

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810165674.1

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101422614A

[22] 申请日 2000.11.28

[21] 申请号 200810165674.1

分案原申请号 00816224.7

[30] 优先权

[32] 1999.11.28 [33] US [31] 60/167,716

[71] 申请人 拉卓拉药物公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 M·D·林尼克 P·A·麦克尼利

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 55 页 附图 20 页

[54] 发明名称

基于抗体亲和力来治疗狼疮的方法及使用这种方法的筛选方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了基于测量抗体亲和力来鉴定适合于治疗狼疮的个体的方法和监控治疗的方法，以及基于测量抗体亲和力来治疗狼疮的方法。治疗必需施用包含非免疫原性效价平台分子和可结合来自患者的抗 DNA 抗体的至少两个双链 DNA 表位(诸如 DNA 分子)的缀合物。

1. 治疗个体的系统性红斑狼疮 (SLE) 的方法, 包括对个体施用包含下述的缀合物: (a) 非免疫原性效价平台分子, 和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个双链DNA (dsDNA) 表位; 其中所述dsDNA表位对于来自个体的抗体的亲和力被用作选择接受或继续接受治疗的个体的基础。

2. 权利要求1的方法, 其中dsDNA表位是多核苷酸。

3. 权利要求2的方法, 其中多核苷酸是双链DNA。

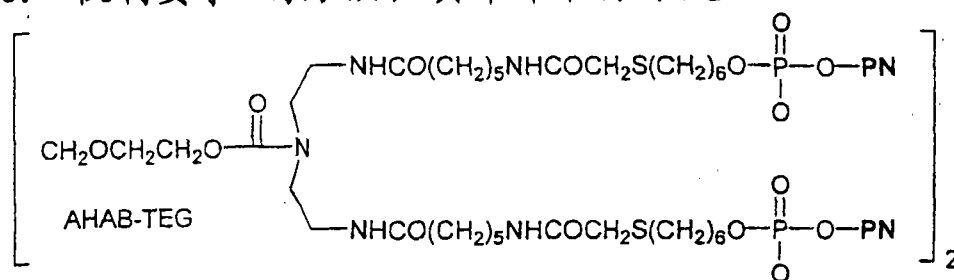
4. 治疗个体的SLE的方法, 包括对个体施用包含下述的缀合物: (a) 非免疫原性效价平台分子, 和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸, 所述多核苷酸基本上由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成; 其中在开始治疗之前或之时, 该多核苷酸对于来自个体的抗体的表观平衡解离常数 (K_D) 低于大约1.0mg IgG/ml, 而且其中所述 K_D 值或其功能等同物被用作选择接受治疗的个体的基础。

5. 权利要求4的方法, 其中 K_D 值低于大约0.8。

6. 权利要求4的方法, 其中 K_D 值低于大约0.5。

7. 权利要求4的方法, 其中 K_D 值低于大约0.2。

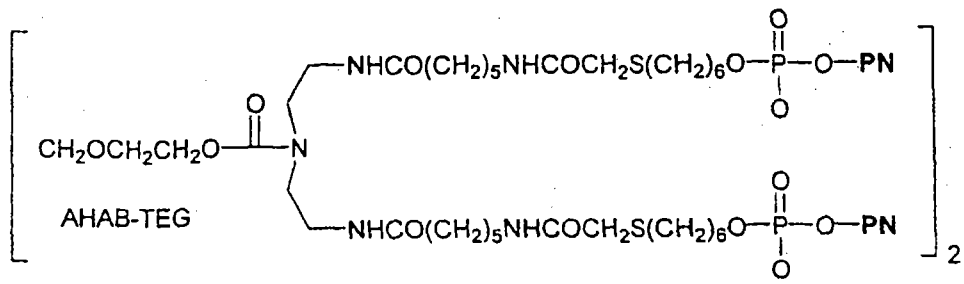
8. 权利要求4的方法, 其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

9. 权利要求5的方法, 其中所述多核苷酸由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

10. 权利要求9的方法, 其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

基于抗体亲和力来治疗狼疮的方法 及使用这种方法的筛选方法和组合物

相关申请

本申请要求1999年11月28日提交的美国临时申请流水号60/167,716（将其完整收入本文作为参考）的优先权。

发明领域

本发明涉及由抗体介导的病理学领域，诸如狼疮。更具体的说，本发明涉及基于抗体亲和力来治疗个体的狼疮的方法，和选择接受治疗的个体的方法。

技术背景

系统性红斑狼疮（SLE）是特征为生成针对许多核抗原（包括双链DNA即dsDNA）的抗体的自身免疫疾病。人们认为，与DNA发生反应的自身抗体参与SLE病理学，而且与狼疮肾炎密切相关。参阅例如Morimoto等人，*J. Immunol.*，139: 1960 - 1965, 1982; Foster等人，*Lab. Invest.*，69: 494 - 507, 1993; ter Borg等人，*Arthritis Rheum.*，33: 634 - 643, 1990; Bootsma等人，*Lancet*，345: 1595 - 1599, 1995。

合成双链寡核苷酸（dsON）显示与抗dsDNA抗体发生交叉反应（美国专利号5,276,013）。已经建议将与非免疫原性载体（也称为平台）缀合的dsON用于SLE的治疗方法。例如，由四个dsON附着于聚乙二醇效价平台而构成的四价缀合物LJP 249被用于在经免疫小鼠模型系统中证明耐受性（Jones等人，*Bioconjugate Chem.*，5: 390 - 399, 1994）。

LJP 394，由四个dsON附着于平台而构成的四价缀合物，在BXSB实验用鼠类狼疮肾炎模型中显示延迟肾病的进展并延长存活（Plunkett等人，*Lupus*，4: S99, 1995; Coutts等人，*Lupus*，5:

158 - 159, 1996)。LJP 394还显示在SLE人类患者中降低抗dsDNA抗体(Weisman等人, *J. Rheumatol.*, 24: 314 - 318, 1997)。

其它文献描述了可用于治疗SLE的方法, 包括通过诱导B细胞耐受性来降低循环抗体水平的方法, 包括但不限于美国专利号5,276,013、5,391,785、5,786,512、5,726,329、5,552,391、5,268,454、5,606,047、5,633,395; 5,162,515; 美国流水号08/118,055(美国专利号6,060,056)、60/088,656、和60/103,088(美国流水号09/328,199和PCT申请号PCT/US99/13194)。

虽然SLE的整体患者预后得到了改进, 但是治疗方案尚不理想, 而且狼疮肾炎仍旧具有相对较差的整体存活(Seleznick等人, *Semin. Arthritis Rheum.*, 21: 73 - 80, 1991)。

需要用于治疗SLE的改进方法和用于鉴定可能特别响应某一指定治疗的患者的改进方法。

将引用的所有参考文献完整收入本文作为参考。

发明概述

本发明提供了涉及狼疮免疫耐受治疗的方法, 该方法基于对来自个体的抗体(即与狼疮有关的抗体, 也就是抗dsDNA抗体)的最初亲和力进行评估。本发明还提供了基于对抗体亲和力的评估来鉴定适合于(或不适合于)治疗的个体的方法, 以及基于对接受治疗后亲和力变化(如果有的话)的评估的治疗方法。

因此, 一方面, 本发明提供了治疗个体的SLE(包含狼疮肾炎)的方法, 包括对个体施用缀合物, 其包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自该个体的能特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个双链DNA表位(优选多核苷酸), 其中表位(优选多核苷酸)对于来自该个体的抗体的亲和力被用作选择接受治疗的个体的基础。在其它实施方案中, 本发明提供了治疗个体的SLE的方法, 包括对个体施用缀合物, 其包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性

结合来自该个体的能特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个双链DNA表位（优选多核苷酸），其中表位（优选多核苷酸）对于来自该个体的抗体的亲和力被用作选择继续接受治疗的个体的基础。

由于使用亲和力作为选择适合于治疗指示的个体的基础，因此本文描述的治疗方法必需测量抗体（个体的抗双链DNA抗体）对于dsDNA表位的亲和力。

另一方面，本发明提供了治疗个体的系统性红斑狼疮（SLE）的方法，包括对个体施用缀合物，该缀合物包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自该个体的能特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸，所述多核苷酸优选包含双链DNA序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，其中在开始治疗之前或之时，该多核苷酸对于来自所述个体的抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ）或其功能等同物低于大约1.0mg IgG/ml，而且其中所述 K_D' 值（或其功能等同物）被用作选择接受治疗的个体的基础。

在有些实施方案中，治疗方法还包括选择步骤，包括在开始治疗之前评估针对来自个体的可特异性结合双链DNA的抗体，该缀合物中所含表位（优选多核苷酸）的表观平衡解离常数（ K_D' ）（或其功能等同物），所述缀合物包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自该个体的可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位，其中选择 K_D' 值（或其功能等同物）低于大约1.0mg IgG/ml的个体来接受治疗。另外，本文描述了能够应用于试图用于治疗的任何dsDNA表位的更低 K_D' 值，对于本文所述指定患者群进行了百分点分级。优选的是，dsDNA表位是多核苷酸，所述多核苷酸优选包含双链DNA序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成。

另一方面，本发明提供了治疗个体的SLE的方法，包括：（1）评估来自个体的抗双链DNA抗体对于治疗中待用dsDNA表位的亲和力，其中基于所述抗体亲和力来选择治疗的个体；并（2）对所述选择的个体

施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)两个或多个dsDNA表位的缀合物。

另一方面,本发明提供了治疗个体的狼疮肾炎的方法,包括对个体施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体的可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物,所述多核苷酸包含双链DNA序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成,其中在开始治疗之前或之时,缀合物中的多核苷酸对于来自该个体的抗体的表观平衡解离常数(K_D')(或其功能等同物)低于大约1.0mg IgG/ml,而且其中所述 K_D' 值(或其功能等同物)被用作选择接受治疗的个体的基础。

另一方面,本发明提供了治疗个体的SLE的方法,包括:(1)在开始治疗之前或之时,评估缀合物中的dsDNA表位对于来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的表观平衡解离常数(K_D'),所述缀合物包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个所述表位;并(2)以足以提高 K_D' 值的量对个体施用缀合物,其中若 K_D' 值相对于开始治疗之前或之时的 K_D' 值提高了至少大约20%,则继续治疗。在其它实施方案中,治疗方法包括以足以降低亲和力(由亲和力测量得到反映,例如由 K_D' 值升高得到反映)的量施用本文所述任何缀合物,优选降低至少大约20%,当然有可能希望变化更大。

另一方面,本发明提供了治疗个体的狼疮肾炎的方法,包括对个体施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位的缀合物。在有些实施方案中,通过本文所述方法评估抗体亲和力。在有些实施方案中,以足以降低抗体亲和力的量施用缀合物。

另一方面,本发明提供了鉴定可能适合于治疗SLE的个体的方法,所述治疗包括施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物,所述多核苷酸包含双链DNA序列

5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，所述方法包括在开始治疗之前或之时，测量缀合物中所用多核苷酸对于来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数(K_D')或其功能等同物，其中通过低于大约1.0mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

另一方面，本发明提供了鉴定可能不适合于治疗SLE的个体的方法，所述治疗包括施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物，所述多核苷酸包含双链DNA序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，所述方法包括在开始治疗之前或之时，测量缀合物中的多核苷酸对于来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数(K_D')或其功能等同物，其中通过高于大约1.0mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

另一方面，本发明提供了监控个体的SLE治疗的方法，所述治疗包括施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位(优选多核苷酸)的缀合物，所述方法包括测量缀合物的dsDNA表位(优选多核苷酸)对于来自个体的抗dsDNA抗体的亲和力。在有些方面，测量表观平衡解离常数(K_D')。

另一方面，本发明提供了在合适包装中包含分子(诸如多核苷酸)的试剂盒，所述分子包含可结合抗双链DNA抗体的表位，优选还包含有关测量来自个体的抗dsDNA抗体对于表位的亲和力的说明书。

另一方面，本发明提供了包含(1)包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物；和(2)有关使用缀合物来检测缀合物对于来自个体的抗dsDNA抗体的亲和力的说明书的试剂盒。

图的简述

图1A-C描述了LJP394对来自各组SLE患者血清的抗体结合¹²⁵I-标

记的dsDNA的竞争性抑制。

图2通过非竞争性亲和力测定法描述了来自SLE患者和正常患者的血清的结合。对来自10份SLE血清样品和10份正常血清样品的IgG级分评估了与LJP394 dsDNA表位的结合。

图3A描述了接受10mg(实心圆形)与50mg(实心方形)缀合物LJP394的患者中抗体亲和力的表观剂量依赖性下降(由 K_D' 的升高指示)。安慰剂用空心圆形表示。第2次测量是服药前基线;第11次测量发生于每周施用药物4个月后。 K_D' 值(Y轴)是mg/ml IgG。图3B以柱形图的形式描述了相同数据。

图4A和4B描述了LJP394治疗或安慰剂(X轴)之前的 K_D' 值相比于LJP394治疗或安慰剂处理(Y轴)4个月之后的 K_D' 值。图A代表接受LJP394缀合物治疗的患者,图B代表接受安慰剂(即不接受治疗)的患者。图4C和4D描述了图4A和4B中的相同数据,只是补充了来自其他患者的数据。

图5A和5B描述了接受缀合物LJP394的患者(A,空心方形)和接受安慰剂的患者(B,实心方形)的 K_D' 变化。每个方形代表一名患者。X轴是接受治疗(或安慰剂)之前的 K_D' ;Y轴是治疗(或施用安慰剂)4个月之后的 K_D' 百分比变化。

图6A和6B描述了与图5A和5B相同的数据,只是补充了来自其他患者的数据。两张图描述了接受缀合物LJP394(左图)或安慰剂(右图)的患者中的 K_D' 变化。每个方形代表一名患者。X轴是接受治疗(或安慰剂)之前的 K_D' ;Y轴是每周静脉内用100mg LJP394(或安慰剂)治疗4个月之后的 K_D' 百分比变化。

图7描述了第二项研究中药物治疗对患者血清对于LJP394的亲和力的影响的概述。数据是每组所有患者的平均值 $\pm$ SEM。该图比较了每周静脉内用100mg LJP394或安慰剂治疗之前(实心柱)与4个月之后(斜线柱)的 K_D' 。

图8描述了来自图7的患者群,分成两组,低亲和力组(K_D' 高于0.8mg IgG/ml 血清)和高亲和力组(K_D' 低于0.8mg IgG/ml 血清)。数据是

每组所有患者的平均值 $\pm$ SEM。该图比较了每周静脉内用100mg LJP394或安慰剂治疗之前（实心柱）与4个月之后（斜线柱）的 K_d' 。

图9描述了患者血清对于LJP394表位的亲和力随时间的变化。对于试验的诱导期（每周服药100mg的前4个月），每月一次测定亲和力。X轴是以周计的时间；Y轴是 K_d' 。根据最初（治疗前）亲和力选择样品，并依相对亲和力分成三组：高、中、和低亲和力。亲和力值是3名患者的平均值。实心三角代表“低亲和力”患者（ K_d' 平均大约1.13mg/ml）；实心圆代表“中亲和力”患者（ K_d' 平均大约0.44mg/ml）；而实心方形代表“高亲和力”患者（ K_d' 平均大约0.14mg/ml）。

图10描述了用LJP394治疗的高和低亲和力患者组的抗dsDNA抗体随时间的百分比变化，通过Farr测定法进行评估。排除在高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺治疗后收集的数据。将患者分成低亲和力（ $K_d' > 0.8$ mg/ml）和高亲和力（ $K_d' \leq 0.8$ mg/ml）两组。用虚线描述低亲和力患者，用实线描述高亲和力患者。数据是研究的所有患者的平均值。X轴是自试验开始后的时间（以周计），Y轴是自试验开始后抗dsDNA抗体水平的百分比变化。灰色区域标志服药阶段，第一阶段是每周100mg LJP394或安慰剂的诱导期，第二阶段是每周50mg LJP394或安慰剂。图中白色区域指示“中断阶段”，不施用LJP394或安慰剂。

图11A与图5A相同，只是用实心方形指示患者中的活性肾红肿的发生。图11B（用LJP394治疗的患者）与图11A相似，只是扩充了用于分析的患者群。图11C使用扩充后的患者群描述了用安慰剂治疗的患者中的 K_d' 百分比变化。对于经历红肿的患者，用实心方形代表用LJP394治疗的患者，用实心圆形代表用安慰剂治疗的患者。

图12描述了接受缀合物LJP394的患者（实心方形）中和接受安慰剂的患者（空心方形）中的肾红肿。每个方形代表一名患者。X轴是接受治疗（或安慰剂）之前的 K_0' ；Y轴是治疗（或安慰剂）4个月之后的 K_0' 百分比变化。

图13描述了接受安慰剂（即不接受治疗）4个月之后的患者中的 K_0' 变化，实心方形指示肾红肿的发生，空心方形指示安慰剂患者。结果

指示红肿相对于最初 K_D' 和相对于 K_D' 变化的随机分布。

图14描述了高亲和力患者的肾红肿发展随时间变化的图。实线代表用LJP394治疗的患者，虚线代表用安慰剂治疗的患者。X轴是自第一次服用LJP394（或安慰剂）后的时间（以月计），Y轴是不经历肾红肿的个体的百分比。

图15描述了高亲和力组中高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺（HDCC）治疗随时间实施的图。HDCC治疗指在高亲和力患者中施用高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺的第一次干预。实线代表用LJP394治疗的个体，虚线代表用安慰剂治疗的个体。X轴是自第一次服用LJP394（或安慰剂）后的时间（以月计），Y轴是不接受HDCC干预的个体百分比。

图16描述了高亲和力组（ $K_D' \leq 0.8\text{mg/ml}$ ）的临床效果的概述。

图17描述了整个患者群（即“意欲治疗的”群体）的临床效果的概述。

发明实施方式

我们发现，来自患有狼疮的个体的抗dsDNA抗体对于将要或正在用作治疗基础的表位的平均亲和力，可预示设计通过施用包含至少两个含该表位的分子的缀合物来诱导免疫耐受的治疗的功效。根据我们对如此治疗狼疮患者得到的临床数据的评估，我们发现：（1）抗体对于用于治疗DNA表位的最初亲和力能够预示对治疗的响应程度，即在降低抗体亲和力方面，以及在减少症状和降低抗dsDNA抗体的量（效价）方面，而且患者的抗体亲和力越高，对治疗的响应越好；（2）抗体对于用于治疗DNA表位的最初亲和力能够预示在减少症状方面的功效程度，而且具有较高亲和力抗体的患者相对于具有较低亲和力抗体的患者（或具有高亲和力抗体但不接受治疗的患者）显示症状减少；（3）抗体对于用于治疗DNA表位的亲和力变化能够预示在减少症状方面的功效程度，而且展示必需亲和力变化（降低）的患者相对于未能展示必需变化的患者显示症状减少。相反，先前的报导公开了在施用本

文所述缀合物 (LJP394) 后测量抗dsDNA抗体的效价 (即以与dsDNA的结合指示抗dsDNA抗体水平), 但是没有报导患者抗dsDNA抗体对于缀合物中多核苷酸表位的亲和力。根据我们的分析, 最初报导的这些效价或效价变化都不预示临床效果。

因此, 本发明提供了治疗方法和鉴定适合于本文所述治疗的个体的方法, 所述治疗必需评估来自个体的抗体对于正在、已经、和/或将要作为本文所述免疫耐受治疗基础的表位的亲和力。

一般技术

本发明的实践将采用 (除非另有说明) 分子生物学 (包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、和免疫学的常规技术, 这些属于本领域技术范围之内。这些技术在文献中有完整解释, 诸如 *《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》* (分子克隆: 实验室指南), 第2版, Sambrook等人, 1989, 冷泉港出版社; *《Oligonucleotide Synthesis》* (寡核苷酸合成), M. J. Gait编, 1984; *《Animal Cell Culture》* (动物细胞培养), R. I. Freshney编, 1987; *《Methods in Enzymology》* (酶学方法), Academic出版公司; *《Handbook of Experimental Immunology》* (实验免疫学手册), D. M. Weir和C. C. Blackwell编; *《Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells》* (用于哺乳动物细胞的基因转移载体), J. M. Miller和M. P. Calos编, 1987; *《Current Protocols in Molecular Biology》* (分子生物学通用方案), F. M. Ausubel等人编, 1987; *《PCR: The Polymerase Chain Reaction》* (PCR: 聚合酶链式反应), Mullis等人编, 1994; *《Current Protocols in Immunology》* (免疫学通用方案), J. E. Coligan等人编, 1991; 和 *《Short Protocols in Molecular Biology》* (分子生物学短方案), Wiley and Sons, 1999。

定义

来自个体的抗体对于在本文所述治疗中将要或正在使用的表位的

“亲和力”在本领域很好理解，指抗体结合表位的程度或强度。可以以本领域知道的许多方式来测量和/或表述亲和力，包括但不限于平衡解离常数 (K_D 或 K_d)、表观平衡解离常数 (K_D' 或 K_d')、和 IC_{50} (在竞争实验中实现50%抑制所需的量；在本文中与 “ I_{50} ” 可互换使用)。可以理解，为了本发明的目的，亲和力是可结合表位的指定抗体群的平均亲和力。在本文中以 mg IgG/ml 或 mg/ml 表述的 K_D' 值指 mg Ig/ml 血清，尽管可以使用血浆。

在将抗体亲和力“用作”施用或选择本文所述治疗方法的“基础”时，在治疗之前和/或之中测量抗体亲和力，并且临床医生将获得的数值用于评估下述任何项目：(1) 个体可能最初适合于接受治疗；(2) 个体可能最初不适合于接受治疗；(3) 对治疗的响应；(4) 个体可能适合于继续接受治疗；(5) 个体可能不适合于继续接受治疗；(6) 调整剂量；(7) 预示临床受益的可能性。本领域将很好理解，抗体亲和力在临床条件下的测量清楚指示这个参数可用作开始、继续、调整、和/或停止施用本文所述治疗的基础。

“在开始治疗之前或之时”测量的抗体亲和力是在个体接受第一次施用本文所述治疗形式之前和/或在接受第一次施用本文所述治疗形式之后至少大约4周内、优选至少大约2周内、优选至少大约1周内、优选至少大约5天内、优选至少大约3天内、优选至少大约2天内、优选至少大约1天内在个体中测量的抗体亲和力。

“群体”指具有由抗体介导的病理学的一组个体。对于指定群体 (成员数目可以根据不同情况而变化)，抗体亲和力在一定范围内变化 (即最大和最小亲和力)。

“可能适合于”本文所述治疗的个体 (包括 “适合于” 本文所述治疗的个体) 指施用所述治疗比不施用该治疗更有可能受益的个体。相反，“可能不适合于” 本文所述治疗的个体 (包括 “不适合于” 本文所述治疗的个体) 指未能由施用所述治疗受益的可能性更大的个体。

