



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107532201 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201680009183.0

(22) 申请日 2016.01.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107532201 A

(43) 申请公布日 2018.01.02

(30) 优先权数据
RM2015A000022 2015.01.19 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2016/050238 2016.01.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/116850 EN 2016.07.28

(73) 专利权人 爱瑞德勒股份有限公司

地址 意大利乌尔比诺

(72) 发明人 莫罗·马尼亚尼 莎拉·比亚焦蒂
米歇尔·曼诺塔

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51) Int.Cl.
G12Q 1/6883 (2018.01)
G12N 15/11 (2006.01)

审查员 贺巧巧

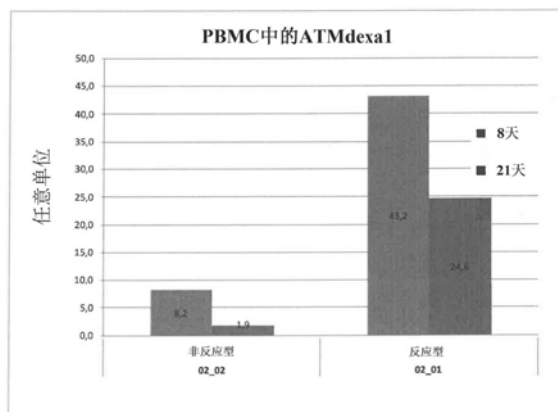
权利要求书1页 说明书11页
序列表10页 附图7页

(54) 发明名称

评估毛细血管扩张性共济失调的患者对糖皮质激素治疗的反应的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于评估患有毛细血管扩张性共济失调(A-T)的患者对糖皮质激素治疗的反应的新方法。具体地,该方法提供了定性和/或定量地测定这种患者的血液中的由糖皮质激素(GC)诱导的非标准剪接所产生的ATM(毛细血管扩张性共济失调突变)基因的mRNA变体表达的步骤。事实上,已经证实,mRNA变体表达存在于对GC治疗阳性反应的患者的血液中。



1. 用于检测毛细血管扩张性共济失调突变基因(ATM基因)的ATMdexa1 mRNA的试剂在制备诊断剂中的用途,所述诊断剂用于评估患有毛细血管扩张性共济失调的患者对糖皮质激素治疗的反应,包括定性和/或定量地测定所述患者的血液中的ATM基因的ATMdexa1 mRNA表达的步骤,所述糖皮质激素为地塞米松同一家族的糖皮质激素,

其中所述ATMdexa1 mRNA是由与已知积极影响所述毛细血管扩张性共济失调的临床表现的地塞米松同一家族的糖皮质激素诱导的非标准剪接产生的,并且含有磷脂酰肌醇3激酶结构域,

其中利用以下5'-3'正向、5'-3'反向引物对所述ATMdexa1 mRNA进行扩增:

SEQ ID:N01/SEQ ID:N02,

SEQ ID:N03/SEQ ID:N04,

SEQ ID:N06/SEQ ID:N07,

SEQ ID:N09/SEQ ID:N010,或

SEQ ID:N012/SEQ ID:N013,

并且其中所述ATMdexa1 mRNA的可检测的表达值表示对所述治疗的阳性反应。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述糖皮质激素选自:泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、地夫可特、或其药学上可接受的盐或酯或其混合物。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述糖皮质激素是泼尼松龙磷酸盐、地塞米松磷酸盐、倍他米松磷酸盐、地夫可特磷酸盐和其钠盐。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中将所述ATMdexa1 mRNA的表达的定量性测定相对于持家基因的表达进行归一化。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述ATMdexa1 mRNA的测定是通过任何扩增技术进行的。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述ATMdexa1 mRNA的测定是通过PCR的技术进行的。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述ATMdexa1 mRNA的测定是通过RT-PCR的技术进行的。

8. 根据权利要求5所述的用途,其中所述ATMdexa1 mRNA的测定是通过选自以下的技术进行的:带有嵌入剂的RT-PCR、Taq聚合酶-PCR、分子信标探针法PCR、FRET探针杂交和蝎型探针PCR。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的用途,其中所述测定是利用选自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的探针进行的。

10. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述糖皮质激素是封装在红细胞内的糖皮质激素。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述糖皮质激素是地塞米松磷酸单钠或地塞米松磷酸二钠。

评估毛细血管扩张性共济失调的患者对糖皮质激素治疗的反应的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于评估患有毛细血管扩张性共济失调 (A-T) 的患者对糖皮质激素治疗的反应的新方法。具体地,该方法提供了定性和/或定量地测定这种患者的血液中的由糖皮质激素 (GC) 诱导的非标准剪接所产生的 ATM (毛细血管扩张性共济失调突变) 基因的 mRNA 变体表达的步骤。事实上,已经证实, mRNA 变体表达存在于对 GC 治疗阳性反应的患者的血液中。

背景技术

[0002] 在过去几年中,各种临床试验提供证据表明用糖皮质激素 (GC) 进行短期治疗能够改善 A-T 患者的神经症状,甚至可以改善一些受试者小脑萎缩的状况 [1-4]。不幸的是,这种改善仅仅是暂时性的,并且在停用 GC 口服治疗后不久便消失;然而由于用类固醇长期治疗带来的危害可能会超过其带来的益处,因此停用是必要的 [5]。另一方面,通过红细胞给予非常低剂量的 GC 可以降低类固醇毒性,而不损害它们的有效性 [6-10]。因此,在 2010 年,建立了 II 期临床研究,该研究设想了通过包埋在自体红细胞中的地塞米松对 A-T 患者进行长期治疗 [11]。所提出的疗法对神经症状产生了显著改善,同时避免了已知的 GC 典型副作用的发作。最近,发明人依据对来自 A-T 患者的淋巴细胞的稳定的淋巴母细胞样细胞系进行的体外实验证实了合成的 GC 地塞米松 (dexamethasone, dexamethasone) 作用可能通过合成新的信使 RNA (mRNA) 分子而发挥作用,而该新的 mRNA 是通过 ATM 基因 (毛细血管扩张性共济失调突变基因) 的 mRNA 前体的非标准剪接而产生的 [14]。

[0003] 经计算机研究,表明所产生的被发明人称为 ATM_{dexa1} 的转录物不是成为垃圾 RNA,而是通过细胞机制被翻译成新的“缩短”形式的 ATM 蛋白质,从而跳过存在于 AT 患者中位于编码激酶和功能酶结构域的序列的上游的基因中的所有突变。在淋巴母细胞样细胞系中有效地鉴定出这种命名为 mini-ATM 的蛋白质变体,并且该蛋白质变体被证实具有潜在活性。这些发现致使发明人假设,通过这种新的分子机制, dexamethasone 治疗可以至少部分地恢复毛细血管扩张性共济失调中的缺陷 ATM 蛋白质,令人惊奇的是,可以允许“跳过”大部分的迄今所描述的 ATM 基因的突变。

发明内容

[0004] 本发明是基于以下的发现,即由糖皮质激素 (GC) 处理所诱导的非标准剪接产生的 ATM 基因 (毛细血管扩张性共济失调突变基因) 的 mRNA 变体的新转录物在从经受 GC 治疗的 A-T 患者获得的血液样品中是可鉴定的,并且其存在与对治疗处理的阳性反应相关。

[0005] 因此,本专利申请的目的是用于定量或定性分析 ATM 基因的 mRNA 变体的新方法,而该 mRNA 变体作为患者血液中的响应于糖皮质激素治疗 (如地塞米松) 的生物标志物。事实上,本发明人证实,这种 mRNA 变体的表达存在于对 GC 治疗阳性反应的患者血液中,尤其是在药物封装于红细胞内时,但是这种 mRNA 变体的表达不存在于健康对照和未接受该药物的患

者中。

[0006] 因此,本申请的目的是:

[0007] 一种用于评估患有毛细血管扩张性共济失调的患者对糖皮质激素治疗的反应的新方法,该方法包括定性和/或定量地测定这种患者的血液中的基因ATM(毛细血管扩张性共济失调突变基因)的mRNA变体表达的步骤,其中这种mRNA变体由糖皮质激素诱导的非标准剪接产生并且含有磷脂酰肌醇3激酶结构域,并且其中这种mRNA变体的可检测的表达值表示对治疗的阳性反应。

