



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104520707 B

(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 201380027247.6

(22)申请日 2013.05.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104520707 A

(43)申请公布日 2015.04.15

(30) 优先权数据
61/651,144 2012.05.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/042627 2013.05.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/177505 EN 2013.11.28

(73)专利权人 欧尔本生物科技有限责任公司
地址 美国麻萨诸塞州布鲁克林阿斯平沃尔
1号大道64号

(72)发明人 秦汉摩·欧尔本

(74)专利代理机构 北京律和信知识产权代理事务
所(普通合伙) 11446

代理人 王美石 刘国伟

(51) Int. Cl.

(56)对比文件
WO 2009120341 A2, 2009.12.30,
刘繁荣等. BALB/c 小鼠 1 型糖尿病模型的构建与 CD4⁺ CD25⁺Treg 的检测.《广东医学》.2011, 第32卷(第4期), 427-429.

杨治芳等.成人隐匿性自身免疫糖尿病CD4+调节性T细胞研究.《中华医学杂志》.2009,第86卷(第36期),2533-2536.

石晓红. I型糖尿病患者外周血辅助性T细胞亚群Th1/Th2细胞平衡研究.《齐鲁医学检验》.2004,第15卷(第1期),8-9.

审查员 于园园

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

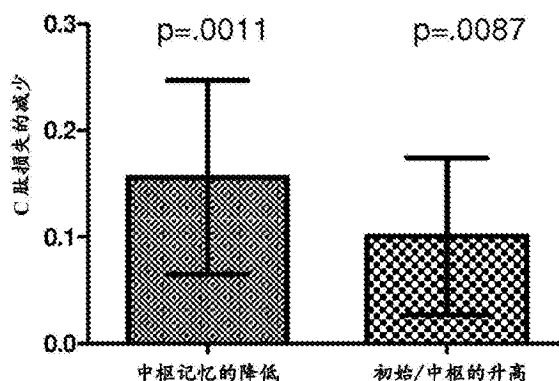
(54)发明名称

糖尿病生物标记物

(57)摘要

本发明已根据CD4初始(CD45RO-CD62L+)与中枢记忆(CD45RO+CD62L+)的比率和CD4中枢记忆T细胞亚群的水平而发现一种新的1型糖尿病中自身胰岛素产生下降的标记物。一种在受试者中诊断自身免疫和其进行性,更确切来说诊断糖尿病、前糖尿病、对糖尿病的易感性或疗法/干预模态对一种或多种这些病状的有效性水平的方法,所述方法可以通过以下方式进行:通过对从受试者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4初始(CD45RO-CD62L+)T细胞的水平;通过对从受试者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4中枢记忆(CD45RO+CD62L+)T细胞的水平;以及定量地关联所述CD4初始T细胞和中枢记忆T细胞的所述水

平,其中CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞的低比率和/或高CD4中枢记忆T细胞表明自身免疫、对自身免疫的易感性、糖尿病、前糖尿病、对糖尿病的易感性或治疗对一种或多种这些病状的无效性。



1. 一种生物标记物的检测和分析方法,所述生物标记物包括CD4T细胞初始与CD4中枢记忆T细胞的低的或降低的比率或高的或增加的CD4中枢记忆T细胞水平,其特征在于:所述检测和分析方法包括:

在一个或多个样品中测量CD45RO+CD62L+CD4+中枢记忆T细胞亚群水平并且任选地测量CD45RO-CD62L+CD4+T细胞初始亚群水平;以及

计算两个或更多个样品之间或在不同时间点对一个样品进行的两个或更多个测量之间的所述CD45RO+CD62L+CD4+中枢记忆T细胞亚群水平的变化,和/或所述CD45RO-CD62L+CD4+T细胞初始亚群与CD4中枢记忆T细胞亚群的比率的变化。

2. 如权利要求1所述的生物标记物的检测和分析方法,所述方法还包括:确定样品中相关的抗体的存在,所述相关的抗体选自谷氨酸脱羧酶-65抗体、胰岛-细胞抗原-512抗体、胰岛素抗体或其它胰岛-细胞自身抗体。

3. 如权利要求1所述的生物标记物的检测和分析方法,其特征在于:所述降低和/或增加的水平或比率是相对于在不同时间点来自提取的所述样品的所述水平或比率而言,或相对于标准化的水平或比率而言。

4. 如权利要求1所述的生物标记物的检测和分析方法,其特征在于:Log中枢记忆T细胞从基线的每个单位的增加都与C肽浓度降低大约-0.178ng/mL相关。

糖尿病生物标记物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年5月24日提交的美国临时申请号61/651,144的优先权,所述美国临时申请以全文引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般来讲涉及自身免疫、糖尿病领域,并且更具体来说,涉及1型糖尿病和免疫标记物。