在用于本文时，“治疗”指用于获得有益或期望效果 (包括且优选临床效果) 的方法。为了本发明的目的，有益或期望效果包括但不

限于下列一项或多项：减轻症状、减小疾病程度、稳定疾病状态（即不再恶化）、预防疾病扩散（即转移）、预防疾病发生或复发、延迟或减缓疾病进展、改善疾病状态、缓解（部分或完全）、降低发病率、和/或减少症状。狼疮治疗包括任何方面的狼疮，包括但不限于狼疮肾炎（这是一种慢性炎性肾病）。在狼疮肾炎过程中，可能发生“红肿（flare）”。“红肿”指活性升高，通常是炎性活性。若活性在肾中，则红肿称为“肾红肿”。可以评估某些因素来鉴定“肾红肿”，包括但不限于蛋白尿水平、血尿水平、和血清肌酸酐水平。不存在狼疮肾炎症状时也可以施用狼疮肾炎“治疗”，而且这种治疗（如“治疗”的定义所指）可降低红肿发病率。“治疗”还涵盖降低任何方面的狼疮（诸如狼疮肾炎）的病理学后果。

在用于本文时，“SLE红肿”指在SLE患者中发生的红肿（即急性临床事件）。SLE红肿可能发生于多种主要器官中，包括但不限于肾、脑、肺、心、肝、和皮肤。SLE红肿包括肾红肿。

在用于本文时，“高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺”或“HDCC”指单独或与环磷酰胺一起加大皮质类固醇剂量的干预。高剂量通常指皮质类固醇。这种干预通常发生于红肿或急性发作。一般而言，例如，加大剂量是至少15mg/天，而且可以超过20mg/天。可以使用标准临床方案来施用HDCC。临床医生可以通过评估某些因素来监控患者并确定何时需要HDCC治疗，所述因素包括但不限于蛋白尿水平、血尿水平、和血清肌酸酐水平。一般而言，对经历肾红肿的患者给予HDCC治疗，尽管这种治疗可用于其它方面的狼疮。

K_D' 或 K_D' 值的“等同物”或“功能等同物”指同样反映亲和力的参数或参数值。例如， K_D' 的等同物是 IC_{50} 。又例如， K_D' 为0.5的等同值是 IC_{50} 为200，如果它们反映相同或大致相同的亲和力的话。这些等同物的测定完全属于本领域技术范围之内，而且本发明涵盖这些等同物及其测定。一般而言，提及 K_D' 即包括提及 K_D' 的功能等同物。

在用于本文时，单数形式“一个”和“一种”包括复数形式，除非另有说明。例如，“一种”抗体包括一种或多种抗体。

“表位”在本领域很好理解，指展示特异性结合抗体的任何化学部分。“表位”还可包括抗原，它是包含表位且同样特异性结合抗体的部分或分子。

“双链DNA表位”或“dsDNA表位”指展示特异性结合抗双链DNA抗体的任何化学部分，而且同样包括包含这种表位的分子。下文进一步讨论了适用于本发明缀合物的双链DNA表位。术语“表位”还包括下文描述的双链DNA自身的模拟物。

“可特异性结合”抗体的表位在本领域很好理解，而且这种特异性结合的测定方法在本领域也是众所周知的。若某种分子与特定细胞或物质发生的反应或联系比其它细胞或物质更频繁、更快速、更持久、和/或具有更高亲和力，则说该分子展示“可特异性结合”。若某种抗体与靶的结合比与其它物质的结合更亲和、更亲合、更容易、和/或更持久，则说该抗体“可特异性结合”该靶。

“抗双链DNA抗体”或“抗dsDNA抗体”或“双链DNA抗体”在本文中可互换使用，指可特异性结合双链DNA(dsDNA)的任何抗体。任何抗体包括任何类型的抗体，诸如IgG、IgA、或IgM，而且抗体不必是任何特定类型。正如在本文提供的“抗体”定义中清楚指出的，“抗双链DNA抗体”包括展示这种必需功能(即特异性结合dsDNA)特性的任何片段，诸如包含可变区的片段，诸如Fab片段。正如下文讨论的，可以理解，与任何抗双链DNA抗体(或功能片段)的特异性结合是足够的。

在用于本文时，术语“循环抗双链DNA抗体”指未结合生物学样品上和/或中的双链DNA表位的抗双链DNA抗体，即游离抗体。

“抗体”指能够通过位于免疫球蛋白分子可变区中的至少一个抗原识别位点而特异性结合靶(诸如碳水化合物、多核苷酸、或多肽)的免疫球蛋白分子。在用于本文时，该术语不仅包括完整抗体，而且包括它们的片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、和包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰结构。

术语“多核苷酸”和“核酸”可互换使用，指任何长度的核苷酸

聚合物形式，其或是核糖核苷酸或是脱氧核糖核苷酸。这些术语包括单链、双链、和三链DNA、基因组DNA、cDNA、RNA、DNA-RNA杂合体、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然的、化学、生物化学修饰的、非天然的、或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。为了本发明的目的，除非另有说明，本文所示序列指双链序列。例如，包含双链序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成的多核苷酸包括互补多核苷酸序列，具体而言就是序列3'-CACACACACACACACACA-5'。可以理解，本文描述的双链多核苷酸序列还包括本文描述的修饰。多核苷酸的主链可包含糖和磷酸基团（通常可能发现于RNA或DNA中）或者修饰后或取代后的糖或磷酸基团。或者，多核苷酸的主链可包含合成亚基（诸如氨基磷酸酯）聚合物，因而可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯（P-NH₂）或混合型氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。硫代磷酸酯键可用于取代磷酸二酯键。另外，可以通过合成互补链并在适当条件下退火而由化学合成的单链多核苷酸产物获得双链多核苷酸，或者使用DNA聚合酶和适当引物从头合成互补链从而获得。

下面是多核苷酸的非限制性范例：基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针、和引物。为了本发明的目的，多核苷酸通常是少于大约1kb、优选少于大约500bp、优选少于大约250bp、优选少于大约100bp、优选少于大约50bp的分离多核苷酸。然而，可以理解，可以使用任何大小或结构的多核苷酸，只要它展示与来自个体的抗双链DNA抗体发生必需结合即可。还可以理解，可以使用与在治疗中曾经、正在、或将要使用的多核苷酸不同的多核苷酸（例如在大小和/或序列方面），只要这两种多核苷酸对于来自个体的抗dsDNA抗体展示等同（或可转换）的结合亲和力和力即可。换言之，非同一的多核苷酸可用于亲和力测定和治疗方面。

优选的是，多核苷酸是DNA。在用于本文时，“DNA”不仅包括碱基A、T、C、和G，而且包括这些碱基的任何类似物或经修饰形式，诸

如甲基化核苷酸、核苷酸间修饰（诸如不带电荷的键和thioate）、使用糖类似物、和经修饰和/或其它主链结构（诸如聚酰胺）。

“天然发生的”部分指内源化学部分，诸如碳水化合物、多核苷酸、或多肽序列，即在自然界中发现的部分。天然发生部分的加工可发生于一个或多个步骤，而且这些术语涵盖所有加工阶段。相反，“非天然发生的”部分指所有其它部分，即在自然界中不存在的部分，诸如重组多核苷酸序列和非天然碳水化合物。

在用于本文时，术语“免疫原”指在注射到动物体内后引发体液免疫应答的化学实体。免疫原具有B细胞表位和T细胞表位二者。

在用于本文时，术语免疫原的“类似物”（也称为“模拟物”）指可特异性结合免疫原能特异性结合的抗体的生物学或化学化合物。同样的，“双链DNA表位”包括天然发生的双链DNA的模拟物。“类似物”或“模拟物”与双链DNA共享表位或结合特异性。类似物可以是展示必需结合特性的任何化学物质，因而可以是例如简单或复杂的有机或无机分子、多肽、多核苷酸、碳水化合物、脂质、脂多糖、脂蛋白、或上述任意组合，包括但不限于包含多核苷酸的多肽、糖基化多肽、和糖脂。术语“类似物”涵盖术语“模拟型（mimotope）”，该术语在本领域是众所周知的。

“个体”指脊椎动物，优选哺乳动物，更优选人。哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。

“T细胞表位”指在T细胞上具有抗原特异的特异性结合位点且与其的结合导致T细胞激活的成份或其部分。当将本发明的一个实施方案描述成“缺乏”T细胞表位时，这表示使用本领域标准测定法检测不到T细胞表位。为了本发明的目的，“缺乏”T细胞表位的表位指表位缺乏在待治疗个体（即将接受表位呈递效价平台分子的个体）中引起T细胞激活的T细胞表位。有可能的是，例如，表位可能缺乏针对一个或一组个体的T细胞表位，但是拥有针对其它个体的T细胞表位。用于检测T细胞表位的存在的方法在本领域是众所周知的，而且包括检测T细胞增殖的测定法（诸如胸苷掺入）。通常认为未能诱导高于背景的统

计学显著(即使用标准统计学方法得到的 p 通常低于0.05)胸苷掺入的免疫原缺乏T细胞表位,尽管可以理解,胸苷掺入的定量量可以随测试的免疫原而变化。一般而言低于大约2-3、更优选低于大约1的刺激指数指示缺乏T细胞表位。还可以通过依照标准方法测量T细胞衍生淋巴因子的分泌来测定T细胞表位的存在。可以根据经验来确定T细胞表位的定位和内容(若存在)。可以理解,随着时间的流逝可以开发出用于检测T细胞表位的存在更灵敏的测定法,而且对缺乏T细胞表位的说明依赖所用检测系统的类型。

“诱导耐受”或“诱导免疫耐受”指降低和/或稳定针对免疫原的免疫应答的程度。“免疫应答”可以是体液和/或细胞的,而且可以使用本领域知道的标准测定法进行测量。为了本发明的目的,通常用抗双链DNA抗体的存在和/或水平来反映免疫应答。定量的说,降低(以抗体生成和/或水平的降低进行测量)指至少大约15%、优选至少大约25%、更优选至少大约50%、更优选至少大约75%、更优选至少大约90%、甚至更优选至少大约95%、最优选100%。可以理解,耐受是抗原特异的,而且为了本发明的目的,用于那些具有抗双链DNA抗体的个体。“诱导耐受”还包括减缓和/或延迟抗体水平的升高速率。

在用于本文时,术语“B细胞无反应性”指需要T细胞辅助来生成并分泌抗体的那些B细胞的不响应,包括但不限于未成熟和/或成熟B细胞的克隆缺失和/或B细胞不能生成抗体。“不响应”指针对免疫原的体液应答在治疗上有效的降低。定量的说,降低(以抗体生成的降低进行测量)指至少50%、优选至少75%、最优选100%。

“有效量”(在用于狼疮方面或由抗体介导的病理学方面时)指足以实现有益或期望效果(包括临床效果)的量。可以一次或多次施用给予有效量。为了本发明的目的,本文所述缀合物(或包含缀合物的组合物)的有效量指足以降低抗双链DNA抗体的循环水平的量,优选通过诱导耐受性来实现降低,特别是在抗双链DNA抗体的方面。就治疗而言,本文所述缀合物(或包含缀合物的组合物)的“有效量”指足以减轻、改善、稳定、逆转、减缓、或延迟系统性红斑狼疮(SLE)的

进展或预防系统性红斑狼疮（SLE）的量，包括由SLE引起的肾进行性炎症性退化（即狼疮肾炎）。

在生化反应中在任意两种或多种成份间形成的“稳定复合物”指在形成复式结构或复合物与随后检测（包括任何任选的清洗步骤或过渡期可能发生的其它操作）之间持续时间足够长的复式结构或复合物。

“分离的”或“纯化的”多肽或多核苷酸指基本上不含自然界中相关物质的多肽或多核苷酸。“基本上不含”指至少50%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%不含自然界中与之相关的物质。

在用于本文时，“效价平台分子”指包含供离散数目的表位和/或表位模拟物附着的位点的非免疫原性分子。缀合物或效价平台分子的“效价”指每个分子中供双链DNA表位附着的位点的数目。或者，缀合物的效价指双链DNA表位与效价平台分子的比率（绝对值或平均值）。

在用于描述效价平台分子时，“非免疫原性”指在将其自身施用于个体后，效价平台分子不能引发免疫应答（即T细胞和/或B细胞应答）和/或不能引发足够的免疫应答。可接受免疫应答的程度取决于使用效价平台分子的具体情况，而且可以根据经验来确定。

与效价平台分子“缀合”的表位指通过共价和/或非共价相互作用而附着于效价平台分子的表位。

“表位呈递效价平台分子”指包含附着的或结合的表位的效价平台分子，其中至少一些（其中至少两个）能够结合目的抗体。

“生物学样品”涵盖由个体获得且可用于治疗或监控测定法的多种样品类型。该定义涵盖血液和生物学起源的其它流体样品、固体组织样品诸如活组织切片标本或组织培养物或由其衍生的细胞、及其后代。该定义还包括获得后经过任何方式操作的样品，诸如试剂处理、溶解、或富集某些成份（诸如蛋白质或多核苷酸）。术语“生物学样品”涵盖临床样品，还包括培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物学流体、和组织样品。

“联合”指除了施用一种治疗形式以外还对相同个体施用另一种

治疗形式，诸如除了施用皮质类固醇环磷酰胺免疫遏制剂（或其它免疫遏制剂疗法）以外还施用本文所述缀合物。同样，“联合”指在对个体进行一种治疗形式之前、之中、或之后施用另一种治疗形式。

“由抗体介导的病理学”指与不适当生成抗体（通常是针对自身抗原的抗体）有关的免疫应答紊乱。由抗体介导的病理学包括但不限于狼疮、由抗体介导的血栓形成和血小板过少、抗磷脂综合症、重症肌无力。因为免疫应答紊乱依赖具体情况，为了本发明的目的，“由抗体介导的病理学”还可涵盖移植排斥（尤其是异种移植），其中就试图维持外来移植组织而言，免疫应答是不适当的，还包括妊娠中基于Rh的排斥。

“接受治疗”包括开始治疗和/或继续治疗。

“包含”指“包括”。

基于对抗体亲和力的评估来治疗狼疮的方法和鉴定适合于治疗狼疮的个体的方法

本文描述的方法必需评估来自个体的抗体的亲和力，其中所述个体患有或怀疑患有系统性红斑狼疮（SLE）。为了本发明的目的，（1）讨论中的亲和力是关于个体的抗体，即由该个体获得的抗体；（2）测量亲和力的抗体是与由抗体介导的病理学（即系统性红斑狼疮（SLE））有关和/或有涉及的抗体；且（3）感兴趣的结合是抗体与可结合抗体的表位的结合，而且表位将如本文所述用于建议的治疗（即dsDNA表位）。

本发明提供了（1）基于对最初抗体亲和力（即开始治疗之前或之时的抗体亲和力）的评估来治疗个体的方法；（2）基于对抗体亲和力变化（如果有的话）的评估来治疗个体的方法，即比较（a）开始治疗之前或之时的抗体亲和力与（b）治疗足以引发亲和力变化（如果有的话）的一段时期之后的抗体亲和力；（3）基于对最初抗体亲和力的评估来筛选可能适合于接受本文所述治疗的个体（或者可能不适合于接受本文所述治疗的个体）的方法；（4）基于对抗体亲和力变化（如果

有的话)的评估来筛选可能适合于接受本文所述治疗的个体(或者可能不适合于接受本文所述治疗的个体)的方法;(5)基于对抗体亲和力的评估来监控本文所述治疗的方法。

在本文所述方法方面,可以独立于治疗方法,同样可以不同于治疗方法,而实践筛选方法(即鉴定适合于或不适合于治疗的个体的方法)。除了医学博士以外,熟练技术人员使用本领域设备和/或技术,可以实践本文所述筛选方法。

对于本发明中使用或针对 K_D' 的所有实施方案,无论是筛选、治疗、监控,或者是针对亲和力评估的任何其它方法,可以理解,可以测量并使用其它等同值,它们均包括在本发明范围之内。例如,如下所述,本领域知道的许多方法能够测量(和表述)来自个体的抗体对于将要用于治疗的表位(在本发明的内容中是双链DNA表位)的亲和力。 K_D' 是这些参数之一,而且可以在本发明中测量和使用等同参数。另外,关于本文报导的 K_D' 临界值,这一发现的基础是大约每周一次施用大约100mg LJP394缀合物。

治疗方法

因此,本发明提供了治疗个体的SLE的方法,包括对个体施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位(诸如两个或多个包含dsDNA表位的分子,优选多核苷酸)的缀合物,其中表位(优选(缀合物中的)多核苷酸)对于来自个体的抗体的亲和力被用作选择接受治疗的个体的基础。在其它实施方案中,本发明提供了治疗个体的SLE的方法,包括对个体施用包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位(优选多核苷酸)的缀合物,其中表位(优选(缀合物中的)多核苷酸)对于来自个体的抗体的亲和力被用作选择继续接受治疗的个体的基础。测定亲和力的方法在本领域是众所周知的且描述于下文。

治疗之前或之中或是通过测量 K_D' 或是通过一些其它方法来表述的

亲和力的测量，强烈（如果不是决定性的话）指示该参数是选择接受和/或继续接受治疗的个体的基础。因此，在本文描述的所有治疗方法方面，而且正如“被用作...的基础”的定义所述，其它实施方案包括（1）如本文所述评估或测量亲和力（并优选选择适合于接受（包括继续接受）治疗的个体）；和（2）如本文所述施用治疗。如本文所述，在有些实施方案中，在评估亲和力变化（如果有的话）时，进行超过一种测量。

本文描述了治疗方法中所使用的dsDNA表位。在有些实施方案中，dsDNA表位是多核苷酸，诸如5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'。可以使用缀合物中所用表位（或者包含该表位的分子或部分）来测量亲和力；或者，可以使用相似的、非同一的表位，只要它的亲和力至少与缀合物中所用表位的亲和力相关，从而可以获得有意义的亲和力测量值即可。

本发明提供了治疗个体的SLE的方法，包括对个体施用包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物，所述多核苷酸包含双链序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，其中在开始治疗之前或之时，缀合物中的多核苷酸对于来自个体的抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ）低于大约1.0mg IgG/ml，而且其中所述 K_D' 值被用作选择接受治疗的个体的基础。在其它实施方案中， K_D' 低于大约下列任何数值：0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.025。这些 K_D' 值应用于其中评估 K_D' 的所有方法（包括治疗和/或筛选），包括诸如基于5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'的治疗的那些方法。在优选实施方案中， K_D' 低于大约0.8mg IgG/ml。在有些实施方案中， K_D' 低于大约0.5mg IgG/ml。在有些实施方案中， K_D' 低于大约0.1mg IgG/ml。下文描述了测量 K_D' 的方法。在治疗之前或之中通过测量 K_D' 或通过一些其它方法来表述的亲和力的测量值，强烈（如果不是决定性的话）指示该参数是选择接受治疗的个体的基础。

在有些实施方案中，本发明提供了治疗个体的SLE的方法，包括：

(1) 在开始治疗之前或之时，评估缀合物中的dsDNA表位（包括包含dsDNA表位的分子，优选多核苷酸）对于来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ），所述缀合物包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个DNA表位（优选多核苷酸），所述多核苷酸（如果它就是所用dsDNA表位的话）优选包含（双链或ds）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，其中选择 K_D' 值低于大约1.0mg IgG/ml的个体来接受治疗；并（2）对个体施用缀合物，优选施用足以提高 K_D' 的量。在其它实施方案中， K_D' 低于大约下列任何数值：0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.025。下文描述了测量 K_D' 的方法。

在其它实施方案中，本发明提供了治疗个体的SLE的方法，包括：

(1) 在开始治疗之前或之时，评估缀合物中的dsDNA表位（优选多核苷酸）对于来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ），所述缀合物包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个表位（优选多核苷酸），所述多核苷酸（如果使用的话）包含（ds）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成；并（2）对个体施用足以提高 K_D' 的量的缀合物，其中若 K_D' 相对于开始治疗之前或之时的 K_D' 升高了至少大约20%，则继续治疗。对于这些实施方案，在开始治疗之后测量的 K_D' （为了与开始治疗之前或之时的 K_D' 进行比较）是在开始治疗之后至少大约4周、优选至少大约6周、更优选至少大约10周、更优选至少大约12周测量的。我们在对治疗群治疗时观察到较大范围的抗体亲和力变化（图5）。因此，在其它实施方案中，若 K_D' 升高了至少大约下列任何数值（与开始治疗之前或之时的 K_D' 进行比较），则继续治疗：40%、50%、75%、100%、200%、500%。下文描述了测量 K_D' 的方法。

在有些实施方案中，以足以降低肾红肿（狼疮肾炎）的发病率或

可能性的量施用缀合物。根据我们的观察，足以实现这种降低的量对LJP394而言是大约100mg，每周给药一次。最初 K_D' 低于大约0.8且接受该量的缀合物的患者展示，因这种紊乱而住院的量降低了超过大约一半。对于个别患者，缀合物的有效量可能与个体的抗体亲和力有关和/或是它的函数，而且亲和力较高的患者能够响应较低的剂量。相反，若给予足够高（更高）的剂量，抗体亲和力较低的患者也可能响应。

因此，本发明提供了治疗个体的狼疮肾炎的方法，包括对个体施用包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸的缀合物，所述多核苷酸包含（ds）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，其中在开始治疗之前或之时，缀合物中的多核苷酸对于来自个体的抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ）低于大约1.0mg IgG/ml，而且其中所述 K_D' 值被用作选择接受治疗的个体的基础。在其它实施方案中， K_D' 低于大约下列任何数值：0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.025。下文描述了测量 K_D' 的方法。在治疗之前或之中或是通过测量 K_D' 或是通过一些其它方法来表述的亲合力的测量，强烈（如果不是决定性的话）指示该参数是选择接受治疗的个体的基础。

在有些实施方案中，以足以降低在不施用所述缀合物的情况中将施用的皮质类固醇和/或环磷酰胺免疫遏制剂疗法剂量的量施用本文所述缀合物。这是有意义的，因为这种免疫疗法是有毒的。因此，本发明提供了治疗狼疮肾炎的方法，其中以相比于使用皮质类固醇或环磷酰胺而不施用缀合物的情况足以降低施用于个体的皮质类固醇或环磷酰胺施用量的量施用本文所述缀合物（诸如LJP394）。在有些实施方案中，降低了个体的肾红肿的发病率，并以足以实现这种降低的量施用缀合物。本发明还提供了治疗SLE（优选狼疮肾炎）的方法，包括与皮质类固醇和/或环磷酰胺联合施用（任何）本文所述缀合物。以足以降低抗体对于缀合物中表位的亲和力的量施用缀合物。优选的是，缀合物是LJP394。施用皮质类固醇和/或环磷酰胺的方法在本领域是知

道的。可以通过例如与本领域知道的通常随时间给药的已知/或确定平均剂量（在量和/或间隔方面）进行比较来评估皮质类固醇和/或环磷酰胺疗法剂量的降低（这降低了对这些药物施用的依赖性并有效延迟这些药物的施用）。

筛选方法

本发明还提供了基于抗体亲和力来鉴定可能适合于接受和/或继续接受本文所述治疗的个体的方法，或者，在其它实施方案中，本发明还提供了基于抗体亲和力来鉴定可能不适合于接受和/或继续接受本文所述治疗的个体的方法。

因此，在有些实施方案中，本发明提供了鉴定可能适合于治疗SLE的个体的方法，所述治疗包括施用包含（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位（优选多核苷酸）的缀合物，所述多核苷酸（如果使用多核苷酸的话）包含（ds）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，所述方法包括在开始治疗之前或之时，测量缀合物中的多核苷酸与来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数（ K_D' ），其中通过 K_D' 值（或其功能等同物）低于大约1.0mg IgG/ml鉴定出个体。在其它实施方案中， K_D' 低于大约下列任何数值：0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.025。本发明由此提供了基于试图用于治疗中的任意数目的dsDNA表位的筛选。一般而言，较高亲和力“临界值”（例如由较低 K_D' 值指示）在治疗成功可能性方面将提供较高程度的确定性。

