



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103153341 B

(45) 授权公告日 2015.05.27

(21) 申请号 201180048232.9

(22) 申请日 2011.08.02

(30) 优先权数据

61/370,403 2010.08.03 US

61/440,162 2011.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/046205 2011.08.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/018771 EN 2012.02.09

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D. 多南 G. 杜查蒂厄-古延

T.Q. 古延 G. 帕勒莫 M. 维瑟

R-F. 叶

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2000027428 A1, 2000.05.18, 全文.

Weiguo Sui. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. 《Transplant Immunology》. 2008, 第 19 卷 84.

Yukio Kawahara 等. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. 《EMBO reports》. 2007, 第 8 卷 (第 8 期), 767-768.

Jennifer Round and Elke Stein. Netrin signaling leading to directed growth cone steering. 《Current Opinion in Neurobiology》. 2007, 第 17 卷 15-16.

Michael Hallek. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. 《Hematology》. 2009, 第 2009 卷 (第 1 期), 440, 443.

审查员 刘超

权利要求书1页 说明书43页
序列表1页 附图11页

(54) 发明名称

慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 生物标志物

(57) 摘要

本申请描述了慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的生物标志物。具体地, 本发明涉及作为生物标志物用于 CLL 中患者选择的 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 / 或 PI3K、以及治疗性处理的方法、制品及其制备方法、诊断用试剂盒、和做与其有关的广告的方法。

1. 一种或多种用于测定来自 CLL 患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物的表达的试剂在制备用于为慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者选择疗法的诊断用试剂盒中的用途, 其中所述选择包括测定所述患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物的表达, 并基于所述生物标志物的表达水平来选择 CLL 药物,

其中所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物, 则选择基于抗 CD20 抗体的疗法, 其中所述基于抗 CD20 抗体的疗法是利妥昔单抗、氟达拉滨和环磷酰胺的组合,

其中所述患者具有降低量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物, 则选择除利妥昔单抗以外的 CLL 药物。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述患者相对于不具有升高量的所述生物标志物的患者具有更大的无进展存活 (PFS)。

3. 权利要求 1 的用途, 其中所述患者具有升高量的 miRNA1513p。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述患者具有升高量的 miRNA4093p。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述患者具有升高量的 PTK2。

6. 权利要求 1 的用途, 其中通过基因表达序型分析 (profiling) 来评估所述生物标志物的量。

7. 权利要求 6 的用途, 其中所述基因表达序型分析包括聚合酶链式反应 (PCR)。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述 PCR 包括定量实时 PCR (qRT-PCR)。

9. 前述权利要求中任一项的用途, 其中所述测定生物标志物的表达包括对来自所述患者的样品测试所述生物标志物的表达。

10. 权利要求 9 的用途, 其中所述样品包含外周血单个核细胞 (PBMC)。

11. 一种或多种用于测定来自 CLL 患者的样品中 PI3K 的生物标志物的表达的试剂在制备用于为慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者选择疗法的诊断用试剂盒中的用途, 其中所述选择包括测定所述患者的样品中 PI3K 的生物标志物的表达, 并基于所述生物标志物的表达水平来选择 CLL 药物,

其中如果所述患者具有减少的 PI3K 生物标志物, 则选择所述患者进行利妥昔单抗、氟达拉滨和环磷酰胺的组的治疗,

其中如果所述患者具有升高的 PI3K 生物标志物, 则选择所述患者进行除利妥昔单抗以外的 CLL 药物治疗。

12. 权利要求 11 的用途, 其中所述 PI3K 生物标志物包含 PIK3R3。

慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 生物标志物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依照 35USC § 119 要求 2010 年 8 月 3 日提交的美国临时申请号 61/370, 403 和 2011 年 2 月 7 日提交的美国临时申请号 61/440, 162 的优先权, 其内容通过提述完整并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的生物标志物。具体地, 本发明涉及作为生物标志物用于 CLL 中患者选择的 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K、以及治疗性处理的方法、制品及其制备方法、诊断用试剂盒以及做与其有关的广告的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 是西方世界中成人白血病的最常见形式。类似于许多其它 B 细胞恶性肿瘤, CLL 由 CD20 表面抗原的表达表征并且可以由此由抗 CD20 疗法靶向。已经证明了利妥昔单抗 (一种单克隆的嵌合抗 CD20 抗体) 对滤泡性 NHL 患者 (Marcus 等, *J Clin Oncol.* 26:4579-4586(2008); Hiddemann 等, *Blood*106:3725-3732(2005)) 和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者 (Coiffier 等, *N. Engl J. Med.* 346:235-242(2002); Feugier 等, *J Clin Oncol.* 23(18):4117-4126(2005)) 就无进展存活 (PFS) 和总体存活 (OS) 而言的重大益处。另外, 还已经显示了使用化疗加利妥昔单抗相比于单独的化疗延长 CLL 中未经治疗的和复发的 / 不应性患者中的 PFS (Hallek 等, *Blood, ASH Annual Meeting Abstract*, 112:325(2008); Robak 等, *Blood, ASH Annual Meeting Abstracts*, 112:lba-1(2008)), 且最近还显示延长总体存活 (Hallek 等, *Blood, ASH Annual Meeting Abstracts*, 114: 摘要 535(2009))。

[0006] 利妥昔单抗清除 B 细胞的作用机制包括抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) (Golay 等, *Blood*95(12):3900-3908(2000))、补体依赖性细胞毒性 (CDC) (Golay 等, *Blood*95(12):3900-3908(2000); Harjunpaa 等, *Scand J Immunol.* 51(6):634-641(2000)) 和直接的促凋亡效应 (Hofmeister 等, *Blood Cells Mol Dis.* 6(2):133-143(2000))。

[0007] 尽管已经知道了抗 CD20 抗体利妥昔单抗的作用机制, 但对于会预测对基于 CD20 抗体的疗法的响应或抗性的疾病或宿主有关因子仍然缺少认知。在 CLL 中已经公开了众多被证明为影响疾病预后的因子。这些因子包括细胞遗传的和分子的畸变、IgVH 基因座的突变状态、ZAP70 和 CD38 表达以及更多 (综述于 Moreno 和 Monserrat *Blood Reviews*22:211-219(2008))。

[0008] 然而, 迄今为止, 这些标志物中没有一个对 CLL 中基于抗 CD20 抗体的疗法显示真正的预测性意义。另外, 与其它 NHL 实体中作用机制有关的 Fc γ 受体多态性 (Cartron 等, *Blood*99(3):754-758(2002); Weng 和 Levy, *J Clin Oncol.* 21(21):3940-7(2003)) 并未显示影响 CLL 中基于抗 CD20 的疗法的结果 (Farag 等, *Blood*103:1472-1474(2004); Dornan 等, *Blood(ASH Annual Meeting Abstracts)*114:2338(2009))。

[0009] 本研究的目的是在一项有对照的随机化试验内用标准化疗 (氟达拉滨 / 环磷酰

胺 ;FC) 或 FC 加利妥昔单抗 (R-FC) 治疗的大患者组中发现预测性的生物标志物,并将基因组数据与临床结果关联。

[0010] microRNA(miRNA) 是通过影响 mRNA 的稳定性和翻译牵涉多细胞生物体中基因表达的转录后调控的短的 (17-27 个核苷酸) 非编码 RNA。miRNA 可以结合靶 mRNA 并且抑制其翻译或促进其降解,由此影响生物学过程。miRNA1513p 是发现于 8 号染色体上的 microRNA,其在 PTK2 的内含子中 (intronic)。关于 miRNA1513p 的出版物包括: Fulci 等 *Genes, Chromosomes&Cancer*48(12):1069-1082(2009);Agirre 等 *Mol. Cancer Res.* 6(12):1830-1840(2008);Ding 等 *Nat. Cell Biol.* 12(4):390-399(2010);Kawahara 等 *EMBO*8(8):763-769(2007)。

[0011] Visone 等 *Blood*114(18):3872-3879(2009) 关注 CLL 中核型特异性的 miRNA 签名。

[0012] 发明概述

[0013] 本文中的发明涉及鉴定生物标志物 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 来预测 CLL 中对疗法的应答。

[0014] 依照第一个实施方案,本发明涉及一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的 CLL 药物。这类 CLL 药物的例子包括:

[0015] - 诱导 FAK 信号传导和 / 或同型粘附的 CLL 药物;

[0016] -B 细胞拮抗剂诸如 CD20 抗体,例如人源化的、人的或嵌合的抗 CD20 抗体

[0017] -I 型抗 CD20 抗体

[0018] -II 型抗 CD20 抗体

[0019] - 抗 CD20 抗体诸如利妥昔单抗、奥法木单抗 (ofatumumab)、GA101、SBI-087、维妥珠单抗 (veltuzumab)、和 AME-133。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的利妥昔单抗、氟达拉滨和环磷酰胺的组合。

[0021] 另外,本发明涉及一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有降低量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的除利妥昔单抗以外的 CLL 药物。

[0022] 本发明还涉及为慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者选择疗法的方法,其包括测定来自患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达,并基于生物标志物的表达水平来选择 CLL 药物。在一个实施方案中,如果癌症样品表达升高水平的生物标志物,则对所述患者选择用 CLL 药物 (例如诱导 FAK 信号传导或同型粘附的 CLL 药物,或者是 B 细胞拮抗剂诸如 CD20 抗体的 CLL 药物) 治疗。在另一个实施方案中,如果癌症样品表达降低水平的生物标志物,则对所述患者选择用除利妥昔单抗以外的 CLL 药物治疗。

[0023] 本发明还提供了一种诊断用试剂盒,其包含一种或多种试剂,所述试剂用于测定来自 CLL 患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达。

[0024] 本发明还涉及一种制品,其包含包装在一起的在药学可接受的载体中的 CLL 药物和包装插页,所述包装插页指示所述 CLL 药物基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者。

[0025] 在一个有关的方面,本发明涉及一种用于制造制品的方法,其包括在包装中组合包含 CLL 药物的药物组合物和包装插页,所述包装插页指示所述药物组合物基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者。

[0026] 此外,本发明涉及一种用于做 CLL 药物广告的方法,其包括向目标受众推广 CLL 药物基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的用途。

[0027] 在另一个方面,本发明涉及一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有减少的 PI3K 生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的 CLL 药物。

[0028] 此外,本发明在一个方面提供了一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有减少的 PI3K 生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的利妥昔单抗、氟达拉滨和环磷酰胺的组合。

[0029] 另外,提供了一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的方法,其包括如果发现所述患者具有升高的 PI3K 生物标志物,则对所述患者施用治疗有效量的除利妥昔单抗以外的 CLL 药物。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1A 图示了关于 miRNA1513p 表达 (基于阵列) 和疗法的无进展存活 (PFS)。

[0032] 图 1B 图示了关于 miRNA1513p 表达 (基于 qRT-PCR) 和疗法的 PFS。

[0033] 图 2A 图示了关于 miRNA4093p 表达 (基于阵列) 和疗法的 PFS。

[0034] 图 2B 图示了关于 miRNA4093p 表达 (基于 qRT-PCR) 和疗法的 PFS。

[0035] 图 3 图示了关于治疗和 PTK2 表达的 **AFFYMETRIX®** Exon1.0ST PFS。

[0036] 图 4 图示了关于治疗和 PTK2 表达的 **AFFYMETRIX®** U133+2PFS。

[0037] 图 5 图示了关于治疗和 PTK2 表达的 qRT-PCR:PFS。

[0038] 图 6 图示了由 miRNA1513p 靶向 3' UTR。如在方法中描述的用 miRNA1513p 或 NTC 转染海拉 (HeLa) 细胞。将 miRNA1513p 对每种构建物的阻抑标准化到 NTC。数据推导自 3 次生物学重复。通过两侧 Student t 检验来测定统计学显著性。**P<0.01, *P<0.05。

[0039] 图 7 图示了由治疗和 PIK3R3 表达 (高:大于等于中值=4;低:小于 4) 分层的患者中的 PFS。

[0040] 图 8A-8C 图示了 PIK3R3 表达的结果关联:PIK3R3 表达亚组的 FCR 对 FC 的治疗效果 (图 8A);FC 分支中 PIK3R3 表达的预后效果 (图 8B);和 FCR 分支中 PIK3R3 表达的效果 (图 8C)。标志物截留指在指定的四分位数处或作为连续变量的 PIK3R3 表达。

[0041] 发明详述

[0042] I. 定义

[0043] “慢性淋巴细胞性白血病”或“CLL”指白细胞 (淋巴细胞) 癌。本文中 CLL 的例子包括,“一线”或“未经治疗”的 CLL (即其中 CLL 患者针对 CLL 治疗未接受过任何在先疗法),

“先前治疗过的 CLL”（其中 CLL 患者已经针对 CLL 接受过在先治疗），“不应性”CLL（其中患者对 CLL 疗法是不应性的），“复发的 CLL”（其中患者在针对 CLL 的在先疗法后复发）。

[0044] 在本文中，“患者”是人患者。所述患者可以是“CLL 患者”，即患有或有风险患上一种或多种 CLL 症状的人。此外，所述患者可以是既往治疗过的 CLL 患者。

[0045] 对于本文中的目的，“先前治疗过的”CLL 患者接受过在先 CLL 疗法，这类疗法包括苯丁酸氮芥 (chlorambucil)（有或无泼尼松 (prednisone)/ 泼尼松龙 (prednisolone)）、氟达拉滨（或其它核苷类似物）、和 / 或含有烷化物的联合方案。任选地，这类先前治疗过的 CLL 患者对于在先烷化剂是敏感或不应性的，但优选地对于氟达拉滨是敏感的（例如实现持续 6 个月或更长的响应）。

[0046] “不应性”CLL 在即使对 CLL 患者施用抗肿瘤剂（诸如化疗剂）的情况下仍然进展。不应性癌症的一个例子是对以下任何一种或多种为不应性的癌症：核苷类似物（例如氟达拉滨）、环磷酰胺；氟达拉滨和环磷酰胺 (FC)；苯丁酸氮芥；泼尼松或泼尼松龙；含有烷化物的联合疗法，包括环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CHOP)、或环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CVP)；阿仑单抗 (alemtuzumab) (Campath) 等。

[0047] “CLL 药物”是对治疗 CLL 有效的药物。CLL 药物的例子包括下文记载的化疗剂和化疗方案；B 细胞拮抗剂诸如 CD20 抗体（例如利妥昔单抗或奥法木单抗等）、CD22 抗体、和 CD79b 抗体；静脉内免疫球蛋白；CD52 抗体（例如阿仑单抗）；烷化剂（例如苯丁酸氮芥、苯达莫司汀 (bendamustine)、或环磷酰胺）；核苷类似物或抗代谢物（例如氟达拉滨）、氟达拉滨和环磷酰胺 (FC)；泼尼松或泼尼松龙；含有烷化物的联合疗法，包括环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CHOP)，或环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CVP)；等等。在一个实施方案中，所述 CLL 药物诱导 FAK 信号传导和 / 或同型聚集。

[0048] “FAK 信号传导”指 FAK 的上调或活化（例如经由 FAK 的 Tyr³⁹⁷ 的磷酸化），包括活化下游信号传导分子诸如 Src 激酶、生长因子受体结合蛋白 2 衔接头蛋白 (Grb2) 的活化，和 / 或 Ras/ 促细胞分裂原 (mitogen) 活化的蛋白质激酶途径（由 FAK 活化所致）。用于鉴定诱导 FAK 信号传导的 CLL 药物 s 或 B 细胞拮抗剂（例如 CD20 抗体）的方法记载于 Altomonte 等 J. Cell. Physiol 200:272-274 (2004)。

[0049] “同型粘附”或“同型聚集”指相同细胞彼此之间的相互作用和附接，其可能导致程序化细胞死亡。可以如记载于 Ivanov 等 J. Clin. Invest. 119 (8):2143-2159 (2009) 或 Altomonte 等 J. Cell. Physiol 200:272-274 (2004) 中的那样评估用于鉴定诱导同型聚集的 CLL 药物或 B 细胞拮抗剂（例如 CD20 抗体）的方法。

[0050] 如本文中使用的，术语“生物标志物”或“标志物”一般指其在组织或细胞中 / 上表达或分泌的可以通过已知的方法（或本文所披露的方法）来检测且是预测性的或可以用于预测（或帮助预测）细胞、组织或患者对治疗方案的响应性的分子，包括基因、mRNA、蛋白质、碳水化合物结构或糖脂。本文中特别感兴趣的生物标志物是 PTK2、miRNA1513p、和 miRNA4093p。

[0051] “蛋白质酪氨酸激酶 2”或“PTK2”用于本文指人蛋白质酪氨酸激酶 2 (PTK2)，也称为焦点粘着激酶 1 (FADK1)。对于本文中的目的，“PTK2”指编码 PTK2 的 DNA 或 mRNA，以及编码的 PTK2 蛋白，包括其中任意一种的促进样品中 PTK2 检测的片段或部分。PTK2 序列公众可获于：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=G>

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q05397>。PTK2 也称为：FAK;FADK;FAK1;FRNK;pp125FAK;PTK2。PTK2 基因编码细胞质蛋白质酪氨酸激酶，其被发现集中于在存在胞外基质组分的情况中生长的细胞之间形成的焦点粘着中。该编码的蛋白是蛋白质酪氨酸激酶的焦点粘着激酶 (FAK) 子家族的成员，但与其它子家族的激酶缺乏显著的序列相似性。对该基因的活化可能是应答某些神经肽或细胞与胞外基质的相互作用所触发的细胞内信号转导途径和细胞生长中的一个重要的早期步骤。对于该基因至少已经发现了编码 4 种不同同等型的 4 种转录变体，但仅确定了其中两种的全长性质。术语“PTK2”在本文中包括其每种同等型，包括同等型 1、2、3、和 4 (分别为 Q05397-1、-2、-3、和 -4)。可以依照本发明评估 PTK2 的 DNA、mRNA 和 / 或蛋白质。

[0052] “磷酸肌醇 3- 激酶”和“PI3K”指人磷酸肌醇 3- 激酶，包括其亚基。PI3K 是能够将磷酸肌醇的肌醇环的 3' OH 磷酸化的脂质激酶。PI3K 在本文中包含 I 类 (包含 IA 类和 IB 类)、II 类和 III 类 PI3K。在一个实施方案中，PI3K 是 I 类 PI3K，且任选地，该 PI3K 包含其调节亚基诸如调节亚基 3 (PIK3R3)。对于本文中的目的，PI3K (和别名) 指编码 PI3K 的 DNA 或 mRNA、或 PI3K 蛋白 (包含 PI3K 亚基)，以及其中任意一种的促进样品中 PI3K 检测的片段或部分。可以依照本发明评估 PI3K 的 DNA、mRNA 和 / 或蛋白质，以及 PI3K 活化。由此，“减少的 PI3K 生物标志物”指量和 / 或活性降低了的 PI3K 生物标志物，且“升高的 PI3K 生物标志物”指量和 / 或活性增加了的 PI3K 生物标志物。

[0053] “磷酸肌醇 -3- 激酶，调节亚基 3(γ)”、“PIK3R3”和“p53- γ ”指能够与 PI3K 催化亚基 (110kDa) 相互作用的人 PI3K 调节亚基 3。参见例如 Dey 等 Gene 209(1-2):175-83(1998)，Ingham 等 J. Biol. Chem. 276(15):12257-65(2001) 和 UniProtKB/Swiss-Prot:P55G HUMAN.Q92569。在此定义中明确地纳入了 PIK3R3 同等型。对于本文中的目的，PIK3R3 (和别名) 指编码 PIK3R3 的 DNA 或 mRNA、或 PIK3R3 蛋白、以及其中任意一种的促进样品中 PIK3R3 检测的片段或部分。可以依照本发明来评估 PIK3R3 的 DNA、mRNA、和 / 或蛋白质、和 / 或 PIK3R3 的活化 (或包含 PIK3R3 的 PI3K 的活化)。

[0054] “microRNA”或“miRNA”是通过影响 mRNA 的稳定性和翻译两者牵涉多细胞生物体中基因表达的转录后调控的短 (一般约 15-30 个核苷酸) 的非编码 RNA。

[0055] “miRNA1513p”用于本文指包含以下序列的 miRNA :CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG (SEQ ID NO:1)。亦参见：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/442893>和 http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000809。miRNA1513p 在 PTK 的内含子中且与其共表达。对于本文中的目的，该术语包括 DNA 或 mRNA，包括其促进样品中 miRNA1513p 检测的片段或部分。

[0056] “miRNA4093p”用于本文指包含以下序列的 RNA :GAAUGUUGCUCGGUGAACCCU (SEQ ID NO:2)。亦参见：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/574413>或 http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0001735。对于本文中的目的，该术语包括 DNA 或 mRNA，包括其促进样品中 miRNA4093p 检测的片段或部分。

[0057] “患者样品”指从 CLL 患者获得的相似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和 / 或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如脑脊液、羊膜液 (羊水)、腹膜液 (腹水) 或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化