背景技术

[0004] 1型糖尿病(T1DM)最常见的形式是免疫介导的疾病,其中的胰岛素分泌 β 细胞被自身免疫应答破坏。若干遗传和环境因素都与所述疾病的发病相关,这涉及到特异性靶向胰岛素分泌 β 细胞的免疫细胞对胰岛的进行性炎性浸润。这种病变在临床发病前(前糖尿病)的一段不确定时间(几个月到几年)形成并且在患者被诊断患有所述疾病之后继续发展。

[0005] 目前有一种方法使用抗体筛选和诊断T1DM。只要所述特异性抗体存在,随着时间的过去,显性糖尿病往往就会发展。GAD65自身抗体(GAA)、ICA512自身抗体(ICA512AA)或抗胰岛素自身抗体(IAA)中一种或多种的表达与发展T1DM的风险相关。GAD65自身抗体(GAA)、ICA512自身抗体(ICA512AA)或抗胰岛素自身抗体(IAA)中两种或两种以上的表达与发展T1DM的高风险相关。(Liping Yu等,Diabetes 2001年8月,第50卷,第8期,1735-1740;Verge CF等,Diabetes 45:926-933,199;Verge CF.等,Diabetes 47:1857-1866,1998和Bingley PJ等,Diabetes 43:1304-1310,1994)。

[0006] 然而,这种筛选对于个体患者来说用处有限。虽然抗体筛选能够检测T1DM风险的增加水平,但是所述风险是基于总的群体并且不能告知个体患者疾病是否会在例如接下来几个月发病或者所述个体是否可能会在接下来5至10年不患糖尿病。自身免疫破坏的强度因不同患者而异。因此,需要一种会告知个体发展T1DM的个人风险并且能够指出疾病发病的时间范围的诊断方法。

[0007] 还需要改善分析T1DM自身免疫治疗的主要终点。治疗要从FDA得到管理批准,临床试验必须在合适的主要终点显示统计上显著的影响。这种治疗效果优选表现一些显而易见和临床上显著的益处。在预防T1DM的治疗的情况下,临床疾病的延迟或不发展(这使这些试验长达5或10年)。在干预患有临床疾病的患者的情况下,合适的主要终点与代谢控制和糖尿病并发症相关。最常应用而代谢主要终点-未达到治愈-是自身胰岛素产生的测量(刺激的C肽作为保留 β -细胞功能的替代标记物),其它的是HbA1c和胰岛素使用。T1DM患者中 β -细胞功能的改善能够预测更好的短期和长期临床结果,这可能花费几年来评估。对于T1DM和并发症的治疗,可以直接监测血糖水平并且可以通过糖基化血红蛋白(例如HbA1c)的水平监测改善的血糖控制,这已经证明与短期和长期糖尿病并发症相关。

[0008] 对于希望在疾病的后临床阶段中维持 β 细胞功能的治疗来说,已经使用刺激的C肽浓度来测量T1DM的发展(Palmer JP等,Diabetes2004;53:250-264)。然而,使用C肽浓度需

要长期进行重复的侵入性检测(所谓的混合餐耐量试验),因此所述试验持续很长时间以允许评估降低 β -细胞功能并且因此降低C肽浓度的疾病的发展。

[0009] 因此,需要更好的标记物作为试验的主要终点(预防和干预试验两者)以及需要更好的标记物以便能够更迅速和可靠地指出T1DM自身免疫的进行性,从而分出前糖尿病和糖尿病病状的阶段。还需要更好的分析法以便能够测量治疗T1DM的疗法的有效性和/或检测并发症。

发明内容

[0010] 已根据CD4初始(CD45RO-CD62L+) T细胞亚群与中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群的比率和在中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群水平而发现一种新的1型糖尿病中自身胰岛素产生下降的标记物。在受试者中诊断糖尿病、前糖尿病、对糖尿病的易感性或疗法对一种或多种这些病状的有效性的方法可以通过如下方式进行:通过对从患者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4初始(CD45RO-CD62L+) T细胞的水平;通过对从患者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞的水平,以及定量地关联所述CD4初始T细胞和CD4中枢记忆T细胞的水平,其中CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞的低的或降低的比率,或高的或增加的CD4中枢记忆T细胞水平表明自身免疫疾病、前自身免疫疾病、对自身免疫的易感性或治疗对一种或多种这些病状的无效性。在前糖尿病情形中,T1DM特异性自身抗体的存在表明T1DM自身免疫本身的存在。因此,在本发明的一个方面中,本文中描述的方法与确定是否存在糖尿病自身抗体组合使用。