在其它实施方案中，本发明提供了鉴定可能不适合于治疗SLE的个体的方法，所述治疗包括施用包括（a）非免疫原性效价平台分子和（b）可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位（优选多核苷酸）的缀合物，所述多核苷酸（如果使用的話）包含（ds）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成，所述方法包括在开始治疗之前或之时，测量缀

合物中的多核苷酸与来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数 (K_D')，其中通过 K_D' 值高于大约1.0mg IgG/ml鉴定出个体。在其它实施方案中，通过 K_D' 值高于大约0.8mg IgG/ml鉴定出个体。如果表述成范围，上限可以是任何数目，包括但不限于大约2.0、大约3.0、大约5.0、大约10、大约15、大约20。

本发明还提供了监控个体的SLE治疗的方法，所述治疗包括施用包含 (a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位 (优选多核苷酸) 的缀合物，所述方法包括测量缀合物或dsDNA表位 (诸如多核苷酸) 与来自个体的抗双链DNA抗体的亲和力 (例如表观平衡解离常数 (K_D'))。对于这些方法， K_D' 变化 (与最初 K_D' 相比) 通常指示可以继续治疗 (即治疗将是有效的)。 K_D' 的变化可以是至少大约本文所述任何变化 (通常由至少大约20%至至少大约500%)，测量通常间隔至少2-6周，但并非必需如此。可以使用任意两次测量 (无论是否连续的) 间的变化。例如，若两周后的测量显示没有变化但四周后的测量比较显示有变化，则可以指示继续治疗。若 K_D' 不发生变化或者发生指示亲和力升高的变化，则也可以继续治疗，因为这种发展 (包括没有变化) 可能是暂时的。或者，不需要测试或观察亲和力 (诸如 K_D') 变化。例如，可以测量亲和力，并与来自普通群体的亲和力 (即平均亲和力) 进行比较。因而，在针对监控治疗的方法的实施方案方面，对于将要实践的方法不需要观察到特定结果，尽管某些结果 (或结果范围) 可能是期望的且可以使用的。

在有些实施方案中，根据亲和力与群体相比的百分点分级来选择治疗的个体。例如，对于指定患者群存在一定的抗体亲和力范围，并且可以根据抗体亲和力关于该群体的百分点分级来鉴定适合于治疗的个体 (或相反，很可能不适合治疗的个体)。因此，在有些实施方案中，若个体的抗体亲和力处于群体亲和力范围的大约前80%，则治疗将包括该个体或鉴定该个体适合于接受治疗 (相反，若个体处于群体亲和力范围的大约后20%，则他们通常不适合于接受治疗)。在其它

实施方案中，若个体的抗体亲和力范围处于群体亲和力范围的大约前50%，则治疗将包括该个体或鉴定该个体适合于接受治疗（相反，若个体处于群体亲和力范围的大约后50%，则他们通常不适合于接受治疗）。在有些实施方案中，该个体的抗体亲和力处于大约下列任何百分比前：30%、25%、20%、10%、5%。就测量的个体数目而言，群体可以是大约或至少下列任何数目：10、15、20、25、30、50、60、75、100、125、150、175、200、225、250、300、400、500。优选的是，测量足够数目的个体以提供统计学上显著的群体，这可以通过本领域已知方法来确定。群体的上限可以是任何数目，包括上文所列。

一般而言，若以足以引发应答（就降低抗体亲和力而言）的量和时间施用缀合物之后，个体的抗体亲和力相对于施用缀合物之前的抗体亲和力降低了至少大约任何20%，则该个体适合于接受（或继续接受）本文所述治疗。例如，抗体亲和力降低20%反映为最初 K_D '0.4变成 K_D '0.5。在其它实施方案中，个体的抗体亲和力降低了至少大约50%。在其它实施方案中，个体的抗体亲和力降低了至少大约75%。根据我们在狼疮治疗中的观察，至少大约8周、优选至少大约10周、更优选至少大约12周应当是足以观察到可测量应答的时间。在这段时间里缺乏可测量变化指示，就减少症状而言，接受治疗的个体不太可能由这种治疗受益。

一般而言，若相比于最初亲和力（即在开始治疗之前或之时测量的亲和力）存在统计学上显著的变化（降低），则指示响应（并因而指示继续治疗）。统计学上显著的变化依赖所使用的具体测定法，而且该数值通常容易获得。对于使用表面激元共振（surface plasmon resonance）的测定法，亲和力降低至少大约15%、优选至少大约20%、更优选至少大约25%、更优选至少大约40%、更优选至少大约50%指示响应，并且指示继续治疗。对于竞争性Farr测定法，通常采用相同的亲和力降低。对于其它测定法，变化可以是至少大约上述任何百分比，还可以是至少大约下列任何百分比：75%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%。

本发明还提供了鉴定可能是用于选择接受本文所述治疗的个体的合适“临界值”的抗体亲和力（由 K_D 和/或其等同物得到反映）的方法。由本文提供的实验数据显然可以看出，可以通过比较最初的亲和力与开始治疗之后（以足以引发应答（如果有应答的话）的量和时间给予缀合物，由亲和力的降低（如果有的话）指示）的亲和力来评估个体群。然后测定指示响应（就降低亲和力和/或减轻疾病而言）的最初亲和力和值，并用作选择接受本文所述治疗的个体的指示物。

因此，本发明提供了鉴定可能指示治疗对于由抗体介导的病理学的适用性（或用途）的抗体亲和力的方法，所述方法包括（1）由个体集合测量在由抗体介导的病理学中涉及的抗体的亲和力（优选测量每个个体的亲和力），所述个体具有由抗体介导的病理学，所述亲和力是由抗体介导的病理学中涉及的所述抗体与免疫原类似物之间的亲和力；（2）对个体集合施用包含该类似物的分子；（3）使由抗体介导的病理学程度与最初亲和力相互关联。一般而言，亲和力与症状减少（或一些其它合适临床终点）之间的正相关指示抗体亲和力预示该治疗的适宜性。相反，负相关指示具有该亲和力（或更低）的个体可能不适合于治疗。对于这些方法，包含类似物的分子可以是本文所述任何平台。在有些实施方案中，类似物缺乏能够在个体中激活T细胞的细胞表位。在有些实施方案中，关联是指抗体亲和力的变化程度与疾病程度之间的关联，因此可鉴定在临床上有意义的最初抗体亲和力和/或抗体亲和力变化。

抗体亲和力的测量

可以使用本领域用来评估DNA表位与抗体的结合程度的已知方法来测量抗体亲和力。一般而言，这些方法包括竞争测定法和非竞争测定法。就多核苷酸表位（它将用于将要施用的缀合物）而言，可以单独使用多核苷酸或包含多核苷酸的缀合物来测量亲和力，只要多核苷酸与包含多核苷酸的缀合物给出等同或至少可转换的数值即可。

在竞争测定法中，将不同浓度的抗体或表位与表位或抗体发生反

应，而结果可以表述成达到最大结合半数所需抗体量，通常称为 IC_{50} 。

另一种表述亲和力的方便方式是表观平衡解离常数或 K_D' ，它反映抗体对于缀合物上抗体结合表位的效价加权平均亲和力。通常由全血获得抗体，并通过血浆、血清、或IgG级分进行测量，还要测量该级分对于缀合物的亲和力。用于获得IgG级分的方法在本领域是知道的，而且本文有所描述。用于测量亲和力的一种优选方式是如实施例中所描述通过表面激元共振测定法来测量 K_D' 。

用于测量亲和力的另一种方式是通过动力学（即非平衡）分析，它的方法在本领域是知道的。优选的是，测量抗体由表位解离的速率（即解离速率）。

治疗形式

为了本发明的目的，所用治疗方法必需使用包含非免疫原性效价平台分子和可结合来自个体的抗dsDNA抗体的至少两个（即两个或多个）dsDNA表位（优选多核苷酸）的缀合物。优选的是，多核苷酸是双链DNA，优选序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'。在有些实施方案中，多核苷酸包含该序列（ $(GT)_{10}$ ），或基本上由该序列组成。

对于治疗方法，以足以实现降低抗体亲和力的量，优选以足以实现减少与狼疮（尤其是狼疮肾炎）有关的一种或多种症状的量施用缀合物。对于LJP394，通常施用缀合物至少大约50mg、优选至少大约100mg，一周一次，尽管如上所述剂量可以随来自个体的抗体的亲和力而变化。

dsDNA表位

用于本发明缀合物的双链DNA（dsDNA）表位可以是可特异性结合dsDNA抗体的任何化学部分。具体而言，感兴趣的表位包括那些可结合系统性红斑狼疮中存在的抗多核苷酸（特别是抗双链DNA）抗体的表位。通常而非必需的是，所用dsDNA表位是多核苷酸，优选DNA（包括DNA类似物）。

合适表位的范例包括但不限于那些可结合狼疮抗DNA抗体的表位（参阅美国专利号5,162,515、5,391,785、5,276,013、5,786,512、5,726,329、5,552,391、5,268,454、5,633,395、5,606,047）。

可以使用本领域知道的和本文描述的技术来鉴定和/或确认具体表位用于结合本发明抗体的适用性。例如，为了由模拟用于SLE的dsDNA表位的小型药物分子文库选择最佳表位，可以构建一组平台，将每种候选物各个展示在相似平台分子上。然后测试组合物的功效。例如，对于体内用途，使用具有非期望类型的循环抗体的动物模型，例如BXSB小鼠模型系统。如果需要，可以用适当表位免疫动物以引发抗体应答。然后依照预期目的通过施用或通过离体用法将装配在平台上的待测候选物用于治疗单个动物。在治疗之前和之后由动物采血，并通过适用于特异抗体的标准免疫测定法测定血浆中的抗体水平。然后依照设计用于指示特异于测试中的表位的抗体亲和力的抗体亲和力测定法来评估候选物的功效。本文描述了适当的亲和力测定法。

可以使用包含目的抗体的抗血清（例如SLE抗血清），通过实施例中描述的和本领域知道的测定法来筛选多核苷酸的结合活性。这些测定法的范例包括竞争性亲和力测定法，例如竞争性Farr测定法和/或竞争性ELISA测定法，和/或非竞争性平衡亲和力测定法，诸如本文描述的基于表面激元共振（例如使用BIAcore®）的测定法。

例示性测定法是可以 IC_{50} （导致最大抑制半数的多核苷酸浓度，单位是摩尔核苷酸）表述结合活性的竞争性Farr测定法。认为， IC_{50} 低于大约500nM、优选低于50nM的多核苷酸双链体具有显著的结合活性，因此可用于生成本发明的缀合物。

另一种适当的测定法是本文描述的测定效价加权亲和力的非竞争性平衡亲和力测定法。

可以理解，为了本发明的目的，在缀合物制备中可以使用超过一种类型的dsDNA表位。或者，可以使用一种类型（即一种化学种类）的dsDNA表位。如使用多核苷酸（诸如dsDNA），则长度通常超过大约10碱基对（bp），更优选超过大约15bp，更优选超过或等于大约20bp。

通常而非必需的是，长度低于大约1kb，优选低于大约500bp，优选低于大约100bp。

效价平台分子

在本发明的缀合物中可以使用多种非免疫原性效价平台分子（也称为“平台”）中的任何一种。许多在本领域已有描述，诸如聚合物，本文就不需要描述了。优选的是，缀合物包含化学确定的效价平台分子，它提供精确的效价（而非平均值）。因此，确定的效价平台是具有确定的结构，因而附着点的数目确定且效价确定的平台。某些种类的化学确定的效价平台、制备它们的方法、包含它们的缀合物、和制备这些适用于本发明的缀合物的方法包括但不限于美国专利号5,162,515、5,391,785、5,276,013、5,786,512、5,726,329、5,268,454、5,552,391、5,606,047、和5,663,395中和在共同拥有的美国流水号60/111,641（美国流水号09/457,607和PCT申请号PCT/US99/29339）和60/138,260（美国流水号09/590,592和PCT申请号PCT/US00/15968）中所述（收入本文作为参考）。

平台可以是蛋白质性质的或非蛋白质性质的（即有机的）。蛋白质性质的平台的范例包括但不限于清蛋白、 γ -球蛋白、免疫球蛋白（IgG）、和卵清蛋白。Borel等人，*Immunol. Methods*, 126: 159-168, 1990; Dumas等人，*Arch. Dermatol. Res.*, 287: 123-128, 1995; Borel等人，*Int. Arch. Allergy Immunol.*, 107: 264-267, 1995; Borel等人，*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 778: 80-87, 1996.

可以由添加到平台分子上的分支基团的数目预先确定本发明的化学确定的效价平台分子的效价。合适的分支基团通常衍生自二氨基酸、三胺、和氨基二酸。

优选的效价平台分子在生物学上是稳定的，即它们通常展示几小时至几天至几月的体内排泄半寿期以赋予治疗功效，而且优选组成确定的合成单链组成。它们通常具有大约200至大约200,000、优选大约200至大约50,000（或更少，诸如30,000）的分子量范围。本发明的效

价平台分子的范例是聚合物（或包含聚合物）诸如聚乙二醇（PEG）、聚D-赖氨酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、D-谷氨酸和D-赖氨酸（比率3:2）。优选聚合物基于分子量大约200至大约8,000的聚乙二醇（PEG）。用于本发明缀合物的其它合适平台分子是清蛋白和IgG。

适用于本发明的优选效价平台分子是共有的美国专利号5,552,391（收入本文作为参考）中公开的化学确定的、非聚合效价平台分子。适用于本发明的特别优选的均一的化学确定效价平台分子是衍生后的2,2'-亚乙二氧基二乙胺（EDDA）和三乙二醇（TEG）。下文描述了用于LJP394的AHAB-TEG平台。

用于dsDNA表位的优选平台是四溴乙酰化合物，和其它四价的和八价的效价平台分子，诸如Jones等人，*J. Med. Chem.*, 38: 2138 - 2144, 1995；和上文提供的美国专利参考文献中所述。

其它合适效价平台分子包括但不限于四氨基苯、七氨基- β -环式糊精、四氨基季戊四醇、1,4,8,11-四氮杂环十四烷（Cyclam）、和1,4,7,10-四氮杂环十二烷（Cyclen）。

一般而言，这些平台是通过标准化学合成技术来生成的。PEG必需是衍生后的并制成多价的，这是使用标准技术实现的。适用于缀合物合成的有些物质，诸如PEG、清蛋白、和IgG可以由商业途径获得。

为了本发明的目的，效价平台分子的最小效价至少是2，优选至少是4，优选至少是6，更优选至少是8，优选至少是10，优选至少是12。作为上限，效价通常低于128，优选低于64，优选低于35，优选低于30，优选低于25，优选低于24，优选低于20，当然上限也可以超过128。对于缀合物的效价范围，下限可以是下列任意数目：2、4、6、8、10、12、16，而上限可以是下列任意数目：128、64、35、30、25、24、20。

在优选实施方案中，效价平台分子包含氨基甲酸酯键，即 $-O-C(=O)-N<$ 。这些平台被描述于题目为《Valency Platform Molecular Comprising Carbamate Linkages》（包含氨基甲酸酯键的效价平台分子）的共有专利申请美国流水号60/111,641（美国流水号09/457,607和PCT申请号PCT/US99/29339）（收入本文作为参考）。

在其它实施方案中，可以使用在缀合后提供平均效价的效价平台（即这些平台就效价而言在化学上不是精确确定的）。这些平台的范例是聚合物诸如线性PEG、分支PEG、星形PEG、聚氨基酸、聚赖氨酸、蛋白质、氨基功能化的可溶性聚合物。

dsDNA表位与效价平台分子的缀合

可以以任意多种方法实现生物学或合成分子与化学确定的平台分子的缀合，通常包括一种或多种交联剂和生物学或合成分子和效价平台分子上的功能基团。可用于缀合的标准化学方法的范例包括但不限于：1) 硫醇取代；2) 硫醇Michael加成；3) 氨基烷化；4) 二硫键形成。

与效价平台分子偶联的合成多核苷酸双链体包含至少大约20bp，优选20-50bp。本文所述多核苷酸是脱氧核糖核苷酸，除非另有说明，而且是5'至3'取向。优选的双链体在长度上基本均一；即群体中的长度变化通常不超过平均双链体长度（单位：碱基对）的大约 $\pm 20\%$ ，优选 $\pm 10\%$ 。同样优选的是，它们在核苷酸组成上基本均一；即双链体之间的碱基组成和序列变化不超过大约10%。更优选的是，双链体之间的核苷酸组成完全均一。

根据圆二色性(CD)光谱的解释，可用于本发明的双链体采取B-DNA型螺旋结构。可以理解，我们并不想将本发明限于这种看法，根据更多的结论性分析，双链体可以采取Z-DNA和/或A-DNA型螺旋结构。

可以由天然DNA合成这些多核苷酸双链体，或者通过化学或重组技术进行合成。可以消化（如酶促、化学、和/或机械剪切）并分离（如通过琼脂糖凝胶或Sephadex™柱）长度较长的天然或重组生产的dsDNA，以获得期望长度的多核苷酸。

或者，可以使用商品化DNA合成仪容易的制备长度可长达大约70个碱基的互补单链多核苷酸链对，然后通过常规流程退火而形成双链体。可以通过化学生成的较短链的酶促延伸（5'-磷酸化及随后的连接）来获得较长的合成dsDNA。

还可以通过分子克隆来获得多核苷酸。例如，如上合成期望长度和序列的多核苷酸。这些多核苷酸可能设计具有用于连接特定限制性位点的适当末端。可以将这些寡聚物的多个重复前后连接，以提供多拷贝复制。将产生的构建物插入标准克隆载体，并通过转化将载体导入合适微生物/细胞。通过标准标记鉴定转化体，并在有利于DNA复制的条件下进行培养。通过限制酶处理和常规大小分离（如琼脂糖凝胶和Sephadex™柱），将多核苷酸与细胞/微生物的其它DNA分开。

或者，可以通过聚合酶链式反应(PCR)技术来复制多核苷酸。Saiki等人, *Science*, 230: 1350-1354, 1985; Saiki等人, *Science*, 239: 487-491, 1988; Sambrook等人, 第14.1-14.35页, 1989。

以保留抗体结合活性的方式，将多核苷酸缀合到化学确定的效价平台分子上。这是通过例如经多核苷酸链上预先确定的位点将多核苷酸缀合到效价平台分子上，使得多核苷酸形成至少大约20bp（由链的缀合位点至游离（未附着）末端测得）的悬垂链而进行的。

在一个实施方案中，多核苷酸双链体在长度上基本均一，而且双链体的一条链直接或经接头分子缀合效价平台分子。可以在缀合效价平台分子之前，将合成多核苷酸偶联接头分子。通常，双链体中含接头的链在它的一个末端处或附近（即大约5bp以内）进行偶联，使得每条链形成至少大约20bp（由链的附着位点至接头序列分子测得）的悬垂链。然后将第二条链与第一条链退火以形成双链体。因而，本发明的缀合物通常可以用下面的通式来描述：

$[(PN)_n\text{-接头}]_m\text{-效价平台分子}$

其中 PN = 含 “n” 个核苷酸的双链多核苷酸，其中 n = 至少大约 20，且 m = 2-8。

在一个实施方案中，缀合物中的多核苷酸在它们的一个末端处或附近偶联接头分子。然后将接头分子偶联化学确定的效价平台分子。如美国专利号5,552,391（收入本文作为参考）中所述，本发明的合适接头分子的范例是6碳硫醇诸如HAD（硫代6碳链磷酸酯）和HADpS（硫代6碳链硫代磷酸酯）。本发明的化学确定的效价平台分子是例如通过

将氨基修饰的PEG与3,5-二-(碘乙酰胺)苯甲酰氯(下文称为“IA-DABA”)、3-羧基丙酰胺-N,N-二-[(6'-N'-苯甲氧甲酰基氨基己基)乙酰胺]4"-硝基苯酯(下文称为“BAHA”)、3-羧基丙酰胺-N,N-二-[(8'-N'-苯甲氧甲酰基氨基-3',6'-二噁辛基)乙酰胺]4"-硝基苯酯(下文称为“BAHAox”)发生反应;或者将PEG-二-氯甲酸酯与N,N-二(2-[6'-N'-苯甲氧甲酰基氨基己酰胺]乙基)胺(下文称为“AHAB”)发生反应而形成的。

例如,可以如下将确定的双链多核苷酸(PN)缀合效价平台分子:首先提供由大约20个交替胞嘧啶(C)与腺嘌呤(A)核苷酸组成的单链。然后通过接头诸如HAD将四个CA链共价缀合到衍生后的平台分子诸如三甘醇上的四个反应性位点。合成包含基团诸如溴乙酰基的基团的效价平台分子。在缀合过程中,离去基团被硫取代。然后将由大约20个交替胸腺嘧啶(C)与鸟嘌呤(A)核苷酸组成的第二条单链核苷酸与CA链退火以形成通式为 $[(PN)_{20}\text{-接头}]_4$ -效价平台分子的双链PN缀合物。

或者,在另一个实施方案中,可以在多核苷酸的3'末端经多核苷酸一条链上的氧化后的3'末端核糖与衍生后的平台分子上的游离氨基缩合形成的吗啉桥接将多核苷酸偶联衍生后的效价平台分子,然后将加合物转入还原条件以形成吗啉键,如美国专利号5,553,391中所述。这些偶联要求衍生后的平台分子所具有的氨基数目至少与平台分子将要结合的多核苷酸双链体的数目相等。这种缀合物的合成是通过两个步骤完成的。第一步是通过缩合/还原反应将多核苷酸双链体的一条链偶联衍生后的平台分子。通过高碘酸处理,将3'末端核糖基团转变成氧化后的核糖基团,从而在单链多核苷酸上形成氧化后的3'末端核糖。然后将单链多核苷酸缓缓加到衍生后的平台分子水溶液(pH大约6.0-8.0, 2-8℃)中。

在所有缀合策略中,多核苷酸与平台分子的摩尔比范围常常是大约2:1至大约30:1,经常是大约2:1至大约8:1,优选大约4:1至6:1。在这点上,优选的是,不像分子量大于200,000的大分子(特别是具有重

复单位的大分子)那样具有过大分子量的缀合物可能是不依赖T的免疫原。参阅Dintzis等人, J. Immunol., 131: 2196, 1983; 和Dintzis等人, J. Immunol., 143: 1239, 1989。在缩合反应之中或之后(反应时间通常是24-48小时), 加入强还原剂诸如氰基硼氢化钠以形成吗啉代基团。然后向缀合物中加入双链体的互补链, 将混合物加热并缓慢冷却以引起链间退火。可以通过凝胶渗透层析法来纯化缀合物。