合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。本文中肿瘤样品的例子包括但不限于,肿瘤活检、循环中的肿瘤细胞、血清或血浆、外周血单个核细胞(PBMC)、循环中的血浆蛋白质、腹水、自肿瘤衍生或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系、以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。在一个实施方案中,所述样品包含外周血单个核细胞(PBMC),其包括富集 CD19 的 PBMC。

[0058] 患者对药物治疗的“有效响应”或“响应性”及类似用语指当施用 CLL 药物时,给予患者(该患者有 CLL 风险或患有 CLL)的临床或治疗受益。此类受益包括下列任意一种或多种:延长存活(包括总体存活和无进展存活);产生客观响应(包括完全响应或部分响应)、或改善 CLL 的征候或症状等。在一个实施方案中,使用生物标志物来鉴定用药物治疗时,预期相对于不以相同水平表达该生物标志物的患者具有更大的无进展存活(PFS)的患者。本文中生物标志物(一种或多种)的出现有效预示或以高灵敏度预示这类有效响应。

[0059] “存活”指患者保持存活,并且包括总体存活以及无进展存活。

[0060] “总体存活”指患者自诊断或治疗时间起保持一定时期存活,诸如 1 年、5 年等。

[0061] “无进展存活”指患者保持存活且癌症没有进展或恶化。

[0062] “延长存活”意味着使接受治疗的患者中总体存活或无进展存活相对于未接受治疗的患者(即相对于未用所述药物治疗的患者)或者不以指定水平表达生物标志物的患者,和/或相对于用已获批准的抗肿瘤剂(诸如氟达拉滨和环磷酰胺的化疗方案,FC)治疗的患者有延长。

[0063] “客观响应”指可测量的响应,包括完全响应(CR)或部分响应(PR)。

[0064] “完全响应”或“CR”意指癌症的所有症候响应治疗而消失。这并不总是意味着癌症得到治愈。

[0065] “部分响应”或“PR”指一处或多处肿瘤或损伤的大小或癌症在身体中的范围响应治疗而缩小。

[0066] 与 CLL 患者升高的临床受益有关的生物标志物的“量”或“水平”是生物学样品中可检测的水平。这些可以通过本领域中技术人员已知的且也被本发明披露的方法来测量。所评估的生物标志物的表达水平或量可用于测定对治疗的响应。

[0067] 术语“表达的水平”或“表达水平”通常可互换使用,且一般指生物学样品中多核苷酸、mRNA 或氨基酸产物或蛋白质的量。“表达”一般指基因所编码的信息转换成细胞中存在的和运行的结构的过程。因此,依照本发明,基因的“表达”可以指转录成多核苷酸、翻译成蛋白质、或甚至蛋白质的翻译后修饰。转录得到的多核苷酸的、翻译得到的蛋白质的、或翻译后修饰得到的蛋白质的片段也应视为表达的,无论它们是源自通过可变剪接生成的转录物或经过降解的转录物,或者是源自蛋白质的翻译后加工(例如通过蛋白水解)。“表达的基因”包括转录成多核苷酸(如 mRNA)、然后翻译成蛋白质的基因,还有转录成 RNA 但不翻译成蛋白质的基因(例如 miRNA)。

[0068] 生物标志物的“升高”或“较高”的量或水平指所述量等于或大于患者群体中(例如在 CLL 患者群体中或在 CLL 患者的亚群(例如先前治疗过的 CLL 患者)中)生物标志物的中值量。例如,所述量可以在 50% 至约 100%,例如约 75 至 100% 的百分位数范围中。

[0069] 生物标志物的“降低”或“较低”的量或水平指所述量小于患者群体中生物标志物的中值量。例如,所述量可以在 0%-约 49% 的百分位数范围中,例如从约 0-25%。

[0070] 短语“基于...的表达”用于本文意指使用本文中一种或多种生物标志物的表达水平的信息来传达治疗决策、在包装插页上提供的信息或销售/推广指导等。在生物标志物的表达升高的情况中,可以用 CLL 药物诸如 B 细胞拮抗剂例如 CD20 抗体(诸如利妥昔单抗)来治疗患者。在生物标志物的表达水平降低的情况中,可以用除利妥昔单抗以外(或除抗 CD20 抗体以外)的 CLL 药物来治疗患者。

[0071] “B 细胞表面标志物”或“B 细胞表面抗原”在本文中指在 B 细胞表面上表达的抗原,可以用能结合它的拮抗剂来靶向它。例示性的 B 细胞表面标志物包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85 和 CD86 白细胞表面标志物(有关说明参见 The Leukocyte Antigen Facts Book, 第 2 版,1997, Barclay 等编, Academic Press, Harcourt Brace&Co., New York)。其它 B 细胞表面标志物包括 RP105、FcRH2、B 细胞 CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、Bt_g、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、和 239287。在一个实施方案中,所述 B 细胞表面标志物是 CD20、CD22、或 CD79b。

[0072] “CD20”抗原或“CD20”是在超过 90% 来自外周血或淋巴样器官的 B 细胞表面上找到的约 35kDa 非糖基化磷蛋白。CD20 存在于正常 B 细胞和恶性 B 细胞二者上,但在干细胞上不表达。CD20 在文献中的其它名称包括“B 淋巴细胞限制抗原”和“Bp35”。CD20 抗原记载于例如 Clark 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985)。

[0073] “B 细胞拮抗剂”指在结合 B 细胞表面标志物或 B 细胞特异性存活或增殖因子后破坏或消减哺乳动物中的 B 细胞和/或干扰 B 细胞存活和/或一项或多项 B 细胞功能的分子,例如通过降低或阻止 B 细胞引发的体液应答。所述拮抗剂优选能够消减用它治疗的哺乳动物中的 B 细胞(即降低循环中的 B 细胞水平)。这类消减可通过多种机制来实现,诸如 ADCC 和/或 CDC、抑制 B 细胞增殖、或 B 细胞直接裂解和/或诱导 B 细胞死亡(例如通过凋亡)。拮抗剂可通过本领域已知的、用于凋亡和消减的其它度量、和 B 细胞增殖和生长的延迟或终止、或 B 细胞存活的多种方法来筛选。

[0074] “结合 B 细胞表面标志物的抗体”或“针对 B 细胞表面标志物的抗体”指在结合 B 细胞表面标志物后破坏或消减哺乳动物中的 B 细胞和/或干扰一种或多种 B 细胞功能(例如通过降低或阻止由 B 细胞引发的体液应答)的分子。优选地,该抗体能够在用其处理的哺乳动物中消减 B 细胞(即降低循环中的 B 细胞水平)。这种消减可通过各种机制来实现,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制 B 细胞增殖、和/或诱导 B 细胞死亡(如通过凋亡)。在一个实施方案中,所述抗体是结合人 CD20 的抗体。

[0075] 抗 CD20 抗体的例子包括:嵌合抗 CD20 抗体诸如利妥昔单抗(参见下文);人抗 CD20 抗体诸如奥法木单抗(由 Genmab, Denmark 销售;亦参见 Glennie 和 van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510 (2003); Cragg 等, Blood 101:1045-1052 (2003); W02004/035607; 和 W02005/103081);人源化抗 CD20 抗体诸如人源化 2H7(参见下文)或维妥珠单抗(hA20)(Goldenberg 等 Blood 113(5):1062-1070 (2009));糖基化变体抗体,包括具有两分无岩藻糖基化的 Fc 区-碳水化合物的糖基化变体诸如 GA101(参见下文);小型模块化免疫药物(Small Modular Immunopharmaceutical)(SMIP)或单链抗

体诸如 SBI-087 ; 钇 [90] 标记的 2B8 鼠抗体, 称作“Y2B8”或“替伊莫单抗 (Ibritumomab Tiuxetan)” (ZEVALIN®), 可购自 Biogen Idec, Inc. (例如美国 5,736,137 ; 2B8 于 1993 年 6 月 22 日保藏于 ATCC 登录号 HB11388 下); 鼠 IgG2a “B1”, 也称为“托西莫单抗 (tositumomab)”, 任选用 ¹³¹I 标记以生成“¹³¹I-B1”或“碘 I131 托西莫单抗”抗体 (BEXXAR™), 可购自 Corixa (亦参见例如 U. S. 5,595,721); 鼠单克隆抗体“1F5” (例如 Press 等 Blood69(2):584-591(1987)) 及其变体, 包括“框架修补的”或人源化的 1F5 (例如 WO2003/002607, Leung, S.; ATCC 保藏物 HB-96450); US2004/0093621 (Shitara 等) 中记载的 Fc 区结合有复杂 N-糖苷连接的糖链的抗体; WO2006/106959 (Numazaki 等, Biomedics Inc.) 中记载的对 CD20 抗原的细胞外表位具有高结合亲和力的嵌合化的或人源化的单克隆抗体; 结合 CD20 的单克隆抗体和抗原结合片段 (例如 WO2005/000901, Tedder 等), 诸如 HB20-3、HB20-4、HB20-25、和 MB20-11; 结合 CD20 的单链蛋白质, 包括但不限于 TRU-015 (例如 US2005/0186216 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US2005/0202534 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter); US2005/0202028 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter); US2005/136049 (Ledbetter 等); US2005/0202023 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter) - Trubion Pharm Inc.); CD20 结合分子诸如 AME 系列抗体, 例如如在 WO2004/103404; US2005/0025764; 和 US2006/0251652 (Watkins 等, Applied Molecular Evolution, Inc.) 中列出的 AME-133 抗体, 和如在例如 WO2005/070963 (Allan 等, Applied Molecular Evolution, Inc.) 中列出的具有 Fc 突变的抗 CD20 抗体; CD20 结合分子诸如记载于 WO2005/016969 和 US2005/0069545 (Carr 等) 中的那些; 双特异性抗体, 如例如在 WO2005/014618 (Chang 等) 中列出的; 针对 CD20 的全人抗体, 如例如记载于 WO2006/130458; Gazit 等, Amgen/AstraZeneca) 中的; 针对 CD20 的抗体, 如例如记载于 WO2006/126069 (Morawala, Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd.) 中的; A20 抗体或其变体, 诸如嵌合的或人源化的 A20 抗体 (分别为 cA20、hA20) 和 IMMUN-106 (例如 US2003/0219433, Immunomedics); 以及单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-C1 或 NU-B2, 可从国际白细胞分型研究组 (International Leukocyte Typing Workshop) 获得 (例如 Valentine 等, 于: Leukocyte Typing III (McMichael 编, 第 440 页, Oxford University Press (1987))。

[0076] “I 型” CD20 抗体经由有力的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 介导细胞死亡。I 型抗 CD20 抗体的例子包括利妥昔单抗、维妥珠单抗、ocrelizumab、奥法木单抗和 AME-133。

[0077] “II 型” CD20 抗体经由不依赖于胱天蛋白酶的凋亡 (伴随着磷脂酰丝氨酸暴露) 启动靶细胞死亡, 且比 I 型抗 CD20 抗体展现出更强的同型粘附和 ADCC。II 型抗体不将 CD20 局部化到脂筏中。II 型抗 CD20 抗体的例子包括托西莫单抗 (B1)、11B8、AT80 和人源化 B-Ly1 抗体。

[0078] “利妥昔单抗”是结合 B 细胞上的 CD20 抗原并消滅体内 B 细胞的嵌合的 IgG1 抗 CD20 抗体。它的重链和轻链的氨基酸序列公开于美国专利 No. 7,381,560 中, 并通过提述明确并入本文。利妥昔单抗在美国可以从 Genentech RITUXAN® 商标下购得, 在其它国家可以从 Roche MABTHERA® 下购得。已经将编码利妥昔单抗的核酸在 1992 年 11 月 10 日保藏于 ATCC 保藏号 69119 下。利妥昔单抗的生物学活性被认为牵涉结合 CD20 时靶细胞中的信号传导, 其导致生长抑制和 (非经典的) 凋亡 (称为“直接细胞死亡”)、补体依赖性

细胞毒性 (CDC)、和由展示 Fc γ 受体 (Fc γ R) 的细胞 (诸如表达 Fc γ RIIIa 的 NK 细胞和巨噬细胞) 介导的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

[0079] 术语“人源化 B-Ly1 抗体”和“GA101”在本文中指人源化的 IgG1B-Ly1 抗体,如披露于描述鼠单克隆抗 CD20 抗体 B-Ly1 的人源化变体的 W02005/044859 和 W02007/031875 中的。此外,优选地,人源化 B-Ly1 抗体是依照记载于 W02005/044859、W02004/065540、W02007/031875、Umana 等 Nature Biotechnol. 17(1999)176-180(1999) 和 W01999/54342 中的规程在 Fc 区中经过糖工程改造 (GE) 的。在本发明的一个实施方案中优选无岩藻糖基化的、经过糖工程改造的人源化 B-Ly1 (B-HH6-B-KV1GE)。这类糖工程改造的人源化 B-Ly1 抗体在 Fc 区中具有改变的糖基化模式,优选地具有降低水平的岩藻糖残基。优选地,岩藻糖的量是在 Asn297 处的寡糖总量的 60% 或更少 (在一个实施方案中,岩藻糖的量介于 40% 和 60% 之间,在另一个实施方案中,岩藻糖的量是 50% 或更少,且在再一个实施方案中,岩藻糖的量是 30% 或更少)。此外, Fc 区的寡糖优选为两分的。这些糖工程改造的人源化 B-Ly1 抗体具有增加的 ADCC。

[0080] 纯粹为了本文的目的,除非另有说明,“2H7”或“2H7 抗体”指包含记载于 US2006/0034835 和 W02004/056312 (同由 Lowman 等);US2006/0188495 (Barron 等);和 US2006/0246004 (Adams 等) 的可变域序列的人源化抗 CD20 抗体。简言之,以一系列定点诱变步骤进行鼠抗人 CD20 抗体 2H7 (本文中也称作 m2H7, m 代表鼠) 的人源化。鼠 2H7 抗体可变区序列和具有小鼠 V 和人 C 的嵌合 2H7 已经记载于例如美国专利 No. 5,846,818 和 6,204,023。通过比较鼠 2H7 可变域的氨基酸序列 (披露于 US5,846,818) 与已知抗体的序列 (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 (Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)), 鉴定了 2H7 的 CDR 残基。基于序列高变性 (Kabat 等, 见上) 定义了轻链和重链的 CDR 区。使用合成的寡核苷酸, 利用定点诱变 (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:488-492(1985)) 将鼠 2H7 的所有六个 CDR 区引入质粒 pVX4 上所包含的、与共有序列 V_kI、V_HIII (V_L κ 亚组 I、V_H亚组 III) 对应的完整人 Fab 框架 (参见 W02004/056312 中的图 2)。通过定点诱变在噬菌粒 pVX4 中对 V 区 (CDR 和 / 或 FR) 进行进一步的修饰。构建用于表达全长 IgG 的质粒, 其通过将嵌合 2H7Fab 以及人源化 Fab2 至 6 型的 V_L和 V_H域亚克隆入先前描述的 pRK 载体中 (Gorman 等, DNA Prot. Eng. Tech., 2:3-10(1990)) 进行哺乳动物细胞表达。Ocrelizumab 是本文中的人源化 2H7 抗体的一个例子。

[0081] 如本文中使用的,“聚合酶链式反应”或“PCR”技术通常指其中如 1987 年 7 月 28 日公告的美国专利 No. 4,683,195 中所记载的,扩增微量的核酸 (RNA 和 / 或 DNA) 特定片段的规程。通常,需要获知目的区域末端或以外的序列信息,从而可设计寡核苷酸引物;这些引物在序列上将待扩增模板的对立链相同或相似。两条引物的 5' 末端核苷酸可与所扩增物质的末端一致。PCR 可用于从总基因组 DNA 和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等扩增特定 RNA 序列、特定 DNA 序列。一般参见 Mullis 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263(1987); Erlich 编, PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)。如本文中使用的, PCR 被认为是用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应方法的一个 (但非唯一的) 例子, 包括使用已知核酸 (DNA 或 RNA) 作为引物并利用核酸聚合酶来扩增或生成核酸的特定片段或者扩增或生成与特定核酸互补的核酸特定片段。

[0082] “定量实时聚合酶链式反应”或“qRT-PCR”指 PCR 的一种形式,其中在 PCR 反应的每个步骤测量 PCR 产物的量。这种技术已经记载于多份出版物,包括 Cronin 等, *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42(2004); 和 Ma 等, *Cancer Cell* 5:607-616(2004)。

[0083] 术语“微阵列”指可杂交阵列元素(优选为多核苷酸探针)在基片上的有序排列。

[0084] 术语“多核苷酸”在以单数或复数使用时一般指任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸,可以是未经修饰的 RNA 或 DNA 或经修饰的 RNA 或 DNA。由此,例如,如本文中定义的多核苷酸包括但不限于单链和双链 DNA、包含单链区和双链区的 DNA、单链和双链 RNA、和包含单链区和双链区的 RNA、包含 DNA 和 RNA 的杂合分子,它可以是单链的,或者更典型的是双链的,或者包含单链区和双链区。另外,如本文中使用的,术语“多核苷酸”指包含 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 二者的三链区。此类区中的链可来自同一分子或来自不同分子。所述区可包含一种或多种分子的整个,但是更典型的是只包含有些分子的一个区。三股螺旋区的分子之一常常是寡核苷酸。术语“多核苷酸”明确包括 cDNA。该术语包括包含一种或多种经修饰碱基的 DNA(包括 cDNA)和 RNA。如此,主链为稳定性或其它原因而修饰的 DNA 或 RNA 也是“多核苷酸”该术语在本文中的意图所在。此外,包含罕见碱基诸如肌苷或经修饰碱基诸如氟化碱基的 DNA 或 RNA 也包括在如本文中所定义的术语“多核苷酸”内。一般而言,术语“多核苷酸”涵盖未修饰多核苷酸的所有化学、酶和/或代谢修饰形式,以及病毒和细胞(包括简单和复杂细胞)的特征性的 DNA 和 RNA 的化学形式。

[0085] 术语“寡核苷酸”指相对短的多核苷酸,包括但不限于单链脱氧核糖核苷酸、单链或双链核糖核苷酸、RNA:DNA 杂合物、和双链 DNA。寡核苷酸(诸如单链 DNA 探针寡核苷酸)经常通过化学方法合成,例如使用商品化的自动化寡核苷酸合成仪。然而,可通过多种其他方法来制备寡核苷酸,包括体外重组 DNA 介导的技术以及通过在细胞和生物体中表达 DNA。

[0086] 杂交反应的“严格性”可以由本领域中的普通技术人员容易地确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性 DNA 重新退火的能力。探针与可杂交序列之间的期望同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果,可推出较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, 1995。

[0087] 如本文中所定义的,“严格条件”或“高严格条件”通常为:(1) 对于洗涤采用低离子强度和高温,例如 0.015M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1% 十二烷基硫酸钠,50° C; (2) 在杂交期间使用变性剂,诸如甲酰胺,例如 50%(v/v) 甲酰胺及 0.1% 牛血清清蛋白/0.1%Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠缓冲液 pH6.5 及 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠的,42° C;或 (3) 使用 50% 甲酰胺、5x SSC(0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠(pH6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5x 登哈特氏(Denhardt's)溶液、超声处理的鲑精 DNA(50 μg/ml)、0.1%SDS 和 10% 硫酸右旋糖苷,42° C,在 42° C 于 0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和 50% 甲酰胺中洗涤,然后在 55° C 进行由含有 EDTA 的 0.1x SSC 组成的高严格洗涤。

[0088] “中等严格条件”可规定为如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所描述的,而且包括使用与上文所述那些相比较不严格的洗涤溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和 %SDS)。中等严格条件的一

个例子是在含 :20% 甲酰胺、5x SSC(150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5x 登哈特氏溶液、10% 硫酸右旋糖苷和 20mg/ml 变性的剪切的鲑精 DNA 的溶液中于 37° C 温育过夜,然后于约 37-50° C 在 1x SSC 中洗涤滤膜。熟练技术人员会认识到如何根据适应诸如探针长度等因素的需要来调节温度、离子强度等。

[0089] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类,诸如塞替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (CYTOXAN®);磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (pivosulfan);氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedepa) 和乌瑞替派 (uredepa);乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine);番荔枝内酯类 (acetogenins)(尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚 (dronabinol), MARINOL®); β -拉帕醌 (lapachone);拉帕醇 (lapachol);秋水仙素类 (colchicines);白桦脂酸 (betulinic acid);喜树碱 (camptothecin)(包括合成类似物托泊替康 (topotecan) (HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康 (irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、东莨菪亭 (scopoletin) 和 9-氨基喜树碱);苔藓抑素 (bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物);鬼臼毒素 (podophyllotoxin);鬼臼酸 (podophyllinic acid);替尼泊苷 (teniposide);隐藻素类 (cryptophycins)(特别是隐藻素 1 和隐藻素 8);多拉司他汀 (dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1);艾榴塞洛素 (eleutherobin);pancratistatin;sarcodictyin;海绵抑素 (spongistatin);氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷酰胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard);亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine);抗生素类, 诸如烯二炔类 (enediyne) 抗生素(例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 11 和加利车霉素 ω 11(参见例如 Nicolaou 等, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186(1994)); CDP323, 一种口服 α -4 整联蛋白抑制剂;蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A;埃斯波霉素 (esperamicin);以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (authramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C(cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托

