

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780011543.1

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101410714A

[22] 申请日 2007.4.5

[21] 申请号 200780011543.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.7 [33] US [31] 60/790,354

[86] 国际申请 PCT/US2007/008597 2007.4.5

[87] 国际公布 WO2007/117611 英 2007.10.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.27

[71] 申请人 日立化成工业株式会社

地址 日本东京东

共同申请人 日立化成研究中心公司

西塞医疗中心

[72] 发明人 三桥将人 斯蒂芬·R·塔尔甘

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟 晶

权利要求书5页 说明书19页 序列表22页
附图16页

[54] 发明名称

在克罗恩病患者的外周血白细胞中 T 细胞受体介导的肿瘤坏死因子超家族与趋化因子 mRNA 增强的表达

[57] 摘要

本发明公开了一种方法，其通过检测应答刺激中某些 mRNA 的水平，用于确定患有克罗恩病的人是否可能对靶向 TNFSE 成员或细胞因子的治疗有应答。本发明还公开了一种评估克罗恩病治疗对人的效力的方法。此外，本发明公开了一种筛选用于克罗恩病的治疗中的化合物的方法。本发明还公开了一种随着时间监控克罗恩病患者疾病状态的方法。

1. 一种确定患克罗恩病的人是否可能会对治疗应答的方法，其包括：
体外刺激第一样品中的白细胞，其中所述第一样品含有来自所述人的白细胞；

刺激后，检测第一样品中选自由肿瘤坏死因子亚家族（“TNFSF”）-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子（C-C基序）配体（“CCL”）-2、CCL-3、CCL-4和趋化因子（C-X-C基序）配体（“CXCL”）-10所组成的组中的 mRNA 的量；

体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞，其中所述第二样品含有来自所述人的白细胞；

刺激后，检测所述第二样品中所述 mRNA 的量；以及

确定第一样品中所述 mRNA 的量与第二样品中所述 mRNA 的量的比例，其中如果所述比例为大约 1.7: 1 或更高，则所述患克罗恩病的人可能会对治疗有应答。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，刺激所述第一样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述第一样品混合。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，刺激所述第一样品中的白细胞包括将所述第一样品与选自由佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯（PMA）、植物凝血素（PHA）、交胚凝集素（WGA）、伴刀豆球蛋白-A（ConA）、脂多糖（LPS）、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物混合。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述第一样品和第二样品中的至少一个含有全血。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述治疗靶向 TNF- α 活性。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，所述治疗包括给药因福利美。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述治疗包括给药选自由环孢霉

素 A 和他克莫司所组成的组中的药物。

9. 一种评估克罗恩病治疗对人效力的方法，其包括：

体外刺激第一样品中的白细胞，其中所述第一样品含有来自所述人的白细胞；

体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞，其中所述第二样品含有来自所述人的白细胞；

刺激后，检测所述第一样品和第二样品中选自肿瘤坏死因子亚家族（“TNFSF”）-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子（C-C 基序）配体（“CCL”）-2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子（C-X-C 基序）配体（“CXCL”）-10 所组成的组中的 mRNA 的量；

计算所述第一样品中所述 mRNA 的量与所述第二样品中所述 mRNA 的量的第一比例；

为所述人实施治疗；

体外刺激第三样品中的白细胞，其中所述第三样品含有从实施治疗后的人获得的白细胞；

体外使用对照刺激物刺激第四样品中的白细胞，其中所述第四样品含有从实施治疗后的人获得的白细胞；

刺激后，检测所述第三样品和所述第四样品中所述 mRNA 的水平；

计算所述第三样品中所述 mRNA 的量与所述第四样品中所述 mRNA 的量的第二比例；以及

比较所述第一比例和所述第二比例，其中所述比例的显著差别是有效治疗的指示。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中，刺激所述第一样品和第三样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述样品混合。

11. 根据权利要求 9 所述的方法，其中，刺激所述第一样品和第三样品中的白细胞包括将所述样品与选自佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯（PMA）、植物凝血素（PHA）、麦胚凝集素（WGA）、伴刀豆球蛋白-A（ConA）、脂多糖（LPS）、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物混合。

12. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

13. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

14. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述比例的显著差别是所述第二比例高于所述第一比例, 并且所述治疗包括使肿瘤坏死因子 α 失活。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中, 所述治疗包括给药因福利美。

16. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中, 所述治疗包括给药选自由环孢霉素 A 和他克莫司所组成的组中的药物。

18. 一种鉴定治疗克罗恩病的假定药物的方法, 其包括:

获得第一样品、第二样品、第三样品和第四样品, 其含有所述人的白细胞, 其中在暴露到抗 T 细胞受体的抗体时, 所述人的白细胞显示出选自由肿瘤坏死因子亚家族 (“TNFSF”)-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子 (C-C 基序) 配体 (“CCL”)-2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 (“CXCL”)-10 所组成的组中的 mRNA 转录提高至少 1.7 倍;

体外刺激所述第一样品中的白细胞;

体外使用对照刺激物刺激所述第二样品中的白细胞;

刺激后, 检测所述第一样品和所述第二样品中所述 mRNA 的量;

计算所述第一样品中所述 mRNA 的量与所述第二样品中所述 mRNA 的量的第一比例;

将所述第三样品和第四样品暴露于所述药物;

暴露后, 体外刺激所述第三样品中的白细胞;

暴露后, 使用对照刺激物体外刺激所述第四样品中的白细胞;

刺激后, 检测所述第三样品和所述第四样品中所述 mRNA 的水平;

计算所述第三样品中所述 mRNA 的量与所述第四样品中所述 mRNA 的量的第二比例; 以及

比较所述第一比例和第二比例, 其中所述比例的显著差别是假定药物的指

示。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述样品混合。

20. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将样品与选自佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA)、植物凝血素 (PHA)、麦胚凝集素 (WGA)、伴刀豆球蛋白-A (ConA)、脂多糖 (LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物混合。

21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

22. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

23. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例。

24. 一种评估人的克罗恩病状态的方法，其包括：

体外刺激第一样品中的白细胞，其中，所述第一样品含有白细胞，并且是在第一时间从所述人获得的；

刺激后，检测所述第一样品中选自肿瘤坏死因子亚家族 (“TNFSF”)-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子 (C-C 基序) 配体 (“CCL”)-2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 (“CXCL”)-10 所组成的组中的 mRNA 的量；

体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞，其中，所述第二样品含有在所述第一时间从所述人获得的白细胞；

刺激后，检测所述第二样品中所述 mRNA 的量；

确定所述第一样品中所述 mRNA 的量与所述第二样品中所述 mRNA 的量的第一比例；

体外刺激第三样品中的白细胞，其中所述第三样品含有白细胞，并且是在第一时间之后的第二时间从所述人获得的；

刺激后，检测所述第三样品中所述 mRNA 的量；

使用对照刺激物刺激第四样品中的白细胞,其中所述第四样品含有在所述第二时间从所述人获得的白细胞;

刺激后,检测所述第四样品中所述 mRNA 的量;

确定所述第三样品中所述 mRNA 的量与所述第四样品中所述 mRNA 的量的第二比例; 以及

将第一比例和第二比例进行比较,其中,所述第一比例和第二比例的显著差别是疾病状态变化的指示。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述样品混合。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将样品与选自佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA)、植物凝血素 (PHA)、麦胚凝集素 (WGA)、伴刀豆球蛋白-A (ConA)、脂多糖 (LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物混合。

27. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

28. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

29. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述比例的显著差别是所述第二比例高于所述第一比例,则所述疾病状态的变化是疾病的加重。

30. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例,则所述疾病状态的变化是疾病的消退。

在克罗恩病患者的外周血白细胞中 T 细胞受体介导的肿瘤坏死因子超家族与趋化因子 mRNA 增强的表达

本申请要求 2006 年 4 月 7 日提交的美国临时申请 No. 60/790,354 的优先权，该临时申请的标题为在克罗恩病患者的外周血白细胞中 T 细胞受体介导的肿瘤坏死因子超家族与趋化因子 mRNA 增强的表达，这里将该临时申请通过参考全部并入，并作为本发明说明书的一部分。

背景

技术领域

本发明涉及一种预测患者对克罗恩病 (Crohn's disease) 治疗应答的方法，所述治疗包括拮抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肿瘤坏死因子超家族的其他成员或细胞因子；本发明还涉及监控这种治疗效力的方法。本发明还涉及筛选用于治疗克罗恩病的化合物的方法。本发明还涉及监控克罗恩病患者中疾病状态的方法。

相关技术描述

自身免疫性疾病的特征在于产生与宿主细胞反应的抗体或自身反应的免疫效应 T 细胞。在某些类型的自身免疫性疾病中经常鉴定到自身抗体，例如重症肌无力中的抗乙酰胆碱受体的抗体，以及系统性红斑狼疮中的抗 DNA 抗体。然而，在许多类型的自身免疫性疾病中没有观察到这类自身抗体。而且，经常在健康个体中检测到自身抗体，但这些抗体不会诱导自身免疫疾病。因此，除了自身抗体外，显然其他未被鉴定的机制参与自身免疫性疾病的发病。

一旦自身抗体与宿主靶细胞结合，则补体级联反应被认为会被激活以形成在靶细胞膜上形成 C5-9 膜攻击复合体，这会引发宿主细胞的死亡(参见, Esser, 毒理学 (Toxicology) 87, 229 (1994))。副产物趋化因子例如 C3a、C4a 或 C5a 招募更多的白细胞到损伤处 (参见 Hugli, 免疫学关键评论 (Crit. Rev. Immunol) . 1, 321 (1981))。被招募的白细胞或在损伤处自然存在的白细胞

通过 Fc 受体 (“FcR”) 识别抗体结合的细胞 (免疫复合物)。一旦 FcR 通过免疫复合物得到交联 (cross-bridged), 白细胞会释放 TNF- α (参见 Debets 等人, 免疫学杂志 (J Immunol). 141, 1197 (1998)), TNF- α 会结合宿主细胞表面上存在的特异性受体, 并诱导细胞凋亡或细胞损伤 (参见 Micheau 等人, 细胞 (Cell), 114, 181 (2003))。激活的 FcR 还会启动趋化细胞因子的释放以将不同亚型的白细胞招募到损伤处 (参见 Chantry 等人, 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol). 19, 189 (1989))。除了 FcR 外, 细胞毒性 T 细胞上的 T 细胞受体 (“TCR”) 也可以识别宿主细胞, 并以与交联的 FcR 相同的方式激活 TCR 功能 (参见 Brehm 等人, J. Immunol. 175, 5043 (2005))。TCR 功能被充分体现在通过与主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的反应呈递抗原上 (参见 Isaacs 等人, 炎症性肠病 (Inflamm. Bowel Dis). 11 Suppl 1, S3(2005); 以及 Garcia 等人, Cell 122, 333 (2005))。尽管 TCR 介导的细胞毒性功能没有被充分鉴定, 其可能参与没有鉴定到自身抗体的病例中, 因为免疫球蛋白和 TCR 是唯一能够识别靶的特异性结构的分子。这是自身免疫疾病分子机制的全部假设。

克罗恩病 (“CD”) 是一种包括胃肠道发炎的免疫疾病。尽管在临床上被充分鉴定, 但是其发病机理还很少被了解。然而, 已知 TNF- α (也被称作肿瘤坏死因子超家族成员 2 (“TNFSF-2”)) 的表达在如 CD 的炎症性肠病中提高。尽管可以使用 5-ASA 药物如柳氮磺吡啶、糖皮质激素或如硫唑嘌呤或 6-巯基嘌呤的嘌呤类似物治疗轻微到中度的 CD, 但对于标准治疗 (例如给药环孢霉素、他克莫司或抗炎性细胞因子) 不显疗效的严重 CD 病例, 治疗选择是非常有限的, 并且效果会变化。大部分 CD 患者会需要至少一次外科手术。因为治疗选择依赖于对 CD 患者疾病状态的评价, 因此期望开发评估疾病状态并监控疾病进展的新方法。

因福利美 (inflixmab) (Remicade®) 的开发是严重 CD 治疗中最近的进展, 其中因福利美是一种针对 TNF- α 的嵌合小鼠-人单克隆抗体。然而, 仅有大约 65% 的患者会对该药物有应答, 并且仅有大约一半的所述患者会在重复输注该抗体 (通常是每 8 周一次, 持续 44 周) 后进入完全缓解。由于该治疗的花费可以总计每年数万美元, 因此高度期望的是一种快速和容易评定 CD 患者是否是因福利美治疗的良好候选者, 以及评定一旦治疗开始后, 因福利美的效力的

方法。而且，一种快速筛选能够用于治疗 CD 的新药物的方法，将在开发补助或代替现有治疗的新型治疗方法中有益处。

发明内容

在一个实施方式中，提供了一种确定患克罗恩病的人是否可能会对治疗应答的方法，其包括：体外刺激第一样品中的白细胞，其中所述第一样品含有来自所述人的白细胞；刺激后，检测第一样品中选自由肿瘤坏死因子亚家族（“TNFSF”）-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子（C-C 基序）配体（“CCL”）-2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子（C-X-C 基序）配体（“CXCL”）-10 所组成的组中的 mRNA 的量；体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞，其中所述第二样品含有来自所述人的白细胞；刺激后，检测第二样品中所述 mRNA 的量；确定第一样品中 mRNA 的量与第二样品中 mRNA 的量的比例，其中如果所述比例为大约 1.7: 1 或更高，则所述患克罗恩病的人可能会对治疗有应答。

在另一个方面中，刺激所述第一样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述第一样品混合。

在另一个方面中，刺激所述第一样品中的白细胞包括将所述第一样品与选自由佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯（phorbol myristate acetate, PMA）、植物凝血素（phytohemagglutinin, PHA）、麦胚凝集素（wheat germ agglutinin, WGA）、伴刀豆球蛋白-A（concanavalin-A, ConA）、脂多糖（LPS）、木菠萝凝集素（jacalin）、岩藻聚糖（fucoidan）、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物进行混合。