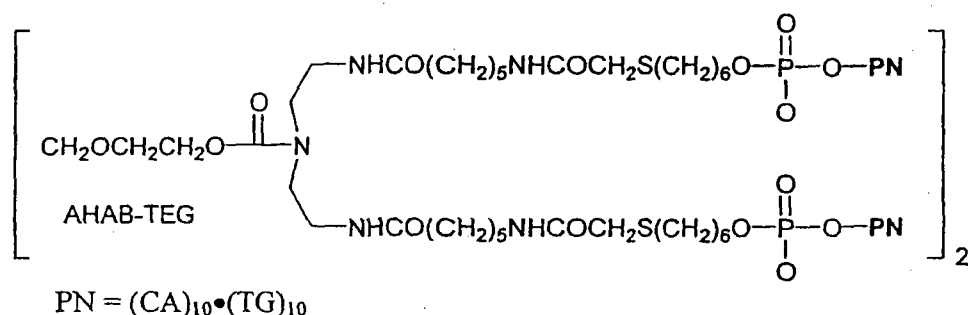
核糖策略的另一方法是在多核苷酸上形成醛功能性并使用这些功能性通过其上的反应性功能基团将多核苷酸偶联平台分子。可以利用基于如下事实的优势: 附着于多核苷酸3'或5'末端的gem邻近二醇可以被高碘酸钠氧化而生成醛, 该醛能够与平台分子的功能性氨基缩合。当二醇位于环形系统(如五元环)中时, 产生的缩合产物是含氮杂环(如六元吗啉代或哌啶子环)。亚氨基缩合产物通过用合适还原剂(如硼氢化钠或氰基硼氢化钠)还原得到稳定。当二醇不是环形时, 产生的氧化产物只包含一个醛基, 而且缩合产物是仲胺。

另一种流程包括通过适当的核苷酸化学法(如亚磷酰胺化学法)将烷基氨基或烷基巯基部分导入多核苷酸的3'或5'末端。然后可以使用亲核基团与大大过量的同型双功能交联剂在烷基氨基衍生物的情况中, 如dimethyl suberimidate)或过量的异型双功能交联剂(在烷基巯基衍生物的情况中, 如间-马来酰亚胺苯甲酸琥珀酰亚胺酯(MBS)或(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(SIAB))反应。一旦除去过量的交联剂, 多核苷酸衍生物与平台分子上的氨基发生反应。或者, 羟基可以与平台上的亲电子中心(诸如马来酰亚胺或 α -卤乙酰基或其它适当Michael受体)发生反应。

还有一种策略采用修饰后的核苷。可以通过标准DNA合成化学法在多核苷酸中的期望位置(优选5'或3'末端)掺入合适脱氧核苷衍生物。然后这些核苷衍生物可以特异且直接与平台分子上的烷基氨基发生反应。或者, 可以通过采用合适核苷衍生物作为待附着链的3'末端来防止上文所述二醛化学法中看到的副反应(诸如胺催化的 β -消除)。它的范例是核糖的5'亚甲基延伸, 即5'(2-羟乙基)基团取代5'-羟甲基基

团。另一种方式是使用磷酸酯键或亚磷酸酯键作为待附着平台分子的多核苷酸3'末端二核苷酸。

Jones等人(1995)和美国专利号5,552,391(收入本文作为参考)描述了缀合物LJP394(一种四价缀合物)的合成。LJP394包含四个由交替C和A核苷酸即(CA)₁₀组成的20聚体寡核苷酸,它们附着在平台上,并与由交替G和T核苷酸即(GT)₁₀组成的互补20聚体寡核苷酸退火。下文显示了在LJP394中使用的效价平台分子。



缀合物的施用

表位呈递缀合物的多种配方可用于施用。在有些实施方案中,可以单纯施用表位呈递缀合物。在有些实施方案中,组合物包含缀合物和制药学可接受赋形剂,而且可以是多种配方。制药学可接受赋形剂在本领域是知道的,而且是便于施用制药学有效物质的相对惰性的物质。例如,赋形剂能够给予形状或坚固,或者担当稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿和乳化剂、用于改变渗透压的盐类、包囊剂、缓冲液、和皮肤渗透增强剂。《Remington's Pharmaceutical Sciences》(雷明顿药物科学)第19版(Mack Publishing, 1995)列出了用于胃肠外和非胃肠外药物投递的赋形剂以及配方。

一般而言,这些组合物配制用于通过注射(如腹膜内、静脉内、皮下、肌肉内等)进行的施用。因此,这些组合物优选联合制药学可接受载体,诸如盐类、Ringer氏液、右旋糖溶液、等等。一般而言,出于实践、经验的考虑(诸如溶解度和渗透压),缀合物通常占到配方质量的大约0.01% - 10%。具体的给药方案(即剂量、给药时间、和重复频率)将取决于具体的个体和个体的病史。一般而言,剂量是

大约 $1\mu\text{g}$ - 大约 100mg 缀合物/ kg 体重的剂量, 优选大约 $100\mu\text{g}$ - 大约 10mg 缀合物/ kg 体重的剂量, 优选大约 $150\mu\text{g}$ - 大约 5mg 缀合物/ kg 体重的剂量, 优选大约 $250\mu\text{g}$ - 大约 1mg 缀合物/ kg 体重。出于经验的考虑(诸如半寿期)通常将有助于确定剂量。本文还描述了其它剂量, 诸如大约 $50 - 100\text{mg}/\text{周}$ 。若作为耐受原使用, 可以例如每天施用缀合物, 以实现抗体清除(除去成份), 随后是频率较低的施用, 诸如每周两次, 每周一次, 或甚至更低的频率。可以随治疗进程并基于维持耐受(即降低或缺乏针对dsDNA的免疫应答)来确定并调整施用频率。根据个体或疾病状况, 其它适当给药方案可以频繁得像每日持续输液、或每周3剂、或每周1剂、或每2-4周1剂、或每月1剂、或更低频率的方案。为了实现和/或维持体液无变应性的状态, 可能需要重复施用(通常根据B细胞转换速率来计时)。这些重复施用通常包括每30-60天进行大约 $1\mu\text{g}$ - 大约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更高的治疗, 或者更短时间(若检测到抗dsDNA抗体水平升高)。或者, 组合物的缓释配方可能是适当的。本领域知道用于实现缓释的多种配方和装置。

其它配方包括适用于口服施用的配方, 若缀合物能够穿过粘膜, 则这些配方是合适的。相似的, 气雾剂配方可能是合适的。

其它配方包括本领域知道的合适投递形式, 包括但不限于载体诸如脂质体。Mahato等人, *Pharm. Res.*, 14: 853-859, 1997。脂质体制剂包括但不限于细胞转染剂、多层小泡、和单层小泡。

在有些实施方案中, 组合物中可能存在超过一种缀合物。这些组合物可以包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的缀合物。这些“鸡尾酒”(正如它们在本领域的常用称谓), 可能在治疗广泛的个体群中特别有用。它们还可能比只使用一种(或少于鸡尾酒中所含种类)缀合物更有效。

组合物可以单独施用, 或者联合有助于增强和/或补充本发明缀合物功效的其它形式试剂, 包括但不限于抗辅助T细胞治疗。这些治疗通常采用遏制T细胞的试剂, 诸如类固醇或环孢菌素。另一种试剂是皮质类固醇和/或环磷酰胺免疫遏制疗法。

功效指示物的检测和测量通常基于抗双链DNA抗体的测量和/或与SLE有关的临床症状，这在本领域是知道的。

狼疮肾炎（肾小球肾炎或肾发炎）的特征是进行性丧失肾功能，在肾衰竭时达到顶点。狼疮肾炎的特征是血尿、尿量减小、血液尿素氮水平升高、血清肌酸酐水平升高、高血压、和蛋白尿。因此，可以监控这些参数作为监控肾退化的手段。

本发明的组合物

包含可结合抗dsDNA抗体的表位的试剂盒

本发明还提供了用于测量本文所述方法中使用的抗体亲和力的试剂盒，特别是可结合抗dsDNA抗体的表位的亲和力。因此，本发明包括包含一种或多种dsDNA表位的试剂盒，优选包含可结合来自个体的抗dsDNA抗体的表位的多核苷酸（优选双链(ds)DNA分子）（含表位的多核苷酸可结合来自个体的抗dsDNA抗体）。因此，试剂盒包括包含dsDNA表位（诸如本文所述任何表位）的分子或部分。在一个实施方案中，试剂盒包含具有（包含）序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'（或者基本上由该序列组成或由该序列组成）的多核苷酸。包含多核苷酸或任何其它合适dsDNA表位的试剂盒还可以包含使用该多核苷酸来检测个体的抗dsDNA抗体对于多核苷酸（或dsDNA表位）的亲和力的说明书。在其它实施方案中，试剂盒包含本文所述缀合物，和使用缀合物来检测个体的抗dsDNA抗体对于缀合物的亲和力的说明书。优选的是，缀合物是LJP394。

试剂盒可用于例如测试个体以确定个体是否适合于使用缀合物治疗，以及用于监控目的。试剂盒还可用于测定亲和力临界值（即与临床效果有关的亲和力数值）。本发明的试剂盒处于合适包装中，而且可以任选提供额外成份，诸如用于测定对于抗dsDNA抗体的亲和力或结合的缓冲液和说明书，诸如捕获剂、显影剂、标记物、反应表面、检测手段、对照样品、和说明性信息。说明书可能是关于抗体亲和力的测量，包括但不限于本文所述测定法。因此，在有些实施方案中，说

说明书是关于使用表面激元共振来测定亲和力。在其它实施方案中，说明书是关于使用直接结合测定法和/或Farr测定法来测定亲和力。在有些实施方案中，提供上文所述试剂，从而能够进行多种测量，诸如能够随时间测量相同个体或者测量多个个体。

一般而言，试剂盒中的dsDNA表位，优选试剂盒中的多核苷酸（或是游离形式，或是附着于缀合物或其它基质）包含将要或正在用于治疗的表位，或由该表位组成；或者已经证明对于个体的抗dsDNA抗体具有与将要用于治疗的表位大致相同的亲和力。在其它实施方案中，试剂盒所包含的dsDNA表位对于抗dsDNA抗体的亲和力模拟将要用于治疗的dsDNA表位（诸如5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'）的亲和力或者与之相关。在评估本文所述方法的抗体亲和力时，这些dsDNA表位可用作将要用于治疗的dsDNA表位（诸如LJP394）的“代理”。

可以采用（并在试剂盒中提供）用于检测抗体结合的任何适当手段，诸如经标记抗人抗体（当测试是否存在人抗dsDNA抗体时），其中标记物可以是酶、荧光团、化学发光材料、放射性同位素、或辅酶。一般而言，所用标记物将是酶。因此，在有些实施方案中，本发明的试剂盒还包含标记物。在有些实施方案中，试剂盒中的多核苷酸缀合了生物素。在一个优选的实施方案中，dsDNA表位（诸如多核苷酸，例如双链DNA）是生物素化的。还可以使用商品化试剂来实现生物素化（即Pharmacia, Uppsala, 瑞典）。在另一个优选的实施方案中，生物素化的dsDNA表位包含5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'、基本上由该序列组成、或由该序列组成。

在其它实施方案中，本发明提供了包含（a）本文所述缀合物，诸如LJP394；和（b）缀合物中所用多核苷酸（或其它dsDNA表位）或者包含缀合物中所用多核苷酸的多核苷酸（或包含缀合物中所用表位的分子或部分）的试剂盒。在用于亲和力测量时，缀合物和/或多核苷酸可以生物素化。在有些实施方案中，试剂盒包含对个体施用缀合物的说明书，以及使用缀合物和/或多核苷酸（包括包含缀合物中所用多核苷酸的多核苷酸）来检测个体中结合本文所述dsDNA的抗体的亲和力的

说明书。如本文讨论的，试剂盒中使用了将要用于治疗的多聚体与包含dsDNA表位的分子的联合，所述dsDNA表位的结合活性或亲和力模拟多聚体的表位或与之相关。

在其它实施方案中，本发明提供了包含类似物的试剂盒，所述类似物可结合由抗体介导的病理学中所涉及的抗体。在有些实施方案中，本发明提供了包括含表位的分子的试剂盒，所述表位可结合由抗体介导的病理学中涉及的抗体。同样可用于进行亲和力测定的这些试剂盒处于合适包装中，而且任选包括使用试剂盒中的类似物或分子来测定由抗体介导的病理学中涉及的抗体对于该类似物或含表位分子的亲和力的说明书。W096/40197和W097/46251中公开了可结合抗磷脂综合症（APS）和狼疮中涉及的抗体的肽类似物。共同拥有的美国流水号09/328,199（PCT/US99/13194）中公开了可结合由抗体介导的病理学中涉及的对 β_2 GPI结构域1具有特异性的抗体的多肽。其它类似物和含表位分子在本领域是知道的。在另一个实施方案中，试剂盒包含D-吡喃半乳糖苷或展示可特异结合抗 α Gal（半乳糖 α 1,3半乳糖基）抗体的分子和用于测定抗体亲和力的说明书和/或试剂。

实施例

为了例示而非限制本发明而提供下列实施例。

实施例1: LJP 394对抗dsDNA抗体与DNA的结合的抑制

在使用Farr测定法确定了患者中抗dsDNA抗体的存在之后，使用竞争性Farr测定法来测量在来自SLE患者的血清中发现的抗dsDNA抗体对于LJP394的亲和力。另外，使用该测定法来测量在来自三种SLE动物模型（BXSB小鼠、NZB x NZW F1小鼠、和MRL/lpr小鼠）的血清中发现的抗dsDNA抗体的亲和力。

Farr测定法使用 125 I-标记的重组dsDNA（Diagnostic Products Corporation，洛杉矶，加利福尼亚），它结合在来自SLE患者或SLE小鼠模型的血清中发现的抗dsDNA抗体。由通过志愿供体计划汇集的

SLE供体的血清样品获得抗dsDNA抗体。采集血液样品，收获血清，分装，标记，并冻存于-70℃直至使用。在这种测定法中，向75 μl Tris缓冲液（50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、10% 正常兔血清）中加入25 μl患者血清，然后加入100 μl ¹²⁵I-标记的重组dsDNA，混匀，并于37℃保温1小时。在同一时间制备包含已知量的抗dsDNA抗体的相似样品（校准物）并保温。向每管中加入500 μl 70% 饱和硫酸铵，混匀，然后以800xg离心15分钟以沉淀溶液中的抗体。倒掉上清液，并通过在γ计数器中进行放射性计数来测定沉淀产物中放射性的量。沉淀中的放射性的量与结合¹²⁵I-标记的重组dsDNA的抗dsDNA抗体的量成比例。含已知量的抗dsDNA抗体的校准物用于绘制标准曲线，由此能够计算由抗dsDNA抗体结合的dsDNA的量。

使用上文所述Farr测定法对来自58名患者的血清样品测定了针对dsDNA的抗体的存在情况。这些样品中的42份具有足够抗体水平（≥20% 结合），可以用于LJP394抑制测定法。

通过竞争性Farr测定法，对LJP394测试它抑制抗dsDNA抗体结合¹²⁵I-标记的重组dsDNA的能力。抑制测定法中还使用了小牛胸腺DNA（ctDNA）作为另一种dsDNA来源。小牛胸腺dsDNA是如下制备的：将小牛胸腺DNA溶于核酸酶S1缓冲液（0.2M NaCl、50mM 醋酸钠 pH4.5、1mM ZnSO₄、0.5% 甘油）和100,000U S1核酸酶，并于37℃保温1小时。通过加入等体积的酚-氯仿、混匀、离心、和回收水层，由该混合液抽提dsDNA。然后通过加入2倍体积的EtOH、混匀、和离心，沉淀dsDNA。回收沉淀，真空干燥，并溶于水至大约10mg/ml。通过分光光度法测定ctDNA制剂的终浓度，260nm的消光系数采用33 μg/10D单位。

在抑制测定法中测试产生≥20% 结合的每份血清样品。简而言之，向75 μl 含多种浓度抑制物（小牛胸腺dsDNA或LJP394）的Tris缓冲液（50mM Tris pH7.0、150mM NaCl、10% 正常兔血清）中加入25 μl患者血清，然后加入100 μl ¹²⁵I-标记的重组dsDNA，混匀，并于37℃保温1小时。向每管中加入500 μl 70% 饱和硫酸铵，混匀，然后以800xg离心15分钟。倒掉上清液，并通过在γ计数器中进行放射性计数

来测定沉淀产物中放射性的量。通过下面的公式计算抑制程度： $\{[(\text{有患者血清、无抑制物下的cpm} - \text{无患者血清、无抑制物下的cpm}) - (\text{有患者血清、有抑制物下的cpm} - \text{无患者血清、无抑制物下的cpm})] \div (\text{有患者血清、无抑制物下的cpm} - \text{无患者血清、无抑制物下的cpm})\} \times 100$ 。

图1A-C图解了LJP394抑制来自代表性SLE患者群的自身抗体的结合的能力。总之，在所有42名SLE患者中，LJP394能够抑制自身抗体结合dsDNA。LJP394和小牛胸腺dsDNA的抑制曲线是平行的，说明由SLE血清识别的抗原决定簇在小牛胸腺dsDNA和LJP394上是同一的。

还测试了LJP394在SLE小鼠模型中抑制抗DNA抗体的结合的能力。如上所述使用小牛胸腺dsDNA和LJP394进行了竞争性抑制测定法，结果显示于表1。与小鼠抗体相比，人抗dsDNA抗体（来自SLE血清）的50%抑制比率（ $IC_{50} \text{ LJP394} / IC_{50} \text{ ctDNA}$ ）是最低的。LJP394显示针对人抗体和NZB x NZW F1小鼠品系具有高亲和力。

表 1: ctDNA 和 LJP394 对抗 dsDNA 抗体的结合的竞争性抑制				
血清 编号	IC ₅₀ , μg/ml (平均值 ±SD)			IC ₅₀ LJP394/ctDNA 比率
	血清来源	ctDNA	LJP394	
3	MRL (lpr/lpr) (小鼠)	0.356 ±0.455	200 ±42	562
3	NZBxNZW F1 (小鼠)	0.021 ±0.011	5.5 ±0.7	258
5	BXSB (小鼠)	0.028 ±0.000	215 ±144	7679
42	人 SLE	1.88 ±0.920	46 ±16	24

实施例2: 通过亲和力测定法来鉴定SLE患者

通过使用下文所述表面激元共振测定法测量来自SLE患者的血清对于LJP394 dsDNA表位的结合亲和力，容易鉴定出SLE患者。如本文所述，使用非竞争性直接亲和力测定法（BIAcore®；皮斯卡塔韦，新泽

西州)，对来自10份SLE患者血清样品和10份正常患者血清样品的IgG级分评估与LJP394 dsDNA表位的结合。图2图解了SLE样品都显示对于表位的可饱和结合，而正常样品显示对于LJP394表位的低结合和低特异性结合。

实施例3: 抗体对缀合物的效价加权平均亲和力和对缀合物治疗的应答的测定

开发了使用表面激元共振的测定法，直接测量来自SLE患者的抗体对于缀合物LJP394的效价加权平均亲和力。表面激元共振用于量化抗原与抗体的饱和比例。调整这种测定法使之适用于测量LJP394的IgG群体的平均亲和力。

材料和方法

试剂

链霉亲和素CM5芯片、HBS缓冲液(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% (v/v) 表面活性剂P20) 得自BIAcore AB (皮斯卡塔韦, 新泽西州)。

LJP394是由通过硫醇键共价附着于基于三甘醇的平台四个20聚体dsDNA表位组成的。DNA表位是由5'-(CA)₁₀-3'链与互补GT链退火而组成的，生物素附着于GT链的游离5'末端。生物素是使用Biodite biotin amidite (Pharmacia, 乌普萨拉, 瑞典) 在(GT)₁₀链的最后偶联中掺入的。基本上如Jones等人(1995)所述制备LJP394，但在退火步骤使用这种生物素修饰的(GT)₁₀链。在有些实验中，只有dsDNA表位用于链霉亲和素芯片上的固定化。表位是通过使5'-(CA)₁₀-3'与5'-生物素-(TG)₁₀-3'链退火并通过HPLC纯化dsDNA而制备的。

在第2次拜访(开始施用研究药物之前)和第11次拜访(每周施用一次药物4个月之后)时由SLE患者采集血浆样品。

由血浆分离总IgG级分: 依照制造商的推荐，将100 μl 血浆与100 μl IgG结合缓冲液(Pierce Chemical公司, 罗克福德, 伊利诺斯州)混合，并与Immunopure Plus®蛋白G琼脂糖珠(Pierce Chemical公司)

混匀。遵循Pierce Chemical公司的酸洗脱/中和方案，将IgG由珠上洗脱下来，并用100 μ l 1M NaPO₄ pH7.5中和300 μ l酸洗脱IgG。然后将这些纯化IgG样品用于滴定实验。使用Bradford测定法（Biorad, Hercules, 加利福尼亚）来测定总IgG浓度。

表面激元共振

所有实验都是使用BIACORE®2000型仪器于25℃、流速10 μ l/min进行的。将以50 μ g/ml溶于HBS+0.3M NaCl的LJP394溶液以5 μ l/min流过芯片达20分钟，从而将LJP394通过它的5'生物素基团附着于链霉亲和素CM5芯片上。在滴定前将芯片预处理，即使用再生缓冲液（1M NaCl、50mM NaOH）进行3x1min脉冲。在将LJP394的dsDNA表位用于固定化时，使用与用于生物素化LJP394相似的条件使生物素化的表位以10 μ g/ml的浓度流过芯片。

用在HBS中1:2系列稀释的纯化IgG进行dsDNA（LJP394）芯片的抗体滴定。注入样品达5分钟，这是有效接近应答平台的合适结合时间；随后是4分钟的解离期，使HBS流过芯片；然后是30秒钟的再生，使用1M NaCl、50mM NaOH进行。

分析

在为了考虑到体积应答/缓冲液影响而减去空流小室的背景曲线后，通过解离曲线与方程式1的非线性最小二乘法拟合，并使用制造商的软件（BiaEvaluation, 2.2版，乌普萨拉，瑞典）获得应答平台值（ R_{eq} ）。

$$R_t = R_{eq}(1 - e^{-k_s(t-t_0)}) + R_0 \quad (\text{方程式 1})$$

其中 R_t 指于时间 t 测量的应答， R_{eq} 指平衡平台应答， t 指时间， t_0 指起始时间， k_s 指表观结合常数（ $k_s = k_a C + k_{dis}$ ，其中 k_a 指结合常数， C 指分析物浓度， k_{dis} 指解离常数）， R_0 指应答偏移。将这些应答平台对总IgG浓度作图，并拟合方程式2以获得 R_{max} 和 K_d^* 的值。

$$R_{eq} = \frac{R_{max} A_T}{K_d^* + A_T} \quad (\text{方程式 2})$$

其中 A_T 指总抗体 (IgG) 浓度, $R_{\max}$ 指最大应答平台, K_d^* 指表观解离常数。 K_d^* 与方程式 3 (下文) 中的 $\langle K_d' \rangle$ 是相同的, 即效价加权平均 (TWA) 解离常数。如 Sem 等人 (1999) 所述进行 K_d' 的衍生, 并洞察 K_d^* 常数在方程式 2 中的物理学含义。这种分析适合于 n 种不同抗体亚群的多克隆集合的情况, 其中 $B = \text{LJP394}$ 且 $A_i =$ 抗体亚群 i 。

$$\langle K_d' \rangle = \frac{A_T}{\sum_{i=1}^n (A_i / K_i)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n (r_i / K_i)} \quad (\text{方程式 3})$$