比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂 (**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99 (**MYOCET®**)、PEG 化脂质体多柔比星 (**CAELYX®**) 和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤、吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、埃坡霉素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (azaauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 抗肾上腺类, 诸如氨基鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verracurin)A、杆孢菌素 (roridin)A 和蛇行菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派; 类紫杉醇 (taxoid), 例如帕利他塞 (paclitaxel) (**TAXOL®**)、帕利他塞的清蛋白改造的纳米颗粒剂型 (ABRAXANE™) 和多西他塞 (doxetaxel) (**TAXOTERE®**); 苯丁酸氮芥; 6-巯鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤;

甲氨喋呤;铂剂,诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂 (carboplatin);阻止微管蛋白聚合而形成微管的长春花药类 (vincas),包含长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**)、长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**)、长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**)、和长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**);依托泊苷 (etoposide) (VP-16);异环磷酰胺 (ifosfamide);米托蒽醌 (mitoxantrone);亚叶酸 (leucovorin);能灭瘤 (novantrone);依达曲沙 (edatrexate);道诺霉素 (daunomycin);氨基蝶呤 (aminopterin);伊本膦酸盐 (ibandronate);拓扑异构酶抑制剂 RFS2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类视黄酸类 (retinoids),诸如视黄酸 (retinoic acid),包括 bexarotene (**TARGRETIN®**);二膦酸盐类 (bisphosphonates),诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸钠 (etidronate) (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 / 唑来膦酸盐 (zoledronic acid/zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿伦膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸盐 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**);曲沙他滨 (troxacitabine) (1, 3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是那些抑制牵涉异常细胞增殖的信号途经中的基因表达的,诸如例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R);疫苗,诸如 **THERATOPE®** 疫苗和基因疗法疫苗,例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗;拓扑异构酶 1 抑制剂 (例如 **LURTOTECAN®**);rmRH (例如 **ABARELIX®**);BA Y439006 (sorafenib;Bayer);SU-11248 (Pfizer);哌立福辛 (perifosine)、COX-2 抑制剂 (例如塞来考昔 (celecoxib) 或艾托考昔 (etoricoxib))、蛋白体抑制剂 (例如 PS341);硼替佐米 (bortezomib) (**VELCADE®**);CCI-779;替吡法尼 (tipifarnib) (R11577);orafenib;ABT510;Bcl-2 抑制剂,诸如哈眠那 (oblimersen sodium) (**GENASENSE®**);匹杉琼 (pixantrone);EGFR 抑制剂 (参见下文定义);酪氨酸激酶抑制剂 (参见下文定义);和任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物;以及两种或更多上述物质的组合,诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0090] 在本文中,化疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”,其作用于调节、降低、阻断或抑制能够促进癌症生长的激素的效果。它们可以本身就是激素,包括但不限于:具有混合的激动剂 / 拮抗剂谱的抗雌激素类,包括他莫昔芬 (tamoxifen) (**NOLVADEX®**)、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬 (toremifene) (**FARESTON®**)、艾多昔芬 (idoxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、雷洛昔芬 (raloxifene) (**EVISTA®**)、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、以及选择性雌激素受体调控物类 (SERM) 诸如 SERM3;没有激动剂特性的纯粹的抗雌激素,诸如氟维司群 (fulvestrant) (**FASLODEX®**) 和 EM800 (此类药剂可阻断雌激素受体 (ER) 二聚化,抑制 DNA 结合,提高 ER 周转,和 / 或遏制 ER 水平);芳香酶抑制剂,包括类固醇芳香酶抑制剂,诸如福美坦 (formestane) 和依西美坦 (exemestane) (**AROMASIN®**),及非类固醇芳香酶抑制剂,诸如阿那曲唑

(anastrozole) (ARIMIDEX®)、来曲唑 (letrozole) (FEMARA®) 和 氨鲁米特 (aminoglutethimide), 及其它芳香酶抑制剂, 包括伏罗唑 (vorozole) (RIVISOR®)、醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) (MEGASE®)、法倔唑 (fadrozole)、和 4(5)-咪唑; 黄体生成素 (lutening hormone) 释放激素激动剂, 包括亮丙瑞林 (leuprolide) (LUPRON® 和 ELIGARD®)、戈舍瑞林 (goserelin)、布舍瑞林 (buserelin) 和 曲普瑞林 (triptorelin); 性类固醇类, 包括孕激素, 诸如醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) 和 醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate), 雌激素, 诸如 乙炔雌酚 (diethylstilbestrol) 和 倍美力 (premarin), 及 雄激素 / 类维生素 A, 诸如 氟甲睾酮 (fluoxymesterone)、全反式维 A 酸 (all transretinoic acid) 和 芬维 A 胺 (fenretinide); 奥那司酮 (onapristone); 抗孕酮类; 雌激素受体下调调节剂 (ERD); 抗雄激素类, 诸如 氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和 比卡米特 (bicalutamide); 及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或更多种上述物质的组合。

[0091] 本文中的化疗剂或化疗方案的特定例子包括: 烷化剂类 (例如 苯丁酸氮芥、苯达莫司汀或 环磷酰胺); 核苷类似物或 抗代谢物类 (例如 氟达拉滨)、氟达拉滨和 环磷酰胺 (FC); 泼尼松或 泼尼松龙; 含有烷化物的联合疗法, 包括 环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CHOP) 或 环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙 (CVP) 等。

[0092] “目标受众”指接受如通过销售或做广告 (尤其为了特定用途、治疗、或适应症) 进行的特定药物促销或意图进行的特定药物促销的人群或机构, 诸如 患者个体, 患者群体, 报纸、医学文献、和 杂志读者, 电视或因特网观众, 无线电或因特网听众, 内科医生, 药品公司等。

[0093] “包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商品包装中的说明书, 它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、要与所包装产品联用的其它治疗用产品、和 / 或警告等的信息。

[0094] 本文中的术语“抗体”以其最广义使用并且涵盖各种抗体结构, 包括但不限于, 单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如 双特异性抗体) 和 抗体片段, 只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0095] “抗体片段”指与完整抗体不同的包含完整抗体的一部分的分子, 其结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于, Fv、Fab、Fab'、Fab' -SH、F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子 (例如 scFv); 和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0096] “亲和力成熟的”抗体指在一个或多个高变区 (HVR) 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这类改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。

[0097] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中将参照抗体对其抗原的结合阻断 50% 或更多的抗体, 且相反, 参照抗体在竞争测定法中将该抗体对其抗原的结合阻断 50% 或更多。本文中提供了例示性的竞争测定法。在一个实施方案中, 所述抗体与 利妥昔单抗、奥法木单抗、GA101、SBI-087、维妥珠单抗或 AME-133 结合相同的表位。

[0098] 术语“嵌合”抗体指这样一种抗体, 其中重链和 / 或轻链的一部分自特定来源或物种衍生, 而重链和 / 或轻链的剩余部分自不同的来源或物种衍生。

[0099] 抗体的“类”指其重链具有的恒定域或恒定区的类型。抗体有五大类: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中有些可进一步分为“亚类” (同种型), 例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁

和 IgA₂。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0100] 如在本文中使用的,术语“细胞毒剂”指抑制或防止细胞的功能和 / 或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于,放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素);化疗剂或化疗药物(例如甲氨蝶呤、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体;以及下文披露的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0101] “效应器功能”指那些可归于抗体 Fc 区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括: C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC); Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调; 和 B 细胞活化。

[0102] 术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C-端区域,其至少包含恒定区的一部分。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一个实施方案中,人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或从 Pro230 延伸至重链的羧基末端。然而, Fc 区的 C 末端赖氨酸(Lys447)可以存在或者不存在。除非在本文中另外指出的,依照 EU 编号系统(也称为 EU 索引)来对 Fc 区或恒定区中的氨基酸残基编号,如记载于 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中的。

[0103] “框架区”或“FR”指除高变区(HVR)残基以外的可变域残基。可变域的 FR 一般由 4 个 FR 域组成: FR1、FR2、FR3、和 FR4。因此, HVR 和 FR 序列在 VH(或 VL)中一般以下列顺序出现: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0104] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用,指具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文中定义的 Fc 区的重链的抗体。

[0105] “人抗体”是具有对应于由人或人细胞生成的抗体的氨基酸序列的抗体、或者自利用了人抗体全集或其它编码人抗体的序列的非人来源衍生的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0106] “人源化”抗体指包含来自非人 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域,其中所有或基本上所有 HVR(例如 CDR)对应于非人抗体的 HVR,且所有或基本上所有 FR 对应于人抗体的 FR。人源化抗体任选地可以包含至少部分自人抗体衍生的抗体恒定区。抗体例如非人抗体的“人源化形式”指已经经过人源化的抗体。

[0107] 如本文中使用的,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中序列上高度可变和 / 或形成结构上定义的环(“高变环”)的每个区域。通常,天然的 4 条链的抗体包含六个 HVR; 三个在 VH 中(H1、H2、H3),且三个在 VL 中(L1、L2、L3)。HVR 通常包含来自高变环和 / 或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列变异性和 / 或牵涉抗原识别。例示性的高变环存在于氨基酸位置 26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2), 和 96-101(H3)中。(Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。例示性 CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3)存在于 L1 的氨基酸残基 24-34、L2 的 50-56、L3

的 89-97、H1 的 31-35B、H2 的 50-65、和 H3 的 95-102。(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。除了 VH 中 CDR1 例外以外, CDR 一般包含形成高变环的氨基酸残基。CDR 还包含“特异性决定残基”或“SDR”, 其为接触抗原的残基。SDR 包含在称为缩略 (abbreviated)-CDR 或 a-CDR 的 CDR 区内。例示性的 a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2 和 a-CDR-H3) 存在于 L1 的氨基酸残基 31-34、L2 的 50-55、L3 的 89-96、H1 的 31-35B、H2 的 50-58、和 H3 的 95-102。(参见 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008))。除非另外指示的, 可变域中的 HVR 残基和其它残基(例如 FR 残基) 在本文中依照 Kabat 等, 见上编号。在一个实施方案中, 本文中的 CD20 抗体包含利妥昔单抗、奥法木单抗、GA101、SBI-087、维妥珠单抗或 AME-133 的 HVR。

[0108] “免疫偶联物”指抗体偶联至一种或多种异源分子, 包括但不限于细胞毒剂。

[0109] 如本文中使用的, 术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各个抗体相同和 / 或结合相同表位, 除了一般以少量存在的可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在生产单克隆抗体制备物的过程中产生)外。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同, 单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此, 修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征, 不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如, 依照本发明所要使用的单克隆抗体可通过多种技术来制备, 包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示技术、以及利用含有所有或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 本文中描述的这类方法以及其它用于制备单克隆抗体的例示性方法。

[0110] “裸抗体(裸露的抗体)”指未偶联异源模块(例如“细胞毒性模块”)或放射性标记物的抗体。所述裸抗体可以以药物配制剂存在。

[0111] “天然抗体”指天然存在的具有各种结构的免疫球蛋白分子。例如, 天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白, 由以二硫键结合的两条相同的轻链和两条相同的重链构成。每条重链从 N 末端到 C 末端都具有可变区(VH)(也称为可变重域或重链可变域), 接着是 3 个恒定域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地, 每条轻链从 N 末端到 C 末端都具有可变区(VL)(也称为可变轻域或轻链可变域), 接着是恒定轻(CL)域。抗体的轻链根据其恒定域的氨基酸序列可以分为两型, 称为卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0112] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商品包装中的说明书, 它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症、和 / 或警告的信息。

[0113] 术语“药物配制剂”指其形式容许药物的生物学活性是有效的, 且不含对会施用该配制剂的受试者产生不可接受的毒性的别的成分的无菌制备物。

[0114] “无菌”配制剂是无菌的或者没有任何活的微生物及其孢子。

[0115] “试剂盒”指包含至少一种试剂(例如用于治疗 CLL 的药物, 或用于特异性检测本发明的生物标志物基因或蛋白的探针)的任何制品(例如包装或容器)。优选地, 所述制品以用于实施本发明方法的单元来宣传、分发、或销售。

[0116] “药学可接受载体”指药物配制剂中除活性成分以外的成分, 其对受试者是无毒性的。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0117] II. CLL 药物

[0118] 在一个方面,本发明涉及基于本文中披露的一种或多种生物标志物的表达来选择能够用 CLL 药物治疗的患者。CLL 药物的例子包括但不限于:

[0119] - 上文所记载的化疗剂和化疗方案,具体包括:烷化剂类(例如苯丁酸氮芥、苯达莫司汀或环磷酰胺);核苷类似物或抗代谢物类(例如氟达拉滨),氟达拉滨和环磷酰胺(FC);泼尼松或泼尼松龙;含有烷化物的联合疗法,包括环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙(CHOP),或环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙(CVP);等等。

[0120] -B 细胞拮抗剂,诸如 CD20 抗体(例如利妥昔单抗、奥法木单抗、GA101、SBI-087、维妥珠单抗和 AME-133 等)、CD22 抗体或 CD79b 抗体;

[0121] - 静脉内免疫球蛋白;

[0122] -CD52 抗体(例如阿仑单抗);以及

[0123] - 正在开发中或已被批准的用于治疗 CLL 的其它药物或其组合。

[0124] 在一个实施方案中,所述 CLL 药物诱导 FAK 信号传导和/或同型聚集。任选地,所述 CLL 药物选自:B 细胞拮抗剂、B 细胞抗体、CD20 抗体、I 型 CD20 抗体、II 型 CD20 抗体、CD22 抗体、CD79b 抗体等。

[0125] 在一个实施方案中(其中生物标志物的表达水平低于中值),所述 CLL 药物不是利妥昔单抗。

[0126] 在一个实施方案中,所述药物是例如针对或结合 CD20 的抗体。本文中的抗体包括:单克隆抗体,其包含嵌合的、人源化的或人的抗体。在一个实施方案中,所述抗体是抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体、或 F(ab')₂ 片段。在另一个实施方案中,所述抗体是全长抗体,例如完整的 IgG1 抗体或如本文中定义的其它抗体类或同种型。

[0127] 在一个实施方案中,所述抗体(例如本文方法中使用的抗体)可单一地或组合地掺入以下 1-6 部分中所描述的任何特征:

[0128] 1. 抗体片段

[0129] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、和 scFv 片段,及下文所描述的其它片段。对于某些抗体片段的综述,参见 Hudson 等 Nat. Med. 9:129-134(2003)。关于 scFv 片段的综述,参见例如 Pluckthün, 于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenburg 和 Moore 编,(Springer-Verlag, New York), 第 269 页 - 第 315 页(1994); 还可参见 W093/16185; 和美国专利 Nos. 5, 571, 894 和 5, 587, 458。对于包含拯救受体结合表位残基,并且具有延长的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段的论述,参见美国专利 5, 869, 046。

[0130] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如 EP404, 097; W01993/01161; Hudson 等, Nat. Med. 9:129-134(2003); 和 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于 Hudson 等, Nat. Med. 9:129-134(2003)。

[0131] 单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利 No. 6, 248, 516B1)。

[0132] 可以通过多种技术,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化及重组宿主细胞

(例如大肠杆菌或噬菌体)的生成来生成抗体片段,如本文中所描述的。

[0133] 2. 嵌合的和人源化的抗体

[0134] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利 No. 4,816,567;和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)中。在一个例子中,嵌合抗体包含非人可变区(例如自小鼠、大鼠、仓鼠、家兔、或非人灵长类诸如猴衍生的可变区)和人恒定区。在另一个例子中,嵌合抗体是“类转换的”抗体,其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0135] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中 HVR 例如 CDR(或其部分)自非人抗体衍生,而 FR(或其部分)自人抗体序列衍生。任选地,人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些 FR 残基用来自非人抗体(例如衍生 HVR 残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0136] 人源化抗体及其制备方法综述于例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008), 并且进一步记载于例如 Riechmann 等, Nature 332:323-329(1988); Queen 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989); 美国专利 No. 5,821,337、7,527,791、6,982,321 和 7,087,409; Kashmiri 等, Methods 36:25-34(2005)(描述了 SDR(a-CDR)嫁接); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991)(描述了“重修表面”); Dall'Acqua 等, Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR 改组”); 和 Osbourn 等, Methods 36:61-68(2005) 和 Klimka 等, Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)(描述了 FR 改组的“引导选择”方法)。

[0137] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(参见例如 Sims 等 J. Immunol. 151:2296(1993));自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(参见例如 Carter 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); 和 Presta 等 J. Immunol., 151:2623(1993));人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008));和通过筛选 FR 文库衍生的框架区(参见例如 Baca 等, J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 和 Rosok 等, J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996))。

[0138] 利妥昔单抗是结合 CD20 的嵌合抗体的一个例子。结合 CD20 的人源化抗体的例子包括:GA101、SBI-087、AME-133 和维妥珠单抗。

[0139] 3. 人抗体

[0140] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术生成人抗体。一般地,人抗体记载于 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001) 和 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)。

[0141] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已经修饰为应答抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有所有或部分的人免疫球蛋白基因座,其替换了内源性免疫球蛋白基因座,或者其存在于染色体外或被随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,一般已经将内源免疫

球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见 Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)。还参见,例如美国专利 No. 6,075,181 和 6,150,584(描述 XENOMOUSE™技术);美国专利 No. 5,770,429(描述 HUMAB®技术);美国专利 No. 7,041,870(描述 K-M MOUSE®技术);美国专利申请公开 No. US2007/0061900(描述 VELOCIMOUSE®技术)。可以通过例如与不同的人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0142] 也可以通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见例如 Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51 页 - 第 63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等, J. Immunol., 147:86(1991)。)经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体还记载于 Li 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)。其它方法包括那些例如记载于美国专利 No. 7,189,826(描述从杂交瘤细胞系生成单克隆人 IgM 抗体)和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)的。人杂交瘤技术(Trioma 技术)还记载于 Vollmers 和 Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937(2005)以及 Vollmers 和 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005)。

[0143] 还可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变域序列来生成人抗体。然后,可以将这类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0144] 奥法木单抗是结合 CD20 的人抗体的一个例子。

[0145] 4. 文库衍生的抗体

[0146] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库并对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如 Hoogenboom 等于 Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien 等编, Human Press, Totowa, NJ, 2001), 并且进一步记载于例如 McCafferty 等, Nature 348:552-554; Clackson 等, Nature 352:624-628(1991); Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1992); Marks 和 Bradbury, 于 Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310(2004); Lee 等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093(2004); Fello use, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472(2004); 和 Lee 等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0147] 在某些噬菌体展示方法中,将 VH 和 VL 基因的全集分别通过聚合酶链式反应(PCR)克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于 Winter 等, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455(1994)的。噬菌体通常以单链 Fv(scFv)片段或以 Fab 片段展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆天然全集以在没有任何免疫的情况下提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由 Griffiths 等, EMBO J, 12:725-734(1993)描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆未重排的 V 基因

区段,并使用含有随机序列的 PCR 引物编码高度可变的 CDR3 区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388(1992) 所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括例如:美国专利 No. 5,750,373, 和美国专利公开 No. 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936 和 2009/0002360。

[0148] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0149] 5. 多特异性抗体

[0150] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一针对 CD20,而另一种针对任何其它抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合 CD20 的两种不同表位。也可以使用双特异性抗体来将细胞毒剂局部化于表达 CD20 的细胞。双特异性抗体可以以全长抗体或抗体片段制备。

[0151] 用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链的重组共表达(参见 Milstein 和 Cuello, *Nature*305:537(1983)、W093/08829 和 Traunecker 等, *EMBO J.* 10:3655(1991))、和“突起-入-空穴”工程(参见例如美国专利 No. 5,731,168)。也可以通过用于生成抗体 Fc- 异二聚体分子的工程化静电操纵效应(W02009/089004A1);交联两种或更多种抗体或片段(参见例如美国专利 No. 4,676,980 和 Brennan 等, *Science*, 229:81(1985));使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体(参见例如 Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992));使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993));及使用单链 Fv (sFv) 二聚体(参见例如 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152:5368(1994));及例如 Tuttle 等 *J. Immunol.* 147:60(1991) 中所描述的,制备三特异性抗体来生成多特异性抗体。

[0152] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如 US2006/0025576A1)。

[0153] 本文中的抗体或片段还包括包含结合 CD20 及另一种不同抗原的抗原结合位点的“双重作用 Fab”或“DAF”(参见例如 US2008/0069820)。

[0154] 6. 抗体变体

[0155] 在某些实施方案中,涵盖本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入和/或替代。可以进行删除、插入、和替代的任何组合以得到最终的构建体,只要最终的构建体拥有期望的特征,例如,抗原结合。

[0156] 在某些实施方案中,提供了具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括 HVR 和 FR。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的 ADCC 或 CDC。

[0157] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力、降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性的替代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如使用基于噬菌体展

示的亲和力成熟技术诸如本文中所描述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个 HVR 残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力和)。