[0011] 在本发明的一个方面中,公开了在受试者中确定疗法对糖尿病和前糖尿病病状的有效性的方法,所述方法包括以下步骤:在受试者中开始疗法,从所述受试者提取样品,在所述样品中测量CD4 T细胞初始(CD45RO-CD62L+) 亚群与中枢记忆(CD45RO+CD62L+) 亚群的比率和/或CD4中枢记忆T细胞的水平,以及评估所述疗法的有效性,其中在所述疗法期间比率的增加和/或低的/下降的CD4中枢记忆T细胞表明治疗有效。

[0012] 在其它实施方案中,所述方法可以包括在所述受试者中开始疗法,从所述受试者提取样品,测量所述样品中的CD4 T细胞中枢记忆(CD45RO+CD62L+) 亚群,以及评估所述疗法的有效性,其中在所述疗法期间低的或降低的CD4中枢记忆T细胞水平或CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞亚群的高的或增加的比率表明治疗有效。

[0013] 一些实施方案提供在受试者中监测如糖尿病的自身免疫疾病的干预效果的方法,所述方法包括:选择经历自身免疫疾病或病状治疗的受试者,从所述受试者提取样品,在所述样品中测量CD4中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群以及任选地测量CD4 T细胞初始(CD45RO-CD62L+) 亚群,以及评估所述疗法的有效性,其中在所述疗法期间低的或降低的CD4中枢记忆T细胞水平或CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞亚群的高的或增加的比率表明治疗有效。所述样品是例如在疗法开始之前(或在疗法开始之后但是在细胞群体中的变化起始之前)以及在疗法进行大约三个月和/或六个月时从所述受试者提取。

[0014] 在其它实施方案中,提供一种在受试者中诊断自身免疫疾病、前自身免疫疾病、对自身免疫疾病的易感性或疗法对一种或多种这些病状的有效性的方法,所述方法包括:选择患有或疑似患有自身免疫疾病、前自身免疫疾病或具有对自身免疫疾病的易感性的受试者,通过对从所述受试者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4初始(CD45RO-CD62L+) T细

胞的水平;通过对从所述受试者提取的样品进行免疫荧光分析确定CD4中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞的水平,以及定量地关联所述CD4初始T细胞和CD4中枢记忆T细胞的水平,其中CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞的低的或降低的比率,或高的或增加的CD4中枢记忆T细胞水平表明自身免疫疾病、前自身免疫疾病、对自身免疫的易感性或治疗对一种或多种这些病状无效。

[0015] 一些实施方案提供一种确定直到自身免疫疾病发病的时间的方法,所述方法包括:获得具有对所述自身免疫病状为特异性的自身抗体的受试者;从所述受试者提取一个或多个样品;在所述样品中测量中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群水平以及任选地测量CD4 T细胞初始(CD45RO-CD62L+) 亚群水平,以及计算两个或更多个样品之间或在不同时间点对一个样品进行的两个或更多个测量之间的所述CD4中枢记忆T细胞亚群水平的变化和/或所述CD4初始T细胞与CD4中枢记忆T细胞亚群的比率的变化,其中所述比率的降低和/或较高的CD4中枢记忆T细胞水平与自身免疫疾病发病的较短时间相关。举例来说,Log中枢记忆从基线的每个单位的增加都与C肽浓度的大约-0.178ng/mL的随后降低相关。这种相关性可以用来测量和预测C肽水平下降的速度,因为这些T细胞群体中的数量变化预示将要发生的C肽水平的数量变化。

[0016] 一些实施方案提供一种确定不同干预模态(如用于糖尿病的不同临床试验)的有效性水平的方法。这种方法包括在受试者中开始疗法,从所述受试者提取样品,在所述样品中测量CD4中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群以及任选地测量CD4 T细胞初始(CD45RO-CD62L+) 亚群,以及评估并且比较不同干预的有效性,其中所述比率的增加和/或较低的CD4中枢记忆T细胞水平与较有效的干预相关。因此,提供了一种可靠地并且定量地比较两种或更多种不同临床试验的活性臂(active arms)中所使用干预模态的有效性的方式。

[0017] 一些实施方案提供一种针对自身免疫的靶向药物开发方法,所述方法包括:从一个或多个受试者提取样品,在所述样品中分离中枢记忆(CD45RO+CD62L+) T细胞亚群以及任选地分离CD4 T细胞初始(CD45RO-CD62L+) 亚群,以及根据这些细胞的疾病特异性特征开发特异性地靶向这些细胞或这些细胞的子集的药物。

[0018] 本文中阐述和描述将显而易见的实施方案的这些和其它特征。

附图说明

[0019] 以下附图构成本说明书的一部分并且被包括来进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文中提出的特定实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0020] 图1是展示与基线相比在先前随访时T细胞中每单位变化的C肽损失降低的图表。展示了中枢记忆的降低和初始/中枢比率的增加。