其中 r_i (相对效价) 指形式 i 占总抗体的分数, 定义为 $r_i = A_i / K_i$ 。因而, 方程式 3 是描述为相对效价 (存在分数) r_i 和解离常数 K_i 的 n 种不同抗体亚群的多克隆群体观察到的解离常数的通用方程式。这种 $\langle K_d' \rangle$ 是方程式 2 的表观 K_d , 即 K_d^* 。

测量的表观解离常数 K_d' 反映抗体亚群 i 对于抗原的内在亲和力, 和抗体亚群 i 的相对效价 (r_i)。一般而言, $0 < r_i < 1$, 所以 $K_d' > K_i$ 。即能够引起 K_d' 降低的因素是亲和力的升高 (K_i 降低) 和/或抗体亚群 i 相对效价的升高 (r_i 升高)。在实践中, 在抗体的多克隆群体中, 将存在结合亲和力略有不同的许多种不同抗体亚群。

上述分析和 Sem 等人 (1999) 的进一步描述产生了反映多克隆集合中克隆相关抗体亚群的多种亲和力和效价的表观解离常数。如上所述获得的表观解离常数是在方程式 3 中衍生的效价加权平均 (TWA) 解离常数, 即 $\langle K_d' \rangle$ 。 $\langle K_d' \rangle$ 的值主要受具有最大 r_i (最高相对效价) 和最小 K_i (最高亲和力) 联合的抗体亚群的影响。依照方程式 3, 具有指定亲和力的亚群的相对效价的任何变化将改变表观解离常数。

结果

研究 1

使用基于表面激元共振的亲和力测定法, 对来自 SLE 患者的血浆 IgG 的 4 个稀释度评估平衡结合值, 以测定达到最大结合半数所需要的

IgG浓度。该数值，即表观平衡解离常数 (K_d' ，单位：mg/ml IgG)，反映IgG群体对于LJP394的效价加权平均亲和力，正如上文和Sem等人（1999）所述。

表2包含来自首次患者中最初IgG对于LJP394的亲和力（第2次拜访）与每周一次使用研究药物4个月后的亲和力（第11次拜访）的 K_d' 比较。来自第一个患者群的数据指示参加试验且具有针对LJP394的高亲和力（低数值的 K_d' = 高亲和力）抗体的患者更有可能响应药物治疗（较高数值的 K_d' = TWA降低）。

表 2: K_d' 值的比较			
患者编号	第 2 次拜访时的 K_d' (mg/ml)	第 11 次拜访时的 K_d' (mg/ml)	% K_d' 变化
02-19	0.05	0.32	540
08-76	0.15	0.34	127
04-37	0.41	0.77	87
02-13	0.51	0.88	73

表2的数据说明，最初IgG亲和力 (K_d') 可能预示患者对LJP394的响应。当如实施例1中所述使用（非竞争性）Farr测定法测量相同样品的IgG亲和力时，最初Farr值不预示患者应答，如表3所述。

表 3: Farr 值的比较			
患者编号	第 2 次拜访时的 Farr (IU/ml)	第 11 次拜访时的 Farr (IU/ml)	% Farr 变化
02-19	35	14	-60
08-76	60	27	-55
04-37	23	18	-22
02-13	75	72	-4

图3A描述了用LJP394治疗的SLE患者中抗dsDNA抗体承受量 (K_d') 的剂量依赖型下降。图3B以柱形图的形式描述了相同数据。这些结果证明，50mg/wk LJP394的剂量依赖型效应提供了比10mg/wk更好的应答，而且两组都与安慰剂不同。

研究2

对于研究的第二个SLE患者群，在第2或3次拜访（开始施用研究药物前）时采集第一份血浆样品，并在以100mg/wk使用研究药物4个月后立即（第18或19次拜访）采集第二份样品。然后将这两份样品用于确定首次患者的最初亲和力和施用研究药物4个月后的亲和力。样品的采集没有已知偏爱，只是它们包括采样时可获得的所有患者。结果显示于表4（可获得样品的数目指可获得用于分析的样品数目；红肿总数目只代表归咎于狼疮的红肿）。表5包括所有表4的样品，还有更多患者样品。

表 4: 用于研究 2 的样品		
	可获得的样品数目 /总患者数目	表现的红肿数目 /总红肿数目
LJP394	71/114	16/19
安慰剂	70/115	16/23

表 5: 用于研究 2 的样品		
	可获得的样品数目 /总患者数目	表现的红肿数目 /总红肿数目
LJP394	104/114	18/19
安慰剂	106/115	23/23

抗体亲和力的变化

药物治疗组和安慰剂组的结果显示于图4和图5。每个正方形代表来自一个患者的数据。图4A和4B反映了表4中概述的患者集合。图4C和4D反映了表5中概述的患者集合。图5A和5B展示了图4A和4B中的数据（关于 K_d' 百分比变化）。V3pre K_d' 代表正好在开始施用研究药物之前患者的 K_d' 。在图4A-D中，Y轴代表用药物或安慰剂治疗4个月后的 K_d' 值。在图5A和5B中，Y轴代表用药物或安慰剂治疗4个月后亲和力（ K_d' 值）的百分比变化。图6A和6B反映了与图5所示相似的数据分析，但是扩充了患者群，正如表5中概述的。

扩充患者群的数据概述于图7（每周100mg LJP394）。当来自图7的结果如图8所示分成高亲和力组（ $K_d' < 0.8\text{mg/ml}$ ）和低亲和力组（ $K_d' > 0.8\text{mg/ml}$ ）时，高亲和力组在4个月期间显示亲和力变化，而低亲和力组不显示任何显著的亲和力变化。

抗体亲和力变化还描述于图9。根据最初（治疗前）亲和力选择样品，并分成三组相对亲和力：高、中、和低亲和力。亲和力值是3名患者的平均值。实心三角代表“低亲和力”患者（ K_d' 平均大约1.13mg/ml）；实心圆代表“中亲和力”患者（ K_d' 平均大约0.44mg/ml）；而实心方形代表“高亲和力”患者（ K_d' 平均大约0.14mg/ml）。

这些数据证明，对于LJP394表位具有高亲和力的患者（低数值的 K_d' = 高亲和力）与最初抗体亲和力较低的患者相比在4个月后展示更大的药物应答。它们还说明，可以预先选择最有可能对LJP394具有阳性血清学应答的患者。

通过将患者分成两组，即低亲和力（ $K_d' > 0.8\text{mg/ml}$ ）和高亲和力（ $K_d' \leq 0.8\text{mg/ml}$ ）组，对通过非竞争性Farr测定法在用LJP394治疗的患者中评估的抗dsDNA抗体水平随时间的变化进行分析。图10描述了两组的比较。排除在高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺治疗后收集的数据。用虚线描述低亲和力组，用实线描述高亲和力组。灰色、阴影背景的区域显示服药阶段。由第一块灰色背景区指示的第一服药阶段是诱导期，给予患者每周100mg LJP394或安慰剂。白色、无阴影区域是不服药阶段，不施用LJP394或安慰剂。第二块灰色背景区指示第二服药阶段，给予患者每周50mg LJP394或安慰剂。如图10所示，在高亲和力组中，通过每周施用100mg和50mg LJP394降低了抗dsDNA抗体水平。在低亲和力组中，通过每周施用100mg LJP394使抗dsDNA抗体水平降低了一些，而每周施用50mg LJP394不引起降低。如图10所示，在高亲和力组中抗dsDNA抗体显著降低。

肾红肿

图11A与图5A相似，只是用暗盒鉴别展示SLE相关红肿的患者。图11B（用LJP394治疗的患者）与图11A相似，只是扩充了用于分析的患

者群。图11C显示了用安慰剂治疗的患者的亲和力百分比变化。实心形状（方形表示用LJP394治疗的患者，圆形表示用安慰剂治疗的患者）指示在治疗期间经历肾红肿的患者。在图11和图12中，低亲和力患者中肾红肿的群集是显然的。这些数据指示，根据血清学和临床测量，对于LJP394具有高亲和力的患者对药物的响应更好，经历的肾红肿更少。

如图13所示，在施用安慰剂4个月后，安慰剂治疗对 K_d' 似乎没有影响。虽然该图中数据点的数目是有限的，但是安慰剂治疗对 K_d' 没有影响是与第一项研究相同的。

图14描述了高亲和力个体（ K_d' 低于0.8mg/ml）的肾红肿分析。X轴是自第一次服用LJP394（或安慰剂）后的时间（以月计），Y轴是不经历肾红肿的个体的比例。在接受LJP394的高亲和力患者中，与接受安慰剂的高亲和力患者相比，较高比例不具有肾红肿。对于用安慰剂治疗的患者，发生了更多的红肿，而且这些红肿在试验的更早期发生。

实施例4：对皮质类固醇和/或环磷酰胺的依赖性

从第一次用高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺（HDCC）治疗进行干预的时间方面对研究2（见实施例3）中的高亲和力患者（ $K_d' < 0.8\text{mg/ml}$ ）进行分析。这种分析的结果描述于图15。实线表示用LJP394治疗的个体，虚线表示用安慰剂治疗的个体。X轴表示自第一剂LJP394（或安慰剂）后的时间（以月计），Y轴表示不接受HDCC干预的个体百分比。HDCC干预指单独或联合环磷酰胺使用加大剂量的皮质类固醇的第一次干预，其中加大剂量是至少15mg/天增量，并且使得皮质类固醇和/或环磷酰胺的总量超过20mg/天。可以使用标准临床方案来施用HDCC。临床医生可以通过评估某些因素（包括但不限于蛋白尿水平、血尿水平、和血清肌酸酐水平）来监控患者并确定何时需要HDCC治疗。一般而言，对经历肾红肿的患者给予HDCC治疗。与用LJP394治疗的高亲和力患者相比，在用安慰剂治疗的高亲和力患者中，需要更多的HDCC干预；而且在用安慰剂治疗的患者中，需要HDCC干预的时间更早。

实施例5: LJP 394的使用影响临床结果

对高亲和力组分析了临床效果的四个参数: 贯穿试验过程的肾红肿、诱导期过程中的肾红肿、HDCC干预、和主要SLE红肿, 结果显示于图16. 斜线柱表示用安慰剂治疗的高亲和力患者, 实心柱表示用LJP394治疗的高亲和力患者 ($K_d' < 0.8\text{mg/ml}$). HDCC干预指第一次发生的施用加大剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺, 正如本文定义的. 主要SLE红肿包括因SLE而住院、第一次发生的高剂量强的松、第一次发生的高剂量环磷酰胺、和/或因SLE而死亡. 诱导期 (在其过程中测量肾红肿) 指每周100mg LJP394 (或安慰剂) 治疗的前4个月. 在治疗期间, 在最初的诱导期之后, 间歇给药. 对于非诱导期, 剂量是每周50mg LJP 394 (或安慰剂), 某些时期没有治疗. 图16图解了高亲和力患者对LJP394治疗的应答显著好于用安慰剂治疗的患者, 而且高亲和力患者的临床效果显著的更好.

相反, 图17显示了所有患者群集合 (即 “意欲治疗的” 群体), 包括低和高亲和力患者. 用LJP394治疗的患者在临床效果中相对于用安慰剂治疗的患者显示一些改善; 然而, 这种 “混合的” LJP394治疗群的临床效果与高亲和力患者的结果 (如图16所示) 相比不显著. 因而, 高亲和力患者展示更为积极的临床效果 (即贯穿试验过程中肾红肿较少、诱导期过程中的肾红肿较少、需HDCC干预的时间较后、且主要SLE红肿较少).

尽管为了清楚理解的目的已经以一些细节通过图解和例示方式描述了上述发明, 对于本领域熟练技术人员是显然的, 可以进行某些变化和修改. 因此, 不应当将描述和实施例解释为限制由所附权利要求书描述的发明范围.

本发明还公开了以下内容:

1. 治疗个体的系统性红斑狼疮 (SLE) 的方法, 包括对个体施用包含下述的缀合物: (a) 非免疫原性效价平台分子, 和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个双链DNA (dsDNA) 表位; 其中所述dsDNA表位对于来自个体的抗体的亲和力被用作选择接受或继续接受治疗的个体的基础。

2. 项目1的方法, 其中dsDNA表位是多核苷酸。

3. 项目2的方法, 其中多核苷酸是双链DNA。

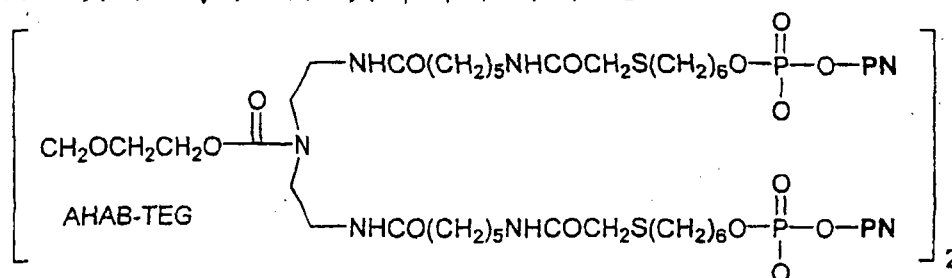
4. 治疗个体的SLE的方法, 包括对个体施用包含下述的缀合物: (a) 非免疫原性效价平台分子, 和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸, 所述多核苷酸基本上由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成; 其中在开始治疗之前或之时, 该多核苷酸对于来自个体的抗体的表观平衡解离常数 (K_D') 低于大约1.0mg IgG/ml, 而且其中所述 K_D' 值或其功能等同物被用作选择接受治疗的个体的基础。

5. 项目4的方法, 其中 K_D' 值低于大约0.8。

6. 项目4的方法, 其中 K_D' 值低于大约0.5。

7. 项目4的方法, 其中 K_D' 值低于大约0.2。

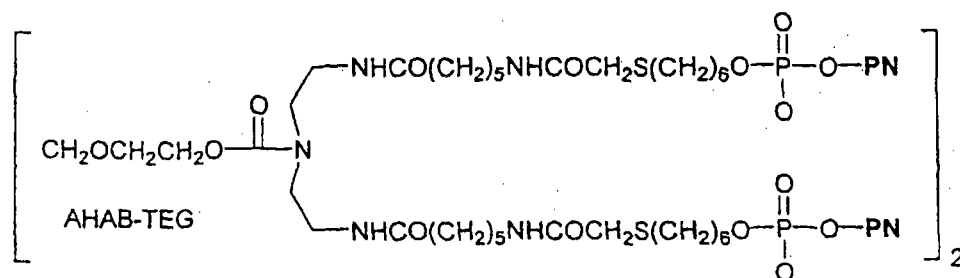
8. 项目4的方法, 其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

9. 项目5的方法, 其中所述多核苷酸由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

10. 项目9的方法, 其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

11. 项目9的方法，其中 K_D' 值低于大约0.5。

12. 治疗个体的SLE的方法，包括：

(1) 评估来自个体的抗双链DNA抗体对于治疗中待用dsDNA表位的亲和力，其中基于所述抗体亲和力来选择治疗的个体；并

(2) 对所述选择的个体施用包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和(b) 两个或多个dsDNA表位。

13. 项目12的方法，其中dsDNA表位是多核苷酸。

14. 项目13的方法，其中多核苷酸是双链DNA。

15. 治疗个体的SLE的方法，包括：

(1) 在开始治疗之前，评估缀合物中的多核苷酸对于来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的表观平衡解离常数(K_D')或其功能等同物，所述缀合物包含：(a) 非免疫原性效价平台分子和(b) 可特异性结合来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸，所述多核苷酸基本上由序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'组成，其中选择 K_D' 值低于大约1.0mg IgG/ml的个体来接受治疗；并

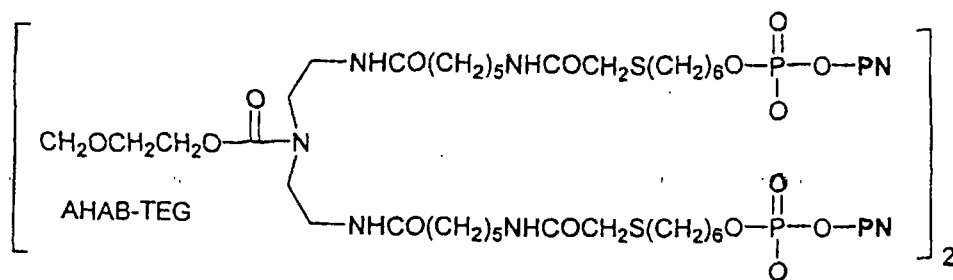
(2) 以足以提高 K_D' 值的量对个体施用缀合物。

16. 项目15的方法，其中 K_D' 值低于大约0.8。

17. 项目15的方法，其中 K_D' 值低于大约0.5。

18. 项目15的方法，其中 K_D' 值低于大约0.2。

19. 项目15的方法，其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

20. 项目19的方法，其中 K_D 值低于大约0.8。

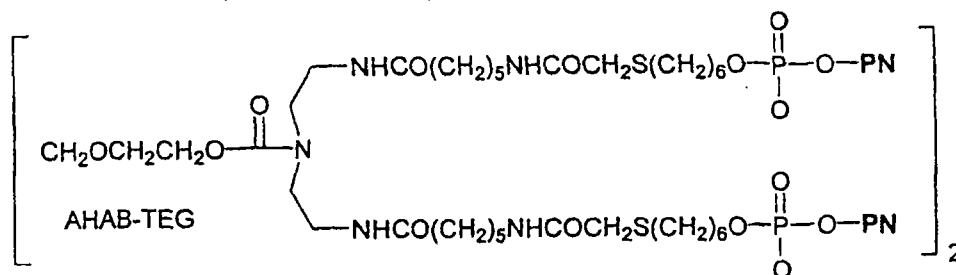
21. 治疗个体的狼疮肾炎的方法，包括对个体施用包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位。

22. 项目21的方法，其中dsDNA表位是多核苷酸。

23. 项目22的方法，其中所述多核苷酸基本上由序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'组成。

24. 项目22的方法，其中所述多核苷酸由序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'组成。

25. 项目24的方法，其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

26. 项目23的方法，其中以足以降低个体中肾脏红肿发病率的量施用缀合物。

27. 项目23的方法，其中以足以降低患者皮质类固醇或环磷酰胺施用量的量施用缀合物。

28. 项目21的方法，其中dsDNA表位对于来自该个体的抗体的亲和

力被用作选择接受治疗的个体的基础。

29. 项目23的方法, 其中多核苷酸对于来自该个体的抗体的亲和力被用作选择接受治疗的个体的基础。

30. 项目23或24的方法, 其中在开始治疗之前或之时, 缀合物的多核苷酸对于来自该个体的抗体的表观平衡解离常数(K_D')或其功能等同物低于大约1.0mg IgG/ml或其功能等同物, 而且其中所述 K_D' 值或其功能等同物被用作选择接受治疗的个体的基础。

31. 项目30的方法, 其中 K_D' 值低于大约0.8。

32. 项目29的方法, 其中以足以降低亲和力的量施用缀合物。

33. 治疗个体的SLE的方法, 包括:

(1) 在开始治疗之前或之时, 评估缀合物中的dsDNA表位对于来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的表观平衡解离常数(K_D'), 所述缀合物包含(a)非免疫原性效价平台分子和(b)可特异性结合来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个所述表位; 并

(2) 以足以提高 K_D' 值的量对该个体施用缀合物, 其中若 K_D' 值相对于开始治疗之前或之时的 K_D' 值提高了至少大约20%, 则继续治疗。

34. 项目33的方法, 其中dsDNA表位是多核苷酸。

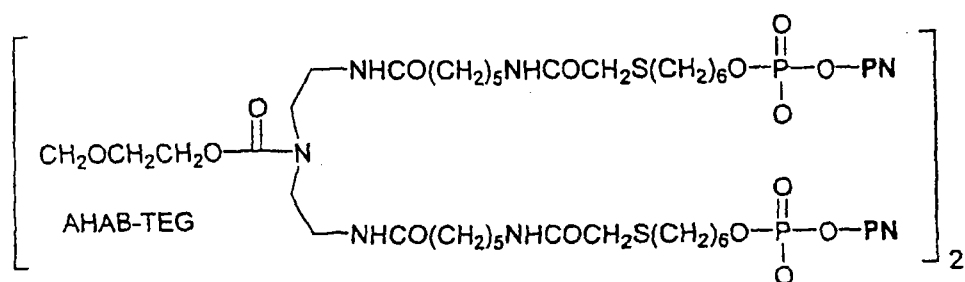
35. 项目34的方法, 其中多核苷酸基本上由序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'组成。

36. 项目34的方法, 其中多核苷酸由序列5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'组成。

37. 项目35或36的方法, 其中若 K_D' 值相对于开始治疗之前或之时的 K_D' 值提高了至少大约50%, 则继续治疗。

38. 项目35或36的方法, 其中若 K_D' 值相对于开始治疗之前或之时的 K_D' 值提高了至少大约100%, 则继续治疗。

39. 项目36的方法, 其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

40. 监控个体的SLE治疗的方法，所述治疗包括施用包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个dsDNA表位；所述方法包括测量来自个体的抗体对于所述治疗中所用dsDNA表位的亲和力。

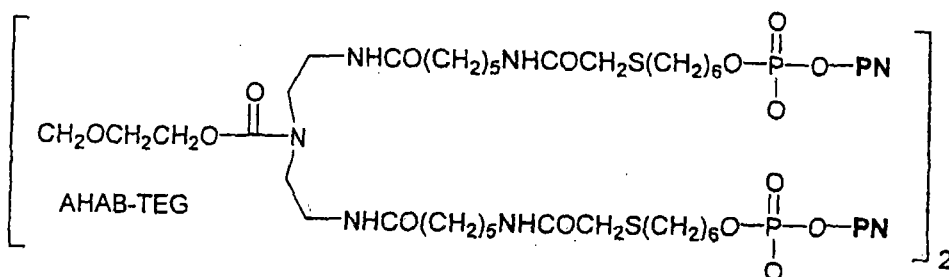
41. 项目40的方法，其中通过测量缀合物的dsDNA表位对于来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数 (K_D) 或其功能等同物来测量亲和力。

42. 项目41的方法，其中dsDNA表位是多核苷酸。

43. 项目42的方法，其中多核苷酸基本上由序列 5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

44. 项目42的方法，其中多核苷酸由序列 5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

45. 项目44的方法，其中平台分子是



其中PN指所述多核苷酸。

46. 鉴定可能适合于治疗SLE的个体的方法，所述治疗包括施用包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸，

所述多核苷酸基本上由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成, 所述方法包括在开始治疗之前或之时, 测量缀合物中的多核苷酸对于来自个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数 (K_D') 或其功能等同物, 其中通过低于大约1.0mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

47. 项目46的方法, 其中通过低于大约0.8mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

48. 项目46的方法, 其中通过低于大约0.2mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

49. 鉴定可能不适合于治疗SLE的个体的方法, 所述治疗包括施用包含下述的缀合物: (a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自该个体且可特异性结合双链DNA的抗体的两个或多个多核苷酸, 所述多核苷酸基本上由序列5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成, 所述方法包括在开始治疗之前或之时, 测量缀合物中的多核苷酸对于来自该个体的抗双链DNA抗体的表观平衡解离常数 (K_D') 或其功能等同物, 其中通过高于大约1.0mg IgG/ml的 K_D' 值或其功能等同物鉴定出个体。