[0158] 氨基酸序列插入包括长度范围为 1 个残基至含有 100 或更多个残基的多肽的氨基和 / 或羧基端融合,及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 或 C 末端与酶(例如对于 ADEPT) 或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0159] 在某些实施方案中,改变本文中提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列,使得创建或消除一个或多个糖基化位点来方便地实现对抗体的糖基化位点的添加或删除。

[0160] 在抗体包含 Fc 区的情况中,可以改变其附着的碳水化合物。由哺乳动物细胞生成的天然抗体通常包含分支的、双触角寡糖,其一般通过 N 连接附着于 Fc 区的 CH₂ 域的 Asn297。参见例如 Wright 等 TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖、和唾液酸,以及附着于双触角寡糖结构“主干”中的 GlcNAc 的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明抗体中的寡糖进行修饰以创建具有某些改善的特性的抗体变体。

[0161] 在一个实施方案中,提供了抗体变体,其具有缺乏附着(直接或间接)于 Fc 区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中的岩藻糖量可以是 1% 至 80%、1% 至 65%、5% 至 65% 或 20% 至 40%。通过相对于附着于 Asn297 的所有糖结构(例如,复合的、杂合的和高甘露糖的结构)的总和,计算 Asn297 处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖量,如通过 MALDI-TOF 质谱术测量的,例如如记载于 W02008/077546 的。Asn297 指位于 Fc 区中的约第 297 位(Fc 区残基的 Eu 编号方式)的天冬酰胺残基;然而,Asn297 也可以由于抗体中的微小序列变异而位于第 297 位上游或下游约 ±3 个氨基酸,即在第 294 位和第 300 位之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的 ADCC 功能。见例如美国专利公开文本 No. US2003/0157108(Presta, L.);US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。涉及“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体的出版物的例子包括:US2003/0157108;W02000/61739;W02001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;W02003/085119;W02003/084570;W02005/035586;W02005/035778;W02005/053742;W02002/031140;Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87:614(2004)。能够生成脱岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的 Lec13CHO 细胞(Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986);美国专利申请 No US2003/0157108A1, Presta, L;及 W02004/056312A1, Adams 等,尤其在实施例 11), 和敲除细胞系,诸如 α-1,6-岩藻糖基转移酶基因 FUT8 敲除 CHO 细胞(见例如 Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87:614(2004);Kanda, Y. 等, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006);及 W02003/085107)。

[0162] 进一步提供了具有两分型寡糖的抗体变体,例如其中附着于抗体 Fc 区的双触角寡糖是通过 GlcNAc 两分的。此类抗体变体可以具有降低的岩藻糖基化和 / 或改善的 ADCC 功能。此类抗体变体的例子记载于例如 W02003/011878(Jean-Mairet 等);美国专

利 No. 6, 602, 684 (Umana 等) ; 及 US2005/0123546 (Umana 等) 。还提供了在附着于 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的 CDC 功能。此类抗体变体记载于例如 W01997/30087 (Patel 等) ; W01998/58964 (Raju, S.) ; 及 W01999/22764 (Raju, S.) 。

[0163] GA101 是结合 CD20 的抗体糖基化变体的一个例子。

[0164] 在某些实施方案中, 可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的 Fc 区中, 由此生成 Fc 区变体。Fc 区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰 (例如替代) 的人 Fc 区序列 (例如, 人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区) 。

[0165] 在某些实施方案中, 本发明涵盖拥有一些但不是所有效应器功能的抗体变体, 这使其成为如下应用的期望候选物, 其中抗体的体内半衰期是重要的, 而某些效应器功能 (诸如补体和 ADCC) 是不必要的或有害的。

[0166] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 中的一个或多个的替代的 (美国专利 No. 6, 737, 056) 。此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 中的两处或更多处具有替代的 Fc 突变体, 包括残基 265 和 297 替代成丙氨酸的所谓的 “DANA” Fc 突变体 (美国专利 No. 7, 332, 581) 。

[0167] 描述了具有改善的或降低的对 FcR 的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利 No. 6, 737, 056; W02004/056312, 和 Shields 等, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604(2001)) 。

[0168] 在某些实施方案中, 抗体变体包含具有改善 ADCC 的一处或多处氨基酸替代, 例如 Fc 区的位置 298、333、和 / 或 334 (残基的 EU 编号方式) 的替代的 Fc 区。

[0169] 在一些实施方案中, 对 Fc 区做出改变, 其导致改变的 (即, 改善的或降低的) C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC), 例如, 如记载于美国专利 No. 6, 194, 551, W099/51642, 和 Idusogie 等 *J. Immunol.* 164:4178-4184(2000) 的。

[0170] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合的抗体记载于 US2005/0014934A1 (Hinton 等), 新生儿 Fc 受体 (FcRn) 负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587(1976) 及 Kim 等, *J. Immunol.* 24:249(1994)) 。那些抗体包含其中具有改善 Fc 区对 FcRn 结合的一处或多处替代的 Fc 区。此类 Fc 变体包括那些在 Fc 区残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 中的一处或多处具有替代, 例如, Fc 区残基 434 的替代的 (美国专利 No. 7, 371, 826) 。

[0171] 还可见 Duncan 和 Winter, *Nature* 322:738-40(1988) ; 美国专利 No. 5, 648, 260 ; 美国专利 No. 5, 624, 821 ; 及 W094/29351, 其关注 Fc 区变体的其它例子。

[0172] 在某些实施方案中, 可以期望创建经半胱氨酸工程化改造的抗体, 例如, “thioMAb”, 其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基替代。在具体的实施方案中, 替代的残基存在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸替代那些残基, 反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点, 并且可以用于将抗体与其它模块, 诸如药物模块或接头 - 药物模块偶联, 以创建免疫偶联物, 如本文中进一步描述的。在某些实施方案中, 可以用半胱氨酸替代下列残基之任一个或多个: 轻链的 V205 (Kabat 编号方式) ; 重链的 A118 (EU 编号方式) ; 和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号方式) 。可以如例如美国专利 No. 7, 521, 541 所述生成经半胱氨酸工程化改造的抗体。

[0173] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。适合于抗体衍生化的模块包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物的数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体要改进的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0174] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质性质模块的偶联物。在一个实施方案中,非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA102:11600-11605(2005))。辐射可以是任何波长的,并且包括但不限于对普通细胞没有损害,但是将非蛋白质性质模块加热至抗体-非蛋白质性质模块附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0175] 在一个实施方案中,所述药物是包含偶联于一种或多种细胞毒剂的抗体(诸如CD20抗体)的免疫偶联物,所述细胞毒剂诸如化疗剂或化疗药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,或其片段)、或放射性同位素。

[0176] 在一个实施方案中,免疫偶联物是抗体-药物偶联物(ADC),其中抗体偶联于一种或多种药物,所述药物包括但不限于美登木素生物碱(maytansinoid)(参见美国专利No. 5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP0425235B1);auristatin诸如单甲基auristatin药物模块DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利No. 5,635,483和5,780,588,和7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素或其衍生物(参见美国专利No. 5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等,Cancer Res. 53:3336-3342(1993);和Lode等,Cancer Res. 58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素诸如道诺霉素或多柔比星(参见Kratz等,Current Med. Chem. 13:477-523(2006);Jeffrey等,Bioorganic&Med. Chem. Letters16:358-362(2006);Torgov等,Bioconj. Chem. 16:717-721(2005);Nagy等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA97:829-834(2000);Dubowchik等,Bioorg. &Med. Chem. Letters12:1529-1532(2002);King等,J. Med. Chem. 45:4336-4343(2002);和美国专利No. 6,630,579);甲氨蝶呤、长春地辛;紫杉烷类诸如多西他塞、帕利他塞、larotaxel、tesetaxel和ortataxel;单端孢菌毒素(trichothecene);和CC1065。

[0177] 在另一个实施方案中,免疫偶联物包含如本文中描述的抗体偶联于酶活性毒素或其片段,包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -帚曲毒素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹(*dianthin*)蛋白、美洲商陆(*Phytolaca Americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草

(sapaonaria officinalis) 抑制物、白树毒素 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌毒素。

[0178] 在另一个实施方案中,免疫偶联物包含如本文中描述的抗体偶联于放射性原子以形成放射偶联物。多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 和 Lu 的放射性同位素。在将放射偶联物用于检测时,它可包含放射性原子用于闪烁照相研究,例如 Tc99m 或 I123,或是包含自旋标记物用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI), 诸如碘 -123、碘 -131、钆 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、钆、锰或铁。

[0179] 可以使用多种双功能蛋白质偶联剂来生成抗体和细胞毒剂的偶联物, 诸如 N- 琥珀酰亚氨基 -3-(2- 吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 琥珀酰亚氨基 -4-(N- 马来酰亚氨基甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC), 亚氨基硫烷 (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对 - 叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对 - 重氮苯甲酰基) - 乙二胺)、二异硫氰酸酯 (诸如甲苯 2, 6- 二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1, 5- 二氟 -2, 4- 二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可以如 Vitetta 等, Science238:1098 (1987) 中描述的制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳 -14 标记的 1- 异硫氰酸苯甲基 -3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如, 可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari 等, Cancer Res. 52:127-131 (1992); 美国专利 No. 5, 208, 020)。

[0180] 本文中的免疫偶联物或 ADC 明确涵盖但不限于用下列交联试剂制备的这类偶联物: 商品化 (如购自 Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U. S. A.) 的 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC 和 sulfo-SMPB、和 SVSB (琥珀酰亚氨基 - (4- 乙烯基砵) 苯甲酸酯)。

[0181] III. 诊断方法

[0182] 在一个方面, 本文在的发明涉及为慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者选择疗法的方法, 其包括测定来自患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达 (或活化), 并基于该生物标志物的表达水平来选择 CLL 药物。在一个实施方案中, 升高水平的生物标志物 (一种或多种) 会导致选择诱导 FAK 信号传导和 / 或同型粘附的 CLL 药物、和 / 或 B 细胞拮抗剂、和 / 或 CD20 抗体来用于治疗患者。在另一个实施方案中, 当生物标志物 (一种或多种) 以降低水平或中值以下的水平存在时, 对该患者会选择除利妥昔单抗以外或除 CD20 抗体以外的 CLL 药物来治疗。

[0183] 可以基本与测量生物标志物表达同时地来测定生物标志物的中值表达水平, 或可以先前已经测定生物标志物的中值表达水平。熟练的技术人员能够对各种诊断测定法测定患者群体中生物标志物的中值表达水平。这在下表中例示, 下表提供了下文实施例中的各种生物测定法和生物标志物的中值表达水平。

[0184]

基因/miRNA	数据类型	高对低表达定义	CD19 样品数	最小值	第一 四分位值	中值	第3 四分位值	最大值
miRNA151 3p	DISCOVARRAY®, RNA标准化的值(log2)	高: >=中值(6.77); 低: <中值	301	-0.01	3.33	6.77	8.96	11.67
	qRT-PCR, 每ng估算的拷贝数	高: >=中值(58.6); 低: <中值	281	0	6.59	58.6	237	3200
	qRT-PCR, Ct	高: <=中值(34.35); 低: >中值	281	28.18	32.19	34.35	37.73	45
	qRT-PCR, 相对于miR-150的-ΔCt	高: >=中值(-13.85); 低: <中值	280	-25.77	-17.23	-13.85	-12.06	-8.87
	qRT-PCR, 相对于miR-26a的-ΔCt	高: >=中值(-9.55); 低: <中值	281	-22.34	-13.28	-9.55	-7.82	-0.44
	DISCOVARRAY®, RMA标准化的值(log2)	高: >=中值(1.12); 低: <中值	301	-0.27	0.58	1.12	2	7.46
miRNA409 3p	qRT-PCR, 每ng估算的拷贝数	高: >=中值(0.38); 低: <中值	281	0	0	0.38	1.74	181
	qRT-PCR, Ct	高: <=中值(39.03); 低: >中值	281	30.35	36.9	39.03	45	45
	qRT-PCR,	高: >=中值(-18.88);	280	-26.22	-24.25	-18.88	-16.31	-7.43

穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如脑脊液、羊膜液（羊水）、腹膜液（腹水）或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。本文中肿瘤样品的例子包括但不限于，肿瘤活检、肿瘤细胞、血清或血浆、外周血单个核细胞（PBMC）、循环中的血浆蛋白质、腹水、自肿瘤衍生或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系、以及保存的肿瘤样品，诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。在一个实施方案中，所述样品包含外周血单个核细胞（PBMC），其包括富集 CD19 的 PBMC。

[0187] 用于测定 mRNA 或蛋白质表达的各种方法包括但不限于，基因表达序型分析、包括定量实时 PCR (qRT-PCR) 在内的聚合酶链式反应、RNA-Seq、微阵列分析、基因表达连续分析 (SAGE)、MassARRAY、蛋白质组学、免疫组织化学 (IHC) 等等。优选地，量化 mRNA。优选地，使用聚合酶链式反应 (PCR) 技术或通过微阵列分析来实施这类 mRNA 分析。当采用 PCR 时，一些优选的 PCR 形式是定量实时 PCR (qRT-PCR)。

[0188] 现在将更详细的描述用于测定基因表达的各种例示性方法。

[0189] 1. 基因表达序型分析

[0190] 一般而言，基因表达序型分析的方法可分成两大组：基于多核苷酸杂交分析的方法，和基于多核苷酸测序的方法。本领域中已知用于样品中 mRNA 表达定量的最常使用的方法包括 Northern 印迹和原位杂交 (Parker&Barnes, *Methods in Molecular Biology*106:247-283(1999))；RNA 酶保护测定法 (Hod, *Biotechniques*13:852-854(1992)) 和聚合酶链式反应 (PCR) (Weis 等, *Trends in Genetics*8:263-264(1992))。或者，可采用能识别特定双链体（包括 DNA 双链体、RNA 双链体、及 DNA-RNA 杂合双链体或 DNA-蛋白质双链体）的抗体。基于测序的基因表达分析的代表性方法包括基因表达连续分析 (SAGE)、和通过大规模平行签名测序 (MPSS) 进行的基因表达分析。

[0191] 2. 聚合酶链式反应 (PCR)

[0192] 在上文所列技术中，PCR 是一种灵敏且灵活的定量方法，它可用于比较经过或未经药物处理的、正常和肿瘤组织中的、不同样品群中的 mRNA 水平，以表征基因表达型式、区分密切相关的 mRNA、及分析 RNA 结构。

[0193] 第一步是从靶样品分离 mRNA。起始材料通常是分别从人肿瘤或肿瘤细胞系及相应的正常组织或细胞系分离的总 RNA。如此，可从多种原发性肿瘤中分离 RNA，包括乳房 / 乳腺、肺、结肠、前列腺、脑、肝、肾、胰、脾、胸腺、睾丸、卵巢、子宫等肿瘤或肿瘤细胞系，及来自健康供体的合并 DNA。如果 mRNA 的来源是原发性肿瘤，那么 mRNA 可从例如冷冻的或归档的石蜡包埋且固定（例如福尔马林固定）的组织样品提取。用于提取 mRNA 的通用方法是本领域众所周知的，并且公开于分子生物学的标准教科书中，包括 Ausubel 等, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons(1997)。用于从石蜡包埋组织提取 RNA 的方法公开于例如 Rupp 和 Locker, *Lab Invest.* 56:A67(1987)；和 De Andrés 等, *BioTechniques*18:42044(1995)。具体而言，RNA 分离可使用来自商业制造商诸如 Qiagen 的纯化试剂盒、缓冲液组和蛋白酶依照制造商的说明书进行。例如，来自培养细胞的总 RNA 可使用 Qiagen RNeasy 微型柱分离。其它商品化 RNA 分离试剂盒包括 MASTERPURE®完整 DNA 和 RNA 纯化试剂盒 (EPICENTRE®, Madison, Wis.) 和石蜡块 RNA 分离试剂盒 (Ambion, Inc.)。来自组织样品的总 RNA 可使用 RNStat-60 (Tel-Test)

分离。从肿瘤制备的 RNA 可通过例如氯化铯密度梯度离心来分离。

[0194] 由于 RNA 不能充当 PCR 的模板,通过 PCR 进行基因表达序型分析的第一步是将 RNA 模板逆转录成 cDNA,接着是它在 PCR 反应中的指数式扩增。最常用的两种逆转录酶是鸟类成髓细胞性白血病病毒逆转录酶 (AMV-RT) 和莫洛尼 (Moloney) 鼠白血病病毒逆转录酶 (MMLV-RT)。逆转录步骤典型的使用特异性引物、随机六聚物或寡聚 dT 引物引发,取决于表达序型分析的情况和目标。例如,提取的 RNA 可使用 GENEAMP™RNA PCR 试剂盒 (Perkin Elmer, Calif., USA) 遵循制造商的说明书逆转录。然后可将衍生的 cDNA 作为模板用于后续 PCR 反应。尽管 PCR 步骤可使用多种热稳定的 DNA 依赖性 DNA 聚合酶,典型的采用 Taq DNA 聚合酶,它具有 5' -3' 核酸酶活性但缺乏 3' -5' 校正内切核酸酶活性。如此,TAQMAN® PCR 典型的利用 Taq 或 Tth 聚合酶的 5' -核酸酶活性来水解与其靶扩增子结合的杂交探针,但是可使用具有等效 5' 核酸酶活性的任何酶。使用两种寡核苷酸引物来生成扩增子,典型的是 PCR 反应的。第三种寡核苷酸或探针设计用于检测位于前两种 PCR 引物之间的核苷酸序列。探针是 Taq DNA 聚合酶不可延伸的且用报道荧光染料和淬灭荧光染料标记。在两种染料如它们在探针上的那样位置靠近时,任何激光诱发的来自报道染料的发射受到淬灭染料的淬灭。在扩增反应期间, Taq DNA 聚合酶以模板依赖性方式切割探针。所得探针片段在溶液中解离,来自所释放报道染料的信号不再受到第二荧光团的淬灭效应的作用。每合成一个新的分子就释放一个分子的报道染料,未淬灭报道染料的检测提供了数据定量阐述的基础。

[0195] TAQMAN® PCR 可使用商品化设备进行,诸如例如 ABI PRISM 7700® 序列检测系统 (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) 或 Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)。在一个优选的实施方案中,在实时定量 PCR 装置上运行 5' 核酸酶规程,诸如 ABI PRISM 7700® 序列检测系统。该系统由热循环仪、激光 (器)、电荷耦合装置 (CCD)、照相机和计算机组成。该系统在热循环仪上以 96 孔形式扩增样品。在扩增期间,通过光纤电缆实时收集所有 96 个孔的激光诱发的荧光信号,并在 CCD 处检测。该系统包括用于运行设备和分析数据的软件。

[0196] 5' -核酸酶测定法数据最初表述为 Ct,或循环阈值 (threshold cycle)。如上文所讨论的,在每个循环期间记录荧光值并代表至扩增反应中该点时扩增的产物的量。首次记录到有统计学意义的荧光信号的点即循环阈值 (Ct)。

[0197] 为了将错误和样品间变异的影响降至最低,通常使用内部标准进行 PCR。理想的内部标准在不同组织间以恒定水平表达,不受实验处理的影响。最频繁的用于基因表达型式标准化的 RNA 是持家基因甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 和 P- 肌动蛋白的 mRNA。

[0198] PCR 技术的一种最新变化形式是定量实时 PCR (qRT-PCR),它通过双重标记的荧光生成探针 (即 TAQMAN® 探针) 测量 PCR 产物积累。实时 PCR 与定量竞争性 PCR (其中使用每种靶序列的内部竞争物来进行标准化) 和定量比较性 PCR (使用样品内包含的标准化基因或持家基因供 PCR 之用) 都兼容。更多详情参阅例如 Held 等, Genome Research 6:986-994 (1996)。

[0199] 多份发表的期刊论文给出了使用固定的、石蜡包埋的组织作为 RNA 来源用于基因表达序型分析的代表性方案的步骤,包括 mRNA 分离、纯化、引物延伸和扩增 (例如 Godfrey

等, J. Molec. Diagnostics 2:84-91(2000); Specht 等, Am. J. Pathol. 158:419-29(2001))。简单的说,一种代表性方法由切出石蜡包埋的肿瘤组织样品的约 10 微米厚切片开始。然后,提取 RNA,并除去蛋白质和 DNA。分析 RNA 浓度后,在必要时可包括 RNA 修复和 / 或扩增步骤,并使用基因特异启动子逆转录 RNA,随后是 PCR。

[0200] 依照本发明的一个方面,PCR 引物和探针是基于待扩增基因中存在的内含子序列设计的。在这个实施方案中,引物 / 探针设计的第一步是描绘基因内的内含子序列。这可通过公众可得到的软件来进行,诸如由 Kent, W., Genome Res. 12(4):656-64(2002) 开发的 DNA BLAT 软件或 BLAST 软件,包括其变化形式。后续步骤遵循完全建立的 PCR 引物和探针设计方法。