[0021] 图2A至2D展示CD4 T细胞子集从基线的变化百分比,其标识为(图2A)初始群体和(图2B)中枢记忆群体以及(图2C)初始:中枢记忆的比率和(图2D) Treg群体,这都是在治疗开始("0个月")之后以指定的时间间隔来测量。最后的治疗是在第24个月。实心圆圈是阿巴西普(abatacept)治疗的,空心圆圈是安慰剂;符号表示平均值,误差线表示95%置信区间。P值和虚线表明两个组在所指时间点显著不同。

具体实施方式

[0022] 1型糖尿病 (T1DM) 最常见的形式是免疫介导疾病,其中胰岛素分泌 β 细胞被自身免疫应答破坏。T细胞在与T1DM相关的自身免疫中扮演核心角色。为了变得完全激活,据信这些细胞需要至少两种关键信号。(Marelli-Berg FM,Okkenhaug K,Mirenda V.A Trends Immunol2007;28:267-73)。第一信号是在抗原呈递细胞上的MHC分子的凹槽中的抗原与T细胞受体之间的相互作用。第二信号是抗原递呈细胞上的CD80和CD86与T细胞上的CD28之间的相互作用。这种共刺激第二信号是细胞完全激活需要的,并且没有它细胞就不能起作用。因此,已经有人建议将共刺激阻断作为自身免疫和移植的治疗模态。(Bluestone JA, StClair EW,Turka LA.Immunity 2006;24:233-38)。

[0023] 初始T淋巴细胞移动到二级淋巴器官的T细胞区域寻找抗原递呈细胞 (APC-s) 所呈递的抗原。一旦被激活,它们就迅速增殖,从而产生的效应细胞,所述效应细胞能够迁移到发炎组织以对抗感染或在自身免疫的情况下破坏组织。在抗原清除时,一小部分的初始/激活T淋巴细胞继续作为循环记忆细胞,从而能够正常带来保护并且在二次激发时提供增强的应答。两种主要类型的记忆T细胞保留:巡视淋巴器官的中枢记忆细胞,和充当如皮肤和内脏的外周组织中的前哨细胞的效应记忆细胞。

[0024] 1型糖尿病 (T1DM) 自身免疫是受激活T淋巴细胞驱动。阿巴西普是一种共刺激调节剂并且阻断完全的T淋巴细胞激活。已在新近确诊的患者的随机双盲试验中评估了施用两年阿巴西普的效果。在两年中,阿巴西普显著地减缓 β 细胞功能的降低。这个试验的初步结果已经在The Lancet上发表,文章标题为“Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset Type 1 diabetes:a randomized,double-blind, placebo-controlled trial”(2011年6月28日在线公布)。这篇论文作为附录A予以包括并且是当前提交申请的一部分。

[0025] 已经分析了多种T细胞标记物与糖尿病病程的任何相关性(剩余胰岛素分泌 β 细胞的破坏)。对于用减缓具有糖尿病体液生物标记物(GAA、ICA512AA、IAA)的患者中自身免疫破坏的化合物所治疗的患者来说,已发现在治疗期间CD4⁺T细胞初始(CD45RO-CD62L⁺)与中枢记忆(CD45RO+CD62L⁺)亚群比率从基线显著增加,并且随后在疗法结束之后回到基线。还发现用阿巴西普的治疗通过降低CD4⁺T中枢记忆(CD45RO+CD62L⁺)细胞的水平显著地减缓C肽的下降。

[0026] 对于未受治疗来减缓糖尿病病程(剩余胰岛素分泌 β 细胞的破坏)的患者来说,发现较高的中枢记忆T细胞显著地与随后的C肽下降相关。因此,治疗组中的这些T细胞的降低与C肽下降的较慢速率显著相关,并且这种T免疫细胞亚群(中枢记忆T细胞)可被用作自身胰岛素产生下降的替代免疫标记物。

[0027] 因此,假设阿巴西普阻断初始细胞被激活,并且与CD4记忆T细胞相比,更高浓度的CD4初始T细胞的存在表明化合物对于延迟前糖尿病受试者的T1DM发病是有效的,并且对于延迟T1DM患者的胰岛素产生的下降是有效的。阿巴西普通过降低CD4中枢记忆T细胞水平对自身免疫发挥其作用,因为它阻断CD4初始到CD4中枢记忆T细胞的激活过程。这种生物标记物也可以在不存在如阿巴西普的化合物时,以用于诊断糖尿病或前糖尿病的进展性(联用糖尿病抗体)以及确定对快速进展的糖尿病的易感性。这种标记物可以监测自身免疫破坏

的强度和侵害性、胰岛素分泌 β 细胞损失的速度。

[0028] 本文中描述的生物标记物分析可以联合已知的抗体测试来提供。这种组合提供对糖尿病的易感性以及发病的时间框的测定。临床发病后,它可以预测达到全部丧失自身胰岛素产生的时间-达到“完全糖尿病”的时间。