在另一个方面中，所述第一样品和第二样品中的至少一个含有全血。

在另一个方面中，所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

在另一个方面中，所述治疗靶向 TNF- α 活性。

在另一个方面中，所述治疗包括给药因福利美。

在另一个方面中，所述治疗包括给药选自由环孢霉素 A 和他克莫司所组成的组中的药物。

在一个实施方式中，提供了一种评估克罗恩病治疗对人效力的方法，其包括：体外刺激第一样品中的白细胞，其中所述第一样品含有所述人的白细胞；

体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞,其中所述第二样品含有所述人的白细胞;刺激后,检测所述第一样品和第二样品中选自由肿瘤坏死因子亚家族(“TNFSF”)-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子(C-C基序)配体(“CCL”)-2、CCL-3、CCL-4和趋化因子(C-X-C基序)配体(“CXCL”)-10所组成的组中的mRNA的量;计算所述第一样品中mRNA的量与所述第二样品中mRNA的量的第一比例;为所述人实施治疗;体外刺激第三样品中的白细胞,其中所述第三样品含有从实施治疗后的人获得的白细胞;体外使用对照刺激物刺激第四样品中的白细胞,其中所述第四样品含有从实施治疗后的人获得的白细胞;刺激后,检测所述第三样品和所述第四样品中所述mRNA的水平;计算所述第三样品中所述mRNA的量与所述第四样品中所述mRNA的量的第二比例;以及将所述第一比例和所述第二比例进行比较,其中所述比例的显著差别是有效治疗的指示。

在另一个方面中,刺激所述第一样品和第三样品中的白细胞包括将抗T细胞受体的抗体与所述样品混合。

在另一个方面中,刺激所述第一样品和第三样品中的白细胞包括将所述样品与选自由佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯(PMA)、植物凝血素(PHA)、麦胚凝集素(WGA)、伴刀豆球蛋白-A(ConA)、脂多糖(LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚IgE、热聚IgA和热聚IgM所组成的组中的药物进行混合。

在另一个方面中,所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

在另一个方面中,所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

在另一个方面中,所述比例的显著差别是所述第二比例高于所述第一比例,并且所述治疗包括使肿瘤坏死因子 α 失活。

在另一个方面中,所述治疗包括给药因福利美。

在另一个方面中,所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例。

在另一个方面中,所述治疗包括给药选自由环孢霉素A和他克莫司所组成的组中的药物。

在一个实施方式中,提供了一种鉴定治疗克罗恩病的假定药物的方法,其

包括：获得第一样品、第二样品、第三样品和第四样品，其含有所述人的白细胞，其中在暴露到抗 T 细胞受体的抗体时，所述人的白细胞显示出选自自由肿瘤坏死因子亚家族 (“TNFSF”) -2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子 (C-C 基序) 配体 (“CCL”) -2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 (“CXCL”) -10 所组成的组中的 mRNA 转录提高至少 1.7 倍；体外刺激所述第一样品中的白细胞；体外使用对照刺激物刺激所述第二样品中的白细胞；刺激后，检测所述第一样品和所述第二样品中所述 mRNA 的量；计算所述第一样品中所述 mRNA 的量与所述第二样品中所述 mRNA 的量的第一比例；将所述第三样品和第四样品暴露于所述药物；暴露后，体外刺激所述第三样品中的白细胞；暴露后，使用对照刺激物体外刺激所述第四样品中的白细胞；刺激后，检测所述第三样品和所述第四样品中所述 mRNA 的水平；计算所述第三样品中所述 mRNA 的量与所述第四样品中所述 mRNA 的量的第二比例；以及将所述第一比例和第二比例进行比较，其中所述比例的显著差别是假定药物的指示。

在另一个方面中，刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述样品混合。

在另一个方面中，刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将样品与选自佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA)、植物凝血素 (PHA)、麦胚凝集素 (WGA)、伴刀豆球蛋白-A (ConA)、脂多糖 (LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物进行混合。

在另一个方面中，所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

在另一个方面中，所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

在另一个方面中，所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例。

在一个实施方式中，提供了一种评估人的克罗恩病状态的方法，其包括：体外刺激第一样品中的白细胞，其中所述第一样品含有白细胞，并且是在第一时间从所述人获得的；刺激后，检测所述第一样品中选自自由肿瘤坏死因子亚家族 (“TNFSF”) -2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、趋化因子 (C-C 基序)

配体 (“CCL”)-2、CCL-3、CCL-4 和趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 (“CXCL”)-10 所组成的组中的 mRNA 的量; 体外使用对照刺激物刺激第二样品中的白细胞, 其中所述第二样品含有在第一时间从所述人获得的白细胞; 刺激后, 检测所述第二样品中所述 mRNA 的量; 确定所述第一样品中所述 mRNA 的量与所述第二样品中所述 mRNA 的量的第一比例; 体外刺激第三样品中的白细胞, 其中所述第三样品含有白细胞, 并且是在第一时间之后的第二时间从所述人获得的; 刺激后, 检测所述第三样品中所述 mRNA 的量; 使用对照刺激物刺激第四样品中的白细胞, 其中所述第四样品含有在第二时间从所述人获得的白细胞; 刺激后, 检测所述第四样品中所述 mRNA 的量; 确定所述第三样品中所述 mRNA 的量与所述第四样品中所述 mRNA 的量的第二比例; 以及将第一比例和第二比例进行比较, 其中所述第一比例和第二比例的显著差别是疾病状态变化的指示。

在另一个方面中, 刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将抗 T 细胞受体的抗体与所述样品混合。

在另一个方面中, 刺激所述第一和第三样品中的白细胞包括将样品与选自佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA)、植物凝血素 (PIA)、麦胚凝集素 (WGA)、伴刀豆球蛋白-A (ConA)、脂多糖 (LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 所组成的组中的药物进行混合。

在另一个方面中, 所述对照刺激物包括纯化的对照免疫球蛋白。

在另一个方面中, 所述第一样品、第二样品、第三样品和第四样品中的至少一个含有全血。

在另一个方面中, 所述比例的显著差别是所述第二比例高于所述第一比例, 则所述疾病状态的变化是疾病的加重。

在另一个方面中, 所述比例的显著差别是所述第一比例高于所述第二比例, 则所述疾病状态的变化是疾病的消退。

附图说明

图 1 显示对来自 CD 患者和对照外周全血的人白细胞中 FcR 和 TCR 介导的 TNFSF、CCL、CXCL 和白介素 mRNA 基因表达定量的结果;

图 2 显示各种 IIAG 诱导的 mRNA 应答的关联;

图 3A-3B 显示各种抗 TCR 诱导的 mRNA 应答之间的关联;

图 4 显示热聚 IgG (heat aggregated IgG, HAG) 对外周血白细胞中 TNFSF 和趋化因子 mRNA 表达的影响;

图 5 显示抗 TCR 抗体对外周血白细胞中 TNFSF 和趋化因子 mRNA 表达的影响;

图 6 显示使用佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA) 对健康个体的全血刺激的结果;

图 7 显示使用植物凝血素 (PHA) 对健康个体的全血刺激的结果;

图 8 显示使用麦胚凝集素 (WGA) 对健康个体的全血刺激的结果;

图 9 显示使用伴刀豆球蛋白-A (ConA) 对健康个体的全血刺激的结果;

图 10 显示使用脂多糖 (LPS) 对健康个体的全血刺激的结果;

图 11 显示使用木菠萝凝集素对健康个体的全血刺激的结果;

图 12 显示使用岩藻聚糖对健康个体的全血刺激的结果;

图 13A-13D 显示使用热聚 IgG 对健康个体的全血刺激的结果;

图 14A-14C 显示使用热聚 IgA 对健康个体的全血刺激的结果;

图 15A-15C 显示使用热聚 IgM 对健康个体的全血刺激的结果;

图 16A-16C 显示使用热聚 IgE 对健康个体的全血刺激的结果。

优选实施方式的详细描述

本发明涉及使用白细胞中应对特异细胞刺激的差异 mRNA 转录模式 (patterns) 用于检验是否 CD 患者是特异治疗的良好候选者, 例如使用 Remicade® 的治疗的良好候选者。本发明还涉及使用这类差异转录模式用于评估是否为 CD 患者施加的治疗例如使用 Remicade® 的治疗是有效的。本发明的公开内容还涉及使用这些差异转录模式用于筛选用于治疗 CD 的候选药物。本发明的公开内容还涉及使用这些差异转录模式用于评估随着时间患者中 CD 的状态, 并监控该疾病的进展。

如上所述, CD 的病理学可能涉及 CD 患者中免疫细胞中 FcR 或 TCR 发挥功能。为了进一步检验 FcR 或 TCR 在疾病中的可能作用, 有用的是检验是否 FcR 或 TCR 在外周血中循环白细胞中的功能在白细胞迁移到自身免疫性疾病患者病理位置之前是正常的, 或者在该迁移之前已经被增强。为了分析 FcR

或 TCR 的功能在 CD 患者中的外周血白细胞中是正常的或增强的, 将热集结人 IgG (“HAG”) 或针对 α/β T 细胞受体的单克隆抗体 (“抗 TCR”) 直接加入到肝素化全血中以分别刺激 FcR 和 TCR 中。尽管对于 IgG, 存在多种 FcR (Fc γ R), 例如 Fc γ RI、IIa、IIb 和 III (GeneBank UniGene 数据库), HAG 作为能够与所有 FcR 亚型反应的通用刺激物。对由于使用 HAG 和抗 TCR 进行刺激所导致的 TNF 超家族 (“TNFSF”) mRNA (参见, 例如 GeneBank UniGene 数据库) 以及选择的 CCL 和 CXCL 趋化因子 mRNA 和趋化白介素 mRNA (IL-1 β 、IL-6 和 IL-8) 的 mRNA 水平的变化进行定量。由于在与全血混合时, γ/δ 抗 TCR 不会诱导任何 TNFSF mRNA, 因此选择 α/β 抗 TCR 用于刺激。

所采用的方法如下。从 GenBank 中的 UniGene 数据库获得各种 TNFSF 和趋化因子基因的核苷酸序列。通过引物表达 (Primer Express) (应用生物系统, 福斯特城, 加利福尼亚 (Applied Biosystem, Foster City, CA)) 和 HYB 模拟器 (HYBsimulator) (RNAture, 欧文 (Irvine), CA) 设计每个基因的 PCR 引物 (参见 Mitsuhashi 等人, 自然 (Nature) 367:759 (1994) 和 Hyndman 等人, 生物技术 (BioTechniques), 20:1090 (1996))。下面的表 1 中总结了这些序列。通过 IDT (Coralville, IA) 合成这些寡聚核苷酸。

表 1: 引物序列

目标 mRNA	正向	反向
TNFSF-1	CAGCTATCCACCCACACAGATG (SEQ ID NO: 1)	CGAAGCCTCCAACAAGACAGT (SEQ ID NO: 2)
TNFSF-2	TCAAATCGGCCCCGACTATCTC (SEQ ID NO: 3)	CAGGGCAATTCATCCCMAAGT (SEQ ID NO: 4)
TNFSF-3	AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA (SEQ ID NO: 5)	CACCGCCCCAAACAAGGT (SEQ ID NO: 6)
TNFSF-4	CCCCCTCTTCCAACCTGAAGAA (SEQ ID NO: 7)	GGTATGTTCAGTGGTCACATTCAAG (SEQ ID NO: 8)
TNFSF-5	CCACAGTTCGGCCAAACCT (SEQ ID NO: 9)	CACCTGGTTGCAATTCAAATACTC (SEQ ID NO: 10)
TNFSF-6	TGGCAGCATCTTCACTTCTAAATG (SEQ ID NO: 11)	GAAATGAGTCCCCAAAACATCTCT (SEQ ID NO: 12)
TNFSF-7	CACACTCTGCACCAACCTCACT (SEQ ID NO: 13)	TGCACTCCAAAGAAGGTCTCATC (SEQ ID NO: 14)
TNFSF-8	ACCACCATATCAGTCAATGTGGAT (SEQ ID NO: 15)	GAAGATGGACAACACATCTCTCAAGA (SEQ ID NO: 16)