50. 项目1、4、12、21、33、40、46、或49任一项的方法, 其中个体是人。

51. 可指示治疗适用性的抗体亲和力的鉴定方法, 所述治疗用于由抗体介导的病理学, 所述方法包括 (1) 对个体集合中的每一个个体测量由抗体介导的病理学中涉及的抗体的亲和力, 所述个体具有由抗体介导的病理学, 所述亲和力是所述抗体与由抗体介导的病理学中涉及的免疫原的类似物之间的亲和力; (2) 对个体集合施用包含该类似物的分子; (3) 使由抗体介导的病理学程度与最初亲和力相互关联。

52. 试剂盒, 其在合适包装中装有包含可结合抗双链DNA抗体的表位的分子, 还装有关于使用该表位来检测表位对于来自个体且可特异性结合双链DNA的抗体的亲和力的说明书。

53. 项目52的试剂盒, 其中表位是多核苷酸。

54. 项目53的试剂盒, 其中多核苷酸是DNA。

55. 项目 54 的试剂盒，其中多核苷酸包含序列 5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'。

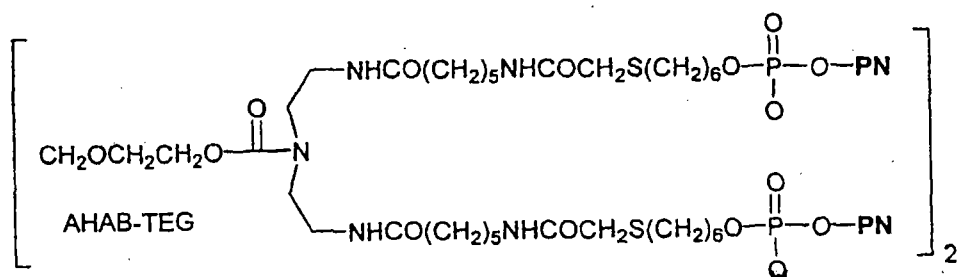
56. 项目 54 的试剂盒，其中多核苷酸基本上由序列 5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

57. 项目 54 的试剂盒，其中多核苷酸由序列 5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 组成。

58. 项目 55、56、或 57 的方法，其中多核苷酸是生物素化的。

59. 试剂盒，其中包括：(1) 包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链 DNA 的抗体的两个或多个多核苷酸；和 (2) 有关使用缀合物来检测缀合物对于来自个体的抗 dsDNA 抗体的亲和力的说明书。

60. 项目 59 的试剂盒，其中缀合物包含序列 5' -GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3' 和平台分子



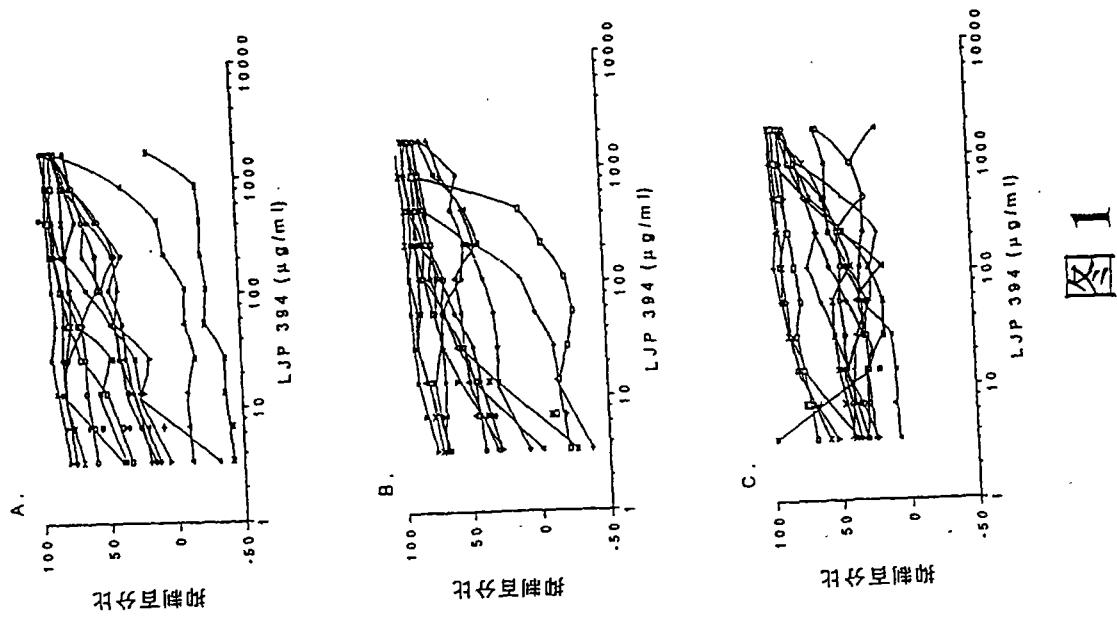
其中 PN 指多核苷酸。

61. 项目 59 或 60 的试剂盒，其中多核苷酸是生物素化的。

62. 试剂盒，其中包括：(1) 包含下述的缀合物：(a) 非免疫原性效价平台分子和 (b) 可特异性结合来自个体且可特异性结合双链 DNA 的抗体的两个或多个多核苷酸；(2) 包含缀合物中的多核苷酸的多核苷酸；和 (3) 有关使用包含缀合物中的多核苷酸的多核苷酸来检测多核苷酸对于来自个体的抗 dsDNA 抗体对于多核苷酸的亲和力的说明书。

63. 试剂盒，其中装有包含可结合抗体所介导病理学中涉及的抗体的表位的分子和有关使用该分子来测定抗体所介导病理学中涉及的抗体对于包含类似物或表位的分子的亲和力的说明书。

