



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104334744 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201380027564. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 14

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

61/616, 394 2012. 03. 27 US

A61K 38/00 (2006. 01)

61/707, 411 2012. 09. 28 US

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/031178 2013. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/148232 EN 2013. 10. 03

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·R·阿巴斯 J·R·阿罗恩

S·钱德里阿尼 G·贾

N·J·I·卢因-科赫 D·德皮安托

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书7页 说明书62页

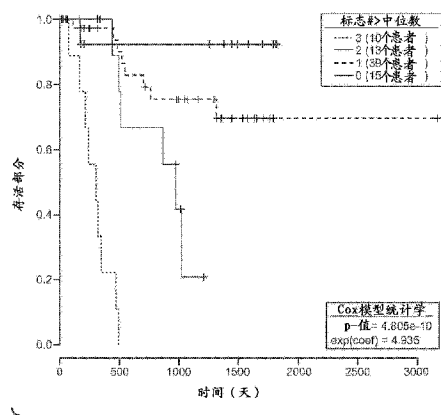
序列表18页 附图33页

(54) 发明名称

预测、诊断和治疗特发性肺纤维化的方法

(57) 摘要

本发明提供用于在患者中评估特发性肺纤维化的预测的组合物、试剂盒和方法。此外,提供用于诊断特发性肺纤维化的亚型的组合物、试剂盒和方法,还提供用于治疗特发性肺纤维化的方法。



1. 在患者中预测或辅助预测特发性肺纤维化 (IPF) 的方法, 其包括从所述患者获得生物样品, 测量所述生物样品中基因或基因组合的表达, 或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达, 其中所述基因或基因组合选自表 2、表 3、表 4 或表 5 中的任一个, 其中所述基因或基因组合提高的表达水平或所述蛋白质或蛋白质组合提高的表达水平指示与存活中位数相比缩短的存活的预测, 并且其中所述基因或基因组合降低的表达水平或所述蛋白质或蛋白质组合降低的表达水平指示与存活中位数相比增加的存活的预测。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述基因或基因组合或所述蛋白质或蛋白质组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述基因或基因组合或蛋白质或蛋白质组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2 ;GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFB3。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述基因或基因组合或蛋白质或蛋白质组合选自 CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (组成型 SAA)、POSTN 和 AND SPP1 (OPN)。

6. 权利要求 5 的方法, 其中所述基因或基因组合或蛋白质或蛋白质组合选自 MMP3 和 SAA4 (组成型 SAA)。

7. 权利要求 5 的方法, 其中所述基因或基因组合或蛋白质或蛋白质组合选自 YKL-40 和 CCL18。

8. 权利要求 5 的方法, 其包括测量 CXCL13 的表达水平。

9. 权利要求 5 的方法, 其包括测量 MMP3 的表达水平。

10. 权利要求 5 的方法, 其包括测量 SAA4 (组成型 SAA) 的表达水平。

11. 权利要求 5 的方法, 其中所述患者正进行免疫调节治疗。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法, 其中所述生物样品选自肺组织、血清和血浆。

13. 在患者中预测或辅助预测 IPF 的方法, 其包括从所述患者获得生物样品, 并测定总基线生物标志得分,

其中所述总基线生物标志得分的测定包括测量 CXCL13、OPN 和 COMP 中至少一个的蛋白质表达水平, 如果所述表达水平分别低于 CXCL13、OPN 和 COMP 的中位数, 则指定 0 的得分, 如果所述表达水平分别高于 CXCL13、OPN 和 COMP 的中位数, 则指定 1 的得分, 其中所述总基线生物标志得分的测定进一步包括测量 YKL-40 的蛋白质表达水平, 如果所述表达水平低于 YKL-40 的中位数, 则指定 0 的得分, 如果所述表达水平高于 YKL-40 的中位数, 则指定 1 的得分, 并且其中所述总基线生物标志得分的测定进一步包括将每一单个得分相加来获得总基线生物标志得分,

其中 2 或 2 以上的总基线生物标志得分指示与存活中位数相比缩短的存活的预测, 并且其中 0 或 1 的总基线生物标志得分指示与存活中位数相比增加的存活的预测。

14. 权利要求 13 的方法,其中如果所述患者的总基线生物标志得分为 2 或 2 以上,那么在临床研究中选择用候选治疗剂治疗所述患者,其中所述候选治疗剂选自抗-IL-13 剂、抗-IL-4 剂、抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗-LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0 888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是 lebrikizumab。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗-IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

19. 权利要求 14 的方法,其中所述抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂是双特异性抗体。

20. 在患者中预测或辅助预测 IPF 的方法,其包括从所述患者获得生物样品并测定总基线生物标志得分,

其中所述总基线生物标志得分的测定包括测量 MMP3 和 COMP 中至少一个的蛋白质表达水平,如果所述表达水平分别低于 MMP3 和 COMP 的中位数,则指定 0 的得分,如果所述表达水平分别高于 MMP3 和 COMP 的中位数,则指定 1 的得分,其中所述总基线生物标志得分的测定进一步包括测量 YKL-40 的蛋白质表达水平,如果所述表达水平低于 YKL-40 的中位数,则指定 0 的得分,如果所述表达水平高于 YKL-40 的中位数,则指定 1 的得分,且其中所述总基线生物标志得分的测定进一步包括将每一单个得分相加来获得总基线生物标志得分,

其中 1 或 1 以上的所述总基线生物标志得分指示与存活中位数相比缩短的存活的预测,且其中 0 的所述总基线生物标志得分指示与存活中位数相比增加的存活的预测。

21. 权利要求 13-20 中任一项的方法,其中所述生物样品选自血清和血浆。

22. 权利要求 20 的方法,其中如果所述患者的总基线生物标志得分为 1 或 1 以上,那么在临床研究中选择用候选治疗剂治疗所述患者,其中所述候选治疗剂选自抗-IL-13 剂、抗-IL-4 剂、抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗-LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0 888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是 lebrikizumab。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂是双特异性抗体。

25. 权利要求 22 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是所述抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR

和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

28. 在受试者中诊断 IPF 的分子亚型的方法,所述方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中基因或基因组合的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达,其中所述基因或基因组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4,其中所述基因或基因组合提高的表达或所述蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。

29. 在受试者中诊断 IPF 的分子亚型的方法,所述方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中基因或基因组合的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达,所述基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、TNFRSF17 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫球蛋白 κ 基因座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM,其中所述基因或基因组合提高的表达或所述蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。

30. 在受试者中诊断 IPF 的分子亚型的方法,所述方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中基因或基因组合的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达,其中所述基因或基因组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2 ;GLI1、GLI2、SMO ;SFRP2、DI02、CDH11、POSTN 和 TGFB3,其中所述基因或基因组合提高的表达或所述蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。

31. 权利要求 28-30 中任一项的方法,其中所述生物样品是肺组织、全血或血清。

32. 权利要求 12、21 或 31 中任一项的方法,其中所述生物样品是肺组织、血浆或全血,且用 PCR 法或微列阵芯片测量所述基因或基因组合的表达。

33. 权利要求 31 的方法,其中所述生物样品是血清,且用免疫测定法测量所述蛋白质或蛋白质组合的表达。

34. 在患者中治疗 IPF 的方法,如果在从所述患者获得的生物样品中检测到基因或基因组合的提高的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的提高的表达,那么所述方法包括对所述患者施用有效量的 IPF 治疗剂来治疗 IPF,其中所述基因或基因组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。

35. 在患者中治疗 IPF 的方法,如果在从所述患者获得的生物样品中检测到基因或基

因组合的提高了的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的提高了的表达,那么所述方法包括对所述患者施用有效量的 IPF 治疗剂来治疗 IPF,其中所述基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、TNFRSF17 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫球蛋白 κ 基因座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。

36. 在患者中治疗 IPF 的方法,如果在从所述患者获得的生物样品中检测到基因或基因组合的提高了的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的提高了的表达,那么所述方法包括对所述患者施用有效量的 IPF 治疗剂来治疗 IPF,其中所述基因或基因组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A); LOXL1、LOXL2; GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGF β 3。

37. 权利要求 34-36 中任一项的方法,其中所述 IPF 治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗 -TGF- β 抗体 (GC1008)、抗 - α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗 -CTGF 抗体 (FG-3019)、抗 -CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述 IPF 治疗剂是抗 -IL-13 剂,其中所述 IL-13 剂是抗 -IL-13 抗体,其中所述抗 -IL-13 抗体是 lebrikizumab。

39. 权利要求 37 的方法,其中所述抗 -IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

42. 权利要求 38-41 中任一项的方法,其中按选自 125mg、250mg 和 500mg 的单调剂量每四周皮下施用所述抗 -IL-13 抗体一次。

43. 权利要求 42 的方法,其中按 250mg 的单调剂量每四周皮下施用所述抗 -IL-13 抗体一次。

44. 权利要求 37 的方法,其中所述 IPF 治疗剂是抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂是双特异性抗体。

46. 之前按照权利要求 1-13、20 或 21 中任一项的方法测定为具有缩短的存活的预测的 IPF 患者的治疗方法,其包括施用有效量的 IPF 治疗剂。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述 IPF 治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、

抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0 888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述抗-IL-13 剂是 lebrikizumab。

49. 权利要求 47 的方法, 其中所述抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗-IL-13 抗体, 所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3, 所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

50. 权利要求 49 的方法, 其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

52. 权利要求 48-51 中任一项的方法, 其中按选自 125mg、250mg 和 500mg 的单调剂量每四周皮下施用所述抗-IL-13 抗体一次。

53. 权利要求 52 的方法, 其中按 250mg 的单调剂量每四周皮下施用所述抗-IL-13 抗体一次。

54. 治疗 IPF 患者的方法, 如果所述患者具有按照权利要求 13 的方法测定的 2 或 2 以上的基线得分, 那么所述方法包括施用有效量的 IPF 治疗剂。

55. 治疗 IPF 患者的方法, 如果所述患者具有按照权利要求 20 的方法测定的 1 或 1 以上的基线得分, 那么所述方法包括施用有效量的 IPF 治疗剂。

56. 权利要求 54 或权利要求 55 的方法, 其中所述 IPF 治疗剂选自抗-IL-13 剂、抗-IL-4 剂、抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗-LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

57. 权利要求 56 的方法, 其中所述抗-IL-13 剂是 lebrikizumab。

58. 权利要求 56 的方法, 其中所述抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗-IL-13 抗体, 所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3, 所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

59. 权利要求 58 的方法, 其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

60. 权利要求 59 的方法, 其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

61. 权利要求 57-60 中任一项的方法, 其中按选自 125mg、250mg 和 500mg 的单调剂量每

四周皮下施用所述抗-IL-13 抗体一次。

62. 权利要求 61 的方法,其中按 250mg 的单调剂量每四周皮下施用所述抗-IL-13 抗体一次。

63. 权利要求 56 的方法,其中所述 IPF 治疗剂是抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合。

64. 权利要求 63 的方法,其中所述抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂是双特异性抗体。

65. 权利要求 34-64 中任一项的方法,其中与无治疗相比,所述治疗延长了发展至疾病进展的时间,其中所述疾病进展显示为以下的一项或多项的首次发生:(i) 死亡;(ii) 非选择性住院;(iii) FVC 从基线减少 10%或更多。

66. 权利要求 65 的方法,其中所述疾病进展进一步显示为第 52 周时 DLCO 从基线减少 $\geq 15\%$ 。

67. 权利要求 34-64 中任一项的方法,其中在治疗 52 周后 DLCO 从基线减少小于 15%。

68. 权利要求 34-64 中任一项的方法,其中与无治疗相比,所述治疗导致治疗 52 周后所述患者在 6 分钟步行测试中的行走距离从基线下降的更少。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述行走距离从基线下降大于 50 米、或大于 30 米、或大于 10 米。

70. 权利要求 34-64 中任一项的方法,其中与无治疗相比,所述治疗延长了发展至首次急性 IPF 加重事件或首次 IPF 恶化事件的时间。

71. 在 IPF 患者中监测疾病进展的方法,其包括在第一时间点及一个或多个其他时间点从所述患者获得生物样品,测量所述生物样品中基因或基因组合的表达,或由所述基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达,其中所述基因或基因组合选自表 2、表 3、表 4 或表 5 中的任一个,其中表达水平从所述第一时间点至所述一个或多个其他时间点的变化指示疾病进展。

72. 权利要求 71 的方法,其中所述基因或基因组合或所述蛋白质或蛋白质组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。

73. 权利要求 71 的方法,其中所述基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。

74. 权利要求 71 的方法,其中所述基因或基因组合或所述蛋白质或蛋白质组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2、GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFB3。

75. 权利要求 71 的方法,其中所述基因或基因组合或所述蛋白质或蛋白质组合选自 CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (组成型 SAA)、POSTN 和 AND SPP1 (OPN)。

76. 权利要求 71-75 中任一项的方法,其中所述生物样品选自肺组织、血清和血浆。

77. 权利要求 76 的方法,其中所述生物样品是肺组织或血浆,且用 PCR 法或微列阵芯片测量所述基因或基因组合的表达。

78. 权利要求 76 的方法,其中所述生物样品是血清,且用免疫测定法测量所述蛋白质或蛋白质组合的表达。

79. 权利要求 71-78 中任一项的方法,其进一步包括在临床研究中用候选治疗剂治疗所述患者。

80. 权利要求 79 的方法,其中所述候选治疗剂选自抗-IL-13 剂、抗-IL-4 剂、抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗-LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0 888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。

81. 权利要求 80 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是 lebrikizumab。

82. 权利要求 80 的方法,其中所述抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗-IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。

83. 权利要求 82 的方法,其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。

84. 权利要求 83 的方法,其中所述抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

预测、诊断和治疗特发性肺纤维化的方法

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2012 年 3 月 27 日提交的美国临时申请号 61/616,394 和 2012 年 9 月 28 日提交的美国临时申请号 61/707,411 的优先权,将两个美国临时申请都在此以其整体并入本文作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已通过电子提交系统 (EFS-Web) 以 ASCII 形式提交的序列表,并在此以其整体并入本文作为参考。2013 年 3 月 6 日创建的该 ASCII 拷贝命名为 P4841R1_SequenceListing.txt,大小为 22,866 字节。

技术领域

[0005] 提供用于在患者中评估特发性肺纤维化的预测的组合物、试剂盒和方法。此外,提供用于诊断特发性肺纤维化的亚型的组合物、试剂盒和方法。还提供用于治疗特发性肺纤维化的方法。

背景技术

[0006] 特发性肺纤维化 (IPF) 是表征为肺实质的进行性间质性纤维化的限制性肺疾病,在美国影响约 100,000 患者 (Raghu 等, Am J Respir Crit Care Med 174:810-816 (2006))。这种与 IPF 相关的间质性纤维化导致肺功能的进行性丧失,在大多数患者中由于引起呼吸衰竭而导致死亡。从诊断的时间起存活中位数为 2-3 年 (Raghu 等, Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011))。IPF 的病因学及关键分子和病理生理学因素 (driver) 未知。显示在 IPF 患者中延长存活的唯一治疗是肺移植 (Thabut 等, Annals of internal medicine 151:767-774 (2009))。但是,肺移植与很高的发病率相关,并非所有 IPF 患者都是合适的肺移植候选者,且适宜的供体肺相对稀缺。尽管进行了许多尝试,迄今没有药物治疗在 IPF 患者中的随机化、安慰剂对照干预试验中显示实质性延长存活,但一些干预似乎在患者中降低了肺功能衰退的速率 (Raghu 等, Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011); Richeldi 等, The New England J. of Med. 365:1079-1087 (2011); Rafii 等, J. Thorac. Dis. 5(1):48-73 (2013))。

[0007] 虽然所有 IPF 患者的预测都是可怕的,但疾病轨迹存在很大的异质性 (Raghu 等, Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011))。一些患者显示相对无痛的病程,在长达 10 年或更长的时间内以相对恒定的速率丧失肺功能,而其他患者经历更快速的肺功能衰退,在诊断的一年或两年内死亡。此外,一些患者遭受疾病的急性加重,通常表征为肺功能突然急剧下降。通常,这些患者在急性事件后未完全恢复,且常在加重期间或加重后短时间内死亡。疾病轨迹的这种异质性表明,不同的 IPF 患者可以具有潜藏在其疾病之下的不同的病理生理学因素,其可能对分子靶向治疗具有不同的敏感性。

[0008] 仅提出了用几种临床或生物学标志作为候选物来从单个时间点预测 IPF 患者的疾病轨迹 (Ley 等, Am J Respir Crit Care Med 183:431-440 (2011); Ley 等, Am J

Respir Crit Care Med185:6-7(2012))。已最令人信服地将减少的存活与肺功能随时间丧失的速率相联系,与具有更稳定的用力肺活量(FVC)的患者相比,在6个月的时期内丧失>10%的FVC的患者具有短得多的后续存活时间(Collard等,Am J Respir Crit Care Med168:538-542(2003))。将超过1100名患者招募入随机临床试验的一项更大的研究发现,5-10%的24周FVC下降与随后一年中增加的超过2倍的死亡率风险相关,而>10%的下降与随后一年中增加的近5倍的死亡率风险相关(du Bois等,Am J Respir Crit Care Med184:1382-1389(2011))。但是,用这种评估来分层招募入临床研究的患者的劣势是六个月的试运转期。已报到了在单个时间点测量的某些外周血生物标志可预测存活或疾病进展,包括MMP7、IL-8、ICAM1、VCAM1、S100A12(Richards等,Am J Respir Crit Care Med,doi:10.1164/rccm.201101-00580C(2011))、KL-6(Yokoyama等,Respirology11:164-168(2006))、CCL18(Prasse等,Am J Respir Crit Care Med179:717-723(2009))、YKL-40(Korthagen等,Respiratory medicine105:106-113(2011))和表面活性蛋白(Kinder等,Chest135:1557-1563(2009))。但是,这些生物标志研究中的许多是在无重复的小群组中进行的,且利用了次优、不一致和/或未验证的生物标志检测技术。

[0009] 由于对可靶向的分子机制的理解有限、疾病轨迹的可变性及在未经选择的IPF患者群体中进行存活研究的时间和花费,设计适当有力的临床研究来评估候选治疗剂在IPF中延长存活的潜力极具挑战。鉴定潜在的可靶向途径的活性并提供对随后的疾病进展的准确预测的生物标志将有助于适当地分层干预试验中的招募者,以更好地评估研究的药物候选物的治疗价值。

[0010] 因此,存在对更有效的方法的需要,所述方法用于确定哪些患者将比其他患者更快地进展或哪些患者与中位数相比将具有缩短的存活时间,及用于将这些测定结果并入更有效的临床试验设计和IPF患者的治疗方案。

[0011] 因此,具有其他预测和诊断方法(包括基于分子的预测和诊断方法)将高度有利,该方法可以用来客观地鉴定疾病在患者中的存在和/或对患者中的疾病分类,限定IPF的病理生理方面、临床活性和预测,包括存活的预测。此外,具有与疾病的多种临床指示剂(indicator)和/或病理生理指示剂和/或其他生物学指示剂相关的基于分子的诊断和预测标志将是有益的。因此,存在鉴定与IPF以及其他限制性肺病症相关的新的分子生物标志的持续需要。

[0012] 本文所述的发明满足上述需要,并提供其他益处。

[0013] 白细胞介素(IL)-13是多效T辅助细胞亚类2(Th2)细胞因子。与IL4一样,IL13隶属于I型细胞因子家族,该家族共有由4 α -螺旋疏水束核心限定的三级结构。IL13与IL4具有约30%氨基酸序列同源性,且共有IL4的许多特性(Wynn,Ann. Rev. Immunol.,21:425(2003))。IL4和IL13的功能相似性归因于这样的事实,IL13可以在与IL13受体 α 链-1(IL13R α 1)结合后结合IL4受体 α 链(IL4R- α)(Hershey,J. Allergy Clin. Immunol.,111:677(2003))。IL4和IL13激活IL4R α ,导致Jak1依赖性STAT6磷酸化。IL4和IL13与CD40/CD40L共刺激组合促进B细胞增殖,并诱导类别转换至IgG4和IgE(Punnonen等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,90:3730(1993);Oettgen等,J. Allergy Clin. Immunol.,107:429(2001))。

[0014] 但是,与 IL4 不一样,IL13 不涉及幼稚 T 细胞分化为 Th2 细胞 (Zurawski 等, Immunol. Today, 15:19(1994))。IL13 上调 Fc ϵ RI,从而有助于肥大细胞的 IgE 引发 (de Vries, Allergy Clin. Immunol. 102:165(1998))。在单核细胞/巨噬细胞中,IL13 上调 CD23 及 MHC I 类和 II 类抗原的表达,下调 Fc γ 和 CD14 的表达,并抑制抗体依赖性细胞毒性 (de Waal Malefyt 等, J. Immunol., 151:6370(1993); Chomarat 等, Int. Rev. Immunol., 17:1(1998))。IL13 (而不是 IL4) 促进嗜酸性粒细胞存活、活化和募集 (Horie 等, Intern. Med., 36:179(1997); Luttmann 等, J. Immunol. 157:1678(1996); Pope 等, J. Allergy Clin. Immunol., 108:594(2001))。IL13 还表现对非造血细胞,诸如平滑肌细胞、上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞的重要作用。IL13 增强平滑肌的增殖和胆碱能诱导的收缩 (Wills-Karp, J. Allergy Clin. Immunol., 107:9(2001))。在上皮细胞中,IL13 是趋化因子产生的有效诱导物 (Li 等, J. Immunol., 162:2477(1999)),改变黏膜纤毛分化 (Laoukili et al., J. Clin. Invest., 108:1817(2001)),减小纤毛上皮细胞的纤毛摆动频率 (Laoukili 等, J. Clin. Invest., 108:1817(2001)),并导致杯形细胞组织转化 (Zhu 等, J. Clin. Invest., 103:779(1999); Grunig 等, Science, 282:2261(1998))。在内皮细胞中,IL13 是对募集嗜酸性粒细胞重要的血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 的有效诱导物 (Bochner 等, J. Immunol., 154:799(1995))。在人皮肤成纤维细胞中,IL13 在人皮肤成纤维细胞中诱导 I 型胶原合成 (Roux 等, J. Invest. Dermatol., 103:444(1994))。

[0015] 之前已描述过 IL-13 拮抗剂,包括抗-IL-13 抗体。见例如国际专利申请公开号 WO 2005/062967。已将这类抗体发展为人类治疗剂。用一种抗-IL-13 抗体 lebrikizumab 进行的一项临床研究的结果已描述于 Corren 等, New Engl. J. Med. 365:1088-1098(2011) 中。

[0016] 本文引用的所有参考文献 (包括专利申请和公开) 为了所有目的以其整体并入本文作为参考。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明的组合物和方法至少部分基于特发性肺纤维化 (IPF) 的至少三种新且不同的分子表型 (本文中也称为分子亚型)。本文所述的 IPF 分子亚型根据亚型间的差别基因表达来定义。此外,本发明的组合物和方法至少部分基于可预测 IPF 患者的存活的血清或血液生物标志的鉴定。这类生物标志尤其用于鉴定和选择按照本发明的方法进行治疗性处理的 IPF 患者。术语“分子表型”和“分子亚型”在本文中可互换使用。

[0019] 因此,在一方面,提供预测或辅助预测特发性肺纤维化 (IPF) 的方法。在某些实施方案中,从该患者获得生物样品,并测量基因或基因组合的表达,或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达。在某些实施方案中,该基因或基因组合提高的表达水平或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合提高的表达指示与存活中位数相比缩短的存活的预测。在某些实施方案中,该基因或基因组合降低的表达或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合降低的表达指示与存活中位数相比增加的存活的预测。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自表 2、表 3、表 4 或表 5 中的任一个。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、

CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A) ;LOXL1、LOXL2 ;GLI1、GLI2、SMO ;SFRP2、DI02、CDH11、POSTN 和 TGFB3。在某些实施方案中,通过测定 mRNA 水平来测量基因表达水平。在某些实施方案中,该测定包括 PCR 法和 / 或使用微列阵芯片。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。在某些实施方案中,试剂盒包括至少一种选自核酸酶、连接酶和聚合酶的酶。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由上文鉴定的基因之一编码的一种或多种蛋白质结合。

[0020] 在以上方法的另一实施方案中,该基因或基因组合选自 CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (组成型 SAA)、POSTN 和 AND SPP1 (OPN)。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 YKL-40、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、MMP7、CXCL13、COMP、SAA 和 OPN。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMP 和 YKL-40。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 POSTN、MMP3 和 CXCL13。在另一实施方案中,测量 YKL-40 的表达水平或 CCL18 的表达水平和 / 或 CXCL13 的表达水平。在另一实施方案中,测量 MMP3 的表达水平和 / 或 SAA 的表达水平。在某些实施方案中,通过测定 mRNA 水平来测量该基因表达水平。在某些实施方案中,该测定包括 PCR 法和 / 或使用微列阵芯片。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。在某些实施方案中,试剂盒包括至少一种选自核酸酶、连接酶和聚合酶的酶。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由上文鉴定的基因之一编码的一种或多种蛋白质结合。

[0021] 在上述方法的某些实施方案中,该患者正进行免疫调节治疗。在另一实施方案中,该生物样品选自肺组织、血清和血浆。

[0022] 在一方面,通过微列阵来测量上述方法的基因表达。在另一方面,通过实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 来测量基因表达。在另一方面,通过多重 PCR 来测量基因表达。根据另一实施方案,通过观察上述基因中的一个或多个的蛋白质表达水平来测量基因表达。根据另一实施方案,如果目的基因的相对 mRNA 水平比健康对照或参照基因 mRNA 水平高 2 倍,则认为与健康对照或参照个体相比,目的基因的表达提高。根据另一实施方案,与健康对照或参照基因表达水平相比,目的基因的相对 mRNA 水平高 3 倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍或 30 倍。在一方面,通过选自 PCR 法、微列阵法或免疫测定法的方法来测量该基因表达水平。在一个实施方案中,该微列阵法包括使用微列阵芯片,该微列阵芯片具有一种或多种可以在严格条件下与编码上文提到的基因的核酸分子杂交,或具有一种或多种多肽 (如肽或抗体),其可以与由上文提到的基因编码的一种或多种蛋白质结合。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。根据一个实施方案,该免疫测定法包括使抗体与在患者样品中的从上文提到的基因表达的蛋白质结合,并测定来自该患者样品的蛋白质水平是否提高。在某些实施方案中,该免疫测定法是酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0023] 在另一方面,提供在患者中预测或辅助预测 IPF 的方法,其中从该患者获得生物

样品,并测定总基线生物标志得分。在某些实施方案中,该总基线生物标志得分的测定包括测量 CXCL13、OPN 和 COMP 中至少一个的蛋白质表达水平,如果该表达水平分别低于 CXCL13、OPN 和 COMP 的中位数,则指定 0 的得分,如果该表达水平分别高于 CXCL13、OPN 和 COMP 的中位数,则指定 1 的得分,其中该总基线生物标志得分的测定进一步包括测量 YKL-40 的蛋白质表达水平,如果该表达水平低于 YKL-40 的中位数,则指定 0 的得分,如果该表达水平高于 YKL-40 的中位数,则指定 1 的得分,其中该总基线生物标志得分的测定进一步包括将每一单个得分相加来获得总基线生物标志得分。在某些实施方案中,2 或 2 以上的总基线生物标志得分指示与存活中位数相比缩短的存活的预测。在某些实施方案中,0 或 1 的总基线生物标志得分指示与存活中位数相比增加的存活的预测。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由 CXCL13、OPN、COMP 和 / 或 YKL-40 编码的一种或多种蛋白质结合。

[0024] 还在另一方面,如果按上文所述测定的患者的总基线生物标志得分为 2 或 2 以上,则在临床研究中选择用候选治疗剂治疗该患者。在某些实施方案中,该候选治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗 -TGF- β 抗体 (GC1008)、抗 - α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗 -CTGF 抗体 (FG-3019)、抗 -CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、antiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是 lebrikizumab。在一个实施方案中,该抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂是双特异性抗体。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,提供治疗 IPF 患者的方法,如果该患者具有按照上述方法测定的 2 或 2 以上的基线得分,那么施用有效量的上文提供的 IPF 治疗剂。

[0025] 在另一方面,提供在患者中预测或辅助预测 IPF 的方法,其中从该患者获得生物样品并测定总基线生物标志得分,其中该总基线生物标志得分的测定包括测量 MMP3 和 COMP 中至少一个的蛋白质表达水平,如果该表达水平分别低于 MMP3 和 COMP 的中位数,则指定 0 的得分,如果该表达水平分别高于 MMP3 和 COMP 的中位数,则指定 1 的得分,其中该总基线生物标志得分的测定进一步包括测量 YKL-40 的蛋白质表达水平,如果该表达水平低于 YKL-40 的中位数,则指定 0 的得分,如果该表达水平高于 YKL-40 的中位数,则指定 1 的得分,且其中该总基线生物标志得分的测定进一步包括将每一单个得分相加来获得总基线生物标志得分。在某些实施方案中,1 或 1 以上的总基线生物标志得分指示与存活中位数相比缩短的存活的预测。在某些实施方案中,0 的总基线生物标志得分指示与存活中位

数相比增加的存活的预测。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由 MMP3、COMP 和 / 或 YKL-40 编码的一种或多种蛋白质结合。

[0026] 还在另一方面,如果按上文所述测定 MMP3、COMP 和 / 或 YKL-40 的表达的患者的总基线生物标志得分为 1 或 1 以上,那么在临床研究中选择用候选治疗剂治疗该患者。在某些实施方案中,该候选治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗 -TGF- β 抗体 (GC1008)、抗 - α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗 -CTGF 抗体 (FG-3019)、抗 -CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是 lebrikizumab。在一个实施方案中,该抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂是双特异性抗体。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,提供治疗 IPF 患者的方法,如果该患者具有按照上述方法测定的 1 或 1 以上的基线得分,那么施用有效量的上文提供的 IPF 治疗剂。

[0027] 另一方面,提供在个体中诊断 IPF 的分子亚型的方法。在某些实施方案中,该方法包括测量从所述受试者获得的生物样品中基因或基因组合的表达,或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达。在某些实施方案中,该基因或基因组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4,该基因或基因组合提高的表达或该蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。在某些实施方案中,该基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、TNFRSF17 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK κ (免疫球蛋白 κ 基因座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM,该基因或基因组合提高的表达或该蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。在某些实施方案中,该基因或基因组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2 ;GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFB3,该基因或基因组合提高的表达或该蛋白质或蛋白质组合提高的表达指示 IPF 分子亚型。在某些实施方案中,通过测定 mRNA 水平来测量该基因表达水平。在某些实施方案中,该测定包括 PCR 法和 / 或使用微列阵芯片。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。在某些实施方案中,试剂盒包括至少一种选自核酸酶、连接酶和聚合酶的酶。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水

平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由上文鉴定的基因之一编码的一种或多种蛋白质结合。

[0028] 在另一方面,用于以上方法中任一种的生物样品是肺组织、全血或血清。在某些实施方案中,该生物样品是肺组织或全血,用 PCR 法或微列阵芯片测量该基因或基因组合的表达。在某些实施方案中,该生物样品是血清,用免疫测定法测量该蛋白质或蛋白质组合的表达。

[0029] 还在另一方面,提供在患者中治疗 IPF 的方法。在某些实施方案中,如果在从该患者获得的生物样品中检测到基因或基因组合提高的表达,或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的提高的表达,那么该方法包括对该患者施用有效量的 IPF 治疗剂来治疗 IPF。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、TNFRSF17 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫球蛋白 κ 基因座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2、GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFB3。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (组成型 SAA)、POSTN 和 AND SPP1 (OPN)。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 YKL-40、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、MMP7、CXCL13、COMP、SAA 和 OPN。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMP 和 YKL-40。在另一实施方案中,该基因或基因组合选自 POSTN、MMP3 和 CXCL13。在另一实施方案中,测量 YKL-40 的表达水平或 CCL18 的表达水平和 / 或 CXCL13 的表达水平。在另一实施方案中,测量 MMP3 的表达水平和 / 或 SAA 的表达水平。在某些实施方案中,通过测定 mRNA 水平来测量该基因表达水平。在某些实施方案中,该测定包括 PCR 法和 / 或使用微列阵芯片。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。在某些实施方案中,试剂盒包括至少一种选自核酸酶、连接酶和聚合酶的酶。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由上文鉴定的基因之一编码的一种或多种蛋白质结合。在某些实施方案中,IPF 治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/ 抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N- 乙酰半胱氨酸、抗 -TGF- β 抗体 (GC1008)、抗 - α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗 -CTGF 抗体 (FG-3019)、抗 -CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。在某些实施方案中,IPF 治疗剂是抗 -IL-13 抗体。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列

的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体 (lebrikizumab) 包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,按选自 125mg、250mg 和 500mg 的单调剂量 (flat dose) 每四周皮下施用 lebrikizumab 一次。在一个实施方案中,按 250mg 的单调剂量每四周皮下施用 lebrikizumab 一次。

[0030] 在另一方面,按以上方法测定预测为具有缩短的存活的 IPF 患者之后,提供治疗该 IPF 患者的方法。在某些这类实施方案中,施用有效量的 IPF 治疗剂。在一个实施方案中,IPF 治疗剂选自抗-IL-13 剂、抗-IL-4 剂、抗-IL-13/ 抗-IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗-LOXL2 抗体 (GS-6624)、N-乙酰半胱氨酸、抗-TGF- β 抗体 (GC1008)、抗- α v β 6 整合蛋白抗体 (STX-100)、抗-CTGF 抗体 (FG-3019)、抗-CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、antiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。在一个实施方案中,该抗-IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗-IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体 (lebrikizumab) 包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,按选自 125mg、250mg 和 500mg 的单调剂量 (flat dose) 每四周皮下施用抗-IL-13 抗体一次。在一个实施方案中,按 250mg 的单调剂量每四周皮下施用抗-IL-13 抗体一次。

[0031] 生长抑素类似物还在另一方面,与无治疗相比,上述用抗-IL-13 抗体或 lebrikizumab 治疗 IPF 患者的方法延长了发展至疾病进展的时间,其中疾病进展显示为以下一项或多项的首次发生:(i) 死亡;(ii) 非选择性住院;(iii) FVC 从基线减少 10% 或更多。在一个实施方案中,疾病进展进一步显示为第 52 周时 DL_{co} 从基线减少 $\geq 15\%$ 。在一个实施方案中,上述抗-IL-13 抗体或 lebrikizumab 治疗导致治疗 52 周后 DL_{co} 从基线减少小于 15%。在一个实施方案中,与无治疗相比,这种治疗导致治疗 52 周后患者在 6 分钟步行测试中的行走距离从基线下降的更少。在一个实施方案中,行走距离从基线下降的减少量大于 50 米、或大于 30 米、或大于 10 米。在某些实施方案中,与无治疗相比,该治疗延长了首次出现急性 IPF 加重事件或首次出现 IPF 恶化事件的时间。

[0032] 在一方面,提供通过施用抗-IL-13 抗体或 lebrikizumab 以在 IPF 患者中延长发展至疾病进展的时间的方法。在某些实施方案中,疾病进展显示为以下一项或多项的首次发生:(i) 死亡;(ii) 非选择性住院;(iii) FVC 从基线减少 10% 或更多。在一个实施方案中,疾病进展进一步显示为第 52 周时 DL_{co} 从基线减少 $\geq 15\%$ 。在一个实施方案中,上述抗-IL-13 抗体或 lebrikizumab 治疗导致治疗 52 周后 DL_{co} 从基线减少小于 15%。在一个实施方案中,与无治疗相比,这种治疗导致治疗 52 周后患者在 6 分钟步行测试中的行走距离从基线下降的更少。在一个实施方案中,行走距离从基线下降的减少量大于 50 米、或大

于 30 米、或大于 10 米。在某些实施方案中,与无治疗相比,该治疗延长了发展至首次急性 IPF 加重事件或首次 IPF 恶化事件的时间。

[0033] 还在另一方面,提供在 IPF 患者中监测疾病进展的方法。在某些实施方案中,该方法包括在第一时间点及一个或多个其他时间点从该患者获得生物样品,并测量该生物样品中基因或基因组合的表达,或由该基因编码的蛋白质或基因组合编码的蛋白质组合的表达,其中该基因或基因组合选自表 2、表 3、表 4 或表 5 中的任一个,其中表达水平从该第一时间点至该一个或多个其他时间点的变化指示疾病进展。在一个实施方案中,该基因或基因组合或该蛋白质或蛋白质组合选自 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3 和 SAA4。在一个实施方案中,该基因或基因组合选自 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。在一个实施方案中,该基因或基因组合或该蛋白质或蛋白质组合选自 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2、GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFB3。在一个实施方案中,该基因或基因组合或该蛋白质或蛋白质组合选自 CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (组成型 SAA)、POSTN 和 AND SPP1 (OPN)。在某些实施方案中,生物样品选自肺组织、血清和血浆。在某些实施方案中,通过测定 mRNA 水平来测量该基因表达水平。在某些实施方案中,该测定包括 PCR 法和 / 或使用微列阵芯片。在一个实施方案中,该 PCR 法是 qPCR。在一个实施方案中,该 PCR 法是多重 PCR。在某些实施方案中,试剂盒包括至少一种选自核酸酶、连接酶和聚合酶的酶。在某些实施方案中,通过免疫测定法来测量该蛋白质表达水平。在某些实施方案中,提供免疫测定试剂盒,该免疫测定试剂盒包含一种或多种抗体,其与由上文鉴定的基因之一编码的一种或多种蛋白质结合。