[0008] 一种治疗患有毛细血管扩张性共济失调患者的方法包括:

[0009] -向所述患者给予一定量的糖皮质激素,优选地塞米松的步骤;

[0010] -定性和/或定量地测定所述患者的血液中的基因ATM(毛细血管扩张性共济失调突变基因)的mRNA变体表达的步骤,其中所述mRNA变体由糖皮质激素诱导的非标准剪接产生并且含有磷脂酰肌醇3激酶结构域,并且其中所述mRNA变体的可检测的表达值表示对治疗的阳性反应;

[0011] -根据该反应而调整这种疗法的步骤。

[0012] 在本发明的一个实施方式中,糖皮质激素选自:泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、地夫可特或其药学上可接受的盐。

[0013] 在本发明的另一个实施方式中,ATM基因的mRNA变体是ATMdexa1mRNA。

[0014] 在另一个实施方式中,mRNA变体的表达的鉴定是定量性的,并相对于持家基因的表达进行归一化。

[0015] 在本发明的另一个实施方式中,利用任选地与探针相关的合适的5'-3'正向和5'-3'反向引物对以任何扩增技术来进行mRNA变体的鉴定。

[0016] 在本发明的替代实施方式中,将糖皮质激素封装在红细胞内。

[0017] 在本领域技术人员考虑到皮质类固醇的治疗通常伴随有副作用,甚至是严重的副作用时,尤其在随时间推移而延长治疗和/或对儿童群体进行治疗时,本发明提供的优点对于本领域技术人员而言是显而易见的。明显地,本发明提供的预后工具避免了将对疗法无反应(非反应型)或不充分反应的受试者进行延长治疗,因此避免了无用甚至有害的治疗。此外,通过测量ATMdexa1表达水平,可以确定向给定患者给予糖皮质激素的最佳次数,从而降低了过度剂量及因治疗引起的不良反应的风险,同时保持其治疗效果。

[0018] 可以使用相同的方法开发新的药物,甚至与糖皮质激素不同却能够诱导ATMdexa1表达的药物,从而为接受治疗的患者带来益处。

附图说明

[0019] 图1:源自经ERYDEX治疗的A-T患者的血液样品中的ATMdexa1转录物的定性和定量鉴定。通过RT-PCR方法用SYBR Green检测ATMdexa1表达水平,并与未经治疗的A-T患者和未经治疗的WT健康志愿者的表达水平进行比较(小图a)。在第二种分析中,根据 ICARS量表测定的对治疗的反应性,将经ERYDEX治疗的A-T患者细分为两个亚组(反应型和非反应型)(Trouillas P等人"International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome.-The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology".J Neurol

Sci.1997Feb 12;145(2):205-11.)，并且将两个接受处理的亚组与健康对照和未处理对照的相关表达水平进行了比较(小图b)。在该附图中，作为非反应型，即认为是在治疗后6个月证实ICARS值降低至低于或等于10 分的治疗后的患者。

[0020] 图2:对治疗后不同时间处的ATMdexa1定量。在ERYDEX给药后第+8天和第+21天时，评估了反应型患者和非反应型患者的表达水平。

[0021] 图3:通过RT-PCR法和SYBR Green扩增的ATMdexa1的示例性标准曲线。通过将适用于ATMdexa1的重组质粒的系列稀释液进行扩增，获得扩增曲线(小图A)、解离曲线(小图B)和线性曲线(小图C)。

[0022] 图4:经ERYDEX治疗的A-T患者的样本中的ATMdexa1扩增曲线(小图A)和解离曲线(小图B)。

[0023] 图5:根据地塞米松(Dexa)的给药量，分析miniATM表达水平与ICARS变化之间存在的线性关系(图a)。确定反应型和非反应型之间的对ERYDEX治疗的反应性和miniATM表达水平相关的数据，以及各自的ICARS值(图b)。

[0024] 图6:评估经Erydex治疗的反应型患者和非反应型患者中的FKBP5和DUSP1基因的表达，其转录物由地塞米松给药引起。

具体实施方式

[0025] 在Savitsky K等人.在Science.1995Jun 23;268(5218):1749-53中描述了ATM基因(毛细血管扩张性共济失调突变基因)。由于选择性剪接，编码PI 3-激酶家族的蛋白激酶的基因转录出27种不同的mRNA和20种已知的mRNA变体形式。

[0026] 在经受糖皮质激素治疗的患有毛细血管扩张性共济失调症的患者的血液中可检测到与本发明目的相关的mRNA变体的新的转录物，并且这种新的转录物与相同糖皮质激素对AT 的治疗效果相关。

[0027] 所述转录物是由糖皮质激素诱导的选择性非标准剪接的结果，其通过显著限制其相对于生理转录物的长度去除ATM基因的突变位点，同时至少部分地保留其对该蛋白激酶活性负责的区域，该区域含有磷脂酰肌醇3激酶结构域。

[0028] 特别是，先前的采用代表性的糖皮质激素地塞米松磷酸钠进行的实验工作使得能够体外地在A-T患者的细胞系上鉴定出约1582bp的命名为ATMdexa1的转录物(参见M.Menotta 等人，J.Biological Chemistry,2012年11月30日第287卷第49期)。

[0029] 已经证实，地塞米松衍生物(如不同于磷酸钠的盐)或与地塞米松同一家族的糖皮质激素类(同样已知对于毛细血管扩张性共济失调症的临床表现发挥改善的治疗效果)的给药通过相同的机制起作用，诱导mRNA变体的相同转录物，或功能等同的转录物。

[0030] 由于没有接受地塞米松治疗的A-T受试者和WT受试者都没有证实可检测水平的转录物，因而目前本发明人已经观察到，ATMdexa1合成与药物治疗直接相关。

[0031] 为了本发明的目的，术语“可检测水平的转录物”或“可检测的表达值”是指与检测方法和操作条件(例如，PCR的循环数或温度)无关的比对照组(即，未用GC治疗的A-T患者或健康个体)的平均值高出参照样标准偏差的至少3倍的值。

[0032] 此外，ATMdexa1表达与临床有效性直接地且成比例地相关，与未观察到疾病症状显著改善的患者(非反应型)相比，这种表达在疾病总体症状极大减轻(即，ICARS评分随着

需要的 Δ ICARS增加而减小)且与神经系统症状较大改善相关的患者(反应型)中更明显。非反应型被认为是已经证实在治疗6个月后ICARS值降低至低于或等于10分的经治疗的患者。

[0033] 此外,已经证实,已知在地塞米松治疗中表达更明显的基因(如FKBP5和DUSP1)表达在两组患者(反应型和非反应型)中没有变化,从而突出了miniATM作为治疗有效性的特异性生物标志物的特异性。

[0034] 最后,证实了ATMdexa1表达在药物输注后不久的数天内较高,然后随着时间推移逐渐降低,以及随着药物循环而消失,确定了地塞米松给药、临床反应和ATMdexa1表达之间的关系。

[0035] 容许用本发明方法监测的治疗和患者是通过给予已知为积极影响疾病的临床表现的糖皮质激素治疗AT。糖皮质激素选自包括以下的家族:泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、地夫可特、其衍生物和其盐形式,如磷酸二氢盐或磷酸钠,例如地塞米松磷酸盐、地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸盐或倍他米松磷酸钠、泼尼松龙磷酸盐或泼尼松龙磷酸钠、地夫可特磷酸盐或地夫可特磷酸钠。显然,用钠成盐的形式可以由第一主族或第二主族的金属的相应和通常的盐代替,而不改变本发明的本质。

[0036] 在通过本发明方法可监测的治疗的具体形式中,以封装在红细胞内的形式给予药物。在标题为“Process for the Preparation of Erythrocytes Loaded with One or More Substances of Pharmaceutical Interest and so Obtained Erythrocytes”的申请W02014/181309 (PCT/IB2014/061338)中描述了封装工艺。