TNFSF-9	AGCTACAAAGAGGACACGAAGGA (SEQ ID NO: 17)	CGCAGCTCTAGTTGAAAGAAGACA (SEQ ID NO: 18)
TNFSF-10	GGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATG (SEQ ID NO: 19)	AAAAGGCCCGAAAAAACTG (SEQ ID NO: 20)
TNFSF-11	GAGTATCTTCAACTAATGGTGTACCTCACT (SEQ ID NO: 21)	TGGTCTTCCCTCCCTTTCATCA (SEQ ID NO: 22)
TNFSF-12	TACTGTACGGTGCACCTTTGATGAC (SEQ ID NO: 23)	GCAGTGGCTGAGAATTCCT (SEQ ID NO: 24)
TNFSF-13	ATATGGTGTCCGAATCCACCAT (SEQ ID NO: 25)	CCTGACCCATGGTGAAGTCA (SEQ ID NO: 26)
TNFSF-13B	ATGCCTGAAACACTACCCAAATAAAT (SEQ ID NO: 27)	GCAAGTGGAGTTCATCTCCTTCT (SEQ ID NO: 28)
TNFSF-14	CGTCCCTGTGCTGGATGA (SEQ ID NO: 29)	CATGAAAGCCCCGAAGTAAGAC (SEQ ID NO: 30)
TNFSF-15	TCCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT (SEQ ID NO: 31)	CCATTAGCTTGTCCCTTCTTG (SEQ ID NO: 32)
TNFSF-18	CGGCTGTATAAAAAACAAAGACATGAT (SEQ ID NO: 33)	TCCCCAACATGCAATTCATAAG (SEQ ID NO: 34)
IL-1B	GAAGATGGAAAAGCGATTTGICTT (SEQ ID NO: 35)	GGGCATGTTTTCTGCTTGAGA (SEQ ID NO: 36)
IL-5	GCTCTTGGAGCTGCCTACGT (SEQ ID NO: 37)	AAGGTCTCTTTCACCAATGCACTT (SEQ ID NO: 38)
IL-6	TCACTACTGGTCTTTTGGAGTTTG (SEQ ID NO: 39)	TCTGCACAGCTCTGGCTTGT (SEQ ID NO: 40)
IL-8	TGCTAAAGAACTTACATGTCAAGTGCAT (SEQ ID NO: 41)	TGGTCCACTCTCAATCACCTCA (SEQ ID NO: 42)
IL-12A	GCAGGCCCTGAAATTTCAACA (SEQ ID NO: 43)	GAAGTATGCAGAGCTTGAITTTIAGTTTTA (SEQ ID NO: 44)
IL-12B	GAAGTAIGCAGAGCTTGATTTIAGTTTTA (SEQ ID NO: 45)	CCCATTGCT CCAAGAIGAG (SEQ ID NO: 46)
IL-15	TGAAGTGCTTCTCTTGGAGTTACA (SEQ ID NO: 47)	CATTCCCATTAGAAGACAAACIGTTG (SEQ ID NO: 48)
IL-16C	AAAACCTCTTGGGAAGCATGAG (SEQ ID NO: 49)	CGGACCCCGAGGACAGTACT (SEQ ID NO: 50)
CCL-2	CCATTGTGGCCAAGGAGATC (SEQ ID NO: 51)	TGTCCAGGTGGTCCATGGA (SEQ ID NO: 52)
CCL-3	CACAGAATTTTATAGCTGACTACTTTGA (SEQ ID NO: 53)	TGGCTTGGTTAGGAAGATGACA (SEQ ID NO: 54)
CCL-4	GGTATTCCAAACCAAAAGGAGCA (SEQ ID NO: 55)	GTECAGTTCAGGTCATACACSTACT (SEQ ID NO: 56)
CCL-5	AGTCGTCTTTGTACCCCGAAA (SEQ ID NO: 57)	AGCTCATCTCCAAAGAGTTGATGTAC (SEQ ID NO: 58)
CCL-7	TGTGCTGACCCACACAGA (SEQ ID NO: 59)	GCTTTGGAGTTGGGTTTCTTG (SEQ ID NO: 60)

CCL-8	ACAGCTACACAAGAATCACCAACATC (SEQ ID NO: 61)	AGACCTCCTTGCCCCGTTT (SEQ ID NO: 62)
CCL-11	CCCAGAAAGCTGTGATCTTCAA (SEQ ID NO: 63)	TCCTGCACCCACTTCTTCTTG (SEQ ID NO: 64)
CCL-13	CCAAACTGGGCAAGGAGATCT (SEQ ID NO: 65)	GGCCAGGTGTTTCATATAATTCT (SEQ ID NO: 66)
CCL-14	TGCTTACCTACACTACCTACAAGATC (SEQ ID NO: 67)	GACAATCCGGGCTTGGA (SEQ ID NO: 68)
CCL-18	CAGAITCCACAAAAGTTCATAGTTGAC (SEQ ID NO: 69)	CCGGCCTCTCTTGGTTAGG (SEQ ID NO: 70)
CCL-19	CTGCTGTAGTGTTCACCACACTGA (SEQ ID NO: 71)	CTGCTGTAGTGTTCACCACACTGA (SEQ ID NO: 72)
CCL-20	GATACACAGACCGTACTTCTTCATCCTAA (SEQ ID NO: 73)	TGAAAGATGATACCATTGATGTCACA (SEQ ID NO: 74)
CCL-21	CGCTCTCAGGCAGAGCTATGT (SEQ ID NO: 75)	CTTGTCCAGATCCTGCATCAG (SEQ ID NO: 76)
CCL-22	GGCGTGGTGAAACACTTC (SEQ ID NO: 77)	ATCGGCACAGATCTCCTTATCC (SEQ ID NO: 78)
CCL-23	CGAAGCATCCCGTGTTCACT (SEQ ID NO: 79)	GATGACACCCGGCTTGGA (SEQ ID NO: 80)
CCL-24	CAGGAGTGATCTTCACCACCAA (SEQ ID NO: 81)	GGGTCCAGGTCTTTCATGT (SEQ ID NO: 82)
CCL-25	GGCGTCCAGSTTCTTCATGT (SEQ ID NO: 83)	GTAGAAATCGCAGCAGGCAGAT (SEQ ID NO: 84)
CCL-26	CTGCTTCCAATACAGCCACAAG (SEQ ID NO: 85)	GAGCAGCTGTTACTGGTGAATTCA (SEQ ID NO: 86)
CCL-27	CGTGCCTCACCTGGCTCAA (SEQ ID NO: 87)	GGTGCCTCAAACCACTGTGACA (SEQ ID NO: 88)
CCL-28	GGAAATGTTTGCCACAGGAAGA (SEQ ID NO: 89)	TGTTTCGTGTTTCCCCTGATG (SEQ ID NO: 93)
CXCL-1	CCACTGCGCCCAAACC (SEQ ID NO: 91)	GCAGGATTGAGGCAAGCTTT (SEQ ID NO: 92)
CXCL-2	CCCCTGGCCACTGAACTG (SEQ ID NO: 93)	TGGATGTTCTIGAGGTGAATTCC (SEQ ID NO: 94)
CXCL-3	GGAATTCACCTCAAGAACATCCA (SEQ ID NO: 95)	GTGGCTATGACTTCGGTTTGG (SEQ ID NO: 96)
CXCL-4	CCGTCCCAGGCACATCAC (SEQ ID NO: 97)	CCGTCCCAGGCACATCAC (SEQ ID NO: 98)
CXCL-5	AGAGCTGCGTTGCGTTTGT (SEQ ID NO: 99)	TGGCGAACACTTGCAGATTACT (SEQ ID NO: 100)
CXCL-6	CAGAGCTGCGTTGCACCTTGT (SEQ ID NO: 101)	ACACCTGCAGTTTACCAATCGTT (SEQ ID NO: 102)
CXCL-7	TCTGGAATTCATCCCAAAAACA (SEQ ID NO: 103)	TCTGGAATTCATCCCAAAAACA (SEQ ID NO: 104)

CXCL-9	CCACCTACAATCCTTGAAAGACCTT (SEQ ID NO: 105)	CAGTGTAGCAATGATTTCAATTTCTC (SEQ ID NO: 106)
CXCL-10	TCCACGTGTTGAGATCATTGC (SEQ ID NO: 107)	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG (SEQ ID NO: 108)
CXCL-16	CCCACAGCCAGGACATCAG (SEQ ID NO: 109)	CTTCCACAGCACATAGGAAAGG (SEQ ID NO: 110)

通过在 63℃ 下 PBS 中加热 20mg/mL 人 IgG (西格玛, 圣路易斯州(Sigma St. Louis)) 15 分钟制备热聚 IgG (HAG) (参见 Ostreiko 等人, Immunol Lett. 15, 311 (1987))。在 8 孔带状微管中, 加入 1.2μl HAG 或抗 TCR 抗体 (IgG1 κ) 或对照 (HAG 的磷酸盐缓冲液或抗 TCR 的小鼠对照 IgG1 κ) (BioLegend, 圣地亚哥(San Diego)), 并存储在 -20℃ 下, 直到使用。尽管此处采用小鼠 IgG1 κ 作为抗 TCR 抗体刺激的对照, 但还可以采用其它纯化的对照免疫球蛋白。将 60μl 新鲜肝素化的全血一式三份 (in triplicate) 加入到每个孔中, 并盖上盖子, 在 37℃ 下孵育 2-8 个小时。每次处理后, 将 50μl 全血转移到下面所描述的滤板。将每种血液样品冷冻存储于 -80℃ 直到使用。

根据在 Mitsuhashi 等人, 临床化学 (Clin. Chem.) 52:4 (公开为: doi: 10.1373/clinchem.2005.048983) 中所描述的方法从全血制备 mRNA 和 cDNA。也可以采用在美国专利申请系列 No. 10/796,298 中所公开的该方法, 此处通过参考将其并入。简言之, 将 96 孔滤板置于收集板之上, 并施加 150 μL 5mM Tris (pH 7.4)。接着在 4℃ 下, 以 120 × g 离心 1 分钟, 将 50 μL 血样品施加到每个孔, 并立即在 4℃ 下 120 × g 离心 2 分钟, 接着使用 300 μL PBS 对每个孔进行清洗一次, 并在 4℃ 下 2000 × g 离心 5 分钟。接着, 将 60 μL 裂解缓冲液贮液施加到滤板, 接着在 37℃ 下孵育 10 分钟, 其中所述裂解缓冲液贮液补充了 1% 的 2-巯基乙醇 (伯乐, 赫克尔士, 加利福尼亚, 美国 (Bio Rad, Hercules, CA, USA)), 0.5mg/mL 蛋白酶 K (皮尔斯, 洛克福特, 伊利诺斯州, 美国 (Pierce, Rockford, IL, USA)), 0.1mg/mL 鲑鱼精子 DNA (5 基本艾芬道夫/布林克曼 (Prime Eppendorf/Brinkmann), 威斯特伯里, 纽约, 美国 (Westbury, NY, USA)), 0.1mg/mL 大肠杆菌 (E. coli) tRNA (Sigma), 10mmol/L 的各种特异性反向引物的混合物以及标准的 RNA34 寡聚核苷酸。接着将所述滤板置于固定寡聚 (dT) 的微量培养板 (GenePlate, RNAture) 上 (参见 Mitsuhashi 等

人, Nature357: 519 (1992) 和 Hamaguchi 等人, Clin. Chem. 44, 2256 (1998); 此处通过参考将两者都并入), 并在 4°C 下 2000 × g 离心 5 分钟。在 4°C 下存储过夜后, 使用 100 μL 单纯裂解缓冲液对微量培养板进行清洗 3 次, 接着在 4°C 下使用 150 μL 清洗缓冲液 (0.5M NaCl, 10mM Tris (pH 7.4), 1mM EDTA) 清洗 3 次。通过加入 30 μL 含有 1 × RT-缓冲液、1.25mM 的各种 dNTP、4 单位 RNA 酶抑制剂 (rRNasin) 以及 80 单位莫洛尼氏鼠白血病病毒(MMLV)反转录酶 (普洛麦格(Promega)) (不含引物) 的缓冲液并在 37°C 下孵育 2 小时, 在每个孔中直接合成 cDNA。特异性引物引导的 cDNA 存在溶液中, 寡聚(dT)-引导的 cDNA 保持固定在微量培养板上 (参见 Hugli, Crit. Rev. Immunol. 1,321(1981))。对于 SYBR Green PCR, (参见 Morrison 等人, 生物技术 (Biotechniques) 24, 954 (1998), 此处通过参考将其并入), 将 cDNA 在水中稀释 4 倍, 并将 4 μl 的 cDNA 溶液直接转移到 384 孔 PCR 板中, 向其中加入 5 μl 的 iTaq SYBR 主体混合物 (BioRad, Hercules, CA), 并施加 1 μl 寡聚核苷酸混合物 (正向和反向引物的每种都为 15 μM), 在 PRISM 7900HT (ABI) 中进行 PCR, 其通过一个循环的 95°C 10 分钟, 接着 45 个循环的 95°C 30 秒以及 60°C 1 分钟。还可以采用 TaqMan PCR; 在这种情况下, 直接将 cDNA 溶液转移到 384 孔 PCR 板, 向其中施加 5 μl TaqMan 通用主体混合物 (ABI) 和 1 μl 寡聚核苷酸混合物 (正向和反向引物的每种都为 15 μM 以及 3-6 μM TaqMan 探针), 在 PRISM 7900HT (ABI) 中进行 PCR 其通过一个循环的 95°C 10 分钟, 接着 45 个循环的 95°C 30 秒、55°C 30 秒以及 60°C 1 分钟。

使用 1xRT 缓冲液作为阴性对照用于确认在 SYBR Green PCR 条件下没有产生引物二聚体。而且, 分析每种情况的解链曲线, 以确认 PCR 信号是来自单个的 PCR 产物。通过分析软件(SDS, ABI)确定 Ct。通过减去适当对照样品的 Ct 值计算 ΔCt , 并通过假设每个 PCR 循环的效率为 100%, 将提高的倍数计算为 $2^{(-\Delta Ct)}$ 。

图 1 显示外周全血的人白细胞中 FcR 和 TCR 介导的 TNFSF、CCL、CXCL 和白介素 mRNA 基因表达分析结果。图 1 中的结果被表示为超过对照值提高的倍数。应答者被定义为应答所述刺激显示出 mRNA 水平提高超过 1.7 倍的个体。在另一个实施例中, 应答者也可以被定义为与对照刺激相比时, 显示

mRNA 水平降低超过 1.7 倍的个体。每个数据 (○代表健康成人, △代表 CD 患者) 是三等份全血的平均值。层垫区域 (Blanket area) 是外部对照 RNA34 (R34) 数值的平均值 ± 3 标准偏差。通过使用上述的应答者和非应答者人群的 x^2 检验计算图 1B 中所表示的统计学显著性 (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$)。通过使用仅应答者人群的提高的倍数的对数值的 t 检验, ++表示 $p < 0.01$ 。