[0029] C肽是充当胰岛素原中的结构连接的31氨基酸肽。它在胰岛素原被酶催化裂解时连同胰岛素一起释放进入循环中。因此,在T1DM患者中发现低水平到不可检测水平的C肽,而T2DM患者在其疾病早期往往具有高于正常的胰岛素/C肽水平。然而,对于C肽水平可以有几个参考范围,这取决于如所使用分析法的类型、患者年龄以及患者在试验之前是否禁食等因素。任何已知的分析法都可以用来定量C肽,如放射免疫分析法(RIA)和免疫化学发光分析法(ICMA)。在RIA方法中,可以使用山羊抗C肽测量C肽。所述抗体(也识别胰岛素原)与胰岛素没有交叉反应性。所述试验的分析灵敏度一般是0.125ng/ml并且需要整夜禁食。RIA方法提供适于正常成年人的0.5-2ng/mL的参考范围。在ICMA方法中,使用两个孵育周期的竞争性免疫分析法来提供大约0.3ng/mL的分析灵敏度。ICMA方法提供适于正常成年人的0.9-4ng/mL的参考范围并且患者必须禁食。对于小于12岁的儿童,参考范围是0.0至0.3ng/mL。对于10-12岁的儿童,参考范围是0.4至3.3ng/mL,而对于17岁及以上的个体。(LAB CORP)。为了评估胰岛素分泌 β 细胞产生胰岛素的能力,使用食物激发试验,最常用的试验称为混合餐耐量试验(MMTT),其中在2或4个小时的时间内采集几个血液样品用于C肽测量。

[0030] 如本文中使用的术语“受试者”是患有或预期患有自身免疫性疾病的人或其它动物。因此,在某些实施方案中,受试者需要本文中提供的治疗性治疗。优选的受试者是哺乳动物。受试者的实例包括但不限于人、马、猴、犬、猫、小鼠、大鼠、奶牛、猪、山羊和绵羊。在一些实施方案中,“受试者”一般是患有或预期患有糖尿病的人患者。在一些实施方案中,“受试者”是已经在过去的200、100或50天内确诊患有糖尿病的人患者。在一些实施方案中,“受试者”是患有1型糖尿病的人患者。在一些实施方案中,“受试者”是前糖尿病的人患者。在一些实施方案中,“受试者”是已经新近确诊患有糖尿病但是仍然具有残余的 β 细胞功能的人患者。在一些实施方案中,“受试者”是除了1型糖尿病患有自身免疫的人患者。这种自身免疫包括但不限于类风湿性关节炎和多发性硬化。

[0031] 患有或预期患有自身免疫疾病或病状的受试者或患有或疑似患有自身免疫疾病、前自身免疫疾病或对自身免疫疾病的易感性的人可以通过根据自身免疫疾病的诊断标准进行评估来选择。替代地或另外,这种患者群体可以通过评估已知与自身免疫疾病、前自身免疫疾病或对自身免疫疾病的易感性相关的任何遗传标记物或自身抗体或其它生物标记物来选择。

[0032] 本文中使用的术语“治疗”或“治疗中”定义为对患者应用或施用治疗剂,或对来自患者的分离组织或细胞系应用或施用治疗剂,所述患者患有疾病、疾病的症状或有患病倾向。希望治疗涵盖预防疾病发生、减缓疾病病程、使疾病逆转或缓解、改善或影响疾病、症状或疾病症状或疾病倾向。例如,用本文中描述的组合物治疗受试者(例如,人受试者)可以减缓、改善或终止1型糖尿病临床发病之前、期间或之后的受试者中的自身免疫的进行,例如,针对胰腺 β 细胞的反应。

[0033] 如本文中使用的术语“糖尿病病状”意图涵盖糖尿病、前糖尿病或对糖尿病的易感性。

[0034] 治疗可以是使用批准用于临床测试的药物成分的治疗,或可以是在临床试验或临床前试验期间进行的治疗。

[0035] 如本文中使用的短语“延迟病程”在延迟糖尿病病程的情形中意指在1型糖尿病的临床发病之前或之后功能性残余细胞群的损失被延迟。例如,所述延迟可以是延迟1、2、3、4、5、6、9、12、15、18、21、24或更多个月,或可以延迟2、3、4或更多年。

[0036] 如本文中使用的术语“施用”意图涵盖直接和间接向其预期的作用位点递送药物组合物的所有方式。

[0037] 术语“治疗有效量”是指在必要的剂量和时段下有效实现所需治疗结果的量。组合物的治疗有效量可根据多种因素而不同,如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及药物组合物在个体中引出所需应答的能力。治疗有效量也是其中治疗有益效果超过药理学试剂的任何毒性或有害效果的量。