[0037] 根据在W02014/181309中描述的方法,采用封装在红细胞内的地塞米松磷酸钠进行本申请中描述的实验工作。

[0038] 设计并建立了用于将血液样品中收集的mRNA变体(例如,ATMdexa1)表达进行鉴定和定量的各种基于聚合酶链式反应的方法。本文中引入的所有方法都允许对感兴趣的样品中的信使RNA进行相对和/或绝对定量。

[0039] 例如,通过选自以下的技术对血液样品或外周单核细胞(PBMC)进行扩增:PCR、RT-PCR、带有嵌入剂的RT-PCR、Taq聚合酶-PCR、分子信标探针法PCR、FRET探针杂交、蝎型探针PCR。在本申请的实验部分中描述了每种技术的方案,并且该方案是本发明的目的。

[0040] 作为定量方法,优选利用以已知的且逐渐增加的量加入作为标准品的DNA样品,由用于mRNA转录物(例如,ATMdexa1)序列的重组质粒分子设定的标准曲线,来评估方法的扩增效率和线性。相同的质粒/mRNA的系列稀释液可用作PCR阳性对照,并且用作靶标分子绝对定量的黄金标准。可替换地,该测定法提供了一对引物,用于扩增与靶标伴随的HPRT1的mRNA,而HPRT1的mRNA被选择作为感兴趣样品的持家基因。除了HPRT1之外,还测试了其它参考基因(例如,GAPDH, β 2M等),并且根据 $\Delta\Delta$ Ct方法或Pfaffel方法,可以将其用于ATMdexa1的相对定量。

[0041] 根据各种技术,本发明人设计并实施了合适的正向引物和反向引物。所述引物的核苷酸序列列于序列列表和下表1中。

[0042] 根据所采用的技术,还利用了适用于扩增检测的探针。这些探针中的一些的序列报告于序列列表和表1中。

[0043] 表1

方法	正向引物 5'—3'	反向引物 5'—3'	探针 5'—3'	报告基团/ 荧光团/ 供体	淬灭基团/荧 光团	定量
[0044] SYBR green qRT-PCR	ATCTAGATC GGCATTCA GATTCCA	GCAGACCAG CCAATTACT AAAC	无	SYBR green	无	直接
5'端核酸外切 酶法	CGCCTGATT CGAGATCC TGAA	GTGCCTCAA CACTTCTGA CCAT	AAACATCTAGAT CGGCATTGAGAT TCCAA	Cy3	BHQ2	
5'端核酸外切 酶法	CGCCTGATT CGAGATCC TGAA	GTGCCTCAA CACTTCTGA CCAT	TCTAGATCGGCA TTCAGATTCC	Cy3	BHQ2-Plus	
分子信标	AGAATGTCT GAGAATAG CA	AACTTAGAT GCCACTCAG	GATGGTCAGAAG TGTTGAGG	6-FAM	BHQ1	分子 信标
杂交/FRET 探 针	ATCCTGAAA CAATTAAC AT	ACTTTGTGA TGCTTATATT AT	TTTACAGAAATA TATTCAGAAAGA AACAGA/ TGAGAATAGCAA AACCAAATGTATC	FAM	LC 红 640	

[0045] 最后,在根据本发明的扩增过程中用作阳性对照的用于扩增已知持家基因的引物和探针的实例报告于表2中。

[0046] 表2

方法	正向引物 5'—3'	反向引物 5'—3'	探针 5'—3'	报告基团/ 荧光团/ 供体	淬灭基团/荧 光团	定量
[0047] SYBR green qRT-PCR	TATGCTGAG GATTTGGAA AGGGT	CCATCACAT TGTAGCCCT CT	无	SYBR green	无	直接
5'端核酸外切 酶法	GGAAAGGG TGTTTATTC CTCATGGA	GGCCTCCCA TCTCCTTCAT C	TATGGACAGGACT GAACGTCTTGC	JOE	BHQ1	
5'端核酸外切 酶法	GGATTTGG AAAGGGTG TTTATTCC	GGCCTCCCA TCTCCTTCAT C	TGGACTAATTATG GACAGGACTGA	JOE	BHQ1-plus	
5'端核酸外切 酶法	TATGCTGAG GATTTGGAA AGGGT	CCATCACAT TGTAGCCCT CT	TATGGACAGGACT GAACGTCTTGC	JOE	BHQ1	
分子信标	TCGTGATTA GTGATGAT GA	TTATGGACA GGACTGAAC	TACCTAATCATTAT GCTGAGGATT	HEX	BHQ1	分子 信标
杂交/FRET	GGCTATAA	GGACATAAA	AGATCCATTCTTA	FAM	LC 红 640	
[0048] 探针	ATTCCTTGC T	AGTAATTGG T	TGACTGTAGATT/ CAGACTGAAGAGC TATTGTAATGAC			

[0049] 实验部分

[0050] 以下部分通过举例的方式报告了利用地塞米松作为糖皮质激素药物的代表性样品,在 IEDAT临床研究下进行的实验工作。

[0051] 体内实验

[0052] 获得管辖中的伦理委员会批准以及经病人或其法定监护人(如果是未成年人的话)批准后,获得进入IEDAT临床研究的22例患者中的10例血液样本。在治疗结束时采集血液,准确地说是在第六次且之后输注由临床研究提供的intra-erythrocytic地塞米松

(ERYDEX[®])起的第21天。还将血液样品收集在特定提供的含有稳定溶液的管(Vacutainer)中,该稳定溶液适合于保留将随后被提取的RNA。简而言之,将提取的RNA反转录成相应的cDNA并进行旨在测定ATMdexa1表达的分析。为此,建立了实时PCR测定法,用于进行定性和定量分析,其能够特异性鉴定在淋巴母细胞中首先转录的新的mRNA分子。根据所述测定法,在所有的10个可用样品中均鉴定出ATMdexa1。作为对照,对未经地塞米松药物治疗的A-T患者和志愿的健康(WT)受试者的血液样品进行了相同的研究。在所述样品中,未检测出ATMdexa1(图1a)。报告的结果表明,诱导ATMdexa1同种型似乎严格依赖于药物治疗。

[0053] 根据ICARS量表的研究所评估的对A-T患者的神经系统症状的ERYDEX功效显示出更大程度的改善与更多封装以及由此导致的更多的药物给予相关[11]。因此,将患者分为反应型(或“加载者”)和非反应型(或“非加载者”)。为了将dexa功效与ATMdexa1诱导相关联,通过将来自患者的样品细分为两组以进行亚组分析。如图1b所示,与非反应型患者相比,反应型A-T患者(样品)显示出ATMdexa1表达更明显,这表明ATMdexa1表达似乎与dexa功效直接相关,或至少有利于dexa功效。最后,分析了两组的单个患者的血液样品,该血液样品收集自ERYDEX输注后的不同时间处,特别是在给药后第+8天和第+21天。在这种情况下,反应型患者证实在这两处时间的表达水平平均高于非反应型。然而,令人惊讶地观察到(通过比较两种情况下的患者内水平),ATMdexa1转录物的表达水平在第+8天时比在第+21天时更高(图2)。这与治疗后随着时间推移而dexa效果逐渐减弱一致,这一事实强调需要进行重复给药,以便保持药物有效性。

[0054] 在随后的实验中,患者参与与上述类似的研究,观察到根据药物(地塞米松)的给药量,miniATM表达与ICARS变化成正比关系(图5a)。特别地,miniATM表达与药物(地塞米松)的给药量之间的相关性是线性的。此外,确定了miniATM表达的增加与神经系统症状的较大改善相关,即ICARS评分降低和需要的 Δ ICARS增加(图5b)。

[0055] 最后,对用于miniATM测定的相同样品中的FKBP5和DUSP1基因表达的评估强调了,尽管糖皮质激素治疗经常增加这些基因的表达,但是其在两组患者(反应型和非反应型)中的表达水平并没有显著变化。这种观察强调了miniATM表达作为治疗功效的特异性生物标志物的特异性。