如图 1A 所示, HAG 主要诱导 TNFSF-2、8、15、18、IL-1B、8、CCL-2、3、4、11、20 和 CXCL-1、2、3, 然而抗 TCR 诱导 TNFSF 的不同成员 (TNFSF-1、2、5、6、9、10、14) 和趋化因子 (IL-6、CCL-2、3、4、8、20 和 CXCL-10) 的 mRNA。图 13 显示了使用健康个体的全血获得进一步的数据, 其中所述健康个体的全血被 HAG 刺激, 并且所述数据表达为循环阈值 (Ct) (参见下面)。尽管 CD 患者不显示任何 HAG 诱导的活性增强, 但是抗 TCR 诱导的 TNFSF-2、5、6、14 和 CCL-2、3 和 4 的在 CD 患者中应答者人群 (提高 > 1.7 倍) 显著大于健康对照中的应答者人群 (提高 > 1.7 倍)。令人感兴趣的是 CD 患者 ($p < 0.001$) 诱导的 TNFSF-2 (=TNF α) 比 TNFSF-14 显著地多。这些数据暗示外周血白细胞中 TCR 功能的损害。该系统将可以用于分析 CD 和其他自身免疫性疾病中免疫细胞的细胞毒性功能。

图 2 显示在各种 HAG 诱导的 mRNA 应答中的相关性。在图 2 中, 来自图 1A 的数据被转化成 x-y 绘图 (x-y plots)。分别地, 图 2A 显示 IL-1B 对比 IL-8; 图 2B 显示 IL-1B 对比 CCL-2; 图 2C 显示 IL-1B 对比 CXCL-1; 图 2D 显示 CXCL-1 对比 CXCL-2; 图 2E 显示 IL-1B 对比 TNFSF-15; 以及图 2F 显示 TNFSF-15 对比 TNFSF-8。在图中, ○: 健康成人; ▲: CD。

图 3 显示在各种抗 TCR 诱导的 mRNA 应答中的相关性。在图 3 中, 来自图 1A 的数据被转化成 x-y 绘图。分别地, 图 3A 显示 TNFSF-2 对比 TNFSF-14; 图 3B 显示 TNFSF-5 对比 TNFSF-6; 图 3C 显示 CCL-2 对比 CCL-3; 图 3D 显示 CCL-2 对比 CCL-4; 图 3E 显示 CCL-2 对比 CCL-20; 以及图 3F 显示 CCL-8 对比 CXCL-10。在该图中, ○: 健康成人; ▲: CD。在图 3A 中, 画出了对照和 CD 患者的回归线。

由于个体与个体之间的宽差异以及存在应答者和非应答者人群, 因此, 标

准的研究者 t-检验 (Student's t-test) 不适合分析这些结果。通过 χ^2 检验, 在 CD 患者中 TNFSF-2、5、6、14、CCL-2、3 和 4 的应答者人群 (如上所示, 提高 >1.7 倍) 分别是 92.9%、66.7%、75.0%、82.1%、75.0%、75.0% 和 83.3%, 这显著高于健康对照 (分别是 38.9%、28.6%、42.9%、44.4%、33.3%、20.0% 和 20.0%) (参见图 1B: *)。当以对数标度对应答者人群的提高的倍数进行比较时, 则 CD 患者显示比对照对象显著 ($P < 0.01$) 高的数值 (参见图 1B: ++)。而且, 与 HAG 诱导的基因表达的结果类似 (图 2), 某些 TNFSF 成员和趋化因子的应答者也是其他 TNFSF 成员和趋化因子的应答者 (图 3), 这暗示抗 TCR 数据的偏差产生自个体应答, 而不是检验技术。令人吃惊的是, 抗 TCR 诱导的 TNFSF-2 (= TNF α) 与 TNFSF-14 之间的相关性在健康对照和 CD 患者之间是显著 ($p < 0.001$) 不同的: CD 患者诱导比 TNFSF-14 多的 TNFSF-2, 尽管这两种 TNFSF 应答者在两种情况中都相互关联 (图 3A)。

所有的情况中外部对照 RNA34 都没有变化, 这暗示该检验进行得适当。尽管这些结果显示个体与个体之间的宽变化, 但某种 TNFSF 和趋化因子的应答者也是对其它 TNFSF 和趋化因子的应答者 (参见图 2), 这暗示数据的偏差是来自于个体的应答, 而不是检验技术。令人感兴趣的是, CD 患者不显示任何 HAG 诱导活性的增强, 并且一些 CD 患者确实显示 HAG 诱导 IL-1B、IL-8、CCL-20 和 CXCL-3 mRNA 表达的活性降低 (图 1A)。相反, 抗 TCR 诱导不同的 TNFSF (TNFSF-1、2、5、6、9、10 和 14) 以及趋化因子 (IL-6、CCL-2、3、4、8、20 和 CXCL-10) mRNA。抗 TCR 不诱导 IL-1 B 和 IL-8 mRNA。

图 4 显示 HAG 刺激的剂量应答和动力学研究。图 4 显示热聚 IgG (HAG) 对外周血白细胞中 TNFSF 和趋化因子 mRNA 表达的影响。图 4A 显示反应的动力学。将三等份的每种 60 μ l 的肝素化全血与 PBS 混合 (○, Δ), 或者与 200 μ g/mL HAG (●, ▲) 混合, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 0-12 个小时。接着如上所述, 对 TNFSF-15 (○, ●) 和 IL-8 (Δ, ▲) 的 mRNA 进行定量。使用在时间=0 时的数值作为对照, 计算提高的倍数。图 4B 显示剂量应答。将三等份每种 60 μ l 的肝素化全血与各种浓度的 HAG 混合, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 个小时。接着如上所述, 对 TNFSF-2 (●)、TNFSF-15 (▲), IL-8 (○)、IL-1B (◇) 和 CXCL-2 (Δ) 的 mRNA 进行定量。使用溶剂 (PBS) 的数值作为对照计算提高的倍数。每个数

据点是三等份全血的平均值 \pm 标准偏差 (A) 或平均值 (B)。

图 5 显示对抗 TCR 刺激的剂量应答和动力学研究。图 5 显示抗 TCR 抗体对外周血白细胞中 TNFSF 和趋化因子 mRNA 表达的影响。图 5A 显示对所述刺激物的剂量应答和动力学。将三等份每种 60 μ l 的肝素化全血与 10 μ g/ml (●)、1 μ g/ml (◆) 或 0.1 μ g/ml (▲) 的小鼠抗人 α/β TCR IgG1 κ , PBS (○) 或 10 μ g/ml (□) 纯化的小鼠 IgG1 κ 混合, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 0-7 个小时。接着如上所述对 TNFSF-2 mRNA 进行定量。图 5B 显示对刺激物的动力学。将三等份每种 60 μ l 的肝素化全血与 10 μ g/ml 小鼠抗人 α/β TCR IgG1 κ 或 0 μ g/ml 纯化的小鼠 IgG1 κ 混合, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 个小时。接着如上所述对 TNFSF-2 (●)、TNFSF-5 (□)、TNFSF-6 (▲)、TNFSF-9 (◆)、TNFSF-14 (○) 和 CXCL-10 (Δ) mRNA 进行定量。通过小鼠 IgG1 κ 作为对照的数值计算提高的倍数。每个数据都是来自三等份全血的平均值 \pm 标准偏差(A), 或者平均值 (B)。

如图 6-12 和图 14-16 所示, 除了上面描述的抗 TCR 和 HAG 外, 其他刺激药物例如佛波醇-豆蔻酸酯-乙酸酯 (PMA)、植物凝血素 (PHA)、麦胚凝集素 (WGA)、伴刀豆球蛋白-A (ConA)、脂多糖 (LPS)、木菠萝凝集素、岩藻聚糖、热聚 IgE、热聚 IgA 和热聚 IgM 也诱导从健康个体获取的全血中 TNFSF 和趋化因子的不同类型亚型。在这些检验中所遵循的方案与上面所提供的相同, 除了在每种情况中采用不同的刺激物外。在图 6-16 中, 数据表达为循环阈值 (Ct), 即产生一定量 PCR 产物所需要的 PCR 循环数。通过从被刺激样品的 Ct 中减去未刺激样品的 Ct 值, 获得 Δ Ct 值。由于 Ct 是对数标度, 因此 1 个 Δ Ct 单位表示量变化 2 因素 (factor)。由于较高的表达水平会减少产生标准量产物所需要的 PCR 循环数, 因此负的 Δ Ct 值表示表达上的提高。

许多这些药物表现出与抗 TCR 类似的刺激模式。特别地, 如图 6 和 7 所示, PMA 和 PHA 与抗 TCR 在 CD 患者中刺激相同的 TNFSF 亚型 (TNFSF-2、TNFSF-5、TNFSF-6 和 TNFSF-14)。此外, 如图 8-12 所示, WGA、ConA、LPS、木菠萝凝集素和岩藻聚糖全部刺激 TNFSF-2 亚型, 已知 TNFSF-2 亚型与 CD 相关。如图 16 所示, 热聚 IgE 刺激 TNFSF-2 以及 CCL-3 和 CCL-4 以及 CXCL-10。最后, 如图 14 所示, 热聚 IgA 刺激 CCL-2、CCL-3 和 CCL-4。由于刺激模式与上述抗 TCR 模式的相似性, 因此这些药物也可以用于检验 CD

患者的治疗选择, 以及用于筛选治疗 CD 的新药物。

通常, 细胞毒性检验已经被用于研究由于免疫系统活性所引起的真实的细胞死亡, 例如被认为是在 CD 中所出现的细胞死亡。通常通过将负载 ^{51}Cr 的靶细胞与效应细胞以各种比例孵育进行细胞毒性检验, 并对从死细胞或受到损伤的细胞释放的 ^{51}Cr 放射性进行定量 (参见 Dunkley 等人, 免疫学方法杂志 (J Immunol Methods) 6, 39 (1974))。在某些情况中, 放射性材料已经被非放射性材料所替换, 例如荧光材料 (参见 Kruger-Krasagakes 等人, J Immunol Methods 156, 1 (1992)), 但基本的原理没有变化。因此细胞毒性检验的结果反映真实的细胞死亡。

然而, 细胞毒性检验是在非生理实验条件下进行的, 因此在这些研究过程中难以检验复杂的细胞与细胞之间相互作用和细胞与血浆的相互作用。而且, 细胞毒性检验不显示哪一种 TNFSF 成员对细胞死亡负责。一旦效应细胞识别靶细胞, 则效应细胞的功能不仅是杀死靶细胞, 而且还有招募其他效应细胞, 因为单个效应细胞不足以杀死众多的靶细胞。这种招募功能被认为是有趋化因子的释放所表示的。效应细胞所释放这些趋化因子的同一性无法被经典的细胞毒性检验所揭示。然而, 在本发明中所提出的检验系统能够同时在效应细胞中鉴定许多类型的基因表达。

通常鉴定负责的 TNFSF 和趋化因子亚型是非常重要的, 因为这些分子与靶细胞或白细胞上的特异性受体反应。例如, 根据通用基因表达序列标签 (UniGene's Expression Sequence Tag) (EST) 布图特征库, TNFSF-2 的受体 (肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF)-1A) 出现在小肠中, 但 TNFSF-5、TNFSF-6 和 TNFSF-14 (TNFRSF-5、TNFRSF-6 和 TNFRSF-14) 则不是。因此, CD 患者中增强的 TNFSF-2 (图 1B、图 3A) 可能与小肠的损伤有关, 其中小肠是 CD 疾病的主要位点。此外, 已知 CCL-2 的受体 (CCR-2) 是单核细胞趋化蛋白-1 的受体, 以及 CXCL-10 的受体 (CXCR-3) 是 NK 细胞和 T 细胞迁移的原因 (UniGene 数据库)。如上所述, 所公开的数据显示 CD 患者的效应白细胞在被刺激时, 转录提高量的 CCL-2 和 CXCL-10 的 mRNA, 这可以揭示在 CD 疾病位置所观察到的各种白细胞浸润。

使用全血优于使用培养基中分离的白细胞, 因为前者比后者更符合生理条

件，并且可以筛选全部的白细胞种群。较长的孵育全血可能产生额外的假象。因此，理想的方式是通过从体内转换到体外，在短时间孵育过程中鉴定全血中的早期杀伤细胞信号和招募信号。mRNA 的转录是在蛋白质合成或者最终生物产物之前的较早事件。因此，mRNA 是该研究的合理靶标。在许多 TNFSF、CCL、CXCL 和白介素的 mRNA 中，如图 1 所示，本发明的数据显示 FcR 和 TCR 诱导不同亚类的基因。

最近的研究暗示 TNFSF-2 是 CD 中的主要因子之一(参见 Isaacs 等人, *Inflamm. Bowel Dis.* 11 Suppl 1, S3 (2005))。事实上，如上所述，针对 TNF- α 的单克隆抗体 Remicade®被临床上用于严重 CD 并使用其他传统治疗效果差的病史的患者。尽管 TNF- α 在损伤中 CD 的致病中发挥关键作用，但是，本发明中所列出的数据显示某些 TNFSF 成员诱导 TCR 的潜在机能亢进是之前未被发现的，其中所述 TNFSF 成员包括外周血内循环白细胞中的 TNF- α (TNFSF-2)。由于本发明使用全血，而不是肠组织，因此，其可以用作 CD 的诊断测试用于评估对 TNF- α 治疗可能的应答，以及监控治疗应答。

具体地，在确定是否患有 CD 的人可能对靶向 TNF- α 活性的治疗响应的方法的优选实施方式中，例如采用抗 TNF- α 单克隆抗体的治疗，如上所述，全血是从 CD 患者获得的，并且对血液样品施加抗 TCR 抗体刺激，以及可选择地施加给对照刺激 (10mg/ml 纯化的小鼠 IgG 1k)。根据上述，可以检测样品中 TNFSF-2 的 mRNA 水平。在使用抗 TCR 抗体刺激后 TNFSF-2 mRNA 水平显著提高的 CD 患者 (例如所述，倍数改变超过 1.7) 是靶向 TNF- α 的治疗的良好候选者。