[0201] 为了避免非特异性信号,重要的是在设计引物和探针时掩盖 (mask) 内含子内的重复序列。这可容易地通过使用 Repeat Masker 程序来实现,该程序可通过贝勒医学院 (Baylor College of Medicine) 在线获得,它针对重复元件文库筛选 DNA 序列并返回其中掩盖了重复元件的查询序列。然后可使用任何商品化或通过其它途径公众可获得的引物 / 探针设计包将掩盖后的内含子序列用于设计引物和探针序列,诸如 Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen 和 Skaletsky (2000) Primer3 在万维网上供一般用户和生物学家程序员使用。在 Krawetz S, Misener S 编的《Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology》中, Humana Press, Totowa, N. J., 第 365-386 页)。

[0202] PCR 引物设计中考虑的因素包括引物长度、解链温度 (melting temperature, T_m)、G/C 含量、特异性、互补引物序列、和 3' - 末端序列。一般而言,最佳的 PCR 引物通常长 17-30 个碱基,包含约 20-80% 诸如例如约 50-60%G+C 碱基。典型的优选 T_m 在 50 和 80°C 之间,例如约 50-70°C。

[0203] 关于 PCR 引物和探针设计的进一步指导参见例如 Dieffenbach 等人,“General Concepts for PCR Primer Design”, 于 PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, 第 133-155 页; Innis 和 Gelfand, “Optimization of PCRs”, 于 PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, 第 5-11 页; 及 Plasterer, T. N., Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997), 将其完整公开内容明确纳入本文作为参考。

[0204] 3. RNN-Seq

[0205] RNA-Seq (也称为全转录物组鸟枪法测序 (WTSS)) 指使用高通量测序技术来对 cDNA 测序以得到关于样品的 RNA 内容物的信息。描述 RNA-Seq 的出版物包括: Wang 等 “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics” Nature Reviews Genetics 10(1):57-63 (January 2009); Ryan 等 BioTechniques 45(1):81-94 (2008); 和 Maher 等 “Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer”. Nature 458(7234):97-101 (January 2009)。

[0206] 4. 微阵列

[0207] 差异基因表达也可使用微阵列技术来鉴定或验证。如此,可使用微阵列技术在新鲜的或石蜡包埋的肿瘤组织中测量乳腺癌相关基因的表达序型。在这种方法中,在微芯片

基片上涂布 (plate) 或排列 (array) 感兴趣多核苷酸序列 (包括 cDNA 和寡核苷酸)。然后使排列的序列与来自感兴趣细胞或组织的特异性 DNA 探针杂交。正如在 PCR 方法中一样, mRNA 的来源典型的是从人肿瘤或肿瘤细胞系及相应的正常组织或细胞系分离的总 RNA。如此, RNA 可从多种原发性肿瘤或肿瘤细胞系分离。如果 mRNA 的来源是原发性肿瘤, 那么 mRNA 可从例如冷冻的或归档的石蜡包埋且固定 (例如福尔马林固定) 的组织样品提取, 所述组织样品是日常临床实践中常规制备和保存的。

[0208] 在微阵列技术的一个具体实施方案中, 将 cDNA 克隆的 PCR 扩增插入物以密集阵列应用至基片。优选的是, 将至少 10,000 种核苷酸序列应用至基片。以每片 10,000 种成分固定化在微芯片上的微阵列基因适于在严格条件下杂交。荧光标记的 cDNA 探针可通过从感兴趣组织提取的 RNA 的逆转录中掺入荧光核苷酸来生成。应用至芯片的经标记 cDNA 探针与阵列上的每个 DNA 斑点以特异性发生杂交。严格清洗以除去非特异性结合的探针后, 通过共聚焦激光显微镜检术或通过其它检测方法诸如 CCD 照相机扫描芯片。每种阵列成分的杂交的定量容许评估相应 mRNA 的丰度。凭借双重有色荧光, 将从两种 RNA 来源生成的分开标记的 cDNA 探针与阵列成对杂交。如此同时测定来自两种来源的对应于每种指定基因的转录物的相对丰度。小型化规模的杂交提供了大量基因表达样式的便利且快速评估。此类方法已经显示出检测以每个细胞少数拷贝表达的罕见转录物所要求的灵敏度及可再现的检测表达水平的至少约 2 倍差异 (Schena 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA93(2):106-149(1996))。微阵列分析可使用商品化设备遵循制造商的方案进行, 诸如使用 Affymetrix GENCHIP™ 技术、或 Incyte 的微阵列技术。

[0209] 为大规模分析基因表达而开发的微阵列方法使得有可能系统搜索多种肿瘤类型中的癌症分类和结果预测的分子标志物。

[0210] 5. 基因表达连续分析 (SAGE)

[0211] 基因表达连续分析 (SAGE) 是容许同时且定量分析大量基因转录物且不需要为每种转录物提供个别杂交探针的一种方法。首先, 生成包含足以唯一鉴定一种转录物的信息的一种短序列标签 (约 10-14bp), 前提是该标签是从每种转录物内的一个唯一位置得到的。然后, 将许多转录物连接起来以形成长、连续分子, 它们可测序, 以同时揭示多种标签的身份。任何转录物群的表达样式可通过测定个别标签的丰度并鉴定与每种标签对应的基因来定量评估。更多详情参见例如 Velculescu 等, Science270:484-487(1995); Velculescu 等, Cell188:243-51(1997)。

[0212] 6. MassARRAY 技术

[0213] MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) 技术是将质谱术 (MS) 用于检测的一种自动化、高通量的基因表达分析方法。依照这种方法, 在分离 RNA、逆转录和 PCR 扩增之后, 将 cDNA 进行引物延伸。将 cDNA 衍生的引物延伸产物纯化, 并分配到预先加载了 MALDI-TOF MS 样品制备所需要的成分的芯片阵列上。通过分析所得质谱中的峰面积, 对反应中存在的各种 cDNA 定量。

[0214] 7. 免疫组织化学

[0215] 免疫组化方法也适用于检测本发明的预后标志物的表达水平。如此, 使用对每种标志物特异的抗体或抗血清, 优选多克隆抗血清, 最优选单克隆抗体来检测表达。抗体可通过直接标记抗体自身来检测, 例如用放射性标记物、荧光标记物、半抗原标记物诸如生物

素、或酶诸如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。或者，未标记一抗与经标记二抗（包括对一抗特异的抗血清、多克隆抗血清或单克隆抗体）联合使用。免疫组织化学方案和试剂盒是本领域众所周知的，而且可通过商业途径获得。

[0216] 8. 蛋白质组学

[0217] 术语“蛋白质组”定义为某一时间点样品（例如组织、生物体或细胞培养物）中存在的蛋白质的全体。蛋白质组学包括研究样品中蛋白质表达的全局变化（也称为“表达蛋白质组学”）等。蛋白质组学典型的包括下列步骤：(1) 通过二维凝胶电泳（2-D PAGE）将样品中的各种蛋白质分开；(2) 鉴定从凝胶中回收的各种蛋白质，例如通过质谱术或 N- 末端测序；及 (3) 使用生物信息学分析数据。蛋白质组学方法是其它基因表达序型分析方法的有用补充，可以单独使用或联合其它方法使用，用于检测本发明的预后标志物的产物。

[0218] 还可以使用体内诊断测定法来评估生物标志物表达，例如通过施用结合待检测分子且标记有可检测标记物（例如放射性同位素）的分子（诸如抗体），然后对患者进行外部扫描以定位所述标记物。

[0219] IV. 治疗方法

[0220] 在一个实施方案中，本发明提供了一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病（CLL）患者的方法，其包括如果发现所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物；或减少的 PI3K 生物标志物，则对所述患者施用治疗有效量的 CLL 药物。本文中 CLL 药物的例子包括：诱导 FAK 信号传导和 / 或诱导同型粘附的 CLL 药物；B 细胞拮抗剂或 B 细胞抗体；CD20 抗体（包括人源化的、人的、嵌合的、I 型或 II 型抗 CD20 抗体，诸如利妥昔单抗、奥法木单抗、GA101、SBI-087、维妥珠单抗和 AME-133）。

[0221] 本发明还涉及一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病（CLL）患者的方法，包括如果发现所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物；或减少的 PI3K 生物标志物，则对所述患者施用治疗有效量的抗 CD20 抗体（例如利妥昔单抗）。

[0222] 此外，本发明了提供了一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病（CLL）患者的方法，包括如果发现所述患者具有升高量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物；或减少的 PI3K 生物标志物，则对所述患者施用治疗有效量的利妥昔单抗、氟达拉滨和环磷酰胺的组合。

[0223] 本发明还涉及一种用于治疗慢性淋巴细胞性白血病（CLL）患者的方法，包括如果发现所述患者具有降低量的一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、和 PTK2 的生物标志物；或升高的 PI3K 生物标志物，则对所述患者施用治疗有效量的除利妥昔单抗以外的 CLL 药物。

[0224] 相对于不具有升高量的生物标志物的患者，期望本文中治疗的患者会受益于更大的无进展存活（PFS）。

[0225] 可以单独地或与其它 CLL 药物组合来使用本发明的 CLL 药物。例如，CD20 抗体可以与至少一种别的治疗剂，例如与化疗方案，具体包括烷化剂（例如苯丁酸氮芥、苯达莫司汀、或环磷酰胺）、核苷类似物或抗代谢物（例如氟达拉滨）、氟达拉滨和环磷酰胺（FC）、泼尼松或泼尼松龙、含有烷化物的联合疗法包括环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙（CHOP）、或环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙（CVP）等；与其它 B 细胞拮抗剂诸如 CD20 抗体（例如利妥昔

单抗、奥法木单抗、GA101、SBI-087、维妥珠单抗和 AME-133 等)、CD22 抗体或 CD79b 抗体,与静脉内免疫球蛋白;和/或与 CD52 抗体(例如阿仑单抗)共同施用。上文所记载的这类联合疗法涵盖了联合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂中或分开的配制剂中)、和分开施用,其中第一药物的施用可以在第二药物的施用之前、同时、和/或之后进行。本发明的 CLL 药物还可以与放射疗法联合使用。

[0226] 本文中的药物(一种或多种)可以通过任何合适的手段来施用,包括胃肠外、肺内、和鼻内、及损伤内(如果希望局部治疗的话)施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。剂量给药可以通过任何合适的路径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长时间的。本文中涵盖各种剂量给药日程表,包括但不限于单次施用或在多个时间点里的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0227] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体(当单独或与一种或多种其它别的治疗剂联合使用时)的合适剂量会取决于所要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和病程、施用抗体是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的斟酌决定。抗体适合于在一次或一系列的治疗中给予患者。取决于疾病的类型和严重性,约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ – $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ – $10\text{mg}/\text{kg}$) 的抗体可作为首次候选剂量施用给患者,无论是例如通过一次或多次分开的给药或通过连续输注。取决于上述提及的因素,一种典型的日剂量可在约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ – $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多的范围内。对于几天或更长时间的重复给药,取决于病情,治疗通常会持续直至出现疾病症状得到期望的抑制为止。CD20 抗体的一种例示性的剂量方案包括每周一次、每两周一次、或每月一次地施用范围从约 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 到约 $1500\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体。利妥昔单抗的一种例示性剂量方案是 $375\text{mg}/\text{m}^2$ (第 1 天),然后每 28 天一次 $500\text{mg}/\text{m}^2$ (周期 2–6)。奥法木单抗的一种例示性剂量方案: 300mg 起始剂量,然后是 2000mg 剂量(每月); 500mg 或 1000mg 的重复剂量; 300mg 与 1 周后 1000mg ,接着是每月一次的 1000mg 输注多至 11 次,等等。

[0228] 然而,也可使用其它剂量方案。通过常规技术和测定法容易地监测该疗法的进展。

[0229] 应当理解,可以替换作为药物的抗体或在作为药物的抗体外使用本发明的免疫偶联物来实施任何上述配制剂或治疗方法。

[0230] V. 制品

[0231] 在本发明的另一个实施方案中,制品用在治疗 CLL 中。所述制品包含容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、管形瓶、注射器等等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器容纳或含有包含作为活性剂的 CLL 药物的组合物,并且可以具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可穿过的塞子的静脉内溶液袋或管形瓶)。

[0232] 制品可以进一步包含第二容器,其包含药学可接受的稀释缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer 氏溶液和右旋糖溶液。制品可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、和注射器。

[0233] 本发明的制品还包括信息,例如以包装插页的形式,指示基于本文中生物标志物的表达水平将所述组合物用于治疗 CLL。所述插页或标签可采取任何形式,诸如纸或电子介质,例如磁记录介质(例如软盘)或 CD-ROM。所述标签或插页还可包括关于所述试剂盒或制品中药物组合物和剂量形式的其它信息。

[0234] 依照本发明的一个实施方案,提供了包含包装在一起的 CLL 药物(例如 B 细胞拮抗剂或抗 CD20 抗体)和包装插页的制品,所述 CLL 药物在药学可接受的载体中,所述包装插页指示所述 CLL 药物基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者。

[0235] 本发明还涉及一种用于制造制品的方法,包括在包装中组合药物组合物和包装插页,所述药物组合物包含 CLL 药物(例如 B 细胞拮抗剂或抗 CD20 抗体),所述包装插页指示所述药物组合物基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者。

[0236] 所述制品可以进一步包含另外的容器,其包含药学可接受的稀释缓冲液,诸如抑菌性注射用水 (BWF1)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer 氏溶液和 / 或右旋糖溶液。制品可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、和注射器。

[0237] VI. 诊断用试剂盒

[0238] 本发明还涉及可用于检测本文中鉴定的任意一种或多种生物标志物的诊断用试剂盒。因此,提供诊断用试剂盒,其包含一种或多种试剂用于测定来自 CLL 患者的样品中选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达。任选地,所述试剂盒进一步包含在患者表达升高水平的生物标志物的情况下,使用该试剂盒来选择用于治疗 CLL 患者的 CLL 药物(例如 B 细胞拮抗剂或抗 CD20 抗体)的说明书。在另一个实施方案中,如果患者表达降低水平的生物标志物,说明书就会指导使用该试剂盒来选择除利妥昔单抗以外(或除抗 CD20 抗体以外)的 CLL 药物。在一个实施方案中,例如在 PCR 试剂盒中,一种或多种试剂包含用于检测 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、或 PI3K 生物标志物的一对 DNA 引物和探针。

[0239] VII. 做广告的方法

[0240] 本文中的发明还涵盖一种用于为 CLL 药物做广告的方法,其包括给目标受众宣传 CLL 药物(例如 B 细胞拮抗剂或抗 CD20 抗体)基于一种或多种选自 miRNA1513p、miRNA4093p、PTK2、和 PI3K 的生物标志物的表达来治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者的用途。

[0241] 做广告为经由非个人媒体进行的、通常付费的通讯,其中发起人受到鉴别且信息受到控制。为本文目的的做广告包括宣传、公共关系、产品布置、赞助、保险 (underwriting)、和促销。该术语还包括出现在任何印刷传播媒体中的赞助的信息公告,其设计用于引起大众的兴趣以劝说、通知、宣传、激发、或以其它方式改变行为,向购买、支持、或认可本文中发明的有利方式发展。

[0242] 本文中诊断方法的广告和宣传可通过任何手段实现。用于传递这些信息的广告媒体的例子包括电视、电台、电影、杂志、报纸、因特网、和告示板,包括商业性的,即出现在广播媒体中的信息。广告还包括那些在食品货车座位上、机场通道墙壁上、和公共汽车侧面上的广告、或电话等候信息或店内布告 (PA) 系统中听到的广告、或可放置视觉或听觉通讯的任何地方的广告。

[0243] 宣传或做广告手段的更特定的例子包括电视、电台、电影、因特网(诸如网络传播和网络研讨会 (webinar))、意图到达同步用户的交互式计算机网络、固定的或电子的告示板和其它公共标牌、海报、传统的或电子的文献(诸如杂志和报纸)、其它媒体渠道、讲座

或个体接触,例如通过电子邮件、电话、即时信息、邮寄、快递、大众 (mass)、或承运人邮件 (carrier mail)、亲自访问等进行。

[0244] 所使用的做广告的类型会取决于许多因素,例如待传达的目标受众的性质,例如医院、保险公司、诊所、医生、护士、和患者,以及成本考虑和管理药物和诊断剂做广告的相关管辖权法律和条例。可根据由服务相互作用和 / 或其它数据 (诸如用户人口统计状况和地理学定位) 限定的用户表征使做广告个性化或用户化。

[0245] VIII. 生物学材料的保藏

[0246] 下列生物学材料已经保藏于美国典型培养物保藏中心,10801University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, USA (ATCC) :

[0247] 保藏物 ATCC 编号保藏日

[0248] 编码利妥昔单抗的 DNA (在 TCAE 载体中) 69119 1992 年 11 月 10 日

实施例

[0249] 预测 CLL 对 CD20 抗体的响应的生物标志物材料和方法

[0250] 样品 :

[0251] 分析来自一项国际、多中心、开放标签的 III 期试验的治疗前 (pretreatment) 患者样品,将 CLL 患者随机分配为接受 R-FC (利妥昔单抗加氟达拉滨 / 环磷酰胺) 或单独的 FC (氟达拉滨 / 环磷酰胺)。主要目标是证明 R-FC 相比于单独 FC 的更好的无进展存活 (PFS)。该研究方案由参与中心处的机构审查委员会批准并且所有的患者都签署了知情同意书。试验设计和资格标准的详情记载于 Robak 等 J. Clin. Oncol. 28 (10) :1756-1765 (2010)。基于 RNA 的可获性和签署的知情同意书来选择参与对外周血样品的分子遗传学分析的患者。

[0252] 从 n=301 位患者可获得针对 CD19+ 细胞阳性选出的治疗前外周血单个核细胞 (PBMC) 样品。依照制造商的方案 (Miltenyi, Germany) 通过磁珠分离来实施 CD19 分离。

[0253] RNA 分离 :

[0254] 在 Qiagen 缓冲液 RLT 中将人细胞团粒匀浆化。由 Asuragen, Inc. 依照该公司的标准操作规程从人细胞团粒匀浆物分离出总 RNA, 该规程已经针对 microRNA 的保留进行过优化, 并且还包括 DNA 酶处理步骤。通过使用 NanoDrop ND-1000UV 分光光度计在 260 和 280nm 处的吸光度读数来测定总 RNA 样品的纯度和数量。使用 Nano 测定法, 通过 Agilent Bioanalyzer2100 毛细管电泳来证明总 RNA 的完整性合格。通过对 1-2 种专有 microRNA (作为总 microRNA 丰度的替代) 的单重 qRT-PCR 测量来测定样品对 microRNA 序型分析的适用性。

[0255] miRNA 表达序型分析 :

[0256] **DISCOVARRAY[®]** miRNA 序型分析服务平台。

[0257] 来自 Ambion 的一种定制 AFFYMETRIX **GENECHIP[®]** 设计为包含自 Sanger miRBase (Marcus 等, J Clin Oncol. 26:4579-4586 (2008); Hiddemann 等, Blood 106:3725-3732 (2005); <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) 和已发表报告 (Coiffier 等, N. Engl J. Med. 346:235-242 (2002); Feugier

等, J Clin Oncol. 23(18):4117-4126(2005); 和 Hallek 等, Blood, ASH Annual Meeting Abstract, 112:325(2008); 和 Robak 等, Blood, ASH Annual Meeting Abstracts, 112:lba-1(2008)) 衍生的探针。抗基因组探针序列由 **AFFYMETRIX®** 提供, 并且自在 **AFFYMETRIX®** 人外显子阵列上用于估计背景信号的较大的对照集衍生, 如下文中描述的。将阵列上的其它非 miRNA 对照探针设计为缺乏与人基因组的序列同源性, 并且使其可以用于掺加 (spike-in) 外部参照对照。

[0258] 样品和阵列处理:

[0259] 将用于 miRNA 序型研究的样品由 Asuragen Services (Austin, TX) 依照该公司的标准操作规程来处理。在样品质量控制 (QC) 评估后, 将总 RNA 样品 (每份样品 400ng 总 RNA) 中的 RNA 分子的 3' 端依照该公司的标准方案用生物素标记。除了从杂交中略去 20X **GENECHIP®** 真核生物杂交对照外, 都依照 **AFFYMETRIX®** 推荐的规程实施杂交、清洗、染色、成像、和信号提取。

[0260] 信号加工:

[0261] 针对 Ambion miRChip 执行的信号加工是一个多步骤的过程, 其牵涉探针特异性的检测调用 (call)、背景估算和校正、常方差稳定化、以及阵列比例调整 (scaling) 或全局标准化 (Hallek 等, Blood, ASH Annual Meeting Abstract, 112:325(2008))。对于每种探针, 减去估算的背景值, 该背景值从 G-C 匹配的抗基因组对照集的中值信号推导。将特定分析实验中的阵列一起标准化, 其依照由 Hallek 等, Blood, ASH Annual Meeting Abstracts, 114:Abstract535(2009) 描述的方差稳定化方法。检测调用基于对 miRNA 探针信号相比于 GC 含量匹配的抗基因组探针的信号分布的 Wilcoxon 秩和检验。

[0262] 统计学分析:

[0263] 对于统计学假设检验, 应用假定为等方差的两样本 t- 检验。对具有同一因子的超过 2 个实验分组或水平的实验设计采用单因素 ANOVA。这些检验基于以下两个标准定义了哪些探针被视为差异表达: 缺省 p 值 0.001 和 \log_2 差异大于 1。