[0056] 总之,最近在ATM^{-/-}淋巴母细胞样细胞系中鉴定出的新的ATMdexa1转录物,首先在体内特别是在经ERYDEX治疗的A-T患者的PBMC中被鉴定出[14]。由于没有接受地塞米松的A-T受试者和WT受试者均未检测出可检测水平的转录物,所以ATMdexa1合成与药物治疗直接相关。此外,ATMdexa1表达与临床疗效直接相关,这种表达在ICARS评分下降较多的患者中更为明显,并且其与神经系统症状极大改善相关。最后,ATMdexa1表达证明了ATMdexa1表达在ERYDEX输注后不久的数天内较高,然后随着时间推移缓慢降低,同时随着药物循环而消失,确定了地塞米松给药、临床反应和ATMdexa1表达之间的关系。

[0057] 经地塞米松治疗的A-T患者的PBMC中的ATMdexa1mRNA鉴定和定量的实验方案

[0058] 1) 样品收集:

[0059] 从A-T患者和健康志愿者收集3ml血液,直接置于Vacutainer Tempus Blood RNA管(Applied Biosystems)中,该管含有裂解溶液和确保RNA保存直到随后提取的稳定剂。取出后立即将样品冷冻并在-20°C下保存几个月。在相同的温度下进行从医院中心到发明

者的实验室的装运,以避免样品除霜和变质。

[0060] 2) 总RNA提取和互补DNA合成:

[0061] 按照制造商的说明书报告,通过Tempus spin RNA分离试剂盒(Applied Biosystems)对血液样品进行总RNA提取。在先利用QIAGEN RNA提取试剂盒进行纯化后,进行清除过程以完全消除DNA污染。每个初始由3ml全血组成的样品的平均产量约为8.5微克的纯的总RNA。然后,将每个样品的500ng RNA用于逆转录反应,产生相应的互补DNA(cDNA),在寡核苷酸T(oligo dT)或随机六聚体(Random hexamer)或两者存在下由酶(SMARTScribe反转录酶(Clontech))催化而引发反应。按制造商说明的方案报告进行cDNA合成。

[0062] 在RNA提取和cDNA合成程序之前,添加从智人以外的物种(例如,细菌mRNA或植物mRNA)获得的外源性非保守的RNA分子作为内部对照,以便能够验证提取、合成和随后的扩增效率。更优选地,用作为标准品的分子可以直接添加至包含于vacutainer中的稳定溶液中。

[0063] 3) PCR测定法用于样品中的ATMdexa1定量:

[0064] 已经设计并建立了几种全都基于聚合酶链式反应(PCR)的方法,用于收集的血液样品中的ATMdexa1鉴定和定量;其中一些在下文中进行详细描述,因此作为发明而要求受到保护。这里介绍的所有方法都允许对感兴趣的样品中的ATMdexa1信使RNA进行相对和/或绝对定量。

[0065] a) 要求保护的第一种方法设想了插入至DNA的双链(ds)中的嵌入剂(例如,SYBR Green)或具有嵌入作用的任何其它的荧光团的应用。这种技术在嵌入剂的存在下通过定量性实时PCR而基于cDNA家族的特异性扩增,该嵌入剂嵌入至逐渐增加DNA的双链中以监测扩增子合成。特别地,对于这种实验,发明人采用了由Takara制造的SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus),其在合适的缓冲系统中含有酶(Taq聚合酶)和SYBR Green。向反应混合物中加入额外量的MgCl₂以达到3.5mM的最佳的终浓度,以及终浓度为300nM的一对特异性引物。通过计算机设计了寡核苷酸对,以选择性识别与ATMdexa1转录物(ATMdexa1 cDNA)互补的DNA,而损害天然mRNA(表1和2)。在本文提出的实施例中,在扩增过程中样品中的实时测量的起始荧光将严格地依赖于存在于初始样品中的ATMdexa1 RNA量,并且将采用与最初RNA量成反比的多个扩增循环,以达到荧光的阈值水平。将优化以获得ATMdexa1的特异性且线性扩增的热分布设定为40个循环,每个循环包括变性(94°C下10秒)、退火(65°C下20秒)和72°C下延伸36秒。作为定量方法,利用以已知的且逐渐增加的量加入作为标准品的DNA样品,由针对ATMdexa1序列的重组质粒分子组装的标准曲线,以评估该方法的扩增效率和线性。相同的ATMdexa1质粒的系列稀释液可用作PCR阳性对照,并作为靶标分子绝对定量的黄金标准。可替换地,该测定法提供了一对引物,用于扩增感兴趣样品中的与靶标伴随的HPRT1 mRNA,而这种HPRT1 mRNA被选择作为持家基因。除了HPRT1之外,还测试了其它参考基因(例如,GAPDH,β2M等),并且根据 $\Delta \Delta Ct$ 方法或Pfaffel方法,可以将其用于ATMdexa1的相对定量。

[0066] 通过此部分描述的测定法获得在本发明的描述中得到的实验结果。方法验证设想了设置如上所述的标准曲线。在图3中报告了相关的扩增曲线(图3,小图A)、解离曲线(图3,小图B)和线性曲线(图3,小图C),证实了ATMdexa1的特异性、线性和单一性扩增。外推的线性线的斜率为-3.30(相当于100%的扩增效率),并且R²为0.99。

[0067] 在相同条件下对经受dexamethasone治疗的A-T患者的感兴趣样品进行扩增,并与未治疗的A-T患者和健康志愿者进行比较。如图4所示,所有研究样品均获得了特异性扩增,而在对照样品中没有检测到扩增。源自阳性样本的阈值循环(Ct)减去持家HPRT1的相关阈值Ct,用于计算ATM_{dexa1} mRNA的相对量。

[0068] b) 示例性的第二种方法是基于5'端核酸外切酶法,其利用Taq聚合酶的5'端核酸外切酶活性。除了一对特异性引物之外,还使用同样特异性的DNA探针,其在新合成的扩增子上退火,并在链延伸期间被聚合酶水解掉。探针携带淬灭剂(BHQ或BHQPIus淬灭剂)和报告荧光团分别与3'-端和5'-端结合,其中淬灭剂抑制报告荧光团的发射。通过聚合酶将探针水解导致淬灭剂的分离和离开,从而发射荧光。通过利用HOT-RESCUE实时PCR FP试剂盒(Diatheva)对发明人的样品进行反应。对于ATM_{dexa1}靶标,设计了作为报告荧光团的具有Cy3的特异性探针,而对于持家HPRT1,设计了作为荧光团的具有JOE的特异性探针,从而具有对于靶基因和参考基因特异性的并能够在多重PCR中进行这两种反应的信号。将两对引物(表1和表2)的浓度优化为500nM,而探针浓度为100nM。热分布设定为在94°C下15秒的50个变性循环,然后在60°C进行退火/延伸60秒。在这种情况下,ATM_{dexa1}的定量可以以相对方式(相对于参考基因)或如先前实施例描述的以绝对方式进行。

[0069] c) ATM_{dexa1}可以通过一系列的全部都基于PCR技术的其它测定法进行量化。例如,发明人设计了在分子信标法中使用的探针。在本申请中,扩增是在分子信标探针的存在下进行的,该分子信标探针在5'末端标记有荧光报告染料(针对ATM_{dexa1}的FAM和针对HPRT1的HEX)并在3'末端标记有淬灭剂(BHQ1,表1和表2)。在退火步骤期间,引物和探针与相应的互补DNA序列杂交。特别地,探针的杂交引起它们“打开”以及荧光团和淬灭剂的必然分离;因此淬灭剂不能再吸收由报告基因荧光团发射的能量。

[0070] d) 所提出的方法的另一个实例是基于杂交/FRET探针,其包括使用两种标记的探针:第一种位于3'末端,具有供体荧光团(FAM),而第二种位于5'末端,具有受体荧光团(LC红640)。

[0071] e) 最后,可以由蝎型技术探针设置PCR测定法。在上述实施例中提出的用于生物样品中ATM_{dex1}的扩增和连续定量的所有引物对和所有探针的序列报告在表1和2中。设想通过聚合酶链式反应(例如,数字PCR)量化ATM_{dexa1}的所提及的所有方法以及在先前方法的主题上设置为变体的任何其它的方法,属于本发明的范围。

[0072] 参考文献

[0073] 1. Broccoletti T, Del GE, Amorosi S, Russo I, Di BM等人 Steroid-induced improvement of neurological signs in ataxia-telangiectasia patients. *Eur J Neurol* 2008, 15:223-228.