64. 项目 63 的试剂盒，其中分子是生物素化的。



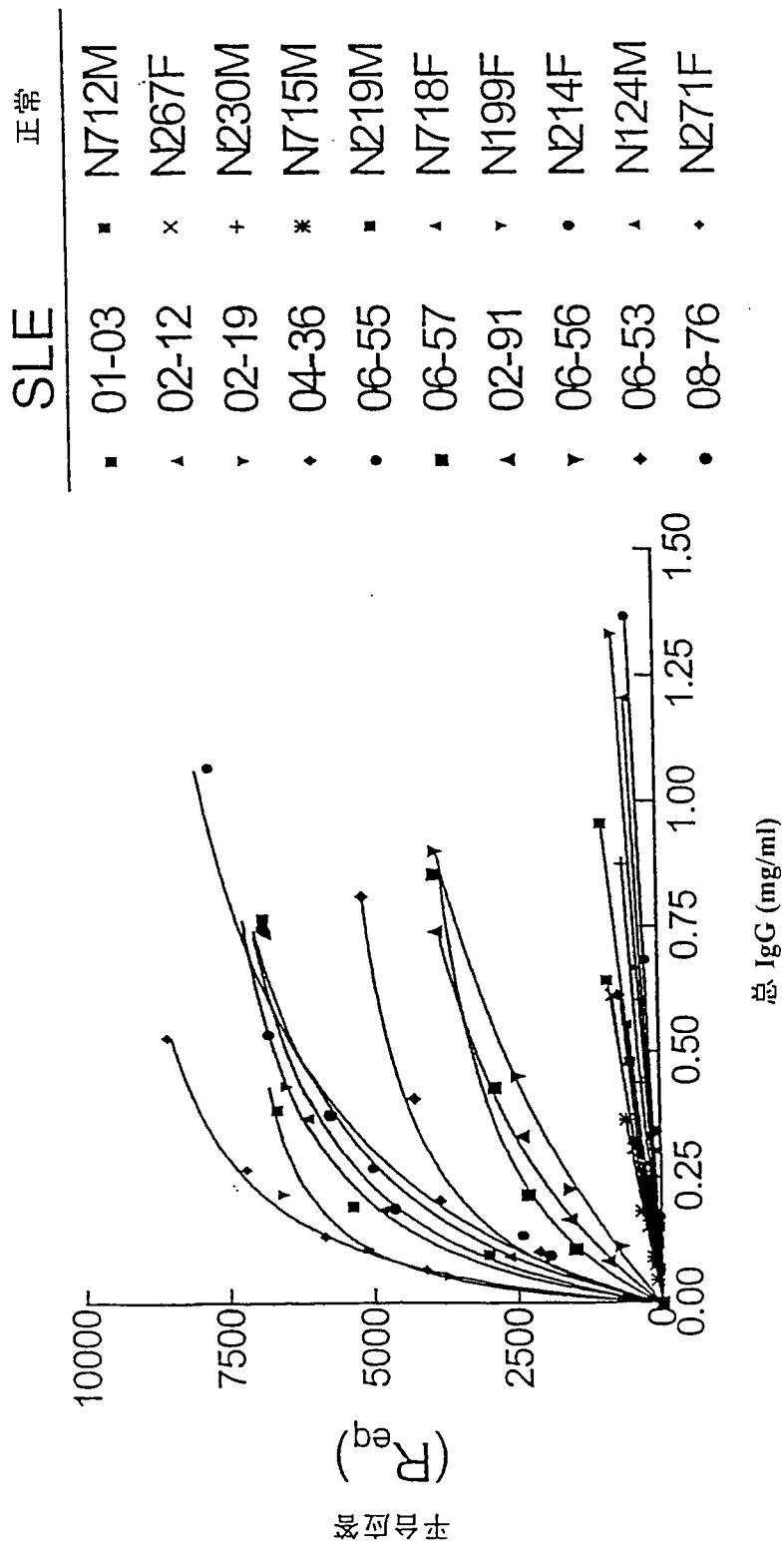


图 2

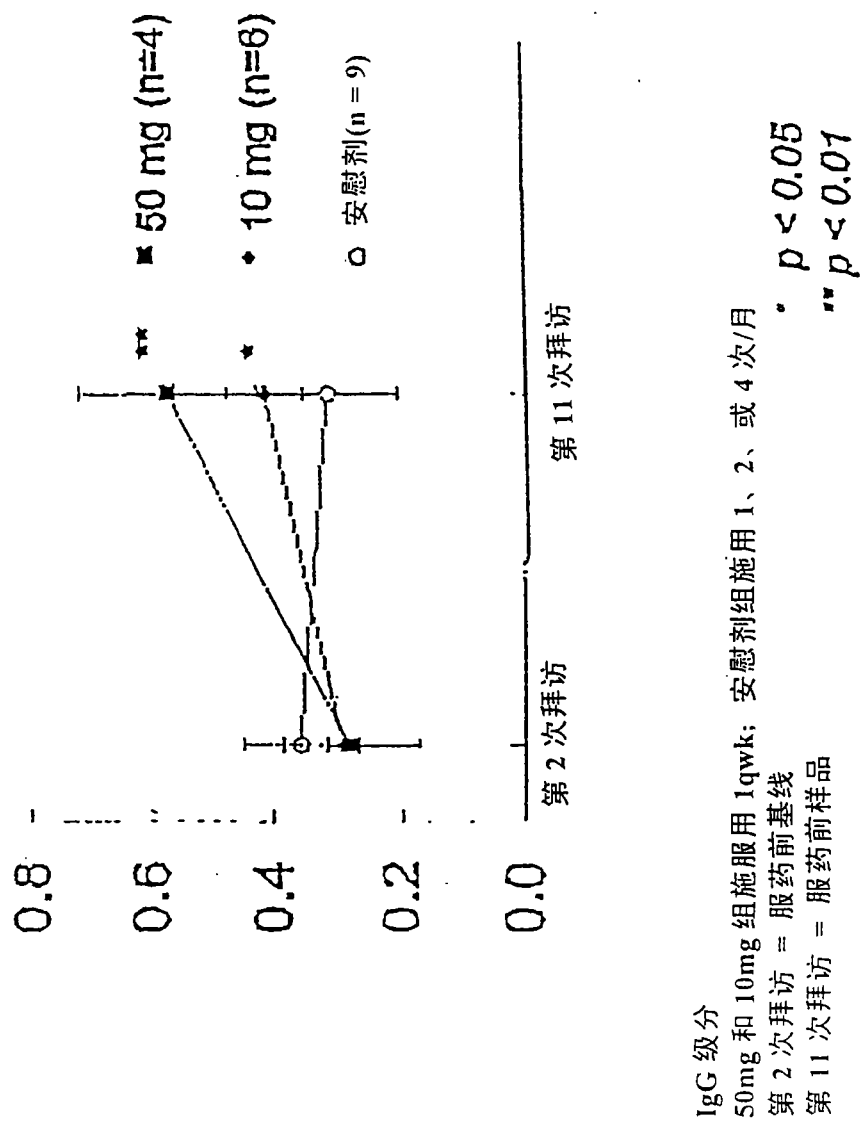


图 3A

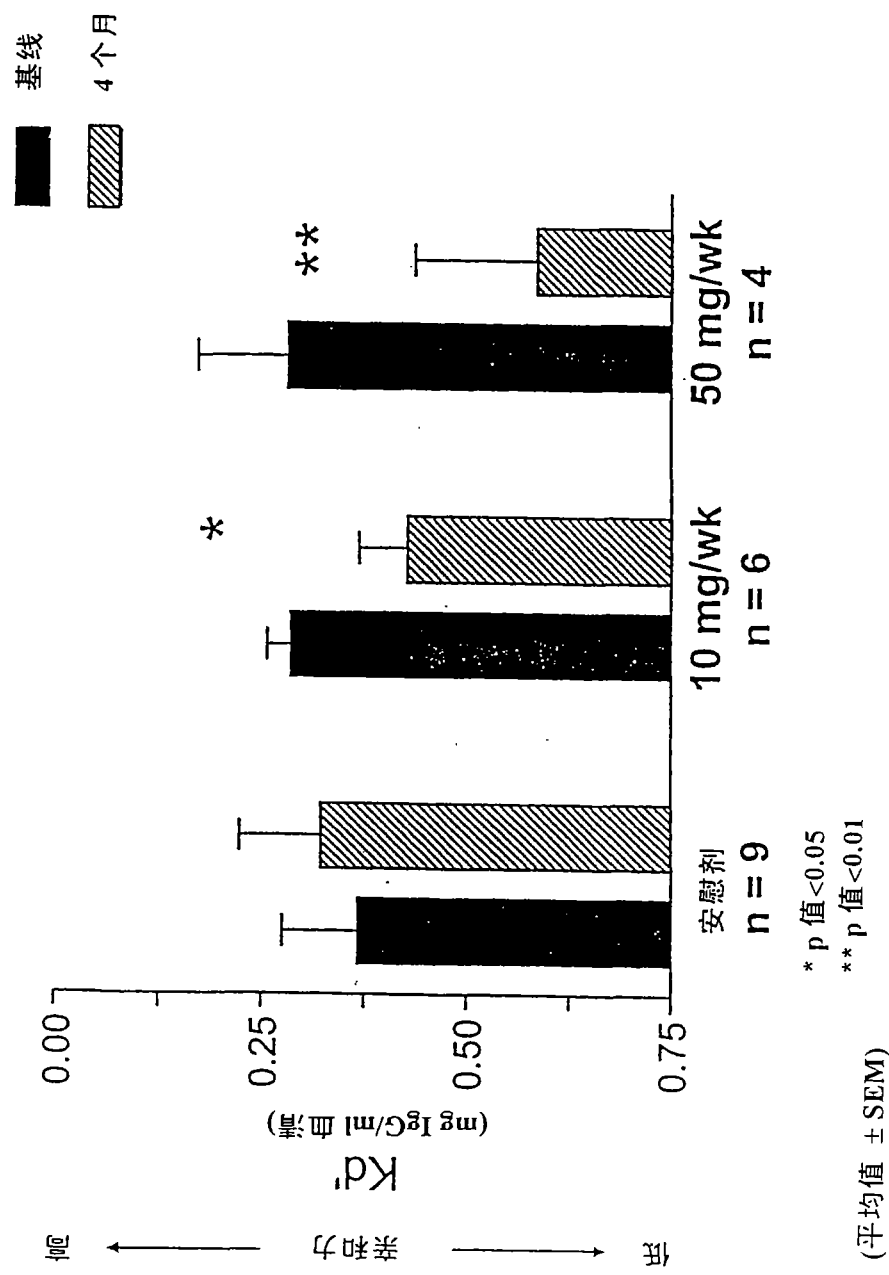


图 3B

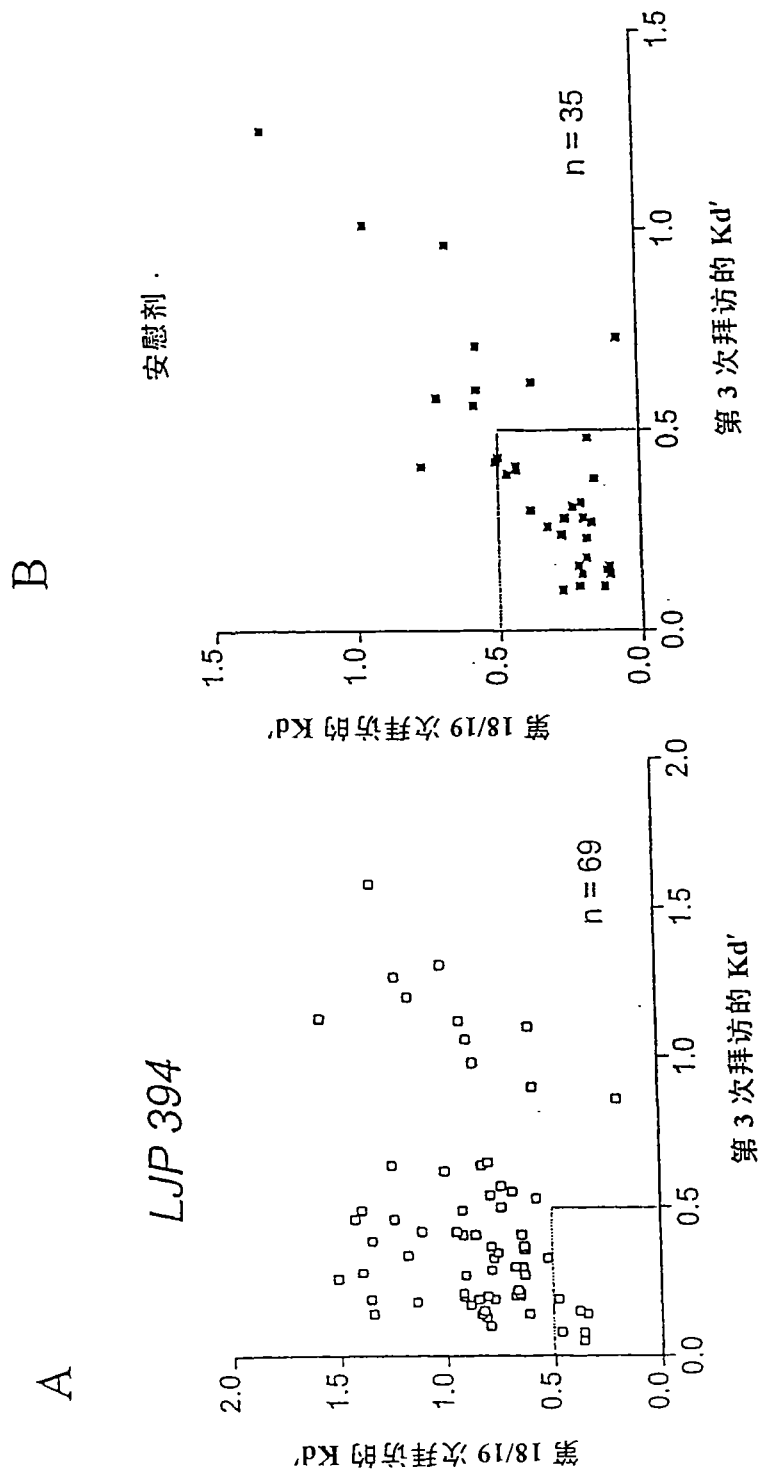


图 4A 和 4B

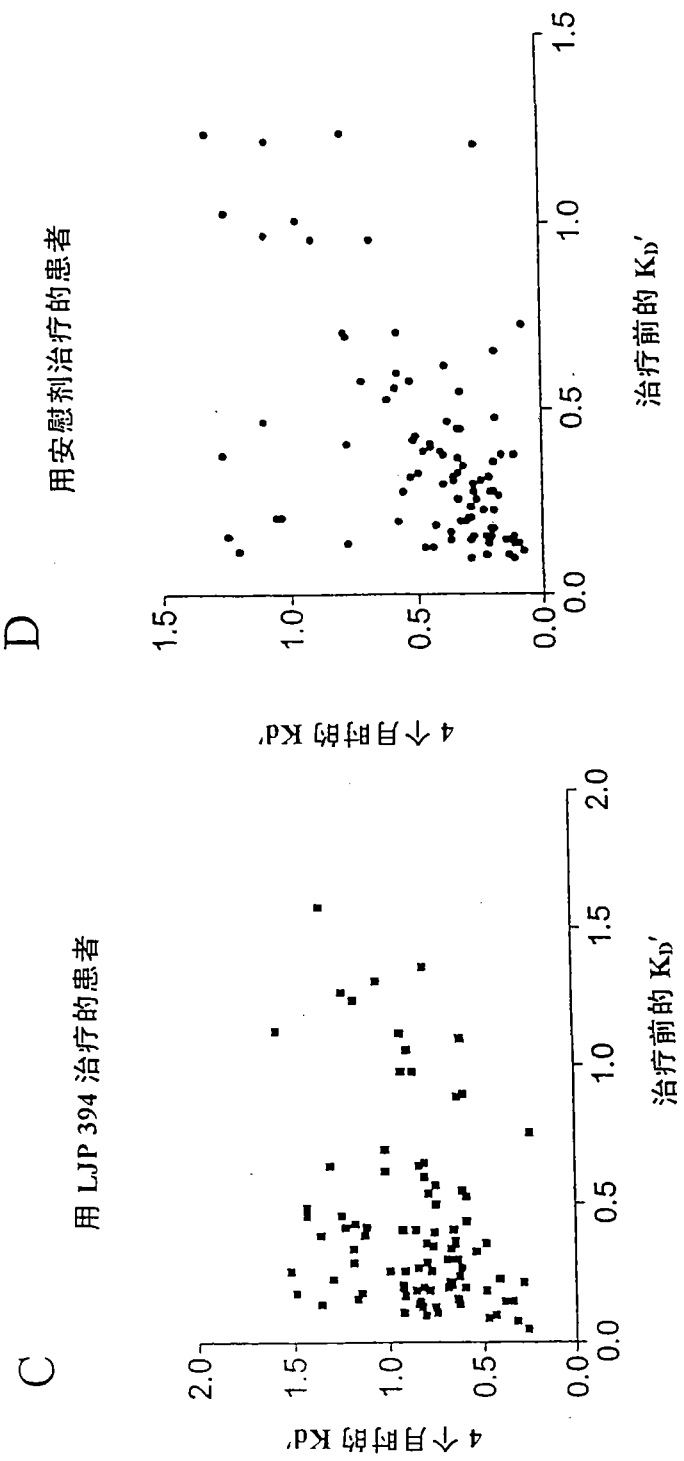


图 4C 和 4D

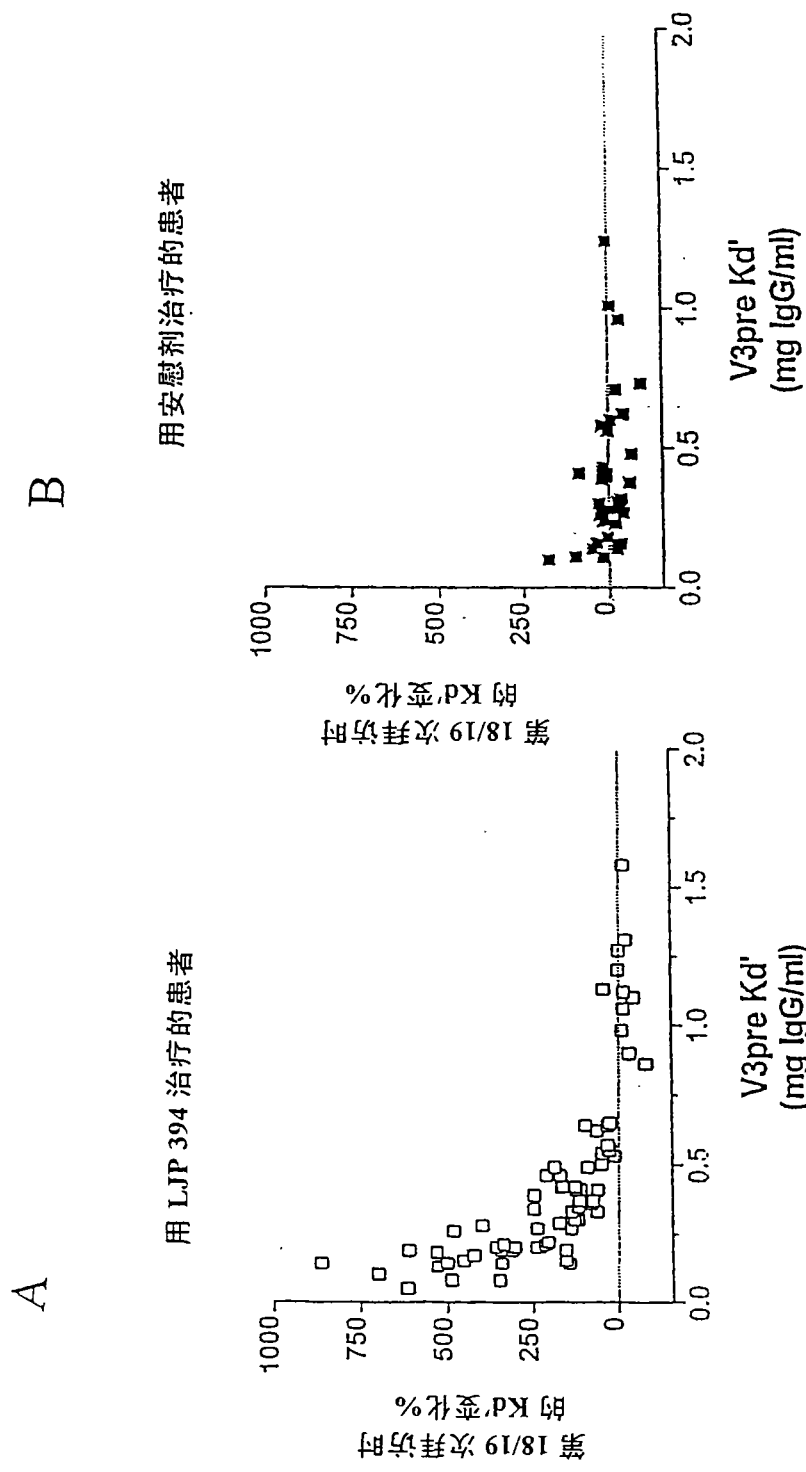


图 5A 和 5B

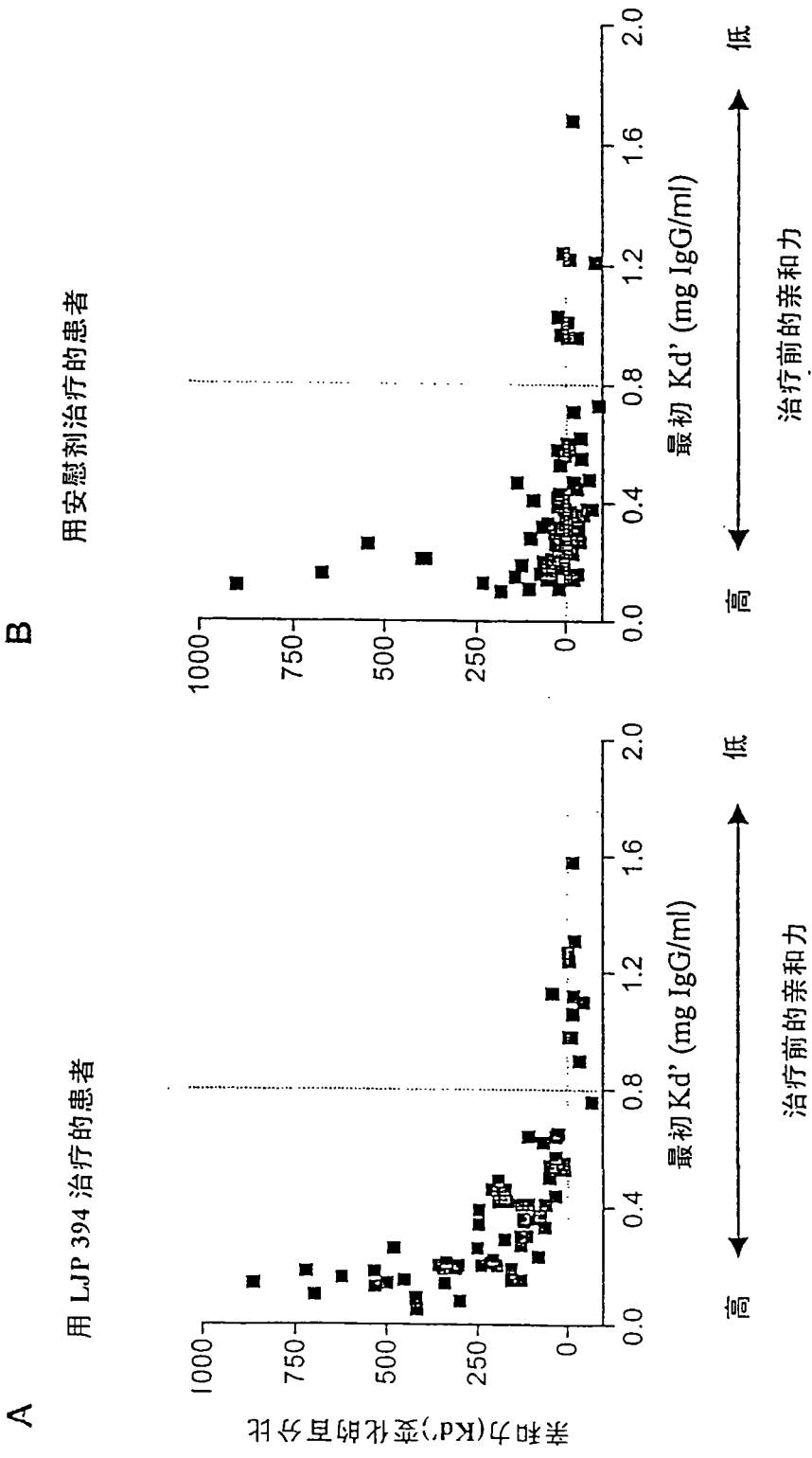


图 6A 和 6B

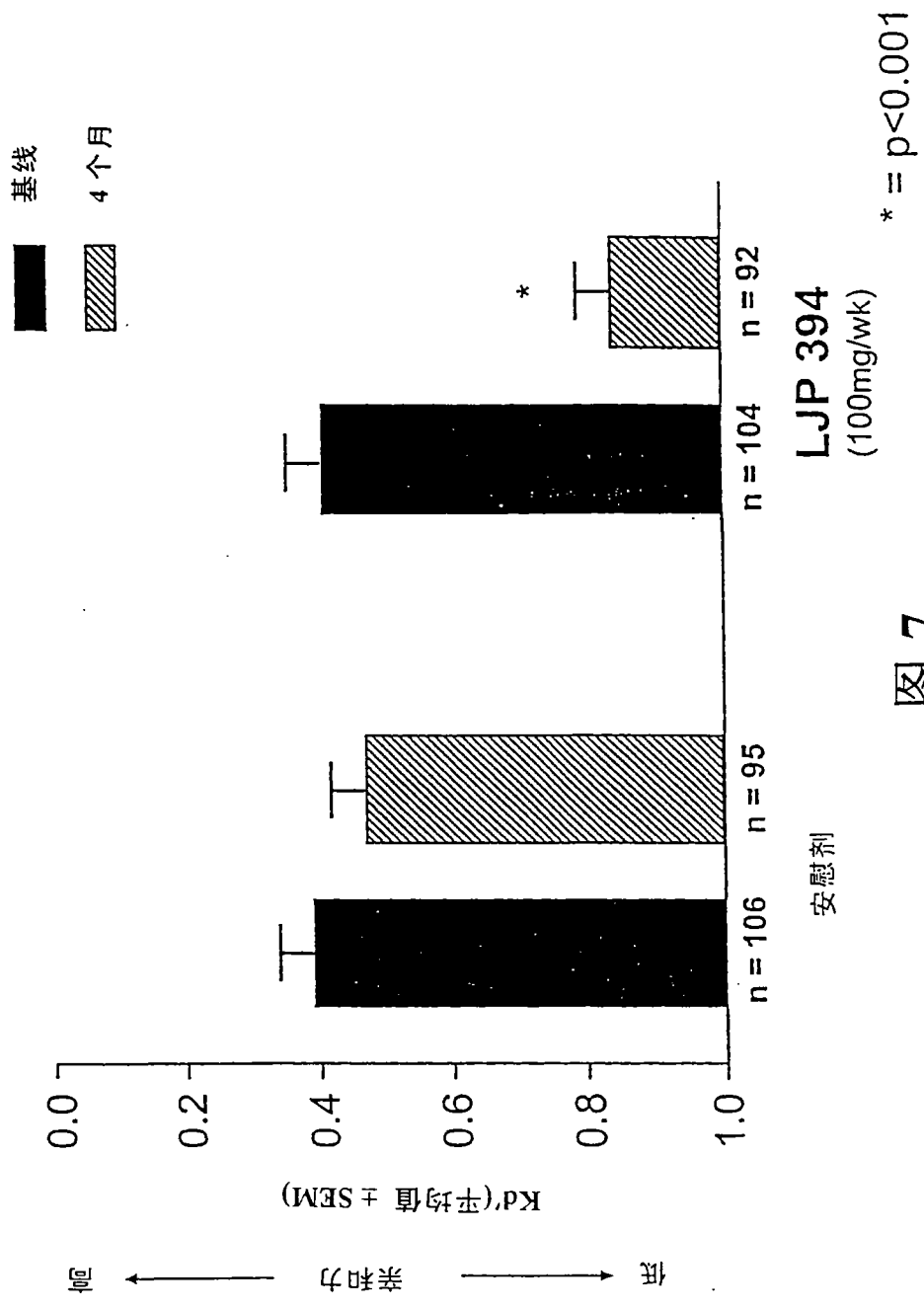


图 7

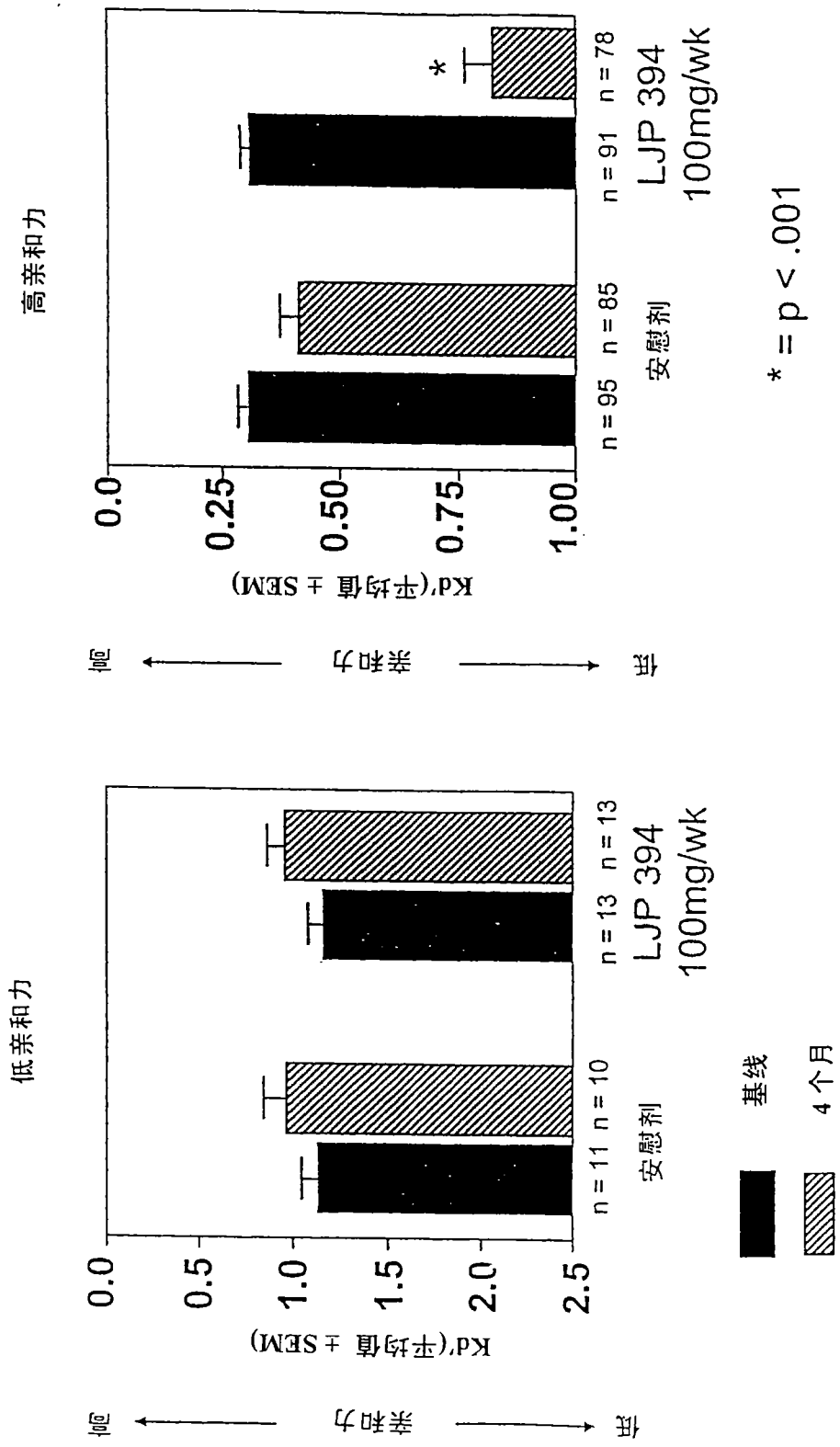


图 8

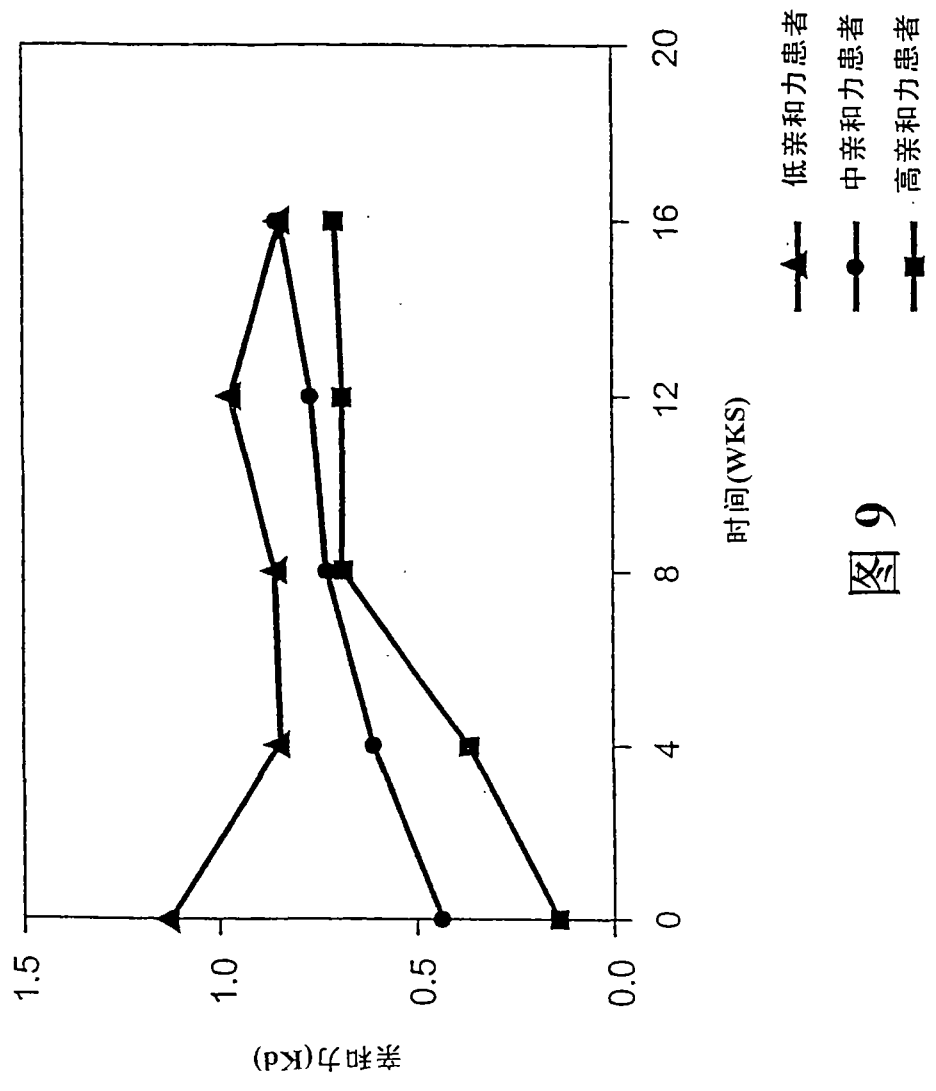
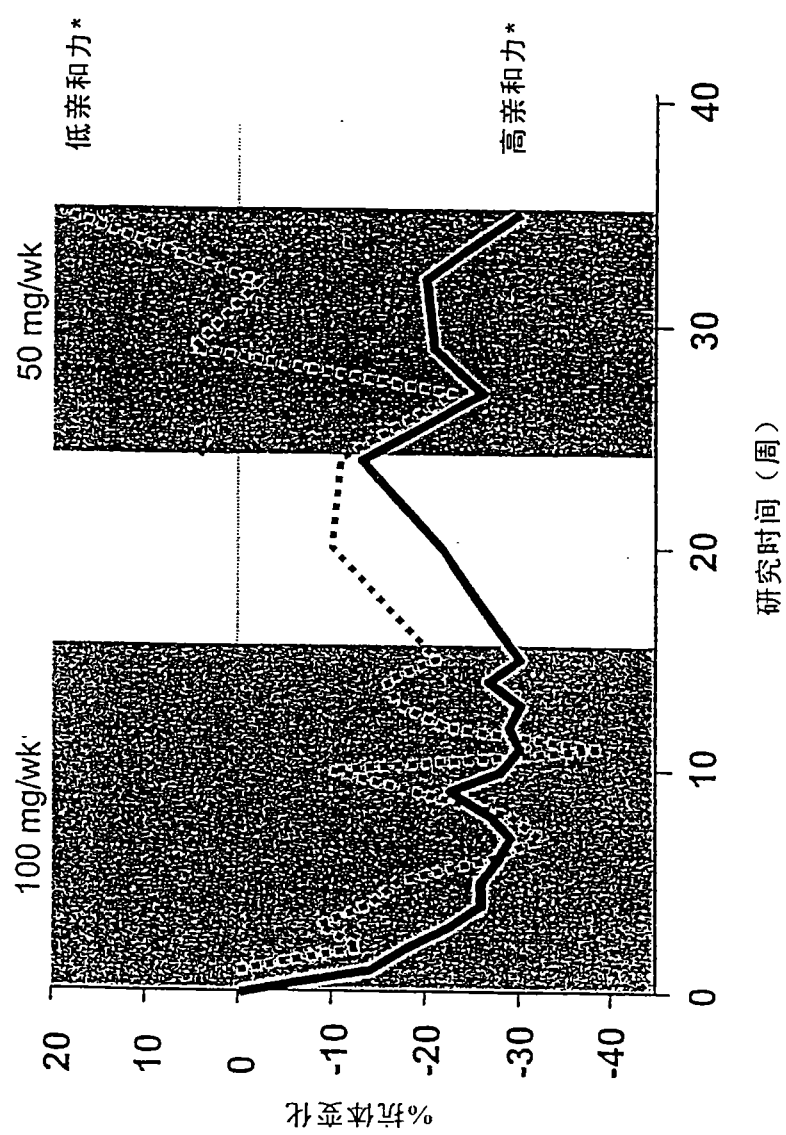
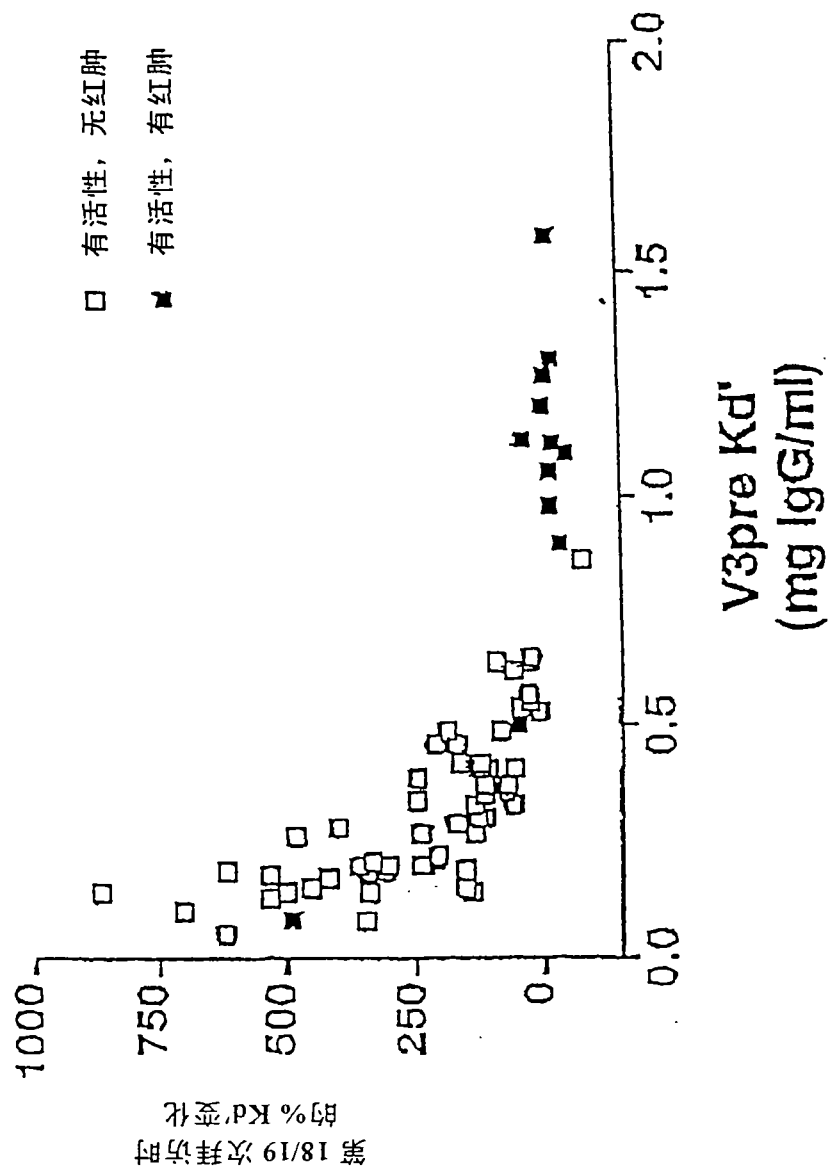


