123] 材料与方法

[0124] 受试者

[0125] 在马萨诸塞州综合医院处招募患有1型糖尿病的患者。对糖尿病患者进行常规地筛选以表征疾病病程并且排除具有可能干扰的医学病状的受试者。在筛选过程中,鉴定了具有长期1型糖尿病和最近发作的EBV的三名患者。在此研究中,使不具有EBV感染的糖尿病患者(N=66)作为参考群体。将所有患者血液和对照血液抽入含有EDTA的BD VacutainerTM管(新泽西州富兰克林湖的BD公司(BD, Franklin Lakes, NJ))中。

[0126] 道德声明

[0127] 该研究由马塞诸塞州综合医院机构审查委员会批准(Massachusetts General Hospital Institutional Review Board)(IRB方案号2001P-001379)。从所有供血者获得书面同意。

[0128] 对表位特异性CD8⁺T细胞的检测

[0129] 为了检测T细胞的具有受限制的抗原特异性的特异性亚群体,利用了装载有小肽片段的商业上可获得的HLA I 类试剂。这些商用试剂通常被称为四聚体(伊利诺伊州德斯普兰斯(DesPlaines IL.)的MBL国际公司,旧称加利福尼亚州富勒顿(Fullerton)贝克曼库尔特)或Dextramer(维吉尼亚州费尔法克斯的Immudex公司(Immudex, Fairfax, VA))。两种T-细胞检测方法的不同之处在于检测试剂的基本结构而不是对自体反应性T细胞的结合特异性。购买四聚体或dextramer试剂是荧光标记的以用于使用流式细胞仪检测抗原特异性T细胞的结合试剂。

[0130] 对于包含在本文中的研究,检测了两种类型的抗原特异性T细胞,即EBV特异性T细胞(装载肽的I类HLA;GLCTLVAML)或胰岛素-B自体反应性T细胞(装载胰岛素-B链的I类HLA;HLVEALYLV)。对T细胞的背景荧光,匹配的I类HLA结构装载有不相关的肽(贝克曼库尔特, Immudex公司)。

[0131] 分离的CD8⁺T细胞法

[0132] 对于CD8⁺T细胞从新鲜血液的直接分离,使用了基于涂覆有抗CD8抗体的顺磁性小珠的“Detach-a-bead”CD8阳性分离试剂盒(加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)(参见布格(Burger)等人,公共科学图书馆综合卷(PLoS One),6:e22430,2011,该文献通过引用结合在此)。使得这些小珠在室温下、在翻转器上、在连续搅拌下连接1小时。然后使用磁体固定小珠/细胞复合物,并且通过使用含有2%FBS(胎牛血清)的HBSS(不含有钙和镁的汉克平衡盐溶液,纽约州格兰德岛(Grand Island)的英杰公司)重复洗涤除去任何未结合的(非CD8)细胞。然后使用分离试剂盒中供应的Detach-A-Bead试剂使小珠与剩余的CD8⁺细胞脱离。此试剂是针对涂覆在小珠上的CD8抗体的抗原识别位点的多克隆抗体。它通过对CD8抗体结合位点的竞争的手段使抗体/小珠复合物与细胞脱离,从而基本上留下处女型细胞(virgin cell)。

[0133] 然后使用PE(藻红蛋白)标记的四聚体或dextramer(20分钟,RT(室温),黑暗中)并且随后使用APC-抗CD8抗体(在RT下在黑暗中10分钟;克隆SK1,加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)标记分离的CD8⁺T细胞以确定分离细胞制备物的纯度。然后将样品用HBSS 0.1%甲醛缓冲液固定,使用HBSS洗涤并且重悬在HBSS/0.05%甲醛中以用于流式细胞术。