可替换地，可以检测应答 T 细胞刺激，一种或者多种其它 mRNA 的水平被差异转录，例如可以检测 TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、CCL-2、CCL-3、CCL-4 或 CXCL-10。一种或者多种这些 mRNA 水平刺激后显著提高 (例如 1.7 倍或更大的变化) 的 CD 患者可以是靶向与这些 mRNA 相关的蛋白质的治疗的良好候选者。

此外，在评估靶向患者中一种或多种的 TNFSF-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、CCL-2、CCL-3、CCL-4 和 CXCL-10 TNF- α 的 CD 治疗功效的方法的优选实施方式中，在开始治疗之前获得体外使用抗 TCR 抗体或其他刺激物

进行 T 细胞刺激后全血中 mRNA 的量与体外对照刺激后的量的第一比例。接着开始治疗过程。在治疗过程中或治疗后的某些点，获得体外抗 TCR 抗体刺激后全血中 mRNA 的量与体外对照刺激后的量的第二比例。比例中的显著差别可以说明治疗的效力。例如，如果所述治疗是给药因福利美，所检测的 mRNA 是 TNFSF-2，并且所述第二比例大于第一比例，则能够说明治疗的效力。关于与 TNF- α 相关 mRNA 的可诱导性得提高的原因是在所分泌的 TNF- α 被治疗药物如 Remicade[®] 所成功灭活，在 T 细胞中有反馈机制发挥作用，通过该机制转录更多的 TNFSF-2 mRNA。

在其他情况中，关于 CD 相关 mRNA 的较小第二比例可以表示成功的治疗。关于治疗后所检测的 mRNA，这类结果显示 T 细胞变得不太可诱导。例如，降低白细胞关于 TNFSF-2 的诱导性进而减少所释放 TNF- α 量的治疗，将推测有利于缓解 CD 的症状。类似地，所转录的 CCL-2 和 CXCL-10 的降低将可能会导致白细胞浸润和较不严重的症状。

重要地，该体外方法也可以用于筛选抑制抗 TCR 介导的 TNF α mRNA 表达的化合物。这些化合物将是令人感兴趣的药物靶标，因为针对 TNF- α 的单克隆抗体与损伤处已经释放的 TNF- α 反应，而这些新药候选物会在转录水平上阻断白细胞产生 TNF- α 。这是开发针对自身免疫性疾病的药物的新策略。

在使用所公开的系统筛选药物化合物，进而鉴定治疗 CD 的假定药物的方法的实施方式中，全血是从作为应答者的 CD 患者中获得的，其中在暴露到如抗 TCR 的 T 细胞刺激时，他们的白细胞表现出 CD 相关 mRNA 水平的至少 1.7 倍提高。计算体外使用抗 TCR 抗体或其他刺激物进行 T 细胞刺激后的全血中 mRNA 的量与体外对照刺激后的量的第一比例。进一步，将从这些对象获得的全血样品体外暴露于药物化合物，接着进行上述的差异刺激。接着计算体外 T 细胞刺激后全血中 mRNA 的量与体外对照刺激后的量的第二比例。这些比例之间的显著差异可以表示该药物化合物是进行进一步研究作为 CD 潜在治疗剂的候选化合物。

另外，在通过检测含有从患者获得的白细胞的样品中 TNFSF-2、TNFSF-5、TNFSF-6、TNFSF-14、CCL-2、CCL-3、CCL-4 和 CXCL-10 中一种或者多种的 mRNA 水平监控 CD 患者疾病状态的方法的优选实施方式中，在第一时间

获得使用抗 TCR 抗体或其他刺激物体外刺激之后全血中 mRNA 的量，与体外对照刺激之后的量的第一比例。在第一时间之后的第二时间，获得体外 T 细胞刺激之后全血中 mRNA 的量与体外对照刺激之后的量的第二比例。比例之间的显著差异可以表示疾病状态的变化。例如，当第二比例高于第一比例时，其能说明疾病加重，而较大的第一比例则说明疾病消退。

<110> 日立化成工业株式会社；日立化成研究中心公司；西塞医疗中心

<120> 在克罗恩病患者的外周血白细胞中T细胞受体介导的肿瘤坏死因子超家族与趋化因子mRNA增强的表达

<130> PIJP0811448

<150> 60/790,354

<151> 2006-04-07

<160> 110

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 1

cagctatcca cccacacaga tg

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 2

cgaaggctcc aaagaagaca gt

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 3

tcaatcggcc cgactatctc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物	
<400> 4 cagggcaatg atcccaaagt	20
<210> 5 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 5 agggtgtaag tcaacatcag tca	23
<210> 6 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 6 cacggcccca aagaaggl	18
<210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 7 gcccctcttc caactgaaga a	21
<210> 8 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 8 ggtattgtca gtggtcacat tcaag	25
<210> 9 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	

<400> 9 ccacagttcc gccaaacct	19
<210> 10 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 10 cacctggttg caattcaaat actc	24
<210> 11 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 11 tggcagcacc ttcacttcta aatg	24
<210> 12 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 12 gaaatgagtc cccaaaacat cctc	24
<210> 13 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 13 cacactctgc accaacctca ct	22
<210> 14 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 14 tgcactccaa agaaggtctc atc	23

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 15
 accaccatat cagtcaatgt ggat 24

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 16
 gaagatggac aacacattct caaga 25

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 17
 agctacaaag aggacacgaa gga 23

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 18
 cgcagctcta gttgaaagaa gaca 24

<210> 19
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 19
 gggaatattt gagcttaagg aaaalg 26

<210> 20

<211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 20
 aaaaggcccc gaannaaactg 20

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 21
 gagtatcttc aactaatggt gtacgtcact 30

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 22
 tggltcttcc tcttttcate a 21

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 23
 tactgtcagg tgcactttga tgag 24

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 24
 gcagtggctg agaattcct 19

<210> 25
 <211> 22
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 25

atatggtgtc cgaatccagg at

22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 26

cctgaacctat ggtgaaagtc a

21

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 27

atgcctgaaa cactaacccaa taatt

25

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 28

gcaagtigga gttcatctcc ttct

24

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 29

egtecggttg ctggatga

18

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223> PCR引物		
<400> 30		
catgaaagcc ccgaagtaag ac		22
<210> 31		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 31		
tgcgaagtag gtagcaactg gtt		23
<210> 32		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 32		
ccattagctt gtcccccttc tg		22
<210> 33		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 33		
cggctgtata aaaacaaga catgat		26
<210> 34		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 34		
tccccaacat gcaattcata ag		22
<210> 35		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		

<400> 35 gaagatggaa aagcgattlg tctt	24
<210> 36 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 36 gggcatgttt tctgcttgag a	21
<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 37 gctcttggag ctgcctacgt	20
<210> 38 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 38 aaggtctctt tcaccaatgc acct	24
<210> 39 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 39 tcataactgg tcttllggag lllg	24
<210> 40 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 40	

tctgcacagc tctggcttgt	20
<210> 41	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 41	
tgctaaagaa cttagatgtc agtgcac	27
<210> 42	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 42	
tggtccactc tcaatcactc tca	23
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 43	
gcaggccclg aatttcaaca	20
<210> 44	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 44	
gaaglatgca gagcttgatt ttagtttta	29
<210> 45	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 45	
gaaglatgca gagcttgatt ttagtttta	29

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 46
 cccattcgct ccaagatgag 20

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 47
 tgaagtgett totottggag ttaca 25

<210> 48
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 48
 cattcccatt agaagacaaa clgttg 26

<210> 49
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 49
 aaaacctett gggaagcatg ag 22

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 50
 gggaccccgga ggacagtact 20

<210> 51
 <211> 20

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 51	
ccattgtggc caaggagatc	20
<210> 52	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 52	
tgtccagggtg gtccatgga	19
<210> 53	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 53	
cacageattt catagctgac tactttga	28
<210> 54	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 54	
tcgcttgggtt aggaagatga ca	22
<210> 55	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 55	
ggtattccaa accaaaagaa gca	23
<210> 56	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> PCR引物	
<400> 56	
gttcagttcc aggtcataca cgtact	26
<210> 57	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 57	
agtcgtcttt gtcaccggaa a	21
<210> 58	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 58	
agtcctcttc caaagagttg atgtac	26
<210> 59	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 59	
tgtgctgacc ccacacaga	19
<210> 60	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 60	
gctttggagt ttgggttttc ttg	23
<210> 61	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> PCR引物

<400> 61

agagctacac aagaatcacc aacalc

26

<210> 62

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 62

agacctcctt gccccgltt

19

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 63

cccagaaagc tgtgatcttc aa

22

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 64

tectgcaccc acttcttctt g

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 65

ccaaactggg caaggagatc t

21

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引物

<400> 66 gccccagggtg tticalataa ttct	24
<210> 67 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 67 lgcttcacct acactacct caagatc	27
<210> 68 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 68 gacaaticcg ggcttggg	18
<210> 69 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 69 cagattccac aaaagttcat agttgac	27
<210> 70 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 70 ceggcctcic tiggtagg	19
<210> 71 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 71 ctgctgtagt gttcaccaca ctga	24

<210> 72	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 72	
ctgctgtagt gtcaccaca ctga	24
<210> 73	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 73	
gatacacaga ccgtaltett catcctaa	28
<210> 74	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 74	
tgaaagatga tagcattgat gtcaca	26
<210> 75	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 75	
cgctctcagg cagagctatg t	21
<210> 76	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 76	
cttgtccaga tgctgcatca g	21
<210> 77	

<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 77	
gcgcgtggtg aaacacitc	19
<210> 78	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 78	
atcggcacag atctccttat cc	22
<210> 79	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 79	
cgaagcaacc cgtgttcaact	20
<210> 80	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 80	
gatgacaccc ggcttggga	18
<210> 81	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 81	
caggagtgat cttcaccacc aa	22
<210> 82	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 82	
ggcgtccagg ttcttcatgt	20
<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 83	
ggcgtccagg ttcttcatgt	20
<210> 84	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 84	
gtageatata gcagcaggca gat	23
<210> 85	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 85	
ctgcttccaa tacagccaca ag	22
<210> 86	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 86	
gagcagctgt tactggtgaa ttca	24
<210> 87	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223> PCR引物		
<400> 87		
cgtgcttcaac ctggctcaa		19
<210> 88		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 88		
ggtgctcaaaa ccaactgtgac a		21
<210> 89		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 89		
ggaaatgttt gccacaggaa ga		22
<210> 90		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 90		
tgtttcgtgt ttcccctgal g		21
<210> 91		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		
<400> 91		
ccactgcgcc caaacc		16
<210> 92		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR引物		

<400> 92 gcaggattga ggcaagcttt	20
<210> 93 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 93 cccctggcca ctgaactg	18
<210> 94 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 94 tggatgllct lgaggtgaat tcc	23
<210> 95 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 95 ggaattcacc teaagaacat cca	23
<210> 96 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 96 glggctatga cltcgglttg g	21
<210> 97 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引物	
<400> 97	

cegtcccagg cacatcac	18
<210> 98	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 98	
ccgtcccagg cacatcac	18
<210> 99	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 99	
agagctgcgt tgcgtttgt	19
<210> 100	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 100	
tggcgaacac ttgcagatta ct	22
<210> 101	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 101	
cagagctgcg ttgcacttgt	20
<210> 102	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 102	
acacctgcag ttaccaatc gtt	23

<210> 103
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 103
 tctggaattc atccccaaaa ca 22

<210> 104
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 104
 tctggaattc atccccaaaa ca 22

<210> 105
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 105
 ccacctacaa tcttggaaag acctt 25

<210> 106
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 106
 cagtgtagca atgatttcaa ttttctc 27

<210> 107
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR引物

<400> 107
 tccacgtggt gagatcattg c 21

<210> 108
 <211> 21

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 108	
tettgatggc ettogattct g	21
<210> 109	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 109	
cccacagcca ggacatcag	19
<210> 110	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 110	
ettgcacagc acataggaaa gg	22