[0034] 在另一方面,上述监测疾病进展的方法进一步包括在临床研究中用候选治疗剂治疗该患者。在某些实施方案中,该治疗剂选自抗 -IL-13 剂、抗 -IL-4 剂、抗 -IL-13/抗 -IL-4 剂的组合、吡非尼酮、抗 -LOXL2 抗体 (GS-6624)、N-乙酰半胱氨酸、抗 -TGF- β 抗体 (GC1008)、抗 - α v β 6 整联蛋白抗体 (STX-100)、抗 -CTGF 抗体 (FG-3019)、抗 -CCL2 抗体 (CNT0888)、生长抑素类似物 (SOM230, 奥曲肽)、angiotensin II 抑制剂 (氯沙坦)、一氧化碳、沙利度胺、四硫钼酸盐、多西环素、米诺环素和酪氨酸激酶抑制剂 (BIBF1120)。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 剂是包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR 的抗 -IL-13 抗体,所述三个重链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :1 的氨基酸序列的 CDR-H1、具有 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列的 CDR-H2 和具有 SEQ ID NO. :3 的氨基酸序列的 CDR-H3,所述三个轻链 CDR 是具有 SEQ ID NO. :4 的氨基酸序列的 CDR-L1、具有 SEQ ID NO. :5 的氨基酸序列的 CDR-L2 和具有 SEQ ID NO. :6 的氨基酸序列的 CDR-L3。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :7 的氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO. :9 的氨基酸序列的轻链可变区。在一个实施方案中,该抗 -IL-13 抗体包含具有 SEQ ID NO. :10 的氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO. :14 的氨基酸序列的轻链。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1 显示实施例 1 中所述的 IPF 患者中的基因表达异质性。(A) IPF 和对照之间 2490 个 DE 微列阵探针的无监督双向分层聚簇分析 (Unsupervised 2-way hierarchical clustering) 显示主要由 IPF 的诊断定义三个主要聚簇 (cluster) (组 1 聚簇、组 2 聚簇和组 3 聚簇); (B) 组 1 聚簇的重新聚簇鉴定出异质性基因表达特征, 其中大多数 IPF 患者 (和少数对照) 表达高水平的细支气管上皮基因特征 (“细支气管特征”); (C) 组 2 聚簇的重新聚簇鉴定出异质性基因表达特征, 其中大多数 IPF 患者 (对照中没有) 表达高水平的淋巴小结基因特征 (“淋巴特征”); (D) 组 3 聚簇的重新聚簇鉴定出异质性基因表达特征, 其中 IPF 患者表达中等水平和高水平的成纤维细胞分化为肌成纤维细胞的基因特征, 而对照个体表达低水平的该基因特征 (“成纤维细胞特征”, 本文中也称为 “肌成纤维细胞特征”); (E) 显示细支气管、淋巴和肌成纤维细胞基因表达特征未随彼此共变的图。

[0037] 图 2 显示从 IPF 肺外植块取下的活检组织的邻近冰冻切片上的免疫组织化学 (IHC), 如实施例 1 中所述。(A) 苏木精和伊红 (H&E) 染色; (B) 三色染色; (C) 抗-角蛋白 14 染色; (D) 过碘酸希夫 (PAS) 染色; (E) H&E 染色显示具有染色深的细胞核的细胞聚集体 (箭头); (F) 三色染色显示胶原沉积在聚集体周围而不存在于聚集体内 (箭头); (G) 抗-CD20 染色显示聚集体具有高浓度的 CD20 阳性 B 细胞; (H) (G) 中用 (*) 标记的区域的更高放大倍数; (I) 细支气管化囊肿的抗-角蛋白 14 染色; (J) 集合淋巴结的抗-CD20 染色。

[0038] 图 3 显示通过 qPCR 测量的候选生物标志基因在获自 IPF 患者和获自对照的肺组织中的基因表达, 如实施例 1 中所述。(A) 骨膜蛋白 (periostin) 基因表达; (B) CCL13 基因表达; (C) CCL18 基因表达; (D) 骨桥蛋白基因表达; (E) COMP 基因表达; (F) YKL-40 基因表达; (G) MMP7 基因表达。

[0039] 图 4 显示如实施例 1 中所述的在中位数水平 (69%) 预测的按 FVC 百分比分层的 IPF 存活。

[0040] 图 5 显示如实施例 1 中所述的用于 IPF 存活的单个和组合的预测生物标志的 Cox 模型。(A) 按血清 CXCL13 水平分层的 IPF 存活的 Cox 模型; (B) 按血清 YKL-40 水平分层的 IPF 存活的 Cox 模型; (C) 按血清 COMP 水平分层的 IPF 存活的 Cox 模型; (D) 按血清 OPN 水平分层的 IPF 存活的 Cox 模型。

[0041] 图 6 显示实施例 1 中所述的六种生物标志 (SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMP 和 YKL-40) 可能的组合的受者作用特征 (ROC) 分析。(A) 所示六种生物标志的每种可能组合的 ROC 分析来预测采集样品后 1、2 和 3 年内的死亡率; (B) 两年时 ROC 分析的曲线下面积及六种生物标志 (SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMP 和 YKL-40) 的所有可能组合的期限显著性 (term significance)。

[0042] 图 7 显示如实施例 1 中所述, 按 YKL-40 加 OPN 加 COMP 加 CXCL13 的组合的基线生物标志得分分层的 IPF 存活的组合 Cox 模型。

[0043] 图 8 显示如实施例 1 中所述, 表达高于生物标志 MMP3、COMP 和 YKL-40 中的零个、一个、两个或全部三个的中位数水平的 IPF 患者的 Kaplan-Meier 存活图。

[0044] 图 9 显示如实施例 2 中所述, 来自对照患者 (左侧) 和来自 IPF 患者 (右侧) 的肺组织中 IL-13Ra2 表达的定量 PCR 结果。

[0045] 图 10 显示如实施例 2 中所述, IL-4 或 IL-13 诱导 IMR90 原代肺成纤维细胞中的 IL13R α 2 表达。

[0046] 图 11 显示如实施例 2 中所述, TNF α 对 IL13R α 2 表达 (A) 及在存在或缺乏 IL-13 的情况下对 CCL26 和骨膜蛋白表达 (B) 的影响。

[0047] 图 12 显示用 TNF α 预处理, 然后进行图中所示和实施例 2 中所述的多种 IL-13 和 / 或 IL-4 细胞因子和封闭性抗 -IL-13mAb1 和 / 或 mAb2 抗体处理的 IMR90 细胞中 CCL26 和骨膜蛋白 (POSTN) 的基因表达水平。

[0048] 图 13 显示如实施例 2 中所述, 来自用 IL-13 (A) 或用 IL-13 和 IL-4 (B) 处理, 然后进一步用抗 -IL-13mAb2 或抗 -IL-13mAb2 处理的 IMR90 细胞的微列阵数据。

[0049] 图 14 显示实施例 2 中所述的 IPF 群组中的 GLI1 表达。

[0050] 图 15 显示原代肺成纤维细胞 (培养在基质胶上) 中响应实施例 2 中所述的多种加入的因子的 GLI1 基因表达。

[0051] 图 16 显示原代肺成纤维细胞 (培养在基质胶上) 中响应图中所示和实施例 2 中所述的多种加入的因子的 TGF β 1 基因表达 (A) 和 GLI1 基因表达 (B)。

[0052] 发明详述

[0053] 某些定义

[0054] 除非另有定义, 本文中所用的所有技术术语、注释和其他科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下, 为了清楚和 / 或为了即时参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语, 本文中这类定义的纳入不应解释为代表与本领域的通常理解的实质性差异。本文中描述或参考的技术和方法通常为本领域技术人员熟知, 且通常用常规方法利用, 例如 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 中所述的广泛利用的分子克隆方法。适当时, 除非另有说明, 涉及使用市售试剂盒和试剂的方法通常按照厂家定义的方案和 / 或参数进行。

[0055] “细支气管基因特征”、“细支气管特征”和“细支气管基因表达特征”在本文中可互换使用, 指表 2 中所示的基因的组合或次组合 (subcombination), 其基因表达模式与某些 IPF 患者相关。该基因包括 MUCL1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3、SAA4 (编码组成型 SAA)。细支气管基因特征的多肽是本文所述的“靶向的多肽”。

[0056] “淋巴基因特征”、“淋巴特征”和“淋巴基因表达特征”、淋巴小结基因特征”、“淋巴小结特征”和“淋巴小结基因表达特征”在本文中可互换使用, 指表 3 中所示的基因的组合或次组合, 其基因表达模式与某些 IPF 患者相关。该基因包括 CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、TNFRSF17 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK κ (免疫球蛋白 κ 基因座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8 和 IGHM。淋巴小结基因特征的多肽是本文所述的“靶向的多肽”。

[0057] “肌成纤维细胞基因特征”、“肌成纤维细胞特征”和“肌成纤维细胞基因表达特征”、“成纤维细胞基因特征”、“成纤维细胞特征”和“成纤维细胞基因表达特征”在本文中可互换使用, 指表 4 中所示的基因的组合或次组合, 其基因表达模式与某些 IPF 患者相关。该基因包括 COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、

HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A)、LOXL1、LOXL2 ;GLI1、GLI2、SMO、SFRP2、DIO2、CDH11、POSTN 和 TGFβ3。肌成纤维细胞基因特征的多肽是本文所述的“靶向的多肽”。

[0058] 在本文中使用时,术语“靶向的多肽”指“天然序列”多肽和变体(其在本文中进行进一步定义)。

[0059] “天然序列”多肽包括具有与对应的源自自然界的多肽相同的氨基酸序列的多肽。因此,术语“天然序列多肽”包括天然存在的截短、增长和移码形式的多肽,包括但不限于选择性剪接形式、亚型和多态性

[0060] “天然存在的变体”意指与参照多肽具有至少约 60%氨基酸序列同一性且保留该天然存在的参照多肽的至少一种生物学活性的多肽。天然存在的变体可以包括与参照多肽具有至少约 65%氨基酸序列同一性、至少约 70%氨基酸序列同一性、至少约 75%氨基酸序列同一性、至少约 80%氨基酸序列同一性、至少约 80%氨基酸序列同一性、至少约 85%氨基酸序列同一性、至少约 90%氨基酸序列同一性、至少约 95%氨基酸序列同一性、至少约 98%氨基酸序列同一性或至少约 99%氨基酸序列同一性的变异多肽。

[0061] 本文中可互换使用的术语“多核苷酸”或“核酸”指任意长度的核苷酸聚合物,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,或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶掺入到聚合物的任意底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在,对核苷酸结构的修饰可以在聚合物装配之前或之后进行。核苷酸的序列可以由非核苷酸成分中断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,如通过与标记成分缀合。其他类型的修饰包括例如“加帽”,用核苷酸类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸,核苷酸间修饰,例如具有不带电荷的连接(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、亚磷酰胺(phosphoramidate)、氨基甲酸酯(carbamate)等)和具有带电荷的连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些,包含悬垂部分(pendant moiety)(例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等))的那些修饰,具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些修饰,包含螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些修饰,包含烷化剂(alkylator)的那些修饰,具有修饰的连接的那些修饰(例如α-异头核酸等),以及未修饰形式的多核苷酸。另外,通常存在于糖中的任意羟基可以例如通过磷酸酯基、磷酸基取代,通过标准保护基团保护,或活化以制备与其他核苷酸的其他连接,或可以缀合至固体或半固体支持体。5'和3'端OH可以磷酸化或用1至20个碳原子的胺或有机封端基团部分取代。其他羟基也可以衍生至标准保护基团。多核苷酸还可以包含本领域公知的核糖或脱氧核糖的类似物形式,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氨基-核糖,碳环糖类似物,α-异头糖,差向异构糖(epimeric sugar)如阿拉伯糖、木糖或来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物(acyclic analog)和无碱基核苷类似物如甲基核苷。可以用备选的连接基团替换一个或多个磷酸二酯键。这些备选的连接基团包括但不限于其中用P(O)S(“硫代”)、P(S)S(“二硫代”)、(O)NR₂(“酰胺化”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“formacetal”)取代磷酸的实施方案,其中每个R或R'是单独的H或可选地包含醚(-O-)键的取代或未取代的烷基(1-20C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或araldyl。多核苷酸中的所有键无需相同。前面的描述适用于本文提到的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0062] 本文所用的“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,且小

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”并非相互排斥。上文针对多核苷酸的描述同等地和完全地适用于寡核苷酸。

[0063] 术语“引物”指单链多核苷酸,其能够与核酸杂交,且通常通过提供自由 3'-OH 基团来允许聚合互补核酸。

[0064] 术语“阵列”或“微阵列”指可杂交的阵列元件(优选多核苷酸探针(例如寡核苷酸))在基质上的有序排列。基质可以是固体基质,如载玻片,或半固体基质,如硝酸纤维素膜。

[0065] 术语“扩增”指产生参照核酸序列或其互补序列的一个或多个拷贝的方法。扩增可以是线性的或指数的(例如 PCR)。“拷贝”并非必然意指相对于模板序列完美的序列互补性或同一性。例如,拷贝可以包含核苷酸类似物(如脱氧肌苷)、刻意序列改变(如通过引物引入的序列改变,所述引物包含可与模板杂交但并非完全互补的序列)和/或扩增过程中出现的序列错误。

[0066] 术语“检测”包括任意检测手段,包括直接检测和间接检测。

[0067] 可与“分子表型”互换使用的术语“分子亚型”指 IPF 的亚型或表型,其表征为一个或多个特定基因的表达或一种或多种特定蛋白质,或基因组合的特定表达模式或蛋白质组合。

[0068] 术语“多重 PCR”指为了在单个反应中扩增两种或多种 DNA 序列的目的而用一套以上引物对获自单一来源(例如患者)的核酸进行的单个 PCR 反应。

[0069] 本文所用的术语“生物标志”指例如患者的病理学状态的指示物,其可以在该患者的生物样品中检测到。生物标志包括但不限于 DNA、RNA、蛋白质、糖类或基于糖脂的生物标志。

[0070] 本文用术语“诊断”来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 IPF 或 UIP 的具体类型的鉴定。“诊断”还可以指例如通过组织病理学或放射照像标准或通过分子特征(例如,表征为具体基因或具体基因组合的表达或该基因编码的蛋白质的亚型)分类 IPF 的具体亚型。

[0071] 本文用术语“辅助诊断”来指就 IPF 的症状或病症的具体类型的存在或性质辅助作出临床决定的方法。例如,辅助诊断 IPF 的方法可以包括测量某些基因在来自个体的生物样品中的表达。

[0072] 本文用术语“预测”来指随时间存活以及一种或多种可归因于 IPF 的疾病症状随时间恶化的概率的预测。

[0073] “对照受试者”指诊断未患有 IPF 且未遭受与 IPF 相关的任意病征或症状的健康受试者。

[0074] 本文所用的术语“样品”指获自或源自目的受试者的组合物,其包含待要例如根据物理、生化、化学和/或生理学特征进行表征和/或鉴定的细胞实体和/或其他分子实体。例如,短语“疾病样品”及其变化指获自目的受试者的任意样品,预期或已知其包含待表征的细胞实体和/或分子实体。

[0075] “组织”或“细胞样品”意指获自受试者或患者的组织的相似细胞的收集。该组织或细胞样品的来源可以是固体组织,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吸出物;血液或任意血液组分;体液,如脑脊髓液、羊水、腹膜液水或间隙液;来自

该受试者妊娠或发育中的任意时间的细胞。该组织样品还可以是原代或培养的细胞或细胞系。可选地,该组织或细胞样品获自疾病组织 / 器官。该组织样品还可以包含并非在自然界中与该组织天然相互混合的化合物,如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。本文所用的“参照样品”、“参照细胞”、“参照组织”、“对照样品”、“对照细胞”或“对照组织”指样品、细胞或组织,其获自己知来源或认为未受用本发明的方法或组合物鉴定的疾病或病症影响。在一个实施方案中,参照样品、参照细胞、参照组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自同一受试者或患者的身体的健康部分,在所述受试者或患者中正在用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病症。在一个实施方案中,参照样品、参照细胞、参照组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自个体的身体的健康部分,该个体不是正在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。

[0076] 对于本文的目的,组织样品的“切片”意指组织样品的单个部分,例如从组织样品切下的组织或细胞的薄片。当理解本发明包括这样的方法,藉由该方法在形态学和分子两个水平分析组织样品的同一切片,或者就蛋白质和核酸方面分析组织样品的同一切片,那么可以取下组织样品的多个切片,并按照本发明进行分析。

[0077] “相关”或“相关的”意指以任意方式将第一分析或方案的表现和 / 或结果与第二分析或方案的表现和 / 或结果相比较。例如,在进行第二方案时可以使用第一分析或方案的结果,和 / 或可以用第一分析或方案的结果来确定是否应进行第二分析或方案。就基因表达分析或方案的实施方案而言,可以用基因表达分析或方案的结果来确定是否应进行特定治疗方案。

[0078] 术语“基因特征”可与“基因表达特征”互换使用,指其表达指示 IPF 的特定亚型的基因或基因组合,所述 IPF 的特定亚型表征为某种分子、病理学、组织学、放射照相和 / 或临床特征。在某些实施方案中,与对照受试者中包含基因特征的一个或多个基因的表达相比,这些基因的表达提高。

[0079] 术语“蛋白质特征”可与“蛋白质表达特征”互换使用,指其表达指示 IPF 的特定亚型的蛋白质或蛋白质组合,所述 IPF 的特定亚型表征为某种分子、病理学、组织学、放射照相和 / 或临床特征。在某些实施方案中,与对照受试者中包含蛋白质特征的一种或多种蛋白质的表达相比,这些蛋白质的表达提高。

[0080] 本文所用的“IPF 治疗剂”、“对治疗 IPF 有效的治疗剂”及其语法变形指这样的试剂,在以有效量提供时,已知、临床上显示或临床医师预期其在患有 IPF 的受试者中提供治疗益处。

[0081] “候选治疗剂”指在以前未获上市批准的条件(例如,具体剂量、给药方案、适应症)下在临床试验中正在进行测试或将要进行测试的试剂。

[0082] “抗-IL-13/IL4 途径抑制剂”指阻断 IL-13 和 / 或 IL-4 信号传递的物质。抗-IL13、抗-IL4 或抗-IL13/IL4 抑制剂的实例包括但不限于抗-IL13 结合剂、抗-IL4 结合剂、抗-IL4 受体 α 结合剂、抗-IL13 受体 $\alpha 1$ 结合剂和抗-IL13 受体 $\alpha 2$ 结合剂。该抑制剂明确包括可以结合 IL-13、IL-4、IL-13R $\alpha 1$ 、IL-13R $\alpha 2$ 或 IL-4R α 的单结构域抗体。应理解,包括可以结合多于 1 个靶标的分子。

[0083] “抗-IL4 结合剂”指特异性结合人 IL-4 的物质。这类结合剂可以包括小分子、适配体或多肽。这种多肽可以包括但不限于选自免疫黏附素、抗体、肽体和肽的多肽。根据一

个实施方案,该结合剂以 1 μ M-1pM 之间的亲和力结合人 IL-4 序列。抗-IL-4 结合剂的具体实例可以包括可溶性 IL4 受体 α (例如,与人 Fc 区融合的 IL4 受体胞外域)、抗-IL4 抗体和可溶性 IL13 受体 α 1 (例如,与人 Fc 区融合的 IL13 受体 α 1 胞外域)。

[0084] “抗-IL4 受体 α 结合剂”指特异性结合人 IL-4 受体 α 的物质。这类结合剂可以包括小分子、适配体或多肽。这种多肽可以包括但不限于选自免疫黏附素、抗体、肽体和肽的多肽。根据一个实施方案,该结合剂以 1 μ M-1pM 之间的亲和力结合人 IL-4 受体 α 序列。抗-IL-4 受体 α 结合剂的具体实例可以包括抗-IL4 受体 α 抗体。

[0085] “抗-IL13 结合剂”指特异性结合人 IL-13 的物质。这类结合剂可以包括小分子、适配体或多肽。这种多肽可以包括但不限于选自免疫黏附素、抗体、肽体和肽的多肽。根据一个实施方案,该结合剂以 1 μ M-1pM 之间的亲和力结合人 IL-13 序列。抗-IL13 结合剂的具体实例可以包括抗-IL13 抗体、与人 Fc 融合的可溶性 IL13 受体 α 2、与人 Fc 融合的可溶性 IL4 受体 α 、与人 Fc 融合的可溶性 IL13 受体 α 。示例性抗-IL13 抗体描述于国际专利号 2005/062967 中。抗-IL13 抗体的其他实例描述于 W02008/083695 (例如 IMA-638 和 IMA-026)、US2008/0267959、US2008/0044420 和 US2008/0248048 中。

[0086] 示例性“抗-IL13 抗体”指如 lebrikizumab,其意指结合人 IL13 的人源化 IgG4 抗体。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含三个重链 CDR:CDR-H1(SEQ ID NO.:1)、CDR-H2(SEQ ID NO.:2) 和 CDR-H3(SEQ ID NO.:3)。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含三个轻链 CDR:CDR-L1(SEQ ID NO.:4)、CDR-L2(SEQ ID NO.:5) 和 CDR-L3(SEQ ID NO.:6)。在一个实施方案,该抗-IL13 抗体包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR:CDR-H1(SEQ ID NO.:1)、CDR-H2(SEQ ID NO.:2)、CDR-H3(SEQ ID NO.:3)、CDR-L1(SEQ ID NO.:4)、CDR-L2(SEQ ID NO.:5) 和 CDR-L3(SEQ ID NO.:6)。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO. 7 和 8 的氨基酸序列的可变重链区 VH。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列的可变轻链区 VL。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO. 7 和 8 的氨基酸序列的可变重链区 VH 及具有 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列的可变轻链区 VL。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:10 或 SEQ ID NO.:11 或 SEQ ID NO.:12 或 SEQ ID NO.:13 的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:14 的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO.:10、SEQ ID NO.:11、SEQ ID NO.:12 和 SEQ ID NO.:13 的氨基酸序列的重链及具有 SEQ ID NO.:14 的氨基酸序列的轻链。

[0087] “抗-IL13 受体 α 1 结合剂”指特异性结合人 IL13 受体 α 1 的物质。这类结合剂可以包括小分子、适配体或多肽。这种多肽可以包括但不限于选自免疫黏附素、抗体、肽体和肽的多肽。根据一个实施方案,该结合剂以 1 μ M-1pM 之间的亲和力结合人 IL-13 受体 α 1 序列。抗-IL13 受体 α 1 结合剂的具体实例可以包括抗-IL13 受体 α 1 抗体。

[0088] “抗-IL13 受体 α 2 结合剂”指特异性结合人 IL13 受体 α 2 的物质。这类结合剂可以包括小分子、适配体或多肽。这种多肽可以包括但不限于选自免疫黏附素、抗体、肽体和肽的多肽。根据一个实施方案,该结合剂以 1 μ M-1pM 之间的亲和力结合人 IL-13 受体 α 2 序列。抗-IL13 受体 α 2 结合剂的具体实例可以包括抗-IL13 受体 α 2 抗体。

[0089] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,且明确涵盖例如单克隆抗体、多克隆抗体、具有

多表位特异性的抗体、单链抗体、多特异性抗体和抗体片段。这类抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体、人抗体和合成抗体。下文更详细地描述这类抗体及产生它们的方法。

[0090] 术语“可变的”指可变域的某些区段的序列在抗体间广泛不同的事实。V 区介导抗原结合,并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。但是,可变性并非在可变域的 110 个氨基酸的跨度内均匀分布。相反,V 区由 15-30 个氨基酸的称为构架区 (FR) 的相对不变的序列组成,构架区由长度各为 9-12 个氨基酸的称为“高变区”的具有极端可变性的较短区域分开。天然重链和轻链的可变域各包含四个 FR,其主要采用 β -折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接该 β -折叠结构的环,且在一些情况下形成该 β -折叠结构的部分。每条链中的高变区通过 FR 近距离保持在一起,并与来自另一条链的高变区一起形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 中的参与。

[0091] 在本文中使用时,术语“高变区”(或“HVR”)指抗体负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”(例如,VL 中的约残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3), VH 中的约残基 31-35B (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3) (Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))) 的氨基酸残基和 / 或来自高变环(例如,VL 中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 及 VH 中的 26-32 (H1)、52A-55 (H2) 和 96-101 (H3) (Chothia 和 Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))) 的那些残基。

[0092] 高变区可以包含如下“扩展的高变区”:VL 中的 24-36 (L1)、46-56 (L2) 和 89-97 (L3), VH 中的 26-35B (H1)、47-65 (H2) 和 93-102 (H3)。对于这些定义中的每一个,按照 Kabat 等,上文编号可变域残基。

[0093] “构架”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基外的那些可变域残基。例如,轻链构架区 1 (LC-FR1)、构架区 2 (LC-FR2)、构架区 3 (LC-FR3) 和构架区 4 (LC-FR4) 区可以分别包含抗体的编号 1-23、35-49、57-88 和 98-107 的残基 (Kabat 编号系统)。在另一实例中,人重链构架区 1 (HC-FR1)、人重链构架区 2 (HC-FR2)、人重链构架区 3 (HC-FR3) 和人重链构架区 4 (HC-FR4) 可以分别包含抗体的残基 1-25、36-48、66-92 和 103-113 (Kabat 编号系统)。

[0094] 本文提到的“共有序列”或共有 V 结构域序列是源自已知的人免疫球蛋白可变区序列的氨基酸序列比较而得到的人工序列。

[0095] 本文所用的术语“单克隆抗体”指来自基本是同质性抗体群体的抗体,即除了在生产该单克隆抗体的过程中出现的可能的变体(这类变体通常小量存在)外,该群体包含的单个抗体相同和 / 或结合一个或多个相同的表位。这种单克隆抗体通常包括这样的抗体,其含有结合靶标的多肽序列,其中该结合靶标的多肽序列是通过以下方法获得的,该方法包括从多个多肽序列选择单个结合靶标的多肽序列。例如,该选择方法可以从多个克隆(如杂交瘤克隆库、噬菌体克隆库或重组 DNA 克隆库)选择独特的克隆。应理解,可以进一步改变所选择的结合靶标的序列,例如以改善对靶标的亲和力、人源化结合靶标的序列、改善其在细胞培养物中的产生、降低其在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,包含改变的结合靶标的序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包含针对不同决定簇

(表位)的抗体的多克隆抗体不同,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除其特异性外,单克隆抗体制剂还因它们通常未受其他免疫球蛋白污染而是有利的。修饰词“单克隆的”表示抗体获自基本同质的抗体群体的性状,不视为需要通过任意特定的方法来产生该抗体。例如,待按照本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,包括杂交瘤法(例如,Kohler等,Nature,256:495(1975);Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling等,在Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681,(Elsevier,N.Y.,1981)中)、重组DNA法(见例如美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(见例如Clackson等,Nature,352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004))及用于从具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物产生人抗体或人样抗体的技术(见例如W098/24893、W0/9634096、W0/9633735和W0/9110741;Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等,Year in Immuno.,7:33(1993);美国专利号5,545,806、5,569,825、5,591,669(全都属于GenPharm);5,545,807;W0 97/17852;美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;和Marks等,Bio/Technology,10:779-783(1992);Lonberg等,Nature,368:856-859(1994);Morrison,Nature,368:812-813(1994);Fishwild等,Nature Biotechnology,14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnology,14:826(1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.,13:65-93(1995)。

[0096] 本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)以及这类抗体的片段,只要它们显示希望的生物学活性,在该抗体中部分重链和/或轻链与以下抗体中对应的序列相同或同源,该抗体源自特定物种或隶属于特定抗体种类或亚类,而一条或多条链的其余部分与以下抗体中对应的序列相同或同源,该抗体源自另一物种或隶属于另一抗体种类或亚类(美国专利号4,816,567;Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。制备嵌合抗体的方法为本领域已知。

[0097] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合片段)。在一些实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中用来自非人物种(如小鼠、大鼠或兔)的具有希望的特异性、亲和力和能力的互补决定区(CDR)(供体抗体)的残基替换来自受体的CDR的残基。在一些情况下,用对应的非人残基替换人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体中也不见于引入的CDR或构架序列中的残基。通常进行这些修饰来进一步改良和最大化抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个可变域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环源自非人免疫球蛋白,而全部或基本上全部FR区源自人免疫球蛋白序列,但FR区可以包含一个或多个氨基酸取代,以例如改善结合亲和力。在一个优选实施方案中,人源化抗体还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区或人共有恒定序列。进一步的细

节见 Jones 等, Nature321:522-525(1986); Riechmann 等, Nature332:323-329(1988); 及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。人源化抗体包括 **PRIMATIZED®** 抗体, 其中抗体的抗原结合区源自通过例如用目的抗原免疫短尾猴产生的抗体。制备人源化抗体的方法为本领域已知。

[0098] 人抗体也可以用本领域已知的多种技术产生, 包括噬菌体展示文库。Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Mark 等, J. Mol. Biol., 222:581(1991)。也可用 Cole 等和 Boerner 等的技术来制备人单克隆抗体。Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 页 (1985); Boerner 等, J. Immunol., 147(1):86-95(1991)。还见 Lonberg 和 Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93(1995); PCT 公开 W0 98/24893; W0 92/01047; W0 96/34096; W0 96/33735; 欧洲专利号 0 598 877; 美国专利号 5, 413, 923; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 569, 825; 5, 661, 016; 5, 545, 806; 5, 814, 318; 5, 885, 793; 5, 916, 771; 及 5, 939, 598。

[0099] “抗体片段”包含全长抗体的部分, 通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0100] “Fv”是包含完整的抗原识别和结合位点的最小的抗体片段。此片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域紧密非共价结合成的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发射出六个高变环 (来自 H 链和 L 链的各 3 个环), 其贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。但是, 甚至单个可变域 (或仅包含对抗原特异的三个 CDR 的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 但亲和力低于整个结合位点。

[0101] 本发明的抗体的“功能片段”是仍以与它们所源自的完整全长分子基本相同的亲和力结合多肽且在至少一种测定 (例如, 抑制如小鼠模型中的纤维化或抑制在体外与该抗体片段结合的抗原的生物学活性) 中具有活性的那些片段。

[0102] 抗体“效应子功能”指可归因于抗体的 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 的那些生物学活性, 且随抗体同种型而变。抗体效应子功能的实例包括: C1q 结合和依赖补体的细胞毒性、Fc 受体结合、依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 的下调和 B 细胞激活。“天然序列 Fc 区”包含与见于自然界中的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0103] 就本文鉴定的多肽和抗体序列而言的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”或“同源性”定义为在将任意保守取代视为序列同一性的部分进行比对后, 候选序列中与所比较的多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域现有技术中的多种方式来实现用于测定氨基酸序列同一性百分比的比对, 例如, 使用公开可获得的计算机软件, 如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数, 包括在所比较的全长序列中实现最大比对所需的任意算法。但是, 对于本文的目的, 用序列比较计算机程序 ALIGN-2 来产生 % 氨基酸序列同一性值。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc. 编写, 源代码已随用户文档提交 U. S. Copyright Office, Washington D. C., 20559, 它以登记号 TXU510087 登记于 U. S. Copyright Office。ALIGN-2 程序从 Genentech, Inc., South San Francisco, California 公开可得。ALIGN-2 程序应编译用在 UNIX 操作系统上, 优选数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程

序设定且保持不变。

[0104] 术语“包含 Fc 区的多肽”指多肽,如抗体或免疫黏附素(见下文定义),其包含 Fc 区。Fc 区的 C 端赖氨酸(EU 编号系统的残基 447)可以例如在纯化多肽期间或通过重组改造编码该多肽的核酸来去除。因此,包含根据本发明的具有 Fc 区的多肽(包括抗体)的组合物可以包含去除了所有 K447 残基的多肽群体、未去除 K447 残基的多肽群体或具有 K447 残基和不具有 K447 残基的多肽的混合物的多肽群体。

[0105] 在本说明书和权利要求中,在提到可变域(大约是轻链的残基 1-107 和重链的残基 1-113)中的残基时,通常使用 Kabat 编号系统(例如,Kabat 等,Sequences of Immunological Interest,第 5 版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda, Md. (1991))。在提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU 编号系统”或“EU 指数”(例如,在此明确并入本文作为参考的 Kabat 等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda, MD(1991)中报道的 EU 指数)。除非本文另有说明,提到抗体可变域中的残基编号意指 Kabat 编号系统的残基编号。除非本文另有说明,提到抗体恒定域中的残基编号意指 EU 编号系统的残基编号(例如,见美国临时申请号 60/640,323, EU 编号的数字)。

[0106] 本领域普通技术人员可以容易地确定杂交条件的“严格性”,其通常是取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度的经验计算。一般而言,较长的探针需要较高的温度进行适当的退火,而较短的探针需要较低的温度。在互补链存在于低于它们的解链温度的环境中时,杂交通常取决于变性 DNA 重退火的能力。探针与可杂交序列间所希望的同源性的程度越高,可以使用的相对温度越高。结果,导致较高的相对温度将趋向于使得反应条件更严格,而较低的相对温度将趋向于使得反应条件更不严格。杂交反应的严格性的其他详情和解释见 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

[0107] 可以通过以下来鉴定本文定义的“严格条件”或“高严格性条件”: (1) 利用低离子强度和高温进行洗涤,例如 0.015M 氯化钠 / 0.0015M 柠檬酸钠 / 0.1% 十二烷基硫酸钠于 50°C; (2) 杂交期间利用变性剂,如甲酰胺,例如 42°C 含 0.1% 牛血清白蛋白 / 0.1% Ficoll / 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮的 50% (v/v) 甲酰胺和含 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠的 pH6.5 的 50mM 磷酸钠缓冲液; 或 (3) 在 42°C 下在包含 50% 甲酰胺、5×SSC (0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5×Denhardt's 溶液、超声处理的鲑精 DNA (50 μg/mL)、0.1% SDS 和 10% 硫酸葡聚糖的溶液中过夜杂交,在 42°C 下在 0.2×SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 中洗涤 10 分钟,然后是 55°C 下用含 EDTA 的 0.1×SSC 进行 10 分钟高严格性洗涤。

[0108] 可以按照 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所述鉴定“中等严格的条件”,且其包括使用严格性低于上文所述的那些洗涤溶液和杂交条件(例如,温度、离子强度和 % SDS) 的洗涤溶液和杂交条件。中等严格的条件的实例是在 37°C 下在以下的溶液中过夜温育,该溶液包含 20% 甲酰胺、5×SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5×Denhardt's 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20mg/ml 变性的剪切鲑精 DNA,然后在约 37-50°C 下在 1×SSC 中洗涤

滤膜。熟练的技术人员将理解如何根据需要调节温度、离子强度等,以适应诸如探针长度等的因素。

[0109] 如本文所使用,待治疗的受试者是哺乳动物(例如,人、非人灵长类、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫等)。该受试者可以是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。该受试者可以疑似患有特发性肺纤维化或处于患上特发性肺纤维化的风险,或者诊断为患有特发性肺纤维化。根据一个优选实施方案,本发明的待治疗的受试者是人。

[0110] “治疗”或“减轻”指其中目的是预防或减慢(减少)所靶向的病理性症状或病症或缓解该病症的一些症状的措施。需要治疗的那些受试者可以包括已经患有该病症以及易于患上该病症或待要预防该病症的那些受试者。如果在接受本发明的治疗剂之后,患者随时间的推移(例如,超过3个月[12周],或6个月[24周],或9个月[36周],或12个月[1年,52周])在以下的一项或多项中显示可观察到和/或可测量到的从基线的减少或改变和/或可测量到的从基线变化的速率,则成功“治疗”了受试者或哺乳动物的特发性肺纤维化:用力肺活量(FVC);肺一氧化碳扩散容量(DL_{CO});患者报告结果工具,如IPF中评估生活质量的工具(ATAQ-IPF)或EuroQol5-Dimension Questionnaire(EQ-5D);6分钟步行距离(6MWD);静息氧流速;肺高分辨率计算层析X射线照相术(HRCT)上的放射照相发现,包括定量肺纤维化(QLF)得分;血清生物标志,包括但不限于骨膜蛋白、CCL18、YKL40、COMP、OPN、CCL13。

[0111] 本文所用的“IPF加重”意指符合以下标准的事件:之前30天内未能解释的恶化或出现呼吸困难;叠加在与常见的间质肺炎(UIP)一致的网状或蜂窝状背景模式上的新的双侧毛玻璃样异常和/或固结的放射学证据;缺乏备选的原因,如左心衰竭、肺栓塞、肺部感染(根据气管内吸出物或支气管肺泡灌洗(如果可得),或研究人员的判断),或其他导致急性肺损伤的事件(例如脓毒、误吸、创伤、再灌注肺水肿)。

[0112] 本文所用的“IPF恶化”或“IPF疾病恶化”意指符合以下(i)、(ii)和(iii)的事件:(i)之前30天内未能解释的恶化或出现呼吸困难;(ii)以下任意两项:(a)叠加在与UIP一致的网状或蜂窝状背景模式上的新的双侧毛玻璃样异常和/或固结的放射学证据;(b)符合以下标准中的至少1项的肺功能恶化:(I)FVC(L),至少10%;(II)DL_{CO}(mL CO/分钟-1/mmHg-1),至少15%;(III)氧饱和(SpO₂),至少4%;和(iii)缺乏备选的原因。

[0113] “有效量”指在必需的剂量和时期下达到希望的治疗或预防结果有效的量。

[0114] 术语“治疗有效量”指在受试者中有效“减轻”或“治疗”疾病或病症的本发明的多肽的量。治疗剂的治疗有效量可以根据因素诸如疾病状态、年龄、性别、受试者的体重和抗体在个体中引出希望的应答的能力而改变。治疗有效量还是这样的量,其中治疗有益作用超过了治疗剂的任意毒性或有害作用。“预防有效量”指在必需的剂量和时期下有效地达到希望的预防结果的量。通常但并非必需,由于在患病之前或在疾病的较早阶段将预防剂量用于受试者,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0115] “长期”施用指以与急性方式相反的持续方式施用一种或多种药物,以在延长的时期中维持起始治疗作用(活性)。“间歇”施用是并非无中断地连续进行而是在性质上是周期性的治疗。

[0116] “用力呼气量(FEV1)”指测量在用力呼气的第一秒中排出的空气体积的标准测试。通过肺活量计测量FEV1,肺活量计由烟嘴口(mouthpiece)和连接至记录结果并将它们显

示在图表上的机器的一次性管道组成。为了进行肺活量测定,让人深吸气,紧紧围绕管道闭上口,然后通过管道呼气,同时进行测量。记录并分析呼出的空气体积及每次呼吸花费的时长。肺活量测定结果表示为百分比。正常肺活量测定结果的实例包括一秒后 FEV1 为肺活量的 75%。异常肺活量测定结果的实例包括小于正常预测值的 80% 的读数。异常结果通常指示存在某种程度的阻塞性肺疾病,如哮喘、肺气肿或慢性支气管炎,或限制性肺疾病,如肺纤维化。例如,可以用 FEV1 值(预测值的百分比)来分类可伴随哮喘和其他阻塞性肺疾病(如肺气肿或慢性支气管炎)出现的阻塞:FEV1 为预测值的 65% 至 79% = 轻度阻塞,FEV1 为预测值的 40% 至 59% = 中度阻塞,FEV1 为预测值的不到 40% = 严重阻塞。此外,阻塞性和限制性肺疾病在至少以下方面不同。在阻塞性疾病中,FEV1/FVC 比例可以低于正常,而 FVC 可以是正常的,而在限制性疾病中,FEV1 和 FVC 可以都低于正常,但 FEV1/FVC 比例可以是正常的。在这类情况下,FEV1 仅是因为 FVC 降低而降低。