[0134] 全血法

[0135] 首先使用50体积的含有2%FBS的HBSS洗涤血液样品。然后使用四聚体或dextramers(在RT下在黑暗中20分钟,)并且随后使用APC-抗CD8抗体(在RT下在黑暗中10分钟)标记它们以能够门控(gating on)CD8⁺T细胞。然后使用NH₄Cl/甲醛缓冲液同时地溶解并固定样品,使用HBSS洗涤并且重悬在HBSS/甲醛中以用于流式细胞术。

[0136] 流式细胞术

[0137] 使用FACSCalibur流式细胞仪(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)分析细胞并且以列表模式收集数据。使用细胞Quest软件(BD生物科学公司)进行数据分析。流动门(Flow gates)被设为“开”以包括所有细胞。开放的门包括所有大小的细胞,但排除细胞碎片、红细胞、破碎细胞以及凋谢体。分别以FL2和FL7检测PE和APC荧光。将CD8⁺T细胞百分比定义为CD8阳性事件的数目和淋巴细胞门中事件的总数的比率。

[0138] ELISA

[0139] 通过Elisa确定EBV感染的患者的血清中的C肽。超灵敏C肽Elisa来自于默克迪亚

公司(瑞典乌普萨拉市)。根据制造商的说明书来使用试剂盒。通过马塞诸塞州综合医院临床实验室服务确定VCA IgM、早期抗原D以及EBNA的血清水平。

[0140] 统计

[0141] 使用0.05置信水平下的不成对的带尾的学生t检验(图3A和2B)或单侧科-斯二氏检验(one sided Kolmogorov-Smirnov test)(图2)确定了统计显著性。

[0142] 结果

[0143] 临床表现(Clinical profiles)

[0144] 在1型糖尿病患者的常规视察的过程中,鉴定了具有最近发作EBV感染的三名患者,临床上又称之为单核细胞增多症或“传染性单核细胞增多症(mono)”(参见表1)。在呈现之后,密切随诊(followed closely)这些患者,持续至少15周。最近发作EBV感染提供了研究在EBV感染的临床症状的过程中和之后两者的自身免疫性和EBV特异性T细胞的流行性和性状的机会。它还提供了证明BCG治疗的临床试验中的以下的过去观察结果的重复性的机会:EBV感染使得胰腺产生的胰岛素瞬时增加,如以共分泌的C肽所测量的(参见佛斯特曼等人,公共科学图书馆综合卷,7:e41756,2012,该文献通过引用结合在此)。

[0145] 表1. 三名EBV受试者的临床特征的总结。

[0146] 受试者的临床特征

[0147]

	性别	年龄 (年)	发作时的年龄 (年)	1型糖尿病的持 续时间 (年)	HbA1c (%)	GADA 状态
受试者1	男	47	17	30	8.2	阳性
受试者2	女	17	11	6	8.0	阳性
受试者3	女	21	2	19	9.8	阴性

[0148] 首先通过标准血清学方法和症状临床诊断EBV感染。这些受试者的临床特征总结在表1中。所有受试者具有建立的1型糖尿病(具有6、19和30年的持续时间)和升高的HbA1c。受试者中的两名(受试者1和2)对谷氨酸脱羧酶GAD65自身抗体是阳性的,该自身抗体是1型糖尿病的胰岛特异性标志物。

[0149] EBV感染的时程

[0150] 在呈现有EBV感染的症状并且对其临床诊断之后,进行更详细的EBV抗体血清学研究来确定感染时程的细节并且相对于在此进行的依序的血液研究估算感染的发作时间(表2)。

[0151] 表2. 对在三名EBV受试者的第一次视察过程中抽出的血液样品进行的EBV抗体测试的结果以及估算的EBV感染的开始的相关性。

[0152] ESV抗体结果

[0153]

	0-6周, VGA IgM	4-8周, 早期抗原D	持续6-8周, EBNA	估算的 持续时间
受试者1	阴性	阳性	未检测到	2周
受试者2	阳性	阳性	阴性	4周
受试者3	阳性	阴性	阴性	2周