[0038] 虽然以上描述提供各种实施方案的实例和具体细节,但是应理解,所描述实施方案的一些特征和/或功能允许不脱离所描述实施方案的范围的修改。以上描述意图说明本发明,其范围只受在随附权利要求书的语言限制。

[0039] 实施例

[0040] 根据下列实施例可以进一步理解申请人教义的方面,所述实施例不应当被解释为以任何方式限制申请人教义的范围。

[0041] 实施例1-试验

[0042] 如以上参考Lancet论文(以全文引用方式并入本文)所述,使用阿巴西普对确诊患有1型糖尿病的患者进行2期临床试验。适格患者已经在过去的100天内确诊患有1型糖尿病并且具有至少一种糖尿病相关的自身抗体(微量分析的胰岛素抗体;谷氨酸脱羧酶-65 [GAD-65] 抗体;胰岛-细胞抗原-512 [ICA-512] 抗体;或胰岛-细胞自身抗体)并且具有0.2nmol/L或更高的受激C肽浓度。

[0043] 通过在参与现场划分将患者以2:1的比率随机分配,使用双盲方案得到用阿巴西普或安慰剂的实验治疗。在第1、14和28天给予阿巴西普 (Orencia, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA), 并且随后每28天以在100mL 0.9%氯化钠输注液中10mg/kg (每个剂量最大1000mg) 的剂量,以30-min静脉内输注方式来给药,其中在第700天给予最后一剂(总共27个剂量)。使用生理盐水输液作为安慰剂。患者不接受任何术前用药。

[0044] 集中分析血液样品。用双位点免疫酶分析法 (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA) 从冷冻血浆测量C肽浓度。在给药结束六个月之后,在3、6、12、18和24个月以及在30个月获得血液样品。

[0045] 在参加研究的112位患者中,随机分配77位接受用阿巴西普的实验治疗,并且分配35位接受安慰剂。结果显示:用阿巴西普进行2年以上的共刺激调节使最新发病的1型糖尿病中的β细胞功能降低减缓9.6个月。在两年时,阿巴西普治疗组的自身胰岛素产生比安慰剂组高59%。整个试验(用相同的胰岛素用量)中,阿巴西普治疗组也具有显著更好的HbA1c (血糖控制水平的测量)。即使所述疾病过程可能已经发展若干年,早期干预的有益效果暗示出T细胞激活仍然在1型糖尿病临床诊断的时间前后发生。

[0046] 实施例2-流式细胞术

[0047] 对于阿巴西普和安慰剂臂两者来说,在0、3、6、12和24个月时,对来自实施例1中的

临床试验的受试者的血液样品执行流式细胞术分析,在试验结束之后六个月(30个月)进行另外的分析。流式细胞术是用于计数和检验微观颗粒(如细胞)的常规技术,它是通过将微观颗粒悬浮在流体流中并且使它们一次一个细胞通过激光和电子检测设备来进行。现代仪器通常具有多个激光和荧光检测器。增加激光和检测器的数目允许进行多抗体标记,并且可以通过其表型标记物更精确地识别目标群体。

[0048] 在所述分析中使用荧光激活细胞分选(FACS),它是流式细胞术的一种特殊化类型。FACS提供一种将生物细胞的异质混合物每次一个细胞分选到两个或更多个容器中的方法,所述方法是基于每个细胞的特定光散射和荧光特征以及对它们的表征。它是一种有用的科学仪器,因为它提供对来自单个细胞的荧光信号的快速、客观和定量的记录以及对特别感兴趣的细胞的物理分离。荧光信号来自FACS之前已经与细胞一起孵育的荧光标记的抗体。对于多标记来说,每个抗体与不同荧光团偶联。使用的抗体对于感兴趣的细胞标记物是特异性的。为了检测CD4⁺细胞,用荧光团标记抗CD4抗体。对于CD45RO的同时检测来说,还使用带有另一个荧光团的特异性抗CD45RO抗体。(荧光标记的抗CD4和抗CD45RO抗体可商购自各种来源,如BD Biosciences, San Jose, CA.) 每个荧光团都有特征峰激发和发射波长,因此使在它们之间加以区分成为可能,例如,通过使用荧光激活细胞分选仪器,如Becton-Dickinson FACSCalibur或FACS Aria系统来进行区分。

[0049] 在三个5色分析法中研究七个T细胞标记物。对于任何这些标记物来说,在安慰剂组中没有发现从基线的变化。在治疗组中,我们观察到CD4和CD8T细胞中或CD8T细胞的初始子集和记忆子集中没有变化。

[0050] 然而,在治疗期间的阿巴西普组中CD4⁺ T细胞初始(CD45RO⁺-CD62L⁺)与中枢记忆(CD45RO⁺+CD62L⁺)亚群的比率从基线显著地增加并且中止疗法后又回到基线。在安慰剂组的试验期间,更高的CD4⁺中枢记忆T细胞显著地与随后的C肽下降相关。在阿巴西普组中这些T细胞的降低显著地与C肽下降速率减慢相关。