[0117] 本文所用的“FVC”指“用力肺活量”,其指测量充分吸气和最大呼气至残气量之间的肺空气体积变化(与 FEV1 中的在 1 秒内排出的空气体积相反)的标准测试。它是功能性肺容量的测量。在患有限制性肺疾病(如间质性肺病(包括 IPF)、过敏性肺炎、肉样瘤病和系统性硬化症)的患者中,FVC 通常由于肺实质的瘢痕形成而降低。

[0118] 可以用来鉴定(例如通过微列阵分析)本文所述的基因(和由基因编码的蛋白质)的核酸探针的实例包括但不限于表 2、3 和 4 中所述的探针。

[0119] “提高的表达水平”或“提高的水平”指患者(例如疑似患有或诊断为患有 IPF 的患者)中 mRNA 或蛋白质的表达相对于对照(如未患 IPF 的一个或多个个体)增加。

[0120] 一般技术

[0121] 除非另有说明,本发明的实施将利用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术为本领域的现有技术。这类技术充分阐述于文献中,如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook 等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M. J. Gait 编辑,1984);“Animal Cell Culture”(R. I. Freshney, ed., 1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F. M. Ausubel 等编辑,1987,及定期更新);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis 等编辑,1994)。

[0122] 用于本发明的引物、寡核苷酸和多核苷酸可以用本领域已知的标准技术产生。

[0123] 本文提供与 IPF 和 IPF 的某些亚型相关的基因表达特征。这些特征构成 IPF 和/或 IPF 的亚型的生物标志,和/或有利于或促进 IPF 的发展、持续和/或进展,以及可预测 IPF 患者的存活。因此,本文公开的发明用于多种情况,例如用于与 IPF 预测、诊断和治疗相关的方法和组合物。

[0124] 基因表达水平的检测

[0125] 本文所述的方法中任一种的核酸可以是转录自基因组 DNA 的 RNA 或产生自 RNA 的 cDNA。核酸可以源自脊椎动物,例如哺乳动物。如果核酸直接获自特定来源或如果核酸是见于该来源中的核酸的拷贝,则称它“源自”该来源。

[0126] 核酸包括核酸的拷贝,例如源自扩增的拷贝。在某些情况下希望扩增,例如以获得用于检测变异的希望的量的物质。然后可以使用变异检测方法(如下文所述的那些)来检测扩增子,以测定某些基因的表达。

[0127] 微列阵是通常在高严格性条件下用成千上万个核酸探针的阵列系列来例如与 cDNA 或 cRNA 样品杂交的多重技术。通常通过检测荧光团、银或化学发光标记的靶标来检测和定量探针-靶标杂交,以测定靶标中核酸序列的相对丰度。在典型的微列阵中,通过探针与化学基质之间的共价键(经环氧-硅烷、氨基-硅烷、赖氨酸、聚丙烯酰胺或其他)将探针结合至固体表面。固体表面是例如玻璃、硅片或微珠。多种微列阵是商业上可获得的,该微列阵包括例如由 Affymetrix, Inc. 和 Illumina, Inc. 制造的那些微列阵。

[0128] 蛋白质表达水平的检测

[0129] 可以在全血、血浆或血清的样品中检测蛋白质的表达水平。用于检测这类生物样品中的蛋白质表达水平的多种方法为本领域已知,该方法包括多种免疫测定法。之前已描述了许多免疫测定技术,见例如美国专利号 4,016,043、4,424,279 和 4,018,653。该方法包括非竞争性类型的单位点和双位点或“夹心”测定,以及传统的竞争性结合测定。这些测定还包括经标记的抗体与靶生物标志的直接结合。

[0130] 夹心测定是最有用和最常用的测定。存在夹心测定技术的许多变形,且全都为本发明所涵盖。简言之,在典型的向前测定(forward assay)中,将未标记的抗体固定在固体基质上,并使待测试的样品与结合分子接触。适宜的温育期(足以允许形成抗体-抗原复合体的时期)后,然后加入对抗原特异的第二抗体,并温育足以形成另一抗体-抗原-标记抗体的复合体的时间,所述第二抗体用能够产生可检测信号的报告分子标记。洗去任何未反应的物质,通过观察由报告分子产生的信号来测定抗原的存在。结合可以通过简单地观察可见信号而是定性的,或可以通过与含有已知量的生物标志的对照样品比较而是定量的。

[0131] 向前测定的变形包括同时测定,其中将样品和标记抗体同时加至结合抗体。这些技术为本领域技术人员公知,且包括显而易见的任意小变化。在典型的向前夹心测定中,使具有针对生物标志的特异性的第一抗体共价或被动结合于固体表面。固体表面通常是玻璃或聚合物,最常用的聚合物是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。固相支持体可以是管、小球、微量培养板的盘的形式,或适合用于进行免疫测定的任意其他表面。结合方法为本领域公知,且通常包括交联共价结合或物理吸附,在测试样品的准备中洗涤聚合物-抗体复合体。然后将待测试样品的整分试样加至固相复合体,并在适宜条件(例如,从室温至 40°C,如 25°C 和 32°C(含)之间)下温育足够的时间(例如,2-40 分钟或过夜(如果更方便)),以允许存在于抗体中的任意亚基的结合。温育期后,洗涤并干燥抗体亚基固相,并与特异地针对生物标志的部分的第二抗体一起温育。第二抗体与报告分子连接,用该报告分子来显示第二抗体与分子标志的结合。

[0132] 备选方法涉及固定样品中的靶生物标志,然后将该固定的生物标志暴露于特异性抗体,该抗体可以用报告分子标记或不标记。取决于靶标的量和报告分子信号的强度,可以通过用抗体直接标记来检测结合的靶标。备选地,将对第一抗体特异的第二标记抗体暴露于靶标-第一抗体复合体,以形成靶标-第一抗体-第二抗体三元复合体。通过报告分子发出的信号来检测复合体。本说明书中所用的“报告分子”意指通过其化学性质提供可分析鉴定的信号的分子,该信号允许检测抗原结合的抗体。这类测定中最常用的报告分子是酶、荧光团或含放射性核素的分子(即放射性同位素)和化学发光分子。

[0133] 在酶免疫测定的情况下,通常利用戊二醛或过碘酸盐将酶缀合至第二抗体。但是,可容易地认识到,存在技术人员可容易地获得的多种不同的缀合技术。常用的酶包括辣根

过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。通常选择底物（根据具体酶而使用），以用于在通过对应的酶水解时产生可检测的颜色变化。适宜的酶的实例包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。还可能利用产生紫光产物的紫光底物而不是上述生色底物。在所有情况下，向第一抗体-分子标志复合体加入酶标记的抗体，使其结合，然后洗去过量的试剂。然后向抗体-抗原-抗体的复合体加入含有适当底物的溶液。底物将与连接至第二抗体的酶反应，产生定性视觉信号，其通常可以通过分光光度计进一步定量，以产生存在于样品中的生物标志的量的指征。备选地，可以将紫光化合物（如紫光素和罗丹明）化学偶联至抗体而不改变其结合能力。在通过用特定波长的光照射来激活时，紫光染料标记的抗体吸收光能，在分子中诱导激发性状态，然后发射出可用光学显微镜视觉上检测的特征性颜色的光。如在 EIA 中，使紫光标记的抗体与第一抗体-分子标志复合体结合。洗去未结合的试剂后，然后将剩余的三元复合体暴露于适当波长的光，所观察到的紫光指示目的分子标志的存在。免疫紫光和 EIA 技术在本领域中都非常完善。但是，也可以利用其他报道分子，如放射性同位素、化学发光或生物发光分子。

[0134] 生物样品可以用本领域技术人员已知的某些方法获得。生物样品可以获自脊椎动物，尤其是哺乳动物。在某些情况下，生物样品是肺组织、全血、血浆、血清或外周血单核细胞 (PBMC)。通过筛查这类身体样品，可以实现 IPF 的简单的早期预测（例如存活）或诊断（例如分子亚型）。此外，可以通过靶核酸（或所编码的多肽）表达水平的变化测试这类身体样品以更容易地监测治疗的进展。

[0135] 在确定受试者或组织或细胞样品包含本文公开的基因表达特征后，考虑可以对该受试者施用有效量的适当的 IPF 治疗剂来在该受试者中治疗 IPF。熟练的医师可以在哺乳动物中进行本文所述的多种病理性病症的临床诊断。允许例如在哺乳动物中诊断或检测 IPF 的临床诊断技术为本领域可得。

[0136] 可以按照已知的方法施用 IPF 治疗剂，如作为大丸药或通过在一段时间内连续输注静脉内施用，通过肌内、腹膜内、脑脊内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。可选地，可以用多种市售装置通过微泵输注进行施用。

[0137] 某些治疗剂

[0138] 之前已将某些治疗剂描述为用于治疗 IPF 的候选物或药物。这些描述于已发表的文献中，并综述于例如 Rafii 等, J. Thorac. Dis (2013) 5(1):48-73 中。这类药物包括具有抗氧化、免疫抑制和 / 或抗炎活性的药物，如 N-乙酰半胱氨酸；具有抗纤维化、抗炎和 / 或抗氧化活性的药物，如吡非尼酮，其是已批准用于 IPF 的临床治疗的口服施用的吡啶；抑制转化生长因子- β (TGF- β) 的药物，如靶向所有 TGF- β 同种型的抗-TGF- β 抗体（例如 GC1008），或抗 $\alpha v \beta 6$ 整合蛋白的抗体（例如 STX-100）；抑制结缔组织生长因子 (CTGF) 的药物，如抗-CTGF 抗体（例如 FG-3019）；抑制生长抑素受体的药物，如生长抑素类似物（例如 SOM230，抑生长肽）；抑制 IL-13、IL-4 和 CCL2 的药物，如抗-IL13 抗体（例如 QAX576、tralokinumab、lebrikizumab[下文进一步描述]）、抗-IL4 抗体、抗-IL13/抗-IL4 药物的组合（例如双特异性抗-IL13/抗-IL4 抗体，如 SAR156597）、抗-CCL2 抗体（例如 CNT0888）；具有抗血管生成、免疫调节和 / 或抗炎活性的药物，如沙利度胺或米诺环素；抑制赖氨酰氧化酶-样 2 (LOXL2) 的药物，如抗-LOXL2 抗体（例如 GS-6624[simtuzumab]）；抑制血管发生的药物，如酪氨酸激酶抑制剂、BIBF1120、四硫钼酸盐；抑制胞外基质沉积和 / 或破坏胶

原沉积的药物,如多西环素;靶向肾素-血管紧张素系统的药物,如氯沙坦;及其他具有抗增殖和/或抗纤维化活性的试剂,如一氧化碳。

[0139] 本文提供用于治疗特发性肺纤维化的某种治疗剂。在一个实施方案中,治疗剂是抗-IL13 抗体,也称为 lebrikizumab。Lebrikizumab 是 IgG4 抗体。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含三个重链 CDR:CDR-H1(SEQ ID NO.:1)、CDR-H2(SEQ ID NO.:2) 和 CDR-H3(SEQ ID NO.:3)。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含三个轻链 CDR:CDR-L1(SEQ ID NO.:4)、CDR-L2(SEQ ID NO.:5) 和 CDR-L3(SEQ ID NO.:6)。在一个实施方案,该抗-IL13 抗体包含三个重链 CDR 和三个轻链 CDR:CDR-H1(SEQ ID NO.:1)、CDR-H2(SEQ ID NO.:2)、CDR-H3(SEQ ID NO.:3)、CDR-L1(SEQ ID NO.:4)、CDR-L2(SEQ ID NO.:5) 和 CDR-L3(SEQ ID NO.:6)。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO. 7 和 8 的氨基酸序列的可变重链区 VH。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列的可变轻链区 VL。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO. 7 和 8 的氨基酸序列的可变重链区 VH 及具有 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列的可变轻链区 VL。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:10 或 SEQ ID NO.:11 或 SEQ ID NO.:12 或 SEQ ID NO.:13 的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有 SEQ ID NO.:14 的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,该抗-IL13 抗体包含具有选自 SEQ ID NO.:10、SEQ ID NO.:11、SEQ ID NO.:12 和 SEQ ID NO.:13 的氨基酸序列的重链及具有 SEQ ID NO.:14 的氨基酸序列的轻链。抗-IL13 抗体进一步描述于国际专利号 2005/062967 中。

[0140] 在另一方面,抗-IL-13 抗体包含与 SEQ ID NO.:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在某些实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列相对于参照序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-IL-13 抗体保留结合人 IL-13 的能力。在某些实施方案中,在 SEQ ID NO.:8 中取代、改变、插入和/或缺失了总计 1 至 10 个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失存在于 CDR 之外的区域(即在 FR 中)。可选地,该抗-IL13 抗体包含 SEQ ID NO.:8 中的 VH 序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0141] 在另一方面,提供抗-IL-13 抗体,其中该抗体包含与 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的轻链可变域 (VL)。在某些实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列相对于参照序列包含取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-IL-13 抗体保留结合 IL-13 的能力。在某些实施方案中,在 SEQ ID NO.:9 中取代、插入和/或缺失了总计 1 至 10 个氨基酸。在某些实施方案中,取代、插入或缺失存在于 CDR 之外的区域(即在 FR 中)。可选地,该抗-IL13 抗体包含 SEQ ID NO.:9 中的 VL 序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0142] 在另一实施方案中,该抗-IL-13 抗体包含与 SEQ ID NO.:9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的 VL 区 和与 SEQ ID NO.:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的 VH 区。

[0143] 试剂盒

[0144] 还提供本文所述或所提出的应用中的试剂盒或制成品。这类试剂盒可以包含为紧密限制地容纳一个或多个容器（如小瓶、管等）而被区室化的载体装置，每个容器包含将要在方法中使用的分开的组件之一。例如，容器之一可以包含被可检测标记或可以被可检测标记的探针。这种探针可以是对包含基因表达特征的一个或多个基因的多核苷酸特异的多核苷酸。当试剂盒利用核酸杂交来检测靶核酸时，试剂盒还可以具有这样的容器，其包含用于扩增靶核酸序列的一种或多种核酸和 / 或包含报道基因，如生物素结合蛋白，如亲和素或链霉亲和素，结合于报道分子，如酶、荧光或放射性同位素标记。

[0145] 试剂盒通常将包含上述容器和一个或多个其他容器，该其他容器包含商业和用户角度希望的物质，包括缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器和含有使用说明书的包装说明书。容器上可以存在标记来指示该组合物用于特定的治疗或非治疗性应用，且还可以包含体内或体外使用的说明，如上文所述的那些。试剂盒中的其他可选成分包括一种或多种缓冲液（例如封闭缓冲液、洗涤液、底物缓冲液等）、其他试剂（如通过酶标记发生化学改变的底物（例如色原）、表位回收液（epitope retrieval solution）、对样品（阳性和 / 或阴性对照）、对照切片等。

[0146] 销售方法

[0147] 本发明还涵盖用于销售 IPF 治疗剂或其可药用组合物的方法，其包括向目标受众推销、讲解和 / 或详述该试剂或其药物组合物在治疗已 IPF 患者或患者群体中的用途，其中已经从所述 IPF 患者或患者群体获得样品并显示本文公开的基因或蛋白质或基因和蛋白质的组合的表达水平。

[0148] 销售通常是通过非个人媒介的付费沟通，其中标明赞助人并控制信息。为了本文目的的销售包括宣传、公共关系、产品放置、赞助、承销（underwriting）和促销。此术语还包括出现在任意印刷信息交流媒体中的赞助信息公告，其设计用于吸引广大受众来说服、告知、促进、激发或以其他方式改变为对采购、支持或认可本发明的有利模式的行为。

[0149] 本文的诊断方法的销售可以通过任意方法达到。用来传递这些信息的销售媒介的实例包括电视、广播、电影、杂志、报纸、互联网和广告牌，包括广告，其是出现在广播媒体中的信息。

[0150] 所使用的销售类型将取决于许多因素，例如要影响的目标受众的性质，例如医院、保险公司、诊所、医生、护士和患者，以及成本考虑及管理药物和诊断剂的销售的相关管辖法律和法规。销售可以根据通过服务互动和 / 或其他数据（如用户人口统计数据 and 地理位置）定义的用户特征来个体化或个性化。

[0151] 本文引用的所有出版物（包括专利和专利申请）在此以其整体并入本文作为参考。

[0152] 在本说明书和权利要求中，词语“包含”或诸如“包括”或“含有”的变形将理解为暗示包含所述整体或整体组但不排除任意其他整体或整体组。

[0153] 认为前面的书面说明足以使本领域技术人员能够实施本发明。提供以下实施例只是为了说明的目的，并非旨在以任何方式限制本发明的范围。事实上，对本领域技术人员而言，除本文显示和描述的那些外，基于前面的描述本发明的多种改变是显而易见的，且落在所附权利要求的范围之内。

[0154] 本文引用的所有参考文献（包括专利申请和出版物）为了所有目的以其整体并入本文作为参考。

实施例

[0155] 实施例 1 :用于 IPF 中的存活预测的系统性生物标志的鉴定

[0156] 为了鉴定可以用来预测 IPF 存活的分子生物标志,我们首先用微列阵和 qPCR 法在来自 40 名 IPF 患者和 8 名未使用过的供体对照(“群组 1”)的肺组织中进行了基因表达分析。然后我们从基因表达结果鉴定出候选预测血清生物标志。在 80 名 IPF 患者的单独群组(“群组 2”)中评估了候选预测血清生物标志的血清水平和肺功能,该群组是在 University of California, San Francisco 的间质性肺疾病诊所就诊时收集。样品采集后跟踪生命状态 2-8 年。

[0157] 方法

[0158] 人肺组织

[0159] 在 University of California, San Francisco Lung Center 在活组织检查或肺移植时从 IPF 患者收集组织。非 IPF 对照收集自供体肺。其他细节在结果部分中提供。

[0160] 组织培养

[0161] 将 IMR-90 细胞(ATCC, Manassas, VA ; 目录号 CCL-186) 培养在补充了 10 % FBS(Sigma, St. Louis, MO ; 目录号 F2442) 和青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA ; 目录号 15140) 的 DMEM 培养基中。将细胞接种在生长因子减少的 Matrigel™(GFR Matrigel™; BD Biosciences, Bedford, MA ; 目录号 354230) 床上。在冰上过夜融化 Matrigel™, 通过使 Matrigel™ 在 37℃ 硬化 30 分钟来在 12 孔板中产生 450ul/ 孔的床体积。然后将细胞 (1E5-2E5) 接种至 Matrigel™ 床上。除非另有说明, 用 10ng/ml (IL-13 和 TNF α) 和 3ng/ml (IL-4) 进行 IL-13 刺激。

[0162] RNA 制备

[0163] 在预冷(液氮中)的 Bessman 组织粉碎机(tissue pulverizer)(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA ; 目录号 189475) 中粉碎速冻的肺活检组织样品。将 **Trizol®** 加至经粉碎的物质, 并吹吸几次。在冰上温育裂解物 10-15 分钟。将裂解物保存在 -80℃, 直至进一步处理。按照厂家的方案从 **Trizol®** 裂解物分离 RNA。然后按照厂家的方案用 Qiagen RNeasy 柱对 **Trizol®** 分离的 RNA 进行另一纯化步骤。

[0164] 通过加入 1ml (12 孔板中的每个孔) **Trizol®** 并吹吸混合物几次来收集组织培养细胞。用 Qiagen RNeasy 方案中所示的钢珠 / TissueLyser (Qiagen) 法 (20s⁻¹, 4 分钟) 匀浆 **Trizol®** 裂解物。匀浆后, 按照 **Trizol®** 厂家的方案分离 RNA。然后按照厂家的方案用 Qiagen RNeasy 柱对 **Trizol®** 分离的 RNA 进行另一纯化步骤。

[0165] 通过分光光度法 (Nanodrop, Thermo Scientific) 测定 RNA 浓度, 并通过 Bioanalyzer (Agilent) 分析所有微列阵样品。

[0166] RT-qPCR

[0167] 按照厂家的方案用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI, 目录

号 4368814) 用随机引物对 100-300ng 总 RNA 进行反转录。用 Taqman 测定进行实时 qPCR。所有反应均在 ABI 7900HT 仪器或 Fluidigm 平台 (48.48 或 96.96 形式) 上进行。

[0168] IL-13 报道基因测定

[0169] 将 L-Luc-BEAS-2B (由 Genentech 构建的细胞系; 源自 BEAS-2B, ATCC, Manassas, VA; 目录号 CRL-9609) 培养在用以下所示试剂包埋的 GFR Matrigel™ 中: 12ng/ml IL-13 (R&D Systems, 目录号 213-IL) 和抗-IL-13 封闭抗体 (Genentech)。唯一的改变为仅测量萤火虫萤光素酶, 按照厂家的方案用 Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, 目录号 E2920) 测量萤火虫萤光素酶活性。

[0170] 微列阵分析

[0171] 用 Quick Amp 标记试剂盒 (Agilent Technologies, 目录号 5190-0444) 扩增和标记 RNA 以从 1ug 总 RNA 产生标记的 cRNA。用 Cy5 标记实验样品; Universal Human Reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA) 用于参照通道, 且用 Cy3 标记。Cy5 和 Cy3 标记的 cRNA 竞争性杂交至两色全人基因组 4×44K 基因表达微列阵平台 (Agilent Technologies, 目录号 G4112F)。按照厂家的方案 (Agilent) 洗涤杂交的微列阵, 用 Agilent Microarray Scanner 采集所有特征强度。用 Feature Extraction Software version 7.5 (Agilent)、方案 GE2-v5_95 (Agilent) 分析所扫描的幻灯片的 TIFF 图像。标示的异常值不包括在任意后续分析中。所有数据都报告为染料归一化的 Cy5/Cy3 比的 log₂ 值。将所有样品的 log₂ 比值对相应的模拟处理样品 (或非 IPF 的对照) 的平均 log₂ 比值归一化。

[0172] 在比较不同的表达概况分析数据集时, 首先如原研究中那样, 过滤、归一化和集中公众可得的数据集。Kaminski 数据集 (GSE10667) (Konishi 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180 (2):167-75 (2009)) 是在全人基因组 Agilent 微列阵平台上运行的, 因此, 用平台特异性探针标识符来连接数据集。用 Java Treeview 产生热图 (heatmap)。

[0173] 通过在 R (LIMMA) 中建立并入了诊断、组织来源和性别 (从 Y 连锁基因的表达分析推断) 这三个因素的线性模型来鉴定差异表达的基因。

[0174] 血液生物标志测定

[0175] 按照厂家的说明用市售测定法评估了血清中以下标志的水平: COMP (Abnova, Taipei, Taiwan, 目录号 KA0021); MMP7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 目录号 DMP700); CXCL13 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 目录号 DCX130); CCL13 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 目录号 DY327); YKL-40 (R&D Systems, Minneapolis, MN, 目录号 DY2599); MMP3 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, 目录号 K15034C); SAA (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, 目录号 K151E0C-1); CCL11 (嗜酸性粒细胞活化趋化因子 (eotaxin)) 和 CCL17 (TARC) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, 目录号 15031C)。按照厂家的说明用市售测定法 (R&D Systems, 目录号 DOST00) 评估了血浆中 OPN 的水平。用之前所述的专利技术分析了血清骨膜蛋白 (见例如国际专利申请号 PCT/US2011/065410)。使用市售测定法按照厂家的方案进行血清 CCL18 的测定, 在该方案中进行了改变以减少基质干扰 (R&D Systems, 目录号 DY394): 用小鼠抗-人 CCL18 单克隆抗体在 4℃ 过夜包被 96 孔板, 然后用含 1X PBS pH7.4、0.5% BSA、0.05% Tween20、0.25% CHAPS、5mM EDTA、0.35M NaCl 和 15PPM Proclin 的缓冲液封闭。一式两份地加入用含 5% FBS 的测定稀释液 1:1000 稀释的血清样品, 并在室温 (20℃) 温育平板 2 小时。洗涤后, 将测定稀

释液中的生物素化山羊抗 - 人 CCL18 单克隆抗体加至平板,并在室温 (20℃) 温育 1 小时,所述测定稀释液含 5% 山羊血清。洗涤后用链霉亲和素 - 过氧化物酶和底物 TMB 显色。此测定的检出限为 ~ 7.8pg/ml。

[0176] 结果

[0177] 研究群组的特征

[0178] 对于获自群组 1 的样品,将来自 40 名 IPF 患者和 8 名对照的活检组织用于微阵列和 qPCR 研究。IPF 样品中的 11 份获自胸腔镜活检,29 份样品获自在肺移植时取下的外植块。所有对照组织都移植自未使用的供体肺。供体肺通常取自无患间质性肺疾病证据的受试者,该受试者死于非肺部原因 (例如外伤),但因为诸如死亡时间过长或由于血型、血管或 HLA 错配而不能获得适宜的接受者的原因而不能用于移植。确认来自所有 IPF 活检样品的邻近组织都具有常见型间质肺炎 (UIP) 模式。之前已描述了由 31 份 IPF 样品和 15 份对照样品组成的可供公开下载的重复数据集 (Konishi 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180 (2):167-75 (2009))。

[0179] 对于获自群组 2 的样品,从在 University of California, San Francisco 的间质性肺疾病诊所就诊的 80 名 IPF 患者中的每一名采集血清和血浆。此群组的临床和人口学特征描述于以下表 1 中。用来自健康对照的血清 (N = 29) 或血浆 (N = 10) 来确定生物标志水平的正常范围。

[0180] 表 1. 群组 2 的临床和人口统计特征

[0181]

变量	中位数 (IQR) 除非另有说明
性别 (男性 : 女性)	62:16
初次就诊年龄, 中位数 (范围)	70 (50-87)
后续肺移植 (是 : 否)	7:63
曾是吸烟者 (是 : 否)	58:16
目前是吸烟者 (是 : 否)	1:73

[0182]

全身性类固醇 ± 硫唑嘌呤 (是 : 否)	21:59
预测的 FVC %	69 (57-81)
预测的 TLC %	70 (59-78)
预测的 DL _{CO} %	48 (36-60)
呼吸困难得分 ¹	10 (5.5-16)

放射照相得分 ²	12 (7.7-20.4)
---------------------	---------------

[0183] FVC = 用力肺活量 ; TLC = 肺总量 ; DL_{CO} = 扩散量 (用一氧化碳测量) ; IQR = 四分位数间距, 第 25-75 百分位 ;¹ = 在 Watters 等, Ann. Rev. Resp. Dis. 133:97 (1986) 的 1-20 的量表上的呼吸困难得分 ;² = 根据 Best 等, Radiology 246:935 (2008) 中所述的方法的纤维化的肺的百分比的放射照相得分估计。

[0184] IPF 中的差异表达基因的鉴定

[0185] 我们用全人基因组微列阵 (Agilent Technologies, 目录号 G4112F) 进行了的 RNA 的基因组范围转录组 (transcriptome) 分析, 所述 RNA 从群组 1 (40 名 IPF 患者和 8 名未使用的供体对照受试者) 的肺组织分离。将有限的可用元数据 (性别、组织来源 (活检组织或在肺移植时收集的组织)) 包含在用来鉴定 IPF 患者和对照之间的差异表达 (DE) 基因的线性模型中。我们将 2940 个微列阵探针鉴定为与对照组织相比在 IPF 组织中差异表达 ($q < 0.05$, 倍数变化 > 1.5) (部分列表显示在表 2 中)。为了降低此处观察到的总体 IPF 表达谱受到由样品收集方法或其他混杂因素引起的系统偏差影响的概率, 我们将表达谱与相似但独立产生的 IPF 数据集 (Konishi 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180 (2):167-75 (2009)) 相比较。此数据集 (GSE10667) 描述了来自 31 名 IPF 患者的肺活检组织和 15 份对照肺组织的表达谱, 所述肺组织从在肺肿瘤切除后的周围非恶性区域收集。我们针对每个基因计算了描述相比于对照样品 IPF 样品的表达水平偏差的 T 统计。在对二者作图时, 我们发现了高度的相似性 (数据未显示)。由于两个数据集是独立地产生, 所以相似的 t 统计支持每项研究的有效性, 并降低了由研究特异的因素或技术误差引起的转录组范围效应的概率。

[0186] IPF 中的细支气管、淋巴和成纤维细胞 / 肌成纤维细胞基因表达特征

[0187] IPF 和对照 (如上文所讨论) 之间 2490 个 DE 微列阵探针的无监督双向分层聚簇显示图 1A 中所示的主要由诊断 (例如 IPF 或对照) 限定的三个主要聚簇 ; 组 1 聚簇、组 2 聚簇和组 3 聚簇。我们重新聚簇了组 1 (图 1B 中所示的热图)、组 2 (图 1C 中所示的热图) 和组 3 (图 1D 中所示的热图)。在图 1B-D 中所示的热图中, 我们观察到几组似乎在 IPF 患者内异源的共调节基因。这些共调节基因的组中的三个分别富集支气管上皮 (见表 2 ; 也称为组 1 聚簇)、淋巴聚集体 (也称为滤泡) (见表 3, 也称为组 2 聚簇) 和肌成纤维细胞 (见表 4, 也称为组 3 聚簇) 中表达的基因。

[0188] 组 1 聚簇或细支气管组包含黏蛋白 (MUCL1、MUC4、MUC20) ; 富含脯氨酸的分泌因子 (PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D) ; 角蛋白 (KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17) ; 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13) ; 离子通道和相关因子 (CLCA2、TRPV4) ; 纤毛成分 (BBS5) ; 以及 MMP3 和 SAA4。这些基因是分化的支气管上皮而不是正常肺实质中预期的肺泡上皮的特征, 且这类基因的表达与之前的 IPF 中肺泡腔的异常“细支气管形成”的报道一致, 其可能代表与严重瘢痕形成相关的蜂窝状囊腔 (cystic space) 的上皮形成 (Chilosi 等, Lab Invest. 82 (10):1335-45 (2002))。细支气管特征与报道为在来自伴随性肺纤维化和肺动脉高压患者的肺组织中上调的基因特征 (包括 TP63、CLCA2、FGF14、PTPRZ1、SOX2、DSC3、CP、MMP1、MUC4、SERPINB3、SERPINB13 和多种角蛋白 (Mura 等, Chest 141:661-673 (2012))) 惊人地相似。因此, 与瘢痕形成、蜂窝样和细支气管形成相

关的降低的组织顺应性和受损的气体交换可能有助于增加肺血管阻力和随后的肺动脉高压。我们还注意到,此聚簇内的某些基因下调,这些基因包括 Notch4、钙黏着蛋白、Wnt7A 和 DKK2。

[0189] 表 2. 与细支气管基因表达特征相关的差异表达基因 (>1.5 倍上调, $q<0.05$) 的部分列表

[0190]

探针 ID	基因符号	基因名称	EntrezID	LogFC	p-值	调整的 p-值
A_23_P150979	MUC1	黏蛋白-样 1	118430	1.61921533	0.00665823	2.60E-02
A_24_P208825	MUC4	黏蛋白 4, 细胞表面结合	4585	2.11873294	2.50E-05	2.72E-04
A_23_P92222	MUC20	黏蛋白 20, 细胞表面结合	200958	1.23642525	0.00022861	1.70E-03
A_23_P30464	PRR7	富含脯氨酸 7 (突触)	80758	1.04150995	3.35E-06	5.34E-05
A_32_P154911	PRR15	富含脯氨酸 15	222171	1.58791565	0.00882268	3.23E-02
A_23_P159406	SPRR1B	小的富含脯氨酸的蛋白质 1B	6699	1.76462785	5.26E-05	5.02E-04
A_23_P11644	SPRR2D	小的富含脯氨酸的蛋白质 2D	6703	1.15788562	0.00025497	1.86E-03
A_23_P218047	KRT5	角蛋白 5	3852	2.52682152	5.44E-06	7.87E-05
A_23_P76249	KRT6B	角蛋白 6B	3854	2.90550487	9.76E-05	8.39E-04
A_24_P228149	KRT13	角蛋白 13	3860	1.22487349	0.00497946	2.06E-02
A_24_P265346	KRT14	角蛋白 14	3861	3.71369769	1.31E-10	1.53E-08
A_23_P27133	KRT15	角蛋白 15	3866	1.8933655	0.00097625	5.56E-03
A_23_P96158	KRT17	角蛋白 17	3872	4.14444061	1.20E-11	2.15E-09
A_23_P55632	SERPINB3	丝氨酸蛋白酶抑制剂 肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵清蛋白), 成员 3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_23_P502413	SERPINB4	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽 酶抑制剂, 进化枝 B (卵	6318	3.54380018	0.00032106	2.25E-03

[0191]

		清蛋白), 成员 4				
A_23_P208126	SERPINB5	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽 酶抑制剂, 进化枝 B (卵 清蛋白), 成员 5	5268	2.18225921	9.31E-05	8.03E-04
A_23_P432978	SERPINB13	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽 酶抑制剂, 进化枝 B (卵 清蛋白), 成员 13	5275	1.33876843	0.01364005	4.56E-02
A_23_P397248	CLCA2	氯通道附件 (chloride channel accessory) 2	9635	2.34309417	7.25E-05	6.52E-04
A_24_P13381	TRPV4	瞬时型感受器电势阳离 子通道 (transient receptor potential cation channel), 亚家 族 V, 成员 4	59341	1.144662	0.00052144	3.34E-03
A_23_P5785	BBS5	Bardet-Biedl 综合征 5	129880	0.60446077	0.00254271	1.20E-02
A_23_P161698	MMP3	基质金属蛋白酶 3 (溶基质 蛋白酶 1, 明胶酶原)	4314	2.33843742	3.32E-06	2.09E-05
A_23_P87238	SAA4	血清淀粉样 A4, 组成型	6291	1.73735951	0.01243724	0.0131173

[0192] 探针 ID = Agilent 全人基因组微列阵上的探针的标识号 ; 基因符号 = NCBI Entrez 基因符号 ; 基因名称 = NCBI Entrez 基因名称 ; ENTREZ ID = NCBI Entrez 基因 ID ; $\log_{FC}$ = IPF 样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值减去健康对照样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值 ; p- 值 = 用 t 检验计算每个探针的 IPF 和对照之间的差异表达 ; 调整的 p- 值 = 用 Bonferroni 的方法对多个测试调整。

[0193] 在 IPF 中显示异质性的高度共调节的基因的第二聚簇 (组 2 聚簇 ; 图 1A) 包括与淋巴小结 (也称为聚集体) 相关的基因。以下组的基因在 IPF 患者中的组 2 聚簇中上调 : B 细胞特异性基因 (CD19、CD20[MS4A1]、BCMA[TNFRSF17]、BLK 和 BLNK) ; 多个免疫球蛋白基因及 CD79A 和 CD79B ; T 细胞和 APC 基因 (CD27、CD28、CD1) ; Fc 受体基因 (FCRLA、FCRL2、FCRL5) ; 趋化因子及其受体 (CXCL13、CXCR3、CXCR5、CCR6、CCR7)。这种基因表达模式与之前的报道一致, 该报道显示 IPF 活检组织中的活性纤维化的区域中的淋巴细胞数增加 (Nuovo 等, Mod. Pathol. (2011) 1-18)。我们选择了这组高度共调节的基因, 并重新聚簇数据集, 其被限制为这些“淋巴基因”的表达模式 (图 1C)。此分析产生表征为淋巴基因的低、中或高同步表达的三个主要亚组。低表达组包含所有对照和少数几个 IPF 患者, 而中和高表达组

包含其余 IPF 受试者。

[0194] 表 3. 与淋巴小结基因表达特征相关的差异表达基因 (>1.5 倍上调, $q < 0.05$) 的部分列表

[0195]

探针 ID	基因符号	基因名称	EntrezID	LogFC	p-值	调整的 p-值
A_23_P114299	CXCR3	趋化因子(C-X-C 基序)受体 3	2833	1.46371763	6.45E-09	3.29E-07
A_24_P252945	CXCR5	趋化因子(C-X-C 基序)受体 5	643	2.37673236	2.81E-05	2.99E-04
A_23_P121695	CXCL13	趋化因子(C-X-C 基序)配体 13	10563	3.4378017	0.00012013	9.96E-04
A_24_P234921	CCR6	趋化因子(C-C 基序)受体 6	1235	2.56106982	1.49E-10	1.65E-08
A_23_P343398	CCR7	趋化因子(C-C 基序)受体 7	1236	3.29053652	2.33E-12	5.59E-10
A_23_P113572	CD19	CD19 分子	930	2.01576251	3.16E-05	3.30E-04
A_23_P116371	MS4A1 (CD20)	跨膜 4 结构域亚家族 A, 成员 1	931	2.39890071	1.31E-05	2.86E-05
A_23_P37736	TNFRSF17 (BCMA)	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 17	608	2.44042243	2.62E-05	5.09E-05

[0196]

A_23_P31725	BLK	B 淋巴 酪氨酸激酶	640	1.58760468	0.0035697	1.58E-02
A_24_P64344	BLNK	B-细胞接头	29760	0.90832362	0.00025269	1.84E-03
A_23_P46039	FCRLA	Fc 受体-样 A	84824	1.64791428	0.00036031	2.47E-03
A_23_P160751	FCRL2	Fc 受体-样 2	79368	1.44435616	0.00408379	1.75E-02
A_23_P201211	FCRL5	Fc 受体-样 5	83416	2.47293587	2.31E-06	3.96E-05
A_23_P107735	CD79A	CD79a 分子, 免疫球 蛋白相关 α	973	1.45014719	0.0006872	4.19E-03
A_23_P207201	CD79B	CD79b 分子, 免疫球 蛋白相关 β	974	1.13800823	0.00031683	2.22E-03
A_23_P48088	CD27	CD27 分子	939	1.4445514	1.87E-06	3.38E-05
A_23_P91095	CD28	CD28 分子	940	3.18508221	1.28E-13	5.59E-11
A_23_P63167	CD1A	CD1a 分子	909	2.71941185	1.34E-08	6.07E-07
A_23_P351844	CD1B	CD1b 分子	910	1.13359253	0.00323118	1.45E-02
A_23_P51767	CD1C	CD1c 分子	911	2.00435627	4.79E-09	2.57E-07
A_23_P201160	CD1E	CD1e 分子	913	1.75899432	0.00031177	2.20E-03
A_24_P367432	IGHV1-69	免疫球蛋白重链可变 1-69	28461	3.31557265	6.44E-10	5.39E-08
A_24_P605563	IGLJ3	免疫球蛋白 λ 连接 3	28831	3.1763507	2.66E-08	1.07E-06
A_23_P167168	IGJ	免疫球蛋白 J 多肽, 免 疫球蛋白 α 和 μ 多肽 的连接蛋白	3512	2.99945067	2.33E-06	3.98E-05
A_24_P204727	IGHV3-48	免疫球蛋白重链可变 3-48	28424	2.68775596	1.20E-07	3.66E-06
A_24_P465799	IGLV3-21	免疫球蛋白 λ 可变 3-21	28796	2.40390705	5.16E-08	1.87E-06
A_32_P722809	IGKV1-5	免疫球蛋白 κ 可变 1-5	28299	2.25836578	1.69E-05	1.97E-04