[0264] **AFFYMETRIX®** U133Plus2.0:

[0265] 使用 **AFFYMETRIX®** 人 U133Plus2.0 全基因组寡核苷酸阵列来实施基因表达序型分析。依照制造商自动化方案使用 **AFFYMETRIX® GENECHIP®** 阵列站 (GCAS) 来实施 RNA 样品标记。简言之, 从来自每份样品的 0.5 μ g 总 RNA 开始生成生物素化的 cRNA。向总 RNA 反应加入 2 μ l 15 种 Gene Logic 的珠蛋白消减寡聚物的 22.5 μ M 混合物, 其由 2- α 、2- β 、和 1- γ 血红蛋白基因构成。珠蛋白寡聚物是基因特异性的阻断物, 其在第一链 cDNA 合成期间极大地减少从珠蛋白 mRNA 生成的珠蛋白 cDNA 的量。Roche 从 GeneLogic (Gaithersburg MD, USA) 购买了该寡聚物序列。

[0266] 在 **GENECHIP®** 阵列系统 (GCAS) 机器人上, 用 **GENECHIP®** HTOne-Cycle 靶物标记试剂盒 P/N900686 来实施靶物标记方法。然后依照制造商的方案将样品染色、清洗并杂交于 **AFFYMETRIX®** 阵列。以每批次 24 份样品进行样品杂交。使用 **GENECHIP®** 扫描仪 3000 扫描阵列。使用 **AFFYMETRIX® GENECHIP®** 操作软件 (GCOS) 来捕捉原始信号强度。将微阵列软件包 (Suite) 5.0 (MAS5.0) 和表达控制台 (Expression Console) 用于基本的计算分析。

[0267] 使用 RMA 算法实施进一步的统计学分析, 其将探针强度汇总为探针集信号 (Irizarry 等, *Biostatistics*4(2):249-264(2003))。使用分位数 - 分位数方法将探针集信号强度标准化 (Bolstad 等, *Bioinformatics*19:185-193(2003))。所有标准化的数据在分析前都经过 \log_2 转化以下调高表达值影响的权重。

[0268] 在应用质量控制的标准规程 (Irizarry 等, 见上) 后, 最终选出 240 份样品用于统计学分析。

[0269] 在 U133Plus2.0 微阵列上存在的潜在的 54,675 个探针集中, 有 41,256 个探针集至少存在于 2 份样品中, 其中存在调用是由 MAS5.0 算法 (AFFYMETRIX® Statistical Algorithms Description Document, 2002) 定义的。在存在的探针集的集合上实施统计学分析。

[0270] 使用全转录本测定法 (WTA) 和基因 / 外显子 1.0ST 测定法对总 RNA 进行 AFFYMETRIX® 基因表达序型分析。

[0271] 由 Asuragen, Inc. 依照该公司的标准操作规程来处理用于 mRNA 序型分析研究的样品。从每份样品 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 制备生物素标记的有义链 cDNA, 其使用修改过的 AFFYMETRIX GENECHIP® 全转录本 (WT) 有义靶物标记测定法 (AFFYMETRIX®, Inc.)。通过分光光度法来量化中间 cRNA 和所得 cDNA 的产量。对于外显子阵列, 使用 $5 \mu\text{g}$ cDNA 进行片段化和标记在 AFFYMETRIX® 640 型杂交炉 (oven) 中, 在 45°C 实施对阵列的杂交达 16 小时。在 AFFYMETRIX® FS450 流控站 (Fluidics station) 上清洗阵列并将其染色。在 GENECHIP® 扫描器 30007G 上扫描阵列。对于每一张扫描的阵列, 提供 .DAT、.CEL、.jpg、和 .xml 平面文件。另外, 对于核心数据集和相应的 QC 信息 (其捕捉了包含曲线下面积和 polyA 峰 (spike) 的度量) 提供 RMA 标准化的数据。

[0272] qRT-PCR 逆转录、扩增和分析, 逆转录和 PCR 扩增:

[0273] 使用贮存 ABI Taqman miRNA 测定法、PCR 主混合物和逆转录 (RT) 组分。对于每一测定的每个重复, 将 $4 \mu\text{L}$ 体积中 1ng 总 RNA 在 $10 \mu\text{L}$ 总反应体积中进行逆转录。将 $3 \mu\text{L}$ RT 产物继续用于每个 $15 \mu\text{L}$ Taqman PCR 扩增。所有的扩增都在经过验证的 ABI7900HT 实时热循环仪上实施。将已知拷贝数的合成的 miRNA 作为阳性对照纳入到每个测定组中。将每组重复的平均 Ct 值与从已知拷贝数的合成 RNA (在酵母 tRNA 中稀释) 衍生的独立生成的标准曲线进行比较。对每反应 500-50,000,000 个拷贝之间的合成 RNA 模板生成标准曲线。报告每条标准曲线的 R^2 值。

[0274] 依照制造商的方案使用 ABI 试剂盒, 使用 UBC 作为对照基因, 通过 qRT-PCR 技术确认 PTK2 的结果。

[0275] 依照制造商方案使用 ABI 试剂盒, 通过 qRT-PCR 技术确认 miRNA1513p 和 miRNA4093p 的结果。相对于普遍显示较高表达水平的对照基因 miRNA150 和 miRNA26 来分析 miRNA1513p 和 miRNA4093p 的表达水平。

[0276] 统计学分析

[0277] 临床数据

[0278] 使用费雪精确 (Fisher's exact) 检验、曼 - 惠特尼 (Mann-Whitney) 检验或时序检验 (log-rank test) 来比较治疗前临床特征, 即人口统计学、预后标志物 (细胞遗传畸

变如 del(17p)、del(11q)、ZAP70 和 CD38 表达、IgVH 状态)、无进展存活 (PFS)。认为 p 值 <0.05 是统计学上显著的。

[0279] Cox 回归建模和测试

[0280] 使用采用了 Cox 回归模型的两种办法来鉴定与存活有关的基因和 miRNA。第一种办法考虑了下列模型。

[0281] 模型 A

[0282] $h_i(t) = \exp(\beta_1Tx + \beta_2RNA)h_0(t)$

[0283] 模型 B

[0284] $h_i(t) = \exp(\beta_1Tx + \beta_2Age + \beta_3Binet + \beta_4IgVH + \beta_5Del17p + \beta_6Del11q + \beta_7RNA)h_0(t)$

[0285] 其中

[0286] • $h_i(t)$ 是个体 i 的危害函数

[0287] • $h_0(t)$ 是基线危害函数

[0288] • β_i 是下列解释变量的系数：

[0289] ◦ Age, Binet, IgVH, Del17p, del11q 和 Tx, 其分别代表了年龄、Binet 分期、IgVH、Del17p 和 del11q 突变状态以及治疗组

[0290] ◦ RNA, 其代表了探针集信号强度 (经 log-2 转化)

[0291] 对于两个模型, 零假设是探针集强度信号和存活之间没有关系。

[0292] 第二种办法使用了下列两个模型 (C 和 D), 将它们与对数-似然比检验 (LRT 检验) 比较。由于对基线处的探针集信号可能能够预测一个治疗组中与另一组相比更好存活的能力感兴趣, 我们将以下两项都纳入到模型 B 中: 探针集信号强度和探针集信号强度与治疗因素的相互作用项。

[0293] 模型 C

[0294] $h_i(t) = \exp(\beta_1Tx + \beta_2Age + \beta_3BinetStage + \beta_4IgVH + \beta_5Del17p)h_0(t)$

[0295] 模型 D

[0296] $h_i(t) = \exp(\beta_1Tx + \beta_2Age + \beta_3BinetStage + \beta_4IgVH + \beta_5Del17p + \beta_6RNA + \beta_7Tx:RNA)h_0(t)$

[0297] 零假设为在探针集强度和存活之间没有关系, 备选假设是存在这样的关系并且在两个治疗组之间存在差异。

[0298] 对鉴定为存在的每个探针集进行两种检验 (Wald 和 LRT)。由于实施大量的检验, 应用基于错误发现率 (FDR) 的多重测试规程 (Storey 等, Proceedings of the National Academy of Sciences 100:9440-9445 (2003)) 来控制被 Wald 和对数-似然比检验二者错误鉴定为差异表达的基因 (或 miRNA) 的预期比例。选择 10% 的 FDR 来声明显著差异。

[0299] 对于在该文件中出现的不同的表和图 (其中计算了中值 PFS), 使用中值作为截留将 mRNA 和 miRNA 信号强度对分。

[0300] miRNA 反向相关和 3' UTR 萤光素酶测定法

[0301] 从 TARGETSCAN5.1™ (<http://www.targetscan.org/>) 下载预测的靶物, 并且不考虑预测位点的保守性从 mRNA 表达序型分析数据提取表达。通过比较 miRNA 阵列和 mRNA 阵列的数据并计算 Pearson 相关系数来测定与 miRNA 的反向相关。以 q 值 <0.01 确定显著反向相关的靶物。随后, 将达到该阈值的 3' UTR 克隆到 3' UTR 萤光素酶报告构建物

(Switchgear Genomics) 上游,并将 100ng 每种构建物转染到 96 孔板中的海拉细胞 (ATCC) 中,用 25ngpRL-CMV、10nM miRNA1513p 模拟物 (Dharmacon) 或混杂的模拟物。在转染后 24 小时测定萤光素酶活性,并将所有数据都标准化到花虫 (renilla) 萤光素酶转染对照和混杂的对照模拟物。实施 3 次生物学重复。通过双侧 Student t 检验来确定混杂的对照和 miRNA1513p 模拟物之间差异的统计学显著性。

[0302] 结果

[0303] microRNA 数据:

[0304] 使用 **DISCOVARRAY®** microRNA 平台,发现了 miRNA1513p 和 miRNA409-3p 在基于利妥昔单抗的疗法中是 PFS 的重要预测性 miRNA (图 1A、1B 和 2A、2B,表 1、2A、2B)。

[0305] 通过 qRT-PCR 对阵列数据进行验证确认了 miRNA1513p 和 miRNA4093p 的预测意义 (图 2A 和 2B,表 1、2A、2B)。

[0306] 当将这两者都纳入到包含了在研究组中证明了预后意义的治疗前因素 (治疗 FC 对 FCR、年龄、Binet 分期、IgVH 突变状态、del(17p)) 的联合多变量模型中时,其独立的预测意义仍然保持。

[0307] 治疗 :miRNA1513p 相互作用 :HR1.09 (1.01-1.17), p=0.021。

[0308] 治疗 :miRNA4093p 相互作用 :HR1.09 (1.1-1.18), p=0.047。

[0309] 在同一模型中组合 miRNA1513p 和 miRNA4093p 并未揭示出叠加的预测意义。

[0310] 表 1: 关于治疗和 miRNA1513p、miRNA4093p 表达的中值 PFS

[0311]

	中值PFS	中值PFS	中值PFS	中值PFS
--	-------	-------	-------	-------

[0312]

	miRNA151	miRNA151	miRNA409	miRNA409
	DISCOVARRAY®	qRT-PCR	DISCOVARRAY®	qRT-PCR
Tx: FC, miRNA 信号 < 中值 miRNA 信号	18	17.9	21.6	18.3
Tx: FC, miRNA 信号 > 中值 miRNA 信号	18.5	20.7	18	18.3
Tx: FCR, miRNA 信号 < 中值 miRNA 信号	24	23.9	24	26.2
Tx: FCR, miRNA 信号 > 中值 miRNA 信号	未达到	未达到	39.3	未达到

[0313] 表 2A:miRNA1513p 在 CLL 中在基于抗 CD20 的疗法中对 PFS 的预测重要性

[0314]

	阵列		RT-PCR	
	HR	P	HR	P
Tx:FC, miRNA151< 中值对 > 中值	0.99	0.96	0.84	0.43
Tx:FCR, miRNA151> 中值对 > 中值	0.49	0.005	0.47	0.0049
miRNA151> 中值 :Tx FCR 对 FC	0.47	0.0019	0.46	0.0027

miRNA151< 中值 :Tx:FCR 对 FC	0.98	0.92	0.87	0.55
---------------------------	------	------	------	------

[0315] 表 2B:miRNA4093p 在 CLL 中在基于抗 CD20 的疗法中对 PFS 的预测重要性

[0316]

	阵列		RT-PCR	
--	----	--	--------	--

[0317]

	HR	P	HR	P
Tx:FC, miRNA409< 中值对 > 中值	1.12	0.6	1.03	0.88
Tx:FCR, miRNA409> 中值对 > 中值	0.5	0.0052	0.54	0.025
miRNA409> 中值 :Tx FCR 对 FC	0.44	0.00098	0.44	0.0028
miRNA409< 中值 :Tx:FCR 对 FC	1	0.98	0.81	0.35

[0318] 如图 1A 中显示的, 具有高于中值的 miRNA1513p 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=75, 事件 :26, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=76, 事件 :47, 中值 PFS:18.5 月 ; p=0.0019) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 miRNA1513p 水平高于中值时 (n=75, 事件 :26, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 miRNA1513p 表达水平 (n=74, 事件 :41, 中值 PFS24 月 ; p=0.005) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.96), 不管 miRNA1513p 表达水平。在 miRNA1513p 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.92), 不管疗法。

[0319] 如图 1B 中显示的, 具有高于中值的 miRNA1513p 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=71, 事件 :25, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=69, 事件 :41, 中值 PFS:20.7 月 ; p=0.0027) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 miRNA1513p 水平高于中值时 (n=71, 事件 :25, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 miRNA1513p 表达水平 (n=66, 事件 :36, 中值 PFS23.9 月 ; p=0.0049) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.43), 不管 miRNA1513p 表达水平。在 miRNA1513p 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.55), 不管疗法。

[0320] 图 2B 显示了具有高于中值的 miRNA4093p 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=75, 事件 :27, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=76, 事件 :43, 中值 PFS:18 月 ; p=0.00098) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 miRNA4093p 水平高于中值时 (n=75, 事件 :27, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 miRNA4093p 表达水平 (n=74, 事件 :40, 中值 PFS24 月 ; p=0.0052) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.6), 不管 miRNA4093p 表达水平。在 miRNA4093p 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.98), 不管疗法。

[0321] 图 2B 显示了具有高于中值的 miRNA4093p 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=64, 事件 :20, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=76, 事件 :43, 中值 PFS:18.3 月 ; p=0.0028) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 miRNA4093p 水平高于中值时 (n=64, 事件 :20, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 miRNA4093p 表达水平 (n=73, 事件 :41, 中值

PFS26.2月;p=0.025)具有显著更长的PFS。在用FC治疗的患者中在PFS中未观察到差异(p=0.88),不管miRNA4093p表达水平。在miRNA4093p表达低于中值的患者中在PFS中未观察到差异(p=0.35),不管疗法。

[0322] mRNA数据:

[0323] 使用AFFYMETRIX Exon1.0ST和U133plus 2.0[®]微阵列平台,发现了PTK2在基于利妥昔单抗的疗法中是PFS的重要的预测性的差异表达基因(参见图3和4;表3和4)。PTK2在包含多种预后因素(FC对FCR治疗、年龄、Binet分期、IgVH突变状态、del(17p))的多变量分析中与无进展存活有关。在对多重检验校正后,WALD检验仍然是显著的(P值=1.510⁻⁴-q值<0.1)。

[0324] 通过qRT-PCR对阵列数据进行验证确认了PTK2的预测意义(图5;表3和4)。

[0325] 此外,miRNA151在8号染色体上PTK2的内含子中并且很可能共同表达,它们的表达水平之间的相关性非常高(Pearson相关系数=0.84)。

[0326] 表3:关于治疗和CD19+细胞中PTK2表达的中值PFS(月)(依照AFFYMETRIX[®]阵列平台)。

[0327]

	中值 PFS	中值 PFS	中值 PFS
	PTK2	PTK2	PTK2
	Exon1.0ST	U133plus2.0	qRT-PCR
Tx:FC, 基因 < 中值	17.9	17.9	17.9
Tx:FC, 基因 > 中值	21.5	21.5	21.5
Tx:FCR, 基因 < 中值	20	20	20
Tx:FCR, 基因 > 中值	未达到	42.4	未达到

[0328] 表4:CD19+细胞中PTK2表达关于治疗(FC对FCR)的预测意义(依照AFFYMETRIX[®]阵列平台)。

[0329]

	Exon 1.0 ST		U133+2		qRT-PCR	
	HR	P	HR	P	HR	P
Tx: FC, PTK2 <中值对>中值	0.86	0.48	0.86	0.53	0.77	0.25

[0330]

Tx: FCR, PTK2 >中值对>中值	0.46	0.0016	0.55	0.027	0.47	0.0049
PTK2 >中值: Tx FCR对FC	0.48	0.0031	0.51	0.011	0.48	0.0059
PTK2 <中值: Tx: FCR对FC	0.94	0.79	0.83	0.46	0.82	0.37

[0331] 图 3 显示了具有高于中值的 PTK2 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=81, 事件 :28, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=69, 事件 :42, 中值 PFS:21.5 月 ;p=0.0031) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 PTK2 表达水平高于中值时 (n=81, 事件 :28, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 PTK2 表达水平 (n=71, 事件 :42, 中值 PFS20 月 ;p=0.0016) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到差异 (p=0.48), 不管 PTK2 表达水平。在 PTK2 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到任何差异 (p=0.79), 不管疗法。

[0332] 图 4 显示了具有高于中值的 PTK2 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=67, 事件 :25, 中值 PFS42.4 月) 时比用 FC 治疗 (n=52, 事件 :34, 中值 PFS:21.5 月 ;p=0.011) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 PTK2 表达水平高于中值时 (n=67, 事件 :25, 中值 PFS42.4 月) 相比于低于中值的 PTK2 表达水平 (n=55, 事件 :31, 中值 PFS20 月 ;p=0.027) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到任何差异 (p=0.53), 不管 PTK2 表达水平。在 PTK2 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到任何差异 (p=0.46), 不管疗法。

[0333] 图 5 显示了具有高于中值的 PTK2 表达水平的患者在用 FCR 治疗 (n=71, 事件 :23, 未达到中值 PFS) 时比用 FC 治疗 (n=65, 事件 :39, 中值 PFS:21.5 月 ;p=0.0059) 时具有显著更长的 PFS。用 FCR 治疗的患者在起始 PTK2 表达水平高于中值时 (n=71, 事件 :23, 未达到中值 PFS) 相比于低于中值的 PTK2 表达水平 (n=63, 事件 :36, 中值 PFS20 月 ;p=0.0049) 具有显著更长的 PFS。在用 FC 治疗的患者中在 PFS 中未观察到任何差异 (p=0.25), 不管 PTK2 表达水平。在 PTK2 表达低于中值的患者中在 PFS 中未观察到任何差异 (p=0.37), 不管疗法。

[0334] 为了评估改变的 miRNA1513p 表达水平的潜在的生物学后果, 将这些 miRNA 的表达与它们的预测靶基因 (在 3'UTR 中保守或不保守) 的 mRNA 表达关联, 因为主要认为 miRNA 在 mRNA 降解的水平上发挥其作用。Guo 等 Nature466(7308):835-40(2010)。

[0335] 测定靶物相关系数并且 1214 个预测出的靶物中仅有 23 个与 miRNA1513p 呈负关联 (PCC<-0.2 及 q 值 <0.01)。为了验证这些预测出的靶物中哪些可能是真正的靶物, 在海拉细胞中表达 miRNA1513p 的模拟物或混杂的对照, 并在 24 小时后评估其抑制萤光素酶报告构建物表达的能力, 所述构建物含有每个基因的 3'UTR (图 6)。在预测的 23 个 3'UTR 中, 18 个可以被亚克隆到合适的载体中。特别地, 18 个 3'UTR 中仅有 5 个 (28%) 在引入 miRNA1513p 时在萤光素酶活性中显示出统计学显著的降低。这些结果暗示, miRNA1513p 选择性地调节靶物以介导特异性的生物学应答, 它可能是调控对 FCR 的响应。此外, 其中一种靶物即 PIK3R3 的较低的 mRNA 表达与 R-FC 结果呈正关联 (p=0.03, 图 7 和 8A-C)。

[0336] 结论

[0337] 本研究的目的是发现预测 CLL 患者用基于抗 CD20 抗体的疗法治疗的结果的生物标志物。本文中的数据首次揭示,升高的 miRNA1513p 和 miRNA4093p 表达水平(高于中位值)以及升高的 PTK2 基因表达水平(高于中位值)与用基于抗 -CD20 的疗法治疗的 CLL 患者中延长的 PFS 有关。通过 qRT-PCR 验证了来自微阵列平台的发现。另外,在使用已知影响疾病预后的多种因素的多变量分析中预测意义得到保持。

[0338] 总之,本文中的数据证明了在治疗前预测 CLL 患者对基于抗 CD20 抗体的疗法的结果和受益的可行性。对 miRNA1513p 和 4093p 以及 PTK2 的 mRNA 表达的诊断性评估充当为 CLL 患者选择最适疗法的有用工具。此外,较低的 PIK3R3(经过确认的 miRNA1513p 的靶物)表达与抗 CD20 抗体结果呈正关联。