[0051] 研究还发现在阿巴西普组中,调节性T细胞群体(CD4⁺+CD25⁺高)从基线降低,随后在中止疗法后回到基线。然而,这些调节性T细胞的降低显示与初始/记忆群体的变化或与C肽水平的变化不相关。

[0052] 表1提供CD4⁺初始T细胞与CD4⁺中枢记忆T细胞的比率从基线的最小二乘方平均变化(作为log给出)和从基线起3、6、12和24个月的标准偏差和p值。从基线起30个月以第30个月的数据给出,其中所述受试者在第30个月中止疗法。药物与安慰剂组之间的p值是在同一次随访时各组之间的p值。

[0053] 表1

[0054] LOG(初始T细胞/中枢记忆T细胞)

[0055]

	从基线起的月数	平均变化	标准 误差	p值
阿巴西普	3	2.137	0.1318	p=NS
安慰剂	3	1.753	0.1927	
阿巴西普	6	2.517	0.1305	p=0.0002
安慰剂	6	1.636	0.1949	
阿巴西普	12	2.698	0.1305	p=0.0002
安慰剂	12	1.793	0.1951	
阿巴西普	24	2.656	0.1328	p=0.0001
安慰剂	24	1.698	0.1954	
阿巴西普	30	1.731	0.1323	p=NS
安慰剂	30	1.623	0.2075	

[0056] 还测量了这些样品和时间点的C肽浓度。分析两组数据,CD4⁺T细胞初始与中枢记忆比率中以及CD4⁺中枢记忆T细胞水平的先前变化预测了随后在T1DM中的C肽损失(图1),而同时期的T细胞测量与从基线的C肽变化没有关系。已发现中枢记忆T细胞的增加显著地与随后的C-肽下降(自身胰岛素产生)相关。确切来说,Log中枢记忆比率从基线的每个单位的增加估计可使C肽平均降低-0.178ng/ml。图1提供导致C肽损失降低的CD4⁺中枢记忆T细胞的降低和CD4⁺初始/中枢记忆T细胞比率的增加。单位变化的数值可加以比较并且定量地表达,从而提供一种表明自身免疫过程的侵害性以及不同干预模态的有效性水平的方法。随后可以根据单位的数值对不同干预模态的有效性水平进行分级。

[0057] 我们观察的时间滞后是3或6个月。因此对我们的目的来说,我们需要对这个细胞群体的两种不同的测量来评估随后的C肽损失或C肽损失的缺少。这些T细胞群体中的变化-CD4⁺初始/中枢记忆细胞比率和CD4⁺中枢记忆细胞水平两者-预测了随后的C肽损失。图2A至2D展示初始、记忆和初始/记忆T细胞随时间相对于基线值的变化。这些图展示它们在30个月内发生的变化。虽然我们在3和6个月观察,可以从图2看出,其它时间和时间间隔也可行,并且可以包括在治疗之前获取的基线测量值,和/或在0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、21、24、27、30、33、36或更多个月获取的测量值。

[0058] 本文中使用的章节标题仅是出于组织目的,而不应解释为以任何方式限制描述的主题。虽然申请人的教义是联合各种实施方案来描述,但是并不意图将申请人的教义限制于这些实施方案。相反,申请人的教义涵盖各种替代、修改以及等效物,这将是本领域技术人员能够理解的。