[0197]

A_23_P390209	IGHG1	免疫球蛋白重链恒定 $\gamma 1$ (G1m 标志)	3500	2.23089237	0.00120748	6.60E-03
A_24_P263786	IGKC	免疫球蛋白 κ 恒定	3514	2.17465687	0.00103502	5.84E-03
A_24_P361816	IGLV6-57	免疫球蛋白 λ 可变 6-57	28778	2.15352717	1.79E-06	3.25E-05
A_24_P677559	IGK@	免疫球蛋白 κ 基因座	50802	2.02637845	8.18E-08	2.70E-06
A_24_P395415	IGHA1	免疫球蛋白重链恒定 $\alpha 1$	3493	1.93646716	0.00186451	9.26E-03
A_24_P306905	IGKV2-24	免疫球蛋白 κ 可变 2-24	28923	1.89765893	4.50E-06	6.74E-05
A_24_P93523	IGKV1D-8	免疫球蛋白 κ 可变 1D-8	28904	1.82178807	4.23E-05	4.21E-04
A_24_P417352	IGHM	免疫球蛋白重链恒定 μ	3507	0.71477012	0.00015195	1.21E-03

[0198] 探针 ID = Agilent 全人基因组微列阵上的探针的标识号 ; 基因符号 = NCBI Entrez 基因符号 ; 基因名称 = NCBI Entrez 基因名称 ; ENTREZ ID = NCBI Entrez 基因 ID ; logFC = IPF 样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值减去健康对照样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值 ; p- 值 = 用 t 检验计算每个探针的 IPF 和对照之间的差异表达 ; 调整的 p- 值 = 用 Bonferroni 的方法对多个测试调整。

[0199] 在 IPF 中显示异质性的高度共调节的基因的第三聚簇包括与成纤维细胞分化为肌成纤维细胞和创伤愈合相关的基因。此聚簇包括多个基因, 其编码胶原 (COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1)、生长因子 (HGF、IGFBP7、SCGF)、赖氨酰氧化酶 (LOXL1、LOXL2)、hedgehog 信号传递的介质 (GLI1、GLI2、SMO)、Wnt 信号传递的介质 (SFRP2、DI02)、CDH11、骨膜蛋白和 TGFB3。这种模式与之前的报道一致, 该报道显示与 IPF 中的肌成纤维细胞和 / 或成纤维细胞病灶 (foci) 相关的许多介质的表达增加 (Elliott 等, J. Cell Science 125:121-132(2012) ; Barry-Hamilton 等, Nature Med. 16:1009-1017(2010) ; Schneider 等, FASEB 26:503-512(2012) ; Okamoto 等, The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127(2011) ; Guy 等, Hepatology doi:10.1002/hep.25559(2011) ; Lam 等, Curr. Op. in Rheum. 23:562-567(2011) ; Lomas 等, Intn' l J. Clin. and Exp. Pathol. 5:58-71(2102))。我们选择了这组高度共调节的基因, 并重新聚簇数据集, 其被限制于这些“肌成纤维细胞”基因的表达模式 (图 1D)。此分析产生表征为肌成纤维细胞相关基因的低、中或高同步表达的三个主要亚组。低表达组包含所有对照和少数几个 IPF 患者, 而中和高表达组包含其余 IPF 受试者。

[0200] 表 4. 与肌成纤维细胞基因表达特征相关的差异表达基因 (>1.5 倍上调, q<0.05) 的部分列表

[0201]

探针 ID	基因符号	基因名称	EntrezID	LogFC	p-值	调整的 p-值
A_24_P254789	COL14A1	胶原, XIV 型, α1	7373	3.41189889	2.34E-16	2.58E-14
A_23_P112554	COL15A1	胶原, XV 型, α1	1306	2.26212501	2.40E-10	1.65E-09
A_23_P207520	COL1A1	胶原, I 型, α1	1277	2.12583648	3.83E-08	1.56E-07
A_24_P277934	COL1A2	胶原, I 型, α2	1278	1.10628708	0.00034794	0.00045028

[0202]

A_23_P33196	COL5A2	胶原, V 型, $\alpha 2$	1290	1.05662729	0.00154581	0.00171757
A_24_P291814	COL12A1	胶原, XII 型, $\alpha 1$	1303	0.97095129	0.00038437	0.00048047
A_23_P211212	COL18A1	胶原, XVIII 型, $\alpha 1$	80781	0.96802064	7.89E-06	1.58E-05
A_23_P160318	COL16A1	胶原, XVI 型, $\alpha 1$	1307	0.7694129	0.00031612	0.00042374
A_23_P111888	CTHRC1	含三股螺旋重复的胶原 1	115908	2.96408731	5.87E-10	3.80E-09
A_23_P153489	CLEC11A	C 型凝集素结构域家族 11, 成员 A	6320	0.63080724	0.00020336	0.00028316
A_23_P93787	HGF	肝细胞生长因子 (hepapoietin A; 散射因子)	3082	0.82101019	8.11E-05	0.00012564
A_23_P353035	IGFBP7	胰岛素样生长因子结合 蛋白 7	3490	0.96418065	3.14E-06	6.91E-06
A_23_P124084	LOXL1	赖氨酰氧化酶-样 1	4016	1.19477688	7.34E-07	2.02E-06

[0203]

A_23_P111995	LOXL2	赖氨酰氧化酶-样 2	4017	0.71925849	0.00080392	0.00094075
A_23_P105251	GLI1	GLI 家族锌指 1	2735	2.08216778	4.61E-11	3.84E-10
A_23_P500034	GLI2	GLI 家族锌指 2	2736	1.53294083	7.06E-09	3.24E-08
A_23_P70818	SMO	平滑、卷曲家族受体 (smoothened, frizzled family receptor)	6608	1.50997486	6.02E-12	8.28E-11
A_24_P137501	SFRP2	分泌性卷曲相关蛋白 (secreted frizzled-related protein 2) 2	6423	4.337804	1.89E-14	6.94E-13
A_23_P48740	DIO2	脱碘酶, 碘化甲状腺氨 酸, II 型	1734	3.33676014	5.27E-15	2.90E-13
A_23_P152305	CDH11	钙黏着蛋白 11, 2 型, OB-钙黏着蛋白(成骨细 胞)	1009	0.7647008	0.00102531	0.00115274
A_24_P347411	POSTN	骨膜蛋白, 成骨细胞特异 性因子	10631	2.13051858	1.37E-07	4.85E-07
A_24_P373096	TGFB3	转化生长因子, $\beta 3$	7043	1.91410548	0.00011172	0.0001617

[0204] 探针 ID = Agilent 全人基因组微列阵上的探针的标识号 ; 基因符号 = NCBI Entrez 基因符号 ; 基因名称 = NCBI Entrez 基因名称 ; ENTREZ ID = NCBI Entrez 基因 ID ; logFC = IPF 样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值减去健康对照样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值 ; p- 值 = 用 t 检验计算每个探针的 IPF 和对照之间的差异表达 ;

调整的 p - 值 = 用 Bonferroni 的方法对多个测试调整。

[0205] 为了测定细支气管、淋巴和肌成纤维细胞特征是否在单个受试者中彼此相关, 我们通过使用各聚簇中的所有基因的归一化的平均表达来取得了各特征的表达指数。这允许我们在个体患者的基础上比较各特征的强度。虽然大多数 IPF 受试者具有比对照高的细支气管、淋巴或肌成纤维细胞特征得分, 但各得分中存在广泛的变化, 在患有 IPF 的单个受试者内, 两种特征未显示任何显著的相关模式 (图 1E)。此结果表明, 三种特征可以反映在 IPF 患者中异质表达的正交过程和 / 或反映在 IPF 组织中异质过程的差异取样。

[0206] 为了测定所选择的包含在三种特征的每一种中的基因是否在 IPF 肺组织的空间上不同的区域表达, 我们在取自 IPF 肺外植块 ($N = 5$) 的活检组织的冷冻切片上进行了免疫组织化学 (IHC)。我们发现, 表征为蜂窝状囊的细支气管形成区域以具有丰富的细胞质的柱状上皮细胞为衬里 (图 2A), 靠近但不同于胶原沉积的区域 (图 2B)。这些上皮细胞为角蛋白 14 (由包含在细支气管特征中的基因编码的蛋白质) 染色阳性 (图 2C), 且表达通过 PAS 染色检测到的黏蛋白 (图 2D)。在空间上不同的区域, 我们观察到具有 H&E 深染色细胞核的细胞聚集体 (图 2E), 靠近但不同于高胶原沉积的区域 (图 2F)。这些聚集体为 CD20 (由包含在淋巴特征中的基因编码的 B 细胞表面标志) 染色阳性 (图 2G-H)。细支气管形成区在空间上不同于淋巴聚集体 (图 2I 和 J), 且细支气管形成区和淋巴聚集体通常出现在高胶原沉积的区域附近, 但在空间上不同于高胶原沉积的区域 (图 2B 和 F); 多个胶原基因包含在成纤维细胞特征中。

[0207] 编码候选血清生物标志的差异表达基因的鉴定

[0208] 为了缩减评价为编码候选血清生物标志的候选基因的列表以及以其他方式鉴定评价为生物标志的候选血液蛋白质, 我们应用了在 UCSF 群组 1 数据集和 GSE10667 数据集 (Konishi 等, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180(2):167-75(2009)) 中都是在 IPF 中上调 >2 倍的更严格的截断。此分析产生了在两个数据集中共同上调的 291 个基因 (见表 5)。这些共同基因中的一些编码可能在外周血中检测的胞外和 / 或分泌性蛋白质, 因此可以是用于进一步评价为可能的血清生物标志或其他生物标志的良好候选者。基于这些结果和之前公开的数据及易于获得的用于血清生物标志检测的测定, 我们选择了以下基因作为 IPF 中的候选预测血液生物标志: YKL-40、COMP、OPN、MMP7、骨膜蛋白、CXCL13、CCL11 (嗜酸性粒细胞活化趋化因子)、CCL13、CCL17 (TARC)、CCL18、MMP3 和血清淀粉样蛋白 A (SAA) (尤其是组成型 SAA)、SAA4。(见例如 Korthagen 等, *Resp. Med.* 105:106-113(2011), Pardo 等, *PLoS Med.* 2(9):891-903(2005), Richards 等, *Am J Respir Crit Care Med*, doi:10.1164/rccm.201101-00580C(2011), Yokoyama 等, *Respirology* 11:164-168(2006), Kinder 等, *Chest* 135:1557-1563(2009))。此外, 之前已将 CCL18 报道为 IPF 中存活的预测生物标志 (Prasse 等, *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 179:717-723(2009)), 但它在我们的微阵列实验中未检测为显著 DE。

[0209] 按照与它们预测的生物学相关的多种分类选择了血液生物标志。CCL11、CCL13、CCL17 和 CCL18 是与 2 型炎症相关的趋化因子。我们之前已显示 CCL13 和 CCL17 在哮喘中响应 IL13 阻断而受药效调节 (Corren *The New England journal of medicine* 365:1088-1098(2011))。骨膜蛋白与 IL13 生物学相关 (Corren *The New England journal of medicine* 365:1088-1098(2011); Woodruff 等, *Proc Natl Acad Sci U S*

A104:15858-15863(2007);Woodruff等,Am J Respir Crit Care Med180:388-395(2009);Jia等,The Journal of allergy and clinical immunology130(3):647-654.e10(2012)),且是上述成纤维细胞基因特征中的代表性基因。CXCL13是在集合淋巴结中高表达的B细胞化学引诱物,且是上述淋巴基因特征中的代表性基因。MMP3和SAA4是上述细支气管基因特征中的代表性基因。YKL-40是与髓样细胞激活相关的几丁质酶-样蛋白质,其系统水平(systemic level)在多种疾病状态中提高。之前公开的研究已显示,YKL-40在IPF中高表达,YKL-40的血清水平是存活的预测(Korthagen等,Respiratory medicine105:106-113(2011))。COMP由TGF β 诱导,且在硬皮病中的肌成纤维细胞中高表达(Farina等,Matrix biology:journal of the International Society for Matrix Biology25:213-222(2006);Farina等,Annals of the rheumatic diseases68:435-441(2009))。OPN和MMP7在IPF组织中高表达;已显示OPN的血液水平与IPF中的肺功能负相关(Kadota等,Respiratory medicine99:111-117(2005)),且已显示MMP7的血液水平是IPF中存活的预测(Richards等,Am J Respir Crit Care Med185(1):67-76(2012))。

[0210] 为了验证这些候选生物标志基因在IPF肺中的差异表达,我们对用于微列阵实验的同一RNA样品进行了定量RT-PCR(qPCR)(见方法)。表6显示微列阵基因表达,图3A-G显示qPCR数据。如表6和图3A-G中所示,我们观察到,相对于对照,所选择的每个候选生物标志基因在IPF患者中的表达显著提高。

[0211] 表5. 两个独立的IPF数据集中的差异表达基因(上调>2.0倍, $q < 0.05$)的部分列表

[0212]

基因符号	GSE10667 调整的 p-值	GSE10667 logFC	UCSF 群组 1 调整的 p-值	UCSF 群组 1 logFC
CHI3L1 (YKL-40)	0.010960171	1.39622824	1.19997E-07	2.972810559
CCL13	0.000480298	1.650926419	0.029881609	1.104407622
COMP	1.64133E-10	4.382169308	2.0246E-06	2.52240034
CXCL13	0.005238542	2.637421496	0.000629905	3.437801699
MMP7	3.26412E-05	2.874722338	6.8955E-11	3.413531235
POSTN	8.94681E-05	2.473564333	8.46908E-06	2.103941264
SPPI (OPN)	5.94635E-07	3.762235672	8.37419E-05	3.64564152

[0213] 基因符号 = NCBI Entrez 基因符号;logFC = IPF 样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值减去健康对照样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值;调整的 p-值 = 用 Bonferroni 的方法对多个测试调整。

[0214] 表 6. 通过微列阵测定的候选生物标志基因在 IPF 活检组织中的基因表达

[0215]

基因符号	倍数变化, 微列阵 ($\log_2$)	q- 值, 微列阵
SPP1 (OPN)	3.65	8.4×10^{-5}
MMP7	3.41	6.9×10^{-11}
CXCL13	3.44	6×10^{-4}
CHI3L1 (YKL-40)	2.97	1.3×10^{-6}
COMP	2.52	2.0×10^{-6}
POSTN	2.10	8.5×10^{-6}
CCL13	1.10	0.03

[0216] 为了确定所选择的标志在 IPF 中相对于对照提高的基因表达水平是否对应于外周血中由那些基因编码的蛋白质的提高的水平, 我们在群组 2IPF 样品 ($N = 80$) 中及来自健康对照的样品中评价了它们在血浆 (OPN) 或血清 (全部其他) 中的水平。对于血浆对照, $N = 10$; 对于血清对照, $N = 29$ 。按上文所述进行血液生物标志中的每一种的测定。

[0217] 所有 IPF 患者与所有对照相比, YKL-40、COMP、OPN、MMP7、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、SAA 和 CXCL13 的外周血水平在 IPF 中显著提高 (表 7)。使用针对 IPF 和对照的 Wilcoxon 秩和检验, 我们获得了以下 p- 值: YKL-40、COMP、MMP7、CCL13、CCL18 和 CXCL13, $p < 10^{-4}$; OPN, $p = 0.04$ 。相对于对照, 一些 IPF 患者具有提高的血清骨膜蛋白或 MMP3 水平, 但总体上这种差异未达到统计显著性。之前的报道表明, 在 IPF 肺和外周血中可检测到提高的骨膜蛋白水平 (Okamoto 等, The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127 (2011))。之前已显示免疫调节疗法 (具体而言, 糖皮质激素) 可以降低骨膜蛋白的基因表达水平 (Woodruff 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 104(40):15858-63 (2007); Woodruff 等, Am J. Respir. Crit. Care Med. 180(5):388-95 (2009)), 并预期骨膜蛋白的外周血水平在这种疗法的存在下将相似地降低。因此, IPF 患者中血清骨膜蛋白水平的变化及与对照相比缺乏显著差异可以解释为事实上采集样品时 21/80 IPF 患者正处于免疫调节治疗 (IT, 全身糖皮质激素或硫唑嘌呤)。

[0218] 因此, 我们检查了该生物标志中任一种 (包括骨膜蛋白) 的外周血水平在处于 IT 的 IPF 患者和不处于 IT 的 IPF 患者之间是否不同。与不处于 IT 的 IPF 患者相比, 处于 IT 的 IPF 患者显示 COMP 和骨膜蛋白的较低水平的趋势。相反, 与不处于 IT 的 IPF 患者相比, 处于 IT 的 IPF 患者具有显著提高的 CXCL13、MMP3 和 SAA 水平 (表 7)。根据 IT 状态, 任意其他生物标志的水平不存在显著的差异或差异趋势。

[0219] 表 7. IPF 患者及对照中血清生物标志水平的范围和分布

[0220]

生物标志	对照中的中位数 (IQR) ¹	IPF 患者中的中位数 (IQR) ¹	IPF 患者中的中位数 (IQR) 不处于 IT (N=59)	IPF 患者中的中位数 (IQR) 处于 IT (N=21)
POSTN (ng/ml)	26.6 (23.9-33.8)	28.6 (23.3-38.4)	30.0 (23.4-39.4)	25.0 (21.5-35.1) ³
CCL11 (pg/ml)	257 (188-292)	225 (259-447) ²	335 (259-440)	340 (255-456)
CCL13 (pg/ml)	159 (111-215)	299 (226-400) ²	300 (244-387)	297 (193-441)
CCL17 (pg/ml)	275 (228-411)	510 (304-823) ²	453 (298-760)	572 (353-1083)
CCL18 (ng/ml)	42 (29-51)	94 (76-122) ²	94 (77-119)	100 (74-124)
MMP3 (ng/ml)	20 (14-26)	22 (16-42)	20 (11-26)	45 (26-112) ²
SAA (ng/ml)	695 (286-1038)	1618 (773-4625) ²	1234 (630-2543)	4625 (2910-8815) ²
CXCL13	28 (22-39)	80 (55-136) ²	69 (50-125)	113 (82-221) ²

[0221]

(pg/ml)				
COMP (ng/ml)	540 (432-720)	901 (706-1163) ²	943 (756-1191)	749 (576-1101) ³
OPN (ng/ml)	51 (41-68)	69 (53-85) ²	68 (53-83)	70 (47-89)
YKL-40 (ng/ml)	41 (23-54)	105 (76-170) ²	104 (74-158)	110 (77-195)
MMP7 (ng/ml)	2.7 (2.4-3.5)	7.4 (5.9-9.4) ²	7.5 (6.2-9.4)	6.6 (5.0-9.8)

[0222] ¹ = 对于除骨桥蛋白和 MMP3 外的所有生物标志, N = 29 对照和 N = 80IPF 患者, 值为血清水平; 对于骨桥蛋白, N = 10 对照和 N = 80IPF 患者, 值为血浆水平; 对于 MMP3, N = 29 对照和 N = 78IPF 患者; IQR = 四分位数间距, 第 25-75 百分数。

[0223] ² = IPF 中显著高于对照, Wilcoxon 秩和检验 p<0.05。

[0224] ³ = 在处于免疫调节治疗 (IT) 状态的 IPF 患者中趋于显著不同, 秩和检验 $p < 0.1$ 。

[0225] 然后我们评价了单个生物标志与人口统计和临床变量之间的相关性。在所测试的 8 个生物标志中, 只有 OPN 在之前的吸烟状态中显示显著差异, 其中血浆 OPN 水平在前吸烟者中低于从未吸烟者 ($p = 0.01$, 数据未显示)。在临床变量的比较中, 我们观察到预测的肺总量 (TLC) % 和预测的用力肺活量 (FVC) 之间以及每个肺活量测定变量和扩散量 (DL_{CO} % 预测) 之间表面上显著的正相关。我们还观察到呼吸困难得分 (Watters 等, Am. Rev. Respir. Dis. 133(1):97-103(1986))、FVC % 预测和 DL_{CO} % 预测之间的负组间相关 (表 8)。在血液生物标志中, 我们通常观察到 MMP7、骨膜蛋白和 COMP 之间及 OPN、YKL-40、SAA、MMP3、CCL11 和 CXCL13 之间的弱组间相关; CCL13 和 CCL17 之间的强组间相关。所观察到的通常低的相关系数表明, 总体上, 生物标志的水平在群体中大致相互正交 (表 8)。我们还观察到单个生物标志和临床 / 人口统计变量之间相对少的显著相关; 在这些显著相关中, CXCL13 与预测的 DL_{CO} % 负相关, 与呼吸困难得分正相关; CCL11 与放射照像得分正相关; SAA 与预测的 TLC % 负相关, 与放射照像得分和呼吸困难得分正相关; MMP3 与预测的 FVC % 负相关, 与呼吸困难得分正相关; OPN 和 COMP 与年龄弱相关 (表 8)。

[0226] 表 8. 生物标志和临床 / 人口统计特征的相关性

[0227]

变量	因变量	r_s	p- 值
预测的 TLC %	预测的 FVC %	0.83	0.0001
预测的 TLC %	预测的 DL_{CO} %	0.34	0.0177
预测的 DL_{CO} %	预测的 FVC %	0.34	0.0044
呼吸困难得分	预测的 DL_{CO} %	-0.43	0.0004
呼吸困难得分	预测的 FVC %	-0.29	0.0118
放射照像得分	预测的 FVC %	-0.37	0.0326
CXCL13 (pg/ml)	预测的 DL_{CO} %	-0.35	0.0035
CXCL13 (pg/ml)	呼吸困难得分	0.40	0.0004
CCL11	放射照像得分	0.44	0.0086
SAA	预测的 TLC %	-0.30	0.0427
SAA	放射照像得分	0.43	0.0108
SAA	呼吸困难得分	0.35	0.0024
MMP3	预测的 FVC %	-0.25	0.0313

MMP3	呼吸困难得分	0.24	0.0427
OPN (ng/ml)	初次就诊年龄	0.23	0.0395
COMP (ng/ml)	初次就诊年龄	0.26	0.0239
MMP7 (ng/ml)	POSTN (ng/mL)	0.40	0.0002
MMP7	SAA	-0.29	0.0107
COMP (ng/ml)	POSTN (ng/mL)	0.24	0.0337
COMP (ng/ml)	MMP7 (ng/ml)	0.24	0.0342
OPN (ng/ml)	YKL40 (ng/mL)	0.23	0.0385
CXCL13 (pg/ml)	YKL40 (ng/ml)	0.26	0.0180

[0228]

CXCL13 (pg/ml)	OPN (ng/ml)	0.27	0.0145
CXCL13	MMP3	0.37	0.0008
CXCL13	SAA	0.37	0.0009
CCL11	MMP3	0.23	0.0449
CCL11	YKL40	0.24	0.0333
CCL11	CCL13	0.25	0.0245
CCL11	CXCL13	0.29	0.0101
CCL13	CCL17	0.43	0.0001
SAA	MMP3	0.41	0.0002

[0229] r_s = Spearman 等级相关 ;p- 值指 Spearman 相关。

[0230] 建立血液生物标志的预测值

[0231] 之前的研究已显示肺功能、扩散量、吸烟状态和年龄的单时间点值 (single timepoint value) 对 IPF 患者中随后的存活的预测值的弱至无影响。与那些发现一致, 除预测的 FVC% 外, 我们未观察到针对那些单个变量的任何显著的存活差异, 其中与显示 <69% 的预测的 FVC% 的患者相比, 显示大于群体的中位数的预测的 FVC% (>69%) 的患者具有存活优势 (HR = 0.37, p = 0.02, 图 4)。

[0232] 为了评价多种血液生物标志的后续存活预测值, 我们用 Cox 比例风险模型来单个地评估了该血液生物标志 (骨膜蛋白、CCL13、CCL18、骨桥蛋白、COMP、YKL-40、MMP3、

MMP7、SAA 和 CXCL13) 中每一个的预测值。在那些生物标志中,我们发现,基线处的 CXCL13、YKL-40、COMP、OPN、MMP3 和 SAA 水平显著地区分 IPF 患者随后的无移植存活(图 5A-D 和表 9)。与之前公开的报道(Richards 等,Am J Respir Crit Care Med,doi:10.1164/rccm.201101-00580C(2011);Prasse 等,Am J Respir Crit Care Med179:717-723(2009))相反,我们未在此群组中观察到 MMP7 或 CCL18 水平的任何预测值,我们也未在此群组中观察到所测试的任意其他生物标志(包括 CCL13 和骨膜蛋白)的统计上显著的预测值。

[0233] 表 9. IPF 患者中单个生物标志的预测值

[0234]

生物标志	Exp(系数)	p-值
骨膜蛋白	1.017	0.2
CCL11	1.002	0.05
CCL13	1.000	0.7
CCL17	1.000	0.4
CCL18	0.994	0.3
MMP3	1.018	5.0×10^{-8}
SAA	1.000	3.0×10^{-4}
CXCL13	1.003	7.3×10^{-6}
COMP	1.000	0.030
OPN	1.026	0.004
YKL-40	1.006	0.010
MMP7	1.053	0.1

[0235] 由于单个预测标志 CXCL13、YKL-40、OPN、COMP、MMP3 和 SAA 的水平在 IPF 患者内未高度组间相关,我们检查了这些标志的组合是否可以进一步增强预测值的准确性。我们评估了上文所示的六种生物标志的每种可能的组合的合成值来用受者作用特征(ROC)分析预测样品采集后 1、2 和 3 年内的死亡率。我们发现,一般而言,与三种或多种生物标志的组合相比,单个生物标志或生物标志对表现得较差(图 6A)。为了确定组合的生物标志的最佳的最小数目,我们评估了 2 年时的 ROC 分析的曲线下面积和六种生物标志的所有可能的组合的期限显著性,并发现许多 3 种生物标志的组合与 4 种或多种生物标志的组合的表现相当(图 6B)。

[0236] 为了达到类别间 IPF 患者数目的相对可比的分布,我们设计了简单的评分系统,每种生物标志高于整个群组中位数(median level)的基线生物标志水平由此获得 1 的得

分。因此,具有全部 4 种生物标志都低于中位数的生物标志水平的患者指定 0 的得分,一种生物标志高于中位数而另外 3 种生物标志低于中位数的患者指定 1 的得分,等等。我们推导了各生物标志的以下值。CXCL13 的中位数为 80pg/ml;YKL-40 的中位数为 105ng/ml;COMP 的中位数为 901ng/ml;OPN 的中位数为 69ng/ml(见表 7)。此评分系统用 Cox 比例风险模型显著地按存活区分患者组 ($p < 10^{-6}$, 图 7)。

[0237] 用在 ROC 分析中表现最好的三种生物标志的组合(MMP3、COMP 和 YKL40)来达到类别间 IPF 患者数目的相对可比较的分布,我们应用了上述评分系统,其中全部 3 种生物标志都低于中位数的患者指定 0 的得分,1 种生物标志高于中位数而另外 2 种生物标志低于中位数的患者指定 1 的得分,任意 2 种生物标志高于中位数但第三种生物标志低于中位数的患者指定 2 的得分,全部 3 种生物标志都高于中位数的患者指定 3 的得分。此评分系统用 Cox 比例风险模型显著地按存活区分患者组 ($p < 10^{-9}$, 图 8;对 Kaplan-Meier 存活数据进行作图)。在得分为 0 的 15 名患者中,只有 1 名在随访期内记录到死亡,而得分为 3 的所有患者在样品采集的 500 天内死亡。

[0238] 因此,我们已显示,测量某些生物标志(CXCL13、YKL-40、COMP、OPN、MMP3 和 SAA)的血液水平并确定各生物标志的值落在中位数之上或之下可以用来在诊断时评估 IPF 患者的存活预测。此外,用本文所述的评分系统来评估生物标志 CXCL13、YKL-40、COMP 和 OPN 中的零个、一个、两个、三个或全部四个或生物标志 MMP3、COMP 和 YKL-40 中的零个、一个、两个或全部三个的血液生物标志水平处于 IPF 患者中位数之上或之下,可以提高存活预测的准确性。这种系统用于鉴定进行积极治疗干预(aggressive therapeutic intervention)或进行肺移植的患者,以及为治疗剂的临床试验而分层进行的患者。

[0239] IPF 中的风险预测对作出诸如肺移植的治疗和患者管理决策很重要,且用于分层研究性治疗剂的临床试验中的招募者。由于肺的直接取样在 IPF 患者中通常不现实或不可行,疾病活动和进展的非侵入性评估具有重要价值。通过随时间推移重复测量的测量方法在监测单个患者的疾病进展中具有一些效用,所述测量方法为高分辨率计算层析 X 射线照相术(HRCT)、肺活量测定法及肺功能的其他测量(如扩散量和运动耐量),但肺功能的单点评估在群体基础上具有相对少的信息(Ley 等,Am J. Respir. Crit. Care Med. 183:431-440(2011))。本文所述的基于血液的生物标志在以下几个水平上具有能够进行 IPF 药物研发和 IPF 的临床管理的潜能:疾病活动的预测、预后、药效和替代测量。

[0240] 预测生物标志在治疗之前提供特定分子途径的活性的证据,鉴定出最有可能从靶向疗法受益的患者亚群。如果只有不能以其他方式预期地鉴定的患者亚组显示益处,那么给定途径可能在 IPF 患者群体内异质性表达,并且鉴定靶向该途径的试剂的临床益处能力可能受损。鉴定最有可能从靶向治疗剂受益的 IPF 患者的预测生物标志可以帮助分层临床试验中的招募者以更严格地测试治疗假说。

[0241] 预测生物标志分层未来疾病进展或死亡的风险。鉴于 IPF 中的高死亡率,可以预期成功的治疗干预相对于安慰剂显著延长寿命。但是,鉴于疾病轨迹的可变性,在不治疗大量患者许多年的情况下在早期临床试验中评估存活益处富有挑战。用鉴定最有可能在 1-2 年的时期内遭受显著疾病进展或死亡的 IPF 患者的预测生物标志分层临床试验中的招募者以评估在试验中最有可能进展的患者中是否存在短期存活益处。此外,给定的治疗干预可能使具有相对好的预测的患者受益,但在疾病已进展通过某个不可逆点的患者中无效。

例如, BIBF1120 的最近的 2 期研究的亚组分析显示, 在基线具有高于 70% 预测 FVC 的患者中观察到了大部分安慰剂对肺功能的调节益处, 而具有小于 70% 预测 FVC 的患者未显示太多益处 (Richeldi 等, abstract, ERS 2011 Annual Congress)。

[0242] 药效生物标志应反映涉及疾病过程的特定分子途径的近似活性, 且应在对具体治疗干预的响应中变化。治疗后药效标志的变化显示分子干预是否以及以什么程度影响其靶标; 因此, 这些标志可以帮助能够在剂量范围研究中进行适当的剂量选择。在具有不易确定的短期临床结果测量方法的疾病 (如 IPF) 中, 缺乏任何临床益处情况下的显著的药效作用可以帮助区分试验失败的原因: 不适当的靶标选择和不适当的剂量。替代生物标志 (如药效标志) 应响应治疗而变化, 但可以远离所靶向的途径, 并与疾病的下游表现和临床结果更密切地关联。替代生物标志在短期内的变化可以指示持续治疗如对存活结果的可能的长期有效性。给定的生物标志可以代表预测、预后、药效和替代种类中的任一个、几个或全部。

[0243] IL-13 是纤维化的介质, 已暗示为 IPF 中潜在的治疗靶标 (Wynn, TA, J. Exp. Med. 208:1339-1350 (2011))。如上文所讨论, 我们发现, IL-13 及可能受 IL-13 调节的基因 (如 IL13R α 2、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18 和骨膜蛋白) 在来自 IPF 患者的肺活检组织中高水平表达。在一项 II 期研究中, 治疗性 IL-13 阻断证明在哮喘中的临床益处, 且该益处患者在患者亚组中增强, 通过血清骨膜蛋白水平测定在所述患者亚组的气道中具有的提高的 IL-13 表达 (Corren 等, New Engl. J. Med. 365:1088-1098 (2011))。在上文讨论的实验中, 我们发现, 在整个 IPF 患者群组中, 血清骨膜蛋白水平并未显著高于在健康对照中测量的那些血清骨膜蛋白水平 (表 7)。但是, 骨膜蛋白水平在 IPF 患者亚组中明显提高 (表 7), 且血清骨膜蛋白水平在 IPF 中的分布类似于在严重哮喘中观察到的分布 (Jia 等, The Journal of allergy and clinical immunology 130(3):647-654.e10 (2012))。骨膜蛋白在本文所述的成纤维细胞 / 肌成纤维细胞特征中表达, 且已通过 IHC 定位至 IPF 中的成纤维细胞病灶 (Okamoto 等, The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127 (2011))。如果 IL-13 阻断在 IPF 患者中具有临床效应, 则它可以仅在具有提高的治疗前血清骨膜蛋白水平的患者亚组中是明显的。类似地, 我们发现, CCL13 和 CCL17 水平在哮喘患者中提高, 且响应治疗性 IL-13 阻断而显著减少 (Corren 等, New Engl. J. Med. 365:1088-1098 (2011))。由于 CCL13 和 CCL17 水平在 IPF 患者中提高, CCL13 和 CCL17 也可以作为 IPF 中的 IL-13 途径活性的药效标志。CCL11 是响应 IL-13 而上调的基质细胞的产物 (Matsukura 等, Am. J. of Respir. Cell and Mol. Biol. 24:755-761 (2001))。CCL18 是选择性激活的巨噬细胞的产物 (Prasse 等, Arthritis and Rheum. 56:1685-1693 (2007)), 该巨噬细胞本身可以是 IL-13 的来源 (Kim 等, Nature Med. 14:633-640 (2008))。因此, CCL11 和 CCL18 也可以在 IPF 中的 IL-13 阻断的治疗研究中作为预测和 / 或药效生物标志。

[0244] OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3 和 SAA 的血清水平各显著地预测 IPF 中的后续疾病进展。但是, 它们的水平在所检查的患者群体内不是显著地组间相关。每种标志可以由不同的细胞来源产生, 并反映 IPF 病灶内的不同致病过程的活性。

[0245] OPN 在 IPF 中以提高的水平表达 (Pardo 等, PLoS Med 2:e251 (2005)), 且已将其表达定位至纤维细胞病灶和 UIP 病灶中的增生性肺泡上皮 (Kelly 等, Am J Respir Crit

Care Med174:557-565(2006))。认为 OPN 在细胞黏附、迁移、炎症和组织重塑中发挥作用 (O'Regan, A., Cytokine&growth factor reviews14:479-488(2003)), OPN 缺失的小鼠免受博来霉素诱发的肺纤维化 (Berman 等, American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology286:L1311-1318(2004))。其他研究人员已报道了血浆 OPN 水平在 IPF 患者中提高, 在 IPF 内, OPN 水平与氧饱和负相关 (Kadota 等, Respiratory medicine99:111-117(2005))。

[0246] YKL-40 是主要由骨髓衍生细胞如活化的巨噬细胞产生的几丁质酶-样蛋白质 (Rehli 等, The Journal of biological chemistry278:44058-44067(2003))。它的系统水平在与组织重塑相关的炎症病症和增生性病症 (neoplastic condition) 中提高 (Lee 等, Annual review of physiology73:479-501(2011)), 我们的发现与之前的报道一致, 该报道显示基线血清 YKL-40 水平是 IPF 患者中随后的死亡率的预测 (Korthagen 等, Respiratory medicine105:106-113(2011))。

[0247] COMP 是主要由软骨、韧带、腱和骨中的成纤维细胞表达的胞外基质蛋白。在系统性硬化症患者中, 发现病灶皮肤肌成纤维细胞表达提高水平的 COMP, 且其表达可由 TGF β 诱导 (Farina 等, Matrix biology:journal of the International Society for Matrix Biology25:213-222(2006); Farina 等, Annals of the rheumatic diseases68:435-441(2009))。

[0248] CXCL13 是由小结树突细胞产生的趋化因子。它通过与其关联受体 (cognate receptor) CXCR5 结合以将 B 细胞招募至二级和三级淋巴结构, 都为淋巴小结形成所需 (Ansel 等, Nature406:309-314(2000))。最近, 已报道集合淋巴结与 IPF 活检组织中的 UIP 病灶相关 (Nuovo 等, Mod. Pathol. (2011)1-18), 并已在肾纤维化中报道了具有高 CXCL13 表达水平的 B 细胞浸润物 (Heller 等, The American journal of pathology170:457-468(2007))。已将血清 CXCL13 描述为关节磨损 (joint erosion) 的严重程度 (Meeuwisse 等, Arthritis and rheumatism63:1265-1273(2011)) 和类风湿性关节炎中利妥昔单抗 (rituximab) 治疗后的 B 细胞再繁殖 (Rosengren 等, Rheumatology (Oxford) 50:603-610(2011)) 的生物标志。CXCL13 表达与本文所述的淋巴特征簇。

[0249] MMP3 和 SAA4 在本文所述的细支气管特征中表达。已描述了来自 IPF 患者的 BAL 液中提高的 MMP3 蛋白水平 (Richter 等, Thorax64:156-161(2009)), 但之前未描述过将 MMP3 的系统水平作为 IPF 的生物标志。SAA 是在许多炎症病症中增加的急性期反应物, 但未描述为 IPF 的生物标志。

[0250] 总结起来, 这六种生物标志 (OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3 和 SAA) 中的每一种在 IPF 患者中的系统水平可以反映不同致病过程的可变的相对贡献。

[0251] 鉴于 IPF 病理学的地理异质性和斑片 (patchy) 性质, 相比于来自单个小活检组织的基因表达水平, 这些生物标志的外周血水平可以提供更全面的 IPF 中累积疾病负荷 (cumulative disease burden) 的图景。虽然与健康对照相比六种生物标志 (OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3 和 SAA) 中的大多数通常在 IPF 患者中增加, 但这些生物标志中的每一种在 IPF 群体内的相对水平广泛变动, 且可以不同地影响疾病进展。因此, 本文所述的多种生物标志的组合值可以提供比单个标志更多的益处。就临床疾病进展评估这些标志随时间的动态将是有益的。