[0074] 2. Buoni S, Zannolli R, Sorrentino L, and Fois A. Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Arch Neurol* 2006, 63:1479-1482.

[0075] 3. Russo I, Cosentino C, Del GE, Broccoletti T, Amorosi S等人 In ataxia-teleangiectasia betamethasone response is inversely correlated to cerebellar atrophy and directly to antioxidative capacity. *Eur J Neurol* 2009, 16:755-759.

[0076] 4. Broccoletti T, Del GE, Cirillo E, Vigliano I, Giardino G等人 Efficacy of

very-low-dose betamethasone on neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Eur J Neurol* 2011, 18:564-570.

[0077] 5. Gatti RA and Perlman S. A proposed bailout for A-T patients? *Eur J Neurol* 2009, 16:653-655.

[0078] 6. Biagiotti S, Paoletti MF, Fraternali A, Rossi L, and Magnani M. Drug delivery by red blood cells. *IUBMB Life* 2011, 63:621-631.

[0079] 7. Bossa F, Latiano A, Rossi L, Magnani M, Palmieri O 等人 Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2008, 103:2509-2516.

[0080] 8. Castro M, Rossi L, Papadatou B, Bracci F, Knafelz D 等人 Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21-phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007, 44:423-426.

[0081] 9. Pierige F, Serafini S, Rossi L, and Magnani M. Cell-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60:286-295.

[0082] 10. Rossi L, Serafini S, Cenerini L, Picardi F, Bigi L 等人 Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biotechnol Appl Biochem* 2001, 33:85-89.

[0083] 11. Chessa L, Leuzzi V, Plebani A, Soresina A, Micheli R 等人 Intra-erythrocyte infusion of dexamethasone reduces neurological symptoms in ataxia teleangiectasia patients: results of a phase 2 trial. *Orphanet J Rare Dis* 2014, 9:5.

[0084] 序列表

[0085] SEQ ID NO:1:

[0086] ATCTAGATCGGCATTCAGATTCCA

[0087] SEQ ID NO:2

[0088] GCAGACCAGCC AATTACTAAAC

[0089] SEQ ID NO:3

[0090] CGCCTGATTCGAGATCCTGAA

[0091] SEQ ID NO:4

[0092] GTGCCTCAACACTTCTGACCAT

[0093] SEQ ID NO:5

[0094] AAACATCTAGATCGGCATTCAGATTCCAA

[0095] SEQ ID NO:6

[0096] CGCCTGATTCGAGATCCTGAA

[0097] SEQ ID NO:7

[0098] GTGCCTCAACACTTCTGACCAT

[0099] SEQ ID NO:8

[0100] TCTAGATCGGCATTCAGATTCC
[0101] SEQ ID NO:9
[0102] AGAATGTCTGAGAATAGCA
[0103] SEQ ID NO:1 0
[0104] AACTTAGATGCCACTCAG
[0105] SEQ ID NO:1 1
[0106] GATGGTCAGAAGTGTTGAGG
[0107] SEQ ID NO:12
[0108] ATCCTGAAACAATTAACAT
[0109] SEQ ID NO:13
[0110] ACTTTGTGATGCTTATATTAT
[0111] SEQ ID NO:14
[0112] TTTACAGAAATATATTCAGAAAGAAACAGA
[0113] SEQ ID NO:15
[0114] TGAGAATAGCAAAACCAAATGTATC
[0115] SEQ ID NO:16
[0116] TATGCTGAGGATTTGGAAAGGGT
[0117] SEQ ID NO:17
[0118] CCATCACATTGTAGCCCTCT
[0119] SEQ ID NO:18
[0120] GGAAAGGGTGTTTATTCCTCATGGA
[0121] SEQ ID NO:19
[0122] GGCCTCCCATCTCCTTCATC
[0123] SEQ ID NO:20
[0124] TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC
[0125] SEQ ID NO:21
[0126] GGATTTGGAAAGGGTGTTTATTCC
[0127] SEQ ID NO:22
[0128] GGCCTCCCATCTCCTTCATC
[0129] SEQ ID NO:23
[0130] TGGACTAATTATGGACAGGACTGA
[0131] SEQ ID NO:24
[0132] TATGCTGAGGATTTGGAAAGGGT
[0133] SEQ ID NO:25
[0134] CCATCACATTGTAGCCCTCT
[0135] SEQ ID NO:26
[0136] TCGTGATTAGTGATGATGA
[0137] SEQ ID NO:27
[0138] TTATGGACAGGACTGAAC

[0139] SEQ ID NO:28
[0140] TACCTAATCATTATGCTGAGGATT
[0141] SEQ ID NO:29
[0142] GGCTATAAATTCTTTGCT
[0143] SEQ ID NO:30
[0144] GGACATAAAAGTAATTGGT
[0145] SEQ ID NO:31
[0146] AGATCCATTCCTATGACTGTAGATT
[0147] SEQ ID NO:32
[0148] CAGACTGAAGAGCTATTGTAATGAC

序列表

- <110> 爱瑞德勒股份有限公司
 <120> 评估毛细血管扩张性共济失调的患者对糖皮质激素治疗的反应的方法
 <130> BW855R
 <160> 32
 <170> BiSSAP 1.2
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..24
 <223> /mol_类型="未指定的DNA"
 /注释="正向引物"
 /有机体="人工序列"
 <400> 1
 atctagatcg gcattcagat tcca 24
- [0001] <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..22
 <223> /mol_类型="未指定的DNA"
 /注释="反向引物"
 /有机体="人工序列"
 <400> 2
 gcagaccagc caattactaa ac 22
- <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <222> 1..21
 <223> /mol_类型="未指定的DNA"
 /注释="正向引物"
 /有机体="人工序列"
 <400> 3

	cgcctgattc gagatcctga a	21
	<210> 4 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..22 <223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 4 gtgcctcaac acttctgacc at	22
	<210> 5 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..29 <223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
[0002]	<400> 5 aaacatctag atcggcattc agattccaa	29
	<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <222> 1..21 <223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 6 cgcctgattc gagatcctga a	21
	<210> 7 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220>	

	<221> 来源	
	<222> 1..22	
	<223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 7	
	gtgcctcaac acttctgacc at	22
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..22	
	<223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 8	
	tctagatcgg cattcagatt cc	22
[0003]	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..19	
	<223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 9	
	agaatgtctg agaatagca	19
	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..18	
	<223> /mol 类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 10	
	aacttagatg ccactcag	18

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..20	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 11	
	gatggtcaga agtggtgagg	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..20	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
[0004]	<400> 12	
	atcctgaaac aattaaacat	20
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..21	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 13	
	actttgtgat gcttatatta t	21
	<210> 14	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..30	

	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 14 tttacagaaa tatattcaga aagaaacaga	30
	<210> 15 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..25 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 15 tgagaatagc aaaaccaaat gtatc	25
	<210> 16 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
[0005]	<220> <221> 来源 <222> 1..23 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 16 tatgctgagg atttgaaag ggt	23
	<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 17 ccatcacatt gtagccctct	20
	<210> 18	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..25	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 18	
	ggaaagggtg tttattcctc atgga	25
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..20	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
[0006]	<400> 19	
	ggcctcccat ctcttcac	20
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..24	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 20	
	tatggacagg actgaacgtc ttgc	24
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<222> 1..24	
	<223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物"	

	/有机体="人工序列"	
	<400> 21 ggatttggaagggtgttta ttcc	24
	<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..20 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 22 ggcctcccat ctccctcatc	20
	<210> 23 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
[0007]	<220> <221> 来源 <222> 1..24 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 23 tggactaatt atggacagga ctga	24
	<210> 24 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..23 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 24 tatgctgagg atttgaaag ggt	23
	<210> 25 <211> 20 <212> DNA	