[0339] 尽管出于理解清楚的目的,已经在一定程度上通过例示和实施例详细描述了前述发明,但这些说明和实施例不应理解为限制本发明的范围。本文中应用的所有专利和科学文献的公开内容都通过提述明确地完整并入。

[0001]

序列表

- <110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.) 等
DORNAN, DAVID
DUCHATEAU-NGUYEN, GUILLEMETTE
NGUYEN, TRI QUANG
PALERMO, GIUSEPPE
WEISSER, MARTIN
YEH, RU-FANG
- <120> 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 生物标志物
- <130> P4456R1-WO
- <141> 2011-08-02
- <150> US 61/370,403
<151> 2010-08-03
- <150> US 61/440,162
<151> 2011-02-07
- <160> 2
- <210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> 人
- <400> 1
cuagacugaa gcuccuugag g 21
- <210> 2
<211> 22
<212> RNA
<213> 人
- <400> 2
gaauguugcu cggugaaccc cu 22

中值 = 6.8 处 miR-151-3p 截留
阵列数据, CD19 样品

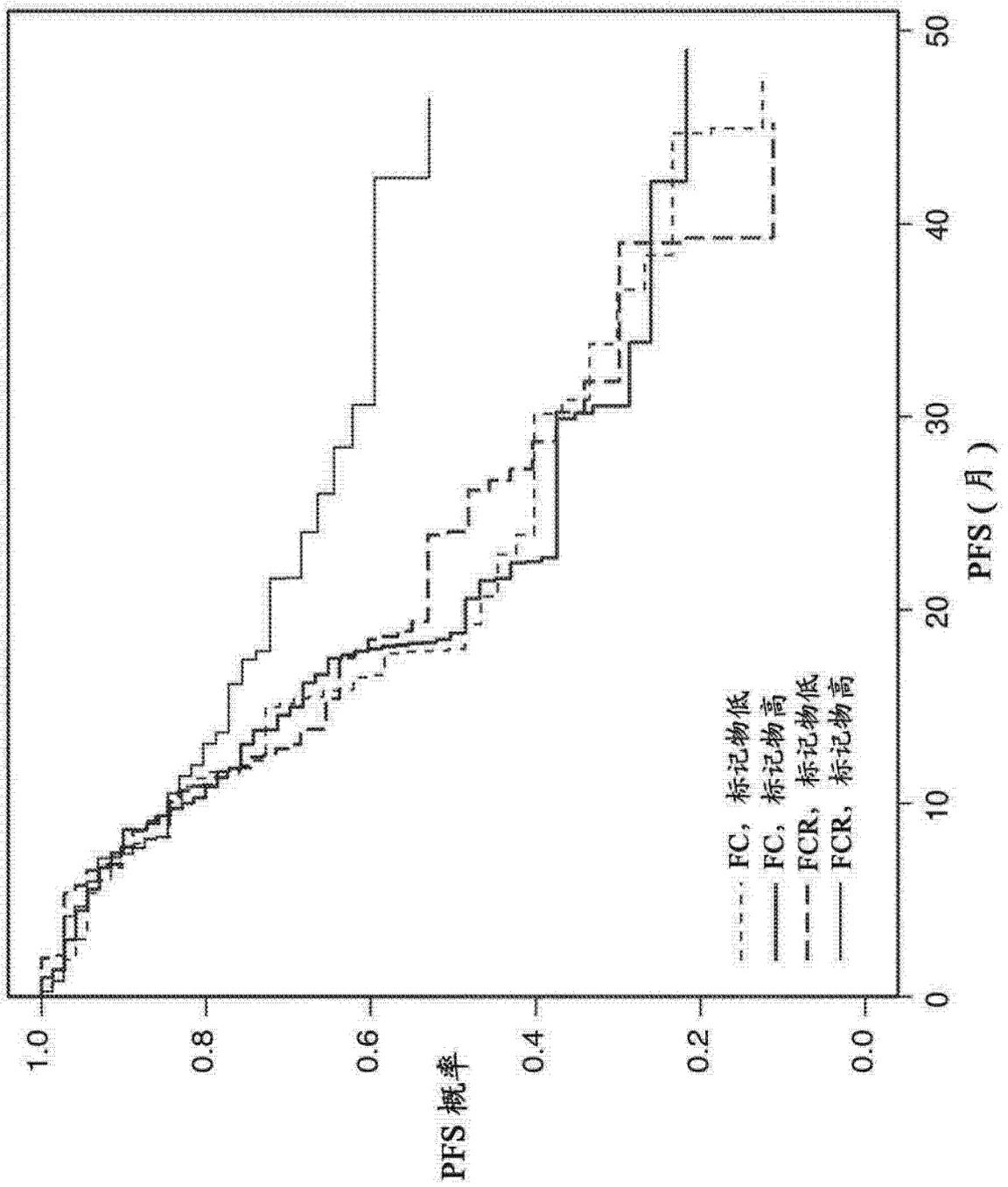