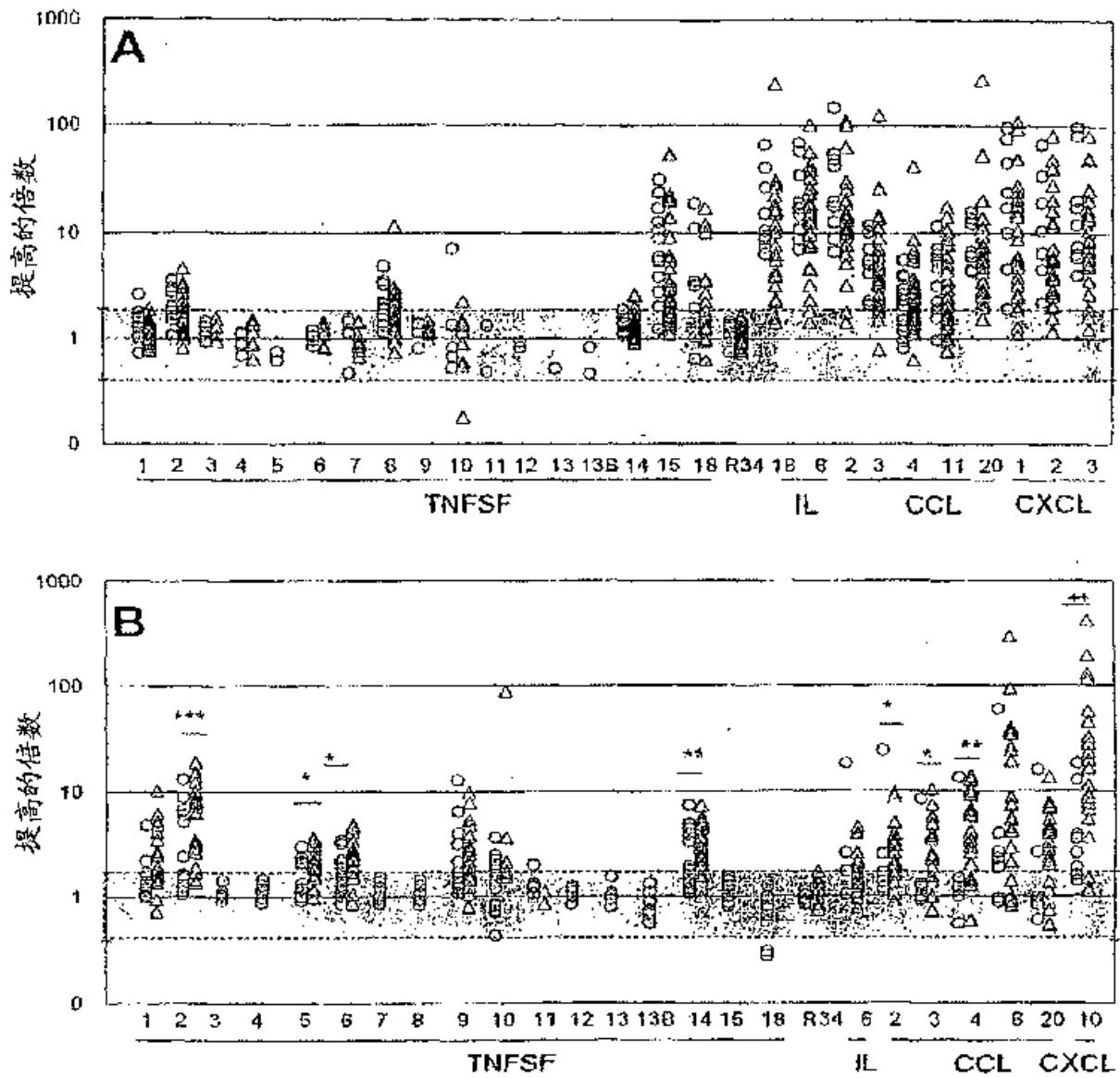


图 1

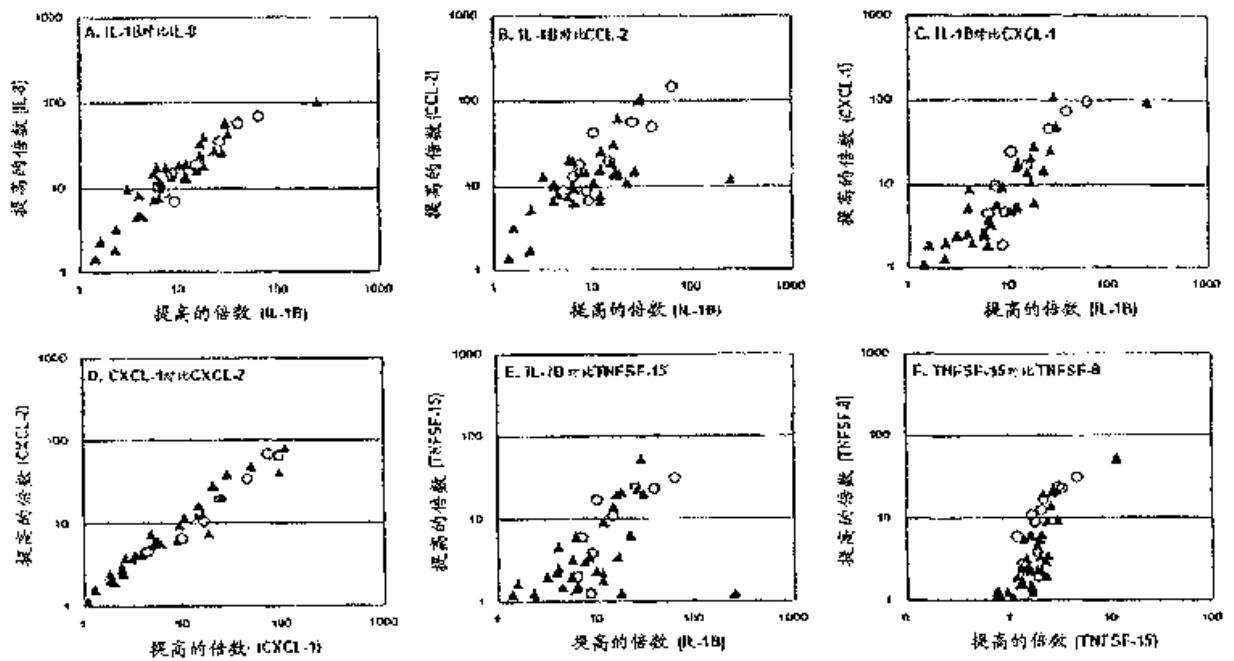


图 2

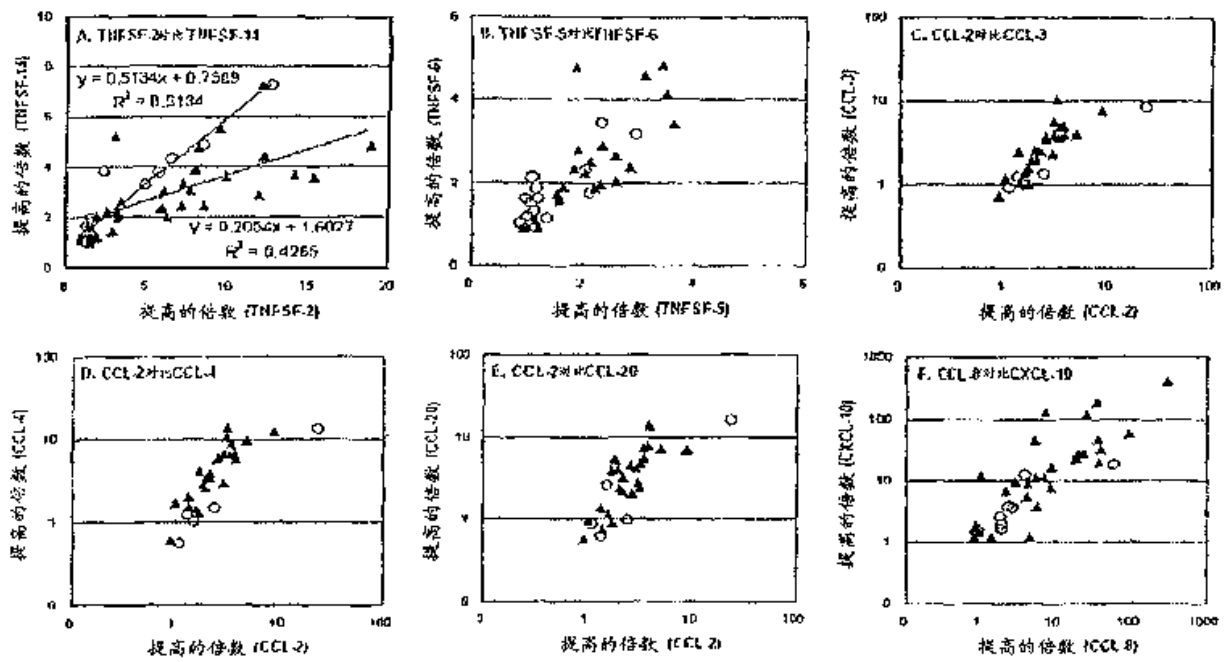


图 3

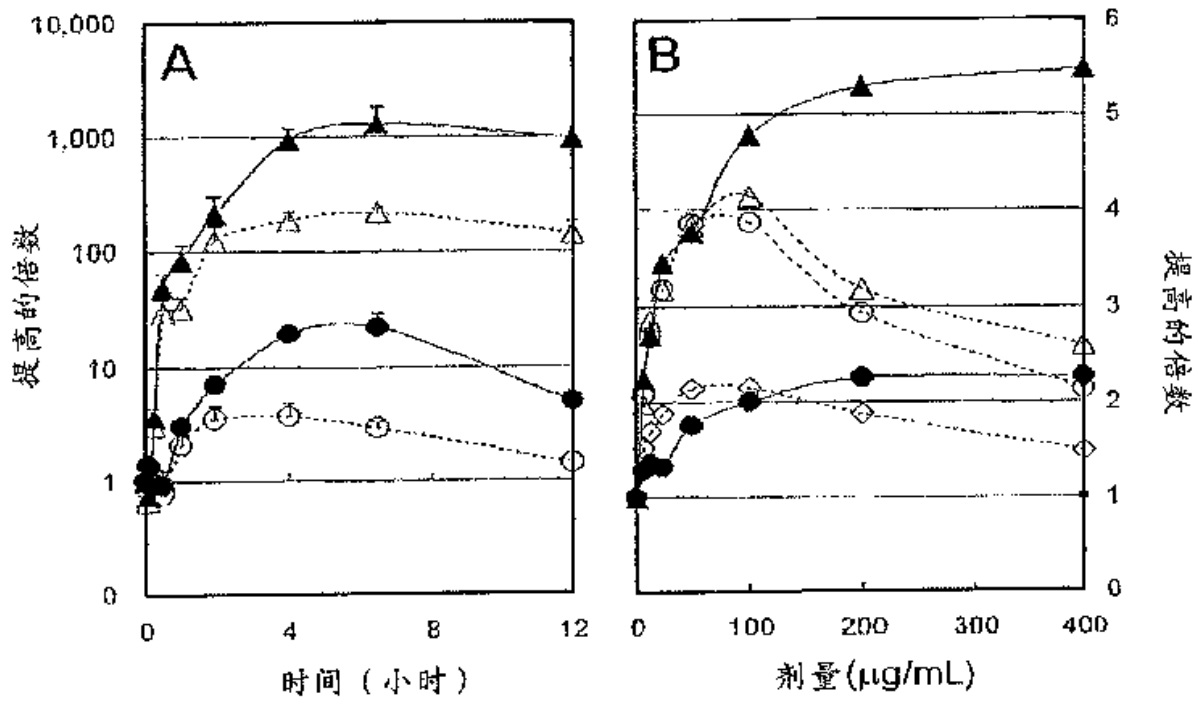


图 4

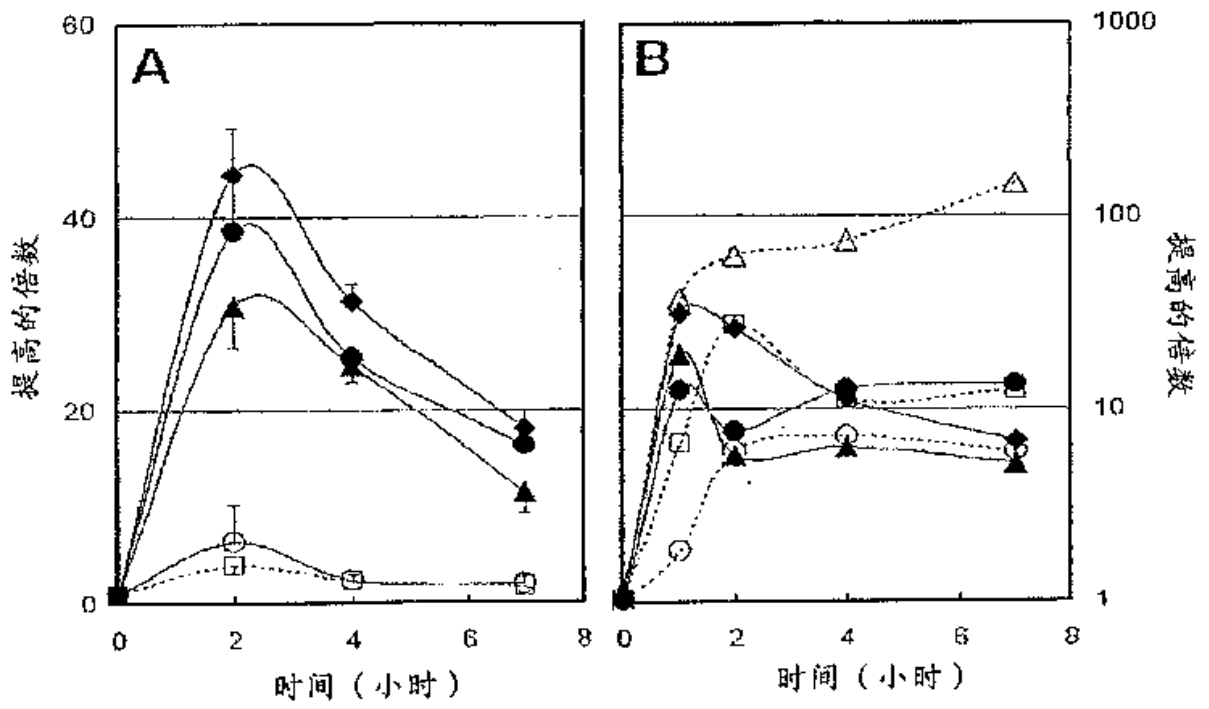


图 5

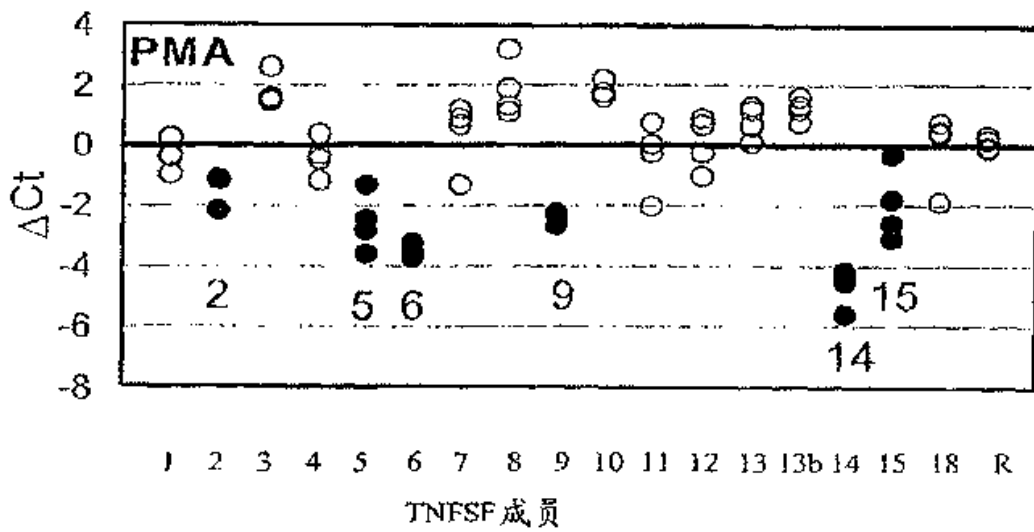


图 6

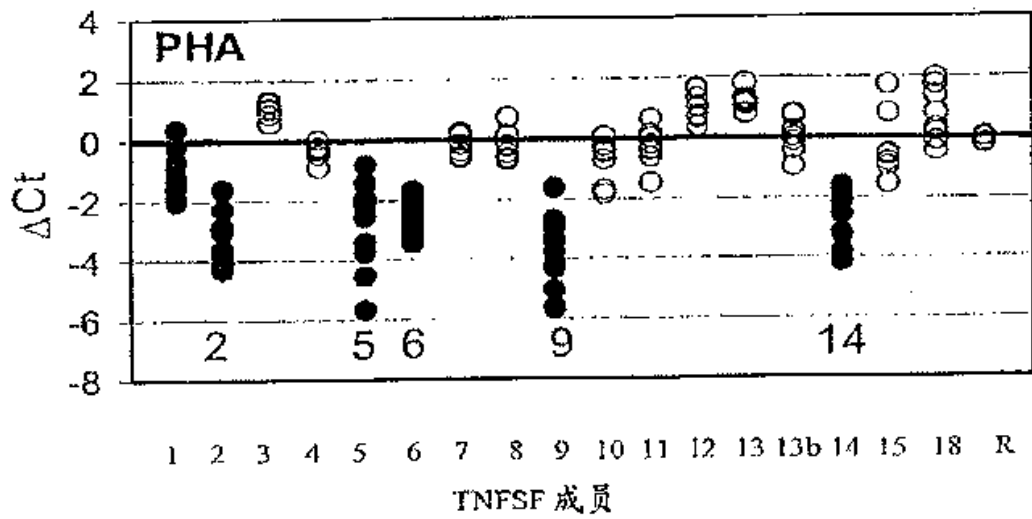


图 7

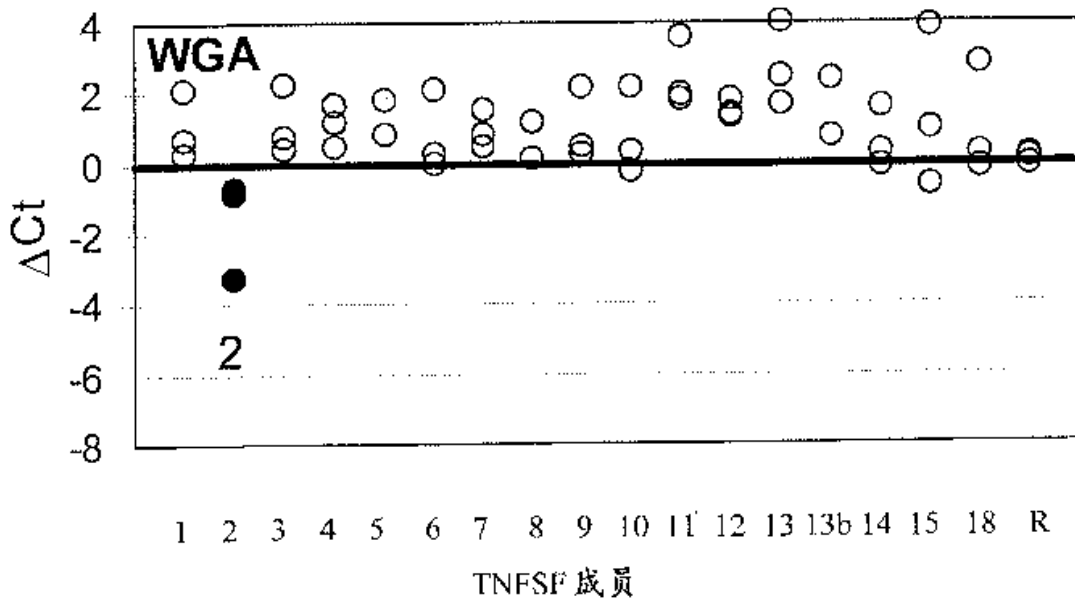


图 8

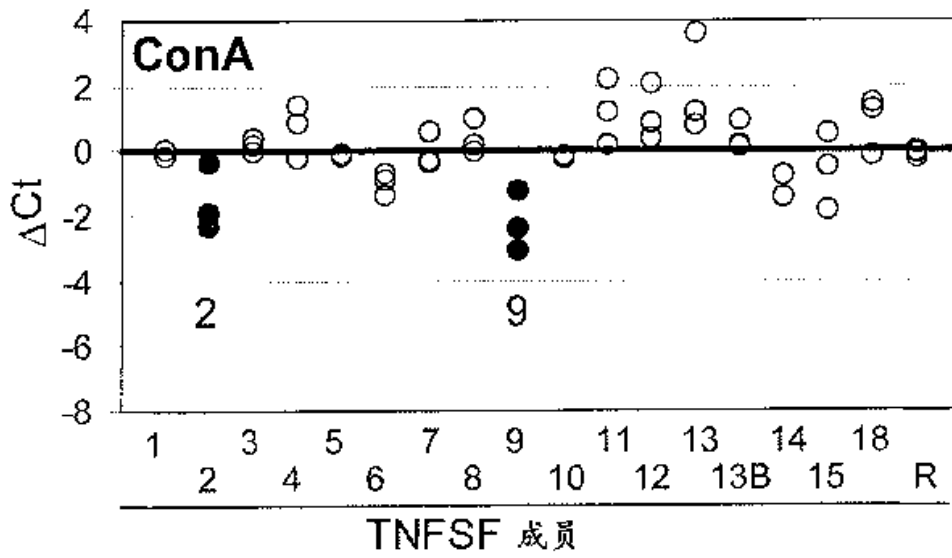


图 9

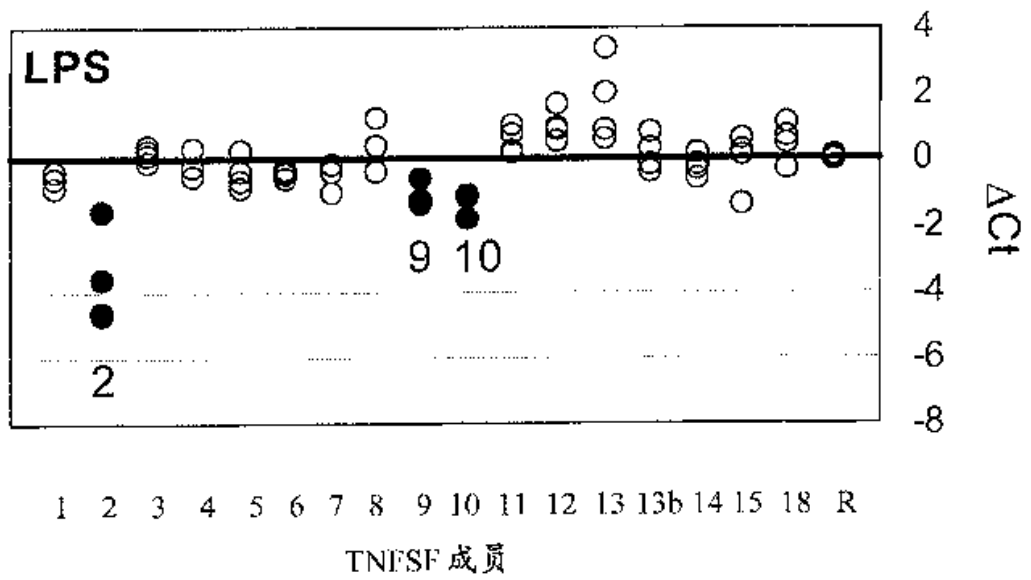


图 10

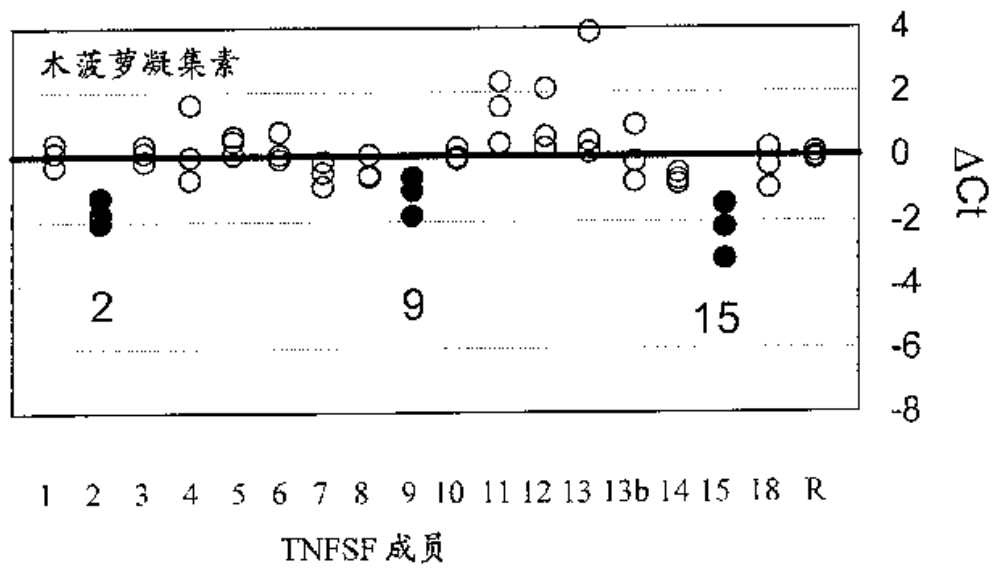


图 11

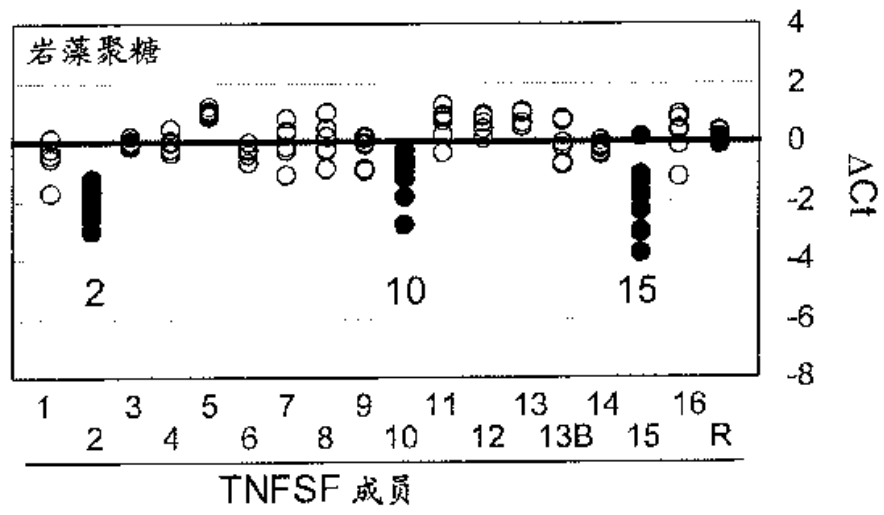


图 12

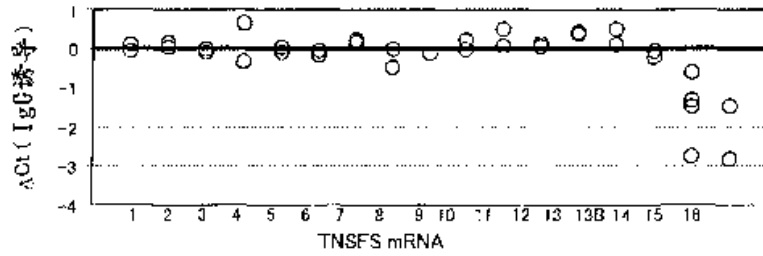


图 13A

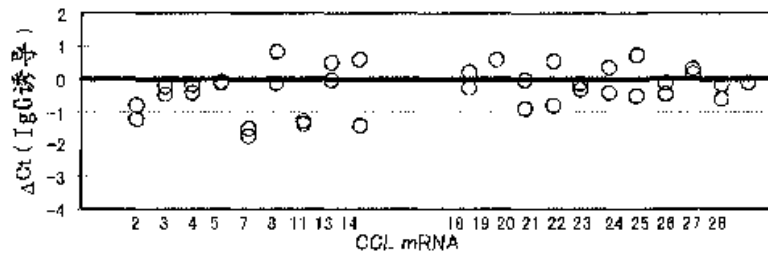


图 13B

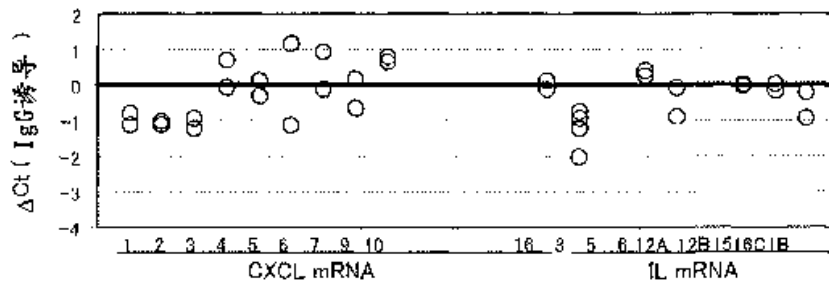


图 13C

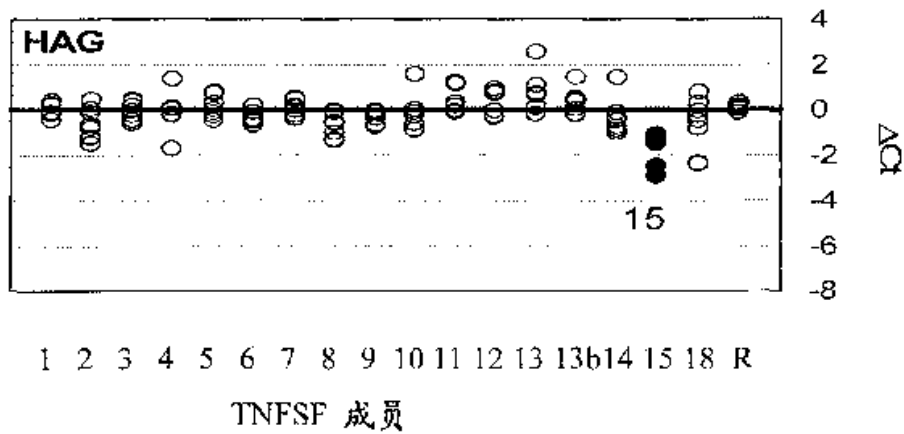


图 13D

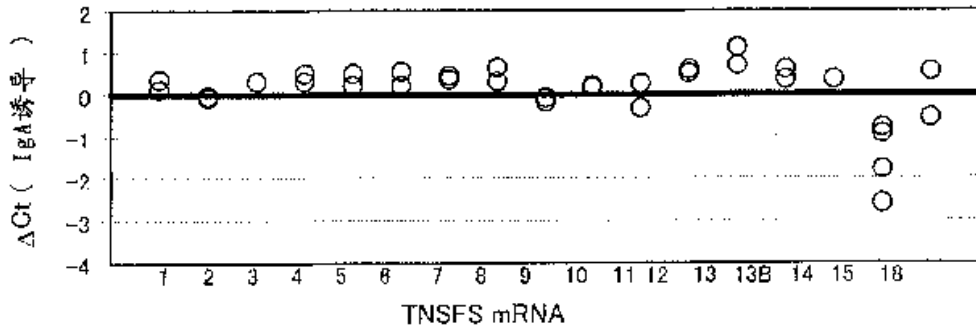


图 14A

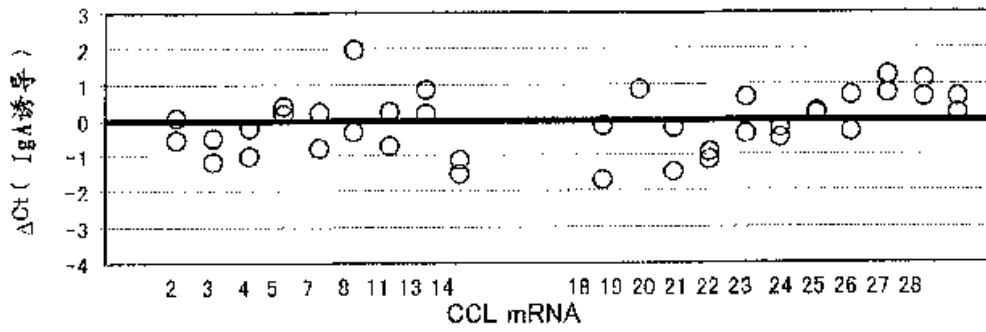


图 14B

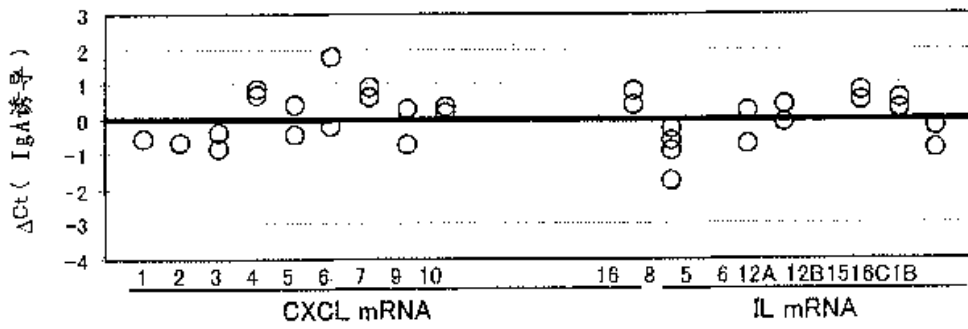