<p><213> 人工序列</p> <p><220></p> <p><221> 来源</p> <p><222> 1..20</p> <p><223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"</p>	
<p><400> 25 ccatcacatt gtagcctct</p>	20
<p><210> 26</p> <p><211> 19</p> <p><212> DNA</p> <p><213> 人工序列</p> <p><220></p> <p><221> 来源</p> <p><222> 1..19</p> <p><223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"</p>	
<p><400> 26 tcgtgattag tgatgatga</p>	19
[0008]	
<p><210> 27</p> <p><211> 18</p> <p><212> DNA</p> <p><213> 人工序列</p> <p><220></p> <p><221> 来源</p> <p><222> 1..18</p> <p><223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"</p>	
<p><400> 27 ttatggacag gactgaac</p>	18
<p><210> 28</p> <p><211> 24</p> <p><212> DNA</p> <p><213> 人工序列</p> <p><220></p> <p><221> 来源</p> <p><222> 1..24</p> <p><223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"</p>	

	<400> 28 tacctaataca ttatgctgag gatt	24
	<210> 29 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..18 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="正向引物" /有机体="人工序列"	
	<400> 29 ggctataaat tctttgct	18
	<210> 30 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..19 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="反向引物" /有机体="人工序列"	
[0009]	<400> 30 ggacataaaa gtaattggt	19
	<210> 31 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <222> 1..25 <223> /mol_类型="未指定的DNA" /注释="探针" /有机体="人工序列"	
	<400> 31 agatccattc ctatgactgt agatt	25
	<210> 32 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	

[0010] <220>
<221> 来源
<222> 1..25
<223> /mol_类型="未指定的DNA"
/注释="探针"
/有机体="人工序列"