[0252] 实施例 2-IPF 中的信号传导途径的表征

[0253] 已将 IL-13、TGF β 和上皮-间质通讯（包括 Hedgehog(Hh) 途径）的介质与特发性肺纤维化 (IPF) 的病理发生相联系。例如, 已显示小鼠肺中的转基因 IL-13 过表达足以诱发严重的肺纤维化 (Zhu 等, J. Clin. Invest. 103(6):779-88(1999)), IL-13 缺失的小鼠部分免受博来霉素诱发的纤维化以及血吸虫诱发的肝纤维化。IL-13 与包含 IL-13R α 1 和 IL-4R α 的异聚体 (heteromeric) 受体复合体结合, 然后 Jak 家族激酶磷酸化 STAT6, STAT6 是介导 IL-13 和 IL-4 下游信号传递的转录因子。第二 IL13 受体 IL13R α 2 已显示为非信号传递诱饵受体, 可以与 IL13R α 1/IL4R α 复合体竞争 IL13 结合, 从而减少 STAT6 激活。IL13R α 2 可以由依赖 STAT6 以及不依赖 STAT6 的信号诱导, 且在纤维化组织以提高的水平表达。一些报道 (Fichtner-Feigl 等, Nat. Med. 12(1):99-106(2006); Mandal 等, Inflamm Bowel Dis. 16(5):753-64(2010)) 已表明, IL13R α 2 可以转导不依赖 STAT6 的可以促成纤维化的信号, 但这些研究依赖细胞系中的异位 IL13R α 2 过表达, 且 IL13R α 2 信号传递的机制仍不清楚。IL13R α 2 缺失的动物显示增加的组织纤维化, 而 IL13R α 1 缺失的动物显示减少的组织纤维化 (Wilson 等, J. Clin. Invest. 117(10):2941-51(2007); Mentink-Kane 等, Gastroenterology 141(6):2200-2209(2011))。虽然在敲除动物中进行的这些研究就 IL13 及其受体在引发纤维化中的作用而言信息丰富, 但它们在已建立的纤维化的背景中 (如在人纤维化疾病中) 难以解释。虽然一堆证据表明 IL13R α 2 形成不能在配体-受体结合时传递信号的诱饵受体, 但似乎矛盾的一堆证据指向 IL13R α 2 在纤维发生中的积极作用。因此, 对内源 IL13 和 IL13R α 2 在人 IPF 中的作用仍知之甚少。

[0254] 为了增强我们对 IPF 中的分子途径的理解, 我们在 IPF 中及非 IPF 对照组织中表征了基因组范围的转录谱。这些实验导致在原代肺成纤维细胞中鉴定和表征了 IL13 下游的信号传导途径。

[0255] 材料和方法

[0256] 人肺组织样品

[0257] 按上文实施例 1 中所述获得人肺组织样品。

[0258] 组织培养

[0259] 将 IMR-90 细胞 (ATCC, Manassas, VA; 目录号 CCL-186) 培养在补充了 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO; 目录号 F2442) 和青霉素/链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA; 目录号 15140) 的 DMEM 培养基中。将细胞接种在生长因子减少的 Matrigel (GFR Matrigel) [BD Biosciences, Bedford, MA; 目录号 354230] 床上。在冰上过夜融化 Matrigel, 通过使基质胶在 37°C 硬化 30 分钟以在 12 孔板中产生 450 μ l/孔的床体积。然后将细胞 (1E5-2E5) 接种至 Matrigel 床上。除非另有说明, 用 10ng/ml (IL-13 和 TNF α) 和 3ng/ml (IL-4) 进行 IL-13 刺激。

[0260] RNA 制备

[0261] 在预冷 (液氮中) 的 Bessman 组织粉碎机 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA; 目录号 189475) 中粉碎速冻的肺活检组织样品。将 Trizol 加至经粉碎的物质, 并吹吸几次。在冰上温育裂解物 10-15 分钟。将裂解物保存在 -80°C, 直至进一步处理。按照厂家的方案从 Trizol 裂解物分离 RNA。然后按照厂家的方案用 Qiagen RNeasy 柱对 Trizol 分离的 RNA 进行另一纯化步骤。

[0262] 通过加入 1ml (12 孔板中的每个孔) Trizol 并吹吸混合物几次来收集组织培养细胞。用 Qiagen RNeasy 方案中所示的钢珠 /Tissuelyser(Qiagen) 法 (20s⁻¹, 4 分钟) 匀浆 Trizol 裂解物。匀浆后, 按照 Trizol 厂家的方案分离 RNA。然后按照厂家的方案用 Qiagen RNeasy 柱对 Trizol 分离的 RNA 进行另一纯化步骤。

[0263] 通过 Nanodrop 测定 RNA 浓度, 并通过 Bioanalyzer(Agilent) 分析所有微列阵样品。

[0264] RT-qPCR

[0265] 按照厂家的方案用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI, 目录号 4368814) 用随机引物对 100-300ng 总 RNA 进行反转录。用 Taqman 测定进行实时 qPCR。所有反应均在 ABI7900HT 仪器或 Fluidigm 平台 (48. 48 或 96. 96 形式) 上进行。

[0266] IL-13 报道基因测定

[0267] 将 L-Luc-Beas-2B 细胞 (ATCC 目录号 CRL-9609) 培养在用以下试剂包埋的 GFR Matrigel 中: 12ng/ml IL-13(R&D Systems, 目录号 213-IL) 和抗 -IL-13 封闭抗体 (Genentech)。唯一的改变为仅测量萤火虫萤光素酶, 按照厂家的方案用 Dual-Glo Luciferase Assay System(Promega, 目录号 E2920) 测量萤火虫萤光素酶活性。

[0268] 微列阵分析

[0269] 用 Quick Amp 标记试剂盒 (Agilent) 扩增和标记 RNA 以从 1ug 总 RNA 产生标记的 cRNA。用 Cy5 标记实验样品; Universal Human Reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA) 用于参照通道, 且用 Cy3 标记。Cy5 和 Cy3 标记的 cRNA 竞争性杂交至两色全人基因组 4×44K 基因表达微列阵平台。按照厂家的方案 (Agilent) 洗涤杂交的微列阵, 用 Agilent Microarray Scanner 采集所有特征强度。用 Feature Extraction Software(Agilent)、方案 GE2-v5_95(Agilent) 分析所扫描的幻灯片的 TIFF 图像。标示的异常值不包括在任意后续分析中。所有数据都报告为染料归一化的 Cy5/Cy3 比的 log₂ 值。将所有样品的 log₂ 比值对相应的模拟处理样品 (或非 IPF 的对照) 的平均 log₂ 比值归一化。

[0270] 在比较不同的表达概况分析数据集时, 首先如原研究中那样, 过滤、归一化和集中公众可得的数据集。Kaminski 数据集 (GSE10667) 是在全人基因组 Agilent 微列阵平台上运行的, 因此, 用平台特异性探针标识符来连接数据集。用 Java Treeview 产生热图 (heatmap)。

[0271] 通过在 R-code (LIMMA) 中建立并入了诊断、组织来源和性别 (从 Y 连锁基因的表达分析推断) 这三个因素的线性模型来鉴定差异表达的基因。

[0272] 结果

[0273] IL13R α 2 是 IPF 肺组织中表达差异最大的基因

[0274] 我们进行了来自 40 名 IPF 患者和 8 名非 IPF 对照受试者的活检肺组织的基因组范围转录组分析。我们从这些临床样品分离了 RNA, 并用全人基因组 Agilent 微列阵 (GEO 检索 ID) 分析了转录物。将有限的可用元数据 [性别、组织来源 (活检组织或在肺移植时收集的组织)、诊断] 包含在用来鉴定差异表达基因的线性模型中。

[0275] 我们将 1508 个基因鉴定为与对照组织相比在 IPF 组织中差异表达 ($q < 0.05$, 倍数变化 $> |2|$)。部分列表显示在表 10 中。在 IPF 中显著上调的基因有基质金属蛋白酶 (MMP1、3、7、10、11、12、13、16)、胶原 (COL15A、10A1、8A2、1A1、24A1、6A3、7A1、1A2、5A2、3A1、17A1、

14A1) 和 IL-13 途径基因 (IL-13、IL13R α 2、POSTN 和 CCL13)。事实上, IPF 中最显著提高的基因是 IL13R α 2, 其显示 44 倍的变化 ($q = 3.4 \times 10^{-14}$)。我们通过进行定量 RT-PCR 验证了此观察结果 (图 9)。

[0276] 表 10. IPF 中与 IL-13 信号传递相关的差异表达基因 (上调 >1.5 倍, $q < 0.05$) 的部分列表

[0277]

探针 ID	基因符号	基因名称	EntrezID	LogFC	p-值	调整的 p-值
A_23_P85209	IL13RA2	白介素 13 受体, $\alpha 2$	3598	5.46608533	1.06E-17	5.45E-14
A_23_P251031	IL13	白介素 13	3596	3.60162356	8.56E-06	1.14E-04
A_23_P55632	SERPINB3	丝氨酸蛋白酶抑制剂 肽酶抑制剂, 进化枝 B(卵清蛋白), 成员 3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_24_P347411	POSTN	骨膜蛋白, 成骨细胞特异性因子	10631	2.10394126	5.96E-07	1.35E-05
A_24_P125335	CCL13	趋化因子(C-C 基序)配体 13	6357	1.10440762	0.00986751	3.53E-02
A_23_P70818	SMO	平滑同源物(果蝇)	6608	1.44870366	1.65E-11	2.81E-09
A_23_P105251	GLI1	GLI 家族锌指 1	2735	2.08669039	1.87E-10	1.96E-08
A_23_P500034	GLI2	GLI 家族锌指 2	2736	1.57463899	8.12E-09	3.98E-07
A_24_P398572	IGF1	胰岛素-样生长因子 1 (生长素介质 C)	3479	1.70343868	0.00081381	4.79E-03
A_23_P153571	IGFL2	IGF-样家族成员 2	147920	4.11862384	5.27E-08	1.90E-06

[0278]

A_23_P102113	WNT10A	无翅型 MMTV 整合位点 家族, 成员 10A	80326	2.83702687	1.14E-17	5.45E-14
--------------	--------	-----------------------------	-------	------------	----------	----------

[0279] 探针 ID = Agilent 全人基因组微列阵上的探针的标识号; 基因符号 = NCBI Entrez 基因符号; 基因名称 = NCBI Entrez 基因名称; ENTREZ ID = NCBI Entrez 基因 ID; logFC = IPF 样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值减去健康对照样品中的表达水平以 2 为底的对数的平均值; p-值 = 来自 limma 分析的线性模型中诊断项的效应显著性的标称 p-值; 调整的 p-值 = 在基因将是统计上显著的最大 p-值下估计的错误发现率。

[0280] IL-13 在培养的原代肺成纤维细胞中诱导 IL13R α 2 表达

[0281] 如上文所讨论,与对照、非 IPF 样品相比,IPF 样品中最高度差异表达的基因是 IL13R α 2,显示在 IPF 中比在对照中高平均 44 倍的表达。我们尝试发展易处理和相关的肺组织培养系统以更好地理解 IL13R α 2 的作用。将原代肺成纤维细胞 (IMR90) 培养在生长因子减少 (GFR) 的基质胶上以模拟比塑料更接近生理状态的生长基质。(除非另有说明,此实施例中的所有培养实验都用培养在 GFR 基质胶上的细胞进行)。IL-13 或 IL-4 刺激 IMR90 细胞导致 IL13R α 2 的实质性 ($\sim$ 8-10) 诱导 (图 10)。因此,这提供了实验系统来用封闭抗体和小分子抑制剂研究内源诱导的而不是异位过表达的 IL13R α 2 的功能。

[0282] IL13R α 2 诱导减弱了原代肺成纤维细胞中来自 IL13R α 1/IL4R α 的信号

[0283] IL13R α 2 具有短的胞质尾,该胞质尾缺乏典型的信号传递结构域。一些证据支持以下模型:IL13R α 2 的胞外结构域 (其可结合 IL-13) 作为 IL13R α 1/IL4R α 受体复合体的诱饵发挥作用并减弱依赖 STAT6 的 IL-13 信号。在研发该组织培养系统期间,我们观察到, TNF α 刺激诱导 IL13R α 2 在 IMR90 细胞中的表达 (图 11A)。虽然已显示 TNF α 增强依赖 IL-13 的 IL13R α 2 诱导,但未显示 TNF α 单独处理在其他系统中上调 IL13R α 2。此培养系统的一个主要不同是将细胞培养在基质胶上。为了测试 IL-13 存在于 GFR 基质胶中的可能性,我们进行了灵敏的 IL-13 测定,其显示培养在生长因子减少的基质胶上的细胞中检测不到 IL-13 (数据未显示)。

[0284] TNF α 刺激的 IMR90 细胞显示提高的 IL13R α 2 表达提供了研究提高的 IL13R α 2 表达对 IL-13 刺激的下游事件的影响的可能性。我们通过测量表达不受 TNF α 处理影响的已知 STAT6 应答性基因 (CCL26 和骨膜蛋白) 的转录物水平来监测了对 IL-13 和 IL-4 的剂量反应性 (图 11B)。如通过 CCL26 和骨膜蛋白基因诱导评估,已用 TNF α 预刺激 (其导致增加的 IL13R α 2 表达) 的细胞显示对 IL-13 但不是 IL-4 (数据未显示) 降低的敏感性 (图 11B),这可以通过提高 IL-13 的剂量来克服。需要浓度高近 10 倍的 IL-13 以在已用 TNF α 预刺激并显示提高的 IL13R α 2 表达的细胞中达到相同水平的 IL-13 的 CCL26 或骨膜蛋白基因诱导,而 TNF α 预处理未改变对 IL-4 刺激 (数据未显示) 的敏感性。总结起来,这些数据显示, TNF α 介导的 IL13R α 2 诱导特异性减弱 IL-13 结合 IL13R α 1/IL4R α 受体复合体和通过 IL13R α 1/IL4R α 受体复合体传递信号的能力,与 IL13R α 2 作为诱饵受体的作用一致。

[0285] 不同的抗-IL13 抗体选择性阻断与 IL13R α 1/IL4R α 或 IL13R α 2 的结合

[0286] 虽然以上数据与 IL13R α 2 就 IL13R α 1/IL4R α 信号传递而言是诱饵受体的模型一致,但仍存在旁路下游信号源自 IL13R α 2 的可能性。通过使用破坏来自特异性 IL13/IL4 受体复合体的信号传递的特异性封闭抗体,我们采用无偏见的基因表达概况分析法来鉴定潜在的 IL13R α 2 信号。一种抗体 (抗-IL-13mAb1) 阻断 IL-13 将 IL4R α 招募至 IL13R α 1 的能力,但不影响 IL-13 与 IL13R α 2 的结合;第二抗体 (抗-IL-13mAb2) 阻断 IL-13 与 IL13R α 1 和 IL13R α 2 结合的能力。虽然两种抗体都阻止依赖 IL13R α 1/IL4R α 的 STAT6 激活而不影响通过 IL13R α 1/IL4R α 受体复合体进行的 IL-4 信号传递,但只有抗-IL-13mAb2 还可以阻断 IL-13 与 IL13R α 2 的结合。为了在原代成纤维细胞培养系统中评价这些抗体中的每一种的活性,在存在或缺乏 mAb1 或 mAb2 封闭性抗-IL-13 抗体的情况下用 IL-13 和 / 或 IL-4 处理细胞。如下文所述,我们测量了 STAT6 的 IL-13/IL-4 信号传递下游的标志

CCL26 和骨膜蛋白的转录物水平。

[0287] 我们首先表征了仅由 IL-13 或 IL-4 在原代肺成纤维细胞培养系统中诱导的基因表达。用 10ng/ml IL-13 或 3ng/ml IL-4 刺激细胞 48 小时,然后提取 RNA,并进行基因组范围的表达概况分析。相对于模拟处理的细胞,各细胞因子诱导的谱显示近乎相同的基因表达变化(数据未显示)。我们未在 IL-4 和 IL-13 刺激条件之间鉴定到统计上显著的差异,明显地表明两种细胞因子都激活相同的 IL13R α 1/IL4R α 受体复合体信号传导途径下游。

[0288] 我们随后在有和无封闭性抗 -IL-13 抗体 mAb1 和 / 或 mAb2 以及细胞因子处理的多种条件下测量了 IMR90 原代肺成纤维细胞培养系统(用 TNF α 预刺激)中 CCL26 和骨膜蛋白(POSTN)的转录物水平。在图 14 中,多种处理条件连同各条件的基因表达结果一起显示在图中。

[0289] 由于 IL13R α 2 在响应之前的信号时内源性上调表明它的作用是调节后续 IL-13 信号传递,对于图 12 中所示的实验结果,我们在第二刺激之前通过用 TNF α 预处理细胞诱导了 IL13R α 2 表达。用 IL-4 或足够高水平的 IL-13 刺激克服了 IL13R α 2 的负调节作用后,显著诱导了 CCL26 和骨膜蛋白转录物(即 CCL26 $\sim$ >100x;骨膜蛋白 $\sim$ >10x)。在用 IL-13 和抗 -IL-13mAb1 或抗 -IL-13mAb2、或 mAb 的组合处理细胞时,CCL26 和骨膜蛋白的诱导几乎完全消失(图 12)。但是,抗 -IL-13mAb1 和抗 -IL-13mAb2 都不阻断 IL-4 介导的 CCL26 或骨膜蛋白诱导(图 12),这与各 mAb 选择 IL-13 而非 IL-4 一致。通过测量 CCL26 和骨膜蛋白表达水平,未能检测到阻断 IL13R α 1(用抗 -IL-13mAb1)和阻断 IL13R α 1 和 IL13R α 2(用抗 -IL-13mAb2)之间可辨别的差异。

[0290] 我们随后试图评估 IL13R α 2 对总体基因表达谱的贡献。我们在设置这些实验时的一个考虑是 IL13R α 2 信号传递有可能需要同时从 IL4R α /IL13R α 1 受体复合体发出共信号(co-signal)。由于 IMR90 细胞缺乏共同的 γ 链(IL2R γ ,数据未显示),IL-4 介导的信号传递仅通过 IL4R α /IL13R α 1 受体复合体的激活发生。因此,用细胞因子 IL-4 处理 IMR90 细胞将以类似于用 IL-13 处理的方式激活通过 IL4R α /IL13R α 1 的信号传递,因此,IL-4 处理这些细胞是 IL-13 通过 IL4R α /IL13R α 1 进行信号传递的替代。

[0291] 图 13A 显示来自用 IL-13 或 IL-13 和 IL-4 处理且在每种情况下使用 mAb1 或 mAb2 处理的细胞的微列阵数据的分析。如可以看到,此分析揭示,在用 IL-13 以及 mAb1 或 mAb2 处理细胞之间及用 IL-13 和 IL-4 以及 mAb1 或 mAb2 处理细胞之间(在所有情况下都用 TNF α 预处理细胞)都没有显著差异表达的基因(调整的 p-值 <0.01)。在 IL-13 刺激的细胞中,在缺乏 IL-4 的情况下,mAb1 和 mAb2 的抑制几乎相同(图 13A);而在 IL-4 存在的情况下,mAb1 和 mAb2 都未导致有意义的基因表达变化(图 13B)。总结起来,这些数据表明,配体-受体 IL13-IL13R α 2 结合未诱导信号传递事件,其导致基因表达变化。

[0292] IPF 中及 IL13/IL4 刺激的原代肺成纤维细胞中提高的 GLI1 表达

[0293] IPF 群组中最显著表达的基因之一是 GLI1(图 14),GLI1 是发育途径中的重要转录因子。已显示 Hedgehog(Hh) 和 TGF β 信号传递诱导 GLI1 表达。GLI1 和 IL13R α 2 表达水平在 IPF 样品内显著相关($r_s = 0.69$, q-值 <0.01)。在细胞培养物微列阵实验中,我们发现,IL13 刺激上调 GLI1 表达(数据未显示)。因此,我们假设,与 IL13R α 2 一样,GLI1 也可以由 IL13 信号传递直接或间接调节。为了验证此观察结果,我们用 IL13 刺激原代肺成纤维细胞(培养在基质胶上),并通过 RT-qPCR 测量 GLI1 表达。IL13 刺激诱导了 GLI1 表

达 ($\sim 4x$) (数据未显示)。

[0294] Hh 或 TGF β 信号传递的阻断未抑制 IL13 诱导的 GLI1 表达

[0295] 由于 Hh 途径活性可以诱导 GLI1 表达,我们假设 IL13 刺激导致 Hh 途径的依赖 Hh 的自分泌 / 旁分泌刺激。为了测试这种可能性,我们使用了小分子 Hh 途径抑制剂 (本文中称为 M1),其通过补缀结合 (patched binding) 来阻断 Hh 配体诱导平滑去抑制 (smoothened derepression) 的能力 (Yauch 等, Nature455:406-410 (2008), 其指 Cur-691 或 HhAntag691)。M1 预处理阻断了 SHH 介导的 GLI1 诱导,但不影响 IL13 依赖的 GLI1 诱导 (图 15)。

[0296] 已显示 TGF β 刺激细胞诱导 GLI1 表达, IL13 可以在一些实验系统中诱导 TGF β 活性。为了评价 IL13 依赖的 GLI1 诱导是否通过依赖 TGF β 的自分泌 / 旁分泌机制发生,用两种 TGF β 途径抑制剂 (抗体 1D11 [Edwards 等, J. of Bone and Mineral Res. 25:2419-2426, 2010] 和 TGFBIIRb-Fc [R&D Systems, 目录号 1003-RT-050]) 预处理细胞。虽然两种 TGF β 途径抑制剂都阻断 TGF β 介导的 GLI1 (已知的 TGF β 应答性基因) 诱导 (图 16A),但都不影响 IL13 依赖的 GLI1 诱导 (图 16B)。

[0297] 这些数据表明之前未描述过的 IL13 和 GLI1 诱导之间的关系,其不由之前表征过的 Hh 和 TGF β 信号传导途径介导。

[0298] 肺组织的基因表达分析揭示在与非 IPF 对照相比时 IPF 患者中明显改变的转录组。与纤维化性质 (fibrotic diathesis) 一致,我们发现,涉及重塑胞外基质的许多基因在 IPF 中以提高的水平表达。此外,本研究之前公开的来自相似大小研究的表达微阵列数据之间显著的转录组范围相似度支持我们的结论,在本研究中观察到的基因表达模式广泛指示在人 IPF 中存在合理的具有活性的过程,而不是由误诊或技术或分析假象引起的假信号。

[0299] 在临床前模型中, IL13 已显示为潜在的纤维化驱动者。在 IPF 活检组织中,我们观察到了 IL13 途径活性的转录证据,之前描述的具有提高的表达的 IL13 靶基因包括骨膜蛋白、CCL13、CCL18 和 IL13R $\alpha 2$;此外, IL13 本身在 IPF 中以提高的水平表达。IPF 中最强烈和持续地上调的基因是 IL13R $\alpha 2$ 。之前的研究就 IL13R $\alpha 2$ 的作用获得了不同的结论,即 1) IL13R $\alpha 2$ 可以转导支持增加的纤维化的信号或 2) IL13R $\alpha 2$ 是 IL13 的诱饵受体且无信号传递能力。鉴于这些形成鲜明对比的可能性,提供了以下挑战:确定我们的活检组织微阵列数据中的 IL13 相关基因表达模式是否表明 IL13R $\alpha 2$ 的高表达反映 IPF 中 IL13 活性的净正作用或净负作用及 IL13R $\alpha 2$ 可能的功能。

[0300] 为了在易处理的系统中阐明 IL13R $\alpha 2$ 的作用,我们发展了使用培养在生长因子减少的基质胶上的 IMR90 细胞 (人原代肺成纤维细胞系) 的体外系统。在用 IL13 刺激时,这些细胞显示增加的 IL13R $\alpha 2$ 表达。我们观察到 TNF α 也可在此系统中强烈诱导 IL13R $\alpha 2$ 。由于未知 TNF α 是否通过 STAT6 传递信号,我们探究此特征是内源地而不是异位地调节 IL13R $\alpha 2$ 水平,并测定 IL13R $\alpha 2$ 表达对 IL13 信号传递的影响。在用 TNF α 预刺激细胞时,如通过两个 IL13 靶基因 (骨膜蛋白和 CCL26) 评估,它们显示对 IL13 刺激的降低的敏感性;相对于未用 TNF α 预刺激的细胞,用 TNF α 预刺激的细胞需要约 10 倍的 IL13 浓度来达到相当的骨膜蛋白和 CCL26 诱导。但是, TNF α 预刺激未显示影响 IL13R $\alpha 1$ /IL4R α 复合体固有的信号传递能力,因为细胞无论是否进行 TNF α 预处理都保持对 IL4 的相似的敏感性。

这些观察结果支持 IL13R α 2 作为 IL13-IL13R α 1/IL4R α 相互作用的诱饵受体发挥作用的模型;但是,这些数据未排除 IL13R α 2 可以产生其自己的独特的胞内信号的可能性。为了更透彻地研究这种可能性,我们利用了允许选择性阻断 IL13 与两种受体复合体的相互作用的试剂。MAb2 是破坏 IL13 与 IL13R α 1 和 IL13R α 2 结合的能力的封闭抗体。但是,MAb1 阻断 IL13 与 IL4R α 结合并通过 IL4R α 传递信号的能力,但不阻断与 IL13R α 2 的结合。我们推断,通过比较在这些封闭抗体的任一种的存在下用 IL13 处理的细胞的表达谱,我们可以鉴定 IL13R α 2 特异性下游转录事件(如果存在)。我们未能在用任一种抗体阻断细胞的条件之间鉴定出单个统计上显著的差异,这显著地表明,在此细胞培养系统中,IL13 单独与 IL13R α 2 结合未产生影响基因表达的胞内信号级联放大。由于在体内 IL13-IL13R α 2 结合可能与 IL13R α 1/IL4R α 同 IL13 结合同时发生,我们试图确定 IL13R α 2 信号是否依赖于 IL13R α 1/IL4R α 复合体的同时结合。但是,尚未鉴定出选择性阻断 IL13-IL13R α 2 相互作用而不影响 IL13-IL13R α 1/IL4R α 信号传递的试剂。由于 IL13 和 IL4 都与 IL13R α 1/IL4R α 信号传递复合体结合并通过 IL13R α 1/IL4R α 信号传递复合体传递信号,且产生相同的表达谱,我们推断,我们可以如上述 MAb1 对 MAb2 阻断实验通过引入 IL4 来模拟活性 IL13R α 1/IL4R α 信号。在此背景中,我们仍未能鉴定出任何 IL13R α 2 依赖的信号传递事件。总结起来,这些数据强烈支持 IL13R α 2 在肺成纤维细胞中是诱饵受体的模型。

[0301] 我们还已显示,已知在肺发育、EMT、肿瘤发生和组织修复中重要的 GLI1 在 IPF 患者中相对于对照受试者上调。我们还观察到,IL13 导致培养的成纤维细胞中的 GLI1 表达增加。这些结果表明,GLI1 可以支持成纤维细胞的持续生长和存活,所述成纤维细胞可以阻断创伤愈合消散的终末期,并支持持续纤维化。

[0302] 实施例 3. II 期临床研究

[0303] 研究原理

[0304] IPF 表征为不同程度的间质纤维化。IPF 患者中的纤维化过程涉及几种胞外基质蛋白,包括 I、III 和 IV 型胶原、纤连蛋白及生腱蛋白 -C 与间充质细胞的异常增殖、肺结构的扭曲和上皮成纤维细胞病灶的产生。IL-13 和 IL-4 是组织纤维化的强诱导物。在非临床模型中,IL-13 在小鼠肺中的转基因过表达足以诱导胶原基因表达和严重的上皮纤维化(Lee 等 2001, J Exp Med 194:809-22;Zhu 等 1999, J Clin Invest 103:779-88)。相反,靶向破坏 IL-13 的小鼠和用对 IL-13 特异的封闭抗体处理的小鼠在博来霉素和异硫氰酸荧光素诱发的肺纤维化模型中显示减少的胞外基质沉积(Belperio 等 2002, Am J Respir Cell Mol Biol 27:419-27;Kolodsick 等 2004, J Immunol 172:4068-76;Liu 等 2004, J Immunol 173:3425-31)。

[0305] 多项研究已得出 IPF 患者中 IL-13 的表达和活性提高的结论。发现与正常对照相比,来自 IPF 患者的肺活检组织样品中 IL-13 及 IL-13 受体(IL-13R) IL-13R α 1 和 IL-13R α 2 的表达在信使 RNA 和蛋白质水平都增加(Jakubzick 等 2004, Am J Pathol 164:1989-2001)。还发现与正常对照相比,来自 IPF 患者的支气管肺泡灌洗液中的 IL-13 提高。重要地,这些样品中 IL-13 的水平与肺功能的关键测量、预测用力肺活量(FVC)的百分比及肺对一氧化碳的扩散量(DL_{CO})负相关(Park 等 2009, J Korean Med Sci 24:614-20),表明 IL-13 在 IPF 患者中的致病功能。

[0306] 除 IL-13 本身外,还显示已知将在 IL-13 信号传递的下游表达的血清生物标志

在 IPF 患者中提高。骨膜蛋白（在哮喘患者中存在的 IL-13 可诱导蛋白，其血清水平与 lebrikizumab 的治疗益处相关 (Corren 等 2011, N Engl J Med 365(12):1088-98)）在 IPF 患者的血清中也提高，且已在 6 个月的时期内显示骨膜蛋白的水平与肺功能参数 (FVC 和 DL_{CO}) 负相关 (Okamoto 等 2011, Eur Respir J 37:1119-27)。根据在骨膜蛋白缺失的小鼠中观察到的减少的博来霉素诱发的肺纤维化提出了骨膜蛋白是 IPF 中的致病因子 (Uchida 等 2012, Am J Respir Cell Mol Biol 146:677-86)，表明 IL-13 可以通过其他机制促成此疾病。IL-13 信号传递还在体外诱导从巨噬细胞强烈地产生趋化因子 (C-C 基序) 配体 18，分离自 IPF 患者而不是正常对照的肺泡巨噬细胞组成性表达 CCL-18 蛋白 (Prasse 等 2006, Am J Respir Crit Care Med 173:781-92)。与骨膜蛋白一样，CCL-18 在 IPF 患者的血清中增加，已报道 CCL-18 水平与疾病进展和预测相关，具有较高的基线 CCL-18 水平的患者经历较大的 FVC 下降和较高的死亡率 (Prasse 等 2007, Arthritis Rheum 56:1685-93; Prasse 等 2009, Am J Respir Crit Care Med 179:717-23)。总结起以，这些数据强烈表明，IL-13 表达在 IPF 患者中提高，从该细胞因子至多种纤维化相关细胞类型的信号在驱动发病中发挥关键作用。

[0307] 抗-IL13 抗体 (lebrikizumab) 氨基酸序列

[0308] 下表显示 lebrikizumab 的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 区的氨基酸序列，以及 VH、VL、重链序列和轻链序列。如下表 11 中所示，VH 和重链可以包括 N 端谷氨酰胺，重链还可以包括 C 端赖氨酸。如本领域公知，N 端谷氨酰胺残基可以形成焦谷氨酸，C 端赖氨酸残基可以在制备过程中剪掉。

[0309] 表 11. 抗-IL13 抗体 (lebrikizumab) 氨基酸序列

[0310]

CDR-H1 (SEQ ID NO.: 1)	Ala Tyr Ser Val Asn
CDR-H2 (SEQ ID NO.: 2)	Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
CDR-H3 (SEQ ID NO.: 3)	Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

[0311]

CDR-L1 (SEQ ID NO.: 4)	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
CDR-L2 (SEQ ID NO.: 5)	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
CDR-L3 (SEQ ID NO.: 6)	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
VH (SEQ ID NO.: 7)	Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VH (SEQ ID NO.: 8)	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VL (SEQ ID NO.: 9)	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

[0312]

	Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
H 链 (SEQ ID NO.: 10)	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLs AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDt ATYYCAGDGY YPYAMDnWGQ GSlVTvSSAS tKGpSVfPLA pCSRStSESt AALGCLVKDY FPEPVTvSWN SGALTSGvHT FPAVLQSSGL YSLSSvVTVP SSSLGtKtYT CNVdHKPSNT KVDKRvESKY GPPCpPCpAP EFLGGpSVFL FPPKPKDtLM ISRTPEVtCV VVDvSQEDPE vQFNWYVDGv EVHNAKtKPR EEQFNStYRV VSVLTvLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQvYtLP PSQEEMtKNQ VSLtCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVmHEAL HNHYtQKSLS LSLG
H 链 (SEQ ID NO.: 11)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLs AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDt ATYYCAGDGY YPYAMDnWGQ GSlVTvSSAS tKGpSVfPLA pCSRStSESt AALGCLVKDY FPEPVTvSWN SGALTSGvHT FPAVLQSSGL YSLSSvVTVP SSSLGtKtYT CNVdHKPSNT KVDKRvESKY GPPCpPCpAP EFLGGpSVFL FPPKPKDtLM ISRTPEVtCV VVDvSQEDPE vQFNWYVDGv EVHNAKtKPR EEQFNStYRV VSVLTvLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQvYtLP PSQEEMtKNQ VSLtCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVmHEAL HNHYtQKSLS LSLG
H 链 (SEQ ID NO.: 12)	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLs AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDt ATYYCAGDGY YPYAMDnWGQ GSlVTvSSAS tKGpSVfPLA pCSRStSESt AALGCLVKDY FPEPVTvSWN SGALTSGvHT FPAVLQSSGL YSLSSvVTVP SSSLGtKtYT CNVdHKPSNT KVDKRvESKY GPPCpPCpAP EFLGGpSVFL FPPKPKDtLM ISRTPEVtCV VVDvSQEDPE vQFNWYVDGv EVHNAKtKPR EEQFNStYRV VSVLTvLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQvYtLP PSQEEMtKNQ VSLtCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVmHEAL HNHYtQKSLS LSLGK

[0313]

H 链 (SEQ ID NO.: 13)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDI ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSLGK
L 链 (SEQ ID NO.: 14)	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSEFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNNEDPR TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLV STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

[0314] 剂量、给药方案和原理

[0315] 这是 lebrikizumab 在 IPF 患者中的随机化、多中心、双盲、安慰剂对照、平行组研究。将在全球范围内约 100 个地点招募约 250 名患者（每个治疗组 125 名患者）进入研究。总治疗持续时间将基于所有受试者接受至少 13 个剂量（q4wk）的隐蔽治疗和在最长达 2.5 年的时期内观察到至少 75 个主要端点事件。

[0316] 提供书面知情同意书的患者将开始筛查期（≤ 4 周）以确定进入标准。筛查期结束时，按 1:1 的比例将合格的患者随机化至皮下注射（SC）lebrikizumab250mg 或安慰剂的双盲治疗，所述 lebrikizumab250mg 或安慰剂从预装注射器施用。将集中进行区组随机化，并按肺功能（FVC < 50%、50%至 75%、> 75%预测）及按区域（北美、欧洲、其他）分层。

[0317] 将通过每 4 周 SC 注射来施用研究药物，第一次注射发生在随机化就诊时（第 1 天）。将在手臂、大腿或腹部进行 SC 注射，所有患者将每次给药就诊时接受总计两次注射。患者将在最短给药期（第 0 至 48 周）内接受最少 13 个剂量的隐蔽治疗。患者将在延长的治疗期内继续每 4 周接受隐蔽研究治疗，直至发生了至少 75 个主要端点事件，且招募的最后一位患者已得到接受至少 13 个剂量的隐蔽治疗的机会。一旦发生了这些事件，所有进行中的患者都将在其研究药物最后一个剂量后约 4 周返回诊所，以在治疗结束（EOT）的就诊时及 18 周安全随访期内的两次后续就诊时完成随访评估。取决于招募和事件频率，预期治疗的总持续时间在 1 至约 2.5 年的范围内。对于各患者，治疗期将不延长超过 2.5 年，预期最长研究持续时间为 2.8 年。将鼓励选择提前停用研究药物的患者留在研究中，并完成所有剩余的评估。如果这不可行，则患者应进入并完成安全随访期，除非知情同意书已撤回。

[0318] 剂量和给药方案原理如下。Lebrikizumab 是抑制 IL-13 信号传递的人源化 IgG4

单克隆抗体。非临床和临床数据都表明,IL-13 信号传递在 IPF 的发病中发挥重要作用(见上文)。Lebrikizumab 的作用机制是阻断 IL-13 和它的受体之间的相互作用,从而阻断 IL-13 的胞内信号传递。由于细胞因子的快速代谢,假定最优 IL-13 阻断需要在肺中维持 lebrikizumab 的持久浓度。假设肺中的 IL-13 水平是在文献中报道的范围内(200–2000pg/mL;Hart 2001,Immunology and Cell Biology79:149–53),血清:肺分配比为 1:500,预期 10 µg/mL 的血清浓度将维持肺中足够高的药物水平以中和 IL-13。此目标浓度也与在 II 期研究中观察到的 12 周波谷浓度(平均值 ±SD:28.8±11.9 µg/mL)的下端一致,其中 lebrikizumab 显示降低患者中严重哮喘加重的速率的有效性,该患者尽管有吸入糖皮质激素治疗也未使其哮喘得到控制。类似于哮喘患者,IPF 患者具有与 IL-13 相关的提高水平的生物标志,暗示在哮喘中产生临床益处的 lebrikizumab 浓度也可以在 IPF 中产生生物学活性。

[0319] 对于 IPF 患者中的 II 期研究,选择每 4 周 (q4wk) 250mg 的剂量以将稳态血清波谷浓度维持在此目标浓度或此目标浓度以上。假设 lebrikizumab 在 IPF 患者中的药物动力学类似于在哮喘患者中的药物动力学,预期此剂量 / 方案将维持 ~ 30 µg/mL 的平均稳态波谷浓度。比目标高三倍的浓度容许 IPF 患者中减少的肺分配(由更厚的间质引起)及存在自身抗体时 lebrikizumab 可能更快的清除(Papiris 等 2012,Curr Opin Pulm Med18:433–40)。之前的 lebrikizumab 在哮喘中的临床研究的安全性数据库也支持 250mg 剂量 q4wk 的选择。

[0320] Lebrikizumab 和安慰剂将在预装注射器中提供。每个注射器仅用于单剂量 SC 施用,且不含防腐剂。活性研究药物的每个预装注射器包含 1mL lebrikizumab 浓度为 125mg/mL 的无菌液体。制剂还包含组氨酸乙酸盐 (20mM)、蔗糖 (60mg/mL)、聚山梨醇 20 (约 0.03%) 和无菌注射用水 USP, pH5.4–6.0。安慰剂的每个预装注射器包含 1mL 无菌液体安慰剂制剂,其由含组氨酸乙酸盐 (20mM)、蔗糖 (75mg/mL) 和聚山梨醇 20 (约 0.03%) 的无菌注射用水组成, pH5.4–6.0。研究药物和安慰剂的预装注射器应在 2°C –8°C 冷藏,并防止过度的光和热。注射器不应冷冻、摇动或在室温保存。