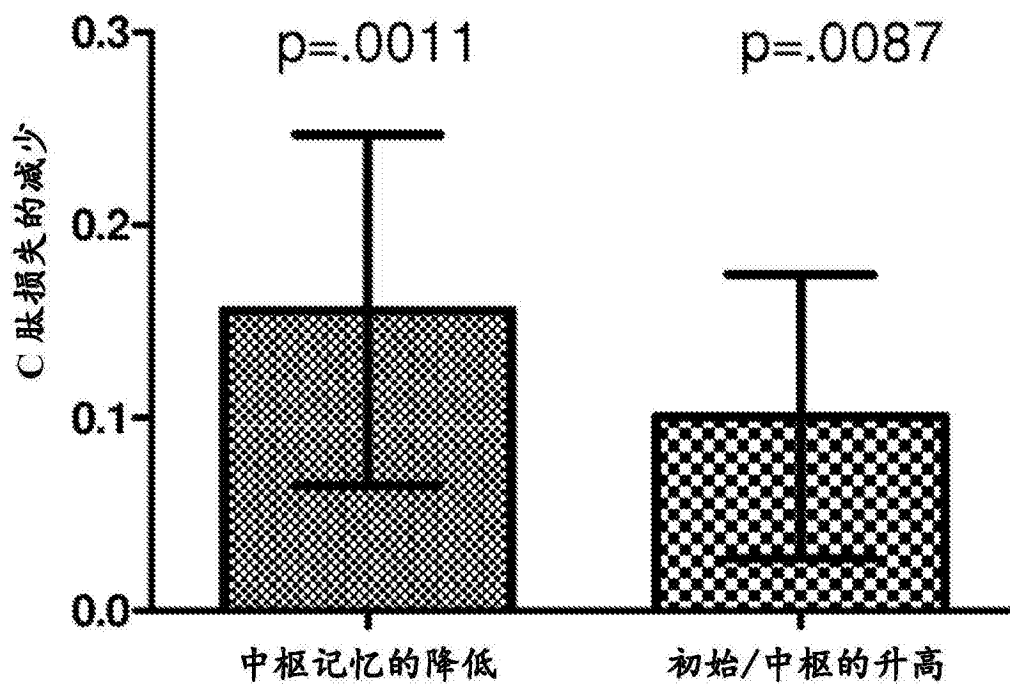


图1

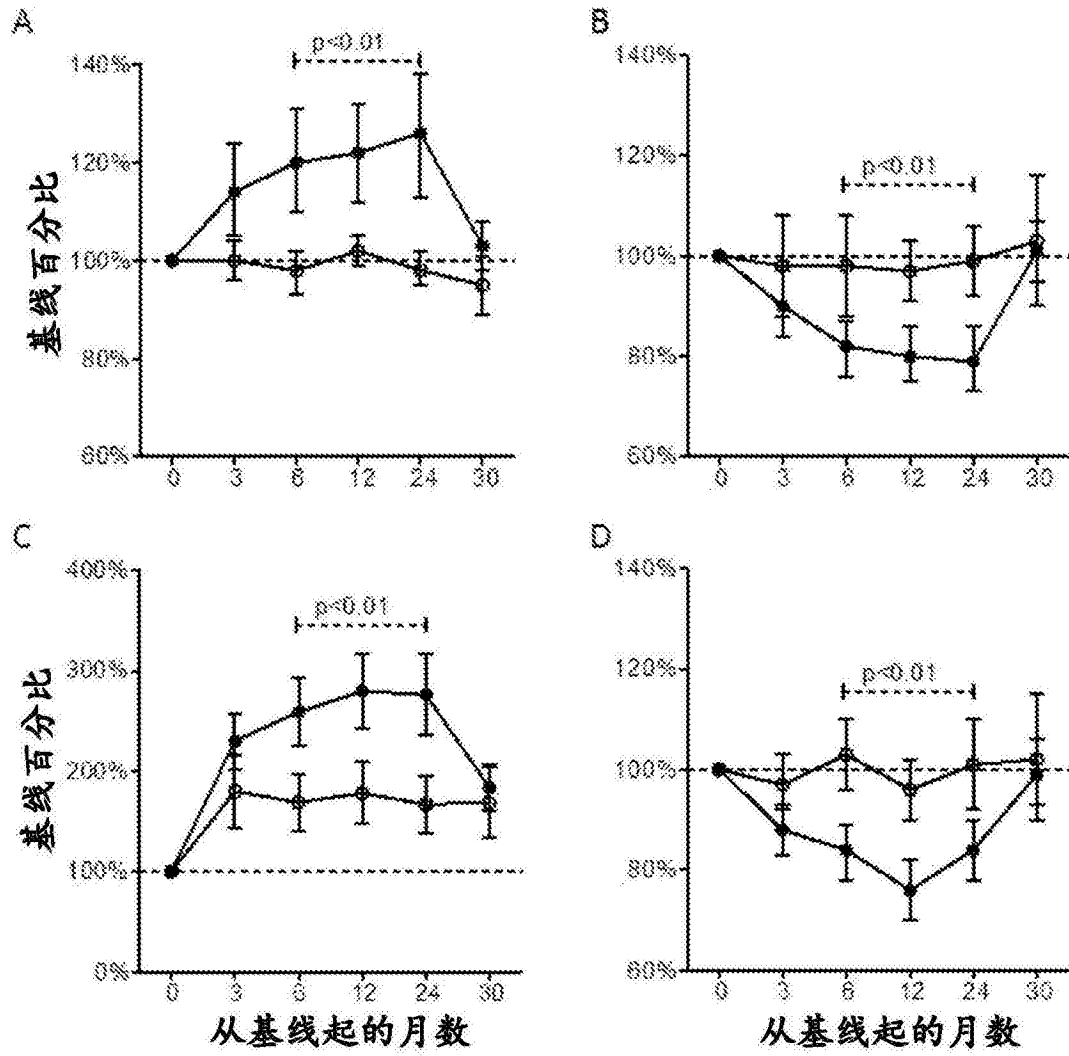


图2A至2D