<400> 32
cagactgaag agctattgta atgac

25

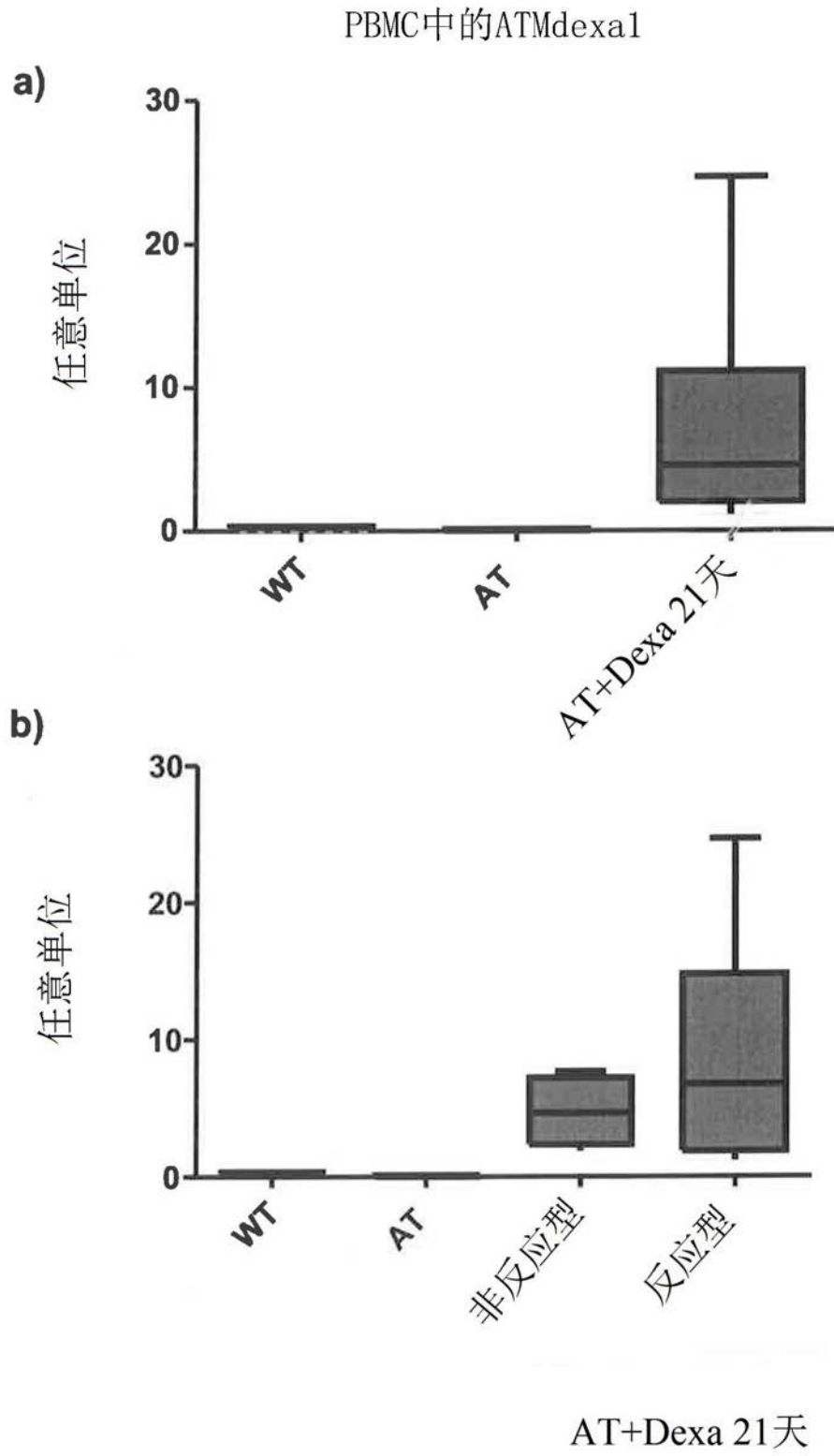


图1

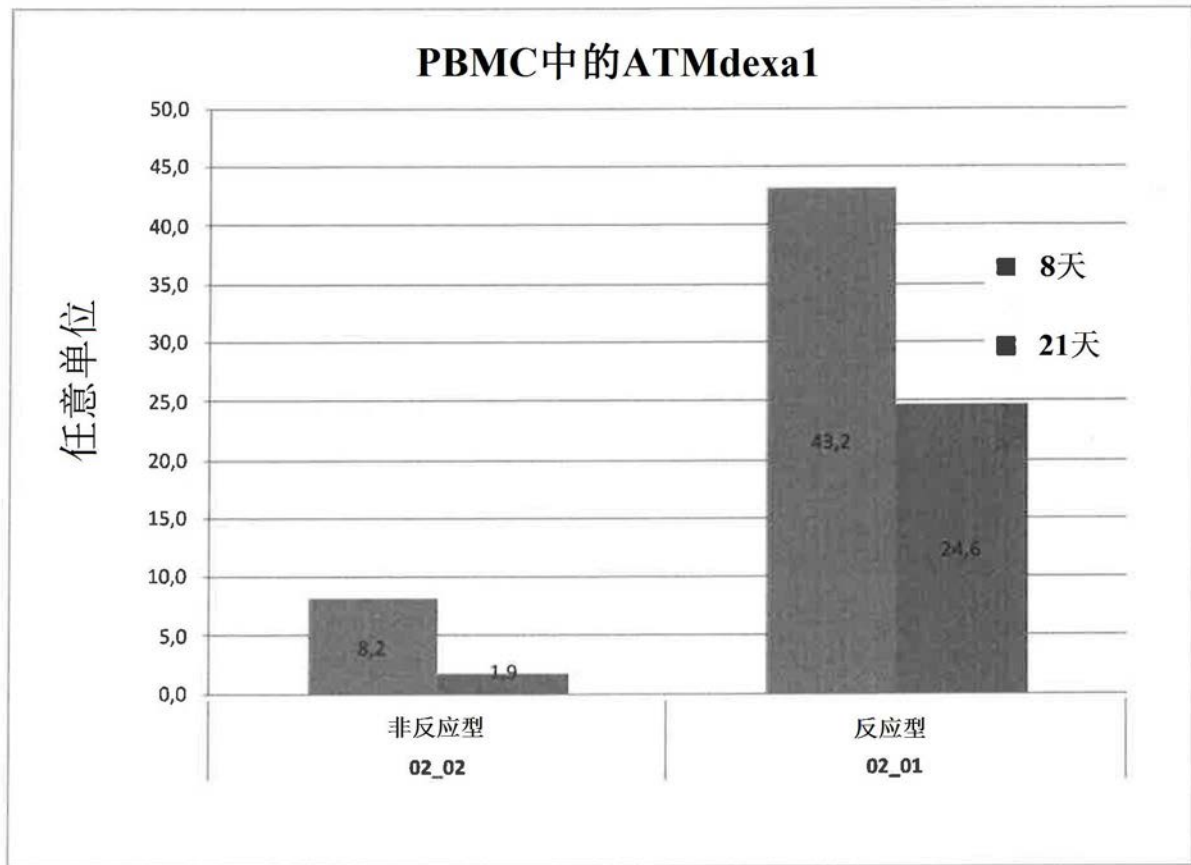


图2

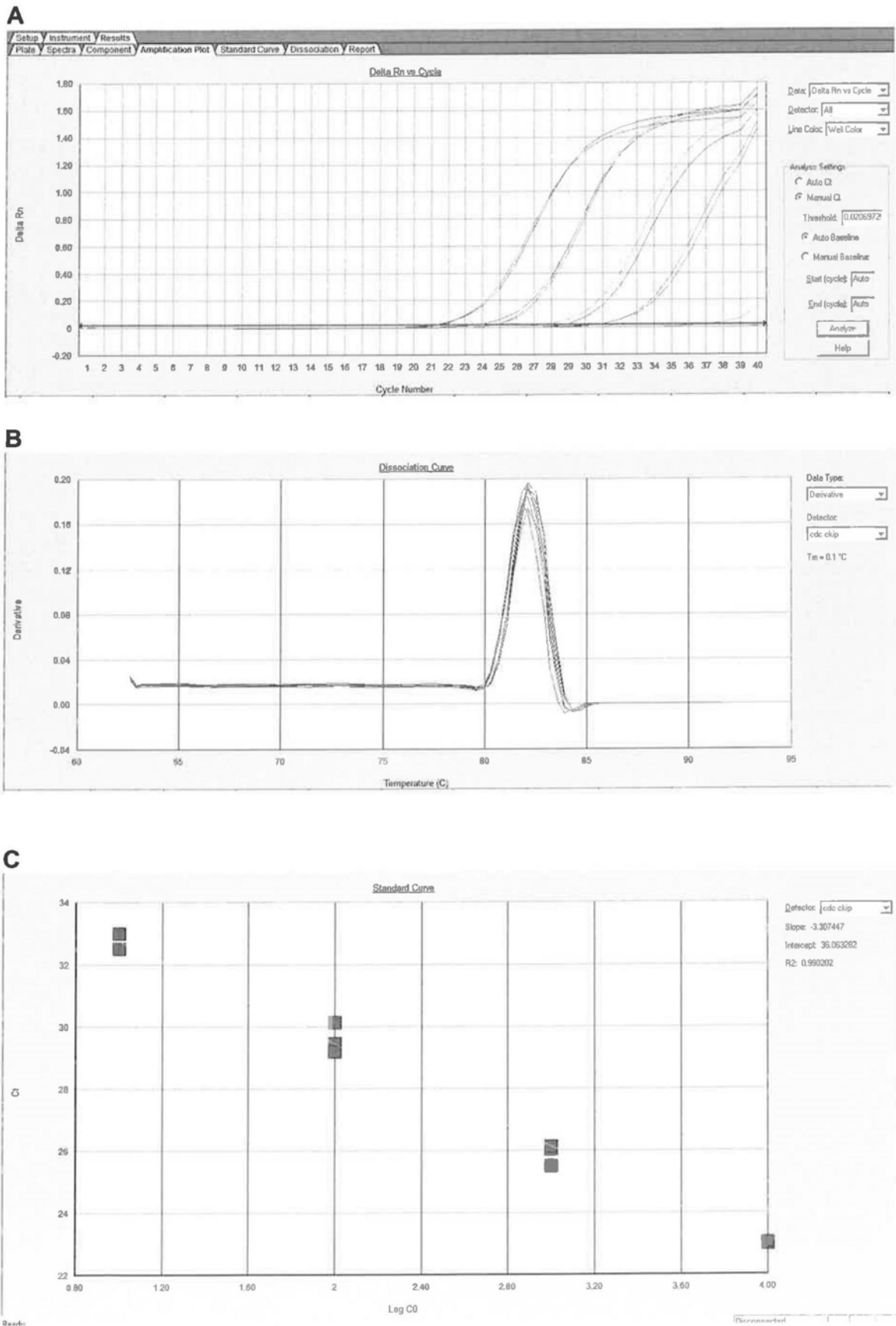
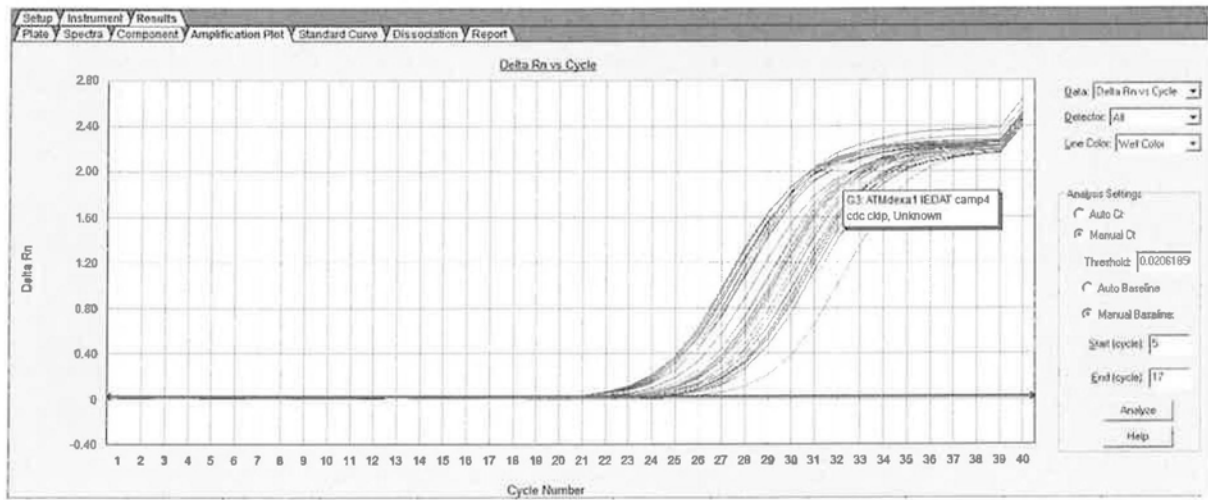