[0321] 纳入和排除标准

[0322] 此研究中将招募约 250 名年龄为 35–80 岁的 IPF 患者。纳入标准包括以下:前 5 年内基于 2011ATS/ERS 准则筛选,在基线时诊断患有或可能患有 IPF;筛查时 FVC>40% 预测且 ≤ 90% 预测;筛查时 DL_{CO}>25% 预测且 ≤ 90% 预测;对于接受口服糖皮质激素治疗的患者:第 1 天之前稳定剂量 ≤ 10mg 强的松(或等同物) ≥ 4 周;能够无辅助行走 ≥ 100 米。排除标准包括以下:对生物制剂严重变态反应或过敏反应的历史或已知对 lebrikizumab 注射的任意成分超敏反应;间质性肺疾病的其他已知原因的证据;预期 6 个月内肺移植;显著的阻塞性肺疾病或其他 IPF 以外的临床上显著的肺疾病或其他临床上显著的医学疾病(包括感染性疾病)的证据;纽约心脏协会(New York Heart Association) IV 类慢性心力衰竭或左心室射血分数 <35% 的历史证据;筛查前 30 天内由于 IPF 加重而住院;体重 <40kg。

[0323] 有效性结果测量

[0324] 主要有效性结果测量是无进展存活(PFS),其定义为从研究治疗随机化至首次出现任意以下事件的时间:死于任意原因;因任意原因非选择性住院;FVC(L) 从基线减少 ≥ 10%。次要有效性结果测量是:绝对 FVC(L) 的年变化速率;第 52 周时 DL_{CO}(mL CO/分

钟 $-1/\text{mmHg}-1$)从基线减少 $\geq 15\%$;从随机化至因任意原因死亡或非选择性住院的时间;IPF中评估生活质量的工具(ATAQ-IPF)从基线至第52周的变化;从随机化至FVC(L)首次相对于基线减少 $\geq 10\%$ 的时间;绝对 DL_{CO} ($\text{mL CO}/\text{分钟}-1/\text{mmHg}-1$)的年变化速率;6分钟步行距离(6MWD)从基线至第52周的变化。探究性结果测量是:FVC([L]和预测值的百分比)从基线至第52周的变化;FVC(L)从基线至第52周的百分比变化;绝对FVC(L)从基线至第52周变化200mL或10%的发生率; DL_{CO} ($\text{mL CO}/\text{分钟}-1/\text{mmHg}-1$)和预测值的百分比)从基线至第52周的变化; DL_{CO} ($\text{mL CO}/\text{分钟}-1/\text{mmHg}-1$)从基线至第52周的百分比变化;基线时接受补充供氧治疗的患者的静息氧流速从基线至第52周的变化;基线时未接受补充供氧的患者从随机化至加入补充供氧治疗的时间;从随机化至因任意原因非选择性住院的时间;从随机化至首例急性IPF加重的时间;从随机化至首例IPF恶化事件的时间;肺HRCT上的放射照像结果(包括定量肺纤维化(QLF)得分)从基线至第24周和第52周的变化;6分钟步行测试(6MWT)中的行走距离从基线的变化;血清生物标志(例如骨膜蛋白、CCL-18、YKL40、COMP、OPN、CCL-13)从基线的变化;EuroQo15维问卷(EQ-5D)从基线至第52周的变化。

[0325] 研究评估

[0326] 特发性肺纤维化加重

[0327] 将IPF加重定义为符合以下标准的事件:之前30天内未能解释的恶化或出现呼吸困难;叠加在与常见的间质性肺炎(UIP)一致的网状或蜂窝状背景模式上的新的双侧毛玻璃样异常和/或固结的放射学证据;缺乏备选的原因,如左心衰竭、肺栓塞、肺部感染(根据气管内吸出物或支气管肺泡灌洗(如果可得),或研究人员的判断),或其他导致急性肺损伤的事件(例如脓毒、误吸、创伤、再灌注肺水肿)。

[0328] 特发性肺纤维化疾病的恶化

[0329] 将“IPF疾病恶化”定义为符合以下的事件:(i)之前30天内未能解释的恶化或出现呼吸困难;(ii)以下任意两项:

[0330] 叠加在与UIP一致的网状或蜂窝状背景模式上的新的双侧毛玻璃样异常和/或固结的放射学证据;

[0331] 符合以下标准中的至少1项的肺功能恶化:

[0332] $-FVC(L)$,至少10%;

[0333] $-DL_{\text{CO}}(\text{mL CO}/\text{分钟}-1/\text{mmHg}-1)$,至少15%;

[0334] $-$ 氧饱和(SpO_2),至少4%;和

[0335] (iii)缺乏备选的原因,上文在IPF加重下列出的那些原因。

[0336] 肺活量测定法

[0337] 肺活量测定法(包括用于支气管扩张药测试的方法)将按基于ATS/ERS Consensus Statement(Miller等2005,Eur Respir J26:319-38)的研究“肺功能手册(Pulmonary Function Manual)”进行。该手册将包括关于设备、方案、患者说明和警惕的信息。要收集的肺活量测定将包括 FEV_1 和FVC值及呼气流量峰值,以及流量和体积-时间曲线。将用源自Hankinson及其同事(Hankinson等1999,Am J Respir Crit Care Med159:179-87)所述的国家健康与营养检查调查(National Health and Nutrition Examination Survey)数据集的方程来从这些体积测量得到的预测的 FEV_1 和FVC的百分

比。

[0338] 在按研究需要配置的计算机化肺活量测定系统上按照 ATS/ERS 肺活量测定标准化 (ATS/ERS Standardisation of Spirometry) (Miller 等 2005, Eur Respir J26:319-38) 所公开的指导进行肺活量测定。

[0339] DL_{CO} 将按照 ATS/ERS 指导 (包括血清血红蛋白浓度的校正) 进行, 并将连同 FVC 测量作为主要和次要端点评估的部分。数据 (包括操作法的图示) 的可用性将由不知情的读者确定。对于可用的操作法的重现性的计算将编程。

[0340] 高分辨率计算层析 X 射线照相术

[0341] 将进行俯卧 (prone) 肺 HRCT 扫描并记录。通过肺 HRCT 扫描诊断 IPF 应证明双基底、外周或胸膜下小叶内中隔增厚的对称模式、纤维化变化、蜂窝样和牵拉性支气管扩张或细支气管扩张。可以伴随肺的相关毛玻璃样浑浊。

[0342] 六分钟步行测试

[0343] 按照集中 ATS 指导 (ATS Statement 2002, Am J Respir Crit Care Med166:111-117) 进行 6MWT 测试。

[0344] 患者报告结果

[0345] 此研究中将得到患者报告结果 (PRO), 以更充分地表征 lebrikizumab 的临床概况。在研究期间, 根据当地语言的需要翻译的 PRO 文件将由患者指定的时间点整体完成。将使用两个 PRO 工具:

[0346] 特发性肺纤维化中评估生活质量的工具 (ATAQ-IPF)

[0347] ATAQ-IPF 是 74 项的 IPF 专用生活质量文件 (Swigris 等 2010, Health and Quality of Life Outcomes8:77)。评估生活质量的工具 (ATAQ) 包含 13 个领域: 咳嗽 (6 项)、呼吸困难 (6 项)、远见 (5 项)、睡眠 (6 项)、死亡率 (6 项)、衰竭 (5 项)、情感健康 (7 项)、社会参与 (5 项)、财务 (6 项)、独立 (5 项)、性健康 (5 项)、关系 (6 项) 和治疗 (6 项)。在从 1 (强烈不同意) 至 5 (强烈同意) 的量表上评估 ATAQ 的每一项。在 ATAQ 中规定无回忆期。ATAQ-IPF 得分和已知在 IPF 中重要的生理学变量之间的相关模式连同使用补充供氧的受试者和不使用补充供氧的受试者之间 ATAQ-IPF 得分的显著差异支持其有效性。

[0348] EuroQol5 维

[0349] EQ-5D 是基于一般偏好的健康相关生活质量问卷, 其提供健康状态的单个指数值 (Rabin 和 de Charro 2001, Ann Med33:337-43)。此工具包括关于移动性、自我护理、惯常活动、疼痛 / 不适和焦虑 / 抑郁的问题, 用来建立患者健康状态的组合材料。

[0001]

序列表

<110> 基因技术公司

<120> 预测、诊断和治疗特发性肺纤维化的方法

<130> P4841R1

<140>

<141>

<150> 61/707,411

<151> 2012-09-28

<150> 61/616,394

<151> 2012-03-27

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 1

Ala Tyr Ser Val Asn

1

5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 2

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

[0002]

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 3

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 4

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 5

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1	5
---	---

<210> 6

<211> 9

[0003]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1

5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 7

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr

1

5

10

15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser

20

25

30

Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

35

40

45

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

50

55

60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

65

70

75

80

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly

85

90

95

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu

[0004]

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 8

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1

5

10

15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr

20

25

30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35

40

45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65

70

75

80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

[0005]

115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 10

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 10

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser
20 25 30

Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
35 40 45

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
65 70 75 80

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
85 90 95

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

[0007]

	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
180	185	190	
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro			
210	215	220	
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
260	265	270	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
325	330	335	
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln			

[0008]

	340		345		350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly					
	355		360		365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro					
	370		375		380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser					
385		390		395	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu					
	405		410		415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His					
	420		425		430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly					
	435		440		
<210> 11					
<211> 444					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工序列的描述: 合成多肽					
<400> 11					
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln					
1		5		10	15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr					
	20		25		30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu					

[0009]

35	40	45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu		
65	70	75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		

[0010]

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		

[0011]

385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
435	440		
<210> 12			
<211> 444			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
<400> 12			
Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr			
1	5	10	15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser			
20	25	30	
Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala			
35	40	45	
Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser			
50	55	60	
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr			
65	70	75	80
Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly			

[0012]

85								90				95				
Asp	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Met	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Leu	
100								105				110				
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
115								120				125				
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
130								135				140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
145								150				155				160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
165								170				175				
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
180								185				190				
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
195								200				205				
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	
210								215				220				
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
225								230				235				240
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
245								250				255				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	

[0013]

260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
385	390	395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
420	425	430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

[0014]

435

440

<210> 13

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 13

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr

20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

[0015]

130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		

[0016]

305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
325	330	335	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
340	345	350	
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
355	360	365	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
370	375	380	
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
435	440	445	
<210> 14			
<211> 218			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
<400> 14			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly			

[0017]

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr	20	25	30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	65	70	75
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn	85	90	95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			

[0018]