图 14C

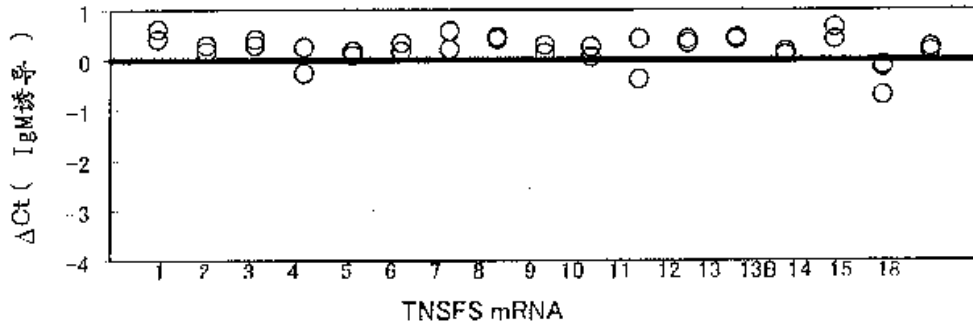


图 15A

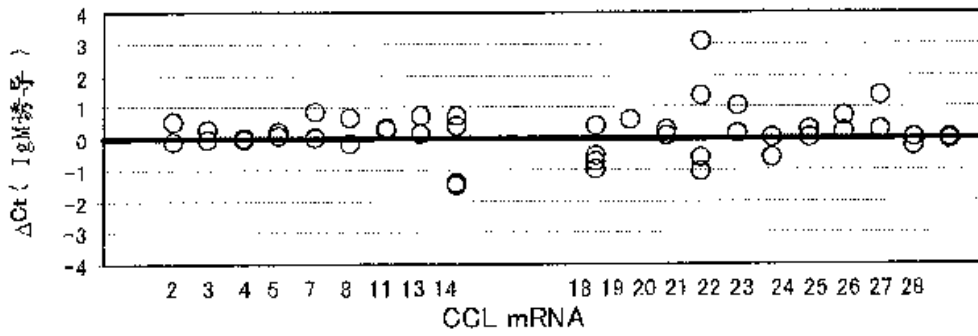


图 15B

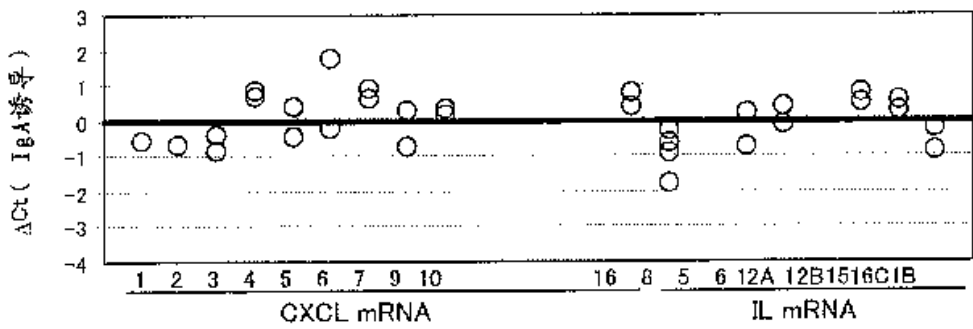


图 15C

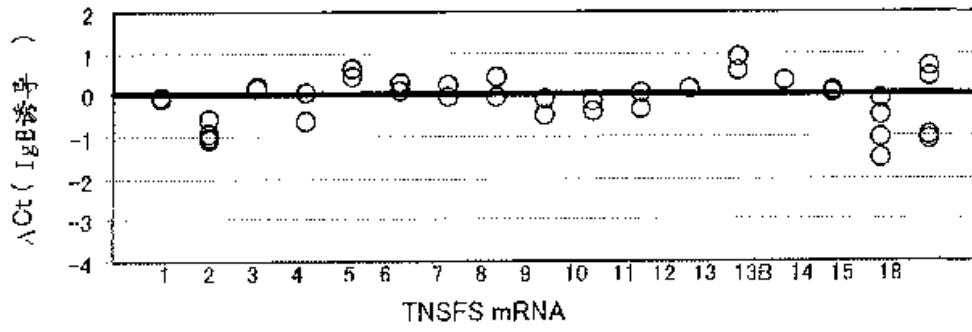


图 16A

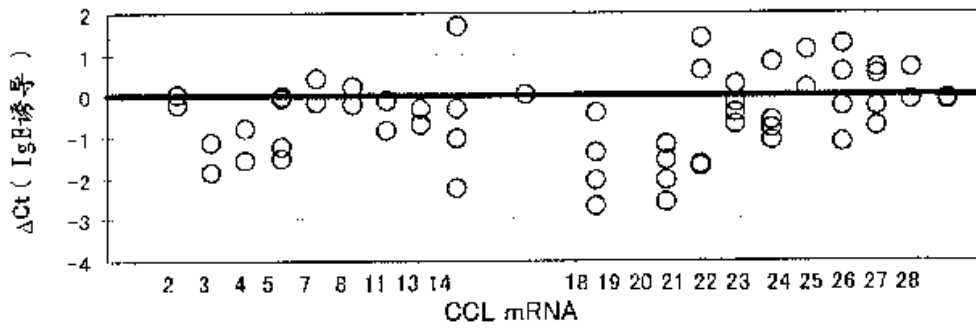


图 16B

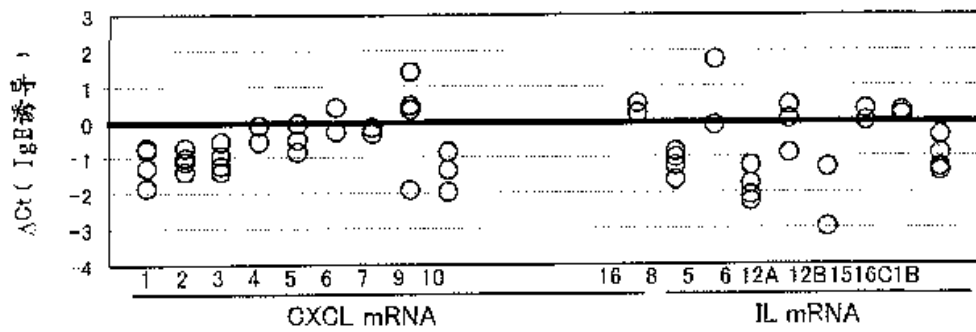


图 16C

专利名称(译)	在克罗恩患者的外周血白细胞中T细胞受体介导的肿瘤坏死因子超家族与趋化因子mRNA增强的表达		
公开(公告)号	CN101410714A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200780011543.1	申请日	2007-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社 日立化成研究中心公司 雪松-西奈医学中心		
申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社 日立化成研究中心公司 西塞医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社 日立化成研究中心公司 西塞医疗中心		
[标]发明人	三桥将人 斯蒂芬 R 塔尔甘		
发明人	三桥将人 斯蒂芬·R·塔尔甘		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12Q2600/158 C12Q2600/106 C12Q1/6883 C12Q2600/136 A61P1/04 A61P37/00		
代理人(译)	钟晶		