图3

A



B

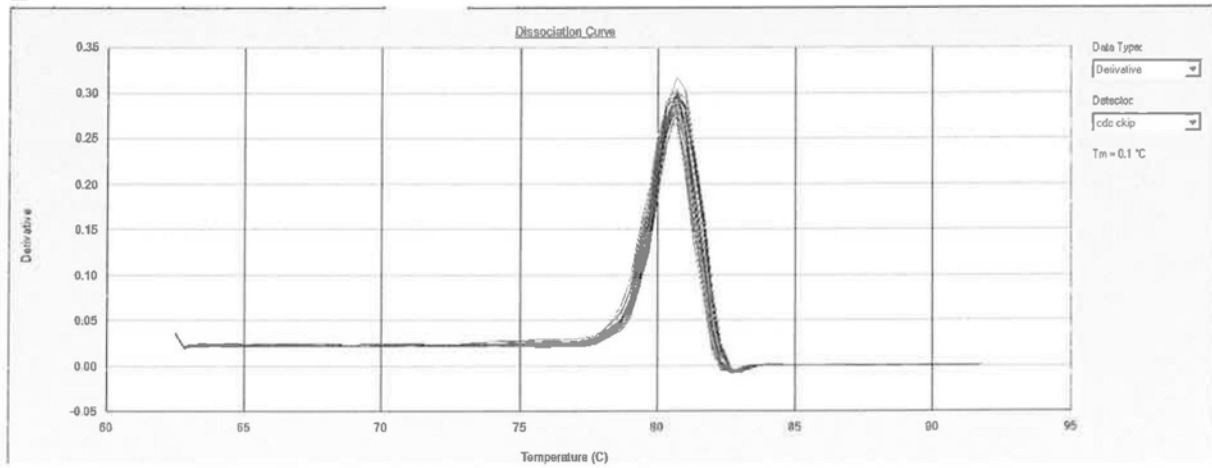
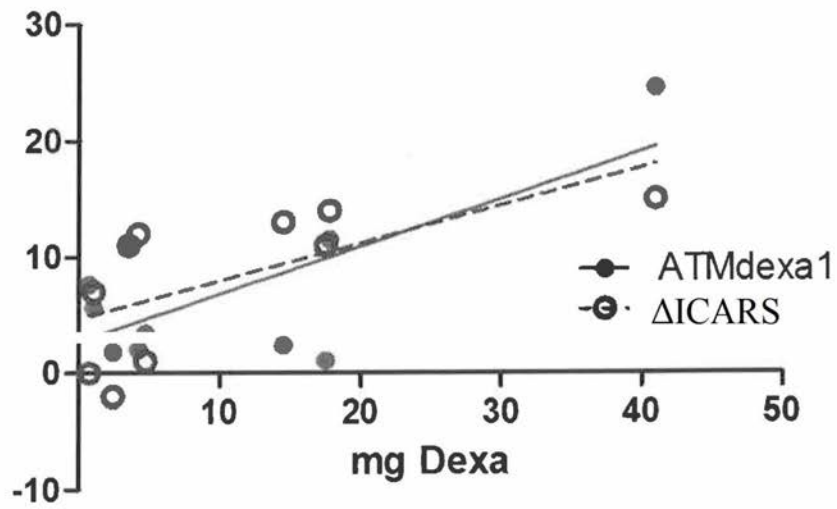


图4

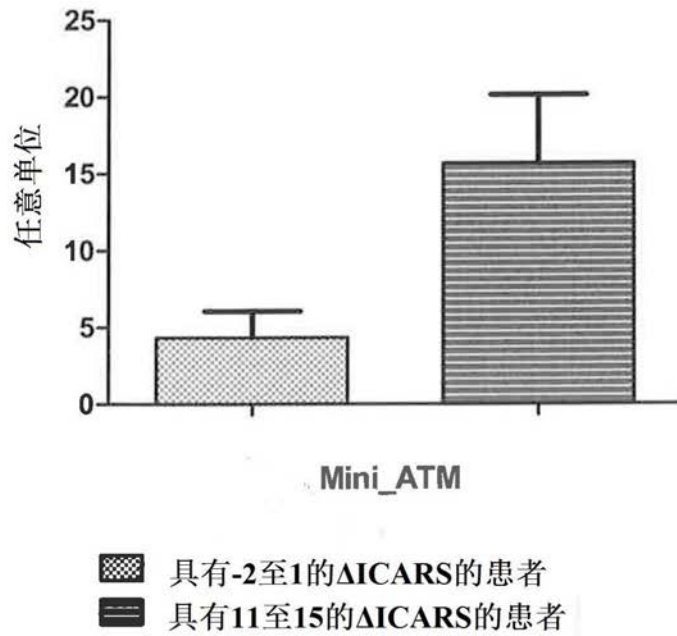
a)

图(双侧)



	ATMdexa1	ΔICARS
XY对的数量	10	10
皮尔逊相关系数	0.7136	0.6466
95%置信区间	0.1523 至 0.9268	0.02848 至 0.9070
P值 (双侧)	0.0205	0.0433
P值总和	*	*
(alpha=0.05):显著相关? (α=0.05)	是	是
R ²	0.5092	0.4181

图5a



数值的数量	3	3	3	3
平均值	4.317	-0.3333	15.69	13.33
标准偏差	3.003	1.528	7.713	2.082
标准误差	1.734	0.8819	4.453	1.202
平均值的95%CI下限	-3.142	-4.128	-3.470	8.162
平均值的95%CI上限	11.78	3.461	34.85	18.50
总计	12.95	-1.000	47.07	40.00

1 mini ATM	1 ΔICARS	2 Mini ATM	2 ΔICARS
3.44	1.	10.95	11.
7.66	0.	11.53	14.
1.85	-2.	24.59	15.
Mini ATM	截止点 = 4.3 ± 6		
ΔICARS	截止点 = -0.33 ± 3		

图5b

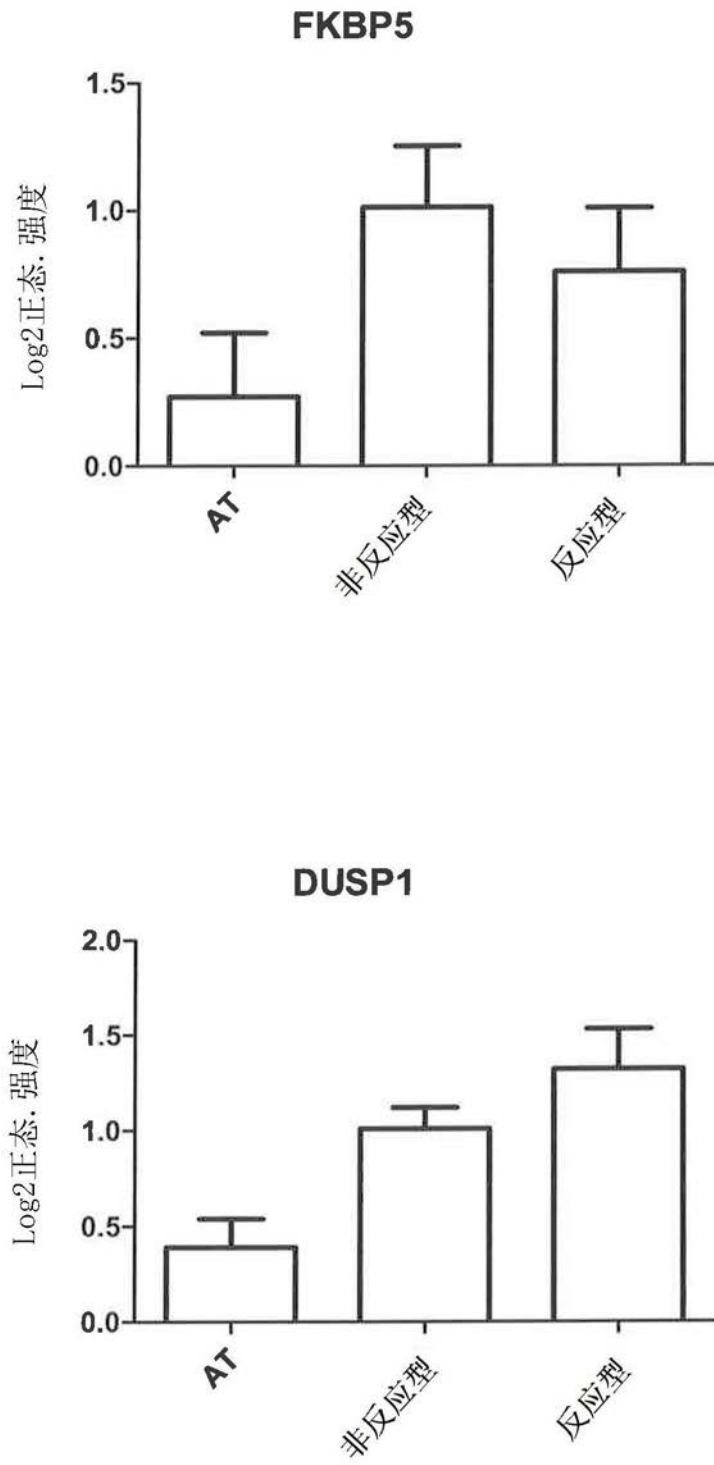


图6