[0154] 检测针对不同时间处的EBV病毒颗粒峰值的不同部分的EBV抗体亚类。使用了VCA IgM、早期抗原D以及EBNA的组合。这些标志物分别在EBV感染后0-6周、4-8周以及6-8周达到

峰值(表2)。对在此研究中报告的所有后续数据,尤其是免疫事件的时间线进行作图并且外推至感染日期“0”。对于受试者1,本研究的呈现时间估算为感染后2周。对于受试者2,呈现时间估算为感染后4周。对于受试者3,呈现时间估算为感染后2周。

[0155] 对EBV特异性CD8⁺T细胞的检测

[0156] 虽然诊断EBV感染的典型的临床方法涉及抗体测试,但是在研究设定中可以通过直接监测新产生的EBV特异性T细胞来证实感染。使用了EBV特异性四聚体,即装载有合成肽序列GLCTLVAML的HLA 1类蛋白。因此,使用流式细胞术检测EBV特异性CD8⁺T细胞(图1A和1B)。虽然相对于受试者2和3,受试者1中利用了稍微不同的检测这些EBV特异性T细胞的方法(分离的CD8⁺T细胞相对于直接观察溶解血液中的CD8⁺T细胞),但是所有受试者的EBV特异性T细胞均具有在荧光的背景水平之上的早期升高(图1B)。

[0157] EBV感染的受试者中C肽的时程

[0158] 过去十五年的研究已显示TNF的系统性增加或使用BCG或EBV的TNF诱导使得胰腺再生并且使得C肽恢复(参见儿玉(Kodama)等人,科学(Science),302:1223-1227,2003;佛斯特曼等人,公共科学图书馆综合卷,7:e41756,2012;和佛斯特曼,临床免疫学杂志(J.Clin.Immunol.)13:1-7,1993,这些文献通过引用结合在此)。C肽是与胰岛素共分泌的蛋白并且是用于在外源性给予的胰岛素存在的情况下测量来自胰腺的胰岛素分泌的灵敏性方法。

[0159] 为了确定EBV感染对胰岛素分泌能力的影响,在患有EBV的受试者呈现给研究临床部(research clinic)之后,监测连续的血清C肽水平,持续至少15周。类似地监测同时研究的非EBV感染的长期糖尿病患者的参考群体,持续15周。对参考受试者的早晨空腹C肽的监测展示了受试者和测定的变化性。

[0160] 相比于参考群体的,EBV感染的受试者1和2中的C肽分别显示处统计学上显著的增加,分别为 $p=0.04$ 和 $p=0.0013$ 。受试者3未显示出胰腺的C肽的显著增加(图2)。

[0161] 1型糖尿病患者中EBV对胰岛素-B自体反应性T细胞的影响

[0162] 先前数据显示使用BCG(或非cGMP等效物完全弗氏佐剂(CFA))对非肥胖糖尿病(NOD)小鼠或糖尿病人类的治疗使得死亡的自体反应性T细胞瞬时增加。在非肥胖糖尿病小鼠中,在使用TNF、BCG或CFA的胰腺中观察到胰腺驻留的自体反应性T细胞直接在分泌胰岛素的胰岛的顶部上经历细胞凋亡(参见曲特赖贝尔(Kuhreiber)等人,分子内分泌学杂志(J.Mol.Endocrinol)31:373-399,2003,该文献通过引用结合在此)。在人类中,可通过死亡的自体反应性T细胞向循环中的快速释放来监测TNF对自体反应性T细胞的影响(参见佛斯特曼等人,公共科学图书馆综合卷,7:e41756,2012,该文献通过引用结合在此)。已知增加的TNF或TNFR2激动性抗体引起培养基中的鼠类和人类糖尿病患者自体反应性T细胞的细胞凋亡(参见班等人,美国国家科学院院报,105:13644-13649,2008,该文献通过引用结合在此)。