180

185

190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195

200

205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

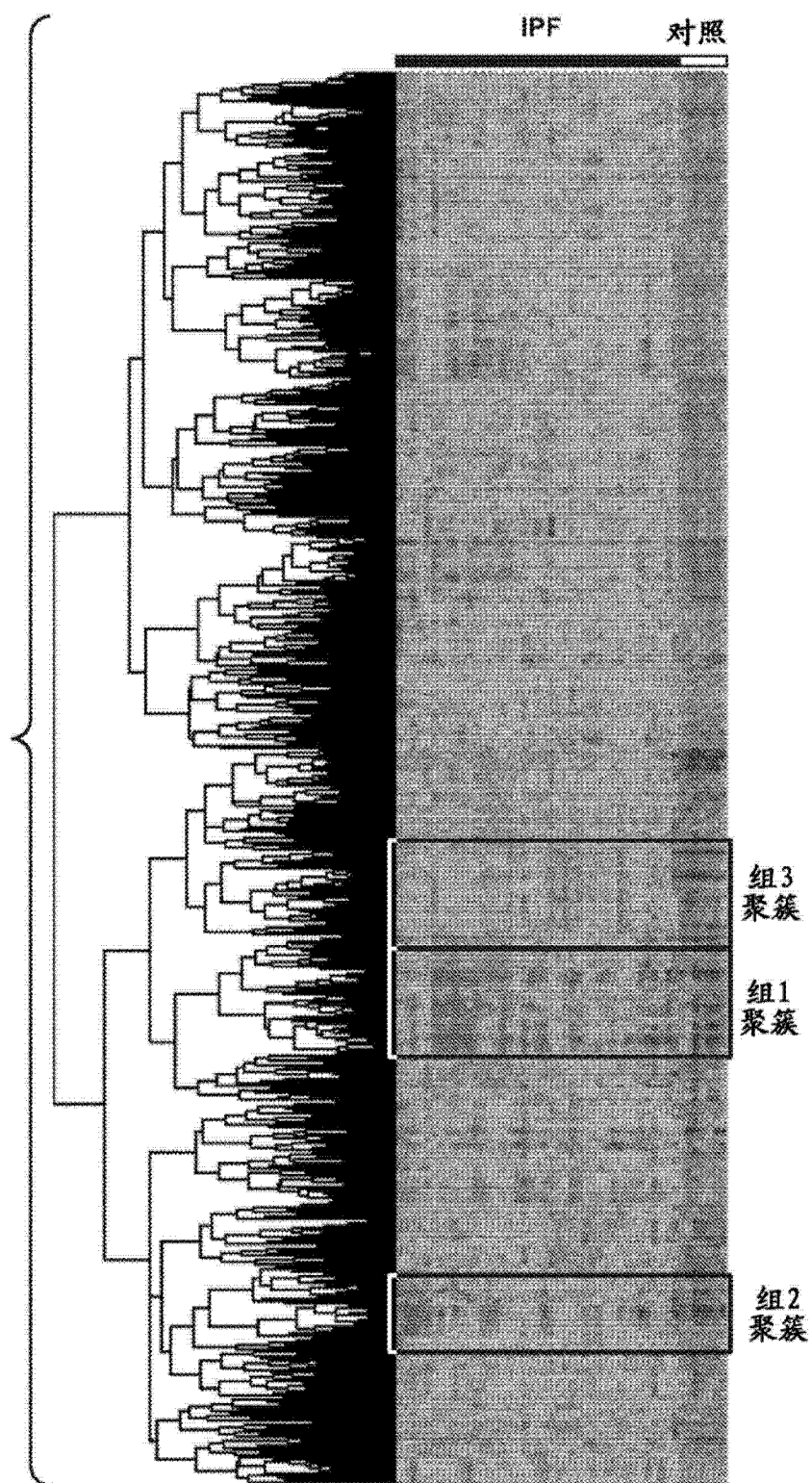


图 1A

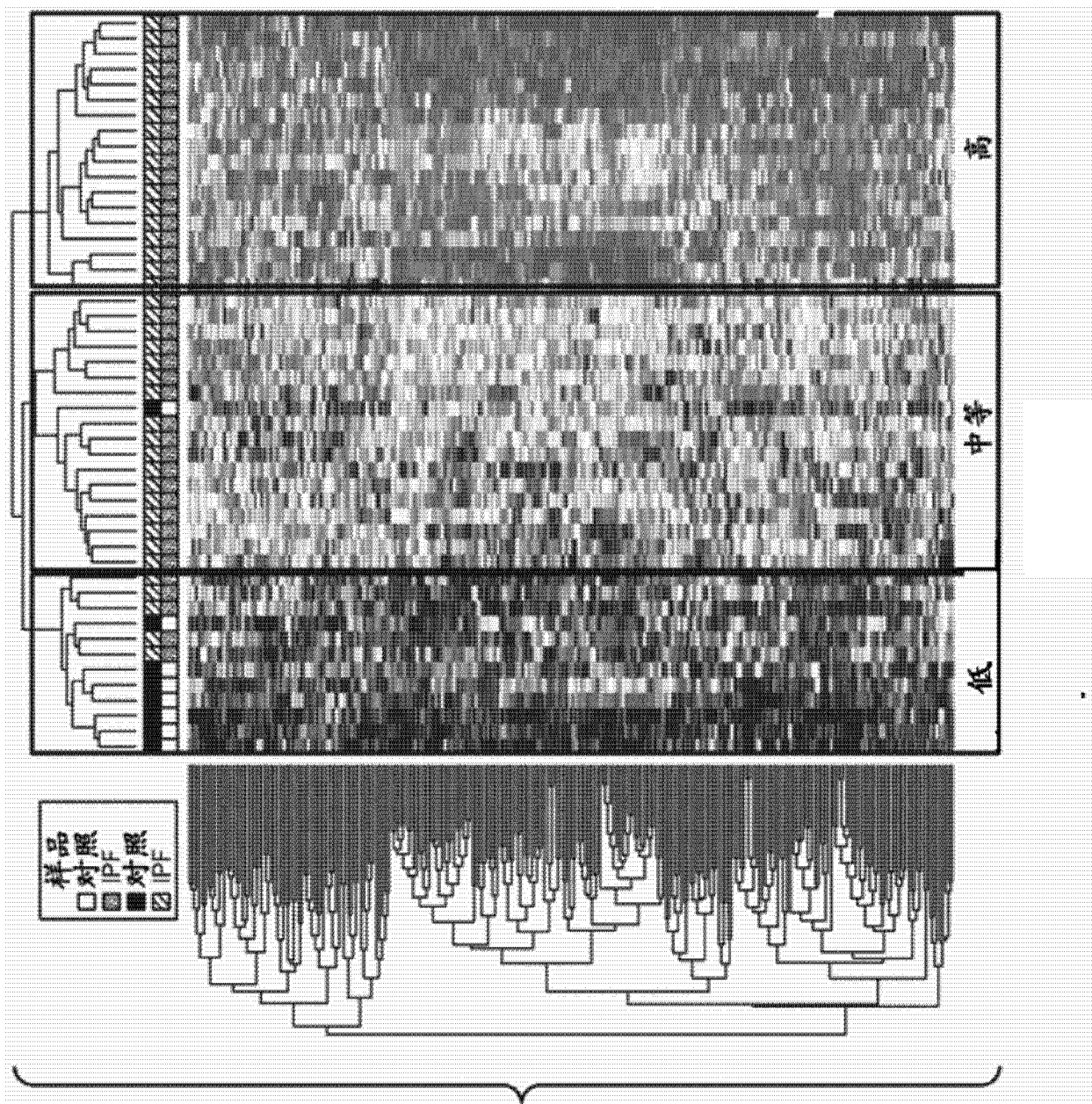


图 1B

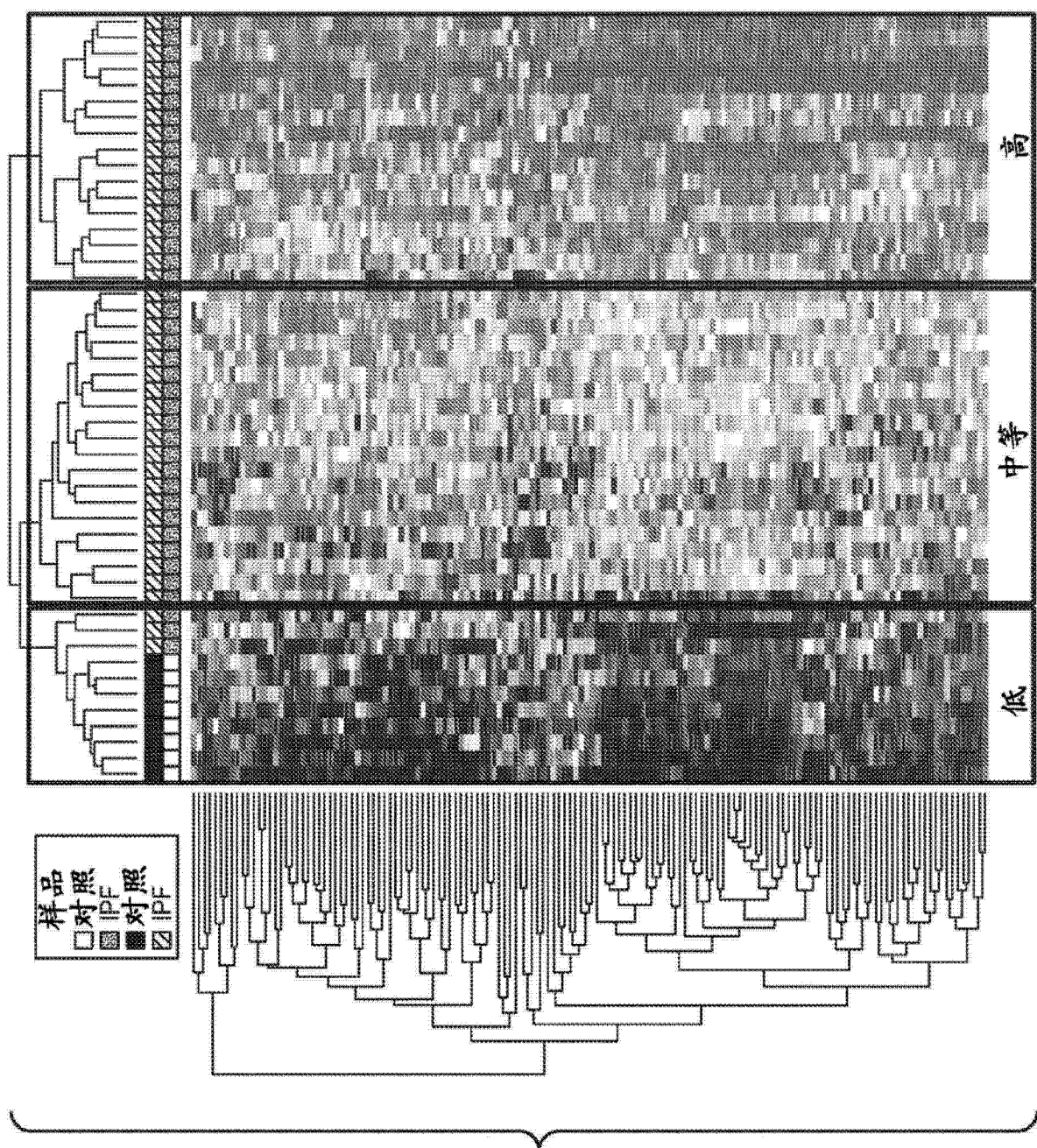


图 1C

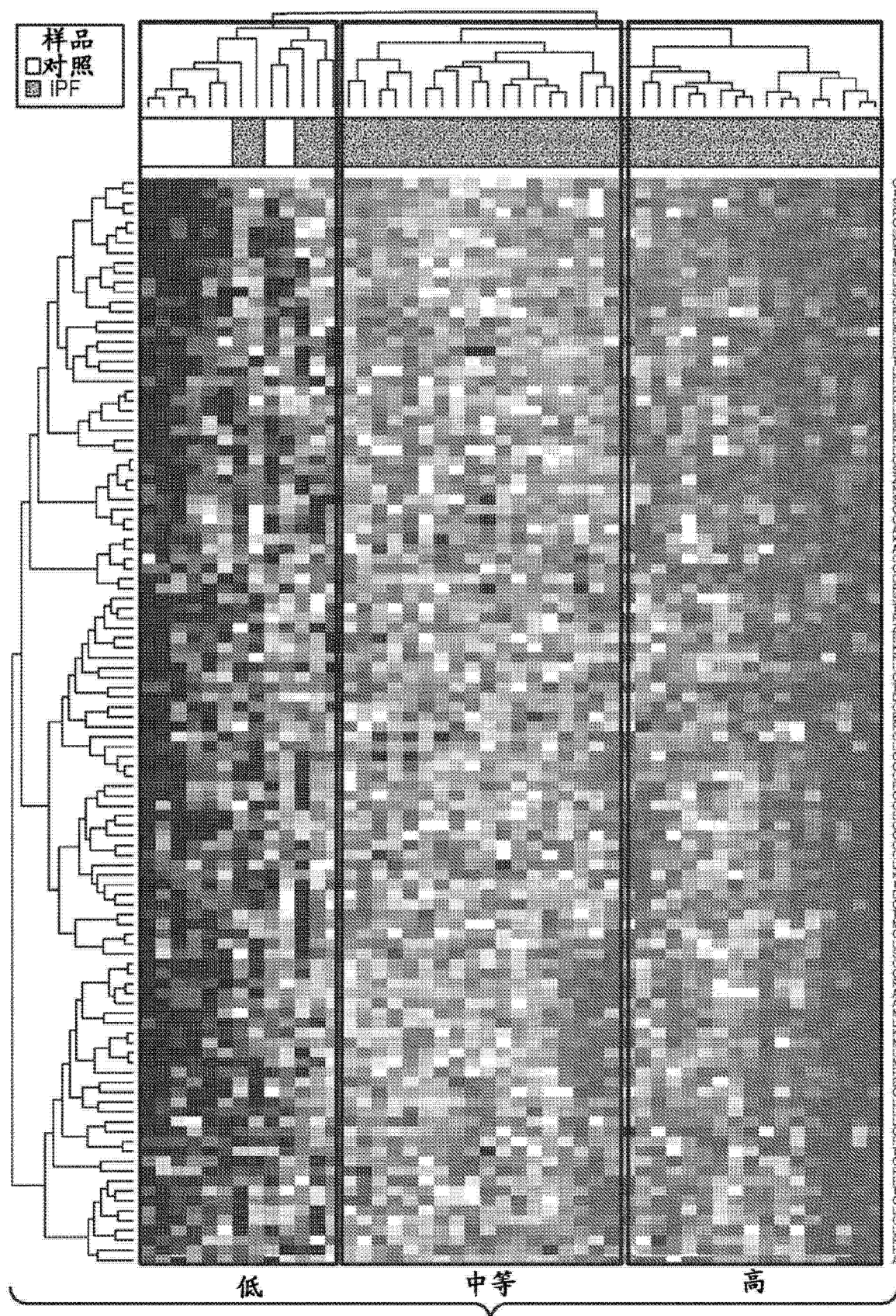


图 1D

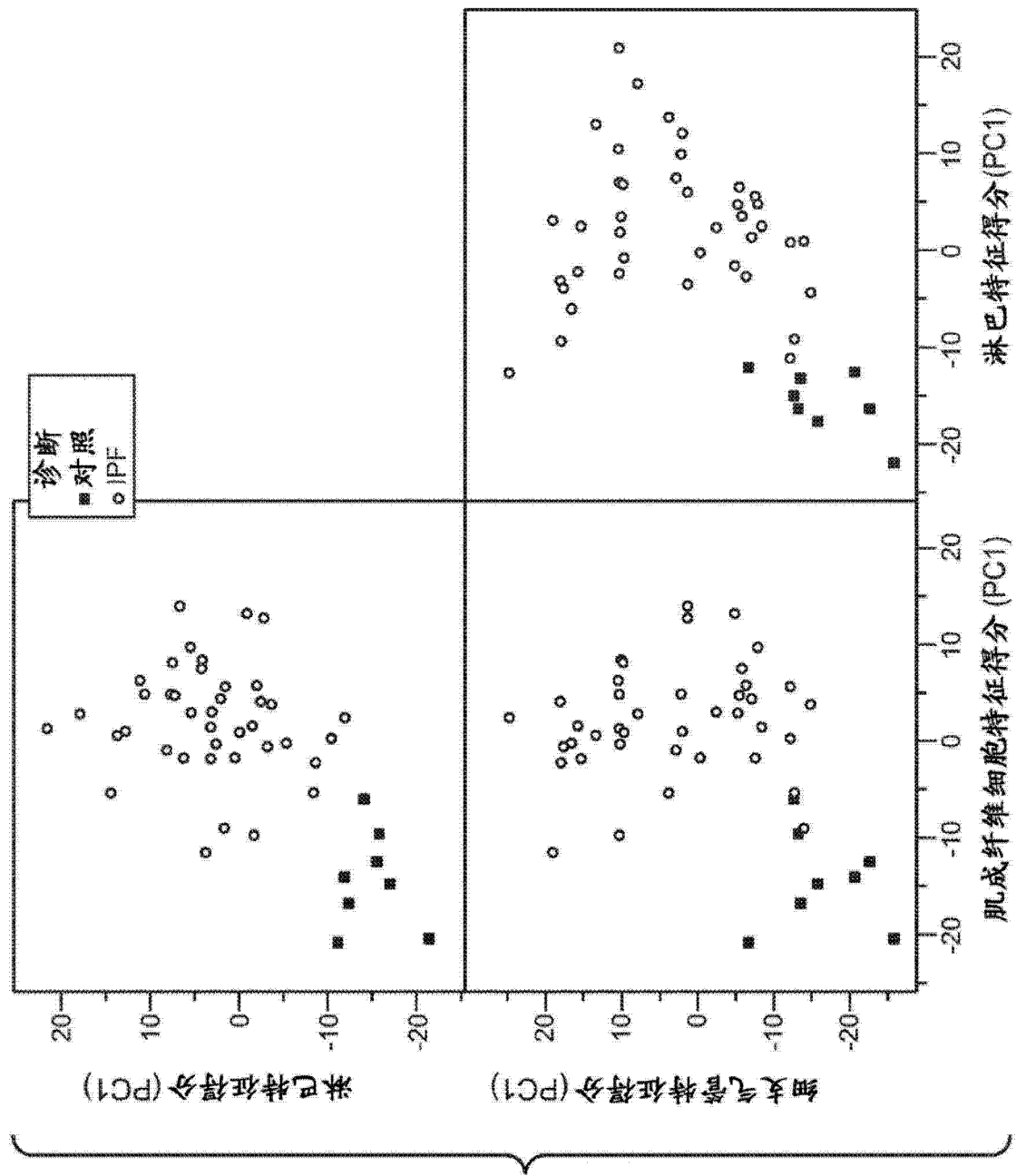


图 1E

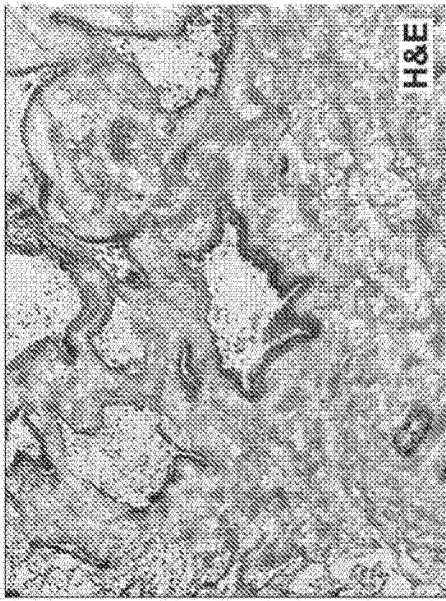


图 2A



图 2B

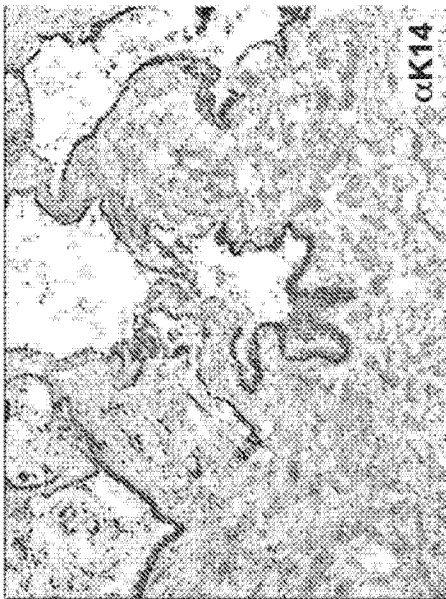


图 2C

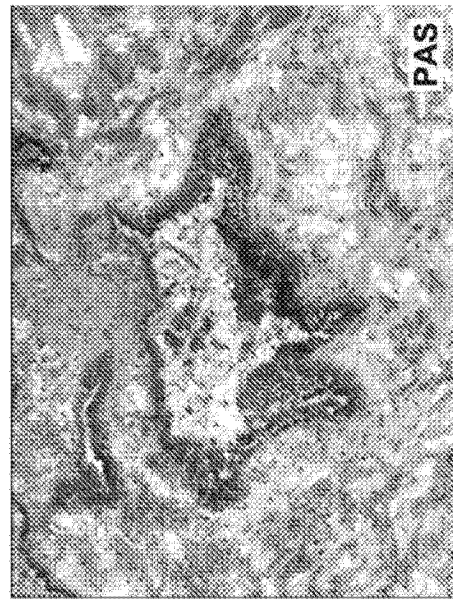


图 2D

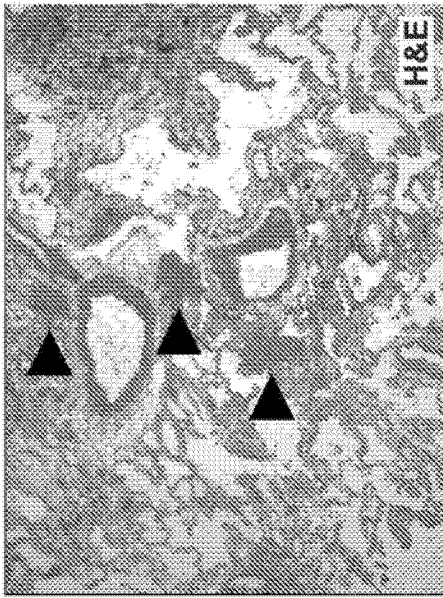


图 2E

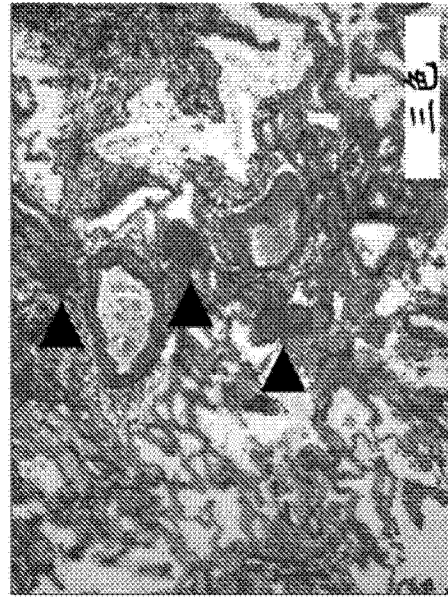


图 2F

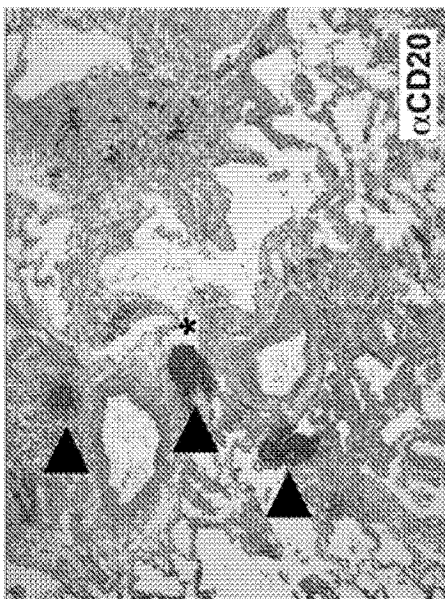


图 2G

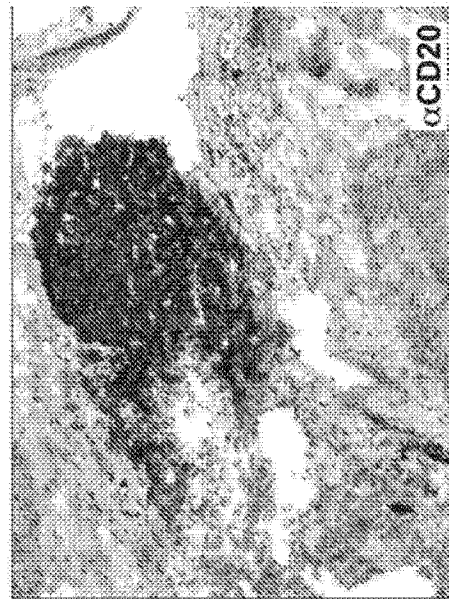


图 2H

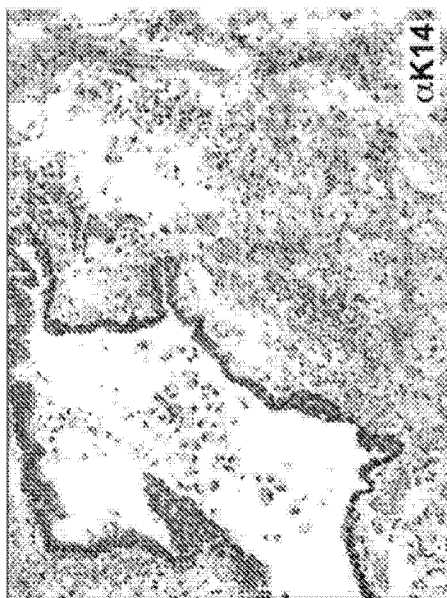


图 2I

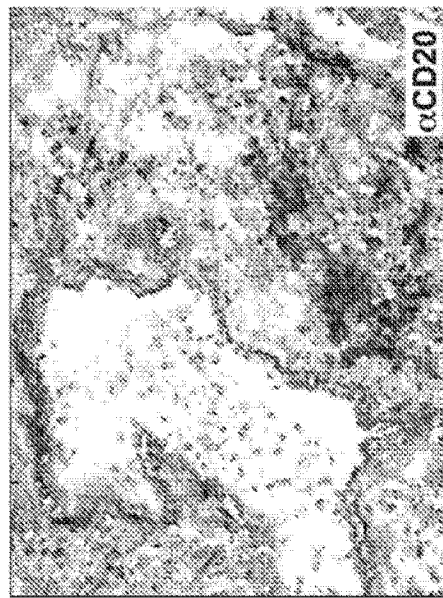


图 2J

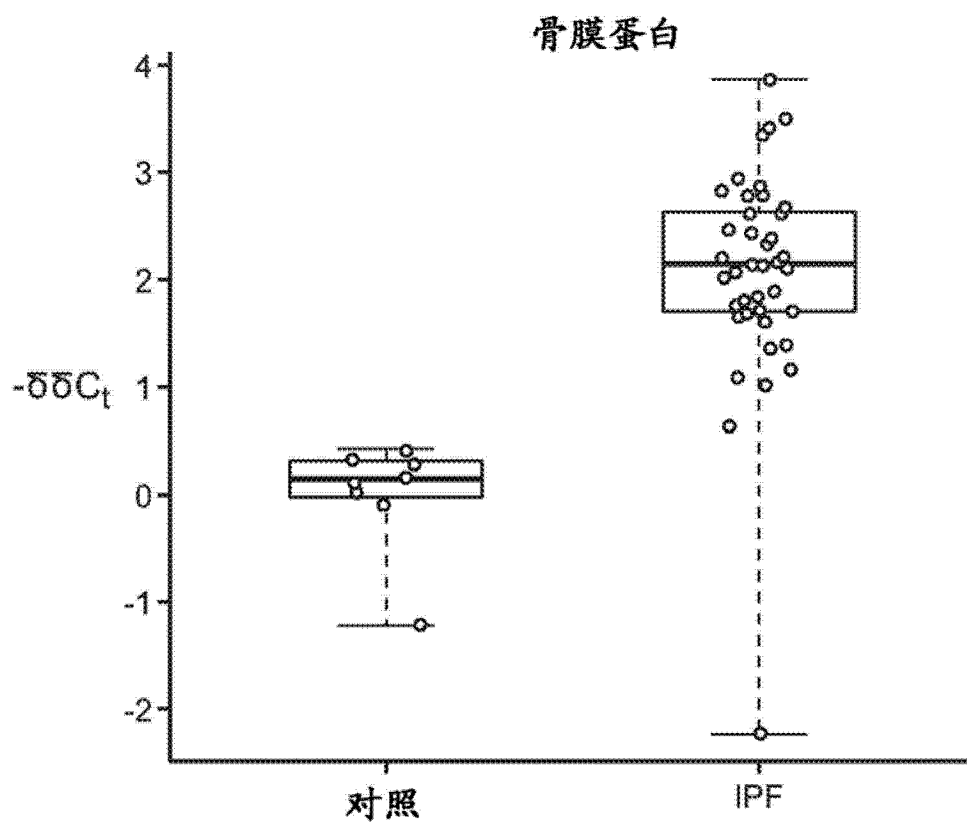


图 3A

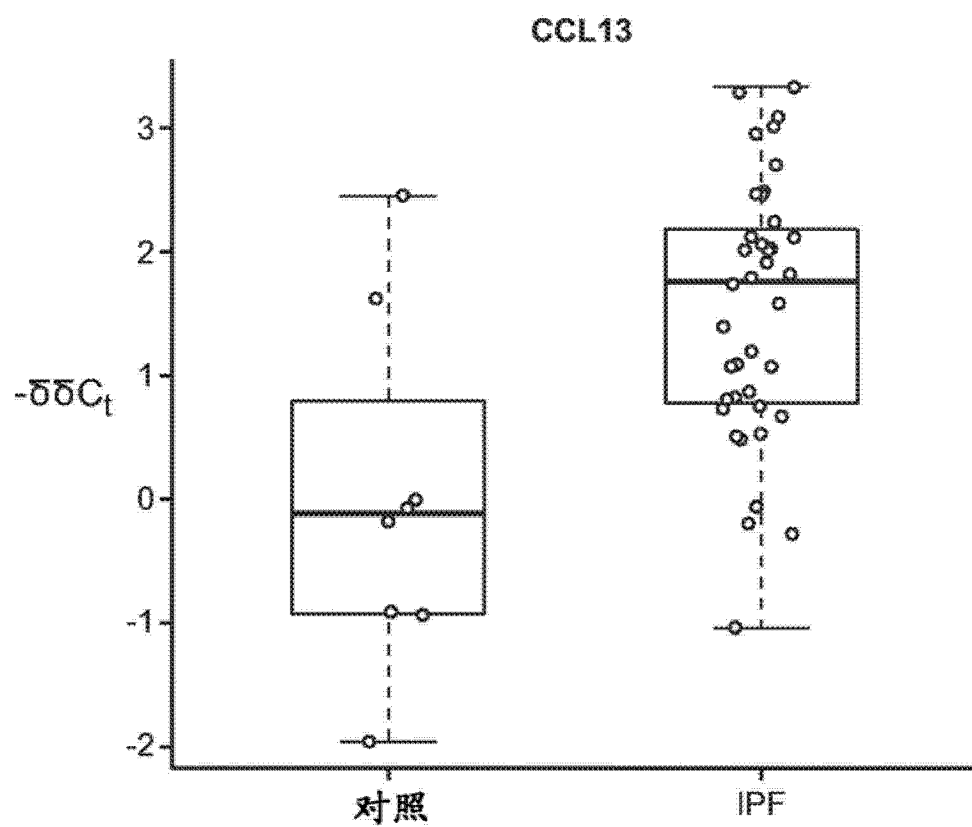


图 3B

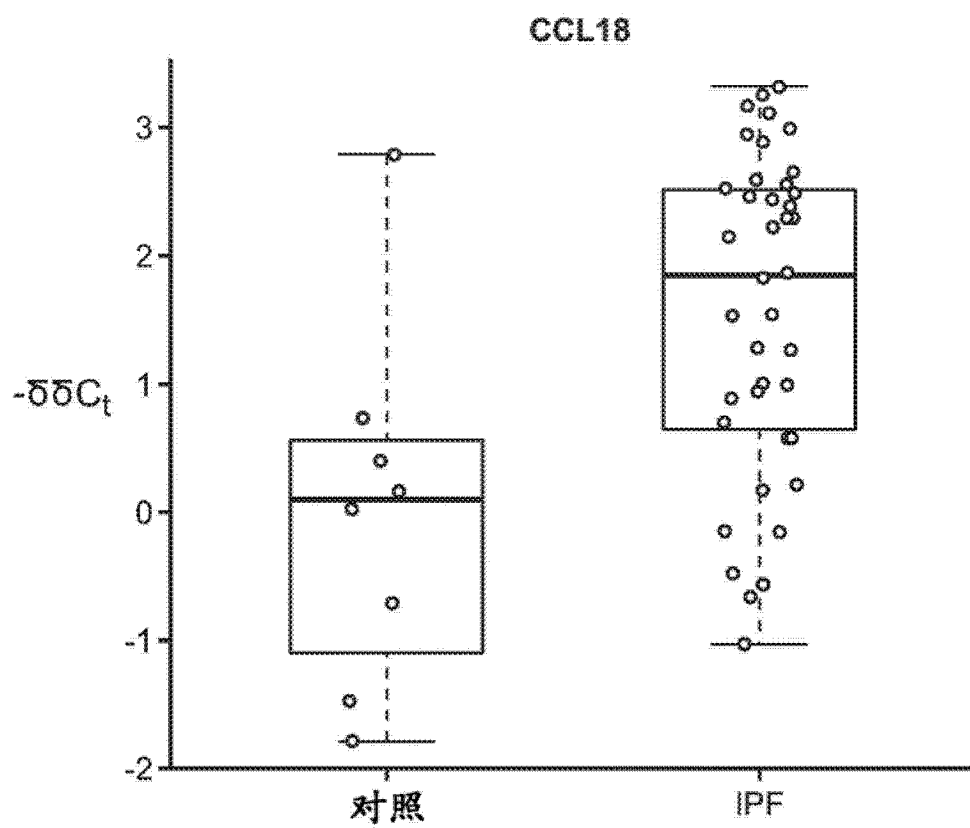


图 3C

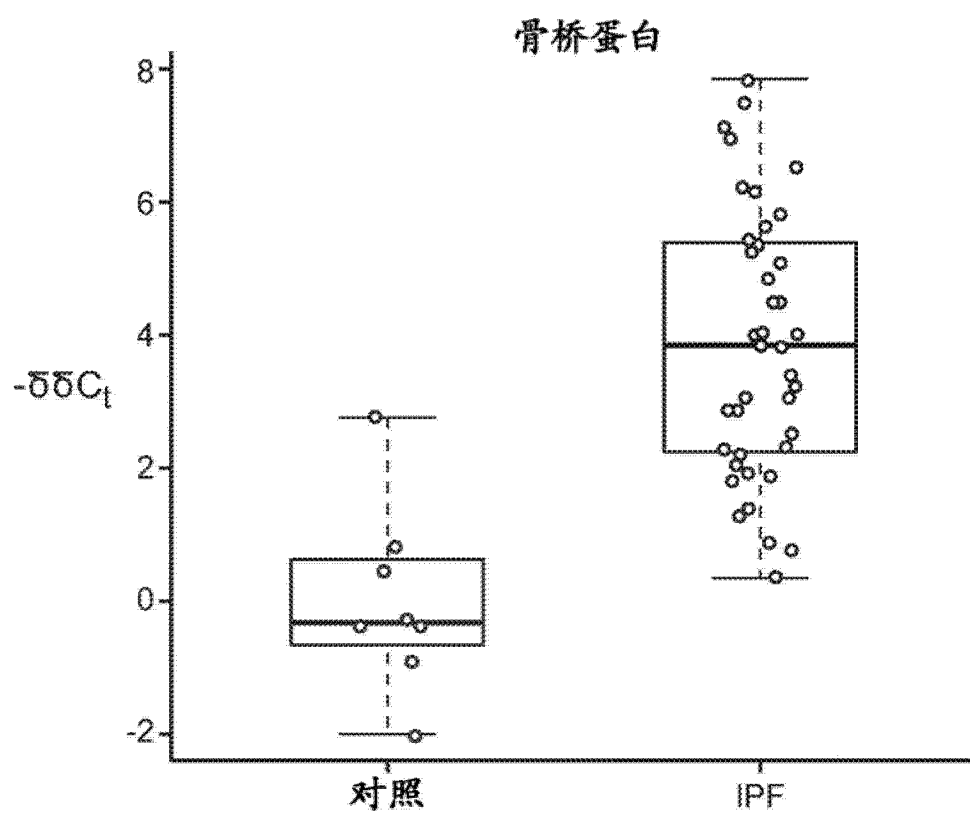


图 3D

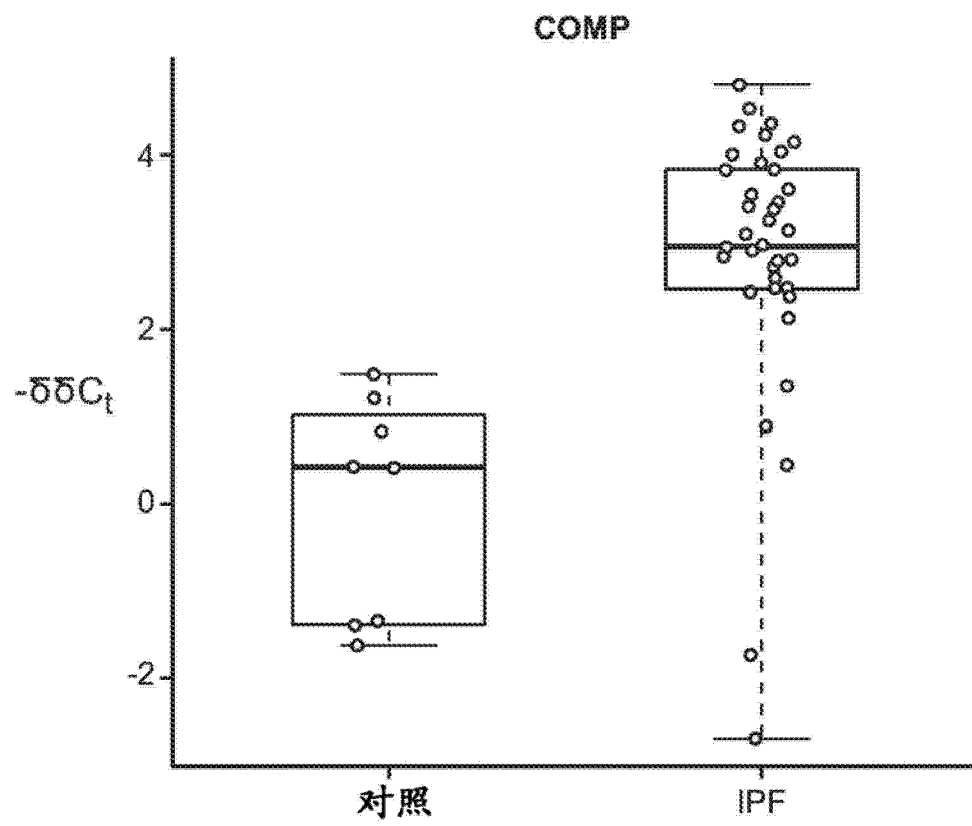


图 3E