图 1A

中值 = -34.3 处 miR-151-3p 截留
qPCR 数据 (-Ct), CD19 样品

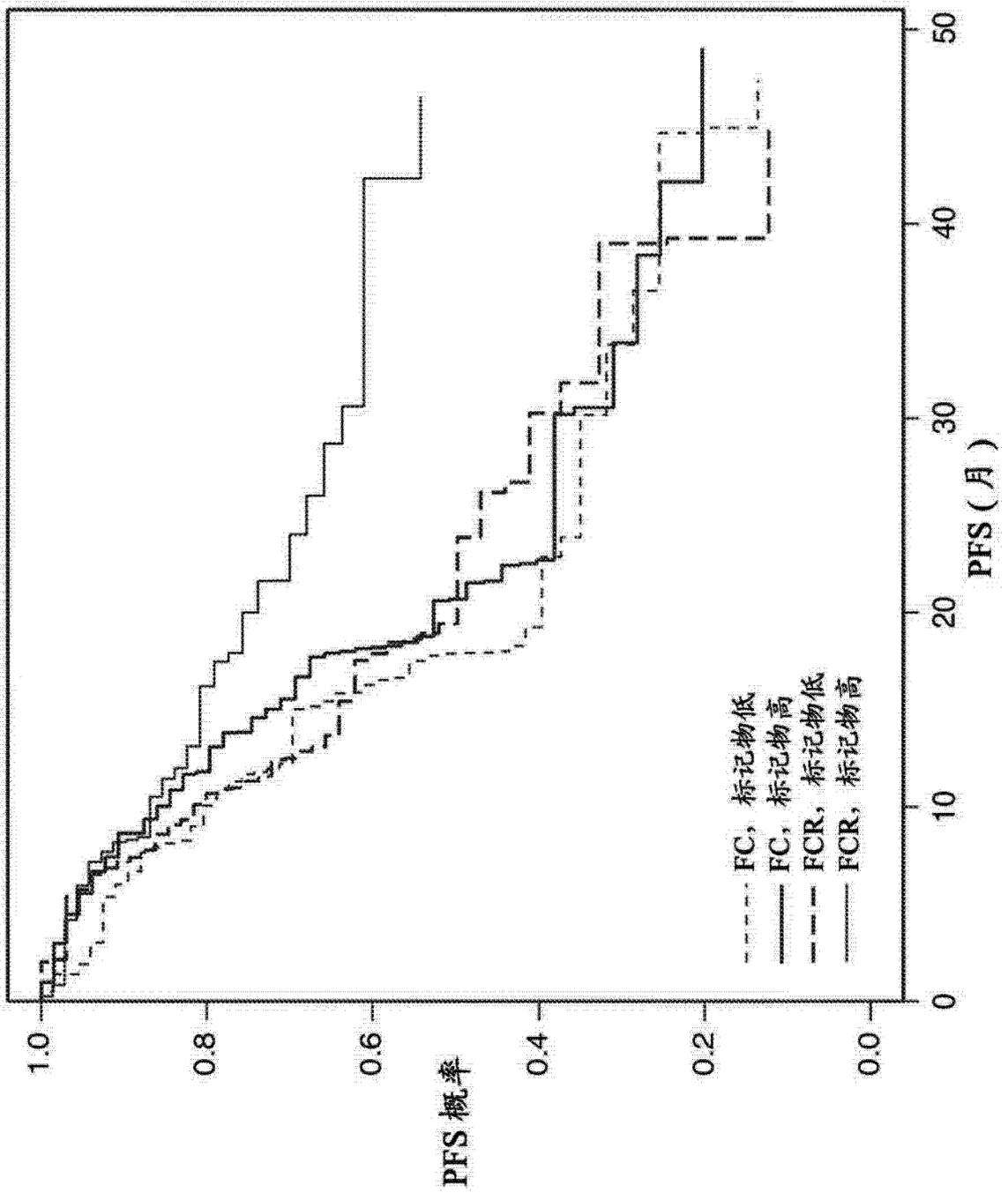


图 1B

中值=1.1处 miR-409-3p 截留
阵列数据, CD19 样品

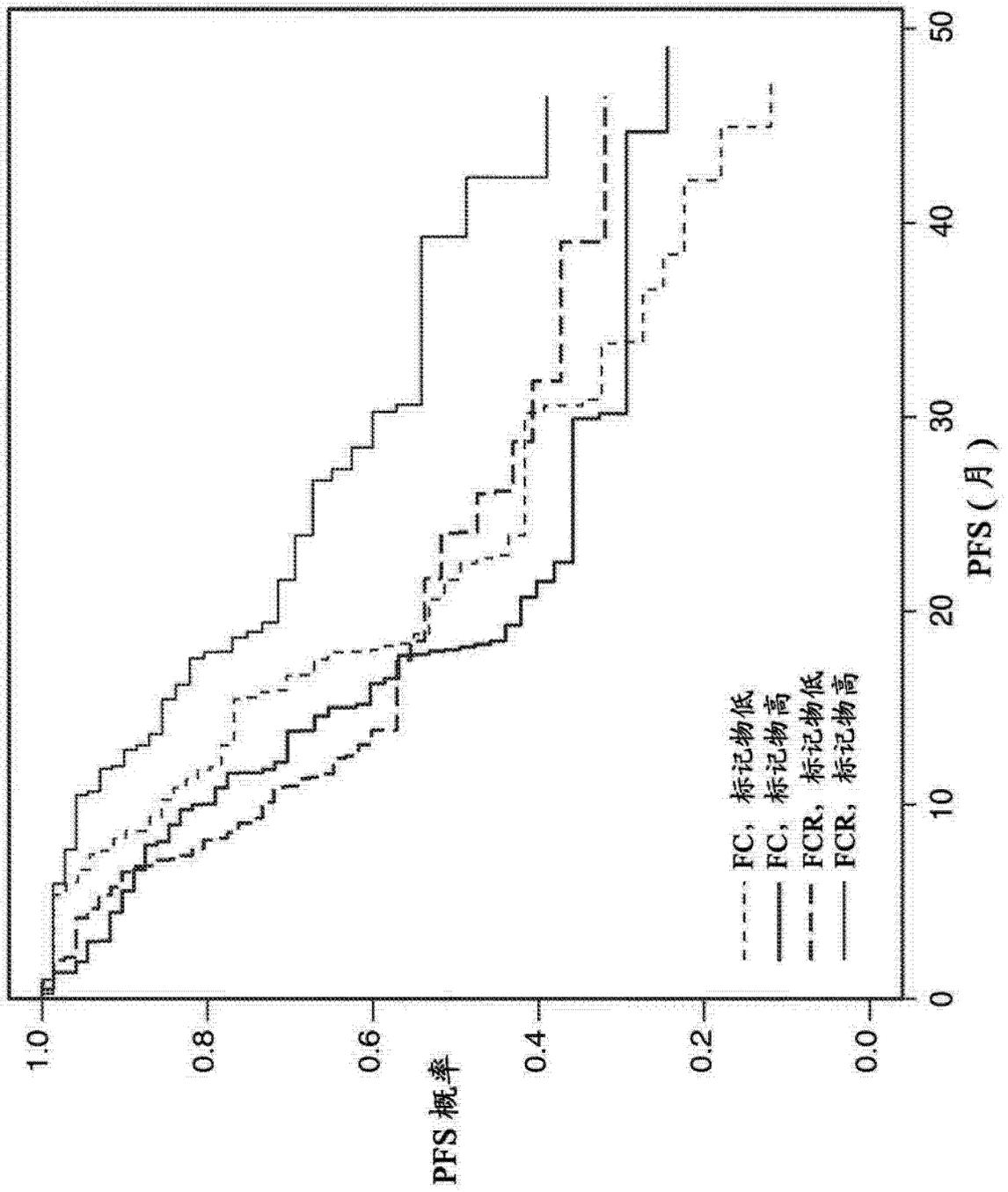


图 2A

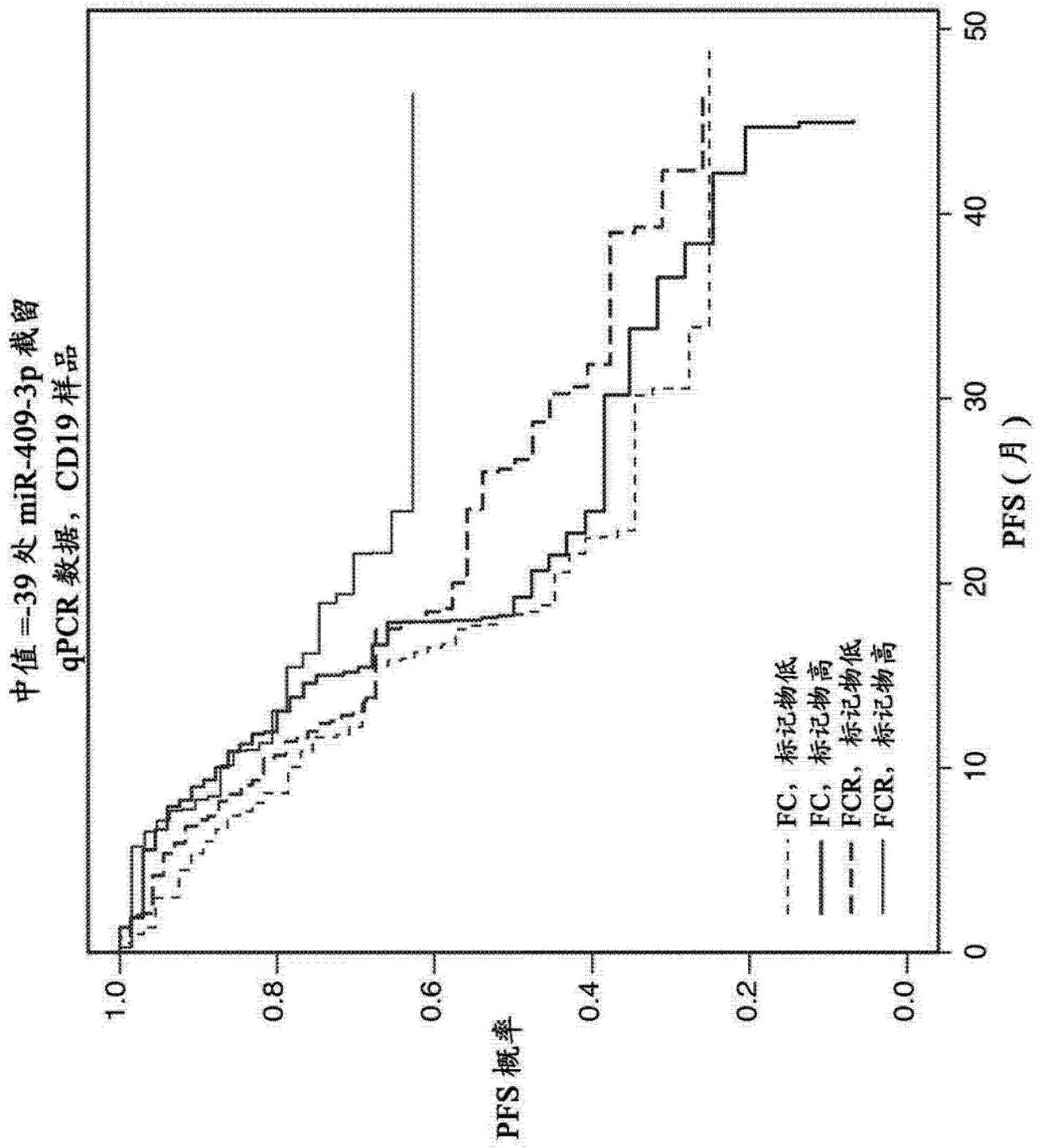


图 2B

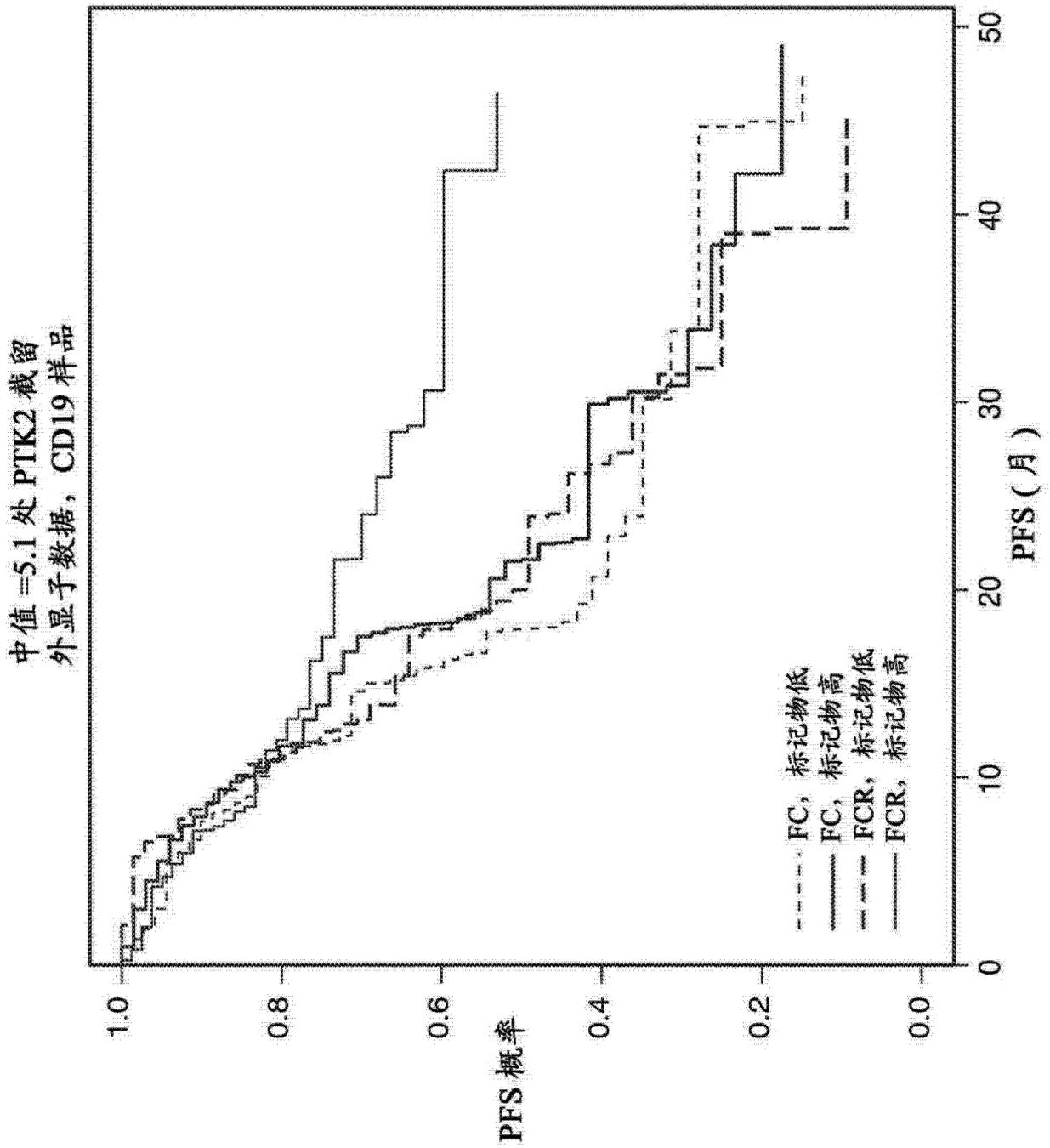


图 3

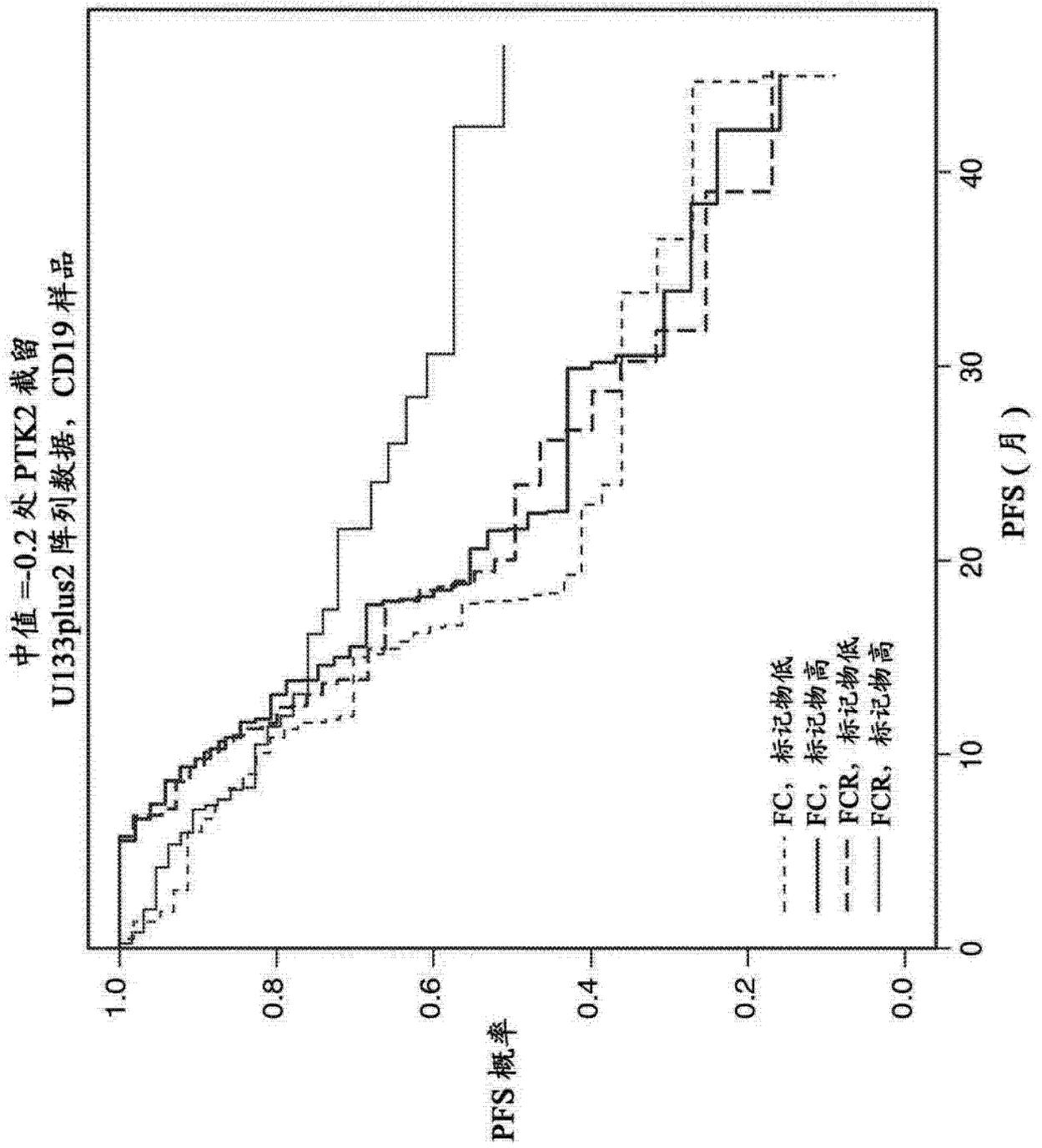


图 4

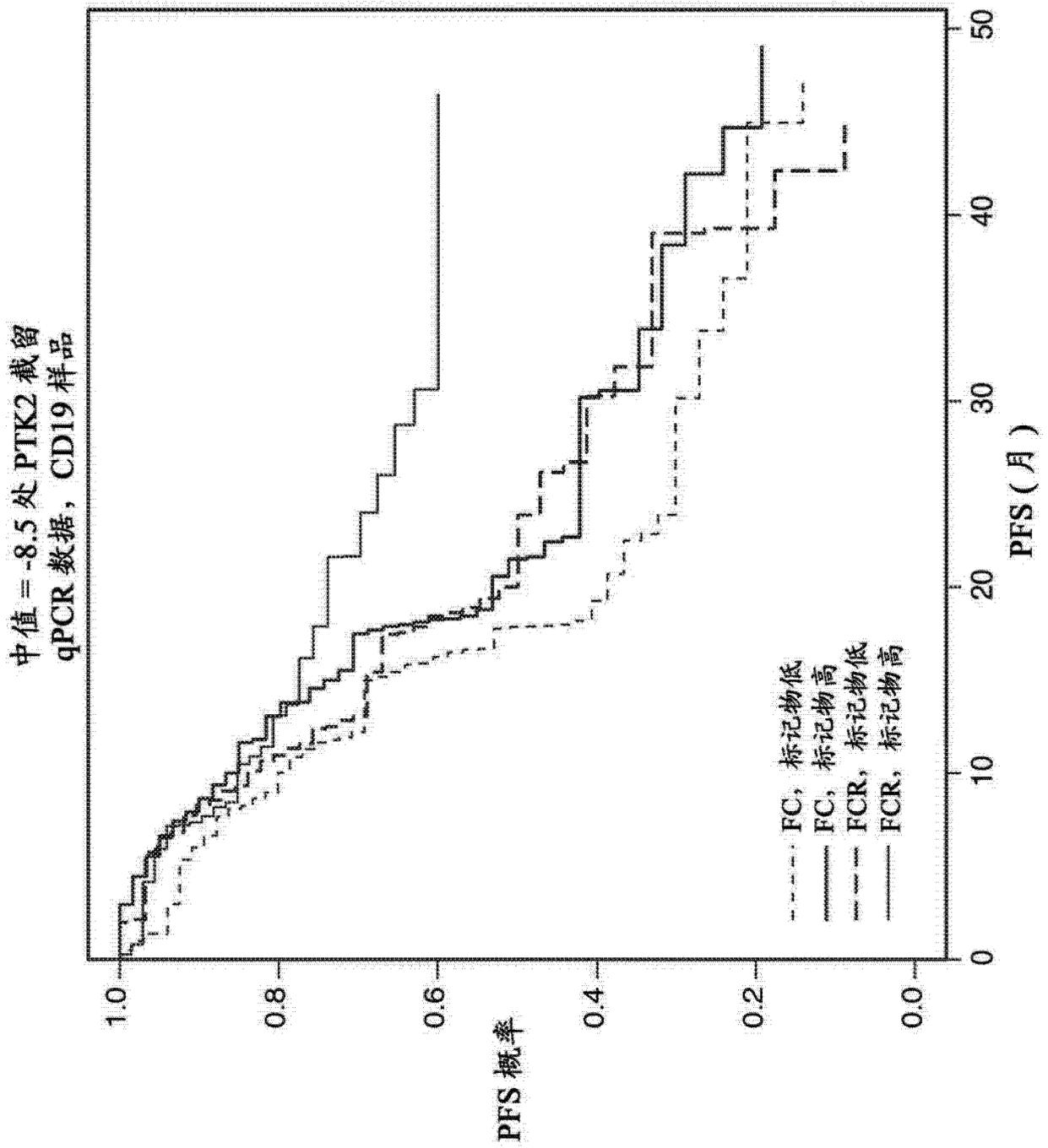


图 5

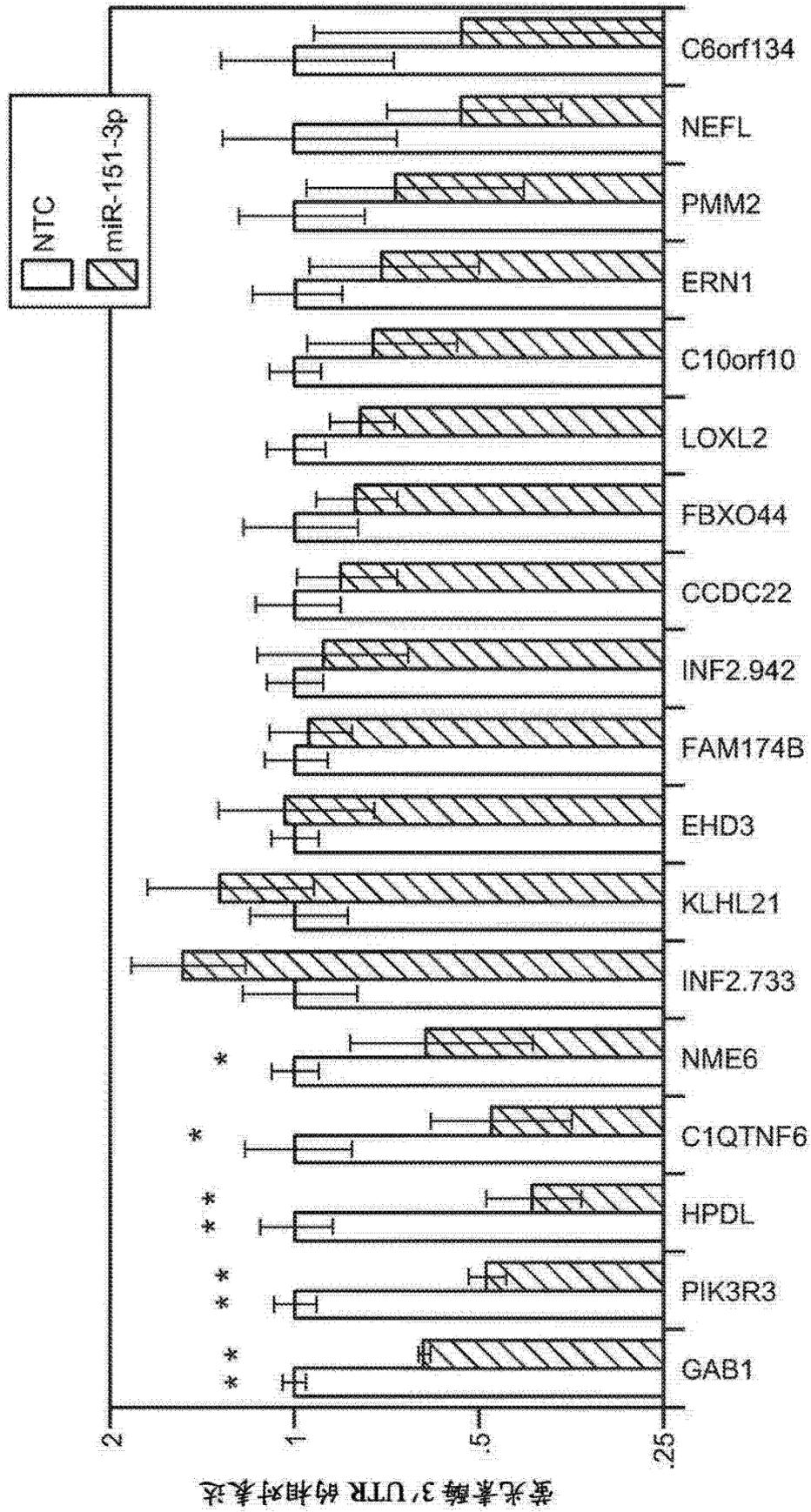


图 6

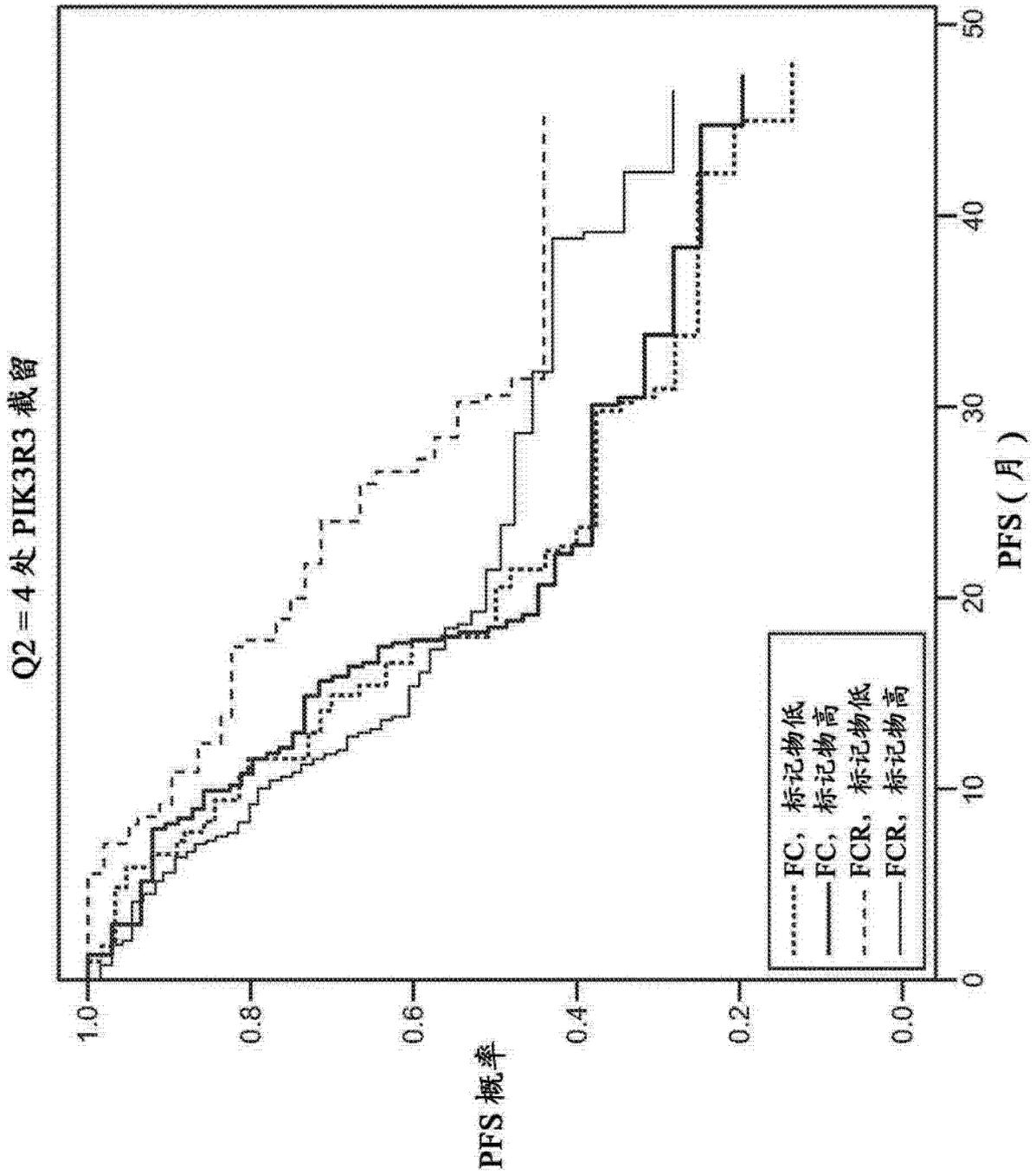


图 7

PFS 治疗效果 (FCR 对 FC), 在 PIK3R3 亚组中

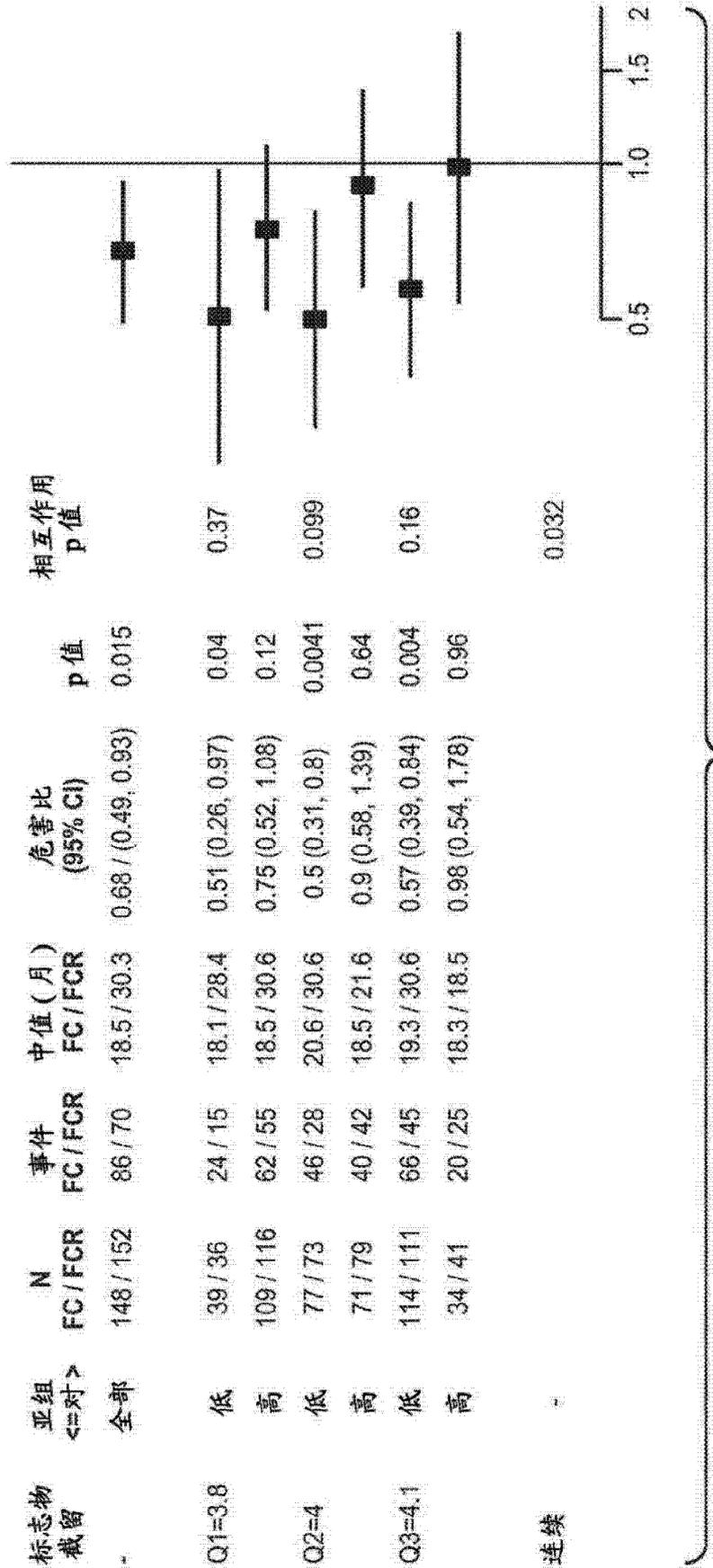


图 8A

在 FC 中 PIK3R3 PFS 预后效果: 高对低 (大于对小于等于截留)

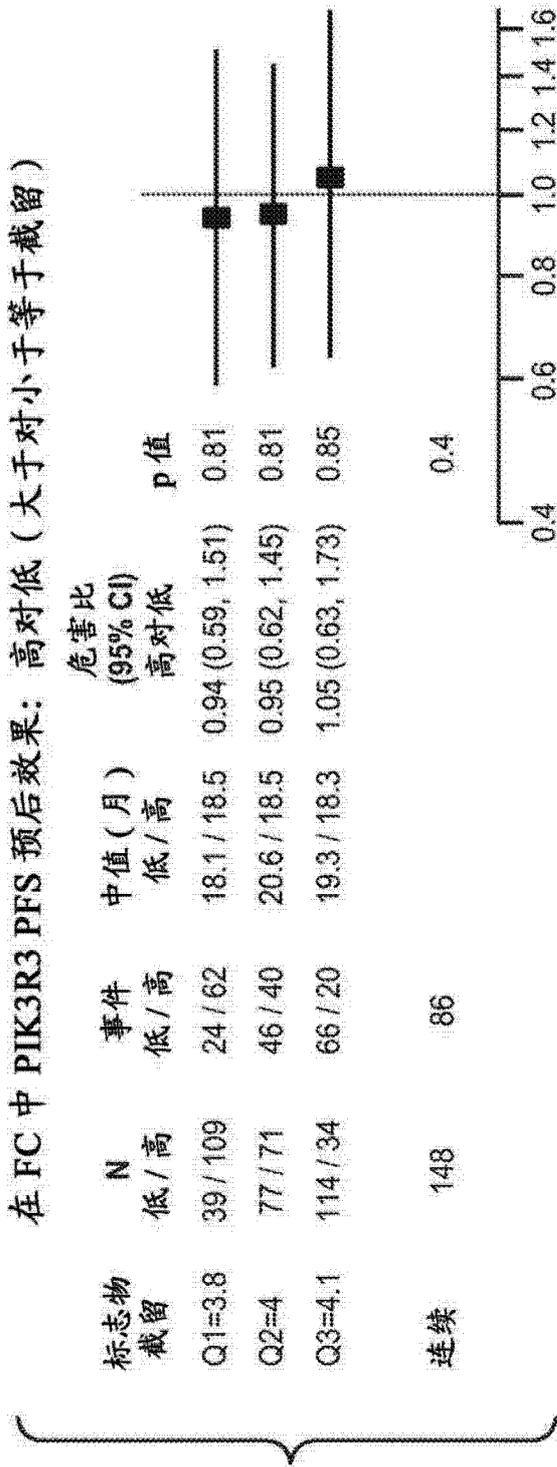


图 8B

在 FCR 中 PIK3R3 PFS 标志物效果: 高对低 (大于对小于等于截留)



图 8C