[0163] 为了确定EBV感染是否类似地杀伤或损伤自体反应性T细胞,检测三名最近EBV感染的受试者的外周血液中胰岛素-B自体反应性CD8⁺T细胞并且将其与未感染的长期糖尿病受试者进行比较。对长期糖尿病患者中的胰岛素-B自体反应性T细胞的追踪是可行的。使用灵敏的监测法,约41%(51个中有21个)的随机招募的长期1型受试者具有可检测的胰岛素-B自体反应性T细胞(0.28%至0.65%,图3A)。使用阴性dextramer试剂染色的相同1型糖尿

病CD8⁺T细胞表现出了0.19%至0.27%的背景信号范围(图3A)。

[0164] 如暴露于TNF诱导的感染的长期糖尿病患者的先前所示,在感染后,EBV感染的受试者在外周血液中表现出过多的胰岛素-B自体反应性T细胞。EBV感染的受试者中胰岛素-B自体反应性T细胞的平均百分比大于阴性背景染色中的($p=0.002$),也大于未感染的参考糖尿病患者的匹配群体中的($p=0.02$)。此发现支持增加TNF的感染使得这些自体反应性T细胞释放到循环中的结论。

[0165] 新释放的胰岛素-B自体反应性T细胞具有异常低的CD8⁺密度。

[0166] 对感染有EBV病毒的长期糖尿病患者中的胰岛素-B自体反应性T细胞的进一步分析揭示了抗原特异性CD8⁺T细胞的一些另外的显著特征(图3B)。在EBV感染后不仅在循环中存在更多的胰岛素-B自体反应性CD8⁺T细胞,而且细胞上CD8标志物的密度显著较低。如图3B中所示,在三个特征直方图中,对于EBV感染的受试者中的胰岛素-B自体反应性T细胞,CD8平均对数荧光密度为1408、1157以及1516。相比之下,对于来自未感染的长期糖尿病受试者的胰岛素-B自体反应性T细胞,CD8标志物的平均对数抗原密度为2976、4003以及4948。EBV感染的受试者中CD8蛋白的较低密度不是针对所有抗原特异性T细胞的普遍趋势,而是仅特异于自体反应性T细胞。对于这些相同的感染受试者,EBV特异性T细胞的对数CD8⁺T细胞密度是正常的。细胞表面上的CD8蛋白密度是4308、3530以及4416,这些值类似于未感染的糖尿病患者的胰岛素-B自体反应性T细胞上CD8蛋白的密度(图3B)。CD8⁺标志物的丧失指示了T细胞的细胞损伤或细胞凋亡(参见迪亚兹(Diaz)等人,白细胞生物学杂志(J.Leukoc.Biol.),76:609-615,2004,该文献通过引用结合在此)。因此,响应于TNFR2活化剂诸如TNF- α 或BCG的自体反应性T细胞的表面上CD8蛋白的丧失可用作诊断患有自身免疫性疾病的受试者可使用TNFR2活化剂治疗的可能性的代用指标。

[0167] 其他实施例

[0168] 在以上说明书中提及的所有公开物、专利以及专利申请都通过引用结合在此。在不偏离本发明的精神和范围的情况下,本发明所描述的装置和使用方法的各种修改和变型对本领域的技术人员来说是清楚的。虽然与特定实施例相结合描述了本发明,但应理解要求保护的本发明不应当过度局限于此类特定实施例。实际上,对于本领域技术人员来说清楚的用于实施本发明所描述的方式的各种修改旨在本发明的范围内。