图 9



* 排除 HDCC 后的数据

图 10



* 分析包括用 LJP 394 治疗的 114 名患者中的 69 名
分析包括来自药物治疗组的 19 名患者中的 14 名

图 11A

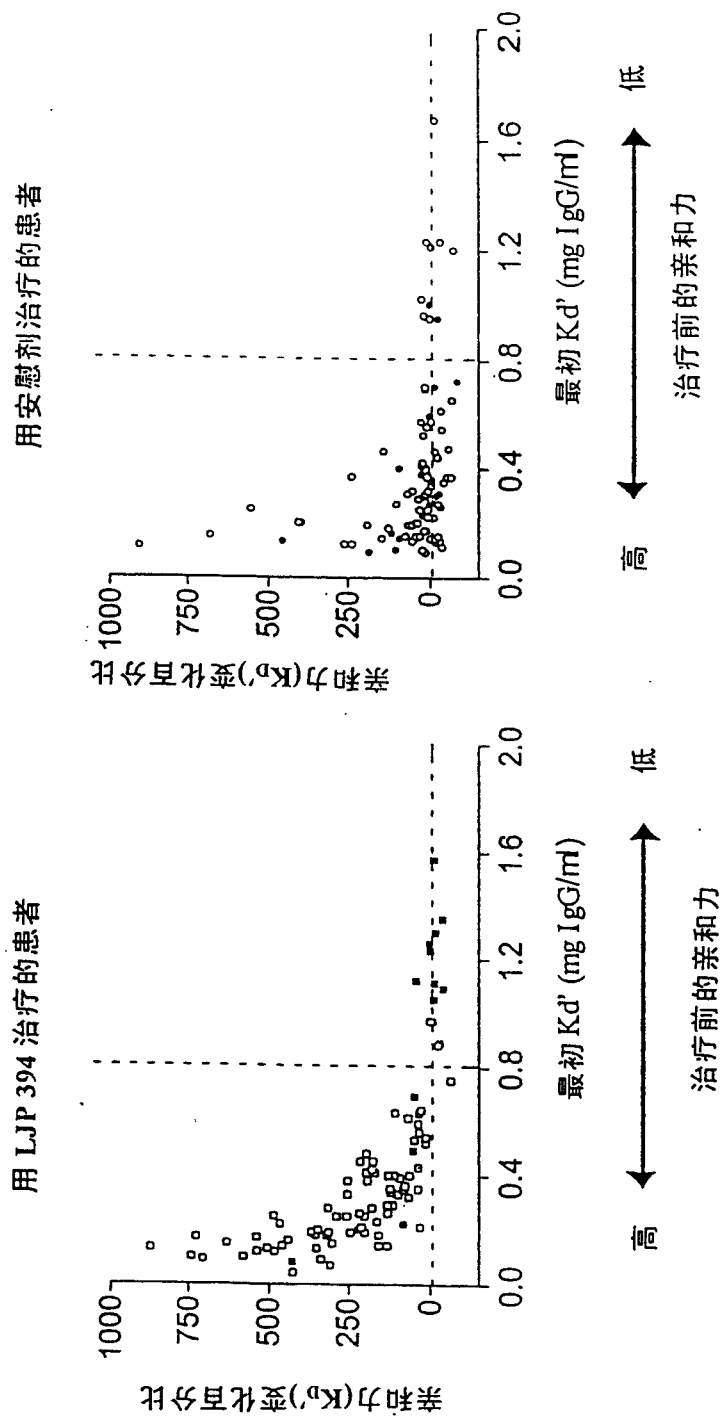
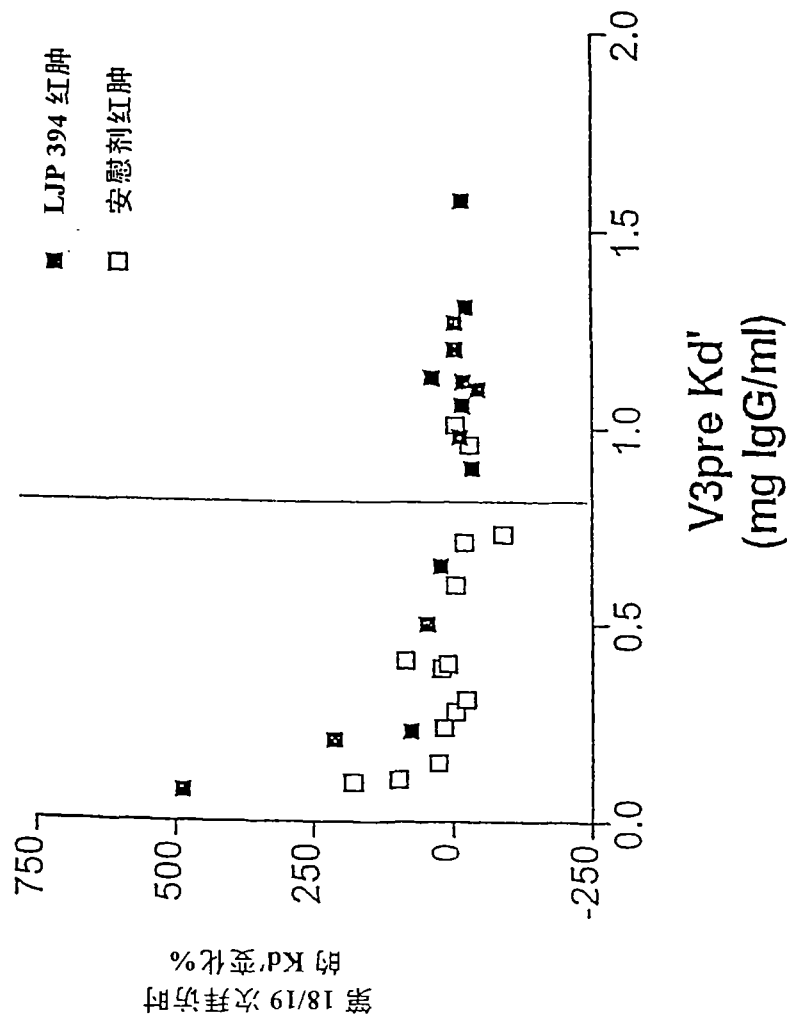


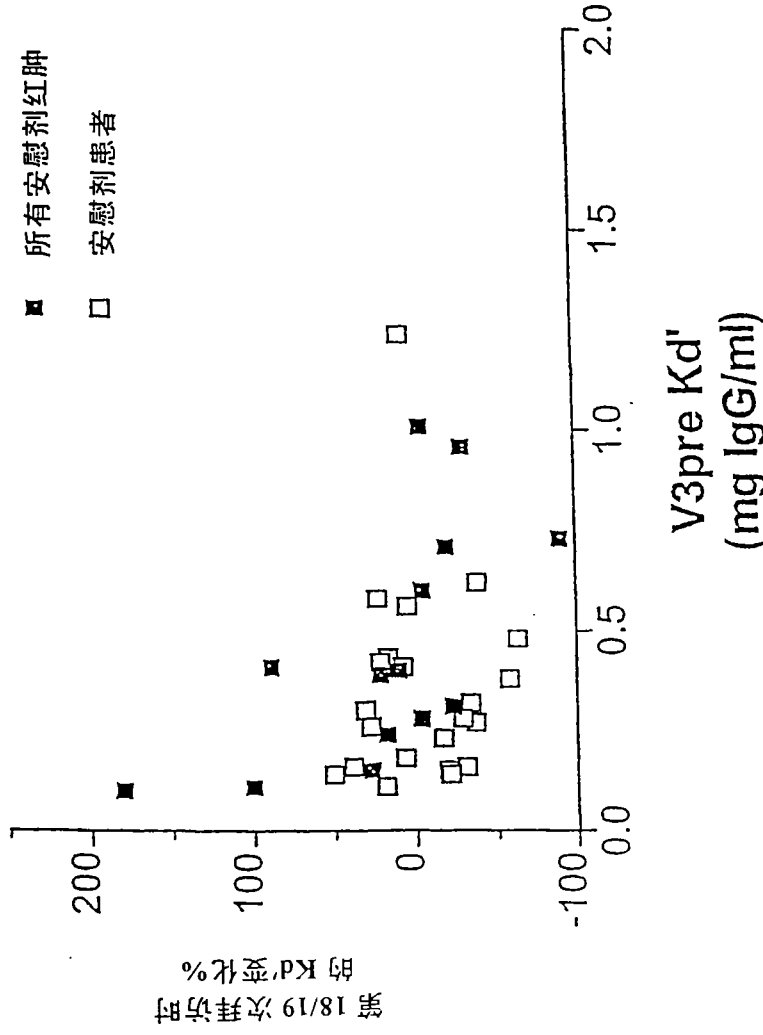
图 11B

图 11C



* 数据代表 19 例 LJP 394 红肿胀中的 15 例和 23 例安慰剂红肿胀中的 14 例

图 12



* 分析包括 115 名用安慰剂治疗的患者中的 36 名
图鉴定了 23 例来自安慰剂治疗组的 23 例狼疮红肿胀中的 14 例

图 13

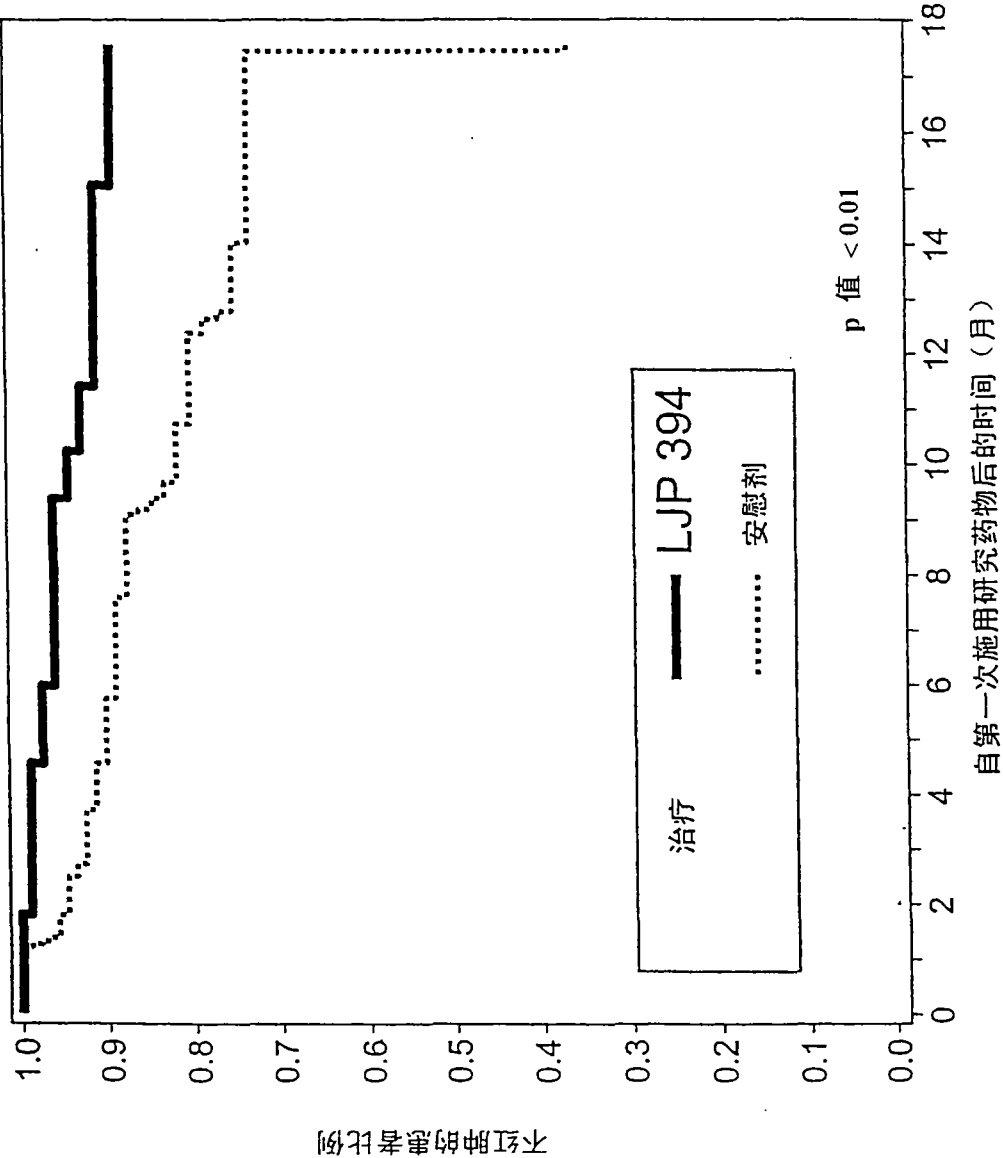
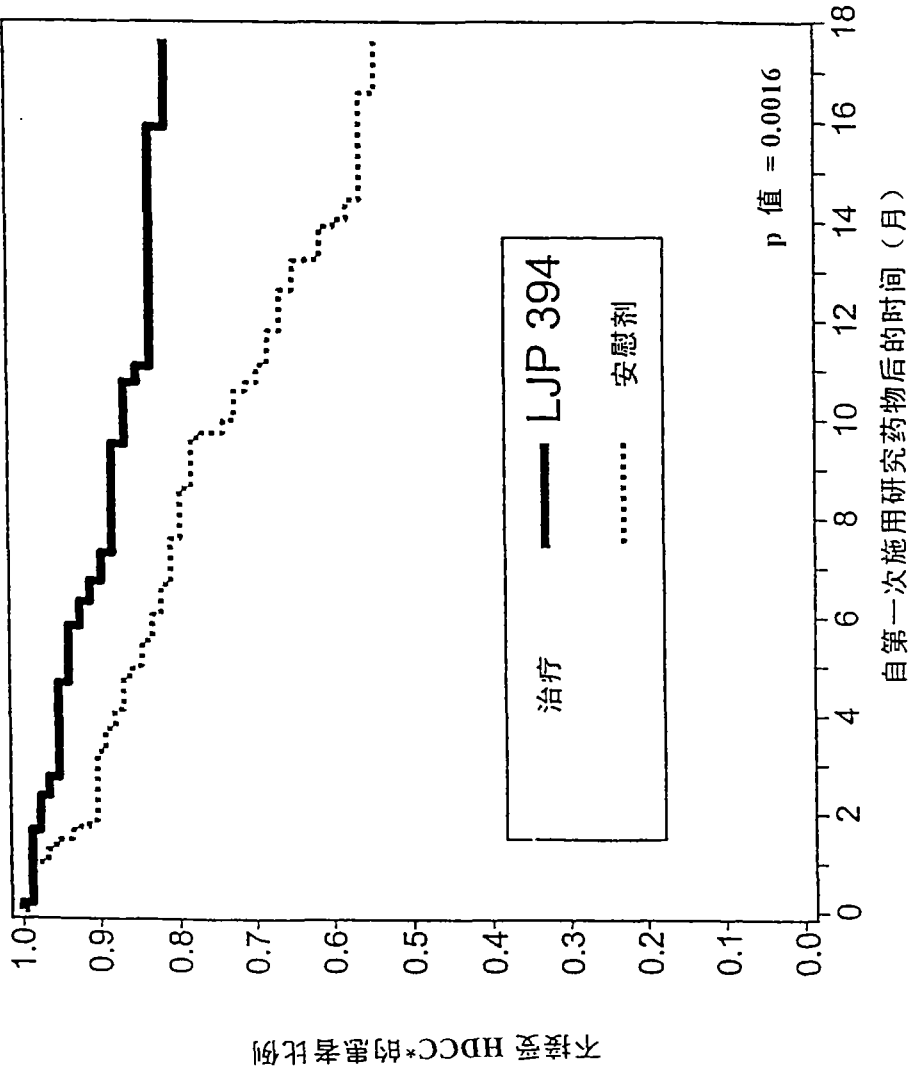


图 14

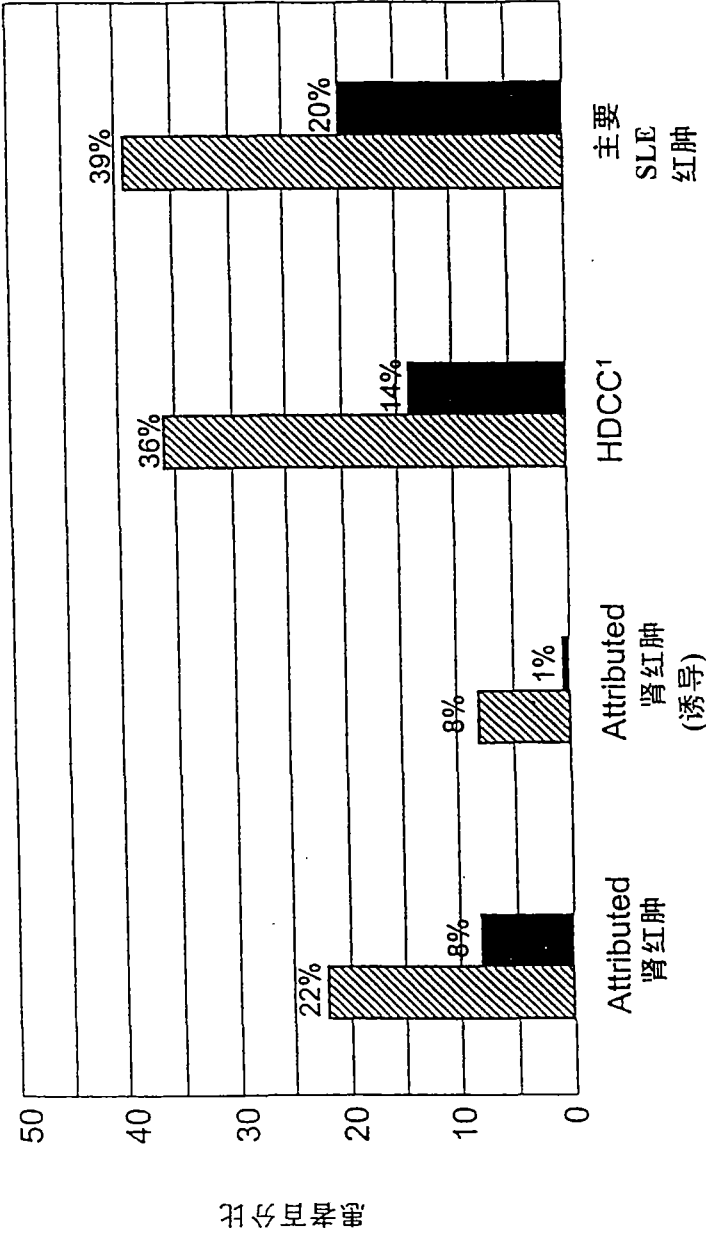


* HDCC = 第一次发生的高剂量皮质激素固醇和/或环磷酰胺给药

图 15

安慰剂 n = 95
活性剂 n = 91

图 16



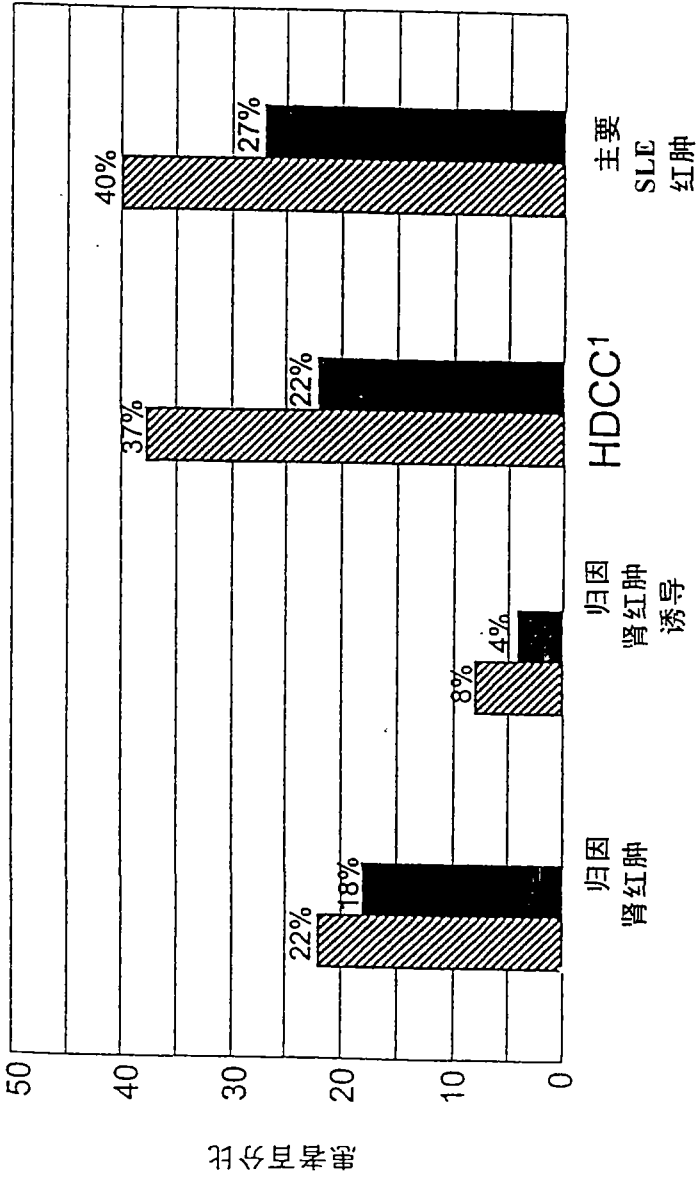
至事件发生的时间 p<0.01
发生率 p<0.01

患者数目 21 7 8 1 34 13 37 18

1 HDCC = 第一次发生的高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺给药
2 主要狼疮红：因 SLE 而住院、第一次发生高剂量的松给药、任何环磷酰胺、因 SLE 而死亡

图 17

安慰剂 n = 106
LJP 394 n = 105



患者数目	23	19	9	4	39	23	42	28
至事件发生时间	p=.522				p=.032		p=.077	
发生率	p=.606				p=.023		p=.057	

1 HDCC = 第一次发生的高剂量皮质类固醇和/或环磷酰胺给药
2 主要狼疮红：因 SLE 而住院、第一次发生高剂量强的松给药、任何环磷酰胺、因 SLE 而死亡