优先权	60/790354 2006-04-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种方法，其通过检测应答刺激中某些mRNA的水平，用于确定患有克罗恩病的人是否可能对靶向TNFSF成员或细胞因子的治疗有应答。本发明还公开了一种评估克罗恩病治疗对人的效力的方法。此外，本发明公开了一种筛选用于克罗恩病的治疗中的化合物的方法。本发明还公开了一种随着时间监控克罗恩病患者疾病状态的方法。

目标 mRNA	正向	反向
TNFSF-1	CAGCTATCCACCCACACAGATG (SEQ ID NO: 1)	CGAAGGCTCCAAAGAAGACAGT (SEQ ID NO: 2)
TNFSF-2	TCAATCGGCCCGACTATCTC (SEQ ID NO: 3)	CAGGCAATGATCCCAAAGT (SEQ ID NO: 4)
TNFSF-3	AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA (SEQ ID NO: 5)	CACGGCCCCAAGAAGGT (SEQ ID NO: 6)
TNFSF-4	GCCCTCTTCCAACCTGAAGAA (SEQ ID NO: 7)	GGTATTGTCAGTGGTCACATCAAG (SEQ ID NO: 8)
TNFSF-5	CCACAGTCCGCCAACCT (SEQ ID NO: 9)	CACCTGGTTGCAATCAAATACTC (SEQ ID NO: 10)
TNFSF-6	TGGCAGCATCTTCACTTCTAAATG (SEQ ID NO: 11)	GAAATGAGTCCCCAAAACATCTCT (SEQ ID NO: 12)
TNFSF-7	CACACTCTGCACCAACCTCACT (SEQ ID NO: 13)	TGCACTCCAAAGAAGGTCATC (SEQ ID NO: 14)
TNFSF-8	ACCACCATATCAGTCAATGTGGAT (SEQ ID NO: 15)	GAAGATGGACAACACATTTCTCAAGA (SEQ ID NO: 16)