[0169] 其他实施例在以下权利要求内。

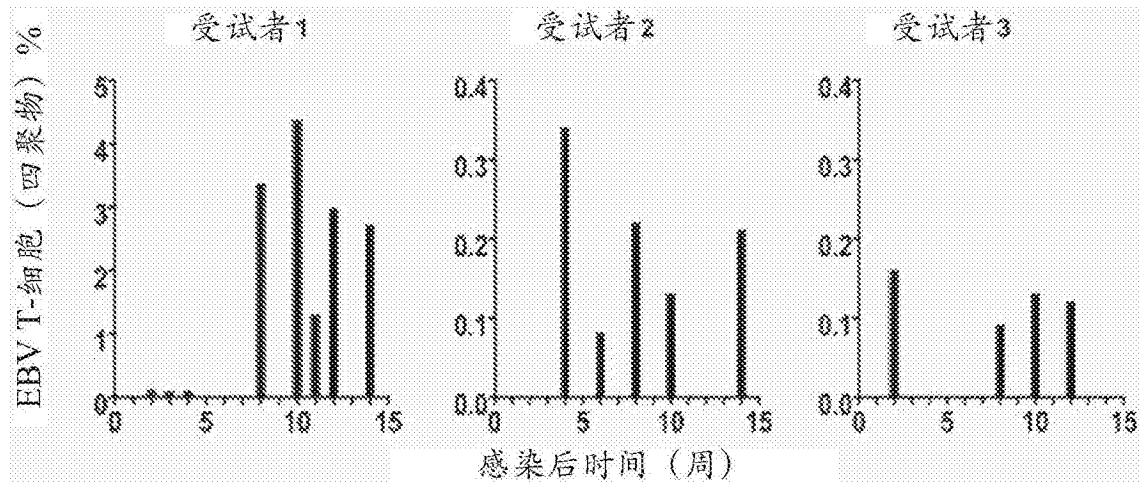


图1A

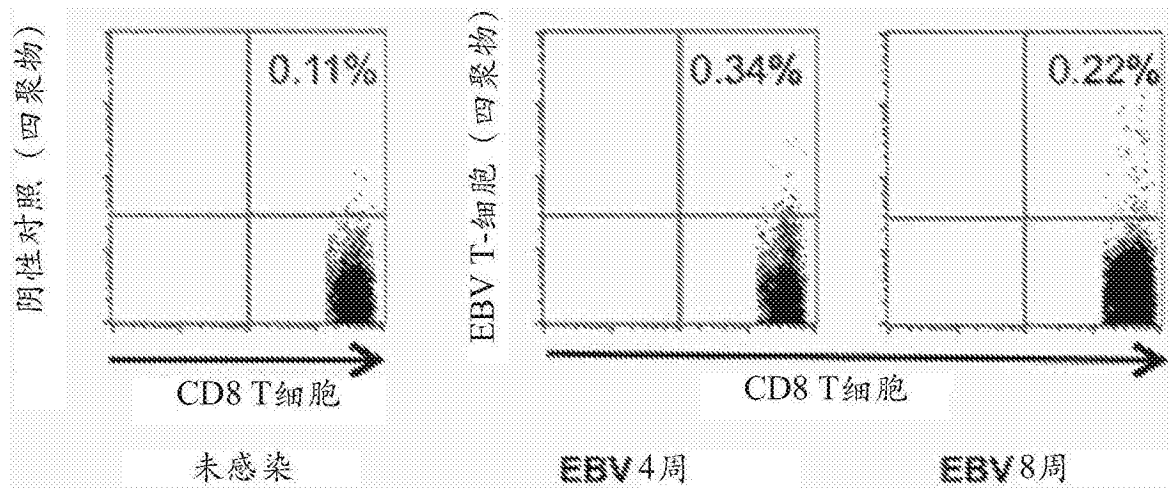


图1B

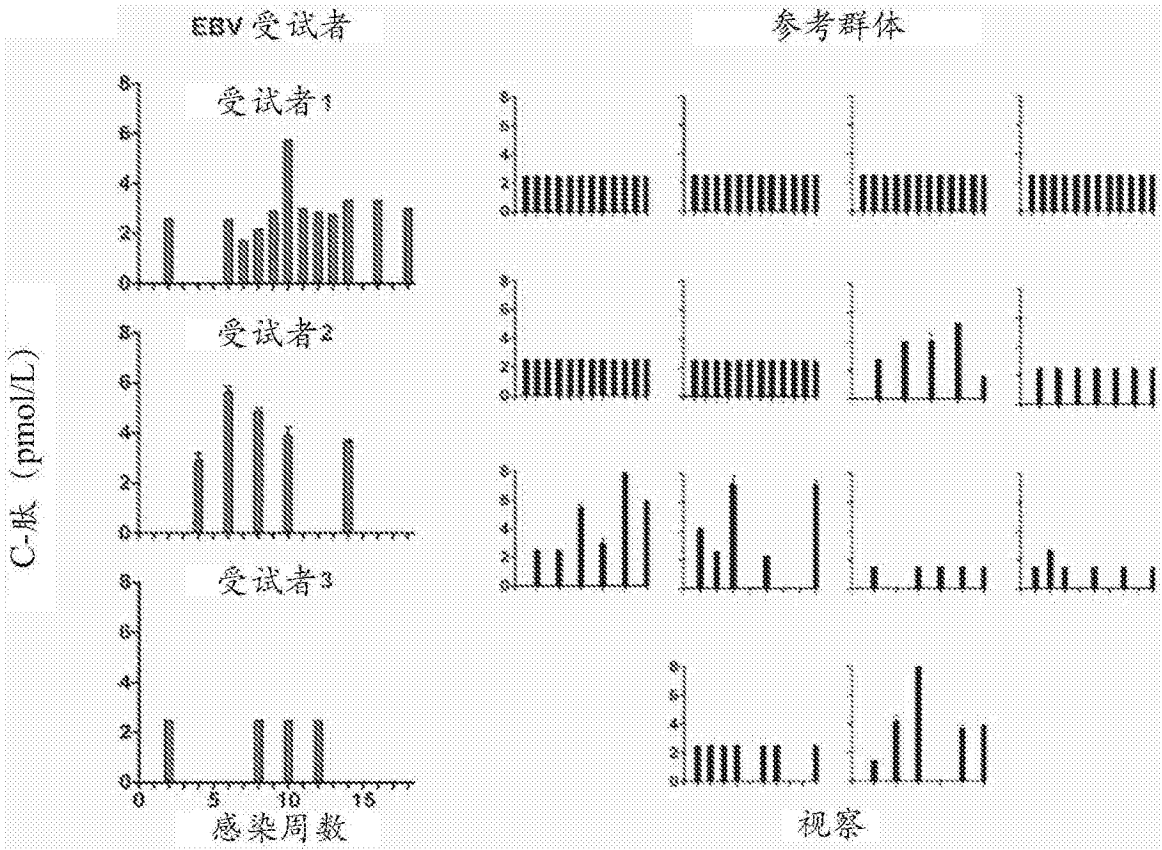


图2

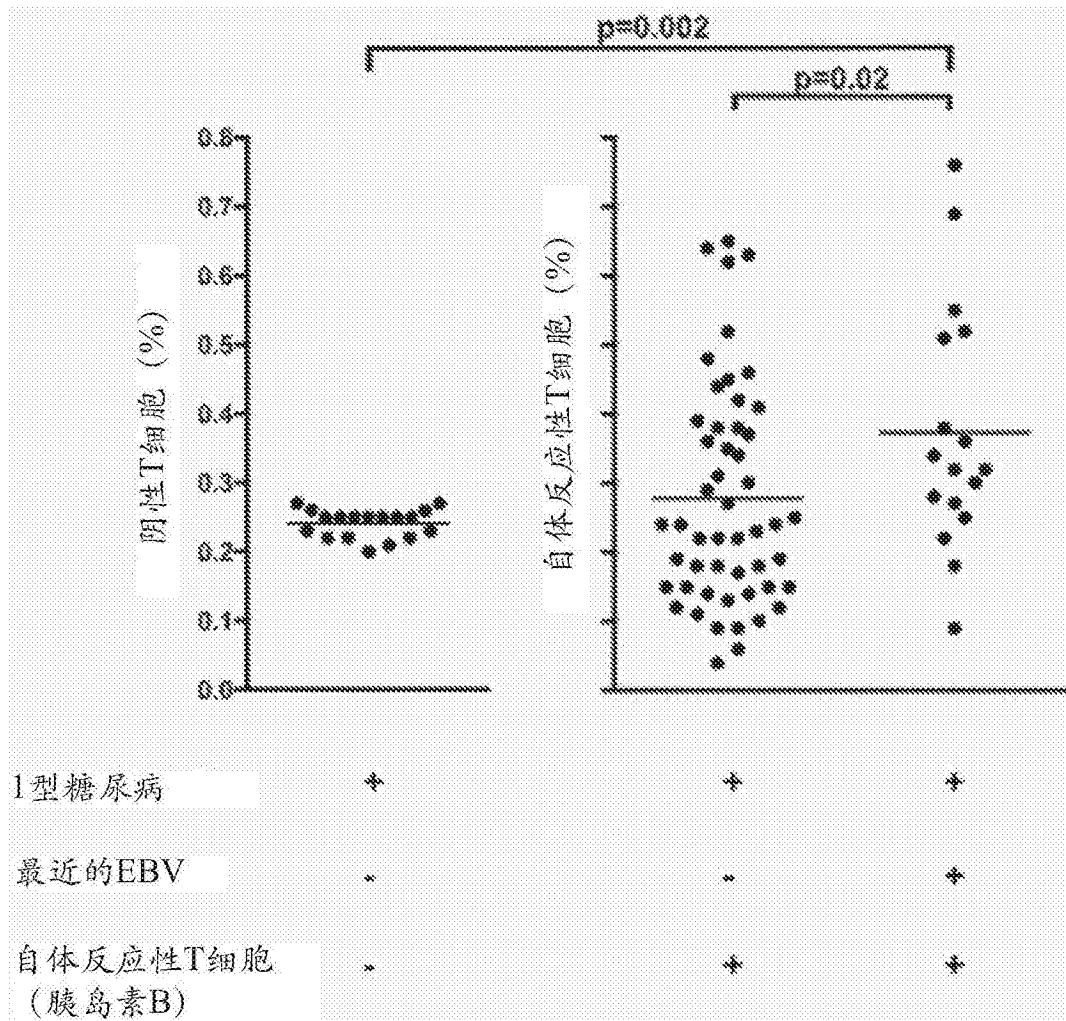


图3A

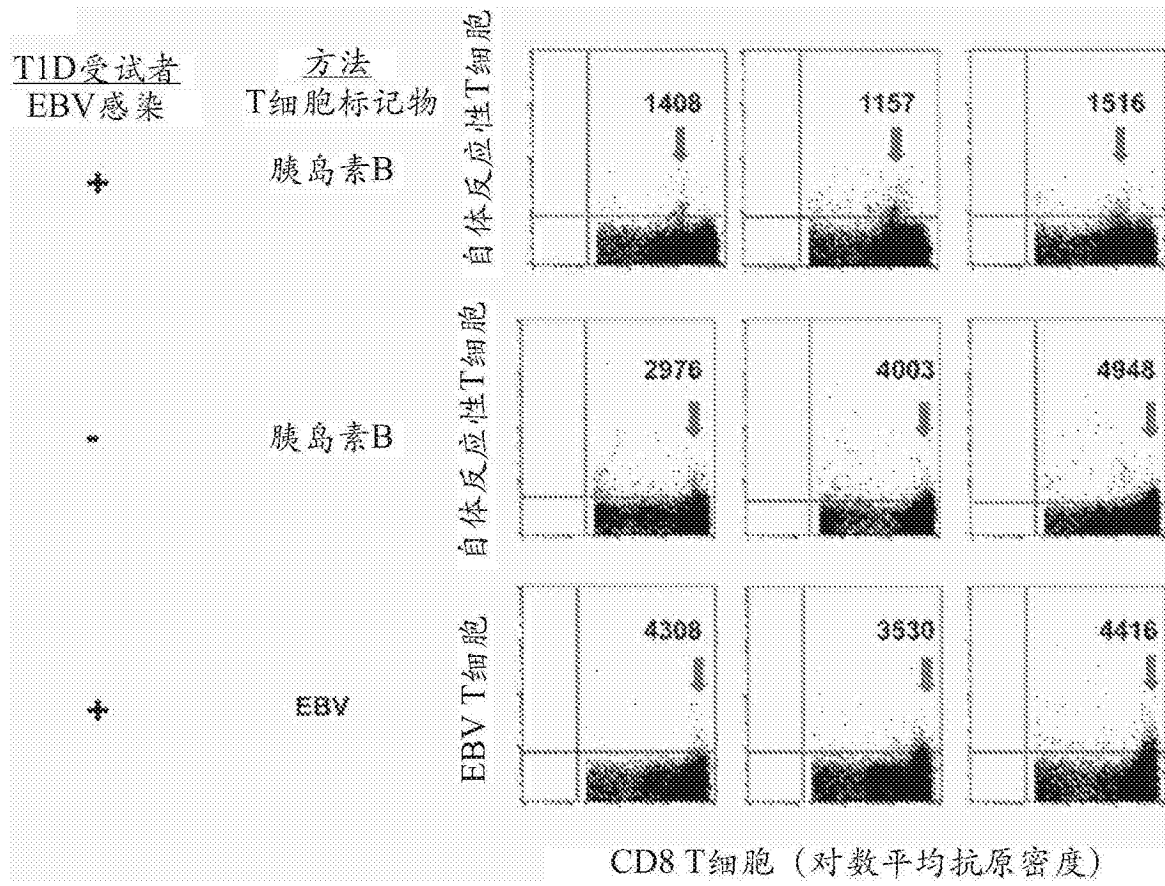


图3B

专利名称(译)	鉴定响应于用于自身免疫性疾病的治疗的受试者的方法以及用于治疗该疾病的组合物		