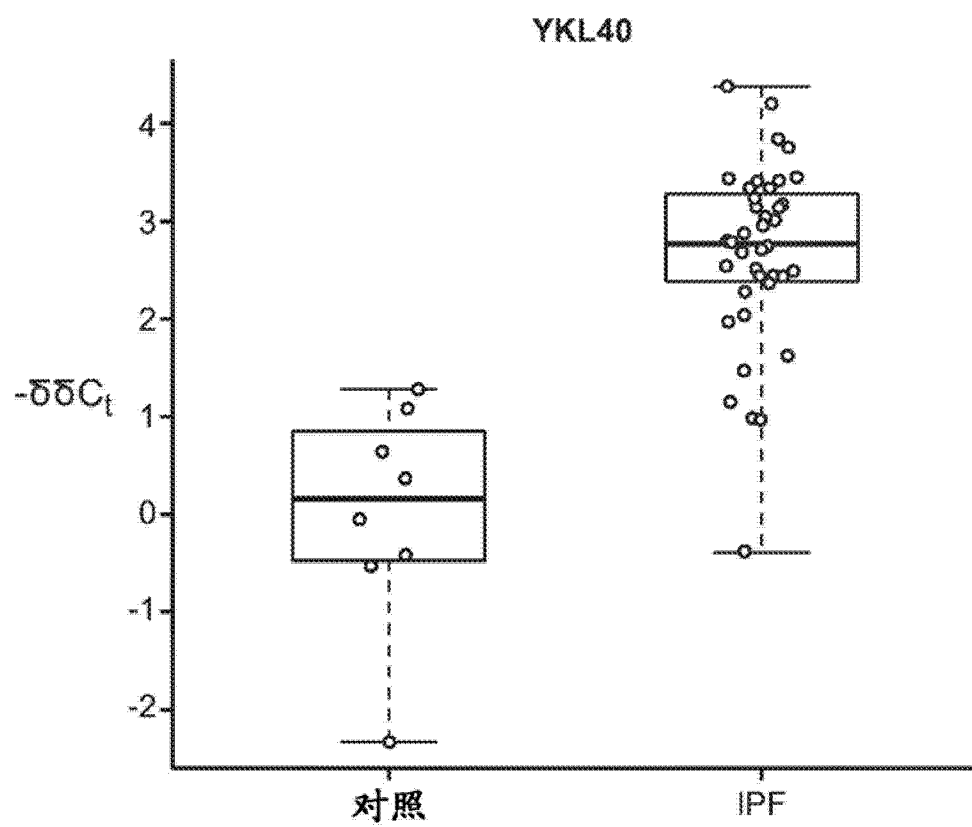


图 3F

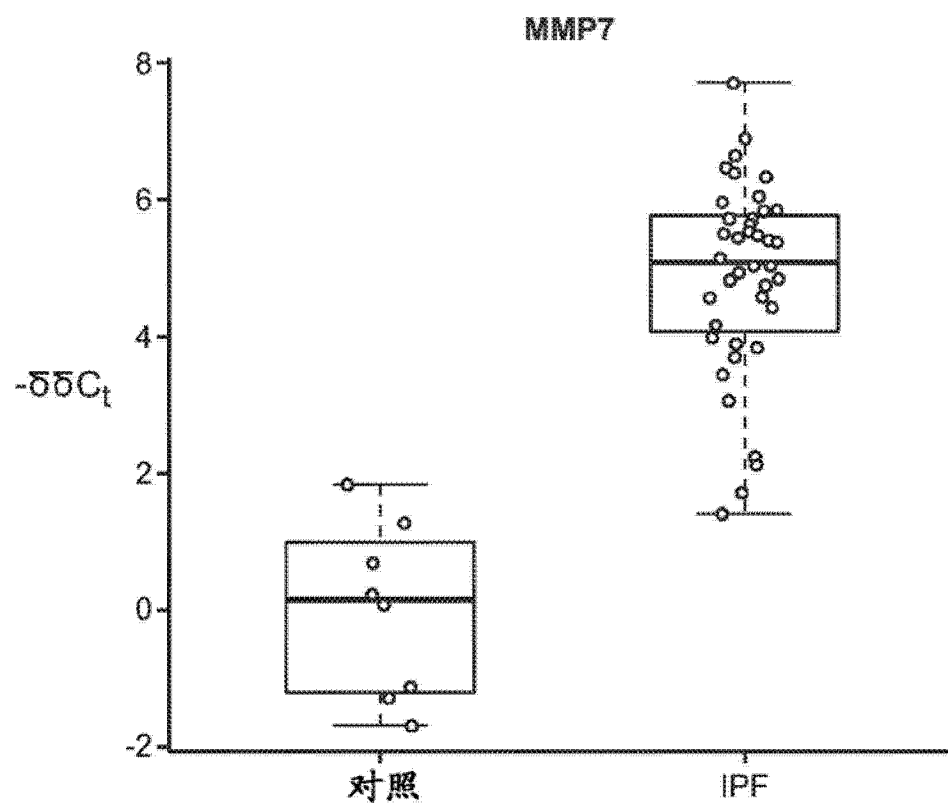


图 3G

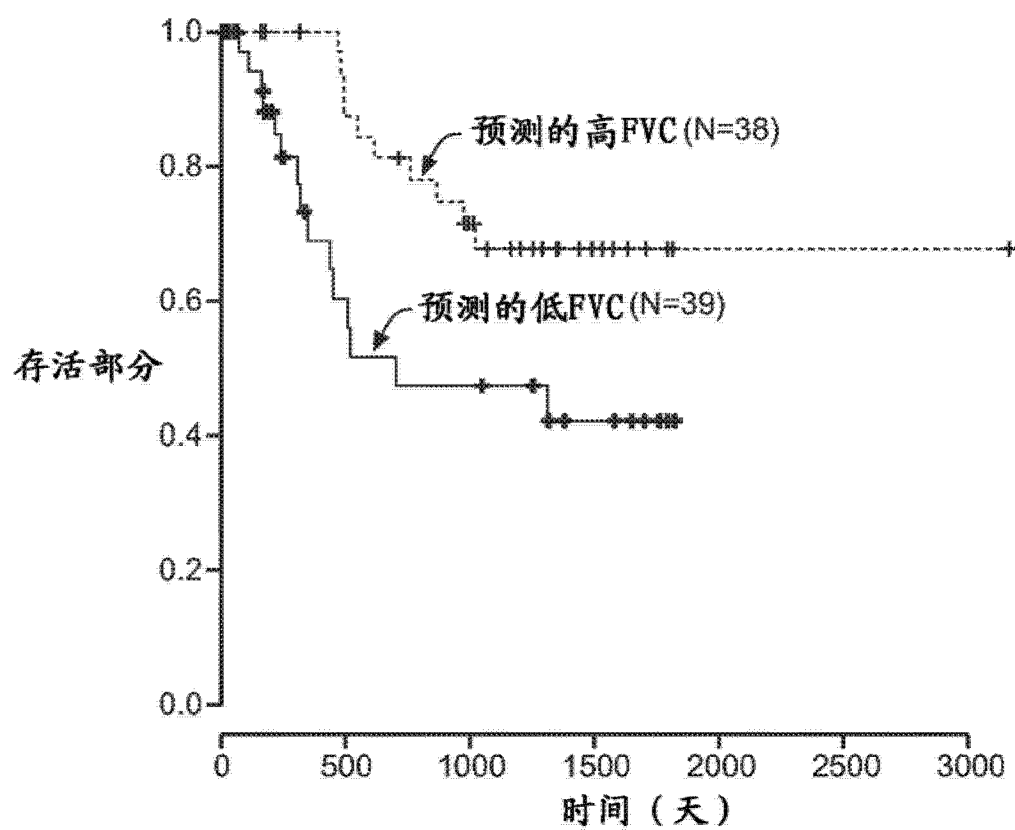


图 4

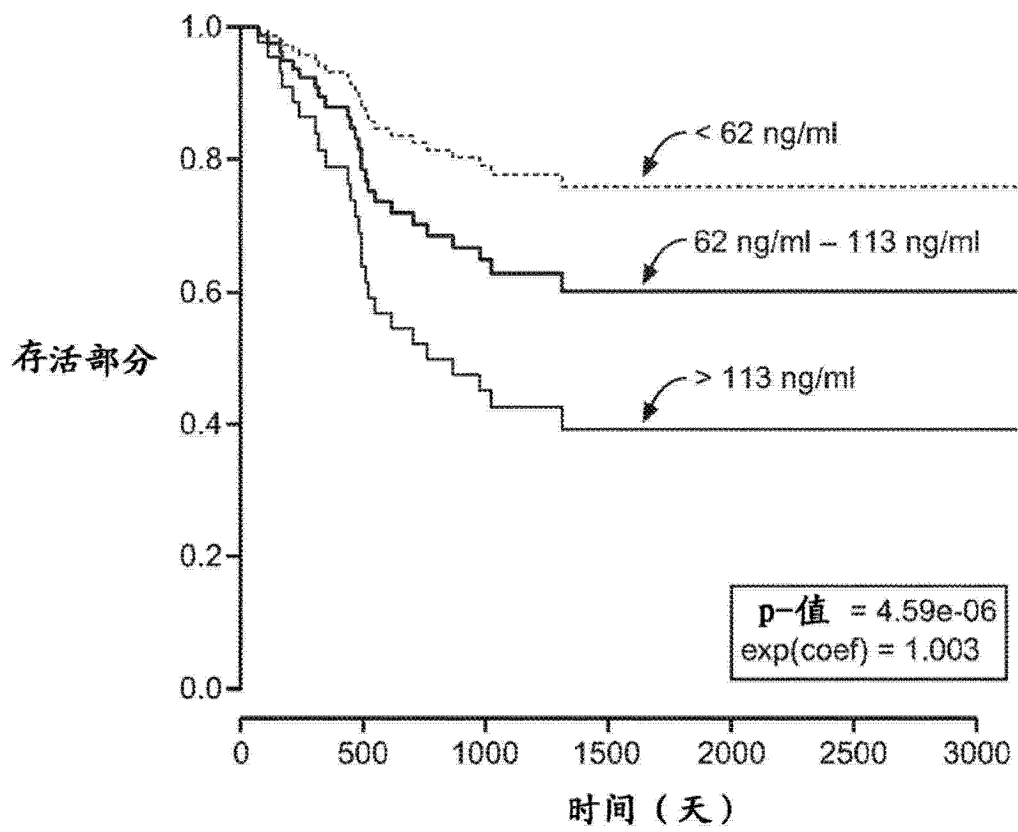


图 5A

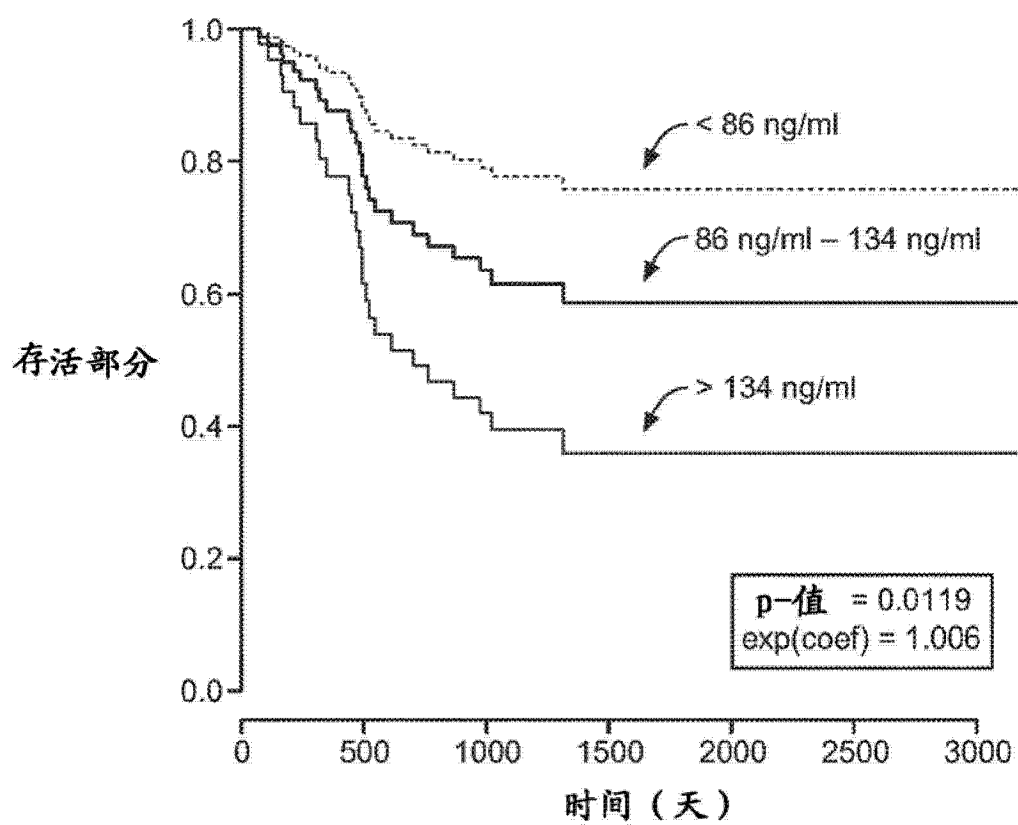


图 5B

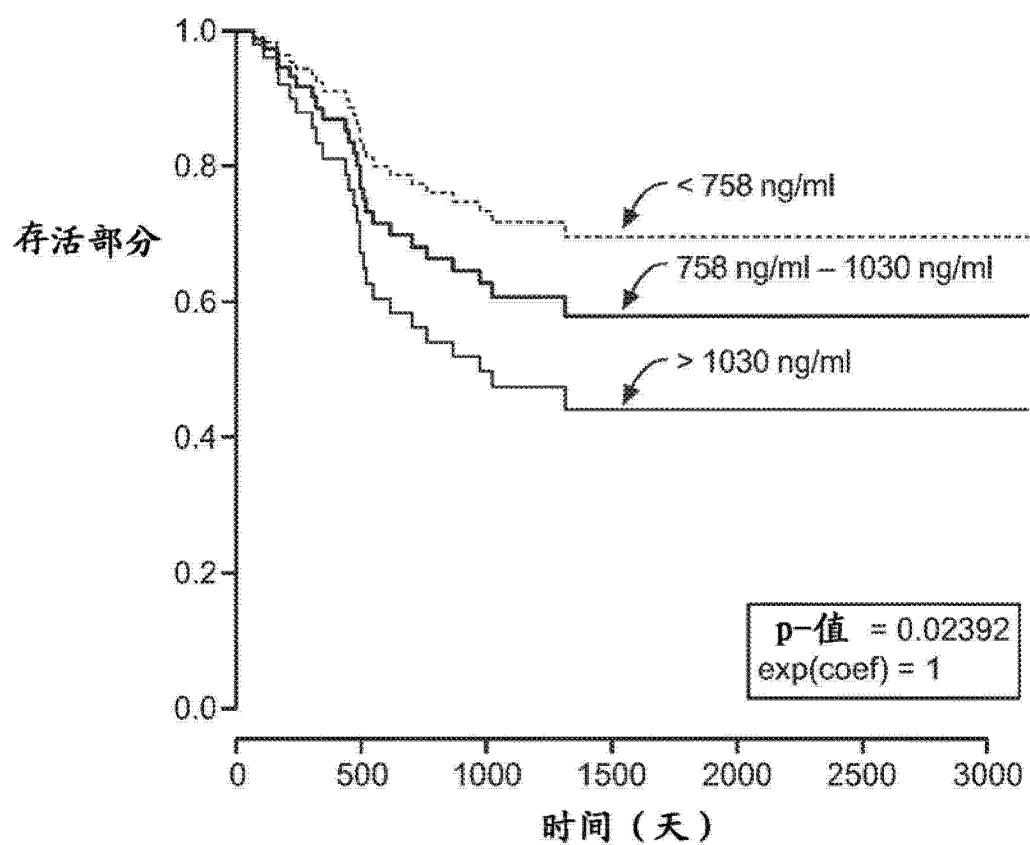


图 5C

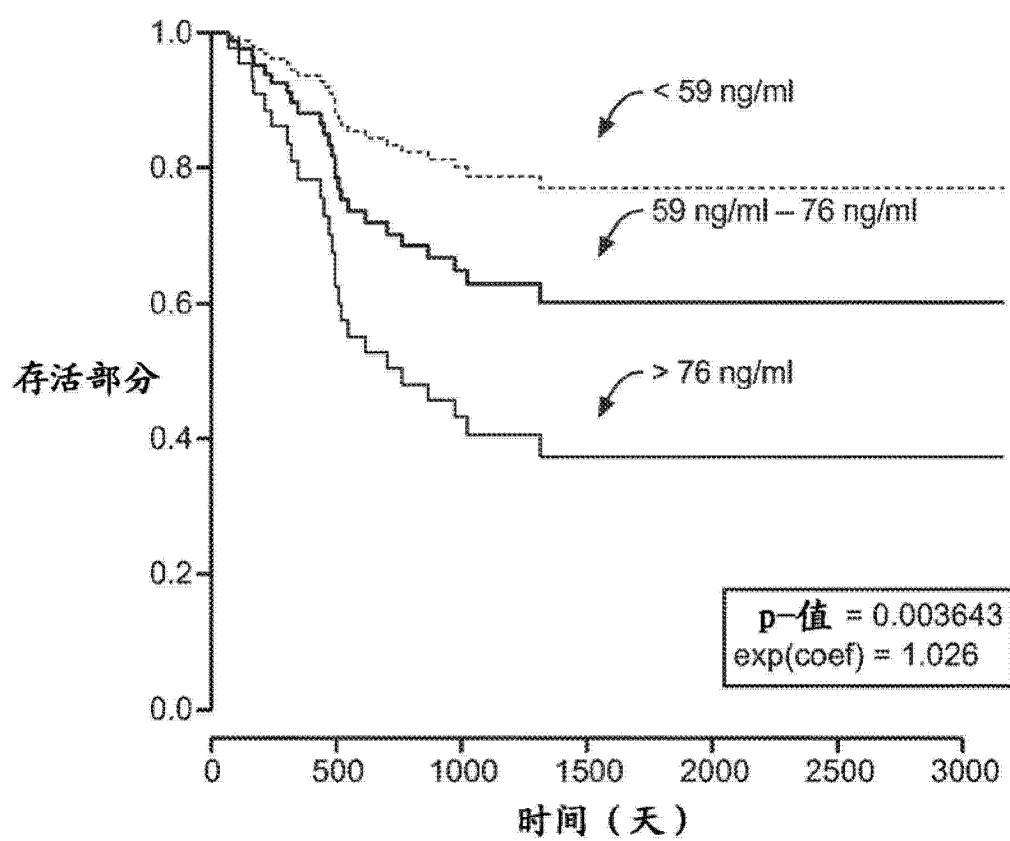


图 5D

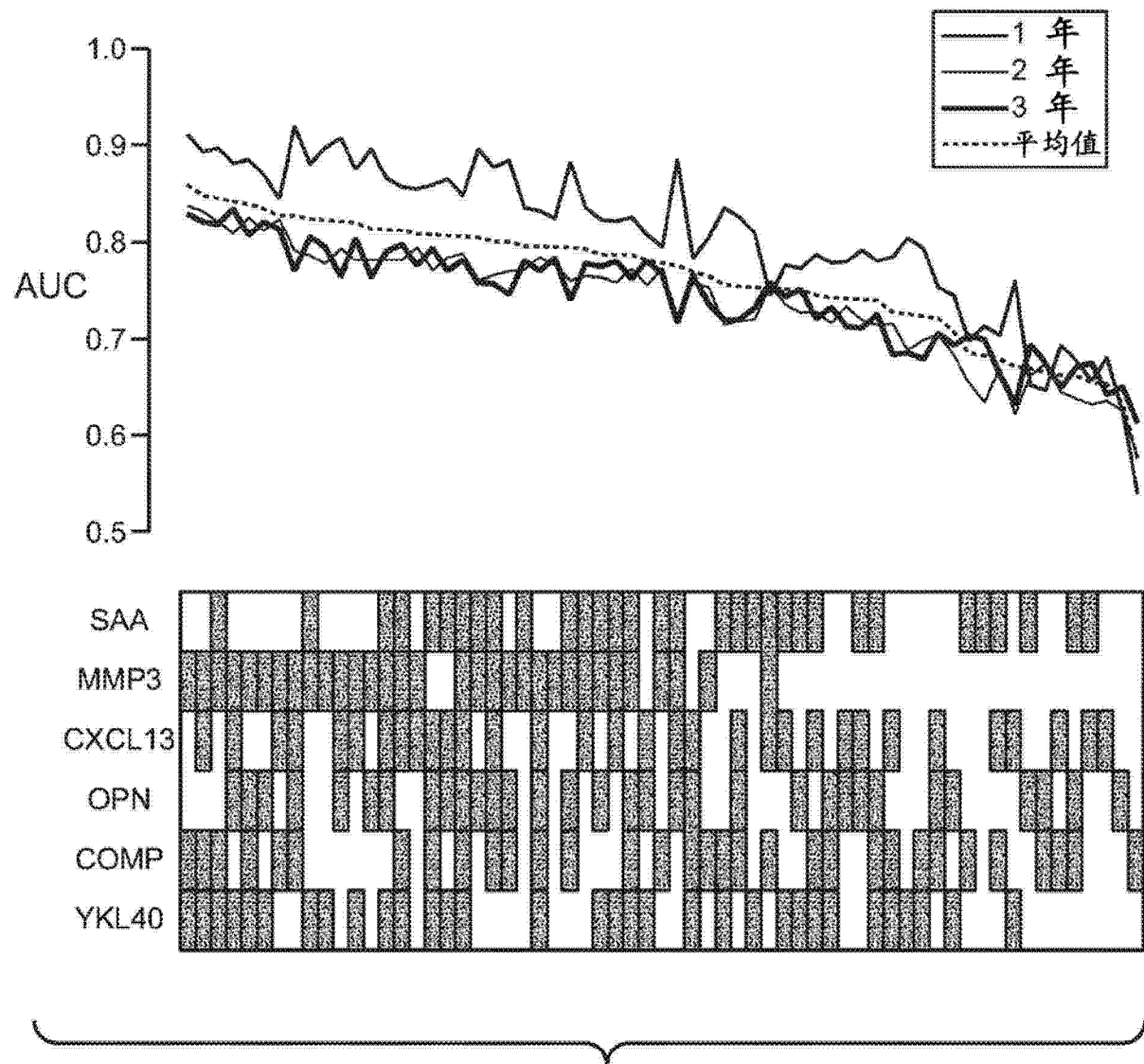


图 6A

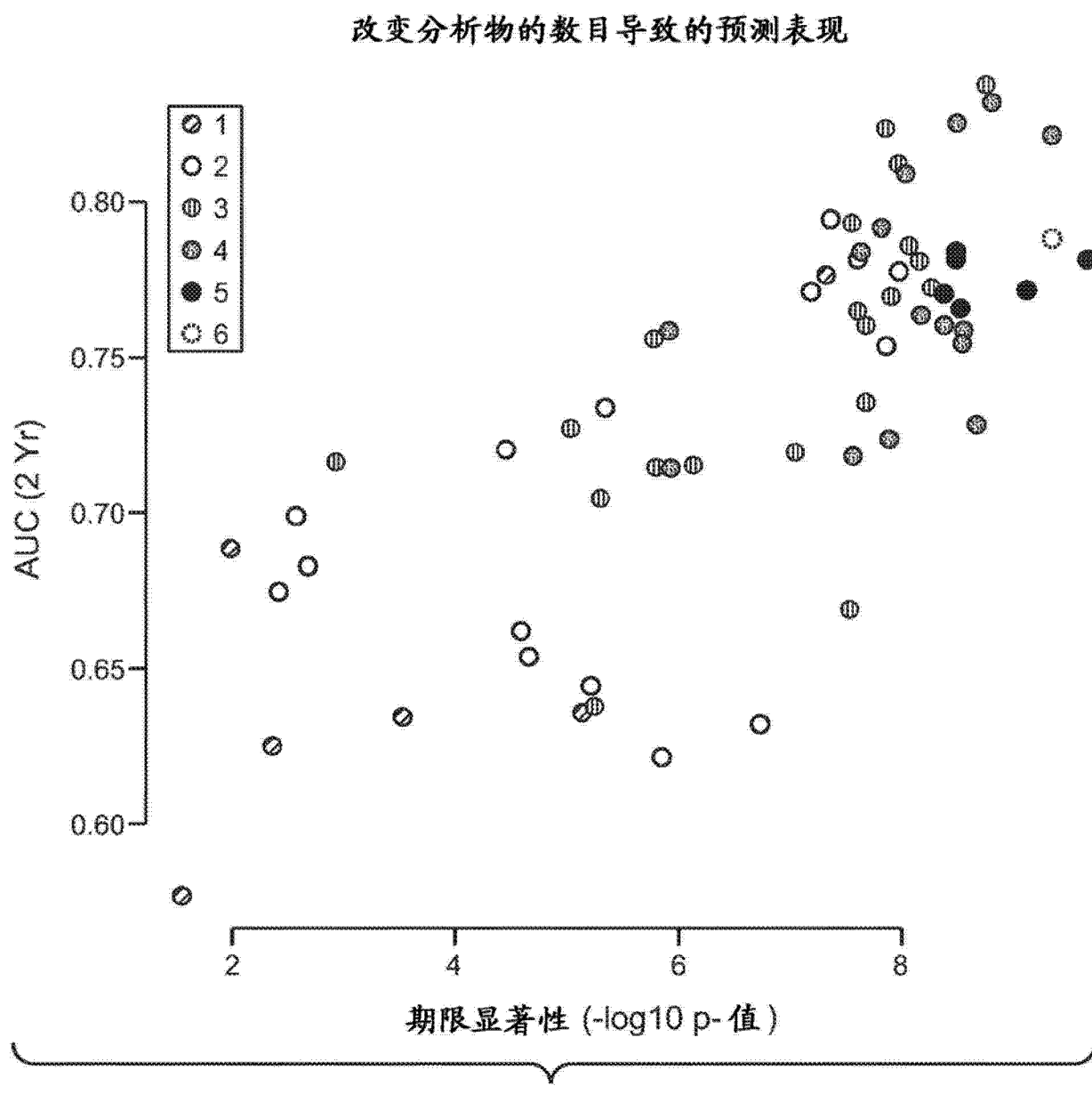


图 6B

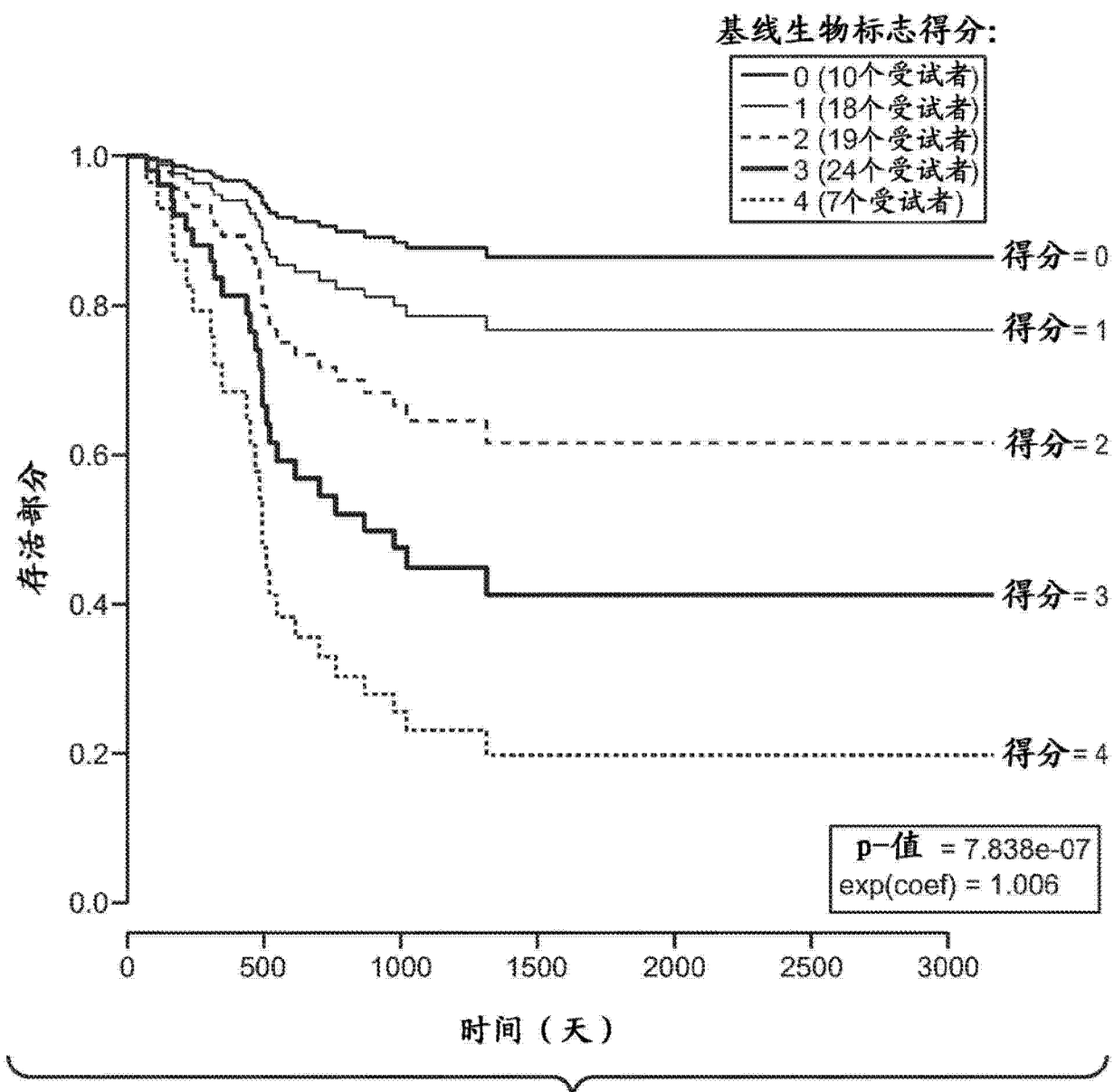


图 7

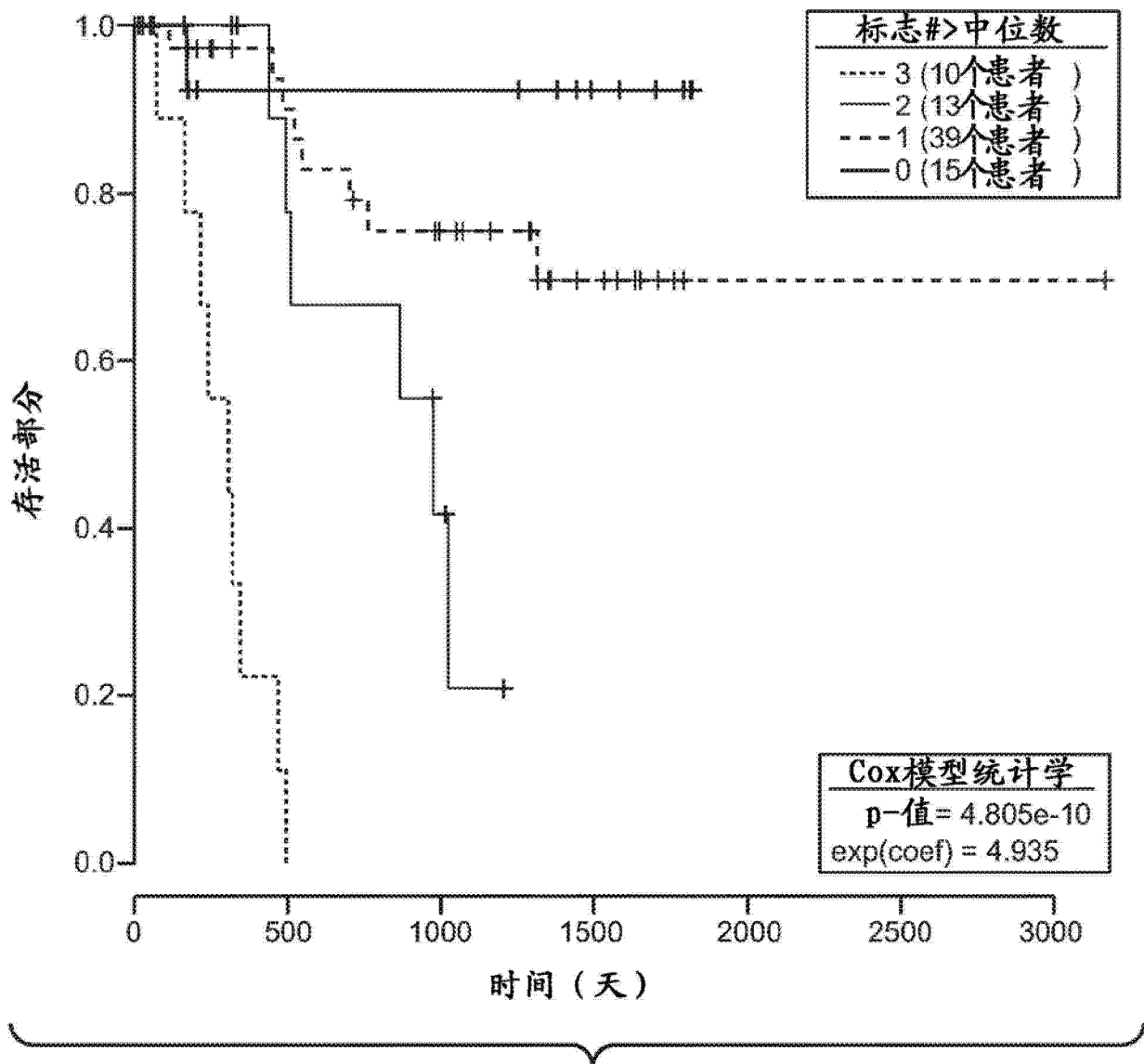


图 8

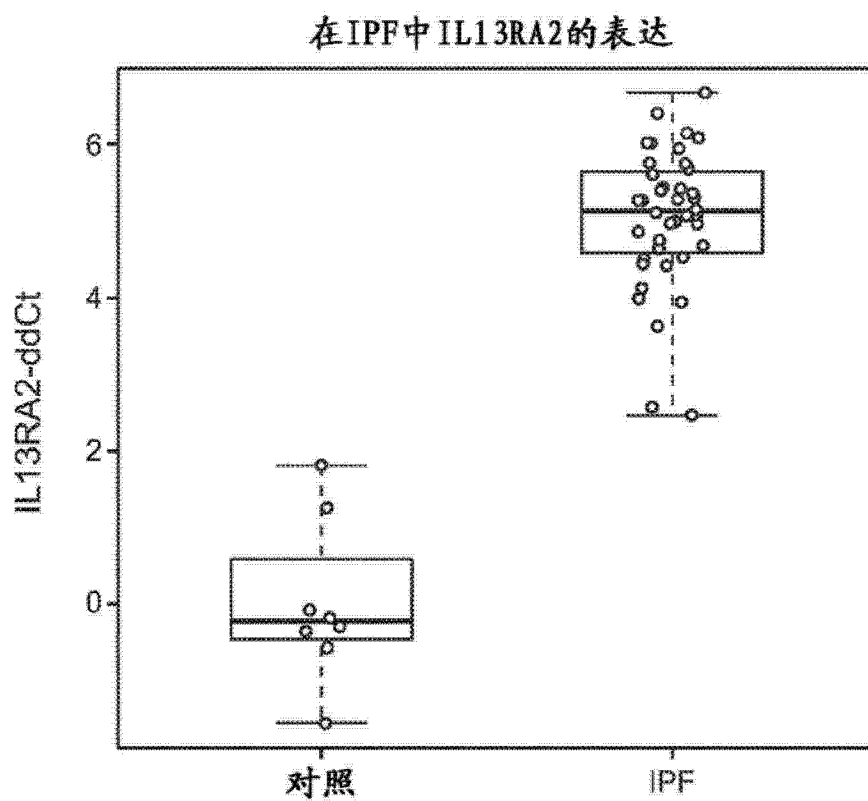


图 9

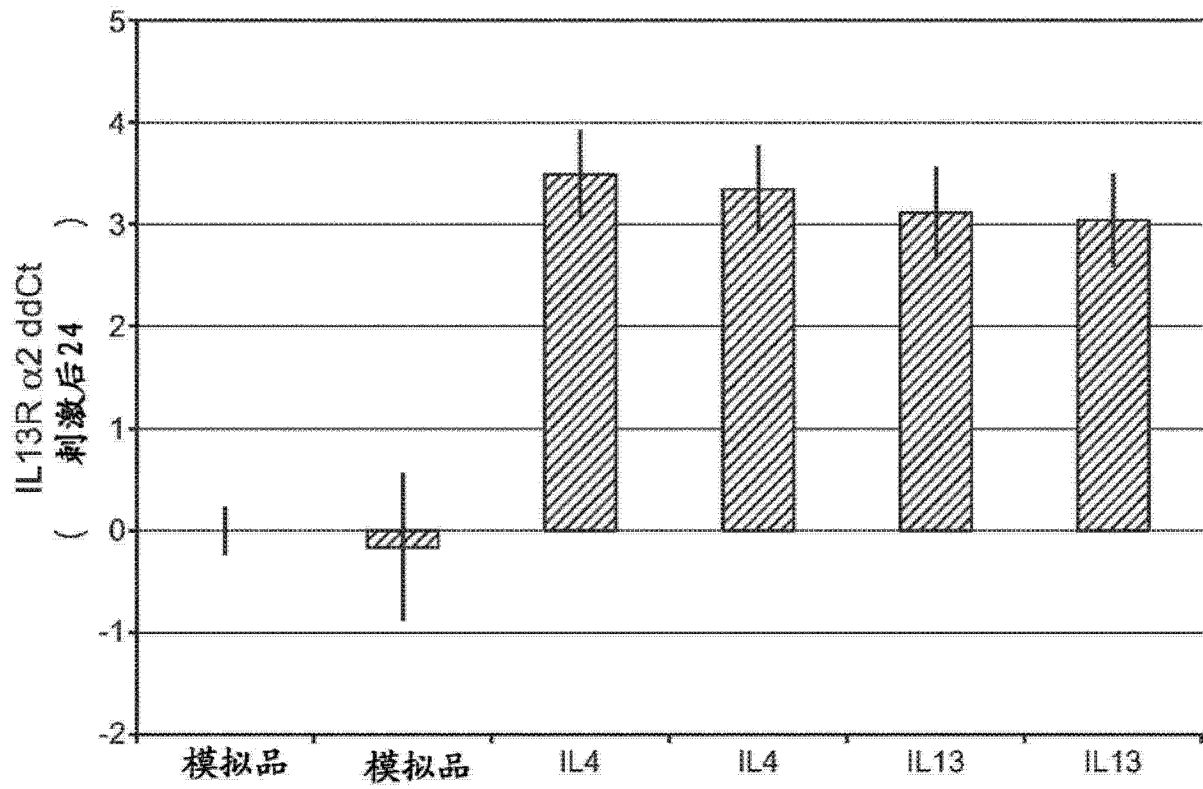


图 10

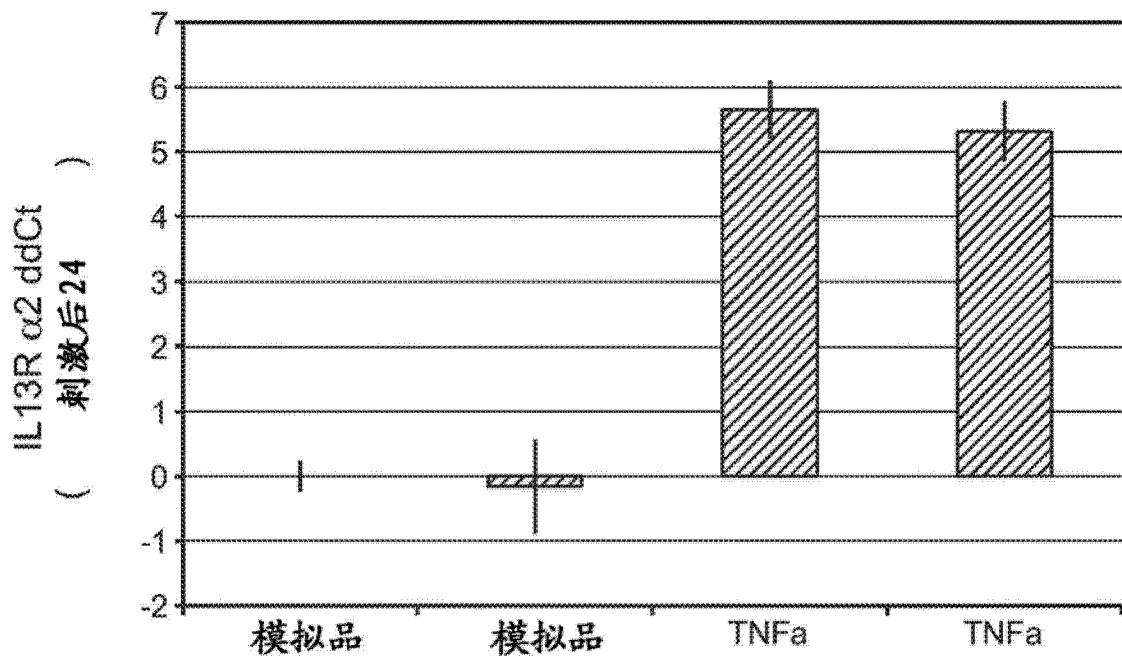


图 11A

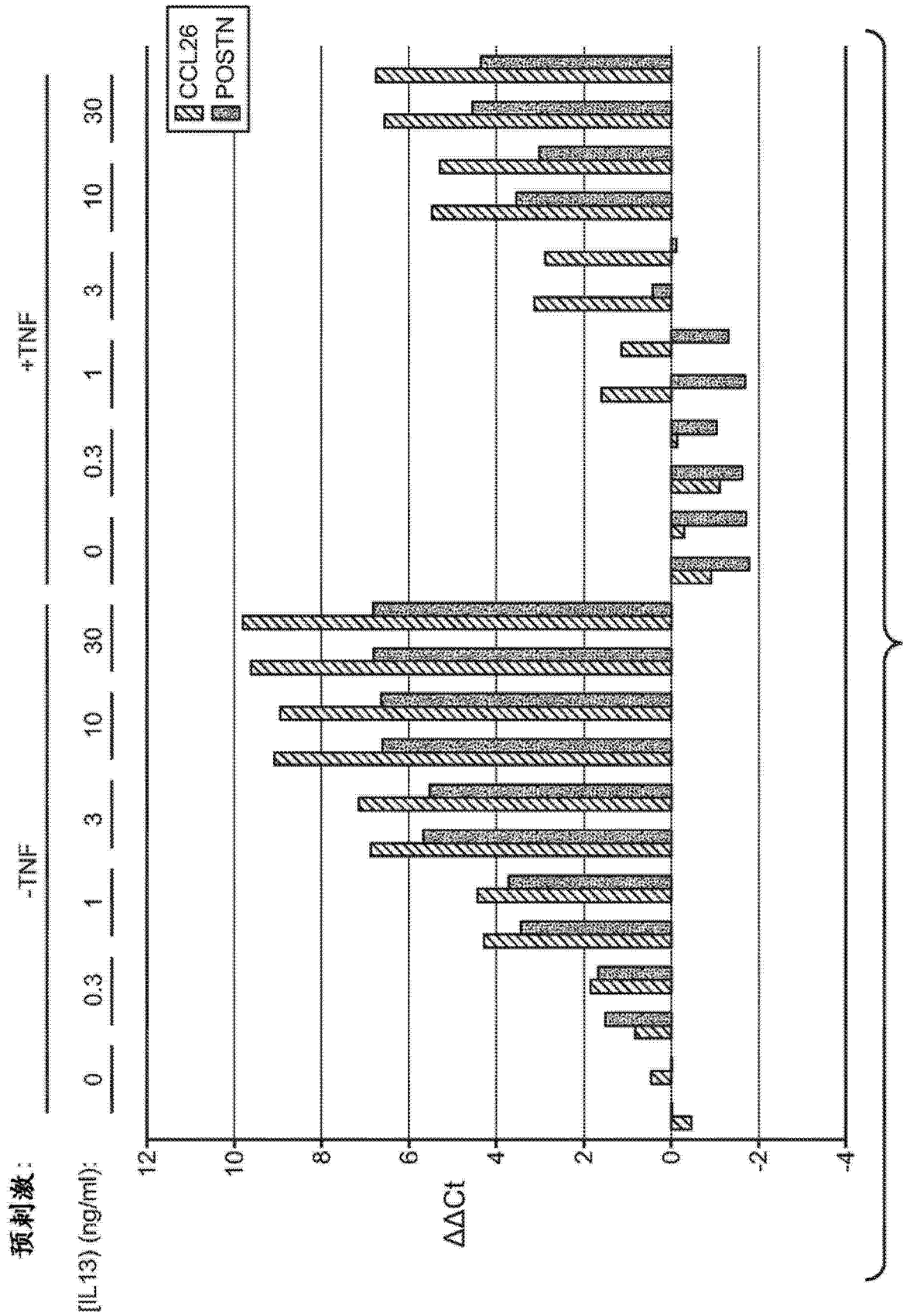


图 11B

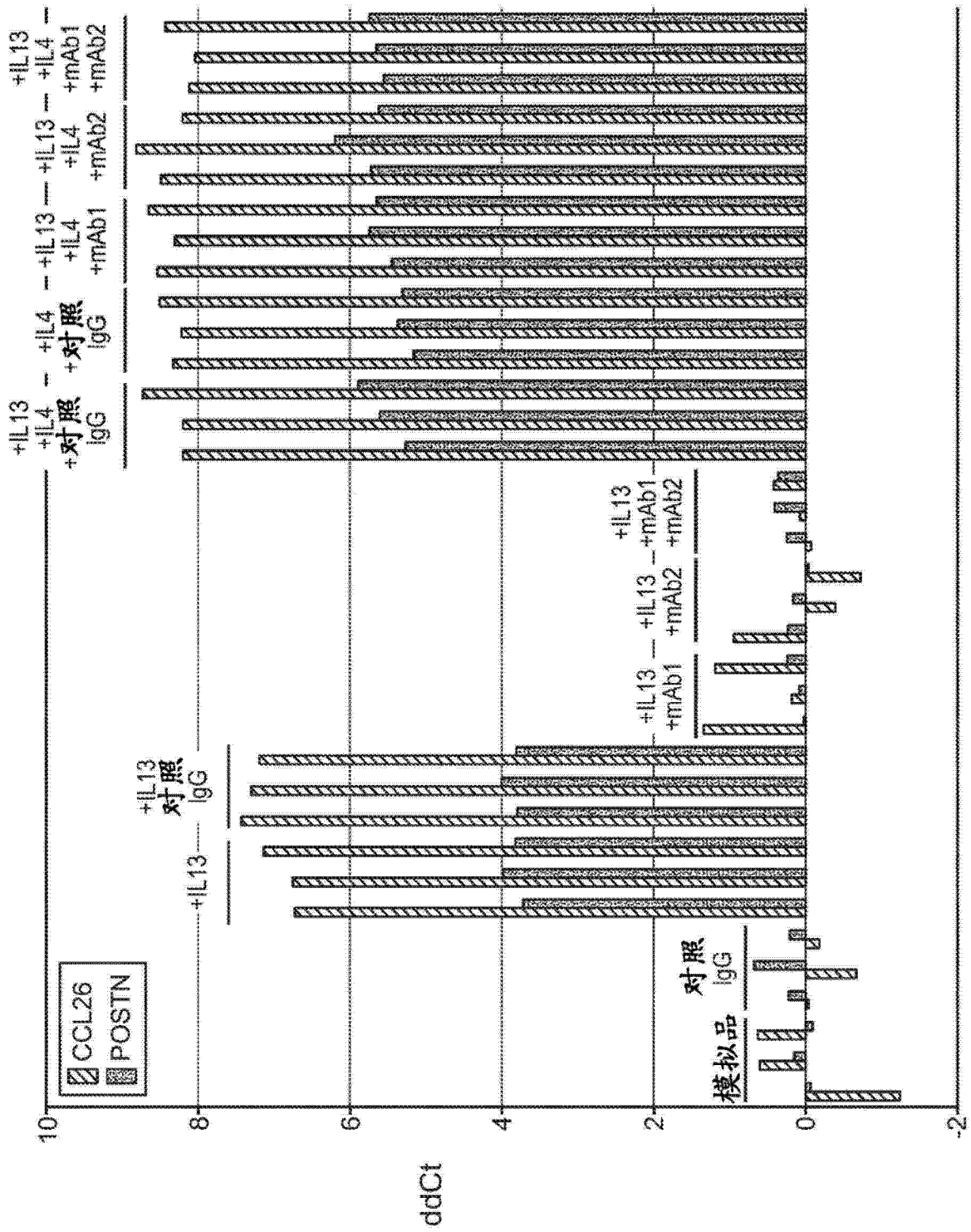


图 12

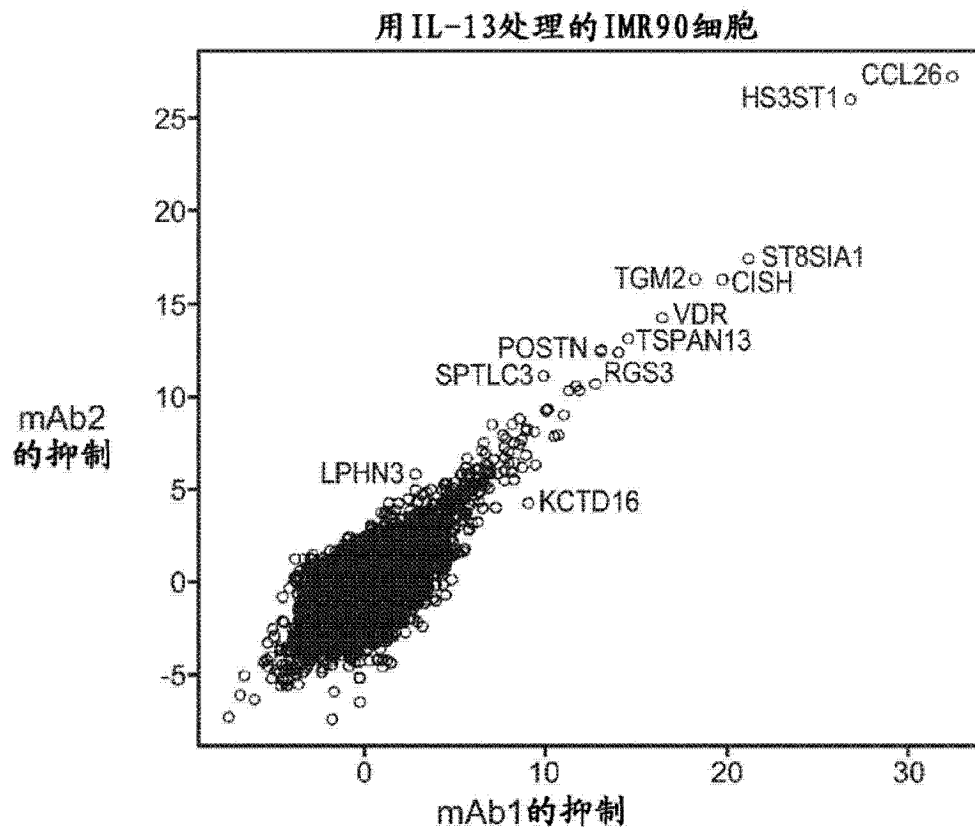


图 13A

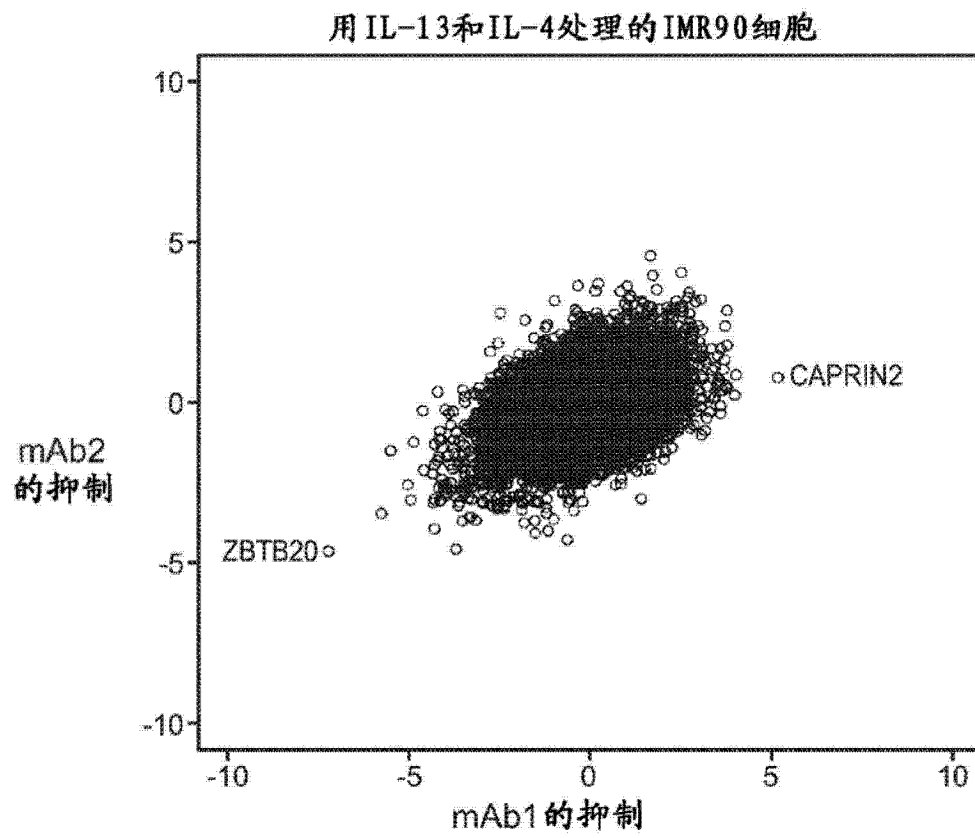


图 13B

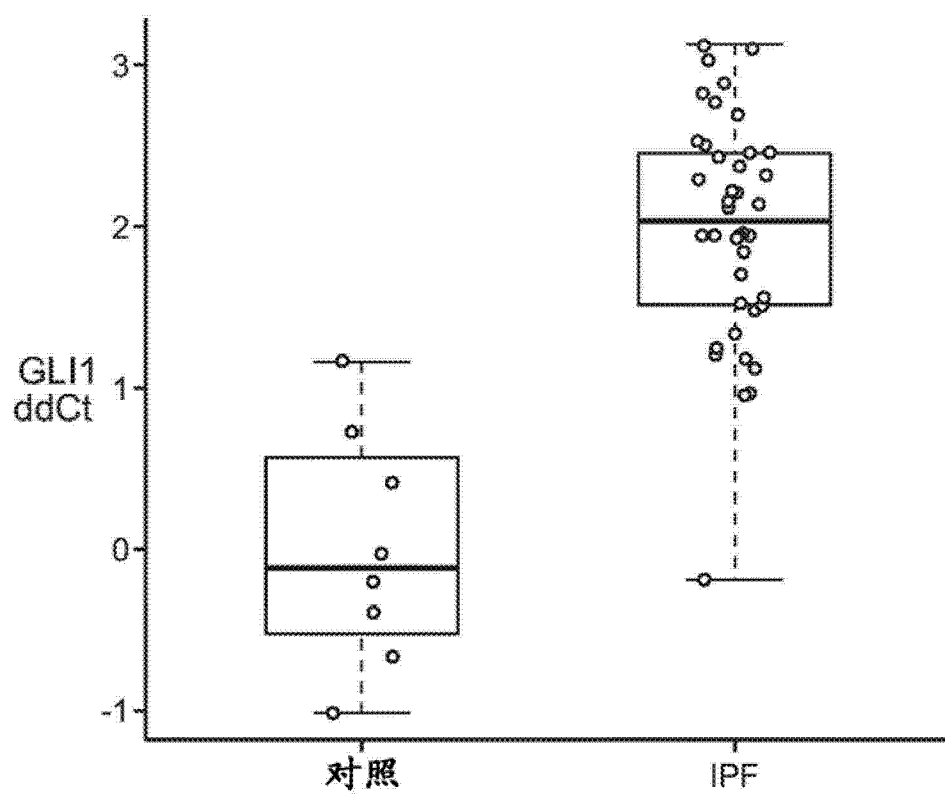


图 14

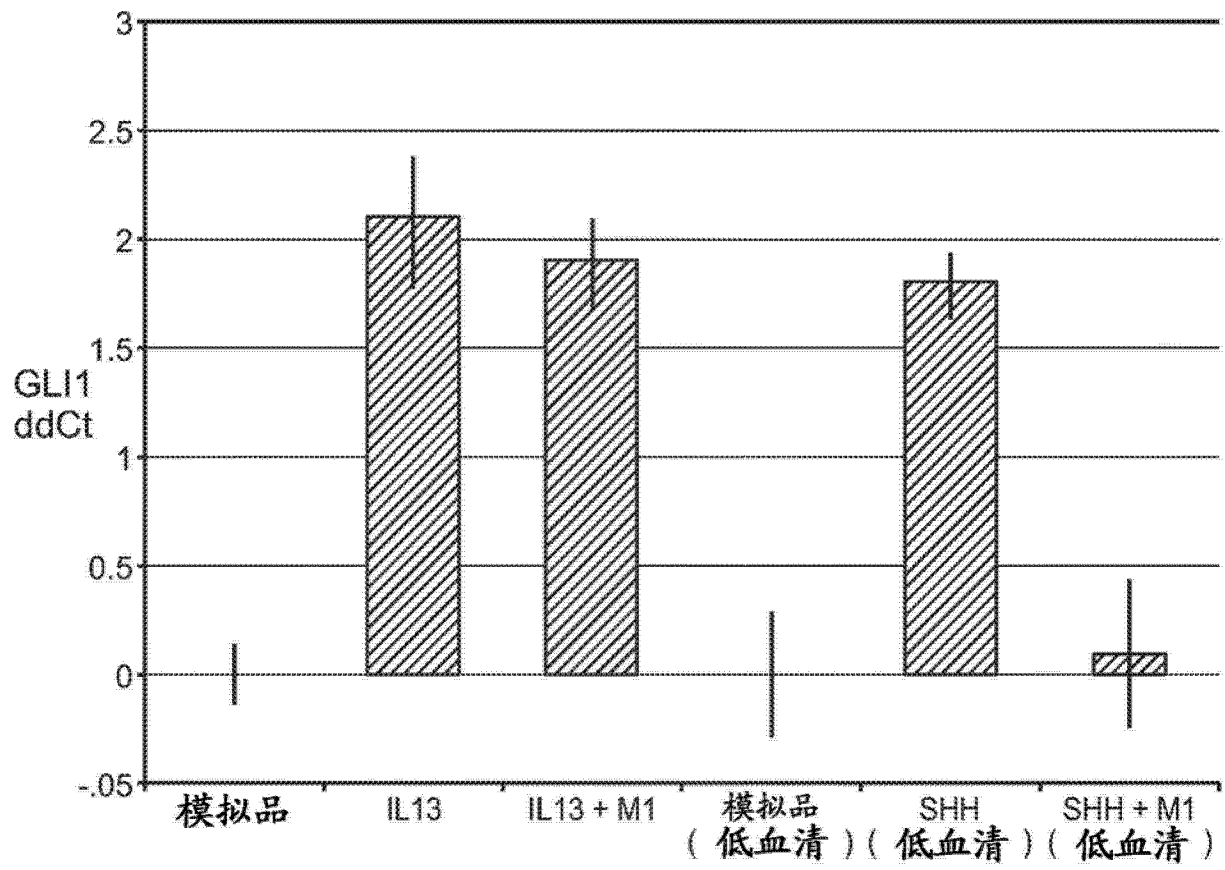


图 15

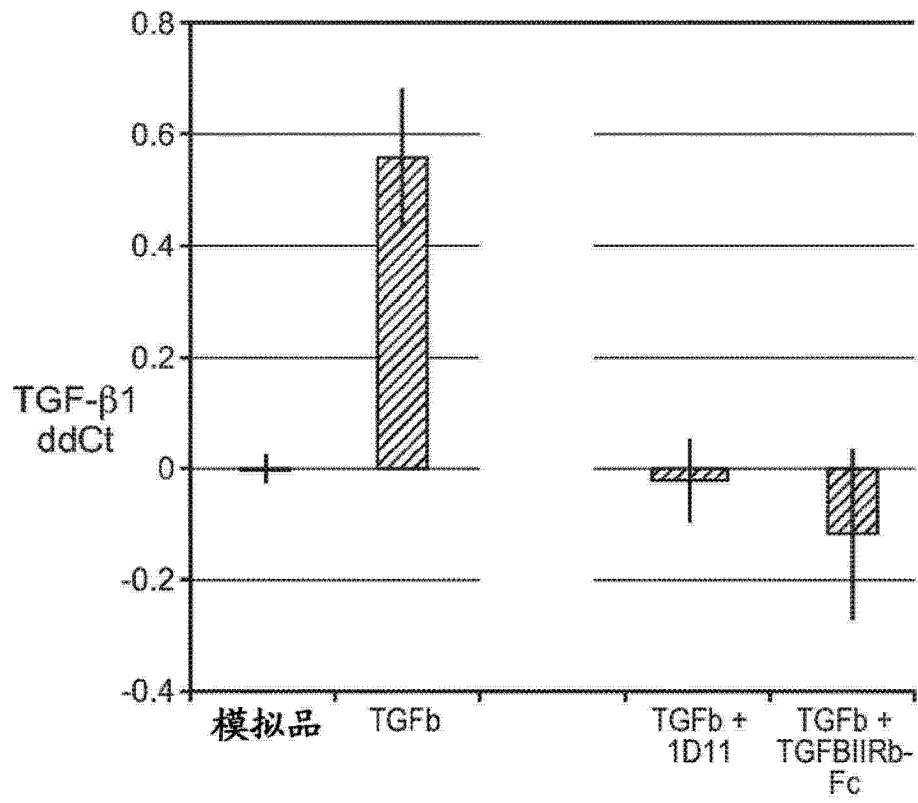


图 16A

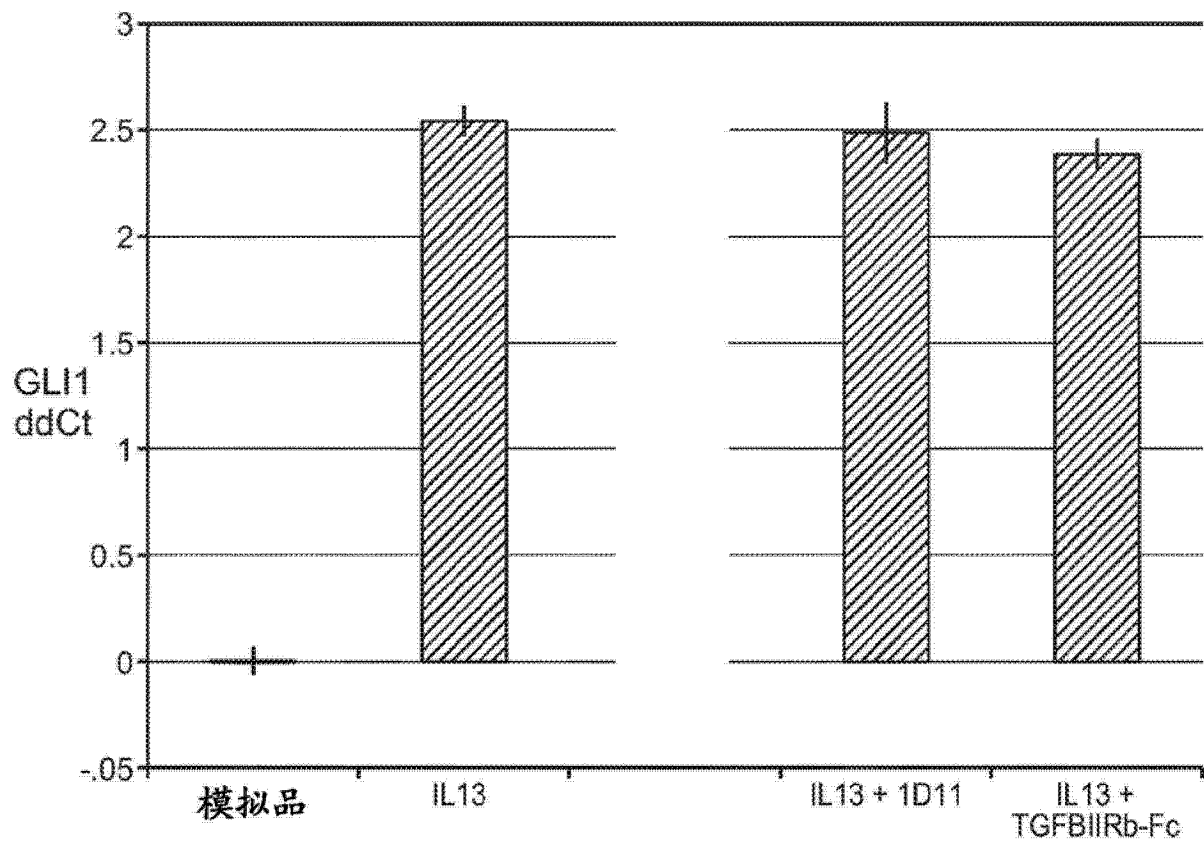


图 16B