公开(公告)号	CN105829885A	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201480068827.4	申请日	2014-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
[标]发明人	D L 富斯特曼		
发明人	D.L.富斯特曼		
IPC分类号	G01N33/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/08 A61P11/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 G01N33/505 G01N2333/62 G01N2333/70517 G01N2800/042 G01N2800/24 G01N2800/52 A61K39/0266 C12Q1/28 G01N33/68 A61K39/04 A61K45/06 A61K2039/572 G01N33/564 G01N33/566 G01N2333/47		
代理人(译)	梁谋 万雪松		
优先权	61/892140 2013-10-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

在此披露了将患有自身免疫性疾病诸如1型糖尿病的受试者鉴定为可能响应于使用肿瘤坏死因子 α (TNF α)受体II活化剂的治疗方法，这些方法涉及测量自体反应性CD8+ T细胞的表面上的CD8蛋白密度并且如果该CD8蛋白密度相对于一种参考CD8+ T细胞降低，则将该受试者鉴定为可能响应于该治疗。对于1型糖尿病，该方法可涉及测量来自该受试者的体外生物样品的C肽水平，如果该C肽水平是可检测的，则将该受试者鉴定为可能响应于该治疗，并且如果该C肽水平是基本上不可检测的则将该受试者鉴定为不太可能响应于该治疗。本发明还特征在于用于治疗性用途的一种或多种TNFR2活化剂的药用组合物。

	性别	发病时的年龄		1型糖尿病的特		GADA	
		年龄 (年)	(年)	续时间 (年)	HbA1c (%)	状态	
受试者1	男	47	17	30	6.2	阳性	
受试者2	女	17	11	6	8.0	阳性	
受试者3	女	21	2	19	9.